# ガラクトース糖鎖と炎症，発生，神経

浅野　雅秀

β1→4 結合にガラクトースを転移するβ4GalT 酵素は七つの遺伝子からなるファミリーを形成しているが，そのうちβ4GalT-I，II，V の欠損マウスについて解説する．β4GalT-I はセレクチンのリガンド糖鎖の合成に関与し，この欠損マウスは炎症反応の減弱や白血球増多症を呈した．また，このマウスは IgA 腎症を発症し，IgA の糖鎖不全が発症原因と考えられた．β4GalT-II は脳での HNK-1 糖鎖の合成に必須であり，β4GalT-II を欠損すると HNK-1 糖鎖の欠損マウスと同様に空間学習・記憶に障害がみられるが，HNK-1 糖鎖とは関係のない協調運動の障害も観察された．β4GalT-V はラクトシルセラミド（LacCer）合成酵素であることがわかり，その欠損マウスは胚体外組織の異常により発生初期に致死となった．このように同じファミリーのβ4GalT でも各々に役割分担があり，発生から炎症反応，神経まで多岐にわたる機能があることがわかった．

## 1.　はじめに

糖鎖はタンパク質や脂質に付加され，それらの機能をさまざまに修飾していることが多くの研究で示されていたが，生体内での重要性については糖転移酵素遺伝子の欠損マウスが作製されるようになって初めて明らかとなってきた．1994 年に糖転移酵素としては初めて，高マンノース型 *N* 型糖鎖に *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を転移して，複合型やハイブリッド型の *N* 型糖鎖合成の鍵となる GlcNAcT-I の欠損マウスが作製され，胎生致死であることが報告された[1,2]．この糖転移酵素が欠損すると複合型 *N* 型糖鎖がまったく形成されないので，これらの糖鎖は哺乳類の発生に必須であることが示され，遺伝子欠損マウスの手法を用いることで糖鎖の重要性がはっきりと認識されることとなった．

我々のグループでは 1997 年に最も主要な β-1, 4-ガラクトース転移酵素（β4GalT）である β4GalT-I の欠損マウスの報告をして以来，*β4GalT* 遺伝子群に注目して研究を進めてきた[3]．本稿では，*β4GalT-I* 欠損マウスの解析から明らかになったさまざまなガラクトース糖鎖の機能と，その後作製した *β4GalT-II* 欠損マウスと *β4GalT-V* 欠損マウスの解析からわかった新たな機能を解説し，β4GalT 群の役割分担について考察する．

## 2.　ガラクトース転移酵素

ガラクトース転移酵素は，糖タンパク質や糖脂質などの糖鎖の非還元末端に，糖供与体である UDP-ガラクトースからガラクトースを転移する II 型膜タンパク質の酵素である．ガラクトースの結合様式によって，α1→3，α1→4，β1→3，β1→4 の 4 種類が知られており，それぞれが複数の遺伝子からなるファミリーを形成している（**表 1**）[4]．特に β-1, 3-ガラクトース転移酵素（β3GalT）と β4GalT は，哺乳類では前者に六つ，後者に七つの遺伝子が存在する．同じ結合様式でガラクトースを転移する酵素が多数存在することから，それぞれに役割分担があると思われるが，その詳細はまだよくわかっていない．β4GalT 群の酵素間でアミノ酸配列を比較すると，β4GalT-I と-II，β4GalT-III と-IV，β4GalT-V と-VI の相同性が高く（**図 1**），各ペアは機能的にも近いことが推測されるが，β4GalT 群の役割分担についてはよくわかっていない．なお，β4GalT-VII はプロテオグリカンの結合領域に位置するキシロースにガラクトースを転移する活性を持っており，系統樹からもほかの六つとは離れている．

金沢大学学際科学実験センター・遺伝子改変動物分野（〒920-8640　金沢市宝町 13-1）

**Galactose-containing carbohydrates in the inflammation, development and nervous system**

**Masahide Asano**（Division of Transgenic Animal Science, Advanced Science Research Center, Kanazawa University, 13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-8640, Japan）

**表 1**　ガラクトース転移酵素ファミリー

| 転移酵素名 | 遺伝子名 | マウス染色体 | セントロメアからの距離 |
|---|---|---|---|
| β4GalT | B4galt1 | 4 | 20.46 cM |
| | B4galt2 | 4 | 53.70 cM |
| | B4galt3 | 1 | 79.29 cM |
| | B4galt4 | 16 | 26.87 cM |
| | B4galt5 | 2 | 87.22 cM |
| | B4galt6 | 18 | 11.48 cM |
| | B4galt7 | 13 | 30.06 cM |
| β3GalT | B3galt1 | 2 | 39.53 cM |
| | B3galt2 | 1 | 62.52 cM |
| | B3galt4 | 17 | 17.98 cM |
| | B3galt5 | 16 | 56.88 cM |
| | B3galt6 | 4 | 87.66 cM |
| | B3galt7, C1galt1 | 6 | 3.37 cM |
| α4GalT | A4galt | 15 | 39.40 cM |
| α3GalT | A3galt1, Abo | 2 | 19.06 cM |
| | Ggta1 | 2 | 23.60 cM |
| | A3galt2, iGb3 | 4 | 62.23 cM |
| Ceramide GalT | Cgt, Ugt8A | 3 | 54.68 cM |

ガラクトースの結合様式により，β4（β1→4），β3（β1→3），α4（α1→4），α3（α1→3）の 4 種類が知られており，セラミドにガラクトースを転移する CGT もこのファミリーに含まれる．B3galt3 は β3GalT ではなく，β-1, 3-*N*-アセチルガラクトサミン転移酵素（β3GalNT）であることがわかり，このファミリーに含まれない．主として GlycoGene DataBase（http://jcggdb.jp/rcmg/ggdb/）と Mouse Genome Informatics（http://www.informatics.jax.org/）のデータを元に作成．

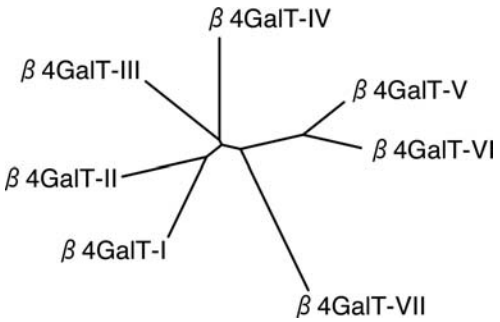


**図 1**　β-1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子群
七つの遺伝子からなる β-1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子群の系統樹．（文献 3 より引用）

## 3.　*β4GalT-I* 欠損マウス

ガラクトースを含む糖鎖は，初期胚の発生や炎症細胞の遊走，がん細胞の浸潤や転移，関節リウマチなどの疾患への関与などさまざまな機能が示唆されていたので，*β4GalT* 遺伝子の欠損マウスを作製してその機能を解析することにした．当時はまだヒトやマウスの全ゲノムが解読されておらず，*β4GalT* 遺伝子としては最も広範囲に強く発現している *β4GalT-I* だけしか知られていなかった[5,6]．

*β4GalT-I* 欠損マウスは 129/Sv と C57BL/6 の交雑系では予想に反して胎生致死ではなく無事に生まれてきた．しかし，出生後の成長が遅延し，半数近くのホモ欠損マウスは離乳前に死亡した[7]．小腸や皮膚での上皮系細胞の増殖と分化に異常がみられた．特に，授乳期の *β4GalT-I* 欠損マウスでは小腸上皮の分化が乱れており，ミルク中のラクトース（乳糖）を分解するラクターゼの発現が低下し，逆に餌を食べるようになると必要なマルターゼやスクラーゼ，イソマルターゼの発現が上昇していた．この消化酵素の発現異常が授乳期の成長遅延を引き起こしたと考えられた．一方，生き残ったホモ欠損マウスは雌雄ともに生殖能力に問題はなかったが，母親は子どもを育てることができなかった．以前より β4GalT がミルク中では α-ラクトアルブミンと結合してラクトース合成酵素として働くことが示されていたが，*β4GalT-I* 欠損母マウスのミルク中のラクトースは検出限界以下であり，β4GalT-I がラクトース合成酵素を担うことが明らかとなった．α-ラクトアルブミン欠損マウスでも報告されているが[8]，ラクトースが含まれないミルクは粘性が高くなり，仔マウスがミルクを吸入できないことがその生育不全の原因であることがわかった．なお，当初は受精や初期発生に異常を生じたり，関節リウマチを発症する可能性も考えられたが，そのような異常は認めなかった．同じころ，Shur 博士らも *β4GalT-I* 欠損マウスの作製に成功し，脳下垂体後葉の低形成を見いだし，これが成長遅延の原因ではないかと考察している[9]．しかし，我々のマウスではそのような異常はみられなかった．また彼らは，自然交配での受精には問題がなかったが，体外受精では *β4GalT-I* 欠損精子の卵子への結合が若干遅れると報告している[10]．

## 4.　*β4GalT-I* が合成する糖鎖構造

次に *β4GalT-I* 欠損マウスの肝臓抽出液中の β-1, 4-ガラクトース転移酵素活性を測定したところ，欠損マウスではほとんど活性が消失していた．しかし，野生型の 5% 程度の残存活性が検出され，それはその後発見されたほかの β4GalT 群に由来するものと思われた．レクチンブロット法により糖鎖構造を解析したところ，欠損マウスの肝臓タンパク質は Galβ1→4GlcNAc を認識するヒマレクチン RCA-I にはほとんど反応せず，逆に露出した GlcNAc を認識するムジナタケレクチン PVL には強く反応した．以上のことから肝臓のほとんどの糖タンパク質の Galβ1→4GlcNAc 合成は β4GalT-I が担っているが，一部はほかの β4GalT が関わることが明らかとなった[7]．さらに，高速液体クロマトグラフィーとマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（MALDI-TOF-MS）を用い

て，肝細胞表面と血清の糖タンパク質の *N* 型糖鎖の構造解析を行った．レクチンブロットの結果と一致して Galβ1→4GlcNAc 構造は激減していたが，予想外に Galβ1→3GlcNAc 構造が増加していた．これは *N* 型糖鎖の基本構造が 2 型から 1 型に変換したことを意味している．それに伴って，シアル酸の結合も Siaα2→6Gal から Siaα2→3Gal に変換しており，β4GalT-I の欠損によりガラクトースが転移されなかった GlcNAc の一部には，β3GalT 群によってガラクトースが補填されていることがわかった[11]．

産業技術総合研究所の成松先生のグループとの共同研究により，肝臓で発現している糖タンパク質のうち，β4GalT の標的になっているものを網羅的に検出する解析を行った[12]．β4GalT-I 欠損マウスと野生型マウスの肝臓の糖タンパク質について，β4-Gal を特異的に認識する RCA120（RCA-I）レクチンを用いた Lectin-isotope-coded glycosylation site-specific tagging（IGOT）-LC/MS 法により比較分析を行ったところ，同定された約 1,000 種類の糖タンパク質のうち，82% が β4GalT-I を含む複数の β4GalT の標的になっていたが，18% は β4GalT-I だけの標的であることがわかった．この β4GalT-I 特異的な糖タンパク質の多くが，1 回膜貫通型の膜タンパク質であることもわかった．ほかの β4GalT についても同様の解析を行うことにより，それぞれの転移酵素の役割分担が明らかになるかもしれない．

## 5. *β4GalT-I* 欠損マウスと炎症反応

糖鎖の機能として最もよく研究が進んでいる分野は，セレクチンとそのリガンド糖鎖の研究である．炎症時の白血球と血管内皮細胞の接着やリンパ節へのリンパ球のホーミングにおける糖鎖リガンドについては，さまざまな糖転移酵素遺伝子欠損マウスを用いることで詳細な解析が行われた[13]．

炎症や感染が起きるとその部位に白血球が集積してくるが，その際いくつかの細胞接着分子が段階的に作用することが知られている．高速で血管内を流れている白血球は，まず炎症部位の血管内皮細胞との間の弱い接着によりスピードダウンして，いわゆるローリングを始める．この接着を担うのが，血管内皮細胞に発現するセレクチンと白血球に発現するセレクチンリガンドである．白血球が血管内皮に弱く接着すると，血管内皮細胞に発現するケモカインが作用して白血球を活性化する．続いて白血球においてインテグリン分子群の発現が亢進し，血管内皮細胞に発現するインテグリンリガンドとの間で強い接着が起きる．その後，白血球は血管内皮細胞の間隙を通って血管外へ脱出し，炎症部位へ浸潤していく（**図 2**）．

炎症の際に血管内皮細胞に発現が誘導されるセレクチンは，E-セレクチン（CD62E）と P-セレクチン（CD62P）である[14]．どちらも N 末端側にある C タイプレクチン様ドメインを介して，白血球の糖鎖リガンドとカルシウム依存性に結合して細胞接着を引き起こす．E-セレクチンのリガンド糖鎖としてはシアリルルイス x（$sLe^x$）とシアリルルイス a（$sLe^a$）が知られているが，正常白血球に発現するのは $sLe^x$ だけで，$sLe^a$ は白血球と血管内皮の接着には関与しないと考えられている．P-セレクチンのリガンド糖鎖は同じく $sLe^x$ であるが，そのキャリアータンパク質である PSGL-1 の硫酸化チロシン残基も P-セレクチンとの結合に関与するようである[15]．E/P-セレクチンのダブル欠損マウスを用いて炎症反応について詳細な解析がなされた．ダブル欠損マウスは易感染性となり，日和見感染を起こ

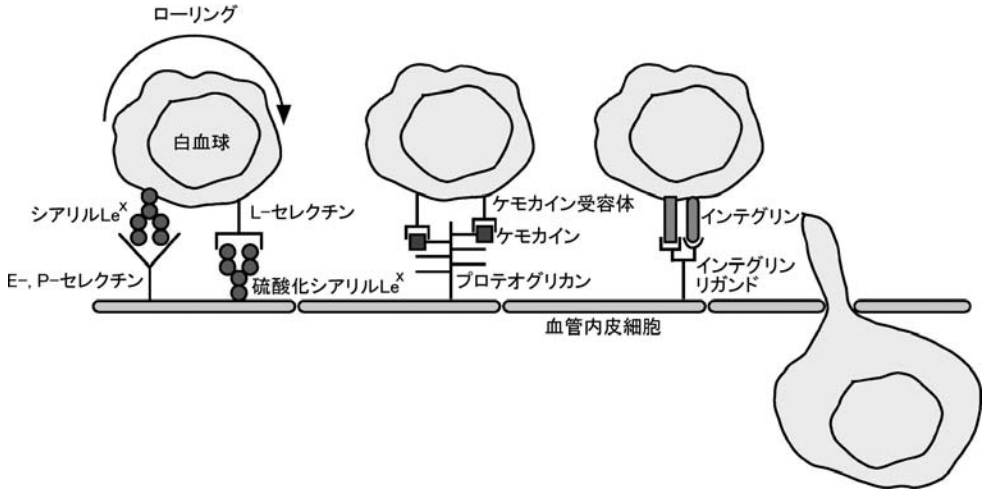


**図 2**　白血球と血管内皮細胞の接着に関与する分子群
最初にセレクチンとそのリガンド糖鎖の弱い接着によりローリングが起こり，次にプロテオグリカン上に提示されたケモカインが作用して白血球が活性化される．最後にインテグリンを介した強い接着が起こって，白血球は組織内に浸潤する．炎症時は E/P-セレクチンとシアリル $Le^x$ の結合が重要であり，白血球のリンパ節へのホーミングには L-セレクチンと硫酸化シアリル $Le^x$ の結合が重要である．この図では便宜上一つの白血球に両方を記載した．（文献 13 より一部改変して引用）

す[16,17]．また，髄外造血が亢進し，顕著な白血球増多症，特に好中球増多症を示した[16]．急性や慢性の炎症反応が顕著に減弱し，炎症部位への好中球の浸潤が低下した[18,19]．生体顕微鏡を用いた解析から血管内皮での白血球のローリングが顕著に低下していることが確認された[16,17]．

一方，E/P-セレクチンのリガンド糖鎖である sLe$^x$ は，シアル酸，ガラクトース，GlcNAc，フコースの4糖からなっており（**図3**），sLe$^x$ を形成する糖転移酵素の同定が遺伝子欠損マウスの解析により進められた[20]．先にも述べたように同じ糖転移酵素活性を持つ遺伝子が複数存在してファミリーを形成しているので，sLe$^x$ の生合成を担う糖転移酵素の同定は容易ではなかった．まず，α-2, 3-シアル酸転移酵素（ST3Gal）は6種類のアイソザイムのうち，ST3Gal-IV が sLe$^x$ の生合成を担い，ST3Gal-VI も若干寄与していることが欠損マウスの解析から明らかとなった[21]．α-1, 3-フコース転移酵素（FucT）については八つの可能性があったが，FucT-VII が主要な役割を担い，FucT-IV と FucT-VII のダブル欠損マウスにおいて sLe$^x$ が完全に消失したことから，FucT-IV も寄与していることが示された[22,23]．また，*FucT-IV/VII* ダブル欠損マウスは E/P-セレクチンダブル欠損マウスと同様に顕著な白血球増多症を呈した[23]．一方，セレクチンのリガンド糖鎖は *O* 型糖鎖のコア2側鎖上に形成されることが多いといわれているが，*O* 型糖鎖のコア2分岐を担うコア2*N*-アセチルグルコサミン転移酵素（GlcNAcT）の候補は三つが知られていた．そのうち *Core2 GlcNAcT-I* 欠損マウスは P-セレクチンのリガンド糖鎖の形成が低下していることが明らかとなった[24]．

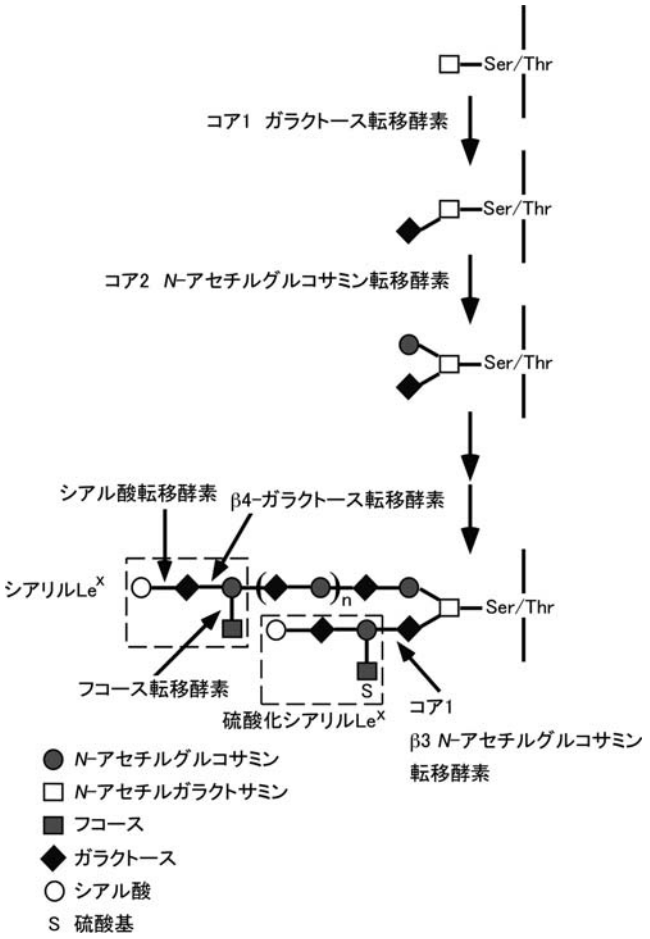


**図3** *O* 型糖鎖上に形成されるシアリル Le$^x$ と硫酸化シアリル Le$^x$

*O* 型糖鎖は Ser/Thr に順番に糖転移酵素が作用して形成される．この図の上段に延びた側鎖をコア2，下段に延びた側鎖をコア1と呼ぶ．4糖からなるシアリル Le$^x$（点線内）はコア2の先端に，シアリル Le$^x$ のフコースが硫酸化された硫酸化シアリル Le$^x$（点線内）はコア1の先端に形成される．（文献13より一部改変して引用）

以上のように sLe$^x$ の形成を担う糖転移酵素についてかなりのことが明らかとなったが，β4GalT についてはまったくわかっていなかった．セレクチンのリガンド糖鎖は *O* 型糖鎖のコア2や *N*-アセチルラクトサミンリピートの末端に形成されることが多いので，我々の作製した *β4GalT-I* 欠損マウスの白血球のコア2*O* 型糖鎖の構造を調べたところ，コア2の80%以上でガラクトースが欠損していた．さらに可溶型 P-セレクチンを用いた FACS 解析により，*β4GalT-I* 欠損マウスの好中球や単球の P-セレクチンへの結合が顕著に低下していることがわかった．以上のことから *β4GalT-I* 欠損マウスではセレクチンのリガンド糖鎖の発現が減少していることがわかった[25]．*β4GalT-I* 欠損マウスも末梢血の白血球，特に好中球と単球が対照群より2〜3倍に増加しており，白血球増多症を示した[25]．しかし，E/P-セレクチンダブル欠損マウスや *FucT-IV/VII* ダブル欠損マウスと比較するとその程度は軽く，*Core2 GlcNAcT-I* 欠損マウスと同程度であった（**表2**）．このことから，*β4GalT-I* 欠損マウスでは sLe$^x$ の発現が完全に消失しているのではなく，コア2の末端の sLe$^x$ が欠損していることが示唆された．次にいくつかの実験的炎症反応を調べてみた．ザイモサンを耳介に塗布する急性炎症反応および接触過敏症反応（CHS）や遅延型過敏症反応（DTH）の慢性炎症反応について調べたが，*β4GalT-I* 欠損マウスはいずれの炎症反応も減弱しており，炎症部位への好中球の浸潤が低下していた[25]．しかし，E/P-セレクチンダブル欠損マウスや *FucT-IV/VII* ダブル欠損マウスのように完全に炎症反応が消失するわけではなかった．リンパ節へのリンパ球のホーミングには L-セレクチンと硫酸化 sLe$^x$ が主要な役割を担っているが，*β4GalT-I* 欠損マウスは *Core2 GlcNAcT-I* 欠損マウスと同様にリンパ球のホーミングは正常であった．β4GalT-I は硫酸化 sLe$^x$ の生合成には関わらないと思われた．

皮膚創傷治癒反応でもセレクチンとそのリガンド糖鎖は重要な役割を果たすと思われる．*β4GalT-I* 欠損マウスの背部に傷をつけて治癒過程を追跡した．受傷部での皮膚の再上皮化やコラーゲンの産生，血管新生が低下し，皮膚創傷治癒が遅延した．創傷部位への好中球やマクロファージの浸潤が低下しており，そのことが原因と考えられた．E/P-セレクチンダブル欠損マウスでも皮膚創傷治癒が遅延

**表 2**　セレクチンの結合障害を呈するノックアウトマウス（KO）における白血球増多症の比較

| 血球細胞の種類 | 各ノックアウトマウスにおけるコントロールマウスに対する血球細胞数の増加率 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | β4GalT-I KO | Core 2 GlcNacT-I KO | E/P-selectin KO | FucT-VII KO | FucT-IV/VII KO |
| 全白血球 | 2.2 | 2.4 | 3.9 | 3.2 | 2.9 |
| 好中球 | 2.3 | 4.3 | 16.6 | 7.4 | 18.4 |
| リンパ球 | 2.5 | 1.6 | 1.5 | 2.0 | 1.2 |
| 単球 | 1.6 | 1.4 | 9.8 | 2.9 | 4.2 |

文献 25 より改変．元のデータは β4GalT-I KO[25], Core 2 GnT KO[24], E/P-selectin KO[16], FucT-VII KO[22], FucT-IV/VII KO[23]を参照．

することが報告されている．したがって，*β4GalT-I* 欠損マウスではセレクチンのリガンド糖鎖の発現低下により炎症細胞の遊走が抑制されて，皮膚創傷治癒の遅延が起こったと考えられた[26]．以上のことから，sLe$^x$ などの E/P-セレクチンのリガンド糖鎖の合成を担う主なガラクトース転移酵素は β4GalT-I であり，その欠損マウスは炎症細胞の炎症部位への遊走が抑制されて，炎症反応の減弱や皮膚創傷治癒の遅延が生じることが明らかとなった．

## 6.　*β4GalT-I* 欠損マウスと IgA 腎症

*β4GalT-I* 欠損マウスは生後に成長遅延を示し，約半数が離乳前に死亡することを最初に述べたが，離乳後も死亡する個体が頻発して，1 年以上生存するマウスはまれであった．*β4GalT-I* 欠損マウスは IgA 腎症を自然発症することがわかったが，その詳細はすでに本誌の「みにれびゅう」に掲載させていただいたので[27]，ここではポイントだけふれることにする．*β4GalT-I* 欠損マウスは 2〜3 か月齢からアルブミン尿が検出され，加齢とともに顕著となった．腎臓の組織切片像からはメサンギウム基質の激しい増生がみられ，電子顕微鏡像からはメサンギウムからパラメサンギウム領域への免疫複合体の沈着が観察された．蛍光免疫染色ではメサンギウム領域への IgA の強い沈着とともに，IgG や IgM，補体 C3 の糸球体への沈着が認められた．以上の病理所見はヒト IgA 腎症の診断基準に合致しており，*β4GalT-I* 欠損マウスは IgA 腎症を自然発症することがわかった[28]．

IgA 腎症は我が国の慢性糸球体腎炎の 30% 以上を占める代表的な腎疾患である[29]．IgA が腎糸球体に沈着することにより発症し，徐々に糸球体硬化を起こして進行するが，1993 年の日本とフランスからの報告では，20 年の歳月を経て約 40% の患者が人工透析や腎移植を必要とする末期腎不全に移行する．その原因にはまだ不明な点が多いが，患者の IgA の糖鎖に異常があることが報告されている．ヒト IgA には IgA1 と IgA2 のサブクラスがあるが，IgA1 分子のヒンジ部には少なくとも 5 か所の *O* 型糖鎖付加部位があり，患者ではその *O* 型糖鎖のガラクトースやシアル酸が欠損していることが報告されている[30,31]．IgA 腎症では糖鎖不全の IgA が凝集して糸球体に沈着するのではないかと考えられている．*β4GalT-I* 欠損マウスは患者と同様に高 IgA 血症を示し，血中 IgA が多量体を形成していた．しかし，マウスの IgA 分子にサブクラスはなく，*O* 型糖鎖が結合しないので，2 か所結合する *N* 型糖鎖の構造を MALDI-TOF MS により分析したところ，ガラクトースやシアル酸が完全に欠損していた．ヒトとマウスでは IgA の糖鎖構造が異なるので，単純には比較できないが，IgA の糖鎖不全が IgA の多量体形成を誘導して，糸球体への沈着を引き起こしている可能性が示唆された[28]．このマウスは糖鎖異常により IgA 腎症を発症するユニークな IgA 腎症モデルマウスであり，IgA 腎症の発症機構の解明や治療法の開発に役立つことが期待される．

## 7.　シアル酸合成酵素 GNE 点変異マウスと腎疾患

ガラクトース転移酵素ではないが，シアル酸合成の律速酵素である UDP-*N*-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼ/*N*-アセチルマンノサミンキナーゼ（UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase：GNE）の点変異マウスを作製したところ，若年より顕著なアルブミン尿を呈し，ネフローゼ症候群様の病態を示したので簡単に紹介する．*GNE* 遺伝子は遺伝性筋疾患の縁取り空胞型遠位型ミオパチー（distal myopathy with rimmed vacuoles：DMRV）の原因遺伝子として同定され[32]，日本人家系ではキナーゼ領域の V572L 変異が知られていたので[33]，当初は DMRV のモデルマウスを目指して *GNE* 遺伝子の V572L 点変異マウスを作製した．しかし，予想に反して骨格筋の組織像や運動機能には明らかな異常はみられず，若年より顕著なアルブミン尿が観察され短命であった．生後 10 日齢からアルブミン尿が検出され，シスタチン C の値も高く，糸球体濾過機能に異常がみられた．腎臓の組織像からは若年より顕著な糸球体の肥大化と硬化，メサンギウム基質の沈着などが観察された．しかし，IgA をはじめ免疫グロブリンの沈着は *β4GalT-I* 欠損マウスと比較して低いレベルであった．さらに，*β4GalT-I* 欠損マウスでは観察されなかったが，電子顕微鏡観察により糸球体上皮細胞（ポドサイト）の足突起が扁平化・融合していた．以上のことより *GNE* 点変異マウスは IgA 腎症ではなく，ネフローゼ症候群様病態を発症していると診断された[34]．レクチンを用いた解析から *GNE* 点変異マウスの糸球体上皮細胞は低シアリル化状態にあり，特に糸球体バリアーに重要な役割を果たしている高シアリル化タンパク質のポドカリキシンはシアル酸付加が顕著に減少していた．

*GNE* 遺伝子の点変異によりシアル酸が欠乏したことが発症の原因と考えられたので，シアル酸の一つである *N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）を補給して発症の抑制を試みた．胎生期より母親に Neu5Ac 溶液を飲ませ，出生後も 2 か月齢まで飲ませ続けたところ，糸球体上皮細胞の低シアリル化が改善された．それに伴い，アルブミン尿が有意に軽減され，糸球体の肥大化や硬化および足細胞の形態異常も改善した．シアル酸がたくさん付加するポドカリキシンなどはその負電荷により糸球体バリアーの形成に関わっていることが知られている．したがって，*GNE* 点変異マウスではポドカリキシンなどの低シアリル化により，足細胞の形態が異常となり，糸球体濾過機能が破綻してネフローゼ症候群様病態を発症したと考えられた[34]．なお，DMRV の患者では腎臓疾患の報告はなく，*GNE* 遺伝子の同じ点変異でヒトとマウスでこのような違いが生じる理由はよくわからない．

## 8. *β4GalT-II* 欠損マウスと脳神経機能

脳神経系でも糖鎖は重要な役割を担っていると考えられる．β4GalT-I はいろいろな組織で広く発現しているが，脳神経系での発現は大変弱い．実際に *β4GalT-I* 欠損マウスの脳での β-1, 4-ガラクトース転移酵素活性は，野生型の約 65% が残存しており，脳ではほかの β4GalT が重要であることがわかった[35]．β4GalT-II は β4GalT-I と最も相同性が高く，脳での発現が強かったので，次に *β4GalT-II* 欠損マウスを作製した．*β4GalT-II* 欠損マウスはメンデルの法則に従って出生し，正常に成長して外見上の異常は観察されず，雌雄とも生殖能力にも問題はなかった．

β4GalT-II は脳での発現が強かったので，行動解析により脳神経系の機能を解析した．*β4GalT-II* 欠損マウスは 129 系統の ES 細胞を用いて作製したが，129 系統は行動解析に適していないので，行動解析の標準系統である C57BL/6 に戻し交配を行って実験に用いた．標的となる脳機能がわからないこのような場合は，同じマウスにストレスの小さい行動テストから順次さまざまなテストを実施していくテストバッテリー方式の行動解析が有効である．具体的には活動性や情動性，学習・記憶，注意機能，運動学習・協調運動などの測定を順番に行った．その結果，*β4GalT-II* 欠損マウスはモリス型水迷路による空間学習・記憶とロータ・ロッドとバランスビームによる運動学習・協調運動に障害が認められた．次に脳の組織学的解析を行ったところ，成体での脳重量が約 10% 減少して大脳皮質に若干の萎縮がみられたのと小脳のプルキンエ細胞に異常がみられた．特にプルキンエ細胞の数の減少と配列の乱れが観察され，この異常が運動機能の障害を引き起こしたと考えられた[36]．

脳神経系では HNK-1 糖鎖とポリシアル酸（PSA）が機能性糖鎖としてよく研究されている．HNK-1 糖鎖や PSA の形成を担う糖転移酵素遺伝子の欠損マウスの解析から，これらの糖鎖は神経ネットワークの形成や神経可塑性に重要な機能を果たしていることが報告されている．そこで *β4GalT-II* 欠損マウスの脳における HNK-1 糖鎖と PSA の発現を調べた．PSA の発現は野生型と違いがみられなかったが，HNK-1 糖鎖は大脳皮質や海馬でほとんど発現が消失していた．両者とも Galβ1→4GlcNAc の 2 型基本構造の末端に形成されることが知られているが，β4GalT-II が生合成する Galβ1→4GlcNAc には HNK-1 糖鎖が形成されて，PSA は形成されないことがわかった[36]．以前に京都大学の川嵜先生・岡先生との共同研究において，HNK-1 糖鎖の生合成を担うグルクロン酸転移酵素（GlcAT-P）の欠損マウスを作製した．このマウスはモリス型水迷路に障害があり，海馬 CA1 領域の長期増強（long term potentiation：LTP）が低下していた[37]．したがって，*β4GalT-II* 欠損マウスにみられた空間学習・記憶の障害は，海馬での HNK-1 糖鎖の発現消失が原因であるといえる．一方，*GlcAT-P* 欠損マウスの運動学習・協調運動は正常であったので，*β4GalT-II* 欠損マウスの運動機能の異常は HNK-1 糖鎖以外の糖鎖が関わると考えられた．さらに岡先生との共同研究により，神経細胞のゴルジ体において β4GalT-II と GlcAT-P が物理的に会合しており，β4GalT-II と GlcAT-P が順番に作用することによって HNK-1 糖鎖が形成されている可能性が示されている[38]．

## 9. *β4GalT-V* 欠損マウスと胚発生

β4GalT-V は β4GalT-II と同様に脳神経系で強く発現しているので，次にこの遺伝子の欠損マウスを作製した．β4GalT-I と -II は完全に遺伝子を破壊するタイプのノックアウトであったが，β4GalT-V は Cre-loxP システムを用いたコンディショナルタイプとした（**図 4**）．転移酵素活性部位を含むエキソン 4〜7 を loxP 配列ではさむように遺伝子改変を行った．β4GalT-V がどのような糖鎖形成に関わるのかはわかっていなかったので，まずは ES 細胞において Cre を作用させて遺伝子を破壊してから，通常の *β4GalT-V* 欠損マウスを作製した[39]．予想に反してヘテロどうしを交配してもホモ欠損マウスは出生せず，胎生期に致死となることがわかった．胎生期の各ステージにおけるホモ欠損胚の同定を行ったところ，胎生 7.5 日（E7.5）からホモ欠損胚は成長遅延を示し，E10.5 以降は生存していなかった．なお，同時期に長岡技術科学大学の古川清先生のグループからも *β4GalT-V* 欠損マウスは胎生致死を示すことが報告された[40]．

*N* 型や *O* 型糖鎖のガラクトース転移を主要に担う β4GalT-I の欠損マウスでさえ胎生致死とはならなかったので，β4GalT-V は糖タンパク質ではなく，糖脂質のガラクトース転移を担う可能性が考えられた．グルコシルセラミド（GlcCer）に β1→4 結合でガラクトースを転移するラクトシルセラミド（LacCer）合成酵素は，ラットの脳から精製後遺伝子クローニングされて，β4GalT-VI であることが

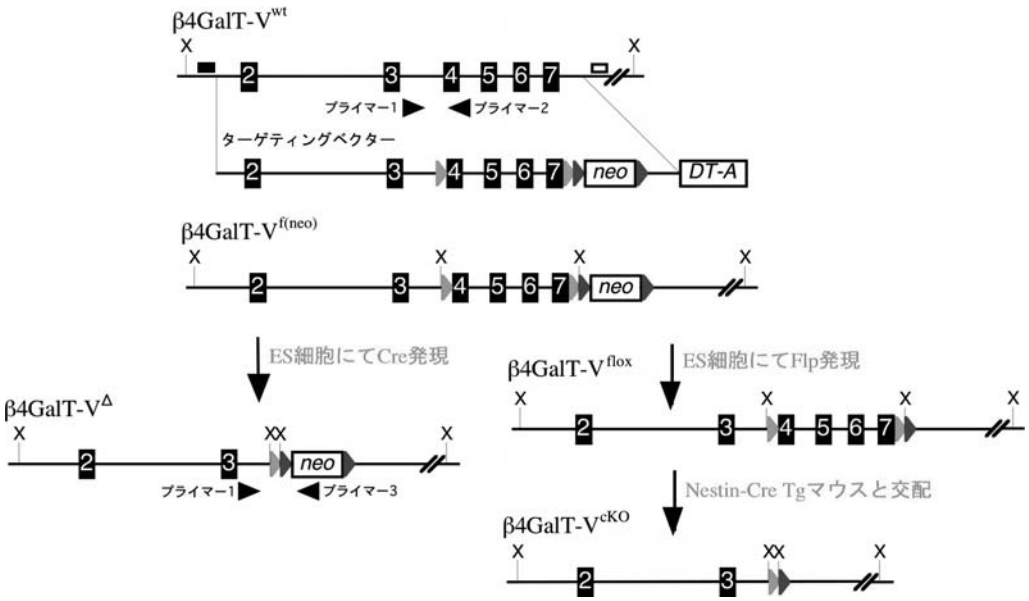


**図 4**　*β4GalT-V* 遺伝子改変のストラテジー

*β4GalT-V* 遺伝子に対してターゲティングベクターを構築し，ES 細胞に導入して相同組換えにより *β4GalT-V* 遺伝子座を改変した．完全破壊マウスを作製するときは，ES 細胞において Cre を発現させて，loxP ではさまれたエキソン 4〜7 を除去してマウスを作製した（左の流れ）．コンディショナルに欠損させるときは，ES 細胞で Flp を発現させて frt ではさまれた *neo* 遺伝子を除去した後マウスを作製した（右の流れ）．この β4GalT-V$^{flox}$ マウスと Nestin-Cre マウスを交配することで，脳神経系特異的に *β4GalT-V* 遺伝子を破壊したマウスを作製した．

報告されたが[41]，β4GalT-V は β4GalT-VI と最も相同性が高いので，β4GalT-V も LacCer 合成酵素を担う可能性がある．また，GlcCer 合成酵素欠損マウスが同じ時期に胎生致死となること[42]からもこの可能性が示唆された．九州大学の伊東先生に依頼して，E7.5 胚を用いて酵素活性を測定したところ，*β4GalT-V* 欠損胚では GlcCer 合成酵素活性は野生型胚と差がなかったが，LacCer 合成酵素活性は顕著に低下していた．胚盤胞から調製した胚体外内胚葉（XEN）細胞を用いて LacCer 合成酵素活性を定量的に測定したところ，*β4GalT-V* 欠損 XEN 細胞では野生型の 10% 程度に低下していた．以上の結果により，少なくとも初期胚では β4GalT-V が主要な LacCer 合成酵素であり，残りの 10% 程度を β4GalT-VI が担うことが示唆された．最近 *β4GalT-VI* 欠損マウスについて報告がなされたが，外見上の異常は検出されず，脳やマウス胎生線維芽細胞（MEF）でも主要な LacCer 合成酵素は β4GalT-VI ではなく β4GalT-V であることが示された[43]．一方，*β4GalT-V* 欠損 XEN 細胞サンプルの RCA-I を用いたレクチンブロットでは野生型とバンドパターンに違いはなく，β4GalT-V は *N* 型や *O* 型糖鎖の合成に寄与しないことが示唆された[39]．なお，具体的にいくつかのタンパク質の *N* 型糖鎖構造が解析され，β4GalT-V はそれらの *N* 型糖鎖合成に関与しないことが示された[44]．

致死となる前の E7.5 胚では三胚葉マーカー（Foxa2, Brachyury, Otx2）の発現が検出され，三胚葉への分化は問題ないことがわかった．しかし，E7.5 から E9.5 の胚切片を解析したところ，胚体外組織に異常が認められた．子宮間膜と反対側の対子宮間膜極に血栓や出血がみられ，その周りに栄養膜巨細胞が集積していた．栄養膜巨細胞は正常では子宮間膜極側に集積しているので，その局在に異常が生じていた．LacCer 合成酵素が欠損するとなぜこのような異常が生じるのかはわからないが，*β4GalT-V* 欠損胚の致死の原因は胚体外組織にあることが示唆された．そこで，テトラプロイド胚（四倍体胚）を用いたレスキュー実験を行った（**図 5**）．テトラプロイド胚は胚体外組織には分化できるが，胚自身には分化できないことが知られている．野生型のテトラプロイド胚と *β4GalT-V* 欠損胚とのキメラ胚を作製して子宮に移植した．*β4GalT-V* 欠損胚の致死の原因が胚体外組織にある場合は，野生型のテトラプロイド胚の胚体外組織への寄与により，胎生致死がレスキューされるはずである．実際に野生型のテトラプロイド胚とのキメラ胚は E9.5 でも正常な形態を示し，E12.5 まで発生するものも存在し，レスキューに成功した．したがって，*β4GalT-V* 欠損胚の致死の原因は胚体外組織にあることがわかった[39]．

β4GalT-V は脳神経系で強く発現しているので，当初は脳機能での役割を解析する予定であったが，胎生致死となり胚発生の解析を行うことになった．しかし，今回はコンディショナルノックアウトができるようにしていたので，β4GalT-V$^{flox}$ マウスを作製して Nestin-Cre マウスと交配することにより，脳神経系特異的 *β4GalT-V* 欠損マウスを作製して解析を進めている（図 4）．これについては現在解析中であるので，次の機会に紹介できたらと考えている．

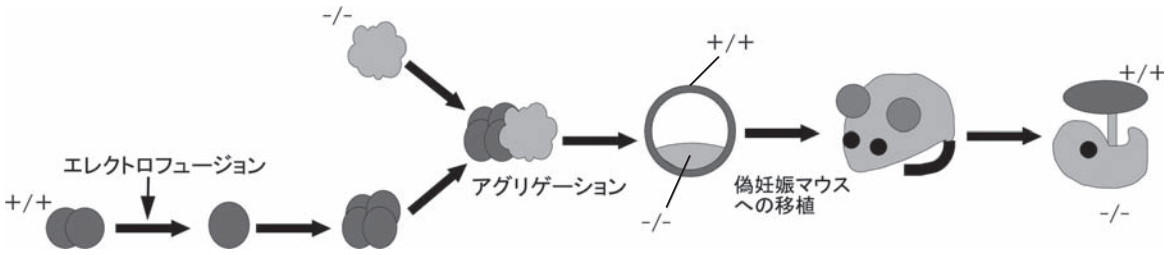


**図5　テトラプロイドレスキュー実験**
テトラプロイド（四倍体）胚は胚体外組織にしか分化できないという性質がある．野生型のテトラプロイド胚（緑色）と遺伝子欠損ディプロイド胚（灰色）のキメラ胚では胚体外組織は野生型となるので，胎生致死の原因が胚体外組織にある場合はレスキューされる．

## 10.　おわりに

本稿では三つのガラクトース転移酵素遺伝子欠損マウスの解析を中心に紹介させていただいた．同じファミリーに属する遺伝子でもその役割は発生から炎症，神経まで多岐にわたることが明らかとなった．このプロジェクトを始める前は，*β4GalT* 遺伝子だけでもなぜ七つも存在するのか疑問であったが，それぞれに基質特異性と発現細胞特異性があって，互いに重複する部分もあるが，それぞれ単独で機能する部分もあることがわかってきた．タンパク質とは異なり，糖鎖構造は遺伝子により一義的に決まるものではなく，個々の細胞で発現している糖転移酵素や糖加水分解酵素，糖供与体などと修飾を受けるタンパク質や脂質の組み合わせにより，複雑に制御されている．一つの糖転移酵素は多数のタンパク質の糖鎖修飾に関与し，逆に一つのタンパク質は同じガラクトースでも複数のガラクトース転移酵素の作用を受けており，この複雑さが糖鎖研究を難しくしている．一つ一つの糖転移酵素欠損マウスを詳細に解析するとともに，基質と発現が重複する糖転移酵素については，複数のものを欠損させて解析を行うことが必要である．その点ではCRISPR/Cas9法などの新しいゲノム編集技術は，複数の遺伝子に容易に変異を導入することができるので，今後威力を発揮すると思われる．また，糖転移酵素欠損マウスと野生型マウスのタンパク質をLectin-IGOT-LC/MS法などで比較することにより，個々の糖転移酵素が修飾するタンパク質を網羅的に同定することも重要な知見を与える．新しい技術を導入することで，複雑な糖鎖修飾の生物学的な意味がさらに解明できればと考えている．

**謝辞**

最後にこれらの研究を推進してくれた当研究室に在籍した大学院生（特に西江敏和，杉原一司，伊藤光俊，引持陽子，鈴木紘史，佐武寛之の各氏）と教員スタッフ（吉原亨，成瀬智恵，神村栄吉，橋本憲佳）ならびに共同研究者の皆様（特に岩倉洋一郎，中江進，高崎誠一，白藤尚毅，宮坂昌之，故宮石理，東治人，成松久，和田隆志，岡昌吾，浅賀知也，伊東信の各先生）に感謝いたします．

## 参　考　文　献

1）Ioffe, E. & Stanley, P.（1994）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 728–732.
2）Metzler, M., Gertz, A., Sarkar, M., Schachter, H., Schrader, J. W., & Marth, J.D.（1994）*EMBO J.*, **13**, 2056–2065.
3）浅野雅秀（2011）モデル動物利用マニュアル―生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール―，小幡裕一，城石俊彦，芹川忠夫，田中啓二，米川博通　編，pp. 346–353，エル・アイ・シー．
4）Hennet, T.（2002）*Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1081–1095.
5）Narimatsu, H., Sinha, S., Brew, K., Okayama, H., & Qasba, P. K.（1986）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4720–4724.
6）Humphreys-Beher, M.G., Bunnell, B., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., & Kidd, V.J.（1986）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8918–8922.
7）Asano, M., Furukawa, K., Kido, M., Matsumoto, S., Umesaki, Y., Kochibe, N., & Iwakura, Y.（1997）*EMBO J.*, **16**, 1850–1857.
8）Stinnakre, M.G., Vilotte, J.L., Soulier, S., & Mercier, J.C.（1994）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6544–6548.
9）Lu, Q., Hasty, P., & Shur, B.D.（1997）*Dev. Biol.*, **181**, 257–267.
10）Lu, Q. & Shur, B.D.（1997）*Development*, **124**, 4121–4131.
11）Kotani, N., Asano, M., Iwakura, Y., & Takasaki, S.（2001）*Biochem. J.*, **357**, 827–834.
12）Sugahara, D., Kaji, H., Sugihara, K., Asano, M., & Narimatsu, H.（2012）*Scientific Reports*, **2**, 680.
13）浅野雅秀（2011）モデル動物利用マニュアル―疾患モデルの作製と利用　免疫疾患―，岩倉洋一郎 編，pp. 523–529，エル・アイ・シー．
14）Vestweber, D. & Blanks, J.E.（1999）*Physiol. Rev.*, **79**, 181–213.
15）Leppaenen, A., Mehta, P., Ouyang, Y.B., Ju, T., Helin, J., Moore, K.L., van Die, I., Canfield, W.M., McEver, R.P., & Cummings, R.D.（1999）*J. Biol. Chem.*, **274**, 24838–24848.
16）Frenette, P.S., Mayadas, T.N., Rayburn, H., Hynes, R.O., & Wagner, D.D.（1996）*Cell*, **84**, 563–574.
17）Bullard, D.C., Kunkel, E.J., Kubo, H., Hicks, M.J., Lorenzo, I., Doyle, N.A., Doerschuk, C.M., Ley, K., & Beaudet, A.L.（1996）*J. Exp. Med.*, **183**, 2329–2336.
18）Homeister, J.W., Zhang, M., Frenette, P.S., Hynes, R.O., Wagner, D.D., Lowe, J.B., & Marks, R.M.（1998）*Blood*, **92**, 2345–2352.
19）Staite, N.D., Justen, J.M., Sly, L.M., Beaudet, A.L., & Bullard, D.C.（1996）*Blood*, **88**, 2973–2979.
20）Lowe, J.B.（2003）*Curr. Opin. Cell. Biol.*, **15**, 531–538.
21）Ellies, L.G., Sperandio, M., Underhill, G.H., Yousif, J., Smith, M., Priatel, J.J., Kansas, G.S., Ley, K., & Marth, J.D.（2002）*Blood*, **100**, 3618–3625.
22）Maly, P., Thall, A., Petryniak, B., Rogers, C.E., Smith, P.L.,

Marks, R.M., Kelly, R.J., Gersten, K.M., Cheng, G., Saunders, T.L., Camper, S.A., Camphausen, R.T., Sullivan, F.X., Isogai, Y., Hindsgaul, O., von Andrian, U.H., & Lowe, J.B.（1996）*Cell*, **86**, 643–653.
23）Homeister, J.W., Thall, A.D., Petryniak, B., Maly, P., Rogers, C.E., Smith, P.L., Kelly, R.J., Gersten, K.M., Askari, S.W., Cheng, G., Smithson, G., Marks, R.M., Misra, A.K., Hindsgaul, O., von Andrian, U.H., & Lowe, J.B.（2001）*Immunity*, **15**, 115–126.
24）Ellies, L.G., Tsuboi, S., Petryniak, B., Lowe, J.B., Fukuda, M., & Marth, J.D.（1998）*Immunity*, **9**, 881–890.
25）Asano, M., Nakae, S., Kotani, N., Shirafuji, N., Nambu, A., Hashimoto, N., Kawashima, H., Hirose, M., Miyasaka, M., Takasaki, S., & Iwakura, Y.（2003）*Blood*, **102**, 1678–1685.
26）Mori, R., Kondo, T., Nishie, T., Oshima, T., & Asano, M.（2004）*Am. J. Pathol.*, **164**, 1303–1314.
27）浅野雅秀，西江敏和（2007）生化学，**79**，673–678.
28）Nishie, T., Miyaishi, O., Azuma, H., Kameyama, A., Naruse, C., Hashimoto, N., Yokoyama, H., Narimatsu, H., Wada, T., & Asano, M.（2007）*Am. J. Pathol.*, **170**, 447–456.
29）松尾清一，他 27 名（2011）IgA 腎症診療指針―第 3 版―，日腎会誌，**53**，123–135.
30）Odani, H., Hiki, Y., Takahashi, M., Nishimoto, A., Yasuda, Y., Iwase, H., Shinzato, T., & Maeda, K.（2000）*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 268–274.
31）Allen, A.C., Bailey, E.M., Brenchley, P.E., Buck, K.S., Barratt, J., & Feehally, J.（2001）*Kidney Int.*, **60**, 969–973.
32）Eisenberg, I., Avidan, N., Potikha, T., Hochner, H., Chen, M., Olender, T., Barash, M., Shemesh, M., Sadeh, M., Grabov-Nardini, G., Shmilevich, I., Friedmann, A., Karpati, G., Bradley, W.G., Baumbach, L., Lancet, D., Asher, E.B., Beckmann, J.S., Argov, Z., & Mitrani-Rosenbaum, S.（2001）*Nat. Genet.*, **29**, 83–87.
33）Arai, A., Tanaka, K., Ikeuchi, T., Igarashi, S., Kobayashi, H., Asaka, T., Date, H., Saito, M., Tanaka, H., Kawasaki, S., Uyama, E., Mizusawa, H., Fukuhara, N., & Tsuji, S.（2002）*Ann. Neurol.*, **52**, 516–519.
34）Ito, M., Sugihara, K., Asaka, T., Toyama, T., Yoshihara, T., Furuichi, K., Wada, T., & Asano, M.（2012）*PLoS ONE*, **7**, e29873.
35）Kido, M., Asano, M., Iwakura, Y., Ichinose, M., Miki, K., & Furukawa, K.（1998）*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 860–864.
36）Yoshihara, T., Sugihara, K., Kizuka, Y., Oka, S., & Asano, M.（2009）*J. Biol. Chem.*, **284**, 12550–12561.
37）Yamamoto, S., Oka, S., Inoue, M., Shimuta, M., Manabe, T., Takahashi, H., Miyamoto, M., Asano, M., Sakagami, J., Sudo, K., Iwakura, Y., Ono, K., & Kawasaki, T.（2002）*J. Biol. Chem.*, **277**, 27227–27231.
38）Kouno, T., Kizuka, Y., Nakagawa, N., Yoshihara, T., Asano, M., & Oka, S.（2011）*J. Biol. Chem.*, **286**, 31337–31346.
39）Nishie, T., Hikimochi, Y., Zama, K., Fukusumi, Y., Ito, M., Yokoyama, H., Naruse, C., Ito, M., & Asano, M.（2010）*Glycobiology*, **20**, 1311–1322.
40）Kumagai, T., Tanaka, M., Yokoyama, M., Sato, T., Shinkai, T., & Furukawa, K.（2009）*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 456–459.
41）Nomura, T., Takizawa, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Wakisaka, E., Yoshizuka, N., Imokawa, G., Dohmae, N., Takio, K., Hattori, M., & Matsuo, N.（1998）*J. Biol. Chem.*, **273**, 13570–13577.
42）Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., & Proia, R.L.（1999）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9142–9147.
43）Tokuda, N., Numata, S., Li, X., Nomura, T., Takizawa, M., Kondo, Y., Yamashita, Y., Hashimoto, N., Kiyono, T., Urano, T., Furukawa, K., & Furukawa, K.（2013）*Glycobiology*, **23**, 1175–1183.
44）Kumagai, T., Sato, T., Natsuka, S., Kobayashi, Y., Zhou, D., Shinkai, T., Hayakawa, S., & Furukawa, K.（2010）*Glycoconj. J.*, **27**, 685–695.

## 著者寸描

**●浅野雅秀**（あさの　まさひで）
金沢大学学際科学実験センター教授，センター長．理学博士（京都大学）．

**■略歴**　1959 年大阪府に生る．83 年京都大学理学部卒業．88 年同大学院理学研究科博士後期課程修了．同年（財）大阪バイオサイエンス研究所・第一研究部特別研究員．91 年ドイツマックスプランク生物物理化学研究所博士研究員．93 年東京大学医科学研究所・実験動物研究施設助手．2000 年金沢大学医学部附属動物実験施設教授．03 年金沢大学学際科学実験センター・遺伝子改変動物分野教授．

**■研究テーマと抱負**　生体内での糖鎖機能について遺伝子改変マウスを用いて研究している．特に発生や神経系に興味を持って進めている．最近は糖鎖異常に起因するヒト疾患も見つかってきており，疾患モデルマウスの開発とそれを用いた原因解明と治療を目指した研究も行っている．

**■ホームページ**　http://kiea.w3.kanazawa-u.ac.jp/tglab/tganimHP/Top.html