

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700509

研究課題名(和文) 精神疾患モデルとしての糖鎖遺伝子改変マウスの解析

研究課題名(英文) Analysis of glycan-related gene manipulated mice as new animal models of mental disease

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖転移酵素に変異を持つ遺伝子改変マウスを用いた行動解析を端緒として、高次精神機能の障害やそれを一因とする精神疾患と脳内の糖鎖機能との関連について検討した。糖鎖修飾に重要な3つの遺伝子改変マウスを用いて実験を行い、1) 糖タンパクの合成に関わるガラクトース転移酵素を欠損させたマウスにおいては、不安の減弱、社会性行動と注意機能の変化を見出した。2) 糖脂質の合成に関わるガラクトース転移酵素を欠損させたマウスでは軸索変性によると推察される顕著な運動障害と発育不全、これらの障害はヒトの精神疾患、神経疾患と類似するものであり、病因理解、治療法の確立に有用なモデルマウスであることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the functions of glycosyltransferases that acts as key factors in behavioral regulators. To reveal the relationships between those glycosyltransferases and human mental / neurological disease, we employed several strains of gene manipulated mice and behavioral, histological and biochemical strategies were used. As result, 1) the knockout mouse related to the glycoprotein formation showed enhanced anxiety and disturbance of attention / sensory gating. 2) the knockout mouse related to the glycolipid formation showed severe motor disfunction and developmental retardation that could be explained by axonal disorganization. Therefore these behavioral phenotypes observed in several gene manipulated mice have similarities in human mental / neurological disease, we could confirm that these model mice are useful for the understanding of human disease.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ノックアウトマウス 糖鎖 精神疾患 糖転移酵素 行動解析

1. 研究開始当初の背景

糖鎖はガラクトースやマンノース等の単糖がタンパク質や脂質等に鎖状に結合した分子である。糖鎖形成過程においては、各々の糖転移酵素が各ステップにおいて、単糖を順次付加していくことから、糖鎖機能の研究では糖鎖そのもののみならず糖転移酵素も重要な研究対象である。遺伝子改変マウスを用いた近年の検討からは、糖鎖が神経可塑性、学習・記憶、情動を始めとした高次脳機能において必須の機能を担うこと、また、その障害がアルツハイマー病などの精神疾患に関連することが知られつつある。

これまでに脳機能における役割がよく知られる糖鎖構造は、ガラクトースを基本骨格として、それ以降に高度に重合したシアル酸が結合したポリシアル酸 (PSA) や硫酸化グルクロン酸が結合した HNK-1 糖鎖と呼ばれる構造などである。シアル酸転移酵素欠損マウスは、海馬シナプス形成・シナプス可塑性の障害 (Angata et al., *J. Biol. Chem.*, 2004)、海馬依存的学習・記憶障害 (Sencov et al. *J. Neurosci.*, 2006) を呈する。また、グルクロン酸転移酵素欠損マウスはシナプス可塑性と学習・記憶の障害を持つことが知られる (Yamamoto et al., *J. Biol. Chem.*, 2002)。これらはガラクトース上への糖鎖修飾が、脳形成、神経伝達機構、高次脳機能にとって必須の役割を担うことを示唆しているが、末端糖鎖の糖転移酵素遺伝子は各々ファミリーを形成し、互いに相補的に機能することから (Gascon et al., *Brain Res. Rev.*, 2007)、各々のノックアウトマウスの表現型は部分的なものであると考えられる。それにも関わらず、その基本骨格であるガラクトースと高次脳機能、精神機能との関連はこれまで全く検討されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、糖転移酵素に変異を持つ遺伝

子改変マウスを用いた行動解析を端緒として、高次精神機能の障害やそれを一因とする精神疾患と脳内の糖鎖機能との関連について、「行動から分子まで」を包括的に検討することを目的とした。糖鎖末端への糖鎖修飾に重要な3つの遺伝子改変マウスを主に用いて、行動解析、組織学的検討、薬理的解析などの多様な手法を処した。さらに、これまであまり検討されてこなかった糖鎖機能と精神疾患との関連を明らかにし、新たな疾患モデルマウスの確立、及びその行動異常の治療法への糸口を見出すことを目的とした。この目的のために、3系統のガラクトース転移酵素欠損マウスを用いた行動解析、組織学的解析を行い、ガラクトースを持つ糖鎖の高次脳機能における役割を検討した。また、ガラクトース上へのシアル酸修飾を根本から低下させる目的で、シアル酸産生そのものに障害を持つマウスを用いて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 4GalT-2 欠損マウスの情動・社会性に関する行動解析

4GalT-2 欠損マウスに関する大凡の行動特性は既に論文として公表したが (Yoshihara et al. *JBC*, 2009)、予備的な検討からは、このマウスでは新奇物体に対する接近が増大することを見出している。すなわち、不安の低減、注意機能の亢進が生じている可能性が考えられる。これらは、ヒトの自閉症等でも高頻度で観察される行動異常であり、自閉症様症状の同定に関わる、情動性、注意、社会性に焦点を当てた行動解析を実施した。測定には、light/dark transition テスト、Pre-Pulse inhibition テスト、オープンフィールド及びホームケージ内での他個体との社会性行動テストを各々用いた。

(2) GNE V572 L 点変異マウスの情動・社会性に関する行動解析

このマウスは、オープンフィールド、高架式十字迷路において、不安の亢進を示唆する行動特性を示したことから、情動性の障害を持つことが推測された。情動性、注意機能、社会性行動について、4GalT-2 欠損マウスと同様の行動実験を行うことを予定していたが、後述の原因により、実験を中断した。

(3) 脳特異的 4GalT-5 欠損マウスの基本的行動解析 (テストバッテリー方式)

既にこの遺伝子を脳・神経系特異的に欠損させたマウスは、129/Ola × C57BL/6 の交雑系を用いて、予備的な行動解析を実施した。その結果、特に新奇環境や、夜間における活動性が顕著に亢進しており、過活動の表現型を呈した。より確実なデータを得るために、C57BL/6 に戻し交配を済ませたマウスを用いて、テストバッテリー方式の行動解析を行い、表現型の確定を行った。

(4) 4GalT-6 欠損マウスの基本的行動解析 (テストバッテリー方式)

4GalT-6 は糖脂質の生合成経路において 4GalT-5 と類似の酵素活性を持つことが知られている。研究期間中に共同研究先よりこの遺伝子のノックアウトマウスを入手し、テストバッテリー方式の行動解析を行い、各々の遺伝子欠損マウスの行動特性の差異や類似性から、行動制御における各遺伝子の役割について検討を行った。

(5) 各遺伝子欠損マウス、変異マウスの脳の形態学的・組織学的検討

各々のマウスに見出された行動特性を基に、脳切片を作製し、各種の免疫染色、糖鎖構造の変化を知るためのレクチン染色を行った。4GalT-2 欠損マウスでは、注意機能の亢進や新奇環境での活動亢進など、ドーパミン神経系と関連する表現型を持つことから、その起始核と終末部を解析した。

4GalT-5 と 4GalT-6 の各々の欠損マウスについては、糖脂質の生合成に変化があることが予想されるため、ガングリオシドを中心とした糖脂質について共同研究として HPLC 法や TLC 法により解析を行った。

4. 研究成果

(1) 4GalT-2 欠損マウスの情動・社会性に関する行動解析

4GalT-2 欠損マウスにおいて、light/dark transition テストでは暗箱に進入する潜時が野生型とは異なっていた。既知個体と新奇個体に対する社会性行動は野生型とは異なっていた。Pre-Pulse inhibition テストでは、正常に抑制が解除されるべきプレパルス条件でも抑制がかかったままであった。これらの表現型は、更に糖鎖末端を修飾して HNK-I 糖鎖の形成に必須のグルクロン酸転移酵素欠損マウスでは観察されなかったことから、末端糖鎖の修飾の違いにより行動の表現型が異なることが示唆された。

(2) GNE V572 L 点変異マウスの情動・社会性に関する行動解析

このマウスについては、情動性の障害を持つことをすでに見出していたが、3 ヶ月齢以降に多くの個体が死亡してしまうことから、それ以上の行動解析は行わなかった。しかしながら、このマウスはネフローゼ症候群様の病態を発症して死亡することがわかり、その原因としてポドカリキシンと呼ばれるタンパクのシアル酸修飾に異常があることから糸球体過機能が破綻していることを報告できた(論文3)。

(3) 脳特異的 4GalT-5 欠損マウスの基本的行動解析

C57BL/6 に戻し交配を済ませたマウスにおいても行動の表現型に変化が見られた。特に新奇環境における過活動性と Pre-Pulse

inhibition テストにおける注意機能の亢進を見出すことが出来た。また、脳における糖脂質の合成が減弱していることを見出した。

(4) 4GalT-6 欠損マウスの基本的行動解析
上述の脳特異的 4GalT-5 欠損マウスと同様に、糖脂質の合成が減弱していることを見出した。しかしながら行動の表現型は全く同じものではなく、これらの2つの遺伝子の脳機能における役割はやや異なることを見出した。

(5) 各遺伝子欠損マウス、変異マウスの脳の形態学的・組織学的検討

4GalT-2 欠損マウスでは、脳領域特異的に注意機能や活動性に関わる神経伝達物質や、その受容体の発現に変化があることを見出した。

脳特異的 4GalT-5 欠損マウスと 4GalT-6 欠損マウスではミエリン鞘形成に関わる遺伝子の発現変動が見られ、現在いわゆるダブルノックアウトを作製して解析を行っている。

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4件)

*Lopatina, O., *Yoshihara, T., *Nishimura, T., Zhong, J., Akther, S., A. K. M. Fakhrul, A., Liang, M., Higashida, C., Sumi, K., Furuwara, K., Inahata, Y., Huang, J. J., Koizumi, K., Yokoyama, S., Tsuji, T., Petugina, Y., Sumarokov, A., Salmina, A. B., Hashida, K., Kitao, Y., Hori, O., Asano, M., Kitamura, Y., Kozaka, T., Shiba, K., Zhong, F., Xie, M., Sato, M., Ishihara, K. and Higashida, H. Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the *CD157/BST1* gene, a risk factor for Parkinson's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*

(2014), 8:13; doi: 10.3389/fnbeh.2014.00133.

*equally contribution (査読有り)

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., Ozaki, M., Yagitani, S., Yokoyama, S., Mukaida, N., Sakurai, T., Hori, O., Yoshioka, T., Hirao, A., Kato, Y., Ishihara, K., Kato, I., Okamoto, H., Hirai, H., Asano, M., Brown, D.A., Nagano, I., Higashida, H. Displays of paternal parental behaviour in mice following communicative interaction with the maternal mate. *Nature Communications* (2013), 4, doi: 10.1038/ncomms2336. (査読有り)

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* (2012), 7, e29873. doi: 10.1371/journal.pone.0029873. (査読有り)

Kouno, T., Kizuka, Y., Nakagawa, N., Yoshihara, T., Asano, M. and Oka, S. Specific Enzyme Complex of β -1,4-Galactosyltransferase-II and Glucuronyltransferase-P Facilitates Biosynthesis of N-linked Human Natural Killer-1 (HNK-1) Carbohydrate. *Journal of Biological Chemistry* (2011), 286, 31337-31346. doi: 10.1074/jbc.M111.233353. (査読有り)

[学会発表](計10件)

吉原 亨・佐武寛之・鈴木紘史・西江敏和・引持陽子・神村栄吉・沖野 望・伊 東 信・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 β 4GalT-5

と-6 欠損マウスの行動解析を中心とした
脳・神経機能の解析 第36回分子生物学会
年会 2013年12月5日 神戸国際会議場

吉原 亨・佐武寛之・鈴木紘史・西江敏和・
引持陽子・神村栄吉・沖野 望・伊 東 信・
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73回日本動物心理学会大会 2013
年9月13日 筑波大学

吉原 亨・佐武寛之・鈴木紘史・西江敏和・
引持陽子・神村栄吉・沖野 望・伊 東 信・
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総会 2013
年5月16日 つくば国際会議場

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 -galactosyltransferase-5-deficient mouse. The
8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona,
Spain, July 15, 2012.

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
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総会 2012年5月
25日 別府コンベンションセンター

鈴木紘史,吉原 亨,西江 敏和,引持陽子,
神村栄吉,浅野雅秀 Analysis of brain
function in neuron specific
beta4-galactosyltransferase-5 deficient

mouse by using behavioral test-battery.
第34回日本分子生物学会年会 2011年12月
14日 パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

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