

令和元年6月20日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08277

研究課題名(和文)新規糖鎖機能解析ツールを利用した記憶形成過程における迅速な糖鎖シグナル制御の解明

研究課題名(英文)Rapid regulation of sialidase activity in response to neural activity and sialic acid removal during memory processing

研究代表者

南 彰(Minami, Akira)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：80438192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖からシアル酸を脱離する酵素シアリダーゼは、神経興奮と連動して活性が迅速に増加する。この増加によって、細胞表面で糖鎖構造を瞬時に変化させることが可能となる。この構造変化は記憶形成に欠かすことができない。本研究では、「神経興奮と連動した迅速な糖鎖構造の変化が、記憶形成時の神経回路形成を制御する」との作業仮説のもと、これまでに開発した糖鎖機能分析ツールを利用して記憶におけるシアリダーゼの機能を多角的に解析した。本研究によって、記憶形成時にシアル酸が脱離すること、この脱離はグルタミン酸放出に対する負のフィードバック機構の一端を担うことや記憶の基礎原理である長期増強に関わることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経における糖鎖の機能解析は、タンパク質の機能解析などと比較して遅れている。その原因として、糖鎖機能の解析ツールが限られていることが挙げられる。記憶などの極めて短時間で変化する現象において糖鎖の役割を理解するためには、新たな糖鎖機能の解析ツールが必要である。本研究では研究代表者らが開発した新たな糖鎖機能分析ツールを利用することにより、神経興奮に伴って糖鎖構造が極めて短いタイムスケール(単位：秒や分)で厳密に制御されていることが明らかになった。この研究成果を基盤として、現在全く新しい視点から疾患や生理機能の機能解明に取り組んでいる

研究成果の概要(英文)：We previously found that sialidase, which removes an acidic sugar molecule from the end of the sugar chain, rapidly changes enzyme activity in response to neural excitation on the cell surface and is essential for memory formation. If the sugar chain structure is regulated on the cell surface, it is possible to change the sugar chain structure instantaneously. In this study, based on the working hypothesis that “a rapid change in sugar chain structure in response to neural excitation controls neural circuit formation during memory formation”, the function of sialidase in memory was investigated by using a novel analysis tools for glycans. The present study revealed that sialic acid detaches during memory formation, and that this detachment is one of the negative feedback mechanisms for glutamate release and is related to the long-term potentiation that is the basic principle of memory.

研究分野：神経糖鎖生物学

キーワード：シアリダーゼ 神経 海馬 記憶 糖鎖 蛍光プローブ シアル酸 in vivo

1. 研究開始当初の背景

糖鎖末端を修飾する酸性糖分子(シアル酸)は、シアリダーゼによって糖鎖から脱離される。ほ乳動物のシアリダーゼ活性はウイルスなどと比較して弱く、組織上のシアリダーゼ活性の分布を知ることは不可能であった。研究代表者は、シアリダーゼの酵素活性をホ乳動物の組織や細胞上で高感度かつ特異的にイメージングすることのできる可視化プローブを開発した(図1、PLoS ONE, 2014; Neuroimage, 2011)。

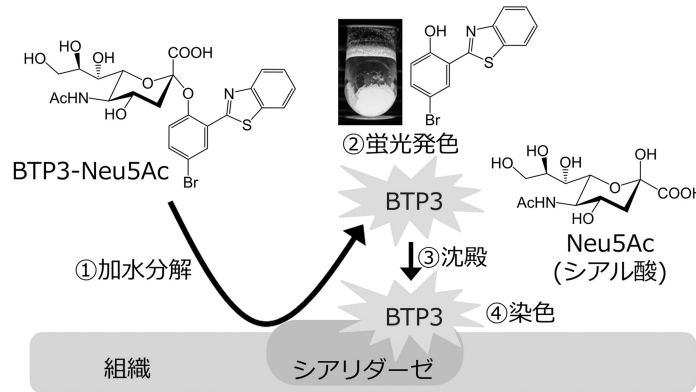


図1 シアリダーゼ活性イメージングプローブ BTP3-Neu5Ac の染色原理

本プローブを利用してシアリダーゼ活性のラット脳内分布を検討したところ、記憶領域(海馬)の主要な興奮性神経線維(苔状線維)の神経終末に強いシアリダーゼ活性が検出されることを見出した。この知見をもとさらに、苔状線維終末付近にシアリダーゼ阻害剤(DANA)を投与すると、モリス水迷路で評価した海馬依存性の空間記憶能が著しく低下した(PLoS ONE, 2017)。シアリダーゼによる糖鎖構造の制御は、海馬の記憶形成に不可欠であると考えられる。これまでに本プローブは、がんの検出(PLoS ONE, 2014)やウイルス感染の検出(Biol. Pharm. Bull., 2015; Virology, 2014; J. Virol. Methods, 2014; Sci. Rep., 2014 など)へと利用範囲が拡大している。

シアリダーゼはどのように記憶を制御しているのでしょうか。脳の発生時において新しい神経回路が形成される時には、互いの神経に発現する神経接着因子(NCAM)同士が結合する必要がある。しかしながら、未成熟なシナプスでは、NCAM上に糖鎖のシアル酸重合体が発現しており、その負電荷によって神経細胞同士の接着が抑制されていることが海外の研究グループから報告されている(Nat. Neurosci., 2007)。新しい神経回路が作られる際には、適切な場所とタイミングでシアル酸がNCAMから外れる必要がある。このことは、発生段階だけでなく、記憶形成時の神経回路形成にもあてはまると考えられる。すなわち、記憶形成時の神経回路構築には、シアル酸がシアリダーゼによってタイミング良く迅速に脱離することが必要だと推定される(図2)。研究代表者は実際に、高濃度カリウムによって神経に脱分極刺激を与えた場合や、記憶の基礎過程であるシナプス伝達効率の長期増強(LTP)を薬物によって誘発した場合に、高感度可視化ツールで検出したラット海馬のシアリダーゼ活性が顕著に増加することを見出している。

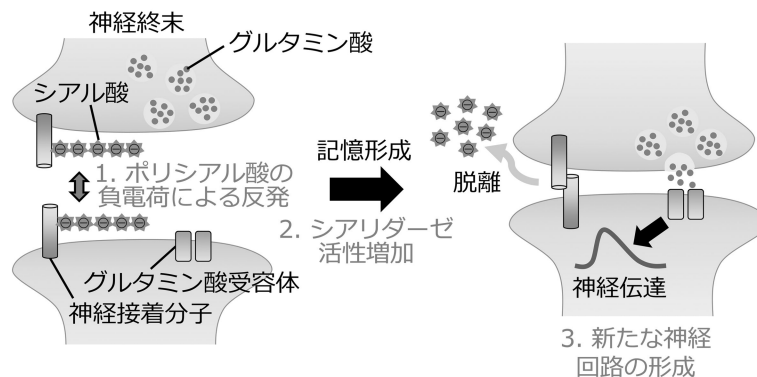


図2 推定される記憶形成におけるシアリダーゼの働き

## 2. 研究の目的

細胞表面に発現する糖鎖の構造変化には、細胞内小器官を経由することから比較的長時間を要すると考えられてきた。研究代表者は、糖鎖末端から酸性糖分子を脱離するシアリダーゼが、細胞表面において神経興奮と連動して酵素活性を迅速に変化させること、また、記憶形成に必須であることを見出した。糖鎖構造が細胞表面で制御されるのであれば、糖鎖構造を瞬時に変化させることが可能である。本研究では、「神経興奮と連動した迅速な糖鎖構造の変化が、記憶形成時の神経回路形成を制御する」との作業仮説のもと、これまでに開発した糖鎖機能分析ツールを利用して記憶におけるシアリダーゼの機能を多角的に解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖鎖脱離のインビボ解析法

シアリダーゼは外界からのシグナルによって細胞内局在が変化することが報告されている (Yamaguchi, et al., B.B.R.C., 2006)。このことから、神経興奮と連動してシアリダーゼの細胞内局在が変化している可能性がある。そこで、インビボマイクロダイアリシス法を利用して、ラットの記憶形成時における細胞表面からのシアル酸脱離を測定した。学習には、恐怖条件付け文脈学習を利用した。また、脳梗塞時のシアリダーゼ活性変化を検討した。

### (2) 記憶におけるシアリダーゼの機能解明

シアリダーゼ阻害薬 (DANA) を利用して、細胞外電位記録法により測定した海馬シナプスのシナプス可塑性 (長期増強) におけるシアリダーゼの役割を検討した。また、シアリダーゼアイソザイム Neu3 をノックアウトしたマウスを利用して、LTP を測定した。さらに、ラット海馬 CA3 領域に Neu4 に対する siRNA を持続的に投与したのち、モリス水迷路で記憶能を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 記憶形成時のシアリダーゼ活性変化と関与するシアリダーゼアイソザイムについて

初めに、恐怖条件付け文脈学習時のシアリダーゼ活性変化についてインビボマイクロダイアリシス法を利用して検討した。ラット海馬の細胞外液中に含まれるシアル酸量は、学習時に有意に増加した。シアリダーゼには、細胞内局在や特性の異なる Neu1、Neu2、Neu3、Neu4 の4種のアイソザイムがある。そこで次に、BTP3-Neu5Ac によって検出されるシアリダーゼアイソザイムを検討した。ラットの各種シアリダーゼアイソザイムを利用して BTP3-Neu5Ac の加水分解を行った。その結果、BTP3-Neu5Ac は中性条件下、Neu2 と Neu4 によって効率良く加水分解された。脳では Neu2 の発現が乏しいことから、BTP3-Neu5Ac で検出される神経活動と連動したシアリダーゼ活性の変化は主に Neu4 に起因すると考えられた。そこで、ラット海馬に Neu4 に対する siRNA を持続的に投与したところ、モリスの水迷路によって評価した海馬依存性記憶能が低下した。以上より、記憶形成時にシアル酸が脱離すること、また、記憶に関わるシアリダーゼアイソザイムの一端が明らかになった。

### (2) グルタミン酸放出に対するシアリダーゼの機能

脳梗塞時の虚血性神経興奮に伴ったシアリダーゼ活性の変化、及びシアリダーゼがグルタミン酸の放出に及ぼす影響を検討した。初めに、*in vivo* マイクロダイアリシス法により内在性のシアリダーゼ活性が検出されていることを正確に把握するために、シアリダーゼ阻害剤でラット海馬領域を灌流し、灌流液中に含まれるシアル酸量を分析した。従来型のシアリダーゼ阻害剤 DANA は、HPLC 分析時のプレカラム標識化の際にシアル酸の場合と同一化合物となるため、DANA 存在下でのシアル酸分析は困難である。そこで新規シアリダーゼ阻害剤 DPNA を合成した。ラット海馬を DPNA で灌流したところ、灌流液中に含まれるシアル酸量が減少した。逆に、バクテリア由来シアリダーゼを添加するとシアル酸量が増加した。このように、シアリダーゼ活性の変化はシアル酸遊離量の変化として捉えられることを確認した。そこで同方法を利用して、脳梗塞時のシアリダーゼ活性の変化を検証した。ACSF による灌流下でローズベンガルによって脳梗塞を惹起させたところ、ラット海馬のシアリダーゼ活性が脳梗塞時に迅速に増加することを見出した。さらに、シアリダーゼ阻害剤を作用させると灌流液中のグルタミン酸量が著しく増加することを見出した。シアリダーゼはグルタミン酸放出を抑制すると示唆される。以上、脳梗塞時のシアリダーゼ活性増加は、グルタミン酸放出に対する負のフィードバック機構の一端を担うと考えられる (図4) (J. Biochem., 2018)。

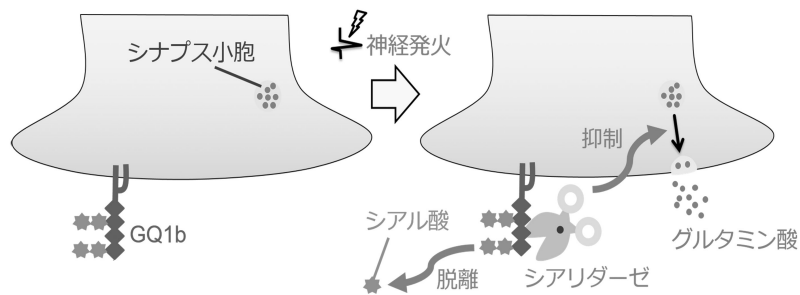


図4 シアリダーゼによるグルタミン酸の放出抑制

(3) シナプス伝達効率の長期増強現象 (LTP) におけるシアリダーゼの役割

記憶の基礎過程であるシナプス伝達効率の長期増強現象 (LTP) におけるシアリダーゼの役割について検討した。ラット海馬の急性切片を作製し、細胞外電位記録法によって Schaffer 側枝-CA1 錐体細胞間シナプスから興奮性シナプス後場電位 (fEPSP) を記録した。同シナプスにおける LTP 強度は、シアリダーゼ阻害剤 (DANA) を作用させることによって減弱した。シアリダーゼアイソザイム Neu3 をノックアウトしたマウスでは、野生型と比較して LTP 強度が有意に減弱していた。これらの結果から、内在性シアリダーゼが LTP 強度に関与していることが示唆された。次に、シアリダーゼ活性イメージングプローブ BTP3-Neu5Ac を用いて LTP 誘導時におけるシアリダーゼ活性の変化を検討したところ、神経の高頻度刺激に応じて CA1 領域のシアリダーゼ活性が上昇した。次に、シアリダーゼが fEPSP に与える影響を検討した。灌流液にシアリダーゼを添加すると fEPSP が濃度に依存して増加し、LTP が誘導された。LTP はポリシアル酸特異的なシアリダーゼによっても誘導された。このシアリダーゼ誘導性 LTP は、NMDA 受容体の活性化や細胞内カルシウムの濃度上昇を介さないものであった。以上より、神経活動と連動したシアリダーゼ活性の上昇は、LTP の誘導に関わることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

- (1) 南 彰, 鈴木 隆: シアリダーゼの機能解析ツールの開発と脳組織への応用、化学と生物、in press.
- (2) Akira Minami, Ami Ishii, Sumika Shimba, Takahiro Kano, Eri Fujioka, Saki Sai, Nagisa Oshio, Sayaka Ishibashi, Tadanobu Takahashi, Yuuki Kurebayashi, Hiroaki Kanazawa, Nobuhiro Yuki, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda and Takashi Suzuki: Down-regulation of glutamate release from hippocampal neurons by sialidase. *J. Biochem.*, 163 (4), 273-280 (2018)
- (3) Daisuke Kato, Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Hitomi Otake, Mika Yamazaki, Chihiro Tamoto, Akira Minami, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki: An easy, rapid, and sensitive method for detection of drug-resistant influenza virus by using a sialidase fluorescent imaging probe, BTP3-Neu5Ac. *PLoS One*, 13, e0200761 (2018)
- (4) Yasunori Iwao, Izumi Tomiguchi, Ayaka Domura, Yusuke Mantaira, Akira Minami, Takashi Suzuki, Takashi Ikawa, Shin-ichiro Kimura, Shigeru Itai: Inflamed site-specific drug delivery system based on the interaction of human serum albumin nanoparticles with myeloperoxidase in a murine model of experimental colitis. *Eur J Pharm Biopharm.*, 125, 141-147 (2018)
- (5) Saki Shimizu, Hiroshi Matsushita, Akira Minami, Hiroaki Kanazawa, Takashi Suzuki, Kazushi Watanabe, Wakatsuki Akihiko: Royal jelly does not prevent bone loss but improves bone strength in ovariectomized rats. *Climacteric*, 21 (6), 601-606 (2018)
- (6) 南 彰, 鈴木 隆: 記憶におけるシアリダーゼの役割、生化学、90 (1), pp94-98 (2018).
- (7) 高橋忠伸、紅林佑希、大坪忠宗、池田 潔、南 彰、鈴木 隆: 薬剤耐性インフルエンザの蛍光検出単離法、*BIO Clinica*, 33 (3), 38-44 (2018)
- (8) 高橋忠伸、紅林佑希、加藤大介、大坪忠宗、池田 潔、南 彰、鈴木 隆: 薬剤耐性インフルエンザの単離法と簡易高感度検出法、*BIO Clinica*, 33 (9), 98-103 (2018)
- (9) 高橋忠伸、紅林佑希、加藤大介、大坪忠宗、池田 潔、南 彰、鈴木 隆: 薬剤耐性インフルエンザの蛍光イメージング法の開発、*アグリバイオ*, 2 (13), 81-87 (2018)
- (10) 大坪忠宗、池田 潔、紅林佑希、南 彰、高橋忠伸、鈴木 隆: 固体発光性色素を用いたシアリダーゼライブイメージングプローブの開発、*有機合成化学協会誌*, 7 (12), 1272-1280 (2018)

- (11) Akira Minami, Yuko Meguro, Sayaka Ishibashi, Ami Ishii, Mako Shiratori, Saki Sai, Yuuki Horii, Hirotaka Shimizu, Hokuto Fukumoto, Sumika Shimba, Risa Taguchi, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki: Rapid regulation of sialidase activity in response to neural activity and sialic acid removal during memory processing in rat hippocampus. *J. Biol Chem.*, 292, 5645-5654 (2017)
- (12) Hiroshi Matsushita, Akira Minami, Hiroaki Kanazawa, Takashi Suzuki, Sanan Subhadhirasakul, Kazushi Watanabe, Akihiko Wakatsuki: Long-term supplementation with young coconut juice does not prevent bone loss but rather alleviates body weight gain in ovariectomized rats. *Biomedical. Reports*, 6, 585-591 (2017)
- (13) Monira Pervin, Keiko Unno, Aimi Nakagawa, Yuu Takahashi, Kazuaki Iguchi, Hiroyuki Yamamoto, Minoru Hoshino, Aya Hara, Akiko Takagaki, Fumio Nanjo, Akira Minami, Shinjiro Imai, Yuriyuki Nakamura: Blood brain barrier permeability of (-)-epigallocatechin gallate, its proliferation-enhancing activity of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, and its preventive effect on age-related cognitive dysfunction in mice. *Biochem. Biophys. Rep.*, 9, 180-186 (2017)
- (14) Monira Pervin, Keiko Unno, Yuya Nakayama, Hiroyuki Ikemoto, Shinjiro Imai, Kazuaki Iguchi, Akira Minami, Yuriyuki Nakamura: Improvement in Cognitive Function with Green Soybean Extract May Be Caused by Increased Neuritegenesis and BDNF Expression. *J. Food. Process. Technol.*, 8, 695 (2017)
- (15) Keiko Unno, Monira Pervin, Aimi Nakagawa, Kazuaki Iguchi, Aya Hara, Akiko Takagaki, Fumio Nanjo, Akira Minami, Yuriyuki Nakamura: Blood-brain barrier permeability of green tea metabolites and their neuritogenic activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 61, 1700294 (2017)
- (16) Pervin M, Unno K, Nakagawa A, Takahashi Y, Iguchi K, Yamamoto H, Hoshino M, Hara A, Takagaki A, Nanjo F, Minami A, Imai S, Nakamura Y, Blood brain barrier permeability of (-)-epigallocatechin gallate, its proliferation-enhancing activity of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, and its preventive effect on age-related cognitive dysfunction in mice. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 9, 180-186 (2017).
- (17) Minami A, Saito M, Mamada S, Ieno D, Hikita T, Takahashi T, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T. Role of sialidase in long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses and hippocampus-dependent spatial memory. *PLoS One*. 11(10), e0165257 (2016).
- (18) Minami A, Matsushita H, Ieno D, Matsuda Y, Horii Y, Ishii A, Takahashi T, Kanazawa H, Wakatsuki A, Suzuki T. Improvement of neurological disorders in postmenopausal model rats by administration of royal jelly. *Climacteric*, 19(6), 568-573 (2016).
- (19) Takahashi T, Unuma S, Kawagishi S, Kurebayashi Y, Takano M, Yoshino H, Minami A, Yamanaka T, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T. Substrate specificity of equine and human influenza A virus sialidase to molecular species of sialic acid. *Biol. Pharm. Bull.*, 39(10), 1728-1733 (2016).
- (20) Kurebayashi Y, Takahashi T, Tamoto C, Sahara K, Otsubo T, Yokozawa T, Shibahara N, Wada H, Minami A, Ikeda K, Suzuki T. High-efficiency capture of drug resistant-influenza virus by live imaging of sialidase activity. *PLoS One*, 11(5), e0156400 (2016).
- (21) 高橋忠伸、紅林佑希、大坪忠宗、池田 潔、南 彰、鈴木 隆：シアリダーゼを利用したウイルス感染細胞の蛍光イメージング、*分析化学*、65 (12), 689-701 (2016)。

〔学会発表〕(計 76 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：シアリダーゼ阻害活性を有する化合物を含むインスリン分泌促進剤、血糖値上昇抑制剤及び糖尿病治療剤、並びにそれらの剤のスクリーニング方法

発明者：南 彰、鈴木 隆、金子 雪子、石川 智久

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-114923

出願年：2016 年 06 月 09 日

国内外の別：国内

## 6 . 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 隆

ローマ字氏名：Suzuki Takashi

研究協力者氏名：池田 潔

ローマ字氏名：Ikeda Kiyoshi

研究協力者氏名：金澤 寛明

ローマ字氏名：Kanazawa Hiroaki