

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06995

研究課題名(和文)ポリシアル酸による新しい細胞機能調節機構の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of new cellular functions mediated by polysialic acid

研究代表者

佐藤 ちひろ (SATO, Chihiro)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：10343211

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)：脊椎動物脳には学習・記憶・社会性行動に深くかかわる酸性多糖"ポリシアル酸(polySia, PSA)"が存在する。我々はこれまでpolySiaがその機能を発揮する際、従来考えられてきた反接着性相互作用を持つ"反発性の場"をつくりだしているだけでなく、神経作用因子の保持および放出(提示)作用を持つ"誘因性の場"も提示することを世界に先駆けて明らかにしてきた。本研究では、我々が明らかにしてきたpolySiaの"誘因性の場"に着目し、神経作用因子の保持メカニズムをpolySia鎖の構造や相互作用モードをその生合成酵素と共に検証した。

研究成果の概要(英文)：Polysialic acid (polySia/PSA) is present in brain and is involved in learning, memory and social interaction. So far, we have been demonstrated that polySia is involved in brain functions not only due to its large exclusion volume but also due to molecule binding properties. In this research, we demonstrated that polySia chains show characteristic features towards molecule-binding properties via biosynthetic enzymes, ST8SIA2 and ST8SIA4.

研究分野：機能生物化学

キーワード：ポリシアル酸 精神疾患 神経細胞接着分子 ポリシアル酸転移酵素

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物脳には学習・記憶・社会性行動に深くかかわる酸性多糖"ポリシアル酸(polySia, PSA)"が存在する。我々はこれまで polySia がその機能を発揮する際、従来考えられてきた反接着性相互作用を持つ"反発性の場"をつくりだしているだけでなく、神経作用因子の保持および放出(提示)作用を持つ"誘因性の場"も提示することを世界に先駆けて明らかにしてきた。つまり polySia が神経栄養因子(BDNF), 増殖因子(FGF2), 神経伝達物質(DA)と特異的に相互作用し、その機能を制御することを明らかにしてきている。本研究では、我々が明らかにしてきた polySia の"誘因性の場"に着目し、神経作用因子の保持メカニズムを polySia 鎖の構造や相互作用モードを検証することで、分子レベルで詳細に解析することを目的としている。

2. 研究の目的

- (1) polySia-NCAM と神経作用因子の分子保持機構の解明
- (2) polySia-NCAM の polySia 鎖の構造解析

3. 研究の方法

(1) polySia-NCAM と神経作用因子の分子保持および放出機構の解明: ヒト HEK293 細胞にヒト NCAM-Fc を遺伝子導入し、分泌型 NCAM-Fc を安定発現する細胞株を樹立した。可溶性 NCAM 安定発現細胞に対して、各種ポリシアル酸転移酵素を組み込んだプラスミド(pBud ベクター骨格)を用いて polySia-NCAM を発現する安定細胞株を作製した。なお、この際にベクターに組み込むポリシアル酸転移酵素の組み合わせは我々が明らかにした精神疾患患者型酵素 ST8SIA2(SCZ)も含めて、ST8SIA2 単独、ST8SIA4 単独、ST8SIA2+ST8SIA4(協調型)、ST8SIA2(SCZ); 統合失調症型, SNP-7) 単独、ST8SIA2(SCZ)+ST8SIA4(協調型)であり、これらは全て脳で発現している組み合わせである。それぞれの酵素が生合成する polySia-NCAM-Fc を分子相互作用解析と、polySia 鎖の解析に用いるために、各種安定発現株の培養上清を大量に調製し、protein A-Sepharose を用いて精製を行った。分子間力測定のために、精製した各種 polySia-NCAM-Fc は、センサーチップ上に調製した自己組織膜に埋め込んだ protein-A を介して固相化し、アナライズとしてすでに結合性が明らかになっている各種神経作用因子(BDNF, proBDNF, FGF2)との相互作用解析を行った(図1)。加えて、polySia-NCAM 鎖の反接着作用を測定するために、polySia-NCAM-Fc の他に、endo-N 消化をして、polySia 鎖を重合度 2~3 の oligoSia 鎖に変化させた oligoSia-NCAM, シアリダーゼ消化をして全てのシアル酸を消失させた asialo-NCAM-Fc を調製し、それぞれを固相化、およびアナライズとして解析することにより、NCAM や polySia-NCAM のホ

モフィリックな相互作用解析を行った。

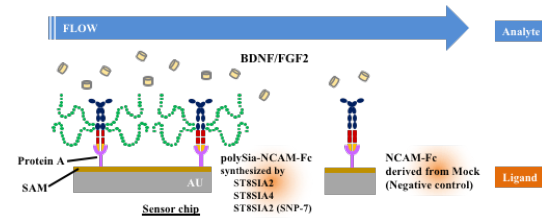


図1. 分子間相互作用の解析法(ピアコア)

(2) polySia-NCAM の polySia 鎖の構造解析: 各種 polySia-NCAM-Fc を monoQ 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて全負電荷量を測定した。また、polySia-NCAM 上の polySia 鎖を蛍光酸加水分解-陰イオン交換 HPLC 法により、最長重合度を測定した。また各種抗 oligo/polySia 抗体を用いたウエスタンブロットティング法により、oligo/polySia の存在形態およびその量を解析した。

4. 研究成果

まず、ST8SIA2, ST8SIA4, ST8SIA2(SNP-7)由来の polySia-NCAM-Fc を用いて(2)の polySia-NCAM の解析を行った。polySia 抗体での染色の結果、ST8SIA2, ST8SIA4 の量は ST8SIA4 が 1.5~2 倍染色性が高かった。SNP-7 の染色性は激減していた。鎖長は ST8SIA2 と ST8SIA4 ではほとんど変化がなかったが、統合失調症型の SNP-7 の鎖長は著しく低下していた(図2)。次に、polySia-NCAM-Fc の負電荷を陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出画分により確認したところ、最も多くの分子が溶出するピークのネットネガティブチャージは、94(ST8SIA2), 86(ST8SIA4), 67 (SNP-7)であり、SNP-7 の負電荷の著しい低下が確認された。

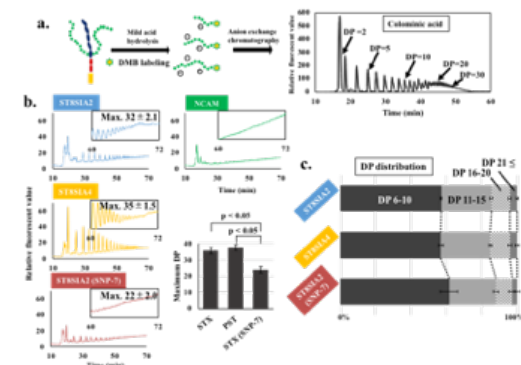


図2. polySia-NCAM-Fcの構造解析
a. 蛍光標識加水分解-陰イオン交換HPLC法。b. polySia-NCAM-Fc上のpolySia鎖の鎖長解析
c. 鎖長の分布図。

以上の結果から、ST8SIA2 と ST8SIA4 の生合成する polySia 量は ST8SIA2 よりも ST8SIA4 の方が多かったが、質の違いは不明のままであった。一方、統合失調症型の SNP-7 では質も量も著しい低下が見られた。

次に、調製し、化学的に評価された polySia-NCAM-Fc を用いて、表面プラズモン共鳴法に基づく FGF2 および BDNF の分子結合性の解析をピアコア測定機を用いて行った。その結果、ST8SIA2 と ST8SIA4 が生合成した polySia 鎖は FGF2 および BDNF に対して異なる結合性を示した。特にその違いは BDNF に対して顕著であった。ST8SIA2 と SNP-7 が生合成した polySia-NCAM で比較するとその分子保持機能はいずれも顕著に低下していた。

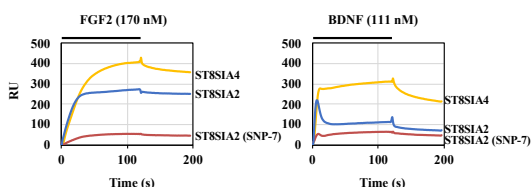


図3. 分子間相互作用の解析

次に、polySia-NCAM のホモフィリックな相互作用を解析するために図 4(左)で示すような測定法を考案した。すなわち、polySia-NCAM のセンサーグラムから、negative control として NCAM-Fc のセンサーグラムを引く。本来、この鎖は正の RU 値を示すが、アナライトによっては負の RU 値を示す。この負の RU 値は、NCAM-Fc が結合する非特異的もしくは特異的な分子を polySia 鎖が排除していることとみなすことができる。すなわち、polySia 鎖の反接着作用を測定することが可能となる。実際、polySia-NCAM(ST8SIA2)-Fc を固相化し、polySia-NCAM-Fc をアナライトにし、NCAM-Fc をコントロールにして差をとると、図 4 右のような、負の RU 値が見いだされた。これは polySia 鎖の反接着作用を測定したと考えられた。一方、SNP-7 の生合成した polySia-NCAM を検証すると、負の RU 値が測定できなかった。すなわち、反接着作用が損なわれたことが明らかになった。また、polySia-NCAM-(ST8SIA4)-Fc を固相化し、同様の実験を行うと、負の RU 値ではなく、正の RU 値が得られた。すなわち、これまで反接着作用を持つとされてきた polySia-NCAM においても、ST8SIA4 の生合成する polySia-NCAM では正の相互作用をすることが明らかになった。

さらに、この傾向は Endo-N で、鎖長を DP=2 ~3 にした oligoSia-NCAM で顕著であった。

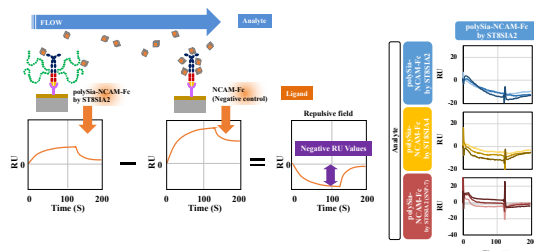


図4. 分子間相互作用の解析(ホモフィリック相互作用)

以上の結果から、polySia-NCAM-Fc は生合成するポリシアル酸転移酵素、ST8SIA2 および ST8SIA4 によって異なる polySia 鎖が生合成され、その鎖の違いは通常の方法では明らかにすることができず、分子結合性の性質でのみ明らかにすることが可能であることがわかった。すなわち、ST8SIA2 が生合成する polySia 鎖は分子結合性をもつ誘因性の場と、大きな分子に対する反接着的な性質をもつ反発性の場を提示する一方、ST8SIA4 は分子誘因性の場のみを提示していることが明らかになった。特に、polySia-NCAM-Fc 同士の結合性が観察され、これは新規な現象であり、今後のメカニズムの解析が待たれる。また、統合失調症型の SNP-7 が生合成する polySia 鎖は質も量も損なわれており、かつ BDNF や FGF2 に対する分子結合性だけでなく、polySia-NCAM に対する反発性の場も損なわれていることが明確になった。また、ここには示さないが、ST8SIA2+ST8SIA4, ST8SIA2(SNP-7)+ST8SIA4 が生合成する polySia-NCAM-Fc および、Ig5 の異なる N 型糖鎖の polySia 鎖の解析も併せて行い、それぞれの性質を明らかにしている。

以上の結果から、polySia-NCAM-Fc は、ST8SIA2 および ST8SIA4 で精緻に制御されること、統合失調症型の SNP-7 では polySia-NCAM の polySia 鎖の質も量も不全になり、機能も不全になることがわかった。従って、生合成された polySia-NCAM が正常であることは、反発性の場による細胞間隙の正常な制御のみならず分子誘因性の場である、分子保持および放出機能の正常な制御が発揮されことにつながり、精緻に制御されていることが示された。今後は、精神疾患に関わる polySia-NCAM の状態を詳細に検証するために、環境要因がおよぼす polySia-NCAM の発現制御機構の解明が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件) 全て査読有
佐藤ちひろ. 酸性糖鎖ポリシアル酸の新機能の発見とその応用展開. 化学と生物. In press (2018)

羽根正弥, 北島健, 佐藤ちひろ. (2017) ポリシアル酸転移酵素遺伝子 ST8SIA2 と精神疾患の関わり. (特集「糖鎖関連遺伝子から眺める疾患」佐藤ちひろ, 岡島徹也 編) 生化学. Vol.89, No 5. 634-643 (doi:10.14952/SEIKAGAKU.2017.890634)

Mori A, Hane M, Niimi Y, Kitajima K, Sato C. (2017) Different properties of polysialic acids synthesized by the polysialyltransferases

ST8SIA2 and ST8SIA4. *Glycobiology* 27(9), 834-846 (doi: 10.1093/glycob/cwx057)

Abe C, Nishimura S, Mori A, Niimi Y, Yang Y, Hane M, Kitajima K, Sato C. (2017) Chlorpromazine increases the expression of polySia in human neuroblastoma cells and mouse prefrontal cortex. *International Journal of Molecular Science* 18(6), pii: E1123. (doi: 10.3390/ijms18061123)

Yamaguchi S, Yoshimura A, Yasuda Y, Mori A, Tanaka H, Takahashi T, Kitajima K, Sato C. (2017) Chemical synthesis and evaluation of a disialic acid-containing dextran polymer as an inhibitor for the interaction between Siglec 7 and its ligand. *ChemBioChem*. 11, 1-11 (doi: 10.1002/cbic.201600694)

Wu D, Fujita A, Hamaguchi K, Delannoy P, Sato C, Kitajima K. (2017) Diverse subcellular localizations of the insect CMP-sialic acid synthetases. *Glycobiology*. pp.1-13 (doi: <https://doi.org/10.1093/glycob/cww128>)

Ohira S, Yasuda Y, Tomita I, Kitajima K, Takahashi T, Sato C, Tanaka H. (2017) Synthesis of End-functionalized Glycopolymers Containing $\alpha(2,8)$ Disialic Acids by π -Allyl Nickel Catalyzed Coordinating Polymerization and Their Interaction with Siglec-7. *Chem. Commun.* 53(3), 553-556 (doi: 10.1039/C6CC07115E)

Go S, Go S, Veillon L, Ciampa MG, Mauri L, Sato C, Kitajima K, Prinetti A, Sonnino S, Inokuchi JI. (2017) Altered expression of ganglioside GM3 molecular species and a potential regulatory role during myoblast differentiation. *J Biol Chem.* 292(17), 7074-7051. (doi: 10.1074/jbc.M116.771253)

Sato C, Hane M, Kitajima K. (2016) Relationship between ST8SIA2, polysialic acid and its binding molecules, and psychiatric disorders. *Biochim Biophys Acta.* 1860(8):1739-1752. (doi: 10.1016/j.bbagen.2016.04.015)

Hane M, Kitajima K, Sato C. (2016) Effects of intronic single nucleotide polymorphisms (iSNPs) of a polysialyltransferase, ST8SIA2 gene found in psychiatric disorders on its gene products. *Biochem Biophys Res Commun.* 478(3), 1123-1129. (doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.079)

〔学会発表〕(計 60 件)

Chihiro Sato. Genetic and environmental factors influence the ex- pression of polysialic

acid in brain. 24th International Symposium on Glycoconjugates; Aug. 27-Sep, 1, 2017; ICC Jeju, Jeju Island, Korea (基調講演)

Chihiro Sato. Attractive field of polySia synthesized by polysialyltransferases, ST8SIA2 and ST8SIA4. 1st International Conference on the Glycobiology of Nervous System; Sep. 2nd-5th, 2017; Korea University, Seoul, Korea (招待講演)

Chihiro Sato. Attractive field of polySia synthesized by polysialyltransferases, ST8SIA2 and ST8SIA4. 1st International Mechanisms that SNPs of the ST8SIA2/STX gene lead to psychiatric disorders. 4th Latin American Congress of Glycobiology, Oct. 4-7, 2017; CDMX, Mexico (基調講演)

佐藤ちひろ. 酸性糖鎖ポリシアル酸の新機能の発見とその応用展開. 日本農芸化学会中部支部 第179回例会; 2017年6月24日; 信州大学伊那キャンパス, 長野 (平成29年度農芸化学奨励賞受賞講演)

Chihiro Sato. Effects of SNPs genetic variations in the ST8SIA2 gene from the psychiatric disorder patients on the expression and functions of polysialic acid. Glycoscience Japan- The Netherlands Joint Seminar 2016; Apr. 19-22, 2016, Leiden, The Netherlands (招待講演)

Chihiro Sato. Polysialic acid as an attractant for bioactive compounds. Frontiers in Sialic Acid Research Conference: From Structural Diversity to Functional Glycobiology; Apr. 23-25, 2016, Bad Lauterberg, Germany (招待講演)

Chihiro Sato. Regulation of Quality and Quantity of Polysialic Acid by ST8SIA2/STX: Lessons from its SNPs Reported in Psychiatric Diseases. The Sialoglyco 2016 conference; Nov. 14-17, 2016, Santa Barbara, USA (招待講演)

佐藤ちひろ. ミクログリアが放出するエキソソームに含まれるシアリダーゼの同定とその機能解析. 第89回日本生化学会大会シンポジウム「エクソソームバイオロジーのフロントライン: 糖鎖関連分子の機能に迫る」(世話人: 佐藤ちひろ, 原田陽一郎); 2016年9月25-27日; 仙台国際センター, 仙台

佐藤 ちひろ. 酸性糖鎖ポリシアル酸の新機能の発見とその応用展開. 日本農芸化学会 2017年度京都大会「農芸化学女性研究者賞」受賞

講演; 2017年3月18日; 京都女子大学、京都 (受賞講演)

Chihiro Sato. Structural and functional changes of polysialic acid related with genetic alterations of ST8SIA2/STX in psychiatric diseases. 23rd International Symposium on Glycoconjugates (Glyco23); September 15-20, 2015; Hotel Le Méridien Lav, Split, Croatia (基調講演)

Chihiro Sato. Effects of the genetic alterations of ST8SIA2/STX reported from psychiatric diseases on the structure and functions of polysialic acid. 3rd International symposium on Glyco-neuroscience; January 14-16, 2016; Westin Hotel Awaji, Awaji, Hyogo, Japan (招待講演)

佐藤ちひろ. 高次脳機能や精神疾患に関与するポリシアル酸構造の新機能. 日本薬学会東海支部特別講演会; 2015年10月23日; 静岡県立大学小講堂, 静岡 (特別講演)

Airi Mori, Masaya Hane, Ken Kitajima, Chihiro Sato. Different properties of polysialic acids synthesized by either or both of the polysialyltransferases ST8SIA2 and ST8SIA4. 24th International Symposium on Glycoconjugates; Aug. 27-Sep, 1, 2017; ICC Jeju, Jeju Island, Korea (口頭)

Chikara Abe, Saki Nishimura, Airi Mori, Yuki Niimi, Yi Yang, Masaya Hane, Ken Kitajima, Chihiro Sato. Effects of chlorpromazine, an anti-schizophrenia reagent, on the expression of the polysialic acid in human neuroblastoma cells and mouse brains. 24th International Symposium on Glycoconjugates; Aug. 27-Sep, 1, 2017; ICC Jeju, Jeju Island, Korea (口頭)

Yuya Iwaki, Chihiro Sato, Ken Kitajima. Incorporation mechanism of deaminoneuraminic acid (KDN) in mammalian cells. 1st International Conference on the Glycobiology of Nervous System; Sep. 2nd-5th, 2017; Korea University, Seoul, Korea (口頭発表)

Atsushi Yoshimura, Mizuki Sumida, Ken Kitajima, Chihiro Sato. Discovery of exosomal glycosidases in microglia and macrophages cells. 1st International Conference on the Glycobiology of Nervous System; Sep. 2nd-5th, 2017; Korea University, Seoul, Korea (口頭発表)

郷詩織、郷慎司、ベイロン・ルーカス、井ノ口仁一、佐藤ちひろ、北島健. 筋分化に伴う GM3 分子種変化の発見とその分子機構の解明. 第

36 回日本糖質学会年会; 2017年7月19-21日; 旭川市民文化会館, 北海道 (口頭)

森愛理、羽根正弥、北島健、佐藤ちひろ. ポリシアル酸転移酵素 ST8SIA2 と ST8SIA4 が合成するポリシアル酸の構造と性質. 第36回日本糖質学会年会; 2017年7月19-21日; 旭川市民文化会館, 北海道 (口頭)

北島健、呉迪、藤田明子、安川裕子、谷口善仁、亀井保博、佐藤ちひろ. シアル酸発現が抑制される CMP-シアル酸合成酵素の2種類の点変異体メダカは異なる運命をもつ. 日本動物学会第88回富山大会; 2017年9月21-23日; 富山県民会館, 富山 (口頭)

郷詩織、郷慎司、Lucas Veillon、井ノ口仁一、佐藤ちひろ、北島健. 筋分化過程における GM3 分子種変化の分子機構解析. 第5回若手による骨格筋細胞研究会; 2017年11月13-14日; 神戸大学医学部神緑会館, 兵庫 (口頭)

森愛理、羽根正弥、北島健、佐藤ちひろ. ポリシアル酸転移酵素 ST8SIA2 と ST8SIA4 が合成するポリシアル酸の構造と性質. 第14回若手のカフォーラム; 2017年11月11日; 藤田保健衛生大学, 愛知 (口頭)

石川寛菜*、佐藤ちひろ、北島健. 動物由来シアル酸9-リン酸合成酵素(SPS)の性質の解析. 日本農芸化学会 2018年度名古屋大会; 2018年3月15-19日; 名城大学, 愛知 (口頭)

津田佳奈*、高橋映莉乃*、北島健、佐藤ちひろ. α 2,8-シアル酸転移酵素(ST8SIA)の生合成するエピトープと抗シアル酸抗体の特異性の解析. 日本農芸化学会 2018年度名古屋大会; 2018年3月15-19日; 名城大学, 愛知 (口頭)

[図書] (計 1 件)
Sato C. Releasing mechanism of neurotrophic factors via polysialic acid. Vitamines and Hormones. 104, 89-112. (2017)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤ちひろ (Chihiro SATO)
名古屋大学 生物機能開発利用研究センター・准教授
研究者番号：10343211

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

羽根 正弥 (Masaya Hane)
名古屋大学生物機能開発利用研究センター・研究員

阿部 智佳羅 (Chikara Abe)
名古屋大学大学院生命農学研究科学生

森 愛理 (Airi Mori)
名古屋大学大学院生命農学研究科学生