

「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  
免疫学フロンティア研究センター・糖鎖免疫学・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。本研究チームでは、糖鎖の動態と機能の相関に統合的にアプローチし、新たな相関をとらえることを目標としている。本年度の主な進捗は、1) 昨年度報告した糖鎖生合成異常に基づく新しい疾患である先天性 GPI アンカー欠損症に関し、プロモーター変異の影響を回復させる手法を見出し、英国の共同研究者によって臨床応用され、著しい症状の改善をもたらした。2) 昨年度、GPI アンカー型タンパク質の脂質マイクロドメインへの組込みに脂肪酸リモデリングが必須であることを見出したので、その生理的意義を明らかにするため、脂肪酸リモデリング遺伝子である PGAP3 のノックアウトマウスを作製し、解析を開始した。3) 哺乳動物 GPI アンカーの特徴である 1-アルキル 2-アシル型ホスファチジルイノシトールが、小胞体での GPI 生合成の途上でジアシル型から変換されてできることを見出した。4) 血清 PSA レベルの上昇が前立腺腫瘍マーカーに用いられているが、前立腺肥大症や炎症でもみられる欠点がある。腫瘍患者血清の PSA は、N-グリカンに  $\alpha$  2,3 シアル酸を持っており、精漿 PSA が  $\alpha$  2,6 シアル酸しか持っていないのと明確に異なっていることを見出し、より腫瘍特異性の高い診断法開発に用いられる可能性を示した。これらの進捗内容や研究実施内容の項に記した成果は、糖鎖の動態・機能相関の理解を進展させるものであり、今後さらに疾患の診断、治療への寄与に繋がると期待できる。

## 2. 研究実施内容

### 木下 タロウグループ

GPI アンカー型タンパク質は、小胞体で生成された GPI がタンパク質に翻訳後修飾され、分泌経路でゴルジ体へ輸送後、さらに細胞表面の脂質ラフトに濃縮されて様々な機能を発揮する。本研究では、その一連の過程で起こる GPI アンカーの構造変化とそれを担う遺伝子を解明し、機能発現との関連を明らかにすること、さらにこの過程の欠損が起こす疾患の研究から、この過程自体の生理的意義を明らかにすることを目標にしている。

昨年度までに、GPI アンカーは、小胞体ではホスファチジルイノシトール(PI)の sn2 に不飽和脂肪酸を持つ形で合成され、タンパク質への付加後、ゴルジ体で sn2 鎖が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、不飽和脂肪酸の除去に PGAP3 が、ステアリン酸の付加に PGAP2 が必要であること、このリモデリングを受けてはじめて GPI アンカー型タンパク質が脂質ラフトに濃縮される事がわかった(Maeda et al, Mol Biol Cell, 2007)。H19 年度は、脂肪酸リモデリングの生理的意義を明らかにするため、PGAP3 遺伝子のノックアウトを可能にする PGAP3<sup>fllox</sup> マウスを作製し、Cre トランスジェニックマウスとの交配を開始した。

ヒトと哺乳動物の GPI アンカーに含まれる PI は、1-アルキル 2-アシル型が主であるが、この特殊な構造が生合成のどの段階でどのようにしてできるかを田口良グループと共同で解明しようとしている。田口良グループが、生合成中間体の構造を決定した結果、GPI の生合成は細胞内在性のジアシル型 PI を使って開始され、第 2 段階のグルコサミン-PI までは、ほぼ内在性の PI そのままであること、第 3 段階のグルコサミン-アシル PI で劇的に 1-アルキル 2-アシル型に変化することがわかった(Houjou et al, J Lipid Res, 2007)。さらに、そのときの 2 本の脂肪鎖の組成は、タンパク質に付加され、脂肪酸リモデリングを受ける前の GPI アンカーの脂肪鎖組成とほぼ同様であったので、第 3 段階以後はタンパク質へ付加されるまで、そのままの PI 部分が維持されることがわかった。現在、GPI のアルキル鎖が、ペルオキシゾームに存在するアルキルリン脂質合成経路によって合成されるかを、同経路の欠損細胞株を用いて解析している。

昨年度に英国のグループとの共同研究で、先天性 GPI アンカー欠損症をはじめて見出し、2 家系 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、それによって好中球、B 細胞など特定の細胞種で PIGM の著しい発現低下を起こしていることを報告した(Almeida, Murakami et al, Nat Med, 2006)。H19 年度は、プロモーター領域の点変異が、ヒストン H4 のアセチル化の低下を起こし、PIGM の転写の低下を来すことを見出した。患者由来の B 細胞株を、ヒストン脱アセチル酵素の阻害剤である NaButyrate 存在下で培養すると、ヒストン H4 のアセチル化が回復し、PIGM の転写が回復し、細胞表面の GPI アンカー型タンパク質の発現が正常化した。この結果に基づき英国の共同研究者が、てんかん症状が悪化していた一人の患児に Butyrate を投与したところ、血液細胞上の GPI アンカー型タンパク質の発現上昇とそれに伴う症状の著しい改善が認められた(Almeida, Murakami et al, N Eng J Med, 2007)。

### 池田 義孝グループ

N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) の逆反応を速度論的に解析した結果、この酵素の触媒する反応は極度に糖転移反応へと平衡がずれていることがわかった。平衡定数にして約  $1.6 \times 10^6$  と算出され、自由エネルギー変化にして約 8.8 kcal/mol であると計算された。この結果から、ゴルジ装置内における UDP 濃度の変化によってほとんど影響を受けないと考えられた。最近、他のいくつかの転移酵素でも逆反応および平衡反応の解析が行なわれつつあるが、糖転移酵素の反応は必ずしも糖付加が有利というわけではなく、酵素によって反応の平衡点は異なっていると考えられる。この違いのため、(糖転移反応の生成物の一つである)ヌクレオチドの濃度によって個々の反応の進み具合は異なるはずであり、このような「反応の平衡支配」は糖鎖のアセンブリにおける多様性の基盤となっている可能性が示唆される。一方、GnT-III の協同的な活性制御機構については、溶解度等の技術的な問題によりあまり進展しておらず現在解決中である。タンパク質レベルでの活性制御および平衡論的制御の観点からさらに研究を進めていきたい。

$\alpha$  1,6 フコース転移酵素 (FUT8) の SH3 ドメインの機能解析については、このドメインに様々なアミノ酸置換を導入した変異酵素を作製し解析を行なった結果、いくつかの変異酵素で活性に大きな影響が現れており、このドメインの必要性が確認された。さらに、詳細な検討を行ない、活性発現とどのような関連が有るのかを明らかにしたと考えている。

## 大山 カグループ

### 1. 精巣癌における糖タンパク糖鎖発現の意義

精巣癌における GnT-V および C2GnT 発現を免疫組織化学的に検討し、その臨床的意義を明らかにして、論文で公表した。

### 2. 膀胱癌における糖タンパク糖鎖発現の意義

膀胱癌細胞 YTS-1 の C2GnT 発現を siRNA 法でノックダウンさせた細胞株を作成した。

### 3. 前立腺癌における糖タンパク糖鎖発現の意義

前立腺癌細胞 PC-3 の C2GnT 発現を siRNA 法でノックダウンさせた細胞株を作成した。

### 4. 前立腺癌の新規バイオマーカーの探索

前立腺圧出液のプロテオミクス的アプローチによって、PSA よりも特異度の高い前立腺癌マーカーの候補を絞り込んだ。

5. 尿路上皮癌における BCG の抗腫瘍効果に関する検討し、nano-particle 化した BCG の抗腫瘍効果を米国泌尿器科学会で発表した。

## 顧 建国グループ

細胞接着分子である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。インテグリンの  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖には、多数 N-結合型糖鎖付加サイトを持っているゆえ、インテグリン上の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、または特定の糖鎖を持つインテグリンがどの分子と結合するかを同定することが必要である。我々は、 $\alpha$  鎖の 12 カ所 N-結合型糖鎖付加サイトの中に 3-5 番が機能発現に重要であることを同定し、4 番に特異的に GnT-III の修飾を受けることを明らかにした。また、 $\beta$  1 鎖の機能発現に重要な糖鎖付加サイトをも同定した。

## 近藤 玄グループ

GPI アンカーの切断メカニズムとその生理学的意義を明らかにすることを目指し、2 点を追求した。

1. ジペプチダーゼ活性を不活性化し、GPI アンカー切断活性(GPIase 活性)は保存させた精巣型 ACE(tACE)を導入したトランスジェニックマウス(Tg)系統を作出し解析した。その結果、これらの Tg 系統では、体外受精における受精率がコントロールに比べて有意に低下し、また精子-透明帯結合の有意な低下もみられた。さらに精巣および精巣上体内容物(精子をふくむ)での GPIase 活性およびジペプチダーゼ活性を測定したところ、精巣上体内容物でジペプチダーゼ活性が有意に低下していたが、GPIase 活性は正常であった。また、複数の個体で、精巣上体内容物のジペプチダーゼ活性が完全に消失していたが、妊否性は保存されていた。このことから、tACE は、主に GPIase 活性をもって受精に寄与していることが示唆された。

2. ウサギ肺由来の体細胞型 ACE 粗精製品から ACE とは異なる GPIase 活性を見出した。この活性を担う因子のひとつとして Ces2 を見出した。

## 菅原 一幸グループ

グリコサミノグリカンの機能発現の分子メカニズムおよび動態-機能相関を生合成と分解の両面から統合的に解明するという菅原研究グループの本来の目標をほぼ達成してきた。分解酵素に関する最近の成果は投稿中である。すなわち、ヒドラで始めてグリコサミノグリカンの存在を示し、以前に発見した線虫の場合のように、ヒアルロン酸は存在しないことを発見した。また、線虫のコンドロイチンが細胞質分裂に必須の成分であることも以前に報告したが(Mizuguchi et al., *Nature*, 423, 443-448, 2003)、最近その分解酵素を同定した。合成面からは、脳のコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸ハイブリッド鎖の神経突起伸長促進活性に関与する増殖因子と相互作用する糖鎖構造の性質および糖鎖合成酵素の発現パターンを明らかにした。一方、糖鎖の動態-機能相関の解析に有用ないくつかの硫酸化グリコサミノグリカン特異抗体の糖鎖エピソードの

一次構造を決定するだけでなく、計算化学の手法を新規に導入してエピトープの高次構造を解明し、硫酸化オリゴ糖鎖の新しい高次構造解析法を開拓しつつある。これらの研究の一部は最近の総説に詳述した (Sugahara, K. and Mikami, T., *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 17, 536-545, 2007)。

### 鈴木 匡グループ

糖タンパク質のアスパラギン(N)型糖鎖の生合成についてはこの20年あまりの間に研究が爆発的な進歩をとげ、そのほとんどの分子機構が解明したといってもいいのに対し、糖鎖がどのように代謝されるかについては哺乳動物においても不明な点が多い。我々はこれまで、PNGase 依存的な、高マンノース型遊離N型糖鎖代謝の系に関わる2つのグリコシダーゼ、ENCaseとMan2C1についてその遺伝子を同定してきた。今年度は、これらとは別のタイプの遊離糖鎖である、複合型糖鎖がある種のがん細胞の細胞質に蓄積していることを明らかにした(近畿大学薬学部、掛樋一晃教授との共同研究)。また、この細胞質蓄積のシアリル化複合型糖鎖の代謝において、細胞質シアリダーゼである Neu2 がその代謝に関わりうることを明らかにした (Ishizuka, et al., submitted)。これらの結果は、我々の見出した高マンノース型糖鎖の代謝機構とは別の、複合型遊離糖鎖に対する非リソソーム糖鎖の代謝機構が存在することを意味している。また、ENCase に関しては KO マウスを作成した。このマウスはホモ変異によって致死ではなかったが、この系を用いて細胞質遊離糖鎖の機構の更なる詳細な解析と生理機能の解析が可能となった。また前年度より開発中であった、遊離糖鎖の還元末端の構造に着目した糖鎖の微量分離解析法を確立し、現在論文を執筆中である (Suzuki, et al., manuscript in preparation)。

### 田口 友彦グループ

リサイクリングエンドソーム(RE)とは、1980年代にトランスフェリンなどエンドサイトーシスを受けたのちに細胞膜へ戻っていく分子(“リサイクリング経路”)が、一時的に滞留する核近縁部の細胞小器官として認識された細胞小器官である。ところが、近年 RE がエキソサイトーシスの経路にも関与していることが我々の研究から明らかとなり、RE はリサイクリング経路だけでなく、より広範な膜輸送経路にも関与していることが示唆されてきた。

本研究に於ける我々の狙いは、(A) RE の膜輸送経路における位置をより明確にしていくことと、(B) RE の局在タンパク質を同定していくことにある。

本年度は下記の2項目について論文発表を行った。

- (1) RE を通過する膜輸送経路の可視化に有効な細胞のスクリーニング: COS-1 細胞の同定
- (2) 細胞膜から核膜へと至る逆行性膜輸送経路が RE を通過する可能性を提示

また、コレラ毒素などに代表される逆行性膜輸送経路が RE を必要とすることを明らかにし、次いでその膜輸送経路を RE 上で支配する分子の同定にも成功した(投稿準備中)。また、Ras, Cdc42, Rac1 などのシグナル伝達分子が細胞膜以外にも RE に局在することがわかり、更に Ras に関しては RE への局在化に関する構造上の必要十分条件を明らかにすることができた(投稿準備中)。

### 田口 良グループ

昨年度来の質量分析を用いた糖脂質の解析結果より、GPI アンカータンパク質の GPI アンカー前駆体のうち、前駆体初期合成反応の GlcNPI から GlcN-acylPI の間で、sn-1位のアルキル体の大きな増加が観察され、全体ではアシル体よりも増加しており、その一方、これらの前駆体の PI の sn-2位は 20:4, 22:6, 18:1 等の不飽和型の分子種であることが判った。このことについて論文発表を行った (Houjou et al, *J Lipid Res*, 2007)。さらに、木下グループとの共同研究により、このアルキル体の増加の原因について、この過程の酵素反応の基質選択制によるものか、アシルからのアルキルへの未知のリモデリング反応が存在するのかについて、アルキル脂質合成変異体を用いて、研究を進めている。また GPI の膜ラフトドメインへの局在について、GPI ア

ンカー構造との相互作用が予想される分子としてガングリオシドの質量分析による分子種の解析をはじめた。

### 和田 芳直グループ

- (1) グライコпротеオームを主題として、大山グループとの共同研究を行った。前立腺特異抗原 PSA は前立腺腫瘍マーカーであるが、その血清レベル上昇は癌特異的でなく、前立腺肥大症や炎症においても見られる。PSA には配列上の1ヶ所に N 型糖鎖が結合する。大山らはかつてレクチンを用いた研究によって癌患者血清 PSA では $\alpha$ 2,3 シアル酸が増加しており、それをもって良性疾患と鑑別できることを提案した。この結果を検証するため、前立腺癌患者血清 PSA および対照としての精漿 PSA の質量分析による糖鎖構造解析を行った。PSA 以外に由来する糖鎖が試料に混在するのを回避するために、糖鎖を切り出して分析するのではなく、PSA をプロテアーゼ消化し、得られた糖ペプチドを試料として解析した。 $\alpha$ 2,3 シアル酸を選択的に脱離する Streptococcus ノイラミニダーゼを組み合わせた分析の結果、癌患者では確かに $\alpha$ 2,3 シアル酸が存在するが、対照とした精漿 PSA には $\alpha$ 2,6 シアル酸のみであることを証明した。血清中 PSA は遊離型の他に $\alpha$ 1 アンチキモトリプシン(ACT)とエステル結合したフォームがある。これらのフォームに結合する PSA 糖鎖は同一であることを初めて明らかにした。また、精漿 PSA の糖鎖は従来報告されていたバイアンテナ糖鎖は主要な糖鎖でなく、混成型および高マンノース型が主要な糖鎖として存在すること、そして、精漿 PSA 標品には PSA 以外の分子に由来するバイアンテナ糖鎖が混在していることもあわせて見出した。
- (2) 細胞融合を制御する分子としてカルポニン 3 とグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素を発見した。それぞれについて RNAi を用いることにより、細胞融合を制御できることを見出し、特許出願を行った。

## 3. 研究実施体制

### (1)「木下 タロウ」グループ

- ①研究者名:木下 タロウ(大阪大学)
- ②研究項目
  1. GPI アンカー型タンパク質の生合成時の動態の解明
  2. GPI アンカー型タンパク質の脂質ラフトへの組み込みと機能発現との相関の解明

### (2)「池田 義孝」グループ

- ①研究者名:池田 義孝(佐賀大学・医)
- 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

### (3)「大山 力」グループ

- ①研究者名:大山 力(弘前大学)
- ②研究項目
  1. 精巣癌における糖タンパク糖鎖発現の意義
  2. 膀胱癌における糖タンパク糖鎖発現の意義
  3. 前立腺癌における糖タンパク糖鎖発現の意義
  4. 前立腺癌の新規バイオマーカーの探索
  5. 尿路上皮癌における BCG の抗腫瘍効果に関する検討

(4)「顧 建国」グループ

①研究者名:顧 建国(東北薬科大学)

②研究項目

・N-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

(5)「近藤 玄」グループ

①研究者名:近藤 玄(京都大学)

②研究項目

・糖鎖プロセッシングの動態と機能発現

(6)「菅原 一幸」グループ

①研究者名:菅原 一幸(北海道大学)

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

(7)「鈴木 匡」グループ

①研究者名:鈴木 匡(大阪大学 理化学研究所)

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

(8)「田口 友彦」グループ

①研究者名:田口 友彦(大阪大学)

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

(9)「田口 良」グループ

①研究者名:田口 良(東京大学)

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

(10)「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)

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)

- Tone, Y., Pedersen, L., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara-Shimizu, J., Tamura, J., Negishi, M., and **Sugahara, K.**: Xyl 2-*O*-Phosphorylation and Gal 6-*O*-Sulfation in the Protein Linkage Region of Glycosaminoglycans Influence the Activity of Glucuronyltransferase-I that Transfers

- Glucuronate to Gal-Gal-Xyl-Ser to Complete the Linkage Region. *EVIDENCE OBTAINED BY ENZYMOLOGY AND X-RAY CRYSTALLOGRAPHY*. To be published.
- Kaneiwa, T., Yamada, S.\*, Mizumoto, S., Montano, A. M., Mitani, S., and Sugahara, K. Identification of a novel chondroitin hydrolase in *Caenorhabditis elegans*. \*Equal contribution. To be published.
  - Fujibayashi, A., Taguchi, T., Misaki, R., Ohtani, M., Dohmae, N., Takio, K., Yamada, M., Gu, J., Yamakami, M., Fukuda, M., Waguri, S., Uchiyama, Y., Yoshimori, T. and Sekiguchi, K.: Human REM-8 is involved in membrane trafficking through early endosomes. *Cell Structure Function*. In press
  - Akita, K., von Holst, A., Furukawa, Y., Mikami, T., Sugahara, K., and Faissner, A.: Expression of multiple chondroitin/dermatan sulfotransferases in the neurogenic regions of the embryonic and adult CNS suggests that complex chondroitin sulfates function in neural stem cell maintenance. *Stem Cells*, in press.
  - Li, F., Yamada, S., Bassapa, Shetty, A. K., Sugiura, M., and Sugahara, K.: Determination of Iduronic acid and glucuronic acid in sulfated chondroitin/dermatan hybrid chains by <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Glycoconj. J.* in press.
  - Fujibayashi, A., Taguchi, T., Misaki, R., Ohtani, M., Dohmae, N., Takio, K., Yamada, M., Gu, J., Yamakami, M., Fukuda, M., Waguri, S., Uchiyama, Y., Yoshimori, T., and Sekiguchi, K. (2008).: Human RME-8 is involved in membrane trafficking through early endosomes. *Cell Structure and Function* in press.
  - 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*, 18:1497-1506, 2007.
  - Almeida A.M\*, Y. Murakami\*, A. Baker, Y. Maeda, I.A.G. Roberts, T. Kinoshita, D. M. Layton, and A. Karadimitris.: Targeted therapy for inherited GPI deficiency. *N. Engl. J. Med.*, 356:1641-1647, 2007. (\* equal contribution)
  - Kim Y.U., H. Ashida, K. Mori, Y. Maeda, Y. Hong, and T. Kinoshita.: Both mammalian PIG-M and PIG-X are required for growth of GPI14-disrupted yeast. *J. Biochem.*, 142:123-129, 2007.
  - Ueda, Y., R. Yamaguchi, M. Ikawa, M. Okabe, E. Morii, Y. Maeda and T. Kinoshita.: PGAP1 knockout mice show otocephaly and male infertility. *J. Biol. Chem.*, 283:30373-30380, 2007.
  - Takida, S., Y. Maeda and T. Kinoshita.: Mammalian GPI-anchored proteins require p24 proteins for their efficient transport from the ER to the plasma membrane. *Biochem. J.*, 409:555-562, 2007.
  - 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 adenylyl cyclase III enhances its activity. *Glycobiology* 17, 655-662, 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 alpha1,6-fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology* 17, 455-466, 2007.
  - Imaizumi T., Yoshida H., Nishi N., Sashinami H., Nakamura T., Hirashima M., Ohyama C., Itoh K., Satoh K.: Double-stranded RNA induces galectin-9 in vascular endothelial cells: involvement of TLR3, PI3K, and IRF3 pathway. *Glycobiology.*, Jul;17(7): 12C-5C, 2007.
  - de Jong J., Stoop H., Gillis AJ., van Gurp RJ., van Drunen E., Beverloo HB., Lau YF., Schneider DT., Sherlock JK., Baeten J., Hatakeyama S., Ohyama C., Oosterhuis JW., Looijenga LH.: JKT-1 is not a human seminoma cell line. *Int J Androl.*, Aug; 30(4): 350-65, 2007.

- Harada O., Suga T., Suzuki T., Nakamoto K., Kobayashi M., Nomiya T., Nadano D., Ohyama C., Fukuda MN., Nakayama J.: The role of trophinin, an adhesion molecule unique to human trophoblasts, in progression of colorectal cancer. *Int J Cancer.*, Sep 1; 121(5): 1072–8, 2007.
- Li Y., Tabatabai ZL., Lee TL., Hatakeyama S., Ohyama C., Chan WY., Looijenga LH., Lau YF.: The Y-encoded TSPY protein: a significant marker potentially plays a role in the pathogenesis of testicular germ cell tumors. *Hum Pathol.*, Oct;38(10): 1470–81, 2007.
- Tajiri M., Ohyama C., Wada Y.: Oligosaccharide profiles of the prostate specific antigen in free and complexed forms from the prostate cancer patient serum and in seminal plasma: a glycopeptide approach. *Glycobiology.*, Jan;18 (1): 2–8, 2008.
- Kyan A., Kamimura N., Hagsawa S., Hatakeyama S., Koie T., Yoneyama T., Arai Y., Nakagawa H., Nishimura S., Miyoshi E., Hashimoto Y., Ohyama C.: Positive expressions of N-acetylglucosaminyltransferase-V (GnT-V) and beta1-6 branching N-linked oligosaccharides in human testicular germ cells diminish during malignant transformation and progression. *Int J Oncol.*, Jan; 32(1): 129–34, 2008.
- Matsumura, K., Higashida, K., Ishida, H., Hata, Y., Abe, Y., Kato, M., Ueda, M., Yamamoto, K., Shigeta, M., Mizuno, Y., Miyoshi, E., Gu, J. and Taniguchi, N.: Carbohydrate-binding specificity of a fucose-specific lectin from *Aspergillus Oryzae*: a novel probe for core fucose. *J. Biol. Chem.* 282:15700–8, 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 alpha1,6-Fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology* 17:455–66, 2007.
- Li, W., Takahashi, M., Shibukawa, Y., Yokoe, S., Gu, J., Miyoshi, E., Ikeda, Y., and Taniguchi, N.: Introduction of Bisecting GlcNAc in N-glycan of Adenylyl Cyclase III enhances its activity. *Glycobiology* 17:655–62, 2007.
- Deguchi, E., T. Tani, H. Watanabe, S. Yamada, G. Kondoh: Dipeptidase-inactivated tACE action *in vivo*: selective inhibition of sperm-zona pellucida binding in the mouse. *Biol. Reprod.*, 77, 794–802, 2007.
- Deepa, S. S., Yamada, S., Fukui, S., and Sugahara, K.: Structural determination of novel sulfated octasaccharides isolated from chondroitin sulfate of shark cartilage and their application for characterizing monoclonal antibody epitopes. *Glycobiology*, 17 (6), 631–645, 2007.
- Yamada, S., Morimoto, H., Fujisawa, T., and Sugahara, K.: Glycosaminoglycans in *Hydra magnipapillata* (Hydrozoa, Cnidaria): demonstration of chondroitin in the developing nematocyst, sting organelle, and structural characterization of glycosaminoglycans. *Glycobiology*, 17(8), 886–894, 2007.
- Purushothaman, A., Fukuda, J., Mizumoto, S., ten Dam, G. B., van Kuppevelt, T. H., Kitagawa, H., Mikami, T., and Sugahara K.: Functions of chondroitin sulfate/dermatan sulfate chains in brain development: critical roles of E and iE disaccharide units recognized by a single chain antibody GD3G7. *J. Biol. Chem.*, 282 (27), 19442–19452, 2007.
- ten Dam, G. B., van de Westerlo, E. M. A., Purushothaman, A., Stan, R.V., Bulten, J., Sweep F. C. G. J., Massuger, L. F., Sugahara, K., and van Kuppevelt, T. H.: Antibody GD3G7 selected against embryonic glycosaminoglycans defines chondroitin sulfate-E domains highly up-regulated in ovarian cancer and involved in VEGF binding. *Am. J. Pathol.*, 171(4):1324–1333, 2007.
- Pothacharoen, P., Kalayanamitra, K., Deepa, S. S., Fukui, S., Hattori, T., Fukushima, N., Hardingham, T., Kongtawelert, P., and Sugahara, K.: Two related but distinct chondroitin sulfate mimotope octasaccharide sequences recognized by monoclonal antibody WF6. *J. Biol. Chem.*, 282 (48),

35232–35246, 2007.

- Fongmoon, D., Shetty, A. K., Basappa, Yamada, S., Sugiura, M., Kongtawelert, P., and **Sugahara, K.**: Chondroitinase-mediated degradation of rare 3-*O*-sulfated glucuronic acid in functional oversulfated chondroitin sulfate K and E. *J. Biol. Chem.*, 282 (51), 36895–36904, 2007.
- Properzi, F., Lin, R., Kwok, J., Naidu, M., van Kuppevelt, T.H., ten Dam, G.B., Camargo, L.M., Furukawa, Y., Mikami, T., **Sugahara, K.**, and Fawcett, J.W.: Heparan sulphate proteoglycans in glia and in the normal and injured CNS: Expression of sulfotransferases and changes in sulfation. *Eur. J. Neurosci.*, 27(3) 593–604, 2008.
- Misaki, R., Nakagawa, T., Fukuda, M., Taniguchi, N., and **Taguchi, T.**: Spatial segregation of degradation- and recycling-trafficking pathways in COS-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 580–585, 2007.
- Hieda, M., Isokane, M., Koizumi, M., Higashi, C., Tachibana, T., Shudou, M., **Taguchi, T.**, Hieda, Y., and Higashiyama, S.: Membrane-anchored growth factor, HB-EGF, on the cell surface targeted to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol.* 180, 763–769, 2008.
- T. Houjou, J. Hayakawa, R. Watanabe, Y. Tashima, Y. Maeda, **T. Kinoshita, R. Taguchi**: Changes in molecular species profiles of glycosylphosphatidylinositol anchor precursors in early stages of biosynthesis. *J. Lipid Res.* 48: 7. 1599–606, 2007.
- **Wada Y.** : Mass spectrometry in the detection and diagnosis of congenital disorders of glycosylation” *Eur. J Mass Spectrom* 13, 101–103, 2007.
- Tajiri M., **Ohyama C., Wada Y.**: Oligosaccharide profiles of the prostate specific antigen in free and complexed forms from prostate cancer patient serum and in seminal plasma: a glycopeptide approach. *Glycobiology.* 18, 2–8, 2008; 2007 Oct 23; [Epub ahead of print]
- Nakano M., Nakagawa T., Ito T., Kitada T., Hijioaka T., Kasahara A., Tajiri M., **Wada Y.**, Taniguchi N., Miyoshi E.: Site-specific analysis of N-glycans on haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer: A novel approach for the development of tumor markers. *Int J Cancer.* 122(10):2301–9. 2008 Jan 23; [Epub ahead of print]

## (2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:1 件 (CREST 研究期間累積件数:12 件)