

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560451

研究課題名(和文)機能性ネオ糖脂質クラスターを利用した神経幹細胞の幹細胞性制御

研究課題名(英文)Creation of functional neoglycolipid clusters for controlling stemness of neural stem cells

研究代表者

加藤 晃一 (Kato, Koichi)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20211849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖脂質は細胞膜上でクラスターを形成し、糖鎖-タンパク質間および糖鎖-糖鎖間相互作用を介して、細胞間コミュニケーションなど様々な生命現象に関与している。私たちは、糖鎖生物学、有機合成化学、構造生物学による融合研究を実施する一環として、人工設計した糖鎖化合物を開発し、細胞機能を制御することを試行した。本研究では、細胞膜上の糖鎖クラスターをモデルとし、神経細胞の分化に関わる糖鎖を応用したネオ糖脂質を合成することに成功した。このようにして作出したネオ糖脂質クラスターの生理活性を評価した結果、ネオ糖脂質が神経幹細胞に対して特異的に細胞死を誘導することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In biological systems, glycolipids forming clusters on cell surfaces play important roles in a variety of physiological and pathological processes. We attempted to design and create neoglycolipids as tools for controlling cellular functions using a hybrid approach combining glycobiology, synthetic chemistry, and structural biology. In this study, functional oligosaccharide units involved in maintaining stemness of neural stem cells were chemically conjugated to lipid derivatives so as to create neoglycolipid clusters mimicking those found on the cell surfaces. The synthetic neoglycolipids were self-assembled into glycoclusters in aqueous conditions. Upon addition of the neoglycolipid cluster, the neural stem cells were selectively eliminated due to apoptosis while the differentiated cells were alive. These results demonstrate the applicability of the newly designed neoglycolipid as a selective apoptosis inducer.

研究分野：生命分子科学

キーワード：ネオ糖脂質 糖鎖クラスター 神経幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞の分化の亢進や幹細胞性の維持過程において、特定のシグナル経路が活性化していることが報告されている。一方で、糖鎖は細胞表層に豊富に存在しており、免疫系などにおいて細胞間コミュニケーションや細胞内シグナル伝達を媒介している。こうした状況に鑑みて、これまでに研究代表者らは、神経幹細胞の分化過程や幹細胞性の維持を糖鎖が制御しているという仮説に基づき、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、Lewis X [Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc-]構造(図1)および HNK-1 [HSO<sub>3</sub>-3GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAc-]構造といった特徴的なグライコトープを有するN型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、MAPK 経路や Notch 経路を制御することにより幹細胞の幹細胞性の維持を担っていることを見出してきた。こうした背景のもと、研究代表者は幹細胞性の維持に関与するシグナル分子である糖鎖を利用することで、幹細胞性を制御する化合物が開発できるのではないかとこの着想をもつに至った。

### 2. 研究の目的

神経幹細胞は高い自己複製能と分化能を併せ持つ神経系の未分化細胞であり、パーキンソン病などの難治性疾患の治療に神経幹細胞を利用することも試みられている。こうした治療を行うためには、移植に用いる神経幹細胞の分化過程を正確に制御することが必要不可欠である。

本研究では、神経幹細胞の幹細胞性を制御する化合物を開発・応用することを目的とする。特に、精密構造解析に基づいて設計した機能性糖脂質(ネオ糖脂質)を利用して、細胞膜を模倣した流動性と集積性を併せ持つ糖鎖化合物の開発を試みた。

### 3. 研究の方法

細胞表層の糖鎖は、ラフトと呼ばれる細胞膜の機能ドメイン上に集積された状態で存在しており、集合体としてペプチドやタンパク質の分子認識に関わっていることが多い。例えば、アルツハイマー病の発症に関与するアミロイドβペプチドは、単一糖鎖に対しては親和性を示さないが、糖鎖クラスターと相互作用して構造変化を引き起こすことが知られている。したがって、糖鎖による神経幹細胞の分化制御を行うには、単体糖鎖を対象とするだけでは不十分であり、生体膜上に集積する糖鎖クラスターを模倣した化合物を合成することが必要である。

そこで本研究では、細胞膜上の糖鎖クラスターをモデルとし、人工設計に基づくネオ糖脂質クラスターの創生に取り組んだ。糖鎖生物学、有機合成化学、構造生物学による融合研究を実施することにより、神経幹細胞の幹細胞性を制御する糖鎖化合物の開発を行っ

た。

### 4. 研究成果

本研究では、幹細胞性の維持に関与する Lewis X 糖鎖構造(図1)をグライコトープとして含む機能性ネオ糖脂質を創出した。Lewis X 糖鎖構造を化学合成した後、これを柔軟なスペーサーを介して脂質と連結することでネオ糖脂質を合成することができた。分枝構造を示す糖鎖の化学合成には多段会の反応が必要であるが、効率的に目的糖鎖を調製する方法を確立することに成功した。調製したネオ糖脂質は水中でミセルを形成し、集積化することがわかった。さらに、カルシウムイオン依存的に糖鎖-糖鎖間相互作用を示すことが明らかとなった。

さらに、得られたネオ糖脂質クラスターの生理活性評価を行った。Lewis X 糖鎖を含むネオ糖脂質クラスターと細胞との相互作用を評価した結果、ネオ糖脂質が神経幹細胞に対して特異的に細胞死を誘導することを見出した。また、合成したネオ糖脂質を応用した糖鎖アフィニティカラムを作成し、Lewis X 糖鎖を認識するタンパク質を探索することが可能となった。

これに加え、人工超分子とのハイブリッドによって、神経細胞膜上の糖鎖構造を均一かつ簡便にクラスター化することに成功した。得られた超分子糖鎖クラスターを用いて、膜結合性タンパク質であるアミロイドβやαシヌクレインとの NMR 相互作用解析を実施し、結合様式に関する構造情報を収集することができた。また、安定同位体標識を施した糖脂質を調製し、固体 NMR 法による精密解析を実現する基盤を整えた。

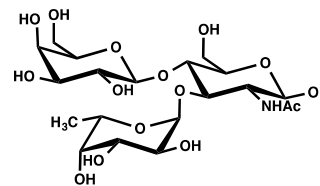


図 1. 神経幹細胞の幹細胞性維持に関わる Lewis X 糖鎖構造

### 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. T. Zhu, T. Yamaguchi, T. Satoh and K. Kato, "A hybrid strategy for the preparation of <sup>13</sup>C-labeled high-mannose-type oligosaccharides with terminal glucosylation for NMR study," *Chem. Lett.* **44**, 1744-1746 (2015), DOI: 10.1246/cl.150898 (査読有)

2. K. Kato and T. Yamaguchi, "Paramagnetic NMR probes for characterization of the dynamic conformations and interactions of oligosaccharides," *Glycoconjugate J.* **32**, 505-513 (2015), DOI: 10.1007/s10719-015-9599-1 ( 査読有 )
  3. M. Yagi-Utsumi and K. Kato, "Structural and dynamic views of GM1 ganglioside," *Glycoconjugate J.* **32**, 105-112 (2015), DOI: 10.1007/s10719-015-9587-5 ( 査読有 )
  4. S. Sato, Y. Yoshimasa, D. Fujita, M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, K. Kato and M. Fujita, "A self-assembled spherical complex displaying a gangliosidic glycan cluster capable of interacting with amyloidogenic proteins," *Angew. Chem. Int. Ed.* **127**, 8555-8559 (2015), DOI: 10.1002/anie.201501981R1 ( 査読有 )
  5. T. Satoh, T. Yamaguchi and K. Kato, "Emerging structural insights into glycoprotein quality control coupled with N-glycan processing in the endoplasmic reticulum," *Molecules* **20**, 2475-2491 (2015), DOI: 10.3390/molecules20022475 ( 査読有 )
  6. T. Yamaguchi, Y. Sakae, Y. Zhang, S. Yamamoto, Y. Okamoto and K. Kato, "Exploration of conformational spaces of high-mannose-type oligosaccharides by an NMR-validated simulation," *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 10941-10944 (2014), DOI: 10.1002/ange.201406145 ( 査読有 )
  7. Y. Kamiya, T. Satoh and K. Kato, "Recent advances in glycoprotein production for structural biology: toward tailored design of glycoforms," *Curr. Opin. Struct. Biol.* **26**, 44-53 (2014), DOI: 10.1016/j.sbi.2014.03.008 ( 査読有 )
- [ 学会発表 ] ( 計 15 件 )
1. T. Yamaguchi, G. Yan, H. Yagi and K. Kato, "Design and creation of Lewis X-expressing glycoclusters toward functional analyses of oligosaccharides in membrane systems", 8th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science: Experiments and Simulation, 2016年2月16日, 岡崎コンファレンスセンター( 愛知県岡崎市 ) .
  2. T. Yamaguchi, T. Satoh, T. Zhu and K. Kato, "Conformational dynamics of high-mannose-type oligosaccharides as studied by NMR spectroscopy combined with molecular dynamics simulation", The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), 2015年12月17日 Honolulu (USA).
  3. G. Yan, T. Yamaguchi, H. Yagi and K. Kato, "Creation of a neoglycolipid inducing cell type-specific apoptosis", The 7th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG) Conference, 2015年11月13日, ホテル大観荘( 宮城県松島町 ) .
  4. 山口拓実, Yan Gengwei, 矢木宏和, 加藤晃二, "ネオ糖脂質による神経幹細胞に対するアポトーシス誘導", 第9回バイオ関連化学シンポジウム, 2015年9月10日, 熊本大学( 熊本県 )
  5. K. Kato, M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, H. Yagi and T. Satoh, "Structural Views of Glycan Functions in Physiological and Pathological Contexts", 9<sup>th</sup> International Conference on Proteoglycans and 10<sup>th</sup> Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (IPC&PPCTSS 2015), 2015年8月24日, Seoul (Korea).
  6. K. Kato, "NMR Views of Fate Determination and Functional Regulation of Proteins Mediated by Sugar Chains", The 19<sup>th</sup> International Society of Magnetic Resonance (ISMAR 2015), 2015年8月20日, Shanghai (China).
  7. T. Yamaguchi and K. Kato, "Paramagnetic Lanthanide-tagging for NMR Characterization of The Conformational Dynamics of Oligosaccharides", IMS Asian International Symposium "Supramolecular Dynamics at the Interface of Chemistry and Biology", 2015年6月12日, 岡崎統合バイオサイエンスセンター( 愛知県岡崎市 ) .
  8. G. Yan, T. Yamaguchi, Y. Zhang, K. Nishimura, K. Kato, "NMR analyses of glycolipid clustering in membrane systems", 日本化学会 第95春季年会 2015年3月28日, 日本大学理工学部( 千葉県船橋市 ) .
  9. 加藤晃二, "生命分子の自己組織化のダイナミクス", 日本化学会 第95春季年会 特別企画「生命および人工分子システムにおける動的秩序形成: 分子論的理解」, 2015年3月26日, 日本大学理工学部( 千葉県船橋市 ) .
  10. 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(岡山県岡山市).

11. 加藤晃一, “生命分子構造学を基礎とする生命分子システムの動的秩序形成の仕組みの探求”, 第 54 回生物物理若手の会 夏の学校, 2014 年 8 月 10 日, ホテル たつき (愛知県蒲郡市).

〔図書〕(計 3 件)

1. 山口拓実, 加藤晃一, 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック~創薬・医療から食品開発まで~, 秋吉一成, 津本浩平, 加藤晃一, 鷹羽武史, 深瀬浩一, 古川鋼一編, エヌ・ティー・エス, pp.265-271 (2015).
2. Y. Zhang, T. Yamaguchi, T. Satoh, M. Yagi-Utsumi, Y. Kamiya, Y. Sakae, Y. Okamoto and K. Kato, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, A. Chakrabarti and A. Surolia ed., Springer (Switzerland), **842**, pp.217-230 (2015).
3. Y. Yamaguchi, T. Yamaguchi and K. Kato, *Advances in Neurobiology*, R. K. Yu and C.-L. Schengrund ed., Springer (New York), **9**, pp.165-183 (2014).

〔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: 特許  
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/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 晃一 (KATO, Koichi)  
名古屋市立大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 20211849

### (3) 連携研究者

矢木 宏和 (YAGI, Hirokazu)  
名古屋市立大学・薬学研究科 (研究院)・  
講師

研究者番号: 70565423

山口 拓実 (YAMAGUCHI, Takumi)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究  
領域・助教

研究者番号: 60522430