

平成30年6月14日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26840041

研究課題名(和文) ショウジョウバエ・ムコ多糖代謝異常症モデルを用いたヘパラン硫酸分解の意義の解明

研究課題名(英文) Functional analyses of heparan sulfate degradation using Drosophila as a model for mucopolysaccharidosis

研究代表者

神村 圭亮 (KAMIMURA, Keisuke)

公益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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)はヘパラン硫酸(HS)を側鎖にもつ糖蛋白質であり、様々な分子と相互作用することで多くの生理機能を調節する。一方、ヒトにおいてリソソームに局在するHS分解酵素の欠損は、様々な発達異常を伴うムコ多糖代謝異常症を引き起こす。本研究では、ムコ多糖代謝異常症の疾患モデルとしてショウジョウバエを用い、発生過程におけるHSの分解の役割を調べた。HS分解酵素の一つであるイズロニダーゼの機能に注目し解析した結果、イズロニダーゼの機能減少はBMPシグナルの低下を引き起こし、翅の形態異常を引き起こすことが分かった。

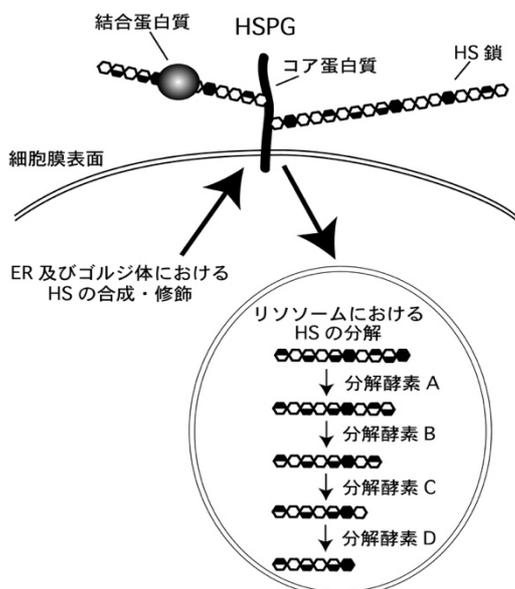
研究成果の概要(英文)：Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) are glycoproteins composed of a core protein with covalently attached heparan sulfate (HS) chains. HSPGs mediate interactions with a variety of extracellular ligands and participate in many physiological processes. In human, mutations in the lysosomal enzymes that degrade HS result in mucopolysaccharidosis, cause various organ dysfunction. Here, we examined the role of HS degradation during development using *Drosophila melanogaster* as a model system. We found that mutations in iduronidase, encoding a HS degradation enzyme, reduce the activity of BMP signaling and affect wing development.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ヘパラン硫酸 プロテオグリカン ムコ多糖代謝異常症 ショウジョウバエ

### 1. 研究開始当初の背景

ヘパラン硫酸鎖(HS)は最終的にリソソームで分解されるが、ヒトにおいてHS鎖の分解に異常をきたすと骨格異常や精神発達遅滞を伴うムコ多糖代謝異常症が発症することが知られている。HS鎖の分解は多数の特異的なグリコシダーゼ及びスルファターゼが、非還元末端から順次分解反応を触媒することによって進行する(図1)。そのためこれらのHS分解酵素が欠損すると、HS鎖の分解が途中で停止しリソソームに蓄積するため、リソソームが肥大することが知られている。このようにHS鎖の分解は発生過程において極めて重要な働きをするが、ムコ多糖代謝異常症で見られる骨格異常や精神発達遅滞がどのような分子メカニズムにより発症するのか全く分かっていなかった。



(図1) HSPGとリソソームにおけるHSの分解

### 2. 研究の目的

HS分解酵素の欠失がどのような分子メカニズムにより発達異常を引き起こすのか全く不明である。そこで本研究では、ムコ多糖代謝異常症の新たな疾患モデルとしてショウジョウバエを用い、発生過程におけるHSの分解の意義を明らかにすることを目標とした。

### 3. 研究の方法

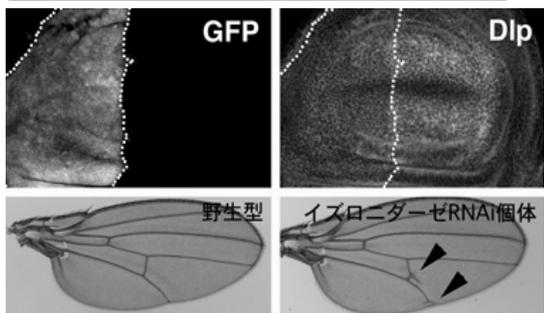
本研究ではショウジョウバエの発生過程におけるHS分解酵素の機能を調べるため、以

下の実験を行った。

- ① HS分解酵素の欠失変異体が示す異常を詳細に観察することで、どのようなシグナル伝達活性に異常をきたしているのか解析した。
- ② HS分解酵素の欠失がHSPGの局在・機能にどのような影響を与えるのか調べた。これにより発生過程におけるHS分解の役割とHS分解酵素によるHSPGの機能調節機構の解明を試みた。

### 4. 研究成果

#### HS分解酵素が関与するシグナル系の同定



(図2) GFPで示した領域でイズロニダーゼが減少するとDlpのレベルが減少し(上段)、BMPシグナル活性の異常により誘導される翅脈の形成異常(下段、矢尻)が観察された。

発生過程におけるHSの分解の役割を明らかにするためにはHS分解酵素欠失変異体を用いた解析が有効である。ショウジョウバエのゲノムには哺乳動物と同様に9種類の分解酵素がコードされている。そこで分解酵素の一つであるイズロニダーゼの変異体及びRNAi個体に注目し、どのような発生異常を示すのか調べた。その結果、イズロニダーゼをノックダウンすると成虫翅の過形成が観察された(図2)。この異常はBMPシグナル活性の異常により引き起こされることが知られている。そこでBMPシグナルによってリン酸化されるMadの翅原基における分布を調べたところ、イズロニダーゼRNAi個体では著しく減少していることが判明した。この結果から、イズロニダーゼによるHSの分解がBMPシグナルを介した翅の発生を調節することが判明した。またこの結果は、HSPGの機能は合成や修飾過程によってのみ調節されるのではなく、リソソームにおける分解によっても制御されることを示す。

次にイズロニダーゼの機能阻害が HS 及び HSPG の分布にどのような影響を及ぼすのかを調べた。その結果、GPI アンカー型 HSPG である Dlp の細胞膜表面におけるレベルが減少することが判明した。そこでイズロニダーゼ RNAi 個体において Dlp を過剰発現したところ、翅脈の過形成が一部回復した。この結果から、イズロニダーゼの機能阻害による翅の発生異常は Dlp の減少により引き起こされることが判明した。一方、HS の分解異常がどうして HSPG の蓄積を起こすのか詳細な分子メカニズムは未だ不明である。

HS 分解酵素の阻害による HS の蓄積は発生段階が進むほど顕著になることが予測される。そこでイズロニダーゼを欠失した成虫ハエの寿命を測定した。その結果、変異体において明らかな異常は観察されなかった。次に老齢ハエ (羽化後 30 日) の学習・記憶能力に注目し解析を行った結果、イズロニダーゼを欠失したハエにおいてもコントロールハエと同様の能力を示した。この結果から、(1) 30 日の期間では HS は異常に蓄積しない、もしくは、(2) ショウジョウバエにおいて HS の蓄積は寿命や学習・記憶に顕著な悪影響は与えない、ことが考えられた。

現在、イズロニダーゼ以外の分解酵素の機能にも注目し、欠失変異体の単離を試みている。今後、様々な HS 分解酵素の生体内における機能を調べることで、HS 分解の意義とムコ多糖代謝異常症の発症機序が明らかになると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

**Keisuke Kamimura and Nobuaki Maeda.** (2017). Heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila* neuromuscular development. *Biochim Biophys Acta*, 1861(10), 2442-2446. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.06.015. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. **Keisuke Kamimura** (2017) (招待講演). Glypican regulates synaptic plasticity at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Internatinal Conference on the Glycobiology*

*of Nervous System.*

2. **Kamimura K., Odajima A. and Maeda N.** (2017). Glypican regulates synaptic plasticity at the *Drosophila* neuromuscular junction. *7 Lakes Proteoglycans Conference.*
3. **神村圭亮、小田嶋愛子、前田信明.** (2017). ショウジョウバエの神経筋接合部においてグリピカンはオクトパミンを介したシナプス可塑性を調節する *ConBio2017*
4. **Keisuke Kamimura, Aiko Odajima, Nobuaki Maeda.** (2016) Glypican regulates synaptic plasticity at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Gordon Research Conference "Proteoglycan"*
5. **神村圭亮、小田嶋愛子、前田信明.** (2016). ショウジョウバエの神経筋接合部においてグリピカンはシナプス可塑性を調節する **第 35 回日本糖質学会年会**
6. **神村圭亮、小田嶋愛子、前田信明.** (2016). ショウジョウバエの神経筋接合部においてグリピカンはシナプス可塑性を調節する **第 89 回日本生化学会大会**
7. **Keisuke Kamimura, Aiko Odajima, Nobuaki Maeda.** (2016) *Drosophila* glypican regulates octopamine mediated synaptic plasticity. *The 3rd International Symposium on Glyco-Neuroscience*
8. **Keisuke Kamimura and Nobuaki Maeda.** (2015) (招待講演) Heparan sulfate proteoglycans at the *Drosophila* neuromuscular junction. **第 38 回日本神経科学大会**
9. **神村圭亮 前田信明.** (2015) (招待講演). ショウジョウバエの神経筋接合部におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割 **第 34 回日本糖質学会年会**
10. **神村圭亮、小田嶋愛子、前田信明.** (2015). ショウジョウバエにおいてグリピカンはオクトパミンを介した神経筋シナプスの可塑的な形態変化を調節する *BMB2015*
11. **Keisuke Kamimura, Rie Hamada, Nobuaki**

Maeda (2014)

Glypican and the heparan sulfate fine structure proteoglycans at the *Drosophila* neuromuscular junction.

**Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research**

12. Keisuke Kamimura, Rie Hamada, Nobuaki Maeda (2014).

Glypican and the heparan sulfate fine structure proteoglycans at the *Drosophila* neuromuscular junction.

**Satellite Symposium “Glycans in Neuroscience”**

13. Keisuke Kamimura (2014)

Heparan sulfate proteoglycans at the *Drosophila* neuromuscular junction.

**International Symposium on Glyco-Neuroscience**

14. 神村圭亮、濱田理絵、前田信明. (2014).

ショウジョウバエの神経筋接合部におけるグリピカンとヘパラン硫酸微細構造の役割  
第 87 回日本生化学会大会

[図書] (計 2 件)

1. 神村圭亮、前田信明. (2015).

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 —ショウジョウバエ神経筋接合部を中心に—  
生化学 **87**, 467-470.

2. Keisuke Kamimura and Nobuaki Maeda. (2015)

Heparan Sulfate Proteoglycans in *Drosophila melanogaster*

**Glycoscience: Biology and Medicine**

Naoyuki Taniguchi et al (Eds.), Springer, New York, 1568, 581-587.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

(公財)東京都医学総合研究所、神経回路形成プロジェクトホームページ  
<http://www.igakuken.or.jp/regeneration/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

神村 圭亮 (KAMIMURA, Keisuke)

公益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