

平成 2 8 年 6 月 1 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2013～2015

課題番号：25293065

研究課題名（和文）ヘパラン硫酸微細構造修飾の生体シグナル調節における役割の解明

研究課題名（英文）Roles of heparan sulfate modification in biological signaling

研究代表者

榎 正幸（Masu, Masayuki）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20243032

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヘパラン硫酸糖鎖の微細構造を修飾するエンド型スルファターゼSulf1とSulf2の解析により、ヘパラン硫酸の脱硫酸化修飾が生体内で持つ役割を解明することを目的とした。ダブルノックアウトマウスの皮質脊髄路異常を成獣で行い、正中交差異常と上丘への異常投射があることを明らかにした。腎臓では、軽度の糸球体メサンギウム病変、軽度のアルブミン尿があること、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病マウスで遺伝子破壊により病変が増悪することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We performed analysis of heparan sulfate endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, in biological signaling by using knockout mice. The double knockout mice showed corticospinal tract defects, including defects in midline crossing at the pyramidal decussation and abnormal trajectory towards the superior colliculus. The double knockout mice also showed slight abnormalities in kidney glomeruli, especially in the mesangial region. Furthermore they showed severer glomerular abnormalities after inducing diabetes mellitus by streptozotocin compared with the wild-type controls.

研究分野：神経科学

キーワード：ヘパラン硫酸 糖鎖 スルファターゼ ノックアウトマウス 脳 腎臓 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

ヘパラン硫酸はプロテオグリカンのコア蛋白質に共有結合した糖鎖であり、細胞表面または細胞外基質に存在し、細胞の分化、増殖、接着、移動、形態形成などを制御する。その多様な生物活性は、ヘパラン硫酸が豊富な陰性電荷を持ち、増殖因子、モルフォゲン、ケモカイン、受容体、細胞外マトリックス分子、接着分子などと相互作用し、これらの分子による細胞間シグナルを調節することによる。ヘパラン硫酸エンド型スルファターゼ (Sulf1 と Sulf2) は、細胞外に分泌されて働く脱硫酸化酵素であり、ヘパラン硫酸糖鎖中のグリコサミノグリカンの6位に付加された硫酸基を選択的に分解する。その結果、シグナル分子との相互作用が変化するため、Wnt シグナルの活性化、FGF シグナルの抑制などの効果を持つことが *in vitro* の研究により明らかにされていた。しかしながら、生体内での役割については未だ不明な点が多かった。

2. 研究の目的

ヘパラン硫酸エンド型スルファターゼ Sulf1 と Sulf2 の生体内での機能を明らかにすることを目的とした。本研究では、特に予備的な実験から異常が発生することを見つけている神経系と腎臓に注目し、異常の詳細と異常発現の基盤を明らかにすることを目指した。

(1) Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウトマウスが皮質脊髄路に異常を持つことを既に見出している。しかし、純系の遺伝背景では生後直ぐに死亡するため、成獣脳における異常を明らかにできていない。一方、アウトブリード系統 (ICR マウス) に交配するとダブルノックアウトマウスが成獣まで生存することを見出したので、そのマウスを用いて成獣脳における異常の詳細を明らかにする。

(2) Sulf1 ノックアウトマウスがドーパミンシグナル異常に基づく行動異常を示すことを以前に見出しているが、その分子基盤は不明である。そこで、コンディショナルノックアウトマウスを用いて、部位特異的な遺伝子破壊を行い、異常発現のメカニズムを明らかにする。

(3) Sulf1 と Sulf2 が腎臓系球体に発現していることを既に見出しており、ヘパラン硫酸が系球体機能に重要な役割を持つことが知られているので、Sulf1 と Sulf2 の腎機能における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

いずれもノックアウトマウスを用いて、遺伝子破壊による異常について解析を行った。

(1) Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウト成獣マウスの連続脳切片を皮質脊髄路のマーカーである PKC γ 抗体で染色し、三次元再構成を行った。

(2) ドーパミン D1a 受容体およびドーパミン D2 受容体およびアデノシン A2A 受容体発現細胞で Cre を発現する BAC トランスジェニックマウス (Drd1-Cre, EY262; Drd1-Cre, EY266, Drd2-Cre, ER44; Adora2a-Cre, KG139) を導入し、C57BL/6N 系統へコンジェニック化を進めた。Cre レポーターマウス (Rosa26-lacZ マウス) と交配し、期待通りの遺伝子破壊が起こるかどうかを組織学的方法で調べた。Sulf1 コンディショナルノックアウトマウスを純系化し、上記の Cre マウス系統と交配した。

(3) Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウト成獣マウスの腎臓を病理学的に解析した。ストレプトゾトシン投与により糖尿病を誘導したマウスで同様に病理学的解析を行った。また、取り出した腎臓組織を用いて遺伝子解析、生化学的解析を行った。更に取り出した腎臓系球体を培養し、各種増殖因子による刺激を行い、反応性を調べた。蓄尿を行い、尿中のアルブミンとクレアチニン量を測定した。

4. 研究成果

(1) Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウト成獣マウスでは皮質脊髄路の錐体交差部における正中交差異常が観察された。正中近くを走行する線維の一部は正常に近い状態で正中交差したが、それ以外の線維は正中交差せずに同側の延髄、脊髄を下降することが分かった。それ以外に、胎児期に観察された上丘へ向かう異常投射が成獣脳でも残存していることが分かった。これらの異常は、皮質脊髄路の異常としては、これまでに報告されたどのノックアウトマウスとも異なり、同じく皮質脊髄路に異常を持つ Sema6A ノックアウトマウスの異常と類似点もあるが性状が異なることが分かった。

(2) 各々の Cre マウス系統が期待される脳部位で遺伝子組換えを起こすことが、レポーターマウスの解析で分かった。Sulf1 の floxed マウスと交配しているが、繁殖に時間がかかったため解析には至っていない。今後得られたマウスを用いて行動実験を行う計画である。

(3) Sulf1/Sulf2 ダブルノックアウト成獣マウスが軽度の腎臓系球体病変と軽度のアルブミン尿を示すことが分かった。系球体病変は、メサングウム細胞の増殖、メサングウム基質の蓄積、メサングウム基質の融解、基底膜の不正などが主体であった。尿検査では、軽度のアルブミン尿があることが分かった。これらの病変がヒトの糖尿病性腎症で見られる病変と似ていることから、ストレプトゾトシン誘導性糖尿病マウスにおける腎臓の変化を調べたところ、尿中アルブミン量の増加、腎臓系球体病変の悪化が観察された。さらに、単離系球体を培養し各種増殖因子で刺激してみると、ダブルノックアウトマウスでは PDGF などの増殖因子に対する反応性が低下していることが分かった。野生型マウスで糖

尿病を誘導すると Sulf1 と Sulf2 の発現が上昇すること、ダブルノックアウトマウスで PDGF シグナルなどが低下することから、Sulf1 と Sulf2 は腎臓系球体の恒常性維持に関わっており、糖尿病性腎症の進展に対して保護的に働いている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Masu, M. Proteoglycans and axon guidance: a new relationship between old partners. *J. Neurochem.* doi: 10.1111/jnc.13508. 査読有
Takashima, Y., Keino-Masu, K., Yashiro, H., Hara, S., Suzuki, T., van Kuppevelt, T.H., Masu, M., and Nagata, M. Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, Regulate Glomerular Integrity by Modulating Growth Factor Signaling. *Am. J. Physiol.-Renal Physiol.* 310, F395-408, 2016. 査読有

Freeman, S.D., Keino-Masu, K., Masu, M., and Ladher, R.K. Expression of the heparan sulfate 6-O-endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, in the avian and mammalian inner ear suggests a role for sulfation in inner ear development. *Dev. Dyn.* 244, 168-180, 2015. 査読有

Akamatsu, M., Takuma, H., Yamashita, T., Okada, T., Keino-Masu, K., Ishii, K., Kwak, S., Masu, M., and Tamaoka, A. A unique mouse model for investigating the properties of amyotrophic lateral sclerosis-associated protein TDP-43, by in utero electroporation. *Neurosci. Res.* 77, 234-241, 2013. 査読有
Wang, R., Iwakura, Y., Araki, K., Keino-Masu, K., Masu, M., Wang, X., Takei, N., Higashiyama, S., and Nawa, H. ErbB2 dephosphorylation and anti-proliferative effects of neuregulin-1 in ErbB2-overexpressing cell lines; re-evaluation of their low-affinity interaction. *Scientific reports.* 3, 1402, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

藤田祥平、寺脇慎一、塩見健輔、榎和子、榎正幸、若松馨、柴田直樹、樋口芳樹「Wnt シグナル伝達因子 CCD1 の DIX ドメインを介する新規な自己活性抑制制御の構造基盤の解明」第 38 回日本分子生物学会年會・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日-4 日(神戸国際会議場/兵庫県・神戸市)

高島康利、屋代紘、榎和子、榎正幸、長田道夫「系球体 Sulf1/2 は腎機能維持に不可欠である。」第 34 回日本糖質学会年會、2015 年 7 月 31 日-8 月 2 日(東京大学安田講堂/東京都・文京区)

Takuya Okada, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu. A role of neurotrophin signaling in the migration and nucleogenesis

of precerebellar neurons. 第 38 回日本神経科学学会大会、2015 年 7 月 28 日-31 日(神戸国際会議場/兵庫県・神戸市)

藤田祥平、寺脇慎一、塩見健輔、榎和子、榎正幸、若松馨、柴田直樹、樋口芳樹「ゼブラフィッシュ CCD1 DIX ドメインの X 線結晶解析 X-ray crystallographic analysis of zebrafish CCD1 DIX domain」第 32 回 PF シンポジウム、2015 年 3 月 17 日-18 日(つくば国際会議場/茨城県・つくば市)

Megumi Akamatsu, Hiroshi Takuma, Takenari Yamashita, Takuya Okada, Kazuko Keino-Masu, Hartmut Oehring, Shin Kwak, Masayuki Masu, Gustav F Jirikowski, Akira Tamaoka. 「Electron microscopic observation of intranuclear aggregation of TDP-43 in mouse cerebral cortex produced by in utero electroporation.」第 37 回日本神経科学学会大会、2014 年 9 月 11 日-13 日(パシフィコ横浜/神奈川県・横浜市)

Takuya Okada, Nana Kagaya, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu. Analysis of the corticospinal tract formation in adult *Sulf1*;*Sulf2* double knockout mice. 第 37 回日本神経科学学会大会、2014 年 9 月 11 日-13 日(パシフィコ横浜/神奈川県・横浜市)

詫間浩、赤松恵、山下雄也、Oehring, H.、岡田拓也、榎和子、石井一弘、Jirikowski, G.、郭伸、榎正幸、玉岡晃。子宮内電気穿孔法 TDP-43 遺伝子導入による in vivo 形成封入体の微細形態の検討。第 55 回日本神経学会総会、2014 年 5 月 21 日-24 日(福岡国際会議場/福岡県・福岡市)

Kazuko Keino-Masu, Takuya Okada, Masayuki Masu. Heparan sulfate modification by endosulfatases Sulf1 and Sulf2 is required for the corticospinal tract formation. International Symposium on Glyco-Neuroscience. 2014 年 1 月 9 日-11 日(Awaji Yumebutai International Conference Center/Hyogo・Awajishima)

Akamatsu, M., Takuma, H., Yamashita, T., Okada, T., Ishii, K., Keino-Masu, K., Kwak, S., Masu, M., Tamaoka, A. TDP-43 aggregation produced by In utero electroporation and its properties in the mouse motor neurons. 43th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2013 年 11 月 11 日(San Diego, USA)

Takashima, Y., Yashiro, H., Masu, M., Keino-Masu, K., and Nagata, M. Extracellular sulfatases regulate PDGF signaling and promotes nephropathy in diabetes. Kidney week 2012, 2013 年 11 月 5 日-10 日 (Atlanta, USA)

榎正幸、昌子浩孝、塩見健輔、宮川剛、榎和子. Ccd1/Dixdc1 欠損マウスにおける行動異常。第 36 回日本神経科学学会大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 30

回日本神経回路学会大会. 2013 年 6 月 20 日-23 日 (国立京都国際会館/京都府・京都市)

赤松恵、詫間浩、山下雄也、岡田拓也、石井一弘、榎和子、郭伸、榎正幸、玉岡晃. 筋萎縮性側索硬化症関連タンパク: TDP-43 封入体の形成-マウス胎児電気穿孔法による大脳皮質運動野への疾患関連遺伝子の導入. 第 36 回日本神経科学学会大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 30 回日本神経回路学会大会 2013 年 6 月 20 日-23 日 (国立京都国際会館/京都府・京都市)

榎和子、奥谷文乃、榎秀人、榎正幸. ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ Sulf1 の嗅覚記憶における役割. 第 36 回日本神経科学学会大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 30 回日本神経回路学会大会 2013 年 6 月 20 日-23 日 (国立京都国際会館/京都府・京都市)

詫間浩、赤松恵、山下雄也、岡田拓也、石井一弘、榎和子、郭伸、榎正幸、玉岡晃. マウス胎仔電気穿孔法による in vivo TDP-43 遺伝子導入と封入体形成の検討. 第 54 回日本神経学会総会 2013 年 5 月 29 日-6 月 1 日 (有楽町フォーラム/東京都・千代田区)

〔図書〕(計 2 件)

Masu, M. Emerging roles of heparan sulfate in axon guidance. In: Cortical Development: Neural Diversity and Neocortical Organization (ed. by R. Kageyama and T. Yamamori), Springer-Verlag, Tokyo, 総ページ数 320 ページ (うち 203-214 ページを分担), 2013.

Masu, M., Koike, S., Okada, T., and Keino-Masu, K. Studies on autotaxin signaling in endocytic vesicle biogenesis and embryonic development using whole embryo culture and electroporation. In: Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry. (Ed. by J. Chun et al.), John Wiley & Son Inc. Hoboken, NJ, USA, chapter 7, 総ページ数 812 ページ (うち 121-136 ページを分担), 2013.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/molneurobiol/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

榎 正幸 (MASU Masayuki)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 20243032

(2)研究分担者

榎 和子 (KEINO-MASU Kazuko)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 50344883

(3)連携研究者

長田 道夫 (NAGATA Michio)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 10192238