戦略的創造研究推進事業

－ＣＲＥＳＴタイプ－

研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

研究領域中間評価用資料

平成１９年２月１日

１．戦略目標

「がんやウイルス感染症に対して有効な革新的医薬品開発の実現のための糖鎖機能の解明と利用技術の確立」

２０１０年までに、免疫反応、がん転移などに関与する「糖鎖」及び糖鎖関連生体情報分子の探索及びその機能解析による情報伝達のメカニズムを解明し、副作用のないがん治療薬（がん細胞だけを特異的に攻撃する治療等)、各種ウイルス・細菌感染症等の治療･予防薬（ウイルス・細菌の標的となる糖鎖を改変するなどによって感染を防止)、糖鎖の制御による遺伝子治療、免疫機能調整等の効率化などを実現することを目指して、以下を達成目標とする。

・細胞内及び細胞間ネットワークの情報伝達系可視化、超微量解析技術の開発
・機能分子及び情報伝達分子の特定と機能修飾の解析
・生体膜構造と情報伝達の関連解析
・脳神経等における機能分子、形態形成・分化関連分子の機能修飾及び輸送・動態の解析

２．研究領域

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」（平成１４年度発足）

本研究領域は、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンといった生体分子群の有する糖鎖の新たな生物機能を解明し、その利用技術を探索するための研究を対象とする。

具体的には、脳神経機能、形態形成、分化における糖鎖の役割と制御のメカニズム等の新しい機能の解明や応用の可能性を開拓する研究、糖鎖の改変によるガンの浸潤転移の制御や感染防止、免疫機能制御の手法探索等の診断、治療、予防への応用を指向する研究、あるいは、糖鎖研究に広く用いられることが期待される糖鎖の超微量解析技術、情報伝達のダイナミックな状況を可視化する技術の実現を目指す研究等が含まれる。

３．研究総括

谷口　直之　　（大阪大学微生物病研究所　寄付研究部門　教授）

４．採択課題・研究費

（百万円）

採択年度	研究代表者	中間評価時 所属・役職	研究課題	研究費*
平成 １４年度	伊藤幸成	理化学研究所　主任研究員	糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明	408
	神奈木玲児	愛知県がんｾﾝﾀｰ研究所部長	癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明	480
	木曽　真	岐阜大学　教授	感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究	263
	小山信人	ﾀｶﾗﾊﾞｲｵ（株）　部長	糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発	483
	鈴木康夫	中部大学　教授	ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用	463
	西原祥子	創価大学　教授	RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発	429
平成 １５年度	伊藤孝司	徳島大学　教授	糖鎖機能を利用した組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発	250
	井ノ口仁一	東北薬科大学　教授	マイクロドメイン機能異常にもとづく2型糖尿病の病態解明	259
	中田　博	京都産業大学　教授	担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化の解析と応用	254
	野村一也	九州大学　助教授	遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明	434
	宮城妙子	宮城県立癌ｾﾝﾀｰ　所長	がんや糖尿病等におけるシアリダーゼ異常の機構解明と制御	370
	山口陽子	東海大学　教授	糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築	247
平成 １６年度	木下タロウ	大阪大学　教授	糖鎖の動態―機能相関への統合的アプローチ	608
	鍔田武志	東京医科歯科大学　教授	糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用	222
	平林義雄	理化学研究所　ﾕﾆｯﾄﾘｰﾀﾞｰ	糖修飾システムによる神経機能の発現・制御	211
	本家孝一	高知大学　教授	病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明	239
			総研究費	5,620

＊　研究費：平成１８年度上期までの実績額に平成１８年度下期以降の計画額を加算した金額

５．研究総括のねらい

・ヒトゲノムの解析がほぼ終了し、ゲノム情報を活用したポストゲノム研究として、タンパク質の構造・機能解析や、遺伝子多型研究などの国家的なプロジェクトが進行しつつあるが、それとともに遺伝子やタンパク質のみでは表現できない多様な生物シグナル伝達物質として、「糖鎖」をはじめとする生体情報分子の意義が強く認識され、その機能発現のメカニズムを解明する重要性が高まってきている。

・また、各種疾患は、生体情報分子の介在により、何らかの異常が細胞内に取り込まれることによって生じ、そのメカニズムの解明が、病気の予防・治療に貢献するなど、幅広い応用が期待される。

・このため、今後は糖鎖の基礎的研究における我が国の強みを一層発展させ、新規医薬品等の開発につながる糖鎖の機能解析を推進するとともに、革新的な解析技術を開発することが重要である。

６．選考方針

ヒトのゲノム構造がほぼ明らかになり、いわゆるポストゲノム研究が２１世紀のライフサイエンスの中心的課題のひとつである。そのなかでも糖鎖による修飾反応はタンパク質の５０％以上にみられ、タンパク質の機能や構造に大きな影響をあたえることがわかってきた。また、糖鎖はタンパク質や脂質に結合して細胞間の認識や相互作用を変えるため、癌、慢性疾患、先天性筋ジストロフィーなどの糖鎖異常、感染症、免疫、脳、発生、再生などの異常、老化などに強くかかわっている。本領域では、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンなどの分子群の中で、特定の糖鎖の生体内標的分子を同定するとともに、糖鎖による標的分子の機能変化を解析し、糖鎖の新たな機能の発見を目指す。そのためには糖鎖超微量分析技術や情報伝達のダイナミックな変化を可視化する技術の開発も重要であり、これらの技術開発の基礎的研究とともに、がんその他の生活習慣病、ウィルスや細菌による感染症などの医薬品開発につながる基礎的研究などが本研究領域の対象となる。糖鎖生物学の他の領域との融合的な研究も選考対象とした。とくに欧米追従型の研究ではなく、国際的にリードする独創的な研究の提案を選考した。

また、選考にあたっては利害関係にある選考委員は選考に参加せず、公正な選考に努めた。

７．領域アドバイザーについて

領域ｱﾄﾞﾊﾞｲｻﾞｰ名	所属	役職	任期
川嵜　敏祐	立命館大学 糖鎖工学研究センター	センター長	平成１４年８月～平成２２年３月
近藤　規元	小野薬品工業(株) 研究渉外室	理事・ 室長	平成１４年８月～平成２２年３月
鈴木　明身	(独)理化学研究所 フロンティア研究システム	グループディレクター	平成１４年８月～平成２２年３月
塚田　裕	(株)エスアールエル　八王子第一第二ラボ	理事	平成１４年８月～平成２２年３月
成松　久	(独)産業総合研究所　糖鎖医工学研究センター	センター長	平成１４年８月～平成２２年３月
若槻　壮市	高エネルギー加速器研究機構　物質構造科学研究所	教授 (第二研究系主幹)	平成１４年９月～平成２２年３月

本来ならＣＲＥＳＴの研究者として推薦したい研究者であるが、現在ほかの競争的資金や、文部科学省の特定領域のメンバーであるため採用できず、かつ、国際的に糖鎖科学で活躍し、広い視野を持ち、研究指導をお願いできる我が国の代表的な研究者に依頼した。またプロジェクトの成果を将来的に社会に還元するためには、研究経験が豊富で、かつ企業にいるかたがたの助言が必要であることから、そのような方々にもお願いした。

８．　研究領域の運営について

１）研究総括の方針や研究領域のマネージメントについて

採択に当たっては、研究が、国際性、独創性、創造性に富んだものであることと、研究計画が具体的で、将来、応用への基盤的な技術開発へ貢献できるものを選出した。必ずしもこれまでの実績だけにはこだわらず、新たな挑戦をする可能性のあるものも選出した。また糖鎖生物学のみならず糖鎖化学の研究者も積極的に採用し、糖鎖科学の専門以外の境界領域の研究者からも選出した。

研究代表者の研究現場への訪問を行い、研究現場の実体把握と問題点を協議し助言した。

研究成果の把握については、領域全体の報告会、チーム毎の報告会および公開シンポジウム等の機会をとらえて研究成果を聴いた。また毎年作成される研究実施報告書により進捗状況の把握に努めたが、平成16年度の研究実施報告書についてはアドバイザーにも配布して、ご意見を伺った。

また研究チーム内の定期的な討論や特許の出願を推奨した。

シンポジウムについては、日本糖鎖科学コンソーシアムを本領域が中心に２度主催し、領域の研究代表者が、他省庁の競争的資金の研究者と共に、研究成果を発表することにより交流を積極的に行った。

さらに、国際性を重視し平成16年11月にはハワイでの日米合同コンソーシアム会議の開催を本領域が中心に行い、国際的な研究会にも積極的に参加するよう呼びかけた。また、本研究総括が主催した平成１７年８月にフロレンスで行われた日独糖鎖会議、また平成１８年９月にＮＩＨでおこなわれたバイオマーカーとバイオインフォマティクスを中心に行われた会議、Frontiers in Glycomicsのいずれにも本領域の研究者が１０名以上参加し、中心的な役割を果たした。

また領域内での非公開の研究報告会も平成19年に行い、未発表のホットな話題を提供しあい、研究チーム間の研究交流を促進させた。

２）研究テーマの導き方について

研究報告会や研究実施報告書を参考に領域アドバイザーのご意見を取り入れ、研究上の問題点、その解決方法などを指導した。また、研究テーマが拡大し過ぎたときには軌道修正や、国際的に競合していたが残念ながら先行されてしまったテーマについては具体的なテーマの方向転換や修正などを指示した。

３）評価と今後の研究についての助言

研究報告会や研究実施報告書を基に各研究課題の研究推進を把握し、これを加味して研究費の配分を行ってきた。

飛躍的な発展が期待できる、特に若手の研究者への援助を積極的に行った。また研究計画の修正、方向性などの助言を行い、研究の健全な発展を図ってきた。

９．研究の経過と所見

これまでの研究成果を、採択年度別に研究チーム毎に記載する。

「平成１４年度採択チーム」

糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明（伊藤幸成チーム）

（背景）糖タンパク質の品質管理機構は、小胞体、ゴルジ体から細胞質でのフォールディング、輸送、分解の過程を包括するものである。これらの過程において糖鎖（特に高マンノース型糖鎖）が重要な役割を果たしていることが示唆されている。研究代表者のグループでは種々の糖タンパク質糖鎖の合成とそれに必要な方法論の開発を行って来た。その結

果、種々のアスパラギン結合型糖鎖の系統的合成への道を開くことができた。そこで、本研究室の糖鎖合成化学のポテンシャルを最大限に活用すれば、糖タンパク質品質管理における様々な糖鎖-タンパク質相互作用の詳細解析につなげることができると考えられる。タンパク質品質管理における従来の研究は構造の不明確な糖タンパク質を用いて行なわれてきたものが殆どであることから、詳細については大部分が不明であり様々な見解の不一致も見られる。それに対し合成糖鎖、糖タンパク質を自在に造り出す手法を推進力とする本研究の実施により糖タンパク質品質管理の分子機構について明確な理解が得られると期待される。

（成果）本研究の基盤となる高マンノース型糖鎖の系統的合成を達成し、これらを用いてタンパク質と合成糖鎖の結合についてより系統的かつ定量的な測定を行った。その結果、以下の成果を得た。

1）糖タンパク質の折りたたみを助けるレクチン-シャペロン Calreticulinの糖鎖特異性を解明した。

2）次に、小胞体内でフールディングセンサーとして機能しているグルコース転移酵素（UGGT）の合成基質を開発した。これを用いることにより、UGGTによってCalreticulin/Calnexinリガンドとなるモノグルコシル化糖鎖が再生されることを化学的に証明した。更にUGGTの特異性の定量的解析に初めて成功した、

3）小胞体内品質管理機構における鍵酵素の一つ、Glucosidase-II（G-II）の解析を、糖鎖レベル及び人工糖タンパク質レベルで行い、その特異性について従来の概念を覆す結果を得た。

4）細胞質における分解過程に係わるPNGaseおよびFbs1の解析を行った、前者については、活性部位の同定と特異的阻害剤の開発に成功した。後者に関しては、Fbs1が主として糖鎖のコア部分を認識することを見出した。

5）細胞内輸送に係わるカーゴレセプター（ERGIC-53）の糖鎖認識機構と特異性を解明した。

（今後）本研究により、糖タンパク質品質管理機構の重要な部分についてその分子的基盤が明らかになった。これらの結果は、タンパク質のミスフォールディングに由来する疾病の理解や臨床応用への可能性を示したものである。また、微生物を用いた異種糖タンパク質の高発現などのバイオテクノロジー分野への応用を見据えた研究の今後の進展が大いに期待できる。

癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明（神奈木チーム）

（背景）糖鎖の機能には細胞識別機能とシグナル分子機能がある。セレクチンと糖鎖リガンドを介したがん細胞の接着においては糖鎖の細胞識別・接着機能が良く発揮されており、がん細胞の CD44-ヒアルロン酸シグナル伝達系においては糖鎖のシグナル分子としての機能が良く発揮されている。神奈木チームはこの両者のがんの病因・病態および進展機構

との関わりを解明することを目指している。。

（成果）がん細胞ではセレクチンの特異的リガンドであるシアリルルイスｘ糖鎖とシアリルルイスａ糖鎖が強く発現する。その発現誘導機構を研究し、がんの発生母地である正常上皮細胞には共通の経路で合成されながら両糖鎖より複雑な構造をもつ糖鎖が発現し、発がん早期にその合成遺伝子の一部の転写抑制によってがん細胞にシアリルルイスｘ/ａ糖鎖が発現するに至ることを解明した。その背後にはこれらの遺伝子に対するDNAメチル化やヒストン脱アセチル化などによるエピジェネティックな転写抑制機構がある。局所進行癌の時期には転写因子HIFによって一連の糖鎖関連遺伝子の発現が誘導され、これによりシアリルルイスｘ/ａ糖鎖の発現がさらに亢進することを明らかにした。その背景には、機能性糖鎖の合成遺伝子に対する活発な転写調節機構が存在する。またシアル酸の環状化を伴う構造変化はセレクチンと糖鎖リガンドの結合を調節する大きな要因であるが、マススペクトロメトリーを用いた環状化シアル酸の化学的検出に成功した。CD44-ヒアルロン酸シグナル伝達系については、v-srcなどのがん遺伝子がヒアルロン酸の合成を誘導しD44-ヒアルロン酸シグナル伝達を促進する機構をあきらかにし、ノックアウトマウスやsiRNAを用いた実験から、がん細胞の産生するヒアルロン酸マトリックスが腫瘍血管形成を促進する機序を解明した。また、SHAPを介したヒアルロン酸の複合体形成が、CD44-ヒアルロン酸相互作用を著明に促進することを見いだした。

（今後）これらの成果は、がんにおける機能性糖鎖の発現誘導機構を糖鎖遺伝子の転写レベルから明らかにし、その機能と生理的意義を分子生物学的に解明したものである。今後さらに研究の進展が期待されるとともに、研究の過程で得られた阻害剤やsiRNA，特異抗体などを利用した難治性がんの診断・治療への応用の可能性を示したものである。

感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究（木曽チーム）

（背景）ウィルスや病原性細菌の感染及び細菌毒素の侵入は、多くの場合、宿主細胞が持つ糖鎖への付着により開始される。また有用な腸内細菌が体内に止まるための足場も糖鎖複合体である。一方、宿主側であるヒトや動物の体内では、免疫系を介して様々な生体反応が誘発される。木曽チームは、ムチン型を含むO-結合型糖鎖を中心に糖鎖の構造と機能解析を行い、その情報に基づいて、化学合成法と酵素合成法を駆使することにより、天然型や非天然型の様々な生理活性糖鎖複合体の創製を行い、感染と共生を制御する糖鎖医薬品の開発を目指している。

（成果）これまでに、（１）「糖鎖構造解析の革新的基盤技術の開発と応用」（長束グループ）、（２）「ボツリヌス毒素と小腸ムチン糖鎖の相互作用の解析と応用」（西河グループ）、（３）「酵素法による機能性糖鎖複合体の合成及び腸内細菌と糖鎖の相互作用解析」（山本グループ）及び（４）「革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製」（木曽グループ）の４つの研究実施項目によりグループ研究を実施し、以下に述べる成果を得た。

（１）ヒドラジン分解法と蛍光標識法、HPLCによる糖鎖マップ法を組み合わせ、反応条件

等を検討することにより、ムチン型を含むO-結合型糖鎖を構造解析するための手法の開発に成功した。さらに本手法を培養細胞に応用し、発現しているO-結合型糖鎖を網羅的に解析できることを確認した。この手法開発の成功により様々な生体サンプル中のO-結合型糖鎖を網羅的に構造解析することが可能となった。

（2）ボツリヌス毒素複合体は複合体を形成するレクチンの作用により、小腸などの細胞表面に存在するムチンのシアリル化糖鎖に強く結合し、主としてクラスリンの関与するエンドサイトーシス機構で細胞内に吸収・移行され、さらに細胞内に移行した複合体の神経毒素部分はゴルジ装置にまで到達していることが判明した。次に、毒素複合体の２種類のレクチンHA1、HA3のそれぞれの糖鎖認識特異性を調べたところ、HA3はシアル酸を強く認識するが、HA1はシアル酸と中性糖のガラクトース、N-アセチルガラクトサミンを認識することが判明した。さらに、HA1のX線結晶構造解析より、HA1上の糖結合部位や結合に関与するアミノ酸残基と糖との相互作用などを推定するに至った。

（3）糸状菌Mucor hiemalisが生産するEndo-β-N-acetylglucosaiminidase（Endo-M）の糖転移活性を利用して、ヒトインフルエンザウィルス感染阻害剤を化学-酵素合成した。合成したシアロ糖鎖重合体のウィルス感染阻害能について、Ａ型ウィルスA/New Caledonia/20/99(H1N1) および A/Panama/2007/99(H3N2) を用いて競合阻害活性を調べた結果、コントロールのフェツインに比べて300倍以上高い阻害活性が示された。また、Ａ型ウィルスのMDCK細胞への感染阻害能につい調べた結果、フェツインに比べて高い残存力価を示し、A/Hyogo/73/2002（H1N1）による感染に対しては100倍以上の力価を示した。多くのビフィズス菌が腸管ムチンに存在するムチン型糖鎖を遊離するEndo-α-N-acetylgalactosaminidaseを有していることを見出し、その遺伝子をクローニングするとともに、組換え酵素の諸性質を調べ、ビフィズス菌の腸管との接着に本酵素が関与していることを示唆した。さらに、本酵素の糖転移活性を活用した生理活性糖鎖複合体を酵素合成し、プレバイオティクスとして利用できる可能性を示唆した。また、腸内の有害菌であるClostridium perfringensのEndo-α-N-acetylgalactosaminidaseの遺伝子をクローニングするとともに、本酵素が従来の酵素と全く異なる基質特異性を有することを明らかにした。

（4）DTBS効果を利用した「革新的α−選択的グリコシル化反応方法」を発見・開発することができた。本法は、ガラクトサミン及びガラクトースのC-2位に隣接基関与（NHTroc, NPhth, NHBz, NHAc, OBz等）が存在してもα-グリコシドを優先的に与える画期的グリコシル化反応方法であり、その汎用性と実用性が確認された。収率の幅は、水酸基の保護基、グリコシル受容体の種類、反応溶媒、反応温度、グリコシル供与体における脱離基の種類により変化するが、NHTroc体で83ー97％、NPhth体でも90ー94％でα-グリコシドを優先的に与えた。GalNHTroc体をグリコシル供与体、Ser/Thr誘導体をグリコシル受容体とした場合、93ー97％の高収率でα-グリコシドが得られ、Galβ1→3GalNHTroc、NeuAcα2→3Galβ1→3GalNHTroc体でも85ー90％の高収率で反応が進行した。また、山本らにより発見された

Endo-α-GalNAc-aseの高感度蛍光標識糖鎖4-methylumbelliferyl T-antigen（4-MU-T-antigen）の新規合成法の開発に成功した。即ち、DTBS基で保護したGalβ1→3GalNHTrocをTHF中、4-methylumelliferone、トリフェニルホスフィン、DEADとreflux条件で反応させると、一段階80%の高収率で対応するα-グリコシド（4-MU-T-antigen）が生成した。更に、本法をα-ガラクトシルセラミド（α-GalCer）やイソグロボトリオシルセラミド（iGb3）などの生理活性糖脂質の合成に応用したところ、高収率にて目的物を得ることができた。

（今後）以上の研究成果はムチン型を含むO-結合型糖鎖の網羅的解析を可能にし、病態糖鎖マーカーの検索と臨床応用の可能性を期待させるものである。特に、ウィルスや病原性細菌及びその毒素の感染を阻止する糖鎖複合体の開発によって、臨床応用を見据えた研究の進展が期待される。また、受容体タンパク質やグリコシダーゼの糖鎖認識特異性と活性を利用した糖鎖医薬品の実用化が期待される。

糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発（小山チーム）

（背景）N-結合型糖鎖は糖タンパク質や細胞の機能と密接に関わっており、一方では、その構造が疾病により変化することが知られている。

小山チームはN-acetylglucosaminyltransferase（GnT-Ⅲ）により形成されるbisecting GlcNAc構造及びfucosyltransferase 8（FUT8）により形成されるcore Fuc構造に注目し、これらの構造と分化、増殖、分泌などの細胞機能との関係を解明し、疾患の治療や診断に役立てることを目標としている。

（成果）ラット肝幹細胞様のRLE細胞においてbisecting GlcNAcが高度に発現していることを見出した。本糖鎖構造に特異的なレクチンであるE4-PHAを用いてラット肝臓から細胞株を樹立し、これを劇症肝炎モデルラットに移植することにより治療効果が得られることを示した。また、GnT-Ⅲ遺伝子のプロモーターを解析し、新規プロモーターを発見した。

FUT8ノックアウトマウスの発育が不良であるのと同様に、一部のがん細胞株のFUT8遺伝子をノックダウンすると増殖能が低下することを見出した。この機構を解析した結果、EGF受容体糖鎖のcore Fucが減少することによってEGFシグナルが低下し、トリプシン遺伝子の発現が抑制されること、及び、それによりproteinase-activated receptor 2（PAR-2）のシグナルが減弱して細胞増殖が抑制されることを明らかにした。一方、膵がんは早期発見が困難な今日の最大の難治性がんであり、従来の膵がんの腫瘍マーカーCA19-9では早期発見は不可能である。本研究ではグライコミクスの手法によって新しい膵がんのマーカーを探索した結果、膵がん患者の血清中で高度にフコシル化される糖タンパク質として、ハプトグロビンを同定した。その出現率は、他のがんに較べて膵癌で有意に高かった。また、本来肝臓で産生されるハプトグロビンのフコシル化が、膵臓がん患者において増加するメカニズムを解析した。

（今後）以上の成果は、糖鎖構造に基づいた肝疾患やがんの治療及び診断の可能性を示唆す

る。今後は、これらの臨床応用を指向した研究を期待する。

ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用（鈴木康夫チーム）

（背景）現在、極めて変異しやすいウイルスの振興・再興、地球温暖化による熱帯ウイルス感染症のグローバル化、高齢化社会における感染症の拡大が進みつつある。ウイルス感染症の克服、感染症に対する創薬は、２１世紀における重要な研究課題である。一方、ポストゲノム時代の進行と共に糖鎖付加によるタンパク質の翻訳や、糖脂質、プロテオグリカンなど機能糖鎖研究の重要性が増している。ウイルス感染における糖鎖の役割の研究は、細胞生命体に起こる複雑な全ての出来事をウイルスの細胞への吸着・侵入、増殖、発芽という極めて単純化、且つ制御された形で推進できる利点がある。糖鎖機能のより深い理解とウイルス感染症の克服はこの意味で深くリンクしており、学術的のみならず社会的・経済的にも重要であり、２１世紀に最も期待される領域の一つとなることが確信される。

（成果）これまで、対象としてきたウイルスは、学術的、社会的に重要であり、有効な治療法が早急に解決されるべきものに焦点を当てた。すなわち、極めて変異を起こしやすく地球規模の感染者を出しているウイルス（インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、HIV）、熱帯熱性ウイルス（デングウイルス）、幼児・高齢者に感受性の高いウイルス（パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス）などを取り上げた。インフルエンザウイルスに関しては、ウイルスの宿主域を決定する分子基盤、高病原性トリインフルエンザウイルスのヒトへの伝播機構、そのヒト間感染を可能とする変異機構などを解明し、ウイルス受容体破壊酵素の新機能を発見した。さらに、インフルエンザウイルスのエンベロープタンパク質上に発現している糖鎖のプロファイリングを行い、宿主により修飾されるウイルス糖鎖の発現パターンは顕著に異なること、加えて、様々な抗インフルエンザ活性を有する糖鎖分子の創薬に対するシーズを見いだした。HIVに関して、ウイルス表面の糖鎖を欠失させることにより低病原性化し、生ワクチンとして極めて有効な防御免疫を誘導するウイルス（Δ5G）を用いて、糖鎖がエイズウイルスの病原性を決定する機序、有効なワクチン開発ための防御免疫機構などを明らかにした。さらに、幾つかの有効な感染阻害剤を明らかにした。デングウイルスについては、その受容体がパラグロボシドに担われる糖鎖であることを見いだし、これを担持するデンドリマーを創製し、動物レベルで感染阻害効果があることを見いだし、今後サルを用いた応用的評価を試みる段階に進展した。パラインフルエンザウイルスの受容体糖鎖の精密化学構造を初めて解明し、感染阻害作用をもつ数種のシアロ糖鎖誘導体を創製した。

（今後）以上の結果は、ウイルス感染における糖鎖の役割・機能を新視点で明らかにする可能性を示すと共に、「ウイルスに対する糖鎖創薬」、「糖鎖ウイルス学」という研究分野を新たに開拓するものである。また、一連の過程で、ウイルスの変異を克服した次世代抗ウイルス剤の開発が可能となることが期待される。

RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発（西原チーム）

（背景）糖鎖修飾は翻訳後修飾の主たるものであり、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示す。西原チームは、「個体レベルでの糖鎖機能の解明」を目的とし、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。

（成果）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約 260 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。167 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。注目される個々の遺伝子に対してより詳しい解析を行い、0-マンノース転移酵素 1 と 2 が協調して筋形成に関わっている事や新規 PAPS 輸送体 1 と 2 がヘパラン硫酸の硫酸化を通して形態形成に関わる事などを明らかにした。また、網膜神経細胞の維持に重要な糖蛋白質について、その糖鎖の重要性を示し、さらに、その糖修飾を制御するメカニズムの解析を行った。

（今後）本解析は、糖鎖機能の網羅的解析の初めての例であり、現在、さらに、個々の遺伝子の詳細な解析や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解析を行っている。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。

「平成１５年度採択」

糖鎖機能を利用した組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発（伊藤チーム）

（背景）標的細胞表面に存在する糖鎖レセプター（カチオン非依存性マンノース6-リン酸レセプターCI-M6PRやマンノースレセプターMR）を分子標的とした、リソソーム病（リソソーム酵素欠損症）の酵素補充療法が実用化されている。

伊藤チームは、中枢神経障害を伴うリソソーム病の脳内酵素補充療法の開発を目指し、β-ヘキソサミニダーゼA（HexA）を構成するα及びβ鎖を各々コードするHEXA及びHEXBの遺伝子変異が原因で、HexA欠損とGM2 ガングリオシド（GM2）の脳内過剰蓄積を伴って発症するTay-Sachs病及びSandhoff病を対象に、メタノール資化酵母変異株を用いたヒト型様糖鎖含有組換えHexAの大量発現・精製、結晶構造情報に基づく高機能化HexAのデザイン、Sandhoff病モデル（SD）マウス由来神経系構成細胞における糖鎖レセプターの発現解析と酵素補充効果の評価および末梢血液から脳実質内への酵素補充技術の開発を進めている。

（成果）これまでに、SDマウス由来のグリア系細胞株（アストロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞、シュワン細胞及びミクログリア)、や骨髄由来間葉系幹細胞、さらに核移植胚性幹細胞（ntES細胞）を樹立し、神経系細胞への分化誘導に成功した。各々の細胞におけるCI-M6PRとMRの発現を行い、HEXA及びHEXBの同時恒常発現CHO細胞株から分泌される組換えHexAが、これらの糖鎖レセプターを介してリソソーム内に輸送され、蓄積するGM等を分解することを明らかにした。メタノール資化酵母（Ogatae minuta）の糖鎖生合成変異株にHEXA及びHEXBを同時導入することにより、末端マンノース6-リン酸（M6P）残基含有N型糖鎖が付加された組換えヒトHexAを大量発現・精製することに成功した。またCI-M6PRを介して患者由来皮膚繊維芽細胞及びSDマウス由来培養細胞に取り込まれ、蓄積GM2の分解に対する有効性が示され、さらにSDマウス新生児の腹腔内に投与することにより、投与量の10%程度が脳内に移行することが明らかになった。HexアイソザイムのX線結晶構造情報に基づき、in silicoでαとβ鎖との相互作用の強化やN型糖鎖追加のためのアミノ酸置換を予測した。当該改変遺伝子をCHO細胞に導入することにより、HexAアイソザイムの選択的発現、in vitroでの熱安定性の増大及びM6P残基含有糖鎖追加等の高機能化に成功した。新規の脳移行性ペプチドとアザミグリーン等のモデルタンパク質との融合タンパク質を作成し、経頚動脈的に投与すると脳実質内に移行することが示された。

（今後）これらの結果から、現在実用化されている糖鎖機能を利用した組換え酵素補充療法が、中枢神経障害を伴うリソソーム病にも応用可能であることが期待される。今後は、ヒト型様糖鎖含有組換えヒトHexAの血液脳関門透過機構を解明し、酵素の脳内補充効率を高めることにより、臨床応用実現につなげたい。

マイクロドメイン機能異常にもとづく２型糖尿病の病態解明（井ノ口チーム）

（背景）スフィンゴ糖脂質が集積して形成される細胞膜マイクロドメインは、シグナル伝達の要としての役割が注目されている。

井ノ口チームは、2 型糖尿病などの生活慣習病の病態は、スフィンゴ糖脂質の異常発現によってマイクロドメインの構成・構造および機能が変化し、シグナル伝達が異常になった「マイクロドメイン病」であるという作業仮説を検証し、新たな分子病態像を解明することを目的としている。

（成果）これまでの研究でインスリン受容体はガングリオシド GM3 の発現増加によって、カベオリン-1 との結合が弱められマイクロドメインから解離し、インスリン抵抗性状態を惹起する機構を証明した。また、２型糖尿病患者の血漿中 GM3 は有意に増加していることを見いだした。

（今後）２型糖尿病患者の血漿中のガングリオシド GM3 量の増加は、２型糖尿病をはじめとする複雑なメタボリック症候群の病態を新たな角度から検出することが出来る新規なリスクファクターである可能性を見いだした。今後は、２型糖尿病、インスリン抵抗性、動脈硬化などの病態との関連性を明確に出来ると期待している。

また、GM3合成酵素のトランスクリプショナルバリアントの生理的役割について解析し、ガングリオシド生合成制御機構を明らかにする。

担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化の解析と応用（中田チーム）

（背景）上皮性癌細胞の産生するムチンは、癌関連糖鎖抗原を含む多様なO-グリカンを発現し、癌組織や癌患者血流中に分泌される。一方、免疫系細胞には多くのレクチンが発現され、ムチン上の多様な糖鎖と相互作用する可能性がある。免疫系細胞への作用は、免疫能の低下のみならず、増殖因子や生理活性物質の産生の変化をもたらし、腫瘍組織形成にも影響することが考えられる。これらの分子機構を明らかにすることにより、担癌状態における免疫能低下を回避する方法の開発などに結びつける。

（成果）上皮性癌細胞の産生するムチンは、様々な受容体を介して免疫担当細胞と相互作用することを明らかにしてきた。これまでに、単球／マクロファージ上のスカベンジャーリセプター（SCR）を介した系、B細胞上のシグレック2を介した系、樹状細胞上のシグレック9を介した系でいくつかの知見を得た。

SCRを介した系では、マウス乳癌細胞株TA3-Haの産生するムチン（エピグリカニン）を用いて、腹腔マクロファージへの作用とPGE_2の産生亢進を示した。TA3-Ha細胞と、その亜株でムチン非産生株であるTA3-St細胞を用いて、担癌マウスにおける腫瘍増殖や免疫作用について比較検討した。TA3-Ha担癌マウス皮下腫瘍形成は、TA3-Stのそれに比して著しく早く、癌組織抽出物中のCOX2タンパク質やVEGFもTA3-Haの方が有意に高い値を示した。また、TA3-Ha、-St担癌マウスの脾細胞を調製し、Th1/Th2バランスを比較したところ、TA3-Ha担癌マウスにおいてTh2への偏りが見られた。これらの結果は、ムチンによるCOX2の誘導に伴うPGE_2の産生亢進がVEGFの誘導、Th2サイトカインの産生を促進しているものと考えられる。事実、TA3-Ha担癌マウスにCOX2阻害剤を投与するとその腫瘍増殖は著しく抑制された。

シグレック2はシアリルTn抗原をはじめとして、α2,6シアル酸をもつ糖鎖に結合することが知られているが、MUC2ムチンやエピグリカニンに結合することを確認した。シグレック2は、B細胞の情報伝達を調節する分子であるが、シグレック2強制発現株あるいはマウス脾臓B細胞を用いて、ムチンの結合がBCRを介した情報伝達を抑制することを示した。さらに、上述したTA3-Ha担癌マウスにおいて、脾臓マージナルゾーンB細胞が特異的に消失し、それに伴いT細胞非依存性抗原に対する応答が低下することを示した。この効果は、抗ムチン抗体を投与することにより抑制された。また、正常マウスにムチンを投与することによっても、同様の効果が脾臓マージナルゾーンB細胞に引き起こされることを明らかにした。これらの結果は、担癌状態において見られる血流中のムチンが、宿主に重大な影響を与えることを明確に示した最初のデータと言える（投稿中）。

また、シグレック9にムチンが結合することにより、樹状細胞からのサイトカインの産生がTh2に偏ることがわかった。

（今後）SCRを介した系では、可溶型SCR組換体を用いて抗腫瘍効果について検討する。また、デルマタン硫酸がSCRに結合することを確認しており、創傷治癒過程での生物学的現象としての可能性を検討する。

シグレック2を介した系で見出された現象が、ヒトにおいても見られるか否かを検討する。同様の現象が見られれば、抗ムチン抗体のヒト型を作成し、その効果を検討する。シグレック3, 7についても、それらを発現する免疫細胞について、ムチンの結合に伴う生物学的効果を検討する。また、シグレックファミリーの内在性リガンドを検索し、その生物学的意義を明らかにする。血中ムチンはシグレック分子とリガンドとの相互作用を阻害すると考えられ、その効果が腫瘍増殖とどのように関わるかを検討する。

遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明　（野村チーム）

（背景）線虫 *C. elegans*はモデル生物としてゲノム研究、ポストゲノム研究を牽引してきた最も解明の進んだ多細胞生物であり、すでに二つのノーベル賞がその研究に与えられている。野村チームはポストゲノム研究の最重要テーマである糖鎖機能の解析（Functional Glycomics研究）に線虫を活用し、ヒトや哺乳類の研究を進める各チームと緊密に協力してヒトの糖鎖遺伝子とそれに対応する線虫の糖鎖遺伝子を相互に研究しつつ、ヒトの病気の解明と治療法の解明、そして基礎生物学の発展に大きく寄与することを目指している。

（成果）バイオインフォマティクスを活用してヒトの糖鎖遺伝子の約70%（145個）以上について、その相同遺伝子が線虫にも存在することを明らかにした。この145個の遺伝子についてRNA干渉法（RNAi)によって全遺伝子の機能破壊を済ませ、34%の遺伝子で異常を検出した。さらに全遺伝子の遺伝子破壊株の取得を進めているが、現在までのところ72個の遺伝子のついては欠失突然変異株を得て表現型を解析し、RNAiと併せて64個（44%）の遺伝子について様々な表現型異常を確認した。この中で最も激しい表現型を示したのはプロテオグリカンに関連する遺伝子群と硫酸化に関係する遺伝子群であった。特にコンドロイチンについてはコンドロイチン合成酵素とその重合化因子による合成メカニズムを解明し、細胞分裂における染色体分配と細胞質分裂の制御に糖鎖が重要な役割を果たしていることを明らかにした。またコンドロイチンのコア蛋白質候補を同定し、コンドロイチン糖鎖が確かに付加されていることをマススペクトルの手法を改良して同定した。またヘパラン硫酸の合成酵素についても激しい表現型を確認しており、詳細な解析を行った。これら糖鎖の硫酸化に重要な機能を果たしているPAPS synthaseのノックアウト株についても詳細な解析を行い、形態形成運動への硫酸化の寄与をあきらかにした。またALG遺伝子群やacetyl CoA transporter, GPIアンカー関連遺伝子など様々な遺伝子のノックアウトが激しい表現型を示すことを発見し、糖鎖遺伝子の重要性を明らかにした。線虫での遺伝子破壊と発現解析の手法を開発・改良し遺伝子破壊の効率を年間500アリル程度に向上させた。また新規の発現解析ベクターを開発した他、糖鎖機能阻害によ

るERストレスの検出法の開発、線虫のプロテオーム解析法の開発、N型糖鎖の硫酸化の発見、哺乳類レクチンの新たな基質の発見、ショウジョウバエでのヘパラン硫酸の役割の解明、哺乳類のヘルペスウイルスの初期感染にコンドロイチン糖鎖が関与することなどを明らかにした。

（今後）遺伝子破壊で激しい表現型を示した遺伝子について詳細な解析を続け、モデル生物の利点を最大限に活用したFunctional Glycomicsの解析を推進する。特にコンドロイチン糖鎖が細胞分裂を制御しているメカニズムを、核からER, ゴルジ、細胞膜への糖鎖輸送メカニズムとの関連を解析しながら解明する。さらに新規に同定した数種のコンドロイチンゴア蛋白質候補の遺伝子破壊と糖鎖構造解析を行い、プロテオグリカンによる細胞分裂制御ネットワークの全貌を解明する。すでに哺乳類でもプロテオグリカン糖鎖が細胞分裂を制御しているという予備的結果を得ており、糖鎖生物学にあらたなパラダイムをもたらす研究となると確信して研究をすすめている。さらに遺伝子破壊株の作成効率の向上と、組織特異的遺伝子破壊手法の開発をすすめ、145遺伝子全部の欠失突然変異株の取得を完了させ、重要な遺伝子については遺伝子破壊効果のプロテオーム解析による検討をおこなう。また糖脂質の輸送や合成・分解に関与する遺伝子の遺伝子破壊、ガレクチンの全く新しいリガンドの解明や、糖鎖にかかわるトランスポーター遺伝子、GPIアンカー遺伝子の遺伝子破壊もすすめ、線虫の遺伝子ネットワークの解明結果と対照させながら哺乳類での糖鎖の機能を解明し、糖鎖機能の解明による病因解明、治療法の開発につながる研究をめざす。

がんや糖尿病等におけるシアリダーゼ異常の機構解明と制御（宮城チーム）

（背景）糖鎖末端を占める酸性糖シアル酸は、糖鎖分子の修飾を介して、多くの重要な細胞機能に関与している。宮城チームは、シアル酸の脱離によってその調節を担うシアリダーゼの解析を通じて、シアル酸異常をもたらすがんや糖尿病などの病態解明とその成果の応用をめざしている。とくに、細胞表層でガングリオシド発現の鍵酵素である形質膜局在型シアリダーゼ(NEU3)を中心に解析を進めている。

（成果）これまでに、NEU3 が各種ヒトがんでほとんど例外なく異常に亢進していること、その異常亢進が Ras の活性化をもたらし、接着や浸潤・運動能の亢進、アポトーシスの抑制など、がん細胞の種々の悪性形質を助長することを検証した。一方、NEU3 遺伝子をノックダウンすると、がん細胞が細胞死に陥り、NEU3 はその生死を制御することが明らかとなった。また、先にこの遺伝子導入マウスに糖尿病が発症することを見いだしたが、糖尿病患者に NEU3 遺伝子多型がみいだされ、インスリン抵抗性と有意に相関することがわかった。

（今後）これまでの結果を基盤として、他種のシアリダーゼの発現や機能の解析を進め、シアル酸異常の実体解明を試み、シアリダーゼを標的としたがんや糖尿病の新しい診断・治療法の開発を目標としている。

糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築（山口チーム）

（背景）抗体産生の機構を生体外で達成できるファージディスプレイ法と人工糖脂質を活用して、各種糖鎖エピトープに特異的かつ高親和性で結合する単鎖抗体を単離し、糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーを構築することを目的としている。ファージ提示型単鎖抗体ライブラリーからの抗体作製は、動物を免疫する必要が無いため、スクリーニング操作が簡便かつ迅速であるばかりでなく、免疫原性を持たない抗原に対しても抗体を得ることが期待できる。本プロジェクトでは、ヒト型単鎖抗体提示ファージライブラリーを使用していることから、ヒト型抗体の作製が容易である。従って、診断薬のみならず、治療用への応用が可能である。

（成果） これまでに、糖タンパク質あるいはプロテオグリカンを糖鎖抗原としてのパンニング・スクリーニングの報告はあるものの、人工糖脂質を利用して様々な糖鎖構造に特異的な抗体を取ったとの報告は無い。山口チームは、モデル糖鎖抗原としてmannotriose に結合するファージ抗体のスクリーニング法、単鎖抗体の遺伝子の単離、単鎖抗体タンパク質の発現･精製、結合性の解析などの方法を確立した。同様にして、Le^x、T 抗原、Tn 抗原、ガングリオシドに対する単鎖抗体の単離･発現・精製が進行中である。この過程を通して、単鎖抗体の単離･発現・精製の全過程をより効率的にするためのライブラリーと糖鎖抗原固定化の改良を進めた。今回開発された糖鎖に対するヒト型抗体作製法は、基礎研究としてのグライコミクス研究に画期的なツールとなるばかりではなく、糖鎖関連抗体医薬･診断薬の開発を飛躍的に促進させうるものである。

（今後）すでに遺伝子として得られている 40 数種の単鎖抗体クローンの解析と応用を継続するとともに、改良ファージライブラリーからの有用な糖鎖抗原に対する抗体の作製を目指している。一方、すい臓がん診断薬、がん治療薬の創製につながる糖鎖抗原の合成を開始した。

「平成１６年度採択」

糖鎖の動態---機能相関への統合的アプローチ（木下チーム）

（背景）糖鎖の機能は、糖鎖の動態に対応して変化する。糖鎖の動態と機能の相関に統合的にアプローチするため、糖鎖動態を時間的流れに沿って、１）糖鎖生合成時の動態、２）糖鎖の膜上動態、３）糖鎖プロセッシングの動態の３つの相に分けてとらえ、各相における機能との相関をとらえることを目標としている。

（成果）これまでに、イギリスの研究グループとの共同研究で、糖鎖生合成の異常に基づく新しい疾患である先天性 GPI アンカー欠損症を発見した。臨床症状から、深部血管における凝固系恒常性維持と神経情報伝達の制御に GPI アンカーが重要であることがわかった。糖鎖の膜上動態の中では、スフィンゴ糖脂質や GPI アンカー型タンパク質が脂質マイクロドメインに組み込まれるメカニズムと機能との関係の解明が重要である。これまでに、GPI アンカーの脂肪酸が PGAP2 と PGAP3 遺伝子の関与のもとゴルジ体膜上で飽和

型脂肪酸に置き換えられる脂肪酸リモデリングが起こること、それが脂質マイクロドメインへの組み込みに必要であることを見いだした。また、糖鎖プロセッシングの動態に関し、N 型糖鎖の細胞質でのプロセッシングに働くα-マンノシダーゼ Man2C1 の遺伝子をクローニングし、Man2C1 が低下するとプロセッシング異常が起こることを示した。

（今後）これらの結果は、糖鎖動態の各相における未解明の現象のメカニズムに解答を与えるものであり、今後さらに、それらの不調がもたらす疾患や機能不全状態の解析を行うことにより、機能との相関が明確になるものと期待できる。

糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用（鍔田チーム）

（背景）記憶リンパ球による迅速な応答はワクチンによる感染防御に重要であり、また、抗原と反応した B リンパ球の適切な運命決定は自己免疫やアレルギーを防止するのに重要とされている。Siglec2/CD22 などの膜型レクチン分子は、細胞株や in vitro の解析により抗原と反応した B リンパ球が活性化するかアポトーシスをおこすかを決定する分子スイッチとして機能することが示されている。しかし、このような機能が実際の免疫応答で働いているのかは不明である。また、Siglec2/CD22 の機能がその糖鎖リガンドα2,6 シアル酸によって制御されることが示唆されているものの不明な点が多い。そこで、本研究では、Siglec2/CD22 などの B リンパ球活性化制御機能が、どのような免疫応答に関わるのか、また、その機能が糖鎖リガンドによってどのように制御されるのかを解明するとともに、改変糖鎖リガンドなどによる免疫応答制御法の開発を行う。

（成果）我々は、B リンパ球が多糖抗原に反応した際には、Siglec2 および Siglec2 と機能重複する CD72 分子による B リンパ球の活性化抑制が解除され、その結果、多糖モデル抗原に対する T 細胞非依存的な免疫応答がおこることを明らかにした（submitted）。また、記憶 B 細胞で発現する膜型 IgG や IgE はナイーブ B 細胞で発現す膜型 IgM や IgD に比べ、効率よく B 細胞を活性化するが、この Ig クラス間の相違において Siglec2 によるシグナル制御の有無が中心的な役割を果たすことを明らかにした（revised）さらに、CD２２欠損により抗体応答が早期化することを明らかにした（特許申請準備中）。Siglec2 の糖鎖リガンドについては、糖鎖リガンド欠損するマウスを樹立し、このマウスで抗体産生が亢進することを明らかにするとともに（submitted）、活性化 B 細胞で Siglec2 の糖鎖リガンド産生が消失すること、さらに、βセクレターゼが Siglec2 糖鎖リガンド代謝に関わることを明らかにした。

（今後）多糖抗原への反応のメカニズムの解明を進め、細菌莢膜など細菌多糖への免疫応答の分子機構とその生体防御での役割を明らかにする。また、Siglec2 欠損により抗体応答が早期化することが明らかになったので、Siglec2 機能阻害により感染防御能を増強できるか検索するとともに、糖鎖リガンド欠損マウスなどを用いて糖鎖リガンドの機能を明らかにし、改変糖鎖リガンドなどを用いた免疫応答早期化によるユニバーサルワクチンの基盤技術を開発する。また、βセクレターゼノックアウトマウスや活性化 B 細胞に

も糖鎖リガンドを発現するトランスジェニックマウスなどを用いて、糖鎖リガンド代謝と機能の解明を行う。

神経グルコース関連糖脂質の生理機能（平林チーム）

(背景)脳は、ニューロンとグリア細胞により構成されており、両者の細胞間相互作用により、脳の形態形成、ネットワーク構築、高次機能の獲得と維持が可能となっている。平林チームは、神経系糖脂質によるニューロン・グリア間の代謝・機能カップリング機構を明らかにし、神経変性疾患等の難病の新たな治療・診断への分子基盤を提供する。

（成果）発達期の放射状グリアに発現する新しいグルコース化リン糖脂質、ホスファチジルグルコシド(PtdGlc)を発見し、続いて、nano-LC/TOF-MS 質量分析計による本糖脂質の微量分析法を開発した。PtdGlcは、C108:0とC20:0の飽和脂肪酸のみで構成されている点で、他の膜脂質には見られないユニークな構造を有している。PtdGlcは発達期のラジアルグリア細胞膜脂質微小領域に存在し、アストログリアへの分化促進や神経軸索のガイダンス等の生理活性が認められた。一方、グルコース化セラミド(GlcCer)のグルコースを分解する全く新しいタイプの中性グルコセレブロシダーゼ遺伝子の同定に成功した（伊東）。

(今後) PtdGlcの本質的理解に、この糖脂質の生合成機構を明らかにすることが必須である。また、PtdGlcの代謝産物であるlyso-PtdGlcの有するガイダンス活性のメカニズムの解明を目指す。新規中性グルコセレブロシダーゼの発見は、未だに神経機能との関連が不明なGlcCerの新たな解決の糸口を与えると期待したい。

病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明（本家チーム）

（背景）細胞膜には、細胞外からの刺激を細胞内に伝達するために、機能的に異なるマイクロドメインが複数存在している。これらのマイクロドメインには、それぞれ特異的な糖脂質や糖タンパク質が会合しており、これらの糖鎖が膜マイクロドメインにおける生物機能の発現に重要な役割を果たしている。本家チームは、膜マイクロドメインに対する抗体の作製やマイクロドメイン指向性プローブの開発を通して、さまざまな生命現象における膜マイクロドメイン機能に関わる糖鎖の役割を解明し、膜マイクロドメイン機能を人為的に制御することを目指している。

（成果）これまで、精子形成細胞や神経細胞等の膜マイクロドメインをマウスに免疫して単クローン抗体を作製するとともに、膜マイクロドメイン指向性プローブを開発した。

（今後）今後は、それぞれの抗体が認識するエピトープを決定し、膜マイクロドメインにおいて糖脂質あるいは糖タンパク質と相互作用する分子を同定することにより、膜マイクロドメインにおける糖鎖の役割を解明する。同技術を、癌、ウイルス感染、免疫の病態に適用し、これらにおける膜マイクロドメイン機能に関わる糖鎖の役割を解明する。さらに、膜マイクロドメインを用いた免疫療法や、糖鎖発現制御による膜マイクロドメインの構造改変法の実現を期待したい。

１０．総合所見

１）戦略目標の現実化に向けて（現時点までの研究結果．経過）

本領域は、戦略目標として、糖鎖機能の解明をおこなうことにより、がんやウイルス感染症などの革新的医薬品開発の実現を目指す基盤的な研究成果を挙げることを目標とした。

採択された課題は、いずれも国際的にも非常にレベルの高いものであり、戦略目標を達成することが十分可能であり、その成果は国際的にリードすることが期待されるものであった。また糖鎖機能を解明することにより、これまでタンパク質や核酸の研究ではあきらかにならなかった情報の解読を行うことが可能である。このため糖鎖研究は他分野の研究領域の研究者が避けて通れなくなっており、本研究プロジェクトでも免疫など糖鎖を専門にしていない人からの提案も採択した。

研究開始後は、研究総括が研究現場を訪問したが、そこでもチームの研究成果報告会を開催した。報告会や研究実施報告書により、研究進捗状況および問題点を把握した。

これらの研究進捗状況の把握により、当初の計画から発展が著しい課題には積極的な研究支援を行ない、また戦略目標から離れたり、国際的に遅れをとっている課題については、適切な研究計画の変更を助言したり研究支援を行なった。

この結果、論文発表数、特許取得数などもかなりの数にのぼっている。糖鎖生物学で国際的に評価の高い雑誌や、共同研究ではあるが Nature 誌への掲載もかなりある。また、マスコミや社会的に注目を浴びる研究テーマもいくつか発表している。

現段階では、これらの経過を経て、戦略目標はおおむね順調に進捗していると考えられる。

２）領域を設けたことによる効果と意義

領域の研究成果報告会は、戦略目標の現実化に向けた活発な議論がおこなわれ、課題間での研究の進展とよい意味での競争心を植えつけ、研究の発展に相乗的な効果をもたらしたといえる。

第１回から、第４回までの日本糖鎖科学コンソーシアムでは本領域からも毎年代表者が発表を行なった。また２回にわたって本領域が主催した。この会には例年 600 名を越す研究者が参加し、他省庁などの競争的資金により研究をしている研究代表者が一堂に会したことから、我が国の糖鎖科学の発展の現状をお互いに把握すると共に、本領域の位置づけを知る恰好の機会となった。また本領域の研究者の優れた研究を社会に認知させることができた。

本領域とＮＩＨの機能グライコミクスのグループが共同開催したハワイでの日米合同会議では、我が国の糖鎖科学の現状を米国のグループに周知させる恰好の機会となった。

進捗状況に問題のある研究課題には、適切な助言と予算面での減額を行い,一層の

努力を喚起した。また研究計画の修正、研究の方向性などの問題点を指摘し、研究の健全な進展を図ってきた。

これらの対応は、ＣＲＥＳＴの枠組みでなければできない柔軟な研究体制として可能であったと考える。

３）今後への期待と展望

いくつかの研究課題のなかで、糖鎖の機能解析や糖鎖の合成化学を基盤とした、がんやウイルスの感染症への新しい医薬品や、糖鎖を利用したがんの早期診断のキットの開発などにつながる研究成果が生まれつつある。

我が国における国際的な糖鎖科学のトップランナーとして優位性は、明らかであるが、引き続き本ＣＲＥＳＴが中心となってその役割を果たすよう、適切な助言を行っていきたい。

終了時点では、本ＣＲＥＳＴの中から、一つでも多くの知的財産が社会に還元できるよう、更なる努力を各課題に期待すると共に、国内外における糖鎖科学の研究と技術開発の重要性を継続して主張していきたい。

特に米国ではＮＩＨ／ＮＩＧＭＳが都合１０年間の巨額な研究資金をＧｌｕｅ Ｇｒａｎｔとして機能グライコミクスに投じ、着々と拠点形成をおこなっている。本ＣＲＥＳＴに続く、継続的な研究資金が今後の我が国の糖鎖科学に必要であることを訴えていきたい。

以上