

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390086
 研究課題名 (和文) スフィンゴ糖脂質による生体調節における分子クラスター形成と特異性の創出機構
 研究課題名 (英文) Mechanisms for molecular cluster formation and specificity in the bio-regulation with glycosphingolipids

研究代表者

古川 鋼一 (FURUKAWA KOICHI)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：80211530

研究成果の概要：スフィンゴ糖脂質による生体調節、とくに分子クラスターの形成プロセスとシグナルの調節機構に関し多くの成果が得られた。糖脂質の欠損では、残存糖脂質構造の代償機能が働く。GM3-only マウスの解析から、細胞膜マイクロドメインの健全性の維持にとって、糖脂質糖鎖の正しい構成が必須であることが、種々の実験から明らかになった。とくに、ラフトの異常が補体系の活性化を惹起して、神経変性の重要な要因となることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：糖脂質、ガングリオシド、スフィンゴ糖脂質、分子クラスター、神経変性、補体、マイクロドメイン、ラフト

1. 研究開始当初の背景：これまで、酸性糖脂質を中心に糖鎖が生体調節において果たす役割について、糖鎖合成系酵素の遺伝子単離とそのノックアウトによって解析を進めてきた。とくに、ノックアウトによる様々な糖鎖グループ欠損マウスの表現型の解析から、糖脂質糖鎖が、神経系の発生・分化というよりは、むしろその構造や機能の維持と修復において必須の役割を演じることが分かってきた。これらの機能を発揮する場として、細胞膜マイクロドメインであ

る脂質ラフトの重要性が明らかになるとともに、糖脂質分子が、同一分子同士あるいは種々の膜会合分子と複合体を形成することが、機能を発現する上で必須のプロセスであることが明らかになってきた。しかし、これらの分子クラスターの形成のメカニズムやクラスター形成に基づくシグナル修飾の具体的なメカニズムの理解は進んでいない。

2. 研究の目的：スフィンゴ糖脂質による

生体調節、とくに神経系の発達、構造と機能の維持、修復における機能の発揮において、分子クラスターの形成がいかになされてシグナルの調節機能を果たすのかを明らかにするために、以下の実験を行った。

3. 研究の方法：これまで樹立した、おもな酸性糖脂質合成の起点で働く糖転移酵素遺伝子のノックアウト (KO) マウスを用いて、行動異常、病理組織学的解析、生化学的解析、免疫組織学的解析を行った。とくに、脂質ラフトの異常に関しては、TritonX-100 抽出物をシュクロース密度勾配超遠心によって分画した後、イムノブロットングを行って、分子の細胞内局在を解析した。また、行動異常の解析に関しては福岡大学薬学部の江頭博士の全面的な協力の下に実施した。アストロサイトの初代培養については、名古屋大学環境医学研究所の錫村教授の協力を得て行った。DNA ミクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングは、Affimetrix 社のアレイを用いた受託研究によった。さらに、電気生理学的な解析は、名古屋大学大学院医学研究科の曾我部教授、南京大学の陳玲教授の全面的な協力により可能となった。KO マウスの基本的な維持と観察は、中部大学の田島織絵博士、古川圭子教授、および大学院生の大海雄介、大川祐樹、橋高大二が担当した。

4. 研究成果：

(1) 生体内における糖脂質のクラスター形成を検討するために、種々のガングリオシド欠損ノックアウトマウスにおける膜マイクロドメインの構造異常を、スクロース密度勾配超遠心による蛋白質の分画と GPI-アンカー蛋白質の免疫組織化学的解析により検討した。その結果、欠損する糖脂質の種類範囲に応じた異常が認められた。

(2) b-系列ガングリオシドを欠損する GD3 合成酵素 KO マウス、ガングリオ系ガングリオシドを欠損する GM3 合成酵素 KO マウスでは、ラフトマーカである flotillin の局在に大きな変化は認められなかった。

(3) 複合型ガングリオシドをすべて欠損する GM2/GD2 合成酵素 KO マウスでは、flotillin および GPI-アンカータンパク質 CD55 などの脂質ラフト局在が減弱する傾向が認められた。また、通常はほとんど認められない 9-O-アセチル GD3 が著明に発現亢進しており、KO による異常形質の代償に働いていることが示唆された。さらに、初代培養アストロサイトを用いた解析により、GD3 の著明な発現下においては、野生型マウスにおいても 9-O-アセチル GD3 を合成しうることが確認された。

(4) また、GM2/GD2 合成酵素 KO マウスで

は、舌下神経切断モデルの実験において神経修復能が著明に低下しており、その原因として舌下神経核における神経栄養因子およびその受容体の遺伝子発現レベルの低下が認められた。

(5) GM3 以外のすべてのガングリオシドを欠損するダブル KO マウスを、GM2/GD2 合成酵素 KO および GD3 合成酵素 KO を交配して作成した。この GM3-only マウスは、幼時から神経変性を呈したが、加齢とともに変性症状の進行と重篤化を認めた。

(6) GM3-only マウスにおける遺伝子発現プロファイルを検討する中で、ダブル KO マウスでは炎症関連、免疫関連の遺伝子の発現が亢進していることが判明した。

(7) GM3-only マウスの体内において、とくに補体系遺伝子の発現レベルを系統的に解析した結果、すべての補体成分、補体受容体の遺伝子発現亢進を認めた。しかし補体タンパク質については著変なし、あるいは減少する場合も認められた。

(8) ダブル KO マウスの免疫組織染色にて、アストロサイトの増生、ミクログリアの集簇などが確認されるとともに、炎症性サイトカイン遺伝子およびタンパク質の発現亢進が認められた。これらの異常が、加齢とともに増強することが確認された。

(9) スクロース密度勾配超遠心により分画した画分を用いて、GPI-アンカー蛋白質の細胞内局在を検討したところ、ラフトマーカである flotillin および補体制御因子 CD55 の、非ラフト画分への移行が認められ、基本的な脂質ラフト構造の変質が示唆された。

(10) さらに免疫組織化学的解析により flotillin や CD55 の分布を検討した結果、ダブル KO マウスにおいて膜染色パターンの異常が認められた。即ち、膜に局在するべき flotillin や CD55 が、細胞質の部位にも有意に染色され、膜の integrity が消失していることが示唆された。

(11) GM2/GD2 合成酵素 KO マウスの海馬スライスを用いて、LTP (long-term potentiation) を測定したところ、基本的に学習能の低下を示唆する結果が得られた。

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 19 件) (全て査読有)

① Zitman, F.M., Todorov, B., Verschuuren, J.J., Jacobs, B.C., Furukawa, K., Furukawa, K., Willison, H.J., Plomp, J.J. Neuromuscular synaptic transmission in aged ganglioside-deficient mice. *Neurobiology of Aging* in press 2009

- ②Silajdžić, E., Willison, H.J., Furukawa, K., Barnett, S.C. In vitro analysis of glial cell function in ganglioside deficient mice. *J. Neurosci. Res.* In press 2009
- ③Oikawa, N., Yamaguchi, H., Ogino, K., Taki, T., Yuyama, K., Yamamoto, N., Shin, R.-W., Furukawa, K., and Yanagisawa, K.: Gangliosides determine the amyloid pathology of Alzheimer disease. *Neuroreport* in press 2009
- ④ Greenshields, K.N., Halstead, S.K., Zitman, F.M., Rinaldi, S., Brennan, K.M., O'Leary, C., Chamberlain, L.H., Easton, A., Roxburgh, J., Pediani, J., Furukawa, K., Furukawa, K., Goodyear, C.S., Plomp, J.J., Willison, H.J. The neuropathic potential of anti-GM1 autoantibodies is regulated by the local glycolipid environment in mice. *J. Clin. Invest.* in press 2009
- ⑤Orie Tajima, Nobuaki Egashira, Yuhsuke Ohmi, Yoshihiko Fukue, Kenichi Mishima, Katsunori Iwasaki, Michihiro Fujiwara, Yasuo Sugiura, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa: Reduced motor and sensory functions and emotional response in GM3-only mice: emergence from early stage of life and exacerbation with aging. *Behavioural Brain Research* in press 2009
- ⑥Zitman, F.M., Todorov, B., Jacobs, B.C., Verschuuren, J.J., Furukawa, K., Furukawa, K., Willison, H.J., and Plomp, J.J.: Neuromuscular synaptic function in mice lacking major subsets of gangliosides. *Neuroscience* in press 2009
- ⑦ Koichi Furukawa, Akiko Tsuchida, Tetsuya Okajima, Keiko Furukawa: Glycoconjugate glycosyltransferases. *Glycoconj. J.* in press 2009
- ⑧ Matsuura, A., Ito, M., Sakaidani, Y., Kondo, T., Murakami, K., Furukawa, K., Nadano, D., Matsuda, T. and Okajima, T.: O-linked N-acetylglucosamine is present on the extracellular domain of notch receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 35486-35495, 2008
- ⑨ Fujii, Y., Ozaki, N., Taguchi, T., Mizumura, K., Furukawa, K., and Sugiura, Y. TRP channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and delayed onset muscle soreness. *Pain* 140, 292-304, 2008
- ⑩Furukawa, K., Hamamura, K., Nakashima, H., Furukawa, K.: Molecules in the signaling pathway activated by gangliosides can be targets of therapeutics for malignant melanomas. *Proteomics* 8, 3312-3316, 2008
- ⑪Miyamoto K, Takada K, Furukawa K, Furukawa K, Kusunoki S. Roles of complex gangliosides in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glycobiology*, 18, 408-413, 2008
- ⑫Kittaka, D., Itoh, M., Ohmi, Y., Kondo, Y., Fukumoto, S., Urano, T., Tajima, O., Furukawa, K., and Furukawa, K.: Impaired hypoglossal nerve regeneration in complex ganglioside-lacking mutant mice: down-regulation of neurotrophic factors and receptors as possible mechanisms. *Glycobiology* 18, 509-516, 2008
- ⑬Furukawa, K., Aixinjueluo, W., Kasama, T., Ohkawa, Y., Yoshihara, M., Ohmi, Y., Tajima, O., Suzumura, A., Kittaka, D., and Furukawa, K.: Disruption of GM2/GD2 synthase gene resulted in neo-expression of 9-O-acetyl GD3 irrespective of Tis21. *J. Neurochem.* 105, 1057-1066, 2008
- ⑭ Yutaka Kondo, Lanlan Shen, Alfred Cheng, Saira Ahmed, Yanis Bumber, Chantale Charo, Tadanori Yamochi, Takeshi Urano, Koichi Furukawa, Bernard Kwabi-Addo, David L Gold, Yoshitaka Sekido, Tim Hui-Ming Huang and Jean-Pierre J Issa: Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 tri-methylation independent of promoter DNA methylation. *Nat. Genet.* 40: 741-750, 2008
- ⑮Hamamura, K., Tsuji, M., Nakashima, H., Miyazaki, S., Urano, T., Yamamoto, N., Ueda, M., Furukawa, K., and Furukawa, K.: Focal adhesion kinase as well as p130Cas and paxillin is crucially involved in the enhanced malignant properties under expression of ganglioside GD3 in melanoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 513-519, 2008
- ⑯Fujita A, Cheng J, Hirakawa M, Furukawa K, Kusunoki S, Fujimoto T.: Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Mol. Biol. Cell*, 18, 2112-2122, 2007
- ⑰Yamauchi Y, Reid PC, Sperry JB, Furukawa K, Takeya M, Chang CC, Chang TY.: Plasma membrane rafts complete cholesterol synthesis by participating in retrograde movement of precursor sterols. *J. Biol. Chem.* 282, 34994-35004, 2007
- ⑱Susuki, K., Baba, H., Tohyama, K., Kanai, K., Kuwabara, S., Hirata, K, Furukawa,

- K., Furukawa, K., Rasband, M.N., Yuki, N.: Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia* 55, 746-757, 2007
- ⑱ Senda, M., Ito, A., Tsuchida, A., Nakamura, Y., Kasama, K., Kiso, M., Katagiri, Y., Yoshikawa, K., Ono, Y., Ogiso, M., Urano, T., Furukawa, K., Oshima, S., and Furukawa, K.: Identification and expression of a sialyltransferase responsible for the synthesis of disialylgalactosylgloboside in normal and malignant kidney cells: Down-regulation of ST6GalNAc VI in renal cancers. *Biochem. J.* 402, 459-470, 2007
- [学会発表] (計 28 件)
1. 田島織絵、大海雄介、大川祐樹、古川圭子、古川鋼一
糖鎖欠損マウスにおける神経再生分子群の探索:Ninjurin2の神経機能制御メカニズム。第31回日本分子生物学会年会/第81回日本生化学会大会シンポジウム (2008年12月11日 神戸)
 2. 大海雄介、田島織絵、大川祐樹、森 敦史、稲垣邦江、古川圭子、古川鋼一
脂質ラフト構築におけるガングリオシドの役割。第31回日本分子生物学会年会/第81回日本生化学会大会シンポジウム (2008年12月10日 神戸)
 3. 古川鋼一、大海雄介、大川祐樹、近藤裕史、章 青、古川圭子
糖脂質を含む複合体形成とシグナル制御。第31回日本分子生物学会年会/第81回日本生化学会大会シンポジウム (2008年12月10日 神戸)
 4. 董 宇、章 青、近藤裕史、徳田典代、中島英行、田島織絵、古川圭子、古川鋼一
GM1合成酵素を導入したメラノーマ細胞株におけるガングリオシドの分布と細胞表現型の変化。第67回日本癌学会学術総会 (2008年10月28日 名古屋)
 5. 成松 久、古川鋼一
Glycobiology and Search of Biomarkers toward Cancer (癌の攻略に向けた糖鎖研究とバイオマーカー探索)
オーガナイザー 第67回日本癌学会学術総会 (2008年10月28日 名古屋)
 6. 古川鋼一、大川祐樹、浜村和紀、牧野勇介、古川圭子
癌関連抗原によるシグナル制御機構と治療応用。第67回日本癌学会学術総会 (2008年10月28日 名古屋)
 7. 大川祐樹、宮崎清香、浜村和紀、宮田麻衣子、大海雄介、田島織絵、古川鋼一、古川圭子
Integrin-mediated signaling is essential in the malignant properties of human melanomas enhanced with GD3 expression. 第67回日本癌学会学術総会 (2008年10月28日 名古屋)
 8. 古川圭子、田島織絵、神戸真理子、宮田麻衣子、宮城妙子、古川鋼一
ヒトメラノーマ細胞におけるシアリダーゼ Neus3の癌性形質への関与。第67回日本癌学会学術総会 (2008年10月25日 名古屋)
 9. 牧野勇介、浜村和紀、辻 桃子、中島英行、古川圭子、古川鋼一
GD3 発現により活性化されるアダプター分子を標的としたメラノーマのRNAi治療の検討。第28回日本糖質学会年会 (2008年8月19日 つくば)
 10. 古川鋼一、山内祥生、浜村和紀、章 青、大海雄介、愛新覚羅維、古川圭子
脂質ラフトを介するシグナル制御と糖脂質糖鎖。第81回日本内分泌学会学術総会 (2008年5月17日 青森)
 11. Koichi Furukawa: Novel mechanisms for the neurodegeneration in the mutant mice lacking gangliosides. Gordon Reserch Conferences Glycolipid & sphingolipid Biology, Lucca, Italy, 2008,2.20
 12. 古川鋼一
糖鎖をターゲットにした癌治療の試み。研究成果公開シンポジウム「第3の生命鎖: 糖鎖の謎が今、解る」(2008年1月25日 東京)
 13. 大川祐樹、宮崎清香、浜村和紀、宮田麻衣子、田島織絵、浦野 健、古川鋼一、古川圭子
Ganglioside GD3 enhances integrins function in human malignant melanomas : 第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 (2007年12月12日 横浜)
 14. Y. Dong, Q. Zhang, Y. Kondo, Y. Zhu, N. Tokuda, H. Nakashima, O. Tajima, K. Furukawa, K. Furukawa: Distribution and compositin of gangliosides in GEM(Glycolipid-Enriched Microdomains)/raft Comparison between a amelanoma cell line and GM1 synthase-trasnfectants. 第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 (2007年12月12日 横浜)
 15. 古川圭子、田島織絵、神戸真理子、古川鋼一、森谷節子、宮城妙子
ヒトメラノーマにおける Neus3 過剰発現の効果。第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 (2007年12月12日 横浜)
 16. O. Tajima, Y. Ohmi, Y. Ohkawa, K.

- Furukawa, K. Furukawa: Identification of neuronal degeneration- and regeneration-related molecules using GM3 only mice: role of an adhesion molecule Ninjurin2 in nervous systems. 第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 (2007年12月12日 横浜)
17. 古川鋼一、宮崎清香、辻 桃子、大川祐樹、土田明子、古川圭子
Molecular complex formation based on glycosphingolipids as a functional platform to support cancer cells : 第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 (2007年12月12日 横浜)
18. 遠藤玉夫、古川鋼一
シンポジウム 「糖鎖による分子複合体形成のダイナミクス・その制御と破綻」オーガナイザー 第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会(2007年12月12日 横浜)
19. 大海雄介、田島織絵、大川祐樹、古川圭子、古川鋼一
GM3 only mice の神経変性における補体系の役割。第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 (2007年12月12日 横浜)
20. 大川祐樹、宮崎清香、浜村和紀、宮田麻衣子、田島織絵、浦野 健、古川鋼一、古川圭子
Ganglioside GD3 enhances integrins function in human malignant melanomas : 第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 (2007年12月12日 横浜)
21. 大海雄介、田島織絵、大川祐樹、古川圭子、古川鋼一
GM3 only mice の神経変性における補体系の役割。第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会大会 (2007年12月12日 横浜)
22. 大川祐樹、宮崎清香、浜村和紀、宮田麻衣子、田島織絵、浦野 健、古川鋼一、古川圭子
Involvement of integrins in the malignant phenotypes of human melanomas enhanced by ganglioside GD3: 第66回日本癌学会学術総会 (2007年10月4日 横浜)
23. 古川圭子、辻 桃子、浜村和紀、中島英行、古川鋼一
酸性糖脂質 GD3 によるヒトメラノーマの癌性形質形成における Src family kinases の役割。第66回日本癌学会学術総会 (2007年10月4日 横浜)
24. 土田明子、千田基宏、伊藤明宏、齊藤誠一、木曾真、安藤隆幸、Anne Harduin-Lepers、古川圭子、古川鋼一
腎癌細胞株における分岐型ジシアリル糖脂質抗原の役割。第66回日本癌学会学術総会 (2007年10月4日 横浜)
25. Noriyo Tokuda: Involvement of beta4GalT-VI in the synthesis of lactosylceramide as analysed by the knockout mice. The 21st Century Center of Excellence Program 4th International Symposium on Functional Molecules Linked to Neurodegeneration and Oncogenesis - Towards Molecular Targeted Therapy -. Nagoya, Japan, 2007,10.4
26. Furukawa K., Hamamura K., Tsuji M., Miyazaki S., Nakashima H., Furukawa K.: Mechanisms for the enhancement of malignant signals with ganglioside GD3 in human melanoma cells. 14th European Carbohydrate Symposium. Lubeck, Germany, 2007,9.5
27. Y. Ohmi*, O. Tajima, Y. Ohkawa, K. Furukawa, K. Furukawa : Roles of complement systems for the nerve degeneration in GM3 only mice. XIX International Symposium on Glycoconjugates. Cairns, Australia, 2007,7.18
28. Yuki Ohkawa, Sayaka Miyazaki, Kazunori Hamamura, Maiko Miyata, Koichi Furukawa, Ori Tajima, Keiko Furukawa, a: Roles of integrins in the malignant properties of malignant melanomas enhanced by ganglioside GD3. The 27th Sapporo Cancer Seminar International Symposium. Sapporo, Japan, 2007, 7.12
- [図書] (計 4 件)
1. 古川鋼一 他 編集 糖鎖情報の独自性と普遍性 蛋白質核酸酵素 2008年増刊 p1547-1551 共立出版(東京)
2. 古川鋼一、遠藤玉夫、川寄敏祐 編集 波及・深化する糖鎖研究 実験医学 2007年 p115-120 羊土社
3. Furukawa, K., Tsuchida, A., Furukawa, K.: Biosynthesis of Glycolipids. In *Comprehensive glycoscience*. From Chemistry to Systems Biology. Eds. By J.P. Kamerling, G.J. Boons, Y.C. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi, A.G.J. Voragen, pp. 105-114, Elsevier, Oxford, UK 2007

4. Furukawa, K., Tajima, O., Okuda, T., Tokuda, N., and Furukawa, K.: Knockout mice and glycolipids. *In **Comprehensive glycoscience***. From Chemistry to Systems Biology. Eds. By J.P. Kamerling, G.J. Boons, Y.C. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi, A.G.J. Voragen, pp. 149-157, Elsevier, Oxford, UK 2007

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoyau.ac.jp/biochemII/index.html>

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10202.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川鋼一 (FURUKAWA KOICHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80211530