

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291021

研究課題名(和文)先天性筋ジストロフィーに関わる ジストログリカン上の機能性糖鎖に関する研究

研究課題名(英文) Studies of functional glycans on alfa-dystroglycan associated with congenital muscular dystrophies

研究代表者

岡 昌吾 (Oka, Shogo)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60233300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ジストログリカン(DG)は、細胞外でラミニンなどのリガンドとの結合を担う-DGと、一回膜貫通型の-DGの二つのサブユニットから構成される。-DGに特徴的に付加されるO-マンノース型糖鎖が-DGの機能に必須の役割を担い、-DGの糖鎖付加不全は大脳皮質形成異常を伴う筋ジストロフィーの原因となることが知られている。本研究では-DG上の糖鎖の発現調節機構や大脳皮質形成異常が引き起こされる過程を詳細に解析した。

研究成果の概要(英文)：-Dystroglycan (-DG) is a cell surface glycoprotein that serves as a receptor for extracellular matrix components such as laminin. The -DG-ligand interaction is mediated by a unique O-mannose-linked glycan attached to -DG, and the glycosylation deficiency of -DG causes several forms of congenital muscular dystrophies associated with cobblestone lissencephaly, classified as dystroglycanopathy. In this study, we investigated the regulatory mechanism for the unique O-mannose-linked glycan expression. We also revealed initial pathological events in the developing brain of Pomgnt2-knockout mouse as a dystroglycanopathy model.

研究分野：糖鎖生物学、生化学

キーワード：ジストログリカン 先天性筋ジストロフィー O-マンノース型糖鎖 糖転移酵素

1. 研究開始当初の背景

-ジストログリカン(-DG)は、細胞膜上でラミニンなどの細胞外基質分子と結合する接着分子である。-DGに修飾される0-マンノース(Man)型糖鎖がリガンドとの結合に重要であり、その糖鎖修飾異常は、骨格筋の壊死・変性に加えて脳奇形や精神発達遅滞を併発する先天性筋ジストロフィーの原因となる(*Nature* 2002, 418, 417-22)。これまでに、福山型先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子 *FKTN* をはじめ、多数の糖転移酵素と推定される遺伝子の変異が報告されており、実際に糖転移活性を有するものも多い。

-DGのリガンド結合活性を担う構造は、通常型の0-Man型糖鎖とは異なり、Manにリン酸ジエステル結合を介して付加される特徴的な糖鎖であり、ポストリン酸糖鎖と呼ばれる。グルクロン酸(GlcA)とキシロース(Xyl)の二糖が繰り返し伸長した末端の直鎖構造がリガンド結合モチーフであると考えられており、LARGEがその伸長反応を触媒することが明らかとなった(*Science* 2012, 335, 93-96)。しかしながら、GlcA-Xylリピードが結合する部分の構造を含めたラミニン結合性糖鎖の全体構造はまだ決定されていなかった。さらに、先天性筋ジストロフィー原因遺伝子群のうち *FKTN*、*FKRP*、*ISPD*、*B3GNT1*、*TMEM5* の酵素活性は同定されておらず、これらの遺伝子変異が -DG 糖鎖修飾不全を引き起こす機序は現在も不明である。このように、-DGのラミニン結合性糖鎖の構造と生合成機構において未だ不明な点が多いために、分子病態の理解が遅れていた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが新たに開発した -DG 糖鎖構造解析手法を用いて、いまだ明らかになっていないラミニン結合性糖鎖の全体構造を明らかにする。また、ポストリン酸糖鎖はラミニン結合活性を有する重要な機能性糖鎖であるが、その付加を受ける分子は -DGのみである。一方で0-Man型糖鎖自体は、脳内では糖鎖含量の約3割を占める豊富な構造であり、細胞外基質分子 phosphacan をはじめ他のタンパク質にも付加される。この事実は厳密なポストリン酸修飾制御機構の存在を示唆している。そこで、ポストリン酸修飾の発現制御機構を明らかにする。さらに先天性筋ジストロフィーの主症状である骨格筋の壊死については病態解明が進む一方で、重症例で併発する大脳皮質異形成(II型滑脳症)については病態発症機構の解明が遅れている。そこで先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子の1つである *Pomgnt2* (AG061) 遺伝子欠損マウスをモデル動物として本疾患で生じる II 型滑脳症の病態発症機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラミニン結合性糖鎖の構造解析

-DGのセリン/スレオニン残基から GlcA-Xyl リピードにいたる構造の解析のために、申請者らが作成した Thr379 の一カ所だけにポストリン酸修飾がおこる -DG のドメイン欠損変異体 mucin1-Fc を用いた。また、GlcA-Xyl リピード構造を抑制できる HNK-1ST も利用した。具体的には、HNK-1ST を共発現させた培養細胞から精製した mucin1-Fc をトリプシンで消化し、糖ペプチドサンプルを LC/MS で解析する。目的の Thr379 を含むペプチド断片 374-GAIIQTPTLGP1QPTR-389のLC/MS上でのピーク位置は、化学合成した同配列ペプチドを利用して特定した。次に、目的ペプチドに存在する糖鎖構造を多段階質量分析によって決定した。LC/MS解析に関しては、国立医薬品食品衛生研究所の川崎ナナ博士に解析を依頼した。

(2) ポストリン酸糖鎖の発現制御機構の解析

-DG上のポストリン酸糖鎖付加部位の決定がどのような機構で行われているかを検討するため、先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子として知られている9種類の糖転移酵素と、-DGの変異体である mucin1-Fc のポストリン酸糖鎖不可部位に変異を導入した m1-T379A-Fc を LARGE と共に培養細胞に過剰発現させた。m1-T379A-Fc 上に異所性に発現する laminin 結合性糖鎖を検出することにより、ポストリン酸糖鎖発現の調節に関する糖転移酵素を同定した。

(3) ラミニン結合性糖鎖の神経発生過程における役割

大脳皮質形成異常を併発する先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子の1つである *Pomgnt2*(AG061)の遺伝子欠損マウスを用いて、本疾患で生じる II 型滑脳症の病態発症機構の解析を行った。具体的には、*Pomgnt2*(AG061)遺伝子欠損マウスの胎生10.5日から胎生16.5日齢の脳切片を作製し、基底膜ラミニンの染色によって、基底膜が破綻する時期を特定した。さらに、子宮内電気穿孔法を用いた GFP 遺伝子の導入によって神経細胞の動態を可視化し、過剰遊走する神経細胞の動態を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) ラミニン結合性糖鎖の構造解析

GlcA-Xyl リピードのような長い直鎖構造は質量が大きいため質量分析が技術的に困難である。これを克服するため、申請者らが見出した硫酸基転移酵素 HNK-1ST によってポストリン酸構造の伸長を抑制した糖鎖を用いて -DG のセリン残基から GlcA-Xyl リピードにいたる構造の解析を試みた。その結果ポストリン酸糖鎖の基礎構造となるリン酸化三糖 [GalNAc 1-3GlcNAc 1-4(P-6)Man] と一致するシグナルが検出された。しかし、

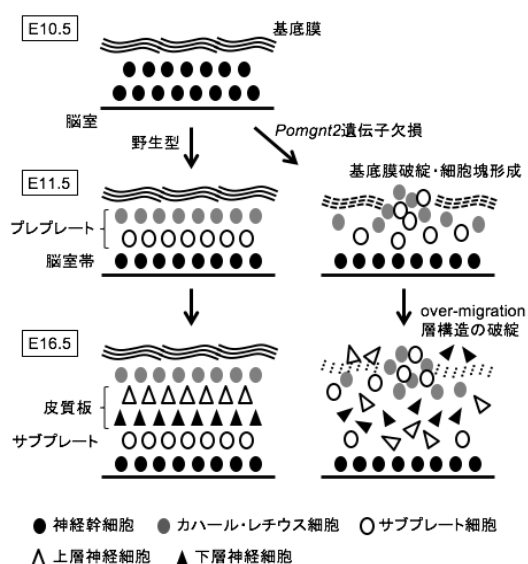
更に伸長した糖鎖構造の検出には至らなかった。本研究を遂行している過程でセリン/スレオニン残基から GlcA-Xyl リピートにいたる詳細な糖鎖構造が報告されたことから (Cell Rep. 2016, 14, 2209-2223)、(1)の課題については、これ以上行わず、以下の(2)、(3)の課題を中心に取り組んだ。

(2) ポストリン酸糖鎖の発現制御機構の解析

O-Man 型糖鎖を持つ糖タンパク質はこれまでも多数知られているが、ポストリン酸糖鎖を持つのは -DG のみである。これは末端の GlcA と Xyl の二糖繰り返し構造を生合成する LARGE が、-DG の N 末端領域を認識して働くことに起因していると考えられている。しかし、-DG のムチン様ドメインには多くの O-Man 型糖鎖付加部位が存在するが、ポストリン酸糖鎖が付加されるのは特定の 3 カ所のスレオニン残基上のみである。この部位特異的な発現調節機構を明らかにするために解析を行った。その結果、先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子として知られている糖転移酵素の中でも、ポストリン酸糖鎖修飾の足場となる core M3 構造の生合成に参与する POMGNT2 (AG061) と B3GALNT2 の過剰発現によって、-DG のムチン様ドメインの特定の部位に異所性にポストリン酸糖鎖を生合成することが明らかになった。さらに B3GALNT2 の過剰発現は、ポストリン酸糖鎖のキャリアタンパク質ではない phosphacan 上にもこの糖鎖を発現させた。これらのことから、POMGNT2 及び B3GALNT2 がポストリン酸糖鎖の発現制御を担っている可能性が示めされた。

(3) ラミニン結合性糖鎖の神経発生過程における役割

先天性筋ジストロフィーの主症状である骨格筋の壊死については病態解明が進んでいるが、一方で、重症例で併発する大脳皮質異形成 (II 型滑脳症) については病態発症機構の解明が遅れている。II 型滑脳症では、脳表基底膜の破綻と、神経細胞のクモ膜下腔への遊出が観察される。しかしながら、脳表基底膜が破綻する時期と原因、また過剰遊走に至るまでの神経細胞の動態など、発症の初期過程は明らかとなっていない。そこで、Pomgnt2 (AG061) 遺伝子欠損マウスを先天性筋ジストロフィーの病態モデルとして使用し、本疾患で生じる II 型滑脳症の病態発症機構の解析を行った。その結果、基底膜破綻が胎生 11.5 日齢 (E11.5) で初めて生じることが明らかとなった。また、E11.5 では興奮性神経細胞がまだ産生されていないこと、この時期の基底膜の破綻部位において早期発生細胞であるカハール・レチウス細胞とサブプレート細胞が異所性の細胞塊を形成していたことから、先天性筋ジストロフィーにおける II 型滑脳症では、まずカハール・レチウス



ス細胞とサブプレート細胞が基底膜を破ってクモ膜下腔に遊出した後、興奮性神経細胞が基底膜の破綻部位から遊出する、という発症機序が示唆された。さらに、子宮内電気穿孔法により興奮性神経細胞を GFP で標識し、移動中の形態を観察した。その結果、Pomgnt2 遺伝子欠損マウス脳の神経細胞では、正常な双極性の形態がみられず、移動の方向にも異常をきたしていることが明らかとなった。これらの知見は、先天性筋ジストロフィーで併発する II 型滑脳症の病態解明に貢献する重要な知見である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件) 全て査読あり

1. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Fujishima A, Oka S, (他 16 名). (2017) MiR30-GALNT1/2 Axis-Mediated Glycosylation Contributes to the Increased Secretion of Inactive Human Prohormone for Brain Natriuretic Peptide (proBNP) From Failing Hearts. *J. Am. Heart Assoc.*, 6, e003601. DOI: 10.1161/JAHA.116.003601.
2. Naito-Matsui Y, Davies LR, Takematsu H, (他 12 名). (2017) Physiological Exploration of the Long-term Evolutionary Selection Against Expression of N-glycolylneuraminic Acid in the Brain. *J. Biol. Chem.*, 292, 2557-2570. DOI: 10.1074/jbc.M116.768531.
3. Nakagawa N and Oka S. (2016) Dystroglycan glycosylation: structure, synthetic pathway, and in vivo role in the brain development. *Journal of Japanese Biochemical Society* 88, 488-491. DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880488.
4. Watanabe H, Okahara K, Naito-Matsui Y,

- Abe M, Go S, Inokuchi J, Okazaki T, Kobayashi T, Kozutsumi Y, Oka S, Takematsu H. (2016) Psychosine-triggered endomitosis is modulated by membrane sphingolipids through regulation of phosphoinositide 4,5 biphosphate production at the cleavage furrow. *Mol. Biol. Cell.* 27, 2037-2050. DOI: 10.1091/mbc.E15-08-0555.
5. Kouno T, Akiyama N, Ito T, Okuda T, Nanchi I, Notoya M, Oka S, Yukioka H. (2016) Ghrelin O-acyltransferase knockout mice show resistance to obesity when fed high-sucrose diet. *J. Endocrinol.*, 228, DOI: 115-125. 10.1530/JOE-15-0330.
 6. Yabuno K, Morise J, Kizuka Y, Hashii N, Kawasaki N, Takahashi S, Miyata S, Izumikawa T, Kitagawa H, Takematsu H, Oka S. (2015) A Sulfated Glycosaminoglycan Linkage Region Is a Novel Type of Human Natural Killer-1 (HNK-1) Epitope Expressed on Aggrecan in Perineuronal Nets. *PLoS One*, 10, e0144560. DOI: 10.1371/journal.pone.0144560.
 7. *Takeuchi Y, *Morise J, Morita I, Takematsu H, Oka S. (2015) Role of Site-Specific N-Glycans Expressed on GluA2 in the Regulation of Cell Surface Expression of AMPA-Type Glutamate Receptors. *PLoS One*, 10, e0135644. DOI: 10.1371/journal.pone.0135644. *These authors contributed equally to this work.
 8. Gu W, Fukuda T, Isaji T, Hang Q, Lee HH, Sakai S, Morise J, Mitoma J, Higashi H, Taniguchi N, Yawo H, Oka S, Gu J. (2015) Loss of α 1,6-fucosyltransferase decreased hippocampal long-term potentiation: implications for core fucosylation in the regulation of AMPA receptor heteromerization and cellular signaling. *J. Biol. Chem.*, 290, 17566-17575. DOI: 10.1074/jbc.M114.579938.
 9. Nakagawa N, Yagi H, Kato K, Takematsu H, Oka S. (2015) Ectopic clustering of Cajal-Retzius and subplate cells is an initial pathological feature in Pomgnt2-knockout mice, a model of dystroglycanopathy. *Sci. Rep.*, 5, 11163. DOI: 10.1038/srep11163.
 10. Yaji S, Manya H, Nakagawa N, Takematsu H, Endo T, Kannagi R, Yoshihara T, Asano M, Oka S. (2015) Major glycan structure underlying expression of the Lewis X epitope in the developing brain is O-mannose-linked glycans on phosphacan/RPTP β . *Glycobiology*, 25, 376-385. DOI: 10.1093/glycob/cwu118.
 11. Hamada Y, Hirano M, Kuwahara M, Samukawa M, Takada K, Morise J, Yabuno K, Oka S, Kusunoki S. (2015) Binding specificity of anti-HNK-1 IgM M-protein in anti-MAG neuropathy: Possible clinical relevance. *Neurosci. Res.*, 91, 63-68. DOI: 10.1016/j.neures.2014.09.010.
 12. Akasaka-Manyu K, Manya H, Kizuka Y, Oka S, Endo T. (2014) α -Klotho mice demonstrate increased expression of the non-sulfated N-glycan form of the HNK-1 glyco-epitope in kidney tissue. *J. Biochem.*, 156, 107-113. DOI: 10.1093/jb/mvu024.
- [学会発表](計 31件)
1. 森瀬 譲二, 鈴木 健一, 北川 英佳, 若園 佳彦, 高宮 考悟, 楠見 明弘, 竹松 弘, 岡 昌吾 AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットは神経細胞膜表面上を単量体で拡散する 第89回日本生化学会大会 2016年9月25日~27日 仙台国際センター (宮城県)
 2. 中村 綾沙, 森瀬 譲二, 竹松 弘, 岡 昌吾 胎生期にTenascin-C上に発現するHNK-1糖鎖の機能解析 第89回日本生化学会大会 2016年9月25日~27日 仙台国際センター (宮城県)
 3. 山本 采季, 森瀬 譲二, 竹松 弘, 岡 昌吾 特定のN型糖鎖がAMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluA1の細胞内輸送を制御する 第35回日本糖質学会年会 2016年9月1日~3日 高知市文化プラザ (高知県)
 4. Watanabe H, Kobayashi T, Inokuchi J, Okazaki T, Oka S, and Takematsu H. Psychosine-triggered endomitosis to produce multiploid cells. 2016 Korea-Japan Bioactive Lipid Joint Symposium. May 11-13, 2016. BAREVE Hotel in Jeju island (South Korea)
 5. Hakematsu H, Kitagawa H, Kannagi R, and Oka S. Identification of modifier genes that modulate cell surface P-selectin ligand expression. ICS 2016 (XXVIII International Carbohydrate Symposium) July 17-21, 2016. New Orleans, Louisiana, (USA)
 6. Morise J, Yamamoto S, Hashii N, Kawasaki N, Takematsu H, and Oka S. Specific N-glycans regulate cell surface expression of AMPA-type glutamate

receptors ICS 2016 (XXVIII International Carbohydrate Symposium) July 17-21, 2016. New Orleans, Louisiana, (USA)

7. 東 良柄, 中川 直樹, 竹松 弘, 岡 昌吾 POMGNT1とB3GALNT2は協同的に alpha-ジストログリカン上の部位特異的なリガンド結合糖鎖の発現を制御する BMB 2015 (第88回日本生化学会大会、第38回日本分子生物学会年会合同大会)2015年12月1日~4日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
8. Yagi H, Nakagawa N, Oka S, and Kato K. Molecular mechanisms underlying the formation of laminin-binding glycans displayed on α -dystroglycan. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Nov. 16-19 2014, Honolulu, Hawaii (USA).

〔図書〕(計 3件)

1. 岡 昌吾 神経可塑性と糖鎖 (97ページから100ページ) 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック (株式会社 NTS)
2. N. Nakagawa and S. Oka, HNK-1 glyco-epitope: COMPLEX machinery for the biosynthesis. Glycoscience: Biology and Medicine, (Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G.W., Seeberger, P.H., and Wong, C.H., eds.) Springer pp 543-549.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
<http://oka-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 昌吾 (OKA, Shogo)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 60233300

(2) 研究分担者

竹松 弘 (TAKEMATSU Hiromu)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号 : 80324680

森瀬譲二 (MORISE Jyoji)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 60755669

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし
()