

疾患関連糖鎖遺伝子変異体を用いた分子病態のプロテオーム解析

●豊田英尚

千葉大学大学院薬学研究院

〈研究の目的と進め方〉

糖鎖機能の理解はポストゲノム研究における重要課題の一つであるが、糖鎖分析技術の発達が不十分なことや適切なモデル動物が存在しなかったために、核酸やタンパク質に比べて研究が立ち後れているのが現状である。最近、Wnt/ Wingless, TGF- β /Dpp, Hedgehog, FGFといった細胞間シグナル伝達物質が、グリコサミノグリカンの一種であるヘパラン硫酸によって機能制御されていることがショウジョウバエを使った研究で示され、これまで哺乳動物特有の高度な生命現象を制御していると考えられてきたグリコサミノグリカンの研究が、代表的なモデル生物であるショウジョウバエを用いて可能になるという進展があった。さらに、コンドロイチンが初期胚の形態形成や細胞分裂の完結に必須であることが線虫のsqv-5変異体を用いて報告され、ヘパラン硫酸のみならずコンドロイチンのもつ種を越えた重要性も注目されている。そこで今後重要になるのが、糖鎖分析法とプロテオーム解析法の整備であるが、ショウジョウバエや線虫のようなモデル生物の解析を主眼においた方法論は十分に検討されていない。そこで本研究は、疾患関連糖鎖遺伝子変異体を用いた糖鎖の超微量分析法とプロテオーム解析法を検討し、グリコサミノグリカンの機能発現メカニズムの解明を試みると同時に、その情報を応用することによってヒト疾患における遺伝的要因のゲノム解析と分子病態の理解を目指す。

〈研究開始時の研究計画〉

疾患関連糖鎖遺伝子変異体であるショウジョウバエ tout velu, sugarless, sulfatless変異体では、複数のタンパク質に異常が起きていることが予想される。すなわち、本来正常なグリコサミノグリカンが結合しているべきタンパク質の変化と、正常なグリコサミノグリカンが生合成されなかったために起こる様々な異常が検出されるはずである。それらのタンパク質を網羅的に検出し、質量分析装置を使った解析とデータベース検索により遺伝子を同定し、グリコサミノグリカンを介した生命現象に寄与する遺伝子群を網羅的に検索する。上記の方法で同定された遺伝子に関してヒトデータベースの検索を行い、ヒトにおける様々な病態解明に役立つような遺伝子を絞り込む。さらに、機能欠失変異体あるいは RNAiによる機能解析を試み、糖鎖機能発現の異常によって引き起こされる分子病態の把握を目指す。

〈研究期間の成果〉

ショウジョウバエ全体を試料としてプロテオーム解析を行うことはこれまで非常に困難であった。我々は本研究において様々な条件検討を行い、ショウジョウバエ試料に適した二次元電気泳動プロトコルを確立したが、微量の試料を用いて野生型と変異体のプロテオームを比較するためには、さらなる方法の改良が必要であることが判明した。検討の結果、少量液相等電点電気泳動システムにより pH 3.0~pH 5.4, pH 5.4~pH 6.2, pH 6.2~pH

7.0, pH 7.0~pH 10.0に分画後、狭域のIPGストリップを用いて等電点電気泳動を行い、二次元電気泳動解析することにより解析が可能になることが明らかになった。また、狭域のIPGストリップを用いた等電点電気泳動を省いて、SDS-PAGEとLC-MSによる、より定量的で再現性の良い方法の有効性も確認できた。これまで、ショウジョウバエのプロテオグリカンのコアタンパク質を生化学的手法で同定した報告例はなかった。そこでまずコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの同定を試みたところ、pH 6.2以下の画分に分子量250 kDa以上の複数のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが存在することが明らかになった。また、微量のショウジョウバエに应用可能な糖鎖分析法を確立し、その成果を様々な生体試料に応用した[1-4]。

〈国内外での成果の位置づけ〉

糖鎖遺伝子研究の大半は、糖転移酵素遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の基質特異性を調べるといった内容だったが、最近ようやく糖転移酵素遺伝子のノックアウト、RNAiによる機能抑制によって引き起こされる生命現象に焦点があたりつつある。ショウジョウバエや線虫などの遺伝学的手法が整ったモデル生物も研究材料として導入され始めたが、これらを用いた糖鎖の超微量分析とプロテオーム解析を武器として生化学的な解析を行い、ヒトにおける分子病態解析に役立てようとする本研究のような試みは数少ないのが現状である。今後、本研究で検討した新しい解析手法を様々なモデル生物に応用していくことで、糖鎖生物学上の新たな展開が期待される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

新規の方法論の構築に予想外の時間がかかり、疾患関連糖鎖遺伝子変異体であるショウジョウバエ tout velu, sugarless, sulfatless変異体の解析を十分に行うことが出来なかった。

〈今後の課題〉

本研究で確立した新規の分析法をショウジョウバエ tout velu, sugarless, sulfatless変異体の解析に応用し、糖鎖機能発現の異常によって引き起こされる分子病態の把握を目指す。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文
1. S. Nishihara, R. Ueda, S. Goto, H. Toyoda, H. Ishida, M. Nakamura: "Approach for functional analysis of glycan using RNA interference." *Glycoconj. J.*, 21, 63-68(2004).
2. P. Vongchan, M. Warda, H. Toyoda, T. Toida, R.M. Marks, R.J. Linhardt.: "Structural characterization of human liver heparan sulfate." *Biochim. Biophys. Acta*, 1721, 1-8(2005).
3. Y.W. Ha, B.T. Jeon, S.H. Moon, H. Toyoda, T. Toida, R.J. Linhardt, Y.S. Kim.: "Characterization of heparan sulfate

from the unossified antler of *Cervus elaphus*." *Carbohydr. Res.*, 340, 411-416(2005).

4. H.Yano, M. Yamamoto-Hino, M. Abe, R. Kuwahara, S. Haraguchi, I. Kusaka, W. Awano, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, S. Goto.: "Distinct functional units of the Golgi complex in *Drosophila* cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 13467-13472(2005).