

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」
研究課題「遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的
解明」

研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成21年3月

研究代表者:野村一也
(九州大学大学院理学研究院
生物科学部門 准教授)

§ 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。細胞系譜や遺伝学的手法を利用したアポトーシス分子機構の解明と RNAi (RNA 干渉) の発見はそれぞれ 2002 年度と 2006 年度のノーベル医学・生理学賞に輝いたし、蛍光タンパク質を生物の体内で利用する手法の開発には 2008 年度のノーベル化学賞が授与されるなど6年間で6人ものノーベル賞を輩出しているのもこの生物の有効性を如実に示している。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予想できた。そこで本研究では 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た。同時にヒトを含む哺乳類やショウジョウバエ、培養細胞などでも重要な糖鎖遺伝子を平行して解析し、その結果を線虫にフィードバックし、線虫での成果を逆にヒトへとフィードバックする研究を行った。こうして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を目標としたが、この目的は十分達成されたと考えられる。

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出し、その線虫オース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することを試みた。本研究開始直前に線虫のグリコサミノグリカンであるコンドロイチンが、線虫初期胚の細胞分裂に不可欠であり、コンドロイチンが無いと胚の細胞分裂が異常になることを明らかにした。これは糖鎖が細胞分裂に関わっていることの初めての発見であり、世界的に注目を浴びる成果であった。本研究ではこの現象を発見したのと同様の詳細な胚発生解析と RNAi、遺伝子ノックアウト(遺伝子の欠失変異体の取得)を併用しながらすべての糖鎖関連遺伝子の機能をスクリーニングし、胚発生や形態形成、生存、行動などに糖鎖がどのようにかかわっているかを明らかにすることを試みた。遺伝子機能を検討した遺伝子としては、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などがある。これら遺伝子全てについて RNAi を行い、約 4 割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、GFP などの蛍光タンパク質に糖鎖遺伝子のプロモーターやプロモーターと遺伝子全長などをつないだ上で線虫に導入し、糖鎖遺伝子の発現部位を解析する研究も行った。このために最適なベクター系の開発も成功し、これを用いた効率的な発現解析によって、糖鎖遺伝子のゴルジや ER での局在、vesicle transport への役割の解明などが飛躍的にすすむようになった。同時に RNAi のメカニズムの解明を行い、解析しにくい遺伝子の RNAi 法の開発にも成功した。さらに遺伝子ノックアウト技術の改良も行なって線虫における相同遺伝子組み換えの手法の開発にもほぼ成功している。

さらに遺伝子破壊の結果どのような遺伝子発現の変動がおきて、異常がおこるかを明らかにするため、プロテオーム解析の技術も開発した。二次元電気泳動で遺伝子破壊した線虫と、野生型の線虫のタンパク質を比較しどのタンパク質の泳動スポットが変動しているかを明らかにした上で、そのスポットを切り出し、アミノ酸配列を質量分析機で決定した。この方法で遺伝子破壊の結果、どのような遺伝子発現の変動が生じているかがあきらかになり、糖鎖遺伝子の機能解析のてがかりが得ら

れた。この二次元電気泳動法に用いる蛍光試薬について検討を加え、数十匹の線虫で二次元電気泳動による解析をおこなう手法を開発した。この方法によれば線虫を一匹一匹十分に観察した上でサンプリングして解析したり、線虫ソーターで集めて解析したりすることが可能であるため、タンパク質発現の個体ごとのゆらぎ、発生にともなう変動などの解析が世界で初めて可能となった。従来、線虫のタンパク質の二次元電気泳動は多数の不均一な個体で行われていたため、二次元電気泳動ではほとんど信頼できる結果が得られていない。私達の開発したこの手法は従来の高価な蛍光試薬を用いないので、統計的に意味のある回数の実験が繰り返し可能となり、線虫以外にも癌細胞と正常細胞のタンパク質プロファイリングを含めて、今後さまざまな分野で活用されると期待される。こうした技術の開発と平行して、哺乳類は線虫のタンパク質に付加されているグルコサミノグリカン糖鎖や GPI アンカーの修飾、シアル酸などを検出する手法も開発して線虫でのこれらの糖鎖の存在を質量分析で確認することも試みたが、残念ながらシアル酸は検出されなかった。

網羅的な糖鎖遺伝子の遺伝子破壊の結果、コンドロイチン合成酵素やコンドロイチン重合化因子の遺伝子機能の障害で線虫の細胞分裂が異常になり、染色体分配と細胞質分裂の両方が異常になることがあきらかになった。ヒトの糖鎖遺伝子のオーソログと考えられる 145 の遺伝子と、それ以外の糖脂質関連やレクチン関係の糖鎖関連遺伝子すべての遺伝子機能の障害を行った結果、N 型糖鎖の合成に関わる遺伝子でも細胞分裂の異常がひきおこされることが判明した。さらにこの遺伝子の破壊によって卵母細胞の成熟が異常になることや、細胞分裂の極性異常が生じることもわかり、コンドロイチンや N 型糖鎖の細胞分裂への関与の遺伝子ネットワークの概略をあきらかにすることに成功した。またマウスにおいてグリコサミノグリカンの合成を障害すると線虫と全く同様に細胞分裂異常がひきおこされることも発見し、糖鎖が細胞分裂に関わることを哺乳類でも確実であることがわかった。線虫で細胞分裂異常をひきおこす N 型糖鎖遺伝子はヒトの Congenital Disorder of Glycosylation 遺伝子の一つであり、胚性致死遺伝子と予想されるがこれはこの遺伝子が卵母細胞の成熟など細胞周期の異常を引き起こしていると考えれば納得できる。線虫では幸い、卵母細胞の成熟と初期胚分裂の全過程が観察できるので現在、さらに詳細に研究中である。

線虫の糖鎖遺伝子の網羅的機能障害で次に多くの異常がでたのは、ヘパラン硫酸や糖鎖の硫酸化に関わる遺伝子の場合であった。*rib-1* や *rib-2* といったヘパラン硫酸の合成に関わる遺伝子や、硫酸化に関わる PAPS 合成酵素、PAPS トランスポーター、そしてその仲間の *hut-1* などの遺伝子の破壊を行うと、初期胚分裂は正常だが原腸貫入期以降の胚発生や神経回路網形成が異常となり致死となる。これは硫酸化した糖鎖が発生後期と形態形成に重要な働きをすることを示しており、単一細胞レベルの解析が可能な線虫を使ってさらに解析を進めている。ヘパラン硫酸については哺乳類やショウジョウバエを使った解析もすすめた。ウイルス感染と硫酸化の関連などの解明に関する成果は今後の医学に大きく貢献できると考えている。最近、血液凝固剤のヘパリンに過硫酸化コンドロイチン硫酸が混ざっていたため多数の死者をだ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経験はこうした事件の対処にも大いに役立った。

糖脂質の研究は糖鎖生物学のなかでも魅力的なテーマであるが、線虫を使えば糖脂質合成遺伝子のノックアウトで詳細な研究が可能となることもわかった。*serine palmitoyl transferase* は糖脂質合成の要になる遺伝子であるし、*ceramide glucosyltransferase* はスフィンゴ糖脂質の合成の第一段階の重要遺伝子である。どちらの遺伝子もノックアウトで発生途上での致死の表現型を示す。さらに後者では成虫での遺伝子ノックアウトで行動異常がひきおこされることを発見しており、行動異常は正常遺伝子の導入で回復することから、糖脂質と行動という新たなパラダイムが展開する可能性を見据えて研究をつづけている。さらに哺乳類のガレクチンの研究から糖脂質と結合するガレクチンの一つが細菌の毒素の侵入を防御する線虫の生体防御システムとして働いていることも新たに発見した。こうした研究によって、糖脂質の重要な隠された機能があきらかにできたと考えている。

さらに糖鎖は細胞内での輸送にも活躍している。*calnexin*, *calreticulin* などはシャペロンとして有

名であるが、コンドロイチンのコアタンパク質は卵母細胞の成熟の過程で cortical granule 内に含まれ細胞膜へ輸送され、cortical granule が細胞膜に融合する際に重要な役割を果たしていることがわかっている。これは糖鎖や糖鎖が付加されたタンパク質の輸送を解明することが細胞分裂の研究にも不可欠な研究であることを示唆する事実である。この局面の研究として、私達は哺乳類の膜輸送にかかわるレクチン様タンパク質のオーソログを詳細に解析しており、輸送現象についての新たな知見が得られつつある。また線虫の糖鎖のアセチル化に関わるトランスポーターの同定や解析(これも遺伝子破壊では生殖系列に異常がでる)、アミノ酸トランスポーターや PAPS トランスポーターの生化学的解析も進めた。また GPI アンカーの全合成遺伝子についても解析を終えており、ノックアウトで致死となる遺伝子がみついている。

§ 2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究ではモデル生物 *Caenorhabditis elegans* の糖鎖遺伝子を戦略的に遺伝子破壊し結果を解析するとともに、平行してヒトを含む哺乳類やショウジョウバエなどでの研究をすすめながらその成果を線虫にフィードバックして解析するという戦略での研究をすすめた。

このため、バイオインフォマティクスを利用しながらヒトの糖鎖関連遺伝子のオーソログをすべて線虫で同定し、その遺伝子破壊を RNAi と遺伝子ノックアウト株(欠失突然変異株)の取得でおこない、その結果を詳細に解析した。こうしてさまざまな糖鎖関連遺伝子の隠された機能を明らかにした。

主な研究手法や目標は以下のようである。

1) RNAi の手法や遺伝子破壊株の取得の実施と、それぞれの手法の改良、開発(三谷グループ、野村グループ)

この研究項目では遺伝子破壊の手法の改良、効率化をすすめた。RNAi の生ずる分子メカニズムについてもノーベル賞受賞者の Mello らとの共同研究も実施した。こうして遺伝子破壊を効率的に行った上で遺伝子の発現部位や時期などを詳細に観察した。そのために2)が必須である。

2) 遺伝子発現解析手法の改良(三谷グループ・野村グループ)

この研究項目ではノーベル化学賞を受賞した Tsien らによって開発された蛍光タンパク質をふくめてさまざまな色の蛍光タンパク質を使い勝手のよい vector にいれて使用できるように改良した。また細胞内局在がさまざまな Golgi marker, ER marker, Endosome マーカーなどを含むトランスジェニック線虫を多数作成して解析に役立つようにした。さらに遺伝子発現を経時的に追跡するための四次元顕微鏡(全自動タイムラプス蛍光微分干渉顕微鏡)のシステムを構築し効率的に実験できるようにした。

3) 遺伝子発現変化のプロテオーム解析による解析と解析法の開発(野村グループによる二次元電気泳動法の開発)

遺伝子のノックアウト結果がどのようにプロテオームに反映するかを調べるため、数十匹程度の線虫で二次元電気泳動の 2D-DIGE 解析 (2 Dimensional Differential In-Gel electrophoresis 法)を実施する手法を開発した。また小数の均一な線虫を蛍光線虫ソーターで分取して解析する手法も確立した。

4) 質量分析法によるグリコサミノグリカン糖鎖構造、GPI アンカーやシアル酸などの修飾の同定方法の開発および未知タンパク質のアミノ酸配列の決定(川崎グループ)

二次元電気泳動法や免疫沈降法で分離した変化しているタンパク質がいった何なのかをあきらかにするため、質量分析法を駆使した研究を行った。同定したタンパク質に本当にコンドロイチンが付加されているかを直接、糖鎖を同定することで決定したり、GPI アンカーの構造を同定する

手法を確立して利用した。シアル酸の同定方法も開発した。

5) 線虫の研究と平行して、線虫にオーソログがあるヒトの糖鎖関連遺伝子の解析を行った。その結果を線虫にフィードバックして解析することで、より詳細な糖鎖関連遺伝子の作用メカニズムがあきらかになった。

例としてはアミノ酸トランスポーター、ガレクチン、VIP36、グリコサミノグリカン合成酵素や合成酵素補助因子、糖脂質合成酵素などがある。

6) 私達が発見した糖鎖による細胞分裂制御機構の解明

私達が線虫で発見したコンドロイチン合成酵素と同様に、細胞分裂に関わる糖鎖遺伝子が存在するか否か、さらにコンドロイチン合成酵素がどのように細胞分裂に関わっているのかを、糖鎖関連遺伝子の網羅的ノックアウトで明らかにすることを試みた。この結果、コンドロイチン合成酵素の補助因子や N 型糖鎖合成酵素などが細胞分裂に関わっていることが明らかになった。

こうした研究の結果、糖鎖遺伝子が細胞周期と卵母細胞の成熟に深くかかわっていること、糖鎖の細胞内から細胞外への輸送が細胞分裂や膜輸送に重要な役割を果たしていること、ガレクチンが生体防御にかかわっていること、糖脂質合成酵素の遺伝子と行動の結びつきなどがあきらかになってきた。

特に糖鎖は細胞表層、あるいは細胞外基質の部分から細胞内へのシグナル伝達に深く関わっているばかりか、細胞分裂の制御に表層を介してかかわっていること、そしてこの現象が線虫のみならず哺乳類でも同様であることは大きな発見である。今までは細胞内部からの細胞膜へのはたらきかけが主として研究されてきたが、本研究を契機に、細胞表層から細胞膜への働きかけの分子実体を明らかにし、その制御機構の細胞内輸送とのカップリングによる制御機構の全体像の解明につなげていきたいと考えている。

(2)実施体制

グループ名	研究代表者又は 主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
野村グループ	野村一也	九州大学理学研究院・生物科学部門・准教授	線虫糖鎖関連遺伝子の遺伝子破壊と破壊結果の解析
三谷・安藤グループ	三谷昌平 安藤恵子	東京女子医科大学医学部・第二生理学教室 教授 助教	線虫糖鎖関連遺伝子のノックアウト株の取得と解析方法の研究・開発
川崎グループ	川崎ナナ	国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長	糖鎖構造、糖鎖修飾の解析とプロテオーム解析と手法の開発
山下・瀬古グループ	山下克子 瀬古玲	東京工業大学・イノベーション研究推進体ライフサイエンス・特任教授 研究員	糖鎖認識分子と糖鎖関連遺伝子の解析

北川グループ	北川裕之	神戸薬科大学・薬学研究科・教授	グリコサミノグリカンの機能解析と生化学的解析
金井グループ	金井好克	大阪大学医学系研究科・教授	トランスポーターの解析

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 線虫糖鎖関連遺伝子の遺伝子破壊と破壊結果の解析(九州大学 野村一也 グループ)

(1)研究実施内容及び成果

ヒトを含む哺乳類の糖鎖の機能の研究をすすめながら、つねに線虫の研究との間でフィードバックを行い、ヒトや哺乳類で重要な遺伝子に対応する線虫遺伝子破壊を行うという戦略で研究をすすめた。遺伝子破壊には TMP/UV 法で作った線虫ノックアウト株ライブラリーから欠失突然変異株をスクリーニングするという洗練された手法を採用した。この方法はチームの三谷昌平、安藤恵子らによるナショナルバイオリソースプロジェクトで大規模に実施されている手法であり世界最高の効率での欠失株取得を進めた(三谷グループの研究実施内容を参照)。またトランスジェニック線虫の作製および技術の革新的改良も試みながら、線虫での糖鎖遺伝子の機能解析を行った。さらに遺伝子の機能阻害法としては RNAi も積極的に利用した。RNAi はその効果を数世代にわたって追跡でき、複数の遺伝子の同時機能阻害が可能な他、機能阻害の強弱を調節できるという得難い利点を持つ遺伝子機能阻害法である。遺伝子欠失株への RNAi も可能であり、synthetic lethality の実験による遺伝子ネットワーク解明も進めた。

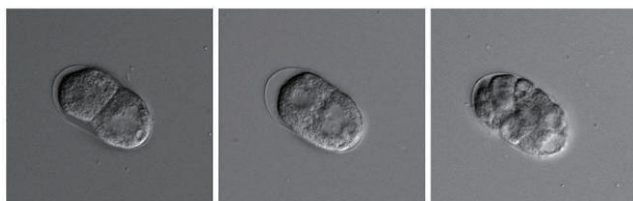
遺伝子破壊の効果はタイムラプス全自動蛍光微分干渉顕微鏡である四次元顕微鏡をトランスジェニック線虫と組みあわせて単一細胞レベルで検出した。またこれに加えて糖鎖関連遺伝子のネットワークの解明するため、DNA マイクロアレイや二次元電気泳動法を用いた遺伝子ノックアウト株の解析も利用した。特に二次元電気泳動で変動しているタンパク質を同定する 2D-DIGE(two dimensional differential in-gel gel electrophoresis) 法を小数の線虫でかつ安価に実施できる手法を開発して活用した。糖鎖関連遺伝子のノックアウトで変動しているタンパク質を同定し、ゲルから切り出したタンパク質のアミノ酸配列を四重極イオントラップ型質量分析機を含む LC/LC/MS/MS システムで決定し当該遺伝子のノックアウトをおこなうという手法で遺伝子ネットワークの解明も行った。

ノックアウトする遺伝子の選定には成松久グループの高度のバイオインフォマティクス技術の援助を受け、ヒトの糖鎖遺伝子のオーソログと考えられる線虫遺伝子 145 個を同定した。さらに線虫で網羅的に行われている yeast two hybrid の結果や線虫 interactome 解析の結果を利用しながら独自のバイオインフォマティクス解析をすすめて、ヒトの疾病の原因解明などに役立つ可能性の高い遺伝子から優先的にノックアウト解析を進める手法をとった。これらの遺伝子の中には、ヒトの筋萎縮性側索硬化症で死んでいく神経細胞で発現が亢進している遺伝子の線虫オーソログや、筋ジストロフィーに関連する遺伝子など重要な遺伝子が多数含まれており、癌や筋ジストロフィーを含む難病、遺伝病などの治療法の開発へつながる研究が展開することを目指した。この結果、従来の哺乳類の研究ではまったく捉えられなかった糖鎖の機能を明らかにすることに成功した。

1) 線虫の糖鎖関連遺伝子の組織的・戦略的ノックアウト：

成松久博士の研究グループとの共同研究でヒトと共通の糖鎖遺伝子 145 個が存在する

ことをバイオインフォマティクスを活用することでつきとめ、順次 TMP/UV 法での欠失突然変異株の取得を行った。三谷グループによるノックアウトと国際ノックアウトコンソーシアムのノックアウト株を併せて、50%以上の欠失突然変異株を入手して解析した。また 145 個の遺伝子全てについて RNAi によるノックアウト・ノックダウンを終了し、4 割程度の遺



コンドロイチン重合化因子 *pfc-1* 遺伝子の機能を低下させた線虫の初期胚。2細胞期胚(左)が1細胞(中央)へと変化したまま死んだようにみえるが、突然、多細胞胚(右)へと変化する。

伝子で異常表現型を確認し、詳細な解析をすすめた。図にはコンドロイチン重合化因子 *pfc-1* の RNAi でみられる胚発生の胚細胞分裂異常を示してある。さらにヘパラン硫酸合成に関連する遺伝子 *rib-1*, *rib-2* (以上、北川裕之グループとの共同研究)、そして硫酸化に不可欠な PAPS 合成酵素や PAPS transporter の遺伝子破壊 (瀬古玲、山下克子グループとの共同研究) でも後期胚発生の異常が確

認され、糖鎖の硫酸化の単一細胞レベルでの解析への道をひらくことができた。またコンドロイチン合成酵素がコンドロイチン糖鎖を付加する相手のタンパク質であるコンドロイチンコアタンパク質候補の同定にも成功し、実際にコンドロイチン糖鎖が付加されていることを川崎サナグループとの共同研究で確認した。コンドロイチンのコアタンパク質候補は他にも存在しているようで現在確認中である。また北川グループによりコンドロイチンプロテオグリカンをマウス初期胚で阻害すると細胞分裂異常が線虫と全く同様に引き起こされることがあきらかになっている。私たちは線虫の N 型糖鎖の合成に関わる遺伝子をノックアウトすると、細胞分裂の異常や細胞極性の異常、そして卵母細胞の成熟の異常が引き起こされることを明らかにした。糖鎖は線虫のみならずマウスでも細胞分裂や卵成熟に不可欠であり、細胞周期の進行に糖鎖が必要であることが初めて明らかになった。現在、線虫の遺伝学を駆使しながら細胞分裂と糖鎖の関係をさらに研究中である。

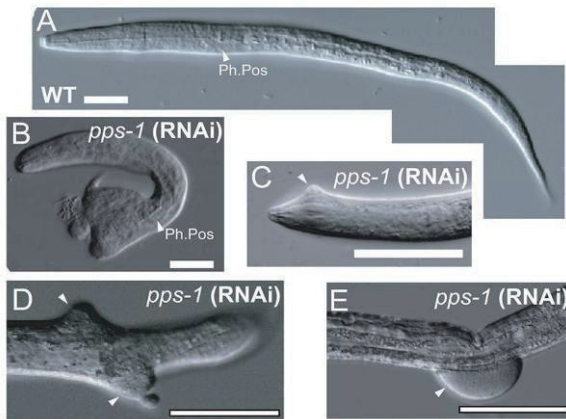
2) ノックアウト株と RNAi を利用した、遺伝子の多重ノックアウトシステムの確立：

遺伝子ノックアウト株の約半数は致死の表現型を示さない。こうした線虫では全く見かけ上正常の表現型を示すものも多いが、ノックアウトされた遺伝子からの遺伝子産物産生は完全に無くなっている。そこで致死でないノックアウト株の線虫を大量に培養し、この線虫に一万種類を超える線虫遺伝子についての RNAi を網羅的に行い何らかの表現型がえられるものをスクリーニングする手法が考えられる。この目的のため、線虫を発生段階、大きさ、蛍光の有無で生きたまま分離できる線虫ソーターを導入し、多数の異なる feeding RNAi 用の大腸菌をまいてあるマイクロタイタープレートの穴に変異株の線虫を数匹ずつ入れて数代にわたって飼育し、表現型を検定するシステムを確立した。現在、この方法で複数の糖鎖関連遺伝子を同時にノックアウトして顕れる表現型 (synthetic lethality など) のスクリーニングを行っており、興味深い結果が得られている。たとえば細胞分裂に必要不可欠とおもわれるコンドロイチンが付加したタンパク質として B0280.5 を同定した。この遺伝子をノックアウトしても細胞分裂は異常にならないし野生型とみかけは変わらない。これに *cej-1* とよばれる別のコンドロイチンのコアタンパク質遺伝子の RNAi をかけたときにだけ細胞分裂が異常になるのである。両遺伝子のノックアウト株も取得しており、単独では異常にならないが、ダブルノックアウトしたときのみ細胞分裂が異常となる。こうした例は他にもあきらかにしており、糖脂質合成酵素の ceramide glucosyltransferase 遺伝子は線虫に 3 種類存在する。それぞれ単独のノックアウトでは表現型は正常だが特定の二つを同時にノックアウトすると発生途上で致死になる。また成体でノックアウトすると行動異常があらわれるのである。このようにダブル、トリプルノックアウトの手法は線虫での糖鎖の機能を探るには極めて有用な手法であり、興味深い結果を次々と生みだしている。

3) 二次元電気泳動法と DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の解析と技術開発：

RNAi や欠失突然変異株で、ある特定の糖鎖関連遺伝子をノックアウトした場合、いったいどのような遺伝子の発現が変化して表現型にむすびついているのだろうか。これを明らかにするために遺伝子機能破壊株と正常株の mRNA 発現パターンの変化を DNA microarray と二次元電気泳動法（二次元 DIGE 法）で検討する研究を行うのがよい。DNA マイクロアレイは Affymetrix 社のものを用いており細胞内レクチンの仲間の遺伝子である *Ile-1*, *Ile-2* のノックアウト株で変動している遺伝子の解析を行った。また二次元 DIGE 法は、野生株と糖鎖関連遺伝子のノックアウト株由来の蛋白質をそれぞれ異なる蛍光色素でラベルして混合した上で同時に二次元電気泳動して泳動ごとの誤差なく比較することができる画期的な手法であるが極めて高価な試薬を使う欠点があった。私達は最新の蛍光試薬をいち早く導入し従来の 1/100 の価格で解析可能なプロトコルを考案した。また糖蛋白質だけを特異的に染色することができる Pro Q-Emerald の染色方法を確立したので、これと 2D-DIGE を組み合わせ、遺伝子ノックアウトにともなうどのような蛋白質、糖蛋白質の変化が起こったかを解析し、変動した蛋白質を含む電気泳動スポットをゲルから切り出し、LC/MS/MS 法などでアミノ酸配列を決定して同定した。またわずか線虫 30 個体程度で二次元電気泳動を行い結果を得る手法を開発したので、より均質なサンプルでの糖鎖関連遺伝子の破壊によるプロテオーム変動が検出出来るようになった。こうした解析によって、糖鎖遺伝子をノックアウトするとストレス応答が高まることが明らかに出来た。また複数種のコンドロイチンコアタンパク質候補も、こうした解析によって同定して解析をすすめた。

4) 硫酸化関連遺伝子の遺伝子破壊の解析：



糖鎖の硫酸化は様々な局面で重要な働きを果たしている。ノーベル賞受賞者の Lipmann は硫酸化の役割を晩年の至上命題として研究を続けていた。私達は糖鎖関連遺伝子の網羅的解析の途中、ヘパラン硫酸の硫酸化に関わる sulfotransferase のノックアウトが神経回路網の異常を引き起こすことを確認したし、さらに Lipmann によって発見された PAPS synthase のノックアウトによって後期胚致死や器官形成の異常が引き起こされること（左図を参照）を見だし、硫酸化が胚発生と器官形成の様々な局面で重要な働きを果たすこと

があきらかになった。

さらにヘパラン硫酸の合成に関わる *rib-1*, *rib-2* のノックアウト株の解析も行っており、これらが後期胚致死となること、ヘパラン硫酸が器官形成やアポトーシスとつながっていることを明らかにした。また PAPS transporter family のバイオインフォマティクス解析をすすめて全遺伝子候補を同定し、RNAi を行ってどの遺伝子が必須な遺伝子であることを明らかにした。さらに PAPS transporter や *hut-1* などの遺伝子のノックアウトも行い、後期発生などでこれらが重要な働きをしている（ノックアウトは致死となる）ことを確認した。また線虫に存在する新規の硫酸化分子を同定し解析に成功した。

5) 糖脂質関連遺伝子やその他の遺伝子の研究：

糖脂質の合成の要の遺伝子である serine palmitoyltransferase の全遺伝子の欠失突然変異株を取得し、RNAi と組み合わせて解析した。この遺伝子機能を破壊すると線虫は後期胚致死となることがわかり、単一細胞レベルでの発生異常解析をすすめている。この致

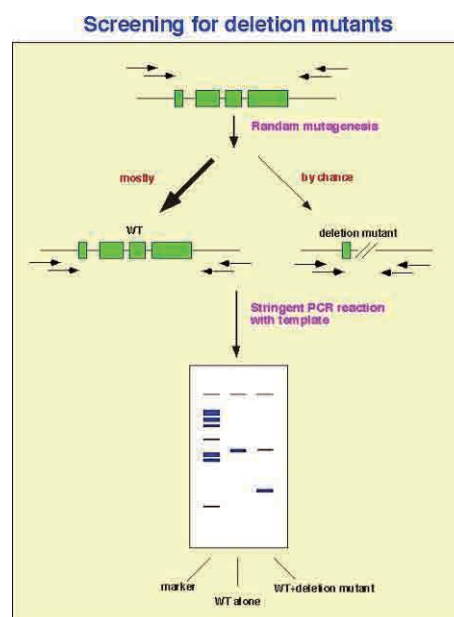
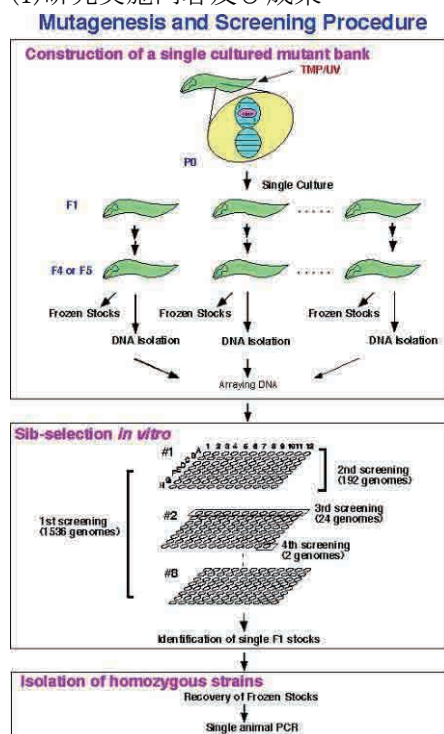
死の表現型は線虫に ceramide 前駆体を与えることでレスキューできることも確認しており、セラミドや糖脂質の胚発生での重要性をうかがわせる結果である。グルコシルセラミド合成酵素 *cgt-1*, *cgt-2*, *cgt-3* や GPI アンカー合成酵素群のノックアウトもすすめており、致死となること、*cgt* の成体での機能障害が行動異常をひき起こすことは興味深い。また GPI アンカータンパク質の同定も済ませており、ノックアウトの結果は GPI アンカーの多細胞生物における不可欠性を示しておりさらに詳細な研究が待たれる。さらに糖鎖のアセチル化の関係している acetyl CoA transporter のノックアウト株や、ALG 遺伝子や POMT 遺伝子、FUT8 遺伝子などのノックアウト株が様々な表現型を示すことを確認した。

(2)研究成果の今後期待される効果

糖鎖遺伝子について研究するにはモデル生物線虫は最適の生物であり、その利点を最大限に活用した成果が糖鎖の細胞分裂と卵母細胞の細胞周期への関わりの発見である。この発見は哺乳類の発生にもあてはまることがわかってきているので、糖鎖の機能の新しいパラダイムの展開が本研究を機にすすむと期待できる。本研究で得られた他の成果もそれぞれ今後の画期的な研究のさきがけとなるものであり、癌やその他の病気の治療にむすびつくことが期待される。

3. 2 線虫糖鎖関連遺伝子のノックアウト株の取得と解析方法の研究・開発(東京女子医科大学 三谷昌平グループ)

(1)研究実施内容及び成果



糖鎖領域研究代表者野村一也博士のグループ他と協力して、糖鎖修飾酵素や糖蛋白質の線虫における機能解析と遺伝子破壊株の作成効率の向上、RNAi メカニズムの解明などの仕事を進めた。図には欠失突然変異株の分離法の概略

を示してある。分担者三谷の主な役割は、機能解析を行うための、欠失変異体を分離し、バッククロスにより無関係な変異を取り除くことである。さらに、目的の遺伝子は生物学的な意義が高い場合が多く、その場

合には変異体が致死表現型を呈する遺伝子であるので、バランサーを導入して表現型の記載が容易にできるような株とする。バランサーは、転座染色体を保有し、かつ、GFPを発現するトランスジーン遺伝子を持っている株を可能な限り使用する。そのメリットは、致死変異体が安定に維持することが可能であることと、ヘテロ接合体は、マーカー蛍光を持つが、目的の変異体ホモ接合体になると、バランサー染色体を持たないために、蛍光が消失するため、容易にホモ接合体が見出されることである。このような株の表現型を調べて、かつ、その後に PCR にて遺伝子型を調べるとホモ接合体であったことを検証することができるのである。

糖蛋白質が疾患の中心的な意味付けを持っているものに関して、RNA 干渉法を用いた病態解析を試みた。このテーマについては、平成 20 年 10 月時点で、継続解析中であり、別の機会に報告したい。

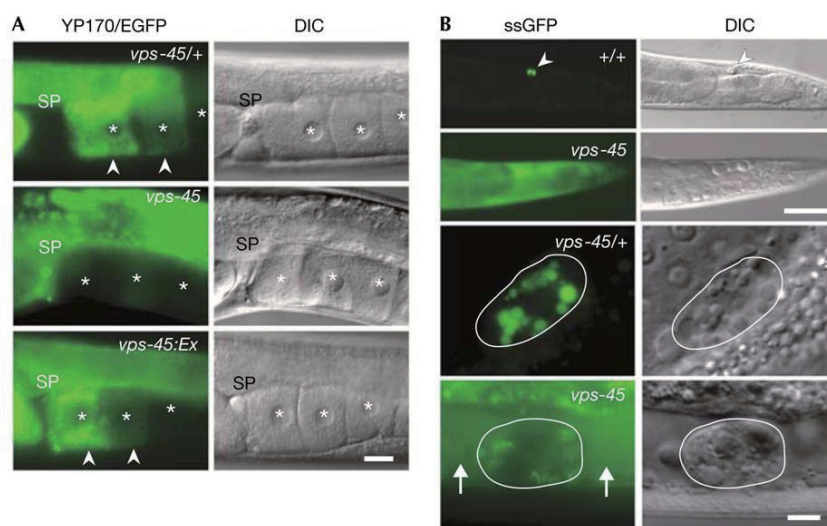
糖鎖関連分子以外にも、線虫の遺伝子機能解析によって、重要な生命現象を解き明かせる可能性のある研究を並行して行ったが、こうした細胞内での膜輸送の研究は山下研究室との共同研究によって糖鎖の研究にも大いに役立つことが分かってきた。

以下には線虫 *vps-45* 遺伝子のエンドサイトーシスパスウェイにおける機能の解析例を紹介したい。

線虫 *vps-45* 遺伝子は、酵母の *Vps45p* 遺伝子のホモログであり、酵母では、ゴルジ装置から液胞への小胞輸送に関わるとされてきた。また、*Munc-18* などとも相同性がある、細胞質蛋白質のファミリーは、SM (Sec-1/Munc-18) 蛋白質ファミリーと総称されている。我々は、膜蛋白質の輸送の制御がこのような小胞輸送の上に成り立っていることから、このファミリーの遺伝子の機能を線虫の遺伝子破壊株を用いて系統的に解析を行うことにした。*vps-45* 遺伝子については、巨視的には、温度感受性致死の表現型を呈したので、小胞輸送の何れかに異常があり、これが生存に必要であることを想像して、解析を行った。

vps-45 遺伝子は線虫個体では、ほぼ ubiquitous に発現していた。致死の表現型が maternal rescue する傾向があり、野生型個体をコレステロール不含培地での培養時に見られる表現型と類似していた。線虫においては、コレステロールは、腸管で卵黄蛋白質に結合した形で分泌され、卵母細胞への取り込みが起こることが知られている。そこで、小胞輸送の中でのエンドサイトーシスに着目して表現型解析を行った。

図： *vps-45* 遺伝子変異体株 (tm246) におけるエンドサイトーシスのアッセイ：A、RME (receptor mediated endocytosis) のアッセイ。B、Cup (coelomocyte uptake) のアッセイ。



合成されて偽体腔へ分泌された GFP の coelomocytes への取り込みが低く (最上列と第三列は野生型、第二列と最下列は、*vps-45* 変異体)、偽体腔全体が光る。

このような表現型をさらに追跡することにより、*vps-45* 遺伝子は、初期エンドソームの融合過程に必須な分子であることが明らかになった。解析の詳細は、K. Gengyo-Ando et al. (2007)

にて発表済みである。

(2)研究成果の今後期待される効果

糖鎖の関わる生命現象は多岐にわたり、個々の現象は、個体レベルでの変化が見られて初めてその意義が明らかになる場合がある。

3.3 糖鎖構造、糖鎖修飾の解析とプロテオーム解析と手法の開発(国立医薬品食品衛生研究所 川崎ナナ グループ)

研究実績内容及び成果

1. 糖鎖関連遺伝子欠失変異体における発現変動タンパク質の同定(九州大学野村グループ、国立衛研川崎グループ)

(1) 研究実績内容及び成果

1) 変動タンパク質の同定

2D-DIGE において発現量に増減が認められたスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化、LC/MS/MS、データベース検索を行い、各種遺伝子欠失変異によって発現が変動したタンパク質の同定を行った。同定したタンパク質数は表1に示す通りである。

表1 糖鎖関連遺伝子欠失変異体における変動タンパク質数と同定タンパク質数

欠失遺伝子		分析	同定
Tm247	アセチル CoA トランスポーター(T26C5.3) 遺伝子の欠失突然変異体	209	146
N2	糖タンパク質特異的染色試薬 ProQ-Emerald によって染色されたタンパク質 (糖タンパク質候補)	140	129
Tm839	(gly-2) N-Acetylglucosaminyltransferase の欠失変異体	36	30
Tm1027	(cgt-1) Ceramide Glucosyl Transferase の欠失変異体	7	7
Tm1097	(cgt-2) Ceramide Glucosyl Transferase の欠失変異体	128	102
Tm504	(cgt-3) Ceramide Glucosyl Transferase の欠失変異体	123	118
Tm1756	(pad-2) O-fucosyltransferase の欠失変異体	7	7
Tm734	(hst-3.1) Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase の欠失変異体	13	11
Tm1156	(gly-8) Polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase の欠失変異体	13	12
Cej-1	コンドロイチンコアタンパク質の欠失変異体	40	40
N2	コンドロイチン6糖認識抗体反応性タンパク質(コンドロイチンコアタンパク質候補)	40	30
B0280	コンドロイチンコアタンパク質 B0280 の欠失変異体	107	97

2. シアル酸定量法の開発と線虫のシアル酸分析(九州大学野村グループ、国立衛研川崎グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

細胞に含まれるシアル酸の定量法としてこれまでに、シアル酸を 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) で標識した後、LC/MS により定量する方法が報告されている。しかし、従来法では、線虫や培養細胞等に含まれる微量シアル酸の定量に利用することは難しいと考えられる。そこで我々は、ナノフロー LC/フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析法(nanoLC/FTICRMS)を用いた N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) 及び N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) の微量定量法を開発した。

nanoLC/FTICRMS を用いた Selected ion monitoring (SIM) によって、フェムトモルレベルのシアル酸の定量が可能になった。また、nanoLC/MS/MS により、NeuAc と NeuGc の構造を確認することができた。この方法をウシ胎仔血清 (FCS) 添加培地で培養した Rapid Growth HL-60 (HL60-RG) 細胞のシアル酸分析に応用し、FCS から細胞に取り込まれたと思われる 1%程度の NeuGc を検出できることを確認した。この結果から、本分析法は、細胞に含まれる微量 NeuAc 及び NeuGc の定量法として応用可能であることが示唆された。尚、本分析法を用いて線虫由来タンパク質のシアル酸定量分析を行ったが、シアル酸の存在を確認することはできなかった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本分析法は、 2.5×10^3 個の細胞に含まれるシアル酸を定量することが可能であり、線虫だけでなく、様々な生物、組織、細胞等の NeuAc 及び NeuGc の定量に応用可能と思われる。

3. GPI 型タンパク質同定法の開発と線虫 GPI 型タンパク質の同定(九州大学野村グループ、国立衛研川崎グループ)

(1) 研究実績内容及び成果

【実施方法・実施内容】

GPI 型タンパク質は、GPI アンカー(glycosylphosphatidylinositol、及びこれに結合する脂肪酸)を介して細胞膜に結合している膜タンパク質である。線虫においても GPI 型タンパク質の存在が示唆されているが、詳細は不明である。そこで、GPI 型タンパク質の効率的 enrichment 法を開発し、線虫 GPI 型タンパク質の同定を試みた。

GPI 型タンパク質に Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC)を作用させると、GPI と脂肪酸との結合が切断され、可溶性 GPI 型タンパク質となる。そこで、モデル組織としてラット脳を用い、Triton X-114 の温度依存性相分離を利用して、膜タンパク質を可溶化した。水相と界面活性剤相を分離した後、膜タンパク質を界面活性剤相より回収した。さらに、得られた膜タンパク質に PIPLC を作用させた後、再度、Triton X-114 を加えて相分離した。GPI 型タンパク質を水相に enrich し、可溶性 GPI 型タンパク質として回収した。可溶性 GPI 型タンパク質を SDS-PAGE で分離し、分離された主要なバンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化後、LC/MS/MS 及びデータベース検索を行った(図 1)。得られた MS/MS スペクト

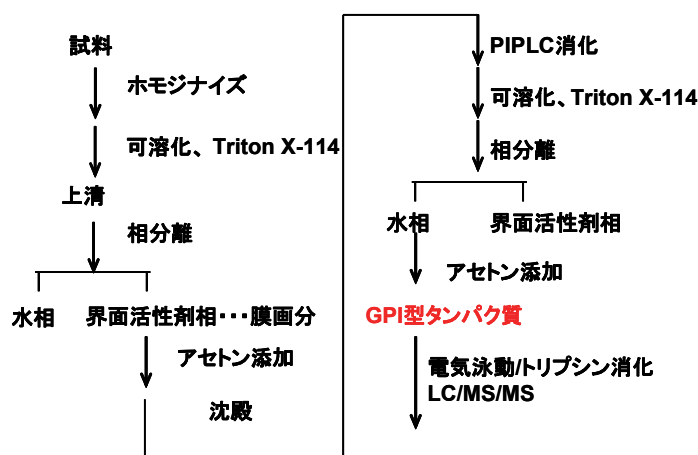


図 1 GPI 型タンパク質の enrichment 方法

ルより、GPI のコア構造に由来する診断イオン GlcNAc-Inositol-PO₄⁺ (*m/z* 422)を指標として、GPI 結合ペプチドのスペクトルを選び出し、GPI 結合ペプチド同定、及び GPI 構造の解析を行った。この方法により、Thy-1、LAMP、OBCAM、及び neurotrimin 等が同定された。これらのタンパク質はいずれも GPI 型タンパク質であり、本手法により GPI 型タンパク質が効率的に濃縮、同定されることを確認した。

本方法を用いて、線虫の GPI タンパク質を enrich し、SDS-PAGE、ゲル内トリプシン消化、LC/MS/MS、データベース検索を用いたタンパク質同定を行った。その結果、複数のタンパク質が GPI 結合タンパク質候補として同定された(表 2)。これらは、GPI を持つことが予想される配列を持つタンパク質であった。診断イオンを用いた GPI 結合ペプチドの検出と構造確認を試みたが、シグナル強度が十分でなく、GPI 関連イオンを検出するには至らなかった。

表2 GPI 型タンパク質候補タンパク質

Sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase family member
Temporarily assigned gene name family member
Prolyl carboxy peptide like family member
F32A5.3
Temporarily assigned gene name family member
To3G6.3
neuronal LGCAM family member (rig-3)
F54E2.1
F35E12.10
T33206 hypothetical protein ZK6.10
Z6.11a

(2) 研究成果の今後期待される効果

本分析法は、様々な組織、細胞に発現している GPI 型タンパク質の解析に応用可能であることから、多くの GPI 型タンパク質の研究に役立つことが期待される。

4. フェニルヒドラジン標識法と LC/MS によるグリコサミノグリカン分析法の検討(国立衛研川崎グループ)

(1) 研究実績内容及び成果

【実施方法・実施内容】

コンドロイチン硫酸 (CS) やヘパリン/ヘパラン硫酸 (Hep) 等のグリコサミノグリカン (GAG)は、細胞の分化、増殖及び接着等様々な生命現象に関係することが知られており、これらを解析する方法として、酵素消化によって GAG から生じたオリゴ糖を LC/MS(/MS)で分析する方法が開発されている。我々はこれまでに、中性条件下、還元等の煩雑な操作を必要としないフェニルヒドラジン (PHN) による N 結合型糖鎖標識法と、LC/MS/MS による微量 N 結合型糖鎖の解析技術を開発している(図2)。そこで、本分析法を、GAG オリゴ糖解析に応用することを検討した。

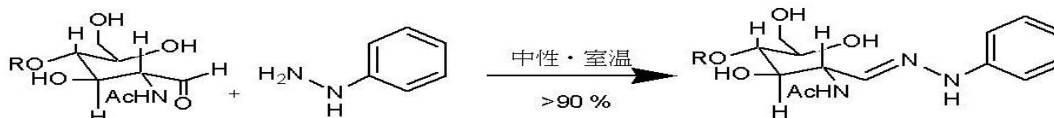


図2 オリゴ糖のフェニルヒドラジン標識

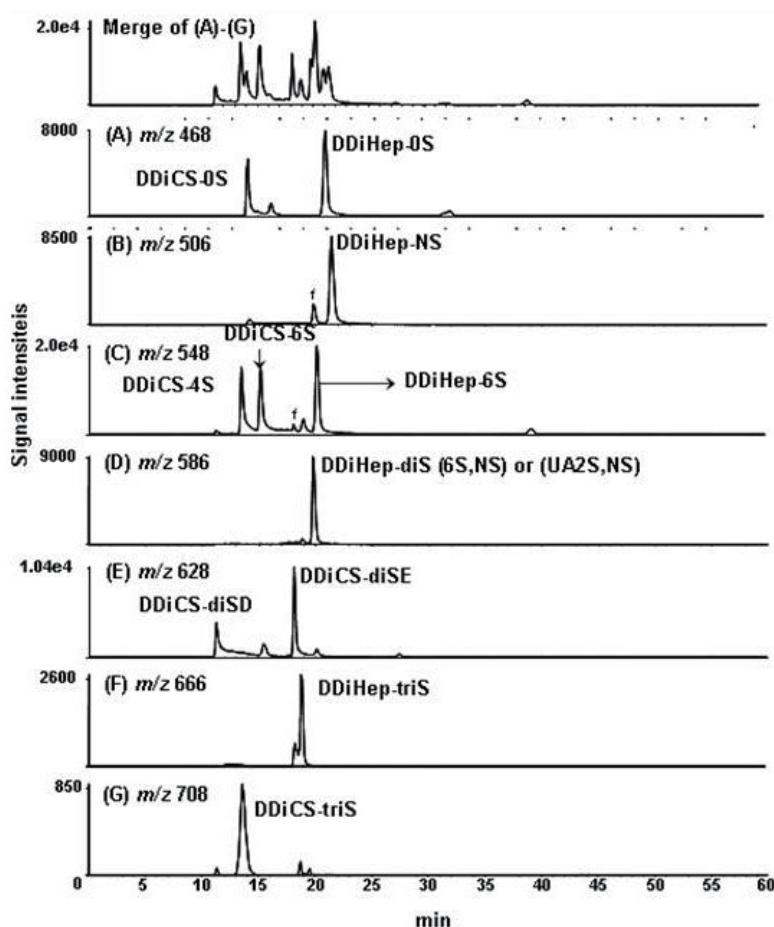


図3 PHZ標識オリゴ糖のLC/MS

はじめに、市販のCS及びHep由来標準不飽和2糖 (Δ diCS及び Δ diHep)をPHNで標識し、内径0.2mmのグラファイトカーボンカラムを用いたLC/MS/MSを行った。その結果、構成糖や硫酸エステル基の数の違いはもとより、硫酸エステル化の位置の違いを識別できること、またPHZ標識することにより、未標識のときに比べて10倍以上ピーク強度が高くなることが確認された(図3)。

さらに、MS/MSにより得られたフラグメントパターンを解析することにより、構造を推定できることが確認された。

つぎに、本分析方法の実行可能性を評価する目的で、モデル細胞 rapid growth HL60

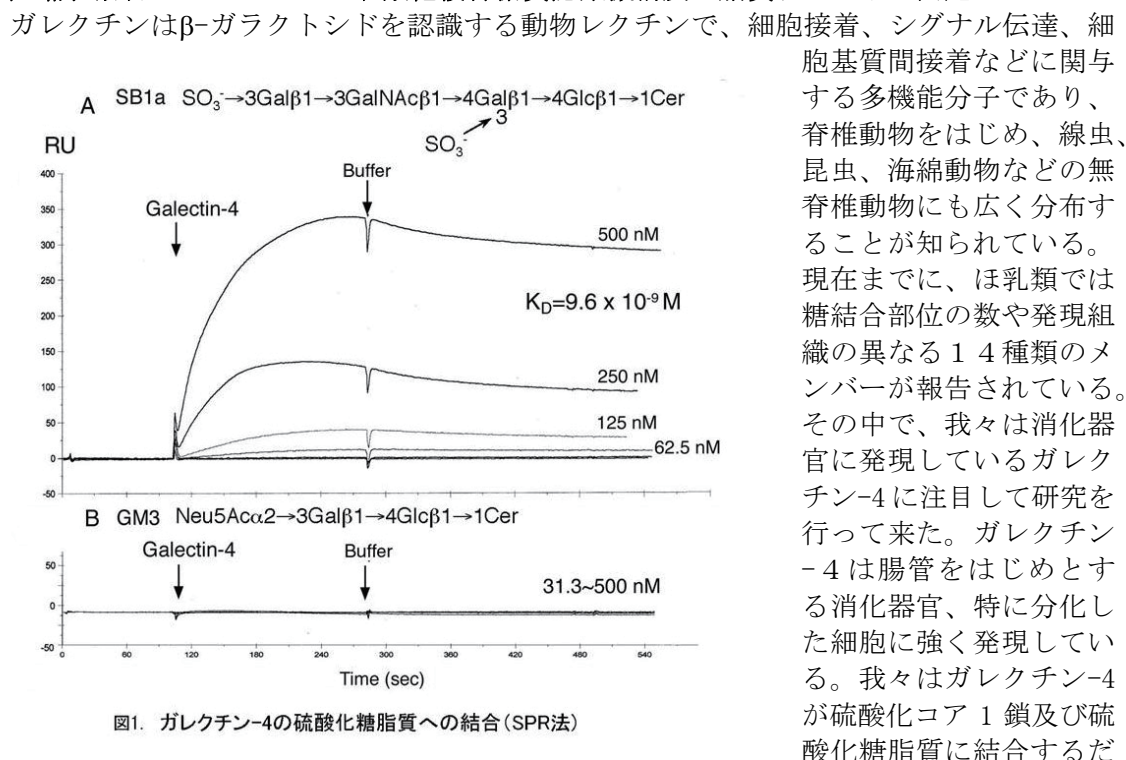
(HL60-RG)のGAG解析を行った。その結果、全体の約95%以上が Δ diCS-4Sであり、以前に報告されている結果に一致することが確認された (Luikart et al., 1984, *Cancer Res.*)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

分担研究者らが、D置換2アミノピリジンを用いた同位体標識法とLC/MSを組み合わせた定量的糖鎖解析法を発表して以来(*J. Chromatogr. A*, 2005; *Immunology* 2008), 様々な研究グループにより他の同位体標識試薬を用いた糖鎖の定量的解析法が報告されるようになった。分担研究者らも、より簡便な定量解析法として、D置換フェニルヒドラジンや ^{13}C 置換フェニルヒドラジンを用いた方法を開発し(特許出願中)、細胞等の糖鎖の定量解析に応用できることを確認している。今回、フェニルヒドラジン標識法とLC/MSがGAGオリゴ糖分析に応用できることが確認されたことから、D/ ^{13}C 置換フェニルヒドラジンをGAGの定量解析にも応用できることが示唆された。本分析法は、約 3×10^5 個程度の細胞のGAGを分析することが可能であり、今後、線虫やその他の生物、細胞、組織のGAGの定量的定性的解析に利用されることが期待される。

3. 4 糖鎖認識分子と糖鎖関連遺伝子の解析（東京工業大学 山下克子グループ）

1) 哺乳動物ガレクチン-4 の硫酸化複合糖質認識機構及び脂質リガンドの同定



けではなく、硫酸化コレステロールにも強く結合し、その結合は0.1Mラクトース及び硫酸化複合糖質で阻害されることを見出した (Ideo, H., *et al.*, (2005) *J Biol Chem.* 280, 4730-4737, Ideo, H., *et al.*, (2007) *J Biol Chem.* 282, 21081-9)。また、その結合に関与するアミノ酸残基を特定し、ガレクチン-4が2量体の構造をとることによってリガンドへの結合を強めることを証明した。さらに、組織ホモジネートを用いた実験でのガレクチン-4が腸管では主にSM4と硫酸化コレステロール、咽頭では硫酸化コレステロールと共に界面活性剤不溶画分に存在することを明らかにし、ガレクチン-4のラフトへの局在に関与する脂質リガンドを明らかにした。また、ガレクチン-4の硫酸化糖鎖の認識機構に関し、高エネルギー研との共同研究でガレクチン-4-SO₃⁻→3Galβ1→3GalNAc複合体の共結晶のX線構造解析を行った。

《成果の位置づけや類似研究との比較》

ガレクチン-4特有の硫酸化複合糖質認識機構及び、硫酸化脂質に結合して生体内に存在することを初めて明らかにした。他のガレクチン研究は糖タンパク質あるいは遊離オリゴ糖との相互作用を見ているものがほとんどである。類似研究としては、我々の論文の半年後に大腸癌細胞でラフトへのガレクチン-4の存在と、SM4への結合を報告する論文があり、我々の研究の成果が他の研究室でも同様に確かめられた。

2) 糖脂質認識線虫ガレクチン、LEC-8の感染防禦機構への関わり

ガレクチン-4の生物機能を解析するために、我々は線虫をモデル生物として、その機能的ホモログを糖脂質への結合活性を指標として検索し、その機能解析を行った。

アミノ酸配列の相同性から予測される線虫のガレクチン (LEC-1~11) のリコンビナント蛋白質を調製し、同時に線虫糖脂質を精製した。LEC-1~11の糖脂質結合活性を調べた結果、LEC-8, 9, 10が結合活性を示し、その中でLEC-8のみがラクトースで結合活性が阻害されたことから、LEC-8が糖脂質に糖鎖を介して結合していることが明らかとなった。

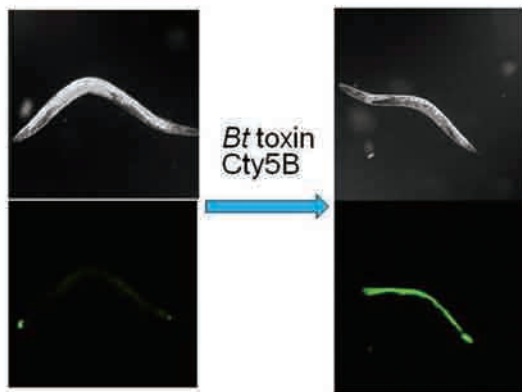


図2. Cry5BによるLEC-8::GFPの発現誘導

Cry5BによるLEC-8 発現誘導が抑制された。これらの現象から、LEC-8 の消化管での発現に糖脂質を介した感染がトリガーとなっている可能性が示唆された。さらにLEC-8 欠失変異体では野生株に比べCry5B毒素感受性が亢進することが明らかとなった。また、in vitroのプレートアッセイにより線虫糖脂質に対するCry5Bの結合をLEC-8 が競合的に阻害した。以上の結果から、糖脂質に結合するLEC-8 はその糖脂質をレセプターとする毒素の感染によって発現誘導されると同時に、毒素そのものと競合的に糖脂質に作用して生体防禦機構に関わっている可能性が強く示唆された。

《成果の位置づけや類似研究との比較》

線虫のガレクチンの研究は、今まで主に入手可能な哺乳動物由来の遊離オリゴ糖を用い、それらの糖鎖間での線虫ガレクチンへの結合能の比較にとどまり、線虫生体内リガンドの同定はほとんどなされていなかった。今回、線虫生体内リガンドとして、線虫糖脂質結合レクチンを初めて明らかにし、生体防御における関与を明らかにした。

《研究成果の今後期待される効果》

モデル生物線虫を用いた研究によって、糖脂質認識ガレクチンの、生体内局在、糖脂質をターゲットとする感染に対する生体防御機構への関与が明らかになったことから、これをさらに、哺乳動物のガレクチン-4に応用し、感染への生体防御機構を解明していく意義は大きい。また、線虫の実験に用いたCry5Bは農業的に生物農薬や、遺伝子組み換え作物に使われるCrystal toxin familyの一種である。このファミリーの生物農薬は毒素レセプターとしての糖タンパク質あるいは糖脂質の糖鎖構造の違いを利用して、哺乳動物へ無害で標的害虫に特異的に作用する。その糖鎖の詳細な認識機構、生体内の耐性、防御機構に関わる分子（レクチン、糖転移酵素等）を研究することは、社会への波及効果が大きいと思われる。

3) 細胞内小胞輸送蛋白質群の機能解析

輸送小胞膜蛋白質の一つである VIP36 は高マンノース型糖鎖結合活性を持ち、糖蛋白質の細胞内輸送の一端を担っている。MDCK 細胞においてVIP36 が糖蛋白質クラスタリンの高マンノース型糖鎖を介して細胞内輸送に関与していることを明らかにした。ついで、VIP36を高発現している組織の1つであるラット唾液腺についてVIP36の細胞内局在性及びリガンド糖蛋白質を調べた。(1)ラット唾液腺をホモゲナイズした後、密度勾配遠心にて細胞内小胞を分画したところ、高密度小胞と低密度小胞にそれぞれVIP36が存在することが判った。(2)高マンノース型糖鎖を有する唾液腺主要糖タンパク質 α -アミラーゼも両小胞画分に存在するが、高密度小胞では高マンノース型糖鎖を持たない型であった。(3)免疫沈降実験により、低密度小胞においてVIP36と α -アミラーゼは結合していることが示された。(4)*N*-結合型糖鎖を脱離させるエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性は両小胞画分に見い出された。したがって、新生合成されたアミラーゼは、VIP36と結合し低密

度小胞にプールされ、小胞内のエンド- β -*N*-アセチルグルコサミナーゼの作用により糖鎖が脱離されると VIP36 と離れ、高密度小胞に移送されるというスキームが示唆された。我々は VIP36 が Mana1-2Man 残基を含む高マンノース型糖鎖に特異的に結合することを世界に先駆けて見出した。糖鎖の認識機構に関し、高エネルギー研との共同研究によって VIP36-Mana1-2Mana1-2Man 複合体の共結晶に成功し、X 線構造解析が完了している (*J. Biol. Chem.*, 282, 28246-55, 2007)。

しかしながら哺乳動物においては、糖認識部位をもった ERGIC-53、ERGICL、VIP36、VIPL など何種類もの小胞輸送蛋白質が存在しているが、それらの結合リガンド、機能分担等、今だ十分に明らかにされていない。これらの小胞輸送蛋白質のアミノ酸一次構造は種を超えてよく保存されており、我々は ERGIC-53 の orthologue である ILE-1 分子と VIP36 の orthologue である ILE-2 分子に着目して、線虫をモデル動物とした機能解析を目指した。

GFP 融合蛋白質の発現解析によって、ILE-1, ILE-2 両分子が線虫組織に広く発現していると同時に、ILE-2 の細胞内局在が哺乳細胞と同様に ER から細胞膜まで広く分布していることを見出した。一方、ILE-1, ILE-2 の knockout 体、及び double knockout 体の作成により、両分子の欠損は ER ストレスの原因となることが明らかになり、両分子が ERGIC-53 や VIP36 と同様に細胞内小胞輸送に関わっていることが強く示唆された。各 mutant と野生株の DNA array の結果から、変化する遺伝子群が限られており、その中にリソソーム酵素群が含まれることを見出された。そこで、リソソーム酵素群に着目してリアルタイム PCR 法により発現量を調べたところ、ILE-1, ILE-2 欠損により発現量の減少する酵素群を特定することができた。これらの実験成果は現在投稿論文として作製準備中である。

細胞内小胞輸送蛋白質の機能を解析しようとする試みは、国内外で活発に行われている。しかしながら、関与している蛋白質が互いにホモロジーが高く、高い特異性を持って識別可能な抗体の作製が困難であることから、哺乳細胞を用いた機能解析は発展を見ていない。一方、遺伝子破壊実験が可能な酵母を用いた研究は成果を挙げているが、哺乳細胞との生体内システムの違いが大きく、哺乳細胞との共通性を見出すのは難しい面がある。線虫は他の項で言及されているように、生体内機能の解明のために良いモデルとなる。本プロジェクトの成果は、細胞内小胞輸送システムの解明のために一助となり得たと同時に、同システムの全容の解明のためには線虫の遺伝子破壊手法が有用であることが示されたことから本研究をさらに発展させたい。

4) ポリ-N-アセチラクトサミン鎖 (polyLacNAc) の生合成に関わる β 3Gn-T2/8 複合体

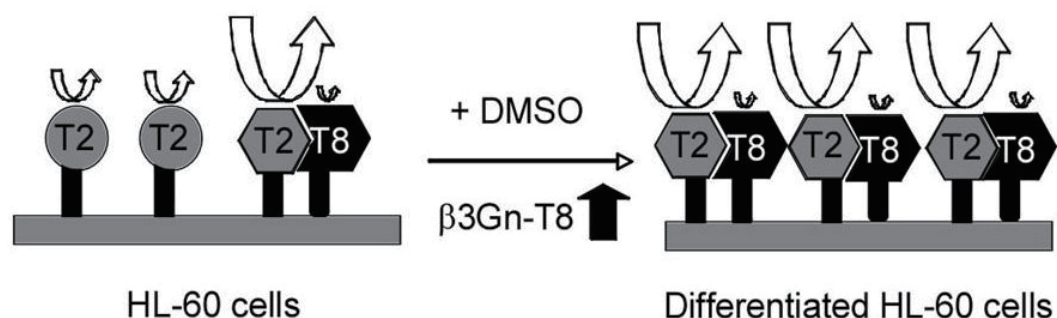


図3. HL-60細胞の分化に伴い β 3Gn-T8の発現が亢進し、poly-LacNAc鎖の合成量が増大する

糖転移酵素は ER やゴルジ体において複合体を形成していることが多くの例で明らかになって来ている。複合体形成は酵素タンパク質の安定化、不活性型酵素の活性化、細胞内オルガネラ局在性、生合成の効率化をもたらすと考えられている。複合体形成の役割をさらに

解明していく上で、酵素間の相互作用の解析のみならず、複合体での触媒機能を解析することが重要である。

$\beta 3\text{Gn-T2}$ 及び $\beta 3\text{Gn-T8}$ は共にトリアンテナ／テトラアンテナ型糖鎖の 2, 6-分岐の N-アセチルラクトサミン (LacNAc) によく作用する酵素である。我々は以前、この 2 つの酵素が *in vitro* でヘテロ 2 量体を形成し、その複合体の触媒活性 ($V_{\max}/K_m$) は単独に比べ約 9 倍であることを証明した (Seko and Yamashita, *Glycobiology*, **15**, 943, 2005)。次いでどちらの酵素が活性化されているのか、またその生物学的意義について研究を行った。即ちアミノ酸置換変異体を用いた実験及び HL60 細胞の分化における $\beta 3\text{Gn-T8}$ の発現変動について調べた。

$\beta 3\text{Gn-T2}$ 及び $\beta 3\text{Gn-T8}$ は糖転移酵素活性に必須とされる DXD 配列 (D245DD 及び Q246DD) を有している。これらの第一アミノ酸残基を Ala に置換した変異体を発現させた。変異型及び野生型の酵素を 1:1 で混合して $\beta 3\text{Gn-T}$ 活性を測定したところ、ADD 型の変異 $\beta 3\text{Gn-T2}$ と野生型 $\beta 3\text{Gn-T8}$ の混合物では活性化が見られないのに対し、ADD 型の変異 $\beta 3\text{Gn-T8}$ と野生型 $\beta 3\text{Gn-T2}$ の混合物では活性化は維持された。この結果から $\beta 3\text{Gn-T2}$ が活性化されていることが示唆された。

HL60 細胞は DMSO 存在下で顆粒球細胞へ分化するが、その際リソソーム膜糖タンパク質 La mp の N-結合型糖鎖の LacNAc 繰り返し構造が増大し、それが $\beta 3\text{Gn-T}$ 活性の増大に基づくことが知られている (Lee et al., *J. Biol. Chem.*, **265**, 20476, 1990)。この polyLacNAc の増大に $\beta 3\text{Gn-T8}$ が関与しているか否かを明らかにするため、 $\beta 3\text{Gn-T}$ ファミリー ($\beta 3\text{Gn-T1-8}$) の発現量を調べた。その結果 $\beta 3\text{Gn-T2}$ は 1.5 倍、さらに $\beta 3\text{Gn-T8}$ の発現量は 2.6 倍に増大していた。以上の結果から、DMSO 処理による HL60 細胞の分化過程での polyLacNAc 鎖の増大は、主に $\beta 3\text{Gn-T8}$ の発現亢進に伴い $\beta 3\text{Gn-T2}$ が活性化することによって引き起こされることが示唆された (Seko and Yamashita *J. Biol. Chem.*, **283**, 33094, 2008)。糖鎖生物学において、糖／硫酸転移酵素の複合体の研究は比較的最近に始まった新しい分野であり、当該分野のトピックである。今後種々の生命現象や疾患に関わる糖鎖の生合成の制御機構を明らかにする上で、複合体研究は中心課題の一つになっていくと考えられる。

これまで活性の検出出来ない酵素の機能解析を、他の酵素との共発現によってクリアする試みは幾例か報告されているが、 $\beta 3\text{Gn-T2}$ と T8 の例のように、実質的な活性を有する酵素 (T2) に対し、T8 の結合により活性化が起こるという発想は独創的である。本研究により、上記のような活性化の例は増えると考えられる。

酵素複合体の存在が多々明らかになり、糖鎖の生合成機構がより深く、正確に理解出来るようになれば、癌をはじめとする種々の重要疾患における糖鎖の意義についてより良い理解が得られるものと思われる。

5) シアル酸転移酵素に対するポリ酸の阻害機構の解析

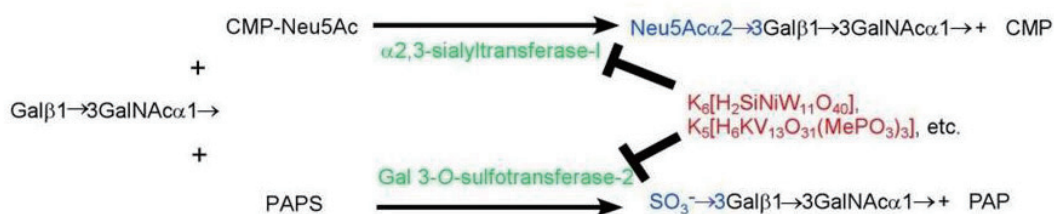


図4. ポリ酸はシアル酸転移酵素及び硫酸転移酵素の強力な阻害剤である

ポリ酸はタングステン、バナジウム、モリブデンなどの酸化物のクラスターであり、多様な立体構造をとり得る分子量数千の無機化合物で、抗 HIV 活性や抗腫瘍活性が知られてい

る。毒性の低い医薬品開発を最終目的として以下のモデル系を用いた研究を行った。我々はポリ酸がある種のシアル酸転移酵素及び硫酸転移酵素活性を数百 pM—数 nM レベルで阻害することを見出したことから、シアル酸転移酵素 ST3Gal-I を用いてその阻害機構について解析した。まず反応速度の解析によりポリ酸の阻害様式は non-competitive であることが判った。そしてこの阻害効果は 0.5 M NaCl 存在下で消失すること、また可逆的であることから、静電的な相互作用が起こっていると考えられた。さらに ST3Gal-I について、塩基性アミノ酸が比較的にかたまって並んでいる部分 5 カ所について mutant を作成し、ポリ酸による阻害効果を検討したところ、C 末端の塩基性アミノ酸を置換した場合のみ阻害効果が減弱することが判った。この結果からポリ酸は ST3Gal-I の C 末端部分の塩基性アミノ酸群と結合し活性を阻害することが示唆された。この阻害機構を基に毒性の低い抗 HIV 系の開発を目指したい。

3.5 グリコサミノグリカンの機能解析と生化学的解析（神戸薬科大学 北川裕之グループ）

（1）研究実施内容及び成果

① 研究のねらい

グリコサミノグリカン鎖関連遺伝子の多細胞生物における機能を解析し、グリコサミノグリカン鎖とその生合成を制御する分子機構の生命における役割を解明することで、様々な疾病の原因の解明やグリコサミノグリカン鎖機能の制御による治療法などの確立の基礎を築くことを目標とし、線虫のグリコサミノグリカン鎖の発現パターンの変動、遺伝子破壊株でのグリコサミノグリカン鎖等の生化学的解析、哺乳類の培養細胞などを用いた遺伝子クローニングや遺伝子破壊などによる解析を行う。

② 研究内容・成果

1) 線虫におけるコンドロイチンの生合成機構と機能：

我々は本プロジェクトが始まる前までに、コンドロイチンの生合成に関与するコンドロイチン合成酵素遺伝子 (*ChSy*) を破壊することにより、線虫のコンドロイチン鎖が、細胞分裂、器官形成、細胞移動などの発生や分化の基本的プロセスにおいて、必須の構成成分として機能していることを明らかにしてきた。本プロジェクトでは、ヒトのコンドロイチン重合化因子 (*ChPF*) の線虫における ortholog と考えられる *PAR2.4* と呼ばれる遺伝子を単離した。*PAR2.4* は、糖転移活性を保持していなかったが、線虫の *ChSy* と共発現させるとコンドロイチン鎖を重合する活性が観察された。また、*PAR2.4* は *ChSy* と同じ部位や組織で発現しており、pull-down assay により *PAR2.4* と *ChSy* は、相互作用していることを明らかにした。さらに、*PAR2.4* 変異体は *ChSy* 変異体と同様にコンドロイチンの合成量が減少し、細胞質分裂異常により初期胚において致死となることが明らかとなった。したがって、*PAR2.4* は *ChSy* と同様にコンドロイチンの生合成に必須であり、線虫体内で *PAR2.4* と *ChSy* は共発現し複合体を形成することによりコンドロイチンの生合成を行っていることを明らかにした。

2) 線虫におけるヘパラン硫酸の生合成機構と機能：

線虫のヘパラン硫酸は、コンドロイチンのおよそ 1/100 量しか存在しないことが知られ、ヒトのヘパラン硫酸鎖の生合成に関与する *EXT* 相同遺伝子として *rib-1* と *rib-2* の存在が明らかとなっている。以前、我々は、*RIB-2* がヘパラン硫酸鎖の生合成に関与する GlcNAc 転移活性を保持することを明らかにしていた。しかし、線虫の *EXT1* の ortholog である *RIB-1* は、*in vitro* で糖転移活性が検出されておらず、その機能は不明であった。そこで、*RIB-1* と *RIB-2* を共発現させ、糖転移活性および重合化活性を測定したところ、*RIB-1/RIB-2* 複合体は、GlcNAc 転移活性に加え GlcA 転移活性およびヘパラン硫酸鎖の重合化活性を保持していた。さらに、*rib-1* 変異体は、*rib-2* 変異体と同様にヘパラン硫酸の合成量が減少し、形態形成期以後に致死となることが明らかとなった。さらに、*rib-1* および *rib-2* 変異体において、発生の遅延や産卵の異常が見られた。この結果より線虫において、コンドロイチン

鎖とヘパラン硫酸鎖はともに胚発生に必須であるが、両者の機能は異なることが判明した。

3) Drosophilaにおけるヘパラン硫酸の生合成機構：

Drosophila では、ヘパラン硫酸の生合成に関与する糖転移酵素として、*ttv*、*sotv*、*botv* の3つがクローニングされ、これらの変異体では、ヘパラン硫酸が劇的に減少し、morphogen のシグナル伝達や分布が異常となる。今までに我々は、BOTV が GlcNAc を転移する活性をもつことを明らかにしていた。しかし、TTV、SOTV は、*in vitro* において糖転移活性が検出されておらず、*Drosophila* のヘパラン硫酸鎖の生合成機構は解明されていなかった。そこで、TTV、SOTV および BOTV を分泌型タンパク質として、単独あるいは共発現させ、単糖転移活性および重合化活性を測定したところ、TTV と SOTV を共発現させた複合体が、ヘパラン硫酸鎖の重合化活性を保持することを明らかにした。さらに、*Drosophila* ではヒトとは異なり、BOTV による結合領域への最初の GlcNAc の転移が、ヘパラン硫酸の伸長に必須であることを明らかにした。

4) ヘルペスウイルスの初期感染に関与するコンドロイチン硫酸鎖：

以前より、ヘパラン硫酸鎖が I 型単純ヘルペスウイルスの初期感染に関与していることが報告されていた。しかしながら最近、ヘパラン硫酸鎖を欠損した細胞にもヘルペスウイルスが感染する例が報告された。そこで、我々は L 細胞の変異株でヘパラン硫酸鎖を欠損しているが、ヘルペスウイルスに対して感染性を示す gro2C 細胞を用い、どのような物質が細胞表面のウイルス受容体になっているのかを調べた。その結果、コンドロイチン硫酸鎖が受容体として機能し、特にコンドロイチン硫酸-E と呼ばれる高硫酸化したタイプのコンドロイチン硫酸が、ウイルスとの結合に重要であることを明らかにした。興味深いことに、ヘパラン硫酸鎖の存在する細胞へのヘルペスウイルスの感染でも、コンドロイチン硫酸-E はヘパラン硫酸よりも低濃度でウイルス感染を阻害できることが判明した。そこでコンドロイチン硫酸鎖の合成不全により、I 型単純ヘルペスウイルスの感染に対して 99%以上の抵抗性を示すマウス L 細胞の変異株 sog9 細胞を用いて、I 型単純ヘルペスウイルスの感染に関与するコンドロイチン硫酸鎖の合成を制御する酵素遺伝子の同定を行った。この sog9 細胞は、コンドロイチン硫酸鎖の合成不全を示すことが報告されていたが、欠損遺伝子など、その詳細な性質は明らかになっていなかった。そこで、L 細胞と sog9 細胞より硫酸化グリコサミノグリカン鎖を精製し、組成分析を行なったところ、sog9 細胞のコンドロイチン硫酸量は、L 細胞の 3 分の 1 にまで減少し、特に E 単位などの GalNAc の 4 位が硫酸化された糖鎖構造が減少していた。次ぎに、それらの生合成に関与する硫酸基転移酵素の発現を調べたところ、sog9 細胞ではコンドロイチン 4-硫酸基転移酵素-1 (C4ST-1) の発現が欠損していることが判明した。また、L 細胞と sog9 細胞で合成されているコンドロイチン硫酸鎖の長さを調べたところ、L 細胞にくらべ sog9 細胞のものの長さは減少していた。逆に、C4ST-1 遺伝子を sog9 細胞に導入するとコンドロイチン硫酸鎖長は長くなり、E 単位量も増加し、I 型単純ヘルペスウイルスの感染性も回復した。このように、I 型単純ヘルペスウイルスの感染には、E 単位が必須であり、その合成に C4ST-1 が重要な働きをしていることが明らかとなった。

5) ヒトのコンドロイチン硫酸鎖の骨格構造の生合成：

これまでにヒトのコンドロイチン硫酸鎖の合成に関与する酵素は 6 種類同定され、ファミリーを形成していることが判明している。我々は以前、コンドロイチン硫酸鎖の重合化がその内の 2 種、コンドロイチン合成酵素-1 (ChSy-1) とコンドロイチン重合化因子 (ChPF) の複合体により担われることを報告した。そこで、ファミリーを形成しているタンパク質の中でそれぞれ ChSy-1 と ChPF とアミノ酸の相同性の高いコンドロイチン合成酵素-2 (ChSy-2) およびコンドロイチン硫酸グルクロン酸転移酵素 (CSG1cA-T) も同様にコンドロイチン硫酸鎖の重合化に関与するかを検討した。その結果、ChSy-1、ChSy-2、CSG1cAT (後に ChSy-3 と命名した) および ChPF の 4 種のタンパク質の様々な組み合わせの複合体によ

っても、コンドロイチン硫酸鎖の二糖繰返し領域の重合が起こることを明らかにした。また、残りの2種のGalNAcを転移させる活性のみを持つコンドロイチンGalNAc転移酵素-1、-2 (ChGn-1, -2)を同定したが、これらは二糖繰返し領域の合成に関与するGlcA転移活性を保持しておらず、コンドロイチン硫酸鎖の生合成への寄与は不明であった。そこでコンドロイチン硫酸鎖の生合成に関与する糖転移酵素6種類がすべて発現しているHeLa細胞を用いて、ChGn-1あるいは-2を過剰発現させ、細胞が産生するコンドロイチン硫酸鎖の二糖総量を分析することにより、ChGn-1および-2がコンドロイチン硫酸鎖生合成にどのように関与するのかを検討した。その結果、ChGn-1はコンドロイチン硫酸鎖の本数を制御しており、ChGn-2はコンドロイチン硫酸鎖の長さを制御していると予想される結果が得られた。

6) Wnt-3aのsignal伝達や分布におけるコンドロイチン硫酸鎖の役割

コンドロイチン硫酸鎖の硫酸基転移酵素の一つ、コンドロイチン-4-O-硫酸基転移酵素-1 (C4ST-1)を欠損させたマウスでは軟骨形成過程が正常に進行せず、BMP2やTGF- β シグナルが影響を受ける。軟骨の形成にはWntシグナルも重要であり、C4ST-1の欠損によるWntシグナル伝達の乱れが軟骨形成異常の一因となる可能性も想起された。また、変形性関節症の初期病変として、細胞外マトリクスのコンドロイチン硫酸鎖の減少が認められており、軟骨細胞のコンドロイチン硫酸鎖の発現量を実験的に操作するとWnt3a/ β -カテニン経路のシグナルの流れが調節されることも示されているため、コンドロイチン硫酸鎖の合成異常がWntのシグナル伝達を変化させ変形性関節症が発症する可能性も示唆されている。我々はC4ST-1の発現が欠損したsog9細胞を用いて、C4ST-1の発現レベルによりWnt-3aシグナリングが調節されることを明らかにした。さらに、Wnt-3aが実際にコンドロイチン硫酸-Eと強く結合することを明らかにした。したがって、C4ST-1はWnt-3aに結合性を示すコンドロイチン硫酸-E様の構造を合成し、Wnt-3aの細胞表面濃度を増加させ、細胞が効率良くWnt-3aに応答できるよう機能していることが示唆された。一般に、形態形成因子の濃度依存的に細胞応答が調節されるモデルが提唱されているが、今回の結果から、たとえ同じ濃度であっても、形態形成因子に対する結合能を細胞自律的に変化させることで異なる応答を起こすことができる可能性が示された。

7) 高硫酸化コンドロイチン硫酸鎖による神経突起伸長作用の発現メカニズムの解析

コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、中枢神経系の細胞外マトリックスにも豊富に存在し、硫酸化の程度やパターンの異なるコンドロイチン硫酸鎖がそれぞれ異なる機能を発揮し、神経回路網の形成に重要な役割を果たしていると考えられている。これまでに北大の菅原らは、高硫酸化二糖単位を多く含むコンドロイチン硫酸に、海馬神経細胞の神経突起の伸長を促進する作用があることを見出しているが、その機能発現メカニズムについては不明であった。我々は最近、神経芽細胞由来株であるNeuro-2a細胞を、高硫酸化コンドロイチン硫酸鎖をコートした基質上で培養した場合には、ほとんど突起の伸長が誘導されないことを見いだした。このことから、Neuro-2a細胞では、海馬神経細胞とは異なり、高硫酸化コンドロイチン硫酸を受容するレセプター分子の発現が低下もしくは欠損している可能性が想起された。そこで我々は、神経細胞上に発現するコンドロイチン硫酸レセプター候補分子の同定と、その機能解析を試みた。Neuro-2a細胞において海馬神経細胞と比較してmRNAの発現が有意に低下している分子をリアルタイムRT-PCR法により検索したところ、神経接着分子の1つであり、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンフォスファカンと結合することが知られているcontactin-1が候補分子の1つと考えられた。そこで、contactin-1を過剰発現するNeuro-2a細胞を樹立し、高硫酸化コンドロイチン硫酸基質上で培養した結果、突起を伸ばす細胞の割合が有意に増加した。このことから、Neuro-2a細胞上に発現したcontactin-1が高硫酸化コンドロイチン硫酸のレセプターとして機能し、突起伸長促進作用を媒介していると考えられた。

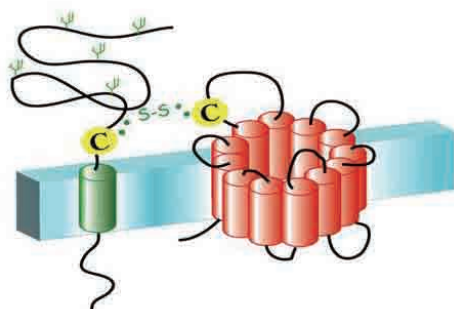
(2) 研究成果の今後期待される効果

当初の目的であった、「グリコサミノグリカン鎖関連遺伝子の多細胞生物における機能を解析し、グリコサミノグリカン鎖とその生合成を制御する分子機構の生命における役割を説明することで、様々な疾病の原因の解明やグリコサミノグリカン鎖機能の制御による治療法などの確立の基礎を築くこと」は、部分的ではあるが達成できたのではないと思われる。しかしながら、今回の成果からも明らかのように、発生や分化過程においてグリコサミノグリカン鎖は非常に多彩な機能を持ち、最近ではグリコサミノグリカン鎖の合成異常による新たな疾患が数多く見いだされるようになってきた。したがって、今後はグリコサミノグリカン鎖の構造変化が、どのようにシグナル伝達に影響を与えるのかを詳細に調べていくことが重要になると思われる。今回明らかにした現象以外にも、特異的な構造を持ったグリコサミノグリカン鎖自身が受容体に結合してシグナル伝達を制御する例が数多く見いだされると考えられ、今回の成果は様々な疾病の原因の解明やグリコサミノグリカン鎖の機能の制御による治療法などの確立の基礎を築くことに役立つものと考えられる。

3. 6 トランスポーター遺伝子機能解析グループ (大阪大学 金井好克グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

Fig.1 哺乳類のヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーター



哺乳類アミノ酸トランスポーターにおける糖鎖の関与

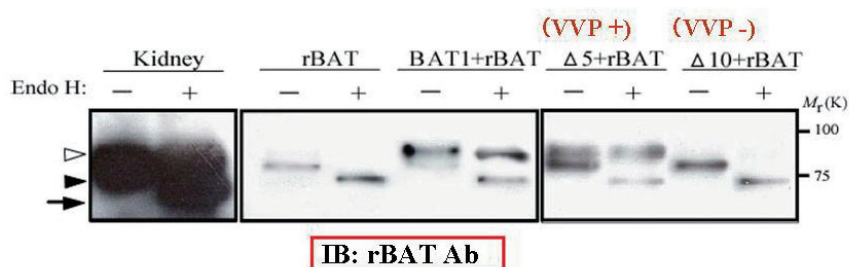
哺乳類のトランスポーターは、多数回の膜貫通構造を持つ膜タンパク質であり、その多くが糖タンパク質であるが、その糖鎖の機能的意義は明らかにされていない。SLC7 (solute carrier 7) ファミリーは、12回膜貫通型のアミノ酸トランスポーターからなるが、このファミリーのメンバーは糖付加を受けず、その代わりに、1回膜貫通型の糖タンパク質 4F2hc (4F2 heavy chain) あるいは

rBAT (related to $b^{0,+}$ -type amino acid transporter) とジスルフィド結合によって連結し、ヘテロ二量体を形成する (Fig. 1)。SLC7 ファミリーのメンバーは、単独では細胞膜へ移行せず、1回膜貫通型の糖タンパク質と結合することにより細胞膜移行が可能となる。

糖付加を受けない SLC7 ファミリーメンバーの $b^{0,+}$ AT1 は、1回膜貫通型糖タンパク質 rBAT

Fig.2 rBAT糖鎖へのEndo-Hの効果

$b^{0,+}$ ATのVVPモチーフの欠損($\Delta 10$)により、Endo-H非感受性のrBATのfull glycosylationに相当するバンドが消失する。

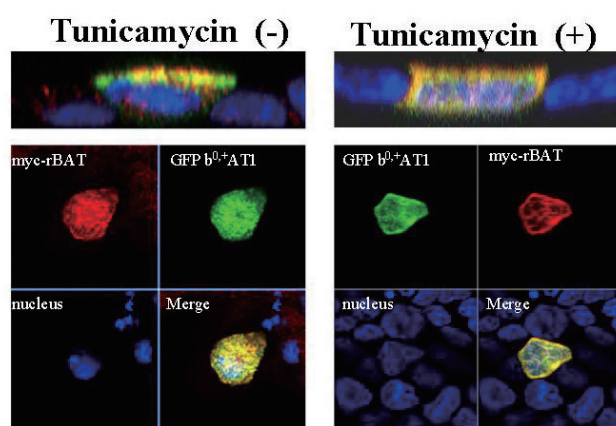


と連結し、腎近位尿細管管腔側膜のシスチントランスポーターを形成する。 $b^{0,+}$ AT1のC-末端には、ファ

KFGWAQKISKPTMHLQMLMEVVPPEEDPE

ミリー内で良く保存されたモチーフ様配列 (VVP) があり、この部分の欠損あるいは変異により、パートナーである rBAT への糖付加が阻害され、細胞膜移行が障害された (Fig. 2)。これは、ヘテロ二量体複合体の小胞体からゴルジ装置への移行が障害されたためであることが明らかとなった。さらに Tunicamycin で糖付加を阻害しても、 $b^{0,+}$ AT1 と rBAT の複合体の細胞膜移行が抑制された (Fig. 3)。 $b^{0,+}$ AT1 の C-末端の欠損変異体及び部位特異的変異体の解析より、アミノ酸トランスポーターヘテロ二量体複合体の細胞膜移行に必須のモチーフ (VPP) が同定され、そこに結合するタンパク質として、多価の足場タンパク質である RACK1 が明らかになった。ヘテロ二量体複合体の小胞体からゴルジ装置への移行における RACK1 の関与が示唆された。

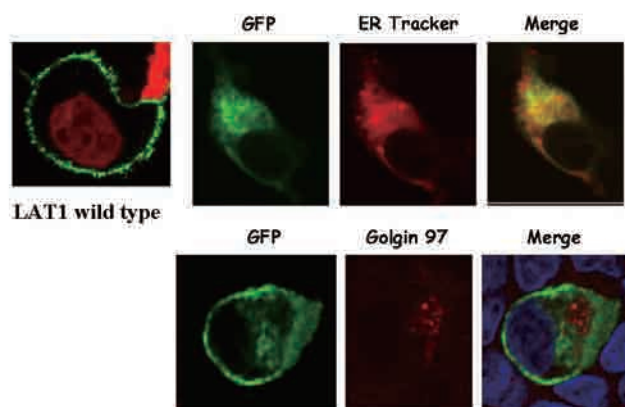
Fig.3 rBAT- $b^{0,+}$ AT 複合体の細胞膜移行における Tunicamycin の影響 (MDCKII 細胞を用いた解析)



$b^{0,+}$ AT1 以外の SLC7 ファミリーのメンバーにおいても、同様の C-末端の役割が観察された (Fig. 4)。中性アミノ酸トランスポーター LAT1 は 1 回膜貫通型の糖タンパク質 4F2hc とペアを組むが、その C-末端も $b^{0,+}$ AT1 と同様に RACK1 が

結合し、ヘテロ二量体複合体の小胞体からゴルジ体への移行を媒介する。この部位の変異により、4F2hc への糖付加が阻害される。4F2hc は、多機能性の 2 型膜糖タンパク質であり、アミノ酸トランスポーターのサブユニットであると同時に、インテグリンの β -サブユニットとも結合し、インテグリンを介するトランスポーター活性の調節に寄与することが明らかになった。また 4F2hc は細胞増殖に関わるシグナルを担い、細胞内ドメインがその制御に関わっている。

Fig.4 LAT1 の VVP モチーフの LLL 変異の細胞内局在。VVP モチーフの LLL 変異体は、ER マーカーと共存する。



トランスポーターは、ほとんどすべてが糖鎖付加を受けようであり、糖付加を受け

ない例外が SLC7 ファミリーと SLC16 ファミリーであるが、SLC7 ファミリーはジスルフィド結合により糖タンパク質 4F2hc あるいは rBAT と、SLC16 ファミリーは非ジスルフィド結合により同じく糖タンパク質である CD147 と連結し、ユニット全体では、なんらかの形で糖鎖付加を受けていることになる。

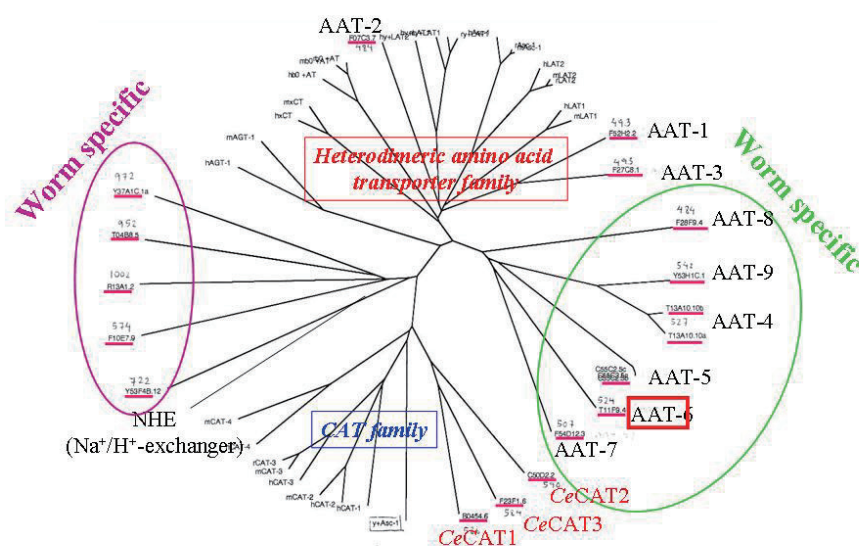
【本研究項目の総括】本研究は、長年の当研究グループのアミノ酸トランスポーターの分子同定と機能解析の研究の基盤の上に、膜タンパク質であるトランスポーターにおける糖鎖の役割を探索した。トランスポーターにおいては糖鎖の機能は十分な解析がなされておら

ず、 H^+/K^+ ATPase やグルタミン酸トランスポーターをはじめとする少数のトランスポーターにおいて、糖付加部位の部位特異的変異導入により、複数の糖付加部位を欠損させると細胞膜発現が低下することが示されているのみである。本研究は、当研究グループが分子同定した、糖タンパク質である 1 回膜貫通型タンパク質と糖付加を受けない 12 回膜貫通型タンパク質からなるヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターを題材にした研究を展開した。その結果、12 回膜貫通型ユニットの C-末端のモチーフ様配列が、ヘテロ二量体型トランスポーターの小胞体からゴルジ装置への移行と 1 回膜貫通型ユニットの full glycosylation に必須であること、また 1 回膜貫通型ユニットの糖鎖付加が、ヘテロ二量体型トランスポーターの細胞膜移行に必須であることを明らかにした。本研究は、トランスポーターにおいて糖付加が細胞膜移行に直接寄与すること、またトランスポーターにおいても小胞体からゴルジ装置への移行と同期して進行することを、ヘテロ二量体型トランスポーターの利点を駆使して明らかにしたものである。

1. 線虫のアミノ酸トランスポーターファミリーの解析

線虫にも哺乳類のアミノ酸トランスポーターファミリー (SLC7) に相当するファミリーが存在する (Fig. 5)。このファミリーのトランスポーターは、哺乳類では細胞外領域に保存

Fig.5 線虫の SLC7 アミノ酸トランスポーターファミリー



されたシステイン残基を有し、ジスルフィド結合を介して糖タンパク質である膜 1 回貫通型のタンパク質 (SLC3 ファミリー) と相互作用しており、この結合により細胞膜への移行が可能となっている。線虫には、これに相当

するトランスポーター (AAT1-3, AAT: amino acid transporter) が知られ、哺乳類の SLC3 ファミリーに相同な線虫の膜 1 回貫通型糖タンパク質 (ATG-1, ATG-2) とジスルフィド結合で連結している。これらのヘテロ二量体型トランスポーターとは別に、それとアミノ酸レベルで非常に高い相同性を示すが、保存されたシステイン残基を持たない線虫に特有なサブファミリーが存在する (AAT4-9)。各遺伝子のプロモーターの下流に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を繋ぎ、線虫に発現させることにより、AAT2 は腸管と咽頭、AAT-3 は感覚神経細胞 (Amphid neuron と Phasmid neuron)、AAT4 は腸管の管腔側膜、AAT6 は腸管と咽頭 (Fig. 6)、AAT-7 は腸管の一部、AAT8 は腸管の管腔側膜に発現することが明らかになった。AAT-1 は、はっきりとは特定できていないが、感覚神経細胞に発現している可能性が示唆される。また、ATG-1 は、腸管、Excretory canal、神経細胞、ATG-2 は、Excretory canal と神経細胞に発現していた。

この線虫特有のサブファミリーに属する AAT6 について詳細な解析を行った。アフリカツメガエル卵母細胞発現系にて AAT6 の細胞膜への局在化およびアミノ酸輸送活性について検討

したところ、AAT6 単独発現では細胞膜への移行が起こらず輸送活性も全く見られないが、

Fig.6 線虫アミノ酸トランスポーターAAT6と1回膜貫通型補助因子ATG-1の腸管と咽頭における共存。

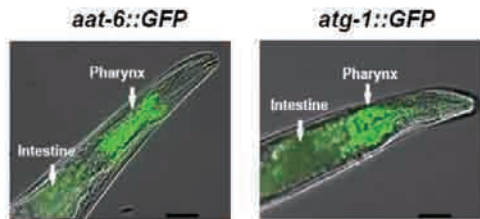


Fig.7 線虫アミノ酸トランスポーターAAT6のアフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能解析
AAT6の機能発現には、ATG-1を必要とする。

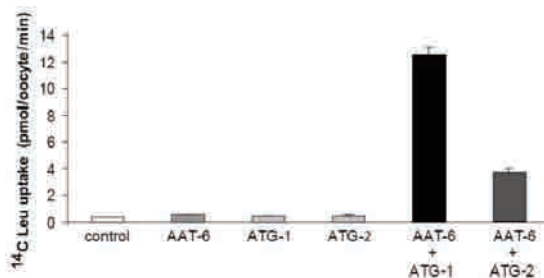
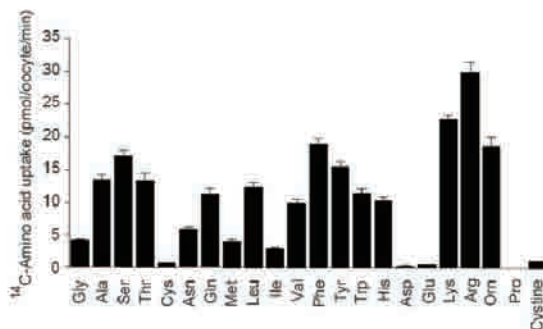


Fig.8 線虫アミノ酸トランスポーターAAT6の基質選択性。
アフリカツメガエル卵母細胞へのATG-1との共発現による。



アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、放射能標識アミノ酸の輸送活性を検討したところ、AAT6はNa⁺非依存性に中性及び塩基性アミノ酸を輸送する広い基質選択性を示した (Fig. 8)。この基質選択性は、哺乳類の b⁰,+AT1 と類似するが、シスチンを輸送しないところが大きく異なる。AAT6 のノックアウトにより、有意な体長の減少、腸管径の減少、受精卵数の減少が観察された。

AAT-4 は、12 回膜貫通型タンパク質であり、1 回膜貫通型タンパク質とヘテロ二量体を形成することによって機能する哺乳類の相同トランスポーターと異なり、単独で機能活性を有する。アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた際、AAT6とも異なり、ATG-1 あるいは ATG-2 との共発現が必要なく、単独で十分な機能活性を有する。AAT-4 は、芳香族アミノ酸を選択的に輸送するが、この基質選択性は哺乳類では異なるファミリーに属するトランスポーターによって担われている。GFP を AAT-4 プロモーター下で発現するトランスジェニック *C. elegans* を作製することにより、AAT-4 は腸管上皮、特にその管腔側膜に局在して発現することが明らかになった。AAT-4 の生体内での機能は、RNA 干渉により個体レベルで AAT-4 のノックダウンを行うことにより検討した。AAT-4 ノックダウン個体は、対照に比し、体長が短く、受精卵数が減少していた。また、腸管上皮細胞の丈が低く、腸管径の有意な減少が観察された。

線虫の糖タンパク質 ATG1 との共発現で細胞膜へ移行が起こり輸送機能を発揮することが明らかになった (Fig. 7)。また、免疫沈降実験により両者が相互作用していることが示された。以上より、AAT6 の機能発現にはジスルフィド結合を介した結合ではないが、糖タンパク質との相互作用が必要であると結論された。各遺伝子のプロモーター下に GFP を導入して線虫に発現させ発現の局在を検討したところ、AAT6 と ATG-1 は、

腸管で共存することが明らかになった (Fig. 6)。

アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、放射能標識アミノ酸の輸送活性を検討したところ、AAT6はNa⁺非依存性に中性及び塩基性アミノ酸を輸送する広い基質選択性を示した (Fig. 8)。この基質選択性は、哺乳類の b⁰,+AT1 と類似するが、シスチンを輸送しないところが大きく異なる。AAT6 のノックアウトにより、有意な体長の減少、腸管径の減少、受精卵数の減少が観察された。

AAT-4 は、12 回膜貫通型タンパク質であり、1 回膜貫通型タンパク質とヘテロ二量体を形成することによって機能する哺乳類の相同トランスポーターと異なり、単独で機能活性を有する。アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた際、AAT6とも異なり、ATG-1 あるいは ATG-2 との共発現が必要なく、単独で十分な機能活性を有する。AAT-4 は、芳香族アミノ酸を選択的に輸送するが、この基質選択性は哺乳類では異なるファミリーに属するトランスポーターによって担われている。GFP を AAT-4 プロモーター下で発現するトランスジェニック *C. elegans* を作製することにより、AAT-4 は腸管上皮、特にその管腔側膜に局在して発現することが明らかになった。AAT-4 の生体内での機能は、RNA 干渉により個体レベルで AAT-4 のノックダウンを行うことにより検討した。AAT-4 ノックダウン個体は、対照に比し、体長が短く、受精卵数が減少していた。また、腸管上皮細胞の丈が低く、腸管径の有意な減少が観察された。

哺乳類アミノ酸トランスポーターには、塩基性アミノ酸を輸送する一群(CAT: cationic amino acid transporter)がある。線虫においても、CAT のオルソログが存在し、当研究グループではそのうちの一つ CeCAT1 の解析を行った。アフリカツメガエル卵母細胞に発現さ

せ輸送機能の解析を行ったところ、塩基性および中性アミノ酸を輸送することが明らかになった。線虫には amphid cell とよばれる sensory neuron が存在し、外界に接することで外界の環境を感受している。CeCAT1 はこの amphid cell のグリア細胞に発現し、特に外界と接する部位において強い発現を認めた。そこで、CeCAT1 が外部環境のセンシングに関与しているのではないかと仮説のもとに、CeCAT1 の欠損変異体を単離し走化性実験を行った。その結果、野生型では NaCl に対する走化性を示すが、欠損変異体では NaCl に対する走化性が有意に減弱していた。このことから、アミノ酸トランスポーターである CeCAT1 が外部環境のセンシングに重要な働きを担っていることが示された。

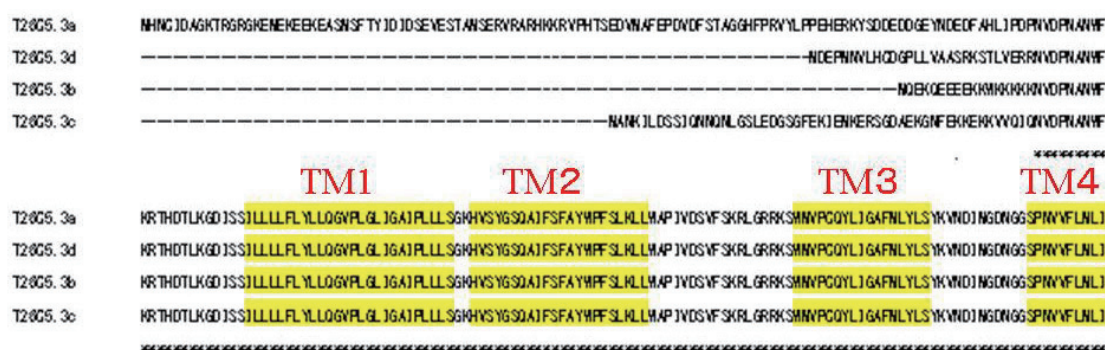
【本研究項目の総括】線虫 *C. elegans* は、ゲノム情報が完備され、細胞系譜も詳細に解析されているモデル生物であり、遺伝子改変や個体レベルでのノックダウンが容易であり操作性に優れることから、近年医学生物学研究における有用な研究材料としての位置付けが確立されている。しかし、トランスポーターに関しては解析が途についたばかりであり、今後膨大な研究の蓄積が必要とされる。本研究は、哺乳類の主要なアミノ酸トランスポーターファミリーである SLC7 ファミリーの相同遺伝子を *C. elegans* において探索し、野村グループ、三谷グループとの共同で、アミノ酸トランスポーター群の基盤情報を集積したものである。また本研究は、*C. elegans* の腸管アミノ酸トランスポーターを初めて同定し、その遺伝子ノックダウンにより、タンパク質栄養における有意な寄与を実証した。本研究の成果は、アミノ酸トランスポーター群の基礎情報を整備することにより、線虫のモデル生物としての価値を高め、モデル生物として線虫を用いた糖鎖研究を展開する本 CREST 研究に、重要な基盤を提供するものである。

2. 線虫の糖鎖関連トランスポーターの機能解析

糖鎖が蛋白質や脂質に結合した複合糖質の糖鎖部分は、硫酸化、リン酸化、アセチル化など様々な修飾が行われ複雑な構造をとる。このアセチル化および硫酸化に必要な基質であるアセチル CoA の細胞への供与は、アセチル CoA トランスポーターによるものと考えられ、これにより糖鎖修飾の調節が行われる可能性が予想されることから、その機能解析は糖鎖機能の理解にとって重要な課題である。野村グループで同定した線虫の候補トランスポーターについて、当グループにおいて輸送機能解析を行った。

候補トランスポーターは、T26C5.3 遺伝子によりコードされるが、Wormbase のデータベースでは、4 つ spliced variant が存在するされている (Fig. 9)。それらは、すべて 5' 末端

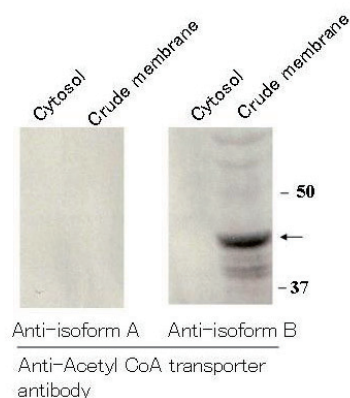
Fig.9 線虫Acetyl CoA トランスポーターのT26C5.3のspliced variant



での splicing によって生じ、細胞内 N 末端の配列が変化する。4 つの variant の全長配列

をクローニングすべく線虫 cDNA を用いて PCR を行ったが、variant b のみが増幅された。抗 variant a 抗体、抗 variant b 抗体を用いて、線虫の Cytosol 画分と Crude membrane 画分で western blot を行ったが、Crude membrane 画分で抗 variant b 抗体により認識される強いバンドが検出されたのみで、抗 variant a 抗体では明らかなバンドは検出されなかった (Fig. 10)。

Fig.10 線虫 Acetyl CoA トランスポーター T26C5.3 の spliced variant の Western blot による解析



従って、variant b が、線虫における主要な spliced variant であると考え、variant b の機能解析を実施した。候補トランスポーター cDNA が組み込まれたプラスミドベクターを用いて cRNA を合成し、これをアフリカツメガエルの卵母細胞に注入することにより発現させ輸送機能解析を行った。放射能標識された $[^3\text{H}]$ acetylCoA を培地

に添加し、候補トランスポーター発現細胞への取込み速度を検討したところ、有意なアセチル CoA の輸送活性が観察された。これは、 Na^+ 非依存的な輸送活性であった。さらに variant a, c, d について、それぞれの splicing 部分を個別に増幅する PCR を行ったところ、variant a に相当するバンドが得られた。variant a に相当する cDNA を現在作製中であり、作製後これについても機能解析を行う。

加えて、PAPS (3' -phosphoadenosine 5' -phosphosulfate) トランスポーターの機能解析を実施した。線虫の候補トランスポーターは、T111B2A.20 遺伝子にコードされる。T111B2A.20 の遺伝子産物は、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させて $[^3\text{H}]$ PAPS の取り込みを計測したが、輸送活性は得られなかった。そこで、T111B2A.20 に GFP を付加した融合タンパク質を哺乳類細胞株 MDCKII 細胞と S2 細胞に発現させたが、細胞内に留まり、細胞膜に出現しないことが明らかになり、これがアフリカツメガエル卵母細胞で機能が検出できない理由であることがわかった。このようなトランスポーターは、リボソームへの再構成による機能解析が必須であり、現在再構成系の構築を行っている。

【本研究項目の総括】線虫のアセチル CoA トランスポーターと PAPS (3' -phosphoadenosine 5' -phosphosulfate) トランスポーターの機能解析は困難を極めた。野村グループで明らかにされた候補遺伝子をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたが、高発現が得られないまでも、アセチル CoA トランスポーターについては、その機能活性を示すことができた。PAPS については、細胞膜に発現しないことが確認され、アフリカツメガエルの卵母細胞や哺乳類培養細胞発現系を用いた機能解析は、不適であることが明らかになった。これについては、リボソームへの再構成系を用いて機能解析を進行させている。

(2) 研究成果の今後期待される効果

《成果の今後の展開見込、想定される科学技術や社会への波及効果についても記述してください。》

本研究は、長年の当研究グループのアミノ酸トランスポーターの分子同定と機能解析の研究の基盤の上に、膜タンパク質であるトランスポーターにおける糖鎖の役割を探索した。本研究は、トランスポーターにおいて糖付加が細胞膜移行に直接寄与すること、またトラ

ンスポーターにおいても小胞体からゴルジ装置への移行と同期して進行することを、ヘテロ二量体型トランスポーターの利点を駆使して明らかにした。トランスポーターにおいては糖鎖の機能は十分な解析がなされていないが、本研究において細胞生物学的な観点からの糸口がつかめたと考える。この延長上に、今後細胞内トラフィックを含めたトランスポーターにおける糖鎖の役割の研究が展開されると期待される。

本研究では、線虫のアミノ酸トランスポーター群の発現の局在、機能活性、ノックアウト表現型を解析し、その基礎情報を整備した。この成果は、線虫のモデル生物としての価値を高め、モデル生物として線虫を用いた本 CREST 研究の延長上の今後の糖鎖研究の展開に重要な基盤を提供するものである。特に、線虫は、ゲノム情報が完備され、細胞系譜も詳細に解析されているモデル生物であり、遺伝子改編や個体レベルでのノックダウンが容易であり操作性に優れており、本研究で明らかにした糖タンパク質であるトランスポーター群を用い、*in vivo* での遺伝子改編を駆使して、トランスポーターにおける糖鎖の役割の *in vivo* での解析が展開される。実際、こういった解析をすでに本研究の延長上に進行させている。さらに、線虫には、すでに解析されている哺乳類のトランスポーターには見いだされない新たなタイプのトランスポータータンパク質が存在するため、本研究の成果は、新たなタンパク質リソースを提供することになる。

§ 4 研究参加者

①統括グループ(線虫 *C. elegans* の糖鎖遺伝子の戦略的破壊とその機能解析の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	野村 一也	九州大学	助教授		H15.10～H19.3
○	野村 一也	同上	准教授		H19.4～H21.3
*	水口 惣平	同上	CREST 研究員		H16.1～H20.3
*	水口 惣平	同上	九州大学学術研究員		H20.4～H21.3
	出嶋克史	同上	修士課程学生		H15.10～H16.3
		同上	博士課程学生		H16.4～H17.3
	出嶋 克史	同上	日本学術振興会特別研究員		H17.4～H19.3
*	出嶋 克史	同上	九州大学学術研究員		H19.4～H21.3
*	野村 和子	同上	CREST 技術員		H16. 1～H20.3
*	野村 和子	同上	九州大学学術研究員		H20.4～H21.3
	永石 貴之	同上	修士課程学生		H16.4～H18.3
	村田 大輔	同上	博士課程学生		H19.11～H21.3
	柴田 由香利	同上	CREST チーム事務員		H16.4～H21.3

②線虫遺伝子ノックアウト研究グループ(線虫糖鎖遺伝子機能の戦略的破壊と破壊結果の解析についての研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	三谷昌平	東京女子医科大学	助教授	線虫糖鎖遺伝子機能の欠失突然	H18.4～H19.3

				変異株の取得と解析	
○	三谷昌平	同上	教授	線虫糖鎖遺伝子機能の欠失突然変異株の取得と解析	H19.4～H21.3
○	安藤 恵子	同上	助手	線虫糖鎖遺伝子機能の欠失突然変異株の取得と解析	H15.10～H18.3
	安藤 恵子	同上	助教	線虫糖鎖遺伝子機能の欠失突然変異株の取得と解析	H18.4～H21.3
*	小林 哲夫	同上	CREST 研究員	線虫糖鎖遺伝子機能の欠失突然変異株の取得と解析	H16.4～H18.9
*	瀬山 陽一	同上	CREST 技術員	線虫糖鎖遺伝子機能の欠失突然変異株の取得と解析	H16.1～H17.10
	吉名 佐和子	同上	助教	線虫糖鎖遺伝子機能の欠失突然変異株の取得と解析	H18.4～H21.3
*	林(旧姓 米積)亜紀	同上	CREST 研究員	糖鎖が関わる疾患の RNAi による解析	H18.10～H21.3
	鴻 宗義	同上	助教	線虫糖鎖遺伝子機能の欠失突然変異株の取得と解析	H19.4～H21.3

③糖鎖構造およびプロテオームの質量分析技術研究グループ(線虫における糖鎖構造とプロテオーム解析手法の開発と研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所	室長		H15.10～H21.3
*	橋井 則貴	同上	CREST 研究員		H17.4～H17.10
	橋井 則貴	同上	研究員		H17.11～H21.3
	中島(旧姓 松石) 紫	同上	CREST 技術員		H16.4～H17.3
*	中島 紫	同上	CREST 技術員		H17.11～H20.9

④糖鎖関連遺伝子の機能解析グループ(哺乳類と線虫の糖鎖関連遺伝子の機能解析に関する研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
--	----	----	----	------	------

○	山下 克子	東京工業大学	特任教授	糖鎖認識分子の機能解析の研究総括	H18.4～H21.3
○	瀬古 玲	佐々木研究所	主任研究員	糖転移酵素複合体の機能及び阻害機構の解析	H15.10～H18.3
	瀬古 玲	東京工業大学	特別研究員	同上	H18.4～H21.3
	福島 慶子	佐々木研究所	研究員	細胞内小胞輸送蛋白質群の機能解析	H15.10～H18.3
	福島 慶子	東京工業大学	特別研究員	同上	H18.4～H21.3
*	井手尾 浩子	佐々木研究所生化学部	CREST 技術員	ガレクチン-4 及び線虫ガレクチンの機能解析	H16.4～H18.4
	井手尾 浩子	東京工業大学	研究員	同上	H18.5～H21.3

⑤プロテオグリカン遺伝子機能の解析グループ(哺乳類やハエ、線虫のプロテオグリカンの遺伝子と機能解析の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	北川 裕之	神戸薬科大学	助教授		H15.10～H17.3
○	北川 裕之	同上	教授		H17.4～H21.3
	泉川 友美	同上	博士課程学生	グリコサミノグリカン鎖の重合機構解析	H15.10～H19.3
	泉川 友美	同上	ポスドク	グリコサミノグリカン鎖の重合機構解析	H19.4～H21.3
	三上 雅久	同上	講師	糖鎖による神経突起伸長機構の解析	H19.4～H21.3
	宮田 真路	同上	ポスドク	遺伝子改変動物を用いた糖鎖機能の解析	H20.4～H21.3
*	田渕 裕子	同上	研究補助員	培養細胞の維持と管理	H18.4～H21.3
*	藤田 伊都子	同上	研究補助員	培養細胞の維持と管理	H18.4～H19.1

⑥トランスポーター遺伝子機能解析グループ(線虫のトランスポーターの研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	金井 好克	杏林大学	教授	線虫の糖鎖関連トランスポーターの機能解析	H15.10～H19.9
	金井 好克	大阪大学	教授	線虫の糖鎖関連トランスポーターの機能解析	H19.10～H21.3
	安西 尚彦	杏林大学	講師	線虫の糖鎖関連トランスポーター	H16.4～H20.3

				の機能解析	
	平田 拓	同上	助手	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	H16.4～H20.3
	Kanokporn Phetdee	杏林大学および大阪大学	博士課程学生	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	H19.11～H21.3

§ 5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

§ 6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 46 件)

主論文

Izumikawa T, Kitagawa H, Mizuguchi S, Nomura KH, Nomura K, Tamura J, Gengyo-Ando K, Mitani S & Sugahara K: Nematode chondroitin polymerizing factor showing cell/organ-specific expression is indispensable for chondroitin synthesis and embryonic cell division. **J. Biol. Chem.**, 279, 53755-53761, 2004.

Fukushima, K., and Yamashita, K. The carbohydrate recognition by cytokines modulates their physiological activities. **Glycoconj J.**, 21, 31-34, 2004.

Hara-Kuge, S., Seko, A., Shimada, O., Tosaka-Shimada, H and Yamashita, K. The binding of VIP36 and α -amylase in the secretory vesicles via high mannose-type glycans. **Glycobiology** 14, 739-744, 2004.

Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Akira Harazono, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/ multiple tandem mass spectrometry. Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, **J. Chromatogr. A**, 1094, 105-1017, 2005

Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, Takao Hayakawa, and Toru Kawanishi: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry., **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 19, 3315-3321, 2005.

Seko, A., and Yamashita, K. Identification and characterization of a novel galactose: β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (β 3Gn-T8). **Glycobiology** 15, 943-951,

2005.

Seko, A., Sumiya, J., and Yamashita, K: Porcine, mouse, and human Gal 3-O-sulfotransferase-2 enzymes have different substrate specificities; the porcine enzyme requires basic compounds for its catalytic activity. *Biochemical Journal* 391, 77-85, 2005.

Fukushima, K., Ikehara, Y., and Yamashita, K.: Functional role played by the GPI-anchor glycan of CD48 in IL-18-induced IFN-gamma production. *J. Biol. Chem.*, 280,18056-18062, 2005.

Ideo, H., Seko, A., and Yamashita, K.: Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and CEA in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 280, 4730-4737, 2005.

Bergefall, K., Trybala, E., Johansson, M., Uyama, T., Naito, S., Yamada, S., Kitagawa, H., Sugahara, K., and Bergstrom, T.: Chondroitin Sulfate Characterized by the E Disaccharide Unit Is a Potent Inhibitor of Herpes Simplex Virus Infectivity and Provides the Virus Binding Sites on gro2C Cells. *J. Biol. Chem.*, 280(37), 32193-32199, 2005.

Dejima K, Seko A, Yamashita K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Izumikawa T, Kitagawa H, Sugahara K, Mizuguchi S, & Nomura K: Essential roles of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthase in embryonic and larval development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 281, 11431-11440, 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. Comm.* 349, 1345-1350, 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.

Yigit E, Batista P, Pang KM, Bei Y, Chen CG, Joshua-Tor NL, Mitani S, Simard M, Mello CC: Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 127, 747-757, 2006.

Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: N-linked oligosaccharide analysis by liquid chromatography with graphitized carbon column/ liner ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes. *J. Chromatogr. A*, 1103, 296-306, 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, 453-60, 2006.

Satoh, T., Sato, K., Kanoh, A., Yamashita, K., Kato, R., Nakano, A., and Wakatsuki, S. Structures of carbohydrate recognition domain of Ca^{2+} -independent cargo receptors Emp46p and Emp47p. **J. Biol. Chem.**, 281, 10410-9, 2006.

Izumikawa, T., Egusa, N., Taniguchi, F., Sugahara, K., and Kitagawa, H.: Heparan Sulfate Polymerization in *Drosophila*. **J. Biol. Chem.**, 281(4), 1929-1934, 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.

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(50), 38668-38674, 2006.

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 *C. elegans*. **EMBO Reports** 8, 152-157, 2007.

Kitagawa H, Izumikawa T, Mizuguchi S, Egusa N, Taniguchi F, 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.

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.

Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Yukari Nakajima, Masashi Toyoda, Yoko Katagiri, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akihiro Umezawa, and Teruhide Yamaguchi: Study on the quality control of cell therapy products Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier

transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1160, 263-269, 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, 28246-55, 2007.

Ideo, H., Seko, A., and Yamashita, K.: Recognition mechanism of galectin-4 for sulfated compounds, *J. Biol. Chem.*, 282, 21081-9, 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.

Hisamoto N, Moriguchi T, Urushiyama S, Mitani S, Shibuya H, and Matsumoto K: *C. elegans* WNK-STE20 pathway regulates tube formation by modulating CIC channel activity. *EMBO Reports* 9, 70-75, 2008.

Darland-Ransom M, Wang X, Sun C-L, Gengyo-Ando K, Mitani S and Xue D: Role of the *C. elegans* TAT-1 protein in maintaining plasma membrane phosphatidylserine asymmetry. *Science* 320, 528-531, 2008.

Kaneiwa T, Yamada S, Mizumoto S, Montaña AM, Mitani S and Sugahara K: Identification of a Novel Chondroitin Hydrolase in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 283, 14971-14979, 2008.

Breckenridge DG, Kang B-H, Kokel D, Mitani S, Staehelin A, Xue D: *Caenorhabditis elegans* drp-1 and fis-2 regulate distinct cell death execution pathways downstream of ced-3 and independent of ced-9. *Mol. Cell* 31, 586-597, 2008.

Akira Harazono, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi-Nakajima, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi: Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 868, 20-30, 2008.

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.*, 283(17), 11396-11406, 2008.

Tone, Y., Pedersen, L. C., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara, J., Tamura, J., Negishi, M., and Sugahara, K.: 2-O-phosphorylation of xylose and 6-O-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in

the linkage region synthesis. **J. Biol. Chem.**, 283(24), 16801-16807, 2008.

Nadanaka, S., Ishida, M., Ikegami, M., and Kitagawa, H.: Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 modulates Wnt-3a signaling through control of E disaccharide expression of chondroitin sulfate. **J. Biol. Chem.**, 283(40), 27333-27343, 2008.

Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ikegami-Kuzuhara, A., Nadanaka, S., Goto, F., Ogawa, T., and Sugahara, K.: Sulfation of the galactose residues in the glycosaminoglycan-protein linkage region by recombinant human chondroitin 6-O-sulfotransferase-1. **J. Biol. Chem.**, 283(41), 27438-27443, 2008.

Seko, A., and Yamashita, K.: Activation of β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-2 (β 3Gn-T2) by β 3Gn-T8: Possible involvement of β 3Gn-T8 in increasing poly-N-acetyllactosamine chains in differentiated HL-60 cells. **J. Biol. Chem.**, 283, 33094-33100, 2008.

Geng X, Shi Y, Nakagawa A, Yoshina S, Mitani S, Shi Y, and Xue D: Inhibition of CED-3 zymogen activation and apoptosis in *Caenorhabditis elegans* by a caspase homolog CSP-3. **Nature Struct. Mol. Biol.**, 15, 1094-1101, 2008.

Killian DJ, Harvey E, Johnson P, Otori M, Mitani S and Xue D: SKR-1, a homolog of Skp1 and a member of the SCF{SEL-10} complex, regulates sex-determination in *C. elegans*. **Dev. Biol.**, 322, 322-331, 2008.

Satsuki Itoh, Akiko Hachisuka, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Reiko Teshima, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Glycosylation Analysis of IgLON Family Proteins in Rat Brain by Liquid Chromatography and Multiple-Stage Mass Spectrometry, **Biochemistry**, 47, 10132-10154, 2008.

Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: Relative quantification of N-glycans using an isotope tagging method, **Immunology**, published online in August 2008.

Sakamoto,S, Chairoungdua,A, Nagamori,S, Ueda,T, Fujimura,M, Shigeta,Y, Naya,Y, Akakura,K Ito,H, Endou,H, Ichikawa,T Kanai,Y: A novel role of C-terminus of b0,+AT in the ER-Golgi traffic of rBAT-b^{0,+}AT heterodimeric amino acid transporter. **Biochem. J.** ,417, 441-448 , 2009.

Mikami, M., Yasunaga, D., and Kitagawa, H.
Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E
J. Biol. Chem. 284, in press (2009)

Katsufumi Dejima, Daisuke Murata, Souhei Mizuguchi, Kazuko H. Nomura, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Shin Kamiyama, Shoko Nishihara, and Kazuya Nomura: The ortholog of human solute carrier family 35 member B1 (UDP-galactose transporter-related protein 1) is involved in maintenance of ER homeostasis and

essential for larval development in *Caenorhabditis elegans*
The FASEB Journal, in press(2009)

関連論文

上記(1)以外の CREST 研究関連論文(国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 13 件)

Kleta R, Romeo E, Ristic Z, Ohura T, Stuart C, Arcos-Burgos M, Dave MH, Wagner CA, Camargo SR, Inoue S, Matsuura N, Helip-Wooley A, Bockenhauer D, Warth R, Bernardini I, Visser G, Eggermann T, Lee P, Chairoungdua A, Jutabha P, Babu E, Nilwarangkoon S, Anzai N, Kanai Y, Verrey F, Gahl WA, Koizumi A. Mutations in SLC6A19, encoding B⁰AT1, cause Hartnup disorder. **Nat Genet.** 36(9):999-1002, 2004

Yoon JH, Kim IJ, Kim H, Kim HJ, Jeong MJ, Ahn SG, Kim SA, Lee CH, Choi BK, Kim JK, Jung KY, Lee S, Kanai Y, Endou H, *Kim do K: Amino acid transport system L is differently expressed in human normal oral keratinocytes and human oral cancer cells. **Cancer Lett.** 222: 237-245, 2005.

Nakanishi K, Matsuo H, Kanai Y, Endou H, Hiroi S, Tominaga S, Mukai M, Ikeda E, Ozeki Y, Aida S, Kawai T: LAT1 expression in normal lung and in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. **Virchows Arch.** 448: 142-150, 2006.

Shigeta Y, Kanai Y, Chairoungdua A, Ahmed N, Sakamoto S, Matsuo H, Kim DK, Fujimura M, Anzai N, Mizoguchi K, Ueda T, Akakura K, Ichikawa T, Ito H, Endou H. A novel missense mutation of SLC7A9 frequent in Japanese cystinuria cases affecting the C-terminus of the transporter. **Kidney Int.** 69(7):1198-1206, 2006.

Nawashiro H, Otani N, Shinomiya N, Fukui S, Ooigawa H, Shima K, Matsuo H, Kanai Y, Endou H: L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors. **Int. J. Cancer** 119: 484-492, 2006.

Kim CH, Park KJ, Park JR, Kanai Y, Endou H, Park JC, Kim do K: The RNA interference of amino acid transporter LAT1 inhibits the growth of KB human oral cancer cells. **Anticancer Res.** 26: 2943-2948, 2006.

Baniasadi S, Chairoungdua A, Iribe Y, Kanai Y, Endou H, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J. Gene expression profiles in T24 human bladder carcinoma cells by inhibiting an L-type amino acid transporter, LAT1. **Arch Pharm Res.** 444-52, 2007

Asano S, Kameyama M, Oura A, Morisato A, Sakai H, Tabuchi Y, Chairoungdua A, Endou H, Kanai Y. L-type amino acid transporter-1 expressed in human astrocytomas, U343MGa. **Biol Pharm Bull.** 415-22, 2007

Fukuhara D, Kanai Y, Chairoungdua A, Babu E, Bessho F, Kawano T, Akimoto Y, Endou H, Yan K. Protein characterization of NA⁺-independent system L amino acid transporter 3 in mice: a potential role in supply of branched-chain amino acids under nutrient starvation. **Am J Pathol.** 888-98, 2007

Nakanishi K, Ogata S, Matsuo H, Kanai Y, Endou H, Hiroi S, Tominaga S, Aida S, Kasamatsu H, Kawai T. Expression of LAT1 predicts risk of progression of transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. **Virchows Arch.** 451(3):681-90, 2007.

Kaira K, Oriuchi N, Otani Y, Shimizu K, Tanaka S, Imai H, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Dobashi K, Kanai Y, Endou H, Nakajima T, Endo K, Mori M. Fluorine-18-alpha-methyltyrosine positron emission tomography for diagnosis and

staging of lung cancer: a clinicopathologic study. *Clin Cancer Res.* 13(21):6369-78, 2007.

Kobayashi K, Ohnishi A, Promsuk J, Shimizu S, Kanai Y, Shiokawa Y, *Nagane M. Enhanced tumor growth elicited by L-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells. *Neurosurgery.* 62(2):493-503, 2008.

Kabir-Salmani M, *Fukuda MN, Kanai-Azuma M, Ahmed N, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Nagamori S, Kanai Y, Sugihara K, Iwashita M. The membrane-spanning domain of CD98 heavy chain promotes $\alpha(v)\beta3$ integrin signals in human extravillous trophoblasts. *Mol Endocrinol.* 22(3):707-15, 2008.

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 30 件、国際会議 9 件)

Kazuva Nomura, Souhei Mizuguchi, Kazuko H. Nomura, Katsufumi Dejima, Hiroshi Kitagawa, Toru Uyama, Shohei Mitani, Keiko Gengyo-Ando, Yoshio Hirabayashi, Kazuyuki Sugahara

Analysis of glycome-related genes using the nematode *C. elegans*

第 76 回 日本生化学会 シンポジウム 比較グライコーム：新しい糖鎖機能への挑戦
2003 年 10 月 17 日 シンポジスト 横浜

野村一也

線虫を使って糖鎖の機能を探る—糖鎖関連遺伝子の戦略的解明をめざして
文部科学省特定領域研究 Functional Glycomics
第 2 回公開シンポジウム 2004 年 1 月 23 日 名古屋 シンポジスト

野村一也

発生異常をひき起こす糖鎖関連遺伝子—モデル生物・線虫 を用いた解析
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所公開シンポジウム 2004
2004 年 2 月 7 日 名古屋

山下 克子, 福島 慶子, GPI-anchor glycan recognition of a group of cytokines modulates physiological activities, 21st International Lectin Meeting, 神奈川, 2004, 5 月

Kazuva Nomura

Functional analysis of proteoglycan-related genes in the nematode *C. elegans*

Informal Seminar, 英語(host: Prof. Volker Schmid) May 26, 2004, Biocenter and Pharmacenter, Basel University, Basel, Switzerland

野村一也

線虫で糖鎖の機能を探る
日本動物学会・九州支部公開講演会、2004 年 6 月 25 日、九州大学 福岡

野村一也

糖鎖の隠された役割の解明をめざして—線虫 *Caenorhabditis elegans* の遺伝子破壊によるアプローチ

文部科学省特定領域研究 発生システムのダイナミクス

班会議 2004 年 9 月 27 日 セミナー 「糖鎖生物学と発生システム」湘南国際村センター

Kazuya Nomura

Systematic knocking out of glycome-related genes in the nematode *C. elegans*

第 77 回日本生化学会大会 シンポジウム Glyco-signaling and glyco-synapse

2004 年 10 月 13 日 横浜

Kitagawa, H.

“Biosynthesis and Functions of Glycosaminoglycans in *Caenorhabditis elegans*”

US/Japan Glyco 2004 Society for Glycobiology (Honolulu 2004. 11. 17)

北川 裕之

「コンドロイチン硫酸の生合成と新たな機能—細胞分裂や骨疾患との関わり」

第 12 回 PG フォーラム/第 4 回神経組織 PG 研究会 (東京 2004. 11. 27)

水口惣平、野村和子、出嶋克史、安藤恵子、三谷昌平、川崎ナナ、金井好克、瀬古玲、北川裕之、菅原一幸、野村一也

細胞分裂と形態形成を支配する糖鎖—モデル生物 *Caenorhabditis elegans* を用いた機能解析
第 27 回日本分子生物学会ワークショップ グライコワールドの新展開 2004 年 12 月 8 日

北川 裕之

「RNAi 法を用いたプロテオグリカンの機能と生合成機構の解析」

第 47 回日本臨床化学会近畿支部例会 (神戸 2005. 4. 23)

山下克子、福島慶子 : Functional role played by the GPI-anchor glycan of CD48 in IL-18-induced IFN- γ production. 第 2 回日蘭 Glycobiology meeting, Utrecht, Netherland, 2005, 4 月

北川 裕之

「ヒアルロン酸やコンドロイチンなどの糖鎖の機能—若さと健康を保つ秘密」

第 6 回神戸薬科大学公開市民講座 (神戸 2005. 5. 14)

Kitagawa, H.

“Biosynthetic and Functional Regulation of Chondroitin Sulfate by Specific Sulfation” Proteoglycans in Signaling (Stockholm 2005. 9. 8)

野村一也 : 遺伝子破壊による糖鎖機能の解明—プロテオーム解析の活用に向けて
日本プロテオーム機構第 3 回大会 (2005, 8, 1) 横浜

北川 裕之

「ヒアルロン酸やコンドロイチンなどの糖鎖の機能—若さと健康を保つ秘密」

ひょうご講座 (神戸 2005. 10. 7)

野村一也 : 線虫の RNAi で糖鎖の機能を探る

第 16 回 フォーラム・イン・ドージン (同仁化学研究所主催) 2005. 12. 2 熊本

野村一也 : 遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明

第 3 回 糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 2005.12.7 東京コンファレンスセンター

野村一也 : 線虫を使って糖鎖の機能をどのように探っていくか—遺伝子ネットワークの解明をめざして

第 28 回日本分子生物学会年会 ワークショップ
モデル生物を用いた glycobiology の cutting edge 2005.12.10 福岡

Kazuva Nomura,
Systematic knocking out of glycosyltransferases and related genes in the nematode
Caenorhabditis elegans
MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge (UK), informal seminar Host: Dr. Mario
de Bono, 2006.4.26

Kazuva Nomura,
Systematic knocking out of glycosyltransferases and related genes in the nematode
Caenorhabditis elegans
The Gurdon Institute, Cambridge (UK), informal seminar Hostess: Dr. Julie Ahringer, 2006.4.
28

山下克子, 福島慶子, 瀬古玲, 井手尾浩子: Structures and Functions of CEA glycans in
Colon Cancer. GlycoT 2006. Tsukuba, 2006, 6 月

瀬古玲: 硫酸化糖鎖の生合成と癌性変化、第 25 回日本糖質学会年会、大津

北川 裕之
「コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化による合成制御とヘルペスウイルス感染」
病態糖鎖研究会 (岡崎 2006. 9. 25)

北川 裕之
“Biosynthetic mechanism and functions of chondroitin sulfate”
北海道大学大学院先端生命科学研究院研究セミナー (札幌 2006. 11. 6)

北川 裕之
「線虫を用いたグリコサミノグリカン鎖の生合成機構と機能の解析」
日本薬学会第 127 年会 (富山 2007. 3. 30)

北川 裕之
「コンドロイチン硫酸鎖の多彩な機能—細胞分裂、骨疾患、そしてウイルス感染への関わり—」
「北陸大学学術フロンティア」特別講演会 (2007.6.22 金沢)

野村一也
生命の第3の鎖＝糖鎖の機能を線虫で探る
バイオインフォマティクス夏の学校 (九州大学システム生命学府 科学技術振興調整費人材養成
ユニット・福岡県高等学校生物部会共催) 2007.7.1

川崎ナナ, 高倉大輔, 中島 紫, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿを用いた
糖鎖抗原付加タンパク質の同定. 日本プロテオーム機構第5回大会 (2007. 7. 30-31) 東京

野村一也
「線虫の糖鎖研究はエレガントでドラマチック」
特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」
研究成果公開発表シンポジウム、東京、2008 年1月 26 日

北川 裕之

「グリコサミノグリカン鎖の合成異常と骨疾患」

日本薬学会第 128 年会(横浜 2008. 3. 26)

川崎ナナ:LC/MS を用いた糖鎖の微量かつ網羅的解析と創薬への応用. 日本薬学会第 128 年会一般シンポジウム「グライコサイエンスから創薬へ」. 横浜(2008. 3. 26-28)

野村一也

「モデル生物線虫を用いた硫酸化シグナルの解析」

日本農芸化学会平成20年度大会シンポジウム 2008 年3月29日名古屋

野村一也

「生命の第3の鎖＝糖鎖の機能を探る」

九州大学理学部生物学科公開講座 九州大学六本松キャンパスおよびウエル戸畑(北九州市)
2008 年 8 月 9 日, 10 日

三谷昌平:「線虫をモデル生物として用いた機能ゲノミクス」精神神経疾患のモデル動物——線虫からサルまで、第 51 回神経化学会、2008 年 9 月、富山

北川 裕之

「コンドロイチン硫酸鎖の神経突起伸長活性の発現機構」

第 6 回日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (東京 2008. 12. 4)

② 口頭発表(国内会議 36 件、国際会議 8 件)

Souhei Mizuguchi, Toru Uyama, Hiroshi Kitagawa, Kazuko H. Nomura, Katsufumi Dejima,
Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Kazuyuki Sugahara, Kazuya Nomura

Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*

第 76 回 日本生化学会 口頭発表およびポスター発表 2003 年 10 月 18 日 横浜

Kitagawa H., Thiele H., Sakano M., Sugahara K., Rajab A., Höhne W., Leschik G.,
Nürunberg P., Mundlos S.

“Loss of Chondroitin 6-O-Sulfotransferase-1 Function Results in Severe Human Chondrodysplasia with Progressive Spinal Involvement”

Gordon Conference on Proteoglycans (Andover 2004. 7. 15)

瀬古 玲, 山下 克子, N-アセチルグルコサミン 6-O-硫酸特異的 β 1, 4-ガラクトース転移酵素
の同定、第 24 回日本糖質学会、横浜、2004 年、8 月。

瀬古 玲, 加納亮, 坂本優, 山下 克子, ヒト卵巣粘液癌に高発現する GlcNAc6-O-硫酸転移
酵素(GlcNAc6ST)-2、第 24 回日本分子腫瘍マーカー研究会、福岡、2004 年、9 月。

泉川 友美, 北川 裕之, 水口 惣平, 野村 一也, 菅原 一幸

“Identification of Chondroitin Polymerizing Factor (ChPF) in *Caenorhabditis elegans* as PAR2.4”

第 77 回日本生化学会大会(横浜 2004. 10. 16)

瀬古 玲、山下 克子、 β 3Gn-T7 はケラタン硫酸関連オリゴ糖に作用する、第 77 回日本生化学会、横浜、2004 年、10 月。

福島 慶子、山下 克子、IL-18 の生理活性発現における GPI アンカー糖鎖認識が果たす役割、2004 年 第 77 回日本生化学会、横浜。

加納亮、瀬古 玲、坂本優、山下 克子、GlcNAc6ST-2 の卵巣粘液癌及び明細胞癌における発現、2004 年 第 77 回日本生化学会、横浜、2004 年、10 月。

Kazuva Nomura, Souhei Mizuguchi, Kazuko H. Nomura, Katsufumi Dejima, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Nana Kawasaki, Akira Seko, Katsuko Yamashita, Yoshikatsu Kanai, Kitagawa Hiroshi, Kazuyuki Sugahara

Systematic knocking out of glycosyltransferase and related genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*

4th International Symposium on Glycosyltransferases, Nov. 5th, 2004 Le Touquet, France

Uyama T., Kitagawa H., Izumikawa T., Sugahara K.

“Chondroitin Polymerization is Achieved by Multiple Enzyme Complexes Consisting of Chondroitin Synthase Family Members”

US/JAPAN GLYCO 2004 Society for Glycobiology (Honolulu 2004. 11. 17)

瀬古玲：硫酸化糖鎖の生合成と癌性変化、第 25 回日本糖質学会年会、大津、2005 年、7 月。

山下克子、瀬古玲、加納亮、山瀬利博：硫酸転移酵素活性を阻害するポリ酸の同定、第 25 回日本糖質学会年会、大津、2005 年、7 月。

川崎ナナ、橋井則貴、松石 紫、伊藤さつき、原園 景、川西 徹：LC/MSn による糖鎖の構造特異的検出。日本プロテオーム機構第 3 回大会（2005, 8, 1）横浜

Nomura, K., Mizuguchi, S., Nomura, K. H., Dejima, K., Nagaishi, T., Narimatsu, H., Kwon Y.D., Sato, T., Togayachi, A., Izumikawa, T., Uyama, T., Kitagawa, H., Sugahara, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S.: Systematic gene knock-out of human glycogene orthologs in the nematode *C. elegans* using RNAi and deletion mutagenesis

XVIII International Symposium on Glycoconjugates (GlycoXVIII) Sept 4-9, 2005. Firenze, Italy

福島慶子、石山智香子、山下克子：IL-6 の糖鎖認識をトリガーとした細胞内シグナル伝達、第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005 年、10 月。

瀬古玲、加納亮、山瀬利博、山下克子：硫酸転移酵素阻害剤としてのポリ酸、第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005 年、10 月。

Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Glycosylation analysis of IgLON family glycoproteins in rat brain by LC/MSn. 第 78 回日本生化学会大会 (2005, 10, 19-22), 神戸

Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, and Toru Kawanishi, T.: Decrease in α -glucosidase II expression in the kidney of a MRL/lpr murine model of human systemic lupus erythematosus (SLE). 第 78 回 生化学会大会, (2005, 10), 神戸。

Izumikawa T., Kitagawa H., Egusa N., Taniguchi F., Kusche-Gullberg M., Lindahl U., Norbert P., Sugahara K.

“Heparan Sulfate Polymerization in *Drosophila*”

第 78 回日本生化学会大会 (神戸 2005. 10. 21)

水口 惣平, 野村 和子, 出嶋 克史, 永石 貴之, 三谷 昌平, 安藤 恵子, 川崎 ナナ, 松石 ゆかり, 橋井 則貴, 瀬古 玲, 山下 克子, 泉川 友美, 北川 裕之, 菅原 一幸, 平林 義雄, 權 娟大, 成松 久, 野村 一也

「遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明-線虫 *C. elegans* を用いた解析の中間報告」

第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡 2005. 12. 8)

川崎ナナ, 伊藤さつき, 松石 紫, 原園 景, 橋井則貴, 川西 徹: グライコミクス技術を用いた疾患関連糖タンパク質解析. 日本薬学会第 126 年会 (2006, 3, 31) 仙台

川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹: LC/MSn を用いた部位特異的糖鎖構造解析. 第 6 回日本蛋白質科学会年会 (2006, 4, 24-26) 京都

Seko, A., and Yamashita, K. The complex formation of β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-2 (β 3Gn-T2) and β 3Gn-T8 enhances the enzymatic activity. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 2006, 7 月.

塩澤 章子, Sun-Young Park, 湯浅 和樹, 北川 裕之, 菅原 一幸

「ヘパラン硫酸重合化における EXT3 の関与」

日本薬学会第 126 年会 (仙台 2006. 3. 30)

泉川 友美, 水口 惣平, 江草 徳幸, 谷口 史恭, 出嶋 克史, 野村 和子, 田村 純一, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 野村 一也, 菅原 一幸, 北川 裕之

「線虫におけるグリコサミノグリカン鎖の生合成機構とその機能」

第 26 回日本糖質学会年会 (仙台 2006. 8. 24)

野村 一也, 水口 惣平, 野村 和子, 出嶋 克史, 永石 貴之, 村田 大輔, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 瀬古 玲, 山下 克子, 泉川 友美, 北川 裕之, 菅原 一幸, 川崎 ナナ, 中島 紫, 權 娟大, 成松 久

「遺伝子破壊による線虫糖鎖関連遺伝子の機能解析」

第26回日本糖質学会年会 (仙台 2006. 8. 25)

泉川 友美, 水口 惣平, 江草 徳幸, 谷口 史恭, 出嶋 克史, 野村 和子, 田村 一, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 野村一也, 菅原 一幸, 北川 裕之

「線虫におけるグリコサミノグリカン鎖の生合成機構とその機能」

第26回日本糖質学会年会 (仙台 2006. 8. 24)

野村 一也, 水口 惣平, 野村 和子, 出嶋 克史, 永石 貴之, 村田 大輔, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 瀬古 玲, 山下 克子, 泉川 友美, 北川 裕之, 菅原 一幸, 川崎 ナナ, 中島 紫, 權 娟大, 成松 久

「遺伝子破壊による線虫糖鎖関連遺伝子の機能解析」

第26回日本糖質学会年会 (仙台 2006. 8. 24)

川崎ナナ, 高倉大輔, 中島 紫, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 山口照英:

LC/MSnを用いた糖鎖抗原付加タンパク質の同定. 日本プロテオーム機構第5回大会 (2007. 7. 30-31)

瀬古 玲、山下 克子、 β 3Gn-T2 と複合体を形成する β 3Gn-T8 の発現増大が polyLacNAc 鎖の伸長を促進する ; 第 27 回日本糖質学会 (福岡) 2007、8 月.

三上 雅久, 森田 知子, 竹中 裕美, 安永 大輝, 薮田 ゆみ, 菅原 一幸, 北川 裕之
「コンドロイチン硫酸の硫酸化を担う硫酸基転移酵素による軟骨分化制御」

第 57 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (高槻 2007. 10. 27) Seko, A., and Yamashita, K.
Involvement of β 3Gn-T8 in elongation of poly-N-acetyllactosamine chains in relation to HL60 cell differentiation. BMB2007. 第 80 回日本生化学会 (横浜) 2007、12 月.

福島慶子、井手尾浩子、安藤恵子、三谷昌平、出島克史、野村一也、山下克子 : Carbohydrate recognition activity of ILE-2, VIP36 in *Caenorhabditis elegans* 第 30 回日本分子生物学会 第 80 回日本生化学会合同大会、ワークショップ、2007、12 月、横浜

安藤恵子、中台枝里子、三谷昌平 : 線虫を用いたメンブレントラフィック制御因子 Sec1/Munc18 ファミリーの体系的機能解析、第 85 回日本生理学会大会、2008 年 3 月、東京

Seko, A., and Yamashita K. β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-8 (β 3Gn-T8) activates β 3Gn-T2: possible involvement of β 3Gn-T8 in increasing poly-N-acetyllactosamine chains in differentiated HL-60 cells. Sixth International GlycoT 2008 Conference, Atlanta、2008、5 月.

泉川 友美, 小池 敏靖, 塩澤 章子, 奥浦 由佳, 田村 純一, 菅原 一幸, 北川 裕之
「コンドロイチン合成酵素複合体によるコンドロイチン鎖の合成機構」
第 9 回 関西グライコサイエンスフォーラム (大阪 2008. 5. 17)

K. Yamashita, K.Fukushima, H.Ideo, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, K. Dejima, Nomura, K. Functional roles of ILE-2, VIP36 orthologue, in *Caenorhabditis elegans* 23rd International Lectin Meeting, Edinburgh、(2008, 7.11~7.16).

灘中 里美, 石田 美穂, 池上 優美, 北川 裕之
「コンドロイチン-4-O-硫酸基転移酵素-1 による Wnt-3a シグナリングの微細調節」
第 58 回薬学会近畿支部総会・大会 (神戸 2008. 10. 25)

安永 大樹, 福田 純子, 三上 雅久, 北川 裕之
「高硫酸化コンドロイチン硫酸による神経突起伸長作用の発現メカニズムの解析」
第 58 回薬学会近畿支部総会・大会 (神戸 2008. 10. 25)

庄司 奈緒子, 岡田 めぐみ, 田中 慎也, 北川 裕之
「EXT1 欠損細胞における EXT1 のヘパラン硫酸鎖合成への関与」
第 58 回薬学会近畿支部総会・大会 (神戸 2008. 10. 25)

③ ポスター発表 (国内会議 78 件、国際会議 38 件)

Kazuko H. Nomura, Souhei Mizuguchi, Shohei Mitani, Keiko Gengyo-Ando, Yoshio Hirabayashi, Kazuya Nomura

Analysis of acetyl CoA transporter in the nematode *C. elegans*

第 76 回 日本生化学会 2003 年 10 月 16 日 横浜

Katsufumi Dejima, Kazuko H. Nomura, Souhei Mizuguchi, Shougo Oka, Toshisuke Kawasaki, Shouji Yamamoto, Yoshio Hirabayashi, Kazuya Nomura

Analysis of HNK-1 antigen in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

第 76 回 日本生化学会 2003 年 10 月 17 日 横浜

Kazuko H. Nomura, Souhei Mizuguchi, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Yoshio Hirabayashi, Kazuya Nomura

Expression pattern analysis of acetyl CoA transporter (SLC33) gene in the nematode *Caenorhabditis elegans*

第 26 回 日本分子生物学会 2003 年 12 月 10 日 神戸

Souhei Mizuguchi, Toru Uyama, Hiroshi Kitagawa, Kazuko H. Nomura, Katsufumi Dejima, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Kazuyuki Sugahara, Kazuya Nomura

Analysis of chondroitin proteoglycan involved in cytokinesis of *Caenorhabditis elegans*,

第 26 回 日本分子生物学会 2003 年 12 月 10 日 神戸

Katsufumi Dejima, Kazuko H. Nomura, Souhei Mizuguchi, Shougo Oka, Toshisuke Kawasaki, Shouji Yamamoto, Yoshio Hirabayashi, Kazuya Nomura

Expression of the HNK-1 epitope in *Caenorhabditis elegans*

第 26 回 日本分子生物学会 2003 年 12 月 10 日 神戸

Hiroiyuki Mihara, Kazuko H. Nomura, Kae Nagazumi, Souhei Mizuguchi, Yoshio Hirabayashi, Kazuya Nomura

Analysis of serine palmitoyltransferase gene by RNAi in the nematode *Caenorhabditis elegans*

第 26 回 日本分子生物学会 2003 年 12 月 10 日 神戸

宇山 徹, 北川 裕之, 菅原 一幸

「Chondroitin synthase と相同性を示す chondroitin synthase-2 のクローニング」

日本薬学会第 124 年会 (大阪 2004. 3. 29)

Souhei Mizuguchi, Toru Uyama, Hiroshi Kitagawa, Kazuko H. Nomura, Katsufumi Dejima, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Kazuyuki Sugahara, Kazuya Nomura

Involvement of chondroitin proteoglycan in cytokinesis of embryonic cells of the nematode *Caenorhabditis elegans*

英語 European worm meeting 2004, May 24, 2004, Casino Kursaal Interlaken Switzerland

Katsufumi Dejima, Kazuko H. Nomura, Souhei Mizuguchi, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Yoshio Hirabayashi, Shogo Oka, Toshisuke Kawasaki, Kazuya Nomura

Analysis of HNK-1 epitope and related genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*

European worm meeting 2004, May 24, 2004, Casino Kursaal Interlaken Switzerland

Kazuko H. Nomura, Souhei Mizuguchi, Katsufumi Dejima, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Yoshio Hirabayashi, Kazuya Nomura

Analyzing a putative acetyl-CoA transporter gene involved in development and morphogenesis

European worm meeting 2004, May 24, 2004, Casino Kursaal, Interlaken Switzerland

Kazuya Nomura, Souhei Mizuguchi, Kazuko H. Nomura, Katsufumi Dejima, Keiko Gengyo-Ando, Kobayashi Tetsuo, Shohei Mitani, Hiroshi Kitagawa, Toru Uyama, Kazuyuki Sugahara, Nana Kawasaki, Akira Seko, Taku Hirata, Yoshikatsu Kanai, Yoshio Hirabayashi

In search for new functions of glycoconjugates-related genes by gene knockout
East Asia *C. elegans* Meeting, May 28-July 1, 2004 淡路島

泉川 友美, 北川 裕之, 宇山 徹, 菅原 一幸

“Molecular Cloning of a Chondroitin Polymerizing Factor That Cooperates with Chondroitin Synthase for Chondroitin Polymerization”

Pharmaceutical Sciences World Congress (PSW2004) (京都 2004. 6. 2)

宇山 徹, 北川 裕之, 菅原 一幸

“Molecular Cloning of Putative Chondroitin Synthase-2 Homologous to Chondroitin Synthase” Pharmaceutical Sciences World Congress (PSW2004) (京都 2004. 6. 2)

福島 慶子, 山下 克子, GPI アンカー糖鎖を認識する腫瘍壊死因子 α 、第 24 回日本糖質学会、横浜、2004 年、8 月。

井手尾 浩子, 瀬古 玲, 山下 克子, ガレクチン-8 の糖結合特異性の解析、第 24 回日本糖質学会、横浜、2004 年、8 月。

野村一也, 野村和子, 泉川友美, 北川裕之, 菅原一幸, 安藤恵子, 三谷昌平, 水口惣平
chondroitin polymerizing factor は線虫 *Caenorhabditis elegans* 初期胚の細胞分裂に必須である

文部科学省特定領域研究 Functional Glycomics 第二回夏期シンポジウム
2004 年 8 月 26, 27 日 かずさアーク

加納 亮, 瀬古 玲, 坂本優, 山下 克子, 卵巣癌に異所性に発現する GlcNAc:6-O-硫酸転移酵素、第 63 回日本癌学会、福岡、2004 年 9 月。

安藤恵子, 町山悦子, 野口幸子, 三谷昌平: メンブレントラフィックに関わる線虫 Sec1/Munc-18 ファミリー遺伝子 Ce-vps45 の機能解析. 第 27 回日本神経科学大会、2004 年 9 月、大阪

Sun-Young Park, 北川 裕之, 田村 純一, 菅原 一幸

“Efficient Heparan Sulfate Chain Polymerization on the GlcNAc-containing Linkage Region Analog Using EXT1 or the EXT1/EXT2 Complex”

第 77 回日本生化学会大会 (横浜 2004. 10. 16)

宇山 徹, 北川 裕之, 菅原 一幸

“Identification of Chondroitin Synthase-2 That Polymerizes Chondroitin Chains in Cooperation with Chondroitin Polymerizing Factor”
第 77 回日本生化学会大会 (横浜 2004. 10. 16)

Sun-Young Park, 北川 裕之, 田村 純一, 菅原 一幸
“Chain Polymerization of Heparan Sulfate on a GlcNAc-containing Linkage Region Analog as Acceptor”
US/JAPAN GLYCO 2004 Society for Glycobiology (Honolulu 2004. 11. 18)

福島 慶子、泉雅之、橋本弘信、山下 克子、**Novel functional role of GPI-anchor glycan in IL-18 induced signaling**、2004 年日米糖質科学合同会議、ハワイ、2004 年、11 月。

瀬古 玲、山下 克子、 **β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase-7(β 3Gn-T7) acts on keratan sulfate (KS)-related glycans**、2004 年日米糖質科学合同会議、ハワイ、2004 年、11 月。

加納 亮、瀬古 玲、坂本優、山下 克子、**GlcNAc:6-O-sulfotransferase-2 ectopically expressed in ovarian mucinous clear cell carcinoma cells**、2004 年日米糖質科学合同会議、ハワイ、2004 年、11 月。

泉川 友美、北川 裕之、水口 惣平、野村 和子、野村 一也、田村 純一、安藤 恵子、三谷 昌平、菅原 一幸
“Chondroitin Polymerizing Factor, Which Shows Cell- and Organ-specific Expression in *Caenorhabditis elegans*, Is Indispensable for Chondroitin Biosynthesis and Embryonic Cell Division”
US/JAPAN GLYCO 2004 Society for Glycobiology (Honolulu 2004. 11. 19)

野村和子、水口惣平、安藤恵子、三谷昌平、平林義雄、松石紫、川崎ナナ、出嶋克史、野村一也：二次元電気泳動を用いた線虫 Acetyl CoA トランスポーターの解析。第 27 回分子生物学会年会。2004 年 12 月、神戸

出嶋克史、野村和子、水口惣平、安藤恵子、三谷昌平、瀬古玲、山下克子、平林義雄、野村一也 (九大、JST)
線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた複合糖質硫酸化修飾に関連した遺伝子の解析
第 27 回日本分子生物学会 2004 年 12 月 10 日

水口 惣平、野村 和子、出嶋 克史、安藤 恵子、三谷 昌平、川崎 ナナ、金井 好克、瀬古 玲、北川 裕之、菅原 一幸、野村 一也
「細胞分裂と形態形成を支配する糖鎖-モデル生物 *Caenorhabditis elegans* を用いた機能解析」 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸 2004. 12. 8)

泉川 友美、北川 裕之、水口 惣平、野村 和子、野村 一也、田村 純一、安藤 恵子、三谷 昌平、菅原 一幸
“Nematode Chondroitin Polymerizing Factor Showing Cell/Organ-specific Expression Is Indispensable for Chondroitin Synthesis and Embryonic Cell Division”
第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸 2004. 12. 8)

泉川 友美、北川 裕之、水口 惣平、野村 和子、野村 一也、田村 純一、安藤 恵子、三谷 昌平、菅原 一幸
「*C. elegans* のコンドロイチン生合成および初期胚における細胞質分裂に必須であるコン

ドロイチン重合化因子 (cChPF; PAR2. 4) の同定」
日本薬学会第 125 年会 (東京 2005. 3. 30)

金川 奈央, 坂野 雅弘, 北川 裕之, 多屋 長治, 菅原 一幸
「コンドロイチン硫酸の硫酸化に働く Chondroitin 6-sulfotransferase-1 (C6ST-1) を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析」
日本薬学会第 125 年会 (東京 2005. 3. 30)

Kobayashi T, Gengyo-Ando K, Ishihara T, Katsura I, Mitani S: Isolation and characterization of an unusual tracking mutant. 15th International *C. elegans* meeting. 2005 年 6 月 Los Angeles.

Gengyo-Ando K, Kobayashi T, Seyama Y, Mitani S: Functional analysis of the *C. elegans* SM gene vps-45 and its cognate syntaxins. 15th International *C. elegans* meeting. 2005 年 6 月 Los Angeles.

福島慶子, 石山智香子, 山下克子: IL-6 の糖鎖認識をトリガーとした細胞内シグナル伝達, 第 25 回日本糖質学会年会、大津、2005 年, 7 月

井手尾浩子, 瀬古玲, 山下克子: 硫酸化コレステロールを認識するガレクチン-4、第 25 回日本糖質学会年会、大津、2005 年, 7 月.

泉川 友美, 北川 裕之, 江草 徳幸, 谷口 史恭, Perrimon Norbert, 菅原 一幸
「*Drosophila* におけるヘパラン硫酸の重合化」
第 25 回日本糖質学会年会 (大津 2005. 7. 20)

永石貴之、野村和子、水口惣平、出嶋克史、川崎ナナ、松石紫、野村一也: 線虫の糖鎖付加タンパク質の決定
日本プロテオーム機構第 3 回大会 (2005, 8, 1) 横浜 P2-4

野村和子、水口惣平、永石貴之、安藤恵子、三谷昌平、平林義雄、松石紫、川崎ナナ、野村一也: *C. elegans* を用いた糖鎖の網羅的機能解析—二次元電気泳動(2D-DIGE) による定量的解析
日本プロテオーム機構第 3 回大会 (2005, 8, 1) 横浜 P2-5

Dejima, K., Seko, A., Nomura, K. H., Mizuguchi, S., Gengyo-Ando, K., Hirabayashi, Y., Mitani, S., Yamashita, K., Nomura, K. :Functional analysis of the genes required for sulfation of glycoconjugates in *C. elegans*
XVIII International Symposium on Glycoconjugates (GlycoXVIII) Sept 4-9, 2005. Firenze, Italy

Mizuguchi, S., Izumikawa, T., Uyama, T., Nomura, K. H., Dejima, K., Kitagawa, H., Sugahara, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Nomura, K. : Glycosaminoglycans play important roles in *Caenorhabditis elegans*
XVIII International Symposium on Glycoconjugates (GlycoXVIII) Sept 4-9, 2005. Firenze, Italy

Nomura, K. H., Mizuguchi, S., Dejima, K., Nagaishi, T., Matsuishi, Y., Kawasaki, N., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Hirabayashi, Y., Nomura, K.: Analyzing glycome-related gene expression with two dimensional in-gel electrophoresis (2D-DIGE)
XVIII International Symposium on Glycoconjugates (GlycoXVIII) Sept 4-9, 2005. Firenze, Italy

福島慶子、石山智香子、山下克子：Interleukin-6 carbohydrate recognition triggers physiological activity. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Florence, Italy, 2005 年, 9 月.

井手尾浩子、瀬古玲、山下克子：Galectin-4 recognizes a variety of sulfated compounds. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Florence, Italy.

瀬古玲、加納亮、山瀬利博、山下克子：Polyoxometalates as inhibitors for sulfotransferases. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Florence, Italy, 2005 年, 9 月.

井手尾浩子、瀬古玲、山下克子：ガレクチン-4 の硫酸基認識機構，第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005 年, 10 月.

Seko, A., Kanoh, A., Yamase, T., and Yamashita, K. Polyoxometalates as inhibitors for sulfotransferases. 第 78 回日本生化学会 (神戸)、2005 年, 10 月.

Hirata, T., Nimitvilai, S., Ellappan, B., Nomura, K., Nilwarangkoon, S., Mitani, S., Gengyo-Ando, K., Anzai, N., and Kanai, Y.: Identification and characterization of *C. elegans* cationic amino acid transporter orthologues. 第 78 回日本生化学会大会，神戸，2005 年 10 月 21 日

野村和子、水口惣平、出嶋克史、永石貴之、安藤恵子、三谷昌平、平林義雄、松石ゆかり、橋井則貴、川崎ナナ、野村一也：*C. elegans* を用いた糖鎖の網羅的機能解析—二次元電気泳動 (2D-DIGE) によるアセチル化の定量的解析
第 28 回日本分子生物学会年会，福岡，2005. 12. 8

平田 拓，Sudarat N，Ellappan B，野村一也，三谷昌平，安藤恵子，安西尚彦，金井好克：塩基性アミノ酸トランスポーターの線虫オルソログの同定とその機能解析．第 28 回日本分子生物学会年会，福岡，2005 年 12 月 7 日～10 日．

永石貴之、野村一也、水口惣平、出嶋克史、安藤恵子、三谷昌平、平林義雄、松石ゆかり、橋井則貴、川崎ナナ、野村一也：*C. elegans* の糖鎖付加タンパク質の決定
第 28 回日本分子生物学会年会，福岡，2005. 12. 8

水口惣平、野村和子、出嶋克史、永石貴之、三谷昌平、安藤恵子、川崎ナナ、松石ゆかり、橋井則貴、瀬古玲、山下克子、泉川友美、北川裕之、菅原一幸、平林義雄、権 娟大、成松久、野村一也：遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明—線虫 *C. elegans* を用いた解析の中間報告
第 28 回日本分子生物学会年会，福岡，2005. 12. 8

出嶋克史、野村和子、水口惣平、安藤恵子、三谷昌平、瀬古玲、山下克子、平林義雄、野村一也：線虫 *C. elegans* を用いた複合糖質硫酸化修飾に関連した遺伝子の解析
第 28 回日本分子生物学会年会，福岡，2005. 12. 9

平田拓，Nimitvilai Sudarat，Babu Ellappan，野村一也，三谷昌平，安藤恵子，安西尚彦，金井好克：塩基性アミノ酸トランスポーターの線虫オルソログの同定とその機能解析 第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月、福岡

泉川 友美, 北川 裕之, 谷口 史恭, 江草 徳幸, 水口 惣平, 野村 一也, 菅原 一幸

「*rib-1*は *C. elegans* のヘパラン硫酸の生合成に必須である」

第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡 2005. 12. 8)

安藤恵子, 小林哲夫, 瀬山陽一, 三谷昌平: 線虫 vps-45 および相互作用する syntaxin 遺伝子の逆遺伝学的解析 第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月、福岡

安藤恵子, 小林哲夫, 三谷昌平: 線虫 SM ファミリー遺伝子 vps-45 のエンドサイトーシスにおける生理的役割 第 83 回日本生理学会大会、2006 年 3 月、群馬

泉川 友美, 江草 徳幸, 谷口 史恭, 菅原 一幸, 北川 裕之

「*Drosophila* におけるヘパラン硫酸の生合成機構の解析」

日本薬学会第 126 年会 (仙台 2006. 3. 28)

Nomura, KH., Mizuguchi, S., Dejima, K., Murata, D., Matsuishi-Nakajima, Y., Kawasaki, N., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Hirabayashi, Y., Nomura, K.

Analyzing a putative acetyl-CoA transporter gene involved in development and morphogenesis,

European Worm Meeting, Crete (Greece), 2006. 4. 30

Mizuguchi, S., Nomura, KH., Dejima, K., Nagaishi, T., Murata, D., Mitani, S., Gengyo-Ando, K., Seko, A., Yamashita, K., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Sugahara, K., Kwon, Y-D., Narimatsu, H., Nomura, K.

Functional knocking out of glycome-related genes in *Caenorhabditis elegans*

European Worm Meeting, Crete (Greece), 2006. 4. 30

北川 裕之, 泉川 友美, 水口 惣平, 江草 徳幸, 谷口 史恭, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 野村 一也, 菅原 一幸

“Expression of *rib-1*, a *Caenorhabditis elegans* homolog of the human tumor suppressor *EXT* Genes is indispensable for heparan sulfate synthesis and embryonic morphogenesis”

Extracellular Glycomatrix in Health Disease Symposium (淡路 2006. 6. 15)

Nomura, K., Murata, D., Mizuguchi, S., Dejima, K., Nagaishi, T., Mihara, H., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Hirabayashi, Y., Nomura, K.

Analyzing serine palmitoyltransferase in the nematode *C. elegans*

20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto (Japan), 2006. 6. 19

Hirata, T., Babu, E., Nimitvilai, S., Nomura, K., Mitani, S., Gengyo-Ando, K., Kanai, Y.: Analysis of *C. elegans* SLC7 amino acid transporters, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, Jun. 19, 2006

Dejima, K., Seko, A., Izumikawa, T., Nomura, KH., Mizuguchi, S., Gengyo-Ando, K., Kitagawa, H., Hirabayashi, Y., Sugahara, K., Mitani, S., Yamashita, K., Nomura,

K.

PAPS synthase *pps-1* is essential for embryogenesis and larval development in *C. elegans*

20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto (Japan), 2006.6.19

Dejima, K., Seko, A., Izumikawa, T., Nomura, KH, Mizuguchi, S., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Kitagawa, H., Sugahara, K., Yamashita, K., Nomura, K.

PAPS synthase, *pps-1*, is essential for epidermal organization in *C. elegans*
C. elegans development & evolution topic meeting #1, Madison (USA), 2006.6.24

北川 裕之, 泉川 友美, 水口 惣平, 出島 克史, 野村 和子, 江草 徳幸, 谷口 史恭, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 野村 一也, 菅原 一幸

「ヒトの EXT 相同遺伝子である *rib-1* は *C. elegans* のヘパラン硫酸の生合成と胚の形態形成に必須である」

特定領域研究班「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」18 年度（第 4 回）夏期シンポジウム（浜松 2006. 8. 8～9）

Keiko Gengyo-Ando and Shohei Mitani: Physiological roles of the Hermansky-Pudlak Syndrome gene, VPS33A ortholog, in the endosomal/lysosomal system of *C. elegans*. East Asian *C. elegans* Meeting, 2006 Nov, Seoul

Sawako Yoshina, Keiko Gengyo-Ando, Yuichi Iino, Shohei Mitani, Hideshi Inoue: The Unfolded Protein Response related to protease. East Asian *C. elegans* Meeting, 2006 Nov, Seoul

石田 美穂, 宇山 徹, 泉川 友美, Trybala, Edward, Tufaro, Frank, Bergstrom, Tomas, 菅原 一幸, 北川 裕之

“Chondroitin 4-*O*-sulfotransferase-1 regulates E disaccharide expression of chondroitin sulfate required for herpes simplex virus infectivity”

日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋 2006.12.6～8）

泉川 友美, 宇山 徹, 奥浦 由佳, 菅原 一幸, 北川 裕之

「コンドロイチン合成酵素-2 (ChSy-2) の *in vitro* および *in vivo* におけるコンドロイチン硫酸生合成への関与」

日本薬学会第127年会（富山 2007. 3. 28～30）

綿本 有希子, 金川 奈央, 泉川 友美, 坂野 雅弘, 浅野 雅秀, 菅原 一幸, 北川 裕之

「グリコサミノグリカン鎖生合成に関与するグルクロン酸転移酵素-I ノックアウトマウスの作製」

日本薬学会第127年会（富山 2007. 3. 28～30）

榎本 典子, 周 少波, 谷口 史恭, 江草 徳幸, 多屋 長治, 菅原 一幸, 北川 裕之

「グリコサミノグリカン鎖生合成に関与する糖転移酵素EXTL2を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析」

日本薬学会第 127 年会（富山 2007. 3. 28～30）

吉名 佐和子 , 安藤 恵子, 飯野 雄一 , 井上 英史, 三谷 昌平 : ER ストレス応答における線虫メタロプロテアーゼの機能解析、第 59 回日本細胞生物学会、2007 年 5 月、福岡

安藤 恵子 , 黒柳 秀人 , 小林 哲夫, 村手 源英 , 藤本 和, 岡部 繁男, 三谷 昌平 : 線虫 VPS-45 のエンドサイトーシス経路における生理的役割、第 59 回日本細胞生物学会、2007 年 5 月、福岡

Kanokporn Phetdee, Taku Hirata, Sirinun Nilwarangkoon, Ellappan Babu, Kazuya Nomura, Shohei Mitani, and Yoshikatsu Kanai: Identification and characterization of an intestinal amino acid transporter (AAT-4) in *Caenorhabditis elegans*. 16th International *C. elegans* Meeting, Los Angeles, US, June 27-July 1, 2007.

Taku Hirata, Kanokporn Phetdee, Ellappan Babu, Sudararat Nimitvilai, Kazuya Nomura, Shohei Mitani, Keiko Gengyo-Andou and Yoshikatsu Kanai: Analysis of *C. elegans* SLC7 amino acid transporters. 16th International *C. elegans* Meeting, Los Angeles, US, June 27-July 1, 2007.

Keiko Gengyo-Ando, Hidehito Kuroyanagi, Tetsuo Kobayashi, Motohide Murate, Kazushi Fujimoto, Shigeo Okabe, Shohei Mitani.: Physiological roles of the Sec1/Munc18 family in the endosomal/lysosomal system of *C. elegans*. 16th International *C. elegans* Meeting, Los Angeles June/July, 2007

Sawako Yoshina, Keiko Gengyo-Ando, Yuichi Iino, Hideshi Inoue, Shohei Mitani.: Functional analysis of *C. elegans* proteases in ER stress response. 16th International *C. elegans* Meeting, Los Angeles June/July, 2007

福島慶子, 井手尾浩子, 安藤恵子, 三谷昌平, 出島克史, 野村一也, 山下克子: 線虫 VIP36 orthologue-ILE-2 の機能解析第27回日本糖質学会年会 (2007、8.1~3、福岡)

井手尾浩子, 福島慶子, 安藤恵子, 三谷昌平, 出島克史, 野村一也, 山下克子: 哺乳動物ガレクチン-4 様線虫ガレクチンの機能解析第 27 回日本糖質学会年会 (2007、8.1~3、福岡)

橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿ による目的部分糖鎖構造を持つ糖タンパク質の特異的同定. 第 27 回日本糖質学会年会 (2007.8.1~3 福岡)

Kitagawa H., Izumikawa T., Mizuguchi S., Dejima K., Nomura K. H., Egusa F., 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”

XIX International Symposium on Glycoconjugates (Glyco 19) (Cairns 2007.7.15~22)

泉川 友美, 塩澤 章子, 田村 純一, 菅原 一幸, 北川 裕之

「コンドロイチン硫酸グルクロン酸転移酵素のコンドロイチン鎖の重合化への関与」
第27回日本糖質学会年会 (福岡 2007.8.1~3)

森田 知子, 竹中 裕美, 安永 大揮, 薮田 ゆみ, 記村 真衣, 三上 雅久, 菅原 一幸, 北川 裕之

「軟骨分化課程におけるコンドロイチン硫酸の硫酸化を担う硫酸基転移酵素の発現変動」
第27回日本糖質学会年会（福岡 2007.8.1～3）

奥浦 由佳, 泉川 友美, 宇山 徹, 菅原 一幸, 北川 裕之
「コンドロイチン硫酸合成酵素-3 (ChSy-2) のコンドロイチン鎖の重合化への関与」
第27回日本糖質学会年会（福岡 2007.8.1～3）

庄司 奈緒子, 周 少波, 谷口 史恭, 江草 徳幸, 灘中 里美, 多屋 長治, 菅原 一幸, 北川 裕之
「*EXTL2*を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析」
第27回日本糖質学会年会（福岡 2007.8.1～3）

水口 惣平, 野村 和子, 出嶋 克史, 泉川 友美, 江草 徳幸, 谷口 史恭, 田村 純一, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 北川 裕之, 菅原 一幸, 野村 一也
モデル生物 *C. elegans* を用いたヘパラン硫酸の生体内機能解析
第27回日本糖質学会年会（2007.8.1～3 福岡）

野村和子, 林康宏, 村田大輔, 永石貴之, 水口惣平, 出嶋克史, 福嶋宏史, 中島紫, 川崎ナナ, 安藤恵子, 三谷昌平, 伊東信, 平林義雄, 野村一也
線虫におけるセラミドグルコシル転移酵素の機能解明
第27回日本糖質学会年会（2007.8.1～3 福岡）

村田大輔, 野村和子, 水口惣平, 出嶋克史, 安藤恵子, 三谷昌平, 福島慶子, 山下克子, 野村一也
線虫 *C. elegans* におけるGPIアンカーの機能解析
第27回日本糖質学会年会（2007.8.1～3 福岡）

出嶋克史, 水口惣平, 野村和子, 村田大輔, 平田拓, 金井好克, 安藤恵子, 三谷昌平, 野村一也
Homolog of UDP-gal transporter (HUT-1)は線虫 *Caenorhabditis elegans* において小胞体機能と幼虫発生に必須である
第27回日本糖質学会年会（2007.8.1～3 福岡）

福島慶子, 井手尾浩子, 安藤恵子, 三谷昌平, 出嶋克史, 野村一也, 山下克子: Carbohydrate recognition activity of ILE-2, VIP36 homologue, in *Caenorhabditis elegans*. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会、2007、12月、横浜

出嶋克史, 瀬古玲, 山下克子, 泉川友美, 北川裕之, 菅原一幸, 安藤恵子, 三谷昌平, 水口惣平, 野村和子, 村田大輔, 野村一也: 線虫 *C. elegans* を用いた硫酸化修飾関連遺伝子の発生過程における役割と硫酸供与体 PAPS の合成制御機構の解析. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会、2007、12月、横浜

水口惣平, 野村和子, 出嶋克史, 泉川友美, 谷口史恭, 田村純一, 中島紫, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 安藤恵子, 三谷昌平, 北川裕之, 菅原一幸, 野村一也: モデル生物 *C. elegans* を用いたヘパラン硫酸とコンドロイチンプロテオグリカンの生体内機能解析. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会、2007、12月、横浜

村田大輔, 野村和子, 水口惣平, 出嶋克史, 安藤恵子, 三谷昌平, 福島慶子, 山下克子, 中島紫, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 野村一也: 線虫 *C. elegans* における GPI アンカーの機能解析. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会、2007、12月、横浜

野村和子、林康広、村田大輔、永石貴之、水口惣平、出嶋克史、福嶋宏史、安藤恵子、三谷昌平、中島紫、川崎ナナ、伊東信、平林義雄、野村一也：線虫におけるセラミドグルコシル転移酵素の機能解明。第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会、2007、12月、横浜

井手尾浩子、福島慶子、安藤恵子、三谷昌平、出嶋克史、野村一也、山下克子：Analysis of galectin-4 orthologues in *Caenorhabditis elegans*. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会、2007、12月、横浜

伊藤さつき、川崎ナナ、橋井則貴、原園 景、中島 紫、高倉大輔、内田恵理子、押澤 正、山口照英：ヒトミエロペルオキシダーゼの部位特異的糖鎖構造解析。第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会（2007. 12, 11-15）横浜

迫田 直樹、三上 雅久、菅原 一幸、多屋 長治、北川 裕之
「コンドロイチン 6-O-硫酸基転移酵素-1 を過剰発現するトランスジェニックマウスの脳に発現するコンドロイチン硫酸の解析」
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学大会合同大会（横浜 2007. 12. 11-15）

小池 敏靖、宇山 徹、迫田 直樹、奥浦 由佳、泉川 友美、菅原 一幸、北川 裕之
「コンドロイチン GalNAc 転移酵素-1 および-2 のコンドロイチン硫酸鎖生合成への関与」
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学大会合同大会（横浜 2007. 12. 11-15）

池上 優美、石田 美穂、灘中 里美、菅原 一幸、北川 裕之
「Involvement of glycosaminoglycans in Wnt-3a signaling pathway」
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学大会合同大会（横浜 2007. 12. 11-15）

鍵山 正二、周 少波、庄司 奈緒子、谷口 史恭、江草 徳幸、灘中 里美、多屋 長治、菅原 一幸、北川 裕之
「The tumor suppressor *EXT*-like gene *EXTL2* regulates glycosaminoglycan amounts」
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学大会合同大会（横浜 2007. 12. 11-15）

平田 拓、Kanokporn Phetdee、Ellappan Babu、野村一也、三谷昌平、安藤恵子、金井好克
「線虫アミノ酸輸送体の機能制御における糖タンパク質の関与。」2008 糖鎖全体会議、大阪、2008 年 1 月 21 日

Kanokporn Phetdee、Taku Hirata、Ellappan Babu、Yoshikatsu Kanai。「Interaction with glycoprotein ATG-1 is essential for the functional activity of *C. elegans* amino acid transporter (AAT6).」、G蛋白質シグナル&膜輸送複合体合同若手ワークショップ、箱根、2008 年 1 月 27 日

田中 慎也、岡田 めぐみ、庄司 奈緒子、灘中 里美、北川 裕之
「ヘパラン硫酸生合成におけるEXTL3の関与」
日本薬学会 第128年会（横浜 2008. 3. 26-28）

藪田 ゆみ、三上 雅久、北川 裕之
「多核化を伴う骨格筋分化過程におけるコンドロイチン硫酸の発現変動」
日本薬学会 第128年会（横浜 2008. 3. 26-28）

安永 大輝、水本 秀二、小林 直樹、三上 雅久、三宅 歩、伊藤 信行、菅原 一幸、北川 裕之

「コンドロイチン4-*O*-硫酸基転移酵素-1のゼブラフィッシュ胚発生過程における機能の解析」

日本薬学会 第128年会 (横浜 2008.3.26-28)

灘中 里美, 石田 美穂, 池上 優美, 北川 裕之

“Fine Tuning of the Cellular Response to Wnt-3a by Chondroitin 4-*O*-Sulfotransferase-1”

第60回 日本細胞生物学会大会 (横浜 2008.6.29-7.1)

Shushi Nagamori, Kanokporn Phetdee, Taku Hirata, Ellappan Babu, Yoshikatsu Kanai.: *C. elegans* amino acid transporter 6 (AAT6), which does not possess a conserved cysteine, requires non-SS interaction with glycoprotein ATG-1 for the function. Gordon Research Conference: Membrane Transport Proteins. Il Ciocco Hotel and Resort in Lucca (Barga) Italy. July 25, 2008.

K. Fukushima, H.Ideo, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, K. Dejima, K. Nomura, K. Yamashita
Carbohydrate recognition activity of ILE-2, VIP36 orthologue, in *Caenorhabditis elegans* 24th International Carbohydrate Symposium) Oslo, Norway, (2008, 7.27-8.1)

H.Ideo, K. Fukushima, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, K. Dejima, K. Nomura, K. Yamashita
Analysis of galectin-4 orthologues in *Caenorhabditis elegans*, 23rd International Lectin Meeting, Edinburgh, (2008, 7.11-7.16).

Izumikawa T., Koike T., Shiozawa S., Sugahara K., Tamura J., 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”

XXIV International Carbohydrate Symposium (Oslo 2008.7.27-8.1)

Ikegami M., Ishida M., Nadanaka S., Kitagawa H.

“Chondroitin 4-*O*-Sulfotransferase-1 Modulates Wnt-3a Signaling Through Control of E Disaccharide Expression of Chondroitin Sulfate”

XXIV International Carbohydrate Symposium (Oslo 2008.7.27-8.1)

山田 修平, 榊本 典子, 檜垣 鮎美, 宮田 真路, 金岩 知之, 水本 秀二, Deepa S. S., 北川 裕之, 菅原 一幸

「組替え体ヒトヒアルロニダーゼ-4の基質特異性の研究」

第28回日本糖質学会年会 (つくば 2008.8.18-20)

小池 敏靖, 泉川 友美, 塩澤 章子, 菅原 一幸, 田村 純一, 北川 裕之

“The mechanism of chondroitin polymerization by multiple enzyme complexes consisting of chondroitin synthase family members”

第28回日本糖質学会年会 (つくば 2008.8.18-20)

宮田 真路, 迫田 直樹, 三上 雅久, 菅原 一幸, 多屋 長治, 北川 裕之

“Functional analysis of chondroitin sulfate in the brain of transgenic mice over expressing chondroitin 6-*O*-sulfotransferase-1”

第28回日本糖質学会年会 (つくば 2008.8.18-20)

岡田 めぐみ, 田中 慎也, 灘中 里美, 北川 裕之
“Involvement of EXTL3 in heparan sulfate biosynthesis”
第28回日本糖質学会年会 (つくば 2008.8.18～20)

福島慶子、井手尾浩子、安藤恵子、三谷昌平、出嶋克史、野村一也、山下克子
線虫VIP36 orthologue ILE-2の機能解析
第28回日本糖質学会年会 (つくば 2008.8.18～20)

(3)特許出願

①国内出願 (2 件)

1. 発明の名称:硫酸転移酵素阻害剤
発明者: 山下克子 瀬古玲 山瀬 利
出願人:東京工業大学 出願日:2005-3-25
出願番号 特願 2005-80542 号
2. 発明の名称: グリコサミノグリカン糖鎖の生合成不全マウス
発明者: 北川 裕之、菅原 一幸、浅野 雅秀、杉原 一司
出願人: JST、国立大学法人金沢大学
出願日: 2007 年 2 月 15 日
出願番号: 特願 2007-34346

②海外出願 (0 件)

- 1.
- 2.
- ...

その他 ◇件

(4)受賞等

①受賞

平田 拓:	第 10 回分子腎臓研究会優秀研究賞	2004 年 9 月.
水口 惣平:	第 21 回井上研究奨励賞	2005 年 2 月
瀬古 玲:	第 25 回日本糖質学会奨励賞	2005 年 7 月
安西 尚彦:	第 11 回分子腎臓研究会優秀研究賞	2005 年 9 月.
平田 拓:	第 79 回日本薬理学会年会優秀発表賞	2006 年 3 月.
平田 拓:	第 12 回分子腎臓研究会優秀研究賞	2006 年 9 月.
平田 拓:	第 13 回分子腎臓研究会優秀研究賞	2007 年
橋井則貴:	日本糖質学会第11回ポスター賞 第 27 回日本糖質学会	2007 年 8 月

②新聞報道

Medical Tribune vol. 39, No. 38, 2006年 9 月 21 日号において第 26 回日本糖質学会についての記事が掲載され「遺伝子破壊により線虫の糖鎖関連遺伝子機能を解析」と題して野村グループの研究が紹介された。Medical Tribune 誌にて野村チームの研究成果を報道。
平成 18 年 9 月 21 日

③その他

1) サイエンスチャンネルで CREST 研究の紹介を放送：

番組名： Message from Scientists 放送時間：14 分 制作年度：2003 年
以下は番組のキャプションです。

「最先端の研究をしている研究者をお迎えして、自身の研究内容を紹介する番組です。今回の研究者は「遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明」の研究をされている九州大学大学院理学研究院生物科学専攻 情報生物学講座 助教授 野村一也さんです。」

2) *Nature Cell Biology* 2004 年 1 月号のトピック欄 (*Nature Cell Biol.* 6, 9-11, 2004) で野村研究室の研究がとりあげられた。

"Sweet control of cell migration, cytokinesis and organogenesis"
Benjamin Podbilewicz 博士

3) 生化学工業 糖質科学へのイントロダクションでの野村研究室の紹介

4) 第 127 年会日本薬学会(富山)において、講演ハイライトに採用された。

橋井則貴, 川崎ナナ, 豊田雅士, 片桐洋子, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 梅澤明弘, 山照英:細胞治療薬の品質評価に関する研究:nanoLC/FTMS による細胞膜の N-グリコリルノイラミン酸の定量. 日本薬学会第 127 回年会 (2007. 3), ハイライト集 p25.

(5) その他特記事項

総説・解説

「線虫を用いた糖鎖機能の網羅的解析のすすめ—プロテオグリカン関連遺伝子を例として」(増刊号「糖鎖機能—第三の生命鎖—」)

野村一也、水口惣平、北川裕之：蛋白質・核酸・酵素、48(8)：1057-1063、2003.

(単行本化 2004)

「単一細胞レベルで糖鎖の機能を探る—コンドロイチンプロテオグリカン为例として」

野村一也、北川裕之、菅原一幸、水口惣平：実験医学、22(5)：921-926、2004

「線虫の細胞分裂を制御する糖鎖コンドロイチン」(short review)

水口惣平、野村和子、出嶋克史、宇山徹、北川裕之、菅原一幸、安藤恵子、

三谷昌平、野村一也：蛋白質・核酸・酵素 49(2)：141-147、2004

「糖鎖の機能を線虫 *C. elegans* の神経系で探る」

野村一也、出嶋克史、野村和子、水口惣平

蛋白質・核酸・酵素 49(15)：2327-2335、2004 (増刊号 神経糖鎖生物学) (単行本化 2005)

Sugar chains in cell adhesion and cell division-Comparative glycomics throwing lights on glycobiology"

Kazuuya Nomura

Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 16 (88): 125-134, 2004

The acetyl-CoA transporter family SLC33

Hirabayashi, Y, Kanamori, A, Nomura, KH, Nomura, K.
Pflugers Arch - Eur J Physiol, in press, 447: 760-762, 2004.
In "The ABC of Solute Carriers - Guest Editor: Matthias A. Hediger."

「糖鎖の機能を単一細胞レベルで探る—その細胞分裂・分化・形態形成における役割」
野村一也、

第9章 発生・分化・形態形成 (分担執筆) pp. 326—329、2005
「未来を拓く糖鎖科学」 監修 永井克孝、金芳堂

「糖鎖の役割を線虫で探る—糖鎖と線虫の発生—」
野村一也、出嶋克史、野村和子、永石貴之、水口惣平
糖鎖科学の新展開—機能解明・次世代型材料・医薬品開発にむけて
監修 谷口直之、伊藤幸成 分担執筆
第2章 第12節 発生 pp. 310—317. 2005年 エヌ・ディー・エス(株)

Mass spectrometry of glycoprotein,
Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi, Takao Hayakawa, and Toru Kawanishi: *Trends in Glycosci. Glycotech.*, 2005, 97, 193-203.

LC/MSを用いたグライコーム解析
川崎ナナ、橋井則貴、伊藤さつき、原園景、川西徹、
臨床化学、2005, 34, 309-318

Biosynthesis of heparin and heparan sulfate
Mizumoto, S., Kitagawa, H., and Sugahara, K.
In *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate* (Garg, H. G., Linhardt, R. J., and Hales, C. A., eds.), pp. 203-243, Elsevier, Oxford, UK, 2005.

Biosynthetic pathways for differential expression of functional chondroitin sulfate and heparan sulfate
Mizumoto, S., Uyama, T., Mikami, T., Kitagawa, H., and Sugahara, K.
In *Handbook of Carbohydrate Engineering* (Kevin J. Yarema, ed.), pp. 289-324, CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL, 2005.

LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins,
Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Toru KAWANISHI
Encyclopedia of mass spectrometry, Vol.8, Elsevier Science (Oxford, UK), 2006

Complex formation of glycosyltransferases and their biological significance
Akira Seko, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 18, 209-230 (2006)

Biosynthesis of glycosaminoglycans and proteoglycans
Uyama, T., Kitagawa, H., and Sugahara, K.
In *Comprehensive Glycoscience* (Johannis P. Kamerling, ed.), pp. 79-104, Elsevier, Oxford, UK, 2007.

Heparan Sulfate Biosynthesis and Disease
Nadanaka, S., and Kitagawa, H.
J. Biochem., 144(1), 7-14, 2008.

Heparan sulfate synthases and related genes

Mizumoto, S, and Kitagawa, H.

In *Experimental Glycoscience (Glycobiology)* (Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H., Kawasaki, T., and Hase, S., eds.), pp. 59-63, Springer, Tokyo, Japan, 2008.

Functional Glycomics at the Level of Single Cells: Studying Roles of Sugars in Cell Division, Differentiation and Morphogenesis with 4D Microscopy,

Mizuguchi, S., Dejima, K., Nomura, KH, Murata, D., Nomura, K.,

In *Experimental Glycoscience (Glycobiology)* (Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H., Kawasaki, T., and Hase, S., eds.), pp. 290-294, Springer, Tokyo, Japan, 2008.

分子生物学 basic technique:モデル seibutu 線虫 *Caenorhabditis elegans*

村田大輔、野村一也

The Lung perspective, 16 (4), 529-532, 2008/10/20 メディカルレビュー社

関連論文 英文総説 3件, 和文総説 1件

Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y.: CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 447:532-542, 2004.

Palacin M, Kanai Y. The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 447(5):490-4, 2004.

Kanai Y, Hediger MA. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447(5):469-79, 2004.

金井 好克:アミノ酸トランスポーター、*細胞工学* 25、280-286、2006

§ 7 研究期間中の主な活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2004 年 7 月 24 日	第1回 CREST チーム 年会(キックオフミーテ ィング)	佐々木研究所 メモリアルホール(東京・神田 駿河台)	20 名	CREST チーム研究打ち合わせ会。 各チームの研究内容を紹介し今 後の研究計画の発展に資した。 CREST 研究チームそれぞれが研究 成果を発表し、討論。今後の研究 について討論。(5 時間)
2004 年 12 月 08 日	第 27 回日本分子生 物学会ワークショップ グライコワールドの新 展開(世話人:遠藤玉 夫、野村一也)	神戸	150	グライコワールドを様々な切り 口で解明する最先端の演者によ る講演と糖鎖生物学の展望につ いて素材の提示と活発な議論を 行い、特に若い研究者に刺激的な 内容とした。
2005 年 7 月 16 日	第2回 CREST チーム 年会	佐々木研究所 メモリアルホール	19 人	CREST 研究チーム全チームからの 研究進捗状況の報告を行い、さら

		(東京・神田駿河台)		に今後の研究方針の検討を行った。(5時間)
2006 年 8 月 30 日	第3回 CREST チーム 年会	東京女子医科大学医学部弥生会館第二臨床講堂 (東京・新宿)	19 人	CREST 研究チーム全チームの研究従事者が研究発表し、研究進捗状況の報告と確認、今後の研究方針の検討を行った。 (8時間)
2007 年 10 月 24 日	第4回 CREST チーム ミーティング	国立医薬品食品衛生研究所、東京	17	CREST 研究チーム全チームからの研究進捗状況の報告を行い、さらに今後の研究方針の検討を行った
2008 年 10 月 2 日	第5回 CREST チーム ミーティング	東京女子医科大学医学部 (東京、新宿)	20 人	CREST 研究チーム全チームからの研究進捗状況の報告を行い、さらに今後の研究の展開について検討を行った

§8 結び

本研究プロジェクトでは、モデル生物 線虫 *C. elegans* を中心としてその有用性を最大限に活用した研究をめざした。遺伝子機能を破壊してその表現型から遺伝子機能を探り、さらに糖鎖の機能を線虫の遺伝学、逆遺伝学、バイオインフォマティクスなどを活用して解明することをこころみた。ノックアウトには世界最先端のノックアウトプロジェクトの協力を得られ研究がすすめられたこと、そして今まで線虫での糖鎖研究を行っていなかった研究チームが二チームも自ら線虫を駆使した研究を遂行できるようになったことは大きな収穫であった。また今まで糖鎖に興味をもっていなかったグループが糖鎖研究を積極的に展開する契機となるという大きな収穫もあった。研究内容では、細胞分裂に関わる糖鎖の遺伝子を新たに同定して、糖鎖が細胞周期にもかかわっていることをあきらかにできたのは大きな成果である。またガレクチンの生体防御への関与の発見をはじめ、糖脂質の行動への影響、GPI アンカーの重要性、コンドロイチンやヘパラン硫酸の役割、硫酸化の役割の解明などにも十分に貢献できたと思う。これらの成果はどのチームも CREST 研究を主催出来る実力をもった共同研究者のおかげであると感謝している。この共同研究を契機に日本の糖鎖研究へあらたな研究者がながれこみ、より生物に密着し生化学と共同できる協力体制が末永く続くことを願っている。また研究面では、細胞膜のうちがわからの制御(ピケットやフェンスなやラフトなどによる制御)以外に、細胞表層からの細胞膜制御の研究の重要性を明らかに出来たと考えている。今後は細胞表層のフロンティア領域ともよぶべき領域からの細胞膜制御に糖鎖や関連分子がどのように関与しているかを明らかにして、新しい糖鎖生物学のきりくちとして研究を続けたいと思っている。また、生体防御への糖鎖や糖脂質、レクチンの関わりは重要な問題であり、これも医学部との共同研究で研究を展開すべく計画中である。(写真 は 2006 年チームミーティングにて)



