

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16877

研究課題名(和文)内耳蝸牛におけるN-結合型糖鎖の網羅的解析と内リンパ液環境の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of N-glycan in the the mammalian cochlea

研究代表者

野々村 頼子 (YORIKO, NONOMURA)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60807022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高速液体クロマトグラフィーと質量分析を駆使し、血管条に発現するN-結合型糖鎖の包括的なプロファイルを作成した。血管条に79種類のN-結合型糖鎖を同定し、その構造を示した。79種類の内訳はpaucimannoseが5.8%、High mannose typeが38.1%、Complex typeが34.8%、Hybrid typeが21.0%含まれていた。さらに、Complex typeの25.4%、Hybrid typeの18.2%がシアル酸を含有し、paucimannose typeの2.6%、Complex typeの23.3%、Hybrid typeの2.4%がコアフコースを含有した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

聴覚機能における糖鎖の役割として、過去に報告されている主なものは、糖脂質であるGM3の合成酵素欠損マウスでは、蝸牛の内、外有毛細胞が脱落し、難聴を呈する(Yoshikawa et al., PNAS 2009)、ムンプス難聴においては、ムンプスウィルスがヒトに感染する際には、N-結合型糖鎖の構造の一部である2-3結合型シアル酸を含む構造が必要である(Kubota et al., PNAS 2016)などがある。これまで内耳に発現するN-結合型糖鎖を網羅的に解析した報告はない。本研究の成果は、発症のメカニズムが不明な内耳障害性難聴の病因解明や、治療開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we comprehensively analyzed the profile of the N-linked glycans in the stria vascularis. Seventy-nine N-linked glycans were identified in the rat stria vascularis. Among these, in 55 glycans, the complete structures were determined; in the other 24 species, partial glycosidic linkage patterns and full profiles of the monosaccharide composition were identified. The high-mannose type was the most abundant and accounted for 38.1% of the total amount of strial glycans. Complex and hybrid types represented 34.8% and 21.0%, respectively. The least abundant variety was the paucimannose type, which represented 5.8% of the total. 43.6% of the total amount of N-glycans had single or multiple sialic acid residues; complex and hybrid types constituted 25.4% and 18.2%, respectively. Finally, core fucosylation was detected in 28.4% of the total amount of N-glycans, i.e. 2.6%, 23.3%, and 2.4% were the paucimannose type, complex type, and hybrid type of glycans, respectively.

研究分野：内耳蝸牛血管条

キーワード：N-結合型糖鎖 血管条 内耳蝸牛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

聴覚の受容器官である内耳蝸牛を満たす「内リンパ液」は、150 mMの K^+ 濃度と+90 mVの高電位を示す特殊な細胞外液である。この特殊なイオン環境と高電位の破綻は難聴を惹起する。我々は、これまでの研究で、1)内リンパ液のイオン環境や高電位などの恒常性は、蝸牛側壁の血管条により維持されること、2)血管条にはイオン輸送分子など約1800種類の膜タンパク質が発現していることを報告した。しかし、これらの膜タンパク質がどのように機能制御され内リンパ液環境が維持されるのかは不明であった。この課題を解決するため、膜タンパク質に結合する「糖鎖」に着目した。一般に、体内に発現するタンパク質の約50%は糖鎖修飾されており、「糖鎖」により、イオン輸送分子などの機能調節、シグナル伝達などが行われている。血管条においても同様のことが推察され、本研究では、蝸牛血管条に発現する糖鎖の網羅的解析糖鎖が膜タンパク質、ひいては内リンパ環境をコントロールする仕組みを明らかにする。

2. 研究の目的

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)と質量分析 (MS) を駆使して、血管条に発現する N-結合型糖鎖の包括的なプロファイルを作成する。

3. 研究の方法

1)血管条分離の精度解析：

BN/SsNSic ラット (7 週齢オス) から、実体顕微鏡下に血管条を単離した。この組織は蝸牛内でらせん靭帯と隣接する。単離サンプルに対し各組織のマーカー遺伝子の発現を real-time PCR で調べ、らせん靭帯の混入が極めて少ないことを検討した。

2)血管条に発現する N-結合型糖鎖の解析：

単離した血管条にヒドラジンを加え、タンパク質から糖鎖を遊離した。加えて、標本を 2-アミノピリジンで処理した。標識された糖鎖を、3種類の HPLC (陰イオン交換 HPLC、逆相 HPLC、サイズ分画 HPLC) に順にかけることで、シアル酸の数、疎水性、分子サイズにより分離した。さらに、逆相 HPLC で分離した糖鎖を、Liquid chromatography-electrospray ionization-MS (LC-ESI-MS) and MS^2 で解析した。

3) N-結合型糖鎖の構造解析：

MS と MS^2 の spectra から、糖鎖を構成する単糖の組成や、部分的な糖鎖構造の情報を得ることができる。また、逆相 HPLC とサイズ分画 HPLC の溶出時間は、糖鎖構造ごとに固有の値を示す。上記のデータを基に、N-結合型糖鎖の構造を解析した。

4) シアル酸の結合様式の解析：

上記の手法で構造解析した糖鎖のうち、シアル酸の結合様式が同定できなかったものについては、sialic-acid-linkage-specific alkylamidation: SALSA と matrix-assisted laser desorption quadrupole ion trap time-of-flight MS: MALDI-QIT-TOF MS で詳細に解析した。この手法は、 α 2,3 結合または α 2,6 結合シアル酸をそれぞれ異なる分子で修飾することで発生する質量差を MS で検出することで、2種の結合様式を区別した。

4. 研究成果

1)血管条に発現する N-結合型糖鎖の解析：

糖鎖を、3種類の HPLC (陰イオン交換 HPLC、逆相 HPLC、サイズ分画 HPLC) に順にか

けさらに、逆相 HPLC で分離した糖鎖を、Liquid chromatography-electrospray ionization-MS (LC-ESI-MS) and MS² で解析した。その結果、77 種類の N-結合型糖鎖が同定された。

2) N-結合型糖鎖の構造解析：

MS と MS² の spectra から、糖鎖を構成する単糖の組成や、部分的な糖鎖構造の情報を得ることができる。また、逆相 HPLC とサイズ分画 HPLC の溶出時間は、糖鎖構造ごとに固有の値を示す。上記のデータを基に、77 種類の N-結合型糖鎖の構造を解析した。

3) シアル酸の結合様式の解析：

全ての糖鎖についてシアル酸の結合様式が明らかにした。また、HPLC と LC-ESI-MS だけでは分離できなかった糖鎖が 2 種同定された。A3-13 糖鎖については、SALSA と positive ion mode MALDI-QIT-TOF MS により、LC-ESI-MS and MS² 解析から推測した構造と異なる構造を持つことが示唆された。そのため、Negative ion mode MALDI-QIT-TOF MSⁿ でさらに解析した結果、硫酸基を含む糖鎖であることが分かった。以上より、蝸牛血管条に計 79 種類の N-結合型糖鎖を同定し、その構造を示した。

これら 79 種類の内訳としては paucimannose が 5.8%、High mannose type が 38.1%、Complex type が 34.8%、Hybrid type が 21.0% 含まれていた。さらに、Complex ty の 25.4%、Hybrid type の 18.2% がシアル酸を含有し、paucimannose type の 2.6%、Complex type の 23.3%、Hybrid type の 2.4% がコアフコースを含有した。

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 1件）

1. 著者名 Yoriko Nonomura, Seishiro Sawamura, Ken Hanzawa, Takashi Nishikaze, Sadanori Sekiya, Taiga Higuchi, Fumiaki Nin, Satoru Uetsuka, Hidenori Inohara, Shujiro Okuda, Eiji Miyoshi, Arata Horii, Sugata Takahashi, Shunji Natsuka, Hiroshi Hibino	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterisation of N-glycans in the Epithelial-Like Tissue of the Rat Cochlea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-38079-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 野々村頼子
2. 発表標題 内リンパ液の恒常性維持に関与する上皮イオン輸送分子の解析
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoriko Nonomura
2. 発表標題 Comprehensive analysis of N-glycan in the epithelial-like tissue of the mammalian cochlea
3. 学会等名 2020 ARO MidWinter Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoriko Nonomura, Seishiro Sawamura, Fumiaki Nin, Satoru Uetsuka, Hidenori Inohara, Shujiro Okuda, Arata Horii, Sugata Takahashi, Shunji Natsuka, Hiroshi Hibino,
2. 発表標題 N-glycan profile of the epithelial-like tissue in the mammalian cochlea.
3. 学会等名 31st Politzer Society Meeting & 2nd Global Otology Research Forum.（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoriko Nonomura, Seishiro Sawamura, Fumiaki Nin, Satoru Uetsuka, Hidenori Inohara, Shujiro Okuda, Arata Horii, Sugata Takahashi, Shunji Natsuka, Hiroshi Hibino
2. 発表標題 N-glycan profile of the epithelial-like tissue in the mammalian cochlea.
3. 学会等名 Inner Ear Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------