

ゼブラフィッシュ GalNAc-T5 遺伝子の単離と発現解析

中村直介¹
黒坂光²

要旨

1. 要旨

細胞内で合成されたタンパク質は、ポリペプチド鎖が正しく折りたたまれ、さらに様々な翻訳後修飾を受けて機能的な分子となる。タンパク質への糖鎖の付加反応は重要な修飾反応の1つであり、この反応によりタンパク質に付加される糖鎖の主要なタイプであるムチン型糖鎖は、上皮細胞を覆う粘性タンパク質に多く認められる。さらに、多くの膜タンパク質、分泌タンパク質もこの糖鎖の修飾を受けているが、糖鎖の機能は十分には理解されていない。ムチン型糖鎖の生合成開始反応はポリプチド N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 転移酵素により触媒される。

我々はムチン型糖鎖の発生における役割を解明する目的でゼブラフィッシュの初期発生における GalNAc 転移酵素の網羅的機能解析を行っている。本論文では、ゼブラフィッシュではまだ報告例のなかった GalNAc 転移酵素アイソザイムの1種である *galnt5* 遺伝子を単離して全塩基配列を決定し、ゼブラフィッシュ初期胚を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を行い 72 時間胚において口顎部、および骨格筋においてアイソザイムが発現していることを見いだした。また、予備的ではあるが、CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集を行った結果について報告する。

キーワード：ムチン型糖鎖，糖転移酵素，ゼブラフィッシュ，*in situ* ハイブリダイゼーション，ゲノム編集

2. 序論

タンパク質への糖鎖の付加反応は、アスパラギン残基に N-アセチルグルコサミン残基が結合する N-グリコシド型糖鎖と、セリンもしくはトレオニン残基に N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基が結合する O-グリコシド型 (ムチン型) 糖鎖に大別される。ムチン型糖鎖の付加は、その名称が示す通り上皮組織を覆う粘性タンパク質のムチンに多く見られる。この糖鎖は、多くの膜タンパク質や分泌タンパク質にも見られ、それぞれの細胞や組織に特有の糖鎖構造を有するが、糖鎖の機

¹ 研究助教 総合生命科学部 生命システム学科, ² 教授 生命科学部 先端生命科学科

能は十分には理解されていない (1). O-GalNAc 型糖鎖の合成は、ペプチド鎖中のセリン/スレオニン残基のヒドロキシル基への GalNAc の転移により開始する. この反応を触媒するポリペプチド GalNAc 転移酵素 (GalNAc-T) は、タンパク中の糖鎖の数と位置を決定する重要な酵素である (2). この酵素は、糖転移酵素の中でも最も多くのアイソザイムからなる大きな遺伝子ファミリーで構成されている. ヒトでは 20 種類のアイソザイム (図 1) があり、それぞれのアイソザイムが互いに重複するが、特有の組織発現、基質特異性を有することが知られている (3). このことは、それぞれの組織に発現するアイソザイムの組み合わせにより組織に特徴的な糖鎖が付加され、タンパク質の機能に影響を与えることを示している.

我々は、ムチン型糖鎖機能解明を目的としてその生合成開始反応、すなわちポリペプチド鎖への GalNAc 付加反応を触媒する GalNAc-T に着目して研究を進め、これまでにゼブラフィッシュを用いて網羅的に GalNAc-T アイソザイムを単離し、解析を行ってきた (4, 5). ゼブラフィッシュは、ゲノムデータベースが整備され、ヒトの相同遺伝子の機能研究の優れたモデル生物である. ゼブラフィッシュとヒトの GalNAc-T においても、その構成を比較すると全体的には保存性が高いものの、ゼブラフィッシュに固有の特徴がある. まず、アイソザイムの構成に違いがある. ゼブラフィッシュでは 18 種類のアイソザイムが存在するが、*galnt15*, *galnt19* はコードされていない (図 1). これらのアイソザイムの役割については哺乳類も含めて解析が必要である. また、ゼブラフィッシュでは部分的にゲノムの重複があることから、GalNAc-T アイソザイムにおいても *galnt8* で 5 種類、*galnt18* で 2 種類のパラログが存在する. 我々は、このパラログが機能的な酵素をコードし、発現しているかどうか、さらにそれぞれのパラログの機能解析実験も行っている. *galnt5* については、以前のデータベースでは 10 番目以降のエクソンに逆位があり、コード領域中に終止コドンが認められたことから機能的な酵素遺伝子ではないと考えられた. しかし、最近のデータベースでは逆位はなくなっており、*galnt5* がゼブラフィッシュで機能している可能性が考えられた. 本論文では、この *galnt5* に着目し、*galnt5* cDNA の単離、発現解析、さらにゲノム編集による変異体作製実験について記す.

3. 方法

(1) ゼブラフィッシュ *galnt5* cDNA のクローニング

ゼブラフィッシュ 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 時間胚から調製した全 RNA の混合物を鋳型に、oligo d (T) をプライマーとして逆転写反応を行い、cDNA を調製した. この cDNA を鋳型とし、forward primer (5'-TGTAACACAGTGGTAGGCATGAGC-3'), reverse primer (5'-GCAACTCCATTTGCATTGC-3'), TaKaRa PrimeSTAR Max DNA polymerase を用いて PCR (98°C 10 秒, 55°C 15 秒, 72°C 1 分; 35 サイクル) を行った. 反応産物をアガロースゲル電気泳動後、目的サイズ (3019bp) 付近のバンドをゲルから切り出し、DNA 断片を精製した. 得られた断片をアンピシリン耐性遺伝子を含む pcrZerO にクローニングし、大腸菌を形質転換した. 目的のコロニーを選別し、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System を用いてプラスミドを精

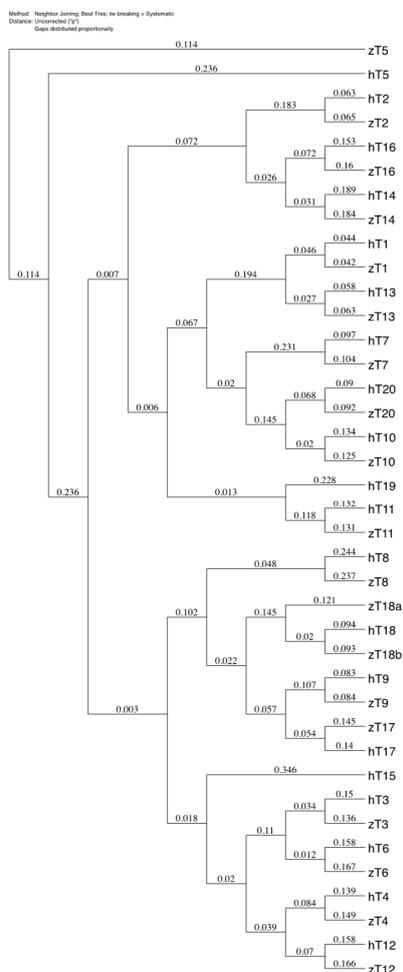


図1 ヒトおよびゼブラフィッシュ GalNAc-T をコードする遺伝子の系統樹

それぞれ GalNAc-T の全アミノ酸配列の相同性に基づいて系統樹を作製した。

アイソザイム名の h, z はそれぞれヒト, ゼブラフィッシュを表している。

製し, 塩基配列を決定した。

(2) 発現解析

a) RT-PCR

それぞれの発生段階のゼブラフィッシュから調製した cDNA を鋳型として, KOD SYBR qPCR キットを用いて, forward primer (5'-CTTCTCAGGCTGACTGTGC-3'), reverse primer (5'-CCGCTAGCATTACCCTCC-3') を用いて, リアルタイム PCR (95°C 15 秒, 60°C 1 分:40 サイクル) により *galnt5* の発現量を定量した. elongation factor 1 α -1 (*efl a 1*) を内在性コントロールとし,

relative standard curve 法により定量した。

b) *in situ* ハイブリダイゼーション

GalNAc-T5 の全長 cDNA を鋳型として標的部位を PCR で増幅した。その際、以下の様にセンス、アンチセンスプローブ作製用の反応において、片方のプライマーの 5' 末端に T7 プロモーター配列を付加した。プライマーの配列は次のとおりである。

センスプローブ (forward primer に T7 プロモータ配列 (下線) を付加)

forward 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTGAATAATCCCCTGCTCTCGC-3'

reverse 5'-CTGCCATCAAATGCTCCGTC-3'

アンチセンスプローブ (reverse primer に T7 プロモータ配列 (下線) を付加)

forward 5'-TGAAATAATCCCCTGCTCTCGC-3'

reverse 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCTGCCATCAAATGCTCCGTC-3'

増幅した DNA 断片を鋳型として、Digoxigenin (DIG) RNA Labeling Kit のマニュアルに準拠して転写反応を行い、DIG で標識したセンス、アンチセンス RNA プローブを作製した。得られた RNA プローブを用い、越田らの方法に従い *in situ* ハイブリダイゼーションを行った (6)。

(3) ゼブラフィッシュ *galnt5* の変異体作製

galnt5 の触媒領域中の Gal/GalNAc-T モチーフをコードする exon5 を標的として、crRNA/tracrRNA (25pg/100pg, IDT) と Cas9 タンパク質 (300pg, Fasmac) をゼブラフィッシュ初期胚にインジェクションした。5'-TACACTCAATGTGAGAGTCCAGG-3' (斜体で示した AGG は PAM 配列) を標的配列とした。

インジェクション胚を生育し、その尾部を一部切り取り、0.5mM EDTA を含む 25mM NaOH 溶液中で 95℃、30 分間処理した。そこに 40mM Tris/HCl, pH5 を加え中和した後に 3,000rpm、5 分遠心して上清を得た。上清に含まれるゲノム DNA を鋳型にして、標的部位を増幅させるプライマーペア (zT5-crispr-f; 5'-TCAACACACAATGCATGTTGTTT-3', zT5-crispr-r; 5'-AGGACAGGGCACTTTTCTGC-3') を用いて PCR を行い、標的領域を含む DNA 断片を増幅した。ゲノム編集の効率は、増幅 DNA 断片をマイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA, Shimadzu) を用いて、heteroduplex mobility 法 (HMA 法) により解析した (7)。

4. 結果

(1) ゼブラフィッシュ *galnt5* 遺伝子の単離と塩基配列の決定

galnt5 の発現分布を解析するために、*galnt5* cDNA を単離し、塩基配列を決定した。まず、ゼブラフィッシュ 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 時間胚から調製した全 RNA の混合物を鋳型に、oligo d (T) をプライマーとして逆転写反応を行い、cDNA を調製した。得られた cDNA を鋳型として、ゼブラフィッシュのゲノムと mRNA データベースに登録されている *galnt5* の塩基配列情報に基づいて設計したブ

ライマーを用いて PCR を行い, *galnt5* の全長 cDNA を含む DNA 断片 (約 3kb) を増幅した. 増幅した cDNA 断片をクローニングし, サイクルシーケンス法により全塩基配列を決定した.

ゼブラフィッシュ GalNAc-T5 はゼブラフィッシュの他のアイソザイムより大きく, 全長 781 アミノ酸残基 (2,343bp) からなる (図 2). これまでに単離されたアイソザイムと同様に GalNAc-T5 もこのファミリーに特徴的な構造, すなわち N 末端側から, 細胞質領域, 膜貫通領域, ステム領域, 触媒領域, レクチン様ドメインを有していた (図 3) (8). N 末端の細胞質領域は他のアイソザイムと同様に 12 アミノ酸残基からなる短い配列であり, その後に 23 アミノ酸残基の疎水性膜貫通領域がある. GalNAc-T5 のステム領域は他のアイソザイムと比較して特徴的に大きい. 代表的なアイソザイムであるゼブラフィッシュの GalNAc-T1 では 150 アミノ酸残基程度であるのに対し, GalNAc-T5

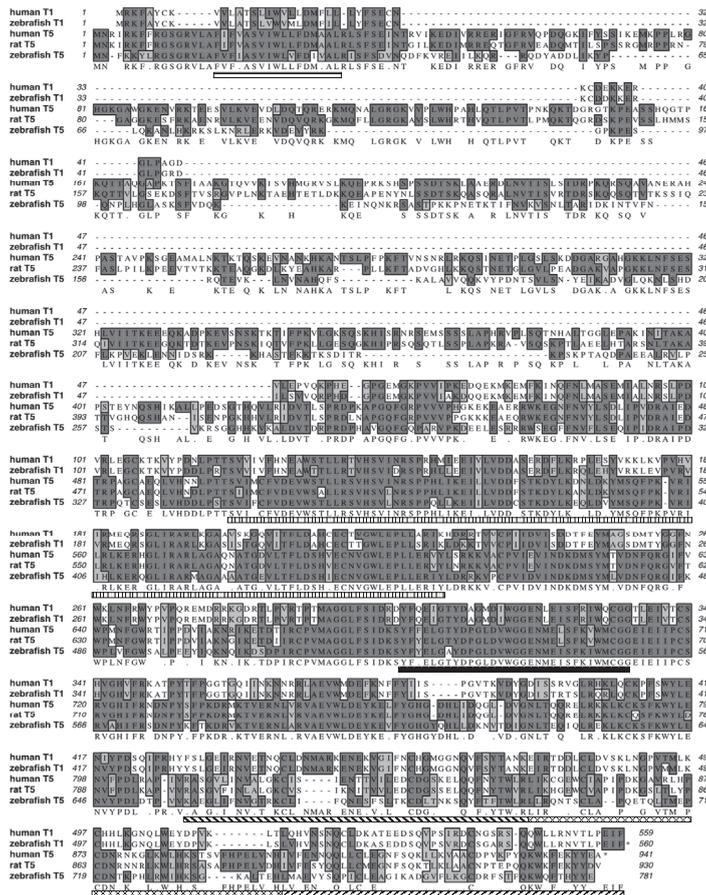


図2 ゼブラフィッシュ GalNAc-T5 の一次構造と他のアイソザイムとの比較

ゼブラフィッシュ GalNAc-T5 の全アミノ酸配列をヒト, ゼブラフィッシュ GalNAc-T1, およびヒト, ラット GalNAc-T 5 と比較した. アイソザイム間で保存されたアミノ酸残基, 相同なアミノ酸残基はそれぞれ濃い, および薄いグレーでの背景で示した.

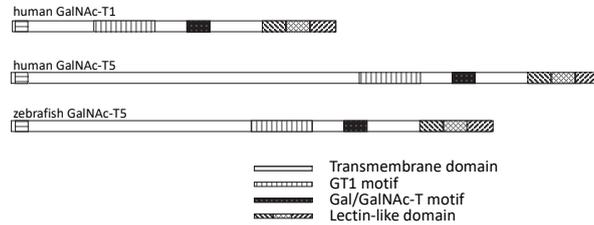


図3 GalNAc-T ファミリーの構造的特徴

ヒト, ゼブラフィッシュ GalNAc-T5 を標準的な構造を有するアイソザイムの GalNAc-T1 と比較した。GalNAc-T5 の膜貫通領域と GT1 モチーフの間をつなぐステム領域が長いことがわかる。ゼブラフィッシュ GalNAc-T5 のステム領域はヒトと比べると短めであった。

では 310 アミノ酸残基からなる。ステム領域の C 末端側にはそれぞれ独立した球状ドメインを持つ触媒領域とレクチン様領域が続くが, GalNAc-T5 のこれらの領域のサイズは他のアイソザイムと変わらない。触媒領域は 316 アミノ酸残基からなり, その中に GalNAc-T ファミリーで保存されている glycosyltransferase 1 (GT1) モチーフと Gal/GalNAc-T モチーフを含んでいる。GT1 モチーフは糖の供与体である糖ヌクレオチド, Gal/GalNAc-T モチーフは糖の受容体との結合に関与している (8)。すなわち, GT1 モチーフは UDP-GalNAc, Gal/GalNAc-T モチーフはペプチドを認識して結合し, GalNAc のペプチドへの転移反応を触媒する。GalNAc-T5 の GT1 モチーフ, Gal/GalNAc-T モチーフはそれぞれ 108, 23 アミノ酸残基からなる。GalNAc-T5 の C 末端側には 102 アミノ酸残基からなるレクチン様ドメインが存在する。GalNAc-T5 も他のアイソザイムと同様に, 植物レクチンのリシンと相同性の高い配列の 3 回の繰り返し構造が認められた。このドメインは糖鎖付加を受けたペプチドの GalNAc 残基を認識して結合することで, その近傍の Ser/Thr 残基への糖鎖付加反応の効率を上げ, ムチン型糖鎖に特徴的な密度の高い糖鎖付加反応を可能にする (9)。ゼブラフィッシュ GalNAc-T5 もこの構造を持つことから, Ser, Thr を多く含むムチン様ペプチドがこのアイソザイムに対する良い基質になると考えられる。

膜貫通領域と触媒領域の間にあるステム領域は棒状の構造をとり, ゴルジ膜から離れた場所に触媒領域を位置付けて反応を進める働きがあるとされる。これまで単離された GalNAc-T5 のステム領域が長いことの生理的な意味は不明である。我々の哺乳類の GalNAc-T5 を用いた *in vitro* の予備的な実験では, ステム領域を短くした組換え GalNAc-T5 の活性は野生型とほぼ同じである。

(2) ゼブラフィッシュ GalNAc-T5 の発現解析

胚発生における GalNAc-T5 の発現を定量的 PCR により求めた。受精後それぞれ 12 時間, 18 時間, 24 時間, 36 時間, 48 時間, 72 時間の胚から単離したゲノム DNA を鋳型に, *e1 a 1* をコントロールとして, *galnt5* 遺伝子の発現量を定量的 PCR により求めた (図 4)。*galnt5* の発現は, 受精後 12 時

間から 24 時間まではほぼ一定で、その後、半分程度までに発現量が低下したが、72 時間胚では約 4.5 倍にまで上昇した。ゼブラフィッシュの消化管の形態形成は、受精後 48 ~ 72 時間頃に完了する(10)。*galnt5* の発現は消化管形成の後期において亢進している。

次に、*galnt5* の組織における発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べた。様々な発生段階の初期胚を用いて実験を行ったが、12 ~ 48 時間胚では *galnt5* の発現量が図 4 のように低いため、*in situ* ハイブリダイゼーションでは検出できなかった。図 5 は 72 時間胚における *galnt5* の発現を示した。アンチセンスプローブを用いた染色において、口顎部に強い発現が見られた。この部位での発現により、*galnt5* が消化管粘性タンパク質の糖鎖付加反応に関与している可能性が考えられた。また、体幹部においては骨格筋での発現が認められた。ヒトにおいては、GalNAc-T5 タンパク、mRNA は消化管や肺で高いレベルで発現するが、骨格筋での発現は低い (The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136542-GALNT5/tissue>)。その一方、マウスでは GalNAc-T5 は骨格筋で発現することが示されているため (Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:2179403>)、生物種によっては本酵素が骨格筋の糖鎖付加に関与する可能性がある。本実験では初期胚での *galnt5* の発現を解析しているため、成魚での発現を観察して哺乳類と比較する必要があるかもしれない。

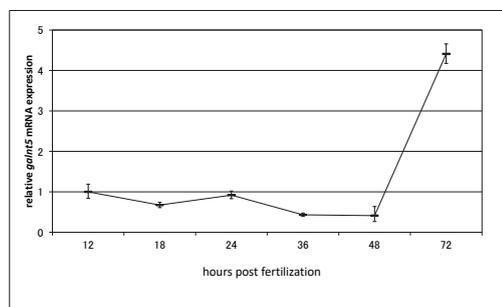


図 4 定量的 PCR によるゼブラフィッシュ *galnt5* の発現解析

12 時間胚における *efl a* に対する *galnt5* の発現量を 1 として、それぞれの胚における *efl a* に対する *galnt5* の発現の比を求めた。

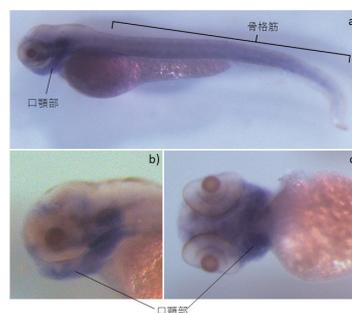


図 5 *in situ* ハイブリダイゼーションによるゼブラフィッシュ初期胚における *galnt5* の発現解析

72 時間胚をアンチセンスプローブで染色した結果を示した。a) 側面からの全体像。b) 側面からの頭部像、c) 背面からの頭部像

(3) ゼブラフィッシュ *galnt5* 変異体作製

galnt5 の生体内の機能を解析するために、*galnt5* の触媒領域中の Gal/GalNAc-T モチーフをコードする exon5 を標的として、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行った。CRISPR/Cas9 をインジェクションしたキメラ胚を生育し、尾部より抽出したゲノム DNA を鋳型として、ゲノム編集標的部位を含む DNA 断片を PCR で増幅し、HMA 法で解析した。図 6 では、10 個体を解析した。図 6 の c で示した野生型個体では、147bp のホモ 2 本鎖のバンドのみが増幅している。キメラ胚でゲノム編集が起こると、標的配列に様々な塩基挿入や欠失が起こるため、多様な大きさの DNA 断片が増幅し、ヘテロ 2 本鎖が形成される。ヘテロ 2 本鎖 DNA は、内部に一部ミスマッチ配列を含んでいることから、ホモ 2 本鎖 DNA と比べてかさ高い立体構造をとるために泳動速度が遅くなる。図 6 で明らかな様に全ての個体で、野生型のホモ 2 本鎖よりも高分子量のバンドが観察されており、効率よくゲノム編集が行われていることがわかる。個体 1, 5, 8 では、野生型ホモ 2 本鎖より低分子量のバンドが増幅していることから、一部のゲノムで比較大きな欠失反応が起こったことがわかる。特に個体 1 では分子量が大きく低下していることから、大きな塩基欠失が期待できる。

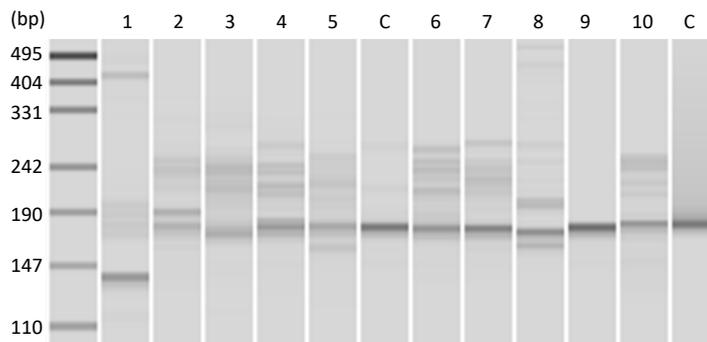


図 6 *galnt5* を標的としてゲノム編集を行ったゼブラフィッシュ F0 キメラ胚の HMA 解析

10 個体の F0 キメラ胚から抽出したゲノム DNA を鋳型にゲノム編集標的部位を PCR で増幅して得た DNA 産物を HMA で解析した。C (2 個体) は野生型である。

5. 考察

GalNAc-T5 はステム領域が他のアイソザイムより長いという特徴的な構造を有しているが、他のいくつかのアイソザイムと同様に、消化管等に多く発現し、セリンやスレオニンを多く含む典型的なムチン様ペプチドを良い基質としており、粘液糖タンパク質の糖鎖付加に関わるであろう性質を備えている (11)。ゼブラフィッシュにおいても、粘液タンパク質の産生組織の一つである口顎部に強く発現していることからゼブラフィッシュ GalNAc-T5 もムチン型糖タンパク質の糖鎖付加反応を担っている可能性が考えられた。骨格筋での発現は生物種により異なり、ヒトではほとんど発現していないのに対し、マウスは発現している。ゼブラフィッシュ初期胚における骨格筋での発現の生理的な

意味は不明である。また、骨格筋での発現が72時間胚に特徴的なものかどうかを調べる必要がある。近年、GalNAc-T5が胆管細胞がんにおいて癌の悪性化に関与する(12)との報告がある。また一方、膀胱癌や胃癌においては癌の進行とGalNAc-T5の発現低下との間に相関が認められている(13,14)。

これらの知見は、GalNAc-T5が典型的なムチン型ペプチドへの糖鎖付加を行うだけでなく、情報伝達に関わる分子の糖鎖修飾を通じて細胞増殖などに影響を与えていることを示している。この様にGalNAc-T5が細胞内の情報伝達との関係を示す報告がなされているものの、GalNAc-T5の分子レベルの詳しい機能解析はなされていない。本研究ではGalNAc-T5の機能解析を目的として、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集により欠失変異体を作製する実験に着手した。糖供与体のUDP-GalNAc結合領域をコードする配列を標的に設計したCRISPR/Cas9をインジェクションしたキメラ胚を解析することにより、効率よくゲノム編集が起こっていることが確認できた。我々のグループはこれまでに同様の方法を用いて、ゼブラフィッシュ *galnt8*, *galnt9*, *galnt17*, *galnt18* の欠失変異体を作製してきた。今後も同様に欠失変異体を作製し、*galnt5* の機能解析を進めていく。

6. 引用文献

1. Brockhausen, I. & Stanley, P. O-GalNAc glycans. in *Essentials of Glycobiology, 3rd ed.* (ed. Varki, A.) 113-124 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015) .
2. Rini, J. M. & Esko, J. D. Glycosyltransferases and glycan-processing enzymes. in *Essentials of Glycobiology 3rd ed.* (ed. Varki, A.) 65-76 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015) .
3. de las Rivas, M., Lira-Navarrete, E., Gerken, T. A. & Hurtado-Guerrero, R. Polypeptide GalNAc-Ts: from redundancy to specificity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **56**, 87-96 (2019) .
4. Nakayama, Y., Nakamura, N., Kawai, T., Kaneda, E., Takahashi, Y., Miyake, A., Itoh, N. & Kurosaka, A. Identification and expression analysis of zebrafish polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase Y-subfamily genes during embryonic development. *Gene Expr. Patterns* **16**, 1-7 (2014) .
5. Kurosaka, A., Nakayama, Y. & Nakamura, N. O-glycosylation in development of zebrafish. *Glycoscience: Biology and Medicine* (eds. Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G. W., Seeberger, P. H. & Wong, C. H.) 833-840 (Springer Japan, 2015) .
6. Koshida, S., Shinya, M., Mizuno, T., Kuroiwa, A. & Takeda, H. Initial anteroposterior pattern of the zebrafish central nervous system is determined by differential competence of the epiblast. *Development* **125**, 1957-1966 (1998) .
7. Mattick, K. L., Green, J., Punia, P., Belda, F., Gallimore, C. & Brown, D. The heteroduplex mobility assay (HMA) as a pre-sequencing screen for Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* **87**, 161-169 (2000) .
8. Bennett, E. P., Mandel, U., Clausen, H., Gerken, T., Fritz, T. & Tabak, L. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family.

- Glycobiology* **22**, 736–756 (2012) .
9. Gerken, T. A., Revoredo, L., Thome, J., Tabak, L., Vester-Christensen, M., Clausen, H., Gahlay, G., Jarvis, D., Johnson, R., Moniz, H. & Moremen, K. The lectin domain of the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases (ppGalNAc-Ts) acts as a switch directing glycopeptide substrate glycosylation in an N- or C-terminal direction, further controlling mucin type O-Glycosylation. *J. Biol. Chem.* **288**, 19900–19914 (2013) .
 10. Wallace, K. N., Akhter, S., Smith, E. M., Lorent, K. & Pack, M. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech. Dev.* **122**, 157–173 (2005) .
 11. Ten Hagen, K. G., Hagen, F., Balys, M., Beres, T., Van Wuyckhuysse, B. & Tabak, L. Cloning and expression of a novel, tissue specifically expressed member of the UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family. *J. Biol. Chem.* **273**, 27749–27754 (1998) .
 12. Detarya, M., Sawanyawisuth, K., Aphivatanasiri, C., Chuangchaiya, S., Saranaruk, P., Sukprasert, L., Silsirivanit, A., Araki, N., Wongkham, S. & Wongkham, C. The O-GalNAcylating enzyme GALNT5 mediates carcinogenesis and progression of cholangiocarcinoma via activation of AKT/ERK signaling. *Glycobiology* (2019) doi:10.1093/glycob/cwz098.
 13. Caffrey, T., Sagar, S., Thomas, D., Lewallen, M., Hollingsworth, M. & Radhakrishnan, P. The glycoprotein mucin - 1 negatively regulates GalNAc transferase 5 expression in pancreatic cancer. *FEBS Lett.* **593**, 2751–2761 (2019) .
 14. He, H., Shen, Z., Zhang, H., Wang, X., Tang, Z., Xu, J. & Sun, Y. Clinical significance of polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-5 (GalNAc-T5) expression in patients with gastric cancer. *Br. J. Cancer* **110**, 2021–2029 (2014) .

Isolation and expression analyses of a zebrafish GalNAc-T5 gene

Naosuke NAKAMURA

Akira KUROSAKA

Abstract

Proteins synthesized in the cell need to be correctly folded and undergo various post-translational modifications to become functional molecules. The addition of glycans to proteins is one of the important post-translational modifications. Mucin-type glycans, which are one of the most frequently observed glycans, are often found in mucus proteins covering epithelial cells. In addition, many membrane and secretory proteins are modified by these glycans, but their functions are not well understood. The biosynthetic initiation reaction of mucin-type glycans is catalyzed by polypeptide N-acetylgalactosamine (GalNAc) transferases.

To elucidate the roles of mucin-type glycans in the development of zebrafish, we have been conducting extensive analyses of GalNAc-transferase functions during early development. In this paper, we isolated and fully sequenced the *galnt5* gene, a novel member of the GalNAc-transferase isoenzyme, which has not been reported in zebrafish. The *galnt5* expressions in the zebrafish early embryos were analyzed by in situ hybridization, and we found that the embryos of 72 hpf expressed *galnt5* in the oral and maxillary regions and the skeletal muscle. We also report the preliminary results of the CRISPR/Cas9 genome editing.

Keywords : mucin-type carbohydrates, glycosyltransferases, zebrafish, in situ hybridization, genome edition