

「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

中枢神経系組織に特異的に存在する新たな糖脂質、ホスファチジルグルコシドは、新しい放射状グリアの細胞表面マーカー分子であることを見出している。この新規糖脂質の代謝産物であるリゾ体は、強力な神経ガイダンス活性を有していることを発見したので、*in vitro*での神経機能のメカニズム解析を進める。特に、特異的受容体の探索を進める。一方、グルコシルセラミド合成の個体レベルでの機能を、マウス、ショウジョウバエを使い解析する。一部は、伊東らのゼブラフィシュの系でスフィンゴ脂質機能を解析する。最近、体内中のグルコースおよびエネルギーホメオスタシスに関わる新しい GPCR 受容体タンパクの存在を見出した。この受容体タンパクに遺伝子は生物間で保存されている。そこで、モデル動物としてショウジョウバエを使い、細胞外グルコースのセンシング機構と細胞間・臓器間の代謝ネットワーク機構を解明する。

2. 研究実施内容

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) 神経系の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。ショウジョウバエと哺乳類間では、スフィンゴ糖脂質の合成・分解に関与する酵素の多くは保存されている。GlcT-1 欠損ショウジョウバエはマウス同様に発生初期に致死であり、特に神経系での細胞死が多く認められた。また、Eiger (TNF ファミリーに属する)による神経細胞死誘導を GlcT-1 が顕著に抑制することを見出している。昨年度は GlcT-1 が Eiger 分子の細胞内プロセッシング過程を制御している事を見出した。さらに哺乳類も同様に、GlcT-1 が TNF ファミリー分子(EDA)のプロセッシング(膜結合型から分泌型への変換)に関わっており、この事が GlcT-1 による細胞死抑制活性の本体であると考えられた。今年度は、遺伝学的、及び分子生物学的手法を用いて、Eiger を含めた TNF ファミリータンパク分子のプロセッシングの GlcT-1 による制御に関わる因子の同定を目指す。また、昨年度、脳の特定領域(小脳プルキンエ細胞)の GlcT-1 ノックアウトマウスを作製することに成功したので、本年度はこのマウスの表現系を解析し、哺乳類の脳におけるスフィンゴ糖脂質の機能を探る。ショウジョウバエを用いた遺伝学的なデータを哺乳類にフィードバックし、双方向の研究を実施することにより、スフィンゴ糖脂質合成の神経系のみならず、生体における種を超えた生理機能を提示する。また、*in vitro* での GlcCer 分解活性と X 線結晶構造解析により Kltho-related protein (KLrP) が新奇 GlcCer 分解酵素であることを明らかにしてきた。本年度は、細胞レベルにおける KLrP のスフィンゴ糖脂質代謝における役割、線虫 *C. elegans* における KLrP ホモログの単離と個体レベルでの機能解析を試みた(伊東)。

2) 神経系新規グルコース化脂質の生理機能と生合成

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。昨年度、新たに確立した単クローン抗体(DIM21)を使うことにより、それが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出し、その完全構造決定に成功した。また PtdGlc の代謝産物であるリゾ体化合物は、微量で神経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出した。今後は、リゾ体糖脂質の特異的受容体と予想される GPCR の同定を進めるとともに、PtdGlc の生合成経路の解明を進める。PtdGlc は、成体マウス脳の神経幹細胞と考えられる細胞表面に発現している。又、神経再生時には再び発現してくるので、PtdGlc に関する基礎研究は、神経再生治療の新たな手段を提供すると期待される。

3) 側頭葉てんかんモデルとしてのシアル酸転移酵素(ST3Gal IV)のノックアウトマウス

本モデルマウスは、海馬歯状回におけるアストロサイトの増殖、大脳皮質帯状回における神経細胞の萎縮、さらには小脳の層構造異常を示していた。情動学習の中枢である扁桃体に関与する行動実験を中心に試みたところ、オープンフィールドテストや恐怖条件付けテストで大きな変化

が示され、更に、睡眠に対する影響も見られた。本マウスが感情障害及び睡眠障害を示すモデルであることを提唱した。

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)

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)

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

(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・獣医学専攻)

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)

- Horibata Y, Nagatsuka Y, Greimel P, Ito Y, Hirabayashi Y. Sensitivity of phosphatidylglucoside against phospholipases. *Anal Biochem.* **365**, 149-151 (2007).
- Y. Hayashi, N. Okino, Y. Kakuta, T. Shikanai, M. Tani, H. Narimatsu, M. Ito. Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral β -glucosylceramidase. *J Biol Chem.* **282(42)**, 30889-30900 (2007).
- Yamazaki Y, Horibata Y, Nagatsuka Y, Hirabayashi Y, Hashikawa T.
Fucoganglioside α -fucosyl (α -galactosyl)-GM1: a novel member of lipid membrane microdomain components involved in PC12 cell neuritogenesis. *The Biochemical Journal.* **407(1)**, 31-40 (2007).
- Furuya S, Yoshida K, Kawakami Y, Yang JH, Sayano T, Azuma N, Tanaka H, Kuhara S, Hirabayashi Y. Inactivation of the 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene in mice:

changes in gene expression and associated regulatory networks resulting from serine deficiency. *Functional & Integrative Genomics*. (2008), in press.

- Ito s, Nabetani T, Shinoda Y, Nagatsuka Y, Hirabayashi Y. Quantitative analysis of a novel glucosylated phospholipid by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*. (2008),
in press.

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:2 件 (CREST 研究期間累積件数:4 件)