

(論文内容の要旨)

糖鎖付加は、タンパク質への主要な翻訳後修飾であり、糖鎖修飾がタンパク質の生理機能の発揮に不可欠である事例が多数明らかにされている。生物の発生過程における糖鎖の発現は非常にダイナミックに変化し、空間的及び時間的に厳密な発現制御を受けていることが知られている。哺乳類の胚発生は体内で進行することから、その解析には困難が伴い、発生過程における糖鎖機能を解明した研究例は未だ少ない。一方、透明な卵殻内で進行するメダカ胚発生は観察が容易であり、形態形成まで要する期間が短い。さらに、遺伝子操作が簡便に行えるという利点を有している。

メダカをモデル動物として用いた本研究では、糖転移酵素遺伝子の発現を実験的に制御することで、胚発生過程における糖鎖機能の解析を試みた。糖転移酵素には、胚発生過程において特異的な抗体で認識される糖鎖を合成するものと、普遍的にみられる糖鎖を合成するものがある。本研究では、多様な糖転移酵素の中から、脊椎動物で3種類同定されている $\beta$ 1,3-グルクロン酸転移酵素ファミリー (GlcAT-P, GlcAT-S 及び GlcAT-I) に着目した。GlcAT-P 及び GlcAT-S は特異的な発現を示すことが知られている HNK-1 (human natural killer-1) 糖鎖を合成し、GlcAT-I は普遍的に存在すると考えられるプロテオグリカンのグリコサミノグリカン鎖 (GAG) に共通してみられる糖鎖構造の合成を担当する。メダカ胚発生過程において、 $\beta$ 1,3-グルクロン酸転移酵素ファミリーにより生合成される糖鎖機能の解析にて得られた成果を以下に示す。

### 第一章 GlcAT-P 及び GlcAT-S により生合成される HNK-1 糖鎖の機能解析

GlcAT-P 及び GlcAT-S は、HNK-1 糖鎖の生合成律速酵素である。HNK-1 抗体で認識される独特な構造を有する HNK-1 糖鎖は、胚発生において特徴的な発現パターンを示すことが知られており、発生過程で重要な役割があるものと示唆される。そこで、HNK-1 糖鎖のメダカ胚発生における機能解析を目的として実験を行った。

メダカ胚発生過程において、HNK-1 糖鎖は受精直後から存在し、発生の進行に伴いその発現パターンが変化することが明らかとなった。次に、GlcAT-P 及び GlcAT-S のクローニングを行い、他動物種と高い相同性を有する cDNA クローンを得た。GlcAT-P は原腸形成期に一過性に発現した後、受精後約 2 日から再び発現がみられた。一方、GlcAT-S は受精後約 2 日に初めて発現が認められた。次に、HNK-1 糖鎖の機能を解析するため、GlcAT-P 及び GlcAT-S に特異的なモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を用いて遺伝子機能阻害実験を行った。GlcAT-P MO 処理胚は頭部を中心として著しい形態異常を示し、アポトーシスによる細胞死が亢進していた。一方、GlcAT-S MO 処理胚はほぼ正常に発生が進行した。また、アポトーシス阻害分子として知られている Bcl-xL を過剰発現させ、アポトーシスを抑制した条件下においても、GlcAT-P MO 処理胚での頭部形態異常は回避されなかった。この結果から、GlcAT-P MO 処理胚で観察される形態異常はアポトーシスの亢進によるものではなく、HNK-1 糖鎖の減少によって二次的に引き起こされる可能性が示唆された。さらに、両酵素の過剰発現胚では、HNK-1 糖鎖の発現量が増加し、頭部の湾曲等の形態異常が認められた。

以上の結果から、メダカ胚発生過程には HNK-1 糖鎖が必須であり、初期発生過程での HNK-1 糖鎖合成には GlcAT-P が不可欠であると考えられた。

## 第二章 GlcAT-I により生合成されるグリコサミノグリカン鎖の機能解析

プロテオグリカンとはコアタンパク質に四糖からなる橋渡し構造を介して GAG が共有結合した分子の総称であり、細胞表面と細胞外マトリックスの主要成分である。GAG の一種であるヘパラン硫酸鎖は成長因子と相互作用する等の報告があり、GAG の個体形成における機能が注目される。そこで、本研究では橋渡し構造を合成する酵素の一種である GlcAT-I の発現を制御することで、GAG の胚発生における機能解析を試みた。

はじめに、GlcAT-I の cDNA クローニングを行い、他動物種と高い相同性を有するクローンを得た。得られた配列をもとに、MO を作製し遺伝子機能阻害実験を行ったところ、頭部においては受精後約 3 日から接眼が観察され、体幹部においても形態異常が観察された。GlcAT-I MO 処理胚における *in situ hybridization* 解析では、脊索前板のマーカである goosecoid (*gsc*) の発現が原腸形成期にはみられるが、体節期までにはその発現がほぼ消失することが観察された。脊索前板は頭部前方の中胚葉であり、眼の形成への関与が示唆されている。従って、GlcAT-I MO 処理胚で観察される接眼は、体節期までの脊索前板における発生異常によると考えられる。また、GlcAT-I MO 処理胚では、原腸形成期に内胚葉のマーカである *sox17 $\alpha$*  の発現が減少していた。さらに、体節期には、体節のマーカである *myoD* 及び未分節中胚葉のマーカである *papc* の発現も減少していた。一方、脊索のマーカである *sonic hedgehog* (*shh*) の発現はほぼ正常であった。従って、体幹部で観察される表現型は内胚葉及び沿軸中胚葉となる細胞群で引き起こされる異常に起因しており、中軸中胚葉への影響は少ないものと考えられた。

以上の結果から GAG は、胚発生過程における中内胚葉の分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上、 $\beta$ 1,3-グルクロン酸転移酵素ファミリー (GlcAT-P, GlcAT-S 及び GlcAT-I) により生合成される糖鎖はメダカ胚発生過程に不可欠であることが、本研究により明らかにされた。

## (論文審査の結果の要旨)

本論文はタンパク質の主要な翻訳後修飾である糖鎖修飾が発生過程において重要な役割を担っていることを、メダカ胚を用いて明らかにしたものである。生物の発生過程における糖鎖の発現は非常にダイナミックに変化し、空間的及び時間的に厳密な発現制御を受けていることが知られているが、哺乳類の胚発生は体内で進行することから、その解析には困難が伴い、発生過程における糖鎖機能を解明した研究例は未だ少ない。一方、透明な卵殻内で進行するメダカ胚発生は観察が容易であり、形態形成まで要する期間が短い。さらに、遺伝子操作が簡便に行えるという利点がある。本論文はこの利点を利用し、多様な糖転移酵素の中から、脊椎動物で3種類同定されている $\beta$ 1,3-グルクロン酸転移酵素ファミリー (GlcAT-P, GlcAT-S 及び GlcAT-I) に着目し研究を行っている。GlcAT-P 及び GlcAT-S は特異的な発現を示すことが知られている HNK-1 (human natural killer-1) 糖鎖を合成し、GlcAT-I は普遍的に存在すると考えられるプロテオグリカンのグリコサミノグリカン鎖 (GAG) に共通してみられる糖鎖構造の合成を担当する。メダカ胚発生過程において、 $\beta$ 1,3-グルクロン酸転移酵素ファミリーにより生合成される糖鎖機能の解析を試み以下に示す新たな知見を得ている。

第一章では HNK-1 糖鎖の機能を解析するため、GlcAT-P 及び GlcAT-S に特異的なモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を用いて遺伝子機能阻害実験を行った。GlcAT-P MO 処理胚は頭部を中心として著しい形態異常を示し、アポトーシスによる細胞死が亢進していた。一方、GlcAT-S MO 処理胚はほぼ正常に発生が進行した。また、アポトーシス阻害分子として知られている Bcl-xL を過剰発現させ、アポトーシスを抑制した条件下においても、GlcAT-P MO 処理胚での頭部形態異常は回避されなかった。この結果から、GlcAT-P MO 処理胚で観察される形態異常はアポトーシスの亢進によるものではなく、HNK-1 糖鎖の減少によって二次的に引き起こされる可能性が示唆された。さらに、両酵素の過剰発現胚では、HNK-1 糖鎖の発現量が増加し、頭部の湾曲等の形態異常が認められた。以上の結果から、メダカ胚発生過程には HNK-1 糖鎖が必須であり、初期発生過程での HNK-1 糖鎖合成には GlcAT-P が不可欠であることが示唆された。

第2章では、GAG の胚発生における機能解析を行うために、GlcAT-I に対する MO を作製し遺伝子機能阻害実験を行った。その結果、頭部において受精後約3日から接眼

が観察され、体節部においても形態異常が観察された。GlcAT-I MO 処理胚における *in situ* hybridization 解析では、脊索前板のマーカである goosecoid (gsc) の発現が原腸形成期にはみられるが、体節期までにはその発現がほぼ消失することが観察された。脊索前板は頭部前方の中胚葉であり、眼の形成への関与が示唆されている。従って、GlcAT-I MO 処理胚で観察される接眼は、体節期までの脊索前板における発生異常によると考えられる。また、体節期において GlcAT-I MO 処理胚では、未分節中胚葉のマーカである papc の発現の減少や体節のマーカである myoD の体節に沿った発現が境界の不明瞭な発現となっていた。一方、脊索のマーカである sonic hedgehog (shh) の発現はほぼ正常であった。従って、体節部で観察される表現型は沿軸中胚葉となる細胞群で引き起こされる分化異常に起因しており、中軸中胚葉への影響は少ないものと考えられた。さらに、GlcAT-I MO 処理胚では、原腸形成期に内胚葉のマーカである sox17a の発現が減少していたが、外胚葉には影響がなかった。以上の結果から GAG は、胚発生過程における中内胚葉の分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

これらの結果から、 $\beta$ 1,3-グルクロン酸転移酵素ファミリーにより生合成される糖鎖はメダカ胚発生過程に不可欠であることが、本研究により明らかにされた。

以上、本研究の結果は、発生過程における糖鎖の重要性を示すと共に、メダカを用いた糖転移酵素群の発現制御による迅速な糖鎖機能解析の有用性を示すものである。よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。さらに、平成 21 年 1 月 21 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。