

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860209

研究課題名(和文) Dystrophic endballを誘導する神経細胞膜表面機構の解明

研究課題名(英文) Neuronal cell surface mechanisms which induce dystrophic endball

研究代表者

坂元 一真 (Sakamoto, Kazuma)

名古屋大学・高等研究院・特任助教

研究者番号：60612801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経軸索の伸長に関する2つの硫酸化糖鎖、ヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸について、その受容体PTPとの結合に必要な最小機能ドメインを決定した。両者とも4糖が結合可能な最小単位であったが、コンドロイチン硫酸においてはその出現頻度は稀であったが、ヘパラン硫酸においてはその出現頻度は極めて高いことが明らかとなった。このことから、両硫酸化糖鎖がPTPを全く正反対に制御している仕組みが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Heparan sulfate and chondroitin sulfate are sulfated glycans which are involved in axonal elongation in our central nervous system. Although they share the same neuronal receptor PTP, how they differentially regulate it is still unknown. Here, minimum essential structures of heparan sulfate and chondroitin sulfate were successfully identified. In both glycans, tetrasaccharide is the shortest structure to interact with PTP. However, interestingly, the probability of the structures is quite rare in chondroitin sulfate, while quite rich in heparan sulfate. These findings account for how heparan sulfate and chondroitin sulfate work in opposing manner on PTP and axonal elongation.

研究分野：生化学

キーワード：軸索再生 オートファジー チロシンフォスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

我々の中枢神経軸索は、構造のよく似た二つの硫酸化糖鎖、ヘパラン硫酸 (HS) およびコンドロイン硫酸 (CS) によってその伸長が制御されている。両者は受容体型チロシンフォスファターゼ (RTP) に属する PTP σ あるいは LAR を神経細胞表面受容体として共有し、HS は特に神経発達時において軸索伸長に対して促進的に働く。その一方、CS は中枢神経損傷後の軸索再生阻害因子として知られ、損傷軸索先端部に dystrophic endball と呼ばれる変性構造を誘導する。本構造の形成こそが、我々の中枢神経系の再生と回路の再編成を妨げる要因であると考えられているが、その分子生物学的・細胞生物学的な機序については未だ理解されていない。とりわけ、構造のよく似た HS および CS が、神経軸索に対して全く正反対の形質をもたらすモデルはまだ確立されていない。

2. 研究の目的

HS および CS が、神経軸索先端部の受容体 PTP σ をどのように制御しているのか、言い換えれば、PTP σ が構造類似性の高い HS・CS にどのように制御されているのかを明らかにする。もって、神経軸索の伸長、およびその再生阻害の分子基盤の理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

HS および CS は多様に硫酸化修飾された 2 糖の繰り返し構造からなる、平均鎖長 50-100 糖の長大な糖鎖である。この長い鎖の中に受容体 PTP σ との直接の結合に関与する、いわゆる「ドメイン」構造があるとの仮説を立て、その同定が上記目的に資すると考えた。

そこで、各種天然由来の CS・HS、および化学合成され構造・鎖長も明らかな CS・HS を用意し、PTP σ との結合を表面プラズモン共鳴により生化学的に検討した。

上記手法により得られた「ドメイン」を含む糖鎖を PTP σ 発現細胞に添加し、PTP σ のクラスターリング、phosphatase 活性について検討し、HS・CS の作動機構について検討した。

申請者らは、本課題と並行して、オートファジー流の阻害が上記 dystrophic endball の生成要因であることを最近明らかにした。そこで、各種糖鎖のオートファジー流への影響を検討した。

4. 研究成果

(1)CS 最小機能ドメインの同定

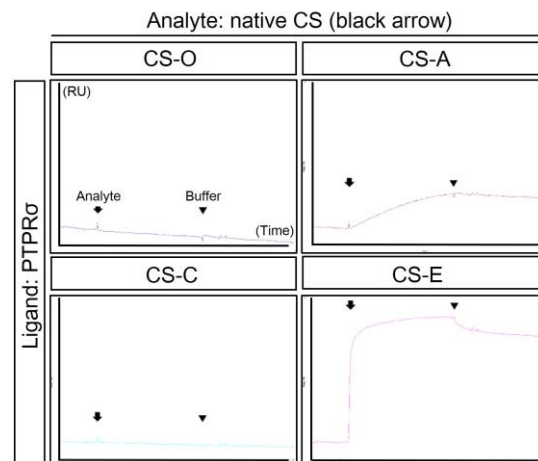
CS は硫酸化パターンの異なる 2 糖構造の繰り返しからなる。PTP σ との結合に関与する CS の機能ドメインを決定するため、以下の実験を行った。

①天然由来 CS を用いた解析

まず、天然由来の各種 CS を用いて、これらと PTP σ の相互作用により SPR を用いて検

出したところ、CS-E が極めて強力な相互作用を示した (図 1)。

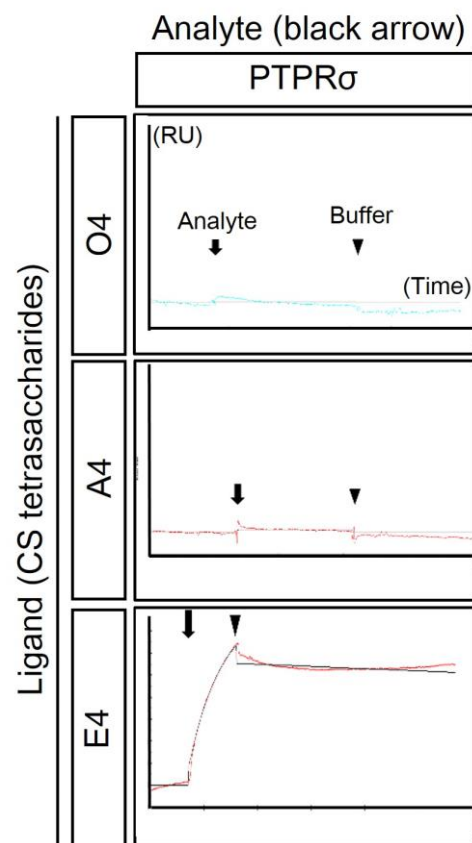
図 1



②化学合成 CS を用いた解析

天然由来の CS は構造・鎖長において依然混合物であるので、鳥取大学との共同研究により有機化学合成された CS と PTP σ との相互作用を検討した。CS-O, -A, -E の各種 4 糖を用いたところ、E4 糖のみ相互作用を示した (図 2)。これは(1)-①の結果を裏付ける結果となった。

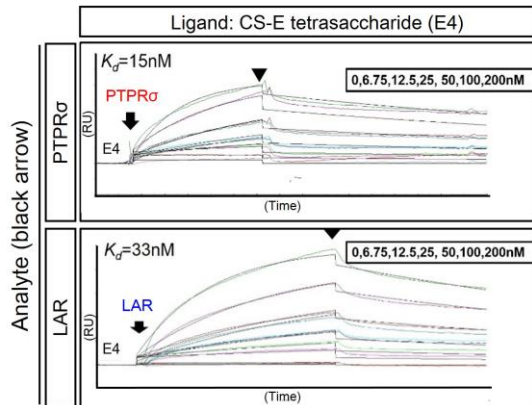
図 2



③E4 糖と PTPσ の結合 kinetics 解析

E4 糖と PTPσ との結合を詳細に検討したところ、その解離定数は 15nM と非常に強固なものであった (図 3) LAR についても京都府の実験を行い、解離定数は 33nM と算出された。一方 E2 糖構造は全く相互作用しなかったことから、PTPσ との結合には 4 糖構造が必要であることが明らかとなった。

図 3



(2)HS 最小機能ドメインの同定

HS もやはり硫酸化パターンの異なる 2 糖構造の繰り返しからなる。PTPσ との結合に参与する HS の機能ドメインを決定するため、台湾・Academia Sinica との共同研究として以下の実験を行った。

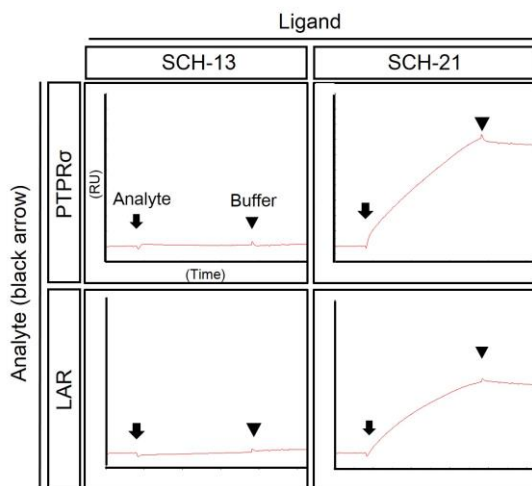
①化学合成 HS を用いた解析

化学合成した 16 種の HS8 糖と PTPσ との相互作用を SPR により網羅的に検討した。その一例を図 4 に示す。この結果、CS とは異なり、HS は硫酸基修飾さえあれば、その位置・数にかかわらず、PTPσ と相互作用することが明らかとなった。

②HS 最小鎖長の決定

各種合成 HS 6 糖および 4 糖と PTPσ との相互作用を検討したところ、HS の場合も CS と同様、PTPσ との結合には 4 糖構造が必要であることが明らかとなった。

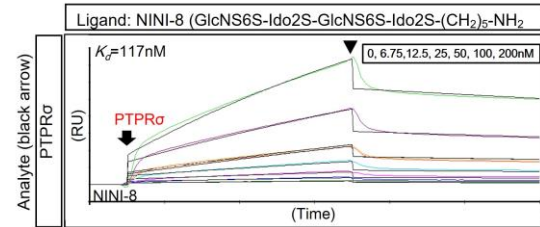
図 4



③HS4 糖と PTPσ の結合 kinetics 解析

HS4 糖と PTPσ との結合を詳細に検討したところ、その解離定数は 117nM と強固なものであった (図 5)。

図 5

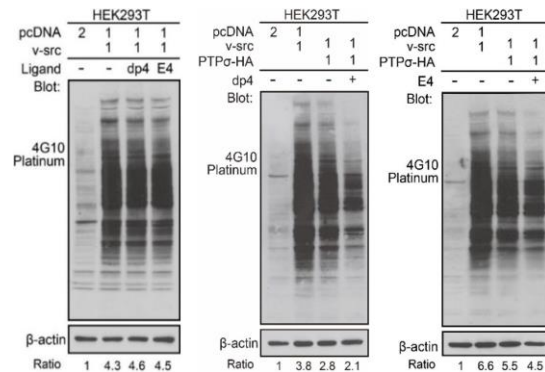


(3)鎖長による PTPσ の制御

①4 糖による酵素活性の制御

上記のように、HS・CS とともに 4 糖構造が最小機能ドメインであることが明らかとなったので、これら 4 糖の PTPσ の phosphatase 活性制御について検討したところ、図 6 のように、HS4 糖、CS4 糖とも PTPσ 依存的にチロシンリン酸化タンパク質を脱リン酸化した。

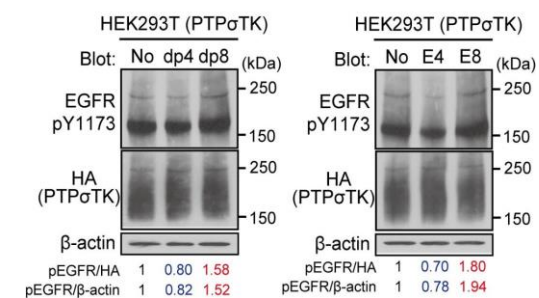
図 6



②4 糖・8 糖による PTPσ クラスターリング

PTPσ の属する RTP は、単量体化により酵素活性が上昇し、多量体化により酵素活性が抑制される。そこで HS・CS の機能ドメイン 4 糖および 8 糖が PTPσ のクラスターリングに与える影響を検討した。ここでは EGFR の細胞内ドメインを利用し、そのリン酸化の程度によって PTPσ のクラスターリングを可視化する方法を確立した。その結果、HS・CS の 4 糖は糖種にかかわらず PTPσ を単量体化させ、一方 8 糖は糖種にかかわらず PTPσ を多

図 7

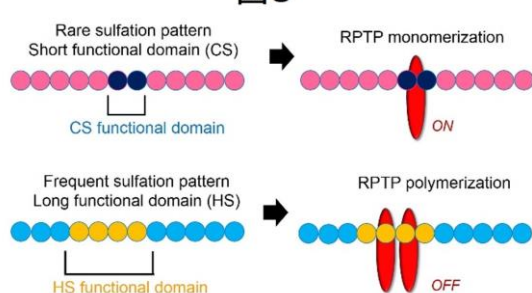


量体化させることを明らかにした（前ページ図7）。

③Chance and Necessity モデル

以上の結果は CS も HS も機能ドメインの作動機構は同じであることを意味する。しかしながら、(1)(2)で決定した CS および HS の機能ドメインの中樞神経系での頻度、割合をみると、CS は極めて少なく (<3%)、HS は極めて多い (=50%)。このことから、糖鎖としての CS・HS の作動機構として、機能ドメインの出現頻度が PTP σ のクラスタリングを制御しているというモデルを構築することができた。すなわち、機能ドメインの極めて稀な CS は PTP σ を単量体化させ、機能ドメインの極めて豊富な HS は PTP σ を多量体化させ、CS は PTP σ を単量体化させるとするモデルである。(図8)。本モデルにより、CS および HS が共有する受容体 PTP σ を真逆に制御する仕組みが説明できる。

図8



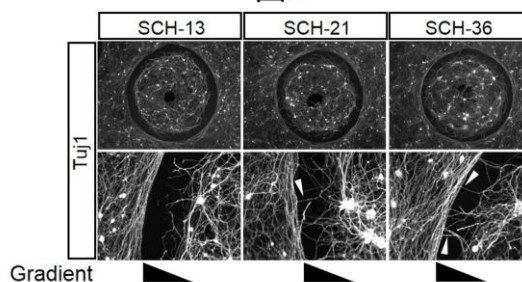
(4)CS によるオートファジー流の制御

CS は PTP σ を介して、成長円錐を伸長能を欠いた dystrophic endball へと変性させるが、申請者らはこのとき、軸索先端部でのオートファジー流が阻害され、結果として dystrophic endball にオートファゴソームが異常蓄積することを見出した。そこで CS およびその機能ドメインである E4 糖構造のオートファジー流に対する影響を調べたところ、PTP σ 依存的にオートファジー流を阻害した。本結果は PTP σ の下流にオートファジー流制御に関わる分子が存在することを示すものであり、この同定を今後の研究課題としたい。

(5)合成糖鎖による軸索再生阻害の rescue

これまでの結果より、PTP σ を多量体化させる糖鎖は、CS による神経軸索再生阻害を解除することが期待された。そこで(2)-①で用いた合成 HS8 糖のうち、特に結果が良好であった SCH-21、SCH-36 について CS による軸索再生阻害の rescue 実験を行った。SCH-13 を対照とした。成体後根神経節細胞軸索は CS 濃度勾配に逆らって伸長することはできないが、培地に SCH-21、SCH-36 を加えることにより、濃度勾配を超えて伸長する神経軸索の数が優位に増加した(図9)。このことから、これら HS8 糖には、軸索再生を促進させる活性があることが示唆された。

図9



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)

①Kadomatsu K, Sakamoto K. Sulfated glycans in network rewiring and plasticity after neuronal injuries. *Neurosci, Res.* 78:50-54 2014
DOI 10.1016/j.neures.2013.10.005. 査読有

②Kadomatsu K, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Sakamoto K, Kishida S, Ferdinandy P. Therapeutic potential of midkine in cardiovascular diseases. *Br. J. Pharmacol.* 171:936-944 2014
DOI 10.1111/bph.12537. 査読有

③ Kadomatsu K, Sakamoto K. Mechanisms of axon regeneration and its inhibition: roles of sulfated glycans. *Arch Biochem Biophys.* 558:36-41
DOI 10.1016/j.abb.2014.06.009. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①Sakamoto K, Ozaki T, Gong Y, Hung SC, Tamur J, Kadomatsu K.

“Frequency and length of sugar codes in sulfated glycans regulate axonal regeneration and its failure through RPTP-autophagy axis. The 3rd International Symposium on Glyco-Neuroscience 2016 年 1 月 14 日-16 日 淡路夢舞台 (兵庫県淡路市)

②Sakamoto K, Gong Y, Ozaki T, Kadomatsu K.

“Keratan sulfate is another ligand for PTP σ and LAR, which is involved in axonal regeneration failure after injury”

SFG & JSCT Joint Meeting 2014 年 11 月 15 日-20 日 Hawaii, USA

③坂元一真 門松健治

「Dystrophic endball 形成および軸索再生阻害における硫酸化糖鎖の役割」

第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 16 日 京都国際会議場 (京都府京都市) 招待講演

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂元 一真 (SAKAMOTO、Kazuma)
名古屋大学・高等研究院 (医学系研究科)・
特任助教
研究者番号：60612801

(2)研究分担者

なし