

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功 刀 浩 ……	344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉 岡 澄 江 ……	358
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合 田 幸 広 ……	373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工 藤 由 起 子 ……	390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能 美 健 彦 ……	402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉 里 勝 利 ……	417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜 山 行 雄 ……	435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎 藤 嘉 朗 ……	449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山 口 照 英 ……	466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川 崎 ナ ナ ……	494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内 田 恵 理 子 ……	509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純 一 ……	525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永 井 洋 士 ……	537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱 脇 祥 子 ……	551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍 兒 ……	566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名 和 行 文 ……	576

受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその 応用に関する研究

所 属 国立成育医療センター研究所
研究者 藤本純一郎

精子・卵の形成過程、受精ならびに初期発生における SSEA-4、テトラスパニン(CD9 および CD81)、硫酸化シアル酸含有新規糖蛋白フラジェラシアリンならびにヒアルロン酸複合体の機能について多角的に解析した。抗ヒト EC 細胞抗体 6E2 が現在最も優れた抗 SSEA-4 抗体であること、フラジェラシアリンに類似の糖蛋白がマウス精子にも存在すること、CD81 は CD9 と同様に受精膜融合に関与するものの異なるステップで機能すること等を明らかにした。

分担研究者

- (1) 名古屋大学生物機能開発利用研究センター 北島 健
- (2) 愛知医科大学・分子医科学研究所 木全弘治
- (3) 国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部 宮戸健二
- (4) 独立行政法人農業生物資源研究所 ゲノム研究グループ 安江 博
- (5) 生化学工業株式会社中央研究所 前田 浩

A. 研究目的

受精、初期胚発生ならびに器官形成過程における細胞表面糖鎖ならびにその関連分子が果たす役割を解析し、受精不全（不妊症）や不育症などの障害克服、幹細胞を用いた再生医療に応用可能な基盤情報を整備することを目的とする。細胞表面には多様な構造をもつ糖鎖が存在するが、精子や卵にはとりわけ大量の糖鎖が存在し受精に重要な役割を果たすことが示唆されてきた。また、マウス初期胚モデルである胎児性癌細胞（EC 細胞）株では成熟段階を示す指標として SSEA などの糖鎖構造が古くから使用されており、最近ではヒト胚性幹細胞（ES 細胞）の指標としても注目を集めている。近年、細胞表面糖脂質は各種の重要な

機能分子とともに局所的に集族し、いわゆるラフト構造を形成して刺激伝達のプラットフォームを提供することが明らかになってきた。また、各種の糖転移酵素が次々と遺伝子クローニングされ、糖鎖を対象とした分子生物学的なアプローチも可能となりつつある。しかしながら、配偶子形成、受精、初期胚発生、着床等の生命現象における糖鎖の役割に関する研究は未だ不十分であり、ラフト等の新たな概念からのアプローチ、遺伝子工学的アプローチ、モデル細胞や動物を用いた解析が必要である。特に不妊症等の克服にはこれらの基礎研究が必須である。そこで本研究では、大量の精子が調整可能なブタを用いて精子におけるラフト構造の詳細解析と糖質関連遺伝子発現解析、受精における CD9 等のテトラスパニン分子の機能解析、不妊症患者におけるヒアルロン酸結合蛋白解析、EC 細胞や ES 細胞等の幹細胞における糖鎖の構造と機能解析、を行う。

B. 研究方法

1) 抗ヒト EC 細胞抗体 6E2 の解析

すでに樹立されていた抗ヒト EC 細胞モノクローナル抗体 6E2 の反応特異性を詳細に解析した。解析に当たっては、6E2 抗体を Alexa488 色素で標識して使用した。マウス受精卵は妊娠 BDF1 マウスより調整した。

2) フラジェラシアリンの構造解析

ウニ精子のラフトに局在する新規蛋白フラジェラシアリンの構造解析とホモロジーサーチを各種哺乳動物データベースを用いて行った。

3) 複合糖鎖の機能解析

発現遺伝子の網羅的解析は、排卵誘発剤投与マウスの mRNA に対し、糖転移酵素やレクチンを主として検出する 1200 遺伝子マイクロアレイを用いて行った。Versican/PG-M のコンディショナル・ノックアウトマウスは Cre リコンビナーゼシステムを用いる系で作成した。

4) 受精膜融合の機序解明

CD9 および CD81 の機能解析を行うため、同遺伝子ノックアウトマウスならびに変異型 cDNA 導入系で解析した。

5) 精巣での発現遺伝子解析

ヒト男子不妊、オスウシ不妊責任遺伝子である CDYL, CDYL2 の発現パターンをマウスおよびウシ精巣で *In situ* ハイブリダイゼーション法で解析した。

C. 研究結果

1) 初期胚モデル細胞での SSEA-4 エピトープの発現様式

ヒト EC 細胞に特異的に反応する 6E2 抗体が SSEA-4 と反応することを明らかにした。抗 SSEA-4 抗体として汎用されている MC813-70 と比較すると、フローサイトメトリー解析や固相化 SSEA-4 検出には 6E2 がより有用であった。6E2 抗体を用いてマウス受精卵を染色したところ、従来の SSEA-4 発現パターンとは異なる染色像が得られた。

2) 硫酸化シアル酸の機能

昨年度ウニ精子の運動性と関連する新規分子を同定しフラジェラシアリンと命名した。同蛋白はアミノ酸相同性検索では哺乳類で相同分子は発見できなかったが、細胞膜ラフトに局在し、糖含有量が大きく、分子量が 40-80Kd と不均一であることを指標に検索を行ったところ、ブタおよびマウスの精子のラフトに局在する糖蛋白の性状に近いこ

とが判明した。

3) 複合糖質の機能

マウス排卵誘発剤投与後に卵巣で発現が変化する遺伝子を網羅的に解析し、約 270 遺伝子を候補としてあげた。また、卵丘マトリックス成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン Versican/PG-M のコンディショナル・ノックアウトを作成した。

4) 受精膜融合の機序解明

昨年度、受精膜融合に決定的な作用を持つ CD9 の機能に C 末端の 7 アミノ酸が重要であることを明らかにしたが、本年度はその部位に結合する蛋白質を同定した。また、CD9 と同じテトラスパニンに属し卵子に発現する CD81 の機能について解析し、やはり精子と卵子の膜融合に関連するが異なるステップで機能することを明らかにした。

5) 精巣での発現遺伝子解析

マウス (げっ歯目) 精巣における CDYL1 遺伝子の発現はウシ (偶蹄目) 精巣における CDYL1 や CDYL2 遺伝子の発現様式とは全く異なることが判明した。

D. 考察

受精の機序解明は、不妊症対策という臨床的な課題への対応策提示のみならず、ES 細胞の樹立やクローン化技術による医療技術の開発にもつながる可能性を持つ。

本研究では、卵の成熟、精子の機能、受精過程そして ES/EC 細胞という初期発生プロセス前後の重要な場面を対象とし、糖鎖に着目しつつ機能分子の役割を明らかにする研究体制となっている。

本年度は昨年度の成果を発展させ、いくつかの興味深い成果を挙げる事ができた。SSEA-4 は初期胚発生や ES 細胞の同定に必須の糖鎖マーカーであったが、本研究では既存の抗体よりも優れた抗体 6E2 の特徴を明らかにした。マーカーとして有用であるばかりではなく、SSEA-4 の機能解析にも威力を発揮すると予想された。ウニのラフト局在分子として発見したフラジェラシアリンはアミノ酸レベルでは哺乳類に相同分子を発見でき

なかったが、近似の構造を持つ分子がマウスにも存在する可能性が示唆されたため、精子運動能が同様の分子により調節されている可能性が出てきた。

受精機序での CD9 の役割はすでに明らかだが、同じテトラスパニンに属する CD81 も同様の機能を異なるステップで発揮することを明らかにした。受精機序の解明のみならず不妊克服にもつながる成果と考える。

E. 結論

1) 抗ヒト EC 細胞抗体 6E2 が SSEA-4 と反応すること、汎用されている MC813-70 より有用な抗体であることが明らかとなった。

2) ウニ精子上で発見した新規分子フラジェラシアリンの相同蛋白は哺乳動物では検索の結果見つからなかったが、類似の構造、ラフト局在性および近似の分子量を持つ類似糖蛋白がブタやマウス精子にも存在した。

3) CD9 および CD81 がともに精子と卵子の細胞膜融合に別々のステップで関与することを明らかにした。

4) 排卵誘発でマウス卵巣で発現が変化する 270 個の遺伝子を同定した。

5) ヒト不妊関連遺伝子の動物相同遺伝子発現をマウスとブタで比較したところ、全く異なる発現様式を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shinji Miyata, Chihiro Sato, Hironobu Kumita, Masaru Toriyama, Victor D. Vacquier, and Ken Kitajima. Flagelliasialin: a novel sulfated alpha2,9-linked polysialic acid glycoprotein of sea urchin sperm flagella. *Glycobiology*, 16, 1229-1241, 2006
- 2) 北島 健 (2006) 精子表面の糖脂質の役割. 新編精子学 p170-173 (東京大学出版会)
- 3) Zhou L, Knamori A, Kannagi R, Itano N, Shen L, Wu J, and Komata K.

SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to hyaluronan substrate. *J. Biol. Chem.* 2006 Jul 21;281(29):20303-14

- 4) Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Miyado M, Umezawa A, Miyado K. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol Reprod Dev*, in press (KM is a corresponding author)
- 5) Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, Umezawa A. Menstrual blood-derived Cells confer human dystrophin expression in the murine model of duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol Biol Cell*, in press.
- 6) Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*, in press.
- 7) Sachiko Kiuchi, Taketo Yamada, Nobutaka Kiyokawa, Toshiyuki Saito, Junichiro Fujimoto, and Hiroshi Yasue. Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, *TAS1R3*, and its expression in tissues *Cytogenetics and Genome Research* 115:51-61
- 8) Oishi M., Gohma H., Hashizume K., Taniguchi Y., Yasue H, Takahashi S., Yamada T., Sasaki Y. Early embryonic death-associated changes in genome-wide gene expression profiles in the fetal placenta of the cow carrying somatic nuclear-derived cloned embryo. *Mol Reprod Dev* 73(4):404-9.
- 9) Ryuji Yamamoto, Hirohide Uenishi, Hiroshi Yasue, Yohtaroh Takagaki, Eimei Sato. The genomic structure and a novel alternatively spliced form of porcine p T α chain. *Molecular Immunology* 44 591-597

- 10) Shimogiri, T., Kiuchi, S., Hiraiwa, H., Hayashi, T., Takano, Y., Maeda, Y., Gary A Rohrer, G. A., Milan, D., and Yasue, H. Assignment of 204 genes localized on HSA17 to a porcine RH (IMpRH) map to generate a dense comparative map between pig and human/mouse. *Cytogenetics and Genome Research* 112:114-120
 - 11) Yasue, H., Kiuchi, S., Hiraiwa, H., Ozawa, A., and Hayashi, T. Assignment of 101 genes localized in HSA10 to a swine RH (IMpRH) map to generate a dense human-swine comparative map. *Cytogenetics and Genome Research* 112:121-125
 - 12) Shimogiri, T., Kiuchi, S., Hiraiwa, H., Hayashi, T., Takano, Y., Maeda, Y., and Yasue, H. Assignment of 115 genes localized on HSA5 to a porcine RH (IMpRH) map to generate a dense human-pig comparative map. In Press
 - 13) Du Z.-Q., Vincent-Naulleau S., Gilbert H., Vignoles F., Créchet F., Shimogiri T., Yasue H., Leplat J.-J., Bouet S., Gruand J., Horak V., Milan D., Le Roy P. and Geffrotin C. Detection of Novel Quantitative Trait Loci for Cutaneous Melanoma by Genome-wide Scan in the MeLiM Swine Model. *International Journal of Cancer* In Press
2. 学会発表
- 1) Xue Lian, Shinji Miyata, Chihiro Sato, and Ken Kitajima: Demonstration of the occurrence of sulfated sialic acid in pig sperm and its capacitation-induced changes in the surface distribution; 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress; Kyoto, Japan; June 18 - 23, 2006
 - 2) Shinji Miyata, Chihiro Sato, Hironobu Kumita, Masaru Toriyama, Victor D. Vaquier, and Ken Kitajima: Flagelliasialin, a novel polysialic acid glycoprotein in sea urchin sperm is involved in sperm motility; *Sialoglycoscience* 2006. 5th International conference; Mishima, Japan; August 27-30, 2006
 - 3) 薛 蓮、藤田 洋、佐藤ちひろ、北島 健：ブタおよびマウス精子における硫酸化シアル酸の存在証明。第26回日本糖質学会年会 2006年8月23-25日；仙台
 - 4) 宮田真路、佐藤ちひろ、久美田紘信、鳥山 優、北島 健：ウニ精子鞭毛局在flagelliasialinのユニークな糖鎖修飾の精子運動性における重要性；第77回日本動物学会大会；島根大学（松江）；平成18年9月21-24日
 - 5) Zhuo L & Kimata K. Formation and function of the hyaluronan-SHAP complex, an extracellular matrix component. 2006.9.14 National Institute of Environmental Health Science (NIEHS), Durham, NC, USA
 - 6) Zhuo L & Kimata K. Frontiers in Glycomics: Bioinformatics and Biomarkers in Disease, Inflammation and the serum levels of SHAP-hyaluronan complex. 2006.9.12 National Institute of Health, Bethesda, MD, USA,
 - 7) (招待講演) Miyado K. Tetraspanin and gamete membrane fusion. International Symposium, Cell Signalling in Gamete Activation-from Basic Research to ART, Nov. 13-15, 2006.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
無し
 2. 実用新案登録
無し

3. その他

無し

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社