

研究課題別評価

1 研究課題名: 糖鎖構造マスターコントロール遺伝子群による細胞機能の制御と創薬研究への応用

2 研究者氏名: 豊田英尚

3 研究のねらい:

細胞表面の糖鎖が細胞間の情報伝達に重要な役割を担っていることは周知の事実になりつつある。しかしながら糖鎖構造は複数の糖鎖合成関連遺伝子の共同作業によって完成するため、どのようなメカニズムでゲノムの支配下にあるのかよくわかっていない。糖鎖生合成の主な担い手は糖転移酵素であり、様々な糖転移酵素が整然とゴルジ装置のコンパートメント内に並んで機能していると考えられるが、糖鎖構造の秩序ある多様性や、発生や分化に対応した正確な変化を理解するためには、これらの糖転移酵素群がどのようにしてゲノムに支配されているかを解明する必要がある。すなわち、糖鎖機能を遺伝子レベルで明らかにするためには、糖鎖の生合成にかかわる既知の遺伝子群に働きかけて糖鎖構造を支配する、マスターコントロール的な制御機構を明らかにしなくてはならない。そこでショウジョウバエ機能獲得変異体を用いたスクリーニング法を用いてこの新しいタイプの糖鎖遺伝子群を探索し、細胞機能制御の仕組みを理解すると同時に、その情報を応用した創薬研究を試みた。

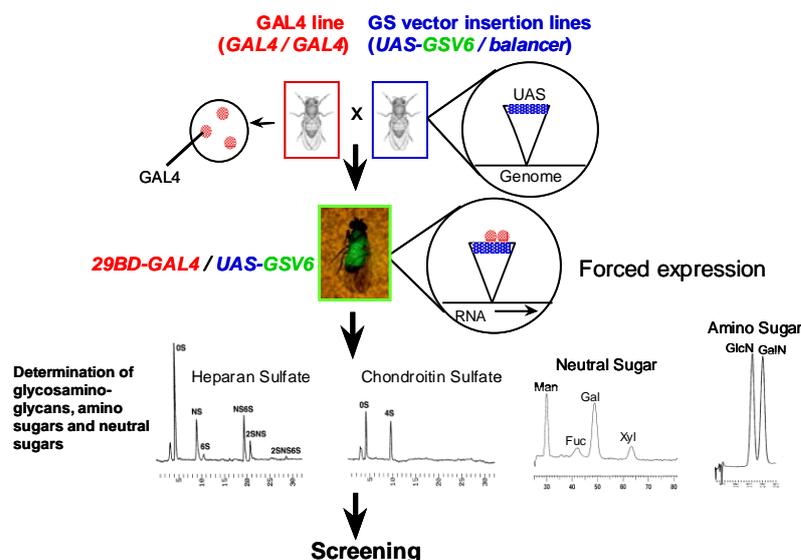
4 研究成果:

1) ショウジョウバエを用いた新規糖鎖遺伝子の探索とプロテオームおよびグライコーム解析法の確立

酵母転写因子 GAL4 の認識配列 UAS を含むP因子ベクターの挿入系統と、GAL4 を発現する個体を交配させることにより、遺伝子を過剰発現している機能獲得変異体を網羅的に作製し、表現型の観察とともに糖鎖分析を行うことで機能未知の糖鎖遺伝子をスクリーニングした(図参照)。スクリーニングの簡便・迅速化のために、ショウジョウバエ糖鎖の微量分析法を検討し、10匹以下のショウジョウバエを用いて正確な分析結果を出せる方法を検討した。

糖組成分析: 2-シアノアセトアミドを用いた蛍光ポストカラムHPLCを用いて、ショウジョウバエ10匹を用いてアミノ糖および中性糖の一斉分析を可能にした。ショウジョウバエが産生する複合糖質

遺伝子過剰発現系による新規糖鎖遺伝子のスクリーニング



質の中性糖は主に Fuc, Gal, Man, Xyl から、アミノ糖は主に GalN と GlcN から構成されており、哺乳動物と同様の構成単糖からなることが示された。

グリコサミノグリカンの二糖組成分析: 本プロジェクトの開始前に、ショウジョウバエが産生するグリコサミノグリカンの、蛍光ポストカラムHPLCによる二糖組成分析法を報告したが(Toyoda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275, 2269-2275, 2000), この方法では、測定にショウジョウバエ 100匹を必要とする。詳細な検討の結果、10匹のショ

ウジョウバエを用いてグリコサミノグリカンの二糖組成分析に成功し、簡便・迅速なスクリーニングが可能になった。

以上の方法を用いて機能未知の約 1,000 遺伝子を探査して新規糖鎖遺伝子候補を選び出した。また、選び出した遺伝子の機能解析のため、微量のショウジョウバエを用いたプロテオーム解析のプロトコルを新たに確立した。さらに、ショウジョウバエの *N*-結合糖鎖およびムチン型糖鎖の解析法を確立することに成功し、ショウジョウバエ グリコサミノグリカンの解析法と合わせて、新規糖鎖遺伝子の機能解析に用いるグライコーム解析法を完成することができた。その成果を、ショウジョウバエのみならず、線虫、培養細胞等の様々な生体試料に応用した¹⁻⁸⁾。

2) *Unbalanced amino sugars (unbas)* 遺伝子群の発見

ショウジョウバエの複合糖質を構成しているアミノ糖はグルコサミンとガラクトサミンであり、その組成比は発生段階に応じて正確に変動していた。スクリーニングの結果、強制発現によりグルコサミンとガラクトサミンの産生量を野生型と比べて大きく変動させる遺伝子群を見いだした。その中の一つ、*unbas-1* は種を越えてよく保存されており、ヒト、マウス、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、線虫、シロイヌナズナなど、全ての多細胞生物に非常に高い相同性をもつ遺伝子が存在していた。*Unbas-1* は7回膜貫通領域を有するレセプター用の構造を取っていることが推定され、強制発現によってムチン型糖鎖を増加させることが明らかになった。*unbas-1* は現在研究されている糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体をコードする従来の糖鎖遺伝子とは全く異なり、糖鎖合成に関して上位で糖転移酵素等を制御している新しいタイプの“糖鎖遺伝子”と予想される。このことは糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体を制御している未知のシグナル伝達系の存在を強く示唆している⁸⁻¹⁰⁾。また主に *N*-結合糖鎖の産生にかかわっていると予想される *unbas-2* や、*N*-結合糖鎖およびムチン型糖鎖の産生に影響を与え、グリコサミノグリカンは変化させない *unbas-3* を発見し解析中である。

3) *Glycomaster* 遺伝子の発見

unbas 遺伝子群は、それぞれ特定のタイプの糖鎖合成に作用を及ぼすが、これらとは別に、広範な糖鎖合成に関与する新規糖鎖遺伝子を探査した。その結果、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、アミノ糖、中性糖全てが変動する一系統を発見し、原因遺伝子を *Glycomaster-1* と命名した。FGF, Wnt, Hh, Dpp, Notch が関与するシグナル伝達系を制御しているヘパラン硫酸も大きく変化することから、*Glycomaster-1* は糖鎖を介した数多くの機能発現に関与していることが推察された。最近、コンドロイチンが初期胚の形態形成や細胞分裂の完結に必須であることが線虫の *Sqv-5* 変異体を用いて報告され、ヘパラン硫酸のみならずコンドロイチン硫酸のもつ種を越えた重要性も注目されている。*Glycomaster-1* はショウジョウバエのコンドロイチン硫酸産生にも深く関与しており、詳細を解析中である¹¹⁾。

今後の展開

さきがけ研究により、糖鎖合成の担い手である糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体を上位でコントロールしていると予想される複数の遺伝子が発見した。今後、ホモロジーサーチにより様々な相同遺伝子、あるいは共通モチーフ構造を有するファミリーを検索し、糖鎖機能発現機構の網羅的解明に発展させる予定である。また、本研究の目的は、新しいタイプの糖鎖遺伝子群を探査して細胞機能制御の仕組みを理解するのみならず、その情報を応用した創薬研究を試みることである。そこで、全ての多細胞生物に相同遺伝子が存在し、ムチン型糖鎖の産生を増加させる *unbas-1* に注目した。ムチン型糖鎖は糖鎖研究の中でも未解決の問題が非常に多く、また研究しにくい糖鎖であるが、生体防御システムと密接な関係がある。そこでヒト培養細胞を用いてショウジョウバエ *unbas-1* の相同遺伝子の機能解析を開始した。今後 *unbas-1* がムチン型糖鎖の制御を介して生体防御反応にどのように関係しているかを追究し、創薬研究へ発展させたいと考えている。

5 自己評価:

本研究の目的とする新規の遺伝子は、既知の遺伝子の情報を基にしたホモロジー検索では絶対に見つからない。糖鎖構造は糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体の発現量や活性測定を行っても明らかにすることができず、常に化学的な分析で実際に調べてみるしか方法がない。従って、本研究で用いた糖鎖の化学分析を基盤とするスクリーニング法は非常に優れた戦略である。しかしながら、手間のかかるスクリーニングを簡便・迅速にするための分析法の微量化や、当初、比較的簡単に確立できると予想していたショウジョウバエの *N*-結合糖鎖およびムチン型糖鎖の解析法を検討するのに予想外の時間を取られてしまった。そのため、*unbas-1*, *unbas-2*, *unbas-3*, *Glycomaster-1* といった魅力的な遺伝子が発見できたにもかかわらず、研究期間内に十分な機能解析を終了させることが出来なかった。今後、特許申請を見据えた遺伝子機能の解析を継続したい。

6 研究総括の見解:

糖鎖構造を制御するマスターコントロール遺伝子群を明らかにする壮大な研究であったが、地道な生化学的手法を駆使して、糖鎖構造に変化をもたらす *unbas-1*, *glycomaster-1* など、従来からの糖転移酵素や糖ヌクレオチド輸送体の遺伝子とは異なる糖鎖関連遺伝子を同定したことは高く評価できる。これら新しいタイプの遺伝子の機能解明により、マスターコントロールとしての意義が明らかにされることを期待する。

7 主な論文等:

原著論文

1. H. Morio, Y. Honda, H. Toyoda, M. Nakajima, H. Kurosawa and T. Shirasawa: EXT gene family member *rib-2* is essential for embryonic development and heparan sulfate biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 301: 317-23, 2003
2. H. Barth, C. Schafer, M.I. Adah, F. Zhang, R.J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T.H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H.E. Blum and T.F. Baumert: Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. **J. Biol. Chem.** 278, 41003-41012, 2003
3. S. Kamiyama, T. Suda, R. Ueda, M. Suzuki, R. Okubo, N. Kikuchi, Y. Chiba, S. Goto, H. Toyoda, K. Saigo, M. Watanabe, H. Narimatsu, Y. Jigami and S. Nishihara: Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporte. **J. Biol. Chem.** 278: 25958-25963, 2003
4. S. Nishihara, R. Ueda, S. Goto, H. Toyoda, H. Ishida and M. Nakamura: Approach for functional analysis of glycan using RNA interference. **Glycoconj. J.** 21: 63-68, 2004
5. H. Yano, M. Yamamoto-Hino, M. Abe, R. Kuwahara, S. Haraguchi, I. Kusaka, W. Awano, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, and S. Goto: Distinct functional units of the Golgi complex in *Drosophila* cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102: 13467-13472, 2005
6. Y.W. Ha, B.T. Jeon, S.H. Moon, H. Toyoda, T. Toida, R.J. Linhardt and Y.S. Kim.: Characterization of heparan sulfate from the unossified antler of *Cervus elaphus*. **Carbohydr. Res.** 340: 411-416, 2005
7. P. Vongchan, M. Warda, H. Toyoda, T. Toida, R.M. Marks and R.J. Linhardt: Structural characterization of human liver heparan sulfate. **Biochim. Biophys. Acta** 1721: 1-8, 2005

学会発表

8. 豊田英尚、吉田真記、岡野奈穂子、伊藤美樹子、細山沙織、豊田亜希子、戸井田敏彦: 複合糖質の超微量分析法の開発と糖鎖機能発現遺伝子探索への応用。第 16 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム 富士吉田 (2003)
9. H. Toyoda: Comparative structural analysis of glycosaminoglycans in model organisms. 第 76 回日本生化学会 横浜 (2003)

10. 豊田 英尚:モデル生物を用いた糖鎖機能の分析科学。第125回 日本薬学会 東京 (2005).
11. 豊田英尚、鈴木淳、吉田真記、戸井田敏彦、相垣敏郎、豊田亜希子:ショウジョウバエ機能獲得変異体を用いた新規糖鎖遺伝子の包括的研究。第25回 日本糖質学会 大津 (2005)