

「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

西原 祥子

(創価大学工学部生命情報工学科 教授)

「RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発」

## 1. 研究実施の概要

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し、重要な生理機能を担っている。本研究は、「個体レベルでの糖鎖機能の解明」を目的としている。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「糖鎖の生理機能の全容」を明らかにしようとするものである。

258 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、155 遺伝子について RNAi 変異体を作成して全身で RNAi を誘導したところ、約 70% が致死性を示した。さらに、組織特異的なノックダウンを行ったところ、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。また、同じクラスターに属する遺伝子は遺伝学的相互作用を示し、生体内で同じシグナル経路に関わっている可能性が示唆された。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。

現在、機能する糖鎖のコアタンパク質、作用するレクチン、関与するシグナル伝達カスケードの 3 要素を強く意識した方向に、研究の流れを切り替えている。糖鎖を中心としたこれら 3 要素とのネットワークを、従来の生化学的手法に加えて、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手法を駆使し、解析している。哺乳類培養細胞系を用いた解析も進行中であり、両者を統合することにより糖鎖の種を超えて保存されている生理機能が明らかになると考える。

## 2. 研究実施内容

本研究は、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にした網羅的解析システムからその全容を明らかにし、ヒトをはじめとする哺乳類へと結果の還元を行う。具体的には、(1) ハエ糖鎖関連遺伝子の網羅的単離と同定、(2) 糖鎖関連遺伝子に対するハエ RNAi ノックダウン体の網羅的作成と解析、(3) 解析結果の哺乳類細胞での検討の 3 つの部分から構成されるが、(2) が研究の中心となっている。なお、(1) については、一昨年度までに、ほぼ終了

している。

## (2)糖鎖関連遺伝子に対するショウジョウバエ RNAi ノックダウン体の網羅的作成と解析

### (2-1)ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子 RNAi ノックダウン体の網羅的作成

誘導型 RNAi を利用して変異体を生成するため、遺伝子断片を逆向き反復配列 (IR) の形でベクターに組み込む。ショウジョウバエ個体に顕微注入し、交配実験により導入遺伝子が安定に保持される系統を作出する。

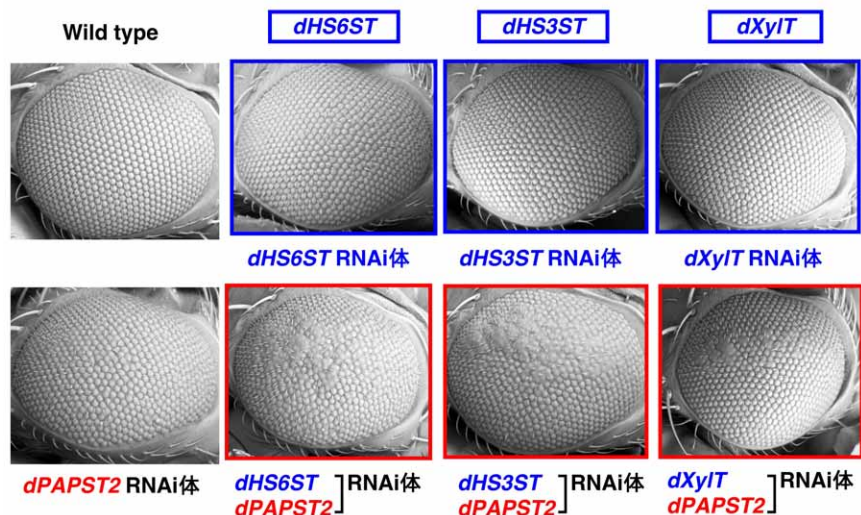
これまで西原によってショウジョウバエゲノムより見出された糖鎖関連遺伝子は 258 遺伝子に及ぶ。網羅的なベクター構築で失敗に終わったものについて、昨年度より再構築を試みている。これにより総計 182 遺伝子 (71%) について IR ベクターを得た。ベクターを導入したハエ系統を作成し、それらを用いて遺伝子機能の解析をおこなっている。

また、上田は本研究以外でも RNAi 変異体を用いた研究をおこなっているが、誘導型 RNAi 法の長所やその限界についての知見を得、本研究へのフィードバックをおこなっている。特に Off-Target 情報に関しては東大・森下研究室の協力を得て、siRNA が交差する可能性を持つ非ターゲット遺伝子を枚挙した。さらにこの配列依存的な Off-Target 効果の可能性を排除するために、mRNA の異なる領域をターゲットする新しいベクターを 54 遺伝子について構築している。

### (2-2)ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子 RNAi ノックダウン体の機能解析

昨年度までに、糖転移酵素を中心に、76 種のショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子については、大まかな表現型の検索は終了したが、他の糖鎖関連遺伝子についても、引き続き、検索を行っている。

この過程で、新規ショウジョウバエ PAPS 輸送体 2 (dPAPST2) を見出した。酵母を用いた異種間発現を行って輸送活性の検討をおこなったところ、dPAPST2 が新規 PAPS 輸送体である事実が明らかになった。dPAPST2 を RNAi によりショウジョウバエ S2 細胞でノック



図：PAPST2 とヘパラン硫酸の合成に関わる遺伝子との遺伝学的相互作用  
各遺伝子だけのノックダウンでは複眼の形成異常は認められないが、ダブルノックダウンを行うと顕著な異常が認められ、PAPST2 と各遺伝子間に遺伝学的作用が確認された。

クダウンしたところ、そのゴルジ画分の PAPS 輸送活性と糖タンパク質への硫酸の取り込みが減少し、dPAPST2 が PAPS 輸送体である事が更に確認された。複眼の形成異常を指標にして、ヘパラン硫酸鎖の合成に関与する硫酸転移酵素(ヘパラン硫酸 3 硫酸転移酵素 B、ヘパラン硫酸 6 硫酸転移酵素)や糖転移酵素( $\beta$  1,4 ガラクトース転移酵素 7、ペプチド *O*-キシロース転移酵素)との間の遺伝学的相互作用解析を行った。図に示したように、これらの遺伝子との間に相互作用が認められ、dPAPST2 が生体内でヘパラン硫酸鎖の合成に関与することが、示唆された。

さらに、ショウジョウバエ  $\beta$  1,4*N*-アセチルガラクトサミン転移酵素 A について、RNAi 体及び変異体を用いた解析から、本酵素が生体内で、*arthro-series* のグライコスフィンゴリピッドの合成に関与するばかりでなく、*N*-結合糖鎖上の LacdiNAc 構造の合成に関与している事も明らかにした。

### (2-3) RNAi ノックダウン体を用いた糖鎖修飾の機能と機構の解析

網羅的スクリーニングの結果同定された表現型の解析を、特定の糖蛋白質に付加している糖鎖に注目して行った。特に、視神経で重要な役割を果たす糖修飾のコア蛋白質の同定を行ったので、そのコア蛋白質に付加される糖鎖の機能を、培養細胞レベルおよびショウジョウバエ個体を用いて解析した。具体的には、コア蛋白質の糖鎖付加アミノ酸に変異を導入し、その変異蛋白質を培養細胞で発現させた。変異蛋白質では、本来持っている細胞接着活性が失われることがわかった。すなわち、糖鎖が細胞接着に重要な役割を果たしていることが明らかになった。ショウジョウバエ個体を用いた解析においては、視神経の形成・維持活性を有しているかを検討している最中である。さらに、その糖鎖の合成過程についても解析も行っている。

### (2-4) SPR によるレクチン分子の探索と解析

ショウジョウバエ新規レクチン分子の探索・解析のため、ヘパラン硫酸部分糖鎖構造などの合成を行った。さらに、糖鎖を化学修飾せずに、還元アミノ化反応を利用してマイルドな条件で金チップに固定化するためのリンカーを開発した。このリンカーには、還元アミノ化反応を効率よく進行させるための芳香族アミノ基と、金と Au-S 結合を形成し、かつ糖鎖との複合体(リガンド複合体と総称)の精製を容易にする分子内環状 S-S 結合が存在する。現在までに、約 70 種類のリガンド複合体を調製し、SPR イメージング用のシュガーチップ調製に用いている。このチップは、約 1 $\mu$ l の溶液を金チップ上へスポットして作成し、1 枚のチップに最大 96 個の糖鎖をリガンドとして固定できる。一例として、38 種類の糖鎖への 5 種類の蛋白質の結合挙動を調べた。それぞれ特異的な糖鎖結合性が観測され、その特異性は従来型の 2 チャンネル型 SPR(SPR-670M)で調べた結果と同様であり、スクリーニング等網羅的解析に用いることが可能であることがわかった。また、結合の相対強度を定量化することもできた。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 「統括グループ」グループ

##### ①研究者名

西原祥子 (創価大学 教授)

##### ②研究項目

- ・ ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の網羅的単離と同定、及び、体系的 RNAi 変異体の分子生物学的・生化学的解析と個々の遺伝子の機能解析、解析結果のヒトへの応用

#### (2) 「遺伝学的機能解析グループ」グループ

##### ①研究者名

上田 龍(国立遺伝学研究所 教授)

##### ②研究項目

- ・ ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の体系的な RNAi 変異体作成とその遺伝学的解析

#### (3) 「発生的機能解析グループ」グループ

##### ①研究者名

後藤 聡(三菱生命研 主任研究員)

##### ②研究項目

- ・ 糖鎖が付加するコア蛋白質の機能と糖修飾機構の解析

#### (4) 「糖鎖構造解析グループ」グループ

##### ①研究者名

豊田 英尚(千葉大学大学院薬学研究院 准教授)

##### ②研究項目

- ・ 野生型、及び、ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子 RNAi 変異体の糖鎖分析

#### (5) 「糖鎖合成グループ」グループ

##### ①研究者名

水野 真盛((財)野口研究所 主任研究員)

##### ②研究項目

- ・ 糖鎖基質、及び、阻害剤の合成

#### (6) 「糖鎖細胞制御グループ」グループ

##### ①研究者名

中村 充(産総研 チームリーダー)

②研究項目

- ・糖鎖関連遺伝子 siRNA 導入哺乳類細胞の性状解析とノックアウトマウスの調製と解析

(7) 「糖鎖チップグループ」グループ

①研究者名

隅田 泰生(鹿児島大学大学院理工学研究科ナノ構造先端材料工学専攻 教授)

②研究項目

- ・糖鎖チップ及び糖鎖固定化金ナノ粒子の調製、それらを用いた解析

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- Zaidman-Remy A, Herve M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, Oh BH, Ueda R, Mengin-Lecreux D, Lemaitre B. The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*, 24, 463-473, 2006.
- Kambris Z, Brun S, Jang IH, Nam HJ, Romeo Y, Takahashi K, Lee WJ, Ueda R, Lemaitre B. *Drosophila* immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. *Curr. Biol.*, 16, 808-813, 2006.
- Brun S, Vidal S, Spellman P, Takahashi K, Tricoire H, Lemaitre B. The MAPKKK Mekk1 regulates the expression of Turandot stress genes in response to septic injury in *Drosophila*. *Genes Cells*, 11, 397-407, 2006.
- Scherfer C, Qazi MR, Takahashi K, Ueda R, Dushay MS, Theopold U, Lemaitre B. The Toll immune-regulated *Drosophila* protein Fondue is involved in hemolymph clotting and puparium formation. *Dev. Biol.*, 295, 156-163, 2006.
- Goda E, Kamiyama S, Uno T, Yoshida H, Ueyama M, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Ueda R, Nishihara S. Identification and characterization of a novel *Drosophila* 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter. *J. Biol. Chem.*, 281, 28508-28517, 2006.
- Kamimura K, Koyama T, Habuchi H, Ueda R, Masu M, Kimata K, Nakato H. Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in *Drosophila* FGF signaling. *J. Cell Biol.*, 174, 773-778, 2006.
- Suda Y, Arano A, Fukui Y, Koshida S, Wakao M, Nishimura T, Kusumoto S, Sobel M. Immobilization and clustering of structurally defined oligosaccharides for sugar chips: An improved method for surface plasmon resonance analysis of protein-carbohydrate interactions. *Bioconj. Chem.*, 17, 1125-1135, 2006.
- Suda Y, Kishimoto Y, Nishimura T, Yamashita S, Hamamatsu M, Saito A, Sato M, Wakao M. Sugar-immobilized gold nano-particles (SGNP): Novel bioprobe for the on-site analysis of the

oligosaccharide protein interactions. *Polymer Preprints*, 47, 156–157, 2006.

- Wijelath ES, Rahman S, Namekata M, Murray J, Nishimura T, Mostafavi-Pour Z, Patel Y, Suda Y, Humphries MJ, Sobel M. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain. Enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ. Res.*, 99, 853–860, 2006.
- Suzuki N, Toyoda H, Sano M, Nishiwaki K. Chondroitin acts in the guidance of gonadal distal tip cells in *C. elegans*. *Dev. Biol.*, 300, 635–646, 2006.
- Sasaki N, Yoshida H, Fuwa TJ, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Hirabayashi Y, Ishida H, Ueda R, Nishihara S. *Drosophila*  $\beta$ 1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase-A synthesizes the LacdiNAc structures on several glycoproteins and glycosphingolipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354, 522–527, 2007.

## (2) 特許出願

平成18年度特許出願：1件（CREST研究期間累積件数：2件）