

「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

小山 信人

(タカラバイオ(株) 細胞・遺伝子治療センター 主幹研究員)

「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」

## 1. 研究実施の概要

*N*-Acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) は糖タンパク質の*N*-結合型糖鎖に bisecting *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) を転移する酵素であり、GnT-III遺伝子を過剰発現させることによってB型肝炎ウイルス (HBV) 遺伝子の発現およびHBV関連タンパクの分泌が抑制されること、メラノーマの実験的肺転移が抑制されること等が知られている。本研究の目的は、(1) GnT-III遺伝子の発現によるHBV遺伝子発現抑制メカニズムを解明してB型肝炎の治療法につなげること、及び(2) GnT-III遺伝子発現誘導物質及びGnT-V遺伝子発現抑制物質を発見することである。

(1) GnT-III遺伝子発現によるHBV遺伝子発現抑制機構を解明する目的で、GnT-III遺伝子発現の有無によるHBV産生細胞株の遺伝子発現変動をDNAマイクロビーズアレイ技術により解析するとともにタンパク質発現変動を2次元電気泳動と質量分析により解析した。また、HBVの主要なエンハンサーであるエンハンサーIIの機能に対するGnT-III遺伝子の影響を解析した。この結果、GnT-III遺伝子の発現は必ずしも転写レベルでHBV遺伝子の発現を抑制しているとは限らず、分泌過程にも影響を及ぼしていることが示唆された。今後はHBVタンパク質分泌への影響も解析する予定である。

(2) GnT-III遺伝子及びGnT-V遺伝子の発現を制御する物質を探索する目的で、両遺伝子のプロモーターの探索を行った。その結果、新規な転写産物を複数見出し、一部についてはゲノム上の上流配列がプロモーター活性を持つことを明らかにした。今後は遺伝子発現制御物質の探索系を構築するとともに、探索を開始する予定である。

## 2. 研究実施内容

### (1) GnT-III遺伝子発現によるHBV遺伝子発現抑制機構の解明

肝がん細胞株であるHuh6にHBVゲノムをトランスフェクトして作製された細胞株HB611はHBV粒子を産生する。HB611にGnT-III遺伝子を導入して発現させた場合にHBV遺伝子の発現が抑制されること及びHBV関連タンパクの分泌が低下することが知られており、このメカニズムを解明するためにGnT-III遺伝子導入によって変化するホストの細胞の遺伝子発現解析とタンパク質発現解析を行った。

Huh6とHB611について、GnT-III遺伝子を導入して得られた細胞とモックトランスフェクタントの遺伝子発現プロファイリングをMassively Parallel Signature Sequencing (MPSS) により行った。cDNAの最も3'末端側のGATC配列で始まる20塩基の配列 (Signature配列) の出現頻度の情報がMPSSによって得られる。各サンプルにつき約290万個のSignature

表1 MPSSにより得られた情報量

		Huh6	HB611
クローン数	GnT-III	2,865,850	2,899,706
	Mock	2,990,913	2,881,964
Signature数		99,035	128,774
Significant Signature		45,172	49,925
UniGeneアノテーションのついたSignature		24,958	29,655
UniGeneクラスター		8,164	12,680

配列が得られ、アノテーションをつけたあと信頼性の低いSignatureを除去した結果、2万数千種類のSignature、1万種類前後のUniGeneクラスターについて発現情報を得た (表1)。一方、GnT-III遺伝子導入と非導入のHuh6について、発現量に差のある遺伝子をMegasortにより網羅的に取得した (図1)。4,000

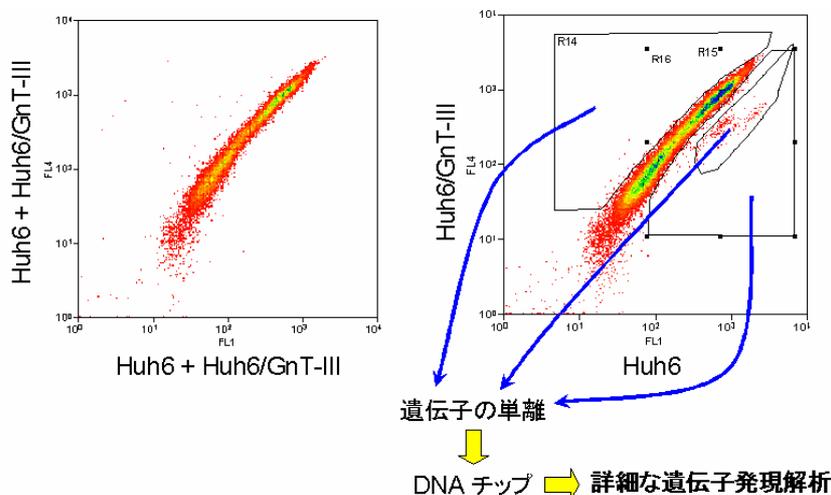


図1 Megasortによる発現変動を示す遺伝子の単離

クローンあまりの配列を決定し、クラスタリングを行ったところ、約1,100個のUniGeneクラスターに分類された。これらの遺伝子に糖鎖関連遺伝子、シグナル伝達関連遺伝子等を加えたDNAチップを作製した。今後はDNAチップを用いて多数のサンプルについて遺伝子発現を解析し、MPSSの結果と合わせてGnT-III遺伝子の機能を探る予定である。

GnT-III遺伝子導入、非導入のHuh6とHB611のタンパク質発現解析を行った。2次元電気泳動により全タンパク質を分離し、発現量に差のあるスポットをゲルから切り出し、プロテアーゼ消化のち、質量分析によってタンパク質を同定した。

HBV遺伝子の転写は4個のプロモーター、2個のエンハンサー (En) 等により制御されている。この中でもEn IIは強力であり、HBVのすべてのmRNAの転写を活性化するので、GnT-III遺伝子の発現がEn IIの機能に及ぼす影響を検討した。En IIをルシフェラーゼ遺伝子の upstream に連結し、Huh7およびHuh6にGnT-III発現ベクターとコトランスフェクトしてルシフェラーゼ活性を測定した。内因性のGnT-III活性を持たないHuh7細胞では、GnT-III過剰発現によりEn IIの活性は抑制されたが、内因性GnT-IIIの高いHuh6細胞では逆にGnT-III過剰発現によりEn IIの活性が増加した。また、これらの結果は、細胞の密度/増殖状態

により、大きく変化した。

#### (2) GnT-III遺伝子発現誘導物質及びGnT-V遺伝子発現抑制物質の探索

GnT-III遺伝子を過剰発現させることによってB型肝炎ウイルス（HBV）遺伝子の発現およびHBV関連タンパクの分泌が抑制されること、メラノーマの実験的肺転移が抑制されること、大腸がん組織におけるGnT-Vの発現量と予後の悪さが正の相関を示す。したがって、GnT-III遺伝子発現を誘導し、GnT-V遺伝子の発現を抑制することが疾病の予防または治療につながる可能性がある。GnT-IIIおよびGnT-V遺伝子の発現を制御する物質を探索する目的で、両遺伝子のプロモーター解析を行った。ヒト脳、腎臓及び胎盤由来のRNAを鋳型に用いてGnT-III及びGnT-V遺伝子の5' -RACEを行ったところ、複数の新規転写産物を発見した。これらのプロモーターと推測されるゲノム領域をクローニングし、プロモーター機能解析を開始した。GnT-IIIの2領域、GnT-Vの1領域についてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、GnT-IIIの1領域がHuh6細胞においてプロモーター活性を示した。今後はこのほかの領域についても解析を進め、様々な細胞におけるプロモーター活性を比較する予定である。

### 3. 研究実施体制

#### タカラバイオグループ

- ① 研究分担グループ長：小山 信人（タカラバイオ（株）、主幹研究員）
- ② 研究項目：
  - ・ GnT-III遺伝子導入によるウイルス性肝障害の修復（遺伝子発現解析、遺伝子導入法開発）
  - ・ GnT-III遺伝子発現誘導物質及びGnT-III遺伝子発現抑制物質の探索

#### 糖鎖治療学グループ

- ① 研究分担グループ長：近藤 昭宏（大阪大学大学院医学系研究科、客員教授）
- ② 研究項目：
  - ・ GnT-III遺伝子導入によるウイルス性肝障害の修復（プロテオーム、グリコーム解析）

#### 糖鎖シグナルグループ

- ① 研究分担グループ長：三善 英知（大阪大学大学院医学系研究科、助教授）
- ② 研究項目：
  - ・ GnT-III遺伝子導入によるウイルス性肝障害の修復（レクチンによる細胞シグナルの解析）

#### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

##### (1) 論文発表

- Capurro M I, Wanless I R, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. (2003) Glypican-3: A novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma *Gastroenterology* **125**, 89-97.
- Noda K, Miyoshi E, Gao C-X, Nakahara S, Kitada T, Honke K, Suzuki K, Yoshihara H, Yoshikawa K, Kawano K, Tonetti M, Kasahara A, Hori M, Hayashi N, Taniguchi N. (2003) Relationship between elevated FX expression and increased production of GDP-L-fucose, a common donor substrate for fucosylation in human hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines. *Cancer Res* **63**, 6282-6289.
- Ito Y, Miyauchi A, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka T, Taniguchi N, Matsuura N, Kuma K and Miyoshi E (2003) Expression of  $\alpha$ -1,6fucosyltransferase is bimodal in papillary carcinoma progression. *Cancer Letter* **200**, 167-172.
- Nakahara S, Miyoshi E, Noda K, Ihara S, Gu J, Honke K, and Taniguchi N. (2003) Involvement of oligosaccharide changes in  $\alpha$ -5 $\beta$ -1 Integrin in a cisplatin-resistant human squamous cell carcinoma cell line. *Molecular Cancer Therapeutics* **2**, 1207-1214.

##### (2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）