

特集：糖鎖機能の多層性と神経 sugar code

ポリシアル酸の新機能と神経形成維持機構

佐藤 ちひろ, 北 島 健

ポリシアル酸はシアル酸の直鎖状ホモポリマーで、がん胎児性抗原として知られている。特に脳に局在する NCAM (神経細胞接着分子) の *N* 結合型糖鎖を時期特異的、部位特異的に修飾しており、そのかさ高い構造が生み出す排他的空間が細胞-細胞、細胞-細胞外マトリックス間の接着を阻害することによって、神経形成を制御する。近年、我々は NCAM 上のポリシアル酸が、神経栄養因子や神経伝達物質と特異的に結合することを見出し、ポリシアル酸が生み出す微小空間が負のみならず正の相互作用も演出することを発見した。すなわち、ポリシアル酸は正および負の相互作用を媒介することによって、NCAM 自身のシグナルだけでなく神経作用因子のシグナルを調節して、神経機能を制御する。実際、ポリシアル酸構造の破綻は統合失調症などの精神疾患に関わる可能性がある。

はじめに

シアル酸は5位の置換基が *N*-アセトアミド基である *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、*N*-ヒドロキシアセトアミド基である *N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、水酸基であるデアミノノイラミン酸 (KDN; 2-ケト-3-デオキシ-D-グリセロ-D-ガラクト-ノノン酸) の3大分子種からなり、1位のカルボキシル基に起因する負電荷をもつ、後口動物に特徴的な9炭糖である。またシアル酸は、水酸基のアセチル化、硫酸化、メチル化、ラクチル化あるいはラクトン形成、1位と5位の間でのラクタム形成など単糖の構造多様性がきわめて大きい (図 1A)。一般的に、シアル酸は糖タンパク質や糖脂質において糖鎖の非還元末端部位にモノシアル基として存在しており、受精、発生、分化過程におけるリガンド-受容体および細胞-細胞間相互作用において重要な機能を果たしている。特にガラクトース結合レクチン (ガレクチン) や、シアル酸結合レクチン (シグレック) の存在からも、「認識される分子」としてシアル

酸の機能的な重要性がさらに注目されている。また、シアル酸の *de novo* 生合成を司る UDP-*N*-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ/*N*-アセチルマンノサミンキナーゼの遺伝子欠損マウスが胎生致死であることから、シアル酸が発生に果たす役割の大きさがうかがえる。

シアル酸残基は通常、1残基が糖鎖の最外部に結合したモノシアル酸として存在するが、まれにその末端シアル酸残基の上にさらにシアル酸の直鎖ポリマーが結合するポリシアル酸構造として存在する場合がある (図 1A)¹⁾。このシアル酸の重合体においては、結合位置 ($\alpha 2, 4-$, $\alpha 2, 5-$, $\alpha 2, 8-$, $\alpha 2, 8/9-$, $\alpha 2, 9-$) と重合度 (DP=2~400) によりさらに多様性が増すことになる。結合位置による多様性は棘皮動物に見られるが、脊椎動物ではほとんどすべて $\alpha 2, 8$ -結合ポリシアル酸構造である。棘皮動物ではポリシアル酸の結合位置による多様性が多様な機能を生みだしており、脊椎動物では単純な $\alpha 2, 8$ polyNeu5Ac 構造を発達させ、神経機能に特化させているように思われる。このユニークな酸性多糖であるポリシアル酸構造は、古くからがん胎児性抗原として知られており、時・空間特異的な発現をする糖鎖構造である。特に近年、その合成を司る酵素のノックアウト (KO) マウスの解析や新規ポリシアル酸含有糖タンパク質の発見を通じて、ポリシアル酸が多様な機能を果たしていることが示されている。本稿では、最近明らかになってきたポリシアル酸の新機能を中心にその神経

名古屋大学 生物機能開発利用研究センター (〒464-8601 名古屋市千種区不老町)

New function of polysialic acid and its involvement in neural activities

Chihiro Sato and Ken Kitajima (Bioscience and Biotechnology Center, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan)

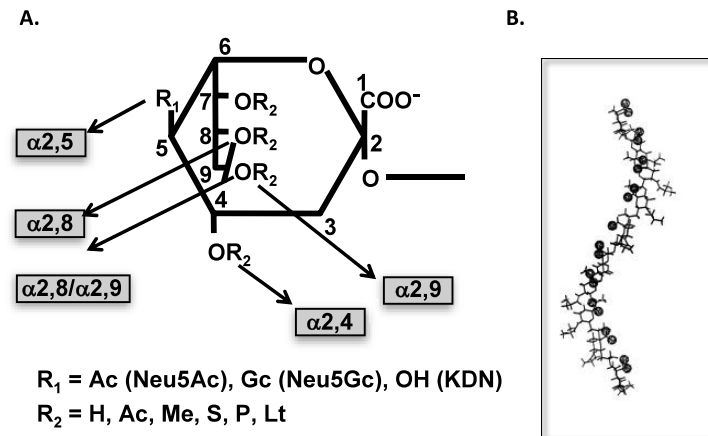


図1 シアル酸構造の多様性

A. シアル酸の構造. シアル酸は2-ケト-3-デオキシノノン酸構造をもつ. シアル酸の5位の置換基(-R₁)が-NHCOCH₃(Ac)の時はNeu5Ac, -NHCOCH₂OH(Gc)の時はNeu5Gc, -OHの時はKDNと呼ばれる. 水酸基が置換基(-R₂)で, 具体的には, アセチル基(Ac), メチル基(-Me), ラクチル基(-Lt), 硫酸基(-S), リン酸基(-P)で置換される場合がある. また, シアル酸はシアル酸同士で直鎖状の重合体を形成することにより多様性が増大する. 現在までに α 2,4-結合, α 2,5-結合(Neu5Gcの場合, α 2,11-結合とする場合もある), α 2,8-結合, α 2,8/9-結合, α 2,9-結合が知られている. また, その重合体の重合度による多様性も知られており, 重合度2~400程度まで存在すると考えられている.

B. α 2,8-結合ポリシアル酸構造の立体構造. α 2,8-結合ポリシアル酸構造は伸びたヘリックス構造をとる.

機能に関して紹介する.

1. ポリシアル酸の存在分布

ポリシアル酸構造は1957年に神経侵襲性のバクテリア莢膜多糖上に初めて見出された. 脊椎動物においては, 1978年にサケ科魚卵に存在するポリシアロ糖タンパク質(PSGP)において初めて報告された. PSGPは卵表層膜に局在し受精に伴い卵卵腔に分泌されるため, 受精・初期発生において機能すると考えられている. その後, 1982年にニワトリおよびラット胎仔脳に存在する神経細胞接着分子(NCAM)においてもその存在が明らかにされた. 興味深いことに, NCAM上のポリシアル酸構造は発達過程の脳にのみ存在しており時・空間特異的に発現する特徴をもつ. さらに魚類, 鳥類, 爬虫類, 両生類の発達過程の脳においても同様な発現が検証されている. これらのことから, ポリシアル酸は脳の発達段階において, 重要かつ普遍的な機能を担うことが示唆され, 神経形成における機能解析が進んでいる. さらに, 近年の検出技術の進歩に伴い, その存在に関して新たな知見が得られている. つまり, これまでシアル酸は存在しないと考えられていた昆虫(前口動物)にも(ポリ)シアル酸構造が検出されたこと, 後口動物では, 脳にだけでなく, 腎臓, 心臓, ヒトの場合はナチュラルキラー細胞にもポリシアル化NCAM(polySia-NCAM)が存在すること, ある種の腫瘍細胞(神経芽細胞

腫, 腎芽細胞腫, 小細胞肺がんなど)に発現し, 悪性度とポリシアル酸の発現に相関があること, 胎仔脳にのみ存在すると考えられていたpolySia-NCAMが, 成体脳の非常に限られた部位(海馬や前脳側脳室下帯(SVZ)など神経細胞の新生が活発に行われている領域)や幹細胞に発現していることである. またこれまでPSGPとNCAMだけがポリシアル酸の担体タンパク質と考えられていたが, 電気ウナギの発電器官に存在するナトリウムチャンネル, ラット脳ナトリウムチャンネル α サブユニット, ヒトミルクCD36, ヒトリンパ球ニューロピリン-2, マウス脳SynCAM-1, ウニ精子フラジェラシアリンにもポリシアル酸修飾が検出されている²⁾.

2. ポリシアル酸の性質

ポリシアル酸の物理化学的性質は α 2,8polyNeu5Ac構造について解析されている. 立体構造については, NMR解析³⁾や抗ポリシアル酸抗体のX線結晶構造解析⁴⁾から, 重合度が8-10以上になると伸びたヘリックス構造をとることが示されている(図1B). 5位の置換基をよりかさ高い構造(N-プロピオニル基, N-ブタノイル基など)に置換しても, 立体構造は保たれるため, このヘリックス構造には1位のカルボキシル基に起因する負電荷が重要であると考えられている. 生体においてポリシアル酸は重合度が8-400にもおよぶ直鎖状の長いヘリックス構造であり, 負電

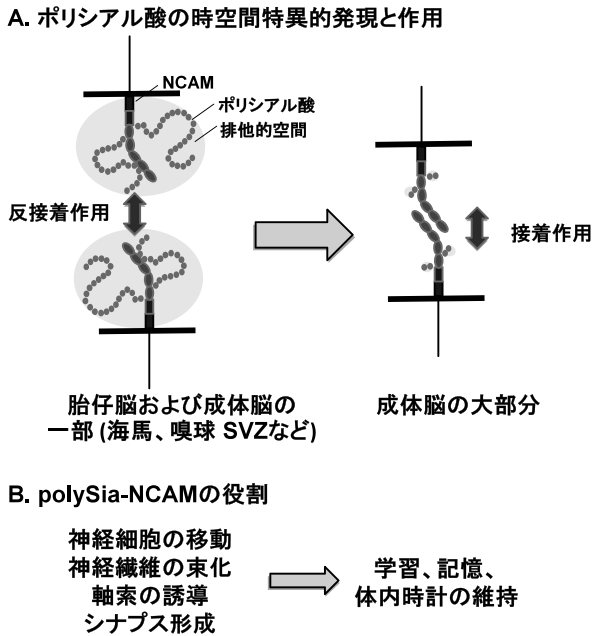


図2 ポリシアル酸による細胞間接着制御

A. NCAM上のポリシアル酸発現の時空間特異的発現。polySia-NCAMは主に胎仔脳の神経細胞表面に存在し、自身の大きな排除体積(灰色の領域)によって、細胞-細胞、細胞-細胞外マトリックス間の相互作用を負に制御する。成体脳では、ポリシアル酸構造のみが消失し、NCAMやその他の接着分子を介する強固な細胞間相互作用が起こる。ただし、成体脳においても、海馬やSVZのような部位ではポリシアル酸の発現が持続している。B. polySia-NCAMの役割。神経形成・発達および神経機能において重要な役割を果たしている。

荷を数多くもち、高い水和効果があることから巨大な排除体積をもつ。そのために細胞表面に存在して細胞と細胞、細胞と細胞外マトリックスとの相互作用を負に制御する調節分子として知られている(図2)。事実、ポリシアル酸の存在により、細胞膜間が10-15nm開くことが示されている⁵⁾。このような役割はポリシアル酸の反接着作用と言われており、この作用によりNCAM自身や他のシグナル伝達を司る受容体が細胞内へ伝達するシグナルが制御されると考えられている。

3. polySia-NCAMにおけるポリシアル酸の機能

(i) polySia-NCAMによる反接着作用とそのシグナル伝達制御

NCAMには細胞内領域の長さが異なる180 kDa (NCAM180)と140 kDa (NCAM140)、またGPIアンカーをもつ120 kDa (NCAM120)の膜結合性分子や可溶性NCAM (sNCAM)のようなアイソフォームが存在する。細胞外領域には、五つのIgドメイン(IgI-V)と二つのフィブロネクチンタイプIIIドメイン(FN_{III})をもつ。Igドメインには推定N結合型糖鎖結合部位が6箇所あり、FNドメインにはO結合型糖鎖が結合している(図3A)。ポリシアル

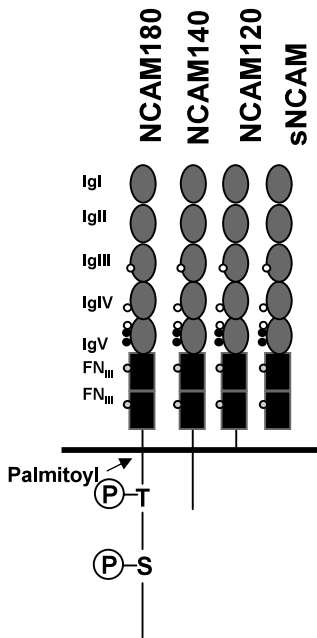
酸はNCAMのIgVドメイン内の二つのN結合型糖鎖上に存在している。これらのポリシアル酸は発達期の脳や成体の海馬や嗅球に存在するNCAMの機能を制御する。

細胞内にシグナルを伝えるのは主にNCAM180である。NCAM180の細胞内領域にはパルミチン酸付加部位、2箇所のリン酸化部位が存在する。NCAMとの相互作用分子の同定などから、細胞内領域ではスペクトリン、Fyn、FAKと相互作用することが示されている。その後、NCAM-スペクトリン-PKCβ2の一連の相互作用が、神経突起形成に関わることが明らかにされている(図3)。また、NCAMはNCAM同士のホモフィリックな相互作用によりFynやFAKのリン酸化が亢進され、Grb2やCasやShcのようなアダプタータンパク質をリクルートすることにより、RasやRafを介したMAPキナーゼの経路を活性化する。

NCAMはホモフィリックな相互作用の他に、その細胞外領域が、他の接着分子(L1やTAG1)、プロテオグリカン、FGF-受容体(FGFR)などとヘテロフィリックな相互作用を行うことによって、細胞内部へのシグナル伝達を制御することが知られている。例えば、FGFRに関してはNCAM同士の同一膜上でのシス相互作用が起こると、FGFRの二量体化とリン酸化を促進し、PLCγによるカスケードを惹起させ、神経突起形成を誘導することが知られている。他にもGDNF/GFRαとNCAMの相互作用は、FGFRと独立にFyn-FAK-MAPキナーゼのシグナル伝達を活性化することが明らかにされている⁶⁾(図3B)。

このような一連のNCAMを介したシグナル伝達は同一細胞上および細胞間で起こるNCAMのホモフィリックおよびヘテロフィリックな相互作用により達成される。polySia-NCAMは特定部位に発現してその相互作用を負に制御するため、ポリシアル酸はNCAMシグナリングを局所的に負に抑えていると考えられている。実際、このようなポリシアル酸の負の制御機能の解析は、NCAMのKOマウスや、ポリシアル酸の生合成を司る酵素、STX(ST8SiaII)およびPST(ST8SiaIV)のKOマウスを用いて検討されている。NCAM-KOマウスでは脳重量の減少や長期増強、長期抑制の障害、空間認知能力の減少、体内時計の制御不全が観察されている。しかし、その表現型は比較的穏やかであることが知られている。ポリシアル酸の合成にはSTXとPSTという二つの酵素が関わることで、一方の酵素のみでもポリシアル酸構造の合成が達成されることが示されている。まず、STXもしくはPSTのいずれか一方のKOマウスが作製されたが、その表現型はNCAM-KOマウスの表現型の一部を包含する様に穏やかなものであった。次に、脳内のポリシアル酸が全く合成されない状態を実現するために、STXとPSTのダブルKOマウスが作製されたが、その表現型は生後すぐ死亡するという重篤なも

A.



B.

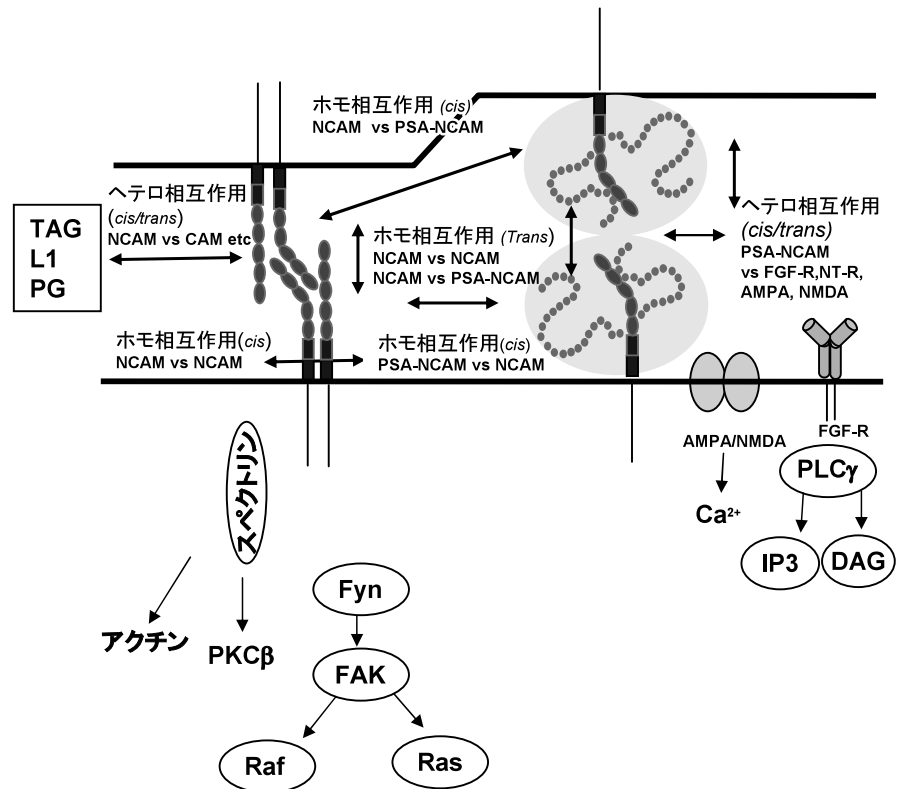


図3 NCAM とシグナル伝達

A. NCAM の模式図。NCAM には、180 kDa (NCAM180)、140 kDa (NCAM140)、GPI アンカー型 120 kDa (NCAM120) のアイソフォームが存在する。また、RNA オルタナティブスプライシングや、翻訳後に酵素反応によりプロセスされて形成する可溶性 NCAM (sNCAM) も存在する。NCAM は細胞外に、五つの Ig ドメイン (IgI-V) と、二つの FN_{III} ドメインをもつ。白丸 (N 結合型糖鎖付加部位：ポリシアル酸は結合していない)。黒丸 (N 結合型糖鎖付加部位：ポリシアル酸が結合している)。灰色丸 (O 結合型糖鎖付加部位：ポリシアル酸が結合していない)。細胞内領域に、パルミチン酸結合領域と、Thr/Ser のリン酸化部位が存在する。

B. NCAM を介する相互作用とシグナル伝達。NCAM は NCAM 同士のホモフィリックな相互作用や NCAM 以外の分子とのヘテロフィリックな相互作用を、同一細胞膜上で起こるシス (cis) 様式および細胞間で起こるトランス (trans) 様式で起こすことにより、自身のシグナル伝達や他の分子によるシグナル伝達に関わっている。また、NCAM 上にポリシアル酸構造が存在すると、その接着が負に制御されることによって、様々なシグナル伝達経路が調節される。また、近年、NCAM のタンパク質部分や polySia-NCAM と直接相互作用する増殖因子受容体や栄養因子受容体、AMPA 受容体などの報告 (本文参照) もあり、シグナル伝達を制御する系はますます複雑になっている。

のであった。このことから、脳内のポリシアル酸は生後の脳の発達やその機能にきわめて重要な役割を果たしていることが直接的に証明された。興味深いことは、二つのポリシアル酸合成酵素と NCAM を欠損するトリプル KO マウスの表現型は、それぞれ単独に KO したときと同様な穏やかな症状へと回復したことである。このことは、まず STX や PST の一つの遺伝子の欠損によりポリシアル酸の発現が低下したとしても、微量な polySia-NCAM が発現されれば、神経活動の機能低下は起こるもののその維持は可能であることを示している。また、ポリシアル酸を完全に消失してしまう場合には、接着分子を介した細胞間相互作用の度合いが強くなり過ぎて、細胞内へのシグナルが正確に伝わらないため、脳機能がひどく損なわれることになる

と考えられている。この過度な細胞接着は、トリプル KO マウスのように細胞膜上に存在する接着分子から NCAM が間引かれることによって緩和されると推定される。つまり、トリプル KO マウスでは、STX/PST ダブル KO マウスにおける過度の接着によるシグナル増強が緩和されることで、結果として、STX もしくは PST の単独 KO マウスの場合以上にその表現型が回復すると解釈されている⁷⁾。

このように、polySia-NCAM におけるポリシアル酸には細胞間の間隔を調整するスペーサーとしての役割がある。この物理的立体障害効果によって、同じ膜上の同種および他種分子とのシス相互作用が制御されるだけでなく、隣接する細胞の膜上の同種および他種分子とのトランス相互作用も制御され、正常な神経発達・形成が可能になると考え

られる。しかし、STX-KO マウスや PST-KO マウス、さらには NCAM-KO マウスの表現型は、神経発達・形成機能だけでなく、成体における神経機能の維持に関わる機能の破綻を包含している。したがって、ポリシアル酸の機能はさらに詳細にかつ統合的に理解していく必要がある。その点、以下の(ii)と(iii)で紹介する近年明らかになりつつある polySia-NCAM の新機能はきわめて興味深い。

(ii) polySia-NCAM を介した細胞膜イオン透過の制御

近年、polySia-NCAM が、シナプスに存在するグルタミン酸受容体である AMPA 受容体と NMDA 受容体の機能制御に関わるという報告がなされた。これらのグルタミン酸受容体を再構築した脂質二重膜を用いて、polySia-NCAM の共存下、非共存下でグルタミン酸刺激による活動電位を測定したところ、polySia-NCAM は、NMDA 受容体のイオン透過を阻害した。一方、AMPA 受容体に関しては、polySia-NCAM がその開閉時間を変化させることによって、そのイオン透過を変化させた。すなわち、polySia-NCAM は活性化様式の異なるグルタミン酸受容体に対して、異なる制御をすることにより、海馬におけるシナプス機能に関わっていることが示唆されている。この場合、NCAM 上のポリシアル酸鎖は分子同士の接着に対する反接着作用分子として働くのではなく、これらのグルタミン酸受容体の構造の一部と相互作用して、そのイオンチャンネルの開閉を制御する分子として機能することが推定されている。

このようなイオン透過の制御にポリシアル酸が関わる現象は、神経系のみだけではなくウニ精子の運動制御においても見出されている。2004年、我々はウニ精子膜上の主要なシアル酸含有糖タンパク質（フラジェラシアリンと命名）上に動物細胞ではほとんど報告例のない $\alpha 2, 9$ -結合ポリシアル酸構造を見出した^{8,9)}。この糖タンパク質は、96 アミノ酸からなり、N 端に 26 アミノ酸からなるシグナルペプチド配列、C 端に 23 アミノ酸からなる推定膜貫通領域をもつ膜表在性タンパク質である。いくつかの特定の Thr 残基に対して、高度に *O* 結合型糖鎖が結合しており（重量の 80-90% は糖鎖）、そのほとんどの糖鎖には非還元末端が硫酸化シアル酸でキャップされた $\alpha 2, 9$ -結合ポリシアル酸鎖が存在する。このポリシアル酸構造の受精における機能を明らかにするために、フラジェラシアリンの糖鎖を認識する二つの抗体、 $\alpha 2, 9$ -結合ポリシアル酸の内部シアル酸重合構造を認識する抗体 4F7 と非還元末端の硫酸化シアル酸残基を認識する抗体 3G9 の受精に対する効果を調べた。その結果、4F7 でのみ受精が完全に阻害された。その原因は 4F7 が精子の運動性を著しく阻害することにあった。精子運動には種々のイオン透過が重要であり、とりわけ Ca^{2+} は精子遊泳時には細胞内において低濃度に保たれることが必要である。ウニの精子では、細胞内

カルシウムイオン濃度 $[Ca^{2+}]_i$ を低く保つために、 K^+ -依存的 Na^+/Ca^{2+} 交換体 (suNCKX) および細胞膜 Ca^{2+} ATPase (suPMCA) が関わることを、これらに特異的な阻害剤を用いて示されている。遊泳中のウニ精子を 4F7 で処理すると、顕著な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が見られ、その結果、精子運動が阻害されたことが判明した。一方、同じフラジェラシアリンの糖鎖を認識する 3G9 では、全く $[Ca^{2+}]_i$ に変化がなかった。以上のことから、精子の運動に $\alpha 2, 9$ -結合ポリシアル酸の重合構造が重要であり、その構造が直接的もしくは間接的に suNCKX もしくは suPMCA と相互作用することによって、 Ca^{2+} の透過性が正確に制御されていることが示唆される。

(iii) ポリシアル酸の神経作用因子の保持と放出機能

近年我々は、ポリシアル酸が神経機能に関わる可溶性の神経作用因子と直接結合する性質をもつことを見出している。polySia-NCAM をもつ細胞においては、細胞膜近傍でこのような神経作用因子が保持されることによって、その局所的な濃度が調節されることが推測される。このように「神経作用因子の保持機能」をもつことは、ポリシアル酸が神経形成だけでなく、神経機能の調節に関わる因子であることを示している。この機能は polySia-NCAM 上のポリシアル酸構造が自身の巨大な排除体積で細胞同士や細胞と細胞外マトリックスとの接着を阻害するという上述の「反接着機能」とは異なるポリシアル酸の新機能として捉えることができる。さらに、我々はミクログリア細胞株を用いた実験によって、ミクログリア細胞表面には $\alpha 2, 8$ -結合ポリシアル酸が存在し、ミクログリアが炎症刺激を受けるとその構造が素早く消失することを見出している。ミクログリア上のポリシアル酸の消失は、それにともなって、それまでポリシアル酸に結合していた神経作用因子を一気に放出、周囲の細胞に供給することを可能にしている。これはポリシアル酸による神経作用因子の放出機構と捉えることができる。我々はポリシアル酸にこのような新機能が存在することを証明するために、ニューロトロフィン、増殖因子、ホルモン、神経伝達物質など脳内に存在するさまざまな因子について、ポリシアル酸との相互作用の有無のスクリーニングを行っている。ここでは、その詳細が明らかになった脳由来神経栄養因子 (BDNF)^{10,11)} とカテコールアミン類^{12,13)} を中心に紹介する。

BDNF はニューロトロフィンの一員であり、神経栄養因子 NGF と 50% の相同性を持ち、その発現は NGF よりも高い。BDNF は高親和性受容体 Trk や低親和性受容体 p75NTR を介するシグナルによって主に成熟ニューロンの生存維持に関わっている。例えばニューロン死を防御する機能や、記憶や学習の基盤であるニューロンの可塑性などに深く関わる。一方、polySia-NCAM も NCAM-KO マウスの表現型の解析から学習や記憶に関与することが示されて

いる。MullerらはNCAM-KOマウスの海馬スライスを用いて、polySia-NCAMの消失が引き起こすLTPの減少がBDNFの添加によって回復することを見出し、polySia-NCAMがBDNF受容体を介するシグナルに参与することを示唆している¹⁰。また、polySia-NCAMが存在しない神経細胞では、低親和性BDNF受容体p75のシグナルが増強されることも知られている。このシグナル増強はp75とpolySia-NCAMの相互作用によって引き起こされることも想定されるが、polySia-NCAMとBDNFシグナルとの関係を理解するには、ポリシアル酸、BDNF、BDNF受容体の三者の関係を系統的に解析する必要がある。そこで我々は、まず、BDNFとポリシアル酸が直接的に相互作用するのかどうかを、ゲル濾過クロマトグラフィー法、水平式非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（native-PAGE）法、表面プラズモン共鳴（SPR）法によって解析した。その結果、BDNFはその二量体がポリシアル酸鎖に直接結合して複合体を形成することが明らかになった。また、このBDNF-ポリシアル酸複合体はBDNF受容体TrkBやp75NTRと共に三者会合体を形成しないこと、しかしBDNF-ポリシアル酸複合体中のBDNF分子はBDNF受容体へと容易に移行することが明らかになった。この移行はBDNF-ポリシアル酸相互作用の親和性から裏付けられる。SPRで測定したBDNFとポリシアル酸の解離定数は 6.4×10^{-9} Mである¹²のに対して、p75NTRおよびTrkBのBDNFとの解離定数はそれぞれ、 10^{-10} および 10^{-12} Mである。したがって、BDNFはポリシアル酸鎖よりもBDNF受容体に対して高い親和性をもつため、BDNF受容体がポリシアル酸鎖の付近に存在する場合には、ポリシアル酸と結合しているBDNFはポリシアル酸鎖から受容体へと容易に受け渡されると考えられる。次に、TrkBやp75NTRを発現している神経芽腫細胞に対するポリシアル酸やBDNF-ポリシアル酸複合体の細胞増殖に対する効果を調べたところ、両者ともに細胞増殖性を増大させること、またその効果はBDNF-ポリシアル酸複合体の方が顕著であることがわかった。すなわち、ポリシアル酸-BDNF複合体はBDNFによる細胞増殖活性を高める能力をもつ。またBDNFとの結合に必要なポリシアル酸の最小重合度は12であり、複合体形成にはそれ以上の重合度を必要とすることが判明した。このことはポリシアル酸が機能するためには、特定の重合度を必要とすることを初めて示した例である。また、ポリシアル酸はBDNFと相互作用することにより2,500 kDa程度の大きな複合体を形成することが明らかになった。この複合体はBDNF-ポリシアル酸複合体の滴定実験とゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定から、14 molのBDNF分子（二量体）と28 molのポリシアル酸分子（平均重合度43）から形成される超巨大分子であることが推定される。今後このような巨大な複合体

の形態や物理的性質を明らかにする必要がある。

ポリシアル酸はNCAMのIgVドメインの2箇所のN結合型糖鎖上に存在する。ポリシアル酸修飾がNCAMの比較的膜近傍で起こること、またBDNF二量体が2本のポリシアル酸鎖に結合していることを鑑みると、実際にpolySia-NCAMとBDNFが複合体を形成し、その細胞にcisに影響を与えることが示唆される。このようにポリシアル酸は様々な神経作用因子の保持に関わっており、受容体への因子の提示の制御を行っている可能性がある（図4）。また近年、分泌されたproBDNFが細胞外においてtPA/プラスミンによって成熟型BDNFへとプロセスされ、そのBDNFが記憶に関わることが報告されている。我々の予備的研究からポリシアル酸がproBDNFとも結合すること、ポリシアル酸に結合したBDNFはセリンプロテアーゼの切断から保護されることなどが示唆されており、proBDNFとtPA/プラスミンの作用と機能発現にポリシアル酸が関わる可能性もあると考えている。このような効果にはポリシアル酸以外のグリコサミノグリカンなどの酸性多糖が関わることも考えられ、今後の課題である。

最近我々は神経伝達物質の一員であるカテコールアミン類がポリシアル酸と結合することを明らかにしている¹²。神経伝達物質との相互作用を解析する方法としてフロントアルフィニティークロマトグラフィー（FAC）を用いた。FACはレクチンと糖鎖との相互作用解析に広く用いられている方法であるが、我々は初めて多糖と低分子性化合物との相互作用解析に適用した。その結果、ポリシアル酸がドーパミンを含むカテコールアミン系の神経伝達物質に特異的に結合することが明らかになった。この結合はポリシアル酸に特異的で、ジシアル酸とは結合性がみられないことから、単純な静電的相互作用ではなく、カテコール骨格とポリシアル酸の特定の立体構造との特異的相互作用で起こると考えられる。また、ポリシアル酸とカテコールアミン類の相互作用は、pHによってその解離定数が増減することから、細胞外の微妙なpHの違いによりその結合が制御される可能性がある。興味深いことに、我々はポリシアル酸の円二色性（CD）解析によって、ポリシアル酸はpH 5-8においてpHに依存した微妙な構造変化が起こることをつきとめており、pHに依存したポリシアル酸の構造変化がドーパミン分子との結合と放出を制御していると考えている。一方、神経芽細胞腫を用いてドーパミン受容体を介したAktシグナルにポリシアル酸が関係しているか否かも検証した。その結果、ポリシアル酸の存在がAktシグナルを変動させることが判明した¹³。以上の結果は、ある種のシナプス後膜に存在するpolySia-NCAMの機能として、ポリシアル酸部分が特定の神経伝達物質と直接相互作用し、その受容体の下流のシグナルを変化させるという新しい機能があることを示す点できわめて興味深い。ポリシア

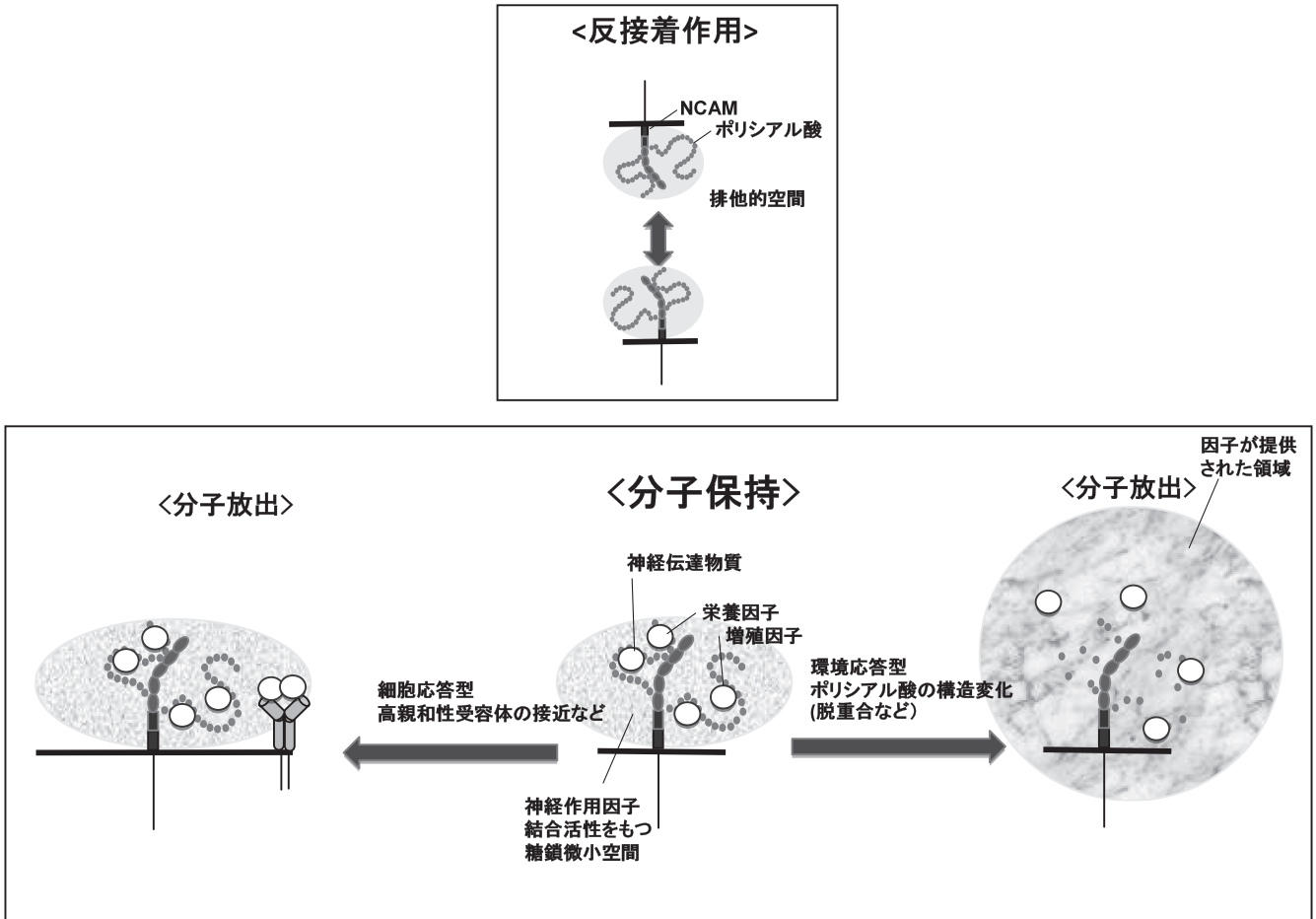


図4 ポリシアル酸の新機能と機能的二面性

上パネル：ポリシアル酸の負の相互作用が生み出す反接着作用の分子機構。従来言われているように、ポリシアル酸構造が自身の巨大な排除体積で排他的空間を生み出し、細胞同士や細胞外マトリックスとの接着を阻害する。それによってその空間間隙をある一定の大きさに保つことが可能になり、神経形成・発達を補助し、正常な神経機能を達成している。

下パネル：ポリシアル酸の正の相互作用が生み出す保持機能と保持分子の放出の分子機構。近年、新たに明らかにされてきたように¹⁰⁻¹³⁾、ポリシアル酸は神経に作用する様々な因子を保持する「分子保持機能」をもつ。ポリシアル酸構造が時期特異的、空間特異的に脳の局所的な部分に発現することによって、神経作用因子を保持できる微小空間を作り出す。この微小空間において、神経作用因子の局所濃度を高めている。一方、この微小空間に高親和性の受容体が近づくと、ポリシアル酸は保持因子を受容体へと受け渡す(左矢印方向)。また、ミクログリア細胞などで明らかになったように、微小空間に存在するポリシアル酸がシアリダーゼなどの分解酵素によって分解されたり、外界のpH変化に応じて立体構造変化したりすることによって、保持因子を周囲に放出することも考えられる(右矢印方向)。このようにポリシアル酸が神経作用分子を保持、放出することで、神経作用分子を介するシグナルが制御されるというポリシアル酸機能の新しい概念を提示している。

ル酸は反接着作用により、細胞間の物理的空間を制御するとともに、神経伝達物質を保持することによってシグナルを制御しており、機能的二面性をもつ分子である可能性が強まった。

4. ポリシアル酸構造の破綻と神経症

上述のようにポリシアル酸と相互作用する神経作用因子であることが判明したBDNFやドーパミンは、統合失調症の発症に深く関わる分子として知られている。一方、ポリシアル酸と統合失調症の関連性に関してはいくつか間接的な関連を示す報告がなされている。例えば統合失調症患者の死後脳の海馬におけるポリシアル酸の免疫染色性が低

いという報告や、患者脳の嗅球の大きさが小さい(NCAM-KOマウスと同様の特徴)という報告である。一方、NCAM-, STX-, PST-KOマウスの脳の構造や神経の可塑性、行動等においても、統合失調症患者といくつかの共通点が存在する⁷⁾。また2006年に新井らは、ゲノムワイドな解析によりポリシアル酸を生合成する酵素STXのプロモーター領域のSNPに統合失調症との関連性が存在することを報告している¹⁵⁾。これらのことから、現在我々は、ポリシアル酸のBDNFやドーパミンのような神経作用因子の保持機能の破綻がさまざまな精神疾患や感情障害を発症する可能性があるのではないかと考えている。この破綻の一因として、特にポリシアル酸鎖の生合成不全に焦点を

あてており、それを検証するため、新井らが報告した SNP 中の翻訳領域に存在する SNP-7 と SNP-9 に注目した。それらの変異をもつ STX を発現する細胞が合成した polySia-NCAM に対して、ポリシアル酸の質と量、および BDNF とドーパミンとの結合能を解析した。SNP-7 由来の NCAM では、ポリシアル酸の合成量が著しく低下し、その質も低下した。それに伴い、BDNF やドーパミンとの結合性が激減していた。また、SNP-9 由来の NCAM でもその結合性が有意に減少していた。このことは NCAM 上のポリシアル酸の量や質が変化することで、BDNF とドーパミンとの結合に異常が生じ、統合失調症の発症のリスクが高くなる可能性を示している¹³⁾。

おわりに

ポリシアル酸が細胞間接着を物理的に負に制御するという機能は古くから指摘されており、この機能が時期特異的、空間特異的に達成されることで、神経形成と広範囲にわたる脳の神経活動の調整が正常に行われている(図4上パネル)。一方、ポリシアル酸の存在は脳に偏っており、そこで機能する学習や記憶、情動に深く関わる分子群として知られる神経栄養因子、神経伝達物質、イオンチャンネルがポリシアル酸と特異的に直接結合して神経機能を制御していることが新たに明らかになってきた(図4下パネル)。ポリシアル酸はポリアニオンであり特徴的な立体構造をもつ分子であり、静電的相互作用や立体障害によって相互に排斥する「負の相互作用」の場を提示する場合もあれば、特定の神経作用分子と特異的に結合する「正の相互作用」の場を提示する場合もある。ポリシアル酸が細胞表面に作り出す大きさを鑑みると、ひとつの微小空間を細胞表面に形成していることが想像される。今後、このような細胞表面の微小環境において、ポリシアル酸の正負の相互作用がどのように働いて神経機能の微調整につながるの

か、その分子メカニズムを統合的に理解していく必要がある。

文 献

- 1) Sato, C. (2004) *Trends Glycosci. Glycotech.*, **14**, 331-344.
- 2) Sato, C. (2011) in *Sialobiology* (Tiralongo, J. ed.), Bentham Science Publisher Ltd., U.A.E., *in press*.
- 3) Baumann, H., Brisson, J., Michon, F., Pon, R., & Jennings, H. (1993) *Biochemistry*, **32**, 4007-4013.
- 4) Evans, S., Sigurskjold, B.W., Jennings, H.J., Brisson, J.-R., To, R., Tse, W.C., Altman, E., Frosch, M., Weisgerber, C., Kratzin, H.D., Klebert, S., Vaesen, M., Bitter-Suermann, D., Rose, D.R., Young, N.M., & Bundle, D.R. (1995) *Biochemistry*, **34**, 6737-6744.
- 5) Yang, P., Yin, X., & Rutishauser, U. (1992) *J. Cell Biol.*, **116**, 1487-1496.
- 6) Gascon, E., Vutskits, L., & Kiss, J. (2007) *Brain Res. Rev.*, **56**, 101-118.
- 7) Hildebrandt, H., Mühlenhoff, M., Weinhold, B., & Gerardy-Schahn, R. (2007) *J. Neurochem.*, **103**, 56-64.
- 8) Miyata, S., Sato, C., Kitamura, S., Toriyama, M., & Kitajima, K. (2004) *Glycobiology*, **14**, 827-840.
- 9) Miyata, S., Sato, C., Kumita, H., Toriyama, M., Vacquier, V. D., & Kitajima, K. (2006) *Glycobiology*, **16**, 1229-1241.
- 10) Kanato, Y., Kitajima, K., & Sato, C. (2008) *Glycobiology*, **18**, 1044-1053.
- 11) Kanato, Y., Ono, S., Kitajima, K., & Sato, C. (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2735-2741.
- 12) Sato, C., Yamakawa, N., & Kitajima, K. (2010) *Methods Enzymol.*, **478**, 219-232.
- 13) 佐藤ちひろ (2010) 生体の科学, **61**, 160-166.
- 14) Muller, D., Djebbara-Hannas, Z., Jourdain, P., Vutskits, L., Durbec, P., Rougon, G., & Kiss, J.Z. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 4315-4320.
- 15) Arai, M., Yamada, K., Toyota, T., Obata, N., Haga, S., Yoshida, Y., Nakamura, K., Minabe, Y., Ujike, H., Sora, I., Ikeda, K., Mori, N., Yoshikawa, T., & Itokawa, M. (2006) *Biol. Psychiatry*, **59**, 652-659.