

主論文の要旨

**Requirement of keratan sulfate proteoglycan  
phosphacan with a specific sulfation pattern  
for critical period plasticity in the visual cortex**

特定の硫酸化パターンをもつケラタン硫酸プロテオグリカン  
ホスファカンの大脳視覚野臨界期における必要性

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻

生物化学講座 分子生物学分野

(指導：門松 健治 教授)

内村 佳子

## 【諸言】

ケラタン硫酸 (KS) は N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とガラクトースの二糖が繰り返して連なった構造をもつグリコサミノグリカン糖鎖の一つである。KS 内部構造には硫酸化パターンの違いが観察される。KS はプロテオグリカンのコアタンパク質に共有結合し、主に細胞表面および細胞外マトリックスに存在する。今までの研究によりコンドロイチン硫酸の硫酸化パターンがマウス脳で経験依存的神経可塑性の制御に関わっていることが明らかとなっている。一方、KS の神経可塑性における役割は未だ明らかにされていない。本研究の目的は中枢神経系において KS の発現を制御する GlcNAc-6-O-硫酸転移酵素 1 (GlcNAc6ST1) の遺伝子欠損 (KO) マウスを用い、経験依存的神経可塑性のモデルである眼優位性可塑性およびそのメカニズムである神経シナプスの可塑性における KS の役割を明らかにすることである。

## 【方法】

GlcNAc の 6 位が硫酸化された KS を特異的に認識する抗体 R10G を用い、マウス大脳視覚野における KS の発現局在を免疫組織染色および電子顕微鏡観察によって解析した。また KS の発現をウエスタンブロットングで確認した。抗ホスファカン抗体および R10G 抗体を用いた免疫沈降および免疫組織染色を行い、KS がホスファカンの糖鎖として存在することを確認した。野生型および GlcNAc6ST1 KO マウスにおいて片眼遮蔽を 6 日間行った後、視覚誘発電位を測定し眼優位性可塑性を検討した。また T 型カルシウムチャンネル依存的長期増強 (T-LTP) を KO マウス臨界期の脳の切片標本で調べた。

## 【結果】

野生型マウスの臨界期大脳皮質視覚野において R10G 抗体で認識される KS は興奮性および抑制性神経細胞の細胞体周囲および後シナプスの周りに局在することが明らかとなった (図 1)。GlcNAc6ST1 KO マウスの臨界期大脳皮質視覚野において、KS の発現が野生型マウスに比べて 50% 減少することをウエスタンブロットングおよび免疫組織染色において確認した (図 2)。また KS がホスファカンの糖側鎖であることを示した (図 3)。野生型マウスの大脳皮質視覚野両眼視領域では両眼からの視覚入力があるが対側からの入力への反応性が優勢である。臨界期のマウスにおいて、一定期間片眼遮蔽をすると優位性が変わることが知られている。臨界期マウスを 6 日間片眼遮蔽し、両眼視領域での視覚誘発電位を測定した。野生型および GlcNAc6ST1 KO マウスともに遮蔽眼刺激により誘発される電位は減少していた。一方、野生型マウスでは非遮蔽眼刺激により誘発される電位は増大したが、KO マウスにおいては増大が観察されなかった (図 4)。大脳皮質視覚野において低頻度刺激により誘発される興奮性シナプス伝達の LTP には T 型カルシウムチャンネルの活性化が必要であり、この T-LTP が非遮蔽眼反応の増大に関与していることが示されている。そこで、視覚野切片標本において T-LTP を測定した。野生型で観察される T-LTP が GlcNAc6ST1 KO マウスでは観察されないことが明らかとなった (図 5)。また、脳切片を KS 分解酵素ケラターナーゼまたは

抗ホスファカン抗体で処理すると T-LTP が観察されなかった。GlcNAc6ST1 KO マウスに TNF alpha を加えると T-LTP が回復することが明らかとなった (図 5)。

## 【考察】

### GlcNAc-6-硫酸化 KS の発現とその局在について

マウス大脳皮質視覚野において、臨界期には R10G 抗体で認識される GlcNAc-6-硫酸化 KS が発現していることがわかった。GlcNAc-6-, Gal-6-高硫酸化 KS はこの時期はほとんど発現していないことから、臨界期において特定の硫酸化パターンをもつ KS が存在することが示された。GlcNAc-6-硫酸化 KS は興奮性神経細胞及びペリニューロナルネットを持つ抑制性神経細胞の周囲に確認され、KS が様々なタイプの神経細胞を制御している可能性が考えられた。GlcNAc-6-硫酸化 KS はホスファカンの糖鎖であることがわかった。大脳皮質 2/3 層の樹上突起上に R10G 認識 KS が局在していることから、錐体細胞が GlcNAc-6-硫酸化 KS ホスファカンを発現していると考えられた。

### GlcNAc-6-硫酸化 KS の T-LTP および眼優位性可塑性への関与について

GlcNAc6ST1 KO マウスの視覚野切片標本、およびケラタナーゼまたは抗ホスファカン抗体で処理した視覚野切片標本の 2/3 層では低頻度刺激により誘発される T-LTP が起こらないことからホスファカンの GlcNAc-6-硫酸化 KS が T-LTP の誘導に重要だと考えられた。T-LTP の誘導には膜結合型 TNF alpha を遊離型 TNF alpha にする TACE が必要であり、KO において TNF alpha を加えると T-LTP が誘導されたことから、GlcNAc-6-硫酸化 KS は TACE あるいは、その上流の T-LTP 誘導に必要な分子の機能制御に関与していることが強く示唆された。臨界期における 6 日間の単眼遮蔽後、野生型マウス、KO マウスともに遮蔽眼刺激により誘発される電位は減少していたが、KO マウスでは野生型マウスで起こる非遮蔽眼刺激により誘発される電位の増大は確認されなかった。この電位の増大は TNF alpha KO マウスや T 型カルシウムチャネルの阻害剤注入で起こらないことから、GlcNAc-6-硫酸化 KS が臨界期では TNF alpha あるいは T 型カルシウムチャネルの上流シグナルを制御し、眼優位性可塑性に関与すると考えられた。一方、成体 GlcNAc6ST1 KO マウスでは非遮蔽眼刺激により誘発される電位の増大が観察された。T 型カルシウムチャネルは臨界期にのみ誘導され、成体では誘導されない。成体において視覚刺激誘発電位の上昇には T 型カルシウムチャネルの活性化は必要ないと報告されている。これらのことから、GlcNAc-6-硫酸化 KS の関与する T-LTP が、臨界期に特異的に観察される現象であると強く示唆された。

## 【結語】

ホスファカンが持つ GlcNAc6ST1 依存性 GlcNAc-6-硫酸化 KS が神経可塑性の一つである眼優位性可塑性に関わり、そのメカニズムとなる T-LTP を制御することが明らかとなった。