神経の発生・分化と糖脂質†

平 林 義 雄

(静岡県立大学薬学部)

シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質はガングリオンドと呼ばれており、細胞膜構成成分のなかでも微量成分として膜表層に存在している。ガングリオンドは細胞間相互作用・相互認識、さらには癌抗原分子として重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。とりわけ、脳・神経組織に高濃度に存在することから、神経・精神活動・機能との関連を明らかにすべく、多くの研究がなされてきた。神経組織は、形態学的かつ機能的に多種多様な細胞集団より構成されていることが1つの特徴となっている。近年、ハイブリドーマによる単クローン抗体産生技術が開発されたことにより、神経細胞種の多様性を物質レベルで追求することが理論上可能となった。事実、過去の方法では区別のできなかった神経細胞群を認識できる単クローン抗体が相次いで得られている。筆者は、小幡邦彦教授(岡崎・生理研)と安藤進博士(都老人研)との共同研究により、神経の発生・分化に伴って出現する抗原を認識する数多くの単クローン抗体のなかから、ガングリオンド等の酸性糖脂質と反応する抗体が少なからず存在していることを明らかにすることができた^(1,2)。

1. 単クローン抗体による神経細胞糖脂質抗原群の解析

神経系は外胚葉の一部の神経板から形成されていく(図1)。神経板はやがて内側へと陥没し、さらに外胚葉から分離した管状の構造体(neural tube)となる。神経管はさらに中枢神経系=ニューロン等の神経細胞へと分化していくことになる。一方、神経冠(neural crest)は、副交感神経節、脊髄神経節等へと分化する。このような神経系の発生と分化の過程で、いかなる特異分子が発現

し機能しているかを明らかにすることは、神経系の形成を分子レベルで理解するために必要不可欠である。単クローン抗体は、少なくとも初期発生の過程で出現する特異分子の同定にきわめて有力な武器となる。

小幡らは、ニワトリ初期胚(ふ卵3日目)の神経管および体節の粗膜画分をBalb/cマウスに免疫することにより、発生過程の神経組織と特徴的な結合パターンを示す多くの単クローン抗体を得ることに成功している⁽¹⁾。そのうちM 6703, M 6704はふ卵ニワトリ初期胚の神経管が形成されると、腹側から始まり、しだいに神経管全体の細胞表面を強く染めるが日齢とともに染色性が低下していく。M 7103は、M 6703, M 6704よりもやや遅れて神経管の前角部および脊髄周辺部と末梢神経の細胞表面に反応する。神経管腔周辺部の細胞分裂が盛んな未分化細胞は染まらない。したがって両者の抗体は異なるエピトープを認識していることが予想される。これに対し、M 6733, M 6749, M 6764は初期には、神経管細胞とそれに由来する末梢神経細胞のみと反応する。以上、すべての抗原は熱に安定で、有機溶媒($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 混液)に可溶であることから脂質性の物質である可能性が考えられた。M 6703, M 6704, M 7103により認識される抗原はシアリダーゼ処理することにより反応性を失ってしまうのでガングリオンドであることが強く示唆された。抗体のエピトープを決定するために、初期胚の神経組織よりガングリオンドを単離し、構造決定を行うことは事実上不可能であり、他の組織より抽出したガングリオンドとの反応性を片端から調べなくてはならない。幸い、安藤進博士は、タラ脳より抽出したC-シリーズガングリオンドの標準品を持っていたためM 6703(M 6704), M 7103ともにC-シリーズガングリオンドと反応することを容易に明らかにすることができた。さらに詳細なエピトープをTLC/酵素抗体染色法により解析してみたところ、両者の抗体の認識部位は微妙に異なっていることが判明した。M 6703, M 6704はGT₃, GT₂,

† Glycosphingolipids as Developmentally Regulated Antigens in Neural Tissues.

Yoshio HIRABAYASHI (Department of Biochemistry, University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Sciences, Shizuoka 422)

図 1 神経の発生

受精後、第3週から4週にかけてのヒト胎児における外胚葉由来神経系の発生を示した(「図説 脳」, 塚田裕三編, 日経サイエンス社より引用)。ニワトリ初期胚では2~3日, マウスでは9~10日前後の早い時期で同様の神経系の発生が見られる。

GT_{1c}, GQ_{1c}, GP_{1c}と同程度に反応することから, そのエピトープはシアル酸3分子の直鎖結合であり, M7103のエピトープはGT₃, GT₂とはほとんど反応

せず, GT_{1c}, GQ_{1c}, GP_{1c}とよく反応することより, シアル酸3分子の直鎖結合とガングリオテトラオース骨格を合わせ持つものであることが明らかとなった。シアル酸3分子の直鎖結合は数多いガングリオシドのなかでC-シリーズガングリオシドに共通して存在する構造である(図2)。

C-シリーズガングリオシドは哺乳動物, 鳥類の成体神経組織には存在せず, 鳥類の胚の神経組織⁽⁶⁾, 魚類の脳⁽⁷⁾に存在していることがすでに知られている。このC-シリーズガングリオシドの分布様式から, Bösnérらは, 個体発生は系統発生を繰り返すという反復説が当てはまるのではないかと考えた。C-シリーズガングリオシドと反応する単クローン抗体は, 他の研究グループにより, 18B8⁽³⁾, A₂B₅⁽⁴⁾, Q211⁽⁵⁾等が得られている(表1)。18B8はM6703, M6704と, Q211はM7103とよく似た結合パターンを示している。しかし, M6703, M6704以外の抗体はIgMタイプでありIgGの抗体としてはM6703, M6704が最初の報告例である。

M6733, M6749, M6764は新しいタイプの酸性糖脂質, スルホグルクロニルパラグロブシド(sulfo-glucuronyl paragloboside; SGPG)を認識している。Bリンパ球が異常増殖し, IgM型単クローン抗体の過剰産生を示すM型蛋白質血症を伴った脱髄性多発性神経炎が注目されているが, M蛋白質は, 末梢神経に存在するSGPGあるいは, 同じ糖鎖構造を有するミエリン関連糖蛋白質(myelin-associated glycoprotein; MAG)と反応することが明らかにされている⁽⁸⁾。SGPG, MAGに関しては, 有賀らによる最近の総説を参考にさせていただきたい⁽⁹⁾。

2. 単クローン抗体による神経の発達に伴うガングリオシド構造変化の解析

今回確立された単クローン抗体M6703, M6704, M7103はC-シリーズガングリオシドとのみ反応すること

表 1 ニワトリ胚神経細胞に対する抗糖脂質単クローン抗体

Monoclonal antibody	subclass	tissue specificity	epitopes	ref.
M6703, M6704	IgG ₃	Neural tube	C-series ganglioside	(1, 2)
M7103	IgM	Ventrolateral neural tube	C-series ganglioside with gangliotetraose	(1, 2)
M6733, M6749, M6764	IgM	Neural crest	SGPG*	(1)
18B8	IgM	Neural retina	GT3 and others	(3)
A2B5	IgM	Neural retina	GQ1c and others	(4)
Q211	IgM	Neural tube	C-series polysialogangliosides	(5)

* sulfated glucuronylparagloboside.

図 2 ガングリオシドの生合成経路

から、抗体を用いて C-シリーズガングリオシド分子種の分布様式、存在量を明らかにすることが可能となった⁽²⁾。TLC/酵素抗体染色法により示されているように(図 3)、ニワトリ視蓋(optic lobe)中の全 C-シリーズガングリオシド量は 10~12 日まで増加し、14 日目までにピークに達し、その後急速に減り始め、孵化直前ではピーク時の 60% 程度になり、成体では 3% まで減少している。興味深いことに、ニワトリ以外にラット胎児の神経組織においても、C-シリーズガングリオシドが発現されているが、シアル酸部分(おそらく 9 位)がアセチル化されていることが示された⁽¹⁰⁾。天然界には、多数のシアル酸分子種が存在していることが知られているが、神経系の発生・分化との関連はほとんど調べられていない。

以上のような C-シリーズガングリオシドの経時的変化は、遺伝的に制御されていると考えられるが、その機構は全く不明である。現在、GD₃→GT₃の生合成酵素であるシアル酸転移酵素を中心に解析を行っている。

単クローン抗体を用いた TLC/酵素抗体染色法によ

図 3 ニワトリ初期胚視蓋糖脂質画分と M6704 抗体との反応

糖脂質を展開後、一次抗体として M6704 で反応させた後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識マウス IgG に対するヤギ血清で反応後、4-クロロ-1-ナフトールで染色した。E, embryonic days; Adult, 出生後 60 日経過したもの。

る高感度分析法により、新しい糖脂質の存在や分布が次々と明らかにされている。大橋らは、表 1 の GA₁→GM_{1b}→GD_{1a}の合成経路(α経路)は両生類であるカエ

ルの脳組織に存在していることを報告しているが⁽¹¹⁾, この α 経路も, 成体ウシ脳において超微量成分としてきちんと存在していることを筆者らは明らかにしている⁽¹²⁾.

3. 神経系ガングリオシドの生理機能

初期発生の神経細胞に出現する C-シリーズガングリオシドや SGPG は, どのような機能を有しているのだろうか? これらの糖脂質はいずれも分子内に陰性荷電したシアル酸, グルクロン酸, 硫酸基を有している. 脂質以外にも, 神経細胞接着分子, N-CAM も胎児期には分子中にシアル酸ポリマーを含んでいる. このことから発生初期の神経細胞表面は, かなり負に荷電しているものと想像される. 発生初期の細胞が活発に移動, 遊走していることと深くかかわっているのかもしれない. たとえば, N-CAM は胎児型から成熟型に移行するにつれ分子内のポリシアル酸量が低下し, それに伴い細胞接着活性が上昇する. N-CAM 分子内のシアル酸は, 細胞接着の調節作用の役割を演じていると考えられている⁽¹³⁾.

C-シリーズのガングリオシドの役割は推測の域を出ず今後の研究に待たねばならないが, 最近の辻らによる一連の研究は大いに参考になると思われる. すなわち, ガングリオシド GQ_{1b} は特異的に, かつナノモルという低濃度で培養神経細胞腫株, NB-1, GOTO, の神経突起の数や長さを増大する活性を有していることを報告した⁽¹⁴⁾. 以前より GM₁ などのガングリオシド等で同様の効果が調べられていたが, いずれもマイクロモル濃度のオーダーで論じられていた. 微量成分の 1 つである GQ_{1b} が低濃度で生理活性が認められたことは, *in vivo* においても実際に神経分化誘導活性を有しているのではないかと推定される. これを支持する証拠として Seyfried は, t^{w1}/t^{w1} というミュータントマウスでは発生初期の神経細胞に GQ_{1b} が発現されずに, 神経分化することなく個体死に至る例が存在することを示した⁽¹⁵⁾. 神経発生の過程でいつ, どの部位に GQ_{1b} が出現するかはまだ不明であり, 特異的な単クローン抗体の作成が望まれている. C-シリーズガングリオシドもまた, 神経の発達, 分化に必須な因子であると仮定すると, C-シリーズのガングリオシドの発現異常に起因する代謝異常マウスが存在してもよさそうである.

GQ_{1b} の作用機作も, 従来のシグナルトランスダクションの機構とは異なるシステムが考えられ興味を持たれている. ここでは, その詳細は紙数の都合上省くが, GOTO 細胞株を使った実験では, 既知の蛋白質リン酸

化酵素とは異なる“ガングリオシド依存性”蛋白質リン酸化酵素があり, それは細胞膜表層に局在すると推定されている⁽¹⁶⁾.

新しい糖脂質微量分析法の発達により, たとえば, ウシ脳ガングリオシド中には, 従来考えられていた以上の微量成分が混在していることが判明しつつある⁽¹⁷⁾. 筆者らは Q-セファロースにより効率よくそれら微量成分を分画できることを明らかにした. 多種多様な細胞集団である神経細胞の特性を考えると, GQ_{1b} 以外にも新たな生理活性ガングリオシドが存在していたとしても不思議ではない. 新しい微量成分の検索や生物活性測定系の確立により, 新たなガングリオシドの世界が開かれるものと期待される.

- (1) K. Obata and H. Tanaka : *Neurosci. Res.*, **6**, 131 (1988).
- (2) Y. Hirabayashi, M. Hirota, M. Matsumoto, H. Tanaka, K. Obata and S. Ando : *J. Biochem. (Tokyo)*, **104**, 973 (1988).
- (3) C. Dubois, J. L. Magnani, G. B. Grunwald, S. L. Spitalink, G. D. Trisler, M. Nirenberg and V. Ginsburg : *J. Biol. Chem.*, **261**, 3826 (1986).
- (4) N. Kasai and R. K. Yu : *Brain Res.*, **277**, 155 (1983).
- (5) H. Rösner, and H. Rahmann : *Gangliosides and Modulation of Neural Functions*, NATO ASI Series Vol. 7, ed. by H. Rahmann, Springer-Verlag, New York, 1987, p. 373.
- (6) H. Rösner : *J. Neurochem.*, **37**, 993 (1981).
- (7) S. Ando and R. K. Yu : *J. Biol. Chem.*, **254**, 12224 (1979).
- (8) T. Ariga, T. Kohriyama, L. Fredo, K. L. Latov, M. Saito, K. Kon, S. Ando, M. Suzuki, N. E. Hemling, K. L. Rinehart, S. Kusunoki and R. K. Yu : *J. Biol. Chem.*, **262**, 848 (1987).
- (9) 有賀敏夫, 郡山達男 : 蛋白質 核酸 酵素, **24**, 225 (1989).
- (10) Y. Hirabayashi, M. Hirota, Y. Suzuki, M. Matsumoto, K. Obata and S. Ando : *Neurosci. Lett.*, **106**, 193 (1989).
- (11) M. Ohashi : *Glycoconjugates*, Proc. VI th Int. Symp. Glycoconjugates, ed. by T. Yamakawa, T. Osawa, S. Handa, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 1981, p. 33.
- (12) Y. Hirabayashi, A. Hyogo, T. Nakao, K. Tsuchiya, Y. Suzuki, M. Matsumoto, K. Kon and S. Ando : *J. Biol. Chem.*, in press.
- (13) U. Rutishauser, A. Acheson, A. K. Hall,

- D. M. Mann and J. Sunshine : *Science*, **240**, 53 (1988).
- (14) S. Tsuji, M. Arita and Y. Nagai : *J. Biochem. (Tokyo)*, **94**, 303 (1983).
- (15) T. N. Seyfried : *Develop. Biol.*, **123**, 286 (1987).
- (16) S. Tsuji, T. Yamashita and Y. Nagai : *J. Biochem. (Tokyo)*, **104**, 498 (1988).
- (17) Y. Hirabayashi, T. Nakao, M. Matsumoto, K. Obata and S. Ando : *J. Chromatogr.*, **445**, 377 (1988).
-