

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番 -	※ -	第
----------	--------	---

氏 名 森 愛 理

論 文 題 目

ポリシアル酸修飾された神経細胞接着分子の構造と
新たな構造制御機構の解明

論文審査担当者

主 査	名 古 屋 大 学 教 授	佐 藤 ち ひ ろ
委 員	名 古 屋 大 学 教 授	北 島 健
委 員	名 古 屋 大 学 教 授	中 野 秀 雄
委 員	名 古 屋 大 学 教 授	岡 島 徹 也
委 員	名 古 屋 大 学 助 教	呉 迪

論文審査の結果の要旨

神経細胞接着分子 (NCAM) は神経細胞に局在し、それ同士のホモフィリックな相互作用やその他の接着分子や受容体とヘテロフィリックな相互作用をすることで、神経機能の制御に深く関わっている。また、NCAM は脳において主要なポリシアル酸 (polySia) の担体タンパク質である。ポリシアル酸は酸性 9 炭糖であるシアル酸の重合体で、その重合度は 8~400 に及ぶ。ポリシアル酸修飾は胎児脳と、成人脳では神経新生が起り高い可塑性が維持されている海馬、嗅球などで起こる。脳内における polySia-NCAM の機能は大きな排除体積による反接着機能と分子保持機能により正常な神経回路の形成や神経発生を可能にすると考えられている。これらの機能を持つ polySia は、ポリシアル酸転移酵素 (polyST) である STX と PST によって制御されている。STX と PST は単独でポリシアル酸の伸長が可能ではあるが、STX と PST が共存する場合には、相加的ではなく協調的に作用することも知られている。またそれぞれの polyST を欠損させたマウスの解析が行われており、STX 欠損マウスと PST 欠損マウスでは表現型が異なることが報告されている。しかしながら表現型が異なるメカニズムについては明らかにされていない。また近年、様々な精神疾患と polySia-NCAM の不全との関係性が報告されており、その生合成遺伝子の変異体解析により、疾患患者の変異体酵素では polySia の構造と機能が損なわれていることが明らかになり、polySia の量と質の制御が正常な脳機能に重要であることが考えられている。しかし、その重要性が示唆されながらも、詳細な polySia-NCAM の構造とその構造制御機構に関しては未だ不明な点が多い。さらに、polySia-NCAM が持つ構造と polySia-NCAM の機能との関係性についても明らかにされていない。そこで本論文では、発達段階における polySia-NCAM と polyST によって生合成された polySia-NCAM に着目し、その構造と機能の関係を明らかにすることを目的としている。

2 章では polySia-NCAM の構造的な特徴、すなわち質を評価する新たな方法として、SDS-PAGE/Native-PAGE (S/N) MAP 法を確立した。S/N MAP 法は新規な解析法であり、抗ポリシアル酸抗体を用いた SDS-PAGE/western blotting (WB) 解析と Native-PAGE/WB 解析を用いて、簡便に polySia-NCAM の質を分類することができる。S/N MAP 法によって、胎児脳と成体脳における polySia-NCAM には質の違いが存在することが示唆された。そこで 3 章では S/N MAP 法で示唆された構造の違いを具体的に明らかにするため、構造解析を行ったところ、成体脳の polySia-NCAM には、胎児脳の polySia-NCAM には見いだされなかった大きな負電荷に寄与する構造が存在していること、その構造は硫酸基であることが示唆された。そこで硫酸化グリコサミノグリカンとその硫酸基転移酵素に着目し解析を行った結果、ケラタン硫酸 (KS) に硫酸基を転移する酵素 KSGal6ST の遺伝子欠損マウスにおいて、有意な polySia 構造の増加が見出された。そこで 4 章では KSGal6ST は NCAM 上の polySia 構造を減少させる機構に関与するという仮説を立証するための実験を行い、新しい

polySia 構造制御機構の存在を立証するに至った。加えて実際のマウス脳において、NCAM 上の KS 修飾の解析を詳細に行った。その結果、従来、主なアイソフォームとして知られている NCAM-180, NCAM-140 の他に、新規のアイソフォームである NCAM-100 と NCAM-80 が見出された。特に重合度 11 以上の長いポリシアル酸は NCAM-140 に存在しているが、重合度 5-10 の短いポリシアル酸は NCAM-100 に伸長しており、さらに NCAM-100 には *N*型糖鎖上に伸長する KS 鎖が存在していた。NCAM-80 にはポリシアル酸鎖は存在せず、*O*型糖鎖上に KS 鎖が伸長していた。このような KS 鎖をもつ NCAM-100 と NCAM-80 は成体脳において発現が高く、KSGal6ST が出生後に発現が増加することと一致していた。以上のことから、KSGal6ST による新たな polySia-NCAM の構造制御が存在し、発達段階で変化する polySia-NCAM の構造制御において重要であることが示唆される。最後に 6 章では、polyST によって制御された polySia-NCAM の詳細な構造の解析と機能の解析を行った。STX (WT) , PST, STX (SNP-7:疾患型) , STX (WT) -PST および STX (SNP-7) -PST のそれぞれが生合成した polySia-NCAM を用いそれぞれが生合成した polySia-NCAM 構造を解析したところ、重合度にはほとんど差がみられなかったが、シアル酸の結合様式が異なることが見出された。さらに機能解析では、STX (WT) の生合成した polySia-NCAM は反接着機能と分子保持機能という異なる 2 つの機能を獲得しているのに対し、PST は分子保持機能のみを獲得していることが明らかになった。すなわち、STX (WT) と PST はお互いに干渉し合い、特定の機能を発揮できるように、適切な polySia-NCAM 構造を生合成することが示唆された。

以上の結果より、森愛理は polySia の新規な構造解析法を確立し、その方法を用いて、新たな polySia 構造の生合成制御メカニズムの存在を証明しそれがケラタン硫酸構造であることを明らかにした。また、異なるポリシアル酸転移酵素が、異なるポリシアル酸構造を生合成し、それが異なる機能を発揮していることを明らかにした。本研究は、polySia の構造と機能の精緻な制御機構の一端を明らかし、今まで解析が困難だった精神疾患の分子レベルでの新たな診断方法の開発の実現が期待されるため、基礎および応用科学における今後の展開に高いポテンシャルをもつ。したがって、審査委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。