

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：平成 20 年度～平成 22 年度

課題番号：20370051

研究課題名(和文) 硫酸化修飾の PAPS 輸送体による統合的機能解析

研究課題名(英文) Analysis of physiological function of sulfation by regulating the expression of PAPS transporter

研究代表者

西原 祥子 (NISHIHARA SHOKO)

創価大学・工学部・生命情報工学科

研究者番号：00164575

研究成果の概要(和文)：硫酸化は広汎に認められる翻訳後修飾の一種である。我々は、硫酸化の鍵となる PAPS 輸送体を取り上げた。そのノックダウン ES 細胞とノックアウトマウスを用いて、硫酸化修飾を受けた糖鎖が Wnt、BMP、FGF シグナルを制御して ES 細胞の未分化性・多能性の維持や分化方向の決定、初期胚における細胞運命の決定に働いていること、また、PAPS 輸送体の機能が低下すると様々な疾病を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Sulfation of glycans, lipids, and proteins is involved in a variety of biological phenomena. PAPS transporters (PAPSTs) is a key component of sulfation processes. We performed RNAi knockdown for *PAPSTs* in mouse ES cells and found that sulfated glycans work on the maintenance and differentiation of ES cells through Wnt, BMP and FGF signals. *PAPST1* knockout mice showed that reduction of PAPST activity causes various type of disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
21 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
22 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,900,000	4770,000	20,670,000

研究分野：糖鎖生物学

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、硫酸化、PAPS 輸送体、ノックアウトマウス、ES 細胞、RNAi、ノックダウン、生理機能

## 1. 研究開始当初の背景

(1) プロテオグリカン上のグリコサミノグリカン鎖、O-結合型・N-結合型糖鎖エピトープ、糖脂質、タンパク質のチロシン残基など、細胞表面や細胞外の様々な構造が硫酸化修飾を受けている。硫酸化は広汎に認められる翻訳後修飾の一種であり、モルフォゲンの分布の決定やリガンド分子の受容体への結合において重要な機能を果たしている。

(2) 硫酸化修飾は、ゴルジ装置内腔で様々な硫酸転移酵素により行われる。硫酸転移酵素

のドナー基質が、高エネルギー構造を持つ 3'-phosphoadenosine 5'-phospho-sulfate (PAPS) である。PAPS 輸送体(PAPST)は、様々な硫酸転移酵素にドナー基質を供給して硫酸化を制御しており、これらの発現を操作することにより硫酸化修飾を効率よく制御することができる。

(3) 我々は、初めてショウジョウバエとヒトで PAPS 輸送体遺伝子、*PAPST1* を同定し報告していた(Kamiyama, Nishihara et al. *JBC*, 278, 25958-25963 (2003))。さらに、第

二の PAPS 輸送体、*PAPST2* もショウジョウバエとヒトで新規に単離同定し (Goda, [Nishihara et al. JBC, 281, 28508-28517 \(2006\)](#); [Kamiyama, Nishihara et al. JBC, 281, 10945-10953 \(2006\)](#))、*PAPST2* がヘパラン硫酸 (HS) の硫酸化を介して、ショウジョウバエの複眼の形態形成に関与している事も明らかにしていた。

## 2. 研究の目的

上述の背景に基づき、本研究では、PAPS 輸送体(PAPST)の RNAi ノックダウン ES 細胞とノックアウトマウスを併用して、*PAPST* の発現制御から硫酸化修飾の機能解析を統合的に行う。

## 3. 研究の方法

### (1) *PAPST1*、*PAPST2* RNAi ノックダウン ES 細胞を用いた硫酸化修飾の機能解析

① ES 細胞の未分化・多能性維持、及び、増殖における硫酸化糖鎖の機能解析  
short hairpin RNA 発現用プラスミドベクターに *PAPST1*、*PAPST2* に対応する配列を組み込み、マウス ES 細胞にトランスフェクションする。一過的に両遺伝子の発現を抑制して、未分化性、多能性、増殖性を検討する。さらに、未分化性・多能性、増殖性に関わると考えられる各種シグナルの下流因子の活性化に対する検討を行い、硫酸化糖鎖とシグナルとの関連も明らかにする。

② ES 細胞の胚様体分化における硫酸化糖鎖の機能解析  
*PAPST1*、*PAPST2* をノックダウンした ES 細胞を胚様体(EB)に分化させ、各胚葉のマーカーの発現をリアルタイム PCR で検討する。さらに、各胚葉への分化を決定すると考えられる各種シグナルの下流因子の検討もを行い、硫酸化糖鎖と分化シグナルとの関連も明らかにする。

③ ES 細胞からの神経誘導における硫酸化糖鎖の機能解析  
レトロウイルスベクター系を用いて、*PAPST1*、*PAPST2* を安定にノックダウンした ES 細胞を胚葉体(EB)に分化させた後、レチノイン酸(RA)を加え接着培養して神経細胞に分化させる。神経幹細胞や神経前駆細胞などのマーカーの発現をリアルタイム PCR で検討する。さらに、神経系への分化を決定する各種シグナルの下流因子の検討もを行い、硫酸化糖鎖と神経分化シグナルとの関連を明らかにする。

### (2) *PAPST1* ノックアウトマウスを用いた硫酸化糖鎖の機能解析

① *PAPST1* ノックアウトマウスの作成  
Cre-lox コンディショナルノックアウトシステムにより、*PAPST1* floxed マウスを作成し、全身性に Cre を発現させ、ヌルマウス (*PAPST1<sup>fl/fl</sup>*)を得る。

② *PAPST1<sup>fl/fl</sup>* のマウスの解析  
*PAPST1<sup>fl/fl</sup>* の胎児において、硫酸化が抑制されることをアルシヤンブルー染色により確認する。胎児の切片を作成し、形態的な異常等が認められるか、解析を行なう。さらに、得られた結果を(1)の ES 細胞における解析結果と比較検討する。

③ *PAPST1<sup>fl/+</sup>* のマウスの解析  
*PAPST1<sup>fl/+</sup>* マウスにおいても、異常が認められるか検討を行なう。

## 4. 研究成果

(1) *PAPST1*、*PAPST2* RNAi ノックダウン ES 細胞を用いた硫酸化修飾の機能解析  
([Sasaki, Nishihara et al., PLoS One, 4, e8262 \(2009\)](#))

① ES 細胞の未分化・多能性維持、及び、増殖における硫酸化糖鎖の機能  
初めに、マウス *PAPST1*、*PAPST2* を単離し、酵母発現系を用いて両遺伝子がコードするタンパク質が PAPS 輸送活性を持つことを確認した。RNAi により、各々 mRNA を特異的に 20%までノックダウンすることができ、これに伴う硫酸化の低下も、 $S^{35}$  を用いた代謝ラベルにより検討した。ES 細胞における主な硫酸化修飾の対象は、ペパラン硫酸(HS)であることがわかった。*PAPST1*、*PAPST2* の各々、及び、*PAPST1* と *PAPST2* をダブルノックダウンした ES 細胞では、アルカリフォスファターゼ陽性コロニーの減少、増殖性の低下(図 1)、*OCT3/4* と *Nanog* の発現の低下認められ、平らな分

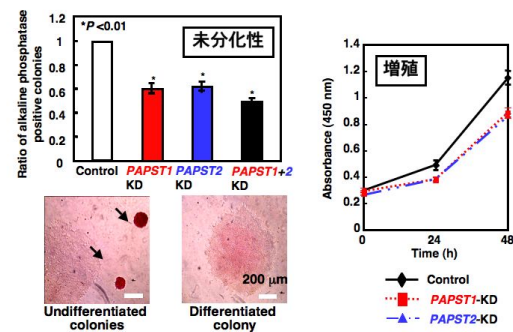


図1:硫酸化の低下に伴う未分化性と増殖の低下

化した形態が観察された。各胚葉マーカーの発現から、原始内胚葉系へ分化していることがわかった(図 2)。HS の 2 糖繰り返し構造を合成する *EXT1* ([Sasaki, Nishihara et al., J](#)

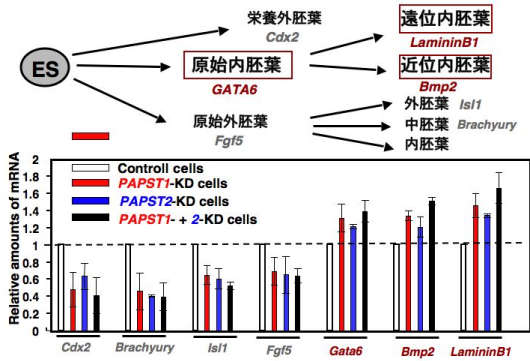


図2: 硫酸化の低下に伴うES細胞の多分化能の喪失 (BC, 283, 3594-3606 (2008)) や HS の硫酸転移酵素 *NDST1* と *NDST2* をノックダウンした場合も同様な結果が得られており、HS の硫酸化がマウス ES 細胞の未分化性・多能性維持、増殖に関与していることが明らかになった。

さらに、未分化性・多能性維持、及び、増殖に関与すると考えられる LIF/STAT、BMP/Smad、Wnt/ $\beta$ -catenin、FGF/ERK シグナルについての検討を行なった。*PAPT1*、*PAPT2* ノックダウン ES 細胞では、LIF/STAT シグナルには変化が認められなかったが、BMP/Smad、Wnt/ $\beta$ -catenin、FGF/ERK シグナルは、低下していた。*EXT1* (Sasaki, Nishihara et al., *JBC*, 283, 3594-3606 (2008)) や硫酸転移酵素 *NDST1* と *NDST2* をノックダウンした場合(図 3)、細胞を heparitinase で処理した場合も、同様

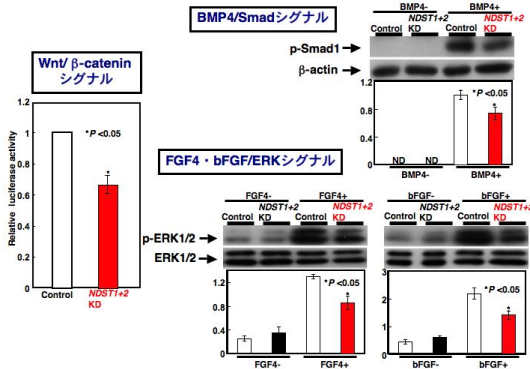


図3: 硫酸転移酵素ノックダウン細胞における各種シグナルの低下な結果が得られており、HS が ES 細胞表面で、Wnt、BMP、FGF シグナルのバランスを保って、未分化性・多能性維持、及び、増殖に働いていることが、本研究で初めて明らかになった(図 4)。

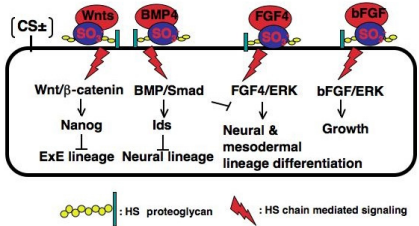


図4: ES細胞におけるヘパラン硫酸の働き

② ES 細胞の胚様体分化における硫酸化糖鎖の機能

ES 細胞を胚葉体(EB)に分化させると、細胞表面のヘパラン硫酸(HS)とコンドロイチン硫酸(CS)の発現がともに増加した。*PAPT1*、*PAPT2* をノックダウンした ES 細胞を EB に分化させたところ、中胚葉と遠位、及び、近位内胚葉への分化が抑えられ、外胚葉への分化が促進された(図 5)。ノックダウン細胞

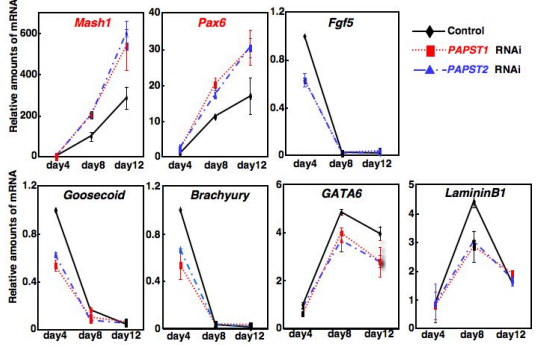


図5: *PAPT* ノックダウンによる外胚葉への分化の促進

では、Wnt、BMP、FGF シグナルが低下していた。heparitinase、chondroitinase により細胞表面の HS と CS を取り除いた場合も、各々のシグナルは、顕著な低下を示し(図 6)、

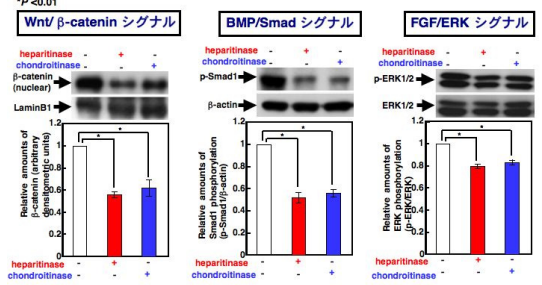


図6:ヘパリチナーゼ・コンドロイチナーゼ処理による Wnt・BMP・FGFシグナルの低下

HS と CS が伴に、Wnt、BMP、FGF シグナルの伝達に寄与していることがわかった。ノックダウン細胞では、これらのシグナルの低下により、中胚葉分化が抑えられ、外胚葉分化が促進したと考えられた(図 7)。

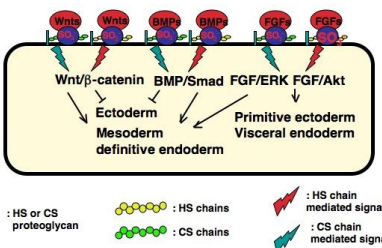


図7: 胚様体分化におけるヘパラン硫酸の働き

③ ES 細胞からの神経誘導における硫酸化糖鎖の機能

*PAPST1*、*PAPST2*を安定にノックダウンしたES細胞を胚葉体(EB)に分化させた後レチノイン酸(RA)を加え培養し、その後接着培養して神経細胞に分化させた。EB形成後8日目で、*PAPST*ノックダウン細胞における神経幹細胞のマーカー(*Nestin*、*Musashi*)と神経前駆細胞のマーカー(*Mash1*、*Math1*、*NeuroD1*、*NeuroD2*)の顕著な発現が認められ、硫酸化を抑えると神経分化が亢進されることがわかった。さらに、接着培養後6日目では、多くのノックダウン細胞がニューロンマーカー( $\beta$ III-Tubulin)を発現する神経細胞へと分化していた(図8)。

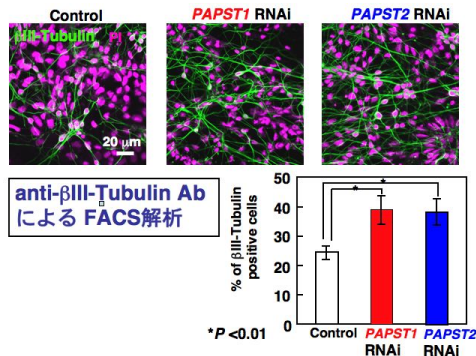


図8: *PAPST*ノックダウンによる神経分化の促進

一方、EB形成後に塩素酸を用いて硫酸化を阻害すると、通常の培養の半分の7日間という短期間で神経細胞への分化が誘導できた(図9)(Sasaki, Nishihara et al., *BBRC*, 401, 480-486 (2010)). 遺伝子操作を行わない本方法は、安全な新規神経分化誘導法であり、その迅速性から多くの方面への応用が可能であると考えている。

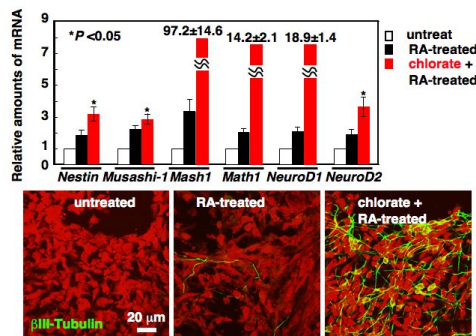


図9: 塩素酸処理による神経分化の促進

さらに、(1)の①と②と同様にして、ヘパラン硫酸(HS)とコンドロイチン硫酸(CS)の各種シグナルへの関与を検討したところ、HSは、Wnt、BMP、FGFシグナルの亢進に働いていることがわかった。一方、CSは、BMPとFGFシグナルの亢進に働いていたが、Wntシグナルに対しては阻害に働いていた。これは、CSがWntをトラップして受容体への結合を妨げているためであると考えられた。以上の結果から、HSは、Wnt、BMPシグナルを介して神経分化の阻害に働いているこ

と、CSは、BMPシグナルを介して神経分化の阻害に、Wntシグナルを阻害して神経分化の亢進に働いていることがわかった(図10)。

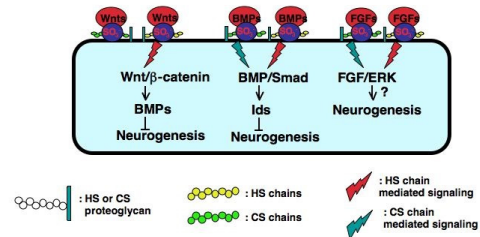


図10: 神経分化における硫酸化糖鎖の働き

(2) *PAPST1*ノックアウトマウスを用いた硫酸化糖鎖の機能解析

① *PAPST1*ノックアウトマウスの作成  
全身性にCreを発現する*Ayu1-Cre*マウスを*PAPST1* floxedマウスに、交配し、*PAPST1<sup>ΔA</sup>*を得、サザンブロット解析とPCRによりゲノタイプを確認した。

② *PAPST1<sup>ΔA</sup>*のマウスの表現型  
アルシアンブルー染色を行なったところ、*PAPST1<sup>ΔA</sup>*の胎児において、硫酸化が顕著に抑制されており、胎児期には*PAPST1*が主に機能していると考えられた。胎生7.5日で致死となり、中胚葉誘導に異常が認められた。この事実は、(1)の②に述べた*PAPST*ノックダウンES細胞からの胚葉誘導で中胚葉の誘導が阻害されていた事実と一致している。ES細胞における解析からWnt、BMP、FGFシグナルの阻害により引き起こされたものであると考えられた。現在、シグナル系の解析を行なっている。

③ *PAPST1<sup>ΔA</sup>*のマウスの解析  
*PAPST1<sup>ΔA</sup>*マウスでは、妊娠確率の低下、加齢に伴う体重の有意な増加、肺気腫や脂肪肝炎、さらに腸管リンパ節の腫れや脾臓の拡大など様々な病態が観察された。ヒトの疾病モデルとなる可能性もあり、現在、詳細な解析を進行中である。

以上のように、我々は、ES細胞を中心に、硫酸化糖鎖の機能を明らかにした。特にES細胞における硫酸化糖鎖の機能は、当時はほとんど明らかにされておらず、先駆的なものであった。本成果は、ES細胞の未分化性・多能性維持に優れた培地の開発や安全で迅速な分化法の開発の基礎を与えるものとなり、社会へ還元できると考えている。さらに、我々は、*PAPST1*ノックアウトマウスで様々な病態モデルとなる表現型を見いだしており、これらはヒト疾病モデルへと発展させたい。硫酸化糖鎖は、FGF、Wnt、BMP

のみならず(下表)、主要なシグナルリガンド

#### 硫酸化糖鎖の各種シグナルリガンドへの結合

Ligand	GAG	$k_f$ (M <sup>-1</sup> Sec <sup>-1</sup> )	$k_d$ (Sec <sup>-1</sup> )	$K_D$ (nM)
BMP4	Heparin	$2.76 \times 10^5$	$1.92 \times 10^2$	69.4
BMP4	CS-E	$1.44 \times 10^5$	$4.33 \times 10^3$	30.0
Wnt3a	Heparin	$2.22 \times 10^{5a}$	$5.77 \times 10^{3a}$	26.0 <sup>a</sup>
Wnt3a	CS-E	$8.26 \times 10^5$	$2.26 \times 10^2$	27.3

と結合する。発生のみならず、免疫、癌化などにおいても重要な局面を支配するシグナルに働くものと考えられ、その重要性は普遍性を持つと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件: 全て査読有り)

1. Kamiyama S, Ichimiya T, Ikehara Y, Takase T, Fujimoto I, Suda T, Nakamori S, Nakamura M, Nakayama F, Irimura T, Nakanishi H, Watanabe M, Narimatsu N, Nishihara S: Expression and role of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters in human colorectal carcinoma.

*Glycobiology*, 21, 235-246 (2011).

2. Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nishihara S: Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells.

*BBRC*, 401, 480-486 (2010).

3. Dejima K, Murata D, Mizuguchi S, Nomura KH, Izumikawa T, Kitagawa H, Gengyo-Ando K, Yoshina S, Ichimiya T, Nishihara S, Mitani S, Nomura K: Two Golgi-resident 3' -phosphoadenosine 5' -phosphosulfate transporters play distinct roles in heparan sulfate modifications and embryonic and larval development in *Caenorhabditis elegans*.

*J Biol. Chem.*, 285, 24717-24728 (2010).

4. Sasaki N, Hirano T, Ichimiya T, Wakao M, Hirano K, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Suda Y, Nishihara S: The 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters, PAPST1 and 2, contribute to the maintenance and differentiation of mouse embryonic stem cells.

*PLoS One*, 4, e8262 (2009).

5. Sasaki N, Okishio K, Ui-Tei K, Saigo K, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Nishimura T, Suda Y, Hayasaka M, Hanaoka K, Hitoshi S, Ikenaka K, Nishihara S: Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells.

*J. Biol. Chem.*, 283, 3594-3606 (2008).

〔学会発表〕(計 37 件)

1. 小林久美子、佐々木紀彦、平野拓也、豊田雅士、梅澤明弘、西原祥子: 「硫酸化阻害剤によるマウス ES 細胞およびヒト iPS 細胞の神経分化誘導」 第 10 回日本再生医療学会総会、東京、3 月、2011.

2. 西原祥子、佐々木紀彦、平野和己、隅田康生、豊田英尚、一宮智美: 「ES 細胞の未分化性・多能性維持、分化シグナルの拠点となる硫酸化糖鎖」 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) ワークショップ、神戸、12 月、2010.

3. 神山伸、一宮智美、池原譲、中森正二、中村充、中山文明、入村達郎、中西速夫、渡邊昌彦、成松久、西原祥子: 「Expression and role of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters in human colorectal carcinoma」 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸、12 月、2010.

4. Nishihara S, Sasaki N, Hirano T, Ichimiya T, Hirano K, Toyoda H, Suda Y: "Functional analysis of sulfated glycans in the differentiation of embryonic stem cells" The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), at Makuhari, August, 2010.

5. Nishihara S: "Sulfated glycan function in development: from *Drosophila* to ES cells" The 8th Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [I] Functions and Disease Mechanisms, at Kanagawa, July, 2010.

6. Sasaki N, Hirano T, Ichimiya T, Wakao M, Hirano K, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Suda Y, Nishihara S: "Sulfation contributes to the maintenance of mouse embryonic stem cells, the differentiation of the embryoid body and the progression of neurogenesis" 第 8 回幹細胞シンポジウム、淡路、5 月、2010.

7. 佐々木紀彦、平野拓也、一宮智美、平野和己、隅田康生、豊田英尚、西原祥子: 「硫酸化修飾は ES 細胞の維持および分化に重要である」 第 9 回日本再生医療学会総会、広島、3 月、2010.

8. 西原祥子、佐々木紀彦、平野和己: 「ES 細胞の未分化性・多能性維持に関わる硫酸化糖鎖」 第 32 回日本分子生物学会年会、ワークショップ、横浜、12 月、2009.

9. Nishihara S, Sasaki N, Hirano T, Ichimiya T, Wakao M, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Suda Y: "The 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters, PAPST1 and PAPST2, are important for the maintenance and the

differentiation of mouse embryonic stem cells” XX International Symposium on Glycoconjugates, at San Juan (Puerto Rico), November, 2009.

10. 幾世高史、一宮智美、藤本泉、尾崎秀徳、工藤崇、中村充、西原祥子：「マウス PAPS 輸送体 mPAPST1, mPAPST2 の機能解析」GlycoTOKYO2009 シンポジウム、東京、11月、2009.

11. 中山文明、梅田禎子、神山伸、一宮智美、西原祥子、明石真言：「PAPST1 抑制による Burkitt リンパ腫細胞の放射線感受性の増加について」第 82 回日本生化学会大会、神戸、10月、2009.

12. Sasaki N, Okishio K, Ui-Tei K, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Nishimura T., Suda Y, Hayasaka M, Hanaoka K, Nishihara S: “Heparansulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells” The 23rd Naito Conference on Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells, at Kanagawa, November, 2008.

〔図書〕(計 10 件)

1. Nishihara S: The function of glycan structures for the maintenance and differentiation of embryonic stem cells.

*Embryonic Stem Cells*, INTECH, in press.

2. Sasaki N, Nishihara S: Gene silencing in mouse embryonic stem cells.

*Methods Mol. Biol.*, in press.

3. Nishihara S: Glycosyltransferases and transporters that contribute to proteoglycan synthesis in *Drosophila*: Identification and functional analyses using the heritable and inducible RNAi system.

*Method in Enzymology*, 480, 323-351 (2010).

4. Nishihara S: The function of glycan structures expressed on embryonic stem cells.

*TIGG*, 21, 207-218 (2009).

5. 西原祥子：ES 細胞の未分化性、多能性維持に関わる硫酸化糖鎖。

*化学工業*, 59, 947-954 (2008) .

6. 神山伸、西原祥子：糖ヌクレオチド輸送体・PAPS 輸送体による糖鎖合成の制御。

*蛋白質核酸酵素*, 53, 1486-1494 (2008) .

7. Nishihara S: Nucleotide sugar transporter genes and their functional analysis.

*Experimental Glycoscience - Glycobiology*, edited by Naoyuki Taniguchi et al., Springer, Part1, Section III, 103-107 (2008).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 4 件)

1. 名称：胚様体分化制御剤発明者：

権利者：西原祥子、佐々木紀彦

種類：同上

番号：特願 2010-261170

出願年月日：平成 22 年 11 月 24 日

国内外の別：国内

特願 2009-267231 に基づく優先権主張

2. 名称：神経細胞の製造方法及び神経細胞分化促進剤

発明者：西原祥子、佐々木紀彦

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2010-223472

出願年月日：平成 22 年 10 月 1 日

国内外の別：国内

3. 名称：胚様体分化制御剤

発明者：西原祥子、佐々木紀彦

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2009-267231

出願年月日：平成 21 年 11 月 25 日

国内外の別：国内

4. 名称：分化制御剤、分化抑制基材及び分化抑制方法並びにその使用

発明者：西原祥子、佐々木紀彦

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2008-167493

出願年月日：平成 20 年 6 月 26 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.t.soka.ac.jp/menu/grad/grad\\_bio/grad\\_prof\\_bio/mc\\_bio02/grad\\_s\\_nishihara.html](http://www.t.soka.ac.jp/menu/grad/grad_bio/grad_prof_bio/mc_bio02/grad_s_nishihara.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西原 祥子 (NISHIHARA SHOKO)

創価大学・工学部・教授

研究者番号：00164575

(2)分担研究者

なし

(3)連携研究者

工藤 崇 (KUDO TAKASHI)

筑波大学・人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：20288062

豊田 英尚 (TOYODA HIDENAO)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：70217579

尾野 雅哉 (ONO MASAYA)

国立がんセンター・化学療法部・室長

研究者番号：00270900