

# ゼブラフィッシュを用いた筋ジストロフィー関連糖鎖修飾機構の解析システムの作製

平成 25 年 4 月 25 日受付

中村直介\*  
黒坂光\*

## 要旨

近年、脳の重篤な疾患を伴う先天性筋ジストロフィーが、膜タンパク質であるジストログリカン(以降 DG)上の糖鎖異常に起因する事が示され、これらの疾患はジストログリカノパチーと分類されるようになった。この内のいくつかの例では、O-mannosyl 型糖鎖に異常が生じることが明らかになり、さらにその合成に関わる糖転移酵素が同定された。一方で、全ゲノム配列決定などの解析技術の発展に伴い、ジストログリカノパチーの原因候補遺伝子が多く見つかっているが、未だにそれらの生化学的機能や、生体内での詳しい機能解析はなされていない。そこで我々は、ゼブラフィッシュを用い、 $\alpha$ ジストログリカン(以降  $\alpha$ DG)の糖鎖修飾解析のモデルシステム構築を目的として研究を行った。今年度は、昨年に単離したゼブラフィッシュ DG の全長 cDNA を元に、精製や検出を容易にする 3xFLAG タグを融合した組換え  $\alpha$ DG を作製し、大腸菌内で発現させる事に成功した。また、同様のコンストラクトから mRNA を作製し、ゼブラフィッシュに強制発現したところ、組換え  $\alpha$ DG がゼブラフィッシュ内で発現することを見いだした。今後は  $\alpha$ DG をより効率良く発現させるため、 $\alpha$ DG cDNA をゲノム内に持つ遺伝子組換えゼブラフィッシュの作製を試みる。

キーワード：ジストログリカノパチー、筋ジストロフィー、ゼブラフィッシュ、糖鎖修飾、組換えタンパク質

## 1. はじめに

タンパク質の重要な翻訳後修飾反応のひとつである糖鎖の生物学的役割は、その構造的多様性のために十分理解されていない。一般的に、タンパク質に含まれる糖鎖は、糖-タンパク質間の結合様式より、N-結合型糖鎖と O-結合型糖鎖に大別される。さらに O-結合型糖鎖は、タンパク質と直接結合する糖の違いにより、O-mannosyl 型や O-GalNAc 型糖鎖などに分類される。N-結合型糖鎖は、N-結合型糖鎖付加を受けるコンセンサス配列が存在するため、糖鎖付加部位の予測が可能であるが、O-結合型糖鎖ではコンセンサス配列がないため、糖鎖付加部位の予測は困難である。また、O-結合型

---

\* 京都産業大学総合生命科学部

糖鎖の良い検出手法や、O-結合型糖鎖を特異的に切断するグリコシダーゼがない事も、O-結合型糖鎖の機能解析を著しく困難にしている。

現在まで、O-結合型糖鎖の働きを示唆する数少ない例の1つとして、DG上の糖鎖修飾異常に起因する先天性筋ジストロフィーがある。DGの糖鎖修飾異常を特徴とする疾病はジストログリカノパチーと分類され、Walker-Warburg syndromeやmuscle-eye-brain disease、さらには、日本人に特有の福山型筋ジストロフィーなどが、代表的な例としてあげられる<sup>(1)</sup>。DGの糖鎖修飾異常は、DGとリガンドとの結合能の低下を引き起こし、その結果、脳の重篤な疾患を含む先天性筋ジストロフィーを発症すると考えられている。近年になり、全ゲノム配列決定などの解析技術の発展により、DGの糖鎖修飾異常がみられるジストログリカノパチーの原因遺伝子が次々と同定されているが、未だにそれらの詳しい機能解析はなされていない<sup>(2,3)</sup>。

細胞表面に存在する膜タンパク質であるDGは、細胞外マトリックスと細胞内にある細胞骨格を結び付ける非常に重要な分子である。DGは、O-結合型糖鎖付加を受けることのできるセリンやスレオニン残基を多く含むムチン様ドメインを持ち(図1)、ほ乳類の筋組織由来のDGは重量にして50%以上の糖を含むことが知られている<sup>(4)</sup>。筆者らは、脊椎動物のモデル生物であるゼブラフィッシュを用いて、DG上の糖鎖生合成に関わる酵素遺伝子を同定し、その生合成調節機構および糖鎖の生理的な役割を解明する事を目的として研究を行っている。そのためには、組換えDGをゼブラフィッシュ内で発現させ、候補遺伝子のノックダウンを同時に行い、組換えDG上の糖鎖構造の変化を解析する

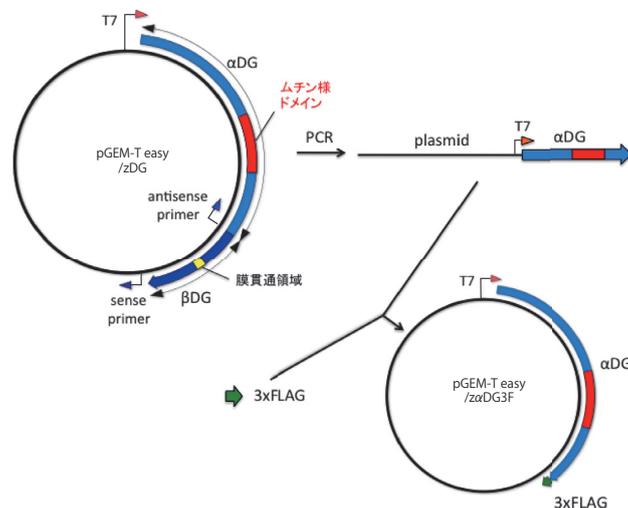


図1 組換え zαDG 3xFLAG コンストラクトの作製

全長のゼブラフィッシュ DG をテンプレートに、図に示した sense と antisense primer を用いて、βDG と一部のプラスミド配列を除くその他の領域を PCR により増幅した。得られた αDG を含む断片の末端に 3xFLAG タグをコードする配列を付加して、ゼブラフィッシュ αDG 3xFLAG を作製した。得られたコンストラクト (pGEM-T easy/zαDG3F) は αDG cDNA (水色) の上流に T7 プロモータ配列 (赤矢印) を持つ。オレンジ；ムチン様ドメイン、黄色；膜貫通領域

事が有効であると考え。本年度は、DG をゼブラフィッシュ内で強制発現することに成功したのでここに報告する。

## 2. 結果と考察

### 組換えゼブラフィッシュ $\alpha$ DG ( $z\alpha$ DG) の作製

ほ乳類の DG は、翻訳後にプロセッシングを受け、 $\alpha$ DG と  $\beta$ DG の 2 本のポリペプチド鎖を生じる。 $\alpha$ DG と  $\beta$ DG は細胞膜上で非共有結合により会合してヘテロダイマーを形成する。以前に筆者らはショウジョウバエを用いて DG の糖鎖構造と、その生合成に関わる分子の同定を行った。その実験では、DG の糖鎖付加部位を含むペプチド ( $\alpha$ DG 相当) の末端に 3xFLAG タグを付加させた組換え分子を強制発現させ、その糖鎖構造を解析することに成功した<sup>(5)</sup>。その経験を踏まえ、我々は脊椎動物であり、DG の糖鎖修飾に関与すると考えられる分子群を全て保存しているゼブラフィッシュを用いて、組換え  $\alpha$ DG を *in vivo* において強制発現させ、その糖鎖構造を解析する実験に着手した。まず、昨年度に単離したゼブラフィッシュの全長 DG をテンプレートに、図 1 に示す様な PCR を行い、 $\alpha$ DG を含む cDNA 断片を得た。次に、この断片の 3' 末端に 3xFLAG 配列をコードする cDNA を連結し、その産物 (pGEM-T easy/ $z\alpha$ DG3F) を用いて大腸菌をトランスフォーメーションした。次に、精製した pGEM-T easy/ $z\alpha$ DG3F を鋳型にして  $z\alpha$ DG 3xFLAG ( $z\alpha$ DG3F) をコードする cDNA 断片を PCR で増幅し、pCS2+ベクターにサブクローニングした。同様に大腸菌をトランスフォーメーションし、プラスミド (pCS2+/ $z\alpha$ DG3F) を精製した。pCS2+/ $z\alpha$ DG3F は  $z\alpha$ DG3F の mRNA を作製するために用いる。ここで得られたプラスミドを用いて以下の実験を行った。

### 大腸菌でのゼブラフィッシュ $\alpha$ DG の発現解析

pGEM-T easy/ $z\alpha$ DG3F は、 $z\alpha$ DG3F cDNA の上流に T7 プロモーターを持つ (図 1)。そこで、ラムノースの添加により組換え T7 RNA ポリメラーゼが発現誘導される大腸菌、KRX 株 (Promega) を、pGEM-T easy/ $z\alpha$ DG3F を用いてトランスフォーメーションし、タンパク質の発現を解析した。形質転換した大腸菌をラムノース存在下で、14 時間、37°C で液体培養を行い、大腸菌の抽出液を SDS-PAGE にて解析したところ、幾つかの発現誘導されてくるタンパク質が CBB 染色にて確認できた (図 2)。そこで、FLAG タグを認識する FLAG M2 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、約 93kDa と約 45kDa のバンドが検出された。アミノ酸配列から想定される  $z\alpha$ DG3F の分子量は 71kDa であり、糖鎖修飾反応を持たない大腸菌で、約 93kDa の大きなバンドが検出された理由は不明であるが、以前の筆者らの実験において、ヒトの DG 由来のペプチドを大腸菌で発現させて電気泳動で解析したところ、予想よりも高分子領域にバンドを検出したという経験がある (未発表データ)。また、約 45kDa のバンドは、約 93kDa の分解産物である可能性があるが、これら 2 本のバンドについては質量分析等を行い、分子を同定する必要がある。

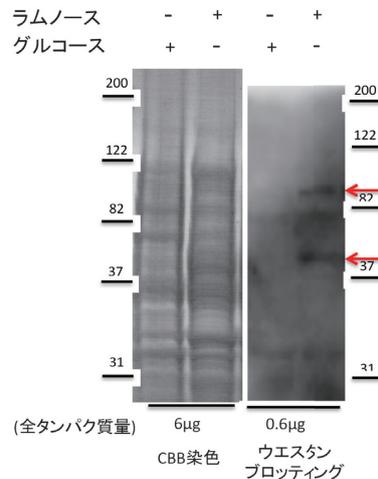


図2 組換え  $z\alpha$ DG 3xFLAG の大腸菌での発現

pGEM-T easy/ $z\alpha$ DG3F で T7 RNA ポリメラーゼを持つ大腸菌株 (KRX) を形質転換し、 $z\alpha$ DG3F を KRX 内で発現させた。KRX 株中の T7 RNA ポリメラーゼの発現はラムノースオペロンで支配されるため、グルコース存在下で阻害され、ラムノース存在下で誘導される。このため、T7 プロモータ下流の目的タンパク質も同様の発現調節を受ける。大腸菌から回収したタンパク質を SDS-PAGE にて分離後、CBB 染色にて解析したところ、ラムノースにより誘導されるいくつかのバンドが確認できた(左)。さらに、3xFLAG を認識する FLAG M2 抗体を用いたウェスタンブロットニングで解析したところ(右)、その内の2つのタンパク質に相当するシグナルが検出できた(赤矢印)。

### ゼブラフィッシュでの $z\alpha$ DG の強制発現

pCS2+/ $z\alpha$ DG3F をテンプレートに  $z\alpha$ DG3F をコードする mRNA を作製し、それを精製後にゼブラフィッシュの初期胚に微量注入した。図 3a で示す様に、受精後 24 時間の胚で、眼が小さくなるなどの発生遅延が見られた。これは、モルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて DG の発現を阻害した時の表現型と良く類似する<sup>(6)</sup>。本実験では、 $z\alpha$ DG3F のみを強制発現したため、 $\beta$ DG に比べ  $\alpha$ DG が過剰量存在すると思われる。糖鎖付加された過剰の  $\alpha$ DG はラミニン等の内在性リガンドとの結合活性を持つため、 $\alpha$ DG/ $\beta$ DG 複合体のラミニンへの結合に対してドミナントネガティブ的に働いた可能性がある。さらに、同様に mRNA を注入した受精後 9 時間胚を回収し、FLAG M2 樹脂を用いて組換え  $z\alpha$ DG3F を精製し、ウェスタンブロットニング解析を行った。その結果、200kDa 付近に  $z\alpha$ DG3F と思われるバンドが検出された(図 3b)。大腸菌よりもより高分子量のバンドが得られたが、これはゼブラフィッシュでは糖鎖修飾を受けて分子量が大きくなった事が考えられる。これらの結果より、今回用いたコンストラクトによって、ゼブラフィッシュ内で組換え  $z\alpha$ DG3F の強制発現が可能である事が示された。

### 3. おわりに

ジストログリカノパチーは、未だに治療法が確立されていない難病であり、その原因解明には上述の様に、ジストログリカン上の糖鎖修飾に関連する分子の機能同定が必要である。そのためには、従

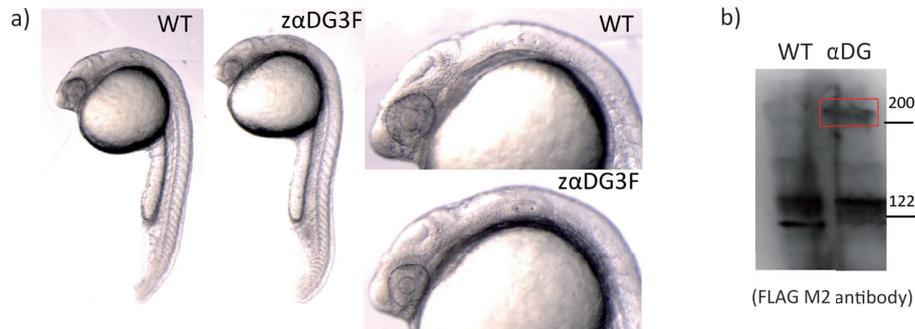


図3 ゼブラフィッシュにおける  $\alpha$ DG 3xFLAG の強制発現

$\alpha$ DG3F をコードする mRNA を試験管内で合成後、微量注入法にてゼブラフィッシュの初期胚に導入した。a) 受精後 24 時間に観察したところ、野生型と比べて眼が小さい等の発現遅延が見られた。b) 野生型 (WT) 及び、 $\alpha$ DG3F mRNA を導入した胚からタンパク質を抽出し、FLAG M2 抗体を用いて組換え  $\alpha$ DG3F タンパク質を精製し、ウエスタンブロットングにより解析した。赤枠で示した、約 200kDa の組換え  $\alpha$ DG3F のシグナルが検出できた。

来から用いられてきた培養細胞や、患者由来の細胞を用いた実験系に加え、新たな糖鎖修飾解析のシステムの構築が求められている。今回我々は、脊椎動物であるゼブラフィッシュを用いて、 $\alpha$ DG の強制発現の可能性を示した。しかしながら、今回の系では、 $\alpha$ DG の発現量が少ないため、その糖鎖構造解析には発現量を高める必要がある。今後は  $\alpha$ DG3F cDNA をゲノム内に持つ遺伝子組換えゼブラフィッシュの作製し、 $\alpha$ DG の発現を解析する予定である。

#### 参考文献

- Hewitt, J. E. (2009) Abnormal Glycosylation of Dystroglycan in Human Genetic Disease, *Biochim Biophys Acta* 1792, 853-861.
- Buysse, K., Riemersma, M., Powell, G., van Reeuwijk, J., Chitayat, D., Roscioli, T., Kamsteeg, E. J., van den Elzen, C., van Beusekom, E., Blaser, S., Babul-Hirji, R., Halliday, W., Wright, G. J., Stemple, D. L., Lin, Y. Y., Lefeber, D. J., and van Bokhoven, H. (2013) Missense Mutations in  $\beta$ -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase 1 (B3GNT1) Cause Walker-Warburg Syndrome, *Hum Mol Genet* 22, 1746-1754.
- Stevens, E., Carss, K. J., Cirak, S., Foley, A. R., Torelli, S., Willer, T., Tambunan, D. E., Yau, S., Brodd, L., Sewry, C. A., Feng, L., Haliloglu, G., Orhan, D., Dobyns, W. B., Enns, G. M., Manning, M., Krause, A., Salih, M. A., Walsh, C. A., Hurler, M., Campbell, K. P., Manzini, M. C., Stemple, D., Lin, Y. Y., and Muntoni, F. (2013) Mutations in B3GALNT2 Cause Congenital Muscular Dystrophy and Hypoglycosylation of  $\alpha$ -Dystroglycan, *Am J Hum Genet* 92, 354-365.
- Endo, T. (1999) O-Mannosyl Glycans in Mammals, *Biochim Biophys Acta* 1473, 237-246.
- Nakamura, N., Stalnakier, S. H., Lyalin, D., Lavrova, O., Wells, L., and Panin, V. M. (2010) Drosophila Dystroglycan is a Target of O-Mannosyltransferase Activity of Two Protein O-Mannosyltransferases, Rotated Abdomen and Twisted, *Glycobiology* 20, 381-394.
- Parsons, M. J., Campos, I., Hirst, E. M., and Stemple, D. L. (2002) Removal of Dystroglycan Causes Severe Muscular Dystrophy in Zebrafish Embryos, *Development* 129, 3505-3512.

## Establishment of a model system to analyze glycosylation underlying congenital muscular dystrophies using zebrafish

Naosuke NAKAMURA  
Akira KUROSAKA

### Abstract

Recently, it has been reported that hypoglycosylation of dystroglycan (DG) causes some of congenital muscular dystrophies with brain malformation, which are designated Dystroglycanopathy. Mutations have also been found in the genes involved in synthesizing O-mannosyl glycans in a cohort of Dystroglycanopathy patients. Although a number of candidate genes have been identified to be responsible for the glycosylation of DG through genome-wide analysis of patients, their physiological and biochemical properties remain to be elucidated. In this study, we used zebrafish as a model organism to establish an analytical system of the DG glycosylation. We made DNA constructs for zebrafish  $\alpha$ DG with a 3xFLAG tag at its C-terminus ( $z\alpha$ DG3F), and expressed recombinant  $z\alpha$ DG3F successfully in *E. coli*, this year. We also prepared mRNA for  $z\alpha$ DG3F by an *in vitro* transcription and observed the expression of  $z\alpha$ DG3F in the zebrafish embryos microinjected with the mRNA. To obtain a larger amount of  $\alpha$ DG, we are making a zebrafish transgenic line expressing recombinant  $\alpha$ DG.

**Keywords :** Dystroglycanopathy, muscular dystrophy, zebrafish, glycosylation, recombinant protein