

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25年5月20日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570149

研究課題名（和文）コンドロイチン硫酸修飾酵素群による大脳皮質形成の制御機構

研究課題名（英文）Regulation of the development of cerebral cortex by chondroitin sulfate modifying enzymes.

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

研究成果の概要（和文）：コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、コンドロイチン硫酸（CS）鎖内に存在する多硫酸化構造を介して多くの蛋白質と結合し、その機能を制御していると考えられている。我々は、子宮内胎仔電気穿孔法および海馬分散培養法を用いて、神経細胞分化におけるCS多硫酸化構造の機能を解析した。その結果、CS多硫酸化構造は、神経細胞の接着性を調節することにより、神経極性を制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Chondroitin sulfate proteoglycans bind with many proteins through the oversulfated structures in the chondroitin sulfate (CS) chains. In the present study, we examined the functional roles of CS oversulfated structures in the neuronal differentiation processes. The results obtained suggest that CS oversulfated structures regulate neuronal polarization by modulating neuronal cell adhesion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、機能生物化学

キーワード：糖鎖生物学・コンドロイチン硫酸・脳・硫酸転移酵素

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、細胞表層および細胞外マトリックスの主要構成成分として普遍的に存在する複合糖質である。従来、CS-PGは物理的な構造分子として見られることが多かったが、最近、CS-PGが神経可塑性や神経突起形成に関与すること、さらに軸索再生を阻害することなどが次々に見い出され、CS-PGは神経細

胞の挙動を制御する重要な分子群であると認識されるようになってきた。神経系におけるCS-PGの機能の多くはコンドロイチナーゼABC処理によって消失することから、コンドロイチン硫酸（CS）部分の機能的な重要性が広く認識されている。しかしながら、その分子機構についてはほとんど明らかにされていない。そのような中で我々は、マウス脳の発達過程でCS構造が時空間的に極めて動的

に変化すること、さらに、脳特異的 CS-PG である受容体型チロシンホスファターゼとそのリガンドであるプレイオトロフィンとの結合が、CS 鎖内の多硫酸化構造、特に D 単位 (GlcA(2S)β1-3GalNAc(6S)) 及び E 単位 (GlcAβ1-3GalNAc(4,6diS)) を含む特定の構造に依存することを見出した。これら一連の研究から我々は、CS-PG が糖鎖構造依存的に成長因子等の機能調節を行なうことによって、種々の神経機能を調節しているという作業仮説を設定した。そこで本作業仮説を検証するため、子宮内胎仔電気穿孔法を用いて、神経細胞が合成する CS 構造を改変することを試みた。すなわち、D 単位の生成に寄与する硫酸転移酵素 uronyl 2-O-sulfotransferase (UST) および、E 単位の生成に寄与する GalNAc4S 6-O-sulfotransferase (GalNAc4S 6ST) の過剰発現あるいはノックダウン用プラスミドを構築し、電気穿孔法を用いてマウス胎仔大脳皮質の神経幹細胞に導入した。その結果、これらの酵素のノックダウンにより神経細胞移動が顕著に阻害されることを見出し、CS 多硫酸化構造が大脳皮質形成に重要な役割を果たしていることを世界で初めて明らかにした。しかしながら、CS 多硫酸化構造の詳細な機能および作用メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

大脳皮質の形成過程において、神経細胞は分裂、接着、脱接着、極性変化、細胞移動、神経突起伸長等の過程を時系列的に経て分化していく。CS は、硫酸化等の修飾により、極めて大きな構造多様性を示す多糖であり、様々な成長因子、ケモカイン、細胞外基質分子等と糖鎖構造依存的に結合して、その機能を制御すると考えられている。我々は、大脳皮質の発達過程における CS の構造変化から、CS が糖鎖構造依存的に種々の細胞外分子の機能を調節することによって、上述のような神経細胞の多様な挙動を可能にしているのではないかと考えている。そこで本研究では、大脳皮質の発達過程における CS の構造特異的な機能とその情報伝達制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 子宮内胎仔電気穿孔法

14 日目のマウス胎仔側脳室にノックダウン用プラスミド溶液を注入した後、電気パルスを与えて神経幹細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した胎仔は母体内で 4 日間成長させた後、脳を採取し、4%パラホルムアルデヒド固定した。その後、凍結切片を作製し、GFP の発現を指標にノックダウンの効果を解析した。

(2) 海馬解離培養

16 日目のマウス胎仔より海馬を採取し、トリプシン処理により単一細胞にまで解離させた。解離した神経細胞は、ポリ-L-リジン処理したカバーガラス上で培養し、顕微鏡下でタイムラプス観察した。

4. 研究成果

(1) 子宮内胎仔電気穿孔法による CS 修飾酵素の機能解析

子宮内胎仔電気穿孔法を用いて大脳皮質神経細胞における UST および GalNAc4S 6ST の発現をノックダウンし、その影響を詳細に解析した。その結果、これらの硫酸転移酵素のノックダウンにより、神経細胞移動が脳室下帯から中間帯で停止することが明らかになった。さらに神経細胞の形態も、複数の軸索様突起を接線方向に伸展した多極性の異常なものであった。本来、神経細胞は脳室下帯で多極性から双極性に極性変化し、放射状グリア線維を足場として脳表に向かって移動していく。それに対して、これらの酵素をノックダウンされた神経細胞は、中間帯を接線方向に走行する軸索束に親和性を示しており、放射状グリア線維との接着性の低下が予想された。これらのことは、CS 多硫酸化構造は神経細胞の極性変化と接着性を調節することにより、神経細胞移動を制御していることを示唆している。

一方、CS 多硫酸化構造の細胞増殖および細胞分化における機能的な重要性を解析するため、ノックダウンした胎仔大脳皮質を各種細胞増殖マーカーや分化マーカーで免疫染色したが、明確な異常は見出せなかった。

(2) 海馬ニューロンを用いた CS の機能解析

神経細胞の極性変化における CS の機能をさらに詳細に明らかにするため、海馬解離培養ニューロンを用いて解析を行った。海馬ニ

ニューロンを培養下に移すと、当初は数本の短い突起を伸ばしているのが観察される。この段階では、これらの突起は対称的であり、軸索や樹状突起の分化は見られない。しかしながら、やがて未分化な突起群の内的一本が急速に伸長して軸索に分化する。一方、それ以外の突起は急速な伸長を示さず、やがて樹状突起に分化していく。このような未成熟な突起群が非対称性を獲得し、軸索と樹状突起に分化していく現象を神経極性化という。これは、(1) で述べた神経細胞の多極性から双極性への形態変化に対応する現象であると考えられている。

培養海馬ニューロンに UST あるいは GalNAc4S 6ST の shRNA 発現プラスミドを導入し、これらの硫酸転移酵素をノックダウンすると、神経極性化が阻害され、本来一本であるべき軸索様突起が複数伸長するのが観察された。同様の現象は、海馬ニューロンをコンドロイチナーゼ ABC 存在下で培養し、CS を分解除去した場合にも観察された。この現象は子宮内胎仔電気穿孔法で観察された神経細胞の形態異常と非常に良く似ており、大脳皮質で起こった現象を *in vitro* で再現したものと考えられる。

次に、CS 多硫酸化構造の局在を観察するため、本構造を認識するモノクローナル抗体を用いて培養海馬ニューロンを免疫染色した。その結果、本構造は神経極性化の最初期段階において、軸索に選択的に発現することが明らかになった。CS 多硫酸化構造は接着斑に局在しており、コンドロイチナーゼ ABC 処理により、本構造のみならず接着斑も消失することが明らかになった。このことは、CS 多硫酸化構造は軸索部分の細胞接着を亢進することによって、神経極性化を制御していることを示唆している。

(3) まとめ

CS-PG は神経細胞の接着性の調節により、神経極性化を制御していることが示唆された。我々は、CS 多硫酸化構造がインテグリンシグナルを増強していることを示唆するデータを得ており、今後、その詳細を解析する予定である。

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 6 件)

(1) 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. doi:10.1083/jcb.201207036 (査読有)

(2) Kamimura K., Maeda N., Nakato H. (2011). In vivo manipulation of heparan sulfate structure and its effect on *Drosophila* development. **Glycobiology** **21**, 607-618. doi: 10.1093/glycob/cwq202 (査読有)

(3) Maeda N., Ishii M., Nishimura K., and Kamimura K. (2011). Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. **Neurochem. Res.** **36**, 1228-1240. doi: 10.1007/s11064-010-0324-y (査読有)

(4) Nishimura K., Ishii M., Kuraoka M., Kamimura K. and Maeda N. (2010). Opposing functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate during early neuronal polarization. **Neuroscience** **169**, 1535-1547. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.027 (査読有)

(5) Maeda N. (2010). Structural variation of chondroitin sulfate and its roles in the central nervous system. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry** **10**, 22-31. doi:10.2174/187152410790780136 (査読有)

(6) Maeda N., Fukazawa, N., Ishii, M. (2010). Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and plasticity. **Frontiers in Bioscience** **15**, 626-644. DOI: 10.2741/3637 (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

(1) 神村圭亮、他 「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機能解析」 第 85 回日本生化学会大会

(2012 12.15 福岡).

(2) 神村圭亮、他 「ショウジョウバエの神経筋接合部においてパールカンは Wnt の双方向性シグナルを調節する」 **第 35 回日本神経科学大会** (2012 9.20 名古屋).

(3) 神村圭亮、他 「ショウジョウバエの神経筋接合部においてパールカンは Wnt シグナルのバランスを調節する」 **包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ** (2012 7.26 仙台).

(4) Kamimura K.、他 “Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction.” **Gordon Conference, Proteoglycans, 2012** (2012 7.9 Andover, USA)

(5) Kamimura K.、他 “Perlecan regulates Wntless signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction.” **7th International Conference on Proteoglycans** (2011 10.20 Sydney, Australia)

(6) 神村圭亮、他 「ショウジョウバエの神経筋シナプス形成においてパールカンは Wnt シグナルを調節する」 **第 84 回日本生化学会大会** (2011 9.24 京都)

(7) 倉岡睦季、他 「大脳皮質発達期におけるコンドロイチン硫酸多硫酸化構造の細胞増殖および神経保護機能の解析」 **第 34 回日本神経科学大会** (2011 9.17 横浜)

(8) 神村圭亮、他 「ショウジョウバエの神経筋接合部においてパールカンは Wntless シグナル伝達を調節する」 **第 34 回日本神経科学大会** (2011 9.15 横浜)

(9) 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 2 回新潟プロテオグリカン研究会** (2011 2.4 新潟)

(10) Kamimura K.、他 “In vivo manipulation of heparan sulfate structure and its effects on *Drosophila* development” **第 33 回日本分子生物学会**

年会-第 83 回日本生化学会合同大会 (2010 12.9 神戸).

(11) 前田信明 「神経回路の形成と再生のメカニズム」 **第 33 回神経研シンポジウム** (2010 10.29 東京).

(12) 神村圭亮、他 「ショウジョウバエの神経筋シナプス形成においてパールカンは BMP シグナルを調節する」 **第 33 回日本神経科学大会** (2010 9.3 神戸).

(13) Kuraoka M.、他 “Functions of oversulfated chondroitin sulfate in the neuron-glia interaction.” **第 33 回日本神経科学大会**, (2010 9.3 神戸)

(14) 前田信明、他 「内在性コンドロイチン硫酸とヘパラン硫酸の神経極性化における対立的機能」 **第 33 回日本神経科学大会** (2010 9.2 神戸).

(15) Kamimura K.、他 “*Drosophila* perlecan regulates BMP signaling essential for synaptic growth.” **The 28th Naito Conference** (2010 7.28 葉山).

[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

倉岡 睦季 (KURAOKA MUTSUKI)

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・研究員

研究者番号：70569144

(平成 22 年度のみ)