

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007~2008  
 課題番号： 19500336  
 研究課題名 (和文) コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを介したニューロン-グリア間相互作用の分子機構  
 研究課題名 (英文) Molecular mechanism of neuron-glia interaction mediated by chondroitin sulfate proteoglycans.  
 研究代表者 前田 信明 (MAEDA Nobuaki)  
 財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員  
 研究者番号： 90202308

研究成果の概要：コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、成長因子、ケモカイン、細胞外基質分子等、様々な蛋白質とコンドロイチン硫酸の糖鎖構造依存的に結合し、その機能調節に重要な役割を果たしている。本研究では、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが、小脳皮質におけるプルキンエ細胞 - バークマングリア細胞間および 大脳皮質における神経芽細胞 - 放射状グリア細胞間の相互作用に寄与し、神経細胞の形態形成を制御していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：コンドロイチン硫酸；プロテオグリカン；神経細胞；細胞移動；神経突起

## 1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CS-PG) は、蛋白質にコンドロイチン硫酸 (CS) が共有結合した分子群であり、細胞表面や細胞外基質の主要構成成分になっている。これまで多くの研究者が、脳神経組織にコンドロイチナーゼ ABC を投与して CS を分解除去すると、軸索の伸長パターンに大きな異常が生じることを明らかにしている。また最近、脊髄損傷部をコンドロイチナーゼ ABC で処理すると、軸索再生および神経機能の回復が促進すると報

告され、CS-PG は神経再生の主要な阻害因子であると認識されるようになった。これらの知見は、CS-PG が神経回路形成や神経再生において極めて重要な調節因子として機能していることを示しているが、その分子機構はほとんど明らかにされていない。今後、CS-PG の操作を軸索再生等に医療応用していく上で、CS-PG がどのような情報伝達経路の基に、上記のような現象を制御しているのかを明らかにする必要がある。

一方、我々はこれまで、CS-PG として生合成される脳特異的受容体型チロシンホスファターゼ、PTP $\zeta$ の解析を進め、本受容体が

へパリン結合性成長因子、プレイオトロフィン（PTP $\zeta$ ）をリガンドとして用いることを明らかにした。ここで、PTP $\zeta$ とプレイオトロフィンとの結合には CS の寄与が重要であること、また、両者間の親和性は CS の構造に依存し、特に多硫酸化構造が高親和性結合に必須であることを見出した。

我々はさらに、プレイオトロフィン - PTP $\zeta$ 情報伝達経路が、小脳プルキンエ細胞 - バーグマングリア細胞間相互作用に寄与し、プルキンエ細胞の樹状突起形成を調節していることを示した。また我々は、PTP $\zeta$ がプルキンエ細胞に大量に発現する Delta 様の細胞外領域を有する膜蛋白質、DNER と複合体を形成することを見出している。

## 2 . 研究の目的

(1) プルキンエ細胞 - バーグマングリア細胞間相互作用における PTP $\zeta$ -DNER 情報伝達経路の解明

(2) 大脳皮質の発生過程における CS 多硫酸化構造の機能の解明

## 3 . 研究の方法

(1) DNER-PTP $\zeta$ 情報伝達経路の解析

DNER の細胞内領域のチロシン残基をアラニンに置換した各種変異体を COS-7 細胞に発現させ、そのエンドサイトーシスおよびチロシン燐酸化状態を解析した。また、DNER 変異体を Neuro-2A 細胞および小脳プルキンエ細胞に発現させ、その神経突起形成に対する影響を解析した。

(2) 子宮内電気穿孔法による CS 機能の修飾

CS 硫酸転移酵素の過剰発現およびノックダウン用プラスミドを作製し、胎生 14 日目のマウス胎仔大脳皮質に電気穿孔法を用いて導入した。胎生 18 日目に胎仔を取り出し、GFP 陽性細胞を観察した。

## 4 . 研究成果

(1) PTP $\zeta$ の情報伝達機構と神経突起形成

DNER の細胞内領域には、そのエンドサイトーシスおよび樹状突起への局在化に必要な輸送シグナル（YXX $\Phi$ モチーフ）が存在する。我々は、本シグナルを構成するチロシン残基が燐酸化されること、及び、その燐酸化によって DNER のエンドサイトーシスが阻害され、本分子が細胞膜に集積することを見出した。また、プレイオトロフィン - PTP $\zeta$ 情報伝達によって DNER のチロシン燐酸化が亢進し、そのエンドサイトーシスが遅延することを明らかにした。これは次のように解釈される。すなわち PTP $\zeta$ は、常時 DNER の YXX $\Phi$ モチーフを脱燐酸化することによって、そのエンドサイトーシスを可能にしている。一方、PTP $\zeta$ にプレイオトロフィンが結合すると、本受容体は二量体化し、そのホスファターゼ活性が不活化する。その結果、DNER の YXX $\Phi$ モチーフのチロシン燐酸化レベルが上昇し、そのエンドサイトーシスが阻害されるものと考えられる。

また、神経芽細胞腫株 Neuro-2A 細胞およびプルキンエ細胞に DNER の輸送シグナルを破壊した変異体を発現させると、本変異体が細胞膜に集積すると共に、過剰な神経突起が伸長することを見出した。以上のことは、プレイオトロフィン - PTP $\zeta$ 情報伝達経路が DNER の細胞内輸送を調節することによって、神経突起伸長を制御していることを示している。

(2) CS による神経細胞移動の制御

CS は、極めて大きな構造多様性を示す糖鎖であり、様々な蛋白質と糖鎖構造依存的に結合して、その機能調節に与っていると考えられている。最近、本糖鎖の特異構造の中でも、特に、多硫酸化構造と呼ばれる D 構造 (GlcA(2S) $\beta$ 1-3GalNAc(6S)) および E 構造 (GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4,6-diS)) の機能的な重要性が注目されている。多硫酸化構造は、CS 鎖内に陰性荷電密度の高い領域を構築し、種々の蛋白質との結合に寄与すると考えられる。そこで、マウス大脳皮質の発達過程における両構造の発現を解析したところ、どちらも神経細胞の産生とその細胞移動の時期に比較的多く存在することが明らかになった。

次に、これらの構造の機能を明らかにするため以下の実験を行なった。すなわち、D 構造および E 構造の生成に寄与する硫酸転移酵素、uronyl 2-sulfotransferase および GalNAc 4-sulfate 6-O-sulfotransferase に着目し、その過剰発現あるいはノックダウンによって、CS 鎖内の D ないし E 構造含量を増減させるシステムを構築した。マウス子宮内胎仔電気穿孔法によって、これらの酵素遺伝子をノックダウンすると、大脳皮質神経細胞の細胞移動が阻害され、脳室下帯に神経細胞が滞留することが明らかになった。その阻害効果は GalNAc 4-sulfate 6-O-sulfotransferase のノックダウンの方が強力であり、神経細胞はより脳室帯近傍に滞留するようになる。このことは、D 構造と E 構造との間に何らかの機能的差異が存在することを示唆しており、各構造に共役する情報伝達系の同定が今後の重要な課題になっている。

ノックダウンにより脳室下帯に滞留している神経細胞は多極性の形態を示している。本来ならば、このような多極性の神経細胞は、放射状グリア細胞の突起である放射状グリア線維に結合し、双極性の形態に変化して移動していく（放射性移動）。従って、CS 多硫酸化構造は、神経細胞の多極性移動段階から放射性移動段階への変化に関与している可能性が考えられる。

## 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 6 件)

Maeda, N. (2009). Structural variation of chondroitin sulfate and its roles in the central nervous system. *Central Nervous System Agents in Medical Chemistry*, in press. 査読有

Ishii, M., and Maeda, N. (2008). Oversulfated chondroitin sulfate plays critical roles in the neuronal migration in the cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 283, 32610-32620. 査読有

Ishii, M., and Maeda, N. (2008).

Spatiotemporal expression of chondroitin sulfate sulfotransferases in the postnatal developing mouse cerebellum. *Glycobiology* 18, 602-614. 査読有

Fukazawa, N., Yokoyama, S., Eiraku, M., Kengaku, M., and Maeda, N. (2008). Receptor type protein tyrosine phosphatase  $\zeta$ -pleiotrophin signaling controls endocytic trafficking of DNER that regulates neurogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4494-4506. 査読有

Saitoh, Y., Matsui, F., Chiba, Y., Kawamura, N., Keino, H., Satoh, M., Kumagai, N., Ishii, S., Yoshikawa, K., Shimada, A., Maeda, N., Oohira, A., and Hosokawa, M. (2008). Reduced expression of the MAb6B4-epitopes of chondroitin sulfate proteoglycan aggrecan in perineuronal nets from the cerebral cortices of SAMP10 mice, a model for age-dependent neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* 86, 1316-1323. 査読有

前田信明、石井万幾 (2008). 「コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによる神経発生の制御」*生体の科学* 59, pp. 105-110. 査読無

[学会発表](計 11 件)

前田信明 「コンドロイチン硫酸多硫酸化構造による神経細胞移動の制御」第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 9 日、神戸。

西村一成 「グリコサミノグリカンは神経極性化の初期段階で神経突起形成を制御する」第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 9 日、神戸。

安藤覚 「網膜軸索は培養基質上のコンドロイチン硫酸を改変する」第 28 回日本糖質学会年会、2008 年 8 月 20 日、つくば市。

前田信明 「コンドロイチン硫酸の特異的硫酸化による神経細胞移動の制御」第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月 9 日、東京。

安藤覚「網膜軸索がコンドロイチン硫酸を含む培養基質に及ぼす影響」第31回日本神経科学大会、2008年7月9日、東京。

石井万幾「発達期マウス小脳におけるコンドロイチン硫酸転移酵素の発現解析」第30回日本神経科学大会、2007年9月10日、横浜。

深澤伸名「PTP $\zeta$ によるDNERの局在制御機構の解析」第30回日本神経科学大会、2007年9月10日、横浜。

松井ふみ子「SAMP10マウス大脳皮質におけるプロテオグリカン関連エピソード6B4の発現低下」第30回日本神経科学大会、2007年9月10日、横浜。

横山彰太「神経細胞における受容体型タンパクチロシンホスファターゼ $\beta$ アイソフォームの機能」第30回日本神経科学大会、2007年9月12日、横浜。

前田信明「小脳および大脳皮質におけるコンドロイチン硫酸D構造の発現」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月12日、横浜。

柳澤比呂子「胎生期におけるPleiotrophin誘導神経突起伸長とwntシグナル」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月14日、横浜。

[図書](計 5件)

Maeda, N. (2009). Receptor-like protein tyrosine phosphatases and proteoglycans in the nervous system. In "Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology", Mikoshiba, K. (ed), Springer, New York, in press.

Yabe, T. and Maeda, N. (2009). Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferases. In "Glycobiology Research Trends", Powell, G. and McCabe, O. (ed), Nova Science, New York, in press.

Maeda, N. (2008). Chondroitin sulfate proteoglycans and neuronal network formation. In "Experimental Glycoscience", Taniguchi, N. et al. (ed), Springer, Tokyo, pp188-191.

Maeda, N. (2007). A chondroitin sulfate proteoglycan, PTP $\zeta$ /phosphacan, and neuronal network formation. In "Neuronal Network Research Horizons", Weiss M.L. (ed), Nova Science, New York, pp181-205.

Maeda, N. (2007). PTP $\zeta$ /phosphacan: Multi-functional receptor-type chondroitin sulfate proteoglycan. In "Neural Proteoglycans", Maeda, N. (ed), Research Signpost, India, pp1-19.

[ホームページ情報] (計 5件)

[http://www.chondro.jp/4\\_senmon/top.html](http://www.chondro.jp/4_senmon/top.html)

<http://tmin.ac.jp/medical/16/neurite1.html>

<http://tmin.ac.jp/develop/>

<http://tmin.ac.jp/research/dept/19/19.html>

<http://www.gak.co.jp/FCCA/glycoword/NSA01/NS-A01J.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 信明 (MAEDA NOBUAKI)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員  
研究者番号：90202308

### (2) 研究分担者

石井 万幾 (ISHII MAKI)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員  
研究者番号：50415535

### (3) 研究協力者

深澤 伸名 (FUKAZAWA NOBUNA)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・非常勤研究員

見学 美根子 (KENGAKU MINEKO)  
理化学研究所・チームリーダー