

ゼブラフィッシュを用いた筋ジストロフィーに 関係する糖鎖修飾機構の解析

平成 24 年 4 月 26 日受付

中 村 直 介*¹
黒 坂 光*²

要 旨

日本人に特有の福山型筋ジストロフィーや、Walker-Warburg syndrome や muscle-eye-brain disease のように、ジストログリカン(以降 DG と略する)上の糖鎖修飾異常が原因と考えられる、脳の重篤な疾患を併発する筋ジストロフィーが存在する。DG は O-mannosyl 型糖鎖を含む事が知られているが、近年、患者の一部から、これらの糖鎖の生合成に関与する糖転移酵素に変異が見つかった。一方で、DG 上には O-mannosyl 型糖鎖に加え、O-GalNAc 型糖鎖も存在するが、その機能は詳しく調べられていない。著者らは、DG 上の糖鎖構造のうち、特に O-GalNAc 型糖鎖の働きを調べることを目的として、モデル生物を用いて研究を行っている。今年、ゼブラフィッシュにおいて、ゼブラフィッシュの組換え DG の強制発現を行うため、DG の全長 cDNA を単離した。その結果、ゼブラフィッシュの DG 遺伝子中には何箇所かの多型が存在することが分かった。また、ゼブラフィッシュ DG の発現時期を RT-PCR で調べたところ、胚発生の初期から後期にかけて広く発現していることが分かった。さらに、DG の機能に関係すると考えられている糖鎖構造を認識する抗体、IIH6C4 を用いて、ゼブラフィッシュの内在性 DG をウエスタンブロットティング法を用いて検出することに成功した。以上のことは、ゼブラフィッシュは哺乳類の DG の働きを調べる良いモデル生物であることを示している。

キーワード：糖転移酵素、筋ジストロフィー、ゼブラフィッシュ、糖鎖修飾、ムチン

1. はじめに

翻訳されたタンパク質に付加される糖鎖は、タンパク質の重要な翻訳後修飾反応のひとつであるが、その構造が多様であるため、糖鎖の生物学的役割は十分には理解されていない。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。このうち、O-GalNAc 型糖鎖は、粘膜上皮で合成されるムチン分子中に多く見られるため、ムチン型糖鎖とも呼ばれている。また、ムチン型糖鎖の生合成開始反応を触媒する

*¹ 京都産業大学工学部

*² 京都産業大学総合生命科学部

ポリペプチド GalNAc 転移酵素(以降 GalNAc-T)は、多くのアイソザイムを構成する事から、ムチン型糖鎖の合成は、組織・細胞レベルで調節を受けていると考えられているが、その仕組みについては解明されていない。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 O-mannosyl 型糖鎖修飾の異常があげられる。DG は、細胞表面に存在する膜タンパク質であり、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(図1)。近年、DG 上の糖鎖修飾異常が Walker-Warburg syndrome や muscle-eye-brain disease の原因になることが報告された⁽¹⁾。さらには、日本人に特有の福山型筋ジストロフィーにも、これらと同様の DG の糖鎖修飾異常が生じていることが示された⁽¹⁾。この糖鎖合成不全により DG のリガンドとの結合能が低下し、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(図1)。一方、DG 中には O-mannosyl 型糖鎖に加えてムチン型糖鎖も存在するが、この糖鎖の機能についてはほとんど調べられていない。

細胞膜上に存在する DG は、ムチン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つ(図2)。実際に、ほ乳類の筋組織由来の DG は重量にして50%以上の糖を含んでおり、その糖鎖成分のおよそ半分がムチン型糖鎖である事が知られている⁽²⁾。筆者らは、モデル生物を用いて、DG のムチン型糖鎖生成に関わる GalNAc-T 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、GalNAc-T のノックダウンを同時に行い、組換え DG 上の糖鎖構

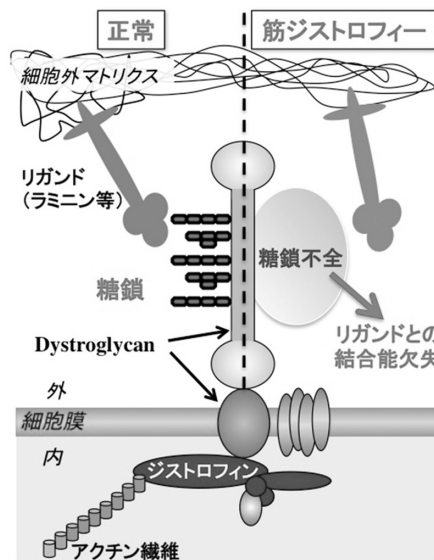


図1 Dystroglycan の構造とその糖鎖の働き

Dystroglycan は細胞外マトリックスタンパク質と細胞内骨格を結びつける非常に重要な分子である。細胞外ドメインはダンベル状の構造をしており、軸となる部分に糖鎖付加を受けるムチン様ドメインが存在する。

造の変化を解析する事が有効であるとする。今回は、その前段階として、ゼブラフィッシュから DG 遺伝子を単離し、ゼブラフィッシュでの DG の発現を、RT-PCR とウエスタンブロッティング法によって調べたので報告する。

2. 結果と考察

ゼブラフィッシュ DG のクローニング

筆者らは、以前にショウジョウバエに組換え DG を強制発現させ、その糖鎖構造の解析を行い、ショウジョウバエでも哺乳類と同様に、O-mannose 型糖鎖に加え、ムチン型糖鎖が存在することを示した⁽³⁾。筆者らは、組換えゼブラフィッシュ 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事を研究の目的としている。そこで、Parsons らのゼブラフィッシュ DG のクローニングのデータ⁽⁴⁾に基づいて、DG の全長 cDNA の単離を試みた。ゼブラフィッシュ全 cDNA は、受精後 26 時間のゼブラフィッシュから全 RNA を抽出し、その全 RNA を鋳型にして、ランダムヘキサマープライマーを用いて逆転写反応により調製した。その全 cDNA を鋳型にして、ゼブラフィッシュ DG に特異的なプライマーペアを用いて PCR を行い、ゼブラフィッシュ DG の全長 cDNA を単離した。次に、得られた cDNA の塩基配列から予測されるアミノ酸配列を、データベースに登録されているゼブラフィッシュ全長 DG のアミノ酸配列の 1 つと比較した。その結果、我々が単離した DG において 3 箇



図2 アミノ酸配列の比較

Macvector 中の ClustalW Alignment を用いてアミノ酸配列を比較した。DB はデータベース由来のアミノ酸配列、cloned はクローニングした cDNA から予測されたアミノ酸配列を示す。破線はムチン様ドメインを示す。

所のアミノ酸置換と、N末端より71番目からの4残基のアミノ酸の欠失が認められたものの、おおむねデータベース中の全長DGのアミノ酸配列と一致していた(図2)。さらに、Expressed sequence tag(EST)データベースや、Whole Genome Shotgun sequence(WGS)データベースを精査すると、我々の単離したクローンと同一の塩基配列が存在する事を確認した。以上より、図2のアミノ酸配列の相違は、ゼブラフィッシュにおいてしばしば見いだされる個体間の塩基配列の違いによるものと考えられた。よって、我々はこの全長cDNAを用いて、実験を進めることにした。

ゼブラフィッシュの内在性DGの発現解析

次に、内因性ゼブラフィッシュDGの発現をRT-PCRを用いて調べた(図3)。受精後3~72時間の胚から、前述の方法で調製した全cDNAを鋳型にゼブラフィッシュDG特異的プライマーを用いてPCRを行った結果、ゼブラフィッシュのDGは受精後の、調べた全ての時間帯にわたって発現することが分かった。受精後の早い段階、特に3時間におけるDGの発現は、母性遺伝による転写物に由来するものと考えられる。以上より、哺乳類と同様に、ゼブラフィッシュDGは発生の早い段階から広い時期にわたって発現する事が分かった^(5,6)。

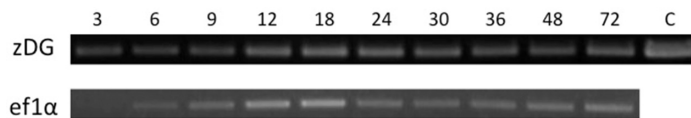


図3 RT-PCR

数字は、ゼブラフィッシュ胚の受精後の時間を示す。また、Cはポジティブコントロールとして、ゼブラフィッシュDGの全長cDNAをテンプレートに用いた。

ウエスタンブロッティングによる内在性ゼブラフィッシュDGの検出

前述のように、DG上の糖鎖が、ラミニンなどの基質との結合に重要であり、これらの結合に関わる糖鎖に対して特異性を持ついくつかの抗体が単離されている。これらの抗体は、哺乳類のDGの機能糖鎖に結合するが、ゼブラフィッシュの初期発生時に発現するDGの糖鎖を検出できるかどうかは検討されていない。そこで、DGの糖鎖識別抗体であるIIH6C4とVIA4-1を用いて、ゼブラフィッシュDGとの反応性を調べた。その際、ゼブラフィッシュのDGの発現量が少ないので、検出の感度を高めるためにアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体法を用いた。この方法は、従来のペルオキシダーゼを用いた検出方法に比べ40倍程度感度がよいと報告されている。受精後24~48時間のゼブラフィッシュ胚からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングを行った結果、IIH6C4を用いた時にのみ、受精後26時間以降で、~160kDaの哺乳類DGに相当すると思われるバンド(図4, 矢印)を検出することが出来た。今回の実験では、VIA4-1ではゼブラフィッシュDGを検出することはできなかった。VIA4-1は、IIH6C4とは異なる構造の糖鎖を認識することが知られている⁽¹⁾。したがって、今回の結果より、発生の初期ではVIA4-1ではなく、IIH6C4が認識する糖鎖がより多く発現し

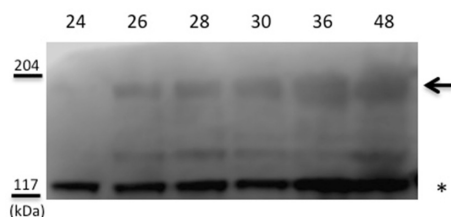


図4 ウェスタンブロッティング

数字は、ゼブラフィッシュ胚の受精後の時間を示す。ゼブラフィッシュ DG に由来すると思われるバンド(矢印)が受精後 26 時間以降で検出された。* は非特異的なバンドである。

ていることが考えられた。

3. おわりに

我々が単離したゼブラフィッシュ DG は、データベースに登録されているゼブラフィッシュ DG のアミノ配列とは一部異なるが、これはゼブラフィッシュ間に存在する遺伝的多型を反映していることが示唆された。また、ゼブラフィッシュ DG の mRNA は、発生の非常に早い段階から発現していることが分かった。さらには、哺乳類 DG の解析に使用される糖鎖識別 IIH6C4 抗体を用いたウェスタンブロッティング法にて、内在性のゼブラフィッシュ DG を検出することに成功した。今後は、クローニングした DG をもとに、組換えゼブラフィッシュ DG を *in vivo* で発現させ、糖鎖関連酵素のノックダウンと組み合わせることで糖鎖修飾、とりわけムチン型糖鎖のゼブラフィッシュ DG に与える影響を調べる予定である。ここで得られた知識は、ヒト等のほ乳動物の DG のムチン型糖鎖を介した機能、及び疾患の原因を解明する上で非常に有用であると考ええる。

参考文献

- Hewitt, J. E. (2009) Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease, *Biochim Biophys Acta* 1792, 853-861.
- Endo, T. (1999) O-Mannosyl glycans in mammals, *Biochim Biophys Acta* 1473, 237-246.
- Nakamura, N., Stalnakar, 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.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Milatovich, A., Ozcelik, T., Yang, B., Koepnick, K., Francke, U., and Campbell, K. P. (1993) Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization, *Hum Mol Genet* 2, 1651-1657.
- Williamson, R. A., Henry, M. D., Daniels, K. J., Hrstkova, R. F., Lee, J. C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., and Campbell, K. P. (1997) Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice, *Hum Mol Genet* 6, 831-841.

Analysis of Glycosylation Involved in Muscular Dystrophy in Zebrafish

Naosuke NAKAMURA
Akira KUROSAKA

Abstract

Some types of muscular dystrophies, such as Fukuyama congenital muscular dystrophy, Walker-Warburg syndrome, and muscle-eye-brain disease, have severe brain defects, which are caused by hypoglycosylation of dystroglycan (DG). DG is a glycoprotein that contains O-mannosyl and O-N-acetylgalactosaminyl (mucin-type) glycans. While the mutations of glycosyltransferases to generate O-mannosyl carbohydrates, which are related to the diseases, have been identified, the function of mucin-type glycans remains to be elucidated. To characterize the roles of mucin-type sugar chains in DG, we are exogenously expressing DG in zebrafish with some glycosyltransferases responsible for mucin-carbohydrate biosynthesis suppressed to examine its functions, such as binding to extracellular matrices. For this purpose, we first isolated a full length DG cDNA from zebrafish. Its nucleotide sequence analysis showed some polymorphisms in the cloned DG cDNA. We next analyzed the expression of endogenous DG by RT-PCR, and found that it was expressed throughout the developmental stages tested (3-72 hours post fertilization). Then, the expression of endogenous DG in zebrafish was investigated using a specific monoclonal antibody IIH6C4, which recognizes the DG glycans involved in the binding to laminin. Western blot analysis with the antibody apparently detected the endogenous DG. The findings so far demonstrate that zebrafish is a suitable model organism to analyze the DG function.

Keywords : glycosyltransferase, muscular dystrophy, zebrafish, glycosylation, mucin