

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570148

研究課題名（和文）神経発生とアポトーシスに関わる脳特異的ムチン型糖鎖合成酵素の機能解析

研究課題名（英文）Functional of a brain-specific mucin-type carbohydrate glycosyltransferase involved in neural development and apoptosis

研究代表者

黒坂 光 (KUROSAKA AKIRA)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90186536

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経発生に関わるムチン型糖鎖合成に関わる糖転移酵素，およびムチン型糖鎖の働きを解明することを目的としている。我々は脳特異的なアイソザイムであるWBSCR17およびムチン型糖鎖の機能を、神経細胞への分化能を持ったマウス胚性癌細胞P19，およびヒト胎児腎細胞HEK293Tを用いて調べた。さらにWBSCR17のゼブラフィッシュの神経分化における役割を調べた。これらの実験を通じてWBSCR17が神経分化や、細胞の膜輸送などに関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the roles of mucin-type carbohydrates and glycosyltransferases involved in their biosynthesis in neural development. We investigated the functions of WBSCR17, a brain-specific isozyme, and mucin-type carbohydrates in mouse embryonic carcinoma P19 cells, which can differentiate into neural cells, and human embryonic kidney HEK293T cells. Also the roles of WBSCR17 in neural differentiation in zebrafish were examined. Through these studies, we elucidated that WBSCR17 is involved in the neural development and membrane trafficking in the cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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，神経科学，糖転移酵素

1. 研究開始当初の背景

タンパク質への糖鎖の付加は、主要な翻訳後修飾反応の一つであり、付加された糖鎖は細胞間の接着や認識などに重要な働きをする。糖鎖の構造は、糖とタンパク質の結合様式によっていくつかのタイプに分類されるが、我々は N-アセチルガラクトサミン

(GalNAc)とタンパク質中のセリン，トレオニン残基のヒドロキシル基との間に形成される O-グリコシド型結合（GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr）に注目し、それらの主に脳における機能を解析している。GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thrの構造を有する糖鎖は、消化器官，呼吸器官等の上皮細胞が分泌する粘性タンパク質で

あるムチンに多く見られることから、ムチン型糖鎖とも呼ばれる。この構造の糖鎖はムチン分子のみならず、他の多くの細胞表面や分泌糖タンパク質中にも存在して、粘膜の保護のみならず、リンパ球と血管内皮細胞の相互作用、微生物や毒素の認識などの多くの生物現象に関与することが知られている。

複雑な細胞間ネットワークを形成する神経系の細胞では、複合糖質の糖鎖が重要な役割を果たしており、プロテオグリカンやN-グリコシド型糖鎖 (GlcNAc β 1 \rightarrow Asn) が、シナプスの形態変化や神経回路の形成に関わるなどの報告がなされてきた。しかし、ムチン型糖鎖の神経系におけるはたらきについては、ほとんど解析されていない。また脳におけるムチン型糖鎖の構造、およびその生合成の調節機構などについても解析は進んでいない。近年我々は、ムチン型糖鎖の生合成開始反応を触媒する脳特異的な酵素遺伝子 (WBSCR17) をクローニングした。我々は、WBSCR17 は脳におけるムチン型糖鎖の機能解析の優れたツールになると考え、その分子の機能解析に着手したところ、WBSCR17 がグリア細胞には発現せず、神経細胞特異的に発現することを見いだした。このことは、WBSCR17 が神経細胞の発生や維持などに必要な糖鎖の合成に関わる可能性を示唆するものである。さらに、神経細胞に分化するP19細胞においてWBSCR17の発現を抑制したところ、神経発生が阻害され、アポトーシスによる細胞死が引き起こされることを見いだした。また、我々とは別に米国の研究グループはWBSCR17がエンドサイトーシスに関わる可能性を指摘した。これらのことから、WBSCR17が、膜輸送を介して神経発生などの生物現象に関係している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

我々は、WBSCR17の神経発生、および細胞機能との関係の解明を目的として研究を進めた。神経発生における役割の解明には、神経細胞への分化能を持つ培養細胞とモデル生物の実験系を用いた。培養細胞系では薬物添加により神経細胞に分化する過程における神経発生を調べた。また、モデル生物としてはゼブラフィッシュを用いて、その初期発生における酵素の働きを解明した。これらの実験系では、培養細胞とゼブラフィッシュの実験結果を互いにフィードバックしながら研究を進めることをねらいとした。また、膜輸送に関しては米国のグループの研究結果をもとにして、膜輸送、膜のとり込み機構に注目してより詳細な解析を行うことをねらいとした。

3. 研究の方法

神経発生に関する実験ではおもにP19細胞とゼブラフィッシュを用いた。

(1) P19細胞を用いた解析

①WBSCR17の発現抑制、およびムチン型糖鎖伸長阻害剤 (benzyl- α -GalNAc, BG) のP19細胞の神経分化に与える影響の解析

神経分化能を持ったP19細胞において、RNAi法によりWBSCR17の発現を抑制する、また培地にBGを添加することによりムチン型糖鎖の伸長を阻害する実験を行った。また、WBSCR17の強制発現実験も行った。これらの細胞の神経分化を調べるとともに、細胞抽出液を調製してレクチンブロッキングを行いムチン型糖鎖の神経発生に与える影響を評価した。

②神経発生マーカーおよびアポトーシス関連遺伝子の発現解析

正常細胞、WBSCR17の発現抑制細胞から調製したcDNAを用いてPCRを行い、様々なマーカー分子の発現量を比較した。神経発生に関わる分子群としては、map2, mash1, ngn, hes, N-cadherinなどを対象とした。また、アポトーシス関連遺伝子の発現はWestern blotting法により調べた。対象分子としてはカスパーゼ群、PARPなどを取りあげた。さらにミトコンドリア経路の活性化も考慮し、Bax, Bak,さらにはJNK, ERKなどの細胞内情報伝達分子も調べた。

(2) ゼブラフィッシュ WBSCR17 抑制胚のマーカー解析

WBSCR17の発現抑制胚では、正常な神経発生が起こらず、アポトーシスによる細胞死が観察される。これらの知見に基づき、神経発生に関わるマーカー遺伝子の発現をwhole mount in situ hybridization法を用いて調べた。その際、fgf8, pax2a, krox20, hoxb1a, wnt, fringe, deltaなどを標的分子として初期胚における解析を行った。

さらに、細胞膜輸送におけるWBSCR17の機能解析を行った。

(3) HEK293T細胞を用いた細胞膜輸送の解析

米国のグループの報告に基づき、まずHEK293T細胞を高い濃度のGlcNAcで処理したときのWBSCR17の発現パターン解析を解析した。さらにWBSCR17の発現を抑制するshRNA発現ベクターを用いた発現阻害実験、WBSCR17の強制発現したときに形態的にみられる影響を観察した。また、細胞の膜系に及ぼす影響を評価する目的で、ピノサイトーシス、エンドサイトーシスの効率を測定し、細胞内膜輸送に関連するマーカー分子の発現を免疫染色により調べた。さらに細胞内の複合糖質の局在をおもにムチン型糖鎖を認識

するレクチンを用いたレクチン染色により解析した。

4. 研究成果

培養細胞、およびゼブラフィッシュを用いた神経発生に関わる研究についての研究成果を初めに記す。

(1) P19 細胞を用いた実験

①WBSR17 の発現抑制および強発現、BG 処理が P19 細胞の分化に与える影響の解析

P19 細胞に WBSR17 を強制発現させたところ、グリア細胞に比して、神経細胞に分化する細胞が多くなった。逆に、WBSR17 の発現を抑制したところ、神経細胞への分化が抑制された。一方、BG で細胞を処理しても、グリア細胞および神経細胞への分化効率に変化が見られないことから、短いムチン型糖鎖が神経細胞への分化に関わることが示唆された。レクチン染色でも、BG 処理で短い糖鎖を持つタンパク質の発現を確認することができた。

②神経発生マーカーおよびアポトーシス関連遺伝子の発現解析

WBSR17 の発現を抑制すると、神経細胞への分化の抑制がみられたため、神経分化に関わる転写因子などの発現を RT-PCR 法で解析した。その結果、MAP2, Mash1, Ngn1, Ngn2, NeuroD などの発現の顕著な抑制が見られた。また、神経細胞に発現する接着因子の N-cadherin の発現も著しく低下していた。

アポトーシスに関わる分子の発現は特異的抗体を用いて Western blotting 法により調べた。その結果、カスパーゼの有意な活性化、およびミトコンドリアカスケードに関わる分子群の活性化も検出された。

(2)ゼブラフィッシュ WBSR17 抑制胚のマーカー解析

WBSR17 発現抑制胚では、脳の発生異常、特に後脳領域に形態異常が見られ、さらに細胞塊の蓄積やアポトーシスによる細胞死が認められる。この原因を調べるため、おもに後脳の発生に関わるマーカー分子の発現を in situ hybridization 法により調べた。まず後脳の compartment 形成に関わる分子群、fgf8, krox20, hox1a, epha4a などの発現を調べたが、これらの分子の発現には影響がなかったため、後脳 compartment は正常に形成されているものと思われた。しかしながらその後の compartment 特異的な神経分化に関わる因子、Rfng, wnt1, deltaD, ash1, ngn1, coe2 などの発現が WBSR17 発現抑制胚で消失している、あるいは異所的に発現しているなどの異常が見られた。さらに、WBSR17 の発現抑制胚は、Rfng (radical fringe) 発現抑制胚とよく似た表現型を示すことが分かっ

た。そこで我々は、WBSR17 発現抑制胚と Rfng 発現抑制胚との関係を調べた。その結果、どちらの抑制胚も後脳発生に異常が見られた。コンパートメント形成は正常に進行しているものの、その後の神経細胞の分化に異常があることがわかった。また、脳室の中にアポトーシスを起こした細胞に由来すると思われる凝集塊が見いだされた。これらの解析を通じて、WBSR17 が後脳の compartment 特異的な神経分化の過程に重要な働きをしていることが明らかとなった。また、Rfng との関連性から、WBSR17 が notch シグナルの調節を介して神経分化に関わっている可能性が示唆された。

以上の結果より、ムチン型糖鎖の生合成酵素である WBSR17 は神経特異的に発現しており、その発現を抑制すると神経発生に関連した分子群の発現が著しく低下することが明らかとなった。本研究より神経特異的なムチン型糖鎖が発現しており、その糖鎖が神経分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、その WBSR17 の発現を抑制するとアポトーシスによる細胞死を誘発することも明らかとなった。

次に、WBSR17 が細胞膜輸送に関わることを示した研究成果を記す。

(3) HEK293T 細胞を用いた細胞膜輸送の解析

HEK293T 細胞における WBSR17 の発現を RNAi で抑制することで我々は以下の知見を得た。まず、我々は細胞内栄養状態の指標である GlcNAc の濃度依存的に WBSR17 の発現量が増加することを確認した。次に、WBSR17 が液相エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシス経路を負に制御することを見いだした。さらに、細胞内のリソソームを含む膜系において、レクチンで染色される凝集体が蓄積することを明らかにした。以上の知見より、WBSR17 は細胞内の膜輸送に関わっており、その調節メカニズムの破綻は膜タンパク質の輸送異常によるリソソーム病様の症状を引き起こすことを見いだした。

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6件)

- ① Ayumi Miyake, Satoka Nihno, Yuino Murakoshi, Ayano Satsuka, Yoshiaki Nakayama, and Nobuyuki Itoh, Neucrin, a novel secreted antagonist of canonical Wnt signaling, plays roles in developing neural tissues in zebrafish. *Mech. Dev.* (2012) **128**,

- 577-590. 査読有
DOI:10.1016/j.bbr.2011.03.031
- ② Ikuo Kimura, Yoshiaki Nakayama, Morichika Konishi, Teruyuki Kobayashi, Masahiro Mori, Masaki Ito, Akira Hirasawa, Gozoh Tsujimoto, Mitsuhiro Ohta, Nobuyuki Itoh, and Masafumi Fujimoto, Neuferricin, a novel extracellular heme-binding protein, promotes neurogenesis. *J. Neurochem.* (2010) **112**, 1156-1167. 査読有
DOI:10.1111/j.1471-4159.2009.06522.x
- ③ Koichi Yamauchi and Akira Kurosaka, Expression and function of glycogen synthase kinase-3 in human hair follicles. *Arch. Dermatol. Res.* (2010) **302**, 263-270. 査読有
DOI:10.1007/s00403-009-0987-x
- ④ Koichi Yamauchi and Akira Kurosaka, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 enhances the expression of alkaline phosphatase and insulin-like growth factor-1 in human primary dermal papilla cell culture and maintains mouse hair bulbs in organ culture. *Arch. Dermatol. Res.* (2009) **301**, 357-365. 査読有
DOI:10.1007/s00403-009-0929-7

[学会発表] (計20件)

- ① Yoshiaki Nakayama, and Akira Kurosaka, Roles of mucin-type carbohydrates in endocytosis, 2012 Joint Seminar in Science and Technology, 2012.3.12, Bangkok (Thailand)
- ② Akira Kurosaka, and Yoshiaki Nakayama, Roles of mucin-type carbohydrates in zebrafish development, 2012 Joint Seminar in Science and Technology, 2012.3.12, Bangkok (Thailand)
- ③ Tamiko Kawai, Kenji Ohshita, Asaka Kakii, Naosuke Nakamura, Yoshiaki Nakayama, and Akira Kurosaka, Functional analysis of N-acetylgalactosaminyltransferase 8 in zebrafish. 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜市
- ④ Naosuke Nakamura, Eiichi Kaneda, Yoshiaki Nakayama, and Akira Kurosaka, Functional analysis of N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4 in zebrafish. 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜市
- ⑤ Hiroki Fujiwara, Tatsunori Satoh, Yasuhiro Tsuji, Yoshiaki Nakayama, Naosuke Nakamura, and Akira Kurosaka, Characterization of a brain-specific polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜市
- ⑥ Yoshiaki Nakayama, Ayumi Wada, Naosuke Nakamura, and Akira Kurosaka, A putative polypeptide GalNAc-transferase, WBSR17, regulates endocytosis in HEK293T cells. 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜市
- ⑦ Naosuke Nakamura, Eiichi Kaneda, Yoshiaki Nakayama, and Akira Kurosaka, Developmental Roles of Putative Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish. 2011 Annual Conference of the Society for Glycobiology, 2011.11.11, Seattle, Washington (USA)
- ⑧ Yoshiaki Nakayama, Naosuke Nakamura, and Akira Kurosaka, The Biological Roles of a putative Polypeptide GalNAc-transferase/WBSR17. Glyco21, 2011.8.21-26, Vienne (Austria),
- ⑨ Yoshiaki Nakayama, Yasuhiro Tsuji, Naosuke Nakamura, and Akira Kurosaka, Characterization of brain-specific polypeptide GalNAc-transferases in P19 cells, 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年会, 2010.12.7-10, 神戸市
- ⑩ Hiroki Fujiwara, Tatsunori Satoh, Yoshiaki Nakayama, Naosuke Nakamura, and Akira Kurosaka, Functional analysis of brain-specific polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-related genes, 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年会, 2010.12.7-10, 神戸市
- ⑪ Naosuke Nakamura, Masaaki Tawara, Kazuma Nishimura, Kosuke Hachiga, Hirotaka Nishizaki, Yoshiaki Nakayama, Ayumi Miyake, Nobuyuki Itoh, and Akira Kurosaka, The Biological Roles of WBSR17, a Gene Homologous to Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish. 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年会,

2010. 12. 7-10, 神戸市

- ⑫ Akira Kurosaka, Shinya Toba, Tatsunori Satoh, Naosuke Nakamura, Yoshiaki Nakayama, and Kei-ich Ozaki, polypeptide

N-acetylgalactosaminyltransferase causes cell death in P19 embryonic carcinoma cells during neural differentiation. International Carbohydrate Symposium (ICS2010), 2010. 8. 1-6, 横浜市

- ⑬ Naosuke Nakamura, Masaaki Tawara, Kazuma Nishimura, Kosuke Hachiga, Hirotaka Nishizaki, Yoshiaki Nakayama, Ayumi Miyake, Nobuyuki Itoh, and Akira Kurosaka, The Biological Roles of Brain-specific Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish. International Carbohydrate Symposium (ICS2010), 2010. 8. 1-6, 横浜市

[図書] (計1件)

- ① Sayaka Sasaki, Hiroya Ohta, Yoshiaki Nakayama, Morichika Konishi, Ayumi Miyake, and Nobuyuki Itoh, In Tech, Human Genetic Diseases (2011) 37-56.

[その他]

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~kurosaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒坂 光 (KUROSAKA AKIRA)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90186536

(2) 研究分担者

寺地 徹 (TERACHI TORU)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90202192

瀬尾 美鈴 (SEO MISUZU)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：60211223

中村 直介 (NAKAMURA NAOSUKE)

京都産業大学・工学部・講師

研究者番号：30424964 (H22→H23：研究分担者)

中山 喜明 (NAKAYAMA YOSHIAKI)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：40512455 (H22→H23：研究分担者)

(3) 連携研究者
なし