

T10の構造ではUDP-GalNAcは分解されているが、分解後のUDPを遊離させない機構を備えていることの意義は何であろうか。T10に見られるUDPとGalNAcの構造ではGalNAcのアノマー炭素原子の α 位側が広く空いている。T10のGalNAcの位置と、T2のペプチド基質の位置は反応生成物であるGalNAc- α -Serがそのままおけるような位置関係にあって非常に合理的であり、T10の構造が反応中間体の構造を反映していることを示唆している(図2B)。T2の構造ではGalNAcを攻撃する受容体基質のスレオニンの水酸基はUDPのリン酸基と水素結合している。二回目の求核置換反応のためスレオニンのプロトンが引き抜かれるが、そのルイス塩基はアミノ酸側鎖ではなく、UDPのリン酸基かもしれない¹⁵⁾。UDPは二回目の反応の活性基であるので、そのまま遊離させないように酵素は固く保持しているのだろう。図の反応サイクル中には、例えば酵素とUDP-GalNAcとのES複合体など、まだ予想にすぎない分子種が多く残っている。今後の構造解析の進展を待ちたい。

4. おわりに

糖転移酵素は供与体基質と結合様式の特異性からいくつかのファミリーを形成していて、アミノ酸配列比較の類似性もはっきりしている。また、計算機科学によりファミリーの構造が一つ解ければドメインの構造予測は可能である。しかしながら糖転移酵素の場合、ファミリー内で受容体基質の特異性の違いを明らかにすること、その違いを生み出す機構を理解することが重要である。アミノ酸配列比較から「違い」において重要な残基を予測することは困難であるし、その違いはどのような相互作用に拠っているかを理解することは不可能である。pp-GalNAc-Tでは二つのドメインからなる酵素で、ドメイン間配向が重要である場合、その予測はますます困難であろう。これら「違い」の解明には、立体構造の情報は不可欠である。しかも、ファミリーの一員の構造が解けたから終わりではなく、複数のメンバーの構造を解き比較することで初めて基質特異性の違いの真相に迫れる。今後とも哺乳類由来の糖転移酵素の構造解析は報告され続けるであろうし、たくさんの比較対象としての構造が枚挙されることにより、基質認識の全体像が見えてくるものであらうと思われる。

- 1) Apweiler, R., Hermjakob, H., & Sharon, N. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1473, 4-8.
- 2) Narimatsu, H., Sinha, S., Brew, K., Okayama, H., & Qasba, P.

- K. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4720-4724.
- 3) 志波智生, 角田品子, 岡 昌吾, 石黒正路, 川崎俊祐, 若槻壮市, 加藤龍一 (2005) *生化学*, 77, 153-158.
- 4) Fritz, T.A., Hurley, J.H., Trinh, L.B., Shiloach, J., & Tabak, L.A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 15307-15312.
- 5) Fritz, T.A., Raman, J., & Tabak, L.A. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 8613-8619.
- 6) Kubota, T., Shiba, T., Sugioka, S., Furukawa, S., Sawaki, H., Kato, R., Wakatsuki, S., & Narimatsu, H. (2006) *J. Mol. Biol.*, 359, 708-727.
- 7) Ten Hagen, K.G., Fritz, T.A., & Tabak, L.A. (2003) *Glycobiology*, 13, 1R-16R.
- 8) Cheng, L., Tachibana, K., Zhang, Y., Guo, J., Kahori Tachibana, K., Kameyama, A., Wang, H., Hiruma, T., Iwasaki, H., Togayachi, A., Kudo, T., & Narimatsu, H. (2002) *FEBS Lett.*, 531, 115-121.
- 9) Gerken, T.A., Zhang, J., Levine, J., & Elhammer, A. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 49850-49862.
- 10) Kikuchi, N., Kwon, Y.D., Gotoh, M., & Narimatsu, H. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 574-579.
- 11) Tenno, M., Saeki, A., Kezdy, F.J., Elhammer, A.P., & Kurosaka, A. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 47088-47096.
- 12) Zechel, D.L. & Withers, S.G. (2000) *Acc. Chem. Res.*, 33, 11-18.
- 13) Lairson, L.L., Chiu, C.P., Ly, H.D., He, S., Wakarchuk, W.W., Strynadka, N.C., & Withers, S.G. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 28339-28344.
- 14) Qasba, P.K., Ramakrishnan, B., & Boeggeman, E. (2005) *Trends Biochem. Sci.*, 30, 53-62.
- 15) Persson, K., Ly, H.D., Dieckelmann, M., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G., & Strynadka, N.C. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, 8, 166-175.

久保田 智巳

(産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター)

Crystal structure of polypeptide-GalNAc transferases: Lectin domain and catalytic domain
Tomomi Kubota (Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Central-2, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki, zip 305-8568, Japan)

中枢神経系に特異的に発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ニューログリカンCの機能

1. はじめに

プロテオグリカン (PG) は硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) 鎖が共有結合したタンパク質の総称である。

中枢神経系では、様々なPGの存在が知られており、コアタンパク質の構造やGAGの種類により分類されている¹⁾。かつては、PGは細胞間隙を埋めている静的な構造支持体と考えられてきたが、最近の研究で、軸索伸長やシナプス形成、神経細胞の分化、細胞分裂、神経の損傷修復など、様々な細胞機能を制御している動的な生理活性物質として認識されるようになってきている²⁾。本稿では、中枢神経系に特異的に発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)であるニューログリカンCの機能について概説する。

2. ニューログリカンCの構造と発現様式

ニューログリカンCは私達の研究室で精製クローニングされた膜結合型CSPGである³⁾。中枢神経系に特異的に発現していることからneural proteoglycan with chondroitin sulfateを略してneuroglycan C (NGC)と名付けられた。NGCのコアタンパク質は、120kDaの分子サイズであり、

N末端側より、CS鎖の結合するCSドメイン、酸性アミノ酸クラスターの存在するAAAドメイン、上皮増殖因子(EGF)様モジュールをもつEGFドメイン、膜貫通部位、C末端側の細胞内ドメインの五つのドメインに分けられる(図1A)。NGCには六つのCS鎖付加可能部位があるが、アミノ酸置換実験により123番目のセリン残基にCS鎖が共有結合していることがわかっている⁴⁾。NGCには、CS鎖以外にN型糖鎖やO型糖鎖も付加している。またNGC細胞外ドメインのセリン残基がリン酸化されうることもわかっている。これらの糖鎖付加やリン酸化によりNGCの機能が制御されていると考えられる。

マウスNGCにはスプライシングにより六つの分子種(NGC-I~-VI)が生成されることが報告されている。このうちNGC-I、-III、および-IVについては脳内でタンパク質として発現していることが確認されており、NGC-Iが主成分である⁵⁾。これら三つの分子種は、共通の細胞外領域をもっているが、NGC-IIIはNGC-Iの細胞内領域の中央部分

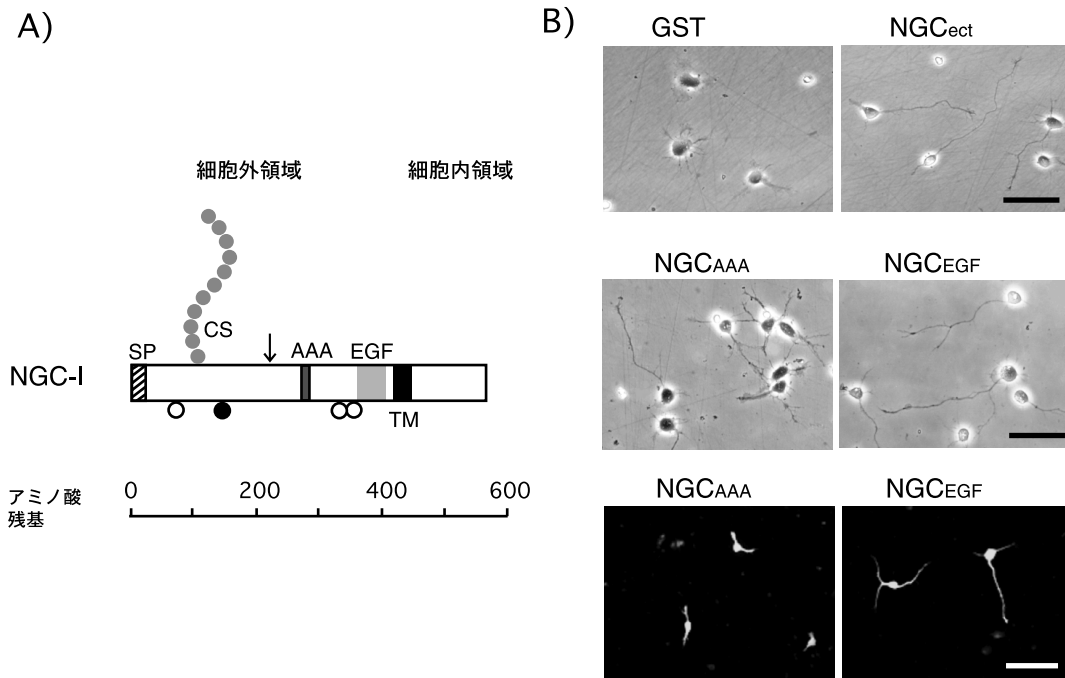


図1 A) NGC-Iの構造模式図。SP：シグナル配列，CS：コンドロイチン硫酸鎖，AAA：酸性アミノ酸のクラスター，EGF：上皮増殖因子様ドメイン，TM：膜貫通領域，白丸：N型糖鎖結合部位，黒丸：O型糖鎖クラスター領域，矢印：セリン残基リン酸化部位。
B) 培養大脳皮質神経細胞に対するGST融合NGCリコンビナントタンパク質の作用。上段：GST単独(対照群)では突起伸長は認められないが、細胞外領域リコンビナントタンパク質(NGCect)では著明に神経突起が伸長した。中段；AAAドメイン(NGCAAA)およびEGFドメイン(NGCEGF)リコンビナントタンパク質の作用。下段；GABA陽性神経細胞に対する作用。NGCEGFはGABA陽性神経細胞に対しても突起伸長活性が認められた。横線；50 μ m。

に27個のアミノ酸が挿入されており、またNGC-IVはNGC-Iよりもさらに短い細胞内領域しかもたない分子である。

脳におけるNGCの発現は、ラットでは胎生中期より観察され、生後3週齢で最高となり、成獣ではピーク時の約半分となる³⁾。NGCの神経細胞上での局在を免疫染色で見ると、樹状突起上の小突起(dendritic protrusion)に局在する。げっ歯類の生後3週齢は神経回路網形成後期にあたり、NGCが神経回路網とくにシナプス形成に関与していることが強く示唆される。NGCは中枢神経系に広く分布しているが、小脳および網膜では、幼若期にはCS鎖を共有結合したPG型であるのに対し、成獣ではCS鎖をもたない非PG型として存在する。即ち、NGCはめずらしいパートタイムプロテオグリカンである⁴⁾。興味深いことに、培養神経細胞が合成するNGCはPG型であるのに対し、培養アストロサイトのNGCは大部分が非PG型である。また、NGC遺伝子を種々の株化細胞に導入すると、一部の株化細胞でのみNGCはPG型として発現する。非PG型NGCしか発現しない株化細胞でも、CS鎖をもつその細胞固有のCSPG分子種は合成されていることから、NGCのCS付加は、他のCSPGとは異なる機構で調節されていると考えられる。CS鎖は神経突起反発作用など固有の生理活性をもつことから、CS鎖をもつNGC(PG型)と、もたないNGC(非PG型)とでは異なる機能をもっている可能性がある。

3. NGCタンパク質の神経系における機能

ドイツの研究グループは、ニワトリにおけるNGC相同分子であるchicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein(CALEB)を単離し、CALEB抗体がニワトリ視蓋細胞の突起伸長を抑制することを発見し⁶⁾、NGCが神経突起伸長に関わる分子であることを示唆した。一方、私達はNGCの細胞外領域をGST融合のリコンビナントタンパク質(NGCect)として調製し、培養大脳皮質神経細胞に添加したところ、図1Bに示すように、GSTタンパク質のみを添加した群に比べて培養神経の突起を著明に伸長促進することを発見した⁷⁾。さらに、このNGCの神経突起伸長促進活性が、EGFドメイン(NGC_{EGF})およびAAAドメイン(NGC_{AAA})に存在することも明らかにした。また、NGC_{EGF}はグルタミン酸作動性神経細胞のみならず、少数成分であるGABA陽性神経細胞の突起をも伸長するのに対し、NGC_{AAA}はGABA陽性細胞に対しては活性を示さなかった。このことから、NGC_{AAA}とNGC_{EGF}は異なる機

序を介して神経突起伸長を促進していることが推察された。

NGCはEGF受容体ErbB3と特異的に結合し、乳がん由来株化細胞の増殖を促進することが報告されている⁸⁾。しかし、既知のEGFファミリー分子(EGF, HB-EGF, ニューレグリン)は神経突起伸長作用をもたないこと、NGCの突起伸長促進活性(EC₅₀=1-5μg/ml)はEGF様増殖促進活性(0.1~10ng/ml)に比べ高濃度を必要とすること、また胎生16日頃の大脳皮質神経細胞にはErbB3の発現は見られないことから、NGCはErbB3とは別の受容体に結合して神経突起を伸長させると考えられる。

NGCは膜結合型PGである。それでは、NGCは生体内で、どのように神経突起伸長に関わっているのだろうか?多くの膜貫通型タンパク質、たとえばEGFファミリー分子や、tumor necrosis factor α(TNFα)などのサイトカイン、アルツハイマー病関連タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質などでは、プロテアーゼによる細胞外領域の切り出し(ectodomain shedding)が起きる。最近Rathjenらは、神経細胞の興奮に連動してCALEBの細胞外領域の一部が切り出されることを報告している⁹⁾。私達も切り出されたNGCの細胞外領域がラット脳組織および神経細胞の培養液に存在することを確認している。樹状突起上に局在するNGCの細胞外領域が、何らかの刺激を受けて切り出され、近傍に近づいて来た軸索先端に作用して軸索を樹状突起へ引き寄せている可能性が考えられる。つまりNGCは、シナプス予定領域近傍で軸索先端(シナプス前部になる)と樹状突起棘(シナプス後部になる)とを接続させ、シナプスの初期形成に寄与しているのかもしれない。

最近、RathjenらはCALEB欠損マウスにおいて幼若期のシナプス発達に異常があることを報告している⁹⁾。私達が作製したNGC欠損マウスでは水迷路実験などで行動異常が認められた。これらの知見は、NGC/CALEBがシナプス形成に関与しているという考えを支持するものである。NGCが、実際にシナプス部で、どのような役割をしているのかを詳細に明らかにしていくことは今後の重要な課題である。

4. NGCに結合するタンパク質

NGCの生理機能を明らかにするためには、NGCと相互作用するタンパク質の探索が必須である。これまでにNGCには、細胞外領域にテネイシン⁶⁾が、細胞内ドメインにPIST(PDZ domain protein interacting specifically with TC10)¹⁰⁾が結合することが報告されている。

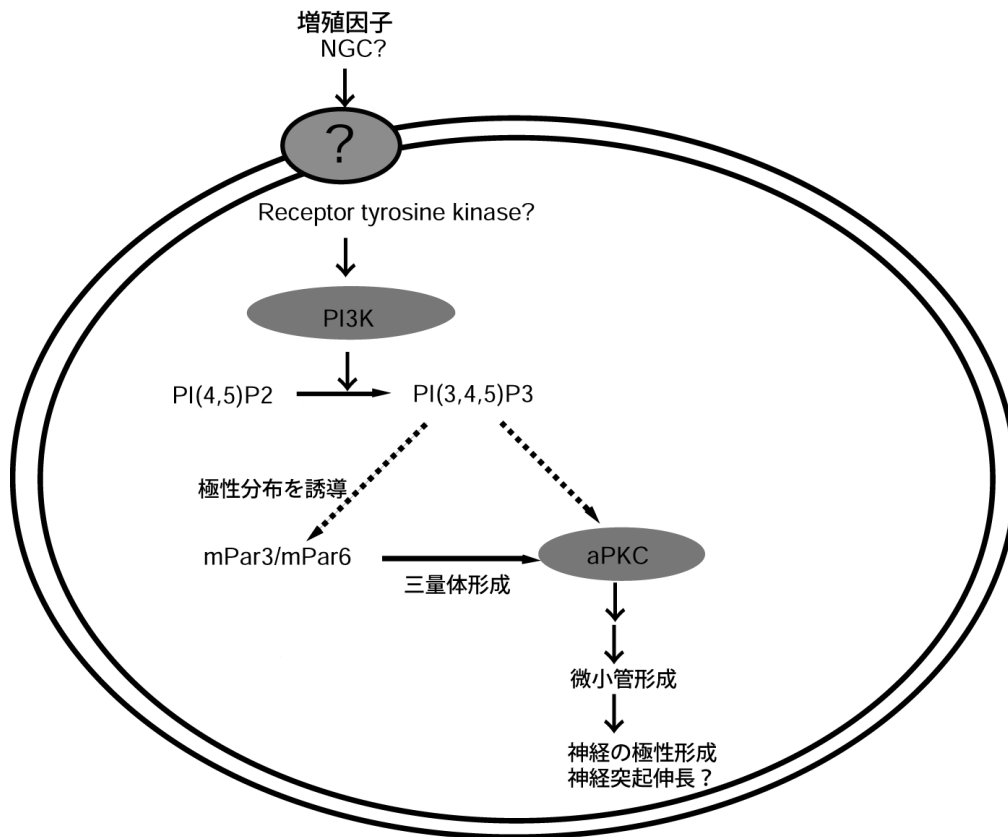


図2 NGCの神経突起伸長の情報伝達予想図

増殖因子などの情報は受容体を介して、PI3Kを活性化し、mPar3/mPar6とatypical PKCとの複合体を形成し、神経の極性形成に関与すると考えられている。NGCの神経突起伸長も同様な機構を介しているものと思われる。

テネイシンは、種々の組織・器官の細胞外マトリクスに存在する糖タンパク質であり、神経系ではテネイシン-Cおよび-Rが存在する。テネイシン-Rは、ランビエ絞輪周囲に存在し、軸索の神経伝達速度を制御している¹¹⁾。また、テネイシン欠損マウスでは、記憶に関わる現象とされる海馬のLTP(長期増強)に異常があり、テネイシンはシナプスの可塑性にも関与していると考えられる¹²⁾。CALEB/NGCのAAAドメインは、テネイシン-Cや-Rのフィブリノーゲン様ドメインと結合することがわかっており¹³⁾、NGCはテネイシンと共役して脳機能の発現や維持に関わっているのかもしれない。

PISTは、低分子量GTPaseであるTC10に結合するPDZドメインタンパク質としてクローニングされた分子である。PISTはGolgi関連タンパク質としてシタキシン-6やフリズドタンパク質などと結合し、これら膜タンパク質のゴルジ体から細胞膜への輸送に関与している。NGC

とPISTとの結合には、NGCの細胞内側膜直下のペプチド部分が必要であり¹⁰⁾、PISTはNGCの細胞膜への輸送にも関与していることが推察される。

最近、NGCはミッドカインと結合することが報告された¹⁴⁾。ミッドカインは、プレイオトロフィンと相同性をもつヘパリン結合性成長因子であり、胎生中期の脳に強く発現している。そして神経突起伸長や細胞移動、アポトーシスの抑制、腫瘍細胞の増殖、マクロファージなどの炎症細胞の移動などに関連する分子として知られている。Ichihara-Tanakaらは、CG4細胞というオリゴデンドロサイト前駆細胞様株化細胞を用いて、NGCがAAAドメインを介してミッドカインと結合し、その受容体として働き、CG4細胞の突起伸長を調節していることを報告している¹⁴⁾。

また、これまでの私達の実験から、NGCの一部は常に二量体として検出されることから、NGC同士が結合する

可能性もある。

5. NGCの細胞内情報伝達機構

NGCの下流で働く情報伝達機構については、まだほとんど知られていない。NGCectによる培養大脳皮質神経細胞の突起伸長促進作用は、Cキナーゼ (PKC) 阻害剤であるスタウロスポリンやビスインドリルマレイミド I (Bis I) およびホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) 阻害剤である LY294002 存在下では観察されなかった⁷⁾。PKCは conventional, novel, atypical の三つのグループに分けられるが、この突起伸長阻害には 10 μ M と高濃度の Bis I が必要であった。以上の結果から、NGCectによる突起伸長促進作用は atypical PKC (aPKC) および PI3K を介したものであると推察される。神経細胞の極性形成は、PI3K が活性化された後 mPar3/mPar6 という細胞極性を司るタンパク質が aPKC と複合体を作ることにより制御されると考えられている。NGCの突起伸長も、この神経細胞の極性形成と同様な細胞内情報伝達系を用いているのかもしれない (図2)。NGCと結合するタンパク質の同定、およびその詳細な細胞内シグナル伝達経路の解析は、NGCの機能を知る上でもう一つの重要な課題である。

6. おわりに

本稿では、NGCの神経系における機能について焦点をあてて、概説した。NGCは将来シナプス後部になると考えられる樹状突起上の棘 (protrusion 又は spine) に発現が濃縮されていることから、中枢神経系において重要な役割を担っている CSPG であることが推察される。知的障害のある患児の脳では樹状突起棘の形態に異常が認められるが、このことは、シナプスの発達の異常が、知的障害や発達障害などの中枢神経疾患に関連していることを強く示唆する。樹状突起棘に局在する NGC の異常が知的障害などを引き起している可能性は高い。また、薬物常用モデルラットの脳では、NGC の mRNA やタンパク質の発現が上昇することが報告されており¹⁵⁾、NGC は薬物乱用に伴う高次精神機能障害にも関連していることが推察される。今後、これらの疑問を解くために、NGC 遺伝子改変マウスの解析など、さらなる NGC の研究の展開が期待される。

謝辞

今回紹介した研究は、愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部の共同研究者の方々とともに行ったものです。改めてここに感謝の意を表します。

- 1) Bandtlow, C.E. & Zimmermann, D.R. (2000) *Physiol. Rev.*, 80, 1267-1290.
- 2) Oohira, A. (2007) in *Comprehensive Glycoscience* (Kamerling, J.P. ed.), Vol. 3, in press, Elsevier, Oxford.
- 3) Watanabe, E., Maeda, N., Matsui, F., Kushima, Y., Noda, M., & Oohira, A. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 26876-26882.
- 4) Aono, S., Tokita, Y., Yasuda, Y., Shuo, T., Yamauchi, S., Matsui, F., Nakanishi, K., Hirano, K., Sano, M., & Oohira, A. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 46536-46541.
- 5) Aono, S., Tokita, Y., Yasuda, Y., Hirano, K., Yamauchi, S., Shuo, T., Matsui, F., Keino, H., Kashiwai, A., Kawamura, N., Shimada, A., Kishikawa, M., Asai, M., & Oohira, A. (2006) *J. Neurosci. Res.*, 83, 110-118.
- 6) Schumacher, S., Volkmer, H., Buck, F., Otto, A., Tarnok, A., Roth, S., & Rathjen, F.G. (1997) *J. Cell Biol.*, 136, 895-906.
- 7) Nakanishi, K., Aono, S., Hirano, K., Kuroda, Y., Ida, M., Tokita, Y., Matsui, F., & Oohira, A. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 24970-24978.
- 8) Kinugasa, Y., Ishiguro, H., Tokita, Y., Oohira, A., Ohmoto, H., & Higashiyama, S. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 321, 1045-1049.
- 9) Jüttner, R., Moré, M.I., Das, D., Babich, A., Meier, J., Henning, M., Erdmann, B., Müller, E.-C., Otto, A., Grantyn, R., & Rathjen, F.G. (2005) *Neuron*, 46, 233-245.
- 10) Hassel, B., Schreff, M., Stübe, E.-M., Blaich, U., & Schumacher, S. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 40136-40143.
- 11) Weber, P., Bartsch, U., Rasband, M.N., Czaniera, R., Lang, Y., Bluethmann, H., Margolis, R.U., Levinson, S.R., Shrager, P., Montag, D., & Schachner, M. (1999) *J. Neurosci.*, 19, 4245-4262.
- 12) Saghatelyan, A.K., Dityatev, A., Schmidt, S., Schuster, T., Bartsch, U., & Schachner, M. (2001) *Mol. Cell Neurosci.*, 17, 226-240.
- 13) Schumacher, S., Jung, M., Norenberg, U., Dorner, A., Chiquet-Ehrismann, R., Stuermer, C.A.O., & Rathjen, F.G. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 7337-7345.
- 14) Ichihara-Tanaka, K., Oohira, A., Rumsby, M., & Muramatsu, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, 278, 40136-40143.
- 15) Toda, S., McGinty, J.F., & Kalivas, P.W. (2002) *J. Neurochem.*, 82, 1290-1299.

中西 圭子, 大平 敦彦

(愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・
周生期学部)

The function of neuroglycan C (NGC), a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan
Keiko Nakanishi and Atsuhiko Oohira (Department of Perinatology, Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center, Kasugai, Aichi, 480-0392, Japan)