領域評価用資料 添付資料 (CREST)

研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

1. 応募件数・採択件数

採択年度	応募件数	面接件数	採択件数
平成 14 年度	57	15	6
平成 15 年度	37	14	6
平成 16 年度	41	12	4
合計	135	41	16

2. 研究実施体制

平成 14 年度採択

研究代表者：伊藤幸成

- (1) 理研伊藤 グループ (理化学研究所)
研究分担グループ長：伊藤幸成 (主任研究員)
研究項目：糖タンパク質品質管理に関わる糖鎖とそのタンパク質複合体の精密合成
- (2) 長崎大 井原 グループ (長崎大学)
研究分担グループ長：井原 義人 (助教授)
研究項目：小胞体内分子シャペロンによる品質管理機構の解明
- (3) 名市大 加藤グループ (名古屋市立大学)
研究分担グループ長：加藤 晃一 (教授)
研究項目：NMR を利用した細胞内レクチンの糖鎖認識機構の構造生物学的解析
- (4) 阪大 鈴木グループ (大阪大学)
研究分担グループ長：鈴木 匡 (COE 助教授)
研究項目：細胞質における遊離糖鎖の代謝系の解析と糖鎖とランスポーターの同定および
ショウジョウバエにおける遊離糖鎖の代謝機構の解明とその生理機能の解析
- (5) 東大 山本グループ (東京大学)
研究分担グループ長： 山本一夫 (教授)
研究項目：細胞内レクチンによるタンパク質輸送機構の解明と新規 cargo receptor 創成
による糖鎖利用技術への応用

研究代表者：神奈木玲児

- (1) 神奈木 グループ (愛知県がんセンター研究所)
研究分担グループ長：神奈木玲児 (部長)
研究項目：セレクチンと糖鎖リガンドを介した細胞識別・接着の制御機構とがんの進展
- (2) 北島グループ (名古屋大学)
研究分担グループ長：北島 健 (教授)
研究項目：細胞接着に関わるシアル酸の構造変化と細胞接着制御の解明
- (3) 土肥グループ (国立国際医療センター研究所)
研究分担グループ長：土肥 多恵子 (部長)
研究項目：消化器癌の糖鎖不全現象におけるエピジェネティックな遺伝子抑制機構の解析
- (4) 小島グループ (東海大学)
研究分担グループ長：小島 直也 (教授)
研究項目：細胞接着性機能糖鎖の人工糖脂質ライブラリーの構築とそれを用いた糖鎖の機能解析
- (5) 浜口グループ (名古屋大学)
研究分担グループ長：浜口道成 (教授)
研究項目：癌細胞の浸潤転移を制御するヒアルロン酸-CD44 シグナルの研究
- (6) 板野研究グループ (信州大学)
研究分担グループ長：板野 直樹 (助教授)
研究項目：ヒアルロン酸糖鎖を標的とした癌浸潤転移阻止技術の開発と創薬

研究代表者：木曾 真

- (1) 糖鎖化学合成グループ (岐阜大学)
研究分担グループ長：木曾 真 (教授)
研究項目：革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製
- (2) 糖鎖酵素合成グループ (京都大学)
研究分担グループ長：山本憲二 (教授)
研究項目：酵素法による機能性糖鎖複合体の合成及び腸内細菌と糖鎖の相互作用解析
- (3) 糖鎖構造研究グループ (大阪大学)
研究分担グループ長：長束俊治
研究項目：シアル酸含有ムチン型糖鎖の構造解析
- (4) 細菌毒素研究グループ (東京農工大学)
研究分担グループ長：西河 淳
研究項目：細菌毒素と糖鎖の相互作用解析

研究代表者：小山 信人

- (1) タカラバイオグループ (タカラバイオ (株))
研究分担グループ長：小山信人
研究項目：糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発
- (2) 糖鎖治療学グループ (大阪大学)
研究分担グループ長：近藤 昭宏 (寄附講座 教授)
研究項目：糖鎖遺伝子による肝炎／肝臓の新しい治療薬開発のための基礎研究
- (3) 糖鎖シグナルグループ (大阪大学)
研究分担グループ長：三善 英知 (助教授)
研究実施項目：糖鎖／レクチンシステムを用いた癌の血清診断法の開発および肝臓の分化に関する研究

研究代表者：鈴木康夫

- (1) ウイルス感染グライコミクスグループ (中部大学、静岡県立大学)
研究分担グループ長：鈴木康夫 (中部大学 教授)
主なグループメンバー：鈴木 隆 (静岡県立大学 教授)
研究項目：ウイルス感染における機能グライコミクスの推進
- (2) 構造解析研究グループ (名古屋市立大学)
研究分担グループ長：加藤晃一 (教授)
研究項目：糖鎖とウイルスタンパク質の三次元構造、両者の相互作用様式の解析、およびウイルス、宿主が発現している糖鎖構造の迅速決定
- (3) ナノ糖鎖クラスターグループ (名古屋大学 → 千葉大学)
研究分担グループ長：西田 芳弘 (千葉大学 教授)
主なグループメンバー：小林 一清 (名古屋大学 名誉教授)
研究項目：硫酸化糖、アルギニル化糖、コリン含有糖など特定の生理活性官能基をもつナノ糖鎖クラスター材料の分子設計、インフルエンザウイルスや微生物毒素の感染阻害剤、糖鎖ナノ材料の創製
- (4) HIV 感染における糖鎖機能解析グループ (群馬大学、国立感染症研・エイズ研究センター)
研究分担グループ長：星野 洪郎 (群馬大学 教授)
主なグループメンバー：森 一泰 (国立感染症研・エイズ研究センター主任研究官)
研究項目：糖鎖機能解析による HIV 感染の制御
- (5) 糖鎖機能によるデングウイルス感染の制御研究グループ (長崎大学)
研究分担グループ長：森田公一 (教授)
研究項目：糖鎖機能によるデングウイルス感染の制御
- (6) 糖鎖合成グループ (埼玉大学)
研究分担グループ長：照沼 太陽 (教授)
研究項目：デング熱ウイルス阻害剤の合成

研究代表者：西原祥子

- (1) 統括グループ (創価大学)

研究分担グループ長：西原 祥子（教授）

研究項目：ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の網羅的単離と同定、及び、体系的 RNAi 変異体の分子生物学的・生化学的解析と個々の遺伝子の機能解析、解析結果のヒトへの応用

(2) 遺伝学的機能解析グループ（国立遺伝学研究所）

研究分担グループ長：上田 龍（教授）

研究項目：ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の体系的な RNAi 変異体作成とその遺伝学的解析

(3) 発生学的機能解析グループ（(株) 三菱化学生命科学研究所）

研究分担グループ長：後藤 聡（ユニットリーダー）

研究項目：糖蛋白質の機能と糖修飾機構の解析

(4) 糖鎖構造解析グループ（千葉大学）

研究分担グループ長：豊田英尚（助教授）

研究項目：野生型、及び、ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子 RNAi 変異体の糖鎖構造解析

(5) 糖鎖合成グループ（(財) 野口研究所）

研究分担グループ長：水野真盛（研究員）

研究項目：糖鎖基質及び阻害剤の合成

(6) 糖鎖細胞制御グループ（産業技術総合研究所）

研究分担グループ長：中村 充（チームリーダー）

研究項目：糖鎖関連遺伝子 siRNA 導入哺乳類細胞の性状解析、及び、ノックアウトマウスの調製と解析

(7) 糖鎖チップグループ（鹿児島大学）

研究分担グループ長：隅田泰生（教授）

研究項目：糖鎖チップ及び糖鎖固定化金ナノ粒子の調製、それらを用いた解析

平成15年度採択

研究代表者：伊藤孝司

(1) 徳島大学 研究グループ（徳島大学）

研究分担グループ長：伊藤 孝司（教授）

研究項目：Sandhoff 病（ α -ヘキソサミニダーゼ β -サブユニット欠損症）モデルマウスの中枢神経系への酵素補充効果の評価システムの構築

(2) 産業技術総合研究所 研究グループ（産業技術総合研究所）

研究分担グループ長：地神 芳文（センター長）

研究項目：メタノール資化性酵母による組換えリソソーム酵素の大量生産と発現系の改

良

- (3) 東京都医学研究機構 研究グループ ((財) 東京都医学研究機構)
研究分担グループ長：桜庭 均 (参事研究員)
研究項目：神経難病の分子病態解明と疾患責任酵素の神経細胞への取り込みに関する検討
- (4) 名古屋大学 研究グループ (名古屋大学)
研究分担グループ長：澤田 誠 (教授)
研究項目：脳標的化ペプチドおよび脳特異的侵入性細胞を用いた脳への酵素導入と
血液脳関門透過機構の検討

研究代表者：井ノ口仁一

- (1) マイクロドメイン分子病態研究グループ (東北薬科大学)
研究分担グループ長：井ノ口 仁一 (教授)
研究項目：マイクロドメイン分子病態研究
- (2) メタボローム・プロテオーム研究グループ (理化学研究所)
研究分担グループ長：鈴木 實
研究項目：マイクロドメインのメタボローム／プロテオーム解析
- (3) 1分子動態研究グループ (北海道大学)
研究分担グループ長：金城 政孝 (助教授)
研究項目：インスリン受容体の可視化観察
- (4) 構造生物学研究グループ (北海道大学)
研究分担グループ長：稲垣 冬彦 (教授)
研究項目：GM3 合成酵素 (SAT-I) の構造生物学
- (5) ノックアウトマウス解析グループ (福岡大学)
研究分担グループ長：藤原 道弘 (教授)
研究項目：インスリン抵抗性状態における脳の解析

研究代表者：中田 博

- (1) 中田博グループ (京都産業大学)
研究分担グループ長：中田 博 (教授)
研究項目：担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化と腫瘍組織形成
- (2) 福井成行グループ (京都産業大学)
研究分担グループ長：福井 成行 (教授)
研究項目：シアル酸含有オリゴ糖の調製とその糖鎖マイクロアレイを用いたシグレック
2 の結合する糖鎖構造の解析
- (3) 静岡大グループ (静岡大学)

研究分担グループ長：村田 健臣（助教授）

主なグループメンバー：碓氷 泰市（教授）

研究項目：シグレック及びスカベンジャーリセプターに結合する人工ムチンの合成

(4) 京都府立医科大グループ（京都府立医科大学）

研究分担グループ長：川人 豊（講師）

研究項目：ヒト消化器癌組織及び関節リウマチ組織におけるムチンあるいはムチン様物質による COX2 の誘導と病態との関連性

研究代表者：野村一也

(1) 野村一也グループ（九州大学）

研究分担グループ長：野村一也（助教授）

研究項目：線虫糖鎖遺伝子機能の戦略的破壊と破壊結果の解析

(2) 三谷昌平グループ（東京女子医科大学）

研究分担グループ長：三谷昌平（助教授）

研究項目：線虫糖鎖遺伝子機能の欠失突然変異株の取得と解析

(3) 川崎ナナグループ（国立医薬品食品衛生研究所）

研究分担グループ長：川崎ナナ（室長）

研究項目：野性株、遺伝子破壊株におけるプロテオーム解析

(4) 北川裕之グループ（神戸薬科大学）

研究分担グループ長：北川裕之（教授）

研究項目：糖鎖関連遺伝子、特にプロテオグリカンに関する遺伝子に関する生化学的解析と細胞生物学的解析

(5) 山下克子グループ（東京工業大学）

研究分担グループ長：山下克子（教授）

研究項目：遺伝子破壊にともなう糖鎖の変動の解析と遺伝子解析

(6) 金井好克グループ（杏林大学）

研究分担グループ長：金井好克（教授）

研究項目：哺乳類、特にヒトとの関連での糖鎖関連遺伝子の解析

研究代表者：宮城妙子

(1) 宮城グループ（宮城県立がんセンター研究所）

研究分担グループ長：宮城妙子（所長）

主なグループメンバー：加藤茂樹（香川大学 客員助教授）

研究項目：①シアリダーゼの機能解明。

②シアリダーゼのがんや糖尿病等における異常発現機構と意義の解析。

③シアリダーゼ異常の人為的制御法の検索。

(2) 鈴木グループ (東北大学)

研究分担グループ長：鈴木進 (助教授)

研究項目：①アデノウイルスベクターを用いた NEU3 肝過剰発現マウスの解析

②肥満, メタボリックシンドローム症例の遺伝子解析

③アデノウイルスベクターを用いた NEU3 過剰発現による膵β細胞機能の解析

(3) 袖岡グループ (理化学研究所)

研究分担グループ長：袖岡幹子 (主任研究員)

研究項目：Neu3 阻害剤の設計と合成

(4) 古川グループ (中部大学)

研究分担グループ長：古川圭子 (教授)

研究項目：ガングリオシド合成系によるシアリダーゼ異常の制御

(5) 東グループ (東北薬科大学)

研究分担グループ長：東 秀好 (教授)

研究項目：細胞膜シアリダーゼによる細胞内カルシウムシグナル調節

研究代表者：山口陽子

(1) 東海大学グループ (東海大学)

研究分担グループ長：山口陽子 (教授)

研究項目：①人工糖脂質を用いた単鎖抗体の網羅的スクリーニングとその発現・精製・糖鎖特異性解析

②ファージ提示型マウス単鎖抗体ライブラリーの作製と改良

③広範な人工糖脂質ライブラリーの構築

(2) 慶應義塾大学グループ (慶應義塾大学)

研究分担グループ長：高柳 淳 (講師)

研究項目：①ファージ提示型ヒト単鎖抗体ライブラリーの作製と改良

②人工糖脂質を用いた単鎖抗体の網羅的スクリーニング

(3) 野口研究所グループ ((財) 野口研究所)

研究分担グループ長：川上宏子 (研究員)

研究項目：ファージ抗体パンニングの為に人工糖脂質の調製と改良

平成16年度採択

研究代表者：木下タロウ

(1) 木下 タロウ 研究グループ (大阪大学)

研究分担グループ長：木下 タロウ (教授)

研究項目：①GPI アンカー型タンパク質の生合成時の動態の解明

②GPI アンカー型タンパク質の脂質ラフトへの組み込みメカニズムの解明

- (2) 池田 義孝 研究グループ (佐賀大学)
研究分担グループ長：池田 義孝 (教授)
研究項目：アスパラギン結合型糖鎖のアセンブリと多様性の制御機構
- (3) 大山 力 研究グループ (弘前大学)
研究分担グループ長：大山 力 (教授)
研究項目：泌尿器疾患における糖鎖の意義と臨床応用
- (4) 顧 建国 研究グループ (東北薬科大学)
研究分担グループ長：顧 建国 (教授)
研究項目：N-結合型糖鎖による細胞膜受容体の機能制御とそのメカニズムの解析
- (5) 近藤 玄 研究グループ (京都大学)
研究分担グループ長：近藤 玄 (助教授)
研究項目：糖鎖プロセッシングの動態と機能発現
- (6) 菅原 一幸 研究グループ (北海道大学)
研究分担グループ長：菅原 一幸 (教授)
研究項目：グリコサミノグリカンの動態-機能相関への統合的アプローチ
- (7) 鈴木 匡グループ (大阪大学)
研究分担グループ長：鈴木 匡 (COE 助教授)
研究項目：細胞質における遊離糖鎖のプロセッシング機構とその生物学的重要性
- (8) 田口 友彦 研究グループ (大阪大学)
研究分担グループ長：田口 友彦 (COE 助教授)
研究項目：エキソ・エンドサイトーシスに関する輸送小胞の形成機構の解明
- (9) 田口 良 研究グループ (東京大学)
研究分担グループ長：田口 良 (教授)
研究実施項目：質量分析法による GPI アンカーの詳細構造決定システムの動態理解への応用
- (10) 和田 芳直 研究グループ (大阪府立母子保健総合医療センター 研究所)
研究分担グループ長：和田 芳直 (所長)
研究実施項目：部位特異的な糖鎖構造解析と糖鎖合成疾患解析への応用

研究代表者：鏑田武志

- (1) 免疫シグナル制御グループ (東京医科歯科大学)
研究分担グループ長：鏑田武志 (教授)
研究項目：獲得免疫応答における糖鎖シグナルの機能解明
- (2) 糖鎖リガンドグループ (京都大学)
研究分担グループ長：小堤保則 (教授)
研究項目：Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの機能と制御機構の解明
- (3) リガンド代謝グループ (理化学研究所)
研究分担グループ長：橋本康弘 (チームリーダー)
研究項目：Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド発現制御機構の解明

研究代表者：平林義雄

- (1) 平林グループ (理化学研究所)
研究分担グループ長：平林義雄 (ユニットリーダー)

- 研究項目：神経グルコース関連糖脂質の生理機能
- (2) 伊東グループ (九州大学)
- 研究分担グループ長：伊東 信 (教授)
- 研究項目：神経発生におけるグルコシルセラミドの機能
- (3) 加藤グループ (大阪府立大学)
- 研究分担グループ長：加藤啓子 (助教授)
- 研究項目：モデルマウスによる神経可塑性機構の解明

研究代表者：本家孝一

- (1) 糖鎖機能解析法 研究グループ (高知大学)
- 研究分担グループ長：本家 孝一 (教授)
- 研究項目：①膜マイクロドメイン抗体の作製とエピトープの決定
②膜マイクロドメイン指向性プローブの開発と応用
③糖鎖抗体遺伝子導入による糖鎖機能阻害にもとづく膜マイクロドメインの機能制御
- (2) 免疫制御 グループ (高知大学)
- 研究分担グループ長：宇高 恵子 (教授)
- 研究項目：胸腺細胞分化決定機構における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明
- (3) ウイルス感染制御 研究グループ (高知大学)
- 研究分担グループ長：今井 章介 (教授)
- 研究項目：EB ウイルス (EBV) 関連腫瘍における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明
- (4) 抗体産生 研究グループ (国立成育医療センター研究所)
- 研究分担グループ長：藤本 純一郎 (副所長)
- 研究項目：膜マイクロドメインに対する単クローン抗体の作製と応用

3. 主要業績

(1) 研究代表者別 発表論文数および特許出願数

		論文発表		口頭ポスター発表		特許出願		特許出願	
		国内	国際	国内	国際	バイドール非適用		バイドール適用	
						国内	海外	国内	海外
平成 14 年度 採択	伊藤 幸成	1	54	166	56	3	0	0	0
	神奈木 玲児	0	84	140	72	6	0	2	0
	木曾 真	2	37	64	31	1	0	2	0
	小山 信人	0	44	62	36	0	0	6	0
	鈴木 康夫	6	94	241	71	0	5	13	1
	西原 祥子	0	45	132	34	1	1	3	0
平成 15 年度 採択	伊藤 孝司	3	53	141	27	0	0	3	2
	井ノ口 仁一	0	8	30	22	1	0	2	0
	中田 博	2	17	30	13	0	0	1	0
	野村 一也	0	26	74	38	0	0	0	0
	宮城 妙子	1	39	78	37	0	0	1	1
	山口 陽子	0	6	27	16	3	0	4	0
平成 16 年度 採択	木下 タロウ	0	80	158	87	7	1	3	2
	鰐田 武志	1	34	52	31	1	0	1	1
	平林 義雄	4	10	37	27	0	0	3	0
	本家 孝一	3	44	44	19	0	0	3	0
領域合計		23	675	1476	617	23	7	47	7

(2) 年度別 発表論文数および特許出願数

	論文発表		口頭ポスター発表		特許出願		特許出願	
	国内	国際	国内	国際	バイドール非適用		バイドール適用	
					国内	海外	国内	海外
平成14年度	0	26	35	5	0	0	0	0
平成15年度	0	73	174	31	4	2	2	0
平成16年度	2	168	423	152	7	0	20	2
平成17年度	4	239	594	189	9	4	17	3
平成18年度*	17	169	250	240	3	1	8	2
合計	23	675	1476	617	23	7	47	7

* 平成18年度は上半期（9月末まで）の集計

(3) 研究代表者（チーム）の代表論文

研究代表者：伊藤幸成

K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, H. Koshino, and Y. Ito “Synthetic substrates for an endoplasmic reticulum protein-folding sensor, UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 7950-7954 (2005)

UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) はフォールディングセンサーとして糖タンパク質品質管理機構において重要な役割を担っている。我々は、糖鎖-メトトレキセート (MTX) 誘導体が UGGT の優れた基質になることを見出した。これを用いて、UGGT によって生成する糖鎖の構造を化学的に証明した。また種々の CHO-MTX 及びそのタンパク質複合体を用い、UGGT の基質特異性を解明した。更に、系内に小胞体内レクチン-シャペロン CRT を共存させると、反応が促進されることを見出した。

T. Suzuki, I. Hara, M. Nakano, G. Zhao, W. J. Lennarz, H. Schindelin, N. Taniguchi, K. Totani, I. Matsuo, and Y. Ito “Site-specific labeling of cytoplasmic peptide:N-glycanase by *N,N*'-diacetylchitobiose-related compounds” *J. Biol. Chem.* **281**, 22152-22160 (2006)

出芽酵母の細胞質に存在するN型糖鎖の脱離酵素、Png1 を用いた実験により、新たに合成された糖鎖プローブ、Man₉GlcNAc₂-IAc は本酵素の非常に強い阻害剤となることが分った。Png1 上の 14 個の Cys 残基の中で、この糖鎖プローブは特定の Cys 残基と特異的な反応を行なうことがわかった。活性中心 Cys の変異体はこのプローブと反応せず、活性中心 Cys が糖鎖プローブと結合していることが考えられ、そのことは精密な質量分析による解析により確かめられた。分子モデリングにより、Png1 上にはキトビオース結合部位が存在することが予想された。この糖鎖プローブは酵素の特異的阻害剤の開発に役立つ可能性がある。

K. Totani, I. Matsuo, Y. Ihara, and Y. Ito “Substrate specificity analysis of endoplasmic reticulum glucosidase II using synthetic high-mannose-type glycans”, *J. Biol. Chem.*, **281**, 31502-31508 (2006).

糖鎖-MTX 誘導体 (CHO-MTX) およびそのタンパク質複合体 (CHO-MTX-DHFR) を用い、Glucosidase-II (G-II) の解析を行った。これまで、Glc1Man8 (G1M8) 型糖鎖は G-II に対して低い反応性を有していると信じられてきたが、我々は、G1M8(B)は G1M9 と比べ基質として遜色ない、糖タンパク質レベルではむしろ高い反応性を持っていることを見出した。更に、CRT を共存化させると G-II による反応は大きな影響を受けることが分かった。これは、CRT/CNX サイクルにおいて G1 型糖鎖が CNX/CRT から解離した後に G-II が作用することを示唆している。また、阻害実験により、G-II

の糖鎖認識機構において分枝 Man5 部分が重要な役割を担っていることが分かった。
なお、この論文は J. Biol. Chem., 2006 年 10 月 20 日号の表紙に採用された。

研究代表者：神奈木玲児

Koike, T., Kimura, N., Miyazaki, K., Yabuta, T., Kumamoto, K., Takenoshita, S., Chen, J., Kobayashi, M., Hosokawa, M., Taniguchi, A., Kojima, T., Ishida, N., Kawakita, M., Yamamoto, H., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., and Kannagi, R. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells—a missing link between Warburg effect and induction of selectin ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 8132-8137, 2004. 低酸素条件下で細胞を培養するとシアリルルイス x やシアリルルイス a 糖鎖の発現が誘導され、細胞はセレクチンに接着するようになることを発見した。このとき転写誘導される糖鎖遺伝子を DNA マイクロアレイで調べたところ、*FUT7*, *ST3O*, *UGT1*, *GLUT1* などの一連の遺伝子の転写が誘導されることが判明した。この転写誘導が、低酸素によって誘導される転写因子 HIF (hypoxia inducible factor) の働きによって起こっていることを、HIF のドミナントネガティブ体を用いたリポーターアッセイから明らかにした。また、これらの遺伝子の転写は、実際の患者癌組織においても著明に増加していることを見いだした。これは局所進行期の癌におけるシアリルルイス a / x 糖鎖の発現亢進機構を明らかにしたものであり、治療において転写因子 HIF をターゲットとした治療が重要であることを解明したものである。

Chen, G.-Y., Osada, H., Santamaria-Babi, L.F., and Kannagi, R. Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on Th1/Th2 lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**: 16894-16899, 2006. セレクチンの糖鎖リガンドであるシアリルルイス x は、顆粒球系細胞には恒常的に発現するが resting 状態のリンパ球には発現しない。リンパ球が活性化されると細胞表面にセレクチンの糖鎖リガンドであるシアリルルイス x の発現が誘導されるが、T ヘルパー 1 細胞には強く誘導されるが、T ヘルパー 2 細胞には誘導は弱い。こうした白血球のサブセット特異的なシアリルルイス x の発現機構が、合成の律速段階酵素 フコース転移酵素 VII 遺伝子 (*FUT7*) の転写調節にあることを明らかにした。*FUT7* の顆粒球系細胞における恒常的転写は転写因子 MZF-1 により、リンパ球による発現抑制は GATA-3 によっており、T ヘルパー 1 に選択的な誘導は転写因子 T-bet によって起こることが明らかになった。以上が白血球サブセットに固有の細胞系統特異的な発現を規定している。細胞の活性化に際しては活性化依存性の転写因子 CREB/ATF および Sp1 が転写を亢進させるが、その程度は転写抑制的因子 GATA-3 と促進的因子 T-bet とのバランスによって規定されている。これらの転写因子は *FUT7* 調節領域上で互いに結合して複合体を形成しており、GATA-3 は HDAC-3/-5 を、T-bet は CBP/P300 をリクルートする。従来糖鎖遺伝子は大部分がハウスキーピング遺伝子と見られがちであったが、機能的糖鎖の発現誘導については細胞系統特異性の面からも活性化依存性の

面からも精妙な転写調節機構がはたらいっていることが明らかになった。

Miyazaki, K., Ohmori, K., Izawa, M., Koike, T., Kumamoto, K., Furukawa, K., Ando, T., Kiso, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Yoshida, A., Takeuchi, M., and Kannagi, R. Loss of disialyl Lewis^a, the ligand for lymphocyte inhibitory receptor Siglec-7, associated with increased sialyl Lewis^a expression on human colon cancers. *Cancer Res*, **64**: 4498-4505, 2004.

がん細胞ではセレクトインの特異的リガンドであるシアリルルイス a 糖鎖が強く発現する。がんの発生母地である正常上皮細胞にはシアリルルイス a と共通の経路で合成されながら両糖鎖より複雑な構造をもつジシアリルルイス a 糖鎖が発現し、その合成遺伝子のうち 2-6 シアル酸転移酵素遺伝子の転写抑制によって早期にがん細胞にシアリルルイス a 糖鎖が発現するに至ることを明らかにした。その背後にはこの 2-6 シアル酸転移酵素遺伝子に対する DNA メチル化やヒストン脱アセチル化などによるエピジェネティックな転写抑制機構がある。正常細胞の糖鎖であるジシアリルルイス a は免疫抑制性リセプター Siglec-7 のリガンドとして働き、粘膜内の免疫学的ホメオスタシスの維持に役立っている。がん化した細胞でこの糖鎖が消滅してシアリルルイス a 糖鎖が優勢になると、免疫抑制性リセプターに対するリガンド活性は失われ、血管内皮のセレクトインの特異的リガンドとなってがんの血行性転移を媒介するに至る。以上の結果は、発がん早期の糖鎖異常の原因としてエピジェネティックな糖鎖遺伝子の転写抑制機構が重要であることを示し、これにより生じる糖鎖ががんの進展・転移を促進するのみならず、この糖鎖変化により失われる正常糖鎖にも機能があり、がん化によってこの機能が喪失することを示したものである。

研究代表者：木曾 真

Yanagida, K., S. Natsuka, and S. Hase. 2006 Structural diversity of cytosolic free oligosaccharides in the human hepatoma cell line HepG2. *Glycobiology*, **16** (4) 294-304.

肝癌細胞株HepG2の細胞質に含まれる糖蛋白質由来の遊離糖鎖を網羅的に構造解析した。それらの糖鎖は、小胞体からゴルジ装置での蛋白質の品質管理や輸送に関連して生じていると考えられており、糖蛋白質の成熟過程を知る上で重要な知見を与えると考えられる。今論文では、これまでに報告されていない多くの糖鎖構造を見出し、詳細な構造解析を行った。その結果、現在知られている小胞体から細胞質への経路の他に、ゴルジ装置から細胞質への糖蛋白質の排出経路の存在が示唆された。

Uotsu, N., A. Nishikawa, T. Watanabe, T. Ohyama, T. Tonozuka, Y. Sakano, K. Oguma “Cell internalization and traffic pathway of Clostridium botulinum type C neurotoxin in HT-29 cells” 2006 *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, **1763**, 120-128.

経口摂取されたボツリヌス毒素は小腸上皮より何らかの経路で循環系に侵入し神経細胞に到達して毒性を発揮するが、この循環系への侵入経路は不明であったが、本論文ではC型ボツリヌス毒素複合体が細胞表面のムチン様糖タンパク質に結合し、エンドサイトシスの機構で細胞内に移行することを明らかにした。また、毒素複合体のうち、神経毒素はゴルジ装置にまで到達していることも判明した。これらのことは、毒素の小腸上皮粘膜バリアー通過におけるトランスサイトシス機構の解明の一助となると思われる。

Fujita, K., F. Oura, N. Nagamine, T. Katayama, J. Hiratake, K. Sakata, H. Kumagai, and K. Yamamoto. 2005. Identification and Molecular Cloning of a Novel Glycoside Hydrolase Family of Core 1 Type O-Glycan-specific Endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J. Biol. Chem.* **280**: 37415-37422.

多くのビフィズス菌がEndo- α -N-acetylgalactosaminidaseを分泌生産することを見出した。この酵素はムチン糖タンパク質のセリン/スレオニン残基に α -結合する galactosyl 1,3-N-acetylgalactosamine 二糖を特異的に遊離する酵素であった。*Bifidobacterium longum* JCM1217の本酵素の遺伝子をクローニングした結果、本酵素は1966アミノ酸残基からなり、全く新しいファミリー (GH family 101) に属する酵素であることを明らかにした。Asp-682、Asp-789が活性中心の触媒残基であった。また、本酵素は糖転移活性を有しており、新奇な複合糖質を酵素合成した。

Makimura, Y., S. Watanabe, T. Suzuki, Y. Suzuki, H. Ishida, M. Kiso, T. Katayama, H. Kumagai and K. Yamamoto. 2006. Chemoenzymatic Synthesis and Application of a Sialoglycopolymer with a Chitosan Backbone as a Potent Inhibitor of Human Influenza Virus Hemagglutination. *Carbohydr. Res.* **341**: 1803-1808.

ニワトリ卵黄に見出されるシアロ糖ペプチドのN-結合型糖鎖をEndo-Mの糖転移活性を利用することによってキトサンに多価重合したシアロポリマーを合成し、A-型インフルエンザウィルスの感染阻害剤としての効果を調べた。その結果、フェツインの300倍以上の阻害効果を示した。将来、インフルエンザウィルスの感染阻害剤として利用できることが示された。

Imamura, A., M. Ando, S. Korogi, G. tanabe, O. Muraoka, H. Ishida, and M. Kiso. 2003. Di-tert-butylsilylene (DTBS) group-directed α -selective galactosylation unaffected by C-2 participating functionalities. *Tetrahedron Lett.* **44**:6725-6728.

DTBS効果による α -選択的ガラクトシル化反応方法を世界で初めて発明、開発した。すなわち、ガラクトースまたはガラクトサミンの4,6位をDTBS基で保護すると、C-2隣接基関与にかかわらず選択的に α -グリコシドが高収率で得られることを示した。

Imamura, A., H. Ando, H. Ishida, and M. Kiso. 2005. Di-*tert*-butylsilylene(DTBS)-directed α -selective synthesis of 4-methylumbelliferyl T-antigen. *Organic Lett.* **7**: 4415-4418.

DTBS 効果を利用して *endo*- α -*N*-acetylgalactosaminidase の高感度蛍光基質である 4-Methylumbelliferyl T-Antigen の効率的合成に成功し、その反応機構、汎用性と実用性を示した。

研究代表者：小山信人

Okuyama N, Ide Y, Nakano M, Nakagawa T, Yamanaka K, Moriwaki K, Murata K, Ohigashi H, Yokoyama S, Eguchi H, Ishikawa O, Ito T, Kato M, Kasahara A, Kawano S, Gu J, Taniguchi N, and Miyoshi E. (2006) Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *Int J Cancer* **118**, 2803-2808.

本論文ではグライコミクスの手法によって膵癌の新しい腫瘍マーカーを探索した。膵癌患者の血清において 40K のタンパクが高頻度にフコシル化されていた。N 末端解析により、ハプトグロビン (Hpt) であることがわかった。フコシル化 Hpt の出現率は他の癌に較べて膵癌で有意に高く、臨床病期 I, II 期で 33%、III, IV 期で 70%を示した。MS による解析の結果、膵癌患者由来の Hpt には、 α 1-3/1-4 および 1-6 結合のフコースを確認した。膵癌細胞の中で、PSN-1 は Hpt を産生し、また膵癌細胞からは Hpt 産生を誘導する因子が分泌されていた。今後、膵癌患者におけるフコシル化 Hpt 産生のメカニズムの解析が待たれる。

Nakagawa T, Uozumi N, Nakano M, Mizuno-Horikawa Y, Okuyama N, Taguchi T, Gu J, Kondo A, Taniguchi N, and Miyoshi E. (2006) Fucosylation of N-glycans regulates the secretion of hepatic glycoproteins into bile ducts. *J Biol Chem* **281**, 29797-29806.

フコシル化 AFP は肝癌に特異性の高い腫瘍マーカーとして広く臨床応用されている。その産生メカニズムに関しては、糖転移酵素 Fut8 よりもドナー基質である GDP-fucose が重要であることを証明してきた。本研究では、肝細胞の極性輸送に関与するフコースの関与を検討した。ヒト胆汁において糖タンパク質は極めて高頻度にフコシル化されていることをレクチンブロット、MS によって証明した。さらに Fut8KO マウスでは、肝臓で産生される糖タンパクが胆汁中に分泌されないことから、フコシル化が胆管への分泌シグナルになっている可能性がある。膵癌でフコシル化ハプトグロビンが増加する一因として、本機構が関与しているかもしれない。

Li W, Nakagawa T, Koyama N, Wang X, Jin J, Mizuno-Horikawa Y, Gu J, Miyoshi E,

Kato I, Honke K, Taniguchi N, and Kondo A. (2006) Down-regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in α 1,6-fucosyltransferase-deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity. *Glycobiology* **16**, 1007-1019.

Fut8 の遺伝子欠損マウスはそのほとんどが生後数日以内に致死性を示し、少数のサバイバーは増殖遅滞を示す。これは Fut8 が、細胞の分化、増殖に関わっていることを示していると思われる。本研究では、Fut8 の遺伝子欠損マウスおよび Fut8 ノックダウン細胞株のゲノミクスおよびグライコミクス解析を行った結果、細胞増殖に関わる EGFR-トリプシン-PAR2 シグナル伝達経路の存在を初めて立証した。さらに、この伝達系が N-結合糖鎖の α 1-6 コア・フコースと強く関わっていることも解明した。

研究代表者：鈴木康夫

Shinya Yamada, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki, Mai Q Le, Chairul A. Nidom, Yuko Tagawa-Sakai, Yukiko Muramoto, Mutsumi Ito, Maki Kiso, Taisuke Horimoto, Kyoko Shinya, Toshihiko Sawada, Makoto Kiso, Yipu Lin, Alan Hay, Lesley F. Haire, David J. Stevens, Rupert J. Russel, Steven J. Gambin, John J. Skehel, Yoshihiro Kawaoka: Hemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, 444, 378-382 (2006).

高病原性トリインフルエンザウイルスがヒト-ヒト間伝播可能な変異を遂げる上で重要なヘマグルチニン分子内のアミノ酸をリバースジェネティクスおよび独自に開発したウイルスシアロ糖鎖受容体認識特異性監視技術により明らかにした。

Chie Aoki, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Saki Itonori, Akihiko Yamada, Takeshi Kasama, Naonori Takahashi, Futoshi Hasebe, Ken Hatano, Koji Matsuoka, Chao-Tan Guo, Tadanobu Takahashi, Yuichi Sakano, Takashi Suzuki, Daisei Miyamoto, Mutsumi Sugita, Daiyo Terunuma, Koichi Morita, Yasuo Suzuki: Structural characterization of carbohydrate molecules recognized by domain III of dengue envelope glycoprotein. *J. Biochem.*, 139, 607-614 (2006)

デングウイルスの全ての型（1-4）に有効な糖鎖性受容体の精密化学構造（パラグロポシドに担われる糖鎖）を初めて明らかにした。さらに、この糖鎖クラスターを担持したデンドリマーを創製し、これが、デングウイルスの全ての型に対して感染阻害活性があることを見いだした。

Takashi Suzuki, Tadanobu Takahashi, Chao-Tan Guo, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Daisei Miyamoto, Hideo Goto, Yoshihiro Kawaoka, Yasuo Suzuki: Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. *J. Virol.*, 79, No.18, 11705-11715 (2005).

トリインフルエンザウイルスおよび世界流行を起こしたパンデミックインフルエンザウイルスのシアリダーゼ活性とヒト間で流行しているインフルエンザウイルスのシアリダーゼ活性の生化学的性質（酸性pHにける安定性）が異なることを発見し、この相違は、ウイルスの宿主細胞内増殖性、病原性発現と深く関わることを明らかにした。さらに、ウイルスシアリダーゼは宿主からの発芽のみならず、感染初期にも重要な

機能を持つことを明らかにし、トリインフルエンザウイルスのヒト型への変異、世界流行、病原性発揮につき新しい概念を導入した。

研究代表者：西原祥子

Takemae, H., R. Ueda, R. Okubo, H. Nakato, S. Izumi, K. Saigo, and S. Nishihara. 2003. Proteoglycan UDP-galactose: β -xylose β 1,4galactosyltransferase I is essential for viability in *Drosophila melanogaster*. *J Biol. Chem.*, **278**; 15571-15578.

本論文は、本研究課題で用いている上田が開発した誘導的 RNAi ノックダウンシステムをプロテオグリカンのリンケージ領域の合成に関与する β 1,4 ガラクトース転移酵素 I (β 1,4Gal-TI) に適用し、その有効性を初めて検証したものである。全身で RNAi を誘導したところ、ターゲット配列によらず致死性を示し、本酵素が生命維持に必須であることが明らかになった。また、本システムは、ファミリーを形成する糖転移酵素に対しても、特異的にかつ有効に機能し、糖鎖機能解析に有用であることがわかった。

Ichimiya, T., H. Manya, Y. Ohmae, H. Yoshida, K. Takahashi, R. Ueda, T. Endo, and S. Nishihara. 2004. The twisted abdomen phenotype of *Drosophila* POMT1 and POMT2 mutants coincides with their heterophilic protein *O*-mannosyltransferase activity. *J Biol. Chem.*, **279**; 42638-42647.

先天性筋ジストロフィーの原因の1つとして、 α ジストログリカンへの *O*-マンノース糖鎖修飾の異常がある。本論文では、この機能を明らかにするため、2種のショウジョウバエ *O*-マンノース転移酵素、dPOMT1 と dPOMT2 を新規に同定し、解析を行った。dPOMT1、dPOMT2 それぞれのノックダウン体は、共に腹部が時計周りに回転する *rt* (*rotated abdomen*) の表現型を示し、両者には遺伝的相互作用が認められた。また、dPOMT1 と dPOMT2 を共発現した場合においてのみ POMT 活性が認められた。これらの結果から、dPOMT1、dPOMT2 が、協調して筋発生に関与している事が明らかになった。

Goda, E., S. Kamiyama, T. Uno, H. Yoshida, M. Ueyama, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, R. Ueda, and S. Nishihara. 2006. Identification and characterization of a novel *Drosophila* 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter. *J Biol Chem.* **281**, 28508-28517.

硫酸転移酵素のドナー基質となるPAPSを糖鎖修飾の場であるゴルジ体内腔へ供給するPAPS輸送体を、我々は、2003年にヒトとショウジョウバエで初めて同定している。本論文では、第二のPAPS輸送体、PAPST2をショウジョウバエで新規に同定した。RNAi変異体は、致死性を示した。本遺伝子は、翅、及び、個眼の形成において、ヘパラン硫酸の合成に関与する糖転移酵素や硫酸転移酵素と遺伝学的な相互作用を示し、PAPST2がヘパラン硫酸の硫酸化を通して形態形成に関わる事が示された。

研究代表者：伊藤孝司

Tsuji, D., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itakura, T., and Itoh, K. 2005. Metabolic correction in microglia derived from Sandhoff disease model mice. *J. Neurochem*, **94**: 1631-1638.

β -Hexosaminidase A (HexA) を構成する β 鎖遺伝子 (*Hexb*) ノックアウトマウス (Sandhoff 病モデルマウス：SDマウス) の新生仔脳由来ミクログリアの初代培養に成功した。糖鎖認識モノクローナル抗体を用い、ミクログリアではGM2ガングリオシドよりも末端GlcNAc残基含有N-グリカンの蓄積が顕著であった。レンチウイルスベクターを用いミクログリアにマウス*Hexb*を導入したところ、細胞外へのHexアイソザイムの分泌と細胞内蓄積基質の減少が観察された。またHEXA及びHEXBの同時恒常発現CHO細胞株由来の組換えヒトHexAが、ミクログリア表面に存在するカチオン非依存性マンノース6-リン酸レセプター及びマンノースレセプターの両方を介して細胞内に取り込まれ、蓄積GM2の分解作用を示した。

Oheda, Y., Kotani, M., Murata, M., Sakuraba, H., Kadota, Y., Tatano, Y., Kuwahara, J. and Itoh, K. 2005. Elimination of abnormal sialylglycoproteins in fibroblasts with sialidosis and galactosialidosis by normal gene transfer and enzyme replacement. *Glycobiology*, **16**: 271-280.

中枢神経障害を伴う、リソソーム性シアリダーゼ (Neuraminidase-1: NEU1) 及びその保護タンパク質 (Protective protein/cathepsin A: PPCA) の欠損症 (Sialidosis及びGalactosialidosis) 患者由来の皮膚繊維芽細胞内で蓄積するシアル酸含有糖タンパク質が、*Maackia amurensis* lectin (MAM) を用いた蛍光染色及びブロット法により検出された。またSialidosis患者由来繊維芽細胞へのヒトNEU1遺伝子の導入及びGalactosialidosis患者繊維芽細胞への組換えヒトPPCAの補充により、蓄積シアル酸含有糖鎖の減少が観察された。従って、MAMレクチンを、NEU1欠損を伴うこれらの疾患の診断および治療効果の評価に応用できることが示唆された。

Sakuraba, H., Sawada, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Chiba, Y., Jigami, Y., and Itoh, K. 2006. Molecular pathologies and enzyme replacement therapies for lysosomal diseases. *Current Drug Targets - Central Nervous System and Neurological Disorders*, **5**: 403-413.

β -ヘキソサミニダーゼ (Hex) を構成する α 及び β 鎖の遺伝子 (HEXA及びHEXB) の変異が原因で、Hex欠損とGM2 ガングリオシド (GM2) の脳内過剰蓄積を伴って発症するTay-Sachs病及びSandhoff病の患者で同定されたアミノ酸置換型変異の構造に及ぼす影響を、Hexアイソザイムの結晶構造情報に基き*in silico*で予測した。ヒト型様糖鎖含有組換えリソソーム酵素の大量発現系としてメタノール資化酵母変異株の有用性を示し

た。*HEXA*及び*HEXB*同時恒常発現CHO細胞株由来の組換えHexが、患者由来繊維芽細胞表面に存在するカチオン非依存性のマンノース6-リン酸レセプターを介した補充効果を示した。また*LacZ*遺伝子導入ミクログリア株がマウスの末梢血液から脳内への移行能を示し、低侵襲的な酵素遺伝子の脳内補充技術として応用できることを示唆した。

研究代表者：井ノ口仁一

Kabayama, K., Sato, T., Kitamura, F., Uemura, S., Kang, B.W., Igarashi, Y., Inokuchi, J. (2005) TNF alpha-induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology* 15:21-29.

脂肪細胞の肥大化によるインスリン抵抗性の発症が問題になっている。我々は以前、低濃度の TNF α で脂肪細胞を慢性的に処理してインスリン抵抗性を惹起させると、GM3 合成酵素遺伝子および GM3 の発現量が亢進することを見いだした。この TNF α 処理脂肪細胞におけるインスリン受容体 (IR)-IRS-1 シグナリングの抑制は、GM3 合成の阻害により回復することから、GM3 の過剰発現はインスリン抵抗性を惹起する可能性を示唆した。そこで本研究では、さらに脂肪細胞のカベオラへ集積する IR が、TNF α 処理による GM3 の発現亢進で解離することをショ糖密度勾配遠心法により実証し、IR を介した代謝性シグナリングにおけるカベオラおよび GM3 の関与を示唆した。

Uemura, S., Kurose, T., Suzuki, T., Yoshida, S., Ito, M., Saito, M., Igarashi, Y., and Inokuchi, J. 2006. Substitution of the N-glycan Function in Glycosyltransferases by Specific Amino Acids (SUNGA): ST3Gal-V as a model enzyme. *Glycobiology* 16:258-270.

シアル酸転移酵素の糖鎖付加部位を種間で比較すると、その保存性は驚くほど低いことから、特定のアミノ酸配列が糖鎖機能を模倣できる可能性を考えた。そこで、我々は ST3Gal-V (GM3 合成酵素) をモデル酵素として選択し、糖鎖が無くても酵素活性を維持している変異体の作成を試みた。その結果、ST3Gal-V は糖鎖付加を抑制する阻害剤や N $\rightarrow$ Q 変異体において著しく活性が低下するのに対して、糖鎖機能を模倣すると考えた変異体では、活性が維持されていた。このように糖鎖は酵素活性において、必ずしも必要ではなく特定のアミノ酸配列でその機能を代替することができることを示した。

研究代表者：中田博

Sugihara, I., Yoshida, M., Shigenobu, T., Takagi, H., Maruyama, K., Takeuchi, N., Toda, M., Inoue, M., and Nakada, H. Different progression of tumor xenografts between mucin-producing and -nonproducing mammary adenocarcinoma-bearing mice. *Cancer Res.*,

66: 6175-6182, 2006.

マウス乳癌細胞でムチン産生株であるTA3-Ha細胞と、その亜株でムチン非産生株のTA3-St細胞を用いて、それぞれの担癌マウスにおける腫瘍増殖と免疫学的影響について比較した。TA3-Ha細胞の産生するムチン（エピグリカニン）は、腹腔マクロファージ上のSCRに結合し、濃度依存的にCOX2の誘導とPGE₂の産生亢進をもたらした。それぞれの皮下腫瘍組織の抽出物の解析及び組織化学的検討により、TA3-Ha腫瘍組織内に浸潤したマクロファージにCOX2の誘導が認められることを確認した。また、担癌マウスの脾細胞を調製し、IFN- γ とIL-4産生細胞を解析したところ、TA3-Ha担癌マウスでは、TA3-St担癌マウスやコントロールのマウスに比して有意にIFN- γ 産生CD4T細胞が減少していた。PGE₂の産生亢進がTh2環境をもたらす結果と考えている。事実、担癌マウスにCOX2阻害剤を投与したところ、TA3-Ha担癌マウスでは著しい抗腫瘍効果を認めたが、TA3-St担癌マウスではほとんど効果はなく、COX2誘導に伴う現象であることを裏付けた。

Yokoigawa, N., Takeuchi, N., Toda, M., Inoue, M., Kaibori, M., Yanagida, H., Tanaka, H., Ogura, T., Takada, H., Okumura, T., Kwon, A-H., Kamiyama, Y., and Nakada, H. Enhanced production of IL-6 in peripheral blood monocytes stimulated with mucins secreted into the bloodstream. *Clin. Cancer Res.*, 11: 6127-6132, 2005.

大腸癌患者血清をヒト正常末梢血単球の培養液に加えると、PGE₂の産生亢進とともにIL-6の産生も亢進することを見出した。患者血清を分画すると、ムチン画分にその活性が見出された。また、糖鎖抗原に対する単クローン抗体を用いて血清よりムチンを除いた場合、その活性は約40%に減少した。SCRへのリガンド拮抗剤によって活性が低下することから、SCRを介した系であることが示唆された。大腸癌患者でIL-6の血中濃度が高まり、IL-6の癌細胞自体への作用によりIL-10の産生が亢進し、腫瘍進展に関与することが指摘されている。これらのカスケードはムチンを起点としたものであることが示唆された。

研究代表者：野村一也

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)

既に報告したように線虫 *C. elegans* のコンドロイチン合成酵素 ChSy の遺伝子破壊は胚の細胞分裂の異常を引きおこし、これは糖鎖の細胞分裂への関与を示す初めての例の発見であった(*Nature*, **423**, 443-448, 2003)。我々は遺伝子のノックアウトで同様な細胞分裂異常を示す遺伝子を系統的に解析し、そうした遺伝子の一つ *PAR2.4* が、哺乳類で明らかにされたコ

ンドロイチン重合化因子のオーソログ *pfc-1* をコードしていることを示し、*in vitro* の pull down によって ChSy と *pfc-1* が複合体をつくる相互作用をすることを明らかにした。さらに線虫での遺伝子破壊でコンドロイチン合成が低下して細胞分裂が異常となることを確認し、新開発の発現ベクターによる発現解析とレスキュー実験で *in vivo* で ChSy と *pfc-1* が同じ細胞に局在して複合体として機能しているらしいことも明らかにした。

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)

プロテオグリカンの遺伝子破壊は線虫の糖鎖遺伝子の遺伝子破壊でも特に著しい表現型をひきおこす。線虫のプロテオグリカンではヘパラン硫酸が硫酸化されており、その他の硫酸化された分子と共に原腸貫入などの形態形成、神経回路網形成などに重要な働きをしている。我々は硫酸化の糖鎖への影響を評価するため硫酸化全般を阻害することを試みた。このため硫酸化に必須な 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) 合成酵素 *pps-1* の遺伝子破壊と RNAi による機能阻害を行い、ともに致死の表現型を確認した。またヘパラン硫酸の硫酸化の低下、上皮細胞の融合や筋肉や形態形成の異常を確認し、新開発のベクターを利用したトランスジェニック解析とレスキュー実験により、この遺伝子が上皮や筋肉などで発現しているが神経などでは発現していないこと、硫酸化が発生と形態形成に不可欠であることなどを単一細胞レベルで明らかにした。

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)

線虫の糖鎖遺伝子のトランスジェニック動物の作成による発現解析やノックアウト株の正常遺伝子の導入によるレスキュー実験には、効率の高いトランスジェニック解析用のベクターや、トランスジェニック動物の作成システムが不可欠である。我々は、この目的のため、制限酵素サイトを考慮することなく任意の遺伝子やプロモーターなどを TA クローニングして、解析できるベクターを開発した。このベクターを活用して我々の全ての糖鎖遺伝子ノックアウト株の解析を行っている。また、トランスジェニック動物の作成効率が初期胚で発現する蛍光蛋白質の毒性によって低下することを見だし、これを回避する手段として、*feeding RNAi* で胚での蛍光蛋白質の発現を抑えると高率でトランスジェニック動物が取得できることを発見した。これらの手法によってトランスジェニック解析の効率の格段の向上を達成することができた。

研究代表者：宮城妙子

Yamaguchi, T., Hata, K., Koseki, K., Shiozaki, K., Akita, H., Wada, T., Moriya, S., and Miyagi,

T.: Evidence for Mitochondrial Localization of a Novel Human Sialidase (NEU4). *Biochem. J.* 390, 85-93, 2005

これまでのシアリダーゼと細胞内局在や基質特異性の異なる新規シアリダーゼをクローニングし、性状解析を行った。他のシアリダーゼが水解しないムチン糖鎖を基質とすること、N-末アミノ酸配列が異なる2種のフォームを有し、ひとつはミトコンドリアに局在することがわかった。Neu3とは組織分布も異なっていた。

Kato, K., Shiga, K., Yamaguchi, K., Hata, K., Kobayashi, T., Miyazaki, K., Saijo, S. and Miyagi, T. : Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) differentially regulates integrin-mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin- derived signaling. *Biochem. J.* 394, 647-656, 2006

大腸がんで異常亢進するヒト形質膜型シアリダーゼ(NEU3)が、細胞接着を修飾していることが明らかとなった。細胞外基質ががん化で増強するラミニンの場合は、インテグリン β 4シグナリングを活性化するが、がん化で減少するファイブロネクチンでは逆にインテグリンシグナリングを阻害することがわかった。

Ueno, S., Saito, S., Wada, T., Yamaguchi, K., Satoh, M., Arai, Y., and Miyagi, T.: Plasma membrane-associated sialidase is up-regulated in renal cell carcinoma and promotes the interleukin-6 -induced apoptosis suppression and cell motility. *J. Biol. Chem.* 281, 7756-7764, 2006

NEU3が腎がん組織においても発現亢進しており、IL-6の亢進と有意に関連していた。腎癌細胞ではNEU3がIL-6シグナリングを活性化する形でアポトーシス抑制や浸潤・運動能を上昇していることがわかった。

研究代表者：山口陽子

Sakai, K., Shimizu, Y., Chiba, T., Matsumoto-Takasaki, A., Kusada, Y., Zhang, W., Nakata, M., Kojima, N., Toma, K., Takayanagi, A., Shimizu, N., and Fujita-Yamaguchi, Y. (2006) Isolation and characterization of phage-displayed single chain antibodies recognizing non-reducing terminal mannose residues. I. A new strategy for generation of anti-carbohydrate antibodies. *Biochemistry* (in press)

ファージ提示型単鎖抗体ライブラリーから、糖タンパク質あるいはプロテオグリカン糖鎖抗原としてパンニング・スクリーニングをしたとの報告はあるものの、人工糖脂質を利用して様々な糖鎖構造に特異的な抗体を取ったとの報告はなかった。すなわち、この方法が容易には達成できないことを意味している。今回、我々は、DPPE化mannotriose (M3-DPPE) をモデル糖鎖抗原としてパンニング・スクリーニングの方法論の確立をし、25種得られたクローンから、4種の抗体ファージの結合特異性をさま

ざまな方法で解析し、非還元マンノース残基特異性であることを示した。

Zhang, W., Matsumoto-Takasaki, A., Kusada, Y., Sakaue, H., Sakai, K., Nakata, M., and Fujita-Yamaguchi, Y. (2006) Isolation and characterization of phage-displayed single chain antibodies recognizing non-reducing terminal mannose residues. II. Expression, purification, and characterization of recombinant single chain antibodies. *Biochemistry* (in press)

第1報では、M3-DPPEを抗原としてファージ提示型単鎖抗体ライブラリーからパンニング・スクリーニングした4クローンについて、抗体ファージとしての解析をした。第2報では、これらのクローンの単鎖抗体タンパク質を発現・精製・解析する系の確立をした。可溶性単鎖抗体(scFv)として発現・精製を各種試みた結果、5A3クローンで、GST-scFvとscFv-Fc融合タンパク質として、それぞれ大腸菌とミエローマ細胞での発現と精製に成功した。精製された単鎖抗体のMan3-BSAへの結合性をSPRで解析し、糖鎖特異的抗体として高い親和性を持つことを示した。

研究代表者：木下タロウ

Almeida, A.*, Y. Murakami*, M. Layton, P. Hillmen, G. S. Sellick, Y. Maeda, S. Richards, S. Patterson, I. Kotsianidis, L. Mollica, D. Crawford, A. Baker, M. Ferguson, I. Roberts, R. Houlston, T. Kinoshita and A. Karadimitris. 2006. Hypomorphic promoter mutation in the mannosyltransferase-encoding *PIG-M* gene causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nat. Med.*, **12**:846-851.

*Equal contribution

従来 GPI アンカー欠損症としては、後天性の血液疾患である発作性夜間血色素尿症だけが知られていた。我々は、常染色体性劣性に遺伝する先天性 GPI アンカー欠損症の2家系を見いだした。3人の患児は、PIGM 遺伝子のプロモーター領域に点突然変異をホモに持ち、それによって特定の細胞種でPIGMの著しい発現低下を起こしていることがわかった。患児は、門脈血栓とてんかんを共通症状として示したが、発作性夜間血色素尿症の主症状である溶血性貧血は見られなかった。また、形態形成異常は全く認められなかった。これらのことは、点変異の影響が細胞種によって、また形態形成の過程と完成後で異なっていることを示しており、従来ハウスキーピング遺伝子であると考えられてきたPIGMの発現が、様々に制御されていることを示唆している。

(参考事項) 本論文は、米国血液学会のニューズレターである *The Hematologist*, vol 3, issue 6, November/December 2006 において、最近のトピックスとして紹介された。

Tashima, Y., R. Taguchi, C. Murata, H. Ashida, T. Kinoshita and Y. Maeda. 2006. PGAP2 is essential for correct processing and stable expression of GPI-anchored proteins. *Mol. Biol.*

Cell, **17**: 1410-1420.

GPI アンカー型タンパク質は、小胞体で合成された後、ゴルジ体を経て細胞表面の膜マイクロドメインに組み込まれる。この過程に働く遺伝子群を明らかにする目的で、GPI アンカー型タンパク質の発現が低下した新規の変異 CHO 細胞を樹立し、その責任遺伝子をクローニングした。PGAP2 と名付けたその遺伝子は、ゴルジ体に発現する膜タンパク質をコードし、GPI アンカーの脂肪酸リモデリングに関与しているらしいことがわかった。

(参考事項) 本論文は、米国細胞生物学会のニュースレターである ASCB Newsletter (March 2006)の注目すべき論文を紹介する “InCytes”の欄で紹介された。

Suzuki, T., I. Hara, M. Nakano, M. Shigeta, T. Nakagawa, A. Kondo, Y. Funakoshi, and N. Taniguchi (2006) Man2C1, an α -mannosidase is involved in the trimming of free oligosaccharides in the cytosol. *Biochem. J.* **400**:33-41.

これまで細胞質 PNGase (ペプチド:N-グリカナーゼ) によって生成される遊離N型糖鎖の分解の分子機構は不明であった。我々はこれまで小胞体酵素として同定されていた Man2C1 (α -マンノシダーゼ) がこの遊離糖鎖の代謝に関与することを明らかにした。Man2C1 の酵素学的諸性質は生化学的にこれまで単離されてきた “細胞質マンノシダーゼ” と酷似しており、RNA 干渉により Man2C1 活性を特異的に阻害したところ、膜タンパク質上の糖鎖構造は影響をうけない一方で、細胞質の遊離糖鎖の構造が顕著に変化した。これらのことから Man2C1 の主要な機能として、新規な “非リソソーム” 糖鎖代謝に関与することが示唆された。

研究代表者：鏑田武志

Satoh M., T. Adachi, T. Tsubata. Augmentation of signaling through BCR containing IgE but not that containing IgA due to lack of CD22-mediated signal regulations. *J. Immunol.* (revised)

IgE 抗原受容体を介するシグナル伝達が Siglec2/CD22 による制御を受けないことを明らかにするとともに、IgG-BCR および IgE-BCR を介するシグナル伝達の亢進が主に、Siglec2/CD22 によるシグナル抑制の解除によることを明らかにした。

S. Kitazume, R. Oka, Y. Tachida, K. Ogawa, K. Nakagawa, Y. Luo, M. Citron, H. Shitara, C. Taya, H. Yonekawa, J.C. Paulson, E. Miyoshi, N. Taniguchi and Y. Hashimoto, “In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer’s beta-secretase (BACE1),” *J. Biol. Chem.*, **280**, 8589-8595 (2005)

β セクレターゼによる α 2,6 シアル酸転移酵素の切断が生体内でおこるか否かを検証した。この切断は、 β セクレターゼ・トランスジェニック・マウスで亢進し、ノックア

ウト・マウスでは低下していた。即ち、生体内での切断が実証された。

研究代表者：平林 義雄

Yasuhiro Y, Nagatsuka Y, Oshima E, Suzuki Y, Hirabayashi Y, Hashikawa T. 2006. Comprehensive analysis of monoclonal antibodies against detergent-insoluble membrane/lipid rafts of HL60 cells. *Journal of Immunological Methods*. **311**:106-116

HL60細胞より調整した脂質ラフト画分をマウスに免役することにより、用いた抗原を認識する数多くの抗体を得ることに成功した。糖脂質（ガングリオシドGM1、ホスファチジルグルコシド）やリゾリン脂質といった膜脂質を認識する抗体やアミノペプチダオーゼN、アネキシン1、アхроグラニンなどのタンパク性の抗原を認識する単クローン抗体を確立した。

Nagatsuka Y, Horibata Y, Yamazaki Y, Kinoshita M, Shinoda Y, Hashikawa T, Koshino H, Nakamura T, Hirabayashi Y. 2006.

Phosphatidylglucoside exists as a single molecular species with saturated fatty acyl chains in developing astroglial membranes. *Biochemistry*. **45**. 8742-8750

HL60細胞の脂質ラフト画分を免役して得られた抗体, DIM21は、ホスファチジルグルコシド(PtdGlc)を特異的に認識する。この抗体を用いることによりDIM21抗原の発現を検索したところ、胎児期の神経上皮細胞、ラジアルグリアに強発現していた。ラット胎児脳よりDIM21陽性糖脂質を単一成分にまで精製し、その完全構造決定に成功した。得られた構造は、C18:0とC20:0の飽和脂肪酸のみで構成されたPtdGlcであった。さらに、グルコースのC 6位の水酸基がアセチル化修飾された新しいPtdGlcを見いだした。PtdGlcの構成脂肪酸組成から、本糖脂質は脂質ラフト様の脂質微小領域に局在することが示唆された。

研究代表者：本家孝一

Cheng, X., Zhang, Y., Kotani, N., Watanabe, T., Lee, S., Wang, X., Kawashima, I., Tai, T., Taniguchi, N., and Honke, K. 2005, Production of a recombinant single-chain variable-fragment (scFv) antibody against sulfoglycolipid. *J. Biochem*. **137**:415-421.

ミエリン形成と精子形成に必須であることが遺伝学的に証明されている硫酸化糖脂質の生細胞における動態を追うために、硫酸化糖脂質に対する組換え単鎖可変領域(scFv)抗体の作製を行った。硫酸化糖脂質欠損マウスにスルファチドを免疫して、抗硫酸化糖脂質単クローン抗体DI8を得た。DI8はIgG3で、脂質に結合した非還元末端のガラクトース3-硫酸構造を認識することがわかった。DI8のH鎖とL鎖の可変部をコードするcDNAを得、ファージミドベクターに組み込み、ファージディスプレイシステム

でscFv抗体がスルファチドと結合することを確認した。可溶性のscFv断片は、結合力は弱いが生元のDI8抗体と同様の特異性を保持していた。

Katagiri, Y.U., Kiyokawa, N., Nakamura, K., Takenouchi, H., Taguchi, T., Okita, H., Umezawa, A., and Fujimoto, J. 2005, Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**:1004-1011.

ヒト腎がん細胞ACHNの膜マイクロドメインに対する単クローン抗体を作製し、このうちのクローンRaft.2はシアロシルグロコペンタオシルセラミド (SSEA-4) を認識する。Raft.2は、SSEA-4を発現していない胎児性癌細胞F9において、ラミニン結合タンパク質 (LBP、34/67ラミニンレセプター) と結合することを見出した。Raft.2はLBP上のシアリル化糖鎖を認識する。Raft.2を用いる共焦点レーザー顕微鏡観察により、LBPは胎児性癌細胞の細胞表面に発現されていることがわかった。

4. 受賞等

平成18年11月現在

受賞者名	賞の名称	授与者名	受賞日(時期)
鈴木康夫	日本薬学会賞	日本薬学会	平成16年3月
鈴木康夫	中日文化賞	中日新聞社	平成16年5月
山本憲二	有馬啓記念バイオインダストリー協会賞	日本バイオインダストリー協会	平成16年10月
鏑田武志	フィリップ フランツフォン ジーボルト賞	ドイツ連邦共和国大統領	平成17年7月
和田芳直	日本医用マズスペクトル学会松本勇賞	日本医用マズスペクトル学会	平成18年9月

5. シンポジウム等

平成19年1月20日現在

シンポジウム名	日時	場所	入場者数	特記事項
第1回糖鎖科学コンソーシアム シンポジウム	H15年11月4日	東京コンファレンスセンター	450名	JST と日本糖鎖科学コンソーシアムが主催
Joint Meeting of the Japanese and American Consortia for Glycomics	H16年11月21日	ヒルトンホテル(ハワイ)	280名	日米の合同糖質学会の開催後、同ホテルで実施した。
第3回糖鎖科学コンソーシアム シンポジウム	H17年12月6日7日	東京コンファレンスセンター	600名	JST と日本糖鎖科学コンソーシアムが主催
糖鎖全体会議(非公開)	H19年1月17日,18日	千里ライフサイエンスセンタービル	142名	研究代表者および代表者が選んだ共同研究者による発表

6. その他の重要事項（新聞・雑誌・テレビ等）

伊藤幸成チームの CREST 研究成果の紹介

- ①「タンパク質の正常機能 糖鎖が重要な働き 理研などで確認」（2003年1月6日、日経産業）
- ②「糖鎖迅速合成法の開発」（2004年1月15日、日刊工業）
- ③「グルコシダーゼⅡタンパク質の適切な折り畳み 理研等が機能解明」（2006年10月20日、日刊工業）
- ④「グルコシダーゼⅡ分子レベルで機能解明」（2006年10月25日、化学工業日報）

神奈木チームの CREST 研究成果の紹介

- ①「がん転移阻止に道筋—糖鎖発生のスイッチ発見」（2005年1月6日、中日）
- ②「糖鎖の仕組み解明—がんの治療法開発に道」（2005年1月11日、日刊工業）
- ③「リンパ球配置分子—糖鎖解明に成功」（2005年10月10日、中日）

木曾チームの CREST 研究成果の紹介

- ①「インフルエンザ感染防ぐ高分子」（2005年3月28日、日経産業）

鈴木チームの CREST 研究成果の紹介

- ①「インフルエンザ感染防ぐ新物質 ウイルスに付着」（2002年12月18日、日経産業）
- ②「インフルエンザ予防 ツバメの巣に効果確認」（2004年12月6日、日経）
- ③「インフルエンザ 3年で別ウイルスに 静岡県立大 香港風邪で分析」（2004年3月28日、産経）

テレビ紹介：①「サイエンスファイル DNA21 世紀の冒険、第2回アウトブレイク～新型インフルエンザの恐怖」（2003年3月4日 TV Tokyo/nexus）②「新薬誕生ドラマ「男たちの挑戦」 ゲストコメンテーター（抗インフルエンザ薬）」（2004年1月10日 日本テレビ）③「インフルエンザ ゲストコメンテーター」（2004年1月28日 TBS）④「インフルエンザウイルス最新撃退法」（2004年2月5日 TBS）⑤「目覚ましテレビ 高病原性トリインフルエンザウイルスについてコメント」（2005年11月 日本テレビ）

伊藤孝司チームの CREST 研究成果の紹介

- ①桜庭「酵母生産ファブリー病治療用酵素がモデル・マウスで有効」（2004年3月15日、日経バイオテク）
- ②櫻庭「進む難病対策. 酵素補充療法」（2005年2月28日 NHK）

野村一也チームの CREST 研究成果の紹介

- ①「遺伝子破壊により線虫の糖鎖関連遺伝子機能を解析」（2006年9月21日、Medical Tribune）
- ②「Message from Scientists」（2007年作成の番組、現在も随時再放送中サイエンスチャンネル）
- ③「Sweet control of cell migration, cytokinesis and

organogenesis」(2004年1月 *Nature Cell Biology* 2004年1月号のトピック欄)

木下チームの CREST 研究成果の紹介

- ①近藤「高血圧の酵素、受精に関与 避妊、不妊症治療、BSE 予防に期待」(2005年1月、NHK, 日本経済新聞、読売新聞、産経新聞、共同通信社、時事通信社、日刊工業新聞)
- ②和田「補助剤使わず質量分析」(2005年9月 日経産業)

7. その他の添付資料

なし

8. 課題中間評価結果

平成14年度採択課題

1. 研究領域の概要

本研究領域は、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンといった生体分子群の有する糖鎖の新たな生物機能を解明し、その利用技術を探索するための研究を対象とするものです。

具体的には、脳神経機能、形態形成、分化における糖鎖の役割と制御のメカニズム等の新しい機能の解明や応用の可能性を開拓する研究、糖鎖の改変によるガンの浸潤転移の制御や感染防止、免疫機能制御の手法探索等の診断、治療、予防への応用を指向する研究、あるいは、糖鎖研究に広く用いられることが期待される糖鎖の超微量解析技術、情報伝達のダイナミックな状況を可視化する技術の実現を目指す研究等が含まれます。

2. 中間評価の概要

2-1. 評価の目的

研究課題毎に、研究の進捗状況や研究成果を把握し、これを基に研究計画の見直し、適切な予算配分を行ない、研究運営の改善およびJSTの支援体制の改善に資すること。

2-2. 評価対象研究代表者及び研究課題

伊藤幸成((独)理化学研究所中央研究所 主任研究員)

糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明

神奈木玲児(愛知県がんセンター研究所分子病体学部 部長)

癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明

木曾 真(岐阜大学応用生物科学部 教授)

感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究

小山信人(タカラバイオ(株)細胞・遺伝子医療センター DNA解析センター 主幹研究員)

糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発

鈴木康夫(静岡県立大学薬学部 教授)

ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用

西原祥子(創価大学工学部 教授)

RNAi法による糖鎖機能解明と利用技術の開発

2-3. 中間評価会の実施時期

平成17年10月2日

2-4. 評価方法

研究総括、研究アドバイザーが評価者を務め、予め研究チーム作成の報告資料に目を通し、研究課題ごとに評価者が研究代表者、主たる共同研究者にヒアリングを行ない、その後評価者が各自独自に中間評価票を作成し、研究総括がそれらをまとめ、被評価者の意見を聞いた後、全評価者の合意を得て作成した。

2-5. 評価項目及び基準

(イ)研究の進捗状況と今後の見込み

- ・当初の研究計画から見た進捗状況や達成度等かどうか
- ・研究体制・遂行は適当か
- ・研究の今後の進め方かどうか
- ・その他

(ロ)研究成果の現状と今後の見込み

- ・現状で成果が出ているかどうか
- ・今後見込まれる成果はあるかどうか
- ・その他

2-6. 評価者

研究総括

谷口 直之 大阪大学大学院医学系研究科 教授

領域アドバイザー

川寄 敏祐 立命館大学糖鎖工学センター センター長

近藤 規元 小野薬品工業(株) 取締役 研究本部長

鈴木 明身 (独)理化学研究所フロンティア研究システム グループディレクター

塚田 裕 (株)エスアールエル 八王子ラボ 理事

成松 久 (独)産業技術総合研究所糖鎖研究センター 副センター長

若槻 壮市 高エネルギー加速器研究機構物質構造化学研究所 教授

外部評価者

なし

1. 研究課題名：糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明

2. 研究代表者名：伊藤幸成((独)理化学研究所中央研究所 主任研究員)

3. 研究概要

- ◆本研究はフォールディング、輸送、分解を含む糖タンパク質品質管理機構の解明をめざすものである。
- ◆ 研究代表者の糖鎖合成研究を基盤にして種々の糖鎖やそれらを含む糖タンパク質の有機化学的創成を行ない、糖鎖生物学、構造生物学を専門とする共同研究者の協力のもとで研究を行う。
- ◆Calreticulin (小胞体シャペロン)、Fbs1 (ユビキチンリガーゼ)、ERGIC-53/VIP36 (カーゴレセプター) の糖鎖認識特異性の解明や、UGGT (フォールディングセンサー)

基質の開発に成功している。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

世界でもトップレベルの糖鎖合成技術を利用して、構造生物学、細胞生物学の共同研究者と良く連携し、タンパク質の品質管理機構の解明を目指している。当初の計画どおり順調に進展しており、技術的にも新規な開発ができています。研究費の配分と成果は相関しており、コストパフォーマンスも極めて高い。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

これまで推論に過ぎなかった複雑な糖鎖の化学構造を、実際に高い技術で合成し証明している。比較的インパクトファクターの高い論文に投稿しており、生化学だけでは到達できない定量的解析が可能となっていることが評価できる。

4-3. 今後の研究に向けて

ERシャペロンの糖鎖認識メカニズムの不明な点を構造化学的手法で解明を進めると共に、合成UGGT基質の開発などで示した高い研究レベルを、ゴルジやその他のオルガネラタンパク質にも応用し、タンパク質の品質管理の解明に向けて研究を発展させて欲しい。

4-4. 戦略目標に向けての展望

タンパク質の品質管理の解明のために、機能性タンパク質の人為的作製の可能性へ向けて、さらに基礎的研究を進めるのは充分意義がある。ただ、「この研究成果を利用して実用化する」という観点をもう少し意識していただきたい。

4-5. 総合的評価

研究代表者が細胞生物学や構造生物学と連携する必然性を良く理解してチーム運営をしており、全体的に非常に質の高い研究成果が得られている。

1. 研究課題名:癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明

2. 研究代表者名:神奈木玲児(愛知県がんセンター研究所分子病態学部 部長)

3. 研究概要

セレクチンの糖鎖リガンドについて、神奈木グループはセレクチンの糖鎖リガンドのがんの病態発生における機能を解明し、がんでその発現が増大する機序を解析した。また、正常個体におけるセレクチンの糖鎖リガンドの機能を、とくに硫酸化糖鎖リガンドを中心に解析した。北島グループは、セレクチンの糖鎖リガンドにおける環状化シアル酸の解析法をはじめとして、がんにおける新規シアル酸の構造を検出・解析する方法論を開発し、各種がん組織・細胞を解析した。小島グループは、糖蛋白質性のがんのセレクチンリガンドの単離と構造解析を行った。CD44の糖鎖リガンドであるヒアルロン酸については、浜口グループがヒアルロン酸がRas, Aktを介してがんの浸潤を活性化する事、ヒアルロン酸産生活性化はRas, FAK, Stat3を必要とする事、HAS2抗体を作製しHAS2のがん特異的発現を証明した。板野グループはヒアルロン酸合成の制御技術確立し、

SHAP などの結合分子の関与する新規な糖機能調節機構を明らかにした。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

研究代表者のリーダーシップのもとに素晴らしい進展を見せている。多くの糖鎖研究者が手がけているセレクトイン、シアリルルイス x/a の分野で、国際的にも圧倒的に高いレベルの研究を遂行し、顕著な業績をあげている。研究費と研究成果に相関がみられ適切な研究費の運用がされている。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

インパクトの高い研究成果が多く出ており、学会発表等も非常に多い。低酸素時におけるシアリルルイス x/a の血管形成誘起の機構、糖鎖と癌との関連において画期的な成果をあげている。癌は非常に複雑であり、全ての癌について適応できるか分からないが、ある種の癌については実用化の可能性はある。

4-3. 今後の研究に向けて

シアリルルイス a/x の研究は本人のライフワークであり、さらに科学的レベルを上げていただきたい。また、共同研究者との連携を更に強化すれば、より良い成果が得られると思われる。

4-4. 戦略目標に向けての展望

癌に関しては、まだまだ不明の問題があるが、研究者によって発見された事項が、検査薬や治療薬に応用できる可能性は高い。

4-5. 総合的評価

科学的成果のレベルは極めて高く、優れた研究を行っているので、このまま継続して成果をあげて欲しい。

1. 研究課題名:感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究

2. 研究代表者名:木曾 真(岐阜大学応用生物科学部 教授)

3. 研究概要

感染と共生を制御する糖鎖医薬品の創製を目的として、(1)「糖鎖構造解析の革新的基盤技術の開発と応用」(長束グループ)、(2)「ボツリヌス毒素と小腸ムチン糖鎖の相互作用の解析と応用」(西河グループ)、(3)「酵素法による機能性糖鎖複合体の合成及び腸内細菌と糖鎖の相互作用解析」(山本グループ)及び(4)「革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製」(木曾グループ)の4つの研究実施項目によりグループ研究を実施し、新しい基盤的技術の開発と応用に成功した。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

ほぼ初期の目的に向けて進捗は十分であり、特にムチン型糖鎖の立体選択的構築法(α -選

択的ガラクトシル化法)を新たに開発したことは特筆に価する。比較的少額の研究費であるが、研究費配分は研究成果と比較的相関しており、有効に執行している。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

DTBS基を用いた新規な α -選択的ガラクトシル化法を開発したが、これにより α 、 β アノマーの特異的合成法が期待できる。シアロ糖鎖重合体(CDO-Chitosan)によるインフルエンザウイルスの増殖抑制やEndo- α -GalNAc-aseの発見など興味ある研究成果がでており、今後これらの応用が期待される。

4-3. 今後の研究に向けて

新しい合成法の改良を続けつつ、酵素法を組み合わせるライブラリーを構築し、その利用目的をより明確化して進めることが大切である。

4-4. 戦略目標に向けての展望

「感染と共生」という観点から、研究開発のためには生物学的有効利用の方向をもう少し議論すべきであろう。

4-5. 総合的評価

研究費は必ずしも多くないが、初期の目的に向けての進捗はほぼ十分である。 α -選択的合成法の発見は高く評価できるが、それを応用した化合物を合成し、生物学的な研究に展開できる体制を早急に確立すべきと思われる。

1. 研究課題名:糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発

2. 研究代表者名:小山信人(タカラバイオ(株)細胞・遺伝子医療センター DNA機能解析センター 主幹研究員)

3. 研究概要

糖鎖構造の制御によりがん及びウイルス疾患を予防・治療する方法を開発すべく、糖転移酵素である G_nT-III、G_nT-V 及び FUT8 の機能を、分子生物学的、生化学的及びプロテオミクス的手法を用いて研究した。この結果、G_nT-III の新規プロモーターを発見し、FUT8 遺伝子発現抑制による細胞増殖抑制機構及び糖タンパク質の細胞内輸送と G_nT-III の関係を解明した。また、簡便な糖鎖構造解析法及び糖鎖構造の違いに基づく肝幹細胞の分離法を開発した。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

中間報告書に記載のとおり、当初の計画から研究内容が変更されているが、癌関連の新しい知見が得られている。今後、本質的な癌のバイオマーカーを発見していくことは重要な課題であり、糖鎖はバイオマーカーの代表となり得る。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

FUT8遺伝子発現抑制による細胞増殖抑制機構及び糖タンパク質の細胞内輸送と G_nT-III

の関係を解明した。また糖鎖を用いた新しいバイオマーカーの開発に手がかりを得た。特に膵がんマーカーの開発は期待が大きい。有用なバイオマーカーを発見し、更に、背後の分子細胞生物学を解明できれば、学問的にもインパクトの高い成果が期待される。

4-3. 今後の研究に向けて

癌領域でより基礎的な研究に注力する方向は妥当だが、焦点をもう少し絞る方が良いと思われる。研究代表者がリーダーシップを発揮して、共同研究グループをより一体化して、研究成果をあげて欲しい。

4-4. 戦略目標に向けての展望

癌関連の新しい知見を進展させ、社会的要望の高い成果をあげられる可能性がある。

4-5. 総合的評価

3年前に新しく研究体制を組んだことによる立ち上げに要した時間はある程度理解できるが、残りの研究期間で更なる成果を期待している。

1. 研究課題名: ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用

2. 研究代表者名: 鈴木康夫(静岡県立大学薬学部 教授)

3. 研究概要

研究代表者・鈴木康夫は、本研究の全体を統括している。本研究は、研究目的遂行上、下記の6つのグループから構成されている。本中間報告では、組織全体についての成果・展望を記述した。

(1) 鈴木・ウイルス感染グライコミクスグループ

- ① 研究分担グループ長: 鈴木 康夫(静岡県立大学・薬学部・薬学科、教授)
- ② 研究項目: ウイルス感染における機能グライコミクスの推進

(2) 岡・糖鎖関連遺伝子改変グループ

- ① 研究分担グループ長: 岡 昌吾(京都大学・大学院・薬学研究科、助教授)
- ② 研究項目: CD57/HNK-1 糖鎖関連遺伝子改変によるウイルス感染防御機構の解析とウイルス感染における糖鎖遺伝子群の解析

(3) 加藤・構造解析グループ

- ① 研究分担グループ長: 加藤 晃一(名古屋市立大学・院・薬学研究科、教授)
- ② 研究項目: 糖鎖とウイルスタンパク質の三次元構造、両者の相互作用様式の解析、およびウイルス、宿主が発現している糖鎖構造の迅速決定

(4) 西田/小林・ナノ糖鎖クラスターグループ

- ① 研究分担グループ長: 小林 一清(名古屋大学・院・工学研究科、教授)
- ② 研究項目: ナノ糖鎖クラスターによるウイルス阻害剤およびウイルス検出剤の創製

(5) 星野/森・HIV感染における糖鎖機能解析グループ

- ① 研究分担グループ長: 星野 洪郎(群馬大学・医学部、教授)
森 一泰(国立感染症研・エイズ研究センター,主任研究官)
- ② 研究項目: 糖鎖機能解析によるHIV感染の制御

(6) 森田・糖鎖機能によるデングウイルス感染の制御

① 研究分担グループ長：森田 公一（長崎大学・熱帯医学研究所・病原体解析部門・分子構造解析分野、教授）

② 研究項目：糖鎖機能解析によるデングウイルス感染の制御

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

多くのグループと有機的なネットワークを作り上げており、共同研究体制が適切に運用されている。新しく参加したグループも既にチームの中で有効に機能しており、ほぼ当初の計画通り順調に進行している。このまま研究の進展を期すれば良いと思われる。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

インフルエンザウイルスの感染・増殖機構への糖鎖およびノイラミダーゼの関与を示すなどレベルの高い科学的知見が出てきており、インパクトも大きい。また科学のおよび人類の健康の両面から重要な研究対象であるデング熱、HIVなどについて顕著な成果をあげている。

4-3. 今後の研究に向けて

ウイルスの感染・増殖を詳しく解析していくことで、これまで明らかにされていないプロセスが発見されて行く可能性を感じさせた。研究代表者の所属が変わることによって、チームのactivityが低下しないように留意してほしい。

4-4. 戦略目標に向けての展望

目標は明確であり、本領域で最も社会的にインパクトの高い成果が期待できる。最後まで気を抜かず新しい薬剤の開発に向けて成果があがることを期待する。

4-5. 総合的評価

当初の期待以上の研究成果をあげており、申し分ないと思われる。効果の高い抗インフルエンザ薬の開発に結び付けて欲しい。

1. 研究課題名:RNAi法による糖鎖機能解明と利用技術の開発

2. 研究代表者名:西原祥子(創価大学工学部 教授)

3. 研究概要

(目的)

生物の発生過程や細胞の癌化において、細胞表面の糖鎖構造は顕著な変化をしめす。糖鎖修飾は翻訳後修飾の主となるものであり、糖鎖修飾を考慮せずにタンパク質の機能を論ずる事はできない。本研究は、ポストゲノムの重要課題である「個体レベルでの糖鎖機能の解明」を目的としている。糖鎖の種を越えて保存されている機能に着目して、ショウジョウバエをモデルとした網羅的解析システムからその全容を明らかにし、糖鎖の基本機能の全体像解明への方法論と技術開発を行うものである。

(方法)

ヒトや他の哺乳類の遺伝子をクエリーとしたデータベース検索により、糖転移酵素

遺伝子をはじめとするショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子を網羅的に抽出した。上田等が開発した誘導型 RNAi ノックダウンシステムにより、RNAi 変異体を網羅的に作成し、発生学的解析、分子生物学的解析、生化学的解析を行った。

(結果)

254個の糖鎖関連遺伝子のうち、155遺伝子について RNAi 変異体を作成した。全身で RNAi を誘導したところ、内68%が致死性を示し、糖鎖が発生、及び、生命維持において重要な働きをすることが、明らかになった。さらに、糖転移酵素を中心とした76遺伝子に対して組織特異的なノックダウンを行った。各々の遺伝子は、その表現型によりクラスタリングされ、各クラスターは、各糖鎖の生合成経路と形態形成における機能を反映していた。本解析は、糖鎖機能の網羅的解析の初めての例であり、これにより、糖鎖の基本機能の全体像解明への道が開かれるものと考えられる。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

共同研究体制は、ショウジョウバエ RNAi 解析を中心として、発生学、糖鎖構造解析、有機合成、ヒト培養細胞の研究者とネットワークを作り上げ、きわめて適切に運営されているので、研究は当初の計画以上に進展している。研究費の配分と論文数は相関している。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

本チームは網羅的ノックダウンを精力的に行い、糖鎖遺伝子の重要性を示すことができた。網羅的な研究としては十分な成果をあげた。RNAi法は100%ノックダウンする事が困難なため明確な結論が出難いが、研究チームのデータは明確であり、技術の高さを感じる。他のモデル生物 *C.elegans* などの研究と比べても進んでいる。

4-3. 今後の研究に向けて

変異体の作製から表現型の解析に進むことになるが、どういう戦略で進めるべきか、いくつかの方向性が提案されているが、本チームの特徴が出せるターゲットに絞って研究をすすめる必要がある。PAPSのtransporterの発見はオリジナリティーが高く、更に精力的に研究を進めて欲しい。また、Notch signal 以外の新しい現象を追求して欲しい。

4-4. 戦略目標に向けての展望

RNAi法が糖鎖生物学の研究に有効に使えることを示す最初の成果である。ショウジョウバエの研究と哺乳類の研究を詳細に照合して重要な問題点を見つけ出し、人の病気につながる成果を期待する。

4-5. 総合的評価

有機的に良くまとまった研究チームを構成し、短時間でRNAi法により糖鎖機能の網羅的解析をまとめたことは高く評価できる。

平成15年度採択課題

1. 研究領域の概要

本研究領域は、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンといった生体分子群の有する糖鎖の新たな生物機能を解明し、その利用技術を探索するための研究を対象とするものです。

具体的には、脳神経機能、形態形成、分化における糖鎖の役割と制御のメカニズム等の新しい機能の解明や応用の可能性を開拓する研究、糖鎖の改変によるガンの浸潤転移の制御や感染防止、免疫機能制御の手法探索等の診断、治療、予防への応用を指向する研究、あるいは、糖鎖研究に広く用いられることが期待される糖鎖の超微量解析技術、情報伝達のダイナミックな状況を可視化する技術の実現を目指す研究等が含まれます。

2. 中間評価の概要

2-1. 評価の目的

研究課題毎に、研究の進捗状況や研究成果を把握し、これを基に研究計画の見直し、適切な予算配分を行ない、研究運営の改善およびJSTの支援体制の改善に資すること。

2-2. 評価対象研究代表者及び研究課題

平成15年度採択研究課題

(1)伊藤 孝司(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授)

糖鎖機能を利用した組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発

(2)井ノ口 仁一(東北薬科大学分子生体膜研究所 教授)

マイクロドメイン機能異常にもとづく2型糖尿病の病態解明

(3)中田 博(京都産業大学 大学院長/工学部 教授)

担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化の解析と応用

(4)野村 一也(九州大学大学院理学研究院生物科学部門 助教授)

遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明

(5)宮城 妙子(宮城県立がんセンター研究所 研究所長・生化学部長)

がんや糖尿病等におけるシアリダーゼ異常の機能解明と制御

(6)山口 陽子(東海大学工学部(糖鎖工学研究施設) 教授)

糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築

2-3. 中間評価会の実施時期

平成18年11月4日

2-4. 評価方法

研究総括、研究アドバイザーが評価者を務め、予め研究チーム作成の報告資料に目を通し、研究課題ごとに評価者が研究代表者、主たる共同研究者にヒアリングを行ない、その後評価者が各自独自に中間評価票を作成し、研究総括がそれらをまとめ、被評価者の意見を聞いた後、全評価者の合意を得て作成した。

2-5. 評価項目及び基準

(イ)研究の進捗状況と今後の見込み

・当初の研究計画から見た進捗状況や達成度等かどうか

- ・研究体制・遂行は適当か
- ・研究の今後の進め方かどうか
- ・その他

(ロ)研究成果の現状と今後の見込み

- ・現状で成果が出ているかどうか
- ・今後見込まれる成果はあるかどうか
- ・その他

2-6. 評価者

研究総括

谷口 直之 大阪大学微生物病研究所 寄付研究部門 教授

領域アドバイザー

川寄 敏祐	立命館大学糖鎖工学研究センター	センター長
鈴木 明身	(独)理化学研究所フロンティア研究システム	グループディレクター
塚田 裕	(株)エスアールエル八王子第1、第2ラボ	理事
成松 久	(独)産業技術総合研究所糖鎖工学研究センター	副センター長
若槻 壮市	高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所	教授

外部評価者

なし

1. 研究課題名：糖鎖機能を利用した組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発
2. 研究代表者名：伊藤 孝司(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授)
3. 研究概要

中枢神経障害を伴うリソソーム病の組換え酵素脳内補充療法を開発する目的で、 β -ヘキサミニダーゼ A (HexA) の遺伝的欠損が原因で、GM2 ガングリオシドの脳内過剰蓄積を伴って発症する Sandhoff 病のモデルマウスを対象に、メタノール資化酵母変異株を用いたヒト型様糖鎖含有組換え HexA の大量発現・精製、結晶構造情報に基づく高機能化 HexA のデザイン、モデルマウス由来神経系構成細胞における糖鎖レセプターの発現解析と酵素補充効果および末梢血液から脳実質内への酵素補充技術の開発と評価を行う。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

論文や特許は比較的良くでており、努力の跡が見える。しかし本研究プロジェクトの最も重要なテーマである脳移行の研究は端緒は捕らえているものの、ほとんど進展していない。また国内外を問わず、中枢神経障害を伴うリソソーム病の酵素補充療法の有効性についてはコンセンサスが得られていない。研究費は初年度を除けば、研究代表者および共同研究者に、ほぼ均等に配分されている。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

バイオフィォーマティクスを用いた組換えヒトHex-Aの改変や、メタノール資化酵母変異株 (*O.Minuta*) によるHex-Aの発現・精製、その酵素の培養細胞への取り込みとGM2ガングリオシドの分解の確認等、研究成果はでている。しかし、最大の成果といえる酵母変異株によるHex-A発現に関して、基本技術は本CREST研究開始前に既に確立しており、本CRESTではその技術を応用・発展させた。

4-3. 今後の研究に向けて

最も重要なテーマである脳内移行技術の開発は共同研究者の名大グループとの連携を強化し、精力的かつ集中的に推進すべきである。Sandhoff 病のモデルマウスの匹数が少ない為、脳内移行の研究進展に支障がでるなら、通常のマウスでのアッセイを併用して効率的に進められたい。Hex α 、 β サブユニットについては、マンノース6リン酸をより効率的に付加するためのプロテインエンジニアリング的な改変を考慮してはどうか。

4-4. 戦略目標に向けての展望

努力の跡は認められるが、実用化への目途は立っていない。酵素の脳内移行という大変難しいテーマに取り組んでいるが、これが解決できないと末梢血液から脳実質内への酵素補充技術の開発ができない。

4-5. 総合的評価

高分子タンパク質が血液脳関門を通過できる技術が開発されれば、そのインパクトは極めて大きいですが、基盤的に何も分かっていないのが現状である。研究代表者はリーダーとして中心的にこの課題に取り組むべきである。

1. 研究課題名：マイクロドメイン機能異常にもとづく2型糖尿病の病態解明
2. 研究代表者名：井ノ口 仁一（東北薬科大学分子生体膜研究所 教授）
3. 研究概要

GM3発現増加による2型糖尿病およびインスリン抵抗性の発症機序の解明を目的として以下の結果を得た。インスリン受容体(IR)はGM3の発現増加によって、カベオリン-1(cav-1)との結合が弱められ細胞膜マイクロドメインから解離し、インスリン抵抗性状態を惹起する機構を証明した。さらに、2型糖尿病患者の血漿中GM3は有意に増加しており、メタボリックシンドロームの新たなリスクファクターとしてGM3の病態診断法の意義を検証中である。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

GM3とインスリン受容体との相互作用に関する新しい知見が確実に得られており、当初の計画どおり進んでいる。研究成果のほとんどは研究代表者のグループで生み出されており、研究費も研究成果に応じて配分されている。GM3と糖尿病との研究では、研究代表者は世界のトップを走っており、論文発表・特許出願もかなり積極的に行われている。今後は、もう少しインパクトファクターの高い雑誌への論文発表を努力されたい。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

血漿中のGM3レベルが2型糖尿病患者で有意に高値を示し、かつ従来の高血糖のパラメーターであるグリコアルブミン値との相関性は無いことが明らかになった。GM3レベルの測定はメタボリックシンドロームの病態を新たな角度から検出できる可能性を見出した。この成果が産学共同シーズイノベーション化事業で発展することを期待したい。また生理的分化誘導培養系の確立は今後展開が期待される。

4-3. 今後の研究に向けて

興味深い研究を展開し研究テーマを沢山見出しているが、生物学的な重要性から優先順位をつけ、ターゲットを絞って推進されたい。脂肪組織由来のGM3が血中濃度と相関することについては、充分その根拠を示し基礎のしっかりしたものにして欲しい。メタボリックシンドロームのリスクファクターである他のマーカー、総コレステロールやLDL等とGM3との相関性を取る事および臨床例を増やすことが必要と思われる。

4-4. 戦略目標に向けての展望

マイクロドメインの機能異常を病態に結び付けようとする意欲的な研究であり、基礎的な知見を積み重ねて確実なものにして欲しい。新しいメタボリックシンドロームの診断法は社会還元につながる可能性がある。糖尿病は診断より治療が重要であり、治療の糸口になる研究成果を期待したい。

4-5. 総合的評価

全般的に大変意欲的に研究を行っており、今後の成果も期待できる。研究費用対成果は良好であり、精力的に研究を展開しており論文発表、国際会議での招待講演等も

適切に行われている。今後は研究ターゲットに優先順位をつけて、よりインパクトの高い論文発表に向けて集中的な研究を進められたい。

1. 研究課題名：担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化の解析と応用

2. 研究代表者名：中田 博（京都産業大学 大学院長／工学部 教授）

3. 研究概要

<目的>シグレックファミリーやスカベンジャーリセプター（SCR）と上皮性癌細胞の産生するムチンの相互作用の解析を通じて、腫瘍組織形成や担癌状態における免疫能力の低下について、その分子機構を明らかにする。その基礎的データに基づき、担癌状態での免疫力回復あるいは一般的見地からの免疫力の制御などの臨床的応用を目指す。<方法>リガンドと受容体の分子レベルでの相互作用、細胞レベルでの情報伝達及び細胞のもつ生物活性への影響、個体レベルでの免疫細胞への影響を解析する。<結果>シグレックファミリーやSCRをもつ免疫系細胞にムチンは様々な形で影響を与え、腫瘍の増殖に有利な環境を整えていると考えられる。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

担癌患者血清中のムチンによる免疫抑制効果を実験モデルにて証明している。また、ムチンの免疫系への関与の様子が具体的にT細胞、B細胞および作用分子としてのシグレックとの相互作用のレベルで明らかにされつつあり、ほぼ当初の計画どおり進んでいる。ムチンの役割を独自の考えで進めていることは評価でき、海外にも類似の研究が始まっているが、担癌患者のムチンの生理作用に関しては研究代表者の研究が進んでいる。研究費の執行はバランス良く進められている。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

上皮性癌細胞の産生するムチンは、様々な免疫担当細胞上の受容体を介して相互作用することを明らかにしてきたが、単球／マクロファージ上のSCRを介した系、B細胞上のシグレック2を介した系、単球から成熟樹状細胞への分化過程におけるシグレック3,9を介した系でいくつかの知見を得た。当初細胞レベルで示されたムチンの免疫系への作用が、個体レベルで確かめられたことは大きな進歩であり、論文も比較的できているが、もう少し質の高い論文を出すことに努力されたい。

4-3. 今後の研究に向けて

シグレック2とB細胞受容体(BCR)との相互作用を分子レベルでもう少し明らかにできるとインパクトがあり、脾臓のマージナルゾーンの役割については、興味ある展開の可能性はある。研究代表者と共同研究者が比較的良くまとまっているが、糖鎖マイクロアレーなど、より強化が必要なところも見受けられる。

4-4. 戦略目標に向けての展望

ムチンの癌悪性化の機序解明は重要であり、研究代表者が独自の考えで進めている。担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化と解析を分子レベルで進め、抗腫瘍薬あるいは免疫制御薬の開発に結びつけて欲しい。

4-5. 総合的評価

研究代表者の独創的な説を裏付ける方向で研究が進展しており評価できる。全体として計画通りの成果が得られ、研究代表者のリーダーシップが良くみえる研究体制ができており、今後の成果が期待できる。

1. 研究課題名： 遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明

2. 研究代表者名： 野村 一也（九州大学大学院理学研究院生物科学部門 助教授）

3. 研究概要

ヒトで重要な機能を果たしている糖鎖遺伝子の解析をすすめつつ、線虫の対応する糖鎖遺伝子を同定しノックアウトによる機能解析を行った。ヒト糖鎖遺伝子のオーソログと考えられる遺伝子全 145 個を選び出し RNA 干渉法で全遺伝子の機能阻害を行い 34%で異常を確認した。また平行して 145 個の遺伝子や他の糖鎖遺伝子の欠失突然変異体の取得をすすめ現在までに 70 個以上の欠失変異体について解析を進めている。遺伝子機能の阻害によって異常を示した遺伝子は全体の 44%以上にのぼっている。さらにバイオインフォマティクスを活用して糖鎖遺伝子で重要な機能を示す可能性が高いものを多数選出し系統的にノックアウトを行った他、プロテオーム解析・遺伝子発現解析やノックアウト法の開発も行った。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

*C. elegans*を材料として有効に使い、網羅的な解析を行っていることは、それなりの評価が出来る。遺伝子破壊には高効率なTMP/UV法を採用して研究を進めており、遺伝子ノックアウトのスループットでは群をぬいているが、国際的にも競争が激しい分野であり、より一層の質の高い研究成果が要求される。研究代表者に多くの研究費が配分されているが、研究成果は共同研究者の方が目立つ。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

コンドロイチンコアタンパク質の同定は一つの成果であるが、生物学的な意義については、今後更に研究を進める必要がある。線虫研究の特徴を生かして糖鎖の機能を解明する本プロジェクトの研究は重要である。しかし、チーム研究としては進展しており、ノックアウト株も順調に取得しているものの、現在まで研究代表者の論文・特許となった成果は乏しい。設備が整い、人手も確保でき、方法論も確立したので、研究を加速させ成果が得ることを期待したい。

4-3. 今後の研究に向けて

研究が進むにつれて情報量が多くなってきたので、焦点(cytokinesis等)を絞った方向性を持つべきである。研究代表者がリーダーシップを一層発揮して、共同研究者をまとめ目標に迫っていただきたい。また研究代表者は研究成果を論文にすることに一層の努力を払われたい。

4-4. 戦略目標に向けての展望

*C. elegans*の基本的実験系を研究するという方向性では評価されるが、本プロジェクトと戦略目標とは隔たりがある。cytokinesisと糖鎖の関連という原点に立ちかえって戦略的に進めるべきである。糖鎖をキャリアするタンパク質の網羅的な同定をハイスループットに行える技術開発をすすめているので、それらを活用するとともに、最終的にはフェノタイプを説明できる糖鎖機能を解明して欲しい。

4-5. 総合的評価

膨大な研究データが蓄積され、一定の評価は出来るが本来のcytokinesisの研究が進んでいないようにみうけられる。網羅的な解析のみでは発展性がないことにより一層留意して焦点を絞って進める必要がある。やっとな基盤的なツールが揃ったので、今後どんどん糖鎖機能を解析・解明できることを期待したい。

1. 研究課題名:がんや糖尿病等におけるシアリダーゼ異常の機構解明と制御
2. 研究代表者名:宮城 妙子 (宮城県立がんセンター研究所 所長・生化学部長)
3. 研究概要

先に、形質膜シアリダーゼ(NEU3)が各種ヒトがんで発現が異常に亢進し、この遺伝子導入マウスに糖尿病が発症することを見いだした。本研究では、この異常発現の意義や制御機構の解明を進めてきた。その結果、NEU3 が細胞運動や浸潤、細胞死を制御し、がん細胞の悪性度を助長する方向に働いていることが明らかとなった。また、NEU3 ノックダウンががん細胞では細胞死をもたらすが、正常細胞には影響しないことが分かったので、この現象の治療への応用の可能性を考えている。今後、糖尿病を含むシアリダーゼに関わる病態の解明、シアル酸変化の全貌解明をめざし、阻害剤の合成等も推進させて、NEU3 を標的とした新しい診断・治療法の開発に繋げたい。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

スタート時において高い科学的レベルにあったせいもあるが、その後の進展は比較的緩やかである。Neu3は興味深い分子であるので国際的に競争が激化しているが、研究代表者は発見者であり、世界の研究リーダー的存在であるだけに、研究の発展を期待したい。面白い現象をいくつも見出しているが、決定的証拠をどうするかで飛躍的な成果が期待できると思われる。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

Neu3がアポトーシスを含む多くの細胞情報伝達経路を修飾していること、その結果がんの悪性形質を助長していることを明らかにした。研究代表者のライフワークとしてのNeu3が、がん細胞生物学と極めて密接に関係していることが解析された。癌との関連がかなり興味深い内容になってきたが、糖尿病との関係は遺伝子解析が遅々としている。Neu3が関連する機能の分子レベルでの説明に関しては今後の課題として残っているが、Neu3のEGFR、IRとの相互作用を阻害する化合物が見つければ大きなインパクトになる。

4-3. 今後の研究に向けて

Neu3分子の分子レベルの説明が必要と思われる、特に酵素活性の関与がどこまであるのか、それ以外のタンパク質-タンパク質相互作用による部分はどこかを明らかにされたい。Neu3のターゲットになっているタンパク質の同定が必要であり、また単にガングリオシド濃度により規定されていないかどうかメタボリックな変化の把握も必要である。研究代表者のリーダーシップのもと着実に成果がでてきているが、阻害剤の設計についてはやや遅れているので加速されたい。

4-4. 戦略目標に向けての展望

基本的な問題がクリアできれば、それに基づく利用の可能性は充分でてくると思われるので基本的な問題点に力を注いで解決すべきである。糖尿病との関連性はヒトのデータがもう少し必要であり、がんとNeu3との関連ではNeu3の局在についてのデータが欲しい。

4-5. 総合的評価

研究費用対研究成果やチームワークも比較的良好であり、がん治療の標的の一つとして研究成果が期待できる。研究代表者のライフワークであるシアリーダーゼ研究が本CRESTにより、シグナル伝達へ発展し始めた。強いリーダーシップを発揮され、研究成果を応用まで繋げる形で発展させていただきたい。

1. 研究課題名：糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築

2. 研究代表者名： 山口 陽子（東海大学工学部(糖鎖工学研究施設) 教授)

3. 研究概要

抗体産生の機構を生体外で達成できるファージディスプレイ法と人工糖脂質を活用して、各種糖鎖エピトープに特異的かつ高親和性で結合する単鎖抗体を単離し、糖鎖構造特異的・単鎖抗体ライブラリーの構築を目的とし、まずモデル糖鎖として **mannotriose** に結合する単鎖抗体の遺伝子の単離、タンパク質の発現・精製、結合性の解析の方法を確立した(成果をまとめた **manuscript 2** 報を **Biochemistry** で印刷中)。同様に、**Lex**、**T** 抗原、**Tn** 抗原、ガングリオシドに対する単鎖抗体の単離が進行中である。この過程を通して、単鎖抗体の単離・発現・精製をより効率的にするためのライブラリーと糖鎖抗原固定化の改良を進めた。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

本研究はCREST発足時に新たな課題として立ち上げたものであり、ゼロから方法論を組み立てて進めて来たため、当初は研究進展が危ぶまれたこともあった。糖鎖に対する単鎖抗体の作製は世界的に始まったところであり、この研究もその中で競合している。チーム会議がほぼ月に一回の頻度で行われており、熱心なチームの研究者の努力により研究計画からやや遅れてはいるが、研究は進展を始めた。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

研究代表者の論文は未だでていないが、通常の単クローン抗体作成法では出来難いマンノトリアースに対して高親和性を持つ単鎖抗体融合タンパク質を得た。これらの成果が2報の論文としてまとめられた。現状での到達点はあまり高くないが、ファージライブラリーの特性を生かした動物では産生できない特異的かつ高親和性の単鎖抗体が次々と作製できればインパクトのある研究成果となる。

4-3. 今後の研究に向けて

研究メンバーは化学的研究畑に片寄っているので、糖鎖生物学が理解できる研究者を参加させた方が良いと思われる。Fv単体でのアフィニティーを正確に測ることが必要であり、そのためには E. coliにしても CHOにしても、Fvのみ(E. coliの場合はGSTを切って)を発現させKD値を出すことが重要と思われる。

4-4. 戦略目標に向けての展望

対象とする糖鎖を的確にすることが重要である。動物では産生しないファージディスプレイの特性を生かした糖鎖抗体産生システムを構築し、その後臨床的に有用な抗体を簡便に得る、という研究の方向性を明確にして進める必要がある。研究は進みだしたが、まだまだ多くの改善すべき点がある。

4-5. 総合的評価

どうにか目標が見えて来ているが、今後は目標とする抗原を慎重に吟味して進めて欲しい。時間経過と費用効果の割には研究進展が遅々としているが、3グループがまとまって研究を進めている熱意は評価できる。ファージディスプレイ法で抗体を作る方法は重要であり、Fcとの複合体として素晴らしいKD値のものが一つとれたことは評価したい。

以上