「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

線虫は体が透明で、体を作り上げている 1,000 個たらずの細胞が一個・一個同定でき、全細胞系譜と神経回路網が完全に解明されている世の中で最もよくわかっている多細胞生物である。さらに全ゲノムの配列も世界で初めて解明され、多くの遺伝子が人と共通していることがわかっている他、遺伝子破壊がマウスなどに較べて遙かに高速に可能であり、ハイスループットで遺伝子破壊が出来る唯一の多細胞生物でもある。私達は、このすぐれたモデル生物である線虫 *C. elegans* を使って、糖鎖に関連する遺伝子を系統的、戦略的にノックアウトし、線虫からヒトにわたって共通の糖鎖の機能を明らかにして医療や創薬にむすびつけようと研究をすすめている。

線虫の遺伝子機能を RNAi （RNA 干渉法）や欠失突然変異体の取得によって破壊した結果あらわれる異常を、単一細胞レベルから個体レベルにわたって解析し、タンパク質や mRNA の発現の異常を検出して、糖鎖がかかわる遺伝子ネットワークを解明している。この目的のために線虫の発生を単一細胞レベルで追跡できる四次元顕微鏡や、作製したトランスジェニック線虫を高速で分離・解析できる線虫ソーターを駆使し、さらに質量分析機や二次元電気泳動法を利用した高度のプロテオーム解析などを交えて、糖鎖の機能を解明している。すでにバイオインフォマティクス解析によって、ヒトと線虫には 145 個の共通する糖鎖関連遺伝子が存在することが明らかになった。これらの遺伝子のすべてを RNAi の手法で遺伝子破壊して調べてみると、約 30%程度の遺伝子で何らかの異常がおこることが分かっている。これらの遺伝子の中には、ヒトの遺伝病の原因遺伝子がいくつも含まれており、モデル生物の利点を最大限活かした解析によって、遺伝病にまつわる遺伝子ネットワークが解明されるものと期待して研究を進めている。糖鎖にまつわる遺伝子の中には、他にヘルペスウイルスの感染や神経再生、あるいは筋ジストロフィーや筋萎縮性側索硬化症の発症と関わると考えら得る遺伝子も含まれており、線虫で得られた成果を発見的に利用して、ハエやヒト細胞などでの糖鎖機能の解析も順次すすめているところである。次々と遺伝子を破壊して、その表現型を調査し、分類し、同じ表

現型を示す遺伝子群をクラスター解析することによって、糖鎖の基本的機能とそのヒトにおける病因解析にも大きく役立つことを確信して研究を進めている。

２．研究実施内容

野村グループでは、線虫の糖鎖関連遺伝子でヒトの遺伝子のオーソログと考えられる遺伝子 145 個すべてについて RNAi を行い、その表現型を詳細に検討した。約 30%の遺伝子について何らかの表現型が確認でき、さらに 2 種類、3 種類の RNAi を同時に行う手法によってさらに多くの遺伝子での表現型を確認しているところである。さらに安藤グループと共同で、これら遺伝子の欠失突然変異株を順次、取得し、致死のものをバランサーを導入して安定した株として解析をすすめている。例えば糖鎖の硫酸化を含むあらゆる硫酸化に関わる遺伝子である PAPS synthase をノックアウトしたところ、糖鎖の硫酸化の異常と類似した表現型などを確認し、胚発生や上皮細胞の融合の異常などが引きおこされることも分かった。また、こうした異常をおこしている線虫と正常線虫のタンパク質発現パターンの比較を行うため、糖鎖付加しているタンパク質を二次元電気泳動ゲル上で検出する方法を改良し、二次元電気泳動で展開されるほとのんどの主要スポットを、川崎グループとの共同実験で LC/MS/MS 法で同定した。また二次元 in gel differential electrophoresis 法（2D-DIGE)法でノックアウト株と正常株を比較し、変動しているタンパク質の同定もすすめており、変動しているタンパク質の RNAi がもとの遺伝子の破壊と同様の異常を引きおこす例も確認されるなど、線虫のプロテオーム解析による糖鎖遺伝子ネットワークの同定法の有効性が示されつつある。今後の研究の展開が楽しみである。また細胞分裂に関わるコンドロイチンコアタンパク質の候補の RNAi の結果、複数の細胞分裂に関わる遺伝子を同定しており、最終的確認作業をすすめている。

川崎グループは、LC/MS^n を利用したヒトを含む多細胞生物の糖タンパク質の糖鎖構造解析技術の開発・改良も行った。まず、糖ペプチドの MS^2 で糖鎖部分の開裂、MS^3 以降でペプチド部分の開裂が生じることを利用して、トリプシン消化物の LC/MS^n によって得られた大量のマススペクトルデータの中から糖ペプチドのマススペクトルのみを選択的に選び出し、一次構造及び糖鎖構造を推定する方法を見出した。この方法を利用することによって、混合物中の各糖タンパク質の部位特異的糖鎖構造解析が可能となった。また、糖鎖構造に特徴的なプロダクトイオンを診断イオンとして、任意の糖鎖抗原を持つ糖ペプチドを選択的に検出し、糖鎖抗原キャリアタンパク質を同定する方法を検討し、マウス腎臓抽出物の中から､モデル糖鎖抗原として用いたルイス x 抗原キャリアタンパク質を同定することに成功した。現在、この技術を用いて、疾患関連糖鎖抗原キャリアタンパク質の同定を行っている。さらに、ポジティブ及びネガティブイオンモードによる精密質量分析及び MS^n を利用することによって、独自に開発した LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングを改良し、より多様な糖鎖を網羅的に解析することが可能になった。この方

法を応用することによって、電気泳動ゲル内糖タンパク質の N 結合型糖鎖の解析などが可能になった。以上の成果はヒトを含む哺乳類から線虫まで広範囲の糖タンパク質の解析に応用できるもので、今後、線虫の糖鎖解析にも大きく寄与する成果である。

安藤グループは、野村グループと共同で、線虫の糖鎖機能の解析を行い、特に硫酸化関連遺伝子の解析に大きく寄与した。さらに糖鎖関連遺伝子のノックアウト株を次々と分離しバランサー導入をすすめており、欠失突然変異株と RNAi を併用して、新たな糖鎖の機能を見いだしており、糖鎖遺伝子の解明を本格的にすすめつつある。

瀬古チームは、野村グループとの線虫糖鎖の硫酸化の解析に大きく寄与した他、線虫ガレクチン（lec ファミリー）の機能解析を行っている。すでにヒトガレクチン-4 が 3'-スルホコア１鎖を特異的に認識することを明らかにした。線虫ガレクチンである lec ファミリーのうち、硫酸化糖鎖に結合するものを探索した結果、少なくとも２種類の lec タンパク質が該当することを見いだした。すでに全 lec 遺伝子についての解析をすすめている。さらに硫酸転移酵素阻害剤としてのポリ酸の機能を見いだし、硫酸転移酵素阻害に基づく医薬品となり得る可能性を明らかにした。さらに癌との関連では抗癌剤耐性卵巣癌に異所性発現する GlcNAc6ST-2 硫酸転移酵素の一種 GlcNAc6ST-2 が、予後の悪い組織型の卵巣癌に異所的に発現することを見いだした。本酵素が悪性卵巣癌の診断薬の標的となり得る可能性が考えられる。また、β1,3-GlcNAc 転移酵素-2 (β3Gn-T2)及びβ3Gn-T8 による複合体の形成をあきらかにした。β1,3-GlcNAc 転移酵素-2 (β3Gn-T2)及びβ3Gn-T8 が 1:1 で複合体を形成し、酵素活性の増大を誘引していることが示唆された。この複合体は癌性糖鎖の生合成に関与する可能性が考えられる。さらにヒト、マウス，及びブタ Gal3ST-2 の基質特異性の解析を行い、同一起源と考えられるヒト、マウス，及びブタ Gal3ST-2 は異なる基質特異性を有することが分かった。動物種によって硫酸化糖鎖の機能が異なることが推測された。

以前より、ヘパラン硫酸鎖がヘルペスウイルスの初期感染に関与していることが報告されていた。しかしながら最近、ヘパラン硫酸鎖を欠損した細胞にもヘルペスウイルスが感染する例が報告された。そこで、北川グループは L 細胞の変異株でヘパラン硫酸鎖を欠損しているが、ヘルペスウイルスに対して感染性を示す gro2C 細胞を用い、どのような物質が細胞表面のウイルス受容体になっているのかを調べた。その結果、コンドロイチン硫酸鎖が受容体として機能し、特にコンドロイチン硫酸-E と呼ばれる高硫酸化したタイプのコンドロイチン硫酸が、ウイルスとの結合に重要であることを明らかにした。興味深いことに、ヘパラン硫酸鎖の存在する細胞へのヘルペスウイルスの感染でも、コンドロイチン硫酸-E はヘパラン硫酸よりも低濃度でウイルス感染を阻害できることが判明した。また線虫とならんで研究が進んでいるショウジョウバエを用いた研究も進めている。*D. melanogaster* では、ヘパラ

ン硫酸の生合成に関与する糖転移酵素として、*ttv*、*sotv*、*botv* の３つがクローニングされ、これらの変異体では、ヘパラン硫酸が劇的に減少し、morphogen のシグナル伝達や分布が異常となる。今までに、北川らは、BOTV が GlcNAc を転移する活性をもつことを明らかにしていた。しかし、TTV、SOTV は、*in vitro* において糖転移活性が検出されておらず、*Drosophila* のヘパラン硫酸鎖の生合成機構は解明されていなかった。そこで本年度は、*Drosophila* のヘパラン硫酸の生合成機構を明らかにしようと試みた。TTV、SOTV および BOTV を分泌型タンパク質として、単独あるいは共発現させ、単糖転移活性および重合化活性を測定したところ、TTV と SOTV を共発現させた複合体が、ヘパラン硫酸鎖の重合化活性を保持することを明らかにした。さらに、*Drosophila* ではヒトとは異なり、BOTV による結合領域への最初の GlcNAc の転移が、ヘパラン硫酸の伸長に必須であることを明らかにした。

金井グループは、線虫の糖鎖関連トランスポーターの機能解析をすすめている。
糖鎖がタンパク質や脂質に結合した複合糖質の糖鎖部分は、硫酸化、リン酸化、アセチル化など様々な修飾が行われ複雑な構造をとり、タンパク質が様々な生理機能を発揮するために重要な構造物である。このアセチル化および硫酸化に必要な基質であるアセチル CoA や PAPS（3’-phosphoadenosine 5’-phosphosulfate）の細胞への供給は、各々アセチル CoA トランスポーターおよび PAPS トランスポーターにより媒介されると考えられる。これらトランスポーターにより糖鎖修飾の調節が行われている可能性が予想されることから、その機能の理解は糖鎖の生物機能の解明に繋がると期待される。野村グループでは線虫を用いたこれらトランスポーターの遺伝子破壊による解析を行っており、金井グループはトランスポーターの輸送機能の解析を分担している。現在、アフリカツメガエル卵母細胞にこれら遺伝子の cRNA を注入し発現させた機能解析系を確立する作業を行っている。さらに金井グループは線虫におけるアミノ酸トランスポーターオルソログの解析もすすめている。
Cationic amino acid transporters (CATs)は，哺乳類の SLC (solute carrier) 7 ファミリーに属する塩基性アミノ酸トランスポーターであるが、その生理的役割は未だ明らかでなく、哺乳類のように複雑な機構を持つ生物を対象とした研究ではその解析は容易でないと考えられる。そこで、非常に単純な構造を持ち，ゲノム情報・細胞系譜などが詳細に調べられている線虫（*C.elegans*）の CATs オルソログの解析を行い、CATs の生理機能にアプローチする。現在、線虫にある３つの CATs オルソログのうち１つについて、deletion mutant の解析を含め、生理機能との関連を検討中である。

以上のように、線虫の研究と、ヒトを含む高等生物の研究を平行してすすめながら、糖鎖の隠された機能を明らかにして、人類の疾病や福祉に貢献することを目標に研究を進めている。

３．研究実施体制

「野村一也」グループ

①研究分担グループ長：野村　一也（九州大学、助教授）

②研究項目：線虫糖鎖遺伝子機能の戦略的破壊と破壊結果の解析

「安藤恵子」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、助手）

②研究項目：線虫糖鎖関連遺伝子の欠失突然変異体の取得とバランサー導入。
線虫糖鎖関連遺伝子の機能解析、発現解析

「川崎ナナ」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、室長）

②研究項目：線虫タンパク質の質量分析による同定。
糖鎖構造の解析。

「瀬古玲」グループ

①研究分担グループ長：瀬古　玲（佐々木研究所、主任研究員）

②研究項目：線虫ガレクチン lec ファミリーの機能解析
線虫糖鎖生合成酵素の機能解析

「北川裕之」グループ

①研究分担グループ長：北川　裕之（神戸薬科大学、教授）

②研究項目：プロテオグリカンの生化学的解析と機能解析

「金井好克」グループ

①研究分担グループ長：金井　好克（杏林大学、教授）

②研究項目：線虫の糖鎖関連トランスポーターの機能解析。
線虫におけるアミノ酸トランスポーターオルソログの解析。

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

○ Katsufumi Dejima, Akira Seko, Katsuko Yamashita, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani,Tomomi Izumikawa, Hiroshi Kitagawa, Kazuyuki Sugahara, Souhei Mizuguchi, and Kazuya Nomura
Essential roles of 3'-phosphoadenosine 5'-phoshosulfate (PAPS) synthase in embryonic and larval development of the nematode *Caenorhabditis elegans*

J. Biol. Chem., Vol. 281(16), 11431-11440, 2006

○ Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Yukari MATSUISHI, Takao HAYAKAWA and Toru KAWANISHI: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, 19, 3315-21.

○ Satuki ITOH, Nana KAWASAKI, Akira HARAZONO, Noritaka HASHII, Yukari MATSUISHI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/ multiple tandem mass spectrometry. Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1094, 105-117

○ Satuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira HARAZONO, Yukari MATSUISHI, Takao HAYAKAWA, Toru KAWANISHI: N-linked oligosaccharide analysis of rat brain Thy-1 by liquid chromatography with graphitized carbon column/ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes , *J. Chromatogr. A*, 2006, 1103, 296-306

○ Seko, A., and Yamashita, K.Identification and characterization of a novel galactose:β1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (β3Gn-T8). *Glycobiology* 15, 943-951, 2005.

○ Seko, A., Sumiya, J., and Yamashita, K Porcine, mouse, and human Gal 3-O-sulfotransferase-2 enzymes have different substrate specificities; the porcine enzyme requires basic compounds for its catalytic activity.
Biochemical Journal 391, 77-85, 2005.

○ Fukushima, K., Ikehara, Y., and Yamashita, K. Functional role played by the GPI-anchor glycan of CD48 in IL-18-induced IFN-gamma production. *J. Biol. Chem.*, 280,18056-18062, 2005.

○ Ideo, H., Seko, A., and Yamashita, K. Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and CEA in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 280, 4730-4737, 2005.

○ Bergefall, K., Trybala, E., Johansson, M., Uyama, T., Naito, S., Yamada, S., Kitagawa, H., Sugahara, K., and Bergstrom, T. (2005) Chondroitin sulfate characterized by the E-disaccharide unit is a potent inhibitor of herpes simplex virus infectivity and provides the virus binding sites on gro2C cells. *J. Biol. Chem.,* 280 (37), 32193-32199

○ Izumikawa, T., Egusa, N., Taniguchi, F., Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2006) Heparan sulfate polymerization in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.,* 281 (4), 1929-1934

（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）