

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700342
 研究課題名（和文）糖鎖欠損マウスにおけるラフト構造破壊と膜局在神経再生分子群の機能制御メカニズム
 研究課題名（英文）Mechanisms of lipid raft disturbance and role of raft-related neurogenerational molecules in the GM3 only mice

研究代表者
 田島 織絵（TAJIMA ORIE）
 中部大学・生命健康科学部・准教授
 研究者番号：10362237

研究成果の概要（和文）：正常なガングリオシド構成を欠損している糖鎖変異マウスの脳組織においては、加齢に伴ってラフト構成分子が非ラフト領域に移行しており、ラフト健全性の崩壊が神経変性を助長している可能性が示唆された。また、本糖鎖変異マウスの中枢神経組織では膜に局在する神経再生関連分子 Ninjurin2 の発現異常が認められたが、Ninjurin2 はラフトに局在し細胞間接着や神経突起伸長に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the brain of the GM3 only mice that defected normal gangliosides composition, localization of lipid raft proteins shifted to non-raft region with aging. Ninjurin2, reported as one of the neuroregeneration-related molecules, was down-regulated in the GM3 only mice in central nervous system. Ninjurin2 localized at raft region and related to homophilic cell adhesion and increased neurite outgrowth. These data suggested that disturbance of raft compositions accelerate neurodegeneration in the GM3 only mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学／神経化学・神経薬理学

キーワード：スフィンゴ糖脂質，ノックアウト，神経変性，ラフト，中枢神経，ガングリオシド，神経再生分子

1. 研究開始当初の背景

近年、糖鎖構造異常と神経変性疾患とを関連づける新たな知見が報告されており、その分子機構の解明が重要な課題となっている。

我々が樹立し解析を進めている GM2/GD2 合成酵素遺伝子及び GD3 合成酵素遺伝子ダブルノックアウト（DKO）マウスはガングリオシドとして GM3 のみを発現しており、重篤な神経

症状や組織変性像を認める。我々は、本 DKO マウス中枢神経組織における遺伝子発現プロファイリングの結果から、神経変性関連遺伝子である Ecell の発現亢進が認められる一方で、Ninjurin2 の発現は著明に低下していることを明らかにした。これらの分子の発現変化が神経変性を誘発・助長するのか、あるいは、糖鎖欠損に伴う機能不全に対する代償反応（再生や機能維持など）であるのかが問題となってきた。これらの分子は、いずれも膜貫通領域を有していることが報告されており、細胞膜上に局在してその機能を発揮していると考えられる。

一方、ガングリオシドは細胞膜ラフト上で種々の受容体やシグナル分子と会合し、分化や増殖、生存など重要なシグナルの調節に深く関与していることが示されてきた。これまでの多くの研究から糖鎖変異に伴って種々の受容体分子の局在やシグナル伝達に変化することも報告されており、ラフト構造や機能の異常と様々な病態との関連も示唆されている。今日、ラフトにおける糖脂質糖鎖によるシグナル調節の具体的なメカニズムの解明が大きな研究課題となっている。

2. 研究の目的

本 DKO マウスはすべての複合型・b-系列ガングリオシドを完全に欠損しているにも関わらず、ある程度までは神経系の形成や機能の遂行が可能である。その分子的背景には、Ecell などの神経保護作用を有する分子を誘導することによって糖鎖欠損に伴う機能不全を補填している可能性が考えられる。しかしその一方で、Ninjurin2 のように発現が抑制され本来の機能が発揮されないことが障害を加速させる一因となっているのかもしれない。いずれにしても、これら神経再生関連分子の発現調節、あるいはその作用機構にガングリオシド糖鎖が関わっていると予測される。また、本 DKO マウスが示す神経系機能異常の背景には、糖鎖変異に伴うラフト構造や機能異常が関与している可能性が考えられる。従って、本研究では、ガングリオシド欠損に伴って発現が変化する膜局在神経再生関連分子の生体内機能を解析すると共に、糖鎖変異マウスのラフト構成分子の挙動を明らかにし、中枢神経系機能調節におけるガングリオシド糖鎖の役割を検討した。

3. 研究の方法

(1) 神経再生関連分子 (Ecell, Ninjurin2) の正常な発現プロファイルを検討した。

- ① リアルタイム RT-PCR を用いた定量解析を行ない、mRNA 発現の組織分布（全身）や脳内局在を確認した。
- ② *in situ* hybridization により神経組織（中枢及び末梢）における mRNA の発現

細胞種を検討した。

(2) DKO マウスの中枢神経系組織における神経再生関連分子 (Ecell, Ninjurin2) の発現変化について検討した。また、DKO マウスにおける神経変性や行動異常との関連性について検討を加えた。

- ① リアルタイム RT-PCR により Ecell と Ninjurin2 の発現について DKO マウスと野生型との比較を行ない、糖鎖欠損に伴う発現変化について検討した。
 - ② マーカー分子の免疫染色により DKO マウス神経組織の形態異常を経時的に解析した。
- (3) 神経系培養細胞株を用いて神経再生関連分子 (Ecell, Ninjurin2) の過剰発現株を構築し、*in vitro* での機能を検討した。
- ① 免疫染色やシヨ糖密度勾配遠心法により調製したラフト分画を用いたウェスタンブロッティングにより細胞内局在を検討した。
 - ② 過剰発現細胞株における形態変化や生存能、増殖能を検討した。
 - ③ Ninjurin2 高発現株においてレチノイン酸や db-cAMP 添加による神経突起伸長誘導を行ない、神経系細胞における Ninjurin2 の役割を検討した。
- (4) DKO マウスの中枢神経系組織を用いてシヨ糖密度勾配遠心法にてラフト分画を調製し、ラフト局在分子の挙動を検討した。

4. 研究成果

(1) Ninjurin2 及び Ecell の発現プロファイリング

- ① Ninjurin2 や Ecell の mRNA 発現分布を検討した結果、いずれの分子も神経系組織特異的に発現していた。
- ② Ninjurin2 は DKO マウスにおいて脊髄や小脳に加えて、大脳皮質、線条体においても発現が減少していた。また、脊髄における発現減少は若齢（4 週齢以降）から認められた。
- ③ Ecell は DKO マウスの小脳で特異的に mRNA の発現が増大しており、加齢に伴う組織変性の増悪化に比例して顕著な発現亢進を示した。さらにタンパクレベルでの発現を検討した結果、未成熟型と成熟型のバンドを検出したが、DKO マウスにおいて成熟型 Ecell の発現量が減少していた。また、Ecell の一部はラフト分画に分布していた。

(2) 神経再生関連分子 Ninjurin2 の機能解析

- ① Ninjurin2 高発現株において、凝集能の亢進が認められた。EGFP 導入 Ninjurin2 高発現細胞を用いて異種細胞との共培養を行なったところ、凝集反応は Ninjurin2 発現細胞同士で起こっており、Ninjurin2 が homophilic な細胞間

接着に関与することが示された。また、CaやCaキレート剤を用いて凝集試験を行ったところ、Ninjurin2高発現株における凝集反応はCa²⁺依存的であることが示唆された。

- ② Ninjurin2高発現株においては、β-カテニンのリン酸化が亢進しており、上記①の結果と合わせるとカドヘリン様の接着様式を示すことが示唆された。
- ③ 293T細胞とNeuro2aとの共培養系において、Ninjurin2高発現株では生存能の増加と突起伸長能の促進が確認された。また、Neuro2a単独培養においても、Ninjurin2高発現株ではレチノイン酸誘導による突起伸長が促進された。
- ④ ショ糖密度勾配法により分画した細胞膜フラクションにおいてNinjurin2はラフトに局在していた。

以上の結果より、Ninjurin2は細胞膜ラフトに局在してhomophilicな細胞間接着に関与だけでなく、他の外部刺激による細胞内シグナルの増大に関与し、生存や突起伸長などの重要な役割を担っていることが示唆された。

(3) 糖鎖変異マウスにおけるラフト集積分子群の検討

- ① 若齢DKOマウスの全脳由来細胞膜ラフトにおいて、ラフト常在分子の局在異常は確認されなかったが、刺激誘導性ラフト局在神経栄養因子受容体(TrkB)の挙動が野生型マウスと異なっていた。
- ② DKOマウス小脳では、加齢に伴ってラフトマーカー分子やGPIアンカー型タンパク質が非ラフト領域に移行していた。
- ③ DKOマウスの小脳では、プルキンエ細胞の脱落やグリオーシス、マイクログリアの増生など著しい組織形態異常が認められた。

以上の結果より、ラフト健全性の維持には適切なガングリオシド組成が必須であり、特に小脳においては、ラフトを介した神経機能調節シグナル伝達にガングリオシドが深く関与していることが示唆された。本DKOマウスでは先行研究の結果より補体分子群の発現亢進が顕著に認められるが、補体制御因子であるCD55(DAF)も非ラフト領域に移行しており、ガングリオシド欠損に伴う補体系システムの制御異常が神経変性の進行を助長した可能性がある。今後、個々のシグナル伝達機構におけるガングリオシド糖鎖の制御メカニズムを詳細に検討することで、神経変性疾患に対する治療応用の足がかりとなることが期待される。

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7件)

- ① Tajima O, Egashira N, Ohmi Y, Fukue Y, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Sugiura Y, Furukawa K, Furukawa K. Dysfunction of muscarinic acetylcholine receptors as a substantial basis for progressive neurological deterioration in GM3-only mice. *Behav Brain Res* 206:101-8, 2010. 査読有
- ② Ohmi Y, Tajima O, Ohkawa Y, Mori A, Sugiura Y, Furukawa K, Furukawa K. Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:722405-10, 2009. 査読有
- ③ Tajima O, Egashira N, Ohmi Y, Fukue Y, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Inokuchi J, Sugiura Y, Furukawa K, Furukawa K. Reduced motor and sensory functions and emotional response in GM3-only mice: emergence from early stage of life and exacerbation with aging. *Behav Brain Res* 198:74-82, 2009. 査読有
- ④ 古川鋼一、大海雄介、徳田典代、古川圭子、田島織絵。神経の分化と糖脂質。生体の科学60:187-193, 2009.
- ⑤ Kondo Y, Tokuda N, Fan X, Yamashita T, Honke K, Takematsu H, Togayachi A, Ohta M, Kotzusumi Y, Narimatsu H, Tajima O, Furukawa K, Furukawa K. Glycosphingolipids are not pivotal receptors for Subtilase cytotoxin in vivo: Sensitivity analysis with glycosylation-defective mutant mice. *Biochem Biophys Res Commun* 378:179-81, 2009. 査読有
- ⑥ Kittaka D, Itoh MI, Ohmi Y, Kondo Y, Fukumoto S, Urano T, Tajima O, Furukawa K, Furukawa K. Impaired hypoglossal nerve regeneration in the mutant mice lacking complex gangliosides: down-regulation of neurotrophic factors and receptors as possible mechanisms. *Glycobiology* 18:509-16, 2008. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 古川鋼一. Neurodegeneration due to ganglioside deficiency is caused via inflammatory reaction based on complement activation. 第32回日本分子生物学会. 2009年12月9~12日. パシフィコ横浜(神奈川県)

- ② 田島織絵. 糖鎖欠損マウスにおける進行性神経機能障害の基盤としてのアセチルコリン受容体異常. 第82回日本生化学会. 2009年10月21~24日. 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ③ Furukawa K. Pivotal roles of gangliosides in the regulation of complement systems. 20th Joint Glycobiology Meeting. 2009年11月8~11日. Cologne, Germany.
- ④ Ohmi Y. Roles of gangliosides in the regulation of lipid rafts. 20th Joint Glycobiology Meeting. 2009年11月8~11日. Cologne, Germany.
- ⑤ 古川鋼一. 細胞膜マイクロドメインの健全性維持と機能における酸性糖脂質の役割. 第29回日本糖質学会. 2009年9月9~11日. 飛騨・世界文化センター (岐阜県)
- ⑥ 大海雄介. GM3 only マウスの神経変性における補体の役割. 第29回日本糖質学会. 2009年9月9~11日. 飛騨・世界文化センター (岐阜県)
- ⑦ 田島織絵. 糖鎖欠損マウスにおける神経再生関連分子の探索:Ninjurin2の神経機能制御メカニズム. 第81回日本生化学会. 2008年12月9~12日. 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑧ 大海雄介. 脂質ラフト構築におけるガングリオシドの役割. 第81回日本生化学会. 2008年12月9~12日. 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑨ 古川鋼一. スフィンゴ糖脂質による神経系調節の分子機構. 第31回日本神経科学会. 2008年7月9~11日. 東京国際フォーラム(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 織絵 (TAJIMA ORIE)
中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号: 10362237

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し