

スフィンゴ糖脂質欠損マウスを用いた加齢に伴う 神経の変性と再生関連分子の探索

Identification of aging dependent neuronal degeneration- and regeneration-
associating molecules using glycosphingolipids-lacking mice

田島 織絵 古川 圭子

Orie TAJIMA Keiko FURUKAWA

要 旨

神経組織に多く発現しているシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質、ガングリオシドの神経系における生理的機能について解析を行った結果、複合型ガングリオシドが神経機能の維持や修復に必須であることが明らかになった。本研究では、神経系の機能や形態の維持・再生におけるガングリオシド糖鎖の役割とその分子メカニズムを明らかにする為に、野生型とガングリオシド糖鎖欠損マウスについて神経組織で発現レベルの異なる遺伝子群をDNAマイクロアレイにより検索した。その結果、糖鎖欠損マウスにおいては炎症関連分子や補体系分子群の発現増大が、また、ニューロン保護作用が報告されている分子Ninj2は著明な発現低下が認められた。糖鎖欠損マウスは、病理学的には小脳のプルキンエ細胞の脱落やマイクログリアの増殖などの異常が観察され、生化学的解析では、神経細胞膜raftの構造異常が示唆された。今後、遺伝子発現に差異の認められる分子群の解析や、膜raftと構成糖脂質及びraft局在分子を解析することにより、スフィンゴ糖脂質による神経機能制御の分子メカニズムを解明するための基盤情報が得られるものと期待できる。

キーワード：糖鎖、神経、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシド、DNAマイクロアレイ、膜raft

我が国においては、21世紀に入り高齢者の健康維持・増進が急務の課題である。加齢に伴い、ヒトは先ず、運動機能や感覚機能の変化により老化を認識するが、これは脳や神経系の老化の現れである。神経細胞の特徴は、140億にのぼる細胞が既に胎生期に分裂を終え、生後は分裂や新生する機能をほとんど有しない点であり、ヒトの脳においては、40歳を過ぎると、数万個／日で細胞が死滅していくと考えられている。一方、生体にはその代償機能も備わっているが、この代償機能も加齢とともに著しく低下することが示唆されている。

我々は、脊椎動物の脳神経系に多く発現してい

るシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質、ガングリオシドの生理的機能を明らかにするために、ガングリオシド合成に働く種々の糖転移酵素遺伝子を単離し、そのノックアウトマウスを樹立して解析を行ってきた。神経系組織においてはGM1、GD1a、GD1b、GT1bなどの複雑な糖鎖構造を持つ糖脂質がその大部分を占めているが（図1）、これまでの我々の解析結果では、複合型ガングリオシドは少なくとも脳神経系の器官形成には必須ではないが、神経機能の維持や修復に必須であることが示された^{1), 2)}。

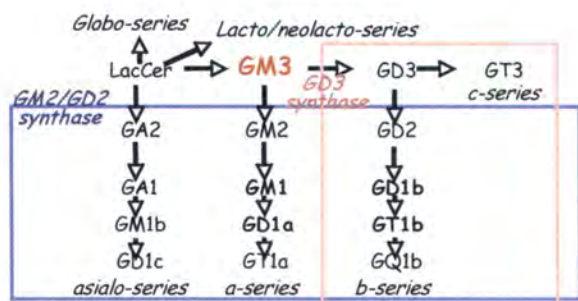


図1 スフィンゴ糖脂質合成経路

GM2/GD2合成酵素遺伝子ノックアウトにより複合型ガングリオシド（青枠）が欠損し、GD3合成酵素遺伝子ノックアウトでb-シリーズガングリオシド（赤枠）が欠損する。よって、これらの遺伝子のダブルノックアウトでは、GM3のみが残存する。GM1、GD1a、GD1b、GT1b（太字）は成体脳神経における主要ガングリオシドである。

例えば、複合型ガングリオシド欠損マウス、GM2/GD2合成酵素遺伝子ノックアウトマウス（KOマウス）では、加齢に伴って、①歩行異常、②末梢神経の伝達遅延とカリウムチャネルの局在異常、③坐骨神経変性、④脊髄後角における神経線維変性とアストログリア肥大、⑤小脳プルキンエ細胞の脱落、などの神経変性とそれに続く変則的な組織再構成像を認めた^{3)~6)}。また、GD3合成酵素遺伝子ノックアウトによるb-系列ガングリオシド欠損マウスは、①熱、機械刺激に対する知覚過敏、②舌下神経切断時における神経再生能の低下などの神経機能異常を示した^{7), 8)}。興味深いことに、これらのダブルノックアウト（DKO）マウスでは、最も単純な糖鎖構造であるGM3以外のガングリオシドを完全に消失しているが、発現ガングリオシドがGM3のみであっても、脳神経系組織の構築、出生および成長の基本的なプロセスがある時点までは進行可能である。しかし、生後4週齢以降に突然死を頻発し、生存マウスにおいても25週齢以降に重篤な難治性皮膚損傷を発症する⁹⁾。さらに、幼若時より、①坐骨神経線維および三叉神経線維の変性、②機械刺激に対する反応低下、③運動機能、情動機能、記憶・学習機能障害、④アセチルコリン受容体、セロトニン受容体応答異常などの種々の神経症状を呈することを確認してきた。これらの結果は、神経系の発生や分化においては、欠損したガングリオシドの機能に対して残存しているガングリオシドによる代償作用が一定程度働くが、一方、神経細胞の健全な

形態や機能の維持には、的確なガングリオシド組成の保持が不可欠であることを示唆している。しかし、ガングリオシド糖鎖欠損マウスにおける神経変性および変性後の再構成のメカニズムは未だ解明されていない。

本研究では、神経系機能および形態の維持・再生におけるスフィンゴ糖脂質糖鎖の役割とその分子メカニズムの解明を目指している。これにより、加齢に伴う神経系の老化機構の一端を明らかにすることが可能となり、老化予防への応用・発展が期待される。

まず、我々は、DNAマイクロアレイを用いて野生型と糖鎖変異マウス（DKOマウス）の中枢神経組織で発現レベルの異なる遺伝子群の探索を行なった。さらに、発現の差異が±5.0以上の候補遺伝子についてリアルタイムRT-PCRによる再検討を行なった結果、DKOマウスで発現が低下する遺伝子5種、増大する遺伝子20種を同定した。これらの遺伝子発現変化について経時的に検討した結果、炎症関連分子や補体系分子群は生後30週程度からDKOマウスの神経組織において発現増大を認め、加齢に伴って発現差が著しくなることを明らかにした。また、DKOマウス中枢神経系組織において発現が顕著に低下している遺伝子の一つとしてNinj2を同定した（図2）。Ninj2は、末梢神経損傷時にグリア細胞（シュワン細胞）において発現誘導され、ニューロン保護作用を示すことが報告されているが、詳細なメカニズムはわかっていない。今後、これらの同定した個々の分子の詳細な機能解析を行い、神経系における役割と糖鎖変異との関連を明らかにすることが重要な課題である。

また、複合型ガングリオシド欠損マウスは加齢

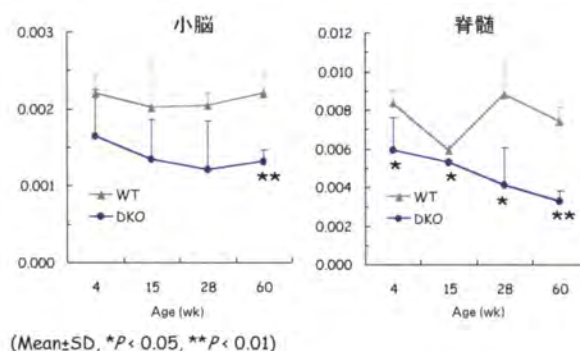


図2 Ninj2発現の経時的变化
（リアルタイムRT-PCR）

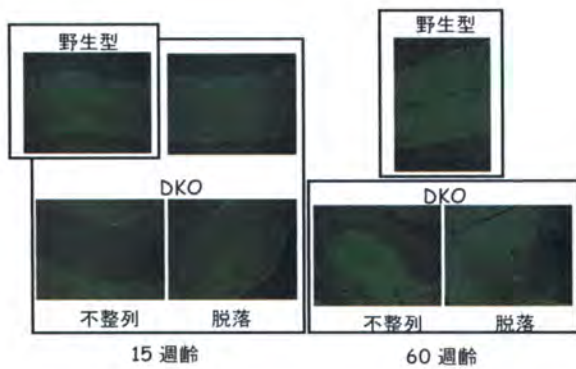


図3-A 糖鎖欠損マウスにおける
小脳プルキンエ細胞の変性

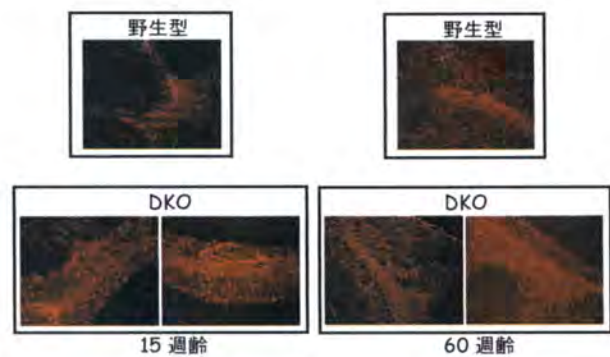


図3-B 糖鎖欠損マウスにおける
小脳の gliosis

に伴って種々の神経変性像を示すことを我々は報告しており^{5),6)}、DKOマウスにおいても同様の神経変性がより早期から起きていることが予測される。細胞のlineageに特異的な抗体を用いた免疫染色によりDKOマウス小脳の形態変化を検討した結果、少なくとも生後15週では、プルキンエ細胞層の異常（不整列、脱落；図3-A）や顆粒層、髄質におけるgliosis（図3-B）が起きていることが確認された。また、加齢に伴うプルキンエ細胞脱落やgliosisの進行、マイクログリアの増殖などの異常の進行を認め、神経組織の形態維持においては複雑な構造のガングリオシドが必須であることを強く指示する結果であった。

近年、スフィンゴ糖脂質が細胞膜上で集合してcaveolae/raftと呼ばれるミクロドメインを形成し、シグナル伝達の中継点として作用することが示唆されている。本研究において小脳および脊髄のraft構造を検討した結果、DKOマウスにおいてはraftのマーカー分子であるFlotillin-1の局在異常が認められた。これらの結果は、raftを構成するガングリオシドの重要性和特異性を示唆しており、神経細胞の適正なraft構造や機能保持はGM3のみでは補填できない可能性を示している。今後、ガングリオシド糖鎖欠損マウスのraftにおける構成糖脂質や会合分子の局在変化などの詳細な解析を進め、さらに、加齢との関連性について明らかにする。これらの解析を進展させることにより、神経変性・再生関連分子が同定され、スフィンゴ糖脂質による神経機能制御の分子メカニズムを解明するための基盤情報が得られるものと期待できる。

用語集

遺伝子ノックアウトマウス：

マウスのゲノム（染色体遺伝子）から解析目的とする特定の一つの遺伝子を人工的に欠損させたマウス。

caveolae（カベオラ）：

細胞膜表面にあって、細胞内部に深く陥入してフラスコ状の形体を有する窪み。飲作用小胞を形成する。脂質ラフト（スフィンゴ脂質とコレステロールを多く含む細胞膜の小領域）からできていると考えられ、複数回膜貫通型のカベオリン蛋白によりカベオラの構造が作られている。

gliosis：

脳または脊髄の損傷部位における星状神経膠細胞（アストロサイト）の過剰増殖。

ガングリオシド：

一つないし複数のシアル酸を含むオリゴ糖を有するスフィンゴ脂質。神経組織からはじめて分離されたが、他の組織にも存在する。但し、比較的複雑な糖鎖構造を有するガングリオシドは神経組織に多い。

シアル酸：

アミノ糖の一種で9個の炭素原子からなるケトース。通常は糖鎖の末端に存在し、接着分子などに認識されることが多い。分子内にカルボシル基（-COOH）をもち、生理的なpHで強い酸性（陰性荷電）を示す。

スフィンゴ糖脂質：

単糖、二糖、またはオリゴ糖が、O-グリコシド結合を介してセラミド（スフィンゴシンの脂肪酸誘導体）と結合した脂質で細胞膜の重要な構成

分子。

DNAマイクロアレイ：

通常、数万個の短いDNA分子を規則正しく配列して固定したスライドガラス。各DNA断片がそれぞれ特定の遺伝子のプローブとなり、数千もの遺伝子産物であるmRNAの発現を一度に分析できる。

糖転移酵素：

一般にグリコシル基を含む供与体から受容体にグリコシル基を転移する反応を触媒する酵素。スフィンゴ糖脂質をつくる糖転移酵素の場合、供与体は糖ヌクレオチド、受容体はセラミドかスフィンゴ糖脂質である。

補体：

生体に侵入した微生物を排除するための重要なエフェクターとして生体防御に機能している一群のタンパク質の総称。血清中と細胞膜上で約30種以上の因子によって構成され、補体系を構成している。

膜raft：

脂質ラフト。細胞膜上で、コレステロールやスフィンゴ糖脂質やGPIアンカー型膜タンパクを多く含む小領域。流動性のある脂質二重層で一時的な相分離が生じたものとみなすことができる。現在、脂質ラフトに局在する多くのシグナル伝達関連タンパクや膜受容体が報告されている。

リアルタイムRT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)：

逆転写酵素によりmRNAからcDNAを合成した後、熱耐性DNA polymeraseでcDNAを増幅して、その増幅量を経時的に測定することによりmRNAの発現量を定量する方法。

lineage：

共通の祖先から直接続いている系統。

参考文献

- 1) Furukawa K, Tokuda N, Okuda T, Tajima O, Furukawa K. Glycosphingolipids in engineered mice: insights into function. *Semin Cell Dev Biol.* 15: 389-396, 2004.
- 2) Furukawa K, Takamiya K, Okada M, Inoue M, Fukumoto S, Furukawa K. Novel functions of complex carbohydrates elucidated by the mutant mice of glycosyltransferase genes. *Biochim. Biophys. Acta.*

1525, 1-12, 2001.

- 3) Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, Yamashiro S, Shin M, Okada M, Fukumoto S, Haraguchi M, Takeda N, Fujimura K, Sakae M, Kishikawa M, Shiku H, Furukawa K, Aizawa S. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides, but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10662-10667, 1996.
- 4) Bullens RWM, O'Hanlon GM, Wagner E, Molenaar PC, Furukawa K, Furukawa K, Plomp JJ, Willison HJ. Complex gangliosides at the neuromuscular junction are essential receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function. *J. Neurosci.* 22, 6876-6884, 2002
- 5) Sugiura Y, Furukawa K, Tajima O, Mii S, Honda T, Furukawa K. Sensory nerve-dominant nerve degeneration and remodeling in the mutant mice lacking complex gangliosides. *Neuroscience* 135: 1167-78, 2005.
- 6) Ma Q, Kobayashi M, Sugiura M, Ozaki N, Nishio K, Shiraishi Y, Furukawa K, Furukawa K, Sugiura Y. Morphological study of disordered myelination and the degeneration of nerve fibers in the spinal cord of mice lacking complex gangliosides. *Arch. Histol Cytol.* 66, 37-44, 2003.
- 7) Handa Y, Ozaki N, Honda T, Furukawa K, Tomita Y, Inoue M, Furukawa K, Okada M, Sugiura Y. GD3 synthase gene knockout mice exhibit thermal hyperalgesia and mechanical allodynia but decreased response to formalin-induced prolonged noxious stimulation. *Pain.* 117, 271-279, 2005
- 8) Okada M, Itoh M, Haraguchi M, Okajima T, Inoue M, Ohishi H, Matsuda Y, Iwamoto T, Kawano T, Fukumoto S, Miyazaki H, Furukawa K, Aizawa S, Furukawa K. b-series ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis, but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. *J. Biol. Chem.* 277, 1633-1636, 2002
- 9) Inoue M, Fujii Y, Furukawa K, Okada M, Okumura K, Hayakawa T, Furukawa K, Sugiura Y. Refractory skin injury in the complex knock-out mice expressing only GM3 ganglioside. *J. Biol. Chem.* 277, 29881-29888, 2002.

著 者

田島織絵 (Orie TAJIMA)

中部大学生命健康科学部生命医科学科講師。
2002年、筑波大学大学院体育科学研究科修了、博士（学術，筑波大学）。同年、財団法人長寿科学振興財団リサーチレジデント。2003年名古屋大学大学院医学系研究科助手。2006年より現職。専門分野は生化学、分子生物学、スポーツ栄養学。主な研究テーマは、神経系におけるスフィンゴ糖脂質の生物学的機能の解明。

古川圭子 (Keiko FURUKAWA)

中部大学生命健康科学部生命医科学科教授。
1993年、長崎大学大学院医学研究科博士課程修了。博士（医学，長崎大学）。同年長崎大学医学部助手。1996年、三重大学医学部助手。1997年、名古屋大学医学部助手、2000年、同大学講師となり現在に至る。専門分野は生化学、腫瘍学。主な研究テーマは、1）酸性スフィンゴ糖脂質による癌性形質の分子機構、及び 2）神経系における酸性スフィンゴ糖脂質の生物学的機能の解明。