

平成10年度厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)
研究報告書

糖鎖合成酵素遺伝子群の生体機能と
治療応用に関する研究
(H10-ゲノム-006)

国立がんセンター研究所・部長 齋藤 政樹

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
総括研究報告書

糖鎖合成酵素遺伝子群の生体機能と治療応用に関する研究

主任研究者 齋藤 政樹 国立がんセンター研究所 部長

研究要旨

本研究において、主任研究者並びに分担研究者らは世界に先駆け、複数の新しい糖鎖遺伝子のcDNAクローニング及びゲノム構造解析に成功し、さらに発現酵素蛋白の機能解析、2つの糖脂質糖鎖遺伝子についてはノックアウトマウスの作製及びその病体解析を、最終的な糖鎖機能解明とその応用を目指して、以下のように進めた：(1) ヒト骨髄性白血病細胞に対する増殖抑制能と分化誘導活性能など、様々な生物活性の重要性ばかりでなく、中・長鎖糖鎖含有糖脂質生合成の分岐点で機能し、生体内主要ガングリオ系ガングリオシドの共通の前駆体となるガングリオシドGM3の合成を触媒する酵素遺伝子、ガングリオシドGM3合成酵素（シアリルトランフェラーゼ-1）遺伝子のcDNAのクローニング及びゲノム構造解析を進めた。ヒトGM3合成酵素遺伝子はシアル酸転移酵素ファミリーに属する新規メンバーであったが、シアリルモチーフ中に他のメンバーには見られない構造的特徴を示し、この特徴はマウス、ラット、サルなど哺乳動物で広く保存されていることが証明された。さらに当該遺伝子ノックアウトマウス作製のためのベクターの準備を開始した。(2) ガングリオシドGM2/GD2合成酵素遺伝子及びGD3合成酵素遺伝子のノックアウトマウスを作成し、その病態を検討したところ、神経組織形態に著しい変化はなかったが、50週齢以上のマウスの末梢神経に著明な変性が見られた。また、舌下神経切断後の再生度に著しい低下が認められ、複合型ガングリオシドが神経組織の維持・修復に重要であることが示された。またGD3合成酵素のアンチセンスcDNAを導入したメラノーマ細胞の増殖能低下から、GD3の細胞増殖における役割が示唆された。同遺伝子のゲノム構造を明らかにし、プロモーターの検討を行ったところ、メラノーマのオートクリンに働く増殖因子とGD3発現機構との接点が生かされた。(3) ある糖鎖抗原発現にもかかわらず、それを合成する既知の糖転移酵素遺伝子が発現していない場合、未知の新規糖転移酵素が存在する可能性が示唆された。この情報を元に、新規の α 1,3-フコース転移酵素を発現クローニング法により(Fuc-TIX)、また新規の β 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子(β 3Gal-T5)をDegenerate primer法により単離した。Fuc-TIXは種間で極めてよく保存され、個体発生や維持に重要な役割を担っていることが示唆された。その発現分布は主に脳、腎臓であり、胃、子宮、末梢白血球でも発現していた。 β 3Gal-T5は主に大腸、胃、脾臓で発現しており、腫瘍マーカーとして有名なCA19-9抗原を合成する酵素であることが判明した。

分担研究者氏名・所属施設名及び職名

古川 鋼一 名古屋大学医学部・教授
成松 久 創価大学生命科学研究所・
教授

とする血液疾患、様々な神経障害、皮膚症状を起こす各種ウイルス疾患やアレルギー疾患、ヘリコバクター・ピロリを含む胃腸管感染症など、様々な疾病に対する糖鎖遺伝子導入・欠失療法の基礎的検討を行い、遺伝子診断・治療へ向けた応用開拓を行う。

B. 研究方法

A. 研究目的

代謝的並びに生体機能上重要な新しい糖鎖遺伝子の探索とともに、本研究者が世界に先駆けて、既に遺伝子クローニングに成功した複数の「糖鎖遺伝子」を、遺伝子ファミリーとして捉え、それらのゲノム構造並びに染色体上の局在や遺伝子発現制御機構の解析を行う。さらに、他疾患遺伝子との相関関係、遺伝子ノックアウトやノックインなどの遺伝子操作に基づく糖鎖改変細胞及び改変動物の作成、などを実施し、血液・免疫系や神経系を中心とした細胞の増殖・分化シグナルの糖鎖による制御機構を解明すると共に、白血病を始め

(1) ガングリオシド合成酵素遺伝子の単離、構造と生物機能の解析：ヒト骨髄性白血病細胞株HL-60をTPAで単球系分化させた細胞のポリ(A)+RNAからcDNAライブラリーを作製し、ガングリオシドGM3を欠失しているポリオマラーゼ T 抗原の安定発現マウス肺癌細胞株(3LL-HK46)及び3LL-HK46細胞のヒトGD3合成酵素遺伝子安定発現株(3LL-ST28)を樹立し宿主細胞として用いた。発現するGM3分子の細胞膜上での存在様式が細胞(株)により異なるために必要な工夫であった。GM3合成酵素（シアリルトランスフェラーゼ-1）遺伝子cDNAクローニングは、セルソーターを用いた3回のソーティングと、その結果得られたサ

ライブラリーのシブセレクションにより成功した。さらに、FISH法にて染色体上の局在を決定し、単離したBACクローンからゲノム構造の解析を進めた。

(2) 末端糖鎖抗原を合成する新しいフコース転移酵素、ガラクトース転移酵素の遺伝子クローニング：未知の酵素の存在が予想されたら、発現クローニング法、若くはファミリー内で保存されたモチーフ配列により degenerate primer を作製し、それを用いて PCR クローニングを行った。さらに、genome project data bank, EST data base を常にサーチし、新しい相同遺伝子を探した。

(3) 細胞レベル、動物レベルでの遺伝子ターゲットとその病態解析：ガングリオシド GM2/GD2 合成酵素遺伝子のノックアウトマウスを作製し、加齢に伴う神経組織の病理学的変化を観察した。また、新たに樹立した GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスと共に、舌下神経切断による神経再生実験を行い、再生における各々の欠失ガングリオシドの意義を検討した。さらに、メラノーマや T 細胞性白血病細胞に特異的に発現している GD3 の細胞増殖における役割について、GD3 合成酵素である α 2,8 シアル酸転移酵素遺伝子の ATG を含む 3 種のアンチセンス cDNA 発現ベクターを作成し、メラノーマ細胞に安定発現することにより検討した。細胞増殖は MTT アッセイにて測定した。また、メラノーマにおける GD3 の特異的発現機構を解明するため、GD3 合成酵素のゲノム構造を明らかにすると共に、5'RACE により転写開始点を明らかにした。また、5'上流の段階的欠失変異クローンによるルシフェラーゼアッセイによって、遺伝子発現調節領域の構造及び機能の検討を行った。

C. 研究結果

(1) 得られたガングリオシド GM3 合成酵素 cDNA クローンは、全長 2,359 塩基対からなり、1,089 塩基対により規定される ORF を含む。推定一次構造には、短い細胞質部位、膜貫通部位、長い C 末端部位が存在し、大多数の糖転移酵素で従来報告されている II 型膜蛋白質の構造的性質を示した。推定分子量は 41.7 kDa、ゴルジ体内腔領域には、シアル酸転移酵素ファミリーで共通に見られる 2 つ (L,S) のシアルルモチーフ配列が同定された。シアルルモチーフ L では、保存性の高いアミノ酸残基の一つで C 末端付近に位置する アスパラギン酸がヒスチジンに置換していた。酸性アミノ酸から塩基性アミノ酸への置換は、分子内微少環境に影響を与えることが予測される。クローニングしたヒト及びマウス cDNA 産物を酵素源として GM3 合成活性を証明し、この合成酵素がラクトシルセラミドのみを糖脂質基質として利用する極めて基質特異性の高い酵素であることを明らかにした。ヒト、マウス共に 2.4 kb の主要な遺伝子転写物を与えた。また、両動物種で調べたことを明らかにした。ヒト、マウス共に 2.4 kb の主要な遺伝子転写物を与えた。

また、両動物種で調べた全ての臓器に当該遺伝子の発現が認められたが、予想に反し、発現パターンには、かなりの臓器特異性が観察された。即ちヒトでは脳・胎盤・骨格筋・精巣で、またマウスでは肝臓で高い発現量を示した。

(2) ガングリオシド GM2/GD2 合成酵素遺伝子のノックアウトマウスを長期間維持し、灌流固定した組織の切片を顕微鏡下に検討した。必要があれば電顕にて検討を行った。舌下神経を切断して 10 週間後に、舌に horseradish peroxidase を注入した後、脳幹の神経核における HRP 陽性ニューロンの数を計測した。GD3 合成酵素遺伝子のアンチセンス cDNA は、ATG を含む異なった 3 種の長さ (全長、約 250bp、25bp) の断片を pMIKneo 発現ベクターに挿入して作成した。ヒトメラノーマ株 McWo に安定発現させ、MTT アッセイによって増殖度を測定した。GD3 合成酵素のゲノム遺伝子は BAC ライブラリーより単離し、exon-intron 構造を決定した。転写開始点は 5'RACE により決定した。エンハンサー付きベクターを用いて欠失変異株を作成し、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、プロモーター活性を検討した。

(3) マウス脳 cDNA ライブラリーを pAMo ベクターにて作製し、これを Namalwa 細胞にトランスフェクトすることにより、Le^x 抗原陽性細胞を分離し、Fuc-TIX をコードする cDNA を単離した。既知の 4 種類の β 3Gal-T のアミノ酸配列に比較的保存されているペプチド配列が 3 ヶ所 (β 3Gal-T motif) あることを見いだした。このモチーフをコードする degenerate primer を用いて、CA19-9 陽性細胞である Colo205 細胞の cDNA をスクリーニングすることにより、 β 3Gal-T5 の cDNA を単離した。糖鎖の末端構造を合成するフコース転移酵素やガラクトース転移酵素は、まだ未知のものが存在することが予想される。生物学的機能として重要性の高い遺伝子をさらに単離していく。

D. 考察

本研究で得られた研究成果から、以下の展望或いは活用法が考察される：

(1) 生物活性の重要性ばかりでなく、代謝面からも重要な位置を占めるガングリオシド GM3 の合成酵素 (シアルルトランスフェラーゼ-1) cDNA のクローニングに成功したことにより、今後、正常組織並びに種々の癌組織など病的状態における発現特異性を明らかにし、免疫・造血系や神経系の細胞・組織への遺伝子導入を試みて、糖鎖並びにその合成酵素の持つ生物機能を明らかにしたい。さらに癌診断や予後判定、制癌への応用の道を探りたい。

(2) ガングリオシド GM2/GD2 合成酵素遺伝子欠失マウスにおける神経変性や再生不良に対し、ガン

グリオシドの補充による治療の試みを行う。また、ガングリオシド合成酵素遺伝子のin vivo投与による遺伝子治療開発のための実験システムとして活用する。GD3合成酵素遺伝子のプロモーターの解析により、メラノーマ特異的発現の制御領域を同定し、その特異性を利用してメラノーマの遺伝子治療のためのベクター構築に発展させる。

(3) フコース転移酵素IX (Fuc-TIX) は、脳神経、初期胚などに発現しており、Le^x (SSEA-1) 抗原を合成している。現在、Fuc-TIXのノックアウトマウスを作成中であり、Fuc-TIXの初期胚の発生、神経系の発生などに及ぼす機能を解析する予定である。β3Gal-T5は、現在まで知られる5種類のβ3Gal-Tの中では最も活性が強く、かつ主に消化管組織で発現している。腫瘍化による1型糖鎖発現(CA19-9を含む)を担っている。現在、この遺伝子をCA19-9陰性の腫瘍細胞株にトランスフェクトし、CA19-9陽性細胞を樹立した。その癌細胞としての特性を解析中である。

E. 結論

(1) EGF受容体自己リン酸化モジュレーター、病原微生物感染の受容体エピトープ、アクチン細胞骨格との相互作用による繊維芽細胞形態維持、インテグリンを介した細胞接着への関与など、様々な生物活性とともに、その存在が動物細胞に広く知られているシアロ糖脂質の一分子、ガングリオシドGM3は、その構造は主なシアル酸含有糖脂質の中で最も単純で、主要ガングリオシド分子種生合成の共通前駆体となっており、GM3生合成の調節や制御はガングリオシド生合成の根幹をなしている。さらに、GM3合成酵素(シアリルトランフェラーゼ1)は、シアル酸受容体であるラクトシルセラミド分子を、ラクト/ネオラクト系・グロボ系・イソグロボ系糖脂質生合成に働く初期酵素と競合することで、中性及び酸性糖脂質の組成と細胞内含量をも調節すると考えられる。このGM3合成酵素遺伝子クローニングを発現クローニング法で試み、国際的にも初めてcDNA及びゲノムのクローニングに成功した。ヒト及びマウスGM3合成酵素遺伝子はシアル酸転移酵素遺伝子ファミリーに属する新規のメンバーであったが、シアリルモチーフ中に他のメンバーには見られない構造的特徴を示し、この特徴は哺乳動物で広く保存されていることが証明された。

(2) 複合型ガングリオシドは、神経組織の機能維持や形態維持、及び修復において必須の役割を果たしている。またガングリオシドGD3はメラノーマの増殖にとって重要であり、その発現調節機構と増殖因子によるオートクリンの増殖機構の統合的理解が可能となった。

(3) 末端糖鎖合成を行う糖転移酵素(フコース転移酵素、ガラクトース転移酵素)は、まだ未発見のものが残されている。上記に掲げた研究方法によ

さらに残された重要な糖転移酵素遺伝子を単離することを試みるべきである。また、クローニングに成功した遺伝子を用いて疾患との関連を解析し、将来的に遺伝子治療に役立てるべく応用する。

GM3合成酵素遺伝子のクローニングをもって、主要ガングリオ系ガングリオシド生合成に関わる糖転移酵素群の役者が揃った。先行的にノックアウトマウス作成並びにその詳細な検討が行われている遺伝子もあり、今後はこれらの結果を踏まえた上で、ガングリオシド生合成並びにその糖鎖機能の総合的理解が長足に進むことが期待される。更に、適当な宿主細胞を用いれば欲しいガングリオシドや糖蛋白糖鎖が取得できるようになり、ガングリオシドはじめとする複合糖質糖鎖の生理機能に関してもこれまでの常識を覆すような新事実遭遇できる日が到来するかも知れない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohta, M., Sakai, T., Saga, Y., Aizawa, S. and Saito, M.: Suppression of Hematopoietic Activity in Tenascin-C-Deficient Mice. *Blood*, 91: 4074-4083 (1998).
- 2) Ishii, A., Ohta, M., Watanabe, Y., Matsuda, K., Ishiyama, K., Sakoe, K., Nakamura, M., Inokuchi, J., Sanai, Y. and Saito, M.: Expression Cloning and Functional Characterization of Human α cDNA for Ganglioside GM3 Synthase. *J. Biol. Chem.*, 273: 31652-31655 (1998).
- 3) Ishii, A., Makino, K., Nakamura, C., Matsuda, K., Ohta, M. and Saito, M.: Molecular characterization of ganglioside GM3 Synthase (CMP-NeuAc:Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer α 2,3-sialyltransferase) from mammals. *J. Biol. Chem.*, in press.
- 4) Mei Xu, Ishii, A., Honke, K., Kobayashi, T., Imai, S., Eto, Y., Makita, A. and Saito, M.: A Severe Clinical Phenotype of Maroteaux-Lamy Syndrome Caused by a Nonsense Point Mutation in Arylsulfatase B Gene. *Human Genetics*, in press.
- 5) Matsuda, K., Fukuda, I., Saito, M. and Yamamoto, N.: HIV Induction from Latently Infected Cells by Phosphoglycolipid Antigens of *Mycoplasma fermentans*. *Infect. Immun.*, in press.
- 6) 島 清彦, 齋藤政樹: 白血病の分化誘導療法, 造血幹細胞一分子から臨床まで(三浦恭定編), 南江堂, (pp.192-196) (1998).
- 7) 齋藤政樹: 生理活性分子とシグナル, 蛋白質核酸酵素, 43: 2484-2487, 1998 (蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖生物学」, 齋藤政樹, 谷口直之, 川崎敏祐, 入村達郎, 鈴木明身編, 共立出版株式会社).
- 8) 石井 陸, 齋藤政樹: GM3合成シアル酸転移酵素の構造と機能, 蛋白質核酸酵素, 43: 2349-2357, 1998 (蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖生物学」, 齋藤

政樹、谷口直之、川壽敏祐、入村達郎、鈴木明身編、共立出版株式会社)。

2. 学会発表

1. Masaki Saito and Atsushi Ishii: Molecular cloning and characterization of cDNA (gene) of human ganglioside GM3 synthase (sialyltransferase-1: SAT-1). Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipids Biology, January 11-16, 1998, Holiday Inn, Ventura, California
2. Masaki Saito, Chikami Nakamura, Keiko Ishiyama, Yuichiro Hamanaka, Kazuhiro Matsuda, and Atsushi Ishii: Molecular characterization of ganglioside GM3 synthase (CMP-NeuAc:Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer α a2,3-sialyltransferase) from mammals. Gordon Research Conference on Glycobiology, February 21-26, 1999, Habortown, Ventura, California
3. Masaki Saito, Chikami Nakamura, Yuka Ohtomo, Yuichiro Hamanaka, Kazuhiro Matsuda and Atsushi Ishii: Cloning and Functional Characterization of Human cDNA for Ganglioside GM3 Synthase (Sialyltransferase 1), Which Relates to Human Leukemic Cell Differentiation. 7th Conference on Gene Therapy of Cancer, November 19-21, 1998, San Diego, California
4. Masaki Saito: Molecular Cloning and Functional Characterization of Human Ganglioside GM3 Synthase (Sialyltransferase 1: SAT1) Gene and Its Product. 2nd Japanese-French Glyco Workshop on Glycotechnology: Glycosyltransferases and Recombinant Glycoproteins: Application to Cellular Remodeling and Oligosaccharide Syntheses, March 8-12, 1998, Lille, France
5. Masaki Saito, Masatsugu Ohta, Yutaka Sanai, Junichi Inokuchi, and Atsushi Ishii: Molecular Characterization of Human Ganglioside GM3 Synthase (CMP-NeuAc:Lactosylceramide α 2,3Sialyltransferase, EC 2.4.99.9, Sialyltransferase-1) Which Produces a Bioactive Glycosphingolipid, Ganglioside GM3, with Differentiation-Inducing Activity toward Human Myelogenous Leukemia Cells. Fourth Joint Conference of AACR and JCA: Innovative Approaches to the Prevention, Diagnosis and Therapy of Cancer, February 16-21, 1998, Maui, Hawaii, USA
6. 石井睦、伊藤明博、福岡雅楽子、川瀬義明、牧野聖子、大田雅嗣、齋藤政樹：シアリルモチーフにヒスチジンをもつシアル酸転移酵素の構造と機能，第20回糖質シンポジウム，1998,7月，札幌
7. 石井睦、大田雅嗣、齋藤政樹：GM3合成酵素の分子生物学的性質，第57回日本癌学会，1998,9月，横浜
8. 石井睦、大田雅嗣、齋藤政樹：発現クローニング法を用いた白血病細胞株HL-60細胞に関連する遺伝子の単離。第60回日本血液学会総会，1998,3月，大阪
9. 福岡雅楽子、石井睦、大田雅嗣、齋藤政樹：白血病細胞株HL-60細胞由来cDNAライブラリーからの細胞内輸送活性化タンパク質遺伝子の単離，第60

回日本血液学会総会、1998、3月、大阪

G. 知的所有権の所得状況

特記すべきことなし

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)
分担研究報告書

ガングリオシド合成酵素遺伝子群の神経機能と治療応用に関する研究
分担研究者 古川 鋼一 名古屋大学医学部

研究要旨

ガングリオシド合成酵素遺伝子のノックアウトマウスを作成し、その神経組織の異常を検討したところ、50週齢のマウスでは末梢神経における軸索の消失など著しい変性像を認められた。また、舌下神経切断システムにおいても再生能の低下を認めるなど、複合型ガングリオシドが、神経組織の維持や修復に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、GD3合成酵素遺伝子のアンチセンスcDNAを導入したメラノーマ細胞では、明らかな増殖能の低下を認め、GD3の細胞増殖における意義が示された。同遺伝子のゲノム構造を明らかにしてプロモーターを解析中である。

A. 研究目的

1. ガングリオシドの、神経系を中心とする生体内機能を解明するために、培養細胞およびマウス個体において遺伝子操作に基づく糖鎖改変を行い、その表現型の変異と機構を解明する。
2. がん細胞の増殖・進展において、酸性糖脂質の糖鎖が担う役割と、その分子機構を解明し、治療戦略における分子標的を明らかにする。
3. 酸性糖脂質糖鎖のがん特異的発現機構を解明することにより、がん細胞の増殖に関与する増殖因子/受容体と特異的糖鎖の機能との相互作用を解明する。また、がん特異的糖鎖の合成酵素遺伝子のプロモーターを利用した、がんの遺伝子治療法の基礎的検討を行う。

B. 研究方法

1. GM2/GD2合成酵素遺伝子のノックアウトマウスに関し、加齢に伴う神経組織の病理学的変化を観察した。また、新たに樹立したGD3合成酵素遺伝子ノックアウトマウスと共に、舌下神経切断による神経再生実験を行い、再生における各々の欠失ガングリオシドの意義を検討した。
2. メラノーマやT細胞白血病細胞に特異的に発現しているGD3の、細胞増殖における役割について、GD3合成酵素である α 2,8シアル酸転移酵素遺伝子のATGを含む3種のアンチセンスcDNA発現ベクターを作成し、メラノーマ細胞に安定発現することにより検討した。細胞増殖はMITアッセイにて測定した。
3. メラノーマにおけるGD3の特異的発現機構を解明するため、GD3合成酵素のゲノム構造を明らかにすると共に、5'RACEにより転写開始点を明らかにした。また、5'上流の段階的欠失変異クローンによるルシフェラーゼアッセイによって、遺伝子発現調節領域の構造および機能の検討を行った。

C. 研究結果

GM2/GD2合成酵素遺伝子のノックアウトマウスは、全ての複合型ガングリオシドを欠失したが、脳神経系組織の構築に明らかな異常を認めなかった。しかし、週齢50週以上のマウスでは坐骨神経線維に著しい変化が認められ、部位によって線維の変性、消失および結合組織の置換を認めた。更に舌下神経切断後の神経再生実験では、野生型に比し著しいニューロンの死滅と、再生能の低下を認めた。

一方、GD3合成酵素遺伝子ノックアウトマウスにおいても、明確な形態形成の異常は認めなかったが、その再生能につき検討を進めている。

3種の異なったsizeのアンチセンスcDNA導入株のうち、2種類のアンチセンス導入細胞ではGD3発現レベルが1/3~1/5に低下しており、増殖速度がベクターコントロールに比して明らかに低下していた。このことより、GD3発現が細胞増殖を促進していることが示唆された。現在、アンチセンス発現細胞における増殖抑制のメカニズム解明のため、細胞内のシグナル変異等を検討中である。

本遺伝子はexon5個から成り、全体で少なくとも50kb以上にわたっていた。

ATG上流約500bpの所に転写開始点を認め、その5'上流約300bpにメラノーマ特異的プロモーター活性を認めた。この領域には、既知の転写因子として、CREB、c-myb、GATA-1、MZFIなどの結合配列が存在することが判った。段階的欠失変異クローンによるルシフェラーゼの結果から、c-myb結合領域には明らかなプロモーター活性を認めず、またc-mybのトランスフェクションでもルシフェラーゼ活性の上昇を認めなかった。

D. 考察

複合型ガングリオシドは、基本的な神経組織の

形成に必須でないことが、ノックアウトマウスにおいて示されていたが、今回の高齢マウスにおける末梢神経の著しい変性所見や、再生実験でみられた再生能の低下は、ガングリオシドが神経組織の形態保持、機能維持、そして損傷時の修復にとって必須であることを示唆した。現在進行中の、GD3合成酵素遺伝子欠失マウスの解析により、b系列ガングリオシドに焦点をしばってその重要性が更に明らかにされるものと思われる。メラノーマにおけるGD3発現は、細胞株、患者腫瘍組織を問わず極めて普遍的である。PC12にGD3合成酵素遺伝子を導入した場合には著しい増殖亢進が見られたが、メラノーマでも増殖能との深い関わりが実証されれば、メラノーマ治療の新たなターゲットの候補として有用と思われる。

c-mybは、メラノサイトの増殖因子であり、かつメラノーマのautocrine増殖の刺激因子として報告されているbFGFの発現を制御していることが報告されている。また、メラノサイトはTPAとcAMP誘導因子の存在下でよく増殖することか知られている。これら事実、CREBやc-mybが主にbFGFなどの増殖因子とGD3という糖脂質の両方の発現を調節することにより、メラノーマ/メラノサイトの増殖をより効率のよいものとし、腫瘍性増殖に深く関与していることを示唆している。現在、メラノーマ/メラノサイトにおいて、CREBやc-mybなどの転写因子がGD3発現に実際に関与しているか否か、またbFGFの発現とGD3発現の相互作用の有無につき検討を進めている。この過程でメラノーマ特異的プロモーターが最終的に同定されれば、それを用いた遺伝子治療のアプローチを検討したいと考えている。

E. 結論

複合型ガングリオシドは、神経組織の機能維持や形態維持、および修復において必須の役割を果たしている。またGD3はメラノーマの増殖にとって重要であり、その発現調節機構と増殖因子によるオートクリンの増殖機構の統合的理解が可能となった。

F. 研究発表

① 論文発表

1. Fukuda, M., Horibe, K. and Furukawa, K.: Enhancement of in vitro and in vivo anti-tumor activity of anti-GD2 monoclonal antibody 220-51 against human neuroblastoma by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor. *Int. J. Mol. Med.* 2, 471-475, 1998

2. Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Zhao, J., Yamashiro, S., Fukumoto, S., Okada, M., Haraguchi, M., Shin, M., Takeda, N., Kishikawa, M., Shiku, H., Aizawa, S. and Furukawa, K.: Complex gangliosides are essential in spermatogenesis of mice: Possible roles in the transport of testosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12153-12157, 1998

3. Fukumoto, S., Miyazaki, H., Urano, T., Furukawa, K. and Furukawa, K.: Expression cloning of mouse cDNA of CMP-NeuAc : lactosylceramide α 2,3-sialyltransferase (GM3 synthase), an enzyme that initiates the synthesis of gangliosides. *J. Biol. Chem.* in press.

4. Okajima, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Ishida, H., Kiso, M., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K.: J. Biol. Chem. Molecular cloning of a novel α 2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids. *J. Biol. Chem.* in press.

② 学会発表

- 古川鋼一、福本敏、宮崎宏、古川圭子、岡田雅彦：細胞の運命を決定する糖鎖シグナル、第71回日本生化学大会、1998、10、名古屋
- 福本敏、武藤多津郎、長谷川智一、宮崎宏、後藤譲治、古川鋼一：GD3合成酵素遺伝子によるNGF/TrkAシグナルの制御、第71回日本生化学大会、1998、10、名古屋
- 岡島徹也、福本敏、大石秀人、宮崎宏、鍋島俊隆、鈴木操、浦野健、古川圭子、古川鋼一：ガングリオシド β 1,4 GalNAc転移酵素遺伝子トランスジェニックマウスの神経機能異常の検討、第71回日本生化学大会、1998、10、名古屋
- 市村明子、福本敏、宮崎宏、下島礼子、中島須美子、浦野健、古川圭子、古川鋼一：GM1合成酵素遺伝子導入PC12における細胞増殖生存・分化のシグナル制御、第71回日本生化学大会、1998、10、名古屋
- 古川圭子、堀江正人、古川鋼一：ヒトGD3合成酵素(α 2,8-シアル酸転移酵素)ゲノム遺伝子の単離と発現調節領域の検討、第57回日本癌学会総

会、1998, 9~10, 東京

6. 宮崎宏、福本敏、岡島徹也、岡田雅彦、古川圭子、古川鋼一：ヒト腫瘍細胞における β 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現とガングリオシド発現の検討、第57回日本癌学会総会、1998, 9~10, 東京

7. 福本敏、宮崎宏、浦野健、古川圭子、大石秀人、岡島徹也、後藤譲治、古川鋼一：ガングリオシドGM3による細胞増殖の制御機構-糖鎖リモデリングによる解析、第57回日本癌学会総会、1998, 9~10, 東京

8. 岡島徹也、福本敏、伊藤道一郎、大石秀人、古川圭子、光田輝彦、岡田雅彦、趙勁民、宮崎宏、相沢慎一、鍋島俊隆、古川鋼一：ガングリオシド変異マウスにおける行動異常と神経再生能の検討、第21回日本分子生物学会、1998,12,横浜

厚生省科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療プロジェクト）
分担研究報告書

フコース転移酵素群の発現特異性と個体間ポリモルフィズム並びに疾患感受性に関する分子・遺伝子レベルの解明と臨床応用

成松 久 創価大学生命科学研究所・教授

研究要旨 神経発生過程においてLewis x (Le^x , CD15, SSEA-1) 抗原は発現制御され、神経細胞とマトリックス間での相互作用に重要な働きをしているらしいと示唆されている。しかしながら、Lewis x 合成能のある既知の5種類の $\alpha 1,3$ フコース転移酵素($\alpha 1,3$ Fuc-T)は、いずれも神経細胞には発現しておらず、まだ未知の $\alpha 1,3$ Fuc-Tの存在が予想された。マウス脳cDNAライブラリーより、新規の $\alpha 1,3$ Fuc-Tを発現クローニング法により単離し、Fuc-TIXと命名した。Fuc-TIXは、種間できわめて保存されており、個体発生や維持に重要な役割を担っていることが示唆された。その発現分布は、主に脳、腎臓であり、他にも胃、子宮、末梢血白血球で発現していた。消化管由来の癌の最も代表的な腫瘍マーカーであるCA19-9は、シアリルルイス A (sLe^a)構造であるが、その合成には $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素 ($\beta 3$ Gal-T)を必要とする。すでに4種類の $\beta 3$ Gal-T遺伝子がクローニングされていたが、大腸、胃、膵臓などCA19-9を発現する組織で、既知のいずれの $\beta 3$ Gal-Tも発現していない。そこで、4種類に共通するアミノ酸配列を見出し、それをコードするdegenerate primerを用いて、新規の $\beta 3$ Gal-T遺伝子を単離し $\beta 3$ Gal-T5と命名した。 $\beta 3$ Gal-Tは、主に大腸、胃、膵臓で発現しており、腫瘍マーカーとして有名なCA19-9抗原を合成する酵素であることを証明した。

A. 研究目的

末端糖鎖構造を合成する糖転移酵素遺伝子は重複遺伝子ファミリーを形成しており、類似の構造をつくる酵素が複数種存在する。ある糖鎖構造が存在してもそれを合成する既知の酵素遺伝子が発現していない場合、まだ未知の酵素の存在が予想される。それらの未知の酵素のうちで、生物学的に重要な機能を果たしている可能性のある酵素遺伝子を単離することを試みる。遺伝子クローニングに成功したならば、それを用いて、トランスジーンやターゲティングにより、生体での糖鎖構造変換を行い糖鎖構造の機能を解明する。また癌細胞の培養細胞レベルでも糖鎖構造改変を行い、その癌細胞としての特性を解析する。

B. 研究方法

未知の酵素の存在が予想されたら、発現

クローニング法、もしくはファミリー内で保存されたモチーフ配列により、degenerate primerを作製しそれを用いてPCRクローニングを行う。さらに、genome project data bank, EST data baseを常にサーチし、新しい相同遺伝子を探す。

C. 研究結果

本年度は新規な糖転移酵素遺伝子Fuc-TIXと $\beta 3$ Gal-T5を発見し、クローニングに成功した。Fuc-TIXは初期胚や神経発生の特異的段階に発現されており、 Le^x 抗原を合成していることを証明した。既知の $\alpha 1,3$ Fuc-Tは種間であまり保存されていないが、Fuc-TIXは種間を越えてきわめて保存されており、個体発生や維持に重要な働きをしていることが予想される。 $\beta 3$ Gal-T5は有名な腫瘍マーカーであるCA19-9を合成す

る酵素であることが証明された。CA19-9は単なる腫瘍マーカーとしてだけでなく、その発現により、悪性度（転移能）が異なることが示唆されている。

D. 考察

今回、クローニングに成功した2種類の糖転移酵素は、Fuc-TIXは発生、神経分化の点できわめて重要な役割を果たしていると予想している。β3Gal-T5は、消化管組織の発生、癌化ときわめて密接に関係した遺伝子であると予想している。

E. 結論

末端糖鎖合成を行う糖転移酵素は、まだ未発見のものが残されている。上記に掲げた研究方法により、さらに残された重要な糖転移酵素遺伝子を単離することを試みるべきである。また、クローニングに成功した遺伝子を用いて疾患との関連を解析し、将来的に遺伝子治療に役立てるべく応用する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Narimatsu, H., Iwasaki, H., Nakayama, F., Ikehara, Y., Kudo, T., Nishihara, S., Sugano, K., Okura, H., Fujita, S. and Hirohashi, S.: Lewis and Secretor gene dosages affect CA19-9 and DU-PAN-2 serum levels in normal individuals and colorectal cancer patients. *Cancer Res.*, 58, 512-518, 1998.
2. Kudo, T., Ikehara, Y., Togayachi, A., Morozumi, K., Watanabe, M., Nakamura, M., Nishihara, S. and Narimatsu, H.: Upregulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. *Lab. Inv.*, 7, 797-811, 1998.
3. Ikehara, Y., Nishihara, S., Kudo, T., Hiraga, T., Morozumi, K., Hattori, T. and Narimatsu, H.: The aberrant expression of Lewis a antigen in intestinal metaplastic cells of gastric mucosa is caused by augmentation of Lewis enzyme expression. *Glycoconjugate J.* 15, 799-807, 1998
4. Kudo, T., Ikehara, Y., Togayachi, A., Kaneko, M., Hiraga, T., Sasaki, K. and Narimatsu, H.: Expression cloning and characterization of a novel murine α1,3-fucosyltransferase, mFuc-TIX, that synthesizes the Lewis x (CD15) epitope in brain and kidney. *J. Biol. Chem.*, 273, 26729-26738, 1998.
5. Nishihara, S., Hiraga, T., Ikehara, Y., Iwasaki,

H., Kudo, T., Yazawa, S., Morozumi, K., Suda, Y. and Narimatsu, H.: Molecular behavior of mutant Lewis enzymes in vivo. *Glycobiology*, 9, 373-382, 1999.

6. Nishihara, S., Hiraga, T., Ikehara, Y., Kudo, T., Iwasaki, H., Morozumi, K., Tachikawa, T. and Narimatsu, H.: Molecular mechanisms of expression of Lewis b antigen and other type I Lewis antigens in human colorectal cancer. *Glycobiology*, in press, 1999.

7. Issiki, S., Togayachi, A., Kudo, T., Nishihara, S., Watanabe, M., Kubota, T., Kitajima, M., Shiraishi, N., Sasaki, K., Andoh, T. and Narimatsu, H.: Cloning, expression and characterization of a novel UDP-galactose:β-N-acetylglucosamine β 1,3-galactosyltransferase (β3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom. *J. Biol. Chem.*, in press, 1999.

2. 学会発表

1. Hisashi Narimatsu; "Molecular analysis of glycosyltransferases responsible for cancer-associated carbohydrate antigens" 2nd French-Japanese Glycotechnology Meeting, at Villeneuve d'Ascq, France, March, 1998.
2. Hisashi Narimatsu; "Molecular analysis of Lewis antigen expression on erythrocytes and in other various tissues" 6th Indo Pacific Congress on Legal Medicine and Forensic Sciences, at Kobe, July, 1998.
3. Nishihara, S., Hiraga, T., Ikehara, Y., Kudo, T., Nakamori, S., Morozumi, K., Narimatsu, H.: "Quantitative analysis of sialylated Lewis antigen and glycosyltransferase gene expression of pancreatic cancer", 8th Meeting of the international association of pancreatology. at Tokyo, July, 1998.
4. 成松 久、西原祥子、工藤 崇、池原 譲、中森正二、諸角強英、渡邊昌彦、北島政樹；「癌関連糖鎖抗原を生合成する糖転移酵素の同定」、第7回がん転移研究会シンポジウム、札幌、1998年7月
5. 西原祥子、工藤 崇、池原譲、成松 久；「癌関連糖鎖抗原とそれを合成する糖転移酵素」、第71回日本生化学会大会シンポジウム、名古屋、1998年10月

その他、多数。

G. 知的所有権の取得状況

特になし。