

ジストログリカン糖鎖の生合成機構と大脳皮質形成における役割

中川 直樹, 岡 昌吾

1. はじめに

ジストログリカン (dystroglycan: DG) は, 細胞膜表面に発現する糖タンパク質で, ラミニンをはじめとする細胞外基質構成分子の受容体として機能する¹⁾. DGは, 細胞外でリガンドとの結合を担う α -DGと, それを細胞膜表面に係留する一回膜貫通型の β -DGの二つのサブユニットから構成される (図1A). α -DGに修飾されるO-マンノース (O-Man) 型糖鎖が, リガンド結合モチーフとして α -DGの機能に必須の役割を果たしており, α -DGの糖鎖修飾不全は大脳皮質形成異常および眼症状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²⁾. これまでに17の糖鎖関連遺伝子 (α -DG自身の変異も含めると18) の変異が, 福山型筋ジストロフィーやWalker-Warburg症候群などの先天性筋ジストロフィー患者から見いだされており, 病変部位において α -DGの糖鎖修飾不全とリガンド結合活性の低下が実証されている³⁾. 現在, α -DGの糖鎖修飾異常に起因するこれらの疾患はジストログリカノパチーと総称されている. 本稿では, α -DGのリガンド結合活性を担う特殊な糖鎖構造と, その生合成機構について概説する. また後半では, α -DG糖鎖修飾異常によって生じる大脳皮質形成異常の病態発生機構について, 著者らの知見を中心に紹介する.

2. α -DGのリガンド結合活性を担うO-Man型糖鎖の構造と生合成機構

1) α -DG上のO-Man型糖鎖

1997年, 遠藤らによって, 還元末端にManを有する糖鎖, すなわちO-Man型糖鎖 (Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man) が α -DGに結合していることが見いだされた⁴⁾

(図1B, Core M1). その後ジストログリカノパチー関連遺伝子である *protein O-mannosyltransferase 1* (POMT1) および *POMT2* がManの転移を, *protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase 1* (POMGNT1) がN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の転移を担うことが明らかとなり, α -DGの機能にはO-Man型糖鎖が重要であると考えられるようになった. 一方でCampbellらは, 上記とは異なる, リン酸基を含むO-Man型糖鎖 (GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-4Man (6P)) が α -DG上に存在することを報告した⁵⁾ (図1B, Core M3).

2) リガンド結合モチーフの同定

2012年, 同じくCampbellらは, ジストログリカノパチー関連遺伝子の一つである *LARGE* の遺伝子産物が, キシロース (Xyl) およびグルクロン酸 (GlcA) 転移活性を併せ持ち, GlcA-Xylの二糖繰り返し構造 (-3GlcA β 1-3Xyl α 1-) を合成する糖転移酵素であることを示した⁶⁾. さらに *in vitro* で調製したGlcA-Xylリピートが実際にラミニンと結合することから, α -DGのリガンド結合モチーフはGlcA-Xylリピートであることが明らかとなった.

3) リン酸化三糖の生合成経路とPOMGNT2の機能

2012年から2013年にかけて, 患者検体の全エキソーム解析やハプロイド細胞を用いたスクリーニングによって, 新たなジストログリカノパチー関連遺伝子 *glycosyltransferase-like domain containing 2* (GTDC2, 別名AGO61), β -1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (B3GALNT2), *SGK196*, *TMEM5* が同定された³⁾. 現在では, GTDC2/AGO61 およびSGK196はその酵素活性からPOMGNT2およびprotein O-mannose kinase (POMK) と呼ばれている. 著者らは, このうちPOMGNT2に着目し, その α -DG糖鎖修飾における機能を解明するために, 矢木・加藤らと共同で *Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスを作製・解析した. *Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスは出生直後に死亡したが, 胎仔脳の大脳皮質切片を解析したところ, ジストログリカノパチー症例と類似の, 神経細胞の層構造異常と脳表基底膜の形成不全が認められた. さらに生化学的解析の結果, α -DGの糖鎖修飾異常およびラミニンとの結合の消失が明らかとなった⁷⁾. *Pomgnt2* 遺伝子欠損マウス胎仔由来の線維芽細胞を用いてレスキュー実験を行ったところ, 野生型POMGNT2の導入

京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 (〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町53)

Dystroglycan glycosylation: structure, synthetic pathway, and *in vivo* role in the brain development

Naoki Nakagawa and Shogo Oka (Department of Biological Chemistry, Human Health Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880488

© 2016 公益社団法人日本生化学会

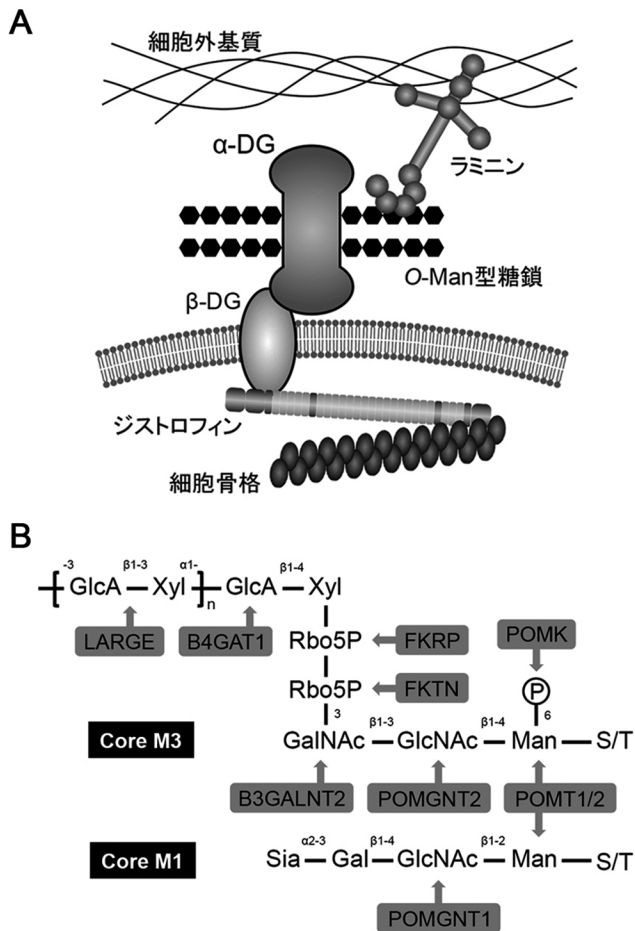


図1 ジストログリカンのリガンド結合活性を担う *O*-Man 型糖鎖

(A) α -DG が *O*-Man 型糖鎖を介して細胞外基質構成分子と結合し、 β -DG が細胞内で細胞骨格系タンパク質と相互作用することで、細胞内外をつなぐ軸を形成する。(B) *O*-Man 型糖鎖の構造と生合成機構。初めに発見された Core M1 型と、リガンド結合モチーフを含む Core M3 型の糖鎖構造を示す。各糖の転移を触媒する酵素（灰色四角）はすべて、ジストログリカノパチー患者において遺伝子変異が同定されている。

によって α -DG の糖鎖修飾とリガンド結合活性が回復したが、患者と同型の変異を持つ変異型 POMGNT2 ではレスキュー効果がみられなかった。したがって、POMGNT2 は生体内で確かに α -DG の糖鎖修飾に必須の分子であることが判明した。

この間、Campbell らは、 α -DG の合成ペプチドを基質とした酵素学的実験によって上述のリン酸化三糖構造の合成酵素を同定し、POMGNT2、B3GALNT2、POMK がそれぞれ GlcNAc、*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、リン酸基の転移酵素であることを報告した⁸⁾。

4) リビトール5-リン酸を含む新規糖鎖構造の同定

最近、和田・遠藤・戸田らのグループは、5 位がリン酸

化されたリビトール（リボースの還元体）がタンデムに二つ結合した構造 (Rbo5P-1Rbo5P) がリコンビナント α -DG に含まれることを見だし、この Rbo5P-1Rbo5P がリン酸化三糖と GlcA-Xyl リピートを結ぶ構造であることを明らかにした⁹⁾ (図 1B)。Rbo5P リピートは fukutin (FKTN) および fukutin-related protein (FKRP) による連続的な Rbo5P 転移によって合成され、その供与体としては isoprenoid synthase domain-containing (ISPD) が合成する CDP-Rbo が使用される。FKTN、FKRP、ISPD はいずれもジストログリカノパチー患者で変異が同定されている。また GlcA-Xyl リピートの最も還元末端側の初めの GlcA-Xyl ユニットだけが LARGE とは別の酵素により合成されること、このうち GlcA の結合様式は β 1-3 ではなく β 1-4 結合であり、ジストログリカノパチー関連遺伝子 *B4GAT1* がその転移を担うことがわかっている。Xyl 転移酵素は現在のところ不明である。

以上のことから、 α -DG のリガンド結合を担う *O*-Man 型糖鎖の構造は、リン酸化三糖に Rbo5P が二つ結合し、その末端に GlcA-Xyl リピートが結合したきわめて特殊な糖鎖構造であることが明らかとなった (図 1B)。

3. α -DG 糖鎖修飾異常に起因する II 型滑脳症

1) II 型滑脳症の病態

ジストログリカノパチー合併症の一つである大脳皮質形成異常は、II 型滑脳症に分類される神経細胞移動障害であり、軟膜直下の脳表基底膜の破綻と神経細胞のクモ膜下腔への遊出 (over-migration) を主徴とする²⁾。神経細胞の産生・移動が進行する発生期の脳皮質において、 α -DG は放射状グリア細胞が脳表面に向けて伸ばす放射状突起の末端に局在し、放射状突起と脳表基底膜との接着を担う¹⁰⁾。このことから、本病変の主な原因は α -DG 機能不全による脳表基底膜の脆弱化であると考えられている。しかし、基底膜が破れる時期と原因、また over-migration に至るまでの神経細胞の動態など、病態発症の初期過程については不明な点が多い。著者らは、上述の *Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスを疾患モデルとして用い、 α -DG 糖鎖修飾異常に起因する II 型滑脳症の発症初期過程の解析を行った。

2) *Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスを用いた発症初期過程の解析

神経細胞は大脳深部の脳室帯で神経幹細胞より産生され、脳表面へと移動し、将来の灰白質となる皮質板を形成する (図 2)。まず、マウス大脳皮質において神経細胞の産生・移動が始まる胎生 12.5 日目 (E12.5) の胎仔脳切片を作製し、抗ラミニン抗体による免疫染色で基底膜を観察したところ、*Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスの脳表面の基底膜

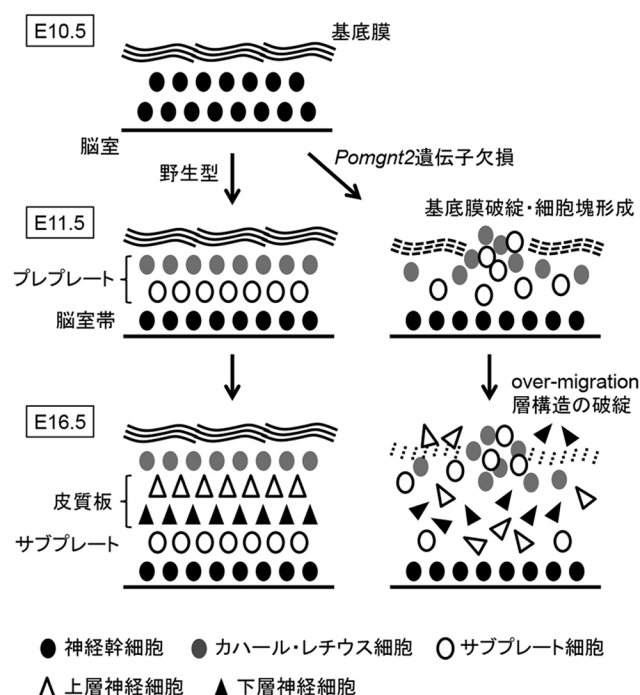


図2 *Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスにおける大脳皮質形成異常
通常の大脳皮質発生過程を左に、*Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスの解析結果から予想されるII型滑脳症の発症機序を右に示す。通常では、新生神経細胞はプレプレートの上に割って入り、皮質板を形成する。後期に産生された神経細胞（白三角）は早期に産生された神経細胞（黒三角）を追い越し、より上層に位置する。*Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスでは、E11.5の時点でカハール・レチウス細胞とサブプレート細胞による凝集塊形成とともに基底膜が破綻し、その後神経細胞の無秩序な移動がover-migrationと層構造の破綻を引き起こす。

はすでに破綻しており、神経細胞が脳表面に向けて移動することが基底膜破綻の直接の原因ではないと考えられた。次に、より早期の胎仔脳の基底膜を解析した結果、E10.5の*Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスでは基底膜は野生型と遜色なく形成されていたが、E11.5で初めて破綻が認められ、破綻部位には異所性の細胞塊が形成されていた。E11.5では、大脳皮質はプレプレートと脳室帯の二つの領域に大別される。プレプレートにはカハール・レチウス細胞と後のサブプレートを形成する細胞が存在し、脳室帯には神経幹細胞が存在する。それぞれの細胞に特異的なマーカー分子であるReelin, Calretinin, Pax6を染色した結果、カハール・レチウス細胞（Reelin+/Calretinin+）およびサブプレート細胞（Reelin-/Calretinin+）が基底膜破綻部位で細胞塊を形成していた¹¹⁾。したがって、*Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスにおいて、脳表面の基底膜は、カハール・レチウス細胞とサブプレート細胞の凝集塊形成が原因で破綻する可能性が高いと考えられる（図2）。

3) II型滑脳症における移動中の神経細胞の形態的異常

移動中の興奮性神経細胞は、脳表面に向かって伸びる先端突起と、将来の軸索となる突起を持つ双極性の形態をとることが知られている。ジストログリカノパチーにおいて、over-migrationに至るまでの、移動中の神経細胞の形態的な変化についてはほとんど知られていなかった。そこで、子宮内エレクトロポレーション法によりE12.5の*Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスの神経幹細胞に緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を導入し、4日後にGFP陽性神経細胞の移動中の形態を観察した。野生型と比較して、*Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスでは双極性の形態を示す神経細胞の割合が大きく減少しており、細胞極性の形成に異常を来していると考えられた。さらに、*Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスでは、皮質板の表層まで移動できずに皮質板下層に停滞する神経細胞が有意に増加していた。哺乳動物の大脳皮質は同時期に産生された神経細胞により形成される6層構造を特徴とし、誕生時期が遅い神経細胞ほど表層に位置することが知られている。上層（第II～IV層）および下層（第V層）神経細胞のマーカーであるBm1およびCtip2を抗体で染色したところ、野生型マウスではBm1陽性細胞とCtip2陽性細胞がそれぞれ異なる層を形成していたが、*Pomgnt2* 遺伝子欠損マウスでは両者が入り混じった無秩序な配置を示し、皮質板下層に停滞する上層（Bm1陽性）神経細胞も多数観察された¹¹⁾。したがって、II型滑脳症では、over-migrationに加えて移動不全による下層停滞を起こす神経細胞も存在し、これが層構造の破綻につながると考えられる（図2）。

以上のことから、 α -DGの糖鎖異常によるII型滑脳症の発症初期過程では、まずカハール・レチウス細胞、サブプレート細胞による凝集塊の形成とともに基底膜が破綻し、異常な形態を示す神経細胞が無秩序に移動した結果、クモ膜下腔への遊出および神経細胞の層形成不全が生じると予想される（図2）。

4. おわりに

本稿で紹介した α -DG特異的な糖鎖修飾は、共通の糖転移酵素群により行われる一般的な糖鎖修飾とは大きく異なる点で興味深い。最近の研究で、 α -DGのリガンド結合性糖鎖の構造の大部分が明らかとなり、ジストログリカノパチーにおける骨格筋、中枢神経病変の発症機序に対する理解も進んでいる。しかしながら、*TMEM5*などいまだ機能未知の原因遺伝子が存在することや、*POMGNT1*の変異と α -DGの機能消失との関連が不明であることなど課題も多く残されている。糖鎖生物学的観点からみると、 α -DGのリガンド結合性糖鎖は、酸性糖（GlcA）を含む二糖繰り返し直鎖という点でグリコサミノグリカンと類似してい

る。グリコサミノグリカンとの構造的類似性から、正常個体におけるDG機能の新たな側面がみえてくるかもしれない。

これまで臨床研究と基礎研究の融合によって進展してきたDG糖鎖の研究が今後さらに発展し、いまだ有効な治療法のないジストログリカノパチーの克服につながることを期待したい。

文 献

- 1) Ervasti, J.M., Ohlndieck, K., Kahl, S.D., Gaver, M.G., & Campbell, K.P. (1990) *Nature*, **345**, 315–319.
- 2) Michele, D.E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R.D., Satz, J.S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R.I., Somer, H., Straub, V., Mathews, K.D., Moore, S.A., & Campbell, K.P. (2002) *Nature*, **418**, 417–422.
- 3) Endo, T. (2015) *J. Biochem.*, **157**, 1–12.
- 4) Chiba, A., Matsumura, K., Yamada, H., Inazu, T., Shimizu, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Kobata, A., & Endo, T. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 2156–2162.
- 5) Yoshida-Moriguchi, T., Yu, L., Stalnaker, S.H., Davis, S., Kunz, S., Madson, M., Oldstone, M.B., Schachter, H., Wells, L., & Campbell, K.P. (2010) *Science*, **327**, 88–92.
- 6) Inamori, K., Yoshida-Moriguchi, T., Hara, Y., Anderson, M.E., Yu, L., & Campbell, K.P. (2012) *Science*, **335**, 93–96.
- 7) Yagi, H., Nakagawa, N., Saito, T., Kiyonari, H., Abe, T., Toda, T., Wu, S.W., Khoo, K.H., Oka, S., & Kato, K. (2013) *Sci. Rep.*, **3**, 3288.
- 8) Yoshida-Moriguchi, T., Willer, T., Anderson, M.E., Venzke, D., Whyte, T., Muntoni, F., Lee, H., Nelson, S.F., Yu, L., & Campbell, K.P. (2013) *Science*, **341**, 896–899.
- 9) Kanagawa, M., Kobayashi, K., Tajiri, M., Manya, H., Kuga, A., Yamaguchi, Y., Akasaka-Many, K., Furukawa, J., Mizuno, M., Kawakami, H., Shinohara, Y., Wada, Y., Endo, T., & Toda, T. (2016) *Cell Rep.*, **14**, 1–15.
- 10) Myshra, T.D., Moore, S.A., Ostendorf, A.P., Satz, J.S., Kowalczyk, T., Nguyen, H., Daza, R.A., Lau, C., Campbell, K.P., & Hevner, R.F. (2012) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **71**, 1047–1063.
- 11) Nakagawa, N., Yagi, H., Kato, K., Takematsu, H., & Oka, S. (2015) *Sci. Rep.*, **5**, 11163.

著者寸描

●中川 直樹 (なかがわ なおき)



ノースカロライナ大学チャペルヒル校医学部。日本学術振興会海外特別研究員。博士 (人間健康科学)。

■略歴 2009年京都大学医学部人間健康科学科卒業。14年同大学院医学研究科博士過程修了。14～15年日本学術振興会特別研究員PD。15年より現職。

■研究テーマと抱負 大学院生時代の糖鎖と神経発生に関する研究を経て、大脳

皮質形成メカニズムに興味を持ち、現在はノースカロライナ大学Anton博士のもとで放射状グリア細胞の極性形成に関する研究に従事しています。

■趣味 テニス、読書、テレビドラマ。