

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 30 日現在

機関番号：82609
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21770154
 研究課題名（和文）ショウジョウバエの神経軸索走行におけるヘパラン硫酸微細構造の役割

研究課題名（英文）Functional analysis of heparan sulfate fine structures in *Drosophila* axon guidance

研究代表者

神村 圭亮 (KAMIMURA KEISUKE)
 財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・主席研究員
 研究者番号：30529524

研究成果の概要（和文）：本研究ではショウジョウバエの卓越した遺伝学を用いることで生体内においてヘパラン硫酸の微細構造を操作することを試みた。またヘパラン硫酸プロテオグリカンがシナプス形成において重要な働きをすることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We have established the "glycogenetics" approach, which allow the manipulation of heparan sulfate fine structures at will, using *Drosophila*, for which sophisticated genetic techniques are available. We also found that HSPGs have important roles in synapse formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：ヘパラン硫酸プロテオグリカン・ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

ヘパラン硫酸はタンパク質と結合したプロテオグリカンの形で存在し、細胞表面や細胞外マトリックスの主要な構成成分として広く生体内に分布する。またその機能は、細胞増殖・分化、細胞接着、酵素反応調節といった様々な生物学的機能に関与することが知られている。ヘパラン硫酸のこの多彩な機能は、糖鎖への硫酸基の付加を中心とする様々な修飾により調節されることが示唆されている。ヘパラン硫酸の生合成は、糖鎖の伸長反応、N 硫酸化、ウロン酸 C-5 位のエピメラー化、そして様々な部位の O 硫酸化という多くの段階から構成される。これらの修飾、特に特定の硫酸基により形作

られる微細構造が、タンパク質との特異的結合に重要であると考えられている（図 1）。これまで、FGF を含めた様々なヘパ

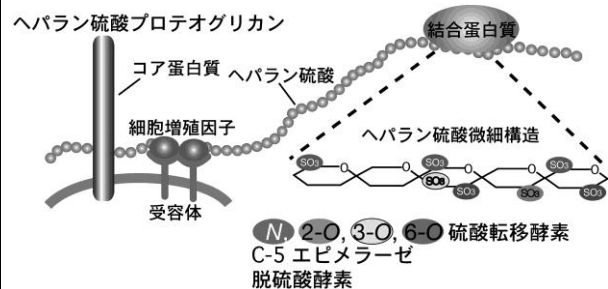


図 1 ヘパラン硫酸プロテオグリカン

ン硫酸結合性タンパク質が、それぞれ異なる微細構造を持ったヘパラン硫酸を特異的に認識し結合することが示されている。ヘパラン硫酸の異なる部位の修飾は、それぞれ異なる修飾酵素（C-5 エピメラーゼ・4種類の硫酸転移酵素・脱硫酸酵素）により触媒される。しかしヘパラン硫酸及び修飾酵素の研究は、これまで *in vitro* での生化学的な手法が主として使われていたため、個体発生におけるヘパラン硫酸微細構造の重要性に関しては、未だに多くの点が不明であった。

2. 研究の目的

本研究では遺伝学的手法が有効なショウジョウバエを用い、ヘパラン硫酸の構造を自由自在に改変し発生過程への影響を調べることで、生体内におけるヘパラン硫酸微細構造の意義を明らかにする。これまでいくつかの器官発生におけるヘパラン硫酸の役割が報告されているが、この中でも近年その重要性が注目されている神経発生における機能に焦点を当て解析を進める。

3. 研究の方法

ショウジョウバエの神経発生におけるヘパラン硫酸微細構造の役割を理解するためには、ヘパラン硫酸修飾酵素の過剰発現個体及び機能欠失個体を用いた解析が有効である。我々は、以前 2-O 及び 6-O 硫酸転移酵素遺伝子の変異体を単離した。本研究ではまずはじめに、これらの欠失変異体に加え、全ての修飾酵素発現個体を作成し、個体内で糖鎖構造を操作することを試みる。次にヘパラン硫酸の微細構造の変化が軸索誘導やシナプス形成などにどのような影響を及ぼすのか解析する。これにより、ヘパラン硫酸微細構造と軸索誘導分子の機能の関係を明確にする。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ生体内における糖鎖構造の操作

まずはじめにショウジョウバエの様々なヘパラン硫酸修飾酵素過剰発現個体を作製し、これらの酵素を単独もしくは様々な組み合わせによる発現が、ヘパラン硫酸の糖鎖構造、発生過程、及びシグナル伝達活性にどのような影響を及ぼすのか解析を行った。その結果、これらの修飾酵素発現個体はそれぞれ異なるヘパラン硫酸構造を有することが判明し（図1）、これにより生体内においてヘパラン硫酸構造を操作することが可能となった。興味深いことに、ある特定の修飾酵素の活性は共発現するもう一方の修飾酵素の種類により、促進もしくは抑制されることが判明した。さらに、これら修飾酵素発現個体はそれ

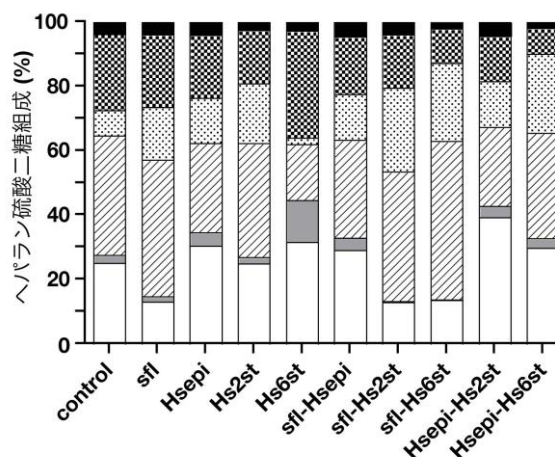


図2 ヘパラン硫酸修飾酵素過剰発現個体におけるヘパラン硫酸二糖組成

ぞれ異なる致死率を示し、また Wnt や BMP シグナル異常に特徴的な形態形成不全を示すことが分かった（図3）。実際に、いくつかの修飾酵素発現個体においては Wnt もしくは BMP シグナル活性が低下していた。重要

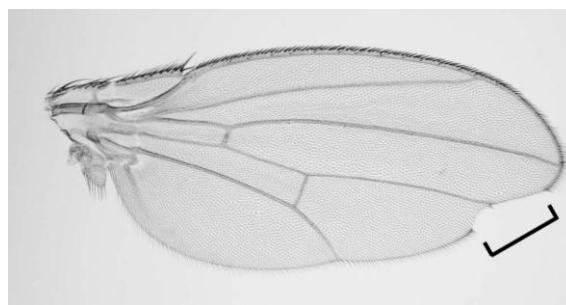


図3 *sfl-Hsepi* 過剰発現個体の成虫翅

なことにこれらのシグナル異常の種類とヘパラン硫酸構造（二糖組成）の関係を調べたところ、両者の間で明白な相関性は見出されなかった。以上のことから、ヘパラン硫酸は二糖組成解析のみでは判別出来ない他の構造的要因が重要な働きをすることが示唆された。

(2) 神経発生におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能解析

本研究ではシナプス形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能を調べるため、ショウジョウバエの神経筋シナプス形成に注目し、解析を進めている。ショウジョウバエの神経筋シナプスは脊椎動物で見られるコリン作動性とは異なり、グルタミン酸作動性であることから、脊椎動物の中樞神経シナプスに類似している。また、このシナプスは、その構造的単純性に加え、電気生理学的手法や透過型電子顕微鏡を用いた解析が確立されており、機能解析が非常に容易である。

まず初めに、様々な HSPG コア蛋白質の変

異体におけるシナプス終末の形態を調べたところ、分泌型 HSPG をコードするパールカンの変異体において極めて特異的な異常が観察された。そこで、神経筋接合部の形成におけるパールカンの機能に注目し解析を行った。まず、免疫電子顕微鏡法を用いた解析から、パールカンがシナプス後部に特

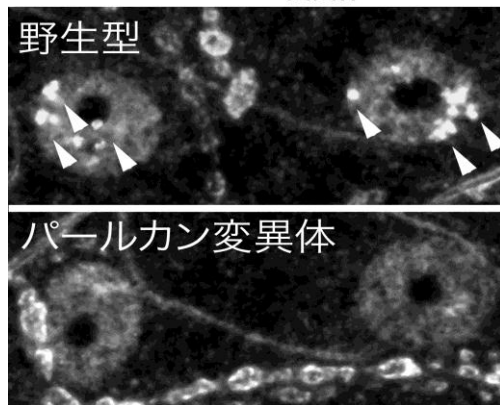
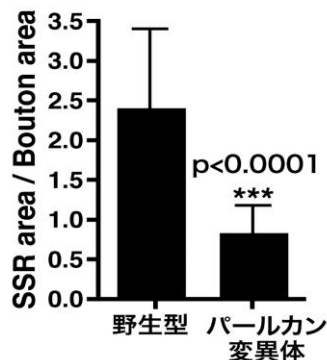
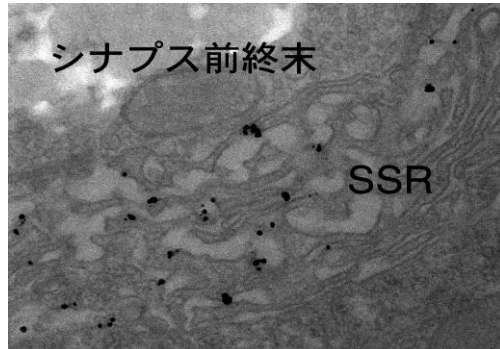


図4 (上段)免疫電子顕微鏡法によるパールカンの局在解析。(中段)パールカン変異体では SSR が減少する。(下段)パールカン変異体では筋細胞核内において点状の Wnt 受容体レベルが減少する。

徴的な構造である Subsynaptic reticulum (SSR)に局在することが判明した(図4上段)。次にパールカン欠失変異体における神経筋接合部の形態を透過型電子顕微鏡を用いて観察した結果、変異体では SSR の領域が小さくなること(図4中段)、またシナプス小胞の開口放出が起こる活動体の近傍の SSR が崩壊するという極めて特徴的な異常を示すことが分かった。興味深いこ

とに、同様の表現型が Wnt のシグナル異常により生じることが報告されている。シナプス前部から分泌された Wnt は、シナプス後膜に局在する Wnt 受容体に結合し、その後、受容体細胞内ドメインが核内に移行することでシナプス後部の形成を促進することが知られている。そこでパールカン変異体における Wnt シグナル活性を解析した結果、シナプス後細胞(筋細胞)における核内の Wnt 受容体レベルが減少することが判明した(図4下段)。この結果と一致して、パールカン変異体の筋細胞において構成的に Wnt の細胞内シグナルを活性化すると、シナプス後部の形成異常が回復した。以上の結果から、パールカンは神経筋接合部の形成において Wnt シグナル活性を調節することが明らかとなった。

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4件)

原著論文

1. Keisuke Kamimura, Nobuaki Maeda, and Hiroshi Nakato. (2011). In vivo manipulation of heparan sulfate structure and its effect on *Drosophila* development. *Glycobiology*, 21(5):607-618. 査読有 doi: 10.1093/glycob/cwq202
2. Adam Kleinschmit, Takashi Koyama, Katsufumi Dejima, Yoshiki Hayashi, Keisuke Kamimura and Hiroshi Nakato. (2010). *Drosophila* heparan sulfate 6-O endosulfatase regulates Wingless morphogen gradient formation. *Dev. Biol.*, 345(2), 204-214. 査読有 doi: 10.1016/j.ydbio.2010.07.006
3. Kazunari Nishimura, Maki Ishii, Mutsuki Kuraoka, Keisuke Kamimura, and Nobuaki Maeda. (2010). Opposing functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate during early neuronal polarization. *Neuroscience*, 169(4), 1535-1547. 査読有 10.1016/j.neuroscience.2010.06.027

総説

1. Nobuaki Maeda, Maki Ishii, Kazunari Nishimura, and Keisuke Kamimura. (2011). Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochem Res.*, 36(7), 1228-1240. 査読有 10.1007/s11064-010-0324-y

[学会発表](計8件)

1. Keisuke Kamimura and Nobuaki Maeda. (2011). Perlecan regulates Wingless signaling

- at the *Drosophila* neuromuscular junction 7th International Conference on Proteoglycans, (Sydney, Australia, 20th October, 2011)
2. 神村圭亮、前田信明. (2011). ショウジョウバエの神経筋シナプス形成においてパールカンは Wnt シグナルを調節する. 第 84 回日本生化学会大会 (京都府京都市, 2011 年 9 月 24 日).
 3. 神村圭亮、前田信明. (2011). ショウジョウバエの神経筋接合部においてパールカンは Wingless シグナル伝達を調節する. 第 34 回日本神経科学大会 (神奈川県横浜市, 2011 年 9 月 15 日).
 4. 神村圭亮、前田信明. (2010). Perlecan regulates BMP signaling essential for synaptic growth. 第 28 回内藤コンファレンス「糖鎖の発現と制御[I]-機能から病態まで-」(神奈川県湘南国際村センター, 2011 年 7 月 28 日) .
 5. 神村圭亮、前田信明、中藤博志. (2010). In vivo manipulation of heparan sulfate structure and its effects on *Drosophila* development. BMB2010 (兵庫県神戸市, 2010 年 12 月 9 日).
 6. 神村圭亮、前田信明. (2009). ショウジョウバエの神経筋シナプス形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能解析 第 82 回日本生化学会大会(兵庫県神戸市, 2009 年 10 月 24 日)
 7. 神村圭亮、前田信明. (2009). ショウジョウバエの神経筋シナプス形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割 第 29 回日本糖質学会大会(岐阜県高山市, 2011 年 9 月 10 日)
 8. 神村圭亮、前田信明. (2010). ショウジョウバエの神経筋シナプス形成においてパールカンは BMP シグナルを調節する Neuro2010 (兵庫県神戸市, 2010 年 9 月 3 日).

[その他]

ホームページ等

http://www.igakuken.or.jp/research/project/res_prj08.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神村 圭亮 (KAMIMURA KEISUKE)

財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・
神経再生研究分野・主席研究員

研究者番号：30529524