

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06107

研究課題名（和文）ランビエ絞輪特異的糖鎖の時空間的発現の解析とその意義の解明

研究課題名（英文）The spatiotemporal analysis of glycan formation of node of Ranvier

研究代表者

西河 淳（NISHIKAWA, ATSUSHI）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：30218127

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ボツリヌス毒素複合体由来レクチンの立体構造解析データをもとに、我々が意図して糖鎖結合能を変化させて創出したGg試薬が、マウス脳内ランビエ絞輪に存在する糖タンパク質の時空間的な発現を観察するツールになり得ることを見いだしたものである。ランビエ絞輪は跳躍伝導で重要な役割を果たしていることからその形成不全は様々な神経疾患に繋がることが知られており、またアストロサイトの結合部位としての役割があり、詳細な解析は脳機能研究において重要である。我々は、生後14日目以降にGg結合性糖タンパク質が増加し、26日目で形成が完成することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

跳躍伝導に重要な役割を果たすランビエ絞輪には、多種類の糖タンパク質性細胞外マトリクスが存在しているが、それら個々の機能・役割についてはいまだ未解明の部分が多い。我々の開発したGgレクチンは脳内のランビエ絞輪に特異的に存在する糖鎖を認識して強く結合する新たなランビエ絞輪検出試薬としての利用が考えられるほか、今後結合糖タンパク質の同定やそれらの集積のメカニズムの解明等Gg結合糖タンパク質の性質の理解が深まれば、神経伝達障害等で原因未解明の疾患の病因解明に繋がる可能性もあり、この新たなツールを使って種々の検体を観察し病態との関係を検証することが待たれる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that the Gg reagent that we intentionally created by changing the binding ability to sugar chain could be a tool for observing the spatiotemporal expression of specific glycoproteins present in the node of Ranvier in the mouse brain. The node of Ranvier plays an important role in saltatory conduction, and also role as a binding site for astrocytes. So, its hypoplasia is known to lead to various neurological diseases. We found that Gg-binding glycoproteins increased after the 14th day of life and the formation was completed on the 26th day. We found that Gg-binding glycoprotein increased from the 14th day after birth and the formation was completed on the 26th day.

研究分野：生化学

キーワード：ボツリヌス毒素 ランビエ絞輪 レクチン 糖鎖

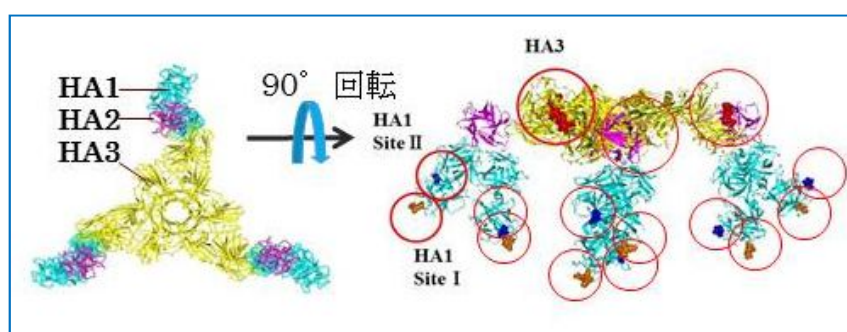
## 1. 研究開始当初の背景

脳は、神経細胞ニューロンとその周りにあるアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアなどのグリア細胞からなり、近年これらの機能が次第に明らかにされ始め、機能異常による種々の神経疾患の病因に関しても解明が進んでいる。神経細胞には跳躍伝導という電気的な興奮が速やかに伝わる仕組みがあり、これは神経細胞の軸索部分に幾つものオリゴデンドロサイトが巻き付いて髄鞘を形成し、髄鞘と髄鞘との間に存在する僅かな隙間が重要な働きをしているとされており、この部分がランビエ絞輪 (node of Ranvier, 以下 NR) である。NR には多くのナトリウムイオンチャネル (Nav) や NrCAM などの接着分子が集まり、NR の周辺部分にはパーシカン V2、プレピカンなど幾つかのプロテオグリカンからなる細胞外マトリクス (ECM) が集積している。

一方、糖タンパク質糖鎖は、組織や細胞特異的かつ多様な構造が細胞表面を覆っており、神経発生や神経ネットワーク形成において細胞移動や軸索延長などのターゲティングに関与するなど脳においても重要な役割が明らかになってきている。

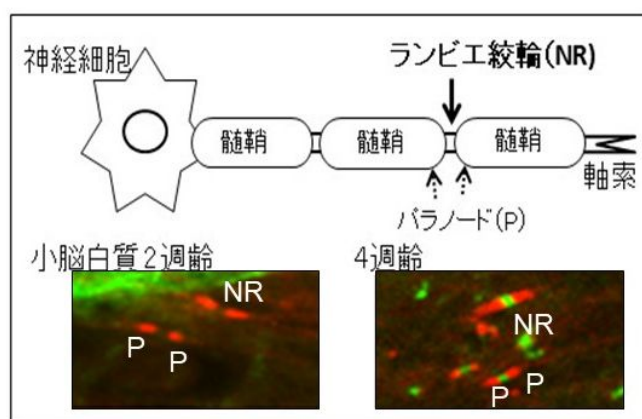
我々は、以前よりボツリヌス神経毒素複合体構成成分に含まれる二種類のレクチン HA1, HA3 について、それらの立体構造やリガンド糖鎖の構造について解析を行ってきた。

右図は C 型ボツリヌス神経毒素複合体から神経毒素タンパク質を除いた無毒成分の立体構造(分子量約 50 万)を示すもので、1 分子の複合体は HA3 が 3 分子、HA2 が 3 分子、HA1 が 6 分子からなり、右側の丸の



位置が糖結合サイトを示し全部で 15 カ所もある天然の多価のレクチン集合体となっている。最近、HA1 のリガンド結合サイトのアミノ酸に変異を加え新たに創製した変異型レクチン複合体の一つ Gg が、3-4 週齢マウス小脳白質の神経ネットワーク発達時期における NR の糖タンパク質糖鎖に特異的に強く反応することを発見した(下図参照、神経細胞の模式図とマウス小脳組織切片の顕微鏡写真)。図のように、神経細胞軸索に巻き付いている髄鞘の端のパラノード部分に特異的に反応する抗 Caspr 抗体の染色位置(写真の P, 赤く染まっているところ)に挟まれた NR に、創製レクチン Gg が 2 週齢では結合していないが 4 週齢になると結合が見られた(緑色)。これは生後まもなく NR が形成されるが、Gg リガンド糖鎖の発現とは時差があると思われる、NR の成熟、機能発揮とも関係している可能性がある。

神経発生や神経ネットワーク形成において HNK-1 糖鎖やポリシアル酸は機能性糖鎖として発現量はごく微量であるが重要な役割を果たしていることが知られており、脳における特別な糖鎖構造の発現の重要性が広く認識されている。しかし、NR に関しては、ヒアルロン酸やプロテオグリカン等の ECM、及びそれらの結合に関与する Bra11 などのリンクタンパク質の構成成分の発現時期や機能の解析が中心で、NR に存在する糖鎖の構造や機能については殆ど未解明のままとなっている。



そこで、本研究の核心をなす課題、「この新規レクチンによって見いだされた NR 特異的な糖鎖、及びその糖鎖を持つ糖タンパク質は、神経発生、ネットワーク形成のどの時期のどの場所においていかなる機能を発現しているのかを解明する」の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、マウス中枢神経のランビエ絞輪に特異的に存在する糖鎖の生理的意義を解明する

ことを目指すものである。我々は、細菌由来レクチン複合体の立体構造解析データから、意図する糖鎖構造に結合するように改変したりコンビナント変異レクチン複合体を既に 3 種類創製しており、それらの反応特異性を種々の組織由来切片で検討したところ、主としてガラクトースに結合するようにデザインした Gg なる変異レクチン複合体がマウス脳のランビエ絞輪に特異的に結合することを見いだした。さらに、予備実験結果より Gg の結合している糖鎖は N-結合型糖タンパク質糖鎖であることが推定された。ランビエ絞輪は、跳躍伝導で重要な役割を果たしていることからその形成不全は様々な神経疾患に繋がることが知られており、またアストロサイト、NG2 細胞の結合部位としての役割もあり、この部位の詳細な構造、成分の理解は脳機能研究においてとても重要である。そこで、我々の創出した Gg を用いて、脳の発生、発達過程、さらには脳内の部位ごとの糖鎖発現量を解析し、Gg のリガンドである糖鎖出現の生理的意義を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 特異的糖鎖発現の時・空間的解析

本研究では、まず Gg 結合性糖鎖の Balb/c マウス脳における時・空間的な発現を検討した。具体的には、試料採取週齢を胎児から生後 5 週ぐらいまでは細かく、それ以降は大まかに定め、パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定した脳を採取して定法により OTC コンパウンドまたはパラフィンで包埋し、主に矢状切断面の切片を多数作製した。NR の形成時期や位置は抗 Caspr 抗体の免疫染色で確認し、その位置への Gg の結合量を蛍光あるいは共焦点蛍光顕微鏡の画像からイメージJソフトを使って数値化し、特異的糖鎖の発現量を脳の部位ごとに時間を追って検証し、発現の時・空間マップを作成した。

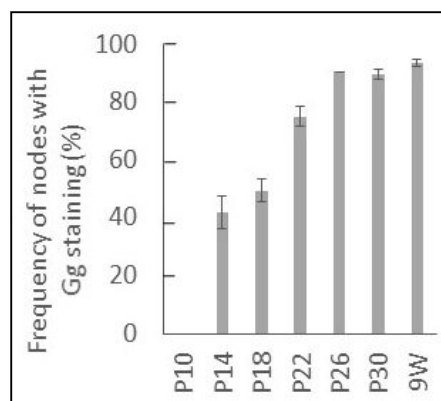
#### (2) Gg が結合する NR のリガンドの同定

Gg のリガンドを持つタンパク質の同定を試みた。方法としては、脳組織抽出物を SDS 電気泳動し、レクチンプロットの要領で Gg 結合性糖タンパク質を検出した。更に、Gg をリガンドとして固定したカラムを用いて抽出液から Gg 結合性の糖タンパク質をアフィニティー精製して SDS 電気泳動を行い、結合性タンパク質を切り出し、常法によりインゲル消化後、質量分析でタンパク質の同定を試みた。

### 4. 研究成果

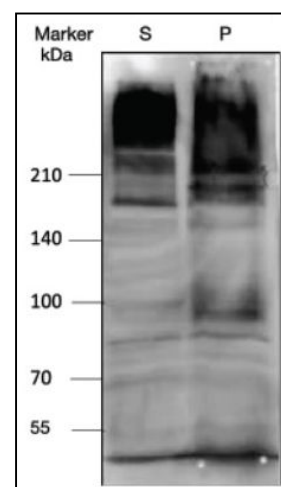
#### (1) 特異的糖鎖発現の時・空間的解析

マウス脳各部位の切片を Gg と抗 Caspr 抗体で共染色し、形成されている NR が Gg でも染色されている率 (%) を計測した。右図は脳内の脳梁部位の測定結果で、生後 14 日頃から Gg 結合性糖タンパク質が NR に出現し始め、生後 26 日頃には Gg 陽性率が約 90% に達し、それ以降は一定値をとることが判明した。図にはプロットしていないが 9 週齢以上 52 週齢までも生後 26 日目とほぼ同等の値であった。他の部位の Gg 結合陽性率は、それぞれの NR 形成時期にずれがあり、それに伴って陽性率の上昇時期もずれていた。また、Gg の染色強度と染色されている範囲(面積)も測定したところ、強度、面積ともに週齢をおうごとに増加していることが判明した。(論文投稿準備中)



#### (2) Gg が結合する NR のリガンドの同定

生後 5-10 週齢の脳梁部分を多数採取しホモジネート後、リン酸緩衝液で抽出し可溶性画分 S と不溶性画分 P (のち 2% SDS で可溶化) に分画して SDS 電気泳動に供し、Gg によるレクチンプロテイングを行った。結果は、右図に示すように Gg 結合性の糖タンパク質は分子量 20 万を超える巨大なものであり、可溶性画分に比較的多く含まれていることが判明した。SDS 電気泳動ゲルから染色部分に相当する箇所を切り出し、トリプシン消化後質量分析計に供し得られた情報より、これらの巨大な糖タンパク質はあるプロテオグリカンであることが判明した。今後は、Gg が認識しているプロテオグリカンの中樞神経系での時空間的な発現とその意義、特に神経疾患との関連性を詳細に検討して行きたい。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takuma Kozono, Hiroyuki Sato, Wataru Okumura, Chifuyu Jogano, Miwa-Tamura Nakano, Yuki. Kawamura, Jack Rohrer, Takashi Tonozuka & Atsushi Nishikawa	4. 巻 11:753
2. 論文標題 The N-terminal region of Jaw1 has a role to inhibit the formation of organized smooth endoplasmic reticulum as an intrinsically disordered region	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 753-769
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80258-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Toshiyuki Homma, Shigeki Kageyama, Atsushi Nishikawa and Koza Nagata	4. 巻 167
2. 論文標題 Anti-melanogenic activity of salacinol by inhibition of tyrosinase oligosaccharide processing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biochem. 2020;167(5):	6. 最初と最後の頁 503-511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takashi Tonozuka, Junichi Kitamura, Mika Nagaya, Reika Kawai, Atsushi Nishikawa, Katsuaki Hirano, Keisuke Tamura, Tadashi Fujii and Takumi Tochio	4. 巻 84
2. 論文標題 Crystal structure of a glycoside hydrolase family 68 -fructosyltransferase from Beijerinckia indica subsp. indica in complex with fructose	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY	6. 最初と最後の頁 2508-2520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1804317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kenta Tsutsumi, Yoshifumi Gozu, Atsushi Nishikawa and Takashi Tonozuka	4. 巻 287
2. 論文標題 Structural insights into polysaccharide recognition by Flavobacterium johnsoniae dextranase, a member of glycoside hydrolase family 31	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1195-1207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齋藤詞音, Ea Kristine Clarisse B. Tulin, 中澤千秋, 中村智美, 西河淳
2. 発表標題 リコンビナントレクチン複合体を用いた血管糖鎖の発現変化解析
3. 学会等名 第4回日本ワンヘルスサイエンス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuma Kozono, Hiroyuki Sato, Wataru Okumura, Chifuyu Jogano, Miwa Tamura-Nakano, Yuki. Kawamura, Jack Rohrer, Takashi Tonzuka, Atsushi Nishikawa
2. 発表標題 The N-terminal Region of Jaw1 Has a Role to Inhibit the Formation of Organized Smooth Endoplasmic Reticulum as an Intrinsically Disordered Region
3. 学会等名 Cell Bio 2020 Virtual-an Online ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ea Kristine Clarisse Tulin, Chiaki Nakazawa, Kyoko Kanai, Tomomi Nakamura, Shin-ichi Nakakita, Takeshi Yoshimura, Yoshiko Kawabata, Takashi Tonzuka, Kazuhiro Ikenaka, Atsushi Nishikawa
2. 発表標題 Study on the Glycan Formation in Mouse CNS Node of Ranvier
3. 学会等名 日本糖質科学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	池中 一裕	生理学研究所・分子細胞生理学研究領域・教授	平成30年度途中にお亡くなりになりました
	(Ikenaka Kazuhiro)		
	(00144527)	(63905)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	中北 慎一  (Nakakita Shin-ichi)  (40314356)	香川大学・総合生命科学センター・准教授    (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関