

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462371

研究課題名(和文) GAGomics グリコサミノグリカンの網羅的解析 の軟骨、靱帯、腱への応用

研究課題名(英文) Application of GAGomics to cartilage, ligament and tendon

研究代表者

土屋 美加子 (TSUCHIYA, MIKAKO)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：90188582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化/タンデム質量分析を用いた4種類のグリコサミノグリカン(GAG)に由来する合計29種の分子種(23種の鎖内繰返し二糖、3種の遊離末端部分の単糖および二糖、3種のGAG結合部六糖)の網羅的解析法(GAGomics)を確立した。この方法をヒト軟骨、靱帯、腱から効率的にGAGを抽出する方法と組み合わせることにより、臨床検体のGAGomics解析が可能になる。

研究成果の概要(英文)：We developed a method for quantitative analysis of four classes of glycosaminoglycans (GAGs) using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). We demonstrated the quantification of a total of 29 saccharides (23 repeating disaccharides, 3 terminal mono- and disaccharides and 3 linkage hexasaccharides). The method with efficient extractions of GAGs from human cartilage, ligament and tendon can be used for clinical GAGomic analysis.

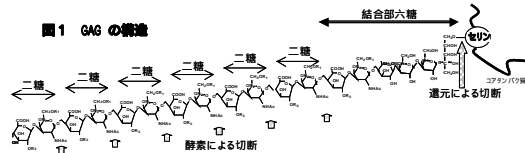
研究分野：生化学

キーワード：グリコサミノグリカン 質量分析 軟骨 靱帯

1. 研究の背景

(1) 整形外科領域における GAG 研究

グリコサミノグリカン (GAG) は、基本骨格をなす二糖 (図 1) の組み合わせとその結合様式によってコンドロイチン/デルマトラン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、およびケラタン硫酸の 4 クラスに分類され、様々な部位・程度で硫酸化、エピマー化などを受けるヘテロ性の高い糖鎖である。



軟骨、靭帯、腱などの組織の構造と機能は、わずかに存在する細胞ではなく、高度に特殊化された細胞外基質によって担われている。GAG はその細胞外基質の主要な構成成分としてコラーゲンなどのタンパク質とともに運動器の働きに大きな役割を果たしている。例えば軟骨の荷重に対する抵抗性と潤滑な表面は、多量に含まれるコンドロイチン硫酸の陰性電荷が水を結合しこれをコラーゲンの網目構造によって緊縛することで可能になっており、靭帯や腱では GAG はコラーゲン繊維を保持する働きを持つと考えられる。

軟骨、靭帯、腱などの細胞外基質は、その物理的性質について生体力学による機能解析と生体工学による人工組織の作成が、また規則正しい高度に組織化された構造がナノスケールでの形態学的観察の対象になるなど最先端の研究が行われていた。しかしながら構成分子の観点からの研究は、複雑な構造ゆえに分子を組織から抽出し定量することが長らく困難で、当時漸くタンパク質を対象として遺伝子解析・遺伝子操作、さらにはゲノミクス、プロテオミクスなどの網羅的オミクス研究により、各組織における特徴的な分布や成長発達段階・病的状態での変化の詳細が明らかにされつつあるところであった。もう一つの重要な構成分子である GAG に至っては、よく似ているが異なる構造を正確に同定し定量する方法がなかったため網羅的解析の対象となっていなかった。

(2) 質量分析法と従来の GAG 解析法との比較

オミクス解析の基礎である質量分析法は質量を厳密に測定することによって対象分子を同定する手段であり、特にタンデム質量分析は、液体クロマトグラフィーと組み合わせること (LC-MS/MS) で対象分子の開裂と分子量測定の一連の繰り返しによる高い特異性を持ち、解析ソフトによる多様な分析が可能な優れた解析技術であって、従来 GAG 解析に用いられてきた呈色反応や抗体とは比較にならない精度、特異性、定量性を持つ。

(3) 質量分析法による GAG 解析の整形外科領域への応用

GAG の質量分析はすでにムコ多糖症患者などの血液や皮膚で試みられているが、整形外科領域への応用は未だ限られている。その理由は、解析対象である軟骨、靭帯、腱などでは、様々な種類の GAG がタンパク質と結合して不均一に分布しているためであり、これらの組織の詳細な GAG 解析を行うためには、GAG の抽出法と多種の GAG の分離同定定量法の確立が必要である。

2. 研究の目的

- (1) 多種の GAG を定量的に一斉解析する方法 (GAGomics) を完成させる。
 - (2) 生化学的手法を駆使して軟骨、靭帯、腱などの組織からの GAG の抽出効率を高める前処理条件を定める。
- これらを組み合わせて、運動器各組織における GAGomics を行い GAG 組成の詳細を明らかにする方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LC-MS/MS 条件の最適化と、GAGomics 解析法の確立

LC: カラム、分離溶媒、流速、溶出濃度 勾配

MS/MS: ・Q1イオン、Q3イオンの選定
・イオンソース (ネブライザーガス)
・カーテンガスの流量、ヒーター温度)
・コリジョンエネルギー、各種電圧パラメータ

解析: ・SRM (Selected reaction monitoring, 選択反応モニタリング)
・Prec (Precursor ion scan, 前駆イオンスキャン)

(2) LC-MS/MS のための検体組織前処理の最適化

組織片の作成: ミクロトームや組織破砕器により微小组織を作成する。

パパイン、コラゲナーゼなどタンパク質分解酵素を組み合わせ、軟骨、靭帯、腱について可溶化の最適条件 (温度、pH、酵素量、処理時間) を決定する。

さらに可溶化された抽出液を用いて

二糖単位への切断: コンドロイチナーゼ ABC, ケラタナーゼ, ヘパリチナーゼ, ヒアルロニダーゼ各々による分解条件 (温度、pH、酵素量、処理時間) の最適化を行う。

タンパク質からの切断: テトラヒドロホウ酸による還元処理

(3) 鎖の長さとお本数の推測

図1に示すように、結合部六糖は鎖の本数に一致し、これに対する二糖単位の割合が高くなるほど鎖長は長くなることを用いて、鎖の本数と長さを推定する。

(4) ヒト組織の GAG 解析

ヒト患者検体を用いて、(1)、(2)で最適化された条件で、各種分子の定量を行う。

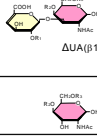
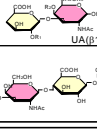
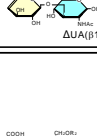
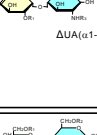
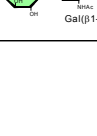
(5) データ解析

GAG の詳細な組成について、軟骨、靭帯、腱、関節軟骨の深度、椎間板、靭帯、腱の部位、それぞれの組織における健常部と損傷部位などで比較する。

4. 研究成果

(1) GAGomics 解析法の確立

4種類のグリコサミノグリカン(GAG)に由来する鎖内の繰り返し二糖の種々硫酸化体を23種類、鎖の遊離末端部分の単糖2種類と二糖1種類、および、GAGとタンパク質の結合部の六糖構造を3種類、あわせて29種類の分子種をLC-MS/MSによって分離定量する方法を確立した。これによって一挙に4種類のGAGの定量的解析を行うのみならず、その鎖長の推測も特別な修飾を行うことなく同時に行うことができる可能性を示し、発表〔原著論文、学会発表〕した。

Class	Abbreviation	Structure	R ₁	R ₂	R ₃	M.W.
CS/DS	ΔCS-0S	 ΔUA(β1-3)GalNAc	H	H	H	379.3
	ΔCS-2S		SO ₃ H	H	H	459.4
	ΔCS-4S		H	SO ₃ H	H	459.4
	ΔCS-6S		H	H	SO ₃ H	459.4
	ΔCS-2S4S		SO ₃ H	SO ₃ H	H	539.4
	ΔCS-2S6S		SO ₃ H	H	SO ₃ H	539.4
	ΔCS-4S6S	H	SO ₃ H	SO ₃ H	539.4	
	ΔCS-1S	SO ₃ H	SO ₃ H	SO ₃ H	619.5	
	GalNAc-4S	-	SO ₃ H	H	301.3	
	GalNAc-6S	-	H	SO ₃ H	301.3	
	GalNAc-4S6S	-	SO ₃ H	SO ₃ H	381.3	
	CS-4S	CS-4S	 UA(β1-3)GalNAc	H	SO ₃ H	H
CS-6S		H		H	SO ₃ H	477.4
ΔHexaSCh-0S-ol						1013.9
HA	ΔHA	 ΔUA(β1-3)GlcNAc	-	-	-	379.3
HS	ΔHS-0SNH	 ΔUA(α1-4)GlcN	H	H	H	337.3
	ΔHS-0S		H	H	Ac	379.3
	ΔHS-2SNH		SO ₃ H	H	H	417.3
	ΔHS-6SNH		H	SO ₃ H	H	417.3
	ΔHS-NS		H	H	SO ₃ H	417.3
	ΔHS-2S		SO ₃ H	H	Ac	459.4
	ΔHS-6S		H	SO ₃ H	Ac	459.4
	ΔHS-2S6S		SO ₃ H	SO ₃ H	Ac	539.5
	ΔHS-2SNS		SO ₃ H	H	SO ₃ H	497.4
	ΔHS-6SNS		H	SO ₃ H	SO ₃ H	497.4
	ΔHS-2S6SNH		SO ₃ H	SO ₃ H	H	497.4
	ΔHS-1S		SO ₃ H	SO ₃ H	SO ₃ H	577.5
KS	KS-6S	 Gal(β1-4)GlcNAc	H	SO ₃ H	-	463.4
	KS-6S6S		SO ₃ H	SO ₃ H	-	543.4

解析対象とする29種類の糖
(原著論文より)

(2) 検体組織前処理の最適化および、鎖の長さとお本数の推測

生体組織のGAGomics解析を行うために、GAGを高い効率で抽出し、完全に二糖化する前処理条件を検討した。豚関節軟骨・靭帯におけるGAG組成解析を行い、従来法と比較することにより、この方法が生体組織に適用できることを示した〔原著論文、学会発表〕。ラット関節軟骨、十字靭帯、側副靭帯でも解析を行い、GAGの差異と機能との関連を示唆した〔学会発表〕。

(3) ヒト組織の GAG 解析

ヒト黄色靭帯のGAGomicsを行い、少量の臨床検体でも十分解析可能であることを示した〔学会発表〕。

(4) そのほかの分野への進展

ムコ多糖症の診断〔原著論文〕や、軟骨発生へのGAG解析〔原著論文〕の応用の可能性についても発表した。

さらに多くの組織におけるGAGの分子組成の特徴を広く系統的に検討し、これをヒト病的変性組織にまで広げることによって、それぞれの組織のもつ機能的・形態的特徴におけるGAG分子各々の役割ならびに病的変化の意義の解明につながり、疾患の病態解明のみならず生体力学、生体工学をも含めた幅広い分野への寄与により、整形外科疾患の診断・治療・予防に広く貢献できると期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Kubaski F., Osago H., Mason R. W., Yamaguchi S., Tsuchiya M., Tomatsu S. **Glycosaminoglycans detection methods: applications of tandem mass spectrometry.** *Frontiers in Bioscience*, 査読有 *in press*

Kobayashi-Miura M., Miura T, Osago H., Yamaguchi Y, Aoyama T, Tanabe T, Matsumoto K, Fujita Y. **Rat articular cartilages change their tissue and protein compositions during perinatal period.** *Anat. Histol. Embryol.*, 査読有 45: 9-18 (2016)

Osago H., Shibata T., Hara N., Kuwata S., Kono M., Uchio Y., Tsuchiya M. **Quantitative analysis of glycosaminoglycans, chondroitin/dermatan sulfate, hyaluronic acid, heparan sulfate, and keratan sulfate by LC-ESI-MS/MS.** *Anal. Biochem.*, 査読有 467: 62-74

(2014)

島根大学・医学部・技術専門職員

〔学会発表〕(計 9件)

長子晴美、三浦美樹子、原 伸正、日吉峰麗、土屋美加子、**ラット支持組織におけるグリコサミノグリカン組成の比較**、第88回日本生化学大会、神戸(神戸ポートピアホテル)、12月1-4日(2015)

河野通快、長子晴美、土屋美加子、松崎雅彦、内尾祐司、**質量分析による腰椎黄色靭帯のグリコサミノグリカン解析**、第30回日本整形外科学会基礎学術集会、富山(富山国際会議場)、10月22-23日(2015)

長子晴美、原 伸正、日吉峰麗、河野通快、内尾祐司、土屋美加子、**ヒト靭帯におけるグリコサミノグリカンの解析**、第40回日本医用マススペクトル学会年会、浜松(アクトシティ浜松)、9月17-18日(2015)

長子晴美、原 伸正、日吉峰麗、河野通快、内尾祐司、土屋美加子、**確認イオン比を利用したGAG二糖異性体の一斉定量解析**、第63回質量分析総合討論会、つくば(つくば国際会議場)、6月17-19日(2015)

長子晴美、原 伸正、日吉峰麗、桑田卓、河野通快、内尾祐司、土屋美加子、**生体組織のグリコサミノグリカンの定量解析**、第87回日本生化学会大会、京都(京都国際会館)、10月15-18日(2014)

6. 研究組織

(1)研究代表者

土屋 美加子 (TSUCHIYA Mikako)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：90188582

(2)連携研究者

内尾 祐司 (UCHIO Yuji)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：20223547

桑田 卓 (KUWATA Suguru)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：80509000

河野 通快 (KONO Michihaya)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：30547740

(3)研究協力者

長子 晴美 (OSAGO Harumi)