

氏名	羽柴 一久
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第5533号
学位授与の日付	平成29年 3月24日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Roles of galectins and glycans in bovine corpus luteum (ウシ黄体における糖鎖および糖鎖結合性タンパク質 galectin の役割に関する研究)
論文審査委員	教授 舟橋 弘晃 教授 木村 康二 准教授 若井 拓哉

### 学位論文内容の要旨

ウシを含む多くの哺乳動物において排卵後に形成される黄体は妊娠の成立と維持に必須の progesterone (P4) を分泌する内分泌器官である。妊娠が成立しなかった際、子宮からの prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF) の作用により黄体は退行する。黄体の退行は P4 分泌の衰退する機能的退行および黄体組織の死滅する構造的退行から成り、構造的退行は黄体を構成する細胞の細胞死および卵巣外への流出により起こる。

Galectin-3 には細胞質型および細胞外型が存在し、細胞質型 galectin-3 は糖鎖を介さずリン酸化され抗アポトーシスに働き、細胞から分泌された細胞外型 galectin-3 は  $\beta$ 1 integrin を含む膜タンパク質受容体の糖鎖と結合し細胞のアポトーシスを誘導する。ウシ黄体において galectin-3 の存在は明らかとなっているが、その役割について詳細な報告はない。Galectin-3 発現量は、黄体退行期において高く、黄体細胞に局在が認められた。培養中期黄体細胞に PGF を添加し 48 h 培養後、galectin-3 発現量および分泌が増加した。Galectin-3 を黄体細胞に添加したところ細胞生存率の低下が認められたが、P4 産生能に変化は認められなかった。Galectin-3 のターゲットタンパク質として報告されている  $\beta$ 1 integrin は、発情周期を通じてその発現に変化は認められなかった。さらに、黄体の  $\beta$ 1 integrin は galectin-3 が結合する糖鎖を有しており、発情周期を通じてそのレベルに変化は認められなかった。Galectin-3 は黄体の  $\beta$ 1 integrin に結合し、galectin-3 による培養黄体細胞の細胞生存率の減少は、 $\beta$ 1 integrin 抗体により抑制された。これらのことから、ウシにおいて PGF により黄体細胞の galectin-3 発現および分泌が促進され、galectin-3 が  $\beta$ 1 integrin の糖鎖に結合することで黄体細胞の死を誘導する可能性が示された。

Galectin-1 は糖鎖中の N-acetyllactosamine (LacNAc) 構造に結合し、LacNAc 構造に含まれる N-acetylglucosamine に  $\alpha$ 2,6-sialic acid が付加されることで galectin-1 の結合が阻害される。ST6Gal-I は糖鎖末端の galactose の  $\alpha$ 2,6 結合に sialic acid を付加する酵素として知られている。我々は、ウシ中期黄体細胞の細胞表面の糖鎖に galectin-1 が結合しており、細胞の生存性を増加させることを報告している。しかしながら、ウシ黄体において  $\alpha$ 2,6-sialylation の役割について詳細は明らかではない。黄体における ST6Gal-I mRNA 発現量および糖タンパク質糖鎖の  $\alpha$ 2,6-sialylation レベルは、黄体退行期に増加しており、黄体細胞の細胞膜に局在が認められた。培養中期黄体細胞に PGF を添加し 72 h 培養後、ST6Gal-I mRNA 発現量および  $\alpha$ 2,6-sialylation レベルが増加した。後期黄体細胞における  $\alpha$ 2,6-sialylation レベルは、中期黄体細胞と比較して高かった。また、galectin-1 は中期黄体細胞の生存率を増加させたが、後期黄体細胞の生存率は増加させなかった。Neuraminidase は、後期黄体細胞の  $\alpha$ 2,6-sialylation レベルを減少させ、galectin-1 は neuraminidase 処理した後期黄体細胞の生存率を増加させた。これらのことから、黄体細胞において PGF により増加した  $\alpha$ 2,6-sialylation は、galectin-1 および糖鎖の結合を阻害することで、galectin-1 の誘導する生存シグナルを減少させ、黄体退行に関与することが示唆された。

本研究より、ウシにおいて galectin および糖鎖の相互作用が黄体退行を調節している可能性が示された。

## 論文審査結果の要旨

黄体は妊娠の成立や維持に必要な progesterone (P4)を分泌する重要な一過性の内分泌器官である。妊娠不成立の場合、子宮からの prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF)により黄体は退行し、速やかな発情周期の再開が生じるが、そのメカニズムを解明することは家畜の効率的生産やヒトの生殖医療にとって重要である。本研究ではウシ黄体細胞上の糖鎖とこれに結合するタンパク質である galectin の黄体退行に果たす役割について検討している。ウシ黄体では galectin 1 および 3 の存在が確認されている。galectin 3 は退行期の黄体細胞において発現が上昇し、これは PGF によるものであることが明らかとなった。さらに galectin 3 を黄体細胞に添加するとその生存率を低下させることが認められた。galectin-3 の結合糖鎖を持つタンパク質の候補として  $\beta$ 1 integrin を見出し、黄体細胞の  $\beta$ 1 integrin に galectin-3 が結合することを確認した。さらに galectin-3 の  $\beta$ 1 integrin への結合を阻害すると、galectin-3 の黄体細胞への致死効果は減少した。よって、PGF により黄体細胞の galectin-3 発現及び分泌が促進され、galectin-3 が  $\beta$ 1 integrin の糖鎖に結合することで黄体細胞死を誘導することを明らかとしている。一方、galectin-1 は黄体細胞の生存因子として報告されているが、黄体退行での作用についての報告はない。galectin-1 は結合糖鎖末端に  $\alpha$ 2,6-sialic acid が付加すると結合できなくなる。退行期黄体では  $\alpha$ 2,6-sialic acid 付加酵素である ST6Gal-I の遺伝子発現が高く、糖鎖の  $\alpha$ 2,6-sialylation レベルも高いことが認められた。培養黄体細胞に PGF を添加すると ST6Gal-I mRNA 発現量及び  $\alpha$ 2,6-sialylation レベルが増加した。後期黄体細胞における  $\alpha$ 2,6-sialylation レベルは、中期黄体細胞と比較して高く、galectin-1 は中期黄体細胞の生存率を増加させたが、後期黄体細胞の生存率は増加させなかった。Neuraminidase は、後期黄体細胞の  $\alpha$ 2,6-sialylation レベルを減少させ、galectin-1 は neuraminidase 処理した後期黄体細胞の生存率を増加させた。以上より、黄体細胞において PGF により増加した  $\alpha$ 2,6-sialylation は、galectin-1 及び糖鎖の結合を阻害することで、galectin-1 の誘導する生存シグナルを減少させ、黄体退行に関与することが示唆された。本研究においてウシ黄体における細胞上糖鎖と糖鎖結合タンパク質 galectin との相互作用が黄体細胞の生存性への関与という新たな黄体退行メカニズムを提示したことは、家畜のみならずヒトの不妊研究の基礎知見として極めて意義深いものである。本学位審査委員会はこれらの成果をまとめた本論文ならびに参考文献を総合的に審査し、本論分が博士学位（農学）に値するものと判断した。