京都大学	博士（薬学）	氏名	森田　一平
論文題目	神経可塑性における HNK-1 糖鎖機能に関する研究		

（論文内容の要旨）

糖鎖はタンパク質の主要な翻訳後修飾の一つであり、発生、分化、病態形成など様々な生命現象への関与が明らかにされている。糖鎖修飾は、糖転移酵素と呼ばれる一群の酵素により行われ、現在までに数多くの糖転移酵素について遺伝子欠損マウスやトランスジェニックマウスの作製、解析がなされている。その結果、いくつかのマウスの表現型として様々な神経機能異常が報告され、神経系における糖鎖の重要性が示されてきた。しかしながら、糖鎖が神経機能を調節する分子機構については不明な点が多い。申請者は、シナプス可塑性や空間記憶に重要な役割を果たす HNK-1 (human natural killer-1) 糖鎖に着目し、糖鎖による神経機能調節機構の解明を目的として研究を行った。以下に得られた知見について記す。

第一章　樹状突起スパイン形成における HNK-1 糖鎖の役割

HNK-1 糖鎖は、複合型糖鎖の末端に硫酸化グルクロン酸が結合した特徴的な構造（HSO_3-GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAc-）を有する。脳内での本糖鎖合成の律速酵素はグルクロン酸転移酵素（GlcAT-P）であり、その遺伝子欠損マウスでは脳内の HNK-1 糖鎖が消失し、海馬 CA1 領域における長期増強現象と記憶学習機能に異常が観察された。しかしながら、これらの神経機能異常の分子機構については未解明であった。申請者は、長期増強に異常が見られた海馬 CA1 錐体神経細胞に着目し、脂溶性蛍光色素（DiI）を用いて *in vivo* での神経突起の詳細な形態観察を行った。その結果、神経回路網の形成時期である２週齢の GlcAT-P 欠損マウスにおいて樹状突起スパインの成熟異常を見いだした。この異常は、海馬初代培養細胞を用いた *in vitro* での系でも再現され、GlcAT-P 遺伝子の導入により形態異常は完全に回復することを示した。また、免疫蛍光染色により GlcAT-P 欠損神経細胞では、シナプスがスパイン上ではなく樹状突起シャフト上に異所的に形成されることを見いだした。以上の結果は、GlcAT-P 欠損マウスで見られる神経機能異常は、スパイン成熟とシナプス形成の異常により引き起こされる可能性を示唆するものである。

第二章　シナプス後部における新規 HNK-1 キャリア分子 GluR2 の同定

スパインの成熟には、シナプス後肥厚部（PSD）に存在するタンパク質群が主導的な役割を担う。申請者は、細胞分画法と免疫染色法により、HNK-1 糖鎖を高発現するタンパク質の一つが PSD に存在することを見いだした。目的タンパク質の

同定のため、海馬シナプス画分より HNK-1 抗体カラムを用いて HNK-1 キャリア分子を精製し、ペプチド解析を行った。結果、新規 HNK-1 キャリア分子として AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) サブユニットの一つである GluR2 を同定した。GluR2 上に発現する HNK-1 糖鎖は *N* 結合型糖鎖であり、質量分析によりその構造を決定した。また、HNK-1 糖鎖は他のグルタミン酸受容体サブユニット GluR1、NR1、NR2 には存在せず、GluR2 に限られたものであることが示された。以上の結果は、HNK-1 糖鎖が GluR2 の機能を特異的に制御する可能性を示唆するものである。

第三章　HNK-1 糖鎖による GluR2 の機能調節機構

AMPA 受容体は、興奮性シナプス伝達の中心的な役割を担う受容体であり、本受容体の細胞膜での存在量の変化によりシナプス可塑性は調節される。特に、GluR2 は成体海馬においてほとんど全ての AMPA 受容体に含まれるサブユニットであり、受容体の細胞内輸送を制御する。そこで、申請者は HNK-1 糖鎖が GluR2 の細胞内輸送に与える影響を検討した。結果として、GlcAT-P 欠損マウス由来の培養神経細胞において、野生型と比較して細胞内への取り込み量の増加と細胞表面量の減少を確認した。これらは、HNK-1 糖鎖が GluR2 の細胞表面での安定性に重要な役割を持つことを示唆するものである。近年、GluR2 は神経接着分子 N-cadherin と相互作用し、この相互作用は GluR2 の膜上での安定性とスパインの成熟に重要であることが示されている。申請者は、海馬組織および培養細胞において、HNK-1 糖鎖の存在により GluR2 と N-cadherin の相互作用が強められることを示した。以上の結果は、HNK-1 糖鎖が GluR2 と N-cadherin の相互作用の制御を介して、GluR2 の細胞表面での安定性とスパインの成熟を促進することを示すものである。

以上、本研究は中枢神経において HNK-1 糖鎖による翻訳後修飾が神経細胞の形態形成および神経伝達物質受容体の機能を制御することを示すものであり、神経機能を詳細に理解する上で重要な知見を与えるものである。

（続紙　２　）

（論文審査の結果の要旨）

シナプスは脳が機能するための基盤であり、その構造は極めて微細で且つ厳密な制御を受けて構築される。しかしながら、その構造は外界からの刺激により動的に変化しうる可塑性と呼ばれる柔軟性をもち、構造が作り替えられることにより学習記憶などの脳の高次機能が発揮される。これらの知見から、シナプスの可塑性を調節するタンパク質の機能を解明することは重要視され、盛んに研究が行われてきた。一方で、これらのタンパク質に翻訳後修飾として付加する糖鎖の機能については、解析が複雑であることからほとんど解明されていない。本論文は、シナプス形成期に特徴的に発現する HNK-1 糖鎖に着目し、糖鎖によるシナプス可塑性の調節機構に関する研究結果を記したものである。

第一章は、樹状突起スパインの形成における HNK-1 糖鎖の機能を明らかにしたものである。樹状突起スパインは興奮性シナプス後部を作る構造体であり、スパインの構造変化がシナプス可塑性や記憶学習と密接に関係している。本研究では、脳内の HNK-1 糖鎖を消失し、シナプス可塑性の異常を示す GlcAT-P 遺伝子欠損（KO）マウスの神経細胞の形態観察を行い、スパインの成熟に遅延を生ずることを見いだした。さらに、スパインの成熟遅延は GlcAT-P 遺伝子の導入により HNK-1 糖鎖を発現させることでほぼ完全に回復することを示した。また、免疫蛍光染色により GlcAT-P KO マウスの神経細胞では、シナプスがスパイン上ではなく樹状突起シャフト上に異所的に形成されることを見いだした。以上の結果は、HNK-1 糖鎖はスパイン成熟とシナプス形成に重要な役割を担い、GlcAT-P KO マウスで見られるシナプス可塑性異常がスパイン成熟やシナプス形成の異常により引き起こされる可能性を示唆するものである。

第二章では、新規の HNK-1 糖鎖キャリア分子として AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットである GluR2 を同定している。本研究では、免疫染色法と細胞分画法を用いてシナプス後部に HNK-1 糖鎖キャリア分子が存在することを見出した。さらに、シナプス画分から目的のタンパク質を精製し、質量分析を用いて新規の HNK-1 糖鎖キャリア分子として GluR2 を同定した。また、HNK-1 糖鎖の発現は GluR2 に特異的であり、他のグルタミン酸受容体サブユニットには発現しないことを示した。以上の結果は、HNK-1 糖鎖は厳密な制御を受けて GluR2 に特異的に発現し、GluR2 の機能を調節する可能性を示唆する知見である。

第三章は、第二章で同定された GluR2 上に発現する HNK-1 糖鎖の機能を明らかにしたものである。GluR2 は AMPA 受容体のシナプス膜での発現量を制御し、シナプスの可塑性を調節するサブユニットである。本研究では、HNK-1 糖鎖の付加により GluR2 が細胞膜上で安定的に発現し、細胞表面量が増加することを示した。その分子機構として、HNK-1 糖鎖は GluR2 と神経接着分子 N-cadherin の相互作用を強め

ることを示した。これらの分子の相互作用は、GluR2 の細胞膜上での安定性とスパインの成熟に重要であることが既に示されており、以上の結果は、HNK-1 糖鎖が GluR2 と N-cadherin の相互作用を制御することによって、GluR2 の細胞膜での安定性とスパインの成熟を調節することを示したものである。

本研究の結果は、GluR2 上に特異的に付加される HNK-1 糖鎖が神経細胞の形態形成および AMPA 受容体の機能を制御することを示す初めての知見であり、GlcAT-P KO マウスで示されたシナプス可塑性異常を説明する上で重要な知見を与えるものである。また、本研究は神経機能を詳細に理解する上で糖鎖修飾を含めた糖タンパク質としての機能を考慮する必要性を示している。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成２２年3月３日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：　平成　　　年　　　月　　　日以降