

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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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)、ウニ精子中の硫酸化シアル酸含有糖蛋白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。SSEA-4 については、新規抗体作成とその応用による糖蛋白糖鎖エピトープとしての存在の確認、汎用されている抗 SSEA-4 抗体よりも有用な抗体の同定とその応用による SSEA-4 機能の新たな解析方法開発について成果があった。テトラスパニンの受精膜融合における機能については、CD9 の C 末端の重要性、それに結合する β -tubulin の発見、CD81 の CD9 類似機能の同定、などを達成した。精子における硫酸化シアル酸の機能については、同含有ウニ新規蛋白を同定しフラジュラシアリンと命名した。本分子は精子運動性に関与するが、類似の構造を持つ分子が哺乳類精子にも存在する可能性が示唆された。卵成熟には複合糖質の関与が必須であり、ヒアルロン酸合成阻害モデルマウスでは妊娠率が低下する。また、ヒアルロン酸の妊娠への関与を解析するモデルとして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。ヒト不妊症での複合糖鎖の関与を検討するため、高感度かつ簡便な ELISA 法を開発した。

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) SSEA-4 解析

①初期胚モデルにおける SSEA-4 エピトープ解析
F9 および NCR-G3 細胞をトリプシン-EDTA 処理により単離し、細胞浮遊液を調整した。Raft.2 抗体および蛍光標識抗マウス IgM 二次抗体を用いた間接蛍光抗体法を用いて染色し、フローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また、双方の細胞から、脂質を抽出し、Raft.2 の反応性を TLC-イムノプロットにより検討した。同様に、蛋白抽出液を調整し、Raft.2 の反応性をイムノプロット解析により検討した。

②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) 精子における硫酸化シアル酸の機能解析

①抗体作成

ウニ精子に存在する硫酸化シアル酸をもつ a-2,9-結合ポリシアル酸に対する抗体を作成し、ブタ精子から調整したラフトとの反応性を生化学的に検討した。

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

①不妊雌マウスの卵巣の組織学的解析を行うと同時に、排卵状況を調べる。さらに、その卵子を採集し、体外受精実験と卵子細胞質内精子注入実験を行い、卵割または受精卵移植後の胚発生率を観

察し、卵の成熟程度と受精能力を評価し、体内における受精障害の原因を解明する。SHAP-ヒアルロン酸共有結合複合体形成機構の研究については、複合体形成反応の基質の一つである血清中インター- α -トリプシンインヒビター (ITI) の ELISA による定量検出法を確立した。

血清ヒアルロン酸結合蛋白(SHAP)とヒアルロン酸(HA)の複合体、すなわち、SHAP-HA 複合体を欠損するマウスおよび正常マウスを使用し、卵巣の卵丘細胞における各種のマトリックス発現を抗体による免疫染色で解析した。また、卵丘細胞を分離しその mRNA を用いてヒアルロン酸合成酵素 3 種類(HAS1, HAS2, HAS3)の発現を解析した。

②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 の機能解析を行うため、各種の変異型 CD9cDNA の未受精卵への導入、機能分子の局在変動の追跡、two-hybrid システムや免疫沈降等による会合分子の同定、トランスジーン導入による CD9 可視化卵の作成と観察等を行った。

各種の変異型 CD9cDNA の未受精卵への導入し解析した。また、EGFP 結合 CD9 の卵での発現系を作成し、受精における分子挙動観察を行った。

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

ブタプロタミン遺伝子をモデルとして組織切片上で同遺伝子発現を効率よく実施できる条件設定を行った。

ブタ味覚受容体遺伝子 (Taste receptor type 1 member 3, TAS1R3)、Peroxisome oxidoreductin 2 (Prdx2) および Neural cell adhesion molecule 1 (Ncam1)

の3遺伝子について、センス発現遺伝子を検出するプローブのみならず、これらのアンチセンス発現を検出できる標識プローブを作成し、切片上での *in situ hybridization* を行った。

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

マウス F9 細胞は生化学的解析では糖脂質 sialylGb5 は発現していないが、フローサイトメトリーでは数%が Raft.2 に対して陽性を示した。この反応性は主として細胞質内にあった。そこで、ヒト EC 細胞株 NCR-G3 での sialylGb5 発現様式を解析したところ、F9 と同様に細胞質内での反応性を認めた。蛋白の二次元電気泳動物との Raft.2 の反応性の結果、陽性反応を示すことが判明した。従って、SSEA-4 エピトープはこれらの細胞では糖蛋白上に存在していると結論したが、この蛋白はラミニンであることが明らかになった。

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

ウニ精子において、硫酸化シアル酸 (8-O-硫酸化 N-アセチルノイラミン酸) をもつ新規糖鎖構造が特定の糖タンパク質に存在することを見いだした。また、その糖鎖構造が硫酸化シアル酸をもつ新規シアル酸重合体 (α-2,9-結合ポリシアル酸) であることを決定した (Miyata et al., *Glycobiology*, 14, 827, 2004)。この構造に対するモノクローナル抗体を作成し、ブタ精子由来ラフ

トとの反応性を検討したところ、ブタ精子においてもウニの精子で見られた硫酸化シアル酸をもつ糖タンパク質を見いだした。ついでこの蛋白の構造を決定しフラジェラシアリンと命名した。また、抗 α-2,9-結合ポリシアル酸抗体を作成・応用し、受精過程で同糖鎖が精子の受精能や運動能に関与することを明らかにした。ブタ精子にも硫酸化シアル酸含有糖蛋白が存在することを世界に先駆け明らかにしたが、この構造は卵との接着部位である精子先端部には存在せず、むしろ、硫酸化ガラクトースが濃縮していた。

上述のフラジェラシアリンはアミノ酸相同性検索では哺乳類で相同分子は見られなかったが、細胞膜ラフトに局在し、糖含有量が多く、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

(1) マウスモデルを用いた機能解析

卵丘組織細胞外マトリックスの形構築機構を解析するために、排卵直後の SHAP-HA 複合体欠損の卵丘組織における様々な卵丘マトリックス成分 (PG-M/Versican, TSG6 など) の分布と存在状態を、蛍光標識抗体を用いて調べた。卵丘細胞の表面にそれらの存在が観察されたが、細胞と細胞の間には殆ど存在せず、卵丘マトリックス高次構造体の細胞間相互作用における SHAP-HA 複合体の中心的な役割が明らかとなった。

卵丘細胞における mRNA 発現を解析したところ、3 種類のヒアルロン酸合成酵素のうち、HAS1 の発現が SHAP-HA 複合体欠損マウスでは全く見られないことが判明した。なお、SHAP-HA 複合体欠損マウス卵の体外受精率は正常卵の 20-30% に低下しているが、顕微授精では何ら差異はないため、SHAP-HA 複合体は精子の卵表面への結合に何らかの役割を発揮する可能性が示唆された。

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。

(2) SHAP-HA 複合体形成機構と不妊症

既に開発されていた SHAP-HA 複合体の ELISA 定量測定法を改良し、その感度を大幅に高めることに成功した。分担研究者が所属する施設の不妊症患者 24 名の血清を解析したが異常所見は得られなかった。

4) 受精膜融合の機序解明

CD9 を欠損した未受精卵に各種変異型 CD9 分子を発現させたところ、CD9 の C 末端が膜融合に重要であることが判明した。可視化 CD9 を発現する卵の観察等の結果、CD9 は微絨毛に存在し、受精過程に伴って精子結合部位へ集積すること、精子融合後は拡散することが判明した。未受精卵で CD9 と共役する分子として、 β -tubulin、85Kd、100Kd、200Kd 超の未知蛋白が候補として挙げられた。ついで、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。また、可視化 CD9 を導入したマウス卵を用いた受精過程の観察により哺乳動物の受精過程での細胞膜相互作用を世界で初めて明らかにした。

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

ブタプロタミン遺伝子をモデルとし、組織固定用還流液と固定液の検討、ハイブリダイゼーション用プローブの選定、反応時間設定ならびに組織貼付用基材の選択などを行った。

ブタ精巣では、TAS1R3 はセンス遺伝子のみ発現していたが、Prdx2 および Ncam1 ではセンス遺伝子およびアンチセンス遺伝子の両者が局在を違えて発現していることが判明した。

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对象とし、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。

3 年間で、SSEA-4、テトラスパニン(CD9 および CD81)、硫酸化シアル酸含有糖蛋白ならびにヒアルロン酸複合体という受精の主役たちの機能を十分に解析することができた。今後はこれらの成果をさらに発展させる研究を推進させるとともに、臨床応用を目指した研究を展開することが求められる。

E. 結論

1) 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)、ウニ精子中の硫酸化シアル酸含有糖蛋白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。

2) SSEA-4 については、新規抗体作成とその応用による糖蛋白糖鎖エピトープとしての存在の確認、汎用されている抗 SSEA-4 抗体よりも有用な抗体の同定とその応用による SSEA-4 機能の新たな解析方法開発について成果があった。

3) テトラスパニンの受精膜融合における機能については、CD9 の C 末端の重要性、それに結合する β -tubulin の発見、CD81 の CD9 類似機能の同定、などを達成した。

4) 精子における硫酸化シアル酸の機能については、同含有ウニ新規蛋白を同定しフラジェラシアリンと命名した。本分子は精子運動性に関与するが、類似の構造を持つ分子が哺乳類精子にも存在する可能性が示唆された。

5) 卵成熟には複合糖質の関与が必須であり、ヒアルロン酸合成阻害モデルマウスでは妊娠率が低

下する。また、ヒアルロン酸の妊娠への関与を解析するモデルとして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。ヒト不妊症での複合糖鎖の関与を検討するため、高感度かつ簡便な ELISA 法を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Suzuki T, Nakajima H, Saito M, Ohmi K, Katagiri YU, Okita H, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J. Characterization of a Shiga-toxin 1-resistant stock of Vero cells. *Microbiol Immunol* 48: 377-387, 2004.
- 2) Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahashi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J. Deficiency of BLNK hampers PLC- γ 2 phosphorylation and Ca²⁺ influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112: 575-582, 2004.
- 3) Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, Okita H, Okuda K, Fujimoto J. Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. *J Cell Sci* 117: 3911-3922, 2004.
- 4) Zhuo, V. C. Hascall, K. Kimata. Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *J Biol Chem* 2004; 279: 38079- 38082.
- 5) S. Cattaruzza, M. Schiappacassi, K. Kimata, A. Colombatti, R. Perris. The globular domains of PG-M/versican modulate the proliferation-apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells. *Faseb J* 2004;18:779-81.
- 6) N. Itano, T. Sawai, F. Atsumi, O. Miyaishi, S. Taniguchi, R. Kannagi, M. Hamaguchi, K. Kimata. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J Biol Chem* 2004;279:18679-18687.
- 7) Kakizaki, K. Kojima, K. Takagaki, M. Endo, R. Kannagi, M. Ito, Y. Maruo, H. Sato, T. Yasuda, S. Mita, K. Kimata, N. Itano. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem* 2004;279:33281-33289.
- 8) Ishibashi T, Ding L, Ikenaka K, Inoue Y, Miyado K, Mekada E, Baba H. Tetraspanin protein CD9 is a novel paranodal component regulating paranodal junctional formation. *J Neurosci.* 24:96-102 (2004).
- 9) Nakamura Y., Yamamoto M., Miyado K., Okano HJ., Fukagawa R., Higaki K., Yamasaki M. and Okano H.: A novel marker for Purkinje cells, KIAA0864 protein. An analysis based on a monoclonal antibody HFB-16 in developing human cerebellum. *J. Histochem. Cytochem.* In Press (2005).
- 10) Katagiri YU, Kiyokawa N, Nakamura K, Takenouchi H, Taguchi T, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J. Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2. *Biochem Biophys Res Commun* 332:1004-1011, 2005.
- 11) L. Zhuo, A. Salustri, F. Atsumi, M. Kawano, J. Wu, L. Shen, A. Ogura, H. Yasue, V. C. Hascall, K. Kimata. Role of serum-derived

- hyaluronan-associated protein in the construction of cumulus matrix and oocyte maturation. *Hyaluronan Structure, Metabolism, Biological Activities, Therapeutic Applications Volume II. Matrix Biology Institute*, 2005:731-735.
- 12) H. Yabushita, T. Kishida, K. Fusano, K. Kanyama, L. Zhuo, N. Itano, K. Kimata, M. Noguchi. Role of hyaluronan and hyaluronan synthase in endometrial cancer. *Oncol Rep* 2005;13:1101-5.
- 13) T. Kishida, H. Yabushita, L. Zhuo, N. Itano, K. Kimata, M. Noguchi. Hyaluronan (HA) and serum-derived hyaluronan associated protein (SHAP)-HA complex as markers of pre-eclampsia. *愛知医科大学医学会雑誌* 2005;33:7-9.
- 14) 卓麗聖, 木全弘治. 第1編 糖鎖を科学する 第1章 糖鎖のしくみ 第3節プロテオグリカン 1 ヒアルロン酸の構造と機能. *糖鎖科学の新展開. NTS*, 2005:40-47.
- 15) 板野直樹, 木全弘治. 3. 糖鎖遺伝子研究 1 糖転移酵素 1.19 ヒアルロン酸合成酵素. *未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂*, 2005: 176-177.
- 16) Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Kanemura Y, Kodama E, Yamamoto A, Yamamoto H, Miyado K, Okano HJ, Fukagawa R, Higaki K, Yamasaki M, Okano H. A novel marker for purkinje cells, KIAA0864 protein. An analysis based on a monoclonal antibody HFB-16 in developing human cerebellum. *J Histochem Cytochem.* 53:423-30 (2005).
- 17) Nakanishi T, Kubota H, Ishibashi N, Kumagai S, Watanabe H, Yamashita M, Kashiwabara S, Miyado K, and Tadashi Baba. Functional role of mouse poly(A) polymerase mGLD-2 During oocyte maturation. *Developmental Biology* 289: 115-26 (2006) .
- 18) 吳吉文, 卓麗聖, 木全弘治, 王緯. 卵母細胞複合体 CD44 和間 α 蛋白抑制剂的表達. *福建医科大学学報*. in press.
- 19) L. Shen, L. Zhuo, A. Okumura, T. Ishikawa, M. Miyachi, Y. Owa, T. Ishizawa, N. Sugiura, Y. Nagata, T. Nonami, S. Kakumu, K. Kimata. The SHAP-hyaluronan complex in serum from patients with chronic liver diseases caused by hepatitis virus infection. *Hepatol Res* 2006;in press.
- 20) 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*, in press.
- 21) Shinji Miyata, Chihiro Sato, Hironobu Kumita, Masaru Toriyam, 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
- 22) 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)
- 23) 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
- 24) 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)
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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
- 28) 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.
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) Du Z.-Q., Vincent-Naulleau S., Gilbert H., Vignoles F., Cr chet F., Shimogiri T., Yasue H., Leplat J.-J., Bouet S., Gruand J., Horak V., Milan D., Le Roy P. and Geffroin 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) 竹野内寿美, 清河信敬, 大喜多肇, 藤本純一郎. 糖脂質 Gb3 を介して伝達される細胞骨格系再構成の誘導刺激. 第 93 回日本病理学会, 札幌, 6 月 9-11 日, 2004.
- 2) Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Katagiri Y, Okita H, Fujimoto J. Effects of intracellular signals mediated by Shiga toxin binding. 4th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awajishima, Japan, Aug 30-Sep 2, 2004.
- 3) Katagiri YU, Takenouchi H, Tang W-R, Taguchi T, Okita H, Kiyokawa N, Fujimoto J. SSEA-4 antigens on embryonal carcinoma cells defined with anti-sialylGb5 monoclonal antibody Raft.2 (ワークショップ). 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 14-16 日, 2004.
- 4) Jiwen Wu, Lisheng Zhuo, Fukiko Atsumi, Mayumi Kawano, Koji Kimata. Structure and function of cumulus HA-rich matrix. 第 51 回マトリックス研究会大会. 京都, 2004.4.9.
- 5) Hideto Watanabe, Kazu Matsumoto, Nobuhiro Kamiya, Fukiko Atsumi, Yoshihiko Yamada, Koji Kimata.

- Proteoglycan aggregate of versican / PG-M in cartilage. 11th Gordon Research Conference Proteoglycans. New Hampshire, U.S.A., 2004.7.11-16.
- 6) Miyado K, Kazuo Yamagata, Masaru Okabe et al. Microvilli formation required for sperm-egg fusion, is CD9-dependent. The 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryo-Coats. Nov 8-13, 2004, Shima, Mie Pref, Japan.
- 7) 片桐洋子, 清河信敬, 唐巍然, 竹野内寿美, 田口智子, 大喜多肇, 藤本純一郎. 抗 sialylGb5 単クローン抗体 Raft.2 によって検出される EC 細胞上の SSEA-4 抗原. 第 94 回日本病理学会総会, 横浜, 4 月 14-16 日, 2005.
- 8) 片桐洋子, 北村紀子, 田口智子, 竹野内寿美, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. ラフト/マイクロドメインを認識する単クローン抗体 Raft.1 (ワークショップ) 第 91 回日本生化学会大会, 神戸, 10 月 19-22 日, 2005.
- 9) 3) 薛蓮, 宮田真路, 佐藤ちひろ, 北島健: ブタ精子の受精能獲得におけるシアロエpiteープの変化; 第 76 回日本動物学会年会; 筑波; 10 月 6-8 日 (2005).
- 10) 4) 河合育子, 太田祐理, 白井智香子, 廣田未央, 小島千佳, 平尾佳美, 卓麗聖, 木全弘治, 米田雅彦. マウス組織におけるヒアルロン酸リッチマトリックス-SHAP-HA 複合体の局在-. 第 37 回日本結合組織学会学術大会. 富山, 2005.5.27.
- 11) 5) Miyado, K. Tetraspanin and gamete membrane fusion.. Mammalian oogenesis and epigenetic modification, October 2005 (Chiba, Japan)
- 12) 宮戸健二 テトラスパニンによる膜融合の制御機構 第 28 回日本分子生物学会年会 ワークショップ、2005 年 12 月 (福岡)
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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ラ酸の存在証明. 第 26 回日本糖質学会年会 2006 年 8 月 23-25 日; 仙台
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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,
- 19) (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