

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570133

研究課題名(和文)ポリシアル酸とFGF2による神経機能の新しい制御メカニズムの証明

研究課題名(英文)Regulation of neural functions via polySia and FGF2 interaction

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ポリシアル酸(polySia)はシアル酸が8-400残基縮重合した構造体の総称で、胎児脳の神経細胞接着分子(NCAM)を修飾している。成体脳ではpolySia構造はほとんど消失するが、海馬や嗅球などの神経新生が盛んな領域ではその発現が維持されている。NCAM上のpolySia構造はその巨大な排除体積によって、細胞接着を負に制御することが知られていたが、本研究によりpolySiaはFGF2などの神経における生理活性物質を自身に保持する分子保持機能を持つこと、またその受容体への提示を制御することで神経機能を制御しうることが示された。この機能はpolySiaの構造によって調節されることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：Polysialic acid (polySia) is a homopolymer of sialic acid with the degree of polymerization 8-400 Sia residues. PolySia is highly expressed on the neural cell adhesion molecule (NCAM) in embryonic brains. In adult, polySia mostly disappeared; however, it persists in distinct regions such as hippocampus, subventricular zone, thalamus, prefrontal cortex and amygdala, where neural plasticity, remodeling of neural connections or neural generation are ongoing. PolySia on NCAM is known to have anti-adhesive effects on cell-cell interactions due to its bulky polyanionic nature and is involved in regulation of neurogenesis and neuronal functions. In this study, we demonstrate that polySia functions as a reservoir scaffold for various molecules of neurological active molecules, such as fibroblast growth factor 2 (FGF2).

研究分野：生物学

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 NCAM ポリシアル酸転移酵素 FGF2 細胞増殖 ヘパラン硫酸 分子間力相互作用

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 (polySia) 構造として存在する。polySia (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 を中心に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性糖鎖であること、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 polySia が存在することを明らかにした。加えて、polySia 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 polySia 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、polySia 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 polySia の素早い脱重合過程が polySia の機能を制御していると考えた。即ち、polySia 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、「様々な物質をプー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。

我々はこの新機能を証明するために、まず分子間相互作用解析法を新たに開発・適用することによって、polySia と結合する脳内の神経作用因子を検索した。脳由来神経栄養因子 (BDNF) をはじめとするニューロトロフィン類、増殖因子 FGF-2 を見出し、また、フロントアルフィニティークロマトグラフィーの新たな適用によって神経伝達物質 (ドーパミン)

を polySia 結合分子として同定し、polySia が分子保持機能を持つことを世界で初めて明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は以上の背景をもとに、予備的実験により polySia との結合が示された増殖因子 FGF2 に特に焦点をあて、その polySia との複合体の性質、FGF 受容体 (FGFR) との相互作用およびシグナル伝達における役割を解明することを目的とした。FGF2 はヘパラン硫酸 (HS) との相互作用が注目されているが、polySia との相互作用は初めての知見であるため、本研究によって HS との違いを明確にして、polySia 特異的な新しい FGF2 機能調節機構の提唱を行うことを主要な目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、FGF2 と polySia の相互作用解析を中心に *in vitro* および *in vivo* でその現象を解析した。具体的には以下の内容を HS と比較することで行った。まず polySia と FGF2 との直接的な結合の完全証明のため、polySia と FGF2 の結合に必要な構成シアル酸、結合部位および重合度の解析、FGF2-FGFR-polySia の三者複合体の解析、FGF2-polySia 複合体の性質の解析をゲル濾過、水平式電気泳動、分子間力測定装置などを用いて行った。また *in vivo* としての細胞における polySia 鎖の影響を明らかにするために、培養細胞におけるポリシアル酸転移酵素 STX、PST および統合失調症患者で発見された変異を持つ STX の安定発現細胞株を樹立し、その細胞が分泌する polySia-NCAM や polySia 発現培養細胞の FGF2 がかわる増殖および生存に対する影響の解析を行った。

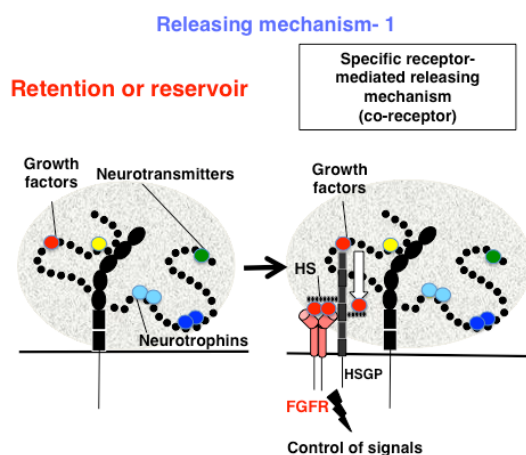
4. 研究成果

FGF は線維芽細胞に対して増殖活性を有する因子として、脳の抽出物中に見出された分子で、現在ヒトにおいて 22 種類同定されている。中でも FGF2 は、脳の発達や神経幹細胞の増殖の際に特に必要とされる因子であり、そのシグナルは受容体と細胞外マトリックス成分であるヘパラン硫酸との三者複合体の形成によって最大になることが知られている。ポリシアル酸は成体脳において、海馬や嗅球など神経の再生が盛んな領域に発現しており、幹細胞のマーカーとしても知られている。特に FGF の中でも特異的な結合が示唆された FGF2 とポリシアル酸の相互作用はその点からも興味深い。そこで我々はポリシアル酸と FGF2 の相互作用をまずゲルシフトアッセイ法、ゲル濾過クロマトグラフィー法、SPR 法

など複数の方法を用いて解析した。SPR 法では、FGF2 をアナライトとしたときの非特異的な吸着を解消するために、センサーチップの金表面に自己組織膜を形成させ、そこにストレプトアビジンを固相化した。その表面にビオチン化標識した polySia や HS を流すことにより、polySia 表面および HS 表面をもつセンサーチップをつくることに成功した。さらに (GlcNAc)₃ 固相化表面をコントロールとして分子間力相互作用解析を行い、より特異的な結合性を解析した。その結果、FGF2 と polySia は直接結合し、その結合力は HS-FGF2 の結合力よりも強いこと、固相化表面とアナライトを逆にして解析すると、FGF2-polySia の結合力は 10³ オーダー減少するが、FGF2-HS では変化しないことが明らかになり、polySia と HS では FGF2 の結合サイトが異なることがわかった。またこの結合には polySia の重合度が 17 以上の比較的長い polySia 鎖が必要であることがわかった。さらによりインタクトな分子との相互作用を明らかにするために polySia の担体タンパク質として polySia-NCAM を安定発現する細胞株を樹立し、polySia-NCAM の精製法を確立し、polySia-NCAM を調製した。asialo-NCAM をコントロールとして用い、FGF2 との特異的相互作用を BIACORE を用いて解析したところ、polySia-NCAM の polySia 鎖の FGF2 に対する親和力は 10⁻⁹(M)オーダーであること、コロミン酸由来の polySia 鎖単独で計測した値よりも 10 倍程度強いことがわかった。このことは、polySia-NCAM の polySia 鎖が結合している N-型糖鎖の構造も FGF2 との結合に重要であることを意味している。さらに FGF2 の polySia 鎖への結合は、FGF2 のインキュベーション時間依存的に減少することが明らかになり、FGF2 の時間依存的におこる微妙な構造変化(劣化)を polySia-NCAM が感知すること、すなわち寿命を制御する機構の存在が示唆された。またゲル濾過および架橋実験により FGF2 単量体が polySia と結合し、巨大な複合体を形成すること、polySia-FGF2 複合体中の FGF2 は受容体が近傍にきても受容体へは移行しないことがわかった。さらに、polySia-NCAM の FGF2 に対する結合力は、これまで結合が明らかになっていた HS 鎖や NCAM のタンパク質部分よりも大きいことがわかった。興味深いことに、FGF2- polySia 複合体と FGF2-HS 複合体は、FGF2 上の会合部位が異なり、複合体の大きさや構造も全く異なる。さらに、FGF2-polySia 複合体中の FGF2 は FGFR には移行できないが、HS には移行できることなどが明らかになった。結合定数はやや polySia の方が高いこと

から、FGF2 の polySia から HS への受け渡しが行われることが示唆された (図 1)。

一方、in vivo の一例として HS が発現しており、polySia 鎖が発現していない NIH-3T3 細胞を用いて FGF2 と polySia 鎖の影響を解析した。ポリシアル酸転移酵素発現プラスミドおよびへパラン硫酸(HS)合成酵素(Ext1)の siRNA を用いて、polySia+/HS+, polySia+/HS-, polySia-/HS+, polySia-/HS- の 4 種類の細胞を作製し、FGF2 依存的な増殖および生存を解析した。その結果、FGF2 依存的な増殖は HS 依存的であるが、この増殖



は polySia 鎖の存在で消失することが明らかになった。なお生存には関与しないことがわかった。ことは FGF2 依存的な増殖が HS だけでなく polySia 鎖を介しても行われることを示唆している。また polySia 存在下での増殖に関しては、FGFR を介する Erk および Akt シグナルの変動から、その制御機構としてローパスフィルターモデルが提唱された。

図 1:本研究であきらかになった polySia の新しい機能(分子保持機能、リザーバー機能)および共受容体依存的 FGF2 放出の機構

以上の結果より、今回はじめて NCAM 上の polySia 鎖が細胞膜近傍において FGF2 を非常に強い力で特異的に結合し、増殖因子に対して親和的な空間を形成すること、HS のような共受容体が近傍に来ると、自身に保持していた FGF2 を受け渡す事が可能であり細胞内部へ FGFR を介したシグナルが伝達されることが明らかになり、新しい細胞機能制御メカニズムの一端が明らかになった。特に NCAM 上の polySia 鎖と FGF2 の結合は FGF2 の時間依存的に変化する構造を見分けている可能性が示唆されており、FGF2 の生体における寿命を決定する因子であることが考えられること、FGF2 は成体脳における polySia の発現維持部

位における神経幹細胞や他の細胞の増殖を司る重要な因子であることは興味深い。

polySia 鎖を生合成する酵素や担体タンパク質の遺伝子欠損マウスの解析から、polySia 鎖が神経の可塑性、記憶、社会性行動のような様々な高次脳機能に直接的または間接的に関与することが明らかになってきている。また polySia 生合成酵素は統合失調症や自閉症と関わるのが我々や他のグループから明らかになりつつある。しかし、その分子メカニズムは不明のままである。今後、polySia 鎖と他の因子との相互作用および放出機構の解析を深めることにより、これまで不明であった polySia の高次脳機能の制御機構や精神疾患の分子基盤が明らかになる。

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 15 件) (全て査読有)

- 1 Sato C, Kitajima K. (2013) Impact of structural aberrancy of polysialic acid and its synthetic enzyme ST8SIA2 in schizophrenia. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 61 (1-11) (doi: 10.3389/fncel.2013.00061)
- 2 Sato C, Kitajima K. (2013) Disialic, oligosialic, and polysialic acids: Distribution, biological functions, and related disease. *J Biochem (Tokyo)*. 154(2), 115-136. (doi: 10.1093/jb/mvt057)
3. Hanashima S, Sato C, Tanaka H, Takahashi T, Kitajima K, Yamaguchi Y. (2013) NMR study into the mechanism of recognition of the degree of polymerization by oligo/polysialic acid antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* 21(19), 6069-76. (doi: 10.1016/j.bmc.2013.07.023) Oct 1.
4. Nagae M, Ikeda A, Hane M, Hanashima S, Kitajima K, Sato C, Yamaguchi Y. (2013) Crystal structure of anti-polysialic acid antibody single chain Fv fragment complexed with octasialic acid: insight into the binding preference for polysialic acid. *J Biol Chem.* 288(47), 33784-96. (doi: 10.1074/jbc.M113.496224) ; 2013 Oct 7.
5. Yabu M, Korekane H, Takahashi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Hatano K, Nonomura N, Sato C, Kitajima K, Miyamoto Y. (2013) Occurrence of free deaminoneuraminic acid (KDN)-containing complex-type N-glycans in human prostate cancers. *Glycobiology* 23(6), 634-642. (doi: 10.1093/glycob/cws132)
6. Ono S, Hane M*, Kitajima K, Sato C. (2012) Novel regulation of fibroblast growth factor 2 (FGF2)-mediated cell growth by polysialic acid. *J Biol Chem.* 287(6), 3710-3722.
7. Kasekarn W, Kanazawa T, Hori K, Tsuchiyama T, Xue L, Garénaux E, Kongmanas K, Tanphaichitr N, Yasue H, Sato C, Kitajima K. (2012) Pig sperm membrane microdomains contain a highly glycosylated 15-25-kDa wheat germ agglutinin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426(3), 356-362.
8. Guérardel Y, Chang LY, Fujita A, Coddeville B, Maes E, Sato C, Harduin-Lepers A, Kubokawa K, Kitajima K. (2012) Sialome analysis of the cephalochordate Branchiostoma belcheri, a key organism for vertebrate evolution. *Glycobiology* 22(4), 479-491.
9. Hane M, Sumida M, Kitajima K, Sato C. Structural and functional impairments of polySia-NCAM synthesized by a mutated polysialyltransferase of a schizophrenic patient. (2012) 479 *Pure Appl Chem.* 84(9), 1895-1906.
10. Takahashi K, Mitoma J, Hosono M, Shiozaki K, Sato C, Yamaguchi K, Kitajima K, Higashi H, Nitta K, Shima H, Miyagi T. (2012) Sialidase NEU4 hydrolyzes polysialic acids of neural cell adhesion molecules and negatively regulates neurite formation by hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 287(18), 14816-14826
11. Davies LRL, Pearce OMT, Tessier MB, Assar S, Smutova V, Pajunen M, Sumida M, Sato C, Kitajima K, Finne J, Gagneux P, Pshezhetsky A, Woods R, Varki A. (2012) Metabolism of Vertebrate Amino Sugars with N-glycolyl Groups: Resistance of α 2-8-linked N-glycolylneuraminic Acid to Enzymatic Cleavage. *J Biol Chem.* 287(34), 28917-28931.
12. Isomura R, Kitajima K, and Sato C. (2011) Structural and functional impairments of polysialic acid by a mutated polysialyltransferase found in schizophrenia. *J. Biol. Chem.* 286(24), 21535-21545.
13. Miyata S, Yamakawa N, Toritama M, Sato C, Kitajima K. (2011) Co-expression of two

distinct polysialic acids, α 2,8- and α 2,9-linked polymers of N-acetylneuraminic acid, in distinct glycoproteins and glycolipids in sea urchin sperm. *Glycobiology* 21(12), 1596-1605.

14. Inoue S, Kitajima K, Sato C, Go S. (2011) Human KDN (deaminated neuraminic acid) and its elevated expression in cancer cells: mechanism and significance. *Adv Exp Med Biol.* 705, 669-678.

15. Kambara Y, Shiba K, Yoshida M, Sato C, Kitajima K, Shingyoji C. (2011) Mechanism regulating Ca^{2+} -dependent mechanosensory behaviour in sea urchin spermatozoa. *Cell Struct Funct.* 36(1), 69-82.

[学会発表] (計 130 件)

1. 佐藤ちひろ. ポリシアル酸研究の新展開. 第三回コンピナトリアル科学研究推進体セミナー「糖鎖の構造と機能のシンポジウム」; 2014年3月11日; 東京工業大学、大岡山 (招待講演)

2. Sayaka Ono, Masaya Hane, Ken Kitajima, Chihiro Sato. Direct interaction of FGF2 with polysialic acid regulates the cell growth, but not cell survival. 22nd International Symposium on Glycoconjugates; June 23-28, 2013; convention center of Dalian Institute of Chemical Physics, Dalian, China (招待講演)

3. 佐藤ちひろ. ポリシアル酸の新機能としての神経作用因子結合能に関する解析. 日本糖質学会第 32 回日本糖質学会年会; 2013年8月5-7日; 大阪国際交流センター、大阪 (選抜講演)

4. Chihiro Sato. Polysialic acid as an on-site regulator of biologically active molecules. 3rd Austria-Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology; July 1-3, 2013; Riken, Wako, Japan (招待講演)

5. Ken Kitajima, Chihiro Sato. A polysialyltransferase SNP in a schizophrenic patient brings about the production of polysialic acids showing impaired binding and signaling of BDNF and FGF2. 8th International Symposium on Glycosyltransferases; June 5-9, 2012, Hannover, Germany (招待講演)

6. Chihiro Sato. Novel regulation of neurological active molecules by polysialic acids. SialoGlyco 2012; September 9-12, 2012; Academia Sinica, Taipei, Taiwan (招待講演)

7. Sayaka Ono, Ryo Isomura, Masaya Hane, Mizuki Sumida, Ken Kitajima, Chihiro Sato. Polysialic acid chains display attractive fields toward neuroactive molecules. The 21st International Symposium on Glycoconjugates; August 21-26, 2011; The University of Vienna, Vienna, Austria. (選抜講演)

[図書] (計 3 件)

1. 佐藤ちひろ、北島健 (2013) ポリシアル酸による神経機能の調節. 実験医学 31巻 10号 (増刊) pp. 26-33; 第三の生命鎖: 糖鎖の機能と疾患 (門松健治、遠藤玉夫、岡昌吾、北川裕之編集) 羊土社 (査読無)

2. Sato C. Polysialic acids (Review). in Sialobiology: Structure, Biosynthesis, and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease (Tiralongo J, Martinez-Duncker I, eds) DOI, 10.2174/97816080538651130101. pp 33-75, Bentham Science. (査読有)

3. Kitajima K, and Sato C. (2011) The roles of carbohydrate binding in cell adhesion and inflammation. in *Carbohydrate Recognition: Biological problems, methods, and applications* (eds., Binghe Wang, Geer-Jan Boons), pp33-63; John Wiley and Sons (査読有)

[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

名古屋大学生物機能開発利用研究センター動物細胞機能研究分野の HP で研究内容を一部紹介

Chihiro Sato and Ken Kitajima (2013)

Carbohydrate analysis by gas-liquid chromatography, in GlycoScience Protocol Online Database (GlycoPOD), JCGGDB - <http://jcgddb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t223>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 ちひろ (SATO CHIHIRO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・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：