

糖鎖生物学から糖鎖工学へ

西川 義尚¹⁾・高橋 哲夫²⁾

From Glycobiology to Glycotechnology

by

Yoshihisa Nishikawa and Tetsuo Takahashi

(Received on Sep. 28, 2001)

Abstract

Glycoproteins are biopolymers that contain one or more oligosaccharide chain covalently linked to a protein. During the past 15 years, it has been generally accepted that the asparagine-linked oligosaccharide of glycoprotein is crucial for the function of glycoprotein. Therefore in the biotechnology, many useful human glycoproteins [*ie.* erythropoietin, tissue plasminogen activator, interferon(and), *etc.*] are produced by transfecting each human corresponding gene to mammalian cells that have the machinery to synthesize asparagine-linked oligosaccharide. In the present paper, our recent studies on the biosynthesis of lipid-linked oligosaccharide which is the precursor of the asparagine-linked oligosaccharide of glycoprotein were described. We have succeeded in the cloning of human genes of the GDP-mannose dependent mannosyltransferases which are involved in the first half of biosynthesis of the lipid-linked oligosaccharide. This approach may enable us, not only to clarify the regulation of the biosynthesis of lipid-linked oligosaccharide, but also to apply for the enzymatic synthesis of functional oligosaccharide, and for the diagnosis of human congenital disorders of glycosylation (CDG).

Keywords: sugar, carbohydrate, biotechnology, glycotechnology, glycobiology, glycoconjugates, glycoprotein, asparagines-linked oligosaccharide, lipid intermediate, gene cloning, cDNA, glycosylation, glycosyltransferase, mannosyltransferase, congenital disorders of glycosylation

1. はじめに

私達が本学に奉職して以来、8年半が経た。私達が本学にお世話になることになったのは、当時の工業化学科主任教授 谷地忠義先生が、御自身の研究テーマであったセルロースとの関連から、その当時、核酸、タンパク質に続く、第三の分子生物学として、脚光を浴びはじめた糖鎖生物学 (glycobiology) とその工業的利用を目指す糖鎖工学 (glycotechnology) に着目され、その教育と研究を工業化学科において展開されようとお考えになったことによる。そして、谷地先生の御要請を受け、私達は工業化学科に着任以来、学部学生・院生を対象に、糖鎖工学および遺伝子工学の講義を行ってきた。その足場固めの途上、谷地先生が急逝されたことは、私達にとってはもとより、工業化学科にとって誠に大きな損失であった。本稿においては、以来、教育のかたわら、院生諸君および学生諸君とともにやってきた研究の一端を御紹介したい。

2. 糖と糖鎖

糖とは分子内に1個のアルデヒド基あるいはケトン基と複数の水酸基を持つ分子およびその縮合体・誘導体を指す。糖の最小構

構成単位は単糖と呼ばれ、ブドウ糖の一般名で知られているグル

コースが代表例である (Fig. 1A および B)。天然に於いて、糖は単糖として存在するほか、糖同士が共有結合したオリゴ糖 (糖が2個から20個ほど結合したもの) および多糖 (それ以上の長さ結合したもの) としても存在する。通常、オリゴ糖・多糖の形状を糖鎖と総称する。

構成成分以外の面で、糖鎖が核酸 (DNA、RNA) やタンパクと異なっている大きな特徴は、核酸やタンパクが直鎖状であるのに対して、オリゴ糖・多糖は直鎖状のみならず分岐状でも存在することである。そのために少ない構成成分で多くの情報を担っている。糖鎖の例としては、グルコースのみからなるセルロース (植物の細胞壁構成成分であり、木材、紙、木綿の主成分)、デンプン (植物のエネルギー貯蔵物質であり、我々ヒトの主たるエネルギー源)、グリコーゲン (我々の体内に於けるエネルギー貯蔵物質) があげられる。これらはいずれもグルコースのみを構成糖としているが、その結合様式・サイズ等を異にしている

* 1 東海大学工学部生命化学科教授
* 2 東海大学工学部生命化学科助教授

(Fig. 1E,F および G)。セルロースはグルコースが 1-4 結合で結合しており、デンプンやグリコーゲンは 1-4 結合を基本とし、更に 1-6 結合で分岐を形成している。高次構造においては、前者は直鎖状であり、後者はらせん状である。また、我々は後者のみを、直接、体内で消化酵素によりグルコースにまで分解して利用することができる。また、最近、ダイエット食品で用いられているマンナンはマンノース (Fig. 1C) という糖からなる多糖であり、チューインガムなどの甘味料として使われているキシリトールの原料であるキシランはキシロース (Fig. 1D) という糖からなる多糖である。尚、キャラメルの商品名の「グリコ」、本稿の英語タイトルにある glycobiology (糖鎖生物学) や glycotchnology (糖鎖工学) の glyco- はギリシャ語の "glukus" (甘い) に由来する。

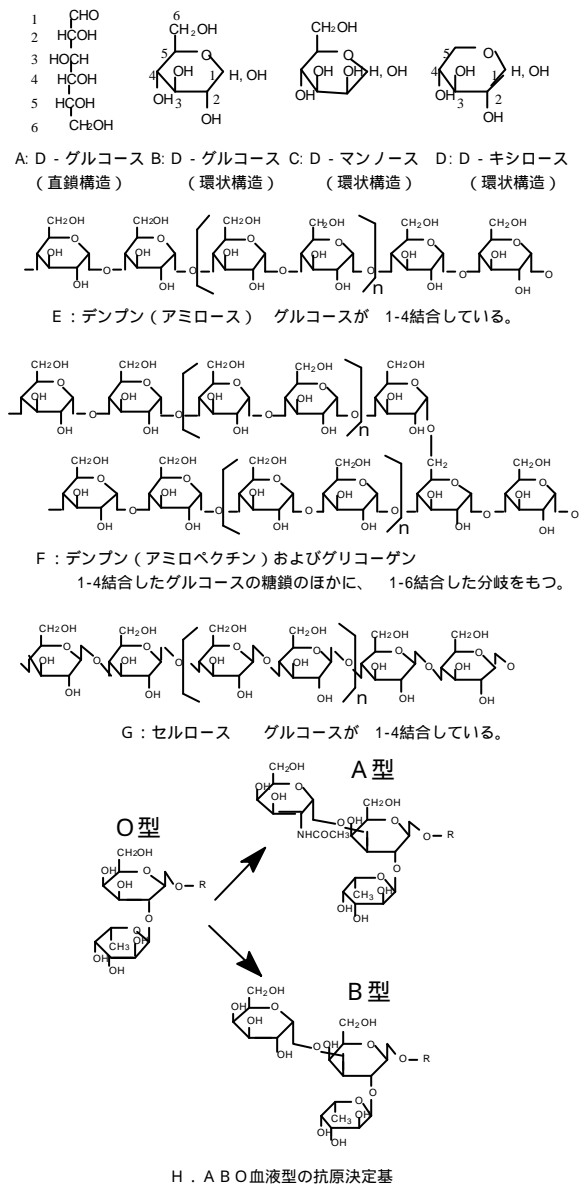


Fig. 1 単糖、オリゴ糖、多糖の構造

更に、糖鎖はタンパク質や脂質と共有結合して糖タンパク、プロテオグリカンや糖脂質のような複合糖質 (glycoconjugates) の構成成分として存在している (Fig. 2)。

当世流行の「血液型心理学」が対象としている ABO 血液型 (Fig. 1H) は糖タンパクや糖脂質に結合している糖鎖の中のわずか 1 個の糖残基の有無あるいは違いにより決定されているとか、ヒトの体を形成している 6×10^{13} 個の細胞の表層が上記のような複合糖質で覆われている (Fig. 3) ことを知れば、糖鎖を一層身近なものとして受け取っていただくことができよう。

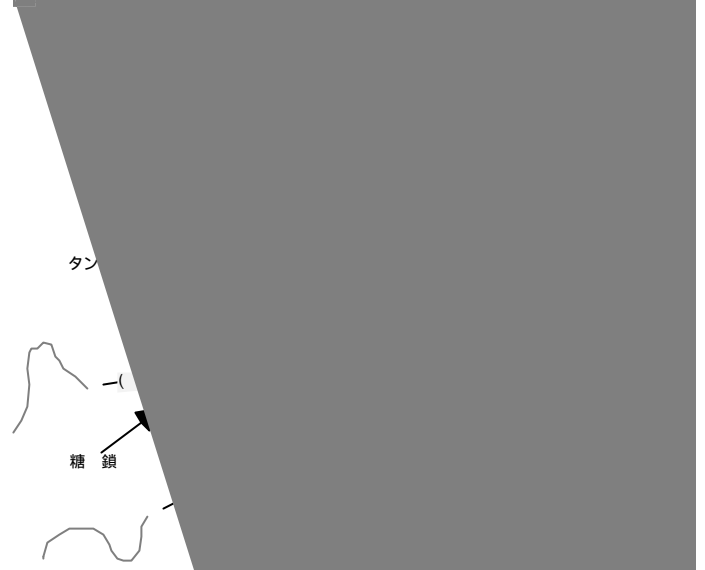


Fig.2 複合糖質：糖タンパク、プロテオグリカン、糖脂質

3 . 糖タンパクにおける糖鎖生物学と糖鎖工学

私達の研究グループは糖タンパクの糖鎖生物学的研究を通して、その糖鎖工学への展開を志向している。この糖鎖生物学および糖鎖工学という名称自体は、ここ 10 年あまり前から用いられるようになった新しい造語である。前者は糖鎖構造の生合成や生物学的機能などを論ずる学問であり、後者は糖鎖の諸機能に基づいて、その応用を開拓する学問である。例えば、インフルエンザウイルス (A 型・B 型) が感染・増殖する際に必要なインフルエンザウイルスのシアリダーゼ (気管上皮を覆う糖タンパクのムチンの糖鎖からシアル酸という糖を除去する酵素) を阻害することから、インフルエンザの特効薬として開発された Relenza (Zanamivir) (2001 年 1 月から日本でも使用認可) は、この 10 年間での糖鎖生物学・糖鎖工学の成果の代表例である。

3 . 1 糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖

糖タンパク (glycoprotein) とは、文字どおり、糖鎖がタンパクと共有結合した生体高分子 (Fig. 2) であり、その糖鎖はたかだか 20 個程度の単糖が直鎖状にあるいは分岐状に脱水縮合したものである。糖タンパクは、細胞表層では細胞外からの栄養分、細胞増殖因子、ホルモン、細胞、細菌、ウイルスなどの受容体として機能するほか、細胞外に分泌されて物質輸送タンパク、酵素、ホルモン、免疫グロブリンなどとして機能し、細胞増殖、分化、細胞接着、感染、受精、生体防御、酵素作用、ホルモン作用、血液凝固、潤滑作用などに関与している (Fig. 3)。

糖タンパクにおいて、糖鎖は、1) 糖タンパクの高次構造の維持、親水性の付与、タンパク分解酵素からのマスキングなど物理化学的性質の付与、そして、2) 認識のシグナルとして機能している。そして、タンパクに対して糖鎖は無秩序に結合しているのではなく、タンパクの然るべき構造部分に、然るべき結合様式で結合している。このうち、アスパラギン結合型糖鎖はタンパク中のアスパラギンというアミノ酸に糖鎖がN グリコシド結合という結合様式で結合したものである (Fig. 4B)。

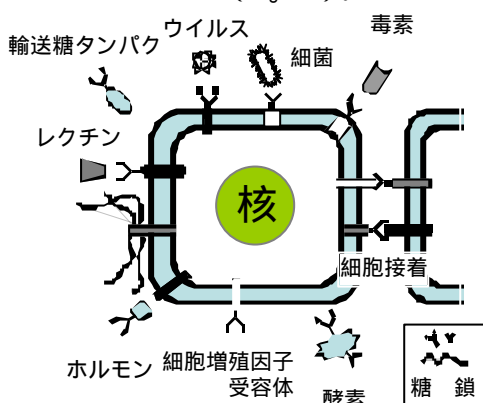


Fig.3 糖タンパクの生物学的機能

近年、年間生産高2兆円を越すまでに成長したバイオテクノロジー産業(ここでは狭義の意味に用いている。酒造、発酵乳製品、パン製造、抗生物質生産、アミノ酸発酵、核酸発酵、ビタミン発酵など旧来の微生物工業は含まない。)で生産されるヒト有用タンパクのかなりがアスパラギン結合型糖鎖を持つ糖タンパクである。そして、エリスロポエチン(貧血治療)、組織プラスミノゲン活性化因子(血栓治療)、インターフェロン(、)、血液凝固因子(血友病治療)などの糖タンパクでは、その機能発現・活性維持にアスパラギン結合型糖鎖が必須である。従って、これら有用糖タンパクの遺伝子をクローニング後、大腸菌に移入して生産させようとしても、大腸菌にはアスパラギン結合型糖鎖合成システムがないために活性あるものは得られない。そのために、それらの生産ではヒトと同様のアスパラギン結合型糖鎖合成システムを持つハムスター由来培養細胞株などに遺伝子を移入することで工業化に成功している。また、後に述べるように、アスパラギン結合型糖鎖を全く生合成できない条件では、我々の体を構成する一個一個の細胞でさえ増殖できない。また、アスパラギン結合型糖鎖は生合成できても、その修飾(プロセッシング、後述)に関わるN-アセチルグルコサミン転移酵素という糖転移酵素(基質に糖を付加する酵素: Fig. 6)の遺伝子を欠損すると、一個一個の細胞は生育可能であるが、同遺伝子を破壊したマウス(ノックアウト・マウス)は胎児の段階で成長を停止し、誕生することができない。以上から、糖タンパクにおいて、アスパラギン結合型糖鎖が、決して、単なる飾りではなく、重要な機能を担っていることが御理解いただければ。

3.2 アスパラギン結合型糖鎖の生合成

アスパラギン結合型糖鎖は、Fig. 4Bにあるように、タイ

プ分けがされているが、その生合成過程は、1) リピド中間体 (Fig. 4A) と呼ばれる糖鎖前駆体の生合成、2) オリゴ糖転移酵素によるリピド中間体からの糖鎖部分のタンパクのアスパラギン残基への転移(オリゴ糖転移)、そして、3) タンパク上での糖鎖の、種々のグリコシダーゼ(糖加水分解酵素)および糖転移酵素による修飾(プロセッシング)の3つの順序で連続的に進行する (Fig. 5)。このうち、1) および 2) の過程は細胞内の粗面小胞体という細胞内小器官で行われ、3) の過程は粗面小胞体およびゴルジ体(同じく、細胞内小器官の一つ)で行われる。

このうち、私達が焦点をあてているのは、粗面小胞体で行われるリピド中間体の生合成過程である。 リピド中間体は Fig. 4 に

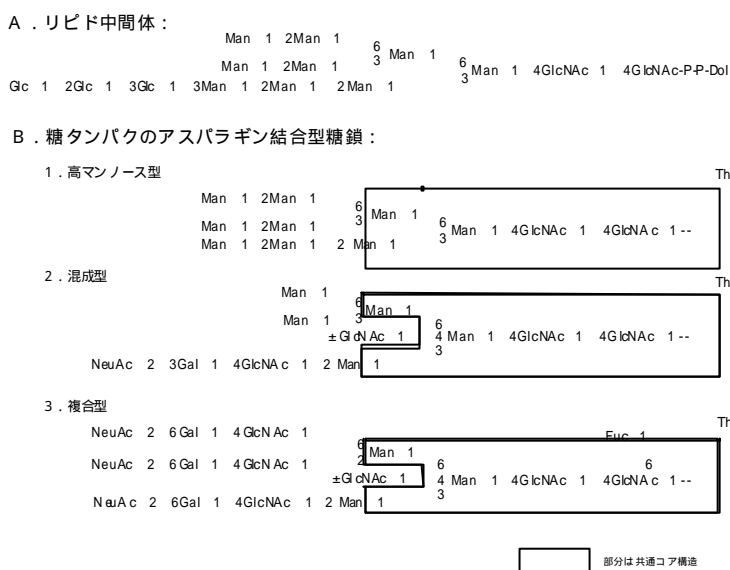


Fig. 4 リピド中間体(A)およびアスパラギン結合型糖鎖(B)の構造
 囲み部分はアスパラギン結合型糖鎖における共通コア構造
 略号: Man (マンノース)、GlcNAc (N-アセチルグルコサミン)、Glc (グルコース)、NeuAc (N-アセチルノイロミン酸)、Gal (ガラクトース)、Fuc (フコース)、P (リン酸)、Dol (ドリコール)、Asn (アスパラギン)、Thr (スレオニン)、Ser (セリン)

示すように、グルコース (Glc) 3 個、マンノース (Man) 9 個、N アセチルグルコサミン (GlcNAc) 2 個、計 14 個の糖から成る枝分かれした糖鎖がピロリン酸を介して、ドリコール (dolichol, Dol) と呼ばれるポリイソプレノイドアルコール(約 20 のイソブレン単位から成る長鎖アルコールで -イソブレン単位が飽和している: 尚、このイソブレン単位の重合は天然ゴムと同様の機構で行われる)と共有結合した $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-}$ ドリコール (P はリン酸) であることがわかっている。

このリピド中間体は全 14 段階の糖転移酵素反応により生合成される。そして、前半の 7 段階と後半の 7 段階では、糖転移酵素反応の糖供与体と粗面小胞体膜上での生合成

部位を異にしている。すなわち、前半の7段階は UDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) および GDP-マンノース (GDP-Man) という糖ヌクレオチド、後半の7段階はドリコールリン酸マンノース (Dol-P-Man) およびドリコールリン酸グルコース (Dol-P-Glc) というドリコールリン酸糖を糖供与体としている。しかも、その生合成される部位は前半は粗面小胞体膜の細胞質側、後半は粗面小胞体内腔側に分かれている (Fig. 5)。

リピド中間体の構造、生合成経路、および、生合成部位については、私達がこの研究に着手したころは決定していなかった。そのような当時の状況や以下に述べる発見が端緒となって、リピド中間体生合成に関する研究の道に入った。

3.3 遺伝生化学的手法によるアスパラギン結合型糖鎖生合成研究

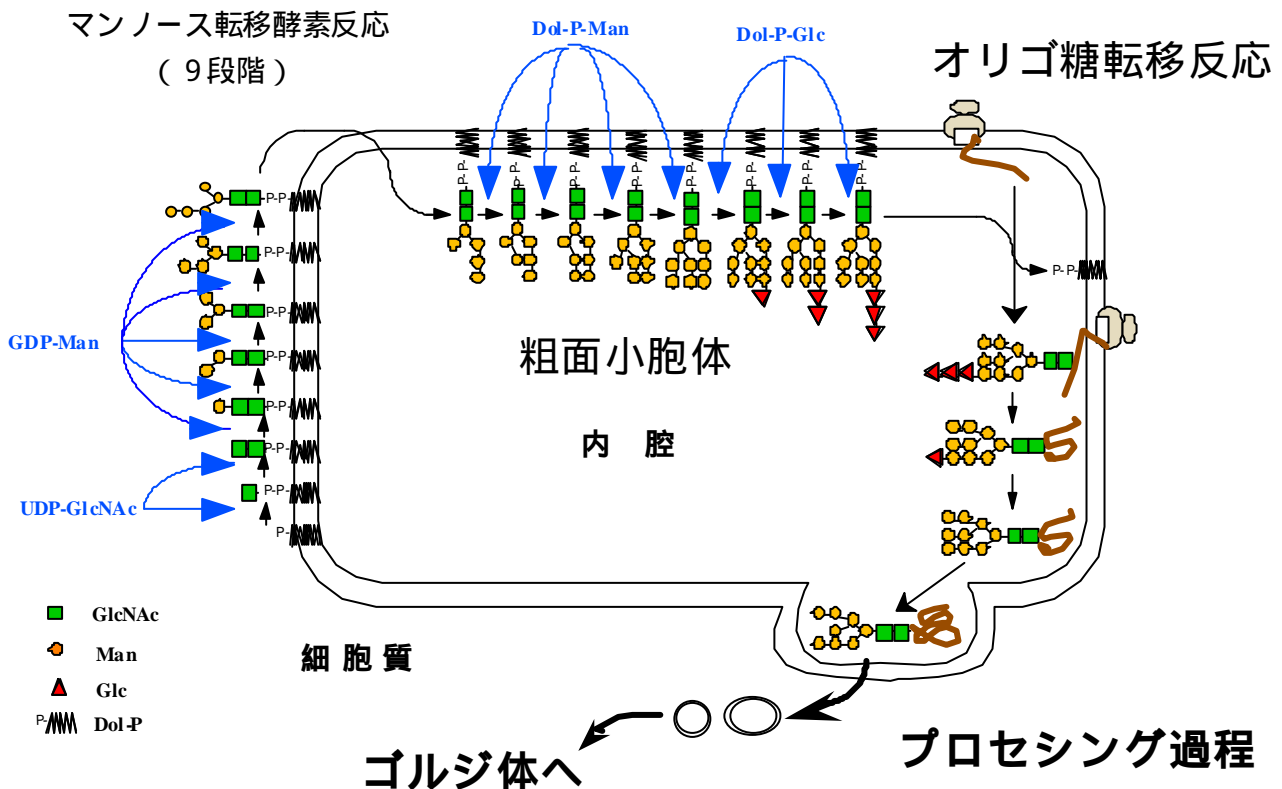
私達は糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖生合成を解析するために遺伝生化学的方法を用いている。遺伝生化学的研究とは、特定遺伝子に書き込まれた遺伝情報の発現 (遺伝子がスイッチオンされて、その遺伝形質が表現されること) を突然変異導入、特

定遺伝子の細胞や動物への移入など遺伝学的手法を用いてコントロールし、それにより生じた結果を生化学的手法で解析することにより、特定遺伝子の変異あるいは移入と生じた現象との因果関係を解明し、特定遺伝子の機能を論ずるものである。この手法は、大腸菌を実験材料とする分子遺伝学で発展した手法であるが、高等動物細胞に対して用いても一番説得力のある手法である。現在、この遺伝生化学的研究によって得られた成果は、特定遺伝子のクローニングとその塩基配列の決定などを経た上、バイオテクノロジー産業においては、特定遺伝子を大腸菌、動物細胞、植物細胞などへ移入することにより低分子有機化合物、タンパク質、糖質などの有用物質の生産に用いられ、また、医学においては、遺伝子診断・遺伝子治療に用いられている。

二本鎖DNAに塩基配列として書き込まれた遺伝情報は、時、場所、場合に応じて、必要部分が一本鎖のメッセージRNA (mRNA) に「転写」された後、その塩基配列が全生物に普遍的な遺伝暗号に従って、アミノ酸に「翻訳」されてタンパクとして生合成され、それが酵素作用などの諸機能を発現する (Fig. 6)。ところで、個々の臓器で生合成される糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖の構造はDNAの塩基配列により一義的に決められているのではなく、相手側のタンパクのアミノ酸配列、各種糖転移酵素遺伝子の発現、糖供与体の供給量など様々な要因の反映により形成される。従って、同一糖タンパクであっても、それ

Fig. 5 糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖生合成経路
アスパラギン結合型糖鎖は、リピド中間体の生合成、オリゴ糖転移、そして、糖のトリミングおよび糖の逐次的付加 (プロセッシング) の3つに過程を経て完成される。

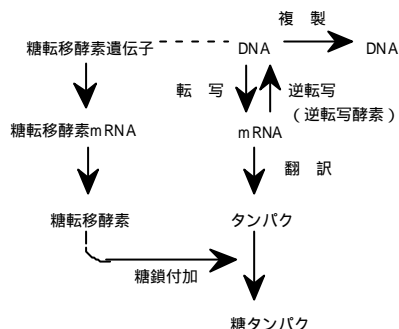
リピド中間体生合成過程



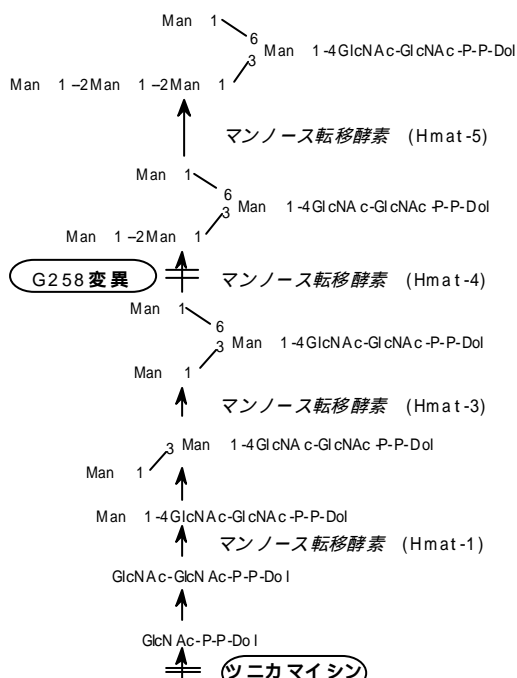
が生合成される臓器によって糖鎖構造が異なる。

ところで、最近、ヒト・ゲノムの全塩基配列の決定がマスコミをにぎわしている。ゲノムとは染色体 DNA に含まれる 1 セットの遺伝情報のことである。ヒト体細胞は 46 本の染色体中に父母から 1 セットずつ、計 2 セットのゲノムを持っている。ヒト・ゲ

Fig. 6 遺伝子発現と糖鎖付加
タンパクのアミノ酸配列は DNA の塩基配列で決定されるが、糖鎖の配列は DNA の塩基配列で決まっているのではない。



ノムは約 3×10^9 塩基対=3,000 メガ塩基 [Mega base (Mb)] 対から成り立っており、そこに含まれている遺伝子の総数は 35,000 前後と言われている。従って、計算上は、約 85 キロ塩基対 (Kb) ごとに一つの割合で遺伝子が存在することになる。しかも、実際は、個々の遺伝子自体が更に、幾つかに分断されて飛び飛びに存在している。例えば、後述するヒト・マンノース転移酵素 遺伝子は翻訳配列 (タンパクに翻訳されるための情報が入っている配列) が 2 カ所に、また、ヒト・マンノース転移酵素 遺伝子の場合には 13 カ所に分かれて存在している。ヒト・ゲノム DNA 中では翻訳配列領域 (エキソン exon) より非翻訳領域 (イントロン intron) の方が圧倒的に大きく、エキソンの占める割合はヒト・ゲノムの 2% 前後にすぎない。このような中で進められてきたヒト・ゲノム・プロジェクトのような、DNA の塩基配列を片っ端から決定するというトップ・ダウ



ンのアプローチでは、得られた配列の全てが機能と対応づけられているわけではない。現段階で機能と塩基配列が決定しているヒト遺伝子は 1 万数千といわれている。それ故、遺伝生化学的解析のような、機能研究からスタートしたボトム・アップのアプローチとの融合が必要である。

Fig. 7 私達が研究対象としているリピド中間体生合成過程前半

私達はリピド中間体生合成過程の前半に働く、GDP-マンノースを糖供与体とするマンノース転移酵素群に焦点をあてて研究を行っている。()内は各酵素のヒト遺伝子名。ツニカマイシン阻害部位および G258 変異株の変異部位も示した。

4. 私達の研究の経緯

4.1 研究の出発点—ツニカマイシンとの出会い—

私達が糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖生合成に着目した契機は、今から 4 半世紀前、東京都臨床医学総合研究所に在籍していた当時、東京大学農学部農芸化学科教授であられた田村学造先生 (1984 年度日本学士院恩賜賞受賞者) から、リピド中間体の生合成の第一反応 (Fig.5) を特異的に阻害することにより、糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖生合成を阻害する抗生物質ツニカマイシン (Fig.7) を御供与いただいていた実験で得られた発見にある。すなわち、ツニカマイシンを用いて、ヒト・パーキットリンパ腫由来 Raji 細胞内において、粗面小胞体で生合成された糖タンパクが細胞表層まで輸送される過程 (細胞内輸送) における、糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖の役割を解析するための実験条件を検討していた際に、ツニカマイシンにより、Raji 細胞の増殖が、細胞周期上の G1 期で可逆的に停止することを発見したのである。細胞周期とは、細胞が分裂してから、次の分裂をするまでの期間を指す。そして、細胞周期は、DNA 合成 (synthesis) をする時期を S 期とし、最後の細胞分裂 (mitosis) の時期を M 期とし、その前後の、分裂した細胞が S 期に入るまでのギャップを G1 期、そして、S 期と M 期の間のギャップを G2 期とする、計 4 つの時期に大別されている (Fig. 8)。このツニカマイシン存在下に培養した Raji 細胞が細胞周期上の G1 期で可逆的に増殖停止するという発見は、ヒトを含む真核細胞の G1 期通過に、リピド中間体生合成および糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖が必要であるということを示している。この発見が私達を糖鎖生物学に向かせることになった。

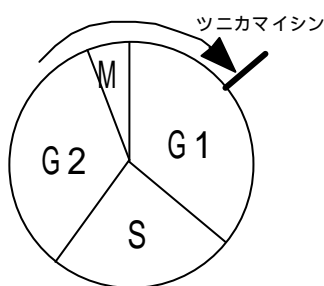


Fig. 8 ツニカマイシンによる真核細胞に G1 期可逆的の停止 この現象の発見が、私達の研究の出発点となった

4.2 糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖生成に関する突然変異株の分離

さて、先に述べたリピド中間体生成における糖転移反応（糖鎖の伸長）に働く14種類の各糖転移酵素（Fig. 5）についての詳細な研究は、それらが存在量が少なく、また、酵素活性の測定に必要な糖受容体（アクセプター）を調製することが極めて困難なことから未だに進んでいない（現在、生命化学科 中原義昭教授とアクセプターの有機合成について共同研究中）。そこで、まず、リピド中間体生成機構の解析のために、先に述べた遺伝生化学的手法を導入した。すなわち、動物培養細胞からリピド中間体生成に関する突然変異株を分離し、リピド中間体生成変異が動物培養細胞にもたらす影響を解析するとともに、その変異株をもとに、その変異を回復させる（相補させる）リピド中間体生成遺伝子をクローニングしようというのである。この研究を始めた当初、リピド中間体生成に関する突然変異株が動物培養細胞から2、3種類分離されていた。それらの変異株は糖鎖親和性の細胞増殖阻害物質存在下でも生存可能な細胞として分離されたものであり、リピド中間体生成に欠陥があっても、いずれも細胞増殖に関しては正常であった。このことは、それらの変異株では、正常よりも糖鎖が短いリピド中間体が生成されるけれども、それらのリピド中間体で欠損している外郭部分は細胞増殖に必要なことを意味している。そこで、リピド中間体において、細胞増殖に必要な根幹糖鎖部分の生成に働く糖転移酵素遺伝子が変異した突然変異株を分離することにした。そして、そのためには、それらを温度感受性変異株という形で得るのが最良の方法である。

この温度感受性変異というものは、突然変異によってある特定遺伝子の塩基配列の一部（一塩基）が変化し、その結果、遺伝子産物であるタンパク中のアミノ酸（一つ）が他のアミノ酸に置換することにより、そのタンパクの熱安定性が低下し、高温で機能を発揮できないことを言う。

リピド中間体生成に関する温度感受性変異株を分離するに際して、用いた方法はトリチウム自殺法というものである。すなわち、マンノースがアスパラギン結合型糖鎖の主要成分であることに着目し、トリチウム（三重水素、 ^3H ）で放射性同位元素標識されたマンノース（2- $[\text{}^3\text{H}]$ マンノース）を、突然変異誘発したマウス FM3A 細胞の培養（約 1×10^7 個の細胞）に高温（39℃）条件下に数時間取り込ませる。このとき、2- $[\text{}^3\text{H}]$ マンノースの大部分は、GDP-マンノース、Dol-P-マンノース、リピド中間体を経て糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖に取り込まれる（Fig. 5）。そして、遠心分離法で培地を除去し、更に、細胞を洗浄して取り込まれなかった 2- $[\text{}^3\text{H}]$ マンノースを除去した後、細胞を液体窒素中に5、6週間、凍結保存し、糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖に取り込まれた 2- $[\text{}^3\text{H}]$ マンノースのトリチウムの崩壊に起因する細胞への傷害を蓄積させた。この条件で、高温で 2- $[\text{}^3\text{H}]$ マンノースをアスパラギン結合型糖鎖に取り込んだ細胞は、トリチウムに由来する細胞への傷害の蓄積のために死滅し、何らかの突然変異により 2- $[\text{}^3\text{H}]$ マンノースを取り込むことができなかった細胞は、トリチウムによる傷害を蓄積しないので、液体窒素保存中も生き残る。この原理に

より、アスパラギン結合型糖鎖生成に関する突然変異株を選択的に濃縮することができる。こうして、マウス FM3A 細胞からリピド中間体生成および細胞増殖に関する温度感受性突然変異株 G258 を分離することに成功した。G258 変異株は、低温ではフルサイズのリピド中間体 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-}$ ドリコールまで生成し、アスパラギン結合型糖鎖生成も正常であり、細胞増殖可能であるが、高温では $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-}$ ドリコールまでしか生成できず（GDP-マンノースをマンノース供与体とするマンノース転移酵素に関する温度感受性変異、Fig. 7）、結果的に、アスパラギン結合型糖鎖が生成できず、細胞増殖もできなかった。そして、G258 変異株から自然復帰変異株（自然突然変異により、G258 変異株のリピド中間体生成および細胞増殖に関する温度感受性変異から回復した株）を解析した結果、G258 変異株は単一遺伝子変異で細胞増殖に関し温度感受性であり、また、リピド中間体生成およびアスパラギン結合型糖鎖生成に関し温度感受性であることがわかった。このことは、G258 変異株は、高温条件下においては、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-}$ ドリコールまでしか生成できないので、その異常に短い糖鎖のリピド中間体がオリゴ糖転移酵素に認識されず、その結果、糖鎖を欠損した（糖）タンパクを生成する。その結果、G258 変異株において、それら糖鎖欠損（糖）タンパクが正常に機能できないことになり、結果的に増殖を停止し、死滅するものと説明される。糖鎖生成阻害による細胞の増殖停止のメカニズムに関する研究は、現在、この分野におけるホットな焦点の一つになっている。この G258 変異株は 1981 年に分離したが、このように、リピド中間体生成段階における変異が細胞増殖と直結した動物培養細胞変異株は、未だに G258 変異株が世界的に唯一のものである。

4.3 マンノース転移酵素遺伝子の発現クローニング

マウス FM3A 細胞由来 G258 変異株が単一遺伝子変異でリピド中間体生成に関して温度感受性であり、また、細胞増殖に関して温度感受性であるという性質を利用して、G258 変異株にヒト遺伝子を移入し、その細胞増殖の温度感受性からの回復を指標に、マウス G258 変異株のリピド中間体生成を相補するヒト遺伝子 [マンノース転移酵素 遺伝子、Hmat-4 (human mannosyltransferase-4) と命名] のクローニングに着手した。この方法は、正常遺伝子の発現を指標に、その遺伝子をクローニングをするというので、発現クローニングと呼ばれている。そして、はじめに、常法通り、電気穿孔法などによるヒト cDNA ライブラリー（後述）の G258 変異株への移入で、G258 変異株のマンノース転移酵素 遺伝子変異を相補するヒト遺伝子のクローニングを試みたが、細胞側と cDNA ライブラリー側双方の種々の問題から成功しなかった。

この時点で、私達は本学に奉職することとなり、院生諸君・学生諸君とともに、新しいスタートを切った。

そして、G258 変異株の浮遊球状細胞としての制約を考慮して、G258 変異株にヒト・ゲノム遺伝子 [約 3,000Mb. 各遺伝子について存在量が等価] を断片化して移入する方法に変更した。すなわち、G258 変異株と、X線照射（80Gy）して染色体を 5 10 Mb のサイズに断片化したヒト HeLa 細胞とを細胞融合（Radiation Hybrid）させた。その

結果、G258 変異株の細胞増殖およびリピド中間体生合成変異から回復した形質転換株を複数分離することができた。このことは、HeLa 細胞中に存在するヒトの正常なマンノース転移酵素 遺伝子で、マウス G258 変異株の欠陥マンノース転移酵素 遺伝子を補うことができたことを意味する。こうして、得られた複数の形質転換株から inter L1-PCR (polymerase chain reaction : ポリメラーゼ連鎖反応) という方法で増幅される DNA 断片を得て、アガロースゲル電気泳動および Alu サザン分析によりヒト特異的 DNA 断片の有無を解析した結果、それらの形質転換株全てに共通して、長さ 1,300 塩基 (1.3Kb) のヒト由来 DNA 断片が含まれていることを見出した。このことは、目的とするヒト・マンノース転移酵素 遺伝子 (Hmat-4) の、ヒト染色体上の存在部位近傍にその 1.3Kb DNA 断片が存在することを強く示唆する (Fig. 9)。そこで、この共通 1.3Kb DNA 断片を指標に、ヒト mega YAC ライブラリー (フランスの CEPH より入手) を検索した。ヒト mega YAC ライブラリーとは、およそ 3,000Mb からなるヒト・ゲノムを 50kb 1.8Mb に切断後、酵母のベクター (DNA の運び屋) に連結して人工染色体 (YAC) とした上、酵母細胞に導入して作られたヒト・ゲノム DNA ライブラリーである。我々はこのヒト mega YAC ライブラリーから 1.3Kb DNA 配列を保持する YAC クローンとして、923f5 (ヒト第 13 番染色体長腕 14 領域由来の 1.06Mb のサイズの DNA 断片を含有) を検出し、更に、この YAC クローン 923f5 が G258 変異株の欠陥マンノース転移酵素 遺伝子の変異を相補する活性を有することを見出した。すなわち、YAC クローン 923f5 に含まれるヒト由来ゲノム DNA 断片 (1.06Mb) 中に、1.3Kb DNA 配列だけでなく、マンノース転移酵素 遺伝子 Hmat-4 も存在することがわかった。つまり、目的とするマンノース転移酵素 遺伝子をヒト全ゲノム約 3,000Mb 中の 0.03% の領域に限定することが出来たのである。G258 変異株の細胞の制約上、止むをえなかったとはいえ、この方法はやや冒険的な方法であっただけに驚くべき成果である。この変異株は世界的に見ても他に類例を見ない新規なものであるので、どうしても自分達の力で目的遺伝子を手にしたかった。その一途な願いで、ここまで到達することが出来た。改めて、遺伝生化学的解析に対する信頼を深くした次第である。この範囲には、まだ約 10 個程の遺伝子が存在する。今後、それらを一一つ調べることにより、目的遺伝子をクローニングしたいと思って頑張っているところである。

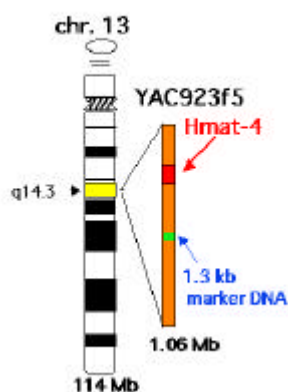


Fig. 9 ヒト・マンノース転移酵素 遺伝子 Hmat-4 の染色体上の存在部位

Hmat-4 遺伝子およびその周辺はヒト第 13 番染色体 (114Mb) の長腕に存在する。すなわち、Hmat-4 遺伝子およびその周辺はヒト YAC クローン 923f5 に挿入されている第 13 番染色体由来ゲノム DNA 断片 (1.06Mb) 中に存在することを見出した。

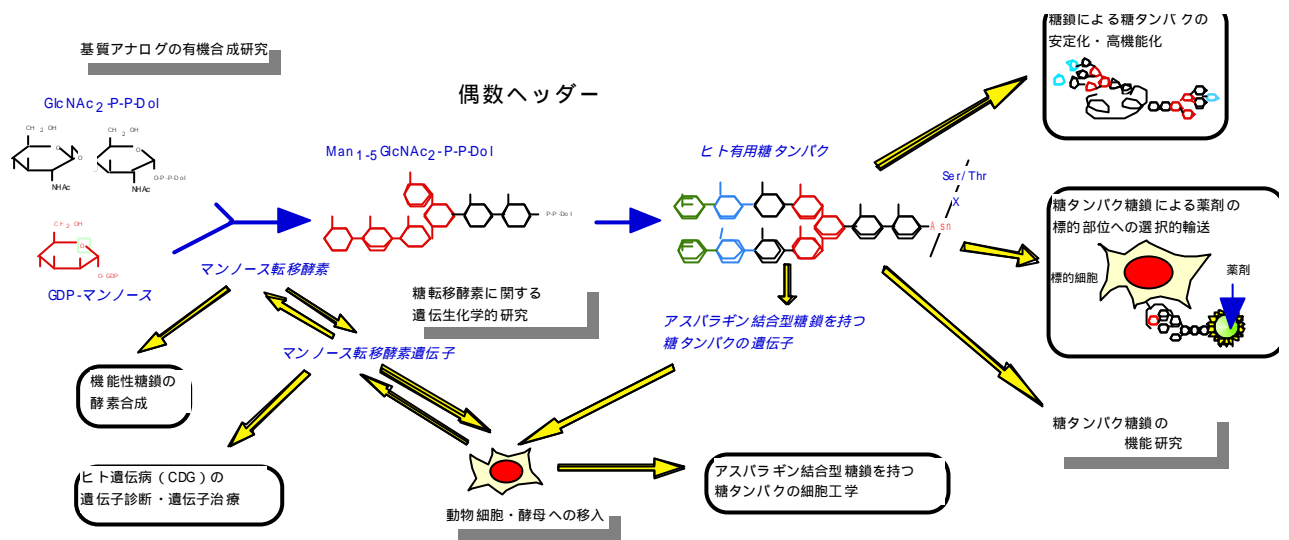
4.4 マンノース転移酵素遺伝子 のホモロジー・クローニング

私達はヒト・マンノース転移酵素 遺伝子 Hmat-4 の発現クローニングを進めるとともに、リピド中間体生合成過程におけるその周辺の遺伝子、すなわち、GDP-マンノースをマンノース供与体とするマンノース転移酵素群 (、) のヒト遺伝子 (Hmat-1, Hmat-3, Hmat-5) のクローニングも行った (Fig. 7)。更に、マウスのこれらの遺伝子 (Mmat-1, Mmat-3, Mmat-5) のクローニングも行っている。これらのクローニングには、Hmat-4 遺伝子のクローニングに用いている発現クローニングとは異なるアプローチを用いている。

リピド中間体生合成過程は酵母から高等動物まで共通して存在している。このことは、それぞれの過程に働く 14 の糖転移酵素も構造的に類似していると予想される。マウス FM3A 細胞からの G258 変異株の分離を学会発表した 1982 年に、アメリカの研究グループにより、酵母で同様な方法でリピド中間体生合成変異株が分離された。そして、それに基づいて、主に、発現クローニング法により、酵母のマンノース転移酵素遺伝子が幾つかクローニングされ、塩基配列が決定された。そこで、私達は酵母遺伝子との相同性 (ホモロジー) をもとに、ヒト遺伝子をクローニングするホモロジー・クローニングに着手した。そして、私達はまず、酵母のマンノース転移酵素 遺伝子 (ALG2) をクローニングし、その全体を標識したプローブを調製し、それを用いてヒトの cDNA ライブラリーをコロニーハイブリダイゼーション法あるいはブランクハイブリダイゼーション法という方法で検索した。

ヒト cDNA ライブラリーとはヒトのそれぞれの臓器で発現している全 mRNA 画分を得、それから逆転写酵素 (mRNA を鋳型として DNA を合成する酵素、Fig. 6) を用いて人工的に DNA に変換したもの [mRNA に対して相補的な (complementary) DNA を含むので cDNA と呼ばれる] であり、ゲノム DNA から、その臓器で機能している全遺伝子の翻訳領域、すなわち、エキソンだけを取り出したものと考えてよい。尚、それぞれの臓器毎に、そこで発現している遺伝子の内容が異なるので、個々の mRNA の存在頻度が異なる。従って、各臓器毎にその mRNA から調製される cDNA ライブラリーもその中身が異なっている。

残念ながら、上記のハイブリダイゼーション法では酵母マンノース転移酵素 遺伝子 ALG2 とホモロジーを示すヒト遺伝子は得られなかった。そうこうするうちに、新しいホモロジー・クローニング法が導入された。それは、ベンチャービジネスが、バイオ特許申請を念頭に置き、その際にプライオリティーを主張する戦略上、先を争って登録した、cDNA の部分的塩基配列 [EST (expressed sequence tags : 発現配列タグ)] のデータベースを利用する方法である。これは種々の動物の、種々の臓器から作成した cDNA ライブ



ラリーに含まれる無数のクローンの塩基配列を、それがどのような機能を持つかは全くお構いなしに、片っ端から決定して登録したものである。したがって、それは、大概是、遺伝子の部分配列であり、しかも、ライブラリーの性格上および作成方法上、各遺伝子の情報量や各遺伝子内の部分配列情報量などに偏りがあるものである。この EST データベースは世界的に公開されており、インターネットでアクセスすることができる。新しいホモロジー・クローニング法というのは、このような EST データベースに対して、他の生物ですでにクローニングされ、機能と塩基配列がわかっている遺伝子と相同性を示す異種の塩基配列を検索することが手がかりとなる。この検索によって、例えば、酵母既知遺伝子の塩基配列を用いて、それと相同性を持つヒト cDNA 塩基配列断片を集積し、それをデータの上で連結することにより、ヒト相同 cDNA の翻訳領域の全体あるいは部分的な塩基配列を仮想的に決めることができるようになった。そして、この仮想的な塩基配列をもとに特定遺伝子をクローニングするのである。このようなホモロジー・クローニングは、パーソナル・コンピューターによるデータベース検索をもとにしているが故に PC クローニングとも言われている。

ところで、ある遺伝子をクローニングしたと主張するためには、自分達で全翻訳領域を含む cDNA (完全長 cDNA) をクローニングし、その機能を遺伝学的に、あるいは、生化学的に証明しなければならない。その意味で、単に塩基配列の登録だけでプライオリティーを主張しようとしたベンチャービジネスの当初の野望は挫折した。

この方法により、私達は酵母の既知マンノース転移酵素群 () 遺伝子 (ALG1、ALG2、ALG11) と相同なヒト・マンノース転移酵素群 () のヒト遺伝子 (Hmat-1、Hmat-3、Hmat-5、Fig. 7) そして、マウス遺伝子 (Mmat-1、Mmat-3、Hmat-5) のクローニングに成功した。ここでは、私達が世界に先駆けてクローニングしたヒト・マンノース転移酵素 遺伝子 (Fig.7) について簡単に紹介する。酵母でクローニングされたマンノース転移酵素 遺伝子 ALG1 の塩基配列から推定されるアミノ酸配列をもとに、ヒト EST データベースを検索すると、相同性を示す塩基配列 (アミノ酸配列) 断片が複数見出された。それらの塩基配列を比較して、その確実性の高い配列をもとに、PCR プライマーを作成し、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリー Fig.10 私達の研究の概観と展望

を鋳型に PCR で確実性の高い配列を増幅した断片を得、そ

れをクローニングして塩基配列を決定した。そして、その増幅断片配列を標識して、それをプローブとしてヒト胎児脳 cDNA ライブラリーを検索した結果、増幅断片配列の全部あるいは一部がオーバーラップする cDNA クローンを 2 株得て、その塩基配列を決定した。このような、ヒト EST データベースの検索とそれに基づく cDNA ライブラリーの検索のサイクルを繰り返し、最終的に、ヒト・マンノース転移酵素 のアミノ酸配列全体をコードする DNA 断片をヒト胎児脳 cDNA ライブラリーを鋳型とした PCR で増幅した。こうしてクローニングしたヒト・マンノース転移酵素 遺伝子は酵母マンノース転移酵素 変異株 alg1 の変異を相補したので、その機能がマンノース転移酵素 であることを最終的に証明することができた。そして、これをヒト・マンノース転移酵素 遺伝子 Hmat-1 と命名した。Hmat-1 遺伝子は 464 アミノ酸からなるタンパクをコードし、酵母のマンノース転移酵素 遺伝子 ALG1 とアミノ酸配列で 36% の相同性を示したが、高度な相同性領域が所々に存在していた。このような領域はマンノース転移酵素 の機能に必須な領域であるが故に、10 億年を越す真核生物 (細菌を除く生物) の進化の過程でも保存されたと考えられる。これら各保存領域の機能をこれから解析する予定である。

紙面の都合で省くが、同様の方法により、他のヒトおよびマウスの GDP-マンノース依存性マンノース転移酵素遺伝子群のホモロジー・クローニングにも成功している。

5. 展望

今後は、現在行っているマンノース転移酵素群の遺伝子クローニングを進めるとともに、マンノース転移酵素の酵素学的研究およびマンノース転移酵素遺伝子の発現調節機構を解明したい。そのためには、遺伝子工学的的手法によるマンノース転移酵素遺伝子大量発現系の構築、有機化学的手法によるアクセプターの調製等々、克服しなければならないことが多い。

この研究の応用については、おおよそ Fig. 10 に示すことが

きる。糖鎖工学的には、クローニングした各マンノース転移酵素遺伝子の大量発現系を構築し、その系により大量調製した各マンノース転移酵素を用いて機能性糖鎖を酵素合成するのに有効である。更に、医学的には、ヒト遺伝病である 先天的 グリコシル化異常症

(CDG: Congenital Disorders of Glycosylation) の遺伝子診断に有効である。先天的グリコシル化異常症は 1980 年代に初の症例報告がなされ、脳神経症状、肝臓・脾臓不全などを主たる症状とする重篤な遺伝病である。現在までに世界で 300 程、日本でも 10 以上の症例が見つかり、その症例報告数は年々増加している。生化学的所見としては、体内で合成されるタンパク全般のアスパラギン結合型糖鎖の欠損あるいは構造異常を示す。このうち、タイプ と言われるタイプは、タンパク全般あたりのアスパラギン結合型糖鎖数が減少するものである。タンパクあたりのアスパラギン結合型糖鎖数が減少するという事は、アスパラギン結合型糖鎖の前駆体であるリピド中間体の供給量が不足するか、オリゴ糖転移反応が非効率的であることが考えられる (Fig.5)。そして、ここ 1、2 年、タイプ のサブタイプに、リピド中間体生合成段階に変異がある症例が複数発見されている。また、我々がクローニングしたマンノース転移酵素群の遺伝子に欠陥がある CDG 患者は見出されていないが、そのような患者が存在することは確実である。従って、我々の研究成果は CDG の今後の遺伝子診断に有用である。

6. 終わりに

以上に述べたように、私達は四半世紀前の自らの発見を手がかりに、糖タンパクのアスパラギン結合型糖鎖の前駆体であるリピド中間体の生合成に関する遺伝生化学的研究を行ってきた。そして、現在行っているリピド中間体生合成に働く GDP-マンノース依存性マンノース転移酵素群のヒト遺伝子のクローニング研究では世界的にも私達が先行している。アメリカの大学との共同研究も進行中である。

これらの成果が認められて、私達のグループは、昨年度から、NEDO (新エネルギー・産業技術総合開発機構) のプロジェクト研究「糖鎖合成関連遺伝子ライブラリーの構築」に採択されている (研究代表者 西川義尚、共同研究者 中原義昭、高橋哲夫)。これを励みに、これからも世界に向けた情報の発信基地でありたいと思っている。

今回は紙面の関係から割愛したが、私達は糖鎖生合成阻害剤や漢方薬成分にヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 に対して分化誘導活性をもつものを新しく発見している。これらはヒト白血病の分化誘導療法に有効である可能性を示しており、現在、更に研究を進めているところである。

工学 (テクノロジー) の変貌は著しい。今から 30 年前、誰が今日のバイオテクノロジーの隆盛を予想できたであろうか? そのころ、純粋な微生物現象の解析過程で発見された制限酵素、リガーゼ、逆転写酵素は今では遺伝子工学に欠かすことのできないハサミ、ノリ、コピー機となっており、バイオテクノロジーやヒト・ゲノム・塩基配列決定に貢献している。また、その成果であるヒト・ゲノム・塩基配列決定プロジェクトも、その成果をふまえて、遺伝子の機能発現を重視したポスト・ゲノム・プロジェクトに移行しつつある。これと同じく、応用科学である工学は工学だけでは決して存在し得ない。日進月歩で発展していく物理学、化学、生物学のような基礎科学への眼差しを閉じてはならない。そして、そのような眼差しを持ち続け、それを

研究に生かすことができる環境が大学に必要であろう。やがては社会に還元されるべき研究でも、その萌芽的研究は大学のような、ゆとりある機構に於いてこそ展開されるべきものである。私達は、今後も、このような方向から、私達の「希望を星につなげ」るために教育と研究に頑張りたいと思っている。

7. 謝辞

これらの研究は東海大学総合研究機構、東海大学工学部長留保金、文部省科研費 [重点研究、特定領域研究、一般 (C)、奨励 (A)]、NEDO プロジェクト研究、医薬資源研究振興会、木原記念横浜生命科学振興財団などからいただいた御援助によって行った。ここに感謝致します。また、この間、有形無形の御指導・御鞭撻を賜った学内外および海外の諸先生、そして、激励をしてくれた友人の皆様様に感謝致します。

また、本研究は、本学において研究チームを作ることなしには発展できなかったものである。その意味で、工業化学科第一・第二研究室の卒業生、現所属の院生諸君および学生諸君に感謝致します。

尚、また、遺伝子クローニング研究は湘南校舎組換え DNA 実験安全委員会の承認のもとで行った。更に、G258 変異株の発現クローニングにおける形質転換株の生化学的解析は伊勢原校舎医学部共利研 R I 部門で行った。

最後に、本稿執筆の機会をお与え下さった工学部紀要委員会委員長 青木克己先生に感謝致します。