

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82670

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07998

研究課題名（和文）糖タンパク質によるウシ黄体機能制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of luteal function using glycoprotein

研究代表者

佐野 栄宏（SANO, MASAHIRO）

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部開発第二部バイオ応用技術グループ・研究員

研究者番号：20645577

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では黄体細胞における糖鎖と黄体機能の相関性を検討し、新たな黄体機能制御機構を解明することを目的とした。

研究により、2,6-シアル酸糖鎖が退行期黄体で増加し、ガレクチン-1との結合が妨げられることで黄体退行に貢献した。また、フコシル化糖鎖は退行期で減少し、フコシダーゼにより黄体細胞の生存率は減少するという、糖鎖と黄体機能の関連性が証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在わが国ではプロスタグランジンF₂で発情誘起したウシの低受胎率が問題となっており、自然に近い形で黄体退行を誘起するための新規発情周期制御技術の開発が求められている。しかし、黄体機能の制御には様々な因子の関与することが知られているがその全容は未だ不明であり、更なる制御機構の解明が望まれている。本研究によって、糖鎖による新たな黄体制御機構が明らかになったことにより、これまでにはないアプローチによる黄体退行を誘起する新手法の開発の一助となることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：Alpha 2,6-sialylated glycoproteins inductively expressed by stimulation with PGF₂ inhibits the interaction between galectin-1 and the N-glycoproteins on the cell surfaces, contribute to the regulation of luteolysis in cows. Furthermore, the level of core fucosylation was decreased at the regress stage, and the viability of luteal cells was decreased by fucosidase. The overall findings suggest that glycoproteins contribute to the regulation of luteal functions.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：黄体機能 糖タンパク質 黄体退行 糖鎖 細胞生存率

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の過半は糖鎖で修飾された糖タンパク質として機能しており、最近ではこの糖鎖修飾が生体機能維持に非常に重要な役割を担っている事が明らかになっている。糖鎖形成不全が肺気腫、または2型糖尿病を引き起こすことなど、その発見事例は年々増えている。申請者はこれまでに、動脈硬化病変形成に関与する糖鎖機能メカニズムを報告してきた。世界的にウシにおける繁殖成績の低下が問題となっており、受胎率の低下はその一因となっている。現在、PGF2 α は発情誘起目的に広く用いられているがウシの低受胎率が問題になっており、その原因として不十分な黄体退行が示唆され、より自然な黄体退行を誘起できる「新規発情周期制御技術」の開発が求められている。しかし、発情周期を制御する黄体機能のメカニズムには不明な点が多く残されており、黄体機能制御機構の解明が望まれている。

2. 研究の目的

申請者は糖鎖結合性を有するレクチン的一种であるガレクチン-1が血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR) -2の糖鎖を介して相互作用することで黄体細胞の生存率を増加させることを発見した。この発見は糖鎖による膜タンパク質の機能制御の1つのメカニズムを解明し、さらにその異常が生殖機能障害をもたらすことを明示している。以上の知見は糖鎖が黄体機能制御に深く関与していることを示しており、新たな黄体機能制御機構の解明の礎となることが考えられる。これは従来にない新しい黄体機能制御機構の概念である。

申請者はこれまでの知見を踏まえ、「糖タンパク質糖鎖が黄体機能制御機構を調節している」と作業仮説を立て、その検証のために発情周期を通じた黄体の糖鎖発現変化を解析した。その結果、糖タンパク質糖鎖の発現は中期黄体で高くなるという結果を得た。この事実は糖タンパク質糖鎖が黄体機能を維持する制御因子であり、新規発情周期制御技術の標的として非常に有望であることを意味している。本研究は、黄体の糖鎖機能を標的とした新規黄体制御機構の解明への研究基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では黄体細胞における糖鎖と黄体機能の相関性を検討し、新たな黄体機能制御機構を解明することを最終的な研究目的に掲げ、1) 発情周期を通じた糖鎖構造変化タンパク質の同定 2) 黄体機能調節因子による糖鎖機能の詳細解析、3) 糖鎖構造変化と黄体機能の相関性の検証といった3つの段階的な戦略を用いて検討する。

4. 研究成果

糖転移酵素遺伝子発現の検討

(1) ウシ黄体の発情周期を通じた、O-GlcNAc転移酵素 (OGT) (図1) およびO-GlcNAc切断酵素 (OGA) (図2) の遺伝子発現変化をReal-time PCR法により検証した結果、両遺伝子共に退行期黄体で増加することが明らかになった。

(2) O-GlcNAc糖鎖修飾を増加させるOGTおよびO-GlcNAc糖鎖修飾を減少させるOGAの両遺

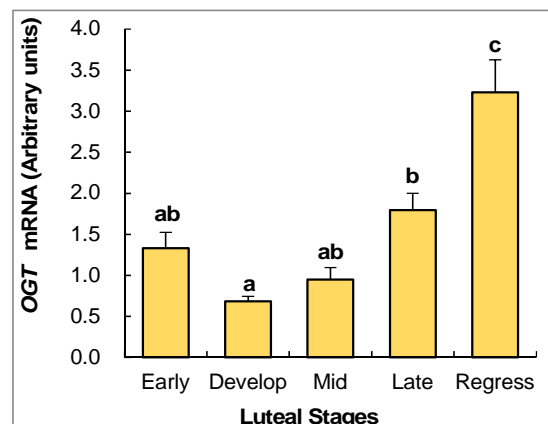


図-1 発情周期を通じたOGT遺伝子発現
a, bおよびcはP<0.05

伝子発現が退行期で増加していたため、実際の O-GlcNAc 糖鎖発現は退行期でどのようになっているかを調べる必要があった。そのため、ウシ黄体の発情周期を通じた、O-GlcNAc 糖鎖発現を抗 O-GlcNAc 抗体を用いた Western Blot 法で解析したところ、O-GlcNAc 糖鎖が退行期黄体で減少することが明らかになった (図 3)。O-GlcNAc 糖鎖は細胞内の様々なタンパク質に修飾され、その機能制御において重要な役割を持つことが知られているので、

その糖鎖が退行期で減少することによって黄体退行に参与するタンパク質の機能制御に作用する可能性は十分に考えられる。

プロテオグリカンおよびヒアルロン酸合成酵素遺伝子発現の検討

(1) ウシ黄体の発情周期を通じたプロテオグリカン遺伝子発現変化を検証した。その結果、シンデカン-1 (SDC-1) 遺伝子発現は退行期で増加することが明らかになった (図 4)。SDC-1 は、免疫細胞の炎症部位への遊走を高めることが報告されているので、この結果は退行期における黄体組織への免疫細胞の集積に SDC-1 が関与している可能性を示唆している。

(2) ウシ黄体の発情周期を通じたヒアルロン酸合成酵素 (HAS) -2 遺伝子発現変化を検証した。その結果、HAS-2 遺伝子発現は退行期で増加することが明らかになった (図 5)。これまでに、内皮細胞上の表面ヒアルロン酸 (HA) 発現の

増加によって CD44 / HA 相互作用を受容し、炎症細胞の血管外遊出を受容する局所部位を作り出す可能性があることが報告されている。今回の退行期黄体における HAS-2 遺伝子発現の増加は、SDC-1 とともに黄体組織への免疫細胞の集積に参与する可能性を示唆している。

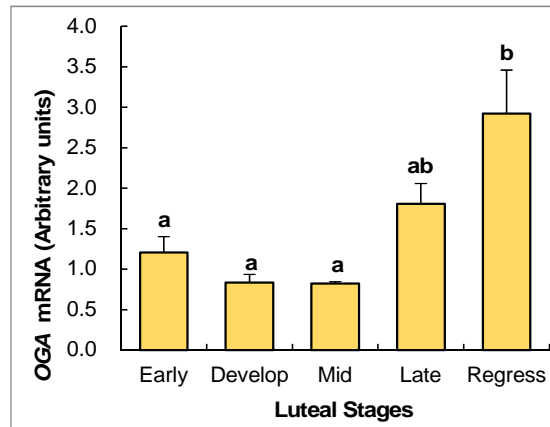


図-2 発情周期を通じた OGA 遺伝子発現
a および b は $P < 0.01$

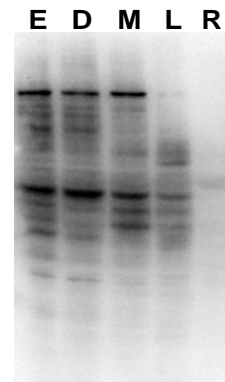


図-3 発情周期を通じた O-GlcNAc 糖鎖
E: Early D: Develop M: Mid L: Late R: Regress

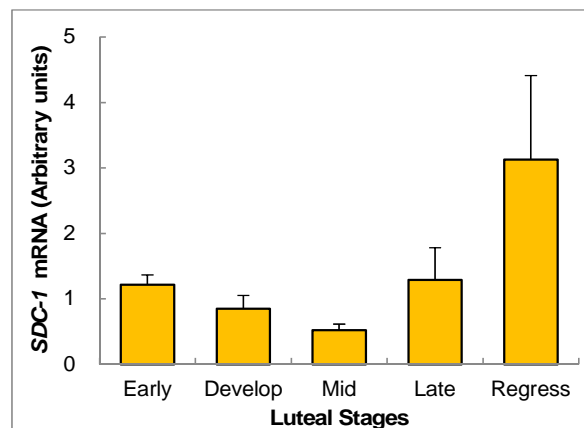


図-4 発情周期を通じたシンデカン遺伝子発現

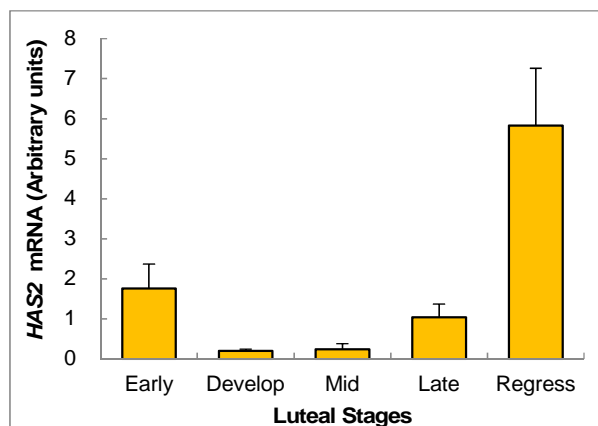


図-5 発情周期を通じたシンデカン遺伝子発現

シアル酸糖転移酵素発現の検討

(1) ウシ黄体の発情周期を通じた、シアル酸転移酵素の遺伝子発現変化を検証した結果、退行期黄体で増加することが明らかになった(図6)。

(2) ウシ黄体の発情周期を通じた、シアル酸糖鎖発現をWestern Blotで解析したところ、シアル酸糖鎖が退行期黄体で増加することが明らかになった(図7)。さらに、黄体細胞のシアル酸レベルはPGF2処理によって増加した。

(3)シアル酸切断酵素によってガレクチン-1による細胞生存率の増加効果は高められた。これらの結果から、PGF2刺激によって発現したタンパク上のシアル酸はガレクチンと糖タンパク質との相互作用を阻害し、ウシにおける黄体退行調節に貢献していることが示唆された。

フコース酵素発現の検討と黄体生存率に対する影響

(1) 発情周期を通じた黄体組織において、糖タンパク質の core fucosylation レベルは後期、退行期と比較して、初期、形成期および中期において高く(図8)、core fucose が黄体細胞に局在することが認められた。

(2) 黄体細胞のEGF receptorはcore fucoseを有していた。

(3)黄体細胞における糖タンパク質の core fucosylation レベルは、control区と比較して fucosidase (0.01, 0.1 units/ml) 添加区において減少し、細胞生存率は control区と比較して、fucosidase (0.1 units/ml) 添加区において有意に減少したが(図9)、P4産生に変化はなかった。さらに、EGF (5, 10 ng/ml) による黄体細胞の生存率の増加は、EGF および fucosidase (0.1 units/ml) の共添加により有意に減少したが、P4産生に変化はなかった。

これらのことから、EGFのもつ黄体機能維持作用にEGFRのcore fucosylationが重要であり、core fucosylationの減少が構造的退行に与与する可能性が示された。

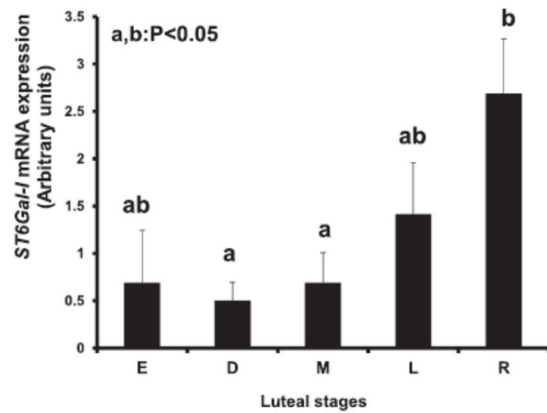


図-6 発情周期を通じた ST6GAL-1 遺伝子発現 (aおよびbは P<0.05)

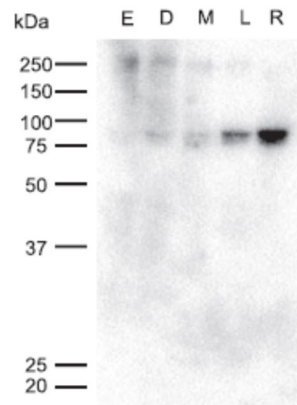


図-7 発情周期を通じたシアル酸糖鎖 E:Early D:Develop M:Mid L:Late R:Regress

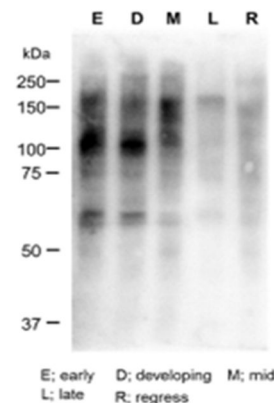


図-8 発情周期を通じたフコシル化糖鎖発現

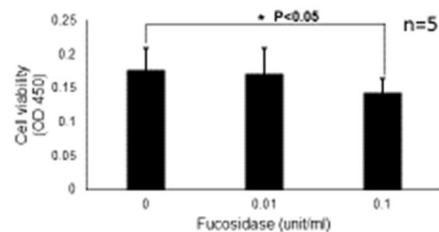


図-9 フコシダーゼ処理による黄体細胞生存率への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Horihata K, Yoshioka S, Sano M, Yamamoto Y, Kimura K, Skarzynski DJ, Okuda K. | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Expressions of lipoprotein receptors and cholesterol efflux regulatory proteins during luteolysis in bovine corpus luteum. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Reprod Fertil Dev. | 6. 最初と最後の頁 1280-1286 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1071/RD15538. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Hashiba K, Nio-Kobayashi J, Sano M, Maeda M, Kimura Y, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K. | 4. 巻 95 |
| 2. 論文標題 Possible contribution of 2,6-sialylation to luteolysis in cows by inhibiting the binding of galectin-1. | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Biol Reprod. | 6. 最初と最後の頁 1-8 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1095/biolreprod.116.140194. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Junko Nio-Kobayashi, Kazuhisa Hashiba, Masahiro Sano, Kiyoshi Okuda, W. Colin Duncan, Toshihiko Iwanaga | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Expression profiles and possible roles of galectins in the corpus luteum. | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Trends Glycosci Glyc. | 6. 最初と最後の頁 E71-E77 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.1416.1E | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Kizuka Y, Funayama S, Shogomori H, Nakano M, Nakajima K, Oka R, Kitazume S, Yamaguchi Y, Sano M, Korekane H, Hsu T, Lee H, Wong C, Taniguchi N. | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 High-Sensitivity and Low-Toxicity Fucose Probe for Glycan Imaging and Biomarker Discovery . | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Cell Chem Biol. | 6. 最初と最後の頁 782-792 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2016.06.010. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Sano M, Shang Y, Nakane A, Saito T. | 4. 巻 81 |
| 2. 論文標題 Salmon Nasal Cartilage Proteoglycan Enhances Growth of Normal Human Dermal Fibroblast Through Erk1/2 Phosphorylation | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem . | 6. 最初と最後の頁 1379-1385 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1318695. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 羽柴 一久, 小林 純子, 佐野 栄宏, 前田 恵, 木村 吉伸, 奥田 潔, 木村 康二 |
| 2. 発表標題 黄体維持機構における Epidermal growth factor receptor の core fucosylation の役割 |
| 3. 学会等名 日本繁殖生物学会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuhisa Hashiba, Masahiro Sano, Junko Nio-Kobayashi, Megumi Maeda, Yoshinobu Kimura, Yuki Yamamoto, Koji Kimura, Kiyoshi Okuda |
| 2. 発表標題 An increase in the level of 2,6-sialylation contributes to luteolysis in cows by inhibiting galectin-1 binding to glycan |
| 3. 学会等名 Society for the Study of Reproduction (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 佐野栄宏、成田武文 |
| 2. 発表標題 改変プロテオグリカンの機能性および構造解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐野 栄宏、齋藤 知明 |
| 2. 発表標題 サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの細胞増殖促進効果における制御メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masahiro Sano, Yi Shang, Akio Nakane, Tomoaki Saito |
| 2. 発表標題 Salmon nasal cartilage proteoglycan enhances proliferation of normal human dermal fibroblast through Erk1/2 phosphorylation |
| 3. 学会等名 Systems Glycobiology and Beyond (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masahiro Sano, Yi Shang, Aiko Anbo, Shinya Yamaguchi, Akio Nakane, Tomoaki Saito |
| 2. 発表標題 Enhancement of effects of salmon nasal cartilage proteoglycan on biological function by its modification |
| 3. 学会等名 1st Australasian Glycoscience Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐野 栄宏、商 怡、安保 亜衣子、山口 信哉、中根 明夫、齋藤 知明 |
| 2. 発表標題 プロテオグリカンを改変することによる生体機能への有効性に対する増強効果 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------|--|--|----|
| 研究 分担 者 | 山本 ゆき (YAMAMOTO YUKI) (20645345) | 岡山大学・環境生命科学研究科・助教 (15301) | |