

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790080

研究課題名 (和文) コンドロイチン硫酸の硫酸化による細胞分化制御機構の解明

研究課題名 (英文) Functional analysis of chondroitin sulfate chains in cellular differentiation processes

研究代表者

三上 雅久 (MIKAMI TADAHISA)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20330425

研究成果の概要 (和文)：コンドロイチン硫酸 (CS) は脳神経系の主要な細胞外マトリックス構成成分であり、神経突起形成や可塑性、神経再生などの様々な局面に関与する。本研究では、「神経突起形成」における CS の硫酸化の機能解析を行い、以下の成果を得た。1) 高硫酸化 CS の一つである CS-E には、神経突起伸長促進作用があるが、その作用は神経細胞表面上に発現する細胞接着分子である *contactin-1* が CS-E を認識する受容体として機能することにより発揮されることを見出した。2) CS の主要な硫酸化構造の生合成を担う硫酸基転移酵素 (C4ST-1) の発現をノックダウンしたゼブラフィッシュ胚を作製し、CS の硫酸化が運動神経軸索の伸長制御に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Chondroitin sulfate (CS) chains are major components of extracellular matrix in nervous system, and have a broad impact on various neurobiological phenomena. In this project, regulatory roles of CS in neuritogenesis were investigated using several model systems, and the key findings are as follows: 1) A plasma membrane-tethered cell adhesion molecule, *contactin-1*, can function as a neuronal cell-surface CS receptor, and mediates neurite extension promoted by an oversulfated CS variant, CS-E. 2) A morpholino-based knockdown of chondroitin 4-*O*-sulfotransferase-1, which contributes substantially to the *in vivo* construction of 4-*O*-sulfated CS, revealed the functional importance of the characteristic CS sulfation codes in motor axon guidance in zebrafish embryogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：糖鎖、発現制御、発生・分化、細胞・組織、酵素

### 1. 研究開始当初の背景

CS は、硫酸化グリコサミノグリカン多糖のひとつであり、コアタンパク質に共有結合したプロテオグリカン (CSPG) として、脳神経系をはじめ、あらゆる組織の細胞表面や細胞外マトリックスに分布し、細胞の接着、増殖、分化、形態形成など生命活動の根幹を担う様々な現象に関与する。特に最近では、外傷性障害を受けた成体脳において高発現する CSPG が、再生軸索の伸長を阻害する主要な悪玉分子として、神経再生医療の観点から脚光を浴びている。実際、脳の損傷領域で高発現する CS を細菌由来の分解酵素で除去すると、CSPG による阻害効果が消失することから、悪玉分子の実態は CS 鎖部分であると考えられている。一方で、CS は必ずしも神経突起の伸長を阻害するわけではなく、一部の CS には、むしろ促進する働きがある。

このような脳神経系における一見矛盾した CS の作用は、その構造多様性に起因すると考えられている。CS はグルクロン酸と *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が交互に繰返した単純な糖鎖骨格からなるが、その様々な部位が硫酸化されることで多彩な機能を産み出す構造的基盤を獲得する。事実、ほ乳類の組織に多く含まれる典型的な低硫酸化 CS は、一般に神経突起の伸長に対し許容的ではないが、比較的含量が低い CS バリエーションである高硫酸化 CS-E には、初代培養神経細胞の神経突起伸長を強力に誘導する作用が見出されている。したがって、損傷脳の機能回復を「CS の硫酸化」を制御することにより担保できる可能性は高く、高硫酸化 CS の神経再生医療への応用が期待されるが、CS-E の神経突起伸長促進作用がどのような分子メカニズムを介して発揮されるかは不明であった。

また、これまで明らかにされている脳神経系における CS の機能は、内在性の CS を、その構造の違いに依らず一様に分解除去した場合や、異種動物由来の比較的均一な硫酸化構造をもつ特徴的な CS 標品を外来的に投与した場合に観察される現象に基づいて提唱されたものに他ならない。それゆえ、実際の生体内における「CS の硫酸化」の潜在的能力を明確にすることは極めて重要で課題となっている。CS の硫酸化構造は、基質特異性の異なる複数の硫酸基転移酵素群 (CSSTs) の働きにより生合成されることから、個々の CSST の発現を分子生物学的手法により攪乱することは、脳

神経系をはじめとする内在性の CS における硫酸化の意義を解明する上で有効な手段となりうる。

### 2. 研究の目的

CS が豊富に存在する脳神経系の代表的な細胞分化過程である「神経突起形成」における CS の硫酸化の意義とその分子メカニズムを解析し、CS をターゲットとした神経再生医療への応用に繋がる新しい分子基盤を確立することを目的として、以下に掲げる課題に取り組む。

(1) 高硫酸化 CS である CS-E により促進される神経突起伸長の分子メカニズムの解明を目指す。CS の構造の違いにより機能の違いが生じる要因の一つとして、CS の構造を識別するレセプター分子が存在する可能性が以前より提唱されている。そこで、「CS-E に応答性を示す神経細胞には、CS-E を特異的に認識する CS レセプター分子が発現している」という仮定に基づき、その候補分子の同定を試みるとともに、高硫酸化 CS を受容することにより発動する細胞内シグナル伝達経路を特定する。

(2) CS の硫酸化の脳神経系における意義を個体レベルで明らかにする目的で、近年脊椎動物のモデル動物として有用視されているゼブラフィッシュの胚発生系とモルフオリノオリゴヌクレオチドを用いた遺伝子ノックダウン技術を利用して、CS の主要な硫酸化構造である GalNAc の 4 位の硫酸化を触媒する硫酸基転移酵素 (コンドロイチン 4-*O*-硫酸基転移酵素-1: C4ST-1) をノックダウンした胚の脳神経系を中心とした表現型を解析する。

### 3. 研究の方法

(1) 神経細胞に発現する細胞接着分子の中から、CS-E と結合性を示す分子を選定し、候補分子の CS レセプターとしての妥当性を評価した。予備的な解析により、CS-E によっても突起の伸長が観察されない神経芽細胞由来株 (Neuro2a: N2a) において、イムノグロブリンスーパーファミリーの属する細胞接着分子の一つである contactin-1 (CNTN-1) の顕著な発現低下を見出していたので、CNTN-1 の CS レセプターとしての機能を解析した。具体的には、CNTN-1 の全翻訳領域を含む発現ベクターを N2a 細胞に導入して、CNTN-1 過剰発現株 (N2a/CNTN-1 細胞) を樹立し、

CS-E 基質上で培養することによって突起の伸長が有意に促進されるかを調べた。CS-E により促進される N2a/CNTN-1 細胞や初代培養神経細胞の神経突起伸長における CNTN-1 の関与を明確にするために、CNTN-1 に対する中和抗体を用いた阻害実験を行った。また、CS-E を含む種々の CS バリエーションと組換え CNTN-1 タンパク質との間の結合親和性について、表面プラズモン共鳴を用いたバイオセンサーである BIAcore を用いて解析した。さらに、CS-E が CNTN-1 のリガンドとして機能しうるかを検証するために、N2a/CNTN-1 細胞を CS-E で刺激することにより、細胞内の Fyn キナーゼの活性化レベルが上昇するかを調べた。

(2) *C4ST-1* に対するモルフォリノオリゴをゼブラフィッシュ胚に注入し、*C4ST-1* の発現をノックダウンした胚 (*C4ST-1* モルフォント) の表現型について、脳神経系の異常を中心に総合的に解析した。特に、腹側運動神経の走行について解析を行う際には、胚に対して抗  $\alpha$ -チューブリン抗体を用いた免疫染色を施した。

#### 4. 研究成果

(1) CS-E 基質上で培養した N2a 細胞では突起の伸長がほとんど見られなかったのに対し、CNTN-1 を過剰発現させた N2a 細胞 (N2a/CNTN-1 細胞) の多くで、長い突起の伸長が観察された (図 1)。

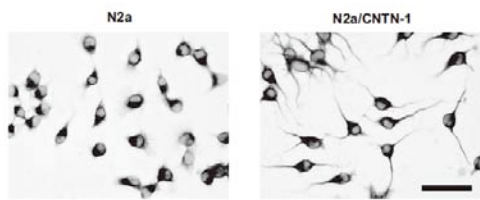


図 1. CS-E 基質上で培養した N2a 細胞および N2a/CNTN-1 細胞の形態

N2a/CNTN-1 細胞や初代培養神経細胞で観察される CS-E 依存性の神経突起伸長は、CNTN-1 に対する中和抗体の添加により特異的に抑制された。一方、N2a/CNTN-1 細胞を低硫酸化 CS (CS-A や CS-C) 基質上で培養しても有意な突起の伸長は観察されなかった。また、BIAcore を用いた分子間相互作用解析により、CS-E は低硫酸化 CS とは異なり、生理的条件下において CNTN-1 と有意な結合親和性をもつグリコサミノグリカンであることが分かった。さらに、N2a/CNTN-1 細胞を CS-E で刺激することにより、CNTN-1 依存性の細胞内シグナル伝達系の最初の構成因子である非受容体型チロシンキナーゼ Fyn の活性化レベルが上昇することが判明した。以上の

結果から、CNTN-1 が CS-E に対して強い親和性をもつ CS レセプターとして機能し、CS-E の神経突起伸長促進活性を仲介する分子であることが明らかになった。それと同時に、CS というグリコサミノグリカン糖鎖自身が、神経突起伸長を誘導する細胞外シグナル分子として振る舞うことができるという新しい機能的側面が明らかになった。

(2) *C4ST-1* モルフォントでは、4-O-硫酸化 CS の割合が減少し、体軸や尾部が曲がったり捻れたりする顕著な形態異常が観察された (図 2)。分子マーカーの発現解析から、この形態異常は筋分化が正常に進行していないことが原因であることが示唆された。さらに、脊髄から腹側へ投射する腹側運動神経の走行を観察したところ、*C4ST-1* モルフォントでは、短い軸索や分岐異常の軸索など異常投射を示す腹側運動神経の発生頻度が有意に高いことがわかった (図 2)。腹側運動神経の軸索は、CS の発現量が元々高い領域 (脊索と体節との境界域) に沿って伸展することが知られており、この領域における 4-O-硫酸化 CS の減少が運動神経軸索の投射異常を引き起こしたものと考えられる。以上の結果から、CS の硫酸化がゼブラフィッシュ胚発生過程の筋分化や神経軸索ガイダンスに関与していることが示唆された。

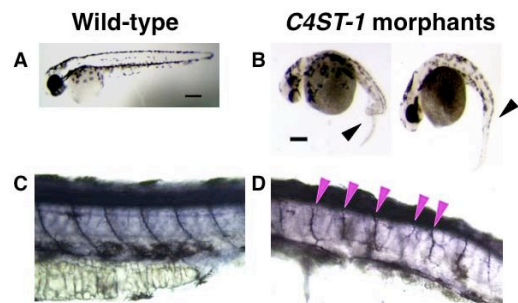


図 2. *C4ST-1* モルフォントの表現型

(A および C) 野生型。(B および D) *C4ST-1* モルフォント。*C4ST-1* モルフォントでは、体軸が湾曲したり、尾部が捻れたりする表現型 (B, 矢じり) を示すとともに、短い軸索や分岐異常の軸索など異常投射を示す腹側運動神経 (D, 矢じり) の発生頻度が有意に高かった。

#### 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 2 件)

- ① Mizumoto, S., Mikami, T., Yasunaga, D., Kobayashi, N., Yamauchi, H., Miyake, A., Itoh, N., Kitagawa, H., and Sugahara, K. (2009) Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 is required for

somitic muscle development and motor axon guidance in zebrafish. *Biochem. J.* **419** (2) 387-399. (査読有)

- ② Mikami, T., Yasunaga, D., and Kitagawa, H. (2009) Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E. *J. Biol. Chem.* **284** (7) 4494-4499. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 玉置祐樹, 安永大輝, 三上雅久, 北川裕之 日本薬学会 第 130 回年会 (2010 年 3 月 30 日, 岡山) “高硫酸化コンドロイチン硫酸による神経突起伸長制御メカニズムの解析”
- ② 安永大輝, 三上雅久, 北川裕之 第 6 回神戸薬科大学ハイテク・リサーチ・シンポジウム ガン・加齢性疾患の克服を目指して 文部科学省ハイテク・リサーチ・センター整備事業公開セミナー(2009年3月21日, 神戸) “高硫酸化コンドロイチン硫酸による神経突起伸長作用の発現機構の解析”
- ③ 安永大輝, 三上雅久, 北川裕之 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008) (2008 年 12 月 12 日, 神戸) “高硫酸化コンドロイチン硫酸による神経突起伸長作用の発現メカニズムの解析”
- ④ 安永大輝, 福田純子, 三上雅久, 北川裕之 第 58 回日本薬学会近畿支部大会 (2008 年 10 月 25 日, 神戸) “高硫酸化コンドロイチン硫酸による神経突起伸長促進作用の発現メカニズムの解析”
- ⑤ 安永大輝, 水本秀二, 小林直樹, 三上雅久, 三宅 歩, 伊藤信行, 菅原一幸, 北川裕之 第 28 回日本糖質学会年会 (2008 年 8 月 18-20 日, つくば) “ゼブラフィッシュ胚発生過程におけるコンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素-1 の機能”

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三上 雅久 (MIKAMI TADAHISA)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20330425

