

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 大 本 敬 之  
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

### 論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 北島 健  
委 員 名古屋大学教授 佐藤 ちひろ  
委 員 名古屋大学教授 邊見 久  
委 員 名古屋大学教授 岡島 徹也  
委 員 名古屋大学助教 呉 迪  
委 員 名古屋大学助教 羽根 正弥

## 論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

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 9 個の炭素骨格をもつ酸性糖で、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、シアル酸生合成経路上の酵素の欠損細胞が生存可能であるのに対して、それらの欠損マウスおよびメダカは胎仔および幼魚において致死であることから、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ことが報告されているが、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、そのような研究はこれまで皆無である。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、以下の項目の内容に取り組んだ。

(1) メダカ発生における  $\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}$  の生物学的役割の解明： まず、メダカ初期発生における  $\alpha 2,6$  と  $\alpha 2,3$  結合シアル酸残基の重要性を探索するために、 $\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}$  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卵腔中に注入した。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。このことから  $\text{Sia}\alpha 2,3\text{Gal}$  ではなく、 $\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}$  がメダカ初期発生において重要な役割をもつことが明らかになった。そこで、メダカ初期発生における  $\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}$  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 日以内に全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ことが判明した。また、定量的 polymerase chain reaction (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。孵化前でのすべて

## 論文審査の結果の要旨

の発生段階及び成体におけるすべての臓器で両酵素がともに発現していることが分かった。さらに、SNA レクチンブロッティングにより、孵化直後における両者の Sial $\alpha$ 2,6Gal エピトープ量を解析したところ、興味深いことに、致死となる *ST6Gal I-KO* メダカでは、野生型メダカとほぼ同量の Sial $\alpha$ 2,6Gal エピトープが存在したのに対して、*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*-グリカ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 Sial $\alpha$ 2,6Gal エピトープのほとんどが *N*型糖鎖上に存在することが判明した。以上の結果から、メダカの生存には *ST6Gal II* が生合成する大多数の Sial $\alpha$ 2,6Gal エピトープではなく、*N*型糖鎖上の *ST6Gal I* が生合成する少数であるが特定の Sial $\alpha$ 2,6Gal エピトープが重要であることが明らかになった。

(2) *ST6Gal I-KO* メダカにおける心臓異常の分子メカニズムの解明：*ST6Gal II-KO* メダカにおいて見出されるタンパク質上の Sial $\alpha$ 2,6Gal 構造は、*ST6Gal I* が付加していると考えられる。そこで *ST6Gal I* が付加する  $\alpha$ 2,6-Sia 残基をもつタンパク質の同定を目的として、*ST6Gal II-KO* メダカの心臓タンパク質の探索、同定を液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) によって解析したところ、データの信頼度が高い候補タンパク質として、マンノース受容体 C タイプ 1 (MRC1) とスタビリン 2 (STAB2) が同定された。そのうち量的に多い MRC1 に着目して、まず、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) メダカを作成し、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。そこで次に、この MRC1-KD メダカの心臓異常が MRC1 の発現異常を原因とすることを MRC1 の全長 mRNA の強制発現によるレスキュー実験を行い検証した。さらに、MRC1 上の *N*型糖鎖の存在意義を調べることを目的として、MRC1-KD メダカに対して脊椎動物間で高い保存性をもつ *N*型糖鎖付加部位の欠損変異体 MRC1 の mRNA を強制発現させた。その結果、特定の 2 カ所の *N*型糖鎖付加部位の欠損変異体 MRC1 の mRNA ではレスキューされないことがわかった。すなわち、メダカ的心臓発生には、MRC1 タンパク質のこれら特定の 2 カ所の *N*型糖鎖が必要であることが初めて明らかになった。以上のことから、MRC1 タンパク質上の特定の 2 カ所の *N*型糖鎖において *ST6Gal I* による  $\alpha$ 2,6 シアリレーションが起こることの重要性が示唆される。

(3) 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：*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 Sial $\alpha$ 2,6Gal または Sial $\alpha$ 2,3Gal を付加する活性が高い *ST6Gal II* 及び *ST3Gal IV* の強制発現によってもレスキューされることが判明した。以上の結果は、メダカ的心臓の正常発生にはシアル酸の結合様式ではなく、特定 *N*型糖鎖上にシアル酸が存在することが重要であることを示している。

## 論文審査の結果の要旨

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出し、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という方法を開発した。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。

以上、本論文は、糖鎖の特徴である結合様式多様性の生物学的意義の解明に取り組み、少なくともメダカの心臓形成においてはシアル酸の結合様式と無関係にその存在自体が重要であることを初めて実験的に証明した。本研究が開発したシアル酸の多様性の意義を解明する方法は、糖鎖の機能解明の新しい方法論として学術的に重要である。また、特定の糖タンパク質の *N* 型糖鎖の存在が重要であることを証明する研究例、少数例ながらこれまでも行われてきたが、本研究のように、さらにその特定の *N* 型糖鎖上のシアリレーションが機能的に重要であることを示した研究は初めてのことである。このように本論文は、独創性および新規性において高い学術的価値をもっており、その成果はさらに社会貢献に繋がることが期待できる。したがって、審査委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。