

平成 28 年 10 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790080

研究課題名(和文) 記憶形成時における海馬神経興奮と連動したシアリダーゼ活性変化のインビボ解析

研究課題名(英文) Function of sialidase in hippocampal-dependent memory

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖構造の末端を修飾するシアル酸は、記憶において重要な役割を担う。しかし、どのように制御されているのか詳細については不明な点が多い。本研究では、糖鎖からシアル酸を脱離させるシアリダーゼの働きに着目し、記憶形成におけるシアリダーゼの役割を検討した。本研究により、シアリダーゼによる記憶形成時の迅速なシアル酸脱離が記憶に不可欠であることが見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Sialidase removes sialic acid residues from sialoglycoconjugates such as glycoproteins and glycolipids. Since sialic acid plays crucial roles in synaptic plasticity and memory in the hippocampus, regulation of sialyl signaling by sialidase is also necessary for neural functions. In this projects, we found that sialidase is essential for hippocampal-dependent memory.

研究分野：神経糖鎖生物学

キーワード：シアリダーゼ イメージング 蛍光プローブ 記憶 海馬 シアル酸 N-グリコシルノイラミン酸 ラット

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖に結合したシアル酸は、加水分解酵素であるシアリダーゼによって糖鎖から脱離される。研究代表者はラット脳の記憶形成に関与する海馬において、シアリダーゼ活性の分布を検討した。その結果、グルタミン酸作動性神経である苔状線維終末に比較的強い細胞外シアリダーゼ活性が検出されることを見出した(図1、Minami A. et al., *Neuroimage*, 2011)。さらに研究代表者は、ラットの海馬にシアリダーゼ阻害剤を投与し、海馬依存性の記憶形成に及ぼす影響について予備検討を行った。その結果、モリス水迷路で評価した記憶能が低下することを示す結果を得た。この結果については精査を要するものの、海馬苔状線維終末の細胞表面において、シアリダーゼによる糖鎖構造制御が記憶形成に関与する可能性が考えられる。

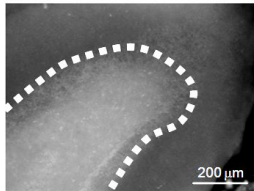


図1 ラット海馬の苔状線維終末(点線内側)に観察される強いシアリダーゼ活性。

記憶は、新たな神経回路を構築することにより形成される。特に記憶形成には、特定のシナプス選択的に伝達効率を増強させ、神経回路を構築する「シナプス可塑性」が関与する。この神経回路構築に、脳に豊富に存在するシアル酸が重要な役割を担うことが報告されている。シアル酸が重合度 8-200 で縮重合したシアル酸重合体は、神経細胞接着分子(NCAM)に結合することにより神経細胞同士の接着を抑制的に制御している。したがって、新たな神経回路構築には、記憶形成時にシアル酸重合体がタイミング良く脱離することが必要であると考えられる。しかし、これまでに神経活動と連動してシアル酸が脱離する様子を捉えた実験結果は、国内外いずれのグループからも報告されていない。

## 2. 研究の目的

シアル酸は主に糖鎖構造の末端を修飾し、個体発生時の神経回路構築において重要な役割を担う。細胞表面に発現した糖鎖は細胞内に取り込まれた後に修飾されることから、構造変化には比較的長時間(数時間から数日)を要すると考えられてきた。研究代表者は、シアル酸脱離に関与するシアリダーゼの酵素活性が神経細胞の表面で検出されることを見出した。糖鎖構造が細胞表面で制御されるのであれば、神経伝達の様なミリ秒オーダーの現象にตอบสนองして、細胞表面の糖鎖構造を迅速に変化させることが可能であると考えられる。しかし、細胞表面の糖鎖構造の変化を高速で捉えた例は無い。本研究では、「神経興奮と連動した極めて短時間における糖

鎖構造の制御が、記憶形成時の神経回路形成に重要な役割を担う」との作業仮説のもと、記憶形成時におけるシアリダーゼ活性の変化をインビボ条件下で解析し、記憶におけるシアリダーゼの役割解明を目指した。

また、動物がもつシアル酸の主な分子種として *N*-アセチルノイラミン酸(Neu5Ac)と *N*-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc)が知られている。Neu5Ac は哺乳動物の脳に豊富に存在し、記憶や神経回路形成、神経伝達の調節に重要な役割を担う。一方 Neu5Gc は、脳において Neu5Gc の合成に関わる酵素(CMP-Neu5Ac hydroxylase, CMAH)の発現が強く抑制されている。それにも関わらず、当研究室ではこれまでに脳には微量な Neu5Gc が存在していることを見出した。Neu5Gc はシアリダーゼによる脱離を受けにくく、脳の機能に Neu5Gc は有害であると考えられる。そこで本研究では、脳に存在する Neu5Gc の由来を明らかにする目的で、抹消の Neu5Gc の脳への移行性を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 記憶におけるシアリダーゼの役割

ラット海馬 CA3 領域にシアリダーゼ阻害剤(DANA)を投与したのち、モリス水迷路で記憶能を評価した。また、細胞外電位記録法により海馬苔状線維-CA3 錐体細胞間の長期増強現象(LTP)を測定した。

### (2) 記憶形成時における糖鎖からの迅速なシアル酸脱離

Wistar 系雄性ラット(8週齢)の海馬に微小透析膜を挿入した。覚醒下、ホームケージ内で人工脳脊髄液(ACSF)による灌流を開始した後、ラットをフット刺激チャンバーに入れて電気刺激を与え、再びホームケージに戻した。灌流液中に回収されたシアル酸量を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

### (3) グルタミン酸放出におけるシアリダーゼの役割

インビボマイクロダイアリス法を利用してグルタミン酸放出におけるシアリダーゼの役割について検討した。ラット海馬を ACSF で灌流した後、シアリダーゼ阻害剤(DANA, 0.1-1 mM)を含む ACSF で灌流した。続いて、灌流液中に含まれるグルタミン酸量を高速液体クロマトグラフィーで測定した。また、海馬神経初代培養細胞におけるシナプス開口放出を蛍光色素 FM1-43 で計測した。

### (4) 神経興奮と連動した迅速なシアリダーゼ活性変化

組織染色用のシアリダーゼ活性蛍光プローブ(BTP3-Neu5Ac)でラットの海馬急性切片を染色した。また、苔状線維に電極を挿入し、高頻度電気刺激(25-100 Hz)を与えた。

#### (5) Neu5Gcの脳への移行

ラジオアイソトープ標識された Neu5Gc を合成した。<sup>14</sup>C-Neu5Gc をラット尾静脈に投与したのちに、海馬に含まれる放射活性をオートラジオグラフィで可視化した。また、HPTLC を利用して、海馬のガングリオシドに含まれる放射活性を詳細に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 記憶におけるシアリダーゼの役割

はじめに、海馬依存性の記憶におけるシアリダーゼの役割を検討した。ラット海馬 CA3 領域にシアリダーゼ阻害薬 (DANA) を投与すると、モリス水迷路で評価した記憶能が著しく低下した。また、記憶の基礎過程である LTP におけるシアリダーゼの役割を検討した。海馬苔状線維-CA3 錐体細胞間の LTP は、DANA を添加することによって有意に抑制された (図2)。以上より、シアリダーゼがシナプス可塑性の制御を介して記憶に関与することが示唆された。

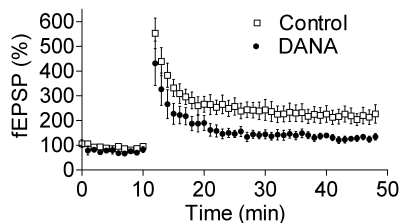


図2 シアリダーゼ阻害剤 (DANA) による LTP の減弱。

##### (2) 記憶形成時における糖鎖からの迅速なシアリ酸脱離

次に、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リ酸量は、学習時に有意に増加した。翌日、ラットを再びフット刺激チャンパーに入れると、フット刺激を与えていない群と比較してフリージング時間が有意に延長した。このことから、記憶が成立していることが確認された。以上より、恐怖条件付け文脈学習時にシアリダーゼ活性が増加することが示唆された。糖鎖構造が極めて迅速に修飾を受けている可能性がある。今後は、再現性を評価する必要がある。

##### (3) グルタミン酸放出におけるシアリダーゼの役割

インビボマイクロダイアリシス法を利用してグルタミン酸放出におけるシアリダーゼの役割について検討した。海馬細胞外液中のグルタミン酸量は、灌流する DANA の濃度に依存して増加した。次に、シナプス開口放出におけるシアリダーゼの影響を検討した。海馬神経初代培養細胞におけるシナプス開口放出を蛍光色素 FM1-43 で計測した結果、DANA を作用させることによって開口放出が促進された。このことから、シアリダーゼ

が海馬興奮性神経伝達の制御に関与することが示唆された。

##### (4) 神経興奮と連動した迅速なシアリダーゼ活性変化

当講座で開発した BTP3-Neu5Ac でラットの海馬急性切片を染色した結果、苔状線維終末に比較的強いシアリダーゼ活性が検出された。この活性は、苔状線維を電氣的に刺激 (25-100 Hz) すると、刺激頻度に応じてただちに増加した。また、この増加はテトロドトキシンで電位依存性ナトリウムチャンネルを阻害することによって抑制された。神経興奮と連動してシアリダーゼ活性が迅速に変化していることが示唆された。

##### (5) Neu5Gcの脳への移行

ラジオアイソトープ標識された Neu5Gc をラット尾静脈に投与したところ、投与3時間後に海馬から比較的高い放射活性が検出された (図3)。そこで海馬に含まれる放射活性を詳細に解析したところ、GM1 や GD1a、GD1b、GT1b、GQ1b などのガングリオシドから放射活性が検出された。食餌などに由来して血中に取り込まれた Neu5Gc のうち一部は脳に移行し、糖脂質などの構成成分として利用されることが示唆される。シアリダーゼは Neu5Ac と比較して Neu5Gc に対する基質特異性が低いことから、糖鎖に含まれる Neu5Gc はシアリダーゼによる Neu5Ac の加水分解を競合的に阻害することによってシアリダーゼによるシアリ酸シグナルの制御が乱れ、海馬の機能に影響する可能性がある。

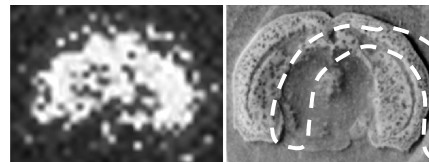


図3 ラット尾静脈に投与した<sup>14</sup>C-Neu5Gcは海馬に蓄積する。左図：オートラジオグラム、右図：実体顕微鏡観察像 (点線内は海馬)。

##### (6) 総括

本研究により、記憶形成時における迅速な糖鎖構造変化が記憶に不可欠であることが示唆された。また、シアリダーゼに抵抗性を示すシアリ酸分子種 Neu5Gc は、抹消から脳に一部移行することが見いだされた。Neu5Gc による脳機能の影響について、今後精査する必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計20件)

Minami A. Highly sensitive histochemical imaging of sialidase activity and role of sialidase in hippocampal memory. Yakugaku Zasshi, 査読有り, 135(12), 1341-1348 (2015).

DOI : 10.1248/yakushi.15-00220  
Taguchi R\*, Minami A \* (\*these authors contributed equally), Matsuda Y, Takahashi T, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T. Preferential Accumulation of 14C-N-Glycolylneuraminic Acid over 14C-N-Acetylneuraminic Acid in the Rat Brain after Tail Vein Injection. PLoS ONE, 査読有り, 10, e0131061 (2015).  
DOI : 10.1371/journal.pone.0131061.  
DOI : 10.1248/bpb.b15-00298.  
Minami A, Otsubo T, Ieno D, Ikeda K, Kanazawa H, Shimizu K, Ohata K, Yokochi T, Horii Y, Fukumoto H, Taguchi R, Takahashi T, Oku N, Suzuki T. Visualization of sialidase activity in Mammalian tissues and cancer detection with a novel fluorescent sialidase substrate. PLoS ONE, 査読有り, 9, e81941 (2014).  
DOI : 10.1371/journal.pone.0081941.  
Minami A, Ishibashi S, Ikeda K, Ishitsubo E, Hori T, Tokiwa H, Taguchi R, Ieno D, Otsubo T, Matsuda Y, Sai S, Inada M, Suzuki T. Catalytic preference of Salmonella typhimurium LT2 sialidase for N-acetylneuraminic acid residues over N-glycolylneuraminic acid residues. FEBS Open Bio, 査読有り, 3, 231-236 (2013).  
DOI : 10.1016/j.fob.2013.05.002.  
Otsubo T, Minami A, Fujii H, Taguchi R, Takahashi T, Suzuki T, Teraoka F, Ikeda K. 2-(Benzothiazol-2-yl)-phenyl-beta-d-galactopyranoside derivatives as fluorescent pigment dyeing substrates and their application for the assay of beta-d-galactosidase activities. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 査読有り, 23, 2245-2249 (2013).  
DOI : 10.1016/j.bmcl.2013.01.043.  
Minami A, Suzuki T. Distribution of sialidase activity and the role of sialidase in the brain. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 査読有り, 24, 112-121 (2012).  
DOI : 10.4052/tigg.24.112

〔学会発表〕(計 107 件)

南 彰、扁桃体における神経活動と連動したシアリダーゼ活性の変化と機能解析、日本薬学会第 136 年会、2016 年 03 月 27 日、横浜  
南 彰、希少シアル酸分子種が認知症に及ぼす影響の解明、平成 27 年度中部乳酸菌研究会総会、2015 年 11 月 21 日、新潟  
南 彰、神経活動と連動した迅速なシアリダーゼ活性変化、第 34 回日本糖質学会年会、2015 年 08 月 03 日、東京  
Akira Minami、Imaging of sialidase activity in rat brain sections with a novel fluorescent sialidase substrate、The 38th Annual

Meeting of the Japan Neuroscience Society、2015 年 07 月 29 日、Kobe  
南 彰、新規糖鎖機能分析ツールを利用した記憶におけるシアリダーゼの機能解明、新学術領域研究(領域略称名: 神経糖鎖生物学)第 9 回 班会議プログラム、2015 年 06 月 25 日、鳥取  
南 彰、ラット海馬における希少シアル酸分子種 N-グリコリルノイラミン酸の蓄積、第 79 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2015 年 05 月 23 日、松本  
南 彰、新規シアリダーゼ活性イメージング基質を利用したラット臓器の染色と成長に伴うシアリダーゼ活性の変化、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日、京都  
南 彰、海馬依存性記憶におけるシアリダーゼの役割、第 33 日本糖質学会、2014 年 08 月 10 日、名古屋  
南 彰、海馬における興奮性神経伝達調節機構の多角的解析と糖鎖機能分析ツールの開発、第 60 回 日本薬学会東海支部 総会・大会 2014、2014 年 07 月 05 日、鈴鹿  
南 彰、新規シアリダーゼ活性検出用プローブを利用した組織染色、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 09 月 11 日、横浜  
南 彰、新規蛍光基質プローブを利用したシアリダーゼ活性の可視化、第 32 回日本糖質学会年会、2013 年 08 月 05 日、大阪  
南 彰、新規シアリダーゼ活性検出プローブによる大腸癌検出、第 59 回日本薬学会東海支部 総会・大会、2013 年 07 月 06 日、名古屋  
南 彰、記憶におけるシアリダーゼの役割、糖鎖科学中部拠点 第 10 回若手のカフォーラム、2012 年 09 月 06 日、静岡

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)  
名称: 新規化合物及び該化合物を含む蛍光組成物  
発明者: 鈴木隆、高橋忠伸、南彰、池田潔、大坪忠宗  
権利者: 同上、種類: 特許  
番号: 2015-18871  
出願年月日: 2015 年 02 月 03 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕ホームページ

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~biochem/k-enkyu02i.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

南 彰 (AKIRA MINAMI)  
静岡県立大学・薬学部・講師  
研究者番号: 80438192