

メダカ発生過程に関わる糖鎖の構造とその機能に関する研究

2006

殿山 泰弘

メダカ発生過程に関わる糖鎖の構造とその機能に関する研究

2006

殿山 泰弘

## 目次

序論	1
本論	3
第1章  メダカ発生過程におけるN型糖鎖プロファイリング	4
第1節  HPLCを用いた二次元マッピング法によるN型糖鎖プロファイリング	4
第2節  考察と総括	7
第3節  実験方法	8
第2章  メダカ胚形成における $\beta$ 1-4ガラクトース転移酵素2 ( <i>olβ4GalT2</i> )の機能解析	10
第1節  メダカの胚形成過程	11
第2節  メダカ <i>β4GalT2</i> ホモログの同定と発現パターン解析	12
第3節  モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドによる <i>olβ4GalT2</i> 機能阻害実験	15
第4節 <i>olβ4GalT2</i> MO 処理胚の表現型解析	17
第5節  考察と総括	24
第6節  実験方法	27
結論	31
謝辞	33
引用文献	34

## 略語一覧

Asn	asparagine
Ser	serine
Thr	threonine
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl glucosamine
GalNAc	<i>N</i> -acetyl galactosamine
Man	mannose
Gal	galactose
Glc	glucose
Fuc	fucose
Sia	sialic acid
IdoA	iduronic acid
hpf.	hour post fertilization
dpf.	day post fertilization
GU	glucose unit
SSEA-1	stage specific embryonic antigen-1
HNK-1	human natural killer-1
MO	morpholino antisense oligonucleotide
5mis MO	five-base mismatch morpholino antisense oligonucleotide
$\beta$ 4GalT	beta1,4-galactosyltransferase
WISH	whole mount <i>in situ</i> hybridization
W	tryptophan
A	alanine
ASOR	asilo-orosomuroid
PCP	planner cell polality
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
FGF	fibroblast growth factor
HSPG	heparan sulfate proteoglycan

## 序論

ヒトからハエ、酵母におよぶ多くの生物種でゲノム解読が完了し、データベースが構築された現在において、任意のタンパク質のアミノ酸配列を推定するだけでなく、タンパク質の機能までが推定可能となっている<sup>(1)</sup>。しかし、タンパク質のアミノ酸配列からの情報だけでは複数のタンパク質間の相互作用からなる複雑な生命現象を理解することはできない。なぜなら、細胞内で翻訳されたタンパク質の多くは、糖鎖付加、リン酸化、脂質修飾といった様々な翻訳後修飾を受けることにより、完全な機能分子となるからである<sup>(2)</sup>。実際、細胞内で翻訳されるタンパク質の約半数に糖鎖が付加されていると予想されている<sup>(3)</sup>。したがって、ポストゲノム時代と呼ばれる今日、生体内での翻訳後修飾の役割を解明することは、生物学における主要な課題であると考えられる。

最も主要な翻訳後修飾の一つである糖鎖付加は、細胞の移動、認識などの様々な生体内の局面において、それに関わるタンパク質分子の機能を修飾していることが知られている<sup>(4)</sup>。特にマウスの個体形成過程においては、これまでに多くの研究者によってモノクローナル抗体を用いた細胞表面の糖鎖抗原探索の試みがなされ、特定の発生段階において部位特異的、組織特異的に発現するポリラクトサミン (poly-lactosamine)、SSEA-1 (stage specific embryonic antigen-1)、HNK-1 (human natural killer-1) といった様々な糖鎖抗原の存在が報告されている<sup>(5, 6)</sup>。一方、ヒトにおいても糖鎖合成に必須である種々の糖転移酵素をコードする遺伝子の変異が胎児の形態異常、多臓器形成不全を引き起こすことが知られている<sup>(7)</sup>。また、近年の分子遺伝学的なアプローチにより、いくつかの糖転移酵素をコードする遺伝子欠損マウスが作製されており、*GnT1* 欠損マウスでは心臓発達、神経管形成、血管新生における異常を伴う胎生致死 (E9.5) がみられるという報告もある<sup>(8)</sup>。これらのことは、糖タンパク質上に存在する糖鎖が発生過程で必須の機能を果たすことを強く示唆している。しかし、糖鎖は免疫原性が低いために特異的な抗体を得にくいこと、マウスは体内で発生が進むため観察が困難な上、胎生致死となった場合に詳細な解析を行うにはさらに困難が伴うことなどから、発生過程と糖鎖の関連性は強く示唆されているものの、その機能に関しては未だ不明な点が多い。

そこで、著者は個体発生における糖鎖の役割を明らかにすることを目的として、脊椎動物の発生モデルである小型魚類のメダカ (*Oryzias latipes*) を採用した。メダカの受精卵は透明な卵膜を有し、体外で発生が進行するために発生過程の観察が容易であること、多産で個体形成に要する期間が約9日とマウスに比べて短いことなどから古くから発生生物学の好材料として用いられてきた<sup>(9)</sup>。

本研究の第一段階として、メダカの発生進行に伴う糖鎖構造の変化を詳細に調べるために、二次元マッピング法を用いて受精後から孵化までのN結合型糖鎖の構造解析を行った。その結果、約30種の糖鎖をマッピングすることができた。さらに、データベースとの比較から、多くのものがヒトやマウスをはじめ

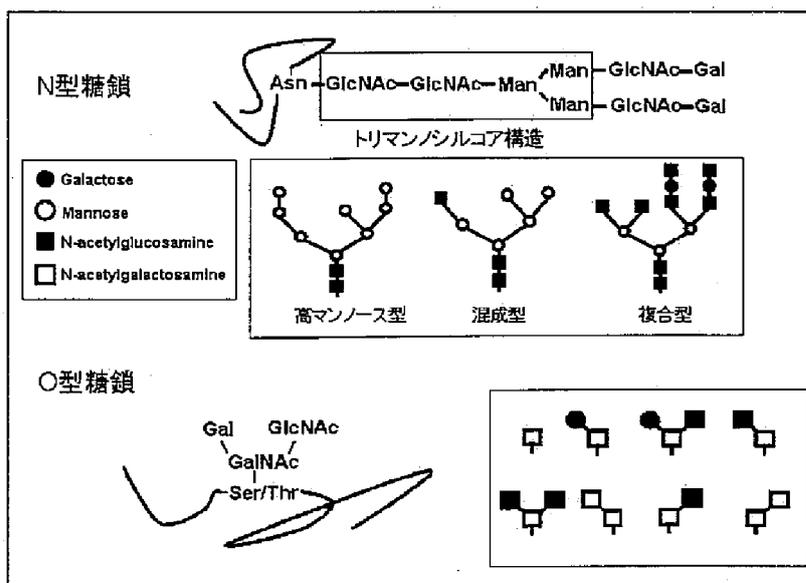
とする哺乳動物と同種の構造を有すると考えられた。また、一般にN型糖鎖（後述）は、その構造の違いから高マンノース型、混成型、複合型の3種に分類されるが、メダカにおいても9種の高マンノース型、2種の混成型、20種以上の複合型に属する糖鎖が発現していることが明らかになった。得られた二次元マップにおいて、高マンノース型と混成型糖鎖は発生の中の時期にもみられた。一方、複合型糖鎖の場合には、受精後3日目以降より新たに検出される一群の構造がみられ、これらは3本から4本の高分枝鎖を有する酸性または中性糖鎖であると推定された。これらのことから、他の哺乳動物と同様に糖鎖を介する機能がメダカにおいても保存されており、N型糖鎖のうちで特に複合型糖鎖が発生において重要な役割を果たしている可能性が示唆された（第1章）。

複合型糖鎖上にみられるポリラクトサミン、Le<sup>x</sup>といった個体形成過程において良く知られる糖鎖マーカの多くは、その一部にラクトサミン構造（Gal-GlcNAc）といった共通の構造を有する。ラクトサミン構造は、一般的に糖残基間の結合様式の違いからI型（Gal β1-3 GlcNAc）とII型（Gal β1-4 GlcNAc）に分類され、そのほとんど全てがII型であることが知られている<sup>(10)</sup>。β1-4ガラクトース転移酵素（β1,4-galactosyltransferase; β4GalT）は、この構造の合成にとって必須の糖転移酵素である。この糖転移酵素は、ヒトにおいてβ4GalTは7種のアイソザイムからなるファミリーを形成している<sup>(11)</sup>。すなわち、β4GalTファミリーに属する酵素はメダカ発生過程における複合型糖鎖の機能を知るうえで重要な鍵となる酵素であると言える。また、すでに作製されているβ4GalT1欠損マウスは、個体形成において異常を示さない<sup>(12)</sup>ことから、残りのアイソザイムが発生に関与している可能性が考えられる。今回、著者はβ4GalT1と最も高い相同性を有し、かつこれまで解析がなされていなかったβ4GalT2に着目し、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてメダカ由来β4GalT2（*Oryzias latipes*-β4GalT2; olβ4GalT2）の機能抑制実験を行った。その結果、アンチセンス処理胚は頭部の形成異常、胚の短縮、眼の融合、体節の分節化異常などの著しい形態異常を示すことが明らかになった。さらに、得られたアンチセンス処理胚の表現型を詳細に解析することにより、olβ4GalT2が合成する糖鎖が背腹軸の形成や細胞分化に影響することなく、挿入を介する正常な収斂伸長運動に必須であることを明らかにした（第2章）。以下、本論にて詳述する。

第1章 メダカ発生過程におけるN型糖鎖プロファイリング

糖鎖は、真核生物において、酵母からヒトに至るまで多くの生物種でその存在が確認されている。近年、糖鎖機能の解明を目的としてマウス、ショウジョウバエや線虫などのモデル動物が導入されており、これらの研究を通して生体内における糖鎖の普遍的な機能が見出されることが期待されている<sup>(13)</sup>。しかし、一方では、これらのモデル動物において種特異的な糖鎖が存在することも知られている<sup>(14, 15)</sup>。したがって、メダカをモデル動物として糖鎖の機能解析を行うためには、まずメダカにどのような構造の糖鎖が存在するかを調べる必要がある。メダカでは、卵構成タンパク質であるハイソフォリンに高分枝の複合型糖鎖が付加されていることが知られている<sup>(16)</sup>。しかし、メダカ由来の糖鎖構造に関する報告はこれまでほとんどなされていない。そこで著者は、本研究の第一段階としてメダカ発生の進行に伴う糖鎖構造の変化を詳細に調べるために、糖鎖の全体像を見るのに適した二次元マッピング法を用いて受精後から孵化までのN型糖鎖の構造解析を行った。

一般に糖鎖付加の様式には、タンパク質の Asn 残基へ付加される N 結合型糖鎖 (N 型糖鎖) と Ser/Thr 残基へ付加される O 結合型糖鎖 (O 型糖鎖) とがあり、N 型糖鎖はその構造によってトリマンノシルコア部分 (Fig1-1、最上段の枠内) にさらに Man が付加された高マンノース型、GlcNAc を末端に持つ分枝鎖と Man のみからなる分岐鎖を併せ持つ混成型、そして両方の Man に GlcNAc が付加された複合型の3つに分類される (Fig 1-1)。一方、O 型糖鎖は Ser または Thr 残基へ GalNAc が付加されることで始まり、



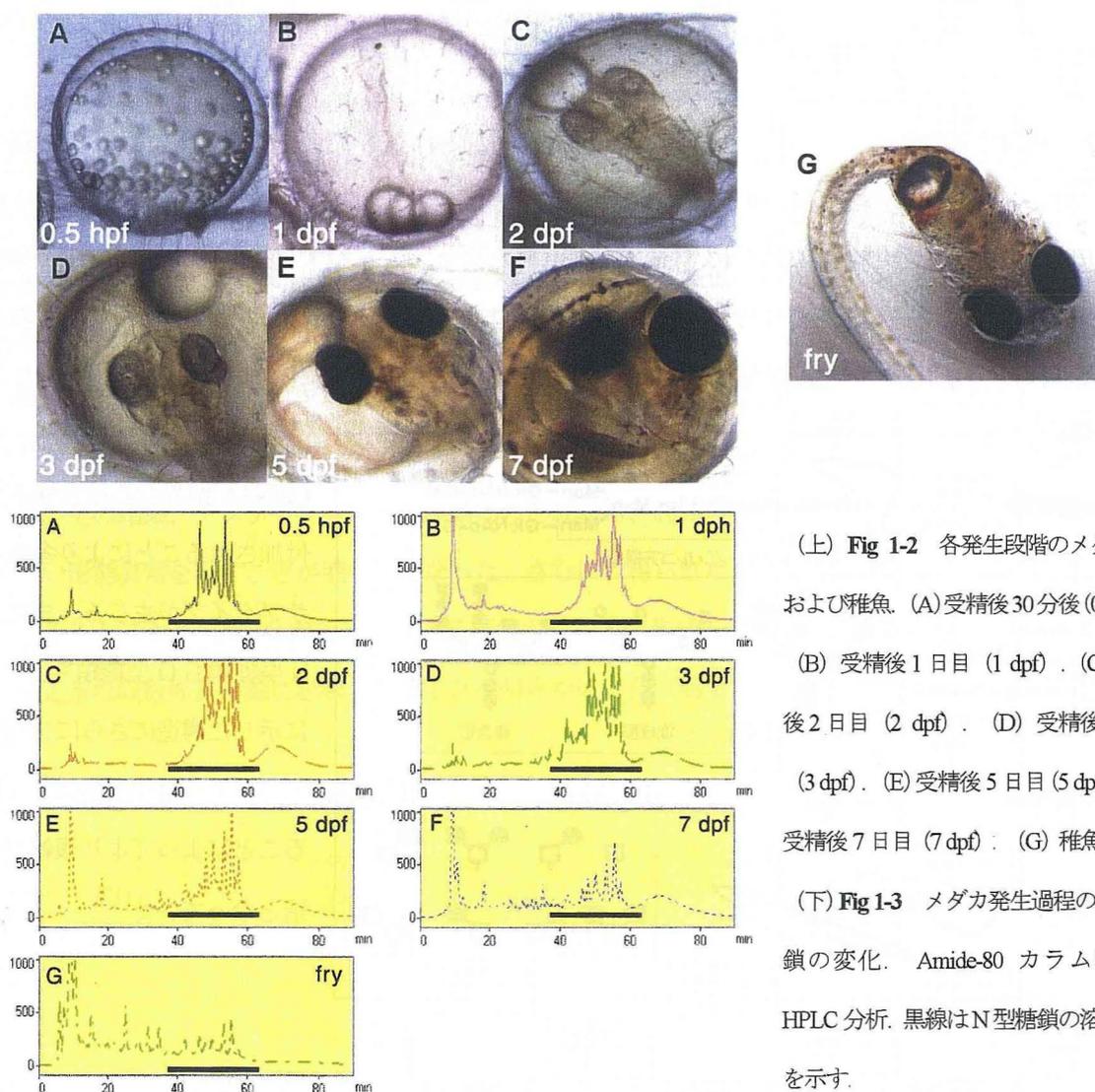
さらに Gal、GlcNAc や GalNAc が異なる結合様式で付加されることにより多数のサブタイプが生じる。また、N 型糖鎖も O 型糖鎖も、ここに示した構造にさらにフコースやシアル酸などが付加されることによってより複雑な構造となっていく<sup>(17)</sup>。

Fig 1-1 一般的な糖鎖構造の模式図。

## 第1節 HPLCを用いた二次元マッピング法によるN型糖鎖プロファイリング

### 1.1 メダカで発現している糖鎖構造は、発生過程の進行に伴って劇的に変化する

メダカ由来N型糖鎖の二次元マップを作製するため、受精後30分後(0.5 hpf、Fig 1-2A)、1日目(1 dpf、Fig 1-2B)、2日目(2 dpf、Fig 1-2C)、3日目(3 dpf、Fig 1-2D)、5日目(5 dpf、Fig 1-2E)、7日目(7 dpf、Fig 1-2F)の胚、および稚魚(fry、Fig 1-2G)に存在する糖鎖を2-アミノピリジン(PA)で標識した後、PA化糖鎖の精製を行った。Amido-80カラムを用いて、得られたPA化糖鎖をサイズ分画した。その結果、N型糖鎖が溶出される30 min以降のクロマトグラムについて比較したところ、0.5 hpfから2 dpfではパターンに大きな変化が見られないのに対して(Fig 1-2A-C)、3 dpf以降のパターンでは発生の進行に伴う大きな変化がみられた(Fig 1-3D-G)。このことから、メダカ発生過程において糖鎖構造が劇的に変化していると考えられる。



(上) Fig 1-2 各発生段階のメダカ胚、および稚魚。(A)受精後30分後(0.5 hpf)。(B)受精後1日目(1 dpf)。(C)受精後2日目(2 dpf)。(D)受精後3日目(3 dpf)。(E)受精後5日目(5 dpf)。(F)受精後7日目(7 dpf)。(G)稚魚(fry)。

(下) Fig 1-3 メダカ発生過程のN型糖鎖の変化。Amide-80カラムによるHPLC分析。黒線はN型糖鎖の溶出位置を示す。

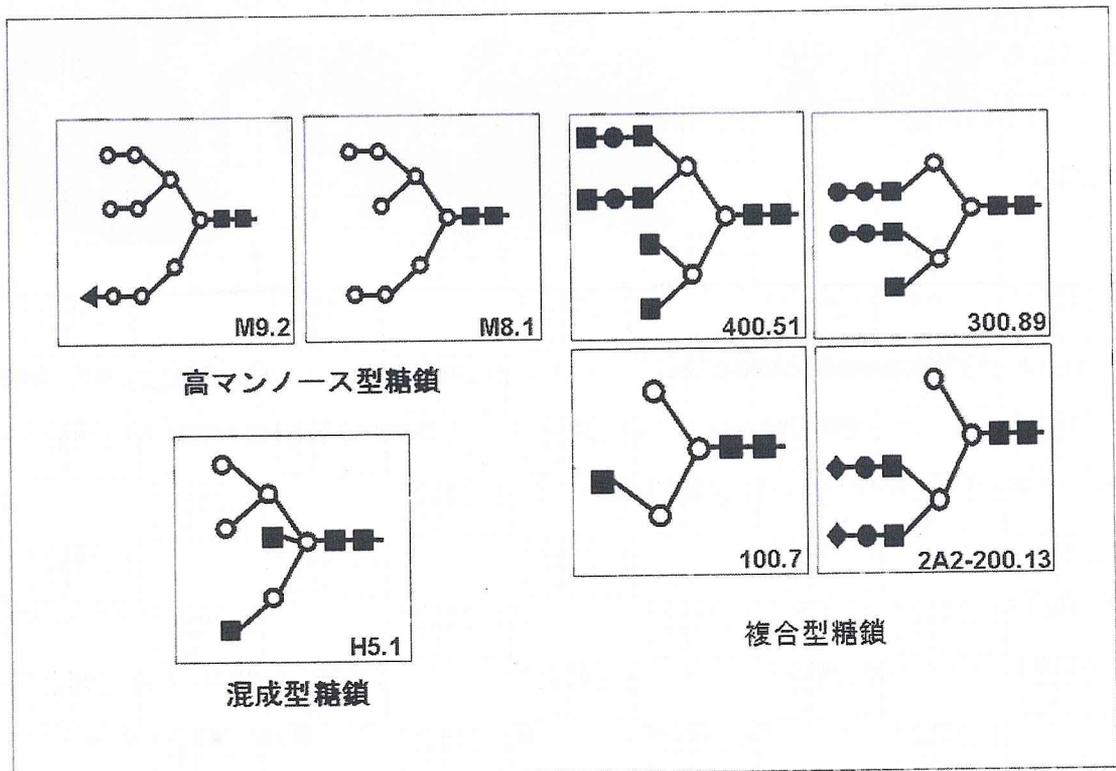
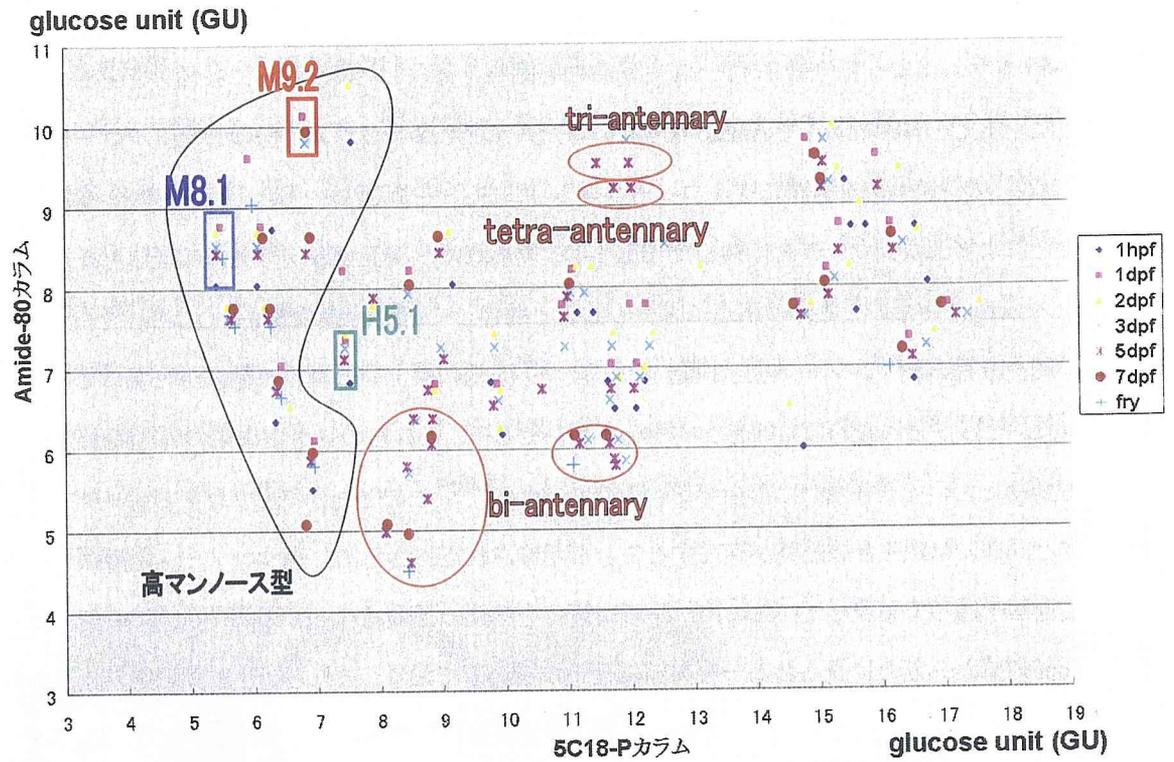
## 1.2 メダカには他の哺乳動物と同様の糖鎖が存在し、メダカの発生において複合型糖鎖が特に重要な機能を有している可能性がある

Amido-80 カラムによって分離された PA 化糖鎖の各画分を分取した後、さらに各画分を逆相カラムにより分離した。また、同様の条件で Amido-80 カラムあるいは 5C18-P カラムで分離したグルコースオリゴマー (DP: 3-22) の保持時間を基準にグルコースユニット (GU) を算出し、それぞれを縦軸・横軸にプロットすることにより二次元マップを作製した (Fig 1-4)。得られた二次元マップの各点の座標を既知の構造データベース Galaxy を用いて既知の構造に固有の数値と照合して糖鎖構造の推定を行った。その結果、メダカにおいて、10 種の高マンノース型、2 種の混成型、約 15 種の複合型に属する糖鎖が発現していることが推定された。そのうち代表的なものを示す (Fig 1-5)。そして、これらのメダカ由来の N 型糖鎖の構造は、他の脊椎動物においても普遍的に存在するものであった<sup>(18-20)</sup>。このことから、少なくともメダカにも他の脊椎動物と同様の糖鎖生成経路が存在することが示唆された。さらに、高マンノース型糖鎖と混成型糖鎖は発生過程を通して発現していたのに対して、複合型糖鎖の種類は 3 dpf 以降で劇的に増加していた。特に、3 dpf 以降から新たに見られる一群の糖鎖構造が存在しており、これらは 1 本鎖の構造も見られるものの、主に 3 本鎖と 4 本鎖の高分岐型の酸性または中性の複合型糖鎖であると推定された (Fig 1-5, 複合型糖鎖)。これらのことから、メダカの発生過程における複合型糖鎖の重要性が示唆された。

---

(上) Fig 1-4 メダカ発生過程における糖鎖の二次元マップ。黒枠の中の糖鎖が高マンノース型、緑枠の中の糖鎖が混成型、残り  
は全て複合型である。また、赤枠の中の糖鎖は、3 dpf 以降からみられる糖鎖であり、1 本鎖の構造も見られるものの、主に 3  
本鎖と 4 本鎖の高分岐型の酸性または中性の複合型糖鎖であると推定された。

(下) Fig 1-5 二次元マッピング法により推定された糖鎖 (代表例)。二次元マッピング法により、メダカには M9.2、M8.1  
といった高マンノース型糖鎖、H5.1 といった混成型のものが存在した。また、図に示した 400.51、300.89、100.7、2A2-200.13  
といった糖鎖は、二次元マップ上の赤枠内の糖鎖構造である。■: GlcNAc、○: Man、●: Gal、▲: Glc、◆: Sia を表す。



## 第2節 考察と総括

第1章を通して著者は、メダカがほかの哺乳動物と同様のN型糖鎖を発現していることに加えて、特に複合型糖鎖が発生過程で重要な役割を果たす可能性があることを示した。二次元マッピングの結果からメダカには高マンノース型、混成型および複合型に属する、哺乳動物において典型的な糖鎖が発現していることが明らかになった。またM9.2 (Fig 1-5) は、哺乳動物の糖鎖プロセッシング過程で見られる典型的な構造である<sup>(21)</sup>。これらのことからメダカの糖鎖は、哺乳動物に共通したプロセッシング経路によって作られていることが示唆される。一方、線虫、ショウジョウバエおよび酵母において特殊な糖鎖の存在が報告されている。たとえば、線虫の複合型糖鎖にはその最末端にFucが付加されているものが存在すること、ハエのN型糖鎖には $\alpha$ 1-3結合のFucが存在することや酵母のN型糖鎖のコア構造は哺乳動物と比べてManの結合が多いなどの例が挙げられる<sup>(14, 15, 22)</sup>。これらの構造は哺乳動物ではみられていない。現時点においてメダカやゼブラフィッシュの中でも、そのような糖鎖構造がみられていないことからメダカなどの小型魚類をモデル動物として用いた糖鎖の機能解析を行うことによって哺乳動物における糖鎖機能の普遍性が明らかになることが期待される。

メダカの実生過程において、高マンノース型糖鎖および混成型糖鎖ほどの時期にもみられたのに対して、複合型糖鎖の種類は発生の進行に伴って顕著に増加している。さらに3 dpf以降の胚で新たに検出される一群の糖鎖構造の中には高分枝の構造が多くみられる。複合型糖鎖の末端にはSSEA-1やHNK-1などの糖鎖マーカーが発生段階特異的あるいは組織特異的に存在している<sup>(23, 24)</sup>。高分枝の糖鎖は、これらの糖鎖マーカーをより多く付加することができるために多様な機能を持つことが予想される。したがって、メダカの実生過程において複合型糖鎖は重要な機能を果たすと考えられる。ヒトにおいて複合型糖鎖合成に関わる*GnT-II*の欠損は、先天的形態異常や精神運動異常を引き起こすことが知られている<sup>(7)</sup>。さらに、同じく複合型糖鎖合成に関わる*GnT-I*欠損マウスは胎生致死となる<sup>(8)</sup>。これらのことは、本章における著者の主張を支持している。

また一方で糖鎖は、生体内において糖タンパク質として存在しているために、糖鎖構造の変化から機能を有する糖鎖を予測不可能という見解もある。すなわち、このような糖鎖構造の変化は、タンパク質の発現変化に伴って付随しているにすぎないという主張である。しかし糖転移酵素遺伝子の発現量は、細胞分化やがん化に伴って厳密な制御を受けている。実際に、複合型糖鎖の合成に関わる*GnT-II*のプロモーター領域には*c-src*や細胞増殖因子の結合配列が存在することや*GnT-V*の発現量は、腫瘍の悪性化に伴って増大することなどが知られている<sup>(25, 26)</sup>。これらのことは、細胞が分化あるいはがん化に伴って積極的に糖鎖構造を制御していることを示唆している。したがって、発生過程で見られる糖鎖構造の変化に着目して、その

変化の意義を知ることにより糖鎖機能の解明を試みるという著者のアプローチは、糖鎖研究において有用であると考えられる。

### 第3節 実験方法

#### メダカの飼育と受精卵の採取

d-rR 系統のメダカは、循環ろ過式水槽システム（名東水園社製）で水温 28°C、14 時間の明期と 10 時間の暗期の光周期下で飼育した。餌は孵化させたブラインシュリンプ（INVE 社製、プレミアム・アルテミア）を与えた。採取した受精卵は 0.0002%メチレンブルー含有塩類溶液（60 mg/l 人工海水溶液）を満たした 60 mm 径プラスチック培養皿中で、人工気象器にて成魚と同様の条件下でそれぞれの発生段階まで培養した。

#### 二次元マップの作製

糖鎖の精製、標識から二次元マップの作製は Natsuka らの方法で行った<sup>(27)</sup>。

##### (i) メダカに発現する糖鎖の精製

受精直後 1 日目、2 日目、3 日目、5 日目、7 日目、そして稚魚を各々 100 個（匹）採取してアセトン中でホモジナイズした後、遠心して得られた沈殿を凍結乾燥した。続いて、4 mg の凍結乾燥品を Reacti-vial（PIRCE 社製）に移し、400  $\mu$ l の無水ヒドラジン（東京化成社製）を加えて 100°C、10 分間加熱して糖鎖の切り出しを行った。その後、減圧遠心機（サーバント社製）により無水ヒドラジンを留去し、さらに 70  $\mu$ l のトルエンを加えて留去する操作を 3 回繰り返すことにより、残った無水ヒドラジンを完全に除去した。得られた試料を蒸留水（ナカライ社製、HPLC 分析用）に溶解後、セルロースカラム（タカラバイオ社製）を用いて精製した。続いて、糖鎖の還元末端を再アセチル化するため、得られた試料 200  $\mu$ l の飽和炭酸水素ナトリウム、及び 8  $\mu$ l の無水酢酸を加えて 5 分間氷上で静置した後、再度飽和炭酸水素ナトリウムと無水酢酸を加えて、さらに 30 分間静置した。その後、Dowex50W-X2（H<sup>+</sup>フォーム、室町化学社製）を溶液の pH が約 3 になるまで加え、この樹脂を含んだ溶液を微量分析用ロート（トップ社製）に移した後、樹脂の 5 倍容の蒸留水で溶出し、この溶出液と洗液とを合わせて凍結乾燥した。

#### (ii) 2-アミノピリジン (PA) による糖鎖の標識

(i) で精製した凍結乾燥品を 10  $\mu$ l の PA 化試薬 (552 mg 2-aminopyridine を 200  $\mu$ l AcOH に溶解したもの) に溶解し、Reacti-vial 中で 90°C、1 時間加熱した後、反応液を室温に戻し、70  $\mu$ l の還元試薬 (100 mg borane-dimethylamine を 40  $\mu$ l AcOH および 25  $\mu$ l の蒸留水に溶解したもの) を加えて 80°C、35 分間加熱した。その後、得られた試料をセルロースカラムにかけて PA 化糖鎖を精製し、溶出液を凍結乾燥した。

#### (iii) HPLC 分析

(ii) で得られた凍結乾燥品を 50  $\mu$ l の蒸留水に溶解した後、そのうちの 10  $\mu$ l を TSK-GEL Amido-80 カラム (4.6 mm  $\times$  250 mm、トソー社製) を用いて分離した。この Amido-80 カラムによって分離された各画分を分取する操作を 3 回繰り返した後、3 回分を合わせたものをそれぞれ凍結乾燥した。続いて、これらの凍結乾燥品を 50  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、COSMOSIL 5C18-P カラム (4.6 mm  $\times$  250 mm、ナカライ社製) によりさらに分離した。Amido-80 カラムあるいは 5C18-P カラムを用いた HPLC の分析条件を以下に記す。Amido-80 カラムによる分析条件; 溶離液 A: アセトニトリル (ナカライ社製、HPLC 分析用)、溶離液 B: 50 mM ギ酸アンモニア (pH 4.4)、流速: 0.5 ml/min、濃度勾配: 30%-70%B (90 min)、5C18-P カラムによる分析条件; 溶離液 A: 0.1 M 酢酸-トリエチルアミン (pH 4.0)、溶離液 B: 0.5% n-ブタノール含有、0.1 M 酢酸-トリエチルアミン、流速: 1.5 ml/min、濃度勾配: 5%-100%B (55 min)。カラム温度と励起波長/検出波長は、いずれも同じ条件である。カラム温度: 35°C、励起波長/検出波長: 315 nm/400 nm。また HPLC は、LC-10A システム (島津製作所製) を用いた。

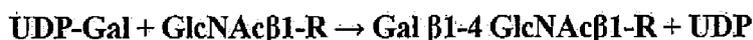
#### (iv) 二次元マップの作製

(iii) の試料を分析する直前に、グルコースオリゴマー (DP=3-22、タカラバイオ社製) を Amido-80 カラム、5C18-P カラムを用いてそれぞれ分離し、3 mer から 22 mer までのそれぞれのピークの保持時間をもとにして、Amido-80 カラム、および 5C18-P カラムで得られた各ピークの保持時間をグルコースオリゴマーの重合度に換算し、これをグルコースユニット (GU) とした。続いて、Amido-80 カラム、及び 5C18-P カラムから得られた GU をそれぞれ、縦軸と横軸にプロットすることにより、二次元マップを作製した。二次元マップの各点の座標を既知の糖鎖構造データベース (Galaxy: <http://www.glycoanalysis.info/>) と照合し、糖鎖構造を推定した。またこの時、実験値と既知の構造の固有値との許容誤差は  $\pm 0.5$  までとした。糖鎖の命名は Takahashi らの方法に従った<sup>(28)</sup>。

## 第2章 メダカ胚形成における $\beta$ 1-4 ガラクトース転移酵素 2 ( $\beta$ 4GalT2) の機能解析

糖鎖の発現は、発生過程を通して時期特異的および細胞特異的に厳密に制御されている。そして、糖鎖の合成が組織あるいは細胞系列特異的に制御されているのは、その合成を司る糖転移酵素の発現が極めて厳密に制御されているためである<sup>(25, 26)</sup>。したがって、糖鎖の機能を解析するためには、これらの糖転移酵素の発現を阻害するような処理を行うことが有用となる。メダカ、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルといった発生生物学のモデル動物では、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを胚に顕微注入するという手法により、標的遺伝子の機能を阻害することが可能である<sup>(29-31)</sup>。モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (以下、モルフォリノオリゴ) は、配列特異的に標的遺伝子の翻訳過程を阻害する人工合成オリゴヌクレオチドである。さらに、このモルフォリノオリゴでは核酸中の糖残基がモルフォリン骨格に変換されているので、塩基間のホスホジエステル結合が存在しないことから、RNA 分解酵素の影響を受けることなく、細胞内に長期間留まることができる。したがって、モルフォリノオリゴを用いることにより、初期発生だけでなく、器官形成期においても影響をみることができると考えられる<sup>(32)</sup>。

第1章で述べた N 型糖鎖プロファイリングの結果から、N 型糖鎖のうちで複合型のものが発生過程で特に重要な機能を果たしている可能性が示唆された。そこで著者は、メダカ発生過程での複合型糖鎖の役割を調べるために、複合型糖鎖の合成に関与する糖転移酵素の機能阻害を行うことにした。複合型糖鎖上に見られるポリラクトサミンや Le<sup>x</sup> といった個体形成過程において良く知られる糖鎖マーカーの多くは、その一部にラクトサミン構造 (Gal-GlcNAc) という共通の構造を有する。一般的に、ラクトサミン構造は糖残基間の結合様式の違いから I 型 (Gal  $\beta$ 1-3 GlcNAc) と II 型 (Gal  $\beta$ 1-4 GlcNAc) に分類され、そのほとんど全てが II 型であることが知られている<sup>(10)</sup>。 $\beta$ 1-4 ガラクトース転移酵素 ( $\beta$ 4GalT) は、この II 型ラクトサミン構造の合成に必須の糖転移酵素である。 $\beta$ 4GalT は、Mn<sup>2+</sup>などの金属イオン存在下で次の反応を触媒する<sup>(33)</sup>。



そして、この糖転移酵素は、ヒトにおいて  $\beta$ 4GalT は 7 種のアイズォイムからなるファミリーを形成している<sup>(11)</sup>。すなわち、 $\beta$ 4GalT ファミリーに属する酵素はメダカ発生過程における複合型糖鎖の機能を知るうえで重要な鍵となる酵素であると言える。また、すでに作製されている  $\beta$ 4GalT1 欠損マウスは個体形成において異常を示さないことから、残りのアイズォイムが発生に関与している可能性が考えられる<sup>(12)</sup>。今回、著者は  $\beta$ 4GalT1 と最も高い相同性を有し、かつこれまで解析がなされていなかった  $\beta$ 1-4 ガラクトース転移酵素 2 ( $\beta$ 4GalT2) に着目し、モルフォリノオリゴを用いた機能抑制実験を行った。

## 第1節 メダカの胚形成過程

第2章の内容を理解するためには、メダカがどのようにして形態形成をするのかについて知る必要がある。そこでまず、メダカの胚形成過程について説明する<sup>(34)</sup>。発生過程の最初の状態である未受精卵では、全体に渡って多数の油滴が観察される (0 hpf, Fig 2-1A)。受精後、これらの油滴は互いに融合しながら植物極半球側に移動し、動物極域に原形質の盛り上がりが生じた後、1細胞期となる (0.5 hpf, Fig 2-1B)。その後、受精卵は卵割を繰り返して細胞数を増やして胞胚 (blastula) となる (6.5 hpf, Fig 2-1C)。胞胚期から約 10 時間後、一部の細胞に肥厚が観察され始める。この肥厚部に含まれる特定の細胞は、オーガナイザーとして後に背側の組織となるとともに、また他の部位の細胞に分化を促すシグナルの源となる (15 hpf, Fig 2-1D、矢印)。その後、動物極側に位置する胚盤葉は、卵黄を覆うように移動を始める。この胚盤葉の被包をエピボリー (epiboly) といい、胚盤葉の被包が卵黄球の約 1/2 まで進んだ状態を 50% エピボリー (50% epiboly) と呼ぶ (18 hpf, Fig 2-1E)。約 4 時間後、胚盤葉の被包はほぼ 3/4 まで進み、胚体が認められるようになる (21 hpf, Fig 2-1F)。さらに 5 時間後、胚体の厚みは増して前後軸に沿った伸長が見られる。また胚盤葉の被包はほぼ完了しかけているが、未だ体節はできていない (26 hpf, Fig 2-1G)。約 1.5 時間後、胚盤葉の被包は完了しており、尾部中軸の両側に 2 対の体節が認められる (27.5 hpf, Fig 2-1H)。以上、Fig 2-1A-H がメダカの胚形成過程である。また、原腸形成 (gastrulation) とは Fig 2-1 D-H の時期を指し、D-E までを初期原腸形成期 (early gastrula stage)、E-F までを中期原腸形成期 (mid-gastrula stage)、F-G までを後期原腸形成期 (late gastrula stage)、またエピボリーが完了して体節形成が開始される G-H までを尾芽胚期 (bud stage) と呼ぶ。

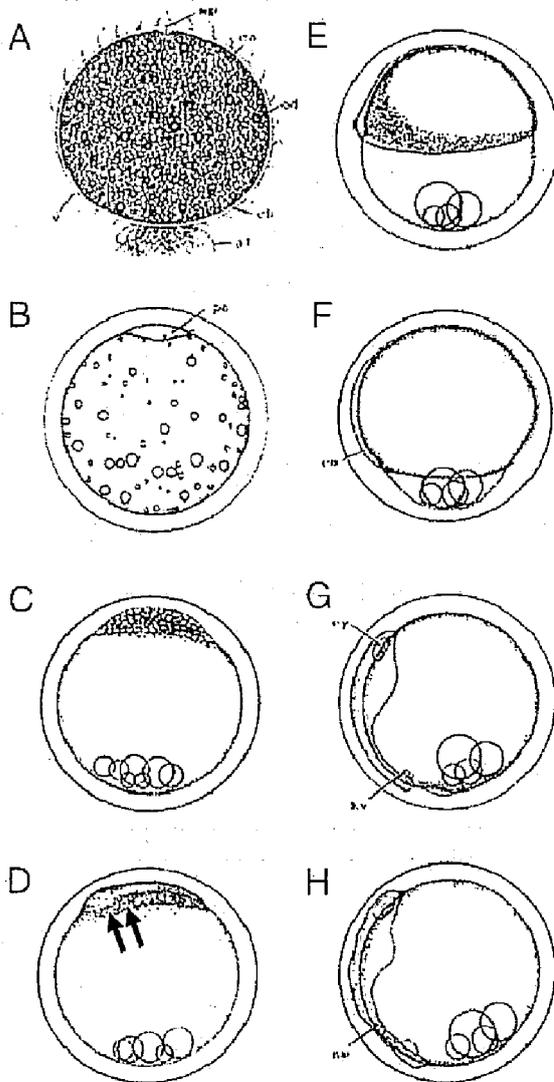


Fig 2-1 メダカの胚形成過程<sup>(34)</sup>

## 第2節 メダカ $\beta 4GalT2$ ホモログの同定と発現パターン解析

### 2.1 メダカ $\beta 4GalT2$ のクローニング

メダカ発生過程における  $\beta 4GalT2$  の機能解析を行うことを目的として、メダカ由来の  $\beta 4GalT2$  ホモログの完全長 cDNA クローニングを行った。まず、ヒト由来  $\beta 4GalT2$  ( $h\beta 4GalT2$ ) のアミノ酸配列をメダカのゲノムデータベースに対して相同性検索を行い、高い相同性を有する配列を取得した。相同性検索により得られた配列には翻訳開始部位と終止コドンの領域が既に含まれていたため、これらの塩基配列からプライマーを作製して完全長 cDNA を得た。得られたメダカ  $\beta 4GalT2$  ( $ol\beta 4GalT2$ ; Accession No: AB282995) の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、フグ (*figu rabripes*;  $fr\beta 4GalT2$ )、ヒト (*homo sapiens*;  $h\beta 4GalT2$ ) およびマウス (*mus musculus*;  $m\beta 4GalT2$ ) の  $\beta 4GalT2$  ホモログとそれぞれ、90.6%、68.7%、66.1%の相同性を示した (Table 2.1)。さらに、上の4種の推定アミノ酸配列を多配列比較解析ソフト CLASTALW により配列比較を行った結果、 $ol\beta 4GalT2$  は糖転移酵素に共通する膜貫通領域を持ち (Fig 2-2A、赤字)、 $\beta 4GalT$  ファミリーに共通して存在する FNRA、N (I/V) G、DVD、WGWGGEDDD (Fig 2-2A、白字) および保存された位置に存在する Cys 残基 (Fig 2-2A、黄字) といった特徴的なモチーフを有していることが明らかとなった (Fig 2-2A)。これらのモチーフは、 $\beta 1-4Gal$  転移活性に必須であることが知られている。また、 $ol\beta 4GalT2$  と  $h\beta 4GalT$  ファミリーとの系統樹解析の結果、 $ol\beta 4GalT2$  と  $\beta 4GalT$  ファミリーに属する  $h\beta 4GalT1$ 、 $h\beta 4GalT3$  および  $h\beta 4GalT 4$  -  $h\beta 4GalT 7$  とは、それぞれ 49.7%、52.6%、45.5%、44.4%、36.4%、29.4%の相同性を示した (Table 2.1)。すなわち、 $ol\beta 4GalT2$  は  $h\beta 4GalT$  ファミリーの中で  $h\beta 4Gal2$  と最も高い相同性を示した (Fig 2-2B)。この際に、既知である  $ol\beta 4GalT7$  はやはり  $h\beta 4GalT7$  と最も高い相同性を有していた (74.8%、Fig 2-2B)。以上の結果から、著者がクローニングした cDNA はメダカ由来の  $ol\beta 4GalT2$  ホモログであることが確認された。

Table 2.1  $ol\beta 4GalT2$  と他種生物由来  $\beta 4GalT$  ファミリーとの相同性

species	Gene	Accession No.	identity(%)
<i>Figu rabripes</i>	<i>fr\beta 4GalT2</i>	FRUP00000144236	90.6
<i>Mus musculus</i>	<i>m\beta 4GalT2</i>	AB019541	66.1
<i>Homo sapiens</i>	<i>h\beta 4GalT1</i>	X14085	49.7
	<i>h\beta 4GalT2</i>	AB024434	68.7
	<i>h\beta 4GalT3</i>	AB024435	52.6
	<i>h\beta 4GalT4</i>	AB024436	45.5
	<i>h\beta 4GalT5</i>	AB004550	44.4
	<i>h\beta 4GalT6</i>	AB024742	36.4
	<i>h\beta 4GalT7</i>	AJ005382	29.4

A

olβ4GalT2	1	MTRLMLGRTLERICKGVL...C...LHFLIMMHLYFDVYSORFDLFSRFNNGRNGSRNINVSQA	60
frβ4GalT2	1	MTRLMLGRTLERICKGVL...C...LHFLIMMHLYFDVYSORFDLFSRFNNGRNGSRNINNSAAA	60
hβ4GalT2	1	MSRL-LGGTLERVCKA...L...LHFLVAVILYFDVYACHLAFFSRFSARGPAHALHPAAS	60
mβ4GalT2	1	MSRL-LGGTLERVCKA...L...LHFLVAVILYFDVYACHLAFFSRFSTRSPAHALYPAAS	60
olβ4GalT2	61	GSGHHYYNYNLSRNTLAWLATGEQLAPTMIPESNOTPSPKPLPPCPENPPQLVGRLL	120
frβ4GalT2	61	GNAHHFYNYNLSRPNATSSSYLAVGEHLVQSAQPGTNDTPSPKPLPPCPENPPQLVGRLL	120
hβ4GalT2	61	-----SSSSSNCSRPNATASSSGLPEVPSALPGTAPTLPCCPDSPPQLVGRLL	110
mβ4GalT2	61	-----SSTN-CSRPNATAASSSGLPEVPSARPGTAPVLPCCPDPVPPQLVGRVV	107
olβ4GalT2	121	IEFSSQMTMERVOKENPNVTEGGRYTPDPCRPRKVA...IPFRHRENHLKYWLHYLHPIL	180
frβ4GalT2	121	IEFSSQMTMERVOKENPNVTEGGRYTPDPCRPRKVA...IPFRHRENHLKYWLHYLHPIL	180
hβ4GalT2	111	IETSPMLERVORENPGVLLMGGRYTPDCTPAQTVAVI...IPFRHREHLRYWLHYLHPIL	170
mβ4GalT2	108	IETSPMLERVORENPGVLLMGGRYTPDCTPAQTVAVI...IPFRHREHLRYWLHYLHPIL	167
olβ4GalT2	181	RROKIDYGIYIINOLGEDTFNRAKLLNICYMEAKD-GEYDCFIFSDVDLIPMDORNLYH	240
frβ4GalT2	181	RROKIDYGIYIINOLGEDTFNRAKLLNYGYREALKE-AA'YDCFIFSDVDLIPMDORNLYH	240
hβ4GalT2	171	RRORLRYGVYVINOHGEDTFNRAKLLVGFLEALKEDAA'YDCFIFSDVDLIPMDORNLYR	230
mβ4GalT2	168	RRORLRYGVYVINOHGEEITFNRKLLVGFLEALKEDAA'YDCFIFSDVDLIPMDORNLYR	227
olβ4GalT2	241	CYDOPRHFAIAMDKFGFRLPYAGYFGVSGLSKQKQFLKINGFPNEYWGWGGEDDDIYNR	300
frβ4GalT2	241	CYDOPRHFAIAMDKFGFRLPYAGYFGVSGLSKQKQFLKINGFPNEYWGWGGEDDDIYNR	300
hβ4GalT2	231	CGDOPRHFAIAMDKFGFRLPYAGYFGVSGLSKAQFLRINGFPNEYWGWGGEDDDIFNR	290
mβ4GalT2	228	CGDOPRHFAIAMDKFGFRLPYASVFGVSGLSKAQFLRINGFPNEYWGWGGEDDDIFNR	287
		*	
olβ4GalT2	301	TLNGMKVSRPDVRIGRYRMIKHERDKHNEPNPQRFNKIONTKHTMKKDGISSLTYKLLQI	360
frβ4GalT2	301	TLNGMKVSRPDVRIGRFRMIKHERDKHNEPNPQRFNKIONTKNTMKKDGISSLTYRLVQV	360
hβ4GalT2	291	SLETGMKISRPDVRIIRGRYRMIKHDRDKHNEPNPQRFNKIONTKLTKKRDGIGSVRYQVLEV	350
mβ4GalT2	288	SLETGMKISRPDVRIIRGRYRMIKHDRDKHNEPNPQRFNKIONTKMSMKWDGIGSVRYRVLEV	347
olβ4GalT2	361	KRFPLYTNISVEIGKPPRRPITG	383
frβ4GalT2	361	KKYPLYTNISVEIGKPPRRPFKG	383
hβ4GalT2	351	SROPLFTNITVDIGRPPSWPPRG	373
mβ4GalT2	348	SROPLFTNITVDIGOPMSWLTG	370

B

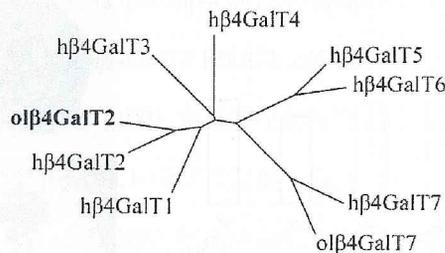
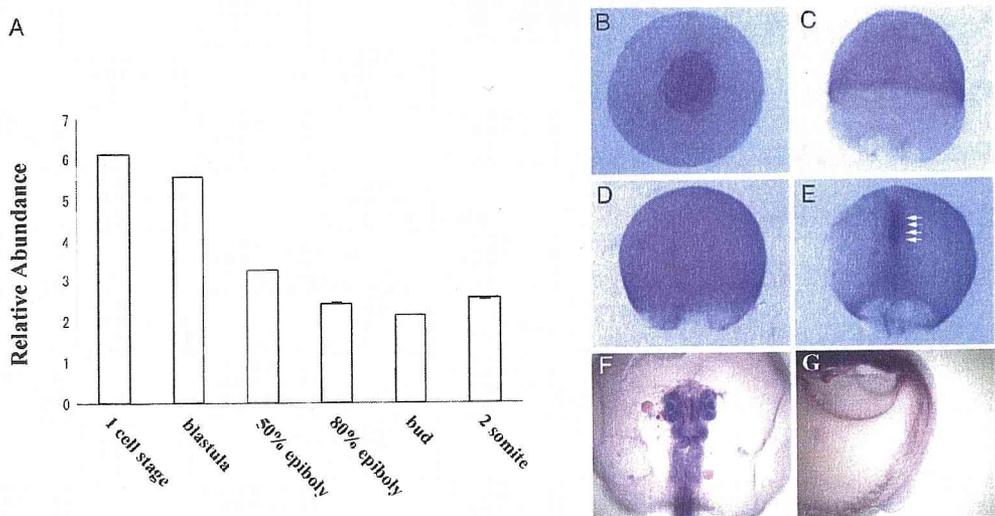


Fig 2-2 *olβ4GalT2* の推定アミノ酸配列と他の生物種由来の  $\beta$ 4GalT ファミリーとの系統樹解析。(A) *olβ4GalT2* の推定アミノ酸配列とフグ (*frβ4GalT2*)、ヒト (*hβ4GalT2*) およびマウス (*mβ4GalT2*) の  $\beta$ 4GalT2 との配列比較。推定膜貫通領域 (赤字)、FNRA、N (IV) G、DVD、WGWGGEDDD (赤地に白字)、 $\beta$ 4GalT ファミリー間で保存された位置にある Cys 残基 (黄地に黒字)。また、星印は変異を導入したアミノ酸残基を示す (後述)。(B) *olβ4GalT2* とヒト  $\beta$ 4GalT ファミリーとの系統樹解析。*olβ4GalT2* は  $\beta$ 4GalT ファミリーに属する酵素の中でも *hβ4GalT2* に最も高い相同性を示した。

## 2.2 発生過程における *olβ4GalT2* の発現量変化とその局在

発生過程における *olβ4GalT2* の発現量変化を調べるため、定量的 RT-PCR 解析を行った。その結果、*olβ4GalT2* は、新たな遺伝子の転写が起こっていない受精直後から 1 細胞期の中で既に発現していることが明らかになった (Fig2-3A)。このことから、*olβ4GalT2* が母性効果因子であることが示唆された。1 細胞期以降、*β4GalT2* の発現量は胞胚期から後期原腸形成期の尾芽胚期まで減少し、尾芽胚期から 2 体節期にかけて増大していた (Fig 2-3A)。そして体節期以降、その発現量は孵化後に至るまで発生の進行に伴ってさらに増大した (図には示していない)。また、発生過程における *olβ4GalT2* の局在を調べるために、*olβ4GalT2* をプローブとして whole mount *in situ* hybridization (WISH) を行ったところ、*olβ4GalT2* は胞胚期から尾芽胚期までの原腸形成期では普遍的に存在し、胚形成の完了する体節期では眼と脳において強く発現し、尾部ではほとんど発現がみられなかった (Fig 2-3B-E, F, G)。原腸形成の進行に伴って背側での発現が強くなっていったのは、この時期において細胞が背側へと集積するためであると考えられる。しかし、90%エピボリー期では、頭部での発現が特に強くなっていった (Fig 2-3E, 矢印)。これらのことから、*olβ4GalT2* の眼や脳の前基での新たな発現がこの時期において既に始まっていることが示唆された。



**Fig 2-3** 発生過程における *olβ4GalT2* の発現量変化とその局在 (A) 発生過程を追った *olβ4GalT2* の定量的 RT-PCR.

*olβ4GalT2* は 1 細胞期 (1 cell stage) で既に発現していた。その後、原腸形成期においてその発現量は減少し、尾芽胚期 (bud stage) から 2 体節期 (2 somite) にかけて増大した。(B-G) 発生過程における *olβ4GalT2* の局在 (B) 胞胚期の胚を動物側から見た図。(C-E) 原腸形成期の胚、各々 50%、80%、95%エピボリー胚を背側から見た図。(F, G) 10-15 体節期胚をそれぞれ背側と側面から見た図。

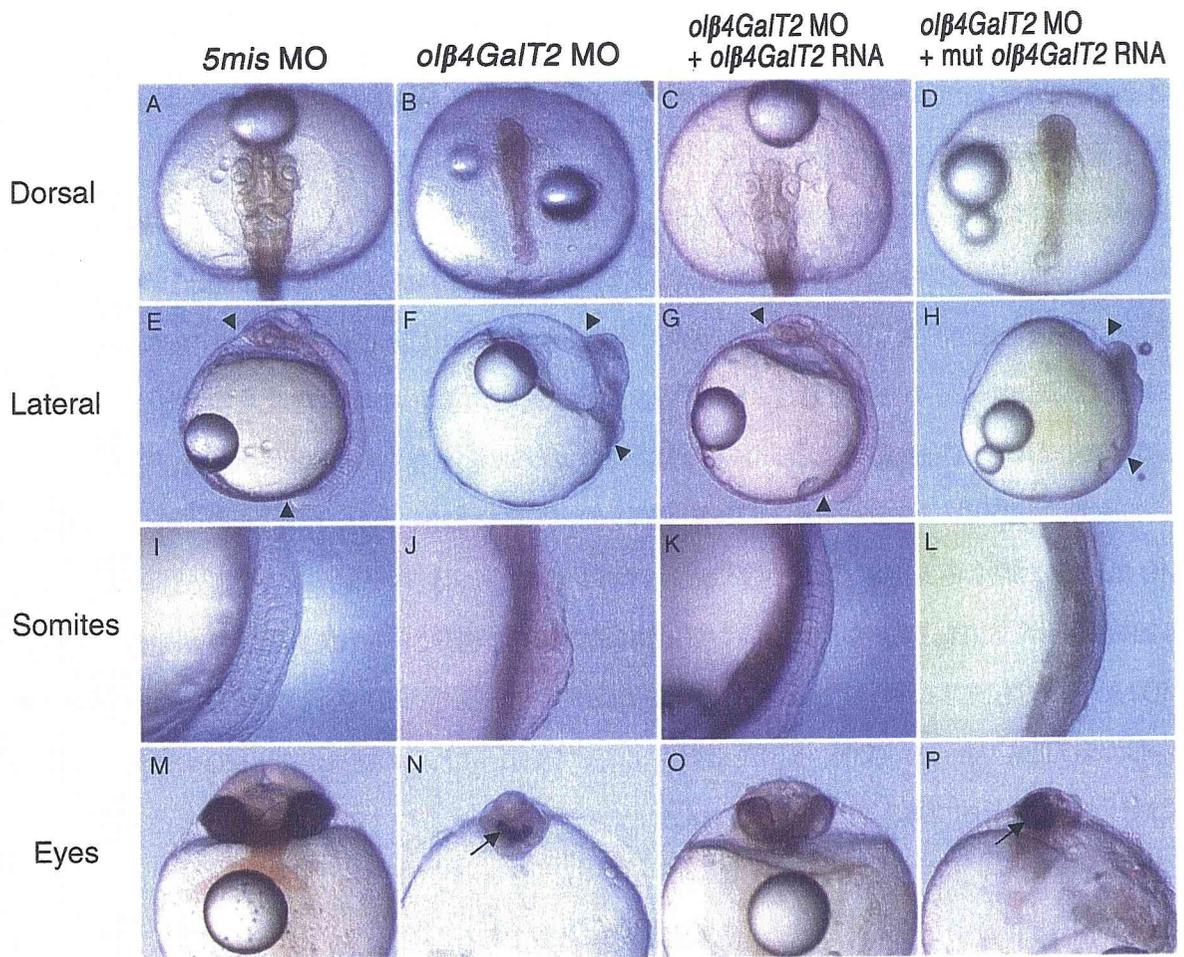
### 第3節 モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドによる *olβ4GalT2* 機能阻害実験

3.1 *olβ4GalT2* MO 処理胚は、頭部や体節のパターン形成不全、胚の短縮、眼の融合などの著しい形態異常を示す。

発生過程における複合型糖鎖の機能を調べるために、複合型糖鎖の合成に必須である *olβ4GalT2* の翻訳開始部位付近の配列をもとにして、異なる部位に対する2つのモルフォリノオリゴ (MO) を設計し、胚1個あたり 4 ng を顕微注入してこの糖転移酵素の機能阻害を行った (*olβ4GalT2* MO および *olβ4GalT2* MO2)。また、この時のコントロールとして、MO の配列のうちの5塩基を *olβ4GalT2* に相補的でない塩基に置換したものをを用いた (5mis MO および 5mis MO2)。胚体の形成を明確に判定可能である処理後2日目において、5mis MO 処理胚の96% (n=100) は正常に胚体を形成していた (Fig 2-4A, E, I, M) のに対して、*olβ4GalT2* MO 処理胚の86% (n=100) が頭部や体節のパターン形成不全、胚の短縮、そして眼の融合などの著しい形態異常を示した (Fig 2-4B, F, J, N)。さらに、*olβ4GalT2* MO 処理胚でみられた典型的な表現型は、*olβ4GalT2* MO2 処理胚でも同様にみられた (62%, n=86; 図に示していない)。またこの時、5mis MO2 処理胚の胚体形成はほぼ正常であった (83%, n=79; 図に示していない)。これらの結果から、MO の効果が *olβ4GalT2* に対して配列特異的であることが確認された。

3.2 *olβ4GalT2* が合成する糖鎖は、正常な胚形成に必須である。

*olβ4GalT2* MO 処理胚でみられる形態異常が *olβ4GalT2* の機能が阻害されたことに起因することを確認するため、試験管内で調製した 200 pg の *olβ4GalT2* RNA と *olβ4GalT2* MO とを同時に胚に顕微注入した。その結果、同時処理を行った胚の72% (n=100) が正常な表現型へと回復した (Fig 2-4C, G, K, O)。さらに、酵素活性に必須であることが知られているアミノ酸 (Fig 2-2A, 星印 W<sup>276</sup>) に変異を導入した 400 pg の変異体 *olβ4GalT2* RNA (mut *olβ4GalT2* RNA) を *olβ4GalT2* MO と同時に処理した場合には、処理胚の90% (n=40) の形態異常が正常な表現型へと回復しなかった (Fig 2-4D, H, L, P)。mβ4GalT2 の276番目のトリプトファン (W) をアラニン (A) に変換することによって、β4GalT2 活性は約90%低下することが知られている。これらのことから、*olβ4GalT2* MO 処理胚でみられる形態異常は *olβ4GalT2* の機能が阻害されたことに起因すること、すなわち *olβ4GalT2* が合成する糖鎖は、正常な胚形成に必須であることが示唆された。



**Fig 2-4** モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドによる *olβ4GalT2* 機能阻害実験. *olβ4GalT2* に対するモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはRNAを1-2細胞期の胚に処理した後、2日目に観察した。(A、E、I、M) コントロール、5mis MO 処理胚では正常な胚体形成がみられた。(B、F、J、N) 4 ng の *olβ4GalT2* MO 処理胚。(B) 頭部のパターン形成不全。(F) 胚の短縮(矢頭)。(J) 体節形成不全。(N) 眼の融合(矢印)などの著しい形態異常を示した。(C、G、K、O) 4 ng の *olβ4GalT2* MO と 400 pg の *olβ4GalT2* RNA を同時に処理した胚は、正常な表現型へと回復した。(D、H、L、P) 4 ng の *olβ4GalT2* MO と活性をほとんど有しない、400 pg の変異体 *olβ4GalT2* RNA (mut *olβ4GalT2* RNA) を同時に処理しても正常な表現型へと回復しなかった。(A-D) 背側(Dorsal)から見た図。(E-H) 側面(Lateral)から見た図。(I-L) 尾部を側面から見た図。(M-P) 正面から見た図。

#### 第4節 *olβ4GalT2* MO 処理胚の表現型解析

4.1 *olβ4GalT2* MO 処理胚でみられる形態異常は、分化やオーガナイザー形成の異常ではなく、後期原腸形成期での細胞運動の異常によって引き起こされる。

*olβ4GalT2* MO 処理胚は、胚の形成に著しい異常を示した。原腸形成過程は胚の形態形成にとって必須の過程であることが知られている<sup>(35)</sup>ことから、*olβ4GalT2* MO 処理胚ではこの原腸形成期において何らかの異常がみられることが予想された。そこで、*olβ4GalT2* MO 処理胚の原腸形成過程を経時的に観察した。その結果、*olβ4GalT2* MO 処理胚の初期原腸形成期において背側の肥厚は正常に生じており (Fig2-5A、F: 矢印)、さらにエピボリーも 5mis MO 処理胚に比べてやや遅れるものの正常に進行していた (Fig2-5F-I: 矢頭)。しかし、後期原腸形成期である 95%エピボリー期において、胚体の厚みが 5mis MO 処理胚に比べて薄く (Fig2-5D、I、白線)、その後の尾芽胚期に至っても胚の伸長は起こらず、5mis MO 処理胚の形態との違いが明確になった (Fig2-5E、J: 矢印)。これらのことから、*olβ4GalT2* MO 処理胚でみられる形態異常は、後期原腸形成期に生じることが明らかになった。

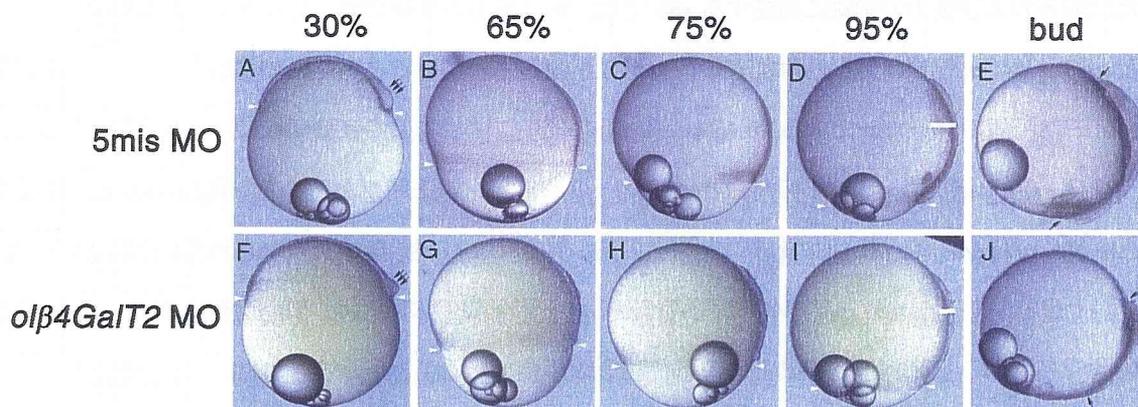


Fig 2-5 *olβ4GalT2* MO 処理胚の形態形成過程の経時的観察。

*olβ4GalT2* MO 処理胚の原腸形成過程を経時的に観察した。(A-E) 5mis MO 処理胚、(F-G) *olβ4GalT2* MO 処理胚を側面から見た図。*olβ4GalT2* MO 処理胚において、背側の肥厚 (A、F: 矢印)、及びエピボリーは共に正常に生じた (F-I: 矢頭)。しかし、95%エピボリー期において、*olβ4GalT2* MO 処理胚は胚体の厚みが 5mis MO 処理胚に比べて薄く (D、I、白線)、その後の尾芽胚期に至っても胚の伸長は起こらず、5mis MO 処理胚の形態との違いが明確になった (E、J: 矢印)。

さらに、各種マーカー遺伝子をプローブとして WISH 解析を行ったところ、細胞やオーガナイザー組織の分化誘導が起こる初期原腸形成期において、背側のマーカーである *chordin* (*chd*) と *goosecoid* (*gsc*)、腹側のマーカーである *bmp2*、中胚葉のマーカーである *no tail* (*ntl*) と *spadetail* (*spd*) の局在は、5mis MO 処理胚との間に差がみられなかった (Fig 2-6A-E)。これらのことから、*olβ4GalT2* MO 処理胚では、オーガナイザーの形成や細胞の分化による領域の特異化は正常に起こっていることが示唆された。一方、体節期では *olβ4GalT2* MO 処理胚における *ntl* の脊索での発現は 5mis MO 処理胚に比べ短く、異常なパターンを示した (Fig 2-6F)。また、体節期形成期において尾芽に集積するはずの *spd* の発現の場合にも尾芽への集積がみられなかった (Fig 2-6G)。すなわち、*olβ4GalT2* MO 処理胚では、オーガナイザー形成や細胞の分化による領域の特異化は正常に起こるのに対して、後期原腸形成期を境にマーカー遺伝子の発現パターンの異常および形態異常が生じた。また、先述の *olβ4GalT2* MO 処理胚の観察結果からも、同様のことが示唆されていた。後期原腸形成期の胚では胚形成にとって必須の運動が起こっており、これらの運動異常は胚の短縮、眼の融合、体節形成不全などの形態異常を引き起こすことが知られている(36, 37)。これらのことから、*olβ4GalT2* MO 処理胚の異常な表現型は初期原腸形成期までに起こる細胞の分化の異常ではなく、後期原腸形成期で起こる種々の細胞運動の異常が引き起こしていることが示唆された。

また、前方および後方の中軸に局在する *shh* では、特に後方の中軸においてシグナルが検出されなかったことから、*olβ4GalT2* MO 処理胚は後方の中軸形成が阻害されていることが示唆された (Fig 2-7H, 矢印)。さらに、中内胚葉のマーカーである *foxA2/cxcl* (*cxcl*) の局在に関しては中胚葉領域のみに異常が見られたこと (Fig 2-7I, J)、*pax2* や *six3* などの外胚葉マーカーのパターンは正常であること (Fig 2-7K, L; 矢印) などから、*olβ4GalT2* MO 処理胚では後方の中軸中胚葉の異常により脊索形成が阻害されていることが示唆された。以上の結果から、*olβ4GalT2* MO 処理胚でみられる形態異常の原因は、細胞分化の異常ではなく、後期原腸形成期に起こる細胞運動の異常による中軸形成不全であることが示唆された。

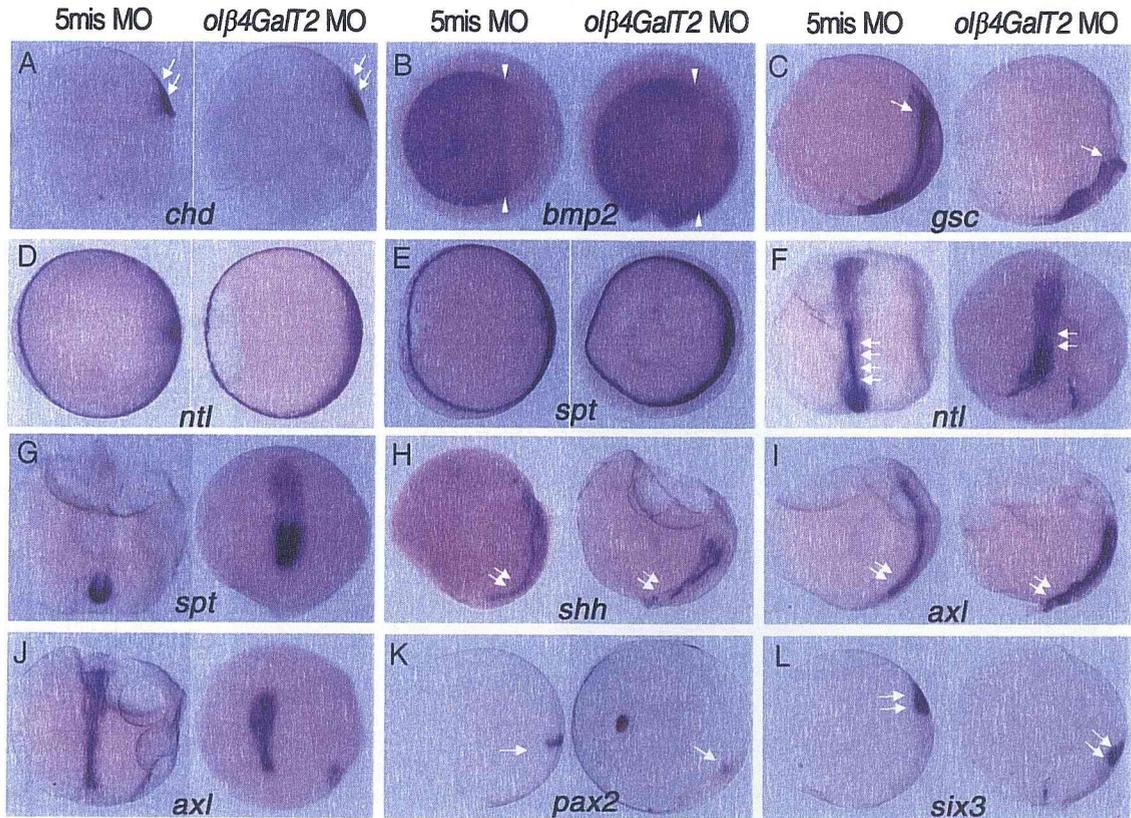


Fig-2-6 各種発生マーカー遺伝子による *olβ4GalT2* MO 処理胚の WISH 解析.

(A) 背側組織のマーカー、*chordin (chd)* . 30%エピボリー期胚では背側のオーガナイザーが形成される領域で検出された (矢印) . 側面から見た図 . (B) 腹側組織のマーカー、*bmp2* . 30-40%エピボリー期胚において、背側の領域以外の細胞で検出された (矢印頭) . 動物極側から見た図 . (C) 背側組織、または中内胚葉のマーカー、*gooseoid (gsc)* . 尾芽胚期において、いずれの処理胚でも中内胚葉の前方への移動が認められた (矢印) . 側面から見た図 . (D, F) 汎中胚葉マーカー、*notail (ntl)* . 初期原腸形成期ではエピボリーの先端の領域で検出されたが、体節期の胚では脊索、脊索前盤の中軸中胚葉で検出された (F、矢印) . (D) は動物極側から見た図 . (F) は背側から見た図 . (E, G) 側方中胚葉のマーカー、*spadetail (spd)* . *ntl* と同様に、初期原腸形成期ではエピボリーの先端の領域で検出されたが、体節期の胚では尾芽で検出された . (E) 動物極側から見た図 . (G) 背側から見た図 . (H) 前方、及び後方の中軸中胚葉のマーカー、*sonic hedgehog (shh)* . *olβ4GalT2* MO 処理胚では、体節期において、後方の中軸での局在で異常がみられた . (矢印) . 側面から見た図 . (I, J) 中内胚葉のマーカー、*foxA2/axial (axl)* . *olβ4GalT2* MO 処理胚では、体節期において前後軸に沿って検出されたが、中軸中胚葉領域での発現に異常がみられた (矢印) . (I) 側面から見た図 . (J) 背側から見た図 . (K) 外胚葉マーカー、*pax2* . 尾芽胚期胚の中脳後脳境界域で検出された . 側面から見た図 . (L) 外胚葉マーカー、*six3* . 尾芽胚期胚の前脳で検出された . 側面から見た図 .

4.2 *olβ4GalT2* が合成する糖鎖は、後期原腸形成期での正常な収斂伸長運動に必須である。

メダカ原腸形成期において、動物極側にある細胞層が卵黄を覆うエピボリー運動 (Fig 2-7B)、側面 (Lateral) の細胞が背側 (Dorsal) へと向かう収斂運動 (Fig 2-7C)、そして背側に集まった細胞群が前後軸に沿って移動する伸長運動 (Fig 2-7D) の主に3種の細胞運動が協調的に起こることが知られている<sup>(38)</sup>。*olβ4GalT2* MO 処理胚のエピボリー運動は5mis MO 処理胚と差がなく正常であることから、*olβ4GalT2* MO 処理胚ではこの収斂と伸長運動の異常がみられることが予想された。そこで、*olβ4GalT2* MO 処理の収斂と伸長運動に対する影響を調べるため、ケージド蛍光化合物 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB)-caged fluorescein dextran を用いて原腸形成時での各領域の細胞を標識し、細胞追跡実験を行った。すなわち、*olβ4GalT2* MO または5mis MO とケージド蛍光化合物を同時に胚に処理したのち、初期原腸形成期胚の側面または背側にUV照射することにより細胞を蛍光標識して胚形成を観察した。*olβ4GalT2* MO 処理胚において、標識細胞の収斂運動は5mis MO 処理胚の標識細胞に比べて多少遅れるものの、運動自体は正常に起こっていた (Fig 2-8D-F)。ただし、背側へたどり着いた後の前後軸に沿った伸長は*olβ4GalT2* MO 処理胚では観察されなかった (Fig 2-8F: 矢印)。一方、伸長運動に関しては、5mis MO 処理胚では標識細胞の前後軸に沿った伸長がみられたのに対して、*olβ4GalT2* MO 処理胚の標識細胞では伸長がほぼ完全に阻害されていた (Fig 2-8I, L: 矢印)。以上の結果から、*olβ4GalT2* の合成する糖鎖が後期原腸形成期での正常な収斂伸長運動に必須であることが明らかになった。

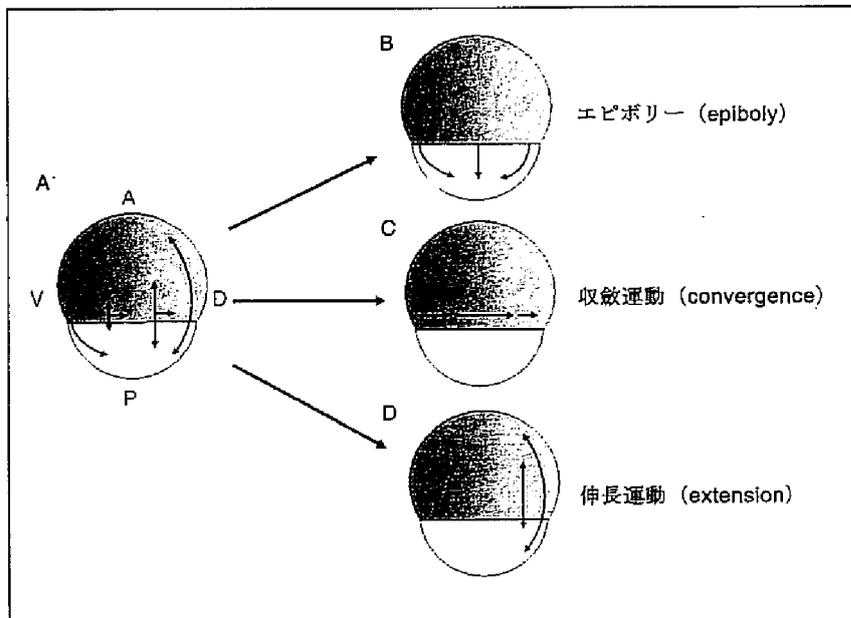
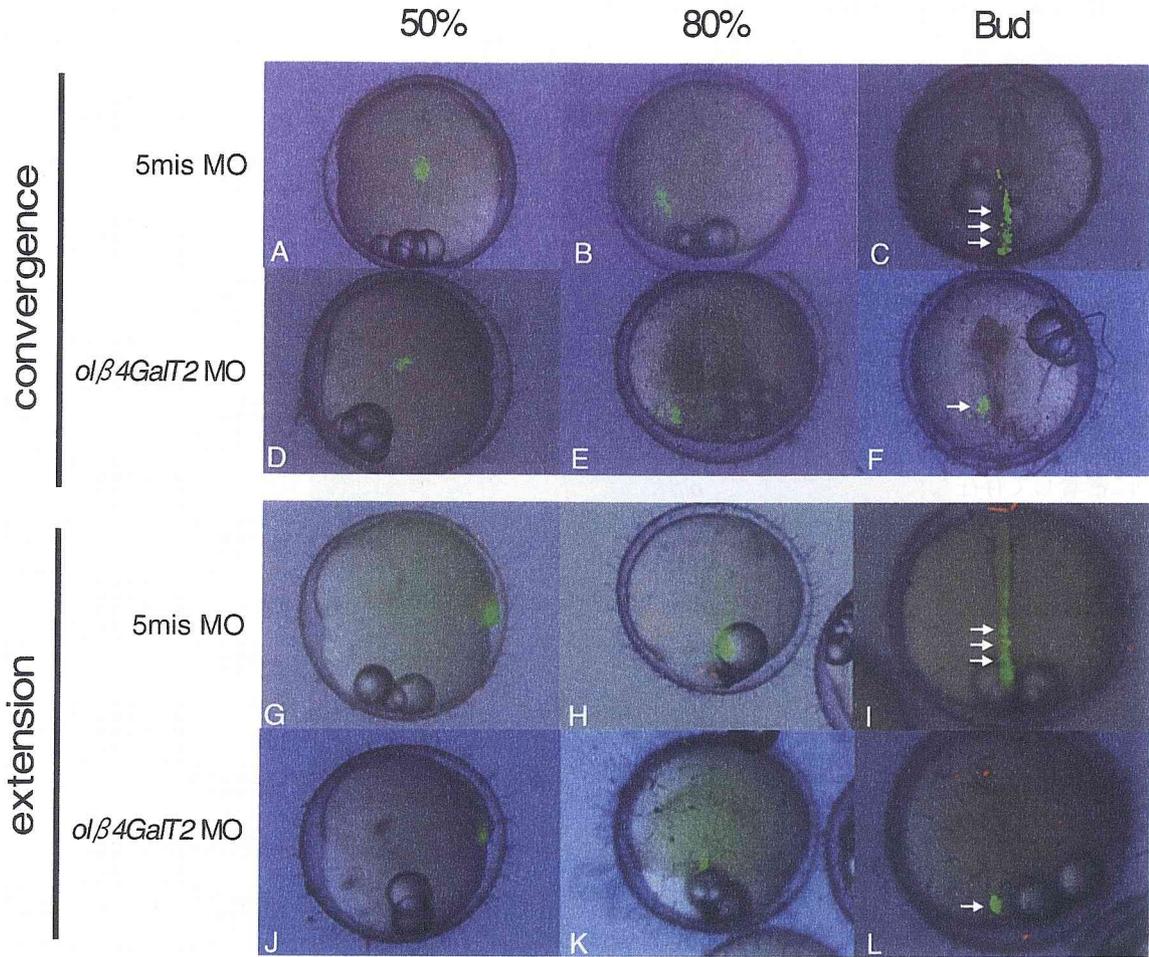


Fig 2-7 メダカ原腸形成過程で起こる3種の細胞運動。(A)メダカ原腸形成過程では主に3種の運動が協調して起こることが知られている。図中のAは前方(Anterior)、Pは後方(Posterior)、Dは背側(Dorsal)、Vは腹側(Ventral)を示す。(B)エピボリー、(C)収斂運動(convergence)、(D)伸長運動(extension)は形態形成に必須の運動である。



**Fig 2-8** 後期原腸形成過程におけるケージド蛍光化合物を用いた細胞追跡実験

(A-F) ケージド蛍光化合物を用いて、後期原腸形成過程における収斂運動 (convergence) に対するモルフォリノオリゴ処理の影響を評価した。(A-C) 5mis MO 処理胚では、標識細胞の収斂運動は正常に起こっていた。(D-F) *olβ4GalT2* MO 処理胚でも標識細胞の収斂運動は 5mis MO 処理胚の標識細胞に比べ多少遅れるものの、収斂運動は正常に起こっていた。ただし、背側へたどり着いた後の前後軸に沿った伸長はみられなかった (C, F: 矢印)。(G-L) ケージド蛍光化合物を用いて、後期原腸形成過程における伸長運動 (extension) に対するモルフォリノオリゴ処理の影響を評価した。(G-I) 5mis MO 処理胚では標識細胞の前後軸に沿った伸長がみられた (I, 矢印)。(J-L) *olβ4GalT2* MO 処理胚の標識細胞では伸長がほぼ完全に阻害されていた (L, 矢印)。

4.3 *olβ4GalT2* が合成する糖鎖は、後期原腸形成期において、細胞の挿入を介する正常な収斂伸長運動に必須である。

*olβ4GalT2* MO 処理胚の後期原腸形成期での細胞の形態を詳細に観察するため、*olβ4GalT2* MO、あるいは 5mis MO 処理胚が 16-32 細胞期の時に、一つの細胞に親油性の高い蛍光色素である DiI を顕微注入してモザイク様に標識した後、これらを観察した。その結果、すでに脊索形成の始まっている 4 体節期においては 5mis MO 処理胚の標識細胞は背側に集まり胚形成に関与しているのに対して、*olβ4GalT2* MO 処理胚の標識細胞は胚の形成に全く関与せず、胚の周囲に集まっている像が観察された (Fig 2-9A-D)。さらにこの時、背側の後方にある細胞を観察したところ、5mis MO 処理胚の標識細胞は細長く伸び、胚の中軸上で互いに密着して存在しているのに対して、*olβ4GalT2* MO 処理胚の標識細胞は丸く、極性を失った状態で胚の周囲に留まっている像が観察された (Fig 2-9E-H)。

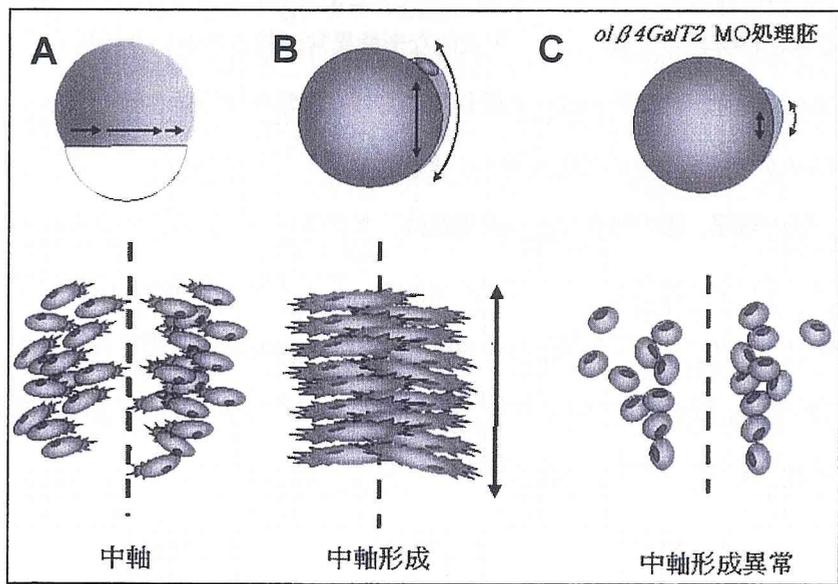
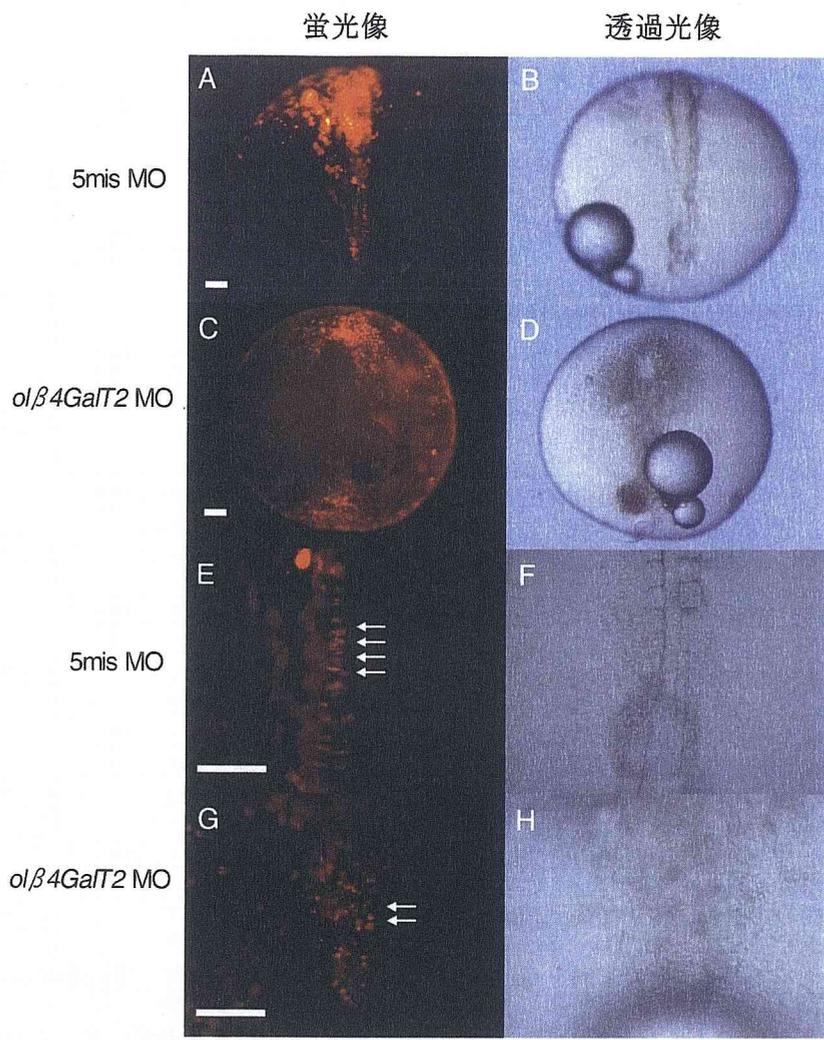
後期原腸形成期において、両方の側面から集まった細胞が細長く伸びて、中軸上で互いに密着する運動は挿入 (intercalation) と呼ばれ、この運動が胚を前後軸に沿って伸長させ、また脊索など中軸を形成する原動力であることが知られている<sup>(39)</sup> (Fig 2-10)。一連の細胞標識実験の結果から、*olβ4GalT2* MO 処理胚の背側後部においてこの挿入が起こらないことにより、伸長運動および中軸形成が起こらないこと、そしてそのことにより中軸形成の異常が眼の融合や体節形成異常といったさらなる形態異常を引き起こしていることが示唆された。以上の結果から、*olβ4GalT2* によって作られる糖鎖は、メダカ原腸形成期において細胞の挿入を介する正常な収斂伸長運動に必須であることが明らかになった。



(上) Fig 2-9 DiI によるモルフォリノオリゴ処理胚のモザイク標識実験

*olβ4GalT2* MO あるいは 5mis MO 処理胚が 16-32 細胞期の時に、一つの細胞に親油性の高い蛍光色素である DiI を顕微注入して細胞をモザイク様に標識した。(A、B) 4 体節期の 5mis MO 処理胚の蛍光像と透過光像。標識細胞は胚体へと移動していた。(C、D) 4 体節期の *olβ4GalT2* MO 処理胚の蛍光像と透過光像。標識細胞は胚体への移動はみられなかった。(E、F) 4 体節期の 5mis MO 処理胚の背側後方の細胞。標識細胞は細長く伸び、胚の中軸上で互いに密着して存在していた。(E、矢印) (G、H) 4 体節期の *olβ4GalT2* MO 処理胚の背側後方の細胞。標識細胞は丸く、極性を失った状態で胚の周囲に留まっていた (G、矢印)。Scale bar: 0.1 mm。(下) Fig 2-10 中軸形成に必須である細胞間の挿入 (intercalation) の模式図

(A) 後期原腸形成期において、収斂運動により中軸へと移動した細胞。(B) 中軸への移動の際、細胞は細長く伸び、中軸上で互いに接する。この挿入 (intercalation) は中軸の形成に必須である。(C) *olβ4GalT2* MO 処理胚では、この挿入が起こらないことにより中軸形成不全が引き起こされる。



## 第5節 考察と総括

5.1 *olβ4GalT2* によって作られる糖鎖は、メダカ後期原腸形成期において細胞の挿入を介する正常な収斂伸長運動に必須である。

本章を通して、著者は *olβ4GalT2* MO 処理胚の表現型を詳細に解析することにより、*olβ4GalT2* によって作られる糖鎖がメダカ後期原腸形成期において細胞の挿入を介する正常な収斂伸長運動に必須であることを示した。この主張の根拠となった主な観察結果として、①*olβ4GalT2* MO 処理胚は、頭部や体節のパターン形成不全、胚の短縮、眼の融合などの著しい形態異常を示すとともに、このような表現型が *olβ4GalT2* を同時に発現させることにより正常な表現型へと回復したのに対して、活性を持たない *olβ4GalT2* 変異体を発現させても回復しなかったこと。②*olβ4GalT2* MO 処理胚の異常は、後期原腸形成過程で最初に観察され、初期原腸形成期での背腹軸の形成は正常であったのに対して、後期原腸形成期から体節期にかけての後方の中軸中胚葉形成に顕著な異常がみられたこと。③*olβ4GalT2* MO 処理胚の後期原腸形成期において、収斂運動よりも伸長運動の方が著しく阻害されていたこと。④*olβ4GalT2* MO 処理胚の初期体節期において、細胞の挿入がみられなかったことが挙げられる。

①で挙げた結果は、メダカの胚形成に糖鎖の存在が必須であることを示唆している。*olβ4GalT2* は、*hβ4GalT* ファミリーの内でも複合型糖鎖の合成に必要である *hβ4GalT2* に対して最も高い相同性を示した。また著者の所属する研究室において、複合型糖鎖が豊富に存在しているアジアロオルソムコイド (ASOR) に  $\beta$ -ガラクトシダーゼを処理し、その末端を GlcNAc へと変化させたものに対して、*olβ4GalT2* は Gal を転移するが、変異体 *olβ4GalT2* は Gal を転移しないことが確認されている (未発表データ)。これらのことは、複合型糖鎖がメダカの胚形成に必須であることを示唆している。また、ヒトやマウスにおいて複合型糖鎖の合成に関わる糖転移酵素の欠損により、先天的な形態異常が起こるという報告もある。たとえば、*GnT-I* 欠損マウスでは心臓発達、神経管形成、血管新生における異常を伴う胎生致死 (E9.5) が見られること、そしてヒトの *GnT-II* 欠損が胎児の形態異常を引き起こすことなどである<sup>(7, 8)</sup>。さらに、頭部や体節のパターン形成不全、胚の短縮、眼の融合などの表現型は、ゼブラフィッシュ、マウスの中軸中胚葉欠損変異体の表現型に酷似している。マウス、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルにおいて中軸形成に必須であり、中軸中胚葉のマーカースとして知られる *no tail*、*sonic hedgehog* の欠損変異体では、いずれも頭部や尾部の低形成、胚の短縮、眼の融合がみられる<sup>(40-42)</sup>。これらのことは、個体発生における複合型糖鎖の機能が脊椎動物に普遍的なものであることを示唆している。

脊椎動物の原腸形成過程における細胞の収斂伸長運動および挿入は、三胚葉を正しい位置へと配置する運動というほかに、中軸形成の過程として定義されている<sup>(43)</sup>。後期原腸形成期において、これらの運動は協調して起こる。すなわち、胚の側面に位置する細胞が背側へと移動する過程で細長く伸び、中軸および沿軸領域で細胞同士の挿入が起こる。そして、この挿入を原動力として、中軸は幅が狭く、前後軸に沿って伸びた緻密な構造となる。したがって、脊椎動物での収斂伸長運動の異常は、常に中軸形成不全を伴う。たとえば、ゼブラフィッシュにおいて、*bmp2b* (*swirl*) 変異体では *bmp2b* の欠損により収斂運動が阻害されているため、その脊索は顕著に幅広くなるが、前後軸に沿った伸長はみられる<sup>(44)</sup>。また反対に、*knypek* (*kn*) や *wnt11* (*slb*) 変異体では、*knypek*、または *wnt11* の欠損により挿入が阻害されているため、その脊索の幅には変化がみられないものの顕著な短縮がみられる<sup>(45-49)</sup>。*olβ4GalT2* MO 処理胚の脊索は、幅はほぼ変化していないが、顕著な短縮がみられる。このことは、*olβ4GalT2* MO 処理胚において挿入が阻害されているという結果を支持している。

## 5.2 *olβ4GalT2* MO 処理胚でみられる形態異常に関わるシグナル経路は何か？

Trinkaus らは、メダカ近縁種である *Fundulus heteroclitus* の原腸形成期において、収斂伸長運動および挿入が胚体形成を引き起こすことを示した<sup>(50, 51)</sup>。その後、ゼブラフィッシュの原腸形成でも同様の細胞運動が起こっていることが示された<sup>(52-55)</sup>。したがって、メダカやゼブラフィッシュの原腸形成は共通の機構により進行しているものと考えられる。また、ゼブラフィッシュでは順遺伝学的手法により、収斂伸長運動に関わる分子がいくつか報告されている。ここでは、メダカの *olβ4GalT2* MO 処理胚の表現型とこれらの分子との関連について考察する。

細胞質でインターロイキン (IL) を介するシグナル伝達に関与している *sta3* の阻害によって、中軸周辺での収斂伸長運動や挿入の異常がみられることから、*sta3* は中軸の形成に必須の分子であると考えられている<sup>(56)</sup>。また、この異常は細胞の分化異常は伴わない。*sta3* は、その下流で細胞を中軸周辺へと集積させる液性因子の発現を制御していると考えられている<sup>(57)</sup>。この液性因子の本体は未だ同定されていないが、ニワトリなど他種生物における研究から *fgf4* であることが示唆されている<sup>(58)</sup>。一方、Wnt/PCP 経路に関わる分子の変異によって、中軸周辺での挿入に異常がみられるという報告もある<sup>(59)</sup>。Wnt/PCP 経路は、分泌性の糖タンパク質である *wnt* とその受容体 *frizzled* (*fz*) との結合が、細胞質側のエフェクターである *dishevelled* (*dsh*) と低分子量 GTPase の *rhoA*、*rac1*、*cdc42* の複合体を介して、細胞骨格の再構成を引き起こす経路である。すなわち、この経路は細胞の極性化に必須であり、細胞の形態変化や分裂方向決定に必須であると考えられている<sup>(60)</sup>。*Wnt11* あるいは *Wnt5* の欠損変異体では、中軸周辺の細胞が極性を失うことにより、胚の伸長や眼の融合といった形態異常が生じる。そして、*sta3* の例と同様に、これらの変異体

でも細胞分化の異常はみられない。また、*wnt11* や *wnt5* の下流の分子の異常によっても同様の表現型がみられる<sup>(61)</sup>。上に挙げたゼブラフィッシュの例と *olβ4GalT2* MO 処理胚の表現型との間で共通している点は、いずれも細胞分化は正常であるのに対して、胚の前後軸に沿った伸長がみられないことである。また、*fgf4* や *wnt* はいずれも糖タンパク質であり、細胞表面に存在するこれらの受容体にも糖鎖が付加されていることが予想されること、さらに糖鎖が受容体の補因子として機能する報告があることなど<sup>(62)</sup>から、糖鎖が Wnt/PCP 経路や FGF シグナリングにおいて機能している可能性が示唆される。しかし、*stat3* 阻害胚では眼の融合はみられないのに対して、Wnt/PCP 経路に関わる分子の欠損変異体ではいずれも眼の融合がみられることから、糖鎖はむしろ Wnt/PCP 経路に関与している可能性も考えられる。実際に、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の *glypican4* (ゼブラフィッシュでは *knypek* として知られている) が *wnt11* 受容体 *frizzled2* (*fz2*) の補因子として機能するという報告もある<sup>(63)</sup>。また、受容体の補因子としての HSPG の機能は、TGF-β や FGF シグナリングにおいても報告されている。しかし、HSPG の糖鎖部分は GlcA または IdoA と GlcNAc の二糖繰り返し構造であり、Galβ1-4GlcNAc といった配列を含まないので *olβ4GalT2* の基質と成り得ない。したがって、いずれにせよ今回著者が報告した現象には未知の機構が関与している可能性が高い。もちろん、*olβ4GalT2* MO 処理胚における細胞と基質の接着に対する影響も考慮する必要性はあるが、いくつか報告されている E-cadherin などの接着分子の欠損変異体ではエピボリーに影響がみられており<sup>(64)</sup>、*olβ4GalT2* MO 処理胚の表現型とは異なっている。さらに、protocadherin (*papc*) の欠損変異体は、収斂伸長運動異常の結果として中軸に異常が生じるが<sup>(65)</sup>、挿入への影響は未だ不明である。

また、ラクトサミン構造を認識する内因性レクチンとして知られるガレクチンは、ゼブラフィッシュやメダカの脊索に特異的に局在している<sup>(66)</sup>ことから、やはり脊索形成において、糖鎖が何らかの役割を担っていることが示唆される。

## 第6節 実験方法

### 完全長 *olβ4GalT2* cDNA のクローニング

メダカゲノムデータベース (NBRP; <http://shigen.lab.nig.ac.jp>) よりヒト *olβ4GalT2* (Accession No. AB024434) と高い相同性を示す塩基配列を取得した。得られた配列をもとにしてプライマー[forward; 5-CTTG AATTCGACCCGGCTGATGTTGGG-3, reverse; 5-GTGAAATTCCTAACCTGTGATGGGCCGGGG-3、(下線部は EcoRI 認識配列)] を作製し、1細胞期から稚魚のメダカから得た cDNA を混合したものを鋳型として、PCR を行い完全長 *olβ4GalT2* cDNA を得た。得られたクローンを EcoRI によって消化した後、同様に EcoRI を用いて消化した pCS2+MT ベクターへと組み込んだ。また 5-UTR を得るために、上記の cDNA を鋳型として、*olβ4GalT2* に特異的なプライマー[reverse; 5-CCTGTTCCAGAGGTCAATCGTCCTCTCTCT-3]および SMART RACE cDNA Ampurification Kit (Clontech 社製) に添付されているプライマーを用いて、PCR を行った。

### リアルタイム RT-PCR を用いたメダカ発生過程における *olβ4GalT2* の定量的解析

1細胞期、胞胚期、50%エピボリー、80%エピボリー、尾芽胚期、2体節期の胚から TRIzol Reagent (Invitrogen 社製) を用いて total RNA を抽出した。ゲノム由来 DNA を取り除くため、得られた total RNA に RNase free-DNase I を処理した後、ランダムヘキサマー (タカラバイオ社製)、および逆転写酵素を加えて 42°C で 90 分間静置して cDNA を作製した。iQ SYBR Green SuperMix (Bio-Rad 社製) に、得られた cDNA と *olβ4GalT2* に対するプライマー[forward; 5-ATGACCCGGCTGATGTTGGGACGGA-3, reverse; 5-AAGACCAGGCGGGTTCCTCAGGACA-3]、または、β-actin に対するプライマー[forward; 5-ACCCACACAGTGC CCATCTACGA-3, reverse; 5-AGACAGCACAGTGTTGGCGTACAG-3]をそれぞれ、終濃度 0.5 μM となるように加えた後、リアルタイム PCR 解析システム Chromo4 (Bio-Rad 社製) を用いて 95°C で 3 min を 1 サイクル、95°C で 10 sec、62°C で 30 sec、72°C で 30 sec を 35 サイクル、65°C で 1 分を 1 サイクルのプログラムを行い、目的の断片を増幅した。また、定量解析は Opticon Monitor Analysis Software Ver 3.1 (Bio-Rad 社製) を用いた。

### モルフォリノオリゴの調製

モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドは GeneTool 社より購入した。olβ4GalT2 MO または olβ4GalT2 MO2 は、olβ4GalT2 の開始メチオニンを含む塩基配列に相補的になるように設計した。コントロールとしては、olβ4GalT2 MO の配列のうち 5 塩基を olβ4GalT2 と相補的でない塩基に置換した 5mis MO および 5mis MO2 を用いた。以下にこれらの配列を示す。下線部は、開始メチオニン部分で、小文字は置換部位を表す。5mis MO; 5-CGTCCgAAgATCAaCCGGGTgATcG-3、5mis MO2; 5 CcAtcGAGGTTAgCGT CgTGCCaC -3、olβ4GalT2 MO; 5-CGTCCCAACATCAGCCGGGTCATGG-3、olβ4GalT2 MO2; 5- CCGAT GGAGGTTACCGTCCTGCGAC-3

### olβ4GalT2 への変異導入

W<sup>276</sup> が A へと変換されるように設計したプライマー[forward; 5-GAGTACTGGGGCGCGGGGGGGGAG GAC-3、reverse; 5-GTCCTCCCCCCCCCGC GCCCAGTACTC (下線部は変異導入部位)]を用いて、pCS2+MT-olβ4GalT2 を鋳型にして PCR を行った。得られた PCR 産物を KpnI で消化することにより鋳型由来のプラスミドを除いた後、大腸菌 TOP10 (invitrogen 社製) を用いて形質転換を行った。続いて、得られたコロニーの中から 16 コロニーを選択してプラスミドを精製した後、変異導入部位の配列を確認することにより陽性クローンを得た。

### olβ4GalT2 RNA および変異体 olβ4GalT2 RNA の調製

Capped olβ4GalT2 RNA および変異体 Capped olβ4GalT2 RNA は、pCS2+MT-olβ4GalT2 または pCS2+MT-変異体 olβ4GalT を NotI により消化した後、RiboMAX Large Scale RNA Production System-SP6 (Promega 社製) を用いて作製した。

### モルフォリノオリゴまたはRNAのメダカ胚への顕微注入

顕微注入に用いたマイクロピペットは、マイクロピペットプーラーPC-10（ナリシゲ社製）を用いて、芯入ガラス管GD-1（1×90 mm、ナリシゲ社製）の加熱部を引き切った後、マイクログラインダーEG-400（ナリシゲ社製）を用いて先端を研磨することにより作製した。続いて、モルフォリノオリゴまたはRNAを注入したマイクロピペットをジョイスティック式マニピュレーターMN-151（ナリシゲ社製）に接続した。その後、実体顕微鏡（オリンパス社製）下で1-2細胞期のメダカ胚をガラス製ホルダー（雨林製作所社製）上に固定し、光学顕微鏡（オリンパス社製）下でマイクロピペットの先端を細胞内へ挿入した後、マイクロインジェクターFemtoJet（Eppendorf社製）を用いて顕微注を行った。またこの時、注入した液滴の直径が約0.05 mmとなるよう圧力の調整を行った。

### whole mount *in situ* hybridization (WISH) 解析用プローブの調製

WISH解析に用いたプローブの内、*ntl*、*shh*、*bmp2*、*axl*、*spt*および*gsc*の部分配列を含むプラスミドは、京都大学大学院農学研究科木下政人博士より供与された。*olβ4GalT2*、*chd*、*pax2*および*six3*は、ESTデータベースから取得した配列をもとにしてPCRにより部分配列を得た後、pGEM-T easy（Promega社製）を用いたTAクローニングを行うことにより得た。PCRは、50%エピポリーから2体節期の胚からtotal RNAを抽出した後、逆転写することにより調製したcDNAを鋳型として、それぞれの部分配列に対するプライマー[*olβ4GalT2*: forward; 5-CATCTGCAAAGGCGTCCTGCTGCTTTG-3, reverse; 5-CTCAGTATGGGATG AAGGTAGTGGAGC-3. *chd*: forward: 5-CACTGCCATACAGCGGTCTGGATGT-3, reverse; 5-TCATAGTTG GGGTCCAGTTGGAAC-3. *pax2*: forward; 5-GCGGATCCGTTTTTCGGGGATGCAC-3, reverse; 5-GATAGA GTAAGATCCCCTGGGTC-3. *six3*: forward; 5-ATGGTTTTTCAGAGCTCCGCTTGACT-3, reverse; 5-TAAA GCAGTGCGTCTTCTGCTCACC-3.]を用いて行った。得られたプラスミドは適切な制限酵素により消化された後、DIG RNA Labeling Kit（Roche社製）を用いてアンチセンスプローブまたはセンスプローブの調製を行った。以下にプローブ調製に用いた制限酵素およびRNAポリメラーゼ組み合わせを示す。*ntl* (XhoI-T3)、*shh* (EcoRI-T7)、*bmp2* (EcoRI-T7)、*axl* (EcoRI-T7)、*spt* (EcoRI-T7)、*gsc* (EcoRI-T7)、*chd* (MscI-SP6)、*pax2* (NcoI-SP6)、*six3* (Sall-T7)、センス*olβ4GalT2* (NcoI-SP6)、アンチセンス*olβ4GalT2* (SpeI-T7)。

## WISH 解析

whole mount *in situ* hybridization (WISH) は Ristoratore らの方法に準じて行った<sup>(67)</sup>。すなわち、各発生段階の胚を 4%パラホルムアルデヒド/PBS 中で室温、4 時間振とうした後、時計用ピンセット (No.5、INOX 社製) を用いて卵殻を取り除いた。次にメタノールによって脱水後、再水和した胚を proteinase K で処理した。これらの胚を PBST で洗浄して、ハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide、5×SSC、50 μg/ml ヘパリン、0.1% Tween、5 mg/ml torula RNA) 中で 65°C、3 時間振とうした後、プローブを添加して同様の条件で一晩振とうした。次に、50% formamide/2×SSC 中で 65°C、2 回振とうした後、同様にして 2×SSC、続いて 0.2×SSC 中で振とうした。これらをブロッキング溶液 (5% sheep serum/PBST) 中で室温、1 時間振とうして、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニンポリクローナル抗体/PBST (Roche 社製) 中でさらに 2 時間振とうした。その後、PBST で洗浄し、発色基質 BM purple (Roche 社製) を加えて発色させた。

## ケージド蛍光化合物を用いた細胞追跡実験

1 細胞期のメダカ胚に 1.5% DMNB-caged fluorescein dextran (3000 MW、Molecular Probe 社製) を顕微注入した後、同様にして 1 mM の 5mis MO または *olβ4GalT2* MO を顕微注入した。細胞を蛍光標識するため、これらの胚を 30-50%エピボリーまで発生させ、胚の背側または側面にマイクロポイント (ニコン社製) を用いて UV を点照射した後、胚形成過程を観察した。

## Dil を用いたメダカ胚のモザイク標識実験

1 細胞期のメダカ胚に 1 mM の 5mis MO または *olβ4GalT2* MO を顕微注入した後、モルフォリノオリゴ処理胚を 16-32 細胞期まで発生させた。16-32 細胞期にあるモルフォリノオリゴ処理胚の 1 細胞にメタノールで調製した 1.5% Dil (Molecular Probe 社製) を顕微注入した後、胚形成過程を観察した。

## 結論

著者の本稿における主な主張を以下に記す

- メダカは少なくともヒトやマウスなどの哺乳動物と同様の糖鎖を発現している (第1章)。
- メダカ発生過程において、N型糖鎖は発生の進行に伴って質的および量的に劇的な変化を遂げているが、その中でも特に複合型の変化が最も大きいことから、複合型糖鎖はメダカ発生過程において重要な機能を有することが示唆される (第1章)。
- $\alpha\beta4\text{GalT2}$  が合成する複合型糖鎖はメダカ原腸形成期における挿入を介する正常な収斂伸長運動に必須である (第2章)。

糖鎖は、核酸やタンパク質に次ぐ第3の生命鎖と呼ばれている。核酸は4種の塩基が重合した鎖であり、タンパク質は約20種のアミノ酸残基が重合した鎖である。それに対して、糖鎖は多くの異性体を持つ糖残基からなる鎖であり、結合様式の違いによっても異なる構造をとり得る。さらに、その非還元末端が硫酸基やアセチル基により修飾されているものまである。すなわち、糖鎖は生命鎖の中で最も多様な構造を取り得る。そして、この糖鎖の持つ多様性は糖転移酵素の多様性に起因すると考えられている。なぜなら、多くの生物種において同様の活性を持つ糖転移酵素が複数存在している例が多く見られるからである。もちろん、活性が同じでも、それぞれの酵素において基質特異性、発現時期または局在が異なることもある。しかし、アミノ酸配列に若干の違いはあるものの、活性、基質特異性、発現時期、局在において全く同様の酵素も多く存在する。そして、こういった機能重複遺伝子のうちの一つを抑制しても糖鎖の構造にはほぼ影響を与えることはできない。この遺伝子の機能重複が遺伝子機能阻害実験の弱点である。しかし、遺伝子の重複の仕方は生物種によって異なっている。たとえば、*GnT-I* に相同性のある遺伝子はヒトやマウスでは1つだが、線虫では *gly-12*、*gly-13g*、*gly-14* の3つあることが知られている<sup>(68)</sup>。したがって、糖鎖の機能を理解するためには、マウスだけでなく重複性の異なる他の生物種での糖鎖についても調べる必要がある。著者の一連の研究によってメダカは糖鎖生物学の新たな材料として加えられた。さらに本研究では、複合型糖鎖の機能を原腸形成期の収斂伸長運動という一つの現象へと結びつけることもできた。確かに、メダカでは必要だがマウスでは不要という糖鎖もあるかもしれない。しかし、システムを分子レベルでみた時、受容体の補因子としての機能のように、その役割が保存されていることがあると考えられる。すなわち、用いられる糖鎖の構造は種によって異なっても、システムとしては種を越えて保存されていることが考えられる。

ほとんどの生物種の前腸形成過程では、多くの異なる細胞集団が協調的に動くことにより、背腹軸、前後軸といった体の形作りの基礎が完成するという共通の現象がみられる<sup>(69)</sup>。この時、それぞれの細胞群は生体内の微小環境の中で基質あるいは他の細胞と相互作用しながら分化と移動を続けている。一方、細胞の表面は糖鎖で覆われており、糖鎖はこの生体内の微小環境の変化に最初に触れ得る存在である。糖鎖の構造は多様であり、この時期においても特徴的な発現をするものが存在する。以上のことから、前腸形成期は糖鎖の機能を知るうえで、非常に興味深い期間であると考えられる。今後さらに研究を重ねて、前腸形成過程における糖鎖の役割を分子レベルで明らかにしていきたい。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えて下さいました京都大学名誉教授川寄敏祐先生に深く感謝の意を表します。そして、本稿の執筆や学位申請にあたり御指導賜りました京都大学薬学研究科竹島 浩教授に深謝いたします。また、本研究の遂行にあたり終始直接の御指導と御鞭撻を賜りました京都大学医学部岡昌吾教授に深謝いたします。また、本研究に種々の御助力と御協力を頂きました京都大学大学院農学研究科木下政人博士、並びに京都大学医学部角田品子博士に深く感謝いたします。また、本稿の御校閲を頂きました京都大学大学院薬学研究科池田篤史博士に謹んで感謝いたします。最後になりましたが、本稿執筆にあたり多大なる御協力を頂きました京都大学大学院薬学研究科生体分子認識学分野の研究室員の皆様から心より感謝いたします。

## 引用文献

- (1) Eisenberg, D., Marcotte, E. M., Xenarios, I., and Yeates, T. O. Protein function in the post-genomic era., (2000) *Nature*, **405**, 823-6.
- (2) Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M. M., and Pawson, T. Reading protein modifications with interaction domains., (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 473-83.
- (3) Ben-Dor, S., Esterman, N., Rubin, E., and Sharon, N. Biases and complex patterns in the residues flanking protein N-glycosylation sites., (2004) *Glycobiology*, **14**, 95-101.
- (4) Lis, H., and Sharon, N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects., (1993) *Eur J Biochem*, **218**, 1-27.
- (5) Solter, D., and Knowles, B. B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1), (1978) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 5565-9.
- (6) Abo, T., and Balch, C. M. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1), (1981) *J Immunol*, **127**, 1024-9.
- (7) Grünewald, S., Matthijs, G., and Jaeken, J. Congenital disorders of glycosylation: a review., (2002) *Pediatr Res*, **52**, 618-24.
- (8) Ioffe, E., and Stanley, P. Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates., (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 728-32.
- (9) YAMAMOTO, T. Physiological studies on fertilization and activation of fish eggs. V. The role of calcium ions in activation of *Oryzias* eggs., (1954) *Exp Cell Res*, **6**, 56-68.
- (10) Kornfeld, R., and Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides., (1985) *Annu Rev Biochem*, **54**, 631-64.

- (11) Almeida, R., Levery, S. B., Mandel, U., Kresse, H., Schwientek, T., Bennett, E. P., and Clausen, H. Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family., (1999) *J Biol Chem*, **274**, 26165-71.
- (12) Asano, M., Furukawa, K., Kido, M., Matsumoto, S., Umesaki, Y., Kochibe, N., and Iwakura, Y. Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells., (1997) *EMBO J*, **16**, 1850-7.
- (13) Freeze, H. H. Human disorders in N-glycosylation and animal models., (2002) *Biochim Biophys Acta*, **1573**, 388-93.
- (14) Cipollo, J. F., Awad, A. M., Costello, C. E., and Hirschberg, C. B. N-Glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages., (2005) *J Biol Chem*, **280**, 26063-72.
- (15) Fabini, G., Freilinger, A., Altmann, F., and Wilson, I. B. Identification of core alpha 1,3-fucosylated glycans and cloning of the requisite fucosyltransferase cDNA from *Drosophila melanogaster*. Potential basis of the neural anti-horseadish peroxidase epitope., (2001) *J Biol Chem*, **276**, 28058-67.
- (16) Taguchi, T., Seko, A., Kitajima, K., Inoue, S., Iwamatsu, T., Khoo, K. H., Morris, H. R., Dell, A., and Inoue, Y. Structural studies of a novel type of tetraantennary sialoglycan unit in a carbohydrate-rich glycopeptide isolated from the fertilized eggs of Indian Medaka fish, *Oryzias melastigma*., (1993) *J Biol Chem*, **268**, 2353-62.
- (17) Varki, A., and Freeze, H. H. The major glycosylation pathways of mammalian membranes. A summary., (1994) *Subcell Biochem*, **22**, 71-100.
- (18) Jefferis, R., Lund, J., Mizutani, H., Nakagawa, H., Kawazoe, Y., Arata, Y., and Takahashi, N. A comparative study of the N-linked oligosaccharide structures of human IgG subclass proteins., (1990) *Biochem J*, **268**, 529-37.

- (19) Tsuda, E., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S., and Sasaki, R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin., (1990) *Eur J Biochem*, **188**, 405-11.
- (20) Mizuochi, T., Yamashita, K., Fujikawa, K., Kisiel, W., and Kobata, A. The carbohydrate of bovine prothrombin. Occurrence of Gal beta 1 leads to 3GlcNAc grouping in asparagine-linked sugar chains., (1979) *J Biol Chem*, **254**, 6419-25.
- (21) Liu, T., Stetson, B., Turco, S. J., Hubbard, S. C., and Robbins, P. W. Arrangement of glucose residues in the lipid-linked oligosaccharide precursor of asparaginyl oligosaccharides., (1979) *J Biol Chem*, **254**, 4554-9.
- (22) Herscovics, A., and Orlean, P. Glycoprotein biosynthesis in yeast., (1993) *FASEB J*, **7**, 540-50.
- (23) Fenderson, B. A., Eddy, E. M., and Hakomori, S. Glycoconjugate expression during embryogenesis and its biological significance., (1990) *Bioessays*, **12**, 173-9.
- (24) Kuratani, S. C. Alternate expression of the HNK-1 epitope in rhombomeres of the chick embryo., (1991) *Dev Biol*, **144**, 215-9.
- (25) Zhang, W., Revers, L., Pierce, M., and Schachter, H. Regulation of expression of the human beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II gene (MGAT2) by Ets transcription factors., (2000) *Biochem J*, **347**, 511-8.
- (26) Dennis, J. W., Granovsky, M., and Warren, C. E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression., (1999) *Biochim Biophys Acta*, **1473**, 21-34.
- (27) Natsuka, S., Adachi, J., Kawaguchi, M., Ichikawa, A., and Ikura, K. Method for purification of fluorescence-labeled oligosaccharides by pyridylamination., (2002) *Biosci Biotechnol Biochem*, **66**, 1174-5.
- (28) Takahashi, N., Wada, Y., Awaya, J., Kurono, M., and Tomiya, N. Two-dimensional elution map of GalNAc-containing N-linked oligosaccharides., (1993) *Anal Biochem*, **208**, 96-109.

- (29) Ohkawara, B., Yamamoto, T. S., Tada, M., and Ueno, N. Role of glypican 4 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*., (2003) *Development*, **130**, 2129-38.
- (30) Zhu, Y., Song, D., Tran, N. T., and Nguyen, N. The effects of the members of growth hormone family knockdown in zebrafish development., (2007) *Gen Comp Endocrinol*, **150**, 395-404.
- (31) Fukui, A., Goto, T., Kitamoto, J., Homma, M., and Asashima, M. SDF-1 alpha regulates mesendodermal cell migration during frog gastrulation., (2007) *Biochem Biophys Res Commun*, **354**, 472-7.
- (32) Nasevicius, A., and Ekker, S. C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish., (2000) *Nat Genet*, **26**, 216-20.
- (33) Guo, S., Sato, T., Shirane, K., and Furukawa, K. Galactosylation of N-linked oligosaccharides by human beta-1,4-galactosyltransferases I, II, III, IV, V, and VI expressed in Sf-9 cells., (2001) *Glycobiology*, **11**, 813-20.
- (34) Iwamatsu, T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*., (2004) *Mech Dev*, **121**, 605-18.
- (35) Schoenwolf, G. C., and Smith, J. L. Gastrulation and early mesodermal patterning in vertebrates., (2000) *Methods Mol Biol*, **135**, 113-25.
- (36) Marlow, F., Zwartkruis, F., Malicki, J., Neuhauss, S. C., Abbas, L., Weaver, M., Driever, W., and Solnica-Krezel, L. Functional interactions of genes mediating convergent extension, knypek and trilobite, during the partitioning of the eye primordium in zebrafish., (1998) *Dev Biol*, **203**, 382-99.
- (37) Munoz, R., Moreno, M., Oliva, C., Orbenes, C., and Larain, J. Syndecan-4 regulates non-canonical Wnt signalling and is essential for convergent and extension movements in *Xenopus* embryos., (2006) *Nat Cell Biol*, **8**, 492-500.
- (38) Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D., and Skoglund, P. Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation., (2000) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**, 897-922.

- (39) Shih, J., and Keller, R. Cell motility driving mediolateral intercalation in explants of *Xenopus laevis*, (1992) *Development*, **116**, 901-14.
- (40) Nasevicius, A., and Ekker, S. C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish., (2000) *Nat Genet*, **26**, 216-20.
- (41) Abdelkhalek, H. B., Beckers, A., Schuster-Gossler, K., Pavlova, M. N., Burkhardt, H., Lickert, H., Rossant, J., Reinhardt, R., Schalkwyk, L. C., Muller, I., Herrmann, B. G., Ceolin, M., Rivera-Pomar, R., and Gossler, A. The mouse homeobox gene *Not* is required for caudal notochord development and affected by the truncate mutation., (2004) *Genes Dev*, **18**, 1725-36.
- (42) Conlon, F. L., Sedgwick, S. G., Weston, K. M., and Smith, J. C. Inhibition of *Xbra* transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of *Xbra* in dorsal mesoderm., (1996) *Development*, **122**, 2427-35.
- (43) Wargä, R. M., and Kimmel, C. B. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish., (1990) *Development*, **108**, 569-80.
- (44) Myers, D. C., Sepich, D. S., and Solnica-Krezel, L. Bmp activity gradient regulates convergent extension during zebrafish gastrulation., (2002) *Dev Biol*, **243**, 81-98.
- (45) Heisenberg, C. P., Tada, M., Rauch, G. J., Saude, L., Concha, M. L., Geisler, R., Stemple, D. L., Smith, J. C., and Wilson, S. W. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation., (2000) *Nature*, **405**, 76-81.
- (46) Topczewski, J., Sepich, D. S., Myers, D. C., Walker, C., Amores, A., Lele, Z., Hammerschmidt, M., Postlethwait, J., and Solnica-Krezel, L. The zebrafish glypican knypek controls cell polarity during gastrulation movements of convergent extension., (2001) *Dev Cell*, **1**, 251-64.
- (47) Chuai, M., Zeng, W., Yang, X., Boychenko, V., Glazier, J. A., and Weijer, C. J. Cell movement during chick primitive streak formation., (2006) *Dev Biol*, **296**, 137-49.

- (48) Sepich, D. S., and Solnica-Krezel, L. Analysis of cell movements in zebrafish embryos: morphometrics and measuring movement of labeled cell populations in vivo., (2005) *Methods Mol Biol*, **294**, 211-33.
- (49) Marlow, F., Gonzalez, E. M., Yin, C., Rojo, C., and Solnica-Krezel, L. No tail co-operates with non-canonical Wnt signaling to regulate posterior body morphogenesis in zebrafish., (2004) *Development*, **131**, 203-16.
- (50) Trinkaus, J. P., Trinkaus, M., and Fink, R. D. On the convergent cell movements of gastrulation in *Fundulus*., (1992) *J Exp Zool*, **261**, 40-61.
- (51) Trinkaus, J. P. Gradient in convergent cell movement during *Fundulus* gastrulation., (1998) *J Exp Zool*, **281**, 328-35.
- (52) Warga, R. M., and Kimmel, C. B. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish., (1990) *Development*, **108**, 569-80.
- (53) D'Amico, L. A., and Cooper, M. S. Morphogenetic domains in the yolk syncytial layer of axiating zebrafish embryos., (2001) *Dev Dyn*, **222**, 611-24.
- (54) Solnica-Krezel, L. Gastrulation in zebrafish – all just about adhesion?, (2006) *Curr Opin Genet Dev*, **16**, 433-41.
- (55) Montero, J. A., Carvalho, L., Wilsch-Brauninger, M., Kilian, B., Mustafa, C., and Heisenberg, C. P. Shield formation at the onset of zebrafish gastrulation., (2005) *Development*, **132**, 1187-98.
- (56) Yamashita, S., Miyagi, C., Carmany-Rampey, A., Shimizu, T., Fujii, R., Schier, A. F., and Hirano, T. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation., (2002) *Dev Cell*, **2**, 363-75.
- (57) Jessen, J. R., Topczewski, J., Bingham, S., Sepich, D. S., Marlow, F., Chandrasekhar, A., and Solnica-Krezel, L. Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements., (2002) *Nat Cell Biol*, **4**, 610-5.

- (58) Yang, X., Dormann, D., Munsterberg, A. E., and Weijer, C. J. Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8., (2002) *Dev Cell*, **3**, 425-37.
- (59) Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D., and Solnica-Krezel, L. Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements., (2002) *Curr Biol*, **12**, 876-84.
- (60) Winter, C. G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J. D., and Luo, L. Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton., (2001) *Cell*, **105**, 81-91.
- (61) Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H., and Moon, R. T. Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements., (2003) *Curr Biol*, **13**, 680-5.
- (62) Kayed, H., Kleeff, J., Keleg, S., Jiang, X., Penzel, R., Giese, T., Zentgraf, H., Buchler, M. W., Korc, M., and Friess, H. Correlation of glypican-1 expression with TGF-beta, BMP, and activin receptors in pancreatic ductal adenocarcinoma., (2006) *Int J Oncol*, **29**, 1139-48.
- (63) Topczewski, J., Sepich, D. S., Myers, D. C., Walker, C., Amorés, A., Lele, Z., Hammerschmidt, M., Postlethwait, J., and Solnica-Krezel, L. The zebrafish glypican knypek controls cell polarity during gastrulation movements of convergent extension., (2001) *Dev Cell*, **1**, 251-64.
- (64) Shimizu, T., Yabe, T., Muraoka, O., Yonemura, S., Aramaki, S., Hatta, K., Bae, Y. K., Nojima, H., and Hibi, M. E-cadherin is required for gastrulation cell movements in zebrafish., (2005) *Mech Dev*, **122**, 747-63.
- (65) Kim, S. H., Yamamoto, A., Bouwmeester, T., Agius, E., and Robertis, E. M. The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation., (1998) *Development*, **125**, 4681-90.

- (66) Ahmed, H., Du, S. J., O'Leary, N., and Vasta, G. R. Biochemical and molecular characterization of galectins from zebrafish (*Danio rerio*): notochord-specific expression of a prototype galectin during early embryogenesis., (2004) *Glycobiology*, 14, 219-32.
- (67) Ristoratore, F., Carl, M., Deschet, K., Richard-Parpaillon, L., Boujard, D., Wittbrodt, J., Chourrout, D., Bourrat, F., and Joly, J. S. The midbrain-hindbrain boundary genetic cascade is activated ectopically in the diencephalon in response to the widespread expression of one of its components, the medaka gene *O1-eng2*., (1999) *Development*, 126, 3769-79.
- (68) Chen, S., Spence, A. M., and Schachter, H. Isolation of null alleles of the *Caenorhabditis elegans* *gly-12*, *gly-13* and *gly-14* genes, all of which encode UDP-GlcNAc: alpha-3-D-mannoside beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I activity., (2003) *Biochimie*, 85, 391-401.
- (69) Solnica-Krezel, L. Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation., (2005) *Curr Biol*, 15, R213-28.