

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年 5月 27日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300142

研究課題名（和文） 高次脳機能におけるガラクトースやシアル酸糖鎖の機能解析

研究課題名（英文） The role of carbohydrates including galactose and sialic acids in higher brain functions

研究代表者

浅野 雅秀（ASANO MASAHIDE）

金沢大学・学際科学実験センター・教授

研究者番号：50251450

研究成果の概要（和文）：高次脳機能における糖鎖の役割を明らかにするために様々な糖鎖遺伝子の改変マウスを用いて、行動実験を中心に解析を行なった。 β 4GalT-2 欠損マウスや C6ST-1 Tg マウスでは新奇刺激に対する過敏性や注意機能の異常が認められ、ドーパミン系の異常が示唆された。脳特異的 β 4GalT-5 と β 4GalT-6 欠損マウスでは活動性の変化や注意機能の異常が見られ、ミエリン形成の異常が示唆された。このように糖鎖は高次脳機能に重要な役割を持っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the role of carbohydrates in higher brain functions, we investigated glycogene-manipulated mice using behavioral analysis. β 4GalT-2 KO mice and C6ST-1 Tg mice showed hypersensitive to novel stimuli and disturbed attention, and were suggested to be impaired in the dopamine system. β 4GalT-5 KO mice and β 4GalT-6 KO mice showed abnormal activity and disturbed attention, and were suggested to be impaired in myelin formation. These results indicated that carbohydrates play an important role in higher brain functions.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 4,800,000 | 1,440,000 | 6,240,000 |
| 2011年度 | 4,700,000 | 1,410,000 | 6,110,000 |
| 2012年度 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,300,000 | 3,990,000 | 17,290,000 |

研究分野：糖鎖生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：糖鎖，糖転移酵素，高次脳機能，行動実験，遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

糖鎖はタンパク質や脂質に結合してそれらの機能を修飾しており、特に細胞表面の糖鎖は細胞同士の相互作用に重要な役割を果たしている。我々はこれまで7つのファミリー分子からなるガラクトース転移酵素遺伝子（ β 4GalT）群の欠損マウスを作出し、生体内での様々な糖鎖の機能を明らかにしてきた。

高次脳機能においても糖鎖は重要な役割を果たしていると考えられているが、神経系において機能性糖鎖として知られているのは、ポリシアル酸（PSA）や HNK-1 糖鎖と糖脂質であるガングリオシドぐらいでその全体像はまだ明らかではない。我々は京大の川寄先生・岡先生との共同研究で、HNK-1 糖鎖の生合成を担うグルクロン酸転移酵素（GlcAT-P）の欠損マウスが海馬でのシナプ

ス可塑性と空間的学習・記憶に障害を生じることを明らかにした (Yamamoto *et al.* JBC 2002)。さらに2つ目のガラクトース転移酵素である $\beta 4\text{GalT-2}$ は、神経系での HNK-1 糖鎖の生合成に必須であり、その欠損マウスも空間的学習・記憶に障害があることを明らかにした (Yoshihara *et al.* JBC 2009)。また、PSA の生合成を担う2つのシアル酸転移酵素の欠損マウスの解析から、PSA はシナプス形成・シナプス可塑性に異常を生じ、学習・記憶が障害されることが報告されている (JBC 280:42971-77, 2005)。一方、脳内に大量に存在するガングリオシド群について、いくつかの転移酵素の欠損マウスが解析されたが、期待されたほどの神経系での表現型は報告されていない (JBC 277: 29881-88, 2002, PNAS 102: 2725-30, 2005)。本研究では、これらの研究成果を踏まえて、高次脳機能における糖鎖の役割をさらに明らかにする。

2. 研究の目的

細胞の相互作用に重要な役割を果たしている糖鎖に注目して、我々がすでに作製した4種類の糖鎖遺伝子改変マウスに新たなマウスも加えて、高次脳機能における糖鎖の役割を多角的に明らかにする。すでに実施している行動テストバッテリーの結果から、運動学習や哺育行動、低活動性、不安の亢進など、それぞれのマウスでたいへん興味深い行動異常が検出されているので、多方面における高次脳機能と糖鎖の関連が明らかにできると考えている。本研究は、独自に開発した糖鎖遺伝子改変マウスと網羅的な行動テストバッテリーを組み合わせる独創的な研究であり、高次脳機能における糖鎖の役割だけでなく、糖鎖異常による新たな精神疾患モデルマウスの開発にもつながる、実験動物学に貢献できる研究と考えている。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス

ガラクトース転移酵素である $\beta 4\text{GalT-2}$ の欠損マウスとコンディショナル KO に使える $\beta 4\text{GalT-5 flox}$ マウス、及びシアル酸合成酵素である GNE の点変異マウスと HNK-1 糖鎖合成を担う GlcAT-P の欠損マウスは研究開始時点ですでに作製済みであった。スピードコンジュニック法により C57BL/6 背景の $\beta 4\text{GalT-5 flox}$ マウスを作製し、Nestin-Cre マウスと交配することにより脳神経系特異的 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスを作製した。さらに $\beta 4\text{GalT-6}$ 欠損マウスを名大の古川先生から入手して、脳神経系特異的な $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスとのダブル欠損マウスを作製した。また、コンドロイチン硫酸鎖の合成に関与する C6ST-1 の Tg マウスを神戸薬科大の北川先生から入手して解析に加えた。

(2) 行動解析

テストバッテリー方式の行動解析として、学習・記憶についてモリス型水迷路、受動的回避反応、恐怖条件付け、不安・情動についてオープンフィールドテスト、明暗往来テスト、注意機能についてプレパルス抑制テスト、運動・運動学習についてロータ・ロッドテスト、バランスビーム、生体リズムについてホームケージ活動量などを測定した。また、他個体との接近・接触を計測して社会性行動の解析も行なった。

(3) その他の解析

脳機能の指標となる遺伝子群の定量 RT-PCR 法による発現解析、脳切片の解析による脳構造の解析、各種抗体を用いた免疫組織学的解析などを行なった。

4. 研究成果

(1) $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスと GlcAT-P 欠損マウスの解析

$\beta 4\text{GalT-2}$ と GlcAT-P の各々の欠損マウスについて、他個体への社会性行動や注意機能の測定 (プレパルス抑制テストと明暗往来テスト) を行なったところ、 $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスが新奇個体に対する探索行動の増加と GlcAT-P 欠損マウスは注意機能の障害を持つことを見いだした。このような行動異常が脳内でのドーパミン系の障害によるものかを検討する目的で、ドーパミンレセプター、トランスポーター、合成酵素の mRNA の発現パターンを脳領域毎に検討した。 $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスの大脳皮質や線条体、海馬において、いくつかのドーパミンレセプターの mRNA の発現が亢進していることを見出した (図 1)。

一方、京大の岡先生らとの共同研究で、 $\beta 4\text{GalT-2}$ と GlcAT-P の細胞内での局在を解析した。神経細胞において、両者はゴルジ体の内腔領域を介して会合しており、協調して HNK-1 の生合成を行なっていることを明らかにした。複数の糖転移酵素がゴルジ体で会合して、特定の糖鎖構造を合成しているという興味深い例を示すことができた (発表論文 ⑦)。

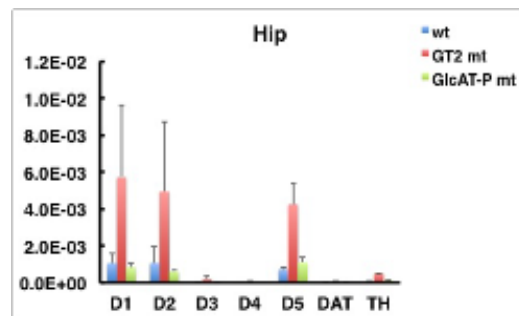


図 1 野生型、 $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損、 GlcAT-P 欠損マウスの海馬におけるドーパミンレセプター (D1-D5) やトランスポーター (DAT)、合成酵素 (TH) の発現。 $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスでのみ D1, D2, D5 の発現が上昇していた。

(2) 脳神経系特異的な $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスと $\beta 4\text{GalT-6}$ 欠損マウスの解析

生後の発達期の脳では $\beta 4\text{GalT-5}$ と $\beta 4\text{GalT-6}$ の発現が高く、脳神経系特異的な $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスの出生直後の脳では期待通り野生型の 10%程度に $\beta 4\text{GalT-5}$ の発現が消失していた。 $\beta 4\text{GalT-5}$ は LacCer 合成酵素活性を担うことを明らかにしたが (発表論文⑧), $\beta 4\text{GalT-6}$ もその活性を持つとの報告があるので、脳抽出液中の LacCer 合成酵素活性を測定したところ (九大の伊東先生に依頼), 野生型の脳と比較して、それぞれの脳では活性が約半分に減少しており、どちらも LacCer 合成酵素活性を持つことが明らかとなった。

次にテストバッテリー方式の行動実験を実施したところ、両マウスともホームケージ活動量の顕著な低下が見られた (図2) が、オープンフィールドテストでは $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスでは高活動性、 $\beta 4\text{GalT-6}$ 欠損マウスでは低活動性と異なる結果が得られた。また、プレバルス抑制テストでの注意機能の障害は $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスにのみ観察された。一方、 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスでは大脳皮質での MBP, $\beta 4\text{GalT-6}$ 欠損マウスでは延髄での PLP の発現上昇が見られ、ミエリン形成の何らかの異常によって、行動障害が生じたことが示唆された。なお、両者のダブル欠損マウスを作製したところ、半数以上が離乳前に死亡し、一部生き残ったマウスは明らかな運動障害が見られ、やはりミエリン形成の異常が示唆された。電顕による詳細な解析などを行なって論文としてまとめるつもりである。

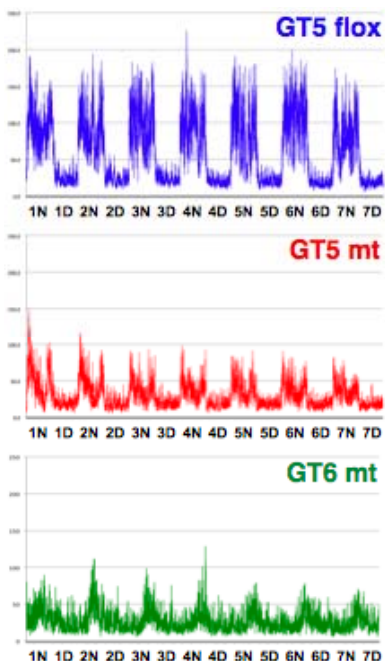


図2 コントロール、脳神経系特異的 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損、 $\beta 4\text{GalT-6}$ 欠損マウスの1週間 (D: 明記, N: 暗記) のホームケージ活動量の測定。野生型マウスに比べて両マウスは顕著に活動量が低下していた。

(3) C6ST-1 Tgマウスの解析

コンドロイチン硫酸鎖の6位に硫酸基を転移する C6ST-1 を過剰発現する Tg マウスに対して、テストバッテリー方式の行動実験を行った。このマウスは臨界期を過ぎても眼優位性の可塑性が維持されることが北川らにより報告されている (Nature Neurosci. 15: 414-422, 2012)。オープンフィールドテスト、明暗往来テスト、プレバルス抑制テストの結果から、新奇刺激に対する過敏性や注意機能の変化が認められた。そこで、脳領域毎にドーパミン系の mRNA の発現量を調べたところ、特定の脳領域においてドーパミンレセプターの顕著な発現上昇が確認され、ドーパミン系制御機構の異常が行動異常を生じさせていることが示唆された。ドーパミン系の解析をさらに詰めて論文としてまとめていく。

(4) GNE 点変異マウスの解析

シアル酸生合成の鍵酵素である GNE を完全欠損したマウスは胎生期に致死となるので、V572L の点変異を導入したマウスを作製した。テストバッテリー方式の行動実験を実施したが、顕著な異常は検出されず、脳神経系の解析は中止した。しかし、ネフローゼ症候群様の腎疾患を発症することを見だし、その病態を詳細に解析して糸球体の足細胞に多く発現している Podocalyxin 等のシアル酸が欠損していることが、糸球体ろ過機能の破綻を引き起こしたと考えられた。さらに母親を通して胎生期からシアル酸を与えることで、この病態が抑制できることを示して、論文として発表した (発表論文⑥)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Nadanaka, S., Zhou, S., Kagiya, S., Shoji, N., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M. and Kitagawa, H. EXTL2, a member of EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 288: 9321-9333, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.416909. 査読有
- ② Liu, H-X., Lopatina, O., Higashida, C., Fujimoto, H., Akther, S., Inzhutova, A., Liang, M., Zhong, J., Tsuji, T., Yoshihara, T., Sumi, K., Ishiyama, M., Ma, W-J., Ozaki, M., Yagitani, S., Yokoyama, S., Mukaida, N., Sakurai, T., Hori, O., Yoshioka, K., Hirao, A., Kato, Y., Ishihara, K., Kato, I., Okamoto, H., Cherepanov, S.M., Salmina, A.B., Hirai, H., Asano, M., Brown, D.A., Nagano, I., and Higashida, H. Displays of paternal mouse

- pup retrieval following communicative interaction with maternal mates. *Nat. Commun.* 4: 1346, 2013. doi: 10.1038/ncomms2336. 査読有
- ③ Sugahara, D., Kaji, H., Sugihara, K., Asano, M., and Narimatsu, H. Large-scale identification of target proteins of a glycosyltransferase isozyme by Lectin-IGOT-LC/MS, an LC/MS-based glycoproteomic approach. *Scientific Reports*, 2: 680, 2012. doi: 10.1038/srep00680. 査読有
- ④ Yamaguchi, K., Shiozaki, K., Moriya, S., Koseki, K., Wada, T., Tateno, H., Sato, I., Asano, M., Iwakura, Y., and Miyagi, T. Reduced susceptibility to colitis-associated colon carcinogenesis in mice lacking plasma membrane-associated sialidase. *PLoS ONE* 7: e41132, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0041132. 査読有
- ⑤ Shinzaki, S., Iijima, H., Fujii, H., Kuroki, E., Tatsunaka, N., Inoue, T., Nakajima, S., Egawa, S., Kanto, T., Tsujii, M., Morii, E., Takeishi, S., Asano, M., Takehara, T., Hayashi, N. and Miyoshi, E. Altered oligosaccharide structures reduce colitis induction in mice defective in β -1,4-galactosyltransferase. *Gastroenterology* 142: 1172-1182, 2012. doi: 10.1053/j.gastro.2012.02.008. 査読有
- ⑥ Ito, M., Sugihara, K., Asaka, T., Toyama, T., Yoshihara, T., Furuichi, K., Wada, T. and Asano, M. Glycoprotein hyposialylation gives rise to a nephrotic-like syndrome that is prevented by sialic acid administration in GNE V572L point-mutant mice. *PLoS ONE* 7: e29873, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0029873. 査読有
- ⑦ Kouno, T., Kizuka, Y., Nakagawa, N., Yoshihara, T., Asano, M. and Oka, S. Specific enzyme complex of β -1,4-galactosyltransferase-II and GlcAT-P facilitates biosynthesis of N-linked HNK-1 carbohydrate. *J. Biol. Chem.* 286: 31337-31346, 2011. doi: 10.1074/jbc.M111.233353. 査読有
- ⑧ Nishie, T., Hikimochi, Y., Zama, K., Fukusumi, Y., Ito, M., Yokoyama, H., Naruse, C., Ito, M. and Asano, M. β 4-Galactosyltransferase-5 is a lactosylceramide synthase essential for mouse extra-embryonic development. *Glycobiology*, 20: 1311-1322, 2010. doi: 10.1093/glycob/cwq098. 査読有
- ⑨ Izumikawa, T., Kanagawa, N., Watamoto, Y., Okada, M., Saeki, M., Sakano, M., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M., and Kitagawa, H. Impairment of embryonic cell division and glycosaminoglycan biosynthesis in glucuronyltransferase-I deficient mice. *J. Biol. Chem.*, 285: 12190-12196, 2010. doi: 10.1074/jbc.M110.100941. 査読有
- [学会発表] (計 35 件)
- ① 吉原亨, 佐武寛之, 鈴木紘史, 神村栄吉, 沖野望, 伊東信, 徳田典代, 古川圭子, 古川鋼一, 浅野雅秀 「ラクトシルセラミド合成に関わるガラクトース転移酵素群欠損マウスの行動解析と脳の組織学的・生化学的解析」第 60 回日本実験動物学会, つくば国際会議場 (茨城県), 2013 年 5 月 16 日
- ② 田畑佳祐, 高垣聡一郎, 西江敏和, 浅野雅秀 「 β -1,4-ガラクトース転移酵素-I が作る糖鎖は造血幹細胞の骨髄ニッチへのホーミングに必須である」第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場 (福岡県), 2012 年 12 月 14 日
- ③ 吉原亨, 鈴木紘史, 西江敏和, 引持陽子, 神村栄吉, 沖野望, 伊東信, 浅野雅秀 「脳・神経系特異的 β -1,4-ガラクトース転移酵素-5 欠損マウスにおけるミエリン鞘形成障害の検討」第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場 (福岡県), 2012 年 12 月 12 日
- ④ Yoshihara, T., Suzuki, H., Nishie, T., Hikimochi, Y., Kamimura, E., Okino, N., Ito M. and Asano, M. “Reduction of lactosylceramide synthase activity and behavioral abnormalities in brain-specific β 4-galactosyltransferase-5-deficient mouse.” The 8th FENS Forum of Neuroscience, International Convention Center Barcelona (Spain), July 15, 2012.
- ⑤ 吉原亨, 鈴木紘史, 西江敏和, 引持陽子, 神村栄吉, 沖野望, 伊東信, 浅野雅秀 「脳・神経系特異的 β -1,4-ガラクトース転移酵素-5 欠損マウスにおける活動性・注意機能の障害」第 59 回日本実験動物学会, 別府国際コンベンションセンター (大分県), 2012 年 5 月 25 日
- ⑥ 伊藤光俊, 浅賀知也, 杉原一司, 吉原亨, 和田隆志, 浅野雅秀 「シアル酸糖鎖欠損による腎疾患モデルマウスの病態解析とシアル酸投与による治療効果」第 2 回分子腎臓フォーラム, 京都リサーチパーク (京都府), 2012 年 1 月 21 日
- ⑦ 鈴木紘史, 吉原亨, 西江敏和, 引陽子, 神村栄吉, 浅野雅秀 「行動テストバッテリーによる神経特異的 β 4GalT-5 欠損マウスの高次脳機能の解析」第 34 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県), 2011 年 12 月 14 日
- ⑧ Ito, M., Asaka, T., Sugihara, K., Yoshihara,

- T. Wada, T. and Asano, M. “Hyposialylation of glycoproteins in the UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) point mutant mice gives rise to a renal impairment that is prevented by sialic acid administration.” *Kidney Week 2011, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia (USA), November 11, 2011.*
- ⑨ 伊藤光俊, 浅賀知也, 杉原一司, 吉原亨, 和田隆志, 浅野雅秀 「GNE V572L 点変異マウスにおける腎臓の病態解析とシアル酸糖鎖の関与」第 84 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館 (京都府), 2011 年 9 月 24 日
- ⑩ Toru Yoshihara, Toshikazu Nishie, Yoko Hikimochi, Hiroshi Suzuki and Masahide Asano “Behavioral analysis of CNS-specific β 4GalT-5-deficient mice.” 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県), 2010 年 12 月 10 日
- ⑪ Toshikazu Nishie, Yoko Hikimochi, Kota Zama, Yoshiyasu Fukusumi Mitutoshi Ito, Haruka Yokoyama, Chie Naruse, Makoto Ito, and Masahide Asano “ β 4-galactosyltransferase-5 is a lactosylceramide synthase essential for mouse extra-embryonic development.” 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県), 2010 年 12 月 10 日
- ⑫ Yoshihara, T., Sugihara, K., Kizuka, Y., Oka, S. and Asano, M. “Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in β -1,4-Galactosyltransferase-2-deficient mice.” *The Society for Neuroscience Annual Meeting 2010 (Neuro2010), Sandiego (USA), November 15, 2010.*
- ⑬ Asano, M. “Glycosylation of glycoproteins and glycolipids plays important roles in the nervous system and embryogenesis.” 2010 Chonbuk-Kanazawa Joint Symposium, Jeonju (Korea), October 28, 2010.
- ⑭ 高垣聡一郎, 西江敏和, 浅野雅秀 「 β 1-4 結合型ガラクトース糖鎖は造血幹細胞の骨髄へのホーミングに必須である」第 57 回日本実験動物学会, 京都テルサ (京都府), 2010 年 5 月 13 日
- ⑮ 吉原亨, 西江敏和, 引持陽子, 浅野雅秀 「中枢神経系特異的 β 1,4 ガラクトース転移酵素-5 欠損マウスにおける活動性の亢進」第 57 回日本実験動物学会, 京都テルサ (京都府), 2010 年 5 月 13 日
- ⑯ 伊藤光俊, 浅賀知也, 杉原一司, 吉原亨, 和田隆志, 浅野雅秀 「GNE V572L 点変異

マウスにおける腎臓の病態解析とシアル酸糖鎖の関与」第 57 回日本実験動物学会, 京都テルサ (京都府), 2010 年 5 月 13 日

[その他]
ホームページ等
<http://asrc.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 雅秀 (ASANO MASAhide)
金沢大学・学際科学実験センター・教授
研究者番号: 50251450

(2) 研究分担者

吉原 亨 (YOSHIHARA TORU)
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任助教
研究者番号: 00401935