

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390011

研究課題名（和文） マイクロダイセクションを用いた糖鎖の領域特異的解析法の開発

研究課題名（英文） Development of region-specific analytical methods for sugar chains by using microdissection

研究代表

豊田 英尚（TOYODA HIDENAO）

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：70217579

研究成果の概要：遺伝子発現のパターンが細胞や組織で異なっているのと同様に，起源，分化の状態に応じて糖鎖も様々に変化していることが予測され興味を持たれているが，脳のように構造が複雑で，領域特異的に役割分担が決定している組織の糖鎖を解析する手段はこれまでに存在しなかった．本研究では，レーザーマイクロダイセクションで微小部位を切り取り糖鎖の分析をする方法を研究した．その結果，脳組織切片から微小領域を回収後，様々な種類の糖鎖構造を解析することが可能になった．

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	11,700,000	0	11,700,000
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	14,900,000	960,000	15,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：糖鎖，レーザーマイクロダイセクション

1. 研究開始当初の背景

生命現象の主役であるタンパク質の半数以上は糖鎖の修飾を受けており，糖鎖の異常が様々な疾病を引き起こすことが明らかになりつつある．糖鎖は発生・分化に応じて正確に変化し，ゲノム上にそのプログラムが存在しているはずであるが，その実体は不明である．糖鎖は複数の糖鎖合成関連遺伝子の共同作業によって完成する．そこで遺伝子産物である糖転移酵素の性質が詳しく解析され始めたが，最終的な糖鎖構造がどのようなメカニズムでゲノムの支配下にあるのか結局のところわかっていない．組織や細胞株はそ

れぞれ特徴的な遺伝子発現パターンを示しており，その解明は多くのプロジェクトの基幹テーマとなっている．糖鎖に関しても，起源・分化の程度等に応じて異なる発現パターンを示していると予測され，生命現象理解のためにそれらを効率よく解析する技術が渴望されている．最近の大きな社会問題のひとつに，インフルエンザ治療薬「タミフル」服用による転落や飛び降りなどの異常行動が挙げられる．2008年7月に「タミフルと異常行動との関連は検出できなかった」とする見解が厚労省から発表されたが，その後もタミフル服用後の異常行動が相次いで報告され，

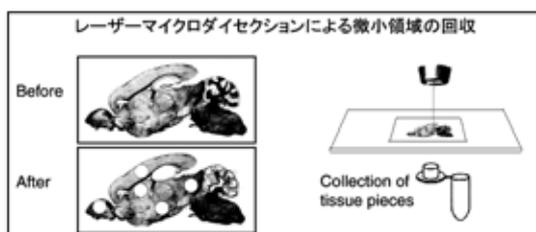
医療現場は少なからぬ混乱に陥っている。図らずも、シアリダーゼ阻害剤、タミフルの副作用は、糖鎖がおよぼす脳神経機能への影響の大きさを証明する出来事となった。糖鎖が関与する様々な生命現象解明の進展に必要不可欠なのが、対象試料を微小領域ごとに解析する研究手段である。

2. 研究の目的

最近の共焦点レーザー顕微鏡の普及によって、微小領域の鮮明な蛍光画像が簡単に得られるようになり、部位特異的な生命現象解析技術が飛躍的に向上した。この時用いられる抗体等の構造特異的なプローブとして、タンパク質や核酸に対しては有効な物が数多く存在するものの、精密な糖鎖構造を解析する場合に有益なものは僅かである。そこで、今後発展させるべき新しい技術として領域特異的な糖鎖の計測が挙げられるが、糖鎖に対する抗体やレクチンを用いた共焦点レーザー顕微鏡観察では糖鎖構造を特定することはできず、最終的には糖鎖の化学的な微量分析が必須となる。現状では、顕微鏡下で可視化された病変部位等の微小領域に存在する糖鎖を、質的・量的に解析可能な分析システムは確立されていない。そこで、タンパク質・核酸に次ぐ第三の生命鎖として注目を集めている糖鎖の機能を解明する上で、時期および領域特異的な糖鎖解析システムが確立される意義は非常に大きい。糖鎖付加はタンパク質の翻訳後修飾においてリン酸化と並ぶ重要プロセスであり、その生理機能はタンパク質の安定化のみならず、発生・分化、細胞間認識を介した免疫応答など広範囲にわたる。そこで本研究は、糖鎖の領域特異的な解析法の開発を目的として、レーザーマイクロダイセクションシステムと超高感度な高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた革新的解析法の確立を試みた。

3. 研究の方法

脳のように複雑な構造をとっている組織や、様々な細胞が混在している組織の場合、それらの相互分離は非常に困難であるため、従来、組織全体を用いて解析が行われてきた。しかし、より正確な解析のためには、標的組織・細胞をあらかじめ単離する必要がある。レーザーマイクロダイセクションは、顕微鏡下でプレパラートやシャーレ上の目的の領域のみを採取する技術として開発された装置である。組織や細胞を形態的に観察するだけでなく、採取した細胞群を生化学的手法で解析できることから、近年、微小領域を解析する研究ツールとして注目を集めている。レーザーマイクロダイセクションは、標的部位を切除回収する方法と、スライドガラス上の組織切片に熱で溶解するフィルムを接触さ

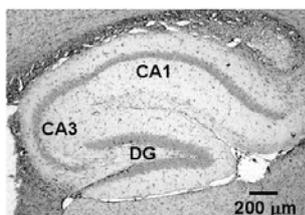


せ、赤外線レーザーで加熱して標的部位を接着してはがし採る方法 (laser capture microdissection) の二種類に大別できる。前者はスライドガラスに張ってあるフィルム上に組織切片を貼り付け、紫外線レーザーで標的部位をフィルムごと切り取ることにより行われる。その回収方法はさらに、レーザーパルスの光圧力で標的細胞を飛ばして上部にセットしたマイクロチューブに回収する方法 (laser microdissection and pressure catapulting) と、下部にセットしたチューブに落下して回収する自然落下法に分けられる。本研究では、波長 337 nm の紫外線レーザーによる自然落下法を用いて実験を行った (上図・マウス脳の組織切片から様々な領域を切り出した例を示した)。レーザーマイクロダイセクションは局所の DNA 分析、RNA 分析、タンパク質機能解析等に利用されはじめていたが、本研究はこれを糖鎖構造の解析に応用した。

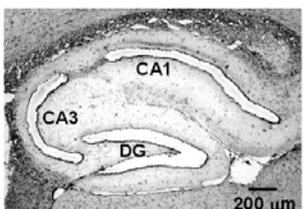
4. 研究成果

(1) レザーマイクロダイセクションを用いて分取した領域特異的な試料の *N*-結合糖鎖解析法を検討した。まず、レーザーマイクロダイセクションと組み合わせて使用できる *N*-結合糖鎖の超微量分析法の検討を行った。セミマイクロカラムを用いてピリジルアミノ (PA) 化 *N*-結合糖鎖分析の高感度化を検討したところ、広く PA 化 *N*-結合糖鎖分析に使用されている内径 6.0 mm のカラムに比べて 20 倍以上の感度の向上を達成した (S/N=3 で PA 化 *N*-結合糖鎖の検出限界は 400 amol)。この方法を用いて、ヘマトキシリン染色を施したマウスの脳切片の解析を行い良好な結果を得た。組織切片からレーザーマイクロダイセクションを用いて目的とする微小領域を採取し、タンパク質や糖鎖の解析を行う試みが国内外で始まっているが、PCR 反応で増幅ができる核酸と異なり分析感度が不十分なため、最新の質量分析装置を用いても十分な情報を集めるのは至難の技である。レーザーマイクロダイセクションを糖鎖分析に応用した報告では、感度的な問題から 100 枚近い組織切片から試料を採取して分析する必要があり、実用性がある報告例はない。申請者の確立した方法は、厚さ 10 μm 、半径 300 μm の脳組織切片から *N*-結合糖鎖を解析することが可能であり、生命現象解明の革新的モデルとして、脳神経機能の解明に画期的

Before micro dissection



After micro dissection



な進展をもたらすことが期待される。また、マウス海馬領域 CA1, CA3, DG を調べたところ(上図参照), 領域によって糖鎖プロファイルが異なるだけでなく, DG と CA1, CA3 の糖鎖量が著しく異なることが初めて明らかになった。

(2) シアル酸はノイラミン酸を基本骨格とする誘導体に付けられた総称名である。ヒトや動物に存在するシアル酸は主に *N*-アセチルノイラミン酸 (*N*-acetylneuraminic acid: Neu5Ac), *N*-グリコリルノイラミン酸 (*N*-glycolylneuraminic acid: Neu5Gc) であるが, 水酸基のアセチル化, 硫酸化, メチル化のパターンによって数多くの種類のシアル酸が見出されている。シアル酸の種類や結合様式には種属特異性があり, ウイルスが宿主細胞を認識する際の重要な情報源となっている。レクチンや抗体を用いた研究から, シアル酸含有糖鎖は組織や細胞ごとに発現が異なることが報告されているが, 本研究で目的としている様な微小領域のシアル酸発現量は解明されていない。そこで, レーザーマイクロダイセクションで切り出した脳切片の微小領域からのシアル酸分析法を確立し, さらに, この方法を用いて脳内シアル酸発現量の分布を解析した。切片への応用に先だて, シアル酸分析法の高感度化をセミマイクロ HPLC を用いて行ったところ Neu5Ac の検出限界は約 5 fmol であった。これは細胞数個中のシアル酸量に相当する。次にこの方法を用いて, 6 週齢の ddY 系マウスと胎生 20 日目の wistar 系ラット胎児の脳内シアル酸分布を解析した。6 週齢の ddY 系マウス脳では領域ごとに存在する Neu5Ac 量が大きく異なり, 視床下部で特に多くの Neu5Ac が検出された。ガングリオシドに特異的に働く *N*-アセチルノイラミニダーゼ 3 (Neu3) が強く発現している小脳の顆粒細胞層では, 他の領域と比較して Neu5Ac 量が少ないことが確認された。同じく Neu3 が強く発現している海馬では Neu5Ac 量の平均が脳全体の平均

より少なく, また, DG 領域では CA 領域より少ないことが判明した。胎生 20 日目の wistar 系ラット胎児では, 様々な臓器と比較して大脳皮質の Neu5Ac 量が特に多いことが明らかとなった。

(3) 他の臓器と比較して脳にはコンドロイチン硫酸が豊富に存在し, 神経細胞の伸張など様々な役割を担っていることが示されている。プルキンエ細胞の周囲には D 単位 [GlcA / IdoA(2S)-GalNAc(6S)] に富むコンドロイチン硫酸が豊富に存在することから, コンドロイチン硫酸の構造依存的な情報伝達が注目されている。また海馬神経細胞は, D 単位を多く含む基質上で培養すると樹状突起様の突起を進展させ, E 単位 [GlcA / IdoA-GalNAc(4S, 6S)] を多く含む場合は長い軸索様の突起を伸張させる。コンドロイチン硫酸中の高硫酸化された D 単位や E 単位などの部分構造は, 多くのヘパリン結合性成長因子と結合することが知られており, 海馬のみならず神経細胞全般の分化・形態形成に大きく関与していると考えられている。コンドロイチン硫酸の高感度な分析法として, 2-シアノアセトアミドを蛍光ポストカラム試薬とする HPLC があげられるが, 現状の方法では分析感度が不十分であった。そこで蛍光ポストカラム HPLC のセミマイクロ化を試みたところ, 検出限界を従来法の十分の一以下にすることに成功した。この新しい装置を用いて脳組織切片の微小領域に存在するコンドロイチン硫酸の分析を行ったところ, 過硫酸化部分の解析が世界で初めて可能となった。今後の研究では, 発生段階ごとのマウス脳組織切片を用いて領域特異的な過硫酸化コンドロイチン硫酸のプロファイルを取り, 脳内コンドロイチン硫酸マップの作製を試みたい。

5. 主な発表論文等

(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 13 件)

1. モデル生物と分析化学。豊田英尚, Bunseki, 222-227(2008). 査読無
2. Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. N. Sasaki, K. Okishio, K. Ui-Tei, K. Saigo, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, T. Nishimura, Y. Suda, M. Hayasaka, K. Hanaoka, S. Hitoshi, K. Ikenaka, S. Nishihara, J. Biol. Chem., 283, 3594-3606(2008). 査読有
3. Functional analysis of proteoglycan galactosyltransferase II RNA

- interference mutant flies. M. Ueyama, H. Takemae, Y. Ohmae, H. Yoshida, H. Toyoda, R. Ueda, S. Nishihara, *J. Biol. Chem.*, 283, 6076-6084(2008). 査読有
4. Nucleotide-sugar transporter SLC35D1 is critical to chondroitin sulfate synthesis in cartilage and skeletal development in mouse and human. S. Hiraoka, T. Furuichi, G. Nishimura, S. Shibata, M. Yanagishita, D.L. Rimoin, A. Superti-Furga, P.G. Nikkels, M. Ogawa, K. Katsuyama, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, N. Ishida, K. Isono, Y. Sanai, D.H. Cohn, H. Koseki. and S. Ikegawa, *Nat. Med.*, 13, 1363-1367(2007).
 5. Glycomics of proteoglycan biosynthesis in murine embryonic stem cell differentiation. A.V. Nairn, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, J. Xie, K. Harris, S. Dalton, M. Kulik, J.M. Pierce, T. Toida, K.W. Moremen, R.J. Linhardt, *J. Proteome Res.*, 6, 4374-4387(2007).
 6. Reduced sulfation of chondroitin sulfate in thyroglobulin derived from human papillary thyroid carcinomas. N. Emoto, Y. Kunii, M. Ashizawa, S. Oikawa, K. Shimizu, M. Shimonaka, A. Toyoda and H. Toyoda, *Cancer Sci.*, 98, 1577-1581(2007).
 7. HPLC determination of chondrosine in mouse blood plasma after intravenous or oral dose. S. Kusano, A. Ootani, S. Sakai, N. Igarashi, A. Takeguchi, H. Toyoda, T. Toida, *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 1365-1368(2007).
 8. Mosquito heparan sulfate and its potential role in malaria infection and transmission. P. Sinnis, A. Coppi, T. Toida, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, J. Xie, M.M. Kemp and R.J. Linhardt, *J. Biol. Chem.*, 282, 25376-25384(2007).
 9. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of hyaluronan oligosaccharides. S. Sakai, K. Hirano, H. Toyoda, R.J. Linhardt and T. Toida, *Anal. Chim. Acta*, 593, 207-213(2007).
 10. Regulation of heparan sulfate 6-O-sulfation by -secretase activity. N. Nagai, H. Habuchi, S. Kitazume, H. Toyoda, Y. Hashimoto and K. Kimata, *J. Biol. Chem.*, 282, 14942-14951(2007).
 11. *Drosophila* 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-A synthesizes the LacdiNAc structures on several glycoproteins and glycosphingolipids. N. Sasaki, H. Yoshida, T.J. Fuwa, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, Y. Hirabayashi, H. Ishida, R. Ueda, S. Nishihara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354, 522-527(2007).
 12. Chondroitin acts in the guidance of gonadal distal tip cells in *C. elegans*. N. Suzuki, H. Toyoda, M. Sano and K. Nishiwaki, *Dev. Biol.*, 300, 635-646(2006).
 13. Identification and characterization of a novel *Drosophila* 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter. E. Goda, S. Kamiyama, T. Uno, H. Yoshida, M. Ueyama, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, R. Ueda, S. Nishihara, *J. Biol. Chem.*, 281, 28508-28517(2006).
- [学会発表](計17件)
1. 新規糖鎖遺伝子 unbas-1 による複合糖質の産生. 豊田英尚, 中村かほり, 豊田亜希子. 日本薬学会第129年会要旨集3, 101(2009, 京都).
 2. *C. elegans* コンドロイチン重合体因子 MIG-17/ADAMTS 欠損の抑圧に関与する分子の同定. 佐々壽浩, 豊田英尚, 大蔵清貴, 西脇清二. 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会合同大会要旨集387, (2008, 京都).
 3. ヘパラン硫酸はマウス胚性幹細胞の未分化と多能性を制御する. 佐々木紀彦, 沖汐和彦, 平野拓也, 程久美子, 豊田亜希子, 豊田英尚, 西村知晃, 隅田泰生, 早坂美智子, 花岡和則, 等 誠司, 池田一裕, 西原祥子. 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会合同大会要旨集291, (2008, 京都).
 4. 糖ヌクレオチド輸送体ノックアウトマウスを利用した発生・分化における糖鎖機能の解析. 平岡秀一, 古市達也, 柴田俊一, 柳下正樹, 豊田英尚, 石田信宏, 佐内豊, 西村玄, 池川志郎, 古関明彦, 浅原弘嗣. 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会合同大会要旨集169, (2008, 京都).
 5. ヘパラン硫酸はマウス胚性幹細胞の未分化と多能性を制御する. 佐々木紀彦, 沖汐和彦, 程久美子, 豊田亜希子, 豊田英尚, 西村知晃, 隅田泰生, 早坂美智子, 花岡和則, 等 誠司, 池田一裕, 西原祥子. 第28回日本糖質学会要旨集78, (2008, つくば).

6. mig-22 遺伝子の優性変異は mig-17 変異体の DTC 移動異常を抑圧する。佐々壽浩, 豊田英尚, 大蔵清貴, 西脇清二, 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会要旨集 365. (2007, 横浜)
7. ショウジョウバエを用いた糖鎖関連遺伝子の網羅的機能解析。西原祥子, 上山盛夫, 山本(日野)美紀, 吉田英樹, 不破尚志, 後藤聡, 豊田英尚, 上田龍, 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会要旨集 144. (2007, 横浜).
8. ショウジョウバエ unbas-1 変異体を用いた糖鎖機能の解析。中村かほり, 細山沙織, 戸井田敏彦, 豊田亜希子, 豊田英尚, 第 51 回日本薬学会関東支部会要旨集 93. (2007, 東京)
9. レーザーマイクロダイセクションを用いた脳内糖鎖の解析。高戸美緒, 井関友美, 中込麻里子, 戸井田敏彦, 豊田亜希子, 豊田英尚, 第 51 回日本薬学会関東支部会要旨集 89. (2007, 東京).
10. マボヤ(Halocynthia roretzi)由来新規デルマタン硫酸の単離と構造特性。梅沢道代, 豊田英尚, 戸井田敏彦, 第 51 回日本薬学会関東支部会要旨集 60. (2007, 東京).
11. コンドロイチン硫酸の経口吸収における分子量の影響。竹口敦子, 五十嵐尚子, 酒井信夫, 豊田英尚, 戸井田敏彦, 第 51 回日本薬学会関東支部会要旨集 54. (2007, 東京).
12. 新規低分子ヘパリンの構造と生理活性中務裕子, 豊田英尚, 戸井田敏彦, 第 51 回日本薬学会関東支部会要旨集 53. (2007, 東京).
13. レーザーマイクロダイセクションを用いた脳 N-結合糖鎖の領域特異的解析。中込麻里子, 高戸美緒, 戸井田敏彦, 西原祥子, 豊田亜希子, 豊田英尚, 第 27 回日本糖質学会年会要旨集 92. (2007, 福岡).
14. ショウジョウバエ機能獲得変異体を用いたムチン型糖鎖の解析。細山沙織, 豊田亜希子, 戸井田敏彦, 豊田英尚, 日本薬学会 127 年会要旨集 3, 41. (2007, 富山)
15. メチルエステル化グリコサミノグリカンの酵素分解平野花奈, 酒井信夫, 豊田英尚, 戸井田敏彦, 第 26 回日本糖質学会年会講旨集 168. (2006, 仙台).
16. モデル生物を用いた N-結合糖鎖超微量分析法の開発。豊田亜希子, 伊藤美樹子, 中込麻里子, 高戸美緒, 戸井田敏彦, 西原祥子, 豊田英尚, 第 26 回日本糖質学会年会要旨集 145. (2006, 仙台).
17. 糖鎖の微量分析法の開発とモデル生物を用いた糖鎖機能解明への応用。豊田英尚, 細山沙織, 伊藤美樹子, 雨ノ宮奈穂子, 中村はるか, 戸井田敏彦, 西原祥子, Scott

B. Selleck, 豊田亜希子, 第 26 回日本糖質学会年会要旨集 73. (2006, 仙台).

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ritsumei.ac.jp/pharmacy/toyoda/seitaibunseki/top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

豊田 英尚 (TOYODA HIDENAO)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：70217579