

「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

西原 祥子

(創価大学工学部生命情報工学科 教授)

「RNAi法による糖鎖機能解明と利用技術の開発」

1. 研究実施の概要

細胞表面の糖タンパク質や糖脂質上の糖鎖構造は、生物の発生過程や細胞の癌化において顕著な変化をしめす。また、糖鎖修飾は翻訳後修飾の最たるものであり、ゲノムとプロテオームの先にあるものは、グリコームである。本研究は、ポストゲノムの重要課題である「個体レベルでの糖鎖機能の解明」を目的している。糖鎖の種を越えて保存されている機能に着目して、ショウジョウバエをモデルとした網羅的解析システムからその全容を明らかにし、糖鎖基本機能の全体像に迫る方法論と技術開発を提供する。

糖鎖の複雑性の基礎となる糖転移酵素を取り上げ、基本システムの構築を行なった。ヒトをはじめとする哺乳類では糖転移酵素遺伝子が200種以上と予想されている。我々は、糖転移酵素の分子進化学的な解析からショウジョウバエではそのうち75種が保存され、大部分は基本的な糖鎖構造を作るために必要なものである事を確認した。つまり、ハエをモデル系にしてヒトの基本的な糖鎖機能を解析できることが示された。ヒト糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体に対応するハエ遺伝子を中心に、網羅的RNAiノックダウン体の作製と解析を行っている。現在まで解析を行ったもののうち60%が致死性を示し、糖鎖合成に関与する多くの遺伝子が生体内で重要な役割を果たしていることが示された。また、遺伝子特異的なmRNAの減少と対応する糖鎖構造の減少も認められており、ファミリーを形成する酵素間でも、本システムが有効に働くことが確認された。

今後、糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体遺伝子に対する解析をさらに進めると共に、レクチン分子、コア蛋白質、糖分解酵素などの糖鎖関連遺伝子のRNAiノックダウン体解析も行い、糖鎖の生理機能の全体像を明らかにする。さらに、これらの結果を基にヒトや哺乳類培養細胞系で解析し、本研究の成果を、ヒト遺伝病や癌、感染症等の解析や治療へ応用することを目指す。

2. 研究実施内容

本研究は、糖鎖の種を越えて保存されている機能に着目して、ショウジョウバエをモデルにした網羅的解析システムからその全容を明らかにし、ヒトをはじめとする哺乳類へと結果の還元を行う。具体的には、1) ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の網羅的単離と同

定、2) 糖鎖関連遺伝子に対するハエRNAiノックダウン体の網羅的作製と解析、3) 解析結果の哺乳類細胞での検討の3つの部分から構成されるが、2) が研究の中心となっている。

1) ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の網羅的単離と同定

我々は、160種にのぼるヒト糖転移酵素遺伝子や糖ヌクレオチド輸送体の配列を用いてハエゲノムデータベースを検索し、80種の糖転移酵素遺伝子、11種の硫酸転移酵素遺伝子、1種のエピメラーゼ、5種の糖ヌクレオチド輸送体遺伝子を見出した。系統樹解析を行ったところ、47%にあたるものが、ヒト遺伝子の1:1オーソログにあたるものであった。これらのハエオーソログは、対応するヒト糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体と類似の活性を持つものと推定された。実際に、8種のハエ糖転移酵素遺伝子と2種の糖ヌクレオチド輸送体を昆虫細胞発現系や酵母発現系を用いて発現させたところ、対応する糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体と類似の基質特異性を示し、ハエをモデル系とした糖鎖の基本機能解析の可能性が示された。

2) 糖鎖関連遺伝子に対するハエ RNAi ノックダウン体の網羅的作製と解析

(2-1) RNAiノックダウン体の網羅的作製

1) で得られている糖転移酵素を中心とした糖鎖関連遺伝子に対し、pUAST-R57ベクターを用いてIRベクターを構築し、ハエに導入した。また、レスキュー実験用の遺伝子強制発現用ベクターも、一部についてはハエに導入済みである。前年度作成した系統も合わせ、全身の細胞で遺伝子発現をノックダウンしたときに発生異常により致死となる遺伝子を検索したところ、約60%が致死性を示した。RNAiの遺伝子ノックダウンが完全ではない(hypomorph変異体となる)ことを考慮すると、多くの遺伝子が生体内で重要な役割を果たしていることを示している。

(2-2) RNAiノックダウン体の生化学的、分子生物学的解析

(2-1) で致死性を示した糖転移酵素遺伝子や糖ヌクレオチド輸送体遺伝子のRNAiノックダウン体の3齢幼虫からmRNAを調整し、ノックダウン効率と特異性の検討を行った。ファミリーを形成する糖転移酵素遺伝子間でも交叉のない特異的なノックダウンがおこなわれていることが示され、線虫や植物に比較して、ハエでは、遺伝子のより特異的なノックダウンが可能になることが明らかになった。また、一部の糖転移酵素のノックダウン体では、その生産物である糖鎖構造の特異的減少が認められ、本システムが糖鎖機能解析に適することが確認された。

(2-3) RNAiノックダウン体の発生学的解析

さらに、糖鎖の生理機能を明らかにするため、糖転移酵素中心にRNAiにより翅特異的に機能阻害を誘導し、表現型を解析した。翅の様々な表現型から、どのような発生過程または情報伝達系に異常が生じたかを簡便に推測することが可能である。現在までに得られている系統に対して解析を行ったところ、以下の2つの結論を得た。(i) 糖鎖の種類、例えば、

N-結合型糖鎖か*O*-結合型糖鎖かによって、異なる特定の表現型が得られたため、糖鎖の種類ごとに関与する情報伝達系の種類が示唆された。(ii) 同じ糖鎖を生成する酵素でも、糖鎖の根元側（還元末端側）を作る酵素では重篤な表現型が得られ、糖鎖の末端側（非還元末端側）を作る酵素では多様で軽微な表現型が得られた。このことは、糖鎖の末端側には多様性があり、機能が分化している可能性を示唆している。このような糖鎖機能の網羅的な解析は世界でもほとんど例がなく、糖鎖研究に重要な知見を提供するものと考えられた。

以上、(2-1) から (2-3) に至るショウジョウバエにおける解析結果から、本RNAiシステムが有効に機能し、糖鎖が生存に必須な基本的生理機能を担っていることが示された。さらなるハエRNAiノックダウン体の解析を行うため、本年度は、以下の(2-4)の技術開発も行った。

(2-4) 微量糖鎖構造解析システムの開発

ハエ糖鎖構造の解析に必要な微量糖鎖構造解析システムを開発のため、ハエ*N*-結合型糖鎖の微量分析法の確立を試みた。ヒドラジン分解により化学的に*N*-結合型糖鎖を切り出した後蛍光標識を行い、2D-HPLCによるマッピングによってハエ*N*-結合型糖鎖構造を解析するシステムを構築しつつある。前年度に確立したハエ複合糖質の単糖組成分析法とあわせて使用することで、RNAiノックダウンによって生じる様々な糖鎖の変化を検出できるようになった。

3) 解析結果の哺乳類細胞での検討

2) で行っているハエRNAiのスクリーニングで重要性が明らかとなった糖鎖関連遺伝子を哺乳動物細胞、特に遺伝子導入が難しい細胞に応用するために、レンチウイルスによるsiRNAシステムを導入した。本システムにより、ヒトリンパ球性白血病細胞の組織浸潤に重要な特徴的表面糖鎖発現レベルをコントロールしている二種類のタンパクをコードする遺伝子のサイレンシングを試みたところ、特徴的表面糖鎖発現レベルを低下させることに成功した。今後、本システムをマウスES細胞に応用する予定である。

3. 研究実施体制

(1) 統括グループ

① 研究分担グループ長：西原祥子（創価大学 工学部生命情報工学科、教授）

② 研究項目：ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の網羅的単離と同定

体系的RNAiノックダウン体の分子生物学的・生化学的解析

ハエ解析結果のヒトへの応用

(2) 遺伝学的機能解析グループ

① 研究分担グループ長：上田 龍（国立遺伝学研究所 無脊椎動物遺伝学研究室、教授）

② 研究項目：ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の体系的なRNAiノックダウン体作製
RNAiノックダウン体の遺伝学的解析

(3) 発生学的機能解析グループ

① 研究分担グループ長：後藤 聡（三菱化学生命科学研究所、主任研究員）

② 研究項目：ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子RNAiノックダウン体の発生学的解析

(4) 糖鎖構造解析グループ

① 研究分担グループ長：豊田英尚（千葉大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室、助教授）

② 研究項目：野生型とショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子RNAiノックダウン体の糖鎖構造解析

(5) 糖鎖合成グループ

① 研究分担グループ長：石田秀樹（（財）野口研究所 糖鎖有機化学研究室、研究員）

② 研究項目：糖鎖基質、及び、阻害剤の合成

(6) 糖鎖細胞制御グループ

① 研究分担グループ長：中村 充（産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター、チーム長）

② 研究項目：糖鎖関連遺伝子siRNA導入哺乳類細胞の性状解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Takemae, H., Ueda, R., Ohkubo, R., Nakato, H., Izumi, S., Saigo, K., Nishihara, S.,: Proteoglycan UDP-galactose: β -xylose β 1,4galactosyltransferase I is essential for viability in *Drosophila Melanogaster*
J Biol. Chem., 278, 15571-15578 (2003).
- Kamiyama, S., Suda, T., Ueda, R., Suzuki, M., Okubo, R., Kikuchi, N., Chiba, Y., Goto, S., Toyoda, H., Saigo, K., Watanabe, M., Narimatsu, H., Jigami, Y., Nishihara, S.: Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter.
J Biol. Chem., 278, 25958-25963 (2003).
- Zhang, Y., Iwasaki, H., Wang, H., Kudo, T., Kalka, T.B., Hennes, T., Kubota, T., Cheng, L., Inaba, N., Gotoh, M., Togayachi, A., Guo, J., Hisatomi, H., Nakajima, K., Nishihara, S., Nakamura, M., Marth, J.D., Narimatsu, H.: Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc α -serine/threonine antigen.

- J Biol. Chem., 278, 573-584 (2003).
- Isshiki, S., Kudo, T., Nishihara, S., Ikehara, Y., Togayachi, A., Furuya, A., Shitara, K., Kubota, T., Watanabe, M., Kitajima, M., Narimatsu, H.: Related Articles, Links Lewis type 1 antigen synthase (β 3Gal-T5) is transcriptionally regulated by homeoproteins. J Biol. Chem., 278, 36611-36620 (2003).
 - Nishihara, S., Iwasaki, H., Nakajima, K., Togayachi, A., Ikehara, Y., Kudo, T., Kushi, Y., Furuya, A., Shitara, K., Narimatsu, H.: α 1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) determines Lewis X expression in brain. Glycobiology, 13, 445-455 (2003).
 - Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., Von Weizsacker F., Blum, H.E., Baumert, T.F.: Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. J Biol. Chem., 278, 41003-41012(2003).
 - Suda, T., Kamiyama, S., Suzuki, M., Kikuchi, N., Nakayama, N., Narimatsu, H., Jigami, Y., Aoki, T., Nishihara, S.: Molecular cloning and characterization of a human multi-substrate specific nucleotide-sugar transporter homologous to *Drosophila fringe connection*. J Biol. Chem., 279, 26469-26474 (2004).
 - Tanaka, T, Tsuda, C., Miura, T., Inazu, T., Tsuji, S., Nishihara, S., Hisamatsu, M., Kajimoto, T.: Design and synthesis of peptide mimetics of GDP-Fucose: Targeting Inhibitors of fucosyltransferases. Synlett, 2004, 243-246 (2004).
 - Kudo, T., Kaneko, M., Iwasaki, H., Togayachi, A., Nishihara, S., Abe, K., Narimatsu, H.: Normal embryonic and germ cell development in mice lacking α 1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) which show disappearance of stage-specific embryonic antigen 1. Mol. Cell Biol. 24, 4221-4228 (2004).
 - Ui-Tei, K., Ueda, R., Zenno, S., Takahashi, F., Doi, N., Naito, Y., Yamamoto, M., Hashimoto, N., Takahashi, K., Hamada, T., Tokunaga, T. and Saigo, K.: RNA interference induced by transient or stable expression of hairpin structures of double stranded RNA in *Drosophila* and mammalian cells. Molekulyarnaya biologiya, 38, 228-238 (2004).
 - Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R. and Saigo, K.: siRNA sequence requirement for effective

RNA interference in mammalian cells and chick embryos.

Nucleic Acids Res., *32*, 936-948 (2004).

- Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R. and Lemaitre, B.: *In vivo* RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defence against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults.

J. Biol. Chem. *279*, 12848-12853 (2004)

(2) 特許出願

なし