

# 内容の要旨及び審査結果の要旨

【書式 1 1】

平成 30 年 8 月 22 日

氏名（本籍）	伊藤 和義			
学位の種類	博士（工学）			
学位記番号	甲 第 162 号			
学位記の授与日	平成 30 年 9 月 15 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 創価大学大学院学則第 31 条第 2 項該当 創価大学学位規則第 3 条の 3 第 1 項該当			
論文題目	Functional analysis of mucin-type core 1 glycan in <i>Drosophila</i> neuromuscular junction			
論文審査機関	工学研究科委員会			
論文審査委員	主査委員	理学博士	西原 祥子	印
	委 員	医学博士	中嶋 一行	印
	委 員	理学博士	青山 由利	印

## <論文の内容の要旨>

本論文は、ムチン型糖鎖の一種であるグルクロン酸化 T 抗原に着目し、その合成に関わる 2 種の糖転移酵素の変異体を解析して、不明であった本糖鎖構造の機能を初めて明らかにした。本糖鎖構造は、(1) 神経筋接合部における基底膜の形成とブトンの正常な配置、(2) 神経筋接合部の分岐、(3) シナプス後膜肥厚の形成に必要であった。本論文は、序論、方法、結果、および、考察から構成されており、以下にその要旨を述べる。

## 序論

ムチン型糖鎖は、O-結合型糖鎖の一種である。初めに、タンパク質のセリン、または、スレオニンに *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が転移して、Tn 抗原が合成される。Tn 抗原に、コア 1 ガラクトース転移酵素 (C1GalT1) がガラクトース (Gal) を  $\beta 1,3$  結合で転移すると、コア 1 構造 (Gal  $\beta 1,3$  GlcNAc) が合成される。これを、T 抗原と呼ぶ。その後、ショウジョウバエでは、Gal にグルクロン酸 (GlcA) が  $\beta 1,3$  結合したグルクロン酸化 T 抗原が合成される。ショウジョウバエの主要なムチン型糖鎖は、Tn 抗原、T 抗原、グルクロン酸化 T 抗原であるが、グルクロン酸化 T 抗原の生理機能はこれまで全くわかっていなかった。

本研究では、*dC1GalT1* とグルクロン酸化 T 抗原を合成するグルクロン酸転移酵素 (*dGlcAT-P*) の突然変異体を用いて、神経筋接合部における表現型解析を行い、グルクロン酸化 T 抗原の生理機能の解明を行った。

## 方法

存在する 3 種類のグルクロン酸転移酵素のうち、どの酵素がグルクロン酸化 T 抗原を合成する主要な酵素であるかを検討するため、各々の FLAG タグ付きグルクロン酸転移酵素を発現・精製し、T 抗原をアクセプター基質、UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA をドナー基質として酵素活性を測定した。その後、決定されたグルクロン酸転移酵素、*dGlcAT-P* に対するヌル変異体を CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。

*dC1GalT1* と *dGlcAT-P* 変異体幼虫に対し、レクチン染色や免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。併せて、透過型電子顕微鏡による超微細構造の解析も行った。

**結果と考察**

解析は、神経筋接合部を中心に行った。はじめに、(1) *dC1GalT1* 突然変異体では、*dC1GalT1* mRNA の発現量が 5 %以下まで低下し、T 抗原の発現量が減少していること、(2) *dGlcAT-P* 変異体では、グルクロン酸化 T 抗原が減少していることを確認し、これらの酵素が、幼虫の筋肉と神経筋接合部で、グルクロン酸化 T 抗原の合成に関わることを明らかにした。

次に、基底膜の主要な構成要素である IV 型コラーゲン (Vkg-GFP) とニドゲンを標識して観察を行った。筋肉 6/7 境界において、両酵素の変異体では、これらの基底膜構成要素の部分的消失と神経筋接合部ブトンの配置異常が認められた。また、神経筋接合部の分岐数も減少していた。さらに、透過電顕を用いて、筋細胞表面の切片と筋細胞内部の切片を観察した。野生型では、ブトンが筋肉 6/7 境界に存在しなかったが、両酵素の変異体では、筋肉 6/7 境界にブトンが 2 つの筋肉を繋ぐように位置していた。GlcA は負電荷をもつので、グルクロン酸化 T 抗原が神経および筋肉の細胞表面を負に帯電し、細胞間接着を調節していると推定される。このため、グルクロン酸修飾が抑制されると、神経と筋肉の細胞間接着が促進し、神経筋接合部ブトンの配置異常が起こると考えられた。また、基底膜の多層化と断裂、シナプス後膜肥厚の短縮も観察された。これらの変異体における異常は、各酵素の人工的な発現により救済されたので、上述した異常は、グルクロン酸化 T 抗原が合成されないことに起因することが明らかになった。すなわち、グルクロン酸化 T 抗原は、基底膜の形成、および、ブトンの正常な配置と分岐、シナプス後膜肥厚の形成に必要であることがわかった。

**<論文審査結果の要旨>**

本論文は、これまで不明であったムチン型糖鎖の一種であるグルクロン酸化 T 抗原の機能を、合成に関わるショウジョウバエの 2 種の糖転移酵素の変異体を解析して、初めて明らかにした。類似する糖鎖構造は哺乳類にも見出されており、ヒトの未診断疾患の解明につながる可能性も持つ。新規機能を証明する十分なデータも有することから、学位論文に値する内容であると認定する。

なお、研究の結果は、以下の学術雑誌に掲載された。

1. Itoh K, Akimoto Y, Fuwa TJ, Sato C, Komatsu A, Nishihara S.

Mucin-type core 1 glycans regulate the localization of neuromuscular junctions and establishment of muscle cell architecture in *Drosophila*.

*Dev Biol.*, 412, 114-127 (2016).

2, Itoh K, Akimoto Y, Kondo S, Ichimiya T, Aoki K, Tiemeyer M, Nishihara S.

Glucuronylated core 1 glycans are required for precise localization of neuromuscular junctions and normal formation of basement membranes on *Drosophila* muscles.

*Dev Biol.*, 436, 108-124 (2018).

# 最終試験の結果の要旨

【書式12】

平成30年8月22日

フリガナ 申請者氏名	イトウ カズヨシ 伊藤 和義	専攻名	生命情報工学 専攻
審査委員会委員	主査委員	西原 祥子	印
	委員	中嶋 一行	印
	委員	青山 由利	印

## 要旨

最終試験は、上記3名の審査委員により、平成30年7月24日に実施し、学位申請者に対して、研究内容に関する試問を行った。その結果、申請者は、博士（工学）としての十分な学力と研究能力を有するものと判定された。したがって、審査委員会は、最終試験を合格と認定した。