

神経糖鎖生物学研究室

Laboratory of Neuroglycobiology

1. 研究概要

糖鎖の付加反応は重要な翻訳後修飾反応の一つであり、その構造は、いくつかのタイプに分類される。我々はN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、マンノース(Man)、あるいはN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とタンパク質中のセリン、トレオニン残基のヒドロキシル基との間に形成されるO-グリコシド型結合(GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr, Man α 1 \rightarrow Ser/Thr, GlcNAc β 1 \rightarrow Ser/Thr)を持つ糖鎖に注目し、それらの主に脳における機能を解析している。この中でGalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thrの糖鎖は、粘性タンパク質であるムチンに多く見られることから、ムチン型糖鎖とも呼ばれる。

ムチン型糖鎖の合成開始反応は糖転移酵素UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase (以降GalNAc-T)により触媒される。この酵素はヒトにおいては20種類から成る大きな遺伝子ファミリーを形成する。我々はこれまでに、神経特異的に発現するGalNAc-T9, -T17を単離した。この2つのアイソザイムは、酵素活性に関わるモチーフ内に変異を持ち、in vitroでの酵素活性がほとんど検出できない、サブファミリーに属する。我々は、O-グリコシド型糖鎖、およびその合成酵素の主に脳における機能解析を目的として、次のような課題に取り組んでいる。

1) GalNAc-T17の機能解析

我々はGalNAc-T17が、成体の脳においては海馬や視床、小脳の神経細胞に強く発現し、神経分化に関わること、また培養細胞を用いた実験ではGalNAc-T17がエンドサイトーシス経路を調節している可能性も見いだした。本年度は、GalNAc-T17の遺伝子欠損マウスを作製してその機能を解析した。

2) ゼブラフィッシュを用いたGalNAc-Tファミリーの機能解析

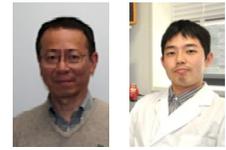
酵素活性が検出できず生化学的な解析が困難なサブファミリーを主なターゲットとして、ゼブラフィッシュを用いて発現解析、および機能阻害実験を行ってきた。本年度は、ゲノム編集技術であるTALEN法やCRISPR/Casシステムを用いて、変異体作製を試みた。

3) P19胚性腫瘍細胞を用いた新規神経分化モデルの確立

神経細胞の機能や分化の解析等に用いられる、多分化能を有するマウス胚性腫瘍由来P19細胞は、レチノイ

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



助教 中山 喜明

Assist. Prof. Yoshiaki Nakayama, Ph. D.

ン酸存在下で浮遊培養することで、神経、およびグリア細胞へと分化する。しかしこの方法では、非神経系細胞が増殖すること、成熟した神経細胞への分化に長期間の培養が必要である等の問題点があった。我々は、接着培養系に神経分化に関わる因子を加えて培養することで、P19細胞を短期間で効率よく神経細胞へと分化させる事に成功した。

4) その他のO-グリコシド型糖鎖の機能解析

ムチン型糖鎖の解析に加えて、我々は細胞外で発現する新規O-グリコシド型糖鎖の機能を、ゼブラフィッシュを用いて調べた。

2. 本年度の研究成果

1) GalNAc-T17 遺伝子欠損マウスの解析

我々はGalNAc-T17の機能解明のため、GalNAc-T17遺伝子欠損マウスを作製した。この遺伝子欠損マウスは体重減少の症状を示し、野生型マウスと比較して摂食量が減少していた。この遺伝子の発現領域の詳細な解析を行ったところ、記憶を司る海馬や扁桃体領域に強い発現が認められた他に、満腹中枢として働く視床下部の腹内側核で発現していた(Fig. 1)。これらの結果から、GalNAc-T17が満腹中枢において摂食行動を正に制御していることが示唆された。

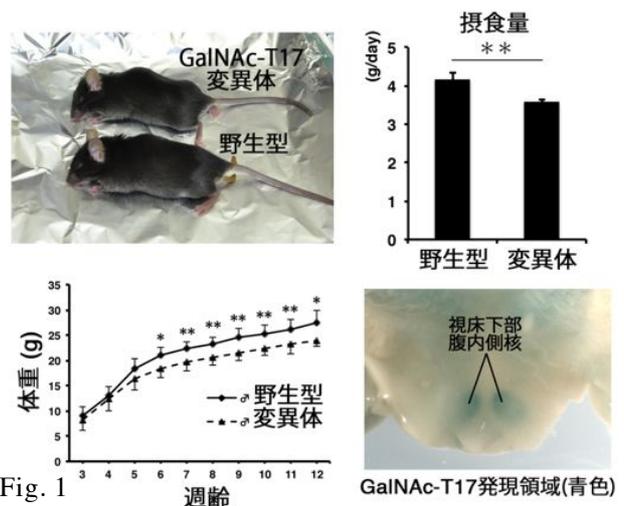


Fig. 1

2) TALEN, CRISPR/Casシステムを用いたゼブラフィッシュGalNAc-Tファミリー変異体の作製

我々がこれまでに単離・同定したゼブラフィッシュGalNAc-Tアイソザイムのうちで、特にその機能が分かっていないGalNAc-Tについて、ゲノム編集技術である

TALEN 法や CRISPR/Cas システムを用いて、その変異体作製を試みた。これまでに GalNAc-T9 や-T18 に対する TALEN ベクター、CRISPR ベクターを構築し、ゼブラフィッシュ受精卵に一過性に発現させたところ、標的配列に変異を導入することに成功している。

3) P19 胚性腫瘍細胞を用いた新規神経分化モデルの確立

P19 細胞の従来の分化方法は、レチノイン酸存在下で浮遊培養し、細胞凝集塊を形成させる方法が用いられてきた。しかしこの方法では、非神経系細胞が増殖すること、成熟した神経細胞への分化に長期間の培養が必要である等の問題点があった。我々は、浮遊培養が非神経細胞の増殖の原因と考え、接着培養を基本とした短期間で効率の良い神経細胞分化系を確立した。これまでの神経細胞分化に関わる因子の研究に基づき、(i) ラミニンをコートした培養皿上で単層培養する、(ii) インスリンやトランスフェリン等の神経分化因子を含む無血清培地を用いる、(iii) レチノイン酸に加えて、ノッチシグナル阻害剤である DAPT を添加する、(iv) 分化の初期段階に FGF8 を添加する等の条件をとり入れた。その結果、分化誘導開始後 3~4 日目に神経突起の形成、6 日目にはより活発な突起伸張が観察された。免疫染色やカルシウムイメージングなどによる解析により、6 日目まで自律的な神経活動を有した成熟神経細胞への分化が認められる一方で、グリア細胞は存在しなかった。以上より、新しい方法では、P19 細胞は従来の約半分以下の時間で、効率よく神経細胞にのみ分化することが明らかとなった。

4) その他のO-グリコシド型糖鎖の機能解析

細胞外で発現する新規 O-グリコシド型糖鎖の機能を、ゼブラフィッシュを用いて調べた。我々はこの糖鎖構造の合成に関わる糖転移酵素が初期胚において脳に強く発現することを見いだした。また、本酵素の発現を抑制すると、脳において形態異常を生じるのに対し、他の組織での表現型の変化は観察されなかった。このことから、この酵素が主に脳において機能する事が示唆された。

3. Research projects and annual reports

We have been investigating roles of O-linked sugar chains with the linkage structures, GalNAc α 1 \rightarrow Ser(Thr), Man α 1 \rightarrow Ser(Thr), or GlcNAc β 1 \rightarrow Ser(Thr). O-GalNAc-type sugar chains are called mucin-type carbohydrates and their biosynthesis is initiated by a group of enzymes, UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts). GalNAc-Ts consist of a large gene family with 20 isozymes in humans. Interestingly, GalNAc-T8, -T9, -T17, and

-T18 are catalytically inactive, while GalNAc-T9 and -T17, which were identified by us, are brain-specific and biologically important for the neural differentiation. Based on these backgrounds, we have focused on the functions of glycosyltransferases to make O-glycan carbohydrate-linkage structures, and obtained the following findings.

1) Analysis of mice defective of a GalNAc-T17 gene

We found that GalNAc-T17 KO mice showed decreased body weight compared with wild-type mice (Fig. 1). Analysis of GalNAc-T17 expression demonstrated that it was expressed not only in hippocampus and amygdala, but in ventromedial nucleus of hypothalamus, which is known as satiety center. GalNAc-T17 may therefore positively regulate feeding behavior.

2) Production of zebrafish GalNAc-T mutants

To produce zebrafish mutants defective of GalNAc-T genes, we employed recently developed genome-editing technology, TALEN and CRISPR/Cas systems. We found that mutations were successfully introduced at the target sites in the zebrafish embryos using TALEN and CRISPR/Cas vectors for GalNAc-T9 and -T18.

3) A rapid and efficient method for neuronal induction of P19 embryonic carcinoma cell line

We revised a novel method to efficiently differentiate P19 cells into neurons by an adherent culture in laminin-coated dish in the presence of several reagents to induce neural differentiation and suppress growth of non-neural cells. The new method induced neurons within 4 days without gliogenesis. The mature neurons obtained were responsive to several neurotransmitters with functional neuronal networks.

4) Analysis of extracellular O-glycosylation

We investigated the function of a glycosyltransferase in zebrafish, which catalyzes extracellular novel O-glycosylation. We found that it was strongly expressed in the brain of zebrafish embryos, and its suppression caused alterations in the brain development.

4. 論文, 著書など

Y. Nakayama, A. Wada, R. Inoue, K. Terasawa, I. Kimura, N. Nakamura, A. Kurosaka: A Rapid and Efficient Method for Neuronal Induction of the P19 Embryonic Carcinoma Cell Line. *Journal of Neuroscience Methods*, in press.

M. Ogawa, N. Nakamura, Y. Nakayama, A. Kurosaka, H. Many, M. Kanagawa, T. Endo, K. Furukawa, T. Okajima: GTDC2 modifies O-mannosylated α -dystroglycan in the endoplasmic reticulum to generate N-acetyl-glucosamine epitopes reactive with CTD110.6 antibody. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 440(1), 88-93

I. Kimura, Y. Nakayama, Y. Zhao, M. Konishi, N. Itoh: Neurotrophic effects of neudesine in the central nervous system. (2013) *Front Neurosci* 7 (article111), 1-5

Y. Nakayama, N. Nakamura, D. Tsuji, K. Itoh, A. Kurosaka: Genetic diseases associated with protein glycosylation disorders in mammals. pp. 244-269 in *Genetic Disorders*, Maria Puiu (Ed.), ISBN: 978-953-51-08866-3, InTech.

5. 学会発表など

中山喜明, 和田あゆみ, 中村直介, 黒坂光: P19マウス胚性腫瘍細胞株を用いた迅速かつ効率の良い神経誘導法の確立. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2013.12.3-6

Y. Nakayama, K. Kato, N. Nakamura, A. Kurosaka: The roles of a putative polypeptide GalNAc-transferase/Wbscr17. International Symposium on Glyco-Neuroscience, Awaji city (Japan) 2014.1.9-11

6. その他特記事項

1) 外部資金

産学連携共同研究(インタープロテイン社)

課題名: VEGFシステム調節薬のスクリーニング系に関する研究

研究代表者: 黒坂光, 取得年度: H25年(1年)

学術研究助成基金助成金・挑戦的萌芽研究

課題名: モデル生物を活用した先天性脳疾患関連オーファン糖転移酵素の機能解明

研究分担者: 黒坂光, 取得年度: H25-26年(2年)

科学研究費補助金・新学術領域, 神経糖鎖生物学

課題名: 神経回路形成におけるムチン型糖鎖による新たな膜輸送制御システムの解析

研究代表者: 中山喜明, 取得年度: H24-25年(2年)

学術研究助成基金助成金・若手研究(B)

課題名: 低栄養環境下の腫瘍細胞におけるマクロピノサイトーシスの機能解析

研究代表者: 中山喜明, 取得年度: H25-26年(2年)

2) 学外活動

黒坂光: 日本生化学会評議員, 日本薬学会近畿支部委員

3) その他

黒坂光: KSU サイエンスコース(京都産業大学附属高校生徒に GFP の発現と精製実験を行った.) (2013.7.26).



ラボメンバー 15号館裏にて