



α -ジストログリカン上に見出された 新規機能性糖鎖修飾

吉田-森口 貴子, 稲森啓一郎, Kevin P. Campbell

細胞表層に局在する α -ジストログリカンは構造未知のO-結合型糖鎖を介して基底膜と結合する。 α -ジストログリカンへのLARGE依存的修飾の欠損は、そのレセプター能を低下させ、筋ジストロフィーを発症させる。LARGEはキシロースとグルクロン酸を交互に転移する二機能性糖転移酵素であることを明らかにした。

糖鎖修飾は、タンパク質の局在性や立体構造を決定する一因子であるほか、タンパク質同士が結合する際の認識部位としても働く。細胞表層に局在する α -ジストログリカン(α -DG)は、O-型糖鎖修飾を高度に受けており、ラミニン、アグリン、ニューレキシン、ピカチュリン等と糖鎖を介して結合することで、基底膜レセプターとして振舞う¹⁾²⁾。O-マンノース型糖鎖合成にかかわる数種の糖転移酵素(GT)およびGT様タンパク質FKRP, FKTN, LARGEの欠損によって、 α -DGのレセプター能が低下し、脳や目の発達異常を伴う重度の筋ジストロフィーが発症する²⁾。これより、基底膜と接着する機能性糖鎖の構造は、詳細には不明であるものの、O-マンノース型糖鎖上に合成されることが示唆されている。さらに、LARGEの過剰発現によって、レセプター能の向上した α -DGが合成されることから、LARGEが機能性糖鎖合成に主要な役割を果たすと推測されてきた。

LARGEの機能解析

LARGEは2つの独立したGT様ドメインをもつことから(図1A)、2種の転移活性を触媒すると推測されてきた。LARGEを過剰発現したHEK293細胞より α -DGを調製し、その構成糖をGC-MS(ガスクロマトグラフィー質量分析法)によって広く調べた結果、過去に同定されているO-マンノシル糖鎖の構成糖以外に、新たにキシロース(Xyl)およびグルクロニル酸(GlcA)が検出された。さらに、UDP-Xyl合成に不全のあるCHO変異細胞では、ラミニン結合能を欠損した α -DGが生産されることが見出され、Xylが機能性糖鎖の合成に不可欠であることが示された。そこで、膜貫通領域を欠損した可溶性LARGEと各種糖ヌクレオチドを用いて、*in vitro*での活性を検討した結果、 α -Xyl誘導体上へのGlcA転移活性が検出された。さらに、UDP-Xylを基質として用いた場合には、蛍光ラベルした β -GlcA誘導体(MU-GlcA)上へのXyl転移活性が検出された。そこで、MU-GlcAをアクセプターとし、

New insights into laminin-binding glycosylation on alpha-dystroglycan

Takako Yoshida-Moriguchi/Kei-ichiro Inamori/Kevin P. Campbell : Howard Hughes Medical Institute/Department of Molecular Physiology & Biophysics, Roy J. and Lucille A. Carver College of Medicine, University of Iowa (ハワードヒューズ医学研究所/アイオワ大学医学部生理学)

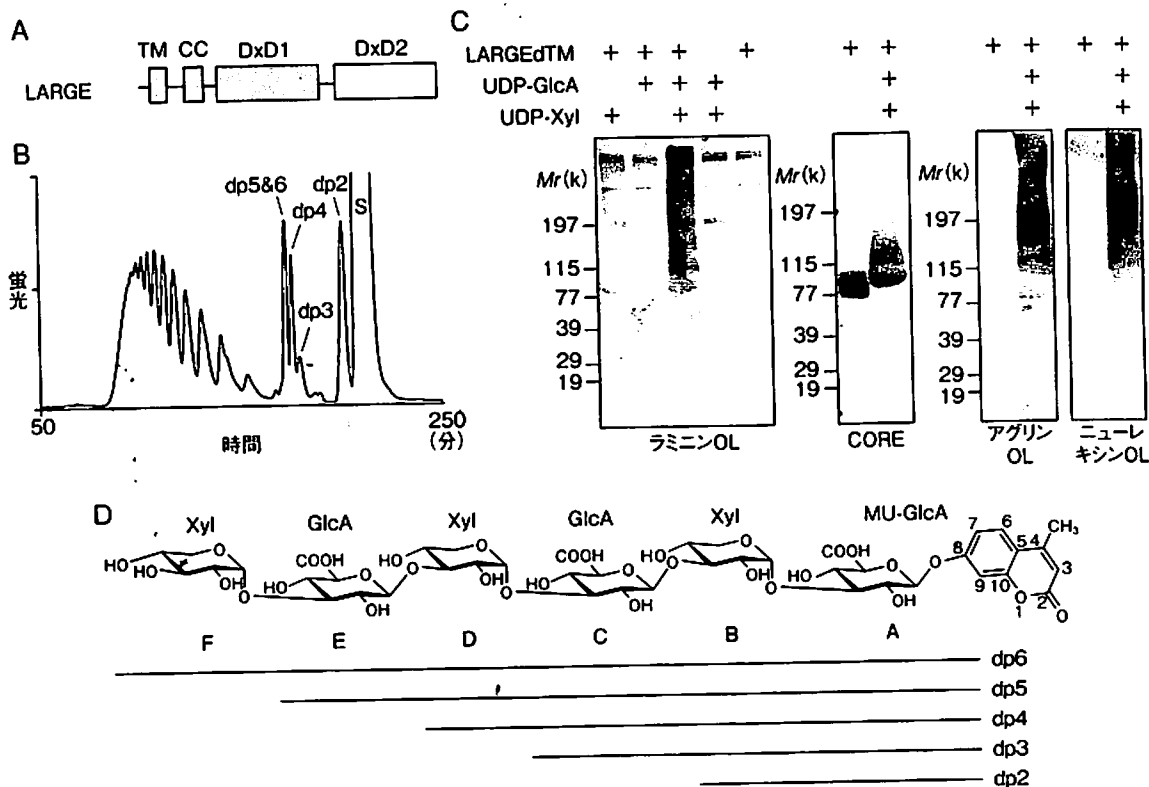


図1 LARGEはXylとGlcAを交互にくり返し結合する二機能性GTである

A) LARGEの構造。DxDドメインは糖ヌクレオチドを基質とするGTに広く保存されている。B) 2種の糖ヌクレオチドおよびMU-GlcAを反応させた場合の生産物をゲル透過カラムにより解析した。C) LARGE変異マウスはラミニン合成能を欠損した α -DGを合成する。そこで変異マウス由来の糖タンパク質をアクセプターとした*in vitro* LARGEアッセイを行い、生産物を免疫プロットにより解析した。糖鎖の付加により α -DGの分子量は増大し(CORE)。さらに各種細胞外リガンドへの結合能が回復した。OL:オーバーレイ。D) 質量分析およびNMRにより決定した糖鎖構造(文献6より転載)

UDP-XylおよびUDP-GlcAをとともに与えた結果、LARGEは多糖を合成することが示された(図1B)。次にLARGE遺伝子を欠損したマウスより調製したタンパク質をアクセプターとし、UDP-GlcA、UDP-XylとLARGEを反応させた結果、ラミニン等の基底膜構成成分に対する結合能が回復した α -DGが合成されたことから(図1C)、この多糖付加が機能性修飾に重要であることが確認された。そこで、図1Bで分離した分子量の異なる生産物をそれぞれMALDI-TOFおよびNMRによって解析した結果、この多糖は[-3Xyl- α 1,3GlcA β 1-]をくり返し単位とした構造であることが同定された(図1D)。

今後の展望

α -結合したXylは、脊椎動物ではNotchのEGF様リピートを修飾するO-グルコース型糖鎖上で見出されているほかに報告例はなく、今回見つけた修飾様式は非常に珍しいものである。EGF様リピートを修飾する2種の α -xylosyltransferaseについては、近年クローニングされ、その酵素活性が同定された³⁾。これらGTもLARGEと同様にGT 8ファミリーに属している。同ファミリーは機能未知のタンパク質を数種含むことから、今後もXylを成分とした新規糖鎖修飾が見出されることが予想される。GlcAはアミノ糖とともに、ヘパラン硫酸、コンドロイチン/デルマトン硫酸といったグリコサミノグリカン(GAG)のくり返し単

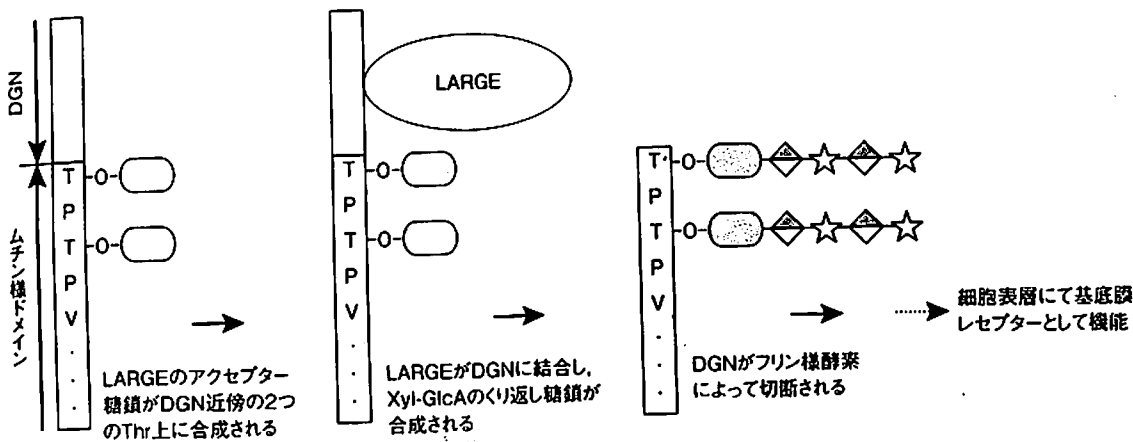


図2 α -DGの翻訳後修飾
 α -DGのN末端 (DGN) に存在する近接した2つのThr残基への機能的糖鎖の合成が、基底膜への結合に重要である (文献4より引用)

位を構成する。LARGEが合成するヘテロ多糖は、アミノ糖を含まないことから、正確な意味ではGAGには属さないものの、単一の重合酵素によって合成される点や二糖のくり返し単位をもつ点など、GAGと類似する要素は多い。

[$-3\text{Xyl}-\alpha 1,3\text{GlcA}\beta 1-$]で構成される多糖が単独でラミニン等の細胞外リガンドと結合するのは今のところ不明であり、今後の重要な課題と思われる。 α -DGのN末端は、LARGEによる基質認識に重要であるが、後期成熟過程でフリン様プロテアーゼによって切断される。この切断部位の直下流に存在する2つのThr残基を修飾するO-結合型糖鎖がラミニン結合に必須であることがわかってきた(図2)⁴⁾。これより、糖鎖単独ではなく、修飾を受けるアミノ酸配列の構造および複数の糖鎖からなる立体構造も、ラミニンに対する親和性に影響することが予想される。先の研究より、O-型結合したマンノースの6位がリン酸化され、そのリン酸基上に機能的修飾が起こることが推測されている⁵⁾。このマンノース-6-リン酸をアクセプターとしてLARGEが α -DG上に多糖を合成するのかを明らかにすることも重要な課題である。

本研究にて確立されたLARGEの*in vitro*アッセイ法は、本酵素活性を増強する化合物のスクリーニングへと応用されることから、創薬の分野でも本論文の意義は大きい。スクリーニングで選択された分子により、 α -DGのレセプター能を増強することで、筋ジストロ

フィーの治療法が確立されることを期待したい。

文献

- 1) Ibraghimov-Beskrovnaya, O. et al.: Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355: 696-702, 1992
- 2) Godfrey, C. et al.: Dystroglycanopathies: coming into focus. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 21: 278-285, 2012
- 3) Sethi, M. K. et al.: Molecular cloning of a xylosyltransferase that transfers the second xylose to o-glucosylated epidermal growth factor repeats of notch. *J. Biol. Chem.*, 287: 2739-2748, 2012
- 4) Hara, Y. et al.: Like-acetylglucosaminyltransferase (LARGE)-dependent modification of dystroglycan at Thr-317/319 is required for laminin binding and arenavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 17426-17431, 2011
- 5) Yoshida-Moriguchi, T. et al.: O-mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding. *Science*, 327: 88-92, 2010
- 6) Inamori, K. et al.: Dystroglycan function requires xylosyl- and glucuronyltransferase activities of LARGE. *Science*, 335: 93-96, 2012

● 筆頭著者プロフィール ●

吉田・森口 貴子: 1999年、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻博士課程を中退後、同大学生物生産工学研究センター生物制御工学部門の助手に就任。在職中に同専攻において学位を取得後、2003年よりアイオワ大学医学部 Kevin P. Campbell 教授のもとで筋ジストロフィーの研究に着手する。現在は、同学部において Research assistant professor として糖鎖研究を行っている。