

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔事後評価用〕

平成16年度採択分

平成21年 3月31日現在

研究課題名（和文） 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
研究課題名（英文） Establishment of Neuroglycobiology
(Glycobiological Approach for Neuroscience)
研究代表者
氏名 岡 昌吾 (Okamoto Shogo)
所属研究機関・部局・職 京都大学・医学研究科・教授



研究の概要：生物はタンパク質だけでなく糖鎖にもその生体情報を書き込み、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。神経発生、神経回路形成は細胞の分化、移動、軸索の伸長、標的細胞の認識、シナプス形成など多くの過程を経て行われる。これらの過程において特徴的な発現を示す糖鎖について研究を行い、糖鎖が神経発生、神経可塑性において重要な役割を担っていること示す知見を得た。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：糖鎖生物学、神経発生、神経回路形成

1. 研究開始当初の背景

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。生物はタンパク質だけでなく糖鎖にもその生体情報を書き込んでいると考えられる。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生体情報の解読が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

神経可塑性や学習記憶に重要な役割を担う HNK-1 糖鎖を中心にその生合成調節機構を酵素学的、構造生物学的手法により解析した。また機能については主にその生合成酵素である GlcAT-P 遺伝子を欠損するマウスを解剖学的、細胞生物学的手法により解析した。神経発生過程で重要な糖鎖に関しては主にメダカをモデル動物として用い、分子生物学的手法や質量分析法などにより解析した。

4. 研究の主な成果

神経系の大きな特徴は可塑性を持つことである。この可塑性が記憶学習などの脳高次機能の分子基盤であると考えられている。HNK-1 糖鎖は神経系の特に神経回路形成時に高発現し、また神経細胞の軸索伸長、標的細胞の認識、シナプス形成に重要であると考えられている細胞接着分子に特徴的な発現を示す糖鎖である。研究代表者らは既に HNK-1 糖鎖が海馬におけるシナプス長期増強(LTP)や空間認知能力に重要な機能糖鎖であることを明らかにしている。そこで本研究では HNK-1 糖鎖を中心に糖鎖の発現調節機構および神経可塑性における糖鎖の果たす役割の解明を目指し以下の成果を得た。

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 (GlcAT-P, GlcAT-S) が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を明らかにした。この結果は糖鎖の発現が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重要な知見であると考えられる。

2) GlcAT-P, -S と硫酸基転移酵素 (HNK-1ST) 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明らかにした。さらに GlcAT-P は細胞内で COPII 輸送小胞の形成に必須な Sar1 と相互作用していることを明らかにした。この結果は、

〔4. 研究の主な成果 (続き)〕

糖鎖の生体における精密な発現調節には単純な糖転移酵素の発現量だけでなく、一群の糖転移酵素の相互作用、さらには細胞内輸送に関与する分子との相互作用など、より大きな糖鎖発現調節に関わる分子複合体によって行われている可能性を示す重要な知見であると考えられる。

3) GlcAT-P 遺伝子欠損マウス脳ではほとんどの HNK-1 糖鎖が消失するもののペリニューロナルネットと呼ばれる特徴的な構造体に HNK-1 糖鎖発現が見いだされた。この構造体に存在する HNK-1 糖鎖は従来知られている構造のものではない新たな構造を持つ糖鎖であると考えられた。近年の研究において、神経可塑性とくに視覚野における眼優位性と呼ばれる現象とペリニューロナルネットとの関係が注目されていることから、HNK-1 糖鎖と神経可塑性との関連をしめす重要な知見である。

4) 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。

神経の初期発生過程における糖鎖の機能解析は主にメダカを用いて解析し、以下の成果を得た。

5) 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定量的質量分析法を用いて解析した。またその情報をもとに、複合型糖鎖の生合成に重要な B4GalT2 遺伝子ノックダウン実験を行い、複合型糖鎖が神経系の誘導に重要な脊索形成に深く関わっていることを明らかにした。さらにその機構を解析したところ複合型糖鎖は後期原腸形成期における収斂伸長運動のとくに伸長運動に必須な糖鎖であることが明らかとなった。

6) 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。そこで、その合成酵素のクローニングを行い、GlcAT-P 遺伝子ノックダウンおよび過剰発現実験により頭部の形成に異常が観察された。以上の結果はメダカ胚発生過程には制御された糖鎖の発現が必須であり、神経発生過程における複合型糖鎖の重要性を示すものである。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

糖鎖の発現が糖転移酵素の発現量だけでなく、糖転移酵素の存在する生体膜上における微細環境、分子複合体などによって制御されている事実は様々な分野における糖鎖機能解析に対して大きなインパクトを与えるものである。また、神経可塑性の基盤ともいえる興奮性シナプスの場となるスパインの形成や神経誘導含む発生過程の重要な現象に糖鎖が深く関与することが明らかとなった。これらの結果は、今後糖鎖を含めた糖タンパク質としての解析の必要性を示すものであり、神経科学のみならず多くの分野と糖鎖生物学分野が融合して行くことの重要性を示す貴重なものであるといえる。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

- 1) D. Anzai, Y. Tonoyama, A. Ikeda, T. Kawasaki, and **S. Oka**. Regulated expression of HNK-1 carbohydrate is essential for medaka (*Oryzias latipes*) embryogenesis. *Glycobiology* in press (2009).
- 2) Y. Tonoyama, D. Anzai, A. Ikeda, S. Kakuda, M. Kinoshita, T. Kawasaki, **S. Oka**. Essential role of beta 1,4-galactosyltransferase 2 during medaka (*Oryzias latipes*) gastrulation. *Mech. Dev.* in press (2009).
- 3) T. Yoshihara, K. Sugihara, Y. Kizuka, **S. Oka**, and M. Asano. Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in beta 4-galactosyltransferase-II-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **284**(18): 12550-12561 (2009).
- 4) Y. Kizuka, Y. Tonoyama, and **S. Oka**. Distinct transport and intracellular activities of two GlcAT-P isoforms. *J. Biol. Chem.* **284**(14), 9247-9256 (2009).
- 5) T. Shiba, S. Kakuda, M. Ishiguro, I. Morita, **S. Oka**, T. Kawasaki, S. Wakatsuki, and R. Kato. Crystal structure of GlcAT-S, a human glucuronyltransferase, involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Proteins* **65**(2), 499-508 (2006).
- 6) Y. Kizuka, T. Matsui, H. Takematsu, Y. Kozutsumi, T. Kawasaki, and **S. Oka**. Physical and functional association of glucuronyltransferases and sulfotransferase involved in HNK-1 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **281**(19), 13644-13651 (2006).

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/5241/