

「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) 哺乳動物の GPI アンカー型タンパク質では、1 アルキル 2 アシル型ホスファチジルイノシトールが主体であることに関して、この生合成はペルオキシソームでのアルキル型リン脂質合成経路に依存していることがわかった。2) GPI 前駆体段階で結合している第 2 マンノースのエタノールアミンリン酸側鎖が、タンパク質への付加後除去される糖鎖部分のリモデリングが存在し、それが PGAP5 によって行われること、GPI アンカー型タンパク質の小胞体からゴルジ体への効率的な輸送に重要であることがわかった。3) 前立腺特異抗原 (PSA) の糖鎖構造を解析して、新規アッセイ法開発の基礎データとすることに関して、前立腺癌由来の PSA は末端にシアル酸が alpha-2,3 で結合し、分岐した N-glycan が多いこと、正常 PSA には 2 本鎖 N-glycan はほとんど含まれず、ハイブリッドタイプや高マンノースタイプが主体であることを明らかにし、この癌性変化を利用して特異度の高い新規アッセイ法の開発が期待されること。4) 細胞質シアリダーゼ Neu2 の生理機能の一つとして、遊離糖鎖の代謝に関わる可能性を示唆した。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

哺乳動物の GPI アンカー型タンパク質では、1 アルキル 2 アシル型ホスファチジルイノシトール (PI) が主体であることに関して、昨年度、GPI の生合成途中の一段階でジアシル型から 1 アルキル 2 アシル型へ劇的に変化することを田口良グループとの共同研究で見出した。今年度は、これがペルオキシソームでのアルキル型リン脂質合成経路に依存しているか検討した。米国 Zoeller 博士から分与されたペルオキシソーム経路の第 1, 第 2 酵素の欠損変異 CHO 細胞株では、1 アルキ

ル2アシル型 GPI 中間体ができないこと、タンパク質に付加された GPI アンカーもジアシル型だけであることを見出した。すなわち、1 アルキル 2 アシル型 GPI アンカーの合成には、ペルオキシソームの経路が必須であることがわかった(Kanzawa N, 論文準備中)。

GPI アンカー型タンパク質が小胞体で生合成された後、分泌経路でゴルジ体に輸送され、その後細胞表面の膜マイクロドメインに発現される。この過程に働く遺伝子群の解明を目指し、GPI アンカー型タンパク質の小胞体から細胞表面への輸送が遅れる CHO 細胞株を複数樹立した。このうちの1株は、GPI アンカー型タンパク質だけでなく、膜貫通型タンパク質の輸送も遅れる変異株であった。この変異株では、調べたすべての糖タンパク質の N-,O-結合糖鎖と糖脂質の糖鎖が不完全であった。異常の本質は、ゴルジ体の pH が正常より 0.3 から 0.4 高いことであり、それは本変異株の責任遺伝子の産物 GPHR が Cl チャネルとしてゴルジ体の酸性化に必須の働きをしているためであることがわかった(Maeda Y et al, Nat Cell Biol, 2008)。

別の変異株では、GPI アンカー型タンパク質の輸送だけが選択的に遅延していた。この変異株の責任遺伝子 PGAP5 をクローニングし、リン酸エステラーゼであることがわかった。変異株の GPI アンカー型タンパク質では、正常細胞では数%しか存在しない、第 2 マンノースのエタノールアミンリン酸側鎖が、大部分のアンカーに結合していた。この事は、GPI 前駆体段階で結合している側鎖が、タンパク質への付加後 PGAP5 によって除去される糖鎖部分のリモデリングが存在し、それが GPI アンカー型タンパク質の小胞体からゴルジ体への効率的な輸送に重要であることを示している (Fujita M, 論文準備中)。

#### 池田 義孝 グループ

N-Acetylglucosaminyltransferase-III (GnT-III)の逆反応(糖除去反応)の解析を行ない、その Gibbs 自由エネルギー変化は約 8 kcal/mol、ATP の加水分解のそれとほぼ同等であることがわかった。この結果から、細胞のゴルジ装置内でヌクレオチドやヌクレオチド糖がどのような変化をしたとしても常に実質的に不可逆であることが示唆された(Okada et al., Glycobiology, 19, 368-374, 2009)。

GnT-III 遺伝子導入昆虫細胞(Sf21 細胞)を作成し、この細胞の生み出す糖タンパク質糖鎖の構造解析を行った。本来昆虫細胞ではトリマンノース、パウチマンノース型糖鎖が主体であるが、遺伝子導入により哺乳類細胞様の糖鎖構造に変化した。このことから、昆虫細胞の糖鎖合成経路に存在するヘキササミニダーゼの作用はバイセクティング GlcNAc の付加により抑制されることが示された。また、バキュロウイルスの感染性に変化がなかったため、糖鎖改変組換え糖タンパク質の発現のための宿主細胞として使用出来ることもわかった。

FUT8 の SH3 ドメインの機能解析については、このドメインの欠失変異体を作成し解析を行った。その結果 N 型糖鎖に対するフコース転移活性にはこのドメインが必須の役割を持つことがわかったが、どのように関与しているのかをさらに検討したいと考えている。

#### 大山 力 グループ

##### 1. 前立腺特異抗原(PSA)の糖鎖構造の解析

和田グループとの共同研究として、ヒト正常 PSA および前立腺癌血清 PSA の糖鎖構造をエンドリシルペプチダーゼでペプチドごと切り出して MALDI TOF-MS で解析した。前立腺癌由来の

PSA は末端にシアル酸は alpha-2,3 で結合し、分岐した N-glycan が多いことを明らかにした。また、正常 PSA には2本鎖 N-glycan はほとんど含まれず、ハイブリッドタイプや高マンノースタイプが主体であることを明らかにした。(Tajiri M, Ohyama C, Wada Y. Glycobiology. 2008.)この癌性変化を利用して特異度の高い新規アッセイ法の開発が期待される。

## 2. 精巣癌における N-glycan の発現に関する研究

ヒト精巣癌のパラフィン切片に対して抗 GnT-V モノクローナル抗体による免疫染色を行い、その染色性と臨床経過とを比較検討した。

精巣癌において GnT-V は予後の良い症例に高発現する傾向があった。図1は精巣摘除術後の非再発率曲線である。GnT-V(+)の症例は GnT-V(-)の症例よりも有意に再発率が低い。(Kyan A, Kamimura N, Hagisawa S, Hatakeyama S, Koie T, Yoneyama T, Arai Y, Nakagawa H, Nishimura S, Miyoshi E, Hashimoto Y, Ohyama C. Int J Oncol. 2008.)

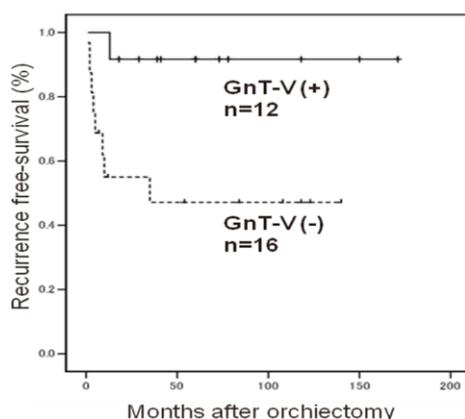


図1

さらに糖鎖構造解析によって GnT-V の発現と beta-1,6 分岐 N-glycan の発現が相関することを明らかにした。図2は正常精巣組織を 100 とした場合の精巣癌組織の N-Glycan の組成割合をプロットしたものである。GnT-V の産物と GnT-IV の産物が癌組織で増加していることが明らかになった。

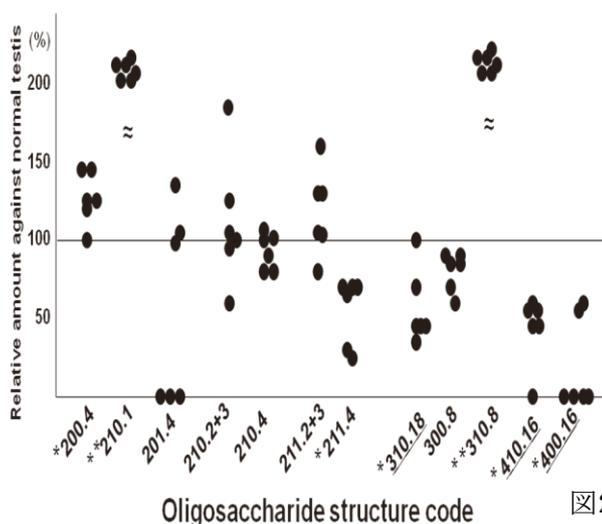


図2

## 3. ヒト精子運動能における trophinin の意義

ヒト精子に外因的に trophinin を添加して、精子運動能が亢進するか否かを検討した。

trophinin はヒト精子の尾部に発現し、精子尾部鞭毛運動に関わるシグナル伝達に関与することが明らかになった。(Hatakeyama S, Sugihara K, Lee SH, Nadano D, Nakayama J, Ohyama C, Fukuda MN. J.Urol. 2008.) さらに、trophinin はヒト精子運動能を亢進させることを見出した。男性不妊症の分子機構解明と治療法開発に貢献するものと期待される。

## 4. 癌の血行性転移における血管内皮糖鎖リガンドの同定

phage display 法で抗 sLeA モノクローナル抗体と反応する糖鎖の mimic peptide:IELLQAR(I)-peptide を同定した。血管内皮細胞に発現する I-peptide receptor(IPR)を in vivo biotinylation 法で同定した。IPR として血管内皮細胞に発現する mRNA splicing factor(Sfrs)

が同定され、この分子も sLeX や sLeA のリガンドになることを証明した。(Hatakeyama S, Sugihara K, Nakayama J, Akama TO, Wong SM, Kawashima H, Zhang J, Smith DF, Ohyama C, Fukuda M, Fukuda MN. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009) Sfrs はフコシル化糖鎖との親和性が高い。Sfrs のターゲティングを目的として、palmitoyl I-peptide にアポトーシス誘導物質として ganglioside GD3 を結合させてマウス尾静脈から注入すると、肺血管内皮細胞にアポトーシスが誘導される、この状態で B16-FTH-M (高肺転移株) を尾静脈注入しても肺転移はわずかしか形成されなかった。腫瘍生物学における糖鎖の役割について一石を投じる論文である。mRNA splicing factor を分子標的にする新規癌治療の可能性が期待される。

#### 5. 前立腺圧出液の protein profiling

protein chip 法による SELDI-TOF MS で前立腺圧出液のタンパク質の質量分析を行った。前立腺癌と良性疾患との間で peak intensity が異なるピークを同定し、階層クラスター解析を行ったところ、感度 91.7%、特異度 83.3% で両者を鑑別することが可能であり、現行の PSA テストを凌駕する特異度が得られた。(Okamoto A, Yamamoto H, Imai A, Hatakeyama S, Iwabuchi I, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Kamimura N, Mori K, Yamaya K, Ohyama C. Oncol Rep. 2009) シングルマーカー解析では、m/z 10788 が再現性を持って有意な候補ピークとして検出された。今後、このピークの構造解析を行い、前立腺癌の新規バイオマーカーとしての意義を確立していきたい。

#### 顧 建国 グループ

細胞接着分子であるインテグリンは糖転移酵素 GnT-III および GnT-V の修飾によってその生物学的機能が正または負に制御されることが明らかとなった(Gu, et al. Cell Adhesion & Migration 2:4. 1-3, 2008; Gu, et al. J. Proteome Res. 8:431-435, 2008)。インテグリン alpha3beta1 のリガンドであるラミニン-332 もそれらの酵素によって修飾され、その細胞接着機能が制御されることを証明した(Kariya, Y., et al. J. Biol. Chem. 283: 33036-33045, 2008)。一方、GnT-III の発現は、E-カドヘリンを介する細胞間接着によって厳密に制御されることが明らかとなった(Akama, R., et al. Proteomics 8: 3221-3228, 2008)。Fut8 欠損マウスにおいて認められる肺気腫様変化の原因は、TGF- $\beta$  受容体の機能低下だけではなく、VEGF 受容体の発現低下とその結果生じるセラミドの生合成亢進により、肺胞アポトーシスが誘導されるためであるという新たな肺気腫発症メカニズムを明らかにした(Wang, X., et al. J. Biochem. In press. 2009)。また、最近、インテグリン alpha5 鎖に GnT-III による特異的に修飾部位の同定や beta1 鎖の機能制御に重要な糖鎖付加部位の同定に成功した (Sato, Y., et al. J. Biol. Chem. In press, 2009; Isaji, T., et al. J. Biol. Chem. In press, 2009)。

今後、本家グループらと共同で開発した“細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法 (EMARS)”を用いて (Kotani, N., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 105: 7405-9, 2008)、N-結合型糖鎖が細胞膜表面のインテグリン超分子複合体形成への関わりに注目して研究する。

#### 近藤 玄 グループ

研究実施項目:糖鎖プロセッシングの動態と機能発現

精巢型アンジオテンシン変換酵素(tACE)の酵素活性に対する糖鎖修飾の影響を検討した。

tACE の N 末端側には、セリン・スレオニンに富む領域があり、O 型糖鎖修飾を受けることが報告されていたが、その生物学的意義は不明であった。そこで、我々は、マウス分子において *in silico* 解析で予測された9か所のスレオニン残基を全てアラニンに置換した変異体を作製した。この変異体では、O 型糖鎖の付加が検出限界以下であった。そこで、この分子と野生型分子とを COS7 細胞で発現させ、組換え酵素を精製し、GPIase 活性および従来のジペプチダーゼ活性を比較した。その結果、いずれの活性も変異体と野生型とで有意差はなかった。一方、野生型 tACE を CHO 細胞で発現させて得た分子の両活性を、COS7 由来分子と比較したところ、ジペプチダーゼ活性は同等であったが、GPIase 活性は CHO 由来分子のほうが2倍程度有意に高かった。そこで、これらの分子の糖鎖プロファイリングを、レクチンアレイ(LecChip™)を用いて解析した。その結果、最も特徴的な違いとして、COS7 由来分子の mucin 系 O 型糖鎖は T-antigen, Tn-antigen, sialyl-T-antigen が混在しているのに対して、CHO 由来分子ではほぼ全てが sialyl-T-antigen であることが判明した。また N 型糖鎖修飾にも違いをみとめ、O 型糖鎖の有無は tACE の両活性の基盤に影響は与えないものの、全体的な糖鎖プロファイリングの違いが、GPIase 活性の高低を左右する可能性が示唆された(Kondoh G., et al. J. Biochem., 145:115-121, 2009)。

#### 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年の間に研究は爆発的な進歩を遂げ、その殆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の詳細な機構は哺乳動物においても不明な点が多い。我々はこれまで細胞質の脱糖鎖酵素、PNGase によって脱離される糖鎖の代謝を中心に、主にリソソームが関与しない糖鎖の代謝機構について研究を行ってきた。今年度はある種のがん細胞に複合型糖鎖が異常に蓄積する例を見出し、その糖鎖が細胞質シアリダーゼ Neu2 の発現によって消失することから、Neu2 の生理機能の一つとして遊離糖鎖の代謝に関わる可能性を示唆した(Ishizuka, et al., Biochem. J.(1))。また、HPLCによる細胞質糖鎖の簡便かつ鋭敏な分析法を確立した(Suzuki, et al., Anal. Biochem.(2))。また、PNGase によらない糖鎖の代謝に関して、蛍光糖鎖による小胞体上の糖鎖トランスポーターの活性測定法を確立した(Haga, et al., manuscript in preparation)。また、オートファジーの系が遊離糖鎖の代謝に特異的に関わっていることを明らかにした(Seino, et al., manuscript in preparation)。また、出芽酵母における新しい遊離糖鎖の代謝機構を明らかにするとともに、PNGase 依存的な ERAD 機構の解析を行った(Hosomi, et al., manuscript in preparation)。遊離糖鎖の生成(PNGase)およびプロセッシングに関わる酵素(ENGase)について、ノックアウトマウスを作成した。

文献:

- (1)A. Ishizuka, Y. Hashimoto, R. Naka, M. Kinoshita, K. Takechi#, J. Seino, Y. Funakoshi, T. Suzuki#, A. Kameyama, and H. Narimatsu (2008) Accumulation of free complex-type N-glycans in stomach cancer cells, MKN7 and MKN45. Biochem. J. 413, 227-237 (#-corresponding authors)
- (2)T. Suzuki#, I. Matsuo, K. Totani, S. Funayama, J. Seino, N. Taniguchi, Y. Ito, and S. Hase (2008) Dual-gradient HPLC for identification of cytosolic high mannose-type free

glycans. Anal. Biochem. 381, 224-232. (#-corresponding author)

#### 田口 友彦 グループ

リサイクリングエンドソーム(以下 RE と略す)は、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が一時的に滞留する核近縁部の膜系として 1980 年代に同定された比較的歴史の浅い細胞小器官である。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 の細胞内膜輸送経路における位置をより明確にしておくこと(Queensland University, Prof. Jenny Stow との共同研究)、(B) RE の局在タンパク質を同定していくことにある。昨年度までに、RE を通過する膜輸送経路の可視化に適している細胞のスクリーニングの結果を論文発表した( COS-1 細胞の同定)、本年度は更に COS-1 細胞を用いて以下の結果を得ることができた。

(A) RE の局在タンパク質として small GTPase である Rap2 を同定し、integrin の細胞膜へのリサイクルの経路への関与を示した<sup>(1)</sup>。

(B) RE の局在タンパク質として eevectin-2 を同定し、eevectin-2 がコレラ毒素などによって代表される糖脂質の逆行性膜輸送経路を制御することを明らかにした。このことにより、細胞膜→RE→ゴルジ体→小胞体という膜の流れが明らかとなった。Eevectin-2 は N 端に PH-domain を持っているが、その酸性脂質に対する親和性の解析から、RE は phosphatidylserine に非常に富む細胞小器官であることが明らかとなった(論文投稿中)。

(C) Ras, Cdc42 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(論文投稿中)。

(D) Rab-GFP library を COS-1 細胞で発現させることにより、60 種類程度から構成される Rab タンパク質 family のおよそ 1/4 が RE に局在することが明らかとなった。今までに機能が明らかにされている Rab タンパク質の多く(代表例として rab5, rab7, rab11 など)が膜輸送の重要な制御因子であることを考えると、RE を通過する膜輸送が非常に多種多様であることをこの結果は示唆している(論文投稿準備中)。

(E) COS-1 細胞と近縁の細胞種である BSC-1 細胞を用いて、シガ毒素 B サブユニットの細胞侵入経路を観察したところ、シガ毒素 B サブユニットは RE を通過した後、ゴルジ体/小胞体へと輸送されることを明らかにした。RE は糖脂質を受容体とする毒素の細胞侵入の経路で普遍的に利用される細胞小器官である可能性がある<sup>(2)</sup>。

(F) Macrophage において、tumor necrosis factor (TNF)などのサイトカインは、ゴルジ体を脱出した後、RE を通過して細胞膜へ輸送される。ゴルジ体と RE の膜輸送経路を解析する中で、新規な phosphoinositide 3-kinase (p110delta) がサイトカインのゴルジ体からの輸送に必須であることを明らかにすることができた(論文投稿中)。

- (1) Uechi, Y., Bayarjargal, M., Umikawa, M., Oshiro, M., Takei, K., Yamashiro, Y., Asato, T., Endo, S., Misaki, R., Taguchi, T., and Kariya, K. (2009). Rap2 function requires palmitoylation and recycling endosome localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 732-737.
- (2) McKenzie, J., Johannes, L., Taguchi, T., and Sheff, D. (2009). Passage through the Golgi is necessary for Shiga toxin B subunit to reach the endoplasmic reticulum. *FEBS J.* 276, 1581-1595.

#### 田口 良 グループ

昨年度、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。このことから、この過程においてアルキル分子種が何らかの機構で増加することが判った。本年度は、この生合成の機構の詳細を確かめるため、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、研究を進めた。その結果少なくともアルキル分子種の増加にはペルオキシゾームにおける合成系が不可欠であることが判った。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解析を検討し、ガングリオシドの網羅的解析法を確立した。この手法により、ラフトには脂肪酸鎖長の長い、比較的流動性の低い分子種が局在化している可能性を確認した。今後、GPI アンカータンパク質のラフトへの局在化との関係を調べる予定である。

#### 三善 英知 グループ

タカラグループ(代表:小山信人)の CREST で、新しい膵癌の腫瘍マーカーであるフコシル化ハプトグロビンを発見し ELISA キットを作製した。この研究に引き続き、ヒト膵癌患者血清から精製したハプトグロビンの部位特異的な糖鎖解析に成功し(*Int J Cancer*, 122(10), 2301-09, 2008)、ハプトグロビンには、4カ所に N 型糖鎖結合部位が存在する。膵癌患者、慢性膵炎患者、高齢者健常人、若年健常人由来のハプトグロビンの構造解析を行なったところ、3 番目の N 型糖鎖の構造が他の部位の糖鎖に較べて、非常にユニークな構造をしていた。膵癌患者由来のハプトグロビンは、すべての部分の糖鎖でフコシル化が増加しており、特に 3 番目の N 型糖鎖ではフコースが 2つ結合したユニークな糖鎖構造を認めた。

(2)ハプトグロビンは、本来肝臓で産生される急性期タンパクの 1 つで、正常の肝臓にはフコシル化反応を制御する一連の遺伝子群の発現が非常に低い。何故、膵癌患者の血清にフコシル化ハプトグロビンが上昇するのか不明であった。そこで、培養細胞系を用いて、膵癌細胞が分泌する IL6(インターロイキン 6)が、肝癌細胞からのハプトグロビンの産生を促進させることを、共培養、IL6 の阻害抗体などの実験から証明した(*Biochem Biophys Res Commun.*377 (3), 792-796.)。さらに、IL6 がフコシル化制御遺伝子の発現上昇を促し、レクチンとハプトグロビン抗体のサンドイッチ ELISA 法でフコシル化ハプトグロビンの産生を誘導することがわかった。膵癌では古くから、

癌遺伝子 ras の活性化が高頻度に起こることが知られており、最近 ras の活性化が IL6 の産生誘導を介して癌化に関与することが報告された。フコシル化ハプトグロビン陽性の膵癌の生物学的特性を推測する上でも、本研究は示唆に富む。

(3) 古くから知られる肝癌特異的な腫瘍マーカーAFP-L3(フコシル化 AFP)の糖鎖構造に関して、これまで培養肝癌細胞レベルでしか証明されていなかったが、実際の肝癌患者血清から精製した AFP を用いて、糖鎖構造を詳細に解析した(J. Proteome Research 7(6), 2222-33, 2008)。この AFP-L3 の研究成果は、旧 CREST タカラグループの近藤昭宏教授との共同研究である。

#### 和田 芳直グループ

(1) O型糖鎖、特にムチン型糖鎖のプロテオーム観点の情報が圧倒的に少なく、O型糖鎖に関する疾患の診断など応用面においても手つかずの状態である。これを打開するためにムチン型糖鎖付加部位に関する解析法の開発を質量分析法を中心に進め、従来からのβ脱離を利用する修飾法を改良して、血漿タンパクについて新規付加部位を決定を行った<sup>1)</sup>。質量分析法による構造解析には不活性ガス等中性粒子との衝突励起解離が行われているが、新しい開裂法である電子移動解離は糖鎖構造に影響を与えずにペプチド鎖のみを切断できる。この方法を IgA1 ヒンジ領域のO型糖鎖結合部位を含む糖ペプチドに対して応用したところ、クラスター状である糖鎖付加が決してランダムに起こっているのではなく、健常人においてはよく保存されていることを見出した。さらにヘモペキシンのO型糖鎖解析において、付加部位の決定のみならず、付加率についても解析できることがわかった。さまざまな疾患において糖鎖付加の変化が報告されているので、健常人におけるO型糖鎖付加に関する付加位置と付加率の情報は、今後、疾患関連糖鎖マーカーを探索する上での基盤になるはずである。

(2) N型糖鎖に関するチーム内の共同研究を進めてきた。大山グループおよび顧グループと行った研究の成果はそれぞれのグループに記載の通りであるが、最終章として、質量分析による定量に関する研究を行った。疾患関連糖鎖マーカーを探索する上でこの点に関するコンセンサスが必須であるからである。とりわけフコシル化には期待がもたれており、また、グライコプロテオームにおいては糖ペプチドを試料とする解析が必須であることから、N型糖鎖含有糖ペプチドにおけるアンテナルイスフコースとコアフコースの開裂の違いを明確にし、さらに、イオン化法によらずフコースレベルの測定が十分な信頼度で行えることを証明した<sup>2)</sup>。

- 1) Wada Y, Tajiri M. 2008. Tackling difficulties in the determination of O-glycosylation sites: approaches to mucin-type glycoproteins. Trends Glycosci. Glycotechnol. 20:69-80.
- 2) Tajiri M, Kadoya M, Wada Y. 2009. Dissociation Profile of Protonated Fucosyl Glycopeptides and Quantitation of Fucosylation Levels of Glycoproteins by Mass Spectrometry" J. Proteome Res. 8:688-693.

### 3. 研究実施体制

#### (1)「木下 タロウ」グループ

- ①研究分担グループ長：木下 タロウ（大阪大学 教授）
- 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研究分担グループ長：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

(3)「大山 力」グループ

- ①研究分担グループ長：大山 力(弘前大学 教授)
- ②研究項目
  1. 前立腺特異抗原(PSA)の糖鎖構造解析
  2. 精巣癌におけるN-glycanの臨床的意義
  3. ヒト精子の運動能におけるtrophininの役割

(4)「顧 建国」グループ

- ①研究分担グループ長：顧 建国(東北薬科大学 教授)
- 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研究分担グループ長：近藤 玄(京都大学 准教授)
- ②研究項目：糖鎖プロセッシングの動態と機能発現

(6)「鈴木 匡」グループ

- ①研究分担グループ長：鈴木 匡(理化学研究所 チームリーダー)
- 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

(7)「田口 友彦」グループ

- ①研究分担グループ長：田口 友彦(University of Queensland Senior Research Officer)
- ②研究項目：エキソ・エンドサイトーシスに關与する輸送小胞の形成機構の解明

(8)「田口 良」グループ

- ①研究分担グループ長：田口 良(東京大学大学院医学系研究科 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

(9)「三善 英知」グループ

- ①研究分担グループ長：三善 英知(大阪大学 教授)
- ②研究項目：フコシル化の制御とその機能解析

(10)「和田芳直」グループ

①研究分担グループ長： 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)

1. Maeda, Y., T. Ide, M. Koike, Y. Uchiyama and T. Kinoshita. 2008. GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. *Nat. Cell Biol.*, 10:1135–1145.
2. Okada T, Ihara H, Ito R, Taniguchi N, Ikeda Y: Bidirectional N-acetylglucosamine transfer mediated by beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III. *Glycobiology* 19, 368-374, 2009.
3. Okamoto, A., Yamamoto, H., Imai, A., Hatakeyama, S., Iwabuchi, I., Yoneyama, T., Hashimoto, Y., Koie, T., Kamimura, N., Mori, K., Yamaya, K., Ohyama, C. Protein profiling of post-prostatic massage urine specimens by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to discriminate between prostate cancer and benign lesions. *Oncol Rep.* 21:73-79,2009.
4. Hatakeyama, S., Sugihara, K., Nakayama, J., Akama, T.O., Wong, S.M., Kawashima, H., Zhang, J., Smith, D.F., Ohyama, C., Fukuda, M., Fukuda, M.N. Identification of mRNA splicing factors as the endothelial receptor for carbohydrate- dependent lung colonization of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:3095-3100,2009.
5. Hatakeyama S, Sugihara K, Lee SH, Nadano D, Nakayama J, Ohyama C, Fukuda MN. Enhancement of human sperm motility by trophinin binding peptide. *J.Urol.* 2008 ;180:767-771.
6. Kyan A, Kamimura N, Hagsisawa 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.* 2008;32:129-134.
7. 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.* 2008, 18:2-8.
8. Kariya, Y., Kato, R., Itoh, S., Fukuda, T., Shibukawa, Y., Sanzen, N., Sekiguchi, K., Wada, Y., Kawasaki, N., Gu, J. N-glycosylation of laminin-332 regulates its biological functions: A novel function of the bisecting GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 283: 33036-33045, 2008
9. Akama, R., Sato, Y., Kariya, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Lu, L., Taniguchi, N., Ozawa, M. and Gu, J. N-Acetylglucosaminyltransferase III Expression Is Regulated by Cell-Cell

- Adhesion via the E-cadherin-catenin-actin Complex. *Proteomics* 8: 3221–3228, 2008
10. Kotani, N., Gu, J., Isaji, T., Udaka, K., Taniguchi, N., and Honke, K. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 7405-9, 2008.
  11. Wang, X., Fukuda, T., Li, W., Gao, C., Kondo, A., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Taniguchi, N. and Gu, J. Requirement of Fut8 for the expression of vascular endothelial growth factor receptor-2: a new mechanism for the emphysema-like changes observed in Fut8-deficient mice. *J. Biochem.* In press. 2009
  12. Isaji, T., Sato, Y., Fukuda, T. and Gu, J. N-glycosylation of the I-like domain of beta1 integrin is essential for beta1 integrin expression and biological function: Identification of the minimal N-glycosylation requirement for alpha 5beta 1. *J. Biol. Chem.* In press, 2009
  13. Sato, Y., Isaji, T., Tajiri, M., Yoshida-Yamamoto, S., Yoshinaka, T., Somehara, T., N-Fukuda, T., Wada, Y. and Gu, J. An N-glycosylation site on the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit plays key roles in both its function and site-specific modification by beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III. *J. Biol. Chem.* In press, 2009
  14. Kondoh, G., H. Watanabe, Y. Tashima, Y. Maeda, T. Kinoshita: Testicular Angiotensin-Converting Enzyme with Different Glycan Modification: Characterization on Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein Releasing and Dipeptidase Activities. *J. Biochem.*, 145:115-121,2009.
  15. A. Ishizuka, Y. Hashimoto, R. Naka, M. Kinoshita, K. Kakehi, J. Seino, Y. Funakoshi, T. Suzuki, A. Kameyama, and H. Narimatsu (2008) Accumulation of free complex-type N-glycans in stomach cancer cells, MKN7 and MKN45. *Biochem. J.* 413, 227-237.
  16. T. Suzuki, I. Matsuo, K. Totani, S. Funayama, J. Seino, N. Taniguchi, Y. Ito, and S. Hase (2008) Dual-gradient HPLC for identification of cytosolic high mannose-type free glycans. *Anal. Biochem.* 381, 224-232.
  17. Uechi, Y., Bayarjargal, M., Umikawa, M., Oshiro, M., Takei, K., Yamashiro, Y., Asato, T., Endo, S., Misaki, R., Taguchi, T., and Kariya, K. (2009). Rap2 function requires palmitoylation and recycling endosome localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 732-737.
  18. McKenzie, J., Johannes, L., Taguchi, T., and Sheff, D. (2009). Passage through the Golgi is necessary for Shiga toxin B subunit to reach the endoplasmic reticulum. *FEBS J.* 276, 1581-1595
  19. Ikeda K, Shimizu T, Taguchi R. Targeted analysis of ganglioside and sulfatide molecular species by LC/ESI-MS/MS with theoretically expanded multiple reaction monitoring. *J Lipid Res.* 2008 ;49:2678-89
  20. Nakano M, Nakagawa T, Ito T, Kitada T, Hijioka T, Kasahara A, Tajiri M, Wada Y., Taniguchi N, Miyoshi E. (2008) 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, 2301-09.

21. Nakagawa T, Miyoshi E, Yakushijin T, Ikura H, Hiramatsu N, Hayashi N, Taniguchi N, Kondo A. (2008) Structural and enzymatic bases of N-glycans of alpha-fetoprotein L2 and L3 from hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients. *J. Proteome Research* 7, 2222-2233.
22. Narisada M, Kawamoto S, Kuwamoto K, Moriwaki K, Nakagawa T, Matsumoto H, Asahi M, Koyama N, Miyoshi E. (2008) Identification of an inducible factor secreted by pancreatic cancer cell lines that stimulates the production of fucosylated haptoglobin in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 377 (3), 792-796.
23. Wada Y, Tajiri M. 2008. Tackling difficulties in the determination of O-glycosylation sites: approaches to mucin-type glycoproteins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 20:69-80.
24. Tajiri M, Kadoya M, Wada Y. 2009. Dissociation Profile of Protonated Fucosyl Glycopeptides and Quantitation of Fucosylation Levels of Glycoproteins by Mass Spectrometry" *J. Proteome Res.* 8:688-693.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 1 件 (CREST 研究期間累積件数 : 13 件)