

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460269

研究課題名(和文)生殖器官形成における糖鎖修飾の意義

研究課題名(英文)Fucosylation regulates reproduction system development.

研究代表者

馬場 敦 (BABA, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70405215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高等生物は管腔様構造の臓器ネットワークを有しており、形成過程での破綻はヒトにおいてもよく見られるが、その原因は遺伝的要因と環境的要因とが交差しており不明な点が多い。申請者は Celsr1欠損マウスが生殖器系管腔様構造の形成不全を呈し、この表現型が糖転移酵素Fringeの欠損マウスの表現型と酷似することを発見した。Celsr1蛋白質は2箇所のEGF-like motifにおいてO-フコシル化かつFringe修飾され、細胞内分布が制御された。以上の結果から「翻訳後の糖鎖修飾がCelsr1蛋白質の局在を制御する」ことが明らかとなり、管腔様構造の形成に特異的な、糖鎖修飾による制御機構が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Developmental defect in the formation of tubular-like structure, is the relatively common disease in human, but its cause remains unknown. Celsr1 inactivation leads to anatomic block of tubular-like structure in reproductive system, and those phenotypes are mimicked in mice with inactivation of Lunatic fringe, which encodes an O-fucose-N-acetylglucosaminyltransferase. Two EGF-like motifs in Celsr1 are O-fucosylated and subject to Fringe modification. Mutation of O-fucosylation sites hampers decreases cell surface expression of the full length protein. Thus, post-transcriptional glycosylation regulates subcellular localization of Celsr1 protein, and participates in the formation of tubular-like structure.

研究分野：発生生物学

キーワード：器官形成 糖鎖修飾 フコシル化 発生・分化 細胞・組織 管腔様構造

1. 研究開始当初の背景

(1) 管腔様構造の形成は、脳、心臓、腎臓、生殖器、肺、腸など重要な臓器を形作る上での基本的なプロセスである。このプロセスの破綻は重篤な障害をひきおこす。例えば神経管閉鎖不全と呼ばれる先天異常は、哺乳類神経系の初期発生過程における神経管の異形成であり、個体での死に至る。また、性決定後のミューラー管やウォルフ管の形成不全は、子宮無形成症や精巣網拡張症を誘発し、生殖細胞には何ら問題がないにもかかわらず不妊に至る。このような異形成は 1000 人あたり数人程度と比較的よく見られる異常であるが、孤発性であることも多く、遺伝的要因と環境要因とが複雑に交差していると考えられる。

(2) 近年、マウスやショウジョウバエ等モデル生物を用いた解析により、平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity; PCP) 関連遺伝子とされる一連の遺伝子群が、これらの異形成の原因となりうるようになってきた。管腔様構造の組織形成過程においては、前後軸が形成されたのちそれぞれ極性を有する細胞が協調しつつ組織を拡張することが必須である。PCP 関連遺伝子産物の多くは特徴的な膜蛋白質をコードし、他の PCP 関連遺伝子産物と複合体を形成しつつ、隣接した細胞と互いに連絡し協調して細胞移動を制御する。このような複雑な制御をおこなうためには、PCP 関連遺伝子産物が翻訳後、細胞接着構造に適切に配置され機能する必要があるが、「いかなる機構により PCP 関連遺伝子産物の細胞内局在が制御されるか」という問題提起はほとんどされていない。

(3) PCP 関連遺伝子のひとつである 7 回膜貫通型カドヘリンは進化的に高度に保存されており、ショウジョウバエには Flamingo、ヒトを含めた哺乳類のゲノムには *Celsr1-Celsr3* (cadherin, EGF-like, EGF-like, LAG-like, and seven-pass receptor) の 3 つの遺伝子が存在する。*Celsr1* は神経管閉鎖と神経細胞移動とを制御し、その不活性化により不妊を呈する。研究代表者は *Celsr1* 蛋白質に O-フコシル化/Fringe 修飾の候補配列が複数存在することを発見し、これら配列の点変異により *Celsr1* 蛋白質の細胞内局在が変化する可能性を見出した。

2. 研究の目的

研究代表者はいくつかの予備的知見により「翻訳後糖鎖修飾が *Celsr1* 蛋白質の細胞膜上への局在を制御し、組織形成に重要な役割を果たす」という仮説を構築するに至った。本研究では、この仮説を検証することで、組織発生における管腔様構造の形成と破綻とを制御する機構の理解をめざした。

3. 研究の方法

(1) 組織化学染色に用いたマウスは 4%PFA で還流固定ののち、スクロースで脱水しクリオスタットで切片を作製、抗体染色をおこなった。

(2) *Celsr1* 欠損マウスより偽妊娠マウスを作製し、卵子を採取したのち *in vitro* での人工授精をおこなった。1 晩培養ののち 1 細胞期の卵と 2 細胞期の卵を係数した。

(3) E13.5 マウスの whole embryo より *Celsr1* の 2 つの EGF motif を含む 256 塩基対の断片を PCR で増幅し、myc およびヒト IgG Fc 領域との融合分泌蛋白質を作製した (EGF1/2-Fc)。発現プラスミドを fringe 欠損あるいは正常 CHO-Lec1 細胞に電気穿孔法により導入し、[6-³H] L-フコースで 48 時間ラベルしたのち、回収した培養上清を Protein A で濃縮し、SDS-PAGE ののちニトロセルロース膜に転写し、オートラジオグラフィーをおこなった。また、AAL を用いたレクチンプロットによりフコースへの糖鎖付加を検出した。

(4) *Celsr1*-EGFP より EGF ドメインを含む断片をサブクローニングしたのち、QuickChange II XL kit を用いて Thr Ala の点変異体を作製、*Celsr1*-EGFP の対応領域と置換することで *Celsr1* 全長蛋白質の点変異体を作製した。HEK293T 細胞にリポフェクションののち、細胞表面の蛋白質をビオチン化により検出した。また、導入した 293T 細胞を 4% PFA で固定し小胞体マーカーである抗 calreticulin 抗体あるいは golgi 体マーカーである GM130 抗体で染色した。

4. 研究成果

(1) *Celsr1* 欠損マウスが生殖器系に代表される管腔様構造の形成不全を呈し、この表現型が糖転移酵素欠損マウスの表現型と酷似することを発見した。このマウスは、雄ではウォルフ管の形成不全による精巣網から精巣上体への精子の移行ブロック、雌では子宮管や卵管の節形成不全により不妊に至ることを見いだした。他の PCP 関連遺伝子産物についても各器官形成期の局在を解析したところ、fzd3、fzd6 は *Celsr1* とともに精巣網および精巣上体接合部に発現しており、*Celsr1* がこれらの遺伝子産物と協調し精巣網形成を制御することが示唆された。

(2) *Celsr1* ホモ欠損マウスより卵を採取し野生型マウスの精子と体外受精後培養したところ、ほぼ全ての受精卵が 2 細胞期に移行できなかった。*Celsr1* 欠損マウス雌でも connexin の局在に影響はなく子宮内の黄体の数に異常がみとめられなかったことから、受精後卵子の成熟不全により不妊にいたることが考えられた。

(3) 電気穿孔法の改良によりこれまで困難であった *Fringe* 欠損株への遺伝子導入に成功した。その結果、EGF1/2-Fc はフコシル化候補配列において、O-フコシル化され *Fringe* 修飾されることが明らかとなった。フコシル化サイトの点変異により、EGF-Fc は分泌されず細胞内に蓄積した。哺乳類に存在する *lunatic-*、*manic-*、*radical-* の 3 種 *Fringe* の全欠損細胞株を用い、EGF-Fc の分泌効率に及ぼす影響を定量的に解析したところ、*Fringe* の全欠損細胞株では EGF1/2-Fc は分泌されず細胞内に蓄積する傾向を示した。これらの結果から、糖転移酵素の修飾により *Celsr1* 蛋白質の局在が制御され、管腔様構造の形成を制御する可能性が示唆された。

lunatic-、*manic-*、*radical-* の各 *Fringe* 欠損マウス、および *Fringe* 全欠損マウスを解析し、*Celsr1* 欠損マウスで見られた神経細胞移動制御や旋毛の形成、神経管形成不全といった表現型について確認したところ、*Fringe* 欠損マウスではこれらの表現型は観察されなかった。*Fringe* 欠損マウスでは *Celsr1* 欠損マウスと同様に生殖器官形成に異常を生じ繁殖が困難であることを考え合わせると、管腔様構造を有する臓器において特異的な制御機構の存在が示唆された。

(4) *Celsr1* 全長蛋白質のフコシル化サイトの点変異により、*Celsr1* 蛋白質の細胞膜表面への移行が阻害された。各種細胞内小器官のマーカー抗体を用いて細胞内分布を解析したところ、EGF-Fc は大部分が小胞体に、一部は golgi 体に蓄積していた。糖鎖修飾カスケードの初期段階における O-フコシル化が蛋白質局在制御において最も重要な働きを示し、続く *Fringe* 修飾はその調節因子として働くことが示唆された。

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 2件)

Yuko Muroyama, Atsushi Baba, Motoo Kitagawa, and Tetsuichiro Saito
Olfactory sensory neurons control dendritic complexity of mitral cells via Notch signaling.
PLoS genetics
査読有り
vol.12(12)
2016
e1006514
10.1371/journal.pgen.1006514

Atsushi Baba and Tetsuichiro Saito
Electroporation of dissociated hippocampal neurons.

Neuromethods

査読無し

vol.102

2015

169-178

10.1007/978-1-4939-2459-2_13

[学会発表](計 3件)

馬場 敦、室山 優子、北川 元生、斎藤 哲一郎

マウスの帰巢行動と嗅球僧帽細胞の樹状突起形態は Notch シグナルで制御される
第 40 回日本神経科学大会

2017 年 7 月 21 日

幕張メッセ(千葉県千葉市)

馬場 敦、室山 優子、斎藤 哲一郎

樹状突起の形態を制御するシグナル解析
第 12 回 Chiba Neuroresearch Meeting

2017 年 1 月 21 日

京葉銀行文化プラザ(千葉県千葉市)

馬場 敦、斎藤 哲一郎

培養神経細胞への電気穿孔法による新規遺伝子導入技術の確立

第 11 回 Chiba Neuroresearch Meeting

2016 年 1 月 9 日

京葉銀行文化プラザ(千葉県千葉市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 敦 (BABA, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70405215

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()