

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590065

研究課題名（和文） 最終的な遺伝子特定を目指した DNA マイクロアレイの開発-糖鎖遺伝子を中心として

研究課題名（英文） DNA microarray for identifying glycan genes involved in glycan expression

研究代表者

小堤 保則（KOZUTSUMI YASUNORI）

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：70205425

研究成果の概要：

細胞表面に存在する糖鎖（糖の重合体）の合成や分解に主体的に関わる遺伝子（糖鎖遺伝子）の研究を行うために開発中の相関解析法を組み込んだ DNA マイクロアレイを利用した。細胞表面での糖鎖の測定は、抗体などを用いて行った。一方これらの細胞の遺伝子発現の解析は DNA マイクロアレイを用いて測定し、両者の相関関係を解析した。その結果、本解析方法をより改善することで、適切な糖鎖遺伝子を特定するのに有用であった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：マイクロアレイ、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

従来の DNA マイクロアレイによる解析は通常、生物学的現象の異なる A と B 二つのサンプルの遺伝子発現を DNA マイクロアレイで解析し、その結果から発現量の異なる遺伝子とその生物学的現象に関わる遺伝子の候補としてきた。しかしながら、現実にはこのような解析を行っても多くの場合、両サンプル間で発現量の異なる多数の遺伝子が見つかることが普通である。これらの多数の遺伝子候補から目的の遺伝子を絞り込むには、研究者のこれまでの知識と有る意味、勘で絞り込む

ことが多い。この場合、当然全く予想に無い遺伝子は候補には挙がらない。もし、そのような遺伝子が実際に関与しているのであれば、その分野のブレイクスルーを逃すことになる。あるいは、発現量の差異が大きいものを取りあえず調べるなどの方法もあるが、差異が大きい遺伝子が必ずしも生物学的現象に関連しているとは限らない。以上のような問題点があった。

2. 研究の目的

本研究は、糖タンパク質および糖脂質など

の糖鎖関連の遺伝子をターゲットにして、最終的な遺伝子特定を可能にする新たな DNA マイクロアレイ解析法を開発することにより、ある意味、未だ経験と勘が頼りの状況にある DNA マイクロアレイによる遺伝子の絞り込み、サイエンスを導入することを目的とする。

対象を糖タンパク質および糖脂質などの糖鎖関連に絞ったのは、申請者のこれまでの知識の蓄積もあるが、糖タンパク質および糖脂質の生理作用は、生理活性のあるタンパク質のように直接の遺伝子の支配を受けるのではなく、その間に生合成や修飾に関与する種々のタンパク質を経て行われるため極めて複雑であり、DNA マイクロアレイ解析により網羅的に研究を進める上で興味ある分野であることが挙げられる。また、ここ数年のこれらの分野の発展は目覚ましく、生合成や代謝、輸送に関する基本的な遺伝子のほとんどが同定されてきた。このことは糖タンパク質および糖脂質領域において、これらの遺伝子を用いた網羅的な解析が真に可能な段階になってきたと言える。そこでこれらの遺伝子を新たに組み込んだマイクロアレイを作製し、新たな DNA マイクロアレイ解析法を開発することで、糖および脂質に関与する種々の生物現象に関わる遺伝子の同定を遺伝子の同定を行う予定である。

3. 研究の方法

DNA マイクロアレイ解析法の開発には、3糖の糖鎖を含む糖脂質の一種である CD77 の発現と、その発現に関与する糖鎖遺伝子をモデル系として用いた。CD77 は B 細胞の成熟のマーカーとして、あるいは病原性大腸菌 0157 などのペロ毒素の受容体としても機能している分子である。この系では、糖鎖の発現パターンと遺伝子発現パターンを比較する場合、解決すべき大きな問題点として (1) 糖鎖の発現パターンの測定法、(2) 多種類サンプル間の遺伝子発現パターンの相互比較法がある。そこで、これらの問題点を解決することによって、DNA マイクロアレイを改良するとともに、種々の細胞に適応する。また、DNA マイクロアレイに関する基本的な問題点もいくつかは解決できていない。これらの点も明らかにしていく。

次に、既に述べてきたように、従来型 DNA マイクロアレイ解析法による 2 サンプル間比較では、関与する遺伝子を一義的に決めることは困難である。そこで、目的とする生物学的現象、ここでは糖鎖の発現に注目し、糖鎖発現の異なる多種類のサンプルを用いて、糖鎖の発現とこれらサンプル間の遺伝子発現との相関を解析することによって、関与する糖鎖遺伝子について優先順位を付与できる系を確立する。具体的には、サンプル間の糖鎖の発現の程度を数値化することで得た発

現のパターンと各遺伝子の発現のパターンとを比較解析し、それぞれの遺伝子について相関係数を求め、この係数の高いものから順に信頼性が高い遺伝子とする。これらに関しては植物レクチンを用いて、細胞表面の糖鎖の量を定量した場合には部分的にはうまくいっているが、今回 CD77 を対象として、抗体を用いて CD77 の糖鎖量を測定する系で詳細を確認する。また、パターン解析には多因子解析が可能な主成分解析法を導入することも検討する。

4. 研究成果

(1) 相関解析法を組み込んだ DNA マイクロアレイの改良

DNA マイクロアレイに使用するプローブの Cy3、Cy5 標識に関して、従来は 1step 法により行ってきたが、標識効率が異なることから、その補正が問題となっていた。そこで、今回 2step 法による標識を行いその標識効率を検討した。まず、最初の step でアミノアシル化されたヌクレオチドを取り込ませた後、アミノアシル基に対して、反応性の高い NHS 基を持つ Cy3 NHS-エステルあるいは Cy5 NHS-エステルをカップリングさせることで、サンプルに蛍光標識を行った。その結果従来の 1step 法で見られた蛍光標識間のバイアスがほとんど、見られなくなった。そこでこれ以降はこの 2step 法によるプローブの Cy3、Cy5 標識を行うこととした。

第 2 番目の改良点として内部標準について検討を加えた。相関解析法においては複数のマイクロアレイのデータを相互比較する必要があるが、比較のための内部標準について検討した。検討したものは、一定量加えたラムダファージ DNA、アクチン DNA である。あらかじめ高い相関が得られることが分かっているヒト B 細胞株に対する細胞表面の CD77 の発現と関連する遺伝子発現プロファイルを用いて検討した結果両者には大きな違いはなかった。おどろいたことに、これらの内部標準を用いずに、DNA スポットの総和を用いた Σ 補正の方がこれら両者よりも若干良好な結果を得たので、この後は Σ 補正を用いることとした。

第 3 番目の改良点として糖鎖の発現パターンの測定法に関して改良を加えた。抗体を用いた ELISA 法およびセルソーターによる解析の 2 種について比較検討したところ、細胞全体の糖鎖を見るには前者が適していたが、定量性に難点があった。後者は細胞表面に限られるが、定量性があるため主としてこれを採用した。

第 4 番目の改良点として多種類サンプル間の遺伝子発現パターンの相互比較法について検討を加えた。通常 DNA マイクロアレイは 2 点間の解析しかできないが、あらたに開発

している方法は、多種類のサンプルの比較をする必要があった。比較する方法としては、多種類サンプルのうち、基準となるサンプルの mRNA を標準とした方法、あるいはあらかじめ種の臓器から mRNA をプールして得た標準 mRNA を用いる方法の検討を行った。その結果、後者の方が優れていることが分かった。以上の改良を加えた、最終的に確立できた方法を CIRES (Correlation index-based responsible enzyme gene screening) と名付ける。

(2) CIRES-DNA マイクロアレイを用いた CD77 の発現に關与する糖鎖関連遺伝子の特定

確立した CIRES-DNA マイクロアレイを用いて細胞表面の CD77 の発現制御に直接關与する糖鎖関連遺伝子の特定を行った。用いた細胞は 6 種類のヒト由来のミエローマ細胞株、Namalwa, Raji, Ramos, Daudi, KMS12-BM, KMS12-PE を用いた。CD77 の発現は特異的な抗体を用いて、セルソーターでその抗体の結合量を測定することによって、発現量とした。次にこれらの細胞から mRNA を単離し、あらが締め用意した基準となる mRNA との間でそれぞれマイクロアレイ解析を行い、最終的に基準 RNA の値を 1 とすることで、6 種の細胞間での遺伝子発現を相対的に比較した。各遺伝子の相対的な発現のプロファイルと、CD77 の発現プロファイルの相関係数を算出することによって比較した。その結果、 β 1,4 galactosyltransferase-6 の遺伝子が、第 2 位の高い相関係数を示した。この遺伝子は、CD77 の 3 糖のうち、真ん中のガラクトースの合成に關わる可能性のある遺伝子の一つである。高い相関係数からこの遺伝子が、CD77 の発現制御に關わっている遺伝子の一つと考えられた。その他の遺伝子としては、 α 1,4 galactosyltransferase が第 8 位の高い相関係数を示した。この遺伝子産物は、CD77 糖鎖の最後のガラクトースの転移に關わる酵素遺伝子である。そのため、この酵素遺伝子も、CD77 の発現制御に關わっていると考えられた。

(3) CIRES-DNA マイクロアレイを用いた逆相関遺伝子の特定

既に明らかにしてきたように CIRES-DNA マイクロアレイシステムでは、レクチンや糖鎖特異的抗体の定量的な結合データとマイクロアレイデータを組み合わせることにより、細胞表面糖鎖の発現と高い相関を示す遺伝子を提示することができる。今までは主に正の相関がある遺伝子に注目して結果を示してきたが、さらに負の相関を持つ遺伝子の特定について検討を行った。系としては多くの分岐を持つ一連の糖脂質を選んだ。細胞としては、正の相関で実績のある一連のヒト B 細胞株の組み合わせ、及びこれに T 細胞株など

の用いた組み合わせを用いた。この糖脂質合成系では GM1 と CD77 が LacCer を核として別々の分岐に存在している。CD77 の発現は特異的抗体を用い、GM1 の発現はコレラトキシンを用い、何れもセルソーターにて測定した。次にこれらの細胞から mRNA を単離し、あらが締め用意した基準となる mRNA との間でそれぞれマイクロアレイ解析を行い、最終的に基準 RNA の値を 1 とすることで、6 種の細胞間での遺伝子発現を相対的に比較した。これらの各遺伝子の相対的な発現のプロファイルと、CD77 及び GM1 の発現プロファイルを比較し、それぞれの遺伝子の相関係数を算出した。その結果、LacCer から Gb3Cer の合成を行う α 1,4 galactosyltransferase に高い負の相関が得られた。このことを確認するために、用いた 6 種のヒトミエローマ株の中で中程度に CD77 および GM1 を発現している B 細胞ミエローマである Namalwa 細胞を用いて、 α 1,4 galactosyltransferase を強制発現したところ、CD77 の発現は上昇し、逆に GM1 の発現が減少したことから、CIRES-DNA マイクロアレイの結果が裏付けられた。すなわち、CD77 分岐と GM1 分岐が競合していることが CIRES を用いた DNA マイクロアレイのみで同定できることを明らかにした。

(4) CIRES-DNA マイクロアレイを用いたサイコシンによる細胞質分裂阻害に關与する遺伝子の特定

通常、脳内のガラクトシルセラミドの分解は、ガラクトースとセラミドに分解される。しかしながら、グロボイド細胞ロイコジストロフィー症患者では、この分解が十分には行われず、ガラクトシルセラミドはガラクトシルスフィンゴシンと脂肪酸に分解されると考えられている。このガラクトシルスフィンゴシンをサイコシンと言ひ、グロボイド細胞ロイコジストロフィー症患者の脳内に蓄積する。重篤なタイプは生後数年で死亡するが、死亡した患者の脳を調べると多数の核を持つ巨大細胞が多数観察される。我々のこれまでの研究から、グロボイド細胞ロイコジストロフィー症患者脳に多核の細胞が出現する原因物質であることが明らかにされている。その機構は、サイコシンは核の分裂が阻害しないが、細胞質分裂を阻害するためこのような多数核を持つ細胞が出現するというものであった。しかしながら、サイコシンがなぜ多核細胞を産生するのかは不明であった。そこで、CIRES-DNA マイクロアレイ法を用いて解析した。用いた細胞は、ヒト由来ミエローマ細胞、T 細胞系のガン化細胞などであった。これらの細胞にサイコシンを添加し 48 時間で多核になった細胞の割合をセルソーターで測定し、これを用いてプロファイルを作成した。次にこれらの細胞から mRNA を単離し、あらが締め用意した基準となる mRNA との間

でそれぞれマイクロアレイ解析を行い、最終的に基準 RNA の値を 1 とすることで、これらの細胞間での遺伝子発現を相対的に比較した。そして各遺伝子の相対的な発現のプロファイルと、サイコシンによる多核プロファイルの相関係数を算出することによって比較した。その結果、とりわけ相関係数の高い遺伝子は得られなかった。遺伝子発現に関しては部分的に他の方法でも確認しており主要な原因としては、サイコシンに対する感受性に対する測定方法にあると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kanazawa, T., Takematsu, H., Yamamoto, A., Yamamoto, H., and Kozutsumi, Y. Wheat germ agglutinin stains dispersed post-golgi vesicles after treatment with the cytokinesis inhibitor psychosine. J Cell Physiol, vol.215, 517-525 (2008), 査読有
- ② Tatano, Y., Fujinawa, R., Kozutsumi, Y., Takahashi, T., Tsuji, D., Takeuchi, N., Tsuta, K., Takada, G., Sakuraba, H., and Itoh, K. Tropoelastin regulates chemokine expression in fibroblasts in Costello syndrome Biochem Biophys Res Commun, vol. 372, 681-687 (2008), 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 金沢崇之, 竹松弘, 山本章嗣. 小堤保則 クラッペ病における蓄積脂質ガラクトシルースフィンゴシン (サイコシン) の細胞質分裂阻害機構の解析 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 2007. 12. 13, 横浜
- ② 竹松弘, 内藤裕子, 村田恵祐, 小堤保則, マウスリンパ球における活性化依存的なシアル酸分子種の変化とその意義, 第 28 回日本糖質学会年会, 2008. 8. 19, 茨城

[図書] (計 1 件)

- ① Yamamoto, H, Takematsu, H, and Kozutsumi, Y. Experimental Glycoscience Glycobiology (一部), Springer, 498 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小堤 保則 (KOZUTSUMI YASUNORI)
京都大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号：70205425

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者
無し