

# 神経特異的ムチン型糖鎖付加機構と 神経変性疾患との関連

黒 坂 光

## 1. 神経変性疾患とムチン型糖鎖付加

近年、神経変性疾患の発症基盤として、細胞内で合成されたタンパク質の立体構造の異常（ミスフォールディング）が注目されている。一般的に、可溶性タンパク質は球状の高次構造を持つ。球状分子においては、疎水性アミノ酸残基は分子の内部に存在する一方、親水性アミノ酸残基は分子表面にあり、水和して分子の可溶化を促進している。しかしながら、分子のミスフォールディングにともない、内部にあった疎水性残基が分子の表面に露出するようになる。このような変性分子同士は互いに疎水性相互作用を介して凝集する。このようにして出来た凝集塊は水に不溶であり、それらが細胞内に異常蓄積するとやがて細胞死を引き起こす。特に分裂能を持たない神経細胞においては、タンパク質の異常蓄積による細胞死が神経変性疾患の原因となる。アルツハイマー病におけるプリオン、パーキンソン病の $\alpha$ -シヌクレインなどが神経変性疾患の原因タンパク質としてよく知られている。

タンパク質が正しい立体構造を形成し、それを維持するには翻訳後に種々の化学修飾反応を受ける必要がある。特にタンパク質への糖鎖の付加は、タンパク質分子の立体構造の維持のみならず、分子間の認識等に重要な役割を果たしている。筆者は、糖鎖の中でも GalNAc $\alpha$ 1  $\rightarrow$  Ser (or Thr) の糖-タンパク質の結合様式を持つムチン型糖鎖の神経細胞における役割、特に神経変性疾患との関連に注目している。近年、前述した神経変性疾患の原因タンパク質とムチン型糖鎖の関連が指摘されている。プリオンへの GalNAc の付加は、タンパク質の二次構造をコイル構造から $\beta$ -シートへ変化させる。異常蓄積したタンパク質が $\beta$ -シート構造を多く持つことから、ムチン型糖鎖の付加がタンパク質の立体構造に与える影響が注目されている。また後述するように、 $\alpha$ -シヌクレインにおいても異常凝集にムチン型糖鎖の付加反応が関連しているとの報告もある。

ムチン型糖鎖の付加反応の第一段階は、UDP-GalNAc: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 転移酵素と記載）により触媒される（図1）。すなわち、この酵素はタンパク質分子上のムチン型糖鎖の数と位置を決定する重要な役割を果たしている。近年の遺伝子クローニングの結果より、GalNAc 転移酵素は大きな遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなった。

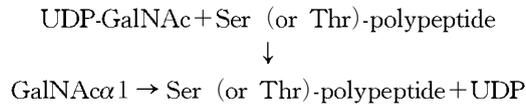


図1 GalNAc 転移酵素が触媒する反応

現在まで、ヒトでは14種類のアイソザイム遺伝子のクローニングが完了している。そのうち、筆者らがクローニングした GalNAc-T9 は、脳特異的に発現するアイソザイムである。また、成松らにより単離された GalNAc-T13 も脳に多く発現することが知られている。さらに GalNAc-T9 と相同性の高い新規クローン（未発表であるが、ここでは GalNAc-T15 とよぶことにする。）も、脳特異的な発現様式を持つ。本論ではこれらの脳特異的アイソザイムとパーキンソン病の原因タンパク質の  $\alpha$ -シヌクレインとの関連について報告する。

## 2. $\alpha$ -シヌクレインへの糖鎖付加反応

$\alpha$ -シヌクレインは常染色体優性遺伝形式を呈する家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物である。 $\alpha$ -シヌクレインはパーキンソン病の病理的特徴である Lewy 小体の主要構成タンパク質の1つである。病変部位において、異常凝集した  $\alpha$ -シヌクレインの蓄積が見られるが、その原因は明らかではない。しかしながら、近年 Lewy 小体から単離した  $\alpha$ -シヌクレインが、ムチン型糖鎖の修飾を受けていることが報告されたことから、糖鎖付加によるフォールディング異常が、 $\alpha$ -シヌクレインの異常蓄積の引き金となっている可能性が指摘されている。そこで筆者らは、我々がクローニングした神経特異的なアイソザイムを含む、4種類のアイソザイムを用いて  $\alpha$ -シヌクレインへの糖鎖付加活性を測定した。

酵素反応に用いる  $\alpha$ -シヌクレインは、Qiagen 社の発現システムを用いて大腸菌で合成させた。このシステムでは、 $\alpha$ -シヌクレインの C-末端に 6XHis タグを持った組換えタンパク質が合成される。発現ベクター *pQE60* に  $\alpha$ -シヌクレインの cDNA を組込んだ。組換え *pQE60* をクローニングして、それを大腸菌株 M15 にトランスフェクトした。大腸菌の培養液に IPTG を加えて、 $\alpha$ -シヌクレインの合成を誘導した。その後、大腸菌を溶菌し、可溶性画分と不溶性画分とに分けた。それぞれの画分を SDS-PAGE で解析した（図2）。IPTG 添加1時間後には顕著な  $\alpha$ -シヌクレインの発現誘導が起こるが、本実験では添加4時間後に大腸菌を回収した。また、誘導された  $\alpha$ -シヌクレインは可溶性画分に回収された。発現効率は非常に高く、可溶性画分では  $\alpha$ -シヌクレインは最も含量の高いタンパク質であった。

次に  $\alpha$ -シヌクレインの精製を試みた。精製には  $\alpha$ -シヌクレインの C 末端に付加した 6XHis タグを利用した。 $\alpha$ -シヌクレインを発現した大腸菌の可溶性画分を Ni-アガロースカラムを使って精製した。カラムから溶出された画分では、可溶性画分に存在した夾雑タンパク質が除去されていた。こ

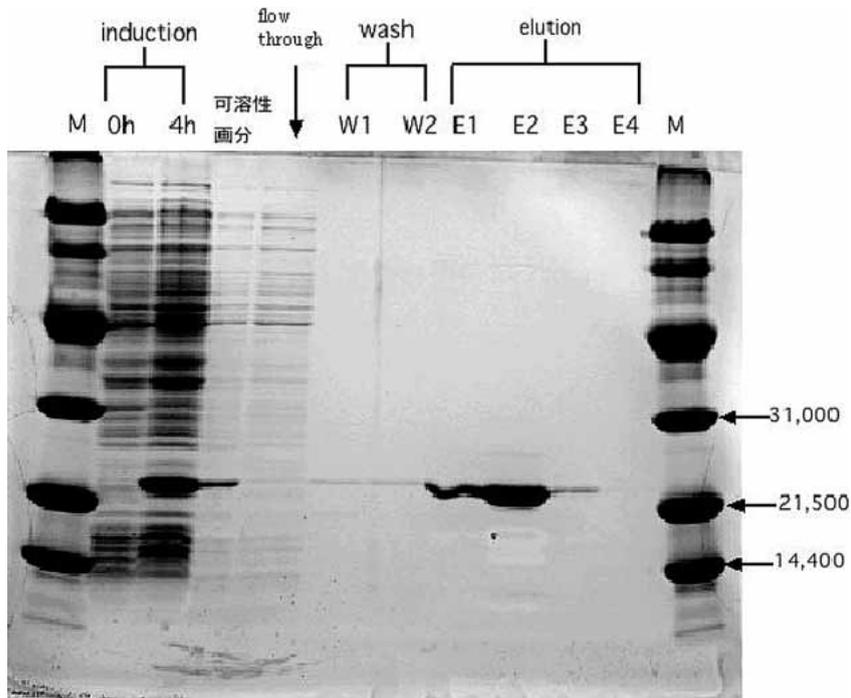


図2  $\alpha$ -シヌクレインの発現と精製

0.1mM IPTG で誘導し、4 時間後に大腸菌を回収した。大腸菌を溶菌し、可溶性画分を調整した。その画分を Ni- アガロースを用いて精製した。カラムの素通り画分、洗浄画分 (W1、W2)、溶出画分 (E1、E2、E3、E4) に分けて SDS-PAGE で分析した。

表1  $\alpha$ -シヌクレインへの糖付加反応

約 30,000dpm の UDP-[<sup>3</sup>H]GalNAc を用いて 37°C で10時間反応させた。

アイソザイム	活性 (dpm)
GalNAc-T1	120
GalNAc-T9	ND
GalNAc-T13	440
GalNAc-T15	ND

のようにして精製した  $\alpha$ -シヌクレインを酵素反応に用いた。

酵素原としては、脳特異的なアイソザイムである GalNAc-T9、-T15 および脳で比較的強く発現している GalNAc-T13 を用いた。さらに最も多くの組織で発現しており、典型的なムチン型糖タンパク質への糖鎖付加反応に関与すると考えられている GalNAc-T1 も用いた。これらのアイソザイムを

コードする cDNA をほ乳類の発現ベクターである *pcDNA3.1* に組み込み、組換え GalNAc 転移酵素を COS7 細胞で発現させた。GalNAc 転移酵素は分子の N 末端に付加したタグ（プロテイン A の IgG 結合ドメイン）を利用して、IgG-Sepahrose を用いて精製した。

以上のように精製した  $\alpha$ -シヌクレインと 4 種類のアイソザイムを用いて酵素活性を測定した。表 1 に示したように、GalNAc-T13 が最も高い  $\alpha$ -シヌクレインへ糖を転移する活性を示した。GalNAc-T1 も弱いながらも活性を持っていた。GalNAc-T13 と -T1 は非常に相同性の高いアイソザイムであるため、この 2 つは類似した基質特異性を持つことが予想される。脳特異的な GalNAc-T9 と -T15 に関しては活性を検出することが出来なかった。

### 3. 今後の予定

GalNAc-T13 と -T1 については  $\alpha$ -シヌクレインへの糖転移活性を検出した。これは、 $\alpha$ -シヌクレインへのムチン型糖鎖の付加反応がタンパク質の凝集形成に関与する可能性を示すものであり注目に値する。しかしながら、最も活性の高い GalNAc-T13 においても、 $\alpha$ -シヌクレインの約 2 % が糖鎖付加されたにすぎず、酵素反応の条件を再検討する必要があると思われる。基質量、酵素量などの諸条件を整え、GalNAc-T9 と -T15 を含めて糖付加実験を繰り返す予定である。

GalNAc-T9 と -T15 に関しては、脳以外での発現が全く認められず、神経変性疾患との関連のみならず、脳の発生や働きに関わっている可能性がある。これらのアイソザイムについてはモデル生物での遺伝子のノックダウンを含めて機能を解析していく。