

令和元年6月21日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07786

研究課題名(和文) 多能性幹細胞を糖鎖で制御 - 多能性の維持・分化は糖鎖生合成経路の改変で得られるか？

研究課題名(英文) Controlling pluripotent stem cells by sugar chains - Can maintenance and differentiation of pluripotency be obtained by modifying biosynthetic pathway of sugar chain?

研究代表者

相川 順一 (AIKAWA, JUNICHI)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：10260192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は多能性幹細胞の性状とアスパラギン結合型糖鎖の生合成の関係を明らかにすることを目的とした。まず、マンノシダーゼ阻害剤はゴルジ体に局在するマンノシダーゼIA(mMAN1A1)の活性も阻害する。レチノイン酸の添加によりマウス胚性幹細胞を分化させる系で、阻害剤を添加した。添加の有無で、糖鎖構造には大きな変化が見られたが、分化の指標となる細胞形態に顕著な変化は見られなかった。次に、MAN1A1の転写開始点上流領域に見いだされた転写産物の発現パターンをRT-PCR法により解析した。その結果、予想される転写物の一部の領域の発現が、マウス胚性幹細胞の分化に伴い変化することが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は多能性幹細胞の性状とアスパラギン結合型糖鎖の生合成の関係を明らかにすることを目的とした。マウスのゴルジ体に局在するマンノシダーゼIA(mMAN1A1)に見い出された転写産物の発現を制御することで、アスパラギン結合型糖鎖のパターンが変化する可能性が示された。分化や疾病との関係解明が期待される。mMAN1A1の活性を抑制する阻害剤ではマウス胚性幹細胞では形態レベルでは顕著な変化は見られなかったが、他の分化系での試験が引き続き必要である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the relationship between the properties of pluripotent stem cells and the biosynthesis of asparagine-linked sugar chains. First, the mannosidase inhibitor, which also inhibit the activity of mouse mannosidase IA (mMAN1A1) localized to the Golgi apparatus, was added in a system where mouse embryonic stem cells were differentiated by the addition of retinoic acid. Although the sugar chain structure was significantly changed, no significant change was observed in the cell morphology which is an indicator of differentiation. Next, the expression pattern of transcripts found in the region upstream of the transcription start point of mMAN1A1 was analyzed by RT-PCR. As a result, it was found that the expression of a partial region of the predicted transcript changes with differentiation of mouse embryonic stem cells.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：多能性幹細胞 ES細胞 糖鎖 ゴルジマンノシダーゼ レチノイン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 多能性幹細胞である ES 細胞及び iPS 細胞では、他の分化した細胞に比べ、ハイマンノース型 *N*-glycan の割合が多いことが明らかになった。さらに、GolgiManIA の mRNA の発現量が分化した細胞に比べ大幅に抑制されていた。

(2) そこで、同じ蛋白質であっても、コンプレックス型糖鎖に比べ、マンノースが外側に露出したハイマンノース型 *N*-glycan を持つ集団の生理活性機能が強く、蛋白質が未分化能を維持する機能を十分に発揮できるという仮説が立てられた。また、品質管理機構の作用により蛋白質の適切な折り畳みが促進され、蛋白質が未分化能を維持する機能を十分に発揮できるという仮説が立てられた。

2. 研究の目的

本研究計画は、多能性幹細胞の未分化維持及び分化誘導が糖鎖生成酵素の活性に影響を受けることを明らかにするものである。従来、多能性幹細胞の未分化の状態を維持または、分化を誘導するには、蛋白質因子や低分子化合物の添加によって行われてきた。しかしながら、糖鎖生成酵素を標的とし、その活性を制御することで多能性幹細胞の性状を改変または維持することはほとんど行われていなかった。そこで、本研究では、申請者が取り扱ってきたゴルジ体マンノシダーゼの活性の増減を強制発現や阻害剤添加の手法により多能性幹細胞において実施し、予想される糖鎖構造の変化が多能性幹細胞の性状に直接及ぼす影響を示すことを意図した。本研究の成果は、特異的な阻害剤の創薬や再生医療における幹細胞の活用に波及、貢献できると考える。

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞 TT2 をフィーダーMEF 細胞と共存下、LIF を含む 20%血清含有培地で培養した。分化誘導時には、LIF を含まない 10%血清含有培地にレチノイン酸を添加して培養した。

(2) 回収した細胞から Trizol (Invitrogen 社) により、タンパク質画分を回収した。得られたタンパク質から常法により、2-アミノピリジン標識糖鎖を調製した。

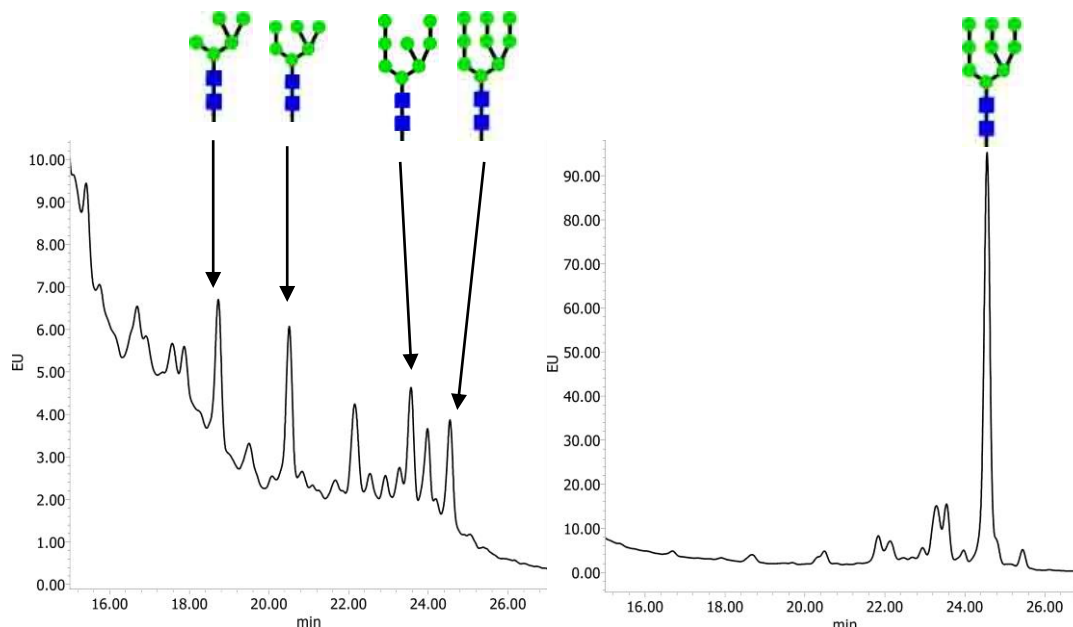
(3) 回収した細胞から Trizol により、RNA を回収した。得られた RNA から 1st strand cDNA を調製し、PCR に供した。

4. 研究成果

(1) ES 細胞でのマンノシダーゼ阻害剤の添加による細胞の性状および糖鎖構造への影響

ゴルジマンノシダーゼ IA (MAN1A1) の活性も阻害するキフネンシンによる影響：レチノイン酸の添加により ES 細胞を分化させる系に、キフネンシンを添加したところ、1) 糖鎖構造の解析から高マンノース型糖鎖のプロセッシング阻害が確認された一方(図 1)、2) 細胞形態に顕著な変化は見られなかった。また、キフネンシンの代わりに RNAi の手法により、mMAN1A1 の発現抑制を行ったが、形態変化に関しては同様であった。

(図 1) レチノイン酸添加 6 日後の糖鎖プロファイルの解析
(左) キフネンシン無添加 (右) キフネンシン添加

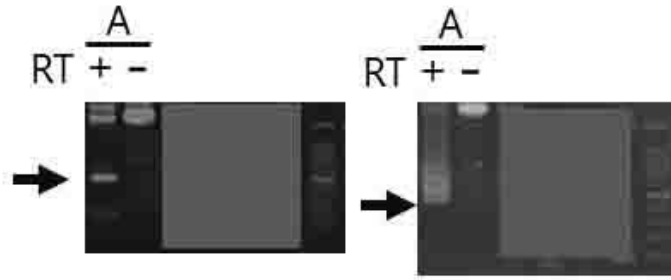


(2) MAN1A1の転写開始点上流領域に見いだされたESTの解析

ES細胞の分化系におけるnon-coding RNAの発現：mMAN1A1の転写開始点上流領域に見いだされたESTがnon-coding RNAであり、mMAN1A1の発現に関わる可能性を検討した。その結果、予想される転写物の一部の領域の発現が、分化前後で異なっていることを見出した（図2）。

(図2) RT-PCR

(左) 未分化
(右) レチノイン酸
添加4日後
RT+/- 逆転写酵素
添加あり/なし



(3) マウスゴルジマンノシダーゼIA発現抑制による糖鎖構造への影響

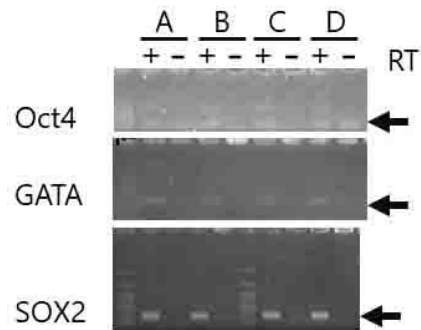
未分化のマウスES細胞TT2にゴルジマンノシダーゼIA (MAN1A1) 発現抑制用siRNAを導入した。その結果、細胞の糖鎖構造は、コントロールのGAPDH発現抑制用siRNA導入細胞と同様であった。TT2の未分化状態の糖鎖形成にMAN1A1は寄与していないと考えられた。

(4) 無血清培地の検討

フィーダー細胞なしのマウスES細胞TT2由来糖鎖を単離解析するために、市販の合成培地を検討した。未分化能を維持することを確認した。

(図3) 回収した細胞由来 cDNA を用いた RT-PCR

A: 血清含有 DMEM 培地
B: 血清代替物含有 DMEM 培地
C: STEM med
D: Primate ES cell med
RT+/- 逆転写酵素添加あり/なし



(5) マウスゴルジマンノシダーゼIA欠損細胞の樹立

Cas9-CRISPR系を利用して、ゴルジマンノシダーゼIA欠損ES細胞を樹立するために、TT2細胞にMAN1A1に対するgRNAを発現するプラスミドDNAを導入した。現在までのところ、欠損細胞は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※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、研究者個人に帰属されます。