

平成 11 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

昨年度に引き続き、本研究において主任研究者並びに分担研究者らは以下の諸点を明らかにした：(1) 酸性糖脂質ガングリオシド合成系のキーエンザイムであるヒト GM3 合成シアル酸転移酵素の遺伝子のゲノム構造解析を行った。ゲノム全長を含むゲノミッククローンを単離し、エクソン・イントロン構造の解明と転写開始点の決定を行い、FISH 法により当該遺伝子の染色体上の位置 (2p11.1) を確認した。マウスの当該遺伝子の染色体上の位置は 6C であった。シス領域 (5' 上流域) の特定を行い、プロモーター活性の評価を開始した。マウスでは 5'-RACE 法で最上流エクソンのみが異なる 3 種類の転写物 (L 型、B1 型、B2 型) が明らかになり、ノーザンブロット解析で組織及び種特異性の mRNA 発現が明らかになった。ラット及びサル GM3 合成酵素 cDNA をクローニングしヒト及びマウス遺伝子と比較検討したところ、アミノ酸置換 (アスパラギン酸がヒスチジンに置換) の重要な意味が内包されていることが示唆された。発現酵素は II 型膜酵素糖蛋白質であると推定され、C 末端を Myc-tag 標識した Construct で Western blot 解析し、GST 融合酵素蛋白及び MBP 融合酵素蛋白として、可溶化型酵素を大腸菌に発現させる vector の構築に部分的に成功した。生物活性においてガングリオシド GM3 と対照的な側面をもつネオラクト系ガングリオシドの生合成経路のキーエンザイム、N-アセチルグルコサミン転移酵素のヒト cDNA クローニングを開始した。(2) ガングリオシド GM2/GD2 合成酵素遺伝子および GD3 合成酵素遺伝子のノックアウトマウスを作成し、その神経組織の異常を検討した。前者では加齢に伴って神経変性と知覚異常を認めた。また、舌下神経切断後のニューロン死と再生においては、複合型ガングリオシドを欠くノックアウトマウスで著しい悪化を認めた。酸性糖脂質の糖鎖合成に働く糖転移酵素遺伝子を更に 4 種クローニングし、その発現と基質特異性など遺伝子産物の機能を解析した。ヒトメラノーマ、肺癌などの細胞株における糖鎖遺伝子の操作に基づく糖鎖リモデリングを行い、GD3 あるいは GD2 の細胞増殖における重要性を明らかにした。更に抗ガングリオシド抗体による治療の可能性につき検討した。また、メラノーマにおける GD3 合成酵素の特異的発現機構につき解析を行い、転写開始点の同定とメラノーマ特異的調節部位の同定を行った。(3) 昨年度クローニングした新規の Fuc-TIX は、その発現分布は、主に脳、腎臓であり、他にも胃、子宮、末梢白血球で発現していた。今年度はまずヒトおよびマウスにおける Fuc-TIX 遺伝子のゲノム構造と染色体位置を決定した。ヒトでは 6 番染色体長腕の 6q16 に存在しマウスではそれに相当する 4 番染色体に位置した。6 種類存在するヒト α 1,3 フコース転移酵素 (α 1,3Fuc-T) の基質特異性を詳細に解析したところ、Fuc-TIX は既知の 5 種類の酵素に比べて、ポリラクトサミン鎖の非還元末端に Fuc を転移する活性 (すなわち Le^x 合成活性) が圧倒的に強いことがわかった。Fuc-TIX のノックアウトマウスを作成した。Fuc-TIX-KO マウスは致死的ではなく、外見上、正常に発生してきた。神経系、胃、腎臓における Le^x エピトープは完全に消失したことより、Fuc-TIX が真の Le^x 合成酵素であることを証明した。Fuc-TIX-KO マウスの病理的解析、および各組織の機能解析については現在進行中である。昨年度、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 を合成する β 1,3-ガラクトース転移酵素 (β 3Gal-T) をクローニングし、 β 3Gal-T5 と命名した。今年度は、 β 3Gal-T5 のゲノムをクローニングし、その上流域の転写調節機構を解析した。 β 3Gal-T5 は、近位大腸より遠位大腸に発現量が多く、癌化によってその発現量は激減した。また大腸癌の肝転移巣においてはさらに減少した。その発現制御は、消化管発生のホメオボックス遺伝子として知られる CDX 遺伝子によって調節を受けていることが判明した。また本年度、新規の糖転移酵素遺伝子を 2 種類クローニングし、その酵素学的特徴を解析し報告した。そのうち、ST6GalNAc I (sTn 合成酵素) は胃癌、乳癌患者の予後と深く関連した癌抗原 sTn を合成する酵素である。

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

A. 研究目的

糖鎖遺伝子、とくに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。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、染色体上の局在並びに遺伝子発現制御（とくに転写調節）機構の解析、糖鎖複合体産物の機能解析を行う。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、生体内機能、とくに血液・免疫系や神経系などにおける表現型の変異とメカニズム、細胞増殖・分化シグナルの糖鎖による制御機構を解明すると共に、様々な「がん」の増殖・進展、血液リンパ系疾患、神経疾患、皮膚・アレルギー疾患など、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、特異的プロモーターを利用した遺伝子治療・診断へ向けた応用開拓を行う。

B. 研究方法

(1) 酸性糖脂質ガングリオシド合成系のキーエンザイムであるヒト GM3 合成シアル酸転移酵素の遺伝子のゲノム構造解析を行った。ヒト染色体 DNA の BAC ライブラリーをスクリーニングすることによって、ゲノム全長を含むゲノミッククローンを単離し、さらにエクソン・イントロン構造の解明と転写開始点の決定を行い、FISH 法により当該遺伝子の染色体上の位置を確認した。塩基配列情報をもとにシス領域（とくに 5' 上流域）の特定を行い、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼの発現を指標として転写活性を測定、個々のシスエレメントの有効性（プロモーター活性）の評価を開始した。種々の組織由来の抽出液を右傾反応系に供することで、組織特異的シス領域を同定する計画である。マウスでは 5'-RACE 法で最上流エクソンのみが異なる 3 種類の転写物を明らかにし、ノーザンブロット解析で組織及び種特異性を解析した。マウス最上流エクソンを含む 5' 端側ゲノム領域の構造解析を行い、ラット及びサル

GM3 合成酵素 cDNA をクローニングしヒト及びマウス遺伝子と比較検討した。発現酵素は II 型膜酵素糖蛋白質であると推定され、C 末端を Myc-tag 標識した Construct で Western blot 解析した。N 結合型糖鎖結合可能部位に突然変異を入れ、野生型と糖鎖欠損型酵素の酵素活性・動態を比較し、シアリルモチーフ L 中の特異的な His177 残基の変異体を作製し、酵素活性・動態を比較した。糖鎖自動合成器作製への応用、酵素蛋白の立体構造解析並びに特異的抗体作成のため、GM3 合成酵素並びに GD3 合成酵素について、GST 融合酵素蛋白及び MBP 融合酵素蛋白を、可溶化型酵素として大腸菌に発現させる vector の構築を行った。ガングリオシドの包括的生物機能解析のため GM3 合成酵素欠損マウス作出のためのターゲティングベクターの構築を行い、ES 細胞への導入を開始した。ヒト遺伝子ノックアウト体細胞作成のため、GM3 合成酵素ゲノム DNA から positive and negative selection vector 及び promoter less vector を作成、数種類の付着性及び浮遊性ががん細胞株に導入しホモ相同組み換えを起こした細胞のクローニングを開始した。生物活性においてもガングリオシド GM3 と対照的な側面をもつネオラクト系ガングリオシドの生合成経路のキーエンザイム、N-アセチルグルコサミン転移酵素 (GDP-GlcNAc:Lactosylceramide GlcNAc-transferase, アミノトリアオシルセラミド合成酵素) のヒト cDNA クローニングを開始した。

(2) GM2/GD2 合成酵素、GD3 合成酵素遺伝子のノックアウトマウスにつき、その神経系の病理学的変化を経時的に検討した。また、舌下神経切断モデルを用いて神経再生とニューロン死抑制作用につき解析した。メラノーマ細胞における GD3 発現を、GD3 合成酵素遺伝子のアンチセンス cDNA 導入により抑制した。また肺癌細胞における GD2 発現を GM2/GD2 合成酵素遺伝子の導入に基づいてリモデリングし、それらの役割を明らかにした。新たな酸性糖脂質合成酵素遺伝子を、発現クローニング、あるいは類似性に基づく PCR クローニング等により単離し、その基質特異性や発現パターンの解析を行った。メラノーマにおける GD3 合成酵素遺伝子の特異的発現調節のメカニズムを明らかにするため、段階的欠損クローンをを用いたルシフェラーゼアッセイによりプロモーター領域を同定した。

(3) ケラタン硫酸より調整したポリラクタミン鎖の還元末端を蛍光ラベルして、アクセプター基質とし、各酵素は、動物由来培養細胞、或いはバキュロウイルス・ベクターにより発現して、リコンビナント酵素とし、基質特異性の解析を行っ

た。また Fuc-TIX を含む 6 種類の $\alpha 1,3$ Fuc-T, $\beta 3$ Gal-T5 を含む 5 種類の $\beta 3$ Gal-T の基質特異性を解析した。Fuc-TIX-KO マウスはクローニングしたゲノムを元に、定法通り作成した。 $\beta 3$ Gal-T5 のゲノムをクローニングし、上流域をルシフェラーゼ遺伝子と組み替え、定法通り、プロモーター活性を測定した。CDX 遺伝子をクローニングしこれを $\beta 3$ Gal-T5 転写活性測定の実験に用いた。

C. 研究結果

(1) 酸性糖脂質ガングリオシド合成系のキーエンザイムであるヒト GM3 合成シアル酸転移酵素について、ヒト染色体 DNA の BAC ライブラリーをスクリーニングすることによって、ゲノム全長を含むゲノミッククローンを単離し、さらにエクソン・イントロン構造の解明と転写開始点の決定を行い、FISH 法により当該遺伝子の染色体上の位置 (2p11.1) を確認した。マウスの当該遺伝子の染色体上の位置は 6C であった。塩基配列情報をもとにシス領域 (とくに 5' 上流域) の特定を行い、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼの発現を指標として転写活性を測定、個々のシスエレメントの有効性 (プロモーター活性) の評価を開始した。マウスでは 5'-RACE 法で最上流エクソンのみが異なる 3 種類の転写物 (L 型、B1 型、B2 型) が明らかになり、ノーザンブロット解析で組織及び種特異性の mRNA 発現が明らかになった。5' 端側ゲノム領域の構造解析で、5' 端より B1、B2、L の順に、それぞれをコードする領域が並列していることが判明した。ラット及びサル GM3 合成酵素の単離ホモログにもヒト及びマウスで見られたアミノ酸置換 (アスパラギン酸がヒスチジンに置換) が確認され、哺乳類でこのアミノ酸置換の重要な意味が内包されていることが示唆された。発現酵素は II 型膜酵素蛋白で、ペプチド部が 41.2-41.7kDa の糖蛋白質であると推定され、C 末端を Myc-tag 標識した Construct で Western blot 解析した。N 結合型糖鎖結合可能部位に突然変異を入れ、野生型と糖鎖欠損型酵素の酵素活性・動態を比較し、シアリルモチーフ L 中の特異的な His177 残基の変異体を作製し、酵素活性・動態を比較したが、明確な結論に至っていない。糖鎖自動合成器作製への応用、酵素蛋白の立体構造解析並びに特異的抗体作成のため、GM3 合成酵素並びに GD3 合成酵素について、GST 融合酵素蛋白及び MBP 融合酵素蛋白を、可溶化型酵素として大腸菌に発現させる vector の構築に部分的に成功した。ガングリオシドの包括的生物機能解析のため GM3 合成酵素欠損マウス作出のためのターゲティングベクターの構築を行い、ES

細胞への導入を開始した。ヒト遺伝子ノックアウト体細胞作成のため、GM3 合成酵素ゲノム DNA から positive and negative selection vector 及び promoter less vector を作成、数種類の付着性及び浮遊性がん細胞株に導入しホモ相同組み換えを起こした細胞のクローニングを開始した。悪性度の高いメラノーマ 12 日本人症例から 4 症例の細胞株化に成功した。コーカシアン系のメラノーマ細胞株を含め 5 株の培養細胞に、GD3 合成酵素 cDNA を組み込んだ sense 及び antisense vector を導入し、変異株を複数分離した。antisense vector 導入株の一部に、GD3 産生能低下と増殖能低下を認めた。一方、予後の不良の膀胱がん (浸潤性) にはガングリオシド GM3 が殆ど発現していないが、予後良好の膀胱がん (表在性) では強力に発現している事実を GM3 合成酵素遺伝子発現レベルで検索している。生物活性においてもガングリオシド GM3 と対照的な側面をもつネオラクト系ガングリオシドの生合成経路のキーエンザイム、N-アセチルグルコサミン転移酵素 (GDP- GlcNAc:Lactosylceramide GlcNAc-transferase, アミノトリアオシルセラミド合成酵素) のヒト cDNA クローニングを開始した。(2) 複合型ガングリオシドを欠く GM2/GD2 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスでは坐骨神経、後根神経節、脊髄後角に顕著な変性を認めた。またアストログリアの増生と突起の肥大化が認められた。舌下神経切断後の神経再生度が著しく低下していた。GD3 合成酵素遺伝子のノックアウトマウスでは野生型の 60% 程度に低下した。GD3 発現を抑制されたメラノーマ株 MeWo では増殖速度の低下が見られたが、肺小細胞癌の多くでは GD2 の発現を認め、抗 GD2 抗体を加えると増殖抑制が認められた。この時に、細胞死が誘導されることが判明し、現在そのメカニズムを検討中である。新規糖転移酵素遺伝子として、GM3 合成酵素、シアリルパラグロシド合成酵素遺伝子などのシアル酸転移酵素に加えて、GD1 α 合成酵素、GD1 α /GT1a α /GQ1b α 合成酵素など α シリーズガングリオシドのマウス合成酵素遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子のヒト組織における発現を現在検討中である。GD3 合成酵素遺伝子の転写開始点を、キャップ cDNA 法により同定し、以前に 5'RACE により同定した部位とほぼ同様であることを確認した。その上流 480~790bp にメラノーマに特異的なプロモーター領域を同定したがその活性はエンハンサー付きルシフェラーゼベクターで検出可能であった。現在ゲルシフト法により結合タンパクの存在を確認中である。(3) Fuc-TIX は、既知の 5 種類の $\alpha 1,3$ Fuc-T とはきわめて

異なった基質特異性を発揮することが判明した。ポリラクトサミン鎖の非還元末端に非常に効率よく Fuc を転移した。一方、既知の 5 種類の酵素は、非還元末端よりむしろ還元末端の GlcNAc に Fuc を転移した。このことは、Fuc-TIX が *in vivo* における真の Le^x 合成酵素であることを示唆した。胃癌における Fuc-TIX 発現量を調べたところ、すべての症例の胃癌組織において、正常部分と比べて Fuc-TIX の発現量は激減していた。Fuc-TIX はシアリルルイス X (sLe^x) の合成活性はなく、むしろ sLe^x 合成に拮抗することより、癌化による sLe^x 抗原の発現量増大の一つの要因として、Fuc-TIX 発現量の減少が考えられた。作成した Fuc-TIX-KO マウスは外見上何の変化もなく生まれてきた。初期胚を SSEA-1 で染色したところ、-/- の初期胚は SSEA-1 を消失していた。1980 年頃より提唱されてきた「SSEA-1 抗原はマウス初期胚の発生にとり必須である」という仮説は誤りであることを証明した。発生時の神経、成人マウスの胃粘膜、腎臓からは、Le^x (SSEA-1) 抗原は消失した。*in vivo* における Le^x 合成酵素が、Fuc-TIX であることが証明できた。Le^x の発現している組織の機能を -/- マウスを用いて現在、解析中である。また病的にもきわめて興味深い所見を呈している。β3Gal-T5 のプロモーター領域を同定することができた。この領域に、CDX の結合するコンセンサス配列を見出した。その配列に点変異を入れることにより、プロモーター活性は消失した。現在、さらに解析を遂行中である。

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) 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はほぼ出揃ったが、ラクト系、ネオラクト系のガングリオシド生合成酵素遺伝子に関しては未知の部分が多い。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るが、今後はこれらの結果を踏まえた上で、様々な生物活性をもつ酸性糖脂質ガングリオシドの生合成とその機能の総合的理解が長足に進む事が期待される。更に、適当な宿主細胞を用いれば欲しいガングリオシド分子種が取得できるようになる可能性があり、また糖鎖の自動合成器作製の可能性が視野に入ってきた。(2) 複合型ガングリオシド群が神経系の組織維持と再生に重要であることが示され、b 系列ガングリオシドを欠損する GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスでは再生能の低下が軽度であったことより、神経再生にとって

は a 系列ガングリオシドの方がより重要であることが示唆された。これらの結果は、ラットにおける外来性ガングリオシド添加の実験では GT1b/GD1b などが最も高い効果を示したことと一致しないものであった。メラノーマにおける GD3 の役割は、抗体による増殖抑制により示唆されてきたが、発現を抑制してもやはり増殖が抑えられることにより再確認された。肺小細胞癌では GD2 が特徴的に発現しており、抗 GD2 抗体で明瞭な増殖抑制が示された。従って、GD2 が増殖シグナルを亢進させていることが示唆された。現在、GD2 に結合するシグナル分子の同定を試みている。GD3 合成酵素遺伝子のプロモーター領域には c-myb、CREB、GATA-1 などの結合モチーフが存在したが、実際には活性が認められず、その下流に活性部位に確認された。未知の転写因子の作用部位の存在が示唆され、現在同定を試みている。

(3) 従来より、Fuc-TIV が Le^x 合成酵素であると考えられてきた。培養細胞へのトランスフェクションにより、Fuc-TIV は確かに Le^x を合成する。しかし、培養細胞の系は常に過剰発現であり、生理的な発現量よりは圧倒的に多い量である。実際に、*in vivo* で発現している生理的な量で Le^x を合成できるのは、Fuc-TIX のみであることがわかった。その理由は、基質特異性の違いで説明できた。Fuc-TIX-KO マウスの解析により、Le^x 抗原の機能解析が進んでいる。CA19-9 抗原の合成を担う β3Gal-T5 が、腸管発生のホメオボックス遺伝子である CDX 遺伝子により制御されていることはきわめて興味深い知見である。2 型糖鎖 (Galβ1,4GlcNAc) 構造は、生体のあらゆる組織に存在するが、1 型構造 (Galβ1,3GlcNAc) は腸管組織に局限している。この糖鎖構造は腸管発生にとり重要な機能を果たしているかも知れない。β3Gal-T5 を欠損するノックアウトマウスの作成を計画している。

E. 結論

(1) 中性の骨格スフィンゴ糖脂質ラクトシルセラミドが最初にシアリル化を受けて生じる「ガングリオシド代謝」の基点物質であり、様々な生物機能を有する「ガングリオシド GM3」を最終的に合成するシアリル転移酵素について、その遺伝子ゲノム構造をヒト及びマウスで、ほぼ解明し、その発現制御機構を解析している。この II 型膜糖蛋白酵素を、未だ産生効率は高くないが、選別した発現ベクターをある種の大腸菌コンピテント細胞に導入することによって、融合タンパク質として可溶性活性酵素に変換・産生することに成功し、その特異的抗体の産生にも成功しつつある。また

この糖鎖合成酵素の欠損マウス産生のためのベクター構築にもほぼ成功したので、それ程遠くない時期に、ガングリオシド GM3 並びにその合成酵素の生物機能が遺伝子レベルで明らかになり、その発現を調節することによって、細胞の悪性化をはじめとする病的状態を制御できる可能性が期待できる。(2) 複合型ガングリオシド、特に α 系列ガングリオシド糖鎖の神経維持と再生における重要性が示された。またメラノーマや肺癌において GD3 や GD2 が増殖亢進に働いており、それらを標的とする治療法の開発の可能性が示唆された。

(3) Fuc-TIX は、既知の酵素とはきわめて特異性を異にする酵素であり、 Le^x を合成する。初期胚、神経、胃、腎臓、白血球における Le^x 合成を担っている。 Le^x の生体機能は Fuc-TIX-KO マウスが教えてくれるであろう。 β 3Gal-T5 は、CDX により転写調節されており、腸管発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。CA19-9 合成酵素である β 3Gal-T5 は、癌抗原合成酵素というよりはむしろ腸管の分化マーカーであることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ikeda M, Nozaki A, Sugiyama K, Tanaka T, Naganuma A, Tanaka K, Sekihara H, Shimotohno K, Saito M, Kato N.: Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Res.*, 66: 51-63, 2000.
- Ishii A., Makino, K., Nakamura, C., Matsuda, K., Ohta, M. and Saito M.: Molecular characterization of ganglioside GM3 synthetic sialyltransferase-1 (CMP-NeuAc:Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer α 2,3-sialyltransferase): Its expression characteristics and genomic structure in humans and mice. *Eur.J.Biochem.*, in press.
- Nakamoto, T., Yamagata, T., Sakai, R., Ogawa, S., Honda, H., Ueno, H., Hirano, N., Yazaki, Y. and Hirai, H.: CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases. *Mol.Cell.Biol.*, 20: 1649-1658, 2000.
- 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, 2000.
- Honda, H., Nakamoto, T., Sakai, R. and Hirai, H. p130Cas, an assembling molecule of actin filaments, promotes cell movement, cell migration, and cell spreading in fibroblasts. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 262: 25-30, 1999.
- Nishida, Y., Takamori, Y., Ohru, H., Ishizuka, I, Matsuda, K. and Kobayashi, K. Synthesis and absolute configuration of a novel aminoglyco-glycerolipid, species-specific major immunodeterminant of *Mycoplasma fermentans*. *Tetrahedron Lett.*, 40: 2371-2374, 1999.
- 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.* 274, 9271-9276, 1999.
- 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.*, 274, 11479-11486, 1999.
- Ito, M., Fukumoto, S., Kuga, Y., Mizuno, A. and Furukawa, K.: Prevention of the death of the rat axotomized hypoglossal nerve and promotion of its regeneration by bovine brain gangliosides. *Glycobiology* 9, 1247-1252, 1999
- Fukumoto, S., Mutoh, T., Hasegawa, T., Miyazaki, H., Okada, M., Goto, G., Furukawa, K., Urano, T. and Furukawa, K.: GD3 synthase gene expression in PC12 cells results in the continuous activation of TrkA and ERK1/2 and enhanced proliferation. *J. Biol. Chem.*, 2000, in press.
- Zhao, J., Furukawa, K., Fukumoto, S., Okada, M., Miyazaki, H., Shiku, H., Aizawa, S., Matsuyama, M. and Furukawa, K.: Attenuation of the interleukin 2 signals in complex ganglioside-lacking mice. *J. Biol. Chem.*, 274, 13744-13747, 1999.
- 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.
- 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*, 9, 607-616 1999.

14. Isshiki, S., Togayachi, A., Kudo, T., Nishihara, S., Watanabe, M., Kubota, T., Kitajima, M., Shirashi, N., Sasaki, K., Andoh, T. and Narimatsu, H.: Cloning, expression and characterization of a novel UDP-galactose:β-N-acetylglucosamine β1,3-galactosyltransferase (β3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom. *J. Biol. Chem.*, 274, 12499-12507, 1999.

15. Kaneko, M., Kudo, T., Iwasaki, H., Ikehara, Y., Nishihara, S., Nakagawa, S., Sasaki, K., Shiina, T., Inoko, H., Saitou, N. and Narimatsu, H.: α1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; Molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. *FEBS Lett*, 452 (3), 237 - 242 1999.

2.学会発表

1. Masaki Saito, Chikami Nakamura, Keiko Ishiyama, Yuichiro Hamanaka, Kazuhiro Matsuda, and Atsushi Ishii: Molecular characterization of ganglioside GM3 synthase (CMP-NeuAc:Galβ1-4Glcβ1-1 ⇨ Cer α2,3-sialyltransferase) from mammalians. Gordon Research Conference on Glycobiology, February 21-26, 1999, Habortown, Ventura, California.

2. 中村親民、石井睦、石山敬子、星淡子、濱中裕一郎、松田和洋、齋藤政樹: Characteristic features of mammalian GM3 synthases. XVth International Symposium on Glycoconjugates. 1999, 8.22~27, 東京.

3. 石山敬子、石井睦、中村親民、濱中裕一郎、松田和洋、齋藤政樹: Genomic structure of GM3 synthase gene from human and mouse. XVth International Symposium on Glycoconjugates. 1999, 8.22~27, 東京.

4. 野崎昭人、池田正徳、杉山和夫、長沼篤、田中寅彦、齋藤政樹、加藤宣之: ラクトフェリンによるC型肝炎ウイルスの感染防御機構. 第58回日本癌学会. H11, 9.29~10.1, 広島.

5. 長沼篤、田中寅彦、杉山和夫、野崎昭人、下遠野邦忠、齋藤政樹、加藤宣之: C型肝炎ウイルス感染ヒト培養細胞由来のコア及びNS5A蛋白質の

構造と機能解析. 第58回日本癌学会, H11, 9.29~10.1, 広島.

6. 田中寅彦、杉山和夫、長沼篤、野崎昭人、齋藤政樹、加藤宣之: 培養系から分離したHCV遺伝子のNS5B産物. 第58回日本癌学会, H11, 9.29~10.1, 広島.

7. 石山敬子、石井睦、中村親民、濱中裕一郎、松田和洋、齋藤政樹: ヒト及びマウスGM3合成酵素ゲノム遺伝子の単離. 第58回日本癌学会, H11, 9.29~10.1, 広島.

8. 中村親民、石井睦、濱中裕一郎、松田和洋、齋藤政樹: ラットGM3合成酵素の遺伝子生化学的解析. 第58回日本癌学会, H11, 9.29~10.1, 広島.

9. 松田和洋、市野瀬志津子、井ノ口仁一、石井睦、齋藤政樹: GM3- およびGD3合成酵素の恒常発現によるマウス肺癌細胞の形態変化. 第58回日本癌学会, H11, 9.29~10.1, 広島.

10. 野崎昭人、池田正徳、杉山和夫、長沼篤、田中寅彦、齋藤政樹、加藤宣之: ラクトフェリンによるHCV感染防御機構の解析. 第47回ウイルス学会, H11, 11.7~11.9, 横浜.

11. 長沼篤、田中寅彦、杉山和夫、野崎昭人、下遠野邦忠、齋藤政樹、加藤宣之: C型肝炎ウイルス感染ヒト培養細胞由来のウイルス蛋白質の構造及び機能解析. 第47回ウイルス学会, H11, 11.7~11.9, 横浜.

12. 堺 隆一、齋藤政樹、Jeffery T. Henderson, Tony Pawson: 脳特異的アダプター分子ShcB, ShcCのノックアウトマウスの解析. 第22回日本分子生物学会, H11, 12.7~10, 福岡.

13. Atsushi Ishii, Takako Ishiyama, Chikami Nakamura, Yuichiro Hamanaka, Kazuhiro Matsuda, Masaki Saito: Genomic Structure of Mammalian GM3 Synthases. *New Frontier of Glyco- and Lipid-Biology Toward the Twenty-First Century*. H11, 8.28~30, 徳島.

14. 齋藤政樹: ヒト骨髄性白血病細胞の分化誘導に關与するガングリオシドGM3合成酵素の分子クローニングとその生物機能. 第25回日本医学学会総会, シンポジウムS-52糖鎖生物学. 東京, 平成11年4月2-4日

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GM2/GD2合成酵素遺伝子およびGD3合成酵素遺伝子のノックアウトマウスを作成し、その神経組織の異常を検討した。前者では加齢に伴って神経変性と知覚異常を認めた。また、舌下神経切断後のニューロン死と再生においては、複合型ガングリオシドを欠くノックアウトマウスで著しい悪化を認めた。酸性糖脂質の糖鎖合成に働く糖転移酵素遺伝子を更に4種クローニングし、その発現と基質特異性など遺伝子産物の機能を解析した。ヒトメラノーマ、肺癌などの細胞株における糖鎖遺伝子の操作に基づく糖鎖リモデリングを行い、GD3あるいはGD2の細胞増殖における重要性を明らかにした。更に抗ガングリオシド抗体による治療の可能性につき検討した。また、メラノーマにおけるGD3合成酵素の特異的発現機構につき解析を行い、転写開始点の同定とメラノーマ特異的調節部位の同定を行った。

A. 研究目的

1. 酸性糖脂質ガングリオシドの神経系における生体内機能を解明するために、その合成酵素遺伝子欠損マウスを作成し、それらの表現型の変異とメカニズムを解明する。

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を、糖鎖遺伝子の操作により明らかにする。その知見に基づき新たな癌の治療法の開発を試みる。

3. 酸性糖脂質のがん特異的発現機構を明らかにするため、糖鎖合成酵素遺伝子のゲノム構造を明らかにし、その遺伝子発現調節機構を解明する。また、癌特異的プロモーターを利用した癌の遺伝子治療の開発を試みる。

B. 研究方法

1. GM2/GD2合成酵素、GD3合成酵素遺伝子のノックアウトマウスにつき、その神経系の病理学的変化を経時的に検討した。また、舌下神経切断モデルを用いて神経再生とニューロン死抑制作用につき解析した。

2. メラノーマ細胞におけるGD3発現を、GD3合成酵素遺伝子のアンチセンスcDNA導入により抑制した。また肺癌細胞におけるGD2発現をGM2/GD2合成酵素遺伝子の導入に基づいてリモデリングし、それらの役割を明らかにした。

3. 新たな酸性糖脂質合成酵素遺伝子を、発現クローニング、あるいは類似性に基づくPCRクローニング等により単離し、その基質特異性や発現パターンの解析を行った。

4. メラノーマにおけるGD合成酵素遺伝子の特異的発現調節のメカニズムを明らかにするため、段階的欠損クローンをを用いたルシフェラー

ゼアッセイによりプロモーター領域を同定した。

C. 研究結果

複合型ガングリオシドを欠くGM2/GD2合成酵素遺伝子ノックアウトマウスでは坐骨神経、後根神経節、脊髄後角に顕著な変性を認めた。またアストログリアの増生と突起の肥大化が認められた。舌下神経切断後の神経再生度が著しく低下していた。GD3合成酵素遺伝子のノックアウトマウスでは野生型の60%程度に低下した。

GD3発現を抑制されたメラノーマ株MeWoでは増殖速度の低下が見られたが、肺小細胞癌の多くではGD2の発現を認め、抗GD2抗体を加えると増殖抑制が認められた。この時に、細胞死が誘導されることが判明し、現在そのメカニズムを検討中である。

新規糖転移酵素遺伝子として、GM3合成酵素、シアリルパラグロポシド合成酵素遺伝子などのシアリル糖転移酵素に加えて、GD1 α 合成酵素、GD1 α /GT1a α /GQ1b α 合成酵素など α シリーズガングリオシドのマウス合成酵素遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子のヒト組織における発現を現在検討中である。

GD3合成酵素遺伝子の転写開始点を、キャップcDNA法により同定し、以前に5'RACEにより同定した部位とほぼ同様であることを確認した。その上流480~790bpにメラノーマに特異的なプロモーター領域を同定したがその活性はエンハンサー付きルシフェラーゼベクターで検出可能であった。現在ゲルシフト法により結合タンパクの存在を確認中である。

D. 考察

複合型ガングリオシド群が神経系の組織維持と再生に重要であることが示され、b系列ガングリオシドを欠損するGD3合成酵素遺伝子ノックアウトマウスでは再生能の低下が軽度であったことより、神経再生にとってはa系列ガングリオシドの方がより重要であることが示唆された。これらの結果は、ラットにおける外来性ガングリオシド添加の実験ではGT1b/GD1bなどが最も高い効果を示したと一致しないものであった。

メラノーマにおけるGD3の役割は、抗体による増殖抑制により示唆されてきたが、発現を抑制してもやはり増殖が抑えられることにより再確認された。肺小細胞癌ではGD2が特徴的に発現しており、抗GD2抗体で明瞭な増殖抑制が示された。従って、GD2が増殖シグナルを亢進させていることが示唆された。現在、GD2に結合するシグナル分子の同定を試みている。

GD3合成酵素遺伝子のプロモーター領域にはc-myc、CREB、GATA-1などの結合モチーフが存在したが、実際には活性が認められず、その下流に活性部位に確認された。未知の転写因子の作用部位の存在が示唆され、現在同定を試みている。

E. 結論

複合型ガングリオシド、特にa系列ガングリオシド糖鎖の神経維持と再生における重要性が示された。またメラノーマや肺癌においてGD3やGD2が増殖亢進に働いており、それらを標的とする治療法の開発の可能性が示唆された。

F. 研究発表

① 論文発表

1. 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.* 274, 9271-9276, 1999

2. 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.* 274, 11479-11486, 1999

3. Ito, M., Fukumoto, S., Kuga, Y., Mizuno, A. and Furukawa, K.: Prevention of the death of the rat axotomized hypoglossal nerve and promotion of its

regeneration by bovine brain gangliosides. *Glycobiology* 9, 1247-1252, 1999

4. Kitamura, M., Takamiya, K., Aizawa, S., Furukawa, K., and Furukawa, K.: Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1441, 1-3, 1999

5. Fukumoto, S., Mutoh, T., Hasegawa, T., Miyazaki, H., Okada, M., Goto, G., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K.: GD3 synthase gene expression in PC12 cells results in the continuous activation of TrkA and ERK1/2 and enhanced proliferation. *J. Biol. Chem.* 2000 in press

6. Zhao, J., Furukawa, K., Fukumoto, S., Okada, M., Miyazaki, H., Shiku, H., Aizawa, S., Matsuyama, M., and Furukawa, K.: Attenuation of the interleukin 2 signals in complex ganglioside-lacking mice. *J. Biol. Chem.* 274, 13744-13747, 1999

7. Saito M, Yamaguchi A, Goi T, Tsuchiyama T, Nakagawara G, Urano T, Shiku H, Furukawa, K.: Expression of DCC protein in colorectal tumors and its relationship to tumor progression and metastasis. *Oncology* 56, 134-141, 1999

8. Okajima, T., Yoshida, K., Kondo, T., and Furukawa, K.: Human homolog of *Caenorhabditis elegans sqv-3* gene is galactosyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 274, 22915-22918, 1999

9. Okajima, T., Fukumoto, S., Ito, H., Kiso, M., Hirabayashi, Y., Urano, T., Furukawa, K., Furukawa, K.: Molecular cloning of brain-specific GD1 α synthase (ST6GalNAc V) containing CAG/glutamine repeats. *J. Biol. Chem.* 274, 30557-30562, 1999

10. Okajima, T., Fukumoto, S., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K.: Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome: Identification and characterization of two mutations in galactosyltransferase I gene. *J. Biol. Chem.* 274, 28841-28844, 1999

11. Okajima, T., Chen, H.-H., Ito, H., Kiso, M., Tai, T., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K.: Molecular cloning and expression of mouse GD1 α /GT1 α /GQ1b α synthase (ST6GalNAc VI) gene. *J. Biol. Chem.* 2000 in press

12. Hyuga, S., Yamagata, S., Takatsu, Y., Hyuga, M., Nakanishi, H., Furukawa, K., Yamagata, T.: Suppression by ganglioside GD1a of migration capability, adhesion to vitronectin and metastatic potential of highly metastatic FBJ-LL cells. *Int. J. Cancer* 83, 685-691, 1999

13. Kojima, Y., Fukumoto, S., Furukawa, K., Tetsuya, O., Wiels, J., Yokoyama, K., Suzuki, Y., Ohta, M., and Furukawa, K.: Molecular cloning of Gb3/CD77 synthase, a glycosyltransferase that initiate the synthesis of globo-series glycosphingolipids. *J. Biol. Chem.* 2000 in press

14. Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Okajima, T., and Furukawa, K.: Assignment of human xylosylprotein β -1,4-galactosyltransferase gene (B4GALT7) to human chromosome 5q35.2/Eq35.3 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 2000 in press

② 学会発表

1. 古川鋼一、伊藤道一郎、福本敏、岡島徹也、岡田雅彦、高宮孝悟、古川圭子：酸性スフィンゴ糖脂質による細胞増殖・分化と生存の制御、第72回日本生化学大会、1999、10、横浜
2. 小島啓尚、福本敏、古川圭子、岡島徹也、鈴木康夫、古川鋼一：ヒトCD77合成酵素(α 1,4-ガラクトース転移酵素)遺伝子の発現クローニングとその解析、第72回日本生化学大会、1999、10、横浜
3. 岡島徹也、福本敏、平林義雄、木曾真、陳鶴祥、光田輝彦、沼田真一郎、古川圭子、浦野健、古川鋼一：脳特異的に発現するマウスGD1 α 合成酵素遺伝子のクローニング、第72回日本生化学大会、1999、10、横浜
4. 井上雅博、中嶋須美子、福本敏、岡島徹也、光田輝彦、奥村健二、古川圭子、浦野健、古川鋼一：メラノーマ細胞増殖におけるガングリオシドGD3の役割：アンチセンスcDNAによる検討、第72回日本生化学大会、1999、10、横浜
5. 光田輝彦、福本敏、岡島徹也、古川圭子、沼田真一郎、浦野健、古川鋼一：GM1高発現はPDGF刺激によるSwiss3T3細胞の増殖を抑制する、第72回日本生化学大会、1999、10、横浜
6. 北村勝、相沢慎一、高宮孝悟、古川圭子、古川鋼一：ポツリヌスおよび破傷風神経毒素の受容体はガングリオシドである、第72回日本生化学大会、1999、10、横浜
7. 浦野健、三原裕嗣、本多桂、加藤雄三、古川鋼一：細胞周期におけるヒトaurora kinaseIIの解析、第72回日本生化学大会、1999、10、横浜

8. BORGELD, Harm-Jan W、菊地韶彦、古川鋼一、八木國夫、田中雅嗣：Generation of rho minus *S. cerevisiae* by EcoRI targeted into mitochondria、第72回日本生化学大会、1999、10、横浜

9. 浦野健、本多桂、山口明夫、古川鋼一：ヒトAurora Kinase IIのユビキチン・プロテアソーム系による分解、第58回日本癌学会、1999、10、広島

10. 岡島徹也、福本敏、宮崎宏、古川圭子、浦野健、古川鋼一：シアリルラクトサミン構造の合成に関与する新規シアル酸転移酵素(ST3Gal VI)のクローニング、第58回日本癌学会、1999、10、広島

11. 本多桂、浦野健、山口明夫、古川鋼一：Rap1に対する新規GDP/GTP交換反応促進蛋白Rap1-GEFIVのクローニング、第58回日本癌学会、1999、10、広島

12. 陳鶴祥、福本敏、古川圭子、浦野健、秋山清次、中尾昭公、古川鋼一：ガングリオシドGM2/GM1による癌転移の制御-糖鎖リモデリングによる解析、第58回日本癌学会、1999、10、広島

13. 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)遺伝子の発現調節機構、第58回日本癌学会、1999、10、広島

14. 岡島徹也、近藤忠雄、吉田久美、陳鶴祥、光田輝彦、沼田真一郎、古川圭子、古川鋼一：線虫Caenorhabditis elegans sqv-3遺伝子のヒトホモログはグリコサミノグリカンとコアタンパク質との橋渡し領域の生合成に関与するガラクトシルトランスフェラーゼである、第22回日本分子生物学会、1999、12、福岡

15. 浦野健、三原裕嗣、本多桂、加藤雄三、古川鋼一：ヒトAurora Kinase II蛋白の分解機構、第22回日本分子生物学会、1999、12、福岡

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、ガラクト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

分担研究者 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。また、各種の悪性腫瘍細胞にも抗原として発現されており、細胞接着機能と関連していることが示唆されている。昨年度、クローニングした新規の Fuc-TIX は、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。今年度はまずヒトおよびマウスにおける Fuc-TIX 遺伝子のゲノム構造と染色体位置を決定した。ヒトでは 6 番染色体長腕の 6q16 に存在しマウスではそれに相当する 4 番染色体に位置した。6 種類存在するヒト α 1,3 フコース転移酵素(α 1,3Fuc-T)の基質特異性を詳細に解析したところ、Fuc-TIX は既知の 5 種類の酵素に比べて、ポリラクタミン鎖の非還元末端に Fuc を転移する活性（すなわち Le^x 合成活性）が圧倒的に強いことがわかった。Fuc-TIX のノックアウトマウスを作成した。Fuc-TIX-KO マウスは致死的ではなく、外見上、正常に発生してきた。神経系、胃、腎臓における Le^x エピトープは完全に消失したことより、Fuc-TIX が真の Le^x 合成酵素であることを証明した。Fuc-TIX-KO マウスの病理解析、および各組織の機能解析については現在進行中である。

昨年度、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 を合成する β 1,3-ガラクトース転移酵素 (β 3Gal-T)をクローニングし、 β 3Gal-T5 と命名した。今年度は、 β 3Gal-T5 のゲノムをクローニングし、その上流域の転写調節機構を解析した。 β 3Gal-T5 は、近位大腸より遠位大腸に発現量が多く、癌化によってその発現量は激減した。また大腸癌の肝転移巣においてはさらに減少した。その発現制御は、消化管発生のホメオボックス遺伝子として知られる CDX 遺伝子によって調節を受けていることが判明した。

また本年度、新規の糖転移酵素遺伝子を 2 種類クローニングし、その酵素学的特徴を解析し、報告した（原著論文番号 9 と 11）。そのうち、文献番号 9 の ST6GalNAc I (sTn 合成酵素) は胃癌、乳癌患者の予後と深く関連した癌抗原 sTn を

合成する酵素である。

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。昨年度、その未知の酵素として、Fuc-TIX と β 3Gal-T5 をクローニングした。それらの生体での機能を探るため、まずその酵素学的な基質特異性を知る。Fuc-TIX に関しては、KO マウスを作成することにより、各組織におけるその生体機能を解析する。

β 3Gal-T5 は、CA19-9 合成酵素であり癌細胞におけるその転写調節機構を解析することにより、 β 3Gal-T5 の癌化における機能を探る。

B. 研究方法

(基質特異性の解析) ケラタン硫酸より調整したポリラクトサミン鎖の還元末端を蛍光ラベルし、アクセプター基質とした。各酵素は、動物由来培養細胞、あるいはバキュロウイルス・ベクターにより発現し、リコンビナント酵素とした。Fuc-TIX を含む 6 種類の α 1,3Fuc-T, β 3Gal-T5 を含む 5 種類の β 3Gal-T の基質特異性を解析した。

Fuc-TIX-KO マウスはクローニングしたゲノムを元に、定法通り作成した。

β 3Gal-T5 のゲノムをクローニングし、上流域をルシフェラーゼ遺伝子と組み替え、定法通り、プロモーター活性を測定した。CDX 遺伝子をクローニングしこれを β 3Gal-T5 転写活性測定の実験に用いた。

C. 研究結果

Fuc-TIX は、既知の 5 種類の α 1,3Fuc-T とはきわめて異なった基質特異性を発揮することが判明した。ポリラクトサミン鎖の非還元末端に非常に効率よく Fuc を転移した。一方、既知の 5 種類の酵素は、非還元末端よりむしろ還元末端の GlcNAc に Fuc を転移した。このことは、Fuc-TIX が *in vivo* における真の Le^x 合成酵素であることを示唆した。胃癌における Fuc-TIX 発現量を調べたところ、すべての症例の胃癌組織において、正常部分と比べて Fuc-TIX の発現量は激減していた。Fuc-TIX はシアリルルイス X (sLe^x) の合成活性はなく、むしろ sLe^x 合成に拮抗することより、癌化による sLe^x 抗原の発現量増大の一つの要因として、Fuc-TIX 発現量の減少が考えられた。

作成した Fuc-TIX-KO マウスは外見上何の変化もなく生まれてきた。初期胚を SSEA-1 で染色したところ、 $-/-$ の初期胚は SSEA-1 を消失していた。1980 年頃より提唱されてきた「SSEA-1 抗原はマウス初期胚の発生にとり必須である」という仮説は誤りであることを証明した。発生時の神経、成人マウスの胃粘膜、腎臓からは、 Le^x (SSEA-1) 抗原は消失した。*in vivo* における Le^x 合成酵素が、Fuc-TIX であることが証明できた。 Le^x の発現している組織の機能を $-/-$ マウスを用いて現在、解析中である。また病理的にもきわめて興味深い所見を呈している。

β 3Gal-T5 のプロモーター領域を同定することができた。この領域に、CDX の結合する

コンセンサス配列を見出した。その配列に点変異を入れることにより、プロモーター活性は消失した。現在、さらに解析を遂行中である。

D. 考察

従来より、Fuc-TIV が Le^x 合成酵素であると考えられてきた。培養細胞へのトランスフェクションにより、Fuc-TIV は確かに Le^x を合成する。しかし、培養細胞の系は常に過剰発現であり、生理的な発現量よりは圧倒的に多量である。実際に、*in vivo* で発現している生理的な量で Le^x を合成できるのは、Fuc-TIX のみであることがわかった。その理由は、基質特異性の違いで説明できた。Fuc-TIX-KO マウスの解析により、Le^x 抗原の機能解析が進んでいる。

CA19-9 抗原の合成を担う β 3Gal-T5 が、腸管発生のホメオボックス遺伝子である CDX 遺伝子により制御されていることはきわめて興味深い知見である。2型糖鎖(Gal β 1,4GlcNAc)構造は、生体のあらゆる組織に存在するが、1型構造(Gal β 1,3GlcNAc)は腸管組織に限局している。この糖鎖構造は腸管発生にとり重要な機能を果たしているかも知れない。 β 3Gal-T5 を欠損するノックアウトマウスの作成を計画している。

E. 結論

Fuc-TIX は、既知の酵素とはきわめて特異性を異にする酵素であり、Le^x を合成する。初期胚、神経、胃、腎臓、白血球における Le^x 合成を担っている。Le^x の生体機能は Fuc-TIX-KO マウスが教えてくれるであろう。

β 3Gal-T5 は、CDX により転写調節されており、腸管発生に重要な役割を果たしている

ことが示唆された。CA19-9 合成酵素である β 3Gal-T5 は、癌抗原合成酵素というよりはむしろ腸管の分化マーカーであることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表(原著)

1. 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.
2. 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*, 9, 607-616 1999.
3. Isshiki, 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 (β 3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom. *J. Biol. Chem.*, 274, 12499-12507, 1999.
4. Kaneko, M., Kudo, T., Iwasaki, H., Ikehara, Y., Nishihara, S., Nakagawa, S., Sasaki, K., Shiina, T., Inoko, H., Saitou, N. and Narimatsu, H.: α 1,3-fucosyltransferase IX

- (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; Molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. *FEBS Lett*, 452 (3), 237 - 242 1999.
5. Mizukawa, Y., Ikehara, Y., Nishihara, S., Shiohara, T. and Narimatsu, H.: An immunohistochemical study of β 1,4-galactosyltransferase in human skin tissue. *J. Dermatol. Sci.*, 20, 183-190, 1999.
 6. Togayachi, A., Kudo, T., Ikehara, Y., Iwasaki, H., Nishihara, S., Andoh, T., Higashiyama, M., Kodama, K., Nakamori, S. and Narimatsu, H.: Up-regulation of Lewis enzyme (Fuc-THI) and plasma-type α 1,3-fucosyltransferase (Fuc-TVI) expression determines the augmented expression of sialyl Lewis x antigen in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 83, 70-79, 1999.
 7. Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T., Niimi, A., Ueda, M. and Kimata, K.: RHAMM, Receptor for Hyaluronan-mediated Motility and CD44 Expressions in Colon Cancer Assessed by Quantitative Analysis Using Real Time RT-PCR. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 987-992, 1999.
 8. Kaneko, M., Kudo, T., Iwasaki, H., Shiina, T., Inoko, H., Kozaki, T., Saitou, N. and Narimatsu, H.: Assignment of the human α 1,3-fucosyltransferase IX (FUT9) gene to chromosome band 6q16 by *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 86, 329-330, 1999.
 9. Ikehara, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Kudo, T., Kono, M., Nishihara, S., Issiki, S., Morozumi, K., Itzkowitz, S., Tsuda, T., Nishimura, S., Tsuji, S. and Narimatsu, H.: Cloning and expression of a human gene encoding an N acetylgalactosamine- α 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I) which is a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology*, 9, 1213-1224, 1999.
 10. Nakamori, S., Nishihara, S., Ikehara, Y., Nagano, H., Dono, K., Sakon, M., Narimatsu, H. and Monden, M.: Molecular mechanism of increased expression of sialyl Lewis antigens in ductal carcinoma of the pancreas. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 18, 425-432, 1999.
 11. Ikehara, Y., Shimizu, N., Kono, M., Nishihara, S., Nakanishi, H., Kitamura, T., Narimatsu, H., Tsuji, S. and Tatematsu, M.: A novel glycosyltransferase with a polyglutamine repeat; a new candidate for GD1a synthase (ST6GalNAc V). *FEBS Letters*, 463, 92-96, 1999
 12. Shiina, T., Kikkawa, E., Iwasaki, H., Kaneko, K., Narimatsu, H., Sasaki, K., Bahram, S. and Hidetoshi Inoko.: The β 1,3-galactosyltransferase-4 (β 3Gal-T4) gene is located in the centromeric segment of the human MHC class II region. *Immunogenetics*, 51, 75-78, 2000.

2. 学会発表

1. Narimatsu, H., Kudo, T., Ikehara, Y., Togayachi, A., Kaneko, M., Sasaki, K., Abe, K., Ishii, Y. and Osumi, N. : Molecular cloning and characterization of murine α 1,3-fucosyltransferase IX gene", XVth International symposium on glycoconjugates. at Tokyo, August, 1999.
2. Nishihara, S., Hiraga, T., Iwasaki, H., Kaneko, M. and Narimatsu, H.: "Substrate specificity of six α 1,3Fuc-T members towards poly lactosamine; Fuc TIX has an unique specificity to each GlcNAc residue of poly lactosamine", XVth International symposium on glycoconjugates. at Tokyo, August, 1999.
3. Saitou, N., Kaneko, M., Noda, R., Nishihara, S., and Narimatsu, H.: "Evolution of glycosyltransferase genes", XVth International symposium on glycoconjugates. at Tokyo, August, 1999.
4. Isshiki, 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 (β 1,3Gal-T) responsible for synthesis of CA19-9 antigen in colonic and pancreatic cancer", XVth International symposium on glycoconjugates. at Tokyo, August, 1999.
5. Narimatsu, H.: A unique α 1,3-fucosyltransferase, Fuc-TIX (FUT9), New Frontier of Glyco- and Lipid-Biology Toward the Twenty-First Century Tokushima Symposium, at Tokushima, August, 1999.
6. Narimatsu, H.: Fuc-TIX is a real Lewis X synthase in vivo. 1999 Xiangshan Science Conferences on Glycoconjugate and Human Health, at Beijing China, September, 1999.
7. Narimatsu, H.: FUT9 is a real Le^x (CD15, SSEA-1) synthase, Sugar remodeling and cellular communications, at Nagoya, October, 1999.
8. Narimatsu, H., Kudo, T., Nishihara, S., Ikehara, Y., Togayachi, A., Kaneko, M., Sasaki, K., Abe, K., Ishii, Y. and Osumi, N.: Characterization of a new member of α 1,3-fucosyltransferase family, RIKEN Forum Glycobiology and Shingo lipid Biology, at RIKEN Wako, October, 1999.
9. Narimatsu, H., Isshiki, S., Togayachi, A., Kudo, T., Nishihara, S., Watanabe, M., Kubota, T., Kitajima, M., Shiraishi, N. and Sasaki, K.: A family of β 3-galactosyltransferase (β 3Gal-T); β 3Gal-T5 is a CA19-9 synthase., ISOBM 1999, The XXVII meeting of the international society for oncogene developmental biology and medicine, at Kyoto, October, 1999.
10. Ikehara, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Kudo, T., Nishihara, S., Isshiki, S.,

- Itzkowitz, S., Kono, M., Tsujii, S. and Narimatsu, H.: "Cloning and expression of human *N*-acetylgalactosamine α 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc1) which synthesizes cancer associated sialyl-Tn antigen", XVth International symposium on glycoconjugates. at Tokyo, August, 1999.
11. Togayachi, A., Kudo, T., Ikehara, Y., Iwasaki, H., Nishihara, S., Andoh, T., Higashiyama, M., Kodama, k., Nakamori, S. and Narimatsu, H.: "Up-regulation of Lewis enzyme (Fuc-TIII) and Fuc-TVI expression determines the augmented expression of sialyl Lewis x antigen in non-small cell lung cancer", XVth International symposium on glycoconjugates. at Tokyo, August, 1999.
 12. Kaneko, M., Kudo, T., Ikehara, Y., Nishihara, S., Nakagawa, S., Sasaki, K., Shiina, T., Inoko, H. and Narimatsu, H.: " α 1,3-fucosyltransferase IX (hFuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; Molecular cloning, characterization and chromosomal mapping of hFuc-TIX", XVth International symposium on glycoconjugates. at Tokyo, August, 1999.
 13. 榎谷内晶、一色聡一郎、工藤崇、渡辺昌彦、北島政樹、白石紀彦、佐々木克敏、成松 久：「大腸癌・膵癌において CA19-9 を合成する β 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子の探索」、第 8 回癌転移研究会、於；東京、1999 年 5 月
 14. 成松 久、榎谷内晶、赤島智博、一色聡一郎、工藤 崇、西原祥子：「胃癌細胞において Lewis 抗原を合成する β 1,3-ガラクトース転移酵素」、第 8 回癌転移研究会、於；東京、1999 年 5 月
 15. 榎谷内晶、一色聡一郎、工藤 崇、渡辺昌彦、久保田哲朗、北島政樹、白石冬彦、佐々木克敏、成松 久：「大腸癌・膵癌において CA19-9 抗原を合成する新規 β 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子(β 3Gal-T5)のクローニング」、第 19 回腫瘍マーカー研究会、於；宇部、1999 年 9 月
 16. 榎谷内晶、一色聡一郎、工藤 崇、渡辺昌彦、北島政樹、成松 久：「大腸癌・膵癌において CA19-9 抗原を合成する新規 β 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子(β 3Gal-T5)のクローニング」、第 58 回日本癌学会、於；広島、1999 年 9 月
 17. 榎谷内晶、一色聡一郎、工藤 崇、渡辺昌彦、北島政樹、入村達郎、成松 久：「大腸癌・膵癌において CA19-9 抗原を合成する新規 β 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子(β 3Gal-T5)のクローニング」、第 72 回日本生化学会、於；横濱、1999 年 10 月
 18. Menon Krishna, K., 藤木一朗、大竹洋介、成松 久、長谷純宏、池田一裕：「Physiological significance of galactosyltransferase (β 4Gal-T1) expression in CG4 cells containing brain enriched sugar chain BA2」, 第 72 回日本生化学会、於；横濱、1999 年 10 月
 19. 西原祥子、浅野 徹、岩崎裕子、金子美華、多和田明、望月秀雄、成松 久：「ポリラクト

サミンに対する α 1,3-フコース転移酵素群の
基質特異性;Fuc-TIXは非還元末端のGlcNAc
残基にフコースを転移しやすい」、第72回日
本生化学会、於;横濱、1999年10

20. 金子美華、西原祥子、岩崎裕子、工藤 崇、
赤島智博、阿部訓也、斉藤成也、成松 久:「発
生初期における mFuc-TIX 遺伝子の発現」、
第72回日本生化学会、於;横濱、1999
年10月

21. 岩崎裕子、中山文明、成松 久:「血液細胞
での CD15(Lewis X)抗原は Fuc-TIX の産物
である」、第72回日本生化学会、於;横濱、
1999年10月

G. 知的所有権の取得状況

特になし。