

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名 (研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

西原 祥子 (創価大学工学部 教授)

主たる共同研究者

上田 龍 (国立遺伝学研究所系統生物研究センター 教授)

後藤 聡 (三菱化学生命科学研究所 主任研究員)

豊田 英尚 (千葉大学大学院薬学研究院 准教授)

水野 真盛 ((財)野口研究所 主任研究員)

中村 充 (北里大学東病院 研究医)

隅田 泰生 (鹿児島大学大学院理工学研究科 教授) (平成17年4月～)

3. 研究内容及び成果

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示す。合成されたタンパク質や脂質はゴルジ装置で糖転移酵素により順次糖を付加される。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ことはできない。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」を目的とした。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った。

本プロジェクトは、(1)統括グループ(西原)、(2)遺伝学的機能解析グループ(上田)、(3)発生学的機能解析グループ(後藤)、(4)糖鎖構造解析グループ(豊田)、(5)糖鎖合成グループ(水野)、(6)糖鎖細胞制御グループ(中村)、(7)糖鎖チップグループ(隅田)から構成される。実施にあたっては、ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の網羅的単離と同定は西原が行い、RNAi変異体の作成は上田、機能解析は西原と後藤、糖鎖構造解析は豊田、哺乳類細胞への応用は、中村と西原が行った。水野は合成基質等のサポート、隅田は糖鎖チップの方向からのサポートを行った。

[1] ショウジョウバエにおける糖鎖関連遺伝子RNAi変異体の網羅的作成と解析

14,141個の遺伝子より、糖鎖関連遺伝子と推定される遺伝子、糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体、レクチン、コアタンパク質、糖鎖分解酵素など、257個の候補遺伝子を選択した。202個(79%)についてRNAi用のベクターを構築し、ハエに形質転換して362系統のRNAi変異体ハエを樹立した。全細胞、全発生ステージでRNAiを誘導したところ、62%で発生致死となり、糖鎖が種々の生体機能に関与して生命維持に重要な働きをしていることが明らかになった。特に、糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体などの糖鎖合成関連遺伝子のRNAi変異体では、76%と高い致死性を示した。この結果は、糖転移酵素の欠損に由来する遺伝病が糖鎖分解酵素に由来するものに比較して少ない事実と符合するものであり、ショウジョウバエのようなモデル生物を用いた解析が遺伝病の病因論へも適用できる可能性を示すものであった。

さらに、組織特異的、あるいは、発生段階特異的にRNAiを誘導したところ、54%で形態形成異常を示した。*N*-結合型糖鎖の合成に関与する糖転移酵素群は、中程度の致死性と中程度の形態形成異常の出現を示した。一方、*O*-結合型糖鎖のうち、プロテオグリカン型(グリコサミノグリカン鎖)、*O*-Fuc、*O*-GlcNAc、*O*-Manなどのムチン型糖鎖以外の糖鎖合成に関与する糖転移酵素群では、高い致死性と高い形態形成異常の出現が観察された。しかし、ムチン型糖鎖の合成に関与する糖転移酵素群では、致死性は高かったが、形態形

成異常の出現率は低く、糖鎖の種類による機能分担が示唆された。さらに、各々の遺伝子における翅や複眼の形態形成異常を詳細に観察した。各遺伝子は、その表現型により3種のグループにクラスタリングされた。各糖転移酵素遺伝子を同定したところ、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、同じ糖鎖を生成する糖転移酵素でも、糖鎖の根元側（還元末端側）の合成に関与する糖転移酵素では重篤な表現型が得られ、糖鎖の末端側（非還元末端側）の合成に関与する糖転移酵素では多様で軽微な表現型が得られた。この事実は、糖鎖の末端側には多様性があり、機能が分化している可能性を示していた。

以上の網羅的解析により、糖鎖の形態形成における機能の全体像を、初めて、示すことができた。糖鎖機能の網羅的な解析はほとんど行われておらず、本研究は糖鎖研究に重要な知見を提供し、糖鎖の基本機能の全体像解明へ大きく寄与すると考える。

【2】網羅的解析の過程で見出された注目すべき遺伝子に対するより詳しい解析

ショウジョウバエ *O*-マンノース転移酵素、*O*-GlcNAc転移酵素、プロテオグリカンガラクトース転移酵素II、グルクロン酸転移酵素群、 α 1,3フコース転移酵素A、 β 1,4-*N*-アセチルガラクトザミン転移酵素-A、コア1 β 1,3ガラクトース転移酵素群、硫酸転移酵素群、糖ヌクレオチド輸送体群について、個別に詳しい解析を行った。特に、*O*-マンノース転移酵素が筋形成に関与して筋ジストロフィーのモデルとなること、プロテオグリカンガラクトース転移酵素IIがヘパラン硫酸を介してWinglessの安定化に寄与している可能性を示した。

【3】コアタンパク質を固定した糖鎖修飾機構の解析

ショウジョウバエの視神経の発生に必要な糖タンパク質chaoptinを同定し、その糖鎖構造を詳細に解析して、糖鎖の細胞接着への関与を明らかにした。さらに、糖鎖修飾に必要な遺伝子の検索から、糖鎖修飾に必要な新規遺伝子群を発見した。

【1】～【3】に加え、【4】各種糖鎖機能解析関連技術の開発（糖鎖構造の微量解析法、有用糖鎖合成技術、糖鎖チップと糖鎖固定化金ナノ粒子作成解析技術）、さらに、ショウジョウバエの網羅的解析結果のヒトや哺乳類への還元を目的として、【5】ヒト培養細胞におけるRNAi技術の開発、【6】注目すべき遺伝子に対するES細胞を用いた解析、及び、【7】注目すべき遺伝子に対するノックアウトマウスの作成も行った。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

遺伝学的背景が確立しているショウジョウバエを使って、257の糖鎖関連遺伝子の中で、202個についてRNAi用のベクターを構築し、ハエに形質転換してRNAi変異ハエを樹立した。全細胞、全発生ステージについて網羅的な解析を行い、糖鎖遺伝子のノックダウンによる機能変化の多くの知見を得ており、国際的にも高く評価される。また、筋ジストロフィーの原因の一つである α -ジストログリカンの糖鎖異常で重要な*O*-マンノース転移酵素POMT1、POMT2の解析など、個々の遺伝子の解析においても注目すべき成果が得られている。

質の高いJournalに発表しており、素晴らしい研究成果が出ているが、論文の数はそれほど多くない。もう少し、論文数を増加させる努力をしても良かったと思われる。研究課題が基礎研究であるため、特許取得はあまり期待出来ない。

論文発表(国内 0件、国際 44件) 招待講演(国内 28件、国際 9件)

口頭発表(国内 24件、国際 6件) 特許出願(国内 4件、海外 1件)

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

短時間で簡便に表現型を観察できるのがショウジョウバエ実験モデルの長所である。網羅的な遺伝子解

析から、いかにして糖鎖、タンパク質レベルでの機能調節への新規な知見へと結び付けることができるかが、このアプローチの将来の発展にとって重要な条件である。遺伝子のクラスタリング → 糖鎖合成経路の反映、遺伝学的相互作用とした論点は最初から予想されるものであり、新規発見には至っていない。今後は生化学的に未知の遺伝子 → 表現型の解析 → 生化学的機能の予想などが可能となればショウジョウバエをツールとした研究が生かされるであろう。

4-3. その他の特記事項 (受賞歴など)

代表者のリーダーシップのもと、異なる特殊技術をもつ専門家が、与えられた課題に対して十分な成果を出し、素晴らしい共同研究体制を形成して研究を推進した。

ショウジョウバエをツールとして糖鎖遺伝子機能を網羅的に解析した成果は国際的にも大きく評価できる。既に作成済みのノックアウトハエをさらに活用して基本的な糖鎖機能発見に尽力してもらいたい。また、哺乳類、特にヒトでの糖鎖関連遺伝子の新機能を見つけることが最重要課題である。