

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 郷 詩 織

論 文 題 目

筋分化過程における糖脂質構造変化の発見
とその分子機構の解明

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	松 田 幹
委 員	名古屋大学准教授	岩 崎 雄 吾
委 員	名古屋大学准教授	岡 島 徹 也

論文審査の結果の要旨

骨格筋はヒトにおいて約 40%の体積を占める巨大な臓器であり、生命活動を支える運動機能、エネルギー代謝においてきわめて重要な役割を担っている。生体内の他臓器と比べて細胞融合して多核化した線維を形成するという点できわめて特徴的な分化過程をもつ。また、糖尿病や癌などの疾患や再生医療の領域での研究も盛んであるが、近年、重篤な症状をもつ筋ジストロフィーの原因遺伝子の研究にはとくに注目が集まっている。その原因遺伝子の多くが細胞膜上の糖タンパク質 α -ジストリグリカンの糖鎖関連酵素であり、その不全が細胞膜付近に存在するジストロフィン-糖タンパク質複合体の関連遺伝子であり、その成分の α -ジストログリカン上の特殊な O-マンノース型糖鎖の一連の糖鎖不全が骨格筋の維持に重要であることが解明されている。一方、糖鎖は糖タンパク質だけでなくスフィンゴ糖脂質（以下、糖脂質）にも存在し、膜流動性を変化させるだけでなく、様々な受容体との相互作用を介して細胞機能の制御を行っていることが知られている。ところが、骨格筋における糖鎖の役割に関する知見は、現在、糖タンパク質に限定されており糖脂質に関する知見はきわめて乏しい。そこで本研究では、骨格筋分化における糖脂質の構造変化とその役割を明らかにすることを目的として取り組んだ。具体的には、マウス骨格筋モデル細胞である C2C12 細胞を用い、第一に筋分化における糖脂質分子種の発現変化の解析、第二に、筋分化におけるセラミド分子種の発現調節機構とその意義の解明、第三に、筋分化におけるシアル酸分子種の発現調節機構とその意義の解明を行った。

1. 骨格筋分化における糖脂質の構造変化の解析： 分化段階を追って C2C12 細胞から糖脂質を抽出して解析したところ、酸性糖脂質成分のひとつであるガングリオシド GM3 の量的および質的变化が見出された。すなわち、筋分化に伴い GM3 全体量は増加する一方で、主要な GM3 分子種の極性が低い種類から高い種類へと変化することが見出された。質量分析による組成分析の結果、GM3 の糖鎖部分のシアル酸が N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) から N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) へと、またセラミドのアシル基が C24 から C16 へと変化することが明らかとなった。

2. 筋分化におけるセラミド分子種変化の分子機構とその意義： C2C12 細胞の各分化段階において調製した cDNA を用いて、リアルタイム PCR 法によって脂質関連遺伝子の発現変動を調べたところ、C24 セラミドの合成に関与するセラミド合成酵素 (CerS) サブタイプ 2 (CerS2) が分化に伴い急激に減少していることが見出された。一方、C16 セラミドの合成に関与する CerS6 の発現は変化しなかったものの、CerS6 のスプライシングバリエントである CerS6-var1 (isoform 1) が分化に伴い 10 倍程度増加することが見出された。CerS6-var1 はその活性測定の結果から、C16-Cer の合成に関与することが分かり、分化に伴うセラミド分子種の変化が CerS2 の発現減少と、CerS6-var1 の発現上昇が要因であると考えられる。また、CerS-var1 は本研究によって新たに見出された CerS6 isoform であり、骨格筋の発達段階で一時的に発現し、成体マウスにおいては脳と心臓のみで発現することがわかった。また、この

酵素が筋芽細胞の移動能に関与していることも明らかになった。さらに、C16-GM3 と C24-GM3 の存在下で、C2C12 細胞を分化誘導させたところ、C24-GM3 を添加した細胞では分化が抑制され、セラミド分子種が特徴的な細胞移動や分化における融合変化に関与していることが示唆される。

3. シアル酸 (Sia) 分子種変化の分子機構とその意義： 新規合成される Neu5Gc はサイトゾルに存在する CMP-Neu5Ac 水酸化酵素 (CMAH) によって CMP-Neu5Ac を基質として合成される CMP-Neu5Gc を介して生成される。そこで各分化段階において C2C12 細胞から調製された cDNA を用いて CMAH 遺伝子の発現解析を行った結果、その発現は筋分化に伴う Neu5Gc の出現と一致した。すなわち、分化に伴う Neu5Gc への変化は少なくとも CMAH の遺伝子転写レベルで制御されることが明らかになった。また、C2C12 細胞の分化誘導時に Neu5Ac 添加した細胞では有意に分化が抑制されるのに対して、Neu5Gc を添加した細胞では有意に促進されることが示された。さらに、CMAH を過剰発現させた細胞では、コントロールと比較して、細胞の伸展速度が顕著に促進されることも見出され、Sia 分子種変化が筋細胞の性質の変化に効果をもつことが明らかになった。

以上、本研究において、郷詩織はこれまで全く研究が行われてこなかった骨格筋と糖脂質との関係に着目して解析を行った結果、筋分化に伴って糖脂質 GM3 の脂質部分と糖鎖部分のシアル酸種に変化が起ることを初めて明らかにした。また、その構造変化が脂質部分は CerS サブグループのスイッチによって、シアル酸種の変化が CMAH の発現によって制御されることを解明した。とくに、筋分化に伴い一過的に発現する CerS6-var1 の存在を発見し、その機能を明らかにした点は前例を見ない。さらに、シアル酸種の変化についても細胞自体の伸展能に影響を及ぼすという予測外の結果を得ることができた。本研究の糖脂質に着目した研究は、骨格筋の生物学、生化学において新しい概念を提唱することになり、学術的に意義深い。また、脂質や糖鎖の構造変化によって細胞自体の性質を変化させられる可能性を提唱しており、筋再生や筋ジストロフィーの治療応用の観点からも興味深い成果をあげたと言える。すなわち、本研究は基礎および応用科学研究において今後の展開に高いポテンシャルをもっている。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。