

## 博士論文要旨

### 論文題名：ヒト人工多能性幹細胞由来シアロ糖タンパク質 ポドカリキシンのグリコミクス研究

立命館大学大学院薬学研究科  
薬学専攻博士課程  
永井 裕子

ポドカリキシンはラットの糸球体上皮細胞で最初に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、ヒト人工多能性幹細胞 (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胚性腫瘍細胞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 250 kDa 以上の高分子として存在し、多様な糖鎖が結合していると予想されている。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、ポドカリキシンの特殊な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である。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構造解析を通じた未分化状態維持メカニズムの分子基盤解明を試みた。フィーダー細胞存在下に無血清培養した未分化状態のヒト iPS 細胞(201B7 株)の細胞抽出液を作製し、R-10G 抗体のアフィニティカラムに 2 回かけることによりポドカリキシンを高度に精製した。LC/MS/MS 解析によるタンパク質の同定および各種のグリコシダーゼ消化、ウェスタンブロッティングによる解析を行った。ヒト iPS 細胞由来 R-10G 抗原タンパク質は複雑な糖鎖修飾を受けたポドカリキシンであることが明らかになった。また、ウェスタンブロッティングによる解析から、このタンパク質はケラタン硫酸様糖鎖に修飾されていることが示された。この糖鎖はエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼでは高い反応性が見られたが、ケラタナーゼ II 消化には消化抵抗性を示した。新しい分析法を確立してヒト iPS 細胞由来ポドカリキシンの糖鎖解析を行ったところ、腎ポドカリキシンと同様にシアル酸を多く含んでいることが分かった。また、ポリ-N-アセチルラクトサミン様構造を含んだ硫酸化度の非常に低い、特殊なケラタン硫酸が結合していることが明らかになり、未分化状態の維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

## Abstract of Doctoral Dissertation

### **Title: Glycomic study of podocalyxin, a sialoglycoprotein from human induced pluripotent stem cells**

Doctoral Program in Pharmacy  
Graduate School of Pharmacy  
Ritsumeikan University  
NAGAI Yuko

Podocalyxin was initially identified as a heavily sialylated transmembrane glycoconjugate in rat glomerular podocytes. In the kidneys, podocytes, along with glomerular endothelial cells and the glomerular basement membrane, form the glomerular filtration barrier. Recently, many epitopes of undifferentiated state markers in human induced pluripotent stem (iPS) cells have been found to be glycans attached to podocalyxin. It is reported that podocalyxin is also present in human embryonal carcinomas. Therefore, the study of the structures and functions of glycans is considered highly important. Podocalyxin is a protein consisting of 528 amino acids with a calculated molecular weight of 55 kDa, although various molecular weights have been reported, presumably due to post-translational glycosylation. The molecular weight of a form of podocalyxin in human iPS cells has been shown to be >250 kDa, depending on the diversity of glycans. Thus, the elucidation of glycan structures in podocalyxin from human iPS cells is required for the progress of regenerative medicine. A human iPS cell line, 2017B, was cultured in KSR-based medium on mouse embryonic fibroblasts. The cell lysate was purified twice using an R-10G-affinity column to isolate podocalyxin. Then, the podocalyxin was analyzed by LC/MS/MS and glycosidase digestion followed by western blotting. It was found that the R-10G antigen protein was podocalyxin with complicated carbohydrate chains. Also, western blotting showed that this protein was modified by a keratan sulfate-related chain. We have devised sensitive methods for the structural analysis of sialic acids and keratan sulfates. It was clarified that podocalyxin in human iPS cells is heavily sialylated, as are renal proteins. Furthermore, a very low-sulfated keratan sulfate with a poly-*N*-acetylglucosamine structure was found, and this new structure seems to have a significant role in the undifferentiated state of human iPS cells.