

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15090

研究課題名(和文)特徴的N型糖鎖付加によるAMPA受容体合調節を介した神経可塑性の制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of neuronal plasticity through AMPA receptor association by characteristic N-glycans

研究代表者

森瀬 譲二 (Morise, Jyoji)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60755669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：四量体で機能するAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA)は、神経細胞シナプス領域に集積し速い興奮性伝達をもたらすイオン透過型チャネルである。これまでにAMPAの主要サブユニットGluA1上の糖鎖構造解析を行い、複数のN型糖鎖付加部位で未成熟な糖鎖(高マンノース型糖鎖)が存在すること、加えて特定のN型糖鎖付加部位では一定の割合で糖鎖付加が成されていないことを見出してきた。一方で、特徴的な糖鎖付加が四量体形成能へどのように影響するかは分かっていなかった。本研究の目的は、AMPA上の特徴的糖鎖付加の機能的意義を生細胞膜上で解析し、神経可塑性への影響を明らかにすることである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMPAは記憶学習形成の基盤となる神経可塑性において中心的役割を担うことから、そのチャネル形成調節機構の解明は神経科学分野での重要課題の1つとなっている。本研究成果は四量体形成における糖鎖の重要性を示すものであり、その学術的意義は高いと考える。また、創薬においてAMPAはてんかんや統合失調症などの標的分子として注目されており、事実拮抗薬等が近年研究開発されている。本研究はチャネル形成能を糖鎖が制御することを示すものであり、AMPA上の糖鎖が新たな創薬ターゲットとなることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：AMPA-type glutamate receptor (AMPA) is an ionotropic channel that accumulates in neuronal synaptic regions and provides rapid excitatory transmission. Until now, I analyzed the glycan structure on GluA1, the major subunit of AMPA, and found that the immature glycans (high-mannose type glycan) existed at several N-glycosylation sites and also the specific N-glycosylation site was not glycosylated at a constant rate. Meanwhile, it was still unknown how the characteristic N-glycosylation on AMPA could affect the ability of tetramer formation. The purpose of this study is to analyze the functional significance of characteristic N-glycosylation on AMPA on living cell membranes and clarify the influence on neuronal plasticity.

研究分野：神経糖鎖生物学

キーワード：AMPA型グルタミン酸受容体 N型糖鎖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) は、4 つのサブユニット (GluA1, GluA2, GluA3, GluA4) の組み合わせから成るホモまたはヘテロ四量体として機能し、神経細胞のシナプス領域において速い興奮性伝達をもたらすイオン透過型チャネルである。シナプス領域での受容体数に従い伝達効率が変化することから、その膜表面での受容体数制御機構や、単量体から四量体への会合制御機構が重要な課題となる。私はこれまでに、特徴的な 3 糖構造を示す Human Natural Killer-1 (HNK-1) 糖鎖 (HSO<sub>3</sub>-3GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAc-) が GluA2 上の特定の N 型糖鎖付加部位に発現すること、神経接着分子として知られる N-cadherin との相互作用を増強させること、さらにその相互作用が AMPAR の細胞膜表面発現量を維持することを見出した (PLoS One. 10, e0135644, 2015)。事実、HNK-1 糖鎖を欠失させたマウスでは未成熟なスパインの増加とそれに伴う長期増強の減弱ならびに記憶学習能力の低下が観察されており、特定の糖鎖が神経細胞の可塑的变化に重要であることを明らかにしてきた (Biochim. Biophys. Acta. 1861, 2455-2461, 2017)。加えて、N 型糖鎖のコアフコースを欠失させたマウスでは、その脳内で AMPAR サブユニットのヘテロの会合が亢進していることを見出し、HNK-1 糖鎖欠失マウスと同様に長期増強の減弱といった神経機能異常が観察されることを明らかにしてきた (J. Biol. Chem. 290, 17566-17575, 2015)。このように AMPAR 上の N 型糖鎖が膜表面での受容体数および四量体形成を制御する上で重要な因子と考えられるものの、これまでどの N 型糖鎖が機能的であるかについては詳細に分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究を進める上ではじめに、AMPA の主要サブユニットの一つである GluA1 を 2 週齢のマウス脳膜画分より精製し、液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC/MS) による糖鎖構造解析を行った。細胞膜表面へ輸送される膜タンパク質では通常、未成熟型糖鎖が小胞体内で付加され、ゴルジ体内で複合型糖鎖へとプロセッシングされることが知られる。ところが LC/MS 解析により GluA1 における 6 箇所の糖鎖付加部位 (N63, N249, N257, N363, N401, N406) のうち N63, N249, N257 位に豊富に未成熟型糖鎖が存在し、N401 位においては GluA1 の約 70% で糖鎖付加が無いまま膜表面に発現することを見出した。未成熟型糖鎖を有する分子が神経細胞膜表面上に発現することは報告されてきたものの (eLife 5, e20609, 2016)、その機能については詳細に調べられていなかった。また、N401 位における糖鎖付加の有無が、どのような生理的意義を有するか不明であった。そこで本研究ではこのような特徴的な糖鎖付加が AMPAR の四量体形成能に影響を与えるかを調べるために、岐阜大学鈴木健一博士の研究協力のもと一分子イメージング法を導入し生細胞膜上での解析を目指した。加えて、特定の糖鎖による神経可塑性への影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 一分子イメージング法は、全反射顕微鏡を用いて生細胞膜表面上の一分子の会合の瞬間をリアルタイムに可視化できる手法である。特に鈴木健一博士が有する手法では膜表面に発現させた目的分子に対し 100% の蛍光ラベル効率で導入することが可能なため、全ての一分子の時空間的なダイナミクスを観察でき、一分子同士の会合の時間を計測・定量化できることが特色である。そこで本方法を用いて AMPAR 上のどの N 型糖鎖がサブユニット同士の会合に重要であるかを調べるために、HEK293 細胞 (AMPA を内在的に発現していない細胞) に各糖鎖付加部位変異体を導入し、それぞれの会合時間を調べた。ただし GluA1 を HEK293 細胞に発現させると、多くは複合型糖鎖として膜表面に発現しており、神経細胞での付加パターンと異なることが分かっている。一方で AMPAR 補助サブユニットの一つである Cornichon-2 (CNIH-2) は、AMPA サブユニット上の一部の糖鎖付加部位に未成熟型糖鎖を維持させて細胞膜表面に発現させる機能があることが知られる (PLoS one. 7, e30681, 2012)。そこで未成熟型糖鎖の意義を調べるために、CNIH-2 の安定発現株を作製し、その細胞膜上での会合時間も同様に計測した。さらに前述の糖鎖構造解析において、特徴的な糖鎖構造として知られるコアフコース型糖鎖も見つかった。そこで、コアフコース転移酵素である Fut8 を欠損させた HEK293 細胞でも同様に会合時間の計測も目指した。

(2) 神経細胞上での AMPAR 上の特定の糖鎖付加部位を欠損させて解析する方法は難しく、なぜなら内在的に多く AMPAR が発現しているため、欠損変異体の評価を正しくできない可能性が考えられるからである。そこで N 型糖鎖切断酵素である N-glycosidase F (PNGase F) 処理を培地中に添加することで、内在性 AMPAR 上の特定の糖鎖が切断されるか試みた。そしてその際の神経細胞の形態およびスパインの数も同時に計測することで、神経可塑性への影響について調べた。

### 4. 研究成果

(1) GluA1 の 6 つの糖鎖付加部位変異体のなかでも、N401 位変異体ではホモ二量体の会合能が著しく低下することが分かった (野生型: 約 170 ミリ秒、N401 位変異体: 約 100 ミリ秒)。GluA1 の細胞外領域である ligand binding domain (LBD) の上流に位置する N-terminal domain (NTD) は、会合に重要なドメインであることが知られる (Trends Neurosci. 30, 407-416, 2007)。そこで NTD を欠損させた変異体を作製し、HEK293 細胞膜表面上でそのホモ二量体会合時間を計測

すると、約 100 ミリ秒で、予想通り野生型と比べて有意に会合時間が低下していた。ここで N401 位変異体は NTD 欠損変異体とほぼ同程度の会合時間であったことから、N401 位の糖鎖は NTD の会合能を調節する糖鎖であることが示唆された。特に N401 位は NTD と LBD の間の linker 部分に位置することから、その調節を構造的に支持する可能性は十分に考えられる。また、前述の通り N401 位では一定の割合で糖鎖付加が見られなかった。従って本研究成果により、生理的条件下における N401 位の糖鎖の有無が、GluA1 の会合を調節する上で重要であることが予想された。

CNIH-2 安定発現株上で GluA1、GluA2 のホモ二量体形成時間を調べると、野生型と同程度の結果だった。すなわち当初の予想に反し、GluA1 上の未成熟型糖鎖は四量体形成能への影響は特に無いことが示唆された。一方で、Fut8 欠損 HEK293 細胞膜上で解析すると、有意に二量体形成時間が減弱した。コアフコース型糖鎖は N401、N406 位の N 型糖鎖上に存在すること、両部位は linker 部分に存在することから、この特徴的な糖鎖付加もまた NTD の会合能を調節する上で重要な因子であることが示唆された。

(2) はじめに HEK293 細胞に GluA2 野生型および各糖鎖付加部位欠損変異体(GluA2 の糖鎖付加部位; N256, N370, N406, N413)を発現させ、PNGase F を培地中に添加した。すると、細胞膜表面上の GluA2N406 位の N 型糖鎖のみが切断されていた。これは立体構造上 N406 位の糖鎖にのみアクセシブルであると考えられるが、逆に言えば、PNGase F 添加により N406 位の欠損変異体を擬似的に創り出すことができると考えられる。そして海馬初代神経細胞に対して PNGase F の培地添加を行ったところ、細胞膜表面上の GluA2 は分子量の低下を示した。すなわち特定の糖鎖が切断されていると考えられ、それが N406 位の N 型糖鎖である可能性が高い。この条件において海馬初代神経細胞の形態的観察を行ったところ、樹状突起の分岐数などには影響が見られなかったものの、スパイン数(PSD95 陽性クラスターの数)を計測すると、未添加と比べて減少傾向にあった。従って、GluA2 上の特定の糖鎖がシナプス可塑性に影響を及ぼすことが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件) 全て査読あり

Nakamura A, Morise J, Yabuno-Nakagawa K, Hashimoto Y, Takematsu H, Oka S. Site-specific HNK-1 epitope on alternatively spliced fibronectin type-III repeats in tenascin-C promotes neurite outgrowth of hippocampal neurons through contactin-1. *PLoS One*. 14, e0210193 (2019)  
doi: 10.1371/journal.pone.0210193

Kandel MB, Yamamoto S, Midorikawa R, Morise J, Wakazono Y, Oka S, Takamiya K. N-glycosylation of the AMPA-type glutamate receptor regulates cell surface expression and tetramer formation affecting channel function. *J. Neurochem*. 147, 730-747. (2018)  
doi: 10.1111/jnc.14565

Morise J, Takematsu H, Oka S. The role of human natural killer-1 (HNK-1) carbohydrate in neuronal plasticity and disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1861, 2455-2461. (2017)  
doi: 10.1016/j.bbagen.2017.06.025

[学会発表](計 10 件)

Jyoji Morise, Kenichi G.N. Suzuki, Ayaka Kitagawa, Yoshihiko Wakazono, Kogo Takamiya, Taka A. Tsunoyama, Hiromu Takematsu, Akihiro Kusumi, and Shogo Oka. Monomers of AMPA-type glutamate receptor subunits diffuse in and out of spines; unraveling by single-molecule tracking. BPS19 63rd Annual Meeting of the Biophysical Society, 2019年3月6日、ボルチモア (アメリカ)

Susumu Kusunoki, Taro Matsui, Yukihiro Hamada, Motoi Kuwahara, Jyoji Morise, and Oka Shogo. Variability of the Binding Specificity of IgM M-Proteins in Anti-MAG Neuropathy; Possible Clinical Relevance. 143rd Annual Meeting of the American Neurological Association, 2018年10月21日、アトランタ (アメリカ)

森瀬 譲二、中村 綾沙、竹松 弘、岡 昌吾. HNK-1 糖鎖は Tenascin-C と Contactin-1 を介した神経軸索伸長を促進させる. 第 37 回日本糖質学会年会、2018年8月28日、仙台国際センター (仙台)

北野 仁望、森瀬 譲二、岡 昌吾. 糖尿病性腎症に伴う腎臓内の非硫酸化型 HNK-1 糖鎖発現変化の解析. 第 58 回日本臨床化学学会年次学術集会、2018年8月25日、名古屋国際会議場 (名古屋)

Susumu Kusunoki, Taro Matsui, Yukihiro Hamada, Motoi Kuwahara, Jyoji Morise, and Oka Shogo. Temporal variability of the binding specificity of IgM M-proteins in anti-MAG neuropathy. Peripheral Nerve Society annual meeting 2018、2018年7月24日、ボルチモア (アメリカ)

森瀬 譲二、鈴木 健一、北川 英佳、楠見 明弘、竹松 弘、岡 昌吾. 神経細胞膜表面上で AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットは単量体で拡散し、一過的に複合体を形成する. 第 65 回日本生化学会近畿支部、2018年5月26日、兵庫医科大学 (兵庫)

北野 仁望、森瀬 譲二、岡 昌吾. ストレプトゾトシン誘導性腎機能障害マウスにおける非硫酸化型 HNK-1 糖鎖の発現解析. 第 57 回日本臨床化学会年次学術集会、2017年10月8日、北海道大学 (札幌)

松井 太郎、濱田 征宏、桑原 基、森瀬 譲二、岡 昌吾、楠 進. 抗 MAG 抗体ニューロパチーにおける抗体 affinity の継時的変化と臨床経過の比較. 第 29 回日本神経免疫学会学術集会、2017年10月7日、札幌市教育文化会館 (札幌)

森瀬 譲二、鈴木 健一、山本 采季、北川 英佳、高倉 大輔、川崎 ナナ、楠見 明弘、竹松 弘、岡 昌吾. N 型糖鎖による AMPA 型グルタミン酸受容体の機能調節機構の解析. 第 36 回日本糖質学会年会、2017年7月19日、旭川市民文化会館 (旭川)

森瀬 譲二、鈴木 健一、北川 英佳、山本 采季、竹内 祐介、楠見 明弘、竹松 弘、岡 昌吾. N 型糖鎖欠損体による AMPA 型グルタミン酸受容体の機能解析. 第 18 回関西グライコサイエンスフォーラム、2017年5月13日、京都大学 (京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://oka-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 健一

ローマ字氏名：SUZUKI, Kenichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。