

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659153  
 研究課題名（和文）先天性筋ジストロフィーに関わる機能性糖鎖の発現制御機構に関する研究  
 研究課題名（英文） Research on regulation and expression mechanisms of functional glycans associated with congenital muscular dystrophy  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

$\alpha$ -ジストログリカン上の糖鎖はラミニンなどの細胞外基質との結合に重要であり、その付加不全は先天性筋ジストロフィーの発症に関連する。本研究において HNK-1 糖鎖合成に関連する硫酸基転移酵素（HNK-1ST）が、 $\alpha$ -ジストログリカン上の糖鎖の発現調節に関与していることを見出した。さらにメラノーマ細胞を用いて HNK-1ST による  $\alpha$ -ジストログリカン上の糖鎖の硫酸化が細胞の移動性を制御することを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

$\alpha$ -Dystroglycan undergoes extensive glycosylation required for the interaction between  $\alpha$ -dystroglycan and the extracellular matrix such as laminin and aberrant glycosylation of  $\alpha$ -DG has already been identified in the pathogenesis of several types of congenital muscular dystrophy. In this study, we revealed that a sulfotransferase, HNK-1ST, suppressed the glycosylation and reduced the ligand-binding activity of  $\alpha$ -dystroglycan. We also found that HNK-1ST regulated the migration of melanoma cells through the glycosylation state on  $\alpha$ -dystroglycan.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

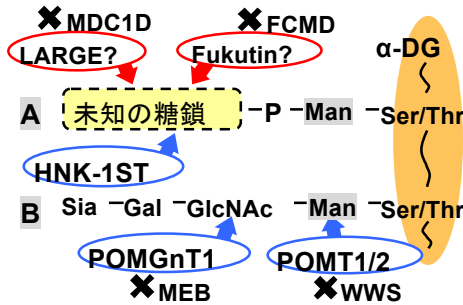
キーワード：生体分子医学、機能糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾は、生理活性分子であるタンパク質の生合成過程において転写・翻訳に次ぐ、最終段階での機能制御を担う重要なステップである。近年、糖鎖自身が特徴的な機能をもつ「機能性糖鎖」の存在が明らかにされつつある。 $\alpha$ -DG は、骨格筋や神経、上皮など広範な組織の細胞膜上に存在する接着分子

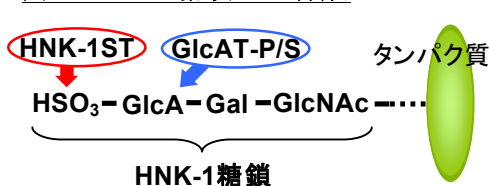
で、ラミニン等の細胞外基質との結合により細胞と基底膜をつなぎ、組織構造の維持に寄与している。 $\alpha$ -DG とラミニンとの結合には  $\alpha$ -DG 上の O-Man 型糖鎖が重要であり（図 1）、その糖鎖付加不全は、筋組織では筋ジストロフィーを、神経系では大脳皮質構造の異形成を引き起こすことが知られている（*Nature* 2002, 418, 417-22）。事実、先天性筋

図1 O-Man型糖鎖と生合成酵素群



ジストロフィー (CMD) に分類される Walker-Warburg 症候群 (WWS) では O-Man 型糖鎖の最初の Man を転移する糖転移酵素 (POMT1/2)、また muscle-eye-brain 病 (MEB) では 2 番目の、GlcNAc を転移する酵素 (POMGnT1) がその原因遺伝子である (図 1B)。さらに、CMD の原因遺伝子には他にも、Fukutin (FCMD; 福山型筋ジストロフィー)、LARGE (MDC1D) などがある。しかし、Fukutin や LARGE は構造的には糖転移酵素と推定されるものの、合成する糖鎖の詳細に関しては不明である。また最近ではリン酸基を介した新規な O-Man 型糖鎖 (図 1A) が重要であるなどの報告もある (*Science* 2010, 327, 88-92)。一方、我々は HNK-1 糖鎖と呼ばれる硫酸化グルクロン酸を末端にもつ機能性糖鎖の解析を行い (図 2)、本糖鎖が神経可塑性などの高次脳機能に重要な糖鎖であることを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 2002, 277, 27227-31, *Neuroscience* 2009, 164, 1685-94)。我々は既に  $\alpha$ -DG の O-Man 型糖鎖の末端に HNK-1 糖鎖が付加されることを示唆する結果を得ていたことから、HNK-1 糖鎖と  $\alpha$ -DG の機能 (ラミニンとの結合) との関係性を調べていた。その過程で HNK-1 糖鎖生合成酵素遺伝子の導入により、 $\alpha$ -DG の糖鎖付加状態が大きく変化し、ラミニンとの結合が減弱することを見出した。しかし驚いたことに、その作用には

図2 HNK-1糖鎖の生合成



HNK-1 糖鎖生合成に必須のグルクロン酸転移酵素は必要ではなく、HNK-1ST 単独の作用により引き起こされることが明らかとなった。従って  $\alpha$ -DG の機能制御機構において、HNK-1 糖鎖ではなく、HNK-1ST が認識し、硫酸基を転移する新規の糖鎖構造が存在すると考えられた。

## 2. 研究の目的

$\alpha$ -DG の糖鎖付加不全が原因となって生じる先天性筋ジストロフィーには、未だ変異遺伝子が不明の症例が多く、根治療法も現時点では存在しない。さらに図 1A に示すように、LARGE や Fukutin が合成する糖鎖の詳細な構造も明らかとなっていない。このことは治療法を考える上でも、疾患の病因を解明する上でも大きな障害となっており、ラミニンとの結合に必要な糖鎖構造の解析は非常に重要な課題である。そこで本研究では、我々が  $\alpha$ -DG の機能調節に関わる分子として新たに見出した硫酸基転移酵素 HNK-1ST を手がかりとして、 $\alpha$ -DG 上の機能性糖鎖の構造と生合成機構を明らかにする。また HNK-1ST による硫酸基の導入が持つ生理学的意義を、細胞を使った実験によって検証し、細胞移動や筋組織形成といった  $\alpha$ -DG が関与する細胞機能において HNK-1ST の果たす役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) HNK-1ST の作用によって生じる硫酸化糖鎖の解析

HNK-1ST の  $\alpha$ -DG 糖鎖付加調節作用において、HNK-1ST の硫酸基転移活性が重要であるかどうかを検討するため、189 番目のアルギニンアラニンに置換することによって、硫酸基転移活性を持たない HNK-1ST 変異体を作製した。作製した HNK-1ST 変異体を、Fc タグを付加した  $\alpha$ -DG ( $\alpha$ -DG-Fc) および myc タグを付加した LARGE (LARGE-myc) とともに培養細胞に発現させ、ラミニンとの結合に生じる変化を laminin overlay assay により解析した。

次に、HNK-1ST によって  $\alpha$ -DG 上に硫酸基が転移されるかどうかを検討するため、 $\alpha$ -DG-Fc と HNK-1ST を共発現させた培養細胞に放射性同位体  $^{35}\text{S}$  で標識された硫酸ナトリウムを添加し、取り込まれた放射性同位体  $^{35}\text{S}$  をオートラジオグラフィによって検出した。

#### (2) HNK-1ST による $\alpha$ -DG 機能調節に伴う細胞機能変化の解析

マウス由来の S91 メラノーマ細胞株を用いて、細胞移動性の変化における HNK-1ST の役割を解析した。1  $\mu\text{M}$  レチノイン酸 (RA) の存在下で培養し分化誘導させた S91 細胞を用いて、以下の解析をおこなった。コントロールとしては DMSO のみを添加した培地で培養した細胞を用いた。HNK-1ST を含む HNK-1 糖鎖生合成酵素の mRNA の検出には RT-PCR を用いた。HNK-1 糖鎖の発現は HNK-1 抗体を用いたウエスタンブロットによって検出した。RA 処理による  $\alpha$ -DG の糖鎖付加状態およびラミニン結合活性の変化は、ビオチン化法によって細胞表面タンパク質を回収し、IIH6 抗体 (糖鎖付加を受けた  $\alpha$ -DG に対する抗体) を用いたウエスタンブロットおよび laminin overlay assay によって解析した。HNK-1ST のノックダウン実験には、HNK-1ST に対する配列の異なる二種類の siRNA を用いた。ノックダウン効率は RT-PCR を用いて確認した。S91 細胞の細胞移動性は、Transwell migration assay を用いて解析した。インサート膜には 10  $\mu\text{g/ml}$  のラミニンでコートしたものをを用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) HNK-1ST の作用によって生じる硫酸化糖鎖の解析

これまでの研究で、HNK-1ST が  $\alpha$ -DG の糖鎖付加を抑制することを明らかにしている。そこでまず、この作用において HNK-1ST の硫酸基転移活性が重要であるかどうかを検討するため、HNK-1ST の酵素活性に必須の 189 番目のアルギニンをアラニンに置換することによって、硫酸基転移活性を持たない

HNK-1ST 変異体を作製した。CHO-K1 細胞に対し、 $\alpha$ -DG-Fc および LARGE-myc とともに野生型、あるいは変異体の HNK-1ST を共発現させ、 $\alpha$ -DG の糖鎖付加状態を解析したところ、野生型 HNK-1ST は LARGE による  $\alpha$ -DG の糖鎖付加を抑制し、ラミニン結合活性を低下させたが、変異体 HNK-1ST の場合ではそのような抑制作用は観察されなかった。従って、HNK-1ST による  $\alpha$ -DG の機能制御には、HNK-1ST の硫酸基転移活性が重要であることが明らかとなった。即ち、HNK-1ST によって硫酸基が転移される、HNK-1 糖鎖以外の新規の糖鎖構造が存在し、 $\alpha$ -DG の糖鎖付加を調節していると考えられた。

HNK-1ST による  $\alpha$ -DG の糖鎖付加抑制作用は、LARGE の共発現の有無に関係なく観察されることから、HNK-1ST は LARGE ではなく  $\alpha$ -DG を硫酸化すると考えられた。この仮説を検討するため、放射性同位体  $^{35}\text{S}$  で標識された硫酸ナトリウムを CHO-K1 細胞に添加し、 $\alpha$ -DG に対する硫酸基の転移を調べた。その結果、HNK-1ST を共発現させた  $\alpha$ -DG-Fc にのみ  $^{35}\text{S}$  のシグナルが検出されたことから、HNK-1ST は  $\alpha$ -DG に対して硫酸基を転移することが明らかとなった。以上の結果から、HNK-1ST が  $\alpha$ -DG 上に硫酸化糖鎖を合成することによってラミニン結合性糖鎖の発現を抑制し、その結果  $\alpha$ -DG の機能が減弱したと考えられる。これらの結果は  $\alpha$ -DG 上の機能性糖鎖の生合成における硫酸基の重要性を示唆するとともに、従来の HNK-1 糖鎖生合成とは異なる、HNK-1ST の新たな機能を示すものである。

#### (2) HNK-1ST による $\alpha$ -DG 機能調節に伴う細胞機能変化の解析

最近、メラノーマ細胞にレチノイン酸 (RA) を添加すると HNK-1ST の発現が誘導され、細胞移動性が低下することが報告された (*Cancer Res.* 2009, 69, 5218-25)。しかしながら、HNK-1ST の機能と細胞移動性の変化を結びつける分子機構は未解明であった。そこで本研究では、HNK-1ST が  $\alpha$ -DG の機能を調節することによってメラノーマ細胞の移動

性を変化させるという仮説を検証した。まず、マウス由来メラノーマ細胞株である S91 細胞に RA を添加し、HNK-1 糖鎖生合成酵素の mRNA 発現を RT-PCR により調べたところ、HNK-1ST の発現は報告通り大きく増加したが、HNK-1 糖鎖生合成に必須のグルクロン酸転移酵素である GlcAT-P および GlcAT-S の発現は検出されなかった。この結果と一致して、RA を添加した S91 細胞においては HNK-1 糖鎖自体の発現も観察されず、HNK-1ST が HNK-1 糖鎖生合成以外の機能を発揮していることが示唆された。次に、RA 添加細胞における  $\alpha$ -DG の変化を調べたところ、糖鎖付加状態およびラミニン結合活性が大きく低下していることが明らかとなった。RA によって発現誘導された HNK-1ST が  $\alpha$ -DG の糖鎖付加を抑制した可能性が考えられたため、RA 添加細胞に対し、siRNA を用いた HNK-1ST のノックダウンを行った。その結果、RA 添加により低下していた  $\alpha$ -DG の糖鎖付加状態およびラミニン結合活性が HNK-1ST のノックダウンによって有意に回復したことから、S91 細胞において HNK-1ST が  $\alpha$ -DG の機能制御に関わることが示された。

$\alpha$ -DG は細胞外基質分子と結合する接着分子であり、細胞移動性との関連を示唆する報告がなされていたことから、S91 細胞の移動性における  $\alpha$ -DG の役割を調べた。まず RA を添加した S91 細胞について、ラミニンでコートしたインサート膜を用いた Transwell migration assay を行ったところ、RA の添加により移動性が大きく低下した。これは RA による分化誘導が生じた結果であると考えられ、過去の報告とも一致する。次に、IIH6 抗体の存在下、即ち  $\alpha$ -DG とラミニンとの結合を阻害した条件で同様に実験したところ、IIH6 抗体の添加によって DMSO 添加細胞の移動性が低下したことから、 $\alpha$ -DG が S91 細胞の移動性に関与することが示唆された。一方で、HNK-1ST のノックダウンによって RA 添加細胞の移動性が有意に回復した。以上の結果により、RA によって発現誘導された HNK-1ST が  $\alpha$ -DG 上のラミニン結合性糖鎖の発現を抑制し、その結果 S91 細胞の移動性が低下したと考

えられた。

本研究で得られた成果は、 $\alpha$ -DG 上の機能性糖鎖の発現が、拮抗する LARGE と HNK-1ST によって制御される可能性を示す新たな知見である。また今後の解析によって、先天性筋ジストロフィー病態解明の鍵となる、LARGE の合成する糖鎖構造の解明に向けた重要な手がかりを与えることが期待される。

## 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 8 件)

1. N. Nakagawa, H. Many, T. Toda, T. Endo, and S. Oka. Human natural killer-1 sulfotransferase (HNK-1ST)-induced sulfate-transfer regulates laminin-binding glycans on  $\alpha$ -dystroglycan. *J. Biol. Chem.* 287(36), 30823-30832 (2012). doi: 10.1074/jbc.M112.363036. 査読有
2. Y. Kizuka and S. Oka. Regulated expression and neural functions of human natural killer-1 (HNK-1) carbohydrate. *Cell Mol. Life Sci.* 69(24):4135-47 (2012). DOI: 10.1007/s00018-012-1036-z 査読有
3. Y. Kizuka, N. Nakagawa, I. Morita, and S. Oka. Requirement of acidic amino acids in the Glucuronyltransferase-P (GlcAT-P) flexible loop for its enzyme activity. *Glycans: Biochemistry, Characterization and Applications*. (Nova Science publishers, New York) H. M. Mra-Montes (ed.). pp295-312 (2012). 査読有 URL, [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=31002&osCsid=d07ea77a4fb9add4edc18602967a1750](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=31002&osCsid=d07ea77a4fb9add4edc18602967a1750)
4. Role of interaction of mannan-binding protein with meprins at the initial step of complement activation in ischemia/reperfusion injury to mouse kidney. M. Hirano, B.Y. Ma, N. Kawasaki, S. Oka, and T. Kawasaki. *Glycobiology* 22(1), 84-95 (2012). doi: 10.1093/glycob/cwr107. 査読有
5. Sulfation of glucuronic acid in the linkage tetrasaccharide by HNK-1 sulfotransferase is an inhibitory signal for the expression of a chondroitin sulfate chain on thrombomodulin. N. Nakagawa, T. Izumikawa, H. Kitagawa and S. Oka. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415(1):109-13.(2011). doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.023. 査読有
6. Specific Enzyme Complex of Beta-1, 4-galactosyltransferase-II and GlcAT-P Facilitates Biosynthesis of N-linked HNK-1

Carbohydrate. T. Kouno, Y. Kizuka, N. Nakagawa, T. Yoshihara, M. Asano, and S. Oka. J. Biol. Chem. 286(36), 31337-31346 (2011). doi: 10.1074/jbc.M111.233353. 査読有

総説

7. 森瀬譲二, 森田一平, 岡 昌吾 HNK-1 糖鎖によるグルタミン酸受容体の発現レベルの調節 生化学 83(3), 205-211 (2011). 査読有
8. 中川直樹, 森田一平, 岡 昌吾 HNK-1 糖鎖抗原と神経突起の形成 脳 2 1, 14(1), 37-43 (2011). 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. 橋本希, 中川直樹, 岡 昌吾 HNK-1 糖鎖性合成酵素群による  $\alpha$ -ジストログリカンの新規機能調節 第 85 回日本生化学会大会 福岡国際会議場 (福岡) 平成 24 年 1 月 15 日発表 (国内)
2. 家治 翔平, 中川 直樹, 神奈木 玲児, 吉原 亨, 浅野 雅秀, 岡 昌吾 神経系に発現する Lewis X 糖鎖抗原に関する研究 第 85 回日本生化学会大会 福岡国際会議場 (福岡) 平成 24 年 1 月 15 日発表 (国内)
3. 岡 昌吾 神経可塑性制御における糖鎖の役割 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク「夏のワークショップ」 仙台国際センター (宮城県) 平成 24 年 7 月 27 日発表 (国内)
4. 岡 昌吾 神経機能に重要な糖鎖とその合成機構 第 17 回高知システム糖鎖生物学教育研究センターセミナー 高知大学医学部 (高知県) 平成 23 年 1 月 7 日発表 (国内)
5. S. Oka. Function and regulation of the HNK-1 glyco-epitope in the nervous System. 日蘭糖鎖科学 Joint Seminar 名古屋大学医学部 平成 23 年 10 月 11 日発表 (国内)
6. 岡 昌吾 藪野景子, 中川直樹, 森瀬譲二 HNK-1 糖鎖抗原の構造的機能的多様性 第 84 回日本生化学会大会 平成 23 年 9 月 22 日発表 (国内)
7. S. Oka, Y. Kizuka, N. Nakagawa, T. Yoshihara, M. Asano, and T. Kouno. Functional Enzyme Complex of Beta-1, 4-galactosyltransferase-II and GlcAT-P in HNK-1 biosynthesis. Glyco21 (21st international symposium on glycoconjugates). University of Vienna (ウィーン, オーストリア). August 25, 2011 発表 (国外)
8. 岡 昌吾, 中川直樹, 森田一平, 木塚康彦 GlcAT-P の酵素活性における flexible loop の役割 第 30 回日本糖質学会 平成 23 年 7 月 12 日発表 (国内)

[図書] (計 0 件)

[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

なし ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

川崎ナナ ( KAWASAKI NANA )  
国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長  
研究者番号 : 20186167