

神経糖鎖生物学研究室

Laboratory of Neuroglycobiology

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)、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。これらの中で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。

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 ppGalNAc-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(Fig. 1)が、それぞれのアイソザイムの性質はまだ明らかになっていない。我々はこれらのうち、

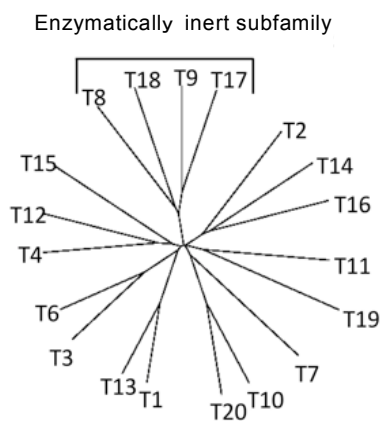
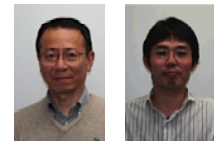


Fig. 1 A phylogenetic tree of human ppGalNAc-Ts

ppGalNAc-T9, -T17 をクローニングし、これらが神経特異的に発現することを報告した。また、ppGalNAc-T9, -T17 が属するサブファミリーは、*in vitro*での酵素活性が検出されておらず、生化学的な解析は極めて困難である。このような背景を踏まえ、我々の研究室では、O-グリコ

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



助教 中山喜明

Assist. Prof. Yoshiaki Nakayama Ph. D.

シド型糖鎖、およびそれに関連した分子の主に脳における機能解析を研究の目的として、次のような課題に取り組んでいる。

1) 細胞膜輸送におけるムチン型糖鎖合成酵素 ppGalNAc-T17 の機能解析

糖タンパク質糖鎖は立体構造の安定化に寄与するだけでなく、レクチンとの相互作用を介する細胞内タンパク質輸送の際の“荷札”として機能する。ムチン型糖鎖も、古くから細胞内輸送に関与する可能性が示唆されているものの、その詳細は明らかにされていない。

我々は ppGalNAc-T17 とそれが合成に関わるであろうムチン型糖鎖について解析を進め、ppGalNAc-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などを報告してきた。近年、HEK293T 培養細胞を用いたゲノミクス解析により、ppGalNAc-T17 がエンドサイトーシス経路を調節している可能性が報告された。我々は ppGalNAc-T17 が関わる新たな現象について詳細な研究を行った。

2) ゼブラフィッシュを用いた ppGalNAc-Tファミリーの機能解析

我々は ppGalNAc-T1 の構造活性相関に関する研究を行い、酵素分子中のモチーフ内に存在する酵素活性に必要なアミノ酸残基を同定した。ppGalNAc-Tファミリーの中で ppGalNAc-T8, -T9, -T17, -T18 では、それらのアミノ酸のいくつかは他のアミノ酸に置換されている。そのため、他のアイソザイムと同じ基質ペプチドを用いた *in vitro* アッセイでは、酵素活性を検出することはできず、これらのアイソザイムの生化学的な特徴付けはきわめて困難である。そこで我々は、ゼブラフィッシュを用いて発現を抑制することで、これらのアイソザイムの機能解析を行い、ppGalNAc-T9, -T17 が脳の発生に関わることを見いだした。さらに、今年度は同じサブファミリーに属する ppGalNAc-T8, -T18 の機能解析に着手した。

3) その他のO-グリコシド型糖鎖の機能解析

今年度よりゼブラフィッシュを用いて、O-GlcNAc型糖鎖の機能解析を始めた。酵素遺伝子のクローニング、発現解析、発現抑制実験を行った。

2. 本年度の研究成果

1) 細胞膜輸送におけるムチン型糖鎖合成酵素 ppGalNAc-T17 の機能解析

HEK293T における ppGalNAc-T17 について、新たに細胞生物学的手法を用いて機能解析を行った。その結果、(i)細胞内栄養状態の指標である GlcNAc の濃度依存的に ppGalNAc-T17 の発現量が増加すること、(ii) ppGalNAc-T17 が液相エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシス経路を負に制御していること、(iii)その調節メカニズムの破綻は膜タンパク質の輸送異常によるリソソーム病様の症状を引き起こすという新たな知見を得た。これらの結果は ppGalNAc-T17 により形成されるムチン型糖鎖が、マクロピノサイトーシスを通じた細胞外分子の取り込みを制御することにより、細胞内栄養状態のホメオスタシスの維持に関与することを示唆している (Fig. 2)。

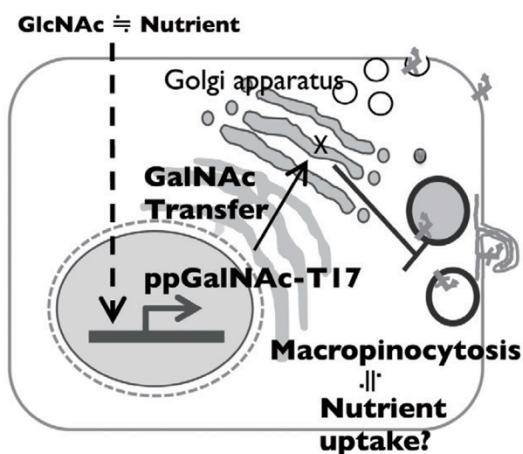


Fig. 2 Hypothetical roles of ppGalNAc-T17 in membrane trafficking

2) ゼブラフィッシュを用いた ppGalNAc-Tファミリーの機能解析

ゼブラフィッシュを用いて ppGalNAc-T8, -T18 の機能解析を行った。データベース検索により、ゼブラフィッシュでは染色体の重複により、ppGalNAc-T8 については5つ (ppGalNAc-T8a ~ e), ppGalNAc-T18 については2つ (ppGalNAc-T18a, b) のパラログ遺伝子が存在していることを見いだした。現在は、これらアイソザイムのクローニング、発現分布解析、ノックダウン実験を進めているが、今年度は、ppGalNAc-T18a, b の cDNA クローニングを完了した。これらのアイソザイムについて、RT-PCR によりどちらも受精後 18 時間から発現しており、さらに in situ hybridization により、受精後 24 時間のゼブラフィッシュ胚において、ppGalNAc-T18a mRNA が全身、特に脳や尾に強く発現していることを見いだした。また、ppGalNAc-T18a に対するモルホリノアンチセンスオリゴを用いたノックダウン実験から、このアイソザイムがゼブラフ

ィッシュにおいて尾の形成に重要な働きをすることが示された (Fig. 3)。脳における機能についても検討中である。

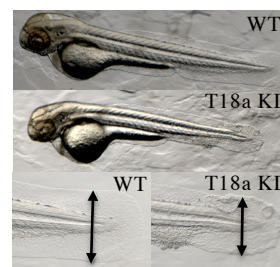


Fig. 3 Suppression of ppGalNAc-T18a in zebrafish embryos gave rise to the altered tail formation during the development.

3) その他のO-グリコシド型糖鎖の機能解析

細胞質、および細胞外に見いだされる O-GlcNAc 型糖鎖の機能をゼブラフィッシュを用いて調べた。この糖鎖構造の合成に関わる糖転移酵素をゼブラフィッシュで同定しその cDNA をクローニングした。初期胚における発現、機能解析を行い、O-GlcNAc 型糖鎖の発現が初期発生に必要であることを見いだした。

3. Research projects and annual reports

O-Glycosylation is an important post-translational modification of proteins, and is classified into several types based on the carbohydrate-protein linkage structures. We have been investigating roles of 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). Among them, GalNAc α 1 \rightarrow Ser(Thr) is the most frequently observed linkage, and O-glycans with this linkage are called the mucin carbohydrates since they are highly expressed in mucins secreted from epithelial cells. The mucin carbohydrate biosynthesis is initiated by a group of enzymes, UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (ppGalNAc-Ts). ppGalNAc-Ts consist of a large gene family with 20 isozymes in humans (Fig. 1). Interestingly, ppGalNAc-T8, -T9, -T17, and -T18 are catalytically inactive when assayed with classical assay methods, while ppGalNAc-T9 and -T17, which are cloned by us, are brain-specific isozymes and are 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) Roles of mucin-type carbohydrates in intracellular membrane trafficking

Recent genome-scale analysis of HEK293T cells treated with a high GlcNAc concentration demonstrated that ppGalNAc-T17 is one of the genes upregulated, which are possibly involved in the fluid phase endocytosis. To assess its roles, we first biochemically characterized recombinant ppGalNAc-T17 in COS7 cells, and demonstrated that it was N-glycosylated, and localized mainly in the Golgi apparatus. We then suppressed the expression of endogenous ppGalNAc-T17 in HEK293T cells using siRNA. The suppression led to phenotypic changes of the cells with reduced lamellipodia formation, altered O-glycan profiles, and unusual accumulation of glycoconjugates in the late endosomes and lysosomes. Analysis of endocytotic pathways revealed that macropinocytosis, but neither clathrin- nor caveolin-dependent endocytosis, was elevated in the knockdown cells. This was further supported by the findings that recombinant ppGalNAc-T17 overexpressed in HEK293T cells inhibited macropinocytosis, and rescued the influences observed for the knockdown cells. Our data provide the first implication that a subset of mucin-type O-glycosylation produced by ppGalNAc-T17 is involved in the control of dynamic membrane trafficking probably between the cell surface and the late endosomes through macro-pinocytosis, in response to the nutrient concentration as exemplified by the environmentally available GlcNAc (Fig. 2).

2) Analysis of ppGalNAc-T family using zebrafish

We have been investigating ppGalNAc-T8 and -T18 that are catalytically inert under the conventional assay conditions. To characterize these isozymes, we first screened the database, and found that zebrafish have 5 and 2 paralogue genes for ppGalNAc-T8, and -T18, respectively. For ppGalNAc-T18, we cloned both paralogue genes, and showed that they were expressed throughout the early embryos with the stronger expression in the brain and the tail. Suppression of ppGalNAc-T18a in the embryos with specific morpholino oligos demonstrated the abnormal tail formation (Fig. 3).

3) Analysis of other O-glycosylation

We investigated the expression and roles of glycosyltransferases that are involved in the O-GlcNAcylation.

We found that the suppression of O-GlcNAcylation in zebrafish resulted in the abnormal development of embryos.

4. 発表論文

A. Miyake, S. Nihno, Y. Murakoshi, A. Satsuka, Y. Nakayama, and N. Itoh: Neucrin, a novel secreted antagonist of canonical Wnt signaling, plays roles in developing neural tissues in zebrafish. *Mech. Dev.* in press.

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. **Human Genetic Diseases** 37-56 (2011)

6. 招待講演、シンポジウム等

なし

7. 学会発表

Y. Nakayama, N. Nakamura, and A. Kurosaka: The Biological Roles of a putative Polypeptide GalNAc-transferase/ WBSCR17. Glyco21, Vienne (Austria), 2011. 8. 21-26

N. Nakamura, E. Kaneda, Y. Nakayama, and A. Kurosaka: Developmental Roles of Putative Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish. 2011 Annual Conference of the Society for Glycobiology, Seattle, Washington (USA) 2011. 11. 11

Y. Nakayama, A. Wada, N. Nakamura, and A. Kurosaka: A putative polypeptide GalNAc-transferase, WBSCR17, regulates endocytosis in HEK293T cells. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2011.12.13-16

H. Fujiwara, T. Satoh, Y. Tsuji, Y. Nakayama, N. Nakamura, and A. Kurosaka: Characterization of a brain-specific polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2011.12.13-16

N. Nakamura, E. Kaneda, Y. Nakayama, and A. Kurosaka: Functional analysis of N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4 in zebrafish. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2011.12.13-16

T. Kawai, K. Ohshita, A. Kakii, N. Nakamura, Y. Nakayama, and A. Kurosaka: Functional analysis of N-acetylgalactosaminyltransferase 8 in zebrafish. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2011.12.13-16

8. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究(C)

課題名: 神経発生とアポトーシスに関わる脳特異的ムチン型糖鎖合成酵素の機能解析

研究代表者: 黒坂 光, 取得年度: H21-23 年 (3 年)

研究分担者: 中山喜明, 取得年度: H21-23 年 (3 年)

科学研究費補助金・基盤研究(B)

課題名: ダイコンの雄性不稔・稔性回復システムの分子機構とその多様性形成メカニズムの解明

研究分担者: 黒坂 光, 取得年度: H22-23 年 (2 年)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

課題名: オルガネラゲノムの研究成果を基盤とする有用植物の育成

研究分担者: 黒坂 光, 取得年度: H20-24 年 (5 年)

学術研究助成基金助成金・若手研究(B)

課題名: 網膜発生に関わるムチン型糖鎖の機能解明に向けた ppGalNAc-T の解析

研究代表者: 中山喜明, 取得年度: H23-24 年 (2 年)

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: H23 年 (1 年)

2) 知財権等 なし

3) 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

4) 受賞等 なし

5) その他

黒坂 光: THE UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA (バレンシア, スペイン)との大学間協定の締結のための交渉を行った。

黒坂 光: 京都産業大学附属高校との連携授業(実験)を実施した。

黒坂 光: 放射線取扱主任者として RI 管理を行った。



ラボ集合写真: 15号館テラスにて