

神経変性疾患とムチン型糖鎖付加反応

黒 坂 光

1. はじめに

近年、神経変性疾患に共通する発症基盤として、細胞内で合成されたタンパク質の立体構造の異常が指摘されている。たとえば、パーキンソン病においては、 α -シヌクレインの立体構造がランダムコイル型から β -シート型へと変化することで分子が凝集して不溶性の繊維を形成し、やがて細胞死が起こることが知られている。同じような現象が、アルツハイマー病やクロイツフェルト・ヤコブ病においても見られ、それぞれ、 β -アミロイドタンパク質とプリオンの凝集が観察されている。

生体内のタンパク質が機能を獲得するには、タンパク質が適切な翻訳後修飾反応を受け、正しく折りたたまれる必要がある。タンパク質への糖鎖付加反応は真核細胞における重要な翻訳後修飾反応の一つであり、付加された糖鎖はタンパク質の立体構造を安定化させ、また細胞間や分子間の認識反応に直接関与することが知られている。筆者は、特にムチン型糖鎖の働きに注目し、その生合成開始反応を触媒する酵素である、UDP-N-アセチルガラクトサミン：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転移酵素と略する）遺伝子のクローニングとその機能解析を行ってきた。GalNAc転移酵素は大きな遺伝子ファミリーを形成することが知られているが、筆者らは神経細胞に特異的に発現するGalNAc転移酵素アイソザイム、GalNAc-T9のクローニングに成功している(1)。さらに、GalNAc-T9と非常に高い相同性を持つ遺伝子putative GalNAc-T (pt-GalNAc-Tと略)も単離した(2)。pt-GalNAc-Tも神経系に特有の発現様式を持つ。また、我々は最近、pt-GalNAc-Tがムチン様の一次構造を持つペプチドに対してGalNAc転移活性を持つことも明らかにしている（未発表）。前述のように、神経変性疾患においてタンパク質の立体構造異常が分子凝集に密接に関連しているため、神経細胞内における糖付加反応の異常が神経変性に関与する可能性が考えられる。実際、パーキンソン病において凝集した α -シヌクレインがムチン型糖鎖を持つとの報告がなされている(3)。このような観点に基づき、筆者は、神経系におけるムチン型糖鎖の役割を解明するため、i) α -シヌクレインへのムチン型糖鎖付加反応の解析、ii) 培養神経細胞における神経特異的GalNAc転移酵素の発現様式の解析、iii) ゼブラフィッシュにおける神経特異的GalNAc転移酵素のノックダウンの3つの実験を行った。

2. 結 果

1) α -シヌクレインへの糖付加反応の解析

昨年度の総合学術研究所所報に記したように、 α -シヌクレインを基質として4種類のアイソザイ

ムを用いて酵素活性を測定したところ、GalNAc-T1 と GalNAc-T13 の 2 種類のアイソザイムが糖転移活性を示した。昨年度に比べ、基質および酵素濃度を高め、さらに反応時間を調節することにより、表 1 のように、より正確に酵素活性を求めることができた。特に、神経特異的な GalNAc-T13 が α -シヌクレインを基質としたことは神経変性疾患の病因と関連して注目される。GalNAc-T1 は神経を含め多くの組織で ubiquitous に発現しているアイソザイムであるが、GalNAc-T13 とアミノ酸レベルで 85% もの高い相同性を持ち、GalNAc-T13 とほぼ同じレベルの高い活性を示した。神経細胞内において、GalNAc-T1 と-T13 は協同的に α -シヌクレインに糖付加している可能性も考えられた。

表 1 α -シヌクレインへの糖付加反応

アイソザイム	活性 (nmol/h/mmol α -シヌクレイン)
GalNAc-T1	1
GalNAc-T9	ND
GalNAc-T13	53
pt-GalNAc-T	ND

ND; not detected.

2) 培養神経細胞における神経特異的 GalNAc 転移酵素の発現様式の解析

GalNAc-T9 と pt-GalNAc-T は神経に特異的に発現していることが、*in situ* hybridization により明らかにされている。したがって、これらのアイソザイムは神経系に特異的な糖付加反応を触媒していると考えられているが、神経細胞内の基質の同定などの生化学的な特徴はまだ十分理解されていない。そこで、培養細胞を用いてこれらのアイソザイムの性質を解明する目的で、5 種類の神経系の培養細胞におけるこれらのアイソザイムの発現様式を RT-PCR により調べた。

それぞれの細胞から全 RNA を抽出し、oligo-d(T) をプライマーとして cDNA を作製した。その cDNA を鋳型にして、GalNAc-T9 と pt-GalNAc-T に特異的な組み合わせのプライマーを使って PCR を行った。PCR の結果の 1 例を図 1 に示した。Neuro2A を用いたこの実験では、GalNAc-T9、pt-GalNAc-T のどちらにおいても目的の大きさの DNA 断片の増幅が見られた。これらの結果をとりまとめたところ、表 2 のように GalNAc-T9 は pt-GalNAc-T より多くの細胞で発現していることがわかった。*in situ* hybridization においても特徴的な発現様式をもつ pt-GalNAc-T の発現は培養細胞においても限局されており、神経系に特徴的な反応を触媒することが期待される。また、予備的な実験ではあるが、神経細胞をツニカマイシンで処理してストレスを与えたところ、ある種の細胞では pt-GalNAc-T の発現が高くなった。

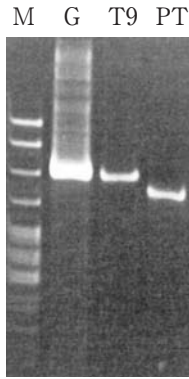


図1 Neuro2A 細胞における神経特異的アイソザイムの発現
 M；分子量マーカー，G；G3PDH，T9；GalNAc-T9，PT；pt-GalNAc-T

表2 神経特異的アイソザイムの発現

	Neuro2A	NB41A3	IMR-32	SK-N-SH	PFSK-1
GalNAc-T9	+	-	+	+	+
pt-GalNAc-T	+	-	+	-	-

+, 特異的断片の増幅あり；-, 増幅なし.

3) ゼブラフィッシュにおける神経特異的 GalNAc 転移酵素のノックダウン

GalNAc-T9 と pt-GalNAc-T の役割を調べるために、モデル生物の1種であるゼブラフィッシュを用いて、これらの遺伝子のノックダウン実験を行った。ゼブラフィッシュは、そのゲノムの配列がおおむね解明されている。また脊椎動物であるために、哺乳生物と遺伝子の相同性が高いという特徴を持っている。実際、筆者らはほ乳類の GalNAc-T と pt-GalNAc-T の塩基配列を元にして、ゼブラフィッシュの相同遺伝子をクローニングすることに成功した。また、胚が透明であるため、発生の過程の観察が容易であるとともに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた遺伝子ノックダウンの系が確立しているという利点を持つ。

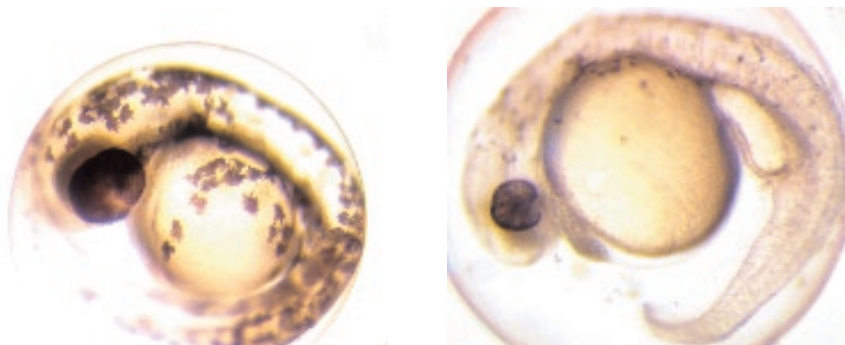
筆者らはまず、*in situ* hybridizaion により GalNAc-T と pt-GalNAc-T がゼブラフィッシュにおいても神経特異的に発現していることを見いだした。つぎに、それぞれの塩基配列からアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し、それらをゼブラフィッシュの初期胚に注入し神経発生を観察した。

GalNAc-T9 遺伝子の発現を抑制したときには、受精後24時間胚でわずかではあるものの眼の発生遅延が観察され、また後脳の形態に乱れが生じた。また、終脳の形にも影響が見られた。さらに2日後では、眼の影響は顕著となり、脳室の肥大も観察された。

pt-GalNAc-T の場合は、GalNAc-T9 よりも顕著な形態変化が見られた。受精後24時間後には頭部に形態異常が生じた。眼もより小さくなっていた。図2に示したように、受精後36時間胚では、正常胚と比べて眼の小ささがより顕著となり、頭部の形態異常もはっきりしている。さらに色素細胞の発

達遅延などの顕著な表現型の違いを示した。

これらの結果より、GalNAc-T9 と pt-GalNAc-T はゼブラフィッシュの神経発生において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これらの遺伝子が神経系特異的に発現していることから、神経系に特異的な糖鎖付加反応が存在することが考えられる。



正常胚

pt-GalNAc-T ノックダウン胚

図2 遺伝子ノックダウン実験の36時間胚での比較

3. おわりに

これらの3種の実験を通じてGalNAc-T9 と pt-GalNAc-T が神経系において重要な働きをしていることが考えられた。今後は、神経細胞における内在性の基質の同定、および培養細胞を用いた遺伝子ノックダウン実験により、これらの酵素の働きを調べていく。さらに、遺伝子ノックダウン実験においては、糖鎖構造の変化も同時に調べる必要があると思われる。

参考文献

1. Toba, S., Tenno, M., Konishi, M., Mikami, T., Itoh, N., and Kurosaka, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 264-268
2. Nakamura, N., Toba, S., Hirai, M., Morishita, S., Mikami, T., Konishi, M., Itoh, N., and Kurosaka, A. (2005) *Biol. Pharm. Bull.* 28, 429-433
3. Shimura, H., Schlossmacher, M. G., Hattori, N., Frosch, M. P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K. S., and Selkoe, D. J. (2001) *Science* 293, 263-269