

脳神経の発達と *N* 結合型糖鎖

池 中 一 裕, 鳥 居 知 宏, 吉 村 武

糖鎖は神経発生や回路網形成に関与していることが明らかになりつつある。これまで、マウス胎仔脳組織のように少量の組織の糖鎖解析は非常に困難であったが、我々は、脳組織中からシアル酸付加糖鎖を検出することができる三次元 HPLC 解析法を改良し、実現可能なレベルまで達することができた。本総説では、このシステムを利用した発達過程における脳内糖鎖構造の変化と、近年多く報告されている糖転移酵素ノックアウトマウス解析の結果から神経発生における *N* 結合型糖鎖の意義について考察したい。

1. はじめに

ポストゲノムの時代に入りプロテオーム解析の全盛期にあって、翻訳後修飾の解析も同様に重要視されるようになってきた。その中でもリン酸化、ユビキチン化などと共に盛んに解析されているのが糖鎖付加である。糖タンパク質糖鎖は細胞表面の大部分を覆っており、細胞間や細胞-基質間相互作用に重要な役割を果たしていることが知られており、タンパク質の約 50% 以上に糖鎖が付加されていると推測されている。神経発生においては細胞間/細胞-基質間相互作用が細胞移動や軸索伸長などの正確なターゲットングに関与している。ゆえに、糖鎖が神経発生に重要な役割を果たしていることは想像に難くない。本総説で取り上げる *N* 結合型糖鎖は、小胞体でタンパク質に付加し、糖分解酵素によりトリミングされた後、ゴルジ体で様々な糖転移酵素によりプロセッシングを受ける。その後、細胞膜へと運搬されるか、もしくは細胞外へ分泌される。この *N* 結合型糖鎖の機能を知るために、それぞれの糖転

移酵素遺伝子のノックアウトマウスを作製することが盛んに行われている。本総説においてはマウス脳発生過程における *N* 結合型糖鎖の構造変化と、それがどのように糖転移酵素遺伝子改変により影響を受けるかについて考察することによって、神経発生における *N* 結合型糖鎖の意義について考えたい。

2. マウス脳内 *N* 結合型糖鎖の構造解析

神経発生における *N* 結合型糖鎖の役割を知るためには、まずどのような糖鎖が胎生期脳に発現しているのか知る必要がある。我々は従来マウス脳に発現している糖鎖の構造解析を行って来ており、その解析法の改良にも努めてきた¹⁻³⁾。その結果、脳内で発現している *N* 結合型糖鎖の含有量の解析が、胎生期マウス 1 匹の脳からでも充分にできるようになった (投稿準備中)。本方法を用いればヒトの生検組織サンプルの糖鎖構造を解析することも可能であるし、精製糖タンパク質に応用すると 1 μg のサンプルの糖鎖構造を決定することもできる。そこで、まず我々が主に用いている *N* 結合型糖鎖解析方法の概略について解説する (図 1)。始めに大脳皮質等の脳組織を 9 倍量のアセトン中でホモジナイズし、遠心沈殿物を乾燥させる。このパウダー状のサンプル 0.5~2 mg をヒドラジン分解し、糖鎖を遊離させる。その後、我々が開発したカーボンカラムを用いた方法でヒドラジン除去、再アセチル化を同時に行う²⁾。次にピリジルアミノ基で蛍光標識し、セルロースカラムで未反応の蛍光物質を除去する。ここで一連の糖鎖のサンプル調整が終了する。

自然科学研究機構・生理学研究所・分子神経生理研究部門 (〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1)

Development of the nervous system and *N*-linked sugar chains

Kazuhiro Ikenaka, Tomohiro Torii, and Takeshi Yoshimura (Division of Neurobiology and Bioinformatics, National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan)

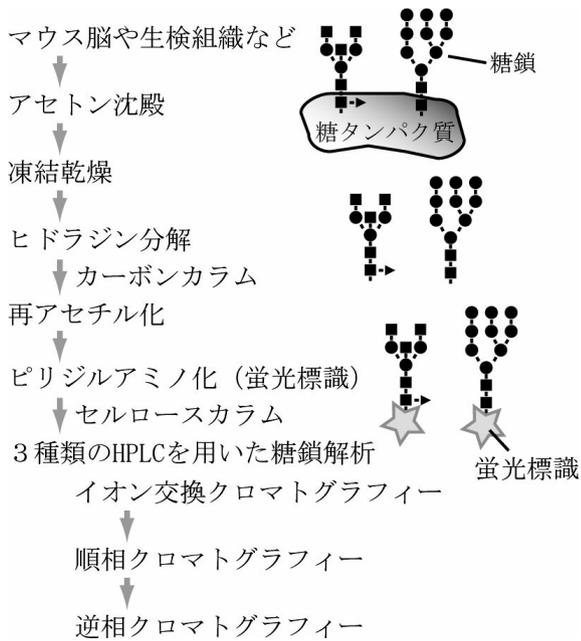


図1 N結合型糖鎖の精製法および解析法

糖鎖精製の際に夾雑物が多く混入するとHPLCチャート上に夾雑物由来のピークが多く現れ、本来の糖鎖由来ピークが隠れてしまう。微量なサンプルからの糖鎖解析のカギは、2種類のカラム（カーボンカラムとセルロースカラム）を用いて効率よく不純物を取り除くことにある。

純粋なピリジルアミノ化糖鎖はHPLC上10フェムトモル程度が検出可能である。しかし、蛍光化色素などが混入するとHPLCチャート上に夾雑物由来のピークが多く現れ、本来の糖鎖由来ピークが隠れてしまう。微量化のカギは2段階のカラム精製により、効率よく不純物を取り除くことにある。本精製方法によって得られる糖鎖は感度的に充分量であり、各反応段階はほぼ定量的に行える。

3. 脳神経系の発達における酸性糖鎖の意義

HPLC解析の第一歩はイオン交換クロマトグラフィー（Mono QもしくはDEAEカラム）である。これにより、酸性糖鎖の含有量に関して大まかな情報を得ることができる（図2）。酸性糖鎖の代表であるシアル酸付加N結合型糖鎖は負電荷を有しているため、細胞表面の状態を大きく変えることができる。シアル酸が $\alpha, 2, 8$ 結合で多数結合したポリシアル酸はさらにこの傾向が強い。イムノグロブリンスーパーファミリーに属し、シアル酸を認識するレクチンはシグレックと呼ばれ、脳内に多数存在する。シグレック-シアル酸結合により盛んに情報伝達が行われており、脳機能にも重要な働きをしていると考えられている⁴⁾。ポリシアル酸はほとんどがneural cell adhesion molecule (N-CAM) に結合しており、その細胞接着活性を減少させているが⁵⁾、神経発達過程における可塑性や長期増強（LTP）誘導にも影響することが知られている⁶⁾。最近では成体脳

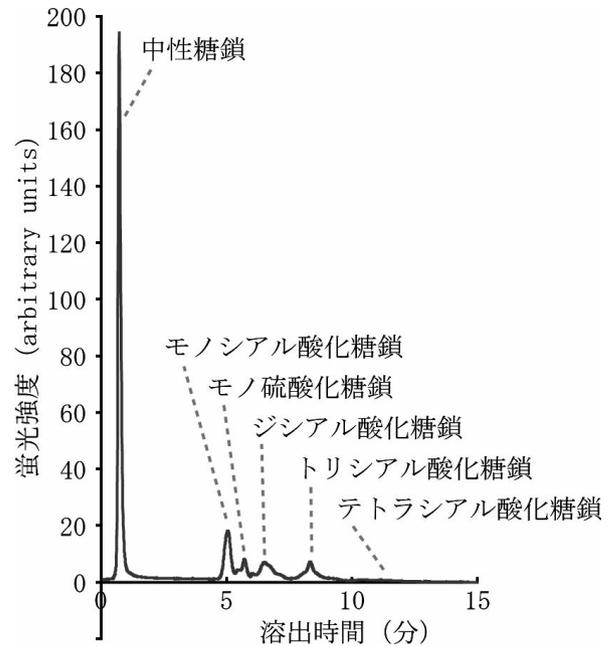


図2 Mono Q HPLCを用いた成体マウス脳のN結合型糖鎖パターン

成体マウス大脳からN結合型糖鎖を精製後、陰イオン交換カラム（Mono Q）HPLCを用いて解析を行った。中性糖鎖はすぐに溶出されるが、シアル酸化糖鎖や硫酸化糖鎖は負電荷を有しているためカラム内に保持される。シアル酸の含有数が多いほど、溶出時間が遅くなる。量は少ないがシアル酸を四つ含むテトラシアル酸化糖鎖も存在している。

におけるポリシアル酸の働きに注目が集まっており、成体脳の神経発生に関与していることが報告されている⁶⁾。酸性糖鎖にはシアル酸化の他にも硫酸化された糖鎖がある。その中に硫酸化されたグルクロン酸残基を有するHNK-1構造（ $\text{HSO}_3\text{-3GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-}$ ）があり、これも神経発生や脳機能発現に重要な役割をしている。HNK-1構造を欠失させたマウスは海馬CA-1領域におけるシナプス伝達効率のLTP誘導が弱く、空間学習も悪くなっている⁷⁾。HNK-1構造の神経発達過程における役割はスパイン形成にあることが、グルクロン酸転移酵素（GlcAT-P）ノックアウトマウスの解析から明らかになった⁸⁾。

酸性糖鎖は機能的に重要であるにも関わらず、脳組織中には酸性糖鎖の含有量は比較的少なく、中性糖鎖がより多く含まれている。脳内の酸性糖鎖の中にはシアル酸含有糖鎖と硫酸化糖鎖が多く認められる。しかし、糖鎖の全体像を見る限りにおいては、脳発達において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきたポリシアル酸やHNK-1構造はほんの僅かしか検出できない。シアル酸化糖鎖に関しては、ノイラミニダーゼと $\alpha, 2, 3$ -シアリダーゼを組み合わせることで切断様式を解析することにより、その結合様式が2,6-Galか2,3-Galかを知ることができる（論文投稿準備中）。脳組織には $\alpha, 2, 6$ シアル酸が $\alpha, 2, 3$ シアル酸よりやや

優位に存在し、発達過程においてこれらの比率は大きくは変化しないことが明らかとなった。シアル酸がN-アセチルグルコサミンの6位に結合する特徴的な構造は、生後出現し、成体に到るまでその含有量が増加するので、神経発生後期でなんらかの役割を果たしていることが考えられる(論文投稿準備中)。

4. ハイマンノース型糖鎖

脳組織に含まれる中性糖鎖は、陰イオン交換カラム非吸着画分をさらに2種類のカラムを用いたHPLCを使うことで容易に解析することができる。これにより、ハイマンノース型が圧倒的に多い(全糖鎖の40~45%)ことが明らかとなった³⁾。しかも、全ハイマンノース型糖鎖の含有量は発達過程を通してあまり変化しない(図3A)。しかし、ハイマンノース型糖鎖群の中で、個々のハイマンノース型糖鎖の発現量は脳発達過程で変化する(図3B)。例えば胎生期のマウス脳においてはM9AやM8Aの含有量はともに10%程度と高いが、成体脳では5%程度に減少する。逆にM5Aは胎生12日目では7%程度であるが、成体脳では全糖鎖の23%を占めるようになる。このようにそれぞれのハイマンノース型糖鎖の発現量がダイナミックに変化するという事は、ハイマンノース型糖鎖のそれぞれ(例えばM9AとM5A)が固有の機能を有していることを示唆している。

5. フコース含有糖鎖

脳内N結合型糖鎖の一つの特徴にコアフコースが多いことが挙げられる。全N結合型糖鎖の20%程度がコアフコースを含有している。この含有量は成体になるに従い若干増加するが、全発達過程を通して比較的一定に保たれて

いる(図3C)。脳内コアフコース合成は基本的にフコース転移酵素8(FUT8)により行われており、胎生期FUT8ノックアウトマウス脳⁹⁾を解析するとコアフコースが全く存在しない。このように約20%も含有している糖鎖の構造が変化すると、全体の糖鎖構造にも大きな変化が認められることがあるが、なくなったコアフコース型糖鎖の代わりに増加しているのは元の糖鎖構造からコアフコースが除去された形の糖鎖であり、生合成経路に大きな影響は認められない(池中, 谷口; 未発表データ)。しかも、胎生期のFUT8ノックアウトマウス脳において異常は認められていない⁹⁾。糖鎖全体の20%にも及ぶ修飾をしているフコース残基が全く不要なものであるとは信じがたく、さらなる詳細な解析が必要であろう。

脳内にはアウターフコース(α 1,3)含有糖鎖も比較的多く存在し、しかも発達過程においてかなり劇的に変化する(図3C)。このアウターフコース含有糖鎖はシアル酸化されていないため、これらはsialyl LewisX構造やsialyl LewisA構造ではなく、LewisX構造である³⁾。FUT9の働きにより、この構造はタイプ2構造(Gal β 1-4GlcNAc-)のGlcNAcの3位にフコースが入ることにより合成されるが、FUT9ノックアウトマウス¹⁰⁾において胎生期脳に異常が認められない。LewisX抗原は未分化な細胞に現れる構造なので、神経発達に関与しないとは考えにくい。この構造が分化した神経細胞においても発現すること、成体に到るまで増え続けること(図3C)、また成体になって不安行動が多くなること¹⁰⁾などを考えると成熟した脳機能により重要な役割をしているのかも知れない。

6. おわりに

糖タンパク質糖鎖は細胞表面を密に覆っており、細胞間

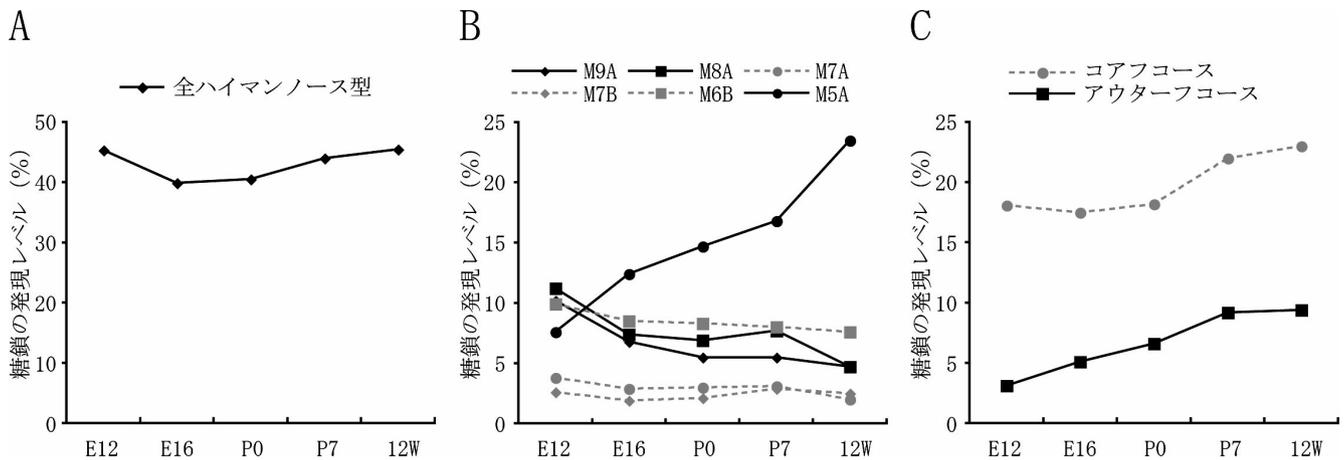


図3 発達過程のマウス大脳皮質におけるN結合型糖鎖の発現レベルの変化

胎生12日目(E12)・16日目(E16)・生後0日目(P0)・7日目(P7)・12週目(12W)のマウス大脳皮質からN結合型糖鎖を精製後、三次元HPLC解析を行い、全N結合型糖鎖に対する全ハイマンノース型糖鎖(A)・各種ハイマンノース型糖鎖(B)・コアフコースおよびアウターフコースを有する糖鎖(C)の発現レベルを調べた。全ハイマンノース型糖鎖の含有量は脳発達過程であまり変化しないが、M5Aの含有量は約3倍上昇する。また、アウターフコースを持つ糖鎖の含有量も約3倍上昇する。

認識に重要な役割を果たしていると考えられているので、*N* 結合型糖鎖の構造を大きく変えることにより、発達段階における脳構造は大きく変わると思われてきた。しかし、脳組織に最も多く存在している中性糖鎖の構造変化はあまり脳構造形成には影響しないようである。本文では述べなかったが、GlcNAc 転移酵素 III (GnT III) ノックアウトマウスではバイセクティング GlcNAc (15% 程度含有) がなくなっているにも関わらず脳構造に大きな影響は認められない¹¹⁾。ハイマンノース型糖鎖と匹敵できるほど多く存在している BA-1 および BA-2 という脳内 *N* 結合型中性糖鎖は脳組織特異的に存在し、コアフコースとバイセクティング GlcNAc を有している³⁾。これらの構造も FUT8 や GnT III ノックアウトマウスではなくなっている。脳組織の *N* 結合型糖鎖の 4 割以上を占めるハイマンノース型糖鎖に関しては、複合型糖鎖に影響なく欠失させることができないので、判断できない。

酸性糖鎖に関しても、主要な構造であるシアル酸 (ポリシアル酸を除く) 含有糖鎖が重要な役割を果たしている証拠はまだ得られていない。α2,6 シアル酸は ST6Gal-I 酵素を欠失させると脳内でほとんどその発現が消失するが、脳発達に影響はない^{12,13)}。α2,3 シアル酸は脳内で欠失させたマウスができていないのでその影響は不明である。神経発生においてその役割が証明されているのはポリシアル酸と HNK-1 構造であるが、それらは微量な糖鎖である。

脳内の *N* 結合型糖鎖構造はヒトとマウスにおいてほとんど同じであり、進化的に保たれている。このことは今まで述べてきた脳内の大部分の糖鎖構造にも重要な役割があることを示唆している。我々はより詳細にある糖鎖構造の欠失マウス脳を調べることによって、未だに見出されていない役割が発見できるのではないかと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、FUT8 ノックアウトマウス脳を提供していただいた大阪大学 (現理化学研究所) の谷

口直之先生、FUT9 ノックアウトマウス脳を提供していただいた産業技術総合研究所の成松久先生にこの場を借りて感謝いたします。

文 献

- 1) Fujimoto, I., Menon, K.K., Otake, Y., Tanaka, F., Wada, H., Takahashi, H., Tsuji, S., Natsuka, S., Nakakita, S., Hase, S., & Ikenaka, K. (1999) *Anal. Biochem.*, **267**, 336-343.
- 2) Tanabe, K. & Ikenaka, K. (2006) *Anal. Biochem.*, **348**, 324-326.
- 3) Ishii, A., Ikeda, T., Hitoshi, S., Fujimoto, I., Torii, T., Sakuma, K., Nakakita, S., Hase, S., & Ikenaka, K. (2007) *Glycobiology*, **17**, 261-276.
- 4) 安形高志 (2004) 生化学, **76**, 1224-1228.
- 5) Hidebrandt, H., Mühlenhoff, M., Oltmann-Norden, I., Röckle, I., Burkhardt, H., Weinhold, B., & Gerardy-Schahn, R. (2009) *Brain*, **132**, 2831-2838.
- 6) Rutishauser, U. (2008) *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, 26-35.
- 7) Yamamoto, S., Oka, S., Inoue, M., Shimuta M., Manabe T., Takahashi, H., Miyamoto, M., Asano, M., Sakagami, J., Sudo, K., Iwakura, Y., Ono, K., & Kawasaki, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 27227-27231.
- 8) Morita, I., Kakuda, S., Takeuchi, Y., Kawasaki, T., & Oka, S. (2009) *Neuroscience*, **164**, 1685-1694.
- 9) Wang, X., Inoue, S., Gu, J., Miyoshi, E., Noda, K., Li, W., Mizuno-Horikawa, Y., Nakano, M., Asahi, M., Takahashi, M., Uozumi, N., Ihara, S., Lee, S.H., Ikeda, Y., Yamaguchi, Y., Aze, Y., Tomiyama, Y., Fujii, J., Suzuki, K., Kondo, A., Shapiro, S.D., Lopez-Otin, C., Kuwaki, T., Okabe, M., Honke, K., & Taniguchi, N. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 15791-15796.
- 10) Kudo, T., Fujii, T., Ikegami, S., Inokuchi, K., Takayama, Y., Ikehara, Y., Nishihara, S., Togayachi, A., Takahashi, S., Tachibana, K., Yuasa, S., & Narimatsu, H. (2007) *Glycobiology*, **17**, 1-9.
- 11) Priatel, J.J., Sarkar, M., Schachter, H., & Marth, J.D. (1997) *Glycobiology*, **7**, 45-56.
- 12) Hennes, T., Chui, D., Paulson, J.C., & Marth, J.D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 4504-4509.
- 13) Martin, L.T., Marth, J.D., Varki, A., & Varki, N.M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 32930-32938.