

平成 18 年度 学術創成研究費 研究進捗状況報告書（中間評価用）

平成 18 年 3 月 31 日現在

ふりがな	おか しょうご		②所属研究機関・ 部局・職	京都大学・薬学研究科・助教授				
①研究代表者 氏名	岡 昌吾							
③研究課題名 (英訳名)	糖鎖生物学と神経科学の融合による神経糖鎖生物学領域の創成 (Establishment of Neuroglycobiology (Glycobiological Approach for Neuroscience))							
④研究経費 (千円未満切捨) 平成 16,17 年度使用内訳 は支出額、平成 18 年度以 降の交付額は内約額、使 用内訳は支出予定額を記 入	年度	研究経費 (千円)		使用内訳 (千円) <平成 18 年度以降は支出予定額>				
		交付額	支出額	設備備品費	消耗品費	旅費	謝金等	その他
	平成 16 年度	83,000	83,000	20,343	55,546	1,549	285	5,277
	平成 17 年度	80,400	80,400	23,983	37,921	861	10,340	7,295
	平成 18 年度	78,000	—	24,000	30,000	3,000	13,000	8,000
	平成 19 年度	77,500	—	20,000	32,500	4,000	13,000	8,000
	平成 20 年度	78,000	—	20,000	33,000	4,000	13,000	8,000
	総計							
⑤研究組織 (研究代表者及び研究分担者)								
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)					
岡 昌吾	京都大学・薬学研究科・ 助教授	糖鎖生物学	神経発生、神経機能維持に関わる糖鎖の発見とその機能解析					
伊藤信行	京都大学・薬学研究科・ 教授	発生生物学	遺伝子欠損マウスの作製とその解析					
馬 永	京都大学・薬学研究科・ 助手	生化学	糖鎖の発現調節機構と糖鎖認識分子の解析					
小堤保則	京都大学・生命科学研 究科・教授	分子生物学	DNA マイクロアレイを用いた糖鎖遺伝子の解析					
木下政人	京都大学・農学研究科・ 助手	発生工学	トランスジェニックメダカ作製とその解析					
川崎ナナ	国立医薬品食品衛生研 究所・生物薬品部・室長	質量分析学	質量分析によるグライコプロテオーム解析					
石 龍徳	順天堂大学・医学部・ 講師	神経解剖学	糖鎖機能の神経解剖学的解析					
計 7 名								

⑥当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)

ヒトゲノムの解読が終了し、ポストゲノムの時代を迎え、翻訳後修飾としての糖鎖に関する研究の重要性が増している。ヒトでは遺伝子にコードされているタンパク質の半数以上が糖鎖修飾をうけた糖タンパク質として機能していると考えられている。最近の研究によって糖鎖が様々な生物現象に深く関与していることが示されるに伴い、核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命情報鎖としての糖鎖に内在されている情報の解読が期待されている。すなわち、生体に存在する糖タンパク質は、たとえ同一タンパク質であっても発現している組織や細胞によって異なる構造の糖鎖を持つ。また、同一細胞であっても発生過程や外界からの刺激に応じて同一タンパク質の糖鎖構造が大きく変化する。研究代表者らは神経系に特徴的に発現する糖鎖 (HNK-1 糖鎖やポリシアル酸) の機能を解析する過程で、糖鎖の違いによりタンパク質自身の機能が大きく変化することや、糖鎖発現がタンパク質とは独立に時間的にも (発生過程)、空間的にも (脳の領域)、厳密に制御されていることを明らかにしてきた。このことから、生物はタンパク質だけでなく糖鎖にもその生物情報を書き込み、同一タンパク質に多様な機能を付加していると考えられる。本研究では HNK-1 糖鎖やポリシアル酸など神経系に特徴的に発現する糖鎖に書き込まれた情報の解読をめざすとともに、神経発生や神経回路形成に重要な糖鎖を新たに見だし、糖鎖を含めた糖タンパク質としての機能解析を通して、神経発生の原理や神経機能維持機構の総合的理解をめざすことを目的としている。

⑦これまでの研究経過

1. 本研究は、学術創成研究費の趣旨の3つの観点のうち、どの観点に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。

本研究は糖鎖研究を基盤に、神経科学研究分野に糖鎖という新しい視点を導入し、糖鎖生物学と神経科学との融合をはかり、神経発生の原理や神経機能維持機構の総合的理解をめざすものであり、「創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究」に主眼を置いた研究である。

2. 研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。

研究代表者の岡らは神経可塑性や学習記憶に重要な役割を担う HNK-1 糖鎖に関してその生合成調節機構、遺伝子欠損マウスの作成とその解析などにより糖鎖情報の解読を進めている。研究分担者の石らは成体脳で発現するポリシアル酸に着目し、神経細胞再生過程における糖鎖の役割の解析を行っている。研究分担者の川崎らは、神経系で重要な機能を持つ細胞接着分子について部位特異的な糖鎖の構造解析法および質量分析による糖鎖の定量的解析法を確立した。現在この方法を利用し、神経発生過程で変化する糖鎖についてメダカをモデル動物として解析している (川崎、岡)。神経発生過程における糖鎖の機能解析についてはメダカやゼブラフィッシュなどの小型魚類を用いた糖鎖関連遺伝子のノックダウン実験が進行し、神経系を含む胚体の形成異常が観察されるものが得られている (岡、伊藤、木下)。また神経発生過程における糖鎖の役割を明確にするため蛍光で神経細胞を可視化するためのトランスジェニックメダカの作成を試みている (木下)。糖鎖を認識し結合するタンパク質を用いた解析や糖鎖遺伝子を中心とした DNA チップを用いた研究も同時に進行している (馬、小堤)。以下にその具体的な進行状況を述べる。

HNK-1 糖鎖に関する研究

1) HNK-1 糖鎖生合成に関与する2種のグルクロン酸転移酵素の N 末端から膜貫通領域までをプロテイン A タンパク質に置換した分泌型酵素を動物細胞に発現させ、酵素学的性質を検討した。その結果、両酵素ともに細胞膜上のリン脂質によりその活性が制御され、その基質認識を変化させる非常に興味深い酵素であることがわかった。また GlcAT-P が糖鎖の末端構造を厳密に認識するのに対し、GlcAT-S はより広い基質特異性を持つことや N 型糖鎖の中でも 3 本鎖に高い特異性を持つことがわかった。

2) 大腸菌を用いた GlcAT-P 及び GlcAT-S の大量発現系を確立し、この組み換えタンパク質を用いて X 線結晶構造解析に成功した。両酵素はいずれも 2 量体を形成していることや基質認識に関わるアミノ酸残基を明らかにした。さらに、結晶構造解析により得られた情報を基に GlcAT-P と GlcAT-S の基質認識に重要なアミノ酸を部位特異的な変異により入れ替えたところ基質特異性が変化することを明らかにした。

3) 神経系において HNK-1 糖鎖は硫酸化グルクロン酸として糖鎖の末端に存在している。硫酸化されていない HNK-1 糖鎖が腎臓で発現していることを見出し、研究分担者の川崎らと共同でその糖鎖構造を多段階質量分析により明らかにした。

4) グルクロン酸転移酵素と硫酸基転移酵素が細胞内で複合体を形成し、効率のよい HNK-1 糖鎖合成に関与していることを研究分担者の小堤らと共同で明らかにした。

⑦これまでの研究経過 つづき

5) GlcAT-P 遺伝子欠損マウスの解析の結果、海馬 CA1 領域の長期増強 (LTP) の減弱が観察された。その機構を解明するため、海馬の初代神経細胞培養を用い解析したところ、神経突起上の AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2 の発現部位に差が見られることがわかった。

6) GlcAT-S 遺伝子欠損マウスの作成に成功した。その解析の結果、脳内には GlcAT-P、GlcAT-S のどちらの酵素もその合成に関与しない HNK-1 糖鎖が存在することが示唆された。

ポリシアル酸に関する研究

神経科学では、100 年以上「成体の脳ではニューロンは新生されない」という考えが常識であった。しかし、近年このドグマは崩れ、成体の脳でも海馬や嗅球では、ニューロンが新生されていることが現在注目を浴びている。研究分担者の石らは神経細胞接着分子 (NCAM) に結合している糖鎖ポリシアル酸 (PSA, polysialic acid) 分子が、成体の海馬で新生しているニューロンに特異的に発現していることを発見し、成体ラット海馬のニューロン新生機構を解剖学的に解析した。その結果、成体海馬歯状回内側の増殖性神経前駆細胞から分化した PSA 陽性ニューロblastは、水平な突起を伸ばしながら移動した後、水平な突起を基底側に残しながら (基底樹状突起)、垂直な突起を伸長することが明らかになった。その後、垂直な突起は樹状突起に発達し、基底樹状突起は退縮した。さらに、ヒトてんかん患者 (硬化を伴う) の海馬を調べたところ、基底樹状突起を多数持った異常な PSA 陽性細胞が検出された。ラットの正常発達過程の結果から考えて、この異常な基底樹状突起は、正常な発生過程で見られる基底樹状突起が残存、発達したものであることが推測された。従って、NCAM の糖鎖である PSA は正常な発生過程を解析する分子マーカーとして有用であるばかりでなく、ヒトの病態を解析する上でも有用であることが明らかになった。

質量分析による糖タンパク質上の部位特異的糖鎖構造解析

NCAM を代表とするイムノグロブリン (Ig) スーパーファミリーに属する一群の細胞接着分子はカルシウム非依存的な細胞間相互認識に関わる分子であり神経回路の形成や維持に重要な役割を担うことや上記の HNK-1 糖鎖やポリシアル酸が発現していることが知られている。しかし、その詳細な糖鎖構造が明らかにされた例は少ない。そこで、SDS-PAGE と液体クロマトグラフィー多段階質量分析法 (LC/MSⁿ) を用いた糖タンパク質の部位特異的糖鎖構造解析法を開発し、GPI アンカー型 Ig スーパーファミリータンパク質の部位特異的糖鎖構造解析を行った。その結果 Thy-1 分子上の、Asn23 及び 98 には高マンノース型糖鎖、混成型、及び 2 本鎖を中心とした複合型糖鎖、また Asn74 にはフコシル複合型糖鎖が主に結合していることを明らかにした。さらに、LAMP、OBCAM、NTM、及び kilon についても部位特異的糖鎖構造を明らかにすることに成功した。この 4 つのタンパク質の糖鎖付加は類似しており、N 末側には共通して高マンノース型糖鎖、また、C 末側にはレイス型糖鎖が集中して結合していることが明らかになった。

DNA マイクロアレイを用いた解析

従来型の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析の手法では、十分に候補遺伝子を絞りきれないことが多いため新たな解析方法を考案した。この方法は表現形のパターンと遺伝子発現のパターンを比較し相関係数を計算することで、優先順位を付けて候補遺伝子を示すことができる。この方法を用いて、糖脂質の一種で、病原性大腸菌 0157 のペロ毒素のリセプターであるグロボトリアオシルセラミド (以下 Gb3Cer) の発現を解析したところ、この糖鎖構造に関与する α 4GALT 遺伝子と LacCer 合成酵素遺伝子の双方が高い確率で候補遺伝子として示され、新しい解析方法が有用であることが明らかになった。次にマウス胚中心のマーカーである GL7 の未知のエピトープをこの方法で解析したところ ST6GAL1 遺伝子が最有力の候補として示され、最終的に 5 位の水酸基を含まないシアル酸から成る Sia α 2-6Gal 構造がエピトープであることが分かった。

メダカを用いた神経発生過程における糖鎖機能解析

メダカ発生過程で大きく変動する糖鎖については 2 次元マップ法および質量分析を用いて解析し、複合型糖鎖が増加することが明らかになった。またメダカにおいても HNK-1 糖鎖が神経発生初期から発現していることが明らかとなったのでその合成酵素のクローニングを行い、モルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた実験の結果、GlcAT-P 遺伝子ノックダウンにより頭部の形成に異常が観察された。

神経系を可視化するためのトランスジェニックメダカに関しては、肝臓で緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を発現するように設計された遺伝子コンストラクトを持つトランスジェニックメダカの中に、予想に反して嗅球、嗅上皮、網膜などの神経細胞に GFP を発現する系統が得られた。この系統では、神経細胞で発現誘導させるためのエンハンサーの近傍に GFP 遺伝子が組み込まれたと考えられる。そこで、ゲノム DNA を抽出し、F o s m i d ライブラリーを構築し、G F P 遺伝子配列をプローブとしてスクリーニングを行った。その結果、導入遺伝子は、メダカゲノムの Scaffolds45 に挿入されていることが明らかとなった。更に、この Scaffolds45 を解析したところ、導入遺伝子の近傍には、シグナル伝達に関与するグアニルシンシラーゼのホモログが存在し、このホモログのエンハンサーが GFP 遺伝子に影響を及ぼしているのではないかと推測された。

⑧特記事項

これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。

- 1) HNK-1 糖鎖合成に関与するグルクロン酸転移酵素活性が膜リン脂質で制御されていることが明らかとなった。この結果は糖鎖の発現が糖鎖生合成に関与する糖転移酵素の発現量だけではなく、糖転移酵素の存在する生体膜上の微細環境の変化によっても制御されている可能性を示すものであり、生体における糖鎖発現調節機構を考える上において重要な知見である。
- 2) HNK-1 糖鎖生合成に関わるグルクロン酸転移酵素 GlcAT-P と GlcAT-S の X 線結晶構造解析に成功し、両酵素の基質認識の機構を明らかにした。またマウス脳における GlcAT-P と GlcAT-S の発現分布を比較し異なる領域に発現していることがわかった。これらの結果から GlcAT-P と GlcAT-S とが脳内で異なる場所で異なる構造の HNK-1 糖鎖合成に関与している可能性が示された。
- 3) GlcAT-S 遺伝子欠損マウスの作成に成功し、その解析の結果、脳内には GlcAT-P と GlcAT-S 以外に HNK-1 糖鎖合成に関与するもう一つのグルクロン酸転移酵素の存在が示唆された。このことは現在まで知られている構造以外の HNK-1 糖鎖が生体に存在する可能性を示している。
- 4) HNK-1 糖鎖合成に関与する 2 つの酵素（グルクロン酸転移酵素と硫酸基転移酵素）が複合体を形成し、効率のよい HNK-1 糖鎖合成に関与していることを明らかにした。一連の糖鎖合成に関与する糖転移酵素が触媒領域を介して相互作用していることを示した初めてのものである。今後、糖鎖発現調節機構を解明する上において糖転移酵素複合体としての解析が必要であることを示した重要な結果である。
- 5) HNK-1 糖鎖消失に伴い引き起こされる LTP（長期増強）の減弱の機構解明のため、海馬の初代神経細胞培養系を用いて解析した。その結果 AMPA 型グルタミン酸受容体の一つである GluR2 上に HNK-1 糖鎖が発現していることを見出し、さらに神経突起上の GluR2 の分布が HNK-1 糖鎖消失に伴って変化している観察結果が得られた。この結果は神経可塑性の分子基盤と考えられている長期増強の機構解明に糖鎖を含めた糖タンパク質としての機能解析の必要性を示したものである。
- 6) HNK-1 糖鎖はグルタミン酸受容体の中でも GluR2 特異的に発現していることが明らかとなった。NMDA 受容体の NR1 や NR2、あるいは GluR2 と分子複合体を形成していると考えられている GluR1 上にも HNK-1 糖鎖はほとんど発現していなかった。この結果は、同一細胞内で合成される糖タンパク質のなかでも一部の糖タンパク質にだけ特異的に糖鎖を付加する機構の存在を示すものであり、糖鎖によるタンパク質機能制御を考える上で重要な結果である。
- 7) 研究分担者の川崎らは質量分析による糖タンパク質上の部位特異的糖鎖構造解析により、タンパク質の特定の部位に特定の糖鎖が存在することを明らかとした。この結果はタンパク質を構成する機能ドメインに対し、その機能調節に対応した糖鎖が存在する可能性を示すものである。特定のタンパク質の糖鎖依存的機能変化の分子機構を解析する上において、また、糖鎖を含めたタンパク質の全体構造を知る上で重要な知見である。
- 8) 研究分担者の川崎らは安定同位体標識法と LC/MSⁿ を用いた遊離糖鎖の定量的プロファイリング法を開発した。今まで質量分析では糖鎖の定量的解析は難しいとされていたが、この方法を用いることにより神経発生過程で変動する糖鎖の詳細を明らかにすることが可能となった。
- 9) 神経系を特異的に染色する糖鎖認識単クローン抗体は数多く存在し、その中には抗原が未同定なものがある。研究分担者の小堤らが開発した DNA マイクロアレイを用いた解析法により、これら抗体の認識する糖鎖抗原の合成に関与する遺伝子同定が可能となり、その機能解析を進展させる上で重要な研究成果である。

以上、本研究は概ね順調かつ着実に成果を上げており、5年間の研究終了後は推薦者の期待に十分応えるだけの成果が得られると考えている。

⑨研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について、2頁以内に記入してください。

原著論文

- 1) Y. Kizuka, T. Matsui, H. Takematsu, Y. Kozutsumi, T. Kawasaki, and S. Oka. Physcal and functional association of glucuronyltransferases and sulfotransferase involved in HNK-1 biosynthesis. *J. Biol. Chem* (2006) in press.
- 2) I. Kimura, M. Konishi, A. Miyake, M. Fujimoto and N. Itoh. Neudesin, a secreted factor, promotes neural cell proliferation and neuronal differentiation in mouse neural precursor cells. *J. Neurosci. Res.* (2006) in press.
- 3) S. Itoh, N. Kawasaki, N. Hashii, A. Harazono, Y. Matsuishi, T. Kawanishi, and T. Hayakawa. N-linked oligosaccharide analysis by liquid chromatography with graphitized carbon column/ liner ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes. *J. Chromatogr. A*, 1103, 296-306 (2006).
- 4) A. Harazono, N. Kawasaki, S. Itoh, N. Hashii, A. Ishii-Watanabe, T. Kawanishi, and T. Hayakawa. Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography/ electrospry ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 348, 259-268 (2006).
- 5) Y. Ide, E. Miyoshi, T. Nakagawa, J. Gu, M. Tanemura, T. Nishida, T. Ito, H. Yamamoto, Y. Kozutsumi, and N. Taniguchi. Aberrant expression of N-acetylglucosaminyltransferase-IVa and IVb (GnT-IVa and b) in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 341(2), 478-482, (2006).
- 6) M. Hirano, B. Y. Ma, N. Kawasaki, K. Okimura, M. Baba, T. Nakagawa, K. Miwa, N. Kawasaki, S. Oka, and T. Kawasaki. Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin alpha and beta. *J. Immunology* 175 (5), 3177-3185 (2005).
- 7) H. Tagawa, Y. Kizuka, T. Ikeda, S. Itoh, N. Kawasaki, H. Kurihara, M. L. Onozato, A. Tojo, T. Sakai, T. Kawasaki, and S. Oka. Non-sulfated form of the HNK-1 carbohydrate is expressed in mouse kidney. *J. Biol. Chem.* 280 (25), 23876-23883 (2005).
- 8) M. Terada, K.H. Khoo, R. Inoue, C.I. Chen, K. Yamada, H. Sakaguchi, N. Kadowaki, B. Y. Ma, S. Oka, T. Kawasaki, and N. Kawasaki. Characterization of oligosaccharide ligands expressed on SW1116 cells recognized by Mannan-binding protein a highly fucosylated polylactosamine type N-glycan. *J. Biol. Chem.* 280 (12), 10897-10913 (2005).
- 9) S. Kakuda, Y. Sato, Y. Tonoyama, S. Oka, and T. Kawasaki. Different acceptor specificities of two glucuronyltransferases involved in the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate. *Glycobiology* 15 (2): 203-210 (2005).
- 10) N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, A. Harazono, Y. Matsuishi, T. Hayakawa, and T. Kawanishi. Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid commun. Mass spectrom.*, 19, 3315-3321 (2005).
- 11) A. Harazono, N. Kawasaki, T. Kawanishi, and T. Hayakawa. Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Glycobiology.* 15, 447-462 (2005).
- 12) J. Yuan, N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, T. Kawanishi, and T. Hayakawa. Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1067, 145-152 (2005).
- 13) N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, M. Hyuga, T. Kawanishi, and T. Hayakawa. Glycomic/ glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structural alternation in the cells. *Proteomics*, 5, 4665-4672 (2005).
- 14) S. Itoh, N. Kawasaki, A. Harazono, N. Hashii, Y. Matsuishi, T. Kawanishi, T. Hayakawa. Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/ multiple tandem mass spectrometry. Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1094, 105-1017 (2005).
- 15) Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47 : 803—815 (2005).
- 16) Namba T, Mochizuki H, Onodera M, Mizuno Y, Namiki H, Seki T. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 22: 1928-1941 (2005).
- 17) Yoshimi K, Ren YR, Seki T, Yamada M, Ooizumi H, Onodera M, Saito Y, Murayama S, Okano H, Mizuno Y, Mochizuki H. Possibility for neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. *Ann Neurol* 58:31-40 (2005).
- 18) Scholz S., Kurauchi K., Kinoshita M., Oshima Y., Ozato K., Schirmer K. and Wakamatsu, Y. Analysis of estrogenic effects by quantification of green fluorescent protein in juvenile fish of a transgenic medaka. *Environmental Toxicology and Chemistry* , 24, (10) 2553-2561 (2005).
- 19) Kurauchi K, Nakaguchi Y, Tsutsumi M, Hori H, Kurihara R, Hashimoto S, Ohnuma R, Yamamoto Y, Mastuoka S, Kawai S, Hirata T, Kinoshita M. An in vivo visual reporter system for detection of estrogen-like substances by transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.*, 39, (8), 2762-2768 (2005).

⑨研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について、2頁以内に記入してください。

- 20) C.D. Nandini, N. Itoh, and K. Sugahara. Novel 70 kDa chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains with a unique heterogenous sulfation pattern from shark skin, which exhibit neurotogenic activity and binding activities for growth factors and neurotrophic factors. *J. Biol. Chem.* 280, 4058-4069 (2005).
- 21) N. Nakamura, S. Toba, M. Hirai, S. Morishita, T. Mikami, M. Konishi, N. Itoh and A. Kurosaka. Cloning and Expression of a Brain-Specific Putative UDP-GalNAc: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase Gene. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 429-343 (2005).
- 22) Y. Kassai, P. Munne, Y. Hotta, E. Penttilä, K. Kavanagh, N. Ohbayashi, S. Takada, I. Thesleff, J. Jernvall and N. Itoh. Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin. *Science* 309, 2067-2070 (2005)
- 23) A. Miyake, Y. Nakayama, M. Konishi and N.Itoh. Fgf19 regulated by Hh signaling is required for zebrafish forebrain development. *Dev. Biol.* 288, 259-275 (2005).
- 24) K. Uemura, H. Yamamoto, T. Nakagawa, K. Nakamura, N. Kawasaki, S. Oka, B.Y. Ma, and T. Kawasaki. Superoxide production from human polymorphonuclear leukocytes by human mannan-binding protein (MBP). *Glycoconj J.* 21 (1-2) 79-84 (2004).
- 25) S. Kakuda, T. Shiba, M. Ishiguro, H. Tagawa, S. Oka, Y. Kajiwara, T. Kawasaki, S. Wakatsuki, and R. Kato. Structural basis for acceptor substrate recognition of a human glucuronyltransferase, GlcAT-P, an enzyme critical in the biosynthesis of the carbohydrate epitope HNK-1. *J Biol Chem.* 279 (21), 22693-22703 (2004).
- 26) S. Kakuda, S. Oka, T. Kawasaki. Purification and characterization of two recombinant human glucuronyltransferases involved in the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate in Escherichia coli. *Protein Expr Purif.* 35 (1), 111-119 (2004).
- 27) M. Hyuga, S. Itoh, N. Kawasaki, M. Ohta, A. Ishii, S. Hyuga, and T. Hayakawa. Analysis of site-specific glycosylation in recombinant human follistatin expressed in Chinese hamster ovary cells, *Biologicals*, 32 (2) 70-77 (2004).
- 28) S. Kamoda, C. Nomura, M. Kninoshita, S. Nishiura, R. Ishikawa, K. Kakehi, N. Kawasaki, and T. Hayakawa. Profiling analysis of oligosaccharides in antibody pharmaceuticals by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1050 (2), 211-216 (2004).
- 29) Saegusa T, Mine S, Iwasa H, Murai H, Seki T, Yamaura A, Yuasa S. Involvement of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM)-positive granule cells in the amygdaloid-kindling-induced sprouting of a hippocampal mossy fiber trajectory. *Neurosci Res* 48:185-194 (2004).
- 30) Yamashita T, Tonchev AB, Vachkov IH, Popivanova BK, Seki T, Sawamoto K, Okano H. Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* 14:861-875 (2004).
- 31) Seki T Polysialic acid-expressing cells in adult neurogenesis. *Trends Glycosci Glycotech* 16: 319-330 (2004).
- 32) Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T Collateral Sprouting Occurs following End-to-Side Neurotaphy. *Plast Reconstr Surg* 114: 129-137 (2004).
- 33) Kinoshita M. Transgenic medaka with brilliant fluorescence in skeletal muscle under normal light. *Fisheries Sci.*, 70, 645-649 (2004).
- 34) Ohtsuka M, Kikuchi N, Yokoi H, Kinoshita M, Wakamatsu Y, Ozato K, Takeda H, Inoko H, Kimura M. Possible roles of zic1 and zic4, identified within the medaka Double anal fin (Da) locus, in dorsoventral patterning of the trunk-tail region (related to phenotypes of the Da mutant). *Mech. Dev.* 121,873-882 (2004).
- 35) Tagawa M, Kaji T, Kinoshita M, Tanaka M. Effect of stocking density and addition of proteins on larval survival in Japanese flounder. *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 230, 517-525 (2004).
- 36) Koike, T., Kimura, N., Miyazaki, K., Yabuta, T., Kumamoto, K., Takenoshita, S., Chen, J., Kobayashi, M., Hosokawa, M., Taniguchi, A., Kojima, T., Ishida, N., Kawakita, H., Yamamoto, H., Takematsu, H., Suzuki, A., Kozutsumi, Y. and Kannagi, R. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8132-8137, (2004).
- 37) S. Ashikari-Hada, H. Habuchi, N. Itoh, A. H. Reddi, and K. Kimata. Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library. *J. Biol. Chem.* 279, 12346-12354 (2004).
- 38) X. Bao, S. Nishimura, T. Mikami, S. Yamada, N. Itoh, and K. Sugahara. Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from embryonic pig brain, which contain a higher proportion of L-iduronic acid than those from adult pig brain, exhibit neurotogenic and growth factor-binding activities. *J. Biol. Chem.* 279, 9765-9776 (2004).

学会発表（招待講演、シンポジウム）

1. 岡 昌吾 メダカの発生における糖鎖の重要性 第28回日本分子生物学会 2005年 12月 福岡
2. S. Oka, H. Tagawa, Y. Kizuka, N. Kawasaki, H. Kurihara, and T. Kawasaki Expression of the non-sulfated HNK-1 carbohydrate in mouse kidney. *Pacificchem* 2005 2005年 12月 Honolulu, Hawaii