

京都大学	博士 (人間健康科学)	氏名	森瀬 譲二
論文題目	Structural and biochemical characterization of O-mannose-linked HNK-1 glycan expressed on phosphacan in developing mouse brains (神経回路形成期におけるホスファカンには特徴的な O-マンノース型 HNK-1 糖鎖が発現する)		
(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、その多様な構造が発生、分化、病態形成など様々な生命現象に関与する。中でも HNK-1 糖鎖は特徴的な硫酸化グルクロン酸を糖鎖末端に有し、神経回路形成期に脳で高発現する糖鎖抗原である。本糖鎖合成にはグルクロン酸転移酵素(GlcAT-P)が主に関与しており、その遺伝子欠損マウスでは脳内の大部分の HNK-1 糖鎖が消失し、スパイン形成異常やシナプス可塑性の低下を伴う記憶学習能力の低下が観察された。現在までの研究により一部の神経機能異常はシナプス後部で機能する AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA2 に存在する N型糖鎖上の HNK-1 糖鎖に起因することが明らかとなっている。しかし、HNK-1 糖鎖欠損に伴って観察される表現型には N型 HNK-1 だけでは説明できない点が存在する。タンパク質への糖鎖結合様式は N型と O型に分類されるが、HNK-1 糖鎖の多くは N型上に存在し、GluA2 を含めた様々な N型 HNK-1 キャリア分子の同定、その糖鎖構造および機能解析が成されてきた。その一方で、O型糖鎖上にも HNK-1 糖鎖の存在は知られていたが、その主要なキャリア分子や詳細な糖鎖構造はほとんど解析されていなかった。以上の背景を元に本研究では、HNK-1 糖鎖の関与する脳の高次機構調節機構の全体像を明らかにすることを目的として、O型 HNK-1 の主なキャリア分子の同定および糖鎖構造の解析を行った。 O型 HNK-1 キャリアタンパク質を同定する目的で、神経回路形成期のマウス脳可溶性画分を調製し、N型糖鎖除去後に存在する HNK-1 糖鎖を解析した。その結果、250kDa を越える高分子領域に O型 HNK-1 を有するタンパク質が存在することを見出した。そこで脳可溶性画分より目的分子を精製し、液体クロマトグラフ質量分析(LC/MS)を行ったところ、O型 HNK-1 の主なキャリア分子がホスファカンであることを同定した。ホスファカンはコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの一つであり、ホスファカン上の糖鎖が多様な神経機能に関与することが知られている。次に、O型 HNK-1 の構造解析を液体クロマトグラフ/タンデム質量分析 (LC/MS ⁿ) によって行った。その結果、5種類の HNK-1 糖鎖を含む糖鎖構造が見出され、その全体構造は O-マンノース型糖鎖と良く一致していた。O-マンノース型糖鎖はその合成不全が先天性筋ジストロフィーの発症につながることで知られている重要な糖鎖である。そこで、O型 HNK-1 が O-マンノース型糖鎖上に存在することを確認する目的で、その糖鎖合成に必須の N-アセチルグルコサミン転移酵素 POMGnT1 遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。その結果、POMGnT1 遺伝子欠損マウスでは O型 HNK-1 の発現がホスファカン上から消失することが明らかになった。以上のことから、神経回路形成期において O-マンノース型 HNK-1 が主にホスファカン上に発現することを示された。また、GlcAT-P 遺伝子欠損マウスを用いて解析したところ、ホスファカン上の O-マンノース型 HNK-1			

が消失していた。従って、GlcAT-P 遺伝子欠損マウスで観察される表現型の一部はホスファカン上の O-マンノース型 HNK-1 に起因する可能性が示された。

以上、本研究は O-マンノース型 HNK-1 糖鎖がホスファカン上に発現することを初めて見出し、その構造と生合成酵素を明らかにした。これらの結果は神経回路形成期における HNK-1 糖鎖の関与する脳の高次機構調節機構を理解する上での重要な知見である。

(論文審査の結果の要旨)

HNK-1 糖鎖は神経回路形成期に脳で高発現し、特徴的な 3 糖構造を有する。その生合成律速酵素遺伝子 (GlcAT-P) 欠損マウスでは HNK-1 糖鎖消失に伴う記憶学習能力の低下が観察された。HNK-1 糖鎖の多くは N 結合型糖鎖上に存在し、現在までに様々なキャリア分子の同定、糖鎖構造および機能解析が行われてきた。しかし HNK-1 糖鎖欠損に伴う神経機能異常には N 型 HNK-1 だけでは説明できないことから、O 型 HNK-1 の関与が考えられた。そこで本研究では現在までほとんど解析がされていない O 型 HNK-1 による脳の高次機能調節機構の一端を明らかにするべく、そのキャリア分子の同定と糖鎖構造解析が行われた。その結果、申請者は O 型 HNK-1 の主要なキャリア分子がプロテオグリカンの一つであるホスファカンであることを明らかにした。また、その糖鎖構造を質量分析により推定し、O-マンノース型と呼ばれる特徴的な糖鎖上に存在することを明らかにした。さらに、GlcAT-P 遺伝子欠損マウスではホスファカン上の O-マンノース型 HNK-1 が確かに消失していることから、その表現型が O-マンノース型 HNK-1 に起因する可能性を示した。

以上の研究は O-マンノース型 HNK-1 による脳の高次機構形成メカニズムの理解に貢献し、HNK-1 糖鎖による記憶学習形成の分子機構解析の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (人間健康科学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 1 月 28 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を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： 2014 年 12 月 17 日以降