

「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である。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。

この目的のために、ヒトのゲノムに存在する糖鎖関連遺伝子を、バイオインフォマティクスなどを駆使して選び出し、その線虫オーソログの遺伝子機能を系統的・戦略的に破壊してその効果を検討することで糖鎖の機能を次々と明らかにしている。今年度までに糖転移酵素、糖脂質合成酵素や分解酵素、糖鎖と結合するレクチン、糖鎖の硫酸化に関わる全遺伝子、GPI アンカー構造合成に関わる全ての酵素や糖鎖関連のトランスポーターについて RNAi を行い、約半数以上の遺伝子について激しい表現型を確認した。同時平行で進めている遺伝子欠失突然変異株の取得では RNAi では異常がみられない糖鎖遺伝子でも激しい異常が確認される例も多かった。これらの実験結果は糖鎖が生命にとって不可欠の働きを果たしているというゆるぎのない証拠である。また遺伝子破壊の結果顕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・生化学解析なども進め、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。特に細胞分裂と関わる糖鎖の遺伝子ネットワークについては詳細な検討を加えており、既に明らかにしたコンドロイチン以外にも重要な糖鎖遺伝子の細胞分裂への関わりを明らかにしている。最近、血液凝固剤のヘパリンに硫酸化されたコンドロイチンが混ざっていたため多数の死者を出すという

事件があったが、私達のチームのコンドロイチンのマスペクトルによる分析法はこうした事件の対処にも大いに役立つものである。

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。また線虫を用いた細菌感染やウイルス感染のモデルシステム、ヒトの疾病のモデルシステム、あるいは糖鎖による細胞分化の制御システムを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たい。

2. 研究実施内容

糖鎖の機能を戦略的、系統的に解明するためヒトの糖鎖関連遺伝子のオーソログを線虫で同定し、その遺伝子機能を RNAi (RNA 干渉法) や遺伝子ノックアウト株 (欠失突然変異株) の取得と解析によって明らかにする研究を進めている。野村グループでは、糖鎖の硫酸化にかかわる様々な遺伝子の RNAi による全ノックアウトを終えて、既に明らかにした PAPS 合成酵素のノックアウトと関連した表現型を示す数種の遺伝子を新たに同定し発現解析を終了した。この中には PAPS トランスポーターや関連トランスポーター遺伝子が含まれており、さらにチロシン硫酸化酵素も含まれている。これらのノックアウト・ノックダウン株は発生の後期で致死を含む異常を示しており、すでに発表したヘパリン硫酸の合成に関わる遺伝子のノックアウト結果と比較しながら線虫での硫酸化糖鎖と硫酸化の機能解析を進めている。また以前から進めている糖脂質関連の研究では全てのグルコシルセラミド合成酵素やセリンパルミトイル合成酵素遺伝子、主要なグルコシルセラミド分解酵素のノックアウト株などを取得し発現解析と生化学的解析を終え、RNAi 実験と併せて糖脂質関連遺伝子の機能解析を終了した。この結果、これらの酵素は胚発生の後期で不可欠な働きをしていることが判明し、ヒトの病気との関連の解析のてがかりが得られた。さらに GPI アンカー構造の合成酵素全ての RNAi でのノックアウトを完了し、そのいくつかで胚致死の表現型を確認した。さらに線虫での GPI アンカー型蛋白質のプロテオーム解析によるスクリーニングを行い、多数の GPI アンカー型蛋白質候補を同定することにも成功した。これは、硫酸化、糖脂質合成、GPI アンカーなどが多細胞生物にとって不可欠の遺伝子であることを明らかにする研究結果である。さらに細胞分裂に関わるプロテオグリカン遺伝子や糖鎖遺伝子の網羅的スクリーニングと RNAi 実験を行い、コンドロイチンの細胞分裂制御機構のおおまかな遺伝子ネットワークの解明に成功した。この目的のため川崎グループと共同でプロテオグリカンに付加しているコンドロイチン糖鎖の同定手法も確立したが、この手法はヘパリンに混入して多数の死者を出すなどした過硫酸型コンドロイチン硫酸の分析などに必須の手法であり今後、医薬品の品質管理に極めて役立つと期待される。さらに N 型糖鎖の合成に関わる遺伝子のノックアウト結果からはストレス応答との関連が確認され、引き続き細胞内での糖鎖合成と細胞内輸送、ストレス応答とスプライシングなどの関連を研究する予定であ

る。川崎グループは上記のコンドロイチン糖鎖の同定の研究に加えて、糖鎖遺伝子ノックアウト株のプロテオーム解析、線虫でのシアル酸の存否の検討、LC/MS/MS 技術開発を行い、糖鎖の解析技術の開発改良を進めることに成功した。三谷グループは、線虫の遺伝子欠失突然変異株の取得とバランス手法を改良し、蛍光バランスを用いて効率的に糖鎖遺伝子の変異株をスクリーニングできるようにして研究を大きく前進させた。さらに線虫での遺伝子操作技術の改良も進めている。またアポトーシスと phosphatidylserine の関係を解析する研究は、野村グループによるセリンパルミトイル合成酵素のノックアウト結果との関連から、極めて重要な研究成果であると考えられる。またN型糖鎖の付加による品質管理やスプライシングとストレス応答の研究も進めており、野村グループとの緊密な研究が進んでいる。山下グループは、ヒトや哺乳類の研究で得られた成果を着々と線虫にフィードバックしながら野村グループ、三谷グループと共同で糖鎖機能を解明する研究を進めている。レクチンである VIP36 や galectin の研究を線虫に移すことでこれらのレクチンの機能に関する研究を飛躍的に進展させることに成功しつつある。金井グループは野村グループと共同で、糖鎖合成や糖鎖修飾とカップルしている可能性の高いアミノ酸トランスポーターの解析やアセチル CoA トランスポーターの解析を進めている。SLC7 ファミリーの線虫遺伝子を網羅的に解析し、糖タンパク質と相互作用するトランスポーターを同定したり、神経細胞特異的に発現するトランスポーターを同定するなど興味深い成果を得つつある。北川グループはコンドロイチン合成酵素の細胞分裂での役割を哺乳類で調べる研究を進めており、コンドロイチン合成酵素の新しい構成分子を同定し、その多分子複合体としての機能実態を明らかにすることに成功している。また野村グループと共同でヘパラン硫酸の硫酸化などの生化学的測定も進めている。

以上、各研究グループの有機的な連携によって、糖鎖機能の多細胞生物での基本的な役割が解明されその医学生物学への応用が進むことを念頭におきつつ研究を進めている。

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)
- 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)
- 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)

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)

② 研究項目

- ・線虫レクチンファミリーの機能解析・線虫糖鎖生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)

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(大阪大学)

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)

- Akira Harazono, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi-Nakajima, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi: Simultaneous glycosylation analysis of serum glycoproteins by LC/MS/MS. **J. Chromatogr. B** (2008, [accepted](#))
- Izumikawa, T., Koike, T., Shiozawa, S., Sugahara K., Tamura, J., and Kitagawa, H. Identification of chondroitin sulfate glucuronyltransferase as chondroitin synthase-3 involved in chondroitin polymerization: Chondroitin polymerization is achieved by multiple enzyme complexes consisting of chondroitin synthase family members. **J. Biol. Chem.** 2008 [in press](#).
- Darland-Ransom M, Wang X, Sun C-L, Gengyo-Ando K, Mitani S and Xue D: The important role of the *C. elegans* aminophospholipid translocase TAT-1 in maintaining plasma membrane

phosphatidylserine asymmetry. *Science*, in press.

- Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Yukari Matsuishi, Masashi Toyoda, Yoko Katagiri, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akihiro Umezawa, Teruhide Yamaguchi: Study on the quality control of cell therapy product: Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Furrier transformation ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1160**, 263-269 (2007).
- Izumikawa, T., Uyama, T., Okuura, Y., Sugahara, K., and Kitagawa, H. Involvement of chondroitin sulfate synthase-3 (chondroitin synthase-2) in chondroitin polymerization through its interaction with chondroitin synthase-1 or chondroitin polymerizing factor. *Biochem. J.*, **403**(3), 545-552 (2007).
- Satoh, T., Cowieson, N.P., Hakamata, W., Ideo, H., Fukushima, K., Kurihara, M., Kato, R., Yamashita, K., and Wakatsuki, S. Structural basis for recognition of high mannose type glycoproteins by mammalian transport lectin VIP36, *J. Biol. Chem.*, **282**, 28246-28255 (2007).
- Ideo, H., Seko, A., and Yamashita, K. Recognition mechanism of galectin-4 for sulfated compounds, *J. Biol. Chem.*, **282**, 21081-21089 (2007).
- Wang X, Wang J, Gengyo-Ando K, Gu L, Sun C-L, Yang C, Shi Y, Kobayashi T, Shi Y, Mitani S, Xie X-S & Xue D: *C. elegans* mitochondrial factor WAH-1 promotes phosphatidylserine externalization in apoptotic cells through phospholipid scramblase SCRM-1. *Nature Cell Biology* **9**, 541-549 (2007).
- Kobayashi T, Gengyo-Ando K, Ishihara T, Katsura I & Mitani S: IFT-81 and IFT-74 are required for intraflagellar transport in *C. elegans*. *Genes to Cells* **12**, 593-602 (2007).
- Peden E, Kimberly E, Gengyo-Ando K, Mitani S and Xue D: Control of sex-specific apoptosis in *C. elegans* by BarH homeodomain protein CEH-30 and transcriptional repressor UNC-37/Groucho. *Genes & Dev.* **21**, 3195-3207 (2007).
- Kuroyanagi H, Ohno G, Mitani S and Hagiwara M: Fox-1 family and SUP-12 coordinately regulate tissue-specific alternative splicing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8612-8621 (2007).
- Hisamoto N, Moriguchi T, Urushiyama S, Mitani S, Shibuya H, and Matsumoto K: *C. elegans* WNK-STE20 pathway regulates tube formation by modulating ClC channel activity. *EMBO Reports* **9**, 70-75 (2008).

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:0 件 (CREST 研究期間累積件数:3 件)