

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28日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770267

研究課題名（和文） 脊椎動物の臓器形成におけるグライコーム解析

研究課題名（英文） Glycome analysis in Vertebrate Embryogenesis

研究代表者

小沼 泰子（ONUMA YASUKO）

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員

研究者番号：90431824

研究成果の概要（和文）：レクチンマイクロアレイを用いて、アフリカツメガエルの胚発生における糖鎖プロファイルの解析を行った。結果のクラスター解析によって、糖鎖プロファイルが発生の進行に伴って経時的に変化することがわかった。発生前期と後期で比較すると、96レクチンプローブのうち、4プローブは前期で高く、5プローブは後期で高いシグナルを示した。関連する糖転移酵素の遺伝子発現プロファイルは、レクチンマイクロアレイの結果を支持するものであった。

研究成果の概要（英文）：To investigate stage-specific glycomes in *Xenopus laevis* embryos, a lectin microarray system was used. Unsupervised cluster analysis of lectin microarray data indicated that glycan profiles changed sequentially during development. Nine lectin probes showed significantly different signals between early and the late-stage embryos: 4 showed higher signals in the early stages, and 5 exhibited higher signals in the late stages. The gene expression profiles of relevant glycosyltransferase genes support the lectin microarray data.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、発生生物学

キーワード：器官形成

1. 研究開始当初の背景

発生学は、胚観察から始まり実験発生学を通じて、現在では個々の胚細胞の分化過程の遺伝子発現制御とその過程の細胞シグナルを明らかにすることが中心となっており、網羅的な遺伝子やタンパク質発現の解析の手法は広く導入されている。

一方で、糖鎖は近年改めてその重要性が認識されている。細胞表面の糖鎖の種類を調べることでその細胞の状態を知るマーカーとして利用できるため、腫瘍細胞やiPS細胞等幹細胞の特異的糖鎖の探索から得られた、有用ながんマーカーや未分化マーカーが利用

されている。また、マーカーとしてだけでなく、タンパク質の翻訳後修飾の実体として安定性や作用領域を決めたり、細胞表面でタンパク質が働く場として作用を調節したりする機能についての認識も深まっており、TGF-betaやFGF、Wnt、Notch等、発生学においても重要な細胞シグナル伝達機構での果たす役割について、様々な成果が報告されている。

しかし、直線的な核酸やタンパク質と比較して、枝分かれ構造を持つ糖鎖は複雑であり、その解析の難しさと煩雑さから、発生学分野においては網羅的な糖鎖の解析は十分と

はいえない。

2. 研究の目的

研究の目的は、ヒトを含む脊椎動物の臓器形成過程での細胞表面糖鎖のダイナミックな変化を網羅的に解明することとした。糖鎖はタンパク質に機能を付加したり、細胞表面でタンパク質が働く場や条件を規定し、臓器形成過程でも様々な誘導現象に必須であることは知られているが、これまで臓器形成過程での網羅的な解析は十分には行われてこなかった。本研究では、特定の糖鎖構造に特異的に結合するレクチンをプローブとして用いたマイクロアレイによって、発生過程の個々の時期や臓器で特有な糖鎖プロファイルを取得し、臓器形成過程で明らかになっていない糖鎖機能を解明するための基礎情報を整備することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 脊椎動物の発生モデル系として、卵生であり臓器形成の経時観察が可能で、胚操作技術と人工的な臓器誘導方法が確立している利点を活かして、アフリカツメガエル胚を用いた。

(2) 発生時期をおった全胚細胞表面糖鎖プロファイルの作成、発生期の臓器領域ごとの細胞表面糖鎖プロファイルの作成のための網羅的な糖鎖解析には、がん細胞や幹細胞等の研究で実績のあるレクチンマイクロアレイを用いた。

(3) 作成されたプロファイルを相互に比較し、臓器形成時期・領域特異的な細胞表面糖鎖マーカーを同定し、その結果を糖鎖合成系データベースと照らし合わせることで、各糖鎖の合成経路と合成酵素を同定し、実際の胚での臓器形成過程において確認・解析を行った。

4. 研究成果

脊椎動物の発生過程における糖鎖プロファイルの全体像の把握のために、レクチンマイクロアレイを用いて、どのような糖鎖が発現しているかについての糖鎖解析を行った。これまでの研究から、1-10万個程度の哺乳類細胞から膜画分の糖鎖を結合したタンパク質を抽出して解析するプロトコルの確立ができていたが、この通常のプロトコルを用いてアフリカツメガエルの初期胚における膜画分の調整を行ったところ、抽出されたタンパク質量が非常に少なかったため、膜画分を含む全タンパク質を抽出する方法に変更し検討を行った。その結果、レクチンマイクロアレイで十分なシグナル値が得られたため、この方法で実験を進めた。この方法は、従来のプロトコルと比較して、膜画分の糖鎖だけでなく、分泌性のタンパク

質の糖鎖も含むことが予想されるため、糖鎖プロファイルの全体像の把握という本研究の目的により適合するものである。

この方法を用いて、はじめに発生時期をおった全胚の糖鎖プロファイルの作成に着手した。未受精卵および、二細胞期、八細胞期から幼生期胚までのツメガエル胚を12の発生段階に分けて、胚全体をサンプルとして取得し、前述の膜画分を含む全タンパク質を抽出する方法で調整した。その後、サンプルを従来の方法を用いて蛍光ラベル化し、レクチンアレイを用いてサンプル中の糖鎖の種類を解析した。その結果、糖鎖プロファイルが発生の進行に伴って経時的に変化することが明らかになった(図1)。

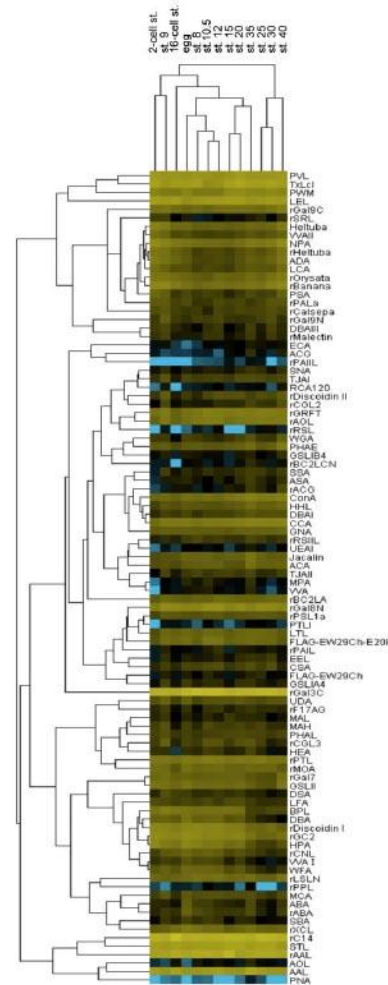


図1 Unsupervised hierarchical cluster (教師なし階層的クラスター解析の結果)

同時に、関連する糖転移酵素の遺伝子発現の動態を解析するため、既知の human glycome library (<http://riodb.ibase.aist.go.jp/rcmg/ggdb/>) 等を元に 'Xenopus

glycogenes' のリストを作成した。

DNA マイクロアレイ (G2519F, Agilent Microarray Design ID 015066) を用いて、レクチンアレイで解析したのと同様の各発生段階における遺伝子発現を解析し、その相関係数を計算した (図2)。

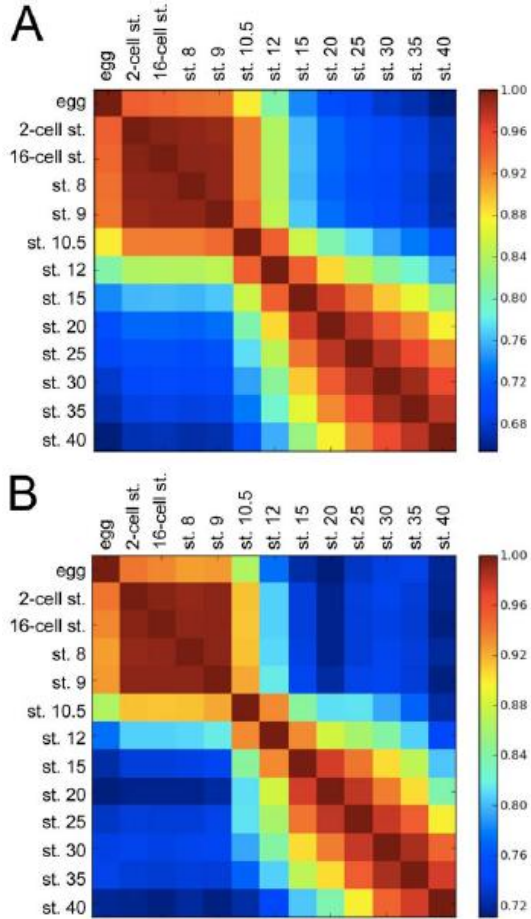


図2 遺伝子発現プロファイルの相関係数のヒートマップ。(A) DNA マイクロアレイのすべてのスポット (B) “Xenopus glycogene “のみの相関係数。各カラーチャートの右側の数値は、相関係数を示す。DNA マイクロアレイのすべてのデータは、GEO データベースに登録した (GSE40620)。egg; 未受精卵, st.; ステージ

その結果、全遺伝子の変化と同様に、“Xenopus glycogene “の遺伝子は大きく分けて、発生前期(二細胞期からステージ 9)、原腸陥入期 (ステージ 10.5、12)、発生後期 (ステージ 15 から 40) の3つのクラスターに分けられることがわかった。Student' s t-test ($p < 0.01$) を用いて、発生前期と後期で差があるレクチンプローブを抽出したところ、96レクチンプローブのうち、4プローブは前期で高く、5プローブは後期で高いシ

グナルを示した (図3A)。

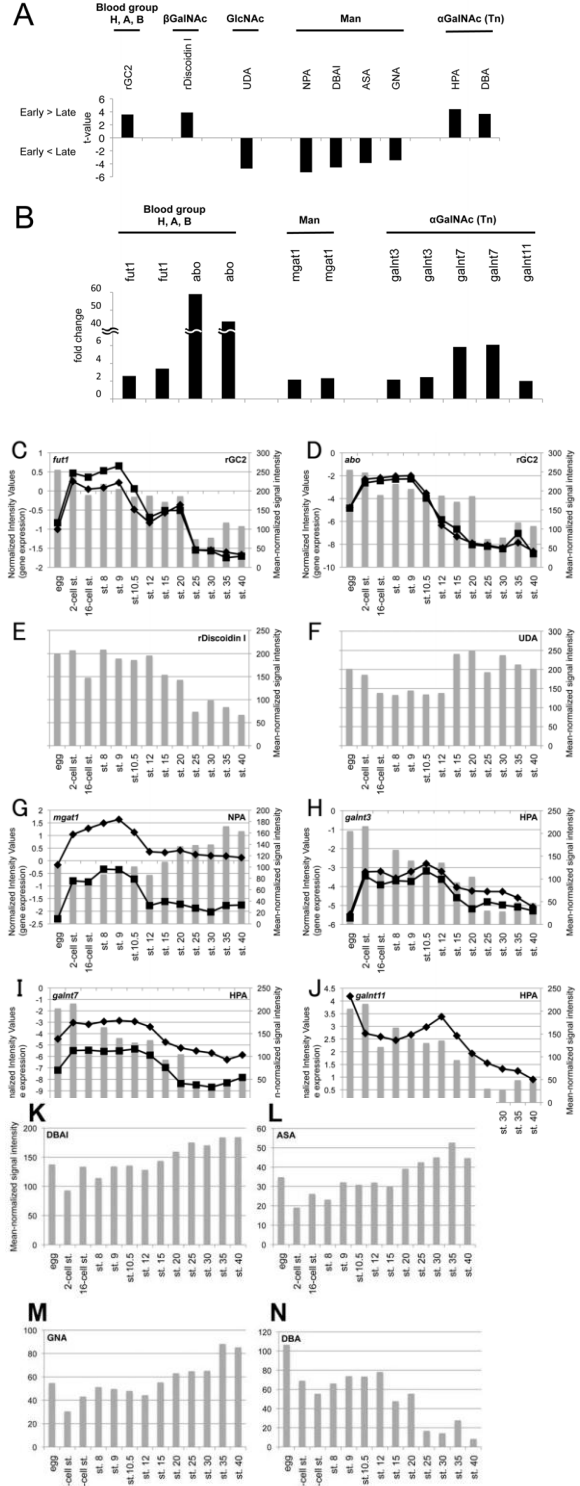


図3 発生前期と後期で差があるレクチンプローブ (A) と関連する糖転移酵素の遺伝子発現 (B)。(C-J) 各レクチンプローブのシグナル (棒グラフ; 右軸) と関連する遺伝子発現 (折れ線グラフ; 左軸) の発生における経時的な変化。

これらのレクチンプローブの時系列的な変化を表したグラフが、図3C-Nである。これらのレクチンの糖鎖結合能の特異性から、ツメガエル胚発生期における糖鎖プロファイルの変化について、以下の5つのことが明らかになった。

- (1) rGC2 が結合する blood A および B の糖鎖構造は、発生後期よりも前期で高い (図3C-D)。
- (2) rDiscoidin I が結合する β GalNAc は発生後期よりも前期で高い (図3E)。
- (3) GlcNAc に結合する UDA のシグナルは、発生後期に増加する (図3F)。
- (4) mannose に結合するレクチン (NPA, DBAI, ASA, GNA) のシグナルは、発生後期に増加する (図3G, K-M)。
- (5) α GalNAc (Tn-antigen) に結合する HPA と DBA のシグナルは、発生後期よりも前期で高い (図3H-J, N)。

これらのレクチンプローブが結合する糖鎖構造に関連する糖転移酵素の遺伝子発現の変化を経時的に解析した (図3B、図4)。

fut1 と *abo* の発現は、発生後期よりも前期で高く、*rGC2* の示すパターンと一致していた (図3C-D)。

コンプレックス型およびハイブリッド型のN型糖鎖の合成に必須である *mgat1* の発現は発生前期で高く、ステージ 10.5 から減少し、ステージ12以降では低かった (図3G)。この結果は、ハイマンノース型のN型糖鎖に結合するレクチン (NPA, DBAI, ASA, GNA) のシグナルがステージ 15 から増加する結果と関連する (図3G)。

UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 遺伝子のグループに属する *galnt3*, *galnt7*, *galnt11* は発生前期で高く、緩やかに減少した (図3H-J)。この結果は、 α GalNAc (Tn-antigen) に結合する HPA と DBA のシグナルが、発生後期よりも前期で高いことと一致する (図3H-J, N)。

発生の進行に伴い、組織や臓器が形成される過程で部域化が起こるため、今回得られた胚全体の糖鎖プロファイルの解析は、各部位における差を平均化した結果である。しかしながら、本研究により、糖鎖プロファイルが発生の進行に伴って経時的に変化することが明らかになり、発生前期と後期で比較すると、96レクチンプローブのうち、4プローブは前期で高く、5プローブは後期で高いシグナルを示すことが明らかになった。また、これらに関連する糖転移酵素の遺伝子発現プロファイルは、レクチンマイクロアレイの結果を支持するものであった。このことは、レクチンマイクロアレイのシステムが、ツメガエル胚の糖鎖解析に適用可能であることを

はじめて示したものである。

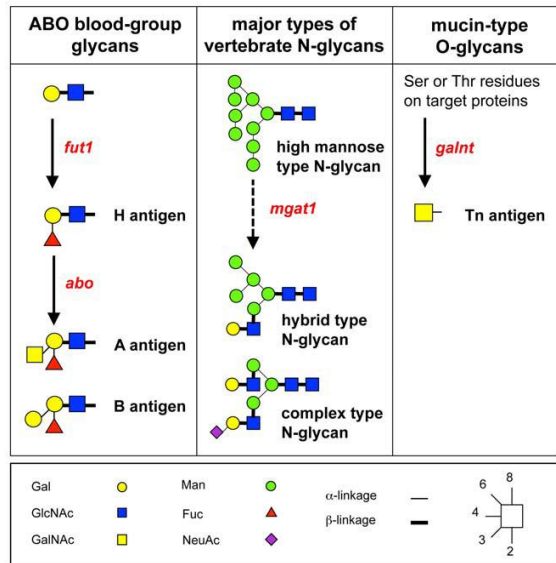


図4 前期と後期で異なる糖鎖プロファイルに関連する合成経路

さらに発生領域ごとの糖鎖プロファイルの作成のために、頭部および尾部と、形成初期の腸の原器となる内胚葉をマニピュレーションにより切り分けて、それぞれの領域から抽出したサンプルをレクチンマイクロアレイにより解析した。その結果、それぞれの領域特異的な糖鎖プロファイルを取得することができた。

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1件)

① Yasuko Onuma, Hiroaki Tateno, Shingo Tsuji, Jun Hirabayashi, Yuzuru Ito, Makoto Asashima, A lectin-based glycomic approach to identify characteristic features of *Xenopus* embryogenesis, PLoS One 誌、査読有、8(2)、2013、e56581

DOI:10.1371/journal.pone.0056581

[学会発表] (計2件)

① 小沼泰子, *Xenopus* 胚のグライコーム解析へのレクチンの利用、第12回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会、2013年2月5日、独立行政法人産業技術総合研究所 (茨城県)

② 小沼泰子, A lectin-based glycomic approach to *Xenopus* embryogenesis, 14th International *Xenopus* Conference, 2012年9月11日、the Belambra Club (Giens, France)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小沼 泰子 (ONUMA YASUKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・

幹細胞工学研究センター・主任研究員

研究者番号：90431824