

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成 16 年度採択研究代表者

木下 タロウ

(大阪大学微生物病研究所生体防御研究部門 教授)

「糖鎖の動態-機能相関への統合的アプローチ」

1. 研究実施の概要

糖鎖の機能は、糖鎖の動態に対応して変化する。糖鎖の動態と機能の相関に統合的にアプローチするため、糖鎖動態を時間的流れに沿って、1)糖鎖生合成時の動態、2)糖鎖の膜上動態、3)糖鎖プロセッシングの動態の3つの相に分けてとらえ、各相における機能との相関をとらえることを目標としている。

1)糖鎖生合成時の動態に関し、平成 18 年度は、糖鎖生合成異常に基づく新しい疾患である先天性 GPI アンカー欠損症の病因遺伝子を決定した。臨床症状から、深部血管における凝固系恒常性維持と神経情報伝達の制御に GPI アンカーが重要であることが示唆された。2)糖鎖の膜上動態に関しては、スフィンゴ糖脂質や GPI アンカー型タンパク質が脂質マイクロドメインに組み込まれるメカニズムと機能との関係の解明が重要である。平成 17-18 年度の研究で、GPI アンカーの脂肪酸が PGAP2 と PGAP3 遺伝子の関与のもとゴルジ体膜上で飽和型脂肪酸に置き換えられる脂肪酸リモデリングが起ること、それが脂質マイクロドメインへの組み込みに必要であることを見いだした。また、3)糖鎖プロセッシングの動態に関し、N 型糖鎖の細胞質でのプロセッシングに働く α -マンノシダーゼ Man2C1 の遺伝子をクローニングし、Man2C1 が低下するとプロセッシング異常が起こることを示した。

これらの結果や研究実施内容の項に記載した研究成果は、糖鎖動態の各相における未解明の現象のメカニズムに解答を与えるものであり、今後さらに、それらの不調がもたらす疾患や機能不全状態の解析を行うことにより、機能との相関が明確になるものと期待できる。

2. 研究実施内容

木下タロウグループ

従来 GPI アンカー欠損症としては、後天性の発作性夜間血色素尿症だけが知られていた。共同研究者の Karadimitris らは、先天性 GPI アンカー欠損症の2家系を見いだした。我々の解析で、3 人の患児は、マンノース転移酵素である PIGM の遺伝子のプロモーター領域に点突然変異をホモに持ち、それによって特定の細胞種で PIGM の著しい発現低下を起こしていることがわかった。患

児は、門脈血栓とてんかんを共通症状として示したが、発作性夜間血色素尿症の主症状である溶血性貧血は見られなかった。また、形態形成異常は全く認められなかった。これらのことは、点変異の影響が細胞種によって、また形態形成の過程と完成後で異なっていることを示しており、従来ハウスキーピング遺伝子であると考えられてきた GPI 生合成遺伝子の PIGM が、様々に制御されていることを示唆している。

GPI アンカー型タンパク質は、小胞体で合成された後、ゴルジ体を経て細胞表面の脂質マイクロドメインに組み込まれる。この過程に働く遺伝子群を明らかにする目的で、種々の変異 CHO 細胞株を樹立し、それらの GPI アンカーの構造決定、GPI アンカー型タンパク質の動態解析、責任遺伝子のクローニングを行った。その結果、小胞体でできた GPI アンカー型タンパク質の GPI 部分に含まれる不飽和脂肪酸が、ゴルジ体において PGAP2 と PGAP3 と名付けた 2 つのタンパク質の関与のもと、飽和脂肪酸であるステアリン酸に置換される脂肪酸リモデリングを受けることがわかった。さらに、脂肪酸リモデリングが起これないと、GPI アンカー型タンパク質が脂質マイクロドメインに組み込まれないこともわかった。

池田義孝グループ

昨年度から引き続き、アスパラギン結合型糖鎖のコア構造形成に関与する N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) の活性制御機構の解析を行った。無機ピロリン酸による酵素活性制御機構に関して強い協同性を生み出す構造的基盤を検討した。協同性を発現するためには、多数のポリペプチドからなる多量体を形成することが速度論的観点から強く示唆されるため、どういった分子構成であるのかを調べた。その結果、GnT-III は、おそらく10量体以上の多量体として存在し、これを形成するサブユニット(個々の GnT-III ポリペプチド)間の連絡により強い協同性が発現すると考えられた。ただし、N 末(および C 末)の不揃いに起因する精製酵素の不均一性のため電気泳動やイオン交換クロマトによる正確なサブユニット数の決定には至っていない。また、マンガンイオンを配位するアスパラギン酸残基の変異体についても組み換え酵素を調製しているので、野生型酵素との雑種形成を検討しサブユニット間の相互作用についての解析を進めていく。

一方、N 型糖鎖のコアフコースを合成する α 1,6 フコース転移酵素 (FUT8) の結晶構造中に糖転移酵素としてはユニークな SH3 ドメインを見出しており、酵素活性に対する必要性、ゴルジ装置内における糖鎖生合成への役割等を、変異体酵素を調製し現在検討している。

また、昆虫細胞へ哺乳類 GnT-III 遺伝子を導入し、糖鎖生合成経路を、複合型糖鎖合成を可能にするような改変についても試みている。

大山 カグループ

1. 前立腺特異抗原(PSA)の糖鎖構造解析

前立腺癌特異的な糖鎖構造について検討したところ、前立腺癌患者の血清 PSA には Sialic acid α 2,3 Gal-GlcNAc (2,3GlcNAc) が多く発現していることが明らかになった。そこで ADLib システムを用いて、同構造を認識するモノクローナル抗体の作製を行った。その結果、2,3GlcNAc を認識

する抗体を得ることには成功したが、2,3GlcNAc と Sialic acid alpha 2,6Gal-GlcNAc (2,6GlcNAc)を識別する抗体の取得には至っていない。今後は、2,3GlcNAc 抗体を出発点として fine tuning を行うことで、2,3GlcNAc と 2,6GlcNAc を識別する抗体を取得することを試みる。

2. 前立腺癌の悪性度を反映する新規バイオマーカーの開発

Core2-N-acetylglucosaminyltransferase(C2GnT)が前立腺癌の予後因子として臨床的に有用であることを報告したので、本年度はさらに症例数を加えて検討した。前立腺癌生検組織を用いた抗 C2GnT 抗体による免疫組織化学において、その発現は前立腺癌の悪性度と相関した。さらに前立腺全摘術後の再発予測因子として有望であり、優れたバイオマーカーであることが判明した。

3. 膀胱癌における糖タンパク糖鎖発現の意義

膀胱癌における C2GnT と GnT-V の臨床的意義について検討した。抗 C2GnT 抗体および抗 GnT-V 抗体による免疫染色を行ったところ、C2GnT は深達度および grade が高くなるほど陽性率が高くなり、転移巣では 100%の陽性率であった。逆に GnT-V は前癌状態でも陽性になり、陽性率は表在癌で高く浸潤癌で低かった。表在性膀胱癌に対して TURBT を行った症例で検討すると、GnT-V 陽性例は陰性例よりも再発率が有意に低かった。膀胱全摘を行った症例の生存率の比較では、C2GnT 陽性例は陰性例より生存率が有意に低かった。以上より、GnT-V は膀胱癌の発癌過程の早期において何らかの役割を果たし、C2GnT はその後の浸潤性や転移性の獲得と関連していることが示唆された。

顧 建国グループ

インテグリンは多細胞生物の様々な生物学のプロセスに深く関わる N 結合型糖鎖の主なキャリアータンパク質である。GnT-V の産物である β 1,6 GlcNAc 分枝型糖鎖の細胞表面での発現量は、がん転移の亢進と深く関わる事が明らかとなりつつである。一方、GnT-III によって bisecting GlcNAc が合成されると、ほかの分枝型糖転移酵素(例えば、GnT-V)がこの bisected 糖鎖を基質としないため、糖鎖の伸長反応ができなくなる。我々は、GnT-III が GnT-V のアンタゴニストであろうと考え、がん転移・浸潤と深く関わる標的分子インテグリン α 3 β 1 を用いて、その仮説を証明した。すなわち、ラミニン-5上でのインテグリン α 3 β 1 を介したがん細胞浸潤は、細胞に GnT-III 遺伝子を導入することによって阻害されたが、逆に GnT-V の発現によって促進された。この GnT-V によるがん細胞浸潤の促進は GnT-III の発現によって著しく抑制された。さらに、各細胞から精製したインテグリン α 3 β 1 の糖鎖を解析したところ、GnT-V の糖鎖産物は GnT-III 遺伝子の導入によって顕著に低下していた。以上のことは、GnT-III が GnT-V の機能と拮抗すること、受容体の機能が異なった糖鎖修飾で正または負に制御できることを初めて明らかにしたものである。一方、インテグリンの α と β 鎖は、多数の N-結合型糖鎖付加サイトを持っているので、どのサイトが糖鎖で修飾されるか、どの糖鎖が重要であるかを同定することが必要である。我々は、 α 5 インテグリンの糖鎖サイト 5番はインテグリンの細胞表面発現に、サイト3-5番は機能発現に重要であることを明らかにした。

近藤 玄グループ

糖鎖プロセッシングの動態と機能発現機構を解明するため、前年度に引き続きアンギオテンシン変換酵素(ACE)の GPI アンカー型タンパク質遊離活性を解析するとともに、新たな GPI アンカー切断酵素の同定を行った。

- 1、全身でペプチダーゼ欠損精巣型 ACE (ACE-T)を発現するトランスジェニックマウス系統を作製し、複数の系統で受精異常を見出した。この受精異常発生メカニズムの解明を試み、ACE-T の GPI アンカー切断活性(GPIase)に加えて、ペプチダーゼ活性も受精に関与していることが示唆された。
- 2、ACE-T には、スレオニンリッチで高度に O-glycosilation されている領域が存在し、受精における ACE-T の機能的特異性をもたらしていると予想されている。今回、この領域のスレオニン→アラニン置換体を作製し、COS7 細胞で発現させたところ、野生型に比べて低分子量の組換えタンパク質を得ることができた。
- 3、市販の肺由来 ACE(ACE-S)をゲルろ過分離し、各分画における GPIase 活性を調べたところ ACE-S の分画とは別の分画にも強い GPIase 活性が存在した。さらにこの活性を担うと思われる分子量 60kDa のタンパク質を見出した。

菅原一幸グループ

本研究の目的はプロテオグリカンの糖側鎖硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)の生合成と分解の両面から、機能を解明することである。今年度は線虫の3種類の GAG 生合成変異株の解析を行い、GAG の合成異常が形態形成異常を引き起こすことを示した。また、脳のコンドロイチン硫酸(CS)とデルマトン硫酸(DS)の混成鎖が神経突起伸長活性を有し、シグナル分子をリクルートして活性を発揮することを示した。特に小脳の発達における CS/DS 鎖の生合成の重要性を示した。また、ヘルペスウイルスの感染に解細胞表面の CS-E がレセプターとして機能し、その生合成の鍵酵素を同定した。一方、GAG の機能解析の重要なツールである数種の単クローン抗体の認識する CS 機能ドメインの構造を解明した。今後は、GAG 鎖の機能発現に介在するさらに多くのシグナル分子を同定し、CS や DS の分解面からも機能解明へのアプローチを展開し、これらの糖鎖の機能調節を合成と分解の両面から統合的に理解したい。

鈴木匡グループ

真核細胞の細胞質に広く遊離の N 型糖鎖が蓄積、プロセスの分子機構の全容を明らかにすることが本研究の目的である。18 年度は細胞質において遊離糖鎖の代謝を担うマンノシダーゼの遺伝子の同定と、その阻害における遊離糖鎖の蓄積現象を見出し、論文に発表した。また、まだ遺伝子が同定されていない細胞質キトビナーゼのアッセイ系の検討を開始した。また蛍光標識した遊離糖鎖の HPLC による分離条件を確立し、その溶出位置の同定に使うスタンダードの作成が修了した。

田口友彦グループ

リサイクリングエンドソームの機能の解明を目的として実験を進めている。平成18年度は、まずリサイクリングエンドソームを光学顕微鏡の解像度で視覚的に分離可能な細胞のスクリーニングを行い、COS-1 細胞が非常に秀でていたことを見出した。多くの細胞では、リサイクリングエンドソーム・初期エンドソーム・ゴルジ体が核近縁部に混在した状態で認められるのに対して、COS-1 細胞では、ゴルジ体が綺麗なリング状の構造を、リサイクリングエンドソームがそのリングの内側に、また初期エンドソームはリングのやや外側に位置するという、非常にユニークな空間的配置を示す。この細胞を利用することによって、細胞内膜輸送経路がリサイクリングエンドソームと交差しているかどうかを簡便にそして正確に判断することができるようになった。

この特長を活かして、細胞膜から小胞体へ至る“逆行性膜輸送経路”にリサイクリングエンドソームが関与するかどうかを検討した。逆行性膜輸送の特異的リガンドとして蛍光標識したコレラ毒素を用い、低温処理やリサイクリングエンドソームの特異的不活性化処理を組み合わせることにより、細胞膜からゴルジ体・小胞体へ至る経路にリサイクリングエンドソームが介在し、更にリサイクリングエンドソームの通過が逆行性膜輸送に必要な不可欠であることを示すことができた。また、この現象はコレラ毒素に限らず、シガ毒素でも起こることも明らかとなった。この一連の結果は、リサイクリングエンドソームが“ラフト”と呼ばれる特殊な膜構成要素の形成・輸送に深く関与することを示唆するものである。

田口 良グループ

哺乳動物の GPI アンカーに特徴的なアルキルアシル型ホスファチジルイノシトールの生合成機構を明らかにするため、木下グループとの共同で GPI アンカー生合成変異細胞株の数種類を持ちいて、これらの変異株において蓄積される GPI アンカー前駆体糖脂質の微細構造を質量分析により解析した。その結果、前駆体初期合成反応の GlcN-PI から GlcN-acylPI へのアシル化の過程で sn-1 位がアルキル型の分子種の割合がアシル型のものに対して急激に増加している事を発見した。このことから、sn-1 位のアルキル体の増加が、小胞体膜における GlcN-PI の細胞質側から内腔側への輸送の過程での選択か、イノシトールへのアシル化反応を触媒する酵素の基質選択性による可能性、あるいは、アシルからのアルキルへの未知のリモデリング反応の存在による可能性が考えられる。

和田 芳直グループ

グライコプロテオームを主題として、質量分析による糖タンパク質の部位特異的糖鎖構造解析技術の開発と実施、さらに細胞融合機構について研究を行い、下記の成果を挙げた。

- (1) フコース付加異性体の質量分析による識別法を確立した。今後はチーム内共同研究などにおいて実試料で高感度分析を行う予定である。
- (2) シアル酸のガラクトースに対する結合位置の違い(2-3, 2-6)による異性体識別を、量子化学計算で得た結合エネルギーから理論予測し、実測と照合した。

(3) O 結合型糖鎖のうちムチン型(コア I)糖鎖付加修飾に関し、血漿タンパク4種について新しいムチン型糖鎖付加部位を決定した。IgA1 など血漿中に豊富なムチン型糖鎖付加糖タンパク質の除去に改善を加えて解析を加速する予定である。

(4) 細胞融合を制御する分子を発見した。

3. 研究実施体制

木下タロウグループ

①研究者名

木下 タロウ(大阪大学微生物病研究所 教授)

②研究項目

- ・ GPI アンカー型タンパク質の生合成時の動態の解明
- ・ GPI アンカー型タンパク質の脂質ラフトへの組み込みメカニズムの解明

池田義孝グループ

①研究者名

池田 義孝(佐賀大学医学部 教授)

②研究項目

- ・ アスパラギン結合型糖鎖のアセンブリと多様性の制御機構

大山 カグループ

①研究者名

大山 力(弘前大学 教授)

②研究項目

- ・ 前立腺特異抗原 (PSA)の糖鎖構造解析
- ・ 前立腺癌の悪性度を反映する新規バイオマーカーの開発
- ・ 膀胱癌における糖タンパク糖鎖発現の意義に関する検討

顧 建国グループ

①研究者名

顧 建国(東北薬科大学 教授)

②研究項目

- ・ M結合型糖鎖による細胞膜受容体の機能制御とそのメカニズムの解析

近藤 玄グループ

①研究者名

近藤 玄(京都大学 助教授)

②研究項目

- ・糖鎖プロセッシングの動態と機能発現

菅原 一幸グループ

①研究者名

菅原 一幸(北海道大学 教授)

②研究項目

- ・グリコサミノグリカンの動態-機能相関への統合的アプローチ

鈴木 匡グループ

①研究者名

鈴木 匡(大阪大学 特任助教授)

②研究項目

- ・細胞質における遊離糖鎖のプロセッシング機構とその生物学的重要性

田口友彦グループ

①研究者名

田口 友彦(大阪大学 特任助教授(常勤))

②研究項目

- ・エキソ・エンドサイトーシスに関与する輸送小胞の形成機構の解明

田口 良グループ

①研究者名

田口 良(東京大学 客員教授)

②研究項目

- ・質量分析法による GPI アンカーの詳細構造決定システムの動態理解への応用

和田 芳直グループ

①研究者名

和田 芳直(地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター 研究所長)

②研究項目

- ・部位特異的な糖鎖構造解析と糖鎖合成疾患解析への応用

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

(国際)

- Almeida, A., Y. Murakami, M. Layton, P. Hillmen, G. S. Sellick, Y. Maeda, S. Richards, S. Patterson, I. Kotsianidis, L. Mollica, D. Crawford, A. Baker, M. Ferguson, I. Roberts, R. Houlston, T. Kinoshita and A. Karadimitris., Hypomorphic promoter mutation in the mannosyltransferase-encoding *PIG-M* gene causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nat. Med.*, 12:846-851, 2006.
- Maeda, Y., H. Ashida and T. Kinoshita., CHO glycosylation mutants: GPI anchor. *Methods Enzymol.*, 416: 182-205, 2006.
- Shin DJ, Kang JY, Kim YU, Yoon JS, Choy HE, Maeda Y, Kinoshita T, and Hong Y., Isolation of new CHO cell mutants defective in CMP-sialic acid biosynthesis and transport. *Mol Cells*, 22:343-52, 2006.
- Maeda Y., Y. Tashima, T. Houjou, M. Fujita, T. Yoko-o, Y. Jigami, R. Taguchi, and T. Kinoshita. Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association. *Mol. Biol. Cell*, 18(4):1497-506, 2007.
- Ihara H, Ikeda Y, Toma S, Wang X, Suzuki T, Gu J, Miyoshi E, Tsukihara T, Honke K, Matsumoto A, Nakagawa A, Taniguchi N. Crystal Structure of Mammalian {alpha}1,6-Fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology. in press.*
- Li W, Takahashi M, Shibukawa Y, Yokoe S, Gu J, Miyoshi E, Honke K, Ikeda Y, Taniguchi N. Introduction of bisecting GlcNAc in N-glycans of adenyl cyclase III enhances its activity. *Glycobiology. in press.*
- Takahashi T, Hagsawa S, Yoshikawa K, Tezuka F, Kaku M, Ohyama C. Predictive value of N-acetylglucosaminyltransferase-V for superficial bladder cancer recurrence. *J. Urol.* 175(1):90-93, 2006.
- Ishimura H, Takahashi T, Nakagawa H, Nishimura S, Arai Y, Horikawa Y, Habuchi T, Miyoshi E, Kyan A, Hagsawa S, Ohyama C. N-acetylglucosaminyltransferase V and beta1-6 branching N-linked oligosaccharides are associated with good prognosis of patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 12(8):2506-2511, 2006.
- Hoshi S, Yamaguchi O, Fujioka T, Arai Y, Tomita Y, Habuchi T, Ohyama C, Suzuki T, Orikasa S; The Tohoku Prostate Cancer Study Group. A randomized comparative study of endocrine monotherapy and a combination of estramustine phosphate with the endocrine therapy in patients with untreated stage D prostate cancer. *Int J Clin Oncol.* 11(4):303-308, 2006.
- Koie T, Hatakeyama S, Yoneyama T, Ishimura H, Yamato T, Ohyama C. Experience and functional outcome of modified ileal neobladder in 95 patients. *Int. J. Urol.* 13(9):1175-1179, 2006.

- Li W, Nakagawa T, Koyama N, Wang X, Jin J, Mizuno-Horikawa Y, Gu J, Miyoshi E, Kato I, Honke K, Taniguchi N and Kondo A. Down regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in alpha1,6-fucosyltransferase-deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity. *Glycobiology*. 16:1007-19, 2006.
- Nakagawa T, Uozumi N, Nakano M, Mizuno-Horikawa Y, Okuyama N, Taguchi T, Gu J, Kondo A, Taniguchi N, and Miyoshi E. Fucosylation of N-glycans regulates the secretion of hepatic glycoproteins into bile ducts. *J. Biol. Chem.* 281: 29797-29806, 2006
- Zhao, Y., Nakagawa, T., Itoh, S., Inamori, K. I., Isaji, T., Kariya, Y., Kondo, A., Miyoshi, E., Miyazaki, K., Kawasaki, N., Taniguchi, N., and Gu, J. N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.* 281: 32122-32130, 2006.
- Isaji, T., Sato, Y., Zhao, Y., Miyoshi, E., Wada, Y., Taniguchi, N., and Gu, J. N-glycans on the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit are essential for alpha5beta1 heterodimerization, expression on the cell surface and its biological function. *J. Biol. Chem.* 281: 33258-33267, 2006.
- Nakahara S., Saito, T., Kondo, N., Moriwaki, K., Noda, K., Ihara, S., Takahashi, T., Ide, Y., Gu, J., Inohara, H., Katayama, T., Tohyama, M., Takeshi Kubo, T., Taniguchi, N., and Miyoshi, E. A secreted type of β 1.6 N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V), a novel angiogenesis inducer, is regulated by γ -secretase. *FASEB J.* 20:2451-9, 2006.
- Zhao, Y., Itoh, S., Wang, X., Isaji, T., Miyoshi, E., Kariya, Y., Kondo, A., Miyazaki, K., Kawasaki, N., Taniguchi, N., and Gu, J. Deletion of core fucosylation on alpha3beta1 integrin down-regulates its functions. *J. Biol. Chem.* 281: 38343-38350, 2006.
- Rhee, J. M., M. K. Pirity, C. S. Lackan, J. Z. Long, G. Kondoh, J. Takeda, and A-K. Hadjantonakis: In vivo imaging and differential localization of lipid-modified GFP-variant fusions in embryonic stem cells and mice. *Genesis*, 44, 202-218, 2006.
- Kitagawa, H., Izumikawa, T., Mizuguchi, S., Dejima, K., Nomura, K. H., Egusa, N., Taniguchi, F., Tamura, J., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Nomura, K., and 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 (11), 8533-8544. 2007.
- Deepa, S. S., Kalayanamitra, K., Ito, Y., Kongtawelert, P., Fukui, S., Yamada, S., Mikami, T., and Sugahara, K. Novel sulfated octa- and decasaccharides from squid cartilage chondroitin sulfate-E: Sequencing and their application for determination of the epitope structure of monoclonal antibody MO-225. *Biochemistry*, 46 (9), 2453-2465, 2007.
- Li, F., Shetty, A. K., and Sugahara, K. Neuritogenic activity of chondroitin/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brain and their mimicry from shark liver: Involvement of the

- pleiotrophin and hepatocyte growth factor signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 282 (5), 2956-2966, 2007.
- Blanchard, V., Chevalier, F., Imberty, A., Leeflang, B. R., Basappa, Sugahara, K., and Kamerling, J. P. Conformational studies on five octasaccharides isolated from chondroitin sulfate using NMR spectroscopy and molecular modeling. *Biochemistry*, 46 (5), 1167-1175, 2007.
- Nakagawa, H., Hama, Y., Sumi, T., Li, S. C., Maskos, K., Kalayanamitra, K., Mizumoto, S., Sugahara, K., and Li, Y. T. Occurrence of a non-sulfated chondroitin proteoglycan in the dried saliva of *collocalia* swiftlets (edible bird's nest). *Glycobiology*, 17 (2), 157-164, 2007.
- Uyama, T., Ishida, M., Izumikawa, T., Trybala, E., Tufaro, F., Bergstrom, 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 (50), 38668-38674, 2006.
- Pothacharoen, P., Ong-Chai, S., Supaphun, J., Kumja, P., Wanaphirak, C., Sugahara, K., Hardingham, T., and Kongtawelert, P. Raised serum chondroitin sulfate epitope level in ovarian epithelial cancer. *J. Biochem.*, 140 (4), 517-524, 2006.
- Franks, D.M., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Sugahara, K., and Okkema, P.G. *C. elegans* pharyngeal morphogenesis requires both *de novo* synthesis of pyrimidines and synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Dev. Biol.*, 296 (2), 409-420, 2006.
- Mitsunaga, C., Mikami, T., Mizumoto, S., Fukuda, J., and Sugahara, K. Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains in the development of cerebellum: Spatiotemporal regulation of the expression of critical disulfated disaccharides by specific sulfotransferases. *J. Biol. Chem.*, 281 (28), 18942-18952, 2006.
- Deepa, S. S. Carulli, D., Galtrey, C., Rhodes, K., Fukuda, J., Mikami, T., Sugahara, K., and Fawcett, J. W. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: A different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 281 (26), 17789-17800, 2006.
- Dejima, K., Seko, A., Yamashita, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Sugahara, K., Mizuguchi, S., and Nomura, K. Essential roles of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase in embryonic and larval development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 281 (16), 11431-11440, 2006.
- T. Suzuki, and Y. Funakoshi, Free oligosaccharides; formation and degradation (review article). *Glycoconjugate J* 23, 291-302, 2006..
- T. Suzuki, I. Hara, M. Nakano, M. Shigeta, T. Nakagawa, A. Kondo, Y. Funakoshi, and N. Taniguchi, Man2C1, an α -mannosidase is involved in the trimming of free oligosaccharides in the cytosol. *Biochem. J.* 400, 33-41, 2006.
- Tanaka K, Takenaka S, Tsuyama S, Wada Y. "Determination of unique amino acid substitutions in

protein variants by peptide mass mapping with FT-ICR MS" *J Am Soc Mass Spectrom* 17, 508-513, 2006.

- Nakamori Y, Emoto M, Fukuda N, Taguchi A, Okuya S, Tajiri M, Miyagishi M, Taira K, Wada Y, Tanizawa Y. "Myosin motor Myo1c and its receptor NEMO/IKK- γ promote TNF- α -induced serine307 phosphorylation of IRS-1" *J Cell Biol* 173, 665-671, 2006.
- Wada Y, Azadi P, Costello CE, Dell A, Dwek RA, Geyer H, Geyer R, Kakehi K, Karlsson NG, Kato K, Kawasaki N, Khoo K-H, Kim S, Kondo A, Lattova E, Mechref Y, Miyoshi E, Nakamura K, Narimatsu H, Novotny MV, Packer NH, Perreault H, Peter-Katalinic J, Pohlentz G, Reinhold VN, Rudd PM, Suzuki A, Taniguchi N. "Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans—HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study" *Glycobiology* 17: 411-422, 2007.

(2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 2 件 (CREST 研究期間累積件数: 11 件)