

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 脊椎動物におけるシアル酸の結合様式多様性の  
生物学的意義の解明

氏名 大本 敬之

## 論文内容の要旨

シアル酸 (Sia)は細胞表面の糖タンパク質や糖脂質上の糖鎖の最末端に存在する酸性9炭糖で、受精、発生、免疫、神経活動など様々な生命現象において、細胞認識や細胞接着などの重要な機能を果たしている。また、シアル酸生合成系の酵素の欠損細胞は生存可能であるが、それらの欠損マウスおよびメダカが胎仔および幼魚において致死となることから、シアル酸は脊椎動物の胚発生における必須単糖であることが知られている。また、このことはシアル酸の機能探求を個体レベルで行うことの重要性も示している。シアル酸の特徴の1つとして、結合様式多様性をもつことが挙げられる。シアル酸は稀に  $\alpha 2,8$  または  $\alpha 2,9$  結合オリゴ/ポリシアル酸鎖として存在することもあるが、通常は糖鎖末端のガラクトース (Gal) 残基上に1残基のみ  $\alpha 2,3$  または  $\alpha 2,6$  結合で存在している。この結合様式の違いは、ウイルス感染における宿主特異的な棲み分けや、免疫系における免疫細胞特異的な自己非自己認識機構に関与することが知られており、これらの事例ではシアル酸結合様式の多様性が重要であることは明らかである。一方、近年、細胞接着分子  $\beta 1$ -インテグリン上の  $\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}$  の存在が培養細胞の細胞接着性や細胞運動性を変化させるという報告があるが、この現象において、 $\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}$  そのものが必要であるのか  $\text{Sia}\alpha 2,3\text{Gal}$  でも代替できるのかは不明である。その解答は、例えば、個体レベルで  $\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}$  残基を  $\text{Sia}\alpha 2,3\text{Gal}$  残基へと変換して表現型の変化の有無を調べることによって得られるであろうが、そのような研究は皆無である。そこで本研究では、シアル酸結合様式の多様性が本質的に重要であるのか否かを明らかにする方法論の開発と、胚発生におけるシアル酸の結合様式多様性の意義を解明することを目的として、発生学の優れたモデル脊椎動物であるメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて取り組んだ。

まず、メダカ初期発生において  $\alpha 2,6$  と  $\alpha 2,3$  結合のどちらが重要なのかを探索するために、 $\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}$  認識レクチンである SNA と  $\text{Sia}\alpha 2,3\text{Gal}$  認識レクチンである MAA

を受精膜の内側で胚を取り囲む卵胞腔中に注入した。その結果、SNA を注入した時のみ、SNA 濃度依存的に胚体形成前に致死もしくは異常な胚体形成を示した。これより、Sia $\alpha$ 2,3Gal ではなく、Sia $\alpha$ 2,6Gal がメダカ初期発生において重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、メダカ初期発生における Sia $\alpha$ 2,6Gal の生物学的役割を解明するために、遺伝子編集技術 CRISPR/Cas 9 法を用いて、 $\beta$ -ガラクトシド  $\alpha$ 2,6-シアル酸転移酵素 ST6Gal I と ST6Gal II のノックアウト (KO)メダカを作出し、その表現型を解析した。ST6Gal I-KO メダカは受精後 7 日目において重篤な心臓異常を示し、孵化後 10 日以内にすべて致死となるのに対して、ST6Gal II-KO メダカは特に異常を示さず、成魚まで生存し、継代維持が可能であるという表現型の違いが観察された。また、定量 PCR により、ST6Gal I と II の発生段階及び臓器特異的発現を解析した。孵化前後までのすべての発生段階及び成体におけるすべての臓器で両者がともに発現していることが分かった。さらに、SNA レクチンブロッキングにより、孵化直後における両者の Sia $\alpha$ 2,6Gal エピトープの発現解析を行ったところ、興味深いことに、致死となる ST6Gal I-KO メダカでは、野生型メダカと同等に Sia $\alpha$ 2,6Gal エピトープが存在するのに対して、ST6Gal II-KO メダカでは、そのほとんどが消失した。また、N 型糖鎖を切断する酵素であるペプチド N-グリコナーゼ処理を行った結果、メダカ胚および幼魚においてはほとんどの Sia $\alpha$ 2,6Gal エピトープが N 型糖鎖上に存在することが確認された。これまでの結果から、メダカの致死性には ST6Gal II が生合成する多くの Sia $\alpha$ 2,6Gal エピトープが重要ではなく、N 型糖鎖上の ST6Gal I が部位特異的に生合成する Sia $\alpha$ 2,6Gal エピトープが重要であることが示唆された。

次に、ST6Gal I-KO メダカで心臓の異常が生じる分子メカニズムの解明を目指した。ST6Gal II-KO メダカにおいて Sia $\alpha$ 2,6Gal エピトープをもつタンパク質は、ST6Gal I が付加する  $\alpha$ 2,6-Sia 残基をもつタンパク質であると考えられる。そこで ST6Gal II-KO メダカの心臓タンパク質について、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) 解析を行い、マンノース受容体 C タイプ 1 (MRC1) とスタビリン 2 (STAB2)を同定した。そのうち量的に多い MRC1 について、メダカ初期発生における役割を解析した。MRC1 のモルフォリノオリゴヌクレオチドを用いた遺伝子ノックダウン (KD)メダカを作出し、その表現型を解析したところ、約半数の MRC1-KD メダカが ST6Gal I-KO メダカと同様の心臓異常を示した。さらに、MRC1 の全長及び N 型糖鎖付加部位欠損変異体の mRNA を用いたレスキュー実験を行った結果、メダカ的心臓発生には、MRC1 上の特定部位の N 型糖鎖において ST6Gal I が生合成する Sia $\alpha$ 2,6Gal エピトープが重要であることが初めて示された。

最後に、メダカ的心臓発生におけるシアル酸の結合様式多様性の意義の解明を目指した。そのために、ST6Gal I-KO メダカの重篤な心臓異常が  $\alpha$ 2,6-シアル酸転移酵素 ST6Gal I と II 及び  $\beta$ -ガラクトシド  $\alpha$ 2,3-シアル酸転移酵素 ST3Gal の強制発現によってレスキューされるか否かを調べた。その結果、ST6Gal I だけでなく、N 型糖鎖上に Sia $\alpha$ 2,6Gal または Sia $\alpha$ 2,3Gal を付加する活性が高い ST6Gal II 及び ST3Gal IV の強制発現によりレスキューされた。以上の結果から、メダカ的心臓の発生にはシアル酸の結

合様式は関係なく、特定部位の *N* 型糖鎖上のシアル酸付加が重要であることが初めて示された。

以上をまとめると、本研究では、個体レベルでのシアル酸の結合様式多様性の意義を解明する方法論として、特定のシアル酸転移酵素遺伝子のノックアウトメダカを作成し、その表現型の異常が種々のシアル酸転移酵素遺伝子の強制発現によってレスキューされるか否かを調べる方法を開発した。その結果、個体レベルでの胚発生におけるシアル酸の結合様式多様性の意義の一端を初めて明らかにすることができた。