

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 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年 ～ 2011 年

課題番号：22790076

研究課題名（和文） これまで植物糖として考えられていたキシロース含有糖鎖の神経系における機能の解明

研究課題名（英文） Functional analyses of xylose-containing glycans in the nervous system

研究代表者 矢木 宏和（YAGI HIROKAZU）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：70565423

研究成果の概要（和文）：

本研究では、キシロース含有糖鎖の担う役割を解明することを目的としている。キシロース含有 N 型糖鎖の生合成にかかわる候補遺伝子（*AGO61*）の遺伝子欠損マウスは、胎生 11.5 日における *AGO61* 欠損マウスの発達が顕著に遅れており、特に脳構造の形成が遅延していることを明らかにした。こうしたことから、キシロース含有糖鎖が神経系の発生に重要な役割を担っていることが予想された。

研究成果の概要（英文）：

This study aims to elucidate the function of xylosyl-containing glycans. We found that the candidate gene of xylosetransferase (*AGO61*)-knockout mice displayed embryonic growth retardation, especially brain development at embryonic day 11.5. The present study indicated that the xylosyl-containing glycans play important roles in the development of the nervous system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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、キシロース含有糖鎖、キシロース転移酵素、神経系

1. 研究開始当初の背景

脳が正常に機能するためには神経回路が正確に形成され、維持されることが必要である。そのためには回路を構成する神経細胞のコミュニケーションが重要な役割を担っている。近年、ノックアウトマウスの表現型解析から、ある種の硫酸化糖鎖が記憶や学習といった脳の高次機能に関与していることが示されているが、その機能発現の分子機構は今だ未知のままである。さらに、高等動物の

複雑な神経系の細胞間ネットワークがこの単一種類の糖鎖のみで担われているとは到底考えられず、より多くの糖鎖を介した細胞間の相互作用が存在すると申請者は考えている。一方、高等動物より単純な神経系をもつモデル生物には、より少ない種類の糖鎖で細胞間のネットワークが構築されているものであると予想される。

2. 研究の目的

記憶や学習といった脳の高次機能の発現に糖鎖が関与していることが明らかにされつつある。申請者はごく最近、後口動物においてこれまで存在がみとめられていなかったキシロースを含むオリゴ糖鎖が、ホヤの神経に特異的に発現していることを見出した (*Glycobiology*, 2008, 18, 145-151)。キシロースを含む糖鎖は植物界で広く存在することが知られているが、それらがヒトと同じ脊索動物であるホヤにおいて、しかも神経にのみ発現しているという事実は大変興味深い。そこで本研究では、高等動物の脳神経系においてキシロース含有糖鎖がこれまで知られていない普遍的な高次機能を担っているのではないかという着想のもとに、この糖鎖の担う役割を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) キシロース含有糖鎖を中心とする糖タンパク質、レクチンなどの分子素子の同定を試みた。

(2) β 1,2-キシロース転移酵素様タンパク質 (aer61 および AGO61) のキシロース転移メカニズムの解明に向けて、X線結晶構造解析を試みた。

(3) 高等動物の脳神経系におけるキシロース含有糖鎖の担う機能の探索のため、キシロース転移酵素のノックアウトマウスを解析を行った。

(4) 神経系に発現している糖鎖を解析するための基盤技術の開発・応用を行った。

4. 研究成果

(1) 高等動物の脳神経系においてキシロース含有糖鎖がこれまで知られていない普遍的な高次機能を担っているのではないかという着想のもとに、この糖鎖の担う役割を解明することを目指している。キシロース含有糖鎖を介した相互作用に関与する因子 (レクチン、結合タンパク質、キシロース分解酵素) の探索を試み、未だ候補分子を見出すには至っていない。その理由として、どの因子も生体内の存在量が非常に低いことが考えられる。

(2) X線結晶構造解析による β 1,2-キシロース転移酵素様タンパク質 (aer61 および AGO61) のキシロース転移メカニズムの解明に向けて、これらタンパク質の大量発現系の構築を試みた。AGO61 に関しては、未だ大量発現系の構築には未だ成功していないが、

aer61 に関しては、大腸菌にて低温誘導発現をシャペロン分子共存下で行うことで、安定なリコンビナントタンパク質を得ることに成功した。現在、結晶化条件の検討を行っている。

(3) 申請者はこれまでに、キシロース含有N型糖鎖の生合成にかかわる候補遺伝子 (AGO61) の遺伝子欠損マウスは胎生致死であることを見出している。本研究ではより詳細な検討を実施し、胎生11.5日におけるAGO61欠損マウスの発達が顕著に遅れており (図1)、特に脳構造の形成が遅延していることを明らかにした。一方、これまでの研究により、成体の脳においては神経細胞に特異的にAGO61が発現していることを見出している。こうしたことから、キシロース含有糖鎖が神経の発生に重要な役割を担っていることが予想された。

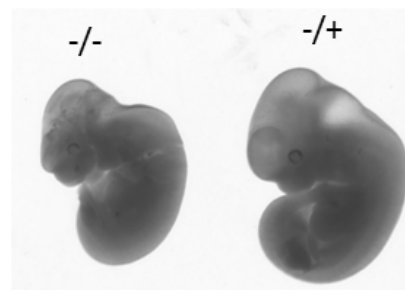


図1：胎生11.5日のAGO61のホモノックアウトマウス (左) とヘテロノックアウトマウス (右) の写真。

AGO61のホモノックアウトマウスに著しい成長遅延が認められた。

(4) これまで申請者が開発してきた HPLC を利用した糖鎖分析法の適用範囲をO型糖鎖にまで拡張した (図2)。

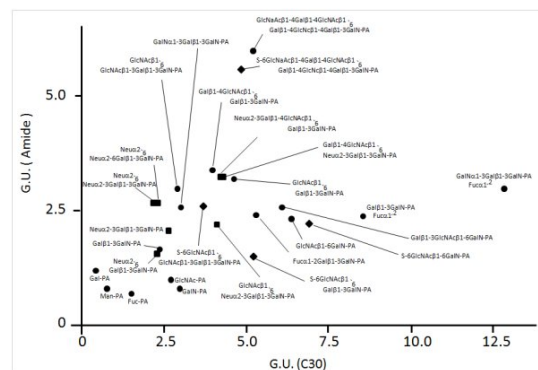


図2：O型糖鎖のHPLCマップ。

●, 中性糖鎖; ■, シアリル化糖鎖

このHPLCマップを利用することにより、これまで困難であった細胞やタンパク質に発現しているO型糖鎖の構造解析が可能となった。

これにより、多種多様な糖鎖の構造の同定が可能になった。こうした HPLC を用いた分析法を応用することにより、Lewis X 構造や HNK-1 糖鎖構造を含む糖鎖が、神経幹細胞に特異的に発現していることを見出した (図 3)。さらには、これら神経幹細胞特異的な糖鎖が、幹細胞性を維持する機能を担っていることを明らかにした。

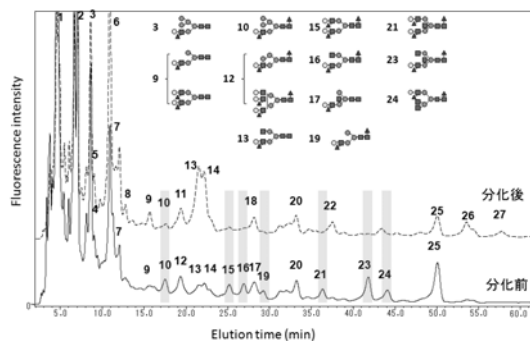


図 3 : 神経幹細胞の分化前後における糖鎖プロファイリング。

分化前を実線で分化後を破線で表す。灰色のマーカーは分化前にのみ発現している分画を示しており、これらすべての分画には LewisX 型糖鎖 (構造式参照) が含まれていた。

(5) 本研究において、研究計画時に予想していたよりも、実際生体内に発現しているキシロース含有糖鎖の存在量が少ないため、分子レベルにおける研究の達成度は遅れているが、キシロース含有糖鎖の生合成にかかわる候補遺伝子 (*AGO61*) の遺伝子欠損マウスの解析に関しては進展があった。今後、顕著な脳の発達遅延が認められた胎生 11.5 日の胎児の脳に着目し、DNA チップを利用した遺伝子発現解析を実施することを通じて、本遺伝子の欠失による影響がもたらされる遺伝子群を網羅的に探査する。これにより、*AGO61* が関与するシグナル伝達経路が明らかになり、*AGO61* 欠損によってもたらされる脳の発生遅延のメカニズムの理解が進むことが期待される。

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 6 件)

① Sriwilajaroen, N., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Nakakita, S., Yamada, K., Ito, H., Hirabayashi, J., Narimatsu, H., Kato, K. and Suzuki, Y.

Bovine milk whey for preparation of natural N-glycans: structural and quantitative analysis, *Open Glycoscience* (査読有) 5, 2012, 41-50

② Yagi, H., Watanabe, S., Suzuki, T., Takahashi, T., Suzuki, Y. and Kato, K.

Comparative analysis of N-glycosylation profiles of influenza A viruses grown in different host cells, *Open Glycoscience* (査読有) 5, 2012, 2-12

③ Yagi, H., Ohno, E., Kondo, S., Yoshida, A. and K. Kato

Development and application of multidimensional HPLC mapping method for O-linked oligosaccharides, *Biomolecules* (査読有) 1, 2011, 48-62

④ Sriwilajaroen, N., Kondo, S., Yagi, H., Takemae, N., Saito, T., Hiramatsu, H., Kato, K. and Suzuki, Y.

N-Glycans from porcine trachea and lung: Predominant NeuAc α 2-6Gal could be a selective pressure for influenza variants in favor of human-type receptor, *PLoS ONE* (査読有) 6, 2011, e16302

⑤ Kamiya, Y., Yagi-Utsumi, M., Yagi, H., Kato, K.

Structural and molecular basis of carbohydrate-protein interaction systems as potential therapeutic targets, *Curr. Pharm. Des.* (査読有) 17, 2011, 1672-1684

⑥ Yagi, H., Yanagisawa, M., Suzuki, Y., Nakatani, Y., Ariga, T., Kato, K., Yu, R.K.

HNK-1 epitope-carrying Tenascin-C spliced variant regulates the proliferation of mouse embryonic neural stem cells *J. Biol. Chem.* (査読有) 285, 2010, 37293-37301

[学会発表] (計 8 件)

① 矢木宏和, 齋藤拓也, 柳澤 亮, Robert Yu, 加藤晃一「神経幹細胞に発現している LewisX 型糖鎖は Notch シグナル経路を介して幹細胞性の維持に関与している」

日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 29 日

② Hirokazu Yagi and Koichi Kato

Identification of specific N-glycans expressed on the nervous systems by HPLC mapping method GCOE International Symposium 2012 年 1 月 11 日

③ Hirokazu Yagi, Takuya Saito, Makoto Yanagisawa, Robert K. Yu and Koichi Kato

Lewis X containing glycans expressed on mouse embryonic neural stem cells regulates their proliferation via Notch signaling pathway 第 71 回岡崎コンファレンス「糖鎖分子科学の

新たな展望 2011年10月13日

④齋藤拓也, 矢木宏和, 柳澤 亮, Robert K. Yu, 加藤晃一
LewisX 型糖鎖の神経細胞系における特異的な発現とその機能解析
第84回日本生化学会大会 2011年9月22日

⑤矢木 宏和
The functional significance of the N-glycans in the differentiation of neural stem cells
第34回日本神経科学大会、2011年9月17日

⑥Hirokazu Yagi, Noriko Takahashi, and Koichi Kato
Development of multi-dimensional HPLC mapping for N-glycans and its application for functional glycomics
98th Session of the Indian Science Congress
2011年1月4日

⑦矢木 宏和
神経幹細胞における特異的糖鎖の発現と機能
2010年バイオインフォマティクス研究会
2010年12月28日

⑧Hirokazu Yagi, Makoto Yanagisawa, Koichi Kato, Robert K. Yu
HNK-1 glyco-epitopes carried by the largest Tenascin-C spliced variant regulate proliferation of mouse embryonic neural stem cell
第28回内藤カンファレンス 2010年7月28日

〔図書〕(計1件)

①矢木宏和, 加藤晃一、シーエムシー出版、バイオ医薬品開発における糖鎖技術、(早川堯夫, 掛樋一晃, 平林 淳監修)、2011、242-252

〔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
名古屋市立大学大学院薬学研究科 生命分子構造学分野
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/sbk/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢木 宏和 (YAGI HIROKAZU)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：70565423

(2) 研究分担者 ()
研究者番号：

(3) 連携研究者 ()
研究者番号：