

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590087

研究課題名(和文) 脳神経系における 1,6 フコースと統合失調症様行動に関する研究

研究課題名(英文) Functional analysis of alpha1,6-fucosyltransferase deficient mice and underlying molecular mechanism

研究代表者

福田 友彦 (Fukuda, Tomohiko)

東北薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40433510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：N型糖鎖の根元に 1,6 フコースを転移する糖転移酵素(Fut8)欠損マウス海馬CA1領域での長期増強(LTP)の形成が野生型マウスより減弱していた。LTPの形成に中心的な役割を果たすと考えられているAMPA受容体の性質と 1,6 フコース欠損の関係を検討したところ、AMPA受容体のシナプス後肥厚における発現に量的変化は見られなかったがAMPA受容体のリン酸化が欠損マウスでは亢進していた。AMPA受容体はそのサブユニットの構成によりチャネルの性質が決まるがGluA1/2 複合体・GluA2/3 複合体ともにホモ欠損マウスで増加していた。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that 1,6-fucosyltransferase (Fut8) knockout (Fut8^{-/-}) mice showed a schizophrenia-like phenotype and a decrease in working memory. To understand the underlying molecular mechanism, we analyzed early-form long-term potentiation (E-LTP), which is closely related to learning and memory in the hippocampus. The scale of E-LTP induced by high frequency stimulation was significantly decreased in Fut8^{-/-} mice. The expression levels of AMPARs in the postsynaptic density were enhanced in Fut8^{-/-} mice, although there were no significant differences in the total expression levels, implicating that AMPARs without core fucosylation might exist in an active state. Taken together, loss of core fucosylation on AMPARs enhanced their heteromerization, which might increase sensitivity for postsynaptic depolarization, and persistently activate N-methyl-D-aspartate receptors as well as Ca²⁺ influx and CaMKII, and then impair LTP.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖転移酵素 フコース 膜タンパク質 AMPA 受容体

1. 研究開始当初の背景

これまで Fut8 欠損マウスの解析は、Fut8 が最も高発現する脳神経の機能に及ぼす影響を行動薬理的に検討してきた。その結果、作業記憶の障害、自発運動量の増加、易攻撃性の増加、社会的行動の障害といった統合失調症の患者に見られる症状と一致する障害を見出し、治療薬 (haloperidol, clozapine) の有効性も確認した。さらに、病態に深く関与すると考えられている脳内モノアミンのバランスが崩れていることを明らかにし、統合失調症治療薬の投与により脳内モノアミンのバランスが修復されることを見出した。統合失調症は人口の約 1% が罹患していると推定されている代表的な精神疾患で、その原因についてはいくつかの仮説が提唱されているが、発症機構は未解明である。糖鎖構造は糖鎖関連遺伝子の発現パターンによって極めて多様な構造をもち、同じ糖タンパク質であっても発生・発達の時期や組織・細胞によって異なることが知られており、糖鎖修飾はタンパク質の機能発現に重要な役割をはたしていると考えられている。これまで、神経系における機能性糖鎖としては神経系の細胞接着分子などに特徴的に発現しているポリシアル酸 (PSA) や HNK-1 糖鎖など限られた構造に注目が集まっていた。一方、脳組織には 1,6 フコースを持つ糖鎖が豊富に存在している。Fut8 欠損マウスに統合失調症様の障害が明瞭に現れたことは、多様な構造をもち糖鎖修飾を受ける糖タンパク質中でも、Fut8 の標的タンパク質の機能は 1,6 フコースの有無という単糖一つ分の僅かな違いにより制御されており、その乱れが統合失調症の発症に関わっていることを強く示唆している。

2. 研究の目的

糖タンパク質に付加された糖鎖は様々な生物活性を持つと考えられているが、特定の糖鎖構造との関係を示した研究は少ない。申

請者らは N-結合型糖鎖の根元に 1,6 フコースを転移する糖転移酵素(Fut8)欠損マウスの表現系が統合失調症患者に見られる症状・特徴と類似していることを見いだした (Fukuda T. et al. *JBC*.286:18434, 2011)。さらに、統合失調症の重要な病態の一つである認知障害に関連するシグナル伝達系の変化を新たに発見した。本研究では、新たに見いだした結果を基に「記憶」に焦点を当て、患者の社会復帰を阻んでいる最大の要因である認知障害の機序を糖鎖による機能分子の質的变化の視点から明らかにする。

3. 研究の方法

統合失調様症状を示す Fut8 欠損マウスは、記憶に関連する CaMKII のリン酸化が海馬で著しく低下していることを見いだした。このことから、統合失調症の認知障害に焦点をあて、以下の解析を行い、認知障害発現における 1,6 フコースの役割を明らかにする。

1. シナプス伝達効率を指標に電気生理学的に解析する。
2. シナプス情報伝達の中心となる CaMKII の上流に位置する NMDA 受容体 AMPA 受容体からの情報の流れの変化を解析する。
3. 脳特異的 Fut8 欠損マウスの作製し、行動薬理的解析を行い神経疾患病態モデルとなることを証明する。

4. 研究成果

統合失調症は人口の約 1% が罹患していると推定されている代表的な精神疾患で、その原因についてはいくつかの仮説が提唱されているが、発症機構は未解明である。Fut8 欠損マウスにいくつかの統合失調症調患者に見られる症状・特徴と類似していることを見いだしたので、その手がかりを得るために Fut8 を高発現して古くから神経細胞分

化モデルとして使われてきた PC12 細胞をもちいて Fut8 欠損細胞を作製し、アクチビン受容体を介するシグナル異常により、神経突起形成に支障が生じることを明らかにした。興味深いことに、アクチビンは長期型 LTP(Long-term potentiation)と長期記憶の保持に対して重要な役割をすることが報告されている。

さらに、患者の社会復帰を阻んでいる認知障害に焦点をあてた電気生理学的解析から、Fut8 欠損マウス海馬での LTP が野生型マウスより著しく減弱していることを見出した。LTP の発現に関係している Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) や NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) のリン酸化を指標にした活性化は、欠損マウスのほうが野生型マウスより有意に亢進していた。ヘテロ欠損マウスのリン酸化の程度がその中間にあることから、Fut8 の発現量と反比例していることが示唆された。CaMKII のリン酸化の機能をなくす変異を導入したマウスを用いた研究から、CaMKII の活性化が LTP の発現に重要であることが報告されているので、Fut8 欠損マウスの結果には驚いた。CaMKII は細胞内タンパクなので N 結合型糖鎖は付加されていないが、その上流に位置する NMDAR や AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) に 1,6 フコースが付加されているので、これら受容体は直接的な影響を受けていると考えられる。

1,6 フコースが無くなることによりどのような変化が起こっているのかを知るために、まずはコンプレックスの形成について検討した。AMPA は GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 の 4 種のサブユニットが集まった 4 量体をつくる。海馬に発現している AMPAR はほとんどがそのサブユニットを含むことでカルシウム非透過性になる GluA2 サブユニットと複合体を形成していると考えられている。Fut8 欠損マウス海馬ではカルシウムとカル

シウム結合タンパク質カルモジュリンによって活性化される CaMKII のリン酸化が亢進していたので、GluA2 を含む複合体形成が低下して GluR1 サブユニットなどのホモ 4 量体が形成されることを予測した。意外にも GluA1/A2, GluA3/A2 サブユニット構成に関わらずそれぞれ、Fut8 の発現量に半比例して、複合体形成能が亢進していた。次に、AMPA の反応性に変化が生じている可能性を検討するため、Fut8 欠損マウス胎仔海馬から分離した神経細胞にグルタミン酸で刺激したところ、細胞外液からのカルシウムの流入が有為に増加し、また、AMPA や NMDAR に特異的な阻害剤でブロックされた。これはカルシウム流入を指標にすると AMPAR/NMDAR の反応は 1,6 フコースが欠損することで、大きくなることを示している。我々は、AMPA 複合体の形成が促進され、反応性が増したことにより恒常的な CaMKII のリン酸化が生じているのではないかと考えている。恒常的な CaMKII のリン酸化が生じているのに、LTP が減弱するのは矛盾するように見えるが、CaMKII の調節ドメイン内のスレオニン残基に変異を導入して、恒常的活性型にした CaMKII を発現するマウスに LTP 減弱が生じることと、血清存在下で培養を続けた細胞は血清を欠乏させた状態で一定時間培養した細胞に比べて、刺激に対するリン酸化反応が弱いことが知られていることで説明できると考えている。

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 2 件)

1. Wei Gu, Tomohiko Fukuda, Tomoya Isaji, Qinglei Hang, Ho-hsun Lee, Seiichiro Sakai, Jyoji Morise, Junya Mitoma, Hideyoshi Higashi, Naoyuki Taniguchi, Hiromu Yawo, Shogo Oka

and Jianguo Gu, Loss of α 1,6-fucosyltransferase decreased hippocampal long-term potentiation: implication of core fucosylation in the regulation of AMPA receptor heteromerization and cellular signaling
J. Biol. Chem.

doi:10.1074/jbc.M114.579938 (2015)
査読有

2. Wei Gu, Tomohiko Fukuda, Tomoya Isaji, Hirokazu Hashimoto, Yuqin Wang and Jianguo Gu, α 1,6-Fucosylation regulates neurite formation via the activin/phospho-Smad2 pathway in PC12 cells: the implicated dual effects of Fut8 for TGF- β /activin-mediated signaling. FASEB. J. **27**:3947-58 (2013)
査読有

[学会発表](計6件)

1. 福田友彦、顧建国、Functional analysis of α 1,6-fucosyltransferase deficient mice and underlying molecular mechanism、第57回日本神経化学会、2014年9月、奈良県文化会館・奈良県新公会堂(奈良県奈良市)
2. Tomohiko Fukuda, Wei Gu, Tomoya Isaji, Seiichiro Sakai, Jyoji Morise, Hideyoshi Higashi, Naoyuki Taniguchi, Hiromu Yawo, Shogo Oka Jianguo Gu, Impairment of hippocampal long-term potentiation and enhanced AMPA receptor complexes formation in alpha 1,6-fucosyltransferase-deficient mice, 9th International Symposium on Glycosyltransferases, June 2014, Porto (Portugal)
3. Tomohiko Fukuda, Wei Gu, Tomoya Isaji, Naoyuki Taniguchi and Jianguo

Gu, Mice lacking fucosyltransferase 8 exhibit abnormal behavioral abnormalities associated with a schizophrenia-like phenotype, Glycoconjugates-22(GLYCO-22), June 2013, Dairen(China)

4. 福田友彦、顧威、李和勳、伊左治知弥、岡昌吾、八尾寛、谷口直之、顧建国、海馬神経細胞における α 1,6 fucosylation の機能解析、第32回日本糖質学会、平成24年8月大阪国際交流センター(大阪府大阪市天王寺区)
5. 福田友彦、顧威、橋本弘和、酒井誠一郎、王玉琴、伊左治知弥、八尾寛、東秀好、顧建国、 α 1,6 フコース転移酵素 Fut8 欠損による海馬機能の変化、第31回日本糖質学会年、平成24年9月 鹿児島市民文化ホール(鹿児島県鹿児島市)
6. 福田友彦、顧威、伊左治知弥、王玉琴、顧建国、脳神経における α 1,6 フコースの機能解析、第6回東北糖鎖研究会、平成24年10月、弘前大学創立50周年記念会館(青森県弘前市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/drg/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 友彦 (Fukuda, Tomohiko)

東北薬科大学 薬学部 准教授

研究者番号 : 40433510