

「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。糖鎖修飾は翻訳後修飾の主たるものであり、ポストゲノムの重要課題である。本研究は、「個体レベルでの糖鎖機能の解明」を目的とし、糖鎖の種を超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するものである。

ヒトや他の哺乳類の遺伝子をクエリーとしたデータベース検索により、糖転移酵素遺伝子をはじめとする 254 個のショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子を網羅的に抽出した。155 遺伝子について RNAi 変異体を作成し、全身で RNAi を誘導したところ、約 70% が致死性を示した。さらに、糖転移酵素を中心とした 76 遺伝子に対して組織特異的なノックダウンを行った。各々の遺伝子は、その表現型によりクラスタリングされ、各クラスターは、各糖鎖の生合成経路と形態形成における機能を反映していた。これらの事実より、糖鎖が発生、及び、生命維持において重要な働きをすることが、明らかになった。

より進んだ高い目標の達成のためには、機能する糖鎖のコアタンパク質、作用するレクチン、関与するシグナル伝達カスケードの 3 要素を強く意識した研究の遂行が不可欠である。糖鎖を中心としたこれら 3 要素とのネットワークを、従来の生化学的手法に加えて、ショウジョウバエの特徴を生かした遺伝学的相互作用解析に基づいた手法を駆使し、明らかにしてゆく予定である。ハエを用いた解析から得られた情報に基づいて、哺乳類培養細胞系へ RNAi 法を適用する事により、糖鎖の種を超えて保存されている生理機能の解明と応用への道が、さらに、開けるものと考える。

2. 研究実施内容

本研究は、糖鎖の種を超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、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成と解析、(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) については、昨年度までに、ほぼ終了している。

(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成と解析

(2-1) 糖転移酵素を中心としたショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子 RNAi ノックダウン体を用いた網羅的糖鎖機能解析

(研究目的)

本項目では、糖鎖の複雑性の基礎となる糖転移酵素を取り上げた。糖転移酵素の生体機能を調べる方法として、糖転移酵素遺伝子をノックアウトした変異体を作出することがもとも基本的であるが、そのすべてに対する変異体の作成は一部のモデル生物以外は必ずしも容易ではない。一方、分子進化学的な解析を行ったところ、ショウジョウバエにはヒト類似の糖転移酵素が約 100 種存在し、オルソログと認められるものも多かった。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と考えられた。遺伝学的な研究の進んだショウジョウバエをモデル動物として取り上げ、RNAi 技術を適用することにより、糖転移酵素の網羅的ノックダウン解析が可能となる。形態形成を指標として、網羅的な解析を行う事により、糖鎖機能の概観を把握することを目的とした。

(方法)

糖転移酵素を中心に、76 種のショウジョウバエ RNAi 誘導系統を作成した。これらに対し、発現時期や強さが異なる 12 種の GAL4 ドライバー系統との掛け合わせを行って、組織特異的なノックダウンを行い、表現型の解析をした。また、鍵となる糖転移酵素遺伝子のノックダウン体については、mRNA や糖鎖構造変化の定量も行った。

(結論)

76 種のショウジョウバエ RNAi 誘導系統に対し、*Act5C-GAL4* とのかけあわせによって、全身で RNAi を誘導したところ、その約 70 % が致死性を示し、糖鎖が発生、及び、生命維持において重要な働きをすることが、明らかになった。さらに、11 種の GAL4 ドライバー系統とのかけあわせにより、組織特異的、あるいは、発生段階特異的にノックダウンを行い、表現型の解析を行った。翅や複眼で顕著な形態形成異常が認められ、これにより、クラスタリングされた。各クラスターは、各糖鎖の生合成経路と形態形成における機能を反映していた。また、各糖転移酵素の発現量とそれが合成する糖鎖構造の解析も行ったところ、各 mRNA のみならず、標的糖鎖の特異的なノックダウンが行われていることも、明らかになった。

(今後の予定)

RNAi 誘導系統の作成が成功していない遺伝子については、処理工程に技術的な改良を加えて2回目の試みをおこなっている。また、注目すべき表現型を示した遺伝子については、更に詳しく解析を行っている。

(2-2) RNAi ノックダウン体を用いた糖鎖修飾の機能と機構の解析

糖鎖の機能を詳細に解析するために、特定の糖蛋白質に付加している糖鎖を変化させ、その機能を調べる系を作成した。着目した蛋白質は、ショウジョウバエの眼で発現している接着因子 Chaoptin(Chp)である。その理由は、Chp には多数の糖鎖が付加していること、光受容細胞の形成に必須であることが挙げられる。本年度は、Chp の細胞接着機能を解析するために、細胞に発現させて接着性を測定する系を作成し、さらに Chp の糖鎖付加位置に突然変異を導入した遺伝子を作成した。さらに、個々の糖鎖の機能を解析するために、個々の糖鎖付加位置にも突然変異を導入している。今後は、その変異遺伝子を細胞に発現させ、接着能力における糖鎖の役割の詳細を明らかにする予定である。

(2-3) 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 微量糖鎖構造解析システムにより解析している。その為に不可欠な微量 N-結合型糖鎖解析システムを構築している。2-アミノピリジンを用いた蛍光プレカラム HPLC による微量分析法を詳細に検討したところ、10匹のショウジョウバエに応用することに成功した。現在、このシステムを用いて、N-結合型糖鎖に関連する RNAi ノックダウン体を解析中である。

(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 siRNAi が働くシステムを、レトロ・レンチ両ウィルスベクターを含む各種ベクターにより構築した。その一部を、まず、造血前駆細胞株に導入し、本 siRNA システムが実際に機能するか否か解析した。細胞間相互作用に関する糖鎖遺伝子群を標的とし、標的遺伝子特異的に 75% 以上のノックダウン効果を示す配列を実験に用いた。ノックダウン細胞を用いた表面糖鎖抗原の発現、内在性レクチンとの反応性、細胞接着活性、免疫不全マウスへの移植による *in vivo* 機能解析などを通して、当該遺伝子機能に対して明解な結果を得ることができた。これらにより、構築した本 siRNA システムが哺乳動物細胞でも実際に活用できることを示せた。

また、最も重要な標的糖鎖関連遺伝子と考えている *PAPST1* を、コンディショナルに遺伝子破壊している。全身性ノックアウトを調製したところ、胎生期または周産期致死であることが判明した。なお、最近単離同定した第二の PAPS 輸送体遺伝子である *PAPST2* についても、ノックアウトマウスの作成を開始している。

3. 研究実施体制

「統括グループ」グループ

- ①研究分担グループ長：西原 祥子（創価大学、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、及び、体系的 RNAi 変異体の分子生物学的・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

「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、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 変異体作成とその遺伝学的解析

「発生学的機能解析」 グループ

- ①研究分担グループ長：後藤 聰（三菱生命研、主任研究員）
- ②研究項目：野生型、及び、ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子 RNAi 変異体の糖鎖構造解析

「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、助教授）
- ②研究項目：ショウジョウバエ N-結合型糖鎖の超微量分析法の確立

「糖鎖細胞制御」 グループ

- ①研究分担グループ長：中村 充（産総研、チームリーダー）
- ②研究項目：糖鎖関連遺伝子 RNAi 導入哺乳類細胞の性状解析、およびノックアウトマウスの作成と解析

「糖鎖合成」 グループ

- ①研究分担グループ長：水野 真盛 ((財) 野口研究所、研究員)
- ②研究項目：糖鎖基質及び阻害剤の合成

「糖鎖チップグループ」 グループ

- ①研究分担グループ長：隅田 泰生（鹿児島大学、教授）
- ②研究項目：糖鎖チップ及び糖鎖固定化金ナノ粒子の調製、それらを用いた解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Sasaki, N., Manya, H., Okubo, R., Kobayashi, K., Ishidad, H., Toda, T., Endo, T., Nishihara, S.: β 4GalT-II is a key regulator of glycosylation of the proteins involved in neuronal development.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **333**, 131-137, 2005.
- Hirota, Y., Sawamoto, K., Takahashi, K., Ueda, R., 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.
- Adachi-Yamada, T., Harumoto, T., Sakurai, K., Ueda, R., Saigo, K., O'Connor, M. B., Nakato, H.: Wing-to-leg homeosis by Spineless causes an apoptosis regulated by Fish-lips, a novel Leucine-Rich Repeats transmembrane protein.
Mol. Cell. Biol., **25**, 3140-3150, 2005.
- Kleino, A., Valanne, S., Ulvila, J., Kallio, J., Myllymaki, H., Enwald, H., Stoven, S., Poidevin, M., Ueda, R., Hultmark, D., Lemaitre, B., and Ramet, M.: Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway.
The EMBO J., **24**, 3423-3434, 2005.
- Ishimoto, H., Takahashi, K., Ueda, R., and Tanimura, T.: G-protein gamma subunit 1 is required for sugar reception in *Drosophila*.
The EMBO J., **24**, 3259-3265, 2005.
- Usui-Aoki, K., Matsumoto, K., Koganezawa, M., Kohatsu, S., Isono, K., Matsubayashi, H., Yamamoto, M., Ueda, R., Takahashi, K., Saigo, K., Mikoshiba, K., Yamamoto, D.: Targeted expression of IP3 sponge and IP3dsRNA impaires sugar taste sensation in *Drosophila*.
J. Neurogenet., **19**, 123-141, 2005.
- Yano, H., Yamamoto-Hino, M., Abe, M., Kuwahara, R., Haraguchi, S., Kusaka, I., Awano, W., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Goto, S.: Distinct functional units of the Golgi complex in *Drosophila* cells.
Proc. Nat. Acad. Sci., **102**, 13467-13472, 2005.
- Ha, Y.W., Jeon, B.T., Moon, S.H., Toyoda, H., Toida, T., Linhardt, R.J., Kim, Y.S.: Characterization of heparan sulfate from the unossified antler of *Cervus elaphus*.
Carbohydr. Res., **340**, 411-416, 2005.
- Vongchan, P., Warda, M., Toyoda, H., Toida, T., Marks, R.M., Linhardt, R.J.: Structural characterization of human liver heparan sulfate.
Biochim Biophys Acta, **1721**, 1-8, 2005.
- Kikuchi, J., Shinohara, H., Nonomura, C., Ando, H., Nojiri, H., Nakamura, M.: Not core 2 beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-2 and -3 but -1 regulates sialyl-Lewis-X expression

in human precursor-B cell.

Glycobiology, **15**, 271-280, 2005.

- Kikuchi, J., Ozaki, H., Nonomura, C., Shinohara, H., Iguchi, S., Nojiri, H., Hamada, H., Kiuchi, A., Nakamura, M.: Transfection of antisense core 2 β 1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase-1 cDNA suppresses selectin ligand expression and tissue infiltration of B-cell precursor leukemia cells.
Leukemia, **19**, 1934-1940, 2005.
- Kamiyama, S., Sasaki, N., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., Nishihara, S.: Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter, *PAPST2*.
J Biol Chem, in press.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)