

氏 名 江 文

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1850 号

学位授与の日付 平成28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6条第1項該当

学位論文題目 The role of Sulfatase1 and Sulfatase2 in the development of  
oligodendrocyte in the mouse spinal cord

論文審査委員 主 査 教授 古瀬 幹夫  
教授 池中 一裕  
教授 高田 慎治  
教授 宮田 卓樹 名古屋大学大学院

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) are cell-surface and extracellular matrix macromolecules that consist of core protein (glypican, syndecan, percan) and heparan sulfate (HS) glycosaminoglycan (GAG) chain. HS consists of uronic acid-(1→4)-D-glucosamine repeating disaccharide subunits and undergoes sulfate modifications on the 2-O position of uronic acid and N, 3-O and 6-O positions of the glucosamine HS units. These sulfate modifications of HS are important to HSPGs for regulating Shh signaling, which acts as a morphogen to regulate the embryonic spinal cord development. Shh furnishes positional information to control cell fate decision and organize structures of the ventral midline through Shh concentration-dependent manner in the developing vertebrate ventral spinal cord. In the mouse embryonic ventral spinal cord pMN domain, at early stage of embryonic development from about embryonic (E) day 9-10.5, Olig2 progenitors give rise to Motor neurons (MNs), and in the later (about E12.5) Olig2 progenitors change their fate from the generation of MN to that of Oligodendrocyte Precursor cells (OPCs) and it is well known that Shh is indispensable for this fate change.

Sulfatase (Sulf) is endo-enzyme that specially remove glucosamine 6-O-sulfate group in HS, containing 2 members, Sulf1 and Sulf2. Although there are several studies showing that Sulf1 acts as a regulator of Shh signaling during embryonic ventral spinal cord development, there are no reports about the details of Sulf2 expression in the spinal cord or whether Sulf2 is involved in the development of spinal cord. In this study, I found a novel function of Sulf2 as an endo-sulfatase involved in the control of MN to OPC fate change by regulating Shh signaling in the ventral spinal cord of mouse.

First I analyzed the expression pattern of Sulfs (Sulf1 and Sulf2), Shh and Shh signaling indicator Patched1 during mouse embryonic spinal cord development (E10.5-E12.5). In the mouse, Sulf mRNAs colocalized with Shh mRNA and gradually expanded dorsally from E10.5 to E12.5, which always followed strong Patched1 signal. These expression patterns gave me an hypothesis that in the mouse strong Shh signaling input was promoted by Shh released by Sulfs, and strong Shh signaling in turn induced Shh and Sulfs dorsal expansion. Consistent with this hypothesis, I found that in the Sulf1 KO or Sulf2 KO mouse ventral spinal cord, Shh expression was restricted to the floor plate at E11.5 and E12.5, and did not expand into p3 domain as in the WT mouse. Moreover, in Sulf1 KO or Sulf2 KO mouse, Patched1 expression was weaker than that in WT mouse at E11.5 and remained as E11.5 expression pattern even at E12.5. Shh is required for the ventral spinal cord domain formation and the MN to OPC fate change in the pMN domain. Thus I checked the domain formation and progenitor differentiation in the pMN domain. I found that the pMN and the p3 domains position shifted ventrally, MN neuron generation prolonged and OPC generation was delayed at E12.5 in Sulf1 KO or Sulf2 KO mouse. These results showed that Sulf2 also plays an important role in MN to OPC fate change by

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

regulating Shh signaling in the ventral spinal cord like Sulf1 and thus has overlapping function as Sulf1.

However, Sulf1 or Sulf2 cannot compensate the loss of Sulf1 or Sulf2 respectively, in the developing mouse spinal cord. In vitro studies showed no evidence for Sulf1 and Sulf2 interaction and sulfatase activity of Sulf1 and Sulf2 was independent. Furthermore, similar phenotypes with Sulf1 or Sulf2 single KO mouse were also observed in the Sulf1, Sulf2 double KO (Sulf1&2 DKO) and Sulf1, Sulf2 double heterozygote (Sulf1<sup>+/-</sup>-Sulf2<sup>+/-</sup>) mice. Severe phenotypes were not found in the Sulf1&2 DKO mouse. These results suggest that a sulfatase threshold in the pMN domain required for precise MN to OPC fate switch change exists and indicates that MN to OPC fate change is not linear against Shh dose. Only when Shh concentration reaches a threshold, precise MN to OPC fate change can occurred.

Taken together, my study characterized a new role of Sulf2 as a positive Shh signaling regulator to control MN to OPC fate change in the ventral spinal cord. My study also indicated that there is a threshold in sulfatase activity (which probably reflects in the Shh dosage) to induce MN to OPC fate switch.

(別紙様式 3)  
(Separate Form 3)

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

細胞表層や細胞外基質に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は、発生過程において Sonic hedgehog (Shh) を含むさまざまなモルフォゲンと相互作用することにより、その濃度勾配形成やシグナリングに関与する。この HSPG のはたらきには、グルコサミンの 6 位を含む糖鎖の特定部位の硫酸化修飾が重要な役割を果たす。一方、HSPG のグルコサミンの 6 位硫酸基を特異的に切断する酵素としてサルファターゼ 1 (Sulf1) とサルファターゼ 2 (Sulf2) が存在する。脊椎動物の腹側脊髄の神経発生では、Shh シグナリングが運動ニューロン産生からオリゴデンドロサイト産生への転換を誘導することが知られており、このスイッチングを Sulf1 が制御することが報告されている。しかしこの過程における Sulf2 の役割はこれまでほとんど知られていなかった。そこで出願者は本研究でマウス胎生期腹側脊髄の神経発生における Sulf2 の機能の解明を試みた。

まず出願者はマウス胎生期 E10.5 から E12.5 の脊髄における Sulf1 と Sulf2 の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。Sulf1 の発現は当初底板に限局していたが、E11.5 にはより背側の p3 領域に拡大した。一方、Sulf2 は底板において高発現するとともに脊髄全体にも弱く発現していたが、その高発現領域は Sulf1 の発現領域と一致することが明らかになった。Sulf2 が Sulf1 と同じ領域で発現するという結果と、Sulf1 欠損マウスにおいて運動ニューロン産生からオリゴデンドロサイト産生への転換に異常が見られるという先行研究の結果から、Sulf2 が Sulf1 の機能を代償できないことが示唆された。そこで出願者は Sulf1 と Sulf2 の関係についてさらに解析を行った。まず、Sulf1 欠損マウスの発生過程の腹側脊髄における Sulf2 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べたところ、発現パターン、発現量ともに野生型と比べて差は見られなかった。さらに、Sulf1, Sulf2 の組換えタンパク質を作製して試験管内でサルファターゼ活性を測定した。その結果、Sulf1 と Sulf2 はそれぞれ単独で同等の活性を有すること、両者を共存させても酵素活性は協奏的に変化しないことが明らかになった。

次に出願者は、胎生期腹側脊髄の神経発生における Sulf2 の機能を解明するために、Sulf2 欠損マウスの表現型を Sulf1 欠損マウスと比較しながら詳細に解析した。その結果、Sulf1 欠損マウス、Sulf2 欠損マウスいずれにおいても、野生型マウスで見られる p3 領域における Shh の発現誘導と Shh シグナリングの変化が起こらず、運動ニューロン産生からオリゴデンドロサイト産生への転換が低下していた。さらに出願者はサルファターゼ活性の強さと Shh シグナリングとの関係を確認するために、Sulf1・Sulf2 ダブル欠損マウス、Sulf1・Sulf2 ダブルヘテロマウスにおいても同様の解析を行った。その結果、両マウスともに Sulf1 欠損マウスおよび Sulf2 欠損マウスと同じ表現型を示すことが明らかになった。これらの観察から、胎生期腹側脊髄の正常な神経発生における Shh シグナリングには Sulf1 と Sulf2 のいずれもが必要であることが証明された。さらに、正常な Shh シグナリングに必要なサルファターゼ活性の閾値が存在することが示唆された。

以上のように、出願者はマウス胎生期腹側脊髄の神経発生における Sulf2 の機能を明らかにした。さらに、正常な Shh シグナリングにおけるサルファターゼ活性の閾値について

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

議論した。本研究は、マウス胎生期腹側脊髄の神経発生におけるサルファターゼの役割を明らかにしたもので、発生期のモルフォゲンの活性制御における HSPG の機能を考える上で重要な知見を含んでおり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。したがって、審査委員全員が本論文は学位論文として相応しいものであると判断した。