

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659108

研究課題名（和文）ヘパリンプロテオグリカン（セルグライシン）の生合成

研究課題名（英文）Biosynthesis of heparin proteoglycan (serglycin)

研究代表者

柳下 正樹 (YANAGISHITA MASAKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70132793

研究成果の概要（和文）：ヘパリンは抗血液凝固作用を持つ生物学的製剤として、心肺手術、血液透析療法や、各種血栓症における抗血液凝固療法に広く使用されている。一方、ヘパリンの生合成過程、とくにゴルジ装置で合成された糖鎖が完成された分子として分泌顆粒に貯蔵される過程に関しては不明な点が多く、これが解明されれば抗血液凝固療法の新たな展開が可能となる。今回の研究では詳細な解析に必要な細胞培養系の条件設定が完成せず、最終結論には到達しなかったが、この過程におけるヘパラーゼの役割、新規生成された糖鎖非還元末端の特殊機能に関する所見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Heparin is a biological product having anticoagulant activity. It is widely used in heart-lung surgeries, hemodialysis, and in the treatment of arterial/venous thromboses. Biosynthetic processes involved in the processing of heparin, especially that of carbohydrate chains after completion in Golgi until the storage of the final products in secretion granules, have not been elucidated. The current research attempted to analyze this processes in detail, and has reached a conclusion that the “heparanase” is the key enzyme in this process and the newly generated non-reducing ends of heparin chains were suggested to have specific functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分化・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：血液凝固・レオロジー

1. 研究開始当初の背景

ヘパリンは広く医学領域で使用されているにもかかわらず、その主な使用はヘパリンの持つ血液抗凝固作用という薬理的な作用

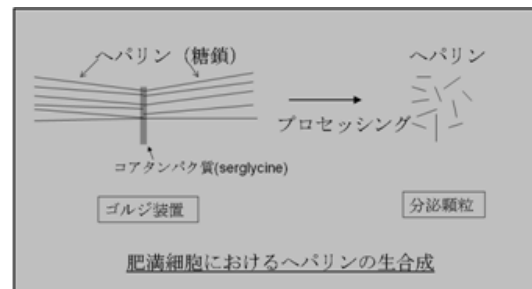
に基づくものである。またヘパリンは多岐にわたる細胞機能調節作用を持っているため、確かな病態での医療応用が困難であった。ヘ

パリンの生物学的作用の全体像を解析的に把握することができれば、ヘパリンの医療応用範囲は大きく拡大することが期待できる。これにはヘパリンが生体内でどのような生理的役割を担っているのかを詳細に理解することが重要な鍵となることが考えられる。ヘパリンの分子構造、血液抗凝固作用に関わる化学修飾（特定糖残基の硫酸化配列をはじめとした糖鎖修飾）、血液凝固関連タンパク質との分子間相互作用(Antithrombin III との分子間相互作用)などに関してはすでに詳細な情報が得られているが、生合成過程とその調節に関してはほとんど情報が欠如している。生合成過程とその生物学的調節機構を解析することはヘパリンの持つ本来の生物学的機能を明らかにするうえで重要な情報を提供するものと考えられる。実際、いくつかの世界でも優れた研究者グループがこの問題に取り組んだが現在まで成功に至っていない。近年、ヘパリン生合成、化学修飾に関わるタンパク質群の分子クローニングが進み、またこれらタンパク質の遺伝子ノックアウト実験動物の作成など従来可能でなかったいくつかの実験計画が可能となってきた。

2. 研究の目的

①ヘパリンは生物化学的にはグライコサミノグリカンと呼ばれる構造を持ち-(GlcUA-GlcNAc)_n-の糖鎖構造であらわされる (n は繰り返し、一部の GlcUA はエピマー化され IdoUA として存在、IdoUA および GlcNAc が種々の程度に硫酸化を受けている)。動物では肥満細胞の合成するプロテオグリカン (セルグライシン) の糖鎖成分としてゴルジ装置で生合成される (下図)。合成直後のヘパリン糖鎖は約 80-100 kDa 分子量を持っているが、さらにプロセスされ 5-7 kDa 分子量の遊離糖鎖として分泌顆粒内に貯蔵され脱顆粒刺激を受けて放出される。

分泌顆粒内では塩基性タンパク質、アミンなどと結合しこれらの物質の活性調節、安定性に寄与していると考えられている。一方ヘパ



リンは 1916 年に血液抗凝固作用を持つ多糖/生理活性物質として発見され、以来、現在では人工心肺、血液透析など体外循環を必要とする外科的処置、血栓症、血管内凝固症候群の予防・治療など広範な医療領域で使用されている。近年にはヘパリンの持つ多岐にわたる細胞機能に対する作用、たとえば冠動脈修復後の血管内皮細胞増殖/血管閉塞抑制作用などが注目され医療応用範囲が拡大している。しかしながらヘパリンの生合成調節/プロセッシング機構には不明な点が多く、またヘパリン本来の生物学的機能に関しても不明な点が多い。申請者は近縁分子であるヘパラン硫酸プロテオグリカンの生合成調節機構の解析を長年にわたり行ってきた。それらの研究方法を応用/発展させヘパリンの生合成過程の詳細、生物学的機能の解析にチャレンジした。

②本研究期間内に特に合成直後約 80-100 kDa のヘパリン糖鎖を持つプロテオグリカンが、プロセスを受け 5-7 kDa 分子量の遊離糖鎖として分泌顆粒内に貯蔵される酵素分解過程と細胞内輸送に焦点を当てて解析を行い、この過程にかかわる酵素反応及びその調節機構について研究した。

3. 研究の方法

ヘパリンプロテオグリカン-プロセッシングの生化学的「可視化」:Native (生合成直後)プロテオグリカンの同定:(マウスおよび

ヒト由来) 肥満細胞培養系を用いヘパリンプロテオグリカンの放射能代謝標識実験を行う。標識時間を短縮し、標識されるプロテオグリカンの分子量の変化をゲル濾過クロマトグラフィーにて分析し、**native** なヘパリンプロテオグリカンと考えられる分子を得る。プロテオグリカンのアルカリ処理、亜硝酸分解パターン、ヘパリネース/ヘパリチネース分解パターンのゲル濾過クロマトグラフィー法を用いた分析でヘパリン糖鎖の化学的性質を分析する。

貯蔵型 (プロセッシングを受けた) ヘパリン

糖鎖の同定: 肥満細胞培養系を用いたプロテオグリカンの放射能代謝標識実験でパルス/チェイス実験を行い、貯蔵型の (プロセッシングを受けた最終産物) ヘパリン糖鎖を同定する。またあらかじめ放射能代謝標識した肥満細胞培養に脱顆粒刺激を加え、貯蔵顆粒中のヘパリン糖鎖を細胞外に放出させる。これらのヘパリン糖鎖をアルカリ処理、亜硝酸分解パターン、ヘパリネース/ヘパリチネース分解パターンのゲル濾過クロマトグラフィー法などを用いてヘパリン糖鎖の化学的性質を分析する。この肥満細胞を用いた培養系で放射能代謝標識/パルス/チェイス実験を用いてヘパリンプロテオグリカンプロセッシングの生化学的「可視化」が達成される。

ヘパリンプロテオグリカン-プロセッシングを行う酵素の同定:

合成直後のプロテオグリカンは約 80-100 kDa のヘパリン糖鎖を持ち、プロセスを受けた後 5-7 kDa 分子量の遊離糖鎖として分泌顆粒内に貯蔵されることが観察されている。これまでの予備実験から、このプロセッシングには **endo** 型の糖鎖分解酵素 (β -グルクロニダーズの一種) が関与していることが示唆されている。これを確認するために分泌顆粒内貯蔵型ヘパリンの還元末端分析を行い、プロセッシングに関与す

る酵素・化学反応を決定する。この情報をもとに肥満細胞培養系を用いて、 β -グルクロニダーズ遺伝子のノックダウン実験を行い放射能代謝標識/パルス/チェイス実験でヘパリンプロテオグリカン-プロセッシングの抑制を確認する。

ヘパリンプロテオグリカンの細胞内局在

肥満細胞培養系におけるヘパリンプロテオグリカンの細胞内局在をコアタンパク質の N 末端、C 末端に対する特異的蛍光標識抗体を用いて解析する。またセルグライシン-GFP キメラタンパク質強制発現のための cDNA コンストラクトを調製、トランスフェクション/強制発現実験を行い特異的抗体を用いた内在性ヘパリンプロテオグリカンの細胞内局在と比較対照する。 β -グルクロニダーズ遺伝子のノックダウン実験を適応してヘパリンプロテオグリカンの細胞内輸送、細胞内局在にどのような変化が生ずるか解析する。さらに細胞内輸送の阻害剤 (**brefeldin A, wortmannin, bafilomycin, chloroquin** など) 処理後のヘパリンプロテオグリカン細胞内局在を解析し、放射能代謝標識/パルス/チェイス実験との対照を行い、ヘパリンの細胞内輸送機構について解析する。

ヘパリン特異的 **endo- β** -グルクロニダーズ

(ヘパラネース) ノックアウトマウスを用いたヘパリンプロテオグリカン-プロセ

ッシングの分析: パラネースノックアウトマウスから肥満細胞を調製し、放射能代謝標識/パルス/チェイス実験でヘパリンプロテオグリカンの生合成、プロセッシング過程を解析する。また肥満細胞の詳細な形態学的解析を行い、ヘパリンプロテオグリカン-プロセッシングの異常が肥満細胞にどのような形態学的異常 (たとえば細胞内輸送の異常、分泌顆粒成熟の障害、脱顆

粒刺激に対する反応性の変化など) を解析する。

4. 研究成果

肥満細胞の初代培養系確立：へパリン糖鎖プロセスの詳細を解析するためには安定したへパリン合成機能の表現形を維持できる細胞培養系の確立が必須である。これまでに報告されている肥満細胞初代培養法を試みたが、獲得される細胞純度が問題となった。各種の細胞調製法を組み合わせ細胞の純度を上げると代謝実験に必要な細胞数を得ることが困難であった。また調製できた細胞培養は培養時間とともに脱分化傾向を示し、へパリン合成が減少し過硫酸化コンドロイチン硫酸への転換が見られた。これら点に関しては本研究期間中に最適な細胞培養条件を確立するに至らず、継続して細胞培養条件の最適化が必要である。これまでに得られた結果からは、へパリン糖鎖の断片化にヘパラーゼ酵素の関与が強く示唆されている。

(成熟) へパリン糖鎖の非還元末端分析：ヘパラーゼ酵素の分解基質構造特異性から成熟へパリン糖鎖の非還元末端構造には硫酸化度の高い糖鎖構造の存在することが推論できる。本研究期間中ボストン大学の糖鎖質量分析グループからへパリン糖鎖非還元末端に硫酸度の高い3糖構造が存在することの報告があり、このグループとこのような構造をもつへパリン糖鎖の生物学的意義解析に関する議論を行った。腎臓細胞培養系において、細胞増殖に特定へパリン3糖構造が大きな役割を持つことを発見し、その同定を進めている。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Sachiko Takehara, Masaki Yanagishita,

Katarzyna Anna Podyma-Inoue and Yoko

Kawaguchi, Degradation of MUC7 and MUC5B in Human Saliva, PLOS ONE, (2013) in press

2. Miki Hara-Yokoyama, Kazue Terasawa, Shizuko Ichinose, Akihiko Watanabe, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Kazunari Akiyoshi, Yasuyuki Igarashi and Masaki Yanagishita, Bioorganic & Medicinal Chemistry letter (2013) in press

3. Miki Hara-Yokoyama, Mutsuko Kukimoto-Niino, Kazue Terasawa, Satoru Harumiya, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Nobumasa Hino, Kensaku Sakamoto, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yoko Hiruta, Nana Kawasaki, Chiemi Mishima-Tsumagari, Yoko Kaitsu, Tomoko Matsumoto, Motoaki Wakiyama, Mikako Shirouzu, Takeshi Kasama, Hiroshi Takayanagi, Nakako Utsunomiya-Tate, Kiyoshi Takatsu, Toshiaki Katada, Yoshio Hirabayashi, Shigeyuki Yokoyama and Masaki Yanagishita, Structure 20, 1585-1595 (2012)

4. Bodil Fadnes, Anne Husbekk, Gunbjorg Sveing, Oystein Rekdal, Masaki Yanagishita, Svein O. Kolset and Lars Uhlin-Hansen, The proteoglycan repertoire of lymphoid cells, Glycoconjugate J. 29:513-523 (2012)

5. Katarzyna A. Podyma-Inoue, Miki Yokoyama, Tomoko Kimura and Masaki Yanagishita, Syndecans Reside in Sphingomyelin-enriched Low Density Fractions of the Plasma membrane Isolated from a Parathyroid Cell Line, PLOS ONE, 7:3 e32351 (2012).

6. N. Ebe, M. Hara-Yokoyama, K. Iwasaki, S. Iseki, K. Terasawa, K. A. Podyma-Inoue, M.

Yanagishita and Y. Izumi, Periodontal pockets as the pathological setting for HMGB1 release, J. Dental Res. (2011) 90:235-240

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Masaki Yanagishita, “Introduction, turnover and degradation of hyaluronan”, 2013 International Society for Hyaluronan Sciences Meeting, Oklahoma City, OK, USA, June 2-7, 2013
2. S. Takehara, M. Yanagishita, K. A. Podyma-Inoue, M. Ueno, K. Shinada and Y. Kawaguchi, Proteolytic Degradation of Human Salivary MUC5B and MUC7, Annual Meeting of International Association for Dental Research, March 16-19, 2012, San Diego
3. 柳下正樹、第 19 回プロテオグライカンフォーラム、「プロテオグライカン、ヒアルロン酸研究の最新トピックス」2012 年 2 月 11 日、東京医科歯科大学
4. Katarzyna A. Podyma-Inoue, Miki Yokoyama and Masaki Yanagishita, Association of heparan sulphate proteoglycan sith trypsin-accessible membrane domains, Gordon Research Conference on Poteoglycan, Andover, NH, USA, July 7-13, 2012
5. Privatananupunt Jutiporn, Watari Ippei, Podyma-Inoue Katarzyna A., Kubono Mariko, Hattori Ikuko, Honda Koji, Ishida Yuji, Yanagishita Masaki, and Ono Takashi, Expression of GIP and its receptor in the rat major salivary glands, 71st Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society, Morioka, September 26-28, 2012
6. Yokoyama Miki, Yokoyama Shigeyuki, Yanagishita Masaki, 「CD38 の触媒活性と

膜ドメイン局在化を両立させている細胞表面でのアセンブリの構造基盤」2011 日本免疫学会総会、2011 年 11 月 27-29 日幕張メッセ

7. 江部典子、横山三紀、寺澤和恵、柳下正樹、和泉雄一、酪酸による酸化ストレス誘導時に放出される HMGB1 の解析、日本歯科保存学会、2011 年 10 月 20-21 日、大阪
8. S. Takehara, M. Yanagishita, K. A. Podyma-Inoue, M. Ueno, K. Shinada and Y. Kawaguchi, Proteolytic Degradation of Human Salivary MUC5B and MUC7, Symposium “Toward networking dental professionals in Asia”, October 6, 2011, Tokyo
9. Katarzyna A. Inoue, Kimiya Norikiyo, Jorge L. Zaredo, Akira Masuda, Shuji Aou and Yasuhiro Kumei, Analysis of neurotransmitters/neuromodulators released under low gravity using microdialysis technique, 第 34 回日本神経科学会、2011 年 9 月 14-17 日、横浜
10. Katarzyna Inoue, “Life is not only wine and roses”? - climbing up Japanese social ladder, 第 84 回日本生化学会ランチョンワークショップ、2011 年 9 月 22 日、京都
11. Katarzyna A. Podyma-Inoue, Miki Yokoyama and Masaki Yanagishita, Characterization of Membrane Rafts Enriched in Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Isolated from a Rat Parathyroid Cell Line. 第 84 回日本生化学大会、2011 年 9 月 21 日 - 24 日、京都
12. 横山三紀、新野睦子、寺澤和恵、橋井則貴、蛭田葉子、川崎ナナ、脇山素明、白水美香子、横山茂之、柳下正樹、リンパ球表面抗原 CD38 の 4 量体化を反映した N 型糖鎖プロセッシング、第 30 回日本糖質学会、2011 年 7 月 11 - 13 日、長岡

13. 横山三紀、市野瀬志津子、市野瀬省三、
多田晃弘、寺澤和恵、吉垣純子、只野-有富桂
子、古川鋼一、柳下正樹、岩渕和久、GM2/GD2
合成酵素欠損マウスにおける血液-精巣関門
の異常、第84回日本生化学会、2011年9月
21-24日、京都

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
該当なし。

〔その他〕
該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳下正樹 (Masaki Yanagishita)

研究者番号：70132793

(2) 研究分担者

井上 KA (Katarzyna Anna Podyma-Inoue)

研究者番号：90302877