

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780204

研究課題名(和文) 魚類における複合糖鎖および関連酵素の生理機能解析

研究課題名(英文) Physiological functions of fish glycoconjugates and their related enzymes

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：メダカより4つのシアリダーゼ遺伝子をクローニングし、その性状について解析した。その結果、Neu1とNeu4はリソソームに局在しオリゴ糖を良い基質としていた。またNeu3aは形質膜、Neu3bは細胞質に局在し、ともにガングリオシドを良い基質としていた。これらシアリダーゼの生理機能について解析したところ、Neu3aは神経細胞、Neu3bは筋芽細胞の分化を促進することが明らかとなった。またNeu1とNeu4はリソソームにて異化分解に関与していることが見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Four medaka sialidase genes (neu1, neu3a, neu3b and neu4) has been cloned and characterized. Neu1 and Neu4 were localized at lysosome and their good substrates were oligosaccharides. On the other hand, ganglioside sialidases Neu3a and Neu3b were detected at plasma membrane and cytosol, respectively. Physiological functions of medaka sialidases were quite different from each other. Neu3a enhanced the differentiation of neurite formation. Neu3b positively regulated myoblast differentiation through the down-regulation of egfr mRNA expression. Neu1 and Neu4 are involved in the catabolism of glycoproteins in lysosome.

研究分野：水圏糖鎖生物学

キーワード：メダカ 糖脂質 糖タンパク シアル酸 シアリダーゼ

1. 研究開始当初の背景

シアリダーゼは糖タンパクや糖脂質の非還元末端からシアル酸を遊離させる糖鎖分解酵素である。哺乳類では Neu1、Neu2、Neu3 および Neu4 の 4 つのシアリダーゼ遺伝子が単離および性状解析されており、酵素学的性状や細胞内局在はそれぞれ大きく異なっている。Neu1 はリソソームに局在し、オリゴ糖や糖タンパクを良い基質とする。Neu2 は細胞質に局在し、中性 pH にて広い基質特性を示す一方で、形質膜シアリダーゼ Neu3 はガングリオシドに特異的に働く。また Neu4 はミトコンドリアに局在し、細胞内ではムチン型の糖タンパクから脱シアルル化を行っている。糖鎖末端のシアル酸は細胞-細胞間だけでなく、タンパク質やウイルス、バクテリアなどの認識分子として働くことから、哺乳類ではシアリダーゼによる糖鎖の脱シアルル化が、細胞増殖や分化、免疫機能やがんなどの疾病など様々な生理現象に関与する事が分かってきた。

一方で、魚類における複合糖質およびシアリダーゼの生理機能についてはほとんど知見が得られていない。ゼブラフィッシュで一部のシアリダーゼのクローニングが報告されているのみである。しかし哺乳類での先行研究から、魚類においても発生や疾病に関与していることが予想される。そのため、魚類における脱シアルル化機構の解明が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

シアル酸は糖鎖の末端に位置し、糖鎖分解の初発反応であることから、魚類においてもシアリダーゼが糖鎖構造の制御を通じて様々な生理機能を発現していると考えられる。

魚類におけるシアリダーゼ研究の意義として、1) 養殖業を始めとする水産業への応用、2) ヒト疾病のモデル動物としての魚類の利用、の 2 つの可能性が挙げられる。最近魚類のモデル動物としてニホンメダカが注目されている。メダカの特徴としては、i) ゲノム構造が明らかであること、ii) 近交系が存在する事、iii) 遺伝子変異が容易であり、成熟までの期間が短いこと、などである。本課題ではこのニホンメダカを試料とし、養殖魚もしくはヒトの糖鎖研究のモデル動物として応用するための基礎的知見を得ることを目的とする。すなわち、シアリダーゼの酵素学的性状解析や細胞、個体実験により、魚類複合糖質の生理的意義について解明する。

3. 研究の方法

- (1) ニホンメダカシアリダーゼ遺伝子のクローニングおよび性状解析

メダカゲノムの解析によりシアリダーゼ遺伝子の *in silico* クローニングを行う。続いてメダカ組織より total RNA および cDNA を調製し、遺伝子クローニングを行う。

- (2) メダカシアリダーゼの酵素学的性状解析

遺伝子クローニングされたシアリダーゼのリコンビナント蛋白質を培養細胞にて発現させ、粗酵素液を調製後し至適 pH や基質特異性などの酵素学的性状の解析を行う。また各シアリダーゼを遺伝子導入した培養細胞を用いて、免疫蛍光抗体法による免疫染色および生化学的手法を用いた細胞分画を行い、シアリダーゼ蛋白質の細胞内局在解析を行う。

- (3) メダカ個体におけるシアリダーゼ発現変化とその意義

メダカ胚を受精直後から継時的にサンプリングを行い、シアリダーゼ遺伝子の発現量について解析を行う。またメダカの各組織における遺伝子発現量についても解析を行う

- (4) 培養細胞におけるメダカシアリダーゼの生理機能解析

神経細胞や筋芽細胞などにシアリダーゼ遺伝子を導入し、細胞増殖や細胞分化に与える影響について検討する。

- (5) 魚類細胞の複合糖質組成変化と *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) 感染との関係

E. tarda は魚類やヒトに感染するバクテリアであり、養殖業ではヒラメなどに大きな被害をもたらしている。このバクテリアには NanA と呼ばれるシアリダーゼが存在しており、細胞感染における重要性が推測されているが、その詳細については分かっていない。そこで NanA シアリダーゼの酵素学的性状を明らかにし、細胞感染と宿主細胞の複合糖質の組成変化との関係性について解析する。

4. 研究成果

- (1) ニホンメダカシアリダーゼ遺伝子のクローニングおよび性状解析

メダカゲノムに対してヒトシアリダーゼ配列を用いた BLAST 解析およびシンテニー解析を行ったところ、メダカゲノムには 4 種のシアリダーゼ遺伝子 (*neu1*、*neu3a*、*neu3b* および *neu4*) の存在が予想された。一方、ヒト *NEU2* シアリダーゼのオーソログはメダカゲノムには存在しなかった。

続いてメダカ脳より total RNA および cDNA を調製し、各シアリダーゼ遺伝子のクローニングを行った。その結果、*neu1* 遺伝子 (ORF:1182bp)、*neu3a* (同 1233bp)、*neu3b* (同 1170bp) および *neu4* (同 1404bp) の単離に成功した。これらの演繹アミノ酸配列について解析したところ、哺乳類シアリダーゼに特徴的である Asp-Box や RIP motif、シアリダーゼ活性に必要とされる 6 アミノ酸の保存が確認された。さらに exon-intron 構造も哺乳類と同様であった。またメダカ Neu1 のみ N 末端に 29 アミノ酸からなるシグナル配列が認められ、エピトプタグ法によりこれが確認された。

(2) メダカシアリダーゼの酵素学的性状解析

各メダカシアリダーゼの cDNA を pcDNA3.1 プラスミドにサブクローニングし、HEK293 細胞にて発現させて粗酵素液を得た。その酵素液を用いて酵素学的性状を解析したところ、Neu3a と Neu3b は至適 pH を 4.0-4.2 とし、ガングリオシドを良い基質としていた。Neu4 シアリダーゼは pH4.6 を至適 pH としていたが中性 pH まで酵素活性が維持されていた。また Neu4 は 3-および 6-シアリルラクトースに高い酵素活性を示した。

一方、Neu1 シアリダーゼの粗酵素液はほとんどシアリダーゼ活性を示さなかった。哺乳類ではカテプシン A による Neu1 の活性化が報告されている。そこでメダカ脳よりカテプシン A 遺伝子 (*ctsa*) のクローニングを行い 1416bp の ORF を得た後に、*neu1* 遺伝子と培養細胞に共発現させて再び粗酵素液を調製した。再びシアリダーゼ活性を測定したところ、著しい Neu1 酵素活性の上昇が認められ、哺乳類同様カテプシン A が Neu1 の賦活化を行っていることが明らかとなった。性状解析の結果、メダカ Neu1 は至適 pH を 4.0-5.0 とし、3-シアリルラクトースが良い基質であった。

表 1 メダカリソソームの性状まとめ

	酵素学的性状	ヒトとの保存性
メダカ Neu1	リソソーム・糖タンパク	やや高い
メダカ Neu2	存在しない	ない
メダカ Neu3a	細胞膜・糖脂質	高い
メダカ Neu3b	細胞質・糖脂質	ない
メダカ Neu4	リソソーム・オリゴ糖	低い

続いてこれらシアリダーゼ蛋白質の細胞内局在解析を行った。Neu3a と Neu3b は似た酵素学的性状を示していたが、それら細胞内局在は大きく異なっていた。Neu3a はそのほとんどが形質膜に局在している一方で、Neu3b は細胞質に局在しており、細胞分画においてもそれが確認された。続いて Neu1 お

よび Neu4 シアリダーゼの細胞内局在を解析したところ、ともにリソソームに局在することが明らかになった (表 1)。さらに Neu1 のリソソームへの局在にはカテプシン A が必要であることもわかった。

(3) メダカ個体におけるシアリダーゼ発現変化とその意義

メダカシアリダーゼの生理機能を明らかにするため、メダカ組織における各シアリダーゼの遺伝子発現について解析した。real-time にて mRNA 量を定量したところ、各シアリダーゼとも脳と肝臓において発現が高い傾向が認められた。4 つのシアリダーゼ遺伝子の発現量は *neu1* > *neu3a* > *neu4* > *neu3b* であった。さらに *neu1* は脾臓で高い発現が認められ、免疫機能との関連が示唆された。

次にメダカ受精卵を用いて、発生過程におけるシアリダーゼ遺伝子発現変化について解析した。*neu1* は 0.5-4.5 の発生前期、および 6.5-9.5dpf の後期に発現が上昇しているのに対し、*neu3a* は受精直後の未分化な 0.5dpf で著しい発現上昇を示していた。また *neu3b* は孵化後に遺伝子発現が亢進しており、*neu4* は発生後期 (5.5-8.5 dpf) で発現していた。

(4) 培養細胞におけるメダカシアリダーゼの生理機能解析

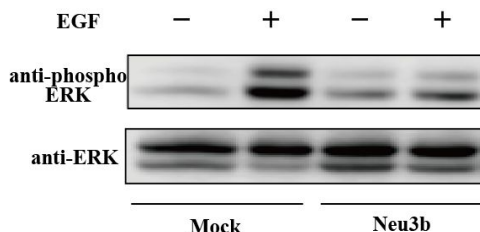


図 Neu3b 発現細胞では ERK のリン酸化が低下し細胞の分化が促進していた

メダカシアリダーゼの生理機能を明らかにするため、培養細胞を用いた解析を行った。マウス神経芽腫細胞 Neuro2a に *neu3a* および *neu3b* 遺伝子を導入し、レチノイン酸により neurite formation を誘導し観察を行ったところ、*neu3b* では野生型と差が見られなかったのに対し、*neu3a* 導入細胞では有意に細胞分化が促進されていた。このことから Neu3a が神経細胞の分化に関与していることが示唆された。

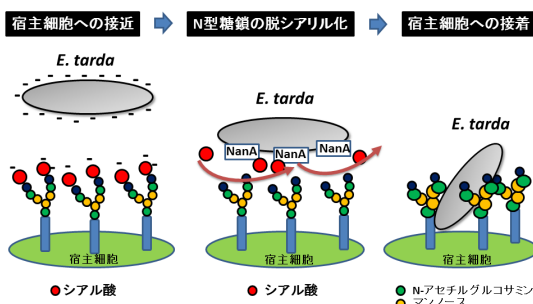
続いて筋分化におけるメダカシアリダーゼの役割について検討した。*neu3b* 導入 C2C12 筋芽細胞では、野生型に比べ有意に細胞増殖能の低下が認められた。さらに 2%ウマ血清による分化誘導条件下において、Neu3b は *myod* や *myog* といった筋分化マーカー遺伝子の上昇を伴って、筋管細胞への分化を促進していた。そこで糖脂質の組成解析を行ったところ、

Neu3b 細胞では GM2 ガングリオシドの減少とラクトシルセラミドの上昇が認められた。さらにシグナル経路の解析を行っていたところ、細胞増殖を促進する ERK のリン酸が Neu3b 導入細胞で有意に減少しており、Neu3b 細胞では増殖から分化へのスイッチが入っていることがわかった。この ERK のリン酸化の抑制は EGFR の遺伝子発現抑制によることが real-time PCR より明らかとなり、糖脂質の組成変化により転写が負に制御されたと示唆された。

(5) 魚類細胞の複合糖質組成変化と *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) 感染との関係

NanA シアリダーゼの性状を明らかにするため、*E. tarda* ゲノムより *nanA* 遺伝子 (ORF:2013bp) のクローニングを行った。このリコンビナント蛋白を大腸菌で発現させたところ、C 末端側の切断が認められ、これは NanA の酵素活性化にオートトランスポートドメインの切断が重要であることを示している。NanA は Sia 2-3 結合や N 型の糖タンパクを良い基質としており、魚類細胞感染時には宿主細胞の脱シアル化が重要であることが明らかとなった。さらに *E. tarda* はマンノースおよび N-アセチルグルコサミンに結合するレクチンを有していることが明らかとなった。以上の結果から、*E. tarda* は N 型糖タンパクを脱シアル化した後露出するマンノースおよび N-アセチルグルコサミンを足場に宿主細胞に接着し、細胞内に感染していることが示唆された。シアリダーゼの阻害剤により *E. tarda* の感染が抑制されたことから、糖鎖を利用した感染予防法の開発が期待される。

糖鎖を利用した *E. tarda* 感染メカニズム



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Shiozaki, K., Harasaki, Y., Fukuda, M., Yoshinaga, A., Ryuzono, S., Chigwechokha, P., Komatsu M., Miyagi, T. Positive regulation of myoblast

differentiation by medaka Neu3b sialidase through ganglioside desialylation. *Biochimie*, 123, 65-72, 2016 (査読有) doi: 10.1016/j.biochi.2016.01.010.

Ryuzono, S., Takase, R., Oishi, K., Ikeda, A., Chigwechokha, P., Funahashi, A., Komatsu, M., Miyagi, T., Shiozaki, K., Lysosomal localization of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) Neu1 sialidase and its highly conserved enzymatic profiles with human. *Gene*, 575, 513-523, 2016 (査読有) doi: 10.1016/j.gene.2015.09.028

Chigwechokha, P., Tabata, M., Shinyoshi, S., Oishi, K., Araki, K., Komatsu, M., Itakura, T., Shiozaki, K., Recombinant sialidase NanA (rNanA) cleaves alpha 2-3-linked sialic acid of host cell surface N-linked glycoprotein to promote *Edwardsiella tarda* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 47, 34-45, 2015 (査読有) doi: 10.1016/j.fsi.2015.08.015

Shiozaki, K., Takahashi, K., Hosono, M., Yamaguchi, K., Hata, K., Shiozaki, M., Bassi, R., Prinetti, A., Sonnino, S., Nitta, K., Miyagi, T., Phosphatidic acid-mediated activation and translocation to the cell surface of sialidase NEU3, promoting signaling for cell migration. *FASEB J.*, 29, 2099-2111, 2015 (査読有) doi: 10.1096/fj.14-262543

Chigwechokha, P., Komatsu, M., Itakura, T., Shiozaki, K., Nile Tilapia Neu3 sialidases: molecular cloning, functional characterization and expression in *Oreochromis niloticus*. *Gene*, 552, 155-64, 2014 (査読有) doi: 10.1016/j.gene.2014.09.029

Shiozaki, K., Ryuzono, S., Matsushita, N., Ikeda, A., Takeshita, K., Chigwechokha, P., Komatsu, M., Miyagi, T., Molecular cloning and biochemical characterization of medaka (*Oryzias latipes*) lysosomal *neu4* sialidase. *Fish Physiol Biochem*, 40, 1461-1472, 2014 (査読有) doi: 10.1007/s10695-014-9940-9

Shiozaki, K., Takeshita, K., Ikeda, M., Ikeda, A., Harasaki, Y., Komatsu, M., Yamada, S., Yamaguchi, K., Miyagi, T.,

Molecular cloning and biochemical characterization of two novel Neu3 sialidases, *neu3a* and *neu3b*, from medaka (*Oryzias latipes*). *Biochimie*, 95, 280-289, 2013 (査読有) doi: 10.1016/j.biochi.2012.09.026

〔学会発表〕(計 14 件)

龍園せな、高瀬 諒、大石一樹、小松正治、塩崎一弘：魚類オートファジーにおける糖タンパク質分解の活性化機構とその重要性。平成 27 年度日本水産学会九州支部会，宮崎大学(宮崎県宮崎市)，2015.11.7

高瀬 諒、龍園せな、若松麗菜、Petros Kingstone Chigwechokha、本田晃伸、荒木亨介、小松正治、塩崎一弘：魚類肝臓におけるシアリダーゼ Neu1 の意義。平成 27 年度日本水産学会九州支部会，宮崎大学(宮崎県宮崎市)，2015.11.7

塩崎一弘、Petros Chigwechokha、新吉沙弥香、大木麗菜、荒木亨介、小松正治：*Edwardsiella tarda* 感染における宿主細胞の N 型糖タンパク糖鎖構造変化の重要性。平成 27 年度日本水産学会秋季大会，東北大学(宮城県仙台市)，2015.9.23

龍園せな、高瀬 諒、大石一樹、池田麻美、舟橋亜希、小松正治、塩崎一弘：魚類リソソームにおける脱シアリル化機構の解明とその意義。平成 27 年度日本水産学会秋季大会，東北大学(宮城県仙台市)，2015.9.23

大石一樹、小松正治、塩崎一弘：魚類ガングリオシドシアリダーゼ Neu3a の形質膜局在機構。平成 27 年度日本水産学会秋季大会，東北大学(宮城県仙台市)，2015.9.23

Petros Chigwechokha、新吉沙弥香、本田晃伸、大木麗菜、荒木亨介、小松正治、宮城妙子、塩崎一弘：*Edwardsiella tarda* 感染による脱シアリル化機構とその意義。第 34 回日本糖質学会年会東京大学(東京都文京区)，2015.7.31

龍園せな、高瀬諒、大石一樹、小松正治、宮城妙子、塩崎一弘：メダカリソソームシアリダーゼの胚発生における意義。第 34 回日本糖質学会年会，東京大学(東京都文京区)，2015.7.31

塩崎一弘、龍園せな、大石一樹、高瀬諒、吉永綾奈、小松正治、宮城妙子：ニホンメダカにおける脱シアリル化機構の解明。第 34 回日本糖質学会年会，東京大

学(東京都文京区)，2015.7.31

Chigwechokha, P., Itakura T., Komatsu, M., Shiozaki, K., Molecular cloning and characterization of gaglioside specific sialidase in tilapia. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会，九州大学(福岡県福岡市)，2014.9.20

原崎裕介、池田麻美、龍園せな、吉川みのり、大石一樹、小松正治、塩崎一弘：筋分化におけるメダカシアリダーゼ Neu3b の機能解析。平成 26 年度日本水産学会秋季大会，九州大学(福岡県福岡市)，2014.9.20

龍園せな、池田麻美、原崎裕介、大石一樹、小松正治、宮城妙子、塩崎一弘：ニホンメダカ *Oryzias latipes* のシアリダーゼ研究におけるモデル動物としての有用性。第 33 回日本糖質学会年会，名古屋大学(愛知県名古屋市)，2014.8.11

塩崎一弘、龍園せな、池田麻美、原崎裕介、福田みどり、小松正治、宮城妙子：メダカシアリダーゼ *neu4* の遺伝子クローニングおよび胚発生における発現解析。第 32 回日本糖質学会年会，大阪交流センター(大阪府大阪市)，2013.8.5

塩崎一弘、竹下一輝、池田麻美、原崎裕介、小松正治、山田章二、宮城妙子：メダカシアリダーゼ *neu3a*, *neu3b* の性状解析とその生理的役割の検討。第 31 回日本糖質学会年会，鹿児島県市民文化会館(鹿児島県鹿児島市)，2012.9.17

竹下一輝、池田麻美、原崎裕介、松下直人、小松正治、山田章二、宮城妙子、塩崎一弘：メダカシアリダーゼ *neu3a*, *neu3b* の神経細胞分化に与える影響。平成 24 年度日本水産学会秋季大会，水産大学校(山口県下関市)，2012.9.15

〔図書〕(計 2 件)

Miyagi, T., Takahashi, K., Shiozaki, K., Yamaguchi, K. Mammalian Sialidase and Tumor Development. (Eds. T, Suzuki., T, Ohtsubo., N, Taniguchi), Sugar Chains, Springer., 2015, pp. 159-176

Miyagi, T., Takahashi, K., Shiozaki, K., Yamaguchi, K. Mammalian Sialidase Assays. (Eds. T, Endo., PH, Seeberger., GW, Hart., CH, wong, N, Taniguchi), Glycoscience: Biology and Medicine, Springer., 2014, pp. 1395-1402

〔その他〕
ホームページ等
<http://kadai-marinebiochem.jimdo.com/>

6．研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし