
統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明

領域番号 3301

平成23年度～平成27年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）（新学術領域研究（研究領域提案型））
研究成果報告書

平成29年3月

領域代表者 門松健治

名古屋大学大学院 医学系研究科 教授

目 次

| | |
|-----------------------------|---------|
| はしがき | 1 |
| 研究組織 | 2-3 |
| 交付決定額（配分額） | 4 |
| 研究領域のスコープ | 5-11 |
| 研究成果 | 12-96 |
| 研究発表（1. 雑誌論文 2. 学会発表 3. 図書） | 97-105 |
| 研究成果による産業財産権の出願・取得状況 | 106 |
| 領域活動 | 107-109 |

はしがき

本新学術領域「統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明」の研究目標は、神経機能を制御する「糖鎖機能ドメイン」から受容体、下流の分子動態、統合的な神経機能に至る制御機能の解明であった。そのために、糖鎖研究と神経研究の融合・連携により、「神経糖鎖生物学」という新たな学問領域の創生を目指して平成23年度に発足した。平成25年度の間報において、有機的な連携が進められていると高い評価を受けた。領域は平成27年度に終了したが、「新しい学術の創生」の成否を自己点検するために、1. 融合研究進展の状況、2. 国際化の推進、3. 若手研究者育成の評価、4. アウトリーチ活動を主要注目点とし、これまでの活動に関する情報を、収集、整理、分析し、これらの結果を総括することを目的に、平成28年度にとりまとめの予算をいただいた。

成果のとりまとめのために、事後1年間を含めた研究活動や成果を各班員から収集した。さらに、意見交換とアウトリーチのために「新学術領域『神経糖鎖生物学』最終シンポジウム」を平成29年3月3日～4日に名古屋で開催した。ここには、計画班、前期・後期の公募班、評価者、班友が一堂に会し、さらに一般公開として一般の研究者も参加した。特に若手研究者の発言が従前の通り多く活発な議論があり、参加者のほとんどがこれまでの研究総括をポスターで行い、議論を交わした。シンポジウムの終了後も若手を中心に深夜まで活発な交流が続いた。また、領域では2015年にExperimental Neurologyのspecial issueとして“Deciphering sugar chain-based signals regulating integrative neural functions”を刊行したが、2017年にはBiochimica et Biophysica Actaのspecial issueとして“Glyconeuroscience”を刊行する予定である。

ここに、本新学術領域の総括を報告する。本領域は5年間の支援を受けた後も継続した学術活動の成果を出しており、まさしく糖鎖と神経の融合研究が日本に根付く第一歩を踏み出せたと結論できると思う。特に、本領域の血を引き継ぐ若手研究者が多数育ったことは望外の喜びであった。これまで本領域を支えてくださったすべての班員、評価者、班友のみなさんに心から謝意を表したい。また、本領域の立ち上げ、評価、事後のまとめに際して力強い支援をいただいた文部科学省、審査委員そして国民のみなさんに厚くお礼申し上げたい。

平成29年3月

領域を代表して
名古屋大学
門松健治

研究組織

【総括班】

研究代表者 : 門松 健治 (名古屋大学・大学院医学系研究科・教授)
(評価者)

研究協力者 : 木全 弘治 (愛知医科大学・先端医学医療研究拠点・名誉教授)

研究協力者 : 山下 俊英 (大阪大学・大学院医学系研究科・教授)

【計画研究】

A01

研究代表者 : 門松 健治 (名古屋大学大学院・医学系研究科・教授)

研究代表者 : 北川 裕之 (神戸薬科大学・薬学部・教授)

研究代表者 : 小松 由紀夫 (生理学研究所・生体情報研究系・特別協力研究員)

研究代表者 : 戸島 拓郎 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員)

研究分担者 : 田村 純一 (鳥取大学・地域学部地域環境学科・教授)

A02

研究代表者 : 岡 昌吾 (京都大学・大学院医学研究科・教授)

研究代表者 : 吉田 秀郎 (兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授)

研究代表者 : 古川 鋼一 (中部大学・生命健康科学部生命健康科学研究所・教授)

研究代表者 : 柚崎 通介 (慶應義塾大学・医学部・教授)

研究代表者 : 高宮 考悟 (宮崎大学・医学部・教授)

研究分担者 : 川崎 ナナ (横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教授)

研究分担者 : 鈴木 健一 (京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点准教授)

【公募研究】

平成 24 年度～平成 25 年度

A01

研究代表者 : 榊 和子 (筑波大学・医学医療系・講師)

研究代表者 : 武内 恒成 (愛知医科大学・医学部・教授)

研究代表者 : 佐藤 ちひろ (名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授)

研究代表者 : 岡島 徹也 (名古屋大学・大学院医学 (系) 研究科 (研究院)・准教授)

研究代表者 : 大橋 俊孝 (岡山大学・大学院医歯 (薬) 学総合研究科・准教授)

研究代表者 : 神野 尚三 (九州大学・大学院医学 (系) 研究科 (研究院)・教授)

研究代表者 : 橋本 康弘 (福島県立医科大学・医学部・教授)

研究代表者 : 楠 進 (近畿大学・医学部・教授)

研究代表者 : 神村 圭亮 (公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達神経再生研究分野・主席研究員)

A02

研究代表者 : 菅原 一幸 (北海道大学・先端生命科学研究院・名誉教授)

研究代表者 : 安藤 弘宗 (岐阜大学・応用生物科学部・准教授)

研究代表者 : 金川 基 (神戸大学・大学院医学 (系) 研究科 (研究院)・講師)

研究代表者 : 矢木 宏和 (名古屋市立大学・大学院薬学研究科 (研究院)・講師)

研究代表者 : 顧 建国 (東北医科薬科大学・薬学部・教授)

研究代表者 : 宮城 妙子 (東北医科薬科大学・薬学部・教授)
研究代表者 : 西原 祥子 (創価大学・理工学部・教授)
研究代表者 : 中山 喜明 (京都産業大学・総合生命科学部・助教)
研究代表者 : 川寄 敏祐 (立命館大学・総合科学技術研究機構・上席研究員)
研究代表者 : 平林 義雄 (独立行政法人理化学研究所・神経膜機能研究チーム・研究員)
研究代表者 : 長江 雅倫 (国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム・研究員)
研究代表者 : 萬谷 博 (地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長)

平成 26 年度～平成 27 年度

A01

研究代表者 : 武内 恒成 (愛知医科大学・医学部・教授)
研究代表者 : 福田 敦夫 (浜松医科大学・医学部・教授)
研究代表者 : 佐藤 ちひろ (名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授)
研究代表者 : 大橋 俊孝 (岡山大学・大学院医歯 (薬) 学総合研究科・教授)
研究代表者 : 神野 尚三 (九州大学・大学院医学 (系) 研究科 (研究院)・教授)
研究代表者 : 新明 洋平 (金沢大学・大学院医学系・准教授)
研究代表者 : 山田 修平 (名城大学・薬学部・教授)
研究代表者 : 楠 進 (近畿大学・医学部・教授)
研究代表者 : 藤川 顕寛 (基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・研究員)
研究代表者 : 神村 圭亮 (公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達神経再生研究分野・主席研究員)

A02

研究代表者 : 安藤 弘宗 (岐阜大学・応用生物科学部・准教授)
研究代表者 : 岡島 徹也 (名古屋大学・大学院医学 (系) 研究科 (研究院)・教授)
研究代表者 : 等 誠司 (滋賀医科大学・医学部・教授)
研究代表者 : 金川 基 (神戸大学・大学院医学 (系) 研究科 (研究院)・講師)
研究代表者 : 矢木 宏和 (名古屋市立大学・薬学研究科 (研究院)・講師)
研究代表者 : 井ノ口 仁一 (東北医科薬科大学・薬学部・教授)
研究代表者 : 川内 健史 (公益財団法人先端医療振興財団・先端医療センター研究所・医薬品開発研究グループ・上席研究員)
研究代表者 : 坂場 武史 (同志社大学大学院・脳科学研究科・教授)
研究代表者 : 木塚 康彦 (国立研究開発法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・研究員)
研究代表者 : 長江 雅倫 (国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム・研究員)
研究代表者 : 鈴木 匡 (国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・チームリーダー)
研究代表者 : 萬谷 博 (地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長)

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|----------|---------------|-------------|---------------|
| 平成 23 年度 | 219,600,000 | 65,880,000 | 285,480,000 |
| 平成 24 年度 | 237,100,000 | 71,130,000 | 308,230,000 |
| 平成 25 年度 | 265,800,000 | 79,740,000 | 345,540,000 |
| 平成 26 年度 | 229,300,000 | 68,790,000 | 298,090,000 |
| 平成 27 年度 | 230,300,000 | 69,090,000 | 299,390,000 |
| 平成 28 年度 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |
| 総計 | 1,185,100,000 | 355,530,000 | 1,540,630,000 |

研究領域のスコープ

ここには、領域全体の成果を眺めるために、平成 23 年度当初の領域の提案〈研究領域の目的及び概要〉と、平成 28 年度終了時のまとめ〈研究領域の設定目的の達成度〉を再掲する (5~11 ページ)。そして、領域終了後の成果も含めた領域活動の総括のために、12 ページ以降の「研究成果」に各班員による成果報告の最新版をまとめた。

〈研究領域の目的及び概要〉

【概要】 糖鎖は核酸、タンパク質に並ぶ第三の生命鎖として、さまざまな生理的・病的過程に関与することが明らかになっている。しかしその機能と構造の多様性ゆえに、糖鎖の作用機序解明の実現性に対しては高い障壁があった。この障壁を克服して糖鎖の普遍的な作動原理を解明する重要な手がかりとして、私たちは、糖鎖の特定配列中に神経機能を制御するドメインが内包されていることを見いだした。一方、糖鎖がシナプス可塑性や神経回路再編を介して記憶・学習などの高次脳機能を制御することが明らかになりつつあり、糖鎖に着目した統合的神経研究が待望されている。本領域では、これまでに我が国において蓄積された世界に誇る糖鎖の知見と新しい解析法を最先端の神経研究に融合させる。これにより、糖鎖機能ドメインから受容体、下流の分子動態、統合的な神経機能に至る制御機構を解明し、新しい生命科学の起点となる学術領域、神経糖鎖生物学を創成する。

図1 生命と糖鎖

1. 背景

【挑戦の時代背景】

あのフェルマーの最終定理を解いたアンドリュー・ワイルズでさえ、1994 年までの 3 世紀半の間に発見・証明された数多くの新しい定理の助けなしには証明はできなかった。科学の新しい展開の裏には常に時代の後押しがある。私たちは今、糖鎖生物学の大きな転換期を迎えていると考えている。

かつて単糖から糖の鎖ができることが分かった時代から研究者たちは核酸、タンパク質と並ぶ第三の生命鎖として糖鎖を捕らえ、その生物学的機能を期待してきた。しかし、糖鎖の構造は難しい。結合様式が一通りではなく (図 1A)、個別の酵素が鎖を長くする (図 1B)。従って構造は多様であり、セントラルドグマと距離を置く制御を受け、より環境の影響をセンシティブに受ける。研究者たちはまず、一体糖鎖はどのような構造を有し、どのような仕組みで作られるのかを知る必要があった。因みにこの過程での日本人の貢献はとても大きい。糖鎖を作る合成酵素遺伝子の発見も約 6 割は日本人の手で遂行され、現在も糖鎖生物学は我が国が世界をリードしている。そしてこのような仕組みが分かってくると糖鎖合成酵素の

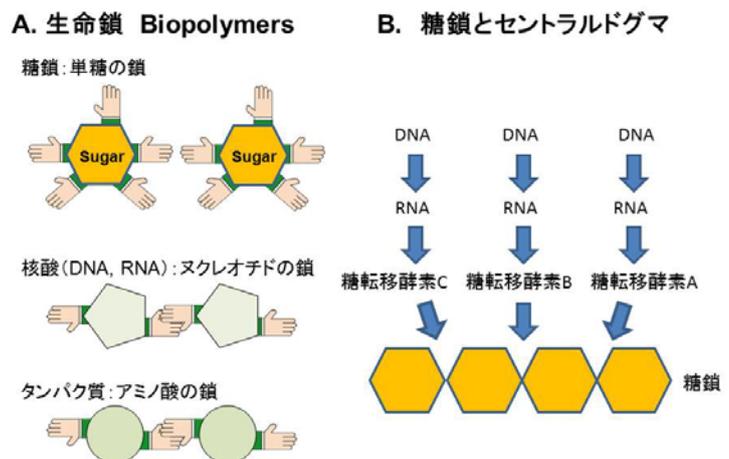
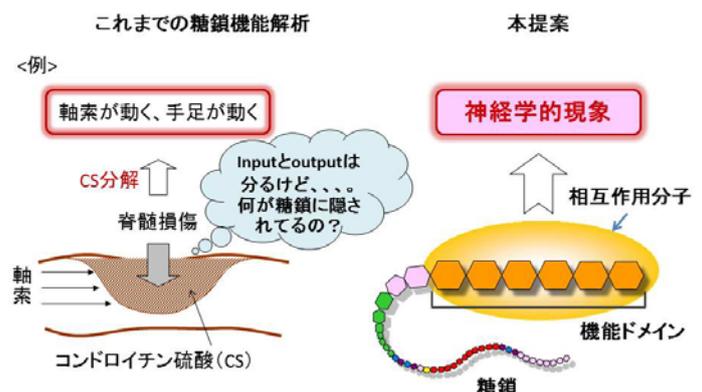


図2 糖鎖による生命活動の制御



遺伝子ノックアウト (KO) やトランスジェニック (Tg) マウスあるいは糖鎖分解酵素によって糖鎖を改変し、糖鎖と生命活動を直接関連づけることが可能となった (図 2 左)。すなわち、「糖鎖が生命活動を制御する」という概念が定理として提出されたといってもよいだろう。しかしながらこの定理の証明は未だ成されていない。何故ならその機構の大部分が解明されていないからである。

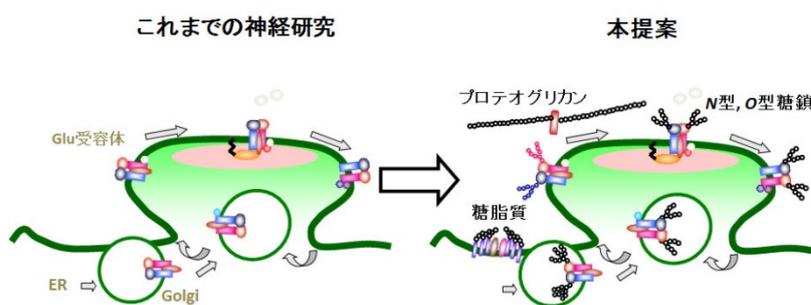
幸い、神経分野の中でも重要課題の 1 つであるシナプス活動制御、神経回路形成・再編制御について糖鎖の重要性の理解が近年急速に深まった。さらに糖鎖解析・合成あるいは一分子イメージングなどの技術が進歩した。今こそ糖鎖による生命活動の制御機構に踏み込める時代である。しかし、そのためには実現性の高い戦略が必要である。私たちは生命現象を神経に絞り込んだ融合研究こそが突破口になると考えている。

私たちは、糖鎖の特定配列中に神経機能を制御するドメインが内包されていることを見いだした。つまり、糖鎖の特定配列の分子構造の違いを神経細胞が読み取って神経活動が差別化される。従って、糖鎖機能ドメインとその受容体の先に生命現象が現れると考えることができる (図 2 右)。

【神経と糖鎖】

神経機能の制御機構の解明は主に神経伝達物質や成長因子などタンパク質性の制御分子とその細胞内シグナリングを中心に長足の発展を遂げた。例えば記憶・学習は神経活動に基づくグルタミン酸受容体のシナプス部へのトラフィッキングと、続いて起こるシナプスの形態的变化によって担われ、その細胞内シグナリング機構が詳しく研究されてきた (図 3 左)。しかしグルタミン酸受容体の移動にはコンドロイチン硫酸などの細胞外マトリックス糖鎖との相互作用が重要である。また、ほとんどの細胞表面および分泌タンパク質は糖鎖修飾され (図 3 右)、グルタミン酸受容体自体の糖鎖修飾はトラフィッキングに重要な機能を持つ。さらに細胞外マトリックス糖鎖はシナプスの形態的变化や神経回路形成・再編においても重要な役割を担うことも判明してきた。このように神経機能の統合的理解のために糖鎖の観点からの研究が待望されている。

図3 糖鎖による神経活動の制御



2. 「研究の対象」と取り組み

本領域研究は糖鎖と神経の「異なる分野の連携により発展を目指すもの」であり、新しい学術領域、神経糖鎖生物学を創成する。特に糖鎖による制御機構が明らかになれば、神経以外の「他の研究分野での新しい展開」がさらに期待できる。取り組みの要諦は、生命現象を絞り込んで二分野の研究者が議論をぶつけ、新しいコンセプトを生み出すことである。そのために糖鎖と神経からほぼ同数の先進の研究者を配し、両者の融合研究なしには領域の進展が望めない仕組みを作った。さらに公募班員も含めた連携の仕組み、領域全体のための研究支援班、若手育成のための若手の会を作り、領域の研究の推進を図る。

3. どのように学術水準の向上・発展につながるか

本領域は神経における糖鎖の作動原理と生物学的意味について単独研究では辿り着くことのなかった新しいコンセプトの確立をもたらす。一方、糖鎖はこれまで重症筋ジストロフィー、がんなど広範な疾病の発生

進展に関わることが知られ、インフルエンザのタミフルや抗体医薬品の活性増強など医療の現場に応用されている。従って本領域は広範な疾病の分子基盤の理解と治療法開発に多大な影響を与える。

<研究領域の設定目的の達成度>

1. 何をどこまで明らかにするか

糖鎖構造は複雑であるだけでなく、ダイナミックに変化する。そうすると、タンパク質同士のように相互作用分子とのおおよそ1対1の対応も見いだせない。こうして、糖鎖の構造と機能の多様性のみがクローズアップされ、機構解明の障壁となってきた。一方、これまでほとんど未開拓であった神経における糖鎖研究によって、これまでに見えなかった神経機能制御機構の解明が期待される。そこで、本領域では糖鎖の内包する機能ドメインを機能単位として、糖鎖の作動原理とそれによる神経機能制御機構を解きたいと考えた(図2,3)。

2. 設定した研究の対象

本領域は次の2つを設定目的とした。(1)異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により、当該研究領域の発展を目指すもの。(2)当該領域の研究の発展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらすもの。

(1)に関しては、まさに連携の実現であり、領域内で如何に融合研究が進展してきたかについて下に記述したい。(2)については、例えば、がん、免疫、発生、再生など神経糖鎖以外の領域への波及をめざすものであり、本領域のゴールである糖鎖作動原理の解明および神経活動制御機構の解明によって普遍化できるコンセプトがもたらす効果を指している。その成果を下に記す。

3. 研究の達成状況

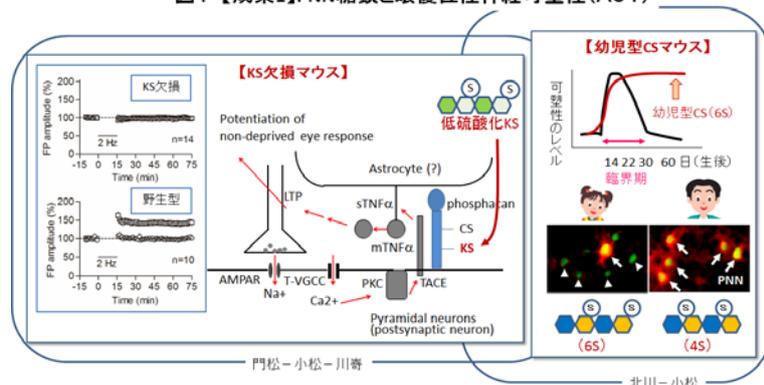
A01 細胞外糖鎖による神経機能制御、A02細胞内・細胞表面糖鎖による神経機能制御、という2つの研究項目で研究を推進した。これらはA01、A02の研究項目をきっかけに始動しつつも、場合によっては研究項目をまたいだ融合研究に進展したものを含む。

神経という生命科学分野に焦点を絞り込んだ、神経と糖鎖の融合研究が本領域の最も注力した活動であり、世界に誇れる学術的な成果を生むことができた。換言すると、世界をリードしうる神経糖鎖生物学という新しい学術領域の創成が叶ったと思われる。以下にいくつかの例を挙げて達成状況を具体的に述べたい。

A01 細胞外糖鎖による神経機能制御

【PNNと眼優位性神経可塑性】 北川 (A01計画) と小松 (A01計画) はコンドロイチン硫酸 (CS) の硫酸化パターンが可塑性制御に決定的役割を果たすことを見出した (Nat Neurosci, 2012)。すなわち、幼児期CSは6Sと呼ばれる硫酸化が多く、この場合、ペリニューロナルネット (PNN) の形成低下が起り、眼優位性可塑性が起こることを証明した (図4【幼児型CSマウス】)。

図4 【成果1】PNN糖鎖と眼優位性神経可塑性(A01)



を引き起こす代表的な例として歴史に残る発見である。また、PNN形成に4Sを含むCSの機能ドメインが必須であることを示したものであり、神経以外の領域にも応用可能な糖鎖の作用機構を提示できる可能性がある。

門松 (A01計画)、小松 (A01計画)、川寄 (A02公募) は、共同で、低硫酸化ケラタン硫酸 (KS) が眼優位性可塑性の一部を正に制御することを見出した (2015年Exp Neuro1) (図4【KS欠損マウス】)。すなわち、KSはフォスファカンに担われており、T型カルシウムチャンネルを介するカルシウム流入によって活性化されたTACEによってTNF α が切断に重要であることが示唆された。これによって活性型のsTNF α が産生され、結果として非遮蔽眼からの入力によるLTPが引き起こされる。KS欠損マウスではこのLTPが起きなかった。この解析には川寄の開発した抗KS抗体が用いられ、KSがシナプス後部に局在することも示された。

さらに、PNNに関しては神野 (A01公募) が海馬の長軸に沿った機能分化 (背側部の神経回路 = 認知; 腹側部の神経回路 = 情動) とPNN形成 (背側部で生後大幅に上昇) に強い相関を見出し、認知と情動を担う神経回路は、

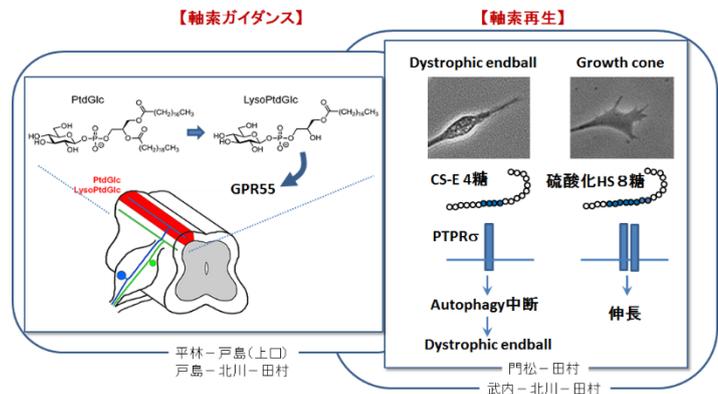
PNNによる異なる制御を受けている可能性を示唆する成果を得た。また、PNNは、PV含有GABAニューロンの中で特定のサブクラスのみを発現していた (J Comp Neurol, 2015)。

【軸索ガイダンス・軸索再生】 門松 (A01計画) はKSが脊髄損傷後の軸索再生阻害・神経機能回復阻害に決定的な役割を担うことを見出した (2011年J Neurosci)。門松 (A01計画)、田村 (総括班分担) は、軸索再生阻害に際して軸索先端が球状に変化するdystrophic endball形成機構を解明した (投稿中) (図5【軸索再生】)。まず、糖鎖機能ドメインとしてCSではCS-Eと呼ばれる硫酸化CSが必要であり、天然には短い長さ (せいぜい4糖) でしか存在しないことを見出した。従って、その受容体PTPR σ の単量体化が起きる。これによってPTPR σ のフォスファターゼ活性はONとなり、結果としてautophagosomeとlysosomeの融合が阻害され、autophagosomeが蓄積し、dystrophic endballができることが明らかとなった。他方、軸索伸長を誘導するヘパラン硫酸 (HS) の場合、硫酸化されたHSが必要であり、天然には長い機能ドメインを作ることを見出した (図5【軸索再生】)。これによりPTPR σ のフォスファターゼ活性はOFFとなり、軸索伸長は阻害されることがない。これらの発見が、これまで見過ごされてきたgrowth cone collapseとdystrophic endballとの差別化、in vivoでの意義、そこへのCS、HSの関与といった観点をクローズアップした意義は大きい。

また、武内 (A01公募)、北川 (A02計画)、田村 (総括班分担) と共同でHS、CSの両方の合成に影響を及ぼすKOマウスが損傷後、著明な軸索再生促進の表現型を示すことを見出した (Nat Commun, 2013)。このKOマウスは、阻害分子であるCSができにくくなっているだけでなく、促進分子であるHSの合成が亢進しているため、軸索再生が著明になることが示唆された。

また、戸島 (A01計画)、北川 (A01計画)、田村 (総括班分担) は共同で、CS鎖内に存在する糖鎖機能ドメインとその受容体候補を絞り込むことに成功し、さらに受容体下流で軸索成長円錐の運動性を調節する細胞内シグナル伝達クロストークについても多くの知見を得た (投稿準備中)。すなわち、高硫酸化CSサブタイプの一つであるCS-Eによる軸索ガイダンスを媒介する受容体としてCNTN-1、PTPR σ 、LARを選定し、受容体下流の細胞内シグナル分子としてCa²⁺とcAMPの関与を示した。興味深いことに、軸索の誘引時と反発

図5【成果2】 軸索ガイダンス・軸索再生 (A01)



時では、必要な最短CS-E鎖長、活性化される受容体の組み合わせ、さらには開口するCa²⁺チャネルの種類が全く異なることが明らかになってきた。

平林 (A02公募)、上口 (A01計画戸島の連携) は共同で、糖脂質であるリゾホスファチジルグルコシド (LysoPtdGlc) は脊髄内の固有感覚の神経突起が通る特定の部位にのみ存在し、痛覚の神経突起を反発することで、両方の神経突起は混ざり合うことなく別の目的地へ投射することを明らかにした (Science, 2015) (図5【軸索ガイダンス】)。そしてLysoPtdGlcの受容体としてGPR55 (GPCRの1種) を同定した。

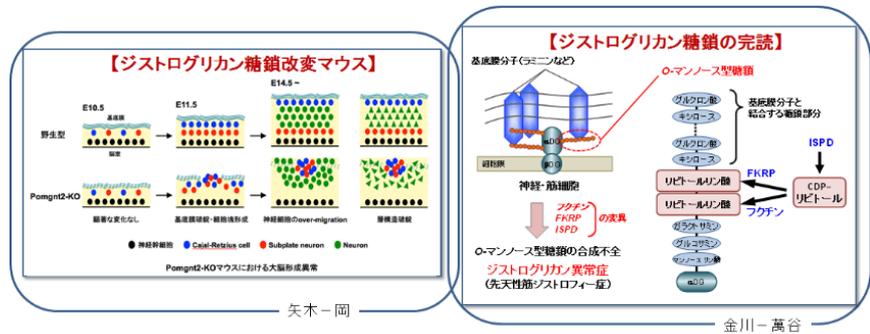
これまで未知だったガイダンス分子が糖脂質であるという事実は驚きをもって迎えられた。

A02 細胞内・細胞表面糖鎖による神経機能制御

【ジストログリカン】 α-ジストログリカンに修飾される糖鎖は、基底膜やシナプス分子との結合を介し、脳の形成や神経機能に重要な役割を担い、また、その形成障害は脳奇形や精神発達遅滞、筋ジストロフィーなどの疾患の原因となる。金川 (A02)、萬谷 (A02) は、リガンドの結合に重要な糖鎖機能ドメインの構造を決定し (哺乳類で初めて同定したリビトールリン酸のタンデム構造を含む)、その修飾に関わる酵素活性を同定することで、修飾メカニズム、機能ドメインの生理的意義、疾患機序を明らかにした。得られた成果に基づいて疾患治療薬の開発が期待される (Cell Reports, 2016) (図6【ジストログリカン糖鎖の完読】)。

また、筋ジストロフィーの脳皮質形成異常の初期過程については不明な点が多かった。矢木 (A02公募)、岡 (A02計画) は、原因遺伝子の一つである AGO61 (POMGNT2) 遺伝子欠損マウスを作成し解析を行うことにより、基底膜破綻はカハール・レチウス細胞、サブプレート細胞による凝集塊の形成によって引き起こされ、さらに異常な形態を示す神経細胞が無秩序に移動した結果、クモ膜下腔への遊出および神経細胞の層形成不全が生じることを示す結果を得た (Sci Reports, 2013; Sci Reports, 2015) (図6【ジストログリカン糖鎖改変マウス】)。

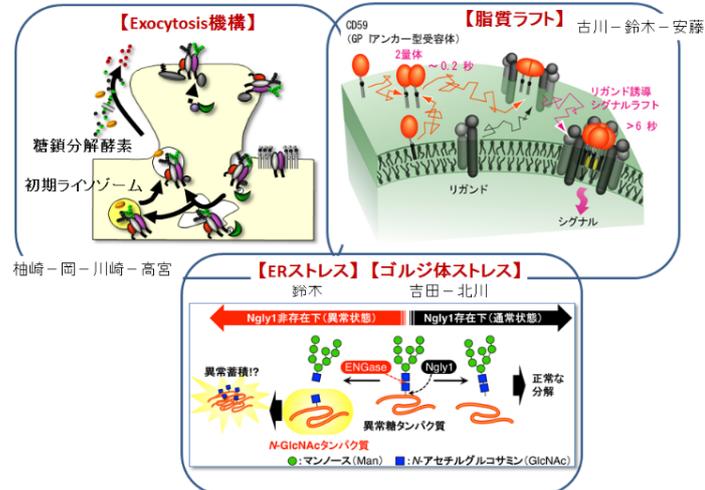
図6【成果3】ジストログリカン糖鎖(A02)



【小胞輸送、膜動態】 柚崎 (A02計画)、岡、川崎 (総括班分担)、高宮 は記憶・学習の基礎過程と考えられている LTP 時に、AMPA 受容体がライソゾーム様細胞内プールから表面輸送されることを見出した。これにより AMPA 受容体そのものの糖鎖に変化が生じるとともに、LTP 刺激時にそのプールから糖鎖分解酵素が分泌され細胞外糖鎖に変化をもたらすという興味深い可能性が示唆された (図7【Exocytosis 機構】) (投稿準備中)。これはグルタミン酸受容体トラフィッキング機構に新たなコンセプトを与える重要な発見である。

鈴木 (総括班分担)、安藤 (A02公募)、古川 (A02計画) は、天然のものと同じように振舞う蛍光プローブを作成することに成功した。GM1 など各々のガングリオシドは同じ糖脂質同士がダイマー化してクラスターを形成することを見出し、糖鎖の特異性およびクラスター形成を初めて可視化した (Nat Chem Biol, 2012) (図7【脂質ラフト】)。この成果は神経機能での新発見に繋がるだけでなく、論争の続く脂質ラフトの構造・機能の解明の意味で、広く他の

図7【成果4】小胞輸送、膜動態(A02)



研究領域にも影響を及ぼす。

酵素と基質は究極の分子間相互作用の一例である。鈴木 (A02 公募) は ER ストレスに伴って細胞質プロテアゾームで分解される N 型糖鎖が Ngly1 によって最初に切られ、その欠損は重篤な神経症状を示す遺伝子病を引き起こすことをはじめて明らかにした (PNAS, 2015) (図 7【ER ストレス】)。

<研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況>

領域内連携、若手育成、研究成果、海外への波及、と本領域で大切にしてきた目標は、順調に達成できたと思われる。問題とは言い難いが、運営の途中で、連携相手の照会が多数あり、一部の班員に連携が集中する危険性が生じた。この点に関しては、領域外の専門家を紹介し、順調に共同研究が進んだ。

組織変更は行わなかった。

図8 本領域のロゴマーク



なお、本領域での学術的成果の acknowledgements にグラントの情報を書き入れることを班員に要請した。また、本領域独自のロゴマークを作成した (図 8)。これは、左にある六角形が神経細胞を、右の塗りつぶした六角形が糖鎖を表しており、両者の融合研究を象徴している。班員にはこのロゴを学術集会での発表で使うように要請した。このロゴは、班員にこの領域が融合研究を推進することを繰り返し刷り込み、大きなグラントの支えで研究が行われることを自覚させる点で、思った以上の効果があった。

<審査結果の所見及び中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況>

<審査結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況>

【審査結果の所見】 本領域研究を進めるに当たっては、糖鎖機能ドメイン決定のための新しい探索アプローチの必要性や、シグナル伝達を熟知したメンバーを公募研究で補強することが望ましいとする意見もあった。

【対応状況】 公募要領 H24-25および26-H27で、「本領域では、下記の研究項目について、「計画研究」により、糖鎖科学研究者と神経科学研究者が多重的・多層的に協力し、共通のプラットフォームの上で議論を進め、糖鎖機能ドメインを軸に、糖鎖による神経機能制御機構を解くことを目指す。この取組を推進するため、従来の糖鎖、神経の研究に加えて、細胞内シグナル、構造、バイオインフォマティクスなどを含めた多角的なアプローチによってコンセプト作りに貢献する研究が必要である。さらに糖鎖・神経研究に貢献する技術開発研究も重要である。」と明記し、探索、シグナル伝達を含めた多角的アプローチの必要性を説いた。また、公募説明会も開催し、同様の説明を行った。その結果、化学合成学、構造学、シグナリングなど多様な人材を公募班から得ることができた。

<中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況>

【中間評価の所見】 「神経系をモデルとして明らかとなった糖鎖による生命活動制御機構は、がんや免疫系、発生など他の生命現象においても共通の原理が存在する可能性が高く、他分野への波及効果は高い。シンポジウムの開催や若手研究者への支援活動についても積極的に推進されており、評価できる。」として中間評価は A 評価を得た。

一方、今後の研究領域の推進方策として、「糖鎖研究と神経研究の融合・連携による研究成果は順調にあがりつつある。一方で、糖鎖機能ドメインの抽出は十分になされていないと思われるので、今後の発展に期待したい。若手研究者育成も積極的に推進されており、今後も継続的に発展させることを期待したい。なお、海外の研究者を招聘してシンポジウムの開催が行われているが、今後は「神経糖鎖生物学」をテーマとして海外でシンポジウムを開催するなど、海外に向けたより積極的な活動が望まれる。」とのコメントをもらった。

【対応状況】糖鎖機能ドメインの抽出により注力し、その相互作用分子・受容体の同定、機能や作用機構の解明に全力を注いだ。その結果、「**2. 研究領域の設定目的の達成度**」に記したように、世界をリードする研究成果を得ると同時に、その多くが領域内の共同研究であるという新学術の目的に合致する成果を得ることができた。また、海外でのシンポジウム開催、国際誌特集号企画などを積極的に行い、後述するように、「神経糖鎖生物学」の取組みが世界的に浸透する状況を作ることに成功した。

研究成果

研究課題名：統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110001

研究代表者：門松 健治（名古屋大学大学院医学系研究科 教授）

研究分担者：川崎 ナナ（横浜市立大学大学院生命医科学研究科 教授）、田村 純一（鳥取大学地域学部 教授）、北川 裕之（神戸薬科大学薬学部 教授）、柚崎 通介（慶應義塾大学医学部 教授）、鈴木 健一（京都大学物質－細胞統合システム拠点 特定拠点准教授）、岡 昌吾（京都大学大学院医学研究科 教授）

<研究の目的>

本新学術領域は、神経機能を制御する「糖鎖機能ドメイン」から受容体、下流の分子動態、統合的な神経機能に至る制御機能の解明を目指した。そのために総括班は、糖鎖研究と神経研究の融合・連携により、「神経糖鎖生物学」という新たな学問領域の創生することを目的とした。

<研究の成果>

融合研究の促進と確立のためには(1)学術連携(2)技術支援(3)若手育成の3つの柱が必要である。一方、他領域への波及効果を意図した活動の促進のためには(4)研究活動・成果の広報(5)領域主催のシンポジウム・会議が重要である。そして、このすべてに関わる最も重要な事項は上質な研究成果を生み出す融合研究であると考えた。

(1) 連携：融合研究の促進のために、総括班で心がけたのは異分野の研究者が議論できるプラットフォーム形成であった。そのために共同研究事例の状況を把握し、評価し、また、推奨に努めてきた。それを後押しするための日常業務として、領域内外の技術・リソースのまとめ、データベース活用のためのまとめを行い、提供してきた。班会議と若手の会を通して、領域内の会話を促進した。その結果、この領域開始以降の共同研究は飛躍的に増え、総括班の活動は実を結んでいると確信している。融合研究を概括すると、神経の現象・機能を横系に糖鎖を縦系にして連携はまさに多重的多層的に進化してきた。こうした融合研究はこれまでのコンセプトを書きかえるような重要な研究成果をもたらしている。一方で、融合研究の加速化に伴う研究支援活動

のキャパシティーオーバーが生じていた。そこで、総括班が、多くの班員に対して信頼できる研究者を紹介して共同研究を進めるなどの取り組みを始めた。また、本領域の特徴ある活動として、融合研究の延長として領域主催の研究会を行ってきた。軸索再生クラブと糖鎖新技術クラブである。これから領域内のユニークなプラットフォームとして融合研究推進に貢献した。

(2) 研究支援活動：領域推進に必要な技術について先進技術、基盤技術を問わず講習会ならびに個別指導を行ってきた。さらに、班会議やホームページなどをとおして、動物・細胞・化合物などのリソースの登録と情報の提供を行ってきた。その結果、中間の時点でも技術習得35件、講習会19件、解析支援71件、リソース提供102件におよぶ実績となった。

(3) 若手の会：20代30代の若手研究者を中心に自主的交流を主眼とする若手の会を設置した。30代の若手ながらPIとして計画班を持つ戸島(A01計画)をトップに、大籠(門松班)、松田(柚崎班)、竹松(岡班)、三上(北川班)の有能な若手研究者をコアメンバーとし、班会議でのテーブルディスカッションなどを運営し、その結果を班会議で発表し領域運営に反映させてきた。これにより若手研究者には顔見知りを超えて同志の感覚が備わり、研究技術や戦略について情報を交換するだけでなく、共同研究の種も作ってきた。班会議ではディスカッションの枠を十分に取り、議論を活性化させることにより、今では若手からの発言がシニアを凌駕するまでになった。また、上述の研究支援に加えて、国内外学会・シンポジウム参加、領域・班員による外国人

研究者招へいは若手育成に大いに役立った。国内外のシンポジウムは後述するように多数にわたる。幸い、人材育成については、『神経糖鎖生物学』の活動で数多くの若手のプロモーション(名古屋大学教授、岡山大学教授、横浜市大教授、愛知医科大学教授、名城大学教授、電気通信大学准教授、九州大学助教、名古屋大学助教など多数)が叶った。

(4) 広報：領域のホームページでは領域のイベントやリソース、成果等に、人材募集なども加え、さらにメールマガジン登録により能動的に情報を提供するシステムも構築してきた

(<http://shinkei-tosa.net/>)。また、ニュースレターを発行し、年間を通した活動と成果をまとめた。またアウトリーチ活動を盛んにおこない、中間の時点で計8件、受講者の延べ人数：975名に達している。領域が取り組んだ国内外のシンポジウムは「研究成果の発表状況」の項に述べるように多数にわたり、若手の参加はむろんのこと、時には若手自ら主催したものを含め、領域のプラットフォーム形成に寄与してきた。他領域への波及効果、領域内連携の2つの意味で、シンポジウム・国際活動および国際出版には特に力を入れた。その成果を下記に示す。なかでも4th Annual Conference of COST Action ECMNET (アンタルヤ、トルコ)「Brain Extracellular Matrix in Health and Disease」2014年と、Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research Satellite Symposium II (ハワイ)「Glycans in Neuroscience」2014年の

2つについては、我々の活動が国際的に認められた証拠の一つとしてこれらのイベントの意味は大きい。また、門松健治、北川裕之はそれぞれ、軸索再生、神経可塑性に関して2018年11月の米国神経科学会(SfN)シンポジウム2つを提案し両方とも採択された。これも、我々の活動が国際的に浸透した証左として挙げるができる。同様にExperimental Neurologyのspecial issueとして我々の領域名を冠した“Deciphering sugar chain-based signals regulating integrative neural functions”(2015年)を刊行することができた。さらに、2017年にはBiochimica et Biophysica Actaのspecial issueとして“Glyconeuroscience”を刊行する予定である。

(5) 領域主催のシンポジウム・会議については107ページからの「領域活動」にまとめたので参照されたい。

<研究の意義・展望>

本領域は5年間の支援を受けた後も継続した学術活動の成果を出しており、まさしく糖鎖と神経の融合研究が日本に根付く第一歩を踏み出せたと結論できると思う。特に、本領域の血を引き継ぐ若手研究者が多数育ったことは望外の喜びであった。

<主な研究発表>

班会議、シンポジウム、出版などの総括班活動については107ページからの「領域活動」にまとめたので参照されたい。

研究課題名：経験依存的神経可塑性におけるプロテオグリカンの認識機構

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110002

研究代表者：門松 健治（名古屋大学大学院医学系研究科 教授）

<研究の目的>

コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の CS 鎖およびケラタン硫酸プロテオグリカン (KSPG) の KS 鎖の機能ドメインが神経細胞の上の受容体に認識されるという作動原理の解明が本研究の目的である。

<研究の成果>

【眼優位性神経可塑性】免疫組織染色によって、低硫酸化された KS (GlcNAc のみが硫酸化され Gal の硫酸化のない状態) が、臨界期のマウス大脳皮質視覚野に発現していることが判った。低硫酸化 KS は広く細胞外マトリックスに発現し、特に興奮性神経細胞、抑制性神経細胞の周りには強く発現していた。電顕での解析により、シナプス周囲に（但し、シナプス前部にはない）KS の局在を認めた。KS はプロテオグリカンであるフォスファカンと局在が一致した。

GlcNAc6ST-1 欠損マウスでは KS の発現が半減するが、臨界期のこのマウスに片眼遮蔽を施した。その結果、遮蔽眼と反対側の大脳皮質視覚野両眼領域では遮蔽眼からの入力が減ったが（野生型マウスと同じ反応）、非遮蔽眼からの入力が増すことはなかった（野生型マウスとは異なる反応）。野生型で起こる遮蔽眼からの入力が増す現象の一部は、T 型カルシウムチャンネルを介した LTP によって説明されるが、GlcNAc6ST-1 欠損マウスではこの LTP が起きなかった。以上から、臨界期の大脳皮質視覚野両眼領域の KS は T 型カルシウムチャンネルを介した LTP を制御することが分かった。

【ALS、EAE、脊髄損傷、アルツハイマー病】SOD1G93A マウスと GlcNAc6ST-1 欠損マウスを掛け合わせ、ALS における KS の役割を解析した。GlcNAc6ST-1 欠損があると ALS の病態はむしろ悪化することが判明した。その機構を調べると M1、M2 ミクログリア

の polarization が野生型と異なることが分かった。すなわち、病態の早期では M2 ミクログリアが一過性に強く出現し、後期になるに従って M1 ミクログリアが優勢となる。GlcNAc6ST-1 欠損マウスでは早期の M2 ミクログリア出現が十分でなく、その分病態の進行が早くなると解釈できた。

EAE、脊髄損傷でも KS はミクログリアの活性化と密接に関係していた。例えば、Wallerian degeneration は軸索切断に伴って末梢部の軸索が変性する現象であるが、切断部位から遠位部（末梢側）には活性化ミクログリアが出現し、これらのミクログリアは KS を強く発現していた。

さらに、アルツハイマー病モデルではミクログリアの高硫酸化 KS がヒトでもマウスモデルでも発現上昇していた。これによりミクログリアの A β 貪食能が抑制されることが分かった。実際、GlcNAc6ST-1 欠損マウスで KS が減少するとは A β 沈着が抑えられていた。

脊髄損傷に関連して、CS や KS を担うプロテオグリカンの分解も重要である。特に ADAMTS-4 はアグリカンを初め多くのプロテオグリカン分解することで知られる。ADAMTS-4 の投与により脊髄損傷からの機能回復を促進することができた。また、ヒト歯髄幹細胞の脊髄損傷部位への移植によっても機能回復を促進することができた。

【神経軸索再生】プロテオグリカン上の糖鎖は代表的な軸索再生制御因子である。中でも CS は最も強い阻害因子の一つである。ところが同じ硫酸化糖鎖でもヘパラン硫酸 (HS) はむしろ軸索伸長を促進する。CS と HS は同じ受容体 PTPR σ 、LAR (受容体型チロシンフォスファターゼ) を共有することが知られている。にも拘らず、「何故、HS は軸索伸長を促進し、CS は阻害するのか？」これが本研究を推進する原動力になった疑問である。

私たちは、脊髄損傷後、神経損傷にもなって現れる軸索先端の変形 (dystrophic endball) が、ほぼ全ての損傷軸索末端で起こることを確認し、軸索再生阻害機構を知るには、この dystrophic endball 形成機構に迫るべきであると考えた。神経損傷部位には CS が誘導され、in vitro でも CS 濃度勾配の基質上で軸索伸長阻害を見ることができる。この in vitro モデルを活用し、in vivo で見られる損傷軸索末端の特徴的 dystrophic endball 形成を再現できる。

私たちは、この dystrophic endball 形成が autophagosome の蓄積を伴うことを発見した。この現象は in vivo でも起きた。すなわち、脊髄損傷後、皮質脊髄路の運動神経を BDA ラベルし、損傷した運動神経軸索末端を観察すると LC3 陽性の autophagosome の著明な蓄積を認めた。autophagy flux 中断は dystrophic endball 形成にとって必要十分条件となることが判った。一方、CS 受容体 PTPR σ をノックダウンするとこれらの現象は解除された。以上から、PTPR σ 下流のオートファジー中断が dystrophic endball 形成の原因になることが示された。さらに、CS による dystrophic endball 形成を、HS が解除することを見出した。そこで、同じ受容体を共有するにも関わらず「何故、HS は軸索伸長を促進し、CS は阻害するのか？」という疑問にアドレスした。田村純一博士 (鳥取大学)、Shang-Cheng Hung 博士 (台湾アカデミアシニカ) と共同し、数年をかけて CS、HS それぞれの様々な硫酸化パターンを網羅した合成糖鎖を作成した。これらを用いて、稀な硫酸化パターン (CS-E) で PTPR σ 、LAR と結合する CS では短い機能ドメインしか天然物には存在しえず、結合する受容体を単量体化

に導くものに対して、多様な硫酸化パターンが結合する HS では長い機能ドメインが天然物に存在し受容体を多量体化に導くことを明らかにした。

本研究によって硫酸化糖鎖による軸索再生制御機構を明らかにすることが出来た。CS による軸索再生阻害は、CS (CS-E 4 糖) \rightarrow PTPR 単量体化 \rightarrow オートファジー中断 \rightarrow dystrophic endball 形成 \rightarrow 軸索再生阻害の軸で制御されていた。HS はこの軸を受容体の多量体化を導くことにより解除した。PTPR 結合特異性を決める硫酸化パターンの出現頻度という偶然が機能ドメインの長さを決め、この必然により PTPR の集合体形成が制御されることが判った。

<研究の意義・展望>

本新学術領域が目的とした「糖鎖機能ドメインの同定 \rightarrow 受容体の決定 \rightarrow 細胞内シグナルの解明」を本研究では達成することができた。

<主な研究発表>

1. Zhang Z, (他8名), *Kadomatsu K, (他1名) (2017) Deficiency of a sulfotransferase for sialic acid-modified glycans mitigates Alzheimer's pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(14), E2947-E2954.
2. Y.Takeda-Uchimura, (他4名), Y.Komatsu and *K.Kadomatsu (2015) Requirement of keratan sulfate proteoglycan phosphacan with a specific sulfation pattern for critical period plasticity in the visual cortex. *Experimental Neurology*. 274, 145-155.
3. H.Matsui,(他3名), S.Kusunoki,(他2名), *K.Kadomatsu (2013) Keratan sulfate expression in microglia is diminished in the spinal cord in experimental autoimmune neuritis. *Cell Death Dis*. 4, e946.
4. K.Hirano,(他14名),*K.Kadomatsu (2013) Ablation of keratan sulfate accelerates early phase pathogenesis of ALS. *PLoS One*. 8(6), e66969.
5. S.Imagama,(他14名),*K.Kadomatsu (2011) Keratan sulfate restricts neural plasticity after spinal cord injury. *J. Neurosci*. 31, 17091-102.

研究課題名：コンドロイチン硫酸を中心とした糖鎖による神経活動の制御機構

Regulatory mechanisms of neuronal activity by chondroitin sulfate chains

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110003

研究代表者：北川 裕之（神戸薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者：田村 純一（鳥取大学・地域学部・教授）

連携研究者：灘中 里美（神戸薬科大学・薬学部・講師）、三上 雅久（神戸薬科大学・薬学部・講師）
宮田 真路（名古屋大学・生命農学研究科・特任助教）、佐藤 伴（筑波大学・生命環境系生物学分野・特任助教）、平岡 秀一（神戸薬科大学・薬学部・研究員）、北澤 和之（神戸薬科大学・薬学部・特別契約研究員）

研究協力者：志田 美春（神戸薬科大学・薬学部・大学院生）

<研究の目的>

コンドロイチン硫酸(CS)鎖は、コアタンパク質に共有結合したCSプロテオグリカンとして、ほとんど全ての細胞表面や細胞外マトリックスに存在している。CS鎖は、グルクロン酸とN-アセチルガラクトサミンが交互に繰り返した構造を基本糖鎖骨格にもち、その様々な部位が基質特異性の異なる硫酸基転移酵素群によって硫酸化修飾を受けて構造多様性を獲得する[1]。

脳のCS鎖は、N-アセチルガラクトサミンの4位が硫酸化された4-硫酸化CSと6位が硫酸化された6-硫酸化CSに大別でき、発生初期に豊富に存在する6-硫酸化CSは、成体になると減少する[2]。我々は、CS鎖の硫酸化パターンによって様々な神経機能が調節されると考え、6-硫酸化CSを過剰発現するトランスジェニック(C6ST-1 TG)マウスを作成し、解析した。

<研究の成果>

(1) 6-硫酸化CSによる神経可塑性の制御

CS鎖の硫酸化パターンが、眼優位性可塑性に影響するのかを検討したところ、C6ST-1 TGマウスは通常の臨界期が終了した成体でも、臨界期と同様の眼優位性可塑性を維持していた。

そこで次に、CS鎖の硫酸化パターンが、パルブアルブミンというカルシウム結合タンパク質を発現する抑制性神経細胞(PV細胞)周囲に形成されるペリニューロナルネット(PNN)に与える影響を検討した。PNNは古典的なマーカーであるWFAレク

チンで染色され、成体の野生型マウス視覚野では、全体の約90%のPV細胞が、WFA陽性のPNNによって覆われていた。一方、C6ST-1 TGマウスでは、WFA陽性PNN数が有意に減少していたが、PV細胞の数自体は、野生型と同程度であった。

PV細胞の成熟には、網膜と外側膝状体で合成されたホメオタンパク質Otx2が、軸索内を輸送され視覚野まで到達しPV細胞に選択的に蓄積されることが必要である。そこで、PNNのCS鎖の硫酸化パターンがOtx2の取り込みに関与するのではないかと考えた。特異的抗体を用いて視覚野におけるOtx2の局在を解析したところ、野生型マウスでは多くのPV細胞にOtx2の蓄積が見られたが、C6ST-1 TGマウスではOtx2陽性細胞数が顕著に減少していた。さらに、CS鎖の硫酸化パターンが、PV細胞の電気生理学的性質にどのような影響を与えるのか解析したところ、6-硫酸化CSの過剰発現により、PV細胞は電気生理学的性質に成熟できず、抑制性神経回路の効果が低下することが分かった(図1)[3]。

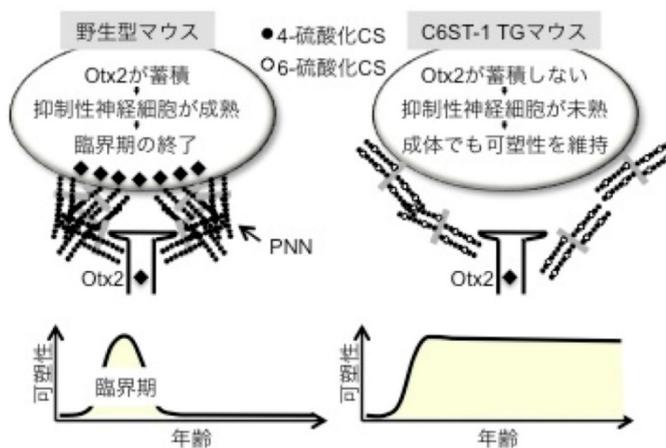


図1 C6ST-1 TGマウスは、PNNの形成不全により抑制性神経細胞にOtx2が蓄積できず、成体でも可塑性を維持する。

(2) 6-硫酸化CSによるPNNの形成制御

6-硫酸化CSがどのようにPNNの形成を制御しているのかをC6ST-1 TGマウスを用いて解析した。C6ST-1 TGマウスと野生型マウスの脳における種々のプロテオグリカンの発現をウエスタンブロッティング解析により調べたところ、C6ST-1 TGマウスの脳において、PNNの主要な成分として知られるアグリカンのみが選択的に減少していた。また、WFAを用いた組織染色からも、野生型マウスと比べC6ST-1 TGマウスではPNNへのアグリカンの蓄積が特異的に減少していることが判明した。さらに、C6ST-1 TGマウスにおける脳由来のアグリカンは、野生型マウス由来のものに比べ、マウス脳に発現してアグリカンを分解することが知られるADAMTS-5 (aggrecanase-2)による分解を受けやすいことがわかった。したがって、アグリカン上のCS鎖の硫酸化構造はアグリカンの安定性に影響を与え、その結果PNNの形成や神経可塑性を制御していることが示唆された[4]。

(3) 6-硫酸化CSによるてんかん発作の発症

CS鎖の硫酸化パターンが、てんかん発作の発症にかかわる可能性を検討した。カイニン酸投与後の野生型マウス的大脑皮質と海馬で、6-硫酸化CSが増加し4S/6S比が低下した。また、カイニン酸投与後120分間、けいれん発作の比較を行ったところ、C6ST-1 TGマウスは、野生型マウスよりてんかん発作が起きやすく、加えてカイニン酸投与後2時間以内の死亡率が高いことが判明した。以上の結果から、てんかんの発症や、てんかんを繰り返す難治性てんかんの発症過程に、6-硫酸化CSが関与している可能性が示唆された[5]。

<研究の意義・展望>

脳においてCS鎖は、硫酸化パターンを変化させることにより神経細胞の機能を調節することで、神経可塑性をはじめとする様々な神経活動を制御することが明らかとなった。本研究から得られた成果は、神経以外の領域にも応用可能なCS鎖の作用機構を提示できる可能性がある。

<主な研究発表>

- [1] Tadahisa Mikami, and Hiroshi Kitagawa (2013) Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4719-4733.
- [2] Shinji Miyata, and Hiroshi Kitagawa (2016) Chondroitin sulfate and neuronal disorders. *Front. Biosci.* 21, 1330-1340.
- [3] Shinji Miyata, Yukio Komatsu, Yumiko Yoshimura, Choji Taya, and Hiroshi Kitagawa (2012) Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nature Neurosci.* 15, 414-422.
- [4] Noriko Yutsudo and Hiroshi Kitagawa (2015) Involvement of chondroitin 6-sulfation in temporal lobe epilepsy. *Exp. Neurol.* 274, 126-133.
- [5] Shinji Miyata, and Hiroshi Kitagawa (2016) Chondroitin 6-sulfation regulates perineuronal net formation by controlling the stability of aggrecan. *Neural Plasticity* 2016, Article ID 1305801, 13 pages.

研究課題名：ペリニューロナル・ネットによる視覚野可塑性の制御

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110004

研究代表者：小松由紀夫（生理学研究所生体情報研究系 特別協力研究員）

<研究の目的>

大脳皮質視覚野においてシナプス可塑性は感受性期に起きる経験依存的な神経回路の精緻化の基盤と考えられている。錐体細胞において興奮性シナプスのT型Ca²⁺チャネル依存性長期増強（T-LTP）は感受性期に局限して起こり、暗室飼育すると感受性期が延長するのに対応して成熟期においても起こる。成長と共にパルブアルブミン（PV）陽性の抑制性細胞はコンドロイチン硫酸（CS）やケラタン硫酸（KS）鎖を持つプロテオグリカン等から構成されるペリニューロナル・ネット（PNN）により取り囲まれる。成熟動物においてCSの酵素処理により眼優位可塑性が復活するので、PNN内の糖鎖機能ドメインがPV細胞を介してシナプス可塑性を調節し、感受性期を制御することが予想される。本計画では、CSやKSの酵素処理や糖鎖を変異させた遺伝子改変動物を用いて糖鎖機能ドメインによる視覚野可塑性制御機構の解明を目指した。

<研究の成果>

（1）CS鎖の硫酸化パターンの変化による感受性期の制御

PV陽性GABA細胞を取り囲むPNNの主要な構成分子であるCS鎖の硫酸化パターンの変化が眼優位可塑性の感受性期の制御に関与する可能性を検討した。6位の硫酸化（6S）を担う硫酸転移酵素を過剰発現させたC6ST-1 TGマウスを用いた研究により、6S優位から4S優位への硫酸化パターンの変化が感受性期の終了を制御することが分かった（研究発表1）。C6ST-1 TGマウスでは感受性期が延長し、成長しても感受性期型の眼優位可塑性が見られ、PNNの構造の異常とホメオプロテインOtx2のPV細胞への取り込みの低下が見られた。野生型マウスに比して、PV細胞の静止膜電位はより脱分極しており、活動電位の幅は広く、PV細胞の電気生理学的特性の一部に発達の遅れが見られた。このPV細胞の変

化により視覚野内の信号伝達に生じる変化を視覚刺激に対する視覚野細胞の反応により解析した。視覚反応選択性は野生型と差が無いが、視覚刺激提示終了より長く反応が持続し、全体としては抑制がやや低下していると推定した。この抑制の低下が感受性期を延長する一因と考えられる（図1、研究発表1）。

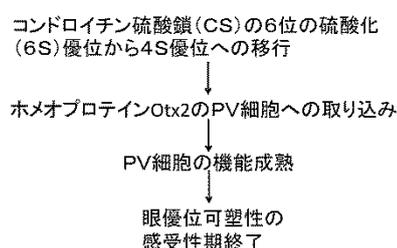


図1 コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化パターンの変化による視覚野可塑性の制御

眼優位可塑性の基盤と考えられるシナプス可塑性のC6ST-1 TGと野生型マウスとの相違を調べた。野生型マウスの視覚野スライス標本において、4層の電気刺激により2/3層に誘発される細胞外電位を解析した結果、2Hz刺激を15分間与えると、ラットと異なり、感受性期だけでなく成熟期にも長期増強が起こることが分かった。野生型マウスにおける感受性期の長期増強は、ラットの場合と同様にNi²⁺あるいはML218で誘発が阻害され、T型Ca²⁺チャネル依存性長期増強（T-LTP）であることが分かった。また、成熟期に見られる長期増強の誘発にはT型Ca²⁺チャネルではなく、L型Ca²⁺チャネルが必要であることも判明した。野生型マウスとは異なり、C6ST-1 TGマウスでは、感受性期、成熟期の両時期においてT-LTPが同様に起こった。T-LTPが成熟期でも起こることが、C6ST-1 TGでは成長しても感受性期と同様な眼優位可塑性が持続する理由の一つと考えられる。Ca²⁺電流を2/3層錐体細胞からホール・セル記録法により計測した結果、Ni²⁺感受性T型Ca²⁺電流は、野生型では感受性期では

大きく、成長に伴い減少した（研究発表4）。C6ST-1 TG マウスでは成長しても感受性期のレベルの電流が持続した。この結果は、CS鎖の硫酸化が6S優位から4S優位に変化すると Ni^{2+} 感受性T型 Ca^{2+} チャンネル電流が減少してT-LTPが起こらなくなり、片眼遮蔽による非遮蔽眼反応の増大が生じなくなることを示唆している。

（2）KS鎖による眼優位可塑性の制御

KS鎖の伸長に必要な酵素の一つであるGlcNAc6ST1を欠くマウス（KS欠損マウス）を解析したところ、感受性期の眼優位可塑性に異常があることが分かった。野生型マウスの視覚野細胞では、片眼遮蔽後に遮蔽眼刺激に対する視覚応答の減弱と非遮蔽眼刺激に対する視覚応答の増強が見られるが、KS欠損マウスでは前者の減弱は生じたが、後者の増強は見られなかった。この結果は、KS欠損マウスではT-LTPが障害されている可能性を示唆するので、KS欠損マウスから作製した視覚野スライス標本で調べた結果、T-LTPは起きないことが分かった。また、野生型マウスから作製したスライスを、ケラタナーゼを含む人工脳脊髄液で灌流すると、KS欠損マウスと同様にT-LTPは障害されていた（研究発表2）。

感受性期の開始時期以降の視覚野に発現しているKSは低硫酸化のものであり、免疫組織学的検索から、フォスファカン上に存在することが分かった。抗フォスファカン抗体6B4存在下ではT-LTPは起こらず、KS欠損マウスにおいて灌流液に $\text{TNF}\alpha$ を加

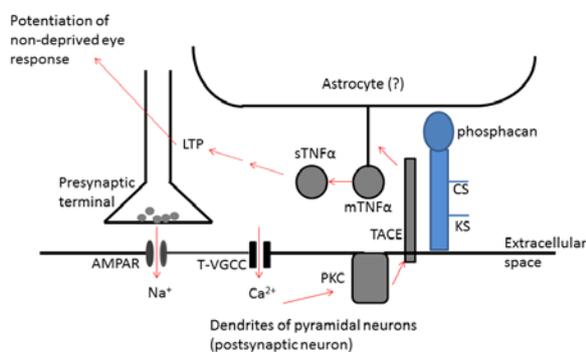


図2. フォスファカンに存在するケラタン硫酸鎖(KS)は $\text{TNF}\alpha$ シグナリングの調節を介してT-LTPと片眼遮蔽による非遮蔽眼反応の増強を制御する

えるとT-LTPは復活した。KS欠損マウスにおけるT-LTPの障害は、 $\text{TNF}\alpha$ 欠損マウスに見られたもの

と同様である（研究発表4）。しかし、KS欠損マウスの視覚野における $\text{TNF}\alpha$ 発現量は野生型と差がないので、膜結合型 $\text{TNF}\alpha$ を可溶性 $\text{TNF}\alpha$ に変換する酵素 $\text{TNF}\alpha$ converting enzyme (TACE)あるいはその上流の信号伝達分子の機能の制御にKS-フォスファカンが関与すると考えられる（図2、研究発表2）。これらの結果は、KSがT-LTPを介して非遮蔽眼反応の増強を制御することを示唆する

<研究の意義・展望>

CSが視覚野の眼優位可塑性の感受性期の制御に関与することはすでに知られていたが、本研究を通してその具体的分子機構の一端を明らかにすることが出来た。また、KSも視覚野の可塑性の制御に関与することが分かった。その役割は、CSとは異なり、感受性期の制御というよりは、可塑性機構自体の制御に関わるようである。CSとKSの眼優位可塑性制御の一部はT-LTPの制御を介して起こる可能性が強い。したがって、眼優位可塑性よりも分子機構の解析が容易と思われるT-LTPにおいて、これらの糖鎖の役割を解析することにより、視覚野可塑性の糖鎖による制御機構並びにその制御の機能的意義の解明に寄与できるであろう。

<主な研究発表>

1. Shinji Miyata, Yukio Komatsu, Yumiko Yoshimura, Choji Taya and Hiroshi Kitagawa (2012) Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nature Neurosci.* 15, 414-422.
2. Yoshiko Takeda-Uchimura, Kenji Uchimura, Taketoshi Sugimura, Yuchio Yanagawa, Toshisuke Kawasaki, Yukio Komatsu and Kenji Kadomatsu (2015) Requirement of keratan sulfate proteoglycan phosphacan with a specific sulfation pattern for critical period plasticity in the visual cortex. *Experimental Neurology.* 274, 145-155.
3. Taketoshi Sugimura, Yumiko Yoshimura and Yukio Komatsu (2015) $\text{TNF}\alpha$ is required for the production of T-type Ca^{2+} channel-dependent long-term potentiation in visual cortex. *Neurosci. Res.* 96, 37-44.
4. Shoko Horibe, Etsuko Tarusawa, Yukio Komatsu and Yumiko Yoshimura (2014) Ni^{2+} -sensitive T-type Ca^{2+} channel currents are regulated in parallel with synaptic and visual response plasticity in visual cortex. *Neurosci. Res.* 87, 33-39.
5. Toshiaki Endo, Yuchio Yanagawa and Yukio Komatsu (2016) Substance P activates Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels through a phosphatidylcholine-specific phospholipase C signaling pathway in nNOS-expressing GABAergic neurons in visual cortex. *Cereb. Cortex.* 26, 669-682.

研究課題名：神経成長円錐の応答性を指標とした糖鎖機能ドメインの解析

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110005

研究代表者：戸島拓郎（理化学研究所脳科学総合研究センター 研究員）

連携研究者：上口裕之（理化学研究所脳科学総合研究センター チームリーダー）

連携研究者：久保山友晴（富山大学和漢医薬学総合研究所 助教）

<研究の目的>

本領域では、糖鎖配列内に存在し生理活性を持つ最小機能単位を「糖鎖機能ドメイン」と名付け、これにより惹起される神経活動の制御機構を解明することを目的として掲げた。戸島班においては、発生中の軸索先端構造である成長円錐を研究対象とし、その運動性を指標として様々な糖鎖機能ドメインおよびその受容体を探索した。さらに、糖鎖受容により惹起される一連の細胞内シグナル伝達経路を同定し、成長円錐の運動性（誘引・反発・伸長停止など）を臨機応変に調節する仕組みに迫った。

<研究の成果>

【コンドロイチン硫酸(CS)による軸索ガイダンス】

培養下において CS サブタイプの一つである CS-E の濃度勾配を作製し、これに対するニワトリ胚脊髄後根神経節細胞の軸索成長円錐の応答性を解析した。その結果、CS-E は細胞内セカンドメッセンジャーを介して成長円錐を誘引または反発する活性を持つ「両方向性」の軸索ガイダンス因子として働くことが明らかになった。具体的には、成長円錐内の cAMP 濃度が高い状態では CS-E は誘引因子として働き、逆に cAMP 濃度が低い状態では反発因子として働いた。またカルシウムシグナルは誘引・反発のどちらにも必要であったが、開口するカルシウムチャンネルの種類が誘引時・反発時において異なっていた。cAMP・カルシウムシグナルの下流では、エクソサイトーシスとエンドサイトーシスの拮抗制御により、軸索の誘引と反発が駆動されることが明らかになった（文献 1, 3）。続いて、CS-E に対する成長円錐上の受容体を探索した。機能阻害実験により、誘引時と反発時では異なる組み合わせの CS 受容体が機能することを示唆するデータを得た。また、様々な鎖長の合成 CS-E 糖鎖（2－8 糖）を成長円

錐に作用させ、誘引と反発を引き起こすために十分な最短長を検討した結果、誘引と反発では必要な鎖長が異なっていた。このことは、誘引と反発で異なる受容体セットが機能していることを支持する結果である。

【ケラタン硫酸 (KS) による軸索ガイダンス】

KS サブタイプの一つである高硫酸化型 KS の濃度勾配を成長円錐に作用させると、軸索反発因子として機能した。一方で低硫酸化型 KS には軸索ガイダンス活性は見られなかった。高硫酸化 KS に対する反発は、細胞内 cAMP を上昇させることで誘引に転換した。この誘引と反発はどちらもカルシウム依存性であったが、開口するカルシウムチャンネルの組合せが誘引時・反発時で異なっていた。以上の結果は前述の CS-E の作用と共通性が非常に高く、糖鎖惹起性細胞内シグナル伝達系の普遍性が示唆された。また、高感度カルシウム感受性蛍光色素 GCaMP6s を用いて、高硫酸化 KS 投与に応じた成長円錐内カルシウム濃度上昇を時空間的に可視化することにも成功した。

【パキシリンのリン酸化による軸索再生機構】

成体中枢神経系の損傷部位に沈着する CS/KS 濃度勾配を上る方向に伸長してきた再生軸索の成長円錐は dystrophic endball と呼ばれる病的構造体を呈して伸長を停止する。本項目では、培養皿上に接着性の CS 濃度勾配を作製し、これに遭遇した成体ラット由来の脊髄後根神経節細胞の軸索先端が dystrophic endball に姿を変えることを見出した。この dystrophic endball は、接着斑構成タンパク質であるパキシリンのリン酸化模倣体を導入することで前進能力を回復した。パキシリンのリン酸化は、cAMP シグナル下流において制御を受けることも明らかになった。さらに、生体マウスにリン酸化模倣

型パキシリン遺伝子を導入した結果、視神経損傷部位での軸索再生が有意に改善した（文献4）。

<研究の意義・展望>

今後は、CS/KS 合成酵素欠損マウスを用いて、発生組織内における CS/KS の軸索ガイダンス活性についても検証して行く予定である。本課題の重要な成果の一つとして、CS-E および高硫酸化 KS はどちらも cAMP 依存的な両方向性軸索ガイダンス因子として働くことが示された（図1）。この結果から、成体損傷神経組織において本来再生阻害因子として働く CS や KS を、細胞内シグナルの操作により軸索再生促進因子として読み直させるといった軸索再生戦略への期待が大きく膨らんだ(文献2,5)。

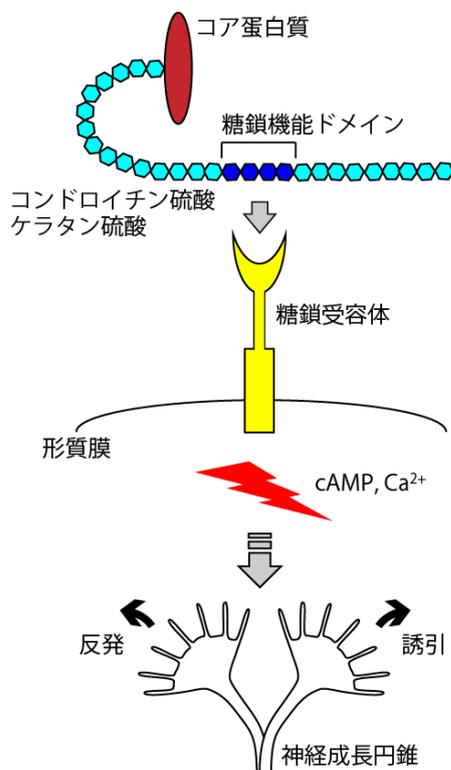


図1. 本課題で明らかになった糖鎖機能ドメインによる両方向性軸索ガイダンスの概略図

<主な研究発表>

1. Hiroki Akiyama, Tetsuko Fukuda, Takuro Tojima, Viacheslav Nikolaev, Hiroyuki Kamiguchi. (2016) Cyclic nucleotide control of microtubule dynamics for axon guidance. *Journal of Neuroscience* 36:5636-5649.
2. Takuro Tojima, Hiroyuki Kamiguchi. (2015) Exocytic and endocytic membrane trafficking in axon development. *Development, Growth & Differentiation* 57:291-304.
3. Takuro Tojima, Rurika Itofusa, Hiroyuki Kamiguchi. (2014) Steering neuronal growth cones by shifting the imbalance between exocytosis and endocytosis. *Journal of Neuroscience* 34:7165-7178.
4. Tomoharu Kuboyama, Xueting Luo, Kevin Park, Murray G. Blackmore, Takuro Tojima, Chihiro Tohda, John L. Bixby, Vance P. Lemmon, Hiroyuki Kamiguchi. (2013) Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. *Experimental Neurology* 248:157-169.
5. Takuro Tojima, Jacob H. Hines, John R. Henley, Hiroyuki Kamiguchi. (2011) Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nature Reviews Neuroscience* 12:191-203.

研究課題名：ヘパラン硫酸エンドスルファターゼがつくる硫酸化ドメイン構造と脳機能

Endosulfatase-mediated sulfation patterning of heparan sulfate and brain functions

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110502

研究代表者：梶 和子（筑波大学医学医療系 講師）

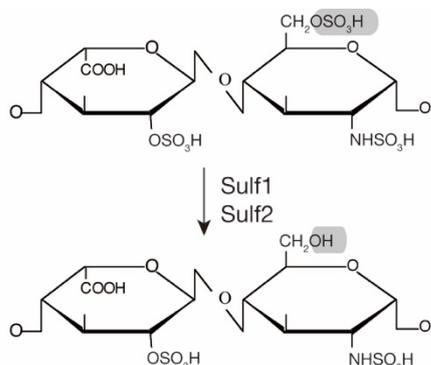
連携研究者：梶 正幸（筑波大学医学医療系 教授）

連携研究者：梶 秀人（高知大学医学部 教授）

連携研究者：奥谷 文乃（高知大学医学部 准教授）

<研究の目的>

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、神経系で、細胞分化、細胞移動、軸索ガイダンス、シナプス形成などを制御する。このような多様な生物活性は、コア蛋白質に共有結合したヘパラン硫酸糖鎖が多くのシグナル分子、酵素、受容体、細胞外マトリックス分子などと相互作用することによって引き起こされる。ヘパラン硫酸は構造多様性を有し、糖鎖中の硫酸基の有無やその配置（硫酸化パターン）が、シグナル分子などとの結合の選択性や強さを決定する。エンドスルファターゼ Sulf1、Sulf2 は、ヘパラン硫酸糖鎖の高硫酸化ドメイン中の6位の硫酸基を選択的に加水分解し、細胞間シグナル伝達を正または負に調節する（下図参照）。



研究代表者らは、これまでに、Sulf1 ノックアウトマウス、Sulf2 ノックアウトマウスのヘパラン硫酸で、2位、6位、N位の三カ所が硫酸化された二糖単位が増加していること、ダブルノックアウトマウスが軸索投射異常を有することなどを明らかにしてきた。本研究では、Sulf の成獣脳における役割を、主にノックアウトマウスを用いて、分子、細胞、回路、行動レベルで明らかにすることを目的と

した。

<研究の成果>

ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ Sulf1 遺伝子をノックアウトしたマウスが嗅覚連合学習障害を示すことを明らかにした。すなわち、生後12日のマウスを2部屋に分かれたチャンバーに入れ、実験群では臭い物質（シトラール）を提示した部屋で床に電気ショックを与え、対照群では電気ショックを与えなかった。翌日、同じチャンバーにマウスを入れてCCDカメラで行動を記録し、臭い物質を入れた部屋での滞在時間を測定したところ、野性型マウスは臭い物質が入った部屋を嫌う傾向を示したが、Sulf1 ノックアウトマウスではその傾向が有意に低かった。

Sulf1 遺伝子の成獣脳での発現を調べたところ、嗅球（傍糸球体細胞の一部、顆粒細胞）、前嗅核、梨状皮質、嗅結節、内嗅皮質など嗅覚情報伝達と密接に関連する脳部位に発現が強く見られた。それ以外に、大脳皮質6層、線条体の一部、側坐核、視床室傍核、最後野などに強い発現が見られた。

次いで、嗅覚刺激で活性化される脳部位を c-fos 免疫染色を用いてマッピングした。生後12日の幼弱マウスを、*in vivo*、または、*in vivo*+電気ショックで刺激した30～60分後に灌流固定し、50ミクロンの凍結切片を作成した。これを抗 c-fos 抗体で染色し、顕微鏡で観察したところ、嗅球、梨状皮質、大脳皮質、海馬、視床室傍核、青斑核などに強い c-fos 陽性細胞が見られた。しかしながら、野性型マウスと Sulf1 ホモで c-fos 染色の強度を比べたところ、明らかに差がある脳部位は認められず、二重染色で Sulf1 遺伝子発現と c-fos 染色が重なる細胞も見ら

れなかった（下図参照）。

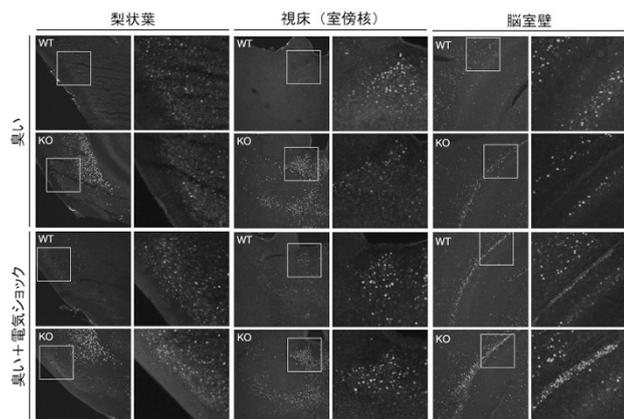


図 脳活動部位のマッピング。野生型マウス (WT) と Sulf1 ノックアウトマウス (KO) における c-fos 染色 (右) を示す。左は、ノックインされた lacZ の染色であり、Sulf1 の発現部位を示す。

以上の結果から、Sulf1 遺伝子が嗅覚情報伝達および嗅覚連合学習と関連する可能性が強く示唆されたが、どの脳部位で、どのような分子メカニズムで制御が行われているかを解明することはできなかった。

<研究の意義・展望>

Sulf1/2 は、ヘパラン硫酸糖鎖の中でシグナル分子との相互作用に重要な S ドメインにおける硫酸

化構造を変化させる酵素であり、細胞間情報伝達の調節に重要な役割を担っていると考えられているが、脳機能制御との関連はあまり分かっていなかった。本研究は、Sulf1 が嗅覚記憶の形成に重要であることを示した意義が大きい。今後、どのような分子メカニズムで記憶形成に関与しているのかを明らかにすることが必要である。

<主な研究発表>

1. Jiang et al. Sulfatase2 Modulates Fate Change from Motor Neurons to Oligodendrocyte Precursor Cells through Coordinated Regulation of Shh Signaling with Sulfatase1. *Dev. Neurosci.* in press.
2. Takashima et al. Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, Regulate Glomerular Integrity by Modulating Growth Factor Signaling. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 310, F395-408, 2016.
3. Freeman et al. Expression of the heparan sulfate 6-O-endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, in the avian and mammalian inner ear suggests a role for sulfation in inner ear development. *Dev. Dyn.* 244, 168-180, 2015.
4. Nagamine et al. Organ-Specific Sulfation Patterns of Heparan Sulfate Generated by Extracellular Sulfatases Sulf1 and Sulf2 in Mice. *J. Biol. Chem.* 287, 9579-9590, 2012.
5. 榭和子、榭正幸 ヘパラン硫酸微細構造の組織特異性とその決定機構 医学のあゆみ 245 (7), 600-602, 2013.

研究課題名：コンドロイチン・ヘパラン硫酸合成酵素の発現制御－脊髄損傷再生・発生・神経機能－

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110503

研究代表者：武内恒成（新潟大学医学部 准教授（平成24年）・愛知医科大学医学部 教授（平成25年））

研究課題名：コンドロイチン・ヘパラン硫酸合成酵素発現ネットワーク－神経再生・発生・機能相関－

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110703

研究代表者：武内恒成（愛知医科大学医学部 教授）

<研究の目的>

中枢神経系の発生・回路形成、および神経の成熟過程にコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）をはじめとするグリコサミノグリカンが多方面から機能する。発生過程ではコンドロイチン硫酸（CS）は、脳の層形成や神経回路形成に関わることが示唆されており、また一方では中枢神経が損傷を受けると、CSPGが神経再生の阻害因子として損傷後修復を抑えてしまうことが言われてきた。実際に、CSが神経損傷後修復をいかに阻害するのか、なぜ阻害因子として機能するのか、中枢神経系損傷後回復を目指す際にどのような治療応用が考えられるかを研究の目的とした。これら解析から得られるCSの発現制御機構と、さらには細胞外マトリックスとして機能するグリコサミノグリカンは従来考えられてきたように静的なものではなく、発生・再生および神経可塑性においてきわめて動的に機能するシステムとして示すことも目標とした。

<研究の成果>

1) 脊髄損傷を標的としたコンドロイチン硫酸（CS）の作用機構（T1KOマウスの解析）

中枢神経障害・損傷を受けた際には、コンドロイチン硫酸（CS）は損傷部周辺で劇的な発現上昇を示しグリア性瘢痕として再生神経の進入を阻害するとされる。我々は、CSの機能を直接見るためにCS糖転移酵素（CSGalNAc T1およびT2）ノックアウトマウスを作成し（Watanabe, Takeuchi et. al. Biochem. J.）、脊髄損傷モデルマウス実験系を立ち上げて解析を行った。我々のKOマウスのうち、T1KO

マウスでは、神経系のCS発現量は発生過程ではおよそ半分、成体における脊髄損傷後の脊髄組織ではコントロールマウスと比べて70%程度の発現量であった。T2KOマウスではCS発現量の大きな減弱は認めなかった。これらマウスを用いて脊髄損傷実験を行ったところ、T1KOマウスでは損傷後回復が生理機能においても組織化学的にも劇的に早かった。これはこれまでCSが脊髄損傷後修復の最大の再生阻害要因であることを示すことにもなったChABC（コンドロイチナーゼABC（CS分解酵素））投与による脊髄損傷後マウスよりも、はるかに顕著な回復を示すことを見出した。この劇的な回復のメカニズムとしては阻害因子CSの発現低下だけではなく、損傷後瘢痕（繊維性瘢痕）が縮小すること、神経進展を（CSとは逆に）促進するHSの発現が高まることを明らかにした（1: Takeuchi, et. al., NatureCommun.）。さらにCS発現を阻害することによって、本来発現しないHSが糖鎖だけではなくプロテオグリカンであるグリピカンに結合して神経細胞に発現することを見出した。さらには、神経細胞培養系による実験から、HS発現を人為的に誘導することに成功し、in vitroにおいても神経線維の伸長を促進することも示すことが出来た。一連の解析から、脊髄損傷修復において、CSGalNAc T1は絶妙な治療ターゲットとなりうることを示した。

2) コンドロイチン・ヘパラン硫酸の人為的制御による治療方向性の提示（T1KDシステムの構築）

上記の結果を踏まえ、治療・神経再生医療に向けたCS発現制御への方法論を確立した。T1およびT2

遺伝子の siRNA を検索し、抑制配列を準備した。また、損傷部組織部位特異的に遺伝子抑制 (KD) を行うため、バイオマテリアルを併用したデリバリーシステム (DDS) を構築した (Tamada et. al Adv. Material)。T1KD マウスでは ChABC による回復を凌駕することは出来なかったが、高いレベルでの生理的・組織学的回復を示した。さらに T1/T2 両遺伝子を同時に KD することによって、KO マウス同様に脊髄損傷時に HS の発現誘導を引き起こし、KO マウスと同レベルの回復を見出すことが出来た。また繊維性瘢痕が縮小する機構の一端を細胞生物学的に解析した。グリア細胞と神経細胞および繊維芽細胞の共培養下での細胞集塊形成を定量化すること、これら集塊が CS を発現するし瘢痕形成と同様に細胞塊を形成する in vitro 再現系を構築した。CS は TGF β ・PDGF 等によって発現誘導されること、さらに CS 発現がフィードバックして瘢痕形成を促進することを明らかにした。

3) コンドロイチン・ヘパラン硫酸の発現制御による発生過程及び PNN への関与

発生段階で CS が如何に機能しているかをさらに詳細にみる目的で、組織学的解析と KD システムを駆使して解析した。とくに我々が作成した CS をリガンドとする神経接着因子 TAG1 の KO マウスも駆使して KD による解析系と併用し、機能相関を解析した。in vivo 解析からは脳形成時の細胞移動に重要 (Okamoto et. al. Nature Neurosci.) であること、さらには神経細胞の軸索極性決定に重要であることを明らかにした (Namba et. al. Neuron,)。さらに、CSKO マウスとの交配および KD マウスの解析から、CS の時空間的発現制御が神経系の初期発生過程の神経細胞移動に重要であり、神経回路形成において重要なタイミングを決めることを示唆した。神経系の後期発生では神経機能発現のために、ペリニューロナルネット (PNN) と呼ばれる構造が知られ、この実態は CS を中心とした構造体である。この PNN は、ChABC 処理ではヒアルロン酸をはじめとする骨格構造とともに消失してしまうがわれわれの T1/T2KO マウスでは CS のみの消失から機能をみる事ができることを示した。さらに CS 発現量のわずかな低

下によっても、マーカーを用いた PNN の発現は認められなくなることと、この KO マウスを用いることでも新たな神経核を見出した (Horii, et al. Eur J Neurosci) 神経機能だけではなく、神経再生過程においても PNN は重要であることを見出した。我々の T1KO マウスでは ChABC 処理など他の要因と比べても劇的な PNN 発現抑制がかかっている。神経再生修復度と PNN 発現低下は相関しており、神経の再生阻害過程で PNN が何らかの因子を保持することで神経再生を阻害することが示唆された。

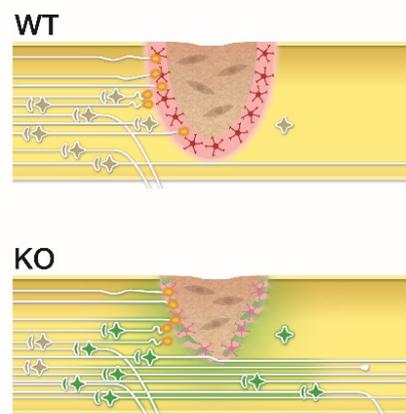
<研究の意義・展望>

本研究では、神経再生医療に向け T1 酵素を中心とする CS 発現制御と HS 誘導が切妙なターゲットになることも示した。実際に KD マウスを用いた実験系などから治療可能性を示唆した。さらに、CS が静的な細胞外基質ではなく、損傷炎症時にはダイナミックな発現制御があり、PNN のような構造体を通して神経再生・発生に機能すること、その発現制御機構などへつなげることができた。

<主な研究発表>

1. K.Takeuchi,(他 3 名), S.Miyata,(他 12 名), H.Kitagawa,(他 1 名) (2013) Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. Nat Commun. 4:2740. doi: 10.1038/ncomms3740.
2. M.Okamoto,(他 5 名), K.Takeuchi,(他 14 名), *T.Miyata (2013) TAG-1-assisted progenitor elongation streamlines nuclear migration to optimize subapical crowding. Nat Neurosci. 11,1556-1566.
3. Namba T., (他 14 名)Takeuchi K. and *Kaibuchi K.(2014) Neuron, 81,814-829
4. N.Horii-Hayashi, (他 3 名),Takeuchi K, Nishi M. (2015) Eur J Neurosci.42(6),2322-2334

<図>



研究課題名：細胞表面酸性多糖が織りなす微小糖鎖空間による神経機能調節機構の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110506

研究代表者：佐藤ちひろ（名古屋大学生物機能開発利用研究センター 准教授）

研究課題名：精神疾患に関与するポリシアル酸転移酵素の機能解析

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110708

研究代表者：佐藤ちひろ（名古屋大学生物機能開発利用研究センター 准教授）

<研究の目的>

脊椎動物脳に偏在する酸性多糖であるポリシアル酸 (polySia) は、シアル酸がタンデムに 8-400 残基結合した構造をもち、主として神経細胞接着分子 (NCAM) 上に存在する。polySia は胎児期の脳に一過的に発現して、その巨大な排除体積によって NCAM による細胞接着を阻害する反接着作用をもち、その作用によって神経発達や脳機能を正常に保つと考えられてきた。しかし近年、成体脳においても、神経新生が起こる領域である海馬や嗅球では polySia の発現が持続し、精神疾患や神経変性疾患においてその量が増減することが見いだされ、成体脳における polySia の機能も注目されている。我々はこれまでに、polySia が BDNF、ドーパミン、FGF-2 のような神経作用因子と特異的に相互作用することを世界で初めて見だし、反接着作用と異なる新たな polySia の機能として、神経作用因子を細胞表面に保持してその機能を正負に制御する役割を提唱した。また、統合失調症患者に見いだされる一塩基変異多型をもつ変異体 polySia 生合成酵素に着目した研究を行い、変異体酵素で合成される polySia 構造ではその新機能が損なわれることを見いだした。本研究は、polySia の構造変化が神経作用因子を介する神経機能を調節すること、またその破綻が精神疾患の病態に結びつくことを検証することを目的としたものである。

<研究の成果>

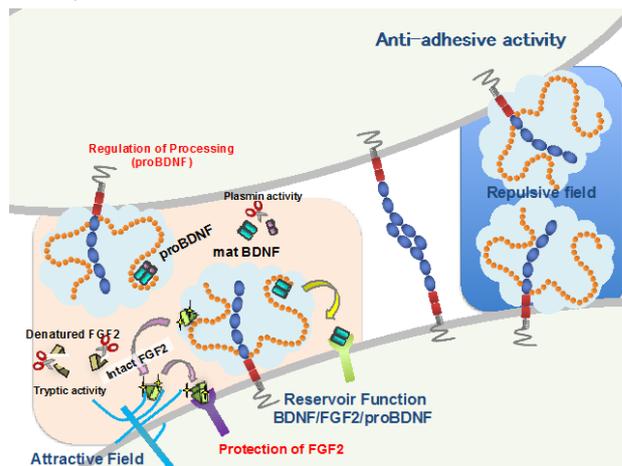
我々が明らかにした polySia の新機能はこれまで反接着作用のみと考えられてきた polySia の従来の性質を覆すものであり、さらに本研究を通して主に下記の成果をあげた。

(1) 細胞表面酸性多糖が織りなす微小糖鎖空間による神経機能調節機構の解明

PolySiaは脳機能に深く関わるBDNFやFGF2と結合し、その機能を制御することを明らかにした。とくにそれらと結合する際、重合度特異的に結合すること(BDNFはDP12以上、FGF2はDP17以上)を明らかにし、polySiaの機能ドメインの一端が明らかになった。また、他にもproBDNF、dopamine、コレステロール、Wnt1などに特異的に結合することも明らかになった。特にFGF2を用いた解析からは、polySiaは立体構造が保たれたFGF2とのみ結合すること、polySiaと結合するとFGF2は細胞外に存在が知られているトリプシン様のプロテアーゼ活性から保護され、そ

の寿命が伸びることが明らかになり、polySiaの分子結合性に基づくプロテアーゼ保護活性が初めて示された。またpolySiaは細胞外でFGF2と優先的に結合しており、ヘパラン硫酸が近傍に来るとFGF2を受け渡し、その後シグナルが細胞内に伝わる機構があることを明らかにした。BDNFに関しては、polySiaがproBDNFと結合すると、proBDNFからBDNFへのtPA/plasminによるプロセッシング機構を阻害することから、細胞外でのBDNF分子のプロセッシング制御に関与することを明らかにした(図1)。

図1. PolySia鎖の分子制御機構。これまで反接着作用をもち、細胞間



の相互作用を負に制御するのみと考えられてきたpolySia鎖(右)は、同時に特定の分子に対して結合性をもつことが明らかになった(左)。PolySia鎖のリザーバー機構は、分子の細胞外濃度、プロセッシング、寿命を制御している。

また、polySiaからの分子放出メカニズムも一部明らかになった。BDNFは通常、polySia-BDNF複合体からTrkBが近傍に来るとアフィニティーの違いにより受容体へ受け渡されることが知られているが、ミクログリア細胞(MG)においては、その活性化に伴い、MGより放出されたエキソソーム上に存在するシアリダーゼ(Neu1)が一過的にMG上、およびまわりの細胞上のpolySia鎖を切断することで、BDNFが一過的に放出されることが明らかになった。

(2) 精神疾患に関与するポリシアル酸転移酵素の機能解析

PolySia 鎖を生合成するポリシアル酸転移酵素 ST8SIA2 と精神疾患(統合失調症、双極性障害、自

閉症)との関連性を明らかにするために、統計学的に有意、もしくは患者に特有な変異に着目し、ST8SIA2のアミノ酸置換を伴う変異 cSNP、アミノ酸置換を伴わない変異 sSNP、イントロン上の変異 iSNP、およびプロモーター領域の変異 rSNP について、polySia の構造及び機能解析を行った。その結果、rSNP や iSNP は ST8SIA2 遺伝子の pre-mRNA の発現量や安定性を変化させることで、sSNP は mRNA から ST8SIA2 酵素の翻訳過程で、cSNP はアミノ酸変異による立体構造変化にもなる活性変化により、産物である polySia の質と量を変化させることを明らかにした。さらに、polySia 鎖の不全が(1)で明らかにした分子結合性の不全をもたらすことを証明し、酵素の不全が疾患に関与する可能性を示した (図 2)。

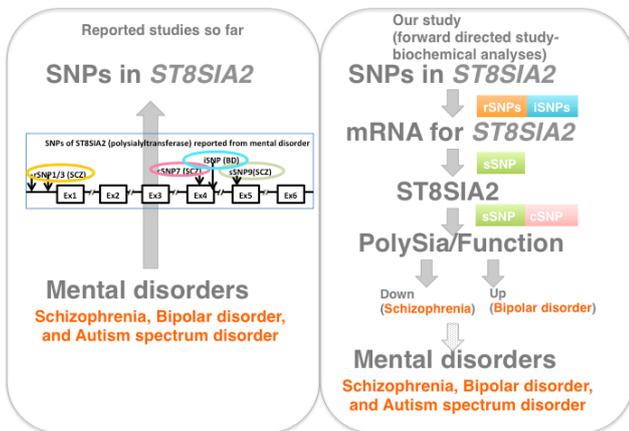


図 2. ポリシアル酸転移酵素 ST8SIA2 の SNPs と polySia の構造及び機能の関連。(左)これまで統計学的に精神疾患と ST8SIA2 の関連性が報告されていた。(右)報告されたいくつかの SNPs の解析を行い、様々な段階で polySia の構造と機能の不全をもたらされることがわかった。

<研究の意義・展望>

PolySia 鎖の合成酵素である ST8SIA2 の SNPs が精神疾患と関連していることが報告されてきた。しかし、それは全て統計学的な検証であった。我々は実際その代表的な SNPs を解析し、その全てが polySia 鎖の構造と機能の不全をもたらすことを明らかにし (図 3)、精神疾患における polySia の不全を詳細に検証する必要性を明らかにした。今後はいまだ全容が明らかではない polySia 鎖の検出プローブの開発や、簡易検出技術の改良を行い、実際の精神疾患患者との関連性をさらに追求する予定である。またこれまで反接着作用しか考えられてこなかった polySia 鎖にリザーバー機能、分子保護活性、プロテアーゼ制御機構など、分子結合性に基づく多

様な機能が備わっていること、これらの機能が polySia の重合度依存的に行われていることを明らかにした。特に polySia 鎖は静的ではなく、ダイナミックに変動するがその発現は時空間特異的に非常に厳密に制御されていることを突き止めている。今後は、polySia 鎖の時・空間特異的な発現制御メカニズムを、遺伝的背景および環境的背景から明らかにしていく予定である。

<主な研究発表>

1. Hane M, Kitajima K and Sato C*. (2016) Effects of intronic single nucleotide polymorphisms (iSNPs) of a polysialyltransferase, ST8SIA2 gene found in psychiatric disorders on its gene products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*478, 1123-1129.
2. Sato C*. Hane M, Kitajima K. (2016) Relationship between ST8SIA2, polysialic acid and its binding molecules, and psychiatric disorders. *Biochim Biophys Acta.* 2016: S0304-4165(16)30120-30129.
3. Sumida M, Hane M, Yabe U, Shimoda Y, Pearce OM, Kiso M, Miyagi T, Sawada M, Varki A, Kitajima K, and Sato C*. (2015) Rapid trimming of cell surface polySia by exovesicular sialidase triggers release of preexisting surface neurotrophin. *J. Biol. Chem.* 290, 13202-13214.
4. Hane M, Matsuoka S, Miyata S, Kitajima K, and Sato C*. (2015) Protective effects of polysialic acid on proteolytic cleavage of FGF2 and proBDNF/BDNF. *Glycobiology* 10, 1112-1124.
5. Sato C.*, and Kitajima K. (2013) Disialic, oligosialic, and polysialic acids: Distribution, biological functions, and related disease. *J. Biochem.* 154, 115-136.

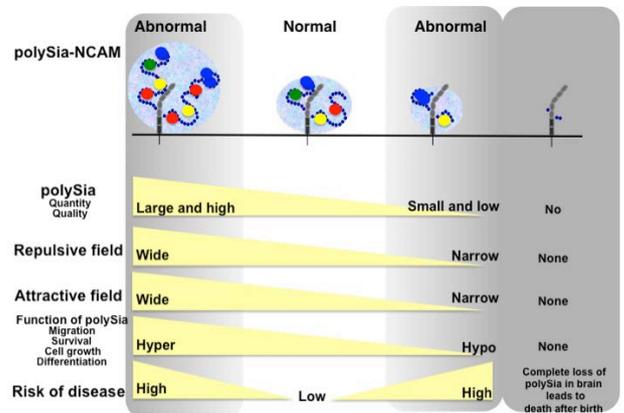


図 3. 質と量が制御されたポリシアル酸の発現と病気へのリスク。遺伝的要因および環境的要因に裏付けられた polySia の時空間特異的な発現制御の破綻が疾患のリスクを高める。

研究課題名：神経組織の機能発現に関与する新規ドメイン特異糖鎖の解析

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110507

研究代表者：岡島徹也（名古屋大学大学院医学系研究科 准教授）

研究協力者：黒坂 光（京都産業大学総合生命科学部 教授）

研究協力者：中村 直介（京都産業大学総合生命科学部 助教）

研究課題名：小胞体 GlcNAc 修飾の神経組織での役割

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110709

研究代表者：岡島徹也（名古屋大学大学院医学系研究科 准教授）

<研究の目的>

一般的なN-型糖鎖、O-型糖鎖、そしてプロテオグリカンと呼ばれる糖鎖は、主要なタンパク質の翻訳後修飾として、多数のタンパク質の機能制御に重要な役割を果たしている。一方で、量的には稀にしか存在しないが特定のタンパク質の制御に関与する糖鎖も知られている。神経機能の制御に関与する糖鎖機能を分子レベルで明らかにするためには、こうしたタンパク質特異糖鎖の神経系での役割を明らかにすることが重要である。本研究では、EOGTに代表されるN-アセチルグルコサミン転移酵素に着目し、遺伝子改変動物における神経系での役割などを明らかにすることを目的とした。

<研究の成果>

1. 新規糖転移酵素 EOGT ファミリーの解析

EOGTは、全身の組織に発現するのに対し、EOGT-Lは、脳組織に高発現していた。EOGT-Lの生物学的役割を明らかにするために、ゼブラフィッシュを用いた機能解析を行った。*Eogt-L*に対するモルフォリノによる処理により、脳室拡大や小眼球といったWalker-Warburg 症候群 (WWS) に関連した表現型が認められた。

WWSは、膜タンパク質であるジストログリカンの糖鎖異常が原因とされている。本研究課題と関連した他の研究課題の成果より、EOGT-LはCTD110.6に反応性を示す糖鎖抗原の生合成に関与することを示した。そこで、WWS患者に見出された遺伝子変異を*Eogt-L*に導入し、ジストログリカンと共発現さ

せた。その結果、ジストログリカンのCTD110.6反応性が消失した。以上の結果より、EOGT-L変異によるジストログリカンの糖鎖異常が、WWSの原因の1つとなることが示唆された。なお、EOGT-Lは、国内外の研究者によって報告された β 1,4GlcNAc転移酵素GTDC2やPomGnT2と呼ばれる分子と同一分子であることが判明した。

2. *Eogt* 変異マウスにおける神経変性の分子機構

Eogt 変異マウスは、正常に発生し、外見上大きな異常を示さない。しかしながら、加齢に伴い神経変性を示す個体が認められた。一方で、生体マウスにおける*Eogt*の遺伝子発現は血管に局限していた。このことから、マウスにおける血管機能の異常が神経変性に関連する可能性が考えられた。

そこで、*Eogt* 変異マウスにおける中枢神経系の血管機能を明らかにするために、生後、始まる網膜の血管新生に着目した。生後5日目 (P5) とP15マウス網膜の*Eogt*発現をin situ hybridizationにて解析したところ、血管に強いシグナルを観察した。*Tie2-Cre; Eogt flox*マウスを用いたところ、シグナルの消失を認めたことから、血管内皮での発現が確認された。これまでの報告で、Notchシグナルは血管のintegrityに重要であるという報告がされている。*Notch1*若しくは*Rbpj*ヘテロ変異マウスにおいて、フィブリノーゲンの血管外への沈着が認められたが、同様な異常が*Eogt* 変異マウスにおいても認められた。更に、*Tie2-Cre; Eogt flox*マウスにおいても、同様な異常が認められた。従って、*Eogt*

変異マウスに認められた血管 integrity の異常は、血管内皮における Notch シグナルの異常が原因であることが示唆された。実際に、*Eogt* 変異マウスより脳血管内皮細胞を単離し、Notch シグナルに関連する遺伝子発現を qPCR により定量したところ、*Hes1* や *Hey1* 等の Notch シグナル標的遺伝子の発現レベルが低下していた。一方で、VEGFR2 や VEGFR3 などの Notch シグナルにより負に制御を受けている分子の発現は上昇した。VEGFR は、血管の透過性に関与することから、血管 integrity の異常は VEGFR シグナルの異常とも関連することが示唆された。

本研究課題と関連した他の研究課題の成果より、EOGT による Notch1 の O-GlcNAc 修飾は、DLL4 を介した Notch1 の活性化に重要な働きをしていることが明らかになった。このことに一致して、*Eogt* 変異マウスから単離した脳血管内皮細胞では、*Dll4* の遺伝子発現レベルが顕著に低下していた。従って、*Eogt* 変異マウスにおける DLL4-Notch1 フィードバックループの不全が Notch シグナル異常の分子機構であることが明らかになった。

<研究の意義・展望>

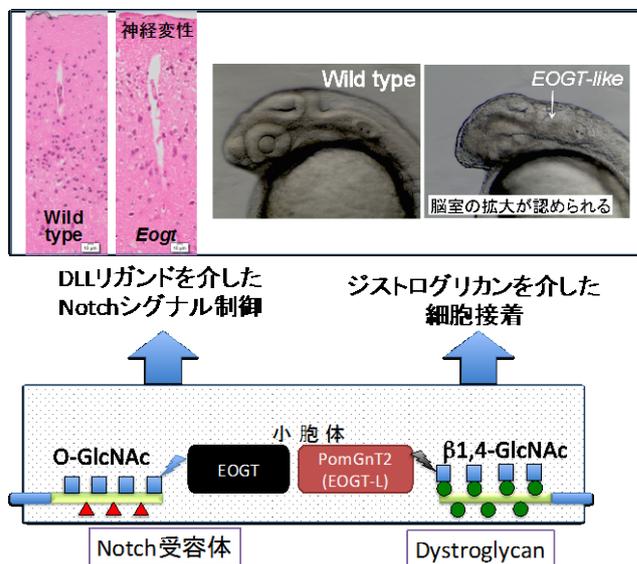
EOGT と EOGT-L は、それぞれ Notch 受容体とジストログリカンに特異的に作用する糖転移酵素である。神経系において、前者は血管内皮細胞に、後者はニューロンやグリアに発現している。EOGT は、血管内皮における Notch シグナル制御に関与し、EOGT-L は、ジストログリカンを介した神経細胞やグリア細胞の接着に関与しており、脳組織の構造と機能に重要な働きをもつ。特に、*Eogt-L/PomGnT2* は WWS の主要な原因遺伝子の 1 つである。また、*EOGT* は、アダムズ・オリバー症候群 (AOS) の原因遺伝子の 1 つであり、AOS の患者にも脳血管異常が

報告されている。従って、EOGT ファミリーの糖転移酵素は、生物学的に重要性を有する異なる膜タンパク質を修飾し、制御することで、脳組織の発生や機能維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

<主な研究発表>

1. Ogawa M, Nakamura N, Nakayama Y, Kurosaka A, Many H, Kanagawa M, Endo T, Furukawa K, **Okajima T**. GTDC2 modifies O-mannosylated alpha-dystroglycan in the endoplasmic reticulum to generate N-acetyl glucosamine epitopes reactive with CTD110.6 antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 440:88-93 (2013)
2. Ogawa M, Sawaguchi S, Kawai T, Nadano D, Matsuda T, Yagi H, Kato K, Furukawa K, **Okajima T**. Impaired O-linked N-acetylglucosaminylation in the endoplasmic reticulum by mutated EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase found in Adams-Oliver syndrome. *J Biol Chem* 290:2137-2149 (2015)
3. Ogawa, M., Varsney, S., Sawaguchi, S., Sakaidani, Y. Y., H., Takeshita, K., Murohara, T., Kato, K., Stanley, P. and **Okajima, T.** (2016) Extracellular O-GlcNAc is required for retinal vascular development and Dll4-Notch signaling. *Glycobiology* 26(12): 1426-1427.
4. Sawaguchi S, Varsney S, Ogawa M, Sakaidani Y, Yagi H, Takeshita K, Murohara T, Kato K, Sundaram S, Stanley P and **Okajima T**. O-GlcNAc on NOTCH1 EGF Repeats Regulates Ligand-Induced Notch Signaling and Vascular Development in Mammals. *eLife* in revision.

<図>



研究課題名：糖鎖拡散型ペリニューロナルネット障害マウスモデルによる神経機能解析

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24111724

研究代表者：大橋 俊孝（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授）

研究課題名：プロテオグリカンによるシナプス伝達調節の分子メカニズム：Bral2 欠損マウス解析

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110713

研究代表者：大橋 俊孝（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授）

連携研究者：坂場 武史（同志社大学大学院脳科学研究科 教授）

研究協力者：枝松 緑（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 助教）

<研究の目的>

ヒアルロン酸(HA)は脳のマトリックスの中心的役割を果たしており、高密度に存在する場所として、ランビエ絞輪とペリニューロナルネット (PNN)とがある。これらヒアルロン酸-コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)複合体形成を安定化させているのが複数の脳リンクプロテイン

(Bral1,Bral2)である。我々は①ランビエ絞輪 ECM 形成阻害モデル②脳幹部神経核・小脳に特異的な PNN の特異的障害モデルを解析する。本モデルは、糖鎖合成や糖鎖ドメインの合成不全を起こすものではないが、本来 HA に依存して PG 等が高密度に・秩序よく会合すべきものが diffuse になった「糖鎖拡散型 PNN 障害モデル」と命名しその表現型解析から PNN 機能理解を目的とした。

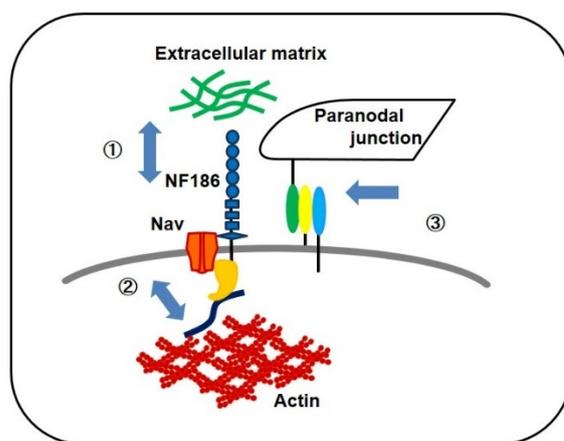
<研究の成果>

(1) 中枢神経ランビエ絞輪形成にプロテオグリカンが関与

神経細胞には電気的な興奮が飛ぶようにして伝わる跳躍伝導という仕組みが備わる。その興奮の伝導には、神経線維(軸索)を覆う鞘(絶縁体の役目)と鞘の切れ目のランビエ絞輪と呼ばれる部分が重要である。またその部分には、興奮を伝えるための電位差を発生させるナトリウムイオンチャンネルが高密度に集積する必要がある。我々はこれまでに、中枢神経のランビエ絞輪の細胞外の部分にヒアルロン酸とそれに結合するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが高度に集積した特殊な細胞外マト

リックス(ECM)構造が存在することを独自に報告してきた。さらに Bral1 欠損マウスなどを用いて、ランビエ絞輪のナトリウムチャンネルが集積する機序に NF186 を介した①プロテオグリカンを主成分とする ECM と②軸索側細胞内骨格分子との結合や③paranode 接合部による領域化、以上3つの異なる安定化機序が協同して関わっていることを明らかにした(図1:研究発表1)。

図1. ランビエ絞輪のナトリウムチャンネルが集積する機序



(2) 深部小脳核シナプス伝達におけるリンクプロテイン Bral2 の役割

我々は、脳幹・小脳の神経核 PNN の形成に必須の Bral2 がプロテオグリカン brevican の局在に必須であると報告し、Bral2 欠損マウス深部小脳核(DCN)におけるシナプス入力数の有意な減少を認めた(研究発表2)。さらに、Bral2 のシナプス伝達における役割を明らかにするため、神経電気生理学

が専門の公募班員の坂場と連携研究を行い、DCN シナプスの特性をパッチクランプ法などで調べ、抑制性シナプス形成の有意な減少を見出した。Bral2 が特定のシナプス結合のために不可欠であること、短期シナプス可塑性に関与していることを示した (研究発表 3)。

(3) リンクプロテイン Bral2 は聴覚機能の正常な発達に重要である

Bral2 の発現は聴覚系伝導路のほぼ全ての神経核の PNN に認められることから、Bral2 KO マウスの聴覚機能解析をチェコ ASCR Syka 教授と国際共同研究により行った。野生型マウスに比べ、Bral2 KO マウスに PNN 形成時期と一致して高波長側で有意な聴力低下が認められ (図 2)、神経順応や時間分解能の低下も認められた。Bral2 は聴覚機能の正常な発達に重要であることが示された。

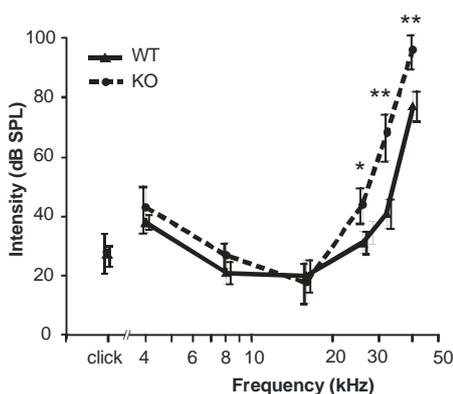


図 2. Bral2 KO マウスの聴力閾値の比較

<研究の意義・展望>

リンクプロテインがランビエ絞輪と PNN に存在するプロテオグリカンの高度な集積に重要であり、それぞれのリンクプロテインは部位特異的な集積に関与することが示された。また、Bral2 が特定のシナプスの安定化に関与することが示唆された。今後、そのメカニズムについて詳しく検証する予定である。

<主な研究発表>

1. Susuki K, Oohashi T *et al.*, Three mechanisms assemble central nervous system nodes of Ranvier. *Neuron*. 78(3), 469-482. (2013)
2. Bekku Y, Saito M, Moser M, Fuchigami M, Maehara A, Nakayama M, Kusachi S, Ninomiya Y, Oohashi T. Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum. *J Comp Neurol*. 520(8):1721-1736. (2012)
3. Sakaba T, Miyano R, Edamatsu M, Oohashi T. 第 39 回 日本神経科学大会 (横浜, 2016) で発表

研究課題名：脳機能制御基盤としての海馬広域神経回路網におけるペリニューロナルネットの存在

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110510

研究代表者：神野尚三（九州大学 大学院医学研究院 教授）

研究課題名：中枢神経系におけるペリニューロナルネットのヘテロジニアスな発現様式と機能

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110714

研究代表者：神野尚三（九州大学 大学院医学研究院 教授）

<研究の目的>

ニューロンの細胞体の周囲を覆っている網状の細胞外基質は、ペリニューロナルネットと呼ばれ、糖タンパク質であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを含んでいる。近年、ペリニューロナルネットは、神経可塑性や神経保護に関与していることが相次いで報告されている。一方、1980年代の先行研究によって、ペリニューロナルネットはパルブアルブミン (PV) 含有 GABA ニューロンに選択的に存在することが示されたが、その後の研究では、PV との関係性を否定する報告や、錐体細胞への発現を示す報告などがなされており、現在に至るまで、どのような GABA ニューロンにペリニューロナルネットが形成されるかについては、見解の一致をみていない。このため本研究で我々は、記憶と情動に関わる海馬の広域神経回路網を構成する多様な GABA ニューロン群に焦点をあて、高次脳機能制御基盤としてのペリニューロナルネットの神経解剖学的解明を目指した。

<研究の成果>

1. マウス海馬のペリニューロナルネットは、GABA ニューロンのサブクラスに選択的に形成される。

本研究で我々は、マウス海馬のペリニューロナルネット (PNN) の分子多様性と PV 陽性 GABA ニューロンのサブクラスの関係について、免疫蛍光多重染色、トレーサー実験、ステレオロジー解析などを組み合わせて検討を進めた。その結果、従来からペリニューロナルネットの標識に用いられてきた植物性レクチン *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA, コンドロイチン硫酸に結合する) 陽性 PNN は、basket 型 PV 含有 GABA ニューロンと、一部の bistratified 型 PV 含有 GABA ニューロンに選択的に形成されている一方で、axo-axonic 型、O-LM 型・H-S 型 PV 含有 GABA ニューロンにおける形成率は極めて低いことを明らかにした (Yamada and Jinno, 2015) (論文

リスト4)。

一方で、アグリカン陽性ペリニューロナルネットは basket 型 PV 含有 GABA ニューロンに加えて、O-LM 型・H-S 型 PV 含有 GABA ニューロンにも形成されていることを見出した。さらに、アグリカン陽性ペリニューロナルネットを有する PV 含有 GABA ニューロンは、同ペリニューロナルネットを欠く PV 含有 GABA ニューロンよりも、GABA シナプスの密度が高いことを明らかにした (Yamada and Jinno, 2017) (論文リスト2)。

2. マウス海馬における Cat-315 糖鎖の発現は、加齢に伴い上昇し、NMDA 受容体阻害剤によって抑制される。

本研究で我々は、Human natural killer-1 (HNK-1) を認識することが知られている Cat-315 抗体を用いて、海馬における発現レベルの変化を解析した。Westernblot によって、加齢に伴い背側海馬の Cat-315 糖鎖の発現レベルが上昇することが示された。その一方で、Cat-315 陽性ペリニューロナルネットの数に加齢に伴う変化は認められなかった。また、抗認知症薬として利用されている NMDA 受容体阻害剤 (memantine) の投与によって、Cat-315 糖鎖の発現レベルは抑制された。これらの結果は、海馬の Cat-315 糖鎖の発現レベルの上昇と、NMDA 受容体によるその抑制が、加齢に伴う認知機能の変調と回復に関わっている可能性を示したものである (Yamada et al., 2017) (論文リスト1)。

3. Zebra finch の song system には生後発達に伴いケラタン硫酸が領域特異的に発現する。

本研究で我々は、zebra finch (キンカチョウ) の song system (歌回路: 言語機能に関わる領域) において、sensory period (模範となる音声を記憶にとどめる時期) と呼ばれる臨界期が終了する時期に一致して高硫酸化型ケラタン硫酸の発現上昇が起こることを見出した。一方で、song system における低硫酸

化型ケラタン硫酸の発現上昇は, sensorimotor period (未成熟な音声を練習する時期) と呼ばれる臨界期が終了する時期に一致していた. これらの結果は, zebra finch の song system の臨界期が硫酸化レベルの異なるケラタン硫酸によって制御されている可能性を示した初めての成果である (Fujimoto et al., 2015) (論文リスト 5).

<研究の意義・展望>

我々の一連の研究によって, 成体海馬のペリニューロナルネットは, GABA ニューロンのサブクラス特異的に形成されており, 神経回路網の活動性の制御に重要な役割を果たしている可能性が初めて明らかになった. また, 上記の二種類のペリニューロナルネットに加えて, バーシカン陽性ペリニューロナルネットが一酸化窒素合成酵素 (NOS) 含有 GABA ニューロンに, ポリシアル酸 (PSA) 陽性ペリニューロナルネットがコレシストキニン含有 GABA ニューロンに形成されていることなどを見出している. 今後は, 分子組成が異なるペリニューロナルネットによる海馬の神経回路網の制御機序の違いや, その加齢変化についてさらに明らかにしていく予定である.

また, 神経系における糖鎖研究はこれまで, WFA で標識されるコンドロイチン硫酸と視覚機能の可塑性制御を中心に行われてきた. しかし我々は,

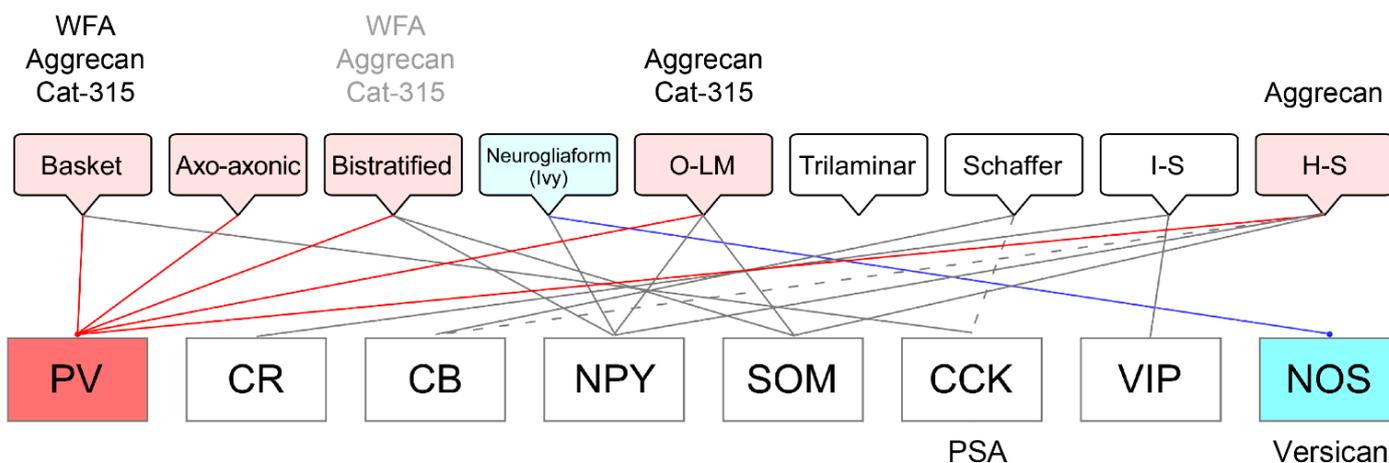
zebra finch を用いた研究によって, ケラタン硫酸が言語機能の可塑性制御に関与している可能性を初めて明らかにした. 今後は, ケラタン硫酸による神経可塑性の制御機序の詳細についても検討をすすめる予定である.

<主な研究発表>

- 1) J.Yamada, T.Ohgomori, *S.Jinno (2017) Alterations in expression of Cat-315 epitope of perineuronal nets during normal ageing, and its modulation by an open-channel NMDA receptor blocker, memantine. *J. Comp. Neurol.* (in press)
- 2) J.Yamada, *S.Jinno (2017) Molecular heterogeneity of aggrecan-based perineuronal nets around five subclasses of parvalbumin-expressing neurons in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol.* 525:1234-1249.
- 3) T. Ohgomori, (他 2 名), K.Kadomatsu, *S.Jinno (2016) Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci.* 43:1340-1351.
- 4) J.Yamada, *S.Jinno (2015) Subclass-specific formation of perineuronal nets around parvalbumin-expressing GABAergic neurons in the Ammon's horn of the mouse hippocampus. *J Comp Neurol.* 523:790-804.
- 5) H.Fujimoto, (他 3 名), K.Kadomatsu, *S.Jinno (2015) Time-dependent localization of high- and low-sulfated keratan sulfates in the song nuclei of developing zebra finches. *Eur J Neurosci.* 42:2716-2725.

<図> 海馬の GABA ニューロンの代表的なサブクラスとペリニューロナルネットとの関係

Subclass-specific formation of PNNs around GABAergic neurons



研究課題名：神経細胞の糖鎖認識による髄液糖タンパク質の直接取り込み機構の解析

研究期間：平成24年度～平成26年度

研究課題番号：24110511

研究代表者：橋本康弘（福島県立医科大学医学部 教授）

<研究の目的>

神経変性疾患の原因の一つとして、酸化ストレスによる神経細胞死が示唆されている。事実、パーキンソン病においても鉄沈着が報告されている。我々は、鉄輸送に中心的役割を果たすトランスフェリン (Tf) の糖鎖アイソフォームをヒト髄液中に見いだした(*Neurobiol. Aging*, 33:1807-15, 2012)。一つは、糖鎖末端に Sia α 2,6Gal を持つアイソフォームであり、血清に由来すると考えられた (血清型 Tf)。もう一つのアイソフォームは、この2糖構造を欠き GlcNAc 末端を持ち、髄液産生組織である脈絡叢に由来すると考えられた (脳型 Tf)。脳型 Tf は、バイセクト GlcNAc およびコア Fuc を持っていた。

我々は、Tf アイソフォーム (糖鎖) の鉄代謝に及ぼす影響を解析した。具体的には、(1) Tf アイソフォームの鉄に対する親和性の比較、(2) Tf レセプターを発現した細胞に対する Tf アイソフォーム結合親和性の比較、(3) Tf アイソフォームの組織による取り込みを検証するため、ラット大槽中への投与と脳内輸送の解析、(4) パーキンソン病および類縁疾患における髄液中 Tf アイソフォームの解析、を計画した。

両アイソフォーム間で生理活性が異なる場合は、糖鎖をグリコシダーゼにより逐次分解した Tf アイソフォーム標品を作製し、糖鎖機能ドメインのマッピングを計画した。

<研究の成果>

Tf アイソフォームの鉄に対する親和性の検討

放射性ラベル化鉄の Tf アイソフォームの結合親和性を分析したが、両者で差は認められなかった。

Tf レセプターを発現した細胞に対する Tf アイソフォーム結合親和性の検討

ヒト Tf レセプターのみを発現した CHO 細胞 (内因性レセプターは発現していない) に対する Tf ア

イソフォームの結合親和性を分析したが、両者で差は認められなかった。

Tf アイソフォームのラット大槽への投与と脳内輸送の解析

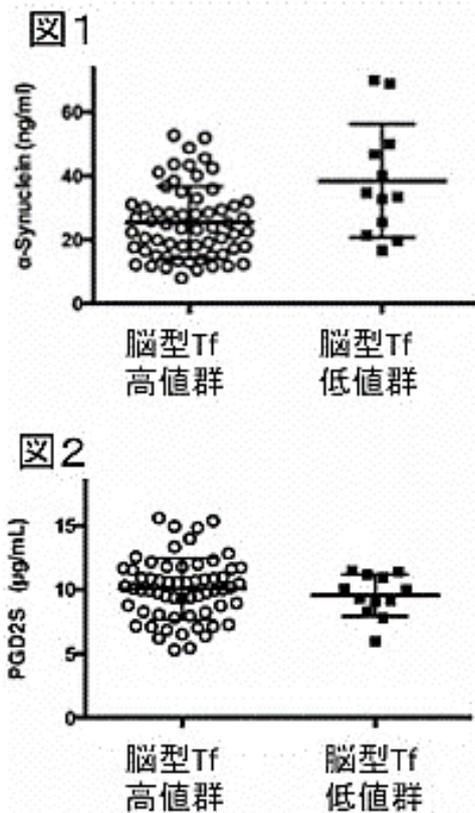
ヒト Tf をラット大槽へ投与し、経時的に切片を作成して Tf の取り込みを検証した。使用した抗 Tf 抗体は内因性のラット Tf とは交差しない特異性の高いものを用いた。血清型 Tf は、投与後 10 分後に神経細胞に取り込まれ、20 分後にマキシマムに達した。脳型 Tf は血清型 Tf より早い取り込みを示した。血清型 Tf を酵素処理したアシアロ Tf、アガラクト Tf (GlcNAc 末端を持つ)、トリマンノシル Tf を調製し、取り込み活性の機能ドメインのマッピングを試みた。アガラクト Tf は脳型 Tf と同様に GlcNAc 末端を持つことから、早い取り込みが期待された。しかし、これらの標品では、取り込みに差が認められなかった。すなわち、脳型 Tf の固有の糖鎖修飾であるバイセクト GlcNAc やコア Fuc などの活性に寄与する可能性が示された (文献 4)。

パーキンソン病の髄液中 Tf アイソフォームの解析

各種の神経変性疾患の髄液中 Tf を分析したところ、タウオパチー (アルツハイマー病、進行性核上麻痺など) ではコントロールと差が無かったのに対し、シヌクレイノパチーであるパーキンソン病および多系統萎縮では、脳型 Tf が著しく減少しているサブグループが見いだされた。統計学的解析 (傾向化除去正規 Quantile-Quantile 分析) により、このサブグループは独立した疾患群である可能性が示された (脳型 Tf 低値群)。このグループにおける臨床症状の違いを検討したが、特徴的な症状は見いだされなかった。

パーキンソン病では、組織内へのシヌクレインの蓄積に伴い、髄液中のシヌクレイン濃度が低下する。事実、脳型 Tf 正常値群では、シヌクレイン濃度の

低下が検出された。一方、脳型 Tf 低値群では、この低下が検出されず、シヌクレイン代謝においても脳型 Tf 正常値群との差が示された (図 1)。代表的な髄液代謝マーカーである Prostaglandin D2 synthetase (PGD2S)を両群で比較したところ、差は認められなかった (図 2)。すなわち、髄液代謝自身の大きな変化は示されなかった (文献 1)。



<研究の意義・展望>

パーキンソン病の中に、脳型 Tf 低値を示すサブグループの存在が示された。このグループでは、従来報告されている α シヌクレインの低下がない点においても特有のグループと考えられた。脳型 Tf の産生についての解析はなされていないが、脳型 Tf の低下が脳組織への鉄の沈着と関連する可能性が考えられる。高分解能 MRI では、鉄沈着を可視化できるので、MRI シグナルと脳型 Tf-1 の相関を調べることが可能である。新たに見いだされたサブグループの病理に鉄沈着が関与する場合は、キレート剤による治療が考えられる。

<主な研究発表>

1. A. Yoshihara, Y. Hashimoto (他 15 名) (2016) Subgroup differences in 'brain-type' transferrin and alpha-synuclein in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J. Biochem.*, published online March 11, 1-5.
2. Y. Kariya, Y. Hashimoto (他 7 名) (2015) Increase cerebrospinal fluid osteopontin levels and its involvement in macrophage infiltration in euronelitis optica. *BBA Clinical*, 3, 126-34.
3. Y. Kizuka, Y. Hashimoto (他 13 名) (2015) An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease *EMBO Mol. Med.*, 7, 175-189.
4. M. Nagae, Y. Hashimoto (他 6 名) (2014) Structural change of *N*-glycan exposes hydrophobic surface of human transferrin. *Glycobiol.* 24, 693-702.
5. K. Hoshi, Y. Hashimoto (他 12 名) (2013) Lectin-dependent inhibition of antigen-antibody reaction: application for measuring α 2,6-sialylated glycoforms of transferrin *J. Biochem.*, 154, 229-232.

研究課題名：難治性神経疾患の病態におけるプロテオグリカンの意義の解明と臨床応用の検討

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110518

研究代表者：楠 進（近畿大学医学部 教授）

連携研究者：北川裕之（神戸薬科大学薬学部 教授）

岡省吾（京都大学大学院医学研究科 教授）

研究課題名：プロテオグリカンの糖鎖に焦点をあてた神経難病の病態解明と治療戦略の構築

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110721

研究代表者：楠 進（近畿大学医学部 教授）

連携研究者：北川裕之（神戸薬科大学薬学部 教授）

岡省吾（京都大学大学院医学研究科 教授）

門松健治（名古屋大学大学院医学系研究科 教授）

<研究の目的>

プロテオグリカン(PG)は、神経系組織の細胞外マトリックスの主成分であり、PGの糖鎖合成異常あるいはPGの糖鎖に対する抗体は、神経疾患の病態や神経障害からの回復過程に大きく影響すると考えられるが、従来ほとんど検討されていなかった。われわれは近年の検討により、コンドロイチン硫酸の糖鎖合成酵素遺伝子のひとつであるChGn-1に酵素活性の著明な低下をきたすSNPが、一般人口の5-10%にヘテロで見られることを見出した。一方で、いくつかのPGの糖鎖合成酵素遺伝子のノックアウトマウスが得られている。

Myelin-associated glycoprotein (MAG)のHNK-1 エピトープは、IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーのIgM M 蛋白の標的であるが、同エピトープが結合する担体によりM 蛋白の反応性が異なることが知られている。従ってPGのもつHNK-1 エピトープに対する反応性の検討は重要であるが従来行われていない。そこで本研究では、1) 上記のChGn-1のSNPが神経疾患の重症度や臨床経過にどのように影響するか、2) PGの糖鎖合成酵素遺伝子異常がEAEの病態に及ぼす影響、3)IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーのM 蛋白の、MAGやPGに結合したHNK-1 エピトープ

に対する抗体活性の違いが臨床的特徴に関連するか、について検討する。

<研究の成果>

1) 多発性硬化症患者におけるChGn-1 遺伝子のSNPと臨床経過の関連

多発性硬化症患者においても前述のChGn-1 遺伝子のSNPはみられた。臨床経過を検討すると、同SNPをもつ男性症例は疾患の増悪の速度が低かった。PGは中枢神経のマトリックスを構成する分子であり、多発性硬化症の経過と関連する可能性がある。同SNPは男性患者の予後予測因子となる可能性がある。(文献1)

2) PGの糖鎖改変とEAE

PGの糖鎖合成酵素であるC6ST-1のノックアウトマウスでは、myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)の感作による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)が重症化する。ノックアウトマウスに野生型で感作したリンパ球を受身移入すると、同じリンパ球を野生型マウスに受身移入する場合よりも重症化がみられた。リンパ球の感作には同酵素の有無は影響を与えなかった。同酵素のトランスジェニックマウスでは軽症化がみられた。コンドロイチン硫酸の6位の硫酸基が正常に存在するか

どうか、EAEの重症度に effector phase で影響することが示された。

ケラタン硫酸 (KS) の糖鎖合成酵素である GlcNAc6ST のノックアウトマウス (KS-KO マウス) で EAE を作成すると、重症度が野生型と比べて有意に低下した。リンパ球幼弱化試験でも KS-KO マウスでの反応性は低く、脾細胞の培養上清における IL-6 と IFN- γ は KS-KO で有意に低下しており、脊髄の炎症細胞浸潤も KS-KO マウスで低下していた。以上より、KS-KO マウスでは induction phase と effector phase の両方で EAE の病態が軽減されていることが示された。

これらの結果は PG の糖鎖改変が免疫性神経疾患の臨床経過に大きく影響することを示唆する。(文献 2 および 3)

3) HNK-1 エピトープを認識する IgM M 蛋白の反応性の検討 (文献 4)

IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチーでは、IgM M 蛋白が MAG の糖鎖である HNK-1 エピトープを認識する。この IgM M 蛋白は、同じく HNK-1 エピトープをもつ PG である phosphacan にも反応する。phosphacan と MAG に対する反応の強さの比 (P/M 比) が高い症例は臨床的増悪の程度が高く、また経過とともに P/M 比がさらに増加する傾向がみられ、P/M 比が臨床経過の予測マーカーとなる可能性が考えられた。

<研究の意義・展望>

上記 1) および 2) により、PG の糖鎖の違いが免疫性神経疾患の臨床経過に関連し、その病態の活動性に影響することが示された。糖鎖の改変が免疫性神経疾患の治療に応用できる可能性が考えられ、今後さらなる検討が必要と考えられる。

また 3) より、PG の糖鎖が免疫性神経疾患の標的となる可能性があり、さらに複合糖質に対する微

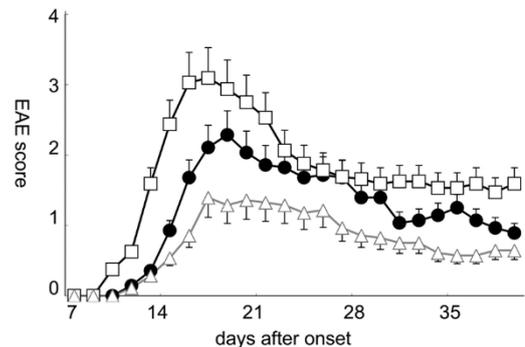
細反応性の違いが、予後予測のマーカーとなる可能性が示唆され、神経疾患の病態解明において PG の糖鎖に対する反応性の解析が重要であることが示された。

<主な研究発表>

1. K.Saigoh,(他 8 名), H.Kitagawa,(他 1 名), *S.Kusunoki (2016) Chondroitin sulfate β -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (ChGN-1) polymorphism; association with progression of multiple sclerosis. *Neurosci Res* 108 (7), 55-59
2. *K.Miyamoto,(他 3 名), K.Kadomatsu, H.Kitagawa, S.Kusunoki (2014) Chondroitin 6-O-sulfate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glycobiology*. 24(5), 469-475. R.Ueno,
3. *K.Miyamoto,(他 2 名), K.Kadomatsu, S.Kusunoki (2015) Keratan sulfate exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*. 93, 1874-1880.
4. Y.Hamada,(他 3 名), S.Oka, *S.Kusunoki (2015) Binding specificity of anti-HNK-1 IgM M-protein in anti-MAG neuropathy: Possible clinical relevance. *Neurosci Res*. 91, 63-68.

<図>

Overexpression of chondroitin 6-sulfotransferase ameliorates EAE. EAE was induced in C6ST1-/- (open squares), C6ST1tg (open triangle) or WT (closed circles) mice via immunization with MOG35-55 in CFA.



Katsuchi Miyamoto et al. *Glycobiology* 2014;24:469-475

- : 野生型、□ : C6ST1 ノックアウト、△ : C6ST1 トランスジェニック (文献 2 より引用)。
- EAE は C6ST1 ノックアウトで重症化、トランスジェニックで軽症化している。

研究課題名：糖鎖遺伝学を用いたシナプス形成・可塑性におけるヘパラン硫酸微細構造の機能解析

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110521

研究代表者：神村圭亮（公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達神経再生研究分野・主席研究員）

研究課題名：神経活動依存的に変化するヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能解析

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110726

研究代表者：神村圭亮（公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達神経再生研究分野・主席研究員）

<研究の目的>

シナプスは神経情報伝達の基盤であり、学習・記憶等の高次機能の実態として、神経活動により動的に形態や分子の局在が変化することが知られている。これまで脊椎動物のグルタミン酸作動性シナプスにおいて様々な分子がシナプス形成及び可塑的な変化に関与することが報告されているが、未だ作動原理の多くが分かっていない。そこで本研究では、シナプスの形成及び可塑的な変化の分子メカニズムを明らかにするため、グルタミン酸作動性シナプスのモデルであるショウジョウバエの神経筋接合部(NMJ)を用いて研究を進めた。特に、近年シナプス形成への関与が指摘されているヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)の機能に注目して解析を行った。

<研究の成果>

【神経筋接合部の形成におけるパールカンの機能解析】

脊椎動物のNMJ形成においてはアグリンが中心的な働きをするが、ショウジョウバエにおいては明確なアグリンのホモログは同定されておらず、現段階でアグリンに最も類似している分子はパールカンである。脊椎動物同様、ショウジョウバエにおいてもパールカン(Trol)は基底膜の構成分子であり、ラミニンやジストログリカン等と相互作用することが知られている。私はシナプス形成におけるパールカンの作用機構を調べるため、まず初めに、trol欠失変異体の幼虫のNMJを詳細に観察した。その結果、シナプス前終末が過剰に形成される一方、シナプス後部の構造は対照的に低形成を示すことが明らかになった。特に本変異体のシナプス後部では、Subsynaptic Reticulum (SSR)と呼ばれ

る筋細胞膜の陥入構造が著しく減少していたが、この異常はWntのホモログであるWingless (Wg)シグナルの低下によって起こる表現型と酷似していた。Wgは運動ニューロンによって合成され、NMJまで軸索内を輸送された後、シナプス前終末から分泌される。放出されたWgは、シナプス前部と後部の両方に存在するWg受容体(Drosophila frizzled 2) Dfz2に結合し、シナプス前終末と後部の発達を促進する。そこで、trol欠失変異体のシナプス後細胞(筋細胞)におけるWgシグナル活性を解析したところ、著しく低下していることが判明した。

それに対してtrol欠失変異体のシナプス前終末は過剰に形成され、その数が減少するwg変異体の表現型とは全く逆の現象が起こっていた。これまで運動ニューロンにおいてWgシグナルが過剰になると、シナプス前終末が増加することが知られていた。そこでtrol欠失変異体の運動ニューロンにおいてWgシグナルの活性を減少させてみたところ、シナプス前終末の過剰形成が抑制されることが分かった。以上の結果から、trol欠失変異体の運動ニューロンではWgシグナルが過剰になる一方、筋細胞では不足することによって、シナプス前後部の発達が不均衡になることが示唆された。

TrolによるWgシグナル伝達の調節機構をさらに調べるため、次に電子顕微鏡を用いてTrolタンパク質の局在を調べた。その結果、Trolタンパク質はシナプス間隙やSSRに局在することが判明した。次に、Wgタンパク質の分布を調べたところ、野生型ではシナプス前膜からシナプス後部のSSRにかけて濃度勾配が形成されていたが、trol欠失変異体ではWgがシナプス前膜に留まりシナプス後部にまで拡散しないことが判明した。このことは、trol変異体におけるWgタンパク質の

偏った分布が、過剰なシナプス前終末とシナプス後部の発達不全を引き起こしたことを示唆している。このように、Trolはシナプス前後部におけるWg蛋白質の分布

を調節することで、シナプス前後部の同調した発達を促進すると考えられた (図 1)。

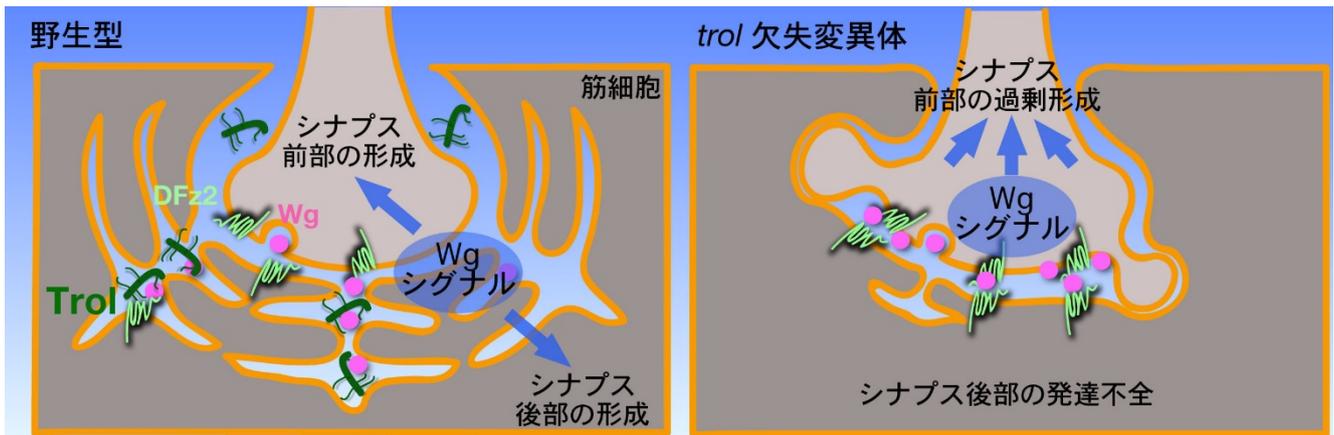


図 1.神経筋接合部におけるパールカン(Trol)の機能

【シナプス可塑性におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能解析】

近年、Wnt 等の HSPG 結合性分子の局在が神経活動によって変化し、シナプスの可塑的な形態変化を調節することが報告されている。また AMPA 型グルタミン酸受容体はシナプスの長期増強及び長期抑圧において重要な働きをするが、HSPG の機能が欠失すると本受容体の局在に異常をきたすことが示されている。これらの結果は、HSPG が HSPG 結合性分子やグルタミン酸受容体の局在を調節することで、シナプスの可塑性を制御している可能性を示唆する。そこで、私は「HSPG は神経活動によって局在や HS の微細構造が変化することで相互作用する分子の機能 (活性) を調節し、シナプスの可塑的な変化を制御する。」という作業仮説を立て、ショウジョウバエ NMJ のシナプス可塑性における HSPG の役割を調べた。

ショウジョウバエにおいては、飢餓時にオクトパミンシグナルを介して NMJ におけるシナプス終末の数が増加し、それと共に運動速度が増加することが知られている。そこで、飢餓及びオクトパミンの欠失が HSPG の局在にどのような影響を及ぼすのか解析した。その結果、飢餓によりグリピカン (Dally-like, Dlp) のシナプス後部における発現レベルが増加する一方、オクトパミンを欠失した個体では Dlp のレベルが減少することが明らかになった。次に Dlp 及び HS の修飾酵素が飢餓依存的なシ

ナプス終末の形成に必要なかどうかを調べた。その結果、Dlp 及びヘパラン硫酸 6-O 脱硫酸化酵素である Sulf1 の機能をノックダウンした個体では飢餓依存的なシナプス終末の増加が抑制されることが分かった。さらに Dlp のノックダウン個体では飢餓による運動速度の増加が抑制された。以上のことから、Dlp はオクトパミンシグナルによって発現レベルが変化することでシナプスの可塑的な形態変化及び運動能を調節すること、また HS の 6-O 硫酸基という特定の糖鎖修飾が重要な役割を果たすことが示唆された。さらに Dlp の詳細な作用機構を調べるため、Dlp がグルタミン酸受容体の局在を調節する可能性について調べた。ショウジョウバエのグルタミン酸受容体は 4 つのサブユニットからなるが、その一つである GluRIIA は神経活動依存的なシナプス形成において重要であり、飢餓に伴いシナプス後部におけるレベルが減少する。しかしながら、Dlp ノックダウン個体では飢餓前において GluRIIA のレベルは既に野生型より高く、また飢餓によりさらに蓄積することが判明した。この結果から Dlp はシナプス後部において GluRIIA の局在を抑制し、飢餓による GluRIIA の発現、シナプス内外への輸送、及びエンドサイトーシスなどの過程を調節することが示唆された (図 2)。

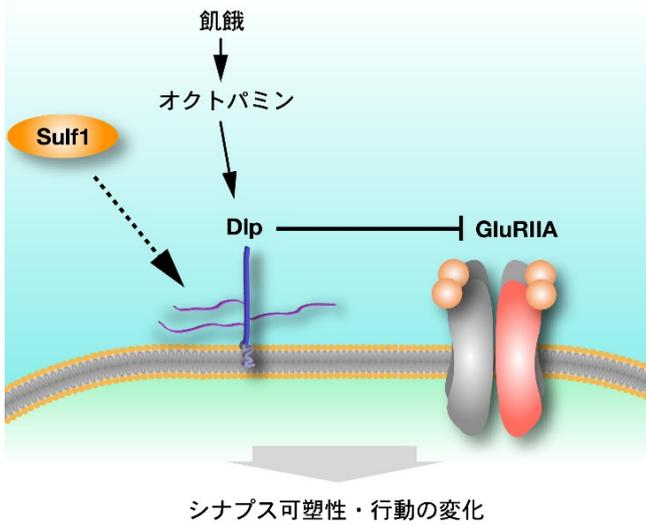


図 2.シナプス可塑性におけるグリピカン(Dlp)の機能

<研究の意義・展望>

ヒトにおいてパールカンの異常は筋持続収縮を示す Schwartz-Jampel 症候群の原因遺伝子として

知られており、本研究で行ったパールカンの機能解析は、パールカン異常疾患を治癒するための重要な基盤となることが期待される。一方、グリピカンはシナプスの可塑的な形態変化に関与することが判明したが、未だ詳細な作用機構は分かっていない。今後、グリピカンがどのような分子と相互作用することで機能するのか明らかにしたい。

<主な研究発表>

1. Kamimura K, Ueno K, Nakagawa J, Hamada R, Saitoe M, and Maeda N. Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, 200(2): 219-233. (2013)
2. 神村圭亮・前田信明 ショウジョウバエのシナプスから眺めたヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能 実験医学 2013 年 31:1488-1493
3. 神村圭亮, 前田信明 シナプス形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能 -ショウジョウバエ神経筋接合部を中心に- 生化学 2015 年 87:467-470

研究課題名：PV 陽性 GABA 細胞-グリア tripartite synapse 細胞外糖鎖の役割

研究期間：平成 26 年度～平成 27 年度

研究課題番号：26110705

研究代表者：福田 敦夫（浜松医科大学医学部 教授）

<研究の目的>

シナプス外に漏出した抑制性神経伝達物質である spillover GABA (γ アミノブチル酪酸)によるトニック GABA_A 受容体を介した作用に着目した。トニック抑制が特に顕著な parvalbumin (PV) 陽性 GABA 細胞には perineuronal nets (PNN) と呼ばれる細胞外糖鎖が発達している。そこで、PNN が GABA バリアを形成して spillover GABA によるトニック抑制を調節しているのではないかと考えた。さらに、PNN がもつ強力な negative charge にも注目し、cation buffer としての PNN が Cl⁻ ホメオダイナミクスにとっても極めて重要ではないかと考えた。そこで、PV 陽性 GABA 細胞-グリアの tripartite synapse における細胞外糖鎖の役割に関して、まずは spillover GABA の物理的バリアの観点で、GABA 合成酵素 GAD67 遺伝子 (*Gad1*) 改変動物 (マウス) を用いて研究を行った。

<研究の成果>

1. PV 陽性 GABA 細胞選択的脱落モデルの細胞外糖鎖の種類と局在の解析:

GAD67 遺伝子のヘテロ欠損胎仔の母体に拘束ストレスをかけると、生後に PV 陽性 GABA 細胞が内側前頭皮質で減少した (Uchida *et al.*, *Transl. Psychiatry* 2014)。このモデルの脳切片を作製し、抗 PV 抗体、biotinylated Wisteria floribunda agglutinin (WFA) (PV 細胞の一部の PNN を認識) と抗アグリカン抗体 (PNN 全般を認識) を用い、PV 陽性/陰性細胞各々の PNN を解析したところ、PV 陽性細胞の脱落に伴い有意に WFA とアグリカンが減少したが、脱落のない PV 陰性細胞では両者とも変化なかった。また、WFA やアグリカンの染色強度も解析したが変化なく、PNN の減少は糖鎖形成の障害ではなく、PV 陽性細胞の脱落による基質の減少に起因すると結論した (図1)。

2. PV 陽性 GABA 細胞と細胞外糖鎖が選択的に脱落したモデルの網羅的 DNA メチル化解析:

上記のように、出生前ストレスと GAD67 ヘテロ欠損の double hits により、PV 細胞系譜の発生が障害された原因を探るため、DNA メチル化の網羅

的解析を行った。多数の遺伝子のメチル化のうち、GABA 細胞の発生を低下させる要因としては GABA 細胞発生に関わる *Dlx2* の他、 α -dystroglycan の α -マンノース型糖転移酵素とされる fukutin をコードする福山型筋ジストロフィー症原因遺伝子 *Fktn* のメチル化が脳全域で増加していた。*Fktn* は胎生期の脳皮質で高発現しており、また、その変異は GABA シナプスに特異的に存在し、シナプス可塑性に関与する α -dystroglycan と結合する laminin や perlecan の糖鎖の減少による細胞外基質の異常を起こすことが知られている。そこで次に、GAD67 ヘテロ欠損仔の母体ストレスの有無で α -dystroglycan の細胞外糖鎖の免疫組織化学及び GABA 作動性シナプスの電気生理学的解析を行った。

3. α -dystroglycan の細胞外糖鎖の免疫組織化学的検討とモデルの電気生理学的解析:

生後 3 週齢で内側前頭皮質の免疫組織化学解析を行ったところ、ストレス群ではコントロール軍に比べて、 α -dystroglycan の α -マンノース型糖鎖が有意に減少していた。そこで、これらのマウスの急性脳スライス標本 (350 μ m) を作製し、人口脳脊髄液中で生きた状態で保持しつつ、パッチクランプ法で自発性微小抑制性シナプス後電流を解析した。GAD67 のヘテロ欠損胎仔のストレス群とコントロール群で比較したところ、ストレス群では有意に頻度が減少していた (図 2)。

4. PV 陽性 GABA 細胞と細胞外糖鎖が選択的に脱落したモデルの行動解析:

生後 8 週齢雄で GAD67 の遺伝型と母体ストレスの有無の 4 群に分けて行動解析の評価を行った。衝動性と注意機能に群間での有意差は無く、場所学習と逆転学習、作業記憶にも有意差は無かった。しかし GAD67 ヘテロ欠損の胎生ストレス群では、社会行動性、およびプレパルス抑制試験において、他群と有意に異なる異常を示した。組織学的に PV 陽性 GABA 細胞と細胞外糖鎖が選択的に脱落したのも GAD67 ヘテロ欠損の胎生ストレス群のみであり、行動解析の結果と矛盾しなかった。

<研究の意義・展望>

細胞外糖鎖の spillover GABA のバリアとしての糖鎖

の役割に着目した。PNN の最近の話題は、酸化ストレスからの PV 陽性 GABA 細胞の保護 (Cabungcal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013) やその喪失が統合失調症の陽性症状フェノタイプを誘発する (Shah et al., *Transl. Psychiatry* 2013) などであるが、いずれも統合失調症における PV 陽性 GABA 細胞機能低下と関連づけられている。さらに直接的なものでは、死後脳解析で PV 陽性 GABA 細胞の PNN が減少し、アストロサイトのコンドロイチン硫酸プロテオグリカンは逆に増えたというのがある (Pantazopoulos, et al., *Arch. Gen. Psychiatry* 2013)。

今回我々が得た、内側前頭皮質での PV 陽性 GABA 細胞と PNN の減少、GABA 作動性抑制性シナプス後電流の異常、社会行動性およびプレパルス抑制試験の異常などはいずれも精神神経疾患のフェノタイプとして頻繁にみられるものである。母体ストレスの影響も疫学的に証明されており、さらに GAD67 の異常も遺伝学的、組織学的にリスクとの関連が強く疑われている。したがって、これら精神神経疾患の病態に、今回明らかとなった α -dystroglycan の糖鎖の異常がいかに関わるのかを今後解明していく糸口が得られた。

以上のように、本課題の成果は神経糖鎖科学の創生、統合失調症などの疾患の分子基盤の理解と治療法開発、精神・神経疾患の病態理解のための基礎知識として今後の展開も期待される。

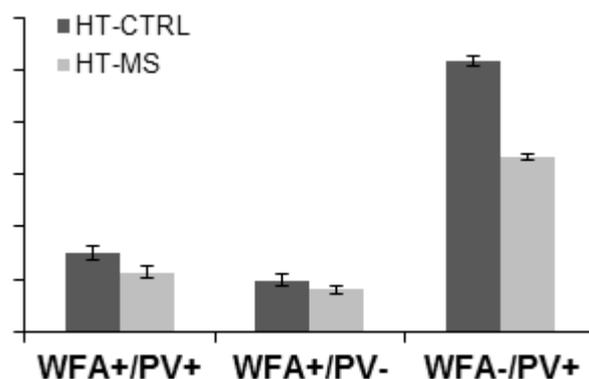
<主な研究発表>

1. K.Kakizawa, M.Watanabe, H.Mutoh, Y.Okawa, M.Yamashita, Y.Yanagawa, K.Itoi, T.Suda, Y. Oki and *A. Fukuda (2016) A novel GABA-mediated corticotropin-releasing hormone secretory mechanism in the median eminence. *Science Adv.* 2:e1501723.
2. H.Saitsu, M.Watanabe, T.Akita, C.Ohba, K.Sugai, WP.Ong, H. Shiraishi, S.Yuasa, H.Matsumoto, KT.Beng, S.Saitoh, S.Miyatake, M.Nakashima, N.Miyake, M.Kato, *A.Fukuda and *N.Matsumoto (2016) Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. *Sci. Rep.* 6:30072.
3. H. Saitsu, T. Akita, J. Tohyama, H. Goldberg-Stern, Y. Kobayashi, R. Cohen, M. Kato, C. Ohba, S. Miyatake, Y. Tsurusaki, M. Nakashima, N. Miyake, A. Fukuda and N. Matsumoto (2015). De novo *KCNB1* mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. *Sci. Rep.* 5, 15199.
4. M.Watanabe and *A. Fukuda (2015). Development and

regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 371.

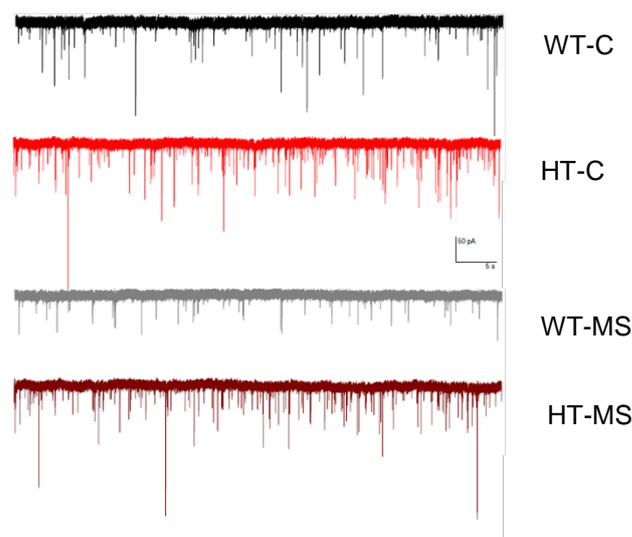
5. H.J. Luhmann, A. Fukuda and W. Kilb (2015). Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 4.

<図 1>



出生前ストレス(MS)を受けた GAD67 ヘテロ仔(HT)にみられる内側前頭皮質での PV 陽性細胞(PV+)と PNN(WFA+)の減少

<図 2>



出生前ストレス(MS)を受けた GAD67 ヘテロ仔(HT)にみられる内側前頭皮質での自発性微小抑制性シナプス後電流頻度のヘテロ仔コントロール(HT-C)に比して減少

研究課題名：糖鎖による軸索ガイダンス分子 draxin の機能制御機構の解明

研究期間：平成 26 年度～平成 27 年度

研究課題番号：26110715

研究代表者：新明 洋平（金沢大学・大学院医学系・准教授）

<研究の目的>

精巧な神経回路網は高次神経機能の構造的基盤である。約 20 年前に神経軸索ガイダンス分子が発見され、神経軸索が（中間）標的細胞からの軸索ガイダンス分子に導かれるという軸索誘導の基本メカニズムは明らかにされた。しかし、脳発生期に複雑で精巧な脳回路がどのようにして形成されるのかについては分かっていない。この 10 年間に、軸索ガイダンス分子である netrin, Slit, Ephrin の働きが糖鎖により制御されることが報告され、糖鎖によるより高度な軸索ガイダンス機構の存在が示された。脳発生期にはヘパラン硫酸 (HS) やコンドロイチン硫酸 (CS) の糖鎖構造が時空間的にダイナミックに変化していく事は明らかになっているが、それらの軸索ガイダンスにおける役割については不明な点が多い。

私はこの 8 年間、独自に発見した軸索ガイダンス分子 draxin の解析を行ってきた (Islam* and Shinmyo* et al., *Science*, 2009 *These authors contributed equally to this work. ; Ahmed and Shinmyo et al., *J. Neurosci.*, 2011)。draxin は脳の様々な領域に発現し、そのノックアウトマウスでは、脳梁、海馬交連、前交連、脳弓、皮質脊髄路、視床皮質軸索投射など様々な神経回路形成に異常を示す。従って、draxin は脳回路形成において極めて重要な軸索ガイダンス分子である。本研究では、プロテオグリカンと draxin 機能との関連性を明らかにする事により、大脳新皮質の脳回路形成機構の解明を目指した。

<研究の成果>

視床神経や大脳皮質神経細胞の分離培養実験から、draxin は低濃度では視床神経の突起伸長を促進し、高濃度では逆に突起伸長を抑制する事が分かった(文献 1)。この draxin の濃度依存的な軸索ガイダンス活性制御の分子メカニズムを調べるために、draxin 受容体である Dcc と Neogenin (Neol) のダブルノックアウトマウスの神経細胞を分離培養し、draxin の濃度依存的な活性にこれらの受容体が必要かどうかを調べた。その結果、低濃度(10 nM)の draxin の活性(神経突起伸長を促進する)は、Dcc と Neol のダブルノックアウトマウスの

神経細胞ではほぼ完全に消失した。この結果から、draxin の神経突起伸長の促進効果には、受容体である Dcc と Neol があれば十分であると考えられた。一方、高濃度(100 nM)の draxin の活性(神経突起伸長を阻害する)は、Dcc と Neol のダブルノックアウトマウスの神経細胞において低減するものの完全には消失しなかった。この結果から、draxin の神経突起伸長の阻害効果には、受容体である Dcc と Neol は必要であるが、それ以外の受容体が関与する事が示唆された(文献 1, 3)。

次に、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が必要であるかどうかを調べるために、HSPG のヘパラン硫酸側鎖を分解するヘパリナーゼの存在下において、正常マウスの神経細胞を分離培養した。その結果、低濃度(10 nM)の draxin の活性は正常に維持されていた。一方、非常に面白いことに、本来神経突起伸長を阻害する高濃度での draxin の活性がヘパリナーゼを添加すると逆転し神経突起伸長を促進する事を見出した。この結果から、draxin の阻害活性に HSPG が重要であると考えられた(図 1)。

HSPG には、Syndecan, Glypican, Agrin, Perlecan 等がある。今後、in vitro での結合実験や神経細胞の分離培養を用いた実験を行うことにより、draxin の神経突起阻害活性に重要な HSPG を同定する。

<研究の意義・展望>

本研究において、糖鎖による軸索ガイダンス分子の制御メカニズムの一端が明らかとなった。draxin は投射神経細胞自身に発現し、軸索間相互作用を介して軸索投射を制御するというユニークな機能を持つ軸索ガイダンス分子である。従って、糖鎖による draxin 分子の制御機構の解析は、脳回路形成機構の解明に新たな知見を提供し、大脳新皮質において多様な軸索投射パターンが生み出されるメカニズムの解明にも繋がる。さらに、本研究により得られる知見を応用すれば、人工的な遺伝子発現制御による神経回路の再構築が可能となり、今後の神経再生医療に貢献できる可能性をもつ。

<主な研究発表>

1. Yohei Shinmyo, M. Asrafuzzaman Riyadh, Giasuddin Ahmed, Iftekhar Bin Naser, Mahmud Hossain, Hirohide Takebayashi, Hiroshi Kawasaki, Kunimasa Ohta, Hideaki Tanaka (2015) Draxin from neocortical neurons controls the guidance of thalamocortical projections into the neocortex. *Nature Communications*, 6:10232.

2. Kosuke Masuda, Tomohisa Toda, Yohei Shinmyo, Haruka Ebisu, Yoshio Hoshiba, Mayu Wakimoto, Yoshie Ichikawa, Hiroshi Kawasaki (2015) Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals. *Scientific Reports*, 5, 15370.

3. M. Asrafuzzaman Riyadh, Yohei Shinmyo, Kunimasa Ohta, Hideaki Tanaka (2014) Inhibitory effects of draxin on axonal outgrowth and migration of precerebellar neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 449, 169-174.

< 図 >

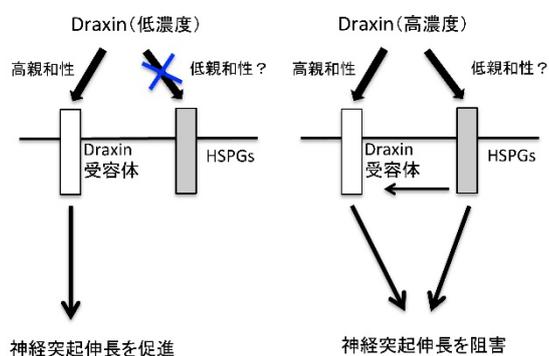


図 1 draxin は、低濃度で視床神経突起伸長を促進し、高濃度では逆に阻害する。ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)が draxin の阻害活性には必要であるが、促進効果には必要ない。

研究課題名：脳におけるコンドロイチン硫酸およびヒアルロン酸の代謝分解機構の解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110719

研究代表者：山田 修平（名城大学薬学部 教授）

連携研究者：水本 秀二（名城大学薬学部 助教）

研究協力者：菅原 一幸（北海道大学先端生命科学研究院 名誉教授）

<研究の目的>

脳や神経系においても、グリコサミノグリカン、特にコンドロイチン硫酸 (CS) やヒアルロン酸 (HA) が重要な役割を果たしていることが報告されてきた。しかし、成人脳では、一般に HA や CS の代謝に関わるとされるヒアルロニダーゼ (HYAL) のファミリーメンバーが殆ど発現しておらず、脳における HA/CS の代謝分解に主要な貢献をしている分解酵素は同定されていない。また、脊髄損傷部位に CS-プロテオグリカンが蓄積し、その存在によって神経軸索の再生が阻害されるが、CS 分解酵素の添加によって、軸索再生が促進されることも報告されている。したがって、CS の分解は、脊髄損傷治療の観点からも重要である。そこで、脳や脊髄における HA/CS 分解酵素を同定し、CS や HA に関連する脳機能を調節する機構の解明を目的とした。

<研究の成果>

脳・神経系における CS/HA の分解機構を解明することを目的とし、まず、(1) 脳・神経系における CS/HA 分解活性の検出を試みた。さらに、これまでに知られている CS/HA 分解酵素及びその関連分子について、遺伝子発現の有無を調べるため、(2) 脳内における CS/HA 分解酵素の候補遺伝子の発現解析を行った。特に、HYAL2 の関与が推定されたので、(3) 脳・神経系に由来する培養細胞株への HYAL 遺伝子の shRNA の安定導入を行ない、ノックダウン細胞株の樹立を試みた。

(1) 脳・神経系における CS/HA 分解活性の検出
脳ホモジェネート、あるいは複数の脳・神経系の培養細胞株をセルスクレーパーで回収後、ソニケーションしたものを酵素源とし、基質として様々な起源の CS および HA を用いて、アガロースゲルでの電気泳動を行い、分解活性を調べた。その結果、HA

は明らかに低分子化され、CS-C も若干低分子化が見られ、CS および HA 分解酵素活性の検出に成功した (図1)。特に C6 グリオーマ細胞においては、酵素活性がコンディションドメディウム中にも検出されたため、酵素タンパク質の精製を行った。様々なカラムクロマトグラフィーを検討したところ、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびヘパリンアフィニティークロマトグラフィーにおいて、結合画分に酵素活性が検出され、酵素の部分精製に成功した。精製画分をトリプシンで消化後、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) で解析を行い、約 100 種類のタンパク質を決定した。現時点では、最終的なタンパク質の同定に至っていないが、さらに精製を進め、脳・神経系で CS/HA 分解活性をもつ酵素タンパク質を明らかにする。

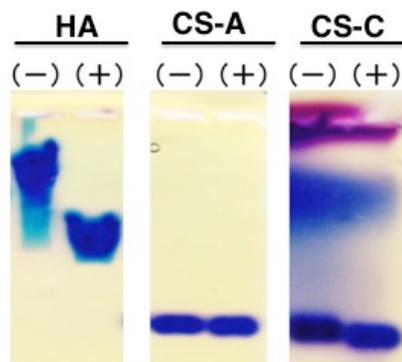


図1 ラット C6 グリオーマ細胞のコンディションドメディウムによる HA、CS-A、CS-C に対する分解活性のアガロースゲル電気泳動を用いた検出 (+) 酵素あり、(-) 酵素なし。

(2) 脳内における CS/HA 分解酵素の候補遺伝子の発現解析

成人脳では HYAL のファミリーメンバーが殆ど発現していないため、胎仔～成獣までのマウス脳を用い、発達段階の異なる脳における、HYAL 遺伝子ファミリーおよび関連酵素遺伝子の mRNA の発現を

調べた。胎生 15 日 (E15)、17 日 (E17)、生後 0 日 (P0)、7 日 (P7)、14 日 (P14)、21 日 (P21)、7 週齢 (7w) のマウスの全脳を摘出し、全 RNA を抽出、精製した。また、神経系培養細胞から全 RNA を抽出し、cDNA を調製した。各 HYAL ファミリー遺伝子 (Hyal1、Hyal2、Hyal3、Hyal4、Hyal5、Hyal6) に特異的なプライマーを用いて、定量的リアルタイム PCR で各遺伝子の発現量を調べた。HA 分解への関与が報告されている Kiaa1199 とその相同遺伝子である Kiaa1412、エキソ型の分解酵素である N-アセチルヘキソサミニダーゼについても、発現を調べた。Hyal2 は、胎児期から出生前後の脳の発達が進む時期に、その発現が高い傾向が見られた。調べた HYAL ファミリーの中では、Hyal2 の発現量が最も多かった (図 2)。また、調べたいずれの培養細胞株においても、Hyal2 が最も高く発現していた。これまでに、HYAL2 の CS 分解活性は報告されていないが、HYAL2 が脳・神経系において CS の代謝を担っている可能性がある。マウス脳における CS 分解に中心的な役割を果たす酵素はまだ同定できていないが、どの酵素が主たる CS 代謝酵素であるのか、あるいは HYAL ファミリー以外に、新規の CS 分解酵素が存在するのか、明らかにする必要がある。

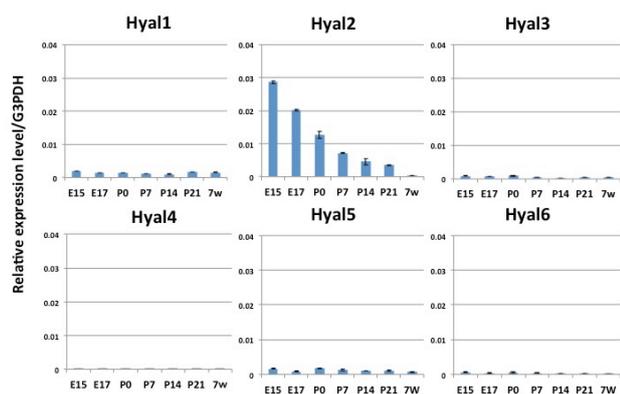


図 2 発達段階の異なる様々な脳における各 HYAL ファミリー遺伝子の発現の定量的解析
グリセロアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼの発現量に対する相対的な比で示した。

(3) 脳・神経系に由来する培養細胞株への HYAL 遺伝子の shRNA の安定導入

これまでの解析で、HYAL2 が脳・神経系での CS/HA 分解に貢献している可能性が推定された。しかし、これまでに *in vitro* で HYAL2 の酵素活性の検出に成功した例は殆どなく、精製したタンパク質を用いて酵素活性を調べることは困難が予想された。そこで、CS/HA 分解活性が検出された細胞株に、HYAL2 の shRNA を安定導入し、活性の変化を検討することとした。また、これまでにその機能が十分に解明されていない HYAL4 についても、shRNA を安定導入し、ノックダウン細胞株を樹立した。

<研究の意義・展望>

本研究では、脳・神経系における CS/HA の分解機構を解明する研究の一環として、脳・神経系由来培養細胞のコンディションドメEDIUMに、活性を検出することができた。この活性の本体となるタンパク質の同定が、CS/HA の分解機構解明のブレイクスルーになるものと期待している。また、これまでに、脳で殆ど発現していないと考えられていた CS/HA の分解酵素遺伝子の発現を詳細に調べ、脳内での時期特異的、部位特異的な発現を見いだすことができた。未知の酵素タンパクが脳内での CS/HA 分解の中心的な酵素である可能性もあるが、これまで活性の検出が困難であったために十分に検証されてこなかった HYAL2 が、該当分子である可能性を指摘した。今後は、HYAL2 の関与をしっかりと検証していきたい。本研究の成果は、脳内における CS/HA の代謝調節、ひいてはそれらの機能調節を解明する糸口になるものと考えている。

<主な研究発表>

1. Shuji Mizumoto*, Shuhei Yamada**, and Kazuyuki Sugahara* (2015) Molecular interactions between chondroitin-dermatan sulfate and growth factors/receptors/matrix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 34, 35-42.
2. Shuhei Yamada** (2015) Catabolism of chondroitin sulfate. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 20(2), 196-212.

研究課題名：コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによる神経可塑性の制御

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110722

研究代表者：藤川顕寛（基礎生物学研究所 統合神経生物学研究部門 研究員）

<研究の目的>

PTPRZは、その細胞外領域がコンドロイチン硫酸(CS)糖鎖で修飾されたユニークな受容体型チロシンホスファターゼ(RPTP)である。PTPRZは、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに発現しており、神経回路形成や神経可塑性、グリア細胞の分化に関与している。

PTPRZには3種類のスプライシングアイソフォーム、すなわちPTPRZ-A受容体、細胞外領域の短縮したPTPRZ-B受容体、そしてPTPRZ-Aの細胞外領域に相当するドメインをもたない分泌型PTPRZ-Sが存在する。神経糖鎖研究において、PTPRZ-Sはphosphacan/6B4 proteoglycan /DSD-1と呼ばれる脳組織の主要なコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の一つとして知られている。脳組織では、上記の3種類のアイソフォーム以外のPTPRZ成分が複数検出される。最近我々は、これら産物がプラスミンやメタロプロテアーゼ、 γ セクレターゼによる制御的プロテオリシスで生じたPTPRZの断片であると実証した。

本課題では、PTPRZの関与する生理機能と各アイソフォームを対応付け、それら分子機能でCS修飾が果たす役割の解明を目的にした。

<研究の成果>

PTPRZの全てのアイソフォームを欠くヌル型欠損マウスでは、海馬依存性学習の障害と海馬CA1領域における長期増強の亢進という機能的変化が生じている。また髄鞘形成の早期化と、実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する抵抗性が見出されている。

(1) 神経可塑性とPTPRZの制御的プロテオリシス

海馬組織中のPTPRZ成分は、状況恐怖条件付け学習課題刺激の有無によって変化することを見出した。すなわち学習刺激後にはメタロプロテアーゼ活性によって生じるCS修飾型PTPRZ細胞外フラグメントが増大することを見出した。このフラグメントの機能的意義を明らかにするため、本成分を結合したアフィニティーカラムを作成し、海馬抽出物から単離・同定を試みた。当初期待した新規成分は検出されなかったが、CS鎖への結合が既知の分子がCS修飾型PTPRZフラグメントの受容体候補と考えら

れた。現在、候補受容体に対するリガンド作用とその生理的意義を検証している。

(2) PTN-PTPRZ-Aによるミエリン鞘形成の制御機構

マウス脳内では、髄鞘形成(オリゴデンドロサイトの分化)が始まる時期の生後10日齢において、PTPRZのリガンドであるpleiotrophin(PTN)の発現が一過性に上昇し、長鎖受容体型アイソフォームのPTPRZ-Aが生後5日から10日齢に発現ピークを示すことが判明した(図1)。またPTNのノックアウトマウスでは、髄鞘形成の時期が遅れていることも判明した。これらの動物個体レベルの見聞に加えて、初代培養細胞及び新たに樹立したオリゴデンドロ系譜細胞OL1を用いた解析結果からは、ミエリン鞘形成時期には、PTNが発現上昇し、これがオリゴデンドロサイト前駆細胞のPTPRZ-Aのホスファターゼ活性を抑制し、それがオリゴデンドロサイトへの分化・成熟を促す引き金になると判明した。

同様の仕組みは、脱髄傷害から回復する際にも働くことが明らかになった。銅キレーターのカプリゾン混ぜた食餌をマウスに与えて脱髄を誘導すると、傷ついた神経細胞ではPTNの発現が一過性に上昇し、これが神経軸索に運ばれ放出される組織像が観察された。これは、脱髄部位の周辺に存在するオリゴデンドロサイト前駆細胞のみを選択的に分化させて、効率良く髄鞘を修復する巧妙な仕組みと考えられる(図2)。

(3) PTPRZの活性制御におけるCS鎖の役割

PTNなどのリガンド分子は、CS鎖を介してPTPRZに高親和性に結合する。我々は、CS鎖の除去によってPTN感受性は消失すると予想したが、オリゴデンドロサイト前駆細胞上のCS鎖をコンドロイチナーゼABC処理によって除去すると、PTN刺激と同様にPTPRZ活性は阻害され、しかもオリゴデンドロサイトへの分化が促進した。PTPRZ受容体は、ダイマー(2量体)化によって抑制されると考えられている。本研究の結果、PTPRZのコアタンパク質は会合しやすく、CS鎖は自発的なダイマー形成を抑制し、またそれと同時にPTNなどのリガンド刺激を高感度にキャッチするアンテナの役割を担うと考えられる(図3)

<研究の意義・展望>

CS 修飾型 PTPRZ 細胞外フラグメントは、脳組織に含まれる PTPRZ の主要成分である。本研究によって生理的な学習刺激で産生が調節されていることが判明した。現在、神経可塑性に関わるシグナル解明に取り組んでいるが、その成果は CS 糖鎖が神経伝達を調節する具体例を示す意義をもつ。

また CSPG は、慢性化した多発性硬化症の脱髄巣や脊髄損傷の損傷部位の細胞外マトリックス成分として蓄積し、髄鞘や神経繊維の再生を妨げになっている。本研究の成果は、脱髄病巣における PTPRZ の CS 修飾の程度や糖鎖修飾の変化が病態と関係する可能性を示唆する新たな知見を供する意義深いものである。

<主な研究発表>

1. K. Kuboyama, A.Fujikawa, R.Suzuki, N.Tanaga, *M.Noda (2016) Role of chondroitin sulfate (CS) modification in the regulation of protein tyrosine receptor type Z (PTPRZ) activity: Pleiotrophin-PTPRZ-A signaling is involved in oligodendrocyte differentiation. *J Bio Chem.* 291, 18177-18128.
2. A.Fujikawa *M.Noda. (2016) Role of pleiotrophin-protein tyrosine phosphatase receptor type Z signaling in myelination. *Neural Regen Res* 11, 549-551.
3. K.Kuboyama, A.Fujikawa, R.Suzuki, *M.Noda (2015) Inactivation of protein tyrosine phosphatase receptor type Z by pleiotrophin promotes remyelination through activation of differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci.* 35, 12162-12171.

<図>

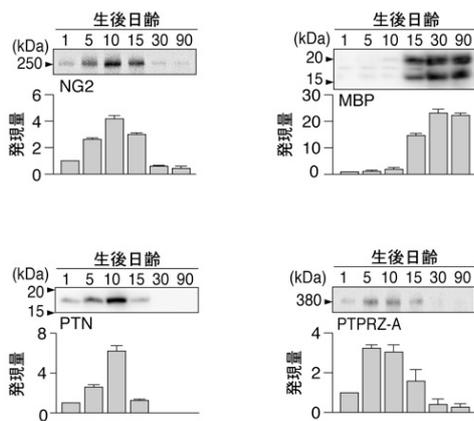


図1:マウス全脳組織のウェスタン解析。オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) のマーカーNG2は生後10日に発現ピークを示す。成熟オリゴデンドロサイトのマーカーミエリン塩基性タンパク質 (MBP) は15日齢から増加。PTNとPTPRZ-Aアイソフォームは、生後5~10日齢に発現ピークを示す。

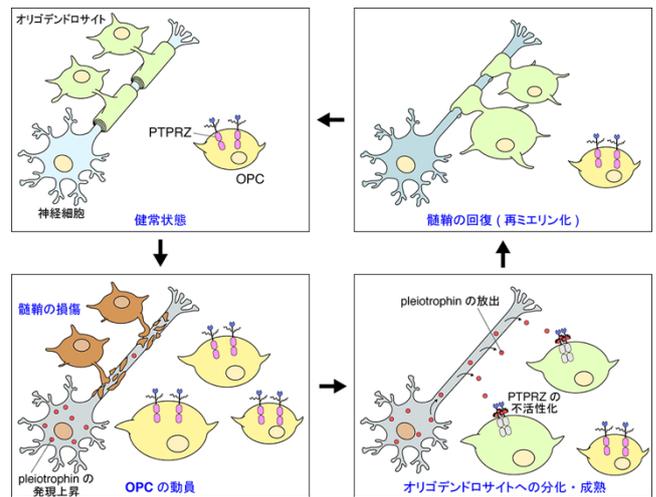


図2: PTN-PTPRZ シグナリング: PTPRZ は OPCs を未分化状態に維持 (左上)。髄鞘損傷によって神経細胞は PTN を産生、神経軸索から放出。脱髄巣には OPCs が集まってくるが、その集積には PTPRZ や PTN は関与しない (左下)。PTN は、OPCs の PTPRZ に結合して分化抑制ブレーキを解除 (右下)。再髄鞘化によって神経機能は回復する (右上)。

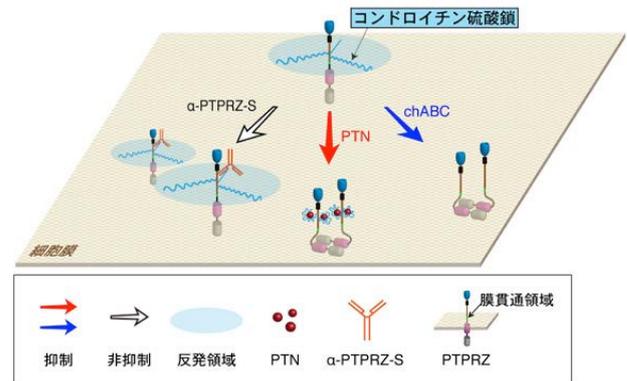


図3: CS 鎖による PTPRZ の活性調節モデル図: PTPRZ の CS 鎖は、その負電荷の反発力によって周囲の PTPRZ 受容体を遠ざけている。塩基性アミノ酸残基のクラスターを有する PTN は、CS 鎖の負電荷性を中和して受容体のダイマー化を促進する。OPCs で発現する PTPRZ-A/-B は、CS 鎖で高度に修飾されている。一方、本来 PTPRZ を発現していない BHK21 細胞などに PTPRZ-B を強制発現させると、低レベルの CS 鎖修飾であれば、PTPRZ の特異抗体でも PTN と同様に受容体の会合が誘導される。

研究課題名：神経活動制御における HNK-1 を中心とした N 型糖鎖機能の解析

研究期間：平成 23 年度～平成 27 年度

研究課題番号：23110006

研究代表者：岡 昌吾（京都大学大学院医学研究科 教授）

研究分担者：川崎 ナナ（横浜市立大学大学院生命医科学研究科 教授）

研究分担者：竹松 弘（京都大学大学院医学研究科 准教授）

研究協力者：森瀬 讓二（京都大学大学院医学研究科 助教）

<研究の目的>

近年、脳の高次機能に糖鎖が深く関わるのが次々に示され、神経系における糖鎖研究の重要性が増している。例えば神経系に特徴的に発現するポリシアル酸 (PSA) や HNK-1 糖鎖が神経可塑性の指標である長期増強 (LTP) に関わること、ペリニューロナルネット (PNN) と呼ばれる構造体に発現するコンドロイチン硫酸 (CS) 鎖が視覚における眼優位性などの神経可塑性を調節していることなどが明らかになりつつある。研究領域の全体構想としては神経機能を制御する糖鎖の機能ドメインを明確にし、神経科学者と糖鎖生物学者の有機的な連携により、神経機能の統合的理解を目指すものである。その中で本研究では N 型糖鎖を中心に、糖鎖が担う神経可塑性の調節機構、神経機能制御機構を解明することを目的とした。

<研究の成果>

我々は神経系において特徴的な発現様式を示す HNK-1 糖鎖に関する研究を行い、本糖鎖が神経可塑性の指標とされる長期増強 (LTP) に関わることや、学習記憶などの脳の高次機能に必須の糖鎖であることを明らかにしていた。また、視覚野などの臨界期の成立に重要と考えられているペリニューロナルネット (PNN) に、従来知られている HNK-1 糖鎖とは異なる構造の HNK-1 糖鎖が存在する可能性を示す結果も得ていた。このような背景のもと本研究において、HNK-1 糖鎖をはじめとする糖鎖が担う神経機能調節機構について以下の知見を得た。

(1) AMPA 型グルタミン酸受容体上の部位特異的な糖鎖機能解析

HNK-1 糖鎖はイオンチャンネル型のグルタミン酸受容体の中でも AMPA 受容体の構成サブユニットである GluA2 に特異的に発現しており、AMPA 受容体の表面発現量の調節に関与している。GluA2 上に存在する 4 カ所の N 型糖鎖付加部位に変異を導入した GluA2 を解析した結果、4 番目 N 型糖鎖 (N413) 上に HNK-1 糖鎖が主に発現していることが明らかになった (図 1 赤色で示された糖鎖)。また、N 末から 2 番目の糖鎖付加部位 (N370) の変異体では、GluA2 の細胞表面発現量が大きく減少することが明らかとなった (図 1 青色で示された糖鎖)。AMPA 受容体のもう一つの主要な構成サブユ

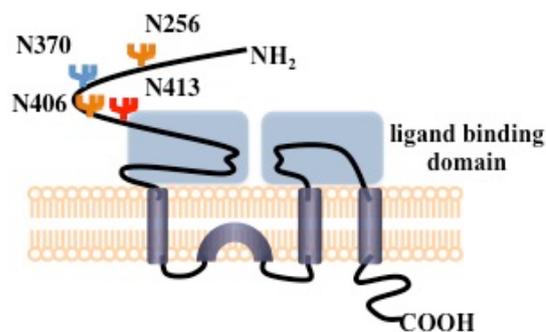


図1 GluA2の模式図
N370のN型糖鎖(青色)は細胞表面発現に必要であり、HNK-1はN413のN型糖鎖に発現する

ニットである GluA1 についても同様の解析を行い、6カ所存在する N 型糖鎖の中で特定の 2カ所の糖鎖付加部位変異体で細胞表面発現量が大きく減少していることが明らかとなった。また、領域内の融合研究により、GluA1 の特定の N 型糖鎖がチャネル機能に影響があること、また、特定の N 型糖鎖が GluA1 の細胞表面上での会合時間に大きく影響することが明らかとなった (主な研究発表 2, 4)。

(2) ペリニューロナルネットに発現する HNK-1 糖鎖抗原の解析

HNK-1 抗体は古くからペリニューロナルネット (PNN) を検出するツールとして利用されてきたが、抗体の認識するエпитープに関しては不明であった。従来から知られている HNK-1 糖鎖生合成

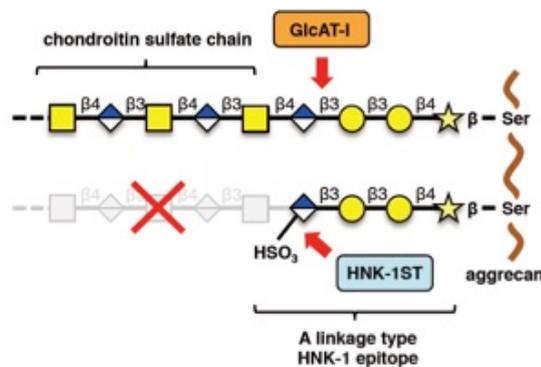


図2 PNNに存在する新規HNK-1糖鎖抗原の構造
GlcAT-IとHNK-1STにより生合成され、コンドロイチン硫酸鎖の発現を抑制する

酵素である GlcAT-P および GlcAT-S の両遺伝子欠

損マウスを用いた解析の結果、PNNに存在するHNK-1糖鎖抗原はプロテオグリカンの橋渡し4糖構造に硫酸が付加させたものであり(図2)、そのキャリアタンパク質がアグリカンであることを領域内の融合研究により証明した。また、その機能的な役割として橋渡し4糖構造に硫酸化されることによりコンドロイチン硫酸鎖の伸長を制御する可能性を示す結果を得た。(主な研究発表 1)。

(3) α -ジストログリカン (α -DG) 上のラミニン結合性糖鎖の解析

α -DGに存在するO-マンノース型糖鎖合成不全が大脳皮質形成異常を伴う筋ジストロフィーの原因となることが知られている。しかし、大脳皮質形成異常の初期過程については不明な点が多かった。領域内の融合研究により、原因遺伝子の一つであるAGO61 (Pomgnt2) 遺伝子欠損マウスを作成し、解析を行うことにより、基底膜破綻はカハール・レチウス細胞、サブプレート細胞による凝集塊の形成によって引き起こされ、さらに異常な形態を示す神経細胞が無秩序に移動した結果、クモ膜下腔への遊出および神経細胞の層形成不全が生じることを示す結果を得た(図3)。(主な研究発表 3, 5)

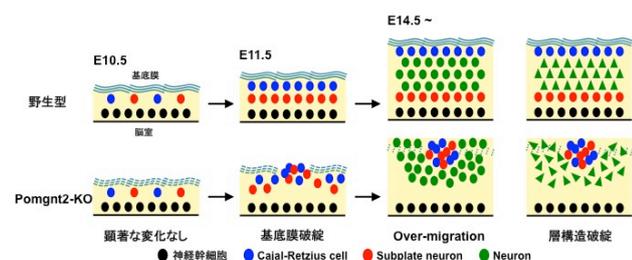


図3 Pomgnt2遺伝子欠損マウスにおける大脳皮質形成異常
Pomgnt2遺伝子欠損マウスでは、E11.5の時点でカハール・レチウス細胞とサブプレート細胞による凝集塊形成とともに基底膜が破綻し、その後神経細胞の無秩序な移動がover-migrationと層構造の破綻を引き起こす。

<研究の意義・展望>

本研究では神経可塑性の調節に重要な役割を持つHNK-1糖鎖、およびシナプス可塑性調節に中心的な役割を担うAMPA受容体に発現するN型糖鎖を中心に解析を行った。その結果、AMPA受容体上のN型糖鎖が、その細胞表面発現量、細胞表面上での側

方拡散の調節などに関わることを明らかにした。また、ペリニューロナルネット上に存在する新規HNK-1糖鎖を同定し、神経可塑性調節に重要なコンドロイチン硫酸鎖の合成を制御していることを明らかにした。これらの結果は、神経可塑性調節に糖鎖が深く関与していることを明らかにするとともに、神経機能制御機構を総合的に理解するには糖鎖を含めた解析の重要性を示している。今後は、これの研究を進展させ、分子機構の詳細を明らかにする。

<主な研究発表>

1. K. Yabuno, J. Morise, Y. Kizuka, N. Hashii, N. Kawasaki, S. Takahashi, S. Miyata, T. Izumikawa, H. Kitagawa, H. Takematsu, and S. Oka (2015) A Sulfated Glycosaminoglycan Linkage Region Is a Novel Type of Human Natural Killer-1 (HNK-1) Epitope Expressed on Aggrecan in Perineuronal Nets. *PLoS One*. 10(12), e0144560. doi: 10.1371/journal.pone.0144560
2. Y. Takeuchi, J. Morise, I. Morita, H. Takematsu, and S. Oka (2015) Role of Site-Specific N-Glycans Expressed on GluA2 in the Regulation of Cell Surface Expression of AMPA-Type Glutamate Receptors. *PLoS One*. 10(8), e0135644. doi: 10.1371/journal.pone.0135644
3. N. Nakagawa, H. Yagi, K. Kato, H. Takematsu, and S. Oka (2015) Ectopic clustering of Cajal-Retzius and subplate cells is an initial pathological feature in Pomgnt2-knockout mice, a model of dystroglycanopathy. *Sci Rep*. 5, 11163. doi: 10.1038/srep11163
4. W. Gu, T. Fukuda, T. Isaji, Q. Hang, H. Lee, S. Sakai, J. Morise, J. Mitoma, H. Higashi, N. Taniguchi, H. Yawo, S. Oka and J. Gu (2015) Loss of α 1,6-fucosyltransferase decreased hippocampal long-term potentiation: implications for core fucosylation in the regulation of AMPA receptor heteromerization and cellular signaling. *J Biol Chem*. 290(28), 17566-17575. doi: 10.1074/jbc.M114.579938
5. H. Yagi, N. Nakagawa, T. Saito, H. Kiyonari, T. Abe, T. Toda, S.W. Wu, K.H. Khoo, S. Oka, and K. Kato (2013) AGO61-dependent GlcNAc modification primes the formation of functional glycans on α -dystroglycan. *Scientific Reports*. 3, 3288. doi:10.1038/srep03288.

研究課題名：ゴルジ体ストレス応答における糖鎖修飾の役割と神経機能への貢献

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110007

研究代表者：吉田 秀郎（兵庫県立大学大学院生命理学研究科 教授）

連携研究者：若林 貞夫（兵庫県立大学大学院生命理学研究科 准教授）

連携研究者：谷口 麻衣（兵庫県立大学大学院生命理学研究科 助教）

<研究の目的>

ゴルジ体は分泌タンパク質や膜タンパク質の糖鎖修飾を担う細胞小器官であり、神経細胞やグリア細胞において顕著に発達している。ゴルジ体ストレス応答はゴルジ体の機能を細胞の需要に応じて増強する機構であり、神経系の細胞においてゴルジ体の機能を強化しているのではないかと考えられた。そこで本研究課題では、ゴルジ体ストレス応答の分子機構を解明すると同時に、ゴルジ体ストレス応答によってゴルジ体での糖鎖修飾能力が増強されることによって神経機能にどのような貢献をしているかを解明することにした。

<研究の成果>

1. ゴルジ体ストレス応答の分子機構の解明

ゴルジ体ストレス応答の研究は研究代表者が開拓したものであり、その分子機構についてはほとんどわかっていなかった。解析の結果、ゴルジ体でのN型糖鎖修飾を改変する糖鎖修飾酵素の発現を制御するゴルジ体ストレス応答の経路（TFE3経路）を同定した。TFE3経路の中心的制御因子である転写因子TFE3は平常時はリン酸化されることによって細胞質に繫留されているが、ゴルジ体の機能が不足すると（ゴルジ体ストレス状態）TFE3は108番目のセリン残基が脱リン酸化されることによって核へ移行できるようになり、N型糖鎖修飾酵素遺伝子のプロモーター領域に存在するエンハンサー配列GASE（コンセンサス配列は、ACGTGGC）に結合して転写を誘導する。

また、プロテオグリカン型の糖鎖修飾酵素の発現を誘導するプロテオグリカン経路がTFE3経路とは別に存在することを見出した。次世代シーケンサーやマイクロアレイを用いた解析から、プロテオグリカン経路の標的遺伝子を多数同定し、これらの遺

伝子の転写を共通に制御するエンハンサーPGSEを同定した。現在は、PGSEに結合して転写を制御する転写因子を検索しているところである。

更に、ムチン型の糖鎖修飾酵素の発現を制御するムチン経路が存在することも見出した。ムチン型経路についても標的遺伝子を複数同定したので、現在はその発現を制御する共通のエンハンサーを同定中である。また、スフィンゴ糖脂質型の糖鎖修飾酵素の発現を制御するスフィンゴ糖脂質経路についても同様の解析を行っている。

興味深いことに、プロテオグリカン型の糖鎖修飾を特異的に阻害するとプロテオグリカン経路が活性化し、ムチン型の糖鎖修飾を阻害するとムチン経路が活性化、スフィンゴ糖脂質の糖鎖修飾を阻害するとスフィンゴ糖脂質経路が活性化されることがわかった。このことは、糖鎖修飾が未完成であることがゴルジ体ストレス応答を活性化させるシグナルになっていることを示唆している。どのような糖鎖が各応答経路の活性化シグナルになっているのかを解析することによって、新たな糖鎖コードを発見することができるのではないかと期待している。

2. 神経機能に対するゴルジ体ストレス応答の貢献

大きな突起を伸長させる神経細胞やグリア細胞では、たくさんの膜タンパク質の合成や輸送を支えるために、突起の基部に非常によく発達したゴルジ体が存在している。このことは、神経細胞やグリア細胞の分化の過程でゴルジ体ストレス応答が活性化されてゴルジ体の機能を増強することで、分化を支えていることを示唆している。アストロサイトは大量にプロテオグリカンを分泌するグリア細胞であり、分泌されたプロテオグリカンはペリニューロナルネットとしてシナプスの可塑性を制御したり、グリア瘢痕として神経軸索再生を阻害したりする

ことが知られている。そこで、アストロサイトの分化過程でゴルジ体ストレス応答が活性化されているかどうか調べたところ、TFE3 経路やプロテオグリカン経路が活性化されていることがわかった。今後は、ゴルジ体ストレス応答の各経路がアストロサイトの分化にどのように貢献しているか解析する予定である。

<研究の意義・展望>

小胞体ストレス応答に比べてゴルジ体ストレス応答の分子機構はこれまでほとんどわかっていなかった。本研究課題の成果によってゴルジ体ストレス応答の分子機構の一端が明らかとなった。ゴルジ体ストレス応答は小胞体ストレス応答と同様に神経変性疾患の発症に深く関与していると考えられることから、その分子機構の解明はアルツハイマー病などの神経変性疾患の予防・診断・治療に役立つ基盤構築に貢献すると考えられる。

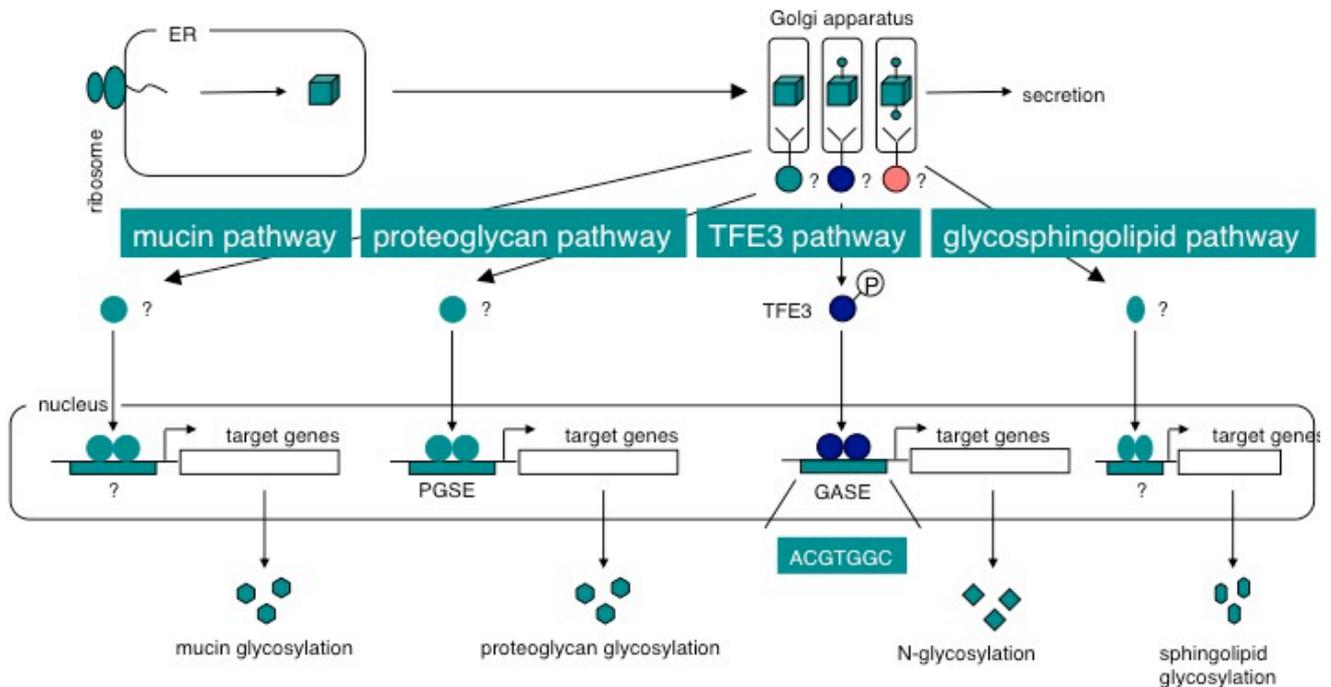
また、アストロサイトの分化においてゴルジ体ストレス応答が活性化されてゴルジ体機能が強化さ

れていることから、TFE3 経路やプロテオグリカン経路の活性を人工的に調節することでペリニューロナルネットワークやグリア瘢痕の産生を制御し、シナプスの可塑性を調節したり神経軸索再生を促進することが可能になると考えられる。

<主な研究発表>

1. M. Taniguchi, K. Sasaki-Osugi, M. Oku, S. Sawaguchi, S. Tanakura, Y. Kawai, S. Wakabayashi and H. Yoshida (2016) MLX is a transcriptional repressor of the mammalian Golgi stress response. *Cell Struct. Funct.*41, 93-104.
2. M. Taniguchi, (他 13 名), S. Wakabayashi, H. Kitagawa and H. Yoshida (2015) TFE3 is a bHLH-ZIP-type transcription factor that regulates the mammalian Golgi stress response. *Cell Struct. Funct.*40, 13-30.
3. K. Sasaki and H. Yoshida (2015) Organelle autoregulation-stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome. *J. Biochem.* 157, 185-195.
4. M. Taniguchi and H. Yoshida (2015) Endoplasmic reticulum stress in kidney function and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 24, 345-350.
5. S. Wakabayashi and H. Yoshida (2013) The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists. *Computational and Structural Biotechnology Journal.* e20130310.

ゴルジ体ストレス応答の応答経路



研究課題名：スフィンゴ糖脂質糖鎖による神経機能の健全性維持の分子機構

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110008

研究代表者：古川鋼一（名古屋大学大学院医学系研究科 教授、平成27年度より中部大学生命健康科学部 教授）

分担研究者：鈴木健一（京都大学物質－細胞統合システム拠点 特定拠点准教授）

<研究の目的>

脳神経系組織に高発現する酸性糖脂質、ガングリオシドの機能と作用機構に関して、とくに脂質ラフトにおける制御機能を中心にして、糖鎖遺伝子欠損マウスに主な焦点をおいて解明した。

<研究の成果>

1. ガングリオシド欠損マウスを用いた糖脂質糖鎖の脳神経系組織の健全性維持のメカニズム解明：

これまで作成したガングリオシド合成酵素遺伝子、GM2/GD2合成酵素、GD3合成酵素のノックアウト(KO)マウス、両者のダブルKOマウスなど、欠損糖脂質の範囲が異なる幾つかの変異マウスを用いて、高次脳神経系機能の異常と、そのメカニズム解析を行った結果、複合型ガングリオシドの欠損が、おもにニューロンにおいて重篤な神経異常を惹起することが示された。本研究は、グラスゴー大学のProf. Willison との共同研究として実施したが、双方の長所を生かした説得力のある結果が得られた。ニューロン特異的にGM2/GD2合成酵素cDNAをニューロン特異的に発現するTgマウスと、同遺伝子の全身KOマウスを交配したところ、KOマウスで見られた行動異常、神経変性、axonの異常などが概ね消失したことから、ニューロンにおけるガングリオシドの発現がより重要であることが示された。脂質ラフトにおけるガングリオシドのクラスター形成の1分子イメージングにおいても、膜上における機能遂行の胴体が示された（鈴木健一、安藤弘宗博士との共同研究）。一方、アストロサイト特異的にGM2/GD2合成酵素遺伝子を発現するTgマウスを樹立し、現在、交配の準備をしているところである。

2. b-系列ガングリオシドによる行動と代謝調節機構の解明

これまで、b-系列ガングリオシドを全て欠損するGD3合成酵素遺伝子KOマウスを作成して解析してきたが、舌下神経再生系での再生不良が認められた以外は、著明な異常を認めなかった。行動異常解析を本格的に行い、幾つかの興味深い結果が得られた。

GD3合成酵素遺伝子KOマウスは、とくにRota-rodテストなどにおいて、著明な機能低下が認められたが、興味深いことに雄における機能低下が際立っていた。また、海馬スライスによるlong term potentiation (LTP)の解析結果により、明らかなLTP低下が見られ、memory機能の低下が示唆された（高宮考悟博士との共同研究）。

さらに、この変異マウスで血清レプチンの異常低下が認められたため、脂肪細胞の初代培養系によるレプチン分泌に対するb-系列ガングリオシドの制御機能を解析した。その結果、b-系列ガングリオシドが白色脂肪組織からのレプチン分泌に必須であり、KOマウスの白色脂肪組織におけるレプチンの蓄積が、そのことを支持する知見と考えられた。さらに視床下部の弓状核ニューロンにおけるレプチン受容体ObRの機能解析を行ったところ、KOマウスではレプチン刺激なしでもATAT3リン酸化の傾向が認められ、刺激時にはより強い反応が認められた。このことは、視床下部ニューロン由来細胞株N-41の糖脂質糖鎖リモデリング実験でも証明された。すなわち、弓状核ニューロンはb-系列ガングリオシド欠損により感受性が亢進しており、そのためにレプチンレベルの低下があっても肥満を示さないことが示唆された(Fig. 1)。

3. 神経組織に発生するグリオーマにおけるガングリオシドの機能の解析

RCASシステムを用いてマウスグリオーマを作成し、ガングリオシドの機能の解明を行った。OSGF-B

発現によりグリオーマを樹立可能なことを明らかにして、野生型マウス、GD3 合成酵素欠損マウスでグリオーマを作成して、両者の腫瘍形質、遺伝子発現を解析した。その結果、GD3 発現が、腫瘍形質の亢進、マウス寿命の短縮を誘導するとともに、腫瘍周囲のマクロファージ系細胞の M2 型への極性変化が認められ、b-系列ガングリシドの悪性形質増強機能が in vivo の系で実証された (Fig. 2)。

<研究の意義・展望>

酸性糖脂質ガングリシドの糖鎖が、神経系細胞の核表面で、種々のシグナル制御に働くことが、糖鎖欠損マウスの解析を通して示された。グリア系における機能、免疫細胞に及ぼす作用に関して、今後さらに解析すべき点があり、一層の展開が必要である。

<主な研究発表>

1. J.Shuting (他 6 名), *[K.Furukawa](#), K.Furukawa (2016) Increased a-series gangliosides positively regulate leptin/Ob receptor-mediated signals in hypothalamus of GD3 synthase-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 479, 453-460.
2. T.Yamaguchi,(他 6 名) *[Furukawa K](#) (2016) Expression of B4GALNT1 (GM2/GD2 synthase) suppresses BACE1 degradation and modulates amyloid precursor protein processing. *Science Report* 6,34505. doi: 10.1038/srep34505.
3. Komura N, [Suzuki KG](#), [Ando H](#),(他 8 名), [Furukawa K](#),(他 4 名), *[Kiso M](#) (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat Chem Biol.* 12, 402-410.
4. Y.Ohkawa,(他 11 名), *[Furukawa K](#) (2015) Ganglioside GD3 enhances invasiveness via Yes activation by forming a complex of GD3/PDGFR α /Yes in gliomas. *J. Biol. Chem.* 290, 16043-16058.
5. *[Furukawa K](#), Ohmi Y, Ohkawa Y, Tajima O, [Furukawa K](#).: Glycosphingolipids in the regulation of the nervous system. *Adv Neurobiol.* 9, 307-320, 201

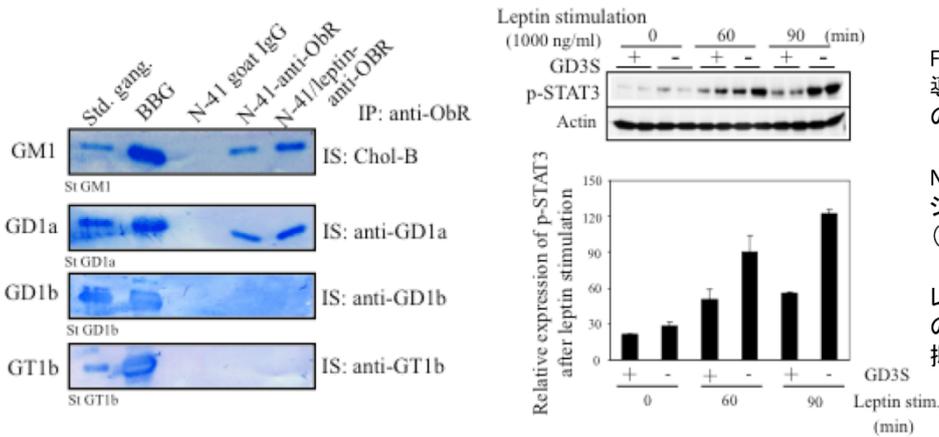


Fig. 1. N41-細胞へのGD3合成酵素導入による、レプチン/ObR シグナルの抑制

N-41細胞膜上で、a-系列ガングリシドがObRと複合体を形成する。(免疫共沈降による証明(左))

レプチン刺激によるSTAT3リン酸化の、b-系列ガングリシドによる抑制を示すimmunoblotting.

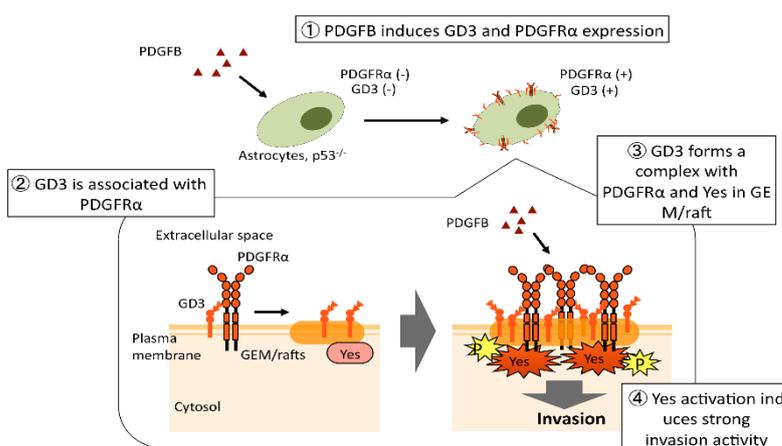


Fig. 2. GD3 が PDGF 受容体 α を脂質ラフトにリクルートし Yes も含む複合体を形成する。

PDGF-B 導入により野生型マウスに形成されたグリオーマでは、GD3 合成酵素が発現して、PDGFR α が脂質ラフトにリクルートされると共に、Src ファミリーキナーゼである Yes が結合して複合体が形成される。その結果、PDGF-B のシグナルの増強と、paxillin のチロシンリン酸化による、グリオーマの浸潤性の増強が誘導される。

研究課題名：小脳をモデルとした糖鎖シグナルによる機能的・形態的シナプス可塑性制御

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110009

研究代表者：柚崎通介（慶應義塾大学医学部 教授）

連携研究者：松田信爾（慶應義塾大学医学部 訪問准教授・電気通信大学大学院 情報理工学研究科 准教授）

連携研究者：松田恵子（慶應義塾大学医学部 講師）

<研究の目的>

神経回路は成熟後においても神経活動の変化によって機能的にも形態的にも変化する。このようなシナプス可塑性こそが記憶・学習を支える本体であると考えられている。短・中期のシナプス可塑性の分子実体は、シナプス後膜上の AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) の数の変化によるシナプス伝達効率の低下 (長期増強 LTP・長期抑圧 LTD) であると考えられている。一方、より長期に持続する記憶にはシナプス形態変化が伴う。これらの現象を担う分子機構の解明は神経科学の最重要課題の一つであるが、不明な点が多く残されている。その原因の一つは、シナプスに豊富に存在し神経機能を調節している糖鎖修飾機構が十分に分かっていない点にある。

本研究では、運動に関与する記憶に重要な役割を果たすことが分かっている小脳神経回路をモデルとして、(1) 糖鎖による AMPA 受容体トラフィッキングとシナプス可塑性制御機構の解明、(2) 糖鎖による神経形態と回路形成制御機構の解明を目指した。

<研究の成果>

(1) 糖鎖による AMPA 受容体トラフィッキングとシナプス可塑性制御機構の解明

LTD を誘導する NMDA 投与によって細胞内 Ca 濃度が上昇すると、フォスファターゼが活性化され、脂質合成酵素 PIP5K γ が活性化されることが分かった。その結果として脂質分子 PI(4,5)P₂ がシナプス後膜で局所的に合成され、AMPA 受容体のクラスリン依存性エンドサイトーシスに必須な分子であるアダプタータンパク質 AP-2 を集積させることを発見した (Neuron, '12a)。これまでに AP-2 が AMPA 受容体を「積み荷タンパク質」として直接認識することが報告されていた。しかし、AP-2—AMPA 受容体間の結合親和性は弱く、また神経活動による調節を受けない。私たちは、AMPA 受容体副サブユニットである γ -2 が神経活動の変化によってリン酸化状態が低下して AP-2 に強固に結合することを見出した (Nat Commun, '13)。この結合を阻害すると LTD が阻害されることから、LTD 誘導時における AP-2 の生理的なターゲットは γ -2 であることが初めて明らかとなった。興味深いことに、エンドサイトーシスされた後に、 γ -2 には別のアダプタータンパク質 AP-3 に結合することが分かった。AP-3 はライソゾーム経路への輸送を制御するが、ライソゾーム分解阻害剤を投与しても LTD は障害されなかった。こ

のことはライソゾーム経路に入った AMPA 受容体は分解されるのではなく、ライソゾーム経路の細胞内プールに蓄えられることを示唆する。ライソゾームには豊富な糖鎖分解酵素が存在するため、このプールに存在する AMPA 受容体の糖鎖付加状態が変化する可能性があり検討を続けている。

一方、LTP 誘導刺激による AMPA 受容体のエキソサイトーシスは Synaptotagmin 7 に依存することが判明した。Synaptotagmin 7 はライソゾーム分泌時に働くことが線維芽細胞で報告されていることから、LTD 時に移行した細胞内のライソゾーム様プールに存在する AMPA 受容体が LTP 誘導時に放出されると可能性が考えられ、現在さらに検討を続けている。さらに LTP 誘導刺激を与えたときにライソゾームに存在する糖鎖分解酵素が細胞外に放出され細胞外マトリクスの糖鎖が変化することも判明した (論文準備中)。

(2) 糖鎖による神経形態と回路形成制御機構の解明

胎生 11.5 日齢のマウスに子宮内電気穿孔法を適用することで、プルキンエ細胞選択的 (99%) に遺伝子導入することに成功した。この方法は、i) プルキンエ細胞特異的、ii) 細胞毒性が少ない、かつ iii) 複数の遺伝子を時期選択的に発現あるいは抑制可能、という長所を持つ (Eur J Neurosci, '12)。プルキンエ細胞の細胞体から出る幼若型樹状突起は複数本存在するが、いったん全て刈り込まれ、その後成熟型樹状突起が発生する。この成熟型樹状突起も 1 本のみを残して再び刈り込まれることによって最終的な樹状突起となることが知られている。スタゲラマウスでは ROR α の突然変異によって、最初の幼若型樹状突起の刈り込み現象が障害されると考えられていた。しかし、子宮内電気穿孔法と時期特異的のノックダウン・ノックアウト法を開発することによって、ROR α 遺伝子がさまざまな発達時期

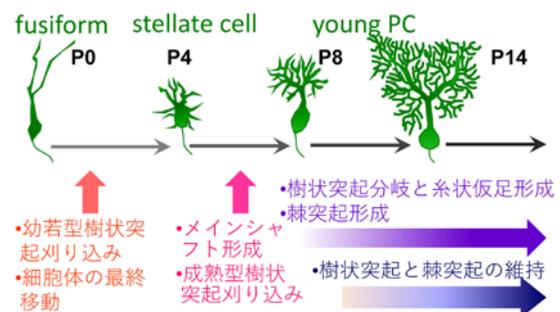


図 1. ROR α は発達時期特異的に樹状突起形成を制御において多彩な樹状突起形態変化を制御すること

を明らかにした (図 1; *J Neurosci*, '15)。

平行線維—プルキンエ細胞シナプス形成分子である *Cbln1* は、シナプス小胞を集積させるだけでなく、シナプス前部から小さな突起を誘導しシナプス前部を形成することを明らかにした (*Neuron*, '12b)。*Cbln1* には N 型糖鎖が付着しており、この糖鎖を除去するとシナプス形成能が亢進することが分かってきた。また神経活動に応じて *Cbln1* もライソゾーム様小胞から分泌されることが分かった。このことは神経活動亢進時に分泌される *Cbln1* は、糖鎖付加状態が低くシナプス形成能が高い可能性を示唆する。

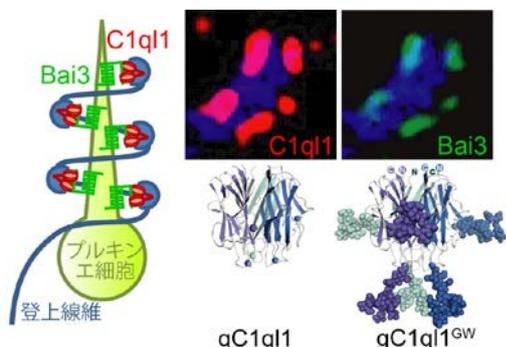


図 2. 糖鎖による *C1ql1*—*Bai3* シグナリングの制御

Cbln1 分泌経路については論文準備中である。

一方、登上線維からは *Cbln1* と同じ補体ファミリーに属する *C1ql1* が分泌される。*C1ql1* に N 型糖鎖を付加すると、プルキンエ細胞樹状突起に存在する受容体 *Bai3* (Brain angiogenesis inhibitor 3) と結合することができず、登上線維—プルキンエ細胞シナプスの成熟と刈り込み現象が阻害されることを初めて明らかにした (図 2; *Neuron*, '15)。

<研究の意義・展望>

AMPA 受容体のエキソサイトシスやエンドサイトシスはシナプス周辺部で起きる。これまで LTP や LTD の研究は AMPA 受容体そのものの細胞内外のトラフィックを中心に研究されてきた。しかしシナプス部位への側方輸送過程の重要性が近年注目されている。したがって、シナプス間隙に豊富に存在する細胞外マトリクスの糖鎖が神経活

動によって変化する機構を明らかにした本研究は AMPA 受容体トラフィック機構を明らかにするために極めて重要である。今後はさらに、LTP 刺激に伴うライソゾームからの分泌によって、時間的にどのように細胞外マトリクスの糖鎖が変化して、AMPA 受容体側方輸送やスパイン形態変化に結びつくのかを明らかにしていきたい。

近年のゲノム解析によって、精神疾患や発達障害の多くはシナプスを構成する分子の変異によって引き起こされることが明らかとなってきた。面白いことにシナプス形成分子の多くは糖鎖によって修飾されている。私たちが明らかにしたシナプス形成分子である *Cbln1* や *C1ql1*、あるいはその受容体である *Neurexin* にも N 型および O 型糖鎖で修飾されており、神経活動によって調節されていることを示唆するデータが得られてきた。シナプス形成分子そのものの糖鎖による制御機構についても明らかにしていきたい。

<主な研究発表>

1. Kakegawa W, Mitakidis N, Miura E, Abe M, Matsuda K, Takeo YH, Kohda K, Motohashi J, Takahashi A, Nagao S, Muramatsu SI, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M. Anterograde *C1ql1* signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron* 85:316-329 (2015).
2. Ito-Ishida A, Miyazaki T, Miura E, Matsuda K, Watanabe M, Yuzaki M*, Okabe S*. Presynaptically released *Cbln1* induces dynamic axonal structural changes by interacting with *GluD2* during cerebellar synapse formation. *Neuron* 76:549-564, 2012. (*co-corresponding author).
3. Kohda K, Kakegawa W, Matsuda S, Yamamoto T, Hirano H, Yuzaki M. The d2 glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:E948-57 (2013)
4. Takeo YH, Kakegawa W, Miura E, Yuzaki M. *RORα* Regulates Multiple Aspects of Dendrite Development in Cerebellar Purkinje Cells *in vivo*. *J Neurosci* 35:12518-12534 (2015).
5. Nishiyama J, Hayashi, Y, Nomura T, Miura E, Kakegawa W, Yuzaki M. Selective and regulated gene expression in murine Purkinje cells by in utero electroporation. *Eur J Neurosci*, 36: 2867-2876 (2012).

研究課題名：高次脳神経機能におけるシナプス可塑性の神経細胞外微小環境による制御機構の解明

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110010

研究代表者：高宮 考悟（宮崎大学医学部 教授）

<研究の目的>

グルタミン酸は、中枢神経系において主な興奮性神経伝達物質であり、シナプス前部より放出される。その受容体であるシナプス後部におけるグルタミン酸受容体は、記憶などを含む多くの神経活動で重要な役割を果たしている。そのなかでも AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) は、主たる興奮性神経伝達物質の受容体としてだけではなく、学習・記憶の分子基盤とされているシナプス可塑性の発現においても中心的役割を果たしている。

これまでに AMPA-R と細胞内や膜上で結合する分子群が発見され、それらがシナプス可塑性の制御を行っていることが多数報告されてきた。しかしながら AMPA-R の細胞外からの制御機構に関しては未知の部分が多い。

神経細胞外には、細胞膜上に結合した分子や膜タンパク質さらに細胞外マトリックスがあり、そこには、豊富な糖鎖が存在している。本研究では、神経細胞外の微小環境における糖鎖のシグナルがシナプスに局在する AMPA-R の機能をどのように修飾するのかをシナプス可塑性の制御という観点から調べた。特に、細胞表面にある AMPA-R の細胞外ドメインは豊富な糖鎖修飾を受けるが、その役割に関しては、よくわかっていない。これら受容体の細胞外ドメインの糖鎖修飾が受容体の機能やシナプス表面への輸送・シナプス形成/除去などにどのような影響を与えるのかを検討し、そのメカニズムを研究した。さらにこれらのシナプス可塑性への関与を解析することにより、記憶・学習への糖鎖情報の重要性を明らかとすることを目的とした。

<研究の成果>

(1) AMPA 型グルタミン酸受容体の糖鎖修飾による機能制御

初代神経細胞において糖タンパク質の N 型糖鎖を消化する PNGase F を用いて、培養神経細胞の AMPA-R の機能解析を行ったところ図 1 のように AMPA-R の特徴である長時間のグルタミン酸投与によってチャンネルが閉口する脱感作現象がみとめられず、再度チャンネルが開口する再感作現象がみられた。このメカニズムをより詳細に解析するために、簡略なシステムである HEK293 細胞に GluA1 サブユニットを発現させ解析を行った。HEK293 細胞において AMPA-R の GluA1 サブユニットを発現させ PNGase F で処理を行うと、同様に再感作現象がみられた。

PNGase F 処理が再感作をおこす事より GluA1 の細胞外領域の N 型糖鎖修飾に注目し、6 カ所ある N 型糖鎖修飾部位に各々変異を加えてチャンネル活性を測定したところ一カ所のアミノ酸をアスパラギンからグルタミンに変換した変異体で再感作現象が認められた。さらにこの再感作現象は、海馬のスライスに PNGase F 処理して電気刺激した際にも観察され、同様のことが脳内のネットワークにおいてもおこることが確認された。

(2) 糖鎖修飾による細胞膜脂質ラフトへの局在の制御

再感作現象に関して、グルタミン酸刺激の時間・方法を変えて解析したところ、観察された再感作現象は、通常 AMPA-R で見られる脱感作現象に加え新たに脱感作の機能を失った AMPA-R の二つの成分よりなることが明らかとなった。従って糖鎖を除去された AMPA-R は、本来もつ脱感作機能を失っている AMPA-R であることが推察された。この脱感作機能を失った AMPA-R は、シナプス前部からのグルタミン酸刺激の強さに比例してイオンを通すことから、本来の神経伝達機構とは異なった情報伝達を行うものと考えられ、個々のシナプスにおける神経伝達強度の個性をもたらすものと推察された。

次に糖鎖修飾されない AMPA-R が、本来の脱感作機能を有する受容体となることが異なるのかを検討していった結果、これらは脂質ラフトに局在している AMPA-R であることが明らかとなった。また同一神経においても脂質ラフトが存在するシナプスと、しないものがあり、シナプスにおける脂質ラフトの形成が神経活動に依存して増加することがわかった。つまり糖鎖の除去により脱感作現象が消失し AMPA-R のチャンネル活性が大きく変化する。さらに同一神経細胞に脂質ラフト陽性のシナプスと陰性のシナプスが存在することにより AMPA-R のシナプスにおける局在が制御されるのである。これらより“糖鎖修飾の有無によって AMPA-R の局在がコントロールされ、個々のシナプス強度が変化する”という新たなメカニズムで神経伝達の各シナプスでの違いを生み出すという結果を得た (図 2)。

(3) 糖鎖修飾によるシナプス可塑性の制御

さらに培養神経細胞を用いた実験においてシナプス可塑性を誘発する刺激を行うと糖鎖修飾をされていない AMPA-R が脂質ラフトを有するシナプスに集中することがわかった。またシナプス可塑性のモデルとして広く使われている海馬の急性スライスを用いた長期増強において、入力線維をテタヌス刺激をおこすと、再感作現象が一部の条件で観察することを見いだした。このことにより、in vivo において AMPA-R の N 型糖鎖の有無により AMPA 型グルタミン酸受容体のチャンネル活性の調節が起こりシナプス可塑性そのものを直接制御している可能性が示唆された。

<研究の意義・展望>

本研究は、当初 AMPA-R のチャンネル機能への影響を調べようとしてスタートした研究であるが、その全貌が明らかとなるにつれ糖鎖修飾が単なるチャンネル機能の制御ではなく、受容体の細胞内外のトラフィックを制御することによりシナプス可塑性をも制御することがわかった。さらにこれまで分子間の相互作用ばかり注目されてきた

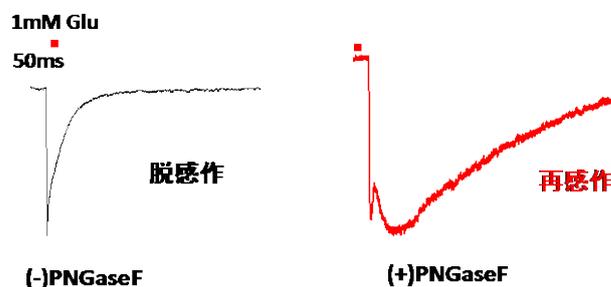
本領域において受容体と膜構造である脂質ラフトとの関係で糖鎖修飾が重要な役割を果たしているという点が明らかとなったことは、本領域において大変重要な発見であると考えられる。これにより糖鎖と細胞膜の相互作用による受容体の機能制御、トラフィック制御という新たな方向性でのシナプス可塑性のメカニズム研究の道筋が開けたと思われる。さらに学習・記憶のみに限らず新たな神経機能の制御メカニズムという点においても神経科学における新たな制御メカニズムを切り拓くブレイクスルーになったと思われる。

<主な研究発表>

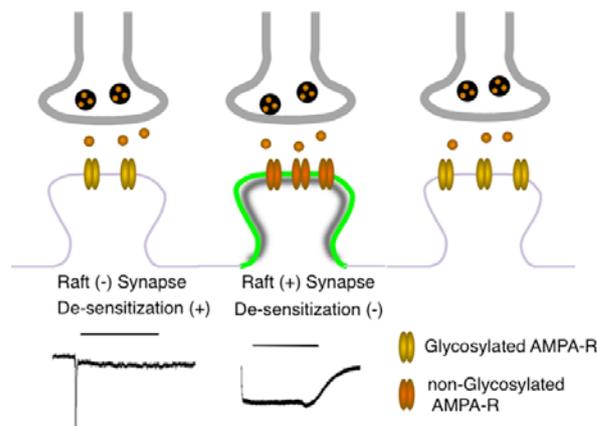
Kogo Takamiya: A novel regulatory mechanism of synaptic plasticity mediated by AMPA-type glutamate receptor glycosylation
2016 International Symposium on Neurodegenerative Diseases & the 43rd Annual Conference of Japan Brain Sciences Society, Xian, China

Kandel Munal Babu: Two N-glycosylation sites regulate cell surface expression of AMPA-type glutamate receptor in neurons
第 67 回西日本生理学会(鹿児島)

<図 1>



<図 2>



研究課題名：プロテオグリカンとコンドロイチン硫酸結合性タンパク質に関する統合的神経糖鎖生物学

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110501

研究代表者：菅原 一幸（北海道大学先端生命科学研究院 名誉教授）

連携研究者：山田 修平（名城大学薬学部 教授）

水本 秀二（北海道大学先端生命科学研究院 博士研究員）

<研究の目的>

コンドロイチン硫酸(CS)はプレイオトロフィンなどの神経栄養因子と相互作用することにより、神経突起の伸長促進活性を有している。また、CSはペリニューロナルネットとよばれる神経細胞周囲に豊富に存在し、特定の機能を担っていると予想されているが、不明な点が多い。そこで、本研究では新規CS結合タンパク質の同定およびCSの機能ドメイン構造の単離を目的とし、CSによる神経突起の伸長メカニズムと、神経細胞の分化およびペリニューロナルネットにおけるCS鎖の機能の解明を目指した。

<研究の成果>

1) CS-D 由来新規六糖の単離

D-unit [GlcA(2-O-硫酸)—GalNAc(6-O-硫酸)] (GlcA および GalNAc はそれぞれグルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンを表す)を多く含む CS-D は、プレイオトロフィンを介して、神経突起伸長活性を示す。その CS-D から新規六糖配列を7種類単離した(Δ O-D-D, Δ A-D-D, Δ C-D-D, Δ E-A-D, Δ D-D-C, Δ A-B-D, Δ E-D-D : Δ は不飽和結合、O, A, B, C, E はそれぞれ[GlcA—GalNAc], [GlcA—GalNAc(4-O-硫酸)], [GlcA(2-O-硫酸)—GalNAc(4-O-硫酸)], [GlcA—GalNAc(6-O-硫酸)], [GlcA—GalNAc(4,6-O-硫酸)]の二糖を表す) (Mizumoto *et al.*, **Glycobiology**, 23, 155, 2013)。さらに、脳のCSを認識する抗CS抗体(MO-225)と単離した六糖が反応することを見出した(図1)。

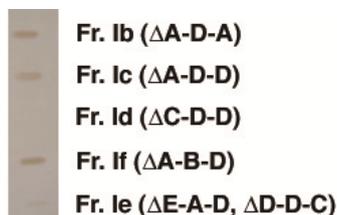


図1. 抗CS抗体(MO-225)と反応する新規CS六糖

2) 様々な神経栄養因子とCSバリエーションとの結合解離定数の解析

CSと結合する増殖因子やサイトカインは、CS鎖中の特定の硫酸化構造を認識していると考えられている。そこで、硫酸化パターンの異なる様々なCSバリエーションを固相化し、神経栄養因子やサイトカインとの結合解離定数を明らかにし、機能性タンパク質の認識に硫酸化配列が重要であることを示唆した(Mizumoto *et al.*, **Glycoconjugate J.**, 30, 619, 2013)。

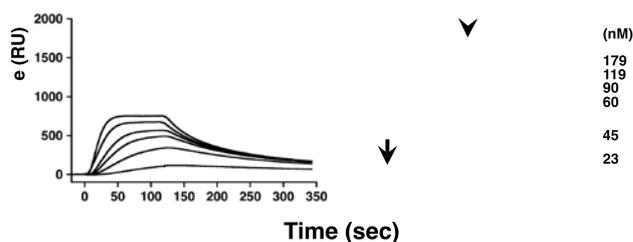


図2. プレイオトロフィンとCSとの結合

3) CSオリゴ糖の新規調製法とマイクロアレイの開発

これまでに、CS鎖中の機能ドメイン解明のために、オリゴ糖が単離されてきたが、酵素法や酸・アルカリ処理が広く用いられてきた。本研究では、非酵素的にかつ酸・アルカリを使用せずにCSをオリゴ糖に低分子化する新技術を開発した。CS多糖鎖を高温高压の亜臨界水で処理することにより、大量調製を可能にし、さらに安価で精製ステップを減らすことに成功した(Yamada *et al.*, **Carbohydrate Res.**, 371, 16, 2013)。

様々な動物種由来のCS鎖と結合する機能性タンパク質を調べるため、CSをガラスの基盤に固相化し、CS鎖を含めたグリコサミノグリカン鎖のマイ

クロアレイを開発した(Takada *et al.*, **Analytical Biochemistry**, 435, 123, 2013)。

4) ペリニューロナルネットのCS-Eの役割

ペリニューロナルネットに存在しているCSが神経の可塑性に関与していると考えられている。本研究では、セマフォリン3AがCS-Eと結合することで、ペリニューロナルネットの構築、可塑性、突起伸長に寄与していることを見出した(Dick *et al.*, **J. Biol. Chem.**, 288, 27384, 2013)。

<研究の意義・展望>

本研究では、CSの機能ドメインを単離する新規オリゴ糖の調製法とマイクロアレイ法を開発し、機能性タンパク質が認識する糖鎖配列(硫酸化修飾構造を含む)の同定が加速すると期待される。

さらに、CS-Dから単離した新規六糖は、脳における神経の突起伸長活性に作用しているか否かについて調べるために有用である。

また、ペリニューロナルネットにおけるCS-Eがセマフォリン3Aと協調して、神経の突起伸長および可塑性に関与していることが明らかとなり、これらの生理機能の一端が解明できたと考えられる。

本研究の成果の一部を **Curr. Opin. Struct. Biol.**および **J. Biol. Chem.**の総説にまとめ、神経系における糖鎖、特にCSの機能の解明に貢献できたと考える。

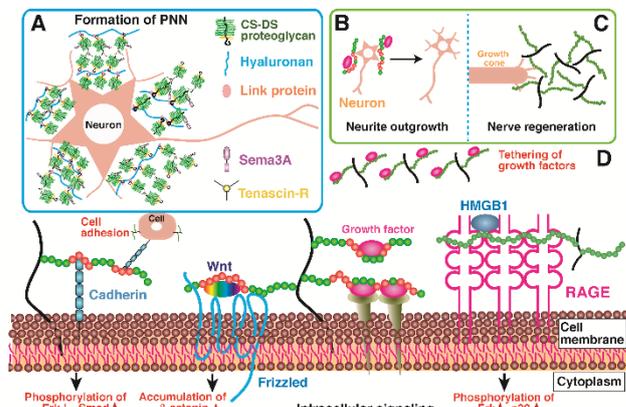


図3. 神経系におけるCSの機能と結合する機能性タンパク質

<主な研究発表>

- 1) Mizumoto S, Yamada S, Sugahara K. (2015) Molecular interactions between chondroitin-dermatan sulfate and growth factors/receptors/matrix proteins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 34, 35-42.
- 2) Purushothaman, A., Sugahara, K., Faissner, A. (2012) Chondroitin sulfate wobble motifs modulate the maintenance and differentiation of neural stem cells and their progeny. **J. Biol. Chem.**, 287, 2935-2942.
- 3) Mizumoto, S., Murakoshi, S., Kalayanamitra, K., Deepa, S. S., Fukui, S., Kongtawelert, P., Yamada, S., Sugahara, K. (2013) Highly sulfated hexasaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate of shark fin cartilage: Insights into the sugar sequences with bioactivities. **Glycobiology**, 23, 155-168.
- 4) Mizumoto, S., Fongmoon, D., and Sugahara, K. (2013) Interaction of chondroitin sulfate and dermatan sulfate from various biological sources with heparin-binding growth factors and cytokines. **Glycoconjugate J.**, 30, 619-632.
- 5) Yamada, S., Matsushima, K., Ura, H., Miyamoto, N., Sugahara, K. (2013) Mass preparation of oligosaccharides by hydrolysis of chondroitin sulfate polysaccharides with subcritical water microreaction system. **Carbohydrate Res.**, 371, 16-21.
- 6) Dick, G., Tan, C.L., Alves, J.N., Ehlert, E.M., Miller, G.M., Hsieh-Wilson, L.C., Sugahara, K., Oosterhof, A., van Kuppevelt, T.H., Verhaagen, J., Fawcett, J.W., Kwok, J.C. (2013) Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. **J. Biol. Chem.**, 288, 27384-27395.

研究課題名：ジストログリカンに見出されたユニークな機能ドメインの作動原理と神経生物学的な役割

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110508

研究代表者：金川 基（神戸大学大学院医学研究科 講師）

研究課題名：脳形成・神経機能に関わる新しい機能ドメイン“ポストリン酸糖鎖”の確立

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110712

研究代表者：金川 基（神戸大学大学院医学研究科 講師）

<研究の目的>

脳の形成に重要な役割を担う糖タンパク質のジストログリカンには、“ポストリン酸糖鎖”と呼ばれるユニークな生理活性をもつ糖鎖が修飾されている。ポストリン酸糖鎖は、基底膜成分やシナプス分子といったリガンドと結合するために必要だが、ポストリン酸糖鎖の不全が、脳奇形（Ⅱ型滑脳症）や精神発達遅滞など、中枢神経障害の原因になることが明らかになってきた（ジストログリカン異常症）。ポストリン酸糖鎖が、新しい機能ドメインとして、神経系で重要な役割を担っていることは明白であるものの、その構造・修飾機序・生理機能について、不明な点は多く残されている。そこで本研究では、ポストリン酸糖鎖の構造と修飾機序の全容を明らかにし、また、ポストリン酸糖鎖不全の疾患モデルを用いて、ポストリン酸糖鎖不全症における中枢神経病態を理解することを目的とする。

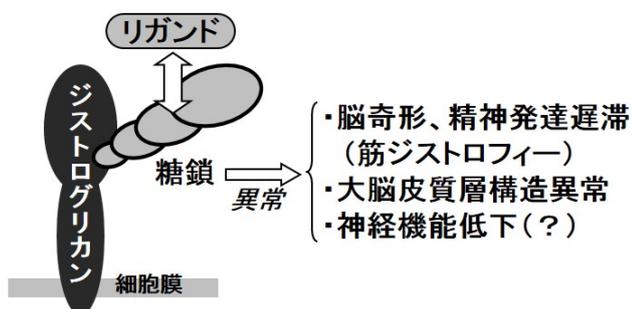


図1 ジストログリカン糖鎖の神経生物学的な重要性

ジストログリカンの糖鎖はリガンドと結合する生理活性をもつ。糖鎖の異常は様々な中枢神経障害の原因となるが、生理活性に重要な機能ドメインは全く明らかにされていなかった。

<研究の成果>

ジストログリカン糖鎖構造の解明が困難を極めてきた理由に、均一な機能性糖鎖の獲得が困難だったこと、未知の糖鎖ユニットが存在している可能性があった。糖鎖解析用の組換え体と培養細胞条件を工夫し、得られたジストログリカン糖鎖を質量分析、ガスクロマトグラフィーなどを駆使することで、糖鎖の中にリビトールリン酸が二つ連なった形で存在することを見出した（リビトールリン酸タンDEM構造）。リビトールリン酸は一部のバクテリアや植物で存在が確認されているだけで、哺乳類で糖鎖ユニットとして機能していることは知られていなかった。バクテリアにおいてリビトールリン酸は、CDP-リビトールをドナー基質にして、糖鎖の中に組み込まれる。ジストログリカン異常症遺伝子の *ISPD* は、バクテリアの CDP-リビトール合成酵素と類似性を示し、実際に CDP-リビトール合成酵素活性を認めた。また、福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子フクチンと肢帯型筋ジストロフィー2I の原因遺伝子 *FKRP* が、CDP-リビトールをドナー基質にして、リビトールリン酸を順に組み込む転移酵素であることも明らかになった。更に、*ISPD*、フクチン、*FKRP* の変異患者モデル細胞を樹立し、リビトールリン酸タンDEM構造の形成不全が発症原因であることを突き止めた。*ISPD* 欠損細胞においては、CDP-リビトールの投与によって糖鎖異常を解消できることが明らかになった。

また、リビトールリン酸不全症のモデルとして神経系選択的なフクチン欠損マウスを作出し、リビトールリン酸タンDEM構造の形成不全によりジストログリカン機能障害が発生し、グリア境界膜/基底

膜の異常を導くことが明らかになった。また、その異常の程度は発生過程における時空間的な機能糖鎖の量に依存することも示された。

<研究の意義・展望>

本研究により、リビトールリン酸のタンデム構造が、シナプス・基底膜分子結合能の獲得に必要な機能ドメインであり、脳形成や神経機能の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、国際的にも注目されていたジストログリカン糖鎖の構造・修飾機序の全容が遂に解明され、糖鎖生物学の教科書を書き換えるインパクトを残した。更に、ジストログリカン異常症の発症メカニズムが解明されたことで、今後、治療薬としての CDP-リビトールの開発に拍車がかかると期待される。

<主な研究発表>

1. Motoi Kanagawa, Kazuhiro Kobayashi, Michiko Tajiri, Hiroshi Manya, Atushi Kuga, Yoshiaki Yamaguchi, Keiko Akasaka-Manyu, Jun-ichi Furukawa, Mamoru Mizuno, Hiroko Kawakami, Yasuro Shinohara, *Yoshinao Wada, *Tamao Endo, *Tatsushi Toda. (2016) Identification of a

2. Naoyuki Kuwabara, Hiroshi Manya, Takeyuki Yamada, Hiroaki Tateno, Motoi Kanagawa, Kazuhiro Kobayashi, Keiko Akasaka-Manyu, Yuriko Hirose, Mamoru Mizuno, Mitsunori Ikeguchi, Tatsushi Toda, Jun Hirabayashi, Toshiya Senda, *Tamao Endo, *Ryuichi Kato (2016) Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113, 9280-9285.
3. Hiroshi Manya, Yoshiaki Yamaguchi, Motoi Kanagawa, Kazuhiro Kobayashi, Michiko Tajiri, Keiko Akasaka-Manyu, Hiroko Kawakami, Mamoru Mizuno, Yoshinao Wada, Tatsushi Toda, *Tamao Endo (2016) The muscular dystrophy gene *TMEM5* encodes a ribitol β 1-4 Xylosyltransferase required for the functional glycosylation of dystroglycan. *J. Biol. Chem.* 291, 24618-24627.
4. Yoshihisa Ohtsuka, Motoi Kanagawa, Chih-Chieh Yu, Chiyomi Ito, Tomoko Chiyo, Kazuhiro Kobayashi, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda, *Tatsushi Toda (2015) Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression. *Sci. Rep.* 5, 8316.
5. Motoi Kanagawa, Chih-Chieh Yu, Chiyomi Ito, So-ichiro Fukada, Masako Hozoji-Inada, Tomoko Chiyo, Atsushi Kuga, Megumi Matsuo, Kanoko Sato, Masahiko Yamaguchi, Takahito Ito, Yoshihisa Ohtsuka, Yuki Katanosaka, Yuko Miyagoe-Suzuki, Keiji Naruse, Kazuhiro Kobayashi, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda, *Tatsushi Toda (2013) Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3003-3015.

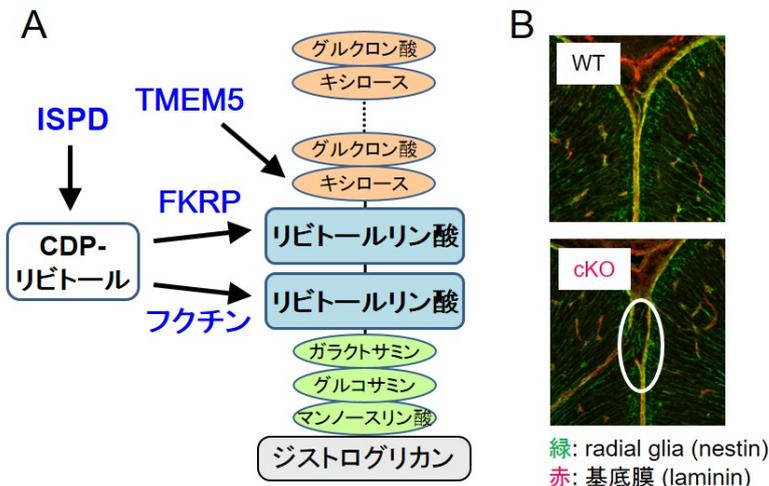


図2 ジストログリカン糖鎖の機能ドメイン

(A) ジストログリカン糖鎖から発見されたリビトールリン酸タンデム構造は、リガンド結合性ドメインであるグルクロン酸/キシロース繰り返し構造の生合成に不可欠なドメインである。ジストログリカン異常症原因タンパク質の ISPD は CDP-リビトール合成酵素、フクチンと FKRP はリビトールリン酸転移酵素、TMEM5 はキシロースをリビトールリン酸に転移する酵素であった。(B) リビトールリン酸欠損マウスでは、グリア境界膜/基底膜の構造異常が観察され、神経細胞の移動障害が発生していることから、ジストログリカン糖鎖が脳形成に重要な役割を担っていることが明らかになった。

研究課題名：神経系におけるキシロース含有N型糖鎖の高次機能およびその分子基盤の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110512

研究代表者：矢木 宏和（名古屋市立大学大学院薬学研究科 講師）

連携研究者：加藤 晃一（名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授）

連携研究者：佐藤 匡史（名古屋市立大学大学院薬学研究科 准教授）

研究課題名：ジストログリカン糖鎖を形成する酵素複合体の同定とその作動メカニズムの解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110716

研究代表者：矢木 宏和（名古屋市立大学大学院薬学研究科 講師）

連携研究者：加藤 晃一（名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授）

連携研究者：佐藤 匡史（名古屋市立大学大学院薬学研究科 准教授）

<研究の目的>

これまで専ら植物のみに発現しているとして考えられていたキシロース含有N型糖鎖がカタユウレイボヤの神経複合体に特異的な発現を見出したことを契機として、研究当初は哺乳動物の脳神経系に本糖鎖が高次機能を担っているという仮定のもと機能発現解析に取り組んだ。2012年にキシロース残基の転移を担う酵素の候補分子の1つとして見出していたAGO61が筋ジストロフィーの原因遺伝子産物であることが報告された。そこで本研究では、AGO61の遺伝子欠損マウスを利用した機能解析を行うとともに、AGO61により形成されるラミニン結合性の全体構造の同定および本糖鎖の形成機構の分子基盤の解明を目指した。

<研究の成果>

AGO61の機能解析

AGO61の遺伝子欠損マウスの解析により、本酵素が α -dystroglycan (α DG)上のラミニン結合性を示す糖鎖の形成に関与し、脳の層形成において重要な役割を担っていることを明らかにした(図1)。さらに、 α DG上の特定の位置に結合したマンノース残基へのN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 修飾をAGO61が担っていることを見出した。興味深いことに、そのGlcNAc修飾箇所は、これまでラミニン結合性糖鎖が発現していると報告されているスレオニン残基と一致していた。つまり、AGO61は α DG上のラミニン結合性を示す糖鎖が形成されるスタートとなる糖鎖構造を作る重要な酵素であることが明らかとなった。本研究を通じて、AGO61の欠

損に伴い α DG上のラミニン結合性糖鎖の形成不全が起こり、筋ジストロフィーが発症することを明らかにすることができた(図1)。以上の成果は、学術雑誌[主な研究発表の2および4]に掲載した(岡 昌吾博士との融合研究)。

ジストログリカン糖鎖の構造と本糖鎖を形成する酵素複合体の同定

筋ジストロフィーの原因遺伝子産物 (TMEM5、FKTN、FKRP、POMK、ISPD) のノックアウト細胞を樹立し、これらノックアウト細胞に α DGを発現させ、質量分析により、リコンビナントタンパク質上の糖鎖の構造解析を行った。その結果、本糖鎖の還元末端構造であるリン酸化3糖構造

(Man-(phosphate)-GlcNAc-GalNAc)の先に、リビトールリン酸が2つタンデムに結合し、その還元末端にさらにキシロースとグルクロン酸が結合した配列を見出すことができた(図2)。ISPD、FKTNおよびTMRM5のノックアウト細胞にはリン酸化3糖構造先にリビトールリン酸の付加がおきていないことから、第一番目のリビトールリン酸の付加に関与していることが考えられる。またFKRPのノックアウト細胞にはリビトールリン酸1残基の付加が認められたことから、FKRPは2つ目のリビトール付加を担っていることが予想される。こうした結果は、ごく最近報告された論文 (Kanagawa *et al.* Cell Reports 14, 2209–2223, 2016) の結果と一致するものであった。その一方で、プルダウンアッセイにより、FKTN、FKRP、TMEM5が3者複合体を形成していること、TMEM5がLARGEと相互作用しているこ

とを明らかとした。先行研究により、LARGE と B4GAT1 が相互作用していることが報告されていることから、ゴルジに存在する原因遺伝子産物は、大きな複合体を形成していることが考えられる。このような、ラミニン結合性糖鎖の生合成に関わる酵素群が複合体を形成し、複雑なラミニン結合性糖鎖の生合成過程を担っているものと予想される。

以上の成果は、学術雑誌[主な研究発表の 1]に掲載した。

<研究の意義・展望>

本研究を通じて、先天性の筋ジストロフィーの発症に関わる糖鎖の構造と一部の原因遺伝子産物の機能を明らかにすることができた。本研究の成果は、筋ジストロフィーの治療戦略の足がかりになることが期待される。

<主な研究発表>

1. H.Yagi, (他 4 名), *K.Kato (2016) Direct mapping of additional modifications on phosphorylated O-glycans of α -dystroglycan by mass spectrometry analysis in conjunction with knocking out of causative genes for dystroglycanopathy. *Mol. Cell Proteomics* 15, 3424-3434
2. N.Nakagawa, H.Yagi, K.Kato, (他 1 名), *S.Oka (2015) Ectopic clustering of Cajal-Retzius and subplate cells is an initial pathological feature in Pomgnt2-knockout mice, a model of dystroglycanopathy. *Sci. Rep.* 5, Article number: 11163.
3. M.Ogawa, (他 4 名), H.Yagi, K.Kato, K.Furukawa and *T.Okajima (2015) Impaired O-linked N-Acetylglucosamylation in the Endoplasmic Reticulum by Mutated EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase (Found in) Adams-Oliver Syndrome. *J. Biol. Chem.* 290(4), 2137-2149.
4. H.Yagi, (他 7 名), *S.Oka, and *K.Kato (2013) AGO61-dependent GlcNAc modification primes the formation of functional glycans on α -dystroglycan. *Scientific Reports*. 3: Article No.3288, doi: 10.1038/srep03288.
5. H.Yagi, (他 3 名), *K.Kato, (2012) Lewis X-carrying N-glycans regulate the proliferation of mouse embryonic neural stem cells via the Notch signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 24356-24364.

<図>

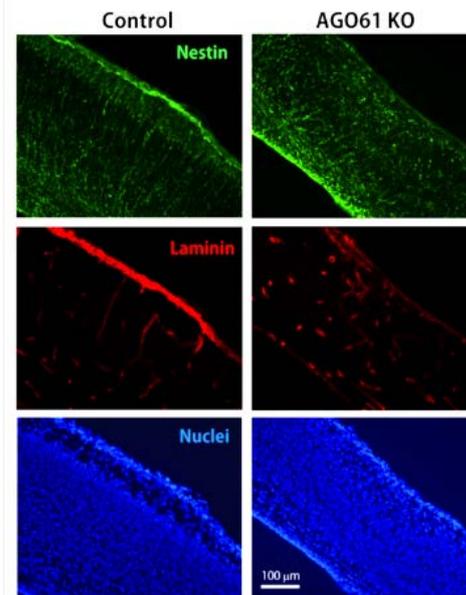


図 1：胎生 17.5 日目の野生型マウスおよび AGO61 遺伝子欠損マウスの脳の免疫染色。
(上段、緑) 放射状グリア線維、(中段、赤) ラミニンタンパク質、(下段、青) 核を示す。

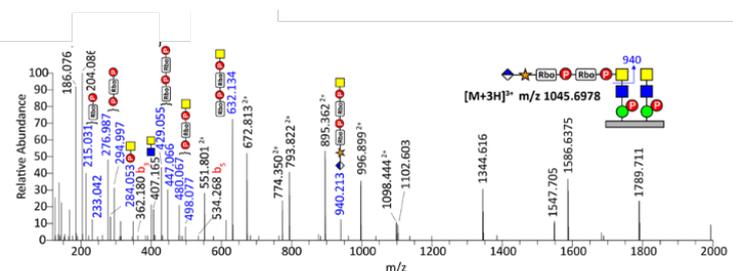


図 2：HEK293T 細胞で発現させたリコンビナント α -dystroglycan を対象とした LC-MS/MS 解析。リン酸化 3 糖構造 (Man-(phosphate)-GlcNAc-GalNAc) の先に、リビトールリン酸が 2 つタンデムに結合し、その還元末端にさらにキシロースとグルクロン酸が結合した糖ペプチドを検出することに成功した。

研究課題名：コアフコースの機能と神経疾患との関連性

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110513

研究代表者：顧 建国（東北医科薬科大学薬学部 教授）

連携研究者：岡 昌吾（京都大学医学部 教授）

<研究の目的>

糖タンパク質に付加された糖鎖は様々な生物活性を持つと考えられているが、特定の糖鎖構造との関係を直接的に示した研究は少ない。私達はN-結合型糖鎖の根元に α 1,6フコース構造（コアフコースと言う）を造る糖鎖遺伝子Fut8の欠損マウスの機能解析を行い、様々な機能に及ぼすことを明らかにした。本研究は、脳神経疾患に関連する細胞膜上の糖タンパク質に着目し、糖鎖の機能最小単位とされるコアフコースによるそれらの機能変化を解析し、統合失調症などの病態とコアフコースとの関連性を明らかにすると共に、コアフコースの脳神経組織での役割を解明することを目指す。

<研究の成果>

これまで、私達は、糖鎖遺伝子を用いて細胞の糖鎖を人為的に改変することで、糖鎖が単なる飾りではなく、さまざまな生物機能の発信源であることを明らかにしてきた。Fut8の最も高発現する脳神経における機能を欠損マウスで行動薬理的に検討した。その結果、作業記憶の障害、自発運動量の増加、易攻撃性の増加、社会的行動の障害などといった統合失調症の患者に見られる症状と一致する障害を見出し、統合失調症治療薬の有効性も確認した

(Fukuda T., JBC. 286: 18434, 2011)。一方、細胞レベルでは、コアフコースが神経細胞に発現するアクチビン受容体の複合体形成および細胞内のシグナル伝達に重要であることを解明した(1)。因に、アクチビン受容体にコアフコースの付加は受容体の複合体形成を負に制御するが、コアフコースを欠損するとその複合体が過形成となり、下流のシグナルも異常になる。また、私達は、統合失調症の病態に関わっているドパミン受容体・セロトニン受容体と種々のトランスポーター、NMDA受容体およびAMPA受容体がFut8のターゲット分子であることを

見出し、さらに欠損マウスの海馬ニューロンにおけるAMPA受容体複合体の過形成および細胞内リン酸化CaMK-IIの異常亢進などによって脳可塑性の指標の一つであるLTP（長期増強）の減弱を来すことを明らかにした(2)。

<研究の意義・展望>

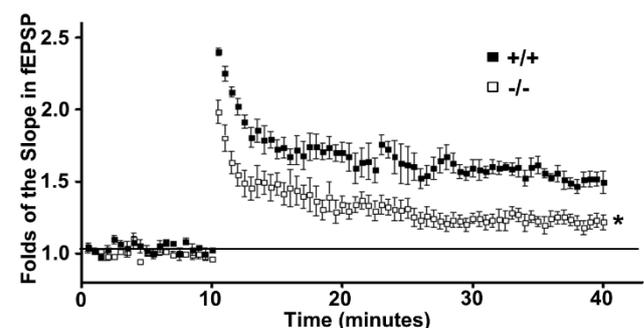
興味深いことに、ごく最近米国の研究グループは、統合失調症の患者の脳組織においてコアフコース発現が低下と発表した(Mueller TM., Schizophr Res. 16: 30468, 2016)。今後、コアフコースの機能変化の解析を通じて、神経疾患の分子メカニズムの理解・解明、さらに当該疾患の新たな創薬標的分子の同定に繋がることが期待される。

<主な研究発表>

- (1) Gu, W., Fukuda, T., Isaji, T., Hashimoto, H., Wang, Y and Gu, J*. α 1,6-Fucosylation regulates neurite formation via the activin/phospho-Smad2 pathway in PC12 cells: the implicated dual effects of Fut8 for TGF- β /activin-mediated signaling. *FASEB J.*, 27:3947-3958, 2013
- (2) Gu, W., Fukuda, T., Isaji, T., Hang, Q., Lee, H., Sakai, S., Morise, J., Mitoma, J., Higashi, H., Taniguchi, N., Yawo, H., Oka, S* and Gu, J*. Loss of α 1,6-fucosyltransferase decreased hippocampal long-term potentiation: implications for core fucosylation in the regulation of AMPA receptor heteromerization and cellular signaling. *J. Biol. Chem.* 290, 17566-75, 2015

<図>

Fut8欠損マウスの海馬ニューロンにおけるLTPの減弱



研究課題名：シアリダーゼによる神経機能の制御

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110514

研究代表者：宮城 妙子（東北医科薬科大学薬学部 教授）

<研究の目的>

酸性糖であるシアル酸は、糖蛋白や糖脂質の糖鎖末端に位置し、多くの重要な生理機能に関わっている。とくに、神経組織の主要な構成成分であるガングリオシドのシアル酸や神経細胞接着因子 NCAM のポリシアル酸は、神経機能に深く関与していることが知られている。しかしながら、これまで、生体内におけるこれらシアル酸の役割解明には、ほとんど細菌やウイルス由来のシアリダーゼが解析ツールとして使われ、生理的シアル酸の役割やその調節機構の実体についてはいまだ不明の点が多い。本課題では、シアル酸の脱離によって、シアル酸量調節の重要な一端を担っている動物細胞由来の内因性シアリダーゼに着目し、その神経機能の解析を目的とした。

<研究の成果>

現在、動物細胞では、4種（NEU1-NEU4）のシアリダーゼが同定・解析されているが、申請者らは、早くからその分子多様性を提唱し、世界に先駆けて2種の遺伝子の単離に成功し、この研究分野を推進してきた。ガングリオシドを優先的に水解する NEU3 と NEU4 が主に神経細胞分化を制御していることがわかってきたので、この2種のシアリダーゼを中心に、細胞や個体レベルにおいて、神経機能の制御機構や異常を調べた。

1. 動物細胞における NCAM ポリシアル酸の水解は、シアリダーゼ NEU4 が関与する。

これまで、NCAM ポリシアル酸の分解酵素としてはバクテリオファージ由来のエンドシアリダーゼが知られていたが、動物細胞由来の酵素は、全く同定されていなかった。本課題によって、NEU4 が *in vitro* assay 系では基質としてのポリシアル酸を水解させ、マウス視床下部プライマリーニューロンを用いて、NEU4 を高発現すると、NCAM ポリシアル酸の分解に伴い、神経軸索の伸長が抑制された。共焦点顕微鏡観察により NEU4 が growth cone と共在した(1) (図1)。

2. NEU3 は Wnt シグナル経路を活性化し、ホスファチジン酸 (PA) によって活性化を受ける。

NEU3 は Wnt の共レセプターである LRP6 のリン酸化を上昇させ、Wnt シグナルを活性化させており、ノックダウンによって、その効力を失なった(2)。一方、EGF や血清刺激で、PA により活性化された NEU3 は細胞膜への移行を促進させ、PLD1

と共に、PLD1 の阻害によりこの効果は消失した(3)。Wnt/ β -カテニン経路の異常な活性化はがん発症の原因とされ、NEU3 の亢進は、事実、発がん過程に関わっていることも検証されたが、一方で、神経細胞の軸索や樹状突起の伸展制御に与っていることが予想される。しかも、PA を産生する PLD1 は Wnt 経路によって転写活性化されることがわかっているため、この NEU3 による positive feedback 機構ががん化だけではなく、神経機能の発現に深く関わっていることが推察された(図2)。

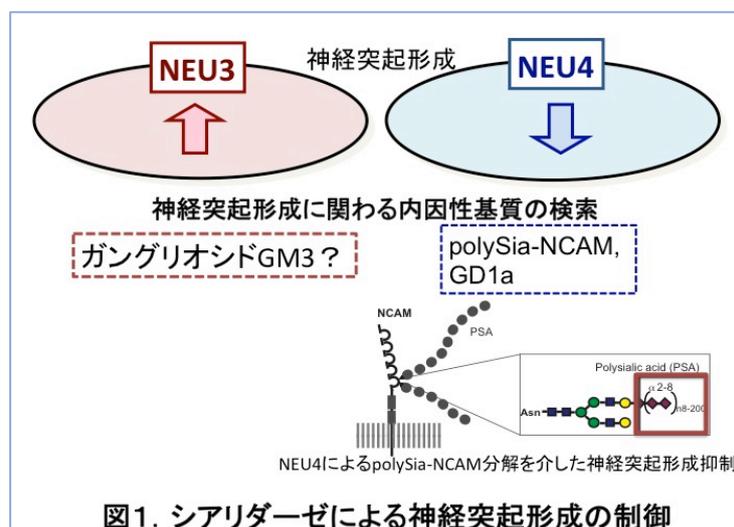


図1. シアリダーゼによる神経突起形成の制御

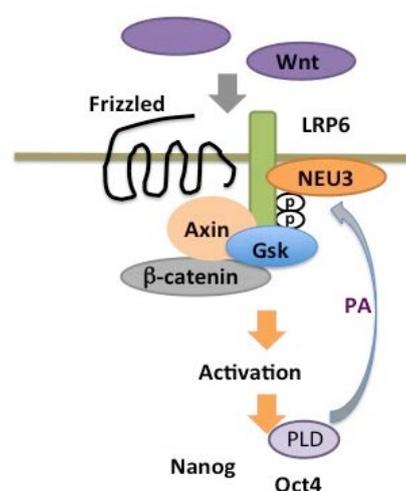


図2. NEU3によるWntおよびPAシグナリングのクロストーク

3. NEU3 と NEU4 は脳神経組織のガングリオシド構成成分を変化させることによって神経分化や機能を制御している。

各々のノックアウトマウスは脳のガングリオシド代謝や機能に著明な変化はもたらさなかったが、ダブルノックアウト Neu3^{-/-};Neu4^{-/-}では、ガングリオシドに対する活性が検出限界以下で、両酵素が主に脳のガングリオシドの脱シアリル化に関与していることを示した。特に、Neu4 は GD1a から GM 1 の産生に、Neu3 は GM 3 から Lac-cer の産生に関与していることが推察された (FASEB J in revision)。

4. グリオーマにおける NEU3 によるカルパイン活性と浸潤能の制御

脳腫瘍のなかでも最も浸潤性が高く、予後不良なグリオーマについて、NEU3 の発現とその細胞接着・運動能の制御機構について解析した。グリオーマ臨床検体では NEU3 の発現が低下傾向を示した。グリオーマ細胞を用いて、NEU3 の浸潤能へ与える影響を調べると、NEU3 の過剰発現により浸潤能は抑制され、発現抑制により上昇した。NEU3 はコラーゲン IV、フィブロネクチンへの接着能及びインテグリンβ1 の発現の上昇をもたらし、フィブロネクチン上での接着斑の形成亢進を認めたが、接着斑会合分子の FAK と Talin の分解が減少し、それらを基質とするカルパインの活性が低下していた。グリオーマでは、NEU3 発現低下に伴うカルパイン活性の上昇と接着斑会合分子の代謝亢進が、細胞運動・浸潤能の亢進をもたらしている可能性が示唆された (in submission) (図 3)。

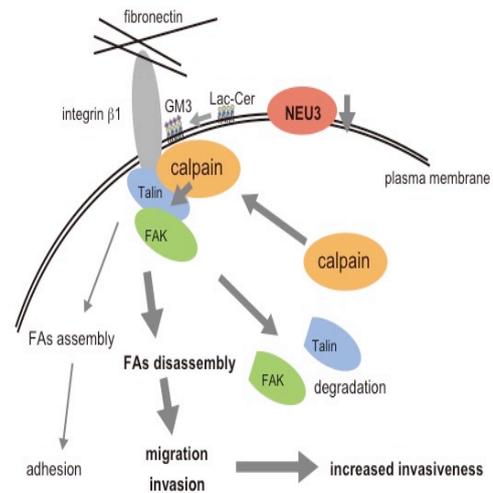


図3. NEU3によるグリオーマ細胞の浸潤能亢進の分子機構

<研究の意義・展望>

本課題の成果によって、NEU3 や NEU4 はガングリオシドの分解を通じて、in vivo, in vitro の両面から、神経機能や分化に深く関わっていることが検証された。主要な内因性基質として、NEU3 は GM 3、NEU4 は GD 1 a やポリシアル酸が挙げられた。また、NEU3 は Wnt シグナルやホスファチジン酸等のシグナルを制御することによってがんの発症だけでなく、神経機能を制御している可能性が推察され、今後はこの観点から、特に NEU3 の神経機能の制御機構について解析を進める必要がある。

<主な研究発表>

- (1) Takahashi K., Mitoma J., Hosono M., Shiozaki K., Sato, C. Yamaguchi K., Kitajima K., Higashi H., Nitta K., Shima H, Miyagi T.: Sialidase NEU4 Hydrolyzes Polysialic Acids of Neural Cell Adhesion Molecules and Negatively Regulates Neurite Formation by Hippocampal Neurons. *J Biol Chem.*287, 14816-14826, 2012
- (2) Takahashi K., Hosono M., Sato I., Hata, K., Wada T., Yamaguchi K., Nitta K., Shima H., and Miyagi T. Sialidase NEU3 defines neoplastic potential on colon

- cancer cells as a key modulator of gangliosides by regulating Wnt signaling. *Int J Cancer.* 137:1560-73. 2015
- (3) Shiozaki K., Takahashi K., Hosono M., Yamaguchi K., Hata K., Shiozaki M., Bassi R., Prinetti A., Sonnino S., Nitta K., and Miyagi T. Phosphatidic acid-mediated activation and translocation to the cell surface of sialidase NEU3 enhances cell migration. *FASEB J.* 29:2099-111 2015

研究課題名：神経近位部特異的に局在する糖鎖の構造と軸索区画化における機能の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110515

研究代表者：西原祥子（創価大学理工学部 教授）

連携研究者：中嶋一行（創価大学工学部 教授）

連携研究者：不破尚志（創価大学工学部 研究員）

連携研究者：小松 明（帝京大学医療技術学部 教授）

連携研究者：秋元義弘（杏林大学医学部 准教授）

連携研究者：篠原康郎（北海道大学先端生命科学研究所（研究院）特任教授）

<研究の目的>

糖鎖は、細胞が司るあらゆる生命現象で機能している。その機能の発現には、糖鎖に結合するレクチン分子が重要で、細胞内では、レクチンが、細胞外へ輸送するタンパク質の品質管理や細胞内輸送に働いている。一方、モノクローナル抗体 BP102 はショウジョウバエの中樞神経を特異的に染色する。その抗原の構造は明らかにされていないが、BP102 抗原がショウジョウバエ神経細胞の初代培養で軸索の近位部に自立的に局在することが報告されていた。予備的な検討から、BP102 抗原が糖鎖を含むことが明らかになったため、本研究では、神経近位部特異的に局在する糖鎖とその軸索区画化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

<研究の成果>

(1) BP102 抗原の局在と軸索の微細構造の解析

初めに、我々は、BP102 抗原の生化学的解析と様々な糖転移酵素の変異体を用いた検索と解析により、BP102 抗原が特殊な構造を持つ糖鎖を含むことを明らかにした。

さらに、Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM) を用いて、細胞骨格と BP102 抗原の局在について検討を行った。BP102 抗原は、軸索の近位部と遠位部の境界付近の近位部側に密集しており、環状に配置していた(1)。また、ショウジョウバエの神経初代培養細胞では、2本の tubulin の束が軸索に沿って走行していることが明らかになった。さらに、これらの2本の tubulin の束が、BP102 抗原の染色が陽性から陰性に変化する軸索境界付近で交差することがわかった(2)。これ

らの事実は、BP102 抗原の軸索近位部への輸送に tubulin が関与していることを強く示唆していた。

加えて、F-actin の局在を詳細に解析したところ、F-actin は、上述の軸索内境界近位部側に密集していることも明らかになった(2)。神経細胞では、軸索の膜タンパク質は、細胞体で合成され、微小管をレールとして軸索内を移動し、成長円錐で F-actin に乗り換えて、細胞膜に輸送される。上述の境界特異的な微細構造の存在は、BP102 抗原が、軸索内境界、すなわち、軸索の途中で細胞膜に輸送される、新たな経路の存在を示唆していた。

(2) T 抗原の局在と軸索の微細構造の解析

T 抗原 (Gal β 1-3 GalNAc α 1-Ser/Thr) は、ヒトをはじめとする哺乳類とショウジョウバエに共通して認められるムチン型糖鎖構造であり、ショウジョウバエの神経系に強く発現している。ショウジョウバエ胚において、T 抗原が BP102 抗原と共局在することから、T 抗原も軸索近位部特異的に局在する可能性が考えられた。

PNA レクチンを用いてショウジョウバエ神経細胞の初代培養を染色したところ、T 抗原もまた、軸索

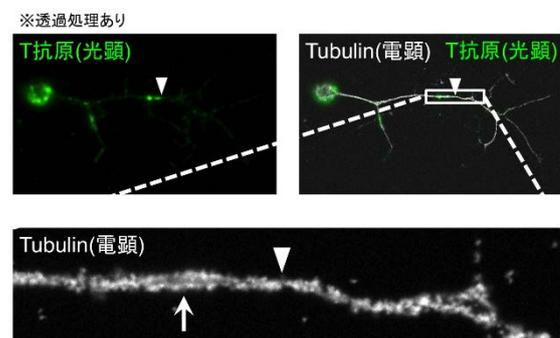


図1: 微小管の束は軸索に2本存在し、境界付近で交差

の近位部に局在していた(3)。さらに、ASEM による

解析から、T 抗原もまた、軸索の近位部と遠位部の境界付近の近位部側に密集しており、環状に配置していた(3)。また、T 抗原の染色が陽性から陰性に変化する軸索境界付近においても、2本の tubulin の束が、交差することがわかった(図1)(3)。これらの事実は、T 抗原もまた、BP102 抗原と類似の機構により、軸索近位部へ輸送されていることを示唆していた。

(3) Short stop (*Drosophila spectraplakine*) 変異体における BP102 抗原と T 抗原の局在の解析

BP102 抗原と T 抗原が、軸索内境界から細胞膜へ輸送される経路の分子機構を明らかにするために、両抗原の軸索近位部特異的な局在化に関与する分子の探索を行い、Short stop (*Drosophila spectraplakine*) を同定した(3)。Short stop のヌル変異体由来神経初代培養においては、両抗原の軸索近位部特異的な局在は、阻害され(図2)、また、変異体バックグラウンドで野生型 Short stop を発現させると救済された。この事実は、Short stop が両抗原の軸索近位部特異的な局在に関わることを示していた。

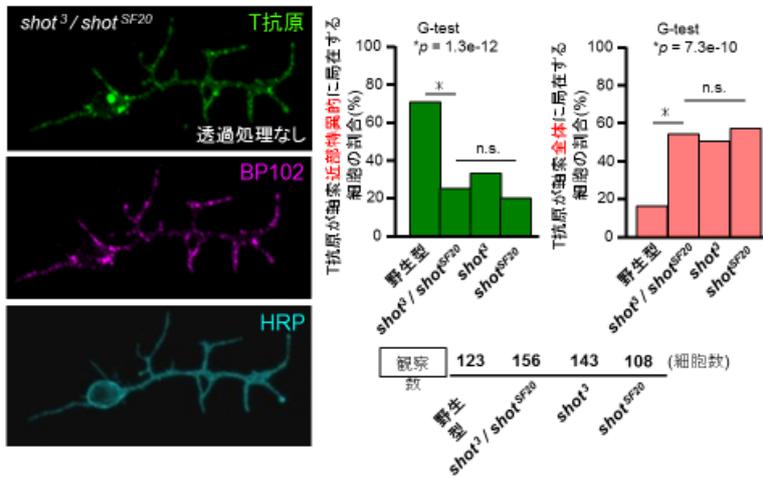


図2: shotヌル変異体神経での近位部特異的な局在の阻害

Short stop は、微小管に結合する領域と F-actin に結合する領域を持つ。ヌル変異体由来神経初代培養では、微小管を束ねる機能も失われるため、微小管の微細構造に異常が認められていた。(1)と(2)の微細構造解析から、微小管と F-actin が軸索内境界からの細胞膜への新たな輸送経路に関与していることが示唆されており、輸送小胞の微小管から F-actin への乗せ替えに、Short stop が働くと考え

られた。そこで、F-actin 結合領域のみを欠損した変異体から神経初代培養を行い、両抗原の局在を解析した。微小管の微細構造に異常は認められなかったが、両抗原の軸索近位部特異的な局在は、阻害され、Short stop の F-actin 結合領域が近位部特異的な輸送に必要であることがわかった。

<研究の意義・展望>

本研究により、「軸索近位部特異的に運ばれる輸送小胞が、細胞体から軸索内の微小管上を移動し、軸索内境界において、shot が架橋する微小管と F-actin を介して細胞膜に運ばれる」という新たな輸送モデルを提唱することができた(図3)。また、本研究で見出した「軸索における糖鎖抗原の近位部特異的な局在」は、糖鎖が担う新たな神経の機能に関わる可能性がある。さらに、これらの「軸索内輸送経路」と「輸送メカニズム」は、哺乳類にも保存されていると考えられ、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの軸索内輸送に異常が認められる疾患との関連も期待できる。

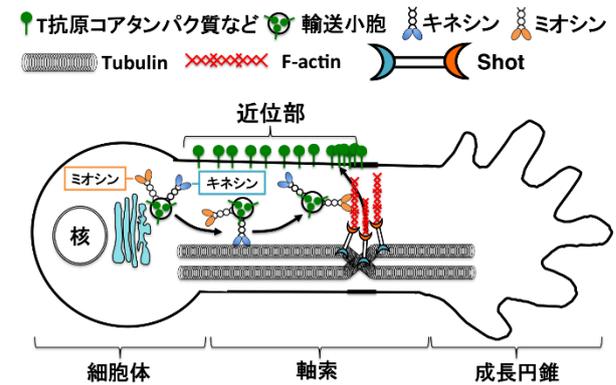


図3: 神経軸索近位部への特異的な輸送のモデル

<主な研究発表>

* corresponding author

- (1) Hirano K, Nishihara S*, Sato C* *et al.*: Electron microscopy of primary cell cultures in solution and correlative optical microscopy using ASEM. *Ultramicroscopy*, 143, 52-66 (2014).
- (2) Kinoshita T, Nishihara S*, Sato C* *et al.* (2014) Immuno-electron microscopy of primary cell cultures from genetically modified animals in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Microsc Microanal.* 20, 470-484
- (3) Kinoshita T, Sato C, Fuwa TJ, Nishihara S* (2017) Short stop mediates axonal compartmentalization of mucintype core 1 glycans. *Scientific Reports*, 7, 41455.

研究課題名：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

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110516

研究代表者：中山喜明（京都産業大学総合生命科学部 助教）

連携研究者：黒坂光（京都産業大学総合生命科学部 教授）

連携研究者：中村直介（京都産業大学総合生命科学部 講師）

連携研究者：伊藤信行（京都大学大学院薬学研究科 教授）

連携研究者：若林真樹（京都大学大学院薬学研究科 助教）

<研究の目的>

タンパク質に結合する代表的なO-グリコシド型糖鎖として、ムチン型糖鎖が挙げられる。このムチン型糖鎖の合成開始反応を触媒する

Wbscr17/ppGalNAc-T17は高次脳機能障害を示す先天性遺伝子疾患ウィリアムズ症候群の原因候補遺伝子の一つであり、海馬や視床、小脳の神経細胞に強く発現する。ゼブラフィッシュ胚や培養細胞を用いた実験系よりWbscr17が神経細胞においてエンドサイトーシス経路を介して膜タンパク質や細胞膜の輸送を調節することにより神経回路形成において重要な役割を担っている可能性が示された。本研究ではこの可能性を検証し、複雑な細胞外因子との相互作用により調節を受ける神経回路形成過程におけるムチン型糖鎖の役割の総合的な理解を目指す。

<研究の成果>

(1) 細胞膜輸送におけるムチン型糖鎖合成酵素Wbscr17の機能解析

腫瘍細胞におけるWbscr17について、細胞生物学的手法を用いて機能解析を行い、(i)細胞内栄養状態の指標であるGlcNAcの濃度依存的にWbscr17の発現量が増加すること、(ii)Wbscr17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。(iii)Wbscr17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を見出した。これらの結果はWbscr17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(図1)。

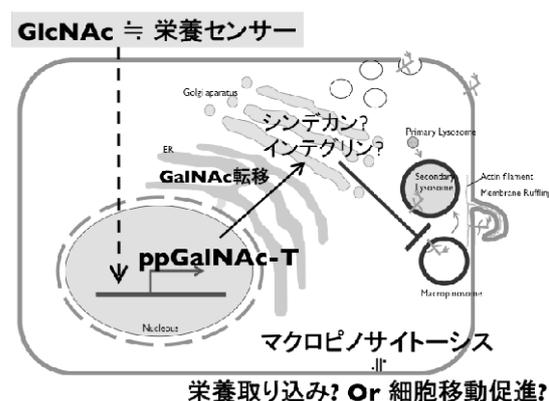


図1. 腫瘍細胞におけるマクロピノサイトーシス機構の仮説図

(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を見いだした。我々はパラログも含めて全てのアイソザイムcDNAのクローニングを完了し、ゼブラフィッシュの初期胚における発現を解析した。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。

(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。その結果、従

来の方法と比較して凡そ半分の期間で神経突起が誘導され、より活発な突起伸張が観察された。分化誘導後 10 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) 新規 O-グリコシド型糖鎖の機能解析

公募研究・岡島先生と共に、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。中山班ではこの糖鎖構造の合成に関わる糖転移酵素 EOGT2 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。

<研究の意義・展望>

本研究では、培養細胞やゼブラフィッシュのモデル実験系を用いて、複雑な細胞外因子との相互作用により調節を受ける神経回路形成過程において、新たにムチン型糖鎖が膜制御を通じた神経突起伸長や神経伝達物質の輸送に関与している可能性を見出した。さらに Wbscr17 遺伝子欠損マウスを用いた解析を通じて、高次脳機能におけるムチン型糖鎖に

よる新たな調節機構が明らかになれば、神経発生領域における基礎的情報を提供するのみならず、ウィリアムズ症候群の症状に対する理解が深まり新たな治療法の開発につながる可能性を有している。

<主な研究発表>

1. Yoshiaki Nakayama, Naosuke Nakamura, Sayoko Oki, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama, Ayumi Miyake, Nobuyuki Itoh and *Akira Kurosaka (2012) A putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase/Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 (WBSR17) regulates lamellipodium formation and macropinocytosis. *J. Biol. Chem.* 287, 32222-32235.
2. Yoshiaki Nakayama, Naosuke Nakamura, Tamiko Kawai, Eiichi Kaneda, Yui Takahashi, Ayumi Miyake, Nobuyuki Itoh, and *Akira Kurosaka (2014) Identification and expression analysis of zebrafish polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase Y-subfamily genes during embryonic development. *Gene Expr. Patterns.* 16(1), 1-7.
3. Yoshiaki Nakayama, Ayumi Wada, Rei Inoue, Kazuya Terasawa, Ikuo Kimura, Naosuke Nakamura, and *Akira Kurosaka (2014) A rapid and efficient method for neuronal induction of the P19 embryonic carcinoma cell line. *J Neurosci Methods.* 227, 100-106.
4. Paitoon Srimontri, Shogo Endo, Toshiro Sakamoto, Yoshiaki Nakayama, Akira Kurosaka, Shigeyoshi Itohara, Yoshio Hirabayashi and *Keiko Kato (2014) Sialyltransferase ST3Gal IV deletion protects against temporal lobe epilepsy. *J. Neurochem.* 131(5),675-687
5. Mitsutaka Ogawa, Naosuke Nakamura, Yoshiaki Nakayama, Akira Kurosaka, Hiroshi Many, Motoi Kanagawa, Endo Tamao, Koichi Furukawa, and *Tetsuya Okajima (2013) GTDC2 modifies O-mannosylated α -dystroglycan in the endoplasmic reticulum to generate N-acetyl-glucosamine epitopes reactive with CTD110.6 antibody. *Biochem Biophys Res Commun.* 440, 88-93.

研究課題名：脳神経系に特徴的に発現するケラタン硫酸の構造と機能

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110517

研究代表者：川寄敏祐（立命館大学・総合科学技術研究機構・上席研究員）

連携研究者：豊田英尚（立命館大学・薬学部・教授）

研究協力者：川寄伸子（立命館大学・総合科学技術研究機構・客員研究員）

<研究の目的>

脳神経系に特徴的に発現することが見いだされたケラタン硫酸の構造と機能を明らかにすることを目的とする。ケラタン硫酸はグリコサミノグリカンに分類されるが、その構造は一般的なグリコサミノグリカンとは大きく異なる。内部構造はウロン酸を含まず、ガラクトースと*N*-アセチルグルコサミンの二糖の繰り返しを基本骨格とする比較的単純な硫酸化ポリラクタサミンであり、*N*-グリコシド結合あるいは

O-グリコシド結合でコアタンパク質に結合している(図1)。

このような構造多様性のため、これまで脳神経系のケラタン硫酸に関する詳細な研究は進んでいない。一方、代表者らは、最近、新規なヒトiPS/ES細胞マーカー抗体の作成に成功している。その内の一つ、R-10Gがケラタン硫酸を認識する抗体であり、iPS/ES細胞以外では脳神経系に広く発現していることを見出している。本研究では、R-10G抗体を新たなプローブとして、豊田英尚教授（連携研究者）の開発したケラタン硫酸高感度分析法を活用することにより、脳神経系に特徴的に発現するケラタン硫酸の構造と機能の解析を進めた。

<研究の成果>

1) ラット R-10G のコアタンパク質の同定。
ラット脳膜画分抽出物を R-10G アフィニティークラムにかけ、R-10G 結合タンパク質を精製した。

次に SDS-PAGE により分画したところ 250kDa を超える高分子領域に 1 本の R-10G 陽性のバンドがみられ、トリプシン分解後の LC/MS/MS 分析により tyrosine-protein phosphatase zeta (PTP-zeta) と同定された（川崎ナナグループとの共同研究）。iPS 細胞ではコアタンパク質はポドカリキシンであることが知られている。同じ特徴的な構造をもつ糖鎖が組織により異なるタンパク質に発現するのは興味深い。

2) R-10G 抗体の最小エピトープの同定。

下記の 7 種類のケラタン硫酸類似化合物を化学合成し、R-10G 抗体への結合を ELISA で解析した。その結果、R-10G の最小エピトープは KS2 であることが判明した。なお、他のケラタン硫酸関連抗体では、TRA-1-60 が KS4 に最も強く、次いで KS5 に結合した。5D4 抗体は KS3 のみに強く結合した。[KS1:

Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1 (type 2-type 2 (0S)); KS2: Gal β 1-4GlcNAc (6S) β 1-3Gal β 1-4GlcNAc (6S) β 1 (type 2-type 2 (2S)); KS3: Gal β (6S) 1-4GlcNAc (6S) β 1-3Gal (6S) β 1-4GlcNAc (6S) β 1 (type 2-type 2 (4S)); KS4: Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1 (type 1-type 2 (0S)); KS5: Gal β 1-3GlcNAc (6S) β 1-3Gal β 1-4GlcNAc (6S) β 1 (type 1-type 2 (2S)); KS6: Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1 (type 1-type 1 (0S)); KS7: Gal β 1-3GlcNAc (6S) β 1-3Gal β 1-3GlcNAc (6S) β 1 (type 1-type 1 (2S))].

<研究の意義・展望>

グリコサミノグリカン研究に新たな抗体プローブを導入した意義は大きい。

<主な研究発表>次節に入力したので省略。

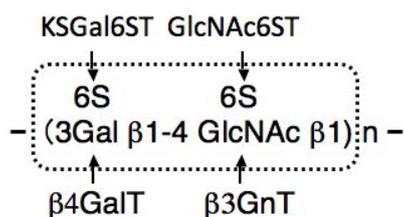


図 1

研究課題名：新規グルコース化脂質分子による神経ガイダンス制御

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110519

研究代表者：平林 義雄（理化学研究所・神経膜機能研究チーム 研究員）

連携研究者名：上口 裕之（理化学研究所・脳科学総合研究センター シニアチームリーダー）

<研究の目的>

私達は、神経発生・発達過程のラジアルグリア細胞膜表面の脂質ラフトに新しい機能性糖脂質であるホスファチジルグルコシド(PtdGlc)が存在する。このグリセロ型糖脂質の代謝産物であるリゾ体PtdGlcは、神経軸索成長円錐にたいし強力な反発活性を有している。又、この糖脂質は神経細胞損傷修復時のアストログリアで発現が急上昇することから、修復に阻害的に作用していることが予想されていた。

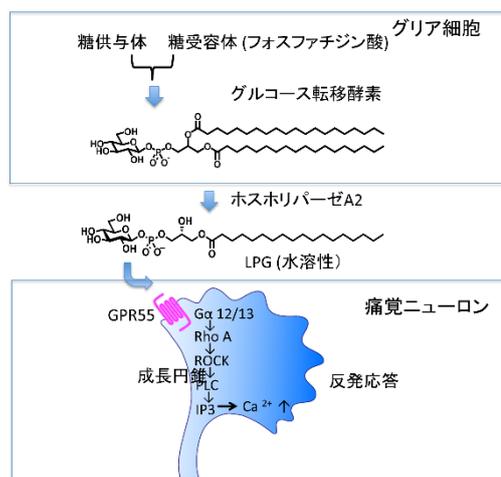
本研究課題では、新奇糖脂質 PtdGlc の合成酵素の酵素学的性質、GPCR 受容体の細胞内シグナリング、そしてそれらのノックアウトマウスを用いた *in vivo* 解析をおこなうことにより、最終的に新たな神経細胞修復の手法の基礎的基盤技術の確立を目指す。

<研究の成果>

PtdGlc 生合成機構と制御：PtdGlc は、申請者らにより胎児の中枢神経組織より単離された新奇な糖脂質である (Nagatsuka *et al.*, *Biochemistry*, 2006)。さらに、PtdGlc の代謝産物であるリゾ体糖脂質 (LysoPtdGlc) は神経回路の構築を制御する強力な生理活性脂質であることを発見するとともに、リゾ体糖脂質に特異的に応答する G タンパク質共役受容体 (GPCR) が GPR55 であると決定した (Adam, Nagatsuka *et al.*, *Science* 2015) (図1)。PtdGlc 生合成の機構を理解し、さらにそこに関わる遺伝子を同定し、その遺伝子を使って機能を解析することが糖鎖生物学の立場からは最も重要な研究課題である。本申請課題において、脂質に対する糖修飾の機構に関し様々な可能性を検討した。その結果、UDP-Glc から糖が供与されること、sn-2 位に C20:0 を含む PA が必須である、活性は小胞体に局在している、等が明らかとなった。この酵素活性を測定す

るためピレニル基を sn-1 の脂肪酸部分に導入した合成基質を用いる方法を開発し、酵素の諸性質を明らかにすることが可能となった (図2)。

図1. リゾ体ホスファチジルグルコシド・GPR55 を介したグリア・ニューロン相互作用



オーファン受容体を含む 110 種以上の GPCR を解析したところ、リゾ体 PtdGlc と反応する受容体は GPR55 のみであった。ノックアウトマウスから分離した TrkA 陽性の DRG ニューロンはリゾ体に対する反応性を失っている。軸索の反発応答には GPR55 とカップルする G-蛋白質 α 12/13 を通して Rho A、ROCK 経路を活性化し、アクチンによる細胞運動を促す (図1)。

CIRES (Correlation Index-based responsible enzyme gene screening) 及び DNA-マイクロアレイ解析により UGGT が責任遺伝子であることを決定した。両遺伝子共に、グルコシルセラミド合成酵素遺伝子 UGCG と共通の配列 (GT8) を有している。3 者に共通して見られる GT8 配列は UDP-Glc 結合および糖化反応に関わる重要なモチーフであると考えられた。しかし、UGGT はグルコシルセラミド合成活性がなく、同様に UGCG は PtdGlc 合成能力が全くない。

UGGT の安定発現細胞株 (CHO 細胞) を得て、そこから各転移酵素タンパク質を精製し、両者の基質特異性、2 価イオンの要求性、熱安定性など酵素の基本的性質の違いを明らかにした。本研究課題により UGGT のノックアウト動物による個体レベルでの PtdGlc 合成の機能解明が初めて可能となった。

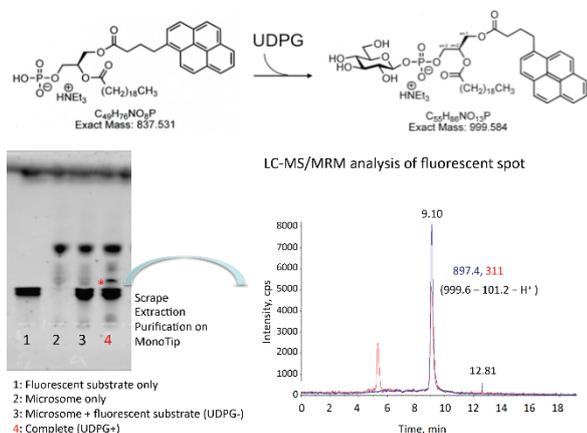


図 2. ピレニル化ホスファチジン酸を基質とした UGGT 糖転移酵素活性の測定系

蛍光標識化ホスファチジン酸、UDP-グルコース (UDPG) 存在下、酵素タンパク標品 (ER 画分) はピレニル化 PtdGlc を産生した。合成物は、LC-MS により確認した。

<研究の意義・展望>

リゾ体糖脂質の前駆体である PtdGlc の存在量は正常な組織においては極めて微量であるが、組織に障害があったり、細胞がストレスを受けたり、ガン化したりすると PtdGlc が再発現することが分かっている。リゾ体 PtdGlc/GPR55 の理解には、リゾ体を産生する PLA2 や PtdGlc を生合成する糖転移酵素の更なる解析が求められる。GPR55 をターゲットとした創薬研究を推進する上でも、こうした基本問題を解決することが重要であり、そこから得られる情報から真に創薬に直結する成果が期待できると考えている。

<主な研究発表>

1. Guy AT, Nagatsuka Y, Ooashi N, Inoue M, Nakata A, Greimel P, Inoue A, Nabetani T, Murayama A, Ohta K, Ito Y, Aoki J, Hirabayashi Y*, Kamiguchi H*. (*Co-corresponding authors) "Neuronal Development: Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord" *Science* **349**(6251): 974-977 (2015)
2. 理研ニュース2015年8月28日:
- Research Highlight in Nature Reviews Neuroscience (doi: 10.1038/nrn4035)
- Recommended in F1000 Prime (Highly Accessed)

研究課題名：PSTによる神経細胞因子 NCAM のポリシアル化機構の解明

研究期間：平成 24 年度～平成 25 年度

研究課題番号：24110520

研究代表者：長江雅倫（理化学研究所糖鎖構造生物学研究チーム 研究員）

研究課題名：髄液内における *N*-GlcNAc 型糖鎖生成機構の解明

研究期間：平成 26 年度～平成 27 年度

研究課題番号：26110724

研究代表者：長江雅倫（理化学研究所糖鎖構造生物学研究チーム 研究員）

<研究の目的>

細胞外には糖蛋白質や糖鎖を含む細胞外マトリックスが豊富に存在し、生理的に重要な役割を果たしている。我々は構造生物学を主な解析手法として、原子レベルの視点から糖鎖と蛋白質の相互作用を研究している。平成 24～25 年度は主に脳神経系で特に豊富に存在する細胞外マトリックスであるポリシアル酸に焦点を当てた研究を目的として行った。また平成 26～27 年度は脳脊髄液中に含まれる *N*-GlcNAc 型糖鎖生成機構に焦点を当て、その前駆体である *N*型糖鎖の動的構造解析も視野に入れた研究を目的として行った。さらに我々の強みである X 線結晶構造解析技術を積極的に領域内に供与した。

<研究の成果>

(1) ポリシアル酸と抗ポリシアル酸抗体複合体の構造解析（主な研究発表 1）

ポリシアル酸はシアル酸が α 2-8 結合で重合した多糖で、脳の初期発生に必須の細胞外マトリックスである。ポリシアル酸は強い負電荷をもち、溶液中で独特なヘリックス構造を持つと言われてきた。我々は名古屋大学の佐藤ちひろ先生と共同でポリシアル酸に特異的な抗体である mAb735 抗体とオリゴシアル酸の相互作用を X 線結晶構造解析によって明らかにした。その結果、ポリシアル酸は従来いわれていたようなヘリックス構造とは異なることが示唆された（図 1 左）。また示差走査熱量計を用いた熱力学的解析によって、ポリシアル酸との結合には非常に大きな熱量変化を伴うことがわかった。こうした挙動はポリシアル酸が溶液中で無秩序に近い運動をしている可能性を示唆している。

(2) 脳型トランスフェリンの糖鎖構造と生理機能の相関研究（主な研究発表 2）

脳脊髄液は血液とは異なる循環系であり、糖鎖修飾様式も血液とは異なっている。共同研究者である福島県立医科大学の橋本康弘先生は、脳脊髄液中に含まれるトランスフェリン上の糖鎖構造の変化が神経変性疾患である特発性正常圧水頭症の診断マーカーとなることを見出した。我々は橋本先生から脳脊髄液の提供を受けて、糖鎖構造ごとにトランスフェリンを精製した。そして質量分析によって *N* 型糖鎖の最小構造である *N*-GlcNAc 型糖鎖の存在を見出した。また生化学的解析によって *N*-GlcNAc 型糖鎖を持つ成分は従来のトランスフェリンとは性質が異なることが明らかになった（図 1 右）。

(3) バイセクト型糖鎖特異的コンフォメーションの可視化研究（主な研究発表 3）

バイセクト型糖鎖は *N* 型糖鎖の一種で脳神経系に豊富にする。バイセクト型糖鎖は GnT-III によって生成されるが、GnT-III の酵素活性は神経変性疾患であるアルツハイマー病に関与する。バイセクト型糖鎖はバックフォールド構造と呼ばれる特徴的な立体構造を取ると言われているが、その可視化はほとんどなされていなかった。そこで、理化学研究所の木塚康弘研究員、谷口直之グループディレクターと共同でレクチンを足場として利用することで X 線結晶構造解析および NMR 測定によってバイセクト型糖鎖の溶液構造を明らかにした（図 2 左）。

(4) ジストログリカノパチー原因遺伝子マウス由来 Protein *O*-mannosyl Kinase 触媒ドメインの構造解析（主な研究発表 4）

ジストログリカノパチーは筋繊維の破壊と再生を繰り返しながら筋力が次第に低下していく遺伝子疾患である。その原因遺伝子の多くが糖転移酵素であり、糖鎖認識機構を理解することは疾患の改善につながる可能性がある。我々は名古屋市立大学の矢木宏和先生、東京都健康長寿医療研究センターの萬谷博先生と共同で原因遺伝子の一つである

Protein O-mannosyl Kinase (POMK)の触媒ドメインの立体構造を明らかにした(図2右)。その結果、POMKの糖鎖認識機構が明らかになり、ジストログリカノパチーの治療につながる可能性がある。

<研究の意義・展望>

本領域は神経生物学と糖鎖生物学の融合を目指したものである。我々は、さらにそこに構造生物学を加えて原子レベルの視点を追加することを目指した。こうしたアプローチは医学から化学までつながる架け橋となるポテンシャルがあると信じている。

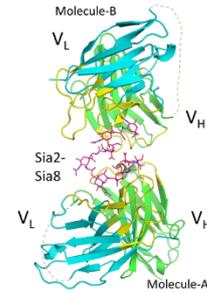
<主な研究発表>

1. Masamichi Nagae, Akemi Ikeda, Masaya Hane, Shinya Hanashima, Ken Kitajima, Chihiro Sato, and Yoshiki Yamaguchi
Crystal structure of anti-polysialic acid antibody single chain Fv fragment complexed with octasialic acid: Insight into the binding preference for polysialic acid
Journal of Biological Chemistry **288**(47), 33784-96 (2013)
2. Masamichi Nagae*, Kana Morita-Matsumoto*, Seisuke Arai, Ikuo Wada, Yuka Matsumoto, Kiyoshi Saito, Yasuhiro Hashimoto, and Yoshiki Yamaguchi (*; equal contributors)
Structural change of N-glycan exposes hydrophobic surface of human transferrin
Glycobiology **24**, 693-702 (2014)
3. Masamichi Nagae, Mayumi Kanagawa, Kana Morita-Matsumoto, Shinya Hanashima, Yasuhiko Kizuka, Naoyuki Taniguchi and Yoshiki Yamaguchi
Atomic visualization of a flipped-back conformation of bisected

glycans bound to specific lectins
Scientific Reports **6** 22973 (2016)
4. Masamichi Nagae, Sushil K. Mishra, Makiko Neyazaki, Rika Oi, Akemi Ikeda, Naohiro Matsugaki, Satoko Akashi, Hiroshi Many, Mamoru Mizuno, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Toshiya Senda, Tamao Endo, Terukazu Nogi and Yoshiki Yamaguchi
3D structural analysis of Protein O-Mannosyl Kinase POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy
Genes to Cells in press

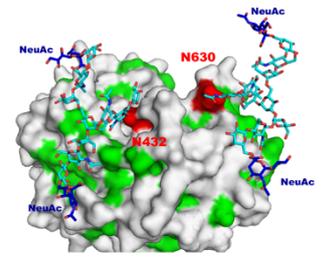
<図>

構造生物学による神経糖鎖生物学へのアプローチ (図1)



抗ポリシアル酸抗体の構造解析

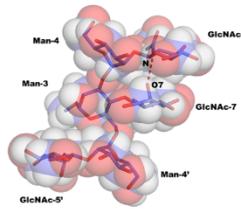
名古屋大学・佐藤ちひろ先生との共同研究



脳型トランスフェリンの糖鎖解析

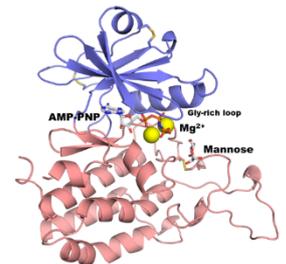
福島県立医科大学・橋本康弘先生との共同研究

構造生物学による神経糖鎖生物学へのアプローチ (図2)



バイセクト型糖鎖の構造解析

理化学研究所・木塚康弘先生・谷口直之先生との共同研究



Protein O-mannosyl Kinase触媒ドメインの構造解析

名古屋市立大学・矢木宏和先生、東京都健康長寿医療研究センター・萬谷博先生との共同研究

研究課題名：脳発生過程におけるO-マンノース型糖鎖の機能解析

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24110523

研究代表者：萬谷 博（地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長）

研究課題名：脳発生過程におけるO-マンノース型糖鎖の機能解析

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110727

研究代表者：萬谷 博（地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長）

<研究の目的>

我々は哺乳類のO-マンノース（Man）型糖鎖を発見し、O-Man型糖鎖の異常が先天性筋ジストロフィー症（ α -ジストログリカノパチー）の原因となるという新たな疾患概念を提唱した。 α -ジストログリカノパチーは筋ジストロフィー症に中枢神経障害を伴うことから、脳発生過程におけるO-Man型糖鎖の重要性が示唆されている。しかし、発症に関わるO-Man型糖鎖の構造は未解明であり、発症の分子メカニズムもほとんど分かっていなかった。近年、 α -ジストログリカノパチーの原因遺伝子が多数報告され、O-Man型糖鎖の生合成が非常に複雑なメカニズムで制御されていることが明らかになってきた。また、O-Man型糖鎖には分岐構造などの多様な構造があることが明らかになり、こうした多様な糖鎖構造の機能や生合成機構の理解が必要となった。本研究では、原因遺伝子産物の機能を明らかにし、O-Man型糖鎖の構造と生合成機構を解明することを目的とした。

<研究の成果>

（1）O-Man型糖鎖の構造と生合成機構の解明

（図1、研究発表1,2,3）

福山型先天性筋ジストロフィー症と類縁疾患の原因遺伝子（fukutin, FKR, ISPD, TMEM5, POMGNT1）の機能を解明し、発症に関わるO-Man型糖鎖（コアM3糖鎖）の完全な構造と生合成機構を明らかにした。コアM3糖鎖は直列に2個のリビトール5リン酸（Rbo5P）を含む、哺乳類では初めて見つかった

糖鎖構造であった。fukutinとFKRPはRbo5P転移

酵素であり、TMEM5は2番目のRbo5Pにキシロース（Xyl）を転移するXyl転移酵素であった。ISPDはRbo5Pの供与体を合成するCDP-Rbo合成酵素であった。POMGNT1はコアM1糖鎖合成におけるグルコサミン（GlcNAc）転移酵素として同定されていたが、コアM3糖鎖合成との関連は不明であり、なぜ α -ジストログリカノパチーの原因遺伝子となるのかが分かっていなかった。今回、X線構造解析からPOMGNT1には触媒ドメインと糖結合ドメインの2つの機能ドメインが存在し、糖結合ドメインがコアM3糖鎖に結合することがfukutinによるRbo5P転移反応に必要であることが明らかとなった。

（2）網膜色素変性症（RP）原因遺伝子の発見

（図2、研究発表4）

POMGNT1は α -ジストログリカノパチーの原因遺伝子であり、これまで報告されている患者変異はPOMGNT1活性を消失させる。RP患者から新たに検出された変異はPOMGNT1の酵素活性を完全には失活させなかった。弱い酵素活性が保持されることで α -ジストログリカノパチーは発症しないが、成人後にRPを発症するリスクが生じることが示された。POMGNT1は成人後の網膜細胞の維持に必要であり、酵素活性の低下による糖鎖合成の減少がRP発症に関わるという新しいメカニズムが明らかとなった。

<研究の意義・展望>

(1) 本研究により、これまで部分的にしか分かっていなかったコア M3 糖鎖の構造と生合成機構が完全に解明されたことから、先天性筋ジストロフィー症研究の飛躍的な進歩が期待される。また、Rbo5Pを含む糖鎖構造は哺乳類では初めての発見であり、この構造の欠損が筋ジストロフィー症の発症に直接関与することから、生物学的にも医学的にも重要な発見である。

(2) 先天性筋ジストロフィー症と RP の発症に O-Man 型糖鎖を介した共通のメカニズムがあることが示唆され、両疾患の病態解明や治療法の開発に活用されることが期待される。

<主な研究発表>

1. *Kanagawa M, *Kobayashi K, *Tajiri M, *Manya H, *Kuga A, Yamaguchi Y, Akasaka-Manyu K, Furukawa J, Mizuno M, Kawakami H, Shinohara Y, Wada Y, Endo T, Toda T. Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. *Cell Rep.*, 14: 2209-2223. (2016)(*co-first author)
2. Kuwabara N, Manyu H, Yamada T, Tateno H, Kanagawa M, Kobayashi K, Akasaka-Manyu K, Hirose Y, Mizuno M, Ikeguchi M, Toda T, Hirabayashi J, Senda T, Endo T, Kato R. Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113(33): 9280-9285. (2016)
3. Manyu H, Yamaguchi Y, Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Akasaka-Manyu K, Kawakami H, Mizuno M, Wada Y, Toda T, Endo T. The muscular dystrophy gene TMEM5 encodes a ribitol α 1,4-xylosyltransferase required for the functional glycosylation of dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, 291(47): 24618-24627. (2016)
4. Xu M, Yamada T, Sun Z, Eblimit A, Lopez I, Wang F, Manyu H, Xu S, Zhao L, Li Y, Kimchi A, Sharon D, Sui R, Endo T, Koenekoop RK, Chen R. Mutations in POMGNT1 cause non-syndromic retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.*, 25(8): 1479-1488. (2016)

<図>

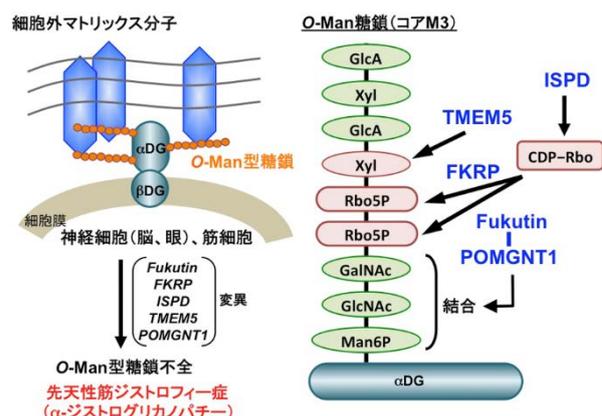


図1. O-Man 型糖鎖 (コア M3) の構造と生合成機構の解明. コア M3 糖鎖はジストログリカン (α DG, β DG) と細胞外マトリックス分子 (ラミニンなど) との結合に必要であり、コア M3 糖鎖の合成不全が α -ジストログリカノパチーの原因となる。POMGNT1 は Fukutin と複合体を形成する。

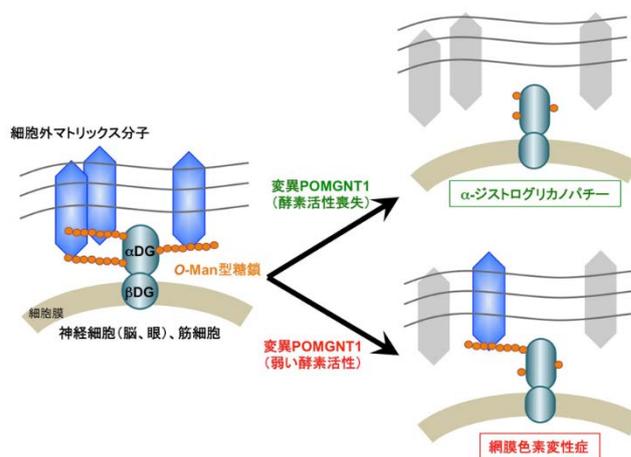


図2. POMGNT1 の変異と網膜色素変性症 (RP) . POMGNT1 活性を喪失させる変異は α -ジストログリカのパチーの原因となり、弱い活性を保持する変異は RP 発症の要因となる。

研究課題名： α 1,3フコース転移酵素 Fut10 による幹細胞の未分化性維持機構の解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110710

研究代表者：等 誠司（滋賀医科大学・医学部・教授）

<研究の目的>

神経幹細胞は、発達期の脳において全ての神経細胞・グリア細胞を産生するのみならず、成体脳にも存在して脳機能に重要な役割を果たす。しかし、神経幹細胞が終生に互って未分化性を維持し、かつ適切な時期に細胞を分化させて神経ネットワークを構築する分子機構には、不明な点が多い。本研究は、幹細胞の未分化性に密接に係わる糖鎖である Le^x 抗原に注目する。これまで、脳における Le^x 抗原を生合成する酵素は Fut9 だと考えられていたが、*Fut9* ノックアウトマウスがほぼ正常に発生・発達し、脳にも大きな異常が観察されないことが大きな矛盾点であった。研究代表者は、独自の視点から、神経幹細胞特異的に発現する新規の α 1,3-フコース転移酵素 Fut10 を同定し、幹細胞の未分化性維持に働いていることを明らかにしてきた。本研究では、Fut10 の基質特異性などの酵素学的解析を進めることにより、Fut10 が生合成する Le^x 抗原を含有する糖鎖の同定、さらには、そのような Le^x 抗原含有糖鎖を側鎖としてもつ糖タンパク質の同定を行う。併せて、*Fut10* ノックアウトマウスを作製・解析することにより、神経幹細胞の未分化性維持のみならず、神経ネットワークの構築や脳高次機能などにおける *Fut10* および Fut10 が生合成する Le^x 抗原の役割を解明しようとするものである。加えて、*Fut10* を用いて神経幹細胞の維持・分化を制御する技術が確立されれば、障害を受けた脳の再生医療への応用も期待できる。

<研究の成果>

レンチウイルスを用いて、ES 細胞で *Fut10* 遺伝子を過剰発現/機能喪失させ、その表現型を解析した。その結果、*Fut10* 遺伝子の過剰発現では未分化性が亢進し、ノックダウンでは逆に分化が促進されることを明らかにした。同様に、レトロウイルスベクターを用いて、神経幹細胞における *Fut10*

遺伝子をノックダウンしたところ、神経幹細胞の自己複製能が減弱することを見出した。これらの結果は、Fut10 もしくはそれが生合成する Le^x 抗原含有糖鎖が、幹細胞の未分化性を制御しているという我々の仮説を支持するものであった。

Fut10 遺伝子は、発達期の網膜において、盛んに分裂する前駆細胞に豊富に発現していることを発見した。この結果を基に、成体マウスの眼において網膜損傷モデルを作製し、網膜の修復過程で *Fut10* 遺伝子の役割を解析した。その結果、網膜修復のために分裂する前駆細胞において *Fut10* 遺伝子発現が上昇することを見出した。これらの結果は、網膜神経細胞の修復過程においても、Fut10 が重要な役割を担うことを示唆する。

<研究の意義・展望>

ES 細胞や神経幹細胞、網膜幹細胞の分化や増殖において、Fut10 が担う機能の一端を明らかにした。今後、損傷を受けた脳や網膜の修復過程において、*Fut10* 遺伝子の発現を制御することにより、再生を促進する新たな治療戦略構築につながる可能性がある。

<主な研究発表>

1. †Zheng L.-S., †Hitoshi S., †Kaneko N., Takao K., Miyakawa T., Tanaka Y., Xia H., Kalinke U., Kudo K., Kanba S., Ikenaka K., *Sawamoto K. (2014) Mechanisms for interferon- α -induced depression and neural stem cell dysfunction. *Stem Cell Reports* 3, 73–84 († equal contribution)
2. Fuke S., Kametani M., Yamada K., Kubota-Sakashita M., Kasahara T., Kujoth G.C., Prolla T.A., Hitoshi S., Kato T. (2014) A heterozygous Polg mutation causes motor dysfunction due to mtDNA deletions. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 1, 909–920 (doi: 10.1002/acn3.133)
3. Torii T., Yoshimura T., Narumi M., Hitoshi S., Takaki Y., Tsuji S., *Ikenaka K. (2014) Determination of major sialylated N-glycans and identification of branched sialylated N-glycans that dynamically change their content during development in the mouse cerebral cortex. *Glycoconj J* 31, 671–683
4. †Naruse M., †Ishino Y., Kumar A., Ono K., Takebayashi H., Yamaguchi M., Ishizaki Y., Ikenaka K., *Hitoshi S. (2016) The dorsoventral boundary of the germinal zone is a

specialized niche for the generation of cortical oligodendrocytes during a restricted temporal window. Cerebral Cortex 26, 2800–2810 († equal contribution)

5. *Yamaguchi M., *Seki T., Imayoshi I., Tamamaki N., Hayashi Y., Tatebayashi Y., Hitoshi S. (2016) Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. J Physiol Sci 66, 197–206

<図>

図1：胎生15日マウス胎仔の眼

網膜は Lotus tetragonolobus agglutinin (LTA) レクチンで染色される Le^x 抗原を発現するが、PCNA 陽性で分裂している (BrdU を取り込む) 前駆細胞は outer neuroblast layer (onbl) に存在して、*Fut10* を豊富に発現している。一方、分裂を終えた細胞は inner neuroblast layer (inbl) に存在し、*Fut9* を発現している。

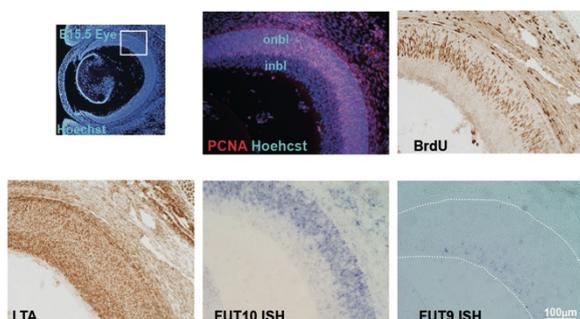
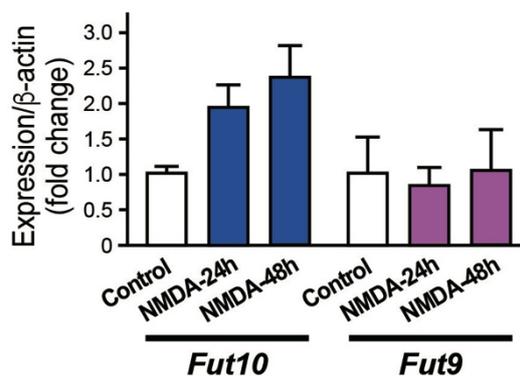


図2：網膜損傷モデル

NMDA 注射による網膜損傷モデルにおいて、修復過程で前駆細胞の分裂に伴って *Fut10* の発現は上昇するが、*Fut9* の発現は変化しない。



研究課題名：聴覚におけるガングリオシドの機能解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110717

研究代表者：井ノ口 仁一（東北医科薬科大学薬学部教授）

連携研究者：稲盛 啓一郎（東北医科薬科大学薬学部準教授）

研究協力者：郷 慎司（東北医科薬科大学薬学部助教）

<研究の目的>

我々は、ガングリオシドGM3合成酵素(GM3S)KOマウスが生後間もなく完全に聴力を消失し、その原因として蝸牛のコルチ器に存在する有毛細胞の聴毛の選択的変性が起こることを見出していた

(Yoshikawa *et al.*, *PNAS* 2009)。この GM3SKOマウスに見られるコルチ器の変性は感音性難聴の病態の一部と類似している。本申請では、内耳有毛細胞の不動毛機能維持に必須と考えられるガングリオシド依存性局所場の実態を明らかにすることを目的とした。

<研究の成果>

音の受容器官である「蝸牛」では発生あるいは生後成熟期間において、様々な糖鎖構造の発現量・発現部位が変化することから、複合糖質の聴覚機能への関与が示唆されていた。しかし、その報告の多くは糖脂質、プロテオグリカン、糖タンパク質の生合成および代謝に関連する酵素遺伝子群のクローニング以前になされた研究であり、聴覚機能を制御する複合糖質分子種の同定には至っていなかった。GM3S KOマウスのコルチ器の崩壊は生後数週齢から始まる。近年ガングリオシド生合成遺伝子のノックアウトマウスが数多く作成、解析されており、ガングリオシドとして GM3 のみが発現するマウスも作成されているが、聴覚異常は見出されていない。これらの結果は、GM3 がコルチ器の形態的・機能的維持において重要な役割を有することを示すものである。

GM3S KOマウスでは、生後間もなく内毛細胞及び外毛細胞の聴毛の変性が確認され、内毛細胞では、聴毛間の融合、聴毛内の分子の「局在の変化」がみられる。内毛細胞及び外毛細胞の細胞膜上およびその細胞質内では、各難聴関連タンパク

質がそれぞれ特徴的な局在を示し聴毛（不動毛：stereocilia）の形態・機能を維持している（図1A）。この聴毛の機能的・形態的維持には同一有毛細胞の聴毛間での分子連結が必須である。GM3S KOマウスでは、生後間もなく内毛細胞及び外毛細胞の聴毛の変性が確認された。特に、内毛細胞では聴毛間の融合、聴毛内の分子の「局在の変化」が GM3S KOマウスの聴覚消失時期に一致して認められた

（研究発表1）（図1）。この聴毛間の分子連結の崩壊に基づく聴毛の融合が GM3S KOマウスの聴覚機能消失の原因であると考えられる。GM3S KOマウスでは、この連結を担う分子（Shaft connector）の一つ PIP2 の分解を司る PTPRQ (Protein Tyrosin Phosphatase Receptor Q) の局在変化を確認している（研究発表1）（図1B）。このほかにも、厳密な局在を示す myosin VI, myosin VIIa, radixin, などの局在が異常を示したことから、細胞膜構成成分ガングリオシドは、有毛細胞の機能性膜領域の形成・維持には必須の成分であることが強く示唆された。

GM3 のみを発現する B4Galnt1(GM2/GD2S)と ST8Sia1(GD3S)の二重欠損マウスでは、このような聴覚の消失は認められていないことから[Kawai *H et al.*, *J.Biol.Chem.*, 276,6885-88, 2001]、GM3 はコルチ器の形態・機能維持において重要な役割を有することが考えられた。2004年にはヒトの GM3S 欠損患者が見いだされ[Simpson *et al.*, *Nat.genet.* 36, 1225-29], 若年性の癲癇, 自閉症, 盲目などの多様な中枢神経系の異常が報告された。2012年には、フランスで見いだされた GM3S 欠損患者で難聴が報告されている[Fragaki *et al.*, *Eur.J.Hum. Genet.* 2012, 1-7]。我々も、米国 CSC(Clinic for Sick Children)との共同で Pennsylvania 州 Amish 家系の GM3S 欠損患者の聴力を調べたところ、すべての患者に聴力低下または消失が認められた（研究発表1）。

難聴（特に加齢性難聴）は最も多い慢性疾患の一つであり、65歳以上の40%以上に生じるとされており、難聴の病態解明、治療への応用は最重要課題である。コルチ器はいったん損傷を受けた場合、現在のところ再生は不可能であり、難聴の根本的治療法は確立されていない。現在の難聴研究の多くが特定の難聴関連タンパク質個々の機能解析であるが、ガングリオシドは特定のおそらく複数のタンパク質との機能複合体、即ちマイクロドメインを形成して内耳有毛細胞の機能を維持・調節していると考えられる。

<研究の意義・展望>

上記の知見を分子レベルで解明する為に、

- 1) GM3 依存性聴毛膜微小領域を介したシグナル伝達制御機構の解明。
- 2) GM3S 欠損症治療および感音性難聴/加齢性難聴治療の基礎実験として GM3S KO マウスおよび GM3S/GM2S DKO マウス、およびそれらのコルチ器の器官培養を用いた、聴覚障害およびコルチ器変性に対する GM3 投与によるレスキュー実験。などを実施する予定である。

<主な研究発表>

1. Yoshikawa M, Go S, Suzuki S, Suzuki A, Morlet T, Strauss K, Fujiwara M, Iwasaki K, and Inokuchi J. Ganglioside GM3 is essential for the structural integrity and function of cochlear hair cells. *Hum. Mol. Genet.* 24:2796-2807 (2015)

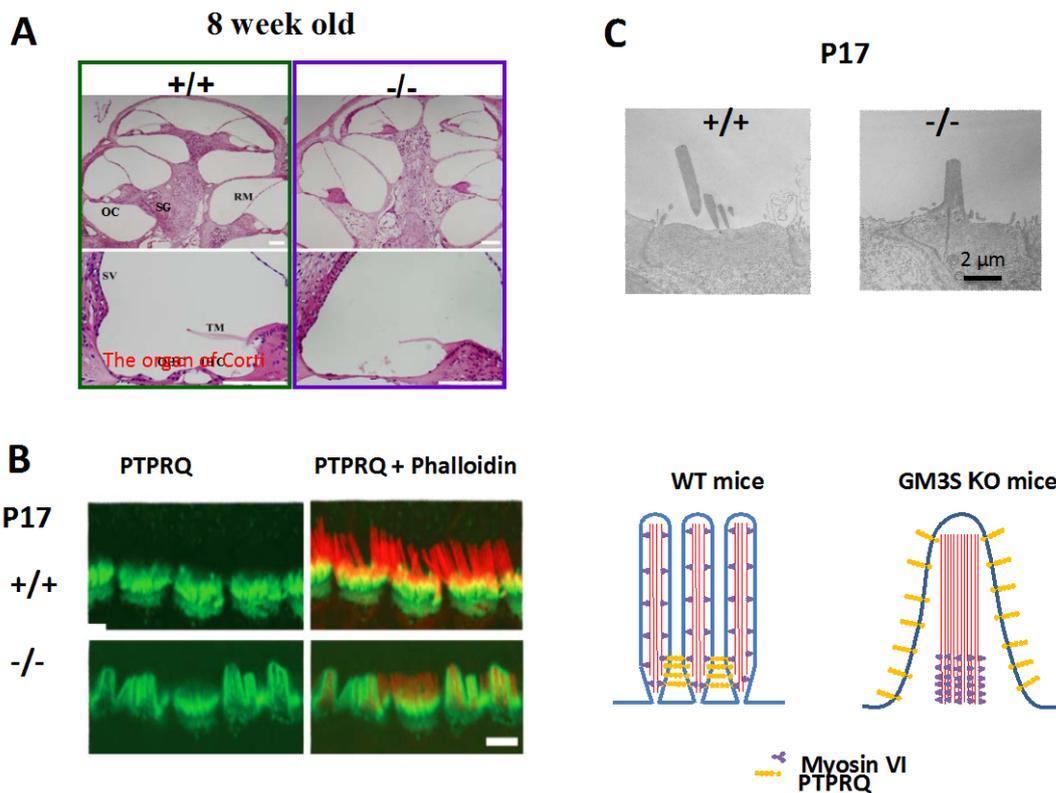


図1 GM3合成酵素KOマウスは内耳コルチ器の選択的変性が認められる(A)。聴毛の基底部分へのPTPRQの局在化が崩壊し(B)、聴毛が融合している(C)。

研究課題名：個体脳において N 型糖鎖が樹状突起形成の時空的制御に果たす役割の解明

研究期間：平成 26 年度～平成 27 年度

研究課題番号：26110718

研究代表者：川内 健史（公益財団法人先端医療振興財団・先端医療センター研究所・医薬品開発研究グループ 上席研究員）

<研究の目的>

脳の高次機能の基盤となる神経回路網は、特定の脳領域に配置された神経細胞が、軸索と樹状突起を介した情報伝達を行うことによって機能を発揮する。国内外の多くの研究グループにより、多くの軸索ガイダンス分子がすでに同定されているのに対して、樹状突起は形態的に複雑であり、しかも脳領域によって多彩な形態を示すことから、*in vivo*におけるその形成機構は不明な点が多い。発生期の脳皮質において、脳室近辺に存在する神経前駆細胞から誕生した未成熟神経細胞は、脳表層に向けて多段階の移動を行うが、樹状突起はこの移動過程で形成される。これまでに我々は、個体への簡便な遺伝子導入法などいくつかの独自手法を用いて、神経細胞移動の分子機構を研究してきたことから、本研究ではこれらの実験手法とバックグラウンドを生かし、糖鎖修飾による細胞膜貫通タンパク質の機能制御を介した樹状突起形成の制御機構を個体レベルで明らかにすることを目的として研究を行った。

<研究の成果>

発生期の脳皮質において、未成熟神経細胞は多段階の移動を行うが、移動の初期段階において、神経細胞は樹状突起の原基となる先導突起を形成する。この先導突起は、初代培養神経細胞の樹状突起形成過程では観察されないことから、個体脳に特異的な樹状突起形成段階であると考えられる。そこで本研究では、先導突起の形成と形態変化の制御機構に着目し、(1)糖脂質 GM1 を介したエンドサイトーシス経路による樹状突起原基（先導突起）の形態形成機構、(2)Rab5 依存性エンドサイトーシスの下流経路、(3)先導突起が分岐して樹状突起へと成熟する機構、の 3 点を中心に解析を行った。

(1)糖脂質 GM1 を介したエンドサイトーシス経路による樹状突起原基の形態形成機構

初代培養神経細胞において、樹状突起は軸索に選択されなかった未成熟突起から形成される。これに対して、発生期の脳皮質では、これらの未成熟突起は退縮し、ほぼ同時に形成される先導突起が樹状突起の原基となる。我々は、簡便に個体への遺伝子導入を行える *in vivo* エレクトロポレーション法を用いたノックダウンスクリーニングにより、糖脂質 GM1 豊富膜ドメインからのエンドサイトーシスが未成熟突起の退縮に必要であること、その後の先導突起の形成には、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが重要な役割を果たすことを見出した。形成された先導突起は、皮質板内では分岐しないが、連続的な形態変化を示す。この形態変化は、神経細胞の移動に必要であると考えられている。我々は、低分子量 G タンパク質 Rab5 を介したエンドサイトーシスが先導突起の形態変化に必要であることを示した。さらに、Rab5 依存性エンドサイトーシスは、糖脂質 GM1 領域を介したエンドサイトーシスとは異なるタイプであることも分かった。以上の結果から、糖脂質が作る細胞膜ドメインの違いによって分類される複数のエンドサイトーシス経路が、樹状突起形成初期を段階的に制御していることが示唆された（文献番号 4 および未発表データ）。

(2)Rab5 依存性エンドサイトーシスの下流経路

上記の結果から、糖脂質 GM1 領域を介したエンドサイトーシスと Rab5 依存性エンドサイトーシスが異なることが示唆されたため、次にこれらの下流輸送経路について解析を行った。これまでに我々は、Rab5 依存性のエンドサイトーシスによって、細胞接着分子 N-カドヘリンが細胞内へと取り込まれること、さらに別の低分子量 G タンパク質 Rab11 によって、N-カドヘリンは再び細胞膜へとリサイクリングされること、このリサイクリング経路が神経細胞の移動に重要であることを報告している (Kawauchi T. et al. Neuron, 2010 および文献番号 2)。我々

は、北里大学の阪上らを中心とした研究グループに研究協力することにより、Rab11の下流エフェクター分子FIP3がN-カドヘリンの輸送に重要であることを報告した(文献番号1)。また、ショウジョウバエにおいてRab5依存性エンドサイトーシス経路の制御に関わるStripのマウスホモログStrip1が神経細胞移動に必要であることも明らかにした(文献番号3)。

(3) 先導突起から樹状突起への成熟機構

先導突起は、脳の表層にある辺縁帯に達すると、分岐を開始する。これまでに我々は、膜タンパク質の細胞内分解系に関するRab7の機能抑制により、先導突起から樹状突起への成熟が抑制されることを報告している。このことから、何らかの膜タンパク質の活性変化が先導突起から樹状突起への成熟に必要であることが示唆される。そこで、上記の*in vivo*ノックダウンスクリーニングを用いて様々な糖転移酵素の機能抑制を行ったところ、N-アセチルグルコサミンの付加パターンが先導突起の適切な分岐に必要であることが示唆された。なお、本研究項目は、本新学術領域の公募班員である東北薬科大学の顧建国先生との共同研究である。

<研究の意義・展望>

神経回路網における電気信号の情報伝達において、樹状突起は情報の入力と統合に必須であるが、個体脳における樹状突起形成のメカニズムは不明な点が多かった。これは、個体脳では、樹状突起形成が神経細胞移動と密接に絡む複雑な過程であるため、解析が困難であったことが原因の1つであると考えられる。本研究では、これまで神経細胞移動の分子機構を解析してきたノウハウを生かし、樹状突起

の原基である先導突起の形成および形態変化を制御する分子機構の一端を明らかにしたことが重要な点である。また、糖脂質の組成によって分類される複数のエンドサイトーシス経路の生理的意義を示したことは、神経発生学のみならず、生化学・細胞生物学分野においても重要な知見であると考え、本領域の目的である「神経科学と糖鎖生物学の融合」にも貢献することが期待される。

<主な研究発表>

1. Y. Hara, M. Fukaya, K. Hayashi, T. Kawauchi, K. Nakajima, H. Sakagami. (2016) ADP reboxylation factor 6 regulates neuronal migration in the developing cerebral cortex through FIP2/Arfophilin-1-dependent endosomal trafficking of N-cadherin. *eNeuro* 3(4), e0148-16, 1-20.
2. T. Kawauchi. (2015) Cellular insights into cerebral cortical development: focusing on the locomotion mode of neuronal migration. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 394.
3. C. Sakuma, T. Kawauchi, S. Haraguchi, M. Shikanai, Y. Yamaguchi, VI. Gelfand, L. Luo, M. Miura, T. Chihara. (2014) A STRIPAK component Strip serves as a platform for early endosome organization during axon elongation. *Nature Commun.* 5, 5180.
4. YV.Nishimura, M. Shikanai, M. Hoshino, T. Ohshima, YI. Nabeshima, K. Mizutani, K. Nagata, K. Nakajima, T. Kawauchi. (2014) Cdk5 and its substrates, DCX and p27kip1, regulate the formation of cytoplasmic dilation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development* 141(18), 3540-3550.

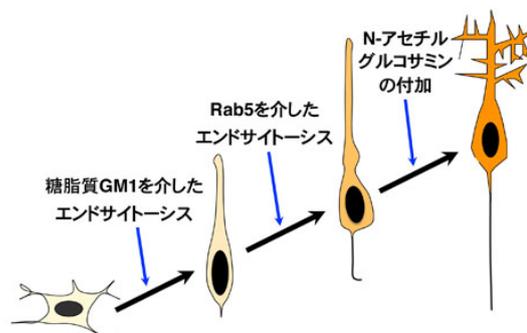


図. 糖鎖による樹状突起成熟の制御機構

研究課題名：糖鎖によるシナプス前終末の機能修飾

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110720

研究代表者：坂場 武史（同志社大学大学院脳科学研究科 教授）

<研究の目的>

2年間での研究期間中の具体的な目的は以下の3点である。(1) 糖鎖修飾によるシナプス前部機能調節について薬理的な検討をおこなう。(2) 電気生理学だけでなくイメージングを併用し、機能分子の動態が糖鎖修飾によってどのような変化をもたらすかを調べる。(3) 糖鎖修飾が重要な役割をもたらす細胞外マトリックスのシナプス伝達における役割を調べるため、これに関連したモデルマウスを用いた解析をおこなう。(1)、(2)に関してはシナプス前終末へのパッチクランプ記録が容易な脳幹 calyx of Held シナプス、(3)に関しては、小脳における出力シナプスで機能的に重要な小脳プルキンエ細胞—深部小脳核間のシナプスを用いて研究をおこなった。

<研究の成果>

(1) シナプス前終末における糖鎖修飾の役割：

カリックス型シナプス前終末に膜容量測定法を適用し、糖鎖機能全般をツニカマイシンを用いて薬理的に急性阻害したときのエキソ・エンドサイトーシスへの効果について検討した。エキソサイトーシスへの効果はなかったが、シナプス小胞の遅いエンドサイトーシス成分 (Hosoi et al., 2009, *Neuron*) に比較的選択的に影響を与えることがわかった。小胞エンドサイトーシスを検出する別の方法として、シナプトタグミン2の内腔側を認識する抗体に pH 感受性色素 (cypHer) を結合することで、シナプトタグミンの前終末内サイクリングを可視化した

(Okamoto et al., in revision)。cypHer は酸性条件下で、蛍光を発し、小胞内は酸性化されているので、伝達物質放出に伴って小胞が細胞外に露出すると蛍光強度が下がり、エンドサイトーシスによって蛍光強度が上がることを観察できる。ツニカマイシンを外液に投与すると、cypHer で観察されるシナプトタグミン2 取り込みの時間経過が遅くなったことが観察できた。以上の実験から、ツニカマイ

シンは (クラスリン依存性) 小胞エンドサイトーシスを阻害することが示唆された (図1)。

(2) 細胞外マトリックスに関わる Bra12 のシナプス伝達の役割について：

小脳からの急性スライス標本を用いて検討をおこなった。Bra12 は脳特異的ヒアルロン酸-プロテオグリカン結合蛋白質であり、ペリニューロナルネットと呼ばれる神経細胞周囲の構造に存在している。Bra12 は脳幹と小脳によく発現しており、深部小脳核神経細胞へ投射するシナプス数が減少していることが示唆された (Bekku et al., 2012, *J. Comp. Neurol.*)。Bra12 欠損マウス (岡山大・大橋研究室との共同研究) を用いた解析で機能的な役割を解明することを試みた。2週齢前後のマウス深部小脳核神経細胞からパッチクランプ記録をおこない、プルキンエ細胞からの抑制性シナプス応答を解析したところ、シナプス後電流の振幅が半分程度に減少し、伝達効率が有意に減少していることがわかった。2発連続刺激で観察されるシナプス電流振幅の比 (いわゆる paired pulse ratio) には有意な差が見出せなかったため、シナプス前終末からの伝達物質放出確率に大きな変化はないと推定された。自発的微小シナプス電流の振幅には影響がなかったことから、シナプス後部受容体数等の特性には変化がないことが示唆され、このことから、シナプス前性のメカニズムによって伝達効率が落ちていることが示唆された。おそらくは伝達物質放出部位で即時放出可能なシナプス小胞数が減少しているのではないと思われる。

深部小脳核への (おそらく) 苔状線維由来の興奮性シナプス電流の解析をおこなったが、単発刺激における電流振幅は正常、ノックアウトマウスで差が見出せなかった。以上の実験から、Bra12 は興奮性ではなく抑制性シナプスに特異的に関与し、シナプス伝達効率、とくに即時放出可能な小胞数を減少さ

せる可能性が示唆された。

(3) シナプス前機能の解析のための技術開発：

シナプス前終末の機能は、シナプス前終末そのものが小さいこと、伝達物質放出を媒介するシナプス小胞、放出分子機構が小さいため、解析が困難であった。糖鎖の役割を解析すると平行して、前機能解析法の開発をおこない、シナプス小胞の全反射蛍光顕微鏡における可視化 (Midorikawa and Sakaba, 2015, *Neuron*)、プルキンエ細胞前終末からのパッチクランプ記録 (Kawaguchi and Sakaba, 2015, *Neuron*; Diaz et al., 2015, *J. Physiol.*) が可能になった。後者の方法は、(2) の対象標本であり、シナプス後電流からシナプス前機能を推定する際の、結果の解釈のために寄与した。

<研究の意義・展望>

本研究によって、シナプス前終末のシナプス小胞エンドサイトーシスに選択的に糖鎖修飾が機能することが示唆されたが、その分子標的を同定する必要がある。Bral2 の機能解析に関しては、プルキンエ細胞からの出力シナプスに影響があったが、これが小脳神経回路にどのような影響を与えるのか、個体レベルでどのような影響を与えるのかは今後の解析が必要である。

<主な研究発表>

1. Díaz-Rojas F, Sakaba T, Kawaguchi SY. “Ca²⁺ current facilitation determines short-term facilitation at inhibitory synapses between cerebellar Purkinje cells.”, *J Physiol*. 査読有 593(22):4889-904, 2015 年、 DOI: doi: 10.1113/JP270704
2. Midorikawa M, Sakaba T, “Imaging Exocytosis of Single Synaptic Vesicles at a Fast CNS Presynaptic Terminal.” *Neuron*, 88(3):492-8, 2015 年、 DOI: 10.1016/j.neuron.2015.09.047
3. Kawaguchi SY, Sakaba T “Control of inhibitory synaptic outputs by low excitability of axon terminals revealed by direct recording.” *Neuron*, 査読有, 85:1273-1288, 2015 年 DOI: 10.1016/j.neuron.2015.02.013
4. Midorikawa M, Okamoto Y, Sakaba T, “Developmental changes in Ca²⁺ channel subtypes regulating endocytosis at the calyx of Held.”, *J. Physiol*. 査読有, 592:3495-3510, 2014 年 DOI: 10.1113/jphysiol.2014.273243

<図>

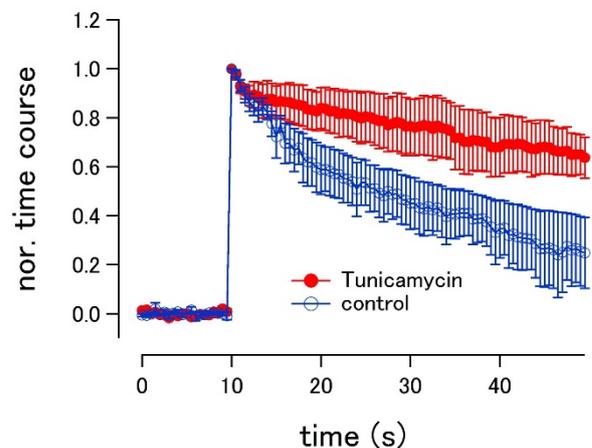


図1 ツニカマイシンのエンドサイトーシスへの影響。膜容量測定をシナプス前終末におこなった。開口放出は上昇、エンドサイトーシスは下降を示す。

研究課題名：神経系の糖鎖発現を規定するエピゲノム因子の探索

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26110723

研究代表者：木塚 康彦（理化学研究所疾患糖鎖研究チーム 研究員）

<研究の目的>

神経系には他の組織に見られないユニークな糖鎖が多数発現しており、それらの糖鎖は様々な生理機能を有している。また多くの神経疾患の発症や進行にも深く関わっている。しかし、これらの神経糖鎖の生理的・病的発現メカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究では、これまで糖鎖発現においてほとんど解析されていなかったエピゲノムに着目し、神経特異的な糖鎖の新たな発現メカニズムの解明を目的とした。これにより、いまだ不明である組織特異的な糖鎖の発現機構の一端を明らかにするとともに、アルツハイマー病などに代表される神経疾患の発症機構解明への一助とする。

<研究の成果>

(1) 神経系細胞の生理的糖鎖発現の分子基盤

神経糖鎖の生理的発現を支える遺伝子基盤を明らかにするため、まずほぼ全ての糖鎖合成酵素(糖転移酵素)の mRNA 発現を定量解析できる系を確立した。得られた手法を用い、マウス胎児脳より単離培養したニューロンとアストロサイトにおいて発現する糖転移酵素のプロファイルを作製した(論文1)。さらにそのプロファイルと、質量分析で同定した糖鎖構造との相関を確認した。また、これらの糖転移酵素の生理的発現がエピゲノムによりどのように制御されているのかを明らかにするため、ニューロンとアストロサイトをエピゲノム試薬(5-Aza, TSA)で処理し、変動する糖鎖および糖鎖遺伝子を同定した(図1)。その結果、ニューロンの糖鎖発現はアストロサイトおよび線維芽細胞よりもエピゲノム変化を受けにくいことがわかった。以上の結果は、神経糖鎖の発現の基盤となる情報を与えるものである。

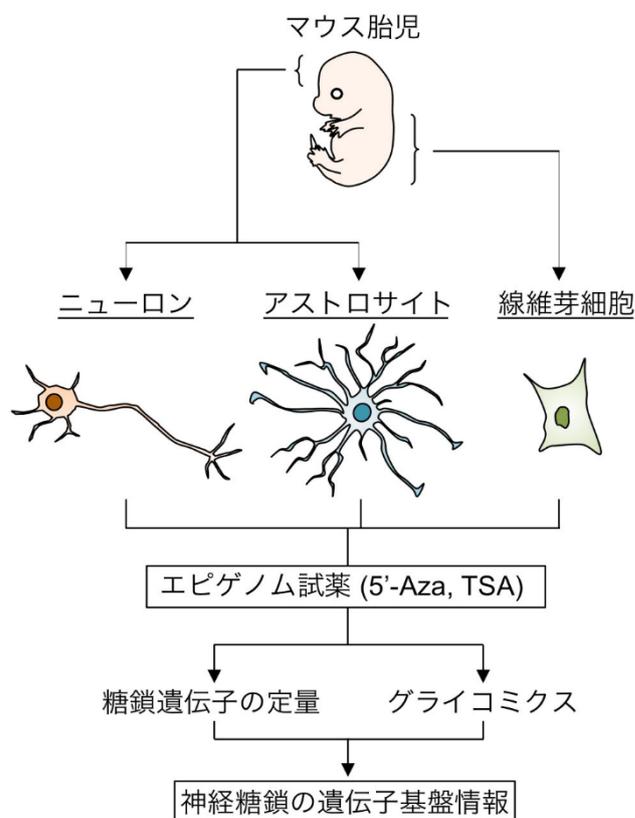


図1. 神経糖鎖の発現メカニズムの解析

図1. マウス胎児より単離した神経系の細胞およびコントロールの線維芽細胞にエピゲノム変化を誘発し、糖鎖遺伝子の定量解析とグライコミクス解析を行った。

(2) アルツハイマー病(AD)などの疾患で亢進する糖鎖の発現機構とその検出

神経糖鎖は様々な神経疾患にも関わっており、中でもバイセクト糖鎖と呼ばれる神経糖鎖はADと関連が深い。代表者らの以前の研究によりバイセクト糖鎖の発現がAD患者で増えること、またバイセクト糖鎖欠損マウスでは、ADの原因となるアミロイドβの蓄積が抑えられることがわかっており、本糖鎖が治療ターゲット候補の一つと考えられる。本研究では、バイセクト糖鎖がADでなぜ発現上昇するのか、その機構の解明を試みた。その結果、アミロイドの蓄積により引き起こされる酸化ストレスが

バイセクト糖鎖発現を上昇させていることを明らかにした(図2)(論文3,4)。現在、酸化ストレスによりなぜバイセクト糖鎖の発現が上昇するのか、その転写メカニズムを解析している。

また、疾患により変動する糖鎖発現を検出できる新たなプローブの開発にも取り組み、フコース含有糖鎖を高感度に検出できる新たな糖アナログの開発に成功した(論文2)。今後は本プローブを用いて、疾患時や生理的条件下で変動する糖鎖の発現を生細胞上で観察し、新たな糖鎖発現機構の解明へとつなげたい。

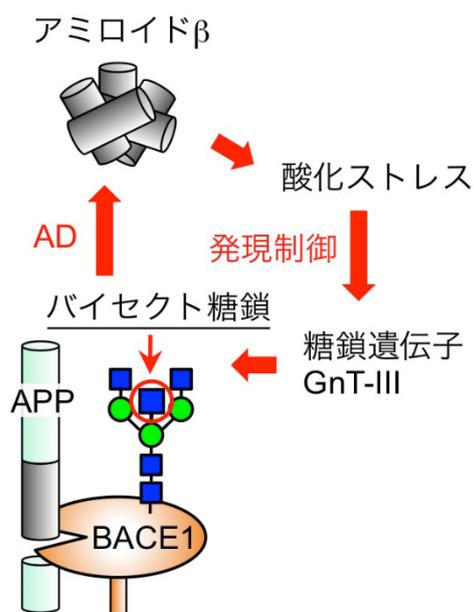


図2. ADにおけるバイセクト糖鎖の発現亢進

図2. ADの原因となる凝集性のアミロイドβペプチドはBACE1プロテアーゼがAPPタンパク質を切断す

ることにより産生される。BACE1には選択的にバイセクト糖鎖が付加され、その切断機能を正に調節している。アミロイドβの蓄積は細胞に酸化ストレスを生じ、それにより糖鎖遺伝子 GnT-III の発現亢進を通じてバイセクト糖鎖の発現が上昇する。

<研究の意義・展望>

本研究は神経系の糖鎖の発現に焦点を絞り、それらの生理的・病的な発現のメカニズムの解明、またその発現変動を捉えるプローブの開発、さらに糖鎖変動の結果生じる疾患との関連性の解明などを目的として行った。今後は、得られた糖鎖遺伝子の一斉定量システムや、開発した糖鎖プローブなどを用い、新しい糖鎖発現メカニズムの解明とその治療応用を目指したい。

<主な研究発表>

1. **Kizuka Y.**, Nakano M., Miura Y., Taniguchi N. (2016) Epigenetic regulation of neural N-glycomics. *Proteomics*, 16, 2854-2863.
2. **Kizuka Y.**, Funayama S., Shogomori H., Nakano M., Nakajima K., Oka R., Kitazume S., Yamaguchi Y., Sano M., Korekane H., Hsu TL., Lee HY., Wong CH., Taniguchi N. (2016). High sensitivity and low toxicity fucose probe for glycan imaging and biomarker discovery. *Cell Chem. Biol.*, 23, 782-792.
3. Takahashi M., **Kizuka Y.**, Ohtsubo K., Gu J., Taniguchi N. (2016) Disease-associated glycans on cell surface proteins. *Mol. Aspects of Med.*, 51, 56-70.
4. **Kizuka Y.**, Nakano M., Kitazume S., Saito T., Saido T. C., Taniguchi N. (2016) Bisecting GlcNAc modification stabilizes BACE1 protein under oxidative stress conditions. *Biochem. J.*, 473, 21-30.

研究課題名：細胞質 Ngly1 (PNGase) の中枢神経系における機能の解析

研究期間：平成 26 年度～平成 27 年度

研究課題番号：26110725

研究代表者：鈴木 匡 (国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・チームリーダー)

連携研究者：藤平陽彦 (国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・特別研究員)

研究協力者：原田陽一郎 (国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・特別研究員)

<研究の目的>

Ngly1 の中枢神経系における KO マウス、あるいは Ngly1 Engase ダブル KO マウスの表現型解析を通じて、Ngly1 の中枢神経系における生理機能を明らかにするとともに、Ngly1 欠損下における N-GlcNAc タンパク質生成が病態に影響する可能性について検討を行った。

<研究の成果>

マウスの表現型解析

全身 KO マウスは胚性後期-生後すぐに致死性を示すのと対照的に予想よりもはるかに緩和な表現型を示した。組織切片解析や行動解析で一部異常は見られるものの、いずれも顕著なものではなく、ヒトの NGLY1 欠損症で見られる神経系の異常は一部ほかの組織の異常から来る 2 次的影響である可能性が示唆された。また Ngly1 Engase-KO マウスは一部胚性致死を免れ、多くのマウスが 1 年以上生存可能であることが分かった。これらのことから Engase が Ngly1 欠損の調節遺伝子として作用する可能性が示唆された。

Ngly1KO 細胞における N-GlcNAc タンパク質の生成の解析

細胞レベルで Ngly1-KO の細胞を用いてモデルタンパク質の分解過程を調べたところ、分解が著しく遅延することが明らかとなった。興味深いことに Ngly1-KO 細胞においてもそのモデルタンパク質は別の脱糖鎖酵素、ENGase によって糖鎖の脱離を受けることが明らかとなった。ENGase による糖鎖脱離はタンパク質に GlcNAc 一残基を残すが、この N-GlcNAc タンパク質は細胞内で凝集体として蓄積することが明らかになった。以上の結果から

ENGase が特に Ngly1 の機能が不全な状況で糖タンパク質に直接作用し、N-GlcNAc タンパク質を生成することが明らかとなり、この現象が NGLY1 欠損症の病態発現に関わる可能性が示唆された。

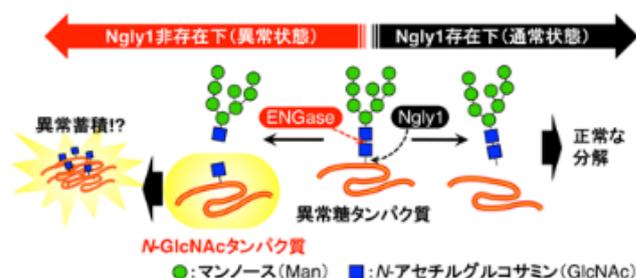
<研究の意義・展望>

Engase が細胞レベル、マウス個体レベルいずれでも Ngly1 の欠損による異常を抑制、または緩和することが明らかとなり、本酵素の阻害が NGLY1 欠損症の治療のターゲットになり得る可能性を提唱した。

<主な研究発表>

1. C. Huang, Y. Harada, A. Hosomi, Y. Masahara-Negishi, J. Seino, H. Fujihira, Y. Funakoshi, T. Suzuki, N. Dohmae, and T. Suzuki (2015) Endo- β -N-acetylglucosaminidase forms N-GlcNAc protein aggregates during ER-associated degradation in Ngly1-defective cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 1398-1403.
2. Y. Harada, C. Huang, S. Yamaki, N. Dohmae, and T. Suzuki. (2016) Non-lysosomal degradation of phosphorylated oligosaccharides is initiated by the cytosolic endo- β -N-acetylglucosaminidase. *J. Biol. Chem.* **291**, 8048-8058.
3. T. Suzuki (2015) The cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) – basic science encounters a human genetic disorder. *J. Biochem.* **157**, 23-34.
4. T. Suzuki NGLY1 and me. Glycobiology Significant Achievement Award Lecture, Society for Glycobiology Annual Meeting (New Orleans, LO) 2016 年 11 月 21 日
5. T. Suzuki ENGase as a potential drug target for NGLY1-deficiency. 7th Annual Rare Disease Day Symposium, San Diego, CA 2016 年 2 月 27 日

<図>



研究課題名：コンドロイチン硫酸を中心とした糖鎖による神経活動の制御機構

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110003

研究代表者：北川 裕之（神戸薬科大学 薬学部 教授）

分担研究者：田村 純一（鳥取大学 地域学部地域環境学科 教授）

以下、田村の研究について記述

<研究の目的>

重要な生命現象の多くに糖鎖が関与していることが近年の研究により明らかになってきたが、その発現の実体ともいえる「糖鎖の機能ドメイン」については明らかになっていないものが多い。分子レベルの研究では均一な構造を持つ糖鎖を用いることが必要であるが、例えば天然のグリコサミノグリカンには、異なる繰返し二糖単位からなるヘテロポリマーであり、天然糖鎖を用いる限り正確な機能ドメインをつきとめることはできない。一方、化学的に再構築された糖鎖は構造的に均一で、類縁体の合成や量産が可能である。本研究では硫酸化パターン異なる種々のコンドロイチン硫酸やケラタン硫酸オリゴ糖を合成し、本領域の研究者と連携して神経機能の分子レベルでの解明に合成化学の側面からアプローチした。

<研究の成果>

(1) 有機化学的に精密合成したコンドロイチン硫酸E型オリゴ糖(図1)を、北川教授をはじめ、領域内のいくつかの研究グループに提供した。その結果、糖鎖長の違いによって神経細胞の伸長などに劇的な変化を起こすことが判明した。

(2) 硫酸化パターン異なる五種のビオチン化コンドロイチン硫酸四糖(図2)を化学合成し、北川教授との共同研究により、Midkineに対する親和性が糖鎖の硫酸化パターンに依存することを分子レベルで解明した(論文1)。

(3) 硫酸基の位置異なる四種のケラタン硫酸二糖と四糖(図3)を化学合成した(論文2)。この糖鎖は門松教授に提供され、神経細胞に及ぼす影響が明らかになった。

<研究の意義・展望>

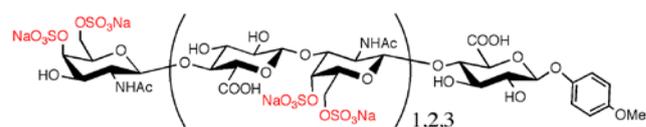
十糖前後の糖鎖が機能ドメインとして細胞のイベントに関与し、種々の変化を起こすことを明らかにしてきた。また、硫酸エステルは機能発現に不可欠なパーツであり、その位置や数によって著しく機能に変化することも、合成糖鎖を用いることで明ら

かになった。従来合成してきた単純なホモオリゴ糖に加え、ハイブリッドタイプのヘテロオリゴ糖の合成が次の機能発現の解明の鍵になるかも知れない。

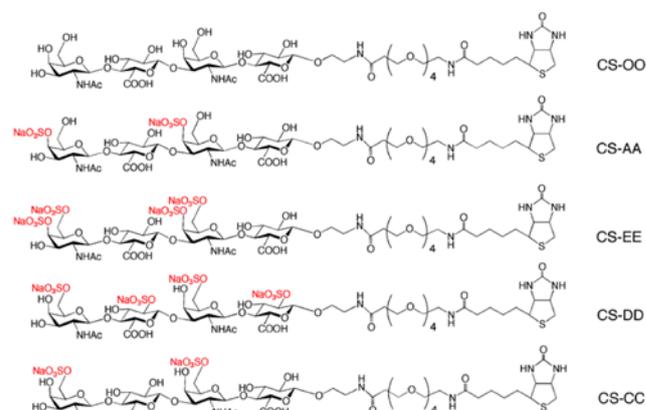
<主な研究発表>

1. Tamura J, Tsutsumishita-Nakai N, Nakao Y, Kawano M, Kato S, Takeda N, Nađanaka S and Kitagawa H. Synthesis and the interaction with midkine of biotinylated chondroitin sulfate tetrasaccharides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22: 1371-1374. (2012)
2. Takeda N and Tamura J. Synthesis of Biotinylated Keratan Sulfate Repeating Disaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 78(1): 29-37. (2014)

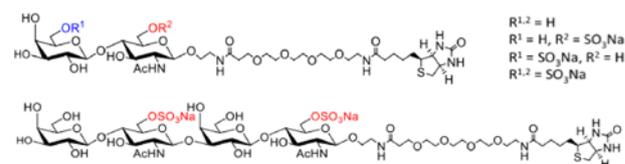
<図>



(図1)



(図2)



(図3)

研究課題名：スフィンゴ糖脂質による神経機能の健全性維持の分子機構

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23110008

研究代表者：古川鋼一（名古屋大学大学院医学系研究科 教授）

分担研究者：鈴木健一（京都大学物質-細胞統合システム拠点 特定拠点准教授）

以下、鈴木の研究について記述

<研究の目的>

シアル酸を含む糖脂質であるガングリオシドは、細胞膜上の受容体活性の制御やウイルス・細菌の細胞内への侵入過程に関わることが知られている。特に神経細胞膜上での機能が古くから研究されており、神経細胞分化誘導、可塑的反応促進、神経損傷部位の回復促進などの役割を担うと報告されている。しかしながら、天然のガングリオシドと同じように振舞う蛍光ガングリオシドプローブがなかったために、生きている細胞膜上でのガングリオシドの動態は不明であった。本研究では、この問題を解決するために、公募班の安藤先生、計画班の古川先生、岡先生らとの共同研究により、天然のガングリオシドと、同様に振舞う蛍光プローブを開発し、生細胞膜上でのガングリオシドの動態を解明することを目的とした。

<研究の成果>

1. ラフト組織化と機能のための GPI アンカー型タンパク質のホモダイマー形成（論文5）

ガングリオシドの動態を調べる前に、まずラフトについてよく理解するために、生きている細胞膜上で代表的なマーカー分子である GPI アンカー型タンパク質の1分子追跡を行い、その動態の解明を試みた。GPI アンカー型タンパク質はどれも、寿命が100-200 ミリ秒のホモダイマーを形成することを発見した。さらに、特異的なタンパク質-タンパク質相互作用がホモダイマー形成を誘起し、ラフト脂質相互作用が、ホモダイマーを安定化することを見出した。また、高発現密度時にホモオリゴマー形成も観察されたが、寿命は100 ミリ秒とずっと短かった。一方で、GPI アンカー型タンパク質 CD59 にリガンド添加し刺激すると、非常に安定なテトラマーラフトを形成し、細胞内のシグナル伝達を誘起することを見出した(図1)。本研究により、定常状態では、

今まで想定されてきたような大きくて安定なラフトは存在せず、寿命が100-200 ミリ秒程度の小さく短寿命のホモダイマーラフトのみが存在するが、刺激後は、ホモダイマーラフトを基本ユニットとして利用して、安定なテトラマーラフトが形成されることが明らかとなった。

2. ガングリオシドプローブ開発と細胞膜上でのラフト形成機構（論文2）

公募班の安藤先生との共同研究により、ガングリオシド蛍光プローブを全合成の技術を用いて開発した（世界初）。親水性蛍光色素をシアル酸など特定の官能基に結合させた場合のみ、天然のガングリオシドと同様に振舞うことを見出した。

次に新規ガングリオシドプローブを1分子観察し、生細胞膜上での動態を研究した。ガングリオシドプローブは、GPI アンカー型タンパク質 CD59 のホモダイマーラフト、会合体ラフトへ40 ミリ秒という短期間リクルートされるが、CD59 モノマーとの相互作用時間は10 ミリ秒程度とさらに短いことが明らかとなった(図2)。一方で、ガングリオシドは、細胞膜中の100 nm以下のサイズの微小領域に5 ミリ秒以上一時停留しないことが判明し、Nature誌での以前の報告を覆す結果を得た。これらによりガングリオシドが入るラフトは、極めて動的であることを明らかにした。

3. ガングリオシドのクラスター形成と受容体活性制御機構の解明（未発表）

開発したガングリオシドプローブは、すべて、100-200 ミリ秒という短寿命のホモダイマーを形成し、高密度では、より短寿命のホモオリゴマーを形成することを発見した。また、ガングリオシドの組み合わせによっては、ホモダイマーと同程度安定なヘテロダイマーも形成されることを見出した。スフ

インゴシン骨格部分が共通しているスフィンゴミエリンでは、このようなダイマーは形成されないことやシアル酸のないアシアログングリオシドのホモダイマーは、短寿命であることなどから、ガングリオシドのホモダイマー形成は、特異的な糖鎖間相互作用により誘起されることが示唆された。また、人工平面リン脂質膜上でもホモダイマーが形成されることから、ガングリオシド自体の糖鎖相互作用により、ホモダイマーが誘起されることが示唆された。また、ガングリオシドの糖鎖相互作用による EGF 受容体の活性制御機構の詳細を明らかにした。

4. スフィンゴミエリンプローブの開発とその細胞膜上での動態 (論文 1)

天然のスフィンゴミエリンと同じようにラフト画分に分配される蛍光プローブを初めて開発した。ガングリオシドプローブの場合と同様に、CD59 ホモダイマーラフトやクラスターラフトへの短寿命のリクルートを観察し、ラフトドメインは、非常に分子の出入りが激しい構造を持つことを明らかにした。

5. 1 分子観察による AMPA 受容体の動態解明 (未発表)

岡先生らとの共同研究により AMPA 受容体は、神経細胞膜上で安定なテトラマーを形成しているという定説を覆し、非常に動的であり、モノマー、ダイマー、トリマー、テトラマー間を行き来していることを発見した。この動的な性質が、刺激に応じて、シナプス領域の迅速な AMPA 受容体濃度変化を容易にするというモデルを提案した。

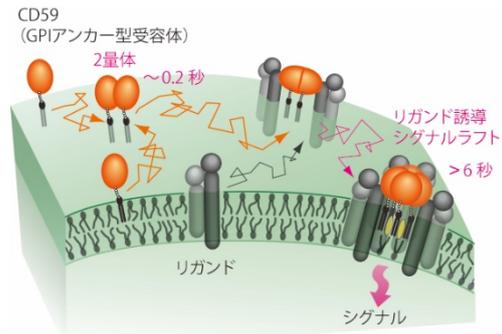
<研究の意義・展望>

本研究により、今まで困難であった生細胞膜上でのガングリオシドやスフィンゴミエリンの動態を明らかにできた。特にガングリオシド間、あるいはガングリオシドと EGF 受容体間の「糖鎖-糖鎖相互作用」を見出した意義は大きいと考えている。今後、「糖鎖-糖鎖相互作用」をさらに検証していく。糖

鎖相互作用による受容体活性制御という新しい概念が広まると期待される。

<主な研究発表>

1. Kinoshita N*, Suzuki KG*(equal contribution), Matsumori N, Takada M, Ano H, Morigaki K, Abe M, Makino A, Kobayashi T, Hirose KM, Fujiwara TK, Kusumi A, Murata M (2017) Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs. *J Cell Biol* in press.
2. Komura N*, Suzuki KG*, Ando H*(equal contribution), Konishi M, Koikeda M, Imamura A, Chadda R, Fujiwara TK, Tsuboi H, Sheng R, Cho W, Furukawa K, Furukawa K, Yamauchi Y, Ishida H, Kusumi A, Kiso M (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat Chem Biol*. 12, 402-410.
3. Suzuki KG (2015) New insights into the organization of plasma membranes and its role in signal transduction. *Int Rev Cell Mol Biol* 317, 67-96.
4. Suzuki KG (2013) Single molecule imaging of receptor-receptor interactions. *Methods Cell Biol* 117, 373-390.
5. Suzuki KG, Kasai RS, Hirose KM, Nemoto YL, Ishibashi M, Miwa Y, Fujiwara TK, Kusumi A (2012) Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. *Nat Chem Biol*. 8, 774-783.
6. Suzuki KG (2012) Lipid rafts generate digital-like signal transduction in cell plasma membranes. *Biotechnol J* 7, 753-761.



<図>

図 1. リガンド添加後、GPI アンカー型受容体の CD59 は、短寿命ダイマーラフトを基に、安定なテトラマーラフトを形成する。

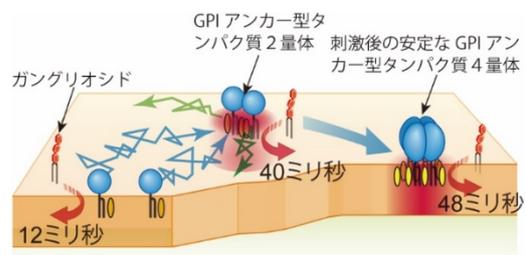


図 2. ガングリオシドは、脂質相互作用で CD59 モノマー、ダイマー、安定化されたテトラマーへ 12-48 ミリ秒という短い間、リクルートされた。

研究課題名：神経活動制御における HNK-1 を中心とした N 型糖鎖機能の解析

研究期間：平成 23 年度～平成 27 年度

研究課題番号：2311006

研究代表者：岡 昌吾（京都大学大学院医学研究科 教授）

分担研究者：川崎ナナ（横浜市立大学大学院生命医科学研究科 教授）

<研究の目的>

糖タンパク質の糖鎖部分は神経活動制御に関与することが知られているが、『どのタンパク質のどの位置のどのような糖鎖』が制御に係っているかを明らかにすることは困難である。それは、糖ペプチド・糖タンパク質の質量分析において、混在ペプチドや界面活性剤によるイオン化抑制が生じ、タンパク質、結合部位、糖鎖構造を解析するための良質な糖ペプチドのマスマスペクトルを取得することが困難であることが原因である。そこで、本研究では、質量分析による糖タンパク質の構造解析、及び網羅的解析を目的として、糖ペプチド濃縮法・回収法の開発を行った。また、その方法を用いて、生体内糖タンパク質の糖鎖解析を行った。

<研究の成果>

1. アセトン沈殿による糖ペプチド濃縮法の開発

血液中や細胞内のタンパク質を網羅的に解析する方法として、タンパク質集団をトリプシン等で消化し、LC/MS/MS で解析するショットガンプロテオミクスの手法がある。しかし、この方法は混在するペプチドによる妨害により、糖タンパク質の網羅的解析に応用することはできない。そこで、我々は、糖ペプチドとペプチドのアセトンへの溶解性の差異を利用して、すべての N-糖ペプチドを濃縮する方法を開発した(図1、研究発表4)。この方法は糖タンパク質のトリプシン消化物に 5 倍容のアセトンを加えるだけの簡便で迅速な方法であり、糖ペプチドは沈殿物として回収され、ペプチドは上清成分として除去することができる。界面活性剤も上清成分として除去されるため、膜を含む画分からの糖ペプチド回収にも利用可能である(研究発表 2)。この方法を用いて、血清中の IgG1 及び IgG2 の糖鎖を簡便に解析することができた(研究発表 1)。

2. グアニジン塩酸を用いた SDS 電気泳動ゲルからの糖ペプチド回収法の開発

微量タンパク質の同定及び翻訳後修飾の解析にプロテオミクスのアプローチ、すなわち、SDS-PAGE ゲルからのペプチド回収、及び LC/MS/MS が用いられる。しかし、この方法では残存する SDS の妨害により、糖ペプチドの良好なマスマスペクトルを得ることは困難である。我々は、ゲル中に含まれる SDS を除去する改良ゲル内消化法を考案した(図 2、研究発表 5)。これは、還元・アルキル化を行うステップにおいて、還元液にグアニジン塩酸を加えるだけの簡便な方法で、SDS はグアニジン塩酸と複合体を形成して不溶化する。本手法を用いることで、糖ペプチドの良好なマスマスペクトルを得ることが可能となり、微量糖タンパク質の糖鎖構造を結合部位ごとに解析できるようになった。この方法を用いて、グルタミン酸受容体(GluA1, GluA2)の N 結合型糖鎖を、糖鎖結合部位ごとに解析することができた。

<研究の意義・展望>

プロテオミクス・グライコミクスで課題となっていた良好な糖ペプチドのマスマスペクトルを得るための方策として、アセトン沈殿法とグアニジン塩酸法を開発した。それぞれショットガンプロテオミクスと電気泳動に組み合わせることが可能であり、神経関連糖タンパク質をはじめ、様々な糖タンパク質の糖鎖の構造解析に利用可能である。本研究の成果は、様々な分野における糖鎖の機能解明に役立つと期待される。

<主な研究発表>

1. Ohmi, Y., Ise, W., Harazono, A., Fukuyama, H., Baba, Y., Narazaki, M., Shoda, H., Takahashi, N., Ohkawa, Y., Shuting, J., Sugiyama, F., Fujio, K., Kumanogoh, A., Yamamoto, K., Kawasaki, N., Kurosaki, T., Takahashi, Y., Furukawa, K.: Sialylation converts pathogenic anti-citrullinated protein/peptide IgG antibodies into effective inhibitors of murine arthritis. *Nat Commun.*, Apr 5;7:11205 (2016)
2. Takakura, D., Tada, M., Kawasaki, N.: Membrane glycoproteomics of fetal lung fibroblasts using LC/MS. *Proteomics*, 16, 47-59 (2016)
3. Kawasaki, N., Okumoto, T., Yamaguchi, Y., Takahashi, N., Wolf Herman Fridman, Sautès-Fridman, C., Yagi, H., and

Kato, K. (2014) Site-Specific Classification of N-Linked Oligosaccharides of the Extracellular Regions of Fcγ Receptor IIIb Expressed in Baby Hamster Kidney Cells. *J. Glycomics Lipidomics*. 4(2), 1000116.

4. Takaura D, Harazono A, Hashii N, *Kawasaki N (2014) Selective glycopeptide profiling by acetone enrichment and LC/MS. *J. Proteomics*. 101, 17-30.
5. Takakura, D., Hashii, N., and Kawasaki, N. (2014) An improved in gel digestion method for identification of peptides and glycopeptides by using guanidine hydrochloride. *Proteomics*. 14 (2-3), 196-201.

< 図 >

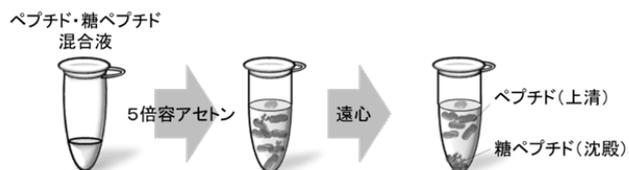


図1. アセトンによる糖ペプチドの選択的回収法

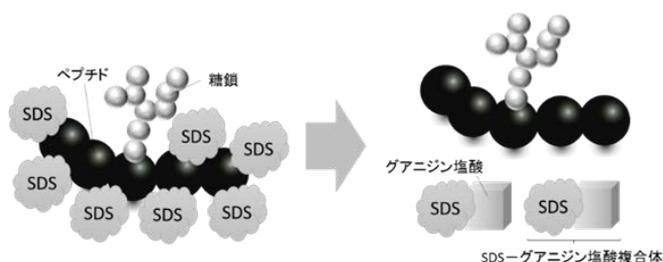


図2. グアニジン塩酸を用いた改良ゲル内消化法

主な研究発表 (雑誌論文、学会発表、図書)

【論文】

研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線、corresponding author には左に*印

A01 計画班

門松 健治 (計画A01) (他37報)

1. Zhang Z, (他8名), *Kadomatsu K, (他1名) (2017) Deficiency of a sulfotransferase for sialic acid-modified glycans mitigates Alzheimer's pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(14), E2947-E2954. 査読有
2. Y.Takeda-Uchimura, (他4名), Y.Komatsu and *K.Kadomatsu (2015) Requirement of keratan sulfate proteoglycan phosphacan with a specific sulfation pattern for critical period plasticity in the visual cortex. *Experimental Neurology*. 274, 145-155. 査読有
3. H.Matsui, (他3名), S.Kusunoki, (他2名), *K.Kadomatsu (2013) Keratan sulfate expression in microglia is diminished in the spinal cord in experimental autoimmune neuritis. *Cell Death Dis*. 4, e946. 査読有
4. K.Hirano, (他14名), *K.Kadomatsu (2013) Ablation of keratan sulfate accelerates early phase pathogenesis of ALS. *PLoS One*. 8(6), e66969. 査読有
5. S.Imagama, (他14名), *K.Kadomatsu (2011) Keratan sulfate restricts neural plasticity after spinal cord injury. *J. Neurosci*. 31, 17091-102. 査読有

北川 裕之 (計画A01) (他27報)

1. S.Miyata, and *H.Kitagawa (2016) Chondroitin 6-sulfation regulates perineuronal net formation by controlling the stability of aggrecan. *Neural Plasticity* 2016, Article ID 1305801, 13 pages. 査読有
2. S.Nadanaka, (他2名), J.Tamura, and *H.Kitagawa (2014) Heparan Sulfate Containing Unsubstituted Glucosamine Residues: Biosynthesis and Heparanase Inhibitory Activity. *J. Biol. Chem*. 289, 15231-15243. 査読有
3. T.Koike, (他1名), B.Sato, and *H.Kitagawa (2014) Identification of phosphatase that dephosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem*. 289, 6695-6708. 査読有
4. T.Izumikawa, (他3名), S.Kusunoki, and *H.Kitagawa (2013) A chondroitin synthase-1 (ChSy-1) missense mutation in a patient with neuropathy impairs the elongation of chondroitin sulfate chains initiated by chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1. *Biochim. Biophys. Acta-General Subjects*. 1830, 4806-4812. 査読有
5. S.Miyata, Y.Komatsu, (他2名), *H.Kitagawa (2012) Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nature Neurosci*. 15, 414-422. 査読有

小松 由紀夫 (計画A01)

1. Y.Takeda-Uchimura, (他4名), *Y.Komatsu and *K.Kadomatsu (2015) Requirement of keratan sulfate proteoglycan phosphacan with a specific sulfation pattern for critical period plasticity in the visual cortex. *Experimental Neurology*. 274, 145-155. 査読有
2. T.Sugimura, (他1名), *Y.Komatsu (2015) TNF α is required for the production of T-type Ca²⁺ channel-dependent long-term potentiation in visual cortex. *Neurosci. Res*. 96, 37-44. 査読有
3. A.Wendy Ishikawa, Y.Komatsu and *Y.Yoshimura (2014) Experience-dependent emergence of fine-scale networks in visual cortex. *J. Neurosci*. 34, 12576-12586. 査読有
4. S.Horibe, (他1名), Y.Komatsu and *Y.Yoshimura (2014) Ni²⁺-sensitive T-type Ca²⁺ channel currents are regulated in parallel with synaptic and visual response plasticity in visual cortex. *Neurosci. Res*. 87, 33-39. 査読有

5. S.Miyata, Y.Komatsu, (他2名), *H.Kitagawa (2012) Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nature Neurosci*. 15, 414-422. 査読有

戸島 拓郎 (計画A01) (他8報)

1. H.Akiyama, (他1名), T.Tojima, (他1名), *H.Kamiguchi. (2016) Cyclic nucleotide control of microtubule dynamics for axon guidance. *J Neurosci*. 36:5636-5649. 査読有
2. *T.Tojima, H.Kamiguchi. (2015) Exocytic and endocytic membrane trafficking in axon development. *Development, Growth & Differentiation*. 57, 291-304. 査読有
3. AT.Guy, (他11名), *Y.Hirabayashi, *H.Kamiguchi (2015) Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord. *Science*. 349, 974-977. 査読有
4. T.Tojima, (他1名), *H.Kamiguchi. (2014) Steering neuronal growth cones by shifting the imbalance between exocytosis and endocytosis. *J Neurosci*. 34, 7165-7178. 査読有
5. T.Kuboyama, (他3名), T.Tojima, (他3名), *H.Kamiguchi (2013) Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. *Exp Neurol*. 248, 157-169. 査読有
6. T.Tojima, (他2名), and *H.Kamiguchi (2011) Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nature Reviews Neuroscience*. 12, 191-203. 査読有

A01 公募班

榎 和子 (公募A01) (他3報)

1. W.Jiang, Y.Ishino, H.Hashimoto, K.Keino-Masu, M.Masui, (他4名) (2017) Sulfatase2 Modulates Fate Change from Motor Neurons to Oligodendrocyte Precursor Cells through Coordinated Regulation of Shh Signaling with Sulfatase1. *Dev. Neurosci*. in press. 査読有
2. Y.Takashima, K.Keino-Masu, (他4名), M.Masui, and Nagata, M (2016) Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, Regulate Glomerular Integrity by Modulating Growth Factor Signaling. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 310, F395-408. 査読有
3. S.D.Freeman, K.Keino-Masu, M.Masui, and R.K.Ladher (2015) Expression of the heparan sulfate 6-O-endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, in the avian and mammalian inner ear suggests a role for sulfation in inner ear development. *Dev. Dyn*. 244, 168-180. 査読有
4. S.Nagamine, (他10名), M.Masui, and K.Keino-Masu (2012) Organ-Specific Sulfation Patterns of Heparan Sulfate Generated by Extracellular Sulfatases Sulf1 and Sulf2 in Mice. *J. Biol. Chem*. 287, 9579-9590. 査読有

武内 恒成 (公募A01) (他7報)

1. K.Takeuchi, (他3名), S.Miyata, (他12名), H.Kitagawa, (他1名) (2013) Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nat Commun*. 4:2740. doi: 10.1038/ncomms3740. 査読有
2. M.Okamoto, (他5名), K.Takeuchi, (他14名), *T.Miyata (2013) TAG-1-assisted progenitor elongation streamlines nuclear migration to optimize subapical crowding. *Nat Neurosci*. 11, 1556-1566. 査読有

佐藤 ちひろ (公募A01) (他23報)

1. *Sato, C, (他1名), K.Kitajima (2016) Relationship between ST8SIA2, polysialic acid and its binding molecules, and psychiatric disorders. *Biochim Biophys Acta*. 2016:

S0304-4165(16)30120-9. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.04.015. 査読有

2. M.Sumida,(他5名), T.Miyagi,(他2名), *K.Kitajima, *C.Sato. (2015) Rapid Trimming of Cell Surface Polysialic Acid (PolySia) by Exovesicular Sialidase Triggers Release of Preexisting Surface Neurotrophin. *J. Biol. Chem.* 290, 13202-13214. (doi: 10.1074/jbc.M115.638759). 査読有

岡島 徹也 (公募A01) (他5報)

1. M.Ogawa,(他4名), H.Yagi,(他1名), K.Furukawa and *T.Okajima. (2015) Impaired O-linked N-acetylglucosaminylation in the endoplasmic reticulum by mutated EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase found in Adams-Oliver syndrome. *J. Biol. Chem.* 290(4), 2137-2149. 査読有
2. M.Ogawa,(他1名), K.Furukawa, *T.Okajima (2015) N-acetylglucosamine modification in the lumen of the endoplasmic reticulum. *BBA-General Subjects.* 1850, 1319-1324. 査読有
3. M.Ogawa,(他2名), *T.Okajima (2015) Intracellular and extracellular O-linked N-acetylglucosamine in the nervous system. *Exp. Neurol.* 274, 166-174. 査読有
4. M.Ogawa, N.Nakamura,(他2名), H.Manya, M.Kanagawa,(他2名), K.Furukawa, and *T.Okajima (2013) GTDC2 modifies O-mannosylated α -dystroglycan in the endoplasmic reticulum to generate N-acetyl-glucosamine epitopes reactive with CTD110.6 antibody. *Biochem Biophys Res Commun.* 440, 88-93. 査読有

大橋 俊孝 (公募A01) (他3報)

1. *T.Oohashi,(他3名) (2015) The hyaluronan and proteoglycan link proteins: Organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity. *Exp Neurol.* 274 (Pt B),134-144. 査読有
2. K.Susuki,(他10名), T.Oohashi, Elior Peles, *M.N. Rasband (2013) Three Mechanisms Assemble Central Nervous System Nodes of Ranvier. *Neuron.* 78, 469-482. 査読有

神野 尚三 (公募A01) (他14報)

1. J.Yamada, T.Ohgomori, *S.Jinno (2017) Alterations in expression of Cat-315 epitope of perineuronal nets during normal ageing, and its modulation by an open-channel NMDA receptor blocker, memantine. *J. Comp. Neurol.* (in press) 査読有
2. J.Yamada, *S.Jinno. (2017) Molecular heterogeneity of aggrecan-based perineuronal nets around five subclasses of parvalbumin-expressing neurons in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol.* 525:1234-1249. 査読有
3. T.Ohgomori, (他2名), K.Kadomatsu, *S.Jinno. (2016) Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci.* 43:1340-51. 査読有
4. J.Yamada, *S.Jinno (2015) Subclass-specific formation of perineuronal nets around parvalbumin-expressing GABAergic neurons in the Ammon's horn of the mouse hippocampus. *J Comp Neurol.* 523, 790-804. 査読有
5. H.Fujimoto, (他3名), K.Kadomatsu, *S.Jinno (2015). Time-dependent localization of high- and low-sulfated keratan sulfates in the song nuclei of developing zebra finches. *Eur J Neurosci.* 42, 2716-2725. 査読有

橋本 康弘 (公募A01) (他8報)

1. A.Yoshihara,(他2名), H.Ito,(他12名), *Y.Hashimoto (2016) Subgroup differences in "brain-type" transferrin and alpha-synuclein in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Journal of Biochemistry*, published online March 11, 2016, 1-5. 査読有
2. Y.Matsumoto,(他2名), H.Ito, Y.Kariya, M.Nagae,(他3名), T.Honda and *Y.Hashimoto (2014) *In situ* visualization of a glycoform of transferrin: Localization of α 2,6-sialylated

transferrin in the liver. *J Biochem.* 157(4), 211-216. 査読有
楠 進 (公募A01) (他6報)

1. K.Saigoh,(他8名), H.Kitagawa,(他1名), *S.Kusunoki (2016) Chondroitin sulfate β -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (ChGN-1) polymorphism; association with progression of multiple sclerosis. *Neurosci Res* 108 (7), 55-59. 査読有
2. Y.Hamada,(他3名), S.Oka, *S.Kusunoki (2015) Binding specificity of anti-HNK-1 IgM M-protein in anti-MAG neuropathy: Possible clinical relevance. *Neurosci Res.* 91, 63-68. 査読有
3. R.Ueno, *K.Miyamoto,(他2名), K.Kadomatsu, S.Kusunoki. (2015) Keratan sulfate exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 93, 1874-1880. 査読有
4. *K.Miyamoto,(他3名), K.Kadomatsu, H.Kitagawa, S.Kusunoki (2014) Chondroitin 6-O-sulfate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glycobiology.* 24(5), 469-475. 査読有

神村 圭亮 (公募A01)

1. C.Sakuma,(他2名), K.Kamimura,(他3名), T.Chihara (2016) The Strip-Hippo pathway regulates synaptic terminal formation by modulating actin organization at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Cell Rep.* 16(9), 2289-2297. 査読有
2. K.Kamimura,(他4名), *N.Maeda (2013) Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Cell Biol.* 200(2), 219-233. 査読有

福田 敦夫 (公募A01) (他13報)

1. K.Kakizawa, M.Watanabe, H.Mutoh, Y.Okawa, M.Yamashita, Y.Yanagawa, K.Itoi, T.Suda, Y. Oki and A.Fukuda (2016) A novel GABA-mediated corticotropin-releasing hormone secretory mechanism in the median eminence. *Science Adv.* 2:e1501723. 査読有
2. H.Saito, M.Watanabe, T.Akita, C.Ohba, K.Su gai, WP.Ong, H. Shiraishi, S.Yuasa, H.Matsumoto, KT.Beng, S.Saitoh, S.Miyatake, M.Nakashima, N.Miyake, M.Kato, *A.Fukuda and *N.Matsumoto (2016) Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. *Sci. Rep.* 6:30072. 査読有
3. M.Watanabe and *A.Fukuda (2015) Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 371. 査読有

新明 洋平 (公募A01) (他2報)

1. Y.Shinmyo,(他8名) (2015) Draxin from neocortical neurons controls the guidance of thalamocortical projections into the neocortex. *Nature Commun.* 6, 10232. 査読有

山田 修平 (公募A01) (他6報)

1. S.Mizumoto, S.Yamada, and *K.Sugahara (2015) Molecular interactions between chondroitin-dermatan sulfate and growth factors/receptors/matrix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 34, 35-42. 査読有

藤川 顕寛 (公募A01) (他4報)

1. K. Kuboyama, A.Fujikawa,(他2名), *M.Noda (2016) Role of chondroitin sulfate (CS) modification in the regulation of protein tyrosine receptor type Z (PTPRZ) activity: Pleiotrophin-PTPRZ-A signaling is involved in oligodendrocyte differentiation. *J Bio Chem.* 291, 18177-18128. 査読有
2. K.Kuboyama, A.Fujikawa,(他1名), *M.Noda (2015) Inactivation of protein tyrosine phosphatase receptor type Z by pleiotrophin promotes remyelination through activation of differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci.* 35, 12162-12171. 査読有

A02 計画班

岡 昌吾 (計画A02) (他11報)

1. K.Yabuno,(他1名), Y.Kizuka,(他1名), N.Kawasaki,(他3名), H.Kitagawa, H.Takematsu, and S.Oka* (2015) A Sulfated Glycosaminoglycan Linkage Region Is a Novel Type of Human Natural Killer-1 (HNK-1) Epitope Expressed on Aggrecan in Perineuronal Nets. *PLoS One*. 10(12), e0144560. 査読有
2. Y.Takeuchi,(他2名), H.Takematsu, and S.Oka* (2015) Role of site-Specific N-Glycans Expressed on GluA2 in the Regulation of Cell Surface Expression of AMPA-Type Glutamate Receptors. *PLoS One*. 10(8), e0135644. 査読有
3. N.Nakagawa, H.Yagi,(他1名), H.Takematsu, and S.Oka* (2015) Ectopic clustering of Cajal-Retzius and subplate cells is an initial pathological feature in Pomgnt2-knockout mice, a model of dystroglycanopathy. *Scientific Reports*. 5, 11163. 査読有
4. H.Yagi,(他7名), S.Oka*, and K.Kato*. (*co-corresponding author) (2013) AGO61-dependent GlcNAc modification primes the formation of functional glycans on α -dystroglycan. *Scientific Reports*. 3, 3288. 査読有
5. N.Nakagawa, H.Manyu,(他2名), S.Oka* (2012) Human natural killer-1 sulfotransferase (HNK-1ST)-induced sulfate-transfer regulates laminin-binding glycans on α -dystroglycan. *J. Biol. Chem.* 287(36), 30823-30832. 査読有

吉田 秀郎 (計画A02) (他2報)

1. M.Taniguchi, K. Sasaki-Osugi, M. Oku, S. Sawaguchi, S. Tanakura, Y. Kawai, S.Wakabayashi and H.Yoshida (2016) MLX is a transcriptional repressor of the mammalian Golgi stress response. *Cell Struct. Funct.* 41, 93-104. 査読有
2. M.Taniguchi,(他13名), S.Wakabayashi, H.Kitagawa and H.Yoshida (2015) TFE3 is a bHLH-ZIP-type transcription factor that regulates the mammalian Golgi stress response. *Cell Struct. Funct.* 40, 13-30. 査読有
3. K.Sasaki and H.Yoshida (2015) Organelle autoregulation-stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome. *J. Biochem.* 157, 185-195. 査読有
4. M.Taniguchi and H.Yoshida (2015) Endoplasmic reticulum stress in kidney function and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 24, 345-350. 査読有
5. S.Wakabayashi and H.Yoshida (2013) The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. e20130310. 査読有
6. A.Uemura,(他2名), M.Taniguchi, S.Wakabayashi and H.Yoshida (2013) UBC9 regulates stability of XBP1, a key transcription factor controlling the ER stress response. *Cell Struct. Funct.* 38, 67-79. 査読有

古川 鋼一 (計画A02) (他36報)

1. Y.Ohmi, (他15名) *Furukawa K (2016) Sialylation converts pathogenic anti-citrullinated protein IgG antibodies into effective inhibitors of murine arthritis. *Nat. Commun.* 7, 11205. doi: 10.1038/ncomms11205, 2016. 査読有
2. J.Shuting (他6名), *K.Furukawa, K.Furukawa (2016) Increased a-series gangliosides positively regulate leptin/Ob receptor-mediated signals in hypothalamus of GD3 synthase-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 479, 453-460. 査読有
3. T.Yamaguchi,(他6名) *Furukawa K (2016) Expression of B4GALNT1 (GM2/GD2 synthase) suppresses BACE1 degradation and modulates amyloid precursor protein processing. *Science Report* 6,34505. doi: 10.1038/srep34505. 査読有
4. Komura N, Suzuki KG, Ando H,(他8名), Furukawa K,(他4名), *Kiso M (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat Chem Biol.* 12, 402-410. 査読有

5. J.Shuting,(他6名), *K.Furukawa (2015) b-series gangliosides regulate leptin secretion from adipocytes in lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459, 189-195. 査読有
6. Y.Ohkawa,(他11名), *Furukawa K (2015) Ganglioside GD3 enhances invasiveness via Yes activation by forming a complex of GD3/PDGFR α /Yes in gliomas. *J. Biol. Chem.* 290, 16043-16058. 査読有
7. Y.Ohmi,(他4名), *K.Furukawa (2014) Ganglioside deficiency causes inflammation and neurodegeneration via the activation of complement system in the spinal cord. *J. Neuroinflamm.* 11, 61. doi: 10.1186/1742-2094-11-61. 査読有
8. D.Yao,(他10名), K.Furukawa,(他1名), *HJ. Willison (2014) Neuronal expression of GalNAc transferase is sufficient to prevent the age-related neurodegenerative phenotype of complex ganglioside deficient mice. *J. Neurosci.* 34, 880-891. 査読有

柚崎 通介 (査読有計画A02) (他7報)

1. W.Kakegawa,(他3名), K.Matsuda,(他9名), *M.Yuzaki (2015) Anterograde C1ql1 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron.* 85, 316-329. 査読有
2. YH. Takeo,(他2名), *M.Yuzaki (2015). ROR α regulates aspects of dendrite development in cerebellar Purkinje cells *in vivo*. *J.Neurosci.* 35, 12518-12534. 査読有
3. A.Ito-Ishida,(他4名), *M.Yuzaki and *S.Okabe (2012) Presynaptically released Cbln1 induces dynamic axonal structural changes by interacting with GluD2 during cerebellar synapse formation. *Neuron.* 76, 549-564. 査読有
4. J.Nishiyama,(他4名), *M.Yuzaki(2012) Selective and regulated gene expression in murine Purkinje cells by in utero electroporation. *Eur. J. Neurosci.* 36, 2867-2876. 査読有
5. T.Nomura,(他1名), S.Matsuda,(他3名), *M.Yuzaki (2012) Cerebellar long-term depression requires dephosphorylation of TARP in Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 35, 402-410. 査読有

高宮 考悟 (計画A02) (他19報)

1. S.Sha,(他2名), K.Takamiya,(他1名), K.Furukawa,(他2名),(2014) Deficits in cognitive behavior and hippocampal plasticity in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Hippocampus.* 24, 369-382. 査読有
2. J.Tsutajima, T.Kunitake, Y.Wakazono, *K.Takamiya (2013) A selective injection system into hippocampus CA1 via monitored theta oscillation. *PLoS One.* 8, e83129. 査読有
3. R.Naono-Nakayama,(他3名), K.Takamiya ,(他1名) (2013) An amino-terminal fragment of Hemokinin-1 has an inhibitory effect on pruritic processing in rats. *Neuroscience.* 259, 172-183. 査読有

A02 公募班

菅原 一幸 (公募A02) (他12報)

1. S.Mizumoto, S.Yamada, *K.Sugahara (2015) Molecular interactions between chondroitin-dermatan sulfate and growth factors/receptors/matrix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 34, 35-42. 査読有
2. G.Dick,(他5名), K.Sugahara,(他4名), *JC. F. Kwok (2013) Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type e motifs in rodent brains. *J. Biol. Chem.* 288, 27384-27395. 査読有

安藤 弘宗 (公募A02) (他14報)

1. N.Komura, K.G.N.Suzuki, H.Ando,(他8名), K.Furukawa,(他3名), *A.Kusumi, *M.Kiso (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat. Chem. Biol.* 12, 402-410. 査読有

2. M.Yamagishi,(他 5 名), *T.Yabe, *H.Ando,(他 1 名) (2015) Structure-activity relationship study of the neuritogenic potential of the glycan of starfish ganglioside LLG-3. *Mar. Drugs*. 13, 7250-7274. 査読有

金川 基 (公募 A02) (他 9 報)

1. N. Kuwabara, H.Manya, T. Yamada, H. Tateno, M.Kanagawa, (他 8 名), *T. Endo, *R. Kato (2016) Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 113, 9280-9285. 査読有
2. H.Manya, Y. Yamaguchi, M.Kanagawa, (他 7 名), *T. Endo (2016) The muscular dystrophy gene *TMEM5* encodes a ribitol β 1-4 Xylosyltransferase required for the functional glycosylation of dystroglycan. *J. Biol. Chem.* 291, 24618-24627. 査読有
3. M.Kanagawa,(他 2 名), H.Manya,(他 6 名), *Y.Wada, *T.Endo, *T.Toda. (2016) Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. *Cell Rep.* 14, 2209-2223. 査読有
4. Y.Ohtsuka, M.Kanagawa,(他 6 名), *T.Toda. (2015) Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression. *Sci. Rep.* 5, 8316. 査読有
5. M.Kanagawa,(他 5 名), A.Kuga,(他 11 名), *T.Toda (2013) Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3003-3015. 査読有
6. M.Ogawa,(他 3 名), H.Manya, M.Kanagawa,(他 1 名), K.Furukawa, *T.Okajima (2013) GTDC2 modifies O-mannosylated α -dystroglycan in the endoplasmic reticulum to generate N-acetyl-glucosamine epitopes reactive with CTD110.6 antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 88-93. 査読有

矢木 宏和 (公募 A02) (他 3 報)

1. H.Yagi,(他 4 名), *K.Kato (2016) Direct mapping of additional modifications on phosphorylated O-glycans of α -dystroglycan by mass spectrometry analysis in conjunction with knocking out of causative genes for dystroglycanopathy. *Mol. Cell Proteomics* 15, 3424-3434. 査読有
2. N.Nakagawa, H.Yagi, K.Kato,(他 1 名), *S.Oka (2015) Ectopic clustering of Cajal-Retzius and subplate cells is an initial pathological feature in Pomgnt2-knockout mice, a model of dystroglycanopathy. *Sci. Rep.* 5, Article number: 11163. 査読有
3. M.Ogawa,(他 4 名), H.Yagi, K.Kato, K.Furukawa and *T.Okajima(2015) Impaired O-linked N-Acetylglucosaminylation in the Endoplasmic Reticulum by Mutated EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase (Found in) Adams-Oliver Syndrome. *J. Biol. Chem.* 290(4), 2137-2149. 査読有
4. H.Yagi,(他 7 名), *S.Oka, and *K.Kato (2013) AGO61-dependent GlcNAc modification primes the formation of functional glycans on α -dystroglycan. *Scientific Reports*.3: Article No.3288, doi: 10.1038/srep03288. 査読有
5. H.Yagi,(他 3 名), *K.Kato (2012) Lewis X-carrying N-glycans regulate the proliferation of mouse embryonic neural stem cells via the Notch signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 24356-24364. 査読有

顧 建国 (公募 A02) (他 4 報)

1. Gu, W.,(他 10 名), Oka, S. and *Gu, J. (2015) Loss of α 1,6-fucosyltransferase decreased hippocampal long-term potentiation: implications for core fucosylation in the regulation of AMPA receptor heteromerization and cellular

signaling. *J. Biol. Chem.* 290, 17566-17575. 査読有

宮城 妙子 (公募 A02) (他 25 報)

1. M.Sumida,(他 5 名), T.Miyagi,(他 3 名), C.Sato (2015) Rapid Trimming of Cell Surface Polysialic Acid (PolySia) by Exovesicular Sialidase Triggers Release of Preexisting Surface Neurotrophin. *J. Biol. Chem.* 290, 13202-13214. 査読有
2. K.Takahashi,(他 3 名),C.Sato,(他 5 名),T.Miyagi (2012) Sialidase NEU4 hydrolyzes polysialic acids of neural cell adhesion molecules and negatively regulates neurite formation by hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 287, 14816-14826. 査読有

西原 祥子 (公募 A02) (他 15 報)

1. Kinoshita, C.Sato, T.J.Fuwa, *S.Nishihara (2017) Short stop mediates axonal compartmentalization of mucin-type core 1 glycans. 査読有
Scientific Reports, 7, 41455.
2. K.Itoh, Y.Akimoto, T.J.Fuwa, C.Sato, A.Komatsu, *S.Nishihara (2016) Mucin-type core 1 glycans regulate the localization of neuromuscular junctions and establishment of muscle cell architecture in *Drosophila*. *Dev Biol.*, 412, 114-127. 査読有
3. T.Kinoshita, (他 14 名), *S.Nishihara, *C.Sato (2014) Immuno-electron microscopy of primary cell cultures from genetically modified animals in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Microsc Microanal.* 20, 470-484. 査読有
4. Hirano K, (他 11 名), *S.Nishihara, *C.Sato: Electron microscopy of primary cell cultures in solution and correlative optical microscopy using ASEM. *Ultramicroscopy*,143, 52-66 (2014). 査読有

中山 喜明 (公募A02) (他7報)

1. Y.Nakayama, N.Nakamura,(他 1 名), M.Wakabayashi,(他 2 名), N.Itoh and *A.Kurosaka (2012) A putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase/Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 (WBSCR17) regulates lamellipodium formation and macropinocytosis. *J. Biol. Chem.* 287, 32222-32235. 査読有

川寄 敏祐 (公募 A02) (他 4 報)

1. H.Nakao, (他 2 名), H.Toyoda, N.Kawasaki, *T.Kawasaki (2017) Binding specificity of R-10G and TRA-1-60/81, and substrate specificity of keratanase II studied with chemically synthesized oligosaccharides. *Glycoconj. J* (DOI: 10.1007/s10719-017-9765-8) 査読有
2. H.Nakao, (他 3 名), H.Toyoda, (他 2 名), N.Kawasaki (他 2 名), N.Kawasaki, *T.Kawasaki (2016) Characterization of Glycoproteins Expressing Blood Group H Type 1 Epitope on Human Induced Pluripotent Stem (hiPS) Cells. *Glycoconj. J* (DOI: 10.1007/s10719-016-9710-2) 査読有
3. S.Matsumoto, (他 3 名), H.Toyoda, (他 8 名), N.Kawasaki, *T.Kawasaki, (2015) A cytotoxic antibody recognizing lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) on human induced pluripotent stem (hiPS) cells. *J Biol Chem.* 290, 20071-20085. 査読有
4. Y.Takeda-Uchimura,(他 3 名), T.Kawasaki, Y.Komatsu, *K.Kadomatsu (2015) Requirement of keratan sulfate proteoglycan phosphacan with a specific sulfation pattern for critical period plasticity in the visual cortex. *Exp. Neurol.* 145-155. 査読有
5. K.Kawabe,(他 2 名), N.Kawasaki,(他 11 名), *T.Kawasaki. (2013) A novel antibody for human induced pluripotent stem (hiPS) cells and embryonic stem (ES) cells recognizes a type of keratan sulfate lacking oversulfated structures. *Glycobiology*, 23(3), 322-336. 査読有

平林 義雄 (公募 A02)

1. AT.Guy,(他 11 名), Y.Hirabayashi, *H.Kamiguchi (2015) NEURONAL DEVELOPMENT. Glycerophospholipid

regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord. *Science*. 349(6251), 974-977. 査読有

長江 雅倫 (公募 A02) (他 5 報)

1. M.Nagae, (他 6 名), H.Manya, (他 1 名), H.Yagi, (他 4 名), *Y.Yamaguchi (2016) 3D structural analysis of Protein O-Mannosyl Kinase POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy. *Genes to Cells*. in press. 査読有
2. M.Nagae, (他 3 名), Y.Kizuka, (他 1 名), *Y.Yamaguchi (2016) Atomic visualization of a flippedback conformation of bisected glycans bound to specific lectins. *Scientific Reports*. Mar 14. 6, 22973. 査読有
3. M.Nagae, (他 5 名), Y.Hashimoto, and *Y.Yamaguchi (2014) Structural change of N-glycan exposes hydrophobic surface of human transferrin. *Glycobiology*. 24, 693-702. 査読有
4. M.Nagae, (他 4 名), C.Sato, and *Y.Yamaguchi (2013) Crystal structure of anti-polysialic acid antibody single chain Fv fragment complexed with octasialic acid: Insight into the binding preference for polysialic acid. *The Journal of Biological Chemistry*. 288(47), 33784-33796. 査読有

萬谷 博 (公募 A02) (他 12 報)

1. H.Manya, (他 1 名), M.Kanagawa, (他 7 名), *T.Endo (2016) The muscular dystrophy gene TMEM5 encodes a ribitol β 1,4-xylosyltransferase required for the functional glycosylation of dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, 291(47), 24618-24627. 査読有
2. N.Kuwabara, H.Manya, (他 2 名), M.Kanagawa, (他 9 名), *T.Endo, *R.Kato (2016) Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113 (33), 9280-9285. 査読有
3. M.Kanagawa, (他 2 名), H.Manya, (他 7 名), *Y.Wada, *T.Endo, *T.Toda. (2016) Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. *Cell Rep*. 14, 2209-222. 査読有
4. M.Xu, (他 5 名), H.Manya, (他 6 名), *T.Endo, *R.K. Koenekoop, *R.Chen (2016) Mutations in POMGNT1 cause non-syndromic retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet*. 25(8), 1479-1488. 査読有
5. N.Nakagawa, H.Manya, (他 2 名), *S.Oka (2012) Human natural killer-1 sulfotransferase (HNK-1ST)-induced sulfate-transfer regulates laminin-binding glycans on α -dystroglycan. *J. Biol. Chem*. 287(36), 30823-30832. 査読有

等 誠司 (公募 A02) (他 5 報)

1. †M.Naruse, †Y.Ishino, (他 6 名), S.Hitoshi (2016) The dorsoventral boundary of the germinal zone is a specialized niche for the generation of cortical oligodendrocytes during a restricted temporal window. *Cerebral Cortex*, 26, 2800-2810. († equal contribution) 査読有
2. M.Yamaguchi, (他 5 名), S.Hitoshi (2016) Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. *J Physiol Sci*, 66, 197-206. 査読有

井ノ口 仁一 (公募 A02) (他 15 報)

1. Yoshikawa M, (他 8 名), Inokuchi J (2015) Ganglioside GM3 is essential for the structural integrity and function of cochlear hair cells. *Hum. Mol. Genet*. 24, 2796-2807. 査読有

川内 健史 (公募 A02) (他 6 報)

1. YV. Nishimura, (他 7 名), T.Kawauchi (2014) Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development*. 141(18), 3540-3550. 査読有

坂場 武史 (公募 A02) (他 2 報)

1. *S.Kawaguchi, * T.Sakaba (2015) Control of inhibitory

synaptic outputs by low excitability of axon terminals revealed by direct recording. *Neuron*. 85, 1273-1288. 査読有

2. *M.Midorikawa, *T.Sakaba (2015) Imaging exocytosis of single synaptic vesicles at a fast CNS presynaptic terminal. *Neuron*. 88, 492-498. 査読有
3. *M.Midorikawa, (他 1 名), *T.Sakaba (2014) Developmental changes in Ca²⁺ channel subtypes regulating endocytosis at the calyx of Held. *J Physiol*. 592, 3495-3510. 査読有

木塚 康彦 (公募 A02) (他 18 報)

1. Y.Kizuka, (他 12 名), *N.Taniguchi (2016). High sensitivity and low toxicity fucose probe for glycan imaging and biomarker discovery. *Cell Chem. Biol.*, 23, 782-792. 査読有
2. Y.Kizuka, (他 4 名), *N.Taniguchi (2016) Bisecting GlcNAc modification stabilizes BACE1 protein under oxidative stress conditions. *Biochem. J*. 473(1), 21-30. 査読有
3. M.Takahashi, Y.Kizuka, (他 1 名), J.Gu, *N.Taniguchi (2016) Disease-associated glycans on cell surface proteins. *Mol. Aspects of Med.*, doi: 10.1016/j.mam.2016.04.008. 査読有

鈴木 匡 (公募 A02) (他 27 報)

1. C.Huang, Y.Harada, (他 1 名), Y.Masahara-Negishi, (他 5 名), T.Suzuki (2015) Endo- β -N-acetylglucosaminidase forms N-GlcNAc protein aggregates during ER-associated degradation in Ngly1-defective cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 112(5), 1398-1403. 査読有

総括班分担：田村 純一 (他 14 報)

1. N.Takeda and *J.Tamura (2014) Synthesis of Biotinylated Keratan Sulfate Repeating Disaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.* 78 (9) 29-37. 査読有
2. S.Nadanaka, (他 2 名), J.Tamura and *H.Kitagawa (2014) Heparan Sulfate Containing Unsubstituted Glucosamine Residues: Biosynthesis and Heparanase-Inhibitory Activity. *J. Biol. Chem*. 289, 15232-15243. 査読有
3. *J.Tamura, (他 5 名), S.Nadanaka and H.Kitagawa (2012) Synthesis and the interaction with midkine of biotinylated chondroitin sulfate tetrasaccharides. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 22, 1371-1374. 査読有

総括班分担：鈴木 健一 (他 11 報)

1. N.Kinoshita[#], K.G.N.Suzuki[#], (#equal contribution), (他 11 名) (2017) Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs. *J. Cell Biol.* in press. 査読有
2. N.Komura[#], K.G.N.Suzuki[#], H.Ando[#] (#equal contribution), (他 8 名), K.Furukawa, (他 5 名) (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nature Chem. Biol.* 12, 402-410. 査読有
3. K.G.N.Suzuki, (他 7 名) (2012) Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. *Nature Chem. Biol.* 8, 774-783. (Highlighted by News and Views in *Nature Chem. Biol.* 8, 743-744, 2012) 査読有

総括班分担：川崎 ナナ (他 6 報)

1. K.Yabuno, (他 1 名), Y.Kizuka, (他 1 名), N.Kawasaki, (他 3 名), H.Kitagawa, (他 1 名), *S.Oka (2015) A Sulfated Glycosaminoglycan Linkage Region Is a Novel Type of Human Natural Killer-1 (HNK-1) Epitope Expressed on Aggrecan in Perineuronal Nets. *PLoS One*. 10(12), e0144560. 査読有
2. Takaura D, (他 2 名), *Kawasaki N (2014) Selective glycopeptide profiling by acetone enrichment and LC/MS. *J. Proteomics*. 101, 17-30. 査読有
3. D.Takakura, (他 1 名), *N.Kawasaki (2014) An improved in gel digestion method for identification of peptides and glycopeptides by using guanidine hydrochloride. *Proteomics*. 14(2-3), 196-201. 査読有

4. J.Morise,(他4名), N.Kawasaki, H.Manya,(他5名), *S.Oka
(2014) Structural and biochemical characterization of
O-mannose-linked HNK-1 glycan expressed on phosphacan

in developing mouse brains. *Glycobiology*. 24(3), 314-324.
査読有

【学会発表】 *招待講演のみ

1. 門松 健治 ・ 7th International Conference on
Proteoglycans "Proteoglycans and neuronal network
reconstruction." October 16-20, 2011, Sydney, Australia.
2. 門松 健治 ・ 8th International Conference on
Proteoglycans "Keratan sulfate and neuronal circuit
reconstruction." August 25-29, 2013, Frankfurt, Germany.
3. 門松 健治 ・ 4th Annual Conference of COST Action
ECMNET "Role of keratan sulfate and chondroitin sulfate in
axon regeneration." Sep 30- Oct 2, 2014, Antalya, Turkey.
4. 北川 裕之 ・ Development, maintenance and
physiology of neural circuits "Involvement of
glycosaminoglycan chains in neural development and
plasticity." Apr 29-30, 2014, Paris, France.
5. 北川 裕之 ・ Fourth ECMNET Conference "Roles of
sulfated glycosaminoglycan chains in neural development."
Sep 30- Oct 2, 2014, Antalya, Turkey.
6. 北川 裕之 ・ The 8TH International Conference on
Proteoglycans "Roles of chondroitin sulfate in neural
development and plasticity." August 25-29, 2013, Frankfurt,
Germany.
7. 北川 裕之 ・ SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting
"Regulation of neuronal development by
glycosaminoglycans." Nov 16-19, 2014, Honolulu, USA.
8. 小松 由紀夫 ・ Yukio Komatsu, Regulation of visual
cortical plasticity by chondroitin and keratan sulfate
proteoglycans. International Symposium on
Glyco-Neuroscience, Jan10, 2014, 淡路夢舞台 (兵庫県淡
路市)
9. 岡 昌吾 ・ The 3rd International Symposium on
Glyco-Neuroscience, Jan 14-16, 2016, 淡路夢舞台 (兵庫県
淡路市)
10. 岡 昌吾 ・ International Symposium on
Glyco-Neuroscience, Jan 9-11, 2014, 淡路夢舞台 (兵庫県
淡路市)
11. 岡 昌吾 ・ 日蘭糖鎖科学 Joint Seminar, Oct 9-10,
2011, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
12. 岡 昌吾 ・ SECOND JOINT AUSTRIA/JAPAN
SEMINAR ON COMPARATIVE AND
DEVELOPMENTAL GLYCOBIOLOGY, Aug, 20, 2011,
Wien, Austria.
13. 吉田 秀郎 ・ ISN Forefront Symposium, Sep 23-25,
2016, Charleston, USA.
14. 吉田 秀郎 ・ PepCon 2014, Apr 25-28, 2014, Dalian,
China.
15. 吉田 秀郎 ・ PepCon 2013, Mar 26-28, 2013, Suzhou,
China.
16. 古川 鋼一 ・ 日本病理学会カンファレンス Aug
5-6, 2011, ホテルブエナビスタ (長野県松本市)
17. 古川 鋼一 ・ 第3回日蘭糖鎖科学 joint meeting 基
調講演、Oct 10-13, 2011, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
18. 古川 鋼一 ・ 14th International Congress of
Histochemistry and Cytochemistry, August 26-29, 2012,
Kyoto International Conference Center (京都府京都府)
19. 古川 鋼一 ・ GLYCO-T 2012, June 5-9, 2012,
Hannover, Germany.
20. 古川 鋼一 ・ Gordon Research Conference, Glycolipid
and Sphingolipid, Jan 12-17, 2014, CA 93001, USA.
21. 柚崎 通介 ・ 4th Annual Conference of COST Action
ECMNET, Sept 30-Oct 3, 2014, Antalya, Turkey.
22. 柚崎 通介 ・ 6th International SRC Congress, July 3-4,
2014, Rome, Italy.
23. 柚崎 通介 ・ Cold Spring Harbor Asia Conferences,
Oct 21-25, 2013, Suzhou, China.
24. 柚崎 通介 ・ Gordon Research Conference, Aug 11-16,
2013, New Hampshire, USA.
25. 柚崎 通介 ・ Gordon Research Conference, June 9-14,
2013, Les Diablerets, Switzerland.
26. 高宮 考悟 ・ International Symposium on
Glyco-Neuroscience, Jan 9-11, 2014, 淡路夢舞台 (兵庫県
淡路市)
27. 高宮 考悟 ・ The 3rd International Symposium on
Glyco-Neuroscience, Jan 14-16, 2016, 淡路夢舞台 (兵庫県
淡路市)
28. 田村 純一 ・ What could replace shark as a source of
chondroitin sulfate? J. Tamura, 1st Conference on Science
Diplomacy and Developments in Chemistry, Nov. 24, 2012,
Alexandria, Egypt. (Plenary lecture)
29. 鈴木 健一 ・ K. G. N. Suzuki, Raft organization and
function revealed by single-molecule imaging of ganglioside
probes. The 3rd International Symposium on
Glyco-Neuroscience, Jan 14-16, 2016, 淡路夢舞台 (兵庫県
淡路市)
30. 鈴木 健一 ・ K. G. N. Suzuki, Unraveling raft
organization and function by GPI-anchore receptors and
gangliosides. Super Resolution Symposium, Nov 26, 2015,
Bangalore, India.
31. 鈴木 健一 ・ K. G. N. Suzuki, The very first steps for
raft formation and function, revealed by single-molecule
imaging. Bordeaux-Kyoto Symposium, May 5-6, 2014,
Bordeaux, France.
32. 鈴木 健一 ・ K. G. N. Suzuki, The very first steps for
raft formation and function, revealed by single-molecule
imaging. Gordon Research Conference on Glycolipid and
Sphingolipid. Jan 12-17, 2014, Ventura, USA.
33. 鈴木 健一 ・ K. G. N. Suzuki, Transient GPI-anchored
protein homodimers are units for raft organization and
function. The 14th International Membrane Research Forum.
Mar 15-17, 2013, 京都大学 (京都府京都市左京区)
34. 川崎 ナナ ・ 川崎ナナ, 高倉大輔: 糖タンパク質
分析技術の開発. 日本プロテオーム学会 (2015. 7. 23,24)
熊本県熊本市
35. 武内 恒成 ・ ISN2015 International Society for
Neurochemistry 国際神経化学会 Aug 20-22, 2015, Cairns,
Australia.
36. 佐藤 ちひろ ・ Chihiro Sato. Novel regulation of
neurological active molecules by polysialic acids.
SialoGlyco 2012; September 9-12, 2012; Academia Sinica,
Taipei, Taiwan
37. 佐藤 ちひろ ・ Chihiro Sato. Structural and functional
changes of polysialic acid related with genetic alterations of
ST8SIA2 in psychiatric diseases. 23rd INTERNATIONAL
SYMPOSIUM ON GLYCOCONJUGATES, September
15-20, 2015 Split, Croatia
38. 佐藤 ちひろ ・ Chihiro Sato, Polysialic acid as an
attractive molecule. Frontiers in Sialic Acid Research
Conference -From Structural Diversity to Functional
GlycobiologyBad Lauterberg, Germany, 23-25 April 2016
39. 岡島 徹也 ・ Glycobiology Gordon Research
Conference, Mar 1-6, 2015, Lucca (Barga), Italy.
40. 神野 尚三 ・ Shozo Jinno. Decline in adult
neurogenesis during aging follows a topographic pattern in

- the mouse hippocampus. Aging-related expression changes in core protein and carbohydrate chain of aggrecan in the hippocampus and their modulation by memantine. International Symposium "Asian Aging Core for Longevity (AACL) 2006-2015, 10 years and Beyond", March 10-13, 2015 (Osaka). (招待講演) Janelia conference, November 11-14, 2012 (Ashburn, USA). (招待講演)
41. 楠 進・Kusunoki S. Anti-GQ1b antibodies; from discovery to recent research. Congress of Korean Neurological Association, Daegu, Korea, April 3, 2015
 42. 楠 進・Kusunoki S. Anti-ganglioside antibodies in inflammatory neuropathies. PNS/Inflammatory Neuropathy Consortium, June 24-27, 2012, Lantaren Venster, Rotterdam, The Netherlands
 43. 楠 進・Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in autoimmune neuropathies. 13th Surugadai International Symposium & Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute International Symposium, Tokyo, November 28, 2014
 44. 神村 圭亮・Kamimura, K. Heparan sulfate proteoglycans at the *Drosophila* neuromuscular junction. 第38回日本神経科学大会 2015年7月28日～31日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
 45. 神村 圭亮・Kamimura, K. ショウジョウバエの神経筋接合部におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割. 第34回日本糖質学会年会 2015年7月31日～2015年8月2日, 東京大学安田講堂(東京都文京区)
 46. 福田 敦夫・Fukuda, A. Maternal taurine modulates immature aspect of GABA actions involved in epileptogenesis. The 16th Annual Meeting of Infantile Seizure Society (ISS): International Symposium on Epileptic Syndromes of Early Infancy and Childhood (ISES), Cappadocia, Turkey. 6/23, 2014. (Keynote lecture)
 47. 山田 修平・Shuji Mizumoto: Travel Award: 9th International Conference on Proteoglycans and 10th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, August 23-27, 2015, Ewha Womans University, Seoul, Korea.
 48. 菅原 一幸・"Mutations in Biosynthetic Enzymes For The GAG-Protein Linkage Region of Proteoglycans" 23rd Symposium on Glycosaminoglycans: Heparin centenary Past, present and future perspectives. Villa Vigoni, Italy, Sep. 18th, 2015. Invited lecture: Kazuyuki Sugahara
 49. 菅原 一幸・Glycosaminoglycan-mimetics in Diagnosis and Therapeutics of Cancer At ""International Symposium on Chemical Biology Approach to etabolomics, Chemical Genomics and Epigenetics"" and ""Second Annual Meeting of Chemical Biology Society, India."" Invited lecture: Kazuyuki Sugahara The University of Mysore, Mysore, India Feb. 19, 2015.
 50. 菅原 一幸・"Mechanism of Glycosaminoglycan-Mediated Tumor Metastasis: Involvement of RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products)" Invited lecture: Kazuyuki Sugahara Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand (Feb. 20, 2015)
 51. 菅原 一幸・3/9, 2013 Invited lecture K. Sugahara The 20th Proteoglycan Forum, 東京医科歯科大学、東京 "Sugar signals of proteoglycans in neurobiology and tumor biology"
 52. 菅原 一幸・2013 6/30 Invited lecture: Kazuyuki Sugahara Shandon University, Jinan, China "Sugar Signals of Proteoglycans in Neurobiology and Tumor Biology"
 53. 安藤 弘宗・Ando, Hiromune: Ganglioside probes for exploring functional molecular complexes in the cell membrane. BIOL 1254, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM™), Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2015.
 54. 安藤 弘宗・Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Diverse synthesis of gangliosides for exploring functional molecular complexes in the cell membrane. SFG-JSCR Joint Meeting 2014, Satellite I: Chemical Aspects of Glycobiology, Hilton Hawaiian Village Waikiki Beach Resort, November 16-19, 2014.
 55. 安藤 弘宗・Ando, Hiromune: Ganglioside Synthesis Makes for Raft Science, Asia-Canada Glycoscience Meeting, Vancouver, Canada, May 31-June 1, 2014.
 56. 安藤 弘宗・Ando, Hiromune: Ganglioside synthesis for understanding interplays with membrane molecules. 2015 Glycoscience Symposium, Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica (Taiwan), December 7-9, 2015.
 57. 安藤 弘宗・Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Diverse synthesis of gangliosides for exploring functional molecular complexes in the cell membrane. SFG-JSCR Joint Meeting 2014, Satellite I: Chemical Aspects of Glycobiology, Hilton Hawaiian Village Waikiki Beach Resort, November 16-19, 2014.
 58. 顧 建国・顧 建国、Functional analysis of N-glycosylation and its related diseases、上海市薬理学会第十三回学術年会 (招待講演)、2012年12月、上海、中国
 59. 顧 建国・顧 建国、 α 1,6-fucosylation and its relationship with diseases、北京大学化学研究所セミナー (招待講演)、2013年6月、北京、中国
 60. 顧 建国・顧 建国、N-glycosylation in cancer cells, 2015年南京腫瘍生物学診断治療国際研討会 (招待講演)、2015年10月、南京、中国
 61. 顧 建国・顧 建国、Roles for glycans in cell adhesion and migration、7th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG) (招待講演)、2015年11月12-15日、宮城
 62. 宮城 妙子・Sialidase in tumor progression, Sialo-Glyco2012, Sep 9-12, 2012, Taipei, Taiwan (招待講演)
 63. 宮城 妙子・Phosphatidic acid-mediated activation of sialidase NEU3 enhances signaling for cell migration Sialo-Glyco2014, Sep 7-10, Gold Coast, Australia. (招待講演)
 64. 宮城 妙子・Sialidase research targeted to cancer diagnosis and therapy, Frontiers in Sialic Acid Conference, Apr 23-25, 2016, Bad Lauterberg, Germany (招待講演)
 65. 西原 祥子・Nishihara S: LacdiNAc structure regulates LIF/STAT3 signaling and is required for self-renewal of naïve state pluripotent stem cells. The 8th International Symposium on Glycosyltransferases, Jun 5-9, 2012, Hannover, Germany (招待講演)
 66. 西原 祥子・Nishihara S: Roles of glycans in the pluripotent stem cells. The 3rd Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology, at Wako (Japan), July (7/3), 2013 (招待講演) (埼玉県和光市)
 67. 西原 祥子・Nishihara S: Glycan structures regulate the states of pluripotent stem cells. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, at Honolulu, USA, November 16-19, 2014 (招待講演)
 68. 西原 祥子・Nishihara S, Miura T, Hamaguchi S: Effects of low-temperature atmospheric-pressure plasma irradiation on mouse embryonic stem cells.

- 5th International Conference on Advanced Plasma Technologies, at Zrece, Slovenia, February 28th-March 3rd, 2016 (招待講演)
69. 西原 祥子 ・ Nishihara S: Atmospheric-pressure plasma irradiation on embryonic stem cells: signals and differentiation. 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6), at Bratislava, Slovakia, September 4-9, 2016 (招待講演)
 70. 川崎 敏祐 ・ 招待講演 Toshisuke Kawasaki, Hiromi Nakao, Kenji Kawabata, Hidenao Toyoda, Nobuko Kawasaki (2016) Glycan Specific Marker Antibodies for Human iPS/ES Cells: Binding Specificity and Biological Significance Glycoscience Japan - The Netherlands Joint Seminar 2016, April 19-22, 2016, Leiden, The Netherlands.
 71. 萬谷 博 ・ 招待講演 萬谷博: O-マンノース型糖鎖研究の最近の動向. 第32回日本糖質学会年会ワークショップ「O-マンノース型糖鎖フロンティア」, 大阪国際交流センター (大阪市天王寺区), 2013.8.5-7
 72. 萬谷 博 ・ 招待講演 萬谷博: 老化関連分子 klotho とタンパク質分解. 第35回日本基礎老化学会シンポジウム「老化とタンパク質分解の接点-分解系を亢進すれば老化制御も可能か?」, 東京都健康長寿医療センター研究所 (東京都板橋区), 2013.12.14
 73. 萬谷 博 ・ 招待講演 萬谷博、赤阪-萬谷啓子、遠藤玉夫:アルツハイマー病患者の脳における糖転移酵素の発現解析. 第33回日本糖質学会年会ワークショップ「認知症と糖鎖」, 名古屋大学豊田講堂 (愛知県名古屋市), 2014.8.10-12
 74. 萬谷 博 ・ 招待講演 萬谷博: O-マンノース型糖鎖生合成機構の解析. 第34回日本糖質学会年会「神経」, 東京大学安田講堂 (東京都文京区), 2015.7.31-8.2
 75. 萬谷 博 ・ 招待講演 萬谷博: O-マンノース型糖鎖の生合成と筋ジストロフィー症. 第88回日本生化学会大会(BMB2015), 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 2015.12.1-4
 76. 井ノ口 仁一 ・ Inokuchi J. Control of Homeostatic and Pathogenic Balance in Adipose Tissue by Ganglioside GM3. 2015 Annual meeting of Consorcium for Functional Glycomics Sanfrancisco, USA December 1st-5th, 2015
 77. 井ノ口 仁一 ・ Inokuchi J. Control of Homeostatic and Pathogenic Balance in Adipose Tissue by Ganglioside GM3; Development of Membrane Microdomain Ortho-Signaling Therapy. Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation & Related Diseases Budapest, Hungary July 12 -15, 2015
 78. 井ノ口 仁一 ・ Inokuchi J. Lipid Membranes and Insulin Signaling. ISSFAL 2014 (International Society for the Study of Fatty Acid and Lipids) Stockholm, Sweden June 28-July 2, 2014
 79. 井ノ口 仁一 ・ Nagafuku M., Sato T., Sato S., Shimizu K., Taira T., Inokuchi J. Control of Homeostatic and Pathogenic Balance in Adipose Tissue by Ganglioside GM3. 6th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology conference., Hyderabad, India December 9th-12th, 2014
 80. 井ノ口 仁一 ・ Inokuchi J. Ganglioside GM3 is essential for the structural integrity and function of cochlear hair cells. SFG-JSCR Joint meeting Satellite Symposium II Glycans in Neuroscience. Hawaii, USA Nov. 2014
 81. 川内 健史 ・ Takeshi Kawauchi “Molecular and cellular mechanisms for cortical neuronal migration” The 7th Research Conference of Developmental Neurobiologists in South Korea, Chuncheon, Korea. December 18-19, 2015.
 82. 坂場 武史 ・ 招待講演 Sakaba T, “Presynaptic recordings from an inhibitory terminal.” Gordon Research Conference “Cell Biology of the Neuron”, Waterville Valley, NH, USA, 2014.6
 83. 坂場 武史 ・ 招待講演 Sakaba T, “Physiology of axon and axon terminals.” Chinese Neuroscience Society meeting, Wuzhen, China, 2015.9.20-23.
 84. 木塚 康彦 ・ 木塚康彦、北爪しのぶ、谷口直之、 “アルツハイマー病を促進させるバイセクト糖鎖”. 第89回日本薬理学会年会. 2016. 3/9-11. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 85. 木塚 康彦 ・ 木塚康彦、北爪しのぶ、中の三弥子、西道隆臣、橋本康弘、遠藤玉夫、谷口直之. “BACE1のbisecting GlcNAc修飾によるアルツハイマー病の発症メカニズム”. 第88回日本生化学会大会 第38回日本分子生物学会年会 合同大会. 2015. 12/1-4. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
 86. 鈴木 匡 ・ Yoichiro Harada BBA General Subjects Best Poster Prize (Society for Glycobiology & Japanese Society of Carbohydrate Research 2014 Joint Annual Meeting, Hawaii, USA) Nov 16-19, 2014.
 87. 鈴木 匡 ・ Tadashi Suzuki Story of the cytoplasmic peptide:N-glycanase -basic science meets a human genetic disorder. 25th Joint Glycobiology Meeting at Ghent (Belgium), 2014年9月16日 (Keynote Lecture)
 88. 鈴木 匡 ・ Tadashi Suzuki The cytoplasmic PNGase (NGLY1): a 20-plus year scientific journey encounters a human genetic disorder. NGLY1 special session at Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research at Honolulu, HI, 2014年11月18日 (Invited Lecture)
 89. 鈴木 匡 ・ Tadashi Suzuki Story of the cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase; Ngly1) - basic science encounters human genetic disorder. GlycoCom at Banff, Canada 2015年5月5日 (Invited Lecture)
 90. 鈴木 匡 ・ Tadashi Suzuki ENGase as a potential drug target for NGLY1-deficiency. 7th Annual Rare Disease Day Symposium, San Diego, CA 2016年2月27日 (Invited Lecture)
- 【図書】**
1. K.Kadomatsu (2015) Glycosaminoglycans: Key Regulator for Recovery from Neuronal Injuries Glycoscience: Biology and Medicine (Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G.W., Seeberger, P.H., Wong, C.-H.) Springer . 1569, 505-510.
 2. K.Kamimura and *N.Maeda (2015) Heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila melanogaster* Glycoscience: Biology and Medicine Naoyuki Taniguchi et al (Eds.), Springer, New York. 1569, 581-587.
 3. 神村圭亮・*前田信明 (2015) シナプス形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能 - ショウジョウバエ神経筋接合部を中心に - **生化学** 87, 91, 467-470.
 4. 藤川顕寛, 新谷隆史, *野田昌晴 (2015) 創薬標的としての受容体型プロテインチロシンホスファターゼ: その生理的役割とシグナリング機構 **生化学** 87, 154, 539-546.
 5. 矢木宏和, 加藤晃一 (2015) 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック〜創薬・医療から食品開発まで〜 (秋吉一成, 津本浩平, 加藤晃一, 鷹羽武史, 深瀬浩一, 古川鋼一編) エヌ・ティー・エス, 678, pp.243-249 HPLC マッピング法による糖鎖プロファイリング
 6. 川崎敏祐・川崎伸子・中尾広美・松本尚悟・古江一楠田美保・豊田英尚 (2013) 実験医学 増刊 Vol.31 No.10 第三の生命鎖 糖鎖の機能と疾患〜がん、糖尿病、筋ジストロフィー発症との関わりからマーカー・合成法の開発、技術革新まで「新規 iPS/ES マーカー抗体とその応

- 用」羊土社, 228, 129–133.
7. N.Sasaki,*S.Nishihara (2012) Gene silencing in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol., Proteoglycans*, edited by R.Françoise, Springer, 836, Part I, Chapter 4, 355, 53-61.
 8. *S.Nishihara (2012) Accelerated neural differentiation of human induced pluripotent stem cells using chlorate treatment. *Stem cells and cancer stem cells - Therapeutic applications in disease and injury*, edited by M.A.Hayat, Springer, 7, Part 4, Chapter 24, 269, 249-257.
 9. *S.Nishihara (2014) Self-renewal of naïve state mouse embryonic stem cells: role of LacdiNAc in LIF/STAT signaling. *Stem cells and cancer stem cells - Therapeutic applications in disease and injury*, edited by M.A.Hayat., Springer, 11, Part 1, Chapter 4, 263, 41-50.
 10. *S.Nishihara (2014) CMP-sialic acid transporter (CST) (SLC35A1). *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (2nd edition) edited by N.Taniguchi, Springer, 3, Section XIV, Chapter 121, 1707, 1369-1378.
 11. *S.Nishihara (2014) UDP-N-acetylglucosamine/UDP-glucose /GDP-mannose transporter (HFRC1) (SLC35D2). *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (2nd edition), edited by N.Taniguchi, Springer, 3, Section XIV, Chapter 125, 1707, 1413-1422.
 12. *S.Nishihara (2014) Adenosine 3' -phospho 5' -phosphosulfate transporter 1,2 (PAPST1,2)(SLC35B2,3). *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (2nd edition), edited by N.Taniguchi, Springer, 3, Section XIV, Chapter 122, 1707, 1379-1392.
 13. T.J.Fuwa, *S.Nishihara (2015) Functional analysis of glycans using *Drosophila* mutants and RNAi. *Glycoscience: Biology and Medicine*, edited by N.Taniguchi et al., Springer, 2, Part IX, Chapter 107, 1569, 891-900.
 14. *S.Nishihara (2015) Members of the nucleotide-sugar transporter family and their functions. *Glycoscience: Biology and Medicine*, edited by N.Taniguchi et al., Springer, 2, Part XIII, Chapter 154, 1569, 1253-1266.
 15. *S.Nishihara (2015) Glycan functions and signals in embryonic stem cells. *Glycoscience: Biology and Medicine*, edited by N.Taniguchi et al., Springer, 2, Part XV, Chapter 180, 1569, 1465-1473.

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

産業財産権の名称：ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤

発 明 者 名：戸田 達史、小林 千浩、金川 基、
遠藤 玉夫、萬谷 博、和田 芳直、田尻 道子

権 利 者 名：国立大学法人神戸大学
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター
地方独立行政法人大阪府立病院機構
戸田 達史、小林 千浩、金川 基、
遠藤 玉夫、萬谷 博、和田 芳直、田尻 道子

産業財産権の種類：特許権

番 号：特願 2016-160390

出 願 年 月 日：2016 年 8 月 18 日

取 得 年 月：出願

領域活動

<領域班会議>

平成 23 年度

9 月 27 日 第 1 回領域班会議 (名古屋大学東山キャンパス ES 総合館)

2 月 17-18 日 第 2 回領域班会議 (淡路島夢舞台国際会議場)

平成 24 年度

7 月 25-27 日 第 3 回領域班会議 (仙台国際センター)

1 月 15-17 日 第 4 回領域班会議 (宮崎青島パームビーチホテル)

平成 25 年度

7 月 23-25 日 第 5 回領域班会議 (滋賀県・ラフォーレ琵琶湖)

1 月 9-11 日 第 6 回領域班会議 (淡路島夢舞台国際会議場)

平成 26 年度

5 月 25-27 日 第 7 回領域班会議 (ヤマハリゾートつま恋)

11 月 16 日 第 8 回領域班会議 (ヒルトン・ハワイアン・ビレッジ・ワイキキ・ビーチ・リゾート)

平成 27 年度

6 月 25-27 日 第 9 回領域班会議 (とりぎん文化会館)

1 月 14-16 日 第 10 回領域班会議 (淡路島夢舞台国際会議場)

平成 28 年度

3 月 3-4 日 新学術領域「神経糖鎖生物学」最終シンポジウム (名古屋 JP タワー)

<国内シンポジウム>

平成 23 年度

9 月 21-24 日 第 84 回日本生化学会 (国立京都国際会館); 11 月 29-30 日 第一回軸索再生連絡会議 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)

11 月 24-25 日 第 9 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (名古屋大学豊田講堂)

平成 24 年度

7 月 25-27 日 包括脳ネットワーク合同シンポジウム (仙台国際センター)

12 月 14-16 日 第 85 回日本生化学会 (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)

平成 25 年度

8 月 29 日-9 月 1 日 包括脳ネットワーク合同シンポジウム (名古屋国際会議場)

9 月 11-13 日 第 86 回日本生化学会 (パシフィコ横浜)

平成 26 年度

10 月 15-18 日 第 87 回日本生化学会大会 (国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都)

平成 27 年度

7 月 28-31 日 第 38 回日本神経科学大会 (神戸国際会議場、神戸国際展示場)

7 月 31 日-8 月 2 日 第 34 回日本糖質学会 (東京大学安田講堂)

10 月 19-20 日 第 13 回糖質科学コンソーシアムシンポジウム (愛知県産業労働センター「ウインクあいち」)

12 月 1-4 日 第 88 回日本生化学会 (神戸国際会議場、神戸国際展示場)

<国際シンポジウム>

平成 23 年度

10 月 9-10 日 日蘭ジョイントセミナー (名古屋)

10 月 16-20 日 7th International Conference on Proteoglycans (豪州・シドニー)

平成 24 年度

9 月 18-21 日 第 35 回日本神経科学大会 (名古屋国際会議場)

11 月 17-18 日 第 2 回軸索再生会議 (京都大学 杉浦地域医療研究センター)

平成 25 年度

8 月 25-29 日 8th International Conference on Proteoglycans (独・フランクフルト)

1 月 9-11 日 第 1 回本領域国際シンポジウム (淡路島夢舞台国際会議場)



平成 26 年度

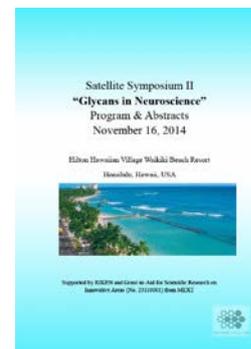
9 月 29 日-10 月 3 日 4th Annual Conference of COST Action ECMNET (トルコ・アンタルヤ)

11 月 16 日 Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research Satellite Symposium II (米・ハワイ)

平成 27 年度

7 月 28-31 日 第 38 回日本神経科学大会 (神戸国際会議場、神戸国際展示場)

1 月 14-16 日 第 2 回本領域国際シンポジウム (淡路夢舞台国際会議場)



<アウトリーチ活動>

多くのアウトリーチ活動のうちの一部を例として挙げる。

平成 23 年度 門松健治・北川裕之：脳の柔らかさの話 平成 24 年 3 月 23 日 名古屋大学 一般入場者 40 名が参加

平成 24 年度 岡 昌吾 糖鎖って何 (出雲高校生に対して講義と実習) 平成 24 年 10 月 10 日 京都大学医学部 出雲高校 1 年生 80 名が参加

平成 25 年度 吉田秀郎 京都府立亀岡高校 1 年生研修 平成 25 年 4 月 9 日 京都府立亀岡高校 京都府立亀岡高校 1 年生 33 名が参加

平成 26 年度 柚崎 通介 スーパーサイエンスハイスクール「神経科学の紹介」 平成 26 年 8 月 6 日 パシフィコ横浜 SSH 指定校 204 校、海外招へい校 23 校の代表生徒・教員及び一般入場者約 5000 名が参加

平成 27 年度 萬谷 博 サイエンスカフェ「夏休み研究体験～集まれ！未来の科学者たち」 平成 27 年 8 月 7 日 東京都健康長寿医療センター 板橋区の小・中学生が参加

<ニュースレター>

領域外の広報としての意味を込めて、毎年「ニュースレター」を作成した。領域内の会議の際にも配布し、領域参加メンバー間の情報収集・交流に役立てた。最新の研究成果紹介以外に、研究スタイル、苦労話やブレイクスルーの振り返り、受賞など、多様な人材の集う学術領域の潤滑剤として機能した。

<領域内より出版した特集号>

Experimental Neurology

ELSEVIER A Journal of Neuroscience Research Volume 273, Part B December 2015

Introduction to glycol-neuroscience

Hiroyuki Kamiguchi and Kenji Kadomatsu

The role of extracellular matrix in spinal cord development

Stefan Wiese and Andreas Faissner

“GAG-ing with the neuron”: The role of glycosaminoglycan patterning in the central nervous system

Patrice D. Smith, Vivien J. Coulson-Thomas, Simona Foscari, Jessica C.F. Kwok, and James W. Fawcett

Sugar-dependent modulation of neuronal development, regeneration, and plasticity by chondroitin sulfate proteoglycans

Gregory M. Miller and Linda C. Hsieh-Wilson

Involvement of chondroitin 6- sulfation in temporal lobe epilepsy

Noriko Yutsudo and Hiroshi Kitagawa

The hyaluronan and proteoglycan link proteins: Organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity

Toshitaka Oohashi, Midori Edamatsu, Yoko Bekku, and Daniela Carulli

Requirement of keratan sulfate proteoglycan phosphacan with a specific sulfation pattern for critical period plasticity in the visual cortex

Yoshiko Takeda-Uchimura, Kenji Uchimura, Taketoshi Sugimura, Yuchio Yanagawa, Toshisuke Kawasaki, Yukio Komatsu, and Kenji kadomatsu

Heparin/heparan sulfates bind to and modulate neuronal L-type (Cav1.2) voltage-dependent Ca^{2+} channels

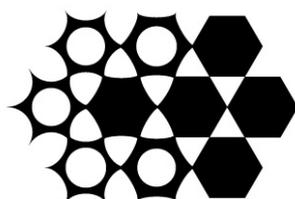
Gianpiero Garau, Paola Magotti, Martin Heine, Svetlana Korotchenko, Patricia Marie-Jeanne Lievens, Vladimir Berezin, and Alexander Dityatev

Intracellular and extracellular *O*-linked *N*-acetylglucosamine in the nervous system

Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Kazuo Kamemura, and Tetsuya Okajima

<領域ホームページ>

領域ホームページ (<http://shinkei-tosa.net/>) を開設し、研究成果、学術活動（シンポジウム、国際会議、研究会、書籍など）、技術・リソース支援、アウトリーチ活動、人材募集などを公開した。これと連動してメンバー登録した研究者には新着情報・重要情報をメールマガジンで配信した。本ホームページの班員の項からは各研究者の独自のホームページへのリンクを張り、領域外との融合研究の促進に繋げた。



神経 × 糖鎖

今、新しい時代が始まる。