

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成 15 年度採択研究代表者

野村 一也

(九州大学理学研究院生物科学部門 准教授)

「遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明」

1. 研究実施の概要

生命の第3の鎖とよばれる糖鎖の、多細胞生物での機能を明らかにするためには、モデル生物線虫 *Caenorhabditis elegans* は最適の生物の一つと考えられる。体を作り上げている 1,000 個たらずの細胞が一個・一個同定でき、全細胞系譜と神経回路網が完全に解明されている唯一の多細胞生物である。線虫のゲノム配列には数多くのヒトと共通の糖鎖遺伝子が検出されており、ショウジョウバエ・酵母・マウスなど他のモデル生物の研究結果を参照しながら Functional Glycomics の研究を行えば、単一細胞レベルでの糖鎖機能の解明が可能となり、ヒトでの糖鎖機能の解明に大いに役立つと考えられる。本研究では RNAi 法と遺伝子欠失突然変異株の取得によって、糖鎖関連遺伝子の遺伝子破壊を系統的・戦略的に行い、どのような表現が顕れるかを詳細に解析している。糖鎖の重要な機能を明らかにし、ヒトでの病態解明、疾病治療などに役立てることが目標である。すでに 200 近い糖鎖遺伝子について RNAi を行い、約半数の遺伝子について激しい表現型を確認した。またヒトと共通な基本的糖鎖遺伝子 145 個については RNAi による解析を完了したのみならず、半数近くの遺伝子について遺伝子欠失突然変異株を入手して解析をすすめている。またあらわれた様々な異常の原因を知るために、トランスジェニック解析・プロテオーム解析・生化学解析などもすすめ、糖鎖にまつわる遺伝子ネットワークの解明が着実に前進している。

今後、主要な糖鎖遺伝子について欠失突然変異株を全て取得するとともに、欠失変異株に RNAi を行って表現型を解析するという手法を系統的に用いて、糖鎖遺伝子の細胞分裂制御機構を含む、生命の素過程での働きを明らかにする。また細菌感染やウイルス感染のモデルシステム、あるいは糖鎖に起因するヒトの疾病のモデルシステムを、線虫を用いて開発することも試み、ヒトと線虫の両システムを行き来しながら糖鎖の基本的機能を解明し、人類の福祉の向上に寄与する研究を進める。

2. 研究実施内容

野村グループでは、線虫の遺伝子破壊にともなう表現型の解析方法を整備し、それを応用して

糖鎖にまつわる遺伝子ネットワークの解明をおしすすめることに成功した。ごく少数の線虫サンプルから二次元電気泳動を行い、分離した蛋白質を質量分析で同定する手法を確立した。さらに均一な発生段階の線虫サンプルを線虫ソーターで集めて分析する手法と二次元電気泳動を組み合わせることで高感度の遺伝子発現変動を捉える手法を作り上げた。これらの手法によって従来困難であった糖鎖遺伝子破壊にともなうプロテオーム変動を均一な材料で再現性よく解析することが可能になり、糖鎖遺伝子のネットワーク解析が高い信頼性で可能となると期待される。また、RNAi や欠失突然変異株の解析法を改良し、シャペロン応答を可視化して糖鎖遺伝子の異常をモニターする手法も導入して糖鎖とシャペロンの関係の単一細胞レベルでの解析を可能とした。プロテオグリカン関連遺伝子のノックアウトは、著しい表現型を示すことが明らかになったが、線虫のプロテオグリカンの一つであるヘパラン硫酸の合成酵素と考えられる *rib-1*, *rib-2* 遺伝子の遺伝子欠失突然変異株の解析も終了した。*rib-1*, *rib-2* 欠失突然変異株の発生の様子を、四次元顕微鏡を用いてモニターし、どちらの遺伝子の破壊株も原腸貫入期以降の細胞運動・形態形成運動等の異常で致死になることを単一細胞レベルであきらかにした。北川グループは野村グループの調製した線虫サンプルの生化学的解析を行いヘパラン硫酸の減少を確認するとともに、両遺伝子産物が相互作用してヘパラン硫酸合成がおこることをあきらかにした。またショウジョウバエのヘパラン硫酸も精力的に研究し、線虫との共通点相違点があきらかになった。またコンドロイチン硫酸がマウス細胞でヘルペスウイルスの感染に関与していることを明らかにし、マウスでのコンドロイチンの機能の解明をおしすすめた。野村グループは線虫のコンドロイチン合成酵素のノックアウトで細胞分裂が異常になるメカニズムを解明するため、ノックアウト株と正常株のプロテオームレベルでの比較その他の解析を行い、コンドロイチン付加タンパク質の主要候補を同定、さらに川崎グループがこれを独立に確認した。野村らはバイオインフォマティクスでこの候補蛋白質におけるコンドロイチン糖鎖の結合部位を予測し、川崎らが糖ペプチドの質量分析手法を開発して予測に基づいて解析した結果、上記蛋白質に付加している糖鎖が確かにコンドロイチンであることを世界で初めて確認した。また野村グループは金井グループと共同で線虫のアミノ酸トランスポーターや acetyl CoA トランスポーターの研究をすすめ、生化学的解析と発現解析を行った。川崎グループでは二次元 DIGE 法でも解析し、百数十個のスポットが同定された。

三谷グループは、TMP/UV 法で多数の糖鎖遺伝子のノックアウト株を取得し、致死のものはバランサー導入をおこなった。遺伝子破壊株での遺伝子発現パターンの変動を、蛍光蛋白質遺伝子を導入したトランスジェニック線虫によりハイスループットで検討するため、新たなベクターを開発し、糖鎖遺伝子破壊株のレスキュー実験を含む研究に活用できることとなった。さらに RNAi をもちいたトランスジェニック動物の効率的取得法の開発、遺伝子破壊にともなうスプライシング異常の検出法の開発を完了した。また、糖鎖のシャペロン機能を線虫で探る実験や、糖鎖の細胞内局在や輸送を可視化する手法の開発もすすめている。遺伝子破壊のもう一つの手法である RNAi については、その分子機構の解明が RNAi 実験の結果の解釈には不可欠であることが近年指摘されている。三谷グループは RNAi の分子機構の解明のため、欠失突然変異株を取得し、ノーベル賞受賞者の Mello 教授らと共同で実験を行って基本的メカニズムの解明にも成功した。山下グループは、線虫

の糖鎖構造の決定を行い、従来報告されているのとは異なる糖鎖構造を発見した。これは注意深いサンプル調製が、線虫の糖鎖構造の決定には不可欠であることを示唆するデータであり、検討をすすめている。さらに山下グループは哺乳類に存在するさまざまなレクチンの相同分子を線虫に発見し、クローニングを全て済ませており詳細な解析を開始している。

以上のように線虫で新たな研究手法を開発しつつ、ヒトと哺乳類、ショウジョウバエなどの研究を平行してすすめながら、それぞれから得られたデータを吟味し、糖鎖の生命の基本過程での機能を解明し、疾病の治療や福祉に貢献できる研究成果をめざしている。

3. 研究実施体制

(1)「野村一也」グループ

①研究者名

野村 一也(九州大学理学研究院 助教授)

②研究項目

・線虫糖鎖遺伝子機能の戦略的破壊と破壊結果の解析

(2)「三谷昌平」グループ

①研究者名

三谷 昌平(東京女子医科大学 教授)

②研究項目

・線虫糖鎖関連遺伝子の欠失突然変異体の取得とバランス導入。

・線虫糖鎖関連遺伝子の機能解析、発現解析

(3)「川崎ナナ」グループ

①研究者名

川崎 ナナ(国立医薬品食品衛生研究所 室長)

②研究項目

・線虫タンパク質の質量分析による同定

・糖鎖構造の解析

(4)「山下克子」グループ

①研究者名

山下 克子(東京工業大学 教授)

②研究項目

・線虫ガレクチン lec ファミリーの機能解析

・線虫糖鎖合成酵素の機能解析

(5)「北川裕之」グループ

①研究者名

北川 裕之(神戸薬科大学 教授)

②研究項目

・プロテオグリカンの生化学的解析と機能解析

(6)「金井好克」グループ

①研究者名

金井 好克(杏林大学 教授)

②研究項目

・線虫の糖鎖関連トランスポーターの機能解析

・線虫におけるアミノ酸トランスポーターオルソログの解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Kitagawa H, Izumikawa T, Mizuguchi S, Dejima K, Nomura KH, Egusa N, Taniguchi F, Tamura J, Gengyo-Ando K, Mitani S, Nomura K, Sugahara K.: Expression of *rib-1*, a *Caenorhabditis elegans* homolog of the human tumor suppressor *EXT* genes, is indispensable for heparan sulfate synthesis and embryonic morphogenesis. *J Biol Chem.* **282**, 8533-8544, 2007.
- Gengyo-Ando K, Kuroyanagi H, Kobayashi T, Murate M, Fujimoto K, Okabe S, Mitani S.: The SM protein VPS-45 is required for RAB-5-dependent endocytic transport in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO reports* **8**, 152-157, 2007.
- Uyama, T., Ishida, M., Izumikawa, T., Trybala, E., Tufaro, F., Bergström, T., Sugahara, K., and Kitagawa, H.: Chondroitin 4-*O*-sulfotransferase-1 regulates E disaccharide expression of chondroitin sulfate required for herpes simplex virus infectivity. *J. Biol. Chem.*, **281**, 38668-38674, 2006.
- Kuroyanagi H, Kobayashi T, Mitani S & Hagiwara M: Transgenic alternative splicing reporters reveal tissue-specific expression profiles and regulation mechanisms *in vivo*. *Nature Methods* **3**, 909-915, 2006.
- Gengyo-Ando K, Yoshina S, Inoue H & Mitani S: An efficient transgenic system by TA cloning vectors and RNAi for *C. elegans*. *Biochem Biophys Res Commun.* **349**, 1345-1350, 2006.
- Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen CC, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ, Mello CC.: Analysis of the *C. elegans* Argonaute Family Reveals that Distinct Argonautes Act Sequentially during RNAi. *Cell*, **127**, 747-757, 2006.

- Franks DM, Izumikawa T, Kitagawa H, Sugahara K, Okkema PG: *C. elegans* pharyngeal morphogenesis requires both de novo synthesis of pyrimidines and synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Dev. Biol.*, **296**, 409-420, 2006.
- Kanoh, A., Seko, A., Ideo, H., Yoshida, M., Nomoto, M., Yonezawa, S., Sakamoto, M., Kannagi, R., and Yamashita, K.: Ectopic expression of N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase 2 in chemotherapy-resistant ovarian adenocarcinomas. *Glycoconjugate J.*, **23**, 453-460, 2006.
- Satoh, T., Sato, K., Kanoh, A., Yamashita, K., Kato, R., Nakano, A., and Wakatsuki, S.: Structures of carbohydrate recognition domain of Ca²⁺-independent cargo receptors Emp46p and Emp47p. *J. Biol. Chem.*, **281**, 10410-10419, 2006.

(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: 3 件)