

研究領域名

統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明

研究期間

平成23年度～平成27年度

領域代表者

門松 健治（名古屋大学・大学院医学系研究科・教授）

研究領域の概要

糖鎖は核酸、タンパク質に並ぶ第三の生命鎖として、さまざまな生理的・病的過程に関与することが明らかになっている。しかしその機能と構造の多様性ゆえに、糖鎖の作用機序解明の実現性に対しては高い障壁があった。この障壁を克服して糖鎖の普遍的な作動原理を解明する重要な手がかりとして、私たちは、糖鎖の特定配列中に神経機能を制御するドメインが内包されていることを見いだした。一方、糖鎖がシナプス可塑性や神経回路再編を介して記憶・学習などの高次脳機能を制御することが明らかになりつつあり、糖鎖に着目した統合的神経研究が待望されている。本領域では、これまでに我が国において蓄積された世界に誇る糖鎖の知見と新しい解析法を最先端の神経研究に融合させる。これにより、「糖鎖機能ドメイン」から受容体、下流の分子動態、統合的な神経機能に至る制御機構を解明し、新しい生命科学の起点となる学術領域、神経糖鎖生物学を創成する。

領域代表者からの報告

1. 研究領域の目的及び意義

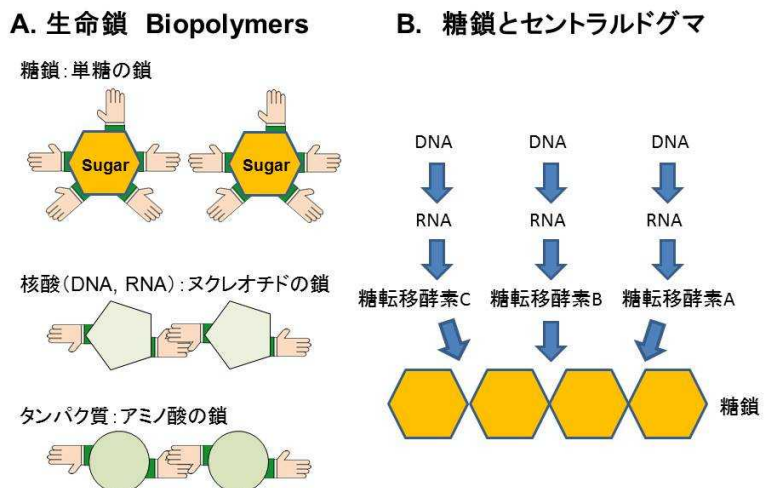
【概要】糖鎖は核酸、タンパク質に並ぶ第三の生命鎖として、さまざまな生理的・病的過程に関与することが明らかになっている。しかしその機能と構造の多様性ゆえに、糖鎖の作用機序解明の実現性に対しては高い障壁があった。この障壁を克服して糖鎖の普遍的な作動原理を解明する重要な手がかりとして、私たちは、糖鎖の特定配列中に神経機能を制御するドメインが内包されていることを見いだした。一方、糖鎖がシナプス可塑性や神経回路再編を介して記憶・学習などの高次脳機能を制御することが明らかになりつつあり、糖鎖に着目した統合的神経研究が待望されている。本領域では、これまでに我が国において蓄積された世界に誇る糖鎖の知見と新しい解析法を最先端の神経研究に融合させる。これにより、糖鎖機能ドメインから受容体、下流の分子動態、統合的な神経機能に至る制御機構を解明し、新しい生命科学の起点となる学術領域、神経糖鎖生物学を創成する。

1. 背景

【挑戦の時代背景】

あのフェルマーの最終定理を解いたアンドリュー・ワイルズでさえ、1994年までの3世紀半の間に発見・証明された数多くの新しい定理の助けなしには証明はできなかった。科学の新しい展開の裏には常に時代の後押しがある。私たちは今、糖鎖生物学の大きな転換期を迎えていると考えている。

図1 生命と糖鎖



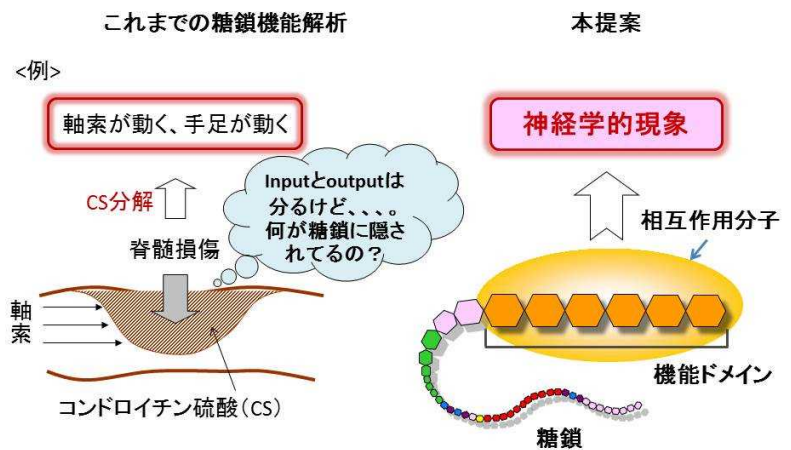
かつて単糖から糖の鎖ができることが分かった時代から研究者たちは核酸、タンパク質と並ぶ**第三の生命鎖**として糖鎖を捕らえ、その生物学的機能を期待してきた。しかし、糖鎖の構造は難しい。結合様式が一通りではなく（図 1A）、個別の酵素が鎖を長くする（図 1B）。従って構造は多様であり、セントラルドグマと距離を置く制御を受け、より環境の影響をセンシティブに受ける。研究者たちはまず、一体糖鎖はどのような構造を有し、どのような仕組みで作られるのかを知る必要があった。因みにこの過程での日本人の貢献は

とても大きい。糖鎖を作る合成酵素遺伝子の発見も約 6 割は日本人の手で遂行され、現在も糖鎖生物学は我が国が世界をリードしている。そしてこのような仕組みが分かってくると糖鎖合成酵素の遺伝子ノックアウト（KO）やトランスジェニック（Tg）マウスあるいは糖鎖分解酵素によって糖鎖を改変し、糖鎖と生命活動を直接関連づけることが可能となった（図 2 左）。すなわち、「糖鎖が生命活動を制御する」という概念が定理として提出されたといってもよいだろう。しかしながらこの定理の証明は未だ成されていない。何故ならその機構の大部分が解明されていないからである。

幸い、神経分野の中でも重要課題の 1 つであるシナプス活動制御、神経回路形成・再編制御について糖鎖の重要性の理解が近年急速に深まった。さらに糖鎖解析・合成あるいは一分子イメージングなどの技術が進歩した。今こそ糖鎖による生命活動の制御機構に踏み込める時代である。しかし、そのためには実現性の高い戦略が必要である。私たちは生命現象を神経に絞り込んだ融合研究こそが突破口になると考えている。

私たちは、糖鎖の特定配列中に神経機能を制御するドメインが内包されていることを見いだした。つまり、糖鎖の特定配列の分子構造の違いを神経細胞が読み取って神経活動が差別化される。従って、糖鎖機能ドメインとその受容体の先に生命現象が現れると考えることができる（図 2 右）。

図2 糖鎖による生命活動の制御

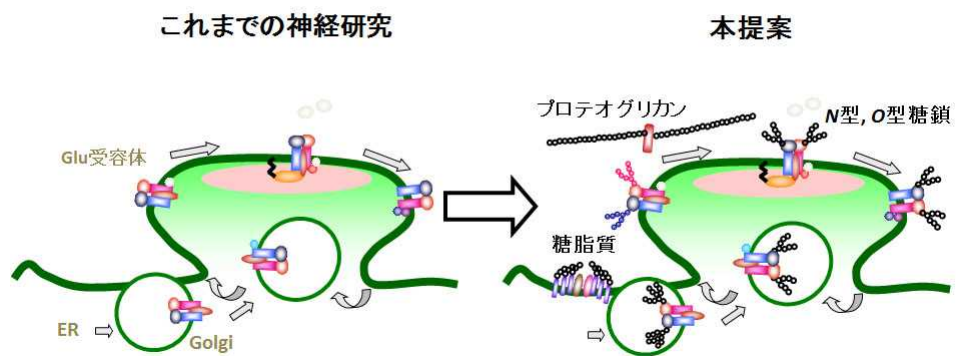


【神経と糖鎖】

神経機能の制御機構の解明は主に神経伝達物質や成長因子などタンパク質性の制御分子とその細胞内シグナリングを中心に長足の発展を遂げた。例えば記憶・学習は神経活動に基づくグルタミン酸受容体のシナプス部へのトラフィッ

キングと、続いて起こるシナプスの形態的变化によって担われ、その細胞内シグナリング機構が詳しく研究されてきた（図 3 左）。しかしグルタミン酸受容体の移動にはコンドロイチン硫酸などの細胞外マトリックス糖鎖との相互作用が重要である。また、ほとんどの細胞表面および分泌タンパク質は糖鎖修飾される（図 3 右）、グルタミン酸受容体自体の糖鎖修飾はトラフィッキングに重要な機能を持つ。さらに細胞外

図3 糖鎖による神経活動の制御



マトリックス糖鎖はシナプスの形態的变化や神経回路形成・再編においても重要な役割を担うことも判明してきた。このように神経機能の統合的理解のために糖鎖の観点からの研究が待望されている。

2. 「研究の対象」と取り組み

本領域研究は糖鎖と神経の「異なる分野の連携により発展を目指すもの」であり、新しい学術領域、神経糖鎖生物学を創成する。特に糖鎖による制御機構が明らかになれば、神経以外の「他の研究分野での新しい展開」がさらに期待できる。取り組みの要諦は、生命現象を絞り込んで二分野の研究者が議論をぶつけ、新しいコンセプトを生み出すことである。そのために糖鎖と神経からほぼ同数の先進の研究者を配し、両者の融合研究なしには領域の進展が望めない仕組みを作った（中間評価報告書 項目2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況 図4参照）。さらに公募班員も含めた連携の仕組み、領域全体のための研究支援班、若手育成のための若手の会を作り、領域の研究の推進を図る。

3. どのように学術水準の向上・発展につながるか

本領域は神経における糖鎖の作動原理と生物学的意味について単独研究では辿り着くことのなかった新しいコンセプトの確立をもたらす。一方、糖鎖はこれまで重症筋ジストロフィー、がんなど広範な疾病の発生活展に関わることが知られ、インフルエンザのタミフルや抗体医薬品の活性増強など医療の現場に応用されている。従って本領域は広範な疾病の分子基盤の理解と治療法開発に多大な影響を与える。

2. 研究の進展状況及び成果の概要

1. 何をどこまで明らかにするか

糖鎖構造は複雑であるだけでなく、ダイナミックに変化する。そうすると、タンパク質同士のように相互作用分子とのおおよそ1対1の対応も見いだせない。こうして、糖鎖の構造と機能の多様性のみがクローズアップされ、機構解明の障壁となってきた。一方、これまでほとんど未開拓であった神経における糖鎖研究によって、これまでに見えなかった神経機能制御機構の解明が期待される。そこで、本領域では糖鎖の内包する機能ドメインを機能単位として、糖鎖の作動原理とそれによる神経機能制御機構を解きたいと考えた(図2,3)。

2. 設定した研究の対象

本領域は次の2つを設定目的とした。

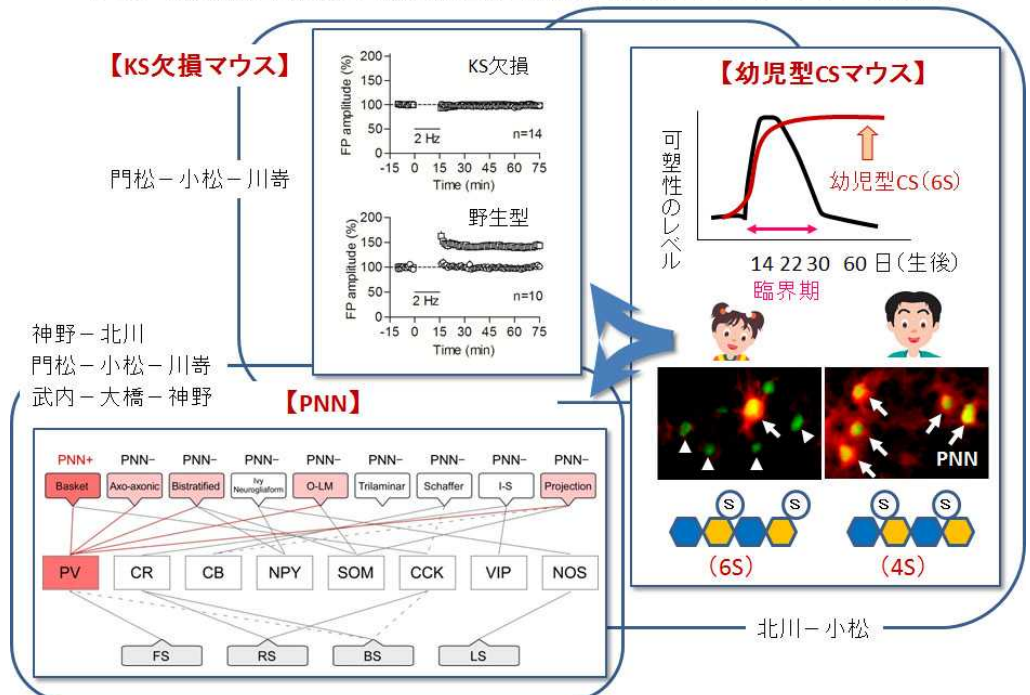
(1)異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により、当該研究領域の発展を目指すもの。

(2)当該領域の研究の発展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらすもの。

(1)に関しては、まさに連携の実現であり、領域内で如何に融合研究が進んできたかについて下に記述したい。

(2)については、例えば、がん、免疫、発生、再生など神経糖鎖以外の領域への波及をめざすものであり、本領域のゴールである糖鎖作動原理の解明および神経活動制御機構の解明によって普遍化できるコンセプトがもたらす効果を指している。その成果を下に記す。

図5 【成果1】PNNと眼優位性神経可塑性とシナプス可塑性



北川-小松

3. 研究の進展状況

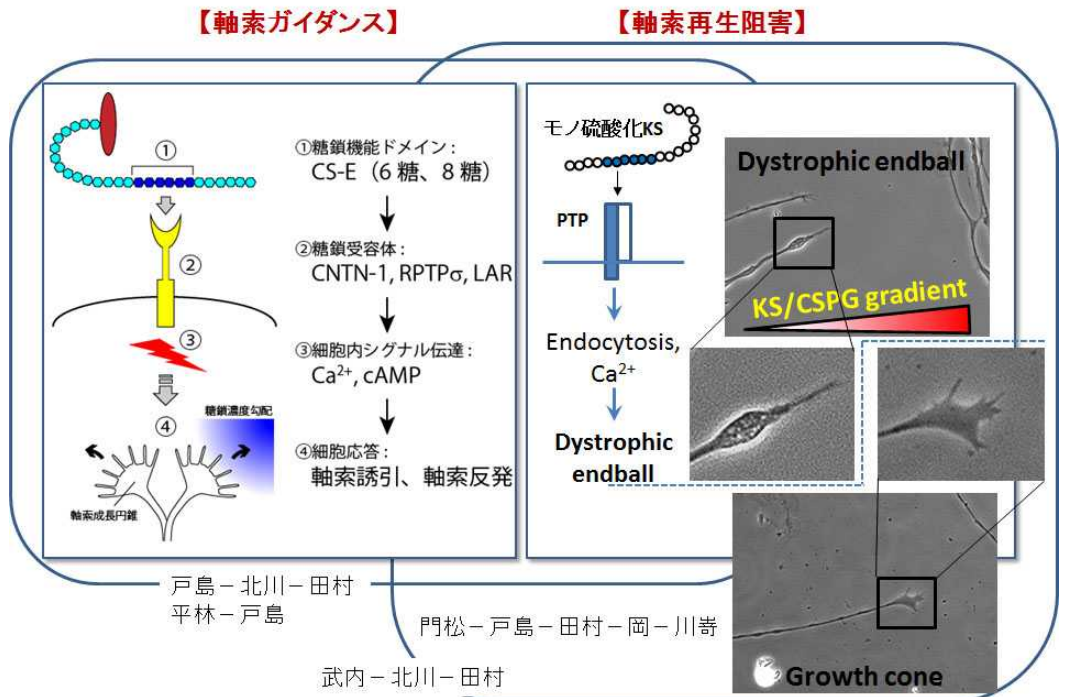
A01とA02の各々の研究項目の中で糖鎖と神経の融合研究が進んでいる。一方、A01とA02は例えばAMPA受容体のトラフィックなど神経活動の重要分子の動きを考えるとまさに切っても切り離せない関係にある。以下に述べる研究の進展状況は代表的な融合研究のうちのいくつかには過ぎない。また、これらはA01, A02の研究項目をきっかけに始動しつつも、場合によっては研究項目をまたいだ融合研究に進展したものを含む(図4右も参照されたい)。融合研究は数が増えるだけでは無意味であり、上質の成果を残してこそ価値がある。本領域でそのような融合研究が生まれていることを読み取っていただきたい。

A01 細胞外糖鎖による神経機能制御

【PNN、眼優位性神経可塑性、シナプス可塑性】北川 (A01計画) と小松 (A01計画) はコンドロイチン硫酸 (CS) の硫酸化パターンが可塑性制御に決定的役割を果たすことを見出した (2012年Nat Neurosci)。すなわち、幼児期CSは6Sと呼ばれる硫酸化が多く、この場合、ペリニューロナルネット (PNN) の形成低下が起こり、眼優位性可塑性が起こることを証明した (図5【幼児型CSマウス】)。糖鎖の微細構造の変化が劇的な神経現象を引き起こす代表的な例として歴史に残る発見である。また、PNN形成に4Sを含むCSの機能ドメインが必須であることを示したものであり、神経以外の領域にも応用可能な糖鎖の作用機構を提示できる可能性がある。PNNに関しては神野 (A01公募) が海馬の長軸に沿った機能分化 (背側部の神経回路 = 認知; 腹側部の神経回路 = 情動)とPNN形成 (背側部で生後大幅に上昇) に強い相関を見出し、認知と情動を担う神経回路は、PNNによる異なる制御を受けている可能性を示唆する成果を得た。神野はまた、PNNがPV含有GABAニューロンの中で特定のサブクラスのみを発現していることを見出している (図5【PNN】)。さらに武内 (A01公募) はヘパラン硫酸 (HS)、CSの両方の合成に影響を及ぼすKOマウスにPNN低形成を見出し、大橋 (A01公募) と共同でその機構を追っている。門松 (A01計画) と小松は、ケラタン硫酸 (KS) 欠損は臨界期に眼優位性可塑性の異常を呈すること (非遮蔽眼の反応上昇が起こらない) を見出し、それがシナプス長期増強 (LTP) にも反映されることを示した (図5【KS欠損マウス】)。このことと、PNNに対する分布の差異 (川崙 (A02公募) の開発した抗KS抗体を用いた) からKSとCSは独立に眼優位性可塑性に関わることが示唆された。

【軸索ガイダンス・再生】戸島 (A01計画) は北川 (A01計画)、田村 (総括班・北川班分担: CSオリゴ糖化学合成) と共同で、CS鎖内に存在する糖鎖機能ドメインとその受容体候補を絞り込むことに成功し、さらに受容体下流で軸索成長円錐の運動性を調節する細胞内シグナル伝達クロストークについても多くの知見を得た (図6【軸索

図6【成果2】 軸索ガイダンス・再生



ガイダンス】)。すなわち、高硫酸化CSサブタイプの一つであるCS-Eによる軸索ガイダンスを媒介する受容体としてCNTN-1, RPTPσ, LARを同定し、受容体下流の細胞内シグナル分子としてCa²⁺とcAMPの関与を示した。興味深いことに、軸索の誘引時と反発時では、必要な最短CS-E鎖長、活性化される受

容体の組み合わせ、さらには開口する Ca²⁺チャネルの種類が全く異なることが明らかになってきた。同一の CS 鎖が両方向性のリガンドとして働くための糖鎖機能ドメイン受容機構とシグナル伝達機構が明らかになりつつあることは特筆に値する。「糖鎖がリガンドとして受容体を活性化する」というコンセプトの証明という観点から、他の研究領域への影響の大きい発見となった。門松 (A01 計画) は KS が脊髄損傷後の軸索再生阻害・神経機能回復阻害に決定的な役割を担うことを見出し (2011 年 J Neurosci)、戸島、田村と共同で dystrophic endball の形成に KS が読まれることを新たにみつけた (図 6 【軸索再生阻害】)。Dystrophic endball は成体神経損傷の際の軸索断端の形状であり、これがプロテオグリカンの濃度勾配を感知する。今回、モノ硫酸化 KS が PTP に読まれることが分かり、またモノ硫酸化 KS を担うプロテオグリカンと PTP の同定にも至った。後者に関しては岡 (A02 計画)、川寄 (A02 公募) との共同で達成できた。これらの発見が、これまで見過ごされてきた growth cone collapse と dystrophic endball との差別化、in vivo での意義、そこへの CS、KS の関与といった観点をクローズアップした意義は大きい。また、武内 (A01 公募) は北川、田村と共同で HS、CS の両方の合成に影響を及ぼす KO マウスが損傷後軸索再生促進の表現型を示すことを見出した。

A02 細胞内・細胞表面糖鎖による神経機能制御

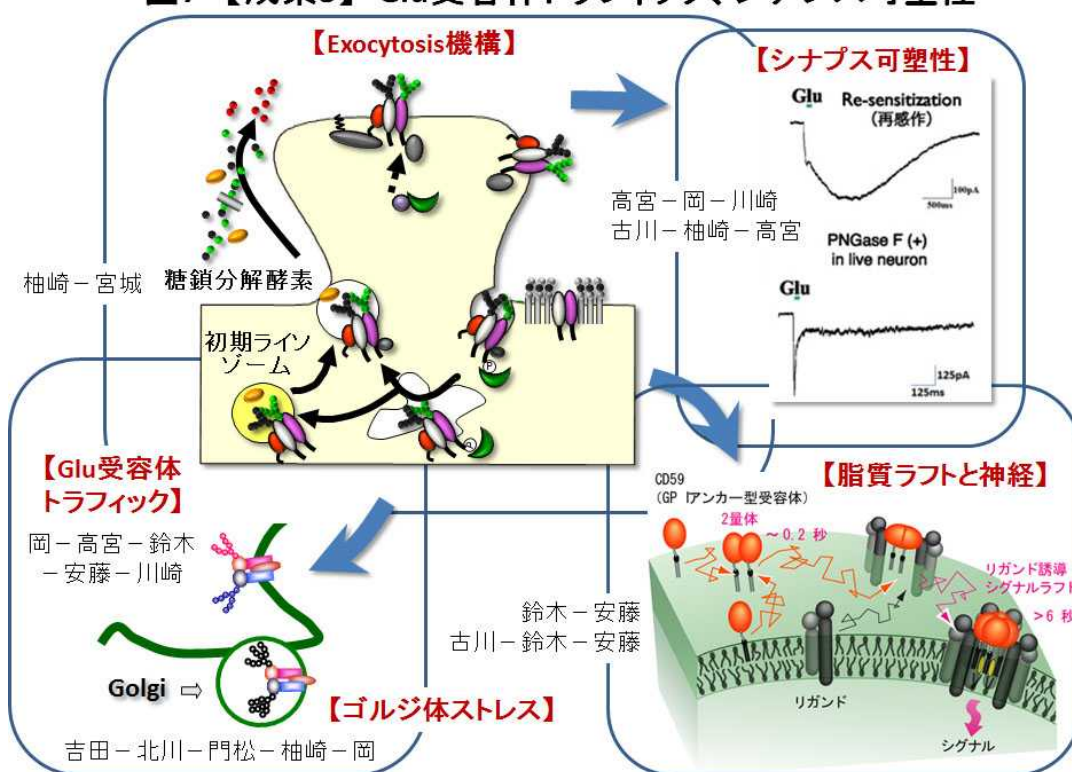
【Glu 受容体トラフィック、シナプス可塑性】 柚崎 (A02 計画) は記憶・学習の基礎過程と考えられている LTP 時に、AMPA 受容体がライソゾーム様細胞内プールから表面輸送されることを見出した。これにより AMPA 受容体そのものの糖鎖に変化が生じるとともに、LTP 刺激時にそのプールから糖鎖分解酵素が分泌され細胞外糖鎖に変化をもたらすという興味深い可能性が示唆された (図 7 【Exocytosis 機構】)。これはグルタミン酸受容体トラフィック機構に新たなコンセプトを与える重要な発見である。シアル酸分解酵素の専門家である宮城 (A02 公募) と共同で解析を進めている。

岡 (A02 計画) は AMPA 受容体 GluA1 および GluA2 を精製し、それぞれの糖鎖付加部位ごとの糖鎖構造を川崎 (総括班・岡班分担：糖鎖構造解析) と共同で決定した。次に各々の糖鎖付加部位ごとの変異を導入したところ、特定の糖鎖付加部位変異体で細胞表面発現量が大きく減少していることを見つけた (図 7 【シナプス可塑性】)。

さらに鈴木 (総括班・古川班分担：一分子イメージング) と共同で 1 分子イメージング法を用いて AMPA 受容体の細胞表面上での動きを解析し、受容体合会についてこれまでの常識を覆す新しい知見を得た (図 7 【Glu 受容体トラフィック】)。また、高宮 (A02 計画) と岡、さらに川崎 (総括班分担)、鈴木 (総括班分担)、長江 (A02 公募) は糖鎖除去および GluA1 糖鎖付加部位変異体によるチャンネル活性の大きな変化など、グルタミン酸受容体の糖鎖付加の生物学的意義をハイライトする重要な成果を得た (図 7 【シナプス可塑性】)。

吉田 (A02 計画) は北川 (A01 計画)、門松 (A01 計画)、柚崎、岡など共同して、ゴルジ体での糖鎖

図7 【成果3】 Glu受容体トラフィック、シナプス可塑性



修飾が関与する恒常性維持機構を見出した(図7【ゴルジ体ストレス】)。グリア細胞分化に伴って転写因子 TFE3 を介してゴルジ体ストレス応答が活性化される。また、シアル酸トランスポーターの発現抑制などによってゴルジ体内での糖鎖修飾能力不全となると、ゴルジ体ストレス応答が活性化される。吉田は小胞体ストレスの分子機構に大きな足跡を残したが、彼の提唱するゴルジ体ストレスは新たなコンセプトとして広く生命科学に影響を与える。古川(A02 計画)は、GM2/GD2 合成酵素遺伝子のトランスジェニックマウス、欠損マウスの記憶・学習異常、LTP 異常を見出し、これまでほとんど研究のない糖脂質のシナプス機能における役割に関して大きな一歩を印した。また、鈴木(総括班・古川班分担：一分子イメージング)、古川、安藤(A02 公募：糖鎖化学合成)によって、天然のものと同じように振舞う蛍光プローブを作成することに成功。GM1 などの各々のガングリオシドは同じ糖脂質同士がダイマー化してクラスターを形成することを見出し、糖鎖の特異性およびクラスター形成を初めて可視化した(図7【脂質ラフトと神経】)。この成果は神経機能での新発見に繋がるだけでなく、論争の続く脂質ラフトの構造・機能の解明の意味で、広く他の研究領域にも影響を及ぼす。

審査部会における所見

A (研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの進展が認められる)

1. 総合所見

本研究領域は、糖鎖研究と神経研究の融合・連携により、神経糖鎖生物学という新たな学問領域を創成することを目指すものである。糖鎖研究の専門家と神経科学の専門家が有機的に連携して多くの共同研究が推進されており、順調に研究成果が生まれつつあるなど、期待どおりの進展が認められる。神経系をモデルとして明らかとなった糖鎖による生命活動制御機構は、がんや免疫系、発生など他の生命現象においても共通の原理が存在する可能性が高く、他分野への波及効果は高い。シンポジウムの開催や若手研究者への支援活動についても積極的に推進されており、評価できる。

2. 評価に当たっての着目点ごとの所見

(a) 研究の進展状況

「異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により、当該研究領域の発展を目指す」という点については、糖鎖研究と神経研究の連携・共同研究が活発に行われており、その成果もあがりつつあることから、期待どおりに進展していると評価できる。また、「当該領域の研究の発展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらす」という観点においても、神経機能制御の他の生物学分野にも大きな波及効果を及ぼす可能性のある成果が出つつあり、今後の発展が期待できる。

(b) 研究成果

「異分野連携の共同研究」の状況については、有機的な連携・共同研究により、リガンドとしての糖鎖機能を明らかにするなど、順調に研究成果があがっていると評価できる。「他領域への波及効果」については、神経系における糖鎖による生命機能制御に関する新しい知見が生まれつつあり、現時点で、他分野への波及効果を示す具体的な事例はないものの、今後の発展が十分期待できる。

(c) 研究組織

糖鎖研究者と神経研究者がバランスよく配置されている。領域代表者のリーダーシップのもと、共同研究や公開シンポジウム、若手研究者の育成、アウトリーチ活動が推進されており、研究組織として十分に機能していると評価できる。

(d) 研究費の使用

特に問題点はなかった。

(e) 今後の研究領域の推進方策

糖鎖研究と神経研究の融合・連携による研究成果は順調にあがりつつある。一方で、糖鎖機能ドメインの抽出は十分になされていないと思われるので、今後の発展に期待したい。若手研究者育成も積極的に推進されており、今後も継続的に発展させることを期待したい。なお、海外の研究者を招聘してシンポジウムの開催が行われているが、今後は「神経糖鎖生物学」をテーマとして海外でシンポジウムを開催するなど、海外に向けたより積極的な活動が望まれる。

(f) 各計画研究の継続に係る審査の必要性・経費の適切性

各計画研究は順調に進展しており、継続に係る審査の必要はない。