

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770104

研究課題名（和文）複合糖質コンドロイチンを介した新しい細胞質分裂制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of chondroitin proteoglycans and related molecules involved in cell division control

研究代表者

水口 惣平(MIZUGUCHI SOUHEI)

熊本大学・大学院生命科学研究所・産学官連携研究員

研究者番号：50398103

研究成果の概要（和文）：複合糖質コンドロイチンは細胞質分裂制御に関与している。モデル生物線虫(*C. elegans*)を用いてコンドロイチンと関連する分子群の生体内機能解析を行い複数の新しい知見を得た。1) コンドロイチンプロテオグリカンによる線虫卵殻と浸透圧障壁形成の機構が明らかとなった。2) 更に、コンドロイチンは線虫の卵成熟過程で減数分裂の制御にも関与していた。3) また、コンドロイチンは卵黄蛋白質である vitellogenin の卵細胞への取込みに必要であった。以上のことから細胞表層のコンドロイチンを介した新たな細胞分裂制御と分子輸送機構が示された。

研究成果の概要（英文）：Chondroitin proteoglycans are involved in cell division. We analysed chondroitin proteoglycans and related molecules using model organism *C. elegans* and found following. 1) Two chondroitin proteoglycans are required for proper assembly of the *C. elegans* eggshell and osmotic barrier. 2) Chondroitin plays an important role on meiosis in nematode germ line. 3) Chondroitin proteoglycans are involved in receptor-mediated transport of vitellogenin during oogenesis. These findings suggest that chondroitin and related molecules are involved in cell division control and molecular transport systems.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：構造生物化学（5802）

キーワード：(1) 糖鎖 (2) *C. elegans* (3) 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

近年、複合糖質の重要性が高く認識されるようになり、糖鎖生物学という言葉も生物学や

医学の分野に広く浸透した。しかし、複合糖質は生体内分子の中でも複雑さの点で群を抜いており、その機能解析が困難である事実

は依然として変わらない。研究代表者らは、全遺伝子配列が解読されており、全ての細胞系譜が同定済みで、しかも多細胞生物の基本的長を有するという利点を持つ、モデル生物線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いて、解析が困難な複合糖質関連分子の生体内機能解明を試みた。研究代表者は線虫のもう一つの利点である遺伝学的解析の容易さを活用して、順遺伝学的な手法と、二本鎖 RNA による遺伝子機能阻害 (RNAi) の逆遺伝学的手法を組み合わせて、複合糖質関連因子の網羅的機能阻害を行う過程で、コンドロイチン合成酵素の遺伝子機能阻害により線虫初期胚の細胞質分裂が阻害され、細胞が多核化することを発見した。これは糖鎖が生命現象の素過程である細胞分裂に関与している事実を世界にさきがけて明らかにするものであり、その分子機構の詳細な解明が希求されたため、研究代表者は本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、複合糖質コンドロイチンが細胞質分裂に関与する生体内分子機構を解明することである。その為にモデル生物線虫を用いて、コンドロイチン合成に関わる他の因子や、コンドロイチンと相互作用する分子群を同定し、生体内での機能を解明する。研究代表者は予備的研究により、コンドロイチン重合化因子の機能阻害でも初期胚細胞質分裂異常が生じることや、別種のグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸合成に関与する酵素の機能阻害が、線虫胚の形態形成や成体の神経の軸索形成に異常を引き起こすことを報告し、線虫において複合糖質が重要な生体内機能を有することを確認している。本研究ではこれらの分子機構をより詳細に理解するため、LC/MSⁿの質量解析によるコンドロイチンプロテオグリカン (ChPG) コア蛋白質の同定や、ChPG コア蛋白質をコードする遺伝子の欠失型変異体株の作成と、更に表現型解析による生体内機能解析を行った。また、抗コンドロイチン抗体を用いた免疫沈降によってコア蛋白質を精製し、中でも発現量の多い B0280.5 (cpg-2 : Chondroitin Proteoglycan) と C07G2.1 (ccej-1: Cell Junction protein 現在別名で cpg-1) の遺伝子産物に関して、線虫初期胚や生殖巣における発現解析と、細胞分裂時の分子挙動を詳細に解析し、その機能の解明を試みた。現在、欧米を中心に線虫のコンドロイチンに興味を持って研究を行っているグループがいくつか存在し、いずれも類似した細胞分裂異常に関する結果が得られている。それらの研究室の見解をまとめると、今後線虫コンドロイチンの生体内機能に関する考え方は以下の2つに落ちつくと予想された。

(仮説1) ChPG が線虫初期胚の細胞と卵殻の間に存在し、浸透圧耐性を調節しているというもので、コンドロイチンが不足すると、浸透圧ショックによって初期胚の細胞分裂異常が引き起こされるという考え方。(仮説2) ChPG は多精の拒否に関与しており、コンドロイチンが不足すると、複数の精子の侵入によって細胞が多核化し、細胞分裂も異常になるという考え方。

しかし研究代表者は、コンドロイチン欠失時の浸透圧ショックが、細胞質分裂の異常の必要条件ではあるが十分条件ではない事を示す実験結果を複数得ており (浸透圧を調節した培養液中でもコンドロイチン合成酵素の機能阻害により線虫初期胚の細胞質分裂異常が引き起こされる、浸透圧調節地中の線虫培養細胞でもコンドロイチンの酵素的消化によって細胞質分裂が異常になる等)、また多精の拒否説に関しても、受精が正常に行われた初期胚でコンドロイチンの欠失で細胞質分裂異常が生じることを確認している。これらの点を考慮して、研究代表者は上記2つの仮説にとらわれず、他にも未知のコンドロイチン生体内機能が存在する可能性を十分に考慮して、発見的に研究を進める事が重要だと結論した。その為に、コンドロイチン関連因子の蛍光融合蛋白質を用いた生体内可視化や、コンドロイチン合成酵素の機能阻害に伴って発現変動する分子群の同定、更にコンドロイチンと相互作用する分子群の同定と機能解析を連携して行うことで、複合糖質のコンドロイチンを介した全く新しい細胞分裂制御に関する機構を明らかにし、線虫のみならず多細胞生物生体内における糖鎖の機能を深く知る為の重要な手がかりを得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) コンドロイチンプロテオグリカンの、線虫生体内の細胞質分裂に関与する因子との関連を、主に蛍光融合蛋白質を用いた生体内リアルタイム観察を行って解明する。ChPG コア蛋白質の輸送や局在を四次元顕微鏡観察 (観察ステージの立体的制御に加えてタイムラプス撮影を行うことが可能な顕微鏡) によって詳細に記録し、初期胚発生時のみならず成体の生殖系列組織における分子の挙動を明らかにする。同時に複数の蛍光蛋白質をレポーターとして用い、種々の ChPG コアタンパク質の生体内局在や、相互作用の有無等についても解析する。さらに、コンドロイチンと相互作用を行う分子群や、ChPG 発現の有無に相関して変動するタンパク質についても、蛍光融合蛋白質とそれを恒常的に発現するトランスジェニック線虫を作製し、生体内での挙動をリアルタイムで調査する。また、

これらの分子の遺伝子機能を RNAi によって系統的に阻害したときに、細胞質分裂やそれぞれの分子の動態がどのように変化するか、同様に蛍光融合蛋白質で視覚的に把握しながら、コンドロイチン生体内機能に関わる分子群のネットワークについても考察する。

(2) コンドロイチンの欠失が線虫生体内の他の蛋白質発現にどのような影響を与えているのか、野生型と変異体の線虫の総蛋白質を比較することで解析する。サンプル間で蛋白質発現量の比較を行う解析手法である大型蛍光 2 元電気泳動(2D-DIGE:2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)法と、既に作成が完了している ChPG 欠失型変異体株 (cpg-1(-/-)及び cpg-2(-/-))を用いて、野生型線虫と比較して変異体で発現が変動している蛋白質群を解明する。有意に発現の増加又は減少を示している二次元電気泳動スポットの蛋白質を質量解析 (nanoLC/MS/MS) によって同定する。更に、発現変動のあった蛋白質群に関しては、それらの遺伝子機能阻害によって細胞質分裂に影響があらわれるかどうか調査すると共に、線虫において蓄積された膨大な量の網羅的解析結果 (DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析、yeast two-hybrid 法による蛋白質間相互作用解析など)の知見と、線虫の複合糖質関連因子解析に特化したサーバーコンピューター(平成 17 年-18 年度、若手研究(B)「バイオインフォマティクスを用いた *C. elegans* 複合糖質関連遺伝子の機能解析-糖鎖関連データベースの構築と複合 RNAi による機能解明-)において研究代表者が構築)を用いて解析を行い、ChPG の欠失が引き起こす蛋白質発現変動の分子ネットワークを解析することで、コンドロイチンの機能に迫る。

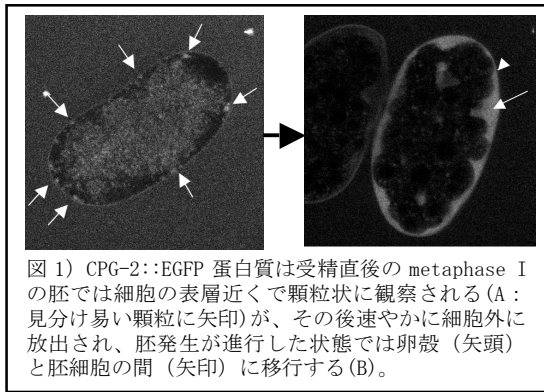
(3) コンドロイチンと相互作用を行う分子を特定する。他種のグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸は相互作用を行う分子が多く知られており、bFGF レセプターと結合し二量体化を促進するなど、成長因子に関連するシグナル伝達に関与するとの報告も多いが、コンドロイチンと相互作用する分子は全く知られていない。(硫酸化されていないコンドロイチンが珍しい分子であるためでもある。)しかし線虫のコンドロイチンには実際に生物学的機能が有るため、何らかの未知の分子と相互作用している可能性が高く、それらの分子群を特定できると期待される。そこで *C. elegans* の ChPG コア蛋白質にエピトプタグを付加した後、適切な抗体を用いた

免疫沈降を行って、共沈してくる分子、もしくは分子複合体を精製する。これらの分子を質量解析 (nano LC/MS/MS) で一挙に同定し、更に蛍光融合蛋白質を発現するトランスジェニック線虫を作成することで、生体内で ChPG と相互作用を行うかどうかを含め、分子の挙動を確認する。同時に各遺伝子の機能阻害を行い ChPG を通して細胞質分裂に影響が生じるかどうかを検証し、コンドロイチンと結合する分子と、ChPG の生体内機能の関係を明らかにする。

4. 研究成果

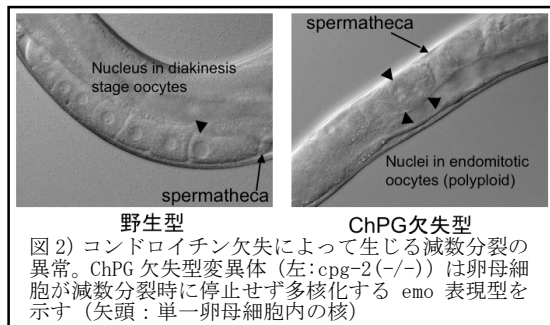
(1) ChPG は cortical granule の成分として細胞外に放出され、卵殻と浸透圧障壁形成に機能している。

抗コンドロイチン抗体を用いた免疫沈降法と nanoLC/MS/MS 解析により同定された 10 種の ChPG コアタンパク質の内、発現量が多く遺伝子機能阻害によって細胞質分裂に異常を引き起こす 2 種類の ChPG コアタンパク質、CPG-1、CPG-2 の生体内機能を解析した。cpg-1、cpg-2 遺伝子はそれぞれ単独の機能阻害ではそれほど重篤な表現型を示さないが、共に機能阻害を行うことで線虫初期胚の細胞質分裂異常を引き起こす。線虫の ChPG コアタンパク質 CPG-1 及び CPG-2 の蛍光融合蛋白質を発現するトランスジェニック線虫を作成し、生体内発現解析を行ったところ、両コアタンパク質は線虫生殖巣に多量に発現することが確認された。更に、受精後の細胞質分裂異常の原因を探るため、卵成熟・受精・胚発生時における ChPG 分子の挙動を共焦点三次元タイムラプス顕微鏡を用いて細胞レベルで経時的に観察する実験系を確立し、観察を行った。解析の結果、これらの ChPG は卵成熟時には卵細胞の細胞質に蓄積され、受精が引き金となり直後に細胞外に放出されることを確認した。線虫の受精直後の卵は卵殻が形成されておらず、浸透圧に対する障壁も存在しない。しかし CPG-1 もしくは CPG-2 が細胞外に放出されることで、卵殻と浸透圧障壁の形成が速やかに完了した。CPG-1、CPG-2 共に卵殻と浸透圧障壁を形成する機能を有している。しかし特に CPG-2 は大量に発現し、線虫卵成熟時に卵母細胞へと蓄積され、cortical granule の成分として受精後細胞外に移行することで、胚細胞の浸透圧耐性と卵殻形成に主要な機能を果たすことが確認された(図 1 参照)。



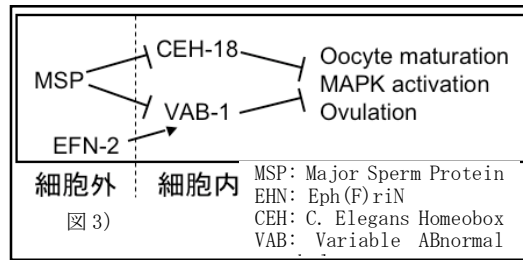
(2) コンドロイチンは卵母細胞の正常な減数分裂に必要な糖鎖である。

更に、コンドロイチン合成に関する酵素や CPG-1, CPG-2 の欠失が線虫生体に及ぼす影響を詳細に観察したところ、生殖巣の卵母細胞形成にも異常が生じていることが明らかとなった。線虫では通常減数分裂時の卵細胞は受精まで細胞の分裂を停止し休止状態 (metaphase I) に留まる。しかし CPG-1, CPG-2 それぞれの欠失型変異体の詳細な表現型解析を行うと、低い遺伝浸透度ではあるが卵細胞が小さく、また卵母細胞が第一減数分裂で停止せずにそのまま有糸分裂を繰り返す emo (EndoMitotic Oocytes) 表現型を示すものが確認された。この表現型は全ての ChPG に影響を及ぼすコンドロイチン合成酵素の機能阻害により顕著に現れる。これは通常 MSP (Major Sperm Protein, 精子由来ホルモン様物質) とそのレセプターへの結合により厳密に制御されている卵母細胞の減数分裂期停止機構が ChPG の欠失により働かなくなる事を示しており、細胞表層のコンドロイチンが、配偶子形成や減数分裂のタイミング決定に関与する可能性を示す新しい知見である。emo 表現型の線虫の卵母細胞は細胞質分裂を行わず、核分裂のみを繰り返すことで、卵母細胞が多核化する。(図2参照)



現在知られている卵成熟過程で減数分裂に関わる分子機構の一部を以下に示すが(図3参照)細胞表層のコンドロイチンはこれらのシグナル伝達系で細胞外からの刺激と、細胞

内の分裂制御機構を結ぶ機能を有していると考えられる。

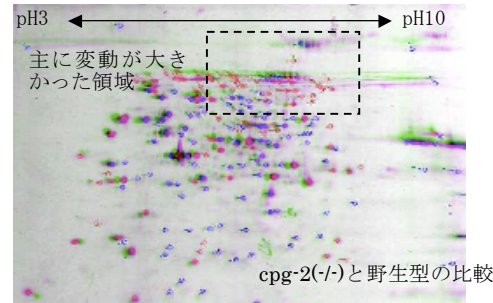


(3) コンドロイチンは卵黄蛋白質 vitellogenin の細胞内への輸送 (endocytosis) に関与する

次に、cpg-1, cpg-2 それぞれの欠失型変異体と野生型線虫の二次元電気泳動 (2D-DIGE 法) による蛋白質発現変動比較解析を行った。cpg-1 欠失型変異体で発現が有意に 1.2 倍以上増減していたタンパク質スポット 40 個と、cpg-2 欠失型変異体で発現が有意に 1.2 倍以上変動していたタンパク質スポット 82 個をゲル内消化し、質量解析 (nanoLC/MS/MS) によりタンパク質同定した。その結果最も大きく発現が変動していたタンパク質は cpg-1, cpg-2 欠失型変異体共通で、卵黄蛋白質 vitellogenin (複数の vit 遺伝子産物) であった。両変異体とも野生型線虫に比べ vitellogenin の大幅な発現減少が確認された(図3参照)。抗コンドロイチン抗体を用いた免疫沈降法でも、ChPG と相互作用する分子として vitellogenin が同定されたことから、コンドロイチンの vitellogenin 輸送や卵母細胞への蓄積への関与が強く示唆された。vitellogenin は線虫成体の腸で合成された後、偽体腔を介して生殖巣に輸送され、最終的には細胞表層のレセプターを介した特殊な小胞輸送 (endocytosis) により卵成熟過程で卵に蓄積されることが知られている。実際に、本研究ではコンドロイチン合成酵素遺伝子に対する機能阻害 (RNAi 処理) で細胞膜表面の ChPG が失われると vitellogenin の取込みが適切に行われず、線虫生殖巣の卵細胞の大きさが縮小する現象が確認された。更に vitellogenin の蛍光融合蛋白質を発現するトランスジェニック線虫を作成し、分子の挙動を解析したところ、ChPG 欠失型変異体では vitellogenin は腸管から偽体腔へは移行するものの、生殖巣での卵細胞への取込みが抑制されていた。このことからコンドロイチンは卵細胞表面の vitellogenin 取込みに関わるレセプター (RME-2 (Receptor Mediated Endocytosis) 等) の機能に必要と考えられる。vitellogenin の卵への蓄積と、分子自体の機能は未だよく解明されていないが、コンドロイチンを介した正常な卵成熟と減数分裂との関わりについて更なる解析が望まれる。

前述の MSP や vitellogenin は共に細胞表面のレセプターを介して生体内で機能する分子である。これらの分子のコンドロイチンによる制御は、ヘパラン硫酸による成長因子とレセプター (bFGF レセプターの多量体化と細胞内へのシグナル伝達制御等) を介したシグナル・分子制御機構を想起させる。本研究ではこれまで知られていなかったコンドロイチンが関与する分子機構の一端が明らかとなった。今後更なるコンドロイチンと相互作用する分子の解析や、コンドロイチンによる MSP や vitellogenin レセプターの機能制御機構の詳細な解明により、複合糖質を介した細胞分裂に関する新規シグナル伝達機構や分子輸送メカニズムの発見が期待される。更にこれらの知見を基にした、高等動物における糖鎖を介した新しい細胞分裂制御機構の解明や、不妊治療など医療への応用も視野に入れ、研究を進展させてゆく。

図3) cpg 欠失型変異体株の 2D-DIGE 解析と変動タンパク質の同定結果 (一部抜粋)



cpg-2 欠失変異体で発現変動が大きかったタンパク質 (上位10スポットの同定結果)				
順位	コスミド名	pI	MW	Protein
1	C42D8.2a	6.24	187604	locus: vit-2 vitellogenin
2	C42D8.2a	6.24	187604	locus: vit-2 vitellogenin
3	F59D8.2	6.61	186192	locus: vit-4
4	C42D8.2a	6.24	187604	locus: vit-2 vitellogenin
5	C42D8.2a	6.24	187604	locus: vit-2 vitellogenin
6	K09F5.2	6.5	187946	locus: vit-1 vit-1
7	F55B11.1	6.02	150188	xanthine dehydrogenase
8	C42D8.2a	6.24	187604	locus: vit-2 vitellogenin
9	C08H9.2		134261.8	high-density lipoprotein-binding protein
10	C08H9.2		134261.8	high-density lipoprotein-binding protein

cpg-1 欠失変異体で発現変動が大きかったタンパク質 (上位10スポットの同定結果)				
順位	コスミド名	pI	MW	Protein
1	C42D8.2a	6.24	187604	locus: vit-2 vitellogenin
2	C42D8.2a	6.24	187604	locus: vit-2 vitellogenin
3	F59D8.2	6.61	186192	locus: vit-4
4	C42D8.2a	6.24	187604	locus: vit-2 vitellogenin
5	C42D8.2a	6.24	187604	locus: vit-2 vitellogenin
6	K09F5.2	6.5	187946	locus: vit-1 vit-1
7	F55B11.1	6.02	150188	xanthine dehydrogenase
8	C42D8.2a	6.24	187604	locus: vit-2 vitellogenin
9	C08H9.2		134261.8	high-density lipoprotein-binding protein
10	C08H9.2		134261.8	high-density lipoprotein-binding protein

(vitellogenin 遺伝子産物を太字表記)

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)

①Dejima K, Murata D, Mizuguchi S, Nomura KH, Gengyo-Ando K, Mitani S, Kamiyama S, Nishihara S, Nomura K
The ortholog of human solute carrier family 35 member B1 (UDP-galactose transporter-related protein 1) is involved in maintenance of ER homeostasis

and essential for larval development in *Caenorhabditis elegans*.

FASEB Journal (査読有) 23: 2009, pp2215-2225

②Mizuguchi, Souhei, Dejima, Katsufumi and Nomura, Kazuya

Sulfation and related genes in *Caenorhabditis elegans* "線虫における硫酸化と関連遺伝子"

Trends in Glycoscience and Glycotechnology (査読有) 21: 2009, pp179-191

[学会発表] (計2件)

①水口 惣平・他. 統合プロテオミクスとバイオインフォマティクスの手法を用いた脳腫瘍の化学治療感受性に関する Vimentin を介したネットワークの解析
第82回日本生化学会大会合同大会 2009年10月22日, 神戸国際会議場

②水口 惣平・他. モデル生物 *C. elegans* を用いたコンドロイチンプロテオグリカンの生体内機能解析
第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 2008年12月11日, 神戸ポートアイランド・神戸国際展示場

[図書] (計1件)

①Mizuguchi Souhei et al. Springer, Experimental Glycoscience, 2008, part3-69, 516 pages

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 融合プロテオミクスによるデータマイニングシステム及びデータマイニング方法

発明者: 荒木令江、水口惣平・他

権利者: 熊本大学

種類: 特許

番号: 特許 2010-81525

出願年月日: 2010年3月31日

国内外の別: 国内

名称: 抗癌剤の効果を飛躍的に向上させる補助薬としての翻訳後修飾阻害剤

発明者: 荒木令江、水口惣平・他

権利者: 熊本大学

種類: 特許

番号: 特許 2010-81524

出願年月日: 2010年3月31日

国内外の別: 国内

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/tumor/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水口 惣平 (MIZUGUCHI SOUHEI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・産学官
連携研究員

研究者番号 : 50398103