

令和元年5月27日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07015

研究課題名(和文) 脳神経系ムチン型糖鎖修飾に関わるオーファン糖転移酵素の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of orphan glycosyltransferases involved in mucin-type O-glycosylation in the brain

研究代表者

黒坂 光 (KUROSAKA, Akira)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90186536

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)：ムチン型糖鎖の合成は、N-アセチルガラクトサミン転移酵素(以後、GalNAc-T)により開始される。本研究は、脊椎生物以降でのみ発現するが、酵素活性が検出されていない4つのGalNAc-Tアイソザイム、及びシアル酸転移酵素ST3GalIVの神経発生における機能を解析した。まず、GalNAc-T8、-T9、-T17、-T18、ST3GalIV遺伝子をすべて単離し、組織発現を明らかにした。次に、GalNAc-T8、ST3GalIVを除く3つのアイソザイムの欠失変異体を作製した。アイソザイムは互いに機能補完しており、それらの機能解析には多重変異体の作製が必要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はゲノム編集を利用して、ムチン型糖鎖合成に関わる酵素(GalNAc-T)欠失ゼブラフィッシュ変異体を作製し、初期発生におけるムチン型糖鎖の機能を解明しようとするものである。GalNAc-Tは大きな遺伝子ファミリーを形成するが本研究では、*in vitro*の酵素活性が検出されていないオーファンアイソザイムの機能解析を行っている。特にこれらの中のGalNAc-T17は神経細胞に特異的に発現し、知的障害、特徴的な認知特性を特徴とするウィリアムズ症候群に関連する遺伝子として知られている。本研究を通じて、糖転移酵素およびムチン型糖鎖の脳における機能の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：Biosynthesis of mucin-type carbohydrates is initiated and modified by the action of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts), and a sialyltransferase, ST3GalIV. This research investigates functions of four vertebrate-specific GalNAc-T isozymes, *in vitro* activities of which have not been reported so far, and ST3GalIV, during early development of zebrafish. First, all the genes for GalNAc-T8, -T9, -T17, -T18, and ST3GalIV were isolated and they were found to have tissue-specific, although overlapping, expression patterns. Next, mutant zebrafish that lack these genes except GalNAc-T8, ST3GalIV were established, and phenotypes of early embryos were analyzed. We found that the genes have overlapping functions, and compensate the activity of a deleted isozyme in zebrafish. Thus, deletions of more than one isozyme would be necessary to observe phenotypic alterations.

研究分野：生化学，糖鎖生物学

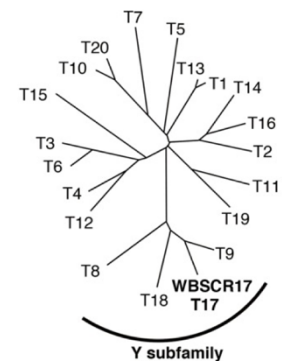
キーワード：ムチン型糖鎖 糖転移酵素 ゲノム編集 ゼブラフィッシュ 初期発生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質に付加する主要な糖鎖として Ser/Thr 残基に N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が結合するムチン型糖鎖 (GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr) がある。ムチン型糖鎖の合成は N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GalNAc-T) により開始される。この酵素はヒトでは 20 種類のアイソザイムからなる大きな遺伝子ファミリーを形成しているが、*in vitro* の酵素活性が未だ検出されず、基質が未同定の 4 種類のオーファンアイソザイムがある (右図)。これらは互いに相同性を有し、脊椎生物にのみ保存されるアイソザイムである。研究代表者らはその中の 2 つのアイソザイム (GalNAc-T9, -T17) を単離し、それらが脳特異的に発現していること、これら 4 つのオーファン酵素がゼブラフィッシュでも発現しており、GalNAc-T9, -T17 が神経特異的であること、GalNAc-T8, -T18 も脳において高発現していることを見いだした。

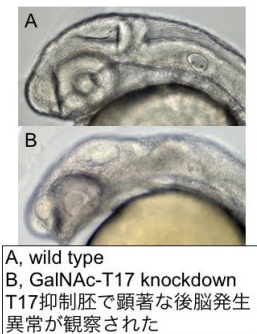
我々は GalNAc-T17 については、成体脳の海馬や視床、小脳の神経細胞に特異的に発現し、培養細胞において膜輸送の調節を介してマクロピノサイトーシス経路を負に制御することなどを明らかにし、GalNAc-T17 が脳神経系において機能的な分子であることを示してきた。また、GalNAc-T17 遺伝子座では、精神遅滞、極度の社交性を特徴とする Williams-Beuren 症候群の原因候補遺伝子の 1 つであると見なされており、Wbscr17 (Williams-Beuren syndrome critical region 17) とも呼ばれている。またある種のアルツハイマー病、およびオオカミ/イエヌ間で GalNAc-T17 の一塩基多型が認められる。これらの情報より、神経系に発現するオーファンアイソザイムの解析を通じて、これまで全く情報のない脳神経系におけるムチン型糖鎖の生理機能を解明することが可能と考えられる。



2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質の主要な翻訳後修飾反応の一つであるムチン型糖鎖修飾が神経機能に及ぼす影響を解明することである。本研究では機能未知サブファミリーの GalNAc-T8, -T9, -T17, -T18, さらにムチン型糖鎖のシアル酸修飾に関わる ST3GalIV などの糖転移酵素の機能の解明を通じてムチン型糖鎖の脳、特に神経発生における機能を見いだすことである。

研究代表者らはこれまでゼブラフィッシュを用いてモルホリノオリゴによる GalNAc-T17 発現抑制実験を行い、後脳領域の形態異常が認められた (右図) が、この知見を遺伝子欠失個体の作製を通じて確認する。さらにその他のアイソザイムについても、同様に遺伝子欠失個体を作製することで機能を評価する。本研究では急速に広まりつつある CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術をゼブラフィッシュ、培養細胞に応用して、機能未知 GalNAc-T サブファミリー、および ST3GalIV の高次機能の解析を行い、従来の生化学的解析では入手困難な情報を得る。さらに、高次機能の解析をプロテオーム解析、糖鎖プロファイル解析に結びつけて、アイソザイムの分子レベルの機能情報も得る。脊椎生物にのみ保存されるサブファミリーに関するこれらの研究を通じて、高等生物におけるムチン型糖鎖の機能的な重要性を解明する。



A, wild type
B, GalNAc-T17 knockdown
T17抑制胚で顕著な後脳発生異常が観察された

3. 研究の方法

実験系にはゼブラフィッシュと胚性癌細胞 P19 細胞を用いる。いずれも変異体の作製を通じて、生化学的な情報のない GalNAc-T サブファミリー、および ST3GalIV の機能を解析する。ゼブラフィッシュでは、変異体の初期発生におけるそれぞれの酵素の役割を解明する。P19 細胞はレチノイン酸存在下で培養することで神経分化を誘導できるため、神経分化における酵素の機能を観察する。

変異体の作製には、CRISPR法を用いたゲノム編集を行う。標的とする GalNAc-T アイソザイム、および ST3GalIV はいずれも脳で発現しているため、おもに胚発生における脳神経系への影響を指標として各酵素の機能を評価する。表現型に変化が見られない場合には、アイソザイム間の機能補完を考慮して二重/三重変異体も作製する。P19 細胞では、神経分化に対する形態的な影響、さらに神経分化に関わるマーカー分子の発現への影響を調べる。また、変異の特異性は標的分子 mRNA を導入して機能回復を見て確認する。ゼブラフィッシュ、培養細胞で得られた情報に基づいて、主に変異体/遺伝子導入個体あるいは細胞を用いて、LC-MS などによるタンパク質発現の変動の解析、糖鎖構造の解析、基質の同定などの実験を行い、アイソザイムの役割、および機能的糖鎖を同定する。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ *galnt* ファミリーの発現解析

標的 GalNAc-T 欠失変異体作製に先立ち、ファミリーをコードする遺伝子 *galnt* のゼブラフィッシュアイソザイムの初期胚における発現解析を行った。ゲノム DNA 塩基配列をデータベース検索により、ゼブラフィッシュは *galnt15*, *19* を除く 18 種類のアイソザイムを持つことが明らか

かとなった。我々はこれらすべてのゼブラフィッシュ *galnt* 遺伝子をクローニングして、正確な塩基配列を決定した。その情報に基づいて作製したプローブを用いて、whole mount *in situ* hybridization を行い、全アイソザイムの初期胚における発現パターンを決定した。その結果、それぞれのアイソザイムは互いに重複するものの、特異的な発現パターンを示すことを明らかにした。また、哺乳類において脳特異的に発現するアイソザイム (*galnt9*, *galnt13*, *galnt17*, *galnt20*) は、ゼブラフィッシュにおいても脳に強く発現していた (右図)。これらの機能欠失体の解析を通して、脳におけるアイソザイムの機能解明が期待できる。



galnt9, *13*, *17*, *29* 遺伝子の WISH による発現解析
いずれの遺伝子も脳で強く発現している。

(2) *galnt9*, *17* 遺伝子変異体ゼブラフィッシュの作製

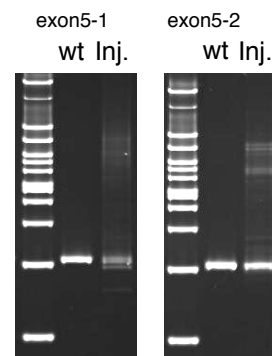
これまでに我々は、*galnt17* の発現をモルホリノアンチセンスオリゴを用いて抑制すると、発生において脳、特に後脳形態に異常が生じることを報告した。この異常が変態においても観察できるかどうかを確認するために、ゲノム編集技術である CRISPR システムを用いて、まず *galnt17* の触媒領域を標的として CRISPR single guide RNA (sgRNA), Cas9 mRNA (あるいは Cas9 タンパク質) をゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションした。変異の導入は、インジェクション胚から調製したゲノム DNA を HMA (heteroduplex mobility assay) により解析した (右図)。インジェクション胚においては高分子領域にスミアなバンドが認められたことから、効率的なゲノム編集が起こったことが確認できた。

ゲノム編集の効率を上げるために、CRISPR single guide RNA (sgRNA) と核移行シグナルを付加し、コドンゼブラフィッシュに最適化した Cas9 mRNA をゼブラフィッシュ初期胚にマイクロインジェクションした。この方法では高い効率でゲノム編集が起こり、F0 世代で遺伝子欠失体と同様の表現系の変化が得られるとの報告がある。その結果、F0 で *galnt17* 遺伝子の標的部位において 80% 以上の効率でゲノム編集されることを見出した。この F0 モザイク胚の表現型を観察したところ、後脳領域の形態異常が見られた (右図)。この表現型異常はモルホリノオリゴで発現抑制と類似した形態異常であることから、*galnt17* は後脳の正常な発生に重要な役割を果たしていることが考えられた。

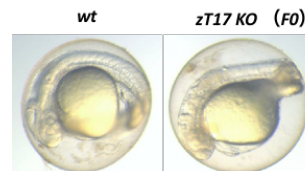
つぎに、この F0 個体から *galnt17* 変異をヘテロで持つ F1 個体を確立し、F1 個体同士を掛け合わせて *galnt17* ホモ変異体 (F2 個体) の解析を行った。予想に反して、*galnt17* ホモ変異体では、モルホリノアンチセンスオリゴによる機能阻害や、前述の F0 個体にて見られた後脳形態異常が観察されなかった。

galnt9 についても、同様の方法により *galnt9* のホモ変異体を作製することにも成功した。*galnt9* 変異体も正常に発生し、異常は観察されなかった。*galnt9* と *galnt17* は互いに相同性が高く、どちらも脳に特異的なアイソザイムであるために、互いに機能補完している可能性が考えられた。

最近、ゼブラフィッシュにおいて、モルホリノアンチセンスオリゴを用いた遺伝子発現阻害により生じる表現型異常が、同一遺伝子の変異体では、類似機能を持つ他の遺伝子の発現亢進により回避されることが報告された。我々の結果においても、*galnt9* および *galnt17* ホモ変異体で類似の機能を有するタンパク質の発現が上昇していることが考えられる。そこで、*galnt17* ホモ変異体において他の *galnt* 遺伝子の発現を定量解析したところ、*galnt9* 等の同じサブファミリーに属する遺伝子の発現亢進が認められた。現在は、*galnt17* ホモ変異体にさらに *galnt9*, *galnt18* の変異を導入する実験を行っている。さらに、変異体で特異的に発現上昇する分子の同定、さらには表現型異常を回避する機構を明らかにしムチン型糖鎖の脳内での働きを解明する。



ゼブラフィッシュ genome DNA の HMA 解析 いずれの標的配列も効率よく編集が起こっている。



(3) *galnt18* 欠失ゼブラフィッシュ変異体の作製

ゼブラフィッシュゲノムには *galnt18a*, *galnt18b* の 2 種類のパラログが存在する。パラログ間で高度に保存されている 5' 側 (N 末端側) の塩基配列を標的として sgRNA を作製し、2 つのパラログを同時にゲノム編集できるようにした。初期胚に sgRNA と cas9 mRNA を導入し、さらにゲノム編集された個体同士を掛け合わせることで、*galnt18a* 欠失体、*galnt18b* 欠失体、*galnt18a/b* の二重欠失体を得た。*galnt18a^{-/-}:18b^{-/-}* の二重ヘテロ変異体同士を掛け合わせたところ、*galnt18a^{-/-}*, *galnt18b^{-/-}* 単独の変異体が正常に発生したのに対し、二重変異体

*galnt18a^{-/-}:18b^{-/-}*では、初期胚は正常に生まれ稚魚まで生育するが、成魚まで育つものはほとんど観察できなかった。そこで、二重変異体がどの段階まで生存するか調べる目的で、*galnt18a^{-/-}:galnt18b^{-/-}*変異体同士を掛け合わせて生存率を調べたところ、*galnt18a^{-/-}:galnt18b^{-/-}*二重ヘテロ変異体同士の掛け合わせの時とは異なり、*galnt18a^{-/-}:galnt18b^{-/-}*二重ホモ変異体は成魚まで問題なく成長することがわかった。このことは、*galnt18b^{-/-}*ホモ変異体から生まれた魚は、何らかの機構により、*galnt18a^{-/-}:galnt18b^{-/-}*二重ホモ変異体の生存率の低下を回避することを示唆する。(2)の結果とも合わせて、ホモ変異体では欠失タンパク質の機能を補完する機能が働くことが示唆された。

(4) その他の変異体の作製

galnt8 遺伝子については、ゼブラフィッシュを用いて変異体の作製を試みた。*galnt8* 遺伝子には4つのパラログ遺伝子が存在するため、変異体の作製は非常に困難である。本実験では、4つの遺伝子を含む比較的大きな領域を欠失させることで*galnt8* 遺伝子の欠失変異体を作製する方法を採用した。ゲノム編集を効率よく導入することに成功し、F0 個体を得ている。現在はF1 個体のスクリーニングを行い、目的の変異が導入されたかどうかを確認している。

ST3GalIV については、RNAi を用いた予備的な実験でST3GalIV がP19 細胞の神経分化誘導に関わるとの知見を得ているので、P19 細胞を用いて変異体を作製することとした。P19 細胞については、他のGalNAc-T アイソザイムについても変異体作製実験を試みたが、CRISPR/Cas9 の細胞への導入効率が悪く、変異体を作製するには至らなかった。本実験については、トランスフェクションの方法の検討を重ね、さらに変異体作製の実験を継続して行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Nakamura, N., and Kurosaka, A. (2019). Mucin-type glycosylation as a regulatory factor of amyloid precursor protein processing. *Journal of Biochemistry*, **43**(3), 269-208. DOI: 10.1093/jb/mvy121 (査読有り)

[学会発表] (計 14 件)

- ① Nakamura, N., Tsujimoto, Y., Nakayama, Y., Konishi, M., Kurosaka, A., Phenotypic analysis of double mutants that lack vertebrate-specific polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase genes, 第41回日本分子生物学会年会, 2018
- ② 中村 直介, 辻本 優季, 高橋 由衣, 川合 多美子, 中山 喜明, 小西 守周, 黒坂 光, 脳特異的ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素を欠失したゼブラフィッシュ変異体の作製, 生命科学系学会合同年次大会, 2017
- ③ 中村 直介, 塚田 かすみ, 辻本 優季, 中山 喜明, 小西 守周, 黒坂 光, ゲノム編集技術を用いたムチン型糖鎖合成酵素をコードするパラログ遺伝子の二重変異体作製, 生命科学系学会合同年次大会 2017
- ④ Kurosaka, A. Developmental roles of polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferases in model organisms, International symposium for the 4th industrial revolution in animal and animal resource industries, 2017
- ⑤ Nakamura, N., Tsukada, K., Tsujimoto, Y., Nakayama, Y., Konishi, M., and Kurosaka, A., Production of double mutants that lack paralogue enzyme genes for mucin-type glycan biosynthesis, 2017 Society for Glycobiology Meeting, 2017
- ⑥ 中村 直介, 中山喜明, 黒坂 光, 脊椎動物特異な GalNAc-T サブファミリーの機能欠失体作製, 新学術「神経糖鎖生物学」, 2017
- ⑦ Kurosaka, A., Nakamura, N., Tsujimoto, Y., Takahashi, Y., Nakayama, Y., Konishi, M., Identification and expression analysis of zebrafish polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase genes during embryonic development, 2016 Society for Glycobiology Meeting, 2016
- ⑧ Nakamura, N., Tsujimoto, Y., Takahashi, Y., Nakayama, Y., Konishi, M., Kurosaka A., Generation of mutant zebrafish that lack multiple vertebrate-specific polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases, 2016 Society for Glycobiology Meeting, 2016
- ⑨ Kurosaka, A., Developmental roles of polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferases, Texas A&M University, Dep. Biochem. Biophys. Special Seminar Series, 2016
- ⑩ 中村 直介, 辻本 優季, 高橋 由衣, 川合 多美子, 中山 喜明, 小西 守周, 黒坂 光, 脊椎動物特異的なポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素を欠失したゼブラフィッシュ変異体の作製, 第35回日本糖質学会年会, 2016
- ⑪ 中村 直介, 辻本 優季, 高橋 由衣, 川合 多美子, 中山 喜明, 小西 守周, 黒坂 光, ゼブラフィッシュを用いた脊椎動物特異的ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素の機能解析, 第89回日本生化学会大会, 2016

- ⑫ 中村 直介, 中山 喜明, 高橋 由衣, 川合 多美子, 辻本 優季, 黒坂 光, ゼブラフィッシュにおけるムチン型糖鎖生成開始酵素ファミリーの発現解析, 第38回日本分子生物学会/第88回日本生化学会合同大会, 2015
- ⑬ Nakayama, Y., Kato, K., Nakamura, N., Konishi, M., Kurosaka, A., GALNT17/Wbscr17 knockout mice show decreased growth and hyperproliferation, 23rd International Symposium on Glycoconjugates, 2015
- ⑭ Nakayama, Y., Nakamura, N., Kurosaka, A., Analysis of zebrafish polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase genes during embryonic development, 23rd International Symposium on Glycoconjugates, 2015

[その他]

ホームページ等 <http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~kurosaka/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：加藤 啓子
ローマ字氏名：KATO Keiko
所属研究機関名：京都産業大学
部局名：総合生命科学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：90252685

研究分担者氏名：中山 喜明
ローマ字氏名：NAKAYAMA Yoshiaki
所属研究機関名：神戸薬科大学
部局名：薬学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：40512455

研究分担者氏名：中村 直介
ローマ字氏名：NAKAMURA Naosuke
所属研究機関名：京都産業大学
部局名：総合生命科学部
職名：研究助教
研究者番号（8桁）：90252685

※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。