

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570165

研究課題名(和文)線虫配偶子幹細胞ニッチをつかさどるGPIアンカー型蛋白質の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of the GPI-anchored proteins involved in the germline niche formation of the nematode *C. elegans*

研究代表者

野村 一也 (Nomura, Kazuya)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30150395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：線虫 *C. elegans* の GPI アンカー型蛋白質 (GPI-AP) 合成が無くなると配偶子幹細胞の激減が起こり、激しい生殖系列の異常が生じ。配偶子幹細胞は隣接する distal tip 細胞からの Notch シグナルで維持されている。本研究では、生化学的解析・DNA マイクロアレイ・RNA-Seq そして GPI アンカー型蛋白質遺伝子の RNAi を活用して生殖系列に必須の 7 つの GPI アンカー型蛋白質を同定した。その中で 2 つが特に重要と考えられ、CRISPR-Cas9 法で 2 つの遺伝子の欠失株を取得して調べると、著しい生殖系列の異常が見いだされた。現在、2 つの遺伝子と Notch シグナルの関係を解析中である。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of GPI-anchored protein (GPI-AP) synthesis of *C. elegans* results in severe germline abnormalities. By analyzing a deletion allele of the GPI-anchor synthesizing gene *piga-1*, we confirmed that the phenotypes were caused by the decrease of dividing germline stem cells (GSCs) at the distal end of the gonad where distal tip cell is providing Notch signal to maintain GSC niche. In this study, we studied GPI-APs enriched in the germline by biochemical analysis, by DNA microarray and RNA-Seq. We also examined RNAi phenotypes of all the GPI-AP genes to identify essential GPI-APs in the GSC niche. From these analyses, we identified seven different GPI-AP coding genes. Among them, two genes seem to be especially important. Thus, we isolated CRISPR-Cas9 mediated deletion allele of the two genes, and found that the germline formation was severely affected in the allele. We are examining the possible involvement of these two genes in the Notch signaling pathways of the GSCs.

研究分野：発生生物学、糖鎖生物学

キーワード：GPIアンカー 配偶子幹細胞 幹細胞ニッチ 卵母細胞 配偶子 PIGA CGGDBデータベース *C. elegans*

## 1. 研究開始当初の背景

細菌や古細菌、そして酵母や線虫、ショウジョウバエから魚・カエル、マウス・ヒトにいたるすべての生物の細胞の表面は糖鎖でびっしり覆われています(糖衣といいます)。糖鎖はグルコースやガラクトースなどの糖が一個一個、鎖のように分枝しながらつながっているもので、その異常は先天性の多くの病気を引き起こす他、ヒトの癌や筋ジストロフィー、糖尿病や感染症などを引き起こす原因となっています。また O157 の毒素の作用や、赤痢やコレラの発症にも糖鎖が関わっていますし、胃癌の原因になるピロリ菌の感染防御などにも糖鎖が関わっていることがわかっています。こうした糖鎖と病気の関わりを研究するのが糖鎖生物学です。我が国の糖鎖生物学への貢献は甚大で、上に述べた多くの成果も我が国で得られたものが多く、糖鎖生物学は我が国が世界をリードしている学問です。

私達は、糖鎖生物学の研究をさらに飛躍的にすすめるため、ヒトの糖鎖を合成する遺伝子や分解する遺伝子など糖鎖に関わるヒト遺伝子をすべてバイオインフォマティクスで選びだし、その成果をもとにモデル生物線虫 *C. elegans* で糖鎖生物学の研究を行うことにしました。ヒトの遺伝子の 60-80%は線虫のゲノムのなかに対応するもの(オソログといいます)をもっており、その遺伝子の機能を阻害するのも簡単です。たとえば足腰膝にコンドロイチンといわれているコンドロイチンを合成する酵素はヒトでは多数あるのですが線虫では1個しかありません。そこでその機能を私達が破壊してみると、なんとコンドロイチンがないと細胞が分裂できなくなりました(Mizuguch 他、Nature 2003)。この研究ののち、同様なことが哺乳類のマウスでもおこることがわかりましたが(Izumikawa 他、J Biol Chem., 2010) 線虫を使えばスピーディーにこうした本質的な現象が明らかにできるのです。

これは線虫の遺伝子に哺乳類と共通のものがあること、そして線虫の発生がすべて実験室で観察できること、および遺伝子機能の阻害などが極めて簡単にできることによります。私達はヒトの糖鎖遺伝子で線虫に相同遺伝子が存在するものをすべてバイオインフォマティクスで選び出し、各糖鎖遺伝子の機能をそれぞれの遺伝子機能を阻害する(RNAi という方法や遺伝子破壊株を取ることで遺伝子機能を阻害した結果を調べます)ことで、ヒトの発生や病気に関わる糖鎖遺伝子の重要な機能を調べる研究を行ってきました。

今回の研究では、細胞膜にホスファチジルイノシトールという脂質に糖鎖がつながっている分子で糖鎖の先端に蛋白質が結合しているものを研究対象に選びました。これは GPI アンカー型蛋白質という膜に埋め込まれて外界側に蛋白質部分がでている分子の

総称です。様々な遺伝子によってコードされている GPI アンカー型蛋白質が知られており、これらは細胞膜の中で集まって信号を伝えるミクロのドメインを作っており、このドメインは信号伝達にもなってダイナミックに形成、消滅を行うことがわかってきました。しかし GPI アンカー型蛋白質がなぜ必要なのかは、なかなかわからない状態が続いていました。私達は線虫で GPI アンカー型蛋白質が存在することを明らかにし、線虫の GPI アンカー合成(蛋白質がくっつく根本の部分を GPI アンカーと呼びます)を阻害する遺伝子破壊株を作ることに成功しました。その線虫では、GPI アンカー型蛋白質が全く合成されません。そしてなんと配偶子も形成されなかったのです。詳しく調べてみると、配偶子幹細胞という、卵母細胞や精子の細胞を生み出す幹細胞の数が激減していることがわかりました。つまり GPI アンカー合成がなければ子孫は残せず、生命が永続的につながって子孫を生み出すには GPI アンカー合成が不可欠であるということです。この発見は 2012 年に論文発表しましたが(Murata 他、2012)、隠されていた GPI アンカー型蛋白質の役割(生殖系列での幹細胞についての役割)を明らかにした成果として大きな注目を集めました。この研究では、GPI アンカー合成能力を全く失わせた線虫(*piga-1* 遺伝子という GPI アンカー合成の第一段階をこなす酵素の遺伝子の遺伝子破壊株です)を用いて研究をすすめ、配偶子幹細胞の分裂を維持する微小環境(ニッチと呼ばれます)が異常になっている可能性を明らかにしました。幹細胞ニッチが正常でないため、幹細胞の分裂ができなくなり、卵母細胞がうまくできずに子孫が全くできないようです。線虫には GPI アンカー型蛋白質が数百種類存在すると予想できましたが、その中のどの GPI アンカー型蛋白質が幹細胞の分裂の維持に不可欠なのでしょう。

## 2. 研究の目的

本研究では、上に述べた背景に基づき、線虫をモデル生物として用いて、配偶子幹細胞の形成に必須な GPI アンカー型蛋白質を同定することを目標に研究を進めました。

## 3. 研究の方法

(1) GPI アンカー型蛋白質合成能を全く失った線虫(*piga-1* 遺伝子破壊株)は配偶子形成ができず子孫が残せません。この線虫の生殖巣(卵母細胞や精子を生み出す管)の末端にある一つの細胞(distal tip 細胞と呼ばれます)でのみ、正常な *piga-1* 遺伝子を発現させてみました。すると卵母細胞の形成は完全に回復し、子孫を残せるようになりました。この回復した線虫から GPI アンカー型蛋白質を精製して分離し、田中耕一さんのノーベル賞で有名な質量分析装置を使って、アミノ酸配列を決定することで、どんな GPI アンカー型

蛋白質が生殖幹細胞ニッチの維持や形成に必要なのかを調べる実験を行いました。GPI アンカー型蛋白質の精製には界面活性剤の Triton X114 と GPI アンカー型蛋白質の蛋白質部分を脂質部分から切り離す酵素などを用い、さらに一部の実験では GPI アンカー型蛋白質を特異的に吸着する トキシンという物質を利用して精製を行いました。こうして正常細胞、遺伝子破壊株を回復させた細胞などから GPI アンカー型蛋白質を精製しすべて同定したわけです。

(2) 線虫の GPI アンカー型蛋白質合成に関わる全遺伝子の機能阻害実験も行いました。これは GPI アンカー型蛋白質の GPI アンカー部分を合成する遺伝子(30個近くあります)の機能を阻害して卵母細胞形成に異常がどうかの実験です。

(3) また線虫ゲノム中に存在する GPI アンカー型蛋白質をコードすると推定される遺伝子すべてをバイオインフォマティクス手法で選び出しました。さらにこれらすべてについて優先順位をつけて、RNAi による遺伝子機能阻害を行い、配偶子幹細胞の数が減っていないかどうかを顕微鏡で観察して検討しました。(分裂中の配偶子幹細胞の数をリン酸化ヒストンに対する抗体(抗 pH3 抗体)と反応する細胞の数としてカウントします)

(4) さらに正常株と、*piga-1* 遺伝子破壊株、そして *piga-1* 遺伝子破壊株を distal tip 細胞でだけ正常 *piga-1* 遺伝子を発現させることで回復させた細胞それぞれから mRNA を抽出し DNA マイクロアレイ解析を行って遺伝子発現の差を調べました。この方法で差がでた遺伝子は幹細胞ニッチの GPI アンカー型蛋白質による維持に関係している遺伝子の可能性が高いと思われます。

(5) 線虫では次世代シーケンサーを用いて、卵母細胞だけを作るようになった変異株や精子だけを作るようになった変異株などで変化している mRNA の同定結果が報告されました(Ortiz 他 2014)。この結果を公開データベースからダウンロードし、卵母細胞や精子細胞を作るときに発現が増えている遺伝子、卵母細胞をつくる時だけ発現が増えている遺伝子などのリストから GPI アンカー型蛋白質をコードする遺伝子をリストアップしました。こうして配偶子形成に必要な GPI アンカー型蛋白質候補リストが作製できたわけで、このリストと(1)から(4)の結果を較べることで、配偶子幹細胞ニッチの維持、形成に不可欠な GPI アンカー型蛋白質候補を絞り込む作業を行いました。

(6) 配偶子幹細胞ニッチに関わる可能性が高い GPI アンカー型蛋白質遺伝子については、RNAi による遺伝子機能阻害を繰り返し行い、

(3) の抗体染色などで確認しました。さらに同定した遺伝子で一番重要と思われる遺伝子2個については、ゲノム編集の新しい方法である CRISPR-Cas9 法を用いた遺伝子破壊株を取得し遺伝子機能を欠失させて、はたして配偶子幹細胞ニッチに影響がどうかを確認しました。

(7) 同定した遺伝子全てについて、Gene Ontology による類別を DAVID サイトを利用して行い、さらに遺伝子間相互作用については Cytoscape のプラグインである GeneMania などを利用した解析を実施しました。

#### 4. 研究成果

(1) 線虫の GPI アンカー構造の形成に関わる全遺伝子について RNAi 実験をおこない、その成果と、ヒトの糖鎖遺伝子の相同遺伝子である全線虫糖鎖遺伝子を網羅した新規のデータベースを完成させ、世界に向けて公開した(CGADB 産業技術総合研究所との共同研究)。掲載されている遺伝子名をクリックすると、その遺伝子配列、蛋白質のアミノ酸配列、遺伝子構造やヒト遺伝子へのリンクなどを簡単にたどることができる。ヒトの糖鎖遺伝子に興味をもっている医療従事者や学生、研究者がこのデータベースを利用することで、他のデータベースを参照する労なく、簡単に線虫での遺伝子阻害の異常を調べることができるデータベースである。オーソログ遺伝子のすべての解析結果や文献、発現部位などもクリック一つで簡単に調べられる有用なデータベースに仕上がっている。

(2) 配偶子幹細胞ニッチの維持、形成に不可欠な7つの GPI アンカー型蛋白質遺伝子を同定した。これらの中で特に重要で、配偶子幹細胞ニッチの形成に不可欠な Notch シグナル伝達系と相互作用している可能性の高い遺伝子2つを、生化学的解析と RNAi 解析、そしてマイクロアレイと RNA-Seq 解析から同定した。7つの遺伝子単独の阻害でそれぞれ配偶子幹細胞の分裂中のものの数が激減することからそれぞれの相互作用の解析をすすめる予定である。

(3) また2つに絞った遺伝子についてはゲノム上に並んで二つある遺伝子であることから、その二つを CRISPR-Cas9 の手法でゲノム配列から除去した株を得ることに成功した(東京女子医大の三谷昌平先生のグループとの共同研究)。現在、DAVID などの遺伝子相互作用解析の結果を参考にしながら Notch シグナル伝達系との関わりをさらに調べる実験を計画している。

#### <引用文献>

Mizuguchi 他、Nature 2003, 423, 443 - 448  
Izumikawa 他、J.Biol.Chem., 2010, 285,

12190-12209

Murata 他、Mol. Biol. Cell 2012, 23, 982-995

Ortiz 他 g3. 2014, 114.012351v1,4/9/1765

#### 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 1 件)

Sayaka Akiyoshi, Kazuko H Nomura, Katsufumi Dejima, Daisuke Murata, Ayako Matsuda, Nanako Kanaki, Tetsuro Takaki, Hiroyuki Mihara, Takayuki Nagaishi, Shuhei Furukawa, Keiko-Gengyo Ando, Sawako Yoshina, Shohei Mitani, Akira Togayachi, Yoshinori Suzuki, Toshihide Shikanai, Hisashi Narimatsu and Kazuya Nomura, RNAi screening of human glycogene orthologs in the nematode *Caenorhabditis elegans* and the construction of the *C. elegans* glycogene database, Glycobiology, 査読有、25、2015、8-20 DOI: 10.1093/glycob/cwu080

[学会発表](計 10 件)

野村一也、線虫 *C. elegans* 糖鎖遺伝子機能の網羅的スクリーニングとデータベース化 *C. elegans* GlycoGeneDatabase (CGGDB) の作製、第 87 回日本生化学会、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

野村一也、モデル生物線虫で探る細菌毒素の作用メカニズム、第 33 回日本糖質学会ワークショップ(招待講演)、2014 年 08 月 11 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

松田采子(野村一也)、線虫 *C. elegans* の生殖系列細胞における GPI アンカー型タンパク質の解析、第 36 回日本分子生物学会大会、2013 年 12 月 03 日、神戸ポートピア(兵庫県・神戸市)

秋好紗弥香(野村一也)、線虫 *C. elegans* におけるヒト相同性糖鎖関連遺伝子の解析とそのデータベース(CGGB)の構築、第 36 回日本分子生物学会大会、2013 年 12 月 03 日、神戸ポートピア(兵庫県・神戸市)

野村一也、線虫 *C. elegans* でこそわかる糖鎖の機能の解析、生理研研究会「構造の多様性に立脚した糖鎖機能の解明に向けて」(招待講演)、2013 年 11 月 15 日、大学共同利用機関 生理学研究所(愛知県・岡崎市)

Ayako Matsuda (Kazuya Nomura)、Analysis of GPI-anchored proteins indispensable for the germ cell development in *C. elegans*, The 3rd International Congress on Natural Sciences with Sisterhood Universities (ICNS2013)、2013 年 10 月 12 日、新潟大学(新潟県・新潟市)

Kazuya Nomura, Studying Glycobiology: A

New Biology for the 21st Century, The 3rd International Congress on Natural Sciences with Sisterhood Universities (ICNS2013)、2013 年 10 月 12 日、新潟大学(新潟県・新潟市)

Kazuya Nomura, GPI-anchor synthesis is indispensable for the germline development of the nematode *Caenorhabditis elegans*, GLYC022 (the 22nd International Glycoconjugate Symposium)、2013 年 06 月 25 日、大連(中国)

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、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

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 54 回日本脂質生化学会、2012 年 06 月 08 日、九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)

[図書](計 2 件)

Kazuya Nomura, Sayaka Akiyoshi, Ayako Matsuda, Kazuko H. Nomura, Springer-Japan, "The Role of Glycosaminoglycans and Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in the Development of *Caenorhabditis elegans*", In "Glycoscience: Biology and Medicine" (Taniguchi N., Endo T., Hart G.W., Seeberger P.H., Wong C-H. (Eds.)), 2014, 1568 (pp 817-824) DOI: 10.1007/978-4-431-54841-6\_159

野村一也、秋好紗弥香、松田采子、野村和子、NTS出版、「線虫でこそわかる糖鎖の新機能の探究」糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック～創薬・医療からヘルスケアまで、2015、総ページ数(未定)

[その他]

ホームページ等

本研究の支援を得て完成した線虫糖鎖遺伝子データベース *C. elegans* Glycogene Database (CGGDB) は以下の URL で世界に向けて公開している。

<http://jcgddb.jp/cggdb/>

野村研究室のホームページ

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

科学を学ぶ人のために

[http://seibutsu.biology.kyushu-u.ac.jp/~nomura/diary/diary\\_index.htm](http://seibutsu.biology.kyushu-u.ac.jp/~nomura/diary/diary_index.htm)

研究内容については随時、この二つのページ

で紹介している。最初が野村研究室のトップページ、次が、研究内容や研究手法などを詳細に紹介しているブログ風記事である。またリンク集も充実しており、上記の web ページは多数のアクセスを集めている。

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

野村 一也 ( NOMURA, Kazuya )  
九州大学・理学(系)研究科(研究院)・  
准教授  
研究者番号：30150395