

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成 16 年度採択研究代表者

平林 義雄

((独) 理化学研究所脳科学総合研究センター平林研究ユニット ユニットリーダー)

「糖修飾システムによる神経機能の発現・制御」

1. 研究実施の概要

脳は、ニューロンとグリア細胞により構成されており、両者の細胞間相互作用により、脳の形態形成、ネットワーク構築、高次機能の獲得と維持が可能となっている。平林チームは、発達期の放射状グリア細胞表面に発現する新しいグルコース化リン糖脂質、ホスファチジルグルコシド (PtdGlc) を発見した。PtdGlc は、C18:0 と C20:0 の飽和脂肪酸のみで構成されている点で、他の膜脂質には見られないユニークな構造を有していた。また、その代謝産物であるリゾ体糖脂質が神経細胞成長円錐の移動に関し強力な反発因子活性を有しており、軸索移動に関わる新しいグリア由来生理活性糖脂質の存在が初めて示された。今後、リゾ体糖脂質の受容体の同定 (恐らく G 蛋白質結合 7 回膜貫通型受容体 (GPCR) タイプ) が重要である。一方、主要な生体膜糖脂質であるスフィンゴ糖脂質合成の鍵を握るグルコシルセラミド (GlcCer) 合成酵素の生理機能をマウス、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュの各モデル動物を使って解析するシステムを構築したので、今後の研究展開が期待された。又、伊東らは GlcCer を加水分解する全く新しいタイプの中性グルコセレブロンダーゼ遺伝子の同定・結晶構造解析に成功した。その機能解明が期待される。

2. 研究実施内容

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。ヒトを含めた哺乳動物細胞膜のラフトには、スフィンゴ糖脂質以外にも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グルコース化糖脂質が存在している。HL60 細胞より調製したラフトを免疫源として、PtdGlc を特異的に認識する単クローン抗体 (DIM21) を確立した。その抗体による免疫染色の結果、発達期の放射状グリアに時期特異的に PtdGlc が発現していることを見いだすとともに、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。PtdGlc はアストログリアへの分化に関わり、またそのホスホリパーゼ A2 消化産物リゾ

PtdGlc は神経軸索先端の成長円錐に作用してその伸長方向をコントロールしていることを見いだした。

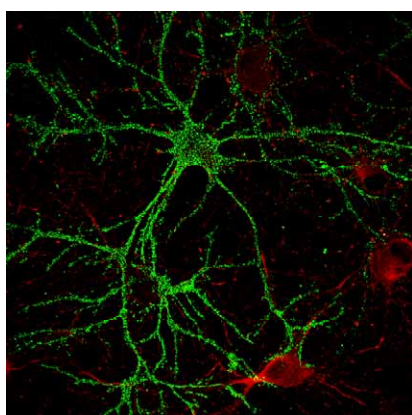
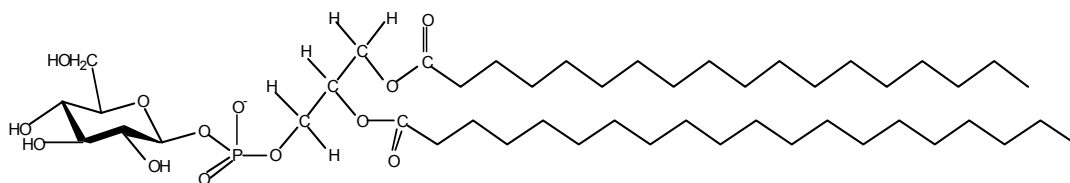


図 ホスファチジルグルコシドの化学構造（上）および DIM21 抗体によるアストログリア細胞染色。ホスファチジルグルコシドを特異的に認識する DIM21 抗体は、GFAP 陽性のアストログリア細胞表面でドット状に反応する（緑色）。同時に存在するニューロン（赤色）とは全く反応しない。

伊東らは、新しい中性グルコシルセラミド分解酵素、KLrP が様々な動物細胞の細胞質に存在することを見いだした。KLrP を過剰発現した細胞は、NBD-GlcCer および天然 GlcCer の分解活性が顕著に増大した。大腸菌で活性型 LrP を大量発現・精製し KLrP とグルコースとの共結晶を得た。1.6 Å での X 線解析を行ったところ、本酵素はベーターストランドとアルファヘリックスを 8 回交互に繰り返した TIM barrel 構造を示し、ベーターストランド 4 と 7 上にあるグルタミン酸 165 と 373 がそれぞれ酸/塩基触媒残基、求核残基として機能することが明らかとなった。

加藤らは、脳のグルコース代謝産物から合成されてくるシアル酸と神経可塑性の関連を解析する目的で、シアル酸転移酵素 STGalIV のノックアウトを作成した。得られたマウスは、海馬歯状回におけるアストログリアの増殖、大脳皮質帯状回における神経細胞の萎縮、更に小脳の層構造異常を示していた。ノックアウトマウスの行動異常・生理学的見地からの解析を行い、特徴的な変化を認めた。

3. 研究実施体制

(1)「平林」グループ

①研究者名

平林 義雄((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 ユニットリーダー)

②研究項目

- ・脳グルコースとグルコース関連糖脂質による細胞間シグナリング

(2)「伊東」グループ

①研究者名

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)

②研究項目

- ・グルコシルセラミド代謝マシーナリーの生物機能の解明

(3)「加藤」グループ

①研究者名

加藤 啓子(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科(旧農学生命科学研究科)獣医学専攻 助教授)

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Matrosovich M, Suzuki T, Hirabayashi Y, Garten W, Webster R, Klenk H. Gangliosides are not essential for influenza virus infection. *Glycoconjugate Journal*. **23**, 107-113 (2006)
- Kawano-Yamamoto C, Muroi K, Nagatsuka Y, Higuchi M, Kikuchi S, Nagai T, Hakomori S, Ozawa K. Establishment and characterization of a new erythroblastic leukemia cell line, EEB:phosphatidylglucoside-mediated erythroid differentiation and apoptosis. *Leukemia Research*. **30**, 829-839 (2006)
- Nagatsuka Y, Horibata Y, Yamazaki Y, Kinoshita M, Shinoda Y, Hashikawa T, Koshino H, Nakamura T, Hirabayashi Y. Phosphatidylglucoside exists as a single molecular species with saturated fatty acyl chains in developing astroglial membranes. *Biochemistry*. **45 (29)**, 8742-8750 (2006)
- Horibata Y, Hirabayashi Y. Identification and characterization of human ethanolaminephosphotransferase1. *Journal of Lipid Research*. **48 (3)**, 503-508 (2006)
- Sasaki N, Yoshida H, Fuwa TJ, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Hirabayashi Y, Ishida H, Ueda R, Nishihara S. Drosophila β 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-A synthesizes the LacdiNAc structures on several glycoproteins and glycosphingolipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **354**, 522-527 (2007)

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:2 件)