

平成21年 5月22日現在

研究種目：学術創成研究費
 研究期間：2004～2008
 課題番号：16GS0313
 研究課題名（和文） 糖鎖生物学と神経科学の融合による神経糖鎖生物学領域の創成
 研究課題名（英文） Establishment of Neuroglycobiology
 (Glycobiological Approach for Neuroscience)
 研究代表者 岡 昌吾 (OKA SHOGO)
 京都大学・医学研究科・教授
 研究者番号：60233300

研究成果の概要：生物はタンパク質だけでなく糖鎖にもその生体情報を書き込み、同一タンパク質に多様な機能を付加していると考えられる。神経発生、神経回路形成は細胞の分化、移動、軸索の伸長、標的細胞の認識、シナプス形成など多くの過程を経て行われる。これらの過程において特徴的な発現を示す糖鎖について研究を行い、糖鎖が神経発生、神経可塑性において重要な役割を担っていること示す知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	83,000,000	24,900,000	107,900,000
2005年度	80,400,000	24,120,000	104,520,000
2006年度	78,000,000	23,400,000	101,400,000
2007年度	77,500,000	23,250,000	100,750,000
2008年度	78,000,000	23,400,000	101,400,000
総計	396,900,000	119,070,000	515,970,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：糖鎖生物学、神経発生、神経回路形成

1. 研究開始当初の背景

生体に存在する糖タンパク質は、たとえ同一タンパク質であっても発現している組織や細胞によって異なる構造の糖鎖を持つ。生物はタンパク質だけでなく糖鎖にもその生体情報を書き込んでいると考えられる。核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命情報鎖としての糖鎖に内在されている生体情報の解読が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究ではHNK-1糖鎖やポリシアル酸など神経系に特徴的に発現する糖鎖に書き込まれた情報の解読をめざすとともに、神経発生

や神経回路形成に重要な糖鎖を新たに見いだし、糖鎖を含めた糖タンパク質としての機能解析を通して、神経発生の原理や神経機能維持機構の総合的理解をめざすことを目的としている。

3. 研究の方法

神経可塑性や学習記憶に重要な役割を担うHNK-1糖鎖を中心にその生合成調節機構を酵素学的、構造生物学的手法により解析した。また機能については主にその生合成酵素であるGlcAT-P遺伝子を欠損するマウスを解剖学的、細胞生物学的手法により解析した。神経発生過程で重要な糖鎖に関しては主にメ

ダカをモデル動物として用い、分子生物学的手法や質量分析法などにより解析した。

4. 研究成果

神経系の大きな特徴は可塑性を持つことである。この可塑性が記憶学習などの脳高次機能の分子基盤であると考えられている。HNK-1 糖鎖は神経系の特に神経回路形成時に高発現し、また神経細胞の軸索伸長、標的細胞の認識、シナプス形成に重要であると考えられている細胞接着分子に特徴的な発現を示す糖鎖である。研究代表者らは既に HNK-1 糖鎖が海馬におけるシナプス長期増強 (LTP) や空間認知能力に重要な機能糖鎖であることを明らかにしている。そこで本研究では HNK-1 糖鎖を中心に糖鎖の発現調節機構および神経可塑性における糖鎖の果たす役割の解明を目指し以下の成果を得た。

1) HNK-1 糖鎖生合成に関与する 2 種のグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P, GlcAT-S) が細胞膜上のリン脂質によりその活性が制御され、その基質認識を変化させる非常に興味深い酵素であることを明らかにした。この結果は糖鎖の発現が糖転移酵素の存在する生体膜上の微細環境の変化によっても制御されている可能性を示す重要な知見であると考えられる。

2) GlcAT-P, -S と硫酸基転移酵素 (HNK-1ST) が細胞内で複合体を形成し、効率のよい HNK-1 糖鎖合成に関与していることを明らかにした。さらに GlcAT-P は細胞内で COPII 輸送小胞の形成に必須な Sar1 と相互作用していることを明らかにした。この結果は、糖鎖の生体における精密な発現調節には単純な糖転移酵素の発現量だけではなく、一群の糖転移酵素の相互作用、さらには細胞内輸送に関与する分子との相互作用など、より大きな糖鎖発現調節に関わる分子複合体によって行われている可能性を示す重要な知見であると考えられる。

3) GlcAT-P 遺伝子欠損マウス脳ではほとんどの HNK-1 糖鎖が消失するもののペリニューロナルネットと呼ばれる特徴的な構造体に HNK-1 糖鎖発現が見いだされた。この構造体に存在する HNK-1 糖鎖は従来知られている構造のものではない新たな構造を持つ糖鎖であると考えられた。近年の研究において、神経可塑性とくに視覚野における眼優位性と呼ばれる現象とペリニューロナルネットとの関係が注目されていることから、HNK-1 糖鎖と神経可塑性との関連をしめす重要な知見である。

4) HNK-1 糖鎖消失に伴い引き起こされる LTP (長期増強) の減弱の機構解明のため、海馬の初代神経細胞培養系を用いて解析した。その結果 AMPA 型グルタミン酸受容体の一つである GluR2 上に HNK-1 糖鎖が発現

していることを見出し、さらに神経突起上の GluR2 の分布が HNK-1 糖鎖消失に伴って変化している観察結果が得られた。この結果は神経可塑性の分子基盤と考えられている長期増強の機構解明に糖鎖を含めた糖タンパク質としての機能解析の必要性を示したものである。

神経の初期発生過程における糖鎖の機能解析は主にメダカを用いて解析し、以下の成果を得た。

5) メダカ発生過程で大きく変動する糖鎖については 2 次元マップ法および定量的質量分析法を用いて解析した。またその情報をもとに、複合型糖鎖の生合成に重要な B4GalT2 遺伝子ノックダウン実験を行い、複合型糖鎖が神経系の誘導に重要な脊索形成に深く関わっていることを明らかにした。さらにその機構を解析したところ複合型糖鎖は後期原腸形成期における収斂伸長運動のとくに伸長運動に必須な糖鎖であることが明らかとなった。

6) メダカにおいても HNK-1 糖鎖が神経発生初期から発現していることが明らかとなった。そこで、その合成酵素のクローニングを行い、GlcAT-P 遺伝子ノックダウンおよび過剰発現実験により頭部の形成に異常が観察された。以上の結果はメダカ胚発生過程には制御された糖鎖の発現が必須であり、神経発生過程における複合型糖鎖の重要性を示すものである。

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 72 件)

- 1) D. Anzai, Y. Tonoyama, A. Ikeda, T. Kawasaki, and S. Oka. Regulated expression of HNK-1 carbohydrate is essential for medaka (*Oryzias latipes*) embryogenesis. *Glycobiology* in press (2009). 査読有
- 2) Y. Tonoyama, D. Anzai, A. Ikeda, S. Kakuda, M. Kinoshita, T. Kawasaki, S. Oka. Essential role of beta 1,4-galactosyltransferase 2 during medaka (*Oryzias latipes*) gastrulation. *Mech. Dev.* in press (2009). 査読有
- 3) T. Yoshihara, K. Sugihara, Y. Kizuka, S. Oka, and M. Asano. Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in beta 4-galactosyltransferase- II-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **284** (18), 12550-12561 (2009). 査読有
- 4) Y. Kizuka, Y. Tonoyama, and S. Oka. Distinct transport and intracellular activities of two GlcAT-P isoforms. *J. Biol. Chem.* **284** (14), 9247-9256 (2009). 査読有

- 5) N. Kawasaki, CW. Lin CW, R. Inoue, KH. Khoo, N. Kawasaki, BY. Ma, S. Oka, M. Ishiguro, T. Sawada, H. Ishida, T. Hashimoto, and T. Kawasaki. Highly Fucosylated N-Glycan Ligands for Mannan-binding Protein Expressed Specifically on CD26 (DPPVI) Isolated from a Human Colorectal Carcinoma Cell Line, SW1116. *Glycobiology*. **19** (4), 437-450, (2009). 査読有
- 6) E. Shimada, M. Kinoshita, and K. Murata. Expression of cardiac myosin light chain 2 (mcmlc2) during embryonic heart development in medaka fish, *Oryzias latipes*, and phylogenetic relationship with other myosin light chains. *Develop. Growth Differ.*, **51**, 1-16 (2009). 査読有
- 7) H. Yagi, K. Yamada, E. Ohno, M. Utsumi, Y. Yamaguchi, E. Kurimoto, N. Takahashi, N. S. Oka, T. Kawasaki, and K. Kato. Development and application of high performance liquid chromatography map of glucuronyl N-glycans. *Open Glycoscience*, **1**:8-18 (2008). 査読有
- 8) I. Morita, Y. Kizuka, S. Kakuda, and S. Oka. Expression and function of the HNK-1 carbohydrate. *J. Biochem.* **43**: 719-724 (2008). 査読有
- 9) Y. Kizuka, K. Kobayashi, S. Kakuda, Y. Nakajima, S. Itoh, N. Kawasaki, and S. Oka. Laminin-1 is a novel carrier glycoprotein for the non-sulfated HNK-1 epitope in mouse kidney. *Glycobiology* **18**: 331-338 (2008). 査読有
- 10) A. Burgess, SR. Wainwright, LS. Shihabuddin, U. Rutishauser, T. Seki, and I. Aubert. Polysialic acid regulates the clustering, migration, and neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Develop Neurobiol* **68**: 1580-1590 (2008). 査読有
- 11) S. Itoh, A. Hachisuka, N. Kawasaki, N. Hashii, R. Teshima, T. Hayakawa, T. Kawanishi, and T. Yamaguchi: Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry*, **47**, 10132-10154 (2008). 査読有
- 12) M. Inoue, K. Kato, H. Matsuhashi, Y. Kizuka, T. Kawasaki, and S. Oka. Distributions of glucuronyltransferases, GlcAT-P and GlcAT-S, and their target substrate, the HNK-1 carbohydrate epitope in the adult mouse brain with or without a targeted deletion of the GlcAT-P gene. *Brain Res.* **1179**, 1-15 (2007). 査読有
- 13) BY. Ma, N. Nakamura, V. Dlabac, H. Naito, S. Yamaguchi, M. Ishikawa, M. Nonaka, M. Ishiguro, N. Kawasaki, S. Oka, and T. Kawasaki. Isolation, cloning, and characterization of a novel phosphomannan-binding lectin from porcine serum. *J. Biol. Chem.* **282** (17), 12963-75 (2007). 査読有
- 14) BY. Ma, M. Kaihama, M. Nonaka, S. Oka, N. Kawasaki and T. Kawasaki. LPS suppresses expression of asialoglycoprotein-binding protein through TLR4 in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages. *Glycoconj. J.* **24**, 243-249 (2007). 査読有
- 15) T. Seki, T. Namba, H. Mochizuki, and M. Onodera. Clustering, migration and neurite formation of neural precursor cells in the adult rat hippocampus. *J Comp Neurol* **502**: 275-290 (2007). 査読有
- 16) H. Yamamoto, H. Takematsu, R. Fujinawa, Y. Naito, Y. Okuno, G. Tsujimoto, A. Suzuki, and Y. Kozutsumi. Correlation Index-Based Responsible-Enzyme Gene Screening (CIRES), a Novel DNA Microarray-Based Method for Enzyme Gene Involved in Glycan Biosynthesis. *PLoS ONE* **2**, e1232. (2007). 査読有
- 17) Y. Naito, H. Takematsu, S. Koyama, S. Miyake, H. Yamamoto, R. Fujinawa, M. Sugai, Y. Okuno, G. Tsujimoto, T. Yamaji, Y. Hashimoto, S. Itoharu, T. Kawasaki, A. Suzuki, and Y. Kozutsumi. Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Mol. Cell Biol.* **27**, 3008-3022 (2007). 査読有
- 18) N. Koike, Y. Kassai, Y. Kouta, H. Miwa, M. Konishi, and N. Itoh. Brorin, a novel secreted BMP antagonist, promotes neurogenesis in mouse neural precursor cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 15843-15850 (2007). 査読有
- 19) T. Shiba, S. Kakuda, M. Ishiguro, I. Morita, S. Oka, T. Kawasaki, S. Wakatsuki, and R. Kato. Crystal structure of GlcAT-S, a human glucuronyltransferase, involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Proteins* **65** (2), 499-508 (2006). 査読有
- 20) Y. Kizuka, T. Matsui, H. Takematsu, Y. Kozutsumi, T. Kawasaki, and S. Oka. Physical and functional association of glucuronyltransferases and sulfotransferase involved in HNK-1 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **281** (19), 13644-13651 (2006). 査読有
- 21) S. Itoh, N. Kawasaki, N. Hashii, A. Harazono, Y. Matsuishi, T. Kawanishi, and T. Hayakawa: N-linked oligosaccharide analysis by liquid chromatography with graphitized carbon column/liner ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and

- negative ion modes, *J. Chromatogr. A*, **1103**, 296-306 (2006). 査読有
- 22) M. Hirano, B.Y. Ma, N. Kawasaki, K. Okimura, M. Baba, T. Nakagawa, K. Miwa, N. Kawasaki, S. Oka, and T. Kawasaki. Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin alpha and beta. *J. Immunology* **175** (5), 3177-3185 (2005). 査読有
- 23) H. Tagawa, Y. Kizuka, T. Ikeda, S. Itoh, N. Kawasaki, H. Kurihara, M. L. Onozato, A. Tojo, T. Sakai, T. Kawasaki, and S. Oka. Non-sulfated form of the HNK-1 carbohydrate is expressed in mouse kidney *J. Biol. Chem.* **280** (25), 23876-23883 (2005). 査読有
- 24) M. Terada, K.H. Khoo, R. Inoue, C.I. Chen, K. Yamada, H. Sakaguchi, N. Kadowaki, B.Y. Ma, S. Oka, T. Kawasaki, and N. Kawasaki. Characterization of oligosaccharide ligands expressed on SW1116 cells recognized by Mannan-binding protein a highly fucosylated poly-lactosamine type N-glycan. *J. Biol. Chem.* **280** (12), 10897-10913 (2005). 査読有
- 25) S. Kakuda, Y. Sato, Y. Tonoyama, S. Oka, and T. Kawasaki. Different acceptor specificities of two glucuronyltransferases involved in the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate. *Glycobiology* **15** (2): 203-210 (2005). 査読有
- 26) A. Miyake, Y. Nakayama, M. Konishi and N. Itoh. Fgf19 regulated by Hh signaling is required for zebrafish forebrain development. *Dev. Biol.* **288**, 259-275 (2005). 査読有
- 27) K. Uemura, H. Yamamoto, T. Nakagawa, K. Nakamura, N. Kawasaki, S. Oka, B.Y. Ma, and T. Kawasaki. Superoxide production from human polymorphonuclear leukocytes by human mannan-binding protein (MBP). *Glycoconj J.* **21**, 79-84 (2004). 査読有
- 28) S. Kakuda, T. Shiba, M. Ishiguro, H. Tagawa, S. Oka, Y. Kajiwara, T. Kawasaki, S. Wakatsuki, and R. Kato. Structural basis for acceptor substrate recognition of a human glucuronyltransferase, GlcAT-P, an enzyme critical in the biosynthesis of the carbohydrate epitope HNK-1. *J Biol Chem.* **279**, 22693-22703 (2004). 査読有
- 29) S. Kakuda, S. Oka, T. Kawasaki. Purification and characterization of two recombinant human glucuronyltransferases involved in the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **35**, 111-119 (2004). 査読有
- [学会発表] (計 53 件)
- 1) Y. Kizuka, Y. Tonoyama, S. Oka

- Two GlcAT-P isoforms are distinctly transported in cell. Clinical and Translational Research on Cancer; Glycomics Applications 伊勢 2009 年 3 月 26 日
- 2) D. Anzai, Y. Tonoyama, E. Tane, S. Oka. The functional analysis of HNK-1 carbohydrate in medaka embryogenesis Joint meeting of the Societe' France de Biologie du De'velopment / Japanese Society of Developmental Biologists フランス Giens 2008 年 9 月 13-17 日
- 3) 木塚康彦、竹内祐介、森田一平、角田品子、岡昌吾、糖転移酵素 GlcAT-P の細胞質領域による分泌制御と活性調節 第 28 回日本糖質学会 つくば 2008 年 8 月 20 日
- 4) 岡昌吾、スパイン形成における HNK-1 糖鎖の役割 第 31 回日本神経科学学会 東京 2008 年 7 月 10 日
- 5) 殿山泰弘、安西大輔、池田篤史、角田品子、木下政人、川寄敏祐、岡昌吾、Beta1,4-galactosyltransferase 2 is required for convergence and extension movements during medaka (*Oryzias latipes*) gastrulation 第 41 回日本発生生物学会 (国際発生生物学会と合同) 2008 年 5 月 28 日 徳島
- 6) 山下彩貴、木塚康彦、角田品子、岡昌吾、GlcAT-P 遺伝子欠損マウスにおける残存 HNK-1 糖鎖発現に関する研究 第 128 年回 日本薬学会 横浜 2008 年 3 月 26-28 日
- 7) 岡昌吾、発生過程に重要な糖鎖の機能解 第 128 年回 日本薬学会 横浜 2008 年 3 月 26-28 日
- 8) 岡昌吾、神経機能に重要な HNK-1 糖鎖 BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会) 横浜 2007 年 12 月 11-15 日
- 8) 岡昌吾、神経可塑性と HNK-1 糖鎖 第 5 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 東京 2007 年 11 月 26-27 日
- 9) Y. Kizuka, N. Kawasaki, N. Maeda, T. Kawasaki, S. Oka. Characterization of a unique HNK-1 (Human Natural Killer-1) carbohydrate on phosphacan in mouse brain. Glyco19, XIX International Symposium on Glycoconjugates. Cairns, Australia. 2007 年 7 月 15-20 日
- 10) Y. Tonoyama, D. Anzai, A. Ikeda, S. Kakuda, M. Kinoshita, T. Kawasaki, and S. Oka. Essential role of beta1,4-galactosyltransferase 2 in convergence and extension movements during medaka (*Oryzias latipes*) embryogenesis. HUPO 6th annual world congress. Seoul, Korea. 2007 年 10 月 6-10 日
- 11) 岡昌吾、神経可塑性における HNK-1 糖鎖の役割 日本薬学会第 127 年会 2007 年 3 月 富山
- 12) 岡昌吾 HNK-1 糖鎖の機能 第 4 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 東京

- 2006年10月23-24日
- 13) 小林恭子, 陣内俊和, 角田品子, 木塚康彦, 高橋 智, 川寄敏祐, 岡 昌吾, HNK-1糖鎖生成酵素 GlcAT-S 遺伝子欠損マウスの作成とその生化学的解釈 第26回日本糖質学会年会 仙台 2006年8月23-25日
- 14) S. Oka, Y. Kizuka, S. Kakuda, I. Morita, S. Yamamoto, and T. Kawasaki, Function and Regulation of the HNK-1 Carbohydrate in the Nervous System. GlycoT 2006 5th International Symposium on Glycosyltransferases, Tsukuba(Japan), 2006年6月25-28日
- 15) I. Morita, T. Shiba, S. Kakuda, S. Oka, T. Kawasaki, S. Watatsuki, R. Kato. Structural and Biochemical Studies on Human Glucuronyltransferase, GlcAT-S, Involved in the Biosynthesis of the Carbohydrate HNK-1. 20th IUBMB Inteanational Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto(Japan), June 18-23 (2006)
- 16) Y. Kizuka, N. Maeda, N. Kawasaki, T. Kawasaki, S. Oka, A unique type of HNK-1 carbohydrate expressed on phosphacan is biosynthesized by GlcAT-P. 20th IUBMB Inteanational Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto(Japan), June 18-23 (2006)
- 17) 殿山泰弘, 安西大輔, 大上志穂, 川寄敏祐, 岡 昌吾, メダカ胚発生に関わる糖転移酵素 B4GALT2 の機能解析 日本発生生物学会第39回大会 広島 2006年5.31-6.3
- 18) 安西大輔, 殿山泰弘, 大上志穂, 川寄敏祐, 岡 昌吾, メダカを用いた HNK-1 糖鎖の機能解析 日本発生生物学会第39回大会 広島 2006年5.31-6.3
- 19) 岡 昌吾 メダカの発生における糖鎖の重要性 第28回日本分子生物学会 2005年12月 福岡
- 20) S. Oka, H. Tagawa, Y. Kizuka, N. Kawasaki, H. Kurihara, and T. Kawasaki Expression of the non-sulfated HNK-1 carbohydrate in mouse kidney. Pacifichem 2005 Dec. 2005, Honolulu, Hawaii.
- 21) Y. Tonoyama, D. Anzai, S. Ogami, and S. Oka. A trial with medaka (*oryzias latipes*) to analyze the function of glycans involved in the embryogenesis. 2nd Soul-Osaka-Kyoto Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences. Dec. 5-6, 2005, Osaka

[図書] (計 8件)

- 1) Y. Tonoyama, and S. Oka. Cell trace experiment with a caged fluorescent dye during medaka gastrulation in Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols. (M. Kinoshita, K. Murata, K. Naruse, M. Tanaka,

Eds), Wiley-Blackwell, (2009) in press

- 2) S. Kakuda, T. Kawasaki, and S. Oka. Glucuronyltransferases Involved in the HNK-1 Biosynthesis. in Experimental Glycoscience-Glycobiology (N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki, and S. Hase, Eds) pp47-49, Springer (2008).
- 3) Y. Kizuka, and S. Oka. Functional Roles of the HNK-1 Carbohydrate and Polysialic Acid in the Nervous System. in Experimental Glycoscience-Glycobiology (N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki, and S. Hase, Eds) pp180-181, Springer (2008).
- 4) I. Morita, and S. Oka. Glucuronyltransferase (GlcAT-P) Gene-Deficient Mice. in Experimental Glycoscience-Glycobiology (N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki, and S. Hase, Eds), Springer pp381-382 (2008).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/5241/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 昌吾 (OKA SHOGO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 60233300

(2) 研究分担者

Ma Bruce・Yong

立命館大学・COE 推進機構・准教授

研究者番号: 00378788

小堤 保則 (KOZUTSUMI YASUNORI)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号: 70205425

木下 政人 (KINOSITA MASATO)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号: 60263125

川崎 ナナ (KAWASAKI NANA)

国立薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長

研究者番号: 20186167

石 龍徳 (SEKI TATSUNORI)

東北大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 20175417

(3) 連携研究者

伊藤 信行 (ITO NOBUYUKI)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号: 10110610