

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14701

研究課題名(和文)血清中シアリル遊離糖鎖の生成機構の解明と肝疾患マーカーとしての応用

研究課題名(英文) Study on the formation mechanism of serum free sialyl glycans and its application as biomarkers for liver diseases

研究代表者

鈴木 匡 (Tadashi, Suzuki)

国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90345265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血清中に新たに同定されたシアリル遊離糖鎖の解析を行った。様々な哺乳動物由来の血清中の主要な糖鎖構造を決定し、ウシ血清に関しては様々な成育ステージにおける糖鎖構造の変化を解析した。その結果、血清遊離糖鎖は肝臓から分泌され、肝臓での発現遺伝子の差異によって構造が規定されている可能性が示唆された。更に肝がん患者由来の血清シアリル糖鎖と健常人のそれを比較したところ、主要な2本鎖ジシアロ糖鎖の量が肝がん患者血清で有意に上昇しており、血清遊離糖鎖が肝臓の病的状態を検知するバイオマーカーとしての役割を果たす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Studies were carried out on the sialyl free glycans newly identified in animal sera. The structures of major free glycans from several mammals were determined. Changes of structures for free glycans during the various developmental stages of calf sera were also analyzed. Based on the structural information, it was hypothesized that these sialyl glycans may be secreted from liver, and their structures may reflect the repertoire of glycogenes expressed in this tissue. Furthermore, structures of serum free glycans were compared between sera of liver cancer patients and those of healthy control. It was found that the amount of major disialo, biantennary glycans were significantly increased in sera of liver cancer patients. This result raised the possibility that the serum free glycans could be utilized as a possible biomarker to indicate the pathophysiological conditions of liver.

研究分野：糖鎖生化学

キーワード：血清 遊離糖鎖 肝臓 シアリル糖鎖 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質上の糖鎖が、タンパク質の物性や生理活性に重要な役割を果たす例は数多く報告されているが、その代謝の詳細な分子機構については現在でも不明な点が多く存在していた。

### 2. 研究の目的

我々は最近ヒト血清中にも大量のシアル酸を非還元末端に持つ遊離糖鎖（シアリル遊離糖鎖）が存在することを発見した。これまで遊離糖鎖は殆どが細胞内に蓄積するもので、血清中の遊離糖鎖について詳細な報告はこれまでされていなかった。

そこで本研究では、この血清シアリル遊離糖鎖の生成の分子機構を明らかにすることを目的とした。

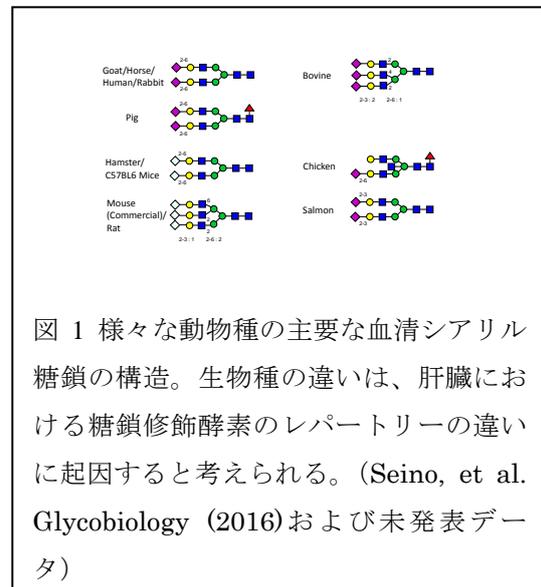
### 3. 研究の方法

様々な哺乳動物あるいは肝がん患者や健康人の血清から遊離糖鎖を精製し、還元末端を蛍光ラベルして HPLC による分離定量を行った。

### 4. 研究成果

10種の哺乳動物血清から遊離糖鎖を調製したところ、還元末端に  $\text{GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}$  を持ち、非還元末端にシアル酸を持つ遊離糖鎖が主に観察された。その主要構造は種ごとに異なっており、各動物種における主要な血清中の糖タンパク質糖鎖の構造と類似していた。またウシ血清において胎児期、幼児期、成体期における遊離糖鎖構造を解析したところ、成長のステージによって特徴的な糖鎖が観察された。殆どの血清糖タンパク質は肝臓で生成されることから、血清遊離糖鎖は肝臓から分泌され、肝臓にステージ毎に発現されている糖鎖合成に関わる遺伝子の違いによって構造の違いが生まれると推測された。この血清遊離糖鎖が脊椎動物でどのくらい

保存されているかを確かめるためにニワトリ（鳥類）、およびサケ（魚類）の血清を用いて同様の解析を行ったところ、いずれも構造的に哺乳動物のそれと異なる特徴を持つシアリル糖鎖が観察された（図1）。興味深いことに、ニワトリでは非還元末端にシアル酸をもたない遊離糖鎖が多く存在することから、遊離糖鎖の「代謝機構が哺乳類と鳥類で異なっている可能性も示唆された。このようなシアル酸を持たない糖鎖構造はニワトリの血清中の糖タンパク質にも多く見られ、血清糖タンパク質上の糖鎖の違いともよく対応していることが明らかとなった。



更にヒト肝臓がん患者由来の血清糖鎖と健康人の遊離糖鎖を比較したところ、主要な2本鎖ジシアロ糖鎖の量が肝臓がん患者で有意に上昇しており、血清遊離糖鎖が肝臓の病的状態を検知するバイオマーカーとしての役割を果たす可能性が示された（図2）。

血清中のシアリル糖鎖が肝臓から分泌されている可能性を検証するために、ラットの初代肝細胞の培地に分泌される糖鎖の解析を試みた。無血清培地での培養条件について検討を行い、遊離糖鎖の分泌が確認されたが、糖鎖の精製条件に工夫が必要であり、まだ定量出来る精製条件が確定できておらず、今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

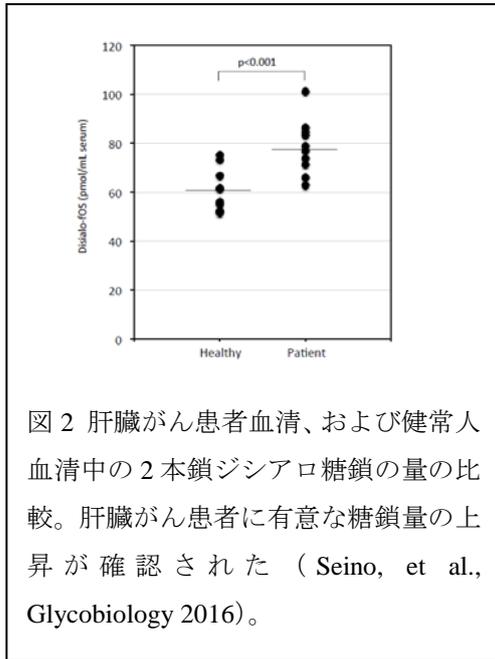


図2 肝臓がん患者血清、および健常人血清中の2本鎖ジシアロ糖鎖の量の比較。肝臓がん患者に有意な糖鎖量の上昇が確認された (Seino, et al., Glycobiology 2016)。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Junichi Seino, Haruhiko Fujihira, Shunichi Nakakita, Yuki Masahara-Negishi, Eiji Miyoshi, Jun Hirabayashi, and Tadashi Suzuki (2016) Occurrence of sialyl oligosaccharides related to N-glycans (sialyl FNGs) in animal sera. **Glycobiology** 26, 1072-1085. (doi:10.1093/glycob/cww048) (査読有)
2. 鈴木 匡 (2016) 遊離 N 型糖鎖 (FNG) -その存在と多様な生成、分解機構 **生化学** 88, 182-191. (doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880182) (査読有 (Invited Review))

[学会発表] (計 4 件)

1. Junichi Seino, Haruhiko Fujihira, Shunichi Nakakita, Yuki Masahara-Negishi, Eiji

Miyoshi, Jun Hirabayashi, and Tadashi Suzuki

Occurrence of sialyl oligosaccharides related to N-glycans (sialyl FNGs) in animal sera.

**International Symposium on ER stress, glycosylation, homeostasis and disease** at Wako (Saitama), Japan

2018年3月22日

ポスター発表

2. Junichi Seino, Haruhiko Fujihira, Shunichi Nakakita, Yuki Masahara-Negishi, Eiji Miyoshi, Jun Hirabayashi, and Tadashi Suzuki

Occurrence of sialyl oligosaccharides related to N-glycans (sialyl FNGs) in animal sera.

**International Symposium “Systems Glycobiology and Beyond”** at Wako (Saitama), Japan

2017年11月17日

ポスター発表

3. Junichi Seino, Haruhiko Fujihira, Yuki Masahara-Negishi and Tadashi Suzuki

Occurrence of free sialyl oligosaccharides related to N-glycans (sialyl FNGs) in animal sera.

**Sialoglyco2016** at The Fess Parker Doubletree Resort, Santa Barbara (CA), USA (Selected for oral presentation)

2016年11月16日

ポスター発表・口頭発表

4. 鈴木 匡

血清中の遊離シアリル糖鎖・細胞質 PNGase 発見裏話

**第 35 回日本糖質学会年会** 高知文化プラザ カルポート (高知)

2016年9月3日

口頭発表

〔図書〕（計 0 件）

研究者番号：

〔産業財産権〕

(3) 連携研究者  
なし

○出願状況（計 0 件）

研究者番号：

名称：

発明者：

(4) 研究協力者  
なし

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.riken.jp/research/labs/chief/glycomet-ab/biochem/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 匡 (Tadashi, Suzuki)

国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝  
学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90345265

(2) 研究分担者

なし