

氏 名 Akhilesh Kumar

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大 1302 号

学位授与の日付 平成 21 年 9 月 30 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 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Identification and functional analysis of a novel
LewisX-synthesizing α 1,3-fucosyltransferase gene in
neural precursor cells

論文審査委員 主 査 教授 深田 正紀
教授 吉村 由美子
教授 辻 崇一（東海大学）
教授 池中 一裕

論文内容の要旨

LewisX (Le^X) or stage specific embryonic antigen-1 (SSEA-1), is an important carbohydrate moiety expressed in undifferentiated embryonic stem cells, 8-cell to blastocyst stages in mouse embryo, in primordial germ cells, neural precursor cells and embryonic carcinoma cells. Le^X expression is developmentally regulated in brain and is thought to play a role in cell-cell recognition, neurite outgrowth and neuronal migration during embryonic brain development. To analyze the functional role of Le^X determinant in neurogenesis it is necessary to characterize the α 1,3-fucosyltransferase enzyme(s) involved in its synthesis in neural precursor cells.

Immunohistochemistry and in situ hybridization have revealed the co-expression of a novel α 1,3-fucosyltransferase enzyme, fucosyltransferase 10 (FUT10) with Le^X epitope in germinal zones around the lateral ventricle in mice embryonic brain. Further, the combinations of in vitro fucosyltransferase assay and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis have confirmed the α 1,3-fucosyltransferase activity of FUT10 on some specific N-glycan bearing glycoprotein(s). In vitro fucosyltransferase assay revealed that FUT10 can synthesize Le^X on bisecting sugar chain bearing glycoprotein(s) from Neuro2a cell lysates but not on pure lacto-N-neotetraose or PA-labeled bisecting sugar chains. Thus, FUT10 essentially requires the presence of substrate N-glycan bearing protein(s) for synthesizing Le^X.

In addition, in vivo loss-of-function studies using RNA interference (RNAi) targeting FUT10 were done. miRNA vectors or control vectors were coelectroporated with an green fluorescent protein (GFP) reporter in utero into the lateral ventricle at embryonic day 14.5 to transfect neural precursor cells of ventricular zone; the distribution of transfected cells were analyzed at embryonic day 17.5. This approach revealed the significance of FUT10 in embryonic brain development. A control miRNA with no effect on FUT10 expression has no effect on the distribution of transfected cells. In contrast, miRNAs that can suppress FUT10 expression showed mislocalization of GFP labelled cells, with essentially most of the transfected cells remain localized in ventricular zone, subventricular zone and intermediate zone. This defect is rescued by in utero electroporation of FUT10 expression construct along with the effective miRNA, confirming that FUT10 is crucial for the normal embryonic brain development.

博士論文の審査結果の要旨

糖鎖は細胞表面に発現する多くの蛋白質や脂質に付加され、細胞接着や細胞間認識、細胞分化等を精緻に制御している。中でも LewisX 抗原は古くから知られる糖鎖抗原の一つで、発現時期、場所が厳密に制御されており、発生脳の細胞分化や神経突起伸長、神経移動に重要な役割を果たしていると考えられてきた。これまでに、LewisX 抗原を合成する酵素 (α 1,3-フコース転移酵素: FUT) として FUT4, FUT7, FUT9 が同定されており、FUT9 が脳内の主要な酵素として解析されてきた。しかし、FUT9 をはじめこれら遺伝子のノックアウトマウスの解析からは顕著な脳機能における表現型は認められなかった。このような背景で、申請者は α 1,3-フコース転移酵素としての活性が議論されている FUT10 に着目し、1) 組織化学、In situ ハイブリダイゼーションによる発現解析、2) in vitro での α 1,3-フコース転移酵素活性の測定、3) in vivo ノックダウン法による神経移動における生理機能に関する解析を行った。

まず、FUT10 および LewisX 抗原の胎児脳における発現パターンを既知のフコース転移酵素である FUT9 と比較することにより解析した。FUT10 と FUT9 は互いに相補的に発現しており、両者の総和は LewisX 抗原の発現部位と見事に合致していた。とりわけ FUT10 は基底核原基 (ganglionic eminence) を含む脳室帯 (Ventricular zone) に一過的 (胎生 14.5-15.5 日) に強く発現していた。脳組織以外にも FUT10 はヒトの ES 細胞を含む様々な未分化な幹細胞群や組織において特異的に発現し、その分布は LewisX 抗原の発現パターンと一致していた。また、細胞レベルでは FUT10 はゴルジ装置に局在していることが明らかになった。

次に HPLC システムを用いた in vitro の α 1,3-フコース転移酵素反応系を構築し、FUT10 の α 1,3-フコース転移酵素活性、並びに基質特異性を検討した。FUT10 は FUT9 とは異なり、直鎖型糖鎖や二分岐型糖鎖標品に対しては酵素活性を示さなかった。興味深いことに FUT10 は蛋白質に付加されている二分岐型糖鎖に対して α 1,3-フコース転移酵素活性を示した。このことから FUT10 は 1) α 1,3-フコース転移酵素として機能すること、2) FUT9 とは異なり、より厳密な基質特異性を有することが示された。

さらに、in vivo における FUT10 の機能を明らかにするために、子宮内胎仔電気穿孔法を用いて胎児脳 (胎生 14.5 日) における FUT10 の機能抑制 (ノックダウン) を行った。FUT10 をノックダウンしたマウス脳では脳室帯から大脳皮質への神経細胞の移動が有意に抑制された。さらに、レスキュー実験によりノックダウン効果が FUT10 に特異的であることを見出した。このことから FUT10 は胎生脳における神経細胞の移動に必須な役割を果たしていることが明らかになった。

以上の結果から、FUT10 は 1) 胎生脳に一過性に発現する新規の α 1,3-フコース転移酵素であり、2) 厳密な基質特異性を有し、3) 神経移動に必要な機能を果たすことが明らかになった。

本研究は、LewisX 抗原を合成する新規酵素を同定し、その分子機能、生理機能を多彩な手法を用いて解明したものである。よって、本研究が学位論文としてふさわしいものであることに、審査委員全員の意見が一致した。