

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570154

研究課題名（和文） シアル酸の付加が血管新生で果たす役割

研究課題名（英文） Role of Sialic Acid for Angiogenesis

研究代表者

北爪 しのぶ (KAWAGUCHI SHINOBU)

独立行政法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・副チームリーダー

研究者番号：80301753

研究成果の概要（和文）：

α 2,6-シアル酸の付加によって血管内皮細胞の機能がどのような分子メカニズムで制御されるか明らかにするために、 α 2,6-シアル酸の生成を担うシアル酸転移酵素ST6Gal Iを遺伝的に欠損させたノックアウトマウスと、野生型マウスの比較解析を行った。その結果、 α 2,6-シアル酸欠損細胞では血管内皮細胞の主要な接着分子であるPECAMの局在変化が起きていることが分かった。通常、PECAMは細胞表面、中でも細胞間接着部位に濃縮して存在してPECAM同士が相互作用しているのに対し、 α 2,6-シアル酸欠損状態ではPECAMが細胞表面にとどまることができず、細胞内に取り込まれていた。この分子的背景として、PECAMがシアル酸依存的にホモフィリックな相互作用をしていることをin vitroの実験系で明らかにした (*J. Biol. Chem.* 285, 6515-6521 (2010))

研究成果の概要（英文）：

In this study, we show that α 2,6-sialic acid is necessary for the cell-surface residency of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM), a member of the immunoglobulin superfamily that plays multiple roles in cell adhesion, mechanical stress sensing, antiapoptosis and angiogenesis. As a possible underlying mechanism, we found that the homophilic interactions of PECAM in endothelial cells were dependent on α 2,6-sialic acid. We also found that the absence of α 2,6-sialic acid downregulated the tyrosine-phosphorylation of PECAM and recruitment of SHP2, and rendered the cells more prone to mitochondria-dependent apoptosis, as evaluated using PECAM-deficient endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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： シアル酸転移酵素、血管内皮細胞、ST6Gal I, PECAM, シアル酸

1. 研究開始当初の背景

脂質やタンパク質に結合して細胞表面を覆っている糖鎖は、発生や分化、免疫現象の際の細胞認識に重要な役割を果たすことが次第に明らかになっている。中でも糖鎖の末端に位置するシアル酸の付加は、リンパ球の血管内皮細胞への接着を促すことや、Bリンパ球の抗体産生能を調節することなどの機能が明らかにされている。本申請者らは、ST6Gal Iの代謝機構や機能について長年研究を続けてきた (S. Kitazume *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2001) **98**, 3650、S. Kitazume *et al.* *J. Biol. Chem.* (2003) 278, 14865, S. Kitazume *et al.* *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 8589)。そして最近、ST6Gal I ノックアウトマウスを解析した結果、(i)通常は血管内皮細胞に $\alpha 2, 6$ -シアル酸の結合している糖タンパク質が高発現していること、(ii)ST6Gal I ノックアウトマウスから単離した $\alpha 2, 6$ -シアル酸の欠損した血管内皮細胞において接着分子であるPECAM(platelet endothelial cell adhesion molecule)の局在が大きく変化していること (図参照)、(iii)PECAMには通常は $\alpha 2, 6$ -シアル酸が結合していること、そして興味深いことに(iv) ST6Gal I ノックアウトマウス由来の血管内皮細胞は *in vitro* での細胞移動速度が変化しているという予備的実験結果を得ている。これらの予備的な実験結果は「 $\alpha 2, 6$ -シアル酸の付加が血管新生を調節する役割を担う」ことを示唆している。血管新生、なかでも病的な血管新生(腫瘍血管新生)は癌の初期増殖の律速過程であり、腫瘍血管新生阻害薬は抗癌治療薬と成り得る。このような医学的観点からも、血管新生についての理解を深めることは重要である。

2. 研究の目的

$\alpha 2, 6$ -シアル酸依存的に血管内皮細胞の機能が制御される機構には、PECAMの $\alpha 2, 6$ -シアル酸依存的な局在変化が鍵となると本申請者らは考えた。そしてこの機構の分子的背景には $\alpha 2, 6$ -シアル酸を持つPECAMに結合する細胞表面レクチンが関与しているののではないか?との仮説を立てた(研究計画の図参照)。具体的には、通常PECAMは $\alpha 2, 6$ -シアル酸結合レクチンと細胞表面でシス、またはトランス相互作用し、血管新生に関与する他の分子と細胞表面や細胞接着部位において安定した機能的複合体を形成するのに対し、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸が欠如した場合はレクチンがPECAMを細胞表面に保持することが出来ず、機能分子は接着分子との相互作用が不全になり、その血管新生に関する機能も不全に至るというものである。

そこで、(i)ST6Gal I ノックアウトマウス由来の血管内皮細胞と野生型マウス由来の血管内皮細胞の血管新生能の差異を*in vitro* および*in vivo*の双方の実験系で明らかにしていくと同時に、本申請者が提唱している仮説を検証するために(ii) $\alpha 2, 6$ -シアル酸依存的な機能的分子複合体の実体を種々の機能解析や生化学的解析によって明らかにし、(iii)PECAM分子内でレクチン認識に際して重要なドメインを決定することや $\alpha 2, 6$ -シアル酸結合レクチンの同定を試みる計画である。

3. 研究の方法

$\alpha 2, 6$ -シアル酸の付加によって血管内皮細胞の機能がどのような分子メカニズムで制御されるか明らかにするために、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸の生成を担うシアル酸転移酵素ST6Gal I

を遺伝的に欠損させたノックアウトマウス ($\alpha 2, 6$ -シアル酸欠損マウス) と、コントロールマウス (野生型マウス) の比較解析を行った。

4. 研究成果

まず第一に、両マウスの肝臓から血管内皮細胞を単離し、解析した結果、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸欠損細胞では、血管内皮細胞の主要な接着分子であるPECAMの局在変化が起きていることが分かった。また、PECAM自体に $\alpha 2, 6$ -シアル酸が結合していることも明らかにした。通常、PECAMは細胞表面、中でも細胞間接着部位に濃縮して存在してPECAM同士が相互作用しているのに対し、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸欠損状態ではPECAMが細胞表面にとどまることができず、細胞内に取り込まれていた。この分子的背景として、PECAMがシアル酸依存的にホモフィリックな相互作用をしていることをin vitroの実験系で明らかにした。PECAMは、ストレス刺激に応じて細胞内領域がリン酸化して、脱リン酸化酵素 (SHP2) を呼び寄せ、多数のシグナル分子の脱リン酸化を通じて細胞死を抑制する働きを持つ。しかし、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸欠損細胞ではPECAMのリン酸化やSHP2のリクルート量が減少していた。そのため、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸を欠損した血管内皮細胞は、アポトーシス誘導刺激でより多くの細胞死を誘導していることが明らかになった。(*J. Biol. Chem.* 285, 6515-6521 (2010))

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

#corresponding author

1. **S. Kitazume** (2011) How does N- and O-glycosylation affect the formation and accumulation of Amyloid

β -peptide? *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 23, 161-167. 査読あり

2. Y. Kizuka, **S. Kitazume**, M. Yoshida, and N. Taniguchi (2011) Brain-specific expression of N-acetylglucosaminyltransferase IX (GnT-IX) is regulated by epigenetic histone modifications *J. Biol. Chem.* **286**, 31875-31884. 査読あり
3. S. Futakawa, K. Nara, M. Miyajima, A. Kuno, H. Ito, H. Kaji, K. Shirogami, T. Honda, Y. Tohyama, K. Hoshi, Y. Hanzawa, **S. Kitazume**, R. Imamaki, K. Furukawa, K. Tasaki, H. Arai, T. Yuasa, M. Abe, H. Arai, H. Narimatsu, and Y. Hashimoto (2011) A unique N-glycan on human transferrin in CSF: a possible biomarker for iNPH. *Neurobiol. Aging*, in press 査読あり
4. **S. Kitazume**, Y. Tachida, M. Kato, Y. Yamaguchi, T. Honda, Y. Hashimoto, Y. Wada, T. Saito, N. Iwata, T. Saido and N. Taniguchi (2010) Brain endothelial cells produce amyloid β from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form *J. Biol. Chem.* **285**, 40097-40103. (This is featured by Research Highlight in Functional Glycomics Gateway (2010) <http://www.functionalglycomics.org/fg/update/2010/101111/full/fg.2010.36.shtml> 査読あり
5. K. Nakajima, **S. Kitazume**, T. Angata, R. Fujinawa, E. Miyoshi, and N. Taniguchi (2010) Simultaneous determination of nucleotide sugars involved in glycosylation with ion-pair

- reversed-phase HPLC, *Glycobiology* **20**, 865-871. 査読あり
6. **S. Kitazume**, R. Imamaki, K. Ogawa, Y. Komi, S. Futakawa, S. Kojima, Y. Hashimoto, J. D. Marth, J. C. Paulson, and N. Taniguchi (2010) α 2,6-Sialic Acid on Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) Regulates its homophilic interactions and downstream antiapoptotic signaling *J. Biol. Chem.* **285**, 6515-6521. (This is featured by Featured article in Functional Glycomics Gateway (2010) <http://www.functionalglycomics.org/fg/update/2010/100211/full/fg.2010.8.shtml> 査読あり)
 7. **S. Kitazume**, R. Oka, K. Ogawa, S. Futakawa, Y. Hagiwara, H. Takigawa, M. Kato, A. Kasahara, E. Miyoshi, N. Taniguchi, and Y. Hashimoto (2009) Molecular insights into β -galactoside α 2,6-sialyltransferase secretion in vivo *Glycobiology* **19**, 479-487. 査読あり
 8. S. Futakawa, **S. Kitazume**, R. Oka, K. Ogawa, Y. A. Kinoshita, K. Miyashita and Y. Hashimoto. (2009) Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay systems for plasma β -galactoside α 2,6-sialyltransferase, a possible hepatic disease biomarker *Analytica Chimica Acta* **531**, 116-120. 査読あり
- [学会発表] (計 4 件)
1. **S. Kitazume**, Brain endothelial cells produce amyloid β from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form, 第 3 2 回日本生化学会シンポジウム口頭発表、2011 年 9 月 22 日 (京都)
 2. **S. Kitazume**, R. Imamaki, K. Ogawa, Y. Komi, S. Futakawa, S. Kojima, Y. Hashimoto, J. D. Marth, J. C. Paulson, and N. Taniguchi, α 2,6-Sialic Acid on Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) Regulates Its Homophilic Interactions and Downstream Antiapoptotic Signaling, **ICS2010, Chiba, Aug. 8, 2010**
 3. **S. Kitazume**, Brain endothelial cells produce amyloid β from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form, GlycoT 2010, Tokyo Jul.30 2010
 4. **S. Kitazume**, “ α 2,6-Sialic Acid on Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) Regulates Its Homophilic Interactions and Downstream Antiapoptotic Signaling”, The 2nd Japan/China Joint Symposium on Glycobiology, Wako, Apr. 6(2010)
 5. S. Kitazume, “An α 2,6-Sialic Acid on Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) Regulates Its Homophilic Interactions and Downstream Anti-apoptotic Signaling”, Joint Japan-CCRC Symposium: New insights into the dynamic functions of glycans, Athens (U.S.A), Mar. 5, 2010
 6. **S. Kitazume**, Sialic acid-based homophilic PECAM interactions regulate pathological angiogenesis, 第

32回日本分子生物学会シンポジウム
口頭発表、2009年12月10日(横浜)

7. Shinobu Kitazume, Rie Imamaki, Kazuko Ogawa, Yusuke Komi, Satoshi Futakawa, Soichi Kojima, Yasuhiro Hashimoto, Jamey D. Marth, James C. Paulson, and Naoyuki Taniguchi, Sialic acid-based homophilic PECAM interactions and pathological angiogenesis, 2009 Annual Meeting of the Society for Glycobiology, San Diego, Nov. 14, 2009(ポスター)
8. 北爪しのぶ、今牧理恵、小川加寿子、小見悠介、小嶋聡一、橋本康弘、Jamey D. Marth、谷口直之「血管新生における α 2,6-シアル酸の役割」第29回日本糖質学会口頭発表、2009年9月9日(飛騨)

[図書] (計3件)

1. Shinobu Kitazume (2011) How does N- and O-glycosylation affect the formation and accumulation of amyloide β -peptide? TIGG23, 161-167
2. 木塚康彦、兼清健志、北爪しのぶ、谷口直之、GnT-IX 遺伝子の脳特異的な発現とアイソフォーム 「脳 21」 14, 1, 9-12, 2011
3. 橋本康弘、北爪しのぶ、アルツハイマー病の原因酵素が糖鎖を変えていた、「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」 2009

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

名称：認知症診断の為の可溶性アミロイド β 前駆体タンパク質770 β 切断産物の検出方法

発明者：北爪しのぶ、谷口直之、立田由里子、西道隆臣、橋本康弘、本多たかし

権利者：理化学研究所

種類：PCT 国際特許

番号：PCT/JP2011/067530

出願年月日：2011年7月29日

国内外の別：国外

名称：認知症診断の為の可溶性アミロイド β 前駆体タンパク質770 β 切断産物の検出方法

発明者：北爪しのぶ、谷口直之、立田由里子、西道隆臣、橋本康弘、本多たかし

権利者：理化学研究所

種類：特願

番号：2010-171122

取得年月日：平成2010年7月29日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北爪 しのぶ (KAWAGUCHI SHINOBU)

独立行政法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・副チームリーダー

研究者番号：80301753

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし