

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05427

研究課題名(和文) N結合型糖鎖の生合成過程をレポーターとした細胞の健康状態の定量化に関する研究

研究課題名(英文) Quantitative evaluation of cell health using N-linked glycan biosynthesis process as a reporter

研究代表者

藤谷 直樹 (Fujitani, Naoki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10374191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、N結合型糖鎖の生合成経路を追跡は小胞体(ER)の状態を反映するレポーターとなり、ERストレスの定量的な指標を提供することを示した。ERストレスに伴うN-グリカンと分解された遊離糖(fOSs)の構造変化を定量的に解析し、それらを統合することで、ERストレスを定量的に評価し、タンパク質マーカーだけでは不可能であったERストレスの原因を区別できる技術として発表した。本研究は、多くの疾患の原因であるERストレスを定量的かつ高感度に検出する技術として導出されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、神経変性疾患、炎症性疾患、さらにはがんなど、様々な疾患の原因となる小胞体(ER)ストレスを、「どの程度のストレスか」といった定量的な評価を可能にする方法を、糖鎖の定量的な構造解析技術によって示した。網羅的な糖鎖構造解析であるグライコミクスがバイオマーカー探索の中心的な技術として成熟してきた中、定性的なマーカー探索を超え、ERの状態を定量的に反映する動的な指標を提供することを可能にすることを示した。本技術によって、細胞の異常を定量的に高感度に検出することが可能となり、細胞診など病理診断分野に応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study showed that tracking the biosynthetic pathway of N-linked glycans is a reporter that reflects the state of the endoplasmic reticulum (ER) and provides a quantitative indicator of ER stress. Quantitative analysis of the structural changes of N-glycans and degraded free sugars (fOSs) associated with ER stress and their integration was presented as a technology that can quantitatively evaluate ER stress and distinguish the cause of ER stress, which was not possible with protein markers alone. This research is expected to be derived as a technique for quantitative and sensitive detection of endoplasmic reticulum stress, which is the cause of many diseases.

研究分野：生体関連化学

キーワード：糖鎖修飾 質量分析法 小胞体ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体 (ER) ストレスは正しく立体構造を形成しなかったタンパク質が、ER 内に過剰に蓄積して細胞の恒常性を乱している現象であり、神経変性疾患、炎症性疾患、がんなど多くの疾患の原因の1つと考えられている。細胞が ER ストレス状態であるかどうかの判断は、特異的なマーカータンパク質や遺伝子発現を検出することによって成されるが、各マーカーは必ずしも端的に ER ストレスであることを示すとは限らない。また、マーカーによる検出は定性的であり、「どの程度の ER ストレスか」や「どの程度、細胞の恒常性が乱されているか」といった、ER ストレスを定量的に評価する系の構築が望まれている。これが可能になれば、「細胞の健康状態」を ER ストレスの程度から評価することが可能となり、細胞診による疾患の発見など医学的な観点からも応用が期待される。

糖鎖修飾は代表的な翻訳後修飾の1つであり、糖鎖は細胞の種類や疾患ごとにダイナミックにその構造が変化することが知られている。ER は糖鎖修飾、特にアスパラギン結合型糖鎖 (N 結合型糖鎖) 修飾が開始される細胞内小器官であるため、N 結合型糖鎖の生合成過程の追跡は、ER の状態を反映するレポーターとなると考え、本研究を着想した。N 結合型糖鎖の生合成過程の追跡は、タンパク質上の N 結合型糖鎖、生合成過程で生じる分解物である遊離糖 (free oligosaccharides; fOSs) の、定量的な構造解析と、ER ストレスに伴うそれらの量の変化の追跡をもって行う (図1)。現在の、糖鎖の網羅的な構造解析 (グリコミクス) は、遺伝子やタンパク質の網羅的構造解析であるゲノミクスやプロテオミクスほど成熟していないものの、質量分析法の進歩により世界的に広く行われるようになり、本邦においても糖鎖に関するコンソーシアムが形成され盛んに行われている。本研究では、申請者が現在までに確立した糖鎖分析技術を応用し、N 結合型糖鎖構造の定量的な変化が ER の状態を反映する動的なマーカーとしてのポテンシャルを示す。

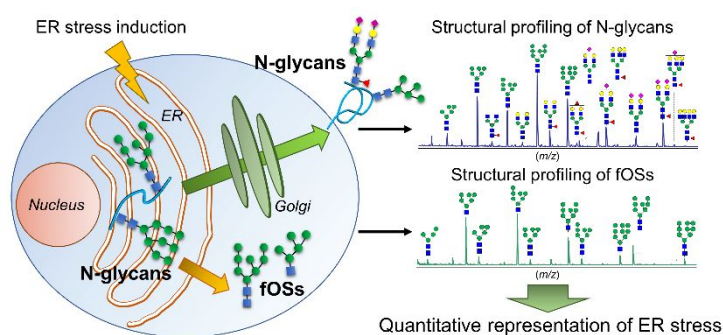


図1. 本研究の概念図。生合成過程の N 結合型糖鎖とその分解産物の定量的な構造解析を通じて ER ストレスを定量的に評価するシステムを構築する。

## 2. 研究の目的

ER ストレスを誘導した細胞の N 結合型糖鎖の生合成過程を経時的に追跡することで、ER ストレスを定量的に評価する方法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

N 結合型糖鎖合成阻害剤であるツニカマイシン(TM)と小胞体へのカルシウムイオン輸送を阻害するタプシガルギン(TG)を用いて、モデル細胞である HeLa 細胞に対して ER ストレスを誘導した。両者添加後、48 時間までストレス誘導を継続し、0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 時間目の細胞に対して以降の解析を行った。

糖鎖分析に先立ち、実績のある ER ストレスマーカーの変化をウエスタンブロッティング法により検出した。N 結合型糖鎖と遊離糖 fOSs の捕捉および構造解析は、グリコプロット法および MALDI-TOF MS/MS 法を用いて行った。N 結合型糖鎖と fOSs は時に同一の構造を有するため、両者が存在するサンプルでは質量分析法において、全く区別ができないという問題が生じる恐れがある。そのため、細胞破碎液から N 結合型糖鎖を含むタンパク質と fOSs を含む非タンパク質画分を、エタノール沈殿により厳格に分離した。タンパク質画分に対して PNGase F を用いて N 結合型糖鎖を遊離しグリコプロット法で捕捉した。fOSs は非タンパク質画分に対して直接同法で捕捉した。

捕捉された糖鎖を高いイオン化効率を示すタグを付加した誘導化糖として回収し、MALDI-TOF MS/MS で解析した。標準物質との比較定量を行い、各誘導時間で得られた糖鎖構造の定量情報を

基にした統計解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 既存マーカーによる ER ストレスの検出

TM 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および TG 4  $\mu\text{M}$  で HeLa 細胞に ER ストレスを誘導し、マーカータンパク質の経時的な変化をウエスタンブロッティングで検出した(図 2)。

小胞体ストレス応答(UPR)に関する ATF6, IRE1, PERK において、IRE1 と PERK はリン酸化が確認されたが、ストレスによって 50kDa 付近に観測されるべき切断型 ATF6 は観測されず、ER ストレスを明確に示唆しなかった。

ER に局在するシャペロン群は、タンパク質のフォールディングの初期に関わる malectin が TM 処理では明確な変化を示さず、ジスルフィド結合形成にかかわる PDI は両刺激に対して曖昧な変化を示した。多くのマーカーが予想通りの変化を示した一方、ER ストレスを定義する上で曖昧な結果を呈したことは、タンパク質マーカーが必ず ER ストレスを検知するとは限らない場合もあることを示唆する。また、タンパク質マーカーの検出のみでは、ER ストレスの原因は区別されず、どの程度のストレスかを明確にすることは難しい。

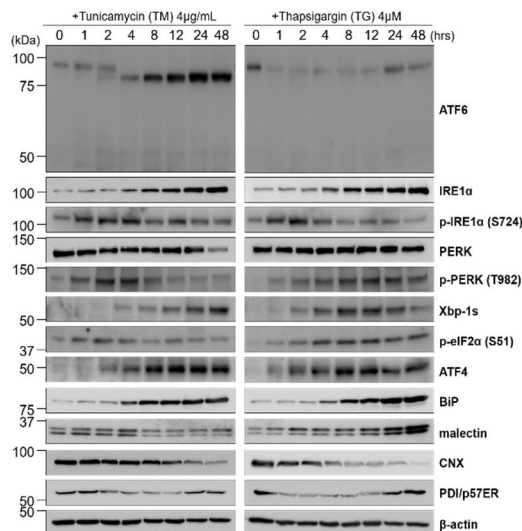


図 2. ER ストレスに伴う HeLa 細胞の UPR 関連タンパク質の活性化の変化とシャペロンタンパク質の変化 (左: TM4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加、右: TG 4  $\mu\text{M}$  添加)

##### (2) ER ストレスにตอบสนองする N 結合型糖鎖と fOSs の総量の変化

TM 2 または 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、および TG 2 または 4  $\mu\text{M}$  で HeLa 細胞に ER ストレスを誘導し、N 結合型糖鎖と fOSs の総量の変化を経時的に追跡した。N 結合型糖鎖において、TM は N 結合型糖鎖合成阻害剤なので、期待通り TM 処理では経時的に減少した(図 3A)。一方、4  $\mu\text{M}$  の TG 処理では 4-8 時間目に最大量に達した後に急減する様子が観察された(図 3B)。これは N 結合型糖鎖を持つタンパク質が ER に蓄積したことを表すと同時に、機能不全 ER が選択的に排除される ER フェージを反映している可能性がある。また、糖タンパク質の蓄積量には最大値が存在することも示唆された。TG 2  $\mu\text{M}$  で処理した場合は増加し続け、4  $\mu\text{M}$  処理で観察された最大量に向かっていく様子が観察された。

fOSs は TM 処理では N 結合型糖鎖が減少するので fOSs も減少するという結果が得られ、TG 処理では経時的に劇的に増加が観察された(図 3C, D)。TG 処理では過剰に蓄積された糖タンパク質を ERAD などによって、分解する経路が亢進していることを示唆している。

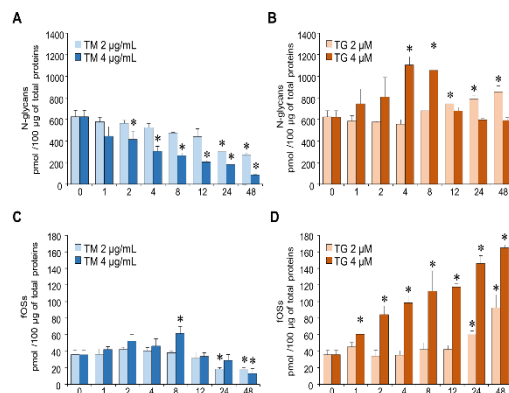


図 3. TM および TG 処理による N 結合型糖鎖総量の経時的な変化(A, B)と fOSs 総量の経時的な変化(C, D)。\*: ストレス誘導無しのコントロールと比べ有意に変化したもの ( $p < 0.05$ )。

##### (3) N 結合型糖鎖の構造別解析

(2) で示した N 結合型糖鎖総量の変化がどのような糖鎖構造に起因しているかを調べるために、構造別の定量プロファイルを得た(図 4)。N 結合型糖鎖は主に高マンノース型とコンプレックス型に分けられる。高マンノース型はマンノースが 5 - 9 個からなり、ER 内の N 結合型糖鎖は基本的に高マンノース型である。コンプレックス型は正しく折りたたまれた糖タンパク質が、最終的に細胞膜に提示されるか分泌されるために、ゴルジ体へ輸送され、マンノースが切断されてガラクトースやシアル酸、フコースなどの修飾を受けた糖鎖である。(2) の総量変化は、いずれも高マンノース型の変動に起因することが明らかになった(図 4A)。これは ER で糖タンパク質が蓄積

している状態を反映していると考えられる。高マンノース型を構造別に調べた結果、特にマンノース8個からなる糖鎖(M8)の顕著な増加が明らかになった。M8は正しく折りたたまれた糖タンパク質がゴルジへ輸送される際の最も好ましい糖鎖構造の1つであり、M8の増加はERでの直積を示唆する。一方、TG 4  $\mu$ Mでのストレス誘導では糖鎖総量が12時間目以降に激減し、総量の観点からはERストレスからの回復が期待されたが、高いマンノース型構造の相対的な割合を調べると、M8が50%以降と高く(図4C)、ストレス状態は継続している様子が示唆された。

コンプレックス型の定量解析から、高濃度のTM(4  $\mu$ g/mL)またはTG(4  $\mu$ M)で処理した細胞においてはシアリル化糖の割合が有意に高く、低濃度処理ではアシアロ糖(シアリル酸付加が無い糖鎖)の割合が高かった。高いマンノース型の構造は各種ヒト細胞に共通であるがコンプレックス型糖鎖は細胞に特異的であるため、HeLa細胞をモデルとした本実験ではERストレスを示唆する定性的なマーカー構造をコンプレックス型糖鎖の中から提案できないが、コンプレックス型に一般にみられるシアリル酸の負荷率の変化は、ストレスの誘導強度の指標となる可能性を示すことができた。

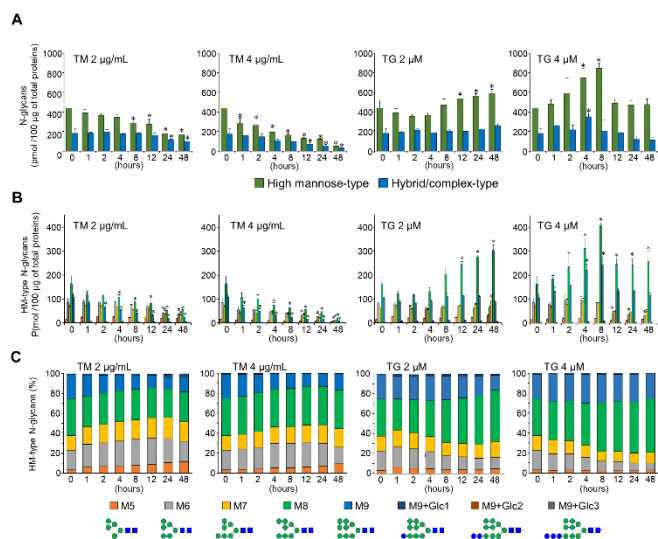


図4. N結合型糖鎖の構造別の定量プロファイル。A: 高マンノース型とコンプレックス型の比較。B: 高マンノース型の構造別絶対定量解析。C: 高マンノース型の構造別相対定量解析。\*: ストレス誘導無しのコントロールと比べ有意に変化したもの( $p < 0.05$ )。

#### (4) fOSsの構造別解析

fOSsもN結合型糖鎖と同様に構造別の定量プロファイルを得た(図5)。fOSsは構造的に非還元末端に1つのN-アセチルグルコサミンを1つ持つfOSGN1型(図5A)と2つ持つfOSGN2型(図5B)に分類される。TM処理では一過性にfOSGN1が増加するものの、最終的には減少する。一方、TG処理、特に4  $\mu$ Mでは、顕著にfOSGN1もfOSGN2も増加する。fOSGN2型はfOSGN1型に比べ微量な糖鎖であるが、TG処理では特徴的に増加することから、ERストレスを表す指標の1つとなると考える。

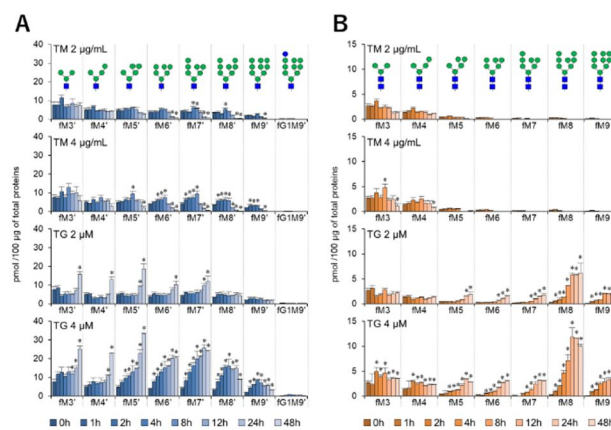


図5. fOSsの構造別の定量プロファイル。A: fOSGN1型の変化。B: fOSGN2型の変化。\*: ストレス誘導無しのコントロールと比べ有意に変化したもの( $p < 0.05$ )。

#### (5) N結合型糖鎖の前駆体の分析

本研究は計画当初、ERに局在しN結合型糖鎖の前駆体であるドリコール結合型糖鎖の分析を計画していた。ドリコール結合型糖鎖は、ドリコールにニリン酸を介して高マンノース型が逐次合成されるため、ERの状態のよい指標になると考えた。膜画分の抽出後、酸加水分解でリン酸エステルを切断し、糖鎖をグリコプロテイング法で捕捉した後に質量分析を用いて検出することができた。しかし、非常に微量なため定量限界付近での検出例が多く、また、以下に述べるERストレスを評価するための統計解析には、N結合型糖鎖とfOSsの定量情報のみで十分であったため、本研究でドリコール結合型糖鎖を統計処理のパラメータとして加えることを見送った。

#### (6) N結合型糖鎖とfOSsによるERストレスの評価

TM および TG による ER ストレス誘導において、N 結合型糖鎖と fOSs の各構造の定量値を階層クラスタ解析(HCA)および主成分分析(PCA)に供した(図 6)。

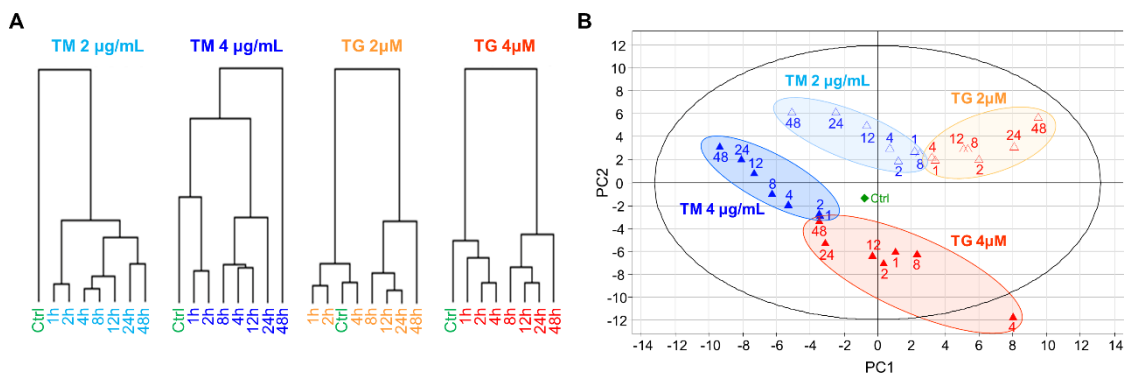


図 6. N 結合型糖鎖および fOSs の定量値を統合した統計解析。  
A: 階層クラスタ解析(HCA)。B: 主成分分析(PCA)。

TM および TG の各濃度での ER ストレスの誘導の HCA は、おおむね経過時間ごとに細胞が並び、N 結合型糖鎖と fOSs の統合は、ストレスの進行度を評価できるポテンシャルがあることを示すことができた(図 6A)。PCA 解析においては、ストレス誘導剤別に、さらには濃度別にクラスター化できることが示された。第一主成分は糖鎖総量、第二主成分はストレスの急性度と意味づけることが可能である。これらの統計解析により、N 結合型糖鎖と fOSs の定量結果の統合は、ストレスの強弱や進行度のみならず、マーカータンパク質の検出のみでは不可能であるストレスの原因を区別することを可能にすることを示す。

以上の結果より、N 結合型糖鎖の生合成過程を、その産物である N 結合型糖鎖と fOSs の定量的な構造解析によって追跡することは、既存のマーカー検出のみに依存する ER ストレス検出の欠点を補い、どの程度のストレスかの定量的な判断材料の提供、さらには、ストレスの原因を推定できるツールとして、細胞診をはじめとする病理学的な技術に貢献するものと考えられる。本研究の成果は米国化学会誌にて報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujitani Naoki, Ariki Shigeru, Hasegawa Yoshihiro, Uehara Yasuaki, Saito Atsushi, Takahashi Motoko	4. 巻 60
2. 論文標題 Integrated Structural Analysis of N-Glycans and Free Oligosaccharides Allows for a Quantitative Evaluation of ER Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1708 ~ 1721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00969	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤谷直樹、有木茂、長谷川喜弘、上原康昭、斎藤充史、高橋素子
2. 発表標題 N結合型糖鎖の構造解析によるERストレスの定量的な評価
3. 学会等名 第58回生化学会北海道支部会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------