

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月9日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657093

研究課題名（和文）線虫初期胚細胞分裂を司る

コンドロイチンプロテオグリカンの同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of chondroitin proteoglycans involved in early cell division of the nematode *C. elegans*

研究代表者

野村 一也 (NOMURA KAZUYA)

九州大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：30150395

研究成果の概要（和文）：

モデル生物線虫で、コンドロイチンと呼ばれる有名な糖鎖が細胞分裂を制御しているという私達の発見(2003年雑誌Natureに掲載された)は糖鎖生物学界に衝撃を与えたが、その分子メカニズムは全く解明できていない。本研究ではコンドロイチン糖鎖のついでに蛋白質を同定することで、未知の細胞分裂制御メカニズムの解明に挑んだ。その結果、コンドロイチンが配偶子形成(減数分裂)にも働いていることを発見し、未知の遺伝子制御ネットワークの存在を示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

Our discovery of involvement of chondroitin proteoglycans in early cell division of the nematode *Caenorhabditis elegans* (Nature 2003) opened up a new chapter in glycobiology, but the molecular mechanism of their involvement in cell cycle progression remains unknown. In this study, I tried to identify novel chondroitin-core proteins, and found that the chondroitin proteoglycans are involved in meiosis as well as in mitosis of the nematode. The identification of the novel gene network sheds new light on the roles of proteoglycans in cell cycle control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：コンドロイチン、減数分裂、体細胞分裂、プロテオグリカン、線虫、モデル生物、GPI アンカー

1. 研究開始当初の背景

私達は2003年にNatureに掲載された論文で、世界で初めて糖鎖(コンドロイチン)の合成が線虫初期胚の細胞分裂に必須であることを発見した。その後、私達のCRESTプロジェクトによって、マウス初期胚でもコンドロイチン合成が細胞分裂に不可欠であることが確認され、有名なプロテオグリカンであるコンドロイチンの糖鎖が、線虫から哺乳類にいたる生物で細胞分裂に不可欠であるという発見は世界に衝撃を与えた。世界中でのコンドロイチンの細胞分裂制御機構の解

明競争の結果、私達を含めて複数のグループがコンドロイチンが付加された蛋白質(コア蛋白質)を同定したが、同定した蛋白質がすべて、線虫類にのみ存在するものだったため、分子メカニズムの解明につながるめぼしい成果を生まなかった。同定されたコア蛋白質は線虫の卵をかこむ殻にも存在することから、浸透圧異常による細胞分裂異常という説も提唱されたが、この説ではマウス胚での結果や浸透圧調節下でのコンドロイチン合成欠如による細胞分裂異常などの結果を説明することができず、未知の分子メカニズムが

存在すると予想できた。

2. 研究の目的

本研究は、コンドロイチンプロテオグリカンによる細胞分裂制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的として実施した。糖鎖が細胞分裂を制御する分子メカニズムを解明することで、いままでになかった新しい癌の治療法や細胞分裂の制御メカニズムを明らかにして、医学・生物学に大きく貢献することを目標に研究を進めることにした。まず、ヒトを含む哺乳類と線虫で共通に存在するプロテオグリカンを探索し同定して、コンドロイチンによる細胞分裂制御の普遍的メカニズムを明らかにするという挑戦的目標をかかげて実験を進めることにした。

線虫と哺乳類ともに共通するコンドロイチンコア蛋白質候補として **bamacan** (*cohesin* の *subunit* で細胞表面にも発現する **SMC-3** とも呼ばれる蛋白質) を取り上げることにした。**bamacan** は有名なムーンライト蛋白質 (一つの蛋白質が複数の全く異なる働きをする蛋白質) であり、マウスの細胞表面に存在するコンドロイチンプロテオグリカンであるとともに、細胞の核内では、細胞分裂において染色体を結びつけている *cohesin* のサブユニットとして働いており、マウスの遺伝子ノックアウト株は致死となる。すでに共同研究者の成果によって、線虫の *cohesin* を切断する酵素である *separase* は、細胞分裂で蛋白質分解酵素として *cohesin* の分解に働いた後、核内から細胞膜表面にコンドロイチンコア蛋白質とともに輸送され、細胞分裂面に集中することが明らかにされていた。そこで、本研究では、*separase* に切断される *cohesin* のサブユニットである線虫の **SMC-3** が、細胞分裂で *cohesin* サブユニットとして働いた後にコンドロイチンを付加された後に細胞膜へと移動し、細胞表面に核分裂の終了を告げて細胞質分裂へと誘導するという仮説 (細胞表面糖鎖による細胞分裂チェックポイント仮説) を検証し、コンドロイチン細胞分裂制御機構を解明することを第一の目的として実験を行った。さらに細胞分裂に関係している線虫遺伝子をバイオインフォマティクスで網羅的に選び出し、それら全遺伝子の遺伝子機能阻害実験をおこなって、コンドロイチンや糖鎖を介した細胞分裂制御機構の全貌の解明を目指した。

3. 研究の方法

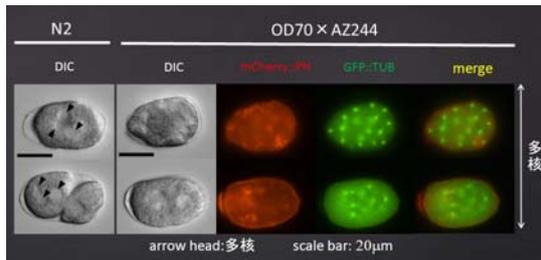
ゲノム中に単一コピーの遺伝子を導入できる **MosSCI** 法を利用して、コンドロイチンコア蛋白質候補 (**SMC-3**, **CPG-1**, **CPG-2**) などの遺伝子に蛍光蛋白質遺伝子を結合した遺伝子を線虫に導入して発現を検討した。並行

して従来法による遺伝子導入線虫も作製して候補蛋白質の発現と細胞内変動を追跡した。さらに免疫沈降法によってコンドロイチンコア蛋白質や、コンドロイチンと相互作用する蛋白質を同定する作業をおこなった。またバイオインフォマティクスによって遺伝子機能を阻害した際に、コンドロイチン合成を阻害した時と同じ表現型を示す全遺伝子約 400 個を選び出し、その主要なものの遺伝子機能阻害を詳細におこなって、コンドロイチン合成と細胞分裂をつなぐ遺伝子ネットワークの同定を試みた。

4. 研究成果

(1) **MosSCI** 法による 1 個の遺伝子 (蛍光蛋白質を付加したコア蛋白質候補遺伝子) の導入実験では、導入した遺伝子が大きすぎてうまく発現できない場合や 1 遺伝子の導入であるため蛍光が弱すぎて観察しにくい場合などがほとんどで、**MosSCI** 法でコア蛋白質候補の細胞内での移動を追跡することは現有の感度のレーザー共焦点顕微鏡では困難であった。これに対して従来法による遺伝子導入を行った線虫ではこのような問題がないが、この方法での **SMC-3** 遺伝子の観察では核内から細胞膜への蛋白質の移動は確認できなかった。より高感度の蛍光観察が必要と結論された。これと並行して、コンドロイチンコア蛋白質を二次元電気泳動法によって分離・濃縮して抗コンドロイチン抗体反応性のスポットとして同定し、抽出後、質量分析によって解析したデータを **Mascot** などの解析ソフトウェアで詳細に検討した。この方法でコンドロイチン付加されている蛋白質を同定したところ、**CPG-2** が線虫の主なコンドロイチンコア蛋白質であり、たしかにコンドロイチン糖鎖が付加されていることを質量分析によって確認できた。しかしこの解析では **SMC-3** にコンドロイチンが付加されていることは確認できなかった。哺乳類と線虫の **SMC-3** のアミノ酸配列を比較して、コンドロイチン糖鎖が付加可能である **SGX** 配列などを比較した結果、ともに **SGX** や **SG** 配列を持つが、どうやら一部のコンドロイチン付加サイトが線虫では失われている可能性を見いだした。そこで、**SMC-3** と複合体をつくとされる幾つかの遺伝子産物がコンドロイチン付加されて **SMC-3** と複合体をつくって核内から細胞膜へと移動している可能性を検討することが今後の課題と考え実験をすすめた。また並行して行った、免疫沈降法によるコア蛋白質候補の同定でも **SMC-3** は検出できず、**SMC-3** がコア蛋白質であることを示す、直接的証拠は得られなかった。免疫沈降後の質量分析結果の今後の詳細な検討が必要である。

(2) コンドロイチン合成酵素 (*sqv-5* や *mig-22* 別名 *pfc-1*)、コア蛋白質と関連遺伝子 (*him-4*, *cpg-1*, *cpg-2*, *rig-6*, *scc-3* その他) の網羅的 RNAi 実験の結果、GPI anchor 型蛋白質の RIG-6 や、SMC-3 と相互作用する SCC-3 等がコア蛋白質となる可能性が高いことがわかった。それぞれの遺伝子の機能阻害は細胞質分裂の異常を引き起こし、コンドロイチン合成阻害と同じ表現型が確認できる。それぞれのコンドロイチンコア蛋白質の可能性の検討が次の検討課題である。これらの遺伝子機能阻害の研究成果は論文発表後に、順次産業技術総合研究所で私達が作製し公開予定の「線虫糖鎖遺伝子データベース」にて公開予定である。

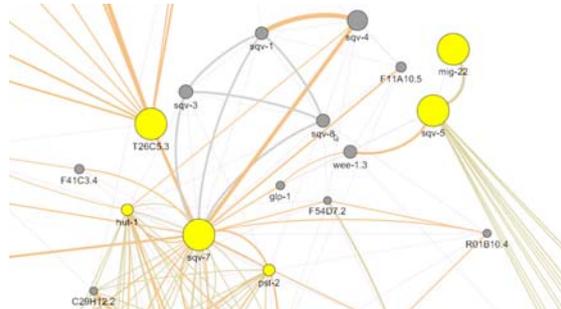


上の図は細胞膜を赤、核を緑の蛍光で光るようにした当研究室で作製したトランスジェニック線虫に、コンドロイチン合成酵素遺伝子 *sqv-5* の RNAi をかけたところである。線虫胚のコンドロイチン合成を RNAi で阻害すると細胞質分裂の異常胚が多数出現する。矢印が多核になっているところで、細胞核は多数分裂しているが細胞に分裂溝がはいらず、全くしきりがはいていない。こうした多核の細胞の出現はヒトなどでの染色体重複による癌の原因の一つと考えられ、コンドロイチンによる細胞分裂制御機構の解明が癌治療のてがかりになるものと考えて研究をすすめている。

(3) (2)の実験中に大きな発見としてコンドロイチン合成は初期胚分裂のみならず、減数分裂(卵母細胞の形成)にも不可欠であることが判明した。糖鎖による細胞分裂の制御において、私達の発見した初期胚の体細胞分裂以外に、減数分裂にもコンドロイチン合成が不可欠であるという発見をてがかりに、糖鎖による細胞分裂制御の全貌が解明できると期待できる。

(4) コンドロイチンは、グルクロン酸とアセチル化されたグルコサミンである GalNAc を構成成分として合成される。VisANT や GeneMANIA などの遺伝子相互作用解析ソフトウェアによる分析から、コンドロイチン合成酵素遺伝子 *sqv-5* と遺伝的に相互作用する *sqv-7* がアセチル基の供与に不可欠である acetyl-CoA トランスポーター(T26C5.3 遺伝

子)や私達が以前詳細に解析して報告した *mig-22*, そして硫酸化関連トランスポーターであり小胞体ストレスに関係していると報告した *hut-1*, そして PAPS トランスポーターとして詳細の解析を行った *pst-2* 遺伝子などと相互作用してコンドロイチン合成を制御する可能性が判明した。(下図の Cytoscape によるネットワーク相互作用の解析結果参照。黄色で示したのが、私達が詳細に解析した遺伝子群である。)



さらに私達の解析の結果、SQV-5 は細胞分裂に関わる RAN-1 などとも相互作用しており、コンドロイチン合成の細胞分裂制御機構のネットワークの全貌の解明のてがかりが得られた。

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) Yoshio Hirabayashi, Kazuko H. Nomura,

Kazuya Nomura

The acetyl-CoA transporter family SLC33,
Molecular Aspects of Medicine, 査読有, Vol. 34,
2013, 586-589

DOI : 10.1016/j.mam.2012.05.009

(2) Daisuke Murata, Kazuko H. Nomura,

Katsufumi Dejima, Souhei Mizuguchi, Nana
Kawasaki, Yukari Nakajima, Satsuki Ito, Keiko

Gengyo-Ando, Eriko, Kage-Nakadai, Shohei

Mitani, Kazuya Nomura

GPI-anchor synthesis is indispensable for the
germline development of the nematode

Caenorhabditis elegans

Molecular Biology of the Cell, 査読有, Vol.
23(6), 2012, 982-995

DOI : 10.1091/mbc.E10-10-0855

[学会発表] (計 6件)

- ① 野村一也、GPI アンカー合成は線虫 *Caenorhabditis elegans* の配偶子幹細胞ニッチの維持と生殖系列細胞発生に必須である、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡市
- ② 野村一也、ヒト遺伝子を発現し志賀トキシン感受性とした線虫 *C. elegans* で細菌毒素の作用メカニズムを探る、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 17 日、鹿児島市
- ③ 野村一也、GPI アンカー型蛋白質の生合成は線虫 *C. elegans* の生殖細胞発生に必須である、第 31 回日本脂質生化学会年会、2012 年 6 月 8 日、福岡市
- ④ Lu Yi (殷璐)、RNAi による線虫が持つヒト相同性糖転移酵素遺伝子 145 個の解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、東京
- ⑤ 野村一也、細胞分裂を制御する線虫糖鎖遺伝子の同定、第 30 回日本糖質学会年会、2011 年 7 月 11 日、長岡
- ⑥ 野村一也、線虫 *C. elegans* のスフィンゴ糖脂質合成は卵母細胞の形成と初期胚分裂に必須である、第 53 回日本脂質生化学会、2011 年 5 月 13 日、東京

[その他]

ホームページ等

九州大学学術情報リポジトリへの関連論文の登録

<https://qir.kyushu-u.ac.jp/dspace/handle/2324/21716>

野村研究室ホームページ

<http://seibutsu.biology.kyushu-u.ac.jp/~nomura/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 一也 (NOMURA KAZUYA)

九州大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：30150395

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：