

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成15年度採択研究代表者

野村 一也

(九州大学理学研究院生物科学部門 助教授)

## 「遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明」

### 1. 研究実施の概要

生命の第3の鎖とよばれる糖鎖の、多細胞生物での機能を明らかにするためには、モデル生物線虫は最適の生物の一つと考えられる。本研究ではRNAi法と遺伝子欠失突然変異株の取得によって、糖鎖関連遺伝子の遺伝子破壊を行い、どのような表現が顕れるかを解析することで糖鎖の重要な機能を明らかにし、ヒトでの病態解明、疾病治療などに役立てることを目標としている。このため、ヒトを含む哺乳類の糖鎖の機能の研究をすすめながら、対応する線虫遺伝子の遺伝子破壊を行うという戦略をとっている。21世紀の医学生物学に革命をもたらすともいわれる糖鎖生物学のさらなる発展のためには、多細胞生物において単一細胞レベルと個体レベルでの糖鎖の機能解析が不可欠である。私たちはトランスジェニック線虫の作成、ノックアウト株の四次元顕微鏡による観察などの手法を駆使して、糖鎖機能の単一細胞レベルでの解析をすすめている。本年度はこれに加えて糖鎖関連遺伝子のネットワークの解明するため、DNAマイクロアレイや二次元電気泳動法を用いた遺伝子ノックアウト株の解析を開始した。ヒトの筋萎縮性側索硬化症で死んでいく神経細胞で発現が亢進している遺伝子の線虫オースログなど重要な遺伝子の解析をすすめており、遺伝子破壊で発現が増減している遺伝子をマススペクトルなどを活用しながら網羅的に同定している。さらにヒトと共通する糖転移酵素遺伝子として選び出した145種の中で110種以上の遺伝子についてRNAiによる機能阻害を試みて、1割以上の遺伝子で著しい異常がひきおこされることを確認した。またsynthetic lethalityのアッセイシステムを確立した他、細胞分裂を制御するコンドロイチンに関わる遺伝子ネットワークの解明も大きく進展している。ヒトや哺乳類の細胞におけるGPIアンカー型蛋白質関連の遺伝子の解析もすすんでおり、そのデータに基づいて線虫における対応する遺伝子のノックアウトをすすめ、癌や筋ジストロフィーを含む難病、遺伝病などの治療法の開発へつなげる研究を展開することを目指している。

### 2. 研究実施内容

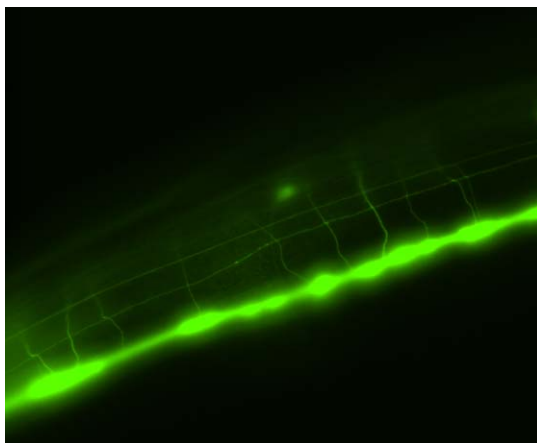
本研究ではヒトと共通の糖鎖関連遺伝子をモデル生物である線虫*C. elegans*のゲノムから選び出し、遺伝子機能を破壊したうえで、どのような異常が顕れるかを単一細胞レベル

であきらかにしている。モデル生物を利用することで、糖鎖が発生、形態形成、神経回路網形成、器官形成、行動などにおいて、どんな役割を果たしているかを迅速かつ完全に解明し、ヒトの病気の治療法の開発など人類の福祉の増進に大いに役立てることを目指している。本年度の研究では、糖鎖関連遺伝子をノックアウト、ノックダウンした時に遺伝子発現がどのように変化するかを細胞・個体レベルだけでなく生化学的に明らかにするため、DNAマイクロアレイや二次元電気泳動による分析を開始した。こうした細胞・個体・分子にわたる多角的な分析から、糖鎖を中心とする遺伝子ネットワークの全貌を解明する手がかりが得られると考えて研究をすすめている。

#### 1) 線虫の糖鎖関連遺伝子の組織的・戦略的ノックアウト：

線虫糖鎖関連遺伝子としてヒトと共通のものをバイオインフォマティクスを活用しながら選び出し、順次TMP/UV法での欠失突然変異株の取得を行っている。本年度は17遺伝子の欠失突然変異株を新たに取得して解析した。その約半分にあたる9個が致死の表現型を示し糖鎖の重要性をうかがわせる結果である。そのうちの幾つかの遺伝子については、神経回路網の異常の発生や細胞融合と形態形成への異常がおきることを単一細胞レベルで確認しており、糖鎖の神経回路網や器官形成への関与という重要なテーマの解析に役立つと期待している（図1）。また線虫にはヒトと共通の糖転移酵素として145種類が存在することを成松久博士の研究グループとの共同研究で明らかにしたので、その中の110種以上の遺伝子についてRNAiによる遺伝子機能阻害を行った。その結果、一割以上の遺伝子で致死を含む激しい表現型を確認し、それぞれの遺伝子について解析を続けており、順次、欠失突然変異株の取得をすすめていく予定である。

図1



生きたままで可視化した線虫の神経細胞。緑色の蛍光が神経細胞の本体と神経線維である。KO株での神経回路網の異常を単一細胞レベルで簡単に検出することができる。

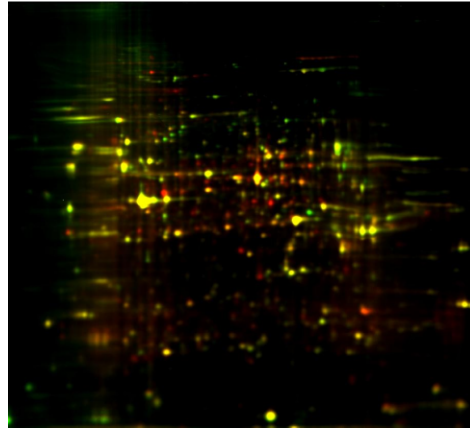
## 2) ノックアウト株とRNAiを利用した、遺伝子の多重ノックアウトシステムの確立：

遺伝子ノックアウト株の約半数は致死の表現型を示さない。こうした線虫では全く見かけ上正常の表現型を示すものも多いが、ノックアウトされた遺伝子からの遺伝子産物産生は完全に無くなっている。そこで致死でないノックアウト株の線虫を大量に培養し、この線虫に一万種類を超える線虫遺伝子についてのRNAiを網羅的に行い何らかの表現型がえられるものをスクリーニングする手法が考えられる。この目的のため、線虫を発生段階、大きさ、蛍光の有無で生きたまま分離できる線虫ソーターを導入し、多数の異なるfeeding RNAi用の大腸菌をまいてあるマイクロタイタープレートの穴に変異株の線虫を数匹ずつ入れて数代にわたって飼育し、表現型を検定するシステムを確立した。現在、この方法で複数の糖鎖関連遺伝子を同時にノックアウトして顕れる表現型（synthetic lethalityなど）のスクリーニングを行っており、興味深い結果が得られ始めている。

## 3) 二次元電気泳動法とDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の解析：

RNAiや欠失突然変異株で、ある特定の糖鎖関連遺伝子をノックアウトした場合、いったいどのような遺伝子の発現が変化して表現型にむすびついているのだろうか。これを明らかにするために遺伝子機能破壊株と正常株のmRNA発現パターンの変化をDNA microarrayと二次元電気泳動法（二次元DIGE法）で検討する研究を開始した。DNAマイクロアレイはAffymetrix社のものを用いており、ALS（筋萎縮性側索硬化症）で発現が上昇している遺伝子の線虫オーソログなどの解析を行っている。また二次元DIGE法は二次元Differential Gel Electrophoresis法の略称で、野性株と糖鎖関連遺伝子のノックアウト株由来の蛋白質をそれぞれ異なる蛍光色素でラベルして混合した上で同時に二次元電気泳動することで、泳動ごとの誤差の無い条件で比較できる画期的な手法である。糖蛋白質だけを特異的に染色することができる蛍光試薬と組み合わせることで、遺伝子ノックアウトにともなうどのような蛋白質、糖蛋白質の変化が起こったかを解析し、変動した蛋白質を含む電気泳動スポットをゲルから切り出し、LC/MS/MS法などでアミノ酸配列を決定して同定している（図2）。さらに線虫の二次元電気泳動ゲル中に存在する主要蛋白質スポットのデータベースを作成中であり、すでに100種以上の蛋白質の同定をすませている。今後、このデータベースを利用することで、質量分析などによる蛋白質の同定の労力が軽減され、糖鎖関連遺伝子のノックアウトにともなう変動する蛋白質の同定が迅速化するため、遺伝子ネットワークの解明が急速に進展するはずである。このデータベースは将来、公開し全世界の研究者に利用してもらえるようにする予定である。

図2 N2\_Cy3 (Green), 糖鎖関連遺伝子KO株\_Cy5 (Red)



Red spots: N2 < KO株  
Green spots: N2 > KO株

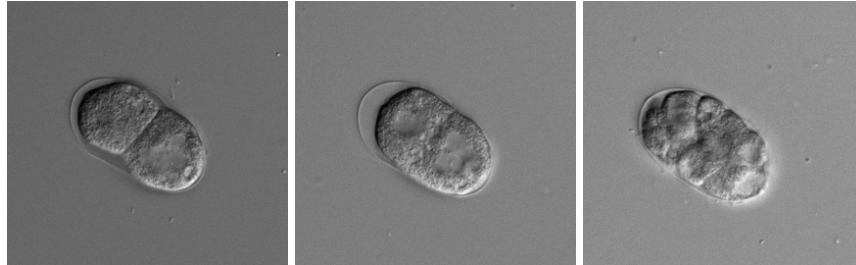
二次元DIGE法による糖鎖関連遺伝子発現の変動解析の一例

赤いスポットはKO株で増えている蛋白質、緑のスポットは減っている蛋白質、そして黄色のスポットは変動していない蛋白質を示す。

4) 細胞分裂を制御するコンドロイチン関連遺伝子ネットワークの研究：

上記の研究と平行して、コンドロイチン合成酵素の遺伝子ノックアウトでひきおこされる細胞分裂異常の分子生物学的解析をすすめた。コンドロイチン合成と細胞分裂をつなぐ信号伝達系の成分を明らかにするためDNA microarrayや二次元電気泳動の結果を活用し、数種類の候補遺伝子を同定した。RNAiの結果は全てこれらの遺伝子が細胞分裂に関与していることを示しており、現在 それぞれについて詳細に分析をすすめている。さらにヒトのコンドロイチン合成酵素はその機能にchondroitin polymerizing factor (コンドロイチン重合化因子) とよばれる蛋白質を必要とすることを明らかにしたので、線虫でのオーソログ遺伝子 (polymerizing factor for chondroitin: *pfc-1* と命名) を同定してその機能を解析し、線虫でもこの因子がコンドロイチン合成酵素と相互作用してコンドロイチン糖鎖を伸長させることを確認した。さらに *pfc-1* をRNAiでノックアウトした結果、コンドロイチン合成酵素のノックアウトと全く同一の細胞分裂異常があらわれることが明らかになった (図3)。またコンドロイチン合成酵素とpolymerizing factorそれぞれの発現解析をトランスジェニック線虫を作成して行い、それらが同時に発現している場合があることを確認した。

図3



コンドロイチン重合化因子 *pfc-1* 遺伝子の機能を低下させた線虫の初期胚。2細胞期胚(左)が1細胞(中央)へと変化したまま死んだように見えるが、突然、多細胞胚(右)へと変化する。

5) ヒトや哺乳類の糖鎖関連遺伝子についての研究：

さらにGPIアンカー型蛋白質やサイトカイン関連遺伝子、プロテオグリカン関連遺伝子、アミノ酸トランスポーター遺伝子や硫酸化関連遺伝子などの解析をヒトを含む哺乳類細胞と線虫ですすめており、線虫とヒトでの研究成果を相互に反映しながら、糖鎖機能の解析をつづけ、基礎医学や臨床応用への格段の貢献を目指している。

### 3. 研究実施体制

#### 統括グループ

- ① 研究分担グループ長：野村 一也（九州大学大学院理学研究院、助教授）
- ② 研究項目：全体の統括と線虫遺伝子破壊による糖鎖関連遺伝子の機能解析・プロテオーム解析

#### 線虫糖鎖関連・解析グループ

- ① 研究分担グループ長：安藤 恵子（東京女子医科大学医学部、助手）
- ② 研究項目：線虫の糖鎖関連遺伝子の欠失突然変異株の取得と解析。トランスジェニック線虫の作成方法の開発と改良。

#### プロテオーム・糖鎖解析グループ

- ① 研究分担グループ長：川崎 ナナ（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部、室長）
- ② 研究項目：二次元電気泳動による線虫蛋白質の分離と解析。質量分析法によるプロテオーム解析および糖鎖解析

#### プロテオグリカン解析グループ

- ① 研究分担グループ長：北川 裕之（神戸薬科大学、助教授）

- ② 研究項目：糖鎖関連遺伝子、特にプロテオグリカンに関する遺伝子に関する生化学的解析と細胞生物学的解析

糖鎖関連遺伝子機能解析グループ

- ① 研究分担グループ長：瀬古 玲（佐々木研究所、研究員）
- ② 研究項目：ヒトを含む高等動物での糖鎖関連遺伝子の解析。遺伝子破壊にもなう糖鎖の変動の解析と遺伝子解析。硫酸化・GPIアンカー付加など糖鎖関連遺伝子の組織的解析。遺伝子クローニング、線虫の糖鎖配列の解析。

トランスポーター機能解析グループ

- ① 研究分担グループ長：金井 好克（杏林大学医学部、教授）
- ② 研究項目：ヒトを含む哺乳類と線虫における糖鎖関連トランスポーター遺伝子の解析。トランスジェニック線虫や四次元顕微鏡などを駆使した線虫のトランスポーターの機能解析。

#### 4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Fukushima, K., Ikehara, Y., and Yamashita, K. (2005) Functional role played by the GPI-anchor glycan of CD48 in IL-18-induced IFN- $\gamma$  production. *J. Biol. Chem.*, published online on March 10, 2005.
- Ideo, H., Seko, A., and Yamashita, K. (2005) Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and Carcinoembryonic antigen in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 4730-4737.
- Izumikawa T, Kitagawa H, Mizuguchi S, Nomura KH, Nomura K, Tamura J, Gengyo-Ando K, Mitani S, Sugahara K. (2004) Nematode chondroitin polymerizing factor showing cell-/organ-specific expression is indispensable for chondroitin synthesis and embryonic cell division. *J Biol. Chem.* **279** (51):53755-53761.
- Fukushima, K., and Yamashita, K. (2004) The carbohydrate recognition by cytokines modulates their physiological activities. *Glycoconj J.*, **21**, 31-34.
- Fukushima, K., Ishiyama, C., and Yamashita, K. (2004) GPI-anchor recognition of TNF- $\alpha$  modulates apoptosis of U937 cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **426**, 298-305.
- Seko, A., and Yamashita, K. (2004)  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase-7 ( $\beta$ 3Gn-T7) acts efficiently on keratan sulfate-related glycans. *FEBS Lett.*, **556**, 216-220.

- Hara-Kuge, S., Seko, A., Shimada, O., Tosaka-Shimada, H., and Yamashita, K. (2004) The binding of VIP36 and  $\alpha$ -amylase in the secretory vesicles via high-mannose type glycans. *Glycobiology*, **14**, 739-744.
- Fukushima, K and Yamashita, K. (2003) A  $\beta$ -N-acetylglucosaminyl phosphate diester residue is attached to the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor of human placental alkaline phosphatase: a target of the channel-forming toxin aerolysin. *J. Biol. Chem.*, **278**, 36296-36303