

神経系におけるコンドロイチン硫酸鎖の糖鎖暗号

三上雅久, 北川裕之

コンドロイチン硫酸 (CS) 鎖は、硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) 多糖の代表格であり、神経系の発達や再生過程において、神経の軸索誘導や再生を阻害する分子として振る舞う一方、神経突起の伸長を促進する分子としての一面も併せもつことが知られている。このような CS 鎖の一見矛盾した機能は、その生合成過程で産み出される構造多様性に起因すると考えられている。実際、CS 鎖上の特徴的な硫酸化構造が固有の CS-タンパク質間相互作用を担保する“糖鎖暗号”となって、CS 鎖の機能発現の方向性が決定されていることが明らかになってきた。

1. はじめに

CS 鎖は、ヘパラン硫酸 (HS) 鎖と双壁をなす代表的な硫酸化 GAG 糖鎖で、様々なコアタンパク質に共有結合したプロテオグリカン (CSPG) として、あらゆる組織の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在している。CSPG は、長い間、単に細胞間隙を埋める静的な構造分子であると捉えられてきたが、近年の研究により、初期胚における細胞質分裂^{1,2)}や、形態形成・骨格形成³⁻⁵⁾をはじめとする数多くの生命現象に関与する他、マラリア原虫やある種のウイルスの感染過程^{3,6)}にも関与することがわかってきた。神経系における CSPG の機能解析も活発に展開されており、特に、外傷性障害を受けた成体脳において、再生軸索の伸長を阻害する主要な分子として、神経再生医学の観点から脚光を浴びている。実際、神経損傷部位で高発現する CSPG の CS 鎖部分を細菌由来の分解酵素 (コンドロイチナーゼ ABC: CHaseABC) で除去すると、CSPG による阻害効果が消失する^{7,8)}ことから、悪玉分子の実態は CS 鎖部分であると考えられている。しかし、すべての CS 鎖が神経突起の伸長を阻害するわけではなく、固有の硫酸化

構造をもった CS 鎖には、初代培養神経細胞の神経突起の伸長をむしろ促進する働きがある^{3,9)}。このような一通りでは説明できない CS 鎖の機能の多様性は、その構造多様性によって産み出されていると考えられている。“多様性”という表現は、掴みどころのない糖鎖の複雑性を説明するための方便と思われるかもしれない。しかし、個々の CS 鎖の硫酸化構造を注視することで、CS 鎖の中に、確かにその機能発現の違いを決定づける固有の“糖鎖暗号”が埋め込まれていることがわかってきた。本稿では、CS 鎖の神経突起伸長制御機能を中心に、“糖鎖暗号”との関連を踏まえながら概説するとともに、最近筆者らが明らかにした“CS 受容体分子の存在”から導き出される CS 鎖の新たな機能的側面についても紹介したい。

2. CS 鎖の構造多様性を産み出す硫酸化修飾

CS 鎖は、グルクロン酸 (GlcA) と *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の二糖が数十回交互に繰り返し重合した直鎖状の糖鎖構造を基本骨格にもつ。CS 鎖の基本骨格は、生合成過程でそれぞれ基質特異性の異なる複数の硫酸基転移酵素の作用により、主に GlcA 残基の 2 位や GalNAc 残基の 4 位または 6 位で硫酸化修飾をうける¹⁰⁾。したがって、生合成された CS 鎖は、図 1A に示すような特徴的な二糖単位 (O, A, C, D, E ユニット) の組み合わせから構成されると捉えることができ、多様な構造を示すようになる。これらの修飾反応は、生体内で無秩序に進行するわけではなく、各硫酸基転移酵素の競合的あるいは協調

神戸薬科大学生化学研究室 (〒658-8558 兵庫県神戸市東灘区本山北町 4-19-1)

Functional sugar codes in neural chondroitin sulfate chains
Tadahisa Mikami and Hiroshi Kitagawa (Department of Biochemistry, Kobe Pharmaceutical University, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan)

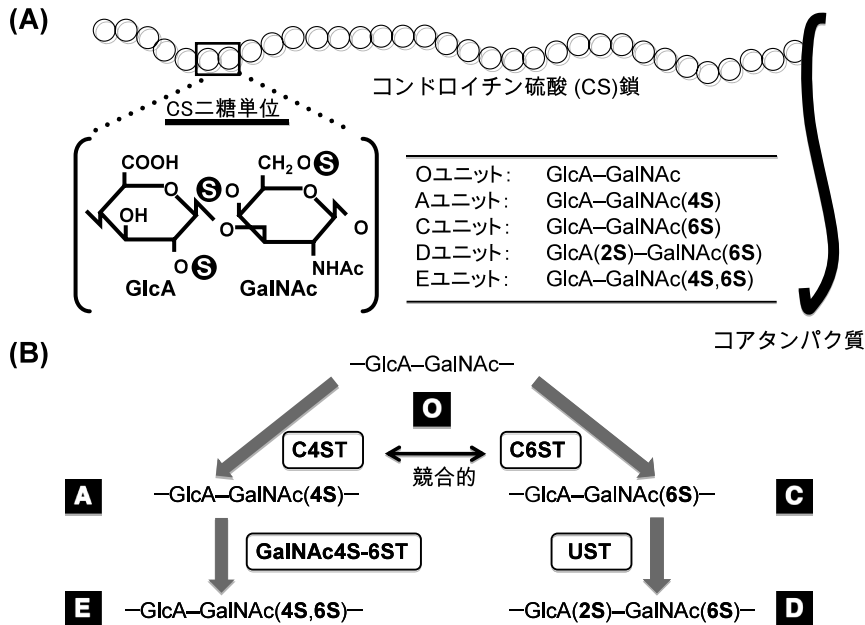


図1 CS鎖の構成二糖単位と硫酸化経路

(A) CS鎖の主要構成二糖単位を示し、硫酸化される水酸基については、“S”を付している。また、表中の2S, 4S, 6Sは、それぞれ2位, 4位, 6位の水酸基が硫酸基に置換された構造を示す。(B) CS鎖の硫酸化反応は、最初に働く硫酸基転移酵素の違いにより、Oユニット (GlcA-GalNAc) の4-O-硫酸化と6-O-硫酸化の二つの経路に分かれる。コンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素 (C4ST) によってGalNAc残基の4位が硫酸化されたAユニットが形成されると、さらにGalNAc 4-硫酸6-O-硫酸基転移酵素 (GalNAc4S-6ST) によって、GalNAc 4-硫酸の6位の一部が硫酸化されてEユニットが構築される。一方、コンドロイチン6-O-硫酸基転移酵素 (C6ST) によってGalNAc残基の6位が硫酸化されたCユニットが形成されると、隣接する非還元末端側のGlcAの2位の一部がウロノシル2-O-硫酸基転移酵素 (UST) による硫酸化を受け、Dユニットが構築される。

的作用によって厳密に制御される (図1B)。すなわち、最初の基質となるOユニット (硫酸化されていない二糖単位) が4-O-硫酸化されるか、あるいは6-O-硫酸化されるかで、それぞれ生成しうる二糖単位も異なってくる。実際、CS鎖の硫酸化プロファイルは脳の発達過程で劇的に変化し¹¹⁻¹³⁾、発達に伴い6-O-硫酸化に対する4-O-硫酸化の比率 (4S/6S比) が顕著に増大する傾向を示す。最近筆者らは、GalNAc残基の6位の硫酸化を触媒するコンドロイチン6-O-硫酸基転移酵素-1 (C6ST-1) を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、このマウスの脳では、野生型マウスに比べ、発達に伴う4S/6S比の増加が少なく、通常成熟に伴い失われる神経可塑性が持続することを見出した (宮田ら, 論文投稿中)。このことは、時空間的に厳密に制御されたCS鎖の硫酸化が神経系の正常発達に必要であることを強く支持する。

3. CS鎖による神経突起伸長制御と“糖鎖暗号”

哺乳類の組織で産生される大部分のCS鎖は、二糖単位あたり一箇所が硫酸化されたAユニットやCユニットが主成分である。それに対して、二糖単位あたり二箇所が硫

酸化されたDユニットやEユニットはいずれもマイナーな構成成分に過ぎないが、脳においては、有意に存在している^{3,13)}。前述したように、CS鎖は構造多様性を獲得しているため、CS鎖の硫酸化構造と機能との関連性を考える上では、特有の二糖単位を多く含むようなCS標品を基準に用いて解析することが有用である。現在、一般に利用可能なCS多糖は、主要構成二糖単位の種類に基づき、いくつかのサブクラスに分類される (図1A)。例えば、比較的硫酸化の程度の低いクジラ軟骨由来CS-Aやサメ軟骨由来CS-Cは、それぞれAユニットやCユニットを主要二糖単位にもつ。サメ軟骨由来のCS多糖でも、Dユニットの含量が高い標品はCS-Dと呼ばれ、イカ軟骨由来のCS多糖は、Eユニットを主要二糖単位にもつことからCS-Eと呼ばれている。CS-DやCS-Eは、比較的硫酸化の程度が高く、しばしば高硫酸化CS鎖として括られる。

興味深いことに、これら4種のCS標品は、マウス胎仔の脳から調製した海馬神経細胞の神経突起伸長に対してそれぞれ異なる影響を及ぼすことがわかっている^{14,15)}。ポリオルニチンで処理した基質表面を対照として、さらにそれぞれのCS標品を塗布した基質を用意し、その上で海馬神

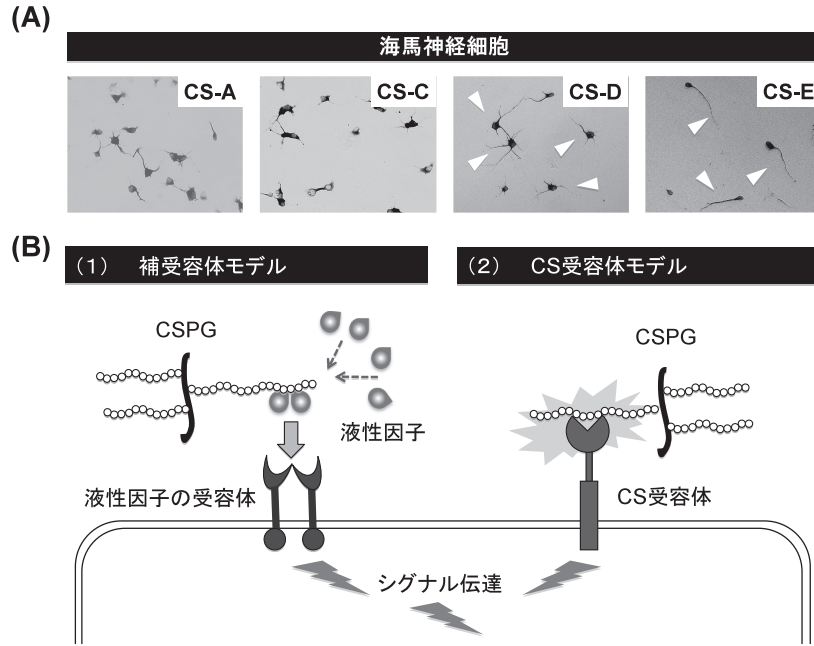


図2 CS鎖による神経突起伸長制御と提唱されているCS鎖を介した細胞内へのシグナル入力モデル

(A) さまざまなCS鎖を塗布した基質上で培養した海馬神経細胞の形態. (B) (1)高硫酸化CS鎖は、ヘパリン結合性増殖因子などの液性因子を捕獲・濃縮し、細胞表面上の高親和性受容体へ効率よく提示する補受容体（もしくはリザーバー）として機能する. (2)細胞表面上に発現するCS受容体分子により、CSPG（またはCS鎖）が認識され、細胞内へシグナルが伝達される.

神経細胞を培養して24時間後の形態を観察すると、CS-AやCS-Cを塗布した基質上では、神経突起の伸長がほとんど観察されない。それに対して、CS-DやCS-Eを塗布した基質上では、顕著な神経突起の伸長が観察される(図2A)。特筆すべきことに、両高硫酸化CS基質上で促進される神経突起の伸長は、形態的に明らかに異なり、CS-E基質上では、軸索様の長い神経突起の形成が観察されるのに対し、CS-D基質上では、樹状突起様の比較的短い（おそらく未熟な）神経突起が複数本観察されるにすぎない(図2A)。これらの形態は、CS-DやCS-Eに限らず、他の生物種由来のDユニットまたはEユニットに富む高硫酸化CS標品でも再現できることから¹⁶⁾、CS鎖中のDユニットやEユニットを含む硫酸化構造は、少なくとも神経突起の伸長に対して促進的に働く“糖鎖暗号”として機能していると考えられる。

1) CS-A または CS-C 様構造は神経突起の伸長阻害に関与する“糖鎖暗号”か？

一般に神経系におけるCSPGは、神経突起の伸長に対して抑制的に作用する分子群であると広く信じられてきた。CSPGが神経損傷後の損傷部位で形成されるグリア性瘢痕で高発現し、神経再生を妨害する分子であることを支持する数多くの報告¹⁷⁾から抱かれるCS鎖のマイナスイメージと相まって、今やCS鎖=悪玉分子という概念にすり替

わってしまったといっても過言ではない。しかし、発達過程の脳において、CS鎖が軸索を退けようとする作用は、むしろ誤った方向に軸索が侵入するのを防ぐガイダンス分子としての一面を表していると考えられる。例えば、CS鎖の発現レベルの高いマウス視交叉やニワトリの終脳-間脳境界において、神経軸索はCS鎖の高濃度領域を避けるように伸長する。このような領域のCS鎖をCHaseABC投与により分解すると、投射する軸索の走行に異常が生じることが見出されている^{18,19)}。これらのことから、ある一定量以上のCS鎖の発現、もしくは局所環境におけるCS鎖の濃度差は、反発要因として軸索の伸長パターン(方向性)を決定することで、発達期の正常な神経回路網形成に貢献しているのかもしれない。また、神経損傷後において、再生軸索がCSPGを高発現するグリア性瘢痕を乗り越えられないのも同様の現象を観察しているのかもしれない。

では、CS鎖の軸索伸長阻害作用を司る“糖鎖暗号”は存在するのであろうか？ 筆者らは、Fawcettらとの共同研究により、成体ラットの損傷脳やグリア性瘢痕組織の形成に関与する様々なグリア細胞における硫酸基転移酵素の発現やCS鎖の硫酸化プロファイルを網羅的に解析した²⁰⁾。正常な初代培養アストロサイトを、神経損傷に応じて産生されるサイトカイン(TGFα)で刺激処理すると、C6ST-1の発現が選択的に亢進し、抗CS-C抗体IO3H10(ファー

ジディスプレイ法によりスクリーニングされたCS-C選択的な一本鎖抗体)に対する反応性が著しく増加した。また、アストロサイト細胞株のうち、共培養した神経細胞の軸索伸長に対して阻害的に働く Neu7 細胞では、軸索伸長に対して許容的な環境を提供する A7 細胞に比べて、*C6ST-1* の発現レベルが顕著に高く、CS 鎖中の C ユニットの割合も約 8 倍高いことがわかった。同様の傾向が、成体ラットの大脳皮質損傷モデルでも観察され、損傷部位に分布する多くのグリア細胞系譜で、*C6ST-1* の発現と IO3H10 に対する反応性が亢進し、損傷部位周囲から回収した CS 鎖では、C ユニットの割合の有意な増加が検出された。これらの結果は、CS-C 様の特定の“糖鎖暗号”が CS 鎖を介した軸索伸長阻害作用に関わっている可能性を暗示する。

一方、Wang らは、CS-A といった 4-O-硫酸化構造に富む CS 鎖に軸索の伸長を妨げる効果があることを見出している²¹⁾。彼らの実験系では、ポリリジン処理したカバースリップ上に、CS 鎖を含む溶液をスポットし、CS 鎖が固相化されていない領域と CS 鎖に富む領域とが混在する基質を用いている。この基質上でマウス小脳顆粒細胞を培養し、スポット周囲に張り付いた顆粒細胞から伸展してきた軸索が CS 鎖に富むスポット境界域を乗り越えて伸展するかを調べると、CS-A 様の CS 鎖を含むスポット内には、軸索がほとんど侵入してこない。それに対して、同様のアッセイ系に供した CS-C は、軸索の侵入を阻害しないとの結果が示されている。

CS-A または CS-C を均一に塗布した基質上で海馬神経細胞を培養しても神経突起の伸長があまり観察されないこと(図 2A)を踏まえると、CS-A や CS-C に代表される“糖鎖暗号”は、①神経突起の伸長に対して許容的な基質でないことは確からしいが、②積極的に阻害・反発作用を示す基質であるかという問いに対しては、CS 鎖の量的変化の影響や、細胞による CS 鎖の認識機能(後述)の観点からも議論の余地がある。

2) CS-D または CS-E と液性因子との相互作用を介した神経突起伸長促進作用

図 2 に示したように、CS-D や CS-E などの高硫酸化 CS 鎖を均一に塗布した基質上では、海馬神経細胞の神経突起伸長が明らかに助長される。最近、化学合成した CS-E 四糖(二つの E ユニットが並列した四糖)でも神経突起伸長促進効果があることが報告された²²⁾。このような高硫酸化 CS 鎖に共通した神経突起の伸長促進作用はどのようなメカニズムで発揮されるのであろうか。最近の研究により、CS-D や CS-E などの高硫酸化 CS 鎖は、いくつかの線維芽細胞増殖因子(FGF)²³⁾、プライオトロフィン(PTN)^{12, 23, 24)}、ミッドカイン(MK)^{23, 25, 26)}といったヘパリン結合性増殖因子や脳由来神経栄養因子(BDNF)²⁶⁾などと高い結合親和性を示すことが示され、これら液性因子の活性

化を調節する形で、間接的に神経突起の伸長を制御する可能性が提唱されている。このモデルを支持する例として、PTN を培地中に添加することにより、CS-D 依存性の神経突起の伸長効果がさらに増強されることが見出されている²⁷⁾。逆に、MK や BDNF に対する中和抗体を培地に添加することで、CS-E 四糖を塗布した基質上で亢進する神経突起の伸長が顕著に抑制されることが報告されている²⁶⁾。これらのことから、高硫酸化 CS 鎖は、初代培養系の神経細胞もしくは非神経細胞から産生された液性因子を捕獲・濃縮し、神経細胞表面上に存在する各液性因子の受容体に提示する形で神経突起の伸長を制御する補受容体(もしくはリザーバー)として機能すると考えられている^{3, 9)}(図 2B)。

CS 鎖と相互作用する液性因子の中で、これまでよく研究されている分子である PTN や MK は、両分子だけで一つのファミリーを形成するユニークなヘパリン結合性増殖因子である^{28, 29)}。PTN と MK は、中枢神経系に発現する主要な CSPG の一つである受容体型チロシンホスファターゼ(PTP ζ)やそのスプライシングバリエーションで、PTP ζ の細胞外領域のみからなる CSPG ホスファカン上の CS 鎖を介して結合する^{30, 31)}。ホスファカン自身も神経突起の伸長を促進する基質として機能するが、その活性は、ホスファカン上の CS 鎖を CHaseABC 処理により取り除いた場合や、その CS 鎖を特異的に認識する抗 CS 抗体(473HD)で処理することにより消失する^{32, 33)}。興味深いことに、473HD は、D ユニットを含む固有の糖鎖構造を認識し、CS-D による神経突起の伸長も阻害する^{15, 34)}。また、PTN および MK の PTP ζ への結合は、CS-D や CS-E により強く阻害される^{31, 35)}。これらの事実を考え合わせると、CS-D や CS-E による神経突起の伸長促進作用の一部は、細胞外マトリックスに分布するホスファカン上の CS 鎖や細胞表面上の PTP ζ 上の CS 鎖の機能を擬似しているものと考えられる。実際、このような CS 鎖の“高硫酸化糖鎖暗号”に依存した PTN-PTP ζ シグナル伝達は、小脳プルキンエ細胞の形態形成³⁶⁾や大脳皮質の発達過程における神経細胞の移動の制御³⁷⁾にも関与していることが報告されている。

4. 神経突起の伸長制御に関わる CS 受容体の発見

高硫酸化 CS 鎖が神経栄養性の液性因子の補受容体として機能することで、神経突起の伸長を制御するというモデルは、ヘパリン/HS 鎖の代表的な機能発現様式³⁸⁾の概念³⁸⁾を踏襲しており、比較的解釈しやすい。しかしながら、CS-D と CS-E との間で、結合性を示す液性因子の種類に大きな差はなく、“補受容体モデル”だけでは、CS-D および CS-E 基質上で誘導促進される神経突起の明確な形態の違いを説明することはできない。実際、“補受容体モデル”とは対照的に、CSPG の CS 鎖を識別する分子が神経細胞

の細胞表面上に存在する可能性も提唱されていたが³⁹⁾ (図2B), これまで, 硫酸化GAG鎖を識別する受容体分子が同定された例はなかった. そこで, 筆者らは, 初代培養系のような不均一な細胞集団からなる共培養系の代わりに, 神経芽細胞腫由来の細胞株を用いたより単純な系で, 高硫酸化CS鎖の突起伸長促進作用のより詳細な分子メカニズムの解明を試みた⁴⁰⁾.

1) CS-E 基質上での Neuro2a 細胞の突起伸長

より単純な系で, 高硫酸化CS鎖の突起伸長促進作用の解析を行うため, 神経芽細胞腫由来株として, Neuro2a (N2a) 細胞を用いた. なぜなら, N2a細胞は, 無血清条件下で分化し, 突起を伸ばすことが知られており, 非神経細胞や血清由来の液性因子の影響を極力無視することができるからである. そこで, CS-D や CS-E を塗布した基質上に N2a 細胞を播種し, 無血清条件下で培養後の細胞の形態を観察した. CS-E 基質上で培養した海馬神経細胞では, 培養してから24時間で, 図2Aのように明らかな神経突起の伸長が観察されたが, 予期せぬことに, CS-E 基質上に播種した N2a 細胞では, 48時間培養した場合でも, ほとんど突起の伸長が見られなかった (図3A). 一方 CS-D を基質とした場合には, N2a 細胞においても, 海馬神経細胞で見られるような複数本の突起の伸長が観察された

(図2Aおよび図3A) (後述).

そこで筆者らは, N2a細胞がCS-Eに対して応答性を示さないことに着目し, その原因を探ることにした. N2a細胞は, MK や BDNF に対する受容体分子をそれぞれ発現していたが, CS-E 基質上で培養した N2a 細胞を両液性因子で追加刺激をしても, 突起の伸長促進は観察できなかった. このことから, N2a細胞は海馬神経細胞とは異なり, MK や BDNF の刺激に対して著しく応答性の乏しい細胞であり, CS-E と共働した突起伸長促進作用を顕在化できない細胞であると考えられた. 見方を変えれば, N2a細胞の分化誘導系は, CS-E の突起伸長促進作用を仲介する未知の“CS受容体分子”を探索する点で, 液性因子の影響を無視できる非常に有用な実験系であると考えられた.

そこで, N2a細胞において, CS-E を認識する受容体の役割を果たすタンパク質の発現が低下もしくは欠損している可能性を想定し, 神経細胞に発現する膜タンパク質の中でも, CSPG と結合することが知られている細胞接着分子^{41,42)} やその類縁分子を中心に, N2a細胞と海馬神経細胞の両細胞間で発現の異なる遺伝子を検索した. その結果, N2a細胞では *contactin-1* (*CNTN-1*) の発現がほとんど検出されないことが判明した (図3B). *CNTN-1* は神経細胞表面に発現する GPI-アンカー型の細胞接着分子であり,

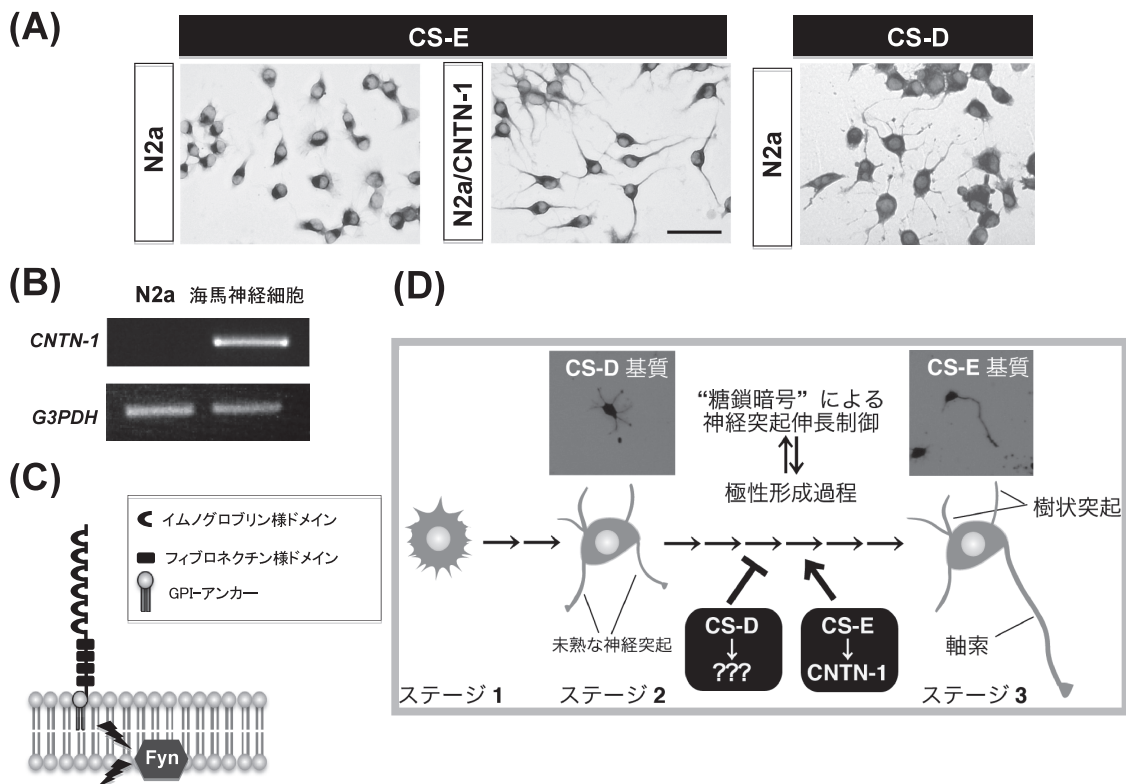


図3 CS受容体を介した神経突起伸長制御機構 (文献40より一部改変)

(A) CS-D または CS-E 基質上で48時間培養した N2a 細胞および N2a/CNTN-1 細胞の形態. (B) N2a 細胞および海馬神経細胞における *CNTN-1* の発現. (C) *CNTN-1* の構造と Fyn の活性化を伴うシグナル伝達経路. (D) CS 鎖の“糖鎖暗号”による神経突起の伸長制御と極性形成との関連.

その構造上の特徴から免疫グロブリンスーパーファミリーに属する (図 3C). CNTN-1 は, 細胞外マトリックスやグリア細胞上に存在する多種多様な分子と相互作用することで, 神経細胞の接着や神経突起の伸長を制御することが知られている^{43,44}. 興味深いことに, CNTN-1 と相互作用する分子の一つとして, CSPG であるホスファカン/PTP ζ が同定されているが, その CS 鎖部分が CNTN-1 との相互作用に関わっているかについての積極的な報告はなされていなかった. これらのことから, CS-E 基質上の N2a 細胞で突起伸長が起らない原因は, CNTN-1 が CS-E の受容体としての機能を果たしており, その発現が N2a 細胞で著しく低下しているためではないかと考えられた.

2) CNTN-1 は CS 受容体として機能する.

そこで, CNTN-1 が CS-E の受容体としての機能を果たしているかを検証するため, CNTN-1 を過剰発現する N2a 細胞 (N2a/CNTN-1) を樹立した. N2a/CNTN-1 細胞を CS-E 基質上で培養したところ, 親株の N2a 細胞とは異なり, 数本の長い突起を伸ばす細胞が多く観察され (図 3A), 突起の伸長が有意に促進されることがわかった. これとは対照的に, CS-A や CS-C を塗布した基質上や, HS 鎖を塗布した基質上で N2a/CNTN-1 細胞を培養しても, 明らかな突起の伸長促進は認められなかった. さらに, CNTN-1 に対する中和抗体を培地中に添加することにより, CS-E 基質上で促進される N2a/CNTN-1 細胞の突起伸長は効果的に抑制され, そのレベルは親株の N2a 細胞とほぼ同程度であった. これらのことから, CS-E により促進される N2a/CNTN-1 細胞の突起伸長には, 細胞表面上での CNTN-1 の機能的発現が必要であることが示唆された.

上述の結果を受けて, CS-E により誘導される海馬神経細胞の神経突起伸長においても CNTN-1 が介在しているのかどうか調べた. 免疫染色により, 分散培養系に供した大部分の海馬神経細胞が CNTN-1 陽性であったので, 中和抗体を用いた CNTN-1 の機能阻害実験を行った. 期待通り, CS-E 基質上で観察される海馬神経細胞の神経突起伸長は, CNTN-1 に対する中和抗体の存在下で顕著に抑制されたが, コントロール基質であるポリオルニチン上で観察される神経突起の長さを基準にすると, その抑制効果は中程度であった. 興味深いことに, MK または BDNF に対する中和抗体をそれぞれ CNTN-1 に対する中和抗体と同時に添加することで, CS-E 駆動性の神経突起伸長がポリオルニチン上で観察されるレベルにまでほぼ完全に抑制された. これらのことから, CS-E を介する海馬神経細胞の神経突起伸長には, 神経細胞上に発現する CNTN-1 のみならず, これまで報告されているような神経栄養性の液性因子の関与も重要であることが示唆された.

3) CS-E の CNTN-1 に対するリガンドとしての機能

CNTN-1 が CS-E に対する受容体として機能するならば,

CNTN-1 と CS-E が直接結合する必要がある. BIAcore を用いた相互作用解析から得られた CNTN-1 と CS-E との相互作用における解離速度定数 (K_D) は $1.4 \mu\text{M}$ であり, CS-E は, CS-A, CS-C や HS と比べて $100\sim 1,000$ 倍程度高い結合親和性を示す硫酸化 GAG 鎖であることがわかった. レクチンのように糖鎖を特異的に認識するタンパク質でも, その K_D 値は数十~数百 μM であることから^{45,46}, CS-E と CNTN-1 は, 生理的条件下でも, 互いにリガンドおよび受容体として機能できるものと考えられた. 実際に, 蛍光標識した CS-E をトレーサーとしてチャンバースライド上に播種した N2a 細胞および N2a/CNTN-1 細胞の培地中に添加したところ, CS-E 由来の蛍光シグナルは, N2a/CNTN-1 細胞の細胞表面で強く観察されたのに対し, N2a 細胞上ではほとんど観察されなかった. このことから, CS-E が細胞表面上の CNTN-1 と直接結合することで, 細胞内にシグナルが伝達され, 突起の伸長が誘導されるものと考えられた.

CNTN-1 は, 内因性リガンドが結合することにより活性化され, 神経細胞の接着および神経突起の伸長を誘導する⁴³. 特に神経突起の伸長を促進する CNTN-1 依存性のシグナル伝達系は, まず細胞内に存在する非受容体型チロシンキナーゼ Fyn を活性化することにより発揮されることが知られている^{47,48} (図 3C). そこで, シグナル分子としての CS-E の機能を明らかにするために, N2a/CNTN-1 細胞を様々な CS 鎖で刺激した際に, Fyn の活性化が惹起されるかを検討した. Fyn の活性化の程度を, その自己リン酸化活性を指標に評価したところ, N2a/CNTN-1 細胞における Fyn の活性化レベルは, 添加した CS-E の用量に依存して増加した. 一方, N2a/CNTN-1 細胞上に CS-A や CS-C を添加しても, Fyn キナーゼ活性は CS 鎖未処理の場合と変わらなかった. このことから, CS-E は CNTN-1 のリガンドとして機能し, CNTN-1 を介したシグナル伝達を活性化することで, 神経突起伸長促進作用を発揮すると考えられた.

4) シグナル分子としての CS 鎖と CS 受容体の意義

CNTN-1 といった CS 鎖を感知・識別する受容体分子が生体内に存在するという事は, 見方を変えれば, CS 鎖自身が, 細胞外シグナル分子としても振舞うことができるということと同義であり, 非常に重要な意味をもつ. なぜなら, この特性を活かすことで, CS 鎖をアゴニスト (またはアンタゴニスト) という観点から薬理的に適用することも可能だからである. したがって, その実現に向け, 化学合成した CS オリゴ糖などを調製し, 活性発現に必要な最小オリゴ糖構造を決定してゆくことも今後の重要な課題であろう.

前述したように, 化学合成した CS-E 四糖により誘導される海馬神経細胞の神経突起伸長は, 筆者らの CS-E 多糖

の場合とは異なり、MKやBDNFに対する中和抗体を培地に添加しただけで、ほぼ完全に抑制される²⁶⁾。このことは、CS-EによるCNTN-1の活性化には、CS-E四糖では不十分であり、ある程度のサイズが必要であることを意味しているのかもしれない。実際、CNTN-1の活性化は、CNTN-1に対する抗体を利用して、細胞表面上のCNTN-1を架橋することによっても誘導できるので⁴⁹⁾、その活性化には、同一細胞上に発現するCNTN-1同士のホモフィリックな相互作用が必要であると考えられる。この点において、筆者らが用いたCS-E多糖は、同一神経細胞上に発現する複数のCNTN-1と多点結合するのに十分なサイズであったため、CNTN-1のシス型の相互作用を助長するリガンドとして機能できたのかもしれない。

また、CNTN-1を介する細胞内へのシグナル入力を考えるに当たっては、CNTN-1自身が細胞内ドメインをもたないGPI-アンカー型の分子であることから、神経細胞上に発現し、CNTN-1と複合体を形成する他の分子の存在も無視できない。最近、CNTN-1とそのサブファミリーメンバーであるTAG-1や、神経細胞接着分子の一つであるL1が、グリア細胞系譜に発現する細胞接着分子CD24上の特定のO結合型糖鎖構造（それぞれLewis X糖鎖抗原や $\alpha 2,3$ 結合型シアル酸含有糖鎖）を認識するレクチン様受容体として機能し、CD24依存性の神経突起伸長制御に関与することが報告された⁵⁰⁾。興味深いことに、これらのレクチン様受容体同士が、神経細胞上でどのような組合せの複合体を形成するかによって、CD24で同じように刺激したとしても、神経突起の伸長が促進される場合と抑制される場合があるようである。同様の分子基盤が根底にあるとすると、もともとCS-Eに対して応答性を示さない親株のN2a細胞においても、TAG-1やL1は発現していることから、CS-Eによる神経突起の伸長促進には、CNTN-1を中心とした複数の膜タンパク質からなる機能的な分子複合体の形成が必要不可欠なのかもしれない。これらのことから、CS受容体としての機能を果たす分子複合体に含まれる構成分子の全体像を明らかにすることは、神経細胞側のもつCS鎖の“糖鎖暗号”に対する認識選択性の分子基盤を解明する上でも重要な課題といえよう。

また、最近、受容体型チロシンホスファターゼの一つであるPTP σ が、軸索伸長に対して阻害的に働くCSPGの受容体として機能することが報告された⁵¹⁾。PTP σ とCSPGとの結合はCS鎖を介しており、PTP σ を欠損した神経細胞では、CSPGによる阻害効果の影響が著しく減弱し、CSPGが高発現する損傷領域を乗り越えて軸索を伸長ようになることから、PTP σ は神経再生に向けた絶好の標的となろう。しかしながら、PTP σ は、CNTN-1と同様、細胞外領域に複数のイムノグロブリン様ドメインとフィブロネクチン様ドメインをもつため、様々な分子と相互作用

しうる分子種であると予想される。したがって、PTP σ の機能の普遍性を明らかにする上でも、PTP σ が神経細胞上のどのような分子と複合体を形成し、どのようなシグナルを伝えるのか、また、CS鎖の硫酸化構造に対して選択性を示すのかなどを検証する必要がある。

5. 高硫酸化CS鎖による神経極性形成過程の制御

神経細胞は高度に極性を獲得した細胞であり、細胞体から1本の軸索と複数の軸索を伸長させる。神経細胞がこのような極性を獲得する際には、図3Dに示したように、形態的にも機能的にも区別つかない未熟な神経突起から、1本のみが急速に伸長して軸索としての性質を獲得するとともに、残りの神経突起が樹状突起として成熟するといった劇的な運命決定が行われる⁵²⁾。興味深いことに、前述したCS-DまたはCS-Eを塗布した基質上で培養した海馬神経細胞の形態は、それぞれ極性形成過程のステージ2またはステージ3の細胞形態と酷似している（図3D）。このことから、CS-Eには、顕著な神経突起の伸長を伴うステージ3への形態移行を促進する働きがあるのに対し、CS-Dには、ステージ2に至るまでの未熟な神経突起の形成を支持するが、ステージ2からステージ3への形態移行に対しては、むしろ抑制的に作用する可能性が示唆された。

筆者らは、この仮説を検証するため、CS-Eの量を一定とし、CS-Dの量を変えて調製したCS-DとCS-Eの混合基質上で、海馬神経細胞を培養し、それぞれの条件での細胞形態の変化を観察した（未発表）。その結果、混合基質中に占めるCS-Dの割合が増加するにつれて、各神経細胞における顕著に長い神経突起の伸長が抑制され、細胞の形態も徐々に複数本の神経突起をもつステージ2のような形態に収束する傾向が観察された。これらのことから、神経細胞の極性形成が、CS-Eによる神経突起伸長の促進作用とCS-Dによる抑制作用のバランスにより制御されている可能性が考えられた。したがって、CS-Dを識別するCS受容体の存在を視野に入れながら、CS-D刺激により神経細胞内で発動するシグナル伝達系と、CS-EとCNTN-1との相互作用により発動する促進性のシグナル伝達系との違いを検証することによって、CS鎖が神経突起の伸長制御に対して二面性をもつ所以が明らかになるのかもしれない。図3Aに示したように、親株のN2a細胞の突起の伸長は、CS-D基質上でも観察されるので、CS-Dによる突起伸長制御には、少なくともCNTN-1非依存的な分子機構が存在すると予想される（図3D）。

最近前田らは、神経細胞自身が産生する高硫酸化二糖ユニットを含むCS鎖が、未成熟な軸索の接着斑上に多く分布しており、接着斑上でのインテグリンシグナルを介して軸索と基質との接着を制御することで、軸索の特性化を導くことを見出した⁵³⁾。これらのことから、神経の極性形成

過程は、神経細胞自律的に産生されたCS鎖や神経細胞を取り巻く微小環境中のCS鎖の“糖鎖暗号”によって厳密に制御されているものと考えられる。

6. おわりに

紙面の制約上割愛したが、神経系におけるCS鎖の研究はここ10年で飛躍的に進展し、その守備範囲も、神経の発生や発達過程を理解するための基礎的な研究領域から、神経可塑性や記憶などの高次機能に関わる分野にまで及ぶようになってきた。現在、CSPGは神経可塑性を消失させる原因分子の一つとも考えられており、それはCSPGが神経系の成熟に伴い、特定の神経細胞周囲で形成されるペリニューロナルネット(PNN)と呼ばれる特殊な構造体に濃縮されることと深く関連している^{54,55)}。最近、若いうちは消去可能な“恐怖記憶”が成体になると消去困難になる原因が、扁桃体のGABA作動性神経細胞周囲のPNNへのCSPGの集積であることが見出され、PNN上のCS鎖をCHaseABCで分解することで、恐怖記憶が消去可能になることが報告された⁵⁶⁾。このように、神経可塑性の回復や神経損傷後の再生を達成するために講じられている手段は、現在のところ、PNNやグリア性瘢痕に高濃度に分布するCS鎖を徹底的に分解することである。しかしながらこの行為は、例えばグリア性瘢痕において、神経突起の伸長に対して促進的に作用する“糖鎖暗号”を保有したCS鎖の効力をも奪い去ってしまっているかもしれない。したがって今後は、各CS受容体のCS鎖に対する選択性や発動するシグナル伝達経路の共通点や相違点を明確にし、CS鎖の“糖鎖暗号”と機能との連関を包括的に捉えてゆく必要があろう。また最近の研究から、CS鎖の構造多様性は、硫酸化修飾のみならず、その鎖長や、コアタンパク質上に載るCS鎖の本数の違いによっても産み出されることがわかってきた⁵⁷⁻⁵⁹⁾。それゆえ、CS鎖の生合成や硫酸化修飾に関わる酵素の発現を改変した動物などを用いて、神経系におけるCS鎖の“糖鎖暗号”の意義を一つ一つ検証することも重要な課題である。さらなる研究の進展により、CS鎖を一刀両断で取り除くのではなく、悪玉CS鎖のシグナル経路は遮断し、善玉CS鎖のシグナル経路は活かすような神経再生治療が実現されることを期待したい。

文 献

- 1) Mizuguchi, S., Uyama, T., Kitagawa, H., Nomura, K.H., De-jima, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Sugahara, K., & Nomura, K. (2003) *Nature*, **423**, 443-448.
- 2) Izumikawa, T., Kanagawa, N., Watamoto, Y., Okada, M., Saeki, M., Sakano, M., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M., & Kitagawa, H. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 12190-12196.
- 3) Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura,

- K., & Kitagawa, H. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 612-620.
- 4) Thiele, H., Sakano, M., Kitagawa, H., Sugahara, K., Rajab, A., Höhne, W., Ritter, H., Leschik, G., Nürnberg, P., & Mundlos, S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10155-10160.
- 5) Klüppel, M. (2010) *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **93**, 113-132.
- 6) Uyama, T., Ishida, M., Izumikawa, T., Trybala, E., Tufaro, F., Bergström, T., Sugahara, K., & Kitagawa, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 38668-38674.
- 7) Bradbury, E.J., Moon, L.D., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W., & McMahon, S.B. (2002) *Nature*, **416**, 636-640.
- 8) Silver, J. & Miller, J.H. (2004) *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 146-156.
- 9) Sugahara, K. & Mikami, T. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 536-545.
- 10) Kusche-Gullberg, M. & Kjellén, L. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 605-611.
- 11) Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Tone, Y., & Sugahara, K. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 31377-31381.
- 12) Maeda, N., He, J., Yajima, Y., Mikami, T., Sugahara, K., & Yabe, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 35805-35811.
- 13) Mitsunaga, C., Mikami, T., Mizumoto, S., Fukuda, J., & Sugahara, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 18942-18952.
- 14) Clement, A.M., Nadanaka, S., Masayama, K., Mandl, C., Sugahara, K., & Faissner, A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 28444-28453.
- 15) Clement, A., Sugahara, K., & Faissner, A. (1999) *Neurosci. Lett.*, **269**, 125-128.
- 16) Hikino, M., Mikami, T., Faissner, A., Vilela-Silva, A.C., Pavão, M.S., & Sugahara, K. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 43744-43754.
- 17) Galtrey, C.M. & Fawcett, J.W. (2007) *Brain Res. Rev.*, **54**, 1-18.
- 18) Ichijo, H. (2004) *Mol. Neurobiol.*, **30**, 23-33.
- 19) Corvetto, L. & Rossi, F. (2005) *J. Neurosci.*, **25**, 7150-7158.
- 20) Properzi, F., Carulli, D., Asher, R.A., Muir, E., Camargo, L.M., van Kuppevelt, T.H., ten Dam, G.B., Furukawa, Y., Mikami, T., Sugahara, K., Toida, T., Geller, H.M., & Fawcett, J.W. (2005) *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 378-390.
- 21) Wang, H., Katagiri, Y., McCann, T.E., Unsworth, E., Goldsmith, P., Yu, Z.X., Tan, F., Santiago, L., Mills, E.M., Wang, Y., Symes, A.J., & Geller, H.M. (2008) *J. Cell Sci.*, **121**, 3083-3091.
- 22) Tully, S.E., Mabon, R., Gama, C.I., Tsai, S.M., Liu, X., & Hsieh-Wilson, L.C. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 7736-7737.
- 23) Deepa, S.S., Umehara, Y., Higashiyama, S., Itoh, N., & Sugahara, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 43707-43716.
- 24) Maeda, N., Fukazawa, N., & Hata, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **281**, 4894-4902.
- 25) Ueoka, C., Kaneda, N., Okazaki, I., Nadanaka, S., Muramatsu, T., & Sugahara, K. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 37407-37413.
- 26) Gama, C.I., Tully, S.E., Sotogaku, N., Clark, P.M., Rawat, M., Vaidehi, N., Goddard, W.A. 3rd, Nishi, A., & Hsieh-Wilson, L. C. (2006) *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 467-473.
- 27) Bao, X., Mikami, T., Yamada, S., Faissner, A., Muramatsu, T., & Sugahara, K. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 9180-9191.
- 28) Rauvala, H., Huttunen, H.J., Fages, C., Kaksonen, M., Kinnunen, T., Imai, S., Rauilo, E., & Kilpelainen, I. (2000) *Matrix Biol.*, **19**, 377-387.
- 29) Muramatsu, T. (2010) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*,

- 86, 410–425.
- 30) Milev, P., Chiba, A., Häring, M., Rauvala, H., Schachner, M., Ranscht, B., Margolis, R.K., & Margolis, R.U. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 6998–7005.
- 31) Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., & Noda, M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 12474–12479.
- 32) Faissner, A., Clement, A., Lochter, A., Streit, A., Mandl, C., & Schachner, M. (1994) *J. Cell. Biol.*, **126**, 783–799.
- 33) Maeda, N. & Noda, M. (1996) *Development*, **122**, 647–658.
- 34) Ito, Y., Hikino, M., Yajima, Y., Mikami, T., Sirko, S., von Holst, A., Faissner, A., Fukui, S., & Sugahara, K. (2005) *Glycobiology*, **15**, 593–603.
- 35) Maeda, N. (2003) *Connect. Tissue*, **35**, 19–23.
- 36) Tanaka, M., Maeda, N., Noda, M., & Marunouchi, T. (2003) *J. Neurosci.*, **23**, 2804–2814.
- 37) Ishii, M. & Maeda, N. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 32610–32620.
- 38) Bishop, J.R., Schuksz, M., & Esko, J.D. (2007) *Nature*, **446**, 1030–1037.
- 39) Carulli, D., Laabs, T., Geller, H.M., & Fawcett, J.W. (2005) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **15**, 116–120, Erratum in: (2005) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **15**, 252.
- 40) Mikami, T., Yasunaga, Y., & Kitagawa, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 4494–4499.
- 41) Oohira, A., Matsui, F., Tokita, Y., Yamauchi, S., & Aono, S. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**, 24–34.
- 42) Bandtlow, C.E. & Zimmermann, D.R. (2000) *Physiol. Rev.*, **80**, 1267–1290.
- 43) Gennarini, G., Durbec, P., Boned, A., Rougon, G., & Goridis, C. (1991) *Neuron*, **6**, 595–606.
- 44) Falk, J., Bonnon, C., Girault, J.A., & Faivre-Sarrailh, C. (2002) *Biol. Cell*, **94**, 327–334.
- 45) Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., Jackson, S.S., & Vasta, G.R. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 513–520.
- 46) Nicholson, M.W., Barclay, A.N., Singer, M.S., Rosen, S.D., & van der Merwe, P.A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 763–770.
- 47) Zisch, A.H., D'Alessandri, L., Amrein, K., Ranscht, B., Winterhalter, K.H., & Vaughan, L. (1995) *Mol. Cell Neurosci.*, **6**, 263–279.
- 48) Brackenbury, W.J., Davis, T.H., Chen, C., Slat, E.A., Detrow, M.J., Dickendesher, T.L., Ranscht, B., & Isom, L.L. (2008) *J. Neurosci.*, **28**, 3246–3256.
- 49) Cervello, M., Matranga, V., Durbec, P., Rougon, G., & Gomez, S. (1996) *J. Cell Sci.*, **109**, 699–704.
- 50) Lieberoth, A., Splittstoesser, F., Katagihallimath, N., Jakovcevski, I., Loers, G., Ranscht, B., Karagogeos, D., Schachner, M., & Kleene, R. (2009) *J. Neurosci.*, **29**, 6677–6690.
- 51) Shen, Y., Tenney, A.P., Busch, S.A., Horn, K.P., Cuascut, F. X., Liu, K., He, Z., Silver, J., & Flanagan, J.G. (2009) *Science*, **326**, 92–96.
- 52) Yoshimura, T., Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 10626–10630.
- 53) Nishimura, K., Ishii, M., Kuraoka, M., Kamimura, K., & Maeda, N. (2010) *Neuroscience*, **169**, 1535–1547.
- 54) Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., & Maffei, L. (2002) *Science*, **298**, 1248–1251.
- 55) 宮田真路, 北川裕之 (2011) 脳 **21**, **14**, 16–21.
- 56) Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., & Herry, C. (2009) *Science*, **325**, 1258–1261.
- 57) Izumikawa, T., Koike, T., Shiozawa, S., Sugahara, K., Tamura, J., & Kitagawa, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 11396–11406.
- 58) Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J., & Kitagawa, H. (2009) *Biochem. J.*, **421**, 157–162.
- 59) Watanabe, Y., Takeuchi, K., Higa-Onaga, S., Sato, M., Tsujita, M., Abe, M., Natsume, R., Li, M., Furuichi, T., Saeki, M., Izumikawa, T., Hasegawa, A., Yokoyama, M., Ikegawa, S., Sakimura, K., Amizuka, N., Kitagawa, H., & Igarashi, M. (2010) *Biochem. J.*, **432**, 47–55.