

氏 名 半田 麻衣

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1865 号

学位授与の日付 平成28年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Roles of LewisC-containing N-glycan whose expression is
developmentally regulated on cell-cell interaction in the
mouse brain

論文審査委員 主 査 教授 西田 基宏
教授 池中 一裕
教授 深田 正紀
教授 北島 健 名古屋大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Glycosylation of proteins is one of the major posttranslational modifications. N-glycans harbored on membrane proteins profoundly affect the character of proteins by altering their structure or capacity to bind to other molecules. Various types of N-glycans are synthesized in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Proper N-glycosylation of proteins is important for normal brain development and multiple functions of nervous system.

Sialic acid is an acidic monosaccharide present at the non-reducing terminal of sugar residues attached through $\alpha 2,3$ -, $\alpha 2,6$ - or $\alpha 2,8$ -linkage. Sialylated A2G'2F (Figure 1) is one of the major N-glycans, most of which contains "6-sialyl-LewisC (6SLeC)" [Gal β (1-3){NeuAc α (2-6)}GlcNAc-] moiety. The level of sialylated A2G'2F increased during development. These observations suggest that 6SLeC-containing sialylated A2G'2F plays a role in the development and/or maintenance of the mouse brain.

I analyzed sialylated N-glycans contained in 12-week-old mouse brain by high performance liquid chromatography (HPLC), and I detected non-, mono-, di-, tri-, tetra-sialylated A2G'2F in addition to our previous report. Biosynthetic pathway of 6SLeC-containing sialylated A2G'2F was deduced from these results. I also analyzed N-glycans contained in subcellular fractionated proteins from 12-week-old mouse brain. Sialylated A2G'2F accumulated in membrane and synaptosomal fraction. These data suggest sialylated A2G'2F mainly localized on plasma membrane and synaptosome.

Sialic acid binding Ig-like lectins (Siglec) distinguish linkage types of sialic acids. Some of the siglecs are crucial for exerting brain function. I predicted that 6SLeC plays a role in adult mouse brain through 6SLeC-siglec interactions. To demonstrate this hypothesis, determination of sialylated A2G'2F-carrier proteins and 6SLeC-recognizing proteins are required.

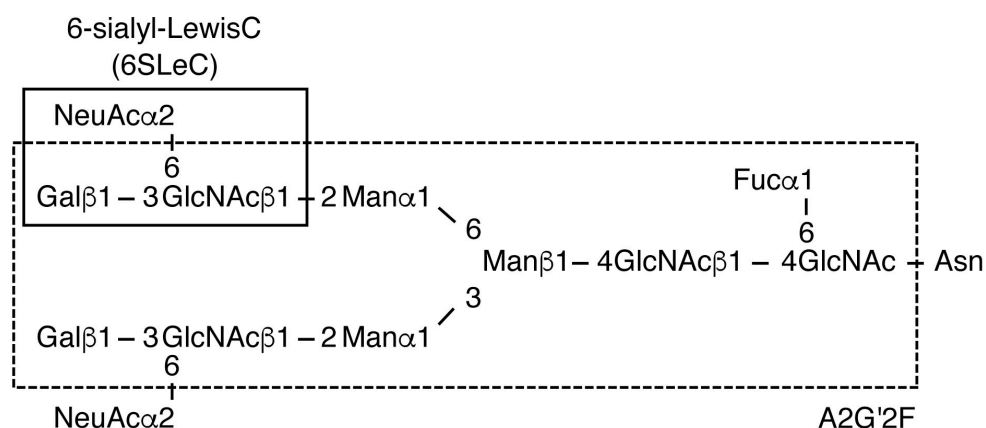
First I tried to identify sialylated A2G'2F-carrier proteins. We previously improved the method for analyzing N-glycan on glycoproteins in the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel. Using this method, we achieved high N-glycan recovery rate; we detected N-glycans from 0.5 μ g of a glycoprotein separated by SDS-PAGE. I homogenized 12-week-old mouse brain and subjected them on a SDS-PAGE. The gel was cut into 20 pieces and N-glycans contained in each gel pieces were analyzed by HPLCs. Sialylated A2G'2F was detected in particular gel pieces with molecular mass of 50-70 kDa. I applied this method not only for SDS-PAGE gel but also for two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) gel. Synaptosomal fraction was separated by 2D-PAGE

(別紙様式 2)
 (Separate Form 2)

and gel containing 50-70 kDa proteins was cut into 10 pieces. N-glycans in these gel pieces were analyzed. I revealed that restricted number of acidic proteins with molecular mass of 50-70 kDa mainly carry A2G'2F in the synaptosomal fraction of mouse brain. Furthermore, I revealed that A2G'2F was mainly accumulated in Triton X-100-soluble component but not in postsynaptic density of the synaptosomal fraction. I also analyzed proteins in the same gels by liquid chromatography-mass spectrometry, and neurotrimin (NTM) and calreticulin (CRT) were detected. It has been reported that there is a N-glycan whose structure is consistent with A2G'2F on NTM. Thus NTM is a strong candidate for the A2G'2F-carrier. Another candidate was CRT, which is expressed on endoplasmic reticulum and the cell surface, but localization in mouse brain was not reported. I performed Western blot analysis of subcellular fractionated proteins and showed that CRT is not only expressed in endoplasmic reticulum but also in triton-soluble component of synaptosomal fraction. I observed that CRT is strongly expressed in cultured cortical neurons and CRT signals were apposed to PSD95 signals in some of the mature spines. This is the first report that CRT exists in synapses.

Next, I tried to identify 6SLeC-recognizing siglec. Since ligand glycan for siglec-H is unknown, I chose this siglec for my study. I used Biacore assay to investigate 6SLeC-Siglec-H interaction and applied sugar chain cluster technology to increase the binding affinity of sugar chains against receptor proteins by forming sugar chain cluster on polylysine residue. This approach was successful and I found that 6SLeC interacted with siglec-H. Siglec-H is expressed in microglia and is reported to activate microglial phagocytosis toward glioma cells.

In summary, I found 6SLeC-containing sialylated A2G'2F is harbored on proteins present in the Triton X-100-soluble component of the synaptosomal fraction and can be recognized by microglia expressing siglec-H. This interaction may contribute to the functions of microglia, such as clearance of apoptotic neuron, synapse pruning, and neuroprotection in the mouse brain.



(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

Figure 1. Structure of di-sialylated A2G'2F. Sialic acid (NeuAc) is transferred to a GlcNAc residue of [Gal β (1-3)GlcNAc-] moiety of desialylated A2G'2F (dotted line box), and 6SLeC (line box) is synthesized.

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

タンパク質の糖鎖修飾は主たる翻訳後修飾の一つであり、膜タンパク質に修飾された糖鎖は神経細胞において、グリア細胞との相互作用に必要な表面認識分子としての役割を担うと考えられている。本論文は、マウス脳において出生後1週間で発現増加するシアル酸(6-sialyl-LewisC (6SLeC))含有N結合型糖鎖(A2G'2F)に着目し、高感度3D-HPLC分析技術を駆使した糖鎖構造決定、生化学的手法を用いた6SLeC相互作用分子ならびにA2G'2Fキャリアータンパク質の同定、および生理学的イメージング手法を駆使することで、神経-ミクログリア相互作用を仲介する糖鎖シグナル伝達様式を分子レベルで明確に証明した研究である。

出願者は、高感度3D-HPLCを用いて12週齢のマウス脳に含まれる複数のシアル酸付加N結合型糖鎖の分子構造を決定し、その結果をもとに6SLeC含有A2G'2Fの合成経路を推察した。また、超遠心分離により細胞内局在分布を調べることで、シアル酸付加A2G'2Fが主に細胞膜およびシナプトソーム画分に存在することを明らかにした。

次に、A2G'2Fに付加した6SLeCとIg様レクチン(Siglec)との結合が神経-グリア相互作用を制御するという仮説を立て、6SLeCを特異的に認識するSiglec分子の同定および6SLeCの細胞膜発現を担うシアル化A2G'2Fキャリアータンパク質の同定を試みた。まず、グリア細胞表面に発現するSiglec-Hのリガンド糖鎖が不明であったことに注目し、ピアコア測定により6SLeCとSiglec-Hとの相互作用解析を行った。糖鎖とSiglecとの結合親和性を高める工夫として6SLeC糖鎖クラスターを合成し、これを用いて固相化Siglec-Hと6SLeC糖鎖クラスターが濃度依存的に結合増加することを実証した。また、SDS-PAGEゲル内の糖タンパク質上のN結合型糖鎖を解析する方法を改良し、二次元電気泳動法を用いて、マウス脳シナプス画分からシアル酸付加A2G'2Fをもつ50-70 kDaのタンパク質を同定した。これらシアル酸付加A2G'2F修飾タンパク質はシナプトソーム分画中のシナプス後肥厚部ではなく、Triton-X100可溶化画分に存在しており、LC-MS分析の結果、neurotrimin (NTM)とcalreticulin (CRT)を同定した。NTMについてはA2G'2Fと一致した構造のN結合型糖鎖が報告されていたことから、A2G'2Fキャリアータンパク質の強力な候補分子であることが確認された。一方、CRTは小胞体における糖タンパク質の品質管理を制御しているレクチン様分子シャペロンとしての役割が知られているものの、マウス脳での局在については知られていなかった。そこで、ウェスタンブロット法によりマウス脳神経細胞内分布を調べたところ、CRTが小胞体のみならずシナプトソーム可溶画分にも存在することを見出した。さらに、初代培養マウス皮質ニューロンを用いた抗体染色の結果、成熟スパインのうち、PSD95陽性部位と異なる部位にCRTが強く発現していることを明らかにした。

本研究は、CRTに修飾された6SLeC含有A2G'2Fがシナプトソーム可溶画分に存在し、

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

Siglec-H を発現するミクログリアにより認識されるという神経-グリア相互作用の新たな分子基盤を明確に証明した極めて優れた内容であり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。従って、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全会一致で判定された。