

「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

生物の発生過程や細胞の癌化において、細胞表面の糖鎖構造は顕著な変化をしめす。糖鎖修飾は翻訳後修飾の主となるものであり、糖鎖修飾を考慮せずにタンパク質の機能を論ずる事はできない。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、糖鎖の基本機能の全体像解明への方法論と技術開発を行う。

昨年度構築し、糖転移酵素遺伝子ファミリーを用いてその有効性を検証したショウジョウバエRNAiノックダウンシステムにより、糖転移酵素遺伝子などの糖鎖合成関連遺伝子に対する網羅的RNAiノックダウン体の作製と解析を行った。現在まで解析を行ったものの多くが致死性を示し、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改めて示された。それらの遺伝子を組織特異的にノックダウンしたところ、顕著な形態形成異常が認められるものも多かった。網羅的解析に並行して個々の遺伝子についての解析も行った。特に、先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子であるヒト*α*-マンノース転移酵素1遺伝子(*POMT1*)とそのホモログである*POMT2*について、各々のハエオーソログのRNAiノックダウン体の解析を行い、両者が協調して筋肉の正常な発生に関与していることを明らかにした。

今後、糖鎖合成関連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、コアタンパク質、糖鎖分解酵素などの他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、これらの結果をヒトや哺乳類培養細胞系で検証し、再生医療、ヒト遺伝病や癌、感染症等の解析や治療へ、本研究の成果を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

ゲノムデータベースの検索により、昨年度見出した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に加え、本年度は、レクチン分子、コアタンパク質候補、及び、糖分解酵素などの検索を行い、総計252種のショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子候補を見出した。また、昨年度に引き続いて、各種ハエ糖転移酵素遺伝子の活性を同定し、dPOMT1とdPOMT2が協調してジストログリカンへマンノースを転移する事を明らかにした。

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

誘導型RNAiを利用して変異体を作製するため、遺伝子断片を逆向き反復配列(IR)の形でベクターに組み込み、ショウジョウバエ個体に顕微注射したあと交配実験により導入遺伝子が安定に保持される系統を作出している。1)で現在までにハエゲノムより見出されている糖鎖関連遺伝子は252遺伝子に及ぶ。このうち平成16年度以前にベクターに組み込んだ遺伝子数は120個であった。今年度は、残りの遺伝子についてのベクター構築を試み、最終的に170個(67%)についてIRベクターを得た。これらは順次ハエ系統を作成し、それらを用いた遺伝子機能の解析を行っている。ベクター構築が失敗した80遺伝子については、処理工程に技術的な改良を加えて2回目の試みに着手している。

(2-2) RNAiノックダウン体の生化学的、分子生物学的解析

重篤な表現型を示した糖転移酵素遺伝子については、昨年度に引き続き、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ている。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、昨年に引き続き確認されている。特に、*O*-マンノース転移酵素ファミリー遺伝子、*dPOMT1*と*dPOMT2*については、mRNAの特異的なノックダウンが行われているだけでなく、各々のRNAiノックダウン体において、対応するジストログリカンへのマンノース転移活性の減少も認められた。これにより、RNAiによりタンパク質の発現が抑制されている事も確認された。

(2-3) RNAiノックダウン体の発生的解析

昨年度に引き続き、糖転移酵素遺伝子を中心にRNAiによる組織特異的なノックダウンを行い、表現型を解析

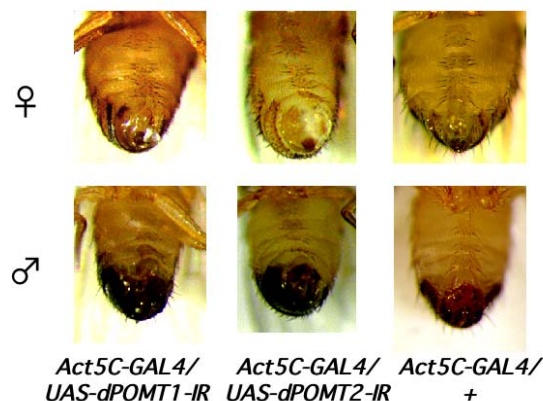


図 : *dPOMT1* 及び *dPOMT2* RNAi 体の表現型

している。特に、*dPOMT1*と*dPOMT2*のRNAiノックダウン体では、ともに、図に示す様な腹部がねじれた表現型を示した。また、両者の間には、遺伝学的相互作用も認められ、両遺伝子が協調して、筋肉の正常な発生に関与していることが明らかになった。

(2-4) RNAiノックダウン体を用いた糖修飾の機能と機構の解析

糖鎖の機能解析の一環として、異常になった糖鎖の構造を生化学的に解析する方法の開発を試みた。モデル系としてショウジョウバエの網膜形成に必要なchaoptin分子に着目し、その蛋白質に付加されている糖鎖の付加位置および糖鎖構造の解析を行った。chaoptin分子に対する抗体を用いてアフィニティー精製を行い、その精製産物をプロテアーゼ消化後、液クロを用いて、切断断片ペプチドを分画・分取した。分取したペプチドそれぞれについて、各種レクチンに対する反応性を調べた。レクチンに反応したペプチドについては、ペプチドシーケンサーを用いて配列を決定した。さらに、糖鎖部分の構造については、レクチンとの詳細な反応性の検討および質量分析計を用いた解析をおこなった。その結果、いくつかのペプチドについては糖鎖結合位置の同定ができた。このようなシステムを立ち上げることによって、生体内の異常になった糖鎖の生化学的解析を行う基本技術が確立されたと考えている。本技術は、糖鎖機能の生物学的解析を行う際に欠くことのできないものである。

(2-5) 微量糖鎖構造解析システムを用いたRNAiノックダウン体の解析

致死性を示したRNAiノックダウン体の糖鎖構造変化を、昨年に引き続いて微量糖鎖構造解析システムにより解析している。その結果、一部の糖鎖構造に特異的な変化をもたらすRNAiノックダウン体を見出した。対応する有用なショウジョウバエ変異体はまだ確立されておらず、現在、本RNAiノックダウン体を用いて、その機能を解析している。

3) 解析結果の哺乳類細胞での検討

機能解析する重要性が確認できた糖鎖関連遺伝子のRNAiを哺乳動物細胞で実現することを目的として、哺乳動物細胞で恒常的にsiRNAが働くシステムを、レトロ・レンチ両ウイルスベクターを骨格に各種構築した。最適なアルゴリズムでターゲット配列を選んでコンストラクトを調製し、複数の他の糖鎖遺伝子に対して遺伝子発現抑制効果を示さない、特異性の高いターゲット配列を得る手順をほぼ確立した。特に、その一部については、造血前駆細胞に導入して安定発現株を樹立し、導入細胞株における標的糖鎖関連遺伝子の発現抑制を確認した上で遺伝子の機能を解析した。今後、順次標的遺伝子のターゲット配列を試して機能解析につなげる予定である。また、最重要と認められた遺伝子については、ノックアウトマウスを作製中である。

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）
- ② 研究実施項目：ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の網羅的単離と同定、及び、体系的RNAiノックダウン体の分子生物学的・生化学的解析と個々の

遺伝子の機能解析、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）
- ② 研究実施項目：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とその遺伝学的解析

(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）
- ② 研究実施項目：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、及び、糖修飾の機能と機構の解析

(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）
- ② 研究実施項目：野生型、及び、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）
- ② 研究実施項目：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）
- ② 研究実施項目：糖鎖関連遺伝子siRNA導入哺乳類細胞の性状解析、及びノックアウトマウスの作製

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Kohyama-Koganeya, A., Sasamura, T., Oshima, E., Suzuki, E., Nishihara, S., Ueda R., Hirabayashi Y.: *Drosophila* glucosylceramide synthase: A negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors. *J. Biol. Chem.*, 279, 35995-6002 (2004).
- Ichimiya T, Manya H, Ohmae Y, Yoshida H, Takahashi K, Ueda R, Endo T, Nishihara S.: The twisted abdomen phenotype of *Drosophila* POMT1 and POMT2 mutants coincides with their heterophilic protein *O*-mannosyltransferase activity. *J. Biol. Chem.*, 279, 42638-42647 (2004).
- Kamimura, K., Rhodes, J. M., Ueda, R., McNeely, M., Shukla, D., Kimata, K., Spear, P. G., Shworak, N. W., and Nakato, H. : Regulation of Notch signaling by *Drosophila* heparan sulfate 3-O sulfotransferase. *J. Cell Biol.*, 166, 1069-1079 (2004).
- Ishimaru, S., Ueda, R., Hinohara, Y., Ohtani, M., and Hanafusa, H. : PVR

plays a critical role via JNK activation in thorax closure during *Drosophila* metamorphosis.

The EMBO J., 23, 3984-3994 (2004).

- Hirota, Y., Sawamoto, K., Takahashi, K., Ueda, R., and Okano, H. : The transmembrane protein, Tincar, is involved in the development of the compound eye in *Drosophila melanogaster*.

Dev. Genes Evol., 215, 90-96 (2005).

- Kikuchi, J., Shinohara, H., Nonomura, C., Ando, H., Nojiri, H. Nakamura, M. : Not Core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-2 and -3 but -1 regulates sialyl-Lewis-X expression in human precursor-B cell.

Glycobiology 15: 271-280, (2005).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数 : 3 件 (CREST研究期間累積件数 : 3 件)