

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 吳 迪

論文題目

Evolutional features and biological significance of
the CMP-sialic acid synthetase

(CMP-シアル酸合成酵素の進化的特徴と
生物学的重要性)

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	北島 健
委員	名古屋大学准教授	佐藤 ちひろ
委員	名古屋大学准教授	MATURANA Andres Daniel
委員	名古屋大学教授	池田 素子
委員	名古屋大学教授	日比 正彦

論文審査の結果の要旨

シアル酸は哺乳類をはじめとする脊椎動物において豊富に存在する単糖であり、細胞表面あるいは体液中のほとんど全ての糖タンパク質や糖脂質の糖鎖上に存在する。シアル酸が生合成できない動物は胎性致死であり、生存と発生に必須の単糖である。また、シアル酸は正常な神経機能や免疫を維持する一方、細菌やウイルス感染の標的となるなど、細胞表面で起こる様々な現象を制御、媒介する。したがって、細胞におけるシアル酸の構造と機能を探求することは、受精、発生、神経機能、免疫、感染に関連する健康や病気に対する理解を深め、健康維持、栄養、病気の診断や治療に関わる食や医薬領域への応用展開を可能にすることが期待できる。農芸化学領域では哺乳類の有用糖タンパク質を昆虫細胞や菌類に合成させる応用研究が進められており、生物種によって異なる糖鎖修飾をもつ問題の解決、とりわけシアル酸修飾に関する技術開発が求められている。本論文はシアル酸の生合成過程に関わる酵素に着目して、その性質や役割に関する新しい基礎的知見を得ることによって、健康、栄養、医療領域における応用展開に資することを目標としている。

シアル酸が糖タンパク質や糖脂質上の糖鎖の末端部分を修飾する過程は、シアル酸転移酵素によってなされ、その唯一の供与体基質として CMP-シアル酸が利用されており、CMP-シアル酸はシアル酸生合成において必須中間体である。生体内で CMP-シアル酸を生合成する過程は CMP-シアル酸合成酵素 (CSS) が担っており、細菌から哺乳類にいたる様々な生物に存在する。シアル酸以外の単糖においては UDP-グルコースなどの糖ヌクレオチドが糖供与体であり、CSS に相当する糖ヌクレオチド合成酵素によって生合成されるが、CSS にはユニークな特徴をもっている。それは CSS の細胞内局在部位の多様性である。シアル酸以外の単糖の糖ヌクレオチド合成酵素はサイトゾルに存在するのに対して、脊椎動物 CSS は核移行シグナルをもつため核に存在する。一方、ショウジョウバエの CSS (DmCSS) はゴルジ装置に局在化しており、細胞内局在が脊椎動物とショウジョウバエで異なる。ただし、昆虫ではショウジョウバエが唯一の研究例であり、この局在の多様性の真偽とその生物学的意義は明らかにされていない。また、近年 CSS の欠損が細胞レベルではその生存に影響しないのに対して、個体レベルでは致死となることが明らかにされている。CSS が発生や形態形成において重要であることを示しているが、その原因は全くわかっていないし、研究例も殆どない。そこで本論文では、CSS のユニークな性質の進化と生物学的意義の解明を目的として、次の2つの項目に取り組んだ：(1) 昆虫 CSS の酵素活性と局在性をショウジョウバエ以外の昆虫で検証すること (第2章)；(2) CSS の変異が個体の発生過程にどのように影響するのかを脊椎動物モデルのメダカを用いて解明すること (第3章)。

(1) 昆虫 CSS の酵素活性と細胞内局在の特徴と進化的特徴：ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) に加えて、カ (*Aedes aegypti*) およびコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) を使用し、CSS の活性と局在性を調べて、以下のことを明らかにした。まず、カ CSS (AaCSS) とコクヌストモドキ CSS (TcCSS) の遺伝子クローニングを行い、その構造と細胞内局在性を調べて、ショウジョウバエ CSS (DmCSS)

と比較した。その結果、昆虫の CSS は脊椎動物の CSS に存在する約 30 kDa の C-末端領域がないこと、また、脊椎動物の N-末端領域とは進化的に高度に保存されているモチーフ構造を含み高いアミノ酸配列の類似性があることが明らかとなった。次に、昆虫 CSS の酵素活性について、3 種類の昆虫 CSS を大腸菌、昆虫細胞、哺乳類細胞を宿主細胞として用いて発現させて調べた。DmCSS と同様に、AaCSS と TcCSS は哺乳類細胞および昆虫細胞で発現させると *in vitro* でも *in vivo* でも酵素活性をもったが、大腸菌で発現させた場合には全く活性が検出されなかった。大腸菌での発現において、CSS の N-末端側の疎水領域を除去することによって活性をもつようになることから、この疎水領域の除去が昆虫 CSS 活性には重要であることが判明した。さらに、昆虫 CSS の細胞内局在性について、CSS を昆虫細胞と哺乳類細胞を宿主細胞として発現させて調べた。その結果、AaCSS と TcCSS は ER に局在化することがわかった。また、DmCSS は細胞においては ER およびゴルジ装置に局在化するものの、80%を超える分子が細胞外に分泌されることが判明した。これらの結果は予期せぬ結果であり、N-末端側の疎水領域の役割の違いによって起こることが推定された。AsCSS と TcCSS では、この疎水領域が分泌シグナルとして機能しており、DmCSS では 40%が分泌シグナルとして 60%が 2 型膜貫通領域として機能していることが示唆された。DmCSS が膜タンパク質として発現された場合には、その N-末端側疎水領域の N-末端部分に KLK 配列が存在しており、この配列が ER 輸出シグナルとして機能していることが明らかになった。以上のように、昆虫 CSS の細胞における動態は複雑で多様であることが、本論文によって初めて証明された。

(2) CSS 変異体をもつメダカの作出とその発生における表現型の解析: CSS が個体レベルにおける発生や器官形成において必要とされる理由の解明を目的として、TILLING ライブラリーから選別した CSS 遺伝子の点変異体をもつメダカを作成し、それらの個体における表現型を調べた。その結果、まず、CSS 遺伝子のエキソン領域に変異をもつふたつの変異体 I230N と L303Q を見出した。次に I230N は N-末端領域の変異、L303Q は C-末端領域の変異であり、*in vitro* で活性測定したところどちらの変異体酵素も低い活性を示した。興味深いことに、I230N 変異メダカはハッチング前に異常形態が観察されて致死となることから、酵素産物の CMP-シアル酸が初期発生で必須であることが示唆された。一方、L303Q 変異メダカは I230N より長寿であるものの受精後 2 ヶ月経つ前に幼魚の段階で致死となった。L303Q は触媒活性には関与しないと考えられている C-末端領域の変異であるが、個体レベルでは初期胚に異常を引き起こすことから、機能的に重要であることが示唆された。以上のことから、CSS はメダカの初期発生において必須酵素であること、発生の各段階で必要とされる CMP-シアル酸量が供給されることが重要であることが示された。

以上の研究成果は、基礎および応用科学における今後の展開に高いポテンシャルをもつ点で重要である。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。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第 号	氏名	呉 迪
試験担当者	主査 北島 健、佐藤 ちひろ、MATURANA Andres Daniel、池田 素子、日比 正彦		
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成29年 2月 9日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>			