

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02617

研究課題名（和文）グライコプロテオミクスによる神経分化の分子基盤の解明と神経変性疾患マーカーの探索

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of neuronal differentiation and search for molecular markers of neurodegenerative diseases by glycoproteomics.

研究代表者

川崎 ナナ（Kawasaki, Nana）

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：20186167

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：糖鎖は様々な生命現象や疾患と関係があるが、グライコプロテオミクス技術や、ヒト神経モデルの入手に限界があり、糖鎖と神経分化や神経変性疾患との関係性には不明な点が多い。我々は、神経変性疾患の糖鎖診断マーカーの探索を目的に、グライコプロテオミクス技術の開発とiPS細胞由来神経の利用を検討している。本研究では、O-GlcNAcプロテオミクス技術を開発し、これをパーキンソン病モデル(PD)と組み合わせることで、PD関連OGlcNAc修飾の探索に利用できることを確認した。また、先にiPS細胞のN-型糖鎖プロテオミクスで見出した神経特異的BA2は、iPSCの神経軸索伸長に関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が開発しているグライコプロテオミクス手法は、微量の糖鎖修飾を定量解析できる利点がある。また、iPS細胞から作製した疾患モデルは、動物モデルでは解明できないヒト糖鎖の機能解析に適している。グライコプロテオミクス手法と、ヒト神経分化や神経変性疾患モデルを組み合わせた糖鎖研究アプローチは、これまで技術的な限界により明らかにできなかったヒト神経分化や神経変性疾患における糖鎖の役割を明らかにし、糖鎖診断マーカーおよび創薬ターゲットの特定につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Glycans are related to various biological phenomena and diseases, but there are limitations in the availability of glycoproteomic approaches and human neural models, and the role of glycans in neuronal differentiation and neurodegenerative diseases has remained unclear. We are investigating the development of glycoproteomic approaches and the use of iPS cell-derived nerves with the aim of searching for glycan diagnostic markers for neurodegenerative diseases. In this study, we developed an O-GlcNAc proteomic approach and combined it with a Parkinson's disease (PD) model and showed that it can be used to explore PD-related OGlcNAc modifications. We also showed that nerve-specific BA2, which was previously found in N-linked glycoproteomics of iPSCs, is involved in neuroaxonal elongation in iPSCs.

研究分野：グライコプロテオミクス

キーワード：グライコプロテオミクス iPS細胞 神経分化 神経変性疾患 糖鎖 データ非依存的数据取得 LC/MS S/MS O-GlcNAc

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は発生、分化、再生、疾患など様々な生命現象に係わっている。糖鎖修飾により生じる微細な構造変化は、細胞間の接着やシグナル伝達の調節など、重要な働きを担っている。神経系においても、糖鎖は神経分化や神経変性疾患に関与していると考えられている。高齢化に伴い、アルツハイマー病やパーキンソン病 (PD) など神経変性疾患の診断法や治療法の開発が求められる中、糖鎖は新たな診断・創薬ターゲットとして期待されている。しかし、タンパク質の糖鎖修飾を網羅的かつ定量的に解析するためのグライコプロテオミクス技術、およびヒト神経分化や神経変性疾患を再現するモデルの入手に限界があり、神経分化や神経変性疾患と関係のある糖鎖の構造やその機能については不明な点が多く残されてきた。

## 2. 研究の目的

我々は、ヒト神経分化や神経変性疾患に関わる糖鎖の構造やその機能を明らかにし、神経変性疾患の診断・創薬ターゲットの特定につなげることを目的として、グライコプロテオミクス技術の開発とヒト神経モデルへの応用を行っている。本研究では、以下の3つを目標とした。

### (1) O-GlcNAc プロテオミクス技術の開発

O-型糖鎖の一種である O-GlcNAc 修飾は、脳神経系のタンパク質によく見られることから、神経分化や神経変性疾患との関係が指摘されている。しかし、O-GlcNAc 修飾は微量であることが多く、網羅的かつ定量的な解析は容易ではなかった。そこで、近年、網羅性と定量性に優れていることからプロテオミクス分野で注目が集まっているデータ非依存性取得質量分析法 (DIA-MS) を用いることにより、O-GlcNAc 修飾を網羅的かつ定量的に解析できる O-GlcNAc プロテオミクス技術の開発を目指す。

### (2) ヒト神経および神経変性疾患モデルの作製

近年、iPS 細胞 (iPSC) が神経分化のモデルとして利用されている。また、iPSC のゲノム編集により、様々な疾患モデルを作製することが可能になった。そこで、iPSC から神経細胞を誘導し、糖鎖の機能解析に利用する。また、PD との関連性が知られているタンパク質の遺伝子変異の導入により PD モデルを作製する。

### (3) 糖鎖と神経分化の関係の解明

我々は先行研究 (平成 30 年 ~ 令和 2 年) において N-型糖鎖プロテオミクスを実施し、ヒト iPSC の神経分化に伴って、マウス・ラット脳特異的糖鎖として知られている BA2 糖鎖 (バイセクトフコシル 2 本鎖) が増加すること、BA2 は成長円錐に存在する軸索ガイダンス関連分子やシナプス接着因子に選択的に付加されていることを見出している<sup>1)</sup>。本研究では、BA2 合成に必須の GlcNAc 転移酵素 III (Beta-1,4-Mannosyl-Glycoprotein 4-beta-N-Acetylglucosaminyltransferase, GnT3; 遺伝子名: MGAT3) のノックダウン実験 (KD) により、神経分化における BA2 の役割を明らかにする。また、PD モデルの O-GlcNAc プロテオミクスにより、PD 特異的な糖鎖修飾を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) O-GlcNAc プロテオミクス手法の開発

翻訳後修飾 DIA-MS に必要なスペクトルライブラリの構築とライブラリ検索には、解析ソフト Skyline を用いた。また、O-GlcNAc スペクトルライブラリに格納する O-GlcNAc ペプチドのマススペクトルデータは、iPSC の溶解物から小麦胚芽レクチン (WGA) を用いて濃縮した O-GlcNAc 修飾タンパク質をトリプシンで消化し、データ依存的質量分析法 (DDA-MS) で測定することで取得した。

### (2) ヒト神経および神経変性疾患モデルの作製

iPSC を Chambers らの方法 (Nature Biotechnology, 2009) を用いて神経に分化した。また、PD 家族性変異として知られる Leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2) の G2019S 変異をゲノム編集により iPSC に導入して作製した PD の神経前駆細胞と、変異を導入していないコントロール細胞を購入した。それぞれを神経細胞に分化させ、細胞免疫染色で神経分化を確認した。

### (3) 糖鎖と神経分化の関係の解明

iPSC 細胞の神経分化 7 日目以降に、BA2 糖鎖合成に不可欠な MGAT3 の siRNA を導入した。神経分化を継続し、分化 21 日目に、MGAT3-KD 細胞とコントロール細胞で細胞数や軸索の形状を比較した。研究方法(1) で作成したスペクトルライブラリ、DIA-MS、および Skyline を用いて、PD モデルとコントロールの O-GlcNAc プロテオミクスを行い、ピーク面積を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 定量グライコプロテオミクス手法の開発

O-GlcNAc 修飾ペプチドのライブラリ構築を目的に、ヒト iPSC (201B7 株) の細胞溶解液から全タンパク質を回収し、還元アルキル化後に N-型糖鎖とシアル酸を除去した。エタノール沈殿でタンパク質を回収し、ビオチン化 WGA を用いて O-GlcNAc タンパク質を濃縮した。脱塩後、LC/MS/MS に供し、DDA-MS でスペクトルを取得した。解析アルゴリズム Byonic と目視確認から複数の O-GlcNAc ペプチドを同定した。これらの LC/MS/MS データを解析ソフト Skyline 上のライブラリへ収載することで、DIA-MS 用のスペクトルライブラリを試作できた。

### (2) ヒト神経および神経変性疾患モデルの作製

iPSC を神経幹細胞、神経前駆細胞、神経細胞に分化させ、SSEA4, Nestin, Tuj-1 等に陽性であることを確認した。つぎに、PD 家族性変異として知られる LRRK2 の G2019S 変異を iPSC に導入して作製された PD 神経前駆細胞と、変異を導入していないコントロール神経前駆細胞を神経細胞へ分化させ、軸索が形成されること、および Tuj-1 陽性であることを確認した。

### (3) 糖鎖と神経分化の関係の解明

iPSC の神経分化過程において、MGAT3-siRNA を用いて MGAT3 を KD し、神経分化における BA2 の影響を調べたところ、MGAT3-KD 細胞ではコントロールと比較して、軸索がまっすぐに伸長せず、ネットワークが適切に形成されていない様子が観察された。このことから、BA2 は神経ネットワーク形成に関与していることが示唆された。今後、MGAT-3 KD 細胞のプロテオミクスと Pathway 解析等により、BA2 の役割を明らかにしたいと考えている。

PD モデルおよびコントロール細胞を溶解後トリプシン消化し、WGA による糖ペプチドの濃縮過程を省略して、DIA-MS を実施した。Skyline と(1) で構築したスペクトルライブラリを用いたライブラリサーチの結果、O-GlcNAc ペプチドとして、既知の HCF1 や BPTF など複数の O-GlcNAc ペプチドを同定することができた。また、試料注入量を変更したときの直線性を確認できた。PD モデルとコントロールを比較することで、一部の O-GlcNAc 修飾の程度に差があることが示唆された。今後は、神経細胞から O-GlcNAc ペプチドを濃縮することでライブラリを拡張すること、また、PD モデル細胞株を増やすことにより、PD に特異的な O-GlcNAc 修飾タンパク質を明らかにすることを計画している。

## まとめ

定量グライコプロテオミクス手法の一つとして、DIA-MS とスペクトルライブラリを用いた定量 O-GlcNAc プロテオミクス手法を開発した。また、iPSC からヒト神経細胞および神経変性疾患の一つである PD のモデルを作製した。まず、iPCS 由来ヒト神経細胞を用いて、先行研究で見出した神経特異的 BA2 糖鎖の合成に必須の MGAT3 を siRNA により発現抑制することで、BA2 は軸索形成に関与している可能性が示された。また、O-GlcNAc プロテオミクスは、O-GlcNAc 修飾タンパク質の探索に利用できることが確認された。今後、同定されたタンパク質や、O-GlcNAc 転移酵素の発現抑制実験により、PD と O-GlcNAc との関係性を明らかにし、診断マーカーや創薬ターゲットの開発につなげていきたいと考えている。

## <引用文献>

- 1) Kazumasa Kimura, Takumi Koizumi, Takaya Urasawa, Yuki Ohta, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki: Glycoproteomic analysis of the changes in protein N-glycosylation during neuronal differentiation in human-induced pluripotent stem cells and derived neuronal cells. *Sci. Rep.* (2021) 11:11169. doi.org/10.1038/s41598-021-90102-z

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Urasawa Takaya, Koizumi Takumi, Kimura Kazumasa, Ohta Yuki, Kawasaki Nana	4. 巻 22
2. 論文標題 Quantitative Proteomics for the Development and Manufacturing of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells Using Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 1843 ~ 1854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.2c00841	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 -

1. 著者名 Kazumasa Kimura, Takumi Koizumi, Takaya Urasawa, Yuki Ohta, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Glycoproteomic analysis of the changes in protein N-glycosylation during neuronal differentiation in human-induced pluripotent stem cells and derived neuronal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 11169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90102-z	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13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河内悠華子、西村梨香、川崎ナナ
2. 発表標題 細胞外マトリクスの違いが内胚葉分化におよぼす影響の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松嶋 華子、西村 梨香、浦澤 貴哉、川崎 ナナ
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の神経分化過程における糖転移酵素GnT- の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村梨香、浦澤貴哉、松嶋華子、河内悠華子、川崎ナナ
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の神経及び心筋細胞分化における糖鎖の機能解明を目指した糖鎖関連酵素の網羅的解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浦澤貴哉、西村梨香、小泉匠、木村一雅、太田悠葵、川崎ナナ
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の超網羅的定量プロテオミクスと分化制御因子の同定
3. 学会等名 第12回レギュラトリーサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浦澤貴哉、小泉匠、木村一雅、太田悠葵、川崎ナナ
2. 発表標題 DIA-MSを用いた定量プロテオミクスによるヒトiPS細胞の分化制御因子の探索
3. 学会等名 日本プロテオーム学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村梨香、松嶋華子、浦澤貴哉、川崎ナナ
2. 発表標題 DIA-MSによる幹細胞の神経分化における糖鎖合成酵素の時間的プロファイリング
3. 学会等名 日本プロテオーム学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浦澤貴哉、小泉匠、木村一雅、太田悠葵、川崎ナナ
2. 発表標題 データ非依存的取得法を用いた定量プロテオミクスによるヒト人工多能性幹細胞の神経幹細胞分化制御機構の解明
3. 学会等名 第70回日本質量分析総合討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村梨香、浦澤貴哉、小泉匠、川崎ナナ
2. 発表標題 ヒト人工多能性幹細胞を用いた超網羅的タンパク質分析法の開発と糖転移酵素変動解析への応用
3. 学会等名 第70回日本質量分析総合討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川崎ナナ
2. 発表標題 グライコプロテオミクスとモダリティ開発
3. 学会等名 臨床プロテオゲノミクス学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村梨香、浦澤貴哉、小泉匠、川崎ナナ
2. 発表標題 iPS細胞を用いた超網羅的タンパク質分析法の開発と糖転移酵素解析への応用
3. 学会等名 GlycoTOKYO
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦澤貴哉、小泉匠、木村一雅、太田悠葵、川崎、ナナ
2. 発表標題 DIA-MSによるヒトiPS細胞由来神経幹細胞の定量プロテオーム解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦澤貴哉、小泉匠、木村一雅、太田悠葵、川崎ナナ
2. 発表標題 ヒトiPS細胞神経分化初期の定量プロテオーム解析
3. 学会等名 第69回日本質量分析学会総合討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村一雅、浦澤貴哉、小泉匠、高倉大輔、太田悠葵、川崎ナナ
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の神経分化に伴う糖タンパク質合成とN型糖鎖修飾の変化の解析
3. 学会等名 第69回日本質量分析学会総合討論会
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
研究 分担 者	大橋 祥子  (Shoko Ohashi)  (00908709)	横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助手   (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	高倉 大輔  (Daisuke Takakura)  (90760231)	横浜市立大学・生命医科学研究科・特任教員    (22701)	

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