

氏 名 石 井 章 寛

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第781号

学位授与の日付 平成16年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Elucidation of mechanism that determines
N-linked sugar chain pattern expressed
in cells or tissues using cDNA macroarray
and 2 dimensional HPLC analyses

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 永山 國昭
教授 池中 一裕
教授 井本 敬二
教授 鈴木 邦彦 (東海大学)

論文内容の要旨

N-linked sugar chains on glycoproteins are indispensable for the normal development. The expression of *N*-linked sugar chains is strictly regulated spatially and temporally, and tissue specific expression patterns of *N*-glycans are observed. Comparison of the mouse brain as well as the human brain revealed little variation among individuals of each species. However, molecular mechanisms that are responsible for the strict regulation of the *N*-linked sugar chains remain largely unknown. The expression of the *N*-glycans is based on the orchestrated action of many enzymes, glycosyltransferases and glycosidases, which catalyze biosynthesis and degradation of glycochains. The expression patterns of genes that encode these enzymes are, therefore, necessary to understand the regulatory mechanisms of *N*-glycan biosynthesis. In the present study, he developed a cDNA macroarray, with which expression of most of the glycosyltransferase and glycosidase genes can be analyzed at the same time. He chose this sensitive system because the expression levels of these genes were mostly too low to be analyzed by a microarray system. Using the cDNA macroarray system, he analyzed the gene expression patterns of more than 110 glycosyltransferases and glycosidases in the brain from 12-day mouse embryos, and in the brain, kidney, and liver from 12-week adult mice, and correlated them with the expression patterns of *N*-linked sugar chains in these tissues. The analyses revealed the tissue specific expression patterns of the glycosyltransferase and glycosidase genes as well as tissue specific *N*-glycan expression profiles. For example, whereas Golgi-mannosidase IB and polypeptide GalNAc Transferase I genes were equally expressed in these four tissues, α 2,8-sialyltransferase V and β 1,4-galactosyltransferase VI genes were highly expressed in the postnatal 12-week brain. mRNA amounts of some of the genes, which were differentially expressed in the four tissues were further verified by means of RT-PCR analyses. By comparing the gene expression and *N*-glycan expression profiles, He could obtain several new findings; bisecting structures were exclusively catalyzed by *N*-acetylglucosaminyltransferase III, and a core fucose is exclusively synthesized by fucosyltransferase VIII. In this study, he also compared the expression of the glyco-genes and *N*-linked sugar chains, and identified correlation between gene expression and *N*-linked sugar chains. For example, the gene expression of glucosidase I, glucosidase II and ER-mannosidase was highly correlated Golgi-mannosidase IB with correlation coefficients (0.82, 0.74 and 0.80, respectively). Such coordinated expression could be necessary and important physiologically to biosynthesize the *N*-linked sugar chains smoothly and efficiently. cDNA macroarray system as well as high-throughput *N*-glycan analyzing system will provide significant information for the elucidation of the regulatory mechanisms and biological function of the *N*-linked sugar chains.

論文の審査結果の要旨

申請者の研究はcDNA マクロアレイと2次元 HPLC を用いて、細胞および組織表面の N グリコシド結合型糖鎖(N 型糖鎖)の発現パターンが経時的にどう変化するかを調べたものである。特に脳神経系に特異的な糖鎖が発生過程でどのような発現変化を示すかを明らかにすることに主眼が置かれている。

糖蛋白質上の N 型糖鎖は細胞標識として重要であり、その発現パターンは時間的、空間的に制御されていると考えられている。ヒト脳とマウス脳の発現パターンの比較からこれらの発現パターンに種差はほとんどなくむしろ臓器特異的なパターンを示すことが知られている。しかしこの N 型糖鎖の発現パターンを制御する機構についてはほとんど解明されていない。糖鎖パターンの発現には糖鎖結合の生成、分解にあずかる糖転移酵素や糖結合加水分解酵素などの多くの酵素が協奏的に働くことが必要である。従ってそれら遺伝子の発現パターン解明が糖鎖発現のパターン解明に必須となる。

本研究は上記の知見と考察の上に、まず糖転移酵素、糖鎖分解酵素の遺伝子発現解明に用いられるcDNA マクロアレイの開発を行った。そしてこのマクロアレイを使って得られた遺伝子発現パターンを HPLC より得られた糖鎖発現パターンと比較し、脳組織における N 型糖鎖発現の様相を精査した。具体的には 110 以上の糖鎖関連酵素の遺伝子について、12 日胎児マウス脳、12 週のマウス脳、マウス腎、マウス肝の糖鎖発現と遺伝子発現の相関解析を行った。

その結果、糖鎖発現、遺伝子発現の両方において臓器特異的発現パターンの存在が明らかになった。たとえば、ゴルジマンノース分解酵素 IB とポリペプチド GalNAc 転移酵素 I の遺伝子はこれら4種の組織に同等に発現される。一方 α 2, 8-シアル酸転移酵素 V と β 1, 4-ガラクトシル転移酵素 VI の遺伝子は特に 12 週マウス脳に高い発現が認められた。こうした相関解析により次の新知見を付け加えることができた;i)糖鎖分岐構造は N アセチルグルコサミン転移酵素 III により独占的に触媒される。ii)フコース核はフコシル転移酵素 VIII により独占的に合成される、iii)糖分解酵素 I, II および ER-マンノース分解酵素はそれぞれゴルジマンノース分解酵素 IB と高い相関を持って発現される。

本研究により発生過程に見られる臓器特異的、特に脳特異的な糖鎖発現の解明に糸口が見出されるとともに、cDNA マクロアレイ解析と HPLC 解析の比較研究が糖鎖研究に有効であることが証された。

これらのことから申請者の論文は学位論文として十分にふさわしい内容であるものと審査委員会全員一致で判定した。

学位論文の内容の発表および審査委員4名との間での質疑応答を行った。発表はよくまとまっており、大変わかりやすいものであった。また申請者は多くの質問に対して、自ら行った実験の意義、結果の解釈、関連分野における所見などを説明した。また、この学位論文が簡潔でわかりやすい英語で書かれていることから語学力も充分であると考えられた。従って、審査委員会全員により申請者は学位授与に相応しい学力があると判定した。