

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	糖鎖集合状態の変化による幹細胞近接場制御
応募事業区分	公募型共同研究
申請代表者氏名	池中 一裕

○ 研究状況報告

- 1) 糖鎖の立体構造解析は、糖鎖の有する運動性と構成残基の類似性から一般には困難とされている。本研究では、単一糖鎖に加え、細胞近接場に見られるような糖鎖が集合した状態を研究対象として糖鎖の立体構造解析法の樹立を目指した。糖脂質由来の糖鎖やハイマンノース型および LewisX 型の糖タンパク質糖鎖に着目し、単一糖鎖の立体構造解析を行った。
- 2) 局所的に密度を高めることができ、Wnt を補足することが期待される糖鎖としては、糖タンパク質糖鎖と糖脂質が考えられる。糖脂質の分布を調べることは比較的容易であるが、糖タンパク質糖鎖は抗体やレクチンを用いてもその部分構造しか解明できない。池中は微量な組織から糖タンパク質糖鎖 1 次構造を化学的に決定する方法を開発している。そこで平成 23 年度は本方法を用いてマウス胎児中枢神経系に発現する糖タンパク質糖鎖を網羅的に解析した。また、液性因子は酸性糖鎖に結合することが多いため、酸性糖鎖合成に関わる酵素遺伝子発現を *in situ hybridization* により解析した。
- 3) 幹細胞や未分化前駆細胞の周囲における液性因子の空間分布は明らかにされていない。例えば、発生過程の神経管において、Wnt の詳細な分布はわかっていない。一方、Wnt などの液性因子は、糖鎖や脂質により翻訳後修飾を受けるとともに、細胞近接場に存在する様々な糖タンパク質や糖脂質と相互作用するものと考えられる。したがって、液性因子の翻訳後修飾の実態を明らかにすること、ならびに液性因子と相互作用する糖タンパク質や糖脂質を同定することは、細胞近接場における液性因子の挙動を理解する上において重要な問題である。そこで平成 23 年度は、免疫組織染色法による Wnt3a タンパク質の神経管における分布を解析した。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

- 1) 糖鎖にランタニドイオンを配位させることにより、擬コンタクトシフトや常磁性緩和の増強効果などが利用可能となり、より効率よく糖鎖の構造解析を行えた。
- 2) マウス胎生 12 日脳に存在する主な N-結合型糖鎖の構造を決定した。また酸性糖鎖合成に関わる酵素遺伝子の内、神経管の背腹軸に沿って、もしくは幹細胞・分化細胞別に存在量の変化する糖鎖遺伝子を明らかにした。
- 3) 組織の固定方法と抗体濃度の条件の最適化を行い、再現性よくシグナルが検出できる条件を見いだすことができた。また、池中との共同研究により培養細胞から調製したマウス Wnt3a を用いた糖鎖修飾の解析法を確立した。さらに、細胞近接場での挙

(様式 3)

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

動に異常を呈するような Wnt 変異体を探索した結果、アフリカツメガエル初期胚の上皮細胞を用いた系で細胞外での挙動に異常を呈するような Wnt 変異体を見いだすことができた。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)

Chen, Q Takada, R., & *Takada, S. (2012) Deficiency of *Porcupine*, an *O*-acyltransferase gene, impairs convergent extension during gastrulation in zebrafish embryos and does not affect equivalently the trafficking of different Wnt proteins. **J. Cell Sci.** in press

(様式 3)

平成 24 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

研究テーマ名称	糖鎖集合状態の変化による幹細胞近接場抑制
応募事業区分	事業枠① (C)「公募型共同研究」
申請代表者氏名	池中 一裕

○ 研究状況報告

昨年に引き続き、モルフォゲンの分布における糖鎖の役割を調べると共に、糖鎖がモルフォゲンと結合するときの分子構造的基盤を明らかにすることを目的とした。

糖鎖は、その運動性や構成残基の類似性から、一般的な生体分子の構造解析手法の適用が困難である。本研究では、単一糖鎖に加え、細胞近接場に見られるような糖鎖がクラスター化した状態を研究対象として糖鎖の立体構造解析法の樹立を目指している。

これまでに、糖脂質由来の糖鎖やハイマンノース型および LewisX 型の糖タンパク質糖鎖に着目し、糖鎖の構造・機能解析を行ってきた。平成 24 年度は、常磁性効果を応用した核磁気共鳴 (NMR) 法による動的構造解析により、神経細胞に豊富に存在する糖脂質ガングリオシドの構造を明らかにした。さらに、細胞近接場での糖鎖の集合状態を模倣し、ガングリオシドを含有したモデル膜を創製した。これにより、糖鎖クラスターとタンパク質との NMR 相互作用解析を行う基盤を整えることができた。

幹細胞や未分化前駆細胞の周囲における液性因子の空間分布は、未だ十分に明らかにされていない。そこで発生過程の中樞神経系組織である神経管等に注目して、液性因子である Wnt の空間分布を検討した。特に、Wnt などの液性因子が細胞近接場に存在する様々な糖タンパク質や糖脂質と相互作用するものと考えられることから、液性因子と相互作用する糖タンパク質や糖脂質を同定することを念頭におき、いくつかの糖鎖修飾変異体における Wnt の空間分布についての検討を進めている。

硫酸化糖鎖がモルフォゲンと結合し、神経発生に影響を与えられられるので、マウス発生期脊髄を対象にして、硫酸化糖鎖の合成酵素、約 40 種類について発現解析を行った。その結果、発生期脊髄に広く発現する遺伝子と局在化して発現する遺伝子の選別は終了した。

現在、発生期脊髄に発現する糖鎖関連遺伝子のうち、以下に挙げるものについて共同研究としてマウスを集め解析を行なっている。

- ・ GlcNAc6ST-1 ノックアウトマウス(ケラタン硫酸欠損マウス (名古屋大学 門松先生))
- ・ Sulf1, Sulf2 ノックアウトマウス(筑波大学 榊先生)
- ・ GlcAT-P ノックアウトマウス(HNK-1 欠損マウス (京都大学 岡先生))
- ・ GalNAc4,6ST-1 ノックアウトマウス(愛知医科大学 羽瀨先生)
- ・ Ext1-flox マウス(ヘパラン硫酸欠損マウス (福井大学 稲谷先生))

各ノックアウトマウスを用いて発生期脊髄のドメイン構造および運動神経からオリゴデンドロサイトへの分化転換について詳細に解析を行なっている。

また、上記のノックアウトマウスに加えて、GM2/GD2/GD3 ノックアウトマウス(lipid

(様式 3)

平成 24 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

raft 欠損マウス (名古屋大学 古川先生))の解析も行なっている。lipid raft はモルフォゲンを受け取る場として重要であると考えられるため、lipid raft 欠損マウスの解析も進めている。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

【加藤担当分】

前年度までに開発した、常磁性プローブを活用した NMR 法と分子動力学計算を組み合わせた糖鎖の動的立体構造解析法を、分岐構造を有するガングリオシド糖鎖に応用した。その結果、糖鎖のコンフォメーションを明らかにするとともに、分岐構造が糖鎖の立体構造のダイナミクスに与える影響を評価することができた。また、脂質膜モデルであるバイセルに着目し、各種ガングリオシドをそれぞれ組込んだ小型バイセルを調製することで、サイズの制御された糖鎖クラスターモデルを構築した。さらに、ガングリオシド含有バイセルと膜結合性タンパク質 α -シヌクレイン (α -Syn) との NMR 相互作用解析を行った結果、 α -Syn が N 末端領域を介して糖鎖構造を識別し、ガングリオシドクラスターと結合することを明らかにした。

【高田担当分】

平成 23 年度においては、以下のような研究成果が得られた。

- (1) 免疫組織染色法によりマウス Wnt3a タンパク質の神経管における分布を詳細に解析した。その結果、背側神経管においては産生細胞から Wnt3a タンパク質が周囲の細胞の間を拡散していると同時に、管腔側に特異的に集積していることを突き止めた。さらに、このような Wnt の集積に応じて発現が誘導される標的遺伝子を同定することにも成功した。今後はこの標的遺伝子の機能解析を行うことによって、Wnt タンパク質の集積の意義を明らかにできるものと考えている。
- (2) 糖鎖合成・修飾に関わるいくつかの変異体 (GD3 合成酵素と GM2/GD2 合成酵素の二重変異体 (脂質ラフト形成に異常を呈する) と N-アセチルグルコサミン-6-硫酸転移酵素-1 の変異体) において、神経管における Wnt3a タンパク質の空間分布を解析した。調べた限りにおいては、どちらの変異体においても大きな異常はなく、これらの糖鎖合成・修飾酵素は Wnt の空間分布には大きな影響を与えないものと考えられた。糖鎖修飾酵素の変異体における Wnt の空間分布については、次年度以降も別の修飾酵素の変異体を用いて引き続きの糖鎖修飾を解析する。

【池中担当分】

現在までに、GlcNAc6ST-1 ノックアウトマウス・GlcAT-P ノックアウトマウス・Sulf1/2 ノックアウトマウスの解析が進んでいる。その解析から、いずれのノックアウトマウスにおいても共通する表現型として、pMN ドメインから生じるオリゴデンドロサイトの分化異常が観察された。本来胎生 12.5 日頃から産生されるオリゴデンドロサイトの数が KO マウ

(様式 3)

平成 24 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

スにおいて有意に減少していた。また、この表現型に加えて、GlcNAc6ST-1 ノックアウトマウスでは motor neuron の産生亢進およびドメイン構造の腹側側へシフトが観察された。胎生 12.5 日でのオリゴデンドロサイト分化には、floor plate から分泌される Shh シグナルが重要な役割を担っていることが知られている。各ノックアウトマウスにおいて Shh シグナルの下流遺伝子である Patched1 を調べたところ、発現の減弱または異所的な発現上昇が認められた。

以上のことから、硫酸化糖鎖によって Shh のシグナル伝達が調整されている状況が見えてきた。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)

【池中一裕】

Gotoh H, Ono K, Nomura T, Takebayashi H, Harada H, Nakamura H, Ikenaka K (2012) Nkx2.2+ progenitors generate somatic motoneurons in the chick spinal cord. PLOS ONE, 7:e51581

【加藤晃一】

S. Yamamoto, Y. Zhang, T. Yamaguchi, T. Kameda, and K. Kato, *Chem. Commun.* **48**, 4752-4754 (2012).

Y. Zhang, S. Yamamoto, T. Yamaguchi, and K. Kato, *Molecules* **17**, 6658-6671 (2012).

H. Yagi, T. Saito, M. Yanagisawa, R. K. Yu, and K. Kato, *J. Biol. Chem.* **287**, 24356-24364 (2012).

T. Yamaguchi, T. Uno, Y. Uekusa, M. Yagi-Utsumi, and K. Kato, *Chem. Commun.* **49**, 1235-1237 (2013).

Y. Kamiya, K. Yanagi, T. Kitajima, T. Yamaguchi, Y. Chiba, and K. Kato, *Biomolecules* **3**, 108-123 (2013).

【高田慎治】

Chen, Q Takada, R., & *Takada S. (2012)

Loss of Porcupine impairs convergent extension during gastrulation in zebrafish.

J. Cell Sci. 125, 2224-2234

(様式 3)

平成 25 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

研究テーマ名称	糖鎖集合状態の変化による幹細胞近接場抑制
応募事業区分	事業枠① (C)「公募型共同研究」
申請代表者氏名	池中 一裕

○ 研究状況報告

昨年に引き続き、モルフォゲンの分布における糖鎖の役割を調べると共に、糖鎖がモルフォゲンと結合するときの分子構造的基盤を明らかにすることを目的とした。

糖鎖は、運動性の高さや構成残基の類似性から、一般的な生体分子の構造解析手法の適用が困難である。本研究では、液中や細胞近接場における糖鎖を研究対象として、糖鎖の三次元構造解析法の樹立を行ってきた。平成 25 年度では、これまでに確立した糖鎖の動的構造解析手法を活用し、分泌経路においてタンパク質の品質を提示する役割を担う高マンノース型糖鎖の動態解明に取り組んだ。さらに、先天性筋ジストロフィー疾患において認められる、細胞膜上の糖鎖構造の形成異常について、疾患の原因遺伝子の 1 つにコードされたタンパク質の機能を明らかにした。

幹細胞とは、自分と同じ未分化な細胞を生み出しながら、一方で分化する細胞を継続的に生み出すことが出来る細胞である。幹細胞や未分化前駆細胞の周囲における液性因子の空間分布は、未だ十分に明らかにされていない。そこで発生過程の中枢神経系組織である神経管をモデル系に選び、液性因子 Wnt の細胞外での時空間動態の解析を行った。特に、Wnt などの液性因子は、細胞近接場に存在する様々な糖鎖と相互作用するものと考えられることから、Wnt と相互作用する糖鎖を同定し、Wnt の空間分布に及ぼす影響を明らかにすることに重点を置き研究を進めた。すでに、平成 23 年度および 24 年度の研究から、Wnt3a タンパク質が産生細胞である神経管最背側（蓋板）の細胞から拡散するとともに、神経管の内側に局所的に局在化もするという、2 相性の分布様式を呈することを明らかにしてきた。そこで本年度は、この 2 相性の分布様式と Wnt のシグナル伝達との関連について、蓋板における Wnt 標的遺伝子の発現に着目して解析を進めた。さらに、このような分布様式に細胞近接場の糖鎖が及ぼす影響を糖鎖修飾酵素の変異体マウスを用いて解析した。

硫酸化糖鎖がモルフォゲンと結合し、神経発生に影響を与えられるので、マウス発生期脊髄を対象にして、硫酸化糖鎖の合成酵素、約 40 種類について発現解析を行い、発生期脊髄に広く発現する遺伝子と局在化して発現する遺伝子の選別を平成 24 年度までに終了した。平成 25 年度は、ケラタン硫酸とヘパラン硫酸に着目して解析をした。ケラタン硫酸はその欠損マウスを用いて発生期脊髄のドメイン構造および運動神経からオリゴデンドロサイトへの分化転換について詳細に解析を行なった。

ヘパラン硫酸はショウジョウバエの系を使った。近年のショウジョウバエ生殖幹細胞研究により、幹細胞の維持には幹細胞を取り巻く細胞外微小環境（ニッチ）が重要であることが明らかになってきた。ニッチの分子の実体は、生殖幹細胞に近接する特殊化された生殖腺体細胞（ニッチ細胞）より分泌される細胞増殖因子であることが明らかになっている。

(様式 3)

平成 25 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

しかし、分泌性の細胞増殖因子が、ニッチ細胞近傍にのみ留まり、限られた領域にニッチを形成するメカニズムは明らかになっていない。本研究ではニッチにおいて増殖因子の分布を制御する因子として、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) に着目した。HSPG はヘパラン硫酸 (HS) を側鎖としてもつ糖タンパク質のファミリーであり、細胞外環境で細胞増殖因子の分布を制御することが知られている。本研究では HSPG がニッチにおいて細胞増殖因子の分布を制御することにより、ニッチの範囲を分子的に規定するのではないかと予想し、解析を行った。

○ 当該事業年度において達成された研究成果

【加藤担当分】

常磁性効果を応用した核磁気共鳴 (NMR) 法と分子動力学 (MD) 計算とを組み合わせ、高マンノース型糖鎖 M9 および M8B の精密構造解析を行った。酵母変異体を用いて調製した糖鎖に常磁性プローブを導入し、分子科学研究所の 920MHz ならびに 800MHz 超高磁場 NMR 装置を活用することで、糖鎖の構造情報を収集した。さらに、糖鎖のレプリカ交換 MD 計算を実施し、その立体配座空間を探索するとともに、NMR 解析による構造情報に基づいて構造サンプリングの適切さを評価した。その結果、M9 および M8B 糖鎖の立体構造の変動範囲が有意に異なることが示され、糖タンパク質の品質管理に関わる一連の高マンノース型糖鎖の、ダイナミックなコンフォメーション変化を明らかにすることができた。

また、先天性筋ジストロフィー原因遺伝子の 1 つである *AGO61* のノックアウトマウスを作出し、その表現型解析を行った。その結果、*AGO61* の欠損に伴い、細胞膜に存在する α -ジストログリカン (α DG) 上のラミニン結合性を示す糖鎖の発現が消失し、脳の層形成の不全が起きることを見出した。さらに、この遺伝子にコードされたタンパク質が、 α DG 上の特定の位置に結合したマンノース残基への *N*-アセチルグルコサミン修飾を担っていることを明らかにした。これらの結果により、*AGO61* の欠損に伴い α DG 上のラミニン結合性糖鎖の形成不全が起これ、ジストログリカノパチーが発症することを明らかにすることができた。また、細胞膜上の糖脂質の機能メカニズムの理解をより深めるために、人工設計に基づく糖脂質 (ネオ糖脂質) の合成と機能評価を実施した。

【高田担当分】

マウス脊髄神経管の蓋板周辺において、2 つの Wnt 標的遺伝子の発現を検討した。まず、最も一般的な Wnt 標的遺伝子の一つである *Axin2* の発現は、蓋板を含む神経管背側の広い領域に認められたが、その領域は *Wnt3a* の拡散的な分布パターンとよく一致していた。一方、*Wnt3a* タンパク質は蓋板の最も内腔側に局在化するというもう一つのパターンを呈するが、この局在化領域に対応して *RPG1* (仮名) という遺伝子が Wnt 依存的に発現することが明らかになった。さらに、この Wnt の 2 相性分布とヘパラン硫酸鎖との関係を調べるために、ヘパラン生合成に必須の酵素である *Ext1* を蓋板特異的にノックアウトし、Wnt

(様式 3)

平成 25 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

タンパク質の空間分布を調べたところ、拡散的な空間分布は影響を受けたのに対して、内腔側への局在化は正常に起きていることが観察された。このことは、Wnt の 2 相性の空間分布がヘパラン硫酸により異なる制御を受けており、Wnt の局在に対してヘパラン硫酸以外の因子が関与することを示唆している。そのような因子の同定と機能解析を進めることにより、Wnt の空間分布の制御機構の全体像が明らかになるものと考えられる。

【池中担当分】

平成 25 年度は GlcNAc6ST-1 ノックアウトマウス (ケラタン硫酸欠損)・Sulf1/2 ノックアウトマウス (ヘパラン硫酸の脱硫酸化酵素欠損) の解析が進んだ。いずれのノックアウトマウスにおいても共通する表現型として、pMN ドメインから生じるオリゴデンドロサイトの分化異常が観察された。pMN ドメインからはまず motor neuron が産生され、引き続きオリゴデンドロサイトが産生される。GlcNAc6ST-1 ノックアウトマウスでは motor neuron の産生亢進が観察されたが、Sulf1/2 ノックアウトマウスでは motor neuron の産生も抑制されていた。胎生 12.5 日でのオリゴデンドロサイト分化には、floor plate から分泌される Shh シグナルが重要な役割を担っていることが知られている。各ノックアウトマウスにおいて Shh シグナルの下流遺伝子である Patched1 を調べたところ、発現の減弱または異所的な発現上昇が認められた。

以上のことから、硫酸化糖鎖によって Shh のシグナル伝達が調整されており、その変化によって神経発生・分化がダイナミックに制御されていることが明らかとなった。

【林担当分】

HSPG の一種であるグリピカンが、幹細胞に増殖因子シグナルを伝達するのに必要であることが明らかとなった。しかし、グリピカンの機能を阻害した場合の影響は、全ての HSPG 働きを阻害した場合の影響に比べると遥かに軽微であることも明らかとなった。このことはグリピカン以外の HSPG がニッチにおいて重要な働きをしていることを示唆していた。そこで、グリピカン以外の主要な HSPG であるシンデカンおよびパールカンのニッチにおける機能の解析を試みた。その結果、これらの HSPG のニッチ細胞における働きは卵巣生殖幹細胞に維持に必要であることが明らかとなった。さらに、グリピカンと異なり、シンデカンおよびパールカンの機能は、増殖因子のシグナル伝達の範囲をニッチ細胞近傍にのみ留めることに関与することを示唆する結果を得た。上記の研究成果は、HSPG はニッチにおいて、幹細胞に安定したシグナルを伝達する働き (グリピカン) と、ニッチ細胞近傍にシグナル伝達の範囲を限定する働き (シンデカンおよびパールカン) という二つの機能を果たすことを示唆している。本研究より得られる成果は、生体内において適切な個数の幹細胞が安定して維持される仕組みを理解する上で、重要な基礎的知見を供出すると考える。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)

【池中一裕】

(様式 3)

平成 25 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

Kumar A, Torii T, Ishino Y, Muraoka D, Yoshimura T, Togayachi A, Narimatsu H, Ikenaka K, Hitoshi S (2013) The Lewis X-related α 1,3-fucosyltransferase, Fut10, is required for the maintenance of stem cell populations. *J Biol Chem*, 288:28859-68

【加藤晃一】

Yamaguchi T, Kamiya Y, Choo, YM, Yamamoto S, Kato K, *Chem. Lett.* **2013**, *42*, 544.

Yagi H, Nakagawa N, Saito T, Kiyonari H, Abe T, Toda T, Wu SW, Khoo KH, Oka S, Kato K, *Sci. Rep.* 2013, *3*, 3288.

Zhang Y, Yamaguchi T, Kato K, *Chem. Lett.* **2013**, *42*, 1455.