

総 説

糖鎖シグナルによる神経細胞分化と成熟

東 秀好

Glyco-signals promoting neuronal differentiation and maturation

Hideyoshi HIGASHI

(Received November 21, 2007)

外界の情報を認識しそれに対処した行動をするために、我々の脳には、可塑性が備わる。これは神経ネットワークがつなぎ替えられることである。脳には多くの糖鎖が発現しており、神経細胞の分化や成熟、機能の維持に必須である。これらの糖鎖は神経突起の伸展を促進したり阻害する作用を有することから、神経の可塑性にもかかわっていると考えられる。糖鎖は細胞の表面に発現されて細胞間認識の目印となるほか、細胞間マトリクスの構成成分として細胞の機能を調節する。糖鎖は、その構造によって細胞へ情報を伝えたり、細胞からの情報を受けとる働きを行う。ここでは、こうした糖鎖による情報

伝達について、我々の見いだした糖鎖受容体を介する例を中心に論じる。

はじめに

外界の情報を認識しそれに対処した行動をするために、我々の脳には、可塑性が備わっている。経験によってニューロンネットワークをつなぎ替える必要があることから、その形態は日々刻々と変化している。翌朝別人になっていないのは、変化しない部分もあるからだ。例えば、言語学習能にかかわる領域や視覚野においては、こうしたつなぎ替えが生後のある一定期間、ヒトでは思春期の頃までしか行えない。そのため、

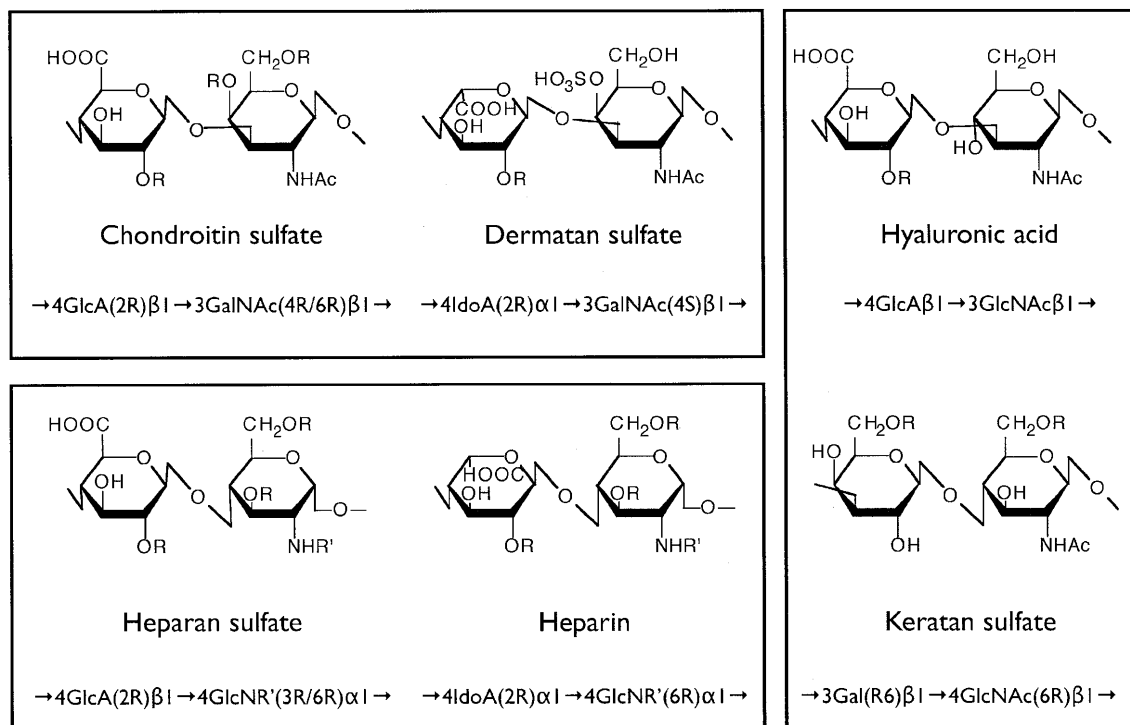


Fig. 1. Two sugar repeating units of glycosaminoglycan chains. R=H or SO₃H. R'=SO₃H or Ac.

思春期を過ぎた後に新たな言語を習得することが困難なのである。この期間を臨界期といい、視覚野について特に詳細に研究されている。¹⁾ 臨界期中に片目からの情報が入らなかった場合は、その目からの神経とシナプスを形成する視覚野の神経細胞が減少し、正常な目からの神経支配が優位になる。臨界期の後に閉じた目を開いても、もうその目からの神経とシナプスを形成する視覚野の神経細胞は増加することはない。ところが、動物を生後ずっと暗黒の環境に置いた場合は、両目からの情報が入らないわけだが、臨界期が延長するのである。この時の視覚野を調べるとコンドロイチン硫酸 (CS) というプロテオグリカン (Fig. 1) の集積が少ない。つまり、臨界期の終焉とともに視覚野に CS の集積が起きていたのである。²⁾ そこで、臨界期を終えた視覚野にコンドロイチナーゼ ABC を投与して CS を分解すると、可塑性を再現できる。このことは、CS にはシナプスのつなぎ替えを抑制する働きがあることを示している。このように、CS には、神経突起の伸展を阻害する作用を有するという報告が多い。³⁻⁸⁾ 神経突起のうち軸索は、コンドロイチン硫酸の濃度の高いところを避けて伸びるので、軸索の伸長の経路を規定していると考えられている。一方で、後述するが、CS のあるものは、培養直後の初代培養海馬神経細胞に対して軸索の伸展作用を有する。別のプロ

テオグリカンであるヘパラン硫酸 (HS) は、繊維芽細胞成長因子 (FGF) とその受容体タンパク質との結合に介在することで FGF の作用を細胞に伝える⁹⁾ が、FGF の作用は神経軸索の走行にも重要で、HS の合成ができない動物では、発生の段階から正しい神経回路の形成ができない。¹⁰⁾ CS も、その合成酵素をノックアウトした動物では細胞分裂がうまくいかずに発生の初期で止まってしまうことが、線虫を用いた実験で示されている。¹¹⁾ CS は、胎児の発達に伴い、脳の特定の部域に特定の分子種が局在する。¹²⁻¹⁵⁾ 脳には、プロテオグリカンの他にガングリオシドという酸性の糖脂質が多量に存在している (Fig. 2)。ガングリオシドも、脳の発生時期に応じて特定の分子種が特定の部域に発現される。^{16, 17)} ガングリオシドは、ほ乳類の生後の脳神経系の形態機能維持に必須であり、これを欠く個体は生後間もなく死ぬ。¹⁸⁾ 我々は、シナプス形成部や樹状突起伸展部に局在するガングリオシドに着目して、その機能を検索し、さらに、CS の機能と比較した。

シナプス形成部に局在するガングリオシド GD1b と GT1b

我々は、ガングリオシド GD1b と GT1b の糖鎖が数日間培養後の海馬の初代培養神経細胞や小脳の初代培養プルキンエ細胞に対して樹状突起の伸

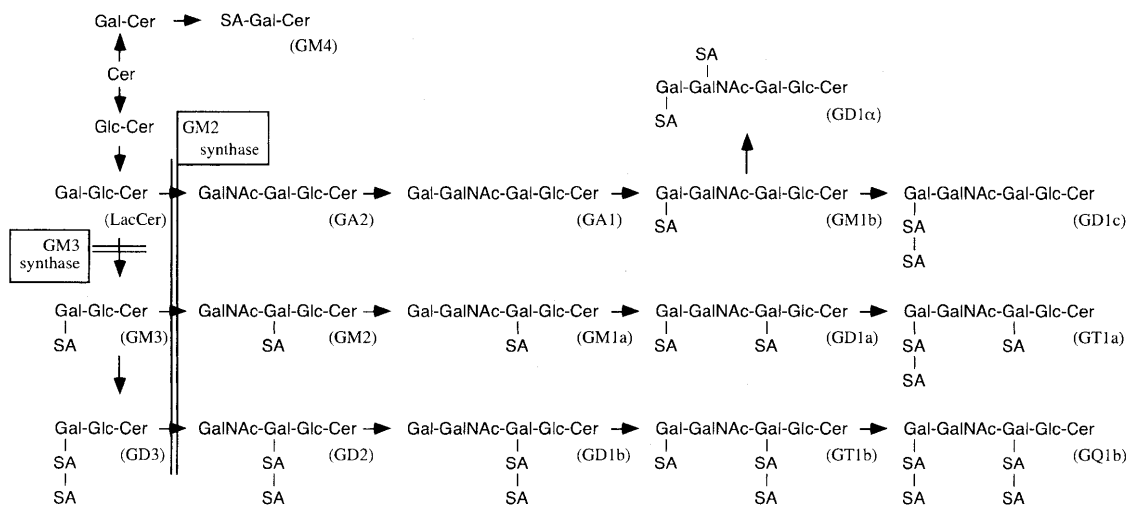


Fig. 2. Biosynthesis path of gangliosides. Double knockout mice deficient of both GM3 and GM2 synthase are unable to produce gangliosides.

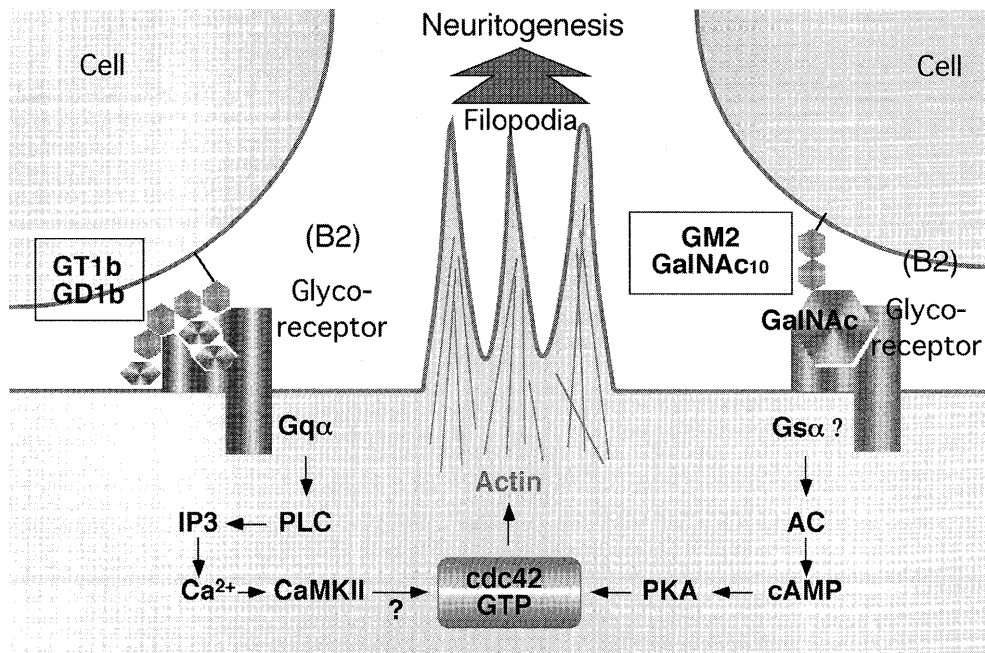


Fig. 3. Two glyco-signal pathways via cell surface glyco-receptor promoting neuritogenesis.

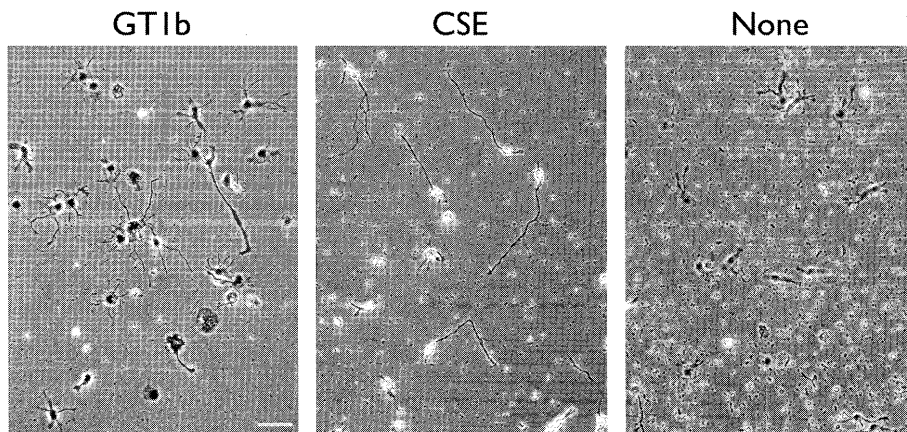


Fig. 4. Differentiation of primary cultured hippocampal neurons on glycan-containing substrate. Scale bar, 50 μ m.

展作用を有し、これがカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II) と cdc42 の活性化によることを示した (Fig. 3 左側).^{19,20)} ガングリオシド糖鎖に触れた細胞では速やかに細胞内ストアからの Ca²⁺ 放出, CaMK II 活性化が起こることから, G-タンパク質共役受容体 (GPCR) の関与が考えられた. cdc42 活性化を引き起こすことが知られている GPCR リガンドはブラジキニンのみであることから, ブラジキニン B2 のアンタゴニストを用いたところ, 一連の反応を阻害したので, B2 がガングリオシド糖鎖の受容体として機能していることが示唆された (投稿中).

ガングリオシドと CS の神経細胞分化促進作用の比較

前述したように, CS のあるものには初代培養海馬神経細胞に神経突起の伸展を促進する作用がある.²¹⁻²⁵⁾ この実験は, 表面に糖鎖をコートした培養器で 24 時間初代培養することによって行われている. そこで我々は, CS とガングリオシドの糖鎖による神経細胞に対する突起伸展作用を比較するため, それぞれの糖鎖をコートした培養器で, 海馬神経細胞を初代培養して比較した (Fig. 4). その結果, 両ガングリオシドは軸索, 樹状突起ともに伸展を促進したのに対し,

コンドロイチン硫酸 E (CSE) は、軸索伸長のみを促進し樹状突起の伸展は逆に抑制した (Fig. 5). B2 アンタゴニストは GD1b による突起伸長を阻害し、CSE による樹状突起伸展抑制を阻害したので、神経突起伸展反応の少なくとも一部は B2 受容体を介した糖鎖シグナルによって制御されていることが明らかになった (投稿中).

B2 受容体の糖鎖受容体としての証明

B2 受容体とこれら糖鎖の直接の機能的な結合を確認するために、B2 受容体を発現した酵母レポーターアッセイ系を用いた。ほ乳類は 300 種類以上にも及ぶ GPCR を発現し、GPCR のあるものは、ヘテロダイマーを形成して受容体として機能する。²⁶⁻³¹ ほ乳類細胞ではどの GPCR が発現し、どの G-タンパク質と共役しているのか

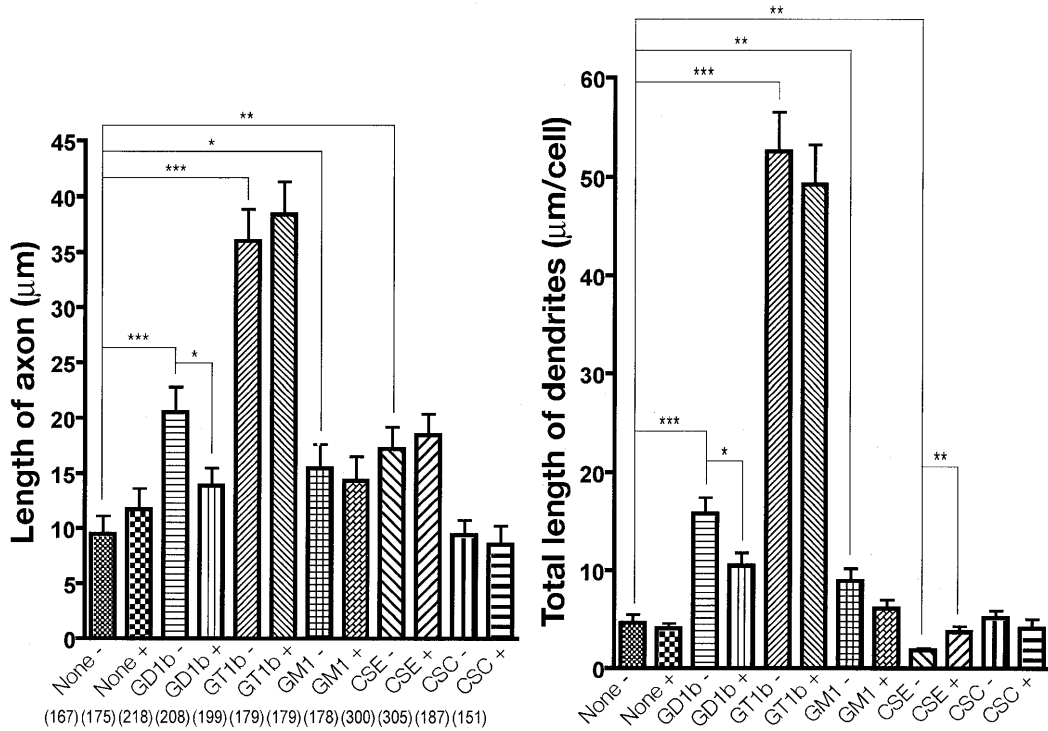


Fig. 5. Neurite outgrowth on glycan-containing culture substrates and effects of B2 antagonist, 10 nM Hoe140. Statistical significance of neurite length on different substrates and effects of B2 antagonist was compared using a t-test. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$. +, With; and -, without Hoe140.

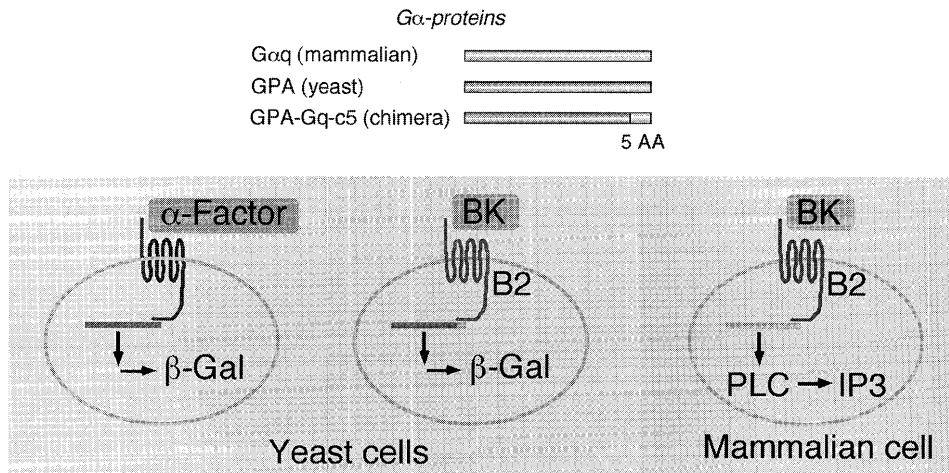


Fig. 6. Mammalian G-protein coupled receptor assay in yeast.

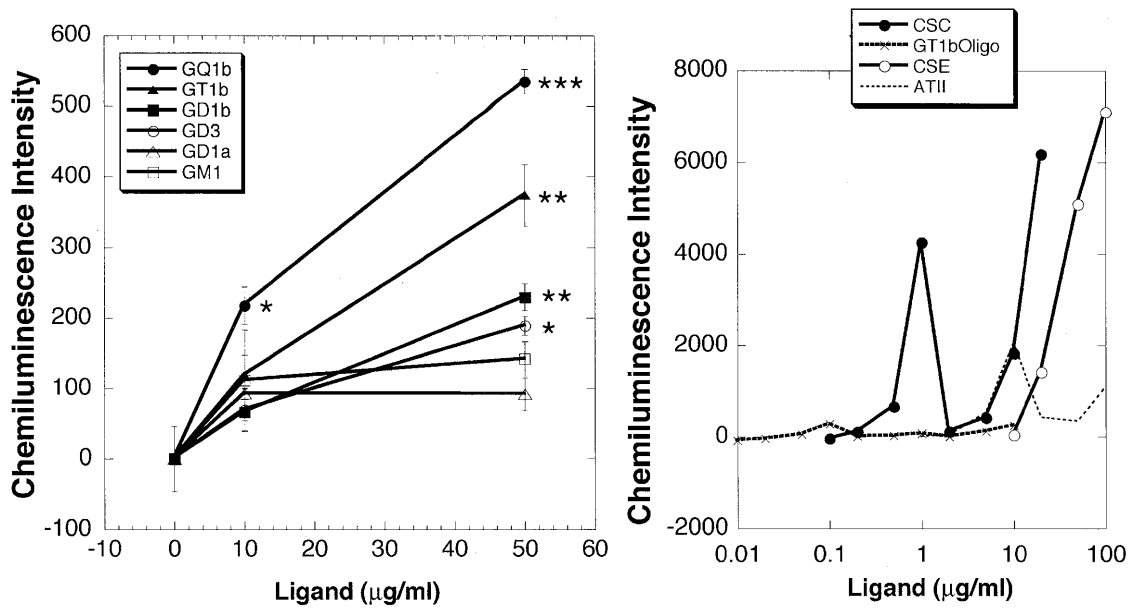


Fig. 7. Recognition of glycans by B2 bradykinin receptor in yeast receptor assay. Error bar, standard error of three samples. Significant differences of the reactivity to those at zero ligand by t-test are shown as **, $p < 0.001$, *, $p < 0.01$.

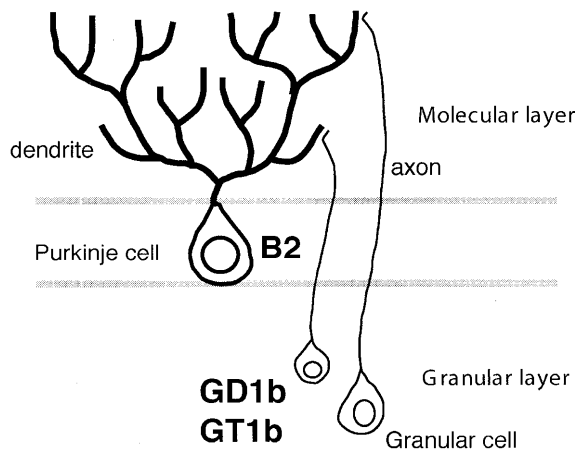


Fig. 8. Synapse formation and ganglioside distribution in cerebellum.

不明なものが多い。一方、酵母では2種類のGPCRが発現しているだけで、その情報伝達系の詳細が明らかになっている。今回用いた酵母レポーターアッセイ系においては、酵母のフェロモン (α ファクター) の受容体とは乳類のB2受容体を入れ替え、B2へのシグナルを酵母のフェロモン情報伝達系につなげた。そのために、酵母のG α タンパク質 (GPA) のC-末の5アミノ酸残基をほ乳類のG α -タンパク質のそれと入れ替えたキメラG α -タンパク質を発現させた

(Fig. 6).³²⁾ このレポーターアッセイによって、GT1b, GD1b, および、CSEは、確かにB2受容体と機能的に直接結合することを証明した (Fig. 7, 投稿中)。

B2受容体は脳の神経細胞に普遍的に分布し、³³⁾ ガングリオシドGT1bやGD1bはシナプス形成部に局在する³⁴⁾ ことから、B2を介した糖鎖シグナルがシナプスのつなぎ替えに関与していると考えられる。我々の得た知見により、小脳におけるガングリオシド糖鎖とB2受容体の発現の機能的な意味を説明できる (Fig. 8)。プルキンエ細胞は、小脳の他の神経細胞よりも多くB2受容体を発現しているが、GD1bやGT1bを発現しない。他方、プルキンエ細胞の樹状突起と分子層でシナプスを作る顆粒細胞はGD1bやGT1bに富んでいる。ガングリオシドは軸索輸送により分子層に運ばれるので、B2受容体と出会い、糖鎖情報をプルキンエ細胞に伝えるのであろう。

樹状突起伸展部位に局在するGM2ガングリオシド

GM2ガングリオシドーシスであるTay-Sachs病やC型ニーマンピック病では、GM2が蓄積している部位で、病的な樹状突起の伸展が観察さ

れる。³⁵⁾ また、特に胎児期で顕著であるが、正常な脳においても GM2 が局所的に発現される部位において樹状突起の伸展が盛んである。³⁶⁾ この現象を説明する機構として、我々は、培養神経細胞に対して GM2 の糖鎖部分が先述の GD1b, GT1b と同様な cdc42 を介した樹状突起伸展作用を示すことを見いだした (Fig. 3 右側)。^{20,37)} GD1b, GT1b と異なり、GM2 糖鎖はアデニル酸環化酵素を活性化し、cAMP を産生、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) を活性化し、cdc42 を活性化する。GM2 は、非還元末端に N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を露出しているため、GalNAc を非還元末端に持つ糖鎖の活性を調べたところ、GalNAc が (α 1-4) でつながったオリゴ糖にも同等の活性があることが分かった。これらの糖鎖も B2 を受容体として示唆するデータを得ている (未発表)。

ブラジキニン B2 受容体のリガンドの多様性と機能

B2 受容体のブラジキニン以外のペプチドリガンドが最近発見された。内在性オピオイドのダイノルフィン A³⁸⁾ である。これは、B2 および B1 受容体に脊髄で作用して痛みを持続させる働きがある。一方のブラジキニンは、組織の損傷部位でプロテアーゼ (カリクレインなど) による前駆体の分解により産生されるが、これが神

経伝達分子になるという証拠は何も無い。血圧降下作用、平滑筋収縮作用、膜透過性亢進作用が知られるように、神経組織の損傷時以外には、神経機能には無関係ではないだろうか。神経系においては、糖鎖やダイノルフィン A が B2 受容体のリガンドとして機能していると考えた方がよいのであろう。さらに最近、リガンドの関与無しで B2 受容体が圧力のセンサーとして機能していることが示されている。³⁹⁾ 血圧や脳圧のセンサーとなっているのかも知れない。B2 受容体のノックアウトマウスは、正常に生まれて成熟し生殖能もある、⁴⁰⁾ 主な障害としてはナトリウム依存性の高血圧、⁴¹⁾ 短い寿命、ミトコンドリア機能の異常、精巣ライディッヒ細胞の形態異常、骨密度減少が報告されている。⁴²⁾ このマウスにおいて、脳神経系の異常は報告されていないが、上述のように B2 受容体が神経細胞に選択的に発現している³³⁾ ことから、神経系に対する影響を詳細に調べる必要があるであろう。

神経系分化に対する糖鎖の役割

糖鎖は細胞の「顔」として、細胞間の認識に関与する。糖鎖の認識機構には、いくつかの形態がある。まず、最も原始的な形態かも知れないが、糖鎖-糖鎖間の相互認識である。これは、箱守仙一郎先生がガングリオシド糖鎖間の相互認識として最初に見いだされた⁴³⁾ のであるが、

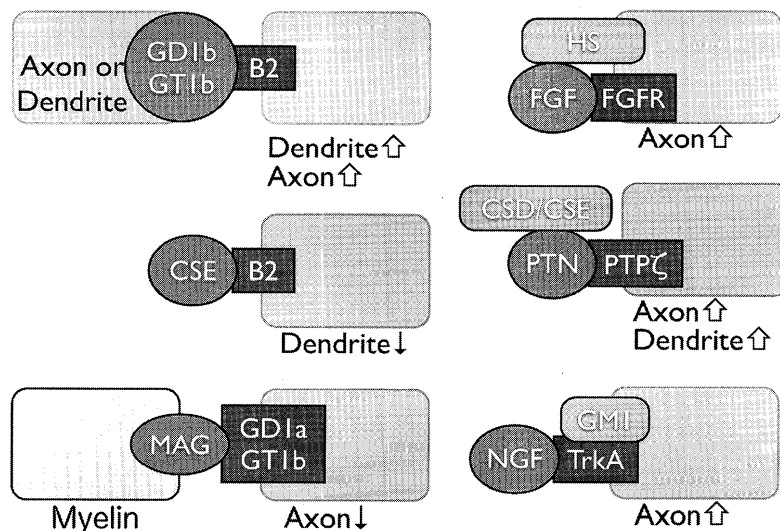


Fig. 9. Glycan-mediated modulation of neurite outgrowth. *Trans* and *cis* effects.

海綿の細胞間の相互認識にも使われている。⁴⁴⁾ 受容体タンパク質が関与する形態は、大きく二つに分類できる (Fig. 9)。一つは、同じ細胞膜上の別のリガンドの受容体タンパク質に作用してその受容体活性を調節する cis 作用である (Fig. 9 右側)。ヘパラン硫酸が FGF 受容体と FGF の結合に関与する例⁹⁾ や、コンドロイチン硫酸 D や E が神経突起伸長促進活性を媒介するプレイオトロフィンとその受容体 PTP と (脳特異的に発現する受容体型蛋白質チロシンホスファターゼ) の結合に関与する例,^{45,46)} GM1 ガングリオシドが NGF 受容体である TrkA の機能発現に寄与するという例⁴⁷⁾ がある。もう一つは、別の細胞膜上の受容体により糖鎖が認識される trans 作用 (Fig. 9 左側) で、上述したガングリオシドや CS 糖鎖が B2 受容体に認識される例, GD1a, GT1b ガングリオシドがミエリン関連糖タンパク質 (MAG) に認識される例⁴⁸⁾ がある。後者は、軸索の再生を阻害する機構として知られているが、MAG のリガンドは Nogo-66 というタンパク質でありガングリオシドは無関係であるという異論もある。⁴⁹⁾ 糖鎖の神経突起伸展阻害作用は、情報の混信や余分なシナプス形成を防ぎ、基本的な神経機能を維持する上で重要な意味を持つ。一方で、突起伸展促進作用は、新たなシナプスの形成を促し可塑性を与え、「頭を柔らかくする」という意味を持つのに加え、損傷した神経の修復や再生を目指した創薬の対象としても有望である。

REFERENCES

- 1) Hensch, T.K., *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 877-888 (2005).
- 2) Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J.W. & Maffei, L., *Science*, **298**, 1248-1251 (2002).
- 3) Snow, D.M., Lemmon, V., Carrino, D.A., Caplan, A.I. & Silver, J., *Exp. Neurol.*, **109**, 111-130 (1990).
- 4) Snow, D.M., Steindler, D.A. & Silver, J., *Dev. Biol.*, **138**, 359-376 (1990).
- 5) Oohira, A., Matsui, F. & Katoh-Semba, R., *J. Neurosci.*, **11**, 822-827 (1991).
- 6) Snow, D.M., Watanabe, M., Letourneau, P.C. & Silver, J., *Development*, **113**, 1473-1485 (1991).
- 7) Brittis, P.A., Canning, D.R. & Silver, J., *Science*, **255**, 733-736 (1992).
- 8) Katoh-Semba, R., Matsuda, M., Kato, K. & Oohira, A., *Eur. J. Neurosci.*, **7**, 613-621 (1995).
- 9) Ishihara, M., *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **5**, 343-345 (1993).
- 10) Inatani, M., Irie, F., Plump, A.S., Tessier-Lavigne, M. & Yamaguchi, Y., *Science*, **302**, 1044-1046 (2003).
- 11) Mizuguchi, S., Uyama, T., Kitagawa, H., Nomura, K.H., Dejima, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Sugahara, K. & Nomura, K., *Nature*, **423**, 443-448 (2003).
- 12) Saigo, K. & Egami, F., *J. Neurochem.*, **17**, 633-647 (1970).
- 13) Oohira, A., Matsui, F., Matsuda, M., Takida, Y. & Kuboki, Y., *J. Biol. Chem.*, **263**, 10240-10246 (1988).
- 14) Gowda, D.C., Margolis, R.U. & Margolis, R.K., *Biochemistry*, **28**, 4468-4474 (1989).
- 15) Herndon, M.E. & Lander, A.D., *Neuron*, **4**, 949-961 (1990).
- 16) 安藤 進, 脳機能とガングリオシド—新たに登場したニューロンの活性物質, 共立出版, 東京, 1997.
- 17) Kotani, M., Terashima, T. & Tai, T., *Brain Res.*, **700**, 40-58 (1995).
- 18) Yamashita, T., Wu, Y.P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J.M., Dupree, J.L., Geyer, R., Sandhoff, K. & Proia, R.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2725-2730 (2005).
- 19) Chen, N., Furuya, S., Doi, H., Hashimoto, Y., Kudo, Y. & Higashi, H., *Neuroscience*, **120**, 163-176 (2003).
- 20) Higashi, H. & Chen, N.H., *Glycoconj. J.*, **20**, 49-58 (2004).
- 21) Clement, A.M., Nadanaka, S., Masayama, K., Mandl, C., Sugahara, K. & Faissner, A., *J. Biol. Chem.*, **273**, 28444-28453 (1998).
- 22) Nadanaka, S., Clement, A., Masayama, K.,

- Faissner, A. & Sugahara, K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 3296-3307 (1998).
- 23) Clement, A.M., Sugahara, K. & Faissner, A., *Neurosci. Lett.*, **269**, 125-128 (1999).
- 24) Hikino, M., Mikami, T., Faissner, A., Vilela-Silva, A.C., Pavao, M.S. & Sugahara, K., *J. Biol. Chem.*, **278**, 43744-43754 (2003).
- 25) Bao, X., Nishimura, S., Mikami, T., Yamada, S., Itoh, N. & Sugahara, K., *J. Biol. Chem.*, **279**, 9765-9776 (2004).
- 26) Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Yao, W.J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J.A., Morse, K., Laz, T., Smith, K.E., Nagarathnam, D., Noble, S.A., Brancheck, T.A. & Gerald, C., *Nature*, **396**, 674-679 (1998).
- 27) Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A. & Bettler, B., *Nature*, **396**, 683-687 (1998).
- 28) White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M. & Marshall, F.H., *Nature*, **396**, 679-682 (1998).
- 29) Jordan, B.A. & Devi, L.A., *Nature*, **399**, 697-700 (1999).
- 30) Liu, F., Wan, Q., Pristupa, Z.B., Yu, X.M., Wang, Y.T. & Niznik, H.B., *Nature*, **403**, 274-280 (2000).
- 31) AbdAlla, S., Lothar, H. & Qwitterer, U., *Nature*, **407**, 94-98 (2000).
- 32) Brown, A.J., Dyos, S.L., Whiteway, M.S., White, J.H., Watson, M.A., Marzioch, M., Clare, J.J., Cousens, D.J., Paddon, C., Plumpton, C., Romanos, M.A. & Dowell, S.J., *Yeast*, **16**, 11-22 (2000).
- 33) Chen, E.Y., Emerich, D.F., Bartus, R.T. & Kordower, J.H., *J. Comp. Neurol.*, **427**, 1-18 (2000).
- 34) Kotani, M., Kawashima, I., Ozawa, H., Terashima, T. & Tai, T., *Glycobiology*, **3**, 137-146 (1993).
- 35) Siegel, D.A. & Walkley, S.U., *J. Neurochem.*, **62**, 1852-1862 (1994).
- 36) Goodman, L.A. & Walkley, S.U., *Devel. Brain Res.*, **93**, 162-171 (1996).
- 37) Chen, N., Furuya, S., Shinoda, Y., Yumoto, M., Ohtake, A., Sato, K., Doi, H., Hashimoto, Y., Kudo, Y. & Higashi, H., *Neuroscience*, **122**, 985-995 (2003).
- 38) Lai, J., Luo, M.C., Chen, Q., Ma, S., Gardell, L.R., Ossipov, M.H. & Porreca, F., *Nat. Neurosci.*, **9**, 1534-1540 (2006).
- 39) Chachisvilis, M., Zhang, Y.L. & Frangos, J.A., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 15463-15468 (2006).
- 40) Borkowski, J.A., Ransom, R.W., Seabrook, G.R., Trumbauer, M., Chen, H., Hill, R.G., Strader, C.D. & Hess, J.F., *J. Biol. Chem.*, **270**, 13706-13710 (1995).
- 41) Alfie, M.E., Yang, X.P., Hess, F. & Carretero, O.A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**, 625-630 (1996).
- 42) Kakoki, M., Kizer, C.M., Yi, X., Takahashi, N., Kim, H.S., Bagnell, C.R., Edgell, C.J., Maeda, N., Jennette, J.C. & Smithies, O., *J. Clin. Invest.*, **116**, 1302-1309 (2006).
- 43) Kojima, N. & Hakomori, S., *J. Biol. Chem.*, **264**, 20159-20162 (1989).
- 44) Misevic, G.N. & Burger, M.M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 4922-4929 (1993).
- 45) Tanaka, M., Maeda, N., Noda, M. & Marunouchi, T., *J. Neurosci.*, **23**, 2804-2814 (2003).
- 46) Bao, X., Mikami, T., Yamada, S., Faissner, A., Muramatsu, T. & Sugahara, K., *J. Biol. Chem.*, **280**, 9180-9191 (2005).
- 47) Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M. & Fujiki, N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5087-5091 (1995).
- 48) Vyas, A.A., Patel, H.V., Fromholt, S.E., Heffer-Lauc, M., Vyas, K.A., Dang, J., Schachner, M. & Schnaar, R.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8412-8417 (2002).
- 49) Liu, B.P., Fournier, A., GrandPre, T. & Strittmatter, S.M., *Science*, **297**, 1190-1193 (2002).