

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570107

研究課題名(和文)

脳に局在するポリシアル酸構造と脳由来神経栄養因子との相互作用の解析

研究課題名(英文)

Interaction between BDNF and polysialic acid localized in brains

研究代表者：

佐藤 ちひろ (SATO CHIHIRO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：10343211

研究成果の概要(和文)：ポリシアル酸は脊椎動物脳において発現する酸性多糖である。特に、胎児期の NCAM を修飾しており、その巨大な排除体積により、細胞-細胞/細胞外マトリックスの相互作用において負の制御を司る分子としてこれまで考えられてきた。本研究ではポリシアル酸が、負の相互作用をもつだけでなく、脳由来神経栄養因子(BDNF)という脳内の生理活性分子と直接相互作用すること、つまり正の相互作用を通じて、その受容体への結合を制御する機構の存在を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Polysialic acid (polySia) is the anionic polysaccharide expressed mainly in vertebrate brains. PolySia modifies embryonic NCAM and functions as a negative regulator between cell-cell/extracellular matrix via its bulky and exclusive features. In this study, we demonstrated that polySia directly binds to a brain derived neurotrophic factor (BDNF) and that through its interaction it regulates the ligand-receptor interactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：糖鎖生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：ポリシアル酸、神経科学、シアル酸、脳・神経、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

シアル酸は糖タンパク質や糖脂質を構成する酸性糖で、受精、発生、分化などの生物学的現象において重要な役割を担っている。通常、1残基が糖鎖の最外部に結合したモノシアル酸として存在するが、天然にはまれにその末端シアル酸残基の上にさらにシアル酸の直鎖ポリマーが結合するポリシアル酸構造として存在する。ポリシアル酸(重合度8以上)は脳髄膜炎細菌の表面莢膜多糖成分として1957年に初めて発見された。その後、脊椎動物では神経

形成期における神経細胞接着分子(NCAM)、成体脳の電圧感受性ナトリウムチャンネル及び魚卵の分泌顆粒局在糖タンパク質であるポリシアロ糖タンパク質(PSGP)、ヒトミルクCD36にその存在が知られるようになった。NCAMを中心とした世界的な研究の結果から、現在ポリシアル酸構造は主に胎児脳に一過的に発現すること、成体脳では神経の再編成が盛んな海馬などに偏在していること、その巨大な排除体積によって接着分子の接着能を負に制御することにより脳の正常な発達を促す重要な機能的糖鎖で

あること(図 1)、免疫寛容機構が働いていることが証明されている。またポリシアル酸は、癌胎児性抗原としても認識されており、ある種の癌細胞(神経芽細胞腫、腎芽細胞腫、小細胞肺癌細胞腫他 13 種)に発現することやその悪性度や転移性に関与すること、近年では幹細胞にも発現することが知られている。

近年、我々はこれまで報告例のないミクログリア細胞にポリシアル酸構造が存在することを明らかにした。加えて、ポリシアル酸構造が炎症刺激で素早く消失する現象を見いだした。特にこのポリシアル酸構造の消失がシアリダーゼの分泌によることを示唆する結果を得ており、ポリシアル酸の脱重合過程がミクログリア細胞の活性化に関わっていると推定している。そこでこのような炎症刺激に伴う細胞表面のポリシアル酸の素早い脱重合過程がポリシアル酸の機能を制御していると考えた。即ち、ポリシアル酸構造が自身の巨大な排除体積で細胞同士や細胞外マトリックスとの接着を阻害するという従来言われてきた「反接着機能」だけではなく、「様々な物質をプルするリザーバー機能」を発揮しているのではないかという作業仮説をたてるに至った。

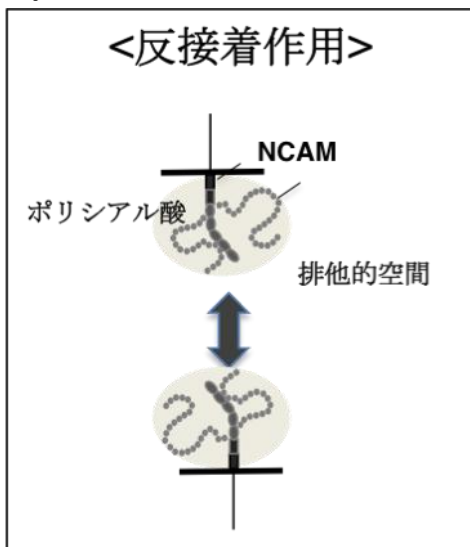


図 1:ポリシアル酸の反接着作用

2. 研究の目的

本研究はポリシアル酸と相互作用すると考えられる候補分子のうち、神経細胞の増殖や障害治癒に有用な BDNF に焦点をあて、BDNF をはじめとする神経栄養因子とポリシアル酸の直接的な結合状態の存在証明と、その生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

BDNF とポリシアル酸の相互作用

は、ゲル濾過クロマトグラフィー法、水平式非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(native-PAGE)法、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によって解析した。また酸性多糖と塩基性タンパク質の相互作用を SPR 法で解析する際、その相互作用における非特異的な結合をおさえるために測定法の改良も試みた。一方、BDNF とポリシアル酸複合体の生物学的な効果に関しては、神経芽細胞腫を用いて、その細胞に対する増殖活性を測定することで検証した。

4. 研究成果

本研究ではまず、BDNF とポリシアル酸との直接的相互作用をいくつかの手法を用いて証明した。まず、水平式非変性ポリアクリルアミド電気泳動により解析した。この方法は、通常は塩基性タンパク質である BDNF は一極側へ泳動されるが、ポリシアル酸と相互作用すると、BDNF がポリシアル酸由来の負電荷を獲得することにより、+極側へ泳動するように変化することを利用した方法である。その結果、BDNF とポリシアル酸が直接相互作用すること、その泳動の変化はシアル酸モノマーでは見られないこと、その変化はポリシアル酸が 12mer 以上の重合体を形成したポリマーで観察されることが明らかになった。また、BDNF と同程度の等電点をもつ塩基性タンパク質であるリゾチームやトリプシンでは、ポリシアル酸との相互作用がみられないことがわかった。このことから、塩基性分子がポリシアル酸と非特異的に結合するのではなく、BDNF 分子がポリシアル酸と特異的に直接結合することが示された(図 2)。また 12mer 以上のポリシアル酸分子がその相互作用に必要であることの証明は、これまで明らかになっていなかったシアル酸の重合体の重合度の生物学的意義を示した最初の例となった。

BDNF とポリシアル酸の結合はゲル濾過クロマトグラフィーでも確認した。BDNF とポリシアル酸の複合体は、ゲル濾過クロマトグラフィー(Sephacryl S-500)を用いることにより約 2000kDa のところに溶出されることがわかり非常に巨大な複合体を形成することがわかった。また BDNF とポリシアル酸の複合体に対して DSS 架橋剤による BDNF の架橋実験を行ったところ、BDNF 分子はポリシアル酸との複合体中でも 2 量体のまま存在することが明らかになった。また、複合体形成に対して化学量論比を求めるために、ゲル濾過クロマトグラフィーによる複合体の見かけの分子量の測定(2000kDa)、ポリシアル酸のゲル濾過クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーによる分子量(60kDa)および重合度(DP<Avr>=43)の測定を行った。加えて水平式電気泳動によ

る、BDNF1分子の電荷を中和するポリシアル酸量の滴定実験により、BDNF二量体1molが平均重合度43のポリシアル酸分子2molと結合すること、また複合体はそのユニットが14ユニット程度会合した超巨大分子であることが推定された。今後このような巨大な複合体の形態や物理的性質を明らかにする必要がある。

次にポリシアル酸とBDNF複合体の相互作用に生物学的意義を明らかにする一端として受容体との三者会合体の可能性を調べた。つまりBDNFはBDNF受容体に結合することにより細胞内へシグナルを伝えるので、BDNF-ポリシアル酸複合体とBDNF受容体との相互作用の関係をゲル濾過クロマトグラフィーで検証した。その結果、ポリシアル酸とBDNFとBDNF受容体TrkBやp75NTRは三者会合体を形成しないこと、しかしBDNF-ポリシアル酸複合体中のBDNF分子はBDNF受容体TrkBやp75NTRに容易に移行することが明らかになった。特に、TrkBへは複合体中の30%程度のBDNFが、p75NTRへは50%程度が移行することがわかった。このBDNFの複合体中からの受容体への移行はBDNF-ポリシアル酸相互作用の親和性とBDNF-受容体の親和性の差から裏付けられた。具体的にはSPR法に基づいてBDNFとポリシアル酸の分子間力測定を行うことで解析した。この測定に際し、天然の状態に近い形で測定するため、塩基性タンパク質(BDNF)をアナライトとして、ポリシアル酸をセンサーチップ表面に固相化することで、それらの結合力を測定した。はじめに、ポリシアル酸を固相化するために、センサーチップの固相化表面によく用いられるカルボキシメチルベースの基盤(CM5, CM1, SA)を用いて解析した。その結果、カルボキシメチル基とBDNFに起因する非特異的な結合が大きく、測定が正確にできないことが判明した。そこで我々は金表面のセンサーチップ(Au)に自己組織膜を形成させるDBAを固相化し、その膜中にストレプトアビジンを吸着させた。その後ビオチン化ポリシアル酸を結合させポリシアル酸表面のセンサーチップを作製することに成功した。また、非特異的な吸着を極力排除するため、(GlcNAc)₃-ビオチンの表面のセンサーチップのセンサーグラムをベースラインとして用いることで、ポリシアル酸とBDNFとの純粋な相互作用を計測する系を確立した。その測定系において、BDNFとポリシアル酸の解離定数を求めたところ 6.4×10^{-9} Mであった。p75NTRおよびTrkBのBDNFとの解離定数はそれぞれ、 10^{-10} および 10^{-12} Mである。したがって、BDNFはポリシアル酸鎖よりもBDNF受容体に対して10-1000倍高い親和性をもつことが明らかになった。従って、BDNF受容体がポリシアル

酸鎖の近傍に移動すると、ポリシアル酸と結合しているBDNFはポリシアル酸鎖から受容体へと容易に受け渡されることが示され、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果を支持することがわかった(図2)。また、このようなポリシアル酸との相互作用はBDNFと高い相同性をもつ他の栄養因子(NGF, NT-3, NT-4)間でも見出され、同様に巨大な複合体を形成することがわかった。

次に、TrkBやp75NTRを発現している神経芽腫細胞に対するポリシアル酸やBDNF-ポリシアル酸複合体の細胞増殖に対する効果を調べたところ、両者ともに細胞増殖性を増大させること、またその効果はBDNF-ポリシアル酸複合体の方が顕著であることがわかった。すなわち、ポリシアル酸-BDNF複合体はBDNFによる細胞増殖活性を実際の細胞系において十分高める能力をもつことがわかった。

一方、天然にはポリシアル酸以外にも酸性多糖としてプロテオグリカン中のグリコサミノグリカン(GAG)鎖があげられる。特に脳の中ではヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸がポリシアル酸と共局在している。これまでグリコサミノグリカンは増殖因子との結合に深く関わることは明らかにされていたが、栄養因子との相互作用はあまり解析されていなかった。そこで、我々は各種グリコサミノグリカン鎖(ヒアルロン酸、コンドロイチン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸)などを用い、各種栄養因子(BDNF, NGF, NT-3)との相互作用を解析した。その結果コンドロイチンとヒアルロン酸以外のGAGがBDNF二量体と直接結合し、巨大複合体を形成することを明らかにした。このことはこれらの酸性多糖と塩基性栄養因子との相互作用が、単純な負電荷と正電荷のイオン性の相互作用ではないことを表している。NT-3もBDNFと同様のGAG結合性を持つことが明らかになった。さらに、BDNFはGAGと複合体を形成した後も、BDNF受容体であるTrkBやp75NTRへ移動できることがわかった。これらの結果は、GAGがポリシアル酸鎖と同様にBDNFや他の神経栄養因子群のリザーバーとなり、細胞表面上の局所的な濃度を調節している可能性を示している。

ポリシアル酸はNCAMのIgVドメインの2箇所N結合型糖鎖上に存在する。ポリシアル酸修飾がNCAMの比較的膜近傍で起こること、またBDNF二量体が2本のポリシアル酸鎖に結合していることを鑑みると、実際にpolySia-NCAMとBDNFが複合体を形成し、その細胞にcisに影響を与えることが示唆される。このようにポリシアル酸は様々な神経作用因子の保持に関わっており、受容体への因子の提示の制御を行っている可能性がある。また近年、分泌されたproBDNFが細胞外においてtPA/

プラスミンによって成熟型 BDNF へとプロセスされ、その BDNF が記憶に関わることが報告されている。我々の予備的研究からポリシアル酸が proBDNF と結合すること、ポリシアル酸に結合した BDNF はセリンプロテアーゼの切断から保護されることなどが示唆されており、proBDNF と tPA/プラスミンの作用と機能発現にポリシアル酸が関わる可能性もあると考えている。このような効果にはポリシアル酸以外のグリコサミノグリカンなどの酸性多糖が関わることも考えられ、今後の課題である。

以上のことから、本研究ではポリシアル酸が従来考えられてきた反接着作用をもつ分子であるだけでなく、BDNF、NT-3、NGF といった神経栄養因子を特異的に自身に結合させ(リザーバー機能、分子保持機能)、巨大な複合体を形成させることにより細胞外の濃度を制御していること、これらの複合体中の因子は受容体が近傍に移動してくることにより、親和性の差に基づき、ポリシアル酸から受容体へ分子が手渡され(分子放出)、そのシグナルを細胞内に伝えることが示された。ポリシアル酸をはじめとする脳に局在する酸性多糖が細胞外微小環境における栄養因子をはじめとする生理活性因子を特異的に保持することで、細胞外の濃度(受容体へ結合できる分子の濃度)を厳密に制御している可能性が示された。またこの機能はシアル酸の重合度に依存することが明確に示された。

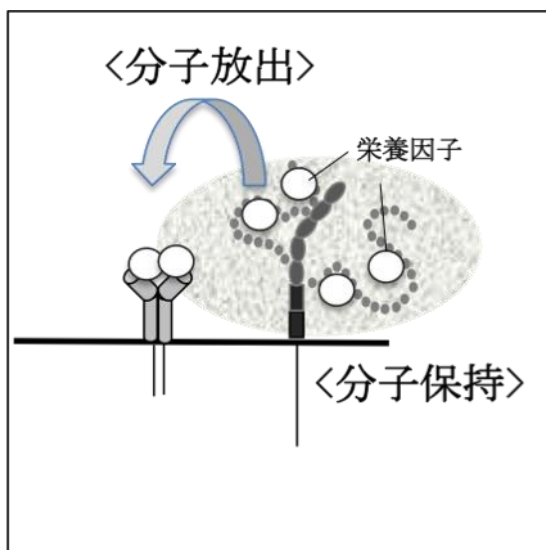


図2:本研究であきらかになったポリシアル酸の新しい機能(分子保持機能、リザーバー機能)。またポリシアル酸中に存在する栄養因子が高親和性受容体へ分子を提示する際に推定される分子放出機構。

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 10 件)

- 1 Developmental stage-dependent expression of an α 2,8-trisialic acid unit on glycoproteins in mouse brain. Inoko, E., Nishiura, Y., Tanaka, H., Takahashi, T., Furukawa, K., Kitajima, K., and Sato, C. *Glycobiology* (査読有), 20, 916-928(2010).
2. 糖鎖と統合失調症. 佐藤ちひろ *生体の科学* (査読無), 61, 160-166 (2010).
3. Extensive enrichment of N-glycolylneuraminic acid in extracellular sialoglycoproteins abundantly synthesized and secreted by human cancer cells. Inoue, S., Sato, C. and Kitajima, K. *Glycobiology* (査読有), 20, 752-762 (2010).
4. Survival signals of hepatic stellate cells in liver regeneration are regulated by glycosylation changes in rat vitronectin, especially decreased sialylation. Sano K, Miyamoto Y, Kawasaki N, Hashii N, Itoh S, Murase M, Date K, Yokoyama M, Sato C, Kitajima K, Ogawa H. *J Biol Chem.* (査読有) 285, 17301-17309 (2010).
- 5 Complex formation of a brain-derived neurotrophic factor and glycosaminoglycans. Kanato, Y., Kitajima, K. and Sato, C. *Biosci. Biotech. Biochem.* (査読有), 73, 2735-2741 (2009). (*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2009 年度論文賞)
6. Membrane microdomains from early gastrula embryos of medaka, *Oryzias latipes* are a platform of E-cadherin and carbohydrate-mediated cell-cell interactions during epiboly. Adachi T., Sato, C., Kishi, Y., Totani, K., Murata, T., Usui, T., and Kitajima, K. *Glycoconjugate J.* (査読有), 26, 285-299 (2009).
7. Developmental regulation of oligosialylation in zebrafish. Chang LY, Harduin-Lepers A, Kitajima K, Sato C, Huang CJ, Khoo KH, Guérardel Y. *Glycoconjugate J.* (査読有), 26, 247-261 (2009).
8. Periodate-resistant carbohydrate epitopes recognized by IgG and IgE antibodies from some of the immunized mice and patients with allergy. Hino S, Matsubara T, Urisu A, Aoki N, Sato C, Okajima T, Nadano D, Matsuda T. *Biochem Biophys Res Commun.*(査読有) 380, 632-637(2009).
9. ポリシアル酸構造による細胞シグナル

の調節機構. 佐藤ちひろ, 北島健 蛋白質核酸酵素 (査読無)53, 1577-1583 (2008).

- 10 Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. Kanato, Y., Kitajima, K., and Sato, C. *Glycobiology* (査読有), 12, 1044-1053, (2008).

[学会発表] (計 102 件)

1. Sato, C.. BDNF- and Dopamine-Retaining Functions of PolySia-NCAM and Their Impairment Induced by Mutations of ST8Sia II/STX Found in Schizophrenia Patients, *Sialoglyco* 2010; Potsdam, Germany Aug. 21-26, 2010
2. 北島 健, 佐藤ちひろ. ポリシアル酸と統合失調症. 第 7 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム-糖鎖研究と他領域との統合「グライコケミカルバイオロジーとグライコテクノロジーへの展開」. 千里ライフサイエンスセンター; 大阪. 2009 年 12 月 7-8 日
3. Sato, C.. A new function of polysialic acid: a unique posttranslational modification of NCAM functions as the reservoir for the particular groups of neurotrophins, growth factors, and neurotransmitters that regulate the neural activity. 第 32 回日本分子生物学会ワークショップ「小胞体・ゴルジ体における翻訳後修飾が可能にする新たな生体機能」. パシフィコ横浜、横浜. 2009 年 12 月 9-11 日
4. Ken Kitajima, Yukihiro Kanato, Ryo Isomura, Sayaka Ono, and Chihiro Sato: A new function of polysialic acid on NCAM as the reservoir for the particular groups of neurotrophins, growth factors, and neurotransmitters that regulate the neural activity. 20th International Symposium on Glycoconjugate (GlycoXX 2009), San Juan, Puerto Rico., Nov 29-Dec 4, 2009
5. Ken Kitajima, Ryo Isomura, and Chihiro Sato: Polysialic acid is not a negative regulator any longer in neurogenesis and neuronal functions: A new finding of its binding to a particular group of neurotransmitters. Gordon Research Conference on Glycobiology, January 18-23, 2009; Ventura, California USA
6. Kanato, Y., Kitajima, K., and Sato, C.: Brain-derived neurotrophic factor binds to polysialic acid directly depending on degree of polymerization. *SialoGlyco*

Conference 2008; On the river cruise ship Moscow-St. Petersburg; July 21-26, 2008

7. Chihiro Sato, Yukihiro Kanato, and Ken Kitajima: Complex formation between polysialic acid and brain derived neurotrophic factor (BDNF). 24th International Carbohydrate Symposium, July 27-August 1, 2008; Oslo, Norway

[図書] (計 4 件)

1. Sato, C., Yamakawa, N., and Kitajima, K. Analysis of glycan-protein interaction by frontal affinity chromatography and Biacore. in *Methods in Enzymology* (Minoru Fukuda ed. in glycomics) *Elsevier science* (査読有) 478, 219-232(2010).
2. Sato, C., and Kitajima, K. Structural analysis of polysialic acid. *Glycoscience Lab Manual* (Taniguchi N, Suzuki A, Ito Y, Narimatsu H, Kawasaki T, Hase S, eds), (査読無) pp77-81 Springer, Japan (2008).
3. Sato, C. Chemical labeling of sialyloligo/polymer. in *Glycoscience Lab Manual* (Taniguchi N, Suzuki A, Ito Y, Narimatsu H, Kawasaki T, Hase S, eds), (査読無) pp77-81, Springer, Japan (2008).
4. Adachi, T., Sato, C., and Kitajima, K. Membrane microdomain as a platform of carbohydrate-mediated interaction during early development of medaka fish. in *Glycoscience Lab Manual* (Taniguchi N, Suzuki A, Ito Y, Narimatsu H, Kawasaki T, Hase S, eds), (査読無) pp299-302 Springer, Japan (2008).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
該当無し

○取得状況 (計 0 件)
該当無し

[その他]

名古屋大学生物機能開発利用研究センター
公開実験講座で研究内容を一部講演

6. 研究組織
(1) 研究代表者
佐藤ちひろ (SATO CHIHIRO)
名古屋大学・生物機能開発利用センター・准教授
研究者番号: 10343211

(2) 研究分担者

該当無し

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当無し

研究者番号：