

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07003

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞が産生するポドカリキシンの糖鎖構造と機能の解明

研究課題名(英文) Glycomic study of podocalyxin from human induced pluripotent stem cells

研究代表者

豊田 英尚 (Toyoda, Hidenao)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：70217579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトポドカリキシンは165kDaのシアロ糖タンパク質として腎糸球体に存在しているが、ヒトiPS細胞が産生するポドカリキシンはblue native PAGEによる解析の結果、720kDa以上の巨大分子として発現していることが示された。糖鎖分析を行った結果、ケラタン硫酸の基本骨格であるGal 1-4GlcNAc(6S) 1-3Gal 1-4GlcNAc(6S) 1の繰り返し構造と、Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1の繰り返し構造の糖鎖が含まれていることが示された。これらの特殊な構造の糖鎖が細胞表面を覆っていることが未分化状態維持に大きく寄与していることが予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞の研究で使用されている未分化マーカーの多くは、ポドカリキシン上のケラタン硫酸様糖鎖を認識していると推測されている。しかしながらヒトiPS細胞を用いた分析化学的な糖鎖研究例は少なく、特にケラタン硫酸の分析は非常に高度な技術を要するため、その詳細は国内外で大きな注目を集めている。ポドカリキシンはがん細胞の悪性度マーカーという側面もあるために、幹細胞研究のみならず、がん研究の面からもポドカリキシンの糖鎖研究は大きな意義を持っている。以上のことから、本研究で明らかにされた、ヒトiPS細胞が産生しているポドカリキシン上の糖鎖構造の情報は、様々な研究分野の進展に大きく寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Podocalyxin (PC) was initially identified as a sialylated glycoconjugate in rat glomerular podocytes. Recently, many epitopes of undifferentiated state markers in human iPS cells have been found to be glycans attached to PC. Thus, the elucidation of glycan structures in PC from human iPS cells is required for the progress of regenerative medicine. PC is a protein with a calculated molecular weight of 55 kDa, although various molecular weights have been reported, presumably due to post-translational glycosylation. In this study, the molecular weight of PC in human iPS cells has been shown to be >720 kDa by blue native PAGE. Then, we have devised methods for the analysis of sialic acids and keratan sulfates. It was clarified that PC in human iPS cells is heavily sialylated. Furthermore, very low-sulfated keratan sulfates with poly N-acetyl lactosamine structures were found, and this unique structure seems to have a significant role in the undifferentiated state of human iPS cells.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：グリコサミノグリカン iPS細胞 ポドカリキシン ケラタン硫酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ポドカリキシンは 1984 年にラットの糸球体上皮細胞で発見されたシアル酸に富む複合糖質であり、糸球体ろ過に必要なスリット構造を作るなど重要な腎機能を担っている。最近、ヒト iPS 細胞を認識する多くの未分化マーカーのエピトープが、ヒト iPS 細胞表面のポドカリキシンに結合している糖鎖であることが示され、その構造と機能が注目されている。ポドカリキシンはヒト EC 細胞(embryonal carcinoma, 胚性がん細胞)、血球芽細胞、血管内皮、脳などにも存在していることが報告されているが、様々な分子量が報告されており、結合している糖鎖の相違に起因すると考えられている。特に、ヒト iPS 細胞では分子量 200kDa 以上の高分子として存在し、抗体を使用した研究から硫酸化多糖の一種であるケラタン硫酸 (KS) が結合していることが予想されている。このようにヒト iPS 細胞が未分化状態を維持するための非常に重要な因子としてポドカリキシンに関心が集まっており、ポドカリキシンの糖鎖構造の解明は再生医療分野における重要な研究テーマと言える。

ヒト iPS 細胞の研究で広く使用されている未分化マーカーである TRA-1-60 と TRA-1-81 はポドカリキシン上のケラタン硫酸様の糖鎖を認識していると推測されている。しかしながら、角膜や軟骨の生化学的・分析化学的なケラタン硫酸の研究が一段落してしまった現在、ケラタン硫酸を化学的に解析できる研究室はほとんど無くなってしまっている。また培養技術の進歩によって、未分化なヒト iPS 細胞を実験に使用する障壁は低くなったものの、分化していない良好な状態のヒト iPS 細胞を集めることは今でも簡単ではない。これら二つの要因により、ヒト iPS 細胞の分析化学的な糖鎖研究例は少なく、特にケラタン硫酸を含むグリコサミノグリカンは分析に高度な技術を要するため、その研究結果は国内外で注目を集めている。ポドカリキシンには、がんの悪性度マーカーという側面もあるために、幹細胞研究者のみならず、がん研究者からも大きな注目を集めている。

2. 研究の目的

ES 細胞や iPS 細胞を用いた研究は再生医療・新薬開発に大きく寄与するものと期待されており、その分化誘導メカニズムの解析を様々な視点から行うことが重要である。本研究は、ヒト iPS 細胞に特徴的に発現していることが予想されるケラタン硫酸の構造と機能の解明を含む、ヒト iPS 細胞をターゲットとした糖鎖研究である。最近、ポドカリキシンに特異的に結合しているケラタン硫酸などの糖鎖がヒト iPS 細胞の未分化性維持に中心的役割を担っていることが示唆されている。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞が産生するポドカリキシン上の糖鎖に着目し、糖鎖の構造解析を通じて分化誘導メカニズムの分子基盤解明を試みた。ポドカリキシンは、腎糸球体ではシアロ糖タンパクとして存在して糸球体ろ過に必要なスリット構造を作るのに寄与していると考えられており、またヒト iPS 細胞では、ケラタン硫酸様糖鎖が結合していることを大きな特徴としていることが示唆されている。そこで研究に先立って、簡便で高感度な、シアル酸分析法とケラタン硫酸分析法を新規に確立し、ポドカリキシンの糖鎖構造の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1)ヒト iPS 細胞の培養：日本国内で広く標準株として用いられている 201B7 株を、Thermo Fisher Scientific 社の Essential 8 培地を用いて、無血清・フィーダー細胞無しの条件で培養した。

(2)ポドカリキシンの精製：ヒト iPS 細胞由来ポドカリキシンの精製は、R-10G 抗体結合カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて行なった。

(3)ポドカリキシンの分子量測定：blue native PAGE を用いて分子量測定を行なった。

(4)ポドカリキシンの糖鎖構造解析：ヒトポドカリキシンのアミノ酸配列情報から、5カ所の N-結合型糖鎖ドメイン、3カ所のグリコサミノグリカン結合ドメイン、多数のムチン結合ドメインが想定されているが、その糖鎖構造は解明されていない。本研究ではシアル酸の分析法とケラタン硫酸の分析法を新たに検討した。シアル酸の分析法：シアル酸は糖脂質中の糖鎖や N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖の非還元末端に存在することが知られている。哺乳動物に存在するシアル酸は主に N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) および N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) であり、組織ごとに存在量が異なるだけでなく、年齢や種によって生成量が異なることが知られている。ポストカラム HPLC を用いると、試料を注入するだけで分離・誘導体化・検出を自動で行うことができるため、誘導体化や過剰な試薬の妨害を考慮する必要がなく、だれでも正確に分析することが可能である。最近我々は、親水性相互作用クロマトグラフィーによるシアル酸の分離後、2-シアノアセトアミドを用いて蛍光ポストカラム検出する高感度な HPLC を報告したが、この方法は溶離液に高濃度の有機溶媒を必要とする。そこで本研究では環境に配慮し、陰イオン交

換クロマトグラフィーを用いてシアル酸を分離後、2-シアノアセトアミドを用いて蛍光ポストカラム検出する HPLC を新たに確立した。検出限界は Neu5Ac と Neu5Gc 共に 5 pmol (S/N=3)、定量範囲は 20 pmol - 15 nmol と高感度だった。ケラタン硫酸の分析法：ヒト系球体のポドカリキシンが分子量 165kDa なのに対して、ヒト iPS 細胞のポドカリキシンは 200kDa 以上の高分子として存在している。ヒト iPS 細胞のポドカリキシンは硫酸化多糖の一種であるケラタン硫酸が結合していることが大きな特徴であると予想されることから、新規にケラタン硫酸の分析法を確立して解析を試みた。ケラタン硫酸はケラターゼ 消化によって、Gal 1-4GlcNAc(6S) および Gal(6S) 1-4GlcNAc(6S) に分解される。2-シアノアセトアミドはコンドロイチン硫酸由来の不飽和二糖に対して特異的で高感度な蛍光ポストカラム試薬として有用である。しかしながら Gal 1-4GlcNAc(6S) および Gal(6S) 1-4GlcNAc(6S) に本法を適用すると、コンドロイチン硫酸由来の不飽和二糖の場合の 10 分の 1 以下の感度しか得られなかった。そこで Gal 1-4GlcNAc(6S) および Gal(6S) 1-4GlcNAc(6S) に適した蛍光ポストカラム試薬の詳細な検討を行った結果、複数の有用な試薬を見いだした。本研究では、逆相イオンペアクロマトグラフィーあるいはゲル濾過と組み合わせた蛍光ポストカラム HPLC を確立した。検出限界は Gal 1-4GlcNAc(6S) と Gal(6S) 1-4GlcNAc(6S) 共に 0.1 ng (S/N=3)、定量範囲は 0.25 ng - 1000 ng と高感度だった。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞 (201B7 株) を無血清・フィーダー細胞無しの条件で培養して解析に必要な未分化状態の iPS 細胞を集めた。我々が以前の研究で報告した、ヒト iPS 細胞のポドカリキシンを特異的に認識するモノクローナル抗体である R-10G をリガンドとしたアフィニティカラムでポドカリキシンを精製した。Blue native PAGE による分子量測定の結果、分子量 720 kDa 以上のスミアなバンドとして検出された。これまでヒト iPS 細胞が産生するポドカリキシンは 200kDa 以上の高分子という認識であったが、コアタンパク質の分子量が 55kDa であることを考慮すると、きわめて高度に糖鎖付加を受けた複合糖質であることが明らかになった。新規に確立したシアル酸分析法での解析結果からは、ヒト iPS 細胞のポドカリキシンにも多数のシアル酸が結合していることが示された。またケラタン硫酸の分析をおこなったところ、ケラターゼ 消化後に生じるオリゴ糖として Gal 1-4GlcNAc(6S) のみが定量され、Gal(6S) 1-4GlcNAc(6S) は検出されなかった。このことは、ヒト iPS 細胞のポドカリキシンにはケラタン硫酸が結合しているが、角膜や軟骨に存在しているケラタン硫酸の様に、構成糖のガラクトースの 6 位の水酸基が硫酸化された、“高度に硫酸化された構造” を含まないことを意味していた。さらに、エンド-β-ガラクトシダーゼ消化物を蛍光ポストカラム HPLC で分析したところ、GlcNAc(6S)-Gal, GlcNAc-Gal が検出された。以上のことから、ケラタン硫酸の基本骨格である Gal 1-4GlcNAc(6S) 1-3Gal 1-4GlcNAc(6S) 1 の繰り返し構造と、Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1 の繰り返し構造である *N*-アセチルポリラクトサミン構造が含まれていることが示された。動物細胞は細胞間シグナル伝達に際して、プロテオグリカンに結合しているヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸などの硫酸化多糖を利用している。したがって、ヒト iPS 細胞において、本研究で明らかになった特殊な構造の糖鎖が細胞表面を覆っていることによって、様々なシグナルが細胞内に伝達されるのをブロックしていることが未分化状態維持に大きく寄与していることが予想された。

本研究では、ヒト iPS 細胞から精製したポドカリキシンだけではなく、iPS 細胞が産生しているグリコサミノグリカンをケラタン硫酸も含めて一斉分析した。その結果、いくつかの興味深い現象を見出した。その一つとして、ヒト iPS 細胞がマウス ES/iPS 細胞と比べて大量にヒアルロン酸を産生していることが明らかとなり、今後のヒト iPS 細胞を用いた再生医療研究へと発展させたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Y. Nagai, H. Nakao, A. Kojima, Y. Komatsubara, Y. Ohta, N. Kawasaki, N. Kawasaki, H. Toyoda, T. Kawasaki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Glycan epitopes on 201B7 human-induced pluripotent stem cells using R-10G and R-17F marker antibodies | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biomolecules | 6. 最初と最後の頁 508 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom11040508, Published: 29 March 2021 | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 H. Nakao, T. Yamaguchi, K. Kawabata, K. Higashi, M. Nonaka, M. Tuiji, Y. Nagai, H. Toyoda, Y. Yamaguchi, N. Kawasaki, T. Kawasaki. | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Characterization of novel antibodies that recognize sialylated keratan sulfate and lacto-N-fucopentaose I on human induced pluripotent cells: comparison with existing antibodies | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Glycobiology | 6. 最初と最後の頁 150-164 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwac074 | 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 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 W.S. Koh, C. Knudsen, T. Izumikawa, E. Nakato, K. Grandt, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, H. Nakato | 4. 巻 136 |
| 2. 論文標題 Regulation of morphogen pathways by a Drosophila chondroitin sulfate proteoglycan Windpipe | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 J. Cell Sci. | 6. 最初と最後の頁 1-14 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.260525 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 泉川友美、藤原裕吾、河野和人、町田修、佐藤怜、豊田亜希子、中藤博志、豊田英尚 |
| 2. 発表標題 ショウジョウバエのコンドロイチン硫酸プロテオグリカンWindpipeの糖鎖分析 |
| 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 豊田英尚、藤原裕吾、望月香奈江、榊原涼介、阪口公美、豊田亜希子、泉川友美 |
| 2. 発表標題 複合糖質の微量分析法の確立と生体成分および糖鎖を含む生物薬品への応用 |
| 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 斉藤萌、正田朋佳、小松原侑夏、豊田亜希子、泉川友美、豊田英尚 |
| 2. 発表標題 放線菌由来ヒアルロニダーゼを用いたヒアルロン酸の微量分析法の確立と生体試料への応用 |
| 3. 学会等名 第71回 日本薬学会関西支部会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 斉藤萌、小松原侑夏、豊田亜希子、泉川友美、豊田英尚 |
| 2. 発表標題 蛍光ポストカラムHPLCによるシアル酸の分析法の確立と哺乳動物血清への応用 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小松原侑夏、細田菜摘、豊田亜希子、泉川友美、豊田英尚 |
| 2. 発表標題 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた生体内シアル酸の蛍光ポストカラム分析 |
| 3. 学会等名 第39回日本糖質学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小松原侑夏、生田悠人、堀井俊佑、豊田亜希子、泉川友美、豊田英尚 |
| 2. 発表標題 蛍光プレカラムHPLCを用いた生体試料中ヒアルロン酸の微量分析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第141年会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|