

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860053

研究課題名(和文) 特定のタンパク質と糖鎖の組み合わせにより発動される神経幹細胞の分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism underlying neural stem cell differentiation regulated by a specific combination of glycans and their carrier proteins

研究代表者

矢木 宏和 (Hirokazu, Yagi)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：70565423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経細胞におけるLewis XやHNK-1糖鎖による特定のキャリアータンパク質への限定的な修飾が起こる仕組みに着目し、これら特異的な修飾が起こる機構について調査した。さらには、特定の糖鎖に修飾されたタンパク質の相互作用分子を同定した。こうした相互作用を介して、特定の糖鎖修飾を受けた特定のタンパク質が細胞内にシグナルを発信している可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we have focused on the system that the specific glycoproteins carry the specific glycans such as LewisX and HNK-1 carbohydrates, and attempted to elucidate the molecular mechanism underlying the definite glycosylation in neural stem cells. Furthermore, we have identified the molecule interacted with a specific glycan-possessing protein. The fact raises the possibility that a specific combination of glycans and their carrier proteins involved in the signaling pathways for the maintenance and differentiation of neural stem cells.

研究分野：生化学

キーワード：糖鎖修飾 LewisX HNK-1

## 1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は高い自己複製能と神経細胞やグリア細胞に分化する分化能を合わせ持つ神経系の前駆細胞である。これまでに、この神経幹細胞の分化過程を糖鎖が制御しているとの予想のもと、分化前後において発現パターンが異なる糖鎖の探索を行ってきた。その結果、LewisX

[Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc-]や HNK-1 [HSO<sub>3</sub>-3GlcA $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-]のような特徴的なグライコトープを有する糖鎖が分化前の細胞に特異的に発現しており、しかもこれらの糖鎖が Notch シグナルや Ras-MAPK シグナルを活性化することにより、幹細胞の分化過程や幹細胞性の維持に関与していることを見出している (J. Biol. Chem. 2012, 287, 24356-24364 and J. Biol. Chem. 2010, 285, 37293-37301)。興味深いことに HNK-1 糖鎖は、細胞外マトリクスタンパク質であるテネシン C (TNC) の特定のスプライシングバリエーションのみに発現しており、一方、LewisX 糖鎖の大部分はリソソーム膜タンパク質 1 (LAMP-1) に発現していた。糖鎖は直接にゲノムにコードされていないため、神経幹細胞にみられるような特徴的な N 型糖鎖が特定のタンパク質のみに結合しているという例はほとんど報告されていない。こうしたことから、神経幹細胞における TNC や LAMP-1 への特異的な糖鎖修飾は、これまで知られていない新たな機構によって制御されており、神経幹細胞はこうした特別な分子を巧みに利用することにより、複雑な分化機構を制御しているものと考えている。

これまでに、異なる糖転移酵素がそれぞれゴルジ体の異なる領域に局在していることから、タンパク質の分泌経路として複数の経路が存在する可能性は示されている (Proc Natl Acad Sci U S A. 2005, 102: 13467-72)。こうした知見に基づき、神経幹細胞にみられるような限定的な糖鎖修飾の仕組みは、糖タンパク質の分泌経路の違いによるものと考えている。しかしながら、タンパク質がどのように選別され、異なる分泌経路を通るかといった選別輸送のメカニズムは未だ不明である。一方、神経幹細胞の幹細胞性の維持や分化過程において、HNK-1 が結合した TNC や LewisX が結合した LAMP-1 がどのようなメカニズムで特異的なシグナル経路の活性化を担っているかということも明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、LewisX および HNK-1 糖鎖を対象として、それらが特定タンパク質を限定的に修飾する仕組みを解明し、そのことが神経分化における分子の機能発現とどのように関わっているのかを明らかにする。これにより神経幹細胞の分化過程における糖鎖修飾の本質的意義を理解することを目的とする。

## 3. 研究の方法

HNK-1 や LewisX 糖鎖がある特定のキャリアタンパク質上に発現するためには、特定のタンパク質が担う情報を読み取ってその分泌経路を選別する機構が存在するはずである。そこで本研究では、そうした仕組みにかかわる特異的な輸送タンパク質の存在や糖転移酵素の認識特異性を想定し、細胞生物学的手法に加えプロテオミクス解析を行うことによって、これまでに知られていない糖タンパク質の選別機構の存在を実証する。

一方、そうした糖タンパク質が分泌された後に、その糖鎖を認識するレクチンとペプチド部分を認識するタンパク質が存在することを予想のもとに、それらの分子を同定することを試み、当該タンパク質が神経細胞分化制御において機能している可能性を検証する。

## 4. 研究成果

本研究は、TNC や LAMP-1 が一般的な糖タンパクとは異なる分泌経路を通ることで、HNK-1 や LewisX のような特徴的なグライコトープが付与されるという想定のもとで実施するものである。そこで、TNC や LAMP-1 が有する小胞体シグナル配列に着目し、LAMP-1 のシグナル配列を Ig のシグナル配列に入れ替えたキメラタンパク質を神経幹細胞に発現させたところ、LAMP-1 上の LewisX の限定的な糖鎖修飾は、かならずしも小胞体シグナル配列によって規定されていないことが明らかになった。つまり、TNC や LAMP-1 は分泌過程で、輸送タンパク質および細胞内レクチンなどの因子により分泌経路が選別され、特定の糖鎖構造が発現しているものと考えられる。

次に、TNC の 6 つのスプライシングドメインのみを発現するプラスミドベクター、さらには 1 つの C1 ドメインを欠損した 5 つスプライシングドメインを有するバリエーションを発現するプラスミドベクターを作成した。両ベクターを神経幹細胞に導入したところ、6 個のスプライシングドメインを有する TNC の

み HNK-1 糖鎖の修飾が認められた。以上の結果から、HNK-1 糖鎖は C1 ドメインの存在により、HNK-1 糖鎖付加が起きているものと推察される。つぎに、直接 C1 ドメインに HNK-1 糖鎖が結合しているか、もしくは C1 ドメインの存在により他のドメインに HNK-1 糖鎖修飾が起きているかについて明らかにするため、神経幹細胞より TNC 分子を抗 HNK-1 糖鎖抗体を用いて精製を行った。これにより、精製した TNC を対象とした質量分析法による HNK-1 糖鎖結合部位の同定を行う準備が整った。さらには、C1 ドメインが選択的に HNK-1 合成酵素であるグルクロン酸転移酵素や硫酸基転移酵素に認識される可能性を考え、これら酵素の相互作用解析にも取り組む予定である。これにより、選択的スプライシングが糖鎖修飾に与える影響が明らかになるものと期待される。

さらに、特異的な糖鎖修飾を受けた分子の機能発現機構の解明のために、細胞外で TNC や LAMP-1 を認識する分子に関しても、プロテオミクス解析により同定することを試みた。抗 TNC 抗体を用いて、神経幹細胞の細胞抽出液から相互作用分子の探索を行った結果、ceruloplasmin (CP) を TNC 分子の相互作用分子の 1 つとして同定することができた。CP は glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型タンパク質として、細胞表面に発現していることが知られている。こうしたことから神経幹細胞膜に GPI 型タンパク質として存在する CP が HNK-1 を発現した TNC 分子を認識し、細胞内シグナルを発信している可能性が考えられる。

一方で、LewisX 型糖鎖の生合成を担う酵素の 1 つである fucosyltransferase 9 (FUT9) をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に導入したところ、単一タンパク質のみに LewisX 糖鎖が付加されていることを見出した。これにより、神経幹細胞だけでなく CHO 細胞などの株化細胞においても、FUT9 による特異的な LewisX 修飾が行われていることを示すことができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

H.Yagi, (3 人省略), T.Yamaguchi, (7 人省略), K.Kato, Stable isotope labeling of glycoprotein expressed in silkworms using immunoglobulin G as a test molecule, J. Biomol. NMR, 査読有、2015、in press  
DOI:10.1007/s10858-015-9930-y

H.Yagi, Y.Zhang, M.Yagi-Utsumi, T.Yamaguchi, S.Iida, Y.Yamaguchi and K.Kato, Backbone <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N resonance assignments of the Fc fragment of human immunoglobulin G glycoprotein, Biomol. NMR Assign., 査読有、2015、in press

DOI:10.1007/s12104-014-9586-7

H.Yagi, (4 人省略), T.Yamaguchi, (5 人省略), K.Kato, NMR-based structural validation of therapeutic antibody produced in *Nicotiana benthamiana*, Plant Cell Rep. 34, 959-968, 査読有、2015

DOI:10.1007/s00299-015-1757-1

矢木宏和、矢木-内海真穂、加藤晃一 糖鎖構造生物学の最前線、ファルマシア, 査読有、50 巻 8 号、pp746-750, 2014

N.Kawasaki, (5 人省略), H.Yagi and K.Kato, Site-specific classification of N-linked oligosaccharides of the

extracellular regions of Fcγ receptor IIIb expressed in baby hamster kidney cells, J. Glycomics Lipidomics 4:116, 査読有、2014  
DOI:10.4172/2153-0637.1000116

矢木宏和、加藤晃一、IgG-Fc と Fc 受容体の複合体形成における糖鎖の役割、実験医学、査読無、31 巻、1602-1606、2013

矢木宏和、加藤晃一、神経幹細胞の幹細胞性維持における複合糖質の役割、生化学、査読無、vol. 85, No.11, pp1012-1016, 2013

〔学会発表〕(計 7 件) うち招待講演 (1 件)

加子夏未、加藤竜也、近藤幸子、矢木宏和、加藤晃一、朴 龍洙、カイコ N 型糖鎖付加経路改変に向けたカイコ内のヒト由来糖転移酵素発現に関する研究、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27~29 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)

矢木宏和、NMR を利用した抗体の高次構造バリデーション、第 5 回グライコバイオロジクス研究会、2014 年 11 月 1 日、臨床研究情報センター (兵庫県神戸市)  
Yan Gengwei, Zhang Ying, 山口拓実、矢木宏和、加藤晃一、Lewis X 構造を提示するネオ糖脂質クラスターの創生、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014 年 9 月 12 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)

矢木宏和、中川直樹、齋藤拓也、戸田達史、呉 思緯、邱 繼輝、岡 昌吾、加

研究者番号：70565423

(2)研究分担者

藤晃一、AGO61 依存的な GlcNAc 修飾は  $\alpha$ -ジストログリカン上の糖鎖形成の初期過程に必須である、日本薬学会 134 年会、2014 年 3 月 30 日、熊本大学黒髪キャンパス（熊本県熊本市）

Hirokazu Yagi, Naoki Nakagawa, Takuya Saito, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, Tatsushi Toda, Sz-Wei Wu, Kay-Hooi Khoo, Shogo Oka, and Koichi Kato、AGO61-dependent GlcNAc modification primes the formation of functional glycans on  $\alpha$ -dystroglycan、Yonsei-IMS Seminars on Biomolecular Sciences : Protein Structures and Diseases (招待講演) 2013 年 12 月 6 日、Busan (Korea)

Gautam Mondal, Yogesh K Chawla, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, and Bishnu P Chatterjee、Glycoproteomics of serum proteins in hepatitis B and hepatitis C induced liver cirrhosis、The 22nd International Glycoconjugate Symposium (GLYCO 22)、2013 年 6 月 25 日、Dalian (China)

矢木宏和、異なる生物基材で発現させた抗体の糖鎖プロファイリング、平成 25 年度比較グライコーム研究会、2013 年 6 月 8 日、名古屋市立大学田辺通キャンパス（愛知県名古屋市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：未分化細胞のアポトーシス誘導剤  
発明者：加藤晃一，矢木宏和，山口拓実，ヤンゲンエイ

権利者：公立大学法人名古屋市立大学，大学共同利用機関法人自然科学研究機構

種類：

番号：特願 2015-102175

出願年月日：平成 27 年 5 月 19 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/sbk/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

矢木 宏和 (YAGI, Hirokazu)

名古屋市立大学・薬学研究科 (研究院)・講師