

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02565

研究課題名(和文)ケミカルグライコミクスによる細胞の包括的な糖鎖代謝ネットワーク解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of glycan metabolic networks by chemical glycomic approach

研究代表者

篠原 康郎 (Shinohara, Yasuro)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20374192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：代謝経路が十分に解明されていない糖鎖の代謝経路を考察するために、糖鎖の代謝に影響を与えることがよく検証されている各種化合物(糖タンパク質のプロセッシング過程の阻害剤として α -グルコシダーゼ阻害剤、 α -マンノシダーゼ阻害剤、細胞内転送阻害剤としてゴルジへの転送あるいはゴルジ内での転送過程に作用する阻害剤、小胞体膜上のCa²⁺-ATPase(SERCA)阻害剤など)をHepG2細胞に曝露させたときのグライコームの変動情報を包括的に取得した。代謝経路が十分に明らかにされていない糖鎖に特に着目し、各種阻害剤とこれらの糖鎖の発現との相関について新規な知見を含む大規模なデータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により糖鎖代謝の阻害メカニズムが多様な種類の阻害剤について主にN-glycanと遊離N-glycanの代謝経路に与える影響を明らかにした。代謝経路が十分に明らかにされていない複合型・ハイブリッド型の遊離オリゴ糖やパウチマンノース型のN-glycanなどの糖鎖も阻害剤依存的に発現がダイナミックに変動したことからこれらの代謝経路の推定に資する結果が得られた。代謝経路の解明や発現変動の機能解析への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Aiming to gain insight into the metabolic pathways of glycan metabolisms of which pathways are poorly understood, we performed gross glycomic analyses upon exposure of HepG2 cells to various glycan metabolism inhibitors of which inhibitory mechanisms are well understood (e.g. inhibitors of α -glucosidases, α -mannosidases, intracellular protein transport, sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases, etc.). These analyses allowed to clarify the correlation between inhibitor employed and expression profile of glycans of which metabolic pathways are not fully understood.

研究分野：グライコミクス、糖鎖代謝

キーワード：ハイブリッド型 モノアンテナ型 パウチマンノース型 遊離N-glycan N-glycan 定性・定量解析 細胞内動態

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖鎖の代謝経路は、日本人研究者を含む多くの先達により解明されてきた。タンパク質に結合する N-glycan、O-glycan や脂質に結合する糖鎖、プロテオグリカンのグリコサミノグリカン鎖、遊離オリゴ糖などの様々なクラスの糖鎖が発見され、それぞれについて代謝経路が解明されてきた。他方、近年、リピトールを構成成分とする糖鎖やグルクロン酸とキシロースの 2 糖構造の繰り返しからなる糖鎖が新たに発見されるなど、糖鎖に関しては生合成経路の全容が解明されたとは言えない状況にある。N-glycan や遊離 N-glycan についても、まだ代謝経路が十分に解明されていない糖鎖が存在する。

糖鎖はまた、環境に敏感に応答することが指摘されており、その端的な例はストレスや病態に伴う糖鎖構造の質・量的な変動である。病態に応じて糖鎖発現が変動するという報告はたくさんあり、実際に FDA や厚生労働省の認可する腫瘍マーカーの多くが糖鎖や複合糖質である。しかしながら、疾患に応じてなぜ糖鎖の発現が変動するのか、その意義については一部しかわかっていない。同様に、細胞分化に伴い糖鎖構造が大きく変動することから糖鎖が細胞(例えば iPS 細胞)の品質管理に有効であることが明らかにされているが、糖鎖発現が変化する意義の解明については今後の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「糖鎖の代謝の全体像がどうなっていて、それが環境依存的に変動する意義や仕組みはどうなっているのか」の問いを解明するための手がかりとして、「細胞の糖鎖代謝の一部が攪乱されたときに、細胞の糖鎖発現ネットワークはどの程度影響を受ける(あるいは受けない)のだろうか」という問いに対して実測データを提供するものである。オミクスは強力な研究手法で、既存の知識では想像が困難なことで大規模なデータがそれを顕在化し新たな仮説の発見につなげることが期待できる。この目的のためにケミカルグライコミクスのアプローチを採択する。すなわち、糖鎖の代謝に影響を与えることがよく検証されている化合物を細胞に添加したときの細胞全体のグライコームの変動情報を包括的に取得する。本研究ではさらに必要に応じて細胞分画後のグライコームの解析を行う。複合糖質や遊離オリゴ糖の局在情報も、糖鎖代謝ネットワークを俯瞰する上でこれまでになかった貴重なデータになると期待される。

3. 研究の方法

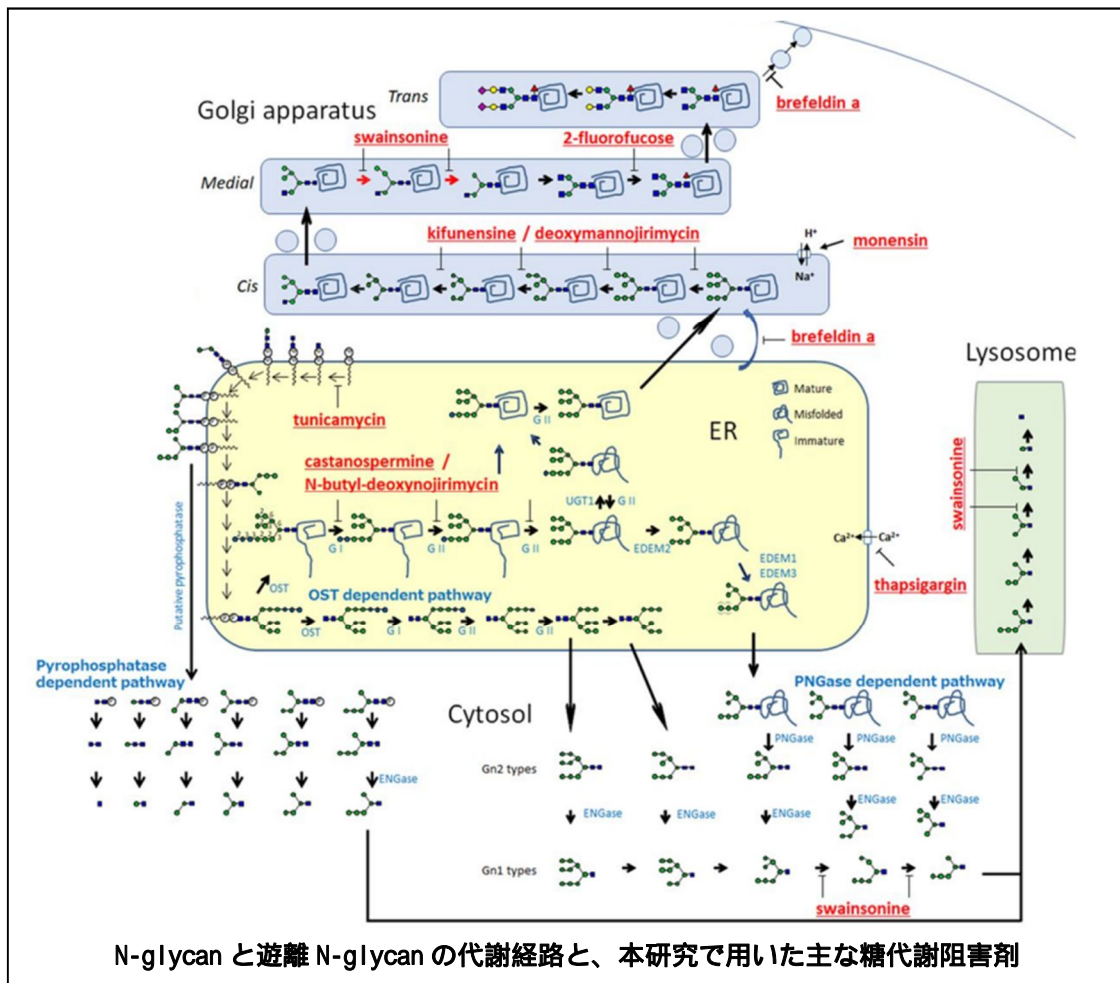
本研究では、阻害メカニズムがよく検証されている種々の糖鎖代謝阻害剤を選定し、これらが細胞のグライコームに与える影響を定性・定量的に解析する。糖鎖代謝阻害機序が異なる化合物として、リピド中間体形成阻害剤、糖タンパク質のプロセッシング過程の阻害剤、糖輸送体阻害剤(形質膜、小胞膜)などの阻害機序が異なる化合物を複数選定する。リピド中間体形成阻害剤として、ツニカマイシン等を、糖タンパク質のプロセッシング過程の阻害剤として、 α -グルコシダーゼ阻害剤である 1-デオキシノジリマイシン等を、 α -マンノシダーゼ阻害剤として 1-デオキシマンノジリマイシン等を、細胞内転送阻害剤としてゴルジへの転送あるいはゴルジ内での転送過程に作用するプレフェルジン A やモネンシン等を、小胞体膜状の Ca^{2+} -ATPase(SERCA)阻害剤であるタプシガルジン等を選定し、これら薬剤が細胞のグライコームに与える影響を明らかにする。

本研究では、代謝経路がよくわかっていない糖鎖に特に着目して発現動態を調べる。代謝経路がよくわかっていない糖鎖として、複合型・ハイブリッド型の遊離オリゴ糖、パウチマンノース(PM)型の N-glycan などに着目する。これらの糖鎖は、がん等の疾患で発現が変動することが報告されている。複合糖質や遊離オリゴ糖の局在情報は代謝経路を考えるうえで重要な情報になるため、興味ある発現動態を与えた糖代謝阻害剤に関しては細胞分画を行い、糖鎖の局在情報も取得する。

4. 研究成果

(1) 質量分析における複雑な糖鎖の定性かつ定量的な解析を支援するためのソフトウェア Toolbox Accelerating Glycomics (TAG)の開発と有用性評価

代表者らが開発した Glycoblotting 法と MALDI-TOF MS による糖鎖の分析法は、糖鎖に高度に特異的であり、高感度かつ高速に糖鎖解析を行うことができる。しかし、質量分析スペクトル上の多くの糖鎖のアノテーションや大規模解析を行うときに生じる多数のスペクトルから効率的に糖鎖の定性・定量情報を読み解くためには専用のソフトウェアの開発が必要である。そこで、新潟大学の三浦と共同で、質量分析における複雑な糖鎖の定性かつ定量的な解析をサポートするためのソフトウェア Toolbox Accelerating Glycomics (TAG)を開発し、その有用性を評価した。本ソフトウェアの開発により、糖鎖リストの自動作成、MALDI-TOF MS のスペクトル上のシグナルのアノテーション、ソーティング、絶対定量、グラフ作成、糖鎖の発現変動を糖鎖の代謝経路上にマッピングすることが可能になった。



(2) α -mannosidase 阻害剤 (キフネシン、デオキシマンノジリマイシン、スワインソニン)
 N-glycan はその生合成の過程で、ゴルジ体に存在する Class 1 α -マンノシダーゼの働きで 1-2 結合するマンノース残基が切断され Man5 を生成し、GlcNAcT-1 の作用によりハイブリッド型が生成する。次いで、Class 2 α -マンノシダーゼの働きで 1-3, 1-6 結合するマンノース残基が切断されて生じるモノアンテナ型に、GlcNAcT-2 が作用してコンプレックス型の N-glycan が生成される。このように Class 1 と Class 2 α -マンノシダーゼは N-glycan の生合成において重要な役割を担う。前者の阻害剤としてキフネシンやデオキシマンノジリマイシンが、後者の阻害剤としてスワインソニンがよく知られている。これらの阻害剤が N-glycan や遊離 N-glycan の糖鎖の生合成に与える影響は多くの報告があるが、本研究では、3 つの阻害剤が N-glycan や遊離 N-glycan の糖鎖の生合成に与える影響を系統的に解析した。

N-glycan の場合、いずれの阻害剤の曝露も N-glycan の総量の増加につながり、クラス別ではハイマンノース(HM)型とハイブリッド型の N-glycan が有意に増大した。Class 1 α -マンノシダーゼ阻害剤で HM 型が増大すること、Class 2 α -マンノシダーゼ阻害剤でハイブリッド型が増大することは当然でありよく知られていることであるが、Class 2 α -マンノシダーゼ阻害剤であるスワインソニンをを用いた場合、ハイブリッド型の蓄積に伴いフコシル化されたハイブリッド型糖鎖やフコシル化された Man5 (M5F) の発現がユニークに観察されることが示された。遊離 N-glycan では、スワインソニンにおいて還元末端に GlcNAc を 1 つ有する Gn1 型の個々の糖鎖の顕著な発現増加や、還元末端に GlcNAc を 2 つ有する Gn2 型の個々の糖鎖ごとのユニークな発現変動を観察した。スワインソニン曝露により誘導される複雑な糖鎖の発現変動の時系列を解析するために発現変動を経時的に解析した結果、スワインソニン曝露により、まず PM-Gn2 型が増加し次いで PM-Gn1 型が増加した。HM 型 FNGs の増加はそれよりも遅いため、HM FNGs は PM FNGs の precursor ではないことが示唆された。フコシル化ハイブリッド型や M5F などの N-glycan の発現も、PM FNGs の発現より遅れて増加し、両者の経時変化プロファイルは類似していることが示された。

(3) フコシル化阻害剤 (2-フルオロフコース)

スワインソニン曝露時にユニークに発現するハイブリッド型 N-glycan のフコシル化や M5F の生成に至る代謝経路を阻害したときの影響を調べるために、フコシル化阻害剤である 2-フルオロフコースとスワインソニンを併用したときの糖鎖発現を解析した。2-フルオロフコースとスワインソニンを共添加したとき、ハイブリッドのフコシル化と M5F の生成は完全に抑制された

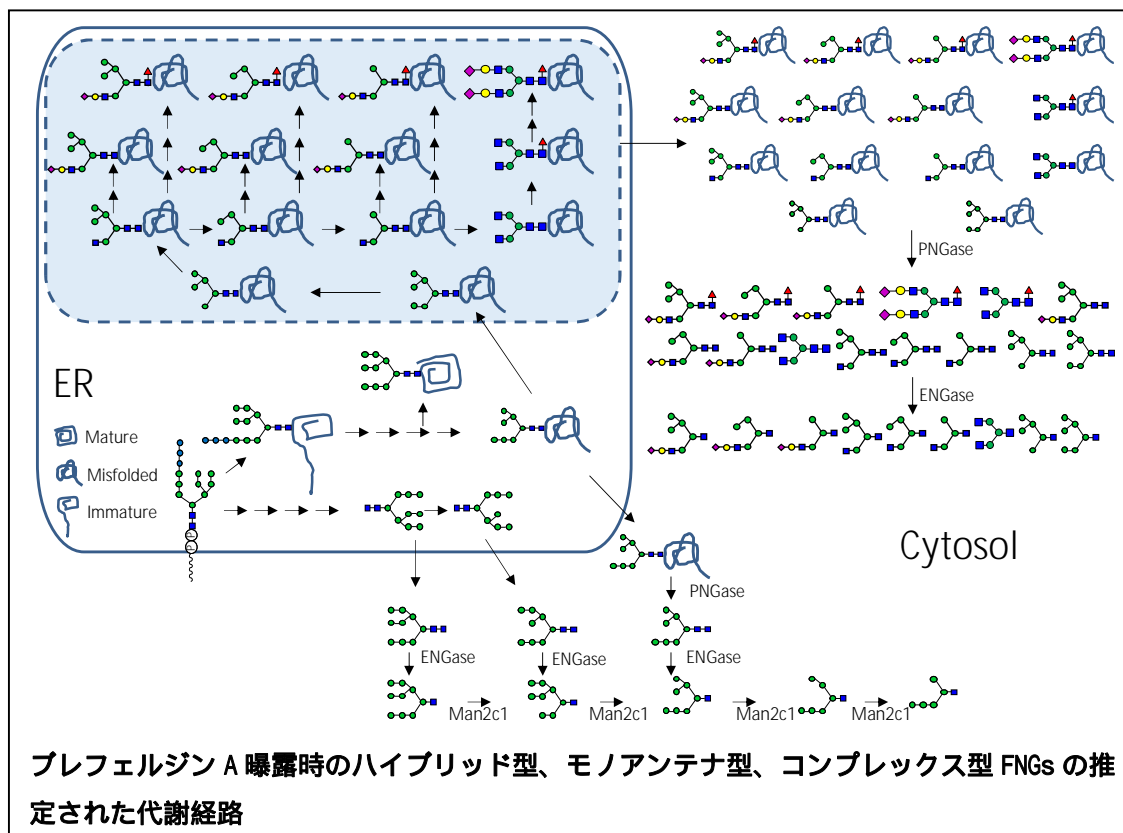
のに対して、コンプレックスとPMのフコシル化は抑制されなかった。この結果は、FUT8の基質特異性を反映している可能性が考えられる。また、2-フルオロフコースによってスワインソニン曝露で誘導されるフコシル化ハイブリッド型やM5FなどのN-glycanの生成を阻害すると、PM型N-glycanの増大につながることを明らかにした。

(4) 細胞内転送阻害剤 (プレフェルジン A)

ゴルジ体ストレス誘導剤であり、ゴルジ体の分解や小胞体への分泌タンパク質の蓄積を引き起こすことが知られているプレフェルジン A が HepG2 細胞の N-glycan と遊離 N-glycan の代謝に与える影響を精査した。プレフェルジン A 曝露により遊離 N-glycans の発現が大きく変動し、プレフェルジン A 非存在下にはほとんど存在しないハイブリッド型やコンプレックス型の遊離 N-glycans が蓄積することを見出した。これらの遊離 N-glycan は、通常の細胞における発現は極めて限定的であり、ある種のがんなどの疾患で発現が増大することが報告されている。これらの遊離 N-glycan の代謝経路はよくわかっていないため、本研究ではハイブリッド型やコンプレックス型の遊離 N-glycan の構造を詳細に同定し、プレフェルジン A が HepG2 細胞の FNGs 代謝に与える影響を定性・定量的に明らかにした。

遊離 N-glycan は Gn1 型と Gn2 型が存在するため、ハイブリッド型やコンプレックス型が存在するとき、構造解析は N-glycan よりもはるかに困難になる。この問題を克服するために、 α -マンノシダーゼ、 α -フコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -N-アセチルグルコサミニダーゼなどのエキソグリコシダーゼおよび Endo F2 などのエンドグリコシダーゼによる消化条件を検討し、最適化した。Jack bean α -マンノシダーゼ消化は、PM、HM およびハイブリッド型の Gn1、Gn2、Gn2F 型の比率の推定を可能にし、Endo F2 は Gn1 と Gn2 型の識別に加え、フコース修飾が専らコアに起こっていることを明らかにした。

構造を明らかにすることができたため、プレフェルジン A が誘導する FNGs の発現変動を定量的に解析した結果、プレフェルジン A 曝露で様々な Gn1 型、Gn2 型のハイブリッド型やモノアンテナ型の遊離 N-glycan が生成すること、コンプレックス型は大部分がコアフコシル化を受けた Gn2 型であることが明らかになった。これらの代謝経路を推定するために個々の糖鎖の発現の経時変化を解析した結果、シアリル化ハイブリッド型やコンプレックス型遊離 N-glycan は中性ハイブリッド型 FNGs より遅れて生成することが明らかとなり、これらの遊離 N-glycan が N-glycan 同様の生成順序で生合成されていることが示唆された。また、細胞内局在解析をするために超遠心機により細胞質画分 (CE) と膜画分 (ME) に分画し解析を行った結果、遊離 N-glycan の種類に関わらずほとんど CE 画分に観察された。このことは、これらの糖鎖がタンパク質上で N-glycan として生合成された後に PNGase により切断されて生じることを示唆している。プレフェルジン A 曝露後の HepG2 細胞の N-glycan を解析した結果、N-glycan もプレフェルジン A 曝露で様々なハイブリッド型やモノアンテナ型の糖鎖の発現が増大することが示された。また、各クラスの



遊離 N-glycan の Gn1 型と Gn2 型の比率には良好な比例関係が認められたことから、Gn1 型は相当する Gn2 型から細胞質の ENGase の働きによって切断されてできることが示唆された。コンプレックス型の Gn1 型が存在しないのは、ENGase がコアフコシル化糖鎖を基質としない基質特性で説明できる。以上の結果から、プレフェルジン A のゴルジ体から小胞体への各種糖転移酵素等の逆行輸送により、小胞体でハイブリッド型、モノアンテナ型、コンプレックス型の N-glycan が生成し、その後、細胞質に輸送され、Gn2 型、Gn1 型はそれぞれ細胞質の PNGase と ENGase の作用によって生成するものと推定した。

(5) イオノフォア (モネンシン、ニゲリシン)

モネンシンはとくに Na⁺に親和性が高いイオノフォアで、リソソームやゴルジ体内の pH を変化させてゴルジ体ストレスを誘導することが示されている。本研究では、特に K⁺に親和性の高いニゲリシンとともに、これらイオノフォアが HepG2 細胞の N-glycan と遊離 N-glycan の代謝に与える影響を精査した。

モネンシン曝露で一部の PM 型と HM 型に加え、ハイブリッド型やモノアンテナ型の N-glycan の有意な発現の増加が認められた。遊離 N-glycan は、モネンシン曝露で一部の PM 型と HM 型の発現の増大が認められるとともに、一部のモノアンテナ型の有意な増加が認められた。これらの糖鎖の構造と局在や、K⁺に親和性が強いイオノフォアであるニゲリシンの影響について引き続き解析を進めている。

(6) -glucosidase 阻害剤 (カスタノスペルミン、N-ブチルデオキシノジリマイシン、デオキシノジリマイシン)

オリゴ糖転移酵素 (OST) の働きによりペプチドに転移された N-glycan には 3 つのグルコース残基が存在し、小胞体の α -グルコシダーゼ I, II の働きでトリミングを受ける。同じグルコシダーゼ阻害剤でもカスタノスペルミンは ER α -glucosidase I と II を、デオキシノジリマイシンは ER α -glucosidase II を、N-ブチルデオキシノジリマイシンはデオキシノジリマイシンよりも Glc3 を有する FOS を生成し、かつ GSLs の生合成を阻害することが報告されている。本研究では、これら 3 種の阻害剤が HepG2 細胞の N-glycan, 遊離 N-glycan, スフィンゴ糖脂質の発現に与える影響について解析を進めている。

(7) Ca²⁺-ATPase (SERCA) 阻害剤 (タブシガルジン)

Moore らにより、OST 経路により小胞体内で生成した FNG の細胞質への輸送がタブシガルジンによって阻害されることが報告されている。またタブシガルジンは強力な小胞体ストレスの誘導剤であることから、フォールディングに失敗した糖タンパク質を基質とする PNGase 経路での遊離オリゴ糖の生成が促進することが知られている。本研究において、HepG2 細胞をタブシガルジンで曝露したときの N-glycan と遊離 N-glycan の発現に与える影響を精査した結果、タブシガルジンが N-glycan の発現に与える影響は極めて軽微であること、遊離 N-glycan では PM-Gn1 型、HM-Gn1 型の発現が顕著に増大すること、HM-Gn2 型の発現が有意に増大することなどを確認した。さらに、従来報告されていない遊離 N-glycan の発現変動を観察したため、引き続き解析を進めている。

(8) 糖化

糖化ストレスが細胞の代謝経路に与える影響についても検討を加えた。予備検討として、糖化の初期反応であるイミン形成能を評価する系を構築した。また、糖化ストレスが細胞の代謝経路に与える影響を調べるために 3-deoxyglucosone が HepG2 細胞の糖鎖代謝に与える影響について解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nobuaki Miura, Hisatoshi Hanamatsu, Ikuko Yokota, Kazue Okada, Jun-ichi Furukawa, Yasuro Shinohara	4. 巻 10
2. 論文標題 Toolbox Accelerating Glycomics (TAG): Glycan Annotation from MALDI-TOF MS Spectra and Mapping Expression Variation to Biosynthetic Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10101383	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 該当する
1. 著者名 Yasuro Shinohara, Yurika Ozawa, Akimi Okita, Koichi Kato, Taku Chiba, Nobuaki Miura, Jun-ichi Furukawa	4. 巻 493
2. 論文標題 Analysis of the susceptibility of reducing disaccharides composed of d-glucose to glycation using the Maillard reaction and a novel sensitive method that measures the percentage of the open-ring form	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 108019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2020.108019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Chie Morikawa, Kanako Sugiura, Keina Kondo, Yurie Yamamoto, Yuma Kojima, Yurika Ozawa, Hiroki Yoshioka, Nobuaki Miura, Jinhua Piao, Kazue Okada, Hisatoshi Hanamatsu, Masumi Tsuda, Shinya Tanaka, Jun-ichi Furukawa, Yasuro Shinohara	4. 巻 1866
2. 論文標題 Evaluation of the context of downstream N- and free N-glycomic alterations induced by swainsonine in HepG2 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2022.130168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nobuaki Miura, Hisatoshi Hanamatsu, Ikuko Yokota, Keiko Akasaka-Manyá, Hiroshi Manyá, Tamao Endo, Yasuro Shinohara, Jun-ichi Furukawa	4. 巻 23
2. 論文標題 Toolbox Accelerating Glycomics (TAG): Improving Large-Scale Serum Glycomics and Refinement to Identify SALSA-Modified and Rare Glycans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 13097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232113097	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 該当する

1. 著者名 Kanao Sugiura, Yuho Kawai, Arisa Yamamoto, Hiroki Yoshioka, Yuika Kiyohara, Ayaka Iida, Yurika Ozawa, Mai Nishikawa, Nobuaki Miura, Hisatoshi Hanamatsu, Jun-ichi, Yasuro Shinohara	4. 巻 1867
2. 論文標題 Exposure to brefeldin A induces unusual expression of hybrid- and complex-type free N-glycans in HepG2 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2023.130331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 杉浦花菜子、森川智恵、近藤恵尚、小島由真、山本友里恵、篠原康郎
2. 発表標題 スワインソニンが惹起する結合型および遊離型N-glycanの発現変動と各種変動の相互関係の解析
3. 学会等名 第142回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小澤優里香、杉浦花菜子、山本友里恵、森川智恵、近藤恵尚、小島由真、篠原康郎
2. 発表標題 スワインソニンにより誘導されるユニークなフコシル化を阻害したときの結合型および遊離型N-glycanの代謝応答
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清原 由衣可、杉浦 花菜子、川合 裕穂、山本 有紗、飯田 彩華、小澤 優里香、吉岡 弘毅、篠原 康郎
2. 発表標題 Brefeldin AはHepG2細胞においてユニークなハイブリッド型やコンプレックス型の遊離N-glycanの発現を誘導する
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 三浦信明、花松久寿、横田育子、篠原康郎、木下聖子、古川潤一
2. 発表標題 グライコミックスのプロトコルと 解析ソフトToolbox Acceletating Glycomics (TAG)
3. 学会等名 質量分析インフォマティクス研究会・第8回公開ワークショップ
4. 発表年 2023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	古川 潤一 (Furukawa Jun-ichi) (30374193)	名古屋大学・糖鎖生命コア研究所・特任教授 (13901)	
研究分担者	吉岡 弘毅 (Yoshioka Hiroki) (30756606)	岐阜医療科学大学・薬学部・講師 (33708)	

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
---------	---------