

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06840

研究課題名(和文) 髄鞘における硫酸化糖鎖の機能解明

研究課題名(英文) Roles of sulfated N-glycans in myelin

研究代表者

吉村 武 (YOSHIMURA, TAKESHI)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教

研究者番号：60402567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：髄鞘はグリア細胞が軸索を何重にも取り囲んだ構造であり、神経系が正常に機能するために重要な役割を果たす。髄鞘において多くの糖蛋白質が同定されてきたが、糖鎖の役割については理解が乏しかった。我々は硫酸化N結合型糖鎖が末梢神経系髄鞘には豊富に存在することを見出した。そして、その硫酸化修飾は硫酸転移酵素GlcNAc6ST-1によるものであると突き止めた。GlcNAc6ST-1ノックアウトマウスの末梢神経系髄鞘ではN結合型糖鎖の硫酸化は見られず、髄鞘異常および軸索変性が観察された。故に、末梢神経系においてGlcNAc6ST-1はN結合型糖鎖の硫酸化を介して髄鞘形成を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Myelin is formed by highly specialized glial cells and enwraps axons with a multilayered myelin membrane in vertebrates. Myelin serves essential roles in the functioning of the nervous system. Many glycoproteins have been identified in myelin. However, the roles of glycans on myelin glycoproteins remain poorly understood. In this study, we report that peripheral nervous system (PNS) myelin glycoproteins contain highly abundant sulfated N-glycans. Major sulfated N-glycans were identified in both porcine and mouse PNS myelin, demonstrating that the GlcNAc-6-O-sulfation is highly conserved in PNS myelin between these species. Mice deficient in GlcNAc6ST-1 failed to synthesize sulfated N-glycans and exhibited abnormal myelination and axonal degeneration in the PNS. Taken together, these results demonstrate that GlcNAc6ST-1 modulates PNS myelination and myelinated axonal survival through the GlcNAc-6-O-sulfation of N-glycans on glycoproteins.

研究分野：神経化学

キーワード：髄鞘 硫酸化糖鎖 末梢神経系 糖蛋白質 グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

髄鞘はグリア細胞が軸索を何重にも取り囲んだ特殊構造である。髄鞘は単に絶縁体として働き跳躍伝導を誘導し伝導速度を飛躍的に上げるだけではない。髄鞘は軸索との間に絶えず情報交換を行い、お互いに生理機能を調節し合っている。特定疾患に認定されている多発性硬化症やギラン・バレー症候群などの脱髄性疾患では軸索変性を伴う場合が多い。このように、神経機能を知る上で髄鞘を理解することは極めて重要である。多くの膜蛋白質は糖鎖修飾されており、細胞間などの相互作用に糖鎖は重要な役割を担っている。髄鞘は多重膜構造であり、これまでに多くの糖蛋白質が髄鞘において重要な役割を担うことが報告されてきた。しかしながら、今までの研究は蛋白質自体を研究対象としており、どの糖蛋白質がどのような糖鎖を有し、その糖鎖修飾がどのような役割を果たすかについて理解が乏しかった。

2. 研究の目的

研究代表者はN結合型糖鎖の網羅的解析方法として3次元 HPLC システムを改良してきており、必要試料の微量化にも成功した。この手法をさらに改良し、髄鞘の酸性糖鎖を網羅的に解析した結果、ブタやマウスなどにおいて、中枢神経系の髄鞘には硫酸化N結合型糖鎖は僅かにしか存在しないが、末梢神経系の髄鞘には豊富に存在することを見出した。末梢神経系髄鞘の硫酸化N結合型糖鎖の詳細な構造解析から、ブタとマウスの種間において GlcNAc の6位が硫酸化されていることが共通していたために、硫酸転移酵素 GlcNAc6ST に研究代表者は着目した。そして、研究代表者はマウス坐骨神経に存在する GlcNAc6ST の mRNA を調べた結果、GlcNAc6ST-1 のみ発現していることを見出した。本研究の目的は、末梢神経系髄鞘において GlcNAc6ST-1 により作られる硫酸化糖鎖がどのような役割を果たすのかを解き明かすことである。

3. 研究の方法

(1) GlcNAc6ST-1 ノックアウト (KO) マウスの末梢神経系髄鞘における糖鎖の解析

名古屋大学の門松健治教授および内村健治特任准教授と共同研究を行い、研究代表者が改良した糖鎖解析手法を用いて GlcNAc6ST-1 KO マウスの末梢神経系髄鞘の N 結合型糖鎖の解析を行った。野生型および GlcNAc6ST-1 KO マウスの坐骨神経から髄鞘を精製し、それをアセトン沈殿後にヒドラジン分解法を用いて N 結合型糖鎖を遊離させ、2 種類のカラム (グラファイトカーボンカラムとセルロースカラム) を用いて N 結合型糖鎖を精製した。HPLC システムを用いて精製した N 結合型糖鎖を解析した。

(2) GlcNAc6ST-1 KO マウスにおける髄鞘と軸

索への影響の観察

東京薬科大学の馬場広子教授および林明子講師と共同研究を行い、パラホルムアルデヒドを用いて固定した GlcNAc6ST-1 KO マウス坐骨神経から長軸方向に切った切片を作製し、パラノドマーカの抗 Caspr 抗体を用いて免疫染色を行った。蛍光顕微鏡を用いて染色したサンプルを観察し、パラノドおよびランビエ絞輪の長さを測定した。

GlcNAc6ST-1 KO マウスの髄鞘の形態を調べるために、パラホルムアルデヒドを用いて固定した GlcNAc6ST-1 KO マウス坐骨神経から断面に切った切片を作製し、トルイジンブルー染色を行った。変性した軸索の数や g-ratio (軸索直径/髄鞘化された線維の直径) を測定した。

GlcNAc6ST-1 KO マウスの末梢神経系髄鞘の詳細な構造を調べるために、生理学研究所の大野伸彦特任准教授と共同研究を行い、連続ブロック表面走査型電子顕微鏡を用いて髄鞘の3次元形態を観察した。

(3) 末梢神経系髄鞘の糖蛋白質 P0 が有する糖鎖の解析

ブタの末梢神経系髄鞘から銅イオンを固定化したアフィニティークロマトグラフィ (Cu²⁺-IMAC) により P0 蛋白質を精製した。精製した P0 から N 結合型糖鎖を精製し、HPLC システムを用いて P0 蛋白質の N 結合型糖鎖を解析した。

アメリカ合衆国オハイオ州クリーブランドクリニックの Bruce D. Trapp 教授と共同研究を行い、PLP 蛋白質の代わりに P0 蛋白質を中枢神経系に発現させたトランスジェニックマウスの中枢神経髄鞘の N 結合型糖鎖を解析した。

4. 研究成果

(1) GlcNAc6ST-1 KO マウスの末梢神経系髄鞘における糖鎖の解析

野生型のマウスの末梢神経系髄鞘において、硫酸化された N 結合型糖鎖の大部分は GlcNAc の6位が硫酸化されたものである。GlcNAc6ST-1 KO マウスの末梢神経系髄鞘における N 結合型糖鎖の網羅的構造解析の結果、このマウスの末梢神経系髄鞘において硫酸化された N 結合型糖鎖は殆ど検出できなかった。故に、マウスの末梢神経系髄鞘では GlcNAc6ST-1 がほぼ独占的に N 結合型糖鎖の硫酸化を担っており、その KO マウスでは他の酵素で補われることがなく N 結合型糖鎖の硫酸化が行われていないことが明らかとなった。

(2) GlcNAc6ST-1 KO マウスにおける髄鞘と軸索への影響の観察

末梢神経系髄鞘における GlcNAc6ST-1 の役割を調べるために、GlcNAc6ST-1 KO マウスの坐骨神経の髄鞘の機能ドメイン (パラノドおよびランビエ絞輪) の長さを測定した。野

生型マウスと比較して、GlcNAc6ST-1 KO マウスのパラノードは長くなっており、また、ランビエ絞輪も広がっていた。

GlcNAc6ST-1 KO マウス坐骨神経の断面を観察し、変性した軸索の数や g-ratio を測定した。野生型マウスと比較し、GlcNAc6ST-1 KO マウスの坐骨神経では変性した軸索が多く認められた。また、GlcNAc6ST-1 KO マウスの坐骨神経では g-ratio が上昇していた。この時、GlcNAc6ST-1 KO マウスの坐骨神経の軸索直径は野生型マウスと有意差がなかった。故に、GlcNAc6ST-1 をノックアウトさせると軸索変性や異常な髄鞘を引き起こすことが明らかとなった (図 1)。

3次元電子顕微鏡法により GlcNAc6ST-1 KO マウスの坐骨神経の詳細な構造を観察した。GlcNAc6ST-1 KO マウスの坐骨神経では軸索と髄鞘の間に空胞構造が観察された。また、GlcNAc6ST-1 KO マウスの坐骨神経では、一部に異常に細くなった軸索が観察された。野生型マウスのパラノードでは髄鞘と軸索は隙間なく結合しているが、GlcNAc6ST-1 KO マウスでは髄鞘が軸索から離れていた。以上の結果は、GlcNAc6ST-1 をノックアウトさせると末梢神経系において異常な形態を引き起こすことを示している (図 1)。

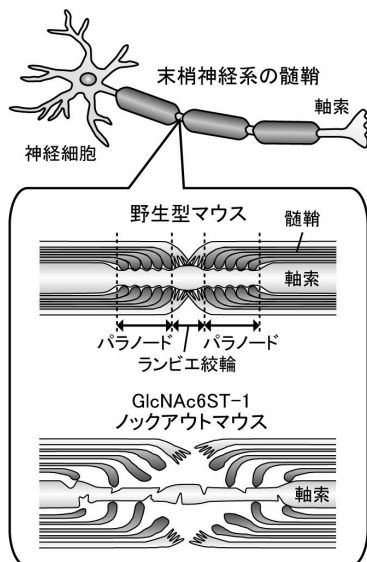


図1: 硫酸転移酵素ノックアウトマウス
硫酸転移酵素 GlcNAc6ST-1 ノックアウトマウスでは異常な髄鞘および軸索変性が認められた。

(3) 末梢神経系髄鞘の糖蛋白質 P0 が有する糖鎖の解析

P0 蛋白質は末梢神経系髄鞘の蛋白質の中で最も発現レベルが高い糖蛋白質である。精製したブタ P0 蛋白質の N 結合型糖鎖を解析した結果、硫酸化された N 結合型糖鎖が豊富に存在していた。詳細な糖鎖構造解析から、多くの硫酸化 N 結合型糖鎖において GlcNAc の 6 位が硫酸化されていることを見出した。

末梢神経系髄鞘に特異的に P0 が発現する一方で、中枢神経系特異的に PLP が発現して

いる。興味深いことに髄鞘は進化の過程で四肢動物までは中枢・末梢神経共に P0 が発現し、PLP はなかった。それ以降、中枢神経系に PLP が出現するに伴い、P0 が末梢神経系のみを発現するようになり、それらの機能的な関連が示唆されている。しかし、PLP KO マウスの中枢神経系に P0 を発現するトランスジェニックマウス (P0-CNS マウス) では、PLP のノックアウトによる軸索変性を P0 発現で機能回復させることが出来ないどころか、増悪させることが知られている。研究代表者らは P0-CNS マウスの中枢神経系髄鞘の糖鎖解析を行った結果、野生型マウスとほぼ同様に硫酸化 N 結合型糖鎖の割合が低いことを明らかにした。これらの結果から、P0 を中枢神経系に発現させても、本来 P0 に付加される N 結合型糖鎖が付加されていないことが示唆された。P0 に正しい糖鎖が付加されていないことで P0 が本来の機能を果たせない可能性がある。

以上の結果から、末梢神経系において GlcNAc6ST-1 は P0 蛋白質などの糖蛋白質の N 結合型糖鎖の硫酸化を介して髄鞘形成を制御することが明らかとなった (図 2)。これらの成果を論文として報告した (Yoshimura et al., Scientific Reports, 2017)。

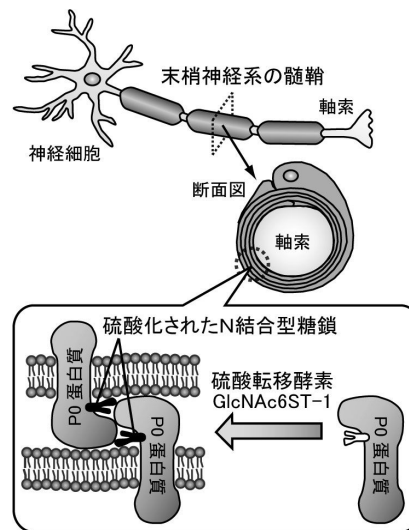


図2: 硫酸化糖鎖の役割
GlcNAc6ST-1 は髄鞘蛋白質 P0 の N 結合型糖鎖の硫酸化を介して末梢神経系髄鞘の形成を制御する。

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1件)

Yoshimura T, Hayashi A, Handa-Narumi M, Yagi H, Ohno N, Koike T, Yamaguchi Y, Uchimura K, Kadomatsu K, Sedzik J, Kitamura K, Kato K, Trapp BD, Baba H, Ikenaka K.

GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of

N-glycans and myelination in the peripheral nervous system. Scientific Reports, 査読有, 7, 2017 pp.42257, doi: 10.1038/srep42257.

〔学会発表〕(計 13 件)

Takeshi Yoshimura and Kazuhiro Ikenaka. N-glycan analysis from water-insoluble samples. The 47th NIPS International Symposium "Decoding Synapses", 2016年10月27日, ポスター発表, Okazaki Conference Center (Okazaki, Japan)

吉村武, 半田麻衣, 林明子, 矢木宏和, 山口宜秀, 内村健治, 門松健治, 加藤晃一, 馬場広子, 池中一裕. Sulfated N-glycans modulate myelination in the peripheral nervous system. 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会合同年会, 2016年9月9日, ポスター発表, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

吉村武. GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system. 新学術領域研究「グリアアセンブリによる脳機能発現の制御と病態」第3回夏のワークショップ, 2016年7月15日, ポスター発表, 山形国際ホテル(山形県山形市)

吉村武. 髄鞘の糖鎖解析から見えてきた硫酸化糖鎖の役割. 第5回新潟脳研-生理研合同シンポジウム, 2016年3月2日, 口頭発表, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

吉村武. GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system. 第21回グリアクラブ, 2016年2月1日, 口頭発表, 小樽朝里クラッセホテル(北海道小樽市)

吉村武. 硫酸化糖鎖は髄鞘形成を制御する. 第3回包括的神経グリア研究会, 2016年1月10日, 口頭発表, ホテルニュータカハシ(静岡県熱海市)

Takeshi Yoshimura, Mai Handa-Narumi, Akiko Hayashi, Hirokazu Yagi, Yoshihide Yamaguchi, Kenji Uchimura, Kenji Kadomatsu, Koichi Kato, Hiroko Baba, Kazuhiro Ikenaka. GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system. 第20回グリア研究会, 2015年12月5日, 口頭発表, 名古屋市立大学医学部研究棟(愛知県名古屋市)

吉村武, 半田(鳴海)麻衣, 林明子, 矢木宏和, 内村健治, 門松健治, 加藤晃一, Bruce D. Trapp, 馬場広子, 池中一裕. 硫酸化糖鎖は末梢神経系髄鞘の形成を制御する. 糖鎖科学中部拠点・第12回若手の

カフォーラム, 2015年11月28日, 口頭発表, 名城大学薬学部(愛知県名古屋市)
吉村武. 髄鞘の糖鎖解析から見えてきた硫酸化糖鎖の役割. 第6回神経科学と構造生物学の融合研究会, 2015年11月26日, 口頭発表, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

吉村武. 硫酸化糖鎖は髄鞘形成を制御する. 第13回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 2015年10月20日, 口頭発表, 愛知県産業労働センター「ウインクあいち」(愛知県名古屋市)

吉村武, 半田麻衣, 林明子, 矢木宏和, 内村健治, 門松健治, 加藤晃一, 馬場広子, 池中一裕. GlcNAc6ST-1はN結合型糖鎖の硫酸化を介して末梢神経系の髄鞘形成を制御する. 第5回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム, 2015年9月19日, ポスター発表, 生理学研究所大会議室(愛知県岡崎市)

Takeshi Yoshimura, Akiko Hayashi, Kenji Uchimura, Kenji Kadomatsu, Yoshihide Yamaguchi, Hiroko Baba, Kazuhiro Ikenaka. GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system. 第58回日本神経化学会大会, 2015年9月12日, 口頭発表, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

Takeshi Yoshimura, Mai Handa-Narumi, Akiko Hayashi, Hirokazu Yagi, Yoshihide Yamaguchi, Kenji Uchimura, Kenji Kadomatsu, Kunio Kitamura, Koichi Kato, Bruce D. Trapp, Hiroko Baba, Kazuhiro Ikenaka. GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system. 12th Biennial ISN Satellite Meeting Myelin Biology 2015, 2015年8月28日, 口頭発表, Fitzroy Island (Australia)

〔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

生理学研究所プレスリリース

http://www.nips.ac.jp/release/2017/02/post_337.html

研究室のホームページ

<http://www.ugscd.osaka-u.ac.jp/mbs/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉村 武 (YOSHIMURA, Takeshi)
大阪大学・連合小児発達学研究所・助教
研究者番号：60402567

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

門松 健治 (KADOMATSU, Kenji)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80204519
内村 健治 (UCHIMURA, Kenji)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特
任准教授
研究者番号：20450835
馬場 広子 (BABA, Hiroko)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40271499
林 明子 (HAYASHI, Akiko)
東京薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：90232090
大野 伸彦 (OHNO, Nobuhiko)
生理学研究所・分子細胞生理研究領域・特
任准教授
研究者番号：10432155