

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659015

研究課題名(和文)リアルタイムPCRを用いた糖鎖情報解析法の開発

研究課題名(英文)Development of the method for the collection of physiological information on carbohydrate chains via the real-time PCR

研究代表者

輿石 一郎(Koshiishi, Ichiro)

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：20170235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Proximity Ligation Assay (PLA)法を糖鎖情報解析に応用するための基礎検討を行った。糖鎖情報としては、細胞膜糖脂質GM1に特異的に結合するコレラトキシンBサブユニットをプローブとするPLA法により、GM1の集積を数値化し、これを指標として脂質ラフトの形成を評価する系を構築した。さらに、生体内糖鎖構造の変動に伴い発現される抗糖鎖自己抗体(IgM)の網羅的解析を実施するため、2種類のオリゴDNAを、各々糖鎖還元末端および抗ヒトIgM抗体に結合することで、PLA法によりIgMをサブクラスとする抗糖鎖自己抗体を網羅的に検出する系を構築した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to establish a novel method to obtain the physiological information on the carbohydrate chains via the proximity ligation assay (PLA) technique. It is generally known that GM1, mono-sialylated ganglioside, clusters on the lipid raft, so that the evaluation of GM1 clustering should indicate the formation of lipid raft on the cell membrane. So, we established the PLA method by using cholera toxin B subunit as a probe, to which oligo-DNA chains were attached. Next, we tried to establish a PLA method for the comprehensive detection of anti-carbohydrate antibodies (IgM sub-class). To achieve this objective, we prepared DNA probes through binding two types of oligo-DNA to the reducing terminal of carbohydrate chain and anti-IgM antibody, respectively. This technique makes it possible to sensitively and comprehensively detect the anti-carbohydrate antibodies.

研究分野：生物分析化学

キーワード：Proximity ligation assay リアルタイムPCR 脂質ラフト 抗糖鎖自己抗体

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、細胞膜表面、細胞外マトリクス等に存在し、その構造的特徴に依存した生理機能を発現している。生体から発信される糖鎖情報を取得することは、医学・薬学にとって重要な課題である。我々は、なかでも、細胞膜表面における糖鎖の位置情報、ならびに、特殊構造を有する糖鎖発現に伴う抗糖鎖自己抗体の発現に焦点を絞り、研究を行ってきた。しかしながら、既存の手法では、この目的にかなう測定法を確立することが困難であった。一方、2011年に、リアルタイムPCRを用いたタンパク質定量法として、Proximity Ligation Assay (PLA) 法が開発され、Applied Biosystems 社よりキットとして入手が可能となった。我々、PLA 法を糖鎖解析法として用いることで、我々の研究目的を達成できるのではないかと考え、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

(1) 細胞膜には、糖たんぱく質ならびに糖脂質が存在し、これらの糖鎖は“細胞の顔”とたとえられている。近年、細胞膜は、均質な構造ではなく、ゲル状態と液晶状態が混在する多様な構造であることが示されている。なかでも、脂質ラフト (Lipid raft) は、糖鎖を有するスフィンゴ脂質、スフィンゴミエリン、コレステロールが高度に集積した構造体であり、膜タンパク質の機能発現の場となっている。すなわち、GM1 の構成糖鎖は、脂質ラフト中では、密集した状態で存在する。そこで、我々は、細胞膜上の脂質ラフトの形成度合いを数値化することを目的として、GM1 に特異的に結合するコレラトキシン B ユニートをプローブとした PLA 法を構築し、細胞に応用するための問題点を明らかにすることとした。

(2) 生体内では、おおかたの細胞が成熟した状態で存在し、それぞれの果たすべき役割を果たしている。高度に分化・成熟した細胞では、膜表面の糖鎖もまた固有の構造を呈している。その一方で、細胞が、何らかの原因により未分化の方向に形態を変化させた場合、それに付随して糖鎖構造が変化し得る。生体は、通常、存在が稀で、特徴的な構造を有する糖鎖に対する抗糖鎖自己抗体を発現する。そこで、我々は、IgM をサブクラスとする抗糖鎖自己抗体の発現を、多様な構造を有する糖鎖ならびに抗 IgM 抗体をプローブとする PLA 法により、網羅的に解析する方法を確立するための基礎検討を実施した。

3. 研究の方法

(1) リアルタイム PCR 装置は、パーソナルユースが可能な、ロッシュ社製 LightCycler Nano を用いた。ピオチニル化コレラトキシン B サブユニットは、Sigma-Aldrich 社より購入した。PLA 法に用いる測定キットは、

Applied Biosystems 社より購入した。また、操作手順は、測定キットに添付されたプロトコールに従った。モデル細胞系として、PC12 細胞をフラスコを用いて、推奨された培養法により培養し、脂質ラフト形成の評価に供した。

PLA 法に影響を及ぼし得る過硫酸化糖鎖として、ヘパリン、コンドロイチン硫酸 E、コンドロイチン硫酸 D は、過去に生化学工業社より購入したストック品を用いて、阻害実験を実施した。また、過度に硫酸化されたコンドロイチン硫酸は、コンドロイチン 4 硫酸を原材料として、常法に従い過硫酸化を行った。また、硫酸化度の測定は、コンドロイチナーゼ消化により生成する不飽和二糖を蛍光ポストカラム誘導体化 HPLC により定量することで実施した。

(2) IgM をサブクラスとする抗糖鎖自己抗体の網羅的検出には、多様性を有する糖鎖と普遍的な IgM 認識系とを組み合わせねばならない。そのためには、糖鎖還元末端に、オリゴ DNA を直接結合させねばならない。これには、Applied Biosystems 社のキットでは対応できない。しかしながら、Applied Biosystems 社はキットの情報を公開していない。そこで、本実験では、オリゴ DNA のデザインならびに合成を、独自に実施し、オリゴ DNA 標識糖鎖の合成を行った。抗 IgM 抗体は、Sigma-Aldrich 社より購入した。

4. 研究成果

(1) コレラトキシン B サブユニットを 2 群に分け、各々に biotin-3'-オリゴ DNA または biotin-5'-オリゴ DNA をストレプトアビジンを介して結合させ、これらプローブを添加した培地中で PC12 細胞を培養した。細胞膜表面におけるこれらコレラトキシン B サブユニットの集積を PLA 法により評価した。本法の概念図を図 1 に示す。

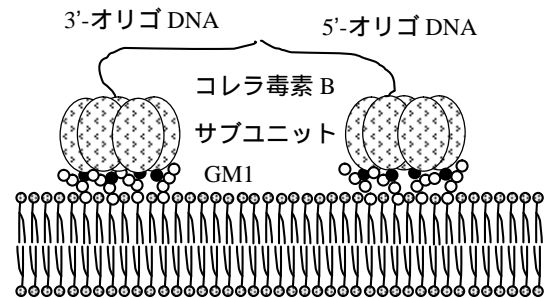


図 1 細胞膜表面におけるコレラトキシン B サブユニットの集積

これらの基礎検討結果より、問題点として、次の 2 点が挙げられた。

骨髄由来細胞の多くが、顆粒中または、細胞表面にプロテオグリカンを貯留または発現しており、これら硫酸化グリコサミノグリカン鎖の PLA 法への影響を考慮しなくてはならない。

絶対的な定量評価が困難であり、相対的評価のみが可能である。

肥満細胞やマクロファージは、細胞内顆粒中にセルグリシンと称するプロテオグリカンを貯留するが、そのグリコサミノグリカン鎖は、分化・成熟に伴い、過度に硫酸化される。結合組織型肥満細胞では、グリコサミノグリカンは過度に硫酸化されたヘパリンである。一方、粘膜型肥満細胞および常在性マクロファージでは、グリコサミノグリカンは、Di-diSE ユニットを有する過硫酸化コンドロイチン/デルマトン硫酸である。そこで、生体より単離精製された一般的なグリコサミノグリカン（肥満細胞由来ヘパリン、皮膚由来デルマトン硫酸、軟骨由来コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸）による PLA 法への影響について検討した。結果を図 2 に示す。縦軸には、グリコサミノグリカン存在下および非存在下での Ct 値の差 (Ct) を示した。

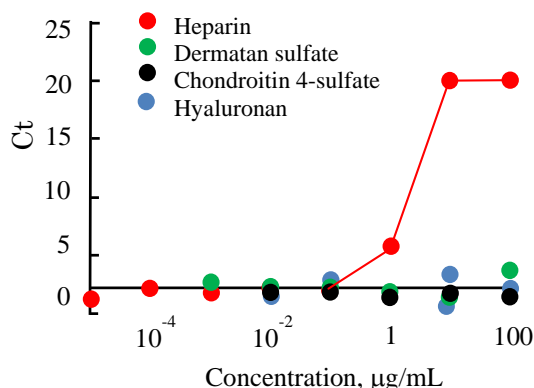


図 2 生体由来グリコサミノグリカン鎖の PLA 法への影響

さらに、コンドロイチン 4 - 硫酸を原料として、常法に従い、過硫酸化を行った。硫酸化の試薬濃度を調整することで、Di-diSE-rich コンドロイチン硫酸 (Di-diSE 含量 70-75%)、Di-triS-rich コンドロイチン硫酸 (Di-triS 含量 50-60%)、Di-tetraS-rich コンドロイチン硫酸 (Di-tetraS 含量 70-90%) を合成した。これら過硫酸化コンドロイチン硫酸の PLA 法への影響について検討した。結果を図 3 に示す。

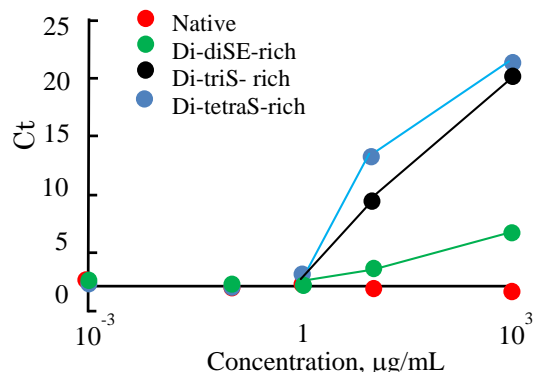


図 3 過硫酸化コンドロイチン硫酸の PLA 法への影響

以上の結果より、ヘパリンを含有する結合組織型肥満細胞では、脱顆粒により PLA 法が阻害されることが明らかとなった。また、過硫酸化コンドロイチン硫酸を含有する粘膜型肥満細胞およびマクロファージでは、Di-diSE 含量が 50% を超える場合には、これら過硫酸化コンドロイチン硫酸の影響を加味しなくてはならない。一方、巨核球/血小板では、2 糖あたり硫酸基が 1 個結合したコンドロイチン硫酸が顆粒中に含まれている。また、神経系の細胞表面には、膜結合型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが存在するが、これらのグリコサミノグリカン鎖もまた、2 糖あたり硫酸基が 1 個結合した構造をとることから、これらのグリコサミノグリカンの PLA 法への影響はないものと結論できた。

(2) 生体は自己を構成する生体内分子に対して自己抗体を発現する場合がある。その中に、糖鎖自己抗体がある。一般に知られている例として、A 型の血液型のヒトは、糖鎖である B 抗原に対する自己抗体を有している。哺乳動物では、抗原に感作すると、まず最初に、免疫グロブリンのなかでも特徴的な 5 量体からなる IgM を産生する。その後、B 細胞はクラススイッチングにより、IgG 等の免疫グロブリンを産生する。すなわち、糖鎖自己抗体発現の早期検出には、IgG に比して発現量の少ない IgM をサブクラスとする糖鎖自己抗体を検出することが有効と考えられる。IgM からなる糖鎖自己抗体の PLA 法による検出の概略図を図 4 に示す。

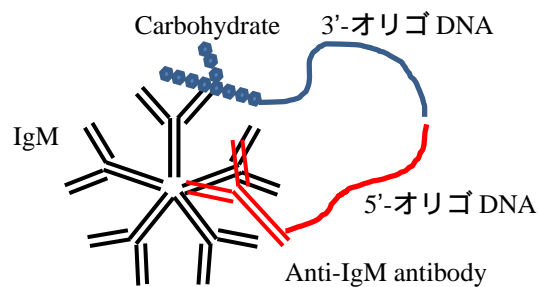


図 4 PLA 法による IgM 糖鎖自己抗体の検出

しかしながら、Applied Biosystem 社が供給している PLA 法用キットは、2 種類のビオチニル化オリゴ DNA をストレプトアビジンを介して抗体に結合させるものであり、糖鎖還元末端へのオリゴ DNA の直接結合が困難である。そこで、全ての PLA 法用試薬を、独自に開発することとした。我々が確立した PLA 法用試薬の詳細を表 1 に示す。

オリゴ DNA(A)は、ビオチニル化抗 IgM 抗体にストレプトアビジンを結合させるためビオチン標識とした。一方、プリズモン共鳴法を用いた、糖鎖とレクチンの親和性解析を目的として、金薄膜に糖鎖を固定するため、

糖鎖の還元末端にスルフヒドリル基を導入する手法が既に確立されている。そこで、アミノ基とスルフヒドリル基の架橋試薬を用いて、糖鎖還元末端にアミノ基を導入したオリゴ DNA(B)と還元末端にスルフヒドリル基を導入した糖鎖を架橋することとした。

表 1 確立した PLA 法用試薬

名称	塩基配列(5'→3')および官能基
オリゴ DNA (A)	biotin-CGCATCGCCCTTGG ACTACGACTGACGAACCG CTTTGCCTGACTGATCGC TAAATCGTG-OH
オリゴ DNA (B)	P-TCGTGTCTAAAGTCCGT TACCTTGATTCCCCTAACC CTCTTGAAAAATTTCGGCA TCGGTGA-NH ₂
Primer Fwd	OH-CATCGCCCTTGGACTA CGA-OH
Primer Rev	OH-GGGAATCAAGGTAAC GGACTTTAG-OH
Connector DNA	OH-TACTTAGACACGACAC GATTTAGTTT-OH
Taqman probe	FAM-TGACGAACCGCTTT GCCTGA-TAMRA

我々は、例として、血液型が A 型のヒト赤血球より、A 抗原糖鎖を単離精製し、B 型ヒト血漿中に存在する抗糖鎖自己抗体である、抗 A 抗原抗体の検出を行った。クロマト分画により、粗精製した抗 A 抗原抗体を用いて、濃度依存性の応答曲線を得ることができた。今後、入手可能な糖鎖を用いることで、ヒト血漿中に発現される抗糖鎖自己抗体の網羅的解析法を確立し、疾患の早期検出の可能性を検討する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Junji Ogawa, Azusa Yokota, Takuya Araki, Tohru Aomori, Tomonori Nakamura, Koujirou Yamamoto, Ichiro Koshiishi, Quantitative evaluation of biliary elimination of gadoxetate, a magnetic resonance imaging contrast agent, via geometrical isomer-specific transporting system in rats, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 査読有
35, 2014, 362-371.
DOI: 10.1002/bdd.1907

〔学会発表〕(計 1 件)

時田佳治、高橋美貴、瀧川雄太、千島里佳、奥石一郎、リアルタイム PCR の生体成分測定装置としての有用性についての検証、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 ~ 28 日、神戸市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

奥石 一郎 (KOSHIISHI Ichiro)
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：20170235