

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570157

研究課題名（和文）

新規糖鎖制御遺伝子による糖転移酵素 mRNA の制御メカニズム

研究課題名（英文）

Regulatory mechanism of glycosylation

研究代表者

後藤 聡 (GOTO SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：60280575

研究成果の概要（和文）：

糖鎖は、発生・分化、免疫、神経機能など様々な生理現象に重要な役割を果たしている。しかし、そのように重要な糖鎖の生合成がどのように制御されているかについては、未知の部分が多く残されている。そこで、私達は、ショウジョウバエの RNAi ライブラリーを用い、糖鎖に関与する遺伝子の大規模なスクリーニングを行い、同定された新規遺伝子の解析を通じて、糖鎖合成に mRNA レベルの重要な制御があることを新たに見出した。

研究成果の概要（英文）：

Glycosylation plays an important role in various physiological processes such as development, immunity and neural functions. However, mechanisms regulating glycosylation still remain largely unknown. To elucidate it, we performed a large scale screen using *Drosophila* RNAi library and identified novel genes. We analyzed the functions of the genes and found novel mechanisms of mRNA of glycosylation related genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
総計	4,100,000	1,230,000	5,330,000

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：糖鎖、mRNA、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、発生・分化、免疫、神経機能など様々な生理現象に重要な役割を果たしている。また、癌や感染などの疾病において、糖鎖には重要な機能があることや、それらの疾病のマーカーとして糖鎖が有用であることなどが知られている。しかし、そのように重要な糖鎖の生合成の制御メカニズムには、未知の部分が多く残されていた。したがって、糖鎖修

飾の制御メカニズムを明らかにすることは、学術的にも社会的にも重要な課題であった。また、糖鎖修飾の制御メカニズムのような未知の分野を解明するツールとして、RNA interference (RNAi) が注目されていた。そこで、私達は、世界に先駆けてその RNAi 法をショウジョウバエに応用し、国立遺伝学研究所の上田龍教授と共同で RNAi ライブラリーの作製をおこなった。このライブラリーを用いることで、興味ある現象に関与する遺伝

子を、個体レベルで大規模にスクリーニングすることができるようになった。

さらに、私達はショウジョウバエの視神経の発生・維持に重要な役割を果たす Chaoptin 蛋白質に付加している N 型糖鎖の構造と付加位置を、質量分析装置を用い詳細に解析した。その結果、12カ所の付加位置のうち8カ所にはそれぞれ異なる長さの高マンノース型が、他の4カ所にはそれぞれ異なる構造をもつ複雑な糖鎖が位置特異的に付加していることがわかった。

私達は、Chaoptin 蛋白質の糖鎖情報を基に、RNAi ライブラリーを用い、Chaoptin 蛋白質の糖鎖修飾に必要な遺伝子の大規模スクリーニングを進行させていた。中途ではあったが、このスクリーニングから RNA の制御に関わると考えられる遺伝子が多数同定されていた。

2. 研究の目的

本研究では、まず Chaoptin 蛋白質の糖鎖修飾に必要な遺伝子の大規模スクリーニングを完遂させる。次に、そのスクリーニングから同定された遺伝子について、その機能を解析する。特に、RNA の制御に関わると考えられる遺伝子群を中心に解析し、糖鎖修飾を RNA レベルで制御する新しいメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

スクリーニングの方法

私達が作成した RNAi ライブラリーは、酵母由来の Gal4 転写因子が結合する UAS プロモーターを利用している。UAS プロモーターは、通常 Gal4 を持たないショウジョウバエ細胞中ではサイレントである。そこに、外来遺伝子として強制発現させた Gal4 が結合すると、その下流の遺伝子の転写を誘導する。私達が作成した RNAi ライブラリーでは、UAS の下流にショウジョウバエのそれぞれの遺伝子の一部を逆向き反復配列になるように連結している。Gal4 によって UAS プロモーターが活性化されると、対応する遺伝子に対する hairpin 型の dsRNA が誘導され、目的の遺伝子発現が抑圧される。

一方、組織・時期特異的に Gal4 を発現しているショウジョウバエ系統が多数存在する。その中から、私達は、ショウジョウバエの視神経で特異的に発現する GMR-Gal4 系統をピックアップした。その GMR-Gal4 系統に、私達の作成した RNAi ライブラリーの各系統を掛け合わせると、その次世代で、視神経特異的に各遺伝子のノックダウンが誘導される。そ

の視神経から、Chaoptin 蛋白質を精製し、Chaoptin の糖鎖構造に異常がないかを複数のレクチンを用いて検討した。異常があった場合、ノックダウンした遺伝子は“糖鎖修飾に必要な遺伝子”としてリストされた。さらに、一部の遺伝子については、その糖鎖構造の異常を、質量分析装置などを用いて、詳細に解析した。

さらに、リストの中から、神経得的な糖鎖構造である alpha1,3-fucosylation に着目して、その糖鎖修飾に必要な遺伝子をピックアップした。その中には、RNA 制御に関わると考えられる遺伝子が多数含まれていたため、それらの遺伝子の機能を解析した。詳細は、研究成果の項に記す。

4. 研究成果

ショウジョウバエの全遺伝子の約 60% にあたる 6923 遺伝子についてスクリーニングを完了し、Chaoptin 蛋白質の糖鎖修飾に必要な 109 遺伝子を同定することに成功した。それらの遺伝子機能を、配列情報などを基に予測したところ、様々なプロセスに関与することがわかった。(図1)

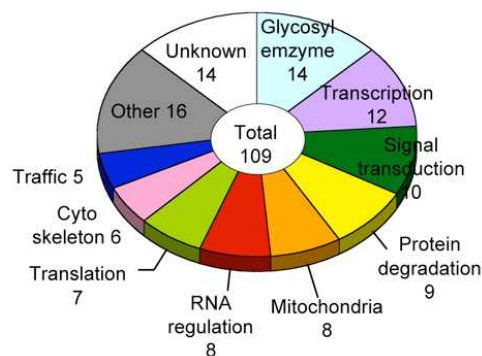


図1 糖鎖修飾に関与する遺伝子群

ところで、私達は、神経特異的な糖鎖修飾である alpha1,3-fucosylation が、ショウジョウバエの脳の形成に重要な役割を果たしていることを見出した。そこで、その alpha1,3-fucosylation に特異的に関与する遺伝子を、同定した 109 遺伝子の中から選別したところ、17 遺伝子が見つかった。それらを遺伝子機能で分類したところ、RNA 制御に関わると考えられる遺伝子が最も多く含まれていた。(図2) このことは、alpha1,3-fucosylation には、RNA レベルでの制御が重要である可能性を示唆している。そこで、私達は、RNA レベルでどのように制御されているかを明らかにすることにした。

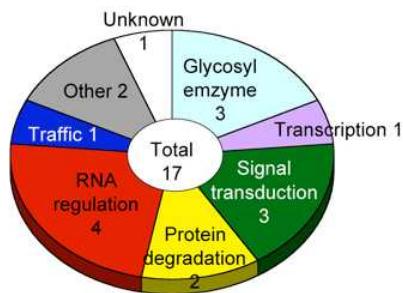


図2 神経特異的糖鎖修飾に関する遺伝子群

alpha1,3-fucosylation は、糖転移酵素 FucTA によって付加される。そこで、スクリーニングから同定された RNA 制御に関わると考えられる遺伝子 swm (second mitotic wave missing) が FucTA の mRNA の制御に関与しているかを解析した。まず、Swm 蛋白質が FucTA mRNA に結合するかを調べたところ、結合していることがわかった。次に、FucTA mRNA の量が swm 変異で変化するかを調べたところ、その量は著しく減少していた。そこで、FucTA mRNA の安定性が swm 変異で減少しているかを検討したが、安定性には変化がなかった。Swm 蛋白質は mRNA の核外輸送に関与するという報告があったので、FucTA mRNA の輸送に関与するかを調べた。その結果、swm 変異体では FucTA mRNA が核内に著しく蓄積していることがわかった。以上の結果より、神経特異的な糖鎖修飾である alpha1,3-fucosylation は、その修飾酵素である FucTA が、mRNA の発現および核外輸送のレベルで制御されていることがわかった。糖鎖修飾において、そのようなメカニズムは知られていなかったため、新たな発見ということができる。

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5件)

Yano, H., Yamamoto Hino, M., Awano, W., Aoki Kinoshita, K.F., Tsuda Sakurai, K., Okano, H. and Goto, S., Identification of proteasome components required for apical localization of Choptin using functional genomics. *J. Neurogenet.*, 査読有, vol.26, 2012, 53-63, DOI:10.3109/01677063.2012.661497

Kanie, O., Kanie, Y., Daikoku, S., Shioiri, Y., Kurimoto, A., Mutsuga, S., Goto, S., Ito, Y. and Suzuki, K., Multistage MS/MS information obtained by deconvolution of energy-resolved

mass spectra acquired by triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 査読有, vol.25, 2011, 1617-1624, DOI: 10.1002/rcm.5031

Yamamoto Hino, M., Kanie, Y., Awano, W., Aoki Kinoshita, K.F., Yano, H., Nishihara, S., Okano, H., Ueda, R., Kanie, O. and Goto, S. Identification of genes required for neural-specific glycosylation using functional genomics. *PLoS Genetics*, 査読有, vol.6, 2010, e1001254, DOI:10.1371/journal.pgen.1001254

Yano, H., Yamamoto Hino, M. and Goto, S., Spatial and temporal regulation of glycosylation during *Drosophila* eye development. *Cell. Tissue Res.*, 査読有, vol.336, 2009, 137-147, DOI:10.1007/s00441-009-0753-6

Kanie, Y., Yamamoto Hino, M., Karino, Y., Yokozawa, H., Nishihara, S., Ueda, R., Goto, S. and Kanie, O., Insight into the regulation of glycan synthesis in *Drosophila* choptin based on mass spectrometry., *PLoS ONE*, 査読有, vol.4, 2009, e5434, DOI:10.1371/journal.pone.0005434

〔学会発表〕(計5件)

山本(日野)美紀、芝野孝子、粟野若枝、村岡正敏、岡野栄之、後藤聡, 「Novel Roles of Glycosylation in *Drosophila* Innate Immunity」(口頭発表、ポスター発表) 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13~16日、横浜パシフィコ(横浜)

山本(日野)美紀、岡野栄之、後藤聡, 「自然免疫を制御する糖鎖修飾関連分子 Senju の解析」(口頭発表、ポスター発表) 第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月27~29日、幕張メッセ(千葉)

山本(日野)美紀、蟹江善美、粟野若枝、木下聖子、西原祥子、岡野栄之、上田龍、蟹江治、後藤聡, 「糖鎖関連遺伝子の大規模スクリーニング」(招待講演) 第84回日本生化学会大会、シンポジウム、2011年9月21~24日、京都国際会館(京都)

山本(日野)美紀、粟野若枝、芝野孝子、岡野栄之、後藤聡、「自然免疫を制御する糖鎖修飾関連分子 Senju の解析」、第84回日本生化学会大会、2011年9月21~24日、京都国際会館(京都)

山本(日野)美紀、芝野孝子、岡野栄之、後藤聡、自然免疫を制御する糖鎖修飾関連分子Senjuの解析、第30回日本糖質学会年会、2011年7月12日、ハイブ長岡(新潟)

〔図書〕(計1件)

Yamamoto-Hino,M., Okano,H., Kanie,O. and Goto,S., Nova Science publishers, Inc., NY, Structure, Function and Formation of Glycans in *Drosophila*. In "Glycans: Biochemistry, Characterization and Applications." 2012, 165-188

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 聡 (GOTO SATOSHI)
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：60280575

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし