

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：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21700420

研究課題名（和文） 新規シアル酸含有糖鎖構造の生理的意義の解明

研究課題名（英文） Analysis of the novel sialylated N-glycan expressed in the mouse brain

研究代表者

吉村 武 (YOSHIMURA TAKESHI)

生理学研究所・分子生理研究系・特任助教

研究者番号：60402567

研究成果の概要（和文）：脳におけるN結合型糖鎖の重要性は糖転移酵素のノックアウトマウスの解析や先天性グリコシル化異常症候群の解析などから明らかである。しかし、どの糖鎖がどの蛋白質に修飾されているか、糖鎖結合分子は何かなど、N結合型糖鎖が関与する分子機構の知見は乏しい。本研究では、微量な試料からN結合型糖鎖を解析する手法を開発し、それを用いて、脳内新規シアル酸化N結合型糖鎖構造 6-Sialyl-Lewis^x (Gal β 1, 3[NeuAc α 2, 6]GlcNAc-) を解析することで、脳機能における糖鎖が関与する新たな分子機構の解明を目指した。

研究成果の概要（英文）：Analyses of glycosyltransferase knockout mice and congenital disorders of glycosylation reveal that N-glycans play important roles in the brain. In this study, we developed a simple method to purify and detect trace amounts of N-glycans. We focused on the analysis of the novel sialylated N-glycan structure, 6-Sialyl-Lewis^x (Gal β 1, 3[NeuAc α 2, 6]GlcNAc-), found in the mouse brain. We aimed to identify its interacting molecules as well as the protein on which it is beared.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：糖鎖・シアル酸・神経細胞・糖蛋白質・シグレック

1. 研究開始当初の背景

脳において糖蛋白質など糖鎖を有する分子は細胞表面や細胞外に存在し、神経系の発生やシナプス活性の調節、成人における脳損傷からの再生過程などにおいて重要な役割を果たしている。糖鎖構造は糖転移酵素の発

現調整や基質特異性、神経系を含め各組織での分布などによって制御されている。ある特定の糖転移酵素を欠損したノックアウトマウスでは神経系の機能異常などが起こる。また、神経運動発達遅延や小脳形成不全、てんかん様発作、多発性ニューロパチーなど様々

な臨床神経学的特徴を示す（N結合型糖鎖の欠損により起こる）先天性グリコシル化異常症候群の解析から、神経系における糖鎖の重要性が高いことは明らかである。しかし、脳における糖蛋白質糖鎖の関与する分子機構は不明な点が多かった。

シアル酸は糖蛋白質や糖脂質などの複合糖質の非還元末端に付加される酸性糖である。シアル酸合成で制御的役割をする酵素UDP-N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ/N-アセチルマンノサミンキナーゼの遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死となることから、シアル酸は生物の必須成分である。シアル酸はカルボキシル基を持つため負電荷を有しており、この性質により細胞接着や分化、神経線維発達、受容体認識などの様々な生命現象に影響を与える。また、ラット脳において全N結合型糖鎖の約40%がシアル酸化されている。これらの報告は、生体内でのシアル酸の高い重要性を示唆するものであるが、脳におけるシアル酸化N結合型糖鎖の生理作用については十分に検討されていない。

2. 研究の目的

研究代表者の所属する研究室では脳内に発現しているN結合型糖鎖構造および糖鎖生成過程に関わる遺伝子発現を網羅的に解析してきた。その過程で、マウス脳において今までに報告されていない新規シアル酸化N結合型糖鎖構造 6-Sialyl-Lewis^x (Gal β 1, 3[NeuAc α 2, 6]GlcNAc-)を見出した。この新規シアル酸化N結合型糖鎖構造の発現は発達過程においてダイナミックに変化するため、脳構造の構築や機能発現に大きな役割を果たしていることが示唆された。本研究は、この新規シアル酸化N結合型糖鎖構造の脳における役割を解明することを目的とした。

(1) 微量な試料からの糖鎖解析方法の確立

マウス脳の特定期域に発現する糖鎖の解析や、マウス脳抽出液をSDS-PAGEで展開後に目的糖蛋白質の糖鎖を解析する際、試料が微量であり、従来の手法では解析が困難であった。本研究では、微量な試料からN結合型糖鎖を解析する手法の開発を試みた。

(2) 新規シアル酸化N結合型糖鎖を持つ糖蛋白質の同定

この新規シアル酸化N結合型糖鎖 6-Sialyl-Lewis^x は糖蛋白質に付加している。ゆえに、この糖鎖は蛋白質部分と協調して働いている可能性が高い。本研究では、新規シアル酸化N結合型糖鎖を持つ糖蛋白質の同定を試みた。

(3) 新規シアル酸化N結合型糖鎖の生合成

経路の解明

この新規シアル酸化糖鎖構造の生合成経路に関わる酵素を明らかにすることで、この糖鎖構造を欠損させることが可能となる。本研究では、新規シアル酸化N結合型糖鎖の生合成経路に関わる酵素の探索を行った。

(4) 新規シアル酸化N結合型糖鎖に対する脳内シグレックの同定

シアル酸化糖鎖を特異的に認識し結合する蛋白質（シグレックファミリー）が知られている。脳内にも多数のシグレックが存在するため、シアル酸を介した分子機構が重要な役割を担うことが強く示唆される。本研究で扱うシアル酸化糖鎖は脳内新規構造であるため、それと相互作用する分子は分かっておらず、同定すれば今まで知られていなかったシアル酸化N結合型糖鎖-シグレックシステムを分子レベルで理解出来るようになる。本研究では、新規シアル酸化N結合型糖鎖を認識するシグレックの同定を試みた。

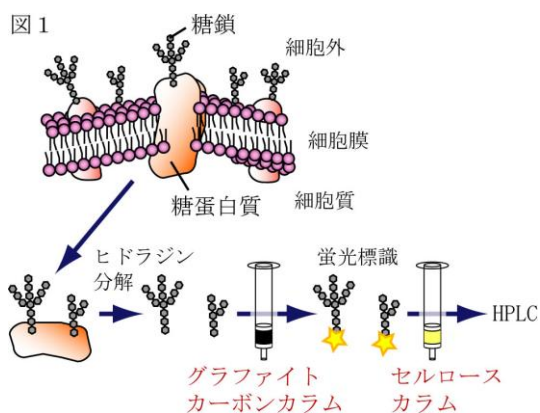
(5) 髄鞘の糖鎖の網羅的解析

研究代表者の所属する研究室における先行研究により、この新規シアル酸化糖鎖構造は生後出現し、成体になるまで増え続け、成体脳では全糖鎖の2%程度存在することが明らかであった。そこで、髄鞘に着目し、本研究では髄鞘の糖鎖の網羅的解析を行い新規シアル酸化糖鎖の発現を調べた。

3. 研究の方法

(1) 微量な試料からの糖鎖解析方法の確立

HPLCを用いて微量な試料から糖鎖解析を行う際、夾雑物由来のバックグラウンドピークが大きいことが問題であった。微量な試料からの糖鎖を解析する方法を確立するため、図1に示すように、ヒドラジン分解後、2種類のカラム（グラファイトカーボンカラムとセルロースカラム）を用いて糖鎖を精製した。



2種類のカラムを用いた糖鎖精製法とSDS-PAGEを組み合わせた。SDS-PAGEのゲルをゲル内ヒドラジン分解し、2種類カラムを

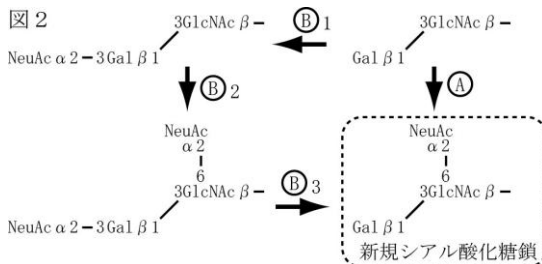
用いて糖鎖を精製することで、微量な試料から目的蛋白質のN結合型糖鎖を解析する手法を開発した。

(2) 新規シアル酸化N結合型糖鎖を持つ糖蛋白質の同定

目的とする新規シアル酸含有N結合型糖鎖構造が特定の蛋白質に付加されているのかどうか検討するために、マウス脳膜画分をSDS-PAGEで展開し、ゲルを20分割した後、(1)で開発した手法を用いて個々のゲルに含まれる糖鎖構造を解析した。また、2次元電気泳動を用いて展開し、ゲルを分割して糖鎖解析を行い、目的とする糖蛋白質の特定を試みた。

(3) 新規シアル酸化N結合型糖鎖の生合成経路の解明

新規シアル酸化N結合型糖鎖構造6-Sialyl-Lewis^x (Gal β 1,3[NeuAc α 2,6]GlcNAc-)の生合成経路は不明であった。図2に示すように、合成経路はAとBが考えられた。しかし、AとB3に関わる酵素は見つかっていなかった。そこで、マウス脳において左下の糖鎖構造(中間産物)が発現しているか検討した。In situ hybridization法を用いて合成に関わると予想される酵素のマウス脳におけるmRNAの分布を検討した。



(4) 新規シアル酸化N結合型糖鎖に対する脳内シグレックの同定

新規シアル酸化糖鎖を認識するシグレックの同定するために、大阪大学の深瀬教授および田中助教と共同研究を行い、ビオチン化した新規シアル酸化糖鎖の合成を依頼し作製した。名古屋大学の北島教授と共同研究を行い、ストレプトアビジン結合ディッシュにビオチン化した合成糖鎖を結合させて、シグレックの探索を行った。

(5) 髄鞘の糖鎖の網羅的解析

中枢神経系および末梢神経系の髄鞘をシヨ糖密度勾配遠心法により精製し、これらの試料を用いてN結合型糖鎖を解析した。主要な糖鎖構造は、3次元HPLCシステムを用いて所有している標準品試料と共注入しながら構造決定した。標準品のないものは、質量分析法および各種糖切断酵素を用いて構造

決定した。

4. 研究成果

(1) 微量な試料からの糖鎖解析方法の確立

2種類のカラム(グラファイトカーボンカラムとセルロースカラム)を用いて糖鎖を精製することで、微量な試料からN結合型糖鎖を解析することが可能となった。マウス脳切片から特定領域を切り出し、この手法を用いてそこに含まれるN結合型糖鎖を解析することが出来た。この手法とSDS-PAGEを組み合わせることで、目的蛋白質のN結合型糖鎖を解析することが出来た。SDS-PAGEのゲルをゲル内ヒドラジン分解する手法は、ゲル内トリプシン処理した場合と比較し、ゲルから効率よく糖鎖を抽出した。これらの結果を論文として報告した(Yoshimura et al., Analytical Biochemistry, 2012)。

(2) 新規シアル酸化N結合型糖鎖を持つ糖蛋白質の同定

マウス脳膜画分をSDS-PAGEで展開し、ゲルを20分割した後、個々のゲルに含まれる糖鎖構造を解析した結果、主に50-70kDa付近の蛋白質が新規シアル酸化糖鎖を持つことを明らかにした。2次元電気泳動を用いて展開し、さらに解析したところ、主に等電点の低い蛋白質がこの新規糖鎖を持つことを見出した。ゆえに、特定の蛋白質がこの新規シアル酸化糖鎖を有している可能性が高い。今後、さらに解析を進め、質量分析法などを用いて新規シアル酸化糖鎖を持つ糖蛋白質を同定する。

(3) 新規シアル酸化N結合型糖鎖の生合成経路の解明

マウス脳を用いて新規シアル酸化糖鎖構造の予想合成経路の中間産物を探したところ、図2の左下に示す糖鎖構造を検出した。ゆえに、経路Bが新規シアル酸化構造への主な合成経路だと推測した。In situ hybridization法を用いて合成に関わると予想されるST6GalNAc4のmRNAの分布を検討した結果、マウス脳において一部の領域に局在していることを見出した。今後、候補酵素は糖鎖標準品を用いてin vitroで新規シアル酸化糖鎖が合成できるか確認する。

(4) 新規シアル酸化N結合型糖鎖に対する脳内シグレックの同定

ビオチン化した合成糖鎖を用いてシグレックの探索を行ったが、良い結果は得られなかった。糖鎖はクラスター化することで相互作用分子との親和性が上がることが知られている。そこで、新規シアル酸化糖鎖をクラスター化した糖鎖の合成を依頼し作製した。今後、このクラスター化した合成糖鎖を用い

てシグレックの探索を試みる。また、蛍光標識化したクラスター化合成糖鎖を用いて脳におけるシグレックの局在も検討する。

(5) 髄鞘の糖鎖の網羅的解析

精製した中枢神経系髄鞘および末梢神経系髄鞘のN結合型糖鎖の網羅的解析を行った。シアル酸化糖鎖は酸性糖鎖であるため、DEAE カラム HPLC を用いて酸性糖鎖を重点的に解析し、主な糖鎖構造を複数同定した。発現量の多い糖鎖の中には新規シアル酸化糖鎖は含まれていなかった。しかし、中枢神経系髄鞘および末梢神経系髄鞘のN結合型糖鎖の比較解析の結果、末梢神経系の髄鞘には多くの特徴的な硫酸化糖鎖が発現していることを見出した。ゆえに、末梢神経系の髄鞘形成に硫酸化糖鎖が重要な役割を担っているのではないかと考えている。

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2件)

① Yoshimura T, Yamada G, Narumi M, Koike T, Ishii A, Sela I, Mitrani-Rosenbaum S, Ikenaka K. Detection of N-glycans on small amounts of glycoproteins in tissue samples and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 査読有, 423, 253-260, 2012, DOI: 10.1016/j.ab.2012.01.023

② 池中一裕、鳥居知宏、吉村武、脳神経の発達とN結合型糖鎖、生化学、査読無、第83巻、212-215、2011、<http://www.jbsoc.or.jp/event/magazine/index.html>

[学会発表] (計11件)

① Yoshimura T. Structure determination of N-glycans on a few pmol glycoprotein and its application to the structural analysis of N-glycans on myelin protein zero. THE 31st NAITO CONFERENCE, Glycan Expression and Regulation[II]: Metabolites, Stress Response, Microdomains, and Beyond, 2011. 9. 13-16, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo, Hokkaido, Japan

② Yoshimura T. Structure determination of N-glycans on a few pmol glycoprotein and its application to the structural analysis of N-glycans on P0. ISN-ESN-2011, 23rd Biennial Meeting, 2011. 8. 30, Megaron Athens International Conference Centre, Athens, Greece

③ Yoshimura T. Analysis of N-glycan structures on myelin protein zero. 10th Biennial ISN Satellite Meeting on Myelin Biology, 2011. 8. 24-27, Kolymvari, Crete, Greece

④ Yoshimura T. Analysis of N-glycans in myelin. 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSN Joint Meeting, 2009. 8. 25, BEXCO, Busan, South Korea

⑤ Yoshimura T. Analysis of N-glycan structure from a femtomole level of glycoprotein. Ninth Biennial Satellite Meeting of the ISN on Myelin Biology, 2009. 8. 20-22, Gyeongju, South Korea

⑥ 吉村武、Analysis of N-glycan structure from a femtomole level of glycoprotein、第52回日本神経化学会(伊香保)大会、2009. 6. 22-24、伊香保温泉ホテル天坊(群馬県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/ninfo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 武 (YOSHIMURA TAKESHI)
生理学研究所・分子生理研究系・特任助教
研究者番号：60402567

(2) 研究協力者

深瀬 浩一 (FUKASE KOICHI)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：80192722
田中 克典 (TANAKA KATSUNORI)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：00403098
北島 健 (KITAJIMA KEN)
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授
研究者番号：80192558