

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790085

研究課題名（和文） 海馬神経興奮に伴ったシアル酸分子種脱離のインビボ解析と記憶形成における役割の解明

研究課題名（英文） Roles of the minor sialic acid molecular species in hippocampal dependent memory

研究代表者

南 彰 (AKIRA MINAMI)

静岡県立大学薬学部生化学教室・助教

研究者番号：80438192

研究成果の概要（和文）：シアル酸の主要な分子種である *N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）は脳内に豊富に存在し、記憶形成において重要な役割を担う。一方、マイナーなシアル酸分子種である *N*-グリコシルノイラミン酸（Neu5Gc）について、脳内における作用は不明な点が多い。本研究では、ラット脳において、Neu5Gc の存在と分布、Neu5Gc と記憶の関係などを明らかにした。さらに、シアル酸を糖鎖構造から脱離させるシアリダーゼの作用に着目し、脳内におけるシアリダーゼ活性の分布や神経活動と連動した糖鎖構造からの Neu5Gc 脱離などを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*N*-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac), the major molecular species of sialic acid, is contained in mammalian brain abundantly and plays crucial roles in many neural functions including memory. However, roles of other minor molecular species of sialic acid were poorly understood. In this project, we found the roles of the minor sialic acid molecular species in hippocampal dependent memory.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
2010 年度	900,000 円	270,000 円	1,170,000 円
2011 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
年度			
年度			
総計	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：糖鎖、記憶、海馬、神経、シアル酸分子種、シアリダーゼ、インビボ解析、酵素活性イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

酸性糖であるシアル酸は、糖タンパク質やガングリオシドなどの糖鎖に結合している。シアル酸には 50 を超える分子種が知られて

いる。中でも主要な酸分子種として、*N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）と *N*-グリコシルノイラミン酸（Neu5Gc）が知られている。Neu5Ac は脳に豊富に存在し、記憶などの

神経機能に重要な役割を担う。脳は、新たな神経回路を構築することにより記憶を形成する。特に記憶形成の初期段階には、特定のシナプス選択的に伝達効率を増強させ、神経回路を構築する「シナプス可塑性」が関与する。この神経回路構築に、脳に豊富に存在する Neu5Ac が重要な役割を担うことが報告されている(D. Muller, *et al.*, *Neuron*, 17, 413-422, 1996)。Neu5Ac が重合度 8-200 で縮重合した poly-Neu5Ac は、神経細胞接着分子(NCAM)に結合することにより神経細胞同士の接着を抑制する。したがって、新たな神経回路構築には、記憶形成時に poly-Neu5Ac がタイミング良く脱離することが必要であると予想される。

一方、Neu5Gc は、Neu5Ac から糖ヌクレオチド(CMP-Neu5Ac)を介して CMP-Neu5Ac 水酸化酵素(CMAH)により合成される。哺乳動物の脳では、CMAH の発現が強く抑制されている。したがって、Neu5Gc は脳機能を発揮する上で不要と考えられてきた。ところが最近の研究から、ヒトやチンパンジー、マウスなどの脳において微量な Neu5Gc が存在することが明らかとなり、脳における Neu5Gc の役割が注目されている(A. Varki, *Biochemie*, 83, 615-622, 2001)。これまでに、中枢神経において Neu5Gc は髄鞘の形成を阻害することが報告されている(B. E. Collins, *Glycobiology*, 10(1), 11-20, 2000)。脳の神経回路は主に有髄神経で構成されていることから、脳は Neu5Gc による有髄神経の成長阻害を回避するために CMAH の発現を抑制し、脳内の Neu5Gc 含量を低く保つと考えられる。その他に、現在までに神経機能における Neu5Gc の役割としては聴覚に関与することが報告されているに過ぎず、脳に存在する Neu5Gc の役割は不明な点が多い(M. Hedlund, *et al.*, *Molec. Cell. Biol.*, 27(12), 4340-4346, 2007)。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、ラット脳における Neu5Gc の分布を明らかにする目的で、抗 Neu5Gc 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、記憶に関与する海馬に Neu5Gc が比較的豊富に存在することを見出した。このことから、Neu5Ac と同様に Neu5Gc もまた記憶と関連することが予想されるが、記憶における Neu5Gc の作用については不明であった。そこで本研究では、Neu5Gc による糖鎖修飾が記憶に与える影響を検討し、記憶形成における Neu5Gc の作用をインビボ条件下で明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Neu5Gc のラット脳内分布の検討

はじめに、ラット脳内に含まれるシアル酸分子種を液体クロマトグラム質量分析計で分析した。次に、シアル酸分子種のラット脳内分布を調べる目的で、脳を 13 部位に部位別し、ホモジネートを作製した後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を利用して各部位に含まれる Neu5Ac 及び Neu5Gc 含有量を定量した。次に、Neu5Gc が比較的豊富に含まれていた海馬に焦点を当てて、免疫組織染色により詳細な Neu5Gc の脳内分布を検討した。

### (2) 記憶における Neu5Gc の作用解析

Neu5Gc をラット海馬に投与することにより、海馬における Neu5Gc 高発現ラットの構築を試みた。HPLC で Neu5Gc を定量し、海馬に Neu5Gc が高発現することを確認した。次に、Neu5Gc 高発現ラットを利用して、海馬依存性記憶能に対する Neu5Gc の作用を解析した。ラットの記憶能の評価には、モリスの水迷路試験法を利用した。対照群として、人工脳脊髄液を同容量同部位に投与した群を用いた。

### (3) 神経興奮と連動した糖鎖構造からのシアル酸脱離のインビボ解析

はじめに、シアル酸を糖鎖構造から脱離させるシアリダーゼについて、シアリダーゼ活性染色用の人工基質である X-Neu5Ac と蛍光発色試薬(Fast Red Violet LB)を利用してラット脳内における分布を検討した。次に、記憶形成における海馬シアリダーゼの役割を検討する目的で、シアリダーゼ阻害剤が海馬依存性記憶に及ぼす影響を検討した。次に、インビボマイクロダイアリス法を利用して、神経興奮に伴ったシアリダーゼ活性の変化を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) Neu5Gc のラット脳内分布の検討

ラット脳内に含まれるシアル酸分子種を液体クロマトグラム質量分析計により分析したところ、脳内に Neu5Gc が存在することが明らかとなった。そこで、脳内各領域に含まれる Neu5Gc 量を定量し比較した。その結果、Neu5Gc は記憶形成に関与する海馬に比較的豊富に存在することが明らかとなった。免疫組織染色を利用して Neu5Gc の脳内分布をより詳細に検討した。結果、Neu5Gc は海馬の神経細胞に高く集積していた。海馬においては、Neu5Ac が記憶に重要な役割を担うことが報告されている。しかし、記憶と Neu5Gc との関連については不明な点が多い。そこで以降では、海馬に発現する Neu5Gc に

ついて、記憶に対する作用解析を行った。

### (2) 記憶における Neu5Gc の作用解析

はじめに、海馬依存性記憶に及ぼす Neu5Gc の作用を検討した。Neu5Gc をラット右側海馬に投与した結果、投与 2 日後において右側海馬における Neu5Gc 含量は、人工脳脊髄液を投与した群と比較して顕著に増加した。同部位における Neu5Ac 含有量や左側海馬における Neu5Gc 含有量は変化しなかった。また、投与 7 日後においても、Neu5Gc 含有量の増加は持続していた。そこで次に、Neu5Gc を両側海馬に投与し、投与 2 日後からモリスの水迷路を利用して海馬依存性の記憶能を評価した。その結果、人工脳脊髄液投与群や無手術群と比較して、Neu5Gc 投与群では記憶能が有意に低下した。以上の結果から、Neu5Gc は海馬において記憶能に影響することが示唆された。

### (3) 神経興奮と連動した糖鎖構造からのシアル酸脱離のインビボ解析

Neu5Gc に対するシアリダーゼの基質特異性について検討した。はじめに、シアリダーゼの人工基質である X-Neu5Ac を利用して、ラット脳内におけるシアリダーゼの活性分布を染色した。その結果、白質領域や、海馬内においては主要な興奮性神経線維である苔状線維の終末などに比較的強い活性が検出された (Minami *et al.*, *Neuroimage*, 2011)。次に、基質によるシアリダーゼ活性の分布の違いを検証した。X-Neu5Gc を利用してシアリダーゼ活性の分布を染色した結果、X-Neu5Ac を利用した染色像と比較して顕著な活性分布の違いは観察されなかった。

次に、海馬神経活動に伴った Neu5Gc 含有糖鎖の構造変化を検討した。インビボマイクロダイアリシス法を利用し、神経活動に伴った海馬細胞外液中におけるシアル酸分子種の濃度変化を検討した。その結果、神経刺激時に細胞外液中に含まれる Neu5Ac や Neu5Gc の濃度が上昇することが明らかとなった。以上の結果より、神経の興奮に伴って、糖鎖構造から Neu5Ac や Neu5Gc が脱離したことが考えられる。今後は、神経興奮と連動したシアリダーゼ活性の変化を詳細に検討し、Neu5Gc による記憶能低下とシアリダーゼに対する基質特異性との関連を明らかにする必要がある。

本研究により、脳内において Neu5Gc が記憶能に影響を与えることが示唆された。ほ乳動物の脳では、CMAH が発現していないため、脳内で Neu5Gc を合成することは出来ない。今後は、脳に含まれる Neu5Gc の由来を明らかにする必要がある。また、ヒトは CMAH を欠損しており、体内で Neu5Gc を合成することは出来ない。しかし、食餌に由来した

Neu5Gc が体内に取り込まれることが報告されている。食餌に由来した微量な Neu5Gc が記憶能に及ぼす影響やアルツハイマーなどの神経疾患との関連などを明らかにする必要がある。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Akira Minami, Hirotaka Shimizu, Yuko Meguro, Naoki Shibata, Hiroaki Kanazawa, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki, Imaging of sialidase activity in rat brain sections by a highly sensitive fluorescent histochemical method, *Neuroimage*, 査読有, 58(1), 34-40 (2011), DOI: 10.1016/j.neuroimage.2011.06.017.

[学会発表] (計 32 件)

- ① 南 彰、ラット海馬の神経興奮に伴うシアリダーゼ活性の変化、2012 年 3 月 29 日、日本薬学会第 132 年会 (北海道)
- ② 齋藤 正和、ラット海馬に発現するシアリダーゼの記憶形成における役割、2012 年 3 月 29 日、日本薬学会第 132 年会 (北海道)
- ③ 田口 理紗、N-グリコリルノイラミン酸のラット脳内分布および体内動態の解析、2012 年 3 月 29 日、日本薬学会第 132 年会 (北海道)
- ④ Akira Minami, Imaging of sialidase activity in rat brain sections by a highly sensitive fluorescent histochemical method, 21 October, 2011, The 4<sup>th</sup> International Conference on Health and Longevity Sciences (Shizuoka)
- ⑤ 南 彰、記憶における N-グリコリルノイラミン酸の影響、2011 年 9 月 27 日、US フォーラム 2011 (静岡)
- ⑥ 稲田 真里、ラット脳内における N-グリコリルノイラミン酸の分布解明、2011 年 5 月 28 日、第 75 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (静岡)
- ⑦ 田口 理紗、海馬における N-グリコリルノイラミン酸高発現ラットの構築および学習能に及ぼす影響、2011 年 5 月 28 日、第 75 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (静岡)
- ⑧ 福元 北斗、新規人工合成基質を利用したラット脳内におけるシアリダーゼ活性の分布解明、2011 年 5 月 28 日、第 75 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (静岡)

- ⑨ 齋藤 正和、ラット海馬依存性記憶におけるシアリダーゼの役割、2011年5月28日、第75回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(静岡)
- ⑩ 崔 紗希、シアリダーゼの海馬神経興奮に伴う活性変化と神経伝達物質放出に対する作用のインビボ解析、2011年5月28日、第75回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(静岡)
- ⑪ 南 彰、海馬神経興奮と連動した細胞表面シアリダーゼ活性の変化、2011年5月28日、第75回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(静岡)
- ⑫ 清水 裕貴、ラット脳内におけるシアリダーゼ活性の分布と神経興奮に伴う変化、2010年3月28日、日本薬学会第130年会(岡山)
- ⑬ Akira Minami, Enhancement of extracellular sialidase activity in rat hippocampus by epileptic seizure, 28 July 2010, The 28<sup>th</sup> Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [ I ]: Functions and disease mechanisms (Hayama)
- ⑭ 南 彰、ラット海馬におけるシアル酸分子種含有糖鎖の発現、2010年3月30日、日本薬学会第130年会(岡山)
- ⑮ 南 彰、海馬依存性記憶の形成過程におけるシアル酸分子種の機能解明、2010年8月3日、USフォーラム2010(静岡)
- ⑯ 南 彰、シアリダーゼ活性のラット脳内分布と神経興奮に伴う変化、2010年8月3日、USフォーラム2010(静岡)
- ⑰ Akira Minami, Enhancement of extracellular sialidase activity in rat hippocampus by neural excitation, 22 August 2010, 13<sup>th</sup> International Conference on Biology and Chemistry of Sialic Acids (Germany)
- ⑱ 石橋 さやか、ラット海馬神経興奮に伴ったシアル酸分子種脱離のインビボ解析、2010年11月28日、平成22年度日本薬学会東海支部例会(静岡)
- ⑲ 目黒 裕美子、シアリダーゼ活性のラット海馬における分布と神経興奮に伴う変化、2010年11月28日、平成22年度日本薬学会東海支部例会(静岡)
- ⑳ 目黒 裕美子、ラット海馬におけるシアリダーゼ活性の分布と神経興奮に伴う変化、2010年12月10日、第33回日本日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会(神戸)
- ㉑ 中島 さや香、ラット脳内におけるシアル酸分子種の分布、2009年11月23日、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬

学会東海支部 合同学術大会 2009 (四日市)

- ㉒ 清水 裕貴、シアリダーゼ酵素活性のラット脳内分布と神経活動に伴う変化、2009年11月23日、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2009 (四日市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南 彰 (AKIRA MINAMI)

研究者番号：80438192