

幹細胞における糖鎖機能の解明 Functional analysis of glycans in stem cells

西原 祥子
Shoko Nishihara

1. 序 論

糖鎖は、細胞表面のタンパク質上に提示され、組織特異的に、また、発生段階特異的に、さらには、各種疾病特異的にその発現が制御されている。CA19-9をはじめとする腫瘍マーカー、各種組織や分化細胞のマーカー、そしてステージ特異的胚性抗原 (SSEA) は、胚性幹細胞 (ES細胞) のマーカーとして使われている。しかし、幹細胞における糖鎖の役割は、明らかではなかった。そこで、我々は、糖鎖を合成する糖転移酵素を主な対象としてマウスES細胞でRNAiスクリーニングを行った。現在までに、マウスES細胞のナイーブな多能性状態を維持するために必要な5種の糖鎖構造、(1) LacdiNAc構造 (GalNAc β 1,4GlcNAc) (Sasaki *et al.*, 2011)、(2) ヘパラン硫酸 (Sasaki *et al.*, 2008, 2009)、(3) デルマタン硫酸 (Ogura and Nishihara, 2021)、(4) O-GlcNAc (Miura *et al.*, 2018; Pecori *et al.*, 2021a)、(5) ムチン型O-結合型糖鎖の1つであるT抗原 (Gal β 1,3GalNAc) (Pecori *et al.*, 2020) を明らかにした。これらの糖鎖は、いずれも、ナイーブな多能性状態の維持に必要な白血病抑制因子 (LIF)、骨形成因子 (BMP)、Wntシグナル、あるいは、分化の出口となる線維芽細胞増殖因子4 (FGF4) シグナルのいずれかに関与、あるいは、未分化性維持に関わる転写因子群の翻訳制御に関与していた。

一方で、これらの糖鎖構造は、ショウジョウバエから哺乳類まで進化的に保存されている糖鎖構造でもあった (Nishihara, 2018)。さらに、我々は、エピプラストへの最初の細胞系譜の決定を*in vitro*で再現するエピプラスト様細胞とES細胞に対し、全グライコム解析と糖転移酵素の発現解析を行った (Pecori *et al.*, 2021b)。全てのタイプの糖鎖構造が発生の初期段階から劇的に変化することが明らかになり、この変化には、ポリコム抑制複合体2による様々な糖転移酵素の発現を同時に制御するネットワークが関与していることを明らかにした。これは、種類の異なる糖転移酵素の発現が一度に制御されることを示した初めての例であった。

ここでは、この中から、本年度、主に行った【1】幹細胞におけるデルマタン硫酸の機能解析、【2】プロテアソーム活性化サブユニット3のO-GlcNAc修飾のマウスES細胞における機能解析、【3】ナイーブなマウスES細胞からプライムなエピプラスト様細胞への遷移におけるポリコム抑制複合体2による糖鎖関連遺伝子の統合的制御の解析について述べる。

2. 幹細胞におけるデルマタン硫酸の機能解析

マウスES細胞は、着床前の胚性3.5日の内部細胞塊から樹立された細胞で、自己複製能と身体を構成する全ての細胞に分化する能力、すなわち多能性を有している。ナイーブなマウスES細胞の未分化状態の維持と分化誘導には、様々なシグナルや増殖因子が寄与しており、そこへの糖鎖、特にグリコサミノグリカンの関与が報告されている (Nishihara, 2018)。

グリコサミノグリカンは、プロテオグリカンのコアタンパク質を除いた糖鎖部分の総称で、代表的なものには、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸 (DS)、ケラタン硫酸があり、細胞表面や細胞外マトリックスに存在する。ケラタン硫酸は、ES細胞のマーカーとして用いられており、ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸は、未分化状態の維持や分化に必要であることが、我々を含めたいくつかのグループから報告されていた。しかし、これまで、マウスES細胞を含む幹細胞におけるDSの機能は不明であった。このため、ES細胞 (Ogura and Nishihara, 2021) と神経幹細胞 (Ogura *et al.*, 2021) におけるDSの機能解析を行った。

2.1. Dermatan 4-sulfotransferase 1のマウスES細胞における未分化性維持への寄与

はじめに、DSの生合成経路でのみ働く硫酸転移酵素 Dermatan 4-sulfotransferase 1 (D4ST1)をとりあげ、マウスES細胞において、D4ST1をノックダウン、あるいは、過剰発現させて、その影響を検討した (Ogura and Nishihara, 2021)。自己複製能はアルカリフォスファターゼ染色、未分化性維持やそれに関わるシグナルに関しては、リアルタイムPCR解析による未分化性維持転写因子の発現やシグナルのターゲット遺伝子の発現の解析、ウエスタンブロットによる各種シグナル構成因子のリン酸化の解析を行った。

マウスES細胞でDSの生合成に関わるD4ST1をノックダウンすると、自己複製能が低下した。同時に、Oct3/4、Nanog、Sox2などの未分化性維持転写因子の発現も低下し、DSが未分化性維持に関わっていることが分かった。逆に、D4ST1を過剰発現させると自己複製能が増すことも明らかになった。さらに、ノックダウン細胞では、未分化性維持に働くBMPシグナルが低下しており、DSはBMPシグナルを制御して未分化性維持に機能していると考えられた。また、Wntシグナルの過剰な伝達を防いでいることも分かった。これらの事実から、DSがマウスES細胞の未分化性維持に機能していることが明らかになった。

2.2. 幹細胞からの神経分化におけるデルマタン硫酸の機能

幹細胞から神経への分化に関しては、マウスES細胞からの分化系と神経幹細胞からの分化系に精製したDSを加え、リアルタイムPCR解析による各種神経分化マーカーの発現や神経突起の伸長から、その効果を判定した (Ogura *et al.*, 2021)。

マウス胚性幹細胞からの神経分化系では、神経分化に従い、DSとDS合成に関わる4種の酵素がすべて増加しており、DSの神経分化における機能の存在が示唆された。分化系に精製したDSを加えたところ、神経分化マーカーの亢進と神経突起の伸長の促進が観察され、DSが神経分化を促進することが分かった。さらに、ヒト神経幹細胞からの神経分化においても、神経分化マーカーの亢進と細胞遊走の促進がみとめられ、DSが神経分化を促進することが分かった。これらの事実により、DSを用いたより効果的な神経分化系の構築が可能となった。

3. プロテアソーム活性化サブユニット3のO-GlcNAc修飾のマウスES細胞における機能解析

RNA顆粒の一種であるP-ボディ (図1)は、膜のない細胞質オルガネラで幹細胞のアイデンティティを調節している (Di Stefano *et al.*, 2019)。液-液相分離によって生じ、その形成には、RNAヘリカーゼであるDEADボックスポリペプチド6 (DDX6)が必要である。一方、プロテアソーム活性化サブユニット3 (PSME3) (図1)は、19S制御ユニットの代わりに20Sプロテアソーム触媒ユニットに会合することができ、ユビキチンやATPに依存しない方法で標的の分解を促進する。カハール体や核スペクルなど、液-液相分離によって形成される膜のない細胞質オルガネラの恒常性を調節していることが報告されていた (Baldin *et al.*, 2008)。また、細胞質にある唯一の糖鎖修飾であるO-GlcNAcの幹細胞における機能も、PKC ζ のリン酸化を阻害して分化への出口となるFGF4シグナルを抑制していることなど (Miura *et al.*, 2018)、我々を含む幾つかのグループにより、複数の機能が明らかになってきていた。しかし、これら三者の関連は予想もされていなかった。本項目の成果は、P-ボディの生物学、多能性ネットワークにおけるプロテアソームと糖鎖修飾O-GlcNAcの役割に

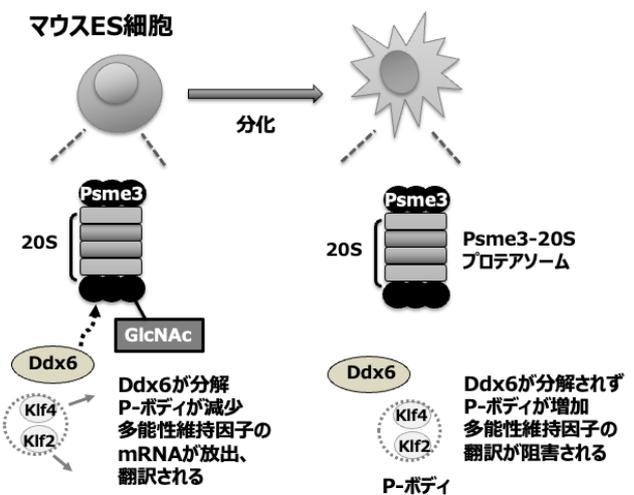


図1：マウスES細胞における、O-GlcNAc修飾・プロテアソーム・液-液相分離 (P-ボディ) の3者の連携による多能性維持機構

能も、PKC ζ のリン酸化を阻害して分化への出口となるFGF4シグナルを抑制していることなど (Miura *et al.*, 2018)、我々を含む幾つかのグループにより、複数の機能が明らかになってきていた。しかし、これら三者の関連は予想もされていなかった。本項目の成果は、P-ボディの生物学、多能性ネットワークにおけるプロテアソームと糖鎖修飾O-GlcNAcの役割に

関連する新たな知見を提供し、発生生物学、幹細胞生物学の基盤形成に寄与するものである。

はじめに、共同研究者の山本らが開発した高感度なO-GlcNAc修飾検出法により、マウスES細胞とそこから誘導したエピプラスト様細胞において、O-GlcNAc化されているタンパク質を広範に検出した (Pecori *et al.*, 2021a)。興味深いことに、マウスES細胞と少し分化が進んでいるが多能性は保持しているエピプラスト様細胞では、O-GlcNAc化されているタンパク質のパターンが異なっていた。O-GlcNAcによるプロテアソームの制御とES細胞の多能性ネットワークの関連が不明であったため、検出されたタンパク質から、Psme3を選択し解析を進めた。Psme3は、多能性を維持している両細胞においてO-GlcNAc修飾を受けていた。

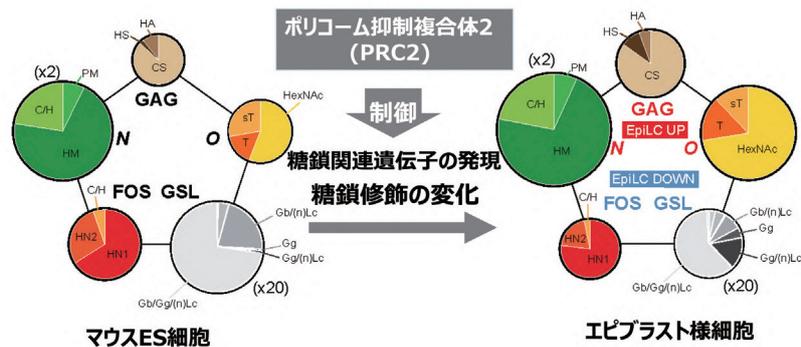
Psme3とFLAGの融合タンパク質を発現させ、免疫沈降と質量分析によりPsme3と相互作用しているタンパク質を解析したところ、P-ボディのアセンブリに必要なDdx6とDdx6と相互作用することが報告されているGrbp2、Fxr1、Rpl7などが検出され、Psme3のP-ボディへの関与が推察された (Pecori *et al.*, 2021a)。実際、Psme3を過剰発現させるとDdx6は分解され、P-ボディが減少した。質量分析と免疫沈降により、Psme3のSer111がO-GlcNAc修飾されていることが分かったので、Ser111をAlaに置換してO-GlcNAc修飾されないようにした変異体と野生型のPsme3をES細胞に発現させて、解析を行った。変異体では、O-GlcNAc修飾が減少してDdx6との相互作用も顕著に減少し、Psme3のSer111のO-GlcNAc修飾が、Ddx6との相互作用とそれに続く分解を制御していることが分かった。また、変異体を過剰発現させたES細胞では、Ddx6の分解が抑えられてP-ボディが増加し、Klf4やKlf2などの多能性コア転写因子のタンパク質レベルが低下して多能性状態から抜け出し、分化に向かっていった。これらの事実から、Psme3のSer111のO-GlcNAc化が、Pボディの恒常性の制御を介してES細胞の多能性を調節するスイッチとして働いていることが明らかになった (Pecori *et al.*, 2021a)。

4. ナイーブなマウスES細胞からプライムなエピプラスト様細胞への遷移におけるポリコム抑制複合体2による糖鎖関連遺伝子の統合的制御の解析

4.1. マウスES細胞とエピプラスト様細胞における全グライコーム解析

マウスES細胞は、E3.5-E4.5の着床前胚に由来し、マウスES細胞から*in vitro*で分化誘導できるエピプラスト様細胞は、E5.5-E6.5の着床後胚に類似している。マウスES細胞とマウスエピプラスト様細胞は、それぞれナイーブ状態とプライム状態という2つの異なる多能性状態を反映しており、着床に伴う多能性状態の遷移を調べるための*in vitro*の有用なモデルとなる (Pecori and Nishihara, 2021)。

マウスES細胞とマウスエピ



糖鎖関連遺伝子の43%がPRC2で制御されている：赤の領域

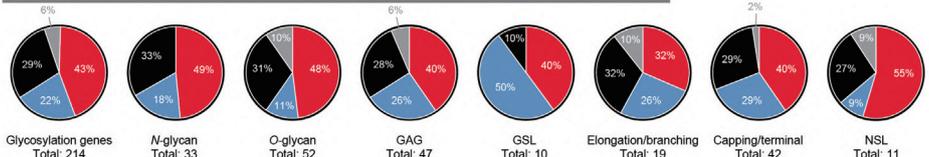


図2：マウスES細胞とエピプラスト様細胞における全糖鎖構造の変化とポリコム抑制複合体2 (PRC2)による糖鎖関連遺伝子の統合的な制御
N, N-結合型糖鎖; O, O-結合型糖鎖; GAG, グリコサミノグリカン; GSL, 糖脂質; FOD, 遊離オリゴ糖。

ラスト様細胞の全糖鎖構造解析を行い、N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖、グリコサミノグリカン、糖脂質、遊離オリゴ糖など、全てのタイプの糖鎖に属する糖鎖構造の絶対量を決定した (Pecori *et al.*, 2021b)。また、全糖鎖構造解析と同じサンプルで全ての糖転移酵素の発現量を定量的に解析した。全てのタイプの糖鎖修飾は、発生の初期段階から、糖転移酵素

の転写レベルと糖鎖構造レベルの両方で劇的に変化していた(図2)。従来報告されているものに加えて、両細胞の各々に特徴的な糖鎖構造が、全てのタイプの糖鎖で新規に見出されており、これらはナイーブ状態とプライム状態の2つの多能性状態を区別するための新規マーカーになると考えられた。また、マウスES細胞とマウスエピプラスト様細胞の両者は、他の細胞株(ヒトES細胞や正常あるいは癌の体細胞株など)に比較して、特徴的な全糖鎖構造のプロファイルを示し、他のタイプの糖鎖より大量に糖脂質が発現していた(図2)。また、マウスES細胞からエピプラスト様細胞への遷移では、糖脂質と遊離オリゴ糖の発現は減少したが、N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖、グリコサミノグリカンは増加した。

4.2. マウスES細胞からエピプラスト様細胞への遷移におけるポリコーム抑制複合体2による糖鎖関連遺伝子の

統合的制御の解析

ポリコーム抑制複合体2 (PRC2) は、ヒストンH3リジン27 (H3K27me3) をトリメチル化し、遺伝子の発現を抑制する (Deevy and Bracken, 2021)。我々は、PRC2が、マウスES細胞からエピプラスト様細胞への遷移に伴って引き起こされる劇的な糖鎖構造の変化をトータルに調整するネットワークの中心となっていることを明らかにした。

はじめに、ChIP-Atlasの包括的なデータベース (<https://chip-atlas.org>) (Oki *et al.*, 2018) を用いて、これまでに公開されているマウスES細胞のクロマチン免疫沈降-シーケンス (ChIP-seq) データセットを詳細に解析し、糖転移酵素などの糖鎖関連遺伝子のプロモーター領域で濃縮されている因子を検索した。マウスES細胞において、PRC2複合体が、すべてのタイプの糖鎖修飾にわたる様々な糖鎖関連遺伝子のプロモーター領域に濃縮されていることを見出し、H3K27me3修飾を顕著に減少させるPRC2阻害剤EED226を用いて、それを確認した (Pecori *et al.*, 2021b)。

マウスES細胞からエピプラスト様細胞への遷移とEED226処理前後のマウスES細胞でフローサイトメーターにより糖鎖構造の変化を比較したところ、エピプラスト様細胞への遷移とEED226処理前後において、多くの構造が同様な変化を示し、遷移におけるPRC2の直接的な関与が考えられた。さらに、マウスES細胞とエピプラスト様細胞、および、EED226処理前後における糖転移酵素などの糖鎖関連遺伝子の発現の違いをRNA-seqで比較した。遺伝子の43%がエピプラスト様細胞とEED226処理マウスES細胞で、同様な発現変化を示し、PRC2による制御を受けていることが分かった(図2)。これらの結果は、発生初期におけるPRC2による「全糖鎖修飾の変化をトータルに制御するネットワーク」の存在を示していた。

5. まとめと展望

上述のように、幹細胞表面にある様々なタイプの糖鎖は、細胞外からの主要なシグナルの受容を制御して、幹細胞の多能性維持や分化に関与している。さらに、細胞内の唯一の糖鎖修飾であるO-GlcNAcは、下流のシグナル伝達分子のリン酸化を制御するばかりでなく、プロテアソーム活性化サブユニット、Psmc3のO-GlcNAc修飾を介してRNA顆粒の安定性を制御し、そこに含まれているKlf4やKlf2などの多能性コア転写因子mRNAのタンパク質への翻訳を調節していることも明らかになった。この成果は、液-液相分離によるmRNAの翻訳調節と多能性ネットワークにおけるプロテアソーム、糖鎖修飾O-GlcNAcの新規な関連を明らかにしたものであり、生化学、幹細胞生物学、発生生物学の基盤形成に寄与する。

さらには、発生初期におけるポリコーム抑制複合体、PRC2による様々な糖転移酵素の発現を同時に制御するネットワークの存在、すなわち、発生初期にそれぞれ異なるタイプの糖鎖構造が一度に変化するメカニズムを初めて明らかにした。この様な異なるタイプの糖鎖構造の同調した変化は、様々な組織の分化形成過程や癌などの疾病に至る過程でも見いだされる可能性があり、今後、糖鎖機能を統合的に調節されたものとしてとらえていく必要があることを示した。

6. 謝辞

ここに記述した研究の成果の一部は、科学研究費補助金18K06139、厚生労働科学研究費補助金20ek0109446h001、創価大学学内研究費によって行われた。

7. 引用文献

- Baldin V, Militello M, Thomas Y, Doucet C, Fic W, Boireau S, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M, Bertrand E, Tazi J, Coux O. A novel role for PA28gamma-proteasome in nuclear speckle organization and SR protein trafficking. *Mol Biol Cell*. 2008 Apr;19(4):1706-16. doi: 10.1091/mbc.e07-07-0637. Epub 2008 Feb 6. PMID: 18256291
- Deevy O, Bracken AP. PRC2 functions in development and congenital disorders. *Development*. 2019 Oct 1;146(19):dev181354. doi: 10.1242/dev.181354. PMID: 31575610
- Di Stefano B, Luo EC, Haggerty C, Aigner S, Charlton J, Brumbaugh J, Ji F, Rabano Jiménez I, Clowers KJ, Huebner AJ, Clement K, Lipchina I, de Kort MAC, Anselmo A, Pulice J, Gerli MFM, Gu H, Gygi SP, Sadreyev RI, Meissner A, Yeo GW, Hochedlinger K. The RNA helicase DDX6 controls cellular plasticity by modulating P-body homeostasis. *Cell Stem Cell*. 2019 Nov 7;25(5):622-638.e13. doi: 10.1016/j.stem.2019.08.018. Epub 2019 Oct 3. PMID: 31588046
- Miura T, Kume M, Kawamura T, Yamamoto K, Hamakubo T, Nishihara S. O-GlcNAc on PKC ζ Inhibits the FGF4-PKC ζ -MEK-ERK1/2 Pathway via inhibition of PKC ζ phosphorylation in mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Reports*. 2018 Jan 9;10(1):272-286. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.007. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29249667 Free PMC article.
- Nishihara S. Glycans in stem cell regulation: from *Drosophila* tissue stem cells to mammalian pluripotent stem cells. *FEBS Lett*. 2018 Dec;592(23):3773-3790. doi: 10.1002/1873-3468.13167. Epub 2018 Jul 3. PMID: 29924384
- Ogura C, Nishihara S. Dermatan-4-O-sulfotransferase-1 contributes to the undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Sep 23;9:733964. doi: 10.3389/fcell.2021.733964. eCollection 2021. PMID: 34631712
- Ogura C, Hirano K, Mizumoto S, Yamada S, Nishihara S. Dermatan sulphate promotes neuronal differentiation in mouse and human stem cells. *J Biochem*. 2021 Feb 6;169(1):55-64. doi: 10.1093/jb/mvaa087. PMID: 32730567
- Oki S, Ohta T, Shioi G, Hatanaka H, Ogasawara O, Okuda Y, Kawaji H, Nakaki R, Sese J, Meno C. ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data. *EMBO Rep*. 2018 Dec;19(12):e46255. doi: 10.15252/embr.201846255. PMID: 30413482
- Pecori F, Akimoto Y, Hanamatsu H, Furukawa JI, Shinohara Y, Ikehara Y, Nishihara S. Mucin-type O-glycosylation controls pluripotency in mouse embryonic stem cells via Wnt receptor endocytosis. *J Cell Sci*. 2020 Oct 23;133(20):jcs245845. doi: 10.1242/jcs.245845. PMID: 32973111
- Pecori F, Kondo N, Ogura C, Miura T, Kume M, Minamijima Y, Yamamoto K, Nishihara S. Site-specific O-GlcNAcylation of Psme3 maintains mouse stem cell pluripotency by impairing P-body homeostasis. *Cell Rep*. 2021a Jul 13;36(2):109361. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109361. PMID: 34260942
- Pecori F, Nishihara S. Transient induction and characterization of mouse epiblast-like cells from mouse

embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2021 May 5. doi: 10.1007/7651_2021_403. Online ahead of print. PMID: 33945143

Pecori F, Yokota I, Hanamatsu H, Miura T, Ogura C, Ota H, Furukawa JI, Oki S, Yamamoto K, Yoshie O, Nishihara S. A defined glycosylation regulatory network modulates total glycome dynamics during pluripotency state transition. *Sci Rep.* 2021b Jan 14;11(1):1276. doi: 10.1038/s41598-020-79666-4. PMID: 33446700

Sasaki N, Okishio K, Ui-Tei K, Saigo K, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Nishimura T, Suda Y, Hayasaka M, Hanaoka K, Hitoshi S, Ikenaka K, Nishihara S. Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2008 Feb 8;283(6):3594-3606. doi: 10.1074/jbc.M705621200. Epub 2007 Nov 16. PMID: 18024963

Sasaki N, Hirano T, Ichimiya T, Wakao M, Hirano K, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Suda Y, Nishihara S. The 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters, PAPST1 and 2, contribute to the maintenance and differentiation of mouse embryonic stem cells. *PLoS One.* 2009 Dec 11;4(12):e8262. doi: 10.1371/journal.pone.0008262. PMID: 20011239.

Sasaki N, Shinomi M, Hirano K, Ui-Tei K, Nishihara S. LacdiNAc (GalNAc β 1-4GlcNAc) contributes to self-renewal of mouse embryonic stem cells by regulating leukemia inhibitory factor/STAT3 signaling. *Stem Cells.* 2011 Apr;29(4):641-50. doi: 10.1002/stem.615. PMID: 21305673