

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：2013～2015

課題番号：25860057

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸の硫酸化パターンによる神経可塑性の制御機構

研究課題名(英文)Sulfation patterns of chondroitin sulfate regulate neural plasticity

研究代表者

宮田 真路 (Miyata, Shinji)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・助教

研究者番号：60533792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、神経細胞の周囲でペリニューロナルネットを形成するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンによって神経可塑性が制御される分子機構の解明を目指した。成体でも未熟なコンドロイチン硫酸鎖構造を発現する遺伝子改変マウスでは、ペリニューロナルネットの形成が低下するのに加え、その主要成分であるアグリカンの量が顕著に減少していた。さらに、遺伝子改変マウス由来のアグリカンは、脳に発現するプロテアーゼに対する感受性が増加していた。つまり、発達期におけるコンドロイチン硫酸の構造変化は、アグリカンの安定性を介してペリニューロナルネットの形成を調節し、それによって神経可塑性が制御されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Perineuronal nets (PNNs) are lattice-like extracellular matrix structures composed of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs). It has been shown that sulfation patterns of chondroitin sulfate (CS) chains on CSPGs influenced neural plasticity. However, the mechanism of PNN formation regulated by CS sulfation remains unknown. In this study, I found that overexpression of chondroitin 6-sulfotransferase-1 (CGST-1) selectively decreased aggrecan, a major CSPG in PNNs, in the aged brain without affecting other PNN components. Overexpression of 6-sulfation primarily impaired accumulation of aggrecan in PNNs. Increased 6-sulfation accelerated proteolysis of aggrecan by a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif protease. These results indicate that sulfation patterns of CS chains on aggrecan influenced the stability of the CSPG, thereby regulating formation of PNNs and neural plasticity.

研究分野：神経糖鎖生物学

キーワード：プロテオグリカン コンドロイチン硫酸 ペリニューロナルネット 神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の主要な細胞外マトリクス成分であるコンドロイチン硫酸鎖は、神経可塑性に対する阻害因子と考えられているが、その詳細は不明である。これまでに申請者は、発生に伴いコンドロイチン硫酸鎖の硫酸化パターンが変動することで、抑制性神経細胞周囲の細胞外マトリクスの構造が変化し、それにより神経可塑性が制御されることを見出している (Miyata, S. et al (2012) *Nature Neuroscience* 15, 414-422)。

神経可塑性とは、新たな経験によって脳が神経回路を再編成する能力のことである。脳は「臨界期」と呼ばれる生後初期の一定期間にのみ高い可塑性を示すが、成体になると可塑性が低下する。視覚野における眼優位性の可塑性は、臨界期可塑性のモデルとして最もよく研究されている。生後 25 日前後のマウスの片方の眼を遮断すると、遮断眼からの情報を伝達する回路が減弱し視力が低下する。しかし、成体ではこのような可塑的变化は起こらない。これらの知見から、成体では可塑性を抑制する分子ブレーキが存在すると考えられている。

コンドロイチン硫酸鎖は直鎖状の硫酸化糖鎖であり、コアタンパク質と結合したコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在する。臨界期を過ぎた成体脳にコンドロイチン硫酸分解酵素を注入すると、眼優位性の可塑性が回復することから、コンドロイチン硫酸鎖が可塑性を阻害する因子であると提唱された (Pizzorusso, T. et al. (2002) *Science* 298, 1284-1251)。同時期に、神経損傷時に多量に合成されるコンドロイチン硫酸鎖を分解することで、軸索再生を促進できることも示された (Bradbury, E. J. et al. (2002) *Nature* 416, 636-640)。これらの発見以来、コンドロイチン硫酸鎖は神経突起伸長に対する非特異的な物理的障壁となることで、神経可塑性を阻害すると考えられてきた。

しかし、コンドロイチン硫酸鎖は可塑性の高い生後初期の脳にも豊富に存在しており、すべてのコンドロイチン硫酸鎖が可塑性を阻害するとは考えにくい。コンドロイチン硫酸鎖は、グルクロン酸 (GlcA) と N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の二糖単位の繰り返しから成り、GlcA 残基の 2 位、GalNAc 残基の 6 位もしくは 4 位に硫酸化修飾を受ける。これまでに、主に *in vitro* の研究から、コンドロイチン硫酸鎖の機能はその硫酸化パターンによって調節されることが示されている。例えば、特定の硫酸化パターンを持つコンドロイチン硫酸鎖と、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するコンタクチン-1 との特異的な相互作用によって、神経突起伸長が促進されることが報告されている (Mikami, T. et al, (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 4494-4499)。

そこで申請者は、コンドロイチン硫酸鎖の

硫酸化パターンによって、可塑性が制御されるのではないかという着想に至った。まず、生後初期には 6-硫酸化コンドロイチン硫酸鎖が多く存在するが、成体になると 4-硫酸化コンドロイチン硫酸鎖が増加することに注目した。申請者の仮説を検証するため、6-硫酸化を担うコンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素 1 (C6ST-1) を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて研究を行った。これまでの研究で、C6ST-1 過剰発現マウスは臨界期が終了した成体でも強い可塑性を維持することを見出した。詳細な解析の結果、コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化パターンの変動が、抑制性神経細胞の一種であるパルプアルブミン陽性細胞を覆っているペリニューロナルネットの形成、およびその細胞の成熟を促す Otx2 タンパク質の蓄積に必要であることを明らかにした。

2. 研究の目的

抑制性神経細胞の一種であるパルプアルブミン陽性細胞は、眼優位性可塑性の制御に重要な役割を果たすことが広く知られている (Hensch, T.K. (2005) *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 877-888)。Otx2 ホメオタンパク質は、パルプアルブミン陽性細胞の成熟を促すことが報告されたが、Otx2 がどのようにパルプアルブミン陽性細胞選択的に集積するかは不明である (Sugiyama, S. et al. (2008) *Cell* 134, 508-520)。最近、別の研究グループにより高硫酸化コンドロイチン硫酸鎖が Otx2 と結合することが報告された (Beurdeley, M. et al. (2012) *J. Neurosci.* 32, 9429-9437)。しかし、この報告では、海産動物由来の構造未知のコンドロイチン硫酸多糖鎖を用いており、その特異性が不明である。これまでの多くの研究では、海産動物由来のコンドロイチン硫酸多糖鎖が用いられてきたが、これらが哺乳動物の生体内で起こっている現象をどれほど反映しているか疑問である。その大きな原因は、これらのコンドロイチン硫酸多糖鎖が不均一であり構造が不明な点である。

Wisteria floribunda agglutinin (WFA) レクチンは、ペリニューロナルネットの検出に広範に用いられており、コンドロイチン硫酸鎖の末端 GalNAc 残基を認識すると考えられている。成体視覚野では、ほとんどのパルプアルブミン陽性細胞が WFA レクチン陽性のペリニューロナルネットに覆われるにも関わらず、Otx2 の蓄積が見られるのは、全体のパルプアルブミン陽性細胞の約半数である。このことは、パルプアルブミン陽性細胞周囲のペリニューロナルネットには不均一性があり、特定のペリニューロナルネットのみが Otx2 の取り込みに関与することを示唆している。

以前、Hockfield らは、いくつかのモノクローナル抗体を用いて、ペリニューロナルネットの不均一性を報告している。3 つのモノ

クローナル抗体は、いずれもペリニューロナルネットの主要なコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるアグリカンと反応するが、それぞれの抗体は異なったペリニューロナルネットを染色することが知られている (Matthews, RT. et al. (2002) J. Neurosci. 22, 7536-7547)。

前述した申請者のこれまでの成果は、神経可塑性におけるコンドロイチン硫酸化パターンの重要性を示した最初の例であるが、その詳細な分子機構は不明である。そこで本研究では以下の点を解明する。

(1) 申請者は、コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化パターンを改変することで 0tx2 タンパク質の蓄積が低下することから、特定のコンドロイチン硫酸鎖を持つペリニューロナルネットが選択的に 0tx2 と結合すると考えた。そこで 0tx2 と結合するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを同定し、コンドロイチン硫酸鎖の構造を解析する。

(2) ペリニューロナルネットはコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを含む様々な分子の複合体である。これまでの申請者の研究により、その形成にはコンドロイチン硫酸硫酸化パターンが関与することが示された。そこで、コンドロイチン硫酸鎖の構造変化によってペリニューロナルネットの形成が制御される分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 生化学的および免疫組織化学的手法によって、0tx2 と結合するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを同定し、0tx2 との結合に必要なコンドロイチン硫酸鎖の構造を解析する。

(2) コンドロイチン硫酸鎖の構造変化がペリニューロナルネット形成を制御する分子機構を解明するために、6-硫酸化コンドロイチン過剰発現マウスにおけるペリニューロナルネット成分の発現パターンを網羅的に解析する。さらに、コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化パターンがコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの安定性に与える影響を検証する。

4. 研究成果

(1) 申請者はこれまでに、脳の細胞外マトリクス成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの糖鎖構造を改変することで神経可塑性が制御できることを明らかにしたが、その詳細な分子機構は未だよく分かっていない。コンドロイチン硫酸鎖の構造変化によって、抑制性神経細胞の成熟に必要な 0tx2 タンパク質の蓄積が低下することから、特定のコンドロイチン硫酸が 0tx2 と直接結合する可能性を検証した。別の研究グループにより高硫酸化コンドロイチン硫酸鎖が 0tx2 と

結合することが報告されたが、遺伝子改変マウスを用いた申請者の実験から、高硫酸化コンドロイチン硫酸鎖が 0tx2 の蓄積に必要でないことが判明した。

本研究で申請は、これまでエピトープの不明であった抗コンドロイチン硫酸鎖抗体によって認識されるコンドロイチン硫酸鎖が 0tx2 と共局在することを見出した。そこで、この抗体が認識するコンドロイチン硫酸鎖の構造決定を試みた。申請者は、コンドロイチン硫酸鎖の生合成に関与する酵素遺伝子を欠損したマウスでは、この抗体によって認識されるコンドロイチン硫酸鎖が激減することを見出した。この遺伝子欠損マウスのコンドロイチン硫酸鎖は野生型マウスと比べて鎖長には変化が見られなかったが、還元末端の構造に違いが見られた。つまり、0tx2 が結合するコンドロイチン硫酸鎖は、還元末端に特定の構造をもっており、この構造はより非還元末端側に存在する 0tx2 結合部位の合成に必要であることが示された。

(2) 成体でも未熟なコンドロイチン硫酸鎖構造を発現する、6-硫酸化コンドロイチン過剰発現マウスを用い、コンドロイチン硫酸の硫酸化パターンによって神経可塑性が制御される分子機構の解明を試みた。その結果、6-硫酸化コンドロイチン過剰発現マウスでは、ペリニューロナルネットの形成が低下していた。網羅的な解析の結果、6-硫酸化コンドロイチン過剰発現マウスでは、ペリニューロナルネットの主要成分であるアグリカンの量が、成体期以降に野生型マウスと比べて顕著に減少することが示された。また、他のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (プレビカン、パーシカン GAGB、ニューロカン、および、フォスファカン) や、テネシシンやリンクタンパク質といった他のペリニューロナルネット成分には影響が見られなかったことから、コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化パターンによるプロテオグリカン量の変動はアグリカンに選択的な現象であることが分かった。

6-硫酸化コンドロイチン過剰発現マウスでは、CS-56 という 6-硫酸化構造を含むコンドロイチン硫酸鎖を認識する抗体で検出されるペリニューロナルネットが形成されていたが、このペリニューロナルネットにおけるアグリカンの集積は、通常のペリニューロナルネットに比べ顕著に減少していた。さらに、6-硫酸化コンドロイチン過剰発現マウス由来のアグリカンは、野生型マウス由来のアグリカンと比べ、脳に発現するプロテアーゼである ADAMTS に対する感受性が増加していた。つまり、発達期におけるコンドロイチン硫酸鎖の硫酸化パターンの変動は、アグリカンの安定性を介して、ペリニューロナルネットの形成を調節し、それによって神経可塑性が厳密に制御されることが明らかになった。

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4件)

(1) Miyata S, Kitagawa H. Chondroitin sulfate and neuronal disorders. *Frontiers In Bioscience (Landmark Edition)*, 2016, 査読有, 21巻, 1330-1340, DOI:10.2741/4460

(2) Miyata S, Kitagawa H. Chondroitin 6-Sulfation Regulates Perineuronal Net Formation by Controlling the Stability of Aggrecan. *Neural Plasticity*, 2016, 査読有, 2016巻, 13 pages, DOI: 10.1155/2016/1305801

(3) Miyata S, Kitagawa H. Mechanisms for modulation of neural plasticity and axon regeneration by chondroitin sulphate. *The Journal of Biochemistry*, 2015, 査読有, 157巻, 13-22, DOI: 10.1093/jb/mvu067

(4) Takeuchi K, Yoshioka N, Higa Onaga S, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamura M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H, Igarashi M. Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nature Communications*, 2013, 査読有, 4巻, 3740, DOI: 10.1038/ncomms3740.

〔学会発表〕(計6件)

(1) 宮田真路、コンドロイチン硫酸による大脳皮質形成と神経可塑性の制御、第66回日本細胞生物学会大会、2014年6月11日-13日、奈良県新公会堂(奈良)

(2) 宮田真路、コンドロイチン硫酸の構造が決める神経の発生と可塑性、第146回薬学談話会、2014年7月9日、名古屋市立大学(名古屋)

(3) 宮田真路、コンドロイチン硫酸による神

経細胞の移動と極性の制御、第33回日本糖質学会年会、2014年8月10日-12日、名古屋大学豊田講堂(名古屋)

(4) Shinji Miyata, Sulfation patterns of chondroitin sulfate regulate neural development and plasticity. SFG & JSCR Joint Annual Meeting, 2014年11月16日-19日、ハワイ(米国)

(5) Shinji Miyata, Roles of chondroitin sulfate in neural development and plasticity. Neuro2013(第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学学会大会、第23回日本神経回路学会大会、合同大会)、2013年6月20日-23日、国立京都国際会館(京都)

(6) 宮田真路、コンドロイチン硫酸の硫酸化パターンによる眼優位性可塑性の制御、第32回日本糖質学会年会、2013年8月5日-7日、大阪国際交流センター(大阪)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://researchmap.jp/maro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田真路(MIYATA, Shinji)
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・特任助教
研究者番号: 60533792

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: