

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670140

研究課題名(和文)モデル生物を活用した先天性脳疾患関連オーファン糖転移酵素の機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of orphan glycosyltransferases associated with congenital muscular dystrophies using model organisms

研究代表者

岡島 徹也 (Okajima, Tetsuya)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20420383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Walker-Warburg症候群(WWS)の原因遺伝子であるGTDC2が、小胞体において  $\alpha$ -ジストログリカン( $\alpha$ -DG)のムチン様領域にCTD110.6抗体に反応性を示すGlcNAcエпитープを生成し、WWSで見出されたGTDC2の遺伝子変異によりこの糖鎖が減少することを明らかにした。また、ゼブラフィッシュにおけるGTDC2の機能阻害は、目の異常と脳室の拡大などの、WWSに関連性のある異常を示した。以上より、GTDC2は小胞体で  $\alpha$ -DGのGlcNAc修飾を触媒する糖転移酵素であり、ゼブラフィッシュが  $\alpha$ -DGのGlcNAc修飾を解析する有用なモデル生物であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Hypoglycosylation is a common characteristic of  $\alpha$ -dystroglycanopathy, which is a group of congenital muscular dystrophies. More than ten genes, including GTDC2, have been implicated in  $\alpha$ -dystroglycanopathies. In this study, we showed that GTDC2 generates CTD110.6 antibody-reactive N-acetylglucosamine (GlcNAc) epitopes on the  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) within the mucin-like domain of  $\alpha$ -DG in the endoplasmic reticulum. Mutations of GTDC2 identified in Walker-Warburg syndrome resulted in decreased glycosylation. Inactivation of GTDC2 function in zebrafish resulted in enlarged cerebral ventricle and microphthalmia, that is associated with dystroglycanopathy. Thus, GTDC2 is a novel glycosyltransferase catalyzing GlcNAcylation of  $\alpha$ -DG in the endoplasmic reticulum. Zebrafish will serve as a suitable model organism to study GlcNAc modification of  $\alpha$ -DG and to analyze defective O-glycosylation in  $\alpha$ -dystroglycanopathies.

研究分野：生化学・糖鎖生物学

キーワード： $\alpha$ -Dystroglycan GTDC2 CTD110.6 zebrafish

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は第4の生命鎖として知られるが、DNA・RNAやタンパク質と異なり、未だに一次構造の決定は不完全である。それに一致して、酵素活性が証明されていない糖鎖合成酵素（オーファン糖転移酵素）が多数存在する。オーファン糖転移酵素の機能解明は、糖鎖一次構造の完全理解につながり、機能的糖鎖（糖鎖コード）の意義解読に向けた重要なステップとして位置づけられ、医学的には、糖鎖異常を伴う多くの疾患の病態の解明に貢献できる。

申請者らは、これまでに植物の糖転移酵素に弱い相同性を示すオーファン糖転移酵素（EOGT）の機能解明に成功し、EOGTがN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）から始まる新規の糖鎖構造の生合成を開始することを明らかにした（Okajima T et al. Nature Commun. 2011）。一方で、高等動物においては、類似の遺伝子（GTDC2）が存在し、同様に新規の糖鎖構造の形成に関与すると予想されるが、酵素活性や酵素機能については全く不明である。2012年9月、エキソーム解析によりGTDC2の遺伝子変異が脳異常を伴う先天性筋ジストロフィー（Walker-Warburg症候群）の患者に同定された（Manzini MC et al. Am.J.Hum.Genet. 2012）。Eogt-likeに遺伝子変異を有する患者は、脳室の拡大（水頭症）と脳回の消失（滑脳症）といった脳奇形や眼球異常を認め、生後数週間以内に致死となる。

本研究課題では、世界に先駆けてオーファン糖転移酵素GTDC2の機能解明を行なうことを目的とする。GTDC2が生合成に関与する糖鎖構造の同定により、糖鎖一次構造の完全理解に向けて前進するのみならず、Walker-Warburg症候群と関連した先天性脳疾患の病態の解明や新たな治療戦略の創出に大きく役立つと考えられる。

## 2. 研究の目的

我々が同定した新規糖鎖構造（細胞外O-GlcNAc型糖鎖）の生合成を開始する糖転移酵素EOGTに相同性を示すEogt-like遺伝子に変異を有する患者が見つかり、先天性脳疾患を伴った筋ジストロフィー（Walker-Warburg症候群）に類似した症状を呈することが、2012年の9月に報告された。しかしながら、GTDC2の酵素機能や修飾タンパク質は全くの不明である。本研究では、オーファン糖転移酵素GTDC2の基質の特定や、GTDC2の触媒する糖転移反応の決定に挑戦した。本研究のゴールは、GTDC2が触媒する糖修飾の異常とGTDC2変異に伴う先天性脳疾患との関連性の解明に道筋をつけることであった。また、GTDC2の機能解析を進める上でのゼブラフィッシュのモデル生物としての有用性を検証した。

## 3. 研究の方法

GTDC2の発現ベクターを構築し、 $\alpha$ ジストログリカン（ $\alpha$ DG）の発現ベクターと共に、HEK293T培養細胞に遺伝子導入した。また、Walker-Warburg症候群の患者において見出された遺伝子変異を持ったGTDC2の発現ベクターを作成し、生成される糖鎖の変化について、CTD110.6抗体を用いた免疫ブロットにより解析した。また、CTD110.6抗体を用いた免疫染色により、生成した糖鎖抗原の細胞内分布を検出した。

また、モデル生物としてゼブラフィッシュを用いて、GTDC2の生物学的役割について解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) GTDC2はCTD110.6により認識される糖鎖を生合成する。

HEK293T細胞に $\alpha$ DGとGTDC2を共発

現させ、CTD110.6 抗体により免疫ブロットを行った。その結果、GTDC2 をトランスフェクションすることにより、 $\alpha$  DG 上に CTD110.6 反応性糖鎖が生合成されることが明らかになった(Fig.1A)。

合成される糖鎖構造を明らかにするために、Pomt1 の siRNA により O-マンノシル化反応を阻害したところ、 $\alpha$  DG の CTD110.6 反応性が大きく低下した(Fig. 1B)。従って、GTDC2 は、 $\alpha$  DG の O-マンノース依存的に CTD110.6 反応性糖鎖を生合成することが明らかになった。

一方、グリコシダーゼ処理により、 $\alpha$  DG の CTD110.6 反応性が増加することを見出した(Fig.1C)。その中でも、 $\beta$ ヘキソサミニダーゼ処理の結果、CTD110.6 反応性が顕著に増加した(Fig. 1D)。これらの結果、GTDC2 は  $\beta$  HexNAc による伸長を受ける糖鎖の生合成に関与することが明らかになった。

(2) GTDC2 は  $\alpha$  DG のムチン様ドメインの O-マンノース残基の GlcNAc 修飾に関与する。

GTDC2 が  $\alpha$  DG のどの領域の修飾に関与するか明らかにするために、 $\alpha$  DG の欠失変異体を作成した (Fig. 2A)。各種変異体における GTDC2 による修飾の有無を検討した結果、O-マンノシル化を受けることが知られているムチン領域を欠失させた変異体では、GTDC2 による修飾が消失することが明らかになった (Fig. 2B)。また、O-マンノシル化部位をアラニン置換した変異体においても、GTDC2 による修飾が消失することが明らかになった (Fig. 2C)。

以上の結果より、GTDC2 は  $\alpha$  DG のムチン様ドメインの O-マンノースを修飾することが明らかになった。

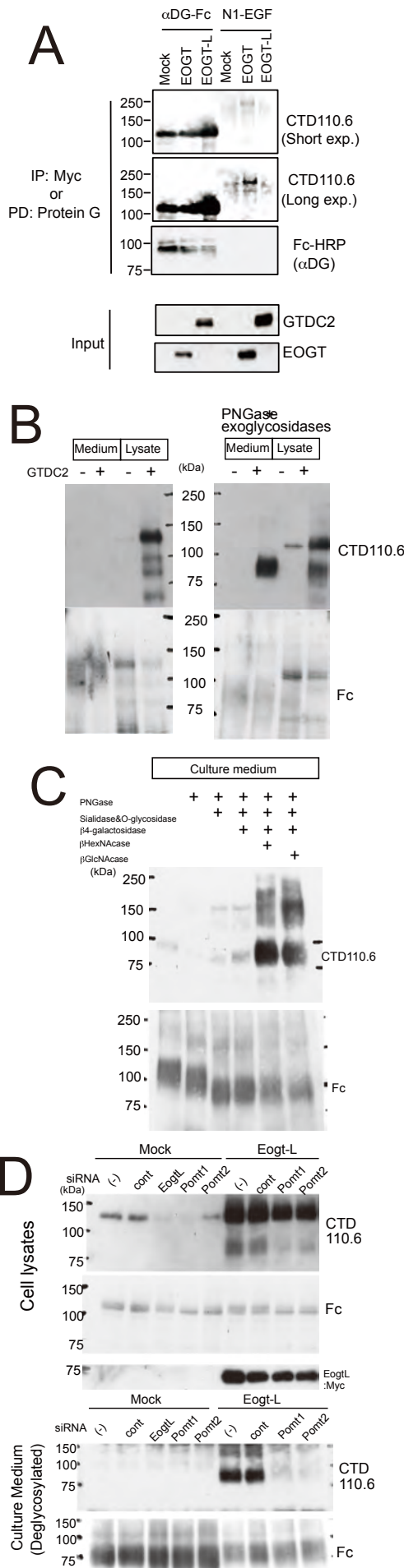
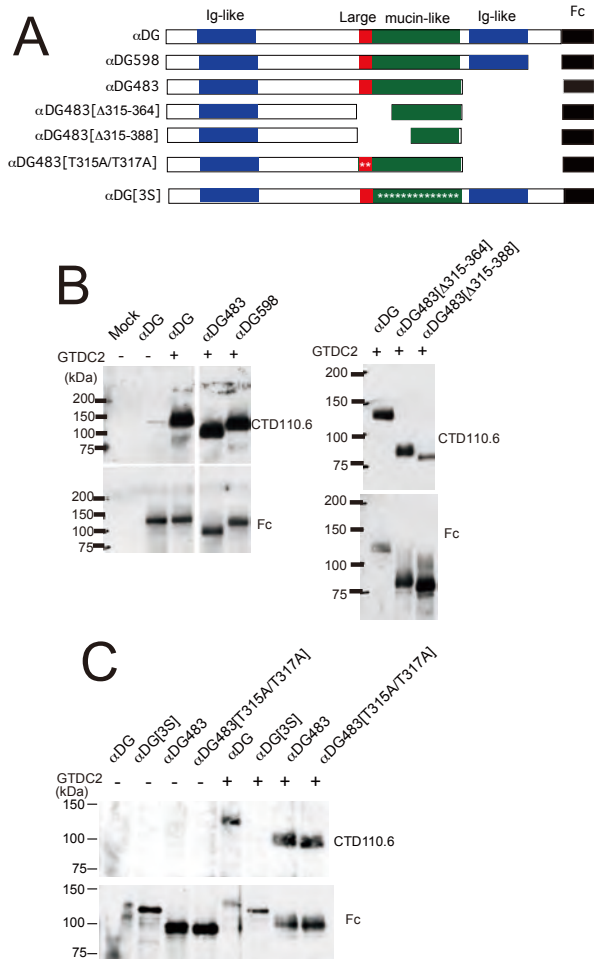


Figure 1. GTDC2による $\alpha$  DGの糖鎖付加

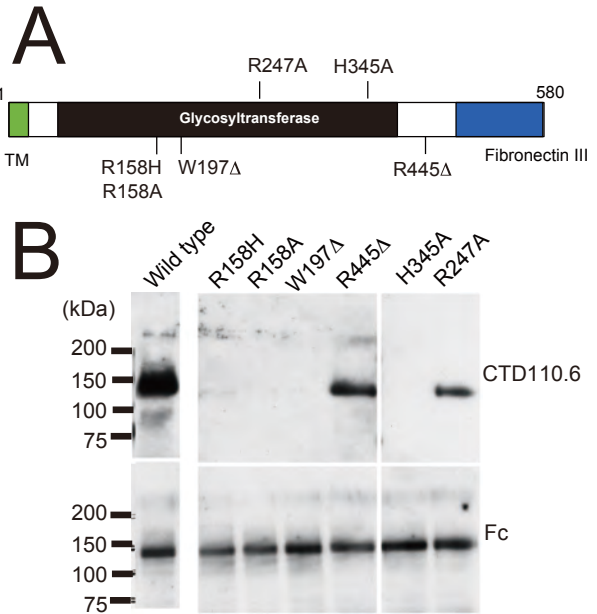


**Figure 2.** GTDC2によるα DGの修飾部位

(3) Walker-Warburg 症候群に関連した GTDC2 の遺伝子変異はα DG の糖修飾能を低下させる

次に、Walker-Warburg 症候群 (以下、WWS) で見出された GTDC2 の遺伝子変異により、GTDC2 の糖転移能が影響するか検討した。WWS の患者で同定された 3 種類の遺伝子変異を GTDC2 に導入した (Fig. 3A 下段)。また、EOGT と GTDC2 に共通するアミノ酸配列についても変異を導入した (Fig. 3A 上段)。これらの変異体の糖転移能を検討したところ、どの変異体においても糖転移能の低下もしくは消失が観察された (Fig. 3B)。以上の結果より、GTDC2 の糖転移活性低下に基づく α DG の糖鎖異常が WWS の原因となることが明らかになった。

また、GTDC2 の酵素活性として、EOGT に関連した小胞体 GlcNAc 修飾に関与することが示唆された。



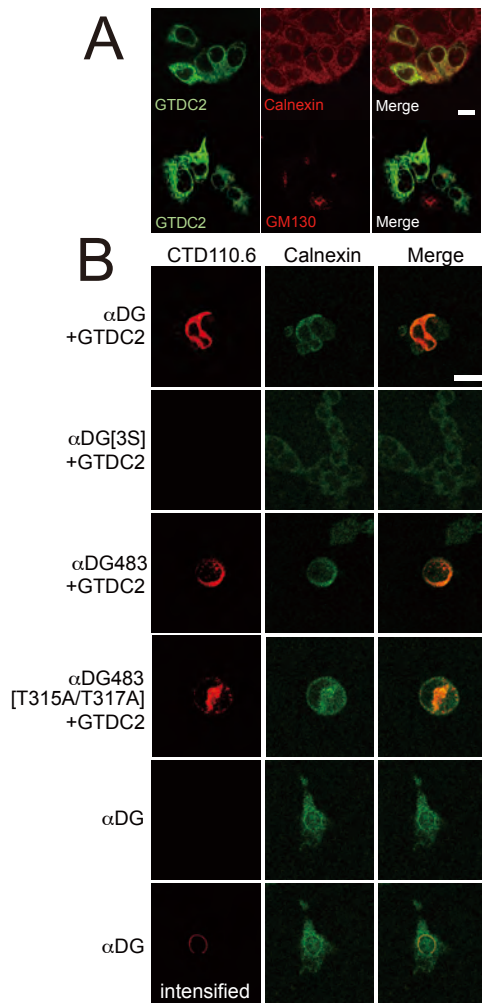
**Figure 3.** Walker-Warburg 症候群に関連した GTDC2 変異体の糖転移能

(4) GTDC2 は小胞体 GlcNAc 修飾に関与する

GTDC2 の細胞内局在を解析したところカルネキシンの局在と一致したことより、小胞体に存在することが明らかになった (Fig. 4A)。そこで、GTDC2 による α DG の GlcNAc 修飾が小胞体で生じるか明らかにするために、α DG やその変異体を用いて CTD110.6 による細胞免疫染色を行った。その結果、GTDC2 存在下で生じる GlcNAc エピトープが小胞体に局在することが明らかになった (Fig. 4B)。以上の結果より、GTDC2 は α DG を小胞体にて GlcNAc 修飾に関与する糖転移酵素であることが示唆された。

(5) GTDC2 はゼブラフィッシュの発生に関与する

GTDC2 の Zebrafish における役割を明らかにするために、in situ ハイブリダイゼーション



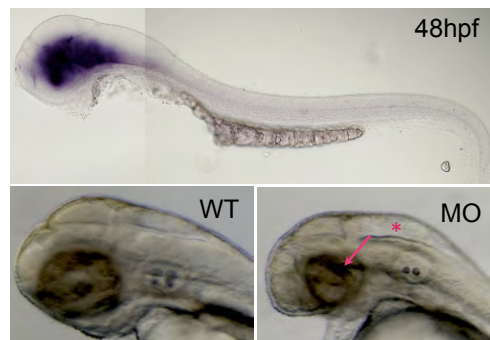
**Figure 4.** GTDC2 は  $\alpha$  DG を小胞体にて GlcNAc 修飾する

ンによる遺伝子発現パターンの解析をおこなった。その結果、Eogt-L は神経系に高発現することが明らかになった (Fig. 5 上段)。またモルフォリノを用いた遺伝子発現阻害の結果、目の異常と脳室の拡大を呈することが明らかになった (Fig. 5 下段)。以上の結果より、Zebrafish における GTDC2 の機能阻害は、WWS に関連性のある異常を示すことが明らかになった。

#### (6) 結語

糖鎖の減少は、先天性筋ジストロフィーの1種である $\alpha$ -ジストログリカノパチーに共通の特徴である。GTDC2 を含め10種類以上の遺伝子が、 $\alpha$ -ジストログリカノパチーの原因であると示唆されている。本研究

では、GTDC2 が小胞体において  $\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ -DG) のムチン様領域に CTD110.6 抗体に反応性を示す GlcNAc エピトープを生成することを見出した。Walker-Warburg 症候群で見出された GTDC2 の遺伝子変異は、この糖鎖の減少をもたらした。ゼブラフィッシュにおける GTDC2 の機能阻害は、目の異常と脳室の拡大などの、 $\alpha$ -ジストログリカノパチーに関連性のある異常を示した。以上の結果より、GTDC2 は小胞体で  $\alpha$ -DG の GlcNAc 修飾を触媒する糖転移酵素であることが明らかになった。ゼブラフィッシュは、 $\alpha$ -DG の GlcNAc 修飾や  $\alpha$ -ジストログリカノパチーにおける糖鎖異常を解析する有用なモデル生物となるであろう。



**Figure 5.** ゼブラフィッシュにおける GTDC2 変異体の表現型

#### 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 10 件)

①Ogawa M, Sawaguchi S, Kamemura K, Okajima T, Intracellular and extracellular O-linked N-acetylglucosamine in the nervous system, *Exp Neurol*, 査読無, 274 巻, 2015, 166-174

DOI:10.1016/j.expneurol.2015.08.009.

②Ogawa M, Sawaguchi S, Furukawa K, Okajima T, N-acetylglucosamine modification in the lumen of the endoplasmic reticulum, *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 1850, 2015, 1319-1324,

DOI:10.1016/j.bbagen.2015.03.003

③Ogawa M, Sawaguchi S, Kawai T, Nadano D, Matsuda T, Yagi H, Kato K, Furukawa K, Okajima T, Impaired O-linked N-acetylglucosaminylation in the endoplasmic reticulum by mutated EGF domainspecific

O-linked N- acetylglucosamine transferase found in Adams- Oliver syndrome., J Biol Chem, 査読有、290、2015、2137- 2149、DOI:10.1074/jbc.M114.598821

④Ishio A, Sasamura T, Ayukawa T, Kuroda J, Ishikawa HO, Aoyama N, Matsumoto K, Gushiken T, Okajima T, Yamakawa T, Matsumo K., O- fucose monosaccharide of Drosophila Notch has a temperature- sensitive function and cooperates with O- glucose glycan in Notch transport and Notch signaling activation., J Biol Chem, 査読有、290、2015、505- 519、DOI:10.1074/jbc.M114.616847

⑤Ogawa M, Furukawa K, Okajima T., Extracellular O-linked beta- N- acetylglucosamine: Its biology and relationship to human disease., World J Biol Chem, 査読有、5、2014、224- 230、DOI:10.4331/wjbc.v5.i2.224

⑥Ogawa, M., Nakamura, N., Nakayama, Y., Kurosaka, A., Many, H., Kanagawa, M., Endo, T., Furukawa, K., and Okajima, T., GTDC2 modifies O- mannosylated  $\alpha$ - dystroglycan in the endoplasmic reticulum to generate N- acetylglucosamine, epitopes reactive with CTD110.6 antibody., Biochem Biophys Res Commun, 査読有、440、2013、88- 93、DOI:10.1016/j.bbrc.2013.09.022.

⑦Nakatani, H., Yasueda, T., Oshima, K., Okajima, T., Nadano, D., Flint, D. J., and Matsuda, T., Post- weaning increases in the milk- fat globule EGF- factor VIII on fat globules in mouse milk and in the uptake of the fat globules by HC11 mammary epithelial cells., J Biochem, 査読有、153、2013、31- 41、DOI:10.1093/jb/mvs116.

⑧Matsumoto, Y., Zhang, Q., Akita, K., Nakada, H., Hamamura, K., Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K., Trimeric Tn Antigen on Syndecan 1 Produced by ppGalNAc- T13 Enhances Cancer Metastasis via a Complex Formation with Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 and Matrix Metalloproteinase 9, J Biol Chem, 査読有、288、2013、24264- 24276、DOI:10.1074/jbc.M113.455006.

⑨Matsubara, T., Akiyama, Y., Oshima, K., Okajima, T., Nadano, D., and Matsuda, T., Dephosphorylation reduces passage of ovalbumin antigen through intestinal epithelial Caco- 2 cell monolayers., J Biochem, 査読有、153、2013、347- 354、DOI:10.1093/jb/mvs154.

⑩Hirano, K., Hino, S., Oshima, K., Okajima, T., Nadano, D., Urisu, A., Takaiwa, F., and Matsuda, T., Allergenic potential of rice- pollen proteins: expression, immuno- cross reactivity and IgE- binding., J Biochem, 査読有、154、2013、195- 205、DOI:10.1093/jb/mvt044.

[学会発表] (計 9 件)

①Ogawa M, Bieniasz- Krzywiec P, Yagi H, Kato K, Usukura J, Furukawa K, Okajima T. : Role of extracellular O- GlcNAc in Notch signaling, retinal vascular development, and blood brain barrier function. SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting - Satellite II: Glycans in Neuroscience (2014年11月16日 Honolulu, USA)

②Ogawa M, Kawai T, Nadano D, Matsuda T, Yagi H, Kato K, Furukawa K, Okajima T. : Impaired O- GlcNAc Modification in the Endoplasmic Reticulum by Mutated EOGT Associated with Adams- Oliver Syndrome. SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting (2014年11月16日～19日 Honolulu, USA)

③小川光貴, 河合崇生, 灘野大太, 松田 幹, 矢木宏和, 加藤晃一, 古川鋼一, 岡島徹也 : アダムズ-オリバー症候群に関連するEOGT遺伝子変異はER型O- GlcNAc修飾の欠損を引き起こす 第37回日本分子生物学会年会 (2014年11月25日～27日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市)

④岡島 徹也, 小川 光貴, 古川 鋼一 : O- GlcNAcylation in the endoplasmic reticulum 第87回日本生化学会大会 (招待講演) (2014年10月15日～18日 京都国際会館 京都府京都市)

⑤Tetsuya Okajima : Roles of O- glycosylation in Notch signaling pathway. International Symposium on Glyco- Neuroscience International Symposium on Glyco- Neuroscience (2014年1月9日～11日 淡路市)

⑥Mitsutaka Ogawa, Pawel Bieniasz- Krzywiec, Takami Kawai, Yuta Sakaidani, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima : Biochemical and functional analysis of EOGT mutation associated with Adams- Oliver syndrome. International Symposium on Glyco- Neuroscience (2014年1月9日～11日 淡路市)

⑦小川 光貴, 河合 崇生, 堺谷 祐太, 矢木 宏和, 加藤 晃一, 古川 鋼一, 岡島徹也 : EOGT の酵素化学的性質とアダムズ-オリバー症候群の関連性 第36回日本分子生物学会年会 (2013年12月3日～6日 神戸国際会議場 兵庫県神戸市)

⑧小川 光貴, 堺谷 祐太, 河合 崇生, 矢木 宏和, 加藤 晃一, 古川 鋼一, 岡島徹也 : EOGT の酵素化学的性質とアダムズ-オリバー症候群の関連性 第86回日本生化学会大会 (2013年9月11日～13日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市)

⑨小川光貴, 河合崇生, 堺谷祐太, 矢木宏和, 加藤晃一, 古川鋼一, 岡島徹也 : アダムズ-オリバー症候群に関わるEogt遺伝子変異の分子機構解析 第32回日本糖質学会年会 (2013年8月5日～7日 大阪国際交流センター 大阪府大阪市)

[図書] (計 2 件)

①Furukawa K, Okajima, T., Tsuchida A, and Furukawa, K., Springer, ST6 N- acetylgalactosaminide alpha- 2,6- sialyltransferase 5,6 (ST6GALNAC5,6) in “Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes” (Eds. Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., Angata, T.), 2013、1707 (759- 765)

②Okajima, T., and Furukawa, K., Springer, ST3 beta- galactoside alpha- 2,3- sialyltransferase 6 (ST3GAL6). in “Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes” (Eds. Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., Angata, T.), 2013、1706 (687- 691)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡島 徹也 (OKAJIMA TETSUYA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 20420383

### (2) 研究分担者

黒坂 光 (KUROSAKA AKIRA)  
京都産業大学・総合生命科学部・教授  
研究者番号 : 90186536