

ショウジョウバエ神経筋接合部におけるムチン型コア 1 糖鎖の生理機能解析

Functional analysis of mucin-type core 1 glycan in *Drosophila* neuromuscular junction

12D5601 伊藤 和義 指導教授 西原 祥子

SYNOPSIS

T antigen (Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr), which is one of mucin-type O-glycans, is synthesized by *Drosophila* core 1 β 1,3-galactosyltransferase 1 (dC1GalT1). Glucuronylated T antigen (GlcA β 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr), in which glucuronic acid is added in a β 1,3-linkage to galactose of T antigen, has been identified in *Drosophila*. However, the physiological function of this glycan structure has not yet been clarified. In this study, to unravel the function of glucuronylated T antigen in *Drosophila* neuromuscular junctions (NMJs), we analyzed the mutant phenotypes of dC1GalT1 and *Drosophila* glucuronyltransferase-P (dGlcAT-P) that predominantly synthesizes glucuronylated T antigen.

We firstly analyzed the phenotypes of dC1GalT1 mutants. The T antigen expression on the muscle surface and NMJs was decreased in dC1GalT1 mutant larvae. We found that the dC1GalT1 mutants showed the partial loss of basement membrane (BM) component and mislocalization of NMJ boutons at the muscle 6/7 boundary. Ultrastructural observation revealed that those mislocalized boutons connected the muscles 6 and 7. Moreover, dC1GalT1 mutants exhibited reduced number of NMJ branches. In *Drosophila*, three glucuronyltransferases (dGlcAT-I, dGlcAT-S, and dGlcAT-P) have been reported. By measurement of enzymatic activity and MS analysis of the enzymatic products, we found that dGlcAT-P is predominant glucuronyltransferase that produces glucuronylated T antigen. Then, we generated dGlcAT-P mutants by using CRISPR-Cas9 method. In dGlcAT-P mutant larvae, glucuronylated T antigen expression was reduced on the muscle surface and at NMJs. As is the case with the dC1GalT1 mutants, dGlcAT-P mutants showed the three phenotypes, i.e., the partial loss of BM component, mislocalization of NMJ boutons, reduced number of NMJ branches. Furthermore, ultrastructural analysis of muscle 6/7 boundary revealed that BMs underneath the mislocalized boutons were severely deformed in dGlcAT-P mutants. We found that there was a genetic interaction between dC1GalT1 and dGlcAT-P because double heterozygous mutants of dC1GalT1 and dGlcAT-P exhibited the BM and NMJ phenotypes. Finally, ultrastructural analysis of NMJ boutons showed the shorter length of postsynaptic density (PSD) in both dC1GalT1 and dGlcAT-P mutants.

Taken together, these data demonstrated that glucuronylated T antigen synthesized sequentially by dC1GalT1 and dGlcAT-P is required for the normal formation of BMs, precise localization of NMJ boutons, arborization of NMJs, and organization of PSDs.

1. 緒言

O-結合型糖鎖の 1 種であるムチン型糖鎖では、タンパク質のセリン (Ser) またはスレオニン (Thr) に結合した N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に、コア 1 ガラクトース転移酵素 (C1GalT1) がガラクトース (Gal) を β 1,3 結合で転移し、T 抗原 (コア 1 構造) を合成する (図 1)。哺乳類のムチン型糖鎖には 8 種類のコア構造が報告されている (文献 1)。また、シアル酸が T 抗原の Gal に α 2-3 結合した構造 (シアリル T 抗原) など、シアル酸修飾されたムチン型糖鎖も報告されている (文献 1)。

哺乳類では Cosmc とよばれる分子シャペロンが C1GalT1 の酵素活性に必要不可欠である (文献 2)。ヒトにおいて Cosmc の変異は溶血性貧血や血小板減少症の原因となる (文献 3)。これまでに、C1GalT1 ノックアウトマウスの表現型解析によって哺乳類のムチン型糖鎖の機能が明らかにされてきた。C1GalT1 ノックアウトマウスでは、血管形成異常が起こり、脳内出血により胚性致死となる (文献 4, 5)。また、C1GalT1 の組織特異的なノックアウトは、血管とリンパ管の誤接続や大腸炎、血小板減少など様々な異常を引き起こす (文献 6, 7, 8)。さらに、シアル酸修飾されたムチン型糖鎖の機能も解析されており、マウスの腎臓では podocalyxin 上の負電荷をもつシアル酸が抗接着分子として働くことにより、濾過膜形成に関与している (文献 9)。また、 α -dystroglycan 上のシアリル T 抗原が筋管細胞上のア

セチルコリン受容体のクラスタリングに必要であることが報告されている (文献 10)。このように、ムチン型糖鎖は哺乳類の様々な組織において多くの機能を担っている。

ショウジョウバエの主なムチン型糖鎖として、Tn 抗原および T 抗原、T 抗原の Gal にグルクロン酸 (GlcA) が β 1,3 結合したグルクロン酸化 T 抗原が同定されている (文献 11; 図 1)。C1GalT1 のショウジョウバエオソログである dC1GalT1 は T 抗原を合成する主要な糖転移酵素であるが、哺乳類とは異なり、Cosmc のような分子シャペロンを必要としない (文献 12)。

これまでに、ショウジョウバエの dC1GalT1 突然変異体を用いた表現型解析によって、T 抗原の機能が明らかにされてきた。その突然変異体幼虫は、腹部神経索の異常伸長および脳の奇形、造血幹細胞の過剰分化などの表現型を示した (文献 13, 14)。したがって、ショウジョウバエにおいても T 抗原は様々な組織において機能している。しかしながら、グルクロン酸化 T 抗原の生理機能はこれまで全く解析されていなかった。

本研究では、dC1GalT1 とグルクロン酸化 T 抗原を合成するグルクロン酸転移酵素 (dGlcAT-P) の突然変異体を用いて、神経筋接合部における表現型解析を行い、グルクロン酸化 T 抗原の生理機能の解明を試みた。

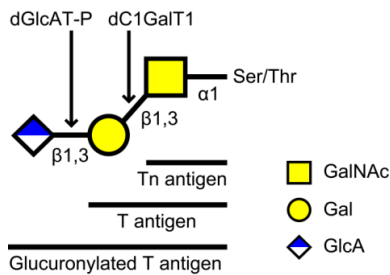


図 1. ショウジョウバエにおけるムチン型糖鎖の構造

2. 材料および方法

2-1. リアルタイム PCR 解析

3 齢幼虫から mRNA を抽出し、オリゴ-dT プライマーおよび逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。*dC1GalT1* に対して特異的なプライマーを設計し、SYBR Green 法を用いてリアルタイム PCR を行った。

2-2. レクチン染色および免疫染色

ショウジョウバエリンガー液中で 3 齢幼虫を解剖し、4 % PFA を用いて組織を室温で 20 分間固定した。洗浄後、1 次抗体を加えて 4°C で一晩インキュベートした。洗浄後、蛍光標識されたレクチンまたは 2 次抗体を加えて室温で 2 時間 30 分インキュベートした。洗浄後、褪色防止剤入りグリセロールを用いてマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (ZEISS) で観察した。組織洗浄の際、レクチン染色の場合は PBS、免疫染色の場合は 0.1 % Triton X-100 を含んだ PBS を用いた。

2-3. 超微細構造解析

ショウジョウバエリンガー液中で 3 齢幼虫を解剖し、2.5 % グルタルアルデヒドを用いて組織を 4°C で一晩固定した。さらに、1 % オスミウムを用いて組織を 4°C で 1 時間固定し、アルコールを用いて脱水処理を行った。その後、組織をエポン樹脂に包埋し、超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で観察した。

2-4. 酵素活性測定および質量分析

アクセプター基質 (パラニトロフェノールで標識した T 抗原) および MES バッファー、UDP-[14 C]GlcA、UDP-GlcA、MnCl₂、発現・精製した FLAG タグ付きグルクロン酸転移酵素を 25°C で 4 時間反応させた。遠心後、上清を Sep-PakC18 カラムに充填した後、メタノールで溶出し、酵素反応生成物を精製した。その後、シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。また、上記の酵素反応によって得られた生成物を過メチル化し、質量分析により糖鎖構造を決定した。

3. 結果および考察

3-1. *dC1GalT1* 突然変異体の筋細胞および神経筋接合部における T 抗原の発現量解析

リアルタイム PCR 解析の結果、*dC1GalT1* 突然変異体幼虫では *dC1GalT1* mRNA の発現量が 5 % 以下まで低下していた。次に、T 抗原を認識するレクチンである PNA および Tn 抗原を認識する HPA を用いてレクチン染色を行ったところ、筋細胞表面および神経筋接合部において T 抗原の発現量が減少した。一方、筋細胞表面において Tn 抗原の発現量が増加した。したがって、*dC1GalT1* は幼虫の筋肉および神経筋接合部において

T 抗原を合成することが明らかになった。

3-2. *dC1GalT1* 突然変異体の筋肉 6/7 境界における基底膜構成要素の部分的消失および神経筋接合部ブトンの配置異常

基底膜の主要な構成要素である IV 型コラーゲン (Vkg-GFP) を標識し、筋細胞を観察した。野生型の筋細胞内部の光学切片では、コラーゲンが筋肉 6/7 境界に発現していた (図 2A, Internal)。一方、*dC1GalT1* 突然変異体では、その発現が部分的に消失していた (図 2B, Internal)。さらに、コラーゲン消失部分またはその消失部分の真上において神経筋接合部ブトンが位置していることがわかった (図 2B)。また、この突然変異体は神経筋接合部の分岐数の減少も示した。したがって、ムチン型糖鎖の減少は、筋肉 6/7 境界における基底膜構成要素の部分的消失および神経筋接合部ブトンの配置異常、分岐数の減少を引き起こすことがわかった。

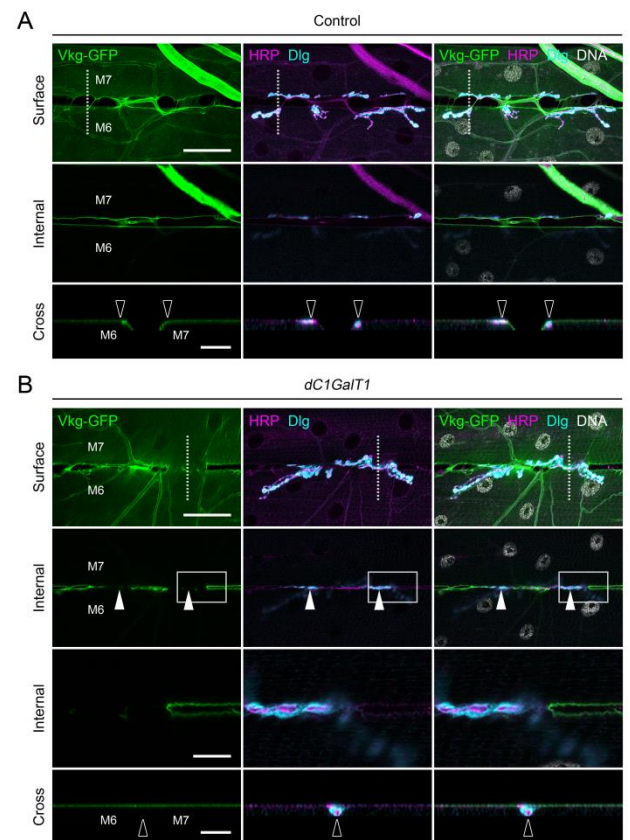


図 2. *dC1GalT1* 突然変異体の筋肉 6/7 境界における基底膜構成要素の部分的消失および神経筋接合部ブトンの配置異常

3-3. *dC1GalT1* 突然変異体の筋肉 6/7 境界における超微細構造解析

透過型電子顕微鏡を用いて、筋肉 6/7 境界を観察したところ、野生型では筋肉 6/7 境界にブトンが観察されなかった (図 3A および A')。それに対して突然変異体では、筋肉 6/7 境界にブトンが観察され、そのブトンが 2 つの筋肉を繋ぐように位置していることがわかった (図 3B および B')。

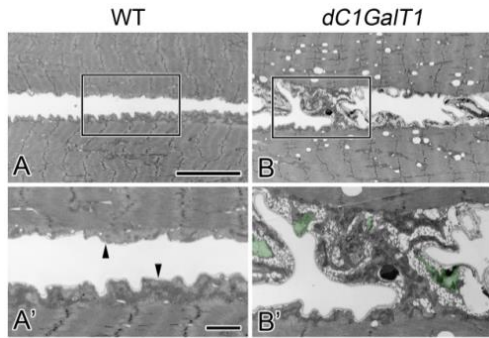


図 3. *dC1GalT1* 突然変異体における筋肉 6/7 境界の超微細構造解析

3-4. グルクロン酸転移酵素の酵素活性測定および質量分析による糖鎖構造解析

3 種類存在するグルクロン酸転移酵素のうち、どの酵素がグルクロン酸化 T 抗原を合成する主要な酵素であるかを調べるために、T 抗原に対する酵素活性測定を行った。その結果、*dGlcAT-P* が顕著に高い活性を示した。さらに、その酵素反応生成物の質量分析を行ったところ、GlcA が T 抗原の Gal に 1-3 結合していることがわかった。したがって、*dGlcAT-P* がグルクロン酸化 T 抗原を合成する主要な糖転移酵素であることが明らかになった。

3-5. *dGlcAT-P* 突然変異体の筋細胞および神経筋接合部におけるグルクロン酸化 T 抗原の発現量解析

CRISPR-Cas9 法を用いて、*dGlcAT-P* の null 突然変異体を作製した。*dGlcAT-P* 突然変異体においてグルクロン酸化 T 抗原が減少しているかどうかを調べるために、PNA 染色を行った。突然変異体では、筋細胞表面および神経筋接合部における T 抗原の発現量が増加した(図 4)。PNA はグルクロン酸化 T 抗原を認識せず、T 抗原のみを認識するため、突然変異体では非グルクロン酸化 T 抗原の発現量が増加したと考えられた。したがって、*dGlcAT-P* は筋細胞および神経筋接合部においてグルクロン酸化 T 抗原を合成することが明らかになった。

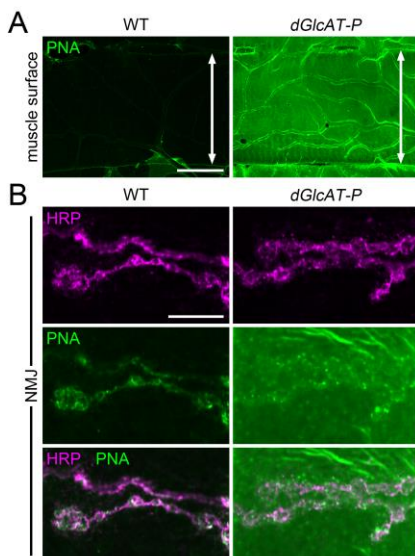


図 4. *dGlcAT-P* 突然変異体の筋細胞表面および神経筋接合

部における非グルクロン酸化 T 抗原の発現量解析

3-6. *dGlcAT-P* 突然変異体の筋肉 6/7 境界における基底膜構成要素の部分的消失および神経筋接合部プンの配置異常

dC1GalT1 突然変異体と同様に、*dGlcAT-P* 突然変異体においても、筋肉 6/7 境界における基底膜構成要素(ニドゲン)の部分的消失および神経筋接合部プンの配置異常が認められた。野生型の筋細胞内部(Internal)の光学切片では、ニドゲンが筋肉 6/7 境界に発現していた(図 5A, Internal)。一方、*dGlcAT-P* 突然変異体では、その発現が部分的に消失していた(図 5B, Internal)。さらに、ニドゲン消失部分の真上において神経筋接合部プンが位置していることがわかった(図 5B)。また、この突然変異体は *dC1GalT1* 突然変異体と同様に、神経筋接合部の分岐数の減少も示した。したがって、グルクロン酸化 T 抗原の減少がこれらの異常を招くと考えられた。

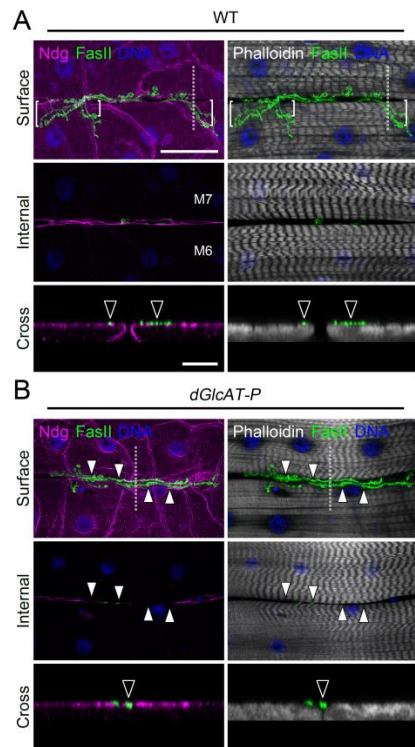


図 5. *dGlcAT-P* 突然変異体の筋肉 6/7 境界における基底膜構成要素の部分的消失および神経筋接合部プンの配置異常

3-7. *dGlcAT-P* 突然変異体の筋肉 6/7 境界における超微細構造解析

透過電顕を用いて、筋肉 6/7 境界における筋細胞表面の切片と筋細胞内部の切片を両方観察した(図 6A)。筋細胞表面の切片において、野生型では筋肉 6/7 境界にプンが存在しなかった(図 6B, Surface)。それに対して *dGlcAT-P* 突然変異体では、*dC1GalT1* 突然変異体と同様に、筋肉 6/7 境界にプンが 2 つの筋肉を繋ぐように位置していた(図 6C, Surface)。次に、筋細胞内部の切片において、野生型では筋肉 6/7 境界に 2 本の基底膜が観察された(図 6B, Internal)。しかし、突然変異体では基底膜の多層化および断裂が観察された(図 6C, Internal)。

顕微鏡および電顕の結果をまとめると、*dGlcAT-P* 突然変異体では、筋肉 6/7 境界にブトンが位置しており、そのブトンの真下ではコラーゲンやニドゲンが欠損した異常な基底膜が形成されることが明らかになった(図 6A)。GlcA は負電荷をもつため、グルクロン酸化 T 抗原が神経および筋肉の細胞表面を負に帯電し、細胞間接着を調節していると考えられた。そのため、T 抗原のグルクロン酸修飾が抑制されると、神経と筋肉の細胞間接着が促進し、神経筋接合部ブトンの配置異常が起こると考えられた。

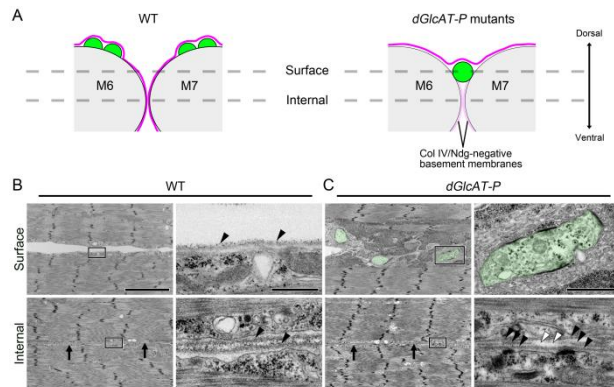


図 6. *dGlcAT-P* 突然変異体における筋肉 6/7 境界の超微細構造解析

3-8. *dC1GalT1* と *dGlcAT-P* の二重ヘテロ突然変異体の解析

dC1GalT1 と *dGlcAT-P* の二重ヘテロ突然変異体を観察したところ、筋肉 6/7 境界において基底膜構成要素の部分的消失および神経筋接合部ブトンの配置異常が観察された。このことから、*dC1GalT1* と *dGlcAT-P* は遺伝学的に相互作用しており、T 抗原のグルクロン酸化が基底膜の形成およびブトンの配置に必要であることが明らかになった。

3-9. *dC1GalT1* および *dGlcAT-P* 突然変異体の神経筋接合部シナプスにおける超微細構造解析

神経筋接合部シナプスの超微細構造解析により、*dC1GalT1* と *dGlcAT-P* の両方の突然変異体において、シナプス後膜肥厚(PSD)の長さが野生型に比べて短くなった(図 7)。このことから、グルクロン酸化 T 抗原がシナプス後膜肥厚の形成に関与していると考えられた。

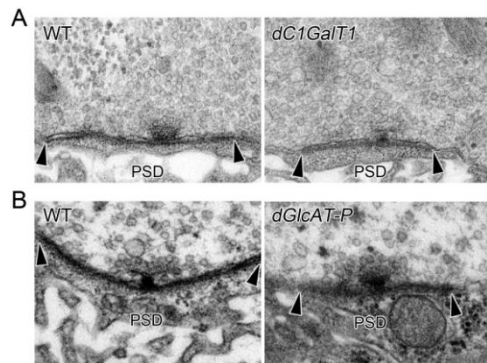


図 7. シナプス後膜肥厚(PSD)の超微細構造

4. 結論

dC1GalT1 および *dGlcAT-P* 突然変異体幼虫では、筋

肉 6/7 境界における基底膜の部分的消失および神経筋接合部ブトンの配置異常、神経筋接合部の分岐数の減少、シナプス後膜肥厚の縮小が観察された(図 8)。以上の結果から、*dC1GalT1* および *dGlcAT-P* によって合成されるグルクロン酸化 T 抗原は、基底膜の形成およびブトンの正常な配置、神経筋接合部の分岐、シナプス後膜肥厚の形成に必要であることが示された。

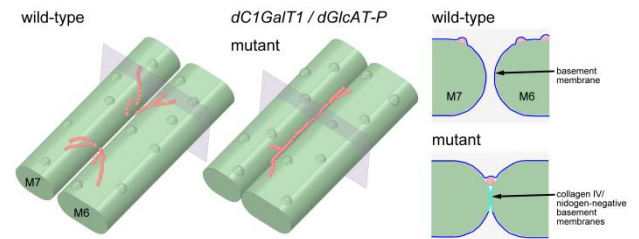


図 8. *dC1GalT1* および *dGlcAT-P* 突然変異体の表現型

5. 参考文献

- Brockhausen, I., 1999. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 67–95.
- Ju, T. and Cummings, R.D., 2002. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 β 3-galactosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16613–16618.
- Ju, T. and Cummings, R.D., 2005. Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature* 437, 1252.
- Xia, L. et al., 2004. Defective angiogenesis and fatal embryonic hemorrhage in mice lacking core 1-derived O-glycans. *J. Cell Biol.* 164, 451–459.
- Xia, L. and McEver, R.P., 2006. Targeted disruption of the gene encoding core 1 β 1,3 galactosyltransferase (T-synthase) causes embryonic lethality and defective angiogenesis in mice. *Methods Enzymol.* 416, 314–331.
- Fu, J. et al., 2008. Endothelial cell O-glycan deficiency causes blood/lymphatic misconnections and consequent fatty liver disease in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3725–3737.
- Fu, J. et al., 2011. Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1657–1666.
- Kudo, T. et al., 2013. *C1galt1*-deficient mice exhibit thrombocytopenia due to abnormal terminal differentiation of megakaryocytes. *Blood* 122, 1649–1657.
- Takeda, T. et al., 2000. Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* 11, 3219–3232.
- McDearmon, E.L. et al., 2003. Core 1 glycans on α -dystroglycan mediate laminin-induced acetylcholine receptor clustering but not laminin binding. *J. Biol. Chem.* 278, 44868–44873.
- Aoki, K. et al., 2008. The diversity of O-linked glycans expressed during *Drosophila melanogaster* development reflects stage- and tissue-specific requirements for cell signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 30385–30400.
- Müller, R. et al., 2005. Characterization of mucin-type core-1 β 1–3 galactosyltransferase homologous enzymes in *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.* 272, 4295–4305.
- Lin, Y.-R.R. et al., 2008. Requirement for a core 1 galactosyltransferase in the *Drosophila* nervous system. *Dev. Dyn.* 237, 3703–3714.
- Fuwa, T.J. et al., 2015. Reduction of T antigen causes loss of hematopoietic progenitors in *Drosophila* through the inhibition of filopodial extensions from the hematopoietic niche. *Dev. Biol.* 401, 206–219.