

氏名	との やま やす ひろ 殿 山 泰 弘
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 611 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	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

論文調査委員 (主査) 教授 竹 島 浩 教授 伊 藤 信 行 教授 中 山 和 久

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質の翻訳後修飾の一つである糖鎖付加は生体内において多様な生命現象に関与していることが知られている。特に個体形成過程において劇的な変化を示す糖鎖がいくつか知られており、この過程で糖鎖が重要な役割を果たしていることが考えられる。しかし、糖鎖は多様な構造を取り得ること、そして特異的なプローブが乏しいことなどから、糖鎖の機能と個体発生とを直接結びつけた研究例はいまだ少ない。

メダカは多産で発生に要する期間が短いことに加えて、発生が体外で進行するため観察が容易であることから、古くから発生研究の好材料として用いられてきた。そこで、申請者は個体発生における糖鎖機能の解明を目的としてメダカを材料として採用した。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、各発生段階の卵に存在する糖鎖の構造解析を行った。さらに得られた情報に基づき、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いて糖転移酵素の発現を抑制することにより糖鎖合成経路を乱し、糖タンパク質の有する糖鎖のメダカ胚形成過程に対する影響を検討した。

第一章 メダカ発生過程における N 型糖鎖プロファイリング

二次元マッピング法を用いて受精後から孵化までの N 型糖鎖の構造推定を行った。その結果、約30種以上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、マウスをはじめとする哺乳動物と同種の構造を有することが考えられた。また、一般に N 型糖鎖は、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、メダカにおいても約10種の高マンノース型、約2種の混成型、約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となった。得られた二次元マップにおいて高マンノース型、及び混成型糖鎖は、発生のどの時期にも見られた。一方、複合型糖鎖のうち受精後3日目以降より新たに検出される一群の構造が見られ、これらは3本から4本の高分岐鎖を有する酸性、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した機能がメダカにおいても保存されており、N 型糖鎖では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。

第二章 メダカ胚形成過程における β 1-4 ガラクトース転移酵素 2 の機能解析

複合型糖鎖上に見られるポリラクトサミン、Le^x 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 β 1-4 GlcNAc) といった共通の構造を有する。 β 1-4 ガラクトース転移酵素 (B4GALT) は、この構造の合成に必須の糖転移酵素である。ヒトにおいて B4GALT は7種のアイズザイムからなるファミリーを形成している。そこで、申請者はこれまで解析がなされていなかった B4GALT2 に着目し、メダカ胚を用いた B4GALT2 の機能抑制実験を行った。

B4GALT2 遺伝子の発現を抑制するため、メダカ由来 B4GALT2 遺伝子をクローニングした。得られた配列に対するモルフォリノアンチセンスオリゴを作製し、これを 1-2 細胞期のメダカ胚に顕微注入した。モルフォリノアンチセンスオリゴは標的遺伝子に対し配列特異的に結合することにより、その遺伝子の翻訳過程を阻害する。またコントロールとして、標的配列に相補的でない 5 塩基を入れ替えた配列を有するモルフォリノアンチセンスオリゴを顕微注入した。

アンチセンスオリゴによる発現抑制実験の結果、コントロールオリゴ処理胚のほぼ全てが正常に発生したのに対し、アンチセンスオリゴ処理胚の約90%に胚の短縮、眼の融合、体節の分節化異常といった著しい形態異常が見られた。さらにこれらの形態異常は、B4GALT2 遺伝子をコードする RNA の顕微注入により救済され、B4GALT2 の活性を欠いた変異体をコードする RNA の顕微注入では救済されなかった。このことから B4GALT2 の合成する糖鎖が形態形成に必要であることが示唆された。また、アンチセンスオリゴ処理胚で見られる異常は後期原腸形成期から観察され、マーカー遺伝子をプローブとした whole mount *in situ* hybridization の結果、初期原腸形成期において三胚葉のマーカー遺伝子は正常な発現パターンを示すのに対し、後期原腸形成期において中胚葉マーカーである no tail の脊索での発現パターンに異常が見られたことからアンチセンスオリゴ処理胚では正常な脊索形成が阻害されていることが明らかになった。このことから B4GALT2 の産物が初期発生での細胞の分化ではなく後期原腸形成期における収斂伸長運動に必要であることが示唆された。そこで、B4GALT2 が収斂伸長運動に関与しているかどうかを確かめるために30-50%エピソード期の背側、または側面のエピソード先端にあたる各領域をケージド化合物によって標識して、これらの細胞運動を観察した。その結果、アンチセンスオリゴ処理胚において収斂にあたる運動はほぼ正常であるのに対して、伸長にあたる運動が著しく阻害された。さらに、アンチセンスオリゴ処理胚では収斂運動の結果、背側に集合した細胞の多くが胚体に取り込まれることなく、極性を失った状態で残っている像が観察された。正常胚では両側から背側に集合した細胞は背側組織の周囲で中軸に交わるように細長く伸びた後、中軸においてそれらの細胞が交互に接触し、入れ子様の構造を取ることが知られている。そして、この一連の細胞運動は挿入と呼ばれ、胚を前後軸へと伸長するのに必須である。すなわち、アンチセンスオリゴ処理胚において、背側への細胞移動は正常であるが、胚体に集まった細胞群が極性を持たずにそこへとどまっているため、細胞同士の挿入が生じないことが示唆された。これらのことから B4GALT2 の合成する糖鎖がメダカ後期原腸形成期において正常な収斂伸長運動に必須であることが強く示唆された。

以上、本研究は発生過程で発現する糖鎖の構造と機能について詳細に解析したものであり、脊椎動物における糖鎖の普遍性を示すとともに、個体発生の機構解明に関して重要な知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

個体形成過程において糖鎖の発現は、時期特異的または組織特異的に厳密な制御を受けている。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、*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) がみられるという報告もある。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。しかし哺乳動物は、体内で発生が進むために詳細な解析を行うには困難が伴うことから、これまで発生と糖鎖の関連性は強く示唆されてきたものの、その機能に関しては未だ不明な点が多い。そこで申請者は、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、発生生物学のモデル動物であるメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて、個体形成過程において発現する糖鎖の構造解析を行うとともに、発生の進行に伴い質的または量的に変化する糖鎖の機能解析を試み、以下の新知見を得た。

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ところ、メダカはヒトやマウスをはじめとする哺乳動物と同種の糖鎖構造を有することが明らかになった。また、N 型糖鎖に属する高マンノース型糖鎖、混成型糖鎖および複合型糖鎖のなかでも特に複合型糖鎖は、発生の進行に伴って質的または量的な変化がみられた。さらに受精後 3 日目以降の胚において高分枝の複合型糖鎖の種類が増加することが明らかとなった。これらのことからメダカは、哺乳動物に共通する糖鎖合成経路を有することに加えて、発生過程における複合型糖鎖の重要性が示唆された。

次に申請者は、発生過程における複合型糖鎖の機能を調べるために、この糖鎖の合成に必須であるガラクトース転移酵素 (β GalT2) に着目して、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたメダカ β GalT2 (*ol β GalT2*) の機能抑制実験を行った。その結果、コントロールオリゴ処理胚のほぼ全てが正常に発生したのに対し、アンチセンスオリゴ処理胚の約90%に胚の短縮、眼の融合、体節の分節化異常といった著しい形態異常がみられた。さらにこれらの形態異常は、*ol β GalT2* RNA の顕微注入により救済され、活性に必須のアミノ酸に変異を導入した変異体 *ol β GalT2* RNA の顕微注入では救済されなかった。このことから *ol β GalT2* の合成する糖鎖が形態形成に必須であることが示された。*ol β GalT2*

MO 処理胚においてみられる異常は、後期原腸形成期から観察された。様々なマーカー遺伝子の発現解析の結果、初期原腸形成期において三胚葉のマーカー遺伝子は、正常な発現パターンを示すのに対して、後期原腸形成期において中胚葉マーカーである *no tail* の脊索における発現パターンについて異常が見られたことから、アンチセンスオリゴ処理胚は、正常な脊索形成が阻害されていることが明らかになった。このことから *olβ4GalT2* が初期発生での細胞の分化ではなく、後期原腸形成期における収斂伸長運動に必須であることが示唆された。そこで、*olβ4GalT2* が収斂伸長運動に関与しているかどうかを確かめるために30-50%エピボリー期の背側、または側面のエピボリー先端にあたる各領域をケージド化合物によって標識して、これらの細胞運動を観察した。その結果、*olβ4GalT2* MO 処理胚において収斂運動は、ほぼ正常であるのに対して、伸長運動は著しく阻害されていた。さらに、*olβ4GalT2* MO 処理胚において収斂運動により背側へ集合したほとんどの細胞は、極性を尖った状態で胚体の周囲に留まっていることが明らかになった。正常な発生過程において、両側から背側へと移動した細胞は、胚体周囲において細長く伸びつつ、互いに接触して入れ子様の構造を取ることが知られている。この一連の細胞運動は挿入 (intercalation) と呼ばれ、胚を前後軸へと伸長するのに必須である。すなわち、アンチセンスオリゴ処理胚において背側への細胞移動は正常だが、胚体へと集まった細胞は、極性を持たずにそこへ留まっているために細胞同士の挿入が生じないことが示された。これらのことから *olβ4GalT2* の合成する糖鎖は、メダカ後期原腸形成期において挿入を介する収斂伸長運動に必須であることが示唆された。

以上の研究は、メダカをモデル動物として用い、発生過程で発現する糖鎖の構造と機能について初めて詳細に解析したものであるとともに、原腸形成過程における糖鎖の重要性を示したものであり、個体発生の機構解明において極めて重要な知見を与えるものである。よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。さらに、平成19年2月23日において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。