

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06130

研究課題名(和文)糖鎖が生み出すペリニューロナルネットの多様性と神経可塑性における機能の解明

研究課題名(英文)Structural diversity of perineuronal nets and its functions in neural plasticity

研究代表者

宮田 真路 (Miyata, Shinji)

東京農工大学・農学部・准教授

研究者番号：60533792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の細胞外マトリクスは、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンやヒアルロン酸といった糖鎖に富む特徴を示す。特定の神経細胞周囲にはペリニューロナルネット(PNN)と呼ばれる特徴的な細胞外マトリクス構造が形成される。PNNは不溶性の凝集体であり、神経可塑性の制御に関わる。本研究では、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン上の糖鎖構造の違いにより、PNNに多様性が生じることを明らかにした。さらに、組織サンプルから微量のヒアルロン酸を単離し、その分子量を解析する手法を確立した。この方法を用いて、PNNを構成する凝集性のヒアルロン酸は、可溶性のヒアルロン酸に比べて分子量が高いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳体積の約20%は、非細胞成分である細胞外マトリクスにより満たされる。細胞外マトリクスは、神経細胞の周囲に特殊な環境を形成し、脳機能において重要な役割を果たす。脳には、ペリニューロナルネットと呼ばれる特徴的な細胞外マトリクス構造が形成される。ペリニューロナルネットは、不溶性の凝集体であり、神経可塑性の制御に関わる。本研究では、脳の細胞外マトリクスに着目し、その構造を機能を解析した。その結果、ペリニューロナルネットを構成する糖鎖構造の違いにより、様々は種類をペリニューロナルネットが存在することを明らかにした。ペリニューロナルネットの多様性により脳機能が制御される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The extracellular matrix of the central nervous system is rich in glycan chains such as chondroitin sulfate proteoglycans and hyaluronan. Characteristic extracellular matrix structures called perineuronal nets (PNNs) form around specific neurons. PNNs are insoluble aggregates and are involved in the regulation of neuronal plasticity. In this study, we show that differences in the glycan structures on chondroitin sulfate proteoglycans contributed to the diversity of PNNs. Furthermore, we established a method to isolate hyaluronan from tissue samples and analyze its molecular weight. Using this method, we found that aggregating hyaluronan, which constitutes PNN, has a higher molecular weight than soluble hyaluronan.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：プロテオグリカン ヒアルロン酸 細胞外マトリクス 神経可塑性 ペリニューロナルネット

## 1. 研究開始当初の背景

脳は「臨界期」と呼ばれる生後初期の一定期間に高い可塑性を示す。マウスの視覚野では、視覚経験の変化による神経回路の可塑的再編成は、生後1ヶ月で顕著に起こるが、成体では見られない。よって、成体では可塑性を抑制する分子ブレーキが存在すると考えられている。

中枢神経系の細胞外マトリクスは、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンやヒアルロン酸といった糖鎖に富む特徴を示す。パルプアルブミン発現神経細胞の周囲には、ペリニューロナルネットと呼ばれる特徴的な細胞外マトリクス構造が形成される。ペリニューロナルネットはヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、および糖タンパク質からなる不溶性の凝集体であり、神経可塑性の低下に関わる。

コンドロイチン硫酸鎖は、多様な硫酸化構造を示す直鎖状の多糖であり、コアタンパク質と結合したコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在する。成体脳にコンドロイチン硫酸分解酵素であるコンドロイチナーゼを注入すると、視覚野の可塑性が回復することから、コンドロイチン硫酸鎖は非特異的な物理的障壁として可塑性を阻害する因子であると提唱された。

しかし最近の研究から、コンドロイチン硫酸鎖は物理的障壁ではなく、パルプアルブミン発現神経細胞の機能を制御することが分かってきた。網膜や脈絡叢で産生された Otx2 ホメオタンパク質は、視覚野に運搬され、そこでパルプアルブミン発現神経細胞の成熟を促し、臨界期のタイミングを調節する。申請者は、コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化構造を改変したマウスを用いた研究から、生後の発達段階におけるコンドロイチン硫酸鎖の構造変化によって強固なペリニューロナルネットが形成され、それによって、パルプアルブミン発現神経細胞への Otx2 の取り込みが促進され、臨界期を終了させることを見出した。

さらに、ペリニューロナルネットに存在するコンドロイチン硫酸鎖は、神経軸索ガイダンス分子であるセマフォリン 3A と結合し、シナプス形成に関与することも知られている。しかし、コンドロイチン鎖のセマフォリン 3A 結合部位はよく分かっていない。Dick らは、セマフォリン 3A が E ユニットを含有するコンドロイチン鎖を介してペリニューロナルネットに結合することを示している。一方、Yang らは、A ユニット含有コンドロイチン鎖がセマフォリン 3A の結合部位として機能することを報告している。

## 2. 研究の目的

上述した背景から、ペリニューロナルネットがパルプアルブミン発現神経細胞の成熟度を反映する指標として広く受け入れられ、ペリニューロナルネットと神経可塑性との関連を示す知見が急速に蓄積しつつある。一方で、以前よりペリニューロナルネットは均一ではなく、多様な種類が存在することが示唆されている。しかしながら、ペリニューロナルネットの不均一性に着目した研究はほとんどなく、現在のところ、ペリニューロナルネットの多様性を生み出す分子的基盤、および、異なった種類のペリニューロナルネットに機能的差異があるのかについては分かっていない。そこで申請者は、コンドロイチン硫酸鎖の糖鎖構造の違いによってペリニューロナルネットに構造、機能的な多様性が生じるという仮説を立てた。本研究では、複数のプローブを用いてペリニューロナルネットの多様性を生み出す分子的基盤を理解する。

また、ペリニューロナルネットは、神経回路の安定化や記憶の維持に必要であることが明らかとなっており、老化に伴う脳機能の低下とペリニューロナルネットとの関連が注目されている。そこで、ペリニューロナルネットを構成する分子群の生化学的性質を詳細に解析することで、これまで不明であった老化に伴うペリニューロナルネットの変化を分子レベルで解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 成体視覚野では、ほとんどのパルプアルブミン発現神経細胞がペリニューロナルネットに覆われるにも関わらず、Otx2 の蓄積が見られるのは、一部のパルプアルブミン発現神経細胞のみである。このことは、特定のペリニューロナルネットが Otx2 の取り込みに関与する可能性を示唆しているが、従来の解析法ではペリニューロナルネットの多様性を検出することができなかった。これまでは、N-アセチルガラクトサミン結合性レクチンである *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) が、ペリニューロナルネットの検出に用いられてきた。一方、本研究では、Lander らが作製したモノクローナル抗体を用いて、ペリニューロナルネットを検出した。

(2) 成体(3ヶ月齢)および老齢(18ヶ月齢)マウスの脳に存在するペリニューロナルネット構成分子群を溶解度の違いに基づき、水溶性、界面活性剤可溶性、不溶性の3画分に分画し、それぞれについてコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとヒアルロン酸の解析を行った。

(3) ヒアルロン酸はその分子サイズにより多彩な機能をもつため、組織サンプルから微量のヒアルロン酸を単離しその分子量を解析する手法の確立を目指した。現在、ヒアルロン酸のサイズ分布分析に広く用いられている方法は、ゲル電気泳動後に Stains-All と呼ばれるカチオン色素で染色する方法である。しかしながら、この色素ではヒアルロン酸と他のグリコサミノグリカンを区別することができない。サイズ排除クロマトグラフィーに基づく方法も確立されているが、しばしば手間と時間がかかり、比較的少量のヒアルロン酸を必要とする。本研究では、ヒアルロ

ン酸をビオチン化ヒアルロン酸結合タンパク質とストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いて単離する手法を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では WFA レクチンに加え、Cat315, 316 と呼ばれるモノクローナル抗体を使用した。その結果、ペリニューロナルネットの主要な構成成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン上の糖鎖構造の違いによって、ペリニューロナルネットが 4 種類に分類できることを明らかにした。WFA は広範なペリニューロナルネットマーカーだが、一方で、Cat316 と Cat315 は、一部のペリニューロナルネットを標識することが分かった。さらに、Cat316 陽性ペリニューロナルネットは視覚野 4 層に、また Cat315 陽性ペリニューロナルネットは 5-6 層に濃縮することが示された。また、単一のパルプアルブミン細胞表面において、WFA 陽性ペリニューロナルネットと Cat316 陽性ペリニューロナルネットは、空間的に分離して微小領域を形成することが示唆された。

3 種類のプローブはいずれも、アグリカンと呼ばれるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの糖鎖構造の違い識別することが分かった。WFA と Cat316 はコンドロイチン硫酸鎖が伸長した構造を認識するのに対し、Cat315 はコンドロイチン硫酸鎖の伸長が停止した構造に結合性を示した。また、パルプアルブミン発現神経細胞の機能に必要な Otx2 タンパク質はコンドロイチン硫酸鎖の伸長したペリニューロナルネットと共同在することを示した。

さらに、化学合成されたコンドロイチン硫酸 4 糖を用いて、Cat316 抗体の反応性を調べた結果、糖鎖の非還元末端の硫酸化されていない N-アセチルグルコサミン残基に対して選択的に結合することが示された。また、Cat316 抗体が認識する構造は、セマフォリン 3A の結合部位とオーバーラップすることも分かった。これまでの予想とは異なり、E ユニットはセマフォリン 3A の結合には必要がないことも示された。

(2) ヒアルロン酸は脳の老化に伴って総量が約 2 倍に増加していたが、コンドロイチン硫酸の量に変化は見られなかった。それぞれの溶解度を調べた結果、加齢に伴ってヒアルロン酸は不溶性画分に存在する割合が有意に減少し、水溶性および界面活性剤可溶性画分に存在する割合が増加することが示された。ヒアルロン酸の溶解度の増加に伴い、その分子量は低下していた。また、ヒアルロン酸と同様に、コンドロイチン硫酸も老化に伴い溶解度が上昇することが示された。そこで次に、複数のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの中で老化に伴う溶解度の変化を示す分子を探索した。その結果、特にアグリカンが老化に伴い不溶性画分から可溶性画分に顕著に移行することが示された。さらに、老齢脳からはタンパク質全長のアグリカンに加えてコアタンパク質の分解断片が検出された。以上の結果から、脳内では加齢に伴いアグリカンのコアタンパク質の分解が亢進することが示唆された。以上の結果より、老齢脳ではヒアルロン酸の蓄積とアグリカンの分解によって、に正常なペリニューロナルネットの機能が損なわれる可能性が示された。

(3) ヒアルロン酸をビオチン化ヒアルロン酸結合タンパク質とストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いて単離した。熱変性後に、ヒアルロン酸をアガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、Stains-All 染色で検出した。この方法は、100 ng 程度のヒアルロン酸の分子量を解析することが可能であった。本方法の最大の利点は、1 つのゲルで複数のサンプルのヒアルロン酸の大きさを同時に比較できることである。この方法を用いて、ペリニューロナルネットを構成するヒアルロン酸は、可溶性のヒアルロン酸に比べて分子量が高いことを明らかにした。つまり、ヒアルロン酸のサイズによってペリニューロナルネットの形成が制御される可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugitani Kei, Egorova Diana, Mizumoto Shuji, Nishio Shunsuke, Yamada Shuhei, Kitagawa Hiroshi, Oshima Kenzi, Nadano Daita, Matsuda Tsukasa, Miyata Shinji	4. 巻 1865
2. 論文標題 Hyaluronan degradation and release of a hyaluronan-aggrecan complex from perineuronal nets in the aged mouse brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129804 ~ 129804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2020.129804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nadanaka Satomi, Miyata Shinji, Yaqiang Bai, Tamura Jun-ichi, Habuchi Osami, Kitagawa Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Reconsideration of the Semaphorin-3A Binding Motif Found in Chondroitin Sulfate Using Galnac4s-6st-Knockout Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1499 ~ 1499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10111499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takechi Mina, Oshima Kenzi, Nadano Daita, Kitagawa Hiroshi, Matsuda Tsukasa, Miyata Shinji	4. 巻 1864
2. 論文標題 A pericellular hyaluronan matrix is required for the morphological maturation of cortical neurons.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129679 ~ 129679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2020.129679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyata S, Nadanaka S, Igarashi M, Kitagawa H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Structural Variation of Chondroitin Sulfate Chains Contributes to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Integrative Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnint.2018.00003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyata Shinji	4. 巻 33
2. 論文標題 Structural and Functional Remodeling of the Extracellular Matrix during Brain Development and Aging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E79 ~ E84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.2003.1E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MIYATA Shinji	4. 巻 58
2. 論文標題 脳の柔軟性を決める分子機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 380 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.58.380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Diana Egorova, Shinji Miyata
2. 発表標題 A RAPID AND HIGH-THROUGHPUT METHOD FOR ANALYZING MOLECULAR WEIGHT OF HYALURONAN IN ANIMAL TISSUE SAMPLES
3. 学会等名 13th International Conference HYALURONAN 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武淵明裕夢、武智美奈、佐藤ちひろ、北島健、北川裕之、宮田真路
2. 発表標題 発生期の脳皮質で形成されるヒアルロン酸を含む細胞外マトリクスの解析
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武淵明裕夢、武智美奈、佐藤ちひろ、北島健、北川裕之、宮田真路
2. 発表標題 胎仔期大脳皮質においてヒアルロン酸/ニューロカン/テネイシンCの三者複合体が形成される
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田真路
2. 発表標題 Age-related changes in the biochemical properties of perineuronal nets in the mouse brain
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮田真路
2. 発表標題 神経細胞周囲の細胞外微小環境における糖鎖の多様性とその機能
3. 学会等名 第38回日本糖質学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Miyata
2. 発表標題 Formation of a ternary complex of hyaluronan/neurocan/tenascin-C during embryonic cortical development
3. 学会等名 11th International Conference on Proteoglycans (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田真路
2. 発表標題 糖鎖と神経：精神疾患における神経可塑性と細胞外マトリクスの異常
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉谷慶、大島健司、灘野大太、松田幹、宮田真路
2. 発表標題 マウス脳の老化に伴う細胞外マトリクスプロテオグリカンの変動解析
3. 学会等名 第183回日本農芸化学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田真路
2. 発表標題 Perineuronal matrix in the brain: Its functional and structural diversity in space and time
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武智美奈、大島健司、灘野大太、松田幹、佐藤ちひろ、北島健、北川裕之、宮田真路
2. 発表標題 胎生期のマウス大脳皮質において形成されるヒアルロン酸を含む細胞外マトリクスの局在と機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.collagen-institute.jp/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------