

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」
研究課題「糖修飾システムによる神経機能の発現・制御」

研究終了報告書

研究期間 平成16年10月～平成22年3月

研究代表者：平林義雄
(独)理化学研究所 脳科学総合研究センター
神経膜機能研究チーム・チームリーダー

§ 1 研究実施の概要

多様な膜糖脂質の機能、特に中枢神経系での生理機能を明らかにするためには、脂質分子のグルコース化の機構を知ることが極めて重要である。セラミドのグルコース化に関わるグルコシルセラミド合成酵素 GlcT-1 の個体レベルでの機能を、マウス、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュを用いて解析した。その結果、1) GlcT-1 によるグスコシルセラミドの産生は、体全体のエネルギー代謝（グルコースとトリグリセリド）のホメオスタシス維持機構に関わっていた。2) GlcT-1 プルキンエ細胞特異的ノックアウトマウスは、ニューロンの細胞体や樹状突起の形態には変化が無く、軸索を取り囲むミエリンの構造（特にパラノーダル領域周辺）に大きな異常が認められた。ニューロンの糖脂質は、軸索・ミエリン間の相互作用に関わり、ミエリンの形態と機能維持に必須であることが示された。3) 伊東グループは、グルコシルセラミド及びグルコシルセラミド合成酵素活性の微量定量法を開発するとともに、ゼブラフィッシュの初期発生の解析系を使うことにより、意外なことに、グルコシルセラミドは外胚葉からの神経細胞ではなく、中胚葉に由来する脊索の形成という胚発生の非常に早い段階で、グルコシルセラミドそのものが直接関与していることを見いだした。グルコシルセラミドはグルコセレブロシダーゼによりグルコースが外された後、セラミダーゼによってスフィンゴシン塩基と脂肪酸に分解代謝される。伊東らは、新しい非リソソーム性グルコセレブロシダーゼとして Klotho-related protein (KLRP) を同定するとともに、その結晶構造を解明した。さらに、脊椎動物の形質膜 II 型糖タンパク質として存在する中性セラミダーゼを見出し、その緑膿菌オルソログの結晶構造解析に成功した。その結果、本酵素は Zn イオンを活性中心に持つ金属酵素であることを世界で初めて示した。

一方、胎児脳組織より全く新しいタイプのグルコース化脂質を発見し、その構造をホスファチジルβグルコシド(PtdGlc)（飽和脂肪酸は 18:0/20:0 のみで構成）と決定した。PtdGlc は胎児期の神経幹細胞、アストログリア系譜の細胞膜表面に発現していた。さらに、成体脳においても神経幹細胞に存在しており、新しい幹細胞表面マーカー分子であった。PtdGlc は、既知のスフィンゴ糖脂質とは独立した脂質ラフトを形成し、神経幹細胞からアストログリア系譜への細胞分化に関わっていた。また、ラジアルグリア細胞より産生されるリゾ体 PtdGlc は、強力な成長円錐反発因子活性を有しており、非タンパク質性成分によるニューロン軸索の移動制御分子の可能性が示唆された。この結果は PtdGlc-脂質ラフトが、神経回路ネットワーク形成や神経再生に重要な役割を演じていることを示唆していた。

ショウジョウバエを使ってグルコシルセラミドとエネルギー代謝制御との関連を研究する過程で、体内中のグルコースと脂質代謝ホメオスタシスに関わる 7 回膜貫通型糖タンパク質の存在を見いだした。ショウジョウバエでは Boss として知られていたが、その欠損変異体は体のサイズが小さく、体液中のグルコース・脂質量が増加していた。また、飢餓ストレスに脆弱であり、飢餓状況下で脂肪体に蓄積する脂質（トリグリセリド）の速やかな消失を伴い、個体死に至ることから、脂質代謝のホメオスタシス維持機構に関わる重要な膜構成分子であることを明らかにした。Boss はスフィンゴ糖脂質-ラフトに存在し、細胞外グルコースに応答する受容体である可能性を提唱した。

脳では複数のシアル酸転移酵素が存在するが、シアル酸による末端糖鎖修飾の生理学的意義は不明な点を多く残している。加藤グループは側頭葉てんかんモデルマウスを用いた実験により、てんかん発作発症過程に連動して脳内成長ホルモンと ST3Gal IV の特異的発現亢進を見いだした。シアル酸転移反応が、てんかん発症に直接関わるのかどうかを検討する目的で ST3Gal IV 欠損マウスを作成した。このノックアウトマウスは、てんかん刺激に対して抵抗性を示し、てんかん発作を獲得しない事がわかった。この結果は、ST3Gal IV によるシアル酸修飾が、てんかん発症に必須であることを示していた。さらに ST3Gal IV 欠損マウスは、気分障害・睡眠障害を伴う生体リズム不全を示し、血中の成長ホルモンと Igf1 の分泌量の減少を伴う成長阻害を示した。これは、成長ホルモンの分泌が、ST3Gal IV の発現量に影響を受けることを示唆すると共に、生体リズム調節に、

ST3Gal IV によるシアル酸修飾が必須である事が示唆された。

以上、主に糖鎖合成の最初と最後のステップに関わる合成・分解酵素を標的とした研究から、脳内での糖鎖合成は、神経ネットワーク形成から高次機能に至る広範囲にわたって重要な役割を演じていることが明らかとなった。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

哺乳動物細胞膜は、一つの細胞あたり 500 以上の異なる脂質分子種で構成されている。この多様な脂質分子集団は無秩序に分布しているのではなく、細胞膜表面に局在するスフィンゴ糖脂質とコレステロールとの安定した会合により、他の脂質領域とは異なったマイクロドメイン（脂質ラフト）を形成していると考えられている（脂質ラフト仮説）。脂質ラフトが生きた細胞の膜表面に本当に存在しているのか否か、存在するとすればその生物機能は何であるのか、大きな関心を集めている。脳での脂質分子機能を解析するにあたり、脂質のグルコース化反応に着目した。脳内グルコースは、生命を維持するための基本的なエネルギー源であるとともに、グリコバイオロジーの原点とも言える最重要物質であるからである。本研究では、特にグルコシルセラミド(GlcCer)と細胞間（ニューロンとグリア細胞）シグナリングに関する研究を中心に展開する。具体的には、GlcCer 合成酵素の組織特異的遺伝子破壊モデル動物を利用した個体レベルでの GlcCer の機能解明、更に、新たに発見された膜糖脂質ホスファチジルグルコシドの化学構造、生合成機構、更に脳の発生、分化における機能解明を中心に展開する。九大・伊東グループは、発生の初期段階で GlcCer がいかなる機能を発揮しているか、ゼブラフィッシュの実験系を用いて解析する。また、GlcCer の分解に関わる新奇中性グルコセレブロシダーゼの単離及び構造と機能の解明を平行して行う。GlcCer はグルコセレブロシダーゼによってグルコースとセラミドに分解された後、セラミダーゼによってスフィンゴシン塩基と脂肪酸に代謝される。CREST 研究に先立ち、形質膜 II 型糖タンパク質である非リソソーム性の中性セラミダーゼを世界に先駆けてクローニングしている (Tani et al. JBC, 2003)。この中性セラミダーゼの結晶構造の解明と触媒機構の解明を目指す。大阪府大・加藤グループは、脳の記憶・学習の基盤となる神経可塑性の機構を解析するために、側頭葉てんかんモデルマウスを作成し、てんかん獲得に至るプロセスでの糖鎖合成の役割を明らかにすることを目標とする。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

本研究を推進する過程で、生体膜脂質ラフトを構成するグルコース関連脂質（特にグルコシルセラミド）が、エネルギー代謝の制御機構に関わっている可能性が急浮上してきた。中枢神経系と脂肪組織に共通して発現している 7 回膜貫通型糖タンパク質（N-型糖鎖）（BOSS/GPRC5B）は、グルコシルセラミド合成遺伝子と同様にショウジョウバエからヒトに至るまで良く保存されている。私達は、哺乳類の肝臓・脂肪細胞に相当するハエの脂肪体で BOSS が発現し、細胞外グルコースに応答する受容体として機能していることを見いだした。Boss の配列と高い相同性を示す遺伝子は、ヒトにおいてはオーファン受容体 GPRC5 として存在している。グルコース応答性受容体 BOSS の役割は、肥満や糖尿病のような疾患の理解に大きく貢献すると考えた。何故なら、エネルギー代謝機構の基本的な仕組みは、進化の過程で良く保存されているからである。GPRC5 のエネルギー代謝における役割を解明するために、そのノックアウトマウスの作成と解析に着手した（平林グループ）。

ゼブラフィッシュを用いた研究を進めていく過程で、ゼブラフィッシュには GM4 (NeuAca2-3Gal β 1-1' Cer) が高発現していることを見出した。GM4 は哺乳類のグリア細胞等に発現していることが知られているが、その合成酵素は未同定であった。そこで、ゼブラ

フィッシュの GM4 合成酵素を単離し、そのオルソログとして哺乳動物の GM4 合成酵素を同定することを試みた(伊東グループ)。

§3 研究実施体制

(○：研究代表者または主たる共同研究者)

(1)「平林」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	平林 義雄	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経膜機能研究チーム	チームリーダー	H16.10～H22.3
	長塚 靖子	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経膜機能研究チーム	研究嘱託	H16.10～H22.3
	堀端 康博	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・平林研究ユニット	研究員	H16.10～H19.3
	大須賀 壮	(独)理化学研究所 研究プライオリティー会議	研究政策 企画員	H16.10～H20.3
	金 然正	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経膜機能研究チーム	研究員	H19.4～H22.3
	東 秀好	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経膜機能研究チーム	客員研究員	H16.10～H22.3
	大嶋恵理子	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経膜機能研究チーム	テクニカル スタッフ I	H16.10～H22.3
	香山 綾子	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経膜機能研究チーム	研究員	H17.2～H22.3
	渡辺 俊	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・平林研究ユニット	CREST 研究員	H17.4～H20.3
	篠田 陽子	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・平林研究ユニット	テクニカル スタッフ I	H16.10～H20.3
	佐野 孝光	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経膜機能研究チーム	CREST 研究員	H18.4～H22.3
	豊田 良子	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経膜機能研究チーム	CREST 事務員	H16.10～H22.3
	浅野 佳美	(独)理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経膜機能研究チーム	CREST 技術員	H20.4～H22.3

② 研究項目

・グルコースおよびグルコース関連糖脂質の神経機能と細胞間シグナリング

(2)「伊東」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	伊東 信	九州大学大学院農学研究院 生物機能科学部門	教授	H16.10～H22.3
	沖野 望	九州大学大学院農学研究院 生物機能科学部門	准教授	H19.4～H22.3
	吉村 征浩	九州大学大学院農学研究院 生物機能科学部門	D3 学術振興会 PD	H17.4～H18.3 H18.4～H19.3
	林 康広	九州大学大学院農学研究院 生物機能科学部門	D2～D3 CREST 研究員	H17.4～H19.3 H19.4～H20.3
	座間 宏太	九州大学大学院農学研究院 生物機能科学部門	D1～D3 CREST 研究員	H17.4～H20.3 H20.4～H21.3
	松永 尚之	九州大学大学院農学研究院 生物機能科学部門	D2	H21.4～H22.3

② 研究項目

・ グルコシルセラミド代謝マシナリーの生物機能の解明

- (1) ゼブラフィッシュ初期発生における GlcCer の生物機能の研究(伊東、吉村、座間)
- (2) 新奇 GlcCer 分解酵素 KLRP の構造と機能の研究(伊東、林、沖野)
- (3) 非リソソーム性中性セラミダーゼの構造と機能の研究(伊東、沖野、吉村)
- (4) GM4 合成酵素に関する研究(伊東、松永)

(3)「加藤」グループ

①研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	加藤 啓子	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	准教授	H16.10～H22.3
	菅野 拓	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	D5	H18.10～H20.12
	大隈 真矢	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	D5	H18.10～H20.12
	山田 茂子	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	D5	H19.4～H20.12
	小林 優里	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	D5	H19.10～H22.3
	鈴木 雅和	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	D5	H19.10～H22.3
	中川 一樹	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	D4	H21.4～H22.3
	長崎 雄太	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	D4	H21.4～H22.3
	寺井登美子	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	研究・事務 補助員	H18.12～H19.10
	北村 靖子	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	研究・事務 補助員	H18.1～H21.2
	平松 要子	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	研究・事務 補助員	H21.4～H22.3
	関野 真司	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	D5	H16.10～H19.3
	宮本 佳苗	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	D5	H16.10～H19.3
	瀧川 政子	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	研究・事務 補助員	H18.1～H19.3
	酒井 玲美	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	D5	H17.4～H19.3
	本池 理恵	大阪府立大学大学院・ 生命環境科学研究科・獣医学専攻	研究・事務 補助員	H18.1～H18.4

②研究項目

- ・モデルマウスによる神経可塑性機構の解明

§ 4 研究実施内容及び成果

3. 1 グルコースおよびグルコース関連糖脂質の神経機能と細胞間シグナリング（理化学研究所脳科学総合研究センター 平林グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

グルコースは、生命を維持するための基本的なエネルギー源であるとともに、グリコバイオロジーの原点とも言える最重要物質である。本研究では、特に脳の発達と機能維持に必須であるグルコースおよびグルコース修飾化脂質と細胞間シグナリングに関する研究を中心に展開する。

I. グルコース化糖脂質の新機能

1) 神経系グルコシルセラミド糖脂質の機能

スフィンゴ糖脂質は、神経系の形成・形態維持・機能、さらに各種神経変成疾患の発症に重要な役割を演じていると考えられているが、その分子メカニズムはほとんど不明である。申請者は、糖修飾酵素のなかで、糖脂質合成の鍵を握るグルコシルセラミド合成酵素であるグルコース転移酵素(GlcT-1)に着目し解析を行ってきた(図1)。GlcT-1 (Ugcg) のノックアウトマウスは、胎生致死であることから、成熟したニューロンでのグルコシルセラミド(GlcCer)関連の糖脂質機能は全く不明であった。

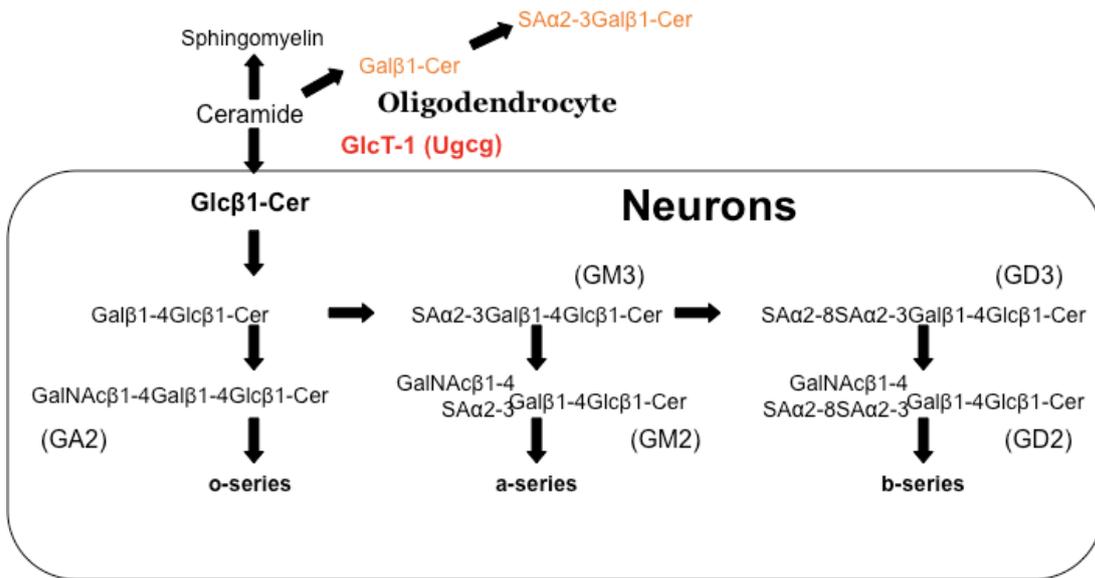


図1. 神経系のスフィンゴ糖脂質合成経路。グルコシルセラミドは、ニューロンに存在する全てのシアル酸含有糖脂質（ガングリオシド）の合成に関わる前駆体糖脂質である。

脳での GlcT-1 タンパクの発現分布をその特異抗体で調べたところ、小脳プルキンエ細胞に強発現していた(図2)。そこで、本プロジェクトにおいて GlcT-1 遺伝子のプルキンエ細胞特異的ノックアウトマウスを作製することにした。L7プロモーターによる組み替え酵素 Cre を発現させたトランスジェニックマウスは、分裂期を終えた成熟プルキンエ細胞(生後2週以降)特異的に発現している。この L7Cre マウスと Ugcg-flox マウスを掛け合わせるにより、プルキンエ細胞特異的に GlcT-1 合成遺伝子を破壊することができた。このマウスの小脳組織を調べたところ、生後1-2ヶ月はプルキンエ細胞には変化が認められなかった。しかし3ヶ月以降、プルキンエ細胞の脱落が認められた。このマウスの小脳組織を電子顕微鏡で詳細に観察したところ、プルキンエ細胞の細胞体・樹状突起は正常の

形態を示したが、軸索に変性を見いだした。又、軸索の周囲を囲むミエリン構造（特にパラノーダル領域周辺）に顕著な異常が認められた。この結果は、成熟した神経細胞のスフィンゴ糖脂質は、ミエリンの形態と機能維持に必須な因子であることが示唆された。

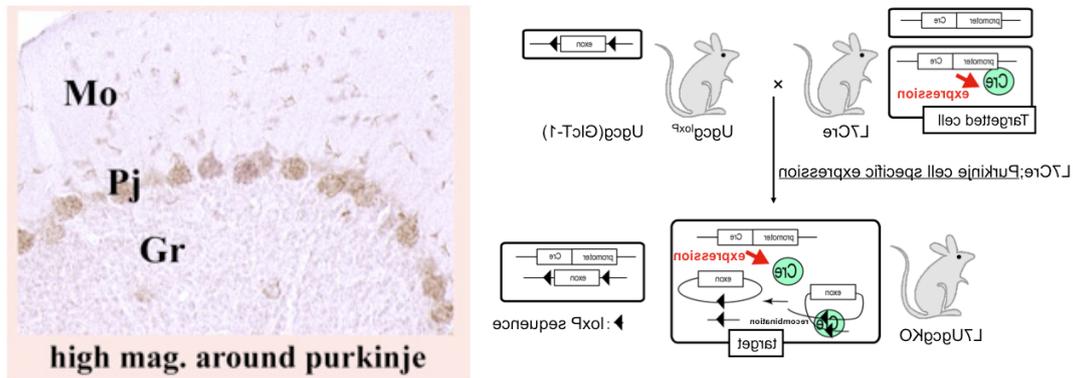


図2. GlcT-1 酵素タンパクに対する抗体による組織染色結果（右図）とプルキンエ細胞特異的ノックアウトマウスの作成スキーム。

2) 新規グルコース化脂質の生理機能と生合成

i) PtdGlc の化学構造

スフィンゴ糖脂質は生体膜の脂質微小領域（ラフト）の主要成分であることから、近年多くの研究者の注目を浴びている。脂質微小領域は、小胞輸送、エンドサイトーシス、生体内シグナル発信の基地として極めて重要な役割を演じている。申請者は、ヒトを含めた哺乳動物細胞には、ホスファチジルグルコシド(PtdGlc)という今まで知られていなかった新しいタイプの糖脂質が存在していることを発見した(長塚ら., PNAS 2003)。HL60 細胞由来

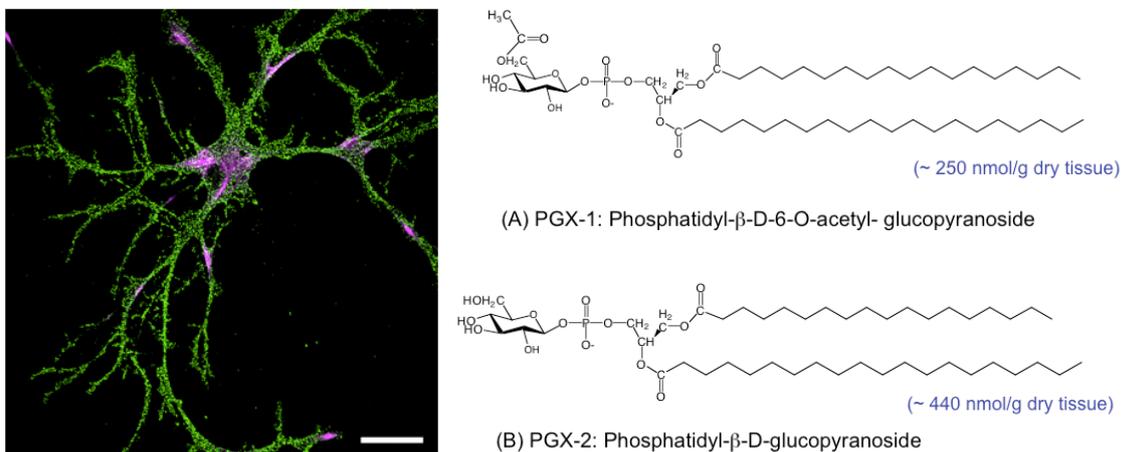


図3. DIM21 抗体による培養アストログリア細胞の免疫染色(左図)と化学構造。胎児脳から2種類の新しい糖脂質を見いだした。PtdGlc と、グルコースの6位の水酸基がアセチル化された PtdGlc が同時に単離・精製された。

の脂質ラフト画分をマウスに免疫することにより、新たに確立した単クローン抗体 (DIM21) を使うことにより(山崎ら, J Immunol Method 2006)、発達期の放射状グリアに時期特異的に発現していることを見いだした。胎児ラット脳より DIM21 陽性糖脂質を単離・精製し、その完全構造決定に成功した。驚いたことに、グリセロール骨格の sn-1 に C18:0、sn-2 に C20:0 を含む単一分子種として存在していた(図3)(長塚ら Biochemistry 2006)。この飽和

脂肪酸組成は、PtdGlc の物理化学的性質が、スフィンゴ糖脂質のそれと良く似ていることを説明していた(未発表)。じっさい、PtdGlc は、スフィンゴ糖脂質と同様に、脂質ラフトの分画に濃縮されていた。

微量成分である PtdGlc を、質量分析計により高感度で検出・定量する方法を確立した。この手法により、PtdGlc はニワトリやラット、マウス等の神経組織や細胞に広く分布していることが示された(伊藤ら, Anal Biochem 2008)。

ii) PtdGlc の神経幹細胞での発現

PtdGlc は、C18:0/C20:0 の飽和脂肪酸鎖を有している点で、他のリン脂質には見られない大変にユニークな脂質分子であり、単に細胞膜構成成分として存在するだけでなく、それ自体が機能性脂質ドメインである脂質ラフトを形成していると考えられた。実際に PtdGlc は、齧歯類胎生期脳の神経前駆細胞ラジアルグリアに強発現して脂質ラフトを形成し、EGFR-JAK/STAT 経路のシグナル起点として gliogenesis に関わっている事が *in vitro* の実験系で示された。この結果から、PtdGlc は新しい神経幹/前駆細胞の有用な表面マーカーと考えられた(木下ら, Biochem. J, 2009)。

成体マウスの中樞神経系では、主に側脳室下帯(SVZ)と海馬の顆粒細胞下層(SGZ)で生後においても神経新生が行われているが、主要な成体神経幹細胞はアストログリアの骨格タンパク質 GFAP 陽性で、非常に分裂活性の低い細胞であることが実験的に証明されてきている。そこで、成体マウスの神経新生領域-側脳室下帯-を対象に、PtdGlc 特異抗体 DIM21 による免疫組織染色法で PtdGlc の発現解析を行った。また PtdGlc 特異抗体を用いたフローサイトメトリー(FACS)により陽性細胞を単離して、得られた細胞の特性を検証した。その結果、PtdGlc は、生体マウスの中樞神経系 (SVZ, SGZ 領域) の神経幹細胞表面に発現していることが確認された。

iii) PtdGlc の生理機能

スフィンゴ糖脂質は、安定した脂質ラフトを形成するのに対し、PtdGlc のそれは、よりダイナミックに変化することが予想された。なぜなら、スフィンゴ糖脂質のセラミド部分の脂肪酸は、直接脱アシル化されないのに対し、PtdGlc の場合は、ホスホオリパーゼの作用により、容易に水に可溶性リゾ体に代謝変換されるからである。ホスホオリパーゼの代謝産物であるリゾ体化合物は、微量で神経軸索の成長円錐を崩壊させる活性を有していることを見いだした。更に、軸索のターニングアッセイ系を導入して調べてみたところ、ニワトリ後根神経節 (DRG) ニューロン (TrkA 陽性) の軸索伸長方向を負に制御する生理活性を有していることを見いだした (図 4)。

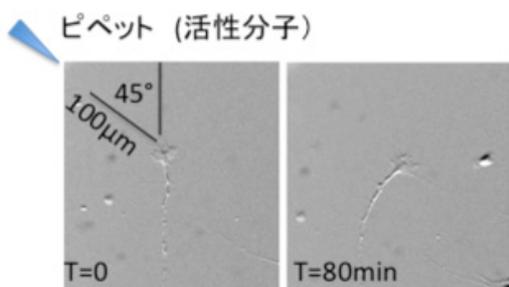


図 4. 神経細胞軸索ガイダンス活性測定法 活性脂質分子をマイクロピペット (内径 1 mm) からパルス状に放出 (2~3psi, 2Hz)。理論上、成長円錐の先端に至るガイダンス分子の濃度はマイクロピペット内液の約 1000 分の 1 程度と計算されている。約 10 mm 径の成長円錐は 4~12% の濃度差を感知していると考えられている。この図では、添加したリゾ体ホスファチジルグルコシド(数百 nmol オーダー)を避けるように、成長円錐がリゾ体濃度の低い方向へ移動している (理研・上口研究室との共同研究成果)。

成体成分より精製した PtdGlc より得られたリゾ体の生物活性を確認するためには、化学合成標品も同程度の生物活性を有しているか否かを検証することが極めて重要である。理研・伊藤研究室との共同研究により、天然型の PtdGlc を完全化学合成することに成功した。合成品よりリゾ体を調整、その活性を調べたところ天然型と同様の活性を示した。以上の結果を総合して、図 5 に示すような PtdGlc の作用モデルを提示した。

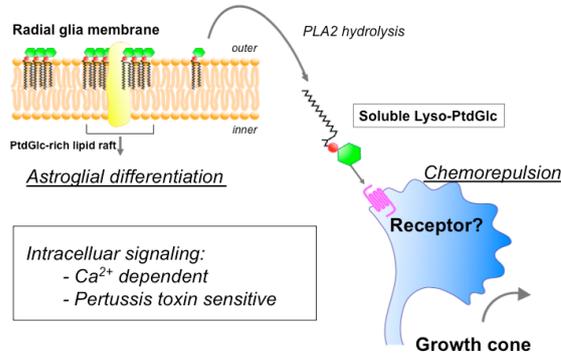


図 5. PtdGlc の生理活性モデル。ラジアルグリアから遊離したリゾ体の PtdGlc は、隣接するニューロン軸索の成長円錐に発現する特異的受容体に作用し、その成長移動方向を負に制御する。

II. ショウジョウバエによるエネルギー代謝制御機構の解明

1) エネルギー代謝制御におけるスフィンゴ糖脂質の役割

メタボリックシンドローム発症にスフィンゴ糖脂質が関わるということが最近の研究により示唆されてきている。例えば、肥満モデルマウスにおいてスフィンゴ糖脂質の発現異常が観察され、又、脂肪細胞におけるスフィンゴ糖脂質の発現異常がインスリン抵抗性発症を導く事が報告された。そこで、遺伝学が発達し、世代が短く、生命維持に関わる基本的なシグナル経路や遺伝子が保存されているショウジョウバエを用いて、スフィンゴ糖脂質によるエネルギー代謝制御メカニズムの解析に新たに着手した。

グルコシルセラミド合成酵素(GlcT-1)の脂肪体（哺乳類の脂肪組織と肝臓に相当）での発現量を変化させ、貯蔵脂質（トリアシルグリセリド）量を測定した。その結果、GlcT-1 発現の過剰発現により、脂質の過剰な蓄積が起こり、逆に、GlcT-1 ノックダウンにより、貯蔵脂質の減少が生じる現象を見出した。スフィンゴ糖脂質の過剰発現が、肥満を引き起こすというこの結果は、肥満モデルマウスや哺乳類培養細での報告と一致している。さらに、遺伝学的な解析から、GlcT-1 は p38-ATF2 シグナル経路を活性化する事で、貯蔵脂質量の制御を行っていることが示され、スフィンゴ糖脂質によるエネルギー代謝制御の分子メカニズムの一端を示すことができた(香山ら、未発表)。GlcT-1 のみならず、p38-ATF2 シグナル経路もショウジョウバエと哺乳類間で保存されていることから、本研究成果は、哺乳類にフィードバック可能であると思われ、ショウジョウバエはヒトのメタボリックシンドロームの発症メカニズムの理解と治療の新たな手段を提供すると期待された。

2) 細胞外グルコースに応答する 7 回膜貫通糖タンパク、BOSS の新機能—エネルギー代謝制御におけるスフィンゴ糖脂質の役割

GPCR オープン受容体の進化系統樹の解析から、ショウジョウバエ BOSS は、糖輸送体や糖転移酵素などと部分的に相同性があり、かつ、さまざまな生物種間で保存されていることを見出した。さらに、エネルギーセンサー器官である脂肪体（ヒトの脂肪組織や肝臓に相当）に存在していたことから、エネルギー（栄養）センサーとして機能する受容体である可能性が強く示唆された（香山ら、PNAS, 2008）。そこで、BOSS 受容体を培養細胞に発現させ、グルコース刺激に対する応答性を調べたところ、BOSS 受容体がグルコース濃度変化に反応して、細胞内にシグナルを伝えることを見いだした（図 6 左）。BOSS 受容体はグルコース刺激に応答し、そのシグナルを細胞内へ伝えるために、細胞膜表面から細胞内へ取り込まれる（図 6 右）。

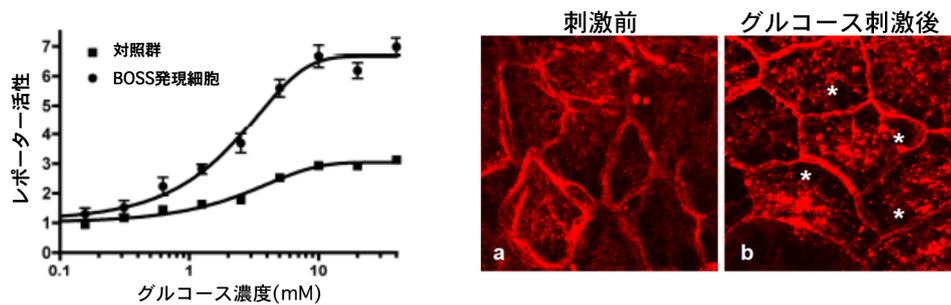


図 6. BOSS 受容体は細胞外グルコース濃度変化に応答する。BOSS 発現細胞はグルコース刺激に対して濃度依存的に応答しレポーター活性が上昇し(左図)、細胞膜から細胞内への取り込み (*印) が観察される(右図)。

BOSS 受容体の機能を欠く突然変異を持つ BOSS 欠損ショウジョウバエ (BOSS 欠損体) のエネルギー代謝状態を解析した。BOSS 欠損体では、グルコース刺激に応答できないことから、エネルギー代謝状態が異常になることが予想できた。実際に、血リンパ液 (ヒトの血液に相当) 中の糖と脂肪の量が上昇 (図 7) し、インスリンシグナルの低下が起こることが明らかとなった。

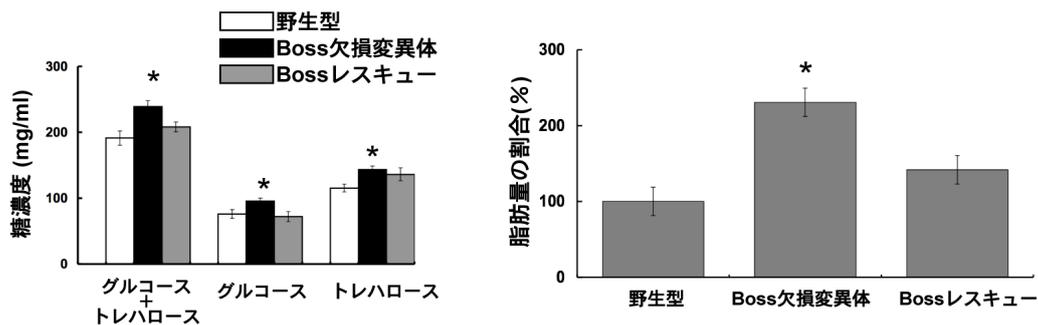


図7. 幼虫体内を循環している糖(グルコースとトレハロース)濃度 (血糖値に相当) と脂肪量の測定結果。

興味深いことに、BOSS 欠損体では個体のエネルギー消費バランスを維持することができず、絶食条件環境に置かれると短時間で個体死に至ることも発見した (図 8 左)。これは、脂肪体に貯蔵されていた脂質が、野生型のショウジョウバエに比べて急速に減少することが原因であった (図 8 右)。更に興味深い事に、BOSS 受容体は脂肪組織に加え、脳・神経系でも発現していることを見出した。これら組織は、脂肪体と共にエネルギー代謝制御に関わる重要な組織・臓器である。従って、BOSS 受容体は、これら組織・臓器の機能発現の入り口(エネルギー (栄養) センサー)として、組織・臓器間の代謝ネットワーク構築に重要な役割を担っていることが予想される。現在、この仮説 (図 9) を証明するために、これら組織・臓器での BOSS 受容体の機能の解析を進めている。

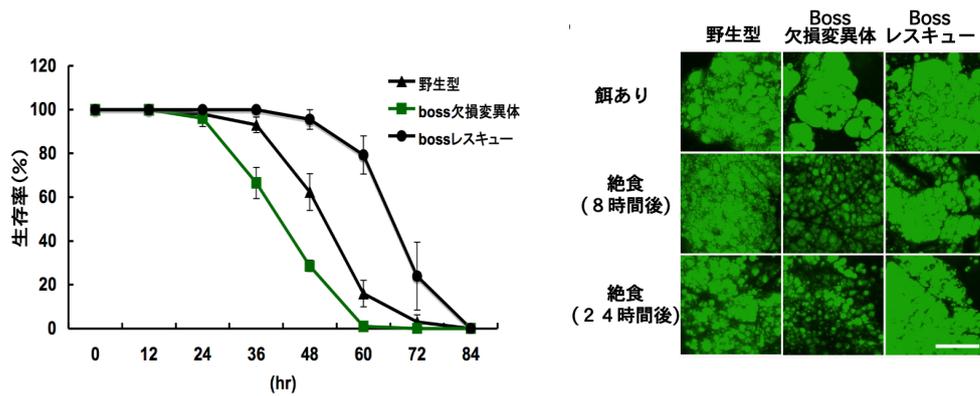


図8. BOSS欠損変異体は飢餓ストレスに脆弱である(左)。脂肪体に蓄えられている脂肪量(緑: BODIPYで貯蔵脂肪を染色)が急速に減少している(右)。脂肪体貯蔵エネルギー源であるトリアシルグリセリドの早期の枯渇が早死にの原因と考えられる。

以上成果は、個体としてエネルギー代謝の恒常性を維持する機構の解明だけでなく、グルコース依存性の高い神経細胞でのBOSS受容体の機能の理解につながると考えられる。*boss*遺伝子は、線虫からヒト(哺乳類ではGPCR5グループ)に至るまで広く保存されていることから、動物一般に共通した、生存に必須な機能を有していると予想できる。このことは、現在私たちが抱えている肥満や糖尿病などの疾患の理解と新たな治療法の開発に貢献すると期待される。

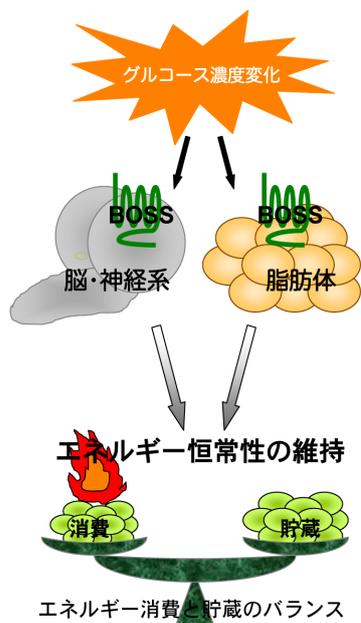


図9. BOSSグルコース応答受容体によるエネルギー恒常性の維持機構のモデル

個体は、全身の組織・臓器がそれぞれに情報を出し合いながら連携して、エネルギーの消費と貯蔵のバランスを調整している。BOSSはこのバランス維持に関与する事が知られている組織(脳・神経系と脂肪体)に発現していることから、生体のエネルギー状態を感知するセンサーとして機能し、エネルギー恒常性維持に機能していると考えられる。

(2) 今後の期待される成果

グルコシルセラミド合成酵素遺伝子、Bossともに、進化の過程で良く保存された遺伝子構造とメタボリズムに関連していることが示されている。特にBossは、ヒトにおいてもオルソログ遺伝子が存在しており、ノックアウトマウスを用いた解析が待たれる。また、グルコースのセンシングと細胞内シグナリングの分子機能は、生命の本質に関わる重要な基礎的問題の一つであり、Bossとその関連遺伝子機能の研究は、その問題の理解に大きく貢献すると共に、ヒトのメタボリックシンドロームの発症メカニズムと治療の新たな手段を提供すると期待された。

3.2 グルコシルセラミド代謝マシナリーの構造と機能の解明 (九州大学・伊東グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

I. 脊椎動物の初期発生におけるグルコシルセラミドの生理機能の研究

スフィンゴ糖脂質の多くは、セラミドにグルコースが転移されたグルコシルセラミド (GlcCer) を母核として合成される (図 1)。この反応を触媒する GlcCer 合成酵素 (GlcT-1) のノックアウトマウスは胎生 7.5 日で致死となるがその分子機構は未だ不明である。伊東らは、脊椎動物の初期発生における GlcT-1 および GlcCer の生物機能を解明するために、以下の 2 項目に焦点を合わせて研究を行った。(1) 微量の試料を用いて、GlcCer, GalCer, セラミド量を高感度測定する方法を開発し、GlcT-1 ノックアウトマウス胚では十分に行われていない、糖脂質とその代謝産物の厳密な定量を行う。(2) 受精卵が透明で初期発生の全過程を観察できるゼブラフィッシュを用いて、マウス胎生 7.5 日までに相当する、発生の非常に早い段階で GlcT-1 をノックダウンした時の胚発生への影響を詳細に調べる。

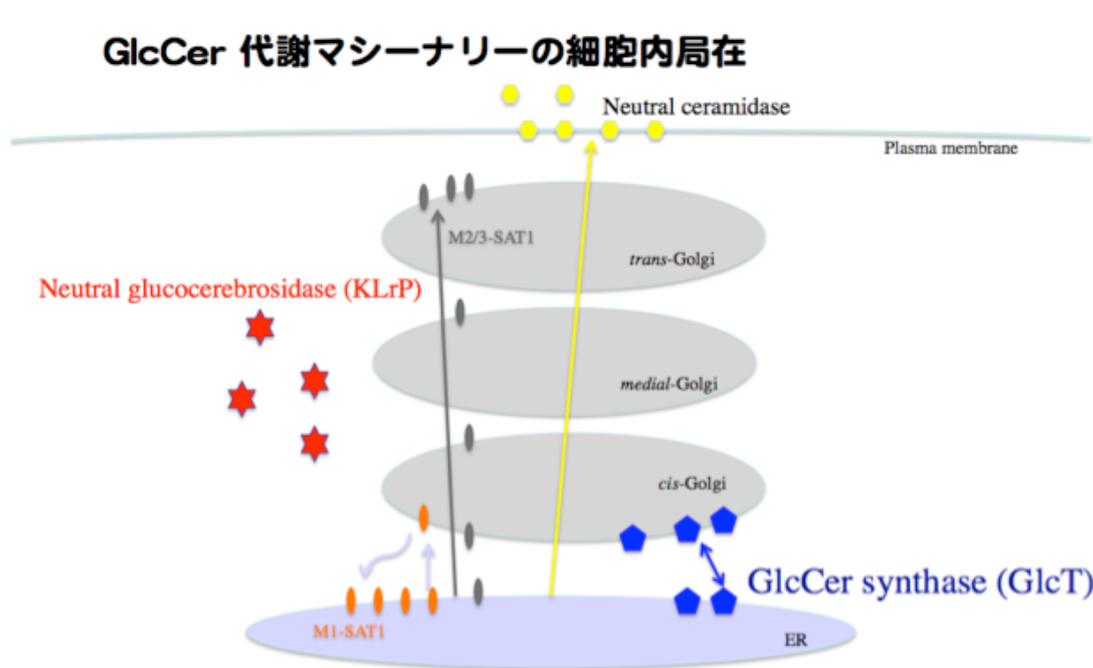


図 1. GlcT-1 酵素は、cis-Golgi あるいは ER に存在し、GlcCer は細胞質側で合成される。新奇中性 GlcCer 分解酵素 (KLRP) は細胞質側に存在し、細胞質側で合成された GlcCer あるいは、リソゾームから細胞質に漏出した GlcCer を分解する。Gaucher 病由来の細胞において、リソゾームから GlcCer が漏出することが知られているので、Gaucher 病と本酵素の関連に興味を持たれる。新奇中性セラミダーゼは形質膜 II 型糖タンパク質であるが一部はプロセッシングを受けて細胞外へ放出される。GM3/GM4 合成酵素 (SAT1) は、ER に逆行輸送されるアイソフォーム (M1-SAT) と trans-Golgi に輸送されるアイソフォーム (M2-SAT, M3-SAT) が存在する。

先ず、報告者の研究室で開発された酵素、SCDase を用いた GlcCer, GalCer の高感度定量法を開発した (Zama et al. Glycobiology, 2009)。また、この方法において SCDase の代わりにセラミダーゼを用いることで、セラミド量も高感度で再現性よく測定することが可能になった。

GlcT-1 の mRNA を用いた WISH 解析によって、GlcT-1 は発生の非常に早い段階で脊索に強く発現していることが分かった。脊索における GlcT-1 の発現は発生の進行に伴って漸減し、

神経管、中枢神経系へと発現場所がダイナミックに変遷することが示された。重要なことは、脊索には GlcT-1 は発現しているが、ラクトシルセラミド(LacCer)合成酵素 (GalT5、6) は発現しておらず、GlcCer が最終産物として発現している可能性が強く示唆されたことである。アンチセンスモルフォリノオリゴ及び GlcT-1 活性阻害剤を用いて GlcT-1 の翻訳、スプライシング、酵素活性をそれぞれ特異的に阻害した胚では、GlcT-1 活性、GlcCer 量が顕著に減少したが、セラミド量には有意な変化は見られなかった。興味深いことに、GlcCer が減少した胚では、脊索細胞の球形化並びに配列異常が観察された。一方、GlcT-1 mRNA を胚に注入することで GlcT-1 活性、GlcCer 量はほぼ正常値に戻り、脊索細胞の異常も回復した。一方、LacCer 合成酵素のノックダウン胚では、酵素活性の顕著な低下は見られたが脊索細胞の形態には全く影響は見られなかった。以上の結果から、脊索細胞の形態形成には GlcCer が必要であることが強く示唆された。脊索細胞は、Sonic hedgehog (Shh) などのモルフォジェンを分泌するオーガナイザーとして神経管の形成等、発生初期に重要な役割を果たしている。GlcT-1 ノックダウン胚では、Shh によって発現が誘導される nhx2.2a の発現低下が観察された。以上の結果から、GlcCer は Shh シグナリングを介して、一次的には脊索細胞の形態形成、二次的には神経管の形成、維持等に重要な機能を有することが明らかになった。

II. 新奇 GlcCer 分解酵素 KLRP の構造と機能の研究

報告者らは、ゼブラフィッシュの初期発生系を用いて糖脂質の生理機能を探ってきたが、その過程で従来の放射性同位体基質と TLC を用いた糖転移酵素の活性測定法に限界を感じ、蛍光基質と HPLC を用いた、GlcCer 合成酵素と LacCer 合成酵素の新しい非放射性高感度測定法を開発した (Hayashi et al. Anal. Biochem, 2005)。本法で LacCer 合成酵素の活性を測定していたときに、偶然にも酸性グルコセレブロシダーゼの特異的な阻害剤である CBE に感受性を示さない、新奇な中性 GlcCer 分解酵素活性を見出した。バイオインフォマティクス的手法により、候補タンパク質を絞り込んだところ、Klotho ファミリーに行き着いた。Klotho 遺伝子の欠損マウスは、通常 2.5-3 年生存する野生マウスと比較して平均 2 ヶ月しか生存できず、ヒトの老化関連疾患と類似した表現型を示すことから Klotho は老化に関連したタンパク質と考えられている。因に、Klotho とは、生命の糸を紡ぐギリシャ神話の女神の名前である。報告者らは、ヒトの Klotho ファミリーに属する 4 種のタンパク質 (α -Klotho, β -Klotho, Klotho-related protein [KLRP], Klotho-lactase plorizin hydrolase related protein) をクローニングし、それぞれを CHOP 細胞で発現させ、CBE 存在下での GlcCer 分解活性を調べた。その結果、KLRP のみが目的の酵素活性を示すことが明らかになった。また、この KLRP は細胞質に局在することが示された。次に、KLRP が細胞内で実際に糖脂質代謝を担っている可能性を検証するために、siRNA を用いて HEK293 細胞の内在性 KLRP をノックダウンした。その結果、KLRP のノックダウンによって GlcCer および GlcCer を前駆体とする糖脂質量は有意に上昇した (Hayashi et al. JBC, 2007)。

次に、本酵素の触媒機構を原子レベルで解明することを目的に、リコンビナントヒト KLRP の X 線結晶構造解析を行った。KLRP と反応産物のグルコースとの共結晶 (KLRP/Glc) を作製し、1.6 Å の高分解能で X 線結晶構造を解析した。その結果、KLRP は a ヘリックスと b ストランドを 8 回繰り返す典型的な TIM バレル構造を示し、E165 と E373 が触媒残基であることが推測された。そこで、E165Q, E373Q の変異型 KLRP を作製した結果、野生型と比較してこれらの変異体は GlcCer 分解活性をほとんど示さず、両グルタミン酸残基が触媒残基であることが判明した。E165 と E373 の距離は 5.3 Å であり、本酵素は保持 (retain) 型の触媒機構を有することも分かった。更に E165Q 変異体とパラニトロフェニル- β -グルコシド (*p*NP- β -Glc) の共結晶を作製して X 線結晶構造を解析したところ、グルコースと E373 が共有結合している中間体が観察され、E373 が求核残基、E165 が酸/塩基触媒残基であり、double displacement 機構で反応が進行することが証明された (Noguchi et al. BBRC, 2008)。前述のように KLRP のホモログである、 α KL, β KL, KLPH は GlcCer 分解活性を示さない。これらの一次構造を KLRP と比較すると、KLRP の E165 に相当するアミノ酸がアスパラ

ギン (a-KL, b-KL の場合) やアスパラギン酸 (KLPH の場合) によって置換されていることが分かった。現時点では、Klotho ファミリーの中で立体構造が明らかにされているのは、KLRP のみである。

以上のように、今回見出された新奇酵素は老化関連蛋白質 Klotho ファミリーに属する KLRP であることが示された。さらに、KLRP の結晶構造解析および細胞生物学的な解析から KLRP の触媒機構と KLRP を介した新しい GlcCer 代謝経路の存在が明らかになった (Hayashi et al. JBC, 2007)。

III. 非リソソーム性中性セラミダーゼの構造と生物機能の研究

GlcCer はグルコセレブロシダーゼによってグルコースとセラミドに分解された後、セラミダーゼによってスフィンゴシン塩基と脂肪酸に代謝される。報告者らは、形質膜 II 型糖タンパク質として存在する中性セラミダーゼをクローニングし (Tani et al. JBC, 2003)、この酵素が形質膜のセラミド代謝に重要であることを示した (Tani et al. JBC, 2005)。本酵素は、ゼブラフィッシュにおいては S1P 受容体を介した血管新生、心臓形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしている (Yoshimura et al. JBC, 2004 及び未発表データ)。本研究においては、緑膿菌由来の本酵素オルソログの結晶構造解析を行った。その結果、本酵素は C 末側のイムノグロブリン様ドメインと N 末側の新奇触媒ドメインからなり、両ドメインの結合部位付近に Mg イオン、触媒ドメインに Zn イオンを保持することが分かった (図 2)。触媒機能に重要なアミノ酸を推定し、その点変異実験を行った結果、本酵素は Zn イオンを活性中心に持つ金属酵素であることが証明された。また、Mg イオンは両ドメインの安定化に重要であることが示唆された。さらに、ホモロジーモデリングの手法を用いて、ヒト、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、ショウジョバエの中性セラミダーゼの構造を明らかにしたところ、全ての酵素で上記の

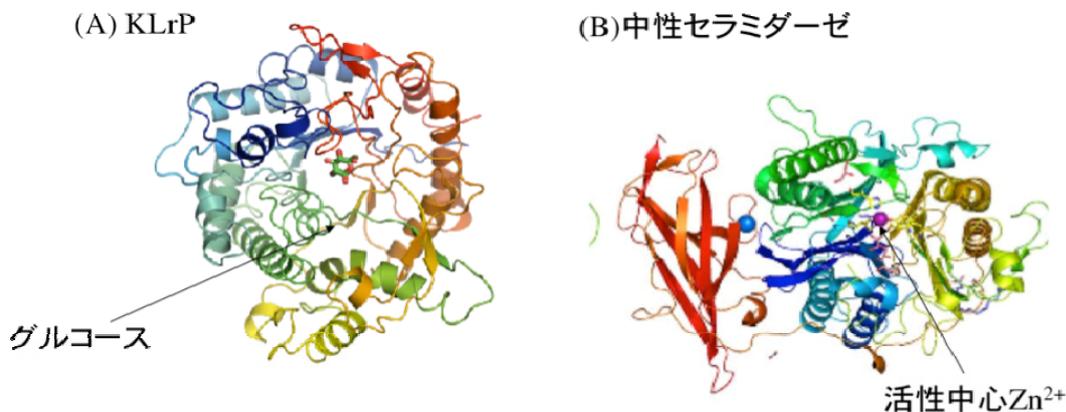


図 2. KlrP は、 α ヘリックスと β ストランドを8回繰り返す TIM バレル構造を示し、double displacement 機構で水解反応が進行する (Hayashi et al., JBC, 2007; Noguchi et al., BBRC, 2009)。一方、中性セラミダーゼは C 末側のイムノグロブリン様ドメインからなり、Zn イオンを活性中心とする金属酵素である (Inoue et al., JBC, 2009)。

酵素触媒機構が合理的に説明できた。以上の結果は、本酵素は細菌からヒトに至るまでその高次構造と触媒機構が保存されていることを示している。本酵素は血管内皮細胞や小腸上皮細胞では、形質膜酵素あるいは分泌酵素として遊離セラミドの代謝酵素として働き、神経系や免疫系では細胞間の接触によってトランス側の形質膜セラミドを分解するというモデルを提唱した (Inoue et al. JBC, 2009)。

IV. GM4 合成酵素に関する研究

報告者らは、ヒトの食中毒や魚の感染症を引き起こすビブリオ属細菌が GM4 (NeuAc α 2-3Gal β 1-1' Cer) に特異的に接着することを明らかにした (Chisada et al. BBRC, 2005)。また、ゼブラフィッシュの飼育環境水中に GFP 標識ビブリオ菌を添加すると、ビブリオ菌は速やかにゼブラの腸管に集積することを見出した。抗 GM4 抗体を用いた免疫化学的方法によってゼブラ腸管上皮細胞に GM4 が存在していることも分かった。

GM4 は哺乳類のグリア細胞等に発現していることが知られているが、その合成酵素は未同定であった。報告者らは、GM4 がゼブラフィッシュの腸上皮細胞の主要な糖脂質であることに着目し、ゼブラフィッシュの GM4 合成酵素遺伝子を同定、単離した。さらに、そのオルソログとして哺乳動物の GM4 合成酵素の同定を試みた。意外なことに、哺乳動物の GM4 合成酵素オルソログは、既に GM3 合成酵素 (SAT-1) として報告されているもの以外には存在しなかった。そこで、マウス SAT-1 をクローニングし、GM4 合成活性を慎重に検討したところ、SAT-1 は GM3 のみならず、GM4 を合成することが明らかになった。但し、SAT-1 の GM4 に対する比活性は、GM3 に対するその約 1/10 であった。次に、SAT-1 のノックアウトマウスの GM4 合成酵素活性および GM4 の存在を調べたところ、このノックアウトマウスでは確かに GM3 合成酵素活性/GM3 のみならず、GM4 合成酵素活性/GM4 も欠損していることが証明された (Chisada et al. JBC, in press 2009)。

マウスの GM4 合成酵素遺伝子には、3つの推定開始メチオニンが存在する。これらの開始メチオニンは Leaky scanning によってそれぞれ読み取られ、3種の異なる長さのアイソフォームを産生する (Uemura et al. MBC, 2009)。そこで、3種のアイソフォームを遺伝子工学的に作製し、それぞれの GM4/GM3 合成活性を調べた。その結果、これらのアイソフォームはすべて GM4/GM3 合成活性を有することが明らかになった。これらのアイソフォームの中で最も分子量が大きい M1-SAT-1 は ER への targeting signal 配列を有している。GalCer は ER で合成されるので、*in vivo* におけるこのアイソフォームの役割に興味を持たれる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

今回の研究で幾つかの GlcCer 代謝マシナリーの結晶構造解析が進み、世界に先駆けて酵素反応機構を原子レベルで明らかにすることができた。さらに構造に基づいた生物学的な機能に関しても格段と理解が進んだ。GlcT-1 についても大腸菌で活性体を得るところまでは漕ぎ着けているので、生産量を増やし、結晶構造まで明らかにできれば新しい展開が期待できる。また、 α -Klotho には従来から知られていたグルクロニダーゼ活性だけではなく、シアリダーゼ活性の存在も示唆されている (Cha et al. PNAS, 2008) ので、その生物学的な役割を明らかにするためにも結晶構造を解明することが重要である。

3.3 モデルマウスによる神経可塑性機構の解明 (大阪府立大学 加藤啓子グループ)

(1)研究実施内容及び成果

情動学習の中枢である扁桃体に発生する神経の発火は、情動系神経回路上（扁桃体→海馬→視床前核→大脳皮質帯状回）を伝播し、“こころ”の調節に深く関わることが知られている。本研究では、扁桃体に電極を埋め込み、刺激することで情動系神経回路上に同期性リズム異常亢進を誘導するモデルを作成した(1)。本モデルは、難治てんかんの約5割を占める側頭葉てんかんのモデルであり、神経可塑性の異常亢進を示すことが知られている。本研究計画時に、糖転移酵素のひとつ $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素がてんかん発症に連動した発現上昇を示すことを発見していた(2, 3)。そこで、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)がてんかん原因分子であることを証明するために、ST3Gal IV欠損マウスを作成し、本欠損マウスが同期性リズム不全症を示すことを検討してきた。本研究目的は、 $\alpha 2, 3$ シアル酸転移酵素遺伝子を軸とした、同期性リズム異常症調整分子群を同定することであり、難治てんかん薬やうつ病を対象としたリズム障害治療薬開発システムを構築することであった。さらには、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素を軸とした“こころ”の調節機構の解明の端緒を得ることにあつた。

1. $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)と同期性リズム不全症

ヒトの難治てんかんの50%に当たる側頭葉てんかんのモデルマウスを作製した。このマウスは、情動学習の中枢である、扁桃体に刺激を挿入し、1日1度軽微な刺激を毎日行うことで、約4週間かけて作製するマウスである。

申請者らは、脳において、末梢の組織・器官の約5倍量存在するシアル酸に着目した。シアル酸を持つ糖脂質(スフィンゴ脂質・ガングリオシド)は、下等動物には、ほとんど存在しないにもかかわらず、ヒトを含む哺乳類脳において、その組成が酷似しているものである。またシアル酸は、負の電荷を持つ糖鎖の末端に付加される糖で、細胞膜上に存在する糖たんぱく質及びガングリオシドに含まれることから、リズムを持った刺激の伝播に重要な役割を持つのではないかと考えた。

そこで、てんかん発症過程でその発現を亢進する、シアル酸修飾に関わるシアル酸転移酵素をスクリーニングした。その結果、20種類のシアル酸転移酵素の中で、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)が、刺激の伝播系路上(扁桃体→海馬→視床前核→大脳皮質帯状回)で著しい発現上昇を示すことを発見した。

次に、ST3Gal IVが、てんかん発症の原因となるかどうかを検討するために、ST3Gal IVのコンディショナルノックアウト(ST3Gal IV-KO)マウスを作製し、扁桃体刺激を挿入したところ、このST3Gal IV-KOマウスが、てんかん発作を誘導しないことが判明した。このことは、ST3Gal IV-KOマウスが、神経の同期性リズム亢進を示さないことをあらわしており、神経リズムをうまく同調できない可能性が考えられた。

そこで次に、リズムに最も関係の深い睡眠リズムについて検討した。その結果、ST3Gal IV-KOマウスは、睡眠リズムの平坦化と共に、REM睡眠の著しい減少を示した。さらに、扁桃体が情動学習の中枢であること、そして、ヒトのうつ病は、その症状に日内リズムを持ち、睡眠障害を併発することが知られている。そこで、気分障害・不安障害の行動試験である、音驚愕反応試験とオープンフィールド試験を実施した。その結果、本KOマウスは、音に対する恐怖記憶の増強及び、オープンフィールド試験における4隅へのアクセスの増加を示した。以上のことから、ST3Gal IV-KOマウスは、睡眠障害・気分障害を示すリズム不全症マウスであることがわかった。

睡眠リズムに同期した分泌様式を持つ分子として最も有名な分子は、成長ホルモンである。成長ホルモンは、うつ病で夜間分泌が減少することも知られている。そこで、ST3Gal IV-KOマウスの血漿成長ホルモン量及び、成長ホルモンにより分泌量が促進される血漿IGF1

量を測定した。その結果、野生型に比べ、成長ホルモン及び IGF1 共に血中への分泌量の減少を示した。また血中成長ホルモン量の減少に一致して、KO マウスは、体重・体長共に成長阻害を示した（特開 2009-201501）。

以上、睡眠障害・気分障害を示すリズム不全症マウス（ST3Gal IV-KO）は、成長ホルモンの分泌量の低下を示したことから、次に、リズム亢進時における成長ホルモンの影響について、検討した。

2. 成長ホルモンと同期性リズム亢進症

成長ホルモンがてんかん発症に連動した発現上昇を示すかどうかを検討した結果、脳内成長ホルモン mRNA の著しい発現亢進が観察された（図 1）。

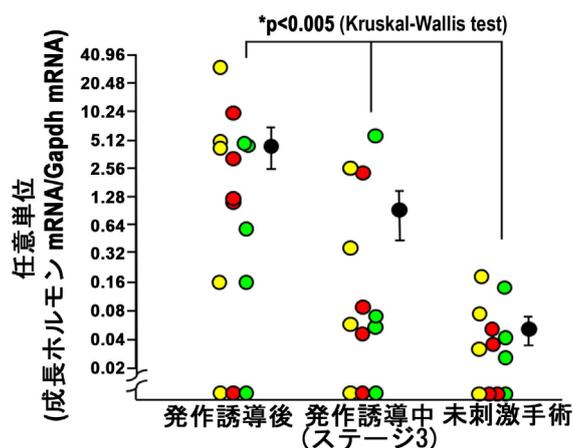


図 1. てんかん発作誘導前後のマウス脳 mRNA を用いた成長ホルモン mRNA 検出・リアルタイム RT-PCR

さらに蛋白レベルにおいても、発現量の亢進が観察された。また、海馬内にヒト成長ホルモンを注入した結果、てんかん発症の亢進（図 2）も確認したことから、成長ホルモンが、神経リズムの亢進に直接関与することも証明した（4）。

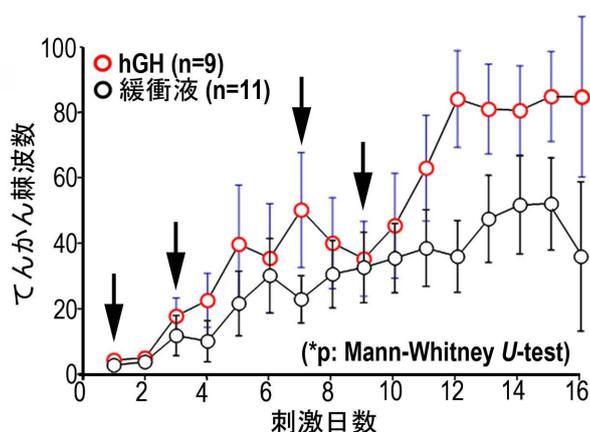


図 2. てんかん発作誘導過程に与える成長ホルモンの影響。ヒト成長ホルモンリコンビナント (hGH: 1 回に 540 pmol/ μ l 投与; 矢印) 注入 30 分後にてんかん誘導刺激を 1 日 1 度実施前後の脳波 spike 数を計測した。hGH 注入により、刺激日数 12 日以降の棘波数の増加を観察した。

てんかん発作獲得後に発現上昇を示す成長ホルモンは、そのシグナル系に支配されている Stat5 のリン酸化を介して、Egr1 の発現上昇を誘導し (図 3)、てんかん発作誘導を促進した。これは成長ホルモンが、脳内のシグナル系を介して、てんかん発作の発現に影響することがわかった。

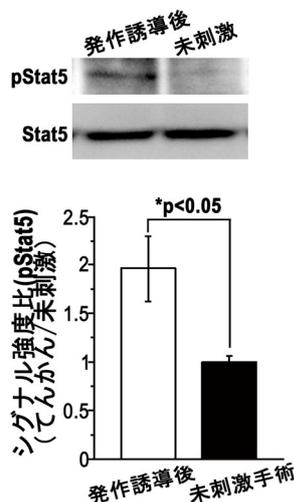


図 3. てんかん発作誘導過程に連動した stat5 リン酸化。てんかん発作獲得前後の海馬・大脳皮質から抽出した TritonX-100 可溶性たんぱく質画分 (40 μ g) のウエスタンブローディング (mean \pm S. E. M., n=4, *Mann-Whitney U-test)

(2) 研究成果の今後期待される効果

活動量が高くてんかん発作を発症するマウス (“こころ” の異常亢進) をもとに、 α 2,3-シアル酸転移酵素が、てんかん原因分子であると共に、本酵素の欠損がうつ病・不安障害の原因となることが判明した。これは、“こころ” の異常亢進と不全の発症が、 α 2,3-シアル酸転移酵素の存在有無により決定していることを示している。また、その “こころ” の調節を計るバイオマーカーが成長ホルモンであることを見つけ、成長ホルモンシグナル系を軸とした分子カスケードマーカー群の発見に成功した。同期性リズム調節に関わる本酵素の基質分子を同定することが、今後の解決すべき重要課題ではあるが、本研究により、“こころ” の調節に深く関わるてんかんや不安症・うつ病等の治療薬のスクリーニング系として、 α 2,3-シアル酸転移酵素を軸としたこれらモデルは非常に有用であると考えられる。

従来、薬剤を用いた動物モデルや遺伝子改変モデルでは、その障害が正常の動物との比較に限定されていた。“こころ” の調節を評価するには、亢進あるいは不全といった片側だけの障害ではなく、亢進と不全の両方向の調節を評価する技術的ニーズが求められていた。本研究において作成した、 α 2,3-シアル酸転移酵素を軸としたこれらモデルは、亢進モデル・正常・不全モデルの3点での比較をおこなうことで、“こころ” のバランスに対応した治療薬や予防食品の開発系に利用できる。さらにこれらモデルにおけるバイオマーカーを中心とした、シグナル系を解明することは、“こころ” の調節メカニズムにおけるシアル酸修飾の役割を明らかにすることになる。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 19件)
(国際)

1. Nagatsuka, Y., Horibata, Y., Yamazaki, Y., Kinoshita, M., Shinoda, Y., Hashikawa, T., Koshino, H., Nakamura, T., and Hirabayashi, Y. Phosphatidylglucoside exists as a single molecular species with saturated fatty acyl chains in developing astroglial membranes. *Biochemistry*. **45 (29)**, 8742–8750 (2006)
2. Sasaki, N., Yoshida, H., Fuwa, T.J., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Hirabayashi, Y., Ishida, H., Ueda, R., and Nishihara, S.
Drosophila β 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-A synthesizes the LacdiNAc structures on several glycoproteins and glycosphingolipids. *Biochem Biophys Res Commun*. **354**, 522–527 (2007)
3. Horibata, Y., Nagatsuka, Y., Greimel, P., Ito, Y., and Hirabayashi, Y. Sensitivity of phosphatidylglucoside against phospholipases. *Anal Biochem*. **365**, 149–151 (2007)
4. Okino, N., and Ito, M. Ceramidase enhances phospholipase C-induced hemolysis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, **282**, 6021–6030 (2007)
5. Ishibashi, Y., Nakasone, T., Kiyohara, M., Horibata, Y., Sakaguchi, K., Hijikata, A., Ichinose, S., Omori, A., Yasui, Y., Imamura, A., Ishida, H., Kiso, M., Okino, N., and Ito, M. A Novel endoglycoceramidase hydrolyzes oligogalactosylceramides to produce galactooligosaccharides and ceramides. *J Biol Chem*, **282**, 11386–11396 (2007)
6. Hayashi, Y., Okino, N., Kakuta, Y., Shikanai, T., Tani, M., Narimatsu, H., and Ito, M. Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral β -glucosylceramidase. *J Biol Chem*. **282(42)**, 30889–30900 (2007)
7. X. Xu, H., Monjusho, M., Inagaki, Y., Hama, K., Yamaguchi, K., Sakaguchi, M., Iwamori, N., Okino, N., and Ito, M. Fucosyl-GM1a, an endoglycoceramidase-resistant ganglioside of porcine brain. *J. Biochem*. **141**, 1–7 (2007)
8. Inoue, M., Kato, K.,* Matsushashi, H., Kizuka, Y., Kawasaki, T., and Oka, S. Distributions of glucuronyltransferases, GlcAT-P and GlcAT-S, and their target substrate, the HNK-1 carbohydrate epitope in the adult mouse brain with or without a targeted deletion of the GlcAT-P gene. *Brain Res*. **1179**, 1–15. (2007)→Keiko Kato* is corresponding author
9. Yamazaki, Y., Horibata, Y., Nagatsuka, Y., Hirabayashi, Y., and Hashikawa, T. Fucoganglioside α -fucosyl(α -galactosyl)-GM1: a novel member of lipid membrane microdomain components involved in PC12 cell neuritogenesis. *Biochem J*. **407(1)**, 31–40 (2007)
10. Ito, S., Nabetani, T., Shinoda, Y., Nagatsuka, Y., and Hirabayashi, Y. Quantitative analysis of a novel glucosylated phospholipid by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*. **376**, 252–257 (2008)
11. Greimel, P., Lapeyre, M., Nagatsuka, Y., Hirabayashi, Y., and Ito, Y. Syntheses of phosphatidyl- β -D-glucoside analogues to probe antigen selectivity of monoclonal antibody

‘DIM21’. *Bioorganic & Med Chem.* **16**, 7210–7217 (2008)

12. Kohyama-Koganeya, A., Kim, Y.J., Miura, M., and Hirabayashi, Y. Drosophila Bride of sevenless (boss) functions as a glucose-responding receptor: loss of boss causes abnormal sugar and lipid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105(40)**, 15328–15333 (2008)
13. Hayashi, Y., Zama, K., Abe, E., Okino, N., Inoue, T., Ohono, K., and Ito, M. A sensitive and reproducible fluorescent-based HPLC assay to measure the activity of acid as well as neutral β -glucocerebrosidases. *Anal. Biochem.* **383**, 122–129 (2008)
14. Kato, K., Iwamori, M., and Hirabayashi, Y. Increase of GQ1b in the hippocampus of mice following kindled-seizures. *Neurosci Lett.* **441**, 286–290. (2008)
15. Inoue, T., Okino, N., Kakuta, Y., Hijikata, A., Okano, H., Goda, H., Tani, M., Sueyoshi, N., Kambayashi, K., Matsumura, H., Kai, Y., and Ito, M. Mechanical insights into the hydrolysis and synthesis of ceramide by neutral ceramidase. *J Biol Chem*, **284**, 9566–9577 (2009)
16. Zama, K., Hayashi, Y., Ito, S., Hirabayashi, Y., Ito, T., Inoue, T., Ohno, K., Okino, N., and Ito, M. Simultaneous quantification of glucosylceramide and galactosylceramide by normal phase HPLC using *O*-phtalaldehyde derivatives prepared with sphingolipid ceramide *N*-deacylase. *Glycobiology.* **19(7)**, 767–775 (2009)
17. Kato, K., Suzuki, M., Kanno, H., Sekino, S., Kusakabe, K., Okada, T., Mori, T., Yoshida, K., and Hirabayashi, Y. Distinct Role of Growth Hormone on Epilepsy Progression in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurochem.* **110**, 509–519. (2009)
18. Kinoshita, M.O., Furuya, S., Ito, S., Shinoda, Y., Yamazaki, Y., Greimel, P., Ito, Y., Hashikawa, T., Machida, T., Nagatsuka, Y., and Hirabayashi, Y. Lipid rafts enriched in phosphatidylglucoside direct astroglial differentiation by regulating tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptors. *Biochem J.* **419(3)**, 565–575 (2009)
19. Chisada, S., Yoshimura, Y., Sakaguchi, K., Uchima, H., Matsunaga, N., Okino, N., Uemura, S., Go, S., Tai, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Inokuchi, J., and Ito, M. Zebrafish and mouse α -2,3-sialyltransferases responsible for synthesizing GM4 ganglioside. *J Biol Chem*, **284**, in press, (2009)

(2) その他の著作物 (総説、書籍など 29 件)

1. 加藤啓子、神経可塑性の獲得機構における分子生物学的基盤の解明、三共生命科学 研究振興財団 研究報告集 vol. 20:54-65(2004)
2. 加藤啓子、てんかんモデルマウスにおける糖鎖修飾、「蛋白質 核酸 酵素」増刊号 神

経糖鎖生物学 49:2491-2498(2004)

3. 伊東信 糖脂質より糖鎖の切り出し、*未来を拓く糖鎖科学*(永井克孝監修)、8-9、金芳堂、(2005)
4. 伊東信、セラミダーゼ関連遺伝子、*未来を拓く糖鎖科学*(永井克孝監修)、196-197、金芳堂、(2005)
5. 加藤啓子、平林義雄、小脳グリア細胞の分化機構—糖鎖生物学の視点から— *CLINICAL NEUROSCIENCE*(臨床神経科学)、中外医学社、23(2) 144-147(2005)
6. 平林義雄(編集) *Sphingolipid Biology*, (2006)
7. Furuya,S., Yoshida,K., and Hirabayashi,Y. マウス. *DNAチップ活用とテクノロジー応用*, 118-130 (2006)
8. Kobayashi,T., Takahashi,M., Nagatsuka,Y., and Hirabayashi,Y. Lipid rafts:new tools a new component. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**, 1526-1531 (2006)
9. Ito,M., Tani,M., and Yoshimura,Y. Neutral ceramidase as an integral modulator for the generation of S1P and S1P-mediated signaling. *Sphingolipid Biology* (Edited by Y. Hirabayashi, Y. Igarashi, A. H. Merrill, Jr.) 183-196, Springer (2006)
10. Ito,M. Structure of glycolipids. *Endoglycosidases: Biochemistry, Biotechnology and Application*. (Edited by M. Endo, S. Hase, K. Yamamoto, K. Takagaki) 15-19, Kodansha-Springer (2006)
11. Ito,M., Sakaguchi,K., and Horibata,Y. Endoglycosidase that relate to glycosphingolipids (Endoglycoceramidase). *Endoglycosidases: Biochemistry, Biotechnology and Application*, (Edited by M. Endo, S. Hase, K. Yamamoto, K. Takagaki) pp.110-117, Kodansha-Springer (2006)
12. Ito,M. Endoglycosidase that relate to glycosphingolipids (Endo- β -galactosidase) *Endoglycosidases: Biochemistry, Biotechnology and Application* (Edited by M. Endo, S. Hase, K. Yamamoto, K. Takagaki) 118-127, Kodansha-Springer (2006)
13. Ito,M., and Horibata,Y. Enzymatic synthesis of neoglycolipids. *Endoglycosidases: Biochemistry, Biotechnology and Application* (Edited by M. Endo, S. Hase, K. Yamamoto, K. Takagaki) 199-206, Kodansha-Springer (2006)
14. Tani,M., Ito,M., and Igarashi,Y. Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cell Signal*, **19**, 229-237, (2007)
15. Ito,M. Degradation of glycolipids. *Comprehensive Glycoscience* (Edited by J.P. Kamerling) 193-208, Elsevier (2007)
16. 加藤啓子 垣間見たアメリカの獣医臨床の世界 大阪府立大学獣医学友会報 45:p10 (2007)

17. Kato, K. Glycobiological approach to understanding neural plasticity. *Trends in glycoscience and glycotecnology* 19(106)97-110. ((2007)
18. 平林義雄 (理化学研究所) Novel glycolipids in developing brain: determination by Nano-LC/MS/MS. *Experimental Glycoscience Glycobiology*, 177-179 (2008)
19. 林 康広、沖野 望、角田佳充、伊東 信 KLRP を介した新しい糖脂質代謝経路、*蛋白質核酸酵素*, 53, 1462-1467 (2008)
20. Ito, M. Release of sugar chains from glycosphingolipids. *Experimental Glycoscience: Glycobiology* (Edited by N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki, S. Hase) 119-122, Springer (2008)
21. Ito, M. Ceramidase and related enzymes. *Experimental Glycoscience: Glycochemistry* (Edited by N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki, S. Hase) 18-21, Springer (2008)
22. 伊東信、糖質、ベータシスクマスター生化学(大山 隆、東中川徹、清水光弘編) 58-77, Ohmsha (2008)
23. 伊東信、小胞体・ゴルジ体における分子動態(オーバービュー) *蛋白質核酸酵素*(糖鎖情報の独自性と普遍性: 古川鋼一、遠藤玉夫、岡昌吾、本家孝一、加藤晃一 編)、53, 1460-1461 (2008)
24. 吉村征浩、伊東 信、ゼブラフィッシュを利用した初期発生における遺伝子の機能解析、*The Lung perspectives* 17, 84-91 (2009)
25. 沖野 望、谷 元洋、光武 進、吉村征浩、合田(問註所)初美、伊東 信、構造から読み解く中性セラミダーゼの触媒機構、存在様式及び生理機能、*細胞*, 41, 12-15 (2009)
26. 林 康広、沖野 望、伊東 信、Klotho 関連タンパク質 KLRP を介した新しいグルコシルセラミド代謝経路. *生化学* 印刷中(2009)
27. 加藤啓子 てんかん発症機構に関わる分子基盤の構築 Elucidation of molecular basis involved in kindling-epileptogenesis てんかん治療研究振興財団研究年報 20 : 31-38 (2009)
28. 加藤啓子 幸田知子 小崎俊司 ボツリヌス毒素によるてんかんの治療 Application of botulinum neurotoxin in the treatment of epilepsy —BRAIN and NERVE— 神経研究の進歩— 医学書院 61:939-948(2009)
29. 香山—古金谷綾子、三浦正幸、平林義雄、 ショウジョウバエを用いた創薬研究—ショウジョウバエ・モデルにおけるエネルギー代謝制御機構の研究、*実験医学*, 27(5)増刊、186-192 (2009)

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 15 件、国際会議 14 件)

(国内)

1. 平林義雄(理化学研究所) 神経系におけるスフィンゴ脂質の役割—ニューロン・グリア間の代謝カップリング機構と脂質合成—、第47回日本脂質生化学学会、(金沢、2005.6.)
2. 平林義雄(理化学研究所) Phosphatidylglucoside as a new marker of lipid raft in developing radial glia cell. Glycobiology and Sphingobiology in 2007 (徳島、2007.2.28.-3.2.)
3. 伊東 信(九州大学) スフィンゴ脂質代謝マシーナリの解明とその応用、産業酵素国際シンポジウム、福岡、(2008,3)
4. 加藤啓子(大阪府立大学) てんかん誘導に連動した発現上昇を示す分子の脳内の役割について、浜松医大セミナー、浜松、(2008.5)
5. 加藤啓子(大阪府立大学) てんかん等の脳疾患とモデル動物、第6回大阪府立大学獣医学専攻・大阪府立成人病センター、(大阪、2007.6)
6. 平林義雄(理化学研究所) 遺伝子改変マウスによる神経系におけるスフィンゴ脂質機能の解析、第3回スフィンゴセラピー研究会、米子、(2008,7)
7. 平林義雄(理化学研究所) スフィンゴシンキナーゼ2阻害剤によるFas依存性細胞死の亢進、第3回スフィンゴセラピー研究会、米子、(2008,7)
8. 伊東 信(九州大学) 新しいグルコセレブロシダーゼ KLRP の発見、第3回スフィンゴセラピー研究会、米子、(2008,7)
9. 平林義雄(理化学研究所) Mass spectrometry as an essential tool for brain metabolism research、第31回日本神経科学大会 Neuroscience2008、東京、(2008,7)
10. 加藤啓子(大阪府立大学) 慢性神経疾患モデルマウスを用いた生体リズム評価システムの構築、Biological rhythm evaluation system with chronic neurological disease model mice、平成20年度第7回国際バイオフィォーラム、東京、(2008.7)
11. 伊東 信(九州大学) 非リソソーム性のスフィンゴ脂質代謝酵素の構造と機能、酵素と蛋白質に関する九州シンポジウム、熊本、(2008,11)
12. 伊東 信(九州大学) セラミダーゼとグルコセレブロシダーゼの構造と機能、セラミド研究会、札幌、(2008,11)
13. 吉村征浩、座間宏太、伊東 信 (九州大学) ゼブラフィッシュ初期発生におけるセラミド代謝の機能解析、シンポジウム「モデル生物を用いた脂質生物学:様々な生物における膜脂質の多様な生物機能」 BMB2008、神戸、(2008,12)
14. 平林義雄(理化学研究所) ショウジョウバエによる新しい脂質代謝ホメオスタシス維

持機構、BMB2008、神戸、(2008,12)

15. 平林義雄(理化学研究所) GPCR 受容体によるエネルギー恒常性機構の存在、日本薬学会 第 129 年会、京都、(2009,3)

(国際)

1. 平林義雄(理化学研究所) Neuron-Glia coupling in sphingo(glyco)lipid Biosynthesis. Glycobiology Symposium: Joint meeting between Japan and Netherlands (Utrecht, Netherlands, April 18-21, 2005)
2. 伊東 信(九州大学) Functional analysis of glycosphingolipid-metabolizing enzymes using zebrafish embryogenesis. Glycobiology Symposium: Joint meeting between Japan and Netherlands (Utrecht, Netherlands, April 18-21, 2005)
3. 伊東 信(九州大学) Sphingolipid metabolism and signaling on plasma membranes and in lipid microdomains. Satellite Symposium of 18th International Complex Carbohydrate Symposium: Glycobiology of lipid membrane domains. (Siena, Italy, September 10-11, 2005)
4. 平林義雄(理化学研究所) A conditional serine palmitoyl transferase knock-out mouse. Glycolipid & Sphingolipid Biology (Ventura, CA, January 2006)
5. 加藤啓子(大阪府立大学) Involvement of sialylation on mouse epileptogenesis in neurocourse in NC State University (NC August 1st 2006)
6. 平林義雄(理化学研究所) Roles of glycosphingolipid synthesis in brain development and survival. 47th International Conference on the Bioscience of Lipids : ICBL- ELIFE-ILPS Joint Meeting (Pecs, Hungary, September 5-10, 2006)
7. 伊東 信(九州大学) Biological significance of ceramide metabolism in development of nervous and vascular systems in zebrafish. 47th International Conference on the Bioscience of Lipids :ICBL-ELIFE-ILPS Joint Meeting (Pecs, Hungary, September 5-10, 2006)
8. 平林義雄(理化学研究所) Neuron specific knockout mice for sphingolipid biosynthesis. The Second ISN Special Neurochemistry Conference Neural Glycoproteins and Glycolipids (Antigua, December 1-5, 2006)
9. 平林義雄(理化学研究所) Metabolic/Functional coupling between neuron and glia through glucose metabolites. NBNI2007 9th China-India-Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (Jeju, Korea, July 5-7, 2007)
10. 平林義雄(理化学研究所) A New brain glycolipid, phosphatidylglucoside: structure, distribution and biological functions. 48th International Conference on the Bioscience of Lipids. (Turku, Finland, September 4-8, 2007)
11. 平林義雄(理化学研究所) Roles of glucosylated membrane lipids enriched in lipid

rafts. Joint Meeting of 2nd Asian Symposium on Plant Lipids and 20th Japanese Symposium on Plant Lipids. (Tokyo, Japan, November 30–December 2, 2007)

- 1 2. 平林義雄(理化学研究所) “Sphingolipid metabolism and transport” as Discussion Leader. Gordon Research Conference for Sphingolipid and Glycolipid Biology. (Lucca, Italy, February 17–22, 2008)
- 1 3. 伊東 信(九州大学) Novel catabolic pathway of GlcCer involving Klotho-related protein. (Lucca, Italy, February 17–22, 2008)
- 1 4. 伊東 信(九州大学) Novel glycosphingolipid metabolic pathway. Insights into Gaucher disease. Lysosomal Diseases and the Brain Conference 2008.(Sacramento, USA, May29–31,2008)

② 口頭発表 (国内会議 25 件、国際会議 4 件)

(国内)

1. 平林義雄(理化学研究所)ケラチノ細胞特異的セリンパルミトイル転移酵素欠損マウス表皮における脂質異常——HPLC/質量分析による解析、第47回日本脂質生化学会、金沢、(2005.6)
2. 伊東 信(九州大学)、ゼブラフィッシュ初期発生系を用いたスフィンゴ糖脂質代謝酵素の機能解析、第25回日本糖質学会年会、大津、(2005.7)
3. 東秀好、平林義雄(理化学研究所)、コンドロイチン硫酸糖鎖による神経分化に関わるガングリオシド糖鎖シグナル系の活性化、第25回日本糖質学会年会、大津、(2005.7)
4. 平林義雄(理化学研究所)、A newly developed monoclonal antibody, PG1, proves existence of phosphatidylglucoside in the central nervous system、第48回日本神経化学会大会、福岡、(2005.9)
5. 加藤啓子(大阪府立大学)、シアル酸合成系に関わる4種の酵素の成熟マウス海馬における発現、第140回日本獣医学会学術集会、鹿児島、(2005.9)
6. 林康弘、伊東信(九州大学)、Development of a fluorescence-based HPLC assay to determine the activity of acid glucocerebrosidase、平成17年度日本臨床検査医学総会・日本臨床化学会年会連合大会、福岡、(2005.11)
7. 加藤啓子、宮本香苗(大阪府立大学)、てんかん発症関連糖質代謝系分子群の発現と神経機能への影響、文部科学省・特定領域「糖鎖によりたんぱく質と分子複合体の機能調節」 題4回公開シンポジウムプログラム、名古屋、(2006.1)
8. 東秀好、平林義雄(理化学研究所)、細胞膜表面糖鎖受容体を介した糖鎖シグナルによる神経細胞機能の調節、日本薬学会第126年会、仙台、(2006.3)

9. 長塚靖子(理化学研究所)ホスファチジルグルコシドは飽和脂肪酸のみからなる単一分子種として発達期のラット中枢神経系に存在する、第48回日本脂質生化学会、東京、(2006.6)
10. 長塚靖子(理化学研究所)神経系に発現する新しいラフト局在糖脂質の発見、第26回日本糖質学会年会、仙台、(2006.8)
11. 平林義雄(理化学研究所)中枢神経系ホスファチジルグルコシドの構造と機能、第2回スフィンゴセラピー(STC)研究会、米子、(2007.5.18-19)
12. 堀端康博、平林義雄(理化学研究所)新規エタノールアミンホストランスフェラーゼの同定と生化学的解析、第49回日本脂質生化学会、札幌(2007.6.4-7)
13. 篠田陽子(理化学研究所)長塚靖子、伊藤伸也、鍋谷卓司、木下雅美、山崎泰広、平林義雄、神経系細胞分化におけるホスファチジルグルコシドの機能解析、第49回日本脂質生化学会、札幌(2007.6.4-7)
14. 長塚靖子(理化学研究所)Peter Greimel、伊藤幸成、鍋谷卓司、伊藤伸也、平林義雄、ラフトを構成する脳の生理活性脂質ホスファチジルコシドの生合成機構探索、第49回日本脂質生化学会、札幌、(2007.6.4-7)
15. 大嶋恵理子(理化学研究所)大須賀 壮、端川 勉、遠藤昌吾、平林義雄、小脳プルキンエ細胞におけるスフィンゴ脂質生合成の機能解析、第49回日本脂質生化学会、札幌、(2007.6.4-7)
16. 金然正(理化学研究所)大嶋恵理子、平林義雄、新規スフィンゴシン-1-リン酸受容体の同定、第49回日本脂質生化学会、札幌、(2007.6.4-7)
17. 林 康広(九州大学)沖野 望、角田佳充、鹿内俊英、谷 元洋、成松 久、伊東 信 Klotho-related protein を介した新しいスフィンゴ糖脂質代謝経路、第27回日本糖質学会、福岡(2007.8.1-3)
18. Kato K(大阪府立大学)Yamada S, Miyamoto K, Kuwamura M, Okada T, Osuka S, Itohara S, Endo S, Hirabayashi Y、シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)遺伝子欠損マウスにおける神経機能における解析(Analysis of brain function on the adult mouse with ST3Gal IV deficiency). BMB2007、パシフィコ横浜、横浜、(2007.12.11-15)
19. 香山綾子(理化学研究所)ショウジョウバエグルコース応答受容体 BOSS による糖・脂質代謝制御機構の解析、BMB2008、神戸、(2008.12)
20. 加藤啓子(大阪府立大学)鈴木雅和、日下部健、岡田利也、平林義雄 側頭葉てんかんモデル(扁桃体キンドリング)マウスにおけるてんかん発症に関わる成長ホルモンの役割(1PO-048)第56回日本実験動物学会、大宮ソニックホール、(2009.5.14)
21. 平林義雄(理化学研究所)脳内微量成分の質量分析—リン酸化蛋白質と膜脂質、第52回日本神経化学会大会、伊香保、群馬(2009.6)
22. 平林義雄(理化学研究所)脳内グルコースと関連脂質に関する最新の話、第4回スフィンゴセラピー研究会、米子(2009.7)

23. 平林義雄(理化学研究所) Neuron glia interaction mediated by membrane glycolipids in lipid rafts, 第51回日本脂質生化学会、名古屋(2009.7)
24. 加藤啓子(大阪府立大学) てんかん及びうつ病の治療薬スクリーニング法の開発、『大阪府立大学/大阪市立大学 新技術説明会』(独)科学技術振興機構 JSTホール、(2009.7.28)
25. 伊東 信(九州大学) ゼブラフィッシュを用いた糖脂質研究のインパクト、第29回日本糖質学会、高山、(2009.9.9-11)

(国際)

1. 平林義雄(理化学研究所) Generation and characterization of mouse monoclonal antibodies to detergent insoluble membranes isolated from HL60 and PC12 cells. 18th International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-XVIII), (Firenze, Italy, Sep 2005)
2. 伊東信(九州大学) Biological significance of ceramide metabolism in development of nervous and vascular systems in zebrafish. 47th International Conference on the Bioscience of Lipids : ICBL- ELIFE -ILPS Joint Meeting (Pecs, Hungary, September 5-10, 2006)
3. 伊藤伸也、鍋谷卓司、篠田陽子、長塚靖子、平林義雄(理化学研究所) Quantitative analysis of novel phospholipid in rodent brain by nano flow normal phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry. 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (Indianapolis, USA, June 3-7. 2007)
4. 伊東信(九州大学) Novel catabolic pathway of glycosphingolipids involving KLRP. Gordon Research Conference for Sphingolipid and Glycolipid Biology, (Lucca, Italy, February 17-22. 2008)

③ ポスター発表 (国内会議 40 件、国際会議 14 件)

(国内)

1. Oshita Masami, Yamazaki Yasuhiro, Nagatsuka Yasuko, Tohyama Koujiro, Hashikawa Tsutomu, Machida Takeo, Furuya Shigeki, Suzuki Yasuo, Hirabayashi Yoshio. (理化学研究所) “ラジアルグリアをラベルするリピッドラフト認識新抗体PG1” 第28回日本神経科学大会 Neuroscience 2005、横浜、(2005.7)
2. Yoshida Kazuyuki, Furuya Shigeki, Sakai Kazuhisa, Shinoda Yoko, Watanabe Masahiko, Azuma Norihiro, Tanaka Hideyuki, Hashikawa Tsutomu, Hirabayashi Yoshio (理化学研究所) “ヒト PHGDH 欠損症モデルマウスの作成とその解析” 第28回日本神経科学大会 Neuroscience 2005、横浜、(2005.7)
3. 酒井玲美、平林義雄、加藤啓子(大阪府立大学) シアル酸合成系に関わる4種酵素 mRNAs の成熟マウス海馬における発現、文部科学省・特定領域「糖鎖によりたんぱく質と分子複合体の機能調節」平成17年第3回夏期シンポジウム、岐阜、(2005.8)

4. Furuya Shigeki, Yoshida Kazuyuki, Sakai Kazuhisa, Shinoda Yoko, Azuma Norihiro, Hashikawa Tsutomu, Hirabayashi Yoshio. (理化学研究所) Phgdh hypomorphic mice serve as an animal model of human genetic serine deficiency、第 48 回日本神経化学会大会、福岡、(2005.9)
5. Yamazaki Yasuhiro, Nagatsuka Yasuko, Oshima Eriko, Suzuki Yasuo, Hirabayashi Yoshio, Hashikawa Tsutomu (理化学研究所) PR#1, a monoclonal antibody raised against the detergent insoluble membrane/lipid rafts from PC12 cells, promotes neurite outgrowth of PC12 cells、第 48 回日本神経化学会大会、福岡、(2005.9)
6. Yamamoto Naoki, Hirabayashi Yoshio, Amari Masakuni, Yamaguchi Haruyasu, Galina Romanov, William E Nostrand Van, Yanagisawa Katsuhiko (理化学研究所) Assembly of hereditary variant amyloid β -protein in the presence of gangliosides、第 48 回日本神経化学会大会、福岡、(2005.9)
7. Furuya Shigeki, Yoshida Kazuyuki, Sakai Kazuhisa, Shinoda Yoko, Azuma Norihiro, Hashikawa Tsutomu, Hirabayashi Yoshio. (理化学研究所) Phgdh hypomorphic mice serve as an animal model of human genetic serine deficiency、第 48 回日本神経化学会大会、福岡、(2005.9)
8. Tojo Hiromasa, Hirabayashi Yoshio, Osuka Soh (理化学研究所) セラミドデノボ合成はラフトの構造と機能維持に必須である、第 78 回日本生化学会大会、神戸、(2005.10)
9. Yamazaki Yasuhiro, Nagatsuka Yasuko, Oshima Eriko, Suzuki yasuo, Hirabayashi Yoshio, and Hashikawa Tsutomu (理化学研究所) 界面活性剤不溶膜画分(脂質ラフト)を認識するモノクローナル抗体の作製、及びその網羅的解析、第 78 回日本生化学会大会、神戸、(2005.10)
10. Yokoyama, M., Kimura, T., Kaku, H., Takatsu, K., Hirabayashi, Y., and Yanagishita, M. (理化学研究所) B 細胞受容体刺激によるマウス脾臓 B 細胞の生存におけるスフィンゴ脂質代謝の関与、第 78 回日本生化学会大会、神戸、(2005.10)
11. Nagatsuka, Y., Horibata, Y., Yamazaki, Y., Kinoshita, M., Uzawa, J., Hashikawa, T., and Hirabayashi, Y. (理化学研究所) 中枢神経系における活性脂質としてのホスファチジルグルコシド、第 78 回日本生化学会大会、神戸、(2005.10)
12. 林 康広、堀端康博、沖野 望、大野耕策、伊東 信 (九州大学)、HPLC と蛍光基質を用いたスフィンゴ糖脂質代謝酵素の高感度測定法の確立、第 78 回日本生化学会大会、神戸、(2005.10)
13. 林 康広、沖野 望、鹿内俊英、成松 久、伊東 信 (九州大学) Klotho related protein はグルコセレブロシダーゼ活性を有する、第 26 回日本糖質学会年会、仙台、(2006.8)
14. 東秀好、宮城妙子、平林義雄 (理化学研究所) 細胞膜シアリダーゼ Neu3 によるカルシウムシグナル増強とインスリン分泌調整、第 26 回日本糖質学会年会、仙台、(2006.8)
15. 渡辺 俊、大嶋恵理子、金 然正、山下 匡、遠藤昌吾、平林義雄 (理化学研究所) プルキンエ細胞特異的グルコシルセラミド合成酵素欠損マウスの解析。第 27 回日本糖質学会、九州大学百年講堂、福岡、(2007.7.31-8.3)

16. 野村和子、林 康宏、村田大輔、永石貴之、水口惣平、出嶋克史、福嶋宏史、中島紫、川崎ナナ、安藤恵子、三谷昌平、伊東 信、平林義雄、野村一也(理化学研究所)線虫におけるセラミドグルコシル転移酵素の機能解明. 第27回日本糖質学会、九州大学百年講堂、福岡、(2007.7.31-8.3)
17. 加藤啓子、宮本佳苗、桑村 充、岡田利也、大須賀壮、糸原重美、遠藤昌吾、平林義雄(大阪府立大学)神経機能におけるシアル酸転移酵素(ST3Gal IV)遺伝子欠損の影響. 第27回日本糖質学会、九州大学百年講堂、福岡、(2007.7.31-8.3)
18. 加藤啓子(大阪府立大学)In vivo 脳内における薬剤効果の査定方法の開発と応用、BioJapan2007、パシフィコ横浜、横浜、(2007.9.19-21)
19. 座間宏太、吉村征浩、沖野 望、平林義雄、伊東 信 (九州大学)ゼブラフィッシュ初期胚を用いたグルコシルセラミド合成酵素の機能解析、第 80 回 日本生化学会大会/第 30 回 日本分子生物学会年会 BMB2007、パシフィコ横浜、横浜、(2007.12.11-15)
20. 加藤啓子 Yamada S, 宮本佳苗, 桑村 充、岡田利也、大須賀壮、糸原重美、遠藤昌吾、平林義雄(大阪府立大学) シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)遺伝子欠損マウスにおける神経機能における解析(Analysis of brain function on the adult mouse with ST3Gal IV deficiency). BMB2007、パシフィコ横浜、横浜、(2007.12.11-15)
21. 平林義雄(理化学研究所)B細胞受容体刺激によるFas-resistanceにおけるスフィンゴシンキナーゼ2の関与、第 50 回日本脂質生化学会、徳島、(2008,6)
22. 加藤啓子(大阪府立大学)慢性神経疾患モデルマウスを用いた生体リズム評価システムの構築、Biological rhythm evaluation system with chronic neurological disease model mice、平成 20 年度 第 7 回国際バイオフォーラム、東京ビッグサイト、(2008.7.4.)
23. Kato K., Kanno H., and Hirabayashi Y. (大阪府立大学)扁桃体キンドリングマウスでのんかん発作誘導時における成長ホルモンの関与 Role of growth hormone on epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy、第 31 回日本神経科学大会 Neuroscience2008、東京、(2008.7.9-11)
24. 平林義雄(理化学研究所) Lack of spontaneous activity of cerebellar purkinje cells in ST3Gal IV KO mice、第 31 回日本神経科学大会 Neuroscience2008、東京、(2008.7.9-11)
25. 平林義雄(理化学研究所)ホスファチジルグルコシド・ラフトは EGF 受容体を動員してアストログリア分化を促進する、第 31 回日本神経科学大会 Neuroscience2008、東京、(2008.7.9-11)
26. 平林義雄(理化学研究所)、加藤啓子(大阪府立大学) α 2,3-sialyltransferase(ST3Gal IV) 欠損マウスの大脳辺縁系における機能障害、第 31 回日本神経科学大会 Neuroscience2008、東京、(2008.7.9-11)
27. 平林義雄(理化学研究所)亜鉛欠乏による脳内グルコシルセラミド合成酵素(GlcT-1)発現への影響、第 28 回日本糖質学会年会、つくば、(2008.8)

28. 座間宏太(九州大学)グルコシルセラミド, ガラクトシルセラミド及び関連スフィンゴ質高感度定量法の開発、第 28 回日本糖質学会年会、つくば、(2008.8)
29. 加藤啓子(大阪府立大学)シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)遺伝子欠損が与える中枢への影響について、第 28 回日本糖質学会年会、つくば、(2008.8)
30. 大嶋恵理子(理化学研究所)軸索の形態維持とミエリン形成における、軸索側スフィンゴ糖脂質の機能、BMB2008、神戸、(2008.12)
31. 鍋谷卓司(理化学研究所)Zn(II)-IMAC/C18 チップおよび ZIC-HILIC を用いたリン酸化プロテオーム解析、BMB2008、神戸、(2008.12)
32. 佐野孝光(理化学研究所)GPCR5B, GPCR5C 受容体の組織局在の解析、BMB2008、神戸、(2008.12)
33. 長塚靖子(理化学研究所)哺乳動物細胞におけるホスファチジルグルコシド (PtdGlc) 生合成機構の検索、BMB2008、神戸、(2008.12)
34. 金 然正(理化学研究所) Lysophosphatidylcholine modulates stress-induced apoptosis via GPCR5B、BMB2008、神戸、(2008.12)
35. 沖野 望、井上豪、角田佳充、土方敦司、岡野浩幸、上林浩二、合田初美、谷 元洋、末吉紀行、伊東 信 (九州大学) 緑膿菌由来の中性セラミダーゼの X 線結晶構造解析と反応機構の解明、BMB2008、神戸、(2008.12)
36. 座間宏太、吉村征浩、沖野 望、平林義雄、伊東 信 (九州大学)ゼブラフィッシュ脊索におけるグルコシルセラミド合成酵素の発現と機能解析、BMB2008、神戸、(2008.12)
37. 加藤啓子、山田茂子、日下部健、岡田利也、遠藤昌吾、平林義雄(大阪府立大学)、シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)遺伝子欠損が与える中枢への影響について、第 147 回日本獣医学会、栃木、(2009.4.2.)
38. 野村和子、村田大輔、宮崎清香、出嶋克史、水口惣平、安藤恵子、三谷昌平、林康広、伊東信、平林義雄、野村一也(九州大学、理化学研究所)線虫におけるセラミドグルコシル転移酵素の機能解明、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、(2009.12.)
39. 渡辺俊、遠藤昌吾、大嶋恵理子、東秀好、遠山稿二郎、山下匡、平林義雄(理化学研究所)軸索の維持とミエリン形成における軸索スフィンゴ糖脂質合成の機能、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、(2009.12.)
40. 香山綾子、三浦正幸、平林義雄(理化学研究所) Control of Fat Storage by Glucosylceramide synthetase(GlcT-1)、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、(2009.12.)

(国際)

1. Nomura K, Mizuguchi S, Dejima K, Nagaishi T, Matsuishi Y, Kawasaki N,

- Gengyo-Ando K, Mitni S, Hirabayashi Y, Nomura K. (理化学研究所) Analyzing glycome-related gene expression with two dimensional in-gel electrophoresis (2-dige). 18th International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-XVIII), (Firenze, Italy, Sep 2005)
2. Dejima K, Seko A, Nomura K, Mizuguchi S, Gengyo-Ando K, Hirabayashi Y, Mitani S, Yamashita K, Nomura K. (理化学研究所) Functional analysis of the genes required for sulfation of glycoconjugates in *C.elegans*. 18th International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-XVIII),(Firenze, Italy, Sep 2005)
 3. Zama Kota, Sato Sayaka, Yoshimura Yukihiro, Hayashi Yasuhiro, Sakaguchi Keishi, Okino Nozomu, Hirabayashi Yoshio, Ito Makoto (九州大学) Development of the neural tube requires synthesis of glucosylceramide by GlcT-1 in zebrafish embryogenesis. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, Japan, Jun18-23, 2006)
 4. Nagatsuka Yasuko, Horibata Yasuhiro, Yamazaki Yasuhiro, Kinoshita Masami, Kim Yeon-Jeong, Shinoda Yoko, Hashikawa Tsutomu, Koshino Hiroyuki, Nakamura Takemichi, Hirabayashi Yoshio(理化学研究所) Phosphatidylglucoside with unique fatty acyl chains in murine central nervous system. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, Japan, Jun18-23, 2006)
 5. Nomura Kazuko, Murata Daisuke, Mizuguchi Souhei, Dejima Katsufumi, Nagaishi Takayuki, Mihara Hiroyuki, Gengyo-Ando Keiko, Mitani Shohei, Hirabayashi Yoshio, Nomura Kazuya (理化学研究所) Analyzing serine palmitoyl transferase in the nematode *C.elegans*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, Japan, Jun18-23, 2006)
 6. Miyamoto Kanae, Hirabayashi Yoshio, Osuka Soh, Kuwamura Mitsuru, Okada Toshiya, Endo Shogo, Itohara Shigeyoshi, Ikeda Toshio, Kato Keiko (大阪府立大学) The effect of Siat 4c deficiency on brain function of the adult mouse. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, Japan, Jun18-23, 2006)
 7. Sekino Shinji, Hirabayashi Yoshio, Yoshida Kazuyuki, Okada Toshiya, Kato Keiko (大阪府立大学) Differential expression of mRNAs for molecules related with glycosylation in a mouse model of temporal lobe epilepsy. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, Japan, Jun18-23, 2006)
 8. Kohyama-Koganeya Ayako, Aonuma Hiroka, Miura Masayuki, Watanabe Shun, Hirabayashi Yoshio (理化学研究所) Roles of glycosphingolipids in drosophila TNF- α (Eiger)induced cell death pathway. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, Japan, Jun18-23, 2006)
 9. Chisada, Y.Yoshimura, H. Uchima, K. Ogura, T. Tai, N. Okino, M. Ito(九州大学) Molecular cloning and characterization of the novel α 2,3-Sialyltransferase (GM4

synthase) from zebrafish: Insights into the glycosphingolipid receptor for fish vibriosis. 19th International Glycoconjugate Symposium, Cairns, Queensland, Australia (July 15-20,2007)

10. Yasuhiro Hayashi, Nozomu Okino, Yoshimitsu Kakuta, Toshihide Shikanai, Motohiro Tani, Hisashi Narimatsu, Makoto Ito. (九州大学) A novel catabolic pathway of glycosphingolipids mediated with a Kltho-related protein. 48th International Conference on the Bioscience of Lipids. Turku, Finland, (2007.9.3-9)
11. 平林義雄(理化学研究所) Lipid raft enriched with phosphatidylglucoside regulates astroglialogenesis in developing rodent brain. The 9th International Congress on Cell Biology (ICCB2008), Seoul Korea, Oct 7-10(2008)
12. 香山綾子(理化学研究所) A Drosophila orphan GPCR receptor BOSS is required for maintenance of sugar and lipid homeostasis. The 9th International Congress on Cell Biology (ICCB2008), Seoul Korea, Oct 7-10(2008)
13. 長塚靖子(理化学研究所) Roles of lipid microdomains enriched in novel glycolipid, phosphatidylglucoside in the central nervous systems. 50th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL2009) Regensburg, Germany, September 1-5(2009)
14. 平林義雄、香山綾子(理化学研究所) Gordon Research Conference “Glycolipid & Shingolipid Biology” Ventura, CA, USA, February 7-12 (2010)

(4) 知財出願

① 国内出願 (5件=公開4件+非公開1件)

1. 発明の名称: 生理活性を有する糖脂質
発明者: 長塚靖子、平林義雄
出願人: 独立行政法人 理化学研究所
出願日: H17.12.12.
出願番号: 特願 2005-357651
2. 発明の名称: G蛋白質共役型受容体およびそのリガンドの新規用途
発明者: 東 秀好、香山綾子、平林義雄
出願人: 独立行政法人 理化学研究所
出願日: H18.3.31.
出願番号: 特願 2006-101057
3. 発明の名称: てんかんの診断、処置または予防用組成物
発明者: 加藤啓子、平林義雄
出願人: 公立大学法人 大阪府立大学
独立行政法人 理化学研究所
出願日: H20.1.18.
出願番号: 特願 2008-9479

4. 発明の名称: α 2、3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV) 欠陥非ヒト動物およびそれを用いたスクリーニング方法
発明者: 加藤啓子、平林義雄、遠藤昌吾
出願人: 公立大学法人 大阪府立大学
出願日: H20.2.2.
出願番号: 特願 2008-23135

②海外出願 (1件)

1. 発明の名称: G蛋白質共役型受容体およびそのリガンドの新規用途
発明者: 東 秀好、香山綾子、平林義雄
出願人: 独立行政法人 理化学研究所
出願日: 2007/3/30
出願番号: PTC/JP2007/057185
出願国: アメリカ

③その他の知的財産権
該当なし

(5) 受賞・報道等

①受賞

- ・(財)てんかん治療研究振興財団 平成18年度銅賞: てんかん発症機構に関わる分子基盤の構築(大阪府立大学)
- ・第26回日本糖質学会ポスター賞受賞: 林 康広、沖野 望、鹿内俊英、成松 久、伊東 信 (九州大学) Klotho related protein はグルコセレブロシダーゼ活性を有する (2006)
- ・国際脂質学会最優秀ポスター賞: Y. Hayashi, N. Okino, Y. Kakuta, T. Shikanai, M. Tani, H. Narimatsu, M. Ito (九州大学) A novel catabolic pathway of glycosphingolipids mediated with a Kltho-related protein. (Turku, Finland, September 4-8, 2007)
- ・Excellent Poster 賞: 香山綾子(理化学研究所) A Drosophila orphan GPCR receptor BOSS is required for maintenance of sugar and lipid homeostasis. (ICCB2008, Seoul Korea, Oct 7-10 2008)

②マスコミ (新聞・TV等) 報道

- ・BOSS に関する PNAS USA (2008) の論文は、*Faculty of 1000 Biology* (Prof. Ross Cagon, Mount Sinai School of Medicine) および *Science Signaling* (14 October 2008 Vol. 1, Prof. Bryan Ray) により、注目論文として紹介された。
- ・日本経済新聞、セラミド分解酵素の構造解明、2009年2月

③その他

該当なし

(6) 成果展開事例

① 実用化に向けての展開

< 公開可能なもの >

- ・ シーズ発掘試験研究事業に採択され、現在実施中。課題名「リズム調節障害治療薬スクリーニング法の開発」平成 21 年度(大阪府立大学)

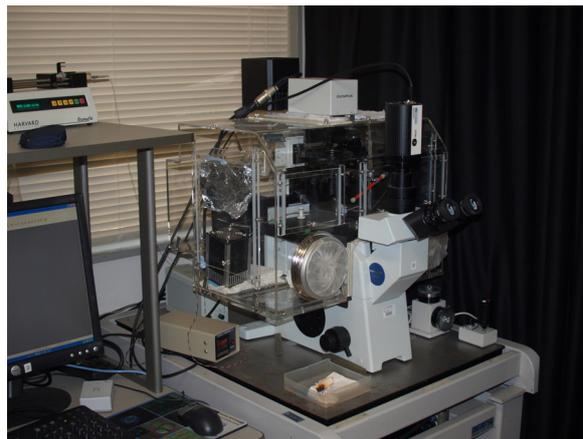
§ 6 研究期間中の主な活動 (ワークショップ・シンポジウム等)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H17.6.9.	ナドメイン生物学ワークショップ 05 「発展する新たな生命膜情報科学」	日本薬学 長井記念 ホール、 東京	197	糖鎖 (タンパク)・脂質は、生体膜上で機能的マイクロドメインを形成し、多細胞生命体の成立と維持に関わるシグナルの時間的・空間的制御や細胞間認識に重要な役割を演じていることが示されてきている。特に、ラフト理論とよばれる新たな膜モデルの提唱が契機となって、糖鎖やスフィンゴ脂質を含めた膜脂質の機能を対象とした研究がにわかに活発化している。最近のラフト研究によれば、そのサイズはせいぜい数十ナノメートルであり、ラフト (マイクロドメイン) の理解・応用には、ナノスケールの観測技術や合成化学の発展が不可欠であることが分かってきた。この様な現状を踏まえ本シンポジウムでは、直接、あるいは間接的にラフト研究に関わる第一線の研究者を集め、次世代生物学研究の発展と可能性を議論する。
H19.8.1-3	第 27 回日本糖質学会年会	福岡	650	特別講演 2、シンポジウム 2、 一般講演 65、ポスター発表 203

§ 7 結び

5 年前に立てた当初の研究計画は、具体性にやや欠けていたと思っている。しかし、グルコースという単純・平凡ではあるが生命維持 (特に脳組織) に必須の単糖を基本としたグライコバイオロジー (糖生物学) 研究を主とした計画戦略は、間違っていなかったと確信している。実際、モデル動物を駆使して、グルコシルセラミドの個体レベルでの新たな機能、新しいグルコース脂質であるホスファチジルグルコシドの構造と機能に関し、世界に例のない独自の研究を展開することができた。研究途中で、エネルギーの代謝ホメオスタシス維持とセンシングに関わる膜糖タンパク質 Boss を発見できたのも、グルコースという合い言葉 (キーワード) で、研究を牽引してきたからである。この新しい 7 回膜貫通型糖タンパク質は、機能的にも進化の過程で保存されていると考えおり、神経高次機能における役割など、過去に例のない新しい研究展開が可能であると信じている。

研究費の使い方に関して言えば、単年度決算ではなく、2～3年程度の複数年で自由に采配できる制度設計をお願いしたい。特に、質量分析計などの高額な器機が必要となるプロジェクトでは、この制度があれば、より効率的で無駄を排した研究費の使い方が可能になると思う。ただし、実際には、進行状況や成果に応じて補正予算的性格の研究費が配布され、大いに助けてもらったので、有りがたく思っている。クレストが採択されたことは、所属している研究所からも高く評価され、研究遂行のために多くの便宜を図っていただいた。クレストの研究資金だけではなく、理化学研究所内の多くの方々のサポートや共同研究無くして、本研究成果を成し遂げることは不可能であったことを申し添えておきたい。



神経軸索のターニングアッセイ装置