

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550185

研究課題名(和文)糖脂質メタボローム解析による細胞のフェノタイピングに関する研究

研究課題名(英文)Phenotyping of cell through the glycolipid metabolic analysis

研究代表者

藤谷 直樹 (FUJITANI, Naoki)

北海道大学・先端生命科学研究所(研究院)・特任助教

研究者番号：10374191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：あらゆる細胞において普遍的に発現しているスフィンゴ糖脂質の網羅的かつ定量的な構造解析を行うことによって、細胞のプロファイリングを行った。糖脂質は代表的な二次代謝産物であり、その網羅的な解析は細胞の状態を端的に示すものである。定量構造解析は主に質量分析法を用いて行った。スフィンゴ糖脂質の分子量分布を単純化させるため(構造多様性の排除)、酵素的に脂質部分のセラミド鎖を効率よく切断する系を構築し、糖鎖のみの解析を行った。その結果、各細胞のスフィンゴ糖脂質の構造と発現量は細胞特異的であり、定量データの統計的解析は細胞を効率よく分類・表現することを可能にすることを示した。

研究成果の概要(英文)：Characterization of cells was performed by the comprehensive and quantitative analyses of glycosphingolipids which are ubiquitously expressed in all kinds of cell. Since glycolipids are the representative of secondary metabolites, the comprehensive analysis is intended to indicate briefly the state of the cell. Quantitative structural analyses were performed using mass spectrometry. In order to simplify the distribution of molecular masses of glycosphingolipids (elimination of structural diversities), enzymatic reaction system to digest efficiently of ceramide moieties in glycosphingolipids was established, enabling to analyze the glycan parts only. As a result, the expression level and structure of glycosphingolipids of each cell is highly cell-specific, and statistical analysis of the quantitative data showed that it makes it possible to classify and delineate the cells efficiently.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：糖脂質 質量分析 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスに代表される、遺伝子やタンパク質の生体分子の網羅的な解析である「オミクス研究」により様々な生命現象を明らかにし、さらには疾患メカニズムの解明や創薬研究へ応用がなされている。

(2) 細胞が有する分子の全てを定量的に構造決定・構造解析することは、細胞そのものを定義することと同義であると考えられる。生体分子の中でも特に代謝産物の網羅的かつ定量的な構造解析(メタボロミクス)は、細胞を特徴付けるとともに、細胞の恒常性を動的に追跡できる点で非常に有用である。しかし、現状ではすべての分子種を定量的に構造解析する手法は整っていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、質量分析法と核磁気共鳴法を用いて、代表的な二次代謝産物である糖脂質の効率的な構造解析法の確立を第一の目的とした。糖脂質は主要な細胞膜の構成成分の1つであり、全ての細胞が有している分子である。糖脂質は疎水性である脂質と親水性である糖鎖からなる両親媒性分子であることから、本技術の確立は、一般に定量化することが難しい場合が多い他の疎水性代謝産物の解析にも応用できると期待される。

(2) 糖脂質はあらゆる細胞に発現し、その構造と各々の発現量は細胞によって特異的であると考えられるため、糖脂質の定量的な構造解析を通して、細胞種を分類・定義することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞から代表的な糖脂質であるスフィンゴ糖脂質を超音波下においてクロロホルム/メタノールの混合溶媒により抽出した。

(2) スフィンゴ糖脂質の構造多様性を排除するため(後の質量分析において得られるスペクトルを単純化するため)糖鎖部分と脂質(セラミド部分)を放線菌ロドコッカス属由来のエンドグリコセラミダーゼ I、II (EGCase I, II)により切断した。2種のサブタイプが互いの基質特異性の違いをカバーする反応条件を決定した結果に基づき(後述)互いに25mUの混合酵素液を用いて37、24時間の反応を行った。

(3) 上記反応に用いるため、EGCase I をリゾチーム感受性の高いロドコッカス属の放線菌を宿主として、大量発現を行った。

(4) スフィンゴ糖脂質から切断された糖鎖をグライコプロッティング法により精製し、質量分析(MALDI-TOF MS)によって、定量的に構造解析を行った。

(5) 上記の方法を用いて、ヒト由来ガン細胞・胚性腫瘍細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、マウス繊維芽細胞等、計11種類の細胞のスフィンゴ糖脂質の定量的構造解析を達成し、各細胞のプロファイリングに成功した。

(6) 他の複合糖質糖鎖(N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖、グリコサミノグリカン、遊離糖)と同時に質量分析とクロマトグラフィを用いて定量的構造解析を行い、ヒト幹細胞(ES細胞、iPS細胞)を含む計18種類の細胞を分類した。

(7) N-結合型糖鎖の前駆体であるドリコールリン酸結合糖鎖(LL0)を定量的に構造解析するために、超遠心法によってLL0を細胞から分離し、得られたLL0からテトラヒドロフラン(THF)中の酸加水分解により糖鎖を遊離させ、同様にグライコプロッティング法と質量分析法により精製、解析を行った。

4. 研究成果

(1) 約 2×10^5 個の細胞からなる培養細胞ペレットを、組成の異なるクロロホルム/メタノール混合溶媒(体積比で2:1, 1:1, 1:2)中で順次超音波で破碎し、上清を回収することで、スフィンゴ糖脂質を最も効率よく簡便に回収する系を確立した。

(2) 質量分析法によってスフィンゴ糖脂質を定量的に構造解析する際、脂肪鎖であるセラミドの構造多様性が、検出シグナルを複雑化させ、正確な定量の妨げになる。そのため、糖鎖部分を選択的に切断し、糖鎖の構造解析によってスフィンゴ糖脂質の定量を達成することとした。

既報に従いアルカリ条件下での切断を試みたが、細胞が 1×10^6 個以上必要であることが明らかになり、貴重な細胞を解析する上でさらなる高感度化が必要であると考えられたため、ロドコッカス属由来のエンドグリコセラミダーゼ I, II (EGCase I, II)による酵素消化を試みた。EGCase II は市販のものを使用し、EGCase I は放線菌を用いた大量発現により得た。宿主外に分泌させて回収するプロトコルが既知であるが、本研究では菌体内からより効率よく大量に回収する系を確立することに成功した。

EGCase II はスフィンゴ糖脂質のグロボ系列の切断効率が著しく低い、ガングリオンド系列の消化が早くラクト系列の消化効率も良い。一方EGCase I はグロボ系列を高効率で切断することが明らかになっている。本研究では、これらの基質特異性を互いに補完し、可能な限りのスフィンゴ糖脂質を消化できる系を確立した。その結果、 2×10^5 個の細胞由来のスフィンゴ糖脂質に対し、各酵素を25mUずつ混合することで最大回収量を得ることに成功した(図1)。

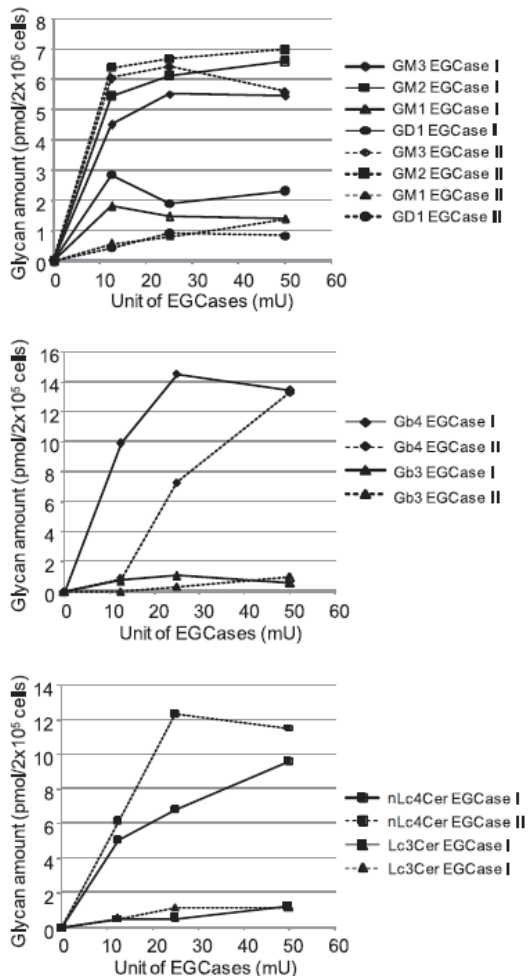


図1：スフィンゴ糖脂質の各クラス(ガングリオ系列(上段) グロボ系列(中段) ラクト系列(下段))のEGCaseを用いた糖鎖切断効率の最適化。

(3) スフィンゴ糖脂質から切断された糖鎖はグリコプロットング法によって精製し、質量分析法(MALDI-TOF MS)によって検出した。定量はイオン化の効率が同等である内部標準試料シグナルと糖鎖シグナルの面積比の計算によって行った。代表的な質量分析スペクトルを図2に示す。

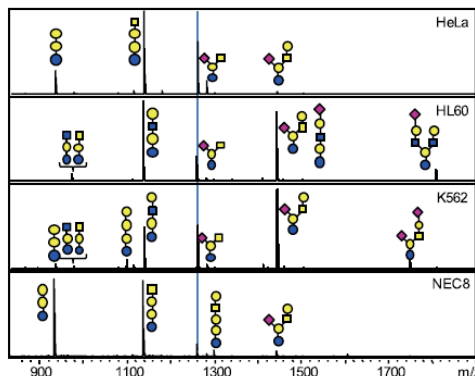


図2：HeLa細胞、白血病細胞HL60とK562、胚性腫瘍細胞NEC8のスフィンゴ糖脂質糖鎖のMALDI-TOF MSスペクトル。青丸、黄丸、青四角、黄色四角、紫菱はそれぞれグルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸を示し、青線は内部標準を示す。

また糖鎖の定量値を用いた階層型クラスター解析によって11種類の細胞(チャイニーズハムスター卵巣由来3種、マウス由来4種、ヒト由来4種)の分類を試みた(図3)。その結果、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞群(CH0-K1, Lec1, Lec8)が近縁にクラスター化され、浮遊細胞であるヒト白血病細胞HL60とK562も同様に近縁にクラスター化された。マウス由来の繊維芽細胞NIH/3T3と同じくマウス由来の胚性腫瘍細胞PCC3/A1とP19C6も比較的近縁に分類されている。またマウス由来胚性腫瘍細胞F9とヒト由来の胚性腫瘍細胞NEC8が似た細胞として分類された。スフィンゴ糖脂質糖鎖の定量的構造解析は細胞を分類・定義するために有用な方法であることを実証した。

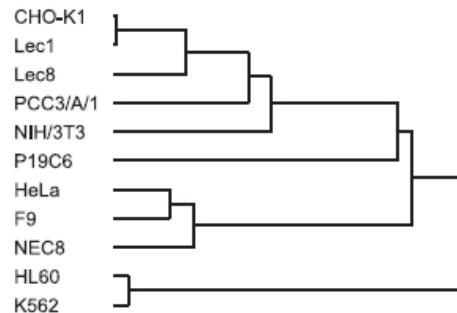


図3：スフィンゴ糖脂質糖鎖の定量値を用いた、各細胞の階層型クラスター解析。

(4) ここまで得られた手法を用い、ES細胞、iPS細胞に代表される未分化細胞を含む計18種類のヒト由来細胞の分類を試みた。図4に臍帯由来のヒトiPS細胞のスフィンゴ糖脂質糖鎖の定量結果を示す。iPS細胞やES細胞の未分化細胞はグロボ系列が最もよく発現しているクラスであり、代表的な未分化細胞マーカーであるSSEA-3と-4の前駆体であるGb4が最も主要な成分であることが明らかになった。また、ラクト系列も他の細胞より多く発現しており、逆にガングリオ系列はその発現が抑制されていることも明らかとなった。

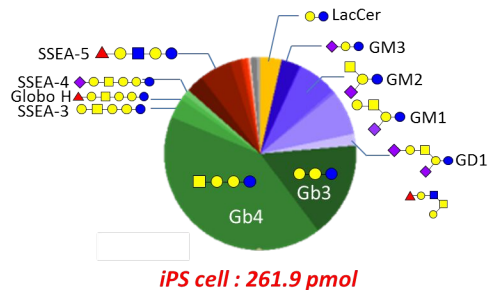
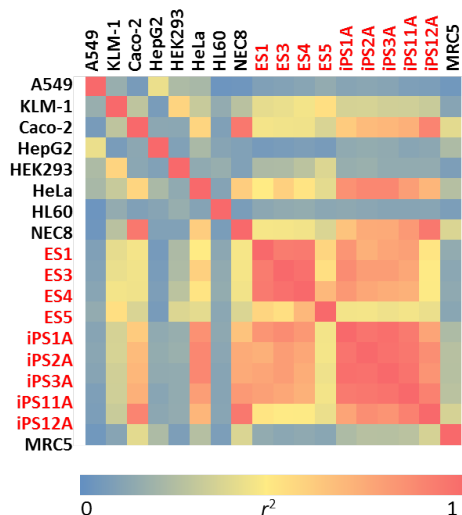


図4：臍帯由来ヒトiPS細胞のスフィンゴ糖脂質糖鎖のプロファイル。絶対量は細胞の総タンパク質100 μ g当たりの糖鎖量を示す。青系はガングリオ系列、緑系はグロボ系列、赤系はラクト系列のスフィンゴ糖脂質を示す。SSEA-3、-4、-5やgloboHなど代表的な未分化細胞マーカーも良好に観測された。赤三角はフコースを示し、他の糖構造の凡例は図2に準じる。

他の複合糖質糖鎖（N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖、グリコサミノグリカン、遊離糖）と共に絶対定量解析を行い、全ての定量値を用いて未分化細胞と非未分化細胞を明確に分類することに成功した。その中で、スフィンゴ糖脂質糖鎖が最も細胞を区別するために寄与していることも明らかになった。このことは、細胞内複合糖質の中でスフィンゴ糖脂質が最も細胞種に特徴的であることを示している。各細胞におけるスフィンゴ糖脂質糖鎖構造とその発現量を用いた、細胞間の相関係数による分類結果を図5に示す。

図5：スフィンゴ糖脂質糖鎖の構造と発現量を用いた



細胞間の相関係数解析。赤で示されるほど「似ている」ことを示し、幹細胞と非幹細胞が明確に区別されている。

(5) 細胞内の糖脂質の1つとしてドリコールリン酸結合糖鎖の糖鎖構造解析も行った。ドリコールリン酸結合糖鎖はN-結合型糖鎖の前駆体であり、極めて微量であることが知られているが、本研究では超遠心分離による回収方法とテトラヒドロフラン中での0.1N塩酸による酸加水分解の方法を確立した。回収された糖鎖を質量分析法により定量化することに成功し、N-結合型糖鎖とその分解物である遊離糖の定量結果と合わせて、細胞内におけるN-結合型糖鎖合成・分解の恒常性を定量化することを行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Fujitani, N., Furukawa, J. (他10名). Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110, 2105-2110 (2013) 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1214233110

Furukawa, J., Fujitani, N. (他1名). Recent advances in cellular glycomics

analysis.

Biomolecules, 3, 198-225 (2013) 査読有 DOI:10.3390/biom3010198

Fujitani, N., Takegawa, Y. (他7名). Qualitative and Quantitative Cellular Glycomics of Glycosphingolipids Based on Rhodococcal Endoglycosylceramidase-assisted Glycan Cleavage, Glycoblotting-assisted Sample Preparation, and Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Tandem Time-of-flight Mass Spectrometry Analysis.

Journal of Biological Chemistry, 286, 41669-41679 (2011) 査読有 DOI:10.1074/jbc.M111.301796

〔学会発表〕(計3件)

藤谷直樹、古川潤一(他5名) 総合的な複合糖質糖鎖プロファイリングによる細胞の分類とバイオマーカー探索。第31回日本糖質学会年会、2012年9月17~20日、鹿児島市民文化ホール(鹿児島市)

藤谷直樹、石橋洋平(他6名) スフィンゴ糖脂質のグライコミクスによる細胞の解析・定義。第4回セラミド研究会、2011年10月27~28日、北海道大学学術交流会館(札幌市)

藤谷直樹、荒木香代(他3名) スフィンゴ糖脂質のグライコミクスによる細胞の解析・定義。第84回日本生化学会大会、2011年9月21~24日、京都国際会議場(京都市)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: Method for selecting pluripotent stem cell

発明者: Shinohara, T., Furukawa, J., Fujitani, N., Araki, K., Nakamura, Y.

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/078651

出願年月日: 2012年11月5日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤谷直樹(FUJITANI, Naoki)

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: 10374191