

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成14年度採択研究代表者

小山 信人

(タカラバイオ(株) 細胞・遺伝子治療センター 主任研究員)

「糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発」

## 1. 研究実施の概要

*N*-Acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) は糖タンパク質の*N*-結合型糖鎖に bisecting *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) を転移する酵素であり、GnT-III遺伝子を過剰発現させることによってB型肝炎ウイルス (HBV) 遺伝子の発現が抑制されること、がんの転移が抑制されること等が知られている。本研究の目的は、(1) GnT-III遺伝子の発現によるHBV遺伝子発現抑制メカニズムを解明してB型肝炎の治療法につなげること、及び(2) GnT-III遺伝子発現誘導物質及びGnT-V遺伝子発現抑制物質を発見することである。

### (1) GnT-III遺伝子導入によるウイルス性肝障害の修復

GnT-III遺伝子の発現からHBV遺伝子発現の抑制にいたる経路を形成する遺伝子の候補を、遺伝子発現解析及びタンパク質・糖鎖発現解析の両面から絞り込み、詳細に解析することが本研究の基本戦略である。平成14年度には種々の肝がん細胞株にGnT-III遺伝子を導入した。遺伝子発現解析はDNAマイクロビーズアレイ技術により行っており、平成14年度には上記のうち1種類の細胞株にGnT-III遺伝子を導入したものとしていないものの遺伝子発現をMassively Parallel Signature Sequencing (MPSS) によって解析し、また、別の細胞株についてはMegasortによってGnT-III遺伝子を過剰発現させたときに発現量が増加または減少する遺伝子を分離した。平成15年度以降は他の細胞株のMPSS解析を行うとともに、Megasortにより分離した遺伝子を同定し、これらの遺伝子を搭載したDNAチップを作製してさらに詳細な遺伝子発現解析を行う。

一方、GnT-III遺伝子を過剰発現させた細胞株とその親株のタンパク質を2次元電気泳動により分離し、タンパク質発現パターンを比較した。平成15年度にはGnT-III遺伝子の過剰発現により発現量が増減するタンパク質を質量分析によって同定するとともに、他の細胞株についても同様の解析を行う。さらに、上記の方法で単離した糖タンパク質から糖鎖を切り出してピリジルアミノ化し、質量分析や微量HPLCによって糖鎖構造を分析することによって糖鎖構造とHBV遺伝子発現の関係を解析する。

GnT-IIIの発現による糖鎖構造の変化をレクチンが認識して細胞内にシグナルを伝達し、HBV遺伝子の発現を抑制するというメカニズムが考えられる。そこで、平成15年度には bisecting GlcNAcを認識する既知のレクチンがHBV遺伝子の転写にどのような影響を与え

るかを検討するとともに、細胞内シグナルに影響を及ぼすレクチンの探索を開始する。

GnT-III遺伝子を肝臓細胞に導入することによりHBVの治療が可能と考えられる。培養条件により血球系細胞が様々な細胞に分化することが報告されているので、平成15年度には造血幹細胞を含有する骨髄細胞への遺伝子導入法を検討する。

#### (2) GnT-III遺伝子発現誘導物質及びGnT-V遺伝子発現抑制物質の探索

GnT-III、GnT-V遺伝子の発現を制御する物質を探索するために、まず両遺伝子のプロモーターの構造と機能を解析する。平成14年度にはヒトゲノムより両遺伝子上流域をクローニングした。一方、新規プロモーターを発見する目的で5' -RACEによって転写開始点を探索した。この結果、データベースにはない転写産物の存在が示された。平成15年度にはプロモーター領域の塩基配列を決定するとともに新規プロモーターの探索を継続する。

プロモーターの機能を解析するために平成14年度にルシフェラーゼアッセイ系を立ち上げた。平成15年度にはサイトカインや成長因子が各プロモーターに与える影響を検討する。これにより両遺伝子がどのような転写制御を受けているかが推測できると考えられる。また、遺伝子発現制御物質のスクリーニング系としてどのようなもの（例えば細胞とプロモーターの組み合わせ）が適切かを評価する。

## 2. 研究実施体制

### タカラバイオグループ

#### ①研究分担グループ長：小山 信人

(タカラバイオ(株) 細胞・遺伝子治療センター、主任研究員)

#### ②研究項目：

- ・GnT-III遺伝子導入によるウイルス性肝障害の修復（遺伝子発現解析、遺伝子導入法開発）
- ・GnT-III遺伝子発現誘導物質及びGnT-III遺伝子発現抑制物質の探索

### 糖鎖治療学グループ

#### ①研究分担グループ長：近藤 昭宏

(大阪大学大学院 医学系研究科 糖鎖治療学(タカラバイオ) 寄附講座、客員教授)

#### ②研究項目：

- ・GnT-III遺伝子導入によるウイルス性肝障害の修復（プロテオーム、グライコーム解析）

### 糖鎖シグナルグループ

#### ①研究分担グループ長：三善 英知

(大阪大学大学院 医学系研究科 保健学専攻 生体情報科学、助教授)

#### ②研究項目：

- ・GnT-III遺伝子導入によるウイルス性肝障害の修復（レクチンによる細胞シグナルの解析）