海馬における興奮性神経伝達調節機構の多角的解析と糖鎖機能分析ツールの開発

南 彰

Multidimensional Analysis of Hippocampal Excitatory Neurotransmission and Development of Analytical Tools for Glycans

Akira Minami

Department of Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka;
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan.

(Received July 15, 2015)

Sialidase removes sialic acid residues from sialoglycoconjugates such as glycoproteins and glycolipids. Since sialic acid plays crucial roles in synaptic plasticity and memory in the hippocampus, the regulation of sialyl signaling by sialidase is also necessary for neural functions. However, since mammalian sialidase activity is remarkably weak, it has been difficult to detect sialidase activity in mammalian tissues. Determination of the distribution of sialidase activity in living mammalian tissues would provide much valuable information for understanding the roles of sialidase in physiological functions. Therefore, we synthesized a novel benzothiazolylphenol-based sialic acid derivative (BTP-Neu5Ac) as a fluorescent sialidase substrate. After cleavage of BTP-Neu5Ac, which is water soluble and shows little fluorescence, with sialidase, the water-insoluble fluorophore benzothiazolylphenol (BTP) released from BTP-Neu5Ac stains tissue and shows bright fluorescence. BTP-Neu5Ac can visualize sialidase activity in brain tissue with high levels of sensitivity and specificity. The sialidase expression level is markedly high in various human cancers such as colon, renal, prostate, and ovarian cancers. BTP-Neu5Ac can detect human colon cancers sensitively. Thus, BTP-Neu5Ac is useful not only for physiological research but also as a cancer probe. BTP-Neu5Ac is now being used in virology research. In this review, methods for histochemical imaging of sialidase activity and the role of sialidase in hippocampal memory are described based on the author's study of multidimensional analysis of hippocampal excitatory neurotransmission and development of analytical tools for glycans, which was awarded a prize by the Tokai branch of the Pharmaceutical Society of Japan.

Key words——sialidase; histochemical imaging probe; hippocampus; memory; BTP3-Neu5Ac; BTP4-Neu5Ac

1. はじめに

神経における糖鎖の機能は不明な点が多い。その一因として糖鎖の機能を解析するためのツールが限られていることが挙げられる。特に神経伝達や記憶形成などの短時間で変化する現象において糖鎖シグナルを理解するためには、新たな糖鎖機能の解析ツールが必要である。こういった背景から、筆者らの研究グループでは糖鎖修飾関連酵素の酵素活性を可視化するプローブの開発を行っている。¹⁻³⁾中でもシアリダーゼの酵素活性を高感度に検出するプローブ benzothiazolylphenol-based sialic acid deriva-

tive (BTP-Neu5Ac) は、神経の研究領域のみならず、がんの検出¹⁾やウイルスの検出^{4,7)}といった研究領域にも利用範囲を広げている。本総説では、平成26年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞内容「海馬における興奮性神経伝達調節機構の多角的解析と糖鎖機能分析ツールの開発」のうち、シアリダーゼの高感度な酵素活性イメージング法の開発と記憶における役割について焦点を絞り概説する。

2. シアリダーゼについて

シアル酸は主に糖鎖の末端を修飾する酸性糖であり、細胞表面に負電荷を提供する。シアリダーゼは、このシアル酸を糖鎖から遊離させる加水分解酵素であり、記憶やシナプス可塑性、軸索伸長、神経分化など多くの神経機能において重要な役割を担う。⁸⁻¹¹⁾動物のシアリダーゼには NEU1, NEU2, NEU3, NEU4 の4種類のアイソザイムがあり、ど

静岡県立大学大学院薬学研究科生化学講座(〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

e-mail: aminami@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、平成26年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Table 1. Substrates for Sialidase Activity Measurement

	Artificial sialidase substrate			
	4MU-Neu5Ac	X-Neu5Ac	X-Neu5Ac+FRV LB	BTP-Neu5Ac
Staining	Impossible	Possible	Possible	Possible
Sensitivity	High	Low	High	High
Specificity	High	High	Low (2 step reaction)	High (1 step reaction)

のアイソザイムも脳に発現している。¹²⁾ NEU1 から NEU4 はそれぞれ細胞内における主な局在部位が異なり、NEU1 はリソソーム、NEU2 は細胞質、NEU3 は形質膜に存在する。またヒトの NEU4 には、ミトコンドリア移行シグナルを持つもの (NEU4L) と持たないもの (NEU4S) の 2 つのアイソザイムがあり、NEU4 はミトコンドリアや小胞体に局在するという報告やリソソームに局在するという報告がある。上記に示した主な局在部位のほかにも、どのアイソザイムも細胞表面又は細胞外液中に存在していることを示す報告がある。¹³⁻¹⁵⁾ また、各シアリダーゼアイソザイムは基質特異性が異なる。NEU1 はオリゴ糖や糖タンパク質、NEU2 はガングリオシドや糖タンパク質、NEU3 はガングリオシド、NEU4 はオリゴ糖や糖タンパク質、ガングリオシド、シアル酸重合体 (polysialic acids; PSA) をそれぞれ効率よく加水分解する。¹⁶⁻²⁰⁾

動物に発現するシアリダーゼの酵素活性は、ウイルスやバクテリアなどのシアリダーゼと比較して著しく低く、動物組織におけるシアリダーゼ活性の分布を知ることは極めて困難であった。そこで筆者らは神経機能におけるシアリダーゼの機能解析を目的として、組織で利用可能な高感度シアリダーゼ活性イメージング法の開発を行った。

3. シアリダーゼ活性プローブ

シアリダーゼ活性の測定に頻繁に利用される人工基質として、4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid (4MU-Neu5Ac) がある。無蛍光である 4MU-Neu5Ac がシアリダーゼによって加水分解を受けると 4-methylumbelliferone (4MU) が遊離され、蛍光を発するようになる。この蛍光強度を測定することにより、シアリダーゼの活性強度を定量することができる。しかし、4MU は水溶性が高く、組織の染色などに利用することはできない

(Table 1)。

シアリダーゼ活性の組織染色には、人工基質である 5-bromo-4-chloroindol-3-yl- α -D-N-acetylneuraminic acid (X-Neu5Ac) が利用されてきた。X-Neu5Ac はシアリダーゼによる加水分解後、X が酸化されて水に難溶性の藍色となり、この色素が組織に沈着することにより染色される。²¹⁾ しかしながら感度が低く、哺乳動物のシアリダーゼ活性の分布を知ることは困難であった (Table 1)。X-Neu5Ac の感度を高めるために、アゾ色素である Fast Red Violet LB (FRV LB) が利用される。^{22,23)} FRV LB はシアリダーゼによって遊離した X と反応し、赤色蛍光色素 (ex/em: 550 nm/696 nm) となる [Fig. 1 (A)]。この方法を組織染色に利用し、ラットの脳切片を染色したところ、脳梁 (corpus callosum) や背側海馬交連 (dorsal hippocampus commissure)、海馬白板 (alveus) や海馬采 (fimbria)、内包 (internal capsule)、大脳脚 (cerebral peduncle) などの白質領域が強く染色された [Fig. 2 (A)]。²²⁾ しかしながら、X-Neu5Ac と FRV LB を利用した染色では反応に 2 段階を要することから、染色の特異性に疑問が残る [Fig. 1 (A)]。

そこで、筆者らは 1 段階の反応でシアリダーゼ活性を可視化することのできる蛍光プローブ BTP-Neu5Ac を合成した [Fig. 1 (B)]。無蛍光の水溶性

南 彰

2005 年 3 月、静岡県立大学大学院薬学研究科博士後期課程修了 (博士 (薬学))、2004-2006 年度日本学術振興会特別研究員、2005 年 4 月静岡県立大学客員研究員、同年 6 月米国カリフォルニア大学バークレー校博士研究員、2008 年 1 月静岡県立大学薬学部・助教 (現職)、2011 年日本生化学会中部支部奨励賞、2014 年日本薬学会東海支部奨励賞受賞など。

Fig. 1. Chemical Reactions for Sialidase Activity Measurement

Fluorescence is produced by reaction with sialidase and X-Neu5Ac/FRV LB (A) or BTP-Neu5Ac (B).

Fig. 2. Imaging of Sialidase Activity in the Rat Brain with X-Neu5Ac/FRV LB or BTP4-Neu5Ac^{1,22)}

Acute coronal brain slices were stained with X-Neu5Ac/FRV LB (A) or BTP4-Neu5Ac (B) at pH 7.3. Brighter fields show higher sialidase activity. Abbreviations: cc, corpus callosum; fi, fimbria; ic, internal capsule; ec, external capsule; hip, hippocampus. Scale bar, 2 mm.

物質ある BTP-Neu5Ac はシアリダーゼによる加水分解を受けると、液晶ディスプレイ素材などで使われる蛍光物質 benzothiazolylphenol (BTP) が遊離される (Fig. 3). この BTP は水溶性が低いため細胞膜に沈着し、組織を染色することができる。3 種類の BTP 誘導体 (BTP2, BTP3, BTP4) にシアル酸を結合させた BTP2-Neu5Ac や BTP3-Neu5Ac,

BTP4-Neu5Ac についてラットの脳急性切片を染色したところ、どの基質も染色に利用することができた。¹⁾ Figure 2 (B) に BTP4-Neu5Ac によるラット脳の染色像を示す。X-Neu5Ac と FRV LB を組み合わせて染色した蛍光の分布と同様に、BTP4-Neu5Ac の染色像においても脳の白質領域で強い蛍光が観察された。BTP4-Neu5Ac による蛍光はシア

Fig. 3. Staining Mechanism of BTP-Neu5Ac

1: BTP-Neu5Ac is water-soluble and shows little fluorescence. 2: BTP-Neu5Ac can be hydrolyzed with sialidase. 3: BTP shows intense fluorescence. 4: BTP is a water-insoluble fluorophore. 5: Tissue is stained with BTP.

リダーゼの阻害剤 (2,3-dehydro-2-deoxy-*N*-acetylneuraminic acid; DANA) によって著しく減弱することから, BTP4-Neu5Ac はシアリダーゼの酵素活性を特異的に検出できることが確かめられている.¹⁾

4. 大腸がんの検出

大腸がんや卵巣がん, 前立腺がん, 腎細胞がんなどの様々ながんでは, シアリダーゼが異常に高い酵素活性を示すことが報告されている.^{13,24,25)} このシアリダーゼの酵素活性を高感度にイメージングすることができれば, がんの早期発見や手術時に残りなくがんを摘出することが可能になる。そこで, 内視鏡による観察時にがん部位を高感度に可視化することのできる技術開発を目的として, マウス大腸がん細胞の同所移植モデルを作製し BTP4-Neu5Ac で染色した。その結果, がん部位が明瞭に染色されることを見出した。¹⁾ ヒト大腸がん組織 (ステージ T3 と T4) についても BTP4-Neu5Ac で染色したところ, 強い蛍光が観察された (Fig. 4)。ヘマトキシリン-エオシンによる形態観察によって, 蛍光を発する部位にがんがあることを確認している。BTP-Neu5Ac はがんの検出に利用できる可能性があり, 診断や治療への応用が期待される。

5. 海馬におけるシアリダーゼの役割

われわれはこれまでに, 記憶の場である海馬においてシアリダーゼ活性の分布を検討した。海馬の主要なグルタミン酸作動性神経の 1 つに, 歯状回顆粒細胞から CA3 錐体細胞に投射する苔状線維がある。ラット海馬を X-Neu5Ac/FRV LB を利用して染色した観察像から, 苔状線維終末に比較的強いシアリダーゼ活性があることを見出している。²²⁾ これは,

BTP3-Neu5Ac を利用して染色した場合にも再現される (投稿中)。

苔状線維終末におけるシアリダーゼは, 軸索伸長やシナプス形成に関与することが示唆されている。成体脳の海馬において, 苔状線維の起始細胞である歯状回顆粒細胞のうち新生したばかりの未熟な顆粒細胞は, 神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecule; NCAM) に PSA が結合している。新生顆粒細胞から伸長した軸索は新生後およそ 10–11 日に CA3 領域に達する。²⁶⁾ 新生 3–4 週間後には新生ニューロンの NCAM 上に発現する PSA が消失し, 12 週間後では観察されなくなる。^{27,28)} PSA を酵素であらかじめ除去すると, このマウスの苔状線維では異所性の投射や終末形成が観察される。⁸⁾ また, ラット海馬由来の初代培養神経細胞において, シアリダーゼ活性を抑制すると軸索の形成や伸長が抑制される。^{29,30)} これらの知見から, 苔状線維の正常な軸索伸長にはシアリダーゼが必要であると考えられる。

また, 苔状線維終末のシアル酸は, シナプス形成を調節する。成熟した苔状線維終末では PSA の発現が観察されないのに対し, シナプス小胞やミトコンドリアの数が少なく未熟な苔状線維終末では PSA の発現が観察される。苔状線維のシナプス前終末は大きいもので 10 μ m もある巨大シナプスを形成するが, それに対応するシナプス後スパインもまた巨大な棘状瘤を形成する。PSA を発現する苔状線維終末では, この棘状瘤の形成過程で起こる CA3 錐体細胞樹状突起からの陥入が観察される。³¹⁾ これらの形態観察の結果から, 適切なタイミングと場所でシアル酸が除去されることによって, 苔状線維終末のシナプスが成熟すると考えられる。

また, シアリダーゼは海馬神経の活動レベルの制御に係わる。シアリダーゼ阻害薬 DANA を作用させると, 海馬の自発的な同期活動³²⁾ やてんかん発作時の発作レベルが増加する。³³⁾ このようなシアリダーゼによる神経興奮の抑制には, 電位依存性ナトリウムチャンネルを修飾する糖鎖構造からのシアル酸脱離が関与するようである。³⁴⁾ また, PSA による糖鎖修飾によって, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体や α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) 型グルタミン酸受容体の活性が変化する。^{35,36)} さらに, PSA に

Fig. 4. Detection of Human Colon Cancer with BTP4-Neu5Ac¹⁾

A, A human colon cancer tissue was stained with BTP4-Neu5Ac. Left and right panels show photographic and fluorescent images, respectively. Scale bar, 10 mm. B, Enlarged fluorescence images of colon cancer tissue were acquired by using a fluorescent microscope. Scale bar, 500 μ m.

脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) やドパミンなどが結合することも報告されている。^{37,38)} これらの知見から、海馬の神経活動はシアリダーゼによるシアル酸シグナルの調節を介して多角的に制御されていると考えられる。

6. 記憶におけるシアリダーゼの役割

糖タンパク質や糖脂質に結合したシアル酸は記憶において重要な役割を担う。³⁹⁾ モリス水迷路や Y 字迷路で評価した記憶能や海馬のシャッフアー側枝-CA1 錐体細胞間におけるシナプス可塑性は、ガングリオシド GQ1b に含まれるシアル酸によって増強される。^{21,40-43)} また、PSA による糖鎖修飾もまた、正常な記憶やシナプス可塑性を発揮する上で不可欠である。^{9,10,44-46)} 海馬に外因性のシアリダーゼを投与すると海馬依存性記憶やシナプス可塑性が影響を受けることから、シアリダーゼによるシアル酸シグナルの制御もまた記憶に関与すると考えられる。^{9,10,44-46)} 筆者らは、ラット海馬に DANA を添加して内在性のシアリダーゼを阻害すると、海馬依存性の記憶能が低下することを見出ししている (投稿中)。

動物が持つシアル酸の主な分子種として *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) と *N*-グリコリルノイラミン酸 (*N*-glycolylneuraminic acid; Neu5Gc) が知られている。Neu5Ac は哺乳動物の脳に豊富に存在し、記憶や神経回路形成、神経伝達の調節に重要な役割を担う。一方 Neu5Gc は、脳において Neu5Gc の合成に係わる酵素 (CMP-Neu5Ac hydroxylase; CMAH) が発現していないことから、脳に含まれる量は極めて微量である。また、ヒトは CMAH を欠損しており、Neu5Gc を合成することができない。筆者らは、ラジオアイソトープ標識された Neu5Gc を尾静脈に投与したところ、投与 3 時

間後に海馬から比較的高い放射活性が検出された (Fig. 5)。⁴⁷⁾ 海馬に含まれる放射活性を詳細に解析したところ、GM1 や GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b などのガングリオシドから放射活性が検出された。シアリダーゼは Neu5Ac と比較して Neu5Gc に対する基質特異性が低い。⁴⁸⁻⁵⁰⁾ 食餌などに由来して血中に取り込まれた Neu5Gc のうち一部は脳に移行し、シアリダーゼによる Neu5Ac の加水分解を競合阻害することによってシアリダーゼによるシアル酸シグナルの制御が乱れ、海馬の機能に影響する可能性がある。

7. おわりに

シアリダーゼは外界からの刺激によって細胞内局在や細胞外の酵素活性を変化させることが報告されている。^{15,51-53)} 海馬から得た細胞膜画分に含まれるシアリダーゼ活性はてんかん発作後に増加することから、⁵¹⁾ 神経興奮に伴って細胞表面上のシアリダーゼ活性が変化している可能性がある。シアル酸脱離による細胞表面電荷のダイナミックな変化は、シアル酸シグナリングが関与するシナプス可塑性や記憶、神経伝達、神経接着、AMPA 受容体輸送などに影響を与えることが予想される。神経機能におけるシアリダーゼの役割を理解するためには、神経活動と連動したシアリダーゼ活性の変化を明らかにする必要がある。

また、BTP を活用した酵素活性イメージングプローブはシアリダーゼ以外の様々な酵素にも拡充している。^{2,3)} BTP の蛍光発色団は分子サイズが小さいことから、BTP を含有する基質は酵素の活性中心へのアクセスが比較的容易であると考えられる。今後、これらの糖鎖機能分析ツールを生理機能の解析や疾患の診断や治療などに活用し、糖鎖研究の発展と医療技術の提供に寄与できれば幸甚である。

Fig. 5. Autoradiograms of ^{14}C -Neu5Gc and ^{14}C -Neu5Ac in the Brain after Tail Vein Injection⁴⁷⁾

A, Schematic of brain regions. H, hippocampus. B and C, Autoradiography of the rat brain was performed at 3 h after tail vein injection of ^{14}C -Neu5Gc (B) or ^{14}C -Neu5Ac (C).

謝辞 本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご支援を賜りました静岡県立大学薬学部 鈴木 隆教授、池田 潔教授、大坪忠宗准教授、金澤寛明教授、左 一八教授、高橋忠伸准教授、ともに研究に取り組んできた学生の皆様に深謝申し上げます。また、今日まで温かいご助言とご鞭撻を賜りました恩師、静岡県立大学薬学部 奥 直人教授並びに武田厚司教授、カリフォルニア大学バークレー校 Robert S. Zucker 教授に心より感謝申し上げます。本研究は、日本科学協会笹川科学研究助成、内藤記念特定研究助成金、天野工業技術研究所基金研究助成金、金原一郎記念医学医療研究助成金、中部科学技術センター学術奨励研究助成金、双葉電子記念財団自然科学研究助成金、中部乳酸菌研究会研究助成、グローバル COE プログラム、糖鎖科学名古屋拠点、日本学術振興会科学研究費補助金（若手研究 B, 21790085, 24790080）の助成を受けて実施したものであり、ここに感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Minami A., Otsubo T., Ieno D., Ikeda K., Kanazawa H., Shimizu K., Ohata K., Yokochi T., Horii Y., Fukumoto H., Taguchi R., Takahashi T., Oku N., Suzuki T., *PLoS One*, **9**, e81941 (2014).
- 2) Otsubo T., Minami A., Fujii H., Taguchi R., Takahashi T., Suzuki T., Teraoka F., Ikeda K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 2245–2249 (2013).
- 3) Takahashi T., Otsubo T., Ikeda K., Minami A., Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 1668–1673 (2014).
- 4) Takahashi T., Takano M., Agarikuchi T., Kurebayashi Y., Minami A., Otsubo T., Ikeda K., Suzuki T., *J. Virol. Methods*, **209**, 136–142 (2014).
- 5) Fukushima K., Takahashi T., Ueyama H., Takaguchi M., Ito S., Oishi K., Minami A., Ishitsubo E., Tokiwa H., Takimoto T., Suzuki T., *FEBS Lett.*, **589**, 1278–1282 (2015).
- 6) Kurebayashi Y., Takahashi T., Otsubo T., Ikeda K., Takahashi S., Takano M., Agarikuchi T., Sato T., Matsuda Y., Minami A., Kanazawa H., Uchida Y., Saito T., Kawaoka Y., Yamada T., Kawamori F., Thomson R., von Itzstein M., Suzuki T., *Sci. Rep.*, **4**, 4877 (2014).
- 7) Takano M., Takahashi T., Agarikuchi T., Kurebayashi Y., Minami A., Otsubo T., Ikeda K., Kanazawa H., Suzuki T., *Virology*, **464**–**465**, 206–212 (2014).
- 8) Seki T., Rutishauser U., *J. Neurosci.*, **18**, 3757–3766 (1998).
- 9) Becker C. G., Artola A., Gerardy-Schahn R., Becker T., Welzl H., Schachner M., *J. Neurosci. Res.*, **45**, 143–152 (1996).

- 10) Muller D., Wang C., Skibo G., Toni N., Cremer H., Calaora V., Rougon G., Kiss J. Z., *Neuron*, **17**, 413–422 (1996).
- 11) Burgess A., Wainwright S. R., Shihabuddin L. S., Rutishauser U., Seki T., Aubert I., *Dev. Neurobiol.*, **68**, 1580–1590 (2008).
- 12) Shiozaki K., Koseki K., Yamaguchi K., Shiozaki M., Narimatsu H., Miyagi T., *J. Biol. Chem.*, **284**, 21157–21164 (2009).
- 13) Miyagi T., Yamaguchi K., *Glycobiology*, **22**, 880–896 (2012).
- 14) Shiozaki K., Yamaguchi K., Takahashi K., Moriya S., Miyagi T., *J. Biol. Chem.*, **286**, 21052–21061 (2011).
- 15) Sumida M., Hane M., Yabe U., Shimoda Y., Pearce O. M., Kiso M., Miyagi T., Sawada M., Varki A., Kitajima K., Sato C., *J. Biol. Chem.*, **290**, 13202–13214 (2015).
- 16) Miyagi T., Tsuiki S., *Eur. J. Biochem.*, **141**, 75–81 (1984).
- 17) Bonten E. J., Campos Y., Zaitsev V., Nourse A., Waddell B., Lewis W., Taylor G., d’Azzo A., *J. Biol. Chem.*, **284**, 28430–28441 (2009).
- 18) Ha K. T., Lee Y. C., Cho S. H., Kim J. K., Kim C. H., *Mol. Cells*, **17**, 267–273 (2004).
- 19) Hasegawa T., Yamaguchi K., Wada T., Take-da A., Itoyama Y., Miyagi T., *J. Biol. Chem.*, **275**, 8007–8015 (2000).
- 20) Takahashi K., Mitoma J., Hosono M., Shiozaki K., Sato C., Yamaguchi K., Kitajima K., Higashi H., Nitta K., Shima H., Miyagi T., *J. Biol. Chem.*, **287**, 14816–14826 (2012).
- 21) Fujii I., Iwabuchi Y., Teshima T., Shiba T., Kikuchi M., *Bioorg. Med. Chem.*, **1**, 147–149 (1993).
- 22) Minami A., Shimizu H., Meguro Y., Shibata N., Kanazawa H., Ikeda K., Suzuki T., *Neuroimage*, **58**, 34–40 (2011).
- 23) Saito M., Hagita H., Iwabuchi Y., Fujii I., Ikeda K., Ito M., *Histochem. Cell Biol.*, **117**, 453–458 (2002).
- 24) Miyagi T., Takahashi K., Moriya S., Hata K., Yamamoto K., Wada T., Yamaguchi K., Shiozaki K., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **749**, 257–267 (2012).
- 25) Nomura H., Tamada Y., Miyagi T., Suzuki A., Taira M., Suzuki N., Susumu N., Irimura T., Aoki D., *Oncol. Res.*, **16**, 289–297 (2006).
- 26) Zhao C., Teng E. M., Summers R. G. Jr., Ming G. L., Gage F. H., *J. Neurosci.*, **26**, 3–11 (2006).
- 27) Seki T., *J. Neurosci. Res.*, **70**, 327–334 (2002).
- 28) Seki T., Arai Y., *J. Neurosci.*, **13**, 2351–2358 (1993).
- 29) Da Silva J. S., Hasegawa T., Miyagi T., Dotti C. G., Abad-Rodriguez J., *Nat. Neurosci.*, **8**, 606–615 (2005).
- 30) Rodriguez J. A., Piddini E., Hasegawa T., Miyagi T., Dotti C. G., *J. Neurosci.*, **21**, 8387–8395 (2001).
- 31) Seki T., Arai Y., *J. Comp. Neurol.*, **410**, 115–125 (1999).
- 32) Isaeva E., Lushnikova I., Savrasova A., Skibo G., Holmes, G. L., Isaev D., *Eur. J. Neurosci.*, **32**, 1889–1896 (2010).
- 33) Isaeva E., Lushnikova I., Savrasova A., Skibo G., Holmes G. L., Isaev D., *Pharmacol. Rep.*, **63**, 840–844 (2011).
- 34) Isaev D., Isaeva E., Shatskih T., Zhao Q., Smits N. C., Shworak N. W., Khazipov R., Holmes G. L., *J. Neurosci.*, **27**, 11587–11594 (2007).
- 35) Hammond M. S., Sims C., Parameshwaran K., Suppiramaniam V., Schachner M., Dityatev A., *J. Biol. Chem.*, **281**, 34859–34869 (2006).
- 36) Hoffman K. B., Kessler M., Lynch G., *Brain Res.*, **753**, 309–314 (1997).
- 37) Isomura R., Kitajima K., Sato C., *J. Biol. Chem.*, **286**, 21535–21545 (2011).
- 38) Kanato Y., Kitajima K., Sato C., *Glycobiology*, **18**, 1044–1053 (2008).
- 39) Minami A., Suzuki T., *Trends Glycosci. Glycotech.*, **24**, 112–121 (2012).
- 40) Furuse H., Waki H., Kaneko K., Fujii S., Miura M., Sasaki H., Ito K. I., Kato H., Ando S., *Exp. Brain. Res.*, **123**, 307–314 (1998).
- 41) Jung W. R., Kim H. G., Kim K. L., *Neurosci. Lett.*, **439**, 220–225 (2008).
- 42) Ramirez O. A., Gomez R. A., Carrer H. F., *Brain Res.*, **506**, 291–293 (1990).
- 43) Wieraszko A., Seifert W., *Brain Res.*, **345**, 159–164 (1985).
- 44) Dityatev A., Dityateva G., Sytnyk V., Delling M., Toni N., Nikonenko I., Muller D., Schachner M., *J. Neurosci.*, **24**, 9372–9382 (2004).

- 45) Kochlamazashvili G., Senkov O., Grebenyuk S., Robinson C., Xiao M. F., Stummeyer K., Gerardy-Schahn R., Engel A. K., Feig L., Semyanov A., Suppiramaniam V., Schachner M., Dityatev A., *J. Neurosci.*, **30**, 4171–4183 (2010).
- 46) Lopez-Fernandez M. A., Montaron M. F., Varea E., Rougon G., Venero C., Abrous D. N., Sandi C., *J. Neurosci.*, **27**, 4552–4561 (2007).
- 47) Taguchi R., Minami A., Matsuda Y., Takahashi T., Otsubo T., Ikeda K., Suzuki T., *PLoS One*, **10**, e0131061 (2015).
- 48) Minami A., Ishibashi S., Ikeda K., Ishitsubo E., Hori T., Tokiwa H., Taguchi R., Ieno D., Otsubo T., Matsuda Y., Sai S., Inada M., Suzuki T., *FEBS Open Bio*, **3**, 231–236 (2013).
- 49) Corfield A. P., Veh R. W., Wember M., Michalski J. C. Schauer R., *Biochem. J.*, **197**, 293–299 (1981).
- 50) Davies L. R., Pearce O. M., Tessier M. B., Assar S., Smutova V., Pajunen M., Sumida M., Sato C., Kitajima K., Finne J., Gagneux P., Pshezhetsky A., Woods R., Varki A., *J. Biol. Chem.*, **287**, 28917–28931 (2012).
- 51) Boyzo A., Ayala J., Gutierrez R., Hernandez R. J., *Brain Res.*, **964**, 211–217 (2003).
- 52) Lukong K. E., Seyrantepe V., Landry K., Trudel S., Ahmad A., Gahl W. A., Lefrancois S., Morales C. R., Pshezhetsky A. V., *J. Biol. Chem.*, **276**, 46172–46181 (2001).
- 53) Yamaguchi K., Hata K., Wada T., Moriya S., Miyagi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346**, 484–490 (2006).