

令和元年5月27日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07876

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた魚類リソソームシアリダーゼの機能解析

研究課題名(英文) Establishment of Neu1 knockout zebrafish by genome-editing

研究代表者

塩崎 一弘 (Shiozaki, Kazuhiro)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・准教授

研究者番号：70390896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シアリダーゼは糖タンパク質や糖脂質のシアル酸を遊離させる糖鎖分解酵素である。そのうちNeu1シアリダーゼはリソソームに局在しており、哺乳類ではオートファジーや免疫、シアリドーシスに関係することが分かっている。一方、魚類ではリソソームシアリダーゼに関する知見が無いことから、本研究では魚類Neu1の生理機能解析を行った。

Neu1の酵素学的性状は魚種間で保存されていた。Neu1ノックダウンメダカでは胚発生に異常が見られ、卵黄吸収抑制が認められた。ゲノム編集によりNeu1を欠失させたゼブラフィッシュでは、骨や筋肉関連の遺伝子発現が変化しており、成長に伴い骨の異常が多くみられるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では魚類Neu1シアリダーゼの機能について明らかにしたが、この表現型はヒトNeu1欠損症であるシアリドーシスの症状と非常に類似したものがあつた。シアリドーシスは胎児期に進行する疾病であり、また希少疾患であることからその発症メカニズムや病気の進行に関する知見は非常に限られている。本研究で用いたゼブラフィッシュは多産であり、しかも卵や孵化後の仔魚は透明であることからヒト胎児の研究に非常に優れた実験動物といえる。今後Neu1ノックアウトゼブラフィッシュがシアリドーシス疾病モデルとして利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mammalian sialidases have been studied so far. Among them, lysosomal sialidases are known to be involved in immunity, autophagy and sialidosis. On the other hand, the functions of fish lysosomal sialidase is not clear. Here, we tried to clarify the significance of fish lysosomal sialidase using gene-modified fish.

First, Neu1 polypeptide knockdown using morpholino-oligo was conducted in medaka embryo. Knockdown embryo exhibited the accumulation of sialoglycoprotein and abnormal phenotypes such as higher heart rate. Enzymatic properties of fish Neu1 are found to be highly conserved by gene cloning and polypeptide analysis. Next, we tried to establish Neu1 knockout zebrafish by CRISPR/Cas9 method. Neu1 knockout zebrafish showed alteration of muscle- and bone-related gene expressions in embryo accompanied with the decrease of sialidase activity. Adult fish showed the abnormal bone shape. As a result, fish Neu1 would be crucial in bone formations.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：シアリダーゼ リソソーム ゲノム編集 シアル酸 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

1. 研究の学術的背景

リソソームにおける異化分解は、オートファジーなどを介した細胞内アミノ酸プールの維持や異物の排除に重要である。魚類ではカテプシン類を中心としたリソソーム性プロテアーゼが筋肉の軟化などに関与する報告があるが、糖鎖分解酵素に関する生理的意義については知見が無い。

シアル酸は、糖タンパクや糖脂質の糖鎖非還元末端に位置する酸性糖であり、細胞がほかの細胞やタンパク質、ウイルスなどに認識される際に重要な働きをしている。そのシアル酸を含む糖鎖の構造を制御しているのが脱シアル化酵素であるシアリダーゼである。申請者はこれまで、哺乳類のシアリダーゼの生理的意義について研究を行い報告してきた。哺乳類では4種類のシアリダーゼ(Neu1、Neu2、Neu3およびNeu4)が存在しているが、これらシアリダーゼによる糖脂質や糖タンパクの糖鎖構造の変化が、様々なシグナル伝達系を変化させ、細胞の分化や形質の変化に関与することを臨床サンプル、培養細胞、および動物実験により明らかにしてきた。またリソソームへの局在する哺乳類シアリダーゼについて、Neu4が神経細胞接着分子NCAMのポリシアル酸を切断し、海馬における神経細胞の分化を抑制していることを初めて明らかにした。またリソソーム性Neu1が細胞表面のインテグリンに作用し、細胞接着の制御に関与していることを見出した。

このように哺乳類におけるリソソーム性シアリダーゼの重要性が明らかになる一方で、他の動物における知見はほとんど得られていない。そこで申請者は魚類に注目し、メダカなどの小型魚類を用いて解析を行ってきた。最近小型魚類はモデル動物としての利用が期待されており、ヒト発生や疾病のモデルだけでなく、養殖魚の実験モデルとしても注目されているからである。そもそも魚類の脱シアル化機構については全く分かっていないため、申請者はゲノムが明らかになっているメダカとティラピアを中心に、シアリダーゼ遺伝子のクローニングと性状解析を行ってきた。その結果、魚類にはNeu1、Neu3、Neu4のヒトオースログが複数存在しており、Neu1は哺乳類同様にリソソーム性タンパクであり、シアロオリゴ糖の分解に関与することを明らかにした。魚類Neu4はNeu1同様にリソソーム性であるが、その発現はNeu1に比べて低いことが明らかとなった。これらの結果は、魚類の発生やバクテリア感染、栄養飢餓状態などでシアリダーゼが何らかの重要な機能を有している可能性を示しており、水産業への技術応用への基礎的知見となりうる。しかし魚類シアリダーゼの作用機作については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では魚類リソソーム性シアリダーゼの新規生物機能を明らかにするために、シアリダーゼ遺伝子組換えメダカやゼブラフィッシュ、魚類細胞株を作成し、機能解析を行う。本研究ではこれらのシアリダーゼのうち、リソソームに局在するNeu1シアリダーゼに焦点を当てて解析を行う。最近、オートファジーリソソーム分解系が多くの生命現象に重要であることが分かっている。また魚類においても、胚発生や筋肉の軟化などにオートファジーが関与している報告がある。その一方で、魚類リソソームにおけるシアル酸分解酵素の意義についてはほとんど分かっていない。本研究では、ゲノム編集による遺伝子改変小型魚類を作成し、*in vivo*における解析を予定している。このことから、本研究の研究成果が水産業、特に養殖分野において魚の育種や魚病研究に応用が期待できることを示しており、糖鎖構造の脱シアル化に着目した非常に特色のある研究になると思われる。

3. 研究の方法

(1) **メダカリソソームシアリダーゼのノックダウンによる胚発生に与える影響**：メダカ受精卵(1細胞期)に対し、モルフォリノオリゴを用いたNeu1遺伝子ノックダウンを行い、胚発生におけるリソソームシアリダーゼの影響について明らかにする。特にメダカの各発生段階、成長過程において、筋肉および骨格形成におけるNeu1の働きと糖鎖構造の変化について明らかにする。

(2) **ゼブラフィッシュ、ティラピア Neu1、Neu4 シアリダーゼの遺伝子クローニングと性状解析**：これまでメダカでしか報告がないNeu1シアリダーゼについて、ゲノム情報が明らかとなっているゼブラフィッシュやティラピアを用いて遺伝子クローニング、および性状解析を行う。

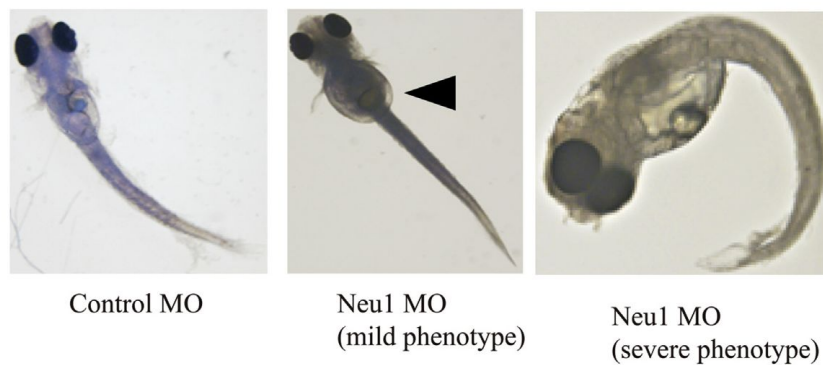
(3) **Neu1 ノックアウトゼブラフィッシュの作出とその表現型解析**：成魚も含めた長期的な魚類Neu1の機能解析を行うために、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いたneu1ノックアウトゼブラフィッシュの作成を行う。その組織における糖鎖構造の変化、および遺伝子発現プロファイルの変化について明らかにする。

(4) **バクテリア感染におけるリソソームシアリダーゼの機能解析**：魚病細菌感染における魚類リソソームシアリダーゼの意義について明らかにする。

4. 研究成果

(1) メダカリソソームシアリダーゼのノックダウンによる胚発生に与える影響

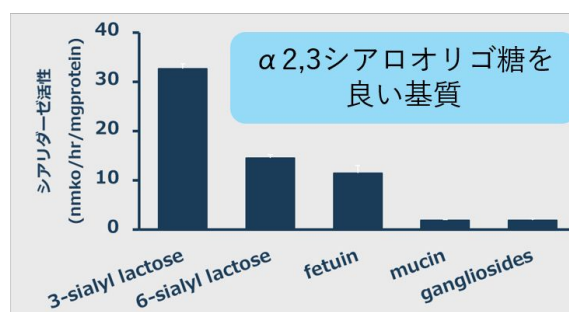
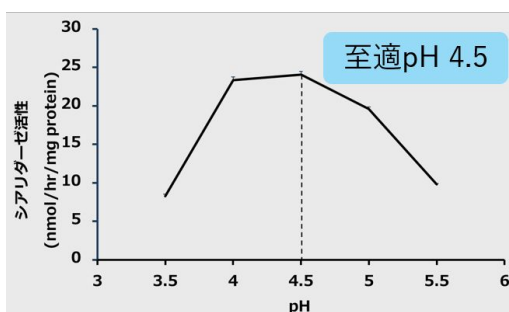
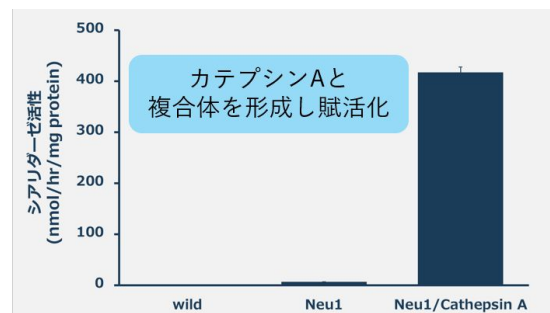
これまでの我々の研究により、メダカには2つのリソソームシアリダーゼ (Neu1、Neu4) が存在し、そのうち Neu1 が主に脱シアリル化に関与するあることが予想されている。この Neu1 は胚において 3.5 および 6.5 dpf で発現が上昇する。メダカ胚由来初代培養細胞をクロロキン処理するとリソソームに糖タンパク質の蓄積がみられることから、Neu1 が糖タンパク質の脱シアリル化に関与することが見いだされた。この Neu1 は 2-3 結合のシアリ酸を良く切断するが、Neu1 の遺伝子発現が変化する 3.5 および 6.5 dpf では、2-3 結合のシアリ酸を持つ糖タンパク質量が変動していた。そこでメダカ受精卵 (1 細胞期) に Neu1 特異的モルフォリノオリゴをマイクロインジェクションしたところ、モルフォリノオリゴ処理したメダカ胚の心拍数の増加、卵黄吸収の遅滞、孵化率の低下、ならびに孵化後の遊泳行動異常が認められた。そこでモルフォリノオリゴ処理メダカ胚の糖タンパク質組成をレクチンプロットで解析したところ、2-3 シアロ糖タンパク質の蓄積が認められたが、2-6 シアロ糖タンパク質量には変化が認められなかった。またこの 2-3 シアロ糖タンパク質は卵黄のピテロジェニン関連タンパク質に由来することが明らかとなった。そこで in situ hybridization で Neu1 の発現を解析したところ、卵黄部分に母性由来と思われる mRNA の発現が認められ、胚発生における Neu1 と合わせて重要な働きをしていることが明らかとなった。これらの研究成果は、Ryuzono, et al., *Biochimie*, 135, 2017 に報告した。



(2) ゼブラフィッシュ、ティラピア Neu1、Neu4 シアリダーゼの遺伝子クローニングと性状解析

魚類における Neu1 シアリダーゼの報告は我々によるメダカ Neu1 のみであり、魚類における機能の保存性については全く分かっていない。そこでティラピアおよびゼブラフィッシュの Neu1 クローニングと性状解析を行った。ティラピアゲノムには 2 つの Neu1 シアリダーゼ (Neu1a、Neu1b) が存在し、これはシクリッドにのみ共通して認められる。一方、ゼブラフィッシュの Neu1 シアリダーゼは 1 種類であった。ティラピア、ゼブラフィッシュともカテプシン A との複合体形成が Neu1 の活性化に必要であり、Neu1 の成熟過程もメダカやヒトと類似していた。酵素学的性状解析や細胞内局在解析の結果から、魚類 Neu1 の性状については魚種間で高度に保存されていることが明らかとなった。一方、組織における Neu1 遺伝子の発現パターンは魚種間で異なっており、Neu1 がリソソームにおける異化分解のみではなく、生息場所や習性に関連するような表現型に影響を与えていることが示唆された。

一方、魚類 Neu4 は魚種間でその性状が大きく異なる事が分かってきた。メダカ Neu4 はリソソームに局在するが、ティラピア Neu4 はリソソームではなく核に局在することが明らかとなった。その基質特異性はメダカ Neu4 と大きく変わらないが、ティラピア Neu4 の至適 pH は酸性側からアルカリ側までかなり広がった。ティラピア Neu4 には核移行シグナル (NLS) が存在し、核内移行タ

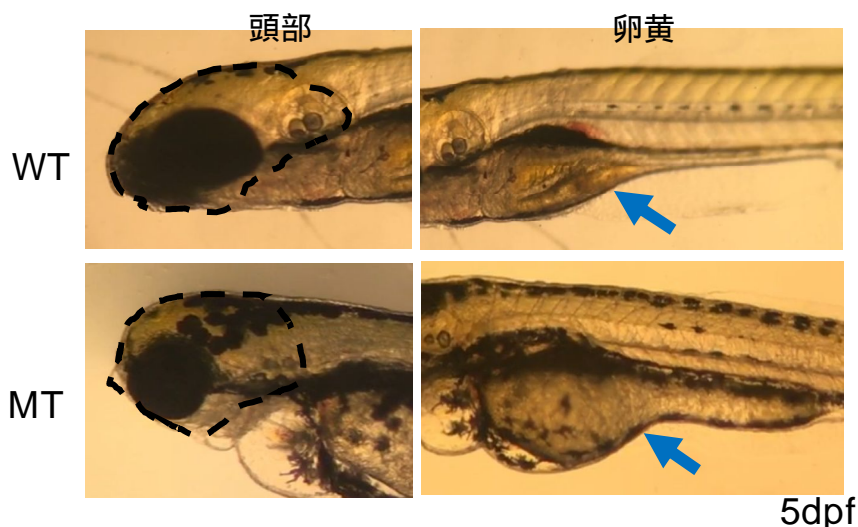


ンパク質インポートとの相互作用により核局在を示していた。以上の結果から、魚類に共通して働くリソソームシアリダーゼは Neu1 であることが明らかとなった。この研究成果は、Honda et al. Biochimie., 2018 に報告した。

(3) Neu1 ノックアウトゼブラフィッシュの作出とその表現型解析

モルフォリノオリゴ処理では限られた期間でのみの観察となるため、長期における解析に必要なノックアウトを CRISPR/Cas9 ゲノム編集により行った。対象魚としてマイクロインジェクションが容易なゼブラフィッシュを用い、複数デザインした gRNA の評価を行った。得られた F0 ファウンダーにおける変異導入効率を求めたところ 90%以上の高い値を示した。F0 と野生型を掛け合わせて得た F1 の遺伝子型と変異箇所のシーケンス解析を行い、フレームシフトにより Neu1 タンパク質が作られない変異体を選び出し、同じ変異体同士を掛け合わせて F2 の完全ノックアウト体を作成した。

このゼブラフィッシュはシアリダーゼ全活性が 80%低下しており、レクチンプロットによる解析から糖タンパク質のプロファイルが変化していることが見いだされた。胚発生時の遺伝子解析を行ったところ、筋肉や神経系の遺伝子の発現変化がダイナミックに変化しているが、胚の生残率や孵化率には大きな影響を与えなかった。これはおそらくゼブラフィッシュの胚発生のスピードが速いためと思われる。成長した個体は正常な性成熟を示し、ノックアウト同士の掛け合わせによる F3 を得ることができた。しかし一方で、成長遅滞や骨異常を示す個体が Neu1 ノックアウトゼブラフィッシュに認められ、ヒトにおける Neu1 欠損症であるシアリドーシスの症状に類似していた。また Neu1 ノックアウトゼブラフィッシュの遊泳行動には異常が見られ、情動行動の変化が生じていることが予想された。



(4) バクテリア感染におけるリソソームシアリダーゼの機能解析

リソソーム酵素である Neu1 が魚病感染においてどのような役割を持つかについて検討した。Neu1 を過剰に発現させた魚類培養細胞をバクテリアに感染させたところ、この細胞内感染が有意に変化することが明らかとなった。そこで感染時における宿主細胞内在性のシアリダーゼの遺伝子発現を解析したところ、感染後の時間に応じてその発現量が低下することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

塩崎一弘, 大石一樹, 本田晃伸: 魚類シアリダーゼの生理機能とその魚種間における多様性. Trend. Glycosci. Glycotech. 31, J7-J14, 2019 (査読あり) DOI: <https://doi.org/10.4052/tigg.1518.1J>

Shiozaki, K., Oishi, K., Honda, K. Functional characterization of fish sialidases and their diversity among different orders. Trend. Glycosci. Glycotech. 31, E7-E13, 2019 (査読あり) DOI: <https://doi.org/10.4052/tigg.1518.1E>

Honda, A., Chigwechokha, P., Kamada-Futagami, Y., Komatsu, M., Shiozaki, K., Unique nuclear localization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Neu4 sialidase is regulated by nuclear transport receptor importin alpha/beta. Biochimie., 142, 94-104, 2018 (査読あり) DOI: 10.1016/j.biochi.2018.04.003.

Ryuzono, S., Takase, R., Kamada, Y., Ikenaga, T., Chigwechokha, P., Komatsu, M., Shiozaki, K., Suppression of Neu1 sialidase delays the absorption of yolk sac in medaka (*Oryzias latipes*) accompanied with the accumulation of alpha 2-3 sialo-glycoproteins. *Biochimie*, 135, 63-71, 2017 (査読あり) DOI: 10.1016/j.biochi.2017.01.008.

[学会発表](計 16 件)

大石一樹、小松正治、塩崎一弘：メダカ Neu3a によるガングリオシド組成の変化は魚類肝臓細胞のトリグリセリド蓄積量を減少させる。第 41 回日本分子生物学会年会，神奈川県横浜市，2018

岡田圭司、高瀬 諒、前田悠太郎、小松正治、塩崎一弘：CRISPR/Cas9 を用いた Neu1KO ゼブラフィッシュの作出とその表現型解析。第 37 回日本糖質学会年会，宮城県仙台市，2018

本田晃伸、二神裕子、小松正治、塩崎一弘：魚類における核局在型シアリダーゼの分布とその局在メカニズム。第 37 回日本糖質学会年会，宮城県仙台市，2018

岡田圭司、高瀬 諒、前田悠太郎、小松正治、塩崎一弘：ヒトシアリドースモデルとしての *neu1* 欠損ゼブラフィッシュ。平成 30 年度日本生化学会九州支部例会，福岡県福岡市，2018

本田晃伸、二神裕子、小松正治、塩崎一弘：ティラピア Neu4 は核に局在する新奇シアリダーゼである。平成 30 年度日本生化学会九州支部例会，福岡県福岡市，2018

大石一樹、宮崎未奈、高瀬 諒、西村 渉、小松正治、塩崎一弘：魚類肝臓細胞におけるガングリオシド脱シアリル化を介した脂質蓄積制御機構の解明。生命化学系学会合同年次大会 (ConBio2017)，兵庫県神戸市，2017

高瀬 諒、前田悠太郎、小松正治、塩崎一弘：シアリドースモデルとしての *neu1* ノックアウトゼブラフィッシュの作製。平成 29 年度日本水産学会九州支部会，長崎県長崎市，2017

都築利治、二神裕子、Vo Khanh Linh、Irandha CM Siahaan、小松正治、塩崎一弘：Edwardsiella tarda の病原性を制御する NanA シアリダーゼ。平成 29 年度日本水産学会九州支部会，長崎県長崎市，2017

塩崎一弘：ゲノム改変ゼブラフィッシュを用いたヒト病態モデルの開発。第 4 回 鹿児島黒豚 機能性食と健康シンポジウム，鹿児島県鹿児島市，2017

Honda, A., Chigwechokha, KP., Wakamatsu, R., Kamada, Y., Komatsu, M., Shiozaki, K. Characterization of tilapia sialidases and its significance in bacterial infection. The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium "Fisheries Science for Future Generations", Tokyo, Japan. 2017

塩崎一弘、都築利治、Vo Khanh Linh、鎌田裕子、小松正治：Edwardsiella tarda の病原性決定における NanA シアリダーゼの重要性。第 36 回日本糖質学会年会，北海道旭川市，2017

本田晃伸、Petros Kingstone Chigwechikha、鎌田裕子、小松正治、塩崎一弘：Importin によるティラピアシアリダーゼ Neu4 の核局在制御機構。第 36 回日本糖質学会年会，北海道旭川市，2017

高瀬 諒、本田晃伸、小松正治、塩崎一弘：脊椎動物モデルへの応用を目指した魚類オートファジー・リソソーム分解系における脱シアリル化機構の解明。第 39 回日本分子生物学会年会，神奈川県横浜市，2016

塩崎一弘、龍園せな、高瀬 諒、鎌田裕子、大石一樹、宮崎未奈、小松正治、池永隆徳：胚発生におけるリソソームシアリダーゼ Neu1、Neu4 の重要性。平成 28 年度日本水産学会秋季大会，奈良県奈良市，2016

本田晃伸、Petros Chigwechokha、鎌田裕子、小松正治、塩崎一弘：テトラピア Neu4 は核に局在するシアル酸水解酵素である。平成 28 年度日本水産学会秋季大会，奈良県奈良市，2016

山本晃司、高橋耕太、塩崎一弘、山口和範、島礼、宮城妙子：形質膜シアリダーゼ NEU3 の EGFR 活性化機構。第 89 回日本生化学会大会，宮城県仙台市，2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://kadai-marinebiochem.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。