

(独) 科学技術振興機構
戦略的創造研究推進事業
研究領域事後評価用資料

研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

2010. 3. 9

1. 戦略目標

「がんやウイルス感染症に対して有効な革新的医薬品開発の実現のための糖鎖機能の解明と利用技術の確立」

免疫反応、がん転移などに関与する「糖鎖」及び糖鎖関連生体情報分子の探索及びその機能解析による情報伝達のメカニズムを解明し、副作用のないがん治療薬（がん細胞だけを特異的に攻撃する治療等）、各種ウイルス・細菌感染症等の治療・予防薬（ウイルス・細菌の標的となる糖鎖を改変するなどによって感染を防止）、糖鎖の制御による遺伝子治療、免疫機能調整等の効率化などを実現することを目指して、以下を達成目標とする。

- ・細胞内及び細胞間ネットワークの情報伝達系可視化、超微量解析技術の開発
- ・機能分子及び情報伝達分子の特定と機能修飾の解析
- ・生体膜構造と情報伝達の関連解析
- ・脳神経等における機能分子、形態形成・分化関連分子の機能修飾及び輸送・動態の解析

2. 研究領域

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」（平成14年度発足）

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。

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、糖鎖の改変によるがん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る。

3. 研究総括

谷口 直之

（大阪大学産業科学研究所 疾患糖鎖学 寄附研究部門 教授 /
理化学研究所 基幹研究所 ケミカルバイオロジー研究領域
システム糖鎖生物学研究グループ グループディレクター）

4. 採択課題・研究費

(百万円)

採択年度	研究代表者	研究終了時の 所属・役職	研究課題	研究費
平成 14年度	伊藤 幸成	理化学研究所 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	407
	神奈木 玲児	愛知県がんセンター研究所 部長	癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明	484
	木曾 真	岐阜大学 教授	感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究	269
	小山 信人	カウハツ(株) 部長	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	484
	鈴木 康夫	中部大学 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	469
	西原 祥子	創価大学 教授	RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発	430
平成 15年度	伊藤 孝司	徳島大学 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	266
	井ノ口 仁一	東北薬科大学 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	265
	中田 博	京都産業大学 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	256
	野村 一也	九州大学 准教授	遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明	444
	宮城 妙子	宮城県立がんセンター 研究所 所長	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	378
	山口 陽子	東海大学 教授	糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築	247
平成 16年度	木下 タロウ	大阪大学 教授	糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ	704
	鏑田 武志	東京医科歯科大学 教授	糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用	258
	平林 義雄	理化学研究所 チームリーダー	糖修飾システムによる神経機能の発現・制御	239
	本家 孝一	高知大学 教授	病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明	273
総研究費				5,873

5. 研究総括のねらい

- ・ヒトゲノムの解析が終了し、ゲノム情報を活用したポストゲノム研究として、タンパク質の構造・機能解析や、遺伝子多型研究などの国家的なプロジェクトが進行したが、それとともに遺伝子やタンパク質のみでは表現できない多様な生物シグナル伝達物質として、「糖鎖」をはじめとする生体情報分子の意義が強く認識され、その機能発現のメカニズムを解明する重要性が高まってきている。
- ・また、各種疾患は生体情報分子の介在により、何らかの異常が細胞内に取り込まれることによって生じ、そのメカニズムの解明が、病気の予防・治療に貢献するなど、幅広い応用が期待される。
- ・このため、今後は糖鎖の基礎的研究における我が国の強みを一層発展させ、糖鎖の動態や機能の基礎的研究を進展させることが必要である。それと共に、新規医薬品等の開発につながる糖鎖の機能解析を推進することを目指した。

6. 選考について

ヒトのゲノム構造がほぼ明らかになり、いわゆるポストゲノム研究が21世紀のライフサイエンスの中心的課題のひとつである。そのなかでも糖鎖による修飾反応はタンパク質の50%以上にみられ、タンパク質の機能や構造に大きな影響をあたえることがわかってきた。また、糖鎖はタンパク質や脂質に結合して細胞間の認識や相互作用を変えるため、癌、慢性疾患、先天性筋ジストロフィーなどの糖鎖異常、感染症、免疫、脳、発生、再生などの異常、老化などに強くかかわっている。本領域では、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンなどの分子群の中で、特定の糖鎖の生体内標的分子を同定するとともに、糖鎖による標的分子の機能変化を解析し、糖鎖の新たな機能の発見を目指した。そのためには糖鎖超微量分析技術や情報伝達のダイナミックな変化を可視化する技術の開発も重要であり、これらの技術開発の基礎的研究とともに、がん、および2型糖尿病等の生活習慣病、ウイルスや細菌による感染症などの医薬品開発につながる基礎的研究などを本研究領域の選考対象とした。糖鎖生物学と他の領域との融合的な研究も選考対象とした。とくに欧米追従型の研究ではなく、国際的にリードする独創的な研究の提案を選考した。

採択に当たっては、研究が、国際性、独創性、創造性に富んだものであることと、研究計画が具体的で、将来、応用への基盤的な技術開発へ貢献できるものを選出した。糖鎖生物学のみならず糖鎖化学の研究者、糖鎖科学の専門以外の境界領域の研究者からも選出した。優れた研究代表者の元で共同研究を行うことにより若手研究者の育成も意図したチーム、また、必ずしもこれまでの実績にとらわれず、新たな挑戦をする可能性がある課題も選考した。

選考にあたっては利害関係にある選考委員は選考に参加せず、公正な選考に努めた。

7. 領域アドバイザーについて

領域アドバイザー名	終了時の所属	役職	任期
川寄 敏祐	立命館大学 糖鎖工学研究センター	センター長	平成 14 年 8 月～平成 22 年 3 月
近藤 規元	小野薬品工業（株） 研究渉外室	理事／室長	平成 14 年 8 月～平成 20 年 3 月
鈴木 明身	東海大学 糖鎖科学研究所	所長／教授	平成 14 年 8 月～平成 22 年 3 月
塚田 裕	(株)エスアールエル	理事	平成 14 年 8 月～平成 22 年 3 月
成松 久	(独) 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター	センター長	平成 14 年 8 月～平成 22 年 3 月
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	平成 14 年 9 月～平成 22 年 3 月

本来ならCRESTの研究代表者として推薦したい研究者であるが、他の競争的資金や、文部科学省の特定領域のメンバーであるため採用できず、かつ、国際的に糖鎖科学で活躍し、広い視野を持ち、研究指導をお願いできる我が国の代表的な研究者に依頼した。また、糖鎖科学の専門家ではないが、近い分野で活躍されている研究者およびプロジェクトの成果を将来的に社会に還元するためには、研究開発の経験が豊富で、かつ企業にいる方々の助言が必要であることから、そのような方々にもお願いした。

8. 研究領域の運営について

1) 研究の進捗状況の把握

下記(1)～(4)の他に、毎年作成される研究実施報告書により進捗状況の把握に努めたが、平成 16 年度の研究実施報告書についてはアドバイザーにも配布して、ご意見を伺った。また、本領域の研究者のほぼ全員が日本糖質学会の会員であるため、日本糖質学会や生化学会の年会でも研究進捗状況の把握に努めた。

(1)研究代表者の研究現場への訪問を行い、研究現場の実体把握と問題点を協議し助言した。(Site - Visit)

(2)チーム毎に開催される会議にも出席し、チーム内の共同研究状況の把握や、チーム内の研究交流を促した。

(3)2 日間にわたる本領域の全体会議（非公開）を 3 回開催し、未公開のホットな話題を提供しあった。第 1 回は口頭発表だけであったが、2 回目からはポスター発表も行い、領域全体の研究把握と共に領域内の交流に努めた。

(4)公開シンポジウムについては、より多くの研究交流と聴衆が期待できる日本の糖鎖研究全体の組織である日本糖鎖科学コンソーシアム(JCGG)のシンポジウムを 5 回、JCGG その他の機関と共同して開催した。領域の研究者が、他の競争的資金の研究者と共に、研究成果を発表することにより領域外の交流を積極的に行った。

さらに、国際性を重視し平成16年11月にはハワイでの日米合同コンソーシアム会議の開催を本領域が中心に行い、国際的な研究会にも積極的に参加するよう呼びかけた。

最終公開シンポジウム（平成22年1月20日開催）は本領域単独で行い、CREST糖鎖の研究成果を発表した。

2) 研究課題の指導・研究費の配分

上記 1) の機会を捉えて研究状況を把握し、領域アドバイザーのご意見を参考にして、研究上の問題点、その解決方法などを指導した。また、研究テーマが拡大し過ぎたときには軌道修正や、国際的に競合していたが残念ながら先行されてしまったテーマについては具体的なテーマの方向転換や修正などを指示した。研究代表者（チーム）の研究に寄与していない共同研究者に対しては、CREST の分担テーマに注力するように、警告を発した。

研究進捗状況を勘案して研究費の配分を行ってきたが、飛躍的な発展が期待できる、特に若手の研究者への援助を積極的に行った。研究代表者または主な共同研究者が異動等により、予期せぬ研究費が必要になった時などは、応分の研究費を支援した。

一方、研究の進展はあるが論文発表を怠っている代表者に対して、投稿を度々促したが効果がないため、研究費の減額を行った。

3) その他

糖鎖の非科学的な効能を宣伝しサプリメント等で利益を上げようとする業者に協力しないように、CREST 研究者に注意を喚起した。守らなかった共同研究者を CREST から外した。

9. 研究を実施した結果と所見

1) 特筆すべき研究成果

まず、糖鎖の動態や生物機能の基礎的研究の進展を目標にしたが、これについては下記(1)に示す数々の顕著な研究成果があった。これらは糖鎖の基礎的研究における我国の強みを遺憾なく発揮した成果である。

また糖鎖機能を利用して、がんやウイルス感染症、免疫、その他の分野に於いて、医薬品開発のための基盤技術の確立を目指したが、下記(2)に記した成果が得られた。これらは今後の研究発展により診断薬または医薬品として、社会還元が期待される。

(1) 戦略目標に対する基礎研究成果

戦略目標に対する特筆すべき研究成果を記載する。

細胞内及び細胞間ネットワークの情報伝達系可視化、超微量解析技術の開発

- ・ 本家チーム (T) は、生きている細胞の細胞膜上で任意の分子と近接する分子を同定する画期的な方法 (EMARS 法) を開発した。この技術を活用することにより、生体膜での情報伝達系の可視化が可能となる。
- ・ 伊藤 (幸) T は、構造が確かな合成糖鎖およびそのタンパク質複合体を駆使し、糖タンパク質品質管理機構において鍵を握るレクチンシャペロン Calreticulin (CRT) 等の定量的特異性解析に成功し、品質管理機構の解明に大きく寄与した。
- ・ 超微量解析技術には質量分析装置が最も有力な機器である。木下 T の田口良グループ (G) は、GPI アンカー前駆体の構造を決定し、木下 G と共に GPI アンカーの生合成経路の解明に寄与した。また和田 G は、大山 G と共同で、前立腺がん特有の糖鎖構造を決定した。

機能分子及び情報伝達分子の特定と機能修飾の解析

- ・ 井ノ口 T は、GM3 合成酵素の欠損マウスが聴覚障害を起こすことを発見した。この発見は聴覚機能に複合糖質が関与していることを示す最初の例となった。難聴に対する有効な治療法がない現状で、今後の研究の発展が期待される。
- ・ 神奈木 T は、がん細胞ではセレクチンの特異的リガンドであるシアリルルイス x とシアリルルイス a が強く発現する。その発現誘導機構を研究し、一つの要因は、発がん

初期の糖鎖合成遺伝子のエピジェネティックな転写抑制であり、二つ目は、局所進行がんにおける低酸素による糖鎖合成遺伝子の転写誘導であることを明らかにした。

- ・西原 T はショウジョウバエ、野村 T は線虫を使って、糖鎖関連遺伝子について RNAi 法を用いて変異体作成を行い、糖鎖機能を網羅的に解析した。

生体膜構造と情報伝達の関連解析

- ・宮城 T は、形質膜局在型シアリダーゼ (NEU3) が各種ヒトがんで異常亢進していること、および NEU3 がシグナル分子として重要な役割を果たし、ホスファチジン酸と結合して、活性化されることを見出した。NEU3 のノックダウンによってがん細胞死を促進したが、正常細胞では影響を受けないことを見出した。NEU3 はがん細胞の生死を規定する分子であり、がんの診断・治療の標的分子として有望であることを明らかにした。
- ・井ノ口 T は、インスリン抵抗性状態では、GM3 の増加によりマイクロドメインの構成および機能に異常が生じ、インスリン受容体をカベオラから解離することで代謝性シグナルを抑制することを、生細胞イメージングなどの手法を用いて明らかにした。
- ・木下 T の顧 G は、EGF と TGF- β などの増殖因子受容体やインテグリンに付加された *N*-型糖鎖により、膜上受容体の機能が正にまたは負に制御されることを明らかにし、また、インテグリン二量体の形成に重要な糖鎖付加部位を同定した

脳神経等における機能分子、形態形成・分化関連分子の機能修飾及び輸送・動態の解析

- ・平林 T は、胎児脳内の新奇糖脂質、ホスファチジルグルコシド(PG)の構造を決定した。
PG は、神経幹細胞からアストログリア系譜への細胞分化に関わっており、リゾ体は、強力な成長円錐反発因子活性を有する生理活性脂質であることを見出した。
- ・木下 T は、GPI アンカー型タンパク質が小胞体からゴルジ体へ輸送される際に、第2マンノースに付加されているエタノールアミンリン酸側鎖が新規遺伝子 PGAP5 によって除去される糖鎖リモデリングを発見した。これが小胞体からの効率的な輸送に必要であることを示し、タンパク質の膜アンカーに脂質だけでなく複雑な糖鎖が含まれていることの意義のひとつを明らかにした。
- ・木下 T は、GPI アンカー型タンパク質だけでなく、広く糖タンパク質と糖脂質の輸送及び *N*-、*O*-型糖鎖の構造形成に、ゴルジ体の pH が重要であること、その制御に新規の塩素イオンチャンネル GPHR がプロトンポンプのカウンターイオンチャンネルとして働くことが必須であることを明らかにした。

(2) 医薬品開発のための基盤技術の確立

- ・鈴木 T は、高病原性鳥インフルエンザウイルスの鳥→ヒトへの伝播機構、ヒト間大流行発生の分子機構を、宿主側の受容体シアロ糖鎖の精密構造、認識変異、およびウイルス側スパイクの分子進化、分子解剖等により明らかにした。同時に、インフルエンザウイルス感染阻止糖鎖誘導体を、新たに 20 種類以上発見し、次世代の抗インフルエンザ創薬の基盤を創生した。
- ・木下 T は、先天性 GPI アンカー欠損症の一つが、小胞体での GPI アンカー生合成の低下のために起こっており、それが *PIGM* 遺伝子のプロモーター変異によっている事を証明した。Na Butyrate によりヒストンのアセチル化を回復させると生合成が回復することを発見し、この情報に基づき英国で治療が行われた。
- ・鏑田 T は、CD22 機能抑制によりナイーブ B リンパ球でも記憶 B リンパ球の反応に変換できることを明らかにし、CD22 などを標的とする免疫制御法の開発により、ワクチンや抗菌剤／抗ウイルス薬とは作用機序の異なる新たな感染防御薬等の開発が可能であることを示した。JST より関連特許を出願済みであり、JST が開催する新技術説明会で共同開発企業を募集する。
- ・木下 T の三善 G は、今まで、早期発見が困難であった膵臓がんの診断マーカーとして、フコシル化ハクトグロビンが有力であることを見出した。実用化に向けて、JST の社会還元を促進する提案に採択され、(株)免疫生物研究所と共同で ELISA キットのバリデーションを実施中である。
- ・井ノ口 T は、ガングリオシド GM3 の量が多くなるとインシュリン感受性が悪くなることを見出し、2 型糖尿病等の生活習慣病の診断や治療につながる糸口を得た。JST より関連特許を出願し、医薬品開発のため製薬企業と共同研究を開始した。

2) 各研究課題の具体的な成果

以下の3項に分類して研究課題（チーム）毎に記載する。

- (1) 糖鎖の機能に関する研究
- (2) 糖鎖と病気に関する研究
- (3) その他糖鎖に関する研究

研究課題	研究代表者	採択年度
(1) 糖鎖の機能に関する研究		
RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発	西原 祥子	H 1 4
遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明	野村 一也	H 1 5
病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明	本家 孝一	H 1 6
糖修飾システムによる神経機能の発現・制御	平林 義雄	H 1 6
糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ	木下 タロウ	H 1 6
(2) 糖鎖と病気に関する研究		
癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明	神奈木 玲児	H 1 4
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	中田 博	H 1 5
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	宮城 妙子	H 1 5
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	小山 信人	H 1 4
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	井ノ口 仁一	H 1 5
ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用	鈴木 康夫	H 1 4
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	伊藤 孝司	H 1 5
(3) その他糖鎖に関する研究		
糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明	伊藤 幸成	H 1 4
感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究	木曾 真	H 1 4
糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用	鏑田 武志	H 1 6
糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築	山口 陽子	H 1 5

(1) 糖鎖の機能に関する研究

RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発（西原祥子チーム）

(背景) 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示す。合成されたタンパク質や脂質はゴルジ装置で糖転移酵素により順次糖を付加される。糖鎖修飾は翻訳後修飾の主たるものである。本研究では、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、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た。

(成果) 糖鎖関連遺伝子と推定される 257 個の候補遺伝子を選択し、ショウジョウバエ RNAi 体を樹立した。全細胞・全発生ステージで RNAi を誘導したところ、62%で発生致死となり、糖鎖が種々の生体機能に関与して生命維持に重要な働きをしていることが明らかになった。さらに、組織特異的・発生段階特異的に RNAi を誘導したところ、54%で形態形成異常を示した。各遺伝子は、表現型により 3 種のグループに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。以上の網羅的解析により、糖鎖の形態形成における機能の全体像を、初めて、示すことができた。併せて、解析過程で見出された注目すべき遺伝子に対する詳細な解析を行い、*O*-マンノース転移酵素が筋形成に関与して筋ジストロフィーのモデルとなること、T 抗原ムチン型糖鎖が血球分化に関与すること、PAPS 輸送体やヘパラン硫酸の合成に関わる酵素が各種シグナルに関与することなどを示した。さらに、「糖鎖の種を越えて保存されている機能」に着目して、ヘパラン硫酸が、FGF、Wnt、BMP シグナルを介して ES 細胞の増殖、未分化性・多能性維持に働くことも明らかにした。

(発展) ショウジョウバエの形態形成に関わるシグナル分子の多くは、ES細胞などの幹細胞で重要な働きをしている。ハエの網羅的解析により見出されているヘパラン硫酸以外の糖鎖も、また、ES細胞で重要な働きをしてきると予想され、現在、検証を行っている。また、このような糖鎖機能は、ES細胞のみならず、組織幹細胞や癌幹細胞にも共通する可能性があり、再生医療や癌研究にまで応用できると考える。なお、ショウジョウバエムチン型糖鎖、*O*-マンノース型糖鎖については、対応するヒト遺伝病のモデルとして、表現型の分子メカニズムの解析を行っている。

遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明（野村一也チーム）

(背景) 糖鎖の機能を解析するためにモデル生物線虫 *C. elegans* を活用することは極めて有望な戦略である。本研究では線虫の糖鎖遺伝子でヒトと共通のものをバイオインフォマティクスを活用して選び出し、その遺伝子機能を RNAi と遺伝子ノックアウト（欠失突然変異体の取得）で抑制・破壊して明らかにする研究を展開した。

(成果) その結果、ヒトと共通な糖転移酵素を中心とした遺伝子 145 種類の他、糖脂質合成・分解、硫酸化関連遺伝子、GPI アンカー関連遺伝子などおよそ 200 種類あまりの遺伝子についてすべて RNAi を行い、主要なものについて遺伝子破壊株を取得して糖鎖

の機能が線虫のどこで重要かを明らかにする詳細な表現型解析を実施・完了した。表現型の解析にはタイムラプス蛍光微分干渉顕微鏡を利用し発生の詳細な解析を行った。また遺伝子の機能阻害の効果を検出するために新しい発現ベクター系を開発し、小胞輸送や小胞体ストレスなどに関わる分子の解明をすすめた他、新たな小胞体発現マーカーなども開発した。さらに RNAi の効率化のため線虫の RNAi の分子メカニズムの解明も行った。生化学面からの遺伝子機能解析としてプロテオーム解析を主要な変異株について行い新たな二次元電気泳動法を開発した他、シアル酸などの探索も行った。こうした解析の結果、細胞分裂に関わるコンドロイチン合成酵素の補助因子の同定・原腸貫入や組織形成に関わるヘパラン硫酸の合成遺伝子の機能の解明・ヘパラン硫酸のウイルス感染における役割の解明などの成果を得た。コンドロイチンに関してはその細胞分裂への関与が哺乳類でもみられることを確認した。この他、糖鎖の硫酸化に関わる PAPS 合成酵素の必須の機能の解明、小胞体輸送や小胞体ストレス、PAPS やアミノ酸輸送などに関わる新たなトランスポーターの同定、ガレクチンの感染防御への関与の解明などの成果を得た。さらに遺伝子機能の戦略的破壊実験の結果、N 型糖鎖の合成に関わる酵素や糖脂質の合成に関わる酵素、GPI アンカー合成に関わる酵素が細胞周期の進行に不可欠な役割を果たしていることが明らかになった。これは糖鎖の第一減数分裂への関与、体細胞分裂への関与を明らかにする世界で初めての成果である。

(発展) 現在、細胞周期の進行に関わる糖鎖の機能について線虫を用いた詳細な解析を継続して行っている。また糖鎖の感染防御への関与の解明も進めている。

病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明（本家孝一チーム）

(背景) 生体膜上で糖脂質は、コレステロールや膜タンパク質とともに、膜マイクロドメインとよばれる機能ユニットを形成してさまざまな生物機能を発揮する。膜タンパク質に付加している糖鎖も、膜マイクロドメインにおけるシス相互作用に寄与している。

(成果) 脂質ラフト免疫法により、膜マイクロドメイン局在の新奇分子に対する抗体を得た。

独自に発見した Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応を用いて、生細胞の細胞膜上で会合する分子群を同定する方法を開発した。

未熟胸腺細胞の CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞あるいは CD4 陽性ヘルパー T 細胞への分化決定の際、T 細胞レセプターは胸腺上皮細胞上の膜マイクロドメインに会合している MHC class II 分子のみを認識することを明らかにした。

脂質ラフト免疫法に明らかな抗腫瘍効果を確認した。

(発展) EMARS 法は簡便な方法なので、幅広い医療や細胞生物学への応用が見込める。

末梢の成熟 Th 細胞の抗原認識においても、膜マイクロドメイン会合性の抗原提示が重要な意味をもつ可能性が高い。ラフト免疫法は、抗腫瘍免疫療法の免疫方法に応用可能と期待される。

糖修飾システムによる神経機能の発現・制御（平林義雄チーム）

（背景）生体膜糖脂質はコレステロールと会合して安定した脂質ドメイン(脂質ラフト)を形成していると考えられているが、その生理機能、特に中枢神経系での役割の多くは不明であった。本研究チームは、グルコシルセラミド、および新しく発見されたホスファチジルグルコシドに焦点を絞り、両者の個体レベルでの機能を種々のモデル動物を用いて解析することを主目的とした。

（成果）プルキンエ細胞特異的グルコシルセラミド(GlcCer)合成酵素遺伝子のノックアウトマウスの解析により、神経細胞での糖脂質合成は相手側のミエリンの形態と機能維持に必須であること；ゼブラフィッシュの初期発生の解析系を使うことにより、GlcCer は中胚葉由来の脊索の形成に直接関与していること、等を見いだした。また、胎児脳内の新奇糖脂質、ホスファチジルグルコシド(PG)の完全構造決定に成功した。PG は、スフィンゴ糖脂質とは独立した脂質ラフトを形成し、神経幹細胞からアストログリア系譜への細胞分化に関わっていた。また、リゾ体 PG は、強力な成長円錐反発因子活性を有する生理活性脂質であった。

（発展）スフィンゴ糖脂質合成のエネルギー代謝制御機構への関与を解析する過程で、ショウジョウバエ Boss が細胞外グルコースに応答する 7 回膜貫通型の糖タンパク質受容体であることを見いだした。その欠損変異体は飢餓状況下で脂肪体に蓄積するトリグリセリドの速やかな消失を伴い、個体死に至ることから、脂質代謝の合成・消費のバランスに関わる全く新しいタイプの *N*-型糖鎖を含む糖タンパク質であった。

糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ（木下タロウチーム）

（背景）糖鎖の機能は、動態に対応して変化する。糖鎖の動態と機能の相関に統合的にアプローチするため、糖鎖動態を時間的流れに沿って、生合成時の動態、膜上動態、プロセッシングの動態の 3 相に分けてとらえ、各相における機能との相関をとらえることを目的とした。対象として、GPI アンカー、*N*-、*O*-グリカン、グリコサミノグリカンを取り上げ、各相における糖鎖の動態を支配する構造的、細胞生物学的基盤を明らかにし、機能との相関の解明と病態解明への展開を図った。その結果、以下のような成果を得た。

（成果）(1) 糖鎖生合成時の動態と機能発現に関し、英国で発見された先天性 GPI アンカー欠損症が、小胞体での GPI アンカー生合成の低下のために起こっており、それが PIGM 遺伝子のプロモーター変異によっている事を証明した。さらに Na Butyrate によってヒストンのアセチル化を回復させると生合成が回復することを発見し、英国グループによって治療に用いられた。一方、哺乳動物の GPI アンカー型タンパク質の多くが、1 アルキル 2 アシル型ホスファチジルイノシトールを持っていることに関し、これが生合成の第 3 ステップ後にジアシル型から劇的に変化すること、それにペルオキシソームのアルキルリン脂質生合成経路が必要であることを示した。

腎・泌尿器領域の疾患における糖鎖発現を検討した結果、前立腺癌に特徴的な糖鎖構造を明らかにした。

膵がんの新しい腫瘍マーカーであるフコシル化ハプトグロビンの産生に関与するフコシル化制御因子として、IL6 を同定した。フコシル化ハプトグロビンのレクチン ELISA キットを作製し、臨床応用の可能性を検討する。フコシル化制御因子の 1 つである GMD 遺伝子の変異を大腸癌で発見し、腫瘍免疫との関連を解析した。

(2) 糖鎖の膜上動態と機能発現に関しては、小胞体で生合成された GPI アンカー型タンパク質の不飽和脂肪酸が、ゴルジ体膜上で新規の PGAP2 と PGAP3 遺伝子の関与のもと、飽和脂肪酸に置き換えられる脂肪酸リモデリングが起ることを発見し、それが脂質ラフトへの濃縮に必須な現象であることを証明した。また、GPI アンカー型タンパク質が小胞体からゴルジ体へ輸送される際に、第 2 マンノースに付加されているエタノールアミンリン酸側鎖が新規遺伝子 PGAP5 によって除去される糖鎖リモデリングを発見した。これが小胞体からの効率的な輸送に必要であることを示し、タンパク質の膜アンカーに脂質だけでなく複雑な糖鎖が含まれていることの意義のひとつを明らかにした。さらに、GPI アンカー型タンパク質だけでなく、広く糖タンパク質と糖脂質の輸送及び *N*-、*O*-型糖鎖の構造形成に、ゴルジ体の pH が重要であること、その制御に新規の塩素イオンチャンネル GPHR がプロトンポンプのカウンターイオンチャンネルとして働くことが必須であることを明らかにした。

リサイクリングエンドソームが、細胞内膜輸送の多くの経路で重要な中継地点として機能していることを示した。

インテグリン二量体の形成に重要な糖鎖付加部位を同定した。

(3) 糖鎖プロセッシングの動態と機能発現に関し、GPI アンカー型タンパク質が精巣で細胞膜から遊離することを追求し、精巣型アンギオテンシン変換酵素(tACE)が GPI を切断する GPIase 活性を持つこと、tACE による GPI 切断が受精能獲得に必要であることがわかった。

(発展) 糖鎖の細胞内動態の変化に伴って起こる構造変化とその機能との相関について、いくつかの新発見があり、一部は臨床への展開もなされたので、今後さらに、糖鎖機能の構造的、細胞生物学的基盤を明確にしつつ、病態解明につなげる研究を発展させたい。これについて、三善グループの成果が、「膵がんの新しい腫瘍マーカーとしてのフコシル化ハプトグロビン ELISA kit の validation」の課題で、研究成果の社会還元を促進する提案に採択された。

(2) 糖鎖と病気に関する研究

癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明（神奈木玲児チーム）

（背景）糖鎖の機能には細胞識別機能とシグナル分子機能がある。セレクトインと糖鎖リガンドを介したがん細胞の接着においては糖鎖の細胞識別・接着機能が良く発揮されており、がん細胞の CD44-ヒアルロン酸シグナル伝達系においては糖鎖のシグナル分子としての機能が良く発揮されている。神奈木チームはこの両者のがんの病因・病態および進展機構との関わりを解明することを目指した。

（成果）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 x 糖鎖とシアリルルイス a 糖鎖が強く発現する。その発現誘導機構を研究し、二つの要因の役割が大きいことを明らかにした。一つの要因は、発がん初期の糖鎖合成遺伝子の 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であり、これが早期の糖鎖変化の大きな原因となっている。二つ目は、局所進行がんにおける低酸素による糖鎖合成遺伝子の転写誘導であり、進行期の糖鎖変化の大きな原因となっている。また、がんの転移と臨床的に良く相関するとされるバリエーション・フォームの CD44 にはしばしばセレクトインの特異的リガンドが結合しており、このような CD44 分子種は、ヒアルロン酸に結合するのみならずセレクトインにも結合し、がん細胞の血管床へのきわめて強い結合を媒介することが判明した。

（発展）これらの成果は、がんにおける機能性糖鎖の発現誘導機構を糖鎖遺伝子の転写レベルから明らかにし、その機能と生理的意義を分子生物学的に解明したものである。今後さらに研究の進展が期待されるとともに、研究の過程で得られた阻害剤や siRNA、特異抗体などを利用した難治性がんの診断・治療への応用の可能性を示したものである。

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（中田 博チーム）

（背景）上皮性癌細胞の産生するムチンは、癌組織や血流中に分泌され、従来より腫瘍マーカーとして研究対象とされてきた。糖鎖抗原の血中存在量と 5 年生存率には逆の相関性があることが指摘されてきたことなどより、腫瘍形成の結果ではなく、腫瘍の悪性化に関与する因子として働いている可能性が示唆された。一方、免疫系細胞や血管内皮細胞には多くのレクチンなどが発現しており、ムチンとの相互作用を介して生物学的機能を発揮することが想定された。

（成果）マクロファージ上に発現しているスカベンジャーリセプター（SCR）とヒト大腸癌などの産生するムチンとの結合を示し、細胞レベルでは COX2 の誘導とそれに伴う PGE2 の産生亢進を明らかにした。実際のヒト癌患者においても、血流中のムチンと単球からの PGE2 や IL-6 の産生量に因果関係を認めた。ムチン産生腫瘍をもつ担癌マウスにおいて、PGE2 の産生亢進に伴う血管新生の亢進、CD4T 細胞からの IFN- γ 産生の減少などを明らかにした。これらの結果は、従来から指摘されている TAM（Tumor associated macrophage）の生物学的機能の分子的背景を示すものと考えられる。さらに、免疫系細

胞に多く発現しているシグレックへのムチンの結合を示し、情報伝達と生物学的な影響について解析した。B 細胞上に発現しているシグレック 2 については、ムチンが結合すると BCR を介した情報伝達を抑制し、マウス担癌状態では脾臓マージナルゾーン B 細胞に特異的に作用することを示した。その結果、同 B 細胞が消失し、T 細胞非依存性抗原に対する免疫応答が著しく低下した。

(発展) 癌微小環境において、癌細胞や免疫細胞を含む間質細胞が様々な相互作用をしている。従来研究されてきた増殖因子やサイトカインに加えて、ムチン—レクチン間の相互作用は双方の細胞に生物学的作用をもつと予想され、微小環境における癌細胞の動態を理解し、薬物の設計にも重要な知見を提供するものと期待される。

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（宮城妙子チーム）

(背景) がんにおけるシアル酸量異常の実体解明をめざして、シアリダーゼの研究を進め、形質膜局在型シアリダーゼ (NEU3) が各種ヒトがんで異常亢進していること、この遺伝子導入マウスに糖尿病が発症することを見出した。本研究では、がんや糖尿病等における NEU3 異常機構と制御について解析を進めた。

(成果) NEU3 がシグナル分子として重要な役割を果たしていること、ホスファチジン酸と結合し、活性化されることを見いだした。

ヒトがんでは、異常亢進した NEU3 ががん細胞のアポトーシス抑制など悪性形質を増強していた。ノックダウン実験等により、NEU3 はがん細胞の生死を規定する分子であることがわかった。

糖尿病では、2 型糖尿病患者において、NEU3 遺伝子の多型の頻度が正常者に比べて有意に高く ($p < 0.001$)、かつインスリン抵抗性と高い相関を示した。

インフルエンザ治療薬の安全性の検討には、ヒトシアリダーゼ活性阻害効果の調査が有効であった。

NEU3 の特異的阻害剤の創製をめざし、効率的、かつ立体選択的な $\text{CF}_2\text{-sialoside}$ 結合合成法を確立した。

(発展) がんと糖尿病には NEU3 異常亢進によるシグナル異常が深く関わっており、両者のクロストークが示唆された。これらの病態解明への NEU3 研究の貢献が期待できる。

NEU3 はがんの診断・治療の標的分子として有望である。

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（小山信人チーム）

(背景) 糖タンパク質の糖鎖構造は多様な生物機能に影響を及ぼす。われわれは、糖鎖構造の制御によりがんやウイルス疾患を予防・治療する技術及び糖鎖構造に基づく新たな腫瘍マーカーの開発を目指し、N-結合型糖鎖の形成におけるキー酵素である

N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III、bisecting GlcNAc 構造を形成) 及び fucosyltransferase 8 (FUT8 ; $\alpha 1\text{-}6\text{FucT}$ 、コアフコース構造を形成) に注目して研究を

進めた。

(成果) FUT8 ノックアウトマウス及びノックダウン細胞株において細胞増殖が抑制されるメカニズムを解析した。この結果、FUT8 の発現抑制による細胞増殖抑制は、上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体によるシグナル伝達の減弱→複数のトリプシン遺伝子の発現低下→プロテアーゼ受容体 2 (PAR-2) のシグナル低下→細胞増殖抑制というメカニズムによることを解明した。

膵がんは最も予後不良ながんの一つであり、その最大の原因は早期発見が困難なことである。膵がん患者の血清においてハプトグロビン (Hpt) β 鎖がフコシル化されていることを発見し、膵がんマーカーとなりうると考えられた。フコシル化ハプトグロビン (Fuc-Hpt) を簡便に測定するため、レクチンを用いた ELISA 系を開発した。

ラット由来の肝幹細胞様 RLE 細胞が多量の bisecting GlcNAc 構造を持つことを発見した。Bisecting GlcNAc 特異的レクチンである E4-PHA を用いて劇症肝炎を発症した LEC ラットの肝臓から bisecting GlcNAc 高発現細胞を分離し、LEC-HS 細胞株を樹立した。この細胞を肝障害モデルラットに投与すると治療効果が得られ、生着を確認した。

(発展) フコシル化ハプトグロビンの研究は共同研究者の三善英知が木下チームに参加したことにより、木下チームに引き継がれた。

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 (井ノ口仁一チーム)

(背景) 近年、脂肪組織は生体最大の内分泌器官であることが明らかになり、生活習慣病の成因に深く関わっていることが明らかとなっている。我々は、肥満・糖尿病モデル動物において脂肪組織の GM3 ガングリオシド量が正常動物と比べて著明に増加していることを見出していた。本研究では、「2 型糖尿病などの生活習慣病の病態は、スフィンゴ糖脂質の異常発現によって細胞膜 (マイクロドメイン) の構成・構造および機能が変化し、シグナル伝達が異常になったマイクロドメイン病である」という作業仮説を検証し、新たな分子病態像の解明を目指した。

(成果) 2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性の病態にはマイクロドメインの異常、即ち、インスリン受容体 (IR) のカベオラマイクロドメインへの局在化の消失が関与している可能性を検証した。正常な成熟脂肪細胞におけるインスリン代謝性シグナルは、カベオラに存在する IR から始まり、一連の経路を介して糖取り込みをおこなう。一方、インスリン抵抗性状態では、GM3 の増加によりマイクロドメインの構成および機能に異常が生じ、IR をカベオラから解離することで代謝性シグナルを抑制することを生細胞イメージングなどの手法をもちいて明らかにした。さらに、GM3 が聴覚機能の維持に必須であることや GM3 合成酵素 (SAT-I) アイソフォームの発見や SAT-I の細胞内トラフィック機構について新局面を開拓した。

(発展) 我々の提唱している 2 型糖尿病の発症機構にもとづいて、スフィンゴ糖脂質合成阻害剤の臨床応用の試みが世界的に展開されている。今後、肥満による糖尿病などの

生活習慣病の新規治療法への貢献が期待される。SAT-1 のノックアウトマウスが難聴であったことの発見は、ガングリオシドが聴覚機能形成において重要であることを示した初めての例であり、難聴の有効な治療法がない現状で、今後の研究の発展が期待される。SAT-1 のトランスクリプショナルバリエントは、細胞内局在小胞体とゴルジ体と異なることは、メンブレントラフィックの研究分野でも画期的な成果となることが期待される。

ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用（鈴木康夫チーム）

（背景）地球規模の新興・再興ウイルス感染症は、地球温暖化、人の都市集中化・高齢化による新たな現代病と位置づけられる。一方、ウイルスの約 2/3 は、糖鎖を持ち、感染サイクルで宿主側の糖鎖と密接な関わりを持つ。よって、糖鎖生物学によるウイルス感染機構の解明、創薬は 21 世紀の重要な研究標的である。本研究では、「ウイルス」、「糖鎖」、「創薬」をキーワードに、新たな「糖鎖ウイルス学」分野の創生を目指した。

（成果）高病原性鳥インフルエンザウイルスの鳥→ヒトへの伝播機構、ヒト間大流行発生の分子機構を、世界に先駆けて、宿主側の受容体シアロ糖鎖の精密構造、認識変異、およびウイルス側スパイクの分子進化、分子解剖等により明らかにした。同時に、インフルエンザウイルス感染阻止糖鎖誘導体を、新たに 20 種類以上発見し、次世代の抗インフルエンザ創薬の基盤を創生した。さらに、後天性免疫不全ウイルスの糖鎖発現制御による強力なワクチン機能付与の発見とその機構解明、デングウイルスやパラインフルエンザウイルスの糖鎖受容体精密構造の発見、その感染機構の解明、阻害分子の創生などを実現した。

（発展）上記基礎研究から、硫酸化糖脂質のインフルエンザウイルス感染制御と創薬の可能性を明らかにした。遺伝子変異では検出できない、高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト間伝播変異を、受容体シアロ糖鎖認識変異として高感度、迅速に捉える監視技術、キットのプロトタイプを開発した。また、現行の抗インフルエンザ薬に匹敵する強力な糖鎖誘導体も明らかにした。以上、本研究により、新科学分野である「糖鎖ウイルス学」が拓かれ、これによる動物→ヒトへのウイルス伝播機構の解明、インフルエンザのパンデミック発生の事前監視、次世代創薬、新視点のワクチン開発などの新技術が開拓された。

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（伊藤孝司チーム）

（背景）リソソーム病は、リソソーム酵素及び関連因子の遺伝子変異が原因で、酵素欠損と生体内基質の過剰蓄積を伴って発症する先天性代謝異常症である。近年、末梢症状を示す一部のリソソーム病に対し、哺乳類培養細胞発現系で生産される組換えヒトリソソーム酵素を患者の静脈内に投与して治療を図る酵素補充療法が臨床応用されている。しかし、組換えヒト酵素の大量生産・安定供給や医療費の低減、また中枢神経症状を示す疾患に対しても有効な補充療法の開発が望まれている。

(成果) 本研究では、 β -ヘキソサニミダーゼ A (HexA, $\alpha\beta$ heterodimer) の欠損に基き、脳内 GM2 ガングリオシド (GM2) の脳内過剰蓄積と中枢神経障害を伴うテイ・サックス病及びザンドホッフ病に対する酵素補充療法の開発を目的とし、メタノール資化酵母 *Ogatae minuta* 変異株を用い、マンノース-6-リン酸 (M6P) 高含有のヒト型様糖鎖が付加される組換えヒト HexA (*OmhHexA*) の生産と精製に成功した。

末端 M6P 含有 *OmhHexA* は、欠損症患者繊維芽細胞や疾患モデルマウス由来神経系細胞表面の M6P レセプターとの結合を介して細胞内に効率よく取りまれ、酵素活性を回復させ蓄積 GM2 等の基質を分解した。

OmhHexA を成体モデルマウスの脳室内に投与すると、運動機能障害の発症が遅延し、また寿命が延長することが明らかになった。

(発展) 本研究から、脳内 M6P レセプターを分子標的とした、患者脳室内または髄腔内への組換えヒトリソソーム酵素投与の有効性が示唆され、中枢神経症状を伴うリソソーム病の次世代型酵素補充療法としての臨床応用が期待される。また現在までに HexA の Structure-based modeling により、 α 鎖と相同性を示す β 鎖の機能改変 (α 型基質認識への変換) に成功し、得られる修飾型 HexB ($\beta'\beta'$ homodimer) を用いる、免疫原性の低いテイ・サックス病に対する新規酵素補充療法の開発につながる可能性がある。

(3) その他糖鎖に関する研究

糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明 (伊藤幸成チーム)

(背景) 糖タンパク質の品質管理機構は、小胞体、ゴルジ体から細胞質でのフォールディング、輸送、分解の過程を包括するものであり、細胞活動根幹への糖鎖の関与を示唆するものとして強いインパクトを与えている。タンパク質品質管理における従来の研究は構造の不明確な基質を用いて行なわれてきたものが殆どであることから、詳細については大部分が不明であり様々な見解の不一致も見られる。それに対し合成糖鎖、糖タンパク質を自在に造り出す手法を推進力とする本研究の実施により糖タンパク質品質管理の分子機構について明確な理解が得られるものと期待し、本研究を開始した。

(成果) 合成糖鎖およびそのタンパク質複合体を駆使し、糖タンパク質品質管理機構において鍵を握るレクチンシャペロン Calreticulin (CRT)、フォールディングセンサー酵素 UDP-グルコース: 糖タンパク質グルコース転移酵素 (UGGT)、Glucosidase II の定量的特異性解析に成功した。また、不良タンパク質の小胞関連分解 (ERAD) に関与するユビキチンリガーゼ(Fbs1)と PNGase の基質特異性を調べると共に、後者の活性がプロテアゾームにおける分解に重要であることを証明した。上記合成研究の過程で、種々の新しい合成手法の開発を行った。その他の成果として、糖タンパク質の品質管理機構のタンパク質分泌への影響、SCF^{Fbs1} による糖鎖認識の分子基盤、PNGase の PUB ドメインとユビキチン鎖との相互作用、ERAD における PNGase の機能の解明、細胞内レクチンによるタンパク質輸送機構の解明、ERGIC-53、VIP36、VIPL の糖鎖特異性が挙げられる。

(発展) 上記成果により、合成化学が糖鎖生物学の強力な推進力になることが示された。糖タンパク質品質管理機構をより深く理解し、有用タンパク質生産に結び付けるための研究が進行中である。

感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究 (木曾 真チーム)

(背景) ウィルスや病原性細菌の感染及び細菌毒素の侵入は、多くの場合、宿主細胞が持つ糖鎖への付着により開始される。また有用な腸内細菌が体内に止まるための足場も糖鎖複合体である。本研究では、これら糖鎖を介した相互作用の制御を目的として、糖鎖の構造と機能情報に基づいて、化学合成法と酵素合成法を駆使することにより、天然型や非天然型の様々な糖鎖複合体の創製を行い、さらに感染症の抑制あるいは有益な共生の促進効果を持つ糖鎖医薬品の開発を目指した。

(成果) 本研究における成果は3つに大別される。

1つ目は構造解析技術の革新である。ヒドラジンによる糖鎖の切り出しと PA 化法を O-結合型糖鎖にも適用し、生体試料由来のムチン型糖鎖を網羅的にかつ高感度で分析する手法を確立した。

2つ目は糖鎖合成技術の革新である。主としてムチン型糖鎖を標的として、新しい化学合成法ならびに酵素合成法の開発を行った。特に DTBS 法は α -GalNAc-Ser/Thr 骨格

の構築において大きなブレークスルーとなった。

最後に糖鎖と細菌及び細菌毒素との相互作用の解析である。その成果として、ボツリヌス産生毒素のリガンド構造要求性を明らかにした。また、善玉菌であるビフィズス菌と腸管ムチンの接着における機構を分子レベルで解析した。

(発展) 本研究の成果の応用により創薬のシーズの提供が期待される。1つは、endo- α -N-acetylgalactosaminidase の阻害剤である。善玉菌に含まれる酵素には作用せず、病原菌由来のものに選択的に作用する阻害剤の設計の可能性が示された。もう1つは、ボツリヌス毒素中和剤である。大腸菌ベロ毒素の例で示されたように、毒素中和剤は副作用が少なく実用化が期待される治療剤の1つである。

糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用（鰐田武志チーム）

(背景) インフルエンザやその他の感染症は社会的にも大きな問題である。CD22/Siglec2 および CD72 は B リンパ球に発現する抑制性の分子で、細胞外にレクチンないしレクチン様ドメインを発現する。とりわけ CD22/Siglec2 は記憶 B 細胞で抑制機能が減弱することが示唆されており、免疫応答を改変して感染抵抗を増強する際の標的となる可能性がある。また、CD22/Siglec2 および CD72 の糖鎖リガンドとその制御や機能について不明の点が多い。

(成果) CD22 機能抑制によりナイーブ B リンパ球でも記憶 B リンパ球の反応に変換できることを明らかにし、改変糖鎖リガンド合成により効果的な CD22 阻害剤の開発に成功した。さらに、CD22 欠損 B リンパ球の移入や CD22 阻害剤によりインフルエンザ感染抵抗性を増強できることを明らかにした。

CD72 についても、糖鎖結合活性があり、自己免疫の制御等の免疫応答で重要な役割を果たすことを明らかにした。

CD22/Siglec2 の糖鎖リガンドが、これまでの報告とは異なり B 細胞機能の抑制因子であることを明らかにするとともに、その発現が Neu5Gc から Neu5Ac への分子種の変化や β セクレターゼによる産生酵素のプロセッシングなどにより制御されることを明らかにした。

(発展) CD22/Siglec2 などを標的とする免疫制御法の開発により、ワクチンや抗菌剤／抗ウイルス薬とは作用機序の異なる新たな感染防御薬等の開発が可能であることが示された。この感染防御薬はこれまでの薬剤やワクチンとは異なり、病原微生物の同定が不要で、微生物の抗原変化に左右されず、また耐性菌／耐性ウイルスの出現の心配がないなど、画期的な特色を持ち、人類の保健に大きく貢献することが期待される。

糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築（山口陽子チーム）

(背景) 糖鎖は自己抗原である為、高い親和性を有する糖鎖に対する IgG は生体免疫では得がたい。そこで、生体外での抗体産生が可能なファージディスプレイ法と人工糖脂質を

活用し、糖鎖構造特異的単鎖抗体を取得し、発現・精製・糖鎖結合性解析を行い、がん診断薬、分子標的治療薬に応用することを目指した。

(成果) 非還元末端マンノースを認識する Man3 特異的単鎖抗体 10 数種の単離と初期解析について、さらにヒト型 2 価抗体として発現・精製後、その糖鎖特異性・親和性解析を進めた研究の成果が *Biochemistry* (2007) に 2 報として掲載された。抗 Man3 抗体は、これまでに他の系からは得られていないものである。各種 (Le^x、T 抗原特異的) の単鎖抗体の発現・精製後の糖鎖特異性・親和性解析を進めた。

(発展) 研究期間終了後、T 抗原特異的単鎖抗体を大腸菌で大量発現させ、封入体からリフォールディング操作により活性のある単鎖抗体を効率的に得ることに成功したので、この技術を応用しこれまで取得した糖鎖に対する単鎖抗体の大腸菌での大量発現・精製を実施し、構造解析、糖鎖結合性解析の後、がん細胞増殖抑制効果を検証する。大量調製する単鎖抗体はヒト型であるので、各種単鎖抗体を効率的かつ経済的に発現・精製・解析できれば、短期間で完全ヒト型 IgG の作製を達成できることになり、これまでなかった、がん関連糖鎖特異的抗体医薬創成に貢献できると言える。

10. 総合所見

1) 採択課題

採択に当たっては、研究が、国際性、独創性、創造性に富んだものであることと、研究計画が具体的で、将来、応用への基盤的な技術開発へ貢献できるものを選出した。糖鎖生物学のみならず糖鎖化学の研究者、糖鎖科学の専門以外の境界領域の研究者からも選出した。また、必ずしもこれまでの実績にとらわれず、新たな挑戦をする可能性がある課題も選考した。

採択された課題は、概ね所期の期待に沿える研究成果を挙げ、糖鎖科学の分野で世界に誇る数々の優れた研究成果が生まれた。ただ平成 15 年度の採択課題は一部を除くと、期待に沿った成果が挙げなかった。

2) 研究領域のマネージメント

領域の研究進捗状況の把握は、8 章で記載したように、**site-visit**、チーム内会議、全体会議等その他の機会を利用して行った。

領域アドバイザーのご意見を参考にして、研究上の問題点、その解決方法などを指導した。また、研究テーマが拡大し過ぎたときには軌道修正や、国際的に競合していたが残念ながら先行されてしまったテーマについては具体的なテーマの方向転換や修正などを指示した。

研究進捗状況を勘案して研究費の配分を行ってきたが、飛躍的な発展が期待できる、特に若手の研究者への援助を積極的に行った。また研究費の増額だけでなく、問題のあるグループに対しては、研究費の減額や CREST の参加を取り消す処置を実施するなど、めりはりの利いた運営を行った。

3) 領域としての成果

前章でも記載したが、下記のように基礎的な研究成果ばかりでなく、社会還元に近い成果も得られ、CREST 糖鎖として満足のいくものであった。

これらの研究成果は、領域全体として 737 件の論文に発表され、特許出願も国内 90 件、海外 29 件が出願されている。生化学及び糖鎖生物学領域のトップジャーナルであり、もっとも構造と機能について solid な論文を公表している *JBC* には 112 編が掲載されており、また合成化学のトップクラスのジャーナル *Angew. Chem. Int. Ed.* と *J. Am. Chem. Soc.* に各々 3 編、4 編が、*Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* には 9 編が掲載されている。話題性の多いテーマを掲載し、いわゆるインパクトファクターが非常に高い雑誌である *Nature*、*Cell*、*Science* およびそれらの姉妹誌への掲載については、CREST 研究者が Corresponding author の論文は 4 編、共著論文としては 10 編発表されている。

(1) 戦略目標に対する基礎研究成果

- ・ GPI アンカーの生化学に関する数々の発見（木下チーム）
- ・ GM3 が聴覚機能に関与することの発見（井ノロチーム）
- ・ タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明（伊藤幸成チーム）
- ・ がん細胞におけるシアリルルイス x、シアリルルイス a の発現機構の解明（神奈木チーム）
- ・ がん細胞における NEU3 の機能の解明（宮城チーム）
- ・ 細胞膜上の近接する分子を同定する EMARS 法の開発（本家チーム）
- ・ 新奇ホスファチジルグルコシドの構造決定と機能の解明（平林チーム）
- ・ 質量分析装置による超微量解析（木下チームの田口良および和田グループ）
- ・ インテグリンの糖鎖機能の解明（木下チームの顧グループ）
- ・ ショウジョウバエと線虫を用いて、糖鎖関連遺伝子の網羅的解析（西原チームおよび野村チーム）

(2) 医薬品開発のための基盤技術の確立

- ・ インフルエンザの感染阻止の為の基盤技術の確立（鈴木チーム）
- ・ 先天性 GPI アンカー欠損症の一つの治療法の発見（木下チーム）
- ・ 従来と作用機序の異なる感染予防薬の開発の可能性の発見（鰐田チーム）
- ・ 膵臓がんの新たな診断薬マーカーの発見（木下チームの三善グループ）
- ・ 2 型糖尿病等の生活習慣病の診断・治療につながる糸口の発見（井ノロチーム）

4) 本研究領域について

CREST は研究費が大きく、かつ柔軟に使用できるため研究者にとって、大変ありがたい制度であった。しかし競争率は非常に高く、多くの優れた研究者を不採用にせざるを得なかった。糖鎖の研究分野は、高価な分析機器が揃っていれば、比較的少ない研究費でも大きな成果が期待できるため、平均的なチーム当たりの研究費を減らして採択件数を増やすことが有効と思われる。

CREST 糖鎖の開始少し前に、糖鎖関連の特定領域研究「グライコミクス」が発足した。このため、CREST の開始と共に、糖鎖の研究者の裾野は大きく広がった。しかし、特定領域が H18 年度に終了し、今、また CREST が終了する。その後に続く大型プロジェクトが発足しないため、せっかく育った若手の研究者の育成の場が急速に狭まりつつある。糖鎖科学は、今後のポストゲノム研究分野の中でも極めて重要な分野であり、日本の糖鎖研究は世界的にトップレベルにある。糖鎖の研究を長期的に助成していくことが日本の科学技術の戦略として極めて重要であるが、これが政策に反映されていないのが現状である。

一方アメリカでは American Recovery and Reinvestment Act of 2009 NIH Challenge Grants in Health and Science Research で、糖鎖研究への fund が継続される。

糖鎖を理解している人は少ない。このため上記の国の科学技術戦略にも反映され難いと思われる。この現状を少しでも解消する必要性を痛感し、対策のひとつとして、糖鎖の専門家でない方々が理解できる比較的やさしい読み物を出版して、糖鎖についての理解を多くの人に広げることを思い立った。研究代表者全員および主な共同研究者の有志に執筆者になっていただき「“糖鎖を知る” その素顔と病気への挑戦」を JST から出版することにした。

以上