

特集：糖鎖機能の多層性と神経 sugar code

聴覚機能における複合糖質の役割 ＝聴覚受容器の糖鎖生物学へ向けて＝

郷 慎 司¹, 吉 川 弥 里^{1,2}, 井ノ口 仁 一¹

音の受容器官である「蝸牛」では発生あるいは生後成熟期間において、様々な糖鎖構造の発現量・発現部位が変化することから、複合糖質の聴覚機能への関与が示唆されている。しかし、その報告の多くは糖脂質、プロテオグリカン、糖タンパク質の生合成および代謝に関連する酵素遺伝子群のクローニング以前になされた研究であり、聴覚機能を制御する複合糖質分子種の同定には至っていなかった。筆者らはガングリオシド GM3 合成酵素欠損マウスが生後間もなく完全に聴力を消失することを見いだした。蝸牛のコルチ器に存在する有毛細胞の聴毛の選択的変性が起こることがその原因であり、コルチ器の機能および形態の維持に糖脂質：ガングリオシドが必須であることが示された。この GM3 合成酵素欠損マウスに見られるコルチ器の変性は感音性難聴の病態の一部と類似している。この発見が聴覚における糖鎖生物学の発展の契機となることを願い、本稿では聴覚器官における複合糖質の情報についてまとめ、今後の聴覚研究における糖鎖生物学の役割に関して考察した。

はじめに

我々動物は外界を感知するために、視覚、聴覚、触覚、味覚、嗅覚等の感覚、いわゆる「五感」を有している。これらの感覚を認識するためには感覚受容細胞、それら細胞が形成する感覚受容組織、伝達のための神経とそれぞれの感覚を最終的に認識する脳の各エリアが正常に機能しなければならない。

聴覚は音、つまり空気を伝わる波の信号を神経活動情報に変換し認識する機能である。外耳にて集められた音波は、中耳の鼓膜・耳小骨を経て増幅され、内耳の「蝸牛」へと伝えられる（図1）。蝸牛は1本の管が渦巻き状に約2回転半巻いた管状の構造をなしており内部はリンパ液によって満たされている。

蝸牛の内部は前庭階、中央階、鼓室階の三層に分かれており、中央階-鼓室階境界の基板上に、音を感知し電気信号に変換して脳に伝える上皮細胞群「コルチ器」が構成されている（図2）。コルチ器は感覚細胞である1列の内毛細胞および3列の外毛細胞とそれを支える支持細胞からなる。コルチ器における音波の電気信号への変換に重要な役割を担っているのが有毛細胞である。有毛細胞はその上部に「聴毛（不動毛；stereocilia）」と呼ばれる規則正しく配列した微細な繊毛構造を有している。蝸牛内に伝わった音波によって、基板が振動すると蓋膜と有毛細胞の聴毛との間で力学的ひずみが生じ、不動毛に発現するイオンチャネルが開きイオンが流入する。これが音を感知する刺激となる。流入したイオンによって有毛細胞は脱分極

¹ 東北薬科大学分子生体膜研究所機能病態分子学教室
(〒981-8558 仙台市青葉区小松島 4-4-1)

² 福岡大学大学院薬学研究科 (〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1)

Glycocojugates in hearing

Shinji Go¹, Misato Yoshikawa^{1,2}, and Jin-ichi Inokuchi¹ (¹Division of Glycopathology, Institute of Molecular Biomembranes and Glycobiology, Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981-8558, Japan; ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka, 814-0180 Japan)

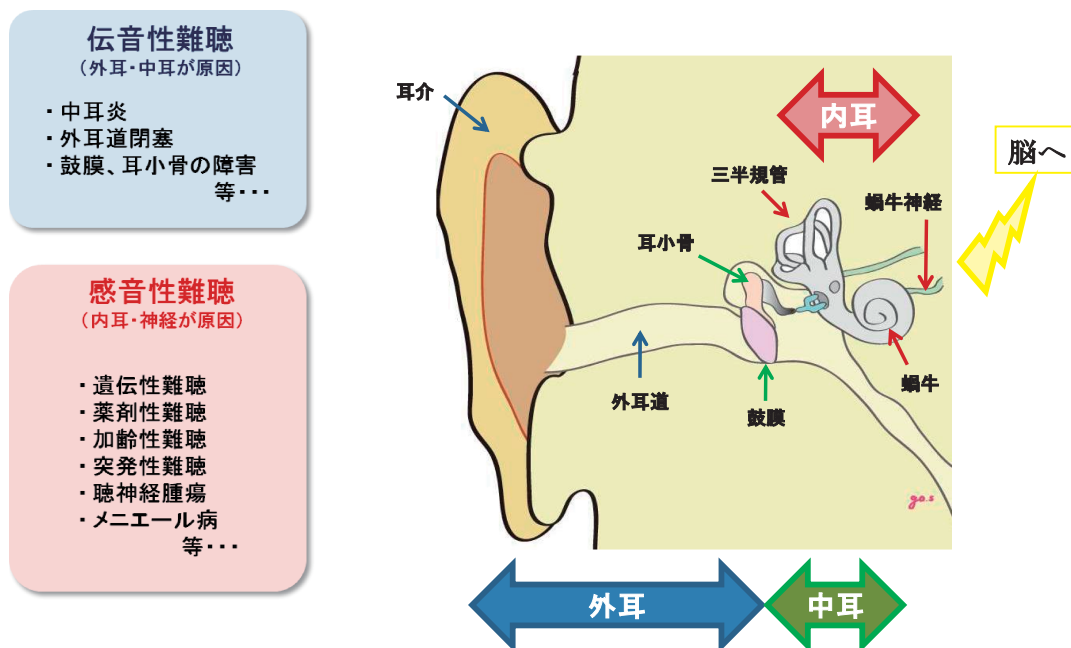


図1 耳の構造と難聴

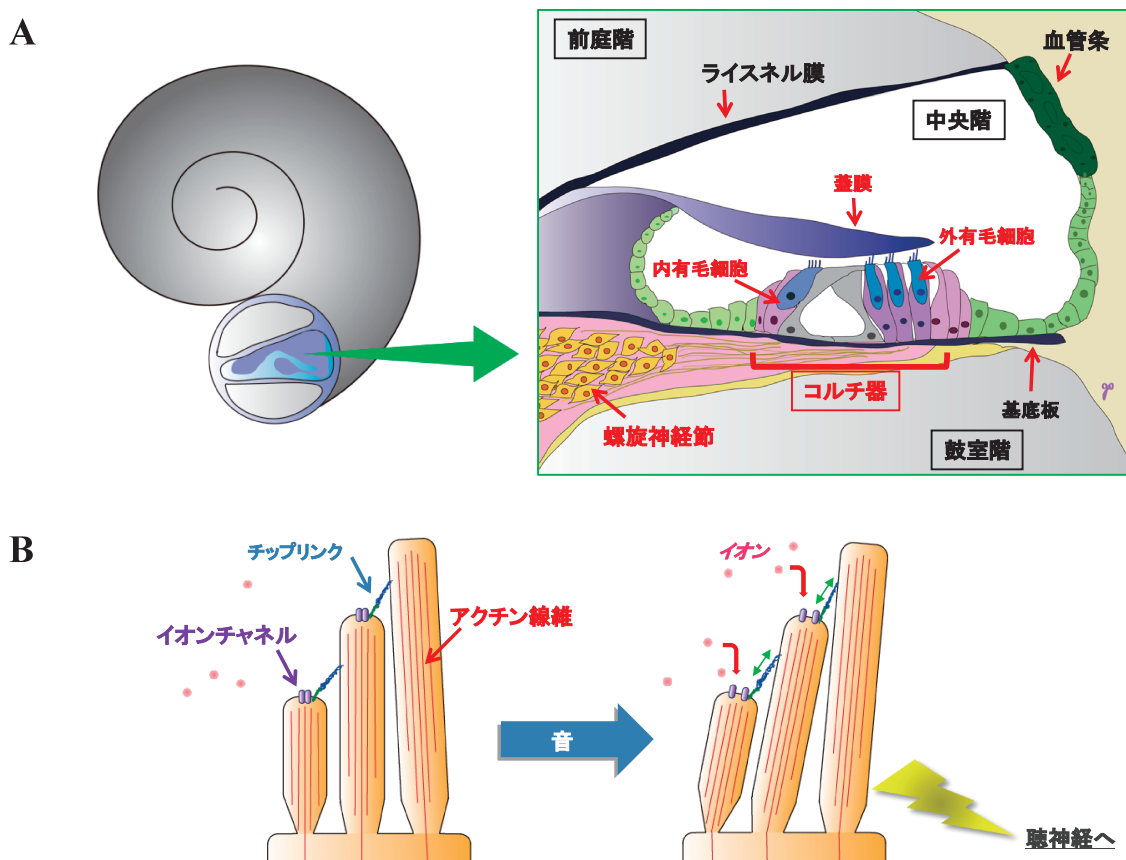


図2 内耳・蝸牛の構造(A)と有毛細胞の聴毛 (stereocilia) による音の感知(B)

内耳の蝸牛の内部は三層に分かれており、中央階-鼓室階境界の基底板上に音を感じし電気信号に変換して脳に伝える上皮細胞群「コルチ器」が構成されている(A)。音の振動によって蓋膜と有毛細胞上部の聴毛との間で力学的ひずみが生じると、聴毛に発現するイオンチャネルが開きイオンが流入する。イオン流入によって有毛細胞が脱分極し、神経伝達物質を放出する(B)。

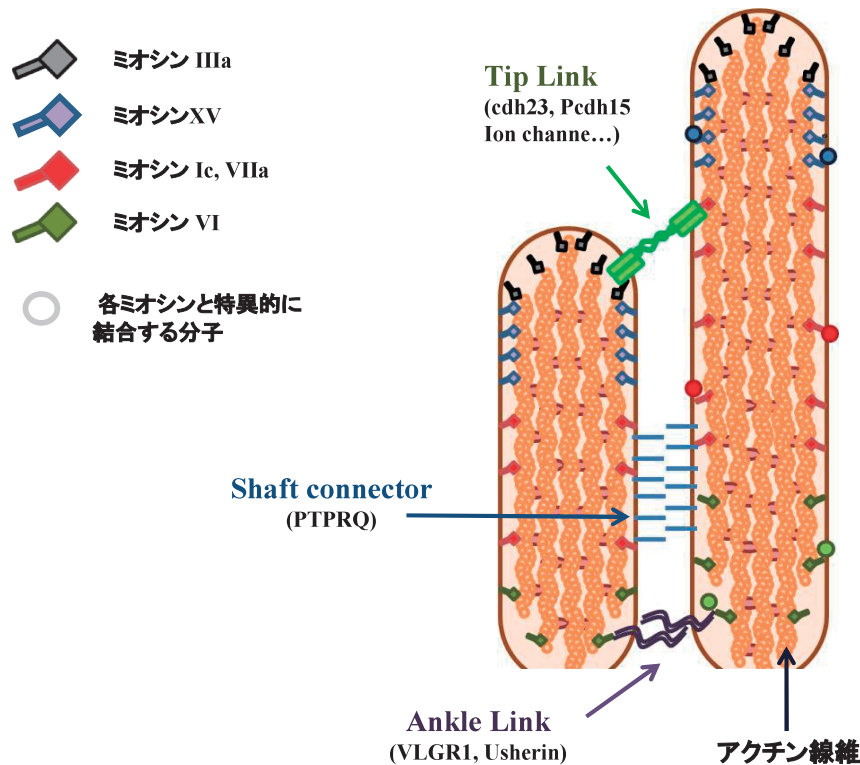


図3 聴毛の微細構造のモデル図

有毛細胞の聴毛内には様々な分子（特に難聴原因遺伝子産物）が特定部位に局在する。

を起こし神経伝達物質を放出する。このシグナルを蝸牛神経が受容し、信号として最終的に脳の聴覚野へと伝達され音として認識される（図2）¹⁾。

従来からこの音受容器官・蝸牛内に様々な糖鎖構造が発現していることが報告されている（表1）^{2,3)}。これらの糖鎖構造の中には、蝸牛発達段階において発現変化するものがあること⁴⁾、また、難聴の原因となる薬剤投与により発現量が変化する可能性があることが知られており⁵⁾、糖鎖が聴覚において重要な機能を果たしているのではないかと考えられていた。しかしながら、特定の糖鎖と聴覚機能の関連が分子レベルで示されてはいなかった。糖鎖は小胞体-ゴルジ経路で合成されるタンパク質または脂質に共有結合し、「複合糖質」と呼ばれる生体分子を作る。細胞表面に発現する糖鎖構造は細胞種によって厳密に制御されており、多細胞生物の細胞社会における各細胞の個性を表現し、細胞膜を介した情報伝達の制御や細胞間認識などにおいて大きな役割を果たしている。近年、がんや糖尿病、神経疾患などにおいて、複合糖質発現の量的・質的变化と病態との関連が次々と明らかにされつつあり、糖鎖研究はポストゲノム研究の柱の一つとなっている。

糖脂質は脂質に糖鎖が結合した分子であり、疎水性の脂質部分が細胞膜に埋め込まれ、細胞膜表面に糖鎖部分をつなぎとめた形となっている。脂質部分がセラミドからなる

ものを「スフィンゴ糖脂質」、ジアシルグリセロールを基本とするものを「グリセロ糖脂質」という。また、糖鎖部分が中性糖のみで構成される糖脂質を「中性糖脂質」、シアル酸、ウロン酸、硫酸化糖などの酸性糖が含まれる糖脂質を「酸性糖脂質」と分類する。多様な糖脂質構造が生体内に存在し、それぞれ固有の機能を有していることが報告されている⁶⁾。

シアル酸を有する酸性スフィンゴ糖脂質「ガングリオシド」は神経系に非常に含量が高く、その機能が多角的に検証されている。マウスの神経系の酸性糖脂質はヒトを含む他の多くの哺乳類とよく類似しており、硫酸化糖脂質サルファチド (SM4 (SO₃-GalCer))、ガングリオシド GM1, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1 などを発現している（図4）。胎児期からの脳の形成・発達過程において、酸性糖脂質の発現分子種・発現量は劇的に変化することが知られている。このことは糖脂質の発現が脳（神経）形成過程に非常に重要な役割をしていることを示唆するが⁷⁾、脳に発現するこれらのガングリオシドを完全に欠損したマウスである GM3 合成酵素 (GM3S) と GM2 合成酵素 (GM2S) の二重欠損 (GM2S/GM3S DKO) マウスは脳形成はほぼ正常に生まれてくる。しかし、生後すぐに重篤な中枢神経障害を示し、大多数が早期に死亡する⁸⁾。また、GM2S KO マウスでは舌下神経の切断による舌下神経再生が障害されて

表1 蝸牛内に発現する糖鎖構造

蝸牛内の各部位に発現する糖鎖構造および各部位に反応するレクチン（破線下）を示した²⁾。

蝸牛内部位	発現糖鎖構造および反応レクチン	動物種
蓋 膜	Le ^x , Le ^y , sLe ^x , sialyl-unbranched type2 chain コンドロイチン 4-, または 6-硫酸, ケラタン硫酸 ケラタン硫酸	モルモット ジャービル チンチラ
	LFA, GSA II, DBA, SJA, VVA, SBA, APA, UAE-I, LTA, ConA, LCA, PSA, RCA-I, MPA WGA, DSA, PWM, E-PHA, L-PHA WGA, APA, UAE-I, RCA120, HPA, ConA	ジャービル モルモット ラット マウスなど ヒト
血 管 条	sLe ^x , sialyl-unbranched type2 chain, GM3, 9-O-Ac GD3, GD2/GD3 ヘパラン硫酸	モルモット チンチラ ラット
	ケラタン硫酸 GM3	チンチラ マウス
螺旋神経節	WGA, APA, RCA120, HPA WGA, ConA, DBA, PNA, RCA-I, SBA	ヒト ラット
	ヘパラン硫酸 ポリシアル酸	チンチラ ラット マウス
コ ル チ 器	GM3, GD2/GD3 GM3	モルモット マウス
	B 型, H 型血液型抗原 ケラタン硫酸 コンドロイチン 4 硫酸 GT1b, GM3 ポリシアル酸	ラット モルモット マウス ラット マウス
ライスネル膜	WGA, ConA, SBA, PSA, RCA-II, PHA-E ヘパラン硫酸	マウス マウス ラット
	WGA, APA, RCA120, HPA, ConA	ヒト
TLC 解 析	GM3, GM1, GT1b, GQ1b, GM3, GM1, GD3, GD1a,b, GT1b GalCer, SM4	チンチラ ラット
	GM3, GM1, GM2, GD3, GD1a,b, GT1b LacCer, GlcCer, SM4, SM3	マウス

おり、この障害はガングリオシド（GT1b）の投与により回復する⁹⁾。これらの研究から、ガングリオシドは脳の形成過程というよりも神経機能の維持や修復の過程で重要な機能を果たしていることが判る。

我々の研究グループは、ガングリオ系ガングリオシドの生合成の律速酵素である GM3S の遺伝子クローニングに参画して以来¹⁰⁾、ガングリオシドの病態生理学的意義の解明に焦点を当てた研究を展開してきた^{11~19)}。その過程において GM3S KO マウスにおいて内耳の蝸牛の機能が選択的に障害されていることを見出した²⁰⁾。本稿では、聴覚機能におけるガングリオシドの役割に関する我々の研究結果について述べ、現在までに報告されている複合糖質分子の聴覚機能への関与についてまとめた。そして、今後の聴覚研究における糖鎖生物学の役割に関して考察した。

1. ガングリオシド欠損マウスと難聴

GM3S KO マウスのほぼすべての臓器では、a-, b-シリーズのガングリオシドが消失し、通常ほとんど発現が見られない α-シリーズのガングリオシドが発現する（図4）。GM3S KO マウスはメンデルの法則に従う比率で生まれ、ほぼ正常に成長し、寿命も野生型と比較して大きな差は見られない。前述のように GM2S/GM3S DKO マウスは生後数か月以内に大半が死亡することから、GM3S KO マウスでは「α-シリーズ」ガングリオシドが生命維持に重要な「a-, b-シリーズ」ガングリオシドの機能を代償していると考えられる。

野生型マウスの内耳にはグルコシルセラミド、サルファチド（SM3, SM4）、a-, b-シリーズの GM3, GM1, GD1a, GD1b, GT1b の多様な糖脂質が発現している（図5）。

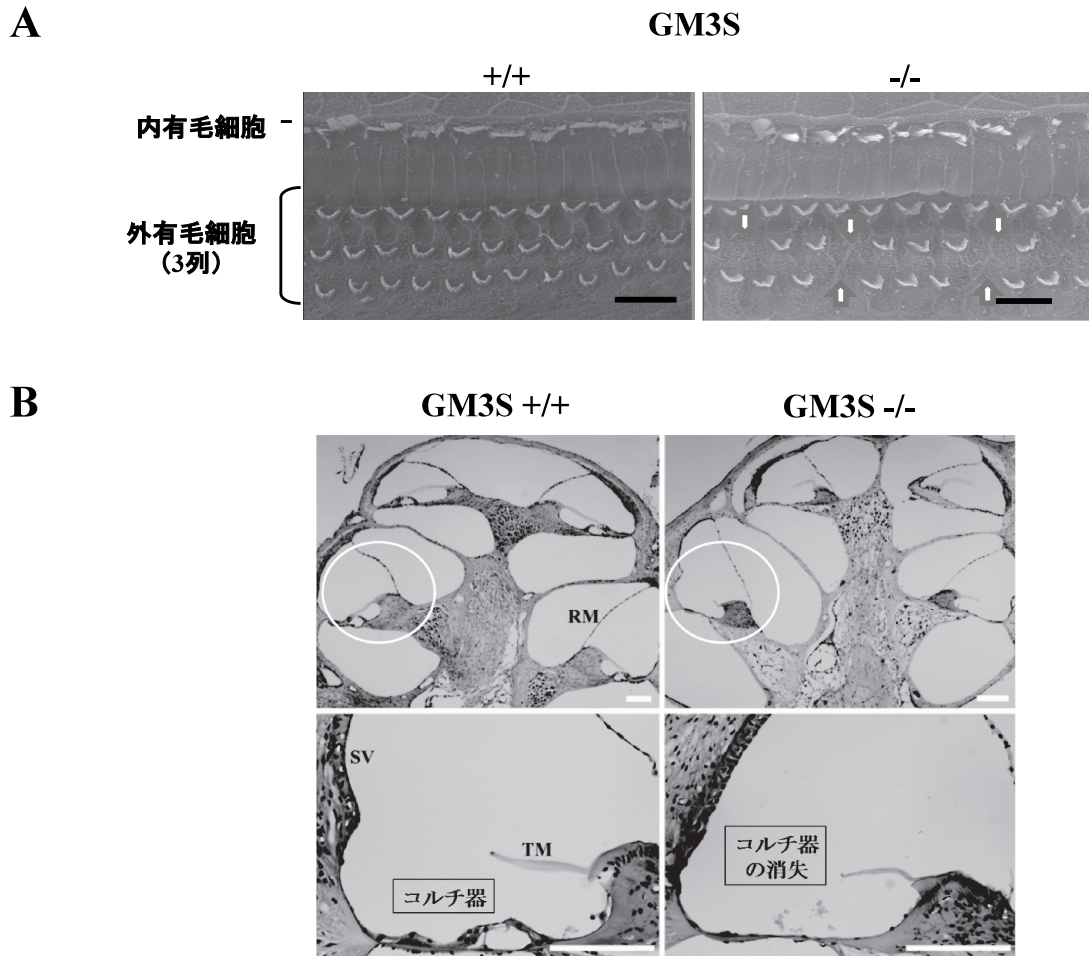


図6 GM3S K.O. マウスはコルチ器の変性を示す

A: 生後14日目の有毛細胞聴毛の電子顕微鏡像。最上段の1列が内有毛細胞，その下の3列が外有毛細胞。矢印は聴毛の脱落部位を示している。

B: 上段は蝸牛の断面図，下段はコルチ器拡大図。生後8週齢のGM3S K.O. マウスはコルチ器が脱落している。RM: ライスネル膜，SV: 血管条，TM: 蓋膜，

GM3S KO マウスの内耳では，a-, b-シリーズのガングリオシドが消失し，o-シリーズのGM1b, GD1 α が発現する。生後間もなくのGM3S KO マウスの蝸牛内の各細胞はほぼ正常に形成されているように見られるが，マウスの聴覚機能開始時期である生後14日目前後にかけて外有毛細胞の聴毛の変性および部分的脱落と，内有毛細胞聴毛の融合・変形が観察されるようになる（図6）。生後14日の段階ではGM3S KO マウスは高度の難聴であるが，その後数日以内に聴覚機能を完全に消失する²⁰⁾。

内有毛細胞は音刺激の電気信号への変換と中枢への伝達，外有毛細胞は内有毛細胞機能のモジュレーターとしての機能を有している。有毛細胞上部の聴毛は，アクチン線維と多様な難聴原因遺伝子産物によって構成されている。聴毛の正常な形成・維持は，音刺激の感知・変換に不可欠である（図2, 3）。GM3S KO マウスで聴覚機能障害の主な原因はこの内及び外有毛細胞の聴毛の変性・脱落である

と考えられる。GM3S KO マウスでは，聴覚機能を完全に消失した後，有毛細胞だけではなくコルチ器全体の変性が進行し，8週齢以降になるとコルチ器全体の選択的な脱落（消失）が起こる（図6）。この蝸牛の変性は「感音性難聴」と呼ばれる難聴の病態の一部と類似している。音を感知し脳に伝える部分である内耳から神経の障害に起因する難聴を感音性難聴と呼ぶが（図1参照），特に蝸牛の有毛細胞，螺旋神経節細胞，血管条細胞が原因となる場合が多い。抗がん剤やアミノグリコシド系抗生物質などの薬物，これらの細胞に発現する難聴原因遺伝子の変異，加齢，騒音などの環境要因による各細胞の損傷が原因となる。いったん損傷した有毛細胞は再生が不可能であり，GM3S KO マウスのように完全にコルチ器が脱落した場合，聴覚の回復は不可能である。

GM3のみ発現するGM3S およびGM2Sの二重欠損マウスは音に対し反応することと²¹⁾，GM3S KO マウスの結果

を合わせて考えると、聴覚機能の維持には、特に“GM3”が重要であると考えられる。この我々の作業仮説を支持する事実として、1) 野生型マウスの外有毛細胞の聴毛には GM3 が特異的に発現し、下流の GM1 ガングリオシドなどは認められない（未発表）こと、2) GM3S KO マウスで最初に認められる異常は外有毛細胞の聴毛の変性・脱落であることを見出している。ガングリオシドは細胞膜上で特定の分子群と相互作用し、マイクロドメイン（機能性微小膜領域）を形成し、様々な生体機能を制御していると考えられている。GM3S KO マウスの聴覚に関する表現系は、内耳蝸牛の有毛細胞の選択的変性である。内耳の前庭や三半規管の機能（体の平衡、加速度感知）は正常であり、その他の感覚器に顕著な異常も現在のところ認められていない。GM3S KO マウスで変性が顕著にみられた聴毛には、多数の難聴原因遺伝子産物が固有のパターンで発現しており、機能的に異なる複数の機能性領域が存在していることが示唆されている（図 3）。したがって、聴毛に特異的に発現する分子の発現、局在、機能を GM3 が制御していると考えられる。この有毛細胞における各難聴原因遺伝子産物の選択的輸送システム・局在の分子機構はほとんど解明されていない。ガングリオシドに注目したマイクロドメイン研究の対象として極めて興味深い。

GM3S KO マウスで解決しなければならない大きな問題がある。それはヒトの GM3S 欠損症との関連である。2004 年、GM3S 欠損の症例が見出された。これはヒトにおけるスフィンゴ糖脂質合成系酵素の欠損の存在を示した最初の報告である²²⁾。患者は幼児期に発症する重篤なてんかん症状と視覚異常を示し、20 歳前後で死亡する。視覚の異常に関しては網膜の機能異常ではなく、視神経-中枢神経の機能異常によるものであると考えられている²³⁾。現在のところ、我々が作製した GM3S KO マウスにおいて、顕著な視覚異常、通常飼育下における重篤なてんかん症状などはみられていない。このヒトとマウスの表現型の違いを今後精査しなければならない。ヒトとマウスの表現型の違いを解明するには、今後、ガングリオシド組成、遺伝子発現等を多角的に比較検討していく必要があると考えられる。

GM3S 欠損の患者の聴覚機能に関して詳細な情報は現在のところ不明である。マウス、ラット、モルモット、チンチラ等のげっ歯類の蝸牛のガングリオシドは類似の発現パターンを示すことから^{24~26)}、げっ歯類間ではガングリオシド分子による共通の聴覚機能制御機構の存在が予想される。また、ヒトの蝸牛を用いた解析は現実的に困難であるし、現在のところヒト内耳由来の培養細胞株も存在しない。これらの事情からヒト内耳における各複合糖質の発現の解析は非常に困難であり、ヒトの聴覚とガングリオシドの関係性を明らかにするには非常に厳しい現状ではある。

しかし最近、マウス iPS 細胞、ES 細胞から有毛細胞様の細胞に分化させる技術が樹立された²⁷⁾。この技術を応用し、将来的にヒトの iPS 細胞から有毛細胞に分化させることが可能になれば、ヒトの有毛細胞の糖脂質の組成・機能解析のモデルとして応用できると期待される。

一般によく用いられるマウス系統 C57BL/6J は、加齢性難聴を発症するマウスとして有名である。その大きな原因としてはカドヘリン 23 をコードする *cdh23* 遺伝子に変異が入っているためとされている。他にも BALB/c や 129X1/SvJ, DBA など実験に頻繁に用いられるマウスが *cdh23* 遺伝子変異を有しているが、C57BL/6J の加齢性難聴の症状（発症時期）とは異なる部分がある。C57BL/6J では *cdh23* 以外のいくつかの要因が加齢性難聴の促進に大きく寄与していると考えられる。我々のグループでも、現在いくつかのマウス系統に GM3S KO マウスの戻し交配を行い解析を進めているが、系統によって聴覚障害の発症時期が大きく異なる（ただし、聴覚が消失するのは間違いない）（未発表）。これらの GM3S KO マウス系統間の表現型の差異に関与する分子が判明すれば、より詳細にガングリオシドの聴覚機能における特異的機能が明らかになってくるであろう。

2. 聴覚機能と複合糖質

聴覚機能における複合糖質の機能が分子レベルで解明された例はほとんどない。しかし、いくつかの糖鎖関連遺伝子の変異による疾患、動物モデルにおいて難聴を発症する報告から糖鎖が聴覚機能維持に必須であることは間違いない。

ヒトの疾患ではシアリドーシス²⁸⁾、ムコ多糖症²⁹⁾（Morquio 症候群、Sly 病）、GM2 ガングリオシドーシス³⁰⁾（Sandhoff 病）などで聴覚機能障害の報告がある。これら複合糖質分解関連酵素の変異によるリソソーム病では、分解対象となる複合糖質の蓄積、代謝異常により様々な細胞で異常が生じる。その結果、全身で様々な症状を呈するがその症状の一つに外耳から内耳・神経の様々な部位に異常が生じる混合性難聴がある。リソソーム病以外では、先天性糖鎖異常症（congenital disorders of glycosylation）type Ig（CDG-Ig）の患者において難聴に関する報告がある³¹⁾。CDG-Ig では様々な糖タンパク質への N 結合型糖鎖の付加が異常になる。CDG-Ig も様々な症状を発症するが、その一症状として感音性難聴が報告されている。これらの病態における難聴は、様々な症状の中の一症状ではあるが正常な糖鎖代謝が聴覚維持に必要であることを示唆するものである。

実験動物レベルでは、我々が報告した GM3S KO マウス（前項参照）以外では、CMP-sialic acid hydroxylase（*Cmah*）欠損マウス³²⁾、糖鎖依存的なユビキチンリガーゼのサブユ

ニットである Fbx-2 の欠損マウス³³⁾、上述したリソソーム病のモデルとなる lysosomal sialidase (Neu-1) 欠損マウス³⁴⁾と VII 型ムコ多糖症モデルマウス (β -グルクロニダーゼ活性欠損マウス)³⁵⁾において難聴を発症することが報告されており、糖鎖と難聴の関連が示唆されている。

分子レベルで聴覚における糖鎖の重要性が示されたのが clarin-1 の例である³⁶⁾。聴覚と視覚の異常を発症するアッシャー症候群 III 型の原因の一部は、clarin-1 の *N* 結合型糖鎖付加部位の変異 (N48K) である。clarin-1 は蝸牛では有毛細胞に発現するテトラスパニンファミリーに属する 4 回膜貫通型の膜タンパク質であり、アクチン線維の形成を制御して有毛細胞の聴毛の形成・維持に関与していると考えられている。N48K 変異によって clarin-1 に *N* 結合型糖鎖が付加されない場合、clarin-1 は速やかに分解されることが *in vitro* の実験によって示されている。この知見は聴覚機能を制御する糖タンパク質の *N* 結合型糖鎖付加の重要性を示す例と言えるが、この部位に付加されるあるいは内耳で実際に付加されている糖鎖構造に関しては不明である。今後、個々の聴覚関連タンパク質の糖鎖付加に関しての情報が益々重要になってくると考えられる。

3. 難聴原因遺伝子と糖鎖

現在、非常に多くの難聴原因遺伝子が見つかった。おそらく蝸牛だけで 100 を超えると推察されている。この事実は蝸牛の機能ひいては聴覚機能が複雑に、かつ精密に制御されていることを示すものである。難聴原因遺伝子は、血管条に発現する各種イオンチャネル、支持細胞に発現するギャップジャンクション・タイトジャンクションを形成する分子、蝸牛の発生・各種細胞の分化に関わる転写因子や成長因子、ミトコンドリア遺伝子、蓋膜を形成する細胞外マトリックス形成タンパク質など様々である³⁷⁾。特に有毛細胞の聴毛の形成、機能維持に必要な分子が難聴原因遺伝子として多数報告されている³⁸⁾。その中には、接着分子 (カドヘリンファミリー)、アクチン線維形成に関わる分子 (espin, TRIOBP, ERM ファミリー)、ミオシンファミリー (unconventional myosins)、イオンチャネルなどが含まれている。

これらの分子を糖鎖の観点から眺めると興味深い事実が見えてくるかもしれない。現在同定されている難聴原因遺伝子のうち糖鎖に関して報告があるものは非常に少ない。

表 2 に難聴原因遺伝子のうち糖鎖情報があるものと、糖鎖

表 2 難聴原因遺伝子と糖鎖

現在判明している主要な難聴原因遺伝子のうち、糖鎖に関する情報があるもの、膜タンパク質あるいは分泌タンパク質であるものを示した。() の数字は推定 *N* 結合型糖鎖付加部位の数を示す。推定 *N* 結合型糖鎖付加部位 (Asn-X-Ser/Thr) はヒトの配列を基に探索した。

難聴原因遺伝子	タンパク質	糖鎖に関する情報 (潜在的 <i>N</i> 結合型糖鎖付加部位数)
<i>PTPRQ</i>	Protein tyrosine phosphatase, Receptor type Q	chondroitin sulphate, (39)
<i>OTOA</i>	otoancorin	GPI-anchored, (11)
<i>CLRN1</i>	clarin-1	<i>N</i> -glycan (N48)
<i>DSPP</i>	dentin sialophosphoprotein	<i>N</i> -, <i>O</i> -glycan, chondroitin sulphate,
<i>cdh23</i>	カドヘリン 23	(44)
<i>pcdh15</i>	プロトカドヘリン 15	(21)
<i>SLC26A4</i>	pendrin	(3)
<i>VLGR1</i>	very large G-protein coupled receptor 1	(99)
<i>TMC1</i>	Transmembrane channel-like protein 1	(4)
<i>COCH</i>	cochlin	(2)
<i>GJB2</i>	コネキシン 26	(1)
<i>GJB3</i>	コネキシン 31	(1)
<i>TMPRSS3</i>	Transmembrane protease, serine 3	(2)
<i>TECTA</i>	alpha-tectrin	(32)
<i>COL9A3</i>	alpha-3 type IX collagen	(1)
<i>COL11A2</i>	alpha-2 type XI collagen	(1)
<i>MARVELD2</i>	tricellulin	(1)
<i>Ush2A</i>	usherin	(73)
<i>GJB6</i>	コネキシン 30	0
<i>Tmie</i>	Transmembrane inner ear	0
<i>CLDN14</i>	クローディン 14	0
<i>KCNQ4</i>	Potassium channel, voltage-gated	0
<i>TMHS</i>	Tetraspan membrane protein of hair cell stereocilia	0

修飾が予想される膜タンパク質あるいは分泌タンパク質を挙げ、*N* 結合型糖鎖の数を推察した結果をまとめた。

聴毛の shaft connector の成分である PTPRQ に関しては、最近コンドロイチン硫酸鎖を持つことが示された³⁹⁾。しかし、PTPRQ タンパク質自体は、蝸牛の発生から生後成熟期まで発現しているが、コンドロイチン硫酸鎖は胎児期には強い発現を示すものの、蝸牛生後成熟時期には発現が大きく低下することが示されており、蝸牛の発生特定時期にプロテオグリカンとしての PTPRQ が重要な役割をしていることが示唆される。

otoancorin に関しては GPI アンカー型タンパク質であることが判明している⁴⁰⁾。前述の clarin-1 に関しては、*N* 結合型糖鎖修飾 (N48) の重要性が示されている。また、DSPP (dentin sialophosphoprotein) に関しては、よく研究される歯の象牙質においてはコンドロイチン 6-硫酸を持つプロテオグリカンであること、コアフコース修飾された *N* 結合型糖鎖と *O* 結合型糖鎖を複数有することが示されている⁴¹⁾。

他の難聴原因遺伝子産物に関しては糖鎖修飾の有無、糖鎖構造等の情報はほとんどないのが現状である。そのアミノ酸配列から潜在的 *N* 結合型糖鎖付加部位 (Asn-X-Ser/Thr) を探索してみると、多くの難聴原因遺伝子産物が *N* 結合型糖鎖の付加を受けていると考えられる。難聴原因遺伝子産物の中には非常に巨大なタンパク質が多数存在する。例えば、VLGR1 (very large G protein-coupled receptor 1) は約 6,300 アミノ酸からなる超巨大分子である。その配列から 90 を超える潜在的 *N* 結合型糖鎖付加部位が見出される。また、カドヘリン 23 (約 3,300 アミノ酸) や PTPRQ (約 2,300 アミノ酸)、プロトカドヘリン 15 (約 1,900 アミノ酸)、usherin (約 5,200 アミノ酸) 等の分子は巨大であり、潜在的 *N* 結合型糖鎖の付加部位も多い。特にこれらの難聴原因遺伝子産物は、聴毛内の特定部位に強く局在する (図 3)⁴²⁾。例えば、カドヘリン 23 とプロトカドヘリン 15 は互いに結合し tip link を形成し、先端付近で隣り合う聴毛間をつなぐ。音刺激時には、力学的なひずみで張力を感じ、近傍に位置するイオンチャネルの開閉に関与する。VLGR1 や usherin は聴毛根元付近にて anker link を形成する。これらの分子は細胞内で unconventional myosin や他の分子と相互作用し、ある種のネットワークを形成してアクチン線維ともリンクする。これらの構造、ネットワークの形成と機能維持は聴覚機能の獲得・維持において必須である。

近年、インテグリンに付加される *N* 結合型糖鎖は、その付加部位ごとにそれぞれ特有の構造と機能を有していることが示されてきている^{42,43)}。難聴関連遺伝子産物、特にその中でも前述の巨大分子において、どのような構造の糖鎖がどこの部位に修飾されて、どのような機能発現に関与

しているかは非常に興味深い。配列からは *N* 結合型糖鎖に関しての推察しかできないため、*O* 結合型糖鎖修飾や、糖脂質との相互作用によるマイクロドメインの形成などの情報は今後個々に明らかにしていく必要があり、聴覚研究分野において糖鎖研究の果たす役割は大きいと考えられる。

おわりに

表 1 に挙げたように、様々な糖鎖構造が蝸牛の発生あるいは生後成熟期間において発現量・発現部位を変化させていることが知られている。しかし、その報告の多くは複合糖質の生合成および代謝に関連する酵素遺伝子群のクローニング以前になされた研究であり、抗糖鎖抗体もしくはレクチンを使った組織染色による発現解析にとどまっている。現在では、これらの蝸牛に発現する複合糖質の発現に関与する種々の遺伝子改変マウスが多数樹立されている。聴覚機能に興味を持ち、その表現型を期待している場合を除き、通常実験下でマウスの聴覚異常に関して見出すのは非常に難しい。我々の研究グループでも GM3S KO マウスを樹立した後、詳細な行動薬理学実験をするまで聴覚障害に気がつかなかった。従って、現存する糖転移酵素および複合糖質代謝酵素の欠損マウスにおいて、聴覚機能障害が見落とされている可能性がある。まず現存する糖転移酵素および複合糖質代謝酵素の欠損マウスに関して聴覚機能を聴性脳幹反応で正確に評価し、統合した情報を集積することが必要である。そこから、聴覚の糖鎖生物学を体系的に推進する必要性が見えてくると考える。

感音性難聴は難聴原因遺伝子の変異、加齢や薬物、ストレス、騒音など様々な要因によって引き起こされる。先天性の難聴は出生 1,000 人あたりに 1 人の割合であり、もっとも頻度が高い先天性疾患の一つである。また、加齢性難聴は 65 歳以上の 40% 以上に生じるとされている。さらに、現代社会特有のストレスによる難聴や、携帯音楽プレイヤー等の普及に伴う騒音性の難聴も増加してきている。しかしながら、一旦障害をうけ変性した蝸牛内の細胞は再生不可能であることから、現医療においては根本的な感音性難聴の治療は無いと言ってよい。

内耳蝸牛の発生や障害のメカニズムが分子レベルで解明されることが新たな難聴治療法の開発には必須である。各難聴関連遺伝子の機能はそれぞれ解明されつつある。これら難聴原因遺伝子を中心となって形成される聴覚の機能分子複合体 (マイクロドメイン) における複合糖質の役割を解明することから、新たな聴覚機能制御の概念が生まれ、糖鎖の新機能の発見や新たな難聴の治療法に繋がっていくものと期待される。

文 献

- 1) 切替一郎 (2004) 新耳鼻咽喉科学 改訂10版 (野村恭也編), pp. 3-226, 南山堂, 東京.
- 2) 郷 慎司, 吉川弥里, 井ノ口仁一 (2010) 生体の科学, **61**, 135-141.
- 3) Gil-Loyzaga, P. (1997) *Prog. Histochem. Cytochem.*, **32**, 1-80.
- 4) Rueda, J., Cantos, R., & Lim, D.J. (2003) *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, **274**, 923-933.
- 5) de Groot, J.C., Hendriksen, E.G., & Smoorenburg, G.F. (2005) *Hear. Res.*, **205**, 68-82.
- 6) 鈴木明身, 古川鋼一 (2003) 蛋白質・核酸・酵素, **48**, 923-928.
- 7) Ngamukote, S., Yanagisawa, M., Ariga, T., Ando, S., & Yu, R. K. (2007) *J. Neurochem.*, **103**, 2327-2341.
- 8) Yamashita, T., Wu, Y.P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J.M., Dupree, J.L., Geyer, R., Sandhoff, K., & Proia, R.L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 2725-2730.
- 9) Kittaka, D., Itoh, M., Ohmi, Y., Kondo, Y., Fukumoto, S., Urano, T., Tajima, O., Furukawa, K., & Furukawa, K. (2008) *Glycobiology*, **18**, 509-516.
- 10) Ishii, A., Ohta, M., Watanabe, Y., Matsuda, K., Ishiyama, K., Sakoe, K., Nakamura, M., Inokuchi, J., Sanai, Y., & Saito, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 31652-31655.
- 11) Tagami, S., Inokuchi, J., Kabayama, S., Yoshimura, H., Kitamura, F., Uemura, S., Ogawa, C., Ishii, A., Saito, M., Ohtsuka, Y., Sakaue, S., & Igarashi, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 3085-3092.
- 12) Uemura, S., Kabayama, K., Noguchi, M., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2003) *Glycobiology*, **13**, 207-216.
- 13) Kabayama, K., Sato, T., Kitamura, F., Uemura, S., Kang, B. W., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2005) *Glycobiology*, **15**, 21-29.
- 14) Noguchi, M., Kabayama, K., Uemura, S., Kang, B.W., Saito, M., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2006) *Glycobiology*, **16**, 641-650.
- 15) Noguchi, M., Suzuki, T., Kabayama, K., Takahashi, H., Chiba, H., Shiratori, M., Abe, S., Watanabe, A., Satoh, M., Hasegawa, T., Tagami, S., Ishii, A., Saito, M., Kaneko, M., Iseki, K., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2007) *Cancer Science*, **98**, 1625-1632.
- 16) Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 13678-13683.
- 18) Sato, T., Nihei, Y., Nagafuku, M., Tagami, S., Chin, R., Kawamura, M., Miyazaki, S., Suzuki, M., Sugahara, S., Takahashi, Y., Saito, A., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2008) *Obesity Research & Clinical Practice*, **2**, 231-238.
- 19) Uemura, S., Yoshida, S., Shishido, F., & Inokuchi, J. (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**, 3088-3100.
- 20) Yoshikawa, M., Go, S., Takasaki, K., Kakazu, Y., Ohashi, M., Nagafuku, M., Kabayama, K., Sekimoto, J., Suzuki, S., Takaiwa, K., Kimitsuki, T., Matsumoto, N., Komune, S., Kamei, D., Saito, M., Fujiwara, M., Iwasaki, K., & Inokuchi, J. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 9483-9488.
- 21) Tajima, O., Egashira, N., Ohmi, Y., Fukue, Y., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Inokuchi, J., Sugiura, Y., Furukawa, K., & Furukawa, K. (2009) *Behav. Brain Res.*, **198**, 74-82.
- 22) Simpson, M.A., Cross, H., Proukakis, C., Priestman, D.A., Neville, D.C., Reinkensmeier, G., Wang, H., Wiznitzer, M., Gurtz, K., Verganelaki, A., Pryde, A., Patton, M.A., Dwek, R. A., Butters, T.D., Platt, F.M., & Crosby, A.H. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 1225-1229.
- 23) Farukhi, F., Dakkouri, C., Wang, H., Wiznitzer, M., & Traboulsi, E.I. (2006) *Ophthalmic Genet.*, **27**, 89-91.
- 24) Maguchi, S., Gasa, S., Matsushima, J., Saga, Y., Kawano, M., & Makita, A. (1991) *Auris Nasus Larynx*, **18**, 1-8.
- 25) Santi, P.A., Mancini, P., & Barnes, C. (1994) *J. Histochem. Cytochem.*, **42**, 705-716.
- 26) Hozawa, K., Wataya, H., Takasaka, T., Fenderson, B.A., & Hakomori, S. (1993) *Glycobiology*, **3**, 47-55.
- 27) Oshima, K., Shin, K., Diensthuber, M., Peng, A.W., Ricci, A. J., & Heller, S. (2010) *Cell*, **141**, 704-716.
- 28) Thomas, G.H. (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, **3**, 3507-3534.
- 29) Fitzgerald, J. & Verveniotes, S.J. (1998) *NY State Dent. J.*, **64**, 48-50.
- 30) Felding, I. & Hultberg, B. (1978) *Neuropadiatrie*, **9**, 74-83.
- 31) Kranz, C., Basinger, A.A., Güçsavaş-Calikoğlu, M., Sun, L., Powell, C.M., Henderson, F.W., Aylsworth, A.S., & Freeze, H. H. (2007) *Am. J. Med. Genet. A.*, **143**, 1371-1378.
- 32) Hedlund, M., Tangvoranuntakul, P., Takematsu, H., Long, J. M., Housley, G.D., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Wynshaw-Boris, A., Ryan, A.F., Gallo, R.L., Varki, N., & Varki, A. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 4340-4346.
- 33) Nelson, R.F., Glenn, K.A., Zhang, Y., Wen, H., Knutson, T., Gouvion, C.M., Robinson, B.K., Zhou, Z., Yang, B., Smith, R. J., & Paulson, H.L. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 5163-5171.
- 34) Wu, X., Steigelman, K.A., Bonten, E., Hu, H., He, W., Ren, T., Zuo, J., & d'Azzo, A. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1802**, 259-268.
- 35) Ohlemiller, K.K., Hennig, A.K., Lett, J.M., Heidebreder, A.F., & Sands, M.S. (2002) *Hear. Res.*, **169**, 69-84.
- 36) Tian, G., Zhou, Y., Hajkova, D., Miyagi, M., Dinculescu, A., Hauswirth, W.W., Palczewski, K., Geng, R., Alagramam, K.N., Isosomppi, J., Sankila, E.M., Flannery, J.G., & Imanishi, Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284** (28), 18980-18993.
- 37) Dror, A.A. & Avraham, K.B. (2010) *Neuron*, **68**, 293-308.
- 38) Vollrath, M.A., Kwan, K.Y., & Corey, D.P. (2007) *Annu. Rev. Neurosci.*, **30**, 339-365.
- 39) Nayak, G., Goodyear, R.J., Legan, P.K., Noda, M., & Richardson, G.P. (2011) *Dev. Neurobiol.*, **71**, 129-141.
- 40) Zwaenepoel, I., Mustapha, M., Leibovici, M., Verpy, E., Goodyear, R., Liu, X.Z., Nouaille, S., Nance, W.E., Kanaan, M., Avraham, K.B., Tekaiia, F., Loiselet, J., Lathrop, M., Richardson, G., & Petit, C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 6240-6245.
- 41) Zhu, Q., Sun, Y., Prasad, M., Wang, X., Yamoah, A.K., Li, Y., Feng, J., & Qin, C. (2010) *J. Dent. Res.*, **89**, 808-812.
- 42) Isaji, T., Sato, Y., Fukuda, T., & Gu, J. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 12207-12216.
- 43) Sato, Y., Isaji, T., Tajiri, M., Yoshida-Yamamoto, S., Yoshinaka, T., Somehara, T., Fukuda, T., Wada, Y., & Gu, J. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 11873-11881.
- 44) Manor, U. & Kachar, B. (2008) *Semin. Cell Dev. Biol.*, **19**, 502-510.