

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21750162

研究課題名 (和文) コンドロイチン硫酸の構造解析・機能探索法に関する研究

研究課題名 (英文) Study of a novel procedure for structural and functional analysis of chondroitin sulfate proteoglycans

研究代表者

武川 泰啓 (TAKEGAWA YASUHIRO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任助教

研究者番号：60515071

研究成果の概要 (和文)：

生体内の細胞膜および細胞外マトリクスの構成成分である主なグリコサミノグリカン (コンドロイチン硫酸・ヘパラン硫酸・ヒアルロン酸) の全ての2糖単位のグライコブロットイング法を応用した簡便な精製法と、両イオン性クロマトグラフィーを用いた分析手法により、これまで困難であった同時かつ高感度な新規分析手法を確立した。また、本法を種々の培養細胞の分析に適用することで、各細胞をグリコサミノグリカンの発現パターンによって分類可能である事を示した。さらに、本法を再生医療に用いられている培養角膜試料に適用する事で新たな知見を得た。

研究成果の概要 (英文)：

We established simple isolation and simultaneous analytical techniques for disaccharides derived from all major glycosaminoglycans (chondroitin sulfate, heparan sulfate, hyaluronic acid), which have been difficult thus far, by using combination glycoblotting technique with zwitterionic interaction chromatography. The established technique was applied for various cultured cells, and we demonstrated the usefulness of this technique for the classification of cell type. We also explored the tissue-engineered cultured cornea sample, which are used as cornea reconstruction with the cornea epithelium and oral epithelium. As a result, we showed a novel finding about cornea regenerative medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾 (糖鎖修飾) であ

るグリコサミノグリカン(GAG)の一種であるコンドロイチン硫酸(CS)は、哺乳動物の細胞膜表面や細胞外マトリクスに普遍的に存在する。CSは、グルクロン酸とN-アセチルガラクトサミンからなる二糖単位が、繰り返し重合した直鎖状分子を基本骨格とする巨大分子である。この二糖単位の水酸基は、様々な位置・数の硫酸化が生合成過程で行われ莫大な数の構造異性体が生じるが、CSの構造多様性の意義はこれまでほとんど明らかとなっていない。

しかし、近年これらCSが神経回路形成や中枢神経損傷後の修復過程に重要な役割を果たしていると報告されるようになってきた。さらに、各種成長因子の機能調節に関与するという報告も出始めている。これらCSが様々な生物学的に重要な機能を発揮するのは、CSの糖鎖構造特異的にタンパク質が結合することによると考えられる。

しかし、簡便な構造解析手法及び機能解析技術の欠如しており、「CSの構造解析・機能解析の技術に関する研究が極めて重要な研究課題」であった。

## 2. 研究の目的

研究開始当初、「CSの簡便かつ微量分析手法の確立」を目的としていたが、CS以外のグリコサミノグリカンの一種であるヘパラン硫酸(HS)やヒアルロン酸(HA)も重要な生物学的機能を発揮する事からこれら、(1)「全ての主要なグリコサミノグリカンの簡便かつ微量分析手法の確立」を目的とした。また、近年、再生医療の分野へ期待が寄せられている幹細胞を有効に活用するためには、細胞の分化(品質)を定量的に評価するアッセイ系が必要であるが、従来の方法では汎用性が低く問題点も多い。

そこで、細胞の状態をよく反映する糖鎖に着目し、(2)「糖鎖発現プロファイルから細胞の分類や状態を評価する系の確立」を目的とした。さらに(3)「糖鎖固定化磁性ビーズを用いて相互作用相手を探索する事で、糖鎖機能解析技術の確立」も目的とした。

## 3. 研究の方法

始めに(1)の目的を達成するために、培養細胞あるいは組織を用いて、その中から主要な全てのグリコサミノグリカン(CS, HS, HA)を2糖単位まで分解し、近年我々が開発した糖鎖を選択的に精製する手法(グライコプロッティング法)を用い、糖鎖を精製すると同時に糖鎖を蛍光ラベルする手法の確立を目指した。

まず培養細胞あるいは組織をクロロホルム/

メタノールによる脱脂を行った後、プロナーゼによりタンパク質を分解させた。その後、エタノールによってグリコサミノグリカン沈澱させ部分精製した後、主要なグリコサミノグリカンであるCS/HS/HAを分解酵素により全て2糖単位まで分解した。最後に近年我々が開発したグライコプロッティング法を用い、糖鎖選択的に精製を行うと同時に、2-アミノベンズアミド(2-AB)試薬による還元のアミノ化反応を用いる事で蛍光ラベル化する手法を用いた。

これにより、細胞や組織から、従来法では非常に煩雑であった精製法を改善し、簡便かつ迅速にグリコサミノグリカン2糖の蛍光ラベル化体を精製する新規技術を確立した。

次に、得られた蛍光ラベル化糖鎖を分離・分析する手法の検討を行った。これまで、一般的にはイオン交換クロマトグラフィーやイオンペア試薬を用いた逆相クロマトグラフィーが使用されていたが、CS, HS, HA由来のすべての2糖単位を分離することは難しく、また質量分析計との相性が悪く、イオン化を阻害してしまうなどの問題点があった。

そこで、私は両イオン性クロマトグラフィー(ZIC-HILIC)に着目した。分離条件を塩濃度・有機溶媒濃度・水の濃度・カラム温度など、種々検討した結果、これまで困難であったCS, HS, HA由来のすべての2糖単位を分離可能な分離条件を初めて確立することに成功し、全てのグリコサミノグリカン2糖を同時分析可能な手法を初めて確立した。

また、本法は、揮発性かつ低塩濃度での分離・分析が可能であり、質量分析計との相性も良く、イオン化効率の低下を招くことなく、LC/MS測定が可能となった。

次に(2)の目的を達成するために、代表的な種々の培養細胞(CHO, Lec1, Lec8, 3T3, HL60, K562)を培養し、セルスクレーパーにより培養細胞を回収した後、本法を適用する事で、 $1 \times 10^6$ 個程度の微量な培養細胞から定量的・定性的なGAGプロファイルを得ることができる事を確認した。さらに、各細胞毎に糖鎖プロファイルが大きく異なる事も確認した。また、組織でも本法が有効であるかを確認するため、試料としてウサギ角膜より角膜上皮・間質・内皮・輪部・結膜を調製し、本法を適用した。

その結果、培養細胞と同様に、定量的・定性的なGAGプロファイルを得ることが可能である事を確認すると同時に、組織特異的に糖鎖プロファイルが異なる事を見出した。

これら上記の結果から、本法が細胞や組織の分類に有用な手法である事が示された。

現在、自家口腔粘膜から人工的に培養した細胞シートが角膜の代替として有用である事が示されており欧州などで臨床試験が行われ、角膜再生医療としておおいに期待されている。

この方法は口腔粘膜に存在する体性幹細胞が角膜方向へ細胞分化する事により、再生医療が可能であると考えられている。私は、モデルとしてウサギ口腔粘膜を用い、マウス3T3をフィーダーとして、口腔粘膜上皮を培養する事で細胞シートを作成した。

元々の試料である口腔粘膜上皮と作成した細胞シートを本法を用いて、定性的・定量的に分析した結果、GAGプロファイルに大きな変化がある事を確認した。生物学的機能は現在不明であるが、GAGプロファイルの中でも特に、細胞シート化に伴い、ヒアルロン酸が数十倍上昇する事を見出した。

これらの結果から、本法が細胞分化過程における細胞の品質の評価にも有用である事、また細胞分化過程における糖鎖変化の生化学的意義に関する新しい知見を得るのに有用な手段である事を示した。また今後、再生医療などの細胞品質の評価法としても期待される技術を確認できたと考えている。

(3)の目標に関しては、現在、糖鎖ライブラリーの調製を行い、磁性ビーズに固定化する点を検討しているところである。その後、糖鎖との相互作用相手の探索を行う予定である。

#### 4. 研究成果

(1)の目的を達成するために、培養細胞や組織を用いて、主要な全てのグリコサミノグリカン(CS, HS, HA)を2糖単位まで分解し、近年我々が開発した糖鎖を選択的に精製する手法(グライコプロッティング法)を用い、糖鎖を精製すると同時に糖鎖を蛍光ラベルする手法を確認した。

得られた蛍光ラベル化糖鎖を両イオン性クロマトグラフィー(ZIC-HILIC)の分離条件を種々検討した結果、CS, HS, HAすべての2糖単位を分離可能な分離条件を初めて確認した。

以上の結果から、従来煩雑かつ困難であった分析手法よりも優れた新規分析法を確認し、主要なグリコサミノグリカンであるコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸(HS)、ヒアルロン酸(HA)を分解する事で得られる二糖単位全てを、培養細胞や組織から簡便に精製し、サンプル精製から一斉分析まで迅速・簡便か

つ同時に定量的・定性的に分析可能な技術の確認に成功した。

次に(2)の目的を達成するために種々の培養細胞や組織に本法を適用する事で、 $1 \times 10^6$ 個程度の微量な培養細胞や組織から定量的・定性的なGAGプロファイルを得ることが出来る事を確認し、また細胞・組織特異的に糖鎖プロファイルが異なる事を見出した。

この結果から本法が細胞や組織の分類に有用な手法である事が示唆された。

さらに、本法を再生医療に用いられている自家口腔粘膜から人工培養した細胞シート試料に適用する事で、口腔粘膜幹細胞から分化する過程で糖鎖プロファイルに大きな変化が起こる事を確認し、細胞分化過程における細胞の品質の評価にも有用である事や、また細胞分化過程における糖鎖変化の生化学的意義に関する新しい知見を得ることができた。

また今後、再生医療などの細胞品質の評価法としても期待される技術を確認できたと考えている。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

武川 泰啓、Novel procedure for glycosaminoglycomics as a tool for molecular characterization of cellular state、第83回日本生化学会大会、2011年12月9日、神戸国際会議場(神戸)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: グリコサミノグリカンの新規な分析方法

発明者: 武川泰啓、篠原康郎、坂井秀昭

権利者: 株式会社セルシード・国立大学法人北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-258385

出願年月日: 2010年11月18日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

武川 泰啓 (TAKEGAWA YASUHIRO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・

特任助教  
研究者番号：60515071

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし