

糖鎖の生理機能と疾患

2022 年 9 月

堀 智美

目次

1. 緒論	
1.1. はじめに	1
1.2. 糖鎖と糖転移酵素	1
1.3. O-Man 型糖鎖と筋疾患	2
1.4. ミツバチ頭部に存在する N-結合型糖鎖構造の生合成に関わる β 1,3-GalTs	3
1.5. 糖鎖の硫酸化修飾とその合成に関わる硫酸転移酵素と PAPS 輸送体	3
1.6. 腫瘍マーカーとしての硫酸化糖鎖と結腸直腸癌における PAPS 輸送体の発現	4
1.7. インフルエンザの流行と HA の結合親和性	5
1.8. インフルエンザウイルス糖鎖結合特異性データの高頻度糖鎖構造マイニング	5
1.9. インフルエンザウイルスと発育鶏卵馴化	6
2. 材料と方法	
2.1. 材料一覧	8
2.2. 糖鎖構造の表記	9
2.3. 各研究項目で共通する実験手法	
2.3.1. リアルタイム PCR による遺伝子発現解析	
2.3.1.1. プライマー、プローブ一覧	9
2.3.1.2. ショウジョウバエ	9
2.3.1.3. ヒト結腸直腸癌培養細胞、ヒト結腸直腸癌組織	10
2.3.1.4. インフルエンザウイルス M 遺伝子	10
2.3.2. GATEWAY™ Cloning Technology による各種コンストラクション作製	10
2.3.3. Sf21 細胞でのバキュロウイルス感染による組み換えタンパク質の発現	11
2.4. ショウジョウバエ O-Man 転移酵素、dPOMT1、dPOMT2 の機能解析	
2.4.1. dPOMT1、dPOMT2 RNAi 変異体の作製	11
2.4.2. dPOMT2 抗体の作製	11
2.4.3. 組み換えタンパク質と生体試料の POMT 活性測定	
2.4.3.1. 感染 Sf21 細胞の膜画分の回収および 3 齢幼虫抽出液の回収	12
2.4.3.2. POMT 活性測定	12
2.4.4. α -マンノシダーゼ消化	12
2.4.5. ショウジョウバエ胚のホールマウント <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	13
2.4.6. POMGnT 活性測定	13
2.4.7. β 1,2-GlcNAcT I および β 1,2-GlcNAcT II 活性測定	13
2.5. ミツバチ頭部に存在する特殊な N-結合型糖鎖構造の生合成に関わる β 1,3-GalTs	
2.5.1. honeybee β 1,3-GalT 組み換えタンパク質の作製	14
2.5.2. β 1,3-GalT 活性測定	14
2.5.3. β 1,3 ガラクトシダーゼ消化	15
2.6. ヒト結腸直腸癌における PAPS 輸送体の発現と役割	

2.6.1. 生体試料	15
2.6.2. 凍結直腸癌試料の <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	15
2.6.3. PAPST1、PAPST2 ポリクローナル抗体の作製および PAPST1 抗体の評価	15
2.6.4. 結腸直腸癌組織の免疫組織学的染色	16
2.6.5. 代謝標識実験による HS、CS、 <i>N</i> -結合型糖鎖への硫酸取り込みの評価	16
2.6.6. DLD-1 細胞における <i>PAPST1</i> 、 <i>PAPST2</i> 遺伝子のノックダウン	
2.6.6.1. siRNA によるノックダウン	17
2.6.6.2. <i>PAPST1</i> 、 <i>PAPST2</i> ノックダウン細胞の増殖解析	17
2.6.6.3. <i>PAPST1</i> 、 <i>PAPST2</i> ノックダウン細胞への成長因子による FGF シグナルの刺激	18
2.7. インフルエンザウイルス糖鎖結合特異性データの高頻度糖鎖構造マイニングと <i>in vivo</i> での検討	
2.7.1. Glycan Minor Tool によるデータマイニング	18
2.7.2. <i>hGlcNAc6ST-1</i> 過剰発現細胞の作製と評価	18
2.7.3. ウイルス感染と培養上清中のウイルス遺伝子量の測定と感染性ウイルスの評価	19
2.7.4. 固相結合解析	19
2.7.5. 抗体とレクチンによる発育鶏卵の組織化学的染色	20
3. 結果	
3.1. ショウジョウバエ <i>O</i> -Man 転移酵素、 <i>dPOMT1</i> 、 <i>dPOMT2</i> の機能解析	
3.1.1. <i>O</i> -Man 転移酵素の PMT ファミリーの比較	21
3.1.2. <i>dPOMT1</i> と <i>dPOMT2</i> の RNAi 変異体	23
3.1.3. <i>dPOMT1</i> と <i>dPOMT2</i> の遺伝学的相互作用	24
3.1.4. <i>dPOMT1</i> と <i>dPOMT2</i> の POMT 活性	25
3.1.5. <i>dPOMT1</i> と <i>dPOMT2</i> mRNA の発現パターン	26
3.1.6. <i>dMGAT1</i> と <i>dMGAT2</i> の POMGnT 活性の検討	27
3.2. ミツバチ頭部に存在する特殊な <i>N</i> -結合型糖鎖構造の生合成に関わる β 1,3-GalTs	
3.2.1. ミツバチ Core1 β 1,3-GalT のクローニングと酵素活性	29
3.2.2. 昆虫 <i>N</i> -結合型糖鎖の合成に関与するミツバチ β 1,3-GalT の推測とクローニング	31
3.2.3. 想定 β 1,3-GalT 1、 β 1,3-GalT 2 の <i>N</i> -結合型糖鎖上の T 抗原合成活性	34
3.3. ヒト結腸直腸癌における PAPS 輸送体の発現と役割	
3.3.1. 結腸直腸癌における PAPS 輸送体遺伝子の発現様式	35
3.3.2. 結腸直腸癌細胞における硫酸化複合糖質	38
3.3.3. DLD-1 細胞における、 <i>PAPST</i> 遺伝子の発現抑制による影響の検討	39
3.3.4. <i>PAPST</i> 遺伝子発現抑制による DLD-1 の細胞増殖の抑制	40
3.3.5. <i>PAPST</i> 遺伝子発現抑制による DLD-1 の HS 依存的な FGF シグナル伝達の抑制	41
3.4. 糖鎖アレイデータから抽出されたインフルエンザウイルス感染を増強する硫酸化糖鎖構造	
3.4.1. Glycan Minor Tool による糖鎖アレイデータの高頻度糖鎖構造マイニング	42
3.4.2. 抽出された硫酸化糖鎖構造の <i>in vivo</i> での検証	44
3.5. ヒト H1N1 亜型インフルエンザウイルスの卵馴化に関与する硫酸化糖鎖構造	
3.5.1. 鶏卵継代 H1N1 亜型ウイルスの合成糖鎖への結合特異性	45

3.5.2. ヒト <i>GlcNAc6ST-1</i> 安定発現 MDCK 細胞の作製と評価	46
3.5.3. 細胞表面における 6-スルホシアリル Le ^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO ₃ ⁻ -6)GlcNAc の影響	48
3.5.4. 発育鶏卵の漿尿膜と羊膜における 6-スルホシアリル Le ^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO ₃ ⁻ -6)GlcNAc の分布	50
4. 考察	
4.1. ショウジョウバエ <i>O</i> -Man 転移酵素、dPOMT1、dPOMT2 の機能解析	53
4.2. ミツバチ頭部に存在する特殊な <i>N</i> -結合型糖鎖構造の生合成に関わる β 1,3-GalTs	54
4.3. ヒト結腸直腸癌における PAPS 輸送体の発現と役割	55
4.4. 糖鎖アレイデータから抽出されたインフルエンザウイルス感染を増強する硫酸化糖鎖構造	57
4.5. ヒト H1N1 亜型インフルエンザウイルスの卵馴化に関与する硫酸化糖鎖構造	58
5. 結論	
5.1. 糖鎖の生理機能と疾患	60
5.2. 最後に	61
6. 謝辞	62
7. 参考文献	63

1. 結論

1.1. はじめに

本博士論文「糖鎖の生理機能と疾患」は、糖鎖の幅広い機能を、①「糖転移酵素活性と筋ジストロフィー表現型との相関」[1]、②「種固有の糖鎖構造と糖転移酵素の保存性」[2]、③「糖鎖の硫酸化と結腸直腸癌との関連」[3]、④「情報科学と糖鎖生物学、ウイルス学の融合」[4]、⑤「ウイルス感染と発育鶏卵馴化に関連する硫酸化糖鎖構造」[5]の 5 つの観点から論じている。ヒトだけでなく、ショウジョウバエ、ミツバチの昆虫、ウイルスを研究対象とし、種を超え、糖鎖の生理機能を検討している。

糖鎖の機能として挙げられるのが、糖鎖の持つ負電荷による分子間相互作用への寄与であるが、負の電荷をタンパク質表面、細胞表面に提示するだけならば、糖鎖は複雑に合成される必要はないはずである。しかし、実際は不均一で多様な糖鎖構造が存在し、負電荷の立体的な位置、強さ、量の細密な制御がなされている。個々の糖鎖構造による分子間相互作用が生命現象として反映されたものが「糖鎖の生理機能」であるとすると、その理解には個々の糖鎖構造の機能解析が必須となる。本博士論文は、個々の糖鎖構造の合成に係る解析と、筋ジストロフィー、結腸直腸癌、ウイルス感染の疾患に関わる糖鎖機能の解析により、糖鎖の生理機能と疾患との関連について、その一端を明らかにしたものである。

1.2. 糖鎖と糖転移酵素

糖鎖修飾は翻訳後修飾の 1 つであり、mRNA から合成されたタンパク質への化学的な修飾である。翻訳後修飾には糖鎖の他に、リン酸、メチル基、ユビキチン等々の多様な修飾が知られている。これらの修飾は、タンパク質の活性、安定性、局在などの機能を緻密に制御し、タンパク質に生理活性物質としての役割を付与している[6]。糖鎖修飾は、糖転移酵素によりタンパク質のアミノ酸側鎖に糖が付加される反応で、単糖にヌクレオチドが結合した糖ヌクレオチドを糖給与体とし、主に細胞内小器官である小胞体・ゴルジ装置において反応が行われる。糖鎖修飾は付加される糖鎖構造のバリエーションが非常に豊富であり、他の翻訳後修飾と比べ高度に複雑である。糖ヌクレオチドは動物では 9 種類、糖転移酵素は 200 種類以上あり、それらにより多様な糖鎖構造が構築される。また、糖鎖は翻訳後修飾としてタンパク質に付加されるだけでなく、脂質に対しても付加され、さらには糖鎖単独で遊離した状態でも存在し、それぞれに生理活性物質として機能している。

タンパク質に結合する糖鎖はその結合様式から *N*-結合型と *O*-結合型の 2 種に大別される。*N*-結合型糖鎖はタンパク質のアスパラギン残基(Asn)のアミド窒素原子に直鎖状の *N*-アセチルグルコサミン(*N*-Acetylglucosamine:GlcNAc) 2 分子と分岐状のマンノース(Mannose:Man) 3 分子の共通構造を持ち、その先の構造の違いから、高マンノース型、複合型、ハイブリッド型の 3 つのタイプに分類される。*O*-結合型糖鎖はセリン(Ser)もしくはスレオニン残基(Thr)の酸素原子に糖鎖が結合したもので、キシロース(Xylose:Xyl)、*N*-アセチルガラクトサミン(*N*-Acetylgalactosamine:GalNAc)、GlcNAc、Man、フコース(Fucose:Fuc)、グルコース(Glucose:Glc)がアミノ酸残基に最初に結合する[7,8]。

200 種類以上の糖転移酵素の存在が知られているが、なぜそこまで種類が豊富なのか、その理由はそれぞれの酵素が厳密な基質特異性を示すためである。糖転移酵素は、ドナー基質である糖給与体の糖ヌクレオチド、付与されるアミノ酸残基を有するアクセプター基質であるペプチド及びコアタンパク質の各々を特異的に認識し、決まった結合様式、分岐パターンで結合させる[8]。これら三者により、不均一で多様な糖鎖修飾が形成される。翻訳後修飾としてタンパク質に結合した糖鎖は、糖鎖付加されるタンパク質(コアタンパク質

と呼ぶ)の安定性、局在、活性、品質保証など、コアタンパク質自身の維持、機能に直接的に関与する。また糖鎖は、コアタンパク質の表面に存在し、糖の持つ多くの水酸基によりコアタンパク質に親水性を与え、分子間相互作用に寄与する。この分子間相互作用は、発生、分化、免疫、癌など様々な生理学的プロセスで重要な役割を担い、個体の生理機能の維持・調節に深く関与している[7]。

1.3. O-Man 型糖鎖と筋疾患

O-Man 型糖鎖は、O-Xyl 型のプロテオグリカンや、O-GalNAc 型のムチンなどの O-結合型糖鎖に比べると生体内での存在は多くなく、特定のコアタンパク質にのみ見られる特殊な糖修飾であると考えられている[9]。O-Man 型糖鎖は出芽酵母において古くから研究されており、O-結合型オリゴマンノース鎖はタンパク質の安定性、局在、機能に重要であることが報告されている[10-15]。酵母の O-Man 糖鎖修飾は小胞体の内腔側において、コアタンパク質の Ser もしくは Thr 残基に Man を転移する 6 つの O-Man 転移酵素 (protein O-mannosyltransferase: PMT, POMT) ファミリー、PMT-1~PMT-6 により行われる[16-18]。PMT ファミリーは系統学的に PMT1, PMT2, PMT4 のサブファミリーに分類され、PMT1 サブファミリーの酵素は PMT2 サブファミリーの酵素とヘテロに相互作用し、PMT4 サブファミリーの酵素はホモ複合体を形成し機能することが報告されている[16]。PMT のホモログはショウジョウバエ (*Drosophila*)、マウス、ヒトなどの多くの多細胞真核生物において同定されており[19-21]、ヒト O-Man 転移酵素ホモログである 2 つの hPOMT1 と hPOMT2 は、それぞれ PMT4、PMT2 のサブファミリーに分類される[20]。

哺乳類の O-Man 型糖鎖は、Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-Ser/Thr の構造が最初にウシ末梢神経とウサギ骨格筋より同定され[9]、その後多様な O-Man 型構造が報告されているが[22]、還元末端側の GlcNAc、Man の 2 糖は共通している。これらの O-Man 型構造は骨格筋や脳、神経系などに存在し、コアタンパク質である α -ジストログリカン (α -DG) とラミニンなどの細胞外マトリックスを結合させるリガンドとして機能する[9,22,23]。この O-Man 糖鎖の最初のステップである Man の転移には、hPOMT1 と hPOMT2 が共発現されることが必須である[24]。また、hPOMT1 遺伝子および hPOMT2 遺伝子の変異は、先天性の筋ジストロフィー、重度な脳の奇形、眼球異常を呈する常染色体劣性遺伝病である Walker-Warburg 症候群 (WWS) の原因となることが報告されている[25]。ヒト遺伝子疾患を網羅したウェブサイトである Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<https://omim.org>) には、hPOMT1 遺伝子 [OMIM : 607423] および hPOMT2 遺伝子 [OMIM : 607439] が関与する WWS の詳細が示されている [OMIM : 236670, 613155, 609308]。さらに O-Man の次に β 1,2 結合で GlcNAc を転移する protein O-mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1) [OMIM : 606822] の変異により、先天性の筋ジストロフィー、重度な脳の奇形、眼の異常を呈する常染色体劣性遺伝病 Muscle-eye-brain 病 (MEB) も報告されている [26,27] [OMIM : 253280, 613151, 613157]。これらの疾患では、遺伝子変異により hPOMT1、hPOMT2 と hPOMGnT1 の酵素活性低下の機能不全が起こり、 α -DG 上の O-Man 糖鎖構造が大きく変化することで、種々の重篤な症状が現れる[22]。このことは α -DG 上の O-Man 糖鎖構造が神経と筋肉組織の発生、維持に重要な役割を果たしていることを示している。

ショウジョウバエには、hPOMT1 と hPOMT2 と一致する、2 つの POMT オルソログ dPOMT1 と dPOMT2 が存在する。dPOMT1 変異体は生存性の低下が知られている一方、救済個体は筋発生の明らかな欠損による「腹よじれ」と呼ばれる表現型を示す。dPOMT1 遺伝子は、この表現型から *rotated abdomen* (rt) と名付けられている[28]。一方、dPOMT2 遺伝子の変異体は論文発表の 2004 年の時点では得られておらず、また、dPOMT1 および dPOMT2 (dPOMTs) の活性は報告されていなかった。本論文[1]において、2 つの dPOMT

遺伝子 *dPOMT1* と *dPOMT2* の RNAi 変異体の作製、その表現型の解析および dPOMTs の活性を検討し、筋ジストロフィーとの関連を考察した。

1.4. ミツバチ頭部に存在する *N*-結合型糖鎖構造の生合成に関わる β 1,3-GalTs

これまでに、ミツバチ (*Honeybee*, *Apis mellifera*) のロイヤルゼリーから非還元末端に Gal β 1-3GalNAc (T 抗原) ユニットを持つ、複合型の *N*-結合型糖鎖が付加された糖タンパク質が同定されている[29]。この糖鎖構造は哺乳類では認められていない特徴的な構造である。ミツバチ頭部のタンパク質より精製されたミクロソーム膜画分に、この特徴的な構造を合成する β 1,3 ガラクトース転移酵素 (β 1,3-Galactosyltransferase: β 1,3-GalT) の酵素活性が同定され[30]、mejor royal jelly glycoprotein (MRJP1) の N 末端領域に、この昆虫の複合型 *N*-結合型糖鎖が存在することが報告されている[31]。Ser/Thr 残基に付加している GalNAc α に β 1,3 結合で Gal を転移する複数の Core1 β 1,3-GalT は哺乳類、線虫、昆虫において報告されている[32-36]。しかしながら、これらの酵素が昆虫の複合型 *N*-結合型糖鎖上の T 抗原を合成するかは不明であった。

コアタンパク質である MRJP1 がミツバチ脳のキノコ体に存在するケニオン細胞に発現していることは分かっているが[37,38]、ミツバチ複合型 *N*-結合型糖鎖に含まれる T 抗原の生理学的特徴や機能は不明である。キノコ体は昆虫の脳における記憶中枢で、学習や記憶の集積に関与しており、ミツバチの高度な社会性、コミュニケーション能力は、キノコ体において統合されていると考えられている。一方、タンパク質に付加している多様な *N*-結合型糖鎖は、細胞間情報伝達や組織形成に重要な役割を果たしている[7]。従って、ミツバチ脳特異的な *N*-結合型糖鎖や MRJP1 のような *N*-結合型糖タンパク質はキノコ体を含む脳組織の形成に関与している可能性が存在する。そこで、T 抗原ユニットを有する複合型 *N*-結合型糖鎖の生理的意義を知る手がかりとして、*N*-結合型糖鎖上の T 抗原の生合成に関わる β 1,3-GalT の同定が必要であると考えた。昆虫のモデル生物であるショウジョウバエの遺伝子データベース FlyBase [<https://flybase.org/>] には想定を含む多くの β 1,3-GalT 遺伝子が登録されているが、*N*-結合型糖鎖上の T 抗原を合成する β 1,3-GalT は不明であった。

本論文[2]では、ミツバチに認められる特徴的な複合型 *N*-結合型糖鎖上の T 抗原を合成する β 1,3-GalT を同定し、 β 1,3-GalT の種を超えて保存される酵素活性に重要な領域を示した。

1.5. 糖鎖の硫酸化修飾とその合成に関わる硫酸転移酵素と PAPS 輸送体

翻訳後修飾としての硫酸化は、タンパク質のチロシン残基への硫酸化と、糖鎖への硫酸化の 2 つに大別される。多種多様な硫酸化糖鎖が存在する中で、6-スルホシアリルルイス X (6-スルホシアリル Le^x) は、高内皮細静脈でのリンパ球ホーミングに関わる L-セレクチンのリガンドであることが報告されている[39]。また、硫酸化グリコサミノグリカン (Glycosaminoglycan: GAG) である、ヘパラン硫酸 (Heparan sulfate: HS)、コンドロイチン硫酸 (Chondroitin sulfate: CS) 等が代表的な硫酸化糖鎖として知られている[7]。HS や CS はコアタンパク質の Ser/Thr 残基に Xyl, Gal, グルクロン酸 (Glucuronic acid: GlcA) が *O*-結合した GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-*O*- の構造に、HS は [4GlcA β 1-4GlcNAc α 1]、CS は [4GlcA β 1-4GalNAc β 1] の 2 糖構造が繰り返し伸長した構造をしており、この 2 糖構造部分が様々な様式で高度に硫酸化されている。これらの硫酸化 GAG は細胞表面や細胞外マトリックスに存在し、様々な成長因子や細胞外マトリックス因子を硫酸基の負電荷により補足することから、分子間相互作用の足場となっている。GAG への硫酸化修飾は一様ではなく、硫酸化の位置や量が緻密に制御されており、硫酸化度の違いに伴って結合する分子の親和性も変化する。硫酸化糖鎖が関与す

る分子間相互作用によるシグナルは、分化、形態形成、増殖、細胞接着、炎症、癌化、感染など非常に広範囲の生命現象に関わっている[7]。

糖鎖の硫酸化は硫酸転移酵素(Sulfotransferase:ST)によって担われ、5つの結合様式(NDST、2ST、3ST、4ST、6ST)があり、これまでにヒトで30種類以上の硫酸転移酵素が報告されている[8]。これら全ての硫酸転移酵素は、活性硫酸である3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate(PAPS)を硫酸基の供与体とするため、PAPSは硫酸化反応において重要な生理活性物質である。PAPSは細胞質においてPAPS合成酵素により、硫酸イオンとATPから合成される。その後、PAPSはゴルジ装置の膜に存在するPAPS輸送体(PAPS transporter:PAPST)によってゴルジ内腔へ輸送され、硫酸転移酵素の基質として反応に供される[7,8]。したがって、PAPS合成、PAPS輸送は、全ての糖鎖の硫酸化において共通するステップであり、その機能に関わる分子は全ての糖鎖の硫酸化に影響を与える。

PAPS輸送体は、ヒトではPAPST1(SCL35B2)とPAPST2(SCL35B3)の2つが報告されている[40,41]。ショウジョウバエにも2つのオルソログSLALOM、dPAPST2が存在し、これらはショウジョウバエの正常な発生とタンパク質の硫酸化に必要である[42,43]。PAPS合成酵素の阻害剤である塩素酸塩を用いた硫酸化の阻害は、WntやFGFのような様々な成長因子のシグナル伝達を抑制する[44-46]。硫酸転移酵素を欠損したショウジョウバエの変異体の解析では、GAGの硫酸化と成長因子の相互作用が、発生過程において重要であることが示されている[47-50]。加えて、ヒトのPAPST1とPAPST2は結腸直腸癌の細胞株において6-スルホラクトサミンエピトープの硫酸化に関与し[41]、CMP-Sia輸送体(SCL35A1)、GDP-Fuc輸送体(SCL35C1)とPAPS輸送体(SCL35B2)は急性炎症での6-スルホシアリルLe^x生合成の転写制御を誘導している[51]ことが報告されている。これらの研究は、硫酸転移酵素に加えてPAPS輸送体が硫酸化のプロセスを制御していることを示している。

1.6. 腫瘍マーカーとしての硫酸化糖鎖と結腸直腸癌におけるPAPS輸送体の発現

癌が発生する悪性形質転換の際、特異的な糖鎖抗原(Carbohydrate Antigen:CA)が癌細胞表面の糖タンパク質や糖脂質に発現する。これらの糖鎖エピトープの出現は、いくつかの糖転移酵素の発現変化と関連がある[7]。糖鎖エピトープは癌の進行と増大に重要な役割を果たし、様々なヒトの癌の診断において典型的な腫瘍マーカーとして使われている[National Institutes of Health, National Cancer Institute (USA) WEB site: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet>]。加えて、特定の糖ヌクレオチド輸送体は癌の糖鎖エピトープの発現に関与していることが報告されている。糖ヌクレオチド輸送体は小胞体もしくはゴルジ装置の膜に局在している複数回膜貫通型タンパク質であり、細胞質から糖ヌクレオチドを取り込み、内腔側に存在する糖転移酵素に基質を供給している。UDP-Gal輸送体(SCL35A2)はヒトの結腸癌で発現が増加し、T抗原とLe^a、Le^xエピトープの合成に関与する[52]。GDP-Fuc輸送体(SCL35C1)は幹細胞癌において発現が上昇し、フコシル化の増加に寄与している[53]。これらの報告は、糖ヌクレオチド輸送体の発現が、癌細胞における糖鎖エピトープの合成制御のカギとなることを示している。また、結腸直腸癌において、糖鎖エピトープのシアリル化の増加と硫酸化の減少は、悪性腫瘍の指標となることが報告されている[54-59]。免疫組織学解析において、Le抗原を持つヒトの結腸上皮において、ゴブレット細胞に硫酸化ムチンの強い染色が示される[60]。特異的な硫酸転移酵素の発現低下により、正常粘膜に比べ大腸腺癌において硫酸化ムチンの発現が低下することが報告されている[61]。しかしながら、癌におけるPAPST遺伝子の発現様式の研究は行われていないため、本論文[3]では、ヒト結腸直腸癌におけるPAPS輸送体の発現を遺伝子レベル

とタンパク質レベルの双方から解析を行い、癌細胞の増殖に関するゴルジ特異的な硫酸化の制御について検討し、悪性形質転換と PAPS 輸送体との関連について考察した。

1.7. インフルエンザの流行と HA の結合親和性

インフルエンザはヒトだけでなく、鳥類、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ、クジラ、アザラシ等の多くの動物に伝搬する人獣共通感染症であり、ヒトにおいては毎年数百万人の人々が感染し、重症化すると死に至ることもある伝染性の高い呼吸器疾患である[62]。インフルエンザの原因となるインフルエンザウイルスには、A 型・B 型・C 型・D 型の 4 つの型が存在し、このうちヒトに感染するものは A 型・B 型・C 型の 3 つである。その中で A 型インフルエンザウイルスのみがヒトと多くの動物に共通して感染する。インフルエンザウイルスはオルソミクスウイルス科に属するマイナス鎖 RNA ウイルスで、A 型インフルエンザウイルスはウイルス粒子表面にヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) のスパイクタンパクが存在している[62,63]。既知のヘマグルチン 16 亜型 (H1-H16) とイラミニダーゼ 9 亜型 (N1-N9) の全ての亜型はカモにおいて維持されており、インフルエンザウイルスの天然貯蔵庫と考えられている。ヒトにおいては、インフルエンザは毎年冬季に感染が拡大し流行するが、まれにパンデミックと呼ばれる世界流行が起こることがある。20 世紀以降では 1918 年のスペインかぜ、1957 年のアジアかぜ、1968 年の香港かぜの 3 回が有名で、さらに 1977 年のソ連かぜ、2009 年のパンデミックが知られている[61,62]。これらは全て A 型インフルエンザウイルスによるパンデミックであり、それぞれの亜型は、1918 年、1977 年、2009 年が H1N1、1957 年が H2N2、1968 年は H3N2 である。現在、季節性インフルエンザとしてエピソード流行しているのは、2009 年の H1N1 亜型 (A(H1N1)pdm09) と、1968 年の H3N2 亜型 (A 香港型) と B 型のインフルエンザウイルスである。また、鳥 H5N1 亜型インフルエンザウイルスのヒトへの最初の感染が 1997 年に香港で報告されている[62,64,65]。

インフルエンザウイルスの感染は、ウイルス粒子表面の HA が、宿主細胞に結合することで開始される。その際 HA のレセプターとなるのが、宿主細胞表面に存在する糖鎖構造の末端に位置するシアル酸 (*N*-Acetylneuraminic acid: NeuAc) である[66,67]。ヒトインフルエンザウイルスは Gal に α 2,6 型の結合様式 (α 2,6 結合) で NeuAc が結合した NeuAc α 2-6Gal 構造に優先的に結合する、一方、鳥類のインフルエンザウイルスは Gal に α 2,3 型の結合様式 (α 2,3 結合) で NeuAc が結合した NeuAc α 2-3Gal 構造に優先的に結合する[68]。これはインフルエンザウイルスが、ヒトにおいて感染・増殖する気管の上皮細胞で NeuAc α 2-6Gal が主に発現し、カモにおいて感染・増殖する腸の上皮細胞で NeuAc α 2-3Gal が主に発現していることと相関している[69,70]。このレセプター特異性はヒト、鳥類の大多数において共有されているが、いくつかの鳥類のインフルエンザウイルスでは、NeuAc α 2-3Gal が結合している、末端の NeuAc から数えて 3 番目の糖および、それよりも還元末端側に位置する糖の影響を受けることが報告されている[71]。加えて、単糖の硫酸化はカモインフルエンザウイルスの結合に影響しないが、1997 年の香港で発生したニワトリとヒトの H5 亜型インフルエンザウイルスは 6-スルホシリアル Le^x 構造への結合性が増加していることが報告されている[72,73]。糖鎖上のシアル酸や硫酸化のような負の帯電はウイルスの結合に影響を与えている可能性が考えられる。

1.8. インフルエンザウイルス糖鎖結合特異性データの高頻度糖鎖構造マイニング

Consortium for Functional Glycomics (CFG: 機能性グライコミクスのための共同事業体) には、糖鎖アレイによるレクチン、抗体、抗血清、微生物、ウイルス等々の糖鎖結合特異性のデータが開示されており、ウェブサイト (<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoreh8.shtml>) から自

由に使用することが出来る。糖鎖アレイには 600 以上の合成もしくは天然の哺乳類糖鎖ライブラリーが使用され、これらの構造の 10%が硫酸化構造である。糖鎖アレイによるこれまでのインフルエンザウイルスの結合解析では、シアル酸が重要な要素であることが確認されていた[74]。一方、固相结合分析では、H5、H6、H7、H9 亜型インフルエンザウイルスが 6-スルホシアリル Le^xを、ニワトリのインフルエンザウイルスがシアリル Le^xを認識することが示されている[75]。

データマイニングは、構造化された大量のデータの中から情報を抽出し、傾向やパターンを検出する情報分析手法である。糖鎖データ解析のための種々のデータマイニングとアルゴリズムツールを提供するウェブリソース RINGS(Resource for INformatics of Glycomes at Soka)では、糖鎖構造のための α -closed frequent subtree mining[76]が用いられている Glycan Miner Tool[77,78]というマイニング方法が提供されている。本論文[4]では、ウイルスの感染に関与しているシアル酸以外の新規の糖鎖構造を抽出することを目的に、インフルエンザウイルスの糖鎖アレイデータを Glycan Miner Tool により解析し、CFG の糖鎖結合データからインフルエンザウイルスの感染に関与する糖鎖構造[79]を抽出した。解析では CFG の糖鎖結合データの中でも特に 1977 年から現在に至るまでのエピソードに関連している H1、H3 亜型インフルエンザウイルスのデータを選択し、加えて、1997 年に香港で報告された、初めてヒトに感染したニワトリ H5 亜型インフルエンザウイルスの存在を考慮し、H5 亜型インフルエンザウイルスのデータも選択した。さらに、得られた糖鎖構造が実際に感染に関わるのかを検討することを念頭に置き、ウイルス感染実験に使用できる入手可能なウイルスであることも条件とした。データマイニングにより、高い結合親和性を示した糖鎖構造に、これまでに報告されている他の末端のシアル酸とシアリル Le^xに加えて[68,71-73,75]、硫酸化構造が含まれることを見出し、この構造が実際に感染に関わるか検討した。

1.9. インフルエンザウイルスと発育鶏卵馴化

ヒトの患者より分離されたインフルエンザウイルスは、発育鶏卵の漿尿膜腔・羊膜腔において培養され、植え継がれる場合がある。その過程において、HA 分子の受容体結合部位付近にアミノ酸置換を持つバリエーションが選択される[80-84]。このような、発育鶏卵で増殖しやすいウイルスが選択される過程で起こる抗原性の変化は「発育鶏卵馴化」と呼ばれている。NeuAc α 2-6Gal と NeuAc α 2-3Gal の構造をそれぞれ特異的に認識し分けるレクチンによる染色では、漿尿膜と羊膜の両方に NeuAc α 2-3Gal が存在する一方、NeuAc α 2-6Gal は羊膜のみに存在していること [85]、NeuAc α 2-3Gal と NeuAc α 2-6Gal の分子比は、発育鶏卵の漿尿膜で 3.3:1.0、羊膜では 1.1:1.0 であることがこれまでに示されている[86]。多くの場合、バリエーションは発育鶏卵での継代後に NeuAc α 2-3Gal への結合特異性を獲得する[85,87]。発育鶏卵漿尿膜における、高い NeuAc α 2-3Gal の発現は、鶏卵継代の過程でヒトインフルエンザウイルスのレセプター結合特異性が NeuAc α 2-6Gal から NeuAc α 2-3Gal へシフトすることを説明している。しかしながら、ヒトインフルエンザウイルスの発育鶏卵馴化の根拠となるメカニズムは解明されていない。

いくつかの鳥インフルエンザウイルスのレセプター認識は、NeuAc α 2-3Gal が結合している末端の NeuAc から 3 番目に位置する糖の構造に影響を受ける[70]。化学酵素合成された *N*-結合型糖鎖アレイを用いた結合解析では、レセプター糖鎖のフコシル化が A 型インフルエンザウイルスの結合特性を変化させることが報告されている[88]。ヒト肺のショットガン *N*-結合型糖鎖マイクロアレイを用いた結合解析においても、鳥と哺乳類の A 型インフルエンザウイルスはシアル酸糖鎖と同様にリン酸化糖鎖、シアル酸のない糖鎖に結合することを示している[89]。1997 年に香港で同定されたニワトリとヒトの H5 亜型インフルエンザウイルスでは、末端か

ら3番目のGlcNAcが硫酸化されたNeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc β 構造への親和性が増大した。対照的に、カモインフルエンザウイルスの結合性は、この硫酸化GlcNAc構造に影響されない[72,73]。発育鶏卵とMDCK細胞で継代したヒトH1N1亜型インフルエンザウイルスのN-結合型糖鎖修飾の概要も解析されており、発育鶏卵で継代されたウイルスのN-結合型糖鎖に占める硫酸化GlcNAcの10.2mol%に対して、MDCK細胞で継代されたウイルスで硫酸化GlcNAcは検出限界以下であった[90]。宿主細胞の糖鎖構造がウイルスの構成に反映されているため、これらのデータは発育鶏卵にはMDCK細胞に比べ、大量の硫酸化糖鎖が含まれていることを示す。しかしながら、発育鶏卵中の硫酸化GlcNAcがインフルエンザウイルスの複製に及ぼす影響については不明である。

インフルエンザウイルスデータの高頻度糖鎖構造マイニングを行った先行研究[4]において、我々は糖鎖の硫酸化がインフルエンザウイルスの結合に関与する興味深い証拠として、いくつかのヒトH1N1亜型インフルエンザウイルスが結合するGal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc構造を見出している。本研究[5]では、ヒトのインフルエンザウイルスの発育鶏卵馴化の根底にあるメカニズムの知見を得ることを目的とし、Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc構造を合成する硫酸転移酵素*hGlcNAc6ST-1*をMDCK細胞で発現させ、この細胞に対する発育鶏卵継代されたヒトH1N1亜型インフルエンザウイルスの感染性の解析を行った。

2. 材料と方法

2.1. 材料一覧

使用した放射性物質と抗体の一覧を表 1 および表 2 に示す。

物質名	放射活性	メーカー	型番
Dolichylphosphate [³ H] Man	56.3 Ci/mmol	American Radiolabeled Chemicals	ART-0791
UDP-[³ H] GlcNAc	180 Ci/mmol	PerkinElmer	
UDP-[³ H] Gal	20 Ci/mmol	American Radiolabeled Chemicals	ART-131
[³⁵ S]Na ₂ SO ₄ (carrier-free)	100 mCi/mL	American Radiolabeled Chemicals	ART-0105
[³⁵ S]PAPS	1.82 Ci/mmol	PerkinElmer	NEG010

表 1: 使用した放射性物質一覧

	名称	認識する構造	解析*	供給元
1 次抗体	抗 dPOMT2 抗体	dPOMT2	WB	本研究
	抗 PAPST1 抗体	hPAPST1, mPAPST1	WB, IHC	本研究
	抗 PAPST2 抗体	hPAPST2	IHC	本研究
	抗 HA 抗体	HA (N327-2-7)	SPBA	(1)
	抗 ERK1/2 抗体	ERK1/2	WB	Cell Signaling
	抗リン酸化 ERK1/2 抗体	pERK1/2-Thr202/Tyr204	WB	Cell Signaling
(糖鎖抗体)	MECA-79 抗体	Gal β 1-4(SO ₃ ⁻ -6)GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc	FACS	Santa Cruz
	抗 CSLEX 抗体	シアリル Le ^x	FACS, IHC	BD
	抗 S1 抗体	O-結合型糖鎖上の 6-スルホシアリル Le ^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO ₃ ⁻ -6)GlcNAc	FACS, IHC	(2)
	抗 S2 抗体	O-結合型糖鎖、N-結合型糖鎖上の 6-スルホシアリル Le ^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO ₃ ⁻ -6)GlcNAc	FACS, IHC	(2)
(タグ抗体)	HRP 標識 抗 FLAG 抗体	FLAG (M2)	WB	SIGMA
	抗 HA 抗体	HA (F-7)	WB	Santa Cruz
	抗 c-myc 抗体	c-Myc (9E10)	WB	Santa Cruz
2 次抗体	HRP 標識 抗マウス IgG 抗体	マウス IgG	WB	NEB
	HRP 標識 抗ラビット IgG 抗体	ラビット IgG	WB	NEB
	AP 標識 抗 DIG 抗体 Fab 断片	ジゴギンゲニン (DIG)	<i>in situ</i>	Roche
	Alexa488 標識 抗マウス IgG 抗体	マウス IgG	IHC	Molecular Probes
	FITC 標識 抗ラット IgG 抗体	ラット IgG	FACS	American Qualex
	HRP 標識 抗マウス IgG 抗体	マウス IgG	SPBA	Bio-Rad
	FITC 標識 抗マウス IgG 抗体	マウス IgG	FACS	Jackson
	ビオチン標識 抗マウス IgG 抗体	マウス IgG	IHC	Southern Bio.
レクチン	ビオチン化 MAL	N-結合型糖鎖(複合型)上の NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc	HC	(3)
	ビオチン化 MAH	O-結合型糖鎖上の NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc	HC	(3)
	ビオチン化 SSA	NeuAc α 2-6Gal	HC	(3)
	FITC 標識 SSA	NeuAc α 2-6Gal	FACS	J-CHEMICAL
その他	正常ヤギ血清			Jackson
	HRP 標識ストレプトアビジン	ビオチン	IHC, HC	ニチレイ
	Alexa488 標識ストレプトアビジン	ビオチン	FACS	Jackson

*WB: ウェスタンブロッティング、IHC: 免疫組織学的染色、SPBA: 固相結合解析、FACS: フローサイトメトリー、HC: 組織学的染色
(1): 北海道大学 高田礼人教授、(2): 千葉大学 川島博人教授、(3): 東京大学 山本一夫教授

表 2: 使用した抗体一覧

2.2. 糖鎖構造の表記

本研究で表記する単糖の省略名を表 3 に示す。

単糖名	略称
Mannose	Man
Glucose	Glc
Galactose	Gal
<i>N</i> -acetylglucosamine	GlcNAc
<i>N</i> -acetylgalactosamine	GalNAc
<i>N</i> -acetylneuraminic acid (Sialic acid)	NeuAc (Sia)
Glucronic acid	GlcA
Fucose	Fuc
Xylose	Xyl

表 3: 単糖名の略称一覧

2.3. 各研究項目で共通する実験手法

2.3.1. リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

2.3.1.1. プライマー、プローブ一覧

リアルタイム PCR で使用したプライマー、プローブセットを表 4 に示す。プローブは 5' 側に 3FAM のレポーターDye、3' 側に TAMRA のクエンチャーDye により標識されている。ただし、インフルエンザウイルスの *M* 遺伝子のプローブのみ、5' 側 3FAM のレポーターDye、3' 側 MGB のクエンチャーDye により標識されている。

遺伝子	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	プローブ
<i>dPOMT1</i>	ACACCTGTGGCAACTGCTCTAC	ACTTATGGCATGCATCCATAGCT	ACGCCGGTCTCACCGATCGC
<i>dPOMT2</i>	TTTCGGCCTTGATCTTCAA	TGGGCAGAACCCTCAAAATG	TCCTTGCTGACGGGCGTTATGTACAAC
<i>RpL32</i>	GCAAGCCCAAGGGTATCGA	CGATGTTGGGCATCAGATACTG	AACAGAGTGCCTGCCGCTTCA
<i>PAPST1</i>	GGCAGGCCCTGAAGCT	TGCGGGTCATCACTCTT	CACAGGGCTCCAGGTGTCTTATCTG
<i>PAPST2</i>	GATTAGGCCCTGCAGTAACATT	ATCCAGTGAGGGAAAAAAGGA	TGTGCAAAGAATCCAGTTCCGGACCTA
<i>M</i> protein	CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC	TGACAGRATYGGTCTTGCTTTAGCCAYTCCA	ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG

表 4: リアルタイム PCR 解析で使用したプライマー、プローブ一覧

2.3.1.2. ショウジョウバエ

25°C で飼育した *Act5C-GAL4/UAS-dPOMT1-IR* および 28°C で飼育した *Act5C-GAL4/UAS-dPOMT2-IR* とコントロールの *Act5C-GAL4/w¹¹⁸* の 3 齢幼虫を回収し、それぞれから抽出した total RNA を逆転写した cDNA に含まれる各々の遺伝子発現量を測定した。ショウジョウバエの遺伝子発現量の解析は、全細胞で発現が不変である必須遺伝子 *RpL32* を内部標準とした絶対定量で行った。*UAS-IR* 系統を作製する際に利用した 500nt の領域は dsRNA として生体内で発現しているため、リアルタイム PCR で増幅する領域はこの dsRNA とは別の領域を設定している。リアルタイム PCR 解析は、表 4 に示すプライマー、プローブセットと qPCR Mastermix QuickGoldStar (Eurogentec) 試薬を用い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) 装置で、94°C、30 秒を 40 サイクル、60°C、4 分のプログラムで行った。

2.3.1.3. ヒト結腸直腸癌組織、ヒト結腸直腸癌培養細胞、

ヒト凍結結腸直腸試料と凍結結腸直腸癌試料(表8に詳細を示す)より RNeasy Plus Mini (QIAGEN)を用い、ヒト結腸直腸癌培養細胞株からはTRIzol reagent (Invitrogen)を用い、total RNAを回収した。Superscript II First Strand Synthesis kit(Invitrogen)とoligo-dT プライマーにより、それぞれのtotal RNAをcDNAへ逆転写し、*PAPST1* と*PAPST2* の遺伝子発現量を計測した。発現量の解析は、全細胞で発現が不変である*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* 遺伝子を内部標準とした絶対定量で行った。リアルタイムPCR解析は、表4に示すプライマー、プローブセットとqPCR Mastermix QuickGoldStar (Eurogentec) 試薬を用い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) 装置で、94°C、30秒を40サイクル、60°C、4分のプログラムで行った。

2.3.1.4. インフルエンザウイルス M 遺伝子

ウイルスRNAは、ウイルス感染細胞の培養上清140 μLからQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用い精製し、70 μLのウイルスRNA溶液を抽出した。リアルタイムPCR解析は、表4に示すプライマー、プローブセットとQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) 試薬を用い、LightCycler 480 Instrument (Roche) 装置で50°C、30分RT反応、94°C、15秒を50サイクル、54°C、75秒のプログラムで行った。

2.3.2. GATEWAY™ Cloning Technology による各種コンストラクション作製

GATEWAY™ Cloning Technology (Thermo Fisher) は特異的な組み換え配列 (*att* 配列) と組み換え酵素 (BP 酵素、LR 酵素 (共に Thermo Fisher)) によるクローニングシステムで、制限酵素部位の制約がかかる古典的なサブクローニングに代わるものである。最初の組み換えに用いられる *att B* 配列は 25bp あるため、本研究では *att B* 配列の付加を 2 回に分けた 2 段階の PCR を行った。1st PCR は遺伝子固有の配列に *att B* 配列の半分が付加したプライマーで、2nd PCR は共通プライマーで、*att B* 配列の残りの配列を付加した。得られた PCR 断片はエントリーベクター pDONR™201 (Thermo Fisher) へ BP 酵素でクローニングされ、続いて *att R* 配列を組み込んだ GATEWAY 用改変発現ベクター (pVL1393(pVL)、pVL-HA、pVL-FLAG、pCXN2) へ LR 酵素でクローニングする方法を用いている。作製した発現ベクターと使用したプライマーを表 5 に示す。

発現ベクター (EST クローン No.)	発現領域 (aa)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
pVL- <i>dPOMT1</i> -HA (RE38203)	1-886 (full)	AAAAAGCAGGCTTGTCTGCCACCTACACCA	AGAAAGCTGGGTAGTACAGGTGGTGGTTCTTG
pVL- <i>dPOMT2</i> (LP01681)	1-765 (full)	AAAAAGCAGGCTTGGCAGCAAGTGTGTGTA	AGAAAGCTGGGTCTAGAACTCCCAGGTAGAAAG
pVL-FLAG- <i>dMGAT1</i> (LD43357)	89-458	AAAAAGCAGGCTTCCATACGAGCCGGCATCAG	AGAAAGCTGGGTACTCTGTCTTAGCGTCGT
pVL-FLAG- <i>dMGAT2</i> (GH07804)	221-488	AAAAAGCAGGCTCCACCCTGCACAAGTATCTG	AGAAAGCTGGGTGCCTTACCTCGTGGCCAG
pVL-FLAG-honeybee <i>Core1 β 1,3-GalT</i>	53-372	AAAAAGCAGGCTATATGTTTAATTGTTTTCTGGTGG	AGAAAGCTGGGTCTAGTATTCAGTCAATACAGTAATTG
pVL-FLAG-honeybee <i>β 1,3-GalT1</i>	27-412	AAAAAGCAGGCTATTATTATCGCACTACTTATTACGA TGTCC	AGAAAGCTGGGTTCATTTTACATTTACTTTTACCATCAATA ATTTTTTC
pVL-FLAG-honeybee <i>β 1,3-GalT2</i>	11-396	AAAAAGCAGGCTATATGGACAAATTGCAATTATTGCC ATTGG	AGAAAGCTGGGTTCAAATATTTCTACTATTTCTACTTAATG TAACTG
pCXN2- <i>hGlcNAc6ST-1</i> (4562846)	1-530 (full)	AAAAAGCAGGCTTGGCCGCCACCATGAAGGTGTTCCGTAGGAAGG	AGAAAGCTGGGTTTAGAGACGGGGCTTCCG
共通の 2nd PCR primer		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

表 5: GATEWAY クローニングで作製した発現ベクターと使用したプライマー一覧

2.3.3. Sf21 細胞でのバキュロウイルス感染による組み換えタンパク質の発現

Sf21 細胞での組み換えタンパク質の発現のために、pVL 発現ベクターに遺伝子を組み込んだコンストラクションを作製した(表 5)。本研究では、膜貫通領域を含む全長を膜タンパク質として発現させる系と、FLAG タグ付きの分泌タンパク質として発現させる 2 つの系を用いている。dPOMT1 と dPOMT2 は多重膜貫通タンパク質であるため、膜貫通領域を含む全長を膜タンパク質として発現させた。さらに、dPOMT1 は C 末端に HA タグが付加されるベクター設計とした。dMGAT1、dMGAT2、honeybee Core1 β 1,3-GalT、honeybee β 1,3-GalT1 及び honeybee β 1,3-GalT2 は II 型膜貫通タンパク質であり、酵素活性領域は膜内腔側に存在するため、膜貫通領域以降の C 末端側の配列を FLAG タグ付きの分泌タンパク質として発現させた。各々の pVL 発現ベクター(表 5)は BaculoGold™ Linearized Baculovirus DNA(BD)と共に Cellfectin 試薬(Thermo Fisher)を用いてバキュロ細胞 Sf21 にトランスフェクションした。27°Cで培養し、バキュロウイルスが産生し Sf21 細胞が死細胞となり培地中に浮遊した時点で、新たな Sf21 細胞に感染させるウイルスの継代を 5 回ほど繰り返してウイルス増殖を行い、感染細胞とウイルス培養上清を回収した。

2.4. ショウジョウバエ O-Man 転移酵素、dPOMT1、dPOMT2 の機能解析

2.4.1. dPOMT1、dPOMT2 RNAi 変異体の作製

RNAi に使用する *UAS-IR* 系統作製のために、生体内で dsRNA として発現させる 500bp の遺伝子領域(dPOMT1 は Expression sequence tag(EST)クローン RE38203 からコード配列の 67-566nt の領域、dPOMT2 は EST クローン LP01681 からコード配列の 802-1301nt の領域)を PCR で増幅した。増幅産物は inverted repeat(IR) 配列になるよう pSC1 ベクターに組み込み、その後 pUAST ベクターにサブクローニングした。これらのコンストラクションをショウジョウバエ胚にマイクロインジェクションし、*UAS-dPOMT1-IR* 系統および *UAS-dPOMT2-IR* 系統を作製した。*UAS-dPOMT1-IR* および *UAS-dPOMT2-IR* を、ドライバー系統である *Act5C-Gal4* 系統とそれぞれ掛け合わせ、25°Cと 28°Cで飼育し、出てきた F₁ 世代の中からバランサー表現型により RNAi 変異体を選択し、表現型を観察した。

2.4.2. dPOMT2 抗体の作製

dPOMT2 の 1-279nt の N 末領域を抗原として dPOMT2 ポリクローナル抗体を作製した。抗原は、EST クローン LP01681 をテンプレートにして、Forward primer 5' -GAATTCATGGCAGCAAGTGTGTT-3' に *EcoRI* サイト、Reverse primer 5' -CTCGAGTTAGCCCATCTTGCCAAAGTG-3' に *XhoI* サイトを付加したプライマーにより増幅した。増幅産物を、N 末に glutathione-S-transferase(GST)を融合する大腸菌の発現ベクター pGEX-6P-1(Amersham Bioscience)の *EcoRI*、*XhoI* サイトにサブクローニングし、pGEX-6P-1-dPOMT2 を作製した。pGEX-6P-1-dPOMT2 を大腸菌での組み換えタンパク質発現によく使われるプロテアーゼ欠損株 *E.coli* BL21(DE3) に形質転換し、37°Cで A600 = 0.6 の対数増殖期まで培養した後、0.5mM IPTG を添加して発現誘導をかけ、20°Cで 18 時間培養した。誘導後の菌体を回収し、超音波により破碎した後、遠心処理でデブリスを除いた上清を組み換えタンパク質粗抽出液とした。GST 融合組み換え dPOMT2 は、グルタチオンセファロース 4B ビーズ(Amersham Biosciences)と還元型グルタチオンにより粗抽出液から精製・溶出された。これを抗原とし、ウサギ(ニュージーランドホワイト)に対し皮下注射で免疫した。3 回免疫後の抗血清をウエスタンブロット解析に用いた。

2.4.3. 組み換えタンパク質と生体試料の POMT 活性測定

2.4.3.1. 感染 Sf21 細胞の膜画分の回収および 3 齢幼虫抽出液の回収

dPOMT1、dPOMT2のPOMT活性は、Sf21細胞で発現させた組み換えタンパク質と、RNAi個体の生体試料でそれぞれ測定された。複数回膜タンパク質として発現している組み換えdPOMT1、dPOMT2は、ウイルス感染Sf21細胞のミクロソーム膜画分として回収した。

感染Sf21細胞をホモジナイズバッファー(10mM Tris-HCl (pH 7.4)、1mM EDTA、250mM sucrose、1mM DTT、3 μ g/mL pepstatin A、1 μ g/mL leupeptin、1mM PMSF、1mM benzamidin-HCl)に懸濁し、ダウンス型ホモジナイザーでホモジナイズした。900 \times gで10分の遠心分離でデブリスを除いた後、100,000 \times g、1時間の超遠心を行った沈殿をミクロソーム膜画分として回収した。ミクロソーム膜画分における組み換えdPOMT1、dPOMT2の発現確認は、ウエスタンブロット解析により行った。8M 尿素溶液で可溶化した各ミクロソーム膜画分 15 μ g は 2-15% SDS PAGEで分離され、フッ化ポリビニリデン(PVDF)メンブレン (Millipore)に転写、5% スキムミルクによるブロッキングの後、1次抗体としてPOMT1-HAの検出に抗HAモノクローナル抗体を、dPOMT2の検出に抗dPOMT2ポリクローナル抗体をそれぞれ用いた。2次抗体反応の後、コニカイムノステイン HRP-1000(廃番品)によりシグナルを検出した。

25°Cで飼育した*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT1-IR* および28°Cで飼育した*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT2-IR* とコントロールの*Act5C-GAL4/w¹¹⁸* の3齢幼虫を回収し抽出液を調製した。それぞれの3齢幼虫に細胞溶解液(20mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM EDTA、0.5% *n*-octyl- β -D-thioglycoside (DOJINDO LABORATORIES)、3 μ g/mL pepstatin A、1 μ g/mL leupeptin、1mM benzamidin-HCl、1mM PMSF) を加え、ペッスルでホモジナイズした後、氷上で静置して膜タンパク質を可溶化させた。これを100,000 \times g、1時間の超遠心にかけて、得られた上清をタンパク質抽出液とした。

2.4.3.2. POMT 活性測定

POMT 活性は、ドナー基質として Dolichylphosphate [³H] Man を用い、アクセプター基質の GST- α -DG への [³H]Man の取り込みにより測定した[24]。酵素源として 80 μ g のミクロソーム膜画分、もしくは 40 μ g の 3 齢幼虫タンパク抽出液を用い、10 μ g GST- α -DG、100nM Dolichylphosphate [³H] Man (56.3Ci /mmol)、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5% *n*-octyl- β -D-thioglycoside、2mM 2-mercaptoethanol、10mM EDTA の組成の反応液 20 μ L の系で酵素反応を行った。22°C、1時間の反応後、200 μ L の反応停止液(130mM NaCl、7mM Na₂HPO₄、3mM NaH₂PO₄、1% Triton X-100)を加えた。その後、10,000 \times g で 10 分遠心処理し、回収した上清に、10 μ L グルタチオンセファロース 4B ビーズを加え、4°Cで 1 時間、回転攪拌した。ビーズは洗浄液(20mM Tris-HCl(pH7.4)、0.5% Triton X-100)で 3 回洗浄され、反応液中の GST- α -DG のみが回収された。その後、GST- α -DG に取り込まれた [³H]Man の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

2.4.4. α -マンノシダーゼ消化

POMT 活性測定後の GST- α -DG は、グルタチオンセファロース 4B ビーズに結合している状態で、0.1 M ammonium acetate buffer(pH 4.5)、1mM ZnCl₂、0.8U Jack bean- α -mannosidase の反応液 50 μ L の系において、37°Cで 60 時間、途中 20 時間おきに 0.8U の分解酵素を足しながら反応させた[24]。100°C、5 分の熱処理で酵素を失活させた後、反応液からグルタチオンセファロース 4B ビーズに結合した GST- α -DG を遠心処理で除いた上清に含まれる、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

2.4.5. ショウジョウバエ胚のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション

dPOMT1 の *Bgl* II-*Eco* RI 断片と *dPOMT2* の *Ecl* 136II-*Not* I 断片を、pBluescript SK⁻ (STRATAGENE) の *Bam* HI-*Eco* RI と *Sma* I-*Not* I 部位にそれぞれサブクローニングし、直鎖状にしてテンプレートとして使用した。Digoxigenin RNA Labeling Mix (Roche) を用い、T3 もしくは T7 RNA polymerase で転写し、それぞれの転写産物を 80mM NaHCO₃、120mM Na₂CO₃、10mM DTT の条件でアルカリ分解し、Digoxigenin (DIG) 標識RNAプローブとした。

4% パラホルムアルデヒドで固定されたショウジョウバエ野生型 CantonS 系統の胚は、50% ホルムアミド、5xSSC (750mM NaCl, 75mM sodium citrate, 100 μg/mL ヘパリン、0.1% Tween-20、10mM DTT、20 μg/mL 酵母RNA、20 μg/mL 熱変性サケ精子DNA) の条件で標識プローブとハイブリダイゼーションさせた。55°C で一晩の反応の後、50% ホルムアミド、5xSSC、0.1% Tween-20 から PBT (PBS, 0.1% Tween-20) への段階系列による洗浄を行い、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識-抗DIG抗体 Fab 断片 (Roche) と反応させた。2mM レバミゾール/TBST (50mM Tris-HCl (pH 8.0)、150mM NaCl、0.1% Tween-20) による処理で内在性のフォスファターゼ活性を不活化した後、AP呈色液 (0.375mg/mL NBT、0.175mg/mL BCIP、100mM NaCl、100mM Tris-HCl (pH 9.5)、5 mM MgCl₂、0.1% Tween-20) に反応させた。その後、TE (10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA) で3回洗浄し、グリセロールで封入した。

2.4.6. POMGnT 活性測定

FLAG-dMGAT1、FLAG-dMGAT2 組み換えタンパク質は、バキュロウイルス発現系を用いて、Sf21 細胞に pVL-FLAG-*dMGAT1* と pVL-FLAG-*dMGAT2* を導入し発現させた。組み換えタンパク質は、ウイルス感染細胞の培養上清に FLAG タグ付きタンパク質として分泌される。FLAG-dMGAT1、FLAG-dMGAT2 組み換えタンパク質を、抗-FLAG M1 AFFINITY GEL (Sigma-Aldrich) を用いて培養上清から回収し、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗 FLAG 抗体 (Sigma-Aldrich) と FLAG-BAP 標準タンパク質 (Sigma-Aldrich) を用いたウエスタンブロットイングにより定量した。

POMGnT活性は、ドナー基質としてUDP-[³H]GlcNAcを用い、アクセプター基質のMan付加ペプチド (Ac-Ala-Ala-Pro-Thr(Man)-Pro-Val-Ala-Ala-Pro-NH₂) への [³H] GlcNAc の取り込みにより測定した[91]。140mM MES (pH 7.4)、400mM UDP-[³H]GlcNAc (180Ci/mmol)、400mM Man付加ペプチド、10mM MnCl₂、2% Triton X-100、5mM AMP、200mM GlcNAc、10% glycerol、50 μg FLAG-dMGAT1もしくはFLAG-dMGAT2の反応液50 μLの系において37°Cで2時間の酵素反応を行った。反応後のMan付加ペプチドは、Wakopak 5C18-200 (4.6 x 250 mm; Wako) に吸着させ、0.1% トリフルオロ酢酸存在下での、蒸留水からアセトンへの1-25%濃度勾配を付けた流速 1mL/分の条件で溶出させた。214nmの吸光度によりMan付加ペプチドの溶出画分を決定し、取り込まれた [³H]GlcNAc の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

2.4.7. β 1,2-GlcNAcT I および β 1,2-GlcNAcT II 活性測定

β 1,2-GlcNAcT I 活性は、ドナー基質として UDP-GlcNAc を用い、アクセプター基質の pyridylaminated (PA) 化糖 PA017、Man α 1-6 (Man α 1-3) Man α 1-6 (Man α 1-3) Man β 1-4 GlcNAc β 1-4 GlcNAc -PA (TaKaRa) への GlcNAc の取り込みにより測定した[91]。100mM MES (pH 6.0)、100mM GlcNAc、5mM AMP、0.2% BSA、20mM MnCl₂、1mM UDP-GlcNAc、0.5% Triton X-100、10 μM PA 化糖 PA017、FLAG-dMGAT1 もしくは FLAG-dMGAT2 の反応液 20 μL の系において 37°C で 2 時間の酵素反応を行った。

β 1,2-GlcNAcT II 活性は、ドナー基質として UDP-GlcNAc を用い、アクセプター基質の PA 化糖 PA100.2、Man α 1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA (生化学工業) への GlcNAc の取り込みにより測定した[91]。100mM MES (pH 6.0)、100mM GlcNAc、100mM NaCl、5mM AMP、0.2% BSA、20mM MnCl₂、1mM UDP-GlcNAc、1% Triton X-100、10 μ M PA 化糖 100.2、FLAG-dMGAT1 もしくは FLAG-dMGAT2 の反応液 10 μ L の系において 37°C で 2 時間の酵素反応を行った。反応後の PA 化糖は、Cosmosil 5C18-AR column (4.6 x 250 mm、Nacalai) と溶媒に流速 1.2mL/分の 100 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.0)、0.15% 1-ブタノールを用いた HPLC で分離され、励起波長 320nm、蛍光波長 400nm の PA の蛍光によって検出した。PA017 の分離は 45°C、PA100.2 の分離は 50°C で行った。

2.5. ミツバチ頭部に存在する特殊な N-結合型糖鎖構造の生合成に関わる β 1,3-GalTs

2.5.1. honeybee β 1,3-GalT 組み換えタンパク質の作製

honeybee Core1 β 1,3-GalT、honeybee β 1,3-GalT1 および honeybee β 1,3-GalT2 の活性を測定するため、2.2.2. および 2.2.3. の方法に沿って、FLAG 融合組み換えタンパク質 FLAG-honeybee Core1 β 1,3-GalT、FLAG-honeybee β 1,3-GalT1 および FLAG-honeybee β 1,3-GalT2 を作製した。PCR クローニングはミツバチ成虫頭部 cDNA を鋳型にし、表 5 のプライマーセットを用いた。FLAG-honeybee Core1 β 1,3-GalT、FLAG-honeybee β 1,3-GalT1、FLAG-honeybee β 1,3-GalT2 組み換えタンパク質は、抗-FLAG M1 AFFINITY GEL によりウイルス培養上清から精製された。組み換えタンパク質は 10% SDS PAGE で分離され、PVDF メンブレンに転写、5% スキムミルクによるブロッキングの後、HRP 標識抗 FLAG 抗体と FLAG-BAP 標準タンパク質を用いたウエスタンブロッティングにより定量された。

2.5.2. β 1,3-GalT 活性測定

GalNAc α に Gal を β 1-3 で付加し、T 抗原を合成する β 1,3-GalT 活性は、ドナー基質として UDP-[³H]Gal を用い、アクセプター基質の *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- α -galactosaminide (GalNAc α -*p*Nph) (Merk Millipore) への [³H]Gal の取り込みにより測定した[36]。3.17 μ g FLAG-honeybee Core1 β 1,3-GalT、250 μ M GalNAc α -*p*Nph、100mM MES (pH 6.8)、2mM ATP、20mM MnCl₂、0.2% Triton X-100、0.4mM UDP-Gal、1.25 μ M UDP-[³H]Gal (20Ci/mmol) の反応液 40 μ L の系において 25°C で 1 時間の酵素反応を行った。200 μ L の蒸留水を加え酵素反応を停止した後、Sep-Pak C18 cartridges (Waters) に通し、蒸留水により未反応の UDP-[³H]Gal を除いた後、メタノールで GalNAc α -*p*Nph を溶出し、取り込まれた [³H]Gal の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

複合型 N-結合型糖鎖基質 GalNAc2GlcNAc2Man3GlcNAc2-PA (LacdiNAcM3-PA) への β 1,3-GalT 活性[30]は、3.7 μ g FLAG-honeybee Core1 β 1,3-GalT、4.0 μ g FLAG-honeybee β 1,3-GalT1、2.7 μ g FLAG-honeybee β 1,3-GalT2 それぞれを酵素源として、680pmol LacdiNAcM3-PA、20mM UDP-Gal、100mM MOPS (pH 6.8)、2mM ATP、20mM MnCl₂、0.2% Triton X-100 の系において 37°C で 16 時間の酵素反応を行った。3 分の煮沸で酵素反応を停止し、12,000 \times g で 5 分の遠心した上清 18 μ L は、ポリマー系アミノカラム Shodex Asahipak NH2P-50 column (10 \times 250mm、昭和電工)、移動相に水-アセトニトリル 30-50%、流速 0.8mL/分による HPLC で分離され、励起波長 310nm、蛍光波長 380nm で検出した [29]。

2.5.3. β 1,3 ガラクトシダーゼ消化

β 1,3-GalT 活性測定による反応産物は、HPLC により LacdiNAcM3-PA と分離されたピークとして回収された。これを基質として 95mU 組み換え β 1,3 galactosidase (NEB)、100mM sodium acetate (pH5.5) の条件で 37°C、終夜の β 1,3 ガラクトシダーゼ消化を行った。消化産物は β 1,3-GalT 活性測定と同様の HPLC によって検出された[30]。

2.6. ヒト結腸直腸癌における PAPS 輸送体の発現と役割

2.6.1. 生体試料

生体試料の使用にあたっては、慶応義塾大学病院、国立病院機構大阪医療センター、産業技術総合研究所、愛知県がんセンター研究所、創価大学の承認を得ている。慶応義塾大学病院から供与された凍結直腸癌試料は *in situ* ハイブリダイゼーション(図 14 A,B)に用いた。国立病院機構大阪医療センターから供与された、ホルマリン固定-パラフィン包埋大腸癌試料は免疫組織学的染色(図 14 E,F)に用いた。国立病院機構大阪医療センターと愛知県がんセンター研究所から供与された凍結結腸直腸試料(図 14 G-K)と凍結結腸直腸癌試料(表 8)はリアルタイム PCR による解析(図 13 B)に用いた。

2.6.2. 凍結直腸癌試料の *in situ* ハイブリダイゼーション

PAPST1 の0.57kb断片がサブクローニングされたpBluescript SK-をNot IIにより直鎖状にし、Digoxigenin RNA Labeling Mix (Roche)を用い、T7 RNA polymeraseにより転写し、DIG標識PAPST1 RNAアンチセンスプローブとした。T3 RNA polymeraseによるセンスプローブの転写にはXho Iで直鎖状にされたテンプレートを用いた。

直腸癌組織は4% パラホルムアルデヒドによる固定の後、Tissue-Tech OCT compound (Sakura Finetechnical)に包埋され、凍結連続切片が作製された。切片はPBS洗浄で包埋剤を除去した後、1 μ g/mL Proteinase K (Roche)で37°C、10分間処理し、抗原の賦活化を行った。4°C、20分間の4% paraformaldehydeによる再固定の後、切片はハイブリダイゼーション液(5 \times SSC、50% deionized formamide、10% dextran sulfate、0.5% Tween 20、5mM DTT、50 μ g/mL heparin、50 μ g/mL yeast tRNA)でプレハイブリした後に、DIG標識アンチセンスプローブ、センスプローブそれぞれを加えたハイブリダイゼーション液において、58°C、16時間反応させた。ハイブリダイゼーション後は、5 \times SSC、50% deionized formamide、0.5% Tween 20による 58°C、30分間の洗浄と、2 \times SSC、50% deionized formamide、0.5% Tween 20による 58°C、30分間、3回の洗浄を行い、TBST (50mM Tris-HCl (pH7.6)、150mM NaCl、0.5% Tween 20)に blocking Reagent (Roche)を終濃度 0.5%で溶解した溶液中で、AP標識-抗DIG抗体 Fab 断片 (Roche)と反応させた。2mM levamisole/TBSTによる処理、AP呈色液による2.5時間の呈色反応の後、TEで3回洗浄し、グリセロールで封入した。

2.6.3. PAPST1、PAPST2 ポリクローナル抗体の作製および PAPST1 抗体の評価

マウス PAPST1 (mPAPST1) の C 末端 KAVPTEPPVQKV の配列および、ヒト PAPST2 (hPAPST2) の 289-300aa の CAKNPVRTYGYA の配列を抗原とする PAPST1、PAPST2 に対するポリクローナル抗体を作製した。PAPST はⅢ型の多重膜貫通タンパク質であるため、膜貫通領域ではない部分から抗原領域を選定した。抗原ペプチドをキャリアタンパク質のヘモシアニンと結合させ、アジュバントと混合したものを免疫源として

ウサギ(ニュージーランドホワイト)へ免疫した。得られた抗血清に対して抗原ペプチドによるアフィニティー精製を行った。

PAPST1 抗体の交差性の評価は、HEK293 細胞において過剰発現させた hPAPST1 に対するウエスタンブロッティング法により解析した。hPAPST1 の ORF 全長を、Forward primer 5'-GAATTC TGGACGCCAGATGGTGG-3' に EcoRI サイト、Reverse primer 5'-CTCGAGTCAAACCTTCTGCACAGGAG-3' に Xho I サイトが付加したプライマーにより増幅した。増幅産物は、N 末に c-myc を融合する発現ベクター pCXN2-c-myc の EcoRI、Xho I サイトにサブクローニングされ、pCXN2-c-myc-hPAPST1 が作製された。1 × 10⁶ cells/6cm dish で培養された HEK293 細胞に、2 μg pCXN2-c-myc-hPAPST1 を Lipofectamine 2000 reagent (Thermo Fisher) と共にトランスフェクションした。3 日後に細胞を回収し、120 μL の細胞溶解液(10mM triethanolamine、0.8 M sorbitol)と 60 μL の 3×SDS sample buffer (NEB) に懸濁し、4°C で 16 時間溶解した。1 μg のタンパク質を含む細胞抽出液は 10% SDS-PAGE で分離され、PVDF メンブレンに転写、5% スキムミルクによるブロッキングの後、PAPST1 抗体、c-myc 抗体による 1 次抗体反応、HRP 標識抗体による 2 次抗体反応の後、ECL Plus (GE Healthcare) によりシグナルを検出した。

2.6.4. 結腸直腸癌組織の免疫組織学的染色

アフィニティー精製された抗PAPST1、抗PAPST2ウサギポリクローナル抗体を用い、免疫組織学的染色を行った。ホルマリン固定、パラフィンに包埋された結腸直腸癌組織、結腸直腸組織はそれぞれ3 μm厚の連続切片に薄切された。免疫組織学的染色は、Ventana XT system BenchMark (Ventana Medical Systems) のプロトコールより、全工程が自動で行われた。組織切片は、抗原の賦活化 (antigen-retrieval solution (Ventana) で100°C、30分間)と、内在性のペルオキシダーゼ活性の失活(3% 過酸化水素、4分間)の処理の後、抗PAPST1抗体と37°C、30分間反応した。LSAB Ventana Iview DAB detection systemによるシグナル検出の後、マイヤーヘマトキシリン溶液によるカウンター染色を行った。

さらに、結腸直腸癌組織、結腸直腸組織の連続凍結切片の免疫組織学的染色も行った。切片は固定され(冷アセトン、5分間)、PBSへの親水処理の後、ブロッキング処理(5% BSA/PBS、室温、30分間)、1次抗体反応(抗PAPST1抗体、抗PAPST2抗体、4°C、16時間)を行った。PBSで洗浄した後、2次抗体反応(Alexa Fluor 488標識抗ラビットIgG抗体、室温、30分間)の後に洗浄し、最後にF-actinを染色するAlexa Fluor 594標識ファロトキシン (Molecular Probes) と核を染めるHoechst 33342で10分間カウンター染色を行い、ProLong Gold Antifade reagent (Molecular Probes) で封入した。

2.6.5. 代謝標識実験によるHS、CS、N-結合型糖鎖への硫酸取り込みの評価

Omega、DLD-1、LS174T 細胞株は Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM)/F12 (1:1) Medium (D-MEM/F12) (Invitrogen) に10% ウシ胎児血清、抗生物質(1×ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen))を加えた培地において、37°C、5% CO₂ の条件で培養した。解析の24時間前に各細胞を24wellプレートに1 × 10⁵ cells/wellで継代し、硫酸フリーのDMEM/F12培地に10% ウシ胎児血清、100 μCi/mL carrier-free Na₂[³⁵S]O₄ (ARC) で培養し、代謝標識を行った。PBSで2回洗浄した後、通常培地で2時間培養し、PBS洗浄して未反応のNa₂[³⁵S]O₄を除去した。続いて、0.5mL DMEM/F12に、10mU/mL ヘパリチナーゼ(生化学工業)、100mU/mL コンドロイチナーゼABC(生化学工業)それぞれを別に加えた培地で2時間培養し、細胞表面のHS、CSを遊離させた。その後PBSで2回洗浄し、細胞からタンパク質を回収した。細胞に50 μLの細胞

溶解液(0.5% Nonidet P-40、1mM EDTA、0.5mM PMSF)を滴下、氷上、1時間静置した後、18,500 × g、30分間の遠心でデブリスを除き、細胞抽出液を得た。それぞれの細胞抽出液のタンパク濃度を決定し、20 μgのタンパク質に対し、10% TCA条件で沈降濃縮、5% TCA溶液と冷アセトンでの洗浄の後、風乾し、50 μL の0.5N NaOHに溶解した。コントロールには、分解酵素反応をせずに同様の処理を行ったサンプルを用いた。これらのサンプルを2-15% SDS-PAGEで分離し、ゲルを65°Cのゲルドライヤーで真空乾燥させた後、一晚イメージングプレートに露光させ、BAS-5000(FUJI)で画像解析を行った。

HS、CSへのNa₂[³⁵S]O₄取り込みは、それぞれの分解酵素処理で得られた培地に含まれる放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することで、遊離したHS、CSを評価した。*N*-結合型糖鎖へのNa₂[³⁵S]O₄取り込みの評価は、ヘパリチナーゼおよびコンドロイチナーゼABC処理を行った細胞からTCA沈殿により回収した20 μgのタンパク質に対する、PNGase F(NEB)消化により行った。37°C、2時間のPNGase F消化の後、18,500 × g、5分間の遠心で上清と沈殿に分け、上清は*N*-結合型糖鎖から遊離した糖鎖の画分、沈殿はHS、CS、*N*-結合型糖鎖以外のその他の硫酸化構造の画分として、それぞれの画分に含まれる放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、解析を行った。

2.6.6. DLD-1細胞におけるPAPST1、PAPST2 遺伝子のノックダウン

2.6.6.1. siRNAによるノックダウン

PAPST1、PAPST2 遺伝子のノックダウンは、siDirect program (<http://genomics.jp/Sidirect>)によりデザインされた、3'側が2塩基突出する19bpのsiRNA(表6)を用いて行った。EGFP(コントロール) siRNAはDLD-1に存在しない配列を用いている。

DLD-1細胞は、D-MEM/F12、10% ウシ胎仔血清、抗生物質の生育培地において、37°C、5% CO₂の条件で培養した。DLD-1細胞 1 × 10⁶ cellsを6cm Dishに継代した日をDay0とし、24時間後のDay1に、それぞれの100nM siRNAはLipofectamine 2000により導入された。siRNAによるノックダウンは、継代 24時間後にsiRNA導入のサイクルを3日毎に計3回行った(Day0、Day3、Day6に1 × 10⁶ cells/Dishで継代。Day1、Day4、Day7にsiRNA導入)。3回目のノックダウン2日後のDay9に、Na₂[³⁵S]O₄による代謝標識実験(2.5.5の項目参照)を、3回目のノックダウン3日後のDay10に、total RNA回収し遺伝子発現解析(2.2.1.2の項目参照)を行った。

遺伝子	センス (5'-3')	アンチセンス (5'-3')
PAPST1	GGUCAAGAGAGCAUAGGUAGG	UACCUAUGCUCUCUUGACCCC
PAPST2	CCAGUUCGGACCUAUGGUUUAU	AACCAUAGGUCCGAACUGGAU
EGFP(コントロール)	GUACCGCACGUCAUUCGUAUC	UACGAAUGACGUGCGGUACGU

表6: 使用したsiRNAの配列

2.6.6.2. PAPST1、PAPST2ノックダウン細胞の増殖解析

細胞増殖の解析には、Cell Counting Kit-8(DOJINDO)のWST-8試薬を用いた。3回目のノックダウン翌日のDay8に、細胞を96wellプレートに2 × 10³ cells/wellで継代し、生育培地で培養した。細胞の数はWST-8試薬の450nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(Model3550;BIO-RAD)で測定することにより解析した。測定はWST-8試薬を添加した2時間後に測定し、Day8からDay12までの5日間測定を行った。

2.6.6.3. PAPST1、PAPST2ノックダウン細胞への成長因子によるFGFシグナルの刺激

FGF-2 刺激による、ERK のリン酸化の変化をウエスタンブロッティングで解析した。3 回目のノックダウン 3 日後の Day10 に、16 時間の無血清培地による血清飢餓培養を行った後、10ng/mL FGF-2(Upstate) で 5 分間刺激し、FGF シグナルを活性化させた。細胞をすみやかに氷冷 PBS で洗浄し、細胞溶解液(50mM Tris-HCl(pH 7.4)、150mM NaCl、1% Triton X-100、1mM Na₃VO₄、10mM NaF、protease inhibitors)を加えて氷上で 1 時間静置した。細胞溶解液を回収し、18,500 × g、5 分間の遠心でデブリスを除き、細胞抽出液を得た。タンパク質濃度を決定した後に、それぞれの細胞抽出液 5 μg は 10% SDS-PAGE で分離され、PVDF メンブレンに転写、1% BSA によるブロッキングの後、1 次抗体反応に抗 ERK1/2 抗体(Cell Signaling)と抗リン酸化 ERK1/2 抗体(Thr-202、Tyr-204; Cell Signaling)を、2 次抗体反応に HRP 標識抗ラビット IgG 応対を、検出に ECL Plus を用いたウエスタンブロッティングにより定量された。

2.7. インフルエンザウイルス糖鎖結合特異性データの高頻度糖鎖構造マイニングと *in vivo* での検証

2.7.1. Glycan Minor Toolによるデータマイニング

糖鎖構造は種々のテキスト形式で表記されるが、CFG によって提供される糖鎖構造データは IUPAC 形式で提示される。IUPAC 形式は線形表記のため分岐は括弧書きによって示されている。一方、Glycan Miner Tool への入力に用いられる KCF(KEGG Chemical Function)形式はノードの特定の単糖とエッジの結合様式によって糖鎖を図形表記する。それぞれのノードに x、y 座標を指定することで、平面での詳細な表記が可能になる。CFG のアレイデータを Glycan Minor Tool の入力形式である KCF 形式へ変換し[92]、Glycan Minor Tool で解析を行った。

Glycan Minor Tool では α -closed frequent subtree algorithm を実行した。 α -closed frequent subtree は頻繁に出現する入力データセットの中の下位構造として定義される。Glycan Minor Tool は、入力データに基づき計算された P 値の順に、 α -closed frequent subtree を戻す。この P 値は、標的とする subtree へ、同様なトポロジーにより無作為に作られた構造の計算によって得られ、無作為に作られた subtree の中で標的とする subtree を得る可能性が計算される。

2.7.2. *hGlcNAc6ST-1* 過剰発現細胞の作製と評価

Madin Darby Canine Kidney(MDCK)細胞はJapanese Collection of Research Bioresources(JCRB)細胞バンクのJCRB9029、Lot.08302007を使用した。MDCK細胞はEagle's minimum essential medium(E-MEM)、10%FBS、抗生物質の培地で37°C、5% CO₂の条件で培養し、ウイルス感染後は35°C、5% CO₂の条件で培養を行った。

pCXN2-*hGlcNAc6ST-1* の発現ベクターは、2.2.2の方法に沿って作製された。MDCK細胞はトランスフェクション24時間前に4x10⁵ cell/wellで12wellプレートに継代され、3 μg pCXN2-*hGlcNAc6ST-1* または pCXN2(コントロール用の空ベクター導入)は9 μL Lipofectamin2000、200 μL OPTI-MEMを用いてトランスフェクションされた。トランスフェクション翌日より、0.4 μg/mL G418を含む培地で培養し、形質転換体の選別を行った。形質転換細胞は3-4日毎の培地交換を繰り返し、出現した形質転換体のコロニーを限界希釈により継代し、単一細胞クローン株とした。

得られた細胞株の*hGlcNAc6ST-1* 遺伝子の発現増加は、RT-PCRとFACS解析により評価された。

異所性発現の *hGlcNAc6ST-1* 遺伝子と内在性のイヌGAPDH遺伝子はRT-PCRにより測定された。トータルRNAはTRI Reagent を用いて抽出し、逆転写にはoligo (dT) 20 primer と SuperscriptII first strand synthesis kit (Invitrogen)を用いた。PCRは *hGlcNAc6ST-1* (F): 5'-GAATCCCGAGGTGTTCTTTCTCT-3'、*hGlcNAc6ST-1* (R): 5'-TTCTTGCGCCAAGCTTGTG-3'、canine GAPDH (F): 5'-ATGGTGAAGGTCCGAGTC-3'、canine GAPDH (R): 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATG-3' のプライマーを使用し、Ex Taq (TaKaRa) で増幅した。

細部表面の*hGlcNAc6ST-1*遺伝子による硫酸化産物は、Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc構造を認識する[93]、MECA-79モノクローナル抗体(Santa Cruz、sc-19602)を用いたFACS解析で評価した。形質導入細胞はAccutase solution (Sigma-Aldrich)を用いて回収し、MECA-79抗体と氷上で2時間反応させた。洗浄後に細胞は2次抗体入りの溶液(fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rat IgM (A-104FS, American Qualex, San Clemente, CA, USA)、0.5% bovine serum albumin (BSA)、0.1% NaN₃、phosphate-buffered saline (PBS))に懸濁された。解析にはFACS AriaIII cell sorter (BD)を用いた。NeuAc α 2-6Galを認識する Sambucus sieboldiana agglutinin (SSA) [94] (FITC標識SSA (J-CHEMICAL) を使用) により NeuAc α 2-6Galを、*N*-結合型糖鎖上のNeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAcを認識するMaackia amurensis leukoagglutinin (MAL) [95] (ビオチン化MALを使用)、*N*-結合型糖鎖及びO結合型糖鎖上のNeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAcを認識するMaackia amurensis hemagglutinin (MAH) [96] (ビオチン化MAHを使用)によりNeuAc α 2-3Galを検出した。O結合型糖鎖上の6-スルホシアリルLe^x およびNeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc はS1抗体[97]、O結合型糖鎖と*N*-結合型糖鎖上の6-スルホシアリルLe^x およびNeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc はS2抗体[97]により、シアリルLe^x はCSLEX 抗体(BD)により検出された。

2.7.3. ウイルス感染と培養上清中のウイルス遺伝子量の測定と感染性ウイルスの評価

感染実験にはヒトとカモのA型インフルエンザウイルス、A/Hokkaido/11/2002 (H1N1) (HKD/2002)、A/Hyogo/YS/2011 (H1N1) (HYG/2011) と A/ duck/Alberta/35/1976 (H1N1) (Dk/AB/1976)を用いた。それぞれのウイルスのHAの塩基配列は、HKD/2002, LC497852; HYG/2011, LC497853; Dk/AB/1976, LC497851でGenBankに登録されている。6wellプレートに5 × 10⁶ cells/wellで細胞を継代し、翌日に細胞をPBSで2回リンスした後、抗生物質を含むE-MEM(最小培地)中にmultiplicity of infection (MOI) 0.01 もしくは 0.0001 でウイルスを接種し、35°Cで 1.5 時間感染させた。細胞をPBSで2回洗浄し、感染しなかったウイルスを除いた後、1 μ g/mL アセチルトリプシン(Sigma-Aldrich)を含む最小培地で培養した。感染後の培養上清を各時間で回収し、2.3.1.1.および2.3.1.4.の方法に沿って、培養上清に含まれるウイルスM 遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで測定した。

培養上清に含まれる感染性ウイルスの量は50% tissue culture infective dose (TCID₅₀)解析により測定された。MDCK 細胞は 96well プレートにおいて、密集状態になるまで培養された。血清を除くために PBS で 2 回洗浄し、10 倍希釈系列の培養上清 50 μ L を加えた。35°C、1.5 時間の接種後、感染しなかったウイルスを PBS の 2 回洗浄で除いた後に、1 μ g/mL アセチルトリプシンを含む最小培地 100 μ L を加え、35°C、5% CO₂ の条件で静置した。感染 3 日後、ウイルスの感染価は感染細胞の細胞変性の観察によって評価した。

2.7.4. 固相結合解析

インフルエンザウイルスの糖鎖結合特異性は8つの異なるビオチン化糖鎖構造(東京化成工業)

[98,99]に対する固相結合解析により解析された。50 μ Lの0.1 μ Mに溶解されたそれぞれのビオチン化糖鎖を、streptavidinコート96wellプレート(Thermo Fisher)に室温で1時間反応させ、糖鎖をプレート上に固定した。0.02% Tween 20 を含むPBS (PBST)で洗浄し、結合しなかった糖鎖を除いた後、5% BSA に2時間反応させ、タンパク質の非特異的吸着を抑制するブロッキングを行った。各ウイルス(50 HAU)のPBSによる2倍希釈系列の段階希釈液は、糖鎖が固定されたwell に加えられ、4°Cで12 時間反応させた。PBST による洗浄後、2% BSA/PBSTで 1000倍希釈されたマウス抗HA モノクローナル抗体と4°Cで2 時間反応させた後、PBST による洗浄を行い、続けて、2% BSA/PBSTで1000倍希釈されたHRP標識 ヤギ抗マウスIgG 抗体と4°Cで2 時間反応させた。PBST による洗浄後、100 μ L の 3,3'-tetramethylbenzidine (TMB) 溶液 (SeraCare) と10分間室温で呈色反応させた後、100 μ L の TMB 停止液 (SeraCare)で反応を停止させた。450 nm の反応産物は MULTISCAN JX (Thermo Fisher)によって計測された。

2.7.5. 抗体とレクチンによる発育鶏卵の組織化学的染色

受精後 10 日齢の発育鶏卵の漿尿膜と羊膜を 3.7% ホルムアルデヒド溶液で固定し、脱水後、パラフィン包埋を行い、2 μ m 厚の組織切片にした。脱パラフィン、親水の後、切片を 0.3% 過酸化水素を含むメタノール溶液に浸し、内在性のペルオキシダーゼ活性を不活化した後、PBS で洗浄した。抗体による組織化学的染色では、切片は 10% 正常ヤギ血清でブロッキングした。マウス抗 CSLEX モノクローナル抗体、マウス抗 S1 モノクローナル抗体、マウス抗 S2 モノクローナル抗体を 1 次抗体として用い、4°Cで一晩反応させた。PBS による洗浄後、ビオチン標識 ヤギ抗マウス IgG 抗体による 2 次抗体反応を室温で 30 分間行い、PBS 洗浄の後、呈色反応を行った。レクチンによる組織化学的染色では、切片は 1% BSA でブロッキングした。ビオチン化 MAL、ビオチン化 MAH、ビオチン化 SSA を用い、切片とそれぞれのビオチン化レクチンを 4°Cで一晩反応させ、PBS 洗浄の後、呈色反応を行った。呈色反応は SAB-PO キット(Nichirei)を使用し、プロトコールに従い、HRP 標識streptavidinによる標識、DAB、過酸化水素による反応を行った。最後にマイヤーヘマトキシリン溶液を用いてカウンター染色を行い、エタノール系列による脱水、キシレンによる透徹を経て切片を封入した。

3.1.2. *dPOMT1* と *dPOMT2* の RNAi 変異体

dPOMT1 と *dPOMT2* の *in vivo* での機能解析のために、GAL4-UAS-IR システムを用いて遺伝性かつ誘導性の RNAi 変異体を作成した。*Act5C-GAL4* はアクチンプロモーターの制御下で、酵母の転写因子 GAL4 を全ての細胞、全ての発生時期において発現する。この *Act5C-GAL4* を、ショウジョウバエの全ての細胞、全ての発生時期において *dPOMT1* と *dPOMT2* の遺伝子抑制を誘導するための GAL4 ドライバー系統として用いた。*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT1-IR* 個体の生存性は 25°C で 19%、28°C で 0% であった。GAL4-UAS 発現システムには温度依存性があるため、RNAi ノックダウンは 25°C に比べ 28°C でより強い影響を受ける。一方、*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT2-IR* 個体の生存性は 28°C で 63% であった。*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT1-IR* のエスケーパー個体は、その遺伝子名 *rt* (*rotated abdomen*) の通りの時計回りに腹部がよじれる表現型を示した (図 2A, D)。興味深いことに、*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT2-IR* エスケーパー個体も時計回りに腹部がよじれる表現型を認められた (図 2B, E)。このことから、2つの *POMT* 遺伝子は強く相互作用してハエの筋発生に機能していることが明らかとなった。

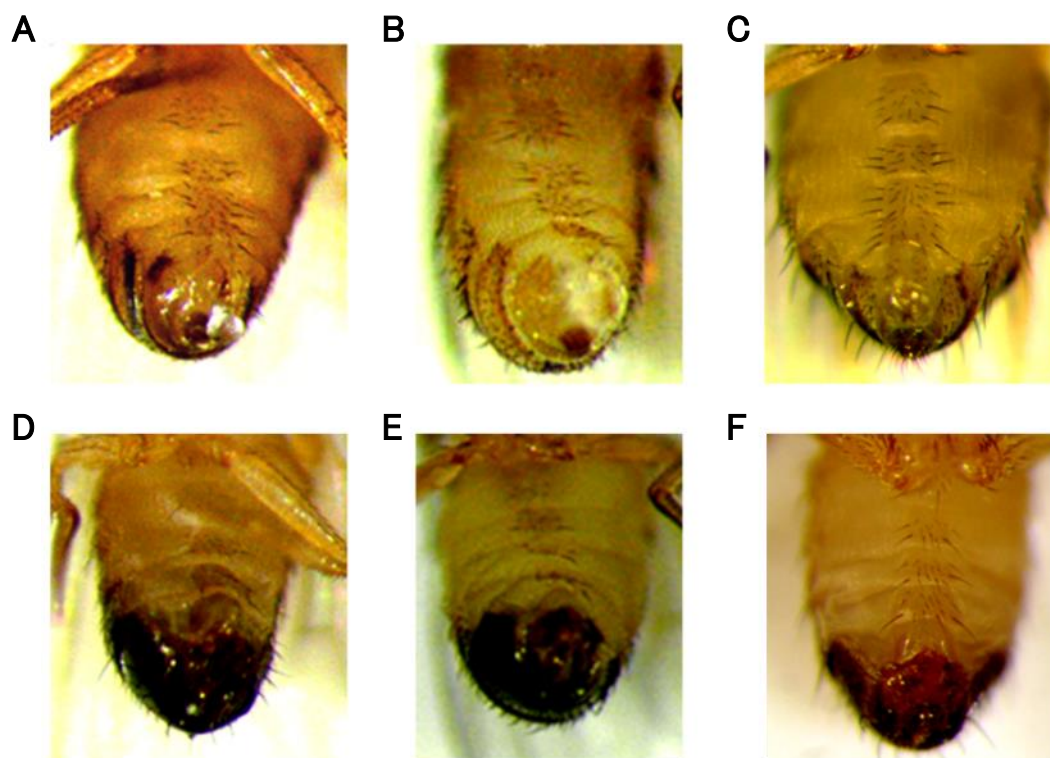


図 2: *dPOMT1* と *dPOMT2* RNAi 変異体の「腹よじれ」の表現型

Act5C-GAL4/UAS-dPOMT1-IR RNAi 変異体 (A, D)、*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT2-IR* RNAi 変異体 (B, E) および野生型 CantonS (C, F) の表現型。A, B, C はメス、D, E, F はオスの個体。*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT1-IR* は 25°C、*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT2-IR*、CantonS は 28°C で飼育した。それぞれの RNAi 変異体は時計回りに 30-60° 腹部がよじれる「腹よじれ」の表現型を示した (A, B, D, E)。

dPOMT1、*dPOMT2* RNAi 変異体の 3 齢幼虫における遺伝子の発現量はリアルタイム PCR により測定した。*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT1-IR* RNAi 変異体は *Act5C-GAL4/+* のコントロール体に比べ *dPOMT1* の発現量が 25°C で 32% に減少していた。*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT2-IR* RNAi 変異体での *dPOMT2* の発現量は 28°C で 21% であった。しかしながら、*dPOMT1* RNAi 変異体における *dPOMT2* の発現量及び *dPOMT2*

RNAi 変異体における *dPOMT1* の発現量に変化は認められなかった(図 3)。これらの結果は、それぞれの遺伝子は RNAi によって特異的に抑制されており、腹部よじれの表現型はそれぞれの遺伝子の抑制によって引き起こされたことを示す。RNAi による *dPOMT2* の発現量低下はより顕著であったが、*dPOMT1* に比べ致死性は低かった。この不一致は発生における未知の機能に由来するものと考えられる。

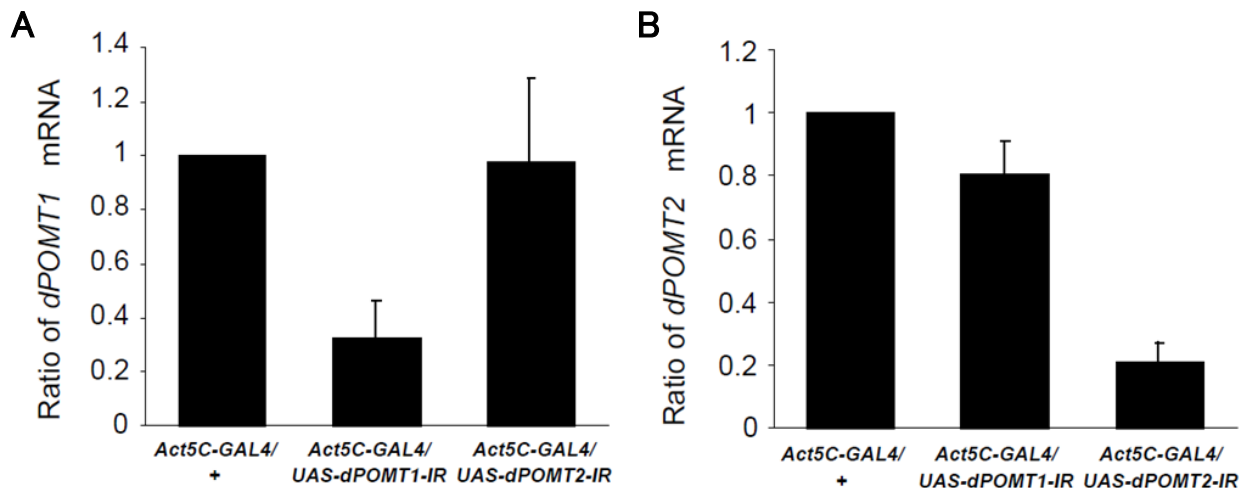


図 3: *dPOMT1* と *dPOMT2* RNAi 変異体における *dPOMT1*、*dPOMT2* mRNA の発現量の解析

A、B: *dPOMT1* mRNA、*dPOMT2* mRNA の発現量をリアルタイム PCR によって測定し、*Rpl32* mRNA の発現量で標準化した。*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT1-IR* は 25°C、*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT2-IR* およびコントロールの *Act5C-GAL4/+* は 28°C で飼育した。

3.1.3. *dPOMT1* と *dPOMT2* の遺伝学的相互作用

dPOMT1 と *dPOMT2* の RNAi 変異体が同じ表現型であることは、筋発生において、両者が遺伝学的相互作用していることを示唆する。したがって、*dPOMT1* と *dPOMT2* の二重変異体の表現型は相乗的に影響を受けると考えられる。*Act5C-GAL4/SM1;UAS-dPOMT2-IR/TM6B* と *+/+;r^l/TM3* を掛け合わせ、*dPOMT2* RNAi 対立遺伝子に *dPOMT1* 変異を持たせた二重変異体を作成し、相乗的な影響を検討した。RNAi ノックダウ

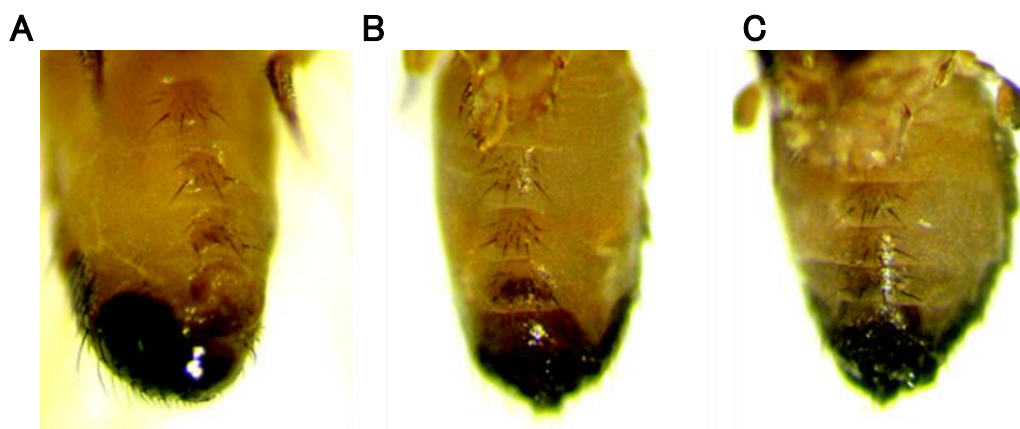


図 4: *dPOMT1* と *dPOMT2* の遺伝学的相互作用

Act5C-GAL4/SM1;UAS-dPOMT2-IR/TM6B と *+/+;r^l/TM3* を掛け合わせ 18°C で飼育した。*Act5C-GAL4/+;r^l/UAS-dPOMT2-IR* (A)、*Act5C-GAL4/+;r^l/TM6B* (B)、*Act5C-GAL4/+;UAS-dPOMT2-IR/TM3* (C)、全てオスの個体を示す。*Act5C-GAL4/+;r^l/UAS-dPOMT2-IR* (A) は「腹部よじれ」の表現型を示すのに対し、*Act5C-GAL4/+;r^l/TM6B* (B)、*Act5C-GAL4/+;UAS-dPOMT2-IR/TM3* (C) に「腹部よじれ」の表現型は認められない。

ンを穏やかに効かせるために、この掛け合わせによる F₁ 世代は *Act5C-GAL4/+;UAS-dPOMT2-IR/TM3* の腹よじれの表現型が出ない 18°C で飼育した。また、1 コピーの *dPOMT1* 変異 (*rt^p*) は劣性形質のため、この対立遺伝子では表現型を示さない。しかしながら、*Act5C-GAL4/+; rt^p /UAS-dPOMT2-IR* 個体ははっきりとした腹よじれの表現型を示した (図 4A)。このことは 1 コピーの *rt^p* が *Act5C-GAL4/+;UAS-dPOMT2-IR/+* の表現型を増強させたことを表している。次いで、RNAi による *dPOMT1* と *dPOMT2* の二重変異体を作成した。*dPOMT1* と *dPOMT2* の RNAi 変異体は、25°C で成体まで発育し、腹よじれの表現型を呈する。しかしながら、RNAi 二重変異体は出現せず、完全致死となった。これらのことより、*dPOMT1* と *dPOMT2* は筋発生において、密接に相互作用していることが明らかとなった。

3.1.4. dPOMT1 と dPOMT2 の POMT 活性

次いで、POMT 活性を測定するために *dPOMT1*、*dPOMT2* の組み換えタンパク質を発現させた。

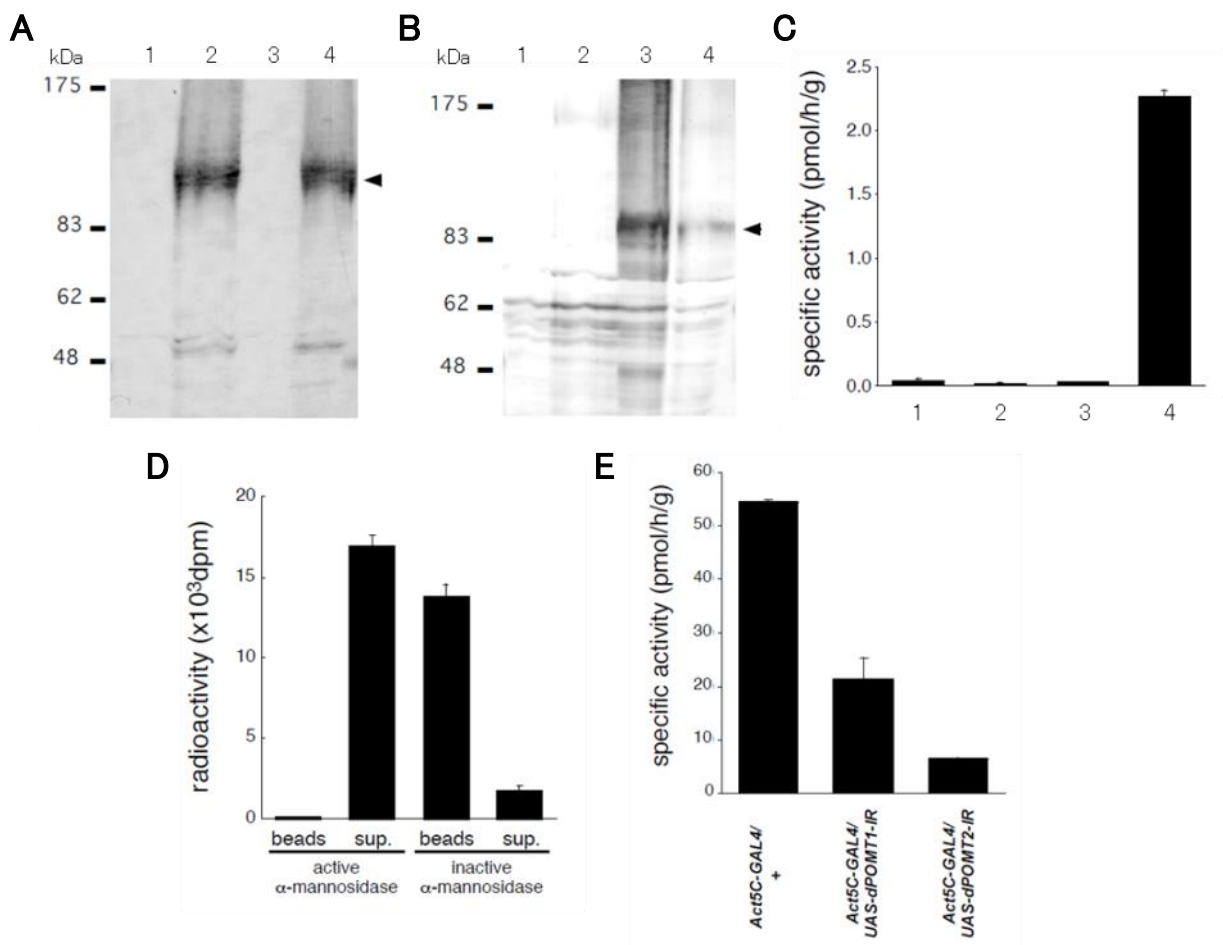


図 5: 組み換え dPOMT1 と dPOMT2 および RNAi 変異体の POMT 活性

A, B: 15 μ g ミクロソーム膜画分の 2-15% グラジエントゲルでのウエスタンブロットイング。抗 HA モノクローナル抗体 (F-7) を用いた *dPOMT1*-HA の発現解析 (A, 矢頭)、抗 *dPOMT2* 抗体を用いた *dPOMT2* の発現解析 (B, 矢頭)。C: 80 μ g ミクロソーム膜画分を用いた GST- α -DG に対する *dPOMT1*、*dPOMT2* の POMT 活性測定。空ベクター導入 (コントロール、レーン 1)、*dPOMT1*-HA 発現 (レーン 2)、*dPOMT2* 発現 (レーン 3)、*dPOMT1*-HA、*dPOMT2* 共発現 (レーン 4)、それぞれのミクロソーム膜画分を使用した。D: レーン 4 の POMT 活性測定の後、グルタチオンセファロース 4B により [³H]マンノシル GST- α -DG を回収、ナタマメ α -マンノシダーゼ消化し、上清にリリースされた放射活性を測定し、熱処理により不活化した α -マンノシダーゼを用いた反応と比較した。E: 3 齢幼虫タンパク抽出液 40 μ g を用いた GST- α -DG に対する POMT 活性測定。*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT1-IR* は 25°C、*Act5C-GAL4/UAS-dPOMT2-IR* およびコントロールの *Act5C-GAL4/+* は 28°C で飼育した。

pVL1393-*dPOMT1*-HA と pVL1393-*dPOMT2* は BaculoGold™ Linearized Baculovirus DNA と共に Sf21 細胞に導入され、感染細胞よりミクロソーム膜画分が調整された。タンパク質の発現は抗 HA 抗体、抗 *dPOMT2* 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した(図 5A、B)。GST- α -DG に対する POMT 活性はミクロソーム膜画分を酵素源として測定した。*dPOMT1* と *dPOMT2* を個別に発現させた場合、酵素活性は無かったが、共発現させた場合にのみ酵素活性が認められた(図 5C)。さらに、 α -DG への Man 残基の結合様式を確認するために、産物を α マンノシダーゼ消化した。グルタチオンセファロース 4B ビーズに吸着された RI 標識産物を消化した上清に放射活性が検出され、GST- α -DG の Ser/Thr 残基に *O*- α -グリコシド結合で Man が転移していることが示された(図 5D)。

また、*hPOMT1* と *hPOMT2* において、両者の共発現が酵素活性に必須であることが報告されている[17]。この結果は、*dPOMT1* と *dPOMT2* の共発現もまた酵素活性に必須であることを示している。さらに、RNAi による転写産物の発現量低下は酵素活性に影響するのかどうか知るために、*dPOMT1* と *dPOMT2* の RNAi 変異体の 3 齢幼虫抽出物の酵素活性を測定した。25°C で飼育した *Act5C-GAL4/UAS-dPOMT1-IR* RNAi 変異体と、28°C で飼育した *Act5C-GAL4/UAS-dPOMT2-IR* RNAi 変異体は、*Act5C-GAL4/+* と比較して、POMT 活性がそれぞれ 40%、12% に低下していた(図 5E)。これらの結果は *in vitro*、*in vivo* において、*dPOMT1* と *dPOMT2* は相互作用して *O*-Man 転移酵素として機能していることを明確に示した。

3.1.5. *dPOMT1* と *dPOMT2* mRNA の発現パターン

in vivo における *dPOMT1* と *dPOMT2* mRNA の発現パターンを、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションで解析した。ステージ 10 のショウジョウバエ胚において、*dPOMT1* と *dPOMT2* のアンチセンスプローブはほぼ全ての細胞を薄くはあるが確実に染色した一方、胚帯と胞胚の嵌入部はより強く染色された(図 6A、B)。*dPOMT2* のセンスプローブは染色が認められなかった(図 6C)。類似した染色パターンは *dPOMT1* と *dPOMT2* は *in vivo* で共発現していることを示している。次いで、*dPOMT1* と *dPOMT2* mRNA の発生ステージ毎の発現をリアルタイム PCR により測定した(図 6D)。*dPOMT1* mRNA は 0-2 hr 胚において、母性由来の発現と思われる高発現が認められた。一方、*dPOMT2* mRNA は 4h 以降の胚性ステージにおいて高発現していた。初期胚のステージでの *dPOMT1* mRNA の高い発現は、*dPOMT1* 単独の他の機能を意味しているのかも知れない。

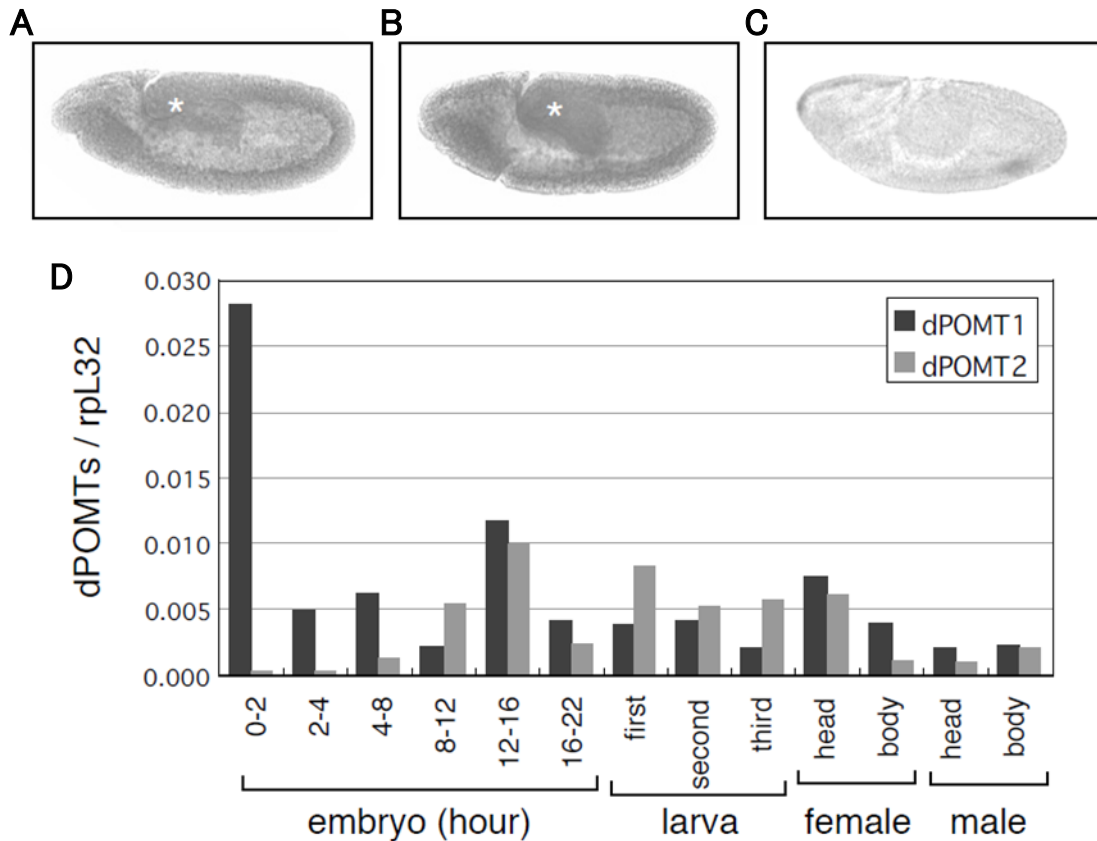


図 6: *in vivo* における *dPOMT1*、*dPOMT2* mRNA の発現

A、B、C: ステージ 10 ショウジョウバエ胚における DIG 標識 RNA プローブを用いたホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション。*dPOMT1* アンチセンスプローブ(A)、*dPOMT2* アンチセンスプローブ(B)による、染色では、胚帯と陥入した原腸(*部分)において類似の染色パターンを示した。一方、*dPOMT2* センスプローブ(C)では顕著なシグナルは認められなかった。D: 各発生ステージでの *dPOMT1* mRNA、*dPOMT2* mRNA の発現量をリアルタイム PCR によって測定し、*RpL32* mRNA の発現量で標準化した。

3.1.6. dMGAT1 と dMGAT2 の POMGnT 活性の検討

哺乳類では、ラミニンとの結合のリガンドとして、 α -DG 上の伸長した $\text{Sia } \alpha 2\text{-3Gal } \beta 1\text{-4GlcNAc } \beta 1\text{-2Man } \alpha 1\text{-Ser/Thr}$ の O-Man 型糖鎖が知られている[9,22,23]。hPOMGnT1 は伸長の最初のステップに重要な酵素である[26,27,100]、この伸長した O-Man 型糖鎖がショウジョウバエに存在するのかどうか知るために hPOMGnT1 をクエリーにして全てのショウジョウバエのデータベースの BLAST サーチを行ったが、hPOMGnT1 のショウジョウバエホモログを見出すことはできなかった。そこで、POMGnT の候補として、2つのショウジョウバエ $\beta 1,2\text{-GlcNAcT}$ である dMGAT1[101]と dMGAT2[102]を調べることにした。ショウジョウバエ EST クローン LD43357、GH007804 にはそれぞれ dMGAT1 と dMGAT2 の全長 ORF が含まれる。FLAG タグ付き組み換え dMGAT1、dMGAT2 タンパク質を Sf21 細胞で発現・精製し、それぞれに POMGnT 活性があるかどうか調べた。FLAG-dMGAT1 は $\text{Man } \alpha 1\text{-6}(\text{Man } \alpha 1\text{-3})\text{Man } \alpha 1\text{-6}(\text{Man } \alpha 1\text{-3})\text{Man } \beta 1\text{-4GlcNAc } \beta 1\text{-4GlcNAc-PA}$ に対する $\beta 1,2\text{-GlcNAcT I}$ 活性を、FLAG-dMGAT2 は $\text{Man } \alpha 1\text{-6}(\text{GlcNAc } \beta 1\text{-2Man } \alpha 1\text{-3})\text{Man } \beta 1\text{-4GlcNAc } \beta 1\text{-4GlcNAc-PA}$ に対する $\beta 1,2\text{-GlcNAcT II}$ 活性を示し、それぞれに適した基質に対しての $\beta 1,2\text{-GlcNAcT}$ 活性が認められたが、POMGnT 活性は認められないことが明らかとなった(図 7B、C、表 7)。これらの結果は、ヒトに存在する $\text{Sia } \alpha 2\text{-3Gal } \beta 1\text{-4GlcNAc } \beta 1\text{-2Man } \alpha$ の糖鎖構造は、POMGnT が無いことからショウジョウバエにおいては存在しないことを強く示している(図 7D)。

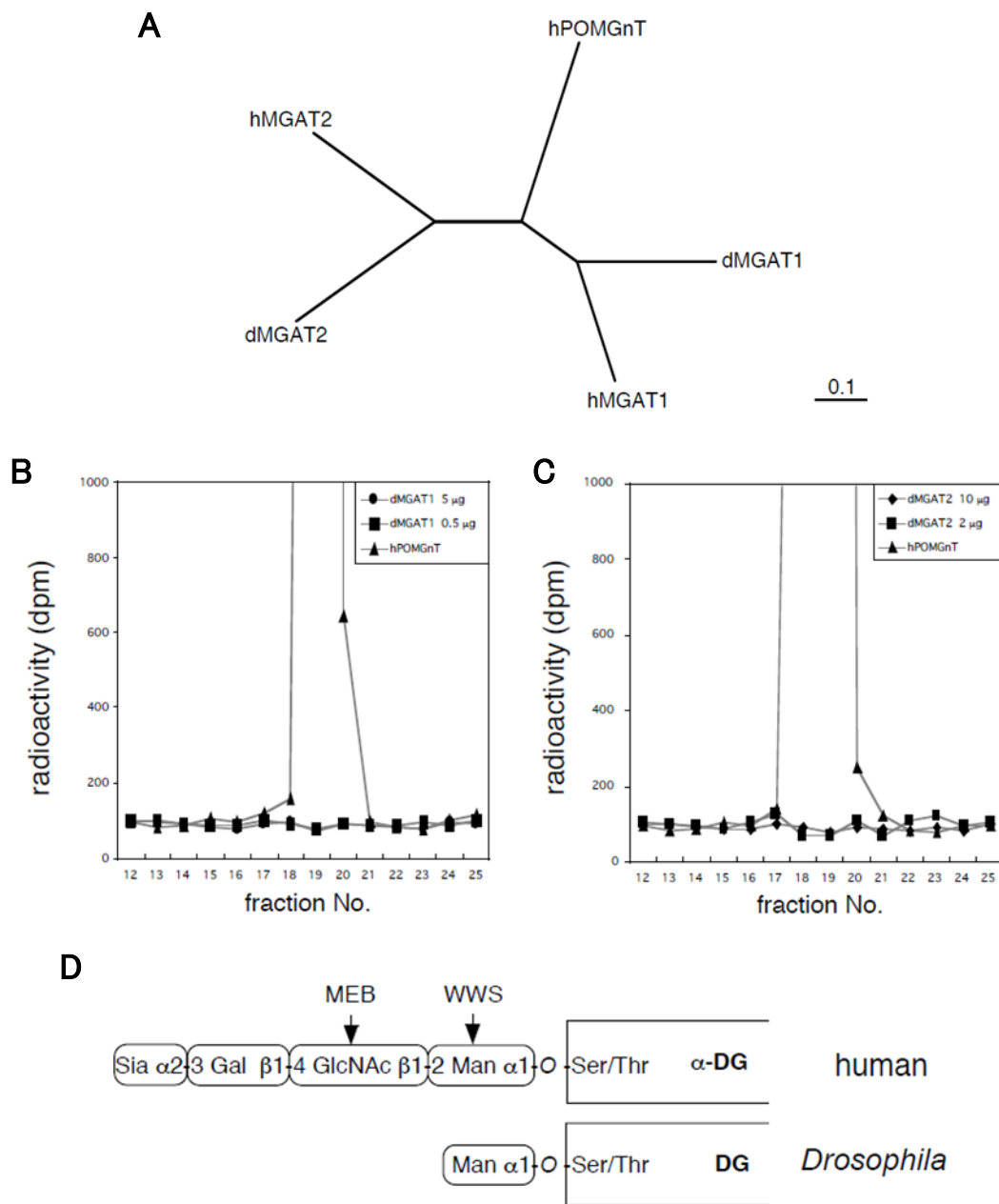


図 7: dMGAT1、dMGAT2 の POMGnT 活性

A: ClustalXによるdMGAT1、dMGAT2、hMGAT1、hMGAT2およびhPOMGnT1の系統樹。枝の長さは座位あたりのアミノ酸置換数を示す。B、C: FLAG-dMGAT1 (B)、FLAG-dMGAT2 (C)によるPOMGnT活性測定。POMGnT活性は、マンノシルペプチドへの ^3H GlcNAcの取り込みにより測定した。D: ヒトとショウジョウバエのO-Man型糖鎖構造の想定モデル。MEB; muscle-eye-brain disease、WWS; Walker-Warburg syndrome。

基質	活性 (pmol/h/μg)	
	dMGAT1	dMGAT2
Man α 1-6 (Man α 1-3) Man α 1-6 (Man α 1-3) Man β 1-4 GlcNAc β 1-4 GlcNAc-PA	55.0	ND*
Man α 1-6 (GlcNAc β 1-2 Man α 1-3) Man β 1-4 GlcNAc β 1-4 GlcNAc-PA	ND	11.7

*検出せず

表 7: dMGAT1、dMGAT2 の β 1,2-GlcNAc I、β 1,2-GlcNAc II 活性

3.2. ミツバチ頭部に存在する特殊な *N*-結合型糖鎖構造の生合成に関わる β 1,3-GalTs

3.2.1. ミツバチ Core1 β 1,3-GalT のクローニングと酵素活性

ミツバチにおいて、非還元末端に T 抗原構造 (Gal β 1-3GalNAc) ユニートを有する複合型 *N*-結合型糖鎖が報告されている (図 8) [29-31]。ショウジョウバエを含む多くの種において *O*-結合型糖鎖上に T 抗原を合成する Core1 β 1,3-GalTs が報告されている [35,36]。これまでにショウジョウバエでは 4 つの Core1 β 1,3-GalTs が報告されている [36]。これらの中で最も高い β 1,3-GalT 活性を持つ、*Drosophila* Core1 β 1,3-GalT1 (CG9520) のミツバチオルソログをクローニングした。*Drosophila* Core1 β 1,3-GalT1 とミツバチオルソログの核酸・アミノ酸の同一性はそれぞれ 55%・58%であった。しかしながらアミノ酸配列は 86%の高い類似性を示し、同様の酵素活性を有することが予想された。ミツバチオルソログにも *Drosophila* Core1 β 1,3-GalT 間で保存されている TWG、DDD、EDV モチーフが存在する。ヒトとショウジョウバエの Core1 β 1,3-GalT2, 3, 4 を比較すると、これら 3 つの酵素には Core1 β 1,3-GalT モチーフ TWG、DDD、EDV を含有する VKxTW(G/A)、WFxKADDD、EDxx(i/L/M)GxC の 3 つのモチーフが見い出された (図 9A)。*Drosophila* Core1 β 1,3-GalT2, 3, 4 に相当するオルソログはミツバチゲノムに見られない。したがって、*Drosophila* Core1 β 1,3-GalT1 のミツバチオルソログ候補は honeybee Core1 β 1,3-GalT のみである。FLAG tag 付組み換えタンパク質として発現させた honeybee Core1 β 1,3-GalT は GalNAc α -pNph に対して Gal を転移し、実際に honeybee Core1 β 1,3-GalT であることが明らかになった (図 9B、C)。さらに、LacdiNAcM3 (GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 (GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3) Man β 1-4 GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA、図 8) に対する活性を測定したが、この *N*-結合型糖鎖に対する酵素活性は認められなかった (図 9D)。このことは、*N*-結合型糖鎖上の Gal β 1-3GalNAc を合成する他の β 1,3-GalT が存在することを強く示している。

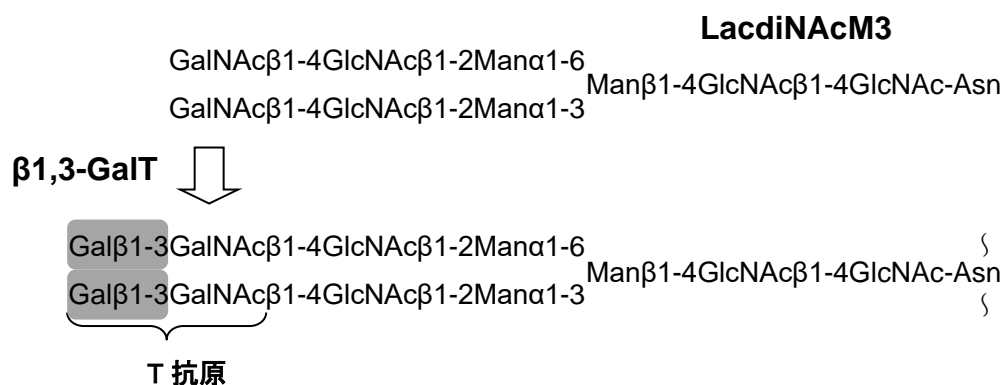


図 8: ミツバチに存在する非還元末端に T 抗原構造を有する複合型 *N*-結合型糖鎖構造

ミツバチにおいて報告された、非還元末端に T 抗原構造 (Gal β 1-3GalNAc) を有する複合型 *N*-結合型糖鎖 (左)。この構造は LacdiNAcM3 (右) に β 1,3-GalT により β 1-3 結合で Gal が付加されることで合成される。

3.2.2. 昆虫 *N*-結合型糖鎖の合成に関与するミツバチ β 1,3-GalT の推測とクローニング

N-結合型糖鎖上に β 1,3 結合で Gal を転移する β 1,3-GalTs は昆虫では報告されていなかった。そこで、Gal β 1-3GalNAc の T 抗原を合成しないものの、Type1 構造 (Gal β 1-3GlcNAc) を合成する、ヒトの β 1,3-GalT1、 β 1,3-GalT2 に注目した[103,104]。このヒトの β 1,3-GalT1、 β 1,3-GalT2 をクエリーにしたショウジョウバエとミツバチのゲノムの BLAST サーチの結果より系統樹を作製し、ミツバチに3つの想定 β 1,3-GalT を見出した(図 10)。ショウジョウバエの想定 β 1,3-GalT のなかで CG8668 と CG33145 の2つは成虫脳で発現していることから、ミツバチ脳で見出された *N*-結合型糖鎖上の T 抗原構造を合成するのは CG8668 と CG33145 のミツバチオルソログ β 1,3-GalT1、 β 1,3-GalT2 であると予想した。

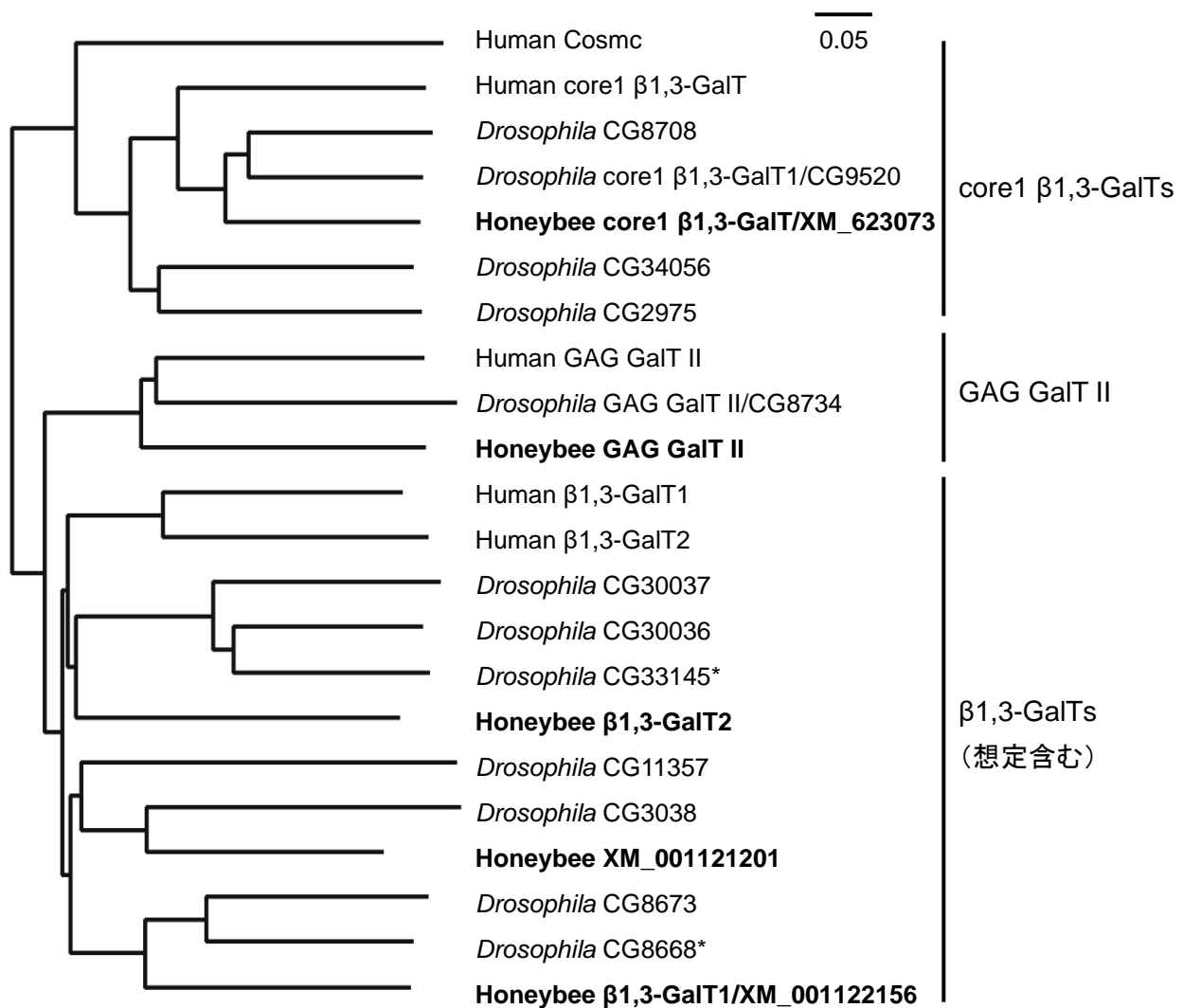


図 10: β 1,3-GalT の系統樹

ヒト、ショウジョウバエ、ミツバチの β 1,3-GalTs の ClustalX による系統樹。枝の長さは座位あたりのアミノ酸置換数を示す。 β 1,3-GalTs は Core1 β 1,3-GalTs、GAG GalT II s、 β 1,3-GalTs の3つのグループに分類される。*: 成虫の脳に発現しているショウジョウバエ CG33145、CG8668。

A

Honeybee β 1,3-GalT1 (XM_001122156)	MYQLLHFR-SRSLR---TLILGLICLTFYAYRRTT-----YYDVP---	36
<i>Drosophila</i> CG8668 (NM_001298811)	MAAMANLHNRMLRFFLVLI VVILTIF IYASYSTTSTLTANHVHPAASPQQQLIGSHPGRQPMQVPPVN	70
	* : : : : * * * * : * : : : : * * * * * : * *	
Honeybee β 1,3-GalT1	---QYNVP-----RNVSRSTSQEIYKQRSNVTIELRMSSLPKNDSPELS-----	77
<i>Drosophila</i> CG8668	STDKEYNSPPGESSKQQS VSSRHSQQLPPQQAEIFHKRHPQHRLPTIDEDALLDGGSGAGASPQVGGPDQT	140
	: * * * : * * * * : * : : : : : * * * * *	
Honeybee β 1,3-GalT1	-----IVD--TYNVQNVSN-----LSNSLITTS-----	99
<i>Drosophila</i> CG8668	PNVMADELLEEQYQGSVDGITGNINSSTNNSADTLAVKQSI PAQSPQQQLPQSQSQVQPLSDADLL	210
	* * * * : : * * * * * : * * * * *	
Honeybee β 1,3-GalT1	-----TSSQTTVNS-----IPVSKQSNEKSQTR---VEKIINETKDVS	135
<i>Drosophila</i> CG8668	IPTSNLQKFIENADRILKNI TSNSSGTNPDSMAQLNAVDGKLEVSGVESEKQEPESKVIQEI KEAKKEAA	280
	* * * * * : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *	
Honeybee β 1,3-GalT1	VPLNECSAR-----AIYEAGHM---VPIPEKCPNFGKEMDLV IIMSAP	176
<i>Drosophila</i> CG8668	VPLPKSAKPPVPPVKTTKSKVSPAPVPSKGVATETLYEPGHVDEEIDAERICPKGGF I KLLVL ISSAM	350
	* * * : : : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : * * * * *	
Honeybee β 1,3-GalT1	THLEARMAI IRQTWGH FGQRSDISILFMLGATMDSKIVETILRKEQKTYNDVIRGKFLDSYNSLTLKTI STL	246
<i>Drosophila</i> CG8668	SHDAARMSI IRQTMH HYGTRRDVGMFLVLRGNETINKALTOENFI YGDLIRGNFIDSYNNLTLKTI STL	420
	: * * * * * : * * * * * : * * * * * : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
Honeybee β 1,3-GalT1	EWVDNYCSKVK FLLKTD DFINVPRLQAFITKHARDKNVIFGRLLAKKWKPI RNKSKSYFVSQAQFKHAV	306
<i>Drosophila</i> CG8668	EWADVHC PKAKY ILKTD DFINVPKLLTFLDKHK-DKRTIYGRLLAKKWKPI RNKSKSYFVSVDQFAAGV	479
	* * * : * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
Honeybee β 1,3-GalT1	FPDFTTGPAYLLSSDIVRKYDAALDQTYLKL EDVFTGIV ADKLGIKRTHANEFLNKKISYSACNVQRG	386
<i>Drosophila</i> CG8668	FPSFTTGPAYVLTGDIVHELIVRSLKTVYLKL EDVFTGIV AKSLNVKRVQANEVNRIRSFNPNIRNA	559
	* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
Honeybee β 1,3-GalT1	ISIHMKVYSEQFDLWKKLFDGKSKCK	412
<i>Drosophila</i> CG8668	ISVHMIKSNEQFDLWKKLLDQTTCK	585
	** : * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	

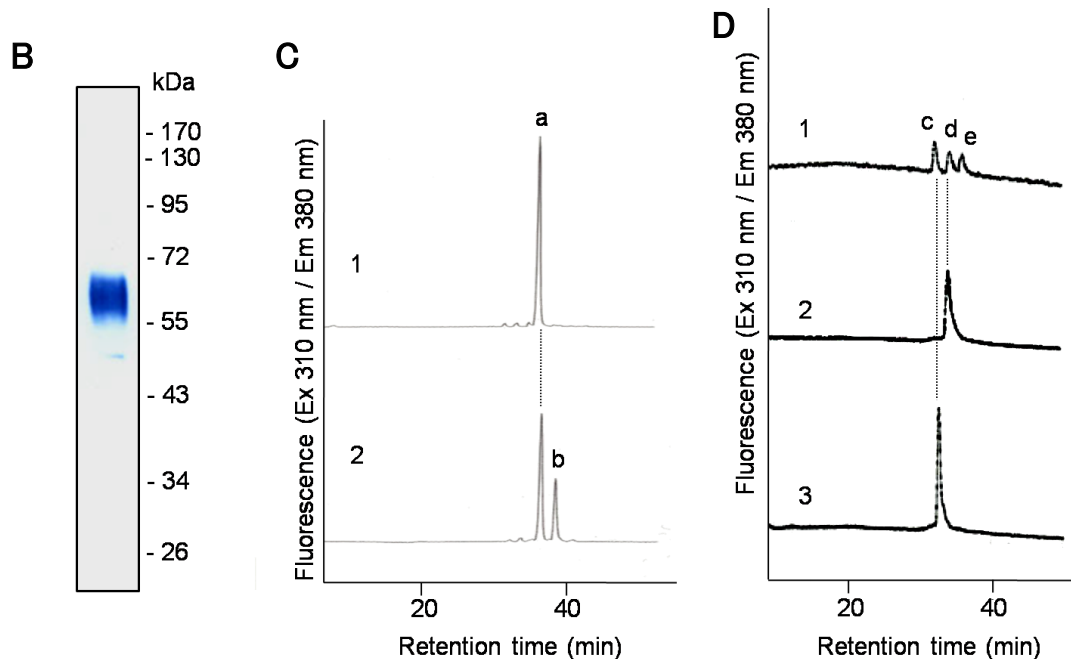


図 11: ミツバチ β 1,3-GalT1 の N-結合型糖鎖上の T 抗原合成活性

A: ClustalW によるミツバチ β 1,3-GalT1 とショウジョウバエオオルソログ CG8668 のアミノ酸配列のアライメント。*は同一のアミノ酸、:はスコア>0.5 で定義される類似アミノ酸、.はスコア<0.5 で定義される類似アミノ酸を示す。下線は三井情報による SO_Sui プログラムにより予測された想定膜貫通領域を示す。長方形で囲った部分は β 3GT モチーフを示し、太文字は保存されているアミノ酸を示す。B: 活性測定に用いた精製した組み換え FLAG-honeybee β 1,3-GalT1 の抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロットティング解析。C: ミツバチ β 1,3-GalT1 の LacdiNAcM3 に対する Gal 転移活性の SF-HPLC による測定。(1) 未反応の LacdiNAcM3 基質のみの溶出(ピーク a)。(2) ミツバチ β 1,3-GalT1 と反応させた後の溶出。産物の溶出が認められた(ピーク b)。D: C のピーク b に対する β 1,3 ガラクシダーゼ消化の SF-HPLC による測定。(1) LacdiNAcM3(ピーク c)、GalLacdiNAcM3(ピーク d)、Gal2LacdiNAcM3(ピーク e)の溶出プロファイル。(2) 基質(ピーク d)の溶出。(3) β 1,3 ガラクシダーゼ消化後の溶出。

A	Honeybee β 1,3-GalT2	MDIKTLQPSNMDKQLLPLELPSTTNINN-----GTVKGI SFVRRLAMGFVIL	49
	<i>Drosophila</i> CG33145 (NM_176148)	MDRRWNPEKIEEGSSLLAAEYSSSSGAAASGEDETVTTSGLALRSKAKLRKRQLNRNRMPL	60
		** : *	
	Honeybee β 1,3-GalT2	ATLGLLYVPAYHSAQGPLLGLGETPSPAKHIGVSHLVASVAQLPGWYNTSRDLSVYIHP	109
	<i>Drosophila</i> CG33145	PRM-LRRLGCGYTL SAFL IGGLLLVYLPLVYLDVHKRSAG---LPDWTSETSRSIADYLDI	116
		: : *	
	Honeybee β 1,3-GalT2	ENTTSVLNPIGICSPSPYLFIIICSAVTNIKART IRNTW AKNNLDN-----	157
	<i>Drosophila</i> CG33145	GLSSGVI VPKDFCRNKTFLVI AVCTGVDNF IQRHT IRETWG NTTEFNYPAFGKLHGHLKG	176
		: : *	
	Honeybee β 1,3-GalT2	-----TYNSSVKVAFLLGQSDNDTLN-----NIIAEESHQYND	190
	<i>Drosophila</i> CG33145	HYLPPLPDRLKMYGDYLSGEGQSLTASVRI VFI VGRQKDEAMLGNETLNRIHIESEKYND	236
		: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	Honeybee β 1,3-GalT2	IIQEKFYDTYNNLTLKSVMLKWI T SNCG-QAK YLMKTDDD MFVNIPTLMKTLQS----	244
	<i>Drosophila</i> CG33145	IIQENFVDSYNNLTLKSVMLKHI S RSCFN AVFLK DDDFVNI P NLLN L FGGTIPL	296
		***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	Honeybee β 1,3-GalT2	-----RSQTTDILLGSLICNAKPI L DPNNKWT P KYMYSERIYP	283
	<i>Drosophila</i> CG33145	YNDTLDYHDRSTYLVTAPQTRLKASDVLVGHQFCNVV P VS S SKWYMP S MYK P ESYP	356
		: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	Honeybee β 1,3-GalT2	NYLSGTGYVMSLDVAFKLYHAALITPLLHL EDVYITGL CAKYAKV R PNVHPGFSYVPRKL	343
	<i>Drosophila</i> CG33145	KYLSGAGY L MSIDV V QRLFEASLNTLLVYL EDVYITGL CAQKAKINRHHHPLFSFAHSKQ	416
		: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	Honeybee β 1,3-GalT2	DPCVLRNAITAHKVN S SMYI I WNKLN D NLSCSNH T HDK S VTLSRNSRNI	396
	<i>Drosophila</i> CG33145	-MCAFGTITQHQLKDDSMVSAWNYVSNYSIKCPPPGRYFSQVRLRKR P IC--	466
		* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

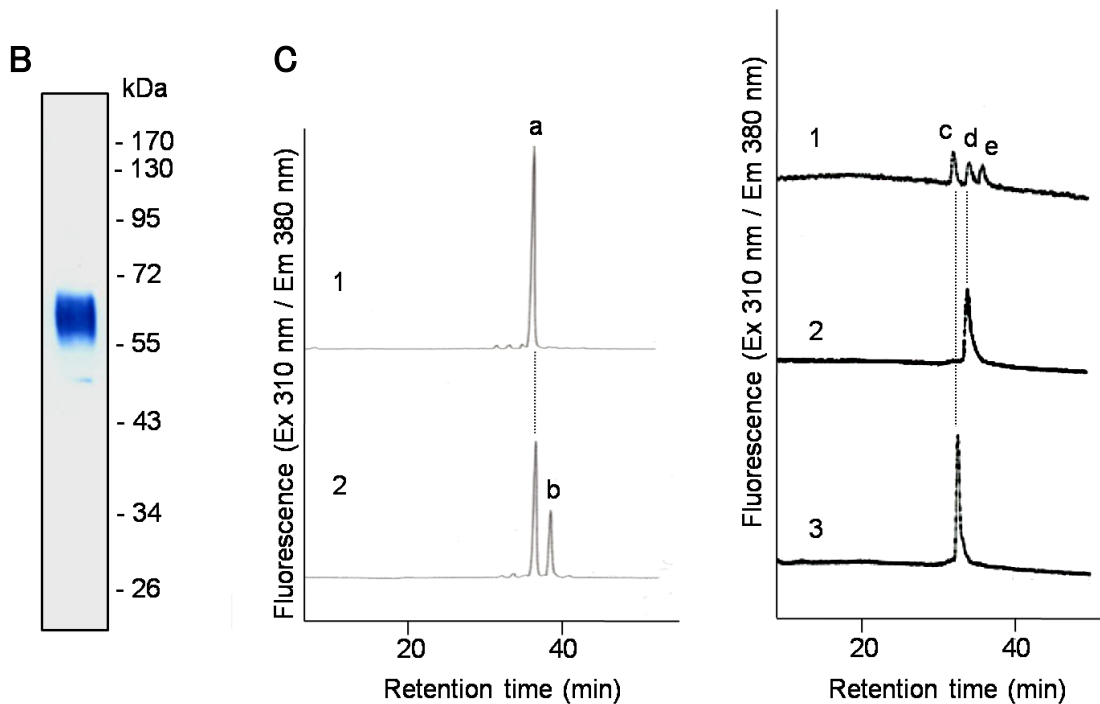


図 12: ミツバチ β 1,3-GalT2 の N-結合型糖鎖上の T 抗原合成活性

A: ClustalW によるミツバチ β 1,3-GalT2 とショウジョウバエオオルソログ CG33145 のアミノ酸配列のアライメント。*は同一のアミノ酸、:はスコア>0.5 で定義される類似アミノ酸、.はスコア<0.5 で定義される類似アミノ酸を示す。下線は三井情報による SOSui プログラムにより予測された想定膜貫通領域を示す。長方形で囲った部分は β 3GT モチーフを示し、太文字は保存されているアミノ酸を示す。B: 活性測定に用いた精製した組み換え FLAG-honeybee β 1,3-GalT2 の抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロッティング解析。C: ミツバチ β 1,3-GalT2 の LacdiNAcM3 に対する Gal 転移活性の SF-HPLC による測定。(1) 未反応の LacdiNAcM3 基質のみの溶出(ピーク a)。(2) ミツバチ β 1,3-GalT2 と反応させた後の溶出。産物の溶出が認められた(ピーク b)。*は内部標準として用いた PA 化アセチルキトペンタオースのピークを示す。D: C のピーク b に対する β 1,3 ガラクトシダーゼ消化の SF-HPLC による測定。(1) 基質の LacdiNAcM3 (ピーク c)、GalLacdiNAcM3 (ピーク d)、Gal2LacdiNAcM3 (ピーク e) の溶出プロファイル。(2) 基質(ピーク d)の溶出。(3) β 1,3 ガラクトシダーゼ消化後の溶出。

新規の β 1,3-GalT の候補として、 β 1,3-GalT1 (GenBank XM_001122156、DDBJ LC017705)、 β 1,3-GalT2 (DDBJ LC017706) をミツバチ頭部 cDNA よりクローニングし、ショウジョウバエオルソログとのアミノ酸配列を比較した(図 11、12)。ミツバチの想定 β 1,3-GalT1 の 412 アミノ酸配列には、糖転移酵素の Mn 配位結合部位である DxD 配列が含まれる。honeybee β 1,3-GalT1 とショウジョウバエオルソログである CG8668 は VKxTW(G/A)、WFxKADDD、EDxx(i/L/M)GxC の 3 つの β 3GT モチーフ[105]を持つことから、honeybee β 1,3-GalT1 は Gal、GalNac、GlcNAc を β 1-3 で転移すると予想した(図 11A)。ミツバチの想定 β 1,3-GalT2 とショウジョウバエオルソログである CG33145 にも β 3GT モチーフが存在する(図 12A)。

3.2.3. 想定 β 1,3-GalT1、 β 1,3-GalT2 の N-結合型糖鎖上の T 抗原合成活性

想定 honeybee β 1,3-GalT1、 β 1,3-GalT2 組み換えタンパク質を Sf21 細胞で発現させ、ドナー基質として UDP-Gal を、アクセプター基質として LacdiNAcM3(GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA)を用い、N-結合型糖鎖上の T 抗原合成活性を測定した(図 11、12)。想定 β 1,3-GalT1 の反応後は基質のピーク a の他に、新規産物のピーク b が検出され、このピークは Gal1LacdiNAcM3 と一致した(図 11C、11D)。Gal 残基が β 1-3 で転移されたこと確認するために、この産物を β 1,3 ガラクトシダーゼで消化した。 β 1,3 ガラクトシダーゼ消化後の溶出時間は元の基質である LacdiNAcM3 と一致したことから、 β 1-4 ではなく β 1-3 結合で Gal を転移していることが示された(図 11D)。また、この産物は β 1-4 結合特異的な β 1,4 ガラクトシダーゼでは分解されなかった(データ未掲載)。想定 β 1,3-GalT1 は複合型 N-結合型糖鎖上に T 抗原を合成することが示された。

想定 β 1,3-GalT2 における活性産物に関しても、Gal1LacdiNAcM3 と見られる産物がピーク b として認められた(図 12C)。 β 1,3-GalT2 は酵素量として β 1,3-GalT1 の約半分の量であったが、アクセプター基質 LacdiNAcM3 の反応後にほぼ見られなくなっていた。このことは β 1,3-GalT2 は β 1,3-GalT1 より比活性が高いことを示している。Gal の転移が β 1-3 結合であることを確認するために、反応産物を β 1,3 ガラクトシダーゼ消化した。 β 1,3 ガラクトシダーゼ消化により反応産物のピークは元の基質のピークに収束し、Gal は β 1-3 結合で転移されていることが示された(図 12D)。これらのことより、honeybee β 1,3-GalT1、honeybee β 1,3-GalT2 は複合型 N-結合型糖鎖上に T 抗原を合成する酵素であることが明らかとなった。

3.3. ヒト結腸直腸癌における PAPS 輸送体の発現と役割

3.3.1. 結腸直腸癌における PAPS 輸送体遺伝子の発現様式

これまでに 2 つのヒト PAPS 輸送体遺伝子 *PAPST1*、*PAPST2* が同定されている[40,41]。本研究[3]ではヒトの結腸直腸癌における PAPS 輸送体の遺伝子およびタンパク質の発現について解析した。初めに、結腸直腸癌細胞株におけるこれらの転写産物の発現量をリアルタイム PCR により測定した。解析した結腸直腸癌細胞株 22 株全てにおいて、*PAPST1* 転写産物の発現量は *PAPST2* 転写産物より多かった(図 13A)。さらに、7 検体から得られた癌性・非癌性結腸直腸組織における *PAPST1*、*PAPST2* の発現量を測定した(図 13B、表 8)。細胞株での結果と一致して、結腸直腸癌組織においても *PAPST1* 転写産物の発現量は *PAPST2* 転写産物より多かった。正常結腸直腸組織での発現と比較して、結腸直腸癌組織では *PAPST1* の発現が増加し、*PAPST2* の発現が低下するという相反する発現変化を示すことが明らかとなった。

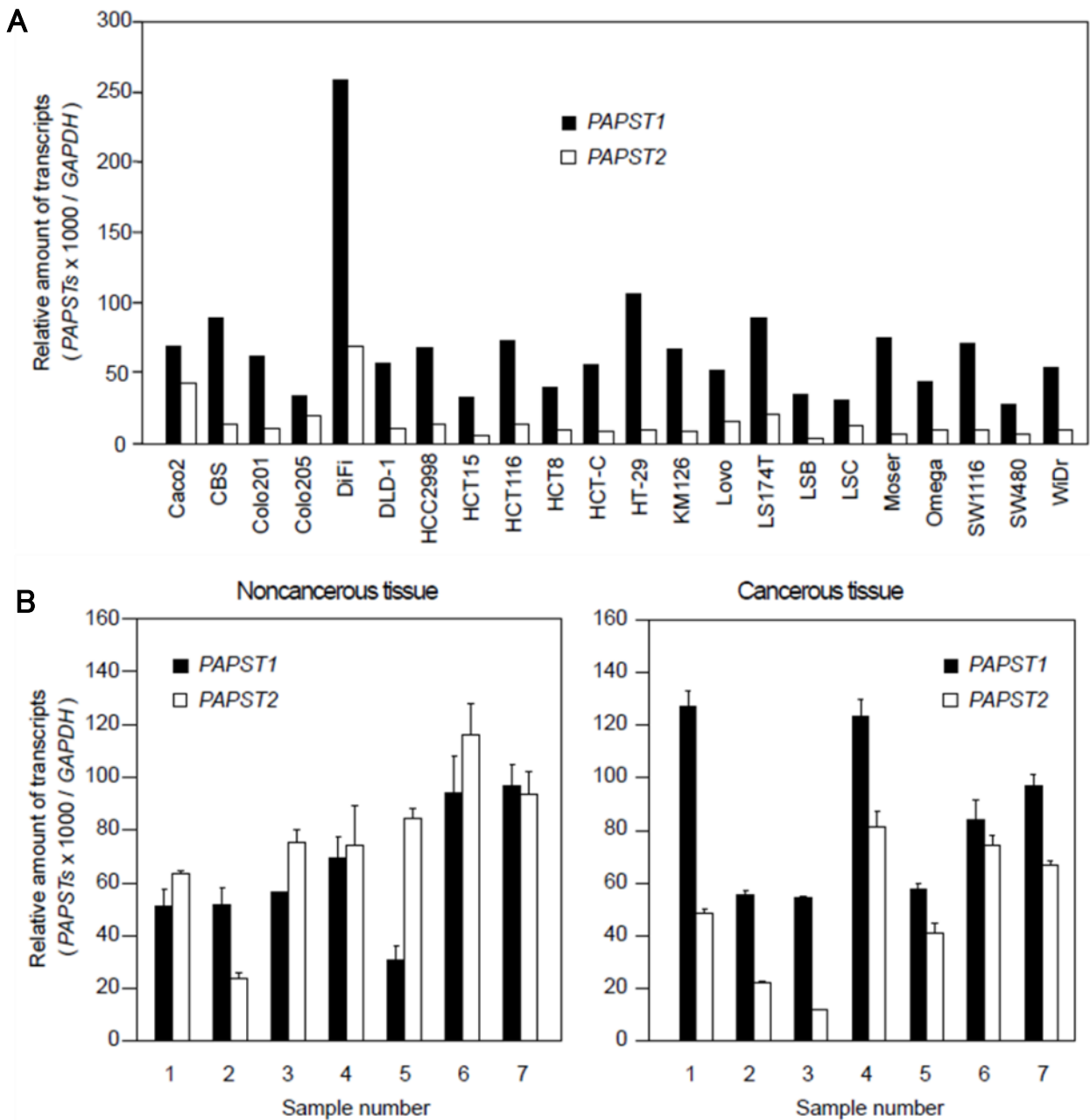


図 13: 結腸直腸癌細胞株および結腸直腸癌試料における PAPS 輸送体遺伝子の発現

A: 結腸直腸癌細胞株 22 株における *PAPT1*、*PAPT2* 遺伝子の定量解析。B: 結腸直腸癌患者 (表 8) の非癌部 (B 左)、癌部 (B 右) の病理組織における *PAPT1*、*PAPT2* 遺伝子の定量解析。遺伝子発現量はリアルタイム PCR において解析し、同じ試料における *GAPDH* の発現量で標準化した。

試料番号	癌腫の部位	病理診断
1	盲腸	中分化型腺癌
2	右半結腸	高分化型腺癌
3	上行結腸	粘液腺癌
4	S 字結腸	中分化型腺癌
5	S 字結腸	中分化型腺癌
6	S 字結腸	高分化型腺癌
7	S 字結腸	高分化型腺癌

表 8: 結腸直腸癌患者試料の組織病理学的特徴

さらに、7 検体から得られた癌性・非癌性結腸直腸組織における *PAPST1*、*PAPST2* の発現量を測定した(図 13B、表 8)。細胞株での結果と一致して、結腸直腸癌組織においても *PAPST1* 転写産物の発現量は *PAPST2* 転写産物より多かった。正常結腸直腸組織での発現と比較して、結腸直腸癌組織では *PAPST1* の発現が増加し、*PAPST2* の発現が低下するという相反する発現変化を示すことが明らかとなった。

次いで、直腸癌組織における *PAPST1* mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによって検討した。*PAPST1* mRNA は腺癌細胞と間質細胞の両方で発現が認められた(図 14A、B)。さらに、結腸直腸癌組織における *PAPSTs* の分布を知るために、マウス *PAPST1* (m*PAPST1*) の C 末端領域のペプチドおよび、ヒト *PAPST* (h*PAPST2*) の 289–300aa の領域のペプチドを抗原としたウサギポリクローナル抗体を作製した。抗原とした m*PAPST1* の C 末端 KAVPTEPPVQKV の配列は、ヒト *PAPST1* (h*PAPST1*) の KAVPVESPVQKV の配列と 2 アミノ酸異なり、83.3%の相同性であった。m*PAPST1* の配列を抗原としたポリクローナル抗体が h*PAPST1* を認識するのか、交差性の評価を行った。癌細胞由来でないため内在性の c-myc が存在していない HEK293 細胞に、c-myc タグ付き h*PAPST1* を過剰発現させ、ウエスタンブロッティングで反応性を検討した結果、m*PAPST1* 抗体は内在性 h*PAPST1* および過剰発現させた c-myc タグ付き h*PAPST1* の両方を認識する交差性が確認された(図 14C、D)。これらの抗体を用いた免疫組織学的染色の結果、癌性および非癌性結腸直腸組織の両方において、間質細胞よりも上皮細胞で優位な *PAPST1* の発現が認められた(図 14E、E'、F、F'、G、H)。上皮細胞での *PAPST1* タンパク質の発現様式は癌性組織と非癌性組織で似ていたが、間質細胞での発現は領域特異的に分散していた(図 14G、G'、I の矢印)。さらに *PAPST1* の発現は浸潤した癌細胞近傍の線維芽細胞において増強されていた(図 14I の*)。これは、癌組織における *PAPST1* の増強した発現は、間質線維化反応と関連していることを示している。また、*PAPST1* タンパク質は試行した全ての癌性および非癌性切片において、細胞の核の周辺のゴルジ装置で検出された(図 14F'、G、G'、H の矢頭)。一方、*PAPST2* タンパク質は非癌性結腸直腸組織の上皮細胞において優位に検出され(図 14J)、結腸直腸癌組織の上皮細胞での *PAPST2* タンパク質の発現はわずかであった。また、癌性結腸直腸組織および非癌性結腸直腸組織の両方において、造血系の細胞に *PAPST2* タンパク質が高発現していた(図 14J、K の印)。これらの結果により、結腸直腸癌組織の間質線維化反応近傍の線維芽細胞において *PAPST1* の発現は増加し、上皮性結腸直腸癌細胞において *PAPST2* の発現は減少することが明らかとなった。

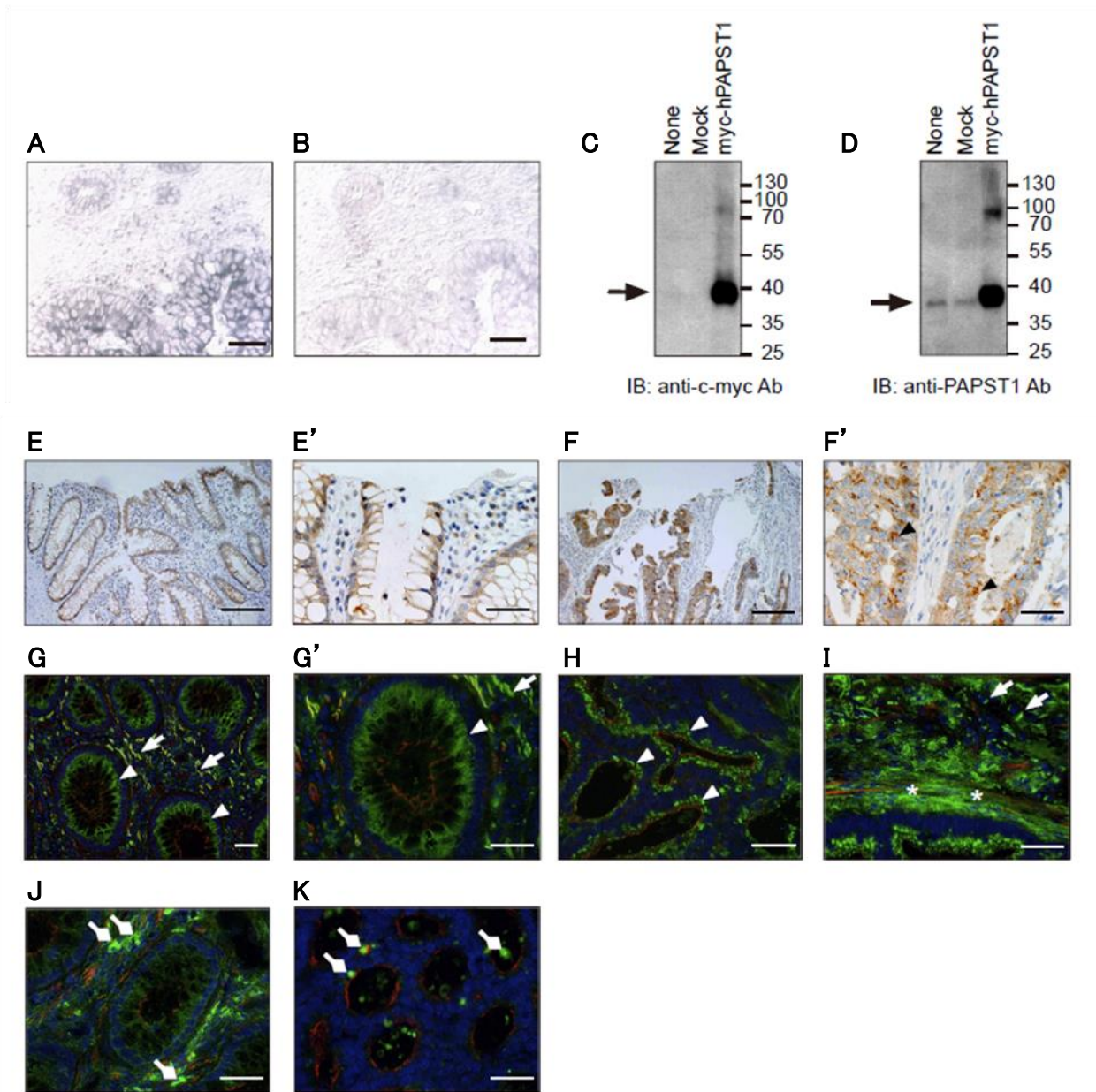


図 14: 結腸直腸癌組織における PAPS 輸送体遺伝子および PAPS 輸送体タンパク質の発現

A, B: *in situ* ハイブリダイゼーションによる *PAPST1* mRNA の発現解析。直腸癌組織の凍結切片は、DIG 標識アンチセンスプローブ(A)、センスプローブ(B)でハイブリした後、AP 標識抗 DIG 抗体によって検出した。スケールバー: 50 μ m。C, D: 抗 *PAPST1* 抗体の交差性の評価。HEK293 細胞で c-myc 融合 *PAPST1* を発現させ、抗 c-myc 抗体(C)および抗 *PAPST1* 抗体(D)を用いたウエスタンブロッティング解析を行った。E, F: 抗 *PAPST1* 抗体によるパラフィン包埋切片の免疫組織学的染色。非癌部(E, E')および癌部(F, F')の結腸直腸組織は、Ventana system により自動染色され、ヘマトキシリンで対比染色された。*PAPST1* タンパク質は癌部の上皮細胞で核周辺に優位に発現している(図 F' の矢頭)。非癌部、癌部共に上皮細胞での強い染色に対し、間質細胞の染色はわずかであった。スケールバー: 200 μ m(E, F: 低倍率)、50 μ m(E', F': 高倍率)。G-K: 抗 *PAPST1* 抗体(G-I)および抗 *PAPST2* 抗体(J, K)による免疫組織学的染色。非癌部(G, G', J)、癌部(H, I, K)の直腸組織凍結切片は Hoechst 33342 (青)で核、ファロトキシン-Alexa Fluor 594 (赤)で F-アクチン、*PAPST1* または *PAPST2* のシグナルはウサギ IgG-Alexa Fluor 488 (緑)で染色されている。*PAPST1* タンパク質は、非癌部、癌部の上皮細胞で核周辺のゴルジ装置(G, G', H の矢頭)と、間質細胞(G, G', I の矢印)に発現している。また、間質線維化反応が見られる浸潤癌細胞において線維芽細胞が強く染色されている(I の*)。*PAPST2* タンパク質は、非癌部、癌部の直腸組織で造血系の細胞に高発現している(J, K の印)。癌部の上皮細胞での *PAPST2* 染色はごくわずかであるが(K)、非癌部では染色が認められる(J)。スケールバー: 50 μ m。G: 低倍率、G': 高倍率。

3.3.2. 結腸直腸癌細胞における硫酸化複合糖質

結腸直腸癌細胞株におけるタンパク質の硫酸化様式の解析を、硫酸化複合糖質を有することが報告されている Omega、DLD-1、LS174T の3つの細胞株[106]を用いて行った。これらの細胞を RI 標識硫酸ナトリウム $\text{Na}_2^{[35}\text{S}]\text{O}_4$ により 24 時間代謝標識し、タンパク質中に取り込まれた代謝産物を電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーで検出した(図 15A)。3つ全ての細胞株において、200kDa 付近に幅広いバンドが認められた。このバンドはヘパリチナーゼ処理によりほぼ消失することから、HS であることが、Omega 細胞で見られる、より高い位置のバンドは、コンドロイチナーゼ ABC 処理により消失することから、CS であることが示された。LS174T ではヘパリチナーゼとコンドロイチナーゼ ABC 処理後も密集したバンドが残っているが、LS174T は高度に硫酸化されたムチンの存在が報告されており[106]、このバンドは硫酸化ムチンに相当する。これらの細胞株における、標識硫酸の HS、CS、*N*-結合型糖鎖への取り込みの割合は、ヘパリチナーゼ、コンドロイチナーゼ ABC、PNGaseF 消化により遊離した糖鎖の放射活性の測定により決定し、タンパク質全体の標識硫酸の取り込み量は、TCA 沈殿により回収したタンパク質の放射活性により決定した(図 15B)。オートラジオグラフィーの結果と一致して、Omega 細胞では HS、CS が主な硫酸化産物であり、*N*-結合型糖鎖の硫酸化産物はわずかであった。また、DLD-1 と LS174T では HS、*N*-結合型糖鎖の硫酸化産物が比較的多いものの、CS の硫酸化産物はごくわずかであった。特に、LS174T では硫酸化ムチンと硫酸化チロシンと考えられるそれ以外の硫酸化産物が主であった。

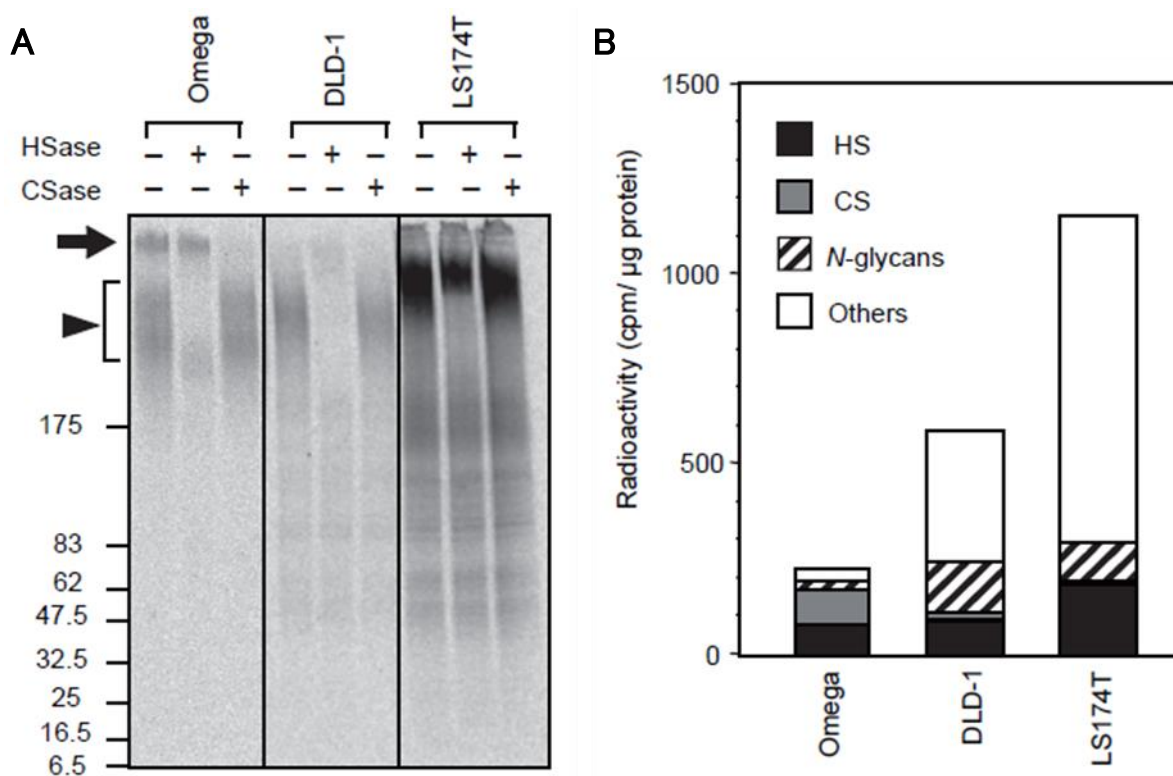


図 15: 結腸直腸癌細胞株での代謝標識解析

A: 代謝標識された硫酸化産物のオートラジオグラフィー。Omega、DLD-1、LS174T 細胞株は $\text{Na}_2^{[35}\text{S}]\text{O}_4$ での 24 時間の代謝標識の後、ヘパリチナーゼ (HSase) またはコンドロイチナーゼ ABC (CSase) で 2 時間処理された。細胞のタンパク質を回収し、2-15% SDS-PAGE で分離した。矢頭は HSase 処理で、矢印は CSase 処理で消失したバンドを示す。B: 代謝標識された硫酸化産物の比率。HS、CS、*N*-結合型糖鎖上の標識硫酸化産物は、HSase、CSase、PNGaseF 消化により遊離した糖鎖の放射活性を測定した。細胞のタンパク質全体への取り込みは、細胞抽出液の TCA 沈殿百分の測定に基づき決定した。

3.3.3. DLD-1 細胞における、*PAPST* 遺伝子の発現抑制による影響の検討

次いで、*PAPST* 遺伝子発現を RNAi により抑制し、結腸直腸癌における硫酸化に *PAPST* の発現がどのような影響するのか検討した。Omega、DLD-1、LS174T の 3 つの細胞株の中から、ノックダウン効率が最も良かった DLD-1 を選択した。RNAi 実験では、*PAPST1* siRNA と *PAPST2* siRNA、あらゆるヒトの遺伝子とマッチしない *EGFP* コントロール siRNA を用いた。1 回だけの導入では硫酸化修飾への影響はわずかであったため、siRNA の導入を 3 回続けて行った。Day1、4、7 にそれぞれの siRNA をトランスフェクションし、3 回目のトランスフェクション 3 日後の Day10 にノックダウン効率をリアルタイム PCR により測定した(図 16)。*PAPST1*、*PAPST2* siRNA 導入により、*PAPST1*、*PAPST2* 遺伝子それぞれの発現レベルは元の発現の 20%以下に低下し、*PAPST1* と *PAPST2* のダブルノックダウンでは両方の遺伝子の発現が減少していた。また、コントロール siRNA 導入では顕著な変動は見られなかった。

さらに、これらノックダウン細胞における細胞タンパク質の硫酸化様式の変化を解析した。3 回目のトランスフェクション 2 日後の Day9 に $\text{Na}_2^{35}\text{S}\text{O}_4$ により 24 時間の代謝標識を行い、細胞抽出液のタンパク質を電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーで解析した(図 17)。*PAPST1*、*PAPST2* siRNA 導入において、HS や他のシグナルが減少していた。また、硫酸化様式の解析では、*PAPST1* siRNA 導入では、HS への取り込みがコントロールの 1/3 に減少していることが示された。*PAPST2* siRNA 導入では、影響はやや少なかったが、コントロール siRNA 導入に比べ、HS への取り込みが半分に減少していた。DLD-1 細胞において、*PAPST1* siRNA 導入は、HS、CS、*N*-結合型糖鎖の硫酸化に影響を与えたのに対し、*PAPST2* siRNA 導入の影響は HS がメインであった。これらの結果により、結腸直腸癌細胞 DLD-1 において、*PAPST* 遺伝子発現は硫酸化の制御をしていることが明らかとなった。

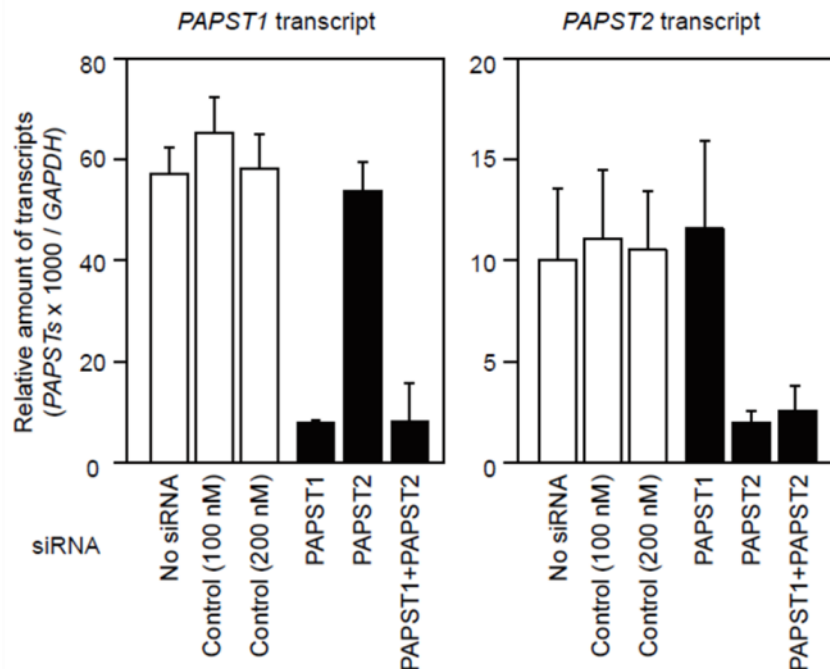


図 16: *PAPST* 遺伝子の RNAi による発現抑制

PAPST1(左)、*PAPST2*(右) 遺伝子のノックダウン効率。3 回連続の siRNA の導入の 3 日後(day10)にトータル RNA を回収し *PAPST1* mRNA、*PAPST2* mRNA の発現量を リアルタイム PCR によって測定、*GAPDH* mRNA の発現量で標準化した。標準偏差は 3 回の独立した実験により求められた。No siRNA: siRNA 無し、Control (100nM): 100nM control siRNA、Control (200nM): 200nM control siRNA、PAPST1: 100nM *PAPST1* siRNA、PAPST2: 100nM *PAPST2* siRNA、PAPST1+PAPST2: 100nM *PAPST1* siRNA と 100nM *PAPST2* siRNA それぞれを DLD-1 細胞に導入した。

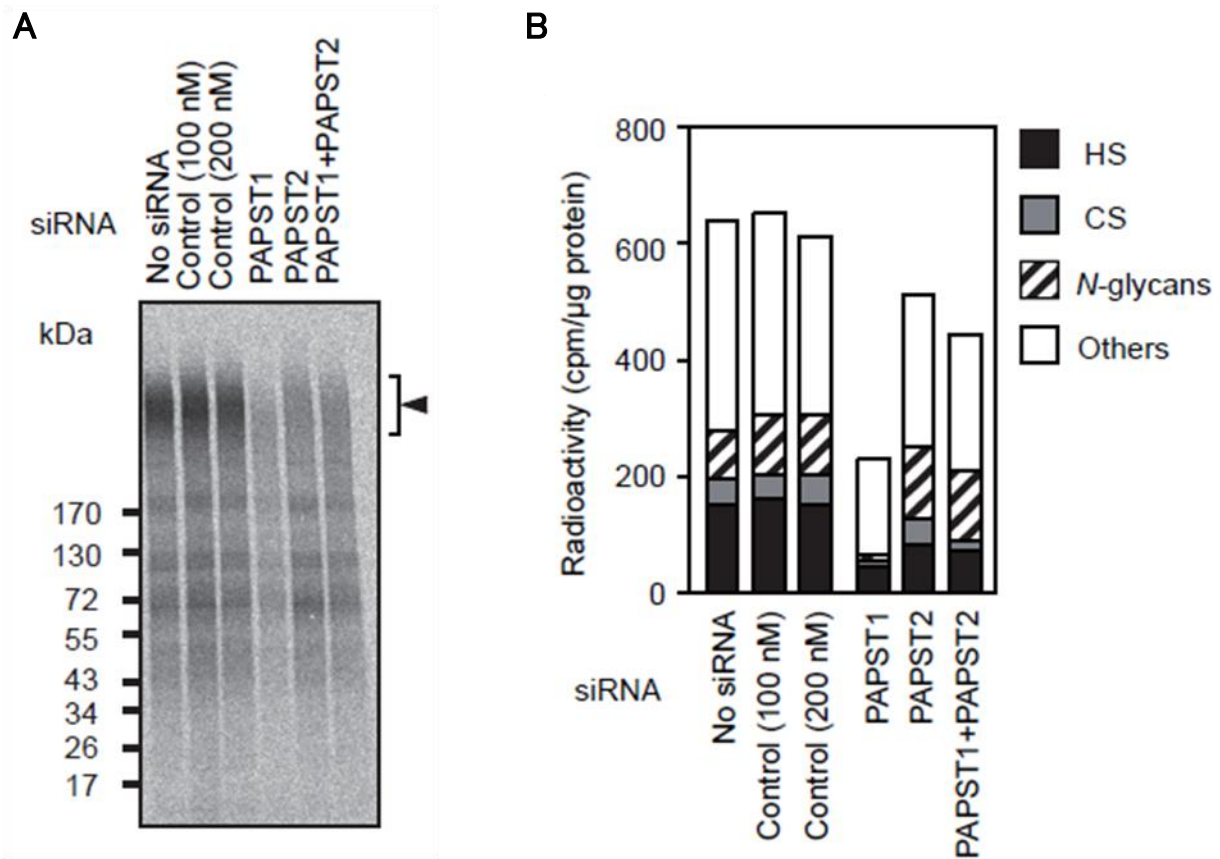


図 17: *PAPST* 発現抑制細胞における代謝標識解析

A: *PAPSTs*ノックダウン DLD-1 細胞の代謝標識された硫酸化産物のオートラジオグラフィー。3 回連続の siRNA の導入の 2 日後 (day9) に $\text{Na}_2^{[35}\text{S}]\text{O}_4$ での 24 時間の代謝標識し、day10 に細胞のタンパク質を回収し、2-15% SDS-PAGE で分離した。矢頭は図 15A の HSase 処理によって減少した HS のシグナルを示す。B: *PAPSTs*ノックダウン DLD-1 細胞のタンパク質に取り込まれた代謝標識された硫酸化産物の比率。day9 に代謝標識、day10 に HSase、CSase、PNGaseF 消化を行い、遊離した糖鎖の放射活性を測定した。細胞のタンパク質全体への取り込みは、細胞抽出液の TCA 沈殿画分の測定に基づき決定した。No siRNA: siRNA 無し、Control (100nM): 100nM control siRNA、Control (200nM): 200nM control siRNA、PAPST1: 100nM PAPST1 siRNA、PAPST2: 100nM PAPST2 siRNA、PAPST1+ PAPST2: 100nM PAPST1 siRNA と 100nM PAPST2 siRNA それぞれを DLD-1 細胞に導入した。

3.3.4. *PAPST* 遺伝子発現抑制による DLD-1 の細胞増殖の抑制

さらに、ノックダウン細胞の増殖について解析した。3 回目のトランスフェクション翌日、Day8 の siRNA 導入細胞を 96well プレートに植え継ぎ、その後 5 日間に渡り WST-8 により細胞の増殖を解析した (図 18)。 *PAPST1*、*PAPST2* どちらのノックダウンにおいても、コントロールに比べ、細胞増殖が顕著に抑制された。代謝標識の結果と同様に、DLD-1 細胞において、*PAPST2* に比べ *PAPST1* ノックダウンの細胞増殖への影響が顕著であった。ダブルノックダウン細胞の細胞増殖は *PAPST1* のみのノックダウンと同程度であった。これらの結果より、PAPS 輸送体は硫酸化を制御することで結腸直腸癌細胞の増殖に関与していることが明らかとなった。

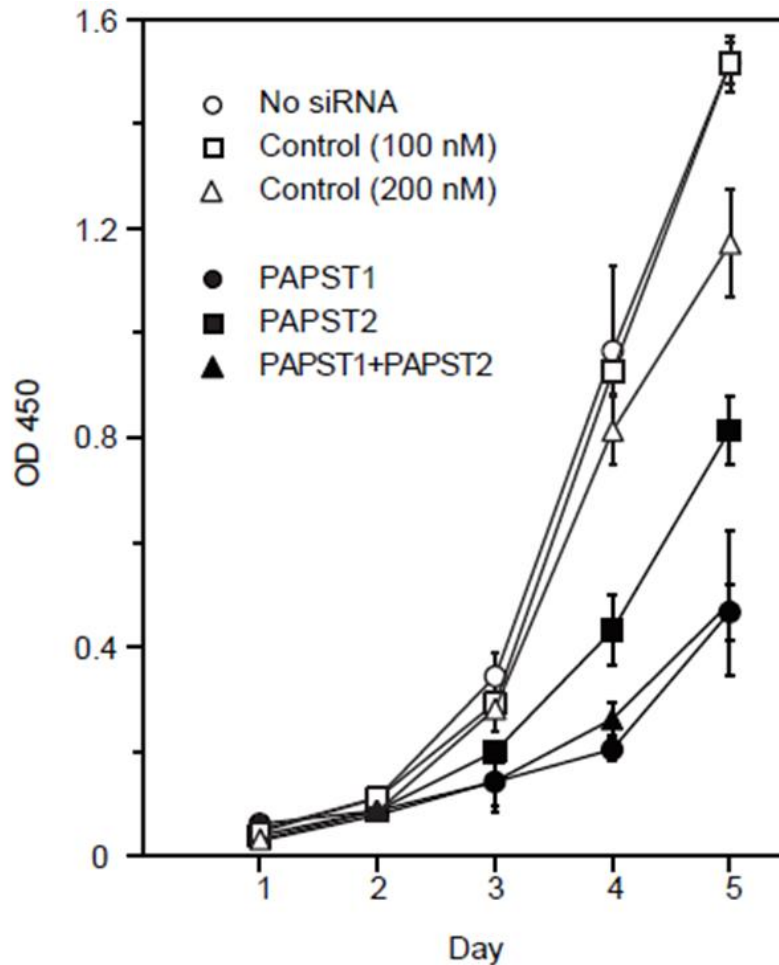


図 18: PAPS1 発現抑制細胞の増殖

3 回連続の siRNA の導入の翌日 (day8) に 96well プレートに継代した後、WST-8 による解析を連日、5 日間行った。No siRNA: siRNA 無し、Control (100nM): 100nM control siRNA、Control (200nM): 200nM control siRNA、PAPST1: 100nM PAPST1 siRNA、PAPST2: 100nM PAPST2 siRNA、PAPST1+PAPST2: 100nM PAPST1 siRNA と 100nM PAPST2 siRNA それぞれを DLD-1 細胞に導入した。標準偏差は 3 回の独立した実験により求められた。

3.3.5. PAPS1 遺伝子発現抑制による DLD-1 の HS 依存的な FGF シグナル伝達の抑制

HS が多くの成長因子シグナル伝達のパスウェイに関与していることは以前より知られている。FGF-2 は HS と相互作用する成長因子の 1 つであり、細胞の増殖の制御に関与している。HS と FGF-2 との相互作用には HS の硫酸基が必要である[44,45]。siRNA により PAPS1 遺伝子の発現が抑制された DLD-1 細胞において、FGF シグナルはどのような影響を受けるのか、FGF-2 刺激による ERK の活性化を解析した(図 19)。3 回目のトランスフェクション 3 日後の Day10 に、血清飢餓状態の細胞を 10ng/mL FGF-2 により刺激し、ERK のリン酸化を解析することで FGF シグナルの活性化を評価した。PAPS1、PAPS2 ノックダウン細胞のリン酸化 ERK および、total ERK の発現をウエスタンブロッティングで検出し、そのバンド強度の解析からリン酸化 ERK/total ERK の比を求めた。PAPS1、PAPS2 どちらのノックダウンにおいても、リン酸化 ERK/total ERK の比は、コントロールに比べ減少した。最も低い ERK のリン酸化はダブルノックダウン細胞で認められた。PAPS1、PAPS2 がノックダウンされた DLD-1 細胞において、HS の硫酸化度の減少が FGF シグナルの活性化の抑制に反映されていることが示された。これらの結果により、結腸直腸癌細胞において、PAPS 輸送体遺伝子の発現が HS 依存的シグナル伝達に影響することが明らかとなった。

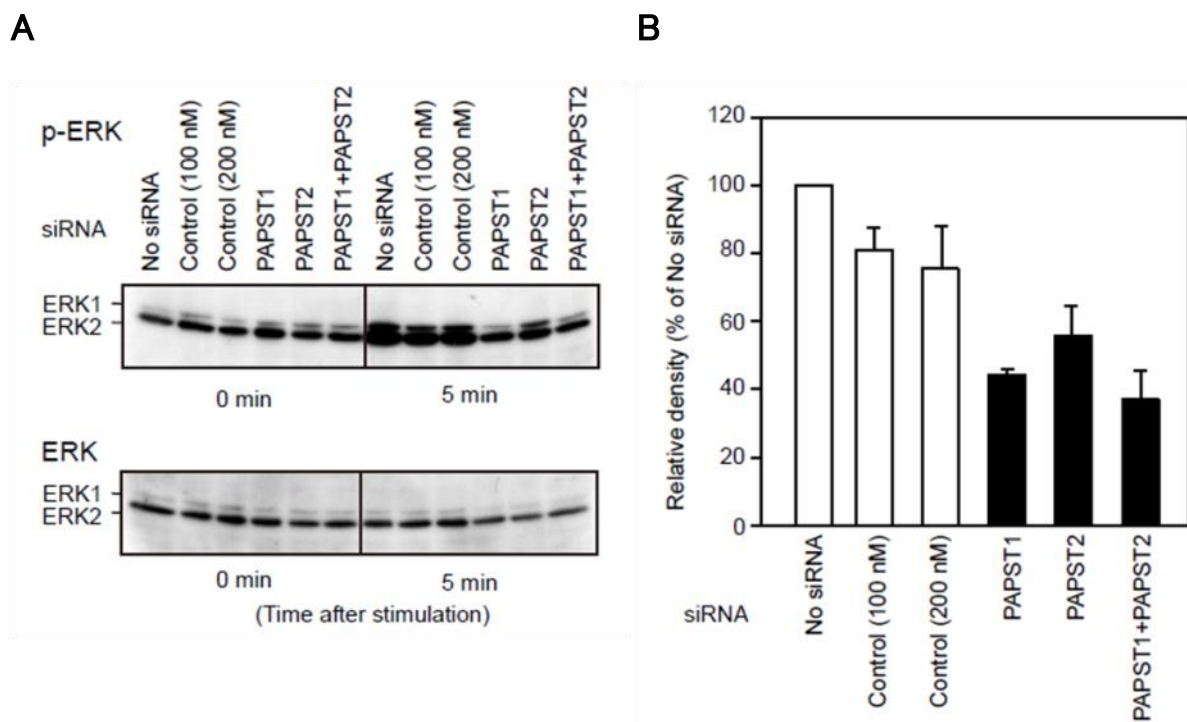


図 19: PAPST 発現抑制細胞における FGF シグナル

A: 抗リン酸化 ERK (p-ERK) 抗体 (A 上) と抗 ERK 抗体 (A 下) によるウエスタンブロッティング解析。3 回連続の siRNA の導入の 3 日後 (day10) に 16 時間の血清飢餓培養を行い、その後 10ng/mL FGF-2 で 5 分間刺激した。B: ウエスタンブロッティングの NIH image による密度解析。5 分間刺激した試料の p-ERK のバンド強度を ERK のバンド強度で割った数値の、No siRNA の数値に対する相対値として算出した。No siRNA: siRNA 無し、Control (100nM): 100nM control siRNA、Control (200nM): 200nM control siRNA、PAPST1: 100nM PAPST1 siRNA、PAPST2: 100nM PAPST2 siRNA、PAPST1+PAPST2: 100nM PAPST1 siRNA と 100nM PAPST2 siRNA それぞれを DLD-1 細胞に導入した。標準偏差は 3 回の独立した実験により求められた。

3.4. 糖鎖アレイデータから抽出されたインフルエンザウイルス感染を増強する硫酸化糖鎖構造

3.4.1. Glycan Minor Tool による糖鎖アレイデータの高頻度糖鎖構造マイニング

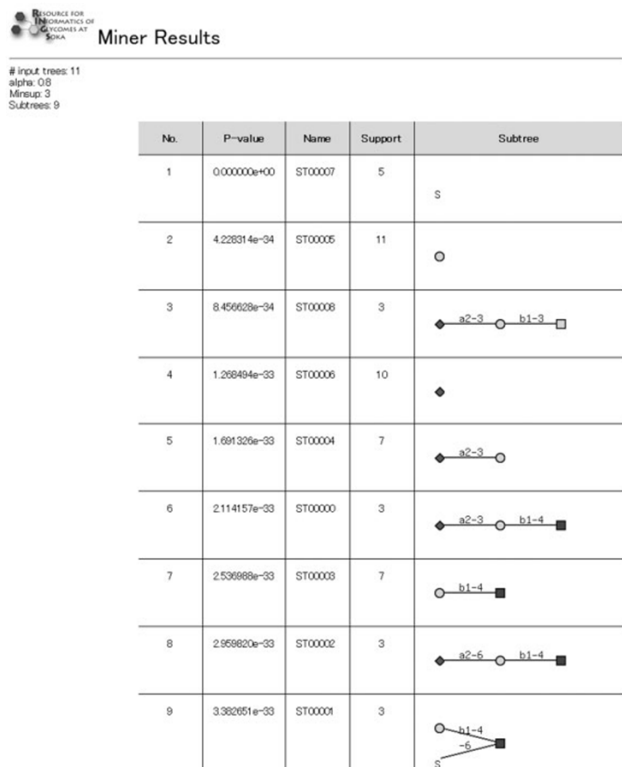
ウイルス感染に関与するシアル酸以外の新規の糖鎖構造を見い出すために、CFG に公開されている多様なインフルエンザウイルス株の糖鎖結合親和性を解析した糖鎖アレイデータ[79]を解析した。CFG によって提供される糖鎖構造データは IUPAC 形式で提示されることから、Glycan Minor Tool へ入力可能な KCF 形式へ変換し、データを分析した。191 データセット全てのウイルス結合アレイの中から、*in vivo*でのウイルス感染実験が可能な 15 の野生株のデータに絞り込み、それぞれのデータセットにおいて高い結合親和性を示す糖鎖構造を抽出した。表 9 は糖鎖アレイデータの α -closed frequent subtree 解析に用いた Glycan Minor Tool パラメータおよび抽出された糖鎖構造の数を示したものである。最も少ない 8 つの糖鎖構造が抽出されたのは、ヒト H1N1 亜型ウイルス株である A/South Carolina/1/1918、最も多い 40 の糖鎖構造が抽出されたのはウマ H3N8 亜型ウイルス株 A/equine/MA/2003 であった。ヒト H1N1 亜型ウイルス株は平均して 15 の糖鎖構造と結合していた。フィブリノーゲンやトランスフェリン等の糖鎖構造単独ではないものは除外して、上位の結合糖鎖構造が抽出された。図 20 は Glycan Minor Tool による、ヒトの H1N1 亜型ウイルス株 A/New York/1/1918 (図 20A) と A/Texas/36/1991 (図 20B) のマイニング結果として表示された画面のスナップショットである。表 10 は単糖を除いた候補となる構造のまとめである。興味深いことに、予想されたシアル酸構造に加えて、 SO_3^- -3Gal、Gal β 1-4 (SO_3^- -6)Glc、 SO_3^- -3Gal β 1-4Glc、 SO_3^- -6Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-4 (SO_3^- -6)GlcNAc、 SO_3^- 、SA α

2-3Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc、SO₃⁻の硫酸単体を含む硫酸化構造が抽出された。特に Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc の硫酸化糖鎖構造は、異なるヒトH1N1 亜型ウイルス株において共通して抽出された。

ウイルス株	抽出された糖鎖構造の数	α	<i>minsup</i>	検索された subtree の数
A/New York/221/2003 (H1N1)	17	0.8	3	7
A/Kawasaki/173/2001 (H1N1)	26	0.8	5	5
A/Texas/36/1991(H1N1)	14	0.7	3	9
A/South Carolina/1/1918 (H1N1)	8	0.8	3	2
A/New York/1/1918 (H1N1)	11	0.8	3	9
A/Duck/Alberta/35/1976 (H1N1)	12	0.7	3	4
A/Moscow/10/1999 (H3N2)	11	0.8	3	7
A/Duck/Ukraine/1/1963 (H3N8)	14	0.8	3	5
A/canine/Florida/2004 (H3N8)	21	0.8	5	7
A/canine/Florida/2004 (H3N8)	39	0.8	7	10
A/equine/MA/2003 (H3N8)	40	0.7	7	7
A/Indonesia/05/2005 (H5N1)	28	0.75	5	9
A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	27	0.75	5	8
A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	23	0.8	5	6
A/Duck/Singapore/Q-F119-3/19 (H5N3)	10	0.7	3	5

表 9: α -closed frequent subtree 解析に用いた Glycan Minor Tool のパラメータ

A



B

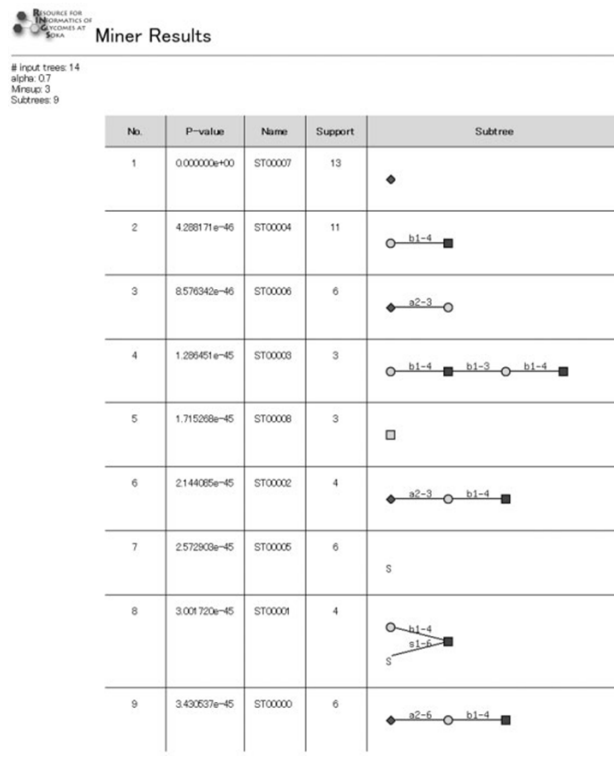


図 20: Glycan Minor Tool によるマイニング結果

マイニング結果画面のスナップショット。A: A/New York/1/1918。B: A/Texas/36/1991。糖鎖構造は、シンボルで単糖 (Man: グレーの丸, Glc: 黒丸, Gal: 白丸, GlcNAc: 黒四角, GalNAc: 白四角, SA (NeuAc): 菱形)、結ぶ線でリンケージ、 α 、 β と数字で結合様式が表示されている。

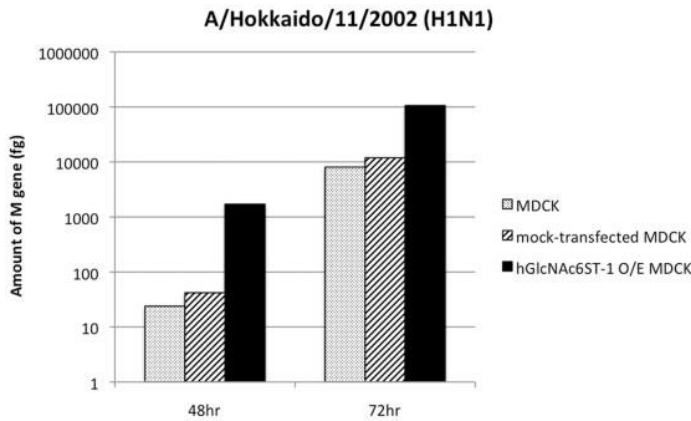
ウイルス株	抽出された糖鎖構造	P-value(左<右)		
A/New York/221/2003 (H1N1)	SO₃⁻-3Gal	Gal β 1-4(SO₃⁻-6) Glc	SO₃⁻-3Gal β 1-4Glc	SO₃⁻-6Gal β 1-4GlcNAc
A/Kawasaki/173/2001 (H1N1)	SA α 2-6 (G2GN2M3GN2 :N-link, α 1-6Man side)	SA α 2-6 (G2GN2M3GN2 :N-link, α 1-3Man side)		
A/Texas/36/1991 (H1N1)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc	Gal β 1-4(SO₃⁻-6) GlcNAc	SA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc
A/South Carolina/1/1918 (H1N1)	SA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc	SA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc		
A/New York/1/1918 (H1N1)	SA α 2-3Gal β 1-3GalNAc	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc	SA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc	Gal β 1-4(SO₃⁻-6) GlcNAc
A/Duck/Alberta/35/1976 (H1N1)	SA α 2-3Gal β 1-3GalNAc	SA α 2-3Gal β 1-3GlcNAc	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc	
A/Moscow/10/1999 (H3N2)	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc :Le ^x	SA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc	SA α 2-3Gal
A/Duck/Ukraine/1/1963 (H3N8)	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc	SA α 2-3Gal β 1-3GalNAc	SA α 2-3Gal β 1-3GlcNAc	
A/canine/Florida/2004 (H3N8)	SA α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc :sLe ^x	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc		
A/canine/Florida/2004 (H3N8)	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc :Le ^x	SA α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc :sLe ^x	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc	
A/equine/MA/2003 (H3N8)	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc :Le ^x		
A/Indonesia/05/2005 (H5N1)	SA α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc :sLe ^x	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc1-3Gal	
A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	SA α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc :sLe ^x	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc1-3Gal	
A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc	SO₃⁻	SA α 2-3Gal β 1-3GalNAc	
A/Duck/Singapore/Q-F119-3/19 (H5N3)	SA α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6) GlcNAc	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc		

硫酸基は太字で示し、硫酸基を含む構造を網掛けで示す。
異なるヒトH1N1 ウイルス株において共通して抽出された硫酸化構造に囲みを付けた。

表 10: Glycan Miner Tool 解析結果の概要

3.4.2. 抽出された硫酸化糖鎖構造の *in vivo* での検証

マイニングにより抽出された硫酸化構造 Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc は、GlcNAc の6位に硫酸基が結合している。この GlcNAc6位の硫酸基は、ヒトでは hGlcNAc6ST-1 ~ hGlcNAc6ST-5 の5つの GlcNAc-6-sulfotransferases (GlcNAc6STs) が合成能力を持つ[8,107]。中でも *hGlcNAc6ST-1* は気道、肺を含む、ユビキタスな組織に発現する。*hGlcNAc6ST-1* を過剰発現させ、Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc の硫酸化糖鎖構造が増加したMDCK細胞においてウイルス感染に変化が見られるのか、H1N1亜型インフルエンザウイルスを用いた感染実験を行い検証した。硫酸化GlcNAc構造の増加はフローサイトメトリーを用いて検討され、コントロール細胞の平均値が12.71であったのに対し、*hGlcNAc6ST-1* 発現細胞の平均値は32.72と、257%の増加を確認した。MDCK細胞と空ベクター導入のコントロール細胞、*hGlcNAc6ST-1* 発現細胞に対し、ヒトH1N1亜型ウイルス株 A/Hokkaido/11/2002を感染させ、感染48、72時間後の培養上清に含まれるウイルスM 遺伝子をリアルタイムRT-PCR法によって定量し(図21)、MDCK細胞における発現を1とした相対量を算出した(表11)。感染48時間後では、*hGlcNAc6ST-1* 発現細胞のウイルスM 遺伝子の量は正常のMDCK細胞の約70倍に増加し、感染72時間後では13倍に増加していた。空ベクター導入のコントロール細胞のウイルスM 遺伝子の量はMDCK細胞と同程度であった。これらの結果により、細胞表面の Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc 構造は、ある種のヒトH1N1亜型ウイルスの感染を大きく増強することが明らかとなった。



細胞	48hr	72hr
MDCK	1.0	1.0
mock transfcted MDCK	1.8	1.5
<i>hGlcNAc6ST-1</i> O/E MDCK	71.5	13.1

表 11:各細胞におけるウイルス産生

図 21: *hGlcNAc6ST-1* 発現細胞における A/Hokkaido/11/2002 (H1N1) の産生

MDCK、mock transfcted MDCK、*hGlcNAc6ST-1* O/E MDCK の各細胞に A/Hokkaido/11/2002 (H1N1) を感染させた 42 時間および 72 時間後の培養上清中に含まれる M 遺伝子の発現量。MDCK 細胞における発現を 1 とした相対量を表 11 に示した。

3.5. ヒト H1N1 亜型インフルエンザウイルスの卵馴化に関する硫酸化糖鎖構造

3.5.1. 鶏卵継代 H1N1 亜型ウイルスの合成糖鎖への結合特異性

鶏卵継代 H1N1 亜型ウイルスのレセプター結合特異性を評価するために、我々は HKD/2002 (ヒト H1N1 亜型季節性流行株 A/Hokkaido/11/2002(H1N1))、HYG/2011 (ヒト H1N1 亜型 2009 年パンデミック株 A/Hyogo/YS/2011(H1N1)) を用いた固相結合解析を行った (図 22)。これらのウイルスは発育鶏卵において増殖されたもので、HA 分子に発育鶏卵培養株に頻繁に見られるアミノ酸置換 [81,87] を持つ。HKD/2002:D190N (H3 numbering)、HYG/2011:Q226R (H3 numbering) のアミノ酸置換は本研究で決定した (GenBank accession number LC497852, LC497853)。鶏卵継代ヒト H1N1 亜型ウイルスと、鳥 H1N1 亜型ウイルスのレセプター結合特異性の比較のために、発育鶏卵において増殖させた Dk/AB/1976 (A/duck/Alberta/35/1976(H1N1)) も用いた。この解析では NeuAc α 2-6Gal を含む 2 種類と NeuAc α 2-3Gal を含む 4 種類からなる 8 つの異なるビオチン化糖鎖を使用した。

HKD/2002 は NeuAc α 2-6Gal を含む糖鎖構造と高い親和性を示すが、この親和性に GlcNAc の硫酸化は影響しなかった。HKD/2002 は NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc には結合しないものの、シアリル Le^x と呼ばれる NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc 構造に結合した。さらに、シアリル Le^x が硫酸化された 6-スルホシアリル Le^x、NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) (SO₃⁻6) GlcNAc に対して劇的に結合親和性が上昇した。硫酸化とフコシル化は HKD/2002 に NeuAc α 2-3Gal を含む糖鎖構造への結合能を与えた。フコシル化 α 2-3 シアル酸糖鎖の結合特性は硫酸化によって増強したように見える。HYG/2011 は GlcNAc の硫酸化に関係なく NeuAc α 2-6Gal を含む糖鎖構造とは結合しなかった。その一方で、HYG/2011 は NeuAc α 2-3Gal を含む糖鎖構造に結合し、GlcNAc の硫酸化とフコシル化により結合能が増強された。Dk/AB/1976 は GlcNAc への硫酸化に関係なく NeuAc α 2-6Gal を含む糖鎖構造にわずかに結合能を示した。NeuAc α 2-3Gal を含む糖鎖構造は Dk/AB/1976 に結合し、GlcNAc のフコシル化はこの結合を増強する。しかしながら、GlcNAc の硫酸化はこの結合を阻害した。これらの結果は、鶏卵継代のヒト H1N1 亜型ウイルス HKD/2002 と HYG/2011 において、GlcNAc の硫酸化が NeuAc α 2-3Gal を含む糖鎖構造への強い結合を促すことを明確に示した。

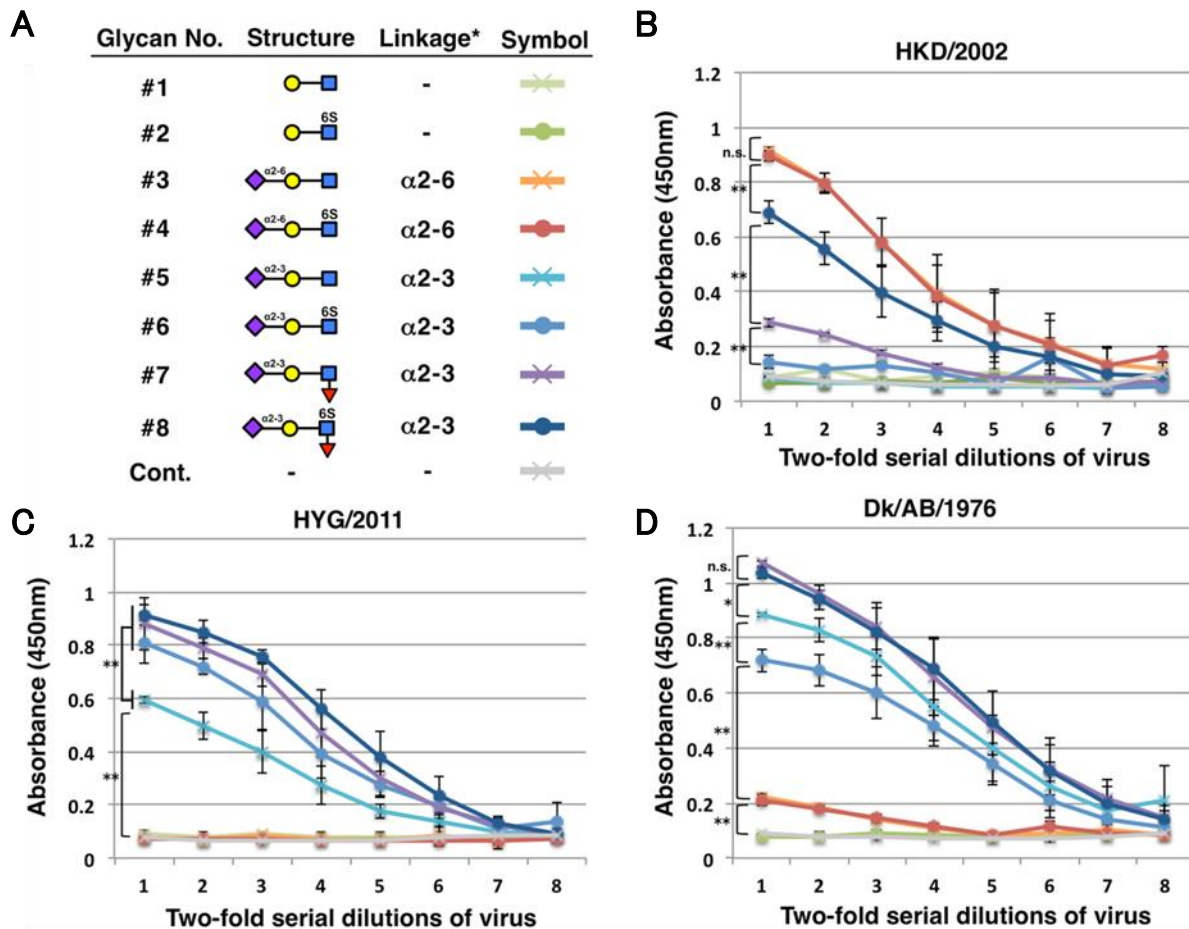


図 22: 鶏卵継代 H1N1 亜型ウイルスの合成糖鎖構造に対する固相結合解析

A: 固相結合解析に用いた合成糖鎖構造。#1: Gal β 1-4GlcNAc β -PEG-biotin, #2: Gal β 1-4GlcNAc[6S] β -PEG-biotin, #3: NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -PEG-biotin, #4: NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc[6S] β -PEG-biotin, #5: NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -PEG-biotin, #6: NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc[6S] β -PEG-biotin, #7: NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -PEG-biotin, #8: NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc[6S] β -PEG-biotin。NeuAc: 紫菱形、Gal: 黄丸、GlcNAc: 青四角、Fuc: 赤三角を示す。6S: GlcNAc6 位に結合した硫酸。*: NeuAc と Gal のリンケージ。Cont.: PBS による解析。B、C、D: 2 倍段階希釈した各ウイルスは糖鎖との結合反応の後、抗 HA モノクローナル抗体により検出された。標準偏差は 3 回の独立した実験による。 p 値は二元配置分散分析により求められた。** $p < 0.001$ 、* $p < 0.05$ 、n.s. $p > 0.5$ 。

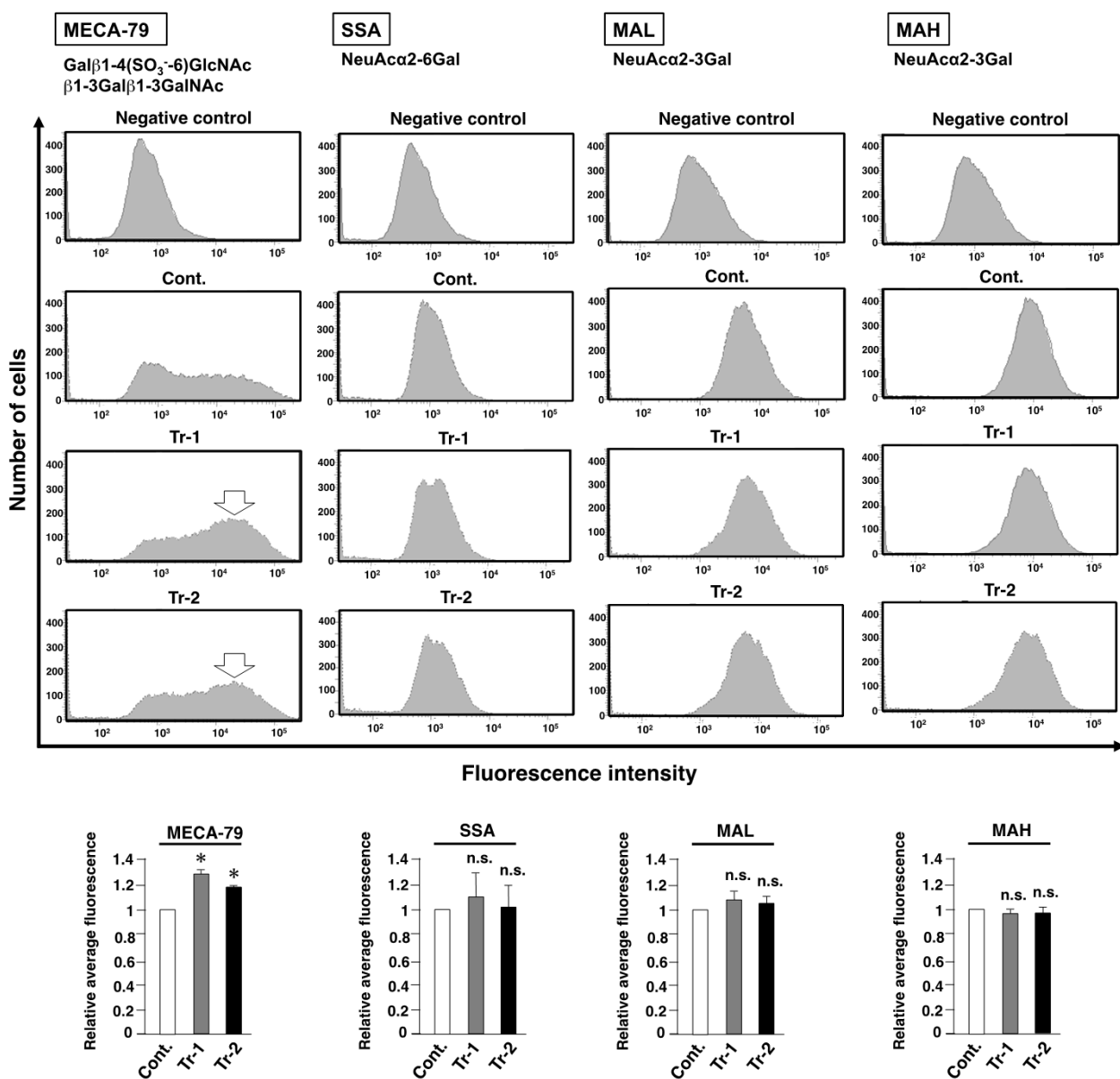
3.5.2. ヒト *GlcNAc6ST-1* 安定発現 MDCK 細胞の評価

データマイニングにより抽出された Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc 構造が HKD/2002、HYG/2011 と糖鎖との結合に影響することが *in vitro* で示された。この構造を合成する *hGlcNAc6ST-1* を過剰発現した MDCK 細胞を用いた感染実験により、*in vivo* での影響を検証すべく、初めに *hGlcNAc6ST-1* 過剰発現 MDCK 細胞[4] の糖鎖プロファイルを解析した。*hGlcNAc6ST-1* 遺伝子の異所的な高発現が確認された *hGlcNAc6ST-1* 過剰発現バルク細胞株 Tr-1、Tr-2 において、MECA-79 抗体[93]によって認識される Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc 構造の増加が認められた。一方、*hGlcNAc6ST-1* 発現細胞株とコントロール細胞における、細胞表面の NeuAc α 2-6Gal と NeuAc α 2-3Gal の糖鎖構造の増減を、*N*-結合型糖鎖上の NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc を認識する MAL [95]、*O*-結合型糖鎖上の NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc を認識する MAH [96]、NeuAc α 2-6Gal を認識する SSA [94] を用いた FACS 解析で検討したが、変化は認められなかった(図 23A)。

HKD/2002 は 6-スルホシアリル Le^x、と呼ばれる NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)(SO₃⁻-6)

GlcNAc 構造に強く結合する。加えて、HYG/2011 は 6-スルホシリアル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc 構造に強く結合する。細胞株 Tr-1、Tr-2 において、NeuAc α 2-3Gal を含むこれらの硫酸化糖鎖構造の定量を行うために、S1、S2 抗体 [97] を用いたフローサイトメリー解析を行った (図 23B)。その結果、コントロール細胞株に比べ、細胞株 Tr-1、Tr-2 において、6-スルホシリアル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc の発現が上昇していることが示された。次いで、6-スルホシリアル Le^x ではなくシリアル Le^x を認識する CSLEX 抗体 [108,109] を用いてフローサイトメリー解析を行ったところ、6-スルホシリアル Le^x の発現パターンと比較すると、CSLEX 抗体が認識するシリアル Le^x 発現は、細胞株 Tr-1、Tr-2 において減少していた。これらの結果により、6-スルホシリアル Le^x を含む NeuAc α 2-3Gal 含有硫酸化糖鎖構造は *hGlcNAc6ST-1* 安定発現 MDCK 細胞において発現していることが明確に示された。

A



B

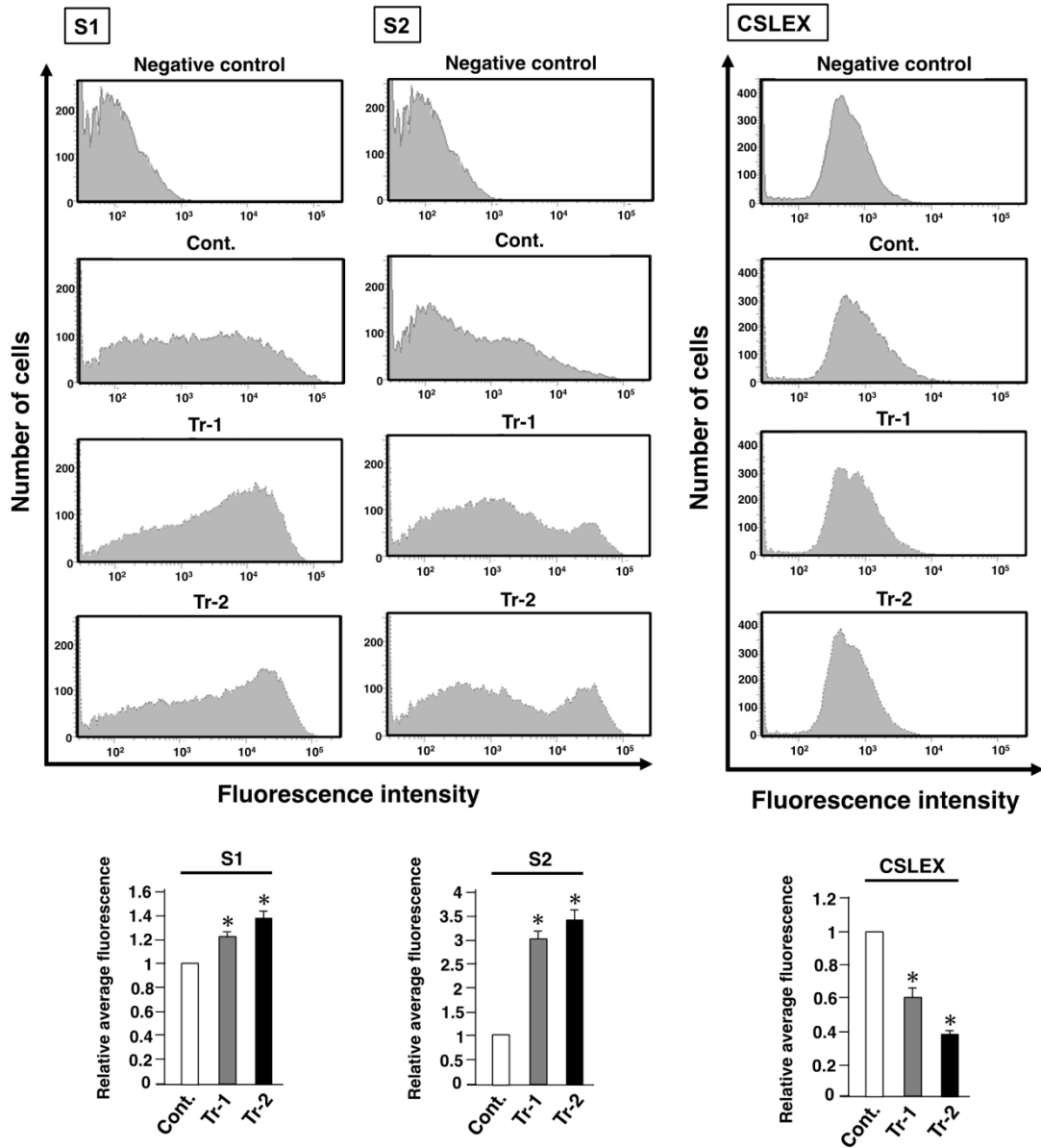


図 23: *hGlcNAc6ST-1* 安定発現 MDCK 細胞の細胞表面の糖鎖構造の評価

A: *hGlcNAc6ST-1* を安定発現させた MDCK バルク細胞株 (Tr-1, Tr-2) 表面における Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc 糖鎖構造の発現を、MECA-79 抗体を用いたフローサイトメトリーで評価した。Cont.は空ベクターを導入した MDCK 細胞。白抜き矢印は増加した構造による蛍光強度の増加を示す。NeuAc α 2-6Gal と NeuAc α 2-3Gal の糖鎖構造の増減は SSA (NeuAc α 2-6Gal を認識)、MAL (NeuAc α 2-3Gal を認識)、MAH (NeuAc α 2-3Gal を認識) によって解析した。Negative control は染色なしの MDCK 細胞。B: Tr-1, Tr-2 細胞表面における 6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc 構造の発現は S1 抗体、S2 抗体を、シアリル Le^x 構造は CSLEX 抗体を用いたフローサイトメトリーで確認した。Cont.は空ベクターを導入した MDCK 細胞。Negative control はアイソタイプコントロール抗体による染色を示す。A, B のグラフは 3 回の独立した染色による蛍光強度の平均値を示した。誤差棒は標準偏差。* $p < 0.01$, n.s. $p > 0.05$ の p 値は t 検定による。

3.5.3. 細胞表面における 6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc の影響

細胞表面における Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc の発現が H1N1 亜型ウイルスの感染性に影響するのか、感染実験を行い検討した。コントロールおよび *hGlcNAc6ST-1* 発現細胞株 Tr-1, Tr-2 に、HKD/2002、HYG/2011、Dk/AB/1976 をそれぞれ MOI=0.01 で感染させ、感染 42 時間後の培養上清に含まれるウイルス

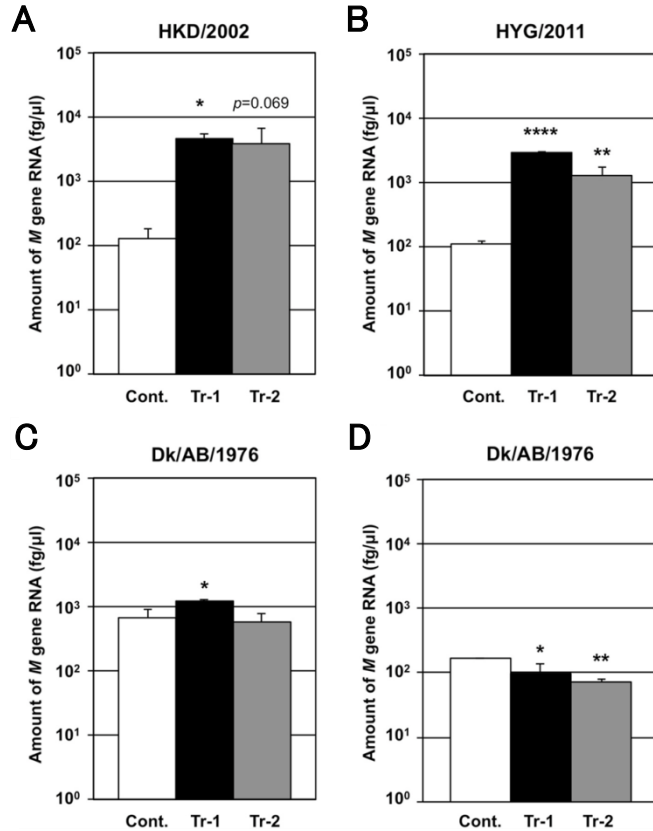


図 24: *hGlcNAc6ST-1* 安定発現 MDCK 細胞におけるウイルス産生の評価

ウイルス感染後の培養上清からウイルス RNA を回収し、そこに含まれるウイルス RNA ゲムの *M*セグメントの量をリアルタイム PCR で測定した。*hGlcNAc6ST-1* 安定発現 MDCK バルク株 Tr-1、Tr-2 と、空ベクター導入バルク株 Cont. に対し、A: HKD/2002 (A/Hokkaido/11/2002 (H1N1))、B: HYG/2011 (A/Hyogo/YS/2011 (H1N1))、C、D: Dk/AB/1976 (A/duck/Alberta/35/1976 (H1N1)) を感染させた。A、B、C は MOI=0.01 でのウイルス感染 42 時間後、D は MOI=0.0001 でのウイルス感染 24 時間後の培養上清を用いた。標準偏差は 3 回の独立した実験による。 p 値はダネット検定により求められた。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 。

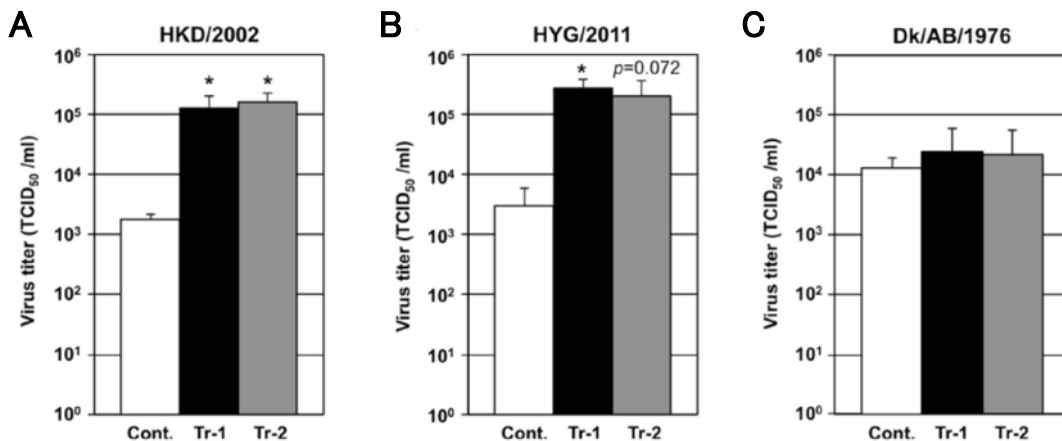


図 25: *hGlcNAc6ST-1* 安定発現 MDCK 細胞におけるウイルス感染性の評価

ウイルス感染後の培養上清に含まれるウイルスの感染価は TCID₅₀ 法によって測定した。*hGlcNAc6ST-1* 安定発現 MDCK バルク株 Tr-1、Tr-2 と、空ベクター導入バルク株 Cont. に対し、A: HKD/2002 (A/Hokkaido/11/2002 (H1N1))、B: HYG/2011 (A/Hyogo/YS/2011 (H1N1))、C: Dk/AB/1976 (A/duck/Alberta/35/1976 (H1N1)) を感染させた。A、B は MOI=0.01 でのウイルス感染 42 時間後、C は MOI=0.0001 でのウイルス感染 24 時間後の培養上清を用いた。標準偏差は 3 回の独立した実験による。 p 値はダネット検定により求められた。* $p < 0.05$ 。

RNA ゲノムの M1 遺伝子の量を測定し、感染・増殖したウイルス粒子量の検討を行った。HKD/2002 を感染させた Tr-1 細胞の培養上清ではコントロール細胞に比べ M1 遺伝子の量が 35 倍に増加していた。HKD/2002 を感染させた Tr-2 細胞においても M1 遺伝子の量が増加していた(図 24A)。同様に、HYG/2011 を感染させた Tr-1、Tr-2 細胞では、コントロール細胞に比べ、それぞれ 25 倍、12 倍に増加していた(図 24B)。Dk/AB/1976 を感染させた Tr-1、Tr-2 細胞の培養上清では、コントロール細胞に比べ M1 遺伝子量の増加はごくわずかであった(図 24C)。Dk/AB/1976 の場合、コントロール細胞の培養上清中の M1 遺伝子の量が HKD/2002、HYG/2011 に比べ約 10 倍高かった。したがって、ウイルス産生が飽和している可能性があるため、MOI=0.0001 での感染実験を行った。Dk/AB/1976 感染 24 時間後の Tr-1、Tr-2 細胞において、M1 遺伝子の量はコントロール細胞よりも若干少なかった(図 24D)。MOI=0.0001 での実験において、ウイルス産生は飽和していないようであるため、Dk/AB/1976 感染では Tr-1、Tr-2 細胞でのウイルス産生の増加は認められないことが示された。

加えて、Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc 発現細胞における感染性ウイルスの産生を評価するために、培養上清の感染価は TCID₅₀ 法を用いて測定した。細胞に MOI=0.01 で HKD/2002、HYG/2011、Dk/AB/1976 を感染させ、42 時間後の培養上清を回収した。Dk/AB/1976 は MOI=0.0001 で感染させ、24 時間後に培養上清を回収した。HKD/2002 を感染させた Tr-1、Tr-2 細胞において、コントロール細胞に比べウイルス感染価がそれぞれ 74 倍、90 倍に増加していた(図 25A)。同様に HYG/2011 を感染させた Tr-1 細胞において、コントロール細胞に比べウイルス感染価は 90 倍増加していた(図 25B)。HYG/2011 を感染させた Tr-2 細胞においても、ウイルス感染価は増加傾向にあった。対照的に、Dk/AB/1976 を感染させた Tr-1、Tr-2 細胞において、培養上清のウイルス感染価はコントロール細胞と同程度であった(図 25C)。

これらのことより、細胞表面での Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc の発現は、鶏卵継代されたヒト H1N1 亜型インフルエンザウイルスの産生を増進するが、カモ H1N1 亜型インフルエンザウイルスの産生には影響しないことが明らかとなった。

3.5.4. 発育鶏卵の漿尿膜と羊膜での 6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc の分布

6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6) 構造が発育鶏卵の漿尿膜と羊膜に発現しているかどうか知るために、S1 および S2 抗体を用いた免疫組織学的解析を行った(図 26)。O-結合型糖鎖上の 6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6) 構造を認識する S1 抗体によって、漿尿膜と羊膜の胎児側が強く染色された(図 26a、b)。O-結合型糖鎖と N-結合型糖鎖上の 6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6) 構造を認識する S2 抗体では、漿尿膜と羊膜が胎児側、殻側双方で強く染色された(図 26d、e)。一方、シアリル Le^x を認識する CSLEX 抗体による染色は極めて弱かった(図 26g、h)。免疫組織学的染色のコントロールとして、シアリル Le^x が高発現しているニワトリの気管を用いた[97]。CSLEX と S2 のエピトープは繊毛上皮細胞の管腔側で高発現していたが、S1 のエピトープは認められなかった(図 26c、f、i)。さらに、NeuAc α 2-3Gal、NeuAc α 2-6Gal の局在を、MAL、MAH、SSA の各レクチンを用いた組織学的染色により評価した。MAL では、漿尿膜と羊膜の胎児側、殻側が染色された(図 27a、b、c)。MAH では、胎仔側の漿尿膜と卵殻側の羊膜が染色された(図 27d、e、f)。SSA では、漿尿膜の胎仔側、卵殻側および羊膜の血管内皮が染色された(図 27g、h、i)。さらに、成鶏の気管上皮の apical 領域が MAL と SSA で染色された(図 27c、i)。これらの結果により、6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6) は漿尿膜と羊膜両方の表面に発現し、発育鶏卵におけるヒト H1N1 亜型ウイルス産生のさらなる扶助として機能していることが明らかとなった。

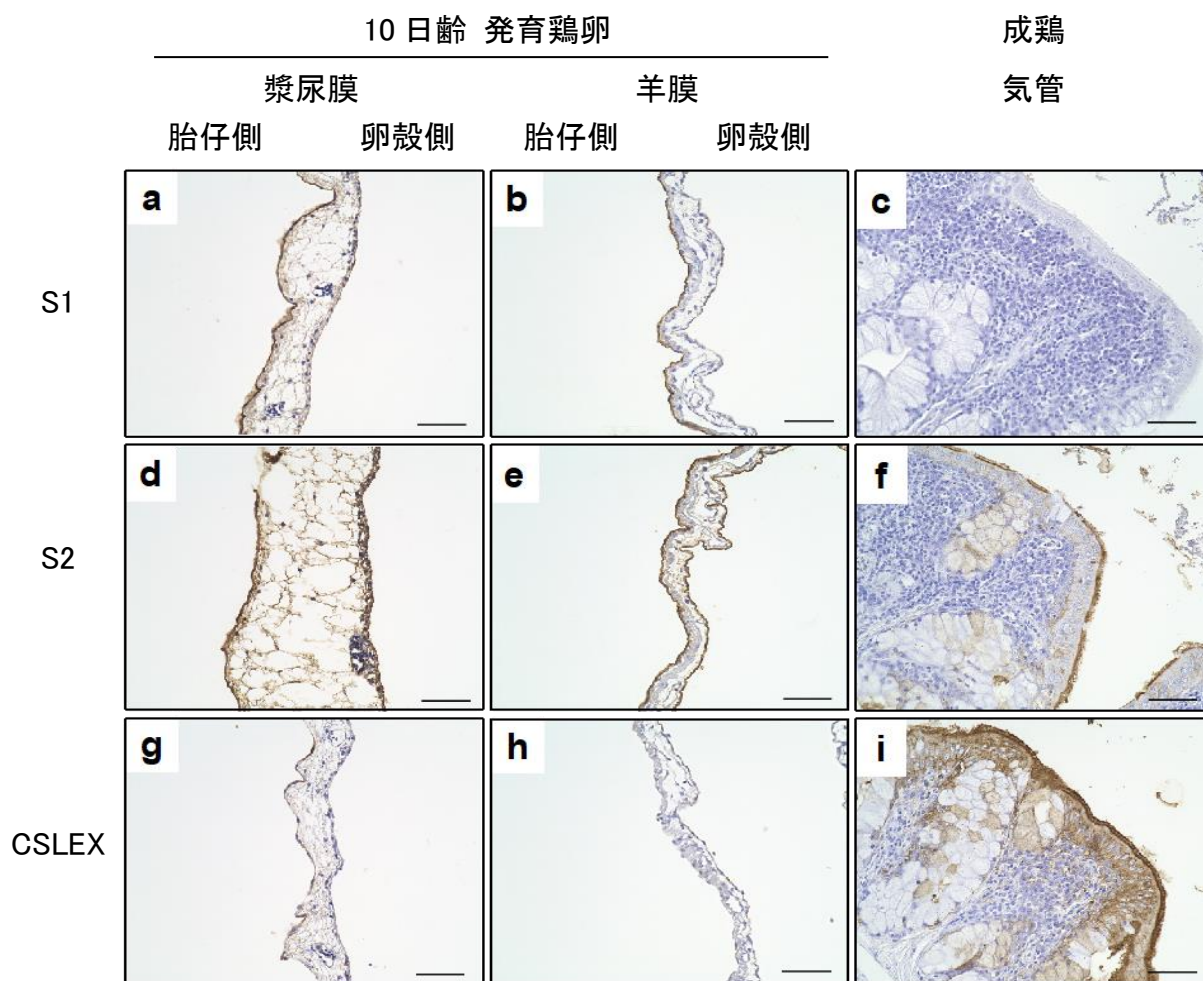


図 26: S1、S2、CSLEX 抗体による發育鶏卵漿尿膜と羊膜およびニワトリ気管の免疫組織学的染色

a、d、g: 10 日齡發育鶏卵の漿尿膜。左: 胎仔側、右: 卵殻側。b、e、h: 10 日齡發育鶏卵の羊膜。左: 胎仔側、右: 卵殻側。c、f、i: 成鶏の気管。S1 抗体は O-結合型糖鎖上の 6-スルホシアリル Le^xと NeuAc α2-3Gal β1-4(SO₃⁻-6) 構造を認識し(a、b、c)、S2 抗体は O-結合型糖鎖上と N-結合型糖鎖上の 6-スルホシアリル Le^xと NeuAc α2-3Gal β1-4(SO₃⁻-6) 構造を認識(c、d、e)、CSLEX はシアリル Le^xを認識する(g、h、i)。スケールバーは 50 μm。

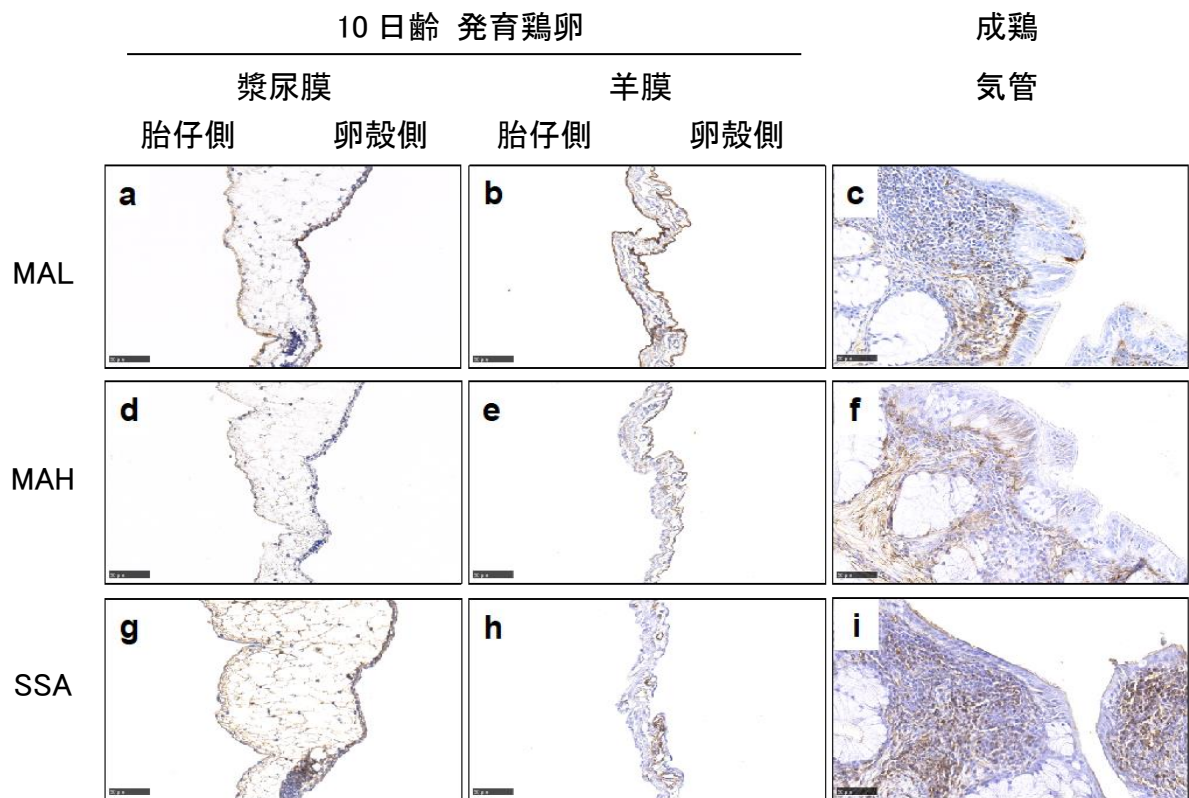


図 27: MAL、MAH、SSA レクチンによる発育鶏卵漿尿膜と羊膜およびニワトリ気管の組織学的染色

a、d、g: 10 日 齡 発 育 鶏 卵 の 漿 尿 膜。左: 胎 仔 側、右: 卵 殻 側。b、e、h: 10 日 齡 発 育 鶏 卵 の 羊 膜。左: 胎 仔 側、右: 卵 殻 側。c、f、i: 成 鶏 の 気 管。MAL は *N*-結 合 型 糖 鎖 上 の NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc、MAH は *O*-結 合 型 糖 鎖 上 の NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc 6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻6) 構 造 を 認 識 し (a、b、c)、S2 抗 体 は *O*-結 合 型 糖 鎖 上 と *N*-結 合 型 糖 鎖 上 の 6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻6) 構 造 を 認 識 (c、d、e)、CSLEX は シア リ ル Le^x を 認 識 す る (g、h、i)。スケールバーは 50 μ m。

4. 考察

4.1. ショウジョウバエ *O*-Man 転移酵素、dPOMT1、dPOMT2 の機能解析

GAL4-UAS-IR システムを用いた遺伝性かつ誘導性 RNAi[110]による *dPOMT2* の RNAi 変異体は、*dPOMT1* の古典的な変異体 *rt* で報告されている「腹部よじれ」の表現型[28]を示した。*dPOMT1*、*dPOMT2* RNAi 変異体における各々の mRNA 量は、ノックダウンしていないもう片方の遺伝子発現には影響を与えず、野生型に比べてそれぞれ、32%、21%に減少していた。各々の RNAi 変異体での時計回りに腹部がよじれる表現型は、それぞれの遺伝子の特異的な減少により引き起こされており、これは *dPOMT2* の欠損が原因となる表現型の初めての報告であった。*dPOMT2* は染色体の 1C4 の領域に位置し、この 1C3-D4 の領域には *twisted* (*tw*) 変異体が遺伝学的に位置付けられている[111]。*tw* 変異体は後部から見て時計回りに 30° 腹部がよじれ、生存性の低下が知られている。*dPOMT2* RNAi 変異体と *tw* 変異体の表現型の類似は、*dPOMT2* が *tw* 遺伝子である可能性を示しているが、*tw* 変異体のゲノム変異箇所は本論文投稿時において調べられていなかった。

dPOMT1 と *dPOMT2* の遺伝学的相互作用解析及び、組み換えタンパク質と RNAi 変異体による POMT 活性測定は両方の dPOMTs が互いに作用して POMT 活性として機能することを *in vivo*、*in vitro* 双方で明確に示した。dPOMT1 と dPOMT2 は、それぞれ PMT4、PMT2 サブファミリーに分類される。酵母において、PMT1 サブファミリーと PMT2 サブファミリーはヘテロ体を形成し、PMT4 サブファミリーはホモ 2 量体を形成する[16]。ショウジョウバエやヒトなどの無脊椎動物、脊椎動物において、PMT2 サブファミリーは PMT4 サブファミリーと相互作用する[24]。この分子の相互作用の組み合わせは進化の過程で変化したものと考えられる。

dPOMT1 と *dPOMT2* RNAi 変異体の実験は、筋発生に両方の *dPOMTs* が不可欠であることを示している。hPOMT1 と hPOMT2 のショウジョウバエオルソログは dPOMT1 と dPOMT2 である。hPOMT1 は 9q34 に位置し[112]、Walker-Warburg 症候群患者の 20% において hPOMT1 に変異が報告されている[OMIM:607426][21]。hPOMT2 は 14 番染色体の q24.3 に位置し、同じく Walker-Warburg 症候群患者において変異が報告されている[OMIM:607439]。先天性筋ジストロフィーの 1 つである Muscle-eye-brain 病の症状は、Walker-Warburg 症候群の重篤な症状ほど厳しくない。Man α 1-Ser/Thr に β 1-2 結合で GlcNAc を転移する hPOMGnT1 の欠損は、Muscle-eye-brain 病を引き起こすことが報告されている[OMIM:606822][26,27]。ショウジョウバエには hPOMGnT1 のオルソログが存在しないが、これは伸長した *O*-Man 糖鎖が無いことを意味している。さらに、他の Man β 1-2GlcNAc 転移酵素である dMGAT1、dMGAT2 に *O*-Man ペプチドに β 1-2 結合で GlcNAc を転移する活性は無かった。ヒトでは伸長した *O*-Man 糖鎖が必要であるのに対し、ショウジョウバエでは *O*-Man 単糖のみで十分であると考えられる。

哺乳類において、*O*-Man 型糖鎖は、脳のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン中に初めて同定された[113]。この糖鎖構造は、脳・神経・骨格筋の限られた糖タンパク質に存在している稀なタイプの糖鎖である[9]。最も知られた *O*-Man 修飾糖タンパク質である α -DG は、骨格筋膜から分離されたジストロフィン糖タンパク質複合体の中心的な構成要素である[9,114]。ショウジョウバエにおいて、古典的な RNAi 変異体を用いた解析から、ジストログリカンは濾胞細胞や卵母細胞の細胞非自律的な基底アクチンの平面内極性化に必要であることが知られている[115]。しかし、*O*-Man 化とジストログリカンの関係を示唆するジストログリカン変異体の表現型は報告されていない。今後、dPOMTs が Man を転移する、ジストログリカンを含むコアタンパク質を明らかにすると、コアタンパク質における *O*-Man 修飾の役割に対する研究が求められる。

近年、ヒト *O*-Man 型糖鎖構造の研究が活発に行われ、非常に複雑な構造であることが解明され

ており、その合成過程の不全が筋ジストロフィーを呈する疾患を伴うことが報告されている[116]。一方、モデル生物であるショウジョウバエにおいては、ヒトの複雑な糖鎖構造を合成する酵素が存在しないことが多く、O-Man 型糖鎖構造が大きく異なると予想される。しかしながら、我々のその後の解析により、ショウジョウバエの O-Man 型糖鎖は筋発生に必要であり、その欠損により運動性が低下し、寿命が短くなるという、筋ジストロフィーを模倣した表現型を示すことを報告している[117]。ヒトに比べて単純なショウジョウバエの O-Man 型糖鎖は、種を超えて保存されている O-Man 型糖鎖機能の本質を知るための良いモデルとなることがわかった。

4.2. ミツバチ頭部に存在する特殊な N 結合型糖鎖構造の生合成に関わる β 1,3-GalTs

β 1-3 結合で Gal を転移する β 1,3-GalT は①Core1 β 1,3-GalTs、②GAG GalT IIs、③その他の β 1,3-GalTs の3つのグループに分類される。この3つ目のグループに属する、ヒトの β 1,3-GalTs の中の h β 1,3-GalT1、h β 1,3-GalT 2 と同じく h β 1,3-GlcNAcT2-8 及び、h β 1,3-GalT4,5 と高い相同性の β 3GT モチーフを持つ新規のサブグループを見出した。昆虫をも含む拡張された β 3GT モチーフ①(I/L/V)Rx(T/S)WG/A/M、②(Y/F)(L/F/I/V/M)(L/M/F)xx(D/Q)xD、③(E/D)D(V/A)(Y/F)x(T)GL/I/M/V を提案する(図 28)。このサブグループは Core1 β 1,3-GalTs との相同性は高くない。Core1 β 1,3-GalTs のみに注目し、昆虫からヒトに至る Core1 β 1,3-GalTs の3つのモチーフ①VKxTW(G/A)、②WFxKADDD、③EDxx(I/L/M)GxC も見出した。

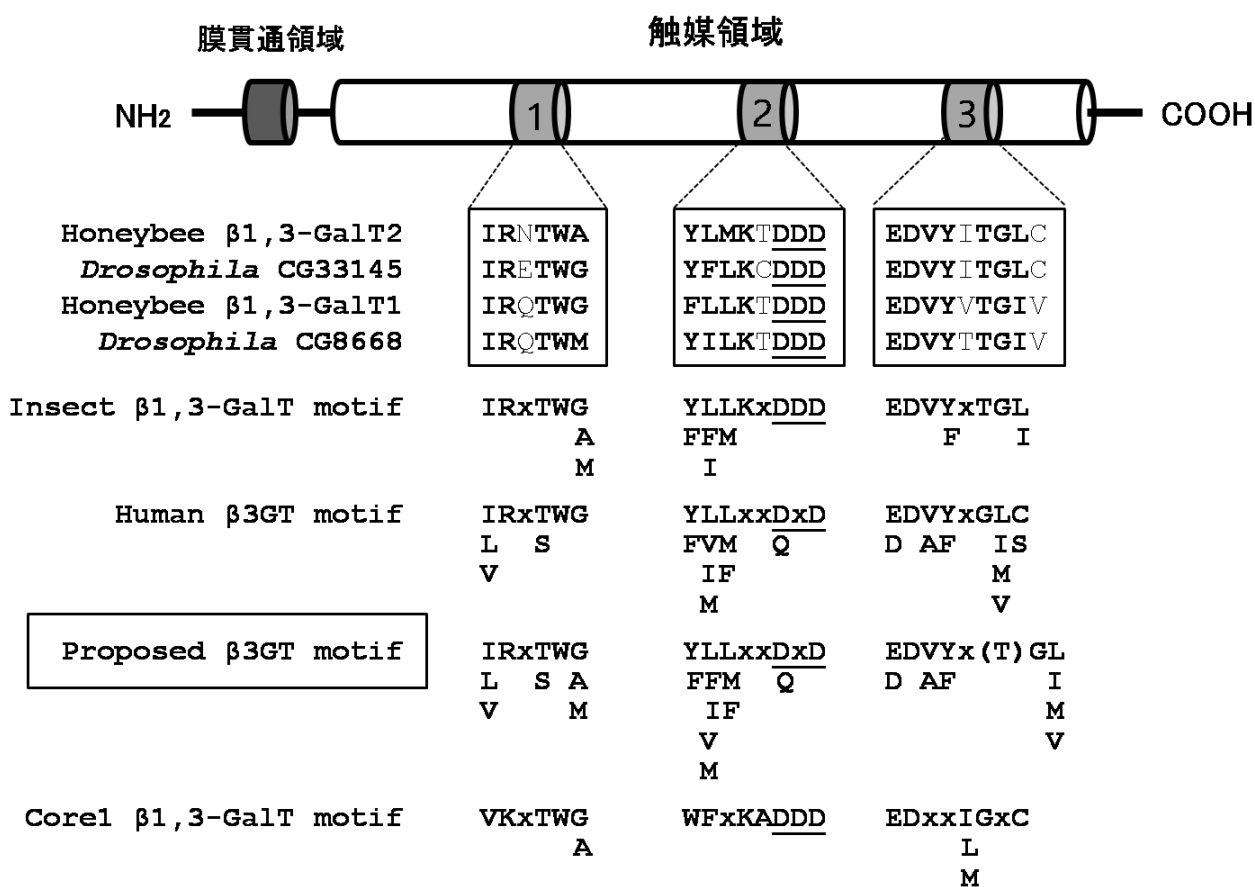


図 28: ヒトと昆虫の β 1,3-GalTs に見出された β 3GT モチーフ

ショウジョウバエ、ミツバチの β 1,3-GalTs に共通する3つのモチーフと、ヒトの β 3GT モチーフに共通する、種を超えて保存されている新たな β 3GT モチーフを提案する。下線のアミノ酸は二価陽イオンの配位結合部位を示す。

ヒトの β 1,3-GalTs のうち、h Core1 β 1,3-GalTs、h β 1,3-GalT4 は GalNAc に β 1-3 結合で Gal を転移するが GlcNAc には転移しない[105,118]。Core1 β 1,3-GalT は O-結合型糖鎖の T 抗原を合成し、h β 1,3-GalT4 は糖脂質であるガングリオシド(GD1b/GM1/GA1)に関連し、哺乳類 β 1,3-GalTs が N-結合型糖鎖に関連している知見は無い。ヒトの β 1,3-GalTs や Core1 β 1,3-GalTs のモチーフ 3 をミツバチの想定 β 1,3-GalTs の配列と比較すると 6 番目のポジションに Thr 残基の挿入が認められる。昆虫(ショウジョウバエとミツバチ)の β 3GT モチーフ 3 では 6 番目のポジションに Thr が挿入されており、この挿入により N-結合型糖鎖への β 1-3 活性を得ていると考えられる。この作業仮説を確認するためには、6 番目のポジションの Thr を欠いた変異 honeybee β 1,3-GalT で活性測定をする必要がある。また、h β 1,3-GalT4 がガングリオシドだけでなく、N-結合型糖鎖への転移をするかどうかの検討も必要である。

注目すべきことに、FLAG-honeybee β 1,3-GalT1、FLAG-honeybee β 1,3-GalT2 とアクセプター基質との長時間の酵素反応においても Gal2LacdiNAcM3 は産生されなかった。これは他の β 1,3-GalT によってもう片方の Gal が転移されている可能性や、最初に転移された Gal がフリーのオリゴ糖基質への立体障害となっている可能性がある。2 つ目の β 1-3 結合の Gal が何によって転移されているのか、メカニズムを明らかにするために、GalLacdiNAcM3 基質を用い、他の想定 β 1,3-GalT による活性測定が望まれる。

これまでの研究により、ロイヤルゼリーの糖タンパク質である MRJP1 の 28 番目の Asn に、T 抗原ユニットを持つ昆虫の複合型 N-結合型糖鎖の存在が報告されている[29-31]。ロイヤルゼリータンパク質の 1 つである MRJP1 は、ミツバチ脳キノコ体に存在するケニオン細胞に発現している[37]。細胞表面に局在するコアタンパク質に結合している様々な N-結合型糖鎖は細胞間の情報伝達や組織形成に重要な役割を担っていることが知られている[7]。したがって、T 抗原を有するミツバチ脳特異的 N-結合型糖鎖は脳組織の構成に関与している可能性があり、ミツバチ脳におけるこれらの糖鎖の発現操作は脳組織の発生に関わる洞察を与えてくれるかもしれない。また、MRJP1 は女王蜂への分化誘導に必要なロイヤラクチンとしても知られている。ロイヤラクチンは働きバチの下顎腺で分泌され、これを摂取した個体が女王となる[119]。MRJP1 は社会性を持つ昆虫であるミツバチにおいて、重要な生理活性物質であり、そこに存在する T 抗原を有する独特な N-結合型糖鎖もまたその活性に影響しているものと考えられる。

本研究において、昆虫の複合型 N-結合型糖鎖のプロセッシングに関与する、honeybee β 1,3-GalT1、honeybee β 1,3-GalT2 を見出したが、ミツバチ頭部における生理学的な機能は不明である。したがって、T 抗原ユニットを含む昆虫の複合型 N-結合型糖鎖の生理的な機能の解明に向け、honeybee β 1,3-GalT1、honeybee β 1,3-GalT2 の発現解析、発現部位の同定が次の段階として求められる。また、類似の複合型 N-結合型糖鎖が、マキガイ類 *Helix pomatia*(食用カタツムリ)[120]と *Lymnaea stagnalis*(ヨーロッパモノアラガイ)[121]のヘモシアニンに見い出されている。T 抗原ユニットの合成に関与する β 1,3-GalTs は無脊椎動物 N-結合型糖鎖のプロセッシング過程において一般的に機能しているかも知れない。これらの哺乳類にはない N-結合型糖鎖の生理機能にはあいまいな点が多い、脊椎動物の免疫システムに似たような免疫学的な活性が将来これらの独特な構造に見出されるかも知れない。

4.3. ヒト結腸直腸癌における PAPS 輸送体の発現と役割

結腸直腸癌細胞株において、*PAPST1* が *PAPST2* よりも数倍発現が高いことが示されたが、結腸直腸癌組織においては両者の差異はさほど見られなかった。免疫組織学的染色によって、*PAPST1* タンパク質

は癌性・非癌性の結腸直腸組織の上皮細胞で優位に発現していることが示された。なかでも PAPST1 タンパク質の発現は、癌部の上皮細胞では変化しない一方で、浸潤した癌細胞付近の線維芽細胞において顕著に発現上昇することが認められた。対照的に PAPST2 タンパク質は正常の結腸直腸組織の上皮細胞において強く発現しており、結腸直腸癌組織の上皮細胞ではわずかな発現しか認められなかった。結腸直腸癌細胞株で見られた PAPST1、PAPST2 発現量の大きな違いは、上皮性癌細胞での PAPST2 の発現減少によるものであると考えられる。

癌化の過程で、結腸直腸組織の硫酸化複合糖質の構成が変化することが複数の研究で報告されている。6-スルホシアリル Le^x [59]と 3-スルホ Le^a [55,122] エピトープは、悪性化していない結腸直腸組織において優位に発現し、悪性組織では発現しない。悪性形質転換における 6-スルホシアリル Le^x と ジシアリル Le^a の合成異常は、大腸癌におけるシアリル Le^x とシアリル Le^a の蓄積の原因となる[59,123,124]。大腸癌において、硫酸イオン輸送体遺伝子 *DTDST* の発現減少が、6-スルホシアリル Le^x の減少とシアリル Le^x の発現亢進を引き起こすことが報告された[125]。硫酸輸送体と PAPS 合成酵素は PAPS 合成に関連する。一方、PAPS 輸送体はゴルジ装置での硫酸化反応に必須である。これまでに、PAPS 輸送体の発現は大腸癌細胞の細胞内タンパク質の硫酸化において鍵となる因子であることが報告されている。加えて、いくつかの硫酸転移酵素が結腸直腸癌において発現レベルの変化と活性化を示すことも報告されている[126-129]。さらに、悪性化の過程に関与する硫酸化複合糖質と硫酸化因子の変化の同定は、癌における硫酸化の役割において価値ある知見をもたらすと考えられる。

PAPST 遺伝子の抑制は結腸直腸癌細胞の拡散とプロテオグリカンの硫酸化に影響を及ぼす。*PAPST1* の過剰発現は MDCK 細胞の細胞上部の経路における CS の硫酸化を増強するが、HS の硫酸化には影響しないという報告がある[130]。対照的に我々の結果は、DLD-1 細胞において *PAPST1* 遺伝子の抑制は HS と CS 両方の硫酸化の減少を引き起こすというものであった。CS の硫酸転移酵素は HS の硫酸転移酵素に比べて、PAPS に対し高い Km 値を示すことが知られている[131]。これは、HS の硫酸転移酵素は、結腸直腸癌細胞のゴルジ装置中の基質の量に影響を受けやすいことを示している。

PAPST 遺伝子のサイレンシングは DLD-1 細胞における FGF-2 シグナルを抑制した。HS と CS は共に FGF-2 に結合する[44,45,132]。細胞表面の HS は細胞表面の CS に比べて 3 倍ほどの量があるため、HS は DLD-1 細胞において FGF-2 シグナルにメインに働いていると考えられる。細胞表面の HS が正常の生育と発生に重要な役割を果たしていることは数多く報告されており、HS は FGF[44,45]、wingless/Wnt[46]、HB-EGF[133]、HGF[134]、VEGF[135,136]等、多くの GF シグナル伝達の制御に必要とされることはよく知られている。我々は以前に *PAPST* はショウジョウバエの正常な発生に必須であること[41,43,137] を報告しており、さらに、ショウジョウバエの *PAPST1* オルソログは wingless と hedgehog のシグナル経路に必要であること[42] が報告されている。CS および他の糖質の影響は考慮されるべきであるが、HS 硫酸化の変化は、結腸直腸癌の細胞増殖の重要な制御因子であるのかも知れない。また、ERK は癌細胞において活性化し、癌の増殖・転移に関わる遺伝子群の発現を亢進させることはよく知られている[138]。*PAPSTs* の発現低下は FGF-2 による ERK の活性化を抑制させたが、逆の *PAPSTs* の発現上昇は、ERK の活性を亢進するものと考えられる。*PAPST1* が癌細胞において高発現し、HS の硫酸化度が増加することにより ERK が活性化されると考えると、癌細胞近傍の線維芽細胞における *PAPST1* の強い発現は、*PAPST1* が HS 依存性シグナル伝達の制御を通して癌の増殖を補助し、腫瘍形成における間質線維化反応に働いていることを示唆している。

糖ヌクレオチド輸送体の発現は、癌や炎症の場合に変化することが報告されている。これらの報

告で、UDP-Gal 輸送体 (SLC35A2) の発現がヒト大腸ガンで増加し、T 抗原、シアリル Le^a、シアリル Le^x エピトープの合成に重要であることが示されている[52]。GDP-Fuc 輸送体 (SLC35C1) は、肝細胞癌において発現が上昇し、フコシル化の増加に寄与する[53]。加えて、シアリル Le^x 合成に関連する輸送体の発現レベルは、炎症依存性の刺激に協調して上昇する[51]。また、E-セレクトインリガンド合成に関与する *FUT7*、*STGal-1*、*SLC35A2* 遺伝子発現は低酸素状態での癌細胞において有意に誘発されることが報告されており、それらの研究により、低酸素誘導性の転写因子がこれらの遺伝子の発現を誘導し、内皮細胞に接着するセレクトイン仲介性の癌細胞において顕著に増加することを示している[139]。さらに、大腸癌細胞においてヒストン修飾を経たエピジェネティックなサイレンシングによって、硫酸イオン輸送体遺伝子 *DTDST* の転写が抑制されることが示されている[125]。これらの輸送体遺伝子の発現が癌や炎症において、どのように転写制御されているのか解明することは興味深い研究対象である。

いくつかの疾患の原因となる糖ヌクレオチド輸送体遺伝子の変異が同定されている[140-143]。GAG の合成に関して、CS の合成に関与する *SLC35D1* 遺伝子の変異は、重篤な骨系統疾患である Schneckbecken 異形成の原因であることが報告されている[143]。ウシの UDP-GlcNAc 輸送体 *SLC35A3* 遺伝子のミスセンス変異は複合脊椎形成不全症を引き起こす[144]。今のところ、PAPS 輸送体遺伝子の変異による疾患は報告されていない。しかしながら、*PAPST1* 変異を持つゼブラフィッシュが、遺伝性多発性外骨腫(良性腫瘍)のヒトの患者の症状に酷似している軟骨の形成不全を示すことを報告されている[145]。加えて、ショウジョウバエの変異体の解析により、発生における PAPS 輸送体の重要性 [41-43]、翅や複眼の形態形成における HS の硫酸化の重要性[110,146]を示した。後の我々の研究において、マウス *PAPST1*、*PAPST2* の両方が Wnt、BMP、FGF シグナル伝達を制御することにより、マウス ES 細胞の維持と分化に寄与すること[147]、HS の3位の硫酸化が Fas シグナルを刺激し、マウス ES 細胞の分化に関与すること[148]が明らかにされ、硫酸化の機能についてこのような結果は、癌細胞における PAPS 輸送体の機能に新たな情報を追加している。将来の遺伝子導入マウスやノックアウトマウスを用いた研究が、PAPS 輸送体の重要な役割の解明に役立つであろう。

4.4. 糖鎖アレイデータから抽出されたインフルエンザウイルス感染を増強する硫酸化糖鎖構造

α -closed frequent subtree法を実装する Glycan Minor Toolによるデータマイニングにより、糖鎖アレイデータの中から Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNA の硫酸化糖鎖構造を抽出し、細胞表面におけるこの硫酸化糖鎖構造がウイルス産生を増強させることを感染実験により証明した。バイオインフォマティクス、糖鎖生物学、ウイルス学の技術を集合させ、生物学的に関連した大きな成果を上げた。これは知り得る限り、初めての報告である。*in vivo* の実験で結果を得るために、パラメータの微細な調整が施されたバイオインフォマティクスのデータマイニング技術、細胞表面の糖鎖構造を適切に修飾する糖鎖生物学の専門的知識、過剰発現細胞による実験での適切な細胞とウイルスに関するウイルス学の専門的知識が提供された。その結果、*in vivo* の wet 実験による検証によって、*in silico* のデータマイニング結果の妥当性を示すことができた。さらに重要なことは、シアル酸糖鎖構造以外のウイルス感染に関与する新規の糖鎖構造 Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNA を実際に独立した実験系において再現したことである。この糖鎖構造にはシアル酸が含まれないが、増強されたウイルス感染へのシアル酸の関与の可能性は完全には否定しきれない。しかしながら、感染の変化は硫酸化の増加単独による影響であることを強く主張する。

4.5. ヒト H1N1 亜型インフルエンザウイルスの卵馴化に関する硫酸化糖鎖構造

発育鶏卵継代された 2009 年パンデミック株である HYG/2011 は、NeuAc α 2-6Gal を含む糖鎖に結合しないが、NeuAc α 2-3Gal を含む糖鎖に結合し、硫酸化とフコシル化はその結合を増強させることが固相結合解析で明らかとなった。類似の現象は卵馴化された Q226R のアミノ酸置換のある A/New York/18/2009 においても報告されている[87]。このアミノ酸置換は、NeuAc α 2-6Gal を含む糖鎖への親和性を完全に喪失させると同時に、NeuAc α 2-3Gal を含む糖鎖への幅広い結合親和性を獲得させ、野生型から NeuAc 結合形式の特異性を変換させる。HYG/2011 と野生型 (A/New York/18/2009) HA のアミノ酸配列を比較すると、8 アミノ酸の違いが見られた。そのうち 5 つの置換 (S146G, G158E, S188T, A200T, Q226R) はレセプター結合領域に存在している。Q226 は 2009 年パンデミック H1N1 亜型のレセプター結合領域においてレセプター分子の末端のシアル酸に結合する、H1N1 亜型ウイルスのレセプター特異性の決定に寄与するアミノ酸である[149,150]。Q226R のアミノ酸置換は HA 分子に追加の正電荷を付与し、負電荷を持つ硫酸化糖鎖と HYG/2011 HA との相互作用を増強することで、NeuAc α 2-6Gal から NeuAc α 2-3Gal への特異性の変化に寄与するのかも知れない。

季節性流行株である HKD/2002 は NeuAc α 2-6Gal を含む糖鎖に結合する。また、修飾のない NeuAc α 2-3Gal を含む糖鎖には結合しないのに対して、6-スルホシアリル Le^x と呼ばれる NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) (SO₃⁻-6) GlcNAc の修飾された NeuAc α 2-3Gal に強い結合性を示した。この結果は、A/New Caledonia/20/1999 と A/Brisbane/59/2007 の D190N 置換が NeuAc α 2-6Gal を含む糖鎖への結合親和性に加えて、親ウイルスと比べ NeuAc α 2-3Gal を含む糖鎖への幅広い結合親和性を獲得するというこれまでの知見[87]と部分的に合致する。HKD/2002 と A/New Caledonia/20/1999、A/Brisbane/59/2007 HA のレセプター結合部位付近のアミノ酸配列の比較により、8 アミノ酸の違い (E124G, T/N129N, K/E144K, K166M, V/A169V, D190N, R/K192R, R/K212R) を見出した。そのうち 5 つの置換 (S146G, G158E, S188T, A200T, Q226R) はレセプター結合領域に存在している。H1 亜型季節性流行株の D190 残基は NeuAc α 2-6Gal を含むレセプターの GlcNAc と相互作用することが報告されている[150]。HKD/2002 HA タンパク質の D190N 置換は負電荷を失っているため、この変異は NeuAc α 2-3Gal を含んでも、6-スルホシアリル Le^x の硫酸化糖鎖により強く相互作用するのかも知れない。

MDCK 細胞への *hGlcNAc6ST-1* の導入は HKD/2002 と HYG/2011 のウイルス産生を増強した。*hGlcNAc6ST-1* は *N*-結合型糖鎖と μ チン型糖鎖の Core2 構造の GlcNAc に硫酸基を転移し[151,152]、レセプター分子の GlcNAc の硫酸化によって発育鶏卵継代ヒト H1N1 亜型ウイルスの産生に関わる。硫酸エステルは pKa < 1、NeuAc は pKa < 2.6 付近であり、硫酸化は NeuAc よりも強い負電荷によって分子の性質を効果的に変化させ、細胞表面に負電荷をもたらす。質量分析法の感度が不十分であるため、現在、硫酸化糖鎖の構成の決定には制限がある。しかしながら、MDCK 細胞において、エキソグルコシダーゼ処理と脱硫酸化、MALDI-TOF-MS 解析を組み合わせた HPLC マッピングにより、SO₃⁻-3Gal β 1-4GlcNAc の硫酸化構造が見出されている[90]。MDCK 細胞には Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc β の構造は発現していないため、6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc 構造は持たないと推測される。GlcNAc の 6-O の位置に硫酸基を転移する[107] *hGlcNAc6ST-1* 発現細胞において、細胞表面の 6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc が産生されるかも知れないと考えた。実際に、*hGlcNAc6ST-1* 発現 MDCK 細胞において、Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc だけでなく、これらの受容基も検出した。鶏卵継代した HKD/2002 と HYG/2011 は、NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc よりも、6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (SO₃⁻-6) GlcNAc をウイルス感染のレセプターとして利用することが明らかとなった。

6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc は発育鶏卵の漿尿膜と羊膜に発現している。発育鶏卵における HKD/2002 と HYG/2011 の自然な増殖は、6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc をレセプターとして利用する疑似種が選択圧によって出現したことを示唆している。その他、2009年パンデミック H1N1 亜型ウイルスの HA の G158E アミノ酸置換は MDCK 細胞継代においても同定されている[153]。この置換は、2009年パンデミック H1N1 亜型ウイルスに感染した患者の肺の剖検試料から抽出したトータル RNA の *de novo* シークエンシングで取得された疑似種 HA 遺伝子においても見出されている[154]。HA の E158 アミノ酸置換体は HA 遺伝子座における核酸の不均一性のウイルス増殖の過程で選択されたものであると推測する。MDCK 細胞から派生したこれらの観測は *in vitro* での分離と増殖の過程におけるインフルエンザウイルスの適応の根底にある在り得べきメカニズムの例を示している。最近の研究と共に、6-スルホシアリル Le^x と NeuAc α 2-3Gal β 1-4(SO₃⁻-6)GlcNAc がヒト H1N1 亜型インフルエンザウイルスの発育鶏卵馴化を促進するカギとなるレセプターであることを明らかにした。

5. 結論

5.1. 糖鎖の生理機能と疾患

本博士論文では糖鎖の生理機能を、①「糖転移酵素活性と筋ジストロフィー表現型との相関」[1]、②「種固有の糖鎖構造と糖転移酵素の保存性」[2]、③「糖鎖の硫酸化と大腸癌の関連」[3]、④「情報科学と糖鎖生物学、ウイルス学の融合」[4]、⑤「ウイルス感染と発育鶏卵馴化に関連する硫酸化糖鎖構造」[5]の5つの観点から検討した。

① 「糖転移酵素活性と筋ジストロフィー表現型との相関」として、ショウジョウバエの *O*-Man 転移酵素、dPOMT1、dPOMT2 両方の RNAi 変異体が共通した「腹よじれ」という独特な表現型を示し、これが dPOMT1、dPOMT2 の POMT 活性と相関することを明らかにした。遺伝学的相互作用解析により、古くから知られる dPOMT1 変異体 *rt* の「腹よじれ」の表現型と、これら2つの RNAi 変異間に相互作用が示され、2つの遺伝子は同じ遺伝的カスケードで機能していることがわかった。また、生化学的解析により、dPOMTs がお互いに作用して *O*-Man 転移酵素として機能することを示し、「腹よじれ」の表現型を示す dPOMT1、dPOMT2 RNAi 変異体で見られる生体での POMT 活性の低下は、2つの酵素がヘテロで機能していることを明確に示した。これらの結果により、dPOMT1 と dPOMT2 の両方が機能的な POMT 活性に必要であり、*in vivo* での正常な筋発生に関与していることが明らかとなった。POMT 活性はヒトにおいても重要であり、*hPOMT1*、*hPOMT2* の変異が原因となる筋ジストロフィーを呈する重篤な疾患が報告されている。しかしながら、合成酵素の解析により、*O*-Man 型糖鎖構造はヒトとショウジョウバエで大きく異なることが予想された。POMT 活性による糖鎖構造は、ヒトとショウジョウバエという大きく種を超えた生物間で共通して筋発生に関与し、糖鎖そのものの生理活性物質としての機能を持つ。ヒトに比べて単純なショウジョウバエの *O*-Man 型糖鎖は、種を超えて保存されている *O*-Man 型糖鎖機能の本質を知るためのよいモデルとなることが明らかとなった。

② 「種固有の糖鎖構造と糖転移酵素の保存性」として、社会性を持つ昆虫であるミツバチの MRJP1 タンパク質に見出された、複合型 *N*-結合型糖鎖上の T 抗原構造を合成する β 1,3-GalTs に注目した。MRJP1 はロイヤルゼリータンパク質でミツバチ脳のキノコ体に存在するケニオン細胞に発現している。MRJP1 は女王蜂の分化に必須であり、T 抗原を有するミツバチ脳特異的 *N*-結合型糖鎖はこの機能に関連しているのかも知れない。ヒトには見られない、*N*-結合型糖鎖上の T 抗原構造を合成する β 1,3-GalTs をショウジョウバエ β 1,3-GalTs との相同性と発現パターンに基づいて、2つの新規ミツバチ β 1,3-GalT、honeybee β 1,3-GalT1、honeybee β 1,3-GalT2 をクローニングし、酵素活性を同定した。さらに、ヒト、ショウジョウバエ、ミツバチ β 1,3-GalTs の比較より、これまでに報告されている β 3GT モチーフを、昆虫をも含む拡張された β 3GT モチーフ、(I)(I/L/V) Rx(T/S)WG/A/M、(II)(Y/F)(L/F/I/V/M)(L/M/F)xx(D/Q)xD、(III)(E/D)D(V/A)(Y/F)x(T)GL/I/M/Vとして拡張し、種を超えて保存されている3つのモチーフ配列を提案した。種特異的な糖鎖構造の存在は糖鎖の多様性を示すものであり、一方でその構造を合成する糖転移酵素のモチーフは種を超えて保存されている。このことは、糖鎖の生理機能を俯瞰して考察する上で、興味深い。

③ 「糖鎖の硫酸化と大腸癌の関連」として、結腸直腸癌での PAPS 輸送体遺伝子の発現と、結腸直腸癌細胞のゴルジ装置特異的な硫酸化の特徴を調べた。結腸直腸癌組織では *PAPST1* が *PAPST2* より多く存在した。免疫組織学的染色では、*PAPST1* は浸潤した癌細胞近傍の線維芽細胞でより強く発現する一方で、*PAPST2* は上皮細胞で発現が減少していることが示された。ヒト結腸直腸癌細胞 DLD-1 細胞において、*PAPST1* と *PAPST2* を RNAi ノックダウンすると、HS などのタンパク質の硫酸化度と細胞増殖の減少が認められ、さらに FGF-2 刺激による ERK のリン酸化が抑制された。硫酸化という糖鎖への修飾が、癌の増悪に機能

する生理活性を有することを、結腸直腸癌において示した。PAPST1が癌細胞において高発現し、特に間質線維化反応による線維芽細胞において強く発現していることは、PAPST1によるHSの硫酸化度の増加がERKの活性化につながり、癌の浸潤・転移に関与することを示唆している。これらの結果により、PAPS 輸送体は、硫酸化度の制御によって、結腸直腸癌細胞自身の増生と、癌の浸潤で見られる間質線維化反応に関与することを強く示した。

④ 「情報科学と糖鎖生物学、ウイルス学の融合」として、インフルエンザウイルスの感染に関するシアル酸以外の新規の糖鎖構造を見出すために、データマイニングの技術を用いて糖鎖アレイデータを解析した。マイニングの結果、これまでに報告されているシアル酸構造に加えて、硫酸化構造が抽出された。Wetでの検証のために、抽出された硫酸化構造の合成に関与する硫酸転移酵素 *hGlcNAc6ST-1* を過剰発現させ、感染の変化を評価する感染実験を行った結果、70倍のウイルス産生の増加を認めた。この結果は、*in silico* のデータマイニング結果の妥当性を *in vivo* の wet 実験により検証しただけでなく、シアル酸糖鎖以外のウイルス感染に関与する新規な硫酸化糖鎖構造 $\text{Gal}\beta\text{1-4}(\text{SO}_3^-6)\text{GlcNAc}$ を見出したというウイルス学的な意義も持つものである。

⑤ 「ウイルス感染と発育鶏卵馴化に関連する硫酸化糖鎖構造」として、④のバイオインフォマティクスの研究を発展させ、継代されたヒト H1N1 亜型インフルエンザウイルスの増殖に寄与するレセプター構造を解析した。解析には、卵馴化変異を有し、 $\text{NeuAc}\alpha\text{2-3Gal}$ を含む硫酸化糖鎖に高い結合を示す季節性流行株および2009年パンデミック株を用い、ウイルス感染実験をさらに仔細に検討した結果、*hGlcNAc6ST-1* 過剰発現 MDCK 細胞において、感染性を有するウイルスの産生が増加することを示した。さらに、マイニングにより抽出された硫酸化構造 $\text{Gal}\beta\text{1-4}(\text{SO}_3^-6)\text{GlcNAc}$ は、発育鶏卵の漿尿膜と羊膜に発現していること、6-スルホシアリル Le^x と $\text{NeuAc}\alpha\text{2-3Gal}\beta\text{1-4}(\text{SO}_3^-6)\text{GlcNAc}$ が発育鶏卵内におけるヒト H1N1 亜型ウイルスの効率的な産生に関与していることを明らかにした。④のデータマイニングにより得られた知見をさらに発展させ、ウイルスの発育鶏卵馴化というメカニズムが不明な現象に対して考察した。これらの結果は、6-スルホシアリル Le^x と $\text{NeuAc}\alpha\text{2-3Gal}\beta\text{1-4}(\text{SO}_3^-6)$ の硫酸化 GlcNAc 構造が発育鶏卵におけるヒト H1N1 亜型ウイルスの産生の扶助として機能していることを示し、発育鶏卵馴化を促進するカギとなるレセプターであることを明らかにした。

5.2.最後に

本博士論文では5つの論文[1-5]により、ショウジョウバエ、ミツバチの昆虫、ヒト、ウイルスと種を超えた糖鎖の機能を、筋ジストロフィー、結腸直腸癌、ウイルス感染の疾患との関連と共に論じた。それぞれの論文では、糖転移酵素が作り出す糖鎖構造の生理機能、糖転移酵素そのものの機能と保存性、硫酸化による糖鎖修飾の生理機能、情報科学と糖鎖生物学とウイルス学の融合、発育鶏卵馴化に関わる糖鎖構造について言及している。

多様な糖と糖転移酵素、および硫酸転移酵素により合成される不均一で複雑な糖鎖構造は、細胞表面に負電荷の立体的な位置、強さ、量の細密な差を生み出す。この多様な負電荷により様々な相互作用が制御され、生物の基本単位である細胞や、組織、器官、ひいては生物個体の生命活動に反映されると考えると、糖鎖の生理機能への理解が図れるであろう。これらの研究が、糖鎖に対する理解を深め、複雑かつ巧妙に制御される生命現象を知る一助となることを願うものである。

6. 謝辞

本博士論文に係る研究は、創価大学大学院 工学研究科 生命情報工学専攻(現: 理工学研究科 生命理学専攻)の西原祥子教授の指導、監修のもと行いました。2003年にCRESTの技術員として西原先生の研究室で働き始め、2018年に退職するまでの15年間、「技術員/研究補佐員」という立場ではあったものの、西原研に在籍していた他のポスドク達と同様に、共同研究・科研費取得・学会発表・論文発表など、ありとあらゆる経験をさせて頂きました。最後の大トリがこの博士論文になります。「感謝します」という言葉には収まり切れませんが、本当に心から感謝しております。「研究」を推進することに対する、西原先生の意欲にただただ感服し、尊敬しております。くれぐれも資本となるお身体にだけはご留意していただき、今後も研究にご活躍なさって下さい。

また、副査を務めて頂きました、創価大学大学院 理工学研究科 生命理学専攻 高瀬明教授、創価大学大学院 理工学研究科 生命理学専攻 梶谷内晶教授には学位論文の査読と、論文への助言を頂きました。心より御礼申し上げます。

加えて、共同研究でお世話になった先生方に心より御礼申し上げます。特にご指導いただいた、各先生方に感謝申し上げます。POMTsの研究では、東京都健康長寿医療センター研究所 遠藤玉夫シニアフェロー、東京都健康長寿医療センター研究所 萬谷博研究副部長、国立遺伝学研究所 上田龍名誉教授にご指導いただきました。ミツバチ GalT の研究では、岡山大学大学院 環境生命科学学域 木村吉伸教授にご指導いただきました。PAPSTの研究では、千葉大学 大学院医学研究院 池原譲教授にご指導いただきました。バイオインフォマティクスの研究では、創価大学大学院 理工学研究科 生命理学専攻 木下フローラ聖子教授に、インフルエンザウイルスの研究では、創価大学大学院 理工学研究科 生命理学専攻 高瀬明教授にご指導いただきました。また、インフルエンザウイルスの感染実験を行う際にご指導いただいた、北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 喜田宏特別招聘教授、北海道大学 獣医学研究院 迫田義博教授、お世話いただいた北海道大学 獣医学部 岡松正敏先生はじめ微生物学教室の皆様感謝申し上げます。特に、高瀬先生には研究室を越えて、多大なお心配りとご指導をいただきました。厚く御礼申し上げます。さらに、PAPSTの論文の共筆頭著者である新潟県立大学 人間生活学部 健康栄養学科 神山伸教授、及び共著者の先生方に深く感謝いたします。

西原研に所属する前の4年間にお世話になりました、創価大学 生命科学研究科 神経化学部門 栗原正教授、服部和枝講師、創価大学大学院 理工学研究科 生命理学専攻 中嶋一行教授、加えて、数々のご指導をいただいた鹿児島大学 理工学研究科 隅田泰生特任教授はじめ、本研究以外の研究においても多くの先生方にご指導をいただきました。心より感謝申し上げます。最後に、西原研究室の歴代のポスドク・学生の方々、その他研究に関わったの方々、家族も加えた全ての関係者に感謝し、心より御礼申し上げます。本当にありがとうございました。

7. 参考文献

- 1 Ichimiya T, Manya H, Ohmae Y, Yoshida H, Takahashi K, Ueda R, Endo T and Nishihara S. The twisted abdomen phenotype of *Drosophila POMT1* and *POMT2* mutants coincides with their heterophilic protein *O*-mannosyltransferase activity. *J Biol Chem.* 2004;279:42638–42647.
- 2 Ichimiya T, Maeda M, Sakamura S, Kanazawa M, Nishihara S and Kimura Y. Identification of β 1,3-galactosyltransferases responsible for biosynthesis of insect complex-type *N*-glycans containing a T-antigen unit in the honeybee. *Glycoconj J.* 2015;32:141–151.
- 3 Kamiyama S, Ichimiya T, Ikehara Y, Takase T, Fujimoto I, Suda T, Nakamori S, Nakamura M, Nakayama F, Irimura T, Nakanishi H, Watanabe M, Narimatsu H and Nishihara S. Expression and the role of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters in human colorectal carcinoma. *Glycobiology.* 2011;21:235–246.
- 4 Ichimiya T, Nishihara S, Takase-Yoden S, Kida H and Aoki-Kinoshita K. Frequent glycan structure mining of influenza virus data revealed a sulfated glycan motif that increased viral infection. *Bioinformatics.* 2014.;30:706–711.
- 5 Ichimiya T, Okamoto M, Kinoshita T, Kobayashi D, Ichii O, Yamamoto N, Sakoda Y, Kida H, Kawashima H, Yamamoto K, Takase-Yoden S and Nishihara S. Sulfated glycans containing NeuAc α 2–3Gal facilitate the propagation of human H1N1 influenza A viruses in eggs. *Virology.* 2021;562:29–39.
- 6 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K and Walter P. Molecular Biology of the Cell, 6th edition. Garland Science (NY). 2015.
- 7 Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL and Seeberger PH. Essentials of Glycobiology, 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY). 2017.
- 8 Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y and Angata T. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes. Springer Japan. 2014.
- 9 Endo T. *O*-mannosyl glycans in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1473:237–246
- 10 Ecker M, Mersa V, Hagen I, Deutzmann R, Strahl S and Tanner W. *O*-mannosylation precedes and potentially controls the *N*-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep.* 2003;4:628–632.
- 11 Lommel M, Bagnat M and Strahl S. Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae O*-mannosylation mutants. *Mol Cell Biol.* 2004;24:46–57.
- 12 Bourdineaud JP, van der Vaart JM, Donzeau M, de Sampaio G, Verrips CT and Lauquin GJ. Pmt1 mannosyl transferase is involved in cell wall incorporation of several proteins in *Saccharomyces cerevisiae.* *Mol Microbiol.* 1998;27:85–98.
- 13 Harty C, Strahl S and Romisch K. *O*-mannosylation protects mutant alpha-factor precursor from endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Biol Cell.* 2001;12:1093–1101.
- 14 Sanders SL, Gentzsch M, Tanner W and Herskowitz I. *O*-Glycosylation of Axl2/Bud10p by Pmt4p is required for its stability localization and function in daughter cells. *J Cell Biol.* 1999;145:1177–1188.
- 15 Zakrzewska A, Migdalski A, Saloheimo M, Penttila ME, Palamarczyk G and Kruszewska JS. cDNA

- encoding protein *O*-mannosyltransferase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*; functional equivalence to *Saccharomyces cerevisiae* *PMT2*. *Curr Genet.* 2003;43:11–16.
- 16 Girrbach V and Strahl S. Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein *O*-mannosyl-transferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem.* 2003;278:12554–12562.
 - 17 Girrbach V, Zeller T, Priesmeier M and Strahl-Bolsinger S. Structure–function analysis of the dolichyl phosphate–mannose: protein *O*-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem.* 2000;275:19288–19296.
 - 18 Lussier M, Gentsch M, Sdicu AM, Bussey H. and Tanner W. Protein *O*-glycosylation in yeast. The *PMT2* gene specifies a second protein *O*-mannosyltransferase that functions in addition to the *PMT1*-encoded activity. *J Biol Chem.* 1995;270:2770–2775.
 - 19 Martin-Blanco E and Garcia-Bellido A. Mutations in the *rotated abdomen* locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:6048–6052.
 - 20 Willer T, Amselgruber W, Deutzmann R and Strahl S. Characterization of POMT2 a novel member of the *PMT* protein *O*-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology* 2002;12:771–783.
 - 21 Beltran-Valero de Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki AE, Cruces J, Voit T, Walsh CA, van Bokhoven H and Brunner HG. Mutations in the *O*-mannosyltransferase gene *POMT1* give rise to the severe neuronal migration disorder Walker–Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* 2002;71:1033–1043.
 - 22 Endo T. Mammalian *O*-mannosyl glycans: Biochemistry and glycopathology. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* 2019;95:39–51.
 - 23 Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Shimizu T, Kusunoki S, Kanazawa I, Kobata A and Endo T. Structures of sialylated *O*-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve α -dystroglycan. The role of a novel *O*-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of α -dystroglycan with laminin. *J Biol Chem* 1997;272:2156–2162.
 - 24 Manya H, Chiba A, Yoshida A, Wang X, Chiba Y, Jigami Y, Margolis RU and Endo T. Demonstration of mammalian protein *O*-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:500–505.
 - 25 Vajsar J and Schachter H. Walker–Warburg Syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:29.
 - 26 Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T and Endo T. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase POMGnT1. *Dev Cell* 2001;1:717–724.
 - 27 Manya H, Sakai K, Kobayashi K, Taniguchi K, Kawakita M, Toda T and Endo T. Loss-of-function of an *N*-acetylglucosaminyltransferase POMGnT1 in muscle–eye–brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:93–97.

- 28 Bridges CD and Morgan T. The Third Chromosome Group of Mutant Characters of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institute of Washington Washington DC. 1923;1–251.
- 29 Kimura Y, Ushijima T, Maeda M, Hama Y, Kimura M, Okihara K, Sugimoto H and Yamada H. Tumor antigen occurs in *N*-glycan of royal jelly glycoproteins honeybee cells synthesize T-antigen unit in *N*-glycan moiety. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70:2583–2587.
- 30 Kimura Y, Sakamura S, Ushijima T, Hama Y, Kajiura H, Fujiyama K, Okihara K, Sugimoto H and Yamada H. Evidence for new β 1–3 galactosyltransferase activity involved in biosynthesis of unusual *N*-glycan harboring T-antigen in *Apis mellifera*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71:1111–1114.
- 31 Kimura Y, Nagai H, Miyamoto M, Kimura M and Yonekura M. Identification of a royal jelly glycoprotein that carries unique complex-type *N*-glycans harboring the T-antigen (Gal β 1–3GalNAc) unit. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010;74:2148–2150.
- 32 Ju T, Brewer K, D' Souza A, Cummings RD and Canfield WM. Cloning and expression of human core β 13-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 2002;277:178–186.
- 33 Kudo T, Iwai T, Kubota T, Takayama Y, Hiruma T, Inaba N, Zhang Y, Gotoh M, Togayachi A and Narimatsu H. Molecular cloning and characterization of a novel UDP-Gal : GalNAc α peptide β 1,3-galactosyltransferase (C1Gal-T2) an enzyme synthesizing a core 1 structure of *O*-glycan. *J Biol Chem* 2002;277:47724–47731.
- 34 Ju T, Zheng Q and Cummings RD. Identification of core 1 *O*-glycan T-synthase from *Caenorhabditis elegans*. *Glycobiology* 2006;16:947–958.
- 35 Müller R, Hülsmeier AJ, Altman F, Hagen KT, Tiemeyer M and Hennet T. Characterization of mucin-type core-1 β 1–3 galactosyltransferase homologous enzyme *Drosophila melanogaster*. *FEBS J* 2005;272:4295–4305.
- 36 Yoshida H, Fuwa TJ, Arima M, Hamamoto H, Sasaki N, Ichimiya T, Osawa K, Ueda R and Nishihara S. Identification of the *Drosophila* core 1 β 1,3-galactosyltransferase gene that synthesizes T antigen in the embryonic central nervous system and hemocytes. *Glycobiology* 2008;18:1094–1104.
- 37 Kucharski R, Malwszka R, Hayward DC and Ball EE. A royal jelly protein is expressed in the subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. *Naturwissenschaften* 1998;85:343–346.
- 38 Schmitzová J, Klauđiny J, Albert S, Schröder W, Hanes J, Júdová J and Simúth J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:1020–1030.
- 39 Mitsuoka C, Sawada-Kasugai M, Ando-Furui K, Izawa M, Nakanishi H, Nakamura S, Ishida H, Kiso M and Kannagi R. Identification of a major carbohydrate capping group of the L-selectin ligand on high endothelial venules in human lymph nodes as 6-sulfo sialyl Lewis X. *J Biol Chem*. 1998;273:11225–11233.
- 40 Kamiyama S, Suda T, Ueda R, Suzuki M, Okubo R, Kikuchi N, Chiba Y, Goto S, Toyoda H, Saigo K, Watanabe M, Narimatsu H, Jigami Y and Nishihara S. Molecular cloning and identification of 3' -phosphoadenosine 5' -phosphosulfate transporter. *J Biol Chem*. 2003;278:25958–25963.
- 41 Kamiyama S, Sasaki N, Goda E, Ui-Tei K, Saigo K, Narimatsu H, Jigami Y, Kannagi R, Irimura T and Nishihara S. Molecular cloning and characterization of a novel 3' -phosphoadenosine

- 5'-phosphosulfate transporter PAPST2. *J Biol Chem.* 2006;281:10945–10953.
- 42 Lüders F, Segawa H, Stein D, Selva EM, Perrimon N, Turco SJ and Häcker U. *Slalom* encodes an adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate transporter essential for development in *Drosophila*. *EMBO J.* 2003;22:3635–3644.
- 43 Goda E, Kamiyama S, Uno T, Yoshida H, Ueyama M, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Ueda R and Nishihara S. Identification and characterization of a novel *Drosophila* 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter. *J Biol Chem.* 2006;281:28508–28517.
- 44 Rapraeger AC, Krufka A and Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science.* 1991;252:1705–1708.
- 45 Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P and Ornitz DM. Cell surface heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991; 64:841–848.
- 46 Reichsman F, Smith L and Cumberledge S. Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol.* 1996;135:819–827.
- 47 Lin X, Buff EM, Perrimon N and Michelson AM. 1999. Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development.* 126:3715–3723.
- 48 Lin X and Perrimon N. Dally cooperates with *Drosophila* Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature.* 1999;400:281–284.
- 49 Kamimura K, Fujise M, Villa F Izumi S, Habuchi H, Kimata K and Nakato H. *Drosophila* heparan sulfate 6-O-sulfotransferase (*dHS6ST*) gene. Structure expression and function in the formation of the tracheal system. *J Biol Chem.* 2001;276:17014–17021.
- 50 Kamimura K, Koyama T, Habuchi H, Ueda R, Masu M, Kimata K and Nakato H. Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in *Drosophila* FGF signaling. *J Cell Biol.* 2006; 174:773–778.
- 51 Huopaniemi L, Kolmer M, Niittymäki J, Pelto-Huikko M and Renkonen R. Inflammation-induced transcriptional regulation of Golgi transporters required for the synthesis of sulfo sLex glycan epitopes. *Glycobiology.* 2004;14:1285–1294.
- 52 Kumamoto K, Goto Y, Sekikawa K, Takenoshita S, Ishida N, Kawakita M and Kannagi R. Increased expression of UDP-galactose transporter messenger RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants. *Cancer Res.* 2001;61:4620–4627.
- 53 Moriwaki K, Noda K, Nakagawa T, Asahi M, Yoshihara H, Taniguchi N, Hayashi N and Miyoshi E. A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation. *Glycobiology.* 2007;17:1311–1320.
- 54 Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, Kabuto T, Iwanaga T, Matsushita Y and Irimura T. Increased expression of sialyl Lewis x antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: Clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.* 1993;53:3632–3637.
- 55 Matsushita Y, Yamamoto N, Shirahama H, Tanaka S, Yonezawa S, Yamori T, Irimura T and Sato E. Expression of sulfomucins in normal mucosae colorectal adenocarcinomas and metastases. *Jpn J*

- Cancer Res.* 1995;86:1060–1067.
- 56 Nakayama T, Watanabe M, Katsumata T, Teramoto T and Kitajima M. Expression of sialyl Lewis(a) as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer.* 1995;75:2051–2056.
- 57 Yamori T, Ota DM, Cleary KR, Hoff S, Hager LG and Irimura T. Monoclonal antibody against human colonic sulfomucin: Immunochemical detection of its binding sites in colonic mucosa colorectal primary carcinoma and metastases. *Cancer Res.* 1989;49:887–894.
- 58 Irimura T, Wynn DM, Hager LG, Cleary KR and Ota DM. Human colonic sulfomucin identified by a specific monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1991;51:5728–5735.
- 59 Izawa M, Kumamoto K, Mitsuoka C, Kanamori C, Kanamori A, Ohmori K, Ishida H, Nakamura S, Kurata-Miura K, Sasaki K et al. Expression of sialyl 6-sulfo Lewis X is inversely correlated with conventional sialyl Lewis X expression in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 2000;60:1410–1416.
- 60 Tsuji H, Hong JC, Kim YS, Ikehara Y, Narimatsu H and Irimura T. Novel carbohydrate specificity of monoclonal antibody 91.9H prepared against human colonic sulfomucin: Recognition of sulfo-Lewis(a) structure. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:374–381.
- 61 Seko A, Nagata K, Yonezawa S and Yamashita K. Down-regulation of Gal 3-O-sulfotransferase-2 (Gal3ST-2) expression in human colonic nonmucinous adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 2002;93:507–515.
- 62 Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, Palese P, Shaw ML, Treanor J, Webster RG and García-Sastre. Influenza. *A.Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):3.
- 63 Wright,P.F. et al. In: Knipe,D.M. and Howley,P.M. (eds). *Fields Virology.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2006:1691–1740.
- 64 Claas EC, Osterhaus AD, Beek R, Jong JCD, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF and Webster RG. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet.* 1998;35:472–477.
- 65 Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K and Cox N. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science.* 1998;279:393–396.
- 66 Luo M. Influenza virus entry. *Adv Exp Med Biol.* 2012;726:201–21.
- 67 Akhtar J and Shukla, D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 2009;276:7228–7276.
- 68 Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG and Paulson JC. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology.* 1994;205:17–23.
- 69 Couceiro JN, Paulson JC and Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res.* 1993;29:155–165.
- 70 Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG and Kawaoka Y. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 1998;72:7367–7373.

- 71 Gambaryan AS, Tuzikov AB, Bovin NV, Yamnikova SS, Lvov DK, Webster RG and Matrosovich MN. Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken and receptor specificity of the 1997 H5N1 chicken and human influenza viruses from Hong Kong. *Avian Dis.* 2003;47:1154–1160.
- 72 Gambaryan AS, Tuzikov AB, Pazynina GV, Webster RG, Matrosovich MN and Bovin NV. H5N1 chicken influenza viruses display a high binding affinity for Neu5Acalpha2–3Galbeta1–4(6–HSO3) GlcNAc–containing receptors. *Virology.* 2004;326:310–316.
- 73 Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish and Klimov A. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology.* 2006;344:432–438.
- 74 Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC and Wilson IA. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J. Mol. Biol.* 2006;355:1143–1155.
- 75 Gambaryan AS, Tuzikov AB, Pazynina G, Desheva JA, Bovin NV, Matrosovich MN and Klimov AI. 6–sulfo sialyl Lewis X is the common receptor determinant recognized by H5, H6, H7 and H9 influenza viruses of terrestrial poultry. *Viol J.* 2008;5:85.
- 76 Hashimoto K, Takigawa I, Shiga M, Kanehisa M and Mamisuka H. Mining significant tree patterns in carbohydrate sugar chains. *Bioinformatics.* 2008;24:i167–i173.
- 77 Akune Y, Hosoda M, Kaiya S, Shinmachi D and Aoki–Kinoshita KF. The RINGS resource for glycome informatics analysis and data mining on the Web. *OMICS.* 2010;14:475–486.
- 78 Aoki–Kinoshita KF. Mining frequent subtrees in glycan data using the rings glycan miner tool. *Methods Mol. Biol.* 2013;939:87–95.
- 79 Blixt O, Head S, Mondala T, Scanlan C, Huflejt ME, Alvarez R, Bryan MC, Fazio F, Calarese D, Stevens J, Raz Ni, Stevens DJ, Skehel JJ, Die I, Burton DR, Wilson IA, Cummings R, Bovin N, Wong CH and Paulson JC. Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101:17033–17038.
- 80 Aytay S and Schulze IT. Single amino acid substitutions in the hemagglutinin can alter the host range and receptor binding properties of H1 strains of influenza A virus. *J. Virol.* 1991;65:3022–3028.
- 81 Gambaryan AS, Robertson JS and Matrosovich MN. Effects of egg–adaptation on the receptor–binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology.* 1999;258:232–239.
- 82 Katz JM, Wang, M and Webster RG. Direct sequencing of the HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell–grown virus. *J. Virol.* 1990;64:808–811.
- 83 Robertson JS, Bootman JS, Newman R, Oxford JS, Daniels RS, Webster RG and Schild GC. Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A (H1N1) virus. *Virology.* 1987;160:31–37.
- 84 Rocha EP, Xu X, Hall HE, Allen JR, Regnery HL and Cox NJ. Comparison of 10 influenza A (H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell– and egg–grown viruses. *J. Gen. Virol.* 1993;74:13–18.

- 85 Ito T, Suzuki Y, Takada A, Kawamoto A, Otsuki K, Masuda H, Yamada M, Suzuki T, Kida H and Kawaoka Y. Differences in sialic acid–galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J. Virol.* 1997;71:3357–3362.
- 86 Sriwilaijaroen N, Kondo S, Yagi H, Wilairat P, Hiramatsu H, Ito M, Ito Y, Kato K and Suzuki Y. Analysis of *N*-glycans in embryonated chicken egg chorioallantoic and amniotic cells responsible for binding and adaptation of human and avian influenza viruses. *Glycoconj. J.* 2009; 226:433–443.
- 87 Chen LM, Rivaller P, Hossain J, Carney P, Balish A, Perry I, Davis CT, Garten R, Shu B, Xu X, Klimov A, Paulson JC, Cox NJ, Swenson S, Stevens J, Vincent A, Gramer M and Donis RO. Receptor specificity of subtype H1 influenza A viruses isolated from swine and humans in the United States. *Virology.* 2011;412:401–410.
- 88 Gao C, Hanes MS, Byrd–Leotis LA, Wei M, Jia N, Kardish RJ, McKittrick TR, Steinhauer DA and Cummings RD. Unique binding specificities of proteins toward isomeric asparagine–linked glycans. *Cell Chem. Biol.* 2019;26: 535–547.
- 89 Byrd–Leotis L, Jia N, Dutta S, Trost JF, Gao C, Cummings SF, Braulke T, Müller–Loennies S, Heimbürg–Molinaro J, Steinhauer DA and Cummings RD. Influenza binds phosphorylated glycans from human lung. *Sci. Adv.* 2019;5:eaav2554.
- 90 Yagi H, Watanabe S, Suzuki T, Takahashi T, Suzuki Y and Kato K. Comparative analyses of *N*-glycosylation profiles of influenza A viruses grown in different host cells. *Open Glycosci.* 2012;5:2–12.
- 91 Takahashi S, Sasaki T, Many H, Chiba Y, Yoshida A, Mizuno M, Ishida H, Ito F, Inazu T, Kotani N, Takasaki S, Takeuchi M and Endo T. A new β -12-*N*-acetylglucosaminyltransferase that may play a role in the biosynthesis of mammalian *O*-mannosyl glycans. *Glycobiology* 2001;11:37–45.
- 92 Aoki–Kinoshita KF. Chapman & Hall/CRC Mathematical and Computational Biology Series. In: *Glycome Informatics: Methods and Applications*. CRC Press, Boca Raton. 2010.
- 93 Yeh JC, Hiraoka N, Petryniak B, Nakayama J, Ellies LG, Rabuka D, Hindsgaul O, Marth JD, Lowe JB and Fukuda M. Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a Core1 extension beta 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase. *Cell.* 2001;105:957–969.
- 94 Kaku H, Kaneko H, Minamihara N, Iwata K, Jordan ET, Rojo MA, Minami–Ishii N, Minami E, Hisajima S and Shibuya N. Elderberry bark lectins evolved to recognize NeuAc alpha2,6Gal/GalNAc sequence from a Gal/GalNAc binding lectin through the substitution of amino–acid residues critical for the binding to sialic acid. *J. Biochem.* 2007;142:393–401.
- 95 Geisler C, and Jarvis DL. Effective glycoanalysis with Maackia amurensis lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology.* 2011;21:988–993.
- 96 Yamamoto K, Ito S, Yasukawa F, Konami Y and Matsumoto N. Measurement of the carbohydrate–binding specificity of lectins by a multiplexed bead–based flow cytometric assay. *Anal. Biochem.* 2005;336:28–38.
- 97 Hirakawa J, Tsuboi K, Sato K, Kobayashi M, Watanabe S, Takakura A, Imai Y, Ito Y, Fukuda M and Kawashima H. Novel anti–carbohydrate antibodies reveal the cooperative function of sulfated *N*- and *O*-glycans in lymphocyte homing. *J. Biol. Chem.* 2010;285:40864–40878.

- 98 Hiono T, Okamatsu M, Nishihara S, Takase-Yoden S, Sakoda Y and Kida H. A chicken influenza virus recognizes fucosylated α 2,3 sialoglycan receptors on the epithelial cells lining upper respiratory tracts of chickens. *Virology*. 2014;456-457:131-138.
- 99 Shichinohe S, Okamatsu M, Sakoda, Y and Kida H. Selection of H3 avian influenza viruses with SA α 2,6Gal receptor specificity in pigs. *Virology*. 2013;444:404-408.
- 100 Endo T and Toda T. Glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Biol Pharm Bull* 2003;26:1641-1647.
- 101 Sarkar M and Schachter H. Cloning and expression of *Drosophila melanogaster* UDP-GlcNAc: α -3-D-mannoside β 12-N-acetylglucosaminyltransferase I. *Biol Chem* 2001;382:209-217.
- 102 Tsitilou SG and Grammenoudi S. Evidence for alternative splicing and developmental regulation of the *Drosophila melanogaster* *Mgat2* (N-acetylglucosaminyltransferase II) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:1372-1376.
- 103 Kolbinger F, Streiff MB and Katopodis A.G. Cloning of a human UDP-galactose:2-acetamido-2-deoxy-D-glucose 3 β -galactosyltransferase catalyzing the formation of type 1 chains. *J Biol Chem* 1998;273:433-440.
- 104 Amado M, Almeida R, Carneiro F, Lavery SB, Holmes EH, Nomoto M, Hollingsworth MA, Hassan H, Schwientek T, Nielsen PA, Bennett EP and Clausen H. A family of human β 3-galactosyltransferases. Characterization of four members of a UDP-galactose: β -N-acetyl-glucosamine/ β -N-acetyl-galactosamine β -13-galactosyltransferase family. *J Biol Chem* 1998;273:12770-12778.
- 105 Togayachi A, Kozono Y, Kuno A, Ohkura T, Sato T, Hirabayashi J, Ikehara Y and Narimatsu H. β 3GnT2 (B3GNT2) a major polyactosamine synthase: analysis of B3GNT2-deficient mice. *Methods Enzymol* 2010;479:185-204.
- 106 Tsuji H, Hayashi M, Wynn DM and Irimura T. Expression of mucin-associated sulfo-Le^a carbohydrate epitopes on human colon carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res*. 1998; 89:1267-1275.
- 107 Uchimura K and Rosen SD. Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. *Trends Immunol*. 2006;27:559-565.
- 108 Fukushima K, Hirota M, Terasaki PI, Wakisaka A, Togashi H, Chia D, Suyama N, Fukushi Y, Nudelman E and Hakomori S. Characterization of sialosylated Lewisx as a new tumor-associated antigen. *Canc. Res*. 1984;44:5279-5285.
- 109 Matsumura R, Hirakawa J, Sato K, Ikeda T, Nagai M, Fukuda M, Imai Y and Kawashima H. Novel antibodies reactive with sialyl Lewis X in both humans and mice define its critical role in leukocyte trafficking and contact hypersensitivity responses. *J. Biol. Chem*. 2015;290:15313-15326.
- 110 Takemae H, Ueda R, Okubo R, Nakato H, Izumi S, Saigo K and Nishihara S. Proteoglycan UDP-galactose: β -xylose β 14-galactosyltransferase I is essential for viability in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 2003;278:15571-15578.
- 111 Demerec M, Kaufmann B, P, Fano U, Sutton E and Sansome E. R. *The gene*. Year book 41 Carnegie Instn Washinton DC. 1942.
- 112 Jurado LA, Coloma A and Cruces J. Identification of a human homolog of the *Drosophila* *rotated*

- abdomen* gene (*POMT1*) encoding a putative protein *O*-mannosyl-transferase and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* 1999;58:171–180.
- 113 Finne J, Krusius T, Margolis RK and Margolis RU. Novel mannitol-containing oligosaccharides obtained by mild alkaline borohydride treatment of a chondroitin sulfate proteoglycan from brain. *J Biol Chem* 1979;254:10295–10300.
- 114 Winder SJ. The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* 2001;26:118–124.
- 115 Deng WM, Schneider M, Frock R, Castillejo-Lopez C, Gaman EA, Baumgartner S and Ruohola-Baker H. Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila*. *Development* 2003;130:173–184.
- 116 Endo T. Mammalian *O*-mannosyl glycans: Biochemistry and glycopathology. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2019;95(1):39–51.
- 117 Ueyama M, Akimoto Y, Ichimiya T, Ueda R, Kawakami H, Aigaki T and Nishihara S. Increased apoptosis of myoblasts in *Drosophila* model for the Walker-Warburg syndrome. *PLoS One* 2010;5(7):e11557.
- 118 Togayachi A, Sato T, Iwai . and Narimatsu H. Cloning and characterization of β 1,3-glycosyltransferase family with a β 3GT motifs. *Trends Glycosci Glycotechnol* 2007;19:29–40.
- 119 Kamakura M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature.* 2011;473(7348):478–83.
- 120 Van Kuik JA, Sijbesma RP, Kamerling JP and Vliegthart JFG. Primary structures determination of seven novel *N*-linked carbohydrate chains derived from hemocyanin of *Lymnaea stagnails*. *Eur J Biochem* 1987;169: 399–411.
- 121 Lommerse JPM, Thomas-Oates JE, Gielens C, Préaux G, Kamerling JP and Vliegthart JFG. Primary structure of 21 novel monoantennary and diantennary *N*-linked carbohydrate chains from alpha-D-hemocyanin of *Helix pomatia*. *Eur J Biochem* 1997;249:195–222.
- 122 Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, Kitoh K, Kato T, Irimura T and Tatematsu M. Reciprocal control of colon-specific sulfomucin and sialosyl-Tn antigen expression in human colorectal neoplasia. *Virchows Arch.* 1997.;31:25–30.
- 123 Kannagi R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression—the Warburg effect revisited. *Glycoconj J.* 2004;20:353–364
- 124 Miyazaki K, Ohmori K, Izawa M, Koike T, Kumamoto K, Furukawa K, Ando T, Kiso M, Yamaji T, Hashimoto Y et al. Loss of disialyl Lewis(a) the ligand for lymphocyte inhibitory receptor sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-7 (Siglec-7) associated with increased sialyl Lewis(a) expression on human colon cancers. *Cancer Res.* 2004;64:4498–4505.
- 125 Yusa A, Miyazaki K, Kimura N, Izawa M and Kannagi R. Epigenetic silencing of the sulfate transporter gene *DTDST* induces sialyl Lewisx expression and accelerates proliferation of colon cancer cells. *Cancer Res.* 2010;70:4064–4073.
- 126 Vavasseur F, Dole K, Yang J, Matta KL, Myerscough N, Corfield A, Paraskeva C and Brockhausen I. *O*-glycan biosynthesis in human colorectal adenoma cells during progression to cancer. *Eur J Biochem.* 1994;222:415–424.
- 127 Yang JM, Byrd JC, Siddiki BB, Chung YS, Okuno M, Sowa M, Kim YS, Matta KL and Brockhausen I.

- Alterations of *O*-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology*. 1994;4:873–884.
- 128 Kuhns W, Jain RK, Matta KL, Paulsen H, Baker MA, Geyer R and Brockhausen I. Characterization of a novel mucin sulphotransferase activity synthesizing sulphated *O*-glycan core 13-sulphate-Gal β 1–3GalNAc α -R. *Glycobiology*. 1995;5:689–697.
- 129 Seko A, Nagata K, Yonezawa S and Yamashita K. Ectopic expression of a GlcNAc 6-*O*-sulfotransferase GlcNAc6ST-2 in colonic mucinous adenocarcinoma. *Glycobiology*. 2002;12:379–388.
- 130 Dick G, Grødahl F and Prydz K. Overexpression of the 3' -phosphoadenosine 5' -phosphosulfate (PAPS) transporter 1 increases sulfation of chondroitin sulfate in the apical pathway of MDCK II cells. *Glycobiology*. 2008;18:53–65.
- 131 Kolset SO, Prydz K and Pejler G. Intracellular proteoglycans. *Biochem J*. 2004;379:217–227.
- 132 Deepa SS, Umehara Y, Higashiyama S, Itoh N and Sugahara K. Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J Biol Chem*. 2002;277:43707–43716.
- 133 Aviezer D and Yayon A. Heparin-dependent binding and autophosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor by heparin-binding EGF-like growth factor but not by EGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12173–12177.
- 134 Zioncheck TF, Richardson L, Liu J C, hang L King KL, Bennett GL, Fugedi P, Chamow SM, Schwall RH and Stack RJ. Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J Biol Chem*. 1995;270:16871–16878.
- 135 Soker S, Goldstaub D, Svahn CM, Vlodaysky I, Levi BZ and Neufeld G. Variations in the size and sulfation of heparin modulate the effect of heparin on the binding of VEGF165 to its receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;203:1339–1347.
- 136 Tessler S, Rockwell P, Hicklin D, Cohen T, Levi BZ, Witte L, Lemischka IR and Neufeld G. Heparin modulates the interaction of VEGF165 with soluble and cell associated flk-1 receptors. *J Biol Chem*. 1994;269: 12456–12461.
- 137 Kamiyama S and Nishihara S. The subcellular PAPS synthesis pathway responsible for the sulfation of proteoglycans: A comparison between humans and *Drosophila melanogaster*. *Trends Glycosci Glycotechnol*. 2004;16:109–123.
- 138 Maik-Rachline G, Hacoheh-Lev-Ran A and Seger R. Nuclear ERK: Mechanism of Translocation, Substrates, and Role in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1194.
- 139 Koike T, Kimura N, Miyazaki K, Yabuta T, Kumamoto K, Takenoshita S, Chen J, Kobayashi M, Hosokawa M, Taniguchi A et al. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:8132–8137.
- 140 Lübke T, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, von Figura K and Köner C. Complementation cloning identifies CDG-IIc a new type of congenital disorders of glycosylation as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat Genet*. 2001;28:73–76.
- 141 Lühn K, Wild MK, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R and Vestweber D. The gene defective in leukocyte

- adhesion deficiency II encodes a putative GDP–fucose transporter. *Nat Genet.* 2001;28:69–72.
- 142 Martinez–Duncker I, Dupre T, Piller V, Piller F, Candelier JJ, Trichet,,C Tchernia G, Oriol R and Mollicone R. Genetic complementation reveals PAPS transporters in colorectal carcinoma disorder of glycosylation of type II due to inactivation of the Golgi CMP–sialic acid transporter. *Blood.* 2005;105:2671–2676.
- 143 Hiraoka S, Furuichi T, Nishimura G, Shibata S, Yanagishita M, Rimoin DL, Superti–Furga A, Nikkels PG, Ogawa M and Katsuyama K et al. Nucleotide–sugar transporter SLC35D1 is critical to chondroitin sulfate synthesis in cartilage and skeletal development in mouse and human. *Nat Med.* 2007;13:1363–1367.
- 144 Thomsen B, Horn P, Panitz ,F Bendixen E, Petersen AH, Holm LE, Nielsen VH, Agerholm JS, Arnbjerg J and Bendixen C. A missense mutation in the bovine *SLC35A3* gene encoding a UDP–*N*-acetylglucosamine transporter causes complex vertebral malformation. *Genome Res.* 2006;16:97–105.
- 145 Clement A, Wiweger M, von der Hardt S, Rusch MA, Selleck SB, Chien CB and Roehl HH. Regulation of zebrafish skeletogenesis by *ext2/dackel* and *papst1/pinscher*. *PLoS Genet.* 2008;4:e1000136.
- 146 Ueyama M, Takemae H, Ohmae Y, Yoshida H, Toyoda H, Ueda R and Nishihara S. Functional analysis of proteoglycan galactosyltransferase II RNA interference mutant flies. *J Biol Chem* 2008;283:6076–6084.
- 147 Sasaki N, Hirano T, Ichimiya T, Wakao M, Hirano K, Kinoshita–Toyoda A, Toyoda H, Suda Y and Nishihara S. The 3′ –phosphoadenosine 5′ –phosphosulfate transporters PAPST1 and 2 contribute to the maintenance and differentiation of mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE.* 2009;4:e8262.
- 148 Hirano K, Sasaki N, Ichimiya T, Miura T, Van Kuppevelt TH, Nishihara S. 3–*O*-sulfated heparan sulfate recognized by the antibody HS4C3 contribute to the differentiation of mouse embryonic stem cells via Fas signaling. *PLoS One.* 2012;7:e43440.
- 149 Hong M, Lee PS, Hoffman RM, Zhu X, Krause JC, Laursen NS, Yoon SI, Song L, Tussey L, Crowe JE Jr, Ward AB, Wilson IA. Antibody recognition of the pandemic H1N1 Influenza virus hemagglutinin receptor binding site. *J. Virol.* 2013;87:12471–12480.
- 150 W, Shi Y, Qi J, Gao F, Li Q, Fan Z, Yan J and Gao GF. Molecular basis of the receptor binding specificity switch of the hemagglutinins from both the 1918 and 2009 pandemic influenza A viruses by a D225G substitution. *J. Virol.* 2013;87:5949–5958.
- 151 Spiro RG, Yasumoto Y and Bhoyroo V. Characterization of a rat liver Golgi sulphotransferase responsible for the 6–*O*-sulphation of *N*-acetylglucosamine residues in beta–linkage to mannose: role in assembly of sialyl–galactosyl–*N*-acetylglucosamine 6–sulphate sequence of *N*-linked oligosaccharides. *Biochem. J.* 1996;319:209–216.
- 152 Degroote S, Lo–Guidice JM, Strecker G, Ducourouble MP, Roussel P and Lamblin G. Characterization of an *N*-acetylglucosamine–6–*O*-sulphotransferase from human respiratory mucosa active on mucin carbohydrate chains. *J. Biol. Chem.* 1997;272:29493–29501.
- 153 Liu Y, Childs RA, Matrosovich T, Wharton S, Palma AS, Chai W, Daniels R, Gregory V, Uhlenhorff J, Kiso M, Klenk HD, Hay A, Feizi T and Matrosovich M. Altered receptor specificity and cell tropism of D222G

hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus. *J. Virol.* 2010;84:12069–12074.

- 154 Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M and Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/ H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One* 2010;23:e10256.