

「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報告されている。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、(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、及び(3) 糖鎖構造の違いに基づいた生物現象を解明して疾患の治療法及び診断法開発の基礎的知見を得ること、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及びタンパク質の発現変動を解析した。この結果、GnT-III 遺伝子の発現によりHBV遺伝子の転写は抑制されず、むしろ分泌過程に影響を及ぼしていることが示唆され、この作用に関与すると考えられる分子を同定した。

(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、新規なプロモーターを発見し、プロモーター機能の発現に必要な最小領域を決定した。異なるプロモーターから転写されたmRNAは異なる5'非翻訳領域(5'-UTR)を持つために、GnT-III 及びGnT-V の種々の5'-UTRをGFP遺伝子上流に連結し、翻訳効率を評価した。今後は遺伝子発現制御物質の探索を開始する予定である。

(3) 肝細胞におけるbisecting GlcNAcを持つ糖鎖構造を調べ、bisecting GlcNAcを認識するレクチンであるアネキシンVの細胞内リガンドを同定した。また、肝幹細胞用の細胞株においてbisecting GlcNAc構造が増加していることを見出した。今後はHBVタンパク質とbisecting GlcNAcの関係の有無を解明する一方、再生医療の基盤技術として肝幹細胞の分離法を開発していきたい。 α 1,6-Fucosyltransferase (FUT8) 遺伝子の発現を抑制することによりトリプシノーゲン遺伝子群の発現が低下することおよび細胞増殖が抑制されることを発見した。今後はこのメカニズムを解明し、がん治療への応用の可能性を探る。

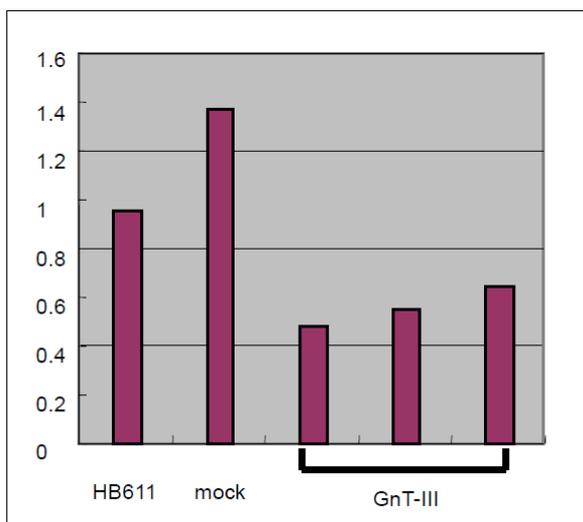


図1 GnT-III遺伝子の発現によるHBs分泌

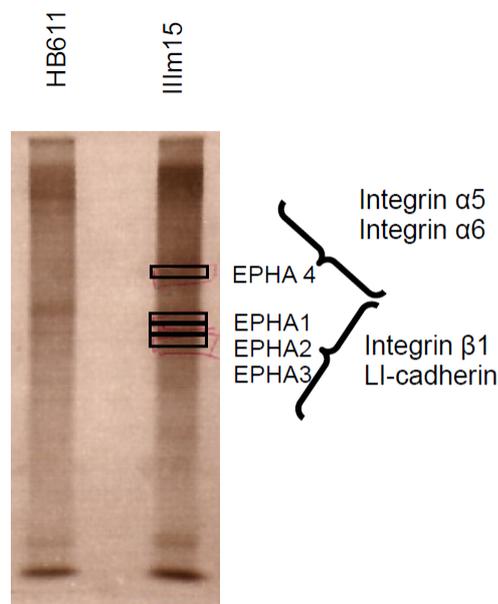


図2 E4-PHAに反応するタンパク質の同定

2. 研究実施内容

(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の解明

HBV抗原及びHBV粒子を産生するHB611細胞にGnT-III遺伝子を導入し、培地中のS抗原(HBs)の量に差が見られるクローンを得た。まず、この分泌抑制がHBs特異的かどうかを調べるため、GnT-III遺伝子導入HB611細胞の培養液中のアルブミン(ALB)、 α 1-アンチトリプシン(α 1AT)、 α フェトタンパク質(AFP)およびHBsの分泌量を抗体染色法で調べた。ALB、 α 1AT、AFPの量はHB611細胞と変わらなかったが、HBsの分泌量のみ低下していることが分かった(図1)。つまりGnT-IIIがHBsの分泌機構を制御していることが確認された。次に、この作用に関与する分子を同定するため、培養液からbisecting GlcNAcを認識するレクチンであるE4-PHAに結合する分子を抽出した。電気泳動と質量分析によりタンパク質を同定し、インテグリン α 5、 α 6、 β 1およびLIカドヘリンであることが分かった(図2)。現在、これらの分子の糖鎖の精密分析を試みている。

プロテオミクス研究において広く用いられている質量分析技術をグライコミクス研究においても用いるべく技術開発を行った。2次元電気泳動ゲルから抽出した微量の糖タンパク質からFmoc-糖鎖を誘導し、キャピラリー電気泳動/質量分析(CE/MS)装置を用いて検出した。糖鎖をCE/MSで分析する方法はそれほど一般的ではないが、Fmoc化することにより効率よくイオン化でき、2価、3価の多価イオンが容易に検出できるなど、質量分析を行うにあたっての基本的な利点があることを確認した。

(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メラノーマの実験的肺転移が抑制されることや、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こと等が報告

されている。したがって、GnT-III遺伝子の発現を誘導し、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。本研究の過程で発見した新規プロモーター及び既知のプロモーターを切り縮めていき、ルシフェラーゼアッセイを行うことによりプロモーター活性発現のための最小領域を決定した。異なるプロモーターから転写されたmRNAは異なる5'非翻訳領域(5'-UTR)配列を持つ。5'-UTRの配列が翻訳効率に与える影響を評価するために、GnT-III及びGnT-V遺伝子の5'-RACEで得られた5'-UTRの下流にGFP遺伝子を連結した。これを培養細胞に導入し、フローサイトメトリーにより細胞あたりのGFPタンパク質量を測定し、リアルタイムRT-PCRにより測定したGFP mRNA量により補正して翻訳効率を求めた。この結果、5'-UTRの長さをはじめいくつかのパラメーターが翻訳効率に影響を及ぼすことがわかった。なお、細胞株の種類が異なってもこの傾向は大差なかった。

今後はGnT-III及びGnT-V遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニングを開始する予定である。

(3) 糖鎖構造の違いに基づいた生物現象の解明

GnT-IIIが作るbisecting GlcNAcを認識するレクチンとしてアネキシンVが同定されている。アネキシンVが結合する肝癌細胞内分子を探索したところ、Hsp47を発見した。アネキシンVと結合するHsp47以外のタンパク質は意外に少なく、bisecting GlcNAcをもつHsp47にのみ特異的に結合した。今後、これらの分子とHBV関連タンパクとの関係を検討してゆきたい。

Hepatic stem-like cellとして知られるRLE細胞の糖鎖構造を解析したところ、種々のレクチンの中でbisecting GlcNAcを認識するE4-PHAとの結合性が著しく強かった。レクチンを用いたフローサイトメトリーでも同様の結果が得られ、さらに質量分析法によってbisecting GlcNAc構造の増加を確認した。このシステムを用いて、現在肝幹細胞の分離を試みている。

FUT8遺伝子ノックアウト(FUT8^{-/-})マウスは成長が遅く、生後短期間のうちに死亡することが知られている。野生型マウスとFUT8^{-/-}マウスの胎児における遺伝子発現を解析したところ、FUT8^{-/-}マウスではトリプシノーゲン遺伝子群の発現が低下しており、酵素活性も同様の傾向を示した。膀胱がん細胞株であるTGP49のFUT8遺伝子発現をRNAiにより抑制したところ、ノックアウトマウスと同様にトリプシノーゲン遺伝子発現の低下と増殖抑制が見られた。今後はFUT8遺伝子発現の抑制によるトリプシノーゲン遺伝子発現減少及び増殖抑制の機構を解明する予定である。

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)細胞・遺伝子治療センター、主幹研究員)

② 研究項目：

1. 糖鎖遺伝子によるウイルス性肝障害の修復
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

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 糖鎖治療学 (タカラバイオ) 寄附講座、
客員教授)

② 研究項目：糖鎖遺伝子によるウイルス性肝障害の修復 (プロテオーム、
グライコーム解析)

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 生化学講座、助教授)

② 研究項目：

1. 糖鎖遺伝子によるウイルス性肝障害の修復
2. 糖鎖関連分子を用いた、新規バイオマーカーの開発

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

- Inamori KI, Endo T, Gu J, Matsuo I, Ito Y, Fujii S, Iwasaki H, Narimatsu H, Miyoshi E, Honke K, and Taniguchi N. N-acetylglucosaminyltransferase IX acts on the GlcNAc β 1,2-Man α 1-Ser/Thr moiety, forming α 2,6-branched structure in brain O-mannosyl glycan. *J Biol Chem.* **279**, 2337-2340, 2004.
- Akita H D, Miyoshi E, Suzuki O, Itoh T, Kinoshita I, Yamazaki K, Nishimura M, Katoh H, and Taniguchi N. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in non-small cell lung cancers: its association with prognosis and histology. *Clinical Cancer Res.* **10**, 1773-1779, 2004.
- Ito Y, Miyoshi E, Sasaki N, Kakudo K, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K, and Miyauchi A. Polo-like kinase 1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma. *Br J Cancer* **90**, 414-418, 2004.
- Ihara S, Miyoshi E, Nakahara S, Sakiyama H, Ihara H, Honke K, Dickson R B, Lin C Y, and Taniguchi N. Addition of β 1-6 GlcNAc branching on matriptase increases the stability to degradation, especially via the

Asn 772 site. *Glycobiology* **14**, 139-146, 2004.

- Gu J, Zhao Y, Isaji T, Shibukawa Y, Ihara H, Takahashi M, Ikeda Y, Miyoshi E, Honke K, and Taniguchi N. β 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III down-regulates neurite outgrowth induced by co-stimulation of epidermal growth factor and integrins through the Ras/ERK signaling pathway in PC12 cells. *Glycobiology* **14**, 177-186, 2004.
- Isaji T, Gu J, Nishiuchi R, Zhao Y, Takahashi M, Miyoshi E, Honke K, Sekiguchi K, and Taniguchi N. Introduction of bisecting GlcNAc into integrin alpha 5beta 1 reduces ligand binding and down-regulates cell adhesion and cell migration. *J Biol Chem.* **279**, 19747-19754, 2004.
- Nakamura Y, Koh M, Miyoshi E, Ida O, Morikawa M, Tokuyama A, Nagano T, Honda Y, Iida J, Yamamoto K, Minami N, Kasahara A, Hirai M, Hayashi N, and Kishimoto T. High prevalence of the hepatitis C virus infection among the inpatients of schizophrenia and psychoactive substance abuse in Japan. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **28**, 591-597, 2004.
- Murata K, Miyoshi E, Ihara S, Noura S, Kameyama M, Ishikawa O, Doki Y, Yamada T, Ohigashi H, Sasaki Y, Higashiyama M, Tarui T, Takada Y, Kannagi R, Taniguchi N, and Imaoka S. Attachment of human colon cancer cells to vascular endothelium is enhanced by N-acetylglucosaminyltransferase V. *Oncology* **66**, 492-501, 2004.
- Kim YS, Hwang SY, Oh S, Sohn H, Kang HY, Lee JH, Cho EW, Kim JY, Yoo JS, Kim NS, Kim CH, Miyoshi E, Taniguchi N, and Ko JH. Identification of target proteins of N-acetylglucosaminyl-transferase V and fucosyltransferase 8 in human gastric tissues by glycomic approach. *Proteomics* **4**, 3353-3358, 2004.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：1件）