

ティラピアにおける

脱シアリル化機構の意義とその生理機能

(Significance and physiological function of desialylation in Nile tilapia)

本田 晃伸

2021

Abstract

Sialidase is a glycohydrolytic enzyme that cleaves sialic acid residues from the non-reducing end of glycoproteins and glycolipids. In addition, desialylation by sialidases regulates cell survival, cell–cell communication, and pathogenesis of infectious diseases. While mammalian sialidase has been well studied, the physiological function of fish sialidase is not well understood. In this study, we focused on Nile tilapia, a member of the cichlid family with diverse morphology and ecology.

Among tilapia sialidase genes, two unidentified *neuls* (*neu1a* and *neu1b*) and one *neu4* were cloned and analyzed for enzymatic properties. The results showed that tilapia Neu1a and Neu1b were localized to lysosomes similar to mammalian and medaka Neu1. Tilapia Neu1a showed the maximum activity against sialo-oligosaccharide, whereas Neu1b exhibited the activity only against the artificial substrate MU-Neu5Ac.

In contrast, tilapia Neu4 was active at acidic to neutral pH and used gangliosides and sialo-oligosaccharides as substrates. Tilapia Neu4 was localized at nucleus, which was very different from medaka (lysosome) and zebrafish Neu4 (ER).

As nuclear localized sialidase has not been reported to date, we examined the distribution of nuclear sialidase in fish. *In silico* analysis predicted a nuclear localization signal (NLS) in *Acanthopterygii* Neu4, but their actual localizations were mostly different from nuclear localization. Hence, we analyzed predicted 3D structure of tilapia Neu4. As the result, tilapia

Neu4 was found to possess low complexity (LC) region surrounding its NLS. The Neu4 mutant was generated and analyzed by fluorescence immunostaining and immunoprecipitation, which revealed that its LC region interacted importin, resulting in the nuclear localization. Only Perciformes Neu4 possesses NLS and LC region. Actually, amberjack Neu4 was confirmed to be localized at nucleus.

To investigate the physiological functions of tilapia sialidases during embryogenesis, the gene expression of each sialidase was analyzed by real-time PCR. As the results, each gene showed different expression pattern, suggesting that each sialidase has a different function during embryogenesis, and that tilapia Neu4 plays an important role in neurogenesis. Hence, the tilapia reared under aphotic condition, which exhibited the delay of retina development, showed the reduction of sialidase activity under neutral pH accompanied by the decrease of *neu4* gene expression. Furthermore, tilapia Neu4 accelerated neurite formation in neural cell lines, indicating that tilapia Neu4 is involved in neurogenesis during embryogenesis.

要旨

シアリダーゼは糖タンパク質や糖脂質の非還元末端よりシアル酸を遊離させる糖鎖分解酵素である。シアリダーゼによるシアル酸の遊離（脱シアリル化）は糖鎖分解を促進するだけでなく、糖鎖分子のコンホメーションやレセプターによる認識機構、細胞接着や免疫機構などに影響を与えることから、哺乳類において様々な生理機能を持つことが知られている。一方、魚類におけるシアリダーゼの生理機能についてはよくわかっていない。そこで、本研究では、その形態や生態が多様なシクリッド科のナイルティラピアに着目し、魚類シアリダーゼの性状解析およびその生理機能を明らかにすることを目的とした。

ティラピアシアリダーゼ遺伝子群のうち、未同定の2つの *neu1* (*neu1a* および *neu1b*) および 1 つの *neu4* のクローニングを行い、酵素学的性状を解析した。その結果、ティラピア *Neu1a* および *Neu1b* は、哺乳類 *Neu1* やメダカ *Neu1* と同様にリソソームに局在し、酸性 pH で最大活性を示した。また、ティラピア *Neu1a* はシアロオリゴ糖を良い基質としたが、*Neu1b* は人工基質 MU-*Neu5Ac* のみに活性を示した。一方、ティラピア *Neu4* は酸性 pH から中性 pH まで活性を示し、ガングリオシドやシアロオリゴ糖を基質とした。ティラピア *Neu4* は細胞内局在を核に示し、これはリソソーム局在のメダカ *Neu4*、小胞体局在のゼブラフィッシュ *Neu4* とは大きく異なっていた。

これまで核に局在を示すシアリダーゼは報告されておらず、魚類における核シアリダーゼの分布を検討した。*in silico* 解析により、棘鱗上目の魚類 *Neu4* に核移行シグナル (NLS) が

予想されるものの、実際の局在はこれと異なっていた。そこで、ティラピア Neu4 の立体構造予測解析を行ったところ、ティラピア Neu4 には限られた種類のアミノ酸が連続する低複雑領域 (LC) が存在し、NLS の近傍に位置することが明らかとなった。Neu4 変異体を作成し、蛍光免疫染色法や免疫沈降法で解析したところ、LC が核輸送タンパク質と相互作用することにより、Neu4 は核に局在することが示唆された。NLS と LC 領域をともに有する魚類はスズキ類のみであり、実際に同じスズキ類のカンパチ Neu4 も核局在を示した。

次に、ティラピアシアリダーゼの胚発生における機能を明らかにするために、各シアリダーゼの発生段階における遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した。その結果、*neu1a* および *neu1b* は胚発生の初期、*neu3a* は後期、*neu4* は孵化直前に高い発現を示した。このことから、各ティラピアシアリダーゼは発生段階において異なる機能を持つことが示唆され、特に Neu4 は神経新生における働きが予想された。そこで暗闇でティラピア仔魚を飼育し、視神経の発達を遅延させたところ、*neu4* 遺伝子の発現低下に伴う中性シアリダーゼ活性の減少が認められた。さらに、ティラピア *neu4* を導入した神経細胞株では、神経突起の形成が有意に促進された。このことから、ティラピア Neu4 は網膜の神経新生に関与していることが推察された。

目次

緒言.....	1
第1章 ティラピア Neu1a および Neu1b の遺伝子クローニング、酵素学的性状および細胞内局在の解明.....	7
背景および目的.....	8
実験方法.....	10
実験結果.....	17
考察.....	25
第2章 ティラピア Neu4 の遺伝子クローニング、酵素学的性状および細胞内局在.....	47
背景および目的.....	48
実験方法.....	51
実験結果.....	56
考察.....	62
第3章 ティラピア胚発生 of 神経新生におけるティラピアシアリダーゼの生理機能.....	77
背景および目的.....	78
実験方法.....	82
実験結果.....	86
考察.....	91
第4章 ティラピア Neu4 の核局在メカニズム.....	103
背景および目的.....	104
実験方法.....	106
実験結果.....	110
考察.....	114
総合考察.....	126
謝辞.....	132
参考文献.....	133

緒言

糖鎖は全ての生物において、細胞膜や細胞壁といった最外層を構築する共通の生体成分として存在する。真核生物においては、細胞膜上の膜タンパク質の外表面や、細胞外マトリックスおよび体液中のタンパク質が糖鎖修飾されており、さらに、細胞内のサイトゾル、核といった細胞内小器官に存在するタンパク質や脂質の中にも糖鎖修飾を受けている分子が存在する¹。また、真核生物間においても、動物と植物、脊椎動物と無脊椎動物といった間では糖鎖を構成する単糖の種類や分岐パターンが異なっている²。

糖鎖が結合した脂質やタンパク質を複合糖質と呼び、糖鎖の付与により様々な生理機能を持つことが知られている。例えば、特定の糖鎖構造が目的の臓器や細胞小器官への輸送の目印となることや、糖鎖によりコアタンパク質がマスクされることでプロテアーゼによる分解を逃れ、安定性を高めることなどが挙げられる³。特に、これら複合糖質の糖鎖末端に存在するシアル酸は、生体内で最も重要な分子の1種である。ヒトでは *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) が主要なシアル酸として知られているが、他の脊椎動物では *N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) やデアミノノイラミン酸 (KDN) といったシアル酸種も存在する⁴。シアル酸は相対的に強い電氣的負荷や親水性を持ち、イオンや薬剤への結合および輸送、酵素を含むタンパク質の構造の安定化、そしてムチンの粘性の亢進などを付与する⁵。さらに、シアル酸は糖鎖の末端部分に位置することから、他のタンパク質や細菌、ウイルスの認識部位を遮蔽する働きを持つ。多くの場合、抗原タンパク質や受容体を持つ糖鎖のガラク

トースにシアル酸が結合することで、抗原部位やレセプターをマスクし、ガラクトース残基を覆っている。このような糖タンパク質の多くは、シアル酸が遊離しガラクトースが露出することにより、マクロファージや肝細胞によって、Gal 認識レセプターを介して認識され、取り込まれて分解される⁶。また、シアル酸は糖鎖末端において自ら認識部位としても機能する。例えば、微生物や内在性レクチンのリガンドとして作用し、微生物の感染の足場や細胞間コミュニケーションのレセプターとしても機能する⁷。したがって、このシアル酸の遊離（脱シアリル化）は単なる糖鎖分解の初発反応だけではなく、糖鎖分子のコンホメーションやレセプターによる認識機構、細胞接着や免疫機構など様々な生理現象に影響を与える⁸。

シアリダーゼは、糖鎖よりシアル酸を遊離させる糖鎖分解酵素である。ヒトのシアリダーゼに関しては4種類のシアリダーゼ遺伝子 *NEU1*、*NEU2*、*NEU3* および *NEU4* がクローニングされ、性状解析が行われている⁸。*NEU1* は至適 pH4.6 でオリゴ糖や糖ペプチドを良い基質とし、リソソームに局在を示す。*NEU1* はリソソームにおける複合糖質の異化分解、免疫反応のシグナリングや細胞表面へのエラスチン繊維の集合等に関与している。

NEU2 は至適 pH6.0 でオリゴ糖、糖タンパク質やガングリオシドを良い基質とし、細胞質に局在を示す。*NEU2* は筋肉や神経細胞の分化に関わっていると考えられている。*NEU3* は至適 pH を 4.6 および 6.0 にもち、ガングリオシドを良い基質とし、細胞膜に局在を示す。*NEU3* はアポトーシスの抑制や神経細胞の分化促進、細胞の運動能上昇および癌の悪性度上昇に関与している。*NEU4* は至適 pH4.6 でオリゴ糖、糖タンパク質やガングリオシ

ドを良い基質とし、リソソーム、ミトコンドリアや細胞内膜に局在を示す。NEU4 はアポトーシスの促進や神経細胞の分化抑制に関与していると考えられている。このように哺乳類シアリダーゼの様々な生理機能が明らかになる一方で、これまでに哺乳類以外の脊椎動物でシアリダーゼの遺伝子クローニングが行われているのは、鳥類と魚類の一部のみである。

魚類は脊椎動物の種の半数以上を占めており、生態的および形態的な多様性を示している。この魚類の多様性には複合糖質の関与が予想されている。例えば、魚種ごとに卵膜の糖鎖構造が異なっていることや⁹、生態的地位や餌の趣向性の違いにより脳に含まれるポリシアル酸の量が異なることが知られている¹⁰。一方、シアロ複合糖質の制御因子であるシアリダーゼの生理機能についての報告は少ない。また、魚類では Neu5Gc や KDN を糖鎖修飾に用いることが知られており、魚類シアリダーゼがヒトとは異なる酵素学的性状を持ち、魚類特異的な生理機能を持つことが予想されるがその知見は限られている¹¹。これまでに、全てのシアリダーゼが明らかにされている魚類は、ダツ目のメダカとコイ目のゼブラフィッシュのみである。魚類には Neu2 を除く、Neu1、Neu3 および Neu4 が存在する¹²。ゼブラフィッシュでは *neu1*、*neu3.1*、*neu3.2*、*neu3.3*、*neu3.4*、*neu3.5* および *neu4* の 7 種類がクローニングされ、その性状が報告されている。ゼブラフィッシュ Neu1 は至適 pH を 4.5 に持ち、リソソームに局在し、シアロオリゴ糖を良い基質とする¹³。また、Neu3.1 は至適 pH を 4.0 に示し、細胞内局在は細胞膜であり¹⁴、Neu3.2 は至適 pH を 5.6 に示し、

細胞内局在は細胞質であり、Neu3.3 は至適 pH を 2.8 に示し、細胞内局在は細胞膜である。Neu4 は至適 pH を 2.6 に示し、細胞内局在は小胞体に示した¹⁵。一方、メダカでは *neu1*、*neu3a*、*neu3b* および *neu4* の 4 種類がクローニングされ、その性状が報告されている。メダカ Neu1 は至適 pH を 4.0 に示し、シアロオリゴ糖を良い基質とし、リソソームに局在を示す¹⁶。Neu3a は至適 pH を 4.2 にとし、糖脂質を良い基質とする、細胞膜シアリダーゼであるのに対して、Neu3b は至適 pH を 4.0 とし、糖脂質を良い基質とする、細胞質シアリダーゼである¹⁷。Neu4 は至適 pH を 4.6 に示し、シアロオリゴ糖を良い基質とし、リソソームに局在を示す¹⁸。このように、魚種間で遺伝子の重複によるパラログの数が異なっていることや、一部のシアリダーゼでは異なる酵素学的性状や細胞内局在を示すことが分かっている。シアル酸を制御するシアリダーゼが魚種間で異なる性状を示していることから、魚種ごとに特異的な生理機能をシアリダーゼが持つことが予想される。例えば、胚発生において、ゼブラフィッシュは受精後 3 日で孵化するのに対し¹⁹、メダカは受精後 9 日程度で孵化するが²⁰、それに伴い、胚発生におけるシアリダーゼの遺伝子発現もゼブラフィッシュとメダカ間で異なっている。さらに、モルフォリノオリゴによるメダカ Neu1 のノックダウンでは、卵黄吸収の遅延や孵化率の低下などの表現型が認められるが²¹、ゼブラフィッシュ Neu1 をノックアウトした際には、卵黄吸収の遅延は確認されていない¹³。このことから、魚種ごとのシアリダーゼの違いは魚種ごとの特異的な生理現象と密接に関連していることが予想される。しかし、どのようにしてシアリダーゼが魚種ごとに

異なる細胞内局在を獲得したのか、また、その生理機能の差異についてはほとんど分かっていない。

したがって、魚類シアリダーゼの生理機能を明らかにするためには、さらなる魚種におけるシアリダーゼの知見を深め、魚種間で保存された機能と魚種ごとの特異的な機能を明らかにすることが必要である。そこで、本研究ではスズキ類のナイルティラピアに着目した。スズキ類は魚類で最も多くの種を含むことから、魚類シアリダーゼを理解する上で重要な種である。また、ティラピアは世界的に養殖されている魚種であり、生態的および栄養学的研究は盛んに行われているが、分子生物学的解析の例は少なく、糖鎖生物学的な研究はほとんど行われていない。しかし、シアロ複合糖質は胚発生といった生物学的プロセスに関与していることから、ティラピアのシアリダーゼがどのような機能を持つのか明らかにすることで、産業的な観点からも重要な知見を得ることが出来ると思われる。

これまでの研究により、ティラピアのシアリダーゼは Neu3 のみがクローニングと性状解析が行われている²²。5つの Neu3 シアリダーゼ (*neu3a*、*neu3b*、*neu3c*、*neu3d* および *neu3e*) が、ゲノム上に存在しており、そのうち、3つの遺伝子 *neu3a*、*neu3d* および *neu3e* の発現が認められる。さらに、このうち有意なシアリダーゼ活性が認められるのは Neu3a のみであり、至適 pH を 4.6 に示し、糖脂質を良い基質とし、細胞膜に局在を示す。一方、ティラピアシアリダーゼについては、Neu3 以外にも 2つの *neu1* (*neu1a* および *neu1b*) と 1つの *neu4* 遺伝子の存在がゲノム解析により予想されているが、その酵素学的性状等につい

て不明である。

そこで、本研究ではティラピアシアリダーゼの生理機能を解明し、それを他の魚種と比較することで、魚類における脱シアリル化の意義を明らかにすることを目的とした。この目的に必要なティラピアの脱シアリル化機構をすべて明らかにするため、第1章では *neu1*、第2章では *neu4* の遺伝子クローニングを行い、さらにその酵素学的性状および細胞内局在について検討した。第1章および第2章で明らかにされたティラピアにおける脱シアリル化機構の知見をもとに、第3章ではティラピア胚発生における各シアリダーゼの発現解析、およびティラピア仔魚を用いてシアリダーゼの発生における生理機能を明らかにした。さらに第4章では魚種間で異なる細胞内局在がどのようなメカニズムにより制御されているのかについて解析した。

第1章 ティラピア Neu1a および Neu1b の
遺伝子クローニング、酵素学的性状および
細胞内局在の解明

背景および目的

哺乳類の Neu1 シアリダーゼはリソソームに局在し、シアロ複合糖質の異化分解に関与していることが知られている。Neu1 は保護タンパク質であるカテプシン A と複合体形成することにより、安定化および活性化する²³。また、カテプシン A は Neu1 をリソソームに輸送し、Neu1 のオリゴマー化を防いでいる。Neu1 の一部は細胞膜に局在し、Toll 様受容体、インスリン受容体および CD44 などのシグナル伝達経路、およびエラスチンの集合を制御している²⁴。Neu1 の機能不全はシアロ糖タンパク質由来のシアロオリゴ糖の蓄積や、過剰なエキソサイトーシスによるリソソーム内容物の過剰放出を引き起こす。ヒト NEU1 の遺伝子疾患であるシアリドーシスは、腹部膨満、骨格異常、弱視、心不全、筋萎縮および筋痙攣といった重篤な症状を示す²⁵。

このように哺乳類における脱シアリル化を含むリソソームの異化分解の重要性が示されている一方で、魚類におけるリソソームの脱シアリル化の意義については良くわかっていない。これまで、ゼブラフィッシュおよびメダカの *neu1* がクローニングされ、酵素学的性状や細胞内局在について解析が行われている。ゼブラフィッシュ Neu1 は至適 pH を 4.5 に示し、 α 2-3 結合のシアロオリゴ糖を良い基質とする。また、Neu1 を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトしたゼブラフィッシュでは、筋萎縮や脊椎の湾曲といったシアリドーシスと似た症状が確認される¹³。メダカ Neu1 は pH 4.0 で最も高い活性を示し、 α 2-3 結合のシアロオリゴ糖を良い基質とする¹⁶。モルフォリノオリゴによるメダカ Neu1 のノック

ダウンでは、卵黄吸収の遅延や孵化率の低下などの表現型が認められる²¹。このように魚類 Neu1 の酵素学的性状は哺乳類と保存されており、特に胚発生に重要であることが明らかとなっている。一方、魚類の胚発生では孵化までの期間や卵黄のサイズが異なることから、Neu1 が、脊椎動物間で保存された機能だけでなく、魚種ごとに異なる機能をもつことが予想される。実際、メダカ Neu1 のノックダウンでは卵黄吸収の遅延が観察されたが²¹、Neu1 ノックアウトゼブラフィッシュではこのような表現型は見られていない¹³。さらに、一部の魚類では遺伝子重複により生じた2種類の Neu1 を持つことが示唆されており、新機能分化や潜在的機能分化を獲得している可能性が高い²⁶。したがって、魚類 Neu1 の生理的意義を理解するためには、様々な魚種での Neu1 研究が必要である。

そこで、本章では2種類の *neu1* (*neu1a* および *neu1b*)を持つことが予想されているが²²、未だ遺伝子クローニングが行われていないナイルティラピアの *neu1a*、*neu1b* および *ctsa* の遺伝子クローニングを行い、酵素学的性状および細胞内局在を明らかにすることを目的とした。

実験方法

1-1 シクリッド科の魚類における 2 つの *neu1* 遺伝子の同定

Ensembl Genome Browser (<https://asia.ensembl.org/index.html>)を用いて、魚類における *neu1* 遺伝子の予想を行った。Ensembl Genome Browser で利用可能な魚類のゲノム(ガー目: 1 種、アロワナ目: 2 種、コイ目: 1 種、カラシン目: 2 種、ナマズ目: 1 種、デンキウナギ目: 1 種、サケ目: 1 種、カワカマス目: 1 種、タラ目: 1 種、カダヤシ目: 10 種、ダツ目: 2 種、トゲウオ目: 2 種、タウナギ目: 2 種、スズキ目: 17 種、カレイ目: 2 種、フグ目: 3 種)について解析した。また、このうち、ゼブラフィッシュ、メダカ、ナイルティラピア、Makobe island cichlid (*Pundamilia nyererei*)、Zebra mbuna (*Maylandia zebra*)、Lyretail cichlid (*Neolamprologus brichardi*) について *neu1* 遺伝子のシクエンス解析を行った。

1-2 ティラピア *neu1a*、*neu1b* および *ctsa* の遺伝子クローニング

NCBI データベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)より、ティラピア *neu1a*(以下 *onneu1a*)、ティラピア *neu1b*(以下 *onneu1b*)およびティラピア *ctsa*(以下 *onctsa*)の予想遺伝子配列を調べ、これを元にクローニング用のプライマーを設計した。*onneu1a* のクローニングには(5'-GTAAGCTTCCACCATGGCAGCAGGAA-3')および (5'-GTGAATTCTTAACGACCACCATA-CAGGTGG-3')、*onneu1b* のクローニングに (5'-GTGAATTCCACCATGGCAGCATGGCG-GCT-3')および (5'-GTGAATTCTTAATGGCCACTATACAGGTGG-3')、*onctsa* のクローニン

グに (5'-GTGAATTCCACCATGCAGCTGCTGCTGTTG3')および (5'-GTGAATTCTCAGT-AGGGCAGCTTCTTGATG-3')の各プライマーを用いた。

指宿で捕獲したティラピアの脳、眼、心臓、脾臓、肝臓および筋肉より、Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque)を用いて、Total RNA を抽出し、続いて ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover (TOYOBO)で cDNA を合成した。 *onneula*、 *onneulb* および *onctsa* 遺伝子の増幅には、KOD-Plus-Neo system (TOYOBO)を用いた PCR を行った。PCR 条件は、94 °C 2分加熱後、98 °C 10秒 68 °C 2分40秒 サイクルとした。得られた PCR 産物をそれぞれ適切な制限酵素で処理し、その後、pBluescript vector (Agilent Technology)にサブクローニングした。サブクローニングされたサンプルは ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いてシーケンス解析した。

シーケンシングで得られた *onneula*、 *onneulb* および *onctsa* の DNA 配列およびアミノ酸配列のデータをもとに、バイオインフォマティクス解析を行った。解析には NetNGlyc (*N*型糖鎖予想、 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)、 NetOGlyc (*O*型糖鎖予想、 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)、 Signal P (切断部位予想、 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) の各プログラムを用いた。アミノ酸配列のアライメント作成は GENETYX ver15 (GENETYX)を用いて作成した。各 *neul* ゲノムの exon/intron のエクソン開始位置や構成されるアミノ酸数の比較は NCBI データベースのティラピアゲノム配列を参考に行った。

1-3 細胞培養およびトランスフェクション

HEK293T 細胞 (ヒト胎児腎細胞)および Hepa-T1 細胞 (ウナギ肝細胞)は RIKEN CELL BANK より入手した。HEK293T 細胞は 10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's 培地を使い、5% CO₂、37 °C のインキュベーターで培養した。Hepa-T1 細胞は 10%ウシ胎児血清を含む E-RDF (enhanced RDF、RPMI:DMEM:F12 = 2:1:1)で CO₂ 非存在下、28 °C のインキュベーターで培養した。遺伝子導入実験には、*onneu1a*、*onneu1b* および *onctsa* の cDNA を発現用ベクターである pcDNA3.1 (Invitrogen)にサブクローニングして用いた。HEK293T 細胞のトランスフェクションにはポリエチレンイミン法で行い、HepaT-1 細胞には X-tream Gene HP DNA (Roche)を用いた。

1-4 ウェスタンブロッティング

onneu1a および *onneu1b* には C 末端に HA タグ配列、*onctsa* は C 末端に FLAG 配列をコードする塩基配列を含むようにプライマーを設計し、インバース PCR を行った。*onneu1a*-HA のクローニングには(5'-TCCAGATTACGCTTAAGAATTCCTGCAGCC-3')および (5'-AC-ATCGTATGGGTAACGACCACCATACAGG-3')、*onneu1b*-HA のクローニングには (5'-TCCA-GATTACGCTTAAGAATTCCTGCAGCC-3')および (5'-ACATCGTATGGGTAATGGCCACTAT-ACAGG-3')、*onctsa*-FLAG のクローニングには (5'-ATGACGACAAGTGAGAATTCGATATC-AAGC-3')および (5'-CGTCTTTGTAGTCGTAGGGCAGCTTCTTGA-3')の各プライマーを用

いた。PCR 条件は 94 °C 2 分加熱後、98 °C 10 秒 68 °C 2 分 30 サイクルで行った。シーケンス解析後、1-3 同様に発現用ベクターにサブクローニングした。

プロテアーゼインヒビター(1 mM EDTA、0.2 mM PMSF および 10 µg/mL ロイペプチン)を含む PBS を細胞ペレットの 9 倍量になるように加え、細胞を懸濁した。その後、超音波ホモジナイザーで粉碎し、4 °C、600 g、10 分間の遠心分離を行い、得られた上清をホモジネートとした。ホモジネートに含まれる糖タンパク質の N 型糖鎖の除去は、PNGase F (New England Biolabs) 処理により行った。熱変性を行ったホモジネートは 10% SDS-PAGE に供し、その後、PVDF 膜へ転写した。1% BSA/PBST でブロッキングをし、1 次抗体 anti-HA (clone 3F10、Roche)、または anti-FLAG (clone FLA-1、MBL) と 37 °C、1 時間反応させた。洗浄後、2 次抗体 HRP-anti-Rat IgG または HRP-anti-Mouse IgG を加え、室温で 45 分間反応させた。メンブレンを洗浄後、発光試薬 EzWestLumi Plus (ATTO) を用いて化学発光をさせ、そのシグナルを ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad) を用いて検出した。

1-5 シアリダーゼおよび Cathepsin A の活性測定

ティラピア *neula* または *neulb* を過剰発現させた細胞より調製したホモジネートを用いて、至適 pH および基質特異性について検討した。至適 pH の検討には、2 mM 4MU-NANA 10 µL を基質とし 37°C で 1 時間反応させた。0.5 M バッファーはそれぞれ 0.5 M 酢酸バッファー (pH 3.5、3.7、4.0、4.2、4.5、4.7 および 5.0)、0.5 M リン酸バッファー (pH 5.0、5.5、

6.0、6.5、7.0) および 0.5 M HEPES バッファー (pH 7.0、7.5、8.0、8.5) を用いた。基質特異性の検討には基質として、2 mM 4MU-NANA 10 μ L、10 mg/mL ガングリオシド混合物、10 mM 3-シアリルラクトース、10 mM 6-シアリルラクトース、45.9 mg/mL フェツイン、30.7 mg/mL ムチンおよび 10 mM コロミン酸を各 2.5 μ L ずつ用いた。

酵素反応液 (50 μ L) は、ホモジネート 10 μ L に各基質、2 % Triton X-100 2.5 μ L、0.5 M バッファー 5 μ L および滅菌水で 50 μ L にメスアップして調製した。37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、反応液に滅菌水 50 μ L と 0.2 M メタ過ヨウ酸ナトリウム 50 μ L を加え、さらに 0.6% 2-チオバルビツール酸 (TBA) 1.5 mL を加え沸騰水中で 15 分加熱し、シアル酸誘導体化を行った。反応後は試験管を水で冷却し、シクロヘキサノン を 1.5 mL 加え 1,450 g 10 分で遠心分離を行い、上層を回収した。分光光度計を用いて 549 nm (補正 532 nm) の波長にて吸光度を測定した。遊離シアル酸は次の式により求めた。

$$\text{遊離シアル酸 (nmol)} = (0.084 \times \text{OD}_{549} - 0.031 \times \text{OD}_{532}) \times 1.5 \times 0.25 \times 1000$$

また、各試料のタンパク質濃度測定はプロテインアッセイ CBB 溶液を用いて行った。

カテプシン A 活性の測定にはカルボキシペプチダーゼ測定キット (Kikkoman) を用いた。

1 unit を基質 Cbz-Tyr-Ala から 1 分間にアラニン 1 μ mol を遊離させたものと定義した。

1-6 細胞内局在

Neu1a、Neu1b および Cathepsin A の細胞内局在を調べるために、Hepa-T1 細胞をコラーゲ

ンコートしたカバーガラスの上に播種し、*neula*-HA、*neulb*-HA および *ctsa*-FLAG を発現するプラスミドをトランスフェクションした。4% PFA/PBS で細胞を 15 分間固定した後、0.2% Triton X-100 を用いて透過処理し、1% BSA/PBS でブロッキングした。Anti-HA および Anti-FLAG 抗体とインキュベートした後、Alexa488 および Alexa555 で標識された 2 次抗体と反応させた。カバーガラスをスライドガラスに封入し、光学的セクション蛍光顕微鏡 (Apotome、Zeiss) で観察した。

1-7 Real-time PCR

ティラピア組織の遺伝子発現をリアルタイム PCR (StepOne、ThermoFisher) により定量した。PCR は KOD SYBR Green PCR Master Mix (TOYOBO) を用いて、94 °C 2 分加熱後、98 °C 1 分間の熱変性、60 °C 10 秒(*onneula*、*onactb*) または 65 °C 10 秒(*onneulb*) でアニーリングを行い、68 °C 30 秒の伸長、30 サイクルで行った。*onneula* のプライマーは (5'-TGTGTTTGTAACGTCAGCCCTC-3') および (5'-GCCCCGTCATCGATAATAAATG -3')、*onneulb* のプライマーは (5'-CCTCACCGTCAACCCTCA -3') および (5'-TGGTCGGGGACCA-GGTGGCTCCTTTGTC -3')、*onactb* のプライマーは (5'-CCTGACAGAGCGTGGCTACTC -3') および (5'-TCTCTTTGATGTCACGCACGAT -3') を用いた。内部標準として *onactb* を使用した。また、それぞれのシアリダーゼ cDNA を含む pcDNA3.1 の希釈系列を検量線として使用した。

1-8 Neu1b 変異体の作製

onneu1b 特異的に存在するエクソン部位(c.81-138)は *onneu1b* の c.139-141 と同じ塩基配列で構成されることが分かった。そのため、特異的な部分および c.139-141 を含む欠損変異体(c.81-141)を作製したのち、c.139-141 のオリゴヌクレオチドを付加することにより作成した。まず、*onneu1b*-HA を含む pBluescript をテンプレートとし、インバース PCR を行い、*onneu1b* 変異体(*neu1b*: c.81-141 欠損)を作製した。プライマーは (5'-GTGAACACTTACAGGATCCCA-CTGCTC-3') および (5'-CTGAGGGTTGACGGTGAGG-3') を用いた。その後、合成オリゴヌクレオチド(c139-141)をアニーリングし (5'-ATCGACCCCCTGGTGTGTTTGAGGAGCAGCTGCTGGGGTGAGTGGATCCCAG-GGCCAG-3') および (5'-CTGGCCCTGGATGATCCACTCACC-CACCAGCCTGCTGCCTCAAACACCAGGGTCGAT-3')、PCR 産物とライゲーションした。シーケンス解析により配列を確認した後、*neu1b* 変異体(c.81-138 デリション)を pcDNA3.1 にサブクローニングにした。

実験結果

これまでの報告より、ナイルティラピアのゲノムには2つの *neul* 遺伝子の存在が予想されており、1つの *neul* 遺伝子のみを有するゼブラフィッシュやメダカとは異なっている²²。そこで、他の魚類においても2種類の *neul* 遺伝子が存在するのかを調べるために、Ensembl genome データベースを用いて、インシリコ解析を行った。その結果、ゲノムデータベース上にゲノム情報が登録されているシクリッド科の魚類は、共通して2つの *neul* 遺伝子を持つことが明らかとなった。興味深いことに、シクリッド科の魚類以外にも *Astyanax mexicanus*、*Pygocentrus nattereri* (カラシン目)、*Ictalurus punctatus* (ナマズ目)、*Electrophorus electricus* (デソクウナギ目)、*Kryptolebias marmoratus* (カダヤシ目)などでも2種類の *neul* 遺伝子を持つことが明らかとなった。また、シンテニー解析の結果、魚種間で *neul* の近傍に存在する遺伝子は高く保存されていた(図 1-1)。

次に、ティラピア *neula*、*neulb* および *ctsa* 遺伝子のクローニングを行った。*onneula* の PCR 産物は、Ensembl genome browser で予想されたヌクレオチド配列 (ENSONIG00000013493)と一致する 1,164 bp であった (図 1-2)。一方、ティラピア *neulb* の予想塩基配列は予想 (ENSONIG00000013494)よりも 57 bp 長い 1,218 bp であった (図 1-3)。ティラピア *neula* は、他の脊椎動物と同様にアミノ酸コード部分は6つのエキソンで構成されていた (図 1-4)。一方、ティラピア *neulb* では1番目のエキソンの後に新しいエキソン (57 bp)の付加が起こっており、他の脊椎動物 *neul* やティラピア *neula* と異なり、そのコー

ド部分は 7 つのエキソンで構成されていた。登録されているティラピアゲノムと比較すると、*onneula* および *onneulb* にいくつかのポイントミューテーションが存在した。*onneula* では、10 個の同義変異および 8 個の非同義変異(Q28L、T74S、Y76S、Y77S、A119Q、N217Y、A292V、R358H)が確認され、*onneulb* では 8 個の同義変異と 1 つの非同義変異(E330K)が認められた。本研究で同定した *onneula* および *onneulb* は Genbank database にそれぞれ LC051024、LC101496 として登録された。

シーケンス解析の結果から得られた遺伝子配列より演繹アミノ酸配列を求め、アライメントを作製した (図 1-5)。その結果、ティラピア Neu1a はヒト NEU1 と 58.7%の相同性を示し、ゼブラフィッシュ Neu1 とは 74.5%、メダカ Neu1 とは 75.5%の相同性を示した。ティラピア Neu1b はヒト NEU1 と 57.8%、ゼブラフィッシュ Neu1 と 71.0%、メダカ Neu1 と 74.0%の相同性を示した。ティラピア Neu1a とティラピア Neu1b はアミノ酸をコードするエキソンの数が異なるにも関わらず、87.3%という高い相同性を示した。また、シアリダーゼ活性に重要な 6 つのアミノ酸や Asp-box (Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp)、RIP 配列、PGPG 配列といったシアリダーゼ特有の配列に関しても¹²、ティラピア Neu1a および Neu1b ではすべて保存されていた。哺乳類 Neu1 は C 末端にリソソーム局在に重要なリソソーム送達モチーフ(Tyr-X-X-疎水性残基)を持つことが知られている²⁷。ティラピア Neu1a および Neu1b にも、メダカ Neu1 (Thr-Gly-Gly-Arg)と同様に、リソソーム送達類似モチーフが存在した。

哺乳類の Cathepsin A は、哺乳類 Neu1 の活性化および安定化に必須であることが知られ

ている²³。同様に、メダカ Neu1 の活性にも Cathepsin A が必須であることが明らかとなっている。そこで、ティラピア Neu1 活性における Cathepsin A の役割を解明するために、ティラピア脳より *ctsa* のクローニングを行った。増幅した PCR 産物は、予想された配列と同様に 373 個のアミノ酸から構成されるポリペプチドをコードする 1,422 bp の塩基配列であった。また、アミノ酸配列のアライメントより、メダカ Cathepsin A と高い相同性(83.7%)を示した (図 1-6)。

これまでの報告により、メダカ Neu1 は哺乳類 Neu1 と同様に、N 末端のシグナルペプチドが切断されることにより、成熟型になることが分かっている¹⁶。ティラピア Neu1a および Neu1b にも同様のシグナルペプチド部位が存在するのかどうかを確認するために、SignalP を用いて解析を行った。その結果、ティラピア Neu1a では 23 番目のシステインと 24 番目のアスパラギンの間 (図 1-7)、ティラピア Neu1b は 23 番目のトレオニンと 24 番目のバリンの間で切断されることが予想された (図 1-8)。インシリコ解析により、ティラピア Neu1a は 3 つの N 型糖鎖付加部位 (N161、N317、N326) と 2 つの O 型糖鎖付加部位 (T95、T161) が予想され、そのうち 2 つの N 型糖鎖付加部位 (N179、N317) と 1 つの O 型糖鎖付加部位 (T95) がヒト NEU1 およびメダカ Neu1 と保存されていた (図 1-2)。ティラピア Neu1b の N 型糖鎖付加部位予想を行ったところ、2 ヶ所 (N179、N335)、O 型糖鎖付加部位予想は 1 ヶ所 (T113) であった (図 1-3)。ティラピア Neu1a と Neu1b は 2 か所の予想 N 型糖鎖付加部位 (N161 と N179、N326 と N335) および 1 か所の予想 O 型糖鎖付加部位 (T95 と T113) が共

通していた。次にテトラピア Neu1a および Neu1b の分子量を確認するために、HA タグを付加した *neu1a* または *neu1b* をトランスフェクションした HEK293T 細胞よりホモジネートを調製し、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、Neu1a はシグナルペプチド切断後の予想分子量である 39.9 kDa とは異なるブロードしたバンド (41.9-55.8 kDa) が検出された (図 1-9)。これはテトラピア Neu1a が O 型糖鎖や N 型糖鎖の付加といった翻訳後修飾を受けたためだと考えられる。マウス Neu1 は N 型糖鎖付加を受けておりバンドがブロードなパターンを示す。テトラピア Neu1a の N 型糖鎖付加を確認するために、PNGase F 処理を行い、Neu1a のホモジネート中の糖タンパク質から N 型糖鎖を除去した。再度ウエスタンブロッティングに供したところ、PNGase F 未処理の Neu1a よりも分子量が減少したバンド (39.9 ~43.0 kDa) が確認された。この結果は Neu1a が N 型糖鎖修飾を受けていることを表しているが、PNGase F 処理後もバンドがブロードしていることから、N 型糖鎖修飾だけでなく、他の翻訳後修飾を受けている可能性が示唆された。また、PNGase F 処理した Neu1a で認められたバンドのうち、最も小さい分子量は 39.9 kDa であり、これは N 末端のシグナル配列部分が切断された Neu1a の予測サイズと一致した。一方、ウエスタンブロッティングにおいて、シグナルペプチド切断後の成熟型 Neu1b の予想される分子量 42.2 kDa とは異なり、43.6 kDa と 45.3 kDa の 2 本のバンドとして検出された (図 1-10)。これらのバンドは成熟型 Neu1b よりも高い分子量を示しており、Neu1b は翻訳後修飾されていることが示唆された。そこで、テトラピア Neu1a 同様に、Neu1b のホモジネートを PNGase F で処理したところ、

N末端が切断された Neu1b のサイズに相当する 42.2 kDa の単一バンドが確認された。このことから、Neu1b は Neu1a と異なり、N型糖鎖修飾のみを受けていることが示唆された。

Cathepsin A も Neu1 と同様にシグナルペプチドの切断が知られており、哺乳類ではシグナルペプチドが切断された後、さらに 285 番目の Met から 298 番目の Arg の間で切断され、ジスルフィド結合を介したヘテロ 2 量体 (32/20 kDa) を形成する²⁸。このティラピア Cathepsin A についても SignalP で解析したところ、19 番目のアラニンと 20 番目のアラニンの間で切断されることが予想された (図 1-11)。また、シグナルペプチド切断後のプロセッシングに関与する部分もティラピア Cathepsin A では保存されていた。そこで、ティラピア Cathepsin A の分子量を確認するために、C 末端に FLAG タグを持つ Cathepsin A を HEK293T 細胞で発現させ、そのホモジネートを用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、ティラピア Cathepsin A は 51 kDa および 19.6 kDa の 2 つのバンドが確認された (図 1-12)。51 kDa のバンドはシグナルペプチドが切断された Cathepsin A と一致し、低分子側のバンドは 2 量体形成の際に形成される分子量と一致していた。

クローニングしたティラピア Cathepsin A のプロテアーゼ活性は、遺伝子導入した HEK293T 細胞のホモジネートにより確認した。ティラピア Cathepsin A を発現させた細胞より調製したホモジネートは Mock 細胞より 13.4 倍高いカルボキシペプチダーゼ活性を示した (図 1-13)。Cathepsin A の活性が認められたことから、次に *ctsa* 遺伝子との共発現下のティラピア Neu1a および Neu1b のシアリダーゼ活性を測定した。この測定は、ティラピア

Neu1a と Neu1b の至適 pH が明らかになっていないことから、メダカ Neu1 の至適 pH 4.6 で活性測定を行った¹⁶。Neu1a および Neu1b のみを単独で発現させた細胞では、シアリダーゼ活性がそれぞれ 25 nmol/hr/mg、5 nmol/hr/mg だったが、Cathepsin A と共発現するとその活性が 118 nmol/hr/mg および 48 nmol/hr/mg まで上昇した (図 1-14)。このことから、哺乳類 Neu1 やメダカ Neu1 と同様に、ティラピア Neu1a および Neu1b は Cathepsin A により活性化されることが明らかとなった。したがって、今後の実験は *ctsa* とティラピア *neu1a* または *neu1b* を共発現させて行うこととした。

ティラピア Neu1a および Neu1b の至適 pH を明らかにするために、様々な pH (pH 3.5-7.0) でシアリダーゼ活性を測定した。その結果、ティラピア Neu1a は pH 3.5-5.5 の酸性条件下で活性を示し、pH 4.0 で最も高い活性を示した (図 1-15)。ティラピア Neu1b も Neu1a と同様の傾向を示し、pH 4.2 で最も高い活性を示した (図 1-16)。以上より、ティラピア Neu1a および Neu1b とともに至適 pH を pH 4.6 に持つヒト NEU1⁸ やメダカ Neu1 (pH 4.0)¹⁶、ゼブラフィッシュ Neu1 (pH 4.5)¹³ と類似した酵素学的性状を示すことが明らかとなった。次に、ティラピア Neu1a および Neu1b の基質特異性を検討した (図 1-17)。ティラピア Neu1a は、ゼブラフィッシュ Neu1¹³ やメダカ Neu1¹⁶ と同様に 3-シアリルラクトースを最も良い基質とし、ガングリオシドやコロミン酸に対しても高い活性を示したが、ムチンや 6-シアリルラクトースに対しては活性をほとんど示さなかった。一方、ティラピア Neu1b は人工基質である MU-NANA 以外には活性をほとんど示さなかった。つまりティラピア Neu1b は Neu1a とは

異なり、限られた基質に対して活性を示すことが示唆された。このことから、ティラピア Neula がリソソーム異化分解を行う主要な Neula である一方、Neulb は限定的な機能を有することが予想された。

ティラピアの各種組織における *neula* および *neulb* の発現を調べるために、ティラピアの各種組織由来の total RNA から調製した cDNA を用いてリアルタイム PCR を行った。その結果、ティラピアの肝臓は他の組織と比較して最も高い *neula* の発現を示した (図 1-18)。ティラピア *neula* の発現パターンはメダカ *neul* と類似しており、肝臓で最も発現が高く、次いで脾臓、脳であった。一方、*neulb* の発現は脾臓で最も高く認められるが、その他の組織では全般的に低かった。全ての組織で *neula* の発現量が *neulb* の発現量に比べて高かったことから、ティラピアでは *neula* が主な Neul であると推測された。

このようなティラピア Neula および Neulb の酵素学的性状は、これら 2 つの Neul がリソソーム酵素である可能性を示していた。そこで、ティラピア Neula および Neulb がリソソーム局在を示すのかを解析した。一般に、ヒト Cathepsin A は、Neul のリソソーム局在化を補助する分子シャペロンであることから²³、まず、ティラピア Cathepsin A がリソソーム局在するののかについて免疫蛍光染色を用いて解析した。その結果、ティラピア Cathepsin A はリソソームのマーカーである lysotracker と重なることから、メダカ Cathepsin A 同様にリソソーム局在が確認された (図 1-19)。次に、HepaT-1 細胞に *neula*-HA または *neulb*-HA を *ctsa*-FLAG と共発現させ、HA タグと FLAG タグの 2 重染色を行った。ティラピア Neula お

よび Neu1b とともに Cathepsin A と共局在を示した (図 1-20、図 1-21)。図 1-11 に示すように、
ティラピア Neu1a および Neu1b は Cathepsin A によって活性化されたことから、ティラピア
ア Neu1 が Cathepsin A と複合体を形成していると考えられる。したがって、ティラピア
Neu1a および Neu1b はメダカ Neu1 と同様にリソソームに局在していることが示唆され
た。

ティラピア Neu1b は、他の脊椎動物 Neu1 とは異なり、7つのエクソンから構成されてい
た (図 1-22)。ところが Neu1b に特異的に存在するエクソン部分は、他のシクリッドでは保
存されていない (図 1-23)。すなわち、このエクソン部分が本章で明らかにしたティラピア
Neu1b の酵素学的性状に影響している可能性が考えられた。そこで、このエクソンを持たな
いティラピア Neu1b 欠損変異体を作製し、解析に供した。ティラピア Neu1b 欠損変異体の
分子量を確認するために、通常の Neu1b および欠損変異体のウエスタンブロッティングを
行ったところ、通常の Neu1b より 2.1 kDa 減少した 2 本のバンド(43.2 kDa および 42.5 kDa)
が確認され、予想された分子量と一致していた(図 1-24)。この Neu1b 変異体は野性型の
Neu1b と同様の基質特異性を示した (図 1-25)。この結果は、ティラピア Neu1b の酵素学的
性状は特徴的なエクソンに影響されず、シクリッド科の魚類内で保存されていることを示
していた。

考察

魚類の *neu1* 遺伝子は、これまでゼブラフィッシュおよびメダカでクローニングされ、その酵素学的性状等が解析されている。これらの魚類では単一の *neu1* 遺伝子しか持たないのに対して、本章ではニルティラピアには遺伝子重複により生じた 2 つの *neu1* 遺伝子 (*neu1a* および *neu1b*) が存在することを明らかにした。また、この *neu1* 遺伝子の重複はシクリッド科の魚類に普遍的に保存されていることが示唆された。また、ティラピア Neu1 はリソソームにおける脱シアリル化を担う重要なシアリダーゼであることが明らかとなった。

本研究により、ティラピア Neu1a の酵素学的性状 (Cathepsin A による活性化、至適 pH、基質特性など) が他の脊椎動物の Neu1 と高く保存されていることが明らかとなった。一般に、Cathepsin A は Neu1 のリソソーム局在に必要である²³。ティラピア Neu1a においても、Cathepsin A と共局在することが確認され、ティラピア Neu1a と Cathepsin A が複合体を形成していることが示唆された。また、ティラピア Neu1a はメダカ Neu1 と同様のリソソーム送達モチーフが存在した。このモチーフは、LAMP-1 や LAMP-2 といったリソソームに局在するタンパク質に認められる²⁷。ティラピア Neu1a はヒト NEU1 の酵素学的性質と類似していることから、Neu1a はヒト NEU1 と同様にシアルオリゴ糖や糖タンパク質のリソソーム分解に重要な役割を担っていることが示唆された。

ティラピア Neu1b は Cathepsin A により活性化され、Neu1a と同様に Cathepsin A と共局在することからも、リソソームに局在する分解酵素であることが示唆された。さらに、Neu1b

の至適 pH はヒト NEU1⁸ やメダカ Neu1¹⁶ と類似していた。最近の研究により、ティラピア Neu1b は Neu1a とは異なり、MU-KDN を脱シアリル化することが明らかとなった¹⁴。また、ティラピア *neu1b* は脾臓、脳、眼で高い発現を示しており、組織別 KDN 含量と類似している傾向が認められた。このことから、生体内で Neu1b が KDN の代謝に関与していると考えられる。

Neu1b はアミノ酸配列の相同性が高いにもかかわらず、Neu1a とは異なる基質特異性を示した。本研究では、2 つの Neu1 アイソフォーム間での基質特異性がどのような機構により生じたのかについては明らかにできなかった。しかし、ウエスタンブロッティングの結果より、Neu1a と Neu1b の翻訳後修飾が基質特異性に影響を与えている可能性が示唆された。特に、N 型糖鎖の付加は活性や安定性に関与しており²⁹、PNGase F 処理の実験より、ティラピア Neu1a と Neu1b では異なる N 型糖鎖の構造または数の付加が示された。さらに、PNGase F 処理により Neu1b は単一のバンドを示す一方で、Neu1a はブロードしたバンドが確認された。これらの結果から、Neu1a は N 型糖鎖付加だけでなく、他の翻訳後修飾も受けていることが示唆された。今後は Neu1a と Neu1b の翻訳後修飾の違いについて解析することにより、基質特異性の違いについて明らかにすることができると考えている。

遺伝子の重複は、新機能分化や潜在的機能分化をもたらすと知られている。また、遺伝子重複は遺伝子発現の多様性を高め、組織や発生において特殊な進化を可能にさせる²⁶。ティラピアには遺伝子重複により獲得された 2 つの *neu1* 遺伝子が存在した。この 2 つの *neu1* 遺

伝子の存在はシクリッド科の魚類で高く保存されていることが明らかとなった。また、*neula* と *neulb* は組織別発現パターンが異なっているだけでなく、異なるシアル酸種を代謝していることが示唆された。今後は、シクリッドにおいて、リソソームの異なる2つのシアル酸代謝経路がどのような生理的役割があるのかを明らかにすることで、進化における糖鎖の重要性が解明できるかもしれない。

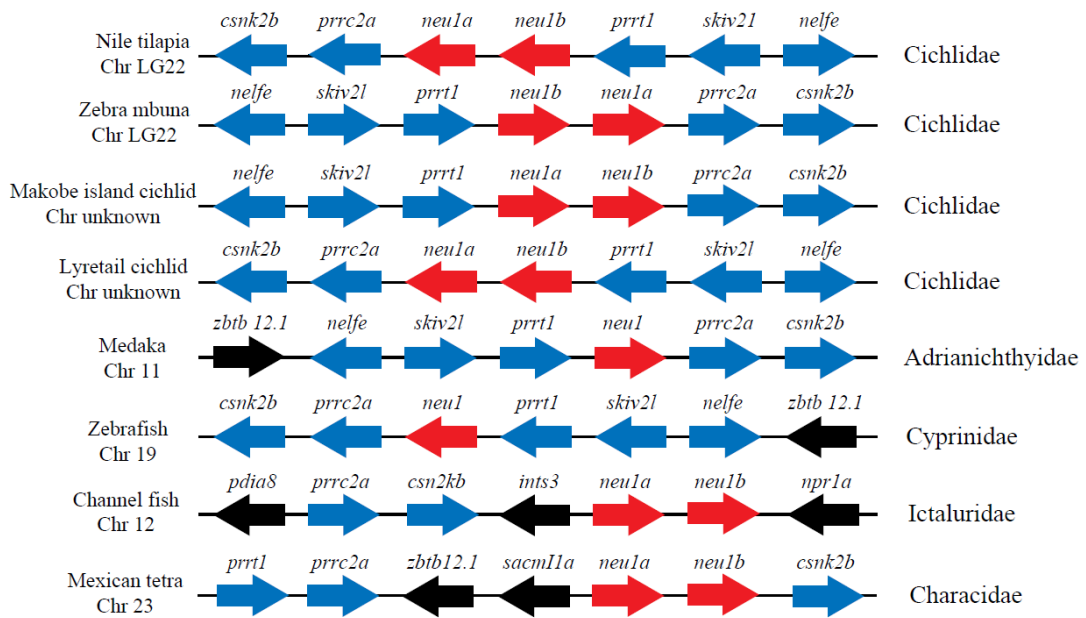


図 1-1 *neu1* 遺伝子近傍のシンテニー解析

赤い矢印は *neu1* 遺伝子を表し、青い矢印は各魚類で Neu1 近傍に保存されている遺伝子を表す。黒い矢印は保存されていない遺伝子を表す。

```

1  atggcagcaggaagccggctcgctgctctttggctacagctctttgtgtggtgtcttcc      60
   M A A G S R L A A L W L Q L F V V V S S
61  tgtgtttgtaacgtcagccctctgcagatcgacccctgggtgttgaggagcagctgctg      120
   C V C N V S P L Q I D P L V F E E Q L L
121 tgggtgagcggatcccaggccaggtgaacacttacaggatcccgctgctcaccttcacc      180
   W V S G S Q G Q V N T Y R I P L L T F T
181 cccaaaggaagcctgctggcggttgcagaagccaggaagtcttcttctctgacattgga      240
   P K G S L L A F A E A R K S S S S D I G
241 gcaaaattctttgctttggggcctccaccgacaaaaggagccagctggccccgaccaca      300
   A K F F A L R R S T D K G A (T) W S P T T
301 tttattatcgatgacggggcggcgccggatggcataaacctgggctctgttgggtggac      360
   F I I D D G A A P D G I N L G S V V V D
361 gaggaagtgggctcagtgattctgatctactcagtgtgcttccacctctaccactgtagc      420
   E E V G S V I L I Y S V C F H L Y H C S
421 ccggctagcatcatgatggtggagagccgggatgacggcctcagctggaccccgccaga      480
   P A S I M M V E S R D D G L S W T P P R
481 aacctctcggttacgctcgggggtgaagaactttgctcctgggcccggcctcggcctccag      540
   (N) L S V (T) L G V K N F A P G P G L G L Q
541 aagcgttcaatcctgcaaaagggaggttgggtgttggcgtcacgggacgctggagggc      600
   K R F N P A K G R L V V C G H G T L E G
601 gatggtgttttctgcatcctgagcagcaccacggacaaaacctggtactatggtgcccgg      660
   D G V F C I L S D D H G Q T W Y Y G A A
661 ctgaaaagcatcccctacaaccagaagaagaagcgcaggactttaacctgatgagtgc      720
   L K S I P Y N Q K K K A Q D F N P D E C
721 cagccaattgagttgactgacggcaccatcgccatcaatgtccggaatcagaacaactac      780
   Q P I E L T D G T I A I N V R N Q N N Y
781 cactgccgggtgccgcattgtggtgcacagctatgatggagggttgaccctgcccttagaa      840
   H C R C R I V V H S Y D G G L T L P L E
841 ggctaatactttgacgaggcactggtggatcctgtagtggcagccggagctctgcaaaaa      900
   G L I F D E A L V D P V V A A G A L Q K
901 gaggcgtgatctacttcaccaaccctccaatgagcaaaagagagtgaaatcacaacctg      960
   E G V I Y F T N P S N E Q K R V (N) L T L
961 aaatggtcgctgacaaaagcagctcttgggagaacaaagctgtccagatatggcgggga      1020
   K W S L T (N) G T S W E N K A V Q I W A G
1021 ccgagcggctactccagtatgacatcactggacagcggctctgtagaagaccacaagtac      1080
   P S G Y S S M T S L D S G S V E D H K Y
1081 atctttgtcatctacgagaagggccagaaagactatctcgagaccgtctcgttcaccaag      1140
   I F V I Y E K G Q K D Y F E T V S F T K
1141 atccacctgtatggtggtcgtaa      1164
   I H L Y G G R *

```

図 1-2 ティラピア *neu1a* 塩基配列および Neula アミノ酸配列

太字は開始メチオニン、*は終止コドンを表している。縦線はエキソン-イントロンの境界を示している。□で囲まれたアスパラギン、○で囲まれたトレオニンは予想 N 型糖鎖付加部位および予想 O 型糖鎖付加部位を表している。

```

1  atggcagcatggcggctctctgcactctggttactgctctctgctttggcgtctctcggtg 60
   M A A W R L S A L W L L L S A L A S S C
61  gtctcaccgctcaaccctcagcagattgacccccctgggtgtttgaggagaagctgctgtgg 120
   V L T V N P Q Q I D P L V F E E K L L W
121  gtgagcggagcccagggccagatcgacccccctgggtgtttgaggagcagctgctgtgggtg 180
   V S G A Q G Q I D P L V F E E Q L L W V
181  agtggatcccagggccaggtgaacacttacaggatcccactgctcaccttcacccccaaa 240
   S G S Q G Q V N T Y R I P L L T F T P K
241  ggaagcctgttggcatttgcagaagccaggaagacttctctctctgacattggagcaaa 300
   G S L L A F A E A R K T S S S D I G A K
301  ttcattgcaatgcggcgtccactgac|aaaggagccaactgggtccccgaccagcttcac 360
   F I A M R R S T D K G A T W S P T S F I
361  gtcgatgacgggatgaagccggatggcctgaacttgggctccggttgggtggacgaggaa 420
   V D D G M K P D G L N L G S V V V D E E
421  gtgggctcagtgattctgatctacgacgtgtgcttctacctctaccactgcagccccacc 480
   V G S V I L I Y D V C F Y L Y H C S P P
481  agcatcatgatggtggagagcctggacgacggcctcagctggagccccccagaaacctc 540
   S I M M V E S L D D G L S W S P P R N L
541  tcggttacgctcgggtgaagaacttccctccgggcccggcctcggc|ctccagaagcgc 600
   S V T L G V K N F I P G P G L G L Q K R
601  ttcaatcccgaaggggaggttgggtgtttgcggtcacgggacgctggagggcgacggt 660
   F N P A K G R L V V C G H G T L E G D G
661  gttttctgcacctcagcagatgaccacggggaacctgggtacaacggtgcgccgctgaaa 720
   V F C I L S D D H G E T W Y N G A A L K
721  agcatccccatacaaccagaagaagaagcacaagactttaacctgat|gagtccagccg 780
   S I P Y N Q K K K A Q D F N P D E C Q P
781  attgagttgactgatggcaccatcgccatcaacgctgcggaaccagaacagataccactgt 840
   I E L T D G T I A I N V R N Q N R Y H C
841  cagtgtcgcattgtggtgcacagctatgatggagggttgacctgcacctgggagggcctg 900
   Q C R I V V H S Y D G G L T L P L E G L
901  atctttgacgaggcactggtggatcctgtagtggcagctggaactctgcaaaaagagggc 960
   I F D E A L V D P V V A A G T L Q K E G
961  gtgatctacttcaccaaccctgcaac|aaggaaaagagagtgaacctaaccttgaaatgg 1020
   V I Y F T N P C N K E K R V N L T L K W
1021  tcgctgacaaaacggcaaatcttgggagaagaagccggtgcagataggtcgggaccgagc 1080
   S L T N G K S W E K K A V Q I W S G P S
1081  ggctactcctgcactcacttccactggacagcgggttctgcagaggaccgcaagtacatctat 1140
   G Y S C I T S L D S G S A E D R K Y I Y
1141  gtcactacgagaaaaggccacaatcagatatttcgagaccgctctcggttcgccaagatccac 1200
   V I Y E K G H N Q Y F E T V S F A K I H
1201  ctgtatagtgccattaa 1218
   L Y S G H *

```

図 1-3 ティラピア *neu1b* 塩基配列および Neu1b アミノ酸配列

太字は開始メチオニン、*は終止コドンを表している。縦線はエキソン-イントロンの境界を示している。□で囲まれたアスパラギン、○で囲まれたトレオニンは予想 N 型糖鎖付加部位および予想 O 型糖鎖付加部位を表している。

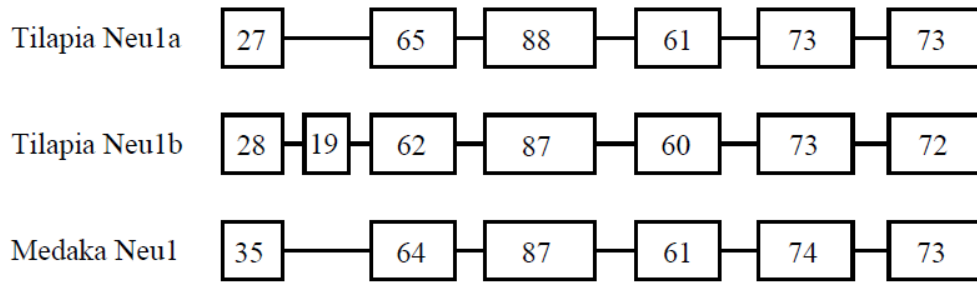


図 1-4 ティラピア Neu1a、ティラピア Neu1b およびメダカ Neu1 のイントロン・エクソン構造

アミノ酸をコードする部分のエクソン構造を表した。数字は各エクソンのアミノ酸残基数を表している。

Tilapia Neu1a	1	-----MAAGSRLAALWLQLFVVVSSCVCNV	25
Tilapia Neu1b	1	-----MAAWRLSALWLLLSALASSCVLTV	24
Medaka Neu1	1	-----MKVSGRSCDALTGFVLVWLLCALLPRCVCYN	31
Zebrafish Neu1	1	-----MDFIRQIGILLGLIAVLSSARA	21
Human Neu1	1	-----MTGERPSTALEPDRRWGPRILGFWGGCRVWVF	31
Tilapia Neu1a	26	SPLQIDPLVFEEQLLWVSGSQGQ-----VNTYRIPLLTFTPKGSLL	66
Tilapia Neu1b	25	NPQQIDPLVFEEKLLWVSGAQGQIDPLVFEEQLLWVSGSQGQVNTYRIPLLTFTPKGSLL	84
Medaka Neu1	32	TSAQIDPLVYEEQLLWVSGGQGH-----VSTYRIPVLTFTPKGSLL	72
Zebrafish Neu1	22	DKTQIDPLIYEEQLLWVSGGAGQ-----VNAYRIPLLTFTLRGSLL	62
Human Neu1	32	AAIFLLLSLAASWSKAENDFGLVQPLVTMEQLLWVSGRQIGSVDTERIPLLTFTPRGILL	91
Tilapia Neu1a	67	AFPEERKSSSSDGGAKFALRRSDDRGATWSPTTFIILDGAEDGINLGSVVVDEEVGSV	126
Tilapia Neu1b	85	AFPEERKISSSDGGAKFAMRRSDDRGATWSPTSFIVLDGMKFDGLNLGSVVVDEEVGSV	144
Medaka Neu1	73	AFPEERKSSSSDGGAKFALRRSDDRGNTWSPTVFIVLDVEHEDGLNLGSVVVDEEVGSV	132
Zebrafish Neu1	63	AFSEERKSSSDGGAKFALRRSDDRGATWSPTSFIVLDGSLADGLSLGSVVVDEEVGSV	122
Human Neu1	92	AFPEERKSSSDGGAKFALRRSDDRGSTWSPTAFIVNDGDVEDGLNLGAVVSDVETGVV	151
Tilapia Neu1a	127	ILTYSLCFHLYHCSPPSSIMVSRDDGLSWVPRNLSVTLGVKNFPGPGGLGQKRNFPA	186
Tilapia Neu1b	145	ILTYDVCFYLYHCSPPSSIMVSRDDGLSWVPRNLSVTLGVKNFPGPGGLGQKRNFPA	204
Medaka Neu1	133	FLTYSLCFHLYHCSPPSSIMVSRDDGLSWVPRNLSIELGVRAFPGPGGLGQKRHSEA	192
Zebrafish Neu1	123	ILTYSLCFHQYHCSPPSSIMVSRDDGFTWSVPRNLSIELGVKSFPGPGGLGQKRYEPPS	182
Human Neu1	152	FLFYSLCAHRAGCQVASTMLVSRDDGVSWVPRNLSLDIGTEVEFPGPGGLGQKQREPR	211
Tilapia Neu1a	187	KGRLVVCGHGTLEGDGFCLLSDDHGQTWYNGAALKSIPYNOQKKAQDFNPDECQPIELT	246
Tilapia Neu1b	205	KGRLVVCGHGTLEGDGFCLLSDDHGETWYNGAALKSIPYNOQKKAQDFNPDECQPIELT	264
Medaka Neu1	193	KGRLVVCGHGTLEGDGFCLLSDDHGKWRNGAALKSIPYNOQKKAQDFNPDECQPIELT	252
Zebrafish Neu1	183	KGRLVVCGHGTIAGDGFCLLSDDHGRSWYNGAALKSIPYNOQKQDLDFNPDECQPIELE	242
Human Neu1	212	KGRLVVCGHGTLERDGFCLLSDDHGASWYNGSGVSGIPYSQPKQENDFNPDECQPIELP	271
Tilapia Neu1a	247	DGTLAINVRNQNMYHCRIVVHSDGGLTLELEGLIFDEALVDPVVAAGAL-QKEGVLY	305
Tilapia Neu1b	265	DGTLAINVRNQNMYHCRIVVHSDGGLTLELEGLIFDEALVDPVVAAGTL-QKEGVLY	323
Medaka Neu1	253	DGSLINVRNQNMYHCRIVVHSDGGESLVEEELVFDSELVDPVVAAGAL-QKNGVLY	311
Zebrafish Neu1	243	DGSLIVINVRNQNMYHCRIVVHSDGGESLVEEELVFDKTLIDPVVAAGAL-QKQGVLY	301
Human Neu1	272	DGSVVINVRNQNMYHCRIVVHSDGGLTLELEGLIFDEALVDPVVAAGAVVTSSGIVF	331
Tilapia Neu1a	306	FTNPSNEQKRVNLTLLKWSLNTNGISWENKAVQHWAGPSGYSSMTSLDSG--SVEDHKYIIV	363
Tilapia Neu1b	312	FTNPNKEKRVNLTLLKWSLNTNGISWENKAVQHWAGPSGYSSMTSLDSG--SAEDRKYIIV	381
Medaka Neu1	324	FTNPSNDRNRVNLTLLKWSLNTDGLSWEKKAVQHWAGPSGYSSMTSLDTG--SVEDQKFEIV	369
Zebrafish Neu1	302	FTNPSSTQHRVNLTLLKWSLNTDGLSWEKAVQHWAGPSGYSSMTSLKGG--SAEDNKYIIV	359
Human Neu1	332	FSNPAHFPRVNLTLLKWSLNTNGISWENKAVQHWAGPSGYSSMTSLDSG--SVEDHKYIIV	391
Tilapia Neu1a	364	IYEKQKDYFETVTFKIHLVYGG	387
Tilapia Neu1b	382	IYEGHNCYFETVTFAKIHLVYSGH	405
Medaka Neu1	370	IYEGHKDYFETVTFVVKVHLVYGG	393
Zebrafish Neu1	360	VYEGHKDYFETVTFAKIHLVYGGK	383
Human Neu1	392	IYEGRNHYFETVTFVAKISVYGTLL	415

図 1-5 ティラピア Neu1a、ティラピア Neu1b、メダカ Neu1、ゼブラフィッシュ Neu1 およびヒト NEU1 のアミノ酸配列アライメント

実線で囲まれている部分は Asp-box、破線で囲まれている部分は PGP 配列、太線は RIP 配列を表している。また、矢印はシアリダーゼ活性に重要なアミノ酸を示している。100%の相同性を示すアミノ酸を黒、部分的な相同性 (>50%)を示す部分は灰色で表している。

Tilapia Cathepsin A	1	-----MQLLLLS	33
Medaka Cathepsin A	1	-----MLVFLWYLLASLLG-AGAAPAADEITVLPGLQ	31
Human Cathepsin A	1	MTSSPRAPPGEQGRGGAEMIRAAPPPLFLILLLLLLLLVSWASRGEAAPDCDEIQRLPGLA	60
Tilapia Cathepsin A	34	KQPSFKQYSGYLSVADGKHLHYWFVESQNKPSSTPLVWLWLN	93
Medaka Cathepsin A	32	KQPSFKQYSGYLSGTEGKHLHYWFVESQNDPSQEPVWLWLN	91
Human Cathepsin A	61	KQPSFRQYSGYLKSGSGKHLHYWFVESQKLPENSPVWLWLN	120
Tilapia Cathepsin A	94	VQSDGATLEYNYPYAWNKIANVLYLESPVGVGFSYSDDQKYATNDTEVSMNYLALKEFFR	153
Medaka Cathepsin A	92	IMIDGATLEYNYPYSWNLKIANVLYLESPVGVGFSYSDDGKHFATNDTEVSLNMYLALKEFFR	151
Human Cathepsin A	121	VQSDGVTLEYNYPYSWNLKIANVLYLESPVGVGFSYSDDKHYATNDTEVAQSNFEALQEFFR	180
Tilapia Cathepsin A	154	LFPEYSKNEFLTGESYGGIYIPTLAERFVMEASLNLQGTAVNGMSSYEMNDNSLVVFA	213
Medaka Cathepsin A	152	LFPEFSKNEFLTGESYGGIYIPTLAERFVMEADLNLQGTAVNGMSSYEMNDNSLVVFA	211
Human Cathepsin A	181	LFPEYKNNKFLTGESYAGIYIPTLAVIVMCDPSMNLQGLAVNGMSSYEMNDNSLVVFA	240
Tilapia Cathepsin A	214	YYHGLLGSSELWAELOTECCSDGKCNFYDNPNCNMDSVGEVQTIIVYSSGLNMYNLYASCF	273
Medaka Cathepsin A	212	YYHGLLGSCLWSELOTECCCKDGCNCFYDNPNCNMDSVGEVQTIIVYSSGLNMYNLYASCF	271
Human Cathepsin A	241	YYHGLLGNRLWSSLOTECCSQNKCNFYDNKDLCEVTNLQEVARIIVNSGLNMYNLYAEC	300
Tilapia Cathepsin A	274	GGVPEQLSVERGQIVIRDLGNSFIHQWNRLEWCKVKSLVALLP	333
Medaka Cathepsin A	272	GGVRRHVSABERGQIVIRDLGNMFIHQWTRLEWCKKLSVALHESVRLDPPCTNSTPSTL	331
Human Cathepsin A	301	GGVESHFRYEKDTVVVQDLGNLETRLEPLKRMWQ---ALLRSGDKVVRMDPPCTNTTAAST	357
Tilapia Cathepsin A	334	YLNNELVVKALHISPKALDWVICSSEVNLNYDRLYMDVKKOYLKLLSALKYRILVYNGDV	393
Medaka Cathepsin A	332	YLNNQYVVKALHISPKALDWVICSSEVNLNYDRLYMDVKKOYLKLLSALKYRILVYNGDV	391
Human Cathepsin A	358	YLNNPYVVKALNIPQLPQWDMCNFLVNLQYRRLYRSMNSOYLKLLSQKYQILLVYNGDV	417
Tilapia Cathepsin A	394	DMACNFMGDEWFVESLQQQVQVRRPWIYEDVD-GQVQVGFVKEEDNIFLTIKGS	452
Medaka Cathepsin A	392	DMACNFMGDEWFVESLQQQVQVRRPWIYEDVD-GQVQVGFVKEEDNIFLTIKGS	450
Human Cathepsin A	418	DMACNFMGDEWFVESLNQKMEVQRRPWLKVKYDSSGEQIAGFVKEESHIFLTIKGS	477
Tilapia Cathepsin A	453	PTDKPAAAFVMEFRFLKLPY	473
Medaka Cathepsin A	451	PTDKPVAAAFVMEFRFLKQPY	471
Human Cathepsin A	478	PTDKPLAAAFVMSRFENKQPY	498

図 1-6 ティラピア Cathepsin A、メダカ Cathepsin A およびヒト Cathepsin A のアミノ酸配列アライメント

100%の相同性を示すアミノ酸を黒、部分的な相同性 (> 50%)を示すアミノ酸を灰色で表している。

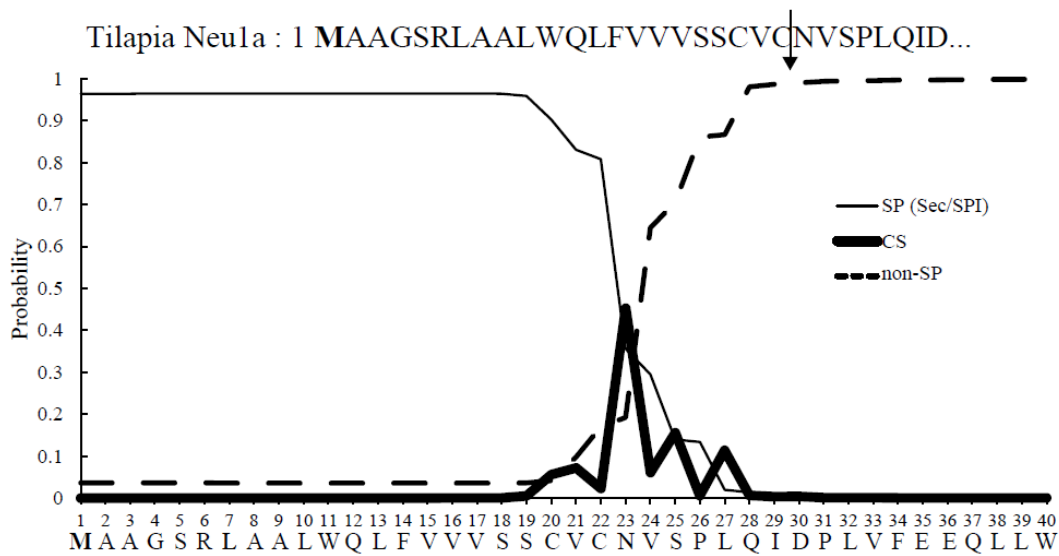


図 1-7 ティラピア Neu1a の予想切断部位

予想切断部位の蓋然性を太線、シグナルペプチドスコアを実線、シグナルペプチドスコアを持たない配列を点線で表した。矢印は切断予想部位を表している。

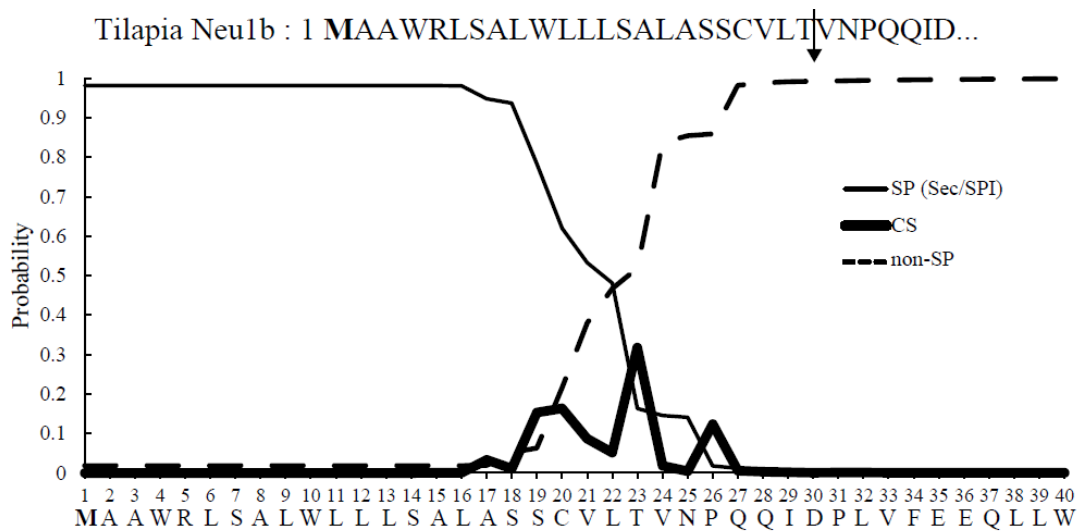


図 1-8 ティラピア Neu1b の予想切断部位

予想切断部位の蓋然性を太線、シグナルペプチドスコアを一本線、シグナルペプチドスコアを持たない配列を点線で表した。矢印は切断予想部位を表している。

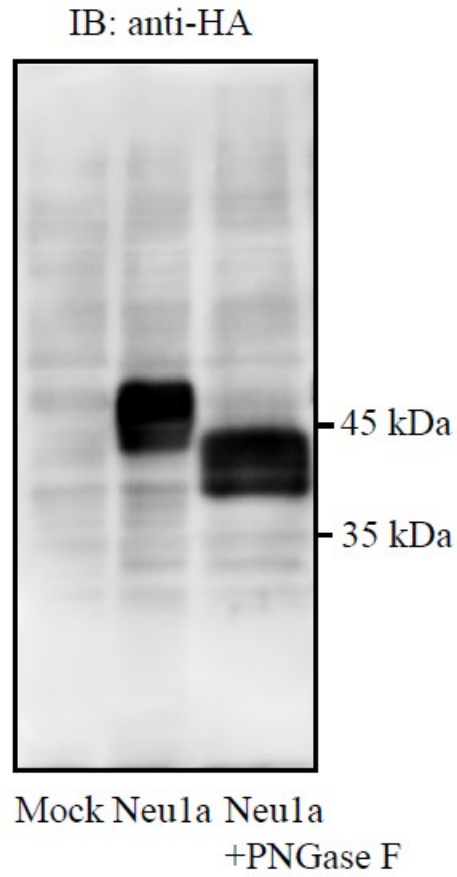


図 1-9 ティラピア *Neula* のウエスタンブロッティング

ティラピア *neula*-HA と *ctsa*-FLAG をトランスフェクションした 293T 細胞よりホモジネートを調製し、ウエスタンブロッティングに供した。

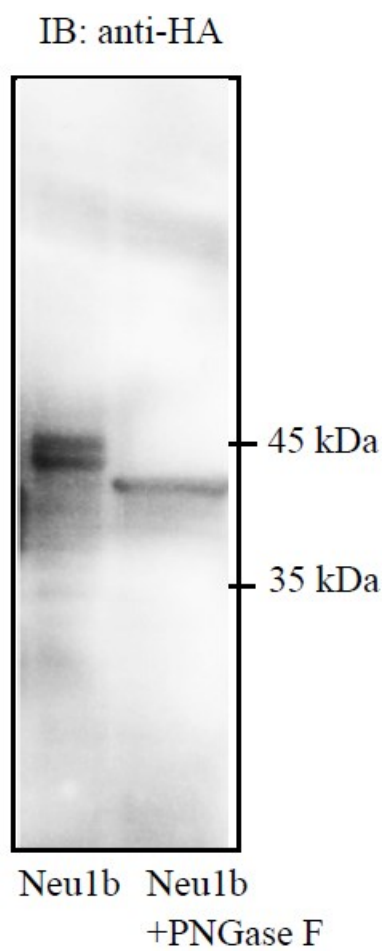


図 1-10 ティラピア Neu1b のウエスタンブロッティング

ティラピア *neu1b*-HA と *ctsa*-FLAG をトランスフェクションした 293T 細胞よりホモジネートを調製し、ウエスタンブロッティングに供した。

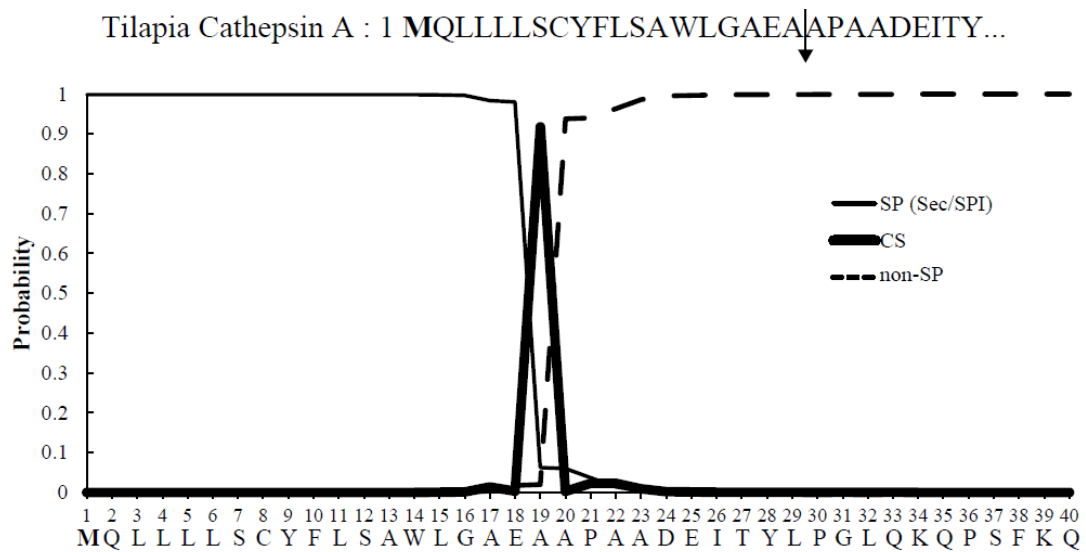


図 1-11 ティラピア Cathepsin A の予想切断部位

予想切断部位の蓋然性を太線、シグナルペプチドスコアを一本線、シグナルペプチドスコアを持たない配列を点線で表した。矢印は切断予想部位を表している。

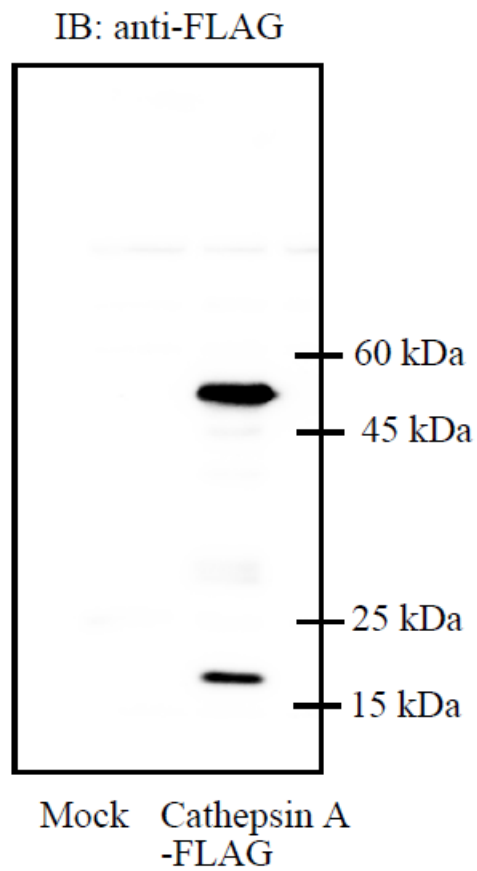


図 1-12 ティラピア Cathepsin A のウエスタンプロットティング

ティラピア *ctsa*-FLAG をトランスフェクションした 293T 細胞よりホモジネートを調製し、ウエスタンプロットティングに供した。

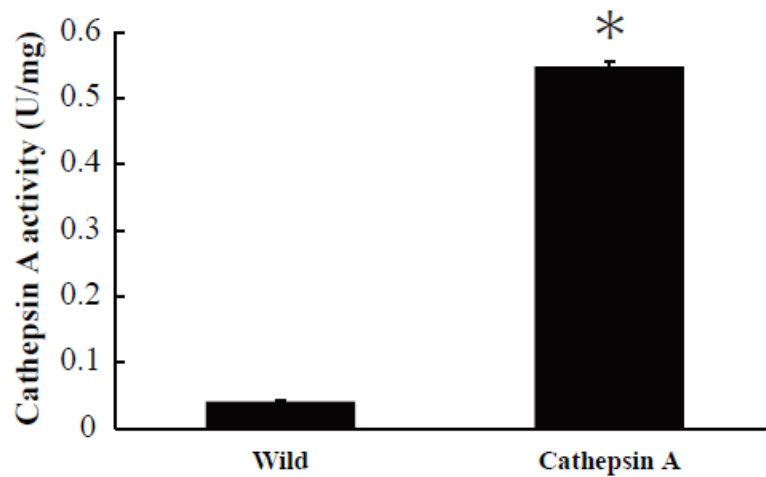


図 1-13 ティラピア Cathepsin A の活性測定

ティラピア *ctsa* を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、調製したホモジネートのカルボキシペプチダーゼ活性を測定した。*は wild と比較して統計的有意差 $p < 0.0001$ を意味する。

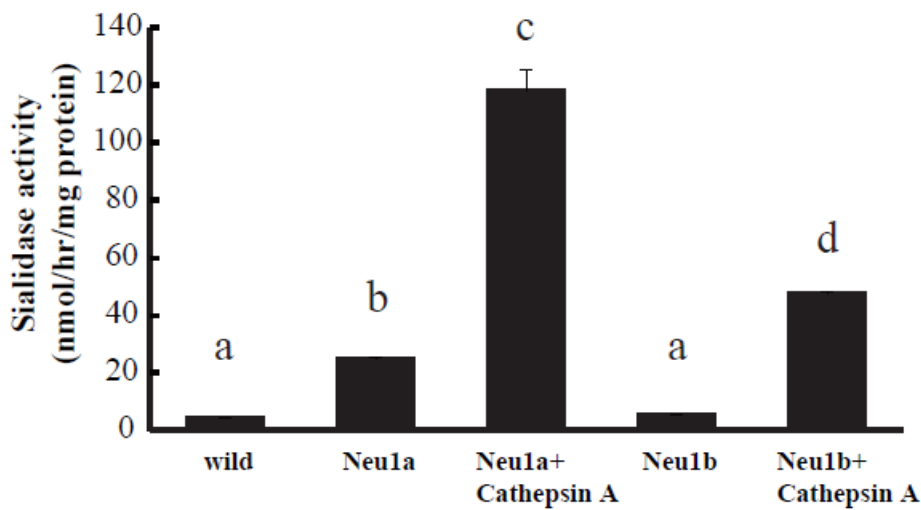


図 1-14 ティラピア Neu1a および Neu1b の活性測定

ティラピア *neu1a* または *neu1b* を *ctsa* と共発現または単独で HEK293T 細胞にトランスフェクションし、調製したホモジネートのシアリダーゼ活性を測定した。平均値の差を ANOVA により比較し、統計的有意差を提示された文字で示した。

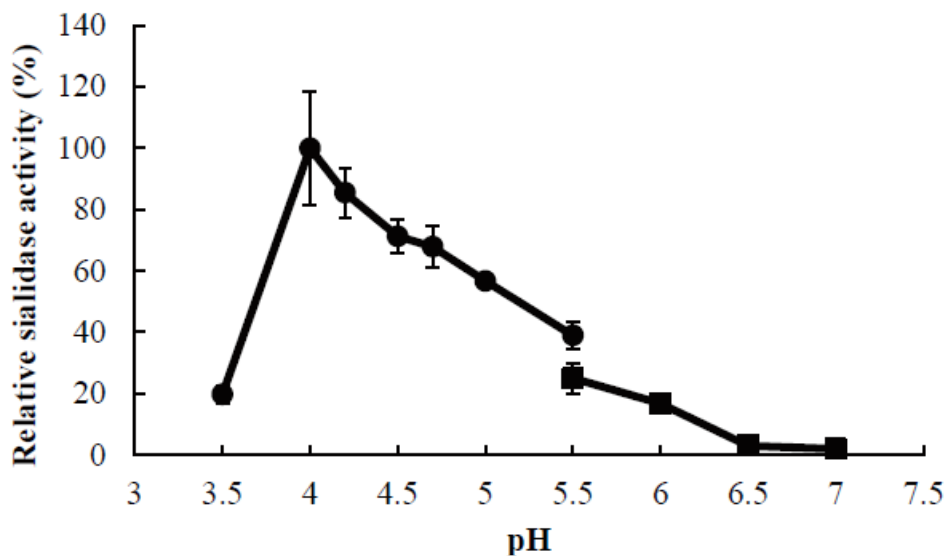


図 1-15 ティラピア Neula の至適 pH

ティラピア *neu1a* と *ctsa* を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、作製したホモジネートの各 pH におけるシアリダーゼ活性を測定した。●は酢酸バッファを、■はリン酸バッファを用いた際の活性を意味する。

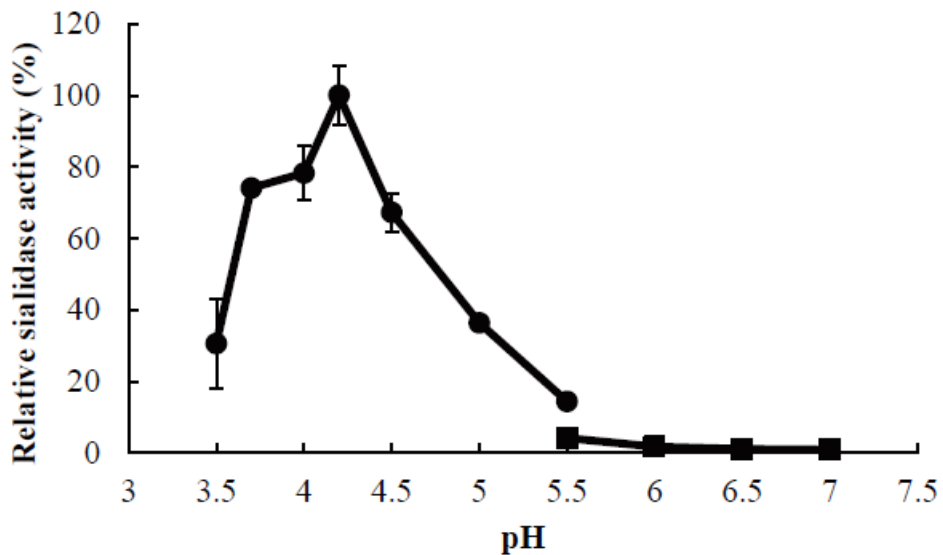


図 1-16 ティラピア Neu1b の至適 pH

ティラピア *neu1b* と *ctsa* を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、作製したホモジネートの各 pH におけるシアリダーゼ活性を測定した。●は酢酸バッファを、■はリン酸バッファを用いた際の活性を意味する。

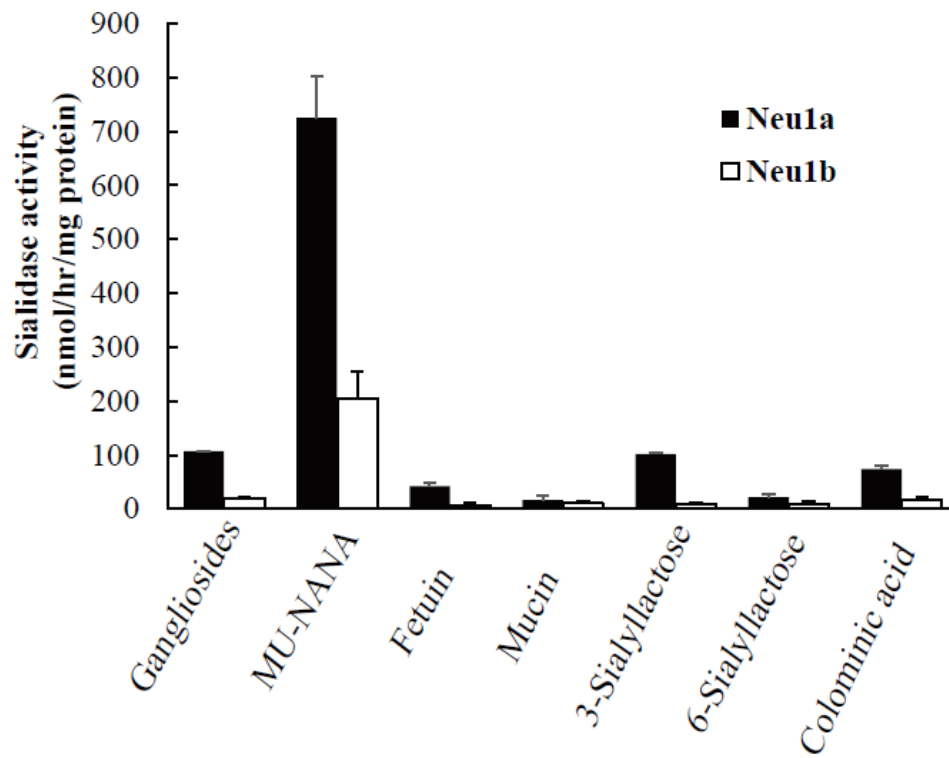


図 1-17 ティラピア Neu1a および Neu1b の基質特異性

ティラピア *neu1a* または *neu1b* と *ctsa* を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、調製したホモジネートの各基質に対するシアリダーゼ活性を測定した。

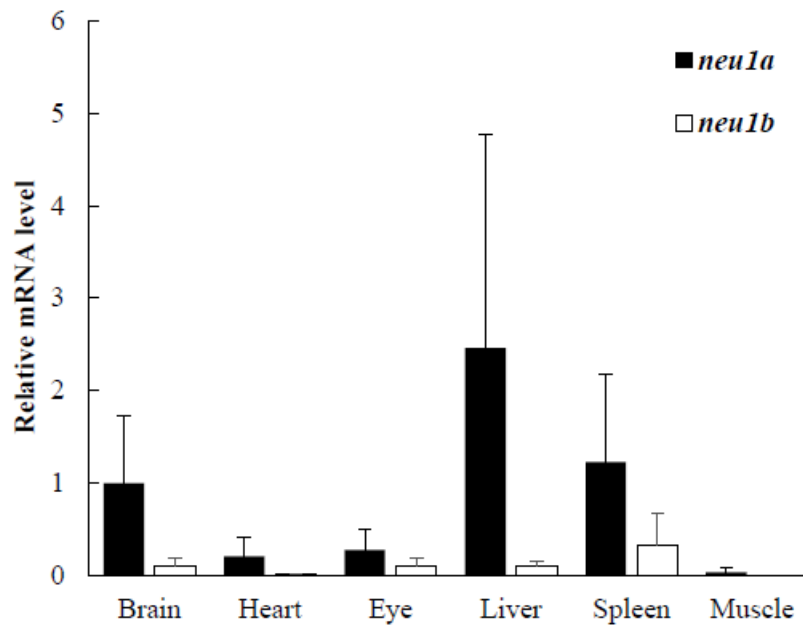


図 1-18 ティラピア *neu1a* および *neu1b* の組織別遺伝子発現

ティラピア *neu1a* および *neu1b* の各組織別遺伝子発現をリアルタイム PCR により測定した。

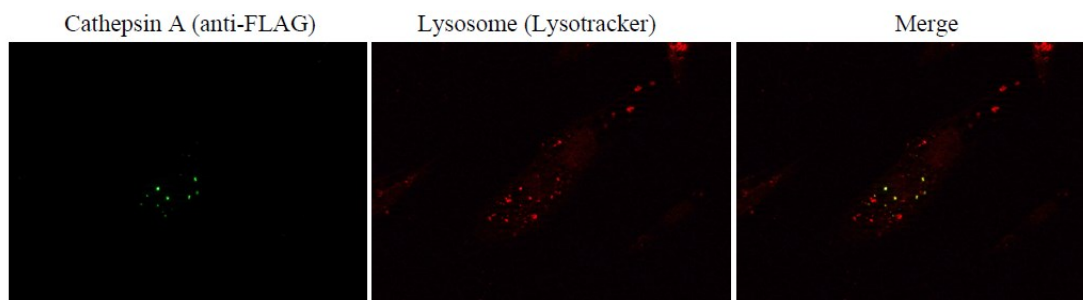


図 1-19 ティラピア Cathepsin A の細胞内局在

Hepa-T1 細胞に *ctsa*-FLAG をトランスフェクションし、間接蛍光抗体法により観察を行った。リソソームのマーカールとして Lysotracker を用いた。

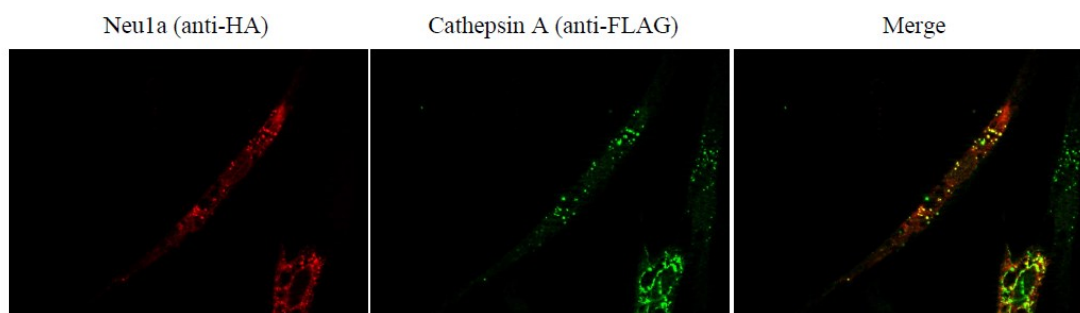


図 1-20 ティラピア Neu1a の細胞内局在

Hepa-T1 細胞に *neu1a*-HA および *ctsa*-FLAG をトランスフェクションし、間接蛍光抗体法により観察を行った。

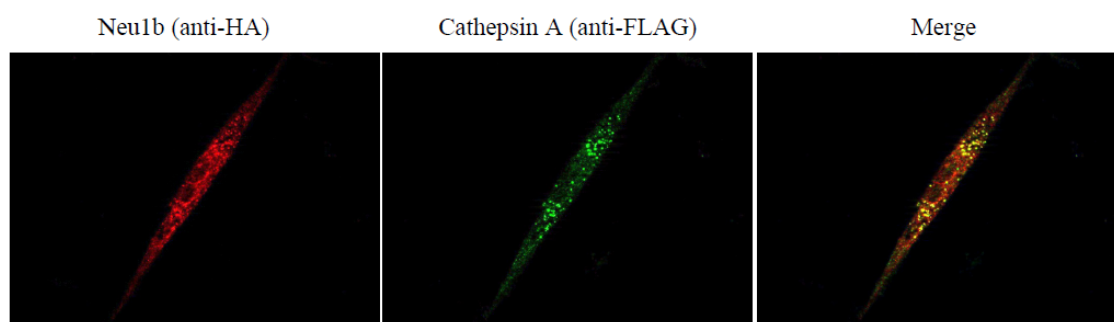


図 1-21 ティラピア Neu1b の細胞内局在

Hepa-T1 細胞に *neu1b*-HA および *ctsa*-FLAG をトランスフェクションし、間接蛍光抗体法により観察を行った。

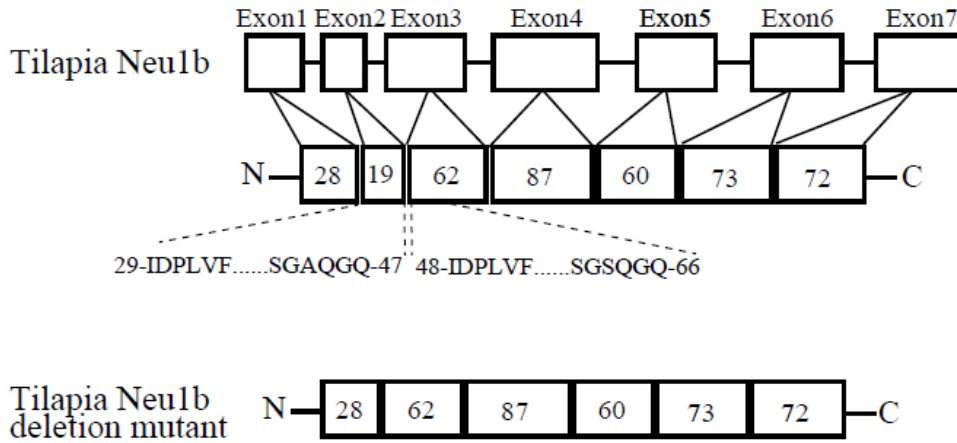


図 1-22 ティラピア Neu1b および欠損変異体のエクソン構造

ティラピア Neu1b とティラピア Neu1b 欠損変異体のエクソンを表している。
数字は各エクソンのアミノ酸数を表している。

Tilapia Neu1b	1	MAAWRLSALWLLLSALASSCVLTVPN	Q	IDPLVFEEKLLWVSGAQGQ	IDPLVFEEQLLWV	60
Zebra mbuna Neu1b	1	MAAWRLSALWLLLSALASSCVLTVPN	S	-----	IDPLVFEEQLLWV	41
Makobe island cichlid Neu1b	1	MAAWRLSALWLLLSALASSCVLTVPN	S	-----	IDPLVFEEQLLWV	41
Lyretail cichlid Neu1b	1	MAAWRLSALWLLLSALASSCVLTVPN	S	-----	IDPLVFEEQLLWV	41

図 1-23 ティラピア Neu1b、Zebra mbuna Neu1b、Makobe island cichlid Neu1b および Lyretail cichlid Neu1b の部分的なアミノ酸配列のアライメント

100%の相同性を示すアミノ酸を黒、部分的な相同性 (>50%)を示すアミノ酸を灰色で表している。

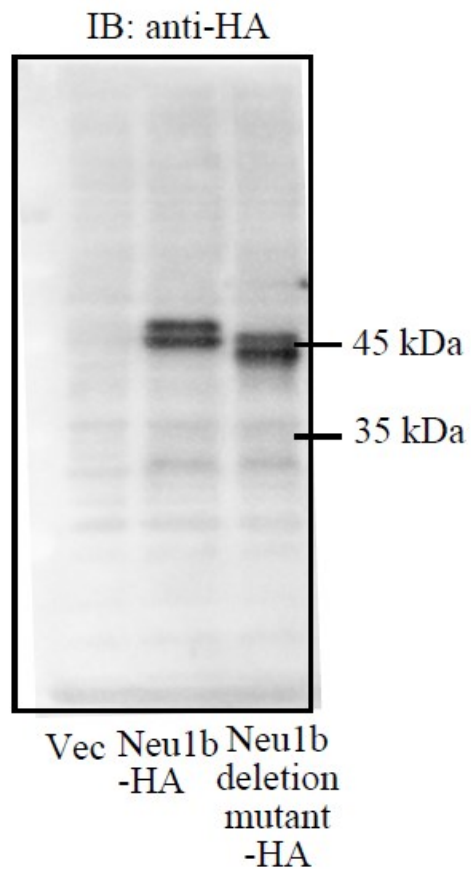


図 1-24 ティラピア Neu1b および欠損変異体のウエスタンブロットティング

ティラピア *neu1b*-HA または欠損変異体と *ctsa*-FLAG をトランスフェクションした 293T 細胞よりホモジネートを調製し、ウエスタンブロットティングに供した。

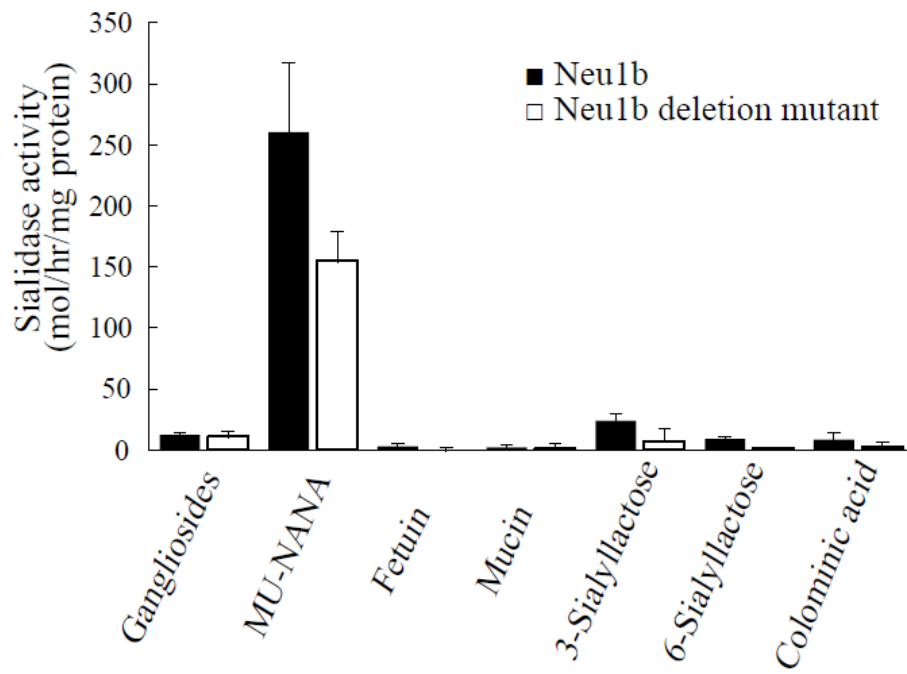


図 1-25 ティラピア Neu1b および欠損変異体の基質特異性

ティラピア *neu1b*-HA またはその欠損変異体 (c.81-138 デリション) と *ctsa*-FLAG をトランスフェクションした 293T 細胞よりホモジネートを調製し、各基質に対するシアリダーゼ活性を測定した。

第2章 ティラピア Neu4 の
遺伝子クローニング、酵素学的性状および
細胞内局在の解明

背景および目的

これまで、哺乳類では4種類のシアリダーゼ(Neu1、Neu2、Neu3 および Neu4)の存在が明らかになっており、これらは酵素学的性状および細胞内局在、生理機能が異なる。ヒト NEU1 シアリダーゼは、至適 pH を 4.6 に持ち、シアロオリゴ糖を良い基質とし、リソソームでの異化分解に関与している。NEU2 は、細胞質シアリダーゼであり、至適 pH を 6.0 に持ち、糖タンパク質および糖脂質など幅広い基質に対して活性を示し、筋分化および神経分化を制御している。また、NEU2 は一部の脊椎動物にしか存在しない。NEU3 は、細胞膜に局在するガングリオシド特異性のシアリダーゼであり、酸性から中性付近まで活性を維持し、EGFR、インテグリンおよび Trk 等のトランスメンブレンシグナル伝達に関与している⁸。Neu1 および Neu3 は、ヒト、マウス、鳥類および魚類等の脊椎動物間で、酵素学的性状が高く保存されている。

一方で、Neu4 は、脊椎動物間で、酵素学的性状および細胞内局在は大きく異なっている。ヒト NEU4 およびマウス Neu4 は、スプライシングによる2種類のアイソフォームが存在する³⁰。ヒトでは NEU4L および NEU4S、マウスでは Neu4a (ヒト NEU4L に対応) および Neu4b (ヒト NEU4S に対応) である。ヒト NEU4L は N 末端にミトコンドリア移行シグナルを持つが、ヒト NEU4S はミトコンドリア移行シグナルを持たず、小胞体の膜に不均一に局在する³¹。一方、マウス Neu4a はミトコンドリア移行シグナルを持たず、マウス Neu4b も小胞体に局在しない³⁰。さらに、ヒトおよびマウスの Neu4 バリエントは基質特異性におい

でも大きく異なる性状を表す。ヒトでは、NEU4L および NEU4S とともに糖脂質および糖タンパク質に高い活性を持つ³²。マウス Neu4b もヒト Neu4 と同様の基質特異性を示すが、Neu4a はコロミン酸を良い基質としている³³。また、ヒト NEU4L は脳に特異的に発現しており、神経細胞のアポトーシスに関わっており³²、ヒト NEU4S は糖タンパク質の脱シアリル化を介して神経分化や細胞接着を抑制することが知られている³⁰。

魚類においてはこれまで、ゼブラフィッシュおよびメダカにおいて、Neu4 シアリダーゼのクローニングおよび酵素学的性状の解析が行われている。メダカ Neu4 はリソソームに局在し、至適 pH を 4.6 に表すが¹⁸、ゼブラフィッシュ Neu4 は至適 pH2.6 に示し、小胞体に局在を示す¹⁵。このように、魚類間でも Neu4 の酵素学的性状および細胞内局在が異なる。また、前述した哺乳類の Neu4 のようなスプライシングバリエントは両魚種とも持たない¹²。

本研究室ではこれまでティラピアシアリダーゼに注目し、研究を行ってきた。その結果、ティラピアには *neu1a*、*neu1b*、*neu3a*、*neu3b*、*neu3c*、*neu3d*、*neu3e* および *neu4* が、ゲノム上に確認され、*neu1* および *neu3* の遺伝子クローニング、性状解析が行われている^{22,34}。しかし、ティラピア *neu4* の遺伝子クローニングおよび性状解析については行われておらず、ティラピアにおける脱シアリル化機構について完全に解明されていない。また、ティラピアはスズキ類に属しており、コイ目やダツ目の Neu4 とスズキ類 Neu4 の細胞内局在は異なる可能性が高い。そこで本研究では、ティラピア Neu4 シアリダーゼのクローニングを行い、酵素学的性状および細胞内局在を明らかにすることにより、ティラピアにおける脱シアリ

ル化の生理的意義を明らかにすることを目的とした。

実験方法

2-1 ティラピア *neu4* の遺伝子クローニング

NCBI データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)より、ティラピア *neu4* (*onneu4*)の予想遺伝子配列を求め、これを基にクローニング用プライマーを設計した。*onneu4* のクローニングには (5'-GTGAATTCCACCATGAGGTCGCCCTATTT-3')および(5'-GTGAATTCTTAAGAC-ACAGAGCACATCTCA-3')のプライマーを用いた。1-2 で調製した cDNA を用いて、1-2 と同様に PCR を行った。得られた PCR 産物をそれぞれ適切な制限酵素で処理し、その後、pBluescript vector (Agilent Technology)にサブクローニングした。サブクローニングされたサンプルは ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いてシーケンス解析した。

シーケンシングで得られた *onneu4* の DNA 配列およびアミノ酸配列のデータをもとに、インシリコ解析を行った。解析には NetNGlyc (N 型糖鎖予想、<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)、NetOGlyc (O 型糖鎖予想、<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) NetPhos (リン酸化部位予想、<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)、cNLS mapper (核移行シグナル予想、http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)の各プログラムを用いた。アミノ酸配列のアライメント作成は GENETYX ver15(GENETYX)を用いて作成した。

2-2 Real time PCR

1-7と同様の方法で、*onneu4*の組織別遺伝子発現を解析した。PCR条件は94 °C 2分加熱後、98 °C 1分間の熱変性、60 °C 10秒のアニーリング、68 °C 30秒の伸長、40サイクルで行った。*onneu4*のプライマーは(5'-CTATGTGGAGTGGGAGGACA-3')および(5'-CAGAAA-GAGAGTACCCGTG-3')を用いた。

2-3 シアリダーゼ活性

ティラピア *Neu4* のシアリダーゼ活性および酵素学的性状を明らかにするため、*neu4* のcDNAを発現用ベクターであるpcDNA3.1にサブクローニングした。その後、1-5と同様の方法で至適pHおよび基質特異性について検討した。

2-4 シアル酸量の測定

培養細胞中の脂質およびタンパク質に結合しているシアル酸量を測定した。まず、細胞のペレットを回収し、PBSで洗浄後、クロロホルム/メタノール(1:2、1:1および2:1、v/v)で脂質画分を抽出した。乾燥させた脂質画分および抽出後の残渣をタンパク質画分とし、0.1 N H₂SO₄で1時間、加水分解し、遊離したシアル酸量を0.8%マロニトリルにより誘導体化した。その後、HPLCにより誘導体化したシアル酸の検出を励起357 nm、蛍光434 nmにて行った。移動相として0.01 M 酢酸アンモニウム (pH 5.5): メタノール (85:15)を用いて、カ

ラムは 4.6×150 mm 5C18-AR-II (nacalai tesque)を用いた。

2-5 細胞内局在

ティラピア Neu4 の細胞内局在を明らかにするために、PCR による Neu4 の C 末端に HA タグ配列の付加を行った。HA タグ配列の付加に用いたプライマーは (5'-TCCAGATTACGCTTAAGAATTCGATATCAA-3')および(5'-ACATCGTATGGGTAAGACACA-GAGCACATC-3')を用いた。PCR は 1-4 と同様の方法で行った。

細胞染色は 1-6 と同様の方法で行った。細胞核の染色は 2-(4-Amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide (DAPI)を用いた。

核輸送阻害は Importazole を用い、25 μ M で 16 時間の曝露とした。その後、1-6 と同様の方法で、間接蛍光体法により Neu4 の局在を解析した。また、Importazole による核輸送阻害の影響を確かめるに、Importazole を取り除いたあとに核輸送が回復するかを観察した。Importazole 曝露後、PBS で 3 回すすぎ (washout)、1 日培養後、細胞染色を行いティラピア Neu4 の細胞内局在を観察した。

2-6 核分画

細胞ペレットを Low-salt wash buffer (10 mM HEPES (pH 8.0)、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.5 mM PMSF)で 10 分間浸潤させた後、Dounce tissue grinder でホモジナイズし

た。懸濁液を 1,300 g で 5 分間遠心分離し、上清 (fraction 1) を取り除いた³⁵。ペレット (fraction 2) を Hypo-osmotic lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、0.25 M スクロース、5 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.1% Triton X-100、0.5 mM PMSF) で再懸濁し、1.2 M sucrose buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、1.2 M スクロース、5 mM MgCl₂、1 mM DTT) に重層し、4 °C、10,000 g、30 分間遠心分離した。上清 2 層をアスピレートし、得られた沈殿を精製核画分 (fraction 3) とした。

核画分の精製度は、ウエスタンブロッティングにより確認した。GAPDH (clone 6C5, Acris Antibodies, Germany) の抗体を細胞質、Lamin A/C (Bethyl Laboratories, USA) の抗体を核のマーカーとして用いた。

2-7 ウエスタンブロッティング

1-4 と同様の方法で行った。

2-8 ティラピア *neu4*-NLS 欠損変異体およびメダカ Neu4 NLS 変異体の作製

核移行シグナル(NLS) を欠損したティラピア Neu4 の作製をインバース PCR により行った。(5'-AGCAAGCTGGCTGGCTGAGATGTGCTCT) および(5'-CACAGGAGTCACCTGTTG-GCAAAC)のプライマーを用いた。PCR 条件は 1-4 と同じ条件で行い、テンプレートは 2-5 で作製した pcDNA-on*neu4*-HA を用いた。

ティラピア Neu4 とメダカ Neu4 が持つ予想 NLS 配列の違いが細胞内局在に関与している

のかどうかを調べるために、メダカ Neu4 の予想 NLS (RPHVKKRRKK)をティラピア Neu4 の NLS (VTPVKKRKK)に置換した。メダカ Neu4 NLS 変異体の構築には、pcDNA 3.1-medaka *neu4*-HA を鋳型とし、(5'-CGTCGCAA-GACCAAAGTGGG-3')および(5'-TCACCGGCTGCA-CAGCAGGTGTCCTT-3')のプライマーを用いて 1-4 と同様に PCR を行った。

実験結果

これまでの報告より、ティラピアのゲノム情報からティラピア *neu4* 遺伝子の存在が予想されている。そこで、実際の *neu4* 遺伝子の塩基配列および Neu4 演繹アミノ酸配列を明らかにするために、ティラピア *neu4* の遺伝子クローニングを行った。PCR により、ティラピア *neu4* のタンパク質をコードする領域である約 1,500 bp のバンドの増幅に成功した。シーケンス解析により、ティラピア *neu4* のタンパク質をコードする領域は 1,497 bp であり、メダカ *neu4* (1,404 bp) やゼブラフィッシュ *neu4* (1,436 bp) と類似した塩基配列をしており、3つのエキソンから構成されることが明らかとなった (図 2-1)。演繹アミノ酸配列を用いて、アライメントを作製した結果、ティラピア Neu4 の相同性はヒト (48.6%)、ゼブラフィッシュ (68.3%)、メダカ (81.8%) であった (図 2-2)。ティラピア Neu4 には Asp-box (Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp)、YRVP、GPG といったシアリダーゼ特有のモチーフ、および触媒部位を形成する 6つの重要なアミノ酸が他のシアリダーゼ同様に保存されていた¹²。本研究で得られた *Tilapia neu4* ヌクレオチド配列には予想 *neu4* 配列 (XM_003454843) と比較し、3つの同義変異 (c.774 C>T、c.1,242 A>G、c.1,371 G>A) と 1つの非同義変異 (c.400 G>A) があり、アミノ酸置換 (D134N) が生じた。これらの変異は他の指宿で捕獲した個体でも確認された。このティラピア *neu4* は Genbank に登録された (accession No: LC055682)。また、ティラピア Neu4 のリン酸化予想部位は、Ser は 22ヶ所 (S45、S47、S128、S197、S227、S253、S304、S317、S319、S322、S323、S326、S327、S332、S334、S337、S382、S394、S405、S407、S465、

S489)、Thr は 11 ヶ所 (T21、T34、T60、T143、T150、T194、T308、T351、T364、T426、T437)、Tyr は 6 ヶ所 (Y91、Y113、Y238、Y396、Y401、Y428) であった。

ティラピア *neu4* の組織別遺伝子発現を調べるために、Real-time PCR を行った。その結果、ティラピア *neu4* mRNA は脳、心臓、眼、筋肉では発現が低く、肝臓と脾臓で発現が高かった (図 2-3)。興味深いことに、ティラピア Neu4 はメダカ Neu4 と高いアミノ酸配列の相同性を示したが、脳で独占的に発現が確認されたメダカ *neu4* とは大きく異なる組織別発現パターンを示した¹⁸。

ティラピア Neu4 の酵素学的性状を明らかにするために、ティラピア *neu4*-HA を含む発現ベクターを HEK293T 細胞に導入し、そのホモジネートを粗酵素液として使用した。このホモジネートを用いてウエスタンブロッティングした結果、単一のバンドが検出され、ティラピア Neu4 のアミノ酸配列から予想される分子量 (56.6 kDa) と一致した (図 2-4)。ティラピア Neu4 は pH 4.0 で最も高い活性を示し (図 2-5)、メダカ Neu4 (pH 4.6) と似ているが¹⁸、ゼブラフィッシュ Neu4 (pH 2.6) とは異なっていた¹⁵。また、ティラピア Neu4 は中性 (pH 7.0) から塩基性 (pH 8.5) までシアリダーゼ活性を維持した。ティラピア Neu4 は 3-シアリルラクトースおよび 6-シアリルラクトースに対して高い活性を示し、ガングリオシド、フェツイン、コロミン酸に対して中程度の活性を示した (図 2-6)。至適 pH を酸性に持つこと、シアロオリゴ糖を良い基質とし、糖タンパク質およびポリシアル酸に対しても高い活性を示すことから、ティラピア Neu4 はメダカ Neu4 と非常に似た酵素学的性状である¹⁸。一方、メ

メダカ Neu4 が基質としないガングリオシドに対して、ティラピア Neu4 は高い活性を示した。そこで、ガングリオシド種における基質特異性を解析するため、GD1a、GM1、GM2 および GM3 に対する活性についても調べた。その結果、ティラピア Neu4 は GD1a および GM3 を良い基質とし、GM1 および GM2 に対してはほとんど活性を示さなかった (図 2-7)。ゼブラフィッシュ Neu4 も GD1a および GM3 を良い基質とするが、至適 pH は pH 2.6 であり¹⁵、異なる酵素学的性状を示す。以上のことから、これまでに報告のあるメダカやゼブラフィッシュ Neu4 とは異なり、ティラピア Neu4 は幅広い pH での活性維持や様々な基質に対しての触媒作用があることが明らかとなった。

細胞内でのティラピア Neu4 の基質を調べるために、ティラピア *neu4* をトランスフェクションした HeLa 細胞より、脂質およびタンパク質画分を調製し、それらに含まれるシアル酸量の変化を調べた。ベクター導入細胞と比較して、*neu4* 遺伝子導入細胞における糖脂質および糖タンパク質に含まれるシアル酸量に差は認められなかった (図 2-8)。このことから、ティラピア Neu4 の触媒作用は限られた複合糖質に対し行われていることが推測された。

免疫蛍光染色により、ティラピア Neu4 の細胞内局在を観察した。その結果、Neu4 導入細胞全体の 90 %以上で核に局在を示すティラピア Neu4 が確認された (図 2-9)。これまで、一部のシアリダーゼが核に局在を示す報告はあるが³⁶、ティラピア Neu4 のように大部分が核に局在を示すシアリダーゼの報告はない。そこで、ティラピア Neu4 の核局在を確認するために、スクロースの密度平衡法による核分画を行った。その結果、一部のティラピア Neu4

は細胞質画分に存在したが、大部分は核画分で確認され、改めて核に局在することが明らかになった (図 2-10)。核画分で得られたティラピア Neu4 の分子量は予想された分子量 55.3 kDa と一致しており、ティラピア Neu4 が糖鎖修飾や切断といった翻訳後修飾を受けて、核に局在しているのではないということが明らかになった。ゼブラフィッシュ Neu4 は小胞体に局在し¹⁵、メダカ Neu4 はリソソームであることから¹⁸、本章の結果と合わせると魚類 Neu4 は魚種ごとに大きく異なる細胞内局在を示すことが分かった。また、ティラピア Neu4 はティラピア肝臓由来の Hepa-T1 細胞だけではなく、哺乳類細胞である HeLa 細胞でも核に局在した (図 2-9)。このことから、ティラピア Neu4 の核局在は種を越えて保存された核輸送メカニズムにより制御されていることが示唆された。

バイオインフォマティクス解析の結果より、ティラピア Neu4 の C 末端側には核移行シグナル (NLS、479-VTPVKRRKKS-490、NLS スコア: 11) が認められた (図 2-11)。NLS とは、核内に輸送されるタンパク質に見られる短いペプチドモチーフで、塩基性のアミノ酸を多く含んでいる。NLS には、1 つの塩基性アミノ酸クラスターをもつ単節型 NLS (monopartite) と、2 つの塩基性アミノ酸クラスターから成る双節型 NLS (bipartite) の 2 タイプが知られており³⁷、ティラピア Neu4 は単節型 NLS のスコアが 11 で、双節型は予想されなかった。一般的に、NLS を持つタンパク質は NLS に Importin α が結合し、その Importin α に Importin β が結合し、3 量体を形成し、Importin β による核膜孔との相互作用により、核内に輸送される³⁸。核内に輸送後、Ran-GTP が Importin β に結合することで、Importin β と Importin α が

解離する。さらに、ヌクレオポリンの1種である Nup50 が Importin α に作用し、輸送されたタンパク質と Importin α が解離し、そのタンパク質は核内に局在する。C 末端に NLS が予想されたことから、ティラピア Neu4 の核局在も同様に、Importin α/β により制御されることが推測された。

そこで、ティラピア Neu4 核局在メカニズムを明らかにするために、NLS の欠損変異体を作製し、その細胞内局在を観察した。もし、ティラピア Neu4 が Importin α/β 複合体により核内に輸送されていれば、NLS 欠損変異体では核局在は完全に消失することが予想された。免疫蛍光染色の結果は予想と一致し、ティラピア Neu4 NLS 欠損変異体では核に局在を示す Neu4 が完全に消失していた (図 2-12)。さらに、Importin β 阻害剤である Importazole を用いて、ティラピア Neu4 の細胞内局在を観察した。Importazole は Ran-GTP と Importin β の相互作用を阻害するジアミノキナゾリン化合物である³⁹。Importazole は細胞毒性があるため、本実験での添加濃度および曝露時間は Yan et al. の報告を参考に³⁹、終濃度 25 μM 、曝露は 16 時間に決定した。その結果、核に存在するティラピア Neu4 の割合が 30%程度減少した (図 2-13)。また、この Importazole を洗い除くことにより、Yan et al. の報告³⁹と同じように核局在が回復し、Neu4 本来の核局在を示した。この結果から、Importazole による Importin α/β 複合体の阻害により、ティラピア Neu4 の核局在が阻害されたことが確認された。以上のことから、ティラピア Neu4 は Importin α/β 複合体により、核膜孔を通り核内に輸送されることが強く示唆された。

ティラピア Neu4 と同様に、メダカ Neu4 およびゼブラフィッシュ Neu4 のアミノ酸配列に対しても cNLS mapper を用いて、NLS スコアの予想を行った。その結果、ティラピア Neu4 と同様にメダカ Neu4 (448-RPHVKKRRKKS-458、NLS スコア:9.5)、ゼブラフィッシュ Neu4 (415-TLLKRRKRIWE-424、NLS スコア:7)でも予想された。特に、メダカ Neu4 は相対的に高い NLS スコアを示したが、実際の細胞内局在は核に示さず、リソソームに局在を示す。そこで、ティラピア Neu4 とメダカ Neu4 の予想 NLS 配列の違いが細胞内局在に影響を与えているのかを明らかにするために、RKK に置換したメダカ Neu4 NLS 変異体を作製し、細胞内局在を観察した。その結果、通常メダカ Neu4 は核局在を全く示さないのに対して (図 2-14)、メダカ Neu4 NLS 変異体は一部が核に局在を示した (図 2-15)。興味深いことに、大部分のメダカ Neu4 NLS 変異体は依然として核以外に局在を示した (図 2-16)。このことから、魚種間の単純な NLS の違いだけではなく、他の因子によってもティラピア Neu4 の核局在は制御されていることが示唆された。

考察

本章では、これまで明らかにされていなかったティラピア *neu4* 遺伝子のクローニングに成功し、その酵素学的性状および細胞内局在を明らかにした。このティラピア Neu4 はこれまで報告のあるシアリダーゼとは異なり核に局在を示しており、本研究ではその核局在メカニズムについても解明した。

ティラピア *neu4* ORF は 1,497 bp で、その演繹アミノ酸配列にはシアリダーゼに特有の YRVP 配列、GPG 配列および Asp-box が存在していた。また、他の動物 Neu4 シアリダーゼとのアミノ酸配列の相同性は高く、ヒト NEU4S と 48.3 %、マウス Neu4 と 48.4%、ゼブラフィッシュ Neu4 と 68.3 %およびメダカ Neu4 と 81.8 %であった。ティラピア Neu4 の酵素学的性状は、至適 pH を 4.0 に示し、酸性からアルカリ性まで活性が維持されており、また様々な基質に対して活性を示した。ティラピア Neu4 が局在を示す核内は pH が 7.2 であることから⁴⁰、ティラピアの酵素学的性状は核シアリダーゼとして適しているといえる。

ティラピア Neu4 は C 末端側に NLS が予想され、その NLS 欠損変異体では核局在が完全に消失した。一般に、NLS を持つタンパク質は Importin α/β 複合体により核膜孔を通り核に輸送されることが知られており、このメカニズムは酵母から哺乳類までに保存されている³⁸。魚類でも Importin α/β 複合体による核輸送は保存されていることが推測され、実際にゼブラフィッシュでは Importin がクローニングされている。ティラピアでは Importin のクローニングは行われていないが、NCBI のデータベース上には遺伝子の存在が予想され、そ

これは哺乳類の Importin α と 70% という高い相同性を示している。そこで、ティラピア Neu4 が Importin α/β 複合体により核内に輸送されるかどうかを調べるために、Importin β の阻害剤である Importazole を用いて、ティラピア Neu4 の細胞内局在を観察した。その結果、核に存在するティラピア Neu4 の割合が 30% 程度減少した。このことより、ティラピア Neu4 は Importin α/β 複合体により核に輸送されることが強く示唆された。NLS を持つタンパク質に代表されるのは DNA の複製に参与する DNA ポリメラーゼ⁴¹ やヒストンと DNA の間に生じる不正確なイオン性の相互作用を阻止している分子シャペロンの 1 種であるヌクレオプラスミンなどが知られている⁴²。このように核局在するタンパク質の多くは核内で遺伝情報の保持や伝達等に参与しており、ティラピア Neu4 も核のシアル酸を制御することにより、このような機能に参与していることが予想される。

また、メダカ Neu4 NLS 変異体の実験より、ティラピア Neu4 の核局在は単純な NLS の違いだけでなく、その他の因子により制御されていることが明らかとなった。一般的に、核に局在を示すタンパク質の多くは NLS 近辺のリン酸化によりその核局在が制御されることが知られている⁴³。ティラピア Neu4 の NLS 周辺にもいくつかの予想リン酸化部位が存在した。リン酸化と核局在の関係については 4 章で検討する。

核には、GM1 および GD1a といった糖脂質、およびヌクレオポリンのような糖タンパク質が存在し、カルシウム/ナトリウムイオンチャネルや核膜孔における輸送に参与している^{44,45}。しかし、これら糖脂質の糖鎖構造がどのように制御されているのかについての解析は

行われていない。また、核における糖タンパク質の報告は少なく、よく分かっていない。例えば、核に存在するシアロ糖タンパク質として、核膜複合体を形成するヌクレオポリンの一種であり NUP62 が知られており、核膜孔での輸送に関与していることが報告されている⁴⁵。しかし、一方でこれらのヌクレオポリンの糖鎖にはシアル酸が含まれないという報告もあり⁴⁶、その見解は一致していない。ティラピア Neu4 は核局在するシアリダーゼであることから、核の糖タンパク質を脱シアリル化することができると予想される。したがって、ティラピア Neu4 は核の糖タンパク質を解析するツールとして応用することができるかもしれない。本研究では、ティラピア Neu4 が核に局在するユニークなシアリダーゼであることを明らかとした。しかし、ティラピア Neu4 の具体的な基質に関して同定することはできなかった。また、ティラピア Neu4 の核での機能についても不明な点が多いことから、更なる研究が必要とされる。

ティラピア Neu4 はこれまで報告のあるシアリダーゼと大きく異なる細胞局在を示した。ゼブラフィッシュ Neu4 は小胞体¹⁵、メダカ Neu4 はリソソーム¹⁸、そして、ティラピア Neu4 は核に局在を示し、魚種間での細胞内局在は大きく異なっている。これは魚種ごとに Neu4 が別々の進化を遂げたことを示唆している。一般に、ティラピアはメダカやゼブラフィッシュと比較して温度や塩度といったストレスに対して高い耐性を示す⁴⁷。細胞にストレスがかかるとインポーチンファミリーによる細胞内輸送は低下し、Hikeshi などのインポーチンファミリー非依存的輸送機構により、Hsp などが核に輸送される。このようなインポーチンフ

ファミリー非依存的核輸送は、核膜孔の糖鎖構造変化により制御されている⁴⁸。ティラピアの他魚種に比べストレス耐性が高い理由として、ティラピア Neu4 の核での脱シアリル化が関与しているかもしれない。すなわち、核膜孔にはシアル酸を含む糖鎖が存在することから⁴⁵、ティラピア Neu4 による脱シアリル化がストレス下での核輸送の変化を制御している因子である可能性が考えられる。今後はティラピア Neu4 の生理機能を解明することにより、魚類 Neu4 が多様性を示した理由の解明に繋がる可能性がある。

```

1 atgagggtcgccctatctccagccagatctgtgcttttccacaaggagccgaacggagtg 60
M R S P Y F P A R S V L F H K E P N G V
61 acgtacagaggtccccagctctgtctctacctgcccccgctccacacatctttctggcctctgt 120
T Y R V P A L L Y L P R (S) T S F L A F C
121 gagggagaggctcagccccgtccgactctcaggctcactgctgggtgtgaggaaaggcact 180
E E R L S P S D S Q A H L L V V R K G T
181 ttctacaggaactatgtggaggggagacatccgtgttctggggcactgctttctctgcca 240
F Y R N Y V E W E D I R V L G T A F L P
241 ggccaccgatccatgaacccgtgccccgtctacgatgagttcaccgggtactctctttctg 300
G H R S M N P C P V Y D E F T G T L F L
301 ttcttcacgtgctgttctgggtcacacccctcagagttcctaccagctgggtgacggggaagaac 360
F F I A V L G H T S E S Y Q L V T G K (N)
361 gtgaccagactgtgtctacgtctccagcactgatgatggcaacacgtggagttccccgact 420
V T R L C Y V S S T D D G N T W S P V T
421 gacctcaccagaaggctcataggagacactatcaaaagaatggggccactctctctgggc 480
D L T K K V I G D T I K E W A T F A L G
481 cggggccacggcatccagctgaagtggggcgggtttgctcattccctgctaccgctaccac 540
P G H G I Q L K S G R L L I P A Y A Y H
541 atcgagtgcaaaagagtgctctgggcaacctctgcccagaccactccccactctctctgcttt 600
I E C K E C F G H L C Q T T P H S F C F
601 cacagcgacactcaccgggagaaacctggcgctttggagaggcgggtccccagggccagagacc 660
H S D T H G R T W R F G E A V P G P E T
661 gtggagtgctcagatgggtgtctgttgagcaagaggatgggactaacgtgtttgtactgtaat 720
V E C Q M V S V D E E D G T N V L Y C N
721 gctcgcagccctctcgggtacagagtgccaggccccctcagctctggacgagtgagctgtgttt 780
A R S P L G Y R V Q A L S L D D G A V F
781 caggaggggacagctgggtgcagcggctgggtggagcctcaaaaatgggtgtcattgggagatt 840
Q E G Q L V Q R L V E P Q N G C H G S I
841 attggtatctcctgccccgttaaatctgtgtcagagttcttagcaacgatttacagcaacct 900
I G F P A P L N L C Q S L S N D L Q Q P
901 gtaaggctctccagacactggacatcctgcaaccacagagttccagttctctccacatcgagt 960
V R L (S) R H W (T) (S) C (T) (T) E (S) (S) L (S) (T) (S) (S)
961 accagctctgtagcctctcagtgctcagcaaacagctccagcaccaccagctccatccca 1020
(T) (S) (S) V A (S) (S) V (S) A N (S) (S) (S) (T) (T) (S) (S) I P
1021 cctcctcaaaaagccccctccggatctctgactcctacctgggtagtatattccccaccgg 1080
P P H K A P P D F L T P T W V V Y S H P
1081 acatggagcactgcacgcaaaaacctgggcttggctcctcagcctttttcccccgagatcca 1140
T W T T A R K N L G L F L S L F P R D P
1141 gacagctggcgtggccccctgggtgatctatgatgggcccagagcgcctactctgacctggccc 1200
D S W R G P W V I Y D G P S A Y S D L A
1201 taccggagctgtcaccctcaccctggagccccacctgctgtggcattcgcctgctgttt 1260
Y L E L S P S P G A P P A V A F A C L F
1261 gagtgtgggtacaaaaacagcttacgacgaaaatctgcttcagcatcttccacctctacgag 1320
E C G T K T A Y D E I C F S I F T L Y E
1321 cccatcgataatctgccccgggaagtttggctggaacaaacaaacgaaggacacagaaaa 1380
L I D N L P R E V W L E T N N E G H R K
1381 cagcaggggaggagctgcagacatgatgctcaaaagtcagcagtttggccaacaggtgact 1440
Q Q G R S C R H D A Q S A A V C Q Q V (T)
1441 cctgtgaagaagaggaggaagaagagcaagctggctgagatgtgctctgtgtcttaa 1497
P V K K R R K K S K L A E M C S V S *

```

図 2-1 ティラピア *neu4* 塩基配列および Neu4 アミノ酸配列

□は開始メチオニン、*は終止コドンを表している。縦線はエキソン-イントロンの境界を示している。□で囲まれたアスパラギンは予想 N 型糖鎖付加部位、○で囲まれたセリンやスレオニンは予想 O 型部位、太字は予想リン酸化部位を表している。

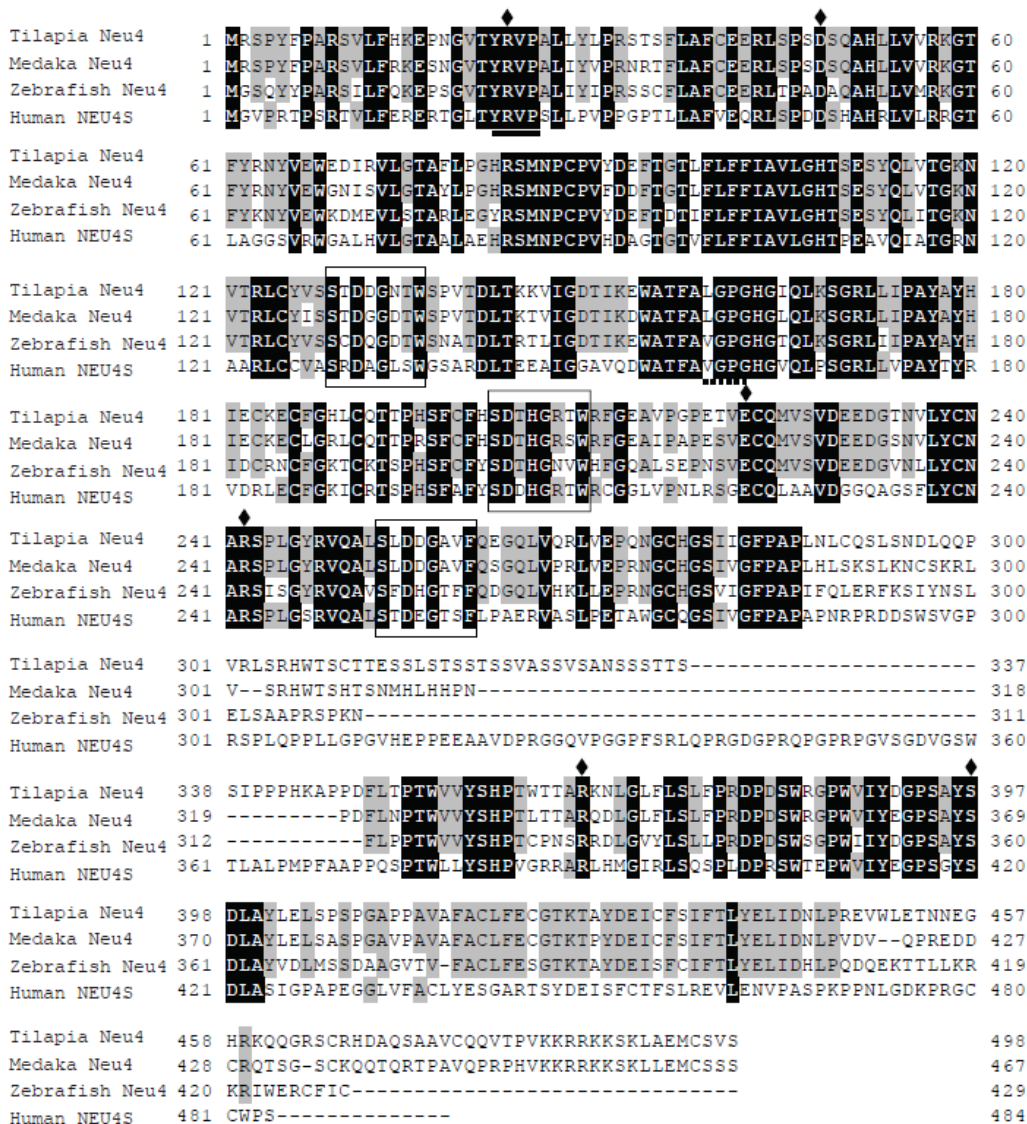


図 2-2 ティラピア Neu4、メダカ Neu4、ゼブラフィッシュ Neu4 およびヒト NEU4S のアミノ酸配列アライメント

実線で囲まれている部分が Asp-box、破線で囲まれている部分が GPG 配列、太線は RVP 配列を表している。また、菱形はシアリダーゼ活性に重要なアミノ酸を示している。100%の相同性を示すアミノ酸を黒、部分的な相同性 (>50%)を示すアミノ酸は灰色で表している。

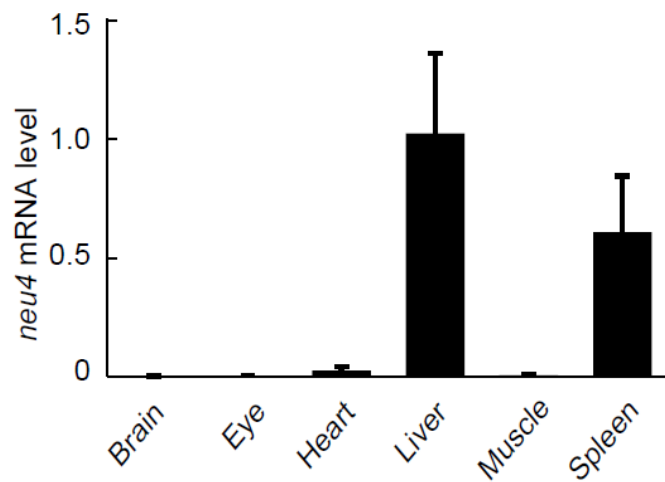


図 2-3 ティラピア *neu4* の組織別遺伝子発現

ティラピア組織から total RNA を抽出し、cDNA 合成を行った。*neu4* mRNA の遺伝子発現量は特異的なプライマーを用いて、リアルタイム PCR により測定した。内部標準として *actb* を使用し、発現量の補正を行った。

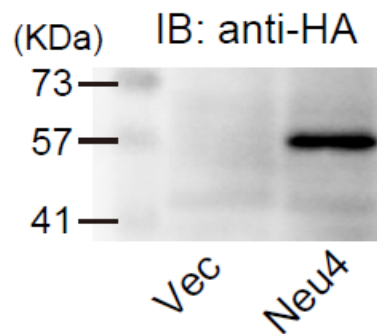


図 2-4 ティラピア Neu4 のウエスタンブロッティング

pcDNA3.1 ベクター (Vec) または pcDNA3.1-ティラピア *neu4*-HA (Neu4) をトランスフェクションした細胞からホモジネートを調製し、ウエスタンブロッティングに供した。1 次抗体に anti-HA、2 次抗体に HRP 結合抗ラット IgG を用いて Neu4 を検出した。

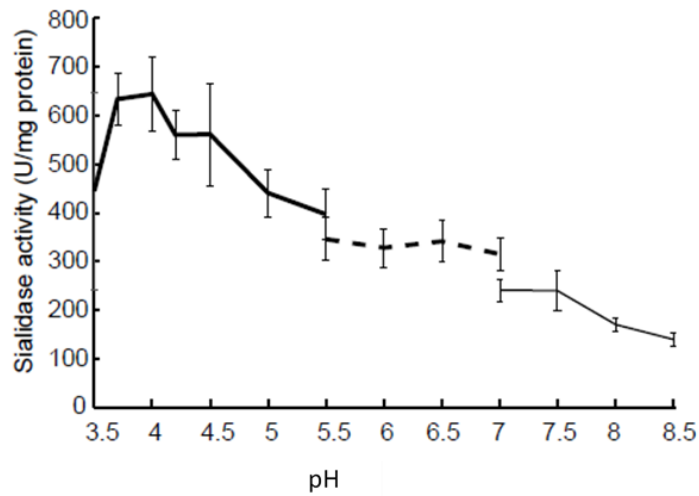


図 2-5 ティラピア Neu4 の至適 pH

ティラピア Neu4 を発現させた細胞より粗酵素液を調製し、各 pH におけるシアリダーゼ活性を測定した。太線は酢酸バッファー、点線はリン酸バッファー、細線は HEPES バッファーでの結果である。

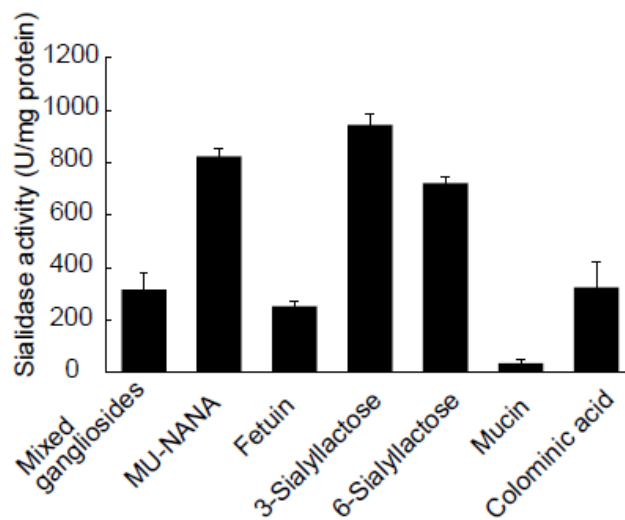


図 2-6 ティラピア Neu4 の基質特異性

ティラピア Neu4 を発現させた細胞より粗酵素液を調製し、各基質に対するシアリダーゼ活性を測定した。TBA 法にて遊離シアル酸量を測定し、シアリダーゼ活性を求めた。

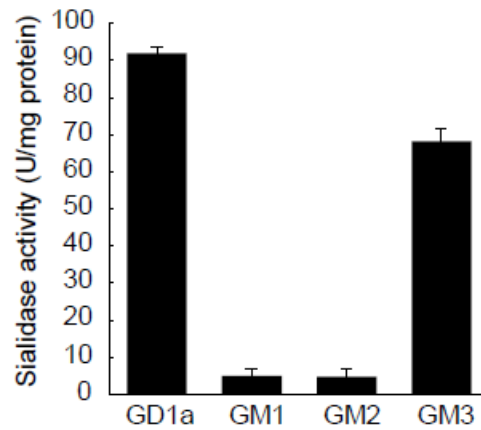


図 2-7 ティラピア Neu4 の各種ガングリオシドに対する基質特異性

ティラピア Neu4 を発現させた細胞より粗酵素液を調製し、各ガングリオシドに対するシアリダーゼ活性を測定した。TBA 法にて遊離シアル酸量を測定し、シアリダーゼ活性を求めた。

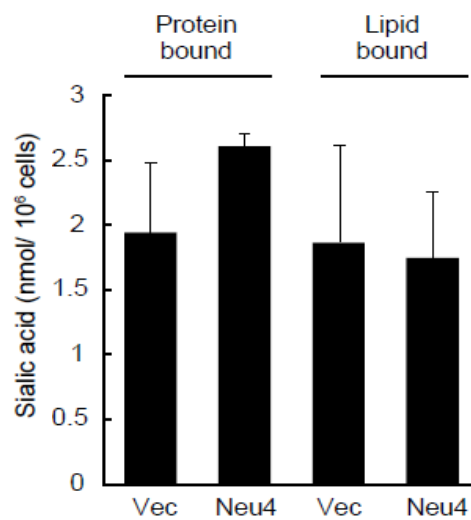


図 2-8 ティラピア Neu4 導入細胞の脂質およびタンパク質由来シアル酸含量

ティラピア Neu4 導入細胞よりタンパク質画分および脂質画分を調製し、0.1N H₂SO₄ で加水分解し、シアル酸量を測定した。

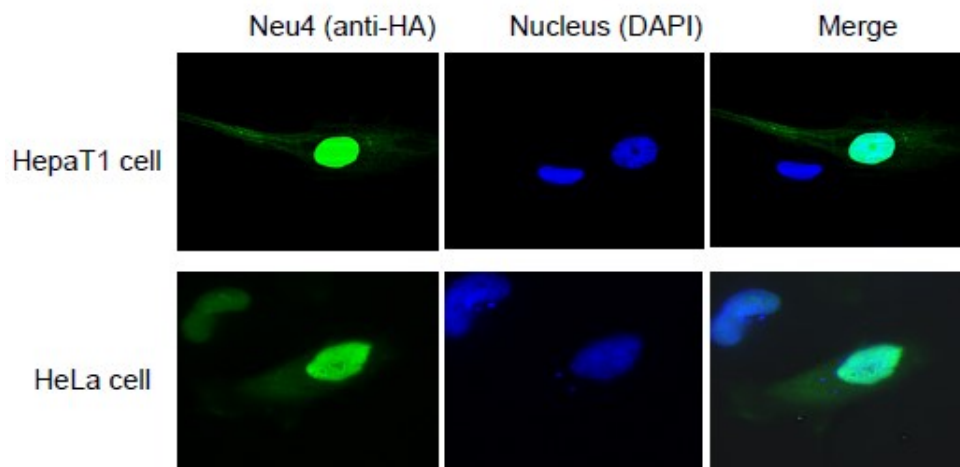


図 2-9 ティラピア Neu4 の蛍光染色による細胞内局在

各培養細胞にティラピア *neu4*-HA をトランスフェクションし、間接蛍光抗体法により観察を行った。核の染色には DAPI を用いた。

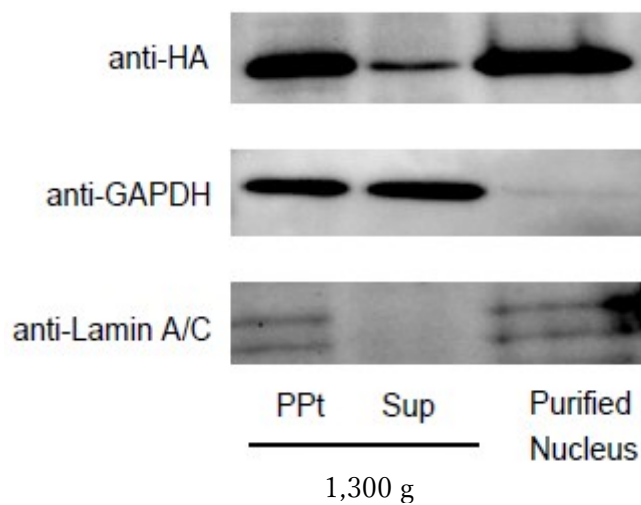


図 2-10 細胞分画によるティラピア Neu4 の細胞内局在

ティラピア Neu4 を発現させた細胞を用いて、核分画を行った。分画はスクロースの密度平衡法により行った。得られた各画分はウエスタンブロッティングに供し、Neu4 量について検討した。核画分マーカーとして anti-Lamin A/C、細胞質マーカーとして anti-GAPDH を用いた。

cNLS Mapper Result

Predicted NLSs in query sequence	
MRSYPFPARSVLFHKEPNGVTYRVPALLYLPRSTSFLAFCEERLSPSDSQ	50
AHLLVVRKGTfYRNYVEWEDIRVLGTAFLPGHRSMNCPVYDEFTGTLFL	100
FFIAVLGHTSESYQLVTGKNVTRLCYVSSDDGNTWSPVTDLTkkVIGDT	150
IKEWATFALGPGHGIIQLKSGRLLIPAYAYHIECKEFCGHLCQTTPHSFCF	200
HSDTHGRTWRFGEAVPGPETVECQMVSVDDEEDGTVNLYCNARSPLGYRVQ	250
ALSDDGAVFQEGQLVQRLVEPQNGCHGSIIGFPAPLNLCQSLSNDLQQP	300
VRLSRHWTSCTTESSLSTSSTSSVASSVSANSSSTSSIPPHKAPPDFL	350
TPTWVVYSHPTWTTARKNLGLFLSLFPRDPDSWRGPWVIYDGPSAYSDLA	400
YLELSPSPGAPPAVAFACLFECGKTAYDEICFSIFTLYELIDNLPREVW	450
LETNNEGHRKQQGRSCRHDAQSAAVCQQ VTPVKRRRKKSKLA EMCSVS	498

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
479	VTPVKRRRKKK	11
481	PVKKRRRKKSK	9
482	VKKRRRKKSKLA	9.5

Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score

図 2-11 ティラピア Neu4 の核移行シグナル予想

cNLS mapper を用いて、ティラピア Neu4 の NLS を予想した。NLS score が高いほど、核輸送される可能性が高くなる。monopartite NLS は単節型 NLS を、bipartite NLS は双節型 NLS を表す。

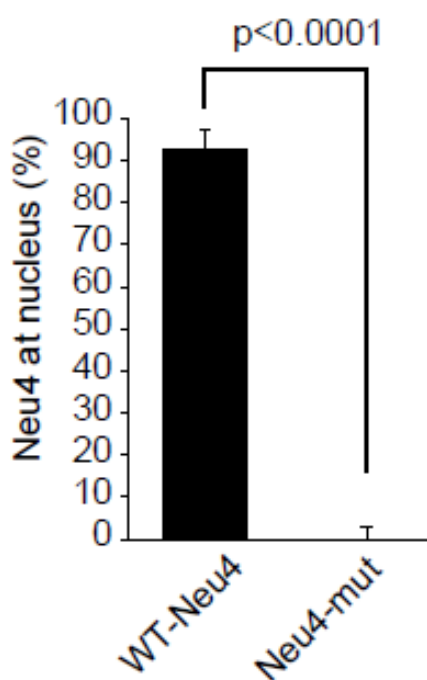
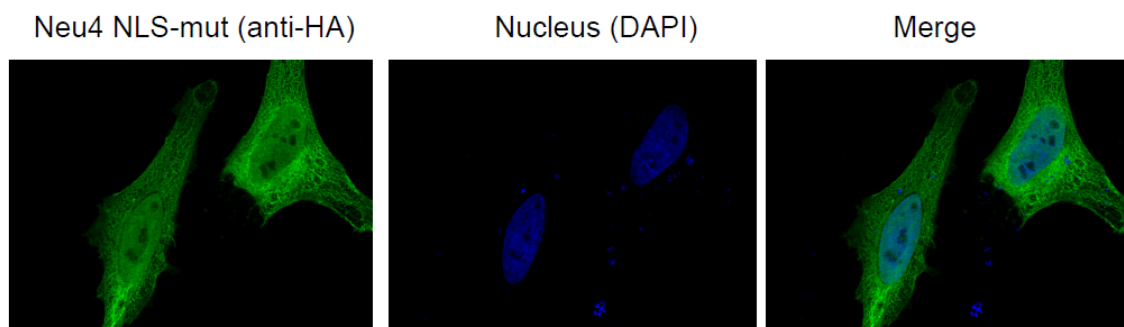


図 2-12 ティラピア Neu4 核移行欠損変異体の細胞内局在

ティラピア Neu4 NLS 欠損変異体を作製し、免疫蛍光染色により、その細胞内局在を観察した。WT-Neu4 はティラピア Neu4 を表しており、Neu4-mut はティラピア Neu4 NLS 欠損変異体を表している。核局在を示す Neu4 導入細胞の割合は、ランダムに顕微鏡下で 5 視野を選び、そこに含まれる細胞数をカウントした。

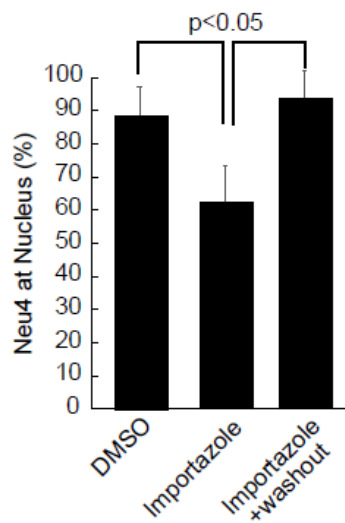
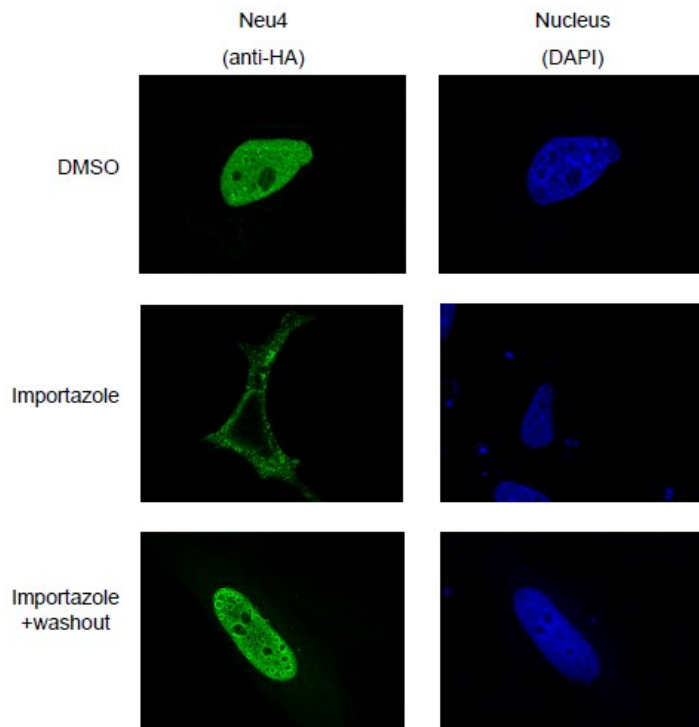


図 2-13 Importazole を添加した際のテトラピア Neu4 の細胞内局在

Importazole を添加し、16 時間曝露した後、テトラピア Neu4 の細胞内局在を免疫蛍光染色により観察した。また、曝露後に PBS で Importazole を洗い除き、1 日後に観察したものを washout として表した。

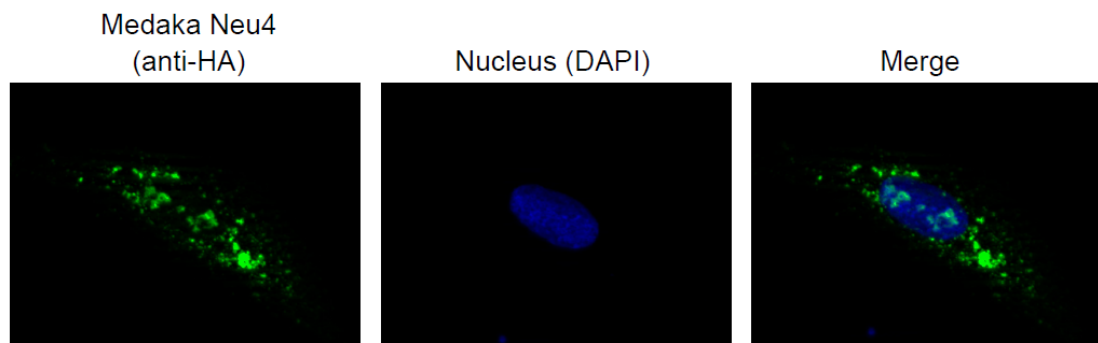


図 2-14 メダカ Neu4 の蛍光染色による細胞内局在

Hepa-T1 細胞にメダカ *neu4*-HA をトランスフェクションし、間接蛍光抗体法により観察を行った。

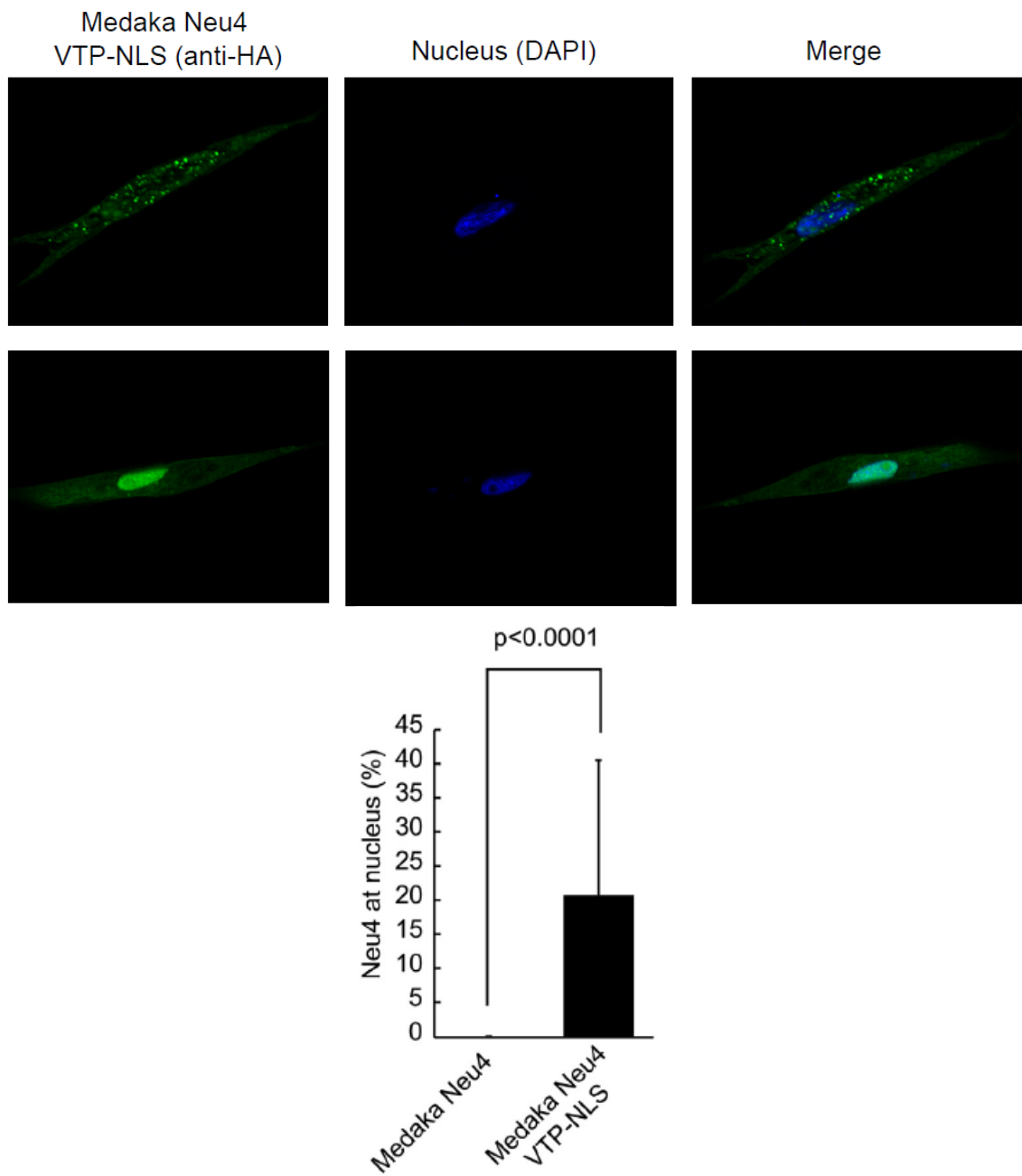


図 2-14 メダカ Neu4 NLS 変異体の細胞内局在

メダカ Neu4 NLS 変異体を作製し、免疫蛍光染色により、その細胞内局在を観察した。Medaka Neu4 VTP-NLS はメダカ Neu4 NLS 変異体を表している。核局在を示す Neu4 導入細胞の割合は、ランダムに顕微鏡下で 5 視野を選び、そこに含まれる細胞数をカウントした。

第3章 ティラピア胚発生
の
神経新生における
ティラピアシアリダーゼの生理機能

背景および目的

神経新生は脳や網膜といった中枢神経系器官の形成に重要である。胚発生における神経新生により、中枢神経の様々なニューロンが生み出される⁴⁹。神経新生は、細胞増殖、細胞運命特定、神経細胞の成熟、分化、シナプス統合といったものを含み、哺乳類ではこれらについての詳細な研究が行われている⁵⁰。最近では、シアロ複合糖質が糖鎖の脱シアリル化を介して、哺乳類の神経新生に重要な役割を果たしていることが報告されている。例えば、海馬に豊富に存在する神経細胞接着分子は、 α 2-8 結合シアリ酸のホモポリマーであるポリシアリル酸を持っている⁵¹。ポリシアリル酸は、高い負電荷、高い水和性による陽イオンとの結合性といった特性を神経細胞接着分子に付与する。神経細胞接着分子に存在するポリシアリル酸は哺乳類の胚発生における神経系で有意に増加し、その後、出生前に劇的に減少する⁵²。このようなことから、神経細胞接着分子は、脊髄形成、神経発生、シナプス可塑性、神経インパルスの伝達など、中枢神経に不可欠な多くの機能を担っている⁵³。また、ガングリオシドの合成系または分解系の遺伝子欠損マウスの実験結果より、ガングリオシドが中枢神経の正常な発生に必要であることが知られている。GM2/GD2 合成酵素⁵⁴、GD3 合成酵素⁵⁵、Gb3 合成酵素⁵⁶、LacCer 合成酵素⁵⁷の各ノックアウトマウス、および GM2/GD2 合成酵素と GD3 合成酵素のダブルノックアウトマウス⁵⁸の全てで中枢神経系の異常が認められた。また、発達や成長に伴いマウス脳組織のガングリオシド組成も変化する。胎生 12–14 日目という発生の初期段階では、脳組織には単純な構造のガングリオシドである GM3、GD3 が

主として存在する。胎生 16 日目以降の、神経突起の伸長やシナプス形成などの分化段階においては、GM1、GD1a、GD1b および GT1b などの成熟型ガングリオシドが増加し、脳組織の主成分となる。成体の脳におけるガングリオシドは、総量が徐々に減少するとともに、その成体における組成も加齢とともに徐々に変化する⁵⁹。

シアリダーゼは複合糖質の機能を制御する調節因子の 1 つである。リソソームのシアリダーゼである Neu1 はマウス脳の細胞表面に存在するポリシアル酸からシアル酸を遊離することにより、正常な神経移動に関与している⁶⁰。また、神経成長因子によるラット褐色細胞腫 PC12 細胞の分化過程で、細胞質シアリダーゼ Neu2 の mRNA レベルが増加することが知られている⁶¹。細胞膜に局在するガングリオシド特異的シアリダーゼ (Neu3) は、マウス神経発生時に細胞表面で高極性のガングリオシドから低極性のガングリオシドに変化させる⁶²。さらに、ラット海馬ニューロンにおいて Neu3 の過剰発現は軸索成長と軸索再生を促進する⁶³。また、マウスの Neu4 は神経細胞接着分子からシアル酸を取り除き、海馬ニューロンのニューロン形成を負に制御している³³。神経新生において、これらのシアリダーゼは様々な場所で、シアロ複合糖質に対して作用している。

しかし、魚類の神経新生におけるシアリダーゼの機能については明らかにされていない。哺乳類の神経新生が胚発生の時期のみしか見られないのとは対照的に、魚類では中枢神経系の神経新生が成長に伴い行われており、生涯を通じて行われている⁶⁴。また、魚類の神経新生は温度⁶⁵、光⁶⁶、生態学的地位¹⁰、生息地⁶⁷などといった環境要因によって影響を受け

やすく、哺乳類の神経新生とは異なり柔軟性があることが示唆されている。また、前述したように哺乳類シアリダーゼの神経新生における機能が明らかになっているが、魚類シアリダーゼでは哺乳類と異なるパラログ数が存在することから、神経新生においても特異的な生理機能を持つことが予想される。ゼブラフィッシュは、1つの *neu1* 遺伝子、5つの *neu3* 遺伝子 (*neu3.1*、*neu3.2*、*neu3.3*、*neu3.4*、*neu3.5*)および単一の *neu4* 遺伝子を持つ¹⁵。メダカでは単一の *neu1* と *neu4* 遺伝子、2つの *neu3* 遺伝子 (*neu3a* と *neu3b*)が存在する¹⁷。魚類 Neu1 は至適 pH、基質特異性、細胞内局在などの酵素学的特性が、哺乳類と似ており、魚種間でも保存されている。メダカ Neu3a は哺乳類 Neu3 と類似した酵素学的性状を示すが、メダカ Neu3b は細胞質に局在し、筋芽細胞の分化を促進する¹⁷。魚類 Neu4 は Neu1 や Neu3 とは異なり、酸性から中性の pH で活性を示し、様々な基質に対して活性を示す。さらに、魚類 Neu4 は魚種間で異なる細胞内局在を示す。メダカ Neu4 はリソソームに局在するが¹⁸、ゼブラフィッシュ Neu4 は小胞体に局在する¹⁵。また、ゼブラフィッシュにおける胚発生の遺伝子発現は各シアリダーゼで異なる発現パターンを示している¹⁵。同様に、メダカの胚発生においても各シアリダーゼの発現パターンは異なっているが、そのパターンはゼブラフィッシュとも異なっている¹⁸。したがって、魚類の神経新生においてシアリダーゼは魚種ごとに異なる機能を持つと考えられる。

本章では引き続き、前章までですべての脱シアリル化経路が明らかになったティラピアを用いて解析した。メダカやゼブラフィッシュと異なり、胚発生における各ティラピアシア

リダーゼの遺伝子発現は明らかにされておらず、脱シアリル化の意義についても明らかになっていない。そこで、本研究では、胚発生におけるシアリダーゼ遺伝子の発現、およびティラピア仔魚と神経細胞を用いて神経新生におけるティラピアシアリダーゼの関与について解析を行った。

実験方法

3-1 ティラピア人工授精および飼育実験

指宿で採捕した野生のナイルティラピアを 28 ± 1 °C、14/10-h の明暗周期で飼育した。人工授精を行うために、雌雄それぞれに 0.1% トリカインを用いて麻酔をかけ、腹部を頭蓋骨方向から肛門に向け軽く押し、精子と卵をそれぞれ得た。得られた精子と卵をシャーレに入れ、数分間穏やかに混合し、その後、飼育水で洗浄した。人工受精後、受精卵を循環水槽の流水により穏やかに攪拌しながら培養した。受精後 12、24、36、48、60、72、84、96、120 および 144 時間に胚をサンプリングした。また、飼育実験のため、受精後 7 日の仔魚を 14/10-h の明暗周期、または 24-h 暗期の 2 L 水槽に移し、2 週間飼育した。給餌は受精後 12 日より、市販飼料を与えた。リアルタイム PCR および酵素活性測定に用いるティラピア頭部は切除後、使用するまで -80 °C で保存した。

3-2 組織染色

ティラピア仔魚を 4 °C の Boulin 溶液で固定し、段階的なエタノール系列 (70%、80%、90% および 100%) で 1 時間ずつ脱水した。その後、キシレンに浸し、1 時間の振とうを 3 回繰り返した。次に、試料をパラフィンに包埋し、マイクロトームで 6 μ m の厚さで切片化し、スライドガラスに張り付けた。切片をキシレン中で 5 分間、脱パラフィン化した後、段階的なエタノール系列 (100%、90%、80% および 70%) で 5 分間、脱水した。各切片はヘマトキシ

リンおよびエオジンで染色し、段階的なエタノール系列 (70%、80%、90%および 100%)で連続的に脱水を行った。切片を封入し、顕微鏡で観察した。

3-3 細胞培養およびトランスフェクション

マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞 (RIKEN CELL BANK)は、10% FBS を添加した DMEM 培地を用いて、5% CO₂、37°Cのインキュベーターで培養した。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞 (RIKEN CELL BANK)は、10% FBS、2 mM L-グルタミン酸、1 mM ピルビン酸ナトリウムを添加した Ham's F12:Dulbecco's modified Eagle's medium を 1 : 1 で培養し、コラーゲンでコーティングしたディッシュで培養した。発現プラスミドをポリエチレンイミン法でトランスフェクションした。

3-4 シアリダーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ活性測定

ライセートはリシスバッファー (50 mM HEPES、0.15 M NaCl、1% NP-40、2 mM EDTA、2 mM PMSF、10 µg/mL ロイペプチン、0.25% デオキシコレート)を用いて調製した。シアリダーゼ活性の測定は 1-5 と同様の方法で行なった。

アセチルコリンエステラーゼ活性は 8 mM Tris-HCl (pH 8.5)、2 mM アセチルチオコリン、25 nM ジチオニトロ安息香酸を用いて、37°Cで 10 分間反応をした。反応後、412 nm で吸光度を測定した。

3-5 リアルタイム PCR

1-7と同様の方法で、*neu1a*、*neu1b*、*neu3a*、*neu4*、*rh1* および *actb* の遺伝子発現を測定した。PCR 条件は 94 °C 2 分加熱後、98 °C 1 分間の熱変性、60 °C 10 秒のアニーリング (*neu1a*、*neu3a*、*neu4*、*rh1* および *actb*)または 65°C 10 秒のアニーリング (*neu1b*)、68 °C 30 秒の伸長、40 サイクルで行った。*rh1* 発現解析用プライマーは予想配列(accession number: XM_003438995)に基づいて設計した。各遺伝子の検量線は、サンプルを段階的に希釈した系列を用いて作成した。内部標準遺伝子として *actb* を使用した。

3-6 細胞内局在

1-6と同様の方法で行った。

3-7 レチノイン酸誘導による神経突起形成

細胞を 6 cm ディッシュに $2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度で播種した。細胞接着後、Neuro2a 細胞は 20 μM レチノイン酸、SH-SY5Y 細胞は 10 μM レチノイン酸を添加し、2% FBS を含む培地に交換した。神経分化を定量化するために、直径の少なくとも 1.5 倍 (Neuro2a 細胞)または 2.0 倍 (SH-SY5Y 細胞)の長さの神経突起を有する細胞を分化とみなした。細胞は、各ディッシュ内のランダムに選択された 5 つの視野で計数した。

3-8 細胞増殖

Neuro2a 細胞は 2.5×10^4 /mL、SH-SY5Y 細胞は 2.0×10^5 /mL で 96 well プレートに播種した。

Cell counting kit 8 (Dojindo Molecular Technologies, Japan)を用いて、プロトコルに従って4日間細胞増殖を計測した。吸光度 450 nm で記録し、相対的な増殖能を算出した。

3-8 核のタンパク質および脂質由来のシアル酸量

テトラピア *neu4*-HA をトランスフェクションした Neuro2a 細胞および SH-SY5Y 細胞より、2-6 と同様の方法で核を精製した。精製した核を DNase および RNase 処理し、クロロホルム/メタノール (1:2、1:1 および 2:1、v/v)で脂質画分を抽出した。乾燥した脂質画分および抽出後の残渣 (タンパク質画分)を 0.1 N H₂SO₄ で 80 °Cで 1 時間加水分解し、2-diamino-4,5-methylene-dioxybenzene (DMB)により誘導体化された遊離したシアル酸を HPLC で測定した。DMB-シアル酸を逆相カラム (COSMOSIL5C18-MS-II、4.6ID×250 nm、nacalai tesque)で分離し、励起波長 373 nm と発光波長 448 nm で検出した。

実験結果

ティラピア発生段階におけるシアリダーゼの発現変化を調べるために、様々な発生段階(受精後 12、24、36、48、60、72、84、96、120 および 144 時間後)における *neu1a*、*neu1b*、*neu3a* および *neu4* の遺伝子発現をリアルタイム PCR で定量した。受精後 12-48 時間後では全てのシアリダーゼ遺伝子の発現がごくわずかであった。その後、*neu1a* の mRNA レベルは、受精後 72-84 時間後の間に急激に増加し、受精後 84-144 時間後の間で減少した (図 3-1 A)。一方、*neu1b* の発現は、受精後 84-144 時間後の間で大きな変化はなかった (図 3-1 B)。興味深いことに、*neu3a* の遺伝子発現は受精後 84 時間後から 120 時間後までに徐々に上昇し、受精後 144 時間後で急激に減少した (図 3-1 C)。*neu4* の発現が最も高かったのは受精後 84 時間後であった(図 3-1 D)。また、*neu3a* の発現量は全ての発生段階において、他のシアリダーゼよりも高く、*neu4* は全ての発生段階で最も発現が低かった。以上の結果から、各シアリダーゼの発生段階における発現パターンは異なっており、それぞれのシアリダーゼが異なる基質を加水分解することが示唆された。

神経新生におけるシアリダーゼの機能を明らかにするために、暗条件を用いた飼育実験を行った。一般に、魚類は暗条件で飼育することで初期発生における神経新生が遅れることが知られている⁶⁶。人工受精後、孵化した仔魚を 1 週間飼育後に、無作為に 2 つの水槽に分けた。一方のグループは 14/10-h の明暗周期 (明条件)で飼育し、もう一方のグループは 24-h の暗条件(暗条件)で飼育した。暗条件の飼育個体は生残率に影響を与えなかったが明条件

よりも色素沈着した体表を示した (図 3-2)。また、暗条件で飼育したティラピアは背骨がやや曲がっている個体が多く存在した。暗条件による暗順応を確認するために、光受容体である *rh1* 遺伝子の発現をリアルタイム PCR で測定した。その結果、暗条件で飼育したティラピアでは明条件で飼育したティラピアに比べ、*rh1* の発現量が有意に増加していた (図 3-3)。このことから、他の魚類と同様に⁶⁸、暗条件により光受容体の発現が上昇することが確認された。

これまでの組織学的解析により、シクリッドやニジマスなどの魚で、無光環境で飼育すると網膜や脳の発育遅延や奇形が生じることが報告されている^{66,69}。そこで、飼育したティラピアの脳切片を解析したところ、暗条件で飼育したティラピアで視神経に隣接する網膜の神経節細胞数が減少していた (図 3-4)。この結果は、*O. leucostictus* を暗条件で飼育した際に見られた網膜の発達遅延と一致していた⁶⁶。次に、網膜の発達遅延を確認するために、神経細胞の成熟や生存に関与するアセチルコリンエステラーゼ活性を解析した⁷⁰。その結果、暗条件で飼育したティラピアでは、明条件で飼育したティラピアと比べて、アセチルコリンエステラーゼ活性が有意に低下した (図 3-5)。これらの結果は、暗条件がナイルティラピアの網膜における神経細胞の生存や分化に影響していることが示唆された。

これまでの報告で、暗闇で飼育された *O. mossambicus* において、シアリダーゼ活性が低下することが明らかにされている⁷¹。しかし、複数存在するシアリダーゼのうち、どのシアリダーゼ遺伝子が寄与しているかについては同定されていない。そこで、本研究では、暗条

件で飼育したティラピアのシアリダーゼ活性がどのように変化するかを確認した。一般にティラピアのシアリダーゼは、酸性 pH での活性を示すシアリダーゼ (Neu1a、Neu1b および Neu3a)と、酸性および中性 pH で活性を示すシアリダーゼ (Neu4)の 2 つのグループに分類される⁷²。そこで、飼育したティラピアより調製したライセートを用いて、酸性 pH および中性 pH でシアリダーゼ活性を測定した。その結果、シアリダーゼ活性は酸性 pH (pH 4.0)では明条件と暗条件で飼育したティラピア間では有意な差は認められなかった (図 3-6)。一方、中性 pH では、暗条件で飼育したティラピアのシアリダーゼ活性が明条件で飼育したティラピアに比べ有意に減少していた (図 3-6)。この結果より、暗条件では Neu4 シアリダーゼの活性が低下していることが予想された。そこで、このシアリダーゼ活性の低下が Neu4 に起因するのかが確認するため、*neu1a*、*neu1b*、*neu3a* および *neu4* の発現量をリアルタイム PCR で測定した。その結果、*neu1a*、*neu1b* および *neu3a* の mRNA レベルは明条件と暗条件では差が認められないが (図 3-7 A B C)、*neu4* の mRNA レベルは暗条件で飼育されたティラピアで有意に減少していた (図 3-7 D)。これらのことから、暗闇条件下でのシアリダーゼ活性の減少は、Neu4 の発現及び活性の低下が減少であることが強く示唆された。

今回の飼育実験により、暗条件はナイルティラピアの網膜の発達を遅らせ、*neu4* の遺伝子発現を低下させることが明らかとなった。発生段階における神経新生には、細胞増殖、アポトーシス、神経分化などが含まれている。そこで、ティラピア Neu4 が細胞増殖またはアポトーシスに参与するののかについて解析するために、哺乳類の神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細

胞および Neuro2a 細胞)を用いて解析を行った。まずティラピア *neu4*-HA またはベクターをトランスフェクションした SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞のシアリダーゼ活性を測定した。ティラピア *neu4*-HA をトランスフェクションした SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞は、モック細胞と比較し、それぞれ 270 倍および 380 倍の高いシアリダーゼ活性を示した(図 3-8)。さらに、SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞におけるティラピア Neu4 の細胞内局在を解析した。その結果、SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞で、ティラピア Neu4 は核局在を示した(図 3-9)。このことから、ティラピア Neu4 が核の糖タンパク質または糖脂質に作用している可能性が示唆された。そこで、ティラピア Neu4 を発現させた SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞を用いて、核糖タンパク質および糖脂質由来のシアル酸量の変化を調べた。この結果、SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞において、ティラピア Neu4 を発現させた細胞で核の糖タンパク質および糖脂質由来のシアル酸量が減少しており、ティラピア Neu4 は核の複合糖質を基質としていることが示唆された(図 3-10)。哺乳類において一部のシアリダーゼが細胞の増殖やアポトーシスに関係していることから、ティラピア Neu4 の細胞増殖またはアポトーシスへの関与について解析した。その結果、いずれの細胞株においてもティラピア Neu4 による細胞増殖の変化は認められず、ティラピア Neu4 がアポトーシスの誘導や細胞増殖に関与しないことが明らかとなった(図 3-11)。次に、ティラピア Neu4 の神経突起形成への影響を調べた。レチノイン酸未処理条件下では、ティラピア *neu4*-HA をトランスフェクションした SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞においてモック細胞同様に神経

突起形成は生じなかった (図 3-12)。しかし、レチノイン酸による分化誘導後 24 時間、48 時間および 78 時間後において、SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞のどちらの Neu4 導入細胞においてもモック細胞に比べ有意に神経突起の伸長が亢進されていた。この Neu4 による神経細胞の分化促進を確認するため、レチノイン酸による分化誘導から 48 時間後に細胞のアセチルコリンエステラーゼ活性を測定した。テトラピア *neu4*-HA をトランスフェクションした SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞では、いずれもモック細胞よりも高いアセチルコリンエステラーゼ活性を示した (図 3-13)。以上のことから、テトラピア Neu4 が神経突起形成を促進したことが示唆された。

考察

本章では、ナイルティラピアの網膜の神経節細胞数が減少する暗条件において、ティラピアでは中性 pH 下でのシアリダーゼ活性が減少しており、このシアリダーゼ活性の減少は *neu4* 遺伝子の発現変化に由来することを明らかにした。さらに、ティラピア Neu4 は 2 つの神経細胞株において、神経突起の形成を促進することが明らかとなった。

ナイルティラピアの胚発生において、ティラピア *neu4* の mRNA レベルは受精後 48 時間まではわずかにしか発現しておらず、受精後 60 時間の眼杯が形成される時期にその発現が初めて確認された。さらに、中脳の視蓋が分化する受精後 84 時間で、*neu4* の発現が急激に増加した⁷³。同じシクリッドの *O. mossambicus* では、脳のシアロ複合糖質、特にガングリオシド組成が発生初期に劇的に変化する⁷⁴。シアル酸を多く含むガングリオシドからシアル酸が減少した極性の低いガングリオシドに変化していくことが観察されている。GT1b、GT1c および GT2 に加え、テトラシアル酸ガングリオシドである GQ1b および GQ1c はシクリッドの発生過程において増加する。このことから、ティラピアの発生においてもシアリダーゼによる脱シアリル化がガングリオシドに含まれるシアル酸量を制御していることが示唆されている。さらに、*O. mossambicus* では脳の発生過程でシアリダーゼ活性が上昇し、暗闇条件で飼育するとシアリダーゼ活性が減少することが報告されている。しかし、どのシアリダーゼが暗闇によって影響を受けるのかについては明らかとなっていない⁷¹。本研究では、*O. niloticus* を暗条件で飼育した際に、Neu4 シアリダーゼの活性が減少することが確認された。

この結果は、暗闇で飼育するとシアリダーゼ活性が減少される現象がシクリッド類の中で保存されていることを示している。以上より、Neu4 はティラピアの初期発生における神経新生に関与していることが推察された。

本研究では、ティラピア Neu4 が神経細胞においても核に局在することを明らかにした。哺乳類の神経分化において、核におけるシアロ複合糖質が遺伝子発現や核輸送に関与していることが明らかとなってきた。核のガングリオシドの中でも、GM1 は神経突起の形成を促進することが知られており、核膜における GM1 量の増加が神経突起の成長に伴うことが知られている⁷⁵。GM1 は Na/Ca 輸送交換体の輸送活性に関与しており、核内の Ca²⁺ホメオスタシスを調節している⁴⁴。さらに、GM1 は GalNAcT (GA2/GM2/GD2/GT2 合成酵素 ;B4galnt1)のプロモーターや、NeuroD1 のプロモーター領域に結合し、ヒストンのアセチル化を促進する⁷⁶。2章の結果より、ティラピア Neu4 はガングリオシドの中でも GD1a を良い基質とすることが分かっている。ティラピア Neu4 は核の脂質由来のシアル酸量を減少させたことから、GD1a の脱シアリル化により GM1 を生成し、GM1 の量を調節している可能性が示唆された。また、ティラピア Neu4 は SH-SY5Y 細胞や Neuro2a 細胞の核糖タンパク質を脱シアリル化した。しかし、哺乳類の核シアロ糖タンパク質に関する報告はほとんどない。核膜孔複合体の1つであるヌクレオポリン p62 (NUP62)は、 α 2-6 結合シアル酸を持ち、SNA レクチンによる α 2-6 結合シアル酸のブロックングにより、Neuro2a 細胞における核輸送が阻害されることが報告されている⁴⁵。また、NUP62 は、Wnt シグナル伝達経路の

β -カテニンをリクルートすることで、原腸胚の背腹側の境界、器官前駆体の組織化などといった胚発生における重要な役割を担っている⁷⁷。興味深いことに、シクリッド類の脳領域の大きさの違いは、胚発生における Wnt シグナルの発現量や発現場所の違いにより調節されていることが知られている⁷⁸。ティラピア Neu4 は α 2-6 結合のシアロオリゴ糖を良い基質とすることから、ティラピア Neu4 による NUP62 の脱シアリル化が核輸送に影響を与え、シクリッド類の Wnt シグナル伝達の調整に関与している可能性がある。

Neu4 以外のシアリダーゼとして、神経新生における Neu3 の機能についてはよく研究されてきた。例えば、マウス Neu3 は、神経細胞の分化や増殖などに関与しており、神経新生に必要であることが示されている。神経新生の際に見られるポリシアリル化ガングリオシドの脱シアリル化は Neu3 により制御されている⁷⁰。また、メダカ Neu3a は神経突起の形成を進めることで、細胞分化を促進する⁷⁹。哺乳類と同様に、魚類においても、脳のガングリオシド組成が発生段階で変化する⁷⁴。このことから、脊椎動物では神経新生の際に、ガングリオシド組成がシアリダーゼによる脱シアリル化により制御されることが高度に保存されていると考えられる。本研究では、ティラピア Neu4 が哺乳類 Neu3 やメダカ Neu3a と同じようにガングリオシド組成を制御し、神経突起形成を促進することで、神経新生に関与していることが示唆された。しかし、ティラピア Neu4 は、細胞膜に局在す哺乳類 Neu3 やメダカ Neu3a とは異なり、核に局在する。このことから、ティラピアでは Neu3a だけでなく Neu4 も神経新生におけるガングリオシド組成を制御している可能性が示唆された。

興味深いことに、Neu4 は魚種間で異なる細胞内局在を示しているが、魚類 Neu4 は眼の機能に関与していることが示唆されている。例えば、メダカ *neu4* の遺伝子発現は眼の活動が活発になる受精後 8.5 日に上昇する^{18,20}。ゼブラフィッシュ *neu4* は受精後 20 時間と 24 時間の水晶体で *in situ* ハイブリダイゼーションによって検出された¹⁵。これらのことから、魚類 Neu4 の眼における機能は部分的に魚種間で保存されているのではないかと考えられる。今後は、他の魚類 Neu4 の網膜や視神経の解析が必要とされる。

本章では、ティラピア Neu4 の神経新生における生理機能を明らかにした。ティラピア Neu4 は核に局在するユニークなシアリダーゼであり、神経細胞株に遺伝子発現させた際には、神経突起の形成が促進された。暗闇条件下で飼育したティラピアでは、ティラピア *neu4* 遺伝子の発現が減少し、それに伴い中性でのシアリダーゼ活性が低下した。また、これらのティラピアでは網膜を含む中枢神経系の発達遅延が伴うことが明らかとなった。魚類の神経新生は、胚発生における中枢神経系の形成や環境変化への適応に重要な役割を果たしている⁸⁰。魚類の中でもシクリッド類は社会行動、摂食習慣、色彩等において多様な表現型を示しており、これらの表現型には視神経や脳での情報処理が重要である⁸¹。このようなシクリッドの多様性に核シアリダーゼによる神経新生が関与している可能性がある。今後は、神経新生における Neu4 の生理機能を明らかにするために、魚種間での比較研究や Neu4 ノックアウト魚を用いた実験が必要である。

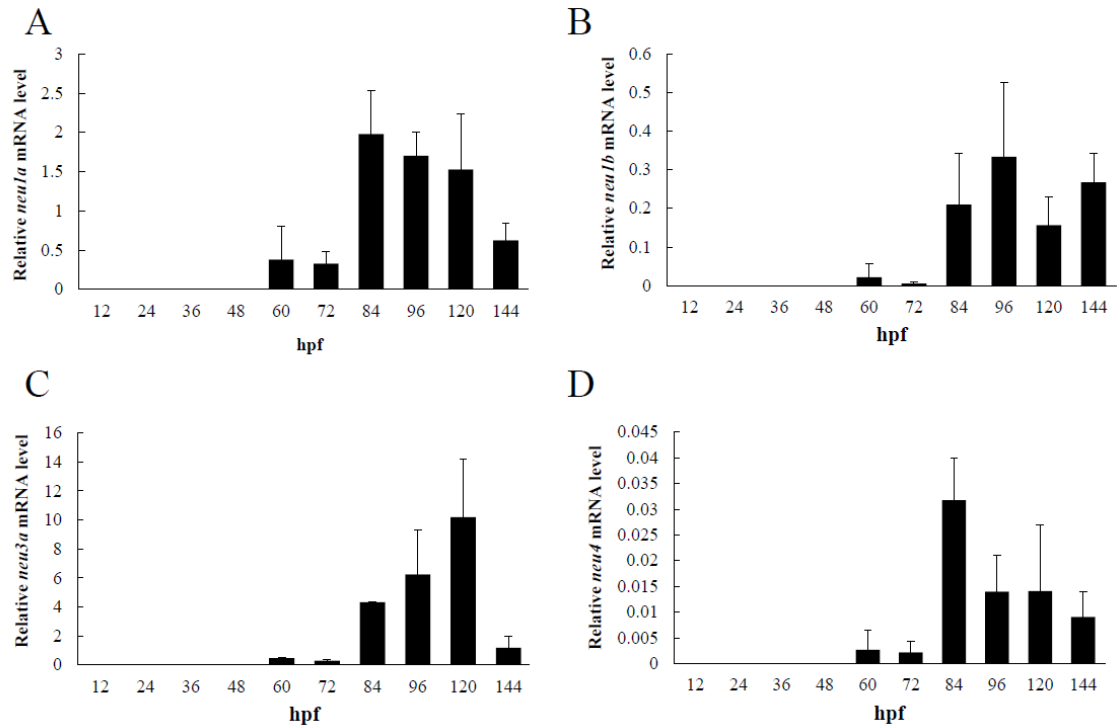


図 3-1 発生段階におけるティラピアシアリダーゼの遺伝子発現

ティラピアの発生段階における *neu1a* (A)、*neu1b* (B)、*neu3a* (C)、*neu4* (D) の遺伝子発現をリアルタイム PCR により測定した。内部標準遺伝子として *actb* を用いた。各シアリダーゼ cDNA を含むプラスミドの希釈系列を用いて、検量線を作成した。

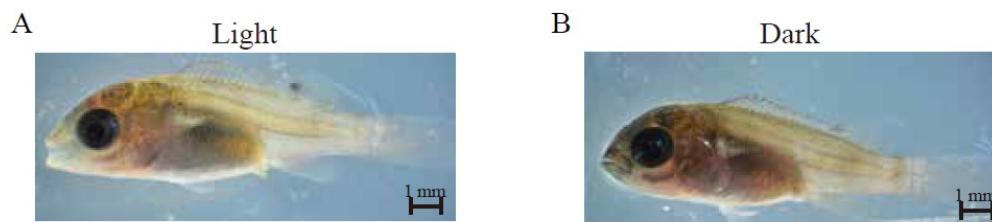


図 3-2 ティラピアの形態

14/10-h 明暗周期(A)と 24-h 暗闇条件(B)で飼育したティラピアを光学顕微鏡で観察した。

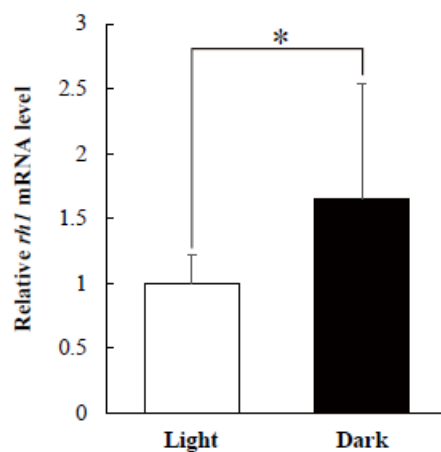


図 3-3 *rh1* の遺伝子発現

ティラピア頭部から抽出した total RNA を用いて、cDNA 合成を行った。*rh1* の mRNA レベルは、特的なプライマーを用いてリアルタイム PCR により測定した。内部標準遺伝子として *actb* を用いた。遺伝子発現は Light を 1 とし、相対値で表した。* は統計学的有意差 $p < 0.05$ を意味する。

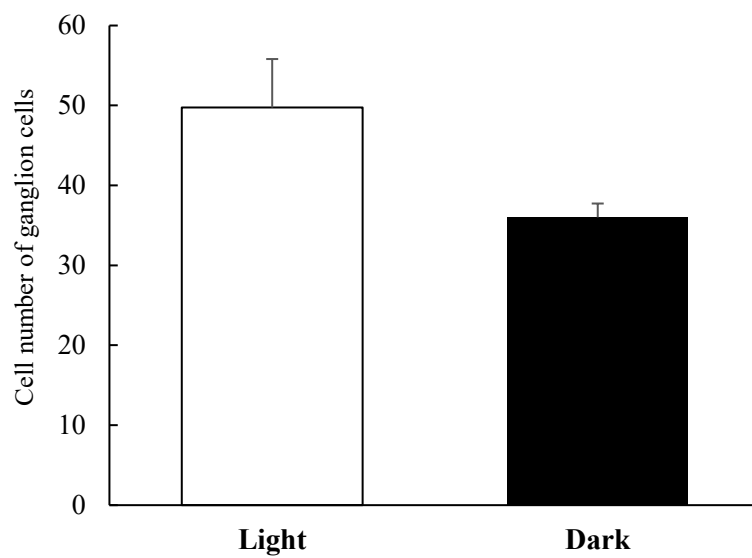
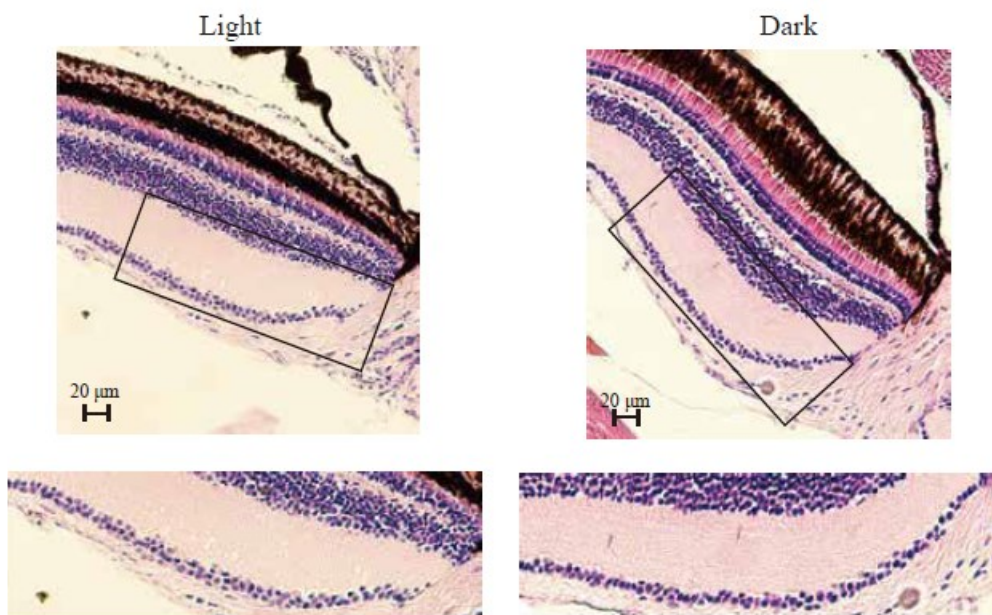


図 3-4 ティラピア網膜の観察

ティラピア視神経周辺の切片を HE 染色した。四角で囲まれた部分を拡大した。

視神経から $100\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ の範囲における神経節細胞の数を計測した。

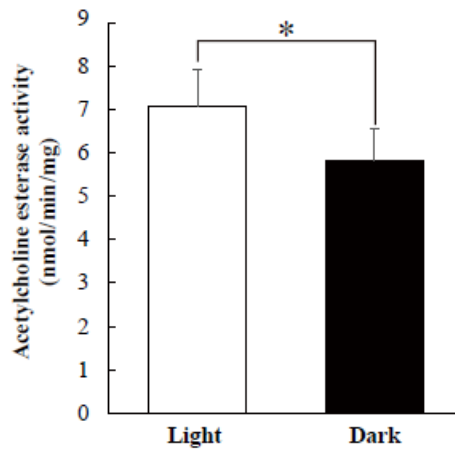


図 3-5 ティラピア頭部のアセチルコリンエステラーゼ活性

アセチルコリンエステラーゼ活性をティラピア頭部より調製したライセートを用いて測定した。*は統計学的有意差 $p < 0.05$ を意味する。

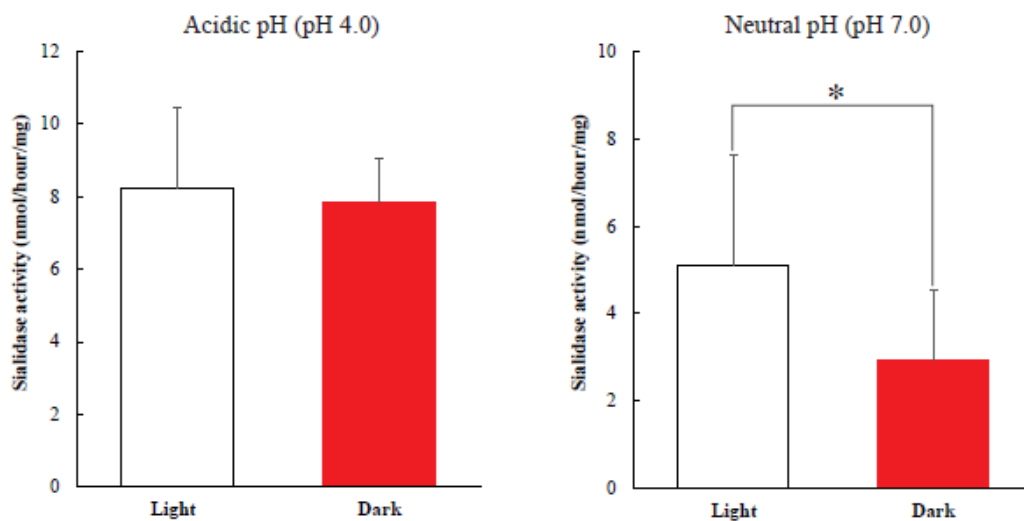


図 3-6 ティラピア頭部のシアリダーゼ活性

シアリダーゼ活性をティラピア頭部より調製したライセートを用いて測定した。*は統計学的有意差 $p < 0.05$ を意味する。

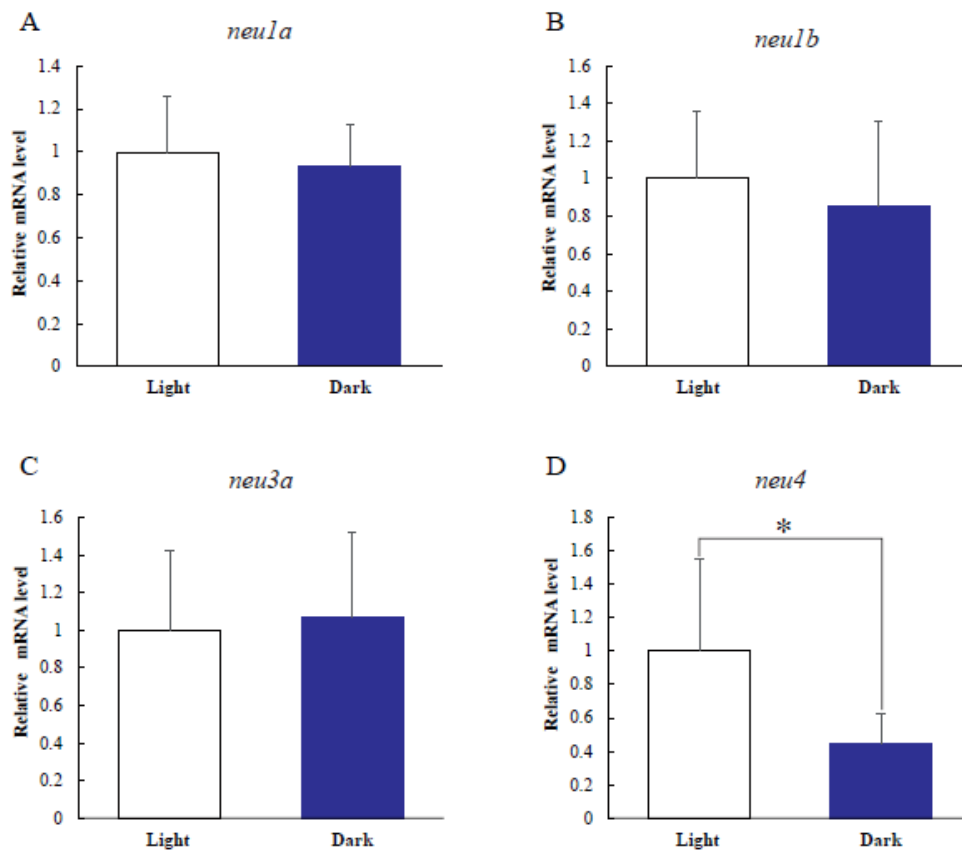


図 3-7 各ティラピアシアリダーゼの発現量

ティラピア頭部より調製した cDNA を用いて、リアルタイム PCR により *neu1a* (A)、*neu1b* (B)、*neu3a* (C) および *neu4* (D) の発現量を測定した。内部標準遺伝子として *actb* を用いた。各シアリダーゼ cDNA を含むプラスミドの希釈系列を用いて、検量線を作成した。遺伝子発現は Light を 1 とし、相対値で表した。* は統計学的有意差 $p < 0.05$ を意味する。

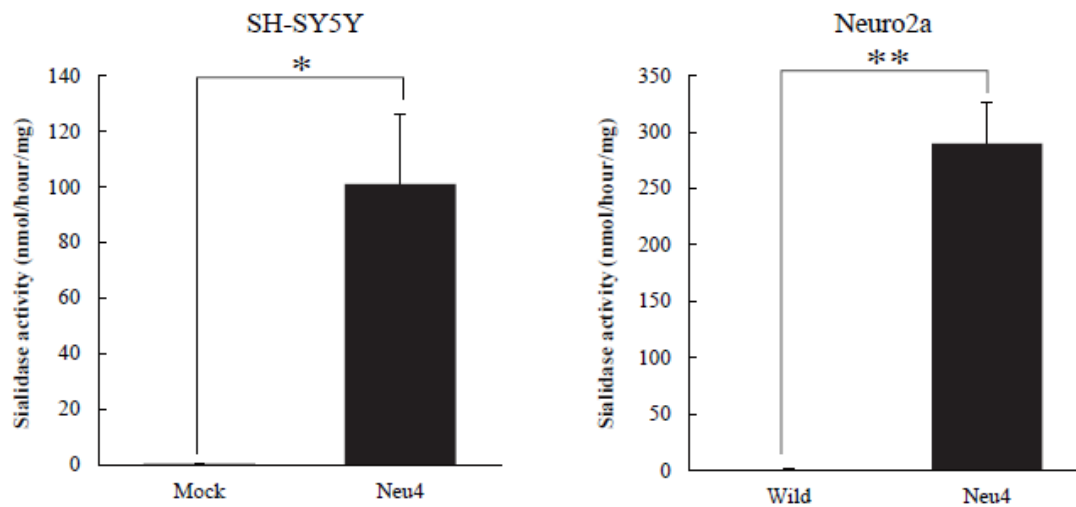


図 3-8 ティラピア Neu4 のシアリダーゼ活性

空ベクターまたはティラピア *neu4*-HA をトランスフェクションした SH-SY5Y 細胞または Neuro2a 細胞より調製したホモジネートを用いて活性測定を行った。* は統計学的有意差 $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ を意味する。

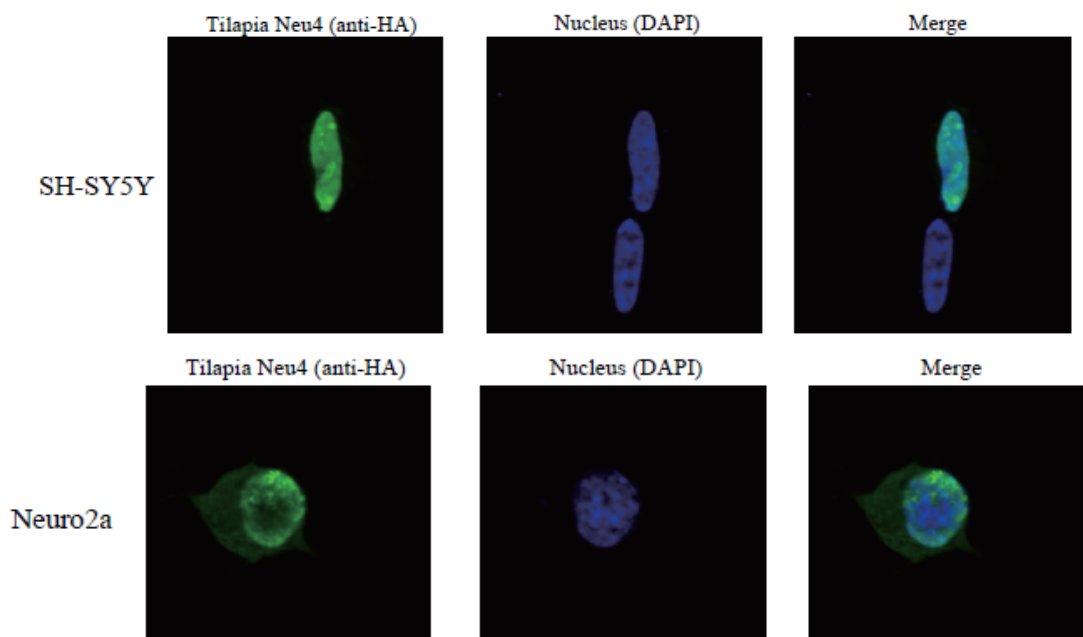


図 3-9 ティラピア Neu4 の細胞内局在

間接蛍光抗体法により、SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞におけるティラピア Neu4 の細胞内局在を観察した。

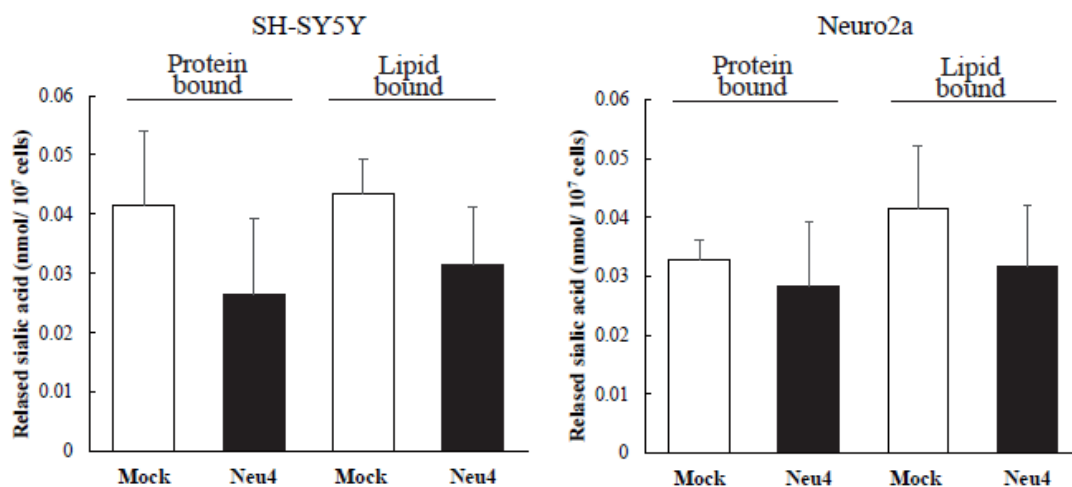


図 3-10 ティラピア Neu4 による核のシアル酸量の変化

空ベクターまたはティラピア *neu4*-HA をトランスフェクションした SH-SY5Y 細胞または Neuro2a 細胞より、核を精製し、シアル酸量を測定した。

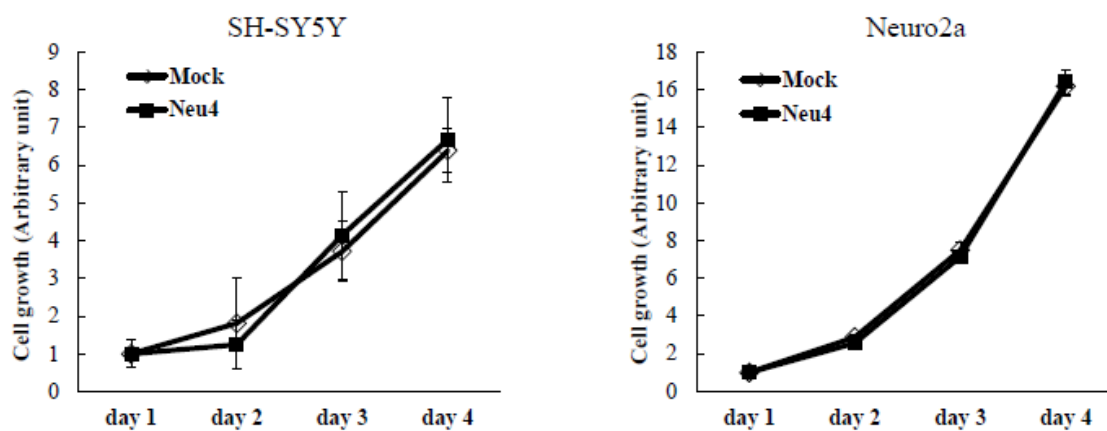


図 3-11 ティラピア Neu4 導入細胞の細胞増殖

Cell Counting kit-8 を用いて、空ベクターまたはティラピア *neu4*-HA をトランスフェクションした SH-SY5Y 細胞または Neuro2a 細胞の細胞増殖を 4 日目測定した。Day 1 を 1 とし、相対値で表した。

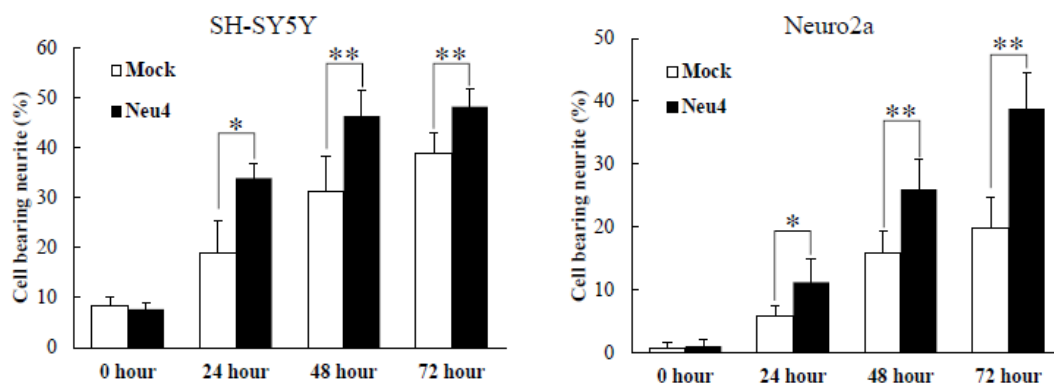


図 3-12 ティラピア Neu4 導入細胞の神経細胞分化

レチノイン酸による分化誘導を行い、細胞長の 2 倍の長さ (SH-SY5Y 細胞) または細胞長の 1.5 倍の長さ (Neuro2a 細胞) の神経突起を持つ細胞を、ランダムで 5 視野選び、計数した。* は統計学的有意差 $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ を意味する。

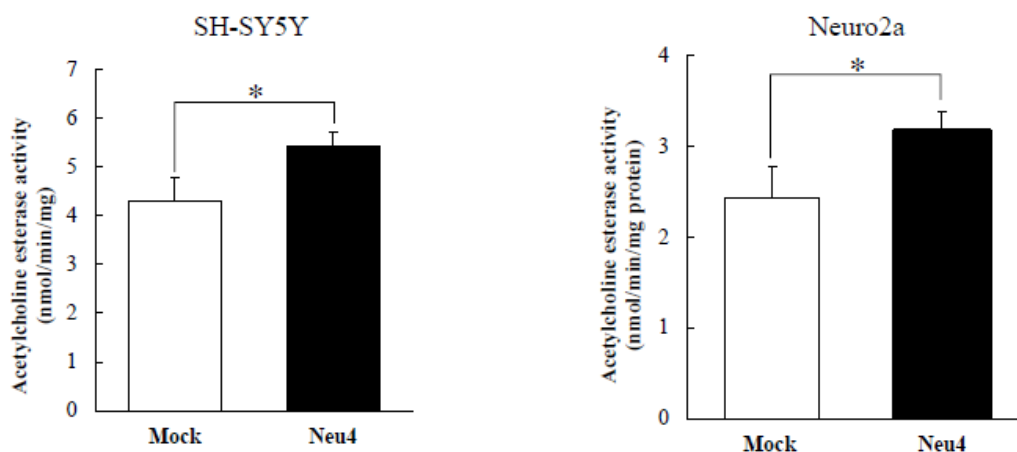


図 3-13 アセチルコリンエステラーゼ活性

空ベクターまたはティラピア *neu4*-HA をトランスフェクションした SH-SY5Y 細胞または Neuro2a 細胞をレチノイン酸による分化誘導し、2 日目の細胞より調製したホモジネートを用いて活性測定を行った。* は統計学的有意差 $p < 0.05$ を意味する。

第4章 ティラピア Neu4 の 核局在メカニズム

背景および目的

本研究では、全てのティラピアシアリダーゼの酵素学的性状および細胞内局在を明らかにしてきた。これらシアリダーゼのうち、Neu4 は核に局在し、神経細胞の分化を促進した。このティラピア Neu4 の C 末端には、リジンやアルギニンにより構成される核移行シグナル (NLS) が存在した。この核移行シグナルを欠損させたティラピア Neu4 では核局在を全く示さず、NLS を持つタンパク質を核に輸送する核輸送タンパク質である Importin の阻害剤を用いると、核局在を示すティラピア Neu4 の割合が減少した。このことから、ティラピア Neu4 は NLS を介して、Importin により、核膜孔を通り核に輸送されることが明らかとなった。一方、同じく核移行シグナルが予想されたメダカ Neu4 は実際の細胞内局在を核に示さず、その局在はリソソームである。さらに、メダカ Neu4 の NLS をティラピア Neu4 の NLS に置換したメダカ Neu4 変異体では、その局在の一部が核に局在を示したが、大部分は依然核以外であった。このことから、ティラピア Neu4 の核局在は NLS だけでなく、その他の因子により制御されることが示唆されたが、その詳細は不明である。また、この Neu4 核局在がティラピアに特異的な性状であるのかについても分かっていない。

そこで、本研究では核局在するティラピア Neu4 の核局在メカニズムを完全に明らかにすることを目的とした。メダカ Neu4 とティラピア Neu4 を比較し、その配列の特徴から種々の変異体を作製し、核局在に重要な因子についての同定を試みた。さらに、Neu4 の核局在が魚種間でどのように保存されているのかを明らかにするため、これまでクローニングが

行われていない魚類 Neu4 の細胞内局在を解析し、核局在制御因子との関連について観察した。

実験方法

4-1 魚類 *neu4* のインシリコクローニングおよび予想 NLS スコアの算出

Ensembl Genome Browser (<https://asia.ensembl.org/index.html>)、および NCBI データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録されているゲノム情報を用いて、魚類 *neu4* 遺伝子のインシリコクローニングを行った。その後、得られた塩基配列より、演繹アミノ酸配列を求め、cNLS mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) を用いて予想 NLS スコアを算出した。

タンパク質立体構造の予想には SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) を用いた。

4-2 魚類 *neu4* の遺伝子クローニング

スポットテットガー (*Lepisosteus oculatus*)、プラティ (*Xiphophorus maculatus*)、カンパチ (*Seriola dumerili*) の *neu4* 遺伝子の予想配列を基にクローニング用プライマーを設計した。スポットテットガー *neu4* のクローニングに (5'-GTAAGCTTCCACCATGGGCTCGCCATAT-3') および (5'-GTGAATTCCTAGGCAACACTGCAGTGATTCCA-3')、プラティ *neu4* のクローニングに (5'-GTAAGCTTCCACCATGAGATCACCGTAC-3') および (5'-GTGAATTCTTAAGAAACAA-AGCACATCTTCATC-3')、カンパチ *neu4* のクローニングに KS509 (5'-GTAAGCTTCCACCATGAGGTCACCTATT-3') および (5'-GTGAATTCTTAAGACACAGAGCACATCTCA-3') の各プライマーを用いた。

スポットテットガーおよびプラティは市販の個体を購入し、脳を摘出し、1-2と同様の方法で RNA 抽出を行った。カンパチは鹿児島大学水産学水産学科の小谷知也教授より分与された仔魚を用いて RNA 抽出を行った。得られた RNA をテンプレートにし、ReverTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA remover (TOYOBO)を用いて、cDNA を合成した。各魚類 *neu4* 遺伝子を増幅するために、KOD One PCR Master Mix (TOYOBO)を用いて PCR を行った。PCR 条件は最適条件を検討した結果、98 °C 10 秒、55 °C 5 秒 (プラティ *neu4*)または 60 °C 5 秒 (スポットテットガーおよびカンパチ *neu4*)、68 °C 20 秒の 40 サイクルに決定した。

4-3 ティラピア *neu4* およびカンパチ *neu4* の変異体作成

ティラピア *neu4*-HA またはカンパチ *neu4*-HA を含む pBluescript をテンプレートとし、インバース PCR を行い、各欠損変異体および点変異体を作製した。ティラピア *neu4*:c.928-1038 欠損変異体の作製には(5'-CCGGATTTCCTGACTCCTACCTGG-3') および(5'-GGATGTCCAGTGTCTGGAGAGCC-3')、ティラピア *neu4*:c.928-957 欠損変異体の作製には(5'-AGTACCAGCTCTGTAGCCTCTTCAGTGTC-3') および (5'-GGATGTCCAGTGTCTGGAGAGCC-3')、ティラピア *neu4*:c.958-1005 欠損変異体の作製には(5'-GGTGCTGGAGCTGTTGCTGAC-3') および (5'-ACCAGCTCCATCCCACCTCCTC-3')、ティラピア *neu4*-HA:c.1006-1038 欠損変異体の作製には(5'-CCGGATTTCCTGACTCCTACCTGG-3') および (5'-CGATGTGGAGAGACTGGACTCTGTG-3')、ティラピア *neu4* S472A 点変異体の作製に

は (5'-CTGCAGCAGTTTGCCAACAGGTGAC-3') および (5'-CTTGAGCCATCATGTCTGC-AGCTCCTCC-3')、テトラピア *neu4* T480A 点変異体の作製には (5'-AGCAAGCTGGCTGAGATGTGCTCT-3') および (5'-CACAGGAGTCACCTGTTGGCAAAC-3')、カンパチ *neu4:c.928-1017* 欠損変異体の作製には (5'-CCAGATTCCTCACCCCCAC-3') および (5'-GGACGTCCTGTGTCTGGA-GC-3') の各プライマーを用いた。PCR は 1-4 と同様の方法で行った。

4-4 リン酸化阻害による細胞内局在の影響

Cyclin-dependent kinase (CDK)阻害には、2種類の試薬を用いた。purvalanol A は培地中に 10 μ M の濃度で2時間曝露した。細胞周期をM期に同調させる nocodazole (500 ng/ mL)は、同じく培地中に加えて、14時間曝露した。Neu4の細胞内局在は、1-6と同様に行った。

4-5 免疫沈降

細胞ペレットを Lysis buffer (50 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% NP40、2 mM EDTA、0.2 mM PMSF、10 μ g/mL ロイペプチン、0.25% deoxycholate、10 mM NaF、2 mM Na₃VO₄)で溶解した。その後、4 $^{\circ}$ C、13,200 g で 10 分間遠心分離し、ライセートを回収した。このライセート 200 μ g を anti-KPNA2 (Gene Tex)または Rabbit IgG (MBL) 3 μ g と 4 $^{\circ}$ C、2 時間半回転混合した。その後、50 μ L の Pierce protein A magnetic beads (Thermo Fisher)スラリー加え、

4 °C、1 時間回転混合した。Lysis bufffer で 5 回洗浄後、50 mM Glycine-HCl (pH 2.8) 20 μL、
3 × sample buffer 10 μL を加え、100 °C で 5 分間加熱し、泳動サンプルとした。ウエスタンブ
ロットィングは 1-4 と同様の方法で行った。

実験結果

Ensembl Genome Browser および NCBI データベースを用いて、32 種の魚類から *neu4* 遺伝子のインシリコクロニングを行った。その結果、ティラピアと同程度以上の NLS スコア (>9.0) を示す魚類 Neu4 が 14 種存在した (表 4-1)。その中の 11 種はティラピアと同じスズキ類であった。全体の傾向として、ガー目やアロワナ目といった進化的に早い段階で分岐した魚類は NLS スコアが低い傾向にあり、一方で棘鰭上目のクレードでは NLS スコアが高い傾向が認められた。しかし、前述のようにメダカ Neu4 は高い NLS スコアを示すが、実際の細胞内局在は核に示さないことから、NLS のみが魚類 Neu4 の核局在の制御因子である可能性は低いと思われる。そこで、スポットテットガー Neu4 (NLS スコア: 2.3)、カダヤシ目に属するプラティ Neu4 (NLS スコア: 10)、ティラピアと同じスズキ類に属するカンパチ Neu4 (NLS スコア: 10) の遺伝子クローニングを行い、それらの細胞内局在を観察した (図 4-1)。その結果、スポットテットガー Neu4 およびプラティ Neu4 は魚類細胞において小胞体様の核周辺のシグナルが観察されるが、核局在はまったく示さなかった。一方、カンパチ Neu4 はティラピア Neu4 と同様に核局在を示したことから、スズキ類の魚類 Neu4 に核局在が保存されていることが推察された。

2 章では、メダカ Neu4 の予想 NLS をティラピア Neu4 の NLS に置換した変異体が核に局在しないことを明らかにしており (図 2-14)、ティラピア Neu4 の核局在が NLS だけでなく、その他の因子により制御されることが示唆された。一般に、核に局在する多くのタンパク質

において、NLS 近辺のリン酸化がその核局在を制御することが知られている⁴³。そこで、ティラピア Neu4 とメダカ Neu4 を比較し、ティラピア Neu4 特異的に存在する NLS 近辺のリン酸化部位を予想した。NetPhos3.1 を用いて解析した結果、メダカ Neu4 には認められない 2 か所のリン酸化部位 (S472 と T480) がティラピア Neu4 に存在することが見いだされた。また、この S472 の Cdk5 によるリン酸化、および T480 の PKC または Cdc2 によるリン酸化が NetPhos3.1 により予想された。そこで、Cdk5 および Cdc2 によるリン酸化抑制には阻害剤である Purvalanol A を用い、さらに細胞周期で発現が変化する Cdk については細胞周期を M 期で停止させる nocodazole を用いた。それぞれの薬剤を曝露し、ティラピア Neu4 の細胞内局在を観察した。その結果、どちらの阻害剤を用いてもティラピア Neu4 は核局在が維持されたままであったことから(図 4-2)、S472 および T480 のリン酸化は核局在に影響しないことが推察された。そこでこれを確認するため、S472 および T480 をそれぞれアラニンに置換したティラピア Neu4 点変異体を作製し、細胞内局在を観察したところ、ティラピア Neu4 S472A および T480A 点変異体ともに核局在を維持した (図 4-3)。これらの結果より、ティラピア Neu4 の核局在は NLS 近辺のリン酸化により制御を受けないことが示唆された。

次に、ティラピア Neu4 とメダカ Neu4 の局在が、構造的な違いに起因しているのではないかと仮定し、それぞれの予想立体構造を構築後に比較した。その結果、ティラピア Neu4 にはメダカ Neu4 とは異なる構造をとる部分が存在することが明らかとなった (図 4-4)。その構造はティラピア Neu4 のアミノ酸配列 287-349 にあたり、この領域はセリンやスレオニ

ンを多く含み、 α ヘリックス構造や β シート構造を形成しない。このような極性非電化側鎖を持つアミノ酸や芳香族アミノ酸により構成され、3次構造をとらない領域は Low complexity 領域と呼ばれている⁸²。この LC 領域はティラピア Neu4 と同様に核局在を示すカンパチ Neu4 (アミノ酸配列: 310-339) にも確認された (図 4-5)。そこで、この LC 領域がティラピア Neu4 の核局在に関与するのかどうかを明らかにするために、ティラピア Neu4 LC 配列 (310-346) 欠損変異体を作製した。この LC 欠損変異体は、核以外に局在する割合がティラピア Neu4 (11.2%) と比較して、57.7% まで増加した (図 4-6)。さらにこの LC 配列を 3 区画 (アミノ酸配列: 310-319, 320-335 および 336-346) に区切り、それぞれの欠損変異体を作製し、細胞内局在を観察した。その結果、これら 3 種のティラピア Neu4 欠損変異体は、すべて Neu4 と変わらない核局在を示した。このことから、部分的な LC 配列でもティラピア Neu4 の核局在を可能にすることが明らかとなった。

ティラピア Neu4 の LC 配列はリン酸化や *O*-GlcNAc 修飾の標的となるセリンやスレオニンを多く含むことから、このセリンおよびスレオニンをアラニンに置換したティラピア Neu4 S/T 変異体を作製し、その細胞内局在を観察した。その結果、ティラピア Neu4 S/T 変異体は、ティラピア Neu4 LC 配列欠損変異体と同様に、核以外に局在する割合が有意に増加した (77.7%、図 4-7)。以上のことから、ティラピア Neu4 の LC 配列にセリンやスレオニンが含まれることが核局在に重要であることが明らかとなった。また、カンパチ Neu4 LC 配列欠損変異体を作製し、細胞内局在を観察した結果、この欠損変異体でも、核以外に局在を

示す割合が、カンパチ Neu4 (25.5%)と比較して、80.5%に増加した (図 4-8)。以上のことから、スズキ類 Neu4 の核局在には NLS および LC 配列が必要であることが示唆された。

LC 配列を欠損させたティラピア Neu4 では、核以外に局在を示すティラピア Neu4 の割合が増加したことから、ティラピア Neu4 の LC 配列が核輸送タンパク質である Importin と相互作用することが予想された。そこで、免疫沈降法により、ティラピア Neu4 の LC 配列と Importin α との相互作用を解析した。その結果、ティラピア Neu4 に比べ、ティラピア Neu4 LC 配列欠損変異体およびティラピア Neu4 S/T 変異体では、Importin α との相互作用が低下していた。このことから、ティラピア Neu4 の LC 配列は Importin α と相互作用があり、特に LC 配列に含まれるセリンやスレオニンがこの相互作用に重要であり、核局在に関与していることが示唆された。

考察

本章では、ティラピア Neu4 の核局在メカニズムを明らかにした。ティラピア Neu4 の核局在は NLS だけでなく、Low complexity (LC)配列も同時に必要であった。この LC 配列は Importin α と相互作用し、核局在を可能にしていることが示唆された。また、LC 配列は他のスズキ類 Neu4 にも存在し、実際にカンパチ Neu4 での LC 配列欠損変異体では、核以外に局在するカンパチ Neu4 の割合が増加した。このことから、NLS および LC 配列による核局在はスズキ類で保存されていることが示唆された。

LC 配列とは 1 種から数種類のアミノ酸だけが極端に多く存在する、または同じアミノ酸が頻繁に繰り返す配列であり、 α ヘリックスや β シートといった立体構造を形成できない領域である⁸³。最近の研究により、核局在を示す多くのタンパク質がこの LC 配列を持つことが明らかとなっており、この配列は DNA 結合タンパク質や RNA 結合タンパク質などの制御タンパク質に認められる⁸⁴。ティラピア Neu4 には DNA 結合ドメインや RNA 結合ドメインの存在は予想されなかったが、同じスズキ類のカンパチ Neu4 には PHD zinc finger (アミノ酸配列: 124-227)や Ring finger (アミノ酸配列: 125-186)といった DNA 結合タンパク質に特徴的なドメインが予想された。ティラピア Neu4 において、カンパチ Neu4 中の HD zinc finger や Ring finger 配列に相当する部分の相同性は 91.1%と 90.3%と高い相同性を示しており、DNA 結合ドメインとして機能する可能性も考えられる。

本研究ではティラピア Neu4 の LC 配列が Importin α と相互作用することにより、核局在

を可能にすることを明らかとした。これまで、Importin ファミリーと LC 配列の相互作用に関する報告は、FUS (RNA-binding protein fused in sarcoma) と Kap β 2 の相互作用についての論文のみである⁸⁵。FUS は、大部分が LC 配列により構成されており、核内ではパラスペクトル、細胞質ではストレス顆粒といった相分離による膜を持たないオルガネラの形成に関与している。Kap β 2 は細胞質の FUS を核内へと輸送するだけでなく、細胞質でのストレス顆粒の状態を制御している。これは Importin ファミリーが NLS と強固に結合しながら、LC 配列とも相互作用することで相分離を抑制すると考えられている⁸⁵。本研究ではティラピア Neu4 の LC 配列が Importin ファミリーと相互作用し、核局在を可能にすることを明らかにした。さらに、他の魚類と異なり、スズキ類 Neu4 は進化的に LC 配列を獲得し、核局在するというユニークな局在メカニズムを示した。

一般に、LC 配列は相分離・液-液相分離により、ドロップレットや膜を持たないオルガネラの形成に関与している⁸⁶。ティラピア Neu4 の LC 配列が膜をもたないオルガネラの形成に関与しているかについては分かっていない。もしかしたら、ティラピア Neu4 は糖鎖分解酵素としての機能だけでなく、LC 配列によるドロップレットのような構造の形成に関与しているかもしれない。実際に、一部の糖タンパク質が持つ N 型糖鎖はドロップレットの形成に寄与していることから⁸⁷、ドロップレットの構成成分として糖鎖分解酵素が含まれていてもおかしくない。今後は、ティラピア Neu4 が核内のどの部分に局在するのか、またどのような核タンパク質と相互作用を持つのかを明らかにしていく必要がある。

本研究ではティラピア Neu4 の LC 配列内にあるセリンおよびスレオニンをアラニンに置換した際にも核以外に局在を示すティラピア Neu4 の割合が増加した。一般に、LC 配列の多くは極性非電荷側鎖を持つアミノ酸や芳香族アミノ酸で構成されることが多い⁸²。したがって、アラニンに置換したことが LC 配列の構造に影響を与え、Importin との相互作用が弱まり、核以外に局在を示すティラピア Neu4 の割合が増加したと考えられる。また、セリンやスレオニンは *O*-GlcNAc やリン酸化の標的部位となることから、核における LC 配列を介した構造体の形成といった機能にも影響を与えるかもしれない。今後は、Neu4LC 配列の個々のアミノ酸がどのような機能を持つのかについても解析を行っていく必要がある。

本研究では、進化的に LC 配列を獲得したスズキ類の Neu4 が核局在を獲得したことを明らかとした。LC 配列による相分離は様々な生命現象に関わっていることが明らかとなってきた一方で、相分離と糖鎖分解酵素の関係についてはほとんど分かっていない。糖鎖はコアタンパク質に水溶性を寄与する性質からも、相分離に関わっている可能性は高い。LC 配列を持つ糖鎖分解酵素が見つかったことが、相分離と糖鎖の関係を明らかにする強力なツールとしての利用が期待される。

表 4-1 魚類 Neu4 の予想 NLS スコア

Scientific name	Order	Family	Accession	NLS score
<i>Lepisosteus oculatus</i>	Semionotiformes	Lepisosteidae	XP_015216986	2.3
<i>Scleropages formosus</i>	Osteoglossiformes	Osteoglossidae	XP_029111631	2.2
<i>Paramormyrops kingsleyae</i>	Osteoglossiformes	Mormyridae	XP_023677112	2.8
<i>Danio rerio</i>	Cypriniformes	Cyprinidae	ABO45315	7
<i>Cyprinus carpio</i>	Cypriniformes	Cyprinidae	KTG32920	2.5
<i>Astyanax mexicanus</i>	Characiformes	Characidae	XP_022534529	9.5
<i>Pygocentrus nattereri</i>	Characiformes	Serrasalminae	XP_017547241	13.5
<i>Electrophorus electricus</i>	Gymnotiformes	Gymnotidae	XP_026874896	15
<i>Lctalurus punctatus</i>	Siluriformes	Ictaluridae	AHH38364	2
<i>Gadus morhua</i>	Gandiformes	Gadidae	XP_030236689	2.7
<i>Oryzias latipes</i>	Beloniformes	Adrianichthyidae	BAM74165	9.5
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Cyprinodontiformes	Poeciliidae	XP_012736642	9
<i>Poecilia reticulata</i>	Cyprinodontiformes	Poeciliidae	XP_008424014	9
<i>Poecilia latipinna</i>	Cyprinodontiformes	Poeciliidae	XP_014898377	8.5
<i>Poecilia mexicana</i>	Cyprinodontiformes	Poeciliidae	XP_014865046	6
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Cyprinodontiformes	Poeciliidae	BBH51368	10
<i>Hippocampus comes</i>	Gasterosteiformes	Syngnathidae	XP_019743140	9
<i>Mastacembelus armatus</i>	Synbranchiformes	Mastacembelidae	XP_026172725	7
<i>Monopterus albus</i>	Synbranchiformes	Mastacembelidae	XP_020480166	10
<i>Seriola dumerili</i>	Perciformes	Carangidae	BBG56813	10
<i>Seriola lalandi dorsalis</i>	Perciformes	Carangidae	XP_023260780	10
<i>Stegastes partius</i>	Perciformes	Pomacentridae	XP_008280755	12
<i>Amphiprion ocellaris</i>	Perciformes	Pomacentridae	XP_023145128	10
<i>Acanthochromis polyacanthus</i>	Perciformes	Pomacentridae	XP_022077799	8
<i>Haplochromis burtoni</i>	Perciformes	Cichlidae	XP_005930021	11
<i>Astatotilapia calliptera</i>	Perciformes	Cichlidae	XP_026047306	11
<i>Neolamprologus brichardi</i>	Perciformes	Cichlidae	XP_006795435	11
<i>Pundamilia nyererei</i>	Perciformes	Cichlidae	XP_005742159	11
<i>Maylandia zebra</i>	Perciformes	Cichlidae	XP_004543686	11
<i>Oreochromis niloticus</i>	Perciformes	Cichlidae	BAR79852	11
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	XP_016887677	10
<i>Psetta maxima</i>	Pleuronectiformes	Scophthalmidae	AWO98938	5

Ensembl Genome Browser および NCBI データベースより、各魚類 *neu4* 遺伝子をインシリコクローニングし、cNLS mapper により予想 NLS スコアを算出した。

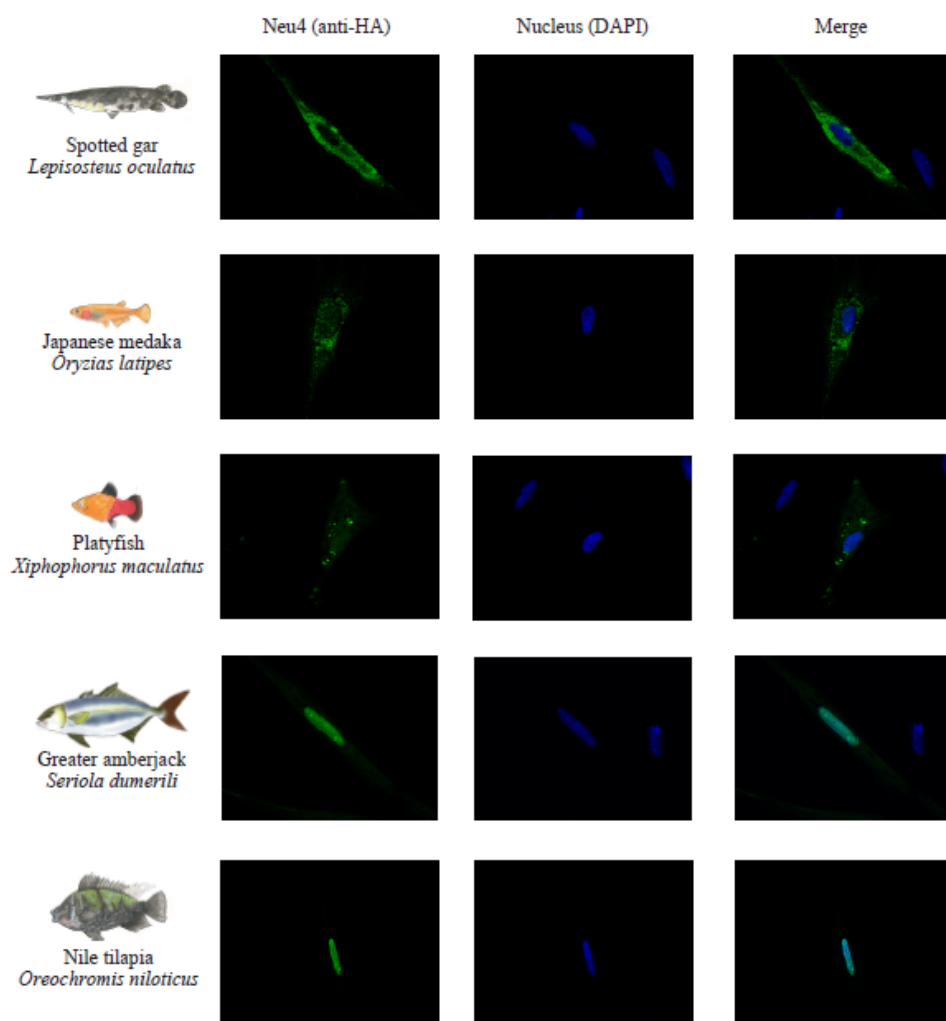


図 4-1 魚類 Neu4 の細胞内局在

Hepa-T1 細胞に各魚類 *neu4*-HA をトランスフェクションし、間接蛍光抗体法により、各魚類 Neu4 の細胞内局在を観察した。

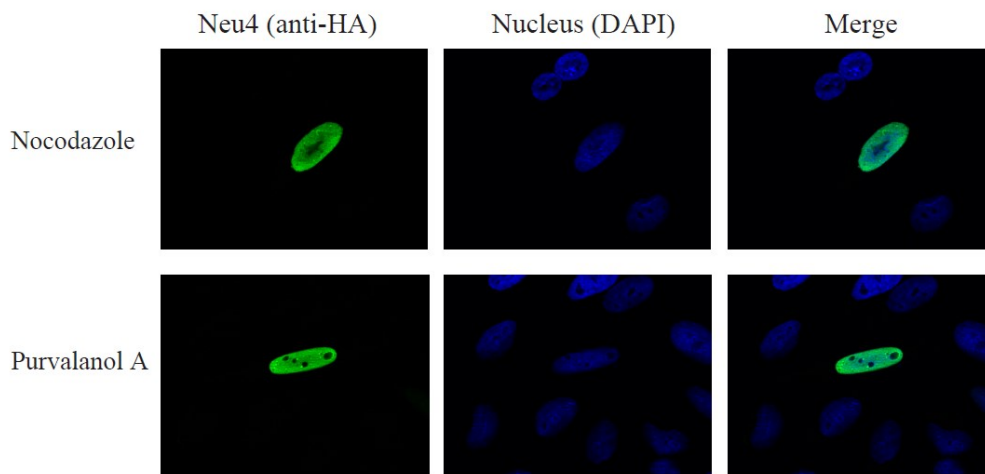


図 4-2 リン酸化阻害剤のティラピア Neu4 細胞内局在への影響

間接蛍光抗体法により、Hepa-T1 細胞におけるティラピア Neu4 の細胞内局在を観察した。

Tilapia Neu4 470 AQ**S**AAVCQQVT**P**VKKRRKKS**K**LAEMCSVS-COOH
 Medaka Neu4 439 TQRTPAVQ**Q**PRPHVKKRRKKS**K**LLEMCS**S**S-COOH

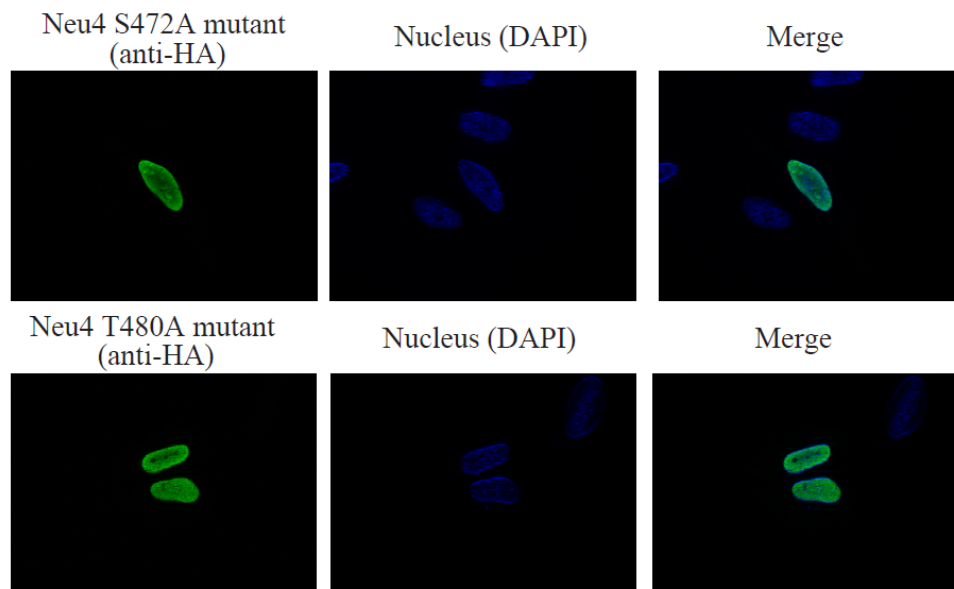


図 4-3 ティラピア Neu4 点変異体の細胞内局在

ティラピア Neu4 点変異体を作製し、免疫蛍光染色により、その細胞内局在を観察した。

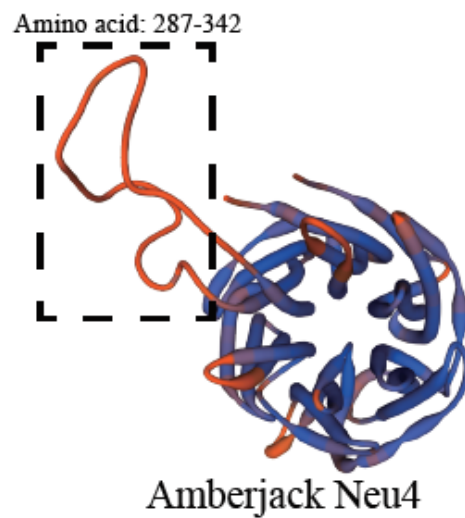
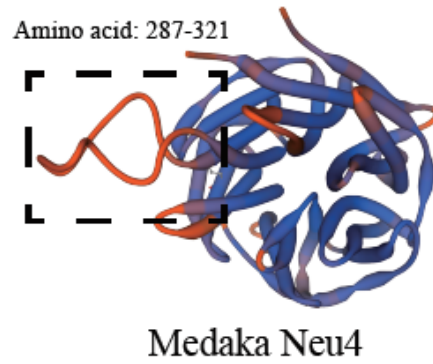
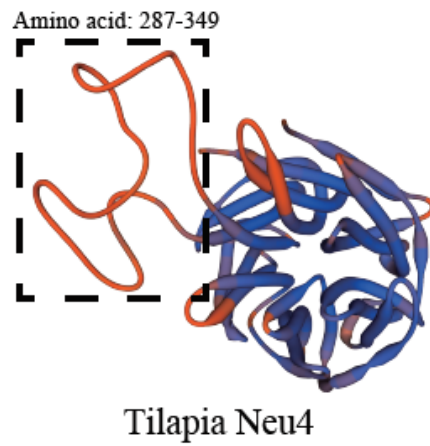


図 4-4 ティラピア Neu4、メダカ Neu4 およびカンパチ Neu4 の予想立体構造

SWISS-MODEL を用いて、ティラピア Neu4、メダカ Neu4 およびカンパチ Neu4 の立体構造を予想した。黒の点線で囲まれた部分はティラピア Neu4 とメダカ Neu4 の間で異なる立体構造を示している。

Low complexity region

<i>Lepisosteus oculatus</i>	281	VGFPAPFDQSCFLSATHKALTGWQEQASQTLRLRSRSTMLDRNPVALPTSSHCGKKSQLHKGQSAK---	FLPPTWVIY	356	
<i>Sclerophages formosus</i>	235	IGFPAPIRLPGRAQTAPGTTQK-----	FLTPTWVVY	266	
<i>Paramormyrops kingsleyae</i>	235	VGFPAPISQPGKKEASSYGQN-----	LTPTWVVY	266	
<i>Danio rerio</i>	281	IGFPAPIQLERFKSIYNSLELSAAPRS PKN-----	FLPPTWVVY	321	
<i>Cyprinus carpio</i>	281	IGFPAPIYKLGCSQHFLRQLRSIYTPLAVSISPR---N-----	FLPPTWVVY	325	
<i>Gadus morhua</i>	281	VGFPAPVHLCRPPGGSPAPPPRPSRSRHWTSCLRPGGDADG-----PPGREPGQSPGNF	LPPTWVVY	344	
<i>Oryzias latipes</i>	281	VGFPAPLHLSKSLKNCCKRLVSRHWTSHTSNMHLHPN-----PDF	LNPTWVVY	330	
<i>Fundulus heteroclitus</i>	281	VGFPAPLHLYKALRGHTSLCRHWTSFMAYTDC THLPNSQSSHNSTLSPNMPFAPDPR-----	PPPDF	LTPTWVAY	351
<i>Poecilia reticulata</i>	281	VGFPAPLRACEAHGGRTSPCRHWTS LTGHTDCSHSA-----	PRPDF	LTPTWVVY	330
<i>Poecilia latipinna</i>	281	VGFPAPLRACEAHGGRTSPCRHWTS LTGHTDRSHSA-----	PRPDF	LTPTWVVY	330
<i>Xiphophorus maculatus</i>	281	VGFPAPLRACEAHGGRRSPCRHWTS LTGPTDRSHSA-----	PRPDF	LTPTWVVY	330
<i>Seriola dumerili</i>	281	VGFPAPLHLCQSRNHHLHQPIHRSRHWTS CMTHSNHTTSPSP-NI-----	TSASTSPLSPNHSAPPDF	LTPTWVVY	351
<i>Seriola lalandi dorsalis</i>	281	VGFPAPLHLCQSRNHHLHQPIHRSRHWTS CMTHSNHTTSPSP-NI-----	TSASTSPLSPNHSAPPDF	LTPTWVVY	351
<i>Stegastes partus</i>	281	VGFPAPLHLQQR LNNHLQQPVGSRHWTS CMANYNHTSSVASTSIAASPPSSISSTPNTLSPHHDATPDF	LTPTWVVY	359	
<i>Amphiprion ocellaris</i>	281	IGFPAPLHLHQQR LNNHLQQPVNRSRHWTS HMAHSFHTSSVASTSITASQPPNITSALNLSLSPHHYSSPDF	LTPTWVVY	359	
<i>Haplochromis burtoni</i>	281	IGFPAPLNLQCS LNDLQQPVRLSRHWTSCTTESLSTSTTS-SVASSVSANSSSTTSSIPPHEAPPDF	LTPTWVVY	358	
<i>Astatotilapia calliptera</i>	281	IGFPAPLHLHQQR LNNHLQQPVRSRHWTS HMAQS FHS SVASTSITASQPPNITSALNLSLSPHHDSPPDF	LTPTWVVY	359	
<i>Neolamprologus brichardi</i>	281	IGFPAPLNLQCS LNDLQRPVRLSRHWTSCTTESLSTSTTS-SVAFSVSANSSSTTSSIPPHEAPPDF	LTPTWVVY	358	
<i>Pundamilia nyererei</i>	281	IGFPAPLNLQCS LNDLQRPVRLSRHWTSCTTESLSTSTTS-SVAFSVSANSSSTTSSIPPHEAPPDF	LTPTWVVY	358	
<i>Maylandia zebra</i>	281	IGFPAPLNLQCS LNDLQRPVRLSRHWTSCTTESLSTSTTS-SVAFSVSANSSSTTSSIPPHEAPPDF	LTPTWVVY	358	
<i>Oreochromis niloticus</i>	281	IGFPAPLNLQCS LNDLQRPVRLSRHWTSCTTESLSTSTTS-SVAFSVSANSSSTTSSIPPHEAPPDF	LTPTWVVY	358	

図 4-5 各魚類 Neu4 の LC 配列部分のアミノ酸配列アライメント

表 4-1 でインシリコクローニングを行った各魚類 *neu4* 遺伝子の塩基配列を基に演繹アミノ酸配列を求め、LC 配列部分のアライメントを作製した。

WT-Neu4 305RHWTSCCTESSLSTSSTSSVASSVSANSSSTSSIPPPHKAPPDFL350
 Neu4 Δ310-346 305RHWT-----PDFL350
 Neu4 Δ310-319 305RHWT-----SSTSSVASSVSANSSSTSSIPPPHKAPPDFL350
 Neu4 Δ320-335 305RHWTSCCTESSLST-----STSSIPPPHKAPPDFL350
 Neu4 Δ336-346 305RHWTSCCTESSLSTSSTSSVASSVSANSS-----PDFL350

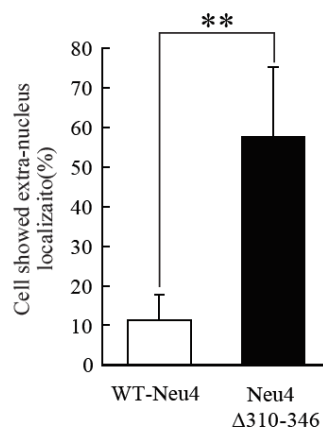
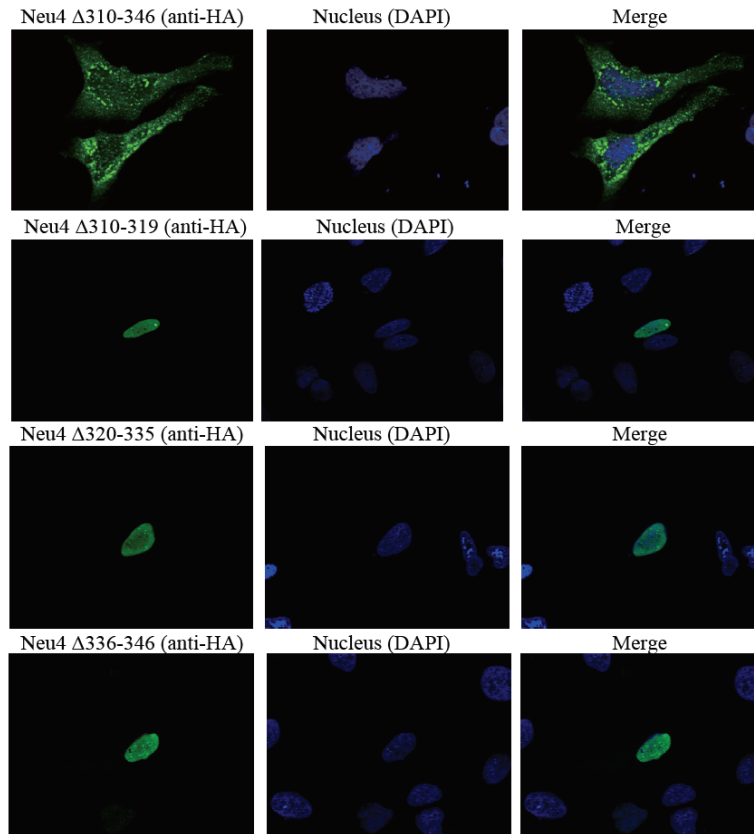


図 4-6 ティラピア Neu4 LC 配列欠損変異体の細胞内局在

ティラピア Neu4 LC 欠損変異体を作製し、免疫蛍光染色により、その細胞内局在を観察した。核局在を示す Neu4 導入細胞の割合は、ランダムに顕微鏡下で 5 視野を選び、そこに含まれる細胞をカウントした。**は統計学的有意差 $p < 0.01$ を意味する。

WT-Neu4 305RHWTSC~~TT~~ESSLSTSS~~TT~~SSVASSVSANSS~~TT~~SSIPPPHKAPPDFL350
 Neu4 Δ310-346 305RHWTSC-----PDFL350
 Neu4 S/T mutant 305RHWTSCAAEAALATAAAAVAAVAAANAAAAAAI~~PP~~PHKAPPDFL350

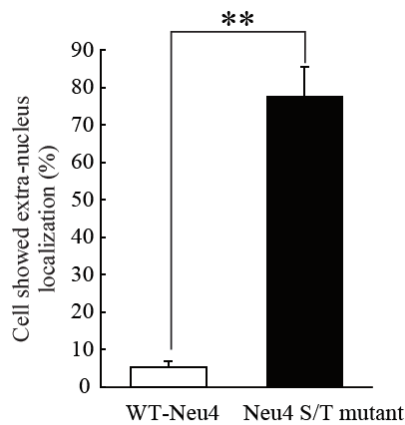
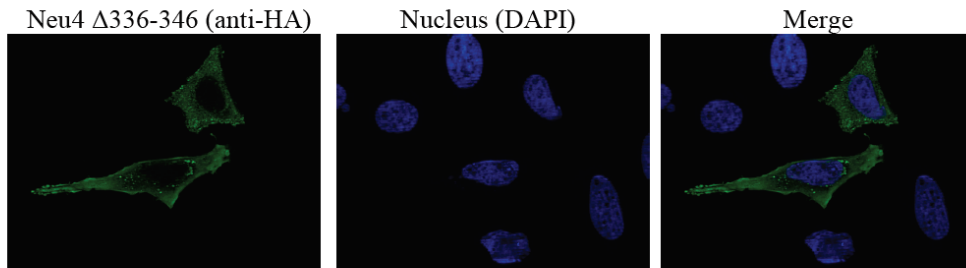


図 4-7 ティラピア Neu4 S/T 変異体の細胞内局在

ティラピア Neu4 の LC 配列に含まれる Ser および Thr を Ala に置換した変異体を作製し、免疫蛍光染色により、その細胞内局在を観察した。核局在を示す Neu4 導入細胞の割合は、ランダムに顕微鏡下で 5 視野を選び、そこに含まれる細胞をカウントした。**は統計学的有意差 $p < 0.01$ を意味する。

Tilapia Neu4 305 RHWISCTTESSLSTSSSTSSVASSVSANSSSTTSSIPPPHKAPPDF 349
 Medaka Neu4 303 RHWTSHTSNMHLHPN-----PDF 321
 Amberjack Neu4 305 RHRISCMTHSNHTTSPSPNITS-----ASTSPLSPNHSAPPDF 342
 Amberjack Neu4 Δ 310-339 305 RHRIS-----PDF 342

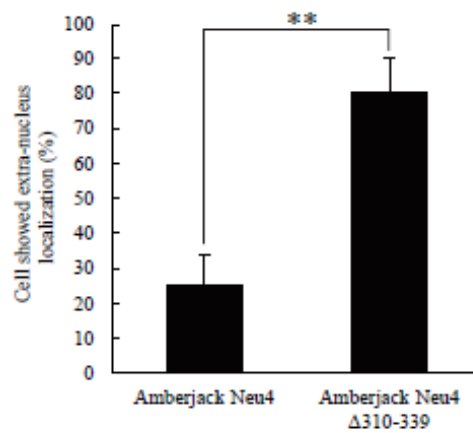
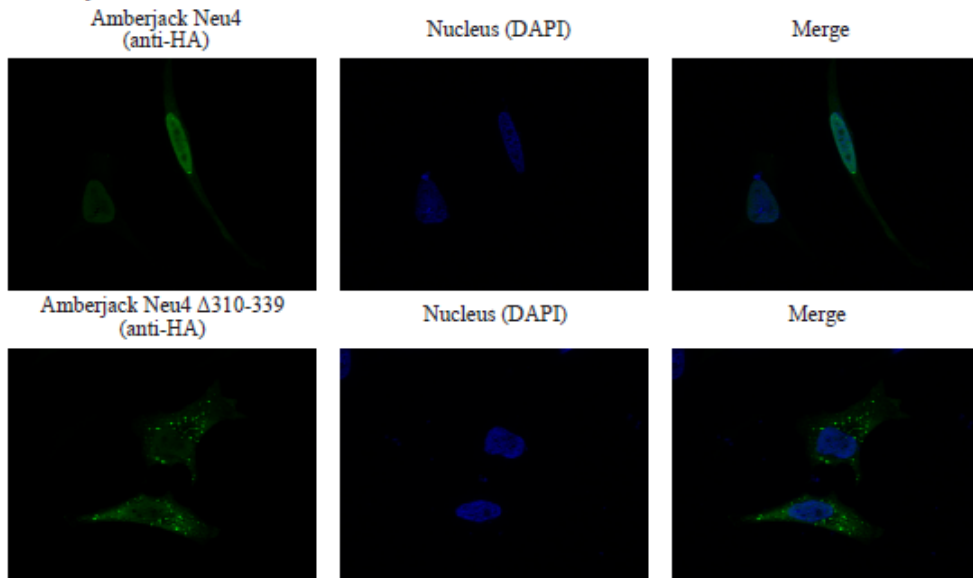


図 4-8 カンパチ Neu4 LC 欠損変異体の細胞内局在

カンパチ Neu4 LC 欠損変異体を作製し、免疫蛍光染色により、その細胞内局在を観察した。核局在を示す Neu4 導入細胞の割合は、ランダムに顕微鏡下で 5 視野を選び、そこに含まれる細胞をカウントした。**は統計学的有意差 $p < 0.01$ を意味する。

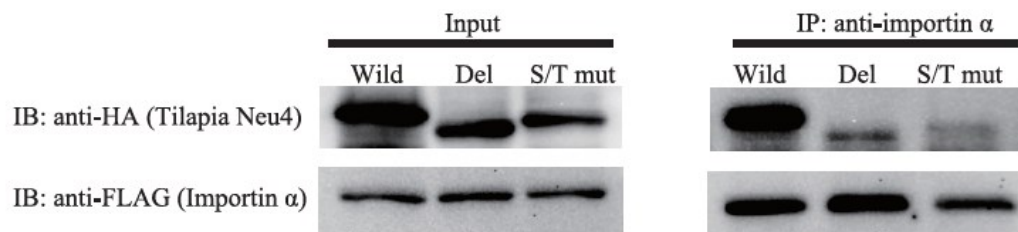


図 4-9 LC 配列と Importin α の相互作用解析

Anti-KPNA2 の抗体を用いて、免疫沈降を行った。IP にはタンパク質 200 μg 、Input は 5%である 5 μg を用いた。Wild はティラピア Neu4、Del はティラピア Neu4 LC 欠損変異体（アミノ酸配列: 310-346）、S/T mut は LC 配列に含まれる Ser または Thr を Ala に置換した変異体を表している。

総合考察

本研究では、魚類の生態的および形態的多様性と糖鎖がどのように関与しているのかを明らかとするために、ティラピアにおける脱シアリル化に着目し研究を行った。第1章ではティラピア *neu1* の遺伝子クローニングに成功し、それらの酵素学的性状および細胞内局在を明らかにした。ティラピアには、メダカやゼブラフィッシュと異なり、2つの *neu1* 遺伝子が存在した。この2つの Neu1 はどちらも至適 pH を酸性に持ち、リソソーム局在を示した。また、他の脊椎動物 Neu1 と同様に、保護タンパク質であるカテプシン A による活性化も確認された。一方、Neu1a と Neu1b 間で基質特性は異なっていた。Neu1a は、他の脊椎動物 Neu1 と同様に、シアロオリゴ糖を良い基質としたが、Neu1b は人工基質である MU-NANA に対してのみ活性を示した。

最近の研究により、ティラピア Neu1b は、Neu1a やメダカ Neu1、ゼブラフィッシュ Neu1 と異なり、MU-KDN に対しても活性を示すことが報告された¹⁴。これにより、ティラピアでは KDN シアリダーゼがリソソームに局在し、KDN 複合糖質を代謝することが示唆された。ゼブラフィッシュやニジマスの CMP シアル酸合成酵素は、ヒトの CMP シアル酸合成酵素と異なり、Neu5Ac だけでなく、KDN も基質とする^{88,89}。ティラピアの CMP シアル酸合成酵素はクローニングされていないが、他の魚種と同様に KDN を基質とする可能性が高い。したがって、ティラピアリソソームで分解された糖鎖に含まれる KDN が、新たな糖鎖修飾に使われることが予想される。2種類の Neu1 を持つシクリッド科以外の魚類として、

カラシン目のブラインドケープ・カラシンの酵素学的性状が明らかとなっている。ブラインドケープ・カラシン Neu1a はシアロオリゴ糖を良い基質とするが、Neu1b は MU-NANA のみしか基質としない。また、ティラピア Neu1b と同様に、ブラインドケープ・カラシン Neu1b は MU-KDN に対し、MU-NANA 同様の高い活性を示した¹⁴。このことから、ブラインドケープ・カラシンにおいてもティラピア同様の KDN 代謝経路の存在が予想される。さらに、ティラピア Neu1b とブラインドケープ・カラシン Neu1b は異なる分子進化をしていることが、アミノ酸配列を用いた系統樹解析により明らかとなっている¹⁴。このことは、魚類のリソソームにおいて、KDN を加水分解する酵素が平行進化により獲得されたことを示している。魚類における KDN の機能は不明であるが、一般に、バクテリアシアリダーゼが KDN を加水分解できないことから、糖鎖構造に存在する KDN はバクテリアから魚類の卵や受精卵を守る役割があるのではないかと考えられている⁹⁰。すなわち、KDN の代謝経路の差異が魚種ごとのバクテリアへの感受性に影響する可能性が示唆された。また、この2魚種に共通する性質として、高いストレス耐性が挙げられる。ティラピアは他の魚類に比べ優れた初期生存率を示すことや、高いストレス耐性を持つことが知られている⁴⁷。さらに、ブラインドケープ・カラシンは食料に乏しい洞窟に生息しているため、栄養飢餓に対して高い耐性を示す⁹¹。このような高いストレス耐性には、KDN 代謝経路の存在が関与しているかもしれない。今後は、Neu1b をノックアウトした魚類などを用いて、リソソームにおける KDN の代謝が魚類においてどのような機能をもたらすのか明らかにする必要がある。

2章では、ティラピア Neu4 が、これまで報告のある脊椎動物シアリダーゼと異なり、核に局在を示すユニークなシアリダーゼであることを発見した。さらに、このティラピア Neu4 の核局在は輸送タンパク質である Importin ファミリーにより、NLS を介して輸送されていることが明らかとなった。また4章では、ティラピア Neu4 の核局在は NLS だけでなく、LC 配列による Importin α との相互作用が必要であることを明らかにした。この LC 配列は他のスズキ類 Neu4 にも保存されており、実際に LC 配列を欠損させたカンパチ Neu4 変異体では核以外に局在する割合が増加した。最近の研究により、タンパク質の LC 配列が核小体やストレス顆粒といった膜を持たないオルガネラの形成に関与していることが明らかになってきた⁸⁶。したがって、スズキ類が持つ核局在型シアリダーゼは、核におけるシアル酸量の制御だけでなく、LC 配列を介した核内構造体の形成に関与している可能性が示唆された。実際に、一部の糖タンパク質が持つ N 型糖鎖はドロップレットの形成に寄与しており⁸⁷、ドロップレットの構成成分として糖鎖分解酵素が含まれる可能性は高い。今後は、核局在型シアリダーゼの機能だけでなく、LC 配列の機能についても着目し研究することが必要であると考えられる。

3章では、核に局在を示すティラピア Neu4 が網膜や視神経の形成に関与することが示唆された。一方、リソソームに局在するメダカ Neu4 は卵黄吸収に関与する¹¹。また、小胞体に局在する魚類 Neu4 の機能については明らかとなっていないが、プラティに小胞体ストレスを負荷すると、プラティ *neu4* の発現が上昇することから (unpublished data)、小胞体スト

レスに関与していることが推測される。このような異なる機能を示す糖鎖分解酵素 Neu4 は、魚類の多様な生態や形態に関与しているのではないかと考えられる。また、核局在する Neu4 を持つことが予想されるスズキ類の魚類は、魚類で最も繁栄した種であり、核局在型シアリダーゼが多様な生態や形態に関与しているかもしれない。今後は、系統的な糖関連遺伝子や糖鎖構造の比較などを網羅的に比較することにより、魚類の多様性について糖鎖生物学的視点から解明できることが期待される。

魚類では、胚発生にかかる期間や組織の形成などが魚種ごとに異なっている。魚類は全ゲノム重複により遺伝子数の違い、潜在的機能分化や新機能分化の影響により、多様な発生段階を示すのではないかと考えられている²⁶。その中でも糖鎖関連遺伝子の遺伝子重複はその遺伝子がコードするタンパク質だけでなく、標的となる全ての糖鎖構造に影響を与えることから、魚類の多様性において重要な役割を担っていることが予想される。実際、メダカの胚発生において、各メダカシアリダーゼ遺伝子は受精直後から発現しているのに対して¹⁸、ティラピアでは受精後 60 時間まで、各シアリダーゼ遺伝子はほとんど発現していなかった。また、メダカでは孵化直前での各シアリダーゼ遺伝子の発現変化は少ない¹⁸。一方、ティラピアでは孵化直前に *neu1a* 遺伝子の発現が増加し、孵化直後には *neu1b* の発現が上昇した。魚類の胚発生において、卵黄吸収は重要な生物学的プロセスである。卵黄の構成成分であるピテロジェニンは N 型糖鎖を有しており⁹²、Neu1 のようなリソソーム局在を示すシアリダーゼの標的基質である。実際に、メダカ *neu1* をモルフォリノオリゴでノックダウンした際

には、脱シリアル化の不全による卵黄の蓄積が見られた²¹。メダカは孵化後、すぐに卵黄が吸収されるのに対して^{20,73}、ティラピアでは孵化後7日目でも卵黄が確認される⁷³。シアリダーゼによる脱シリアル化はコアタンパク質の半減期に大きな影響を及ぼすことから、各ティラピアシアリダーゼ遺伝子が胚発生において比較的遅い時期に発現することと卵黄吸収の速度が関与しているのではないかと考えられる。今後はビテロジェニンを含めた卵黄タンパク質の糖鎖構造と糖鎖分解酵素の発現を魚種間で比較することにより、魚種間での発生、特に卵黄吸収の違いについて明らかにすることができるかもしれない。

魚類において、脳や眼といった器官は、生息地や餌の趣向性などを反映した形態をとることが知られている⁸¹。また、これら器官に発現している糖鎖構造の変化が脳などの形成や機能に影響を与えていることが示唆されている¹⁰。3章の結果より、神経細胞においてティラピア Neu4 は核のシアロ糖タンパク質およびガングリオシドのどちらも基質とし、神経分化を促進した。核のシアロ糖タンパク質としては、核膜孔を構成するヌクレオポリンが知られている。ヌクレオポリンは α 2-6結合シアル酸を持ち、この糖鎖部分をブロッキングすることにより核輸送が阻害される⁴⁵。胚発生時に、多くの転写因子が核内に輸送されることから、ティラピア Neu4 による NUP62 の脱シリアル化が核輸送に影響を与え、遺伝子の発現を制御している可能性がある。核に存在するガングリオシド GM1 は Na/Ca 輸送交換体の輸送活性に関与しており、核内の Ca^{2+} ホメオスタシスを変化させることで神経分化を促進する⁴⁴。さらに、GM1 は神経分化に関与する転写因子のプロモーター領域に結合し、ヒストンのア

セチル化を制御していることも知られている⁷⁶。したがって、ティラピア Neu4 は GD1a の脱シアリル化により GM1 を生成し、神経分化を制御していることが示唆された。

本研究で得られたティラピアシアリダーゼの知見を、これまでに報告にされたメダカおよびゼブラフィッシュシアリダーゼの比較をすることにより、同じ魚類においても異なる細胞内局在や基質特性を示すことが明らかとなった。シアリダーゼによる脱シアリル化は糖鎖分解の初発反応を担うだけでなく、糖鎖分子のコンフォメーションやレセプターの認識機構にも影響を与える。魚類において、異なる脱シアリル化機構を持つことは糖鎖構造においても多様性を示すことを意味する。この糖鎖の多様性が魚類の示す多様な生態や形態に関与しているのではないかと考えられる。本研究では、シアリダーゼが魚種ごとに異なり、それが魚類の多様性に関与している可能性を示した。今後は、シアリダーゼによる脱シアリル化だけでなく、糖鎖合成経路、糖代謝経路、糖鎖構造を比較し、魚類の多様性に糖鎖がどのように関与しているのかについて明らかにしていきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり終始貴重なご指導、ご助言を賜りました鹿児島大学水産学部の塩崎一弘准教授に心から感謝の意を申し上げますとともに厚くお礼申し上げます。

実験を遂行するにあたりご協力ならびに貴重なご助言をいただきました鹿児島大学水産学部小松正治教授、小谷知也教授、田角聡志准教授、技術職員 二神裕子さん、久保友理奈さん、鹿児島大学農学部藤田清貴准教授、二神泰基准教授、鹿児島大学理学部池永隆徳准教授、新潟大学理学部藤村衡至助教に厚くお礼申し上げます。

最後に本研究を行う上でご協力を頂いた塩崎研究室および小谷研究室の学生の皆さん、両親に深く感謝します。

参考文献

1. Ohtsubo, K. & Marth, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* vol. 126 855–867 (2006).
2. Moremen, K. W., Tiemeyer, M. & Nairn, A. v. Vertebrate protein glycosylation: Diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 13 448–462 (2012).
3. Shental-Bechor, D. & Levy, Y. Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8256–8261 (2008).
4. Song, X. *et al.* A sialylated glycan microarray reveals novel interactions of modified sialic acids with proteins and viruses. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 31610–31622 (2011).
5. Pearce, O. M. T. & Läubli, H. Sialic acids in cancer biology and immunity. *Glycobiology* **26**, 111–128 (2015).
6. Sørensen, A. L. *et al.* Role of sialic acid for platelet life span: Exposure of β -galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood* **114**, 1645–1654 (2009).
7. Vimr, E. R., Kalivoda, K. A., Deszo, E. L. & Steenbergen, S. M. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **68**, 132–153 (2004).
8. Miyagi, T. & Yamaguchi, K. Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology* **22**, 880–896 (2012).
9. Gallo, A. & Costantini, M. Glycobiology of reproductive processes in marine animals: The state of the art. *Marine Drugs* vol. 10 2861–2892 (2012).
10. Labak, I. *et al.* PSA-NCAM expression in the teleost optic tectum is related to ecological niche and use of vision in finding food. *Journal of Fish Biology* **91**, 473–489 (2017).
11. Shiozaki, K., Oishi, K. & Honda, A. Functional characterization of fish sialidases and their diversity among different orders. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **31**, E7–E13 (2019).
12. Giacomuzzi, E., Bresciani, R., Schauer, R., Monti, E. & Borsani, G. New Insights on the Sialidase Protein Family Revealed by a Phylogenetic Analysis in Metazoa. *PLoS ONE* **7**, (2012).
13. Okada, K. *et al.* Establishment and characterization of Neu1-knockout zebrafish and

- its abnormal clinical phenotypes. *Biochemical Journal* **477**, 2841–2857 (2020).
14. Shiozaki, K. *et al.* Identification of novel fish sialidase genes responsible for KDN-cleaving activity. *Glycoconjugate Journal* **37**, 745–753 (2020).
 15. Manzoni, M. *et al.* Molecular cloning and biochemical characterization of sialidases from zebrafish (*Danio rerio*). *Biochemical Journal* **408**, 395–406 (2007).
 16. Ryuzono, S. *et al.* Lysosomal localization of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) Neu1 sialidase and its highly conserved enzymatic profiles with human. *Gene* **575**, 513–523 (2016).
 17. Shiozaki, K. *et al.* Positive regulation of myoblast differentiation by medaka Neu3b sialidase through gangliosides desialylation. *Biochimie* **123**, 65–72 (2016).
 18. Shiozaki, K. *et al.* Molecular cloning and biochemical characterization of medaka (*Oryzias latipes*) lysosomal neu4 sialidase. *Fish Physiology and Biochemistry* **40**, 1461–1472 (2014).
 19. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics* **203**, 253–310 (1995).
 20. Iwamatsu, T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of development* **121**, 605–618 (2004).
 21. Ryuzono, S. *et al.* Suppression of Neu1 sialidase delays the absorption of yolk sac in medaka (*Oryzias latipes*) accompanied with the accumulation of α 2-3 sialoglycoproteins. *Biochimie* **135**, 63–71 (2017).
 22. Chigwechokha, P. K., Komatsu, M., Itakura, T. & Shiozaki, K. Nile Tilapia Neu3 sialidases: Molecular cloning, functional characterization and expression in *Oreochromis niloticus*. *Gene* **552**, 155–164 (2014).
 23. Bonten, E. J., Annunziata, I. & D’Azzo, A. Lysosomal multienzyme complex: Pros and cons of working together. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**, 2017–2032 (2014).
 24. Pshezhetsky, A. v. & Hinek, A. Where catabolism meets signalling: Neuraminidase 1 as a modulator of cell receptors. *Glycoconjugate Journal* **28**, 441–452 (2011).
 25. D’Azzo, A., Machado, E. & Annunziata, I. Pathogenesis, emerging therapeutic targets and treatment in sialidosis. *Expert Opinion on Orphan Drugs* **3**, 491–504 (2015).
 26. Xue, C. & Fu, Y. Preservation of duplicate genes by originalization. *Genetica* **136**, 69–78 (2009).
 27. Guarnieri, F. G., Arterburn, L. M., Penno, M. B., Cha, Y. & August, J. T. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 1941–1946 (1993).

28. Rudenkol, G., Bonten, E., D'azzo, A. & Hol, W. G. Three-dimensional structure of the human "protective protein": structure of the precursor form suggests a complex activation mechanism. *Structure* **3**, 1249–1259 (1995).
29. Wang, D., Zaitsev, S., Taylor, G., d'Azzo, A. & Bonten, E. Protective protein/cathepsin A rescues N-glycosylation defects in neuraminidase-1. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1790**, 275–282 (2009).
30. Shiozaki, K. *et al.* Developmental change of sialidase Neu4 expression in murine brain and its involvement in the regulation of neuronal cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 21157–21164 (2009).
31. Bigi, A. *et al.* Human sialidase NEU4 long and short are extrinsic proteins bound to outer mitochondrial membrane and the endoplasmic reticulum, respectively. *Glycobiology* **20**, 148–157 (2009).
32. Hasegawa, T. *et al.* Role of Neu4L sialidase and its substrate ganglioside GD3 in neuronal apoptosis induced by catechol metabolites. *FEBS Letters* **581**, 406–412 (2007).
33. Takahashi, K. *et al.* Sialidase NEU4 hydrolyzes polysialic acids of neural cell adhesion molecules and negatively regulates neurite formation by hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 14816–14826 (2012).
34. Honda, A. *et al.* Novel Nile tilapia Neu1 sialidases: Molecular cloning and biochemical characterization of the sialidases Neu1a and Neu1b. *Gene* **742**, (2020).
35. Luo, Y. *et al.* Rapid preparation of high-purity nuclear proteins from a small number of cultured cells for use in electrophoretic mobility shift assays. *BMC Immunology* **15**, (2014).
36. Saito, M., Fronda, C. L. & Yu, R. K. Sialidase activity in nuclear membranes of rat brain. *Journal of Neurochemistry* **66**, 2205–2208 (1996).
37. Lange, A. *et al.* Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin α . *Journal of Biological Chemistry* vol. 282 5101–5105 (2007).
38. Matsuura, Y. & Stewart, M. Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO Journal* **24**, 3681–3689 (2005).
39. Yan, W., Li, R., He, J., Du, J. & Hou, J. Importin β 1 mediates nuclear factor- κ B signal transduction into the nuclei of myeloma cells and affects their proliferation and apoptosis. *Cellular Signalling* **27**, 851–859 (2015).
40. Casey, J. R., Grinstein, S. & Orlowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 50–61 (2010).
41. Kirby, T. W. *et al.* DNA polymerase β contains a functional nuclear localization signal

- at its N-terminus. *Nucleic Acids Research* **45**, 1958–1970 (2017).
42. Ray Truant, B. R. C. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 tat and rev function as direct importin-dependent nuclear localization signals. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 1210–1217 (1999).
 43. Zhang, F., White, R. L. & Neufeld, K. L. Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 12577–12582 (2000).
 44. Wu, G., Xie, X., Lu, Z.-H. & Ledeen, R. W. Sodium-calcium exchanger complexed with GM1 ganglioside in nuclear membrane transfers calcium from nucleoplasm to endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 10829–10834 (2009).
 45. Emig, S., Schmalz, D., Shakibaei, M. & Buchner, K. The nuclear pore complex protein p62 is one of several sialic acid-containing proteins of the nuclear envelope. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 13787–13793 (1995).
 46. Fang, B., Hanover, J. A. & Miller, M. W. An evaluation of sialation of the nucleoporin p62. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **357**, 95–100 (1998).
 47. Sardella, B. A., Matey, V., Cooper, J., Gonzalez, R. J. & Brauner, C. J. Physiological, biochemical and morphological indicators of osmoregulatory stress in “California” Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. *Journal of Experimental Biology* **207**, 1399–1413 (2004).
 48. Kose, S., Furuta, M. & Imamoto, N. Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat shock-induced nuclear damage. *Cell* **149**, 578–589 (2012).
 49. Ming, G. L. & Song, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience* vol. 28 223–250 (2005).
 50. Kempermann, G., Wiskott, L. & Gage, F. H. Functional significance of adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 14 186–191 (2004).
 51. Langhauser, M. *et al.* Ncam1a and Ncam1b: Two carriers of polysialic acid with different functions in the developing zebrafish nervous system. *Glycobiology* **22**, 196–209 (2012).
 52. Rutishauser, U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 9 26–35 (2008).
 53. Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R. & Hildebrandt, H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological Reviews* **94**, 461–518 (2014).
 54. Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R. J. & Schnaar, R. L. A functional role for complex

- gangliosides: Motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Experimental Neurology* **166**, 227–234 (2000).
55. Handa, Y. *et al.* GD3 synthase gene knockout mice exhibit thermal hyperalgesia and mechanical allodynia but decreased response to formalin-induced prolonged noxious stimulation. *Pain* **117**, 271–279 (2005).
 56. Okuda, T. *et al.* Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 10230–10235 (2006).
 57. Yoshihara, T. *et al.* Lactosylceramide synthases encoded by B4galt5 and 6 genes are pivotal for neuronal generation and myelin formation in mice. *PLoS Genetics* **14**, (2018).
 58. Inoue, M. *et al.* Refractory skin injury in complex knock-out mice expressing only the GM3 ganglioside. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 29881–29888 (2002).
 59. Ohmi, Y. *et al.* Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 22405–22410 (2009).
 60. Pshezhetsky, A. v. & Ashmarina, M. Keeping it trim: roles of neuraminidases in CNS function. *Glycoconjugate Journal* vol. 35 375–386 (2018).
 61. Fanzani, A., Colombo, F., Giuliani, R., Preti, A. & Marchesini, S. Cytosolic sialidase Neu2 upregulation during PC12 cells differentiation. *FEBS Letters* **566**, 178–182 (2004).
 62. Hasegawa, T. *et al.* Molecular cloning of mouse ganglioside sialidase and its increased expression in Neuro2a cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 8007–8015 (2000).
 63. Abad Rodriguez, J., Piddini, E., Hasegawa, T., Miyagi, T. & Dotti, C. G. Plasma membrane ganglioside sialidase regulates axonal growth and regeneration in hippocampal neurons in culture. *Journal of Neuroscience* **21**, 8387–8395 (2001).
 64. Lenkowski, J. R. & Raymond, P. A. Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Progress in Retinal and Eye Research* vol. 40 94–123 (2014).
 65. Baldwin, J. Adaptation of enzymes to temperature: acetylcholinesterases in the central nervous system of fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **40**, 181–187 (1971).
 66. Grun, G. Light - induced acceleration of retina development in a mouth - brooding teleost. *Journal of Experimental Zoology* **208**, 291–301 (1979).

67. Pollen, A. A. *et al.* Environmental complexity and social organization sculpt the brain in Lake Tanganyikan cichlid fish. *Brain, Behavior and Evolution* **70**, 21–39 (2007).
68. Wang, Y. *et al.* Characterization of retinoic acid-induced neurobehavioral effects in developing zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry* **33**, 431–437 (2014).
69. Zeutzius, I. & Rahmann, H. Differentiation quantitative ultrastructural investigations on synaptogenesis in the cerebellum and the optic tectum of light-reared and dark-reared rainbow trout (*Sdmo gairdneri rich.*). *Differentiation* **17**, 181–186 (1980).
70. Valaperta, R. *et al.* Induction of axonal differentiation by silencing plasma membrane-associated sialidase Neu3 in neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry* **100**, 708–719 (2007).
71. Seybold, V., Swoboda, H. & Rahmann, H. Implication of membrane bound neuraminidase in developmental and adaptational processes of different vertebrate species. *Neurochemistry International* **14**, 347–352 (1989).
72. Honda, A., Chigwechokha, P. K., Kamada-Futagami, Y., Komatsu, M. & Shiozaki, K. Unique nuclear localization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Neu4 sialidase is regulated by nuclear transport receptor importin α / β . *Biochimie* **149**, 92–104 (2018).
73. Fujimura, K. & Okada, N. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. *Development Growth and Differentiation* **49**, 301–324 (2007).
74. Seybold, V. & Rahmann, H. Changes in developmental profiles of brain gangliosides during ontogeny of a teleost fish (*Sarotherodon mossambicus*, Cichlidae). *Roux's Archives of Developmental Biology* **194**, 166–172 (1985).
75. Wu, G., Lu, Z. H. & Ledeen, R. W. Induced and spontaneous neuritogenesis are associated with enhanced expression of ganglioside GM1 in the nuclear membrane. *Journal of Neuroscience* **15**, 3739–3746 (1995).
76. Tsai, Y. T., Itokazu, Y. & Yu, R. K. GM1 ganglioside is involved in epigenetic activation loci of neuronal cells. *Neurochemical Research* **41**, 107–115 (2016).
77. Khan, A. U., Qu, R., Ouyang, J. & Dai, J. Role of nucleoporins and transport receptors in cell differentiation. *Frontiers in Physiology* **11**, (2020).
78. Sylvester, J. B. *et al.* Brain diversity evolves via differences in patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 9718–9723 (2010).
79. Shiozaki, K. *et al.* Molecular cloning and biochemical characterization of two novel Neu3 sialidases, neu3a and neu3b, from medaka (*Oryzias latipes*). *Biochimie* **95**, 280–289 (2013).
80. Zupanc, G. K. H. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain.

- Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* vol. 192 649–670 (2006).
81. Seehausen, O. *et al.* Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature* **455**, 620–626 (2008).
 82. Ryan, V. H. *et al.* Mechanistic view of hnRNPA2 low-complexity domain structure, interactions, and phase separation altered by mutation and arginine methylation. *Molecular Cell* **69**, 465–479.e7 (2018).
 83. Ash, P. E. A. *et al.* Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* **77**, 639–646 (2013).
 84. Mori, K. *et al.* Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathologica* **126**, 881–893 (2013).
 85. Yoshizawa, T. *et al.* Nuclear Import Receptor Inhibits Phase Separation of FUS through Binding to Multiple Sites. *Cell* **173**, 693–705.e22 (2018).
 86. Frottin, F. *et al.* The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment. *Science* **365**, 342–347 (2019).
 87. Solá, R. J., Rodríguez-Martínez, J. A. & Griebenow, K. Modulation of protein biophysical properties by chemical glycosylation: Biochemical insights and biomedical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 64 2133–2152 (2007).
 88. Schaper, W. *et al.* Identification and biochemical characterization of two functional CMP-sialic acid synthetases in *Danio rerio*. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 13239–13248 (2012).
 89. Terada, T. *et al.* Synthesis of CMP-deaminoneuraminic acid (CMP-KDN) using the CTP: CMP-3- deoxynonulosonate cytidyltransferase from rainbow trout testis. Identification and characterization of a CMP-KDN synthetase. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 2640–2648 (1993).
 90. Kitajima, K. *et al.* Discovery of a new type of sialidase, “KDNase,” which specifically hydrolyzes deaminoneuraminyl (3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid) but not N-acylneuraminyl linkages. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 21415–21419 (1994).
 91. Riddle, M. R. *et al.* Insulin resistance in cavefish as an adaptation to a nutrient-limited environment. *Nature* **555**, 647–651 (2018).
 92. Fan, X., Klein, M., Flanagan-Steet, H. R. & Steet, R. Selective yolk deposition and mannose phosphorylation of lysosomal glycosidases in zebrafish. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 32946–32953 (2010).