

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」
研究課題「RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術
の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：西原祥子
(創価大学工学部生命情報工学科、
教授)

1 研究実施の概要

(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ことはできない。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」を目的とした。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った。

(実施方法)

本研究では糖鎖の複雑性の基礎となる糖転移酵素をまず取り上げた。多くの高等動物では糖転移酵素遺伝子が 200 種以上と予想され、すべてに対するターゲットマウスの作成は困難である。我々は、糖転移酵素の分子進化学的な解析から、ショウジョウバエではそのうち 92 種が保存され、大部分は基本的な糖鎖構造を作るために必要なものであることを確認した。つまり、ハエをモデル系にしてヒトの基本的な糖鎖機能を解析できると考えられた。

ハエでは、上田により GAL4-UAS 遺伝子強制発現法を利用した「誘導型 RNAi 変異体システム」が新規に開発されており、多数の遺伝子を短時間に解析する方法が確立していた。我々は、ヒト、及び、哺乳類糖鎖関連遺伝子に対応する 257 個のハエ候補遺伝子を選出し、(1)それらに対する RNAi 変異体の網羅的作成と解析を、本システムを用いて行った。さらに、(2)網羅的解析の過程で見出された注目すべき遺伝子に対するより詳しい解析、(3)コアタンパク質を固定した糖修飾機構の解析、(4)各種糖鎖機能解析関連技術の開発も、併せて行った。また、ハエの網羅的解析結果のヒトや哺乳類への還元を目的として、(5)ヒト培養細胞における RNAi 技術の開発、(6)注目すべき遺伝子に対する胚性幹細胞(ES 細胞)を用いた解析、及び、(7)注目すべき遺伝子に対するノックアウトマウスの作成も行った。

(研究成果)

(1) ショウジョウバエにおける糖鎖関連遺伝子 RNAi 変異体の網羅的作成と解析

(1-1) 糖鎖関連遺伝子 RNAi 変異体の網羅的作成と解析

ショウジョウバエゲノム配列から推定される糖鎖関連遺伝子について、GAL4-UAS 遺伝子強制発現法を利用した「誘導型 RNAi 法」を用いて変異体作成を行った。14,141 個の遺伝子より糖鎖関連遺伝子と推定される遺伝子、糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体、レクチン、コアタンパク質、糖鎖分解酵素などの候補遺伝子を選択した。257 個の候補遺伝子より、202 個(79%)について RNAi 用のベクターを構築し、ハエに形質転換して 362 系統の RNAi 変異体ハエを樹立した。これらのハエを利用して全細胞、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。なお、RNAi 法の確実性を担保するため、Off-target 検索データの検討を行い、注目すべき重要な遺伝子に対しては、遺伝子配列の異なった部分をターゲットする変異体も重複して作成した。

(1-2) 糖鎖合成関連遺伝子 RNAi 変異体の形態形成を指標とした網羅的機能解析

糖転移酵素、及び、糖ヌクレオチド輸送体を中心とした糖鎖合成関連遺伝子に対して、形態形成を指標とした網羅的機能解析を行った。これに先立ち、全細胞、全発生ステージで RNAi を誘導し

たところ、76%で発生致死となり、(1-1)に記したレクチンや糖鎖分解酵素を含む糖鎖関連遺伝子全体の 62%に比較して高い致死性を示した。この結果は、糖転移酵素の欠損に由来する遺伝病が糖鎖分解酵素に由来するものに比較して少ない事実と符合するものであり、ショウジョウバエのようなモデル生物を用いた解析が遺伝病の病因論へも適用できる可能性を示すものであった。

組織特異的、あるいは、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。N-結合型糖鎖の合成に関与する糖転移酵素群は、中程度の致死性と中程度の形態形成異常の出現を示した。一方、O-結合型糖鎖のうち、プロテオグリカン型(グリコサミノグリカン鎖)、O-Fuc、O-GlcNAc、O-Man などのムチン型糖鎖以外の糖鎖合成に関与する糖転移酵素群では、高い致死性と高い形態形成異常の出現が観察された。しかし、ムチン型糖鎖の合成に関与する糖転移酵素群では、致死性は高かったが、形態形成異常の出現率は低く、糖鎖の種類による機能分担が示唆された。

さらに、各々の遺伝子における翅や複眼の形態形成異常を詳細に観察した。各遺伝子は、その表現型により 3 種のグループにクラスタリングされた。各酵素遺伝子を同定したところ、グループ 1 には、グリコサミノグリカン鎖の合成に関わる糖転移酵素、グループ 2 には、Notch 関連の糖鎖合成に関わる糖転移酵素、グループ 3 には、一部の N-結合型糖鎖合成に関わる糖転移酵素が集まっていた。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。また、グループ 1 からは、コンドロイチン硫酸の形態形成における機能が、グループ 3 からは、N-結合型糖鎖の形態形成における機能が、新たに示された。さらに、同じ糖鎖を生成する酵素でも、糖鎖の根元側(還元末端側)の合成に関与する酵素では重篤な表現型が得られ、糖鎖の末端側(非還元末端側)の合成に関与する酵素では多様で軽微な表現型が得られた。この事実は、糖鎖の末端側には多様性があり、機能が分化している可能性を示していた。

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。糖鎖機能の網羅的な解析はほとんど行われておらず、本研究は、糖鎖研究に重要な知見を提供し、糖鎖の基本機能の全体像解明へ大きく寄与するものと考ええる。

(2) 網羅的解析の過程で見出された注目すべき遺伝子に対するより詳しい解析

(1)に示した網羅的解析の過程で見出された注目すべき遺伝子に対して、個々のより詳しい解析を行うことにより、各糖鎖関連遺伝子に関わる糖鎖の生理機能をより詳細に検討した。

(2-1) O-マンノース転移酵素 (POMT: protein O-mannosyltransferase)

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-結合型糖鎖修飾の異常、すなわち、O-Man 型糖鎖構造の異常が報告されている。本糖鎖構造の機能を明らかにするために、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、RNAi ノックダウン体と変異体を用いて解析を行った。

dPOMT1、dPOMT2 それぞれの RNAi 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、両者には遺伝学的相互作用が認められた。さらに、両変異体の幼虫で、筋肉の欠失が高頻度に観察された。また、dPOMT1 と dPOMT2 の組み換えタンパク質の POMT 活性を測定したところ、それぞれ単独の発現では活性は検出されなかったが、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 はヘテロ重合体を形成し、筋発生に関与している可能性が示された。筋肉の欠失を指標とした遺伝学的相互作用解析により、本遺伝子の機能に関わる遺伝子ネットワークを明らかにできるものと期待される。

(2-2) *O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT: polypeptide *O*- β -*N*-acetylglucosaminyltransferase)

O-GlcNAc 転移酵素(OGT)は、細胞質に存在する唯一の糖転移酵素であり、細胞質や核に存在するタンパク質の糖鎖修飾を担っている。*O*-GlcNAc 修飾の機能について、ショウジョウバエの精子形成過程に着目して解析を行い、精子形成過程で核膜孔複合体上の *O*-GlcNAc 修飾がダイナミックに変化することを見出した。OGT のノックダウン、あるいは、*O*-GlcNAc 加水分解酵素を過剰発現させて解析したところ、*O*-GlcNAc 修飾が核膜孔の安定性に関与している可能性が示された。

(2-3) プロテオグリカンガラクトース転移酵素II (β 3GalTII: proteoglycan galactosyltransferase II)

グリコサミノグリカン鎖のリンケージ領域の合成に関わるショウジョウバエプロテオグリカンガラクトース転移酵素 II (β 3GalTII) を同定した。RNAi 変異体のヘパラン硫酸プロテオグリカンは減少しており、 β 3GalTII は、生体内でヘパラン硫酸の合成を通じて、翅、及び、複眼の形成に関わっていることがわかった。さらに、ノックダウン領域で細胞外 Wingless の減少が観察され、 β 3GalTII が Wingless の安定性に寄与している可能性が示唆された。

(2-4 ~ 8) その他の転移酵素

その他、糖転移酵素に関しては、(2-4)グルクロン酸転移酵素群、(2-5) α 1,3 フコース転移酵素 A、(2-6) β 1,4-*N*-アセチルガラクトザミン転移酵素-A、(2-7)コア 1 β 1,3 ガラクトース転移酵素群、また、(2-8)硫酸転移酵素群についても、個別に解析を行った。

(2-9) 糖ヌクレオチド輸送体群

糖ヌクレオチド輸送体は、細胞質、あるいは、核で合成された糖ヌクレオチドをゴルジ体や小胞体内腔に輸送し、糖転移酵素のドナー基質を供給している多重膜貫通タンパク質である。糖ヌクレオチド輸送体群の網羅的機能解析の過程で、2 種の新規ショウジョウバエ PAPS 輸送体遺伝子、*dPAPST1*(*slalom*)と *dPAPST2* を同定した。真核生物における膜タンパク質および分泌タンパク質の硫酸化には、高エネルギー型硫酸ヌクレオチドである PAPS が硫酸転移酵素のドナー基質として利用される。細胞質又は核で合成された PAPS は、ゴルジ体の膜に存在する PAPS 輸送体を介してゴルジ体内腔へ運び込まれる。生化学的解析、及び、RNAi 変異体を用いた解析から、*dPAPST1* と *dPAPST2* はゴルジ体内腔に PAPS を輸送することにより、プロテオグリカンの硫酸化に必要な基質を供給していることが、明らかになった。なお、本研究は、PAPS 輸送体の単離同定の初めての例となった。

(3) コアタンパク質を固定した糖修飾機構の解析

糖修飾機構を詳細に解析するために、コアタンパク質を含めた解析を行った。まず、ショウジョウバエの視神経の発生に必要な糖タンパク質 chaoptin を同定し、その糖鎖構造を詳細に解析した。次に、同定した糖鎖付加位置に変異を導入し、糖鎖が付加できない変異タンパク質を作成した。chaoptin は細胞接着因子なので、変異タンパク質の接着活性を調べたところ、その活性を失っていることがわかった。さらに、chaoptin の糖修飾に必要な遺伝子の検索も行い、糖修飾に必要な新規遺伝子群を発見することができた。

(4) 各種糖鎖機能解析関連技術の開発

ショウジョウバエ RNAi 変異体の網羅的機能解析を円滑に行う目的で、(4-1)糖鎖構造の微量解析法の開発、(4-2)有用糖鎖合成技術の開発、(4-3)糖鎖チップ、及び、糖鎖固定化金ナノ粒子作成解析技術の開発を行った。

特に、(4-1)においては、糖鎖分析法全般をセミマイクロ化することで高感度化を達成し、ショウジョウバエ1匹から様々な糖鎖構造を解析することが可能となった。その結果、ハエのみならず、レーザーマイクロディセクションを用いて得られる組織切片上の領域特異的糖鎖解析法も確立することができた。また、(4-3)においては、グリコサミノグリカン鎖と結合するタンパク質の解析を行い、ヘパリンやコンドロイチン硫酸といった高分子グリコサミノグリカン鎖を固定化したチップを用いて、種々の成長因子やシグナル伝達に関係するタンパク質との結合挙動を観測した。特に Wnt3a とヘパリンとは顕著な結合相互作用を示し、解離常数は 26 nM であった。

(5～7) 注目すべき遺伝子の哺乳類細胞における解析

(1)～(3)に示したショウジョウバエにおける糖鎖関連遺伝子の網羅的機能解析の結果をヒトや哺乳類へ還元することを目的とし、(5)ヒト培養細胞における RNAi 技術の開発、(6)注目する遺伝子の胚性幹細胞(ES 細胞)における解析、(7)注目する遺伝子のノックアウトマウスの作成を行った。

特に(6)では、ヘパラン硫酸の合成に関与する遺伝子群に注目し、マウス ES 細胞で各遺伝子を RNAi 法によりノックダウンした。細胞表面のヘパラン硫酸の低下が認められ、これに伴って、ES 細胞の未分化性の低下と多能性の喪失が認められた。さらなる解析を行ったところ、ヘパラン硫酸を介した Wnt/ β -catenin シグナルが ES 細胞の未分化性維持因子である Nanog の発現に必須であることが明らかになった。この結果、ヘパラン硫酸は、マウス ES 細胞の未分化性と多能性維持に必要な因子であることが、初めて、明らかになった。

また、(7)においては、糖鎖の硫酸化の役割を明らかにする目的で、PAPS 輸送体 1 に対するノックアウトマウスを作成した。

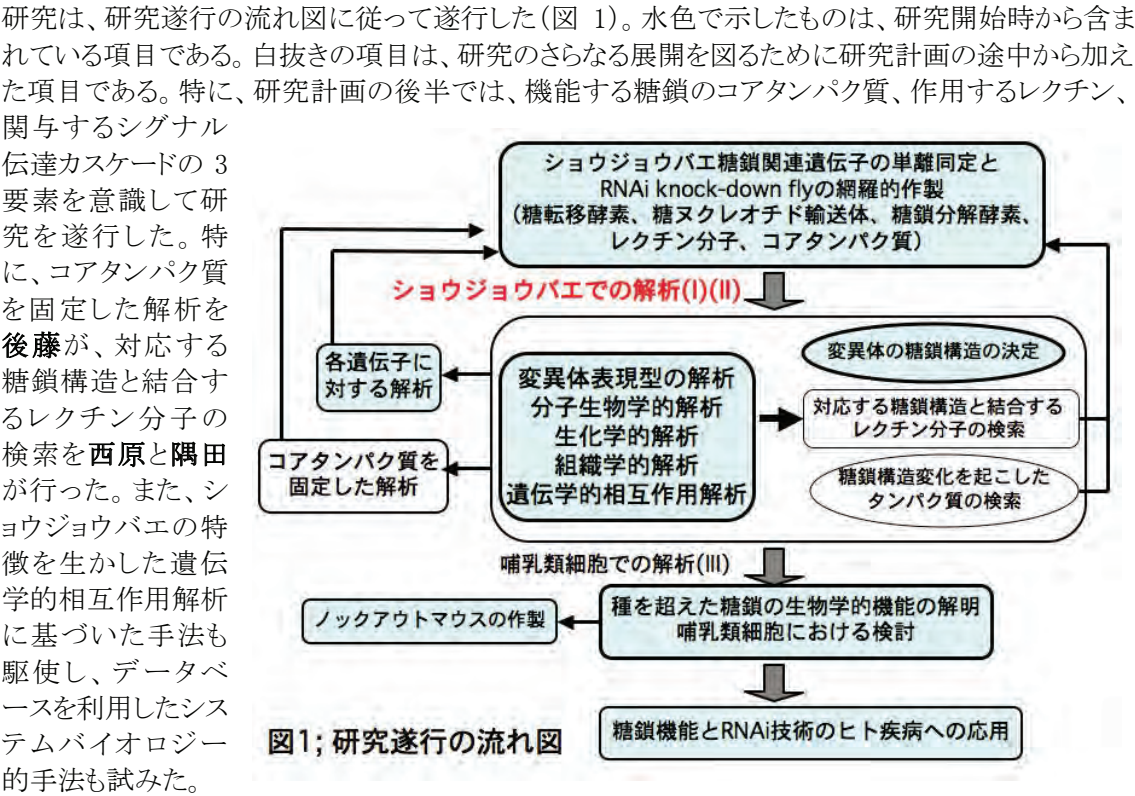
以上、(1)から(7)に示した「ショウジョウバエ RNAi 変異体システムを用いた糖鎖関連遺伝子の網羅的機能解析」から、「共通する糖鎖機能の哺乳類細胞(ES 細胞)における解析」に至る過程で、当初の目的である「糖鎖の基本機能の全容の個体レベルでの把握」は、ほぼ達成できた。本研究は、網羅的糖鎖機能の解析のほとんど初めての例であり、糖鎖研究に重要な知見を与えるものと考えられる。また、本研究過程で明らかになってきた「種を超えて保存されている糖鎖機能」の1つをマウス ES 細胞で検証し、「ES 細胞の未分化性・多能性維持と糖鎖の関連」を明らかにできたことも意義深い。現在、研究は、次の段階に入っており、システムティックな遺伝学的相互作用解析とシステムバイオロジー、また、糖修飾スクリーニングとシステムバイオロジー、を組み合わせることにより、生化学的な解析手法からは得られない新たなシグナル伝達カスケードに関わる分子種や糖修飾に関わる新たな遺伝子群を見出すこともできている。モデル動物ショウジョウバエの特色を生かした新しい糖鎖研究を基礎にして、ハエと共通なシグナル伝達経路が鍵となる幹細胞系や各種疾病モデルへ RNAi 法を適用することにより、「糖鎖の種を超えて保存されている生理機能」のさらなる解明とヒトへの応用を、今後も行っていくたい。

2 研究構想及び実施体制

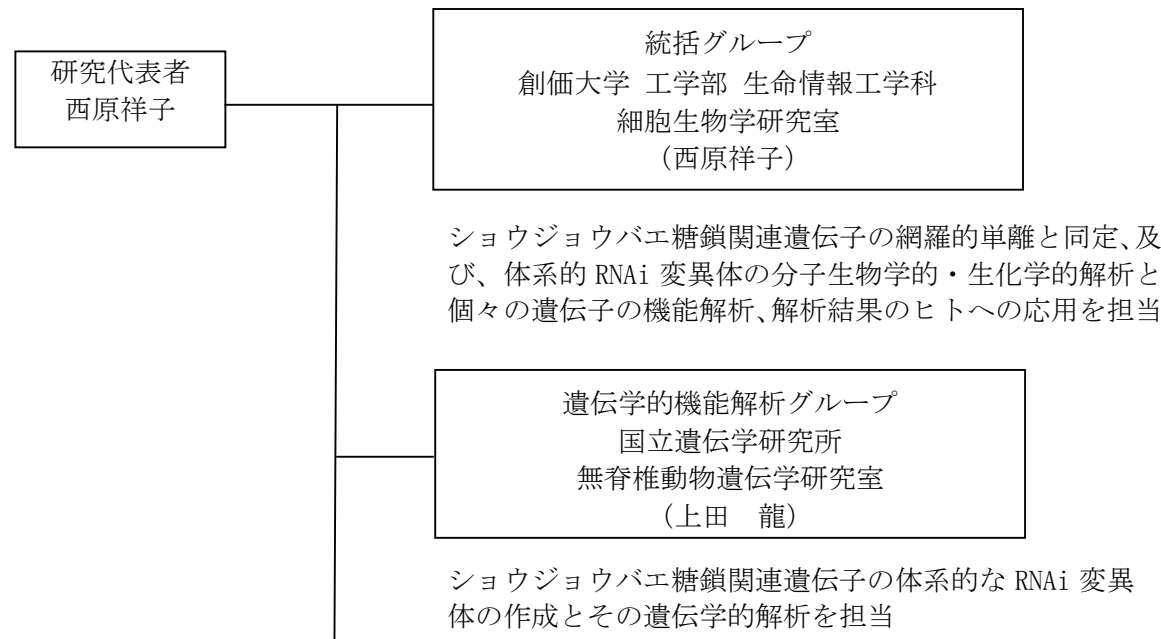
(1) 研究構想

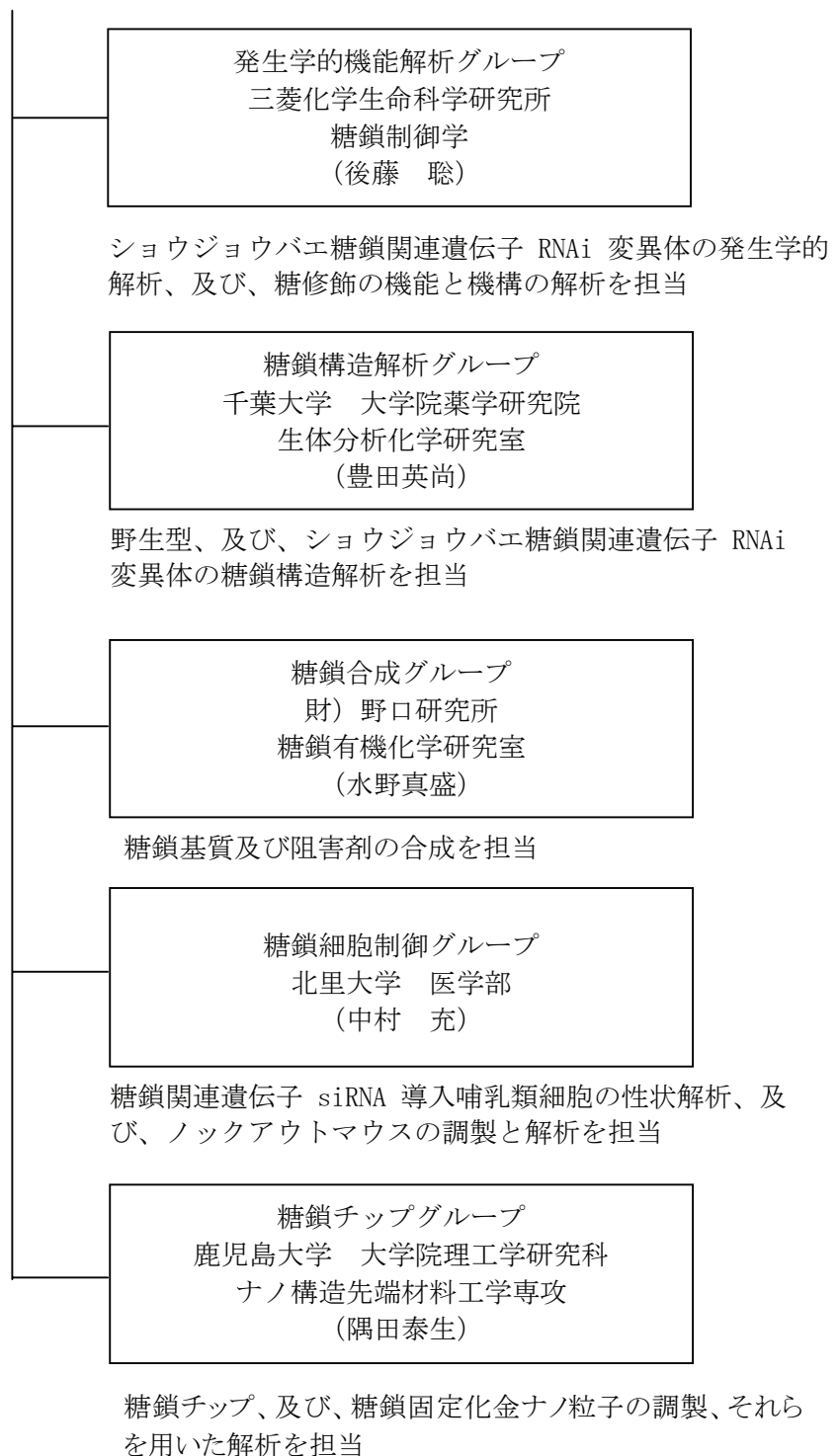
本研究では、「糖鎖の種を超えて保存されている機能」に着目して、ショウジョウバエをモデルにした網羅的解析システムからその全容を明らかにし、ヒトをはじめとする哺乳類へ結果の還元を行うことを目的とした。具体的には、(I)ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の網羅的単離と同定、(II)糖鎖関連遺伝子に対するハエ RNAi 変異体の網羅的作成と解析、(III)解析結果の哺乳類細胞での検討の3つの部分から構成されるが、(II)が研究の中心となっている。

実施にあたっては、ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の網羅的単離と同定は西原が行い、RNAi 変異体の作成は上田、機能解析は西原と後藤、糖鎖構造解析は豊田、哺乳類細胞への応用は、中村と西原が行った。水野は合成基質等のサポート、隅田は糖鎖チップの方向からのサポートを行った。



(2) 実施体制





3 研究実施内容及び成果

3. 1 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
(創価大学 統括グループ 西原祥子)

(1) 研究実施内容及び成果

本研究グループは、主に、[1]ショウジョウバエ糖鎖合成関連遺伝子 RNAi 変異体の網羅的機能解析、[2]網羅的解析の過程で見出された注目すべき遺伝子に対するより詳しい解析、[3]哺乳類細胞への応用として注目する遺伝子のマウス胚性幹細胞(ES 細胞)における解析の3項目について、研究を実施した。[1]については、**後藤、上田、及び、豊田**と共同で解析を行ったので、その結果をまとめて示す。

[1] ショウジョウバエ糖鎖合成関連遺伝子 RNAi 変異体の網羅的機能解析

① 目的

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、様々な糖鎖修飾を受けた後、分泌小胞に乗り細胞外へ分泌、或いは、細胞膜上に提示される。本項目では糖鎖の複雑性の基礎となる糖転移酵素を中心に取上げた。糖転移酵素の生体機能を調べる方法として、糖転移酵素遺伝子をノックアウトした変異体を作出することがもっとも基本的であるが、そのすべてに対する変異体の作成は一部のモデル生物以外は必ずしも容易ではない。一方、分子進化学的な解析を行ったところ、ショウジョウバエにはヒト類似の糖転移酵素が 92 種存在し、オルソログと認められるものも多かった。つまり、ハエをモデル系にしてヒトの基本的な糖鎖機能を解析できると考えられた。遺伝学的な研究の進んだショウジョウバエをモデル動物として取り上げ、RNAi 技術を適用することにより、糖転移酵素の網羅的ノックダウン解析が可能となる。形態形成を指標として、網羅的な解析を行うことにより、糖鎖機能の概観を把握することを目的とした。

② 実施方法

(I) 基本システムの構築と検証

まず、プロテオグリカンのリンケージ領域の合成に関与するショウジョウバエ β 1,4 ガラクトース転移酵素($\delta\beta$ 4GalT7)を用いて、本誘導型 RNAi 変異体システムの構築と検証を行った。本酵素の N-末側の 500bp、C-末側の 500bp に対応する 2 本鎖 RNAi を発現するハエを各々 10 種、計 10 種、**上田**が作成し、遺伝子特異的なノックダウンが行われているか等、検討を行った。

(II) 形態形成を指標とした網羅的な機能解析

上田が作成した 77 種のショウジョウバエ RNAi 誘導系統(糖転移酵素;60 種、硫酸転移酵素;8 種、糖ヌクレオチド輸送体;6 種、コア蛋白質;3 種)に対し、発現時期や強さが異なる 12 種の GAL4 ドライバー系統との掛け合わせを行った。組織特異的なノックダウンを行い、表現型の解析をした。また、鍵となる糖転移酵素遺伝子のノックダウン体については、mRNA や糖鎖構造変化の定量も行った。

③ 成果

(I) 基本システムの構築と検証

$\delta\beta$ 4GalT7 を用いて検討を行ったところ、本酵素が遺伝子ファミリーを形成しているにもかかわらず、ターゲット配列によらず、特異的なノックダウンがおこっていることが、明らかとなった。また、表現型は、ノックダウン効率に依存しており、本システムが有効に働くことが確認された。

(II) 形態形成を指標とした網羅的な機能解析

糖転移酵素、及び、糖ヌクレオチド輸送体を中心とした糖鎖合成関連遺伝子に対して、形態形成を指標とした網羅的機能解析を行った。これに先立ち、全細胞、全発生ステージでRNAiを誘導したところ、76%で発生致死となり、レクチンや糖鎖分解酵素を含む糖鎖関連遺伝子全体の62% (3.2を参照)に比較して高い致死性を示した。この結果は、糖転移酵素の欠損に由来する遺伝病が糖鎖分解酵素に由来するものに比較して少ない事実と符合するものであり、ショウジョウバエのようなモデル生物を用いた解析が遺伝病の病因論へも適用できる可能性を示すものであった。

組織特異的、あるいは、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。*N*-結合型糖鎖の合成に関与する糖転移酵素群は、中程度の致死性と中程度の形態形成異常の出現を示した。一方、*O*-結合型糖鎖のうち、プロテオグリカン型(グリコサミノグリカン鎖)、*O*-Fuc、*O*-GlcNAc、*O*-Manなどの、ムチン型糖鎖以外の糖鎖合成に関与する糖転移酵素群では、高い致死性と高い形態形成異常の出現が観察された。しかし、ムチン型糖鎖の合成に関与する糖転移酵素群では、致死性は高かったが、形態形成異常の出現は低く、糖鎖の種類による機能分担が示唆された。

さらに、各々の遺伝子における翅や複眼の形態形成異常を詳細に観察した。各遺伝子は、その表現型により3種のグループにクラスタリングされた。各酵素遺伝子を同定したところ、グループ1には、グリコサミノグリカン鎖の合成に関わる糖転移酵素、グループ2には、Notch関連の糖鎖合成に関わる糖転移酵素、グループ3には、一部の*N*-結合型糖鎖合成に関わる糖転移酵素が集まっていた。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。また、グループ1からは、コンドロイチン硫酸の形態形成における機能が、グループ3からは、*N*-結合型糖鎖の形態形成における機能が、新たに、示された。

なお、グループ1の解析に際して、各糖転移酵素の発現量とそれが合成する糖鎖構造の解析も行ったところ、各mRNAのみならず、標的糖鎖の特異的なノックダウンが行われていることも、明らかになった。

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。

ショウジョウバエの糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体、レクチン分子の生化学的な同定に関する報告は、最近5年に集中しており、40報程度の報告が出ている(同一の遺伝子について、複数の報告がある場合が多い)。そのうち、8報は、我々とその共同研究者の報告である。各遺伝子の機能についての報告は、Notch上の*O*-Fuc糖鎖(米国のK.Irvine、日本の松野)に関するものとヘパラン硫酸とそのコアタンパク質に関するもの(米国のS.SelleckとH.Nakato、日本の多羽田)が主であるが、最近、ムチン型糖鎖の機能(米国のK.G.Ten Hagen)や*N*-結合型糖鎖の機能(カナダのH.Schachter、オーストリアのF.Altmann)の解析も行われ始めている。しかし、本研究課題で遂行した網羅的な機能解析は、他に例を見ない。線虫などでも、RNAiによる網羅的な解析が行われているが、糖鎖関連遺伝子に対するシステムティックな網羅的解析例はなく、本研究は、糖鎖研究に重要な知見を提供し、糖鎖の基本機能の全体像解明へ大きく寄与すると考える。

[2] 網羅的解析の過程で見出された注目すべき遺伝子に対するより詳しい解析

① 目的

[1]に示した網羅的解析の過程で見出された注目すべき遺伝子に対して、個々のより詳しい解析を行うことにより、各糖鎖関連遺伝子に関わる糖鎖の生理機能をより詳細に解明することを目的とした。

② 研究実施方法

対象とする遺伝子について、以下に示す(I)～(VI)の解析、その他を行う。

(I) 対象とする遺伝子を昆虫細胞系で発現させ、例えば、酵素活性の同定など、各種の生化学的解析を行う。(II) 対象とする遺伝子の野生型ショウジョウバエにおける発現分布の検討を行う。(III) ノックダウン効率を決定し、**豊田**と共同して、糖鎖構造変化の検討も行う。(IV) RNAi 変異体の遺伝学的相互作用解析などから、表現型に關与するシグナル経路を予測する。(V) RNAi 変異体の免疫染色などにより、シグナル経路の変化と糖鎖構造変化の対応を検討する。(VI) さらに、遺伝子によっては、形態形成異常以外の生理機能の解析を行う。

③ 成果

本項目は、各々の遺伝子ごとに、記載する。

[2-1] O-マンノース転移酵素 (POMT: protein O-mannosyltransferase)

いくつかの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-結合型糖鎖修飾の異常が報告されているが、タンパク質の Ser/Thr 残基にマンノースを付加する O-マンノース転移酵素は酵母からヒトの真核生物で広く保存されている。O-結合型糖鎖修飾の機能を明らかにするために、2 種のショウジョウバエ O-マンノース転移酵素、dPOMT1 と dPOMT2 について、生化学的解析、及び、RNAi ノックダウン体と変異体を用いた解析を行った。

dPOMT1、dPOMT2それぞれの RNAi 体は、共に腹部が時計周りに回転する *rt(rotated abdomen)* の表現型を示した(図2)。dPOMT1と dPOMT2の両者には遺伝的相互作用が認められ、*in situ* hybridization の結果、dPOMT1、dPOMT2 mRNA は共に germ band, invaginating gut に発現し、類似の局在パターンが観察された。さらに、両変異体の幼虫で、筋肉の欠失が高頻度に観察された。さらに、dPOMT1 と dPOMT2 の組み換えタンパク質の POMT 活性を測定したところ、それぞれ単独の発現では活性は検出されなかったが、共発現した場合においてのみ POMT 活性が認められた(図3)。これらの結果から、dPOMT1、dPOMT2 はヘテロ重合体を形成し、筋発生に關与している可能性が示された。

また、ショウジョウバエにおける POMGnT (protein O-mannose β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase) 候補遺伝子の検索をおこなったが、ハエでは対応する活性を示すものは、見出すことができなかった。ハエにおいては、マンノース1分子が付加した

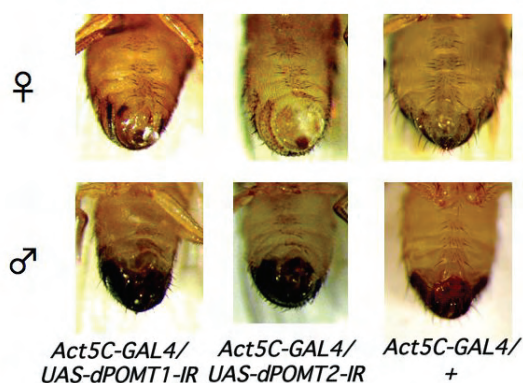


図2; dPOMT1 及び dPOMT2 RNAi 体の表現型

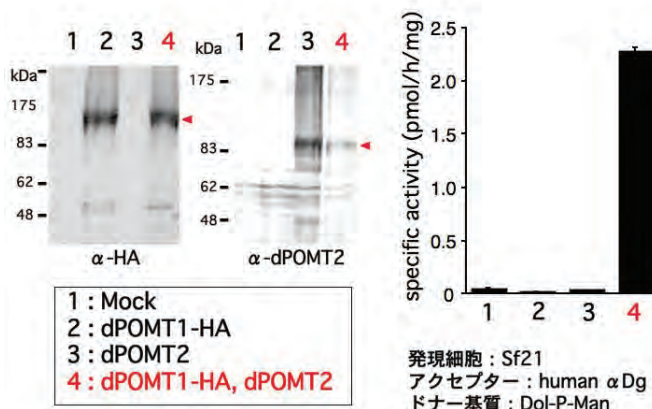


図3; 組み換えタンパク質の POMT 活性測定

もので機能している可能性が示唆された(図 4)。これは、POMT1 に欠損が認められる Walker-Warburg syndrome が、POMGnT に欠損が認められる Muscle-eye-brain disease に比較して、非常に強い症状を示すことを説明していた。

本研究は、*dPOMT2* の RNAi ノックダウンを行い、*in vivo* で *dPOMT1*、*dPOMT2* が相互に作用して筋形成に関与していることを初めて示した点で意義深かったが、その後、ヒト(オランダの H.van Bokhoven)、及び、ショウジョウバエ(米国の V.M.Panin)において *POMT2* の変異が報告された。さらに、本研究で見出された筋肉の欠失を指標とした遺伝学的相互作用解析により、本遺伝子の機能に関わる遺伝子ネットワークを明らかにできるものと期待される。

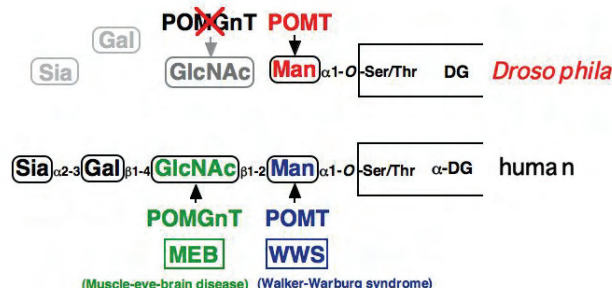


図4；ショウジョウバエとヒトの O-Man 型糖鎖モデル

[2-2] プロテオグリカンガラクトース転移酵素II ($\beta 3$ GalTII: proteoglycan galactosyltransferase II)

グリコサミノグリカン鎖のリンケージ領域の合成に関わるショウジョウバエプロテオグリカンガラクトース転移酵素 II ($d\beta 3$ GalTII) を同定した。

翅、及び、複眼特異的に RNAi を誘導すると形態形成異常を示した。これらの形態形成異常を指標として、図 5 に示したヘパラン硫酸鎖の合成に関わる各種糖転移酵素、*d\beta 4*GalT7、*DEXT1(ttvi)*、*DEXT2(sotv)*、及び、*PAPS* 合成酵素(*Paps*)などと遺伝学的相互作用解析を行った。*d\beta 3*GalTII は、これらの遺伝子と相互作用を示し、生体内でヘパラン硫酸の合成を通じて、翅、及び、複眼の形成に関わっていることが示された。また、抗ヘパラン硫酸抗体を用いて Western blot 解析を行ったところ、*d\beta 3*GalTII ノックダウン体でヘパ

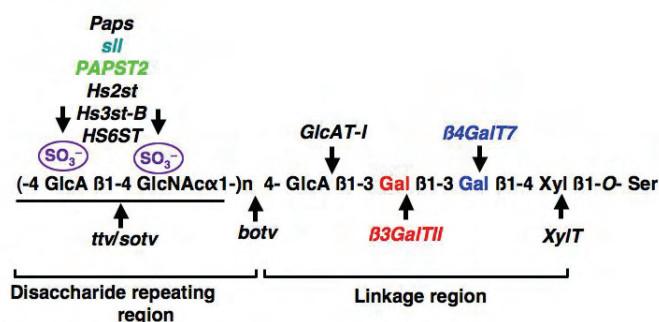


図5; ヘパラン硫酸の合成に関与する遺伝子

これらの遺伝子と遺伝学的相互作用解析を行った。

ラン硫酸プロテオグリカンは減少していた。さらに、*d\beta 4*GalT7 単独のノックダウン体と *d\beta 4*GalT7 と *d\beta 3*GalTII のダブルノックダウン体を比較したところ、ダブルノックダウン体のヘパラン硫酸の減少が著しく、ヘパラン硫酸量を指標にした場合も、また、*d\beta 3*GalTII と *d\beta 4*GalT7 の間に遺伝学的相互作用が認められた。以上の事実から、*d\beta 3*GalTII が生体内でヘパラン硫酸の合成を通じて、翅、及び、複眼の形成に関わっていることが、さらに、確認された。

また、*en-GAL4*により翅成虫原基後部特異的に RNAi を誘導したところ、ノックダウン領域で細胞外 Wingless の減少が観察され、 $d\beta 3$ GalTII が Wingless の安定性に寄与している可能性が示唆された。この事実は、Wingless シグナルにおけるヘパラン硫酸の関与機構の観点からも、重要な知見である。

[2-3] β 1,4-*N*-アセチルガラクトザミン転移酵素-A (β 1,4GalNAcT-A)

GalNAc β 1,4GlcNAc (LacdiNAc) 構造は、脊椎動物の Gal β 1,4GlcNAc に対応するものと考えられており、無脊椎動物によく見出される構造であるが、ショウジョウバエではその構造は同定されていなかった。一方、ショウジョウバエの β 1,4ガラクトース転移酵素遺伝子ファミリーは、プロテオグリカンのリンケージ部分の合成に関わる *db*1,4GalT7、及び、 *β 1,4GalNAcT-A*と *β 1,4GalNAcT-B*からなる。このうち、 *β 1,4GalNAcT-A*が、ハエの糖タンパク質と糖脂質上の LacdiNAc 構造を合成する β 1,4-*N*-アセチルガラクトザミン転移酵素であることを明らかにした。

RNAi 変異体より、中性糖脂質を抽出して TLC で解析したところ、GalNAc β 1,4GlcNAc β 1,3Man β 1,4Glc-Cer に対応する band 強度が減少していた(図 6)。さらに、組み替え酵素を発現させ、ショウジョウバエの中性糖脂質への GalNAc の取り込み活性を測定したところ、対応する構造を合成することが確認され、本酵素が糖脂質上の LacdiNAc を合成していることがわかった。また、糖タンパク質上の LacdiNAc 構造の合成に対しても、組み替え酵素を用いた解析と RNAi 変異体の lectin blot 解析により、その関与を明らかにした。なお、*in vitro* の活性の同定においては、水野(石田)の合成した基質も用いた。

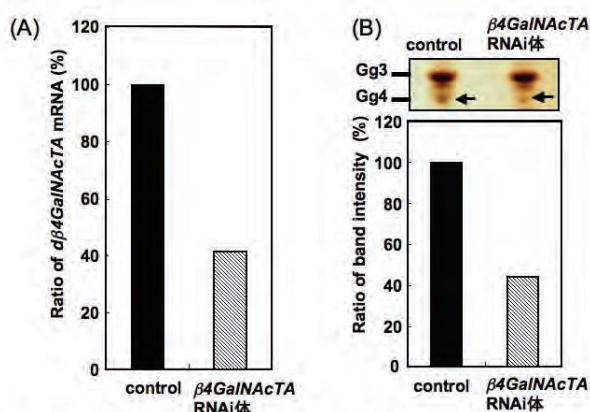


図6; *β 4GalNAcT-A* RNAi 変異体のノックダウン効率(A)と糖脂質の定量(B)
矢印はGalNAc β 1,4GlcNAc β 1,3Man β 1,4Glc-Cerに対応するband

この解析の後、最近、ショウジョウバエにおいても LacdiNAc 構造があることが、質量分析により明らかにされた(米国の M.Tiemeyer)。また、本酵素の変異体が、行動異常を示すことも報告されており(カナダの N.Haines)、糖タンパク質と糖脂質上のどちらの構造が関与しているのか興味を持たれる。

[2-4 ~ 7] その他の転移酵素

その他、糖転移酵素に関しては、[2-4]グルクロン酸転移酵素群、[2-5] α 1,3 フコース転移酵素 A、[2-6]コア 1 β 1,3 ガラクトース転移酵素群、また、[2-7]硫酸転移酵素群についても、個別に解析を行った。

[2-8] 糖ヌクレオチド輸送体群

糖ヌクレオチド輸送体は、細胞質、あるいは、核で合成された糖ヌクレオチドをゴルジ体や小胞体内腔に輸送し、糖転移酵素のドナー基質を供給している多重膜貫通タンパク質である。図 7 にヒトとショウジョウバエの糖ヌクレオチド輸送体の系統樹を示した。糖転移酵素に比較して単純な構成をしており、ヒトとハエで 1:1 のオーソログの関係になっているものも

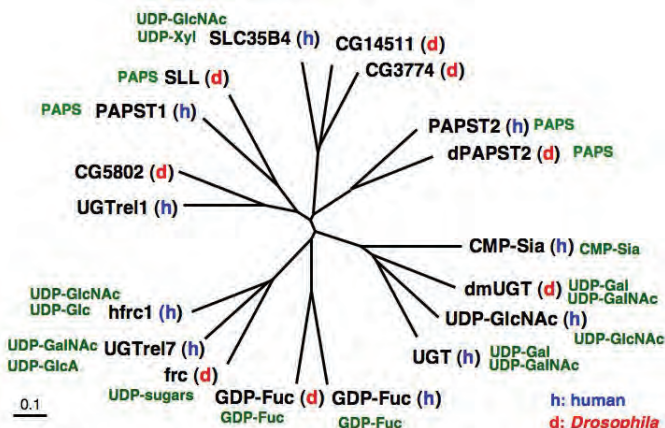


図7; ショウジョウバエとヒトの糖ヌクレオチド輸送体の系統樹

多かった。これらの全てに対し、上田が RNAi ノックダウン体を作成した。網羅的機能解析の結果顕著な表現型を示したものについては、後藤と共同で、さらなる解析を行った。

糖ヌクレオチド輸送体群の網羅的機能解析の過程で、2 種の新規ショウジョウバエ PAPS 輸送体遺伝子、*dPAPST1*(*sll*; *slalom*)と *dPAPST2*を同定した。真核生物における膜タンパク質、及び、分泌タンパク質の硫酸化には、高エネルギー型硫酸ヌクレオチドである PAPS が硫酸転移酵素のドナー基質として利用される。細胞質又は核で合成された PAPS は、ゴルジ体の膜に存在する PAPS 輸送体を介してゴルジ体内腔へ運び込まれる。酵母発現系を用いて輸送活性を測定したところ、各種糖ヌクレオチドに対する輸送活性は示さず、両者は、ともに、PAPS 特異的な輸送活性を示し、PAPS 輸送体であることが明らかになった。さらに、*sll* と *dPAPST2* を RNAi によりショウジョウバエ S2 細胞で特異的にノックダウンしたところ、そのゴルジ画分の PAPS 輸送活性と糖タンパク質への硫酸の取り込みが減少し、両者が PAPS 輸送体であることが更に確認された(図 8)。

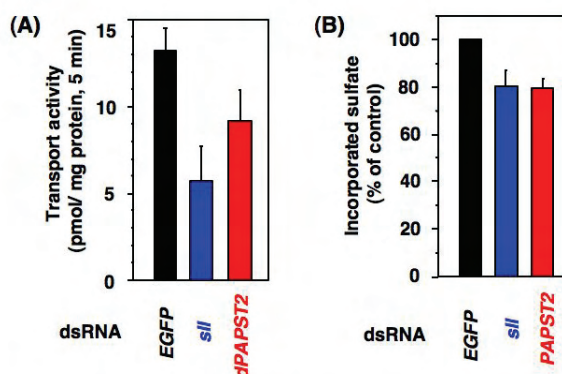


図8; 各PAPS輸送体をノックダウンしたS2細胞におけるゴルジ体画分のPAPS輸送活性(A)とタンパク質への $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込み(B)

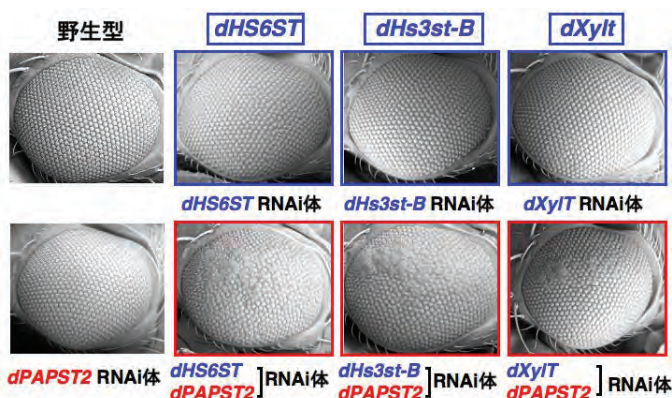


図9; *dPAPST2*とヘパラン硫酸の合成に関わる遺伝子との遺伝学的相互作用
各遺伝子だけのノックダウンでは形態形成異常は認められないが、ダブルノックダウンを行うと顕著な異常が認められ、*dPAPST2*との間に遺伝学的相互作用が確認された。

sll と *dPAPST2* は、ショウジョウバエの各発生段階において発現していた。両者は類似した発現傾向を示し、RNAi 変異体は、ともに致死性を示した。複眼の形成異常を指標にして、ヘパラン硫酸鎖の合成に関与する硫酸転移酵素(ヘパラン硫酸 3 硫酸転移酵素 B、ヘパラン硫酸 6 硫酸転移酵素)や糖転移酵素(β 1,4 ガラクトース転移酵素 7、ペプチド *O*-キシロース転移酵素)(図 5)との間の遺伝学的相互作用解析を行った(図 9)。*sll*、及び、*dPAPST2* とこれらの遺伝子との間に相互作用が認められ、両者が生体内でヘパラン硫酸鎖の合成に関与することが、示唆された。また、*sll* と *dPAPST2* の間にも、遺伝学的相互作用が認められた。なお、各 *dPAPST*間で Off-target 効果は認められておらず、特異的なノックダウンが確認されている。以上の結果から、SLL と *dPAPST2* はゴルジ体内腔に PAPS を輸送することにより、プロテオグリカンの硫酸化に必要な基質を供給していることが、明らかになった

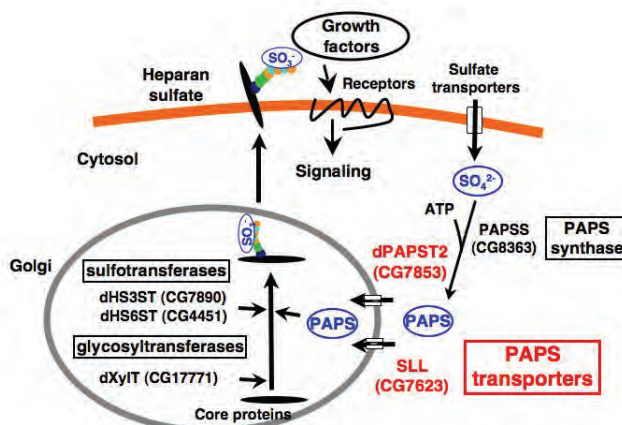


図10; ショウジョウバエPAPS輸送体の役割

た(図 10)。

なお、本研究は、PAPS 輸送体の単離同定の初めての例となった。各々に対して、1:1 のオーソログの関係にあるヒト遺伝子が存在するが、これらについても、同様な PAPS 輸送活性を持つことを、我々は明らかにしている。2 種の遺伝子間に使い分けがあるのか、また、これらの発現により、糖鎖の硫酸化が統合的に制御されている可能性も高く、興味を持たれる。現在、両遺伝子に対しては、コンディショナルノックアウトマウスを作成しているところである。

[3] 哺乳類細胞への応用; 注目する遺伝子のマウス胚性幹細胞(ES 細胞)における解析

[1]の形態形成を指標とした網羅的機能解析、及び、[2-2] のプロテオグリカンガラクトース転移酵素 II の解析から、グリコサミノグリカン鎖の合成に関わる糖転移酵素群が、Wingless などのシグナルに深く関わっていることが予想された。また、これらの糖転移酵素群は、ショウジョウバエと哺乳類で 1:1 のオーソログな関係にあるものも多かった。そこで、我々は、これらの酵素のマウス ES 細胞における機能解析を行った。解析に先立ち、ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸の発現を検討したところ、ES 細胞ではヘパラン硫酸が高い発現を示すことがわかったので(図 11)、ヘパラン硫酸を合成する酵素に重点をおいて解析することとした。

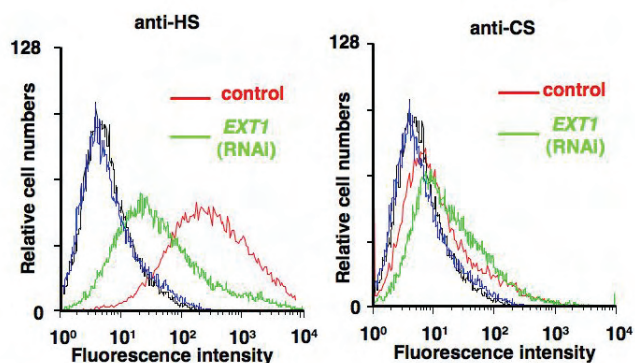


図11; *EXT1* RNAiノックダウン細胞におけるヘパラン硫酸(HS)とコンドロイチン硫酸(CS)の発現

ヘパラン硫酸の伸長に関わる *EXT1*、*EXT2* 遺伝子の各々について、shRNA 発現ベクターを用いて RNAi を誘導したところ、各遺伝子の発現を 20%まで減少させることができた。これに伴って、ES 細胞表面のヘパラン硫酸鎖が著しく減少した(図 11)。*EXT* ノックダウン細胞では、増殖が低下し、アルカリホスファターゼ染色で検定したところ、未分化性の低下が認められた。各種分化マーカーを用いた検討から、原始内胚葉系に分化が規定されていることがわかった。さらに、未分化マーカーである *Oct3/4*、*Nanog* の発現の著しい減少が認められた。ノックダウン細胞では、Wnt の細胞表面への結合の低下、及び、それに伴った β -catenin の核移行の阻害が起っており(図 12)、Wnt シグナルの低下が確認された。これらの事実から、*EXT1*、*EXT2* が合成するヘパラン硫酸鎖が Wnt シグナル通じて、ES 細胞の未分化性や多能性維持に働いていることが初めて明らかになった。

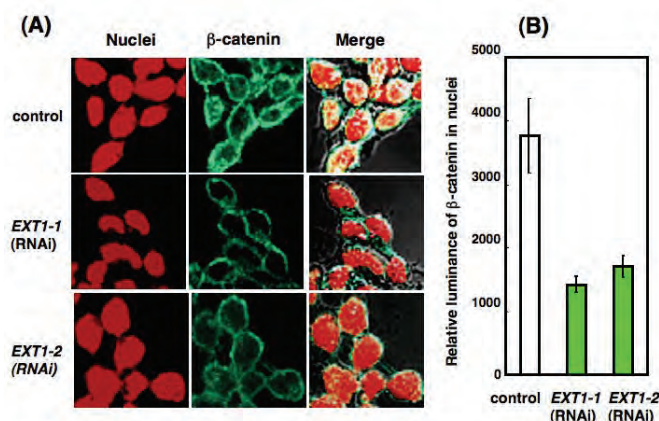


図12; *EXT1*ノックダウンES細胞におけるWntシグナルの阻害 β -cateninの核への移行が、ノックダウンES細胞では減少した。

ES 細胞の未分化性、及び、多能性維持機構の解明は、学術的にも、実用的にも、非常に重要な問題である。未分化性と多能性は、細胞外因子による種々のシグナル伝達と転写因子である

Oct3/4 や Nanog といった細胞内因子によって制御されることが、これまでに報告されている。未分化性と多能性に関わるシグナルとしては、マウスでは、主に、LIF/STAT3、BMP/Smad、および Wnt/ β -catenin 経路が知られている。しかし、ES 細胞におけるこれらのシグナル伝達を制御するメカニズムについて、詳細は不明であった。本研究は、その制御機構の一端を明らかにできた点で非常に意義深い。また、本制御機構は、マウスとヒトに共通するものであると考えられ、実用・応用技術開発という観点からも、非常に重要な情報を与えると考えられた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究において、我々は、「種を超えて保存されている糖鎖機能」に着目して、ショウジョウバエをモデルとし、「糖鎖の基本機能の網羅的解析」を行った。本研究は、網羅的糖鎖機能解析のほとんど初めての例であり、糖鎖研究に重要な知見を与えるものと考ええる。特に、ハエにおける網羅的解析、及び、個別の解析から明らかになってきた「種を超えて保存されている糖鎖機能」の1つをマウス ES 細胞で検証し、「ES 細胞の未分化性と多能性維持への糖鎖の関与」を明らかにできたことは、重要である。ハ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他の糖鎖機能も、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、他の組織幹細胞や癌幹細胞にも共通する可能性があり、その波及効果は、再生医療や癌研究にまで及ぶものと考えられる。

本網羅的解析は、主に、致死性と形態形成異常を指標にして行った。高い致死性を示すが、顕著な形態形成異常を示さない遺伝子も少なからず認められ、自然免疫や神経形成など、糖鎖が、他の重要な内在的な機能を果たす可能性が示唆された。内在的な機能を反映する他の指標を用いた解析を、今後、行っていきたいと考えている。ショウジョウバエの自然免疫には、Toll 経路と Imd 経路があり、これらの経路が活性化されると抗菌ペプチドが産生される。特に、ムチン型糖鎖は、自然免疫の経路に関与している可能性が考えられ、解析を開始したところである。

また、現在、研究は、次の段階に入っており、ショウジョウバエの特徴を生かしたシステマティックな遺伝学的相互作用解析とシステムバイオロジーを組み合わせることにより、生化学的な解析手法からは得られない新たなシグナル伝達カスケードに関わる分子種を見出すことができている。この手法を筋肉の欠失を指標とした *O*-マンノース転移酵素の遺伝学的相互作用解析に適用することにより、筋ジストロフィーの病因論へも迫れるものと考えている。

一方、我々は、網羅的糖鎖機能解析のため、本研究の過程で様々な解析技術を開発してきた。蓄積された技術を他の昆虫に応用することも意義があり、我々は、蚊をその対象と定め、共同研究を開始した。蚊が媒介する感染症は多く、糖鎖との関連が明らかになれば、社会への波及効果も高いものと考ええる。

以上、このようなモデル動物ショウジョウバエの特色を生かした新しい糖鎖研究を基礎にして、ハエと共通なシグナル伝達経路が鍵となる幹細胞系や各種疾病モデルへ RNAi 法を適用することにより、「糖鎖の種を超えて保存されている生理機能」のさらなる解明とヒトへの応用を、今後も、行っていきたいと考えている。

3. 2 ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の体系的な RNAi 変異体の作成とその遺伝学的解析 (国立遺伝学研究所 遺伝学的機能解析グループ 上田龍)

(1) 研究実施内容及び成果

糖鎖の生体内での機能を網羅的に解明するため、リバースジェネティクスのアプローチを適用した。すなわち、まず糖鎖関連遺伝子の変異体を取得し、その異常表現型より個体におけるこれら遺伝子の機能を推定するというアプローチである。このため、ショウジョウバエゲノム配列から推定される糖鎖関連遺伝子について、本研究グループによって開発された GAL4-UAS 遺伝子強制発現法を利用した「誘導型 RNAi 法」を用いた変異体作成をおこなった。すなわち、UAS プロモーターの下流にターゲットとする遺伝子の断片を逆方向反復配列 (inverted repeat, IR) の形で挿入した UAS-IR ベクターを作成し、ハエ個体に導入する (図1)。一方、ハエの全細胞、あるいは組織特異的なパターンで GAL4 蛋白質を発現する GAL4 エンハンサートラップ系統のコレクションより適当なハエを選択し、上記 UAS-IR を持つハエと交配する。この子孫 (F₁) では GAL4 発現細胞で UAS-IR がドライブされ、ヘアピン型の二本鎖 RNA が産生し、RNAi が誘導されターゲット遺伝子の発現抑制 (mRNA 分解) がおこる (図2)。

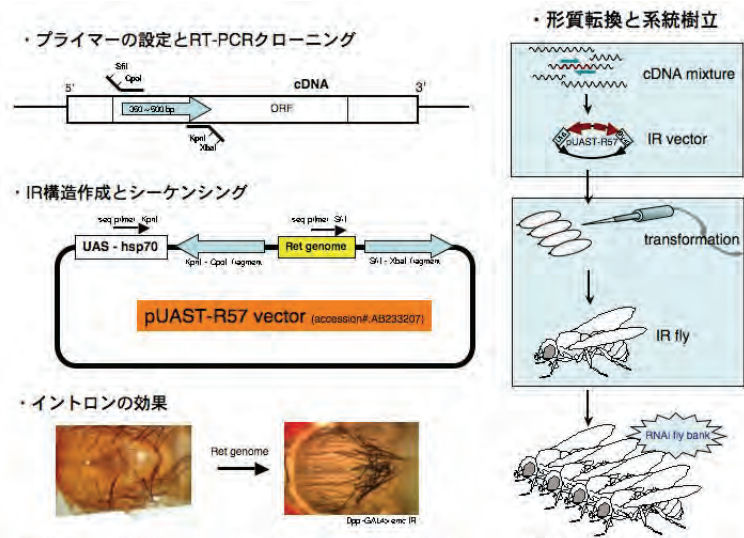


図1: RNAiハエの作成 — IRベクターの作成と形質転換

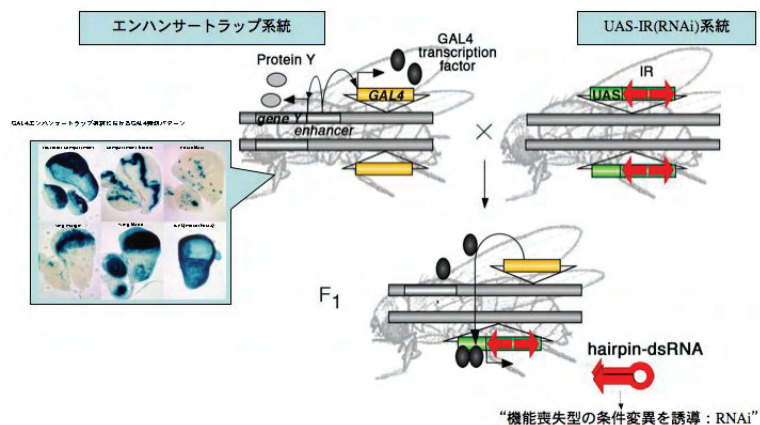


図2: RNAiハエによる組織特異的な遺伝子ノックダウン

西原はショウジョウバエゲノムの蛋白質をコードする 14,141 遺伝子 (annotation release 5.4) より糖鎖関連遺伝子と推定される遺伝子を選択した。当初、生体内での糖鎖機能を調べる上ではまず糖転移酵素遺伝子についての変異体作成が急務であると考えられた。しかしながら研究の進展と共に、糖転移酵素と直接的な協働作用を持つであろう糖ヌクレオチド輸送体、レクチン、コアタンパク質、糖鎖分解酵素などの候補遺伝子についても変異体を作成することにより、それぞれ特定の生命現象 (Notch シグナル伝達、筋肉発生など) について、より確実な機能の解明が可能になると考えた。このような観点から多数の候補遺伝子が選ばれたが、本研究期間中にもショウジョウバエゲノムはアノテーションのアップデートを繰り返し、選択された遺伝子の CG 番号が変わるなど種々の混乱もあった。これらを整理し、最終的には糖鎖関連遺伝子として 257 遺伝子をターゲットと定めた。これらの候補遺伝子について、体系的な RNAi 変異体作成をおこなったところ、第一回目の試行においては 173 遺伝子 (67%) について IR ベクターを構築することができた。多数の遺伝子に対応するため、遺伝子断片の PCR 取得には各発生ステージのハエ個体由来 mRNA 混合物より RT-PCR をおこなった。しかし発現量の少ない遺伝子に対しては充分量の PCR 産物を確保できないという

欠点があり、ここで構築がうまくいかなかったものの多くはベクターへの断片挿入の段階での失敗であった。また IR 構造の保持を確実にするため、宿主大腸菌としては recombination free の特殊な系統を用いたが、それでもベクター増幅時に IR 構造に起因すると思われる構造異常(欠失や挿入)が頻発するものが含まれた。これらの条件を詳細に検討し、それぞれ個別に再試行した結果、これまでに 202 遺伝子(79%)について IR ベクター構築に成功している。ハエへの形質転換直前のサンプルについて丹念なシーケンシングをおこない、最終的に正常なクローンを選択することが信頼できる変異体を作成することために重要であった。

また最近、ショウジョウバエや線虫など、長鎖の二本鎖 RNA を用いた RNAi においては非特異的な遺伝子のノックダウンというオフターゲット効果の可能性が指摘されている(後述)。このため特に重要とした 19 遺伝子については、mRNA の異なる部位をターゲットしたベクターも重複して作成することとした。これまでに 13 遺伝子について構築ができています。

IR ベクターのショウジョウバエ個体への導入は microinjection 法でおこない、その後、4 世代の交配実験を経て系統を樹立した。当初、ベクターが複数コピー挿入したと思われる不安定な系統が散見されたため、もう 1 世代の交配実験を追加し、全ての系統について、導入したベクターが安定に継代される系統を作成した。作成された 202 遺伝子(215 種)のベクターは既に microinjection を終えているが、これまでに系統が樹立されたのは 178 遺伝子である。初期の実験では 1 遺伝子あたり 10 数系統を作成して RNAi の効果を検討した。これはベクターの強制発現では、染色体上での挿入箇所に依存してその程度が変わるという「位置効果」が知られているからである。これらの系統を用いた検討の結果、確率的には 2 系統の樹立でも強い表現型の系統を得られることがわかり、本研究ではそれぞれのベクターで 2 系統を樹立することとし、現在までに 362 系統を樹立している。

樹立された系統を用いて、まず全細胞でターゲット遺伝子のノックダウンを誘導した場合、成虫までの発生過程に異常が生じるかを検討した(致死性の検討)。110 遺伝子(62%)で致死となった。胚期、終齢幼虫期、蛹期など遺伝子により致死期は特異的である。この結果はそれぞれの変異体で特異的に異常となった糖鎖の発生における重要性を示している可能性がある。一方、最近、RNAi による遺伝子ノックダウンの非特異性(ヒストンメチル化などによるエピジェネティックな遺伝子発現抑制)が報告され始めている。これを考慮し、ここで得られた変異体の特異性を検討するために以下の実験をおこなった。

[1] 特異的な RNAi の誘導

翅や複眼の発生は Notch、Wnt、TGF- β などの形態形成で働くシグナル伝達系、また EGF や IGF の関与する増殖／分化のシグナル伝達系を検出するのに優れた系である。この組織で特異的に発現する GAL4 系統を用いて組織特異的に RNAi を誘導する。個体が致死とならず、遺伝子の機能を容易に推定することができる。翅において 87 遺伝子の変異表現型を検討したところ、30 の遺伝子において非常に特異的な異常表現型が観察された。

[2] 二本鎖 RNA から生じる siRNA の Off-target 検索

本研究では 500bp 前後の二本鎖 RNA を細胞内で発現し、RNAi を誘導している。この長い二本鎖 RNA は細胞内で 21bp 程度の短い siRNA に分解され、これらが配列特異的にターゲット mRNA の分解に働いている。産生される全ての siRNA 分子はターゲット mRNA を認識するが、中には他の mRNA と相同性を有する siRNA 分子が生じる場合もある(図 3)。少数個の siRNA でも非ターゲット mRNA を分解するケースがあることが疑われているため(Off-target 効果)、それぞれの siRNA が他の mRNA とクロスリアクトするかどうかを検索する必要性が生じた。これは siRNA の配列が短いために通常の BLAST 検索では困難である。しかしながら共同研究者の東大・西郷教授は森下研究室と共同でこの siRNA の Off-target 検索が可能なプログラム(dsCheck)を開発したので、これを用いてそ

それぞれの IR ベクターの特異性を調べた。その結果、表 2 のように、97%のベクターに関しては完全に特異的か、あるいは Off-target 効果の可能性は無視できると考えられた。一方例外的に、CG30059 遺伝子ベクターより産生された siRNA (482 種類) の 93 % が CG18278 mRNA に結合するという高い非特異性が発見された。両者はゲノム上に近接して存在し、おそらく重複遺伝子であろうと思われる。

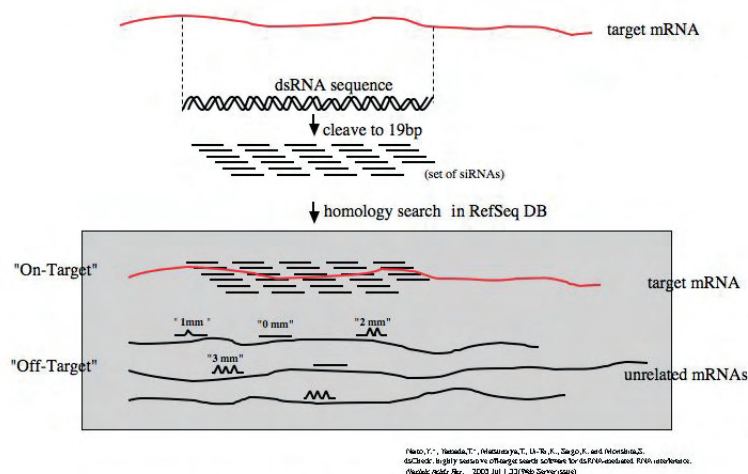


図3; OFF-target検索の概念図

非ターゲットmRNA に結合する siRNA の割合	IR ベクター個数
0%	111 (57%)
～1%	65 (34%)
1～5%	13 (6%)
5%～	5 (3%)
計	194

糖鎖機能に関与する遺伝子の変異体を網羅的に作成、比較解析した研究はいまのところない。しかしながら 2007 年の 4 月にウィーンの Dickson 研より 12,000 遺伝子の RNAi ハエを網羅したバンクが公開された。そのため、ショウジョウバエをモデル動物として用いた糖鎖機能解析研究はこれから一層の進展が見られるであろう。一方、これらのハエはゲノムのエクソン部分を IR 配列として利用しているため、IR 平均長が短く、RNAi 効果が弱いことが考えられる。しかし本研究で使用した IR 配列とは異なる遺伝子部位の断片を使用しているため、2種類のハエを比較すれば Off-target 効果の危険性を払拭できる。その意味で本領域の研究にとっても有効なリソースである。

(2) 研究成果の今後期待される効果

糖鎖関連遺伝子を網羅した変異体のライブラリーは本研究によってほぼ完成した。これまで個々の遺伝子の機能を明らかにする解析的な研究を進めてきたが、ハエを使った研究の利点を生かす意味では遺伝子相互作用解析を進めるべきであろう。(同じカスケードで機能する) 遺伝子ネットワークを明らかにする研究である。そのために利用可能な染色体欠失変異体を体系的に樹立するプロジェクト (<http://www.drosdel.org.uk/>) も動いており、それぞれの遺伝子に関与する糖鎖の機能を系統的に解明したい。RNAi ハエの今ひとつの利点である複数遺伝子の同時ノックダウンによる体系的な異常表現型探索も今後の展開として考えられる。個々の遺伝子ノックダウンではバイパス経路によって異常が検出できない場合でも、同じカスケードの複数遺伝子の操作でそれらの弱い遺伝子機能を発見できる可能性がある。また、本研究で作成したハエを用いて形態形成以外の生体機能、行動や記憶・学習、あるいは免疫などの観点から異常表現型をスクリーンすることは、新たな共同研究を組むことで迅速に展開可能である。

ショウジョウバエはモデル生物であり、それらを利用した研究には基礎研究としての成果が求められている。しかしながら、組織や細胞のレベルで遺伝子機能を見ると哺乳類との相同性も驚くほど保たれており (POMT など)、ハエを材料とした研究が上記の遺伝子ネットワーク解析から始まり、マウスでの解析を経た上で、疾病の理解や創薬といった点に波及することも夢物語ではない。本研

究ではそのスタートを切ることができた。さらにこの方向での展開を進めていきたい。

3.3 ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子 RNAi 変異体の発生学的解析、及び、糖修飾の機能と機構の解析

(三菱化学生命科学研究所 発生学的機能解析グループ 後藤聡)

(1) 研究実施内容及び成果

糖鎖の機能を明らかにするために、ショウジョウバエを用いて、糖転移酵素、糖修飾酵素、糖核酸輸送体などの遺伝子の発現を阻害し、その表現型を解析した。方法としては、ゲノム情報をもとに選り出されたショウジョウバエの糖転移酵素、糖修飾酵素、糖核酸輸送体について、RNAi によるノックダウンをショウジョウバエ個体で行った。解析には主としてショウジョウバエの翅を用いた。その理由は翅の様々な表現型を観ることによって、どのような発生過程または情報伝達系に異常が生じたかを簡便に推測することができるからである。例えば、Notch 情報伝達系が異常になると、翅の周縁部が欠け、翅脈が太くなり、時には過形成される(図1)。



図1. ショウジョウバエの翅。正常(左)と Notch 伝達経路の変異体(右)

また、MAPK 情報伝達系が異常になると翅脈の形成不全が生じる。そのような系をもちいて、約100種類以上の分子について解析したところ、主として2つの結論を得ることができた。ひとつは、糖鎖の種類、例えばN型糖鎖かO型糖鎖かによって異なる表現型が得られたことから、糖鎖の種類ごとに関与する情報伝達系の種類が異なる可能性が示唆された。もうひとつは、同じ糖鎖を生成する酵素でも、糖鎖の根元側(還元末端側)を作る酵素では重篤な表現型が得られ、糖鎖の末端側(非還元末端側)を作る酵素では多様で軽微な表現型が得られた。このことは、糖鎖の末端側には多様性があり、機能が分化している可能性が示唆している。このような糖鎖機能の網羅的な解析は世界でもほとんど行われていないので、本研究は糖鎖研究に重要な知見を提供するものと考えられる。なお、本解析は、西原・上田と共同で行った。

さらに、糖修飾の機能をコア蛋白質も含めて解析した。まず、神経系のモデルとしてショウジョウバエの網膜形成に必要な糖蛋白質 chaoptin に着目し、その蛋白質に付加されている糖鎖の付加位置および糖鎖構造の解析を行った。まず、chaoptin 蛋白質に対する抗体を用いてアフィニティー精製を行い、その精製産物をプロテアーゼ消化後、液クロを用いて、切断断片ペプチドを分画・分取した。分取したペプチドそれぞれについて、各種レクチンに対する反応性を調べた。レクチンに反応したペプチドについては、ペプチドシーケンサーを用いて配列を決定した。さらに、糖鎖部分の構造については、レクチンとの詳細な反応性の検討および質量分析装置を用いた解析をおこなった。その結果、いくつかのペプチドについては糖鎖付加位置の同定ができた。さらに、そこに付加している糖鎖の構造についても解析することができた。その結果、chaoptin 蛋白質には異なる種類の糖鎖が付加されていること、また、それぞれの糖鎖が付加する位置はほぼ決まっていることが

明らかとなった。このことは、以下で述べるように、chaoptin 蛋白質を用いた糖鎖の機能解析に重要な知見を与えることになった。また、この糖鎖構造の解析を通じて、実際の生体内から糖蛋白質を抽出・精製し、その糖鎖付加位置と糖鎖構造を詳細に解析する技術を確立できた。このような技術は、糖鎖機能の生物学的解析を行う際に欠くことのできないものである。以上の解析は、蟹江治先生(三菱化学生命科学研究所、主任研究員)のグループとの共同研究である。

次に、その chaoptin 蛋白質に付加される糖鎖の機能を、培養細胞を用いて解析した。Chaoptin 蛋白質は細胞接着活性を持ち、培養細胞で発現させると細胞凝集塊を形成することが知られている(図2)。

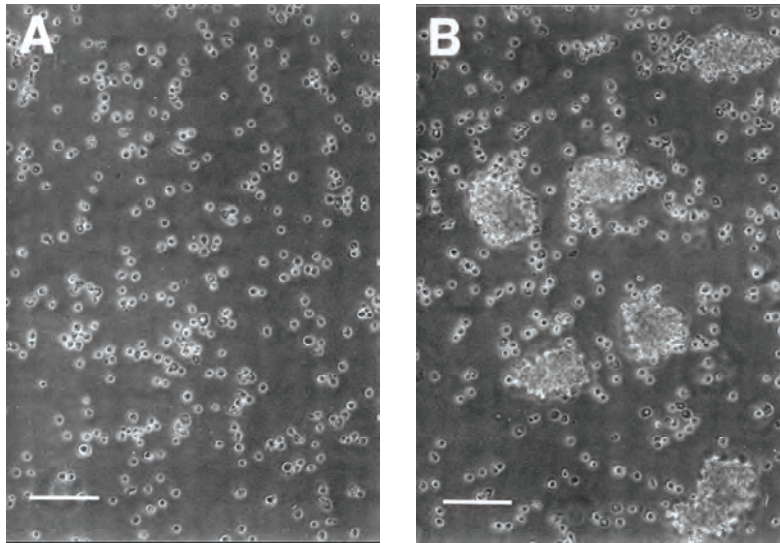


図2. ショウジョウバエの浮遊培養細胞(A)と Chaoptin を発現させた細胞(B)。(Krantz DE. et.al., EMBO.J.)

前述の解析によって同定することのできた chaoptin 蛋白質の糖鎖付加位置に変異を導入し、糖鎖が付加されない変異蛋白質をコードする遺伝子を作成した。変異を導入するにあたり、糖鎖付加位置がクラスター化している3つの領域に分けた。それぞれの領域内のすべての糖鎖付加位置を導入した。3領域のうちのふたつ以上に変異を導入した場合には、変異蛋白質の発現量が減少すると同時に、変異蛋白質自身が切断されることがわかった。すなわち、糖鎖が蛋白質の品質管理に必要である可能性が示された。一方、3領域のうちのひとつに変異を導入した場合には、変異蛋白質は十分に発現し、細胞膜表面に提示されることがわかった。そこで、その変異蛋白質を培養細胞で発現させたところ、本来持っている細胞接着活性が失われることがわかった。すなわち、糖鎖が細胞接着に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

さらに、ショウジョウバエ個体を用いて、chaoptin 蛋白質の糖修飾についても解析も行った。三菱生命研と国立遺伝研で作成中のショウジョウバエ RNAi ライブラリーを用いて、chaoptin 蛋白質の糖修飾に必要な遺伝子の網羅的なスクリーニングを行った。具体的には、RNAi ライブラリーを用いて、視神経特異的に遺伝子をひとつずつ発現阻害し、その視神経から chaoptin 蛋白質を抽出・精製した。その chaoptin 蛋白質の糖鎖を、種々のレクチンによるブロットで解析し、糖鎖に異常が生じていないかを定量的に調べた。その結果、様々な遺伝子の発現阻害によって、chaoptin 蛋白質の糖鎖が異常になることを見出した。その中には、既知の糖転移酵素が含まれており、このスクリーニングの有効性が確かめられた。また、既知の遺伝子ではあるが、いままで糖修飾に関連するとはわかっていなかった遺伝子も新たに同定することができた。また、糖修飾に関わる全く新しい遺伝子などを同定することに成功した。

次に、これらの遺伝子群をシステムバイオロジーの手法を用いて、two-hybrid のデータベースを基にネットワーク化したところ、糖修飾に関する新たな遺伝子クラスターを見出すことができた。ところで、two-hybrid のデータベースには疑似陽性が含まれていることが予想されたので、より信頼性の高い genetic interaction のデータベースを基にネットワーク化した。その結果、さらに信頼性の高い遺伝子クラスターを見出すことができた。このような糖修飾遺伝子のネットワークは、世界で初めての発見であり、今後の糖修飾研究に大きなインパクトを与えていると考えている。このシステムバイオロジー手法を用いたネットワーク化は、木下聖子先生(創価大)との共同研究である。

さらに、それらの遺伝子機能を明らかにすべく、生化学的、細胞生物学的解析系を構築しつつある。特に、細胞生物学的解析として、糖転移酵素の局在を調べる系を構築した。いくつかの遺伝子について解析したところ、ゴルジ体に糖転移酵素が正しく局在するために必要な遺伝子など、まったく新しい機能を持つ遺伝子が含まれていることがわかった。糖転移酵素がどのようにしてゴルジ体に正しく局在するかについては、現在のところ、あまりわかっていない。したがって、このような新規遺伝子を同定できたことによって、糖修飾メカニズムの新たな側面を解明できると考えられる。

さらに、糖鎖の機能解析の一環として、異常になった糖鎖の構造を生化学的に解析した。上述の方法を用いて、糖転移酵素などのノックダウンをおこなった個体から chaoptin 蛋白質を抽出・精製し、その糖鎖構造を詳細に解析した。その結果、糖転移酵素の活性とよく相関する糖鎖異常が検出され、RNAi による阻害と糖鎖構造決定法の正確さが実証された。この構造解析は、蟹江治先生のグループとの共同研究である。

この解析と平行して、細胞内の糖修飾である O-GlcNAc 糖鎖の機能について解析した。O-GlcNAc 糖鎖は、細胞質や核内に存在する多くの蛋白質に付加している。また、その転移酵素(OGT)は、ヒトからショウジョウバエまで一種類しかない。そこで、ショウジョウバエの全身で OGT をノックダウンしたところ致死になり、その重要性が示された。また、組織特異的なノックダウンを行ったところ、細胞のサイズや分化に異常が生じた。この結果は、細胞の栄養状態や分化に O-GlcNAc 糖修飾が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

(2) 研究成果の今後期待される効果

糖鎖は、発生分化、再生、免疫、神経機能、増殖など、様々な機能を持っており、その破綻によって、先天性奇形、感染、精神発達遅滞、癌などが引き起こされる。本研究によって、新たな糖修飾遺伝子を同定できたことは、未知であった糖修飾のメカニズム解明に役立ち、将来的には、上述のような疾病の理解・治療などに貢献することが期待される。今後は、同定された遺伝子の機能をショウジョウバエと哺乳動物を用いて明らかにすると共に、ヒトの疾患との関連性を明らかにする必要があるだろう。

また、本研究によって培われた糖鎖構造の解析技術は、ごく微量の糖鎖に対応したものであり、今後は、ショウジョウバエにとどまらず、他の微量な生体サンプルにも応用できると考えられる。例えば、ヒトの疾患臓器での糖鎖構造解析なども可能になるのではないかと期待している。

3. 4 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 (千葉大学 糖鎖構造解析グループ 豊田英尚)

(1) 研究実施内容及び成果

本研究は、野生型およびショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子 RNAi 変異体の糖鎖分析に用いる糖鎖構造解析システムの開発を目的として展開された。糖鎖関連遺伝子に対して網羅的に作成された RNAi 変異体のうち異常表現型が出たものに対して糖鎖分析を行い、糖鎖構造の変化が異常表現

型を誘導していることを直接証明した。具体的には、微量のショウジョウバエを用いて[1]糖組成分析, [2]グリコサミノグリカンの二糖組成分析, [3]N-結合糖鎖の分析法を確立した。ショウジョウバエ由来糖鎖のアミノ糖および中性糖組成分析, グリコサミノグリカンの一種であるコンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸を10匹のショウジョウバエを用いて測定するシステムを研究期間前半で構築した。さらに研究期間の後半では, 10匹のショウジョウバエを用いた N-結合糖鎖解析法を確立することに成功した。これら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, 研究成果を得た。研究期間の終盤では, 糖鎖分析法全般をセミクロ化することで約十倍の高感度化を達成し, ショウジョウバエ1匹から様々な糖鎖構造の解析を可能とした。その結果, ショウジョウバエのみならず, レーザーマイクロダイセクションを用いて得られる組織切片上の領域特異的糖鎖解析法の確立に至った。以下にその詳細を記す。

[1] 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中の中性糖は主に 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。ショウジョウバエの複合糖質を構成する単糖の組成を再現性よく定量する方法の確立に成功したことから, RNAi 変異体の糖組成変化を解析できるようになった。

[2] グリコサミノグリカンの二糖組成分析: 我々は本プロジェクト研究の開始前に, 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世界に先駆けて報告している(Toyoda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275, 2269-2275 (2000)). この従来法では, ショウジョウバエおよそ 100 匹を用いて分析を行っていたが, 詳細な検討の結果, 10 匹のショウジョウバエのグリコサミノグリカンの二糖組成分析に成功し, RNAi 変異体への応用を可能にした。様々なグリコサミノグリカン合成酵素の遺伝子の誘導型 RNAi を行った結果, C5 エピメラーゼおよびヘパラン硫酸-2-O-スルホトランスフェラーゼの遺伝子をターゲットにした際に, 顕著なヘパラン硫酸構造の変化が起きることを見いだした。現在, C5エピメラーゼおよびヘパラン硫酸-2-O-スルホトランスフェラーゼ遺伝子に関する有用なショウジョウバエ変異体は確立されていない。従って本研究で行われた RNAi による遺伝子機能の阻害実験は, ショウジョウバエにおける両遺伝子の機能を生化学的に解析した初めての試みである。

[3] N-結合糖鎖の分析: N-結合糖鎖はタンパク質のフォールディング等に大きな影響を及ぼすことから, 糖鎖機能の解析に際して微量の試料を用いた構造解析法が重要である。そこで 2-アミノピリジンを用いた蛍光プレカラムHPLCによる微量分析法を詳細に検討し, 10 匹のショウジョウバエへの応用に成功した。PA 化 N-結合糖鎖の標準品を用いた分析や質量分析を用いた同定によって, ショウジョウバエの N-結合糖鎖が M9.1, M5.1, O10.1 等から構成されていることを明らかにした。ショウジョウバエでは, 微量成分として, Fuc α 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc 構造を含む N-結合糖鎖が細胞間シグナル伝達系にかかわっていると推察されていることから, 関連する RNAi 変異体を解析し, 研究を継続中である。

[4] レーザーマイクロダイセクションを用いた糖鎖の領域特異的解析: 共焦点レーザー顕微鏡の普及によって, 微少領域の鮮明な蛍光画像が簡単に得られるようになり, 領域特異的な生命現象解析技術は飛躍的に向上した。しかし, この時用いられる抗体等の構造特異的なプローブによる可視化は, タンパク質や核酸に対しては非常に有効であるが, 糖鎖を解析するには十分に機能しない。そこで, 今後発展させるべき新しい技術として, 領域特異的な糖鎖の計測が挙げられるが, 糖鎖に対する抗体やレクチンを用いた共焦点レーザー顕微鏡観察では糖鎖構造を特定することはできず, 最終的には糖鎖の化学的な微量分析が必要となる。レーザーマイクロダイセクション(LMD)は切片上の標的とする細胞塊をレーザーで切り出して回収することのできる新しい研究ツールであり, 局所の DNA 分析, RNA 分析, タンパク質機能解析等に利用されはじめているが, 本研究ではこれを糖鎖分析に応用した。まず, LMDと組み合わせて使用できる N-結合糖鎖のセ

ミクロLCを用いた分析法の検討を行った(S/N=3 でPA 化 *N*-結合糖鎖の検出限界 400 amol). この方法を用いて、ヘマトキシリン染色を施したマウスの脳切片の解析を行った結果、厚さ 10 μ m、半径 300 μ m の切片から *N*-結合糖鎖を解析することが可能となり、発生や分化に応じた脳 *N*-結合糖鎖の変動を観察することができた。

[5] 糖鎖解析システムのセミマイクロ化による超微量分析: [4]で *N*-結合糖鎖分析法の感度が向上したことから、わずか1匹のショウジョウバエを用いて *N*-結合糖鎖のプロファイル分析が可能になった。またグリコサミノグリカンの二糖組成分析計のセミマイクロ化に着手し、約10倍の高感度化を達成した。その結果、ショウジョウバエ1匹からコンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸を分析可能とした。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究は生体試料中の微量な糖鎖を解析するシステムの構築を目的として展開した。本研究で検討した、様々な生体試料の前処理法および糖鎖微量分析法による感度は他の追従を許さない。得られた研究成果は、現在の糖鎖研究の重要課題とされている、糖鎖の高効率な分画・精製・同定技術の開発、糖鎖の機能解析・検証技術の開発に多大な貢献をもたらした。今後これらの解析法は多くの糖鎖研究の発展に寄与することが期待される。

3. 5 糖鎖基質及び阻害剤の合成

((財)野口研究所 糖鎖合成グループ 水野真盛)

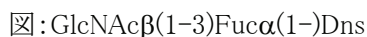
(1) 研究実施内容及び成果、及び、(2) 研究成果の今後期待される効果

生体内の糖鎖の機能を分子レベルで解明するためには単一標品を糖鎖基質として用いた研究が必要である。しかしながら、市販されている糖鎖基質は天然に存在するもののごく一部でしかない。そこで様々な生理機能に関与する糖鎖の機能制御に関わっている糖転移酵素・糖加水分解酵素・レクチン分子など生体の糖鎖関連遺伝子の網羅的な解析のためには基質となるオリゴ糖・糖脂質・糖タンパク質といった多種類の標品を有機化学的手法によって系統的に合成し供給することが必要不可欠である。またさらに、HPLC など様々な分析機器によって容易に検出できるような官能基を導入する必要があるが、そのような基質の合成には有機化学的手法を用いることが最も有効である。本CRESTにおける糖鎖合成グループのターゲットは、[1]ショウジョウバエのNotch糖鎖におけるガラクトース転移酵素探索のための糖鎖基質の合成、[2]*N*-アセチルグルコサミン転移酵素探索のためのペプチド基質の合成、[3]*O*-結合型糖タンパク質のコアタンパク質探索のための*N*-アセチルグルコサミンツールおよび*N*-アセチルガラクトサミンツールの合成、[4]T 抗原およびTn 抗原に対するレクチン釣り上げのための糖鎖基質の合成、[5]ハエのジストログリカンモデルとした抗体作成用糖ペプチドの合成、[6]LacdiNAc 構造に対する抗体作成用糖基質の合成である。以下にそれぞれについて記述する。

[1] Notch 糖鎖におけるガラクトース転移酵素探索のための糖鎖基質の合成

① 研究実施内容

Notch は細胞の運命を決定する要因として最近特に注目されている糖タンパク質である。特にその働きを制御しているのが糖鎖構造であり、哺乳類のNotchの糖鎖はタンパク質のセリン・スレオニン残基にフコースが結合しさらに *N*-アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸 (Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-4)GlcNAc β (1-3)Fuc α (1-)*Ser/Thr*) の順で伸長した興味深い構造を有している。細胞内で糖鎖の構築を担っているのは糖転移酵素であり、糖転移酵素の働きがNotchの機能を直接制御している。事実Notchの機能の制御因子として発見されたFringeと呼ばれるタンパク質は *N*-アセチルグルコサミン転移酵素であることがわかった。そこで、本研究ではショウジョウバエにおけるNotch糖鎖の伸展に関わるガラクトース転移酵素の探索を目的として蛍光発色基をもった二糖誘導体:GlcNAc β (1-3)Fuc α (1-)*Dns* (下図) の合成を行った。



C-3 位水酸基のみ遊離にしたフコース誘導体と適切に保護したグルコサミンのチオグリコシド誘導体をグリコシル化し二糖誘導体を得た。さらに数段階を経て保護基の変換を行い、二糖供与体とした後にアミノエタノール誘導体との α 選択的なグリコシル化を行った。その後蛍光発色基であるダンシル(Dns)基をもったアミノカプロン酸誘導体とのカップリング反応を行い目的化合物を得た。

得られた化合物を基質として用い、**西原**と共同で、ガラクトース転移酵素による糖鎖の伸展反応を調べた。対照実験としたヒト由来の数種のガラクトース転移酵素では転移活性が認められたが、ショウジョウバエ由来の2種類のガラクトース転移酵素ではいずれも転移活性は確認されなかった。以上の結果より本化合物の供給により、ハエのガラクトース転移酵素はヒト由来の酵素とは基質特異性が異なるのかまたは元来ショウジョウバエの Notch 糖鎖にはガラクトースが存在していない可能性があることが推測された。さらに、検討をおこなったところ、これらのハエのガラクトース転移酵素は、ガラクトース転移活性ではなく、*N*-アセチルガラクトサミン転移活性を持ち、内1種は、本基質に GalNAc を転移することが明らかになった。

[2] *N*-アセチルグルコサミン転移酵素探索のためのペプチド基質の合成

① 研究实施内容

O-結合型タンパク質はムチン型に代表されるようにタンパク質のセリンまたはスレオニン残基に *N*-アセチルガラクトサミンが α 結合している。ところが一部の糖タンパク質では *N*-アセチルグルコサミンが O-グリコシドで結合している。本研究ではタンパク質に *N*-アセチルグルコサミンを導入させる酵素の探索のため蛍光発色基をもった 9 残基からなるペプチド誘導体 (Dns-Acp-Tyr-Ser-Asp-Ser-Pro-Ser-Thr-Ser-Thr-OH) を合成した。

② 研究实施方法

ペプチド自動合成装置(Applied Biosystems 433A Peptide Synthesizer)を用いてペプチドを構築した後、ダンシルアミノカプロン酸をカップリングして樹脂からの切り出し、ペプチド側鎖の脱保護を行って目的化合物を合成した。

[3] O-結合型糖タンパク質のコアタンパク質探索のための N-アセチルグルコサミンツールおよび N-アセチルガラクトサミンツールの合成

① 研究実施内容

Bertozzi らの開発したコアタンパク質の釣り上げの方法を用いることにした。彼らは *N*-アジドアセチルガラクトサミン誘導体を細胞に投与し、これがサルベージ経路により UDP-*N*-アジドアセチルガラクトサミンに誘導された後タンパク質に取り込まれる。その後細胞を破碎し、アジド基の Staudinger 反応を利用して蛍光発色基を持ったプローブ分子とのカップリングを行いコアタンパク質を検出することを試みた。本研究では Bertozzi らの方法を用いて、ショウジョウバエの *O*-結合型糖タンパク質のコアタンパク質を探索することとした。

② 研究实施方法

合成目的化合物は *N*-アジドアセチルガラクトサミン誘導体と *N*-アジドアセチルグルコサミン誘導体

(下図)であるが、Bertozzi らの合成方法では単離精製に問題があったため、それを解決する合成ルートを開発した。グルコサミン塩酸塩を出発原料として用い、アミノ基にベンジルオキシアセチル基を導入し、残りの水酸基のアセチル化を行った。その後ベンジル基を除去し遊離となった水酸基をクロル化しアジド基を導入した。ガラクトサミンも同様にして合成し、両方とも純度の高い化合物が精製できた。

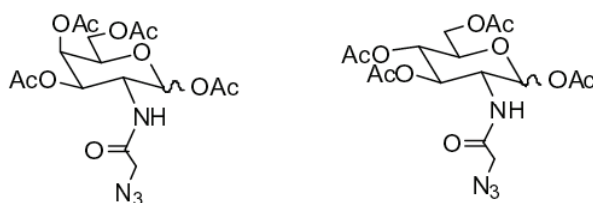


図: *N*-アジドアセチルガラクトサミン誘導体と *N*-アジドアセチルグルコサミン誘導体

③ 研究結果

現在、ショウジョウバエの *O*-結合型糖タンパク質のコアタンパク質の探索は進行中である。

[4] T 抗原および Tn 抗原に対するレクチン釣り上げのための糖鎖基質の合成

① 研究実施内容

レクチンを同定するためにはチップの上にレクチンが認識する糖鎖を固定化しレクチンの入った溶液を注入する。その後洗浄し、糖鎖に結合したレクチンを取り出すといった手法が用いられる。ここでは、固定化部位となるリンカー部分を結合させた T 抗原 ($\text{Gal}\beta(1-3)\text{GalNAc}\alpha$) ならびに Tn 抗原 ($\text{GalNAc}\alpha$) 糖鎖を合成することとした。

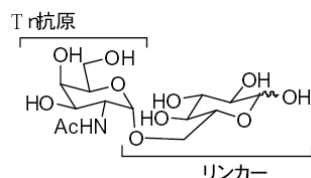


図: グルコースリンカー部位を結合させた Tn 抗原

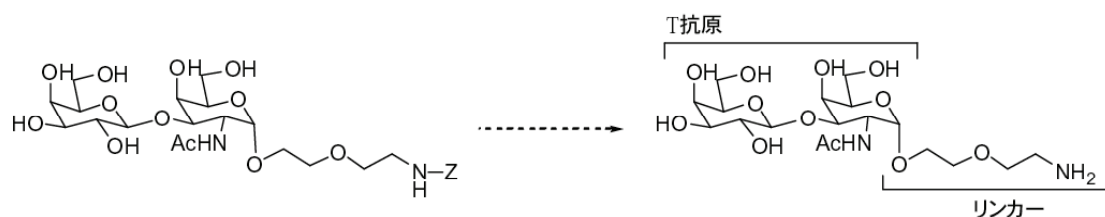


図: アミノエトキシエタノールリンカー部位を結合させた T 抗原

② 研究実施方法

リンカーとしては、還元的アミノ化法での固定化を行うためにグルコースを用いることにした。2-アジドグルコース保護体とグルコース保護体を縮合後、官能基変換、及び脱保護することによりグルコース型リンカーを有する Tn 抗原を合成することができた。

次に、T 抗原誘導体の合成について種々検討を行ったが、目的の 3 糖構造を合成するのは非常に困難であることが明らかと成った。そこで T 抗原に関してはリンカー部位を 2-(2-アミノエトキシ)エタノールへと変更し、固定化もアミノ基を介した手法を用いることにした。まず、2-(2-アミノエトキシ)エタノールのアミノ基をベンジルオキシカルボニル (Z) 基で保護した後、2-アジドグルコース

保護体、ガラクトース保護体の順に縮合を行い、リンカー部分を有するT抗原前駆体までの合成に成功した。最後にアジド基のアセトアミド基への変換、および脱保護操作を行い、目的の T 抗原誘導体の合成に成功した。

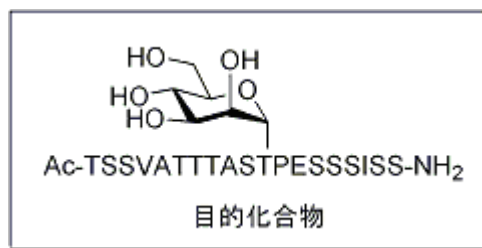
③ 研究成果

これらの化合物は、レクチン釣りあげ用糖鎖チップの原料として用いた。

[5] ショウジョウバエのジストログリカンモデルとした抗体作成用糖ペプチドの合成

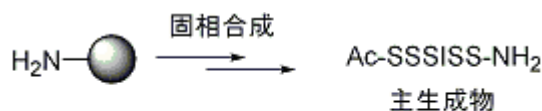
① 研究実施内容

ショウジョウバエにもヒト同様ジストログリカン糖タンパク質が存在している。ヒト型ジストログリカンの糖鎖はタンパク質のセリン・スレオニン残基にマンノースが結合しさらに *N*-アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸 (Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-4)GlcNAc β (1-2)Man α (1-)*Ser/Thr*) の順で伸長した構造を有している。一方、ハエ型ジストログリカンの糖鎖はマンノースのみしか有していないことが示唆されている。そこでこのような *O*-マンノシルペプチドを用いた抗体作成のための基質としてアミノ酸19残基、及びマンノース 1 残基からなるマンノシルペプチドを合成することにした。マンノシルペプチドとしてはアミノ酸配列がハエのジストログリカンの3つのスプライシングバリエーション全てに共通する配列 (TSSVATTTASTPESSSISS) であり、11 残基目のスレオンにマンノースが付加した構造を設計した。



② 研究実施方法

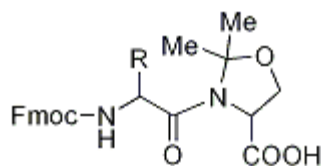
まず、原料となる糖アミノ酸 Fmoc-Thr(Man)-OH を合成し、糖水酸基遊離で行う糖ペプチド合成法であるジメチルチオホスフィン酸混合酸無水物 (Mpt-MA) 法により合成を試みたが目的物は得られなかった。そこで、Mpt-MA 法よりも強力な縮合法である PyBOP 試薬を用いるため糖アミノ酸ユニットとして新たに Fmoc-Thr[Man(OAc)₄]-OH を合成し、糖ペプチドの固相合成を行ったが、本条件においても目的物は得られなかった。そこで、本条件下で得られた主生成物を単離し構造を同定したところ、Ac-SSSISS-NH₂ という構造が得られた。この結果より、C末端から6残基目の Ser 以降の縮合が進行しないことが明らかとなった。これは固相担体上でペプチド鎖の凝集・会合が生じたためと考えられた。



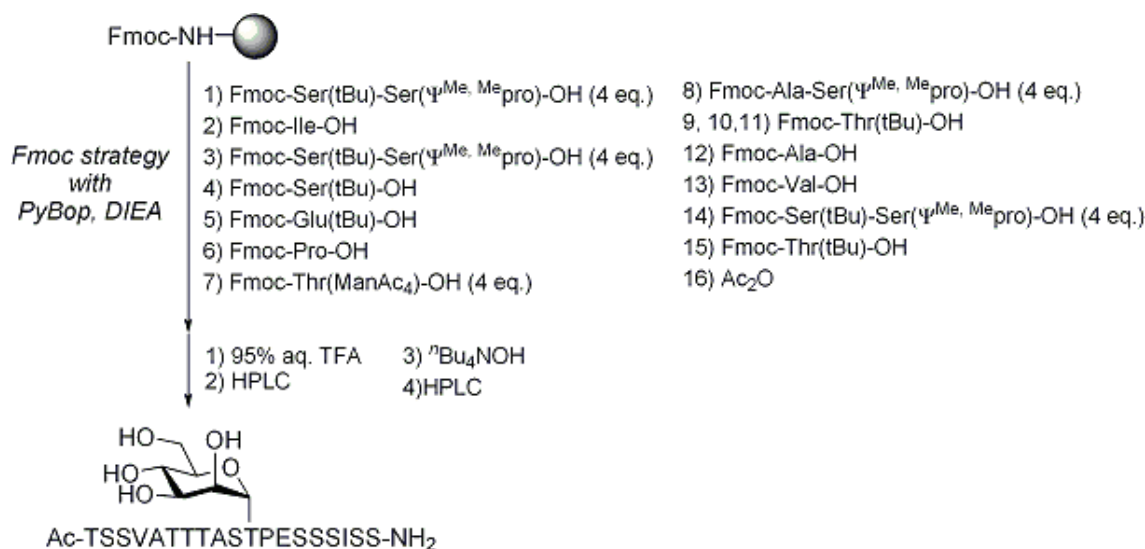
目的化合物は得られず。

③ 研究成果

そこで、固相合成時におけるペプチド鎖の凝集・会合による縮合阻害を回避するため、3, 10, 16, 19 残基目のセリンの代わりに、擬似プロリン誘導体を使用し、PyBOP を縮合剤として用い、反応を行ったところ、収率良く目的のマンノシルペプチドが得られた。



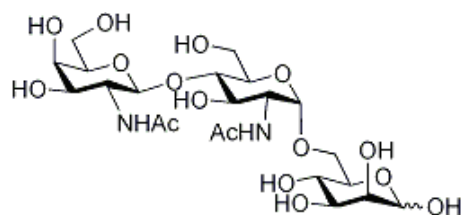
擬似プロリン [Fmoc-AA-Ser($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH]



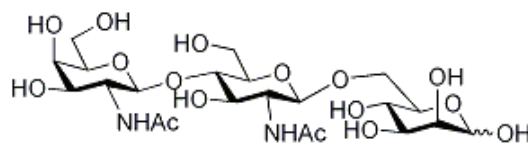
[6] LacdiNAc 構造に対する抗体作成用糖基質の合成

① 研究実施内容

O-結合型やN-結合型糖タンパク中に発現している LacdiNAc の糖鎖構造を認識するような抗体の探索ための基質として、LacdiNAc 骨格 (GalNAcβ1→4GlcNAc) を有する糖誘導体として GalNAcβ1→4GlcNAcα1→6Man (LacdiNAcα-Man) 及び GalNAcβ1→4GlcNAcβ1→6Man (LacdiNAcβ-Man) を設計し、その合成を行った。



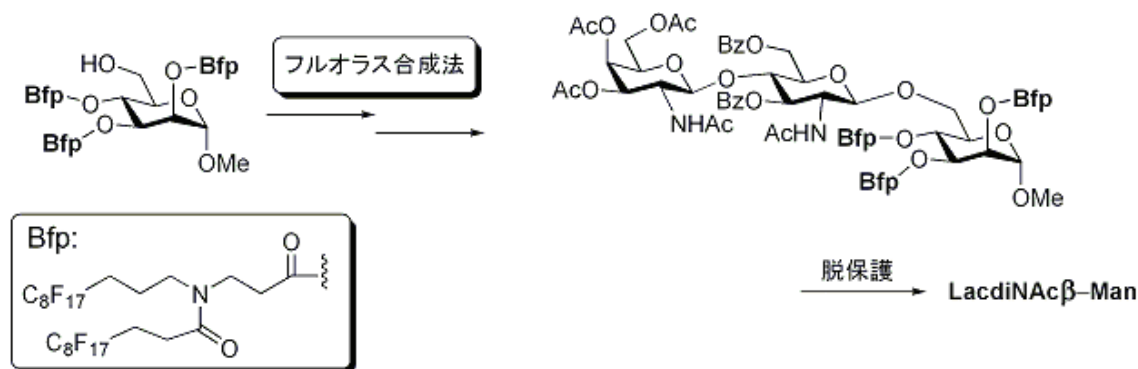
LacdiNAcα-Man



LacdiNAcβ-Man

② 研究実施方法

まず、原料となる GalNAc 誘導体、GlcNAc 誘導体、Man 誘導体の合成を行った。LacdiNAcα-Man の合成は通常の有機合成手法で行った。LacdiNAcβ-Man の合成は、迅速液相合成法として近年注目されているフルオラス合成法を用いて行った。なお、今回は当研究室で開発したフルオラスタグ Bfp 基を用いた。



③ 研究成果

LacdiNAcα-Man、LacdiNAcβ-Manともに良好な収率で合成することができた。特にLacdiNAcβ-Manはフルオラス合成法を用いたことにより、通常の合成法と比べて効率よく合成することが明らかとなった。

3. 6 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 (北里大学 糖鎖細胞制御グループ 中村充)

(1) 研究実施内容及び成果

① 研究のねらい

ショウジョウバエの系でスクリーニングし、哺乳動物細胞の系で機能解析をする重要性が認められた糖鎖関連遺伝子のRNA干渉を、哺乳動物細胞の系で実現する。

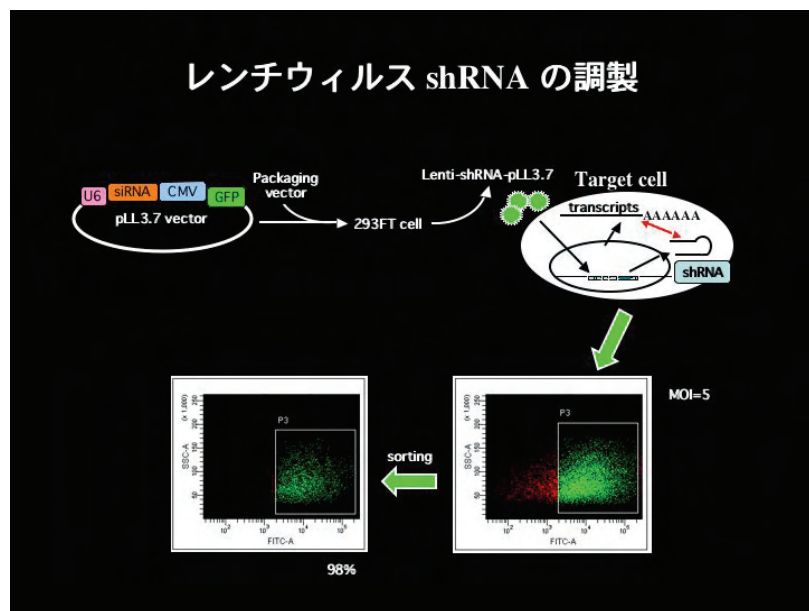
② 研究実施方法

対象とした糖鎖関連遺伝子は、ショウジョウバエの系でスクリーニングし、哺乳動物細胞の系で機能解析する重要性が認められたものを中心とした。

哺乳動物細胞の中には、遺伝子導入が大変難しい細胞が存在する。あらゆる細胞におけるRNA干渉を実現するため、当グループでは、プラスミドベクター系ではなく、レトロウイルスならびにレンチウイルスベクター系に注力することにした。特に、レンチウイルスベクターにおいては、Cre-loxシステムでコンディショナルなRNA干渉を行う系も導入した。Creはアデノウイルスの感染によってONまたはOFFを誘導するシステムである。ターゲット配列を選定するアルゴリズムは、アンビオンなどに代表される商用データベースのアルゴリズムを当初参照していた。しかし当グループでは、さまざまな紆余曲折を経た上で、Ui-Tei、Saigoらの報告(Nucleic Acid Res, 32:936-948, 2004)を参照することにした。システムティックに構築するsiRNAベクターの対象糖鎖関連遺伝子は、N-グリカン系、O-グリカン系、プロテオグリカン系、その他あわせて計12種類で、レトロウイルスベクターを用いた。それぞれの遺伝子に対して、最低でも2種類の異なるターゲット配列を選定するべくノックダウン効果のスクリーニングを行った。

哺乳動物細胞の中で、当グループとして最も扱いに慣れていてRNA干渉技術を応用しやすく、RNA干渉を使った効果的研究を行いやすい造血前駆細胞を導入細胞として選んだ。この場合、導入効率を考慮してレンチウイルスベクターシステムを用いた。ヒトB細胞系の細胞株に導入して安定発現株を樹立するか、または、一過性発現を行って、プレB細胞の分化におけるセレクトイン関連遺伝子の機能解析を行った。導入細胞株における糖鎖関連遺伝子の発現抑制を確認し、標的遺伝子の機能を解析した。レトロウイルス、レンチウイルスともに、マウスU6プロモーターでショートヘアピン

タイプのdsRNAをドライブするベクターを用いた。レトロウィルスではPGKプロモーターで、レンチウィルスではCMVプロモーターでそれぞれEGFPをドライブする配列が両ベクターに組み込まれている。レトロウィルスベクター (pRetroU6-PGK/EGFP) は東京都臨床研の原孝彦先生から、レンチウィルスベクター (pLL3.7) はMITのVanParijs博士から、Cre-loxによるコンディショナルなRNA干渉を実現するレンチウィルスベクター (pSicoおよびpSicoR) は同じくMITのJacks博士からご供与いただいた。レトロウィルス、レンチウィルスともに、宿主細胞としては293系の細胞株を使用してウィルスのパッケージングを行った。siRNA導入細胞はEGFPタンパクにより蛍光を同時に発色している。本蛍光をマーカーにして、セルソーター (FACSaria) を用いて緑の蛍光を発色している細胞を選別し、95%以上の純度の細胞集団として以下の解析に供した。



他方、ショウジョウバエの系で最重要として選定されてきたPAPS輸送体1については、その遺伝子をコンディショナルに破壊するマウスの調製を、定法に従って行った。

③ 研究結果

哺乳動物細胞の系で、レトロ・レンチ両ウィルスベクターを骨格に用いて、一過性または恒常的にsiRNAが働いてRNA干渉を実現するベクターを各種構築した。遺伝子ノックダウン効果をスクリーニングした結果、最も初めに採用していたアルゴリズムでは、75%以上のノックダウン効率をもたらしたターゲット配列は、約40種類調製した中で3配列(8%)と惨憺たる結果だった。次に採用したアルゴリズムでは、48ターゲット配列中で約38%にあたる18ターゲットが75%以上のノックダウン効果をもたらした。現在使用しているアルゴリズムでは、51配列中で63%にあたる32配列で75%以上の遺伝子発現抑制効果が得られ、大幅な向上が見られた。70%以上効く配列ということで計算すると、36ターゲット配列に上り71%に及んだ。

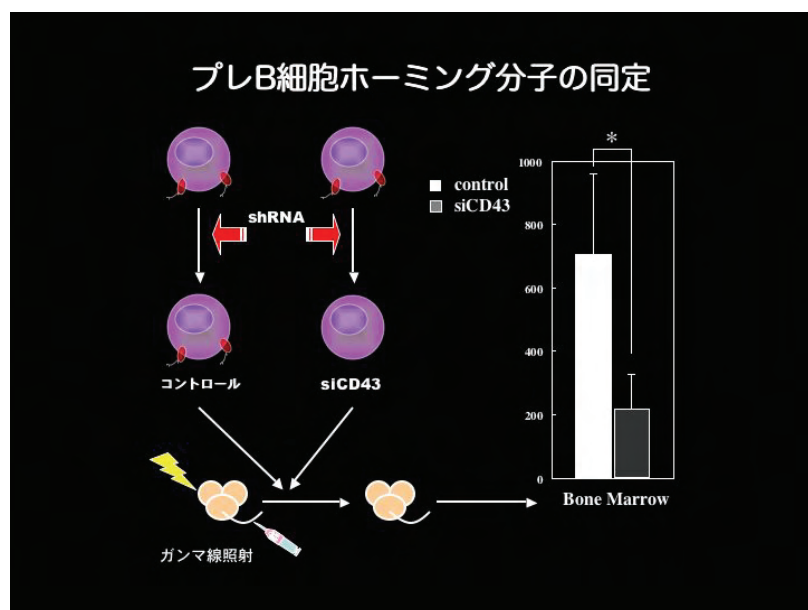
ターゲット遺伝子を外来性に強発現させ、同時にsiRNAを効かせた時に非常に良好な結果が認められても、細胞中で内在性に働いている遺伝子については、必ずしもノックダウンすることは出来なかった。また、当グループではウィルスベクターによるRNA干渉を行ったが、そのためのターゲット配列スクリーニングに、当初プラスミドベクターだけを使うという簡便法を用いていた。しかし、その簡便法を用いて効果的であった配列が、ウィルスにパッケージングして違う細胞に応用した時に同様にノックダウン可能だったかという点、必ずしもそうとはいえなかった。現在の結論としては、目的の細胞を使い、ウィルスにパッケージングしてスクリーニングするのがベストである。目的の細胞が調製困難なものであれば、非常に似た細胞を用いてスクリーニングする必要があると考えている。

配列によっては、他の遺伝子発現にも抑制効果を持つものがあつた。これは、インターフェロン反応を誘導するものと、配列の類似性によるオフターゲット効果をもたらすもの、配列の類似性も見ら

れずインターフェロン反応も誘導していない原因不明のタイプと三つに分類できた。ターゲット効果として、他の遺伝子を抑制している可能性も区別できない。しかし、ターゲット効果としての他遺伝子発現抑制は、異なる二つのターゲット配列で全く同様の効果をもたらす場合にのみ判断できるものと考えられた。詳しい解析は充分進んでいないが、現在までのところ、糖鎖関連遺伝子同士で、ターゲット効果の一環として影響を及ぼしあっているケースには遭遇していない。ともあれ、紆余曲折を経て、複数の他の糖鎖遺伝子に対して遺伝子発現抑制効果を示さない、特異性の高いターゲット配列を得る手順が、ほぼ(6〜7割程度の確率で)整った。

手中にすることができたRNA干渉技術を哺乳動物細胞に応用する第一段階として、当グループでは、まず最も扱いに慣れている造血前駆細胞を対象として選び、特にヒトプレB細胞の分化におけるセレクトイン関連遺伝子の機能解析を行った。ヒトプレB細胞とその細胞分化で細胞接着に重要な働きを示すセレクトイン関連の遺伝子発現を、レンチウイルスベースのRNA干渉技術によりノックダウンし、関連遺伝子の機能を解析した。機能解析の対象としたものは、セレクトインリガンドを発現しているコアタンパクCD43、コア2GlcNAc転移酵素-1である。他の遺伝子、特にPSGL1、FUT7、ST3Gal-IVなどに影響がない、ターゲット遺伝子特異的に75%以上の遺伝子発現抑制効果をもたらす配列をスクリーニングにより選定した。遺伝子発現抑制が認められた細胞については、(1)シアリルLeX抗原発現、(2)セレクトイン/Igキメラタンパクとの反応性、(3)セレクトイン発現CHO細胞との細胞接着活性、(4)免疫不全マウスへの移植によるホーミング能などを解析して良好な結果を得た。

プレB細胞ではセレクトインリガンドを発現していて細胞分化とともにその発現量がダウンレギュレートしてゆく。細胞分化およびセレクトインリガンド発現減少にともなって発現が平行に変化するのには、FUT7でもST3Gal-IVでも β 4Gal-Tsでもコア1遺伝子でもなく、コア2GlcNAc転移酵素-1とCD43であった。PSGL1はヒトプレB細胞では発現がなかった。そこで、CD43、コア2GlcNAc転移酵素-1のRNA干渉を



行って、C2GnT-1+/CD43+/セレクトインリガンド+という免疫学的形質を持つプレB細胞における解析と免疫不全マウス個体を用いた解析を行った。プレB細胞で両遺伝子をノックダウンすると、プレB細胞のシアリルLeX抗原発現およびセレクトイン/Igキメラタンパクとの反応性が低下した。また、セレクトイン発現CHO細胞を用いた細胞接着活性が減少し、NOD/SCID(免疫不全)マウスへの移植における骨髄・肝臓・脾臓へのホーミング能も著しく(〜90%)低下した。本結果により、CD43、コア2GlcNAc転移酵素-1のセレクトインリガンド発現調節機構への重要な関与が証明された。

一方、ショウジョウバエではfrc(フリンジコネクション)やsll(スラローム)が、NotchシグナルやWntシグナル伝達に関与していることが示されている。これらゴルジ膜内在性の糖スクレオチド輸送体のうち、特に、マウスFrcとマウスUGT-Rel7がマウス細胞株でどのように機能しているかも解析した。当該遺伝子に対するレトロウィルス性RNA干渉ベクターを最低2種類構築した。Notchシグナ

ルとWntシグナル伝達系の活性化を測定する目的で、マウス血液前駆細胞BaF3細胞株を用いたレポーターアッセイを構築した。

さらに、機能解析する重要性が認められた糖鎖遺伝子のうち、PAPS輸送体遺伝子1をコンディショナルに遺伝子破壊するマウスを作出した。まず、本遺伝子破壊マウス調製用のベクターを構築し、129/Sv系のE14ES細胞株に導入した。定法に従って、得られた導入ES細胞株を用いてキメラマウスを作成し、生殖系へのノックアウトアレル伝達を確認するまでC57/B6マウスとの交配を続けた。ヘテロマウスの調製が終わった後、全身Creマウスを導入して、全身性ノックアウトマウスを調製したところ、重篤な表現型を示した。現在、**西原**と共同で、さらなる解析を行っている。これは、絞り込みの指標、すなわち、「モデル動物で重要であることが判明した遺伝子」という指標が的を射たものであったことを示している。RNA干渉技術に応用した細胞レベルでの機能解析に加え、マウス個体を用いた当該遺伝子の機能解析が推進された。

以上示した様に、当グループのレトロウィルス・レンチウィルス性のRNA干渉技術が、フローサイトメーター解析の可能な他分子の発現量変化をもたらすだけでなく、細胞を用いた機能解析（細胞接着活性）やマウス個体を用いた*in vivo*実験とも融合させて重要な機能解析に応用可能な技術であることが証明された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

がん幹細胞がいわゆる組織内微小環境（ニッチ）の中に潜って抗がん剤が効かなくなることが示唆されている。本研究で発見されたホーミング分子をターゲットとする抗体医薬などが今後実現することにより、組織内微小環境からがん細胞を追い出し、細胞周期が回転するようにし向けて抗がん剤が効くようにするなど、白血病治療の作用点が増えることが強く期待される。また、本研究によって作成したモデルマウスを用いることにより、硫酸基を認識する機能分子の働きに関する研究が進み、分化誘導、細胞増殖、細胞間相互作用などをターゲットとする新たな作用点が発見される可能性が強まった。これらにより、新たな抗がん剤が開発されて産業応用へと進み、がん患者のQOLが大幅に改善するなど、科学技術はもとより社会への波及効果は大きい。

3. 7 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 (鹿児島大学 糖鎖チップグループ 隅田泰生)

(1) 研究実施内容及び成果

① 実施概要

ショウジョウバエ糖鎖機能の網羅的解析には、糖鎖合成に関わる遺伝子に加え、糖鎖に結合して機能を示すレクチン分子の解析が、重要なものとなる。しかし、ショウジョウバエのレクチンについては、ガレクチンやカルネキシンなどの一部を除いては、その存在すら明らかにされていない。重要と考えられる糖鎖を簡便に金蒸着チップや金ナノ粒子に固定化し、それぞれの糖鎖に結合するショウジョウバエ蛋白質との相互作用を解析した。

② 実施方法

種々の糖鎖に関しては、合成、または、天然物を精製して得た。なお、一部の糖鎖については、**水野**が合成したものをを用いた。それらを我々が確立した技術で簡便に金蒸着チップや金ナノ粒子に固定化する。チップはSPR解析、金ナノ粒子は凝集実験を行って、それぞれの糖鎖に結合するタンパク質との相互作用を解析した。また、タンパク質や細胞ライセートを対象とした場合は、相互作用解析後に、質量分析等によって結合因子の同定を試みた。

③ 成果

[1] 糖鎖を固定化するためのリンカーの開発と SPR イメージング用のシュガーチップの開発

糖鎖を化学修飾せずに、還元アミノ化反応を利用してマイルドな条件で金チップに固定化するためのリンカーを開発した。このリンカーには、還元アミノ化反応を効率よく進行させるための芳香族アミノ基と、金と Au-S 結合を形成し、かつ糖鎖との複合体(リガンド複合体と総称)の精製を容易にする分子内環状 S-S 結合が存在する。現在までに、約 70 種類のリガンド複合体を調製し、SPR イメージング用のシュガーチップ調製に用いている。このチップは、約 1ml の溶液を金チップ上へスポットして作成し、1 枚のチップに最大 96 個の糖鎖をリガンドとして固定できる。一例として、38 種類の糖鎖への 5 種類のタンパク質の結合挙動を調べた。それぞれ特異的な糖鎖結合性が観測され、その特異性は従来型の 2 チャンネル型 SPR (SPR-670M) で調べた結果と同様であり、スクリーニング等網羅的解析に用いることが可能であることがわかった。また、結合の相対強度を定量化することもできた。

[2] ショウジョウバエ胚細胞ライセート中の未知のレクチン分子の解析

ショウジョウバエの胚よりライセートを調整し、それを用いて種々の糖鎖に結合するレクチン分子の検索を行った。SPR 解析により、一部の糖鎖に強い結合を示すタンパク質の存在が確認された(図 1(A))。糖固定化アフィニティゲルを用いたアフィニティクロマトグラフィーと質量分析により数種のタンパク質を同定し、さらなる解析を、**西原**と共同で行っている。その一方で、現在、この試料に対し、糖を固定化した金ナノ粒子を用いて簡便にタンパク質を単離する試みも行った(図 1(B))。また、SPR 解析によって結合を確認した後、解析に用いたチップをそのまま使用して、連続的に質量分析を行ってタンパク質を同定する SPR/MS 法も検討している。

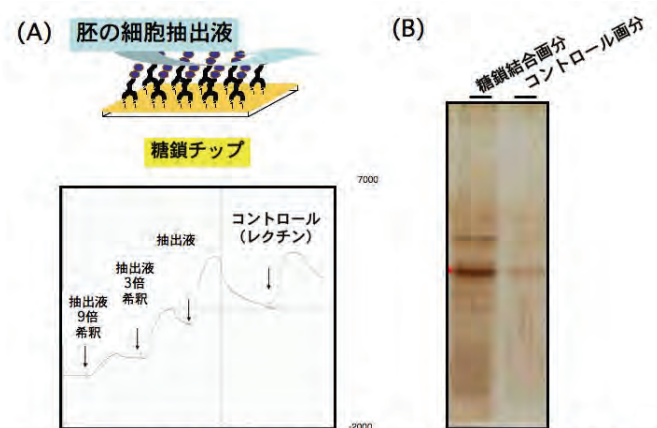


図1; ショウジョウバエ胚細胞ライセート中の未知のレクチン分子の解析
(A) SPR 解析、(B) 得られた糖鎖結合タンパク質

[3] ヘパリン結合性蛋白質の糖鎖チップによる解析

市販のヘパリンから MWCO3500 透析膜を用いて夾雑物及び低分子量のヘパリンを除去して精製ヘパリンを得た。最適化した条件下で、精製ヘパリンを、我々が開発したモノバレントリンカーに還元アミノ過反応によって導入し、リガンド複合体を調製した。SPR の金チップに濃度 10 mM で固定化して Heparin-Chip を作成した。

西原により作成されたヘパリン硫酸

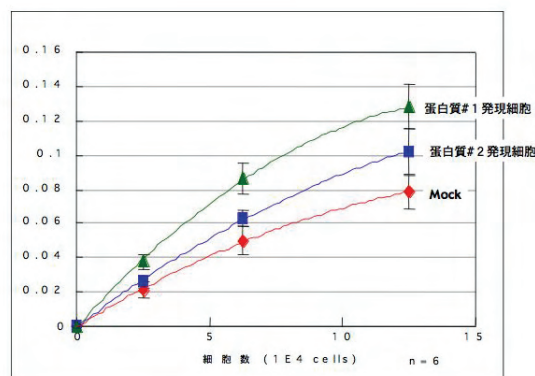


図2; Heparin-Chip に対する
ヘパリン硫酸結合性タンパク質発現細胞の結合

結合性タンパク質を発現している細胞（細胞表層に対応するタンパク質が存在していることは、別途確認済み）を、上記 Heparin-Chip を装填した SPR 装置 (Nano-sensor, モリテックス社) にアプライしてヘパリンとの結合を検討した。タンパク質の種類によって異なるものの、モック細胞とは明らかに異なる応答が確認され、可溶化していないタンパク質でも十分にヘパリンとの結合挙動を解析できることが明らかとなった (図 2)。

さらに、ヘパリン結合性のモルホゲンであるとされている Wingless のマウスホモログの1種、Wnt3a のリコンビナントタンパク質を用いて、ヘパリン結合性の解析を行った。Wnt3a とヘパリンとは顕著な結合相互作用を示し、解離常数は 26 nM であった (図 3)。本解析は、Wnt とグリコサミノグリカン鎖の初めての解析例となった。Wnt がヘパラン硫酸鎖に結合することは予想されていたが、実際に、このように強い親和性があることが明らかになったことは意義深い。

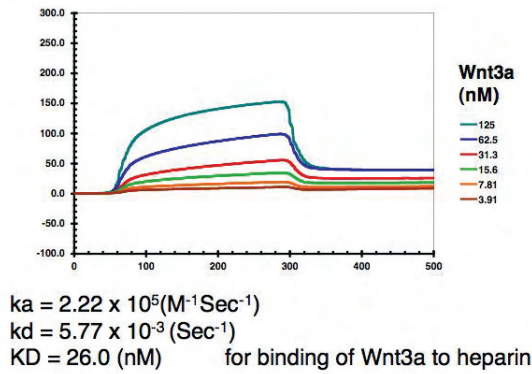


図3 ; Heparin-Chipを用いたSPR解析

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、ショウジョウバエを対象とし、そのレクチン分子の検索と同定を行うため、微量サンプルの解析に耐えうる様々な方法を開発してきた。これらの方法は、ショウジョウバエのみならず、すべてのサンプル、例えば、臨床サンプルにも応用可能であり、その波及効果は極めて高い。

また、[3]に示した研究で、細胞表面の膜タンパク質に対しても、そのヘパリンに対する結合性を、ヘパリン固定化チップを用いて簡便に測定できることが明らかとなった。細胞表面のタンパク質が SPR 解析の対象となることを示した例であり、これに基盤を置く新しい解析方法を提供できるものと考えている。さらに、現在、ヘパリンの代わりにヘパラン硫酸中に存在する、構造が明確な二糖構造を化学合成し、それらを固定化したヘパリン部分二糖チップを調製している。これら構造明確な構造を持つ二糖構造との結合を調べることによって、ヘパラン硫酸結合性分子の詳細な解析が可能となり、これがもたらす学術的意義は非常に大きい。

4 研究参加者

① 統括グループ (ショウジョウバエ、及び、哺乳類糖鎖関連遺伝子の機能の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
西原祥子	創価大学工学部生命情報工学科	教授	全体統括	平成 14 年 11 月～平成 20 年 3 月
佐々木紀彦	創価大学工学部生命情報工学科	共同研究員	生化学的解析、培養細胞の RNAi 解析	平成 15 年 4 月～平成 20 年 3 月
上山盛夫	創価大学工学部生命情報工学科	共同研究員	ハエ RNAi 変異体の発生的解析、遺伝学的解析	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月

不破尚志	創価大学工学部生命情報工学科	CREST 研究員	ハエ RNAi 変異体の発生的解析、遺伝学的解析	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
一宮智美	創価大学工学部生命情報工学科	技術員	分子生物学的解析	平成 15 年 4 月～平成 20 年 3 月
四野見将仁	創価大学工学部生命情報工学科	CREST 技術員	培養細胞の RNAi 解析	平成 18 年 4 月～平成 19 年 10 月
大澤健一	創価大学大学院工学研究科	修士	ハエ RNAi 変異体の発生的解析	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
井伊淳也	創価大学大学院工学研究科	修士	ノックアウトマウスの作成	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
島村優一	創価大学大学院工学研究科	修士	質量分析による解析	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
堀伊孝	創価大学大学院工学研究科	修士	ハエ RNAi 変異体の遺伝学的解析	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
宇野貴明	創価大学大学院工学研究科	修士	ハエ RNAi 変異体の生化学的解析	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
平野拓也	創価大学大学院工学研究科	修士	培養細胞の RNAi 解析	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
平野和己	創価大学大学院工学研究科	修士	培養細胞の RNAi 解析	平成 19 年 4 月～平成 20 年 3 月
吉田英樹	創価大学工学部生命情報工学科	CREST 研究員	ハエ RNAi 変異体の発生的解析、遺伝学的解析	平成 15 年 3 月～平成 18 年 3 月
大久保玲子	創価大学工学部生命情報工学科	技術員	糖鎖関連遺伝子の単離	平成 14 年 11 月～平成 15 年 3 月
鈴木正之	創価大学工学部生命情報工学科	技術員	糖鎖関連遺伝子の単離	平成 14 年 11 月～平成 15 年 3 月
竹前等	創価大学工学部生命情報工学科	共同研究員	ハエ RNAi 変異体の分子生物学的解析	平成 14 年 11 月～平成 15 年 6 月
久松光湖	創価大学工学部生命情報工学科	共同研究員	ハエ RNAi 変異体の生化学的解析	平成 14 年 11 月～平成 16 年 3 月
須田健	創価大学工学部生命情報工学科	共同研究員	siRNA 導入ヒト培養細胞の解析	平成 14 年 11 月～平成 16 年 3 月
濱本洋	創価大学大学院工学研究科	修士	ハエの RNAi 変異体の遺伝学的解析	平成 14 年 11 月～平成 16 年 3 月
大前佳子	創価大学大学院工学研究科	修士	ハエの RNAi 変異体の遺伝学的解析	平成 14 年 11 月～平成 16 年 3 月

合田絵美	創価大学大学院工学研究科	修士	ハエ RNAi 変異体の分子生物学的解析	平成 15 年 4 月～平成 18 年 3 月
稲垣政子	創価大学大学院工学研究科	修士	ハエ RNAi 変異体の遺伝学的解析、ハエの系統維持	平成 15 年 4 月～平成 18 年 3 月
有馬三紀子	創価大学大学院工学研究科	修士	ハエ RNAi 変異体の発生的解析	平成 16 年 4 月～平成 19 年 3 月
沖汐和彦	創価大学大学院工学研究科	修士	培養細胞の RNAi 解析	平成 16 年 4 月～平成 19 年 3 月
練国強	創価大学大学院工学研究科	修士	ハエ RNAi 変異体の発生的解析	平成 17 年 4 月～平成 19 年 3 月

② 遺伝学的機能解析グループ(ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子の体系的な RNAi 変異体作成の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
上田龍	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	教授	グループ総括	平成 14 年 11 月～平成 20 年 3 月
高橋邦明	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	助教	IR ベクター作成	平成 14 年 11 月～平成 20 年 3 月
谷口美佐子	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	技術職員	IR ベクター作成 形質転換	平成 14 年 11 月～平成 17 年 3 月
佐渡由希子	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	CREST 技術員	IR ベクター作成 形質転換	平成 15 年 10 月～平成 20 年 3 月

③ 発生的機能解析グループ(糖修飾の機能と機構の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
後藤聡	三菱化学生命科学研究所	主任研究員	糖鎖の機能と生合成過程の解析	平成 14 年 11 月～平成 20 年 3 月
日野美紀	三菱化学生命科学研究所	CREST 研究員	糖鎖の機能と生合成過程の解析	平成 15 年 4 月～平成 17 年 3 月
日下勇	三菱化学生命科学研究所	CREST 技術員	ショウジョウバエ系統の作成と維持	平成 17 年 4 月～平成 18 年 3 月
草壁あおい	三菱化学生命科学研究所	CREST 補助員	ショウジョウバエ系統の作成と維持	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
栗林理恵子	三菱化学生命科学研究所	CREST 技術員	ショウジョウバエ系統の作成と維持	平成 17 年 4 月～平成 17 年 6 月

④ 糖鎖構造解析グループ(ショウジョウバエ糖鎖関連遺伝子 RNAi 変異体の糖鎖構造の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
豊田英尚	千葉大学大学院薬学研究院	准教授	RNAi 変異体の糖鎖構造解析	平成 14 年 11 月～平成 20 年 3 月
豊田亜希子	千葉大学大学院薬学研究院	CREST 研究員	RNAi 変異体の糖鎖構造解析	平成 15 年 11 月～平成 20 年 3 月

⑤ 糖鎖合成グループ（糖鎖基質、及び、阻害剤の合成の研究）

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
水野真盛	(財)野口研究所	主任研究員	糖鎖基質及び阻害剤の合成	平成 17 年 4 月～平成 19 年 10 月
石田秀樹	(財)野口研究所	研究員	糖鎖基質及び阻害剤の合成	平成 14 年 11 月～平成 17 年 3 月
弘瀬友理子	(財)野口研究所	CREST 技術員	糖鎖基質の合成	平成 14 年 11 月～平成 19 年 9 月
長山園絵	(財)野口研究所	研究員	糖鎖基質の合成	平成 15 年 4 月～平成 15 年 9 月

⑥ 糖鎖細胞制御グループ（糖鎖関連遺伝子 siRNA 導入哺乳類細胞の性状の研究）

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
中村充	北里大学医学部/産業技術総合研究所	/チームリーダー	RNA干渉技術の哺乳動物細胞の系への応用、成果のとりまとめ、特許出願	平成 14 年 11 月～平成 20 年 3 月
佐々木裕信	産業技術総合研究所	派遣職員	RNA干渉技術の哺乳動物細胞の系への応用	平成 14 年 11 月～平成 19 年 9 月
菊池次郎	産業技術総合研究所	共同研究員	RNA干渉技術の哺乳動物細胞の系への応用	平成 14 年 11 月～平成 17 年 3 月
野々村智尋	産業技術総合研究所	CREST 研究員	siRNA 導入哺乳動物細胞株樹立・解析・KO マウス性状解析	平成 15 年 4 月～平成 19 年 3 月
安藤秀信	産業技術総合研究所	技術員	KO マウス調製と解析	平成 15 年 4 月～平成 17 年 3 月
矢口智美	産業技術総合研究所	技術員	グループ事務・KO マウス性状解析	平成 14 年 11 月～平成 18 年 3 月
藤井崇	産業技術総合研究所	共同研究員	KO マウス調製と解析	平成 15 年 4 月～平成 16 年 3 月
仲道裕美	産業技術総合研究所	技術員	siRNA 導入哺乳動物細胞株樹立・解析	平成 14 年 11 月～平成 15 年 3 月

⑦ 糖鎖チップグループ（シュガーチップを用いたレクチンの研究）

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
隅田泰生	鹿児島大学大学院理工学研究科	教授	シュガーチップ、糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたレクチンの解析	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
若尾雅広	鹿児島大学大学院理工学研究科	助教	シュガーチップ、糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたレクチンの解析	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
鶴田祥子	鹿児島大学産学官連携推進機構ベンチャービジネス部門	研究員	シュガーチップ、糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたレクチンの解析	平成 19 年 4 月～平成 20 年 3 月
岸本裕子	鹿児島大学大学院理工学研究科	技術員	糖鎖チップの調製、糖鎖固定化金ナノ粒子の調製、相互作用解析、質量分析	平成 18 年 10 月～平成 19 年 10 月
山下早希子	鹿児島大学大学院理工学研究科	技術員	糖鎖チップの調製、糖鎖固定化金ナノ粒子の調製、相互作用解析、質量分析	平成 18 年 10 月～平成 19 年 10 月

5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

6 成果発表等

(1) 原著論文発表（国内誌 0 件、国際誌 44 件）

1. Takemae, H., Ueda, R., Okubo, R., Nakato, H., Izumi, S., Saigo, K., Nishihara, S.: Proteoglycan UDP-galactose: β -xylose β 1,4galactosyltransferase I is essential for viability in *Drosophila Melanogaster*.

J. Biol. Chem., 278, 15571-15578 (2003).

2. Kamiyama, S., Suda, T., Ueda, R., Suzuki, M., Okubo, R., Kikuchi, N., Chiba, Y., Goto, S., Toyoda, H., Saigo, K., Watanabe, M., Narimatsu, H., Jigami, Y., Nishihara, S.: Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter.

J. Biol. Chem., 278, 25958-25963 (2003).

3. Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K., Saigo, K.: Requirement of Dicer and eIF2C translation initiation factors for short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells.

Curr. Biol., 13, 41-46 (2003).

4. Morio, H., Honda, Y., Toyoda, H., Nakajima, M., Kurosawa, H., Shirasawa, T.: *EXT* gene family member *rib-2* is essential for embryonic development and heparan sulfate biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*.

- Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 301, 317-323 (2003).
5. Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., T. Toida, T.H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H.E. Blum, T.F. Baumert: Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate.
J. Biol. Chem., 278, 41003-41012 (2003).
6. Tanaka, T, Tsuda, C., Miura, T., Inazu, T., Tsuji, S., Nishihara, S., Hisamatsu, M., Kajimoto, T.: Design and synthesis of peptide mimetics of GDP-Fucose: Targeting inhibitors of fucosyltransferases.
Synlett, 2004, 243-246 (2004).
7. Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R., Lemaitre, B.: *In vivo* RNA interference analysis reveals an unexpected role for GNBPI in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults.
J. Biol. Chem. 279, 12848-12853 (2004).
8. Suda, T., Kamiyama, S., Suzuki, M., Kikuchi, N., Nakayama, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Aoki, T., Nishihara, S.: Molecular cloning and characterization of a human multi-substrate specific nucleotide-sugar transporter homologous to *Drosophila fringe connection*.
J. Biol. Chem., 279, 26469-26474 (2004).
9. Kohyama-Koganeya, A., Sasamura, T., Oshima, E., Suzuki, E., Nishihara, S., Ueda, R., Hirabayashi Y.: *Drosophila* glucosylceramide synthase: A negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors.
J. Biol. Chem., 279, 35995-36002 (2004).
10. Ichimiya, T., Manya, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Takahashi, K., Ueda, R., Endo, T., Nishihara, S.: The twisted abdomen phenotype of *Drosophila* *POMT1* and *POMT2* mutants coincides with their heterophilic protein *O*-mannosyltransferase activity.
J. Biol. Chem., 279, 42638-42647 (2004).
11. Ui-Tei, K., Ueda, R., Zenno, S., Takahashi, F., Doi, N., Naito, Y., Yamamoto, M., Hashimoto, N., Takahashi, K., Hamada, T., Tokunaga, T., Saigo, K.: RNA interference induced by transient or stable expression of hairpin structures of double stranded RNA in *Drosophila* and mammalian cells.
Molekulyarnaya biologiya, 38, 228-238 (2004).
12. Korayem, A. M., Fabbri, M., Takahashi, K., Scherfer, C., Lindgren, M., Schmidt, O., Ueda, R., Dushay, M. S., Theopold, U.: A *Drosophila* salivary gland mucin is also expressed in immune tissues: evidence for a function in coagulation and the entrapment of bacteria.
Insect. Biochem. Mol. Biol., 34, 1297-1304 (2004).
13. Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., Saigo, K.: Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference.
Nucleic Acids Res., 32, 936-948 (2004).
14. Kamimura, K., Rhodes, J. M., Ueda, R., McNeely, M., Shukla, D., Kimata, K., Spear, P. G., Shworak, N.W., Nakato, H.: Regulation of Notch signaling by *Drosophila* heparan sulfate 3-*O* sulfotransferase.
J. Cell Biol., 166, 1069-1079 (2004).
15. Kleino, A., Valanne, S., Ulvila, J., Kallio, J., Myllymaki, H., Enwald, H., Stoven, S., Poidevin, M., Ueda, R., Hultmark, D., Lemaitre, B., Ramet, M.: Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway.
The EMBO J., 24, 3423-3434 (2005).
16. Sasaki, N., Manya, H., Okubo, R., Kobayashi, K., Ishidat, H., Toda, T., Endo, T., Nishihara, S.: β 4GalT-II is a key regulator of glycosylation of the proteins involved in neuronal development.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 333, 131-137 (2005).
17. Yano, H., Yamamoto-Hino, M., Abe, M., Kuwahara, R., Haraguchi, S., Kusaka, I., Awano, W., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Goto, S.: Distinct functional units of the Golgi complex in *Drosophila* cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 13467-13472 (2005).
18. Vongchan, P., Warda, M., Toyoda, H., Toida, T., Marks, R.M., Linhardt, R.J.: Structural characterization of human liver heparan sulfate.
Biochim. Biophys. Acta., 1721, 1-8 (2005).

19. Kikuchi, J., Shinohara, H., Nonomura, C., Ando, H., Nojiri, H., Nakamura, M.: Not core 2 β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase-2 and -3 but -1 regulates sialyl-Lewis-X expression in human precursor-B cell.

Glycobiology **15**, 271-280 (2005).

20. Kikuchi, J., Ozaki, H., Nonomura, C., Shinohara, H., Iguchi, S., Nojiri, H., Hamada, H., Kiuchi, A., Nakamura, M.: Transfection of antisense core 2 β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase-1 cDNA suppresses selectin ligand expression and tissue infiltration of B-cell precursor leukemia cells.

Leukemia, **19**, 1934-1940 (2005).

21. Ha, Y.W., Jeon, B.T., Moon, S.H., Toyoda, H., Toida, T., Linhardt, R.J., Kim, Y.S.: Characterization of heparan sulfate from the unossified antler of *Cervus elaphus*.

Carbohydr. Res., **340**, 411-416 (2005).

22. Zaidman-Remy A, Herve M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, Oh BH, Ueda, R., Mengin-Lecreulx D, Lemaître B.: The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection.

Immunity, **24**, 463-473 (2006).

23. Kambris Z, Brun S, Jang IH, Nam HJ, Romeo Y, Takahashi K, Lee WJ, Ueda, R., Lemaître B.: *Drosophila* immunity: a large-scale *in vivo* RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation.

Curr. Biol., **16**, 808-813 (2006).

24. Scherfer C, Qazi M.R, Takahashi K., Ueda, R., Dushay M.S, Theopold U, Lemaître B.: The Toll immune-regulated *Drosophila* protein Fondue is involved in hemolymph clotting and puparium formation.

Dev Biol., **295**, 156-163 (2006).

25. Kamimura, K., Koyama, T., Habuchi, H., Ueda, R., Masu, M., Kimata, K., and Nakato, H.: Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in *Drosophila* FGF signaling.

J. Cell Biol., **174**, 773-778 (2006).

26. Kamiyama, S., Sasaki, N., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., Nishihara, S.: Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter, PAPST2.

J. Biol. Chem., **281**, 10945-10953 (2006).

27. Goda, E., Kamiyama, S., Uno, T., Yoshida, H., Ueyama, M., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Ueda, R., Nishihara, S.: Identification and characterization of a novel *Drosophila* 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter.

J. Biol. Chem. **281**, 28508-28517 (2006).

28. Kusama, S., Ueda, R., Suda, T., Nishihara, S., Etsuko, T.: Involvement of *Drosophila* Sir2-like genes in the regulation of life span.

Genes & Genetic Systems, **81**, 341-8 (2006).

29. Suzuki, N., Toyoda, H., Sano, M., Nishiwaki, K.: Chondroitin acts in the guidance of gonadal distal tip cells in *C. elegans*.

Dev. Biol., **300**, 635-646 (2006).

30. Suda, Y., Arano, A., Fukui, Y., Koshida, S., Wakao, M., Nishimura, T., Kusumoto, S., Sobel, M.: Immobilization and clustering of structurally defined oligosaccharides for sugar chips: An improved method for surface plasmon resonance analysis of protein-carbohydrate interactions.

Bioconjug. Chem., **17**, 1125-1135 (2006).

31. Suda, Y., Kishimoto, Y., Nishimura, T., Yamashita, S., Hamamatsu, M., Saito, A., Sato, M., Wakao, M.: Sugar-immobilized gold nano-particles (SGNP): Novel bioprobe for the on-site analysis of the oligosaccharide protein interactions.

Polymer Preprints, **47**, 156-157 (2006).

32. Wijelath, E.S., Rahman, S., Namekata, M., Murray, J., Nishimura, T., Mostafavi-Pour, Z., Patel, Y., Suda, Y., Humphries, M.J., Sobel, M.: Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain. Enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism.

Circ. Res., **99**, 853-860 (2006).

33. Sasaki, N., Sasamura, T., Ishikawa, H.O., Kanai, M., Ueda, R., Saigo, K., Matsuno, K.: Polarized exocytosis and transcytosis of Notch during its apical localization in *Drosophila* epithelial cells.

- Genes Cells*, **12**, 89-103 (2007).
34. Sasaki, N., Yoshida, H., Fuwa, T.J., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Hirabayashi, Y., Ishida, H., Ueda, R., Nishihara, S.: *Drosophila* β 1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase-A synthesizes the LacdiNAc structures on several glycoproteins and glycosphingolipids.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **354**, 522-527 (2007).
35. Nagai, N., Habuchi, H., Kitazume, S., Toyoda, H., Hashimoto, Y., Kimata, K.: Regulation of heparan sulfate 6-*O*-sulfation by β -secretase activity.
J. Biol. Chem., **282**, 14942-14951 (2007).
36. Sakai, S., Hirano, K., Toyoda, H., Linhardt, R.J., Toida, T.: Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of hyaluronan oligosaccharides.
Anal. Chim. Acta., **593**, 207-213 (2007).
37. Sinnis, P., Coppi, A., Toida, T., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Xie, J., Kemp, M.M., Linhardt, R.J.: Mosquito heparan sulfate and its potential role in malaria infection and transmission.
J. Biol. Chem., **282**, 25376-25384 (2007).
38. Kusano, S., Ootani, A., Sakai, S., Igarashi, N., Takeguchi, A., Toyoda, H., Toida, T.: HPLC determination of chondrosine in mouse blood plasma after intravenous or oral dose.
Biol. Pharm. Bull., **30**, 1365-1368 (2007).
39. Emoto, N., Kunii, Y., Ashizawa, M., Oikawa, S., Shimizu, K., Shimonaka, M., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H.: Reduced sulfation of chondroitin sulfate in thyroglobulin derived from human papillary thyroid carcinomas.
Cancer Sci., **98**, 1577-1581 (2007).
40. Nairn, A.V., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Xie, J., Harris, K., Dalton, S., Kulik, M., Pierce, J.M., Toida, T., Moremen, K.W., Linhardt, R.J.: Glycomics of proteoglycan biosynthesis in murine embryonic stem cell differentiation.
J. Proteome Res., **6**, 4374-4387 (2007).
41. Hiraoka, S., Furuichi, T., Nishimura, G., Shibata, S., Yanagishita, M., Rimoïn, D.L., Superti-Furga, A., Nikkels, P.G., Ogawa, M., Katsuyama, K., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Ishida, N., Isono, K., Sanai, Y., Cohn, D.H., Koseki, H., Ikegawa, S.: Nucleotide-sugar transporter SLC35D1 is critical to chondroitin sulfate synthesis in cartilage and skeletal development in mouse and human.
Nat. Med., **13**, 1363-1367 (2007).
42. Sasaki, N., Okishio, K., Ui-Tei, K., Saigo, K., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Nishimura, T., Suda, Y., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Hitoshi, S., Ikenaka, K., Nishihara, S.: Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells.
J. Biol. Chem., in press.
43. Ueyama, M., Takemae, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Toyoda, H., Ueda, R., Nishihara, S.: Functional analysis of *proteoglycan galactosyltransferase II* RNAi mutant flies.
J. Biol. Chem., in press.
44. Nonomura, C., Kikuchi, J., Kiyokawa, N., Ozaki, H., Mitsunaga, K., Ando, H., Kanamori, A., Kannagi, R., Fujimoto, J., Muroi, K., Furukawa, Y., Nakamura, M.: CD43 but not P-selectin glycoprotein ligand-1 functions as an E-selectin counter-receptor in human B precursor leukemia NALL-1: Possible involvement of CD43 in tissue infiltration and engraftment of B-precursor ALL cells.
Cancer Res., in press.

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

1. 西原祥子、上田龍: ショウジョウバエの糖鎖生物学.
蛋白質核酸酵素、**48**, 1064-1071 (2003).
2. 西原祥子、上田龍: RNAi システムによる糖鎖機能解析.
化学工業、**54**, 760-765 (2003).
3. 西原祥子: *Drosophila* グライコーム: ショウジョウバエを用いた機能解析へのアプローチ.
J. Electrophoresis, **48**, 19-25 (2004).
4. Kamiyama, S., Nishihara, S.: The subcellular PAPS synthesis pathway responsible for the sulfation of proteoglycans: a comparison between humans and *Drosophila melanogaster*.

- TIGG*, **16**, 109-123 (2004).
5. Nishihara, S., Ueda, R., Goto, S., Toyoda, H., Ishida, H., Nakamura, M.: Approach for functional analysis of glycan using RNA interference.
Glycoconj J., **21**, 63-68 (2004).
6. 西原祥子: RNAi.
医学を学ぶための生物学、谷口直之・米田悦啓編、6章E節、444-451 (2004).
7. 吉田秀樹、西原祥子: ショウジョウバエ神経発生における糖鎖の役割.
蛋白質核酸酵素、**49**、2319-2326 (2004).
8. 中村充: Ii式血液型を決定する遺伝子の発見.
医学のあゆみ、**208**、221-222 (2004).
9. 中村充: 血液型異常と糖鎖.
遺伝子医学MOOK「糖鎖と病気」、2章2「糖鎖と診断」、200-206 (2005).
10. 中村充: 幹細胞.
遺伝子医学 MOOK「糖鎖と病気」、2章2「糖鎖と治療」、280-285 (2005).
11. 中村充: 血液型.
糖鎖科学の新展開、谷口直之・伊藤幸成編、2編2章5節、247-255 (2005).
12. 上山盛夫、西原祥子: ショウジョウバエの糖鎖と発生.
糖鎖科学の新展開、谷口直之・伊藤幸成編、2編2章12節、318-324 (2005).
13. 隅田泰生: 糖鎖チップ.
糖鎖科学の新展開、谷口直之・伊藤幸成編、4編3章、474-481 (2005).
14. 隅田泰生: 糖鎖チップの開発.
糖鎖化学の最先端技術、小林一清、正田晋一郎監修、215-224 (2005).
15. 隅田泰生: 表面プラズモン共鳴・糖鎖チップを用いた糖鎖-タンパク質相互作用の解析.
未来を拓く糖鎖科学、永井克孝監修、1章5節、74-75 (2005).
16. 西原祥子: 糖スクレオチド輸送体遺伝子の取得と機能解析.
未来を拓く糖鎖科学、永井克孝監修、3章3節、191-193 (2005).
17. 中村充: 幹細胞糖鎖生物学.
未来を拓く糖鎖科学、永井克孝監修、4章7節、310-312 (2005).
18. 西原祥子: ショウジョウバエ RNAi システムを用いたゲノムワイドな糖鎖機能解析.
未来を拓く糖鎖科学、永井克孝監修、4章9節、323-325 (2005).
19. 中村充: 血液細胞と糖鎖生物学.
未来を拓く糖鎖科学、永井克孝監修、4章14節、383-385 (2005).
20. 中村充: 細胞株を用いた糖鎖生物学研究.
未来を拓く糖鎖科学、永井克孝監修、6章1節、399-401 (2005).
21. 隅田泰生: ヘパリンと血小板ならびにフォンビルブラント因子との相互作用解析からシュガーチップの開発へ.
ドージンニュース、No.121, 1-10 (2006).
22. Goto, S.: Regulation of glycosylation by Golgi units.
TIGG, **18**, 377-382 (2006).
23. Nishihara, S.: *Drosophila* development, RNAi, and glycobiology.
Comprehensive Glycoscience - From Chemistry to Systems Biology, edited by Johannis P Kamerling et al., Elsevier, **4.05**, 49-79 (2007).
24. Nishihara, S.: Nucleotide sugar transporter genes and their functional analysis.
Glycoscience LabManuals, in press.
25. Nishihara, S.: Functional analysis of sugar chains using a genome-wide RNAi system in *Drosophila*.
Glycoscience LabManuals, in press.
26. Nakamura, M.: Blood cells in glycobiology.
Glycoscience LabManuals, in press.
27. Nakamura, M.: Cell lines in glycobiology.
Glycoscience LabManuals, in press.

28. Nakamura, M.: Stem cell glycobiology.
Glycoscience LabManuals, in press.

(3) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 28 件、国際会議 9 件)

1. Nishihara, S.: "Drosophila RNAi model system of glycosyltransferases"
Tumor-Associated Mucins and Related Glycoproteins in Metastasis, Tumor-Specific Immunity and Immunotherapy, at Hawaii, January, 2003.
2. 矢野弘之、阿部将人、後藤聡:「Distinct functions of Golgi UNITs」
第56回日本細胞生物学会大会、滋賀、5月、2003.
3. 西原祥子:「Drosophila グライコーム:ショウジョウバエを用いた糖鎖機能解析へのアプローチ」
第53回日本電気泳動学会シンポジウム、大阪、7月、2003.
4. 西原祥子:「ショウジョウバエ RNAi システムを用いたグライコーム研究:ヒト糖鎖機能解析へのアプローチ」
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、8月、2003.
5. Nishihara, S., Yoshida, H., Ichimiya, T., Sasaki, N., Ohmae, Y., Hamamoto, H., Takemae, H., Goto, S., Toyoda, H., Ueda, R.: "Drosophila functional glycomics using RNAi system"
第76回日本生化学会大会シンポジウム、横浜、10月、2003.
6. Toyoda, H.: "Comparative structural analysis of glycosaminoglycans in model organisms"
第76回日本生化学会大会シンポジウム、横浜、10月、2003.
7. 西原祥子:「ショウジョウバエによる機能グライコミクス」
第1回 糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、東京、11月、2003.
8. 西原祥子、神山伸、須田健:「GAG 合成に関わる糖ヌクレオチド輸送体」
糖鎖病態研究会、岡崎、7月、2004.
9. 中村充:「造血細胞とラクトサミン糖鎖生物学」
糖鎖病態研究会、岡崎、7月、2004.
10. 西原祥子:「糖ヌクレオチド輸送体の機能と糖鎖;その普遍性と多様性」
第5回タンパク質最前線セミナー「疾患グライコプロテオミクス」、東京、8月、2004.
11. Nishihara, S., Hino, M., Yoshida, H., Sasaki, N., Goto, S., Toyoda, H., Ueda, R.: "Functional glycomics using Drosophila RNAi system"
Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, at Honolulu, November, 2004.
12. 豊田英尚:「モデル生物を用いた糖鎖機能の分析科学」
日本薬学会第125年会シンポジウム、東京、3月、2005.
13. 隅田泰生:「シュガーチップ」
センサ・アクチュエータ・マイクロマシン/ウィーク 2005 総合シンポジウム、東京、4月、2005.
14. Nishihara, S., Ohmae, Y., Ichimiya, T., Many, H., Yoshida, H., Toyoda, H., Endo, T., Ueda, R.: "Functional analysis of Drosophila glycosyltransferases using RNAi mutant flies"
The 2nd Netherlands-Japan Glycobiology Symposium, at Utrecht (The Netherlands), April, 2005.
15. 隅田泰生:「シュガーチップ」
第45回澱粉研究懇談会、静岡、6月、2005.
16. Nishihara, S., Yamamoto-Hino, M., Yoshida, H., Sasaki, N., Toyoda-Kinoshita, A., Goto, S., Toyoda, H., Ueda, R.: "Functional glycomics using Drosophila RNAi system"
The 7th Japanese Drosophila Research Conference, at Awaji, July, 2005.
17. Endo, T., Akasaka, K., Nishihara, S., Toda, T., Many, H.: "Congenital muscular dystrophies due to glycosylation defect of protein Omannosylation"
XVIIIth International Symposium on Glycoconjugates, at Florence (Italy), September, 2005.
18. 遠藤玉夫、西原祥子、戸田達史、萬谷博:「先天性筋ジストロフィーに関与する糖転移酵素」
第78回日本生化学会大会シンポジウム、神戸、10月、2005.

19. 西原祥子:「RNAi による網羅的糖鎖機能解析-ショウジョウバエからヒト糖鎖機能へ-」
第 16 回 フォーラム・イン・ドージン「RNA 干渉—その可能性—」、熊本、12 月、2005.
20. 西原祥子:「RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発」
第 3 回 糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、東京、12 月、2005.
21. 隅田泰生:「構造明確なオリゴ糖鎖と蛋白質／細胞との結合相互作用分析システム:表面プラズモン共鳴ならびに金ナノ粒子の利用」
第 3 回 糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、東京、12 月、2005.
22. 西原祥子:「*Drosophila* グライコーム:RNAi システムによる網羅的糖鎖機能解析」
第 28 回日本分子生物学会年会ワークショップ、福岡、12 月、2005.
23. Nishihara, S., Hino, M., Yoshida, H., Sasaki, N., Toyoda, A., Goto, S., Toyoda, H., Ueda, R.:
“*Drosophila* functional glycomics using RNAi system”
Pacifichem 2005, at Honolulu (USA), December, 2005.
24. 後藤聡:「小胞輸送による翻訳後修飾の制御」
岡崎統合バイオサイエンスセンター創立 5 周年記念シンポジウム、岡崎、2 月、2006.
25. Nishihara, S., Hino, M., Yoshida, H., Goda, E., Toyoda, A., Kamiyama, S., Ueyama, M., Goto, S., Toyoda, H., Ueda, R.: “Functional analyses of glycosyltransferases, sulfotransferases and transporters by using RNAi flies”
The 5th International Symposium on Glycosyltransferases, at Tsukuba, June, 2006.
26. 中村充:「ヒト造血細胞の糖鎖生物学～血液型と体内動態」
帯広畜産大学COEセミナー、帯広、7 月、2006.
27. 西原祥子:「ショウジョウバエをモデル系とした網羅的糖鎖機能解析:ショウジョウバエからヒト糖鎖機能へ」
GlycoTOKYO シンポジウム、金沢八景、8 月、2006.
28. Nishihara, S.: “PAPS transporter family; from *Drosophila* to human”
Frontiers in Glycomics: Bioinformatics and Biomarkers in Disease at Bethesda, September, 2006.
29. Suda, Y., Kishimoto, Y., Nishimura, T., Yamashita, S., Hamamatsu, M., Saito, A., Sato, M., Wakao, M.: “Sugar-immobilized gold nano-particles (SGNP): Novel bioprobe for the on-site analysis of the oligosaccharide-protein interactions”
232nd American Chemical Society National Meeting & Exposition at San Francisco, September, 2006.
30. 菊池次郎、清水瑠美、和田妙子、安藤秀信、中村 充、石井秀始、小澤敬也、古川雄祐:「転写制御因子 E2F6 による造血幹細胞のアポトーシス制御」
自治医大シンポジウム、栃木、9 月、2006.
31. Kikuchi, J., Shimizu, R., Wada, T., Ando, H., Nakamura, M., Ishii, H., Ozawa, K., Furukawa, Y.: “E2F-6 suppresses E2F-1-mediated apoptosis of hematopoietic stem cells”
21 世紀 COE シンポジウム、栃木、9 月、2006.
32. Suda, Y.: “Sugar chips: Advanced analytical systems for the binding interaction of sugar chains with proteins, cells or viruses”
2006 International Conference on Chemical and Molecular Technologies (ICCMT 2006) at Tainan, December, 2006.
33. 隅田泰生:「シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP): 糖鎖と蛋白質、細胞、ウイルスとの結合相互作用を解析するための先端分析システム」
KAGAWA 機能糖鎖フォーラム第4回シンポジウム、香川、1 月、2007.
34. 後藤聡:「ショウジョウバエを用いた糖鎖修飾制御機構の解析」
第27回日本糖質学会年会シンポジウム、福岡、8月、2007.
35. 西原祥子:「RNAi 法による糖鎖合成関連遺伝子の網羅的機能解析」
第 79 回日本遺伝学会大会ミニシンポジウム、岡山、9 月、2007.
36. 西原祥子、上山盛夫、山本(日野)みき、吉田英樹、不破尚志、後藤聡、豊田英尚、上田龍:
「ショウジョウバエを用いた糖鎖関連遺伝子の網羅的機能解析」
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)
ワークショップ、横浜、12 月、2007.

37. 山本(日野)美紀、矢野弘之、蟹江善美、栗野若枝、平井ゆう、桑原玲子、木下(青木)聖子、上田龍、西原祥子、蟹江治、後藤聡:「ショウジョウバエを用いた糖鎖修飾制御因子のゲノムワイドスクリーニング」

第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(BMB2007)
ワークショップ、横浜、12月、2007.

② 口頭発表 (国内会議24件、国際会議6件)

1. 矢野弘之、桑原玲子、原口朱夏、後藤聡:「Diversity of the Golgi apparatus as functional units」
第6回日本ショウジョウバエ研究会、東京、7月、2003.

2. Hino, M., Kuwahara, R., Haraguchi, S., Kusaka, I., Takahashi, K., Ueda, R., Nishihara, S., Goto, S.:
“Functional analysis of glycans in *Drosophila melanogaster* using genome-wide RNAi screening”
第6回日本ショウジョウバエ研究会、東京、7月、2003.

3. 神山伸、須田健、上田龍、濱本洋、鈴木正之、菊池紀広、千葉靖典、後藤聡、豊田英尚、成松久、地神芳文、西原祥子:「PAPS トランスポーターのクローニングと機能解析—PAPS トランスポーターは生命維持に必須である」
第24回日本糖質学会年会、横浜、7月、2003.

4. 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、8月、2003.

5. 神山伸、須田健、上田龍、吉田英樹、菊池紀広、千葉靖典、後藤聡、豊田英尚、成松久、地神芳文、西郷薫、西原祥子:「新規 PAPS トランスポーターの単離 RNAi による機能解析」
第26回日本分子生物学会年会シンポジウム、神戸、12月、2003.

6. 神山伸、須田健、合田絵美、菊池紀広、仲山賢一、成松久、地神芳文、西原祥子:「ショウジョウバエ *fringe connection* のホモログであるヒト新規糖スクレオチド輸送体の単離と機能解析」
第27回日本分子生物学会年会ワークショップ、神戸、12月、2004.

7. 伊藤美樹子、中込麻里子、上田龍、西原祥子、戸井田敏彦、豊田亜希子、豊田英尚:「ショウジョウバエ由来フコース含有 N-結合糖鎖の微量分析」
日本薬学会第126年会、仙台、3月、2005.

8. 吉田英樹、大前佳子、一宮智美、上田龍、後藤聡、西原祥子:「ショウジョウバエ $\alpha 1,3$ -fucosyltransferase による Notch シグナルの制御」
第25回日本糖質学会年会、大津、7月、2005.

9. Goto, S., Yano, H., Yamamoto-Hino, M., Abe, M., Kuwahara, R., Haraguchi, S.: “Distinct functional subcomplex of the Golgi in *Drosophila* cell”
46th Annual *Drosophila* Research Conference, at San Diego, March, 2005.

10. 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回日本糖質学会年会、大津、7月、2005.

11. Yoshida, H., Ichimiya, T., Ueda, R., Goto, S., Nishihara, S.: “Regulation of Notch signaling by *Drosophila* $\alpha 1$ -3 fucosyltransferase”
The 7th Japanese *Drosophila* Research Conference, at Awaji, July, 2005.

12. Nishihara, S., Yamamoto-Hino, M., Yoshida, H., Sasaki, N., Toyoda, A., Goto, S., Toyada, H., Ueda R.: “*Drosophila* functional glycomics using RNAi system”
XVIIIth International Symposium on Glycoconjugates, at Florence (Italy), September, 2005.

13. Suda Y., Nishimura, T., Kishimoto Y., Yamashita S., Sato, M., Uetani M., Hamamatsu, M., Saito A., Wakao M., Murray-Wijelath, J., Wijelath E., Strand, K., Sobel, M.: “Advanced analytical systems for the binding interaction of structurally defined oligosaccharides with proteins/cells: use of surface plasmon resonance (SPR) or gold nanoparticles (GNP)”
XVIIIth International Symposium on Glycoconjugates, at Florence (Italy), September, 2005.

14. Nakamura, M., Kikuchi, J., Ozaki, H., Nonomura, C., Ando, H.: “Regulatory mechanism of selectin ligand expression level: control of leukemic cell extravasation by lentiviral shRNA for

transcriptional activator Sp4”

XVIIIth International Symposium on Glycoconjugates, at Florence (Italy), September, 2005.

15. Kamiyama, S., Suda, T., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., Nishihara, S.: “A novel human PAPS transporter: molecular cloning and characterization”

第 78 回日本生化学会大会ワークショップ、神戸、10 月、2005.

16. Ohmae, Y., Yoshida, H., Toyoda, H., Ueda, R., Nishihara, S.: “Functional analyses of *Drosophila* glucuronyltransferases”

第78回日本生化学会大会ワークショップ、神戸、10月、2005.

17. Kudo, T., Fujii, T., Ikegami, S., Inokuchi, K., Takayama, Y., Ikehara, Y., Nishihara, S., Togayachi, A., Takahashi, S., Tachibana, K., Yuasa, S., Narimatsu, H.: “Mice lacking α 1,3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis x epitopes in brain and increased anxiety-like behaviors”

第 78 回日本生化学会大会ワークショップ、神戸、10 月、2005.

18. 斎藤彰寛、大石紘、西村知晃、岸本裕子、若尾雅広、隅田泰生:「種々のヘパリン部分構造のシュガーチップ化」

日本化学会第 86 年会、千葉、3 月、2006.

19. 若尾雅広、猿渡梨紗、西村知晃、岸本裕子、隅田泰生:「ムチン型糖鎖のシュガーチップ化」

日本化学会第 86 年会、千葉、3 月、2006.

20. 若尾雅広、高橋優子、山下早希子、西村知晃、岸本裕子、隅田泰生:「シアリルラクト系糖鎖の化学・酵素合成とそのシュガーチップ化」

日本化学会第 86 年会、千葉、3 月、2006.

21. 若尾雅広、小川智央、鈴木啓悟、名荷谷徹、牟田健一、斎藤敦、岩本俊夫、木村光徳、梶川浩太郎、隅田泰生:「光ファイバー型シュガーチップの作製とその評価」

日本化学会第 86 年会、千葉、3 月、2006.

22. 神山伸、佐々木紀彦、合田絵美、程久美子、西郷薫、成松久、地神芳文、神奈木玲児、入村達郎、西原祥子:「大腸に発現する新規 PAPS 輸送体遺伝子、*PAPST2* 遺伝子の同定と機能解析」

第 26 回日本糖質学会年会、仙台、8 月、2006.

23. 豊田英尚、細山沙織、伊藤美樹子、雨宮奈穂子、中村はるか、戸井田利彦、西原祥子、Selleck, S.B., 豊田亜紀子:「糖鎖の微量分析法の開発とモデル生物を用いた糖鎖機能解析への応用」

第 26 回日本糖質学会年会、仙台、8 月、2006.

24. 隅田泰生:「糖鎖との相互作用解析ツール:シュガーチップ、糖鎖固定化金ナノ粒子」

大学初ベンチャー合同発表会 2007、東京、3 月、2007.

25. 近藤宇男、Ho Hsun, T., Huda, O., 西村知晃、岸本裕子、若尾雅広、隅田泰生:「コンドロイチン硫酸 E 部分二糖構造の合成とシュガーチップへの応用」

日本化学会第 87 年会、大阪、3 月、2007.

26. Goda, E., Kamiyama, S., Uno, T., Yoshida, H., Ueyama, M., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Ueda, R., Nishihara, S.: “Novel *Drosophila* PAPS transporter, *dPAPST2*, contributes to eye development”

XIX International Symposium on Glycoconjugates, at Cairns (Australia), July, 2007.

27. Suda, Y., Nishimura, T., Kishimoto, Y., Yamashita, S., Shigeta, M., Takahashi, S., Wakao, M., Saito, A., Kondo, T., Saruwatari, R., Ohishi, K., Takahashi, Y., Nakamura-Tsuruta, S., Ishida, H., Okuno, H., Tsutsui, H.: “Advanced analytical systems for the binding interaction of sugar chains with proteins, cells or viruses: Sugar chips and sugar chain-immobilized gold nano-particles”

XIX International Symposium on Glycoconjugates, at Cairns (Australia), July, 2007.

28. 上山盛夫、吉田秀樹、神山伸、竹前等、合田絵美、大前佳子、宇野貴明、豊田英尚、上田龍、西原祥子:「ショウジョウバエにおけるグリコサミノグリカン合成関連遺伝子」

第 27 回日本糖質学会年会、福岡、8 月、2007.

29. 神山伸、合田絵美、佐々木紀彦、上山盛夫、吉田英樹、成松久、地神芳文、上田龍、西原祥子:「ヒト及びショウジョウバエにおける PAPS 輸送体と硫酸化」

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)

ワークショップ、横浜、12 月、2007.

30. 石川裕之、鮎川友紀、石田信宏、青木和久、佐内豊、神山伸、西原祥子、松野健治:「小胞体局在の新規 GDP-フコース輸送体 Efr は Notch の O-フコシル化で機能する」

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)
ワークショップ、横浜、12 月、2007.

③ ポスター発表 (国内会議 64 件、国際会議 24 件)

1. 石田秀樹、大久保玲子、西原祥子、稲津敏行:「Notch の機能制御に関わるガラクトース転移酵素の探索のための糖鎖基質の合成」

第 123 回日本薬学会年会、長崎、3 月、2003.

2. 石田秀樹、長山園絵、広瀬由里子、大久保玲子、西原祥子、稲津敏行:「Notch の機能制御に関わる糖転移酵素の探索のための糖鎖基質の合成」

第 24 回日本糖質学会年会、横浜、7 月、2003.

3. 豊田英尚、中村はるか、雨ノ宮奈穂子、豊田亜希子、戸井田敏彦:「オンライン二次元HPLCによるグライコーム解析」

第 24 回日本糖質学会年会、横浜、7 月、2003.

4. 菊池次郎、稲毛田妙子、古川雄祐、仲道裕美、中村和紀、成松久、中村充:「転写因子 Sp1・Sp3・Sp4 によるコア 2GlcNAc 転移酵素-1 の転写制御」

第 24 回日本糖質学会年会、横浜、7 月、2003.

5. 菊池次郎、古川雄祐、Hur, M.W., 成松久、中村充:「Sp1 遺伝子ファミリーによるコア 2GlcNAc 転移酵素-1 の転写制御」

第 76 回日本生化学会大会、横浜、10 月、2003.

6. 吉田真記、細山沙織、戸井田敏彦、豊田亜希子、豊田英尚:「ショウジョウバエ糖タンパク質プロファイリング法の確立と糖鎖遺伝子変異体解析への応用」

第 124 回日本薬学会年会、大阪、3 月、2004.

7. Kamiyama, S., Suda, T., Ueda, R., Suzuki, M., Okubo, R., Kikuchi, N., Chiba, Y., Goto, S., Toyoda, H., Saigo, K., Watanabe, M., Narimatsu, H., Jigami, Y., Nishihara, S.: Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter.

Annual Conference of The Society for Glycobiology, at San Diego, December, 2003.

8. 草間さきく、上田龍、須田健、西原祥子、松浦悦子:「RNAi 法によるショウジョウバエの Sir2 および Sir2-like 遺伝子の機能解析」

第 76 回日本遺伝学会大会、大阪、9 月、2004.

9. 菊池次郎、野々村智尋、安藤秀信、藤井崇、Hur, M.W., 古川雄祐、高久静香、成松久、中村充:「Sp4 は糖鎖遺伝子の転写制御を介してヒトブレ B 白血病細胞のセレクチンリガンド糖鎖発現を制御している」

第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会、京都、9 月、2004.

10. Ichimiya, T., Manya, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Ueda, R., Endo, T., Nishihara, S.: "The functional analysis of RNAi mutant flies of *Drosophila* protein O-mannosyltransferases"

第 77 回日本生化学会大会、横浜、10 月、2004.

11. Kamiyama S., Suda, T., Goda, E., Kikuchi, N., Narimatsu, H., Jigami, Y., Nishihara, S.: "A novel human multi-substrate specific nucleotide-sugar transporter homologous to *Drosophila* fringe connection"

第 77 回日本生化学会大会、横浜、10 月、2004.

12. Kikuchi, J., Nonomura, C., Ando, H., Fujii, T., Hur, M.W., Furukawa, Y., Muroi, K., Narimatsu, H., Nakamura, M.: "Sp4 Regulates core 2 GlcNAc transferase-1 transcription in human B cell precursor acute leukemia cells"

第 77 回日本生化学会大会、横浜、10 月、2004.

13. Nonomura, C., Kikuchi, J., Ando, H., Nakamura, M.: "Regulation mechanism of sLeX expression during phorbol ester induced differentiation of Human pre-B KM3 cells by core 2 GlcNAc transferase-1 at transcriptional level"

第 77 回日本生化学会大会、横浜、10 月、2004.

14. 伊藤美樹子、中込麻里子、豊田亜希子、戸井田敏彦、上田龍、西原祥子、豊田英尚:「鎖遺伝子 RNAi 変異体を用いた糖鎖の微量分析」

第 48 回日本薬学会関東支部大会、千葉、10 月、2004.

15. Ichimiya, T., Manya, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Ueda, R., Endo, T., Nishihara, S.: “The functional analysis of *Drosophila* protein *O*-mannosyltransferases using RNAi mutant flies”
Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, at Honolulu, November, 2004.
16. Kamiyama, S., Suda, T., Narimatsu, H., Jigami, Y., Nishihara, S.: “Molecular cloning and characterization of a human multi-substrate specific nucleotide-sugar transporter homologous to *Drosophila fringe connection*”
Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, at Honolulu, November, 2004.
17. Kinoshita-Toyoda, A., Ito, M., Suzuki, A., Toida, T., Nishihara, S., Toyoda, H.: “Micro-determination of glycoconjugates in *Drosophila melanogaster* by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection”
Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, at Honolulu, November, 2004.
18. 大前佳子, 吉田英樹, 飯田真巳, 豊田英尚, 上田龍, 西原祥子:「ショウジョウバエグルクロン酸転移酵素群の機能解析」
第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月、2004.
19. 吉田英樹, 上田龍, 後藤聡, 西原祥子:「ショウジョウバエ神経発生における α 1-3 フコース転移酵素の機能解析」
第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月、2004.
20. 一宮智美, 萬谷博, 大前佳子, 吉田英樹, 上田龍, 遠藤玉夫, 西原祥子:「RNAi 体を用いたショウジョウバエ *O*-マンノース転移酵素の機能解析」
第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月、2004.
21. 山本(日野)美紀, 桑原礼子, 原口朱夏, 日下勇, 服部成介, 上田龍, 西原祥子, 後藤聡:「糖鎖修飾の制御メカニズムを解明するゲノムワイドなスクリーニング系の構築」
第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月、2004.
22. 糟谷寿子, 土居信英, 村松展敬, 西原祥子, 柳川弘志:「糖転移酵素の無細胞合成とその応用」
第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月、2004.
23. 菊池次郎, 野々村智尋, 安藤秀信, Hur, M.W., 古川雄祐, 室井一男, 成松 久, 中村充:「プレ B 細胞の分化に伴うセレクトインリガンド糖鎖発現の制御 -コア 2GlcNAc 転移酵素-1 転写を介した Sp4 による制御」
第 34 回日本免疫学会総会、札幌、12 月、2004.
24. 野々村智尋, 菊池次郎, 安藤秀信, 中村充:「プレ B 細胞の分化に伴うセレクトインリガンド糖鎖の発現はコア 2GlcNAc 転移酵素-1 により制御されている」
第 34 回日本免疫学会総会、札幌、12 月、2004.
25. Yoshida, H., Ichimiya, T., Ueda, R., Goto, S., Nishihara, S.: Functional analysis of *Drosophila* α 1-3 fucosyltransferase during development.
46 th Annual *Drosophila* Research Conference, at San Diego, March, 2005.
26. 細山沙織, 岡野奈穂子, 小野崎愛, 中込麻里子, 伊藤美樹子, 戸井田敏彦, 豊田亜希子, 豊田英尚:「糖鎖機能解明を目指したプロテオ／グライコーム解析とモデル生物への応用」
日本薬学会第 125 年会、東京、3 月、2005.
27. Funakoshi, Y., Saigo, S., Ueda, R., Nishihara, S., Taniguchi, N., Suzuki, T.: “Analysis of glycosidases involved in metabolisms of cytosolic free N-linked glycan species in *Drosophila melanogaster*”
The 7th Japanese *Drosophila* Research Conference, at Awaji, July, 2005.
28. Hino, M., Kuwahara, R., Haraguchi, S., Kusaka, I., Awano, W., Hattori, S., Nishihara, S., Ueda, R., Goto, S.: “Genome-wide screening system to investigate glycosylation mechanism”
The 7th Japanese *Drosophila* Research Conference, at Awaji, July, 2005.
29. Yano, H., Tohda, Y., Goto, S.: “Glycosylation of the nuclear pore proteins changes during spermatogenesis of *Drosophila*”
The 7th Japanese *Drosophila* Research Conference, at Awaji, July, 2005.
30. 豊田亜希子, 上田龍, 西原祥子, 戸井田敏彦, 相垣敏郎, 豊田英尚:「ショウジョウバエ

GAL4-UAS システムを用いた新規糖鎖遺伝子 *Glycomater-1* の発見」

第 25 回日本糖質学会年会、大津、7 月、2005.

31. 岸本裕子、西村知晃、山下早希子、中川裕美、濱松三奈、上谷昌稔、若尾雅広、隅田泰生:「糖鎖固定化金ナノ粒子:糖鎖-蛋白質相互作用の on-site 解析ツール」

第 25 回日本糖質学会年会、大津、7 月、2005.

32. 西村知晃、岸本裕子、山下早希子、中川裕美、佐藤昌紀、齊藤彰寛、若尾雅広、Murray-Wijelath, J., Wijelath, E., Strand K., Sobel, M., 隅田泰生:「表面プラズモン共鳴法を用いた糖鎖-蛋白質相互作用の解析システム」

第 25 回日本糖質学会年会、大津、7 月、2005.

33. Funakoshi, Y., Saigo, K., Ueda, R., Nishihara, S., Taniguchi, N., Suzuki, T.: “Analysis of putative glycosidases for the metabolic pathways of cytosolic free *N*-linked glycan species in *Drosophila melanogaster*”

XVIIIth International Symposium on Glycoconjugates, at Florence (Italy), September, 2005.

34. 野々村智尋、尾崎秀徳、安藤秀信、菊池次郎、中村充:「ヒトプレ B 細胞のセレクトインカウンターリガンドは CD43 である」

第 67 回日本血液学会総会、横浜、9 月、2005.

35. 菊池次郎、野々村智尋、尾崎秀徳、安藤秀信、古川雄祐、中村充:「白血病細胞の組織浸潤を抑制するセレクトイン関連分子標的」

第 67 回日本血液学会総会、横浜、9 月、2005.

36. 菊池次郎、野々村智尋、尾崎秀徳、安藤秀信、中村充:「RNA 干渉によるセレクトインリガンド発現制御とヒト B 前駆細胞性白血病細胞の組織浸潤抑制」

第 64 回日本癌学会総会、札幌、9 月、2005.

37. Funakoshi, Y., Saigo, S., Ueda, R., Nishihara, S., Taniguchi, N., Suzuki, T.: “Analysis of glycosidases involved in metabolisms of cytosolic free *N*-linked glycan species in *Drosophila melanogaster*”

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

38. Ohmae, Y., Yoshida, H., Toyoda, H., Ueda, R., Nishihara, S.: “Functional analyses of *Drosophila* glucuronyltransferases”

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

39. 安藤秀信、中村和紀、合田恵美、神山伸、中村充、西原祥子:「siRNA を用いたマウスフリンジコネクション遺伝子の機能解析」

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

40. 野々村智尋、菊池次郎、尾崎秀徳、安藤秀信、中村充:「ヒトプレ B 細胞セレクトインリガンド-カウンターパートナーの同定」

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

41. 野々村智尋、菊池次郎、篠原寛貴、安藤秀信、野尻久雄、中村充:「ヒトプレ B 細胞表面の糖タンパク質 CD43 上に発現する sLeX はコア2GlcNAc 転移酵素-2 および-3 ではなく-1 により制御される」

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

42. 菊池次郎、尾崎秀徳、野々村智尋、篠原寛貴、野尻久雄、濱田洋実、木内敦夫、中村充:「アンチセンスコア2GlcNAc 転移酵素遺伝子による CD43 糖タンパク質上のセレクトインリガンド発現抑制と組織浸潤抑制」

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

43. 菊池次郎、尾崎秀徳、野々村智尋、安藤秀信、中村充:「セレクトイン関連遺伝子群のノックダウンによる白血病細胞の組織浸潤抑制」

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

44. 篠原寛貴、菊池次郎、安藤秀信、野尻久雄、中村充:「pp-GalNAcT-2 によるヒトプレ B 細胞 O-グリカン合成の制御」

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

45. 豊田雅哲、中村和紀、安形高志、光永佳奈枝、尾崎秀徳、菊池次郎、中村充:「血液型 I-抗原の MALDI-MSⁿ を用いた解析」

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

46. 西村知晃、岸本裕子、山下早希子、佐藤昌紀、斎藤彰宏、若尾雅広、Murray-Wijelath, J., Wijelath, K., Strand, K., Sobel, M., 隅田泰生:「表面プラズモン共鳴を用いた糖鎖-蛋白質/細胞結合相互作用解析の先端的分析システム」

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

47. 岸本裕子、西村知晃、山下早希子、濱松三奈、上谷昌稔、若尾雅広、隅田泰生:「糖固定化金ナノ粒子:オリゴ糖鎖と蛋白質との相互作用を解析するための新しいバイオプローブ」

第 78 回日本生化学会大会、神戸、10 月、2005.

48. 吉田英樹、稲垣政子、上田龍、後藤聡、西原祥子:「ショウジョウバエ複眼形成における a1-3 フコース転移酵素の機能解析」

第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月、2005.

49. 合田絵美、神山伸、上田龍、西原祥子:「ショウジョウバエ新規 PAPS トランスポーター・dPAPST2 の単離と機能解析」

第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月、2005.

50. 草間さきく、上田龍、西原祥子、松浦悦子:「RNAi 法を用いたショウジョウバエの *Sir2* および *Sir2-like* 遺伝子の解析」

第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月、2005.

51. 藤谷和子、佐渡由希子、高橋邦明、内藤雄樹、山田智之、森下真一、西郷薫、後藤聡、西原祥子、上田龍:「RNAi 変異体ハエバンクを用いたショウジョウバエ遺伝子機能解析」

第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月、2005.

52. Suda Y., Kishimoto, Y., Nishimura, T., Yamashita S., Nakagawa H., Hamamatsu M., Uetani, M., Wakao M. “Carbohydrate-immobilized gold nano-particle: An on-site analytical tool for detecting the interactions between oligosaccharides and protein”

Pacificchem 2005, at Honolulu, December, 2005.

53. Suda Y., Nishimura, T., Kishimoto, Y., Yamashita S., Nakagawa H., Arano, A., Sato, M., Saito, A., Wakao M. “Development of a sugar chip: advanced analytical system for the binding interaction of structurally defined oligosaccharides using surface plasmon resonance”

Pacificchem 2005, at Honolulu, December, 2005.

54. 野々村智尋、菊池次郎、尾崎秀徳、安藤秀信、中村充:「ヒトプレ B 細胞のセレクトインカウンターリガンドの探索と同定」

第 35 回日本免疫学会総会、横浜、12 月、2005.

55. 菊池次郎、尾崎秀徳、野々村智尋、安藤秀信、中村充:「ヒトプレ B 細胞セレクトインカウンターリガンド CD43 の翻訳後糖鎖修飾とセレクトイン反応性制御メカニズム」

第 35 回日本免疫学会総会、横浜、12 月、2005.

56. 細山沙織、中村かほり、高戸美緒、豊田亜希子、戸井田敏彦、豊田英尚:「ショウジョウバエ由来ムチン型糖鎖解析法の確立と新規糖鎖遺伝子 *unbas-1* 変異体への応用」

日本薬学会第 126 年会、仙台、3 月、2006.

57. 菊池次郎、尾崎秀徳、野々村智尋、安藤秀信、古川雄祐、中村 充:「ヒトプレ B 細胞の骨髄ホーミングを制御する糖鎖性分子の同定」

第 4 回幹細胞シンポジウム、東京、5 月、2006.

58. Sasaki, N., Yoshida, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Hirabayashi, Y., Ishida, H., Ueda, R., Nishihara, S.: “*Drosophila* β 1,4GalNAcTA synthesizes the LacdiNAc structures on several glycoproteins and glycosphingolipids”

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th

FAOBMB Congress, at Kyoto, June, 2006.

59. Kamiyama, S., Sasaki, N., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., Nishihara, S.: “Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) transporter”

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th

FAOBMB Congress, at Kyoto, June, 2006.

60 Funakoshi, Y., Saigo, K., Ueda, R., Nishihara, S., Taniguchi, N., Suzuki, T.: “Analysis of

metabolic pathways of cytosolic free *N*-linked glycans in *Drosophila melanogaster*”

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, at Kyoto, June, 2006.

61. Nishimura, T., Kishimoto, Y., Yamashita, S., Wakao, M., Strand, K., Sobel, M., Suda, Y.: “Advanced analytical systems for the binding interactions between oligosaccharides and proteins/cells, using surface plasmon resonance or gold nano-particles”

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, at Kyoto, June, 2006.

62. Tohda, O., Yano, H., Hino, M., Abe, M., Awano, W., Niki Y., Takahashi, K., Ueda, R., Goto, S.: “*O*-GlcNAc modification of nuclear pore complex proteins in *Drosophila*”

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, at Kyoto, June, 2006.

63. Iguchi, S., Shinohara, H., Kikuchi, J., Ando, H., Ozaki, H., Nojiri, H., Nakamura, M.: “*O*-glycan biosynthetic mechanism and its function in human pre-B cells: major roles of pp-GalNAc-T2 and possible involvement in apoptosis”

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, at Kyoto, June, 2006.

64. Ueyama, M., Takemae, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Ueda, R., Nishihara, S.: “*Drosophila* proteoglycan galactosyltransferase II contributes to synthesis of glycosaminoglycan”

The 5th International Symposium on Glycosyltransferases, at Tsukuba, June, 2006.

65. Mizuno, M., Hirose, Y., Goto, K., Ichimiya, T., Nishihara, S.: “Synthesis of mannosyl peptides using solid-phase method and fluorous chemistry”

XXIIIrd International Carbohydrate Symposium, at Whistler (Canada), July, 2006.

66. Goda, E., Kamiyama, S., Uno, T., Yoshida, H., Ueyama, M., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Ueda, R., Nishihara, S.: “Identification and characterization of a novel *Drosophila* 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter”

Annual Conference of the Society for Glycobiology, at Los Angeles, November, 2006.

67. Kamiyama, S., Sasaki, N., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., Nishihara, S.: “Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter, PAPST2”

Annual Conference of the Society for Glycobiology, at Los Angeles, November, 2006.

68. 豊田亜紀子、伊藤美樹子、中込真理子、高戸美緒、戸井田敏彦、西原祥子、豊田英尚:「モデル生物を用いた *N*-結合型糖鎖超微量分析法の開発」

第 26 回日本糖質学会年会、仙台、8 月、2006.

69. 水野真盛、弘瀬友理子、後藤浩太郎、一宮智美、西原祥子:「ショウジョウバエジストログリカンモデルとしたマンノシルペプチドの合成」

第 26 回日本糖質学会年会、仙台、8 月、2006.

70. 岸本裕子、西村知晃、山下早希子、若尾雅広、隅田泰生:「糖鎖固定化金ナノ粒子(II):オリゴ糖鎖と蛋白質との相互作用を On-Site で解析するためのツール」

第 26 回日本糖質学会年会、仙台、8 月、2006.

71. 山下早希子、高橋優子、西村知晃、岸本裕子、若尾雅広、隅田泰生:「シアリルラクト系糖鎖の化学・酵素合成とそのシュガーチップ化」

第 26 回日本糖質学会年会、仙台、8 月、2006.

72. 西村知晃、岸本裕子、山下早希子、若尾雅広、隅田泰生:「シュガーチップと表面プラズモン共鳴法を用いた分析システムの応用(I)」

第 26 回日本糖質学会年会、仙台、8 月、2006.

73. 齊藤彰寛、大石紘、西村知晃、岸本裕子、若尾雅広、隅田泰生:「構造明確なヘパラン硫酸部分構造を固定化したシュガーチップ」

第 26 回日本糖質学会年会、仙台、8 月、2006.

74. Mizuno, M., Hirose, Y., Goto, K., Ichimiya, T., Nishihara, S.: “Synthesis of *O*-mannosylated peptides on a solid-support and a recyclable fluorous support”

International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Peptide Engineering Meeting, at Yokohama, November, 2006.

75. 合田絵美、神山伸、宇野貴明、吉田英樹、上山盛夫、豊田亜希子、豊田英尚、上田龍、西原祥子:「ショウジョウバエ新規 PAPS 輸送体の同定と機能解析」
日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋、12月、2006.
76. 菊池次郎、清水瑠美、和田妙子、安藤秀信、中村 充、小澤敬也、古川雄祐:「転写制御因子 E2F-6 による造血幹細胞の増殖に伴う E2F-1 依存性アポトーシス制御」
日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋、12 月、2006.
77. 隅田泰生:「シュガーチップを用いた検査診断技術の開発」
第一回ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会、東京、12 月、2006.
78. Yamamoto-Hino, M., Kanie, Y., Yano, H., Hirai, Y., Nishihara, S., Ueda, R., Kanie, O., Goto, S.:
“Genome-wide screening for genes regulating glycosylation in *Drosophila*”
Gordon Research Conference, at Ventura, March, 2007.
79. Ueyama, M., Yoshida, H., Kamiyama, S., Takemae, H., Goda, E., Ohmae, Y., Uno, T., Toyoda, H., Ueda, R., Nishihara, S.: “Genes contributing to synthesis of heparan sulfate in *Drosophila*”
The 8th Japanese *Drosophila* Research Conference, at Awaji, July, 2007.
80. Yamamoto-Hino, M., Yano, H., Hirai, Y., Awano, W., Kuwahara, R., Haraguchi, S., Kusaka, I., Nishihara, S., Ueda, R., Goto, S.: “Genome-wide screen for genes regulating glycosylation in *Drosophila*”
The 8th Japanese *Drosophila* Research Conference, at Awaji, July, 2007.
81. Ando, M., Komori, T., Yoshikawa, T., Imamura, A., Ishida, H., Kiso, M., Suda, Y.: “Systematic synthesis of functional oligosaccharide probes for sugar chips”
XIX International Symposium on Glycoconjugates, at Cairns (Australia), July, 2007.
82. Nakamura-Tsuruta, S., Kishimoto, Y., Nishimura, T., Suda, Y.: “One-step purification of lectins using sugar-immobilized gold nano-particles (SGNPS)”
XIX International Symposium on Glycoconjugates, at Cairns (Australia), July, 2007.
83. Suda, Y., Wakao, M., Takahashi, Y., Saito, A., Kondo, T., Saruwatari, R., Ohishi, K., Nakamura-Tsuruta, S., Nishimura, T., Kishimoto, Y., Shigeta, M., Takahashi, S., Ishida, H., Tsutsui, H., Okuno, H.: “Sugar chips and sugar chain-immobilized gold nano-particles: Towards a diagnosis for influenza virus strains”
XIX International Symposium on Glycoconjugates, at Cairns (Australia), July, 2007.
84. Wakao, M., Watanabe, S., Ogawa, T., Suzuki, K., Yumino, T., Myogadani, T., Saito, A., Muta, K., Kimura, M., Kajikawa, K., Suda, Y.: “Development of optical fiber-type sugar chip for localized surface plasmon resonance apparatus”
XIX International Symposium on Glycoconjugates, at Cairns (Australia), July, 2007.
85. 中込麻里子、高戸美緒、戸井田敏彦、西原祥子、豊田亜希子、豊田英尚:「レーザーマイクロダイセクションを用いた脳 N-結合糖鎖の領域特異的解析」
第 27 回日本糖質学会年会、福岡、8 月、2007.
86. Ueyama, M., Yoshida, H., Kamiyama, S., Takemae, H., Goda, E., Ohmae, Y., Uno, T., Toyoda, H., Ueda, R., Nishihara, S.: “Genes contributing to synthesis of heparan sulfate in *Drosophila*”
Annual Conference of the Society for Glycobiology, at Boston, November, 2007.
87. 佐々壽浩、豊田英尚、大蔵清貴、西脇清二:「*mig-22* 遺伝子の優性変異は *mig-17* 変異体の DTC 移動異常を抑圧する」
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)
横浜、12 月、2007.
88. 鶴田(中村)祥子、岸本裕子、西村知晃、奥野寿臣、隅田泰生:「糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNPs)を用いた糖結合タンパク質の1ステップ精製」
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)
横浜、12 月、2007.

(4) 特許出願

① 国内出願 (4 件)

1. 発明の名称: 浸潤抑制剤

発明者: 中村充、菊池次郎、野々村智尋、安藤秀信

出願人: 産業技術総合研究所、科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 6 月 23 日、

出願番号: 特願 2004-184583

2. 発明の名称: 新規糖固定化金属ナノ粒子およびこれを用いて糖-タンパク質相互作用を測定する方法、並びに糖-タンパク質相互作用体からタンパク質を回収する方法

発明者: 隅田泰生、西村知晃、岸本裕子、中川裕美

出願人: 科学技術振興機構、鹿児島大学、隅田泰生

出願日: 平成 17 年 5 月 26 日、

出願番号: 特願 2005-154550

3. 発明の名称: 支持体に対する金属微粒子膜の形成方法及び局在プラズモン共鳴センサ

発明者: 若尾雅広、隅田泰生、小川智央

出願人: 鹿児島大学、モリテックス㈱

出願日: 平成 18 年 3 月 10 日、

出願番号: 特願 2006-66735

4. 発明の名称: 分化制御剤及び自己再生制御剤

発明者: 西原祥子、佐々木紀彦、程久美子、西郷薫、

出願人: 学校法人創価大学、タマティーエルオー株式会社、

出願日: 平成 18 年 6 月 8 日、

出願番号: 特願 2006-159281

② 海外出願 (1 件)

1. 発明の名称: 浸潤抑制剤及び細胞殺傷剤

発明者: 中村充、菊池次郎、野々村智尋、安藤秀信

出願人: 科学技術振興機構

出願日: 平成 17 年 6 月 20 日

出願番号: PCT / JP2005 / 011560

(5) 受賞等

① 受賞

② 新聞報道

③ その他

(6) その他特記事項

1. 平成 18 年 9 月 21 日、株式会社スディックスバイオテックを起業し、研究成果の社会還元を図っている (シュガーチップ、隅田)。

7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2003 年 10 月 17 日	第 76 回日本生化学大会シンポジウム S57: 比	パシフィコ 横浜、会議	250	各種モデル動物の糖鎖機能研究を行うことは、進化

	較グライコーム：新しい糖鎖機能解析への挑戦 (<u>西原祥子</u>、平林淳)	センター 5 階 502		というふるいにかけられた糖鎖機能の「普遍性」と「多様性」を識別する試みにほかならない。本シンポジウムでは、比較生物学に由来する「比較グライコーム」を提唱し、それに基づく新しい糖鎖機能解析への試みを議論した。
2005 年 3 月 30 日	日本薬学会第 125 年回シンポジウム S19：生体分析化学の新展開ーモデル生物を用いた生命現象解明へのアプローチ (<u>豊田秀尚</u>、<u>兎川忠靖</u>)	東京ビッグ サイト 6 階	100	モデル生物を用いた分析科学研究に関して、糖鎖のみならず、タンパク質やアミノ酸研究など幅広いジャンルの第一線で活躍する研究者を演者として講演を行った。
2005 年 12 月 10 日	第 28 回日本分子生物学会年会ワークショップ W4J：モデル生物を用いた glycobiology の cutting edge (<u>伊東信</u>、<u>西原祥子</u>)	JAL リゾートシーホークホテル福岡、3 階ヴェガ	150	モデル生物を用いた糖鎖機能研究の到達点と問題点を整理し、発生、分化、形態形成、細胞死、神経機能等に糖鎖がどのように関わっているかを議論した。
2007 年 9 月 19 日	日本遺伝学会第 79 回大会ミニシンポジウム S5：RNA 干渉 (RNAi) による遺伝子サイレンシング (<u>黒田行昭</u>、<u>上田龍</u>)	岡山大学、理学部、創立 50 周年記念館	150	RNA 干渉による遺伝子サイレンシングの研究とともに小分子 RNA が果たす遺伝子発現調節機構について、哺乳類培養細胞やショウジョウバエ、イネなどの重要なモデル生物を実験材料とした研究を中心に議論した。
2007 年 12 月 12 日	第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会ワークショップ 2W22：糖鎖を介した生体システムの制御 (<u>後藤聡</u>、<u>西原祥子</u>)	パシフィコ横浜、アネックスホール F205	250	各種モデル生物を用いた糖鎖機能の解析研究に焦点をあて、発生・分化、形態形成、細胞死、幹細胞増殖、細胞内輸送に糖鎖がどのように関わっているかを議論した。

8 結び

本研究プロジェクトでは、「糖鎖の基本機能の全容の個体レベルでの把握」を目指して、糖鎖生物学、遺伝学、発生学、分析化学、合成化学、高分子化学など、異なる専門、あるいは、得意分野を持つ研究者が集まり、ショウジョウバエを主な材料として、研究を展開した。このようなチームを組むことができたため、プロジェクト内での情報交換や材料のやり取りにより、迅速な、また、一つの研究室のみでは展開できない有意義な研究ができたと考えている。心から、感謝したい。また、研究の進め方、論理の展開の仕方など、チーム内の方々から学ぶものも多かった。現在、研究は次の段階に入っており、システマティックな遺伝学的相互作用解析とシステムバイオロジー、また、糖修飾

スクリーニングとシステムバイオロジーなど、システムバイオロジーとの融合を模索している。モデル動物ショウジョウバエの特色を生かした新しい糖鎖研究を基礎にして、ハエと共通なシグナル伝達経路が鍵となる幹細胞系や各種疾病モデルへ RNAi 法を適用することにより、「糖鎖の種を超えて保存されている生理機能」のさらなる解明とヒトへの応用を、今後も行っていきたい。