

## 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：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500493

研究課題名(和文)糖転移酵素ノックアウトマウス表現型と糖鎖機能を解明する方法論の開発と実証

研究課題名(英文)The development and demonstration of methodology to elucidate the sugar chain function and glycosyltransferase knockout mouse phenotype.

研究代表者

杉原 一司(Sugihara, Kazushi)

金沢大学・医学系・技術専門職員

研究者番号：10377418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：1,4-ガラクトース転移酵素-2(4GalT-2)遺伝子ノックアウトマウスの行動学的解析から4GalT-2が合成するガラクトース糖鎖が中枢神経系で機能を持つことが明らかとなった。そこで、4GalT-2が主要な働きを持つ脳領域や細胞の特定を行い、個体から機能糖鎖分子に至る手がかりを得る為に新しいノックインマウスの作製を行うことにした。4GalT-2遺伝子の発現をLacZ遺伝子によってモニターできるターゲティングベクターと、部位・時期特異的に機能を回復させることができる2種類のベクターを新しい方法を用いて構築を試み、難航したが構築が完了しES細胞に導入することができた。

研究成果の概要(英文)：From behavioral analyses of beta 1, 4-galactosyltransferase-2 (B4GalT-2) gene knockout mice, we have found that galactose sugar chains synthesized by B4GalT-2 have a function in the central nervous system. Therefore, we tried to generate novel knock-in mice in order to identify cells and brain regions where B4GalT-2 is involved, to obtain clues identifying functional carbohydrate molecules. We constructed two kinds of targeting vectors, one for monitoring B4GalT-2 expression by lacZ gene and the other for recovering B4GalT-2 expression conditionally. We are trying to isolate desired ES clones.

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：発生工学

1. 研究開始当初の背景

第三の生命鎖と呼ばれている糖鎖の生体内での機能を明らかにする為の戦略の一つに、糖鎖が合成されていく過程でその合成を止めることで糖鎖構造を改変し、その結果引き起こされる表現型を解析するということが考えられ、これは糖転移酵素のノックアウトマウスを用いることで実現される。我々はβ1, 4-ガラクトース転移酵素-1 ノックアウトマウス (β4GalT-1 KO マウス) を世界に先駆けて作製し、ガラクトース糖鎖の欠損がIgA 腎症をはじめ様々な生物現象を引き起こすことを既に明らかにした。私は生体内でのガラクトース糖鎖の役割をより詳細に調べる為にβ4GalT-1 に進化的に最も近いβ4GalT-2 KO マウスを作成した。β4GalT-2 KO マウスは正常に出生し妊孕性にも問題は無く外観はほぼ正常であった。その後、C57BL/6 背景に戻し交配した B6 (β4GalT-2) KO マウスの行動学的解析から空間的学習・記憶障害、協調運動障害が見られ、β4GalT-2 が合成するガラクトース糖鎖が中枢神経系で機能を持つことが明らかとなった (Yoshihara and Sugihara et al. 2009 JBC)。しかし改変された糖鎖がどの組織・細胞で働いているのか、またどのようなタンパク質・脂質を修飾しているのかを明らかにしていくことは非常に多くの可能性が考えられ、困難が予想された。

2. 研究の目的

そこで遺伝子改変動物学的手法を駆使してβ4GalT-2がKOマウスの行動異常に主要な働きを持つ脳領域あるいは細胞の特定を行い、個体から機能糖鎖分子に至る過程に応用可能な解析手法の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

β4GalT-2が合成するガラクトース糖鎖によって行動が修飾される脳領域の特定にはレポーター遺伝子をノ

ックインしたマウスを利用する。これによりβ4GalT-2を発現する細胞の同定が可能となる。β4GalT-2を恒常的に強く発現しているかまたは発現が変動する細胞及び領域が目的の候補領域となる。次に上記の候補領域特異的にβ4GalT-2発現を回復させることで、β4GalT-2が合成する糖鎖の機能の証明と、β4GalT-2発現が回復した細胞と隣接する回復しなかった細胞由来の糖タンパク質・糖脂質を比較検討することで、機能糖鎖分子への手がかりが得られると考えられる。この目的の為に通常のコンディショナルノックアウトの方法ではなく機能回復型の flox アリルを持つノックインマウスと機能が回復すると同時にレポーター遺伝子を発現するノックインマウスを組み合わせる。さらにコンディショナルに Cre を発現さ

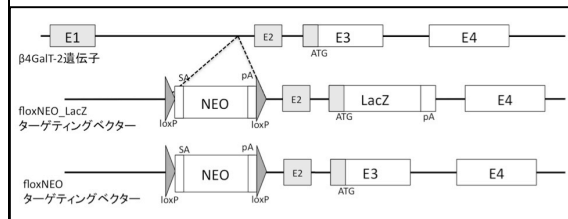


図 2

せる為にウイルスベクターの利用を検討する。ウイルスが感染すると GFP と Cre 組み換え酵素が感染細胞で発現し、β4GalT-2 とレポーター遺伝子が発現するようになり、ウイルスが感染してもβ4GalT-2が発現しない細胞ではレポーター遺伝子は発現しないので区別出来る。この目的の為に図2のような2種類のターゲティングベクターを構築した。β4GalT-2の発現はSV40 スプライスアクセプターを持つネオマイシン耐性遺伝子にある polyA 付加配列で終了する。さらにエクソン3にある翻訳開始点からレポーター遺伝子として核移行シグナルを持つ LacZ 遺伝子が発現するように組み込んだ。ネオマイシン遺伝子は loxP 配列で囲まれており、Cre 酵素によって除去されると、floxNEO\_LacZ ベクターでは LacZ がβ4GalT-2 発現依存的に発現する。一方、floxNEO ベクターではβ4GalT-2の発現が回復する。floxNEO\_LacZ ベクターで得られた相同組換え体はあらかじめES細胞で Cre を働かせてネオマイシン遺伝子を除いてからノックインマウスを作成すれば floxNEO\_LacZ アリルをヘテロにもつマウスができ、β4GalT-2 発現のレポーターマウスとして利用出来る。

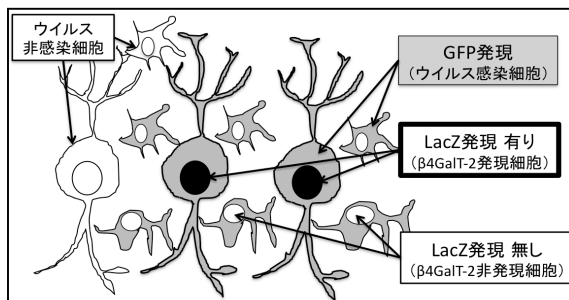


図 1

#### 4. 研究成果

上記の 3 種類のノックインマウスを作成する為の 2 種類のターゲティングベクターの構築に取りかかった。今回のベクター構築にはこれまでの制限酵素切断部位を用いた方法ではなく、PCRを用いた遺伝子増幅とディレクショナルクローニング法を用いて行った

##### (1)ベクターの構築

今回のノックインマウスは  $\beta$  4GalT-2 遺伝子発現と同様にレポーター遺伝子が発現するように  $\beta$  4GalT-2 の翻訳開始点に合わせる形でレポーター遺伝子を組み込んだ。このような構築は従来の制限酵素を用いた方法では困難なため、正確性の高い Taq 酵素を主に用いて行った。

具体的には、それぞれの部品となる DNA フラグメントを PCR 法で増幅する。接続する二つの DNA フラグメント片方端と相同な配列を付加したプライマーを用いて再度増幅し、DNA フラグメント同士をアニーリングさせ Taq 酵素で相補鎖を伸長させて二つのフラグメントを接続する。その後両端のプライマーを新たに加えることで PCR 法によって接続された DNA フラグメントを得るという方法を用いた。

電気泳動法でフラグメントを精製し次の操作に用いた。この方法はその後のシーケンス解析の結果からうまく接続されることがわかった。最終的なプラスミドベクターへの複数鎖のクローニングには市販のキットを用いてディレクショナルクローニングを試みた。DNA フラグメント端の 15bp が相同であればよいというものであったが、これが非常な困難を伴い、

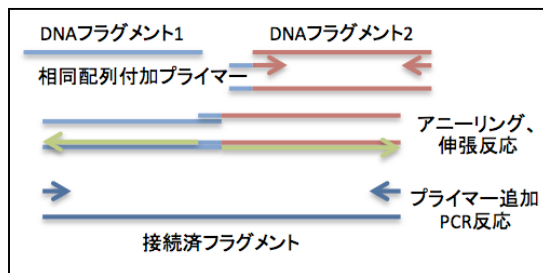


図 3

時間を費やした。最終的には酵素反応の温度をより高温で行う別のキットの利用によりこの問題は解決出来た。

##### (2)ES 細胞へのターゲティング

行動解析を C57BL/6 (B6) 背景の  $\beta$  4GalT-2 KO マウスを用いて行っていることから、B6 背景の B6J-S1 ES 細胞 (筑波大学の杉山先生より分与) を用いてターゲティングを行うことにした。しかしそれまで我々が用いてき

た 129 系統の ES 細胞では G418 による選別を 250  $\mu$ g/ml で行ってきたが、B6J-S1 は半分の濃度でも死に絶える程感受性が高いことがわかった。さらに  $\beta$  4GalT-2 発現レベルでネオマイシン耐性遺伝子が発現するターゲティングベクターを用いていることから、今後 G418 濃度の最適条件の検討を行う必要がある。

(3)B6ES 細胞を用いたキメラマウス作成時の 2i 培地利用による生殖系列寄与率の改善効果の検討

今回のノックインマウス作成には B6 系統由来の ES 細胞を用いて行なったが、一般に B6ES は 129 系統の ES よりも長期間培養による生殖系列通過能力が失われやすい (未分化性喪失) ことが知られていた。そこで、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3  $\beta$  阻害剤の CHIR99021 とマイトージェンアクティベータードプロテインキナーゼ阻害剤 PD0325901 の 2 種類 (2i) を ES 培地に添加した 2i 培地を用いてキメラマウス作成を行い、キメラ率への効果と、生殖系列を通過する効果について検討した。  $\beta$  4GalT-2 以外の 3 遺伝子 9 クローンの B6ES から 157 匹のキメラマウスが得られたが、生殖系列を通過したキメラマウスはわずか 2 匹であった。129 系統由来の ES で高いキメラ率のキメラマウスが生まれなかったクローンを用いて従来の ES 培地と 2i 培地を比較してみたが、キメラ率に大きな改善効果は見られなかった。B6ES の培養方法には更なる改善が必要と考えられた。

この研究は当初の予定どおりに進めることが出来ずこれで終了となるが、得られた相同組換え体から早急にノックインマウスを作成し別のプロジェクトとして研究を進めていきたいと考えている。この機能回復型のコンディショナルノックインの方法論は  $\beta$  4GalT-2 が合成する機能糖鎖分子を網羅的に捕まえられる可能性があると考えており、ぜひ実証したいと考えている。

#### 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 1 件)

1. Nadanaka S, Zhou S, Kagiya S, Shoji N, Sugahara K, Sugihara K, Asano M, Kitagawa H. EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls

glycosaminoglycan biosynthesis in  
a xylose kinase-dependent manner.,  
The Journal of Biological  
Chemistry, 査読有, 288(13),  
2013, 9321-9333

DOI:10.1074/jbc.M112.416909

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://kiea.w3.kanazawa-u.ac.jp/tglab/tganimHP/Top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉原 一司 (SUGIHARA, Kazushi)

金沢大学・医学系・技術専門職員

研究者番号：10377418

### (2) 研究分担者

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