

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2013～2016

課題番号：25430081

研究課題名（和文）神経回路形成におけるコンドロイチン硫酸とヘパラン硫酸の対立的機能のメカニズム

研究課題名（英文）Opposing functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the neural network formation

研究代表者

前田 信明（MAEDA, Nobuaki）

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・プロジェクトリーダー

研究者番号：90202308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000円

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエ及びマウスをモデル生物として脳神経系におけるプロテオグリカンの機能解析を行い、以下のことを明らかにした。（1）ショウジョウバエ幼虫の神経筋接合部において、シンデカン(Sdc)とグリピカン(Dlp)は拮抗的に作用して、神経伝達及び幼虫の運動を制御している。（2）Dlpは、ショウジョウバエ幼虫の神経筋接合部におけるシナプス可塑性を制御する。（3）マウス大脳皮質での興奮性ニューロンの細胞移動及び神経極性化において、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが重要な役割を果たしている。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the functions of proteoglycans in the nervous system using two model organisms: *Drosophila melanogaster* and mouse. We revealed that syndecan (Sdc) and glypican (Dlp) play opposing roles in the neurotransmission at *Drosophila* neuromuscular junction and in the locomotion of larvae. We also found that Dlp regulates synaptic plasticity at the neuromuscular junction. Furthermore, we found that chondroitin sulfate proteoglycans play critical roles in the neuronal migration and polarization of excitatory neurons in the developing mouse neocortex.

研究分野：神経科学

キーワード：コンドロイチン硫酸 ヘパラン硫酸 プロテオグリカン 神経筋接合部 神経細胞移動 ショウジョウバエ プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

プロテオグリカンは、コア蛋白質にグリコサミノグリカン (GAG) が共有結合した分子群であり、細胞表層及び細胞外基質の主成分となっている。プロテオグリカンは、成長因子、ケモカイン、細胞接着分子等、多くの蛋白質と主に GAG 部分を介して結合し、その機能を調節していると考えられている。GAG の中でもコンドロイチン硫酸 (CS) とヘパラン硫酸 (HS) は脳神経系に多量に発現しており、ニューロンの増殖分化、移動、軸索伸長、可塑性等を調節していると考えられている。

これまで、CS プロテオグリカンは軸索伸長を阻害するのに対して HS プロテオグリカンは促進するなど ()、CS と HS はニューロンに対して対立的に機能すると思われてきた。CS と HS の基本構造は互いによく似ており、両者に共通して結合する蛋白質も多い。それにもかかわらず、CS プロテオグリカンと HS プロテオグリカンが対立的に機能を果たすのは大きな謎である。このような問題を解明するためには、CS プロテオグリカン及び HS プロテオグリカン両者に関して、適切なモデルシステムを用いて、その機能と作用機構を詳細に明らかにする必要があると考えられる。

2. 研究の目的

(1) マウス大脳皮質における CS プロテオグリカンと HS プロテオグリカンの機能解析

発達期大脳には、大量の CS プロテオグリカン及び HS プロテオグリカンが発現しているが、その機能はほとんど明らかにされていない。これまで我々は、海馬ニューロンの分散培養系を用いて CS と HS の機能を解析し、CS は軸索決定に寄与して軸索を安定化させる一方、HS は神経突起伸長を不安定化させることを見出した。このことは、CS と HS が対立的に軸索決定を制御していることを示唆しているが ()、その分子機構は明らかになっていない。

大脳皮質の興奮性ニューロンは、皮質深部の脳室帯で誕生した後、脳表に向かって移動する過程で軸索決定 (神経極性化) し、成熟していく。本研究課題では、マウス大脳皮質をモデルとして、神経細胞移動及び神経極性化における CS プロテオグリカン及び HS プロテオグリカンの機能とその分子機構を明らかにする。

(2) ショウジョウバエ神経筋接合部における HS プロテオグリカンの機能

ショウジョウバエ幼虫の神経筋接合部には、分泌型のパールカン、GPI-アンカー型のグリピカン (Dlp)、膜貫通型のシンデカン (Sdc) が主要な HS プロテオグリカンとして発

現する。我々はこれまで、パールカンが神経筋接合部における Wnt 分子の局在を調節することによって、シナプス前部と後部の発達を同調させていることを明らかにした ()。しかしながら、Dlp 及び Sdc の機能に関しては明らかになっていない。そこで本研究では、ショウジョウバエ神経筋接合部の形成及び可塑性における Dlp と Sdc の機能を明らかにする。さらに、神経筋接合部に存在する HS プロテオグリカン結合蛋白質をプロテオームの手法を用いて網羅的に同定し、HS によるシナプス形成調節機構の全貌を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス子宮内胎仔電気穿孔法

胎生 14 日目 (E14) のマウス胎仔の側脳室に GFP 発現プラスミド溶液を注入後、CUY21 エレクトロポレーター (Nepa Gene) を用いて電気パルスを与え、大脳皮質の神経幹細胞に遺伝子導入した。胎仔を母体内に戻して数日間成長させた後、脳を採取し、スライス培養あるいは遺伝子発現解析に用いた。

(2) 大脳皮質スライス培養法

子宮内胎仔電気穿孔法を用いて E14 で GFP 発現プラスミドを導入した後、E16 で胎仔脳を採取した。大脳皮質スライスを作製し、共焦点顕微鏡 TCS SP5 (Leica) を用いてタイムラプス観察を行った。

(3) 遺伝子発現解析

子宮内胎仔電気穿孔法を用いて E14 で GFP 発現プラスミドを大脳皮質神経幹細胞に導入した後、E15、16、17 で大脳皮質を採取した。細胞を解離後、FACS ソーティングにより GFP 陽性ニューロンを単離し、RNA を抽出した。RNA サンプルは DNA マイクロアレイを用いて解析し、ニューロンの分化に伴う遺伝子発現変化を解析した。

(4) HS 結合蛋白質の網羅的解析

ショウジョウバエ 3 齢幼虫の神経筋標本をヘパリンで処理し、組織から遊離してきた蛋白質をプロテオームの手法を用いて同定した。

4. 研究成果

(1) 神経細胞移動における CS プロテオグリカンの機能

大脳皮質は、脳室帯に存在する神経幹細胞 (放射状グリア細胞) から誕生した興奮性ニューロンが、順次、表層に向かって移動する

ことにより形成される。この際、誕生直後のニューロンは多極性の形態をとり、多極性移動と呼ばれる方向性の定まらない移動を示す。その後、ニューロンがサブプレート層に達すると双極性の形態に変化し、放射状グリア細胞の突起である放射状グリア線維を足場として、脳表に向かって速やかに移動するようになる（ロコモーション）。大脳皮質スライス培養法を用いると、このような神経細胞移動の過程を *in vitro* で再現できる。我々は、コンドロイチナーゼ ABC 存在下で大脳皮質のスライス培養を行い、神経細胞移動における CS プロテオグリカンの機能を解析した。コントロールでは、GFP 陽性ニューロンは表層近くまで移動しているのが観察された。一方、コンドロイチナーゼ ABC 処理したスライスでは、GFP 陽性ニューロンの移動は、サブプレート層直下で停止しており、細胞極性にも異常が見られた。このことは、CS プロテオグリカンは新生ニューロンの極性変化および移動の制御に重要な役割を果たしていることを示唆している。サブプレート層には、ホスファカンやニューロカン等の CS プロテオグリカンが多量に発現しており、これらが移動制御に寄与している可能性が考えられる。

(2) 神経細胞移動に伴う遺伝子発現変化

子宮内胎仔電気穿孔法により E14 で GFP 標識された新生ニューロンは、その後、3 日程度で脳表にまで到達する。従って、E15、E16、E17 で GFP 陽性ニューロンを単離し、マイクロアレイ解析を行うことによって、移動の開始から終了までに起こる遺伝子発現変化を網羅的に明らかにすることができる。

解析の結果、PTPRZ1/ホスファカンやニューログリカン C 等の CS プロテオグリカンの発現はニューロンの移動に伴って著しく増加するのに対して、シンデカン 3 やグリピカン 1 等の HS プロテオグリカンは大きな発現変化を示さないことが明らかになった。ただし、ADAMTS ファミリーに属する細胞外基質分解酵素の発現は大きく変化しており、プロテオグリカンの分解による機能制御の可能性が示唆された。

(3) HS 結合蛋白質の網羅的解析

ヘパリンは硫酸化度が非常に高い HS と考えることができ、多くの HS 結合蛋白質と高親和性で結合する。従って、組織をヘパリンで処理すると、組織中の HS 結合蛋白質が HS プロテオグリカンから引きはがされ、遊離すると考えられる。そこで、ショウジョウバエ 3 齢幼虫の神経筋標本をヘパリン処理し、組織から遊離した蛋白質を LC-MS/MS によるショットガン法で網羅的に同定した。その結果、既知の HS プロテオグリカン結合蛋白質である lipophorin や nidogen 等の他、神経栄養

因子、成長因子、プロテアーゼ等、多くの結合分子候補を同定した。

(4) ショウジョウバエ神経筋接合部における HS 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における Dlp と Sdc の機能を解析した。まず、免疫組織化学法を用いて両者の発現を解析し、どちらもシナプス後部に局在することを見出した。しかしながら、Sdc はグルタミン酸受容体と共局在を示すが、Dlp は示さず、両者の神経筋接合部における局在は明瞭に異なることが明らかになった。次に、Dlp を筋肉細胞特異的にノックダウンした個体の神経筋接合部を解析したところ、シナプスボタンの数が増加するとともに、グルタミン酸受容体の発現レベルが増大していることが明らかになった。また、それに伴って、幼虫の移動速度も増大していた。一方、Sdc 欠失変異体では、グルタミン酸受容体の発現レベルが低下するとともに、幼虫の移動速度も低下していた。これらのことは、Sdc と Dlp が拮抗的に作用することによって、神経筋接合部における神経伝達及び幼虫の運動が制御されていることを示唆している。

(5) ショウジョウバエ神経筋接合部のシナプス可塑性における HS プロテオグリカンの機能

ショウジョウバエ幼虫は、飢餓状態に陥ると新たな餌を求めて活発に移動するようになるが、それに伴って、神経筋接合部におけるシナプスボタンの数が増加する。我々は、このような神経可塑性における HS プロテオグリカンの機能を解析した。その結果、ショウジョウバエ 3 齢幼虫を飢餓状態にさらすと、神経筋接合部において Dlp の発現が顕著に増大することが明らかになった。さらに、Dlp をノックダウンすると、飢餓によるシナプスボタンの増加が抑制されることが明らかになった。このことは、Dlp が神経筋接合部におけるシナプス可塑性に重要な役割を果たしていることを示唆している。

< 引用文献 >

Maeda N., Ishii M., Nishimura K., Kamimura K. (2011). Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochem. Res.* **36**, 1228-1240.

Nishimura K., Ishii M., Kuraoka M., Kamimura K., Maeda N. (2010). Opposing functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate during early neuronal polarization. *Neuroscience* **169**, 1535-1547.

Kamimura K., Ueno K., Nakagawa J., Hamada R., Saitoe M., and Maeda N. (2013). Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. **J. Cell Biol.** **200**, 219-233.

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8件)

Sakuma C., Saito Y., Umehara T., Kamimura K., Maeda N., Mosca T.J., Miura M., Chihara T. (2016). The Strip-Hippo pathway regulates synaptic terminal formation by modulating actin organization at the *drosophila* neuromuscular junction. **Cell Rep.** **16**, 2289-2297. (査読有)
Doi:10.1016/j.celrep.2016.07.066.

Ohtaka-Maruyama C., Nakajima K., Pierani A., Maeda N. (2016). Editorial: Mechanisms of neuronal migration during corticogenesis. **Front. Neurosci.** **10**, 172. (査読有) Doi:10.3389/fnins.2016.00172.

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**, 467-470. (査読無)
Doi:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870467.

Maeda N. (2015). Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. **Front. Neurosci.** **9**:98. (査読有)
Doi: 10.3389/fnins.2015.00098.

Yabe T., and Maeda N. (2015). Histochemical analysis of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase expression in mouse brain. **Methods Mol. Biol.** **1229**, 377-387. (査読無)
Doi:10.1007/978-1-4939-1714-3_29.

Morise J., Kizuka Y., Yabuno K., Tonoyama Y., Hashii N., Kawasaki N., Many H., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S., Endo T., Maeda N., Takematsu H., Oka S. (2014). Structural and biochemical characterization of O-mannose-linked human natural killer-1 glycan expression on phosphacan in developing mouse brains. **Glycobiology** **24**, 314-324. (査読有)
Doi:10.1093/glycob/cwt116.

神村圭亮、前田信明 (2013). 「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** **31**, 1488-1493. (査読無)

Kamimura K., Ueno K., Nakagawa J., Hamada R., Saitoe M., and Maeda N. (2013). Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. **J. Cell Biol.** **200**, 219-233. (査読有) Doi:10.1083/jcb.201207036.

[学会発表](計20件)

丸山千秋、大島実莉、由良敬、前田信明 「発生期大脳皮質における新生興奮性ニューロンの移動と細胞外基質制御」**第39回日本分子生物学会年会** 2016.12.1. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

神村圭亮、小田嶋愛子、前田信明 「ショウジョウバエの神経筋接合部においてグリピカンはシナプス可塑性を調節する」**第89回日本生化学会大会** 2016.9.27. 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Ohtaka-Maruyama C, Ohshima M., Yura K., Maeda N. "Gene expression profiling of migrating excitatory neurons during mouse neocortical development" **第39回日本神経科学大会** 2016.7.21. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

神村圭亮、前田信明 「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** 2015.8.2. 東京大学(東京都文京区)

Kamimura K., Maeda N. "Heparan sulfate proteoglycans at the *Drosophila* neuromuscular junction." **第38回日本神経科学大会シンポジウム** 2015.7.29. 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

三枝智香、神村圭亮、進藤真由美、前田信明 「ショウジョウバエにおけるヘパラン硫酸プロテオグリカン結合蛋白質の網羅的解析」**第38回日本神経科学大会** 2015.7.28. 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

前田信明 「ショウジョウバエ神経筋接合部形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能」**第21回プロテオグリカンフォーラム** 2014.1.12. 東京医科歯科大(東京都文京区)

神村圭亮、濱田理絵、前田信明 「ショウジョウバエの神経筋接合部におけるグリピカンとヘパラン硫酸微細構造の役割」**第87回日本生化学会大会** 2014.10.18. 国立京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計1件)

Kamimura K., and Maeda N. (2014).
Heparan sulfate proteoglycans in
Drosophila melanogaster.
In “**Glycoscience: Biology and Medicine**”,
Taniguchi N. et al. (ed), Springer, New
York pp581-587.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/regeneration/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 信明 (MAEDA, Nobuaki)
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・
プロジェクトリーダー
研究者番号：90202308

(2)研究分担者

神村 圭亮 (KAMIMURA, Keisuke)
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
研究者番号：30529524

(3)研究協力者

丸山 千秋 (OHTAKA-MARUYAMA, Chiaki)

三枝 智香 (SAEGUSA, Chika)