

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770159

研究課題名（和文）網膜発生に関わるムチン型糖鎖の機能解明に向けた ppGalNAcT の解析

研究課題名（英文）Studying on ppGalNAcT with focus on the roles of mucin-type carbohydrates in the retinal development.

研究代表者

中山 喜明（NAKAYAMA YOSHIAKI）

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：40512455

研究成果の概要（和文）：

ゼブラフィッシュのゲノム上には、ヒトで20種類存在する ppGalNAcT のうち18種類のアイソザイムが存在することを見出した。これら全てのゼブラフィッシュ ppGalNAcT のクローニングを行い、初期発生期における mRNA の発現を検出したところ、それぞれのアイソザイムは特徴的な組織発現パターンを有しており、その多くが網膜や脳・筋肉に発現することを明らかにした。アンチセンス法を用いて T17 や T18 の機能阻害を行ったところ、それぞれ脳神経系や尾の形成に異常が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We cloned and identified 18 genes encoding ppGalNAcT from zebrafish cDNA library, corresponding to 20 isozymes in human genome. Then, we detected their mRNAs in the embryos during early developmental stages, and found that each of members has characteristic expression patterns mainly in eye, brain and skeletal muscle. Suppression of ppGalNAcT17 and T18 using antisense RNA led to developmental defects in the central nervous system and tail, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物学

キーワード：糖鎖、神経発生、ゼブラフィッシュ、ムチン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質に付加した糖鎖は、タンパク質の立体構造を安定化するだけでなく、分子間あるいは細胞間の認識などに直接関与し、様々な生物現象において重要な機能を担っている。代表的な糖鎖として、タンパク質中のセリンもしくはトレオニン残基にN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）が結合するムチン型糖鎖が知られている。ムチン型糖鎖は、上皮細胞を覆う粘液タンパク質に多く含まれ、細胞の保護や潤滑物質として機能する。また、ムチン型糖鎖は細胞膜タンパク質あるいは分泌タンパク質にも存在するが、その糖

鎖の機能については未だ十分理解されていない。

ショウジョウバエを用いた研究からムチン型糖鎖が初期神経発生に必須の役割を果たしていることが示されており、また、古くから網膜の組織染色にムチン型糖鎖を認識する PNA 等のレクチンが用いられる等、ムチン型糖鎖が眼や神経系の発生あるいは維持に関与する事が示唆される。しかしながら、現在までに作製されたムチン型糖鎖合成開始酵素をコードする ppGalNAcT 遺伝子の欠損マウスでは、発生に顕著な異常は確認されていない (Tabak (2010) Semin. Cell Dev. Bio.

21, 616) ことから、脊椎動物の初期発生におけるムチン型糖鎖の機能については殆ど何の情報も得られていない。

2. 研究の目的

上記の様な背景を踏まえて、脊椎動物の発生過程におけるムチン型糖鎖の機能の解明を目的とする。特に、眼や神経系の発生に焦点をあて、ヒトで 20 種類以上からなる大きな遺伝子ファミリーを形成する ppGalNAcT 遺伝子(Fig.1)の網羅的な機能解明を目的とする。

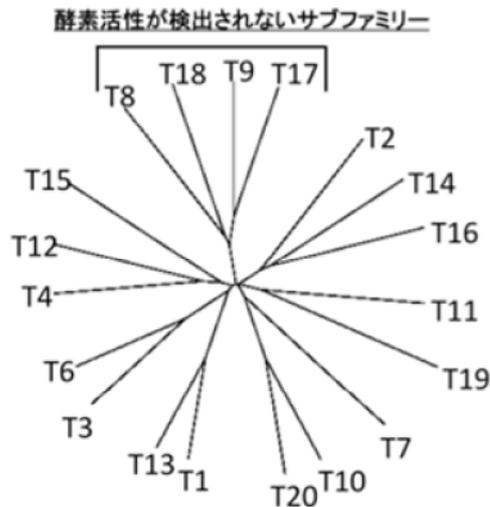


Fig.1 A phylogenetic tree of human ppGalNAcTs

3. 研究の方法

モデル実験動物にゼブラフィッシュを用いて、ppGalNAcT 遺伝子の初期発生段階における網羅的な発現解析を行い、網膜神経発生に関与する候補遺伝子の探索を行う。候補遺伝子に対する合成アンチセンス RNA を用いて ppGalNAcT 遺伝子を阻害してやり、初期発生過程に与える影響を解析する。特に複数のパラログ間において重複して網膜領域に発現する因子については、同時阻害実験を行い、その影響を観察する。

4. 研究成果

ゲノムプロジェクトにより解読されたゼブラフィッシュゲノムデータベースに対し、ヒト ppGalNAcT アミノ酸配列を元に、相同性検索を行い、ppGalNAcT がコードされていると予測される 23 領域を見出した。このうち 4 領域は、機能を持たない偽遺伝子であると考えられた。残りの 19 領域に対して特異的な DNA プライマーを作製し、ゼブラフィッシュ cDNA ライブラリーから、全 19 種類の ppGalNAcT をクローニングした。ヒト ppGalNAcT5、T15、T19 に対するゼブラフィッシュ相同遺伝子は存在せず、

ppGalNAcT8 と T18 がそれぞれ 2 種類のパラログ遺伝子を有することを見いだした。次に、決定した塩基配列をもとに、ゼブラフィッシュの初期発生段階(主に 24 時間胚)における発現を whole mount in situ hybridization (WISH) 法により解析した。その結果、それぞれのアイソザイムは特徴的な発現パターンを有するものの、その多くは脳、および尾の筋肉に発現する事が明らかとなった(Fig. 2)。このうち、過去にヒトやマウスにおいて、脳・神経系に発現することが報告されている 8 種類のメンバーは、ゼブラフィッシュの神経初期発生時においても発現が確認されたことから、脊椎動物において神経系におけるムチン型糖鎖の機能が保存されていることが示唆された。一方で、網膜では ppGalNAc-T1, -T2, -T7, -T9, -T13, -T17, -T18 の発現を確認した。特に ppGalNAc-T2, -T13 は網膜 背側領域で強い発現を確認した。さらに、ppGalNAc T18 については発現抑制実験を行い、機能阻害胚において尾部に囊胞が生じる等の表現型の変化を観察した。尾部凍結切片を解析したところ、細胞接着に関わるカドヘリンやインテグリンの局在性に変化があることを見いだした。

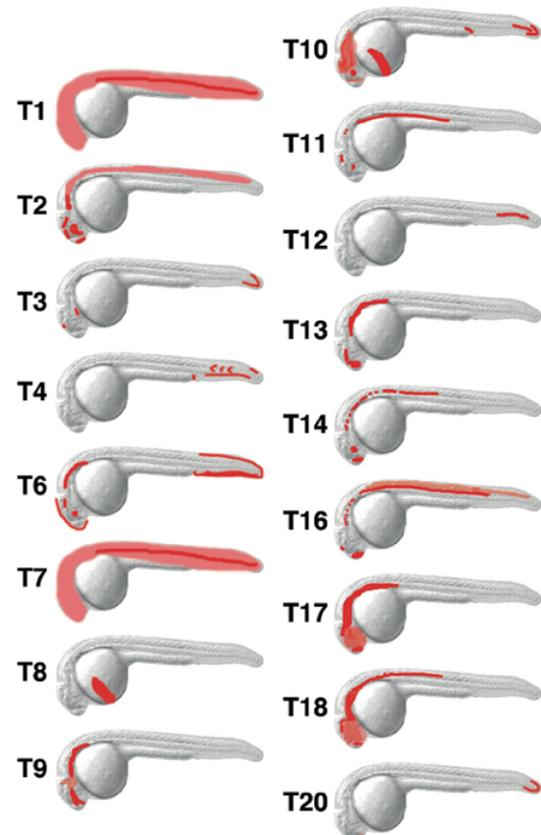


Fig. 2 Expression of GalNAc-Ts in zebrafish embryos

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 3 件)

(1) I. Kimura, Y. Nakayama, M. Konishi, K. Terasawa, M. Ohta, N. Itoh, and M. Fujimoto; Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family members as heme/steroid-binding proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* (査読有) 13, 687-696 (2012), DOI: 10.2174/1389203711209070687

(2) Y. Nakayama, N. Nakamura, S. Oki, M. Wakabayashi, Y. Ishihama, A. Miyake, N. Itoh, and A. Kurosaka; A putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase/Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 (WBSR17) regulates lamellipodium formation and macropinocytosis. *J. Biol. Chem.* (査読有) 287, 32222-32235 (2012), DOI: 10.1074/jbc.M112.370932

(3) A. Miyake, S. Nihno, Y. Murakoshi, A. Satsuka, Y. Nakayama, and N. Itoh; Neucrin, a novel secreted antagonist of canonical Wnt signaling, plays roles in developing neural tissues in zebrafish. *Mech. Dev.* (査読有) 128, 577-590 (2012), DOI: 10.1016/j.mod.2012.01.001

〔学会発表〕 (計 6 件)

(1) T. Kawai; ゼブラフィッシュ初期発生におけるポリペプチド-N アセチルガラクトサミン転移酵素の機能解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012.12.13, 福岡市

(2) A. Kurosaka; Biological roles of a brain-specific polypeptide GalNAc-transferase in zebrafish. The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Congress, 2012.10.11, Bangkok (Thailand)

(3) Y. Nakayama; Roles of mucin-type carbohydrates in endocytosis. 2012 Joint Seminar in Science and Technology, 2012.3.15, Bangkok (Thailand)

(4) Y. Nakayama; A putative polypeptide GalNAc transferase, WBSR17, regulates endocytosis in HEK293T cells. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.14, 横浜市

(5) N. Nakamura; Developmental roles of putative polypeptide GalNAc-transferases in zebrafish. 2011 Annual Conference of

the Society for Glycobiology, 2011.11.11, Seattle (USA)

(6) Y. Nakayama; The biological roles of a putative polypeptide GalNAc-transferase /WBSR17. Glyco21, 2011.8.22, Vienne (Austria)

〔図書〕 (計 2 件)

(1) Y. Nakayama, N. Nakamura, D. Tsuji, K. Itoh, and A. Kurosaka; Genetic diseases associated with glycosylation disorders in mammalian glycoproteins. *Genetic Disorders* (査読有) 243-269 (2013) DOI: 10.5772/54097. URL: <http://www.intechopen.com/books/genetic-disorders/genetic-diseases-associated-with-protein-glycosylation-disorders-in-mammals>

(2) S. Sasaki, H. Ohta, Y. Nakayama, M. Konishi, A. Miyake, and N. Itoh; The FGF Family in Humans, Mice, and Zebrafish: Development, Physiology, and Pathophysiology. Intech, Human Genetic Diseases, (2011) 21 頁, DOI: 10.5772/22859. URL: <http://www.intechopen.com/books/human-genetic-diseases/the-fgf-family-in-humans-mice-and-zebrafish-development-physiology-and-pathophysiology>

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~kurosaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 喜明 (NAKAYAMA YOSHIKI)
京都産業大学・総合生命科学部・助教
研究者番号: 40512455

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

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

中村 直介 (NAKAMURA NAOSUKE)
京都産業大学・総合生命科学部・講師
研究者番号: 30424964

伊藤 信行 (ITOH NOBUYUKI)

京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号：10110610

三宅 歩 (MIYAKE AYUMI)
京都大学・薬学研究科・講師
研究者番号：40346044