

令和 2 年 6 月 14 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07298

研究課題名(和文) 線虫で創るヒト疾患モデル 糖鎖難病の解明にむけて

研究課題名(英文) C. elegans as a new disease model of human glycodiseases

研究代表者

野村 一也 (Nomura, Kazuya)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：30150395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：線虫C. elegansをモデル生物として利用し、ヒトの糖鎖遺伝子に関連する病気の治療、予防の基礎となる研究を実施した。先天性グリコシル化異常症の一つDPAGT1 CDGのモデルとして線虫を用いて研究しN型糖鎖の合成不全が初期胚発生の異常、卵母細胞形成の異常を引き起こすことを発見し、その異常の分子メカニズムを遺伝子ノックアウトやRNAiで解明した。これはヒトの不妊症の一つの原因に糖鎖異常が存在することを強く示唆する。同様の研究をGPIアンカータンパク質、アセチルCoAトランスポーター、0157感染症その他について実施し、線虫がヒトの疾病モデルとしてきわめて有力なシステムであることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線虫C. elegansがヒトの先天性グリコシル化異常症CGDの強力なモデルシステムであることを示し、特にDPAGT1やGPIアンカー型タンパク質が卵母細胞形成や配偶子幹細胞形成に不可欠であることを発見した。これは従来見逃されていた多くの不妊症の原因遺伝子としてこうした糖鎖遺伝子が潜んでいることを示しており今後、重要な診断項目となることが期待される。また0157感染症の線虫モデルが、ヒトの0157感染ときわめて類似した遺伝子発現パターン変化を示す事や、アセチルCoAトランスポーター遺伝子破壊がヒトの同遺伝子異常の良いモデルとなることの発見は今後の線虫を用いた疾病研究の有効性を如実に示している。

研究成果の概要(英文)：By using the nematode C. elegans as a model of various glycodiseases, we found that the key enzyme of N-glycosylation (DPAGT1) plays essential roles in oogenesis and development, and clarified molecular mechanisms of causing abnormalities by RNAi. We also found that GPI-anchored proteins expressed in the germline stem cell niche are involved in germline stem cell proliferation and are important for germline formation. Molecular mechanisms of the genes in germline formation were also clarified by RNAi. By making use of a humanized C. elegans expressing Shiga toxin receptor Gb3 in intestinal cells, we found that infection of the toxin results in over expression of neuronal specific genes, and we found that the orthologs of the nematode genes are also highly expressed in patients of 0157. This line of study is underway in my collaborator's laboratory. In addition, we showed that the nematode can be used as a useful model of human acetyl CoA transported defected patients.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：先天性グリコシル化異常症 糖鎖遺伝子 不妊 0157 志賀毒素 GPIアンカー 配偶子幹細胞 アセチルCoAトランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私達はヒトの糖鎖遺伝子異常による疾患の治療、研究に役立つように、モデル生物である線虫 *C. elegans* とヒトの糖鎖遺伝子を相互に解析する研究を進めてきた。線虫では RNAi (RNA 干渉法) で簡単に任意の遺伝子機能が阻害できるほか、遺伝子破壊株の取得が極めて容易である。また遺伝子機能の異常を単一細胞レベルで発生のはじまりから成体まできわめて詳細に研究できることもこのモデル生物の有用な特徴である。この特徴に目をつけて、私達は線虫での糖鎖遺伝子の RNAi と遺伝子破壊による網羅的、系統的解析を開始した (JST のさきがけ研究、発展研究、CREST など、いずれも野村が研究代表者)。その結果、今まで機能がわからなかったコンドロイチンが線虫の細胞分裂制御に不可欠であることを発見し、マウスでも同様の働きがあることを協同研究者が明らかにした。さらにヘパラン硫酸プロテオグリカンや硫酸化遺伝子、スフィンゴ糖脂質、トランスポーターや GPI アンカー型タンパク質などの機能を同様に解析し、それぞれで新しい機能を発見し、線虫研究の有効性を示してきた。

近年、NGLY1 遺伝子について大いに注目されたように、ヒトの病気の原因として糖鎖遺伝子の同定例が激増し、ある見積ではアメリカ合衆国民の 20% になんらかの糖鎖遺伝子異常がみられるとされている。そのため糖鎖生物学者が医療機関にリクルートされる時勢となっており、また日本を含めた世界各国で糖鎖生物学分野への研究予算の集中が始まっていた。

2. 研究の目的

本研究では私達のすでに確立した成果をもとに、モデル生物線虫を用いてヒトの糖鎖疾患のモデルシステムを作り出し、糖鎖疾患の発症メカニズムを解明しその予防、治療法の開発の基礎を創り上げることを目的としている。そのため、まずヒトの糖鎖遺伝子の相同遺伝子 (オースログ) を線虫ゲノム中で網羅的に抽出してその成果をまとめあげてある私達の作成した線虫糖鎖遺伝子データベース (*C. elegans* GlycoGene DataBase) をもとに様々なヒト糖鎖遺伝子の遺伝子異常モデルを作成しその表現型を解析、遺伝子異常にともなう遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイなどで検出することにした。取り上げる遺伝子としては、コンドロイチン合成酵素、ヒトの先天性グリコシル化異常症 CDG Ij をひきおこす遺伝子で N 型糖鎖合成経路の第一段階で働く酵素 DPAGT1 (UDP-*N*-acetylglucosamine-dolichyl-phosphate *N*-acetylglucosaminophosphotransferase) の線虫オースログ *algn-7*、GPI アンカー合成の第一段階で働く遺伝子 *piga-1*、糖鎖のアセチル化で重要な働きをするアセチル CoA トランスポーター遺伝子を選んだ。さらに O157 感染モデルとして作成したヒト化線虫 (ヒトの O157 毒素レセプターである糖脂質 Gb3 を腸でのみ合成できるように二種のヒト遺伝子を導入した線虫) へ O157 毒素であるペロ毒素 (志賀毒素) を与えたときの表現型と遺伝子変動の解析も併せて行い、ヒトの病原性大腸菌感染モデルとしての線虫の有用性を検討することも目的とした。

3. 研究の方法

ヒトの糖鎖遺伝子のオースログ候補をまとめたデータベース CGGDB を改良しつつ利用しながら、RNA 干渉法と遺伝子ノックアウトを併用することで、線虫の糖鎖遺伝子の機能阻害がどのような表現型をひきおこし、どのようなメカニズムでその異常表現型が生み出されるかを解明する。このために、遺伝子破壊方法としては従来の遺伝子欠損ライブラリーのスクリーニングに加えて、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集も利用する。遺伝子の発現制御による異常表現型の観察には、タイムラプス機能付の蛍光顕微鏡やレーザー共焦点顕微鏡を利用し、遺伝子発現変動の確認には、DNA マイクロアレイと qRT-PCR を併用する。さらに異常表現型を確認した場合は、網羅的 RNAi スクリーニングを用いて別の遺伝子で同様の異常を生ずるものを探しだし、研究している遺伝子とのエピスタシス解析などを行うことで、遺伝子ネットワークについても詳しく探っていく。RNAi については、体細胞特異的 RNAi や生殖細胞特異的 RNAi、あるいは幹細胞ニッチの細胞特異的 RNAi などを適宜併用して、どの細胞で遺伝子が働いているかを含めて解析する。さらに同定した遺伝子群を支配している転写因子など関連遺伝子を、ChIP-seq、RNA-seq などのデータをまとめているデータベース ChIP-Atlas を用いて同定し、さらに遺伝子ネットワークの全貌に迫る作業を行う。

4. 研究成果

まず最初に、私達が公開している *C. elegans* GlycoGene DataBase (CGGDB) の改良を済ませた。掲載全遺伝子について OMIM、GWAS、RNA-Seq database などを参照し、線虫での研究が容易なヒト疾患関連糖鎖遺伝子リストを作成し、database の日本語化、GWAS data の追加、遺伝子名の HGNC 表記への統一を行い、2016 年 6 月に公開した。さらにデータベースに記載されている実験データの知的財産権の処理をおこないデータを自由にダウンロードして利用できるようにした。

私達はすでにコンドロイチン合成酵素の機能阻害が初期胚の細胞分裂異常をひきおこすことを

発見し、プロテオグリカンが細胞分裂制御に働いていることを世界ではじめて明らかにした。ヒトのコンドロイチン合成酵素の異常が短指症をひきおこすことがわかっていることから、線虫成体でのコンドロイチン合成酵素遺伝子の阻害効果を検討した。その結果、線虫の雄の ray とよばれる器官に異常が生ずることを発見した。ray はヒトの指のような形をしており、雄が交配相手を探り、vulva をもともと運動するとき働く器官である。調べてみると ray の異常をひきおこす他の多くの遺伝子も同様にヒトの短指症遺伝子のオーソログであることがわかった。線虫遺伝子の解析がヒトの病気の発症の研究に役立つことを如実に示す事例である。さらにコンドロイチンについては世界ではじめて、線虫で硫酸化されたコンドロイチン(4-O 硫酸化コンドロイチン)の存在を発見しその合成酵素遺伝子 *C41C4.1* を同定して報告し、同時に硫酸化コンドロイチンが酸化ストレス防御と関係していることを発見した。これらの成果は線虫が硫酸化コンドロイチンの異常症の研究にも役立つ可能性を示すものである。

N 型糖鎖の合成異常は、ヒトの先天性グリコシル化異常症 (congenital disorders of glycosylation: CDG) を引き起こすことが知られている。線虫の N 型糖鎖合成経路はヒトと同じであり、N 型糖鎖合成遺伝子の阻害は生殖細胞形成不全や幼虫発生の異常などをひきおこすことを発見していた。今回はヒトの糖鎖遺伝子異常症 CDG 1j (DPAGT1 遺伝子の異常による病気) のモデルとするため線虫の DPAGT1 遺伝子 (*align-7*) を同定し、その遺伝子産物の酵素活性を確認した。遺伝子破壊株と RNAi による解析の結果、卵母細胞形成異常、卵母細胞から胚への転移、受精後の雄由来の核と卵母細胞の融合異常などが起きることを発見した。N 型糖鎖の付加異常でおこるこうした異常がどのようなメカニズムで起こるかを調べるため、線虫の N 型糖鎖を付加されていることが確認されている遺伝子のデータベースを使い、記載されている 452 個の遺伝子すべての RNAi 表現型を調べて、同じ表現型を示すもの 5 つ (*ribo-1*, *stt-3*, *ptc-1*, *ptc-2*, *vha-19*) を発見した。最初の 2 つは既知の CDG の原因遺伝子であり、*vha-19* のヒトオーソログ遺伝子はこの研究を実施中に新たな CDG 遺伝子として報告された。*ptc-1* と *ptc-2* 遺伝子のヒトオーソログがヒトで CDG に関わっている可能性を指摘し、同時に線虫による病気の研究の有効性を論文で強く指摘した。

私達は以前、GPI-アンカー型タンパク質(GPI-AP)の合成経路の第一段階で働く遺伝子 *piga-1* の遺伝子機能阻害や遺伝子破壊によって、配偶子幹細胞ニッチに異常をきたして不稔になることを明らかにした。この研究は GPI-AP が配偶子幹細胞形成に不可欠であることを世界で初めて明らかにしたもので高く評価されている。本研究では「配偶子幹細胞ニッチの細胞である distal tip cell (DTC) で合成されるどのような GPI-AP が、配偶子幹細胞ニッチの正常な形成と機能に必要か」を、RNAi スクリーニングを用いて明らかにした。プロテオミクスで DTC で合成される GPI-AP を同定し、同定した 30 種以上の GPI-AP の RNAi でのスクリーニングによって、7 つの GPI-AP を同定した。さらに DTC 特異的 RNAi を用いてそのうちの 3 つの遺伝子が配偶子幹細胞ニッチの形成に関与していることを発見した。これらはヒトの Notch 遺伝子の一つのオーソログや TGF 信号伝達系の遺伝子であり、これらの遺伝子が従来知られていたシグナル伝達系と並列で働いて配偶子幹細胞形成に働いていることがわかった。

またヒトのアセチル CoA トランスポーター SLC33A1 のオーソログ遺伝子については、トランスポーター活性を生化学的に確認し、遺伝子破壊株としては intron のノックアウト株と exon のノックアウト株の二種を取得し表現形を解析した。さらに DNA マイクロアレイや lipidome 解析によって遺伝子破壊後の遺伝子変動を解析したところ、ヒトの SLC33A1 の異常によって生ずる遺伝性疾患 (遺伝性痙性対麻痺、先天性白内障、アルツハイマー病、低銅血症、難聴、神経変性など) で変動する遺伝子が線虫でも全く同様に変動していることが判明した。これはこれらの病気の研究に線虫が優れたモデルとなることを期待させる発見である。

ヒトの 0157 感染モデルとして作製した線虫への毒素感染後の DNA マイクロアレイデータの解析も終わっており、RT-PCR による確認結果も含めて現在論文を作成中である。0157 のペロ毒素レセプターである Gb3 を腸で発現しているヒト化線虫に、ペロ毒素を与えて DNA マイクロアレイで遺伝子変動を解析した。ペロ毒素は線虫の寿命を有意に減少させ、毒素を与えられた線虫でだけ抗菌ペプチドや成体防御レクチンの活性が急上昇する。さらに注目すべき発見は、毒素を与えられた線虫では、腸から離れた神経細胞での遺伝子の特異的変動がみられることである。これらの変動した遺伝子は、たとえばヒトの 0157 感染でペロ毒素のターゲットの一つである腎臓で発現変動する遺伝子のオーソログであったり、ヒトの毒素被曝後に激しく変動することが本研究を契機に初めて明らかになった遺伝子オーソログであったりする。このようにヒト化線虫は、ヒトの感染症のモデルとしてもきわめて有用なシステムであることが明らかになった。

以上の研究成果より、線虫をモデルシステムとしてヒトの病気を研究することの有効性が示された。例えば本研究の成果によって、ヒトの先天性グリコシル化異常症の病態の一つに不妊が含まれている可能性が明らかになった。不妊症で病院を訪れる患者さんの中には糖鎖遺伝子の機能の低下や異常による症例が含まれている可能性があることも論文で指摘した。またマウスなどと相補的に利用することで薬剤スクリーニングを含めて極めて利用価値の高いシステムで

あることもわかった。以上概観した私達の本研究の成果をもとに、今後の糖鎖研究のロードマップを作成して公表し今後の研究の一つの方向性を指し示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanaki Nanako, Matsuda Ayako, Dejima Katsufumi, Murata Daisuke, Nomura Kazuko H, Ohkura Takashi, Gengyo-Ando Keiko, Yoshina Sawako, Mitani Shohei, Nomura Kazuya	4. 巻 29
2. 論文標題 UDP-N-acetylglucosamine-dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminophosphotransferase is indispensable for oogenesis, oocyte-to-embryo transition, and larval development of the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 163 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwy104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazuya Nomura	4. 巻 1
2. 論文標題 Study on the roles of glycogenes involved in cell division of <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Glycoscience 2013-2017 in Commemoration of the 25th Anniversary of Mizutani Foundation for Glycoscience, 66-69, 2017	6. 最初と最後の頁 66-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomomi Izumikawa, Katsufumi Dejima, Yukiko Watamoto, Kazuko H. Nomura, Nanako Kanaki, Marika Rikitake, Mai Tou, Daisuke Murata, Eri Yanagita, Ai Kano, Shohei Mitani, Kazuya Nomura and Hiroshi Kitagawa	4. 巻 291
2. 論文標題 Chondroitin 4-O-Sulfotransferase Is Indispensable for Sulfation of Chondroitin and Plays an Important Role in Maintaining Normal Life Span and Oxidative Stress Responses in Nematodes	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 23294-23304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1074/jbc.M116.757328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計11件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野村一也
2. 発表標題 線虫C. elegansによるヒト糖鎖関連疾患モデルの構築
3. 学会等名 日本生化学会九州支部例会シンポジウム「モデル生物を活用した生命科学：光生物学から糖鎖・脂質生物学まで」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村一也(発表), 金氣菜々子, 松田采子, 力武茉莉花, 任建宇, 野村和子, 村田大輔, 出嶋克史, 三谷昌平, 北川裕之, 山本健, 鹿内俊秀, 鈴木芳典, 成松久, 田代康介, 平林義雄, 伊東信
2. 発表標題 モデル生物線虫 C. elegans を用いた糖鎖難病解析の突破口
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 任建宇(発表), 村田大輔, 野村和子, 三谷昌平, 安藤恵子, 田代康介, 平林義雄, 金井好克, カノポーン・フェディー, 野村一也
2. 発表標題 線虫 C. elegans におけるアセチル CoA トランスポーターの機能解析
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 力武茉莉花(発表), 松田采子, 村田大輔, 出嶋克史, 野村和子, 三谷昌平, 安藤恵子, 中台枝里子, 田代康介, 野村一也
2. 発表標題 生殖幹細胞の自己複製に必要な線虫 C. elegans GPI アンカー型タンパク質の解析
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野村和子(発表), 藤井潤, 宮崎清香, 村田大輔, 秋好紗弥香, 松田采子, 力武茉莉花, 瀬川孝耶, 沖野望, 伊東信, 安藤恵子, 岩淵和久, 田代康介, 野村一也
2. 発表標題 スフィンゴ糖脂質 Gb3 を発現するヒト化線虫へのペロ毒素(Stx-1)の作用
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野村一也(発表)、野村和子、力武茉莉花、任建宇、水野琢飛、福田強生、木本絢子
2. 発表標題 公共Databaseを利用した線虫C. elegans遺伝子のネットワーク解析 コンドロイチン硫酸化酵素を例として
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会・第40回日本分子生物学会年会 合同大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野村一也
2. 発表標題 線虫コンドロイチン合成酵素遺伝子の新たな解析 ヒト疾患モデルとしての線虫C. elegans
3. 学会等名 比較グライコーム研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 野村一也, 金氣 菜々子, 力武 茉莉花, 任 建宇, 陶 真怡, 久保 沙耶香, 出嶋 克史, 三谷 昌平, 平林 義雄, 野村 和子, 鹿内 俊秀, 鈴木 芳典, 成松 久, 山本 健
2. 発表標題 ヒト糖鎖難病の解明のためのツールとしての線虫糖鎖遺伝子解析
3. 学会等名 第35回日本糖質学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 金氣 菜々子, 松田 采子, 出嶋 克史, 村田 大輔, 野村 和子, 三谷 昌平, 安藤 恵子, 大倉 隆司, 野村 一也
2. 発表標題 CDG (先天性グリコシル化異常症 Congenital Disorders of Glycosylation)モデル生物としての線虫の有用性 DPAGT1 (ALG7) 遺伝子破壊株を中心とした解析
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 力武 茉莉花, 松田 采子, 村田 大輔, 出嶋 克史, 野村 和子, 三谷 昌平, 安藤 恵子, 中台 枝里子, 田代 康介, 野村 一也
2. 発表標題 生殖幹細胞の自己複製に必要な線虫 <i>C. elegans</i> GPIアンカー型タンパク質の解析
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 任 建宇, 村田 大輔, 野村 和子, 三谷 昌平, 安藤 恵子, 田代 康介, 平林 義雄, 金井 好克, Kanokporn Phetdee, 野村 一也
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> におけるアセチルCoAトランスポーターの機能解析
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 野村一也 (谷口直之、遠藤玉夫、平林淳、西原祥子、門松健治、秋吉一成、木下聖子編)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本糖鎖科学コンソーシアム (JCGG)	5. 総ページ数 334
3. 書名 未来を創るグライコサイエンス 我が国のロードマップ	

1. 著者名 Kazuya Nomura (Editors: Taniguchi, N., Endo, T., Hirabayashi, J., Nishihara, S., Kadomatsu, K., Akiyoshi, K., Aoki-Kinoshita, K.F. (Eds.))	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer-Nature	5. 総ページ数 405
3. 書名 Glycoscience: Basic Science to Applications Insights from the Japan Consortium for Glycobiology and Glycotechnology (JCGG)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>(1) C. elegans GlycoGene Database https://jcgddb.jp/cggdb/ 線虫ゲノム中に存在するヒト糖鎖遺伝子オーソログに関する知識を網羅したデータベース。日本語と英語で利用可能である。</p> <p>(2) The Nomura Institute of Glycoscience Blog https://glycostationx.org/ 本研究成果をはじめ、糖鎖生物学入門の連載記事、コロナウイルスと闘う糖鎖生物学の解説なども含めてやさしく解説しているブログ。一般の方に研究成果を理解してもらうことを願って記事を更新中である。</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 健 (Yamamoto Ken) (60274528)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	