

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24750164

研究課題名(和文)脳低温療法における神経幹細胞の膜上糖脂質組成変化解析及び機能解明

研究課題名(英文)Analysis and functional elucidation of glycolipids in neural stem cell under cerebral hypothermia condition

研究代表者

鈴木 佑典 (SUZUKI, Yusuke)

日本大学・理工学部・助教

研究者番号：20586755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、頭部に外傷を負った患者の脳浮腫や炎症反応による脳梗塞治療において、脳低温療法が臨床で応用されており、その有用性が明らかになりつつある。そして、この脳低温療法と同様の培養条件では、上皮成長因子(EGF)枯渇に伴う神経幹細胞株(MEB5)のアポトーシス誘導が抑制される。しかしながら、その詳細なメカニズムは完全に解明されていない。本研究では、神経幹細胞のアポトーシスを含めた重要な機能をもつ糖脂質や、1-インテグリンをはじめとする糖タンパク質発現解析を行った。その結果、脳低温療法培養条件において、特定の糖脂質および糖タンパク質の発現変化がアポトーシス抑制機構に関与している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Cerebral hypothermia has been evaluated and used for clinical application of hypoxic-ischemic encephalopathy, cerebral edema, and cerebral infarction due to inflammation after brain injury. Recently, apoptosis induced by depletion of epidermal growth factor (EGF) in neural stem cell line (MEB5) has also reported to be suppressed under similar culture condition to cerebral hypothermia. However, the regulation mechanism of apoptosis in MEB5 under hypothermia condition is still unknown. In this study, we analyzed glycolipid composition and glycoproteins in MEB5 after culture under cerebral hypothermia condition and found that these glycoconjugates would be related to the regulation mechanism of apoptosis.

研究分野：神経化学，分子生物学，糖質化学

キーワード：神経幹細胞 糖脂質 糖タンパク質 脳低温療法

1. 研究開始当初の背景

脳神経細胞膜の糖脂質組成変化は、膜マイクロドメインの構成・構造変化、及び膜の流動性変化を引き起こし、各種受容体の局在及び情報伝達を制御している可能性が示唆されている。そして、このような糖脂質組成変化が神経変性や細胞死を引き起こす要因となっている可能性が示唆されている。本研究では、脳低温療法における脳神経細胞の保護機構が完全に解明されていない背景から、上皮成長因子(EGF)枯渇による神経幹細胞株(MEB5)のアポトーシス誘導モデルを用い、脳低温療法と同様の培養条件が膜上の糖脂質組成や膜マイクロドメインに集積する分子の発現変化に与える影響を解析した。

そして、膜マイクロドメイン上の糖脂質及び糖タンパク質などの複合糖質は、微量のものも多く、その精製工程は煩雑であることが多いことから、膜マイクロドメイン上の複合糖質の迅速な精製・構造解析システムの確立を検討した。

2. 研究の目的

現在、食事の欧米化や運動不足等の近代日本社会が抱える問題から、生活習慣病患者数は増え続け、高度高齢化社会を迎えることから、パーキンソン病等の身体の一部の機能を失う患者数は急激に増加すると考えられる。このような患者の低下した Quality of Life (QOL)を改善する医療の提供方法開発が喫緊の課題となっている。本研究において、膜マイクロドメイン上に存在するガングリオシドや情報伝達分子の詳細構造解析を通じて脳低温療法における神経幹細胞の炎症及びアポトーシス抑制機構を解明できれば、神経幹細胞を用いた再生医療研究の基礎的データを蓄積することができると考え、検討を開始した。

3. 研究の方法

(1) 脳低温療法と同様の培養条件におけるβ1-インテグリンおよび糖脂質の発現変化解析

MEB5細胞をEGF存在下または枯渇下、および脳低温条件(32℃)または通常の培養条件(37℃)を組み合わせた4条件で培養し、それぞれの条件におけるタンパク質及び糖脂質の発現変化を解析した。

(2) 各培養条件における糖タンパク質の発現パターン変化の解析

各条件で24時間培養したMEB5細胞を回収し、総タンパク質を得た後、*m*-アミノフェニルボロン酸-アガロースを用いて糖タンパク質を得た。各条件の糖タンパク質をSDS-PAGEにより分離およびMS銀染色を行

った。発現に差異の見られたバンドを切り出し、脱色、還元アルキル化、トリプシン消化、および脱塩後、MALDI-TOF/TOF MSによるMSスペクトル測定を行い、タンパク同定を行った。また、同様に15種類のレクチンを用いたレクチンプロット解析を行い、糖タンパク質糖鎖の発現変化についても解析を行った。

(3) 分離後の薄層クロマトグラフィーからの糖脂質の回収・精製の検討

糖脂質を簡便に精製する方法として、薄層クロマトグラフィーから掻きとり抽出する方法がある。しかしながら、シリカゲルから抽出する際、固着剤などが共抽出されてしまい、その後、カラムクロマトグラフィーなどによる再精製が必要なことも多い。本研究では、先行研究で確立した1,2-ジクロロエタン抽出法を応用し、各バンドのシリカゲルを削って回収したサンプルからの糖脂質の精製を検討した。

4. 研究成果

(1) 各培養条件におけるβ1-インテグリンおよび糖脂質の発現変化

β1-インテグリンの発現変化をウェスタンブロット法により解析した結果、アポトーシス誘導条件(37℃, EGF-)のみ、発現が大きく減少していることが判った。また、通常条件(37℃, EGF+)で培養したMEB5に発現している糖脂質の大部分がGD3であったが、アポトーシス誘導条件(37℃, EGF-, 48時間培養後)ではGM3, GM1, およびGD1aなどのガングリオシド発現が上昇することを確認した。そして、上記の発現変化は32℃, EGF-, 48時間培養後では、確認されず、大部分発現している糖脂質がGD3であることを確認した。以上の結果から、EGF枯渇によるアポトーシス誘導と糖脂質発現変化には関連性がある可能性が示唆された。

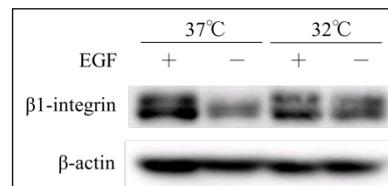


図 1. ウェスタンブロット法による各培養条件における MEB5 細胞の β1-integrin および β-actin の発現解析結果。

(2) 各培養条件における糖タンパク質の発現変化解析結果

各条件により培養後の総タンパク質の発現の差異はわずかであったが、糖タンパク質の発現パターンには大きな差が確認され、特に32℃, EGF(-)の条件下において発現が減少しているバンドが複数存在した。さらに、それぞれをプロテオーム解析した結果、複数の糖

タンパク質の候補を推定した。現在、再現性の確認をしており、同時にこれらの糖タンパク質の機能解明研究を行っている。また、レクチンプロット解析結果から、5種類のレクチンで染色されたバンドに差異が見られた。特に大きな有意差が見られたレクチンのカラムを作製し、糖タンパク質の精製及び構造解析を行っている。

(3) 分離後の薄層クロマトグラフィーからの糖脂質の回収・精製の検討

HPTLC から糖脂質を分離・回収した際に共抽出される夾雑物を DCE 抽出法により、簡単に除去可能であることを確認した。

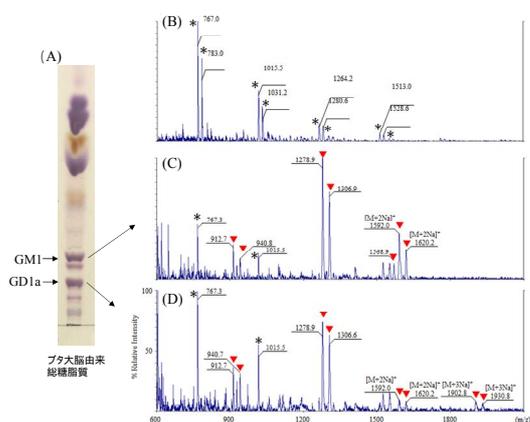


図2. HPTLC による分離・回収後の糖脂質の MALDI-TOF MS スペクトル。(A) ブタ大脳由来総糖脂質の HPTLC 解析結果。(B) HPTLC から GM1 を回収,(C) GM1 を回収・DCE 抽出,(D) GD1a を回収・DCE 抽出後の MALDI-TOF MS スペクトル結果。*はバックグラウンド由来ピーク,赤矢頭はガングリオシド由来ピークを示す。

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3件)

Kamimiya, H., Suzuki, Y., Mathew, A., Kabayama, K., Kojima, H., Kushi, Y. Simple and rapid removal of the interference in gangliosides extracted from HPTLC spot on MALDI-TOF MS analysis. *Analytical Methods*, 5, 6617-6621. 2013/09, DOI: 10.1039/C3AY41011K 査読有。

Kamimiya, H., Suzuki, Y., Kasama, T., Kajiwar, H., Yamamoto, T., Mine T., Watarai, S., Ogura, K., Nakamura, K., Tsuge, J., Kushi, Y. Unique gangliosides synthesized *in vitro* by sialyltransferases from marine bacteria and their characterization: gangliosides synthesis by bacterial sialyltransferases. *Journal of Lipid Research*, 54, 571-580. 2013/03, DOI: 10.1194/jlr.M026955 査読有。

樺山一哉, 小島泰男, 鈴木佑典. 脂質ラフトに存在する糖脂質の詳細な構造解析. *THE CHEMICAL TIMES*, No.3, 15-22, 2013年7月, URL: http://www.kanto.co.jp/times/pdf/CT_229_03.pdf 査読無。

〔学会発表〕(計22件)

Yoshinaga, K., Mathew, A., Suzuki, Y., Kushi, Y. Structural characterizations of acidic glycolipids from *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* C.J.Mou. The 95th Annual Meeting of The Chemical Society of Japan, 2015/3/27, Nihon University, Chiba, Japan.

Suzuki, Y., Kabayama, K., Kushi, Y. Rapid glycoconjugate purification with organic solvent. The Fifth International Conference on Science and Engineering (ICSE2014), 2014/12/30, Yangon, Myanmar.

戸井田竜憲, 藤庵智貴, 鈴木佑典, 落合邦康, 杉村和久, 橋口周平, 濱添勇太, 櫛泰典. 非還元末端 N-アセチルグルコサミン糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体と単鎖型抗体(scFv)の作製. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 18 日, 国立京都国際会館, 京都。

長谷川達也, 鈴木佑典, 芹澤きなり, 黒川 大介, 櫛泰典. 脳低温療法培養条件における神経幹細胞のアポトーシス抑制機構解明. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 17 日, 国立京都国際会館, 京都。

戸井田竜憲, 藤庵智貴, 鈴木佑典, 落合邦康, 杉村和久, 橋口周平, 濱添勇太, 櫛泰典. 非還元末端 N-アセチルグルコサミン糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製とその解析. 第 56 回脂質生化学会, 2014 年 6 月 7 日, 近畿大学, 大阪。

濱中香織, 鈴木佑典, 石坂有梨弥, 上宮悠, 櫛泰典. 脳低温療法培養条件による神経幹細胞 (MEB5) のアポトーシス抑制機構と膜環境との関連性. 第 57 回日本大学学術講演会, 2013 年 12 月 7 日, 日本大学理工学部, 東京。

田村恭祐, 鈴木佑典, 中島晃貴, 樺山一哉, 上宮悠, 櫛泰典. 有機溶媒を用いた複合糖質からの夾雑物除去法の応用. 第 57 回、日本大学学術講演会, 2013 年 12 月 7 日, 日本大学理工学部, 東京。

吉永和矢, 上野弘樹, 上宮悠, 鈴木佑典, 櫛泰典. ハクレイタケ由来酸性糖脂質の構造解析. 第 57 回日本大学学術講演会, 2013 年 12 月 7 日, 日本大学理工学部, 東京。

鈴木佑典, 中鳥晃貴, 樺山一哉, 上宮 悠, 榑泰典. 有機溶媒抽出法による複合糖質精製法の応用と展望. 第8回日本大学先端バイオフォーラム, 2013年11月27日, 日本大学会館, 東京.

戸井田竜憲, 藤庵智貴, 池上亜里紗, 鈴木佑典, 落合邦康, 杉村和久, 榑泰典. ラクト/ネオラクト系糖脂質の非還元末端 N-アセチルグルコサミン鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体の作成とその可変領域の解析. 第8回日本大学先端バイオフォーラム, 2013年11月27日, 日本大学会館, 東京.

Suzuki, Y., Katsuda, S., Kamimiya, H., Kabayama, K., Kojima, H., Mathew, A., Kushi, Y. Removal of excess pyridylamino reagents from PA-oligosaccharides using organic solvents. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月12日, パシフィコ横浜, 横浜.

戸井田竜憲, 藤庵智貴, 鈴木佑典, 榑泰典. Lc3Cer に特異的な IgM モノクローナル抗体の作製とその特徴. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月12日, パシフィコ横浜, 横浜.

Okamoto, A., Suzuki, Y., Horie, A., Ishida, K., Kamimiya, H., Mathew, A., Kushi, Y. Improved the detection of ganglioside in MALDI-TOF MS. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日, 福岡国際会議場, 福岡

Katsuda, S., Suzuki, Y., Yoshida, E., Kojima, S., Kabayama, K., Kamimiya, H., Mathew, A., Kushi, Y. Removal of coupling reagents from fluorescence-labeled oligosaccharides. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日, 福岡国際会議場, 福岡

藤庵 智貴, 戸井田 竜憲, アニラ マシュー, 未定 幹, 柿沼 俊光, 鈴木 佑典, 榑 泰典. Lc₃Cer に特異的なモノクローナル抗体の作製とその可変領域の解析. Production of monoclonal antibodies specific to Lc₃Cer and their variable region analyses. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日, 福岡国際会議場, 福岡

南山潤太郎, 塩谷一紗, 海老塚広子, 有田正信, 渡辺聡, 鈴木佑典, 榑泰典. モノクローナル抗体 (MAC-1) を用いた、N-アセチルグルコサミンを末端に持つネオラクト系糖脂質とエンドβガラクトシダーゼCを発現したトランスジェニックマウスの解析. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日, 福岡国際会議場, 福岡

藤庵智貴, 戸井田竜憲, 若松美季, 鈴木佑典, 榑 泰典. 特徴的な糖脂質に対するモノクローナル抗体の作製とその可変領域の解析. 第56回日本大学理工学部学術講演会, 2012年11月28日, 日本大学理工学部, 東京

柿沼俊光, 上宮悠, 山口玲香, 鈴木佑典, 榑泰典. シアル酸を過剰発現した細胞株の樹立とその応用-インフルエンザウイルス感染を鋭敏に検出するツールの開発-. 第56回日本大学理工学部学術講演会, 2012年11月28日, 日本大学理工学部, 東京

吉田恵里子, 鈴木佑典, 小島駿一, 勝田沙織, 上宮 悠, Mathew Anila, 榑 泰典. 脳低温療法における神経幹細胞の糖脂質組成変化解析. 第56回日本大学理工学部学術講演会, 2012年11月28日, 日本大学理工学部, 東京

岡本明, 鈴木佑典, 石田佳佑, 堀江亜矢, 上宮悠, マシューアニラ, 榑泰典. MALDI-TOF MS 解析におけるガングリオシドのイオン化条件探索. 第56回日本大学理工学部学術講演会, 2012年11月28日, 日本大学理工学部, 東京

②1 上宮悠, 柿沼俊光, 峰利喜, 鈴木佑典, 榑泰典. 海洋性細菌由来シアル酸転移酵素 (ST) を用いた in vitro ガングリオシド合成. 糖鎖科学合同セミナー, 2012年11月11日, 成蹊大学, 箱根

②2 藤庵智貴, 戸井田竜憲, 若松美季, 鈴木佑典, 榑泰典. Lc₃Cer に特異的なモノクローナル抗体の作製と解析. 糖鎖科学合同セミナー, 2012年11月11日, 成蹊大学, 箱根

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 佑典 (SUZUKI Yusuke)
日本大学・理工学部・助教

研究者番号: 20586755