

- 1) Ulloa-Aguirre, A. & Michael Conn, P. (2011) *Recent. Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.*, 5, 13–24.
- 2) Schulein, R., Rutz, C., & Rosenthal, W. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 28844–28852.
- 3) Bernier, V., Lagace, M., Bichet, D.G., & Bouvier, M. (2004) *Trends Endocrinol. Metab.*, 15, 222–228.
- 4) Yasuda, D., Okuno, T., Yokomizo, T., Hori, T., Hirota, N., Hashidate, T., Miyano, M., Shimizu, T., & Nakamura, M. (2009) *FASEB J.*, 23, 1470–1481.
- 5) Nakamura, M., Yasuda, D., Hirota, N., & Shimizu, T. (2010) *IUBMB Life*, 62, 453–459.
- 6) Hirota, N., Yasuda, D., Hashidate, T., Yamamoto, T., Yamaguchi, S., Nagamune, T., Nagase, T., Shimizu, T., & Nakamura, M. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 5931–5940.
- 7) VanLeeuwen, D., Steffey, M.E., Donahue, C., Ho, G., & MacKenzie, R.G. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 15935–15940.
- 8) Fan, Z.C. & Tao, Y.X. (2009) *J. Cell Mol. Med.*, 13, 3268–3282.
- 9) Pan, Y., Metzberg, A., Das, S., Jing, B., & Gitschier, J. (1992) *Nat. Genet.*, 2, 103–106.
- 10) Souied, E., Gerber, S., Rozet, J.M., Bonneau, D., Dufier, J.L., Ghazi, I., Philip, N., Soubrane, G., Coscas, G., Munnich, A., & Kaplan, J. (1994) *Hum. Mol. Genet.*, 3, 1433–1434.
- 11) Valverde, P., Healy, E., Sikkink, S., Haldane, F., Thody, A.J., Carothers, A., Jackson, I.J., & Rees, J.L. (1996) *Hum. Mol. Genet.*, 5, 1663–1666.
- 12) Morello, J.P., Salahpour, A., Laperriere, A., Bernier, V., Arthus, M.F., Lonergan, M., Petaja-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D.G., & Bouvier, M. (2000) *J. Clin. Invest.*, 105, 887–895.
- 13) Bernier, V., Morello, J.P., Zarruk, A., Debrand, N., Salahpour, A., Lonergan, M., Arthus, M.F., Laperriere, A., Brouard, R., Bouvier, M., & Bichet, D.G. (2006) *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17, 232–243.
- 14) Janovick, J.A., Goulet, M., Bush, E., Greer, J., Wettlaufer, D. G., & Conn, P.M. (2003) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305, 608–614.
- 15) Newton, C.L., Whay, A.M., McArdle, C.A., Zhang, M., van Koppen, C.J., van de Lagemaat, R., Segaloff, D.L., & Millar, R.P. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 7172–7176.

安田 大恭^{1,2)}, 中村 元直¹⁾

¹⁾東京大学大学院医学系研究科細胞情報学,

²⁾秋田大学大学院医学系研究科生体防御学)

Specific ligands rescue cell-surface expression of ER-retained GPCR

Daisuke Yasuda^{1,2)} and Motono Nakamura¹⁾ (¹⁾The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan, ²⁾Akita University)

神経幹細胞の幹細胞性維持における複合糖質の役割

1. はじめに

神経幹細胞は、高い自己増殖性と分化能を併せ持つ神経系の未分化細胞である^{1,2)}。神経幹細胞は、胎仔期に神経上皮上に発現し自己増殖するとともに、発生の進行に伴い分化した細胞を生み出している。成体の脳においても、神経幹細胞は側脳室外側の脳室下帯や海馬歯状回顆粒層から単離されており、ニューロンの新生などに関与している。神経幹細胞の自己増殖、分化、細胞死などの細胞の運命は、Notch, Wnt, JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), Ras-MAPK (Ras-mitrogen activated protein kinase) 経路などのさまざまな細胞内シグナル伝達経路の活性化を通じて制御されている³⁾。こうしたシグナル伝達経路の活性化は、細胞表層に存在する受容体分子とリガンド分子との相互作用を介して惹起される。脳室下帯や海馬歯状回顆粒層などのように、幹細胞の運命を制御するシグナルを活性化するリガンド分子が豊富に存在する微視的環境は、神経幹細胞ニッチと呼ばれる。

糖鎖修飾は、タンパク質の主要な翻訳後修飾の一つであり、糖タンパク質はプロテオグリカン、糖脂質とともに細胞膜や細胞外マトリックスの主要な構成成分である。近年、こうした複合糖質が幹細胞ニッチに広く存在し、幹細胞の運命を担うシグナル伝達経路の活性化に関与していることが報告されてきている。本稿では、神経幹細胞の幹細胞性の維持や分化過程における糖鎖の機能に関して、我々の最近の研究成果も踏まえて紹介する。

2. 神経幹細胞マーカーとしての複合糖質

脳室下帯などの神経幹細胞ニッチには、幹細胞の幹細胞性の維持や分化が適切に行われるための環境因子として、上皮成長因子 (EGF) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) のようなシグナル分子が豊富に存在している。同様に、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸を発現するプロテオグリカンや GD2, GD3 などの糖脂質、および tenascin-C (TNC), prominin や gp130 などの糖タンパク質などの複合糖質も、幹細胞ニッチに特異的に発現している⁴⁻⁶⁾。多くの場合、神経幹細胞自身がこれら複合糖質を発現しているため、こうした分子はしばしば幹細胞マーカーとして利用

されている。一般的に、神経幹細胞マーカーとして広く用いられている Nestin や Musashi などは細胞内に局在していることから、脳や培養細胞の中から幹細胞を単離するための選択マーカーとしては不向きである。一方、複合糖質は細胞表層にその多くが発現しているため、幹細胞の単離において有用である。これまでに表 1 に示すように、糖脂質、糖タンパク質、プロテオグリカンなどさまざまな複合糖質もしくはその糖鎖部分が神経幹細胞に発現していることが報告されている。たとえば、SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1)/LewisX は、F9 胎生がん細胞の抗原として見いだされ、神経幹細胞のみならず、古くからさまざまな未分化細胞のマーカーとして広く用いられてきている^{7,8)}。後述するように、こうした幹細胞マーカーの多くは、神経幹細胞を特徴づける顔となっているばかりでなく、さまざまなシグナル伝達経路を制御することで、積極的に幹細胞の運命を制御しているという報告がされてきている。

3. 細胞表層に存在する糖鎖によるシグナル伝達経路の活性化の制御

神経幹細胞に発現している複合糖質は、それぞれ発現部位やその構造上の特徴を生かし、異なるメカニズムで各々シグナル伝達経路の活性化に関与している (図 1)。

1) 糖脂質糖鎖

糖脂質は、細胞膜を構成する主要な構成成分であり、脳の発生に伴いその発現パターンが大きく変化することが知られている⁹⁾。神経幹細胞においても表 1 に示した特異的なスフィンゴ糖脂質が発現している⁴⁾。たとえば、神経幹細胞や神経前駆細胞において GD3 をはじめとするスフィンゴ糖脂質は、種々の成長因子受容体などシグナル伝達を担う受容体分子が存在するマイクロドメイン上に濃縮されて存在している。こうしたマイクロドメインは、integrin や gp130 を介したシグナル伝達経路の活性化に必須であり、神経幹細胞性の維持に関与している¹⁰⁾。さらに、スフィンゴ糖脂質の合成阻害剤を添加すると、Ras-MAPK 経

表 1

複合糖質	論 文
糖脂質	
GD3	Glycobiology, 20, 78-86 (2010)
GQ1b	Genes Cells, 9, 801-809 (2004)
GT1b	Genes Cells, 9, 801-809 (2004)
SSEA-1/LewisX	J. Neurochem., 95, 1311-1320 (2005)
プロテオグリカン	
phosphacan	J. Biol. Chem., 281, 5982-5991 (2006)
glypican-4	Dev. Dyn., 219, 353-367 (2000)
グリコサミノグリカン鎖	
コンドロイチン硫酸	J. Biol. Chem., 281, 5982-5991 (2006)
ヘパラン硫酸	Dev. Dyn., 219, 353-367 (2000)
糖タンパク質	
prominin-I (CD133)	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 14720-14725 (2005)
tenascin-C	Development, 131, 3423-3432 (2004)
cystatin-C	Neuron, 28, 385-397 (2000)
Notch-1	J. Neurosci., 80, 456-466 (2005)
integrin-β1	J. Neurosci., 80, 456-466 (2005)
Thy-1	J. Neurosci., 80, 456-466 (2005)
EGF 受容体	Dev. Biol., 284, 112-125 (2005)
CD24a	Nature, 412, 736-739 (2001)
gp130	J. Neurosci., 21, 7642-7653 (2001)
糖タンパク質糖鎖	
SSEA-1/Lewis X	Neuron, 35, 865-875 (2002)
HNK-1	J. Biol. Chem., 285, 37293-37301 (2010)
二本鎖複合型糖鎖	J. Neurochem., 110, 1575-1584 (2009)

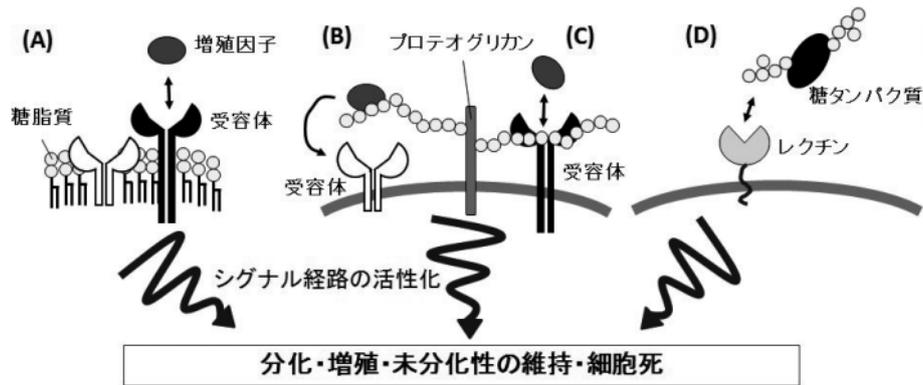


図1 複合糖質によるシグナル伝達経路の活性化

各複合糖質は、(A) 受容体が存在するマイクロドメインを形成する、(B) 増殖因子の非拡散因子として働き、増殖因子を受容体に受け渡す、(C) 増殖因子と受容体と三者複合体を形成する、(D) 細胞外レクチンに認識される、ことを通じて幹細胞性の運命を担うシグナルの発動を制御している。

路の活性化が抑制され、細胞増殖が抑えられる¹¹⁾。こうしたことから、神経幹細胞に特異的に発現している糖脂質は、細胞シグナル伝達を担う受容体が存在するマイクロドメインの形成に関与しており、各シグナル伝達経路の活性化を制御していることが考えられる (図1A)。

2) プロテオグリカン

プロテオグリカンは、神経幹細胞ニッチに豊富に存在している。プロテオグリカン上のグリコサミノグリカン鎖であるヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸などは、硫酸化された2糖の繰り返し配列により構成され、運動性が高く、酸性に富んだ構造を有している。神経幹細胞において、こうしたグリコサミノグリカン鎖の発現を抑制すると、細胞増殖が抑制され、未分化能が維持されることが報告されている^{6,12,13)}。EGF, b-FGF, Wnt等のシグナル伝達経路に関わるリガンド分子は、神経幹細胞の多分化能の維持や細胞増殖において重要な因子である。細胞表面に存在するグリコサミノグリカン鎖は、その構造上の特性を生かし、こうしたリガンド分子と相互作用することで、これら分子の細胞表面の濃度を高める役割を担っている。このように、グリコサミノグリカン鎖はリガンド分子を捕捉し、その後、受容体に受け渡すことで、効率的なシグナル伝達を介助していると考えられている (図1B)。最近では、ポリシアル酸も自身の電荷に富んだ鎖を介してb-FGFと結合することが報告されており¹⁴⁾、神経幹細胞の分化過程においてもポリシアル酸のb-FGFのシグナル伝達経路への関与が示唆される。

一方で、ヘパラン硫酸はb-FGFとFGF受容体と三者複合体を形成することで、b-FGFのFGF受容体への親和性を向上させ、直接的にFGFのシグナル伝達にも関与している (図1C)^{15,16)}。実際に、ヘパラン硫酸合成酵素の一つであるEXT1の神経組織特異的なコンディショナルノックアウトマウスは、FGFシグナルの伝達能の不全により、著しい中枢神経組織の異常を示す¹⁷⁾。

3) 糖タンパク質糖鎖

糖脂質、プロテオグリカン同様に糖タンパク質上の糖鎖も、神経幹細胞の運命を担う重要なシグナル伝達経路の活性化に関与している。たとえば、神経幹細胞が分泌しているcystatin-Cはb-FGFにより誘導される細胞増殖に必要な因子として同定されたが、興味深いことにこのcystatin-C上のN型糖鎖は、この細胞増殖活性に必要な不可欠である¹⁸⁾。このように神経幹細胞において糖タンパク質糖鎖の重要性は報告されつつあるが、神経幹細胞に発現している糖鎖の詳細なプロファイリングは行われていなかった。

我々はこれまでに、神経幹細胞の分化前後において、その発現パターン異なる糖鎖が、積極的に細胞の分化過程や幹細胞性の維持を制御しているとの予想のもと、HPLCマップ法および免疫染色法を用いて糖鎖の発現プロファイリングを行ってきた。その結果、神経幹細胞の分化前後において糖タンパク質糖鎖の発現パターンは大きく異なっていた。特に、未分化の神経幹細胞にLewis X[Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc]¹⁹⁾およびHNK-1[HSO₃-3GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAc-]²⁰⁾を有するN型糖鎖が特異的に発現しているこ

とを見いだした。

ここで明らかにした HNK-1 構造を有する糖鎖は、神経幹細胞の TNC 分子のみに特異的に結合しており、しかもこの糖鎖が、EGF 受容体の発現量を調節することで Ras-MAPK 経路を制御していた。興味深いことに、この TNC タンパク質上の HNK-1 糖鎖は、特定のスプライシングドメイン上のみ発現していた。さらに、分化に伴い TNC 上のこのスプライシングドメインが欠損することで、HNK-1 糖鎖の生合成に関わる糖転移酵素の発現量を変化させることなく HNK-1 糖鎖の発現を制御していることがわかった。

一方、Lewis X 型糖鎖はこれまで SSEA-1 として広く未分化マーカーとして用いられているが、積極的に細胞のシグナル伝達経路を制御しているという報告はなかった。神経幹細胞に発現している Lewis X 型糖鎖は、細胞免疫染色において脱脂処理を行っても大部分残存していることから、主に糖タンパク質上に発現していると考えられていた²¹⁾。我々はプロテオミクス解析により、Lewis X の主要なキャリアータンパク質は TNC と lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1) であることを見いだした^{19,22)}。さらに神経幹細胞における Lewis X 糖鎖の合成を担う *fucoyltransferase 9 (FUT9)* のノックダウン実験を行ったところ、神経幹細胞の Lewis X 糖鎖の発現量が減少し、細胞増殖が抑制されていた。この *FUT9* のノックダウン細胞では、数種類の神経幹細胞マーカータンパク質の遺伝子発現が抑えられており、特に *Musashi-1* の遺伝子発現が顕著に抑制されていた。これまでに *Musashi-1* が Notch シグナルの抑制因子である Numb の翻訳を負に制御し、Notch 経路を活性化していることが報告されている²³⁾。そこで、*FUT9* ノックダウン細胞において、Notch シグナル下流の転写因子の遺伝子発現を調べたところ、その発現が顕著に抑制されていた。以上より、神経幹細胞上の Lewis X 糖鎖は、Notch 経路を活性化することにより、幹細胞性の維持を担っていることが明らかとなった。

このように HNK-1 や Lewis X などの特異的な構造を有する糖タンパク質糖鎖がさまざまなシグナル伝達経路に関与することが明らかになりつつあるが、その詳細な作動機構はまだ明らかになっていない。坂口らによって、糖鎖認識タンパク質の一つである galectin-1 の欠損マウスでは、マウスの脳の脳室下帯の神経幹細胞数が減少しており、galectin-1 が幹細胞性の維持に関与していることが報告されている²⁴⁾。こうしたことから、神経幹細胞膜や細胞外マトリックスには、Lewis X や HNK-1 などの糖鎖を認識す

るレクチンが存在し、これらレクチンと特異的な糖鎖との相互作用を通じて、細胞内シグナルを発信している可能性がある (図 1D)。

4. おわりに

神経幹細胞にはさまざまな複合糖質が発現しており、さらにこれらは積極的に幹細胞の運命をなすシグナル伝達に関与している。こうしたシグナル伝達経路は、各々独自に活性化するのではなく、Notch 経路と Ras-MAPK 経路にみられるように、複数のシグナル伝達経路が互いに影響を及ぼし合うことで、神経幹細胞の複雑な分化機構や幹細胞性維持を制御している²⁵⁾。本稿で述べたように TNC 分子は Ras-MAPK シグナルに関与する HNK-1 糖鎖と Notch シグナルの活性化を担う Lewis X 糖鎖の 2 種類の異なる糖鎖を発現している。こうした分子が神経幹細胞ニッチに存在することで、シグナル伝達経路の間のクロストークを可能にしているのではないかと考えている。

今後、神経幹細胞における糖鎖の役割を正確に理解することにより、複雑な神経幹細胞の維持機構のさらなる解明が進むことが期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究成果の一部は文部科学省・日本学術振興会科学研究費補助金、およびかなえ医薬振興財団 助成金科学研究費補助金による支援を得て行われたものです。ここに謝意を表します。

- 1) McKay, R. (1997) *Science*, 276, 66-71.
- 2) Gage, F.H. (2000) *Science*, 287, 1433-1438.
- 3) Wen, S., Li, H., & Liu, J. (2009) *Cell Adh. Migr.*, 3, 107-117.
- 4) Nakatani, Y., Yanagisawa, M., Suzuki, Y., & Yu, R.K. (2010) *Glycobiology*, 20, 78-86.
- 5) Yanagisawa, M. & Yu, R.K. (2007) *Glycobiology*, 17, 57-74.
- 6) Purushothaman, A., Sugahara, K., & Faissner, A. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 2935-2942.
- 7) Solter, D. & Knowles, B.B. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5565-5569.
- 8) Capela, A. & Temple, S. (2002) *Neuron*, 35, 865-875.
- 9) Yu, R.K., Nakatani, Y., & Yanagisawa, M. (2009) *J. Lipid Res.*, 50, S440-S445.
- 10) Yanagisawa, M., Nakamura, K., & Taga, T. (2004) *Genes Cells*, 9, 801-809.
- 11) Yanagisawa, M., Nakamura, K., & Taga, T. (2005) *J. Biochem.*, 138, 285-291.
- 12) Sirko, S., von Holst, A., Wizenmann, A., Gotz, M., & Faissner, A. (2007) *Development*, 134, 2727-2738.
- 13) von Holst, A., Sirko, S., & Faissner, A. (2006) *J. Neurosci.*, 26, 4082-4094.

- 14) Ono, S., Hane, M., Kitajima, K., & Sato, C. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 3710–3722.
- 15) Goetz, R. & Mohammadi, M. (2013) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 166–180.
- 16) Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., & Ornitz, D. M. (1991) *Cell*, **64**, 841–848.
- 17) Inatani, M., Irie, F., Plump, A.S., Tessier-Lavigne, M., & Yamaguchi, Y. (2003) *Science*, **302**, 1044–1046.
- 18) Taupin, P., Ray, J., Fischer, W.H., Suhr, S.T., Hakansson, K., Grubb, A., & Gage, F.H. (2000) *Neuron*, **28**, 385–397.
- 19) Yagi, H., Saito, T., Yanagisawa, M., Yu, R.K., & Kato, K. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 24356–24364.
- 20) Yagi, H., Yanagisawa, M., Suzuki, Y., Nakatani, Y., Ariga, T., Kato, K., & Yu, R.K. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 37293–37301.
- 21) Yanagisawa, M., Taga, T., Nakamura, K., Ariga, T., & Yu, R. K. (2005) *J. Neurochem.*, **95**, 1311–1320.
- 22) Yagi, H., Yanagisawa, M., Kato, K., & Yu, R.K. (2010) *Glycobiology*, **20**, 976–981.
- 23) Okano, H., Kawahara, H., Toriya, M., Nakao, K., Shibata, S., & Imai, T. (2005) *Exp. Cell Res.*, **306**, 349–356.
- 24) Sakaguchi, M., Shingo, T., Shimazaki, T., Okano, H.J., Shiwa, M., Ishibashi, S., Oguro, H., Ninomiya, M., Kadoya, T., Horie, H., Shibuya, A., Mizusawa, H., Poirier, F., Nakauchi, H., Sawamoto, K., & Okano, H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7112–7117.
- 25) Aguirre, A., Rubio, M.E., & Gallo, V. (2010) *Nature*, **467**, 323–327.

矢木 宏和¹, 加藤 晃一^{1,2,3,4}

¹名古屋市立大学大学院薬学研究科,

²自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター,

³株式会社グライエンス,

⁴お茶の水女子大学糖鎖科学教育研究センター)

Functional roles of glycoconjugates in the maintenance of stemness of neural stem cells

Hirokazu Yagi¹ and Koichi Kato^{1,2,3,4} (¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan, ²Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences, ³GLYENCE Co., Ltd., ⁴The Glycoscience Institute, Ochanomizu University)

脳における SNAP-25 ファミリータンパク質の発現と機能

1. はじめに

脳内ではおびただしい数の神経細胞がシナプスを介した情報伝達を行い、機能的な神経回路を形成している。シナプスでの情報伝達は、シナプス前部から開口放出と呼ばれる機構でシナプス小胞に蓄えられる神経伝達物質が放出され、シナプス後部の受容体に結合することで営まれている¹⁾(図1)。SNAP-25は、シナプスでの開口放出に必須なSNAREタンパク質の一種であり、脳には3種類のアイソフォームが発現しているが、それらの役割の違いについては明らかにはなっていなかった。最近我々はこれら3種類のアイソフォームを識別する抗体の作製に成功し、脳での発現の違いを明らかにすることができた。

2. SNAP-25とは

1) SNAP-25の分子構造

神経伝達物質やホルモンの開口放出に必須なSNAREタンパク質は細胞膜に存在するt-SNAREとシナプス小胞膜に存在するv-SNAREに分けられ、神経のシナプスではVAMP-2がv-SNAREとして、Syntaxin-1とSNAP-25がt-SNAREとして機能している。SNAREタンパク質は分子内にSNAREモチーフを持ち、v-SNAREとt-SNAREがSNARE複合体を作ることによってシナプス小胞膜と細胞膜との融合が引き起こされる。Syntaxin-1とVAMP-2はカルボキシ末端に膜貫通領域を持つ内在性膜タンパク質で、細胞質側にそれぞれ一つのSNAREモチーフを持つ。それに対してSNAP-25は分子中央付近に位置する複数のシステイン残基のパルミトイル化を介して膜につなぎ止められており、その両側に一つずつのSNAREモチーフを持っている。SNARE複合体形成には4本のSNAREヘリックスが必要であり、神経のシナプスではVAMP-2とSyntaxin-1のSNAREモチーフ各一つずつと、SNAP-25が持つ二つのSNAREモチーフが使われる。

2) SNAP-25の多様な機能とアイソフォーム

SNAP-25は開口放出による神経伝達物質やホルモンの放出に関与するが、それ以外にも神経突起の伸長や、開口放出による受容体やイオンチャンネルなどの細胞膜への組