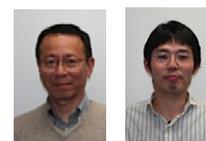


神経糖鎖生物学研究室

教授 黒坂 光

助教 中山喜明



1. 研究概要

タンパク質への糖鎖の付加は、主要な翻訳後修飾反応の一つであり、付加された糖鎖は細胞間の接着や認識などに重要な働きをする。糖鎖の構造は、糖とタンパク質の結合様式によっていくつかのタイプに分類されるが、我々はN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)やマンノース(Man)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)に注目し、それらの主に脳における機能を解析している。GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thrの構造を有する糖鎖は、消化器官、呼吸器官等の上皮細胞が分泌する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。この構造の糖鎖はムチン分子のみならず、他の多くの細胞表面や分泌糖タンパク質中にも存在して、粘膜の保護だけでなく、リンパ球と血管内皮細胞の相互作用、微生物や毒素の認識などの生物現象に関与することが知られている。一方、ほ乳類におけるMan α 1 \rightarrow Ser/Thrの構造を有するO-Man型糖鎖は、筋肉や神経系などの限定されたタンパク質にのみ存在しており、その合成異常は筋ジストロフィーなどの疾病と関係している。

複雑な細胞間ネットワークを形成する神経系の細胞では、複合糖質の糖鎖が重要な役割を果たしており、プロテオグリカンやN-グリコシド型糖鎖(GlcNAc β 1 \rightarrow Asn)が、シナプスの形態変化や神経回路の形成に関わるなどの報告がなされてきた。しかし、O-グリコシド型糖鎖の神経系におけるはたらきについては、ほとんど解析されていない。このような背景を踏まえ、我々の研究室では、O-グリコシド型糖鎖、およびそれに関連した分子の脳における機能解析を研究の目的として、次のような研究を行っている。

1) 神経特異的なムチン型糖鎖の合成反応と、糖鎖の機能解析

ムチン型糖鎖の生合成の開始反応は、UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (以後GalNAc-Tと略する)が触媒する。この酵素はタンパク質中のムチン型糖鎖の数と位置を決定する重要な酵素である。近年我々は、神経特異的に発現するGalNAc-T9、およびGalNAc-Tと高い相同性を持つ分子をクローニングした。後者の分子は精神遅滞を伴う遺伝病であるWilliams-Beuren症候群(WBS)の欠失領域(WBS critical region)に含まれるWBSR17遺伝子としても知られている。GalNAc-T9、WBSR17ともin vitroの酵素活性、お

よびその分子の機能は全く理解されていない。我々は脳におけるムチン型糖鎖の働きを調べるために、これらの分子の生化学的な特徴、さらに脳の発生・分化における役割を、培養細胞やゼブラフィッシュを用いて解析してきた。これまで、ゼブラフィッシュを用いた実験系では、脳特異的なGalNAc-T9、GalNAc-T13、およびWBSR17に対するアンチセンスモルホリノオリゴを用いて、それぞれの分子の発現を抑制し、発生に与える影響を調べ、WBSR17の発現抑制胚で最も顕著に後脳領域において発生異常が起こることを報告してきた。

2) α -dystroglycanのムチン型、およびO-Man型糖鎖に関する研究

α -dystroglycan (以降 α DG)は、O-Man型糖鎖とムチン型糖鎖を有する。ある種の先天性筋ジストロフィーでは筋肉の症状とともに、特徴的に知的発達遅滞やてんかんなど中枢神経症状を呈するが、その原因として α DGのO-Man型糖鎖に合成不全が起こり、 α DGのリガンドへの結合能が低下することが考えられている。今日では α DGの糖鎖修飾異常により引き起こされる疾患は α -dystroglycanopathyと呼ばれているが、その一方で α DGのムチン型糖鎖の機能についてはほとんど調べられていない。本研究では、ゼブラフィッシュを用いて α DGの翻訳後修飾、特にムチン型糖鎖の修飾と α DGの機能の関係を明らかにすることを目的としている。

2. 本年度の研究成果

1) 神経特異的なムチン型糖鎖の合成反応と、糖鎖の機能解析

GalNAc-T遺伝子ファミリーと高い相同性を持つが、酵素活性が検出されていないWBSR17の生化学的な性質を調べた。WBSR17の細胞内局在性を、ヒトWBSR17とGFPの融合タンパク質をHeLa細胞、Cos7細胞で発現させて調べたところ、融合タンパク質は他のGalNAc-Tと同様にcis-Golgiを中心とした細胞内膜系に多く発現していた。このことは、WBSR17が糖転移酵素として機能する可能性を示唆している。次に、Tn抗原、T抗原などを認識するレクチンを用いて、細胞染色、レクチンプロット解析、およびN-アジドアセチルガラクトサミン(GalNAz)を用いた糖鎖の代謝標識法を用いて糖鎖の解析を行った。レクチンを用いた解析では、WBSR17発現細胞とコントロール細胞間での違いは見られなかったが、代謝標識した糖タンパク質糖鎖をシュタウディングー連結反応によりブローブを結合させて検出する実験においては、WBSR17

発現細胞で発現が増加するバンドを検出した。この結果は、WBSCR17 が糖転移活性を持つことを示唆している。

ゼブラフィッシュを用いた実験系では、WBSCR17 の発現を抑制したときに見られる後脳領域での発生異常の原因同定を調べるために、WBSCR17 発現抑制胚における後脳のマーカー分子の発現を分析した。その結果、wnt1, rfng などの後脳の境界の形成に関わる分子の発現パターンが消失あるいは乱れていることを見いだした。さらに、特異的なアンチセンスモルホリノオリゴを用いて wnt1, rfng の発現抑制胚を作製したところ、WBSCR17 抑制胚とよく似た表現型の異常を示したことから、WBSCR17 は wnt1, rfng などのシグナル系に関連している可能性が考えられた。

2) α -dystroglycan のムチン型、および O-Man 型糖鎖に関する研究

この実験ではゼブラフィッシュの初期胚に FLAG タグを有する α DG を発現させる。その際、アンチセンスモルホリノオリゴを用いて特定の GalNAc-T の発現を抑制して、どのアイソザイムが α DG のムチン型糖鎖生成に関わっているかをスクリーニングする。今年度は、組換え α DG のコンストラクトを作製した。

3. Research projects and annual reports

O-Glycosylation is an important post-translational modification of proteins, and is classified into several subtypes based on the carbohydrate-protein linkage structures. GalNAc α 1 \rightarrow Ser(Thr) is the most frequently observed linkage, and O-glycans with this structure are called the mucin carbohydrates since they are highly expressed on mucins secreted from epithelial cells. There is another O-glycosidic structure, Man α 1 \rightarrow Ser(Thr). Contrary to the mucin sugars, the occurrence of O-mannosylated carbohydrates is mostly confined to the tissues, such as muscle and brain. Our interest is to define functional roles of these two types of O-glycosylation in the brain, and we carried out the following experiments.

1) Analysis of synthesis and function of neuron-specific mucin-type carbohydrates

a UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase (GalNAc-T) catalyzes the initial step in the biosynthesis of mucin-type glycans. We previously cloned a novel neuron-specific isozyme, designated GalNAc-T9, and more recently identified a putative GalNAc-T gene, which is also mainly expressed in the embryonic and adult brain. The gene for this putative isozyme is also known as WBSCR17, one of the genes identified in the region critical to Williams-

Beuren syndrome (WBS). We carried out biochemical characterization of WBSCR17, and knockdown of brain-specific isozymes (GalNAc-T9, -T13, and WBSCR17), and obtained the following data.

i) WBSCR17 was predominantly expressed in the cis-Golgi as is the case with other GalNAc-T isozymes, when its recombinant molecule with GFP was expressed in mammalian cells. The subcellular localization suggests that WBSCR17 may work as a glycosyltransferase.

ii) Carbohydrate profiles were studied in the cells with constitutively expressed WBSCR17 by metabolic labeling of carbohydrates using GalNAz. The detection of metabolically labeled glycoproteins from the cells with overexpressed WBSCR17 demonstrated bands with enhanced expression, indicating the possible glycosylation by WBSCR17.

iii) The knockdown (KD) of WBSCR17 in zebrafish generated most severe malformation of hindbrain compared with the other brain-specific isozymes. We then examined the expression of some hindbrain markers, and found that wnt1 and rfng were lost or ectopically expressed. The KD of either wnt1 or rfng in zebrafish showed the similar phenotype to that of the WBSCR17 KD embryos. All these data indicate the WBSCR17 is somehow related to signal transduction of wnt1 and/or rfng.

2) Analysis of functions of O-glycosidic carbohydrates in α -dystroglycan (α DG)

The aim of this project is to identify GalNAc-T isozymes involved in mucin-type O-glycosylation of α DG, and to identify the roles of α DG mucin-carbohydrates. To express FLAG-tagged α DG in zebrafish, we generated its construct. We are introducing the construct into the embryos.

4. 発表論文

K. Yamauchi, and A. Kurosaka: Expression and function of glycogen synthase kinase-3 in human hair follicles. **Arch. Dermatol. Res.** **302**(4): 263-270 (2010)

I, Kimura, Y. Nakayama, M. Konishi, T. Kobayashi, M. Mori, M. Ito, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, M. Ohta, N. Itoh, M. Fujimoto: Neuferricin, a novel extracellular heme-binding protein, promotes neurogenesis. **J. Neurochem.** **112**(5): 1156-1167 (2010)

5. 著書および総説

S. Sasaki, Y. Nakayama, M. Konishi, A. Miyake, N. Itoh: The FGF Family in Humans, Mice, and Zebrafish: Development, Physiology, and Pathophysiology. **Genetic Disease**. in press

6. 招待講演、シンポジウム等

なし

7. 学会発表

N. Nakamura, M. Tawara, K. Nishimura, K. Hachiga, H. Nishizaki, Y. Nakayama, A. Miyake, N. Itoh, A. Kurosaka, The Biological Roles of Brain-specific Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish. International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Yokohama (Japan), 2010.8.1-6.

A. Kurosaka, S. Toba, T. Satoh, N. Nakamura, Y. Nakayama, K. Ozaki Suppression of a novel brain-specific UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase causes cell death in P19 embryonic carcinoma cells during neural differentiation. International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Yokohama (Japan), 2010.8.1-6.

N. Nakamura, M. Tawara, K. Nishimura, K. Hachiga, H. Nishizaki, Y. Nakayama, A. Miyake, Nobuyuki Itoh, A. Kurosaka, The Biological Roles of WBSR17, a Gene Homologous to Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish. 第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会合同年会, 神戸市, 2010.12.7-10

H. Fujiwara, T. Satoh, Y. Nakayama, N. Nakamura, A. Kurosaka, Functional analysis of brain-specific polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-related genes, 第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会合同年会, 神戸市, 2010.12.7-10

Y. Nakayama, Y. Tsuji, N. Nakamura, A. Kurosaka, Characterization of brain-specific polypeptide GalNAc-transferases in P19 cells, 第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会合同年会, 神戸市, 2010.12.7-10

8. その他特記事項

なし