

神経糖鎖生物学研究室

Laboratory of Neuroglycobiology

1. 研究概要

タンパク質は翻訳後に正しくフォールディングされ、さらに様々な修飾反応を受けて機能的な分子となる。糖鎖の付加反応は重要な修飾反応の一つであり、糖鎖はタンパク質の安定化、細胞間の接着や認識などに関わる。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 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(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。我々はこれまでに、GalNAc-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てきた。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の保存されたアミノ酸残基に置換を持ち、in vitroでの酵素活性がほとんど検出されず、生化学的な解析は極めて困難なサブファミリーに属する。一方で、このサブファミリーは従来の

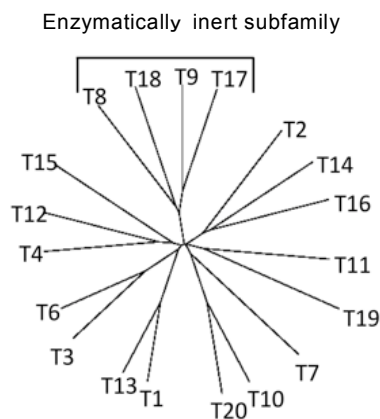
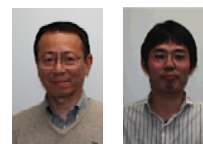


Fig. 1 A phylogenetic tree of human GalNAc-Ts

教授 黒坂 光

Prof. Akira Kurosaka, Ph. D.



助教 中山喜明

Assist. Prof. Yoshiaki Nakayama Ph. D.

酵素とは異なった機能を持つ可能性も指摘されている。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 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、神経分化に関す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、GalNAc-T17 がエンドサイトーシス経路を調節している可能性が指摘された。そこで、我々は GalNAc-T17 が関わる新たな機能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 GalNAc-T ファミリーの網羅的な発現および機能解析

近年、GalNAc-T ファミリーのいくつかのアイソザイムの機能解析がなされ、疾患との関連、および一部の内在性基質が明らかにされてきた。しかしながら、GalNAc-T ファミリーは、互いに重複する組織発現、および基質特異性を有するため、ファミリー全体の機能解析は進んでいない。我々は GalNAc-T9, -T17 等の Y サブファミリーに属するアイソザイムを中心として機能解析を行ってきたが、今年度は、ゼブラフィッシュにおける GalNAc-T ファミリーの網羅的な機能解析に着手した。

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。

3) その他のO-グリコシド型糖鎖の機能解析

ゼブラフィッシュを用いて、新規 O-グリコシド型糖鎖の機能解析を行った。今年度は糖鎖合成酵素の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 GalNAc-T17 の機能解析

HEK293T における GalNAc-T17 について、細胞生物学的手法を用いて機能解析を行い、以下の新しい知見を得た。(i) GalNAc-T17 がゴルジ局在性の分子であること。(ii) 細胞内栄養状態の指標である GlcNAc の濃度依存的に GalNAc-T17 の発現量が増加すること。(iii) GalNAc-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すること。(iv) GalNAc-T17 によるその調節メカニズムの破綻が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こと。これらの結果は GalNAc-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。

2) ゼブラフィッシュを用いた GalNAc-T ファミリーの網羅的な発現および機能解析

データベース検索よりゼブラフィッシュが 18 種類の GalNAc-T アイソザイムを発現していること、GalNAc-T8 と-T18 がそれぞれ5種類、および2種類のパラログ遺伝子を有することを見いだした。我々はパラログも含めてほとんど全てのアイソザイム cDNA のクローニングを完了した。次に、決定した塩基配列をもとに、ゼブラフィッシュの初期胚(主に24時間胚)における発現を whole mount in situ hybridization (WISH) 法により解析した。その結果、それぞれのアイソザイムは特徴的な発現パターンを有するものの、その多

くは脳、および尾の筋肉に発現する事が明らかとなった(Fig. 2)。さらに、GalNAc-T18 については発現抑制実験を行い、機能阻害胚において尾部に嚢胞が生じる等の表現型の変化を観察した。尾部凍結切片を解析したところ、細胞接着に関わるカドヘリンやインテグリンの局在性に変化があ

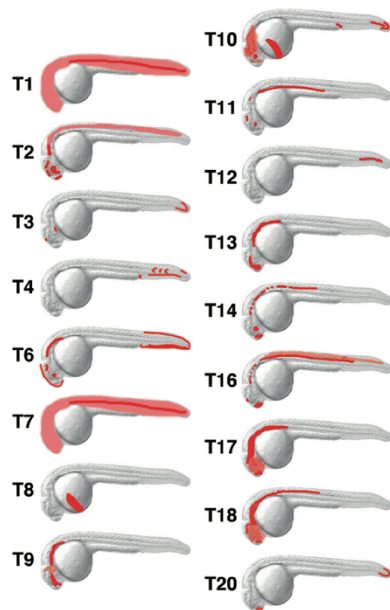


Fig. 2 Expression of GalNAc-Ts in zebrafish embryos

ることを見いだした。

3) P19 胚性腫瘍細胞を用いた新規神経分化モデルの確立

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。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、3~4 日目には神経突起が形成され、6 日目にはより活発な突起伸張が観察された。免疫染色やウェスタンブロットングなどによる解析により、6 日目では成熟神経細胞への分化が認められたにもかかわらず、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

細胞質、および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

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 (GalNAc-Ts). GalNAc-Ts consist of a large gene family with 20 isozymes in

humans (Fig. 1). Interestingly, GalNAc-T8, -T9, -T17, and -T18 are catalytically inactive when assayed with classical assay methods, while GalNAc-T9 and -T17, which were 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 GalNAc-T17 is one of the genes upregulated, which are possibly involved in the fluid phase endocytosis. To assess its roles in membrane trafficking, we first biochemically characterized recombinant GalNAc-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 GalNAc-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 endocytic 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 GalNAc-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 GalNAc-T17 is involved in the control of dynamic membrane trafficking probably between the cell surface and the late endosomes through macropinocytosis, in response to the nutrient concentration as exemplified by the environmentally available GlcNAc.

2) Comprehensive Analysis of GalNAc-T family in zebrafish embryos

Recently, functions and endogenous substrates of some of the GalNAc-T isozymes have been clarified. The overall function of the family, however, still remains to be elucidated. We have been investigating GalNAc-T7 and -T17 that are catalytically inert

isozymes under the conventional assay conditions. To carry out comprehensive analysis of the GalNAc-T family, the expression of all the isozymes in zebrafish embryos were investigated by WISH, finding that most of the isozymes have characteristic expression patterns in the embryos with most frequent expression in the brains and the tail muscles. We then suppressed the expressions of GalNAc-T18. Since it has two paralogue genes, designated GalNAc-T18a and -T18b, antisense morpholino oligos specific for each paralogue was designed to suppress each paralogue independently. Suppression of each paralogue gave similar morphological alterations in the embryos, giving rise to abnormal fin fold with cysts in some of the morphants. This indicates that GalNAc-T18 is involved in tail development in zebrafish.

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

P19 mouse embryonic carcinoma cells are pluripotent cells, and can differentiate into neurons and glial cells by performing nonadherent cell culture in the presence of retinoic acid (RA) to form cell aggregates. The method, however, has several drawbacks that it takes long time to differentiate into mature neurons, and that non-neuronal cells occupy the majority of cell population after day 10. To overcome these problems, we employed an adherent serum-free culture in a laminin-coated dish. A γ -secretase inhibitor, DAPT, and a neural inducing factor, FGF8 were included in the medium together with RA to accelerate neurogenesis. The cells were first cultured with RA, FGF8, and DAPT for 2 days, with FGF8 and DAPT for the following 2 days, and with DAPT for the last 2 days. With the new method, P19 cells efficiently differentiated into cells with neurite-like protrusions within 4 days. Western blot analysis demonstrated the expression of neural progenitor and neuron markers 2 and 4 days after the induction, respectively.

4) Analysis of other O-glycosylation

We investigated the expression and roles of glycosyltransferases that are involved in the formation of novel O-glycosylation. We found that the enzyme was highly expressed in the brain, and that its suppression in zebrafish embryos resulted in altered brain development. This indicates that the enzyme is responsible for the normal development of brain.

4. 発表論文

- A. Miyake, S. Nihno, Y. Murakoshi, A. Satsuka, Y. Nakayama, N. Itoh: Neucrin, a novel secreted antagonist of canonical Wnt signaling, plays roles in developing neural tissues in zebrafish. *Mech. Dev.* **128**, 577-590
- I. Kimura, Y. Nakayama, M. Konishi, K. Terasawa, M. Ohta, N. Itoh, M. Fujimoto: Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family members as heme/steroid-binding proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**(7) 687-696
- Y. Nakayama, N. Nakamura, S. Oki, M. Wakabayashi, Y. Ishihama, A. Miyake, N. Itoh, A. Kurosaka: A putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase/Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 (WBSR17) regulates lamellipodium formation and macropinocytosis. *J. Biol. Chem.* **287**(38) 32222-32235
- 中村直介, 黒坂 光: ゼブラフィッシュを用いた筋ジストロフィーに
関係する糖鎖修飾機構の解析 京都産業大学総合学術研究
所所報 7:73-78 2012

5. 著書および総説

- Y. Nakayama, N. Nakamura, D. Tsuji, K. Itoh, A. Kurosaka:
Genetic diseases associated with protein glycosylation
disorders in mammals. *Genetic Disorders, Intech, in press.*

6. 学会発表

- A. Kurosaka, N. Nakamura, Y. Nakayama: Roles of mucin-type
carbohydrates in zebrafish development. The 2012 CU-
KSU-MUSC Joint Seminar in Science & Technology,
Bangkok (Thailand) 2012.3.15-16
- Y. Nakayama, N. Nakamura, A. Kurosaka: Roles of mucin-type
carbohydrates in endocytosis. The 2012 CU-KSU-MUSC
Joint Seminar in Science & Technology, Bangkok (Thailand)
2012.3.15-16
- 中村直介, 中山喜明, 田原聖明, 西村和真, 三宅歩, 伊藤信
行, 黒坂光: ゼブラフィッシュ後脳において WBSR17 が関
わるムチン型糖鎖の機能解. 2012 年度 包括脳ネットワーク
夏のワークショップ, 仙台市, 2012.7.26
- 中山喜明, 中村直介, 黒坂光: GalNAc-T 様遺伝子 WBSR17
はエンドサイトーシス経路を調節する. 第31回日本糖質学会
年会. 鹿児島市. 2012.9.17-20
- A. Kurosaka, N. Nakamura, N. Nakayama: Biological roles of a
brain-specific polypeptide GalNAc-transferase in zebrafish.
The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science
Associations Congress (AFLAS 2012), Bangkok (Thailand)
2012.10.10-12.

T. Kawai, E. Kaneda, N. Nakayama, N. Nakamura, A. Kurosaka: Functional analysis of polypeptide N-acetyl-
galactosaminyltransferase-like 4 and 8 in zebrafish. The 5th
Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations
Congress (AFLAS 2012), Bangkok (Thailand) 2012.10.
10-12.

Y. Nakayama, N. Nakamura, A. Kurosaka: A Putative
Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase/WBSR17
Regulates Cell Adhesion and Endocytic Pathways in
HEK293T cells. American Society for Matrix Biology and
Society for Glycobiology Joint Meeting 2012, San Diego
(USA) 2012.11.11-14

N. Nakamura, Y. Nakayama, A. Miyake, N. Itoh, A. Kurosaka:
Developmental roles of mucin-type glycosylation in zebrafish.
American Society for Matrix Biology and Society
for Glycobiology Joint Meeting 2012, San Diego (USA)
2012.11.11-14

和田あゆみ, 中山喜明, 中村直介, 黒坂光: 単層培養条件下
におけるマウス胚性腫瘍由来 P19 細胞の神経分化誘導. 第
35 回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2012.12.11-14

川合多美子, 青木俊輔, 高橋由衣, 中村直介, 中山喜明, 黒
坂光: ゼブラフィッシュ初期発生におけるポリペプチド N-アセ
チルガラクトサミン転移酵素の機能解析 第 35 回日本分子生
物学会年会, 福岡市, 2012.12.11-14

金田鋭一, 中村直介, 中山喜明, 黒坂光: ゼブラフィッシュにお
ける N-acetylgalactosaminyltransferase-like4 の機能解析. 第
35 回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2012.12.11-14

7. その他特記事項

1) 外部資金

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: H22-24 年 (3 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
GalNAc-T の解析

研究代表者: 中山喜明, 取得年度: H23-24 年 (2 年)

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)

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: H24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: タイ国 Kasetsart 大学を訪問し, 協定締結の打ち合わせを行った.

黒坂 光: 教員免許状更新講習(モデル動物を用いた神経発生遺伝学)を担当した(2012.8.24).

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号館裏にて