

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

木下 タロウ (大阪大学免疫学フロンティア研究センター 教授/大阪大学微生物病研究所 教授)

主たる共同研究者

池田 義孝 (佐賀大学医学部分子生命科学講座 教授)

大山 力 (弘前大学大学院医学研究科 教授)

顧 建国 (東北薬科大学分子生体膜研究所 教授)

近藤 玄 (京都大学再生医科学研究所 准教授)

鈴木 匡 ((独)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グループ糖鎖代謝学研究チーム チームリーダー)

田口 友彦(The University of Queensland Institute for Molecular Bioscience
Senior Research Officer)

田口 良 (東京大学大学院医学系研究科 教授)

三善 英知 (大阪大学大学院医学系研究科 教授) (平成 20 年 4 月 ~)

和田 芳直 (大阪府立母子保健総合医療センター研究所 所長)

菅原 一幸 (北海道大学大学院先端生命科学研究院 教授) (~平成 20 年 3 月)

3. 研究実施概要

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。

(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(Almeida, Murakami et al, *Nat Med*, 2006)。さらに NaButyrate 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(Almeida, Murakami et al, *N Eng J Med*, 2007)。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(Houjou et al, *J Lipid Res*, 2007)、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(Kanzawa et al, *Proc Natl Acad Sci*, 2009)。前立腺癌、膀胱癌、精巣腫瘍などの泌尿器悪性腫瘍および尿路感染症などの腎・泌尿器領域の疾患における糖鎖発現の意義を検討した結果、特に、前立腺特異抗原(PSA)糖鎖の癌性変化を明らかにする成果を得た。すなわち、前立腺癌由来の PSA は末端にシアル酸が alpha-2,3 で結合し、分岐した N-glycan が多いこと、正常 PSA には 2 本鎖 N-glycan はほとんど含まれず、ハイブリッドタイプや高マンノースタイプが主体であることを明らかにした(Tajiri et al, *Glycobiology*, 2008)。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、インターロイキン6を同定し、これをレクチン ELISA キットで証明した(Inohara et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008)。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(Moriwaki et al,

Gastroenterology, 2009)。糖鎖の構造多様性における平衡支配の可能性を、N-アセチルグルコサミン転移酵素-III の協同的活性調節機構の速度論的モデルから反応可逆性の定量的な解析により示唆した(論文準備中)。グリコサミノグリカン糖鎖の生合成に関わる種々の糖転移酵素と硫酸基転移酵素の遺伝子の機能発現を、動物個体および培養細胞系において解析し、神経突起伸長に重要なコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸ハイブリッド鎖の機能構造と発現パターンを明らかにした(Mitsunaga et al, *J Biol Chem*, 2006 ほか)。

- (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こることを発見し、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(Tashima et al, *Mol Biol Cell*, 2006; Maeda et al, *Mol Biol Cell*, 2007)。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なことを示し、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(Fujita M et al, *Cell*, 2009)。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(Maeda Y et al, *Nat Cell Biol*, 2008)。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(Misaki et al, *Biochem Biophys Res Commun* 2007)。また、糖脂質に依存する逆行性膜輸送経路へのリサイクリングエンドソームの関与と、その制御因子を明らかにすることができた。EGF と TGF-beta 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必要な糖鎖付加部位を同定した(Isaji et al, *J Biol Chem*,2006; Isaji et al, *J Biol Chem*,2009; Sato, et al, *J Biol Chem*, 2009)。
- (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なことがわかった(Kondoh et al, *Nat Med*, 2005)。糖タンパク質から脱離した N 型糖鎖の細胞質でのプロセッシングの全体像を明らかにすることを目指し、遊離糖鎖の微量簡便定量法を確立した(Suzuki, et al, *Anal Biochem*, 2008)。さらに、細胞質マンノシダーゼの Man2C1 が、分解経路においてマンノースの刈り込みに働くことを証明した(Suzuki, et al, *Biochem J*, 2006)。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

研究代表者の GPI アンカーの生化学的研究に関して、世界をリードする優れた研究成果が生まれた。英国で発見された先天性 GPI アンカー欠損症が、GPI アンカー 生合成の低下のために起こり、それが PIGM 遺伝子のプロモーターの変異によることを明らかにした。さらに NaButyrate 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、英国のグループによって治療に用いられた。また GPI のジアシル型から1アルキル2アシル型への変換には、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発見した。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 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なことを示し、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1つを明らかにした。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。これらの研究成果は、*Nat. Med.*, *PNAS*, *Cell*, *Nat. Cell Biol.*などのトップジャーナルに掲載されている。

共同研究者の成果としては、前立腺がん由来の PSA は末端にシアル酸が α -2,3 で結合し、分岐した *N*-グリカンが多いこと、正常 PSA には 2 本鎖 *N*-グリカンは殆ど含まれないことを見出した。

膵がん細胞が分泌する IL6 がフコシル化ハプトグロビンの産生誘導に関与することを見出し、膵がんマーカー候補である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。

精巢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を見出した。

これらの成果は、136 の原著論文に発表され十分な成果が得られた。

特許を標的にした研究組織ではないが、国内出願15件、海外出願 4 件が出願されている。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

研究代表者らのミュータント細胞を得て、原因遺伝子を追求し新たな代謝経路や輸送経路を発見していく戦略は非常に優れており、世界の糖鎖研究の中で抜きん出ている。GPI アンカータンパクの GPI 部分の 生合成と輸送に於いて、脂質部分や糖鎖の改変がラフトや ER への移行に関連していることを世界に先駆けて発見した意義は非常に大きく、糖鎖修飾、輸送のみならずラフト糖鎖科学の進展に大きく寄与した。世界の最先端をリードする研究であり、その重要度も高い。

共同研究者の成果としては、前立腺がんマーカーとして利用できる可能性のあるものの発見や、GPI アンカー型タンパク質の遊離による受精能獲得など医学的にも重要な発展が期待できる。膵がんマーカーについては、JST の社会還元を促進するテーマに採択され、ELISA キットのバリデーションを行う。

4-3. 総合的評価

優れた研究代表者と多くの若手メンバーによって構成されたチームであるが、代表者はチームを良くまとめると共に、素晴らしい研究業績を挙げた。本領域の中でも最も成果の上がったチームである。

GPI アンカー型タンパク質を利用した膜輸送系の研究の進展が期待できる。今後更に細胞機能との関連が解明されることが期待される。

以上