

## 研究課題別事後評価結果

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： 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)

主たる共同研究者：

三谷 昌平(東京女子医科大学医学部 教授)

川崎 ナナ(国立医薬品衛生研究所生物薬品部 部長)

山下 克子(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)

北川 裕之(神戸薬科大学薬学研究科 教授)

金井 好克(大阪大学大学院医学系研究科 教授)

3. 研究内容及び成果：

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には、糖鎖遺伝子の機能を破壊してどのような影響がでるかを調べる **Functional Glycomics**の研究が有望である。しかし遺伝子破壊の結果を調べようとしても体の不透明なマウスやカエル、ショウジョウバエなどでは制約が多すぎる。線虫 *Caenorhabditis elegans*はこうした制約のないすぐれたモデル生物である。線虫ではRNA干渉法による遺伝子機能阻害や遺伝子破壊株の取得が容易で、ヒトと共通の多くの糖鎖遺伝子をもつため、線虫を用いた糖鎖研究は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。さらに遺伝子機能の阻害方法や遺伝子発現の検出方法の開発、糖鎖検出技術の開発・改良およびプロテオーム解析技術の開発も進めた。同時並行で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の解析結果を行い、線虫での研究に反映させながら研究し、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。以下に各サブグループの主な研究成果をまとめる。

**野村一也 グループ**:ヒトの糖鎖遺伝子の線虫オースログ遺伝子として 150 個以上の遺伝子を同定した。全遺伝子について網羅的に機能阻害実験を行い、激しい表現型がみられる遺伝子を選びだして、それらを個別に詳細に解析するという戦略で研究した。その結果、4割以上の糖鎖遺伝子が細胞分裂や胚発生・形態形成、生存、行動などに不可欠であることを見だし、糖鎖遺伝子の多細胞生物での重要性が確認できた。線虫初期胚の細胞分裂にコンドロイチンの糖鎖が不可欠であるという我々の発見をもとに研究を進めた結果、コンドロイチン重合化因子も細胞分裂に関わっていることを明らかにし、川崎グループと共同で細胞分裂に関わるコンドロイチンコア蛋白質を同定した。さらに N 型糖鎖の合成に関わる遺伝子の一つもその機能を阻害すると細胞分裂異常を引き起こすことを発見し、糖鎖の細胞分裂への関与という新たな研究視点を確立する成果が得られた。ヘパラン硫酸合成遺伝子についても詳細に解析し、胚発生や神経回路網形成に不可欠だが初期胚の細胞分裂には関与しないことを明らかにした。糖脂質の合成に関わる各種遺伝子の機能を破壊すると胚発生異常や行動異常などを引き起こすことも発見し、糖脂質の発生・行動などへの積極的関与を明らかにした。また糖鎖の硫酸化に関わる PAPS 合成酵素や PAPS トランスポーター、さらに GPI アンカー合成に関わる全遺伝子の機能阻害によって硫酸化や GPI アンカー蛋白質が発生の各種局面で不可欠の役割を果たしていることを発見した。プロテオーム解析技術も開発し、少量の試料で安価な高度の二次元

電気泳動解析が可能となった。

**三谷昌平 グループ:**線虫の糖鎖遺伝子の欠失破壊株を世界最速スピードで取得し、解析した。また欠失変異体株の取得法の改良を行った。さらに GFP などの蛍光蛋白質を利用した発現解析とそれに最適なベクター系の開発にも成功し、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 での役割の解明、細胞膜脂質のアポトーシスでの役割の解明などを進めた。RNAi の効率化のために、そのメカニズムの解明を RNAi の発見でノーベル賞を受賞した Mello 博士らと行い、解析しにくい遺伝子の RNAi 法の開発にも成功した。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。

**川崎ナナ グループ:**糖鎖遺伝子の機能阻害株と野性株のプロテオーム解析による比較やコンドロイチン糖鎖の構造解析、線虫コンドロイチンコア蛋白質の同定、GPI アンカー型蛋白質の同定手法の開発、線虫における微量のシアル酸の存在の可能性の検討などを行った。主として質量分析技術の開発とその線虫への応用研究を担当した。

**山下克子 グループ:**ヒト糖鎖遺伝子の解析を進めながら、その知識に基づいて線虫での糖鎖機能を解析し、ヒトや哺乳類では解析不可能な局面を線虫で研究して、その成果をヒトでの糖鎖機能の解明に役立てるという戦略で研究を進めた。線虫糖鎖構造の解析、ポリ酸の硫酸転移酵素やシアル酸転移酵素への影響の解析と線虫への影響の解析、線虫の PAPS 合成酵素活性の同定などを、まず研究した。次に従来研究してきた細胞内小胞輸送蛋白質群の機能解析を線虫の遺伝子遺伝子破壊株を駆使して進めたほか、線虫のガレクチンが細菌感染防御に関わっていることを発見し、病原菌感染制御にレクチンが関わっているという画期的可能性を明らかにした。

**金井好克 グループ:**トランスポーターの専門家として線虫におけるトランスポーターの解析を担当した。哺乳類アミノ酸トランスポーターにおける糖鎖の関与の研究を皮切りに、線虫のアミノ酸トランスポーターファミリーの解析、acetyl CoA トランスポーター、PAPS トランスポーター他のトランスポーター群の解析を行い、アフリカツメガエルの卵母細胞での線虫の遺伝子産物の発現と解析、プロテオリポソームなどを利用した解析などを行った。

**北川裕之 グループ:**線虫におけるコンドロイチンやヘパラン硫酸の合成遺伝子の詳細な解析を行うとともに、ヒトにおけるコンドロイチン合成酵素、重合化因子などの研究でコンドロイチン合成メカニズムの全容を解明した。さらにショウジョウバエを用いてのヘパラン硫酸の生合成機構の解明、哺乳類でのヘルペスウイルスの初期感染に関わるコンドロイチン硫酸の硫酸鎖の解明を行った。硫酸化コンドロイチンを線虫でも初めて検出し、その合成に関わる遺伝子の検索も進行中である。さらにマウス初期胚でのコンドロイチン合成が細胞分裂に必須であるという実験結果も得ており、糖鎖の細胞分裂での役割の普遍性を明らかにできた。また Wnt シグナルネットワークへのコンドロイチンの関わりも明らかにして、線虫を用いた詳細な遺伝子ネットワーク解明の基礎とした。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

バイオインフォマテックスを利用しながらヒトの糖鎖関連遺伝子の線虫オースログを網羅的に抑制・ノックアウトをして、コンドロイチン、GPI アンカー関連遺伝子、細胞輸送に関わるレクチンなどを解析したことは、当初の目的を一応達成していると思える。全ての遺伝子機能を解析するには時間も研究費も到底足りない為、今後は線虫の特性を生かして、どの遺伝子を解析すべきか、方向性を見定める必要がある。

論文発表の大半は共同研究者によるものであり、研究代表者による論文はほとんどない。

原著論文 46 件      招待講演 39件      口頭発表 44 件  
特許出願 国内 2 件      海外 0 件

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

線虫の糖鎖関連遺伝子の網羅的な研究という点では、世界で他に類がない。線虫の遺伝子変異体作製技術、RNAi の経験の蓄積、4 次元共焦点顕微鏡での観測・解析技術、プロテオーム解析手段、糖鎖配列決定法などの周辺技術開発はかなり進んだ。モデル生物としての線虫の利点を利用できる実験系を見つけて更なる研究成果を期待したい。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

原著論文のほとんど全てが共同研究者のグループによる発表であることから、本プロジェクトにおける共同研究者の役割は大きく、反面研究代表者はもう少しリーダーシップを発揮すべきであった。今後、研究代表者はこれまでの未発表成果を論文にまとめ、更に CREST で拡充された設備を活用し線虫を使って、糖鎖の生物学的に重要な機能を発見して欲しい。

以上