

RNAi screening of human glycogene orthologs in the nematode *Caenorhabditis elegans* and the construction of the *C. elegans* glycogene database (CGGDB)

秋好, 紗弥香

<https://hdl.handle.net/2324/1470523>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

| | |
|--------|--|
| 氏 名 | 秋好 紗弥香 |
| 論 文 名 | RNAi screening of human glycogene orthologs in the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> and the construction of the <i>C. elegans</i> glycogene database (CGGDB) (線虫 <i>C. elegans</i> が有するヒト糖鎖遺伝子オーソログの RNAi スクリーニングによる機能解明およびデータベース(<i>C. elegans</i> Glycogene Database: CGGDB)の構築) |
| 論文調査委員 | 主 査 九州大学 准教授 野村 一也 副 査 九州大学 教授 石原 健 副 査 九州大学 教授 伊東 信 (生物資源環境科学府) 副 査 九州大学 准教授 角田 佳充 |

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

糖鎖は単糖が鎖のように結合している分子構造である。大腸菌などの細菌や古細菌、酵母、線虫からマウス・ヒトにいたるすべての生命の細胞膜や細胞壁は糖鎖で覆われている。このように進化的に広く保存された糖鎖の存在は、糖鎖が生命にとって不可欠の構造であることを強く示唆しており、実際、筋ジストロフィーの発症やインフルエンザなどのウイルス感染、細菌感染、発癌など各種疾病に深く関わっていることが明らかになってきている。核酸・タンパク質につぐ第3の生命鎖として、その解明は21世紀生物学の主流となるとされるが、糖鎖を合成したり、修飾したり、分解したりする遺伝子群（糖鎖遺伝子とよばれる）についての研究はまだ緒についたばかりである。

本研究では、ヒトの病気の原因や予防に重要な糖鎖の研究を効率的に進めるために、モデル生物線虫 *Caenorhabditis elegans* を材料に、ヒトの糖鎖遺伝子の線虫オーソログ遺伝子を同定し、それらの機能を網羅的に阻害する機能糖鎖生物学の研究を実施した。ヒトの糖鎖遺伝子のオーソログに研究対象を限定するという戦略によって、線虫に特有な糖鎖遺伝子や、ヒトなど高等生物にしか存在しない糖鎖遺伝子の研究を避け、生命の素過程に関わる普遍的な糖鎖遺伝子のみを研究することを目指した。共同研究者の成松久教授（産業技術総合研究所）のグループによるバイオインフォマティクスによる選定結果（108 個の糖鎖遺伝子）に、独自に 87 個の新規糖鎖遺伝子を追加して合計 195 個のヒト糖鎖遺伝子オーソログを選択した。87 個の新規糖鎖遺伝子の選定にはヒト遺伝子と線虫遺伝子の双方向ベストフィットや、OrthoList（線虫ヒト遺伝子オーソログデータベース）の成果、Cazy データベースとの照合および文献検索結果を併せて用い、GPI anchor 合成酵素や新規の糖鎖遺伝子などを選定した。Ahringer 博士のグループの作成した RNAi 用大腸菌や独自に作製した RNAi 用大腸菌による feeding RNAi の手法で合計 181 個のヒト糖鎖遺伝子オーソログの遺伝子機能を阻害した。注意深く多数回にわたる RNAi を行い、表現型として特に生殖系列の発生と初期胚分裂（減数分裂と体細胞分裂）に重点をおき異常な表現型を詳細に検索した。その結果、以下に概略を述べるように、合計 38 個の遺伝子の RNAi で激しい異常を見いだした。

コンドロイチン合成に関わる糖鎖遺伝子を阻害すると卵母細胞の形成が異常になること、ヘパラン硫酸の硫酸化に働く硫酸基転位酵素の阻害でも卵母細胞形成が異常になることを新たに発見した。これは硫酸化とコンドロイチン合成が卵母細胞形成に深く関わっていることを示唆する重要な発見である。また N 型糖鎖の合成遺伝子の阻害でも同様の異常が起こることを発見した。N 型糖鎖の合

成は小胞体 (ER) の細胞質側での Lipid Linked Oligosaccharide (LLO) の合成で開始される。この合成に関わる遺伝子の線虫オーソログ *calg-7*、*calg-13*、*calg-14*、*calg-1*、*calg-2*、*calg-11* の RNAi による阻害は *calg-1* 以外すべて生殖系列の発生異常をひき起こした。細胞質側で合成された LLO は次に ER 内腔側にフリップして *calg-3*、*calg-9*、*calg-12*、*calg-6*、*calg-8*、*calg-10* などで糖鎖構造が完成され、oligosaccharyltransferase 複合体の作用でタンパク質のアスパラギン残基に結合する。本研究では ER から Golgi を経て細胞膜にいたる N 型糖鎖合成に関わる全遺伝子の RNAi による機能阻害実験も行ったが、ER の細胞質側で働く LLO 合成遺伝子と oligosaccharyltransferase の阻害だけが、生殖系列への異常・ER ストレス応答 (Unfolded Protein Response) および体長が短くなる異常 (sma 表現型) をひき起こすことがわかった。ER 細胞質側と内腔で働く LLO 合成に関わる一連の遺伝子の異常は、ヒトでは先天性グリコシル化異常症 (Congenital Disorders of Glycosylation: CDG) タイプ 1 として知られており、精神・運動発達障害や発達障害など重篤な症状を示す。従来は LLO 合成の第一ステップである *ALG7* 遺伝子をツニカマイシンで阻害することで CDG タイプ 1 のモデルとする研究が主流であったが、本研究によって、線虫での N 型糖鎖の合成が特定の糖鎖遺伝子の RNAi によって自在に阻害できることが明らかになった。これはツニカマイシンなど薬剤に頼ることなく、糖鎖遺伝子の RNAi によって CDG タイプ 1 と類似の表現型を線虫で容易に得られるという発見であり、遺伝子ネットワークについての解析が容易な線虫が、CDG type 1 の極めて有効なモデル生物であることを実証した画期的な研究である。

以上の阻害実験の成果と、線虫でのヒト糖鎖遺伝子オーソログの選定結果はデータベース化して広く世界に公開した (線虫糖鎖遺伝子データベース CGGDB: *C. elegans* Glycogene Database—九州大学と産総研の共同作製のデータベース)。秋好が遺伝子リストとデータベースに記載する項目を選定し、ユーザーインタフェースを設計して、産業技術総合研究所の成松グループがデータベースへの実装を分担した。このデータベースには、本研究で明らかにした糖鎖遺伝子のモチーフ情報や RNAi 阻害実験の成果 (生殖巣の異常の写真や ER ストレスの測定結果、独自の文献情報、ヒト糖鎖遺伝子データベース GGDB へのリンクなど) の他、線虫研究の主要データベース WormBase の中から糖鎖遺伝子に関する情報を全てまとめており、線虫糖鎖遺伝子の情報をクリック一つで得られるように設計した。特定の表現型をひき起こす線虫糖鎖遺伝子をクリック一つでリストに出来るほか、特定の細胞で発現している糖鎖遺伝子のリストもクリック一つで可能である。ヒトの糖鎖異常についてのモデル生物での成果を手早く知りたい医学研究者や医師に役立つように設計した、極めて簡単に情報が得られるデータベースである。

本研究は、線虫のヒト糖鎖遺伝子オーソログを全て明らかにし、そのほとんどについて網羅的に機能阻害実験をした世界で初めての系統的、網羅的研究である。新たにコンドロイチン合成や硫酸基転移が生殖細胞の形成に必須であることを明らかにした他、小胞体の細胞質側で N 型糖鎖の合成に関わる糖鎖遺伝子が生殖系列の発生に必須であること、その阻害が小胞体ストレスや体長の減少をひき起こすことを新たに発見した。本研究によってツニカマイシンに頼らずヒトの CDG のモデル生物による研究が可能であることが世界で始めて明らかになった。さらに研究成果は線虫糖鎖遺伝子データベース CGGDB として世界にむけて公開しており、医療関係者や研究者に役立つものとなっている。本研究成果は、基礎生命科学への貢献であるのみならず、ヒトの糖鎖異常による各種の病気の研究にも今後、大いに活用されると期待できる。

よって、本研究者は博士 (理学) の学位を受ける資格があるものと認める。