

神経特異的ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン 転移酵素の機能解析

黒 坂 光

神経変性疾患においては、細胞内で合成されたタンパク質に折りたたみ異常が生じ、普段は分子の内部に存在する疎水性の領域がタンパク質分子表面に露出するようになって、分子間の疎水的な相互作用が生じる。その相互作用はタンパク分子の凝集を導き、やがては水に不溶性の凝集塊の形成をまねき、細胞死を引き起こすと考えられている。アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルトヤコブ病などの神経変性疾患においては、それぞれ β -アミロイド、 α -シヌクレイン、プリオンなどが凝集タンパク質として同定されている。パーキンソン病においては、異常凝集した α -シヌクレインにおいてムチン型糖鎖の存在が認められたため、タンパクへの異常な糖鎖付加が引き金となって、折りたたみ異常を引き起こす可能性が指摘されている。

近年、我々はパーキンソン病における α -シヌクレインへの糖鎖付加反応に注目し、*in vitro* における α -シヌクレインへのムチン型糖鎖付加反応を解析した。その結果、特定のポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素（以後 GalNAc 転移酵素と略）アイソザイムが α -シヌクレインに N-アセチルガラクトサミン残基を転移する活性を有することを見いだした。GalNAc 転移酵素は 20 種類以上の多くのアイソザイムからなることが知られている。これらのアイソザイムは、広い組織分布を持つものと比較的限定した組織に発現するものの 2 つに大別することができる。我々は以前に神経細胞にのみ特異的に発現するアイソザイム GalNAc-T9 のクローニングに成功した。また近年、GalNAc-T9 と同一性の高いもう一つの遺伝子のクローニングにも成功した。この遺伝子も GalNAc-T9 と同様に神経系にのみ発現していることを Northern blotting, *in situ* hybridization により示した。この遺伝子をクローニングした時点では、その翻訳産物の酵素活性を検出できていなかったため、その遺伝子を putative GalNAc-T (pt-GalNAc-T) と命名した。その後、我々はパーキンソン病における神経系での α -シヌクレインへのムチン型糖鎖付加反応、さらには神経系特異的な GalNAc 転移酵素アイソザイムの存在などから、神経系に特有のムチン型糖鎖の付加反応が神経系の機能に関連している可能性を考え、これらの GalNAc 転移酵素と神経分化との関連を調べたので報告する。

1. pt-GalNAc-T の酵素活性

前述のとおり、pt-GalNAc-T は神経系に特異的に発現しており、その翻訳産物は GalNAc-T9 とアミノ酸レベルで 76% の相同性を持つ。我々は以前、ウシ顎下腺ムチンから調製したアポムチンを基質と

して、COS7 細胞で発現させた pt-GalNAc-T を用いて酵素活性を測定したが、活性を検出することができなかった。そこで、我々は昆虫細胞を用いて pt-GalNAc-T の発現系を確立し、より多くの発現酵素を用いて酵素活性を測定することにした。基質には典型的なムチン様配列を持つ MUC5AC (SPVPTTSTTS), MUC1 (PAGSTAPPK), MUC2 (ITTTTTPLPT), MUC7 (SATTPAPPSS) などのペプチドを用いた。pt-GalNAc-T は他の GalNAc-T1 などのアイソザイムと比べると、活性は非常に低かったもののいくつかのペプチドに対して糖転移活性を示した。実験用いたペプチドの中では MUC7 由来のペプチドに対して最も効率よく糖を転移した (図 1)。この結果から pt-GalNAc-T が酵素活性を持つことが確認できたので、以後これを GalNAc-T16 とよぶことにする。

2. マウス胚性細胞株 P19 細胞の神経分化と GalNAc 転移酵素

マウス胚性細胞株 P19 細胞は、高濃度のレチノイン酸を添加した条件で培養すると神経細胞に分化することが知られている。図 2 の (a) は未処理の P19 細胞である。この細胞をトリプシン処理し、ペトリ皿に移す際に、レチノイン酸を加えて培養すると、細胞はペトリ皿の中で凝集塊を形成する (b)。この凝集塊の形成が、その後の神経細胞への分化に必須のプロセスであることが知られている。細胞を 2 日間ペトリ皿で培養した後に、トリプシンで処理し、再度培養皿に戻して培養する。これ以降は、レチノイン酸を除去して培養するが、細胞はレチノイン酸がなくても分化を開始し (c)、4 日後には神経突起を形成しているのがわかる (d)。

次に、細胞の分化と GalNAc 転移酵素の発現の関係を RT-PCR 法により調べた (図 3)。まず、細胞の分化の状態を神経系特異的なマーカーである微小管関連タンパク質の一つである MAP2 遺伝子の発現により調べた。この遺伝子はレチノイン酸の刺激後、神経細胞への分化に伴い発現していることが確認された。

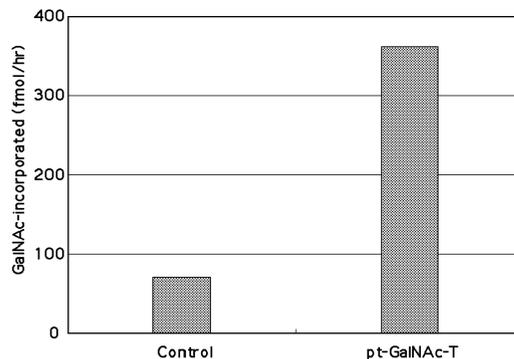


図 1 pt-GalNAc-T の酵素活性

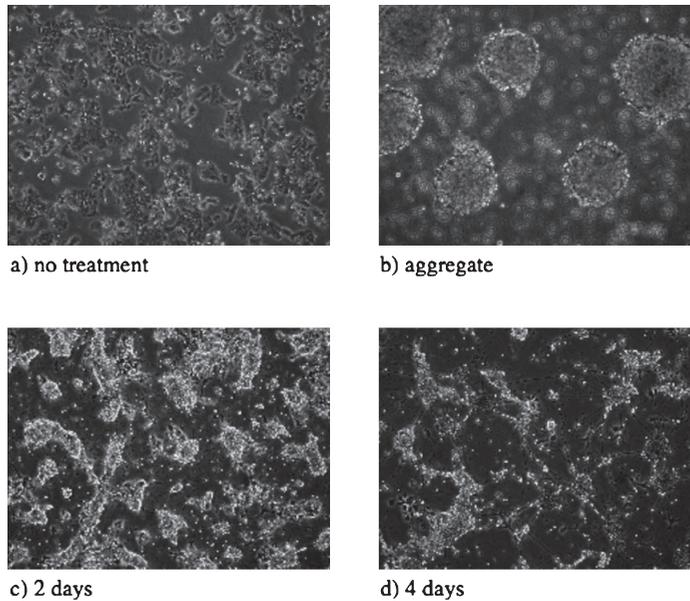


図2 P19細胞の分化

- a) 未処理
- b) レチノイン酸添加，ペトリ皿で培養
- c) レチノイン酸除去，培養皿で培養，2日目
- d) 4日目

GalNAc 転移酵素については4種類のアイソザイムの発現を調べた。GalNAc-T1は発現量も高く、幅広い組織発現様式を持つアイソザイムである。このアイソザイムは、レチノイン酸未処理の細胞においても、細胞の分化とは無関係に発現していた。それに対して、Northern blotting などにより神経系特異的とされてきたその他の3種のアイソザイム GalNAc-T9, GalNAc-T13, GalNAc-T16は、いずれも分化を開始した細胞の凝集塊形成以降に強く発現しており、P19においてもこれらのアイソザイムが神経系特異的に発現していることが明らかとなった。

次に、神経発生における神経特異的なアイソザイムの機能を解析する目的で、これらのアイソザイムの発現をRNA干渉により抑制した。GalNAc-T1, -T9, -T13, -T16のそれぞれのアイソザイムの発現を抑制したところ、いずれのアイソザイムにおいてもレチノイン酸未処理の細胞では変化は見られなかった。図4では、レチノイン酸で分化誘導後、細胞塊を形成させ、培養皿に播種して4日後の細胞の様子を示した。GalNAc-T1は分化の有無にかかわらず発現するアイソザイムであるが、細胞を分化させてもまったく変化は見られなかった。一般にGalNAc 転移酵素アイソザイムはそれぞれ特有の特徴を有するものの、互いに重複した基質特異性と組織分布を持つことが知られている。したがって、GalNAc-T1の発現を抑制したときに、他のアイソザイムがその働きを補完したために細胞に影響が見られなかったのかも知れない。事実、GalNAc-T1のノックアウトマウスにおいても大きな表現型の変

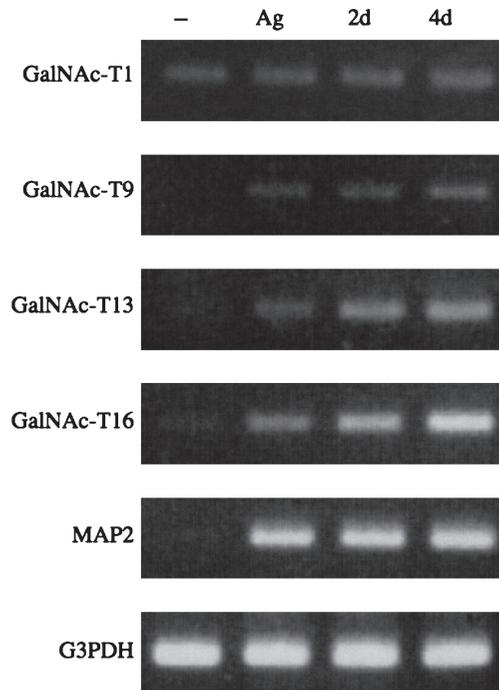


図3 RT-PCR

— ; 未処理

Ag ; レチノイン酸添加, ペトリ皿で培養

2d ; レチノイン酸除去, 培養皿で培養, 2日目

4d ; 4日目

化は認められていない。GalNAc-T13についても、GalNAc-T1 と比べると若干の細胞数の現象が認められたものの、T1 と同様に遺伝子ノックダウンによる影響はほとんど見られなかった。このアイソザイムについても、ノックアウトマウスが作製されているが、やはりほとんど表現型に変化は見られていない。これらのアイソザイムに対し、GalNAc-T9 と -T16 については大きな変化が見られ、その変化は -T16 において特に顕著であった。いずれのアイソザイムもレチノイン酸を添加してペトリ皿で細胞の凝集塊を形成させると、多くの細胞がペトリ皿との接着性を失い浮遊した。特に GalNAc-T16 においてはほとんどの細胞が浮遊し、viability を失った。ペトリ皿に接着した一部の細胞をそのまま培養を続けても、図4のように神経突起を形成することはできなかった。このように、GalNAc-T16 (GalNAc-T9) は GalNAc-T13 と同様に神経系特異的なアイソザイムであるが、それらの発現を抑制したときの細胞に与える影響は大きく異なり、GalNAc-T16 を発現抑制したときにのみ細胞分化の抑制が見られた。

GalNAc-T16 の発現を抑制したときに見られる現象とアポトーシスの関係を調べた。図5はそれぞ

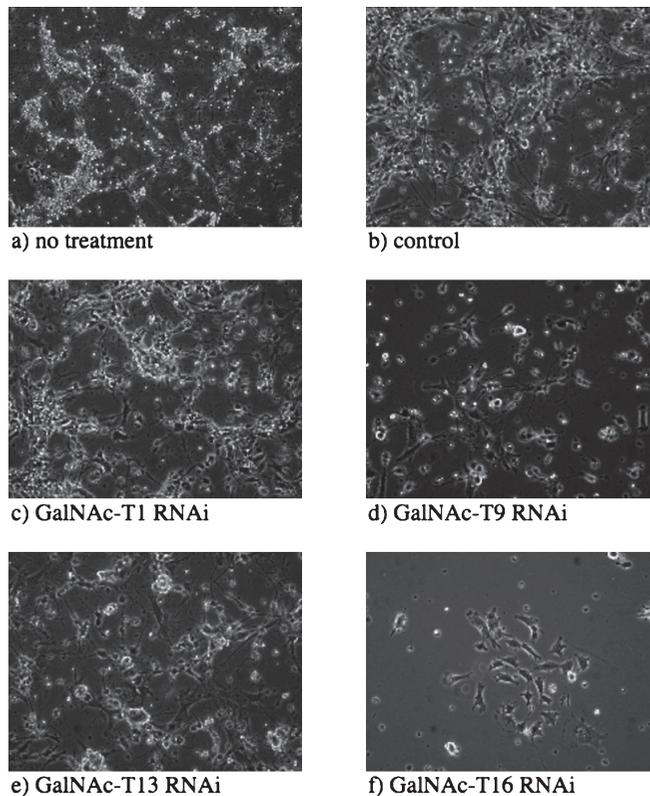
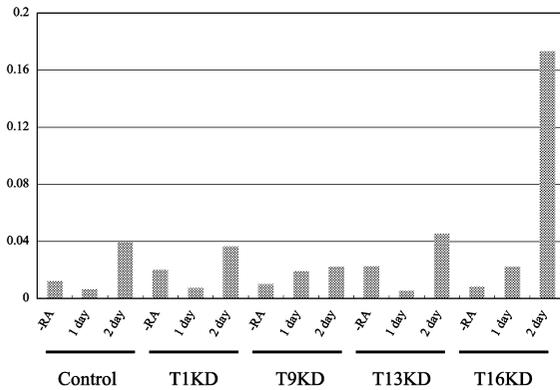
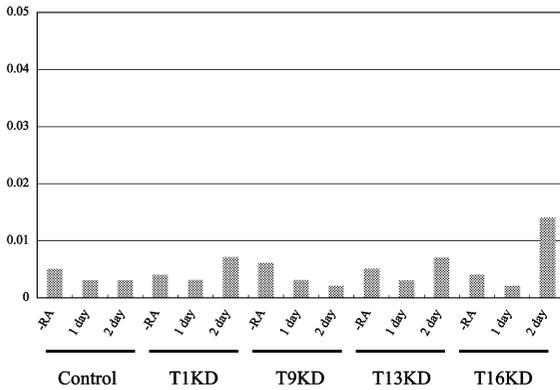


図4 RNAiによるGalNAc転移酵素の発現抑制
control; コントロールベクターを用いた

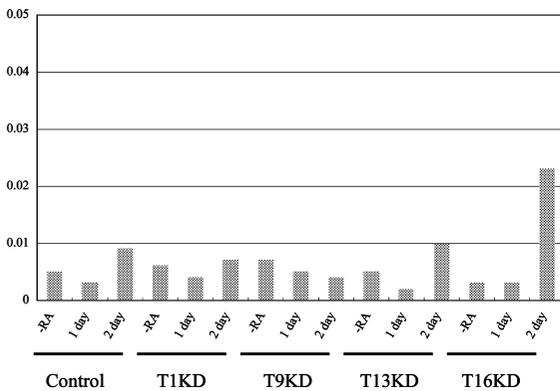
れのアイツザイムの発現を抑制したときに、レチノイン酸による分化誘導後1日目、2日目のカスパーゼの発現誘導を調べたものである。細胞内では、様々な要因が引き金となってアポトーシスを引き起こすことが知られている。アポトーシスにはいくつかの経路があり、それぞれが複雑に調節されたネットワークを構成している。そのネットワークではカスパーゼとよばれるプロテアーゼが順番に活性化される過程を含んでいる。どのカスパーゼが活性化されるかはネットワークによって異なるが、いずれのネットワークでも最終的にカスパーゼ3が活性化されアポトーシスを実行する。我々は、カスパーゼ3, 1, 8の活性を調べたところ、やはりGalNAc-T16において特に顕著なカスパーゼ活性の上昇が見られた。レチノイン酸添加後2日目には高いカスパーゼ3の発現上昇を検出した。また、カスパーゼ1, 3においてもGalNAc-T16で最も高い発現を認めた。



a) Caspase 3



b) Caspase 1



c) Caspase 8

図5 RNAi 処理した細胞のカスパーゼ活性
 -RA ; レチノイン酸未処理
 1 day ; レチノイン酸処理 1 日後
 2 day ; レチノイン酸処理 2 日後

3. まとめ

我々は神経特異的に発現するアイソザイムの機能解析を行った。我々が以前にクローニングした神経特異的なGalNAc-T9と相同性の高いGalNAc-T16の酵素活性を初めて検出することに成功した。しかしながら、典型的なムチン様の配列を用いた実験では、GalNAc-T16の活性は非常に低いものであった。GalNAc-T16が神経系特異的な発現様式を持つことから、GalNAc-T16は典型的なムチン様ペプチドではなく、神経特異的なタンパク質への糖鎖付加反応を触媒している可能性が考えられた。また、GalNAc転移酵素アイソザイムの発現抑制実験においても、GalNAc-T16の発現を抑制したときに、最も顕著な神経分化の抑制が観察された。我々はゼブラフィッシュを用いた遺伝子発現抑制実験においても同様に、GalNAc-T16の発現を抑制したときに後脳発生の異常を観察している。また、本実験では細胞分化が抑制されるばかりでなく、細胞のアポトーシスが誘導されることも明らかとなった。今後は、P19細胞およびゼブラフィッシュのそれぞれにおけるGalNAc-T16の機能解析並びに*in vivo*の基質の同定を行う予定である。