

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成 16 年度採択研究代表者

平林 義雄

(理化学研究所・脳科学総合研究センター 平林研究ユニット ユニットリーダー)

「糖修飾システムによる神経機能の発現・制御」

1. 研究実施の概要

平林グループ

脳の発生・発達・生存維持にグルコースとその代謝産物(特に生体膜脂質)は、中心的役割を果たしている。申請者は、スフィンゴ脂質分子であるセラミドのグルコースによる糖化反応を触媒するグルコース転移酵素(GlcT-1)に着目し解析を行ってきた。GlcT-1 のノックアウトマウスの解析から、スフィンゴ糖脂質は神経系の発生・形態形成に必須であることが示されている。しかしその分子メカニズムは不明である。ショウジョウバエは、遺伝学的な研究のもっとも進んだモデル生物の1つであり、ショウジョウバエとほ乳類間では、スフィンゴ糖脂質の合成・分解に関与する酵素の多くは保存されている。GlcT-1 ノックアウトショウジョウバエはマウスと同様に、発生初期に致死であり、特に神経系での細胞死が多く認められた。GlcT-1 を強制発現したハエを作成し、神経細胞死を表現形とするミュータントハエと交配させ、GlcT-1 の強発現により神経細胞死が抑制可能なミュータントをスクリーニングする系をスタートさせた。この実験系から、神経発生におけるスフィンゴ脂質糖修飾の役割が、分子・遺伝子レベルで解明されると期待される。一方、哺乳動物細胞には、ホスファチジルグルコシド(PtdGlc)という今まで知られていなかった新しいタイプのグルコース化脂質が存在していることを発見した。この糖脂質は、セラミド骨格を持つことなく脂質微小領域に局在し、細胞分化シグナルの発生に関わっていることが示唆されている。新たに確立した単クローン抗体(DIM21)を使い、発達期のグリア系細胞である放射状グリアに時期特異的に発現していることを見だし、その完全構造決定に成功した。以上、新旧2種のグルコース化脂質の神経系での機能を中心に解析を進める。

伊東グループ

GlcT ノックアウトマウスは胎生7.5日で死滅する。しかし、その理由、死に至るメカニズムは不明である。グルコシルセラミドの代謝は、セラミドにグルコースを転移する酵素(グルコシルセラミド合成酵素、GlcT)、グルコシルセラミドの糖鎖を伸長する酵素(ラクトシルセラミド合成酵素、GalT)、グルコシルセラミドを分解する酵素(グルコセレブロシダーゼ)、セラミドを分解する酵素(セラミダーゼ)等の協奏作用によって調節されている。本研究では、ゼブラフィッシュを用いて初期発生における

グルコシルセラミドの代謝およびその機能を明らかにすることを目的としている。これまでの研究で、初期発生における脳・神経管の形成にグルコシルセラミドの合成が重要であることが示唆された。今後は、グルコシルセラミドがどうして脳・神経管の形成に必要なのかを分子レベルで解析する。

加藤グループ

以前より、神経回路網の変化を伴ったてんかん誘導をおこなうことができるキンドリングモデルマウスに着目し、てんかん誘導過程に連動した、海馬、視床における著しい発現上昇を示す Siat4c (α 2,3-シアル酸転移酵素 ST3Gal IV)を見つけていた。今回さらに、てんかん発作獲得前(ステージ3)、てんかん発作獲得後(ステージ5)の脳皮質、視床、海馬 mRNA をもとに、ジーンチップアレイをおこない、神経回路網全体を注視した糖質関連分子基盤の構築を目指した。その結果、領域特異的、ステージ特異的な著しい発現変動を示す糖質・脂質代謝関連分子群の存在が明らかとなった。その中で特に、Siat4c は特徴的な発現変動を示し、視床で発現上昇を、脳皮質では発現減少を示した。一方演者らは、C57Bl/6J 由来 Siat4c ノックアウトマウスの解析も進めており、同腹子数は少ないものの、病理学的解析では、海馬歯状回におけるアストロサイトの増殖や脳皮質帯状回における神経細胞の萎縮を、オープンフィールドテストでは不安様行動を観察した。以上の結果は、Siat4c が、てんかん発作獲得過程の脳において重要な機能を担う糖質関連分子であることを示唆する。

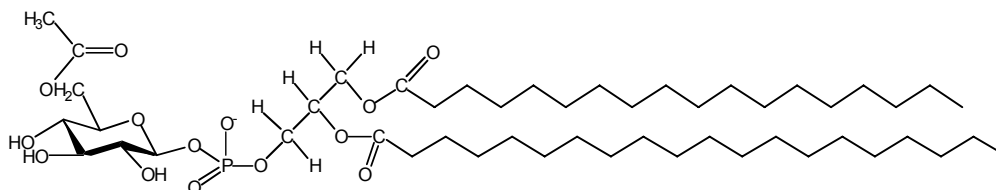
2. 研究実施内容

グルコシルセラミド合成酵素 (GlcT-1) の役割: 神経細胞死における GlcT-1 の機能とその分子機構を、ショウジョウバエを使い遺伝子解析する。その為に、GlcT-1 を含めスフィンゴ脂質代謝に関連したトランスジェニックハエを使い解析する。H17 年度は、多くの Tg ショウジョウバエを調製した。一方、ショウジョウバエはその体のサイズから推測されるように、生化学的解析が困難である。そこで、生化学解析が比較的容易で且つ遺伝子技術も適応できるモデル動物として**ゼブラフィッシュ**を選び、神経の初期発生におけるスフィンゴ糖脂質合成の制御機構と機能を明らかにことにした(伊東グループ)。ゼブラフィッシュは、アンチセンスオリゴを卵に注入することにより簡単に目的の遺伝子をノックダウンすることが可能である。更に、スフィンゴ糖脂質や mRNA を同時に卵に注入することによりレスキュー実験も可能である。GlcT-1 のノックダウンは、神経管の形成不全を引き起こすことを見いだした。この実験系を使い、他の転移酵素 (GalT-V, GalT-VI)のノックダウンが可能となった。以上、ゼブラフィッシュの神経発生におけるスフィンゴ糖脂質機能の全体像を明らかにするための基盤が構築できた。

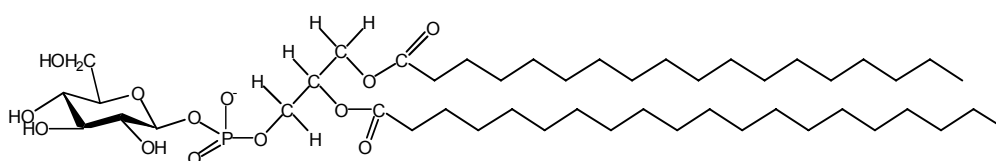
ホスファチジルグルコシド: HL60 細胞、PC12 細胞から生化学的に調製した膜微小領域画分をマウスに免疫することにより、細胞表面糖鎖抗原を認識する単クローン抗体を多数得た。そのうちのひとつである DIM21 IgM 抗体は、ホスファチジルグルコシドに強く反応した。本抗体を手がかりに、ラット胎児脳から DIM21 と反応する2種の脂質抗原を単離精製することができた。NMR、ESI

FT-ICR MS 分析により、ホスファチジルグルコシド、6位のグルコースリングがアセチル化されたホスファチジルグルコシドであると決定することができた。

(A) PGX-1 (Phosphatidyl- β -D-(6-O-acetyl) glucoside)



(B) PGX-2 (Phosphatidyl- β -D-Glucoside)



非常に興味深いことに、両糖脂質の脂肪酸組成が他の膜脂質と大きく異なっていた。すなわち、18:0、20:0 の飽和脂肪酸のみで構成されていた。この飽和脂肪酸組成は、この糖脂質がスフィンゴ脂質と同じように脂質マイクロドメインあるいはラフトに局在していることを示唆していた。

D21抗体を使って脳の発達に伴った抗原分布の変化を調べると、ラット脳の発達期のラジアルグリアに強く発現していることが判明した。

神経高次機能とシアル酸修飾機構：脳にはシアル酸化された糖脂質やタンパクが豊富に存在し、脳機能に重要な役割を演じていると考えられているが、その実態は極めて不明な部分が多く残されている。てんかんのモデルマウスを作成し、神経の可塑性とシアル酸を含む糖代謝の関連を検討したところ、多くの興味ある結果が得られた。そのうちの一つとして、特定のシアル酸転移酵素が、てんかん刺激伝搬経路に沿った形で有意に発現上昇していることが、加藤グループにより見いだされた。そこで、C57Bl/6J ES 細胞を使ったコンディショナルノックアウトマウスを作成することに成功した。今後、本マウスを使い、高次機能におけるシアル酸代謝の役割を明らかにすることが可能となった。

3. 研究実施体制

「平林」グループ

- ①研究分担グループ長：平林 義雄 （(独) 理化学研究所・脳科学総合研究センター
平林研究ユニット、ユニットリーダー)
- ②研究項目：脂質微少領域の解析およびノックアウト動物による高次脳機能解析

「伊東」グループ

①研究分担グループ長：伊東 信（九州大学大学院農学研究員生物機能科学部門、教授）

②研究項目：ゼブラフィッシュ初期発生系におけるグルコシルセラミドの代謝および機能の解明

「加藤」グループ

①研究分担グループ長：加藤 啓子（大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科（旧農学生命科学研究科）・獣医学専攻、助教授）

②研究項目：モデルマウスによる神経可塑性機構の解明

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（１） 論文（原著論文）発表

- Flores-diaz M, Alape-giron A, Clark G, Catimel B, Hiragayashi Y, Nice E, Gutierrez J, Titball R, Thelestam M.
A cellular deficiency of gangliosides causes hypersensitivity to clostridium perfringens phospholipase c (2005) *The Journal of Biological Chemistry*. 280,29. 26680-26689
- M. Tani, Y. Igarashi, and M. Ito: Involvement of neutral ceramidase in ceramide metabolism at the plasma membrane and in extracellular milieu. *J. Biol. Chem.* **280** 36592-36600 (2005)
- Y. Hayashi, Y. Horibata, K. Sakaguchi, N. Okino, and M. Ito: A sensitive and reproducible assay to measure the activity of glucosylceramide synthase and lactosylceramide synthase using HPLC and fluorescent substrates. *Anal. Biochem.* **345** 181-186 (2005)

（２） 特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：1 件）