

20030715

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

α -dystroglycanのO-mannose型糖鎖と
細胞外matrix結合に異常をきたす
先天性筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清水輝夫

平成16(2004)年3月

I. 総括研究報告書

α -dystroglycan の O-mannose 型糖鎖と細胞外 matrix 結合に異常をきたす先天性筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発

清水 輝夫 1

II. 分担研究報告書

1. フクチンの構造と機能の解析と DNA チップによる FCMD の遺伝子プロファイリングと筋分化遅延について

戸田 達史 10

2. β -dystroglycan のプロセッシングに関与するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の解析

砂田 芳秀 14

3. O-mannose 型糖鎖修飾異常による先天性筋ジストロフィーの病態解明

遠藤 玉夫 16

4. 脳髄膜の形成におけるフクチンおよびリーリントタンパクの機能的意義の解明

寺島 俊雄 19

5. α -dystroglycanopathy の病態解明を目指した蛋白生化学的研究

松村 喜一郎 24

6. Rat *POMT1* 相同遺伝子産物の O-マンノース転移活性の検討

千葉 厚郎 28

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 30

α -Dystroglycan の O-mannose 型糖鎖と細胞外 matrix 結合に異常をきたす 先天性筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発

主任研究者 清水輝夫 帝京大学医学部神経内科教授

研究要旨

本研究は筋細胞膜接着蛋白 α -dystroglycan に付加する O-mannose glycan: Ser/Thr·mannose2· β 1GlcNAc4· β 1Gal3·2Sia の形成異常により筋基底層と筋細胞膜の結合不全が生じて発症する筋障害= α -dystroglycanopathy の分子病態解明と治療法の開発を目的として、平成15年度から開始した。特に、福山型筋ジストロフィーの責任蛋白 fukutin の生理機能の解明、O-mannose glycan 合成の各段階での糖転移酵素の解明、FCMD 治療法の開発に力点を置く。従来の実績に続き、初年度は以下の点に進展がみられた。

(1) 福山型筋ジストロフィーFCMD の責任蛋白 fukutin 分子の生理機能に関連して；昨年度、fukutin 蛋白はゴルジ体膜蛋白であることを強制発現系の免疫組織化学で明らかにしたが、今年度アミノ酸配列から N 端付近に予想した膜貫通ドメインにゴルジ体局在シグナルが存在することを最終確認できた。また、第 92 番アミノ酸で N-glycan 1 個が付加していることがわかった。Fukutin 生理活性では Ser/Thr←mannose2← β 1GlcNAc4← β 1Gal3←2Sia の 4 段階のうち、Ser/Thr·mannose2· β 1GlcNAc4← β 1Gal3 の段階に異常があるデータが出てきており確認中である。

(2) FCMD 筋の病態に関連して；FCMD 筋では筋基底層成分、神経筋接合部成分と fetal type の筋収縮蛋白の発現亢進が年齢を通じて一定のパターンでみられ、筋成熟の最終段階で発現する遺伝子群 (MYH7, MRF4) の発現低下が確認できた。この結果、FCMD は十分に分化成熟した筋細胞に発症する Duchenne 型筋ジストロフィーとは異なり、基底層と筋細胞膜の先天的結合不全の結果筋細胞の分化誘導が神経筋接合部形成の時期に断絶され、それ以降の分化成熟ができない状態で発症していると解釈された (分化成熟異常と筋崩壊)。

(3) FCMD 脳奇形について；現在まで、FCMD 脳は MEB/WWS 脳同様滑脳症 II 型で、脳表のグリア限界膜での α DG-laminin 接着の断裂→神経細胞の過遊走を明らかにしてきた。今年度から、大脳皮質の層構築、神経経路の走行について fukutin 欠損キメラマウスを用いて新たな検討を開始した。その結果、大脳皮質第 5、6 層由来の皮質脊髄路、皮質視床路ニューロンについて正常分布の部位とともに層構築異常部位では皮質表層から深部まで分布しており、神経細胞遊走過程の障害が確認された。

(4) MEB の責任蛋白/遺伝子について；Man2← β 1GlcNAc 段階の責任酵素 POMGnT1 の遺伝子 (1p32-34) に昨年度までに見い出した 13 種の変異について、融合変異体を作成し GlcNAc 転移活性を測定したところいずれも失活していた。従って、MEB は POMGnT1 欠損症と最終結論した (loss of function)。POMGnT1 660 アミノ酸の

うち、N 端に膜貫通部位と幹領域が、C 端側に酵素活性部位があり、C 端 9 アミノ酸を削っても活性は保たれるが 19 アミノ酸を削ると失活することが判明し、N 端付近の膜貫通ドメイン、C 端付近の酵素活性ドメインという分子模型を再確認できた。

(5) 約 10 %の WWS で報告された POMT1 遺伝子異常に関連して ; Beltran-Valero de Bernabe らが WWS 患者の約 10 %に、Ser/Thr←Man 段階の酵素 POMT1 の遺伝子変異をみつけたが(2002)、POMT1 がヒトを含む高等動物で実際に機能している酵素であるのか証明されていなかった。そのため、哺乳動物細胞の protein O-mannose transferase(POMT)活性のアッセイ系を確立し、POMT 活性を検討した結果、POMT1 とそのホモログ POMT2 単独では活性はなく(POMT1+POMT2)複合体として活性をもつことが判明した。従って、約 10 %の WWS は、 α DG ←Man の形成障害 (POMT 活性の消失) であることが確認できた。

(6) 新しい動物モデルの発見 ; α -dystroglycanopathy をきたす新動物として、1950 年代から知られる自然発生 dystrophy chicken が該当することが判明した。この鶏は脳や眼の奇形は伴わず、速筋優位の障害で T 管由来の空胞形成をきたす特徴を持つ常染色体不完全優性遺伝の筋ジストロフィーである。今年度、この鶏の胸筋で DG 系架橋構造体の各蛋白は筋形質膜に存在するが、抗 α DG 糖鎖抗体のみ反応性が低下、 α DG-laminin 結合の低下/消失、 α DG の O-mannose glycan の消失が証明され、新研究材料が発見された。

(7) 治療法開発に関連して ; 筋ジストロフィーでの筋崩壊には Ca 流入→calpain 活性亢進 (Ca 説) があるが、これに加え、 β DG 分解機構 β DG(43 kD)→30 kD(細胞内) + 13 kD(細胞外)が膜結合型 matrix metalloproteinase(MMP) により行われること、BPHA で阻止できることを指摘してきたが、今年度、20 数種類ある MMP のうち、膜結合型 MMP(MT1-MMP)が β DG 分解機構に関与することが判明した。

分担研究者

戸田達史 大阪大学大学院医学系研究科・教授
砂田芳秀 川崎医科大学医学部・教授
遠藤玉夫 東京都老人総合研究所・副参事研究員
寺島俊雄 神戸大学大学院医学系研究科・教授
松村喜一郎 帝京大学医学部・助教授
千葉厚郎 杏林大学医学部・助教授

A. 研究目的

Duchenne/Becker 型筋ジストロフィーの責任蛋白 dystrophin が結合する筋形質膜蛋白 β -dystroglycan (β DG)とその細胞外成分 α -dystroglycan (α DG)は、基底層の主要成分 laminin および細胞内骨格 actin filament とを結ぶ架橋構造の中心的存在である。この

dystroglycan 複合体には、sarcoglycan 複合体、syntrophin 複合体、dystrobrevin 複合体が結合し、巨大な dystroglycan 系架橋構造体を形成すると共に、Grb 2、rapsyn、caveolin-3、 agrin、perlecan、MuSK を始め多数の蛋白が機能的連関する。この dystroglycan 系巨大架橋構造体の多くは糖蛋白であり、なかでも α DG は最も豊富な糖鎖をもち 54 %以上が糖鎖成分である。特にその 66 %を占める極めて特異な O-mannose glycan : Ser/Thr•mannose2• β 1GlcNAc4• β 1Gal3•2Sia は laminin 結合に関与する key moiety で、その形成障害による筋ジストロフィーの一群があることを見出し α -dystroglycanopathy を提唱してきた。その共通する特徴として①dystroglycan 系架橋構造体の各成分の core protein は筋細胞膜に存在する (assembly)、②抗 α DG

糖鎖抗体は α DG に反応しない、③ laminin- α DG 結合ができないの3点がある。この O-mannose glycan は従来高等動物には見い出されておらず、下等動物での存在も量的に多くないため注目されず、その機能は全く関心さえ持たれてこなかった。ましてや、その形成過程は全くわかっていない。

現在までのところ α -dystroglycanopathy には、①脳奇形 (II 型滑脳症)・眼奇形を伴う筋ジストロフィー (日本独自の福山型先天性筋ジストロフィー FCMD =fukutin 欠損症、その類縁疾患である Muscle-eye-brain disease MEB=POMGnT1 欠損症と約 10%の Walker-Warburg syndrome WWS=POMT1 欠損症)、②知能低下のない先天性筋ジストロフィー (MDC1C=FKRP 異常症と MDC1D=Large 異常症)、③肢帯型筋ジストロフィー LGMD2I=FKRP 異常症、④自然発生动物の myodystrophy mouse(myd)=Large 異常症、当研究グループで遺伝子工学的にえられた fukutin 欠損キメラマウスがあり、本研究はこれらの分子病態解明と治療法の開発を目的として、平成15年度から開始した。特に、fukutin の生理機能の解明、O-mannose glycan 合成の各段階での糖転移酵素の解明、FCMD 治療法の開発に力点を置く。

B. 研究方法と結果

(1) FCMD の責任蛋白 fukutin 分子の構造・生理機能に関連して；①昨年度、fukutin 蛋白 (遺伝子 9q31、10 exon、461 aa、53.6 kDa) はゴルジ体膜蛋白であることを強制発現系の免疫組織化学で明らかにした。今年度、様々な fukutin 変異体を作成し、アミノ酸配列から N 端付近に予想した膜貫通ドメイン領域だけを GFP と融合させた融合蛋白はゴルジ体に局在すること、膜貫通ドメインを欠失させた fukutin 変異体は細胞質に存在することから、fukutin 分子の N 端付近の膜貫

通ドメインにゴルジ体膜局在シグナルが存在することが最終確認できた。②強制発現させた fukutin の western blot には 2 本のバンドがあり、in vitro translation による fukutin は下のバンドと一致すること、N-glycosidase 処理をすると上のバンドが消失すること、N-glycan の予想付加部位第 92 番アミノ酸 N \rightarrow Q の変異体は下のバンドと一致することから、fukutin は第 92 番 N で一ヶ所 N-glycan が付加していることがわかった。③ Fukutin 生理活性では Ser/Thr \leftarrow mannose2 \leftarrow β 1GlcNAc4 \leftarrow β 1Gal3 \leftarrow 2Sia の 4 段階のうち、千葉・遠藤らが確立したほ乳類での Ser/Thr \leftarrow mannose (protein O-mannose transferase POMT 活性または mannose 転移活性)、Ser/Thr \cdot mannose2 \leftarrow β 1GlcNAc (GlcNAc 転移活性) の 2 つの段階には異常がないことが確認された (fukutin 強制発現細胞、FCMD 筋由来の培養線維芽細胞)。現在、Ser/Thr \cdot mannose2 \cdot β 1GlcNAc4 \leftarrow β 1Gal (Gal 転移活性) 段階に異常があるデータが出てきており確認中である。

(2) FCMD 筋の病態に関連して；FCMD 筋と小児正常筋での遺伝子発現を神経センターが開発した cDNA microarray による transcripts 解析を行った結果、FCMD 筋では筋基底層成分 (Col3、SPARC、MGP、Lumican)、神経筋接合部成分 (Agrin、AChR) と fetal type の筋収縮蛋白 (myosin binding protein H、troponin T2、ACTC) の発現亢進が年齢を通じて一定のパターンでみられた。これに対し筋成熟の最終段階で発現する遺伝子群 (MYH7、MRF4) の発現低下が確認できた。この結果、FCMD は十分に分化成熟した筋細胞に発症する Duchenne 型筋ジストロフィーとは異なり、基底層と筋細胞膜の先天的結合不全の結果、筋細胞の分化誘導が神経筋接合部形成の時期に断絶され、それ以降の分化成熟ができない状態で発症していると解釈された (分化成熟異常と筋崩壊)。

(3) FCMD 脳奇形について；現在まで、FCMD 脳は MEB/WWS 脳同様滑脳症 II 型で、脳表のグリア限界膜での α DG-laminin 接着の断裂→神経細胞の過遊走を明らかにしてきた。今年度から、大脳皮質の層構築、神経経路の走行について fukutin 欠損キメラマウスを用いて新たな検討を開始した。6~8 週令の正常マウスと fukutin 欠損キメラマウスの視床外側腹側核に WGA-HRP を、腰髄にワサビ過酸化酵素 HRP を微量注入し、2 日後脳の完全連続切片を作成し HRP 組織化学にて観察した。その結果、大脳皮質第 6、5 層由来の皮質視床路ニューロン、皮質脊髄路ニューロンの細胞体は正常構築の領域とともに層構築異常部位では大脳皮質表層から深部まで分布しており、従来指摘した神経細胞の過遊走（グリア限界膜の突破）に加え神経細胞遊走自体の障害（遅延？）が確認された。今後、異所性ニューロンとカハール・レチウスニューロンとの相対的位置関係を調べ、リーラーマウスとの異同について検討する。

(4) MEB の責任蛋白／遺伝子について；①昨年度までに MEB 患者の遺伝子解析を行い、Man $2\leftarrow\beta$ 1GlcNAc 段階の責任酵素 POMGnT1 の遺伝子（1p32-34）に 13 種の点変異を見い出してきた。本年度は、その変異遺伝子 13 種をそれぞれ Xpress との融合蛋白質として HEK293T 細胞に発現させ、抗 Xpress 抗体により各酵素の発現量を定量し、Mannanopeptide を基質として GlcNAc 転移活性を測定した。その結果、変異蛋白質の酵素活性はいずれも失活していた。従って、MEB は POMGnT1 欠損症と最終結論した（loss of function）。②新たに POMGnT1 の変異体を各種作成し GlcNAc 転移活性を測定したところ、POMGnT1 660 アミノ酸のうち、N 端に膜貫通部位と幹領域が、C 端側に酵素活性部位があり、C 端 9 アミノ酸を削っても活性は保たれるが 19 アミノ酸を削ると失活することが

判明した。③また、POMGnT1 は fukutin 同様にゴルジ体膜に存在することも再確認した。

(5) 約 10 %の WWS で報告された POMT1 遺伝子異常に関連して；Beltran-Valero de Bernabe らが WWS 患者の約 10 %に、Ser/Thr \leftarrow Man 段階の糖転移酵素 POMT1 の遺伝子変異をみつけたが(2002)、POMT1 がヒトを含む高等動物で実際に機能している酵素であるのか証明されていなかった。そのため、本年度哺乳動物細胞の protein O-mannosyl transferase(POMT)活性のアッセイ系を確立し（Manya H et al,2004）、酵母の O-mannose 転移酵素 pmt の哺乳類ホモログである POMT1 と POMT2 について POMT 活性を検討した。ラット脳よりクローニングした POMT1 cDNA とヒト POMT2 cDNA を培養哺乳動物細胞に導入して、総膜分画について mannose 転移活性を測定した結果、POMT1、POMT2 単独では活性はなく、(POMT1+POMT2)複合体として活性をもつことが判明した。従って、約 10 %の WWS は、ER での α DG \leftarrow Man の形成障害（POMT 活性の消失）であることが確認できた。

(6)新しい動物モデルの発見； α -dystroglycanopathy をきたす新動物として、1950 年代から知られる自然発生 dystrophy chicken が該当することを証明した。この鶏は生後 4-5 週で発症、脳や眼の奇形は伴わず、速筋優位の障害で T 管由来の空胞形成をきたす特徴を持つ常染色体不完全優性遺伝の筋ジストロフィーであることが、（厚）筋ジス班（三好班長、昭和 53 年~58 年；木下、黒岩、中村、高木、埜中、杉田各班員）により解明されている。今年度、この鶏の胸筋（速筋）を免疫化学（組織および western blot）で検討したところ、 α DG を含む DG 系架橋構造体の各蛋白質成分は筋形質膜に存在するが、抗 α DG 糖鎖抗体のみ反応性が低下していること、この α DG は高分子成分が減少

し低分子成分が増加しており(脱糖鎖)、しかも laminin 結合能を western blot でみたところ高分子領域の α DG は laminin 結合能が低下し低分子領域 α DG の laminin 結合能は完全に消失していた。この α DG を western blot 上で多数の lectin overlay assay をすると、N-mannose glycan が多いこと、terminal GalNAc3 \cdot β 1Gal 構造が多いこと、terminal GalNAc 構造が多いこと、terminal Gal3 \cdot 2Sia 構造は少ないことが判明した。従って、dystrophy chicken 胸筋の α DG 糖鎖は O-mannose glycan がほとんどないことが証明された。今後、この鶏は O-mannose glycan 形成のどの段階での異常か検討するが、新しい動物モデルと考えられる。

(7) 治療法開発に関連して;筋ジストロフィーでの筋崩壊には Ca 流入 \rightarrow calpain 活性亢進 (Ca 説)があるが、これに加え、 β DG 分解機構 β DG(43 kD) \rightarrow 30 kD(細胞内) + 13 kD(細胞外)が膜結合型 matrix metalloproteinase(MMP)により行われること、BPHA で阻止できることを指摘してきた。今年度、20 数種類ある MMP のうちどのタイプが β DG 分解機構に関与するかを検討した。肢帯型筋ジストロフィー LGMD1C のモデル動物 caveolin-3 遺伝子変異 (P104L) transgenic mouse に DNA microarray を用いて遺伝子発現が上方制御されている遺伝子をスクリーニングしたところ、膜型 MMP1 の発現が上昇していた。これは、mdx mouse、 β および α サルコグリカンノックアウトマウスでも同様であった。ヒト MMP1 遺伝子を COS 細胞に導入すると、分解された β DG(30 kD)の生成増加が見られた。従って、膜結合型 MMP(MT1-MMP)が β DG 分解機構に関与することが判明した。

C. 考察

α DG の O-mannose glycan : Ser/Thr \cdot mannose2 \cdot β 1GlcNAc4 \cdot β 1Gal3 \cdot 2Sia の形成過程の第1段階 protein

O-mannosyl transferase(POMT)活性はゴルジ体ではなく ER で行われ、その活性発現には互いに酵母の POMT 遺伝子 pmt のホモログである POMT1 および POMT2 の両者の存在が必要であることが明瞭になった。欧米ではこの POMT1 遺伝子異常で、約 10 % の WWS の発症が報告されている。哺乳類の O-mannose glycan は α DG 以外にラットの中樞神経特異的プロテオグリカンである neurocan、phosphocan にも存在することが判明しているため、この段階の異常では α DG 以外の分子にも異常をきたすことが予想され、 α -dystroglycanopathy のなかでも最も重症型であることが理解される。哺乳類材料で第1段階の assay system を確立できたので、生体材料を使った生化学診断ができるようになった点が評価される。同時に、約 9 割の“WWS”の原因究明が今後の課題である。

第2段階である Ser/Thr \cdot mannose2 \leftarrow β 1GlcNAc4 (GlcNAc 転移酵素活性)については、昨年までに POMGnT1 遺伝子異常が解明され、今年度、POMGnT1 分子 C 端の活性領域の変異だけではなく、N 端にある膜貫通ドメインや幹領域の変異でも完全に酵素活性が失われることが判明した。従って、loss of function であることが確認でき、生体材料での生化学診断も可能となった。

第3段階である Ser/Thr \cdot mannose2 \cdot β 1GlcNAc4 \leftarrow β 1Gal (Gal 転移活性)、第4段階である Ser/Thr \cdot mannose2 \cdot β 1GlcNAc4 \cdot β 1Gal3 \leftarrow 2Sia (シアール酸転移活性)を生化学的に測定する系が確立でき、fukutin について検討し第1、2段階の異常でないことは今年度までに判明した。第3段階に異常が疑われるデータがでてきているが確認中である。現在まで fukutin 分子の検討から、POMGnT1 同様に N 端にゴルジ体膜貫通ドメインがあり、ついで幹領域 (stem region) がつづき、C 端に酵素活性部位が想定できるので Gal 転移

酵素である可能性があるが、POMT のように他の蛋白との複合体として酵素活性を担う可能性や modulator、chaperon である可能性も考慮に入れるべきと考え検討している。

今年度には行われなかったが、fukutin 関連蛋白である FKRP、Large、それに今年度我々の手で発見できた dystrophy chicken は、いずれも中枢神経系などの奇形/障害はないかあっても軽微であると考えられ、これらの疾患の分子病態解明が次に進むべき方向と心得ている。

FCMD 筋で今回判明し MEB/WWS でも同様と考えるが、このタイプの先天性筋ジストロフィーは、基底層・筋形質膜の先天性接着不全があるため神経筋接合部形成期以降の最終的筋成熟が進んでおらず、そこに壊死・再生をきたすジストロフィー変化が加わって発症していると考えられる。Duchenne 型など多くの筋ジストロフィーが成熟筋に発症している点と基本的に異なる特徴である。本疾患の基本病態理解に大きな転換がえられた。治療法開発にあたって考慮すべき点である。

治療法の開発に関連して、筋ジストロフィーに共通して Ca 流入→calpain 活性亢進 (Ca 説) があるが、それに加え、膜成分 β DG の分解による DG 系架橋構造体破綻が存在し、それが膜結合型 MMP(MT1-MMP) によることが判明した。この機序は BPHA により阻害されることが昨年度までに解明しているため、今後、fukutin 欠損キメラマウスなどで試す方針である。

D. 結論

(1) FCMD 責任蛋白 fukutin はゴルジ体膜蛋白で、N 端の膜貫通ドメインにゴルジ体膜局在シグナルが存在する。

(2) fukutin 機能には糖鎖転移活性を予想しているが、

mannose 転移活性・GlcNAc 転移活性はなく、Gal 転移活性に関与する可能性がある。

(3) MEB 責任蛋白 POMGnT1 は C 端に GlcNAc 転移酵素活性部位をもつが、N 端の膜貫通ドメインや幹領域の変異でも酵素活性は失活する。従って、MEB は POMGnT1 の loss of function により発症する。

(4) 約 10 % の WWS で同定された POMT1 に関連して、この蛋白に予想される protein O-mannosyl transferase(POMT)活性には、酵母で知られている POMT 遺伝子 pmt の哺乳類ホモログ POMT1 と POMT2 の両者の共存 (複合体) が必要である。WWS の約 10 % は POMT1 の障害の為に mannose 転移活性が消失して発症すると推定される。

(5) FCMD 筋は、基底層と筋形質膜の先天性接着不全のため、神経筋接合部の形成時期以降の分化成熟に障害があり、その上に筋崩壊・再生 (ジストロフィー変化) が起こる。

(6) 新しい α -dystroglycanopathy として、従来の FCMD(fukutin)、MEB(POMGnT1)、WWS(POMT1)、FKRP、Large に加え、dystrophy chicken が確認された。

(7) 20 数種類の膜型 metalloproteinase(MMP)のうち、MT1-MMP が β DG 分解→DG 系架橋の破綻→筋ジストロフィー発症に関与する。BPHA はその阻害活性があるので、治療に応用できる可能性がある。

E. 研究発表

1. Saito, F., Ohi, H.F., Shimizu, T. and Matsumura, K. The role of dystroglycan in the pathogenesis of neuromuscular disorders and infectious diseases. Recent Res. Devel. Biochem. 4: 561-573, 2003

2. Matsumura, K., Arai, K., Zhong, D., Saito, F.,

- Ohi, H.F., Maekawa, R., Yamada, H. and Shimizu, T. Disruption of dystroglycan axis by β -dystroglycan processing in cardiomyopathic hamster muscle. *Neuromusc. Disord.* 13,: 796–803, 2003
3. Matsumura, K., Arai, K., Zhong, D., Saito, F., Fukuta-Ohi, H., Maekawa, R., Yamada, H. and Shimizu, T. Matrix metalloproteinase activity that disrupts the dystroglycan complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Basic and Applied Myology* (in press)
4. Masaki, T., Matsumura, K., Saito, F., Kamakura, K., Yorifuji, H. and Shimizu, T. Association of dystroglycan and laminin-2 co-expression with myelinogenesis. *Medical Electron Microscopy* (in press)
5. Saito, F., Tomimitsu, H., Arai, K., Kanda, T., Mizusawa, H., Shimizu, T. and Matsumura, K. A Japanese patient with distal myopathy with rimmed vacuoles: Missense mutations in the epimerase domain of the UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene accompanied by hyposialylation of skeletal muscle glycoproteins. *Neuromusc. Disord.* (in press)
6. Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Manyu H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, van Coster R, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12:527–534, 2003
7. Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS. The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats. *Am J Hum Genet* 72:733–738, 2003
8. Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, Simsek E, Tunc M, Alper M, Cam M, Guven A, Fukuda Y, Kinoshita M, Kocabay K, Toda T. A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 53:392–396, 2003
9. Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Tachikawa M, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12:595–600, 2003
10. Li M, Ishikawa K, Toru S, Tomomotsu H, Takashima M, Goto J, Takiyama Y, Sasaki H, Imoto I, Inazawa J, Toda T, Kanazawa I, Mizusawa H. Physical map and haplotype analysis of 16q-linked autosomal dominant ataxia (ADCA) type III in Japan. *J Hum Genet* 48:111–118, 2003
11. Nagai Y, Fujikake N, Ohno K, Higashiyama H, Popiel HA, Rahadian J, Yamaguchi M, Strittmatter WJ, Burke JR, Toda T. Prevention of polyglutamine oligomerization and

- neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 12:1253-1259, 2003
12. Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Tachikawa M, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Murakami T, Sunada Y, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 12:1449-1459, 2003
 13. Manya H, Sakai K, Kobayashi K, Taniguchi K, Kawakita M, Toda T, Endo E. Loss-of-function of an N-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 306:93-97, 2003
 14. Zhang W, Vajsar J, Cao P, Brenningstall G, Diesen C, Dobyms W, Herrmann R, Lehesjoki A-E, Steinbrecher A, Talim B, Toda T, Topaloglu H, Voit T, Schachter H. Enzymatic diagnostic test for muscle-eye-brain type congenital muscular dystrophy using commercially available reagents. *Clin Biochem* 36:339-344, 2003
 15. Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) and α -dystroglycanopathy. *Congenit Anom* 43:97-104, 2003
 16. Toda T, Momose Y, Murata M, Tamiya G, Yamamoto M, Hattori N, Inoko H. Toward identification of susceptibility genes for sporadic Parkinson's disease. *J Neurol* 250(supple3):40-43, 2003
 17. Endo T, Toda T. Glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Biol Pharm Bull* 26:1641-1647, 2003
 18. Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. *Basic Appl Myol* (in press)
 19. Longman C, Mercuri E, Cowan F, Allsop J, Brockington M, Jimenez-Mallebrera C, Rutherford M, Toda T, Muntoni F. Antenatal and postnatal brain magnetic resonance imaging in muscle-eye-brain disease. *Arch Neurol* (in press)
 20. Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin M-C, Gasser T, Krueger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J-i, Toda T, Wang J, Ioannidis JPA, Rocca WA, and the UCHL1 Global Genetics Consortium. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* (in press)

21. Murakami T., Nishi T., Kimura E., Goto T., Maeda Y., Ushio Y., Uchino M., Sunada Y. Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult mdx mice by electroporation. *Muscle Nerve*, 27: 237-241, 2003
22. Ohsawa Y., Toko H., Katsura M., Morimoto K., Yamada H., Ichikawa Y., Murakami T., Ohkuma S., Komuro I., Sunada Y. Overexpression of P104L mutant caveolin-3 in mice develops hypertrophic cardiomyopathy with enhanced contractility in association with increased endothelial nitric oxide synthase activity. *Hum. Mol. Genet.*, 13: 151-157, 2004
23. Manyá, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis, R.U., and Endo, T. Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: Coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101: 500-505, 2004
24. Sakakibara S, Misaki K, Terashima T, Cytoarchitecture and fiber pattern of the Superior colliculus are disrupted in the Shaking Rat Kawasaki, *Dev. Brain Res.*, 141(1-2): 1-13, 2003
25. Yamamoto T, Sakakibara S, Mikoshihara K, Terashima T, Ectopic corticospinal tract and corticothalamic tract neurons in the cerebral cortex of the yotari and reeler mice, *J. Comp. Neurol.*, 461(1):61-75, 2003
26. Kikkawa S, Yamamoto T, Misaki K, Ikeda Y, Okado H, Ogawa M, Woodhmas PL, Terashima T, Missplicing resulting from a short deletion in the reelin gene causes reeler-like neuronal disorders in the mutant shaking rat Kawasaki, *J. Comp. Neurol.*, 463(3):303-315, 2003
27. Wu D, Tadano M, Edamatsu H, Masago-Toda M, Yamawaki-Kataoka Y, Terashima T, Mizoguchi A, Minami Y, Satoh T, Kataoka T., Neuronal lineage-specific induction of phospholipase Cepsilon expression in the developing mouse brain, *Eur J Neurosci.*, 17(8):1571-80, 2003
28. Tsukamoto Y, Yamamoto T, Okado H, Nibu K, and Terashima T, Retrograde labeling of Mouse Spinal Descending Tracts by Recombinant Adenovirus, *Arch Histol Cytol.*, 66(3): 209-220, 2003
29. Aoki T, Watanabe Y, Terashima T, Axonal branchings of callosal commissural neurons in the two neurological mutant mice, reeler and yotari, (submitted)
30. Misaki K, Kikkawa S, and Terashima T, Reelin Expressing Neurons in the anterior commissure and corpus callosum of the rat, *Dev. Brain Res.*, (in press)

α -dystroglycan の o-mannose 型糖鎖と細胞外 matrix 結合に異常をきたす先天性

筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発

フクチンの構造と機能の解析と DNA チップによる FCMD の遺伝子プロファイリングと筋分化遅延について

分担研究者 戸田 達史 大阪大学医学系研究科ゲノム機能分野・教授

研究要旨 フクチンのゴルジ体局在化シグナルは、N 末付近に存在する膜貫通ドメインと思われる領域に存在することが示唆された。生物学的機能はまだ不明だが、フクチンは N 型糖鎖修飾を受けていた。フクチンは Gal 転移に関与している可能性があり、Gal 転移酵素、もしくは O-man 糖鎖に関わると考えている β 4GalT-I、 β 4GalT-II のモジュレーター、シャペロンと推測される。また DNA チップにて、FCMD は線維成分の発現が出生時より高く、筋成分の発現が低い、いわゆる線維病であると考えられた。さらに筋成熟の最終段階で発現の上昇する遺伝子群（MYH7, MRF4）の発現低下が見られ、また Agrin や AchR など神経性分化因子の遺伝子発現が著しく上昇していた。FCMD では基底膜を介した筋細胞の分化誘導が神経筋接合部形成の時期に断絶され、それ以降の筋細胞の分化過程が遅延していることが推定された。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)、muscle-eye-brain(MEB)病、Walker-Warburg 症候群(WWS)は、重度の先天性筋ジストロフィーに、胎生期の神経細胞移動期の障害である II 型滑脳症と、眼奇形を伴う常染色体劣性遺伝性神経筋疾患である。これら 3 疾患は類縁疾患とされ、同じメカニズムにより発症すると考えられている。我々は以前 FCMD の原因遺伝子を同定、また原因蛋白質フクチンは α ジストログリカンのラミニン結合糖鎖の修飾に関与していると考えられている。

また FCMD 患者の筋線維は他の筋ジストロフィーに比べ未熟である一方で、筋線維の再生は活発でないことが知られているがその詳細に関し遺伝子レベルでの変化はわかっていない。

B. 研究方法・研究結果

<フクチンの構造と機能の解析>

動物細胞での強制発現系においてフクチンの細胞内局在がゴルジ体局在であることを昨年度報告した。今回、様々なフクチン変異体を作成し、ゴルジ体局在シグナルの位置を調べた。アミノ酸配列から膜貫通ドメインであろうと予測された領域だけを GFP と融合させた蛋白質は、ゴルジ体に局在することがわかり、またその領域を欠失させたフクチンは細胞質に局在した。よってフクチンの膜貫通ドメインにゴルジ体局在シグナルが存在することが示唆された。一方、FCMD 患者で見られた Y371C ミスセンス変異体はゴルジではなく小胞体に局在することがわかった。

動物細胞に強制発現させたフクチンはしばしばウエスタンブロットでバンドが 2 本見える。これが何かを調べるために、in vitro translation による産物と比較したところ、下のバンドと一致し、フクチ

ンが翻訳後に何かが付加されることが示唆された。アミノ酸配列から N 型糖鎖付加部位が予測されていることから、N-glycosidase で処理したところ、上のバンドが消えた。また予測された N 型糖鎖付加部位の変異体 N92Q を作成したところ、やはり上のバンドが見えず下のバンドと一致した。よってフクチンは N 型糖鎖修飾されていることがわかった。

フクチンの糖転移酵素活性を調べるために、フクチン強制発現細胞、あるいは FCMD 患者と健常人の線維芽細胞を用いて、Man 転移、GlcNAc 転移、Gal 転移、Sia 転移活性それぞれを測定しているところである。現在のところ、患者と正常の線維芽細胞において Gal 転移酵素活性に差があるような結果を得ている。サンプル数を増やして検討しているところである。

O-man 糖鎖に関わると考えている β 4GalT-I、 β 4GalT-II の遺伝子について、原因遺伝子未同定の脳病変を示す先天性筋ジストロフィー患者約 50 人で変異検索したが、今の所変異は見つかっていない。

<DNA チップによる FCMD の遺伝子プロファイリングと筋分化遅延について>

今回我々は FCMD の筋組織と小児正常筋での遺伝子発現の違いを、神経センターにより独自に開発された cDNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を用い網羅的に比較検討した。また、実験に用いたサンプルの病理画像を利用し、画像解析及びバイオインフォマティクスの統計解析方を用いて、FCMD 筋に特異的な骨格筋での病態変化を遺伝子レベルで調べた。

FCMD 筋では Col3a1, SPARC, MGP, Lumican 等細胞外マトリックス成分及び基底膜成分の著しい発現の上昇を認めた。一方で骨格筋成分は筋再生の

初期に見られる遺伝子群 (Myosin Binding Protein H, Troponin T2, ACTC) の発現の上昇が見られたにとどまった。また、FCMD の患者間の比較では加齢により発現量の変わる遺伝子は少なく、年齢を通じて一定の発現パターンを示した。

さらに RT-PCR において筋成熟の最終段階で発現の上昇する遺伝子群 (MYH7, MRF4) の発現低下が見られ、また Agrin や AchR など神経性分化因子の遺伝子発現が著しく上昇していた。

C. 考察

フクチンのゴルジ体局在化シグナルは、N 末付近に存在する膜貫通ドメインと思われる領域に存在することが示唆された。Y371C ミスセンス変異体の小胞体局在は、この変異により正常な高次構造をとれなくなり、小胞体で品質管理されていると考えられる。

フクチンは N 型糖鎖修飾を受けるが、その生物学的機能はまだわかっていない。

フクチンは Gal 転移に関与している可能性があり、Gal 転移酵素、もしくは O-man 糖鎖に関わると考えている β 4GalT-I、 β 4GalT-II のモジュレーター、シャペロンと推測される。

FCMD は線維成分の発現が出生時より高く、筋成分の発現が低い、いわゆる線維病であると考えられた。

近年、FCMD では糖鎖異常により筋細胞膜と基底膜構成成分との連結が悪いことが解明されてきており、基底膜を介した筋細胞の分化誘導が神経筋接合部形成の時期に断絶され、それ以降の筋細胞の分化過程が遅延していることが推定された。

D. 研究発表

1. Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Many

- H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, van Coster R, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12:527-534, 2003
2. Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS. The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats. *Am J Hum Genet* 72:733-738, 2003
3. Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, Simsek E, Tunc M, Alper M, Cam M, Guven A, Fukuda Y, Kinoshita M, Kocabay K, Toda T. A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 53:392-396, 2003
4. Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Tachikawa M, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12:595-600, 2003
5. Li M, Ishikawa K, Toru S, Tomomotsu H, Takashima M, Goto J, Takiyama Y, Sasaki H, Imoto I, Inazawa J, Toda T, Kanazawa I, Mizusawa H. Physical map and haplotype analysis of 16q-linked autosomal dominant ataxia (ADCA) type III in Japan. *J Hum Genet* 48:111-118, 2003
6. Nagai Y, Fujikake N, Ohno K, Higashiyama H, Popiel HA, Rahadian J, Yamaguchi M, Strittmatter WJ, Burke JR, Toda T. Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 12:1253-1259, 2003
7. Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Tachikawa M, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Murakami T, Sunada Y, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 12:1449-1459, 2003
8. Manya H, Sakai K, Kobayashi K, Taniguchi K, Kawakita M, Toda T, Endo E. Loss-of-function of an N-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 306:93-97, 2003
9. Zhang W, Vajsar J, Cao P, Brenningstall G, Diesen C, Dobyns W, Herrmann R, Lehesjoki A-E, Steinbrecher A, Talim B, Toda T, Topaloglu H, Voit T, Schachter H. Enzymatic diagnostic test for muscle-eye-brain type congenital muscular dystrophy using commercially available reagents. *Clin Biochem* 36:339-344, 2003
10. Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K.

Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) and α -dystroglycanopathy. Congenit Anom 43:97-104, 2003

11. Toda T, Momose Y, Murata M, Tamiya G, Yamamoto M, Hattori N, Inoko H. Toward identification of susceptibility genes for sporadic Parkinson's disease. J Neurol 250(supple3):40-43, 2003

12. Endo T, Toda T. Glycosylation in congenital muscular dystrophies. Biol Pharm Bull 26:1641-1647, 2003

13. Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. Basic Appl Myol (in press)

14. Longman C, Mercuri E, Cowan F, Allsop J, Brockington M, Jimenez-Mallebrera C, Rutherford M, Toda T, Muntoni F. Antenatal and postnatal brain magnetic resonance imaging in muscle-eye-brain disease. Arch Neurol (in press)

15. Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin M-C, Gasser T, Krueger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J-i, Toda T, Wang J, Ioannidis JPA, Rocca WA, and the UCHL1 Global Genetics Consortium. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility

β -dystroglycanのプロセッシングに關与するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の解析

分担研究者 砂田芳秀 川崎医科大学神経内科教授

研究要旨：筋ジストロフィー発症機構において、 α -dystroglycanの糖鎖異常によるラミニン結合能の喪失と細胞外マトリックスと細胞骨格の架橋構造の脆弱性が問題になっている。サルコグリカノパチーにおいてはマトリックスメタロプロテアーゼによる β -dystroglycan (β DG)の切断が、この架橋構造の破綻をもたらすことが提唱されている。我々は、種々の筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋では膜型MT1-MMP遺伝子発現が上昇しており、これを培養細胞に導入すると β DGのプロセッシングが増加することを見いだした。さらに生体内ではサルコグリカン欠損筋でのみ、 β DGのプロセッシングが亢進していることを明らかにした。

A. 研究目的

Dystroglycan複合体(DG)は α DGと β DGから構成される膜貫通糖タンパクである。細胞外に局在する α DGの糖鎖部分を介して細胞外マトリックス成分であるラミニンに結合し、膜貫通蛋白 β DGの細胞質ドメインはジストロフィンに結合することから、DG複合体は基底膜と細胞骨格を結び付ける強固な架橋構造を形成している。近年、福山型先天性筋ジストロフィーやmuscle-eye-brain病などの先天性筋ジストロフィーの一群では α DGの糖鎖異常によりラミニン結合能が失われることが明らかにされ、それが筋崩壊の病態に關与すると考えられることから、正常な骨格筋機能維持におけるdystroglycan複合体の重要性が改めて認識されてきた。

一方、サルコグリカノパチーの発症機構に関して、サルコグリカン欠損筋ではマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase:MMP)が β DGの細胞外ドメイン部分を切断し、その結果dystroglycanによる基底膜と細胞骨格の架橋構造が崩れ、筋変性が生じる可能性が示唆されている。しかし、20数種類あるMMPのうち、どのMMPが特異的 β DGのプロセッシングに關与しているかは明らかにされていない。我々は、筋ジストロフィーモデル動物である変異caveolin-3トランスジェニックマウス骨格筋において発現が上方制御されているMMP遺伝子を見出し、その遺伝子産物が β DGのプロセッシングに關与する可能性について検討した。

B. 研究方法

1) 我々が作成した肢帯型筋ジストロフィーLGMD1Cのモデル動物として作出したcaveolin-3遺伝子変異(P104L)トランスジェニックマウス(Tg)、と野生型マウスについてDNA arrayを用いて骨格筋遺伝子発現プロファイル解析を行い、筋ジストロフィーモデルマウスにおいて遺伝子発現が上方制御されているMMP遺伝子をスクリーニン

グした。

2) DNA arrayで得られた候補MMP遺伝子についてTgマウス、mdxマウス、 β および γ サルコグリカンノックアウトマウス(β SGK/O, γ SG/KO)、野生型マウスの骨格筋における発現量をノザンブロット法にて解析した。

3) 上記4種類の筋ジストロフィーモデルマウスおよび野生型マウスの骨格筋からSDS抽出分画について β -DGのC末端を認識する抗体を用いてウエスタンブロット解析を行い、30kDの大きさの β DGプロセッシング産物(β DG30)の生成について検討した。

4) 1)のヒトMMP遺伝子をDG複合体が発現しているCOS7細胞に導入し、MT1-MMP遺伝子存在下で β DG30の生成が増加するかどうかをウエスタンブロット解析にて検討した。

なお、本研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け、川崎医科大学動物実験指針に基づき実施した。

C. 研究結果

1) DNA arrayを用いた遺伝子プロファイル解析の結果、変異caveolin-3Tgマウスにおいてmembrane-type matrix metalloproteinase-1(MT1-MMP)遺伝子の発現が上昇していた。

2) ノザンブロット解析の結果、上記すべての筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋においてMT1-MMP遺伝子の発現量が野生型マウスに比べて増加していた。一方、同じ膜型MMPでもMT2-MMPの発現の増加はみられなかった。

3) 可溶性MMPに関しては、今回検討したMMP2、MMP9ともにすべての筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋において発現の増加がみられた。

4) ところが β DG30の生成はサルコグリカンノックアウトマウス(β SGK/O, γ SG/KO)においてのみ増加し、他の筋ジストロフィーモデルマウスでは生成の増加はみられなかった。

5) ヒトMT1-MMP遺伝子をCOS7細胞に導入すると、発現ベクターのみを導入した時と比べて、 β DG30の生成が増加した。

D. 考察

LGMD1Cのモデルマウスである変異caveolin-3 Tg マウス骨格筋において発現が亢進していたMT1-MMP遺伝子は検討した筋ジストロフィーモデルマウスすべてで同様に発現が上昇していた。MT1-MMPをCOS細胞に発現させると、 β DG30の生成が有意に増加したことから、MT1-MMPが β DGのプロセッシングに関与することが示唆された。MT1-MMPはサルコグリカノパチーだけでなく、他のタイプの筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋においても、発現が上昇していたが、 β DG30の生成はサルコグリカノックアウトマウス(β SGK/O, γ SG/KO)のみで増加していた。このことはMMPによる β DGのプロセッシングはサルコグリカン欠損状態で促進されることを意味し、正常筋ではサルコグリカンの存在がMMPによる β DGのプロセッシングを阻止している可能性が示唆された。

E. 結論

20種以上存在するMMPのうち、MT1-MMPが β DGのプロセッシングに関与し、今回検討した筋ジストロフィーモデルマウスすべてにおいてその発現が上昇していた。一方、 β DG30の生成増加はサルコグリカン欠損マウスでのみ認められ、正常なサルコグリカン複合体の存在は、このプロセッシングを阻止する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohsawa Y, Toko H, Katsura M, Morimoto K, Yamada H, Ichikawa Y, Murakami T, Ohkuma S, Komuro I, Sunada Y. Overexpression of P104L mutant caveolin-3 in mice develops hypertrophic cardiomyopathy with enhanced contractility in association with increased endothelial nitric oxide synthase activity. *Hum Mol Genet* 13(2):151-7 2004.

2) Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Tachikawa M, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Murakami T, Sunada Y, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 12 (12): 1149-59, 2003

3) Murakami T, Nishi T, Kimura E, Goto T, Maeda Ya, Ushio Y, Uchino M, Sunada Y. Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult mdx mice by electroporation. *Muscle Nerve* 27 (2): 237-41, 2003

2. 学会発表

1) Ohsawa Y, Toko H, Katsura M, Morimoto K, Yamada H, Ichikawa Y, Murakami T, Ohkuma S, Komuro I, Sunada Y. Non-transcriptional activation of nitric oxide synthase induces hypertrophic cardiomyopathy with enhanced contractility in the P104L mutant caveolin-3 transgenic mice. *Neuromusc Disord* 13 (7-8) 622-3, 2003 (8th International Congress of the World Muscle Society)

2) 大澤裕、山田治来、市川弥生子、村上龍文、調輝男、砂田芳秀. 変異caveolin-3によるrimmed vacuole myopathy. 第44回日本神経学会総会 横浜, 5月16日, 2003

3) 市川弥生子、大澤裕、村上龍文、山田治来、東口治弘、小室一成、砂田芳秀. 変異caveolin-3トランスジェニックマウスにおける肥大型心筋症. 第44回日本神経学会総会 横浜, 5月16日, 2003

4) 砂田芳秀、市川弥生子、大澤裕、萩原宏毅、村上龍文、笹岡俊邦、新石健二、今村道博. 筋ジストロフィーモデルマウスにおけるマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子発現の検討. 平成15年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」清水班班会議 東京 12月5日, 2003

5) 砂田芳秀、萩原宏毅. バイグリカン-新しいジストロフィン結合蛋白複合体の細胞外リガンド. 平成15年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究」清水班班会議 東京 12月5日, 2003

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

O-mannose型糖鎖修飾異常による先天性筋ジストロフィーの病態解明

分担研究者 遠藤玉夫 財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所・副参事研究員

研究要旨 ジストロフィン糖タンパク質複合体の中心構成分子である α -dystroglycanの糖鎖は、O-mannose型糖鎖と呼ばれる特殊な糖鎖であること、この糖鎖のGlcNAc β 1 \rightarrow 2Man合成に関わる酵素遺伝子POMGnT1が先天性筋ジストロフィーであるmuscle-eye-brain病(MEB)の原因遺伝子であること、をこれまでに明らかにしてきた。MEBの類縁疾患に、福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)、Walker-Warburg syndrome(WWS)があり、それぞれ原因遺伝子としてfukutin、POMT1が同定されている。これらの原因遺伝子は、ホモロジー解析から糖転移酵素であることが予想されているが、実際の糖転移酵素活性については未だ不明である。そこでO-mannose型糖鎖合成経路の解明、さらに糖鎖異常による先天性筋ジストロフィーの病態解明を目指す。本年度中枢神経障害を伴う先天性筋ジストロフィー症MEBは、糖転移酵素POMGnT1の機能喪失によるO-mannose型糖鎖不全疾患であることを明らかにした。さらに、哺乳類におけるO-mannose転移酵素活性の測定法を確立し、MEBと類似の病態を示すWWSの原因遺伝子POMT1は、O-mannose転移酵素であることを証明した。この活性発現には、もうひとつのホモログであるPOMT2との間でPOMT1-POMT2複合体形成が必要であった。以上の結果、WWSの原因がO-mannose型糖鎖不全であることが確認され、MEBとともに神経細胞移動障害を伴う筋ジストロフィーの発症機序にO-mannose型糖鎖が深く関わることを明らかになった。

A. 研究目的

遺伝性の神経疾患や筋疾患は進行性で極めて難治性であり、その代表的疾患として筋ジストロフィーがある。これまでに多く筋ジストロフィーの原因遺伝子が発見されてきた。これらの原因遺伝子の多くは、ジストロフィン糖タンパク質複合体(Dystrophin-glycoprotein complex, DGC)に関与していることから、神経や筋におけるDGCの重要性が注目されている。近年、DGCの構成分子である α -dystroglycanの糖鎖異常が、滑脳症などの中枢神経障害を伴う先天性筋ジストロフィー症の発症に深く関与する知見が相次いで報告されている。我々は α -dystroglycanの糖鎖解析から哺乳類で初めてO-mannose型糖鎖(Sia α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man)の構造を明らかにし、この糖鎖のGlcNAc β 1 \rightarrow 2Man合成に関わる酵素であるPOMGnT1をクローニングした。さらに、POMGnT1が先天性筋ジストロフィーであるmuscle-eye-brain病(MEB)の原因遺伝子であることを明らかにした。この原因遺伝子の特定により臨床症状が複雑多様であるMEBの遺伝子レベルでの確定診断が可能になった。さらに、この発見は、筋ジストロフィーや滑脳症の発症に糖鎖異常が関与するという、新たな病態メカニズムを示した最初の例であり、神経や筋組織の発生および機能における糖鎖あるいは糖鎖修飾酵素の機能の重要性が注目されるようになった。

MEBの類縁疾患に、福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)、Walker-Warburg syndrome(WWS)、先天性筋ジストロフィー1C(MDC1C)、肢帯型筋ジストロフィー2I型(LGMD2I)、先天性筋ジストロフィー1D(MDC1D)があり、それぞれ原因遺伝子としてfukutin、POMT1、FKRP、LARGEが同定されている。これらの疾患でも α -dystroglycanの糖鎖異常が観

察され、原因遺伝子もホモロジー解析から糖転移酵素であることが予想されているが、実際の糖転移酵素活性については未だ不明である。

そこで本研究では、(1)未解明であるこれらの遺伝子産物は糖転移酵素活性を持つかどうか、(2)O-mannose型糖鎖合成にかかわる各段階の糖転移酵素、を解明することによって、O-mannose型糖鎖の機能、さらには糖鎖異常による先天性筋ジストロフィーの病態の解明を目指す。これらの研究を通して、神経や筋組織の発生・機能におけるO-mannose型糖鎖の役割を明らかにし、先天性筋ジストロフィーの画期的な治療法の実現に向けて貢献したい。

B. 研究方法

(1)MEBでこれまで発見したPOMGnT1の13変異のうち、すでに酵素活性を有していないことを確認したsplicing site変異以外の変異遺伝子をHEK293T細胞に発現させ、変異タンパクの酵素活性の有無を調べる。

我々はこれまでMEB患者の遺伝子解析により13種類の遺伝子変異をみいだした。これらの変異は1塩基の置換、1塩基の挿入、1塩基の脱離のような点変異であり、変異はPOMGnT1遺伝子全体に散在していた。これらの変異体遺伝子組み換え体を構築し発現ベクターに組み込み、Xpressとの融合タンパク質としてHEK293T細胞に発現させた。抗Xpress抗体により各酵素の発現量を定量し、Mannanopeptideを基質として各POMGnT1変異体の酵素活性を測定した。

(2)WWSの原因遺伝子産物POMT1(protein O-mannosyltransferase 1)についてO-mannose転移酵素かどうかを明らかにするために、まず哺乳類の

組織や細胞での酵素測定法の開発を目指す。その後その測定法を利用し、POMT1 およびそのホモログ POMT2 を HEK293T 細胞に発現後、*O*-mannose 転移酵素活性を調べ POMT1 あるいは POMT2 が *O*-mannose 転移酵素かどうかを明らかにする。

O-mannose 転移酵素について、酵母の *pmt* 酵素と哺乳類の POMT1 と POMT2 とでは、同じ酵素反応を触媒するにもかかわらず、金属イオン要求性、基質特異性、界面活性剤の要求性などが異なるのではないかと考え詳細に酵素反応条件を検討した。

C. 研究結果

我々はこれまで MEB 患者の遺伝子解析により 13 種類の遺伝子変異を見いだした。これらの変異は 1 塩基の置換、1 塩基の挿入、1 塩基の脱離のような点変異であり、変異は *POMGnT1* 遺伝子全体に散在していた。MEB 患者よりみいだされた 13 種類の酵素変異体は、いずれも活性を消失していたことから、MEB は *POMGnT1* の機能喪失による疾患であると結論した。興味深いことにこれらの変異のうち 2 例は、酵素触媒に直接関与しない幹領域における 1 アミノ酸置換変異体であった。これは幹領域を含めた全体の立体構造の変化によって酵素活性が失われたと考えられる。また、660 アミノ酸のうち 626 アミノ酸まで同一である患者でも酵素活性を失うことが分かった。そこで C 末端の活性発現への寄与について詳しく調べるために、C 末端からアミノ酸を一部削った変異体を作製した。その結果、9 アミノ酸を削っても活性には全く影響がなかったが、19 アミノ酸を削ると完全に活性を消失した。

MEB と類似の病態を示す WWS の原因遺伝子 *POMT1* は、酵母の *O*-mannose 転移酵素 (*pmt*) に相同性がある。哺乳類の *pmt* ホモログとして POMT1 と POMT2 が報告されているが、これらの酵素活性についてはこれまで全く明らかにされていなかった。我々は基質と界面活性剤を検討し、哺乳類における *O*-mannose 転移酵素活性の測定法を確立した。次に、ヒト POMT1 および POMT2 を HEK293T 細胞に発現させ、上記の測定法により酵素活性を調べた。その結果、POMT1 と POMT2 を共発現させた細胞で *O*-mannose 転移活性の顕著な上昇が観察された。一方、POMT1 あるいは POMT2 の単独発現では活性の上昇は全く見られなかった。このことから、POMT1 と POMT2 は *O*-mannose 転移酵素であり、活性発現に POMT1-POMT2 複合体形成の必要性が示唆された。また、MEB の類縁疾患である WWS の原因遺伝子 *POMT1* が、セリン／トレオニン残基にマンノースを転移する *O*-mannose 転移酵素であることを明らかにした。本研究により WWS の原因が *O*-mannose 型糖鎖不全であることが確認され、MEB とともに神経細胞移動障害を伴う筋ジストロフィーの発症機序に *O*-mannose 転移酵素が深く関わる事が明らかになった。

D. 考察

MEB 患者よりみいだされた 13 種類の酵素変異体は、いずれも活性を消失していたことから、MEB は *POMGnT1* の機能喪失による疾患であると結論した。また、MEB 骨格筋では α -dystroglycan の糖鎖異常

が起こっており、 α -dystroglycan が本酵素の標的分子の一つと考えられた。

MEB は筋、眼、脳に特徴的な異常を呈するが、これらの特徴は、WWS や FCMD と類似しており、中枢神経症状を伴う先天性筋ジストロフィーとして同じグループを構成している。最近 *POMT1* 遺伝子に WWS 患者の 20% で遺伝子変異が起こっていることが報告されたが、POMT1 が *O*-mannose 転移酵素である直接的な証拠は得られていなかった。今回の我々の研究により、POMT1 と POMT2 は *O*-mannose 転移酵素であり、活性発現に POMT1-POMT2 複合体形成の必要性が示唆された。また、WWS の原因が *O*-mannose 型糖鎖不全であることが確認され、MEB とともに神経細胞移動障害を伴う筋ジストロフィーの発症機序に *O*-mannose 型糖鎖が深く関わりと考えられる。POMT の変異は、*O*-mannose 型糖鎖合成経路で *POMGnT1* より初期に働く酵素の変異であり、MEB と比べて WWS では全く *O*-mannose 型糖鎖ができないためにより重篤な症状を呈するのではないかと考えられる。

FCMD 原因遺伝子は *fukutin* と呼ばれる 461 のアミノ酸からなるタンパク質をコードしているが、*fukutin* の機能はアミノ酸配列上の特徴から糖鎖修飾に関連する分子であろうと推定されているが詳細は不明である。病態が似ている WWS と MEB の原因が *O*-mannose 型糖鎖不全であることが確認されたことより、FCMD の発症機序に *O*-mannose 型糖鎖が深く関わりと考えられる。FCMD における糖鎖異常の有無を具体的に明らかにすることは、筋ジストロフィーの糖鎖病理機序の解明の新たな道を拓くことが期待される。さらに最近の研究により、MEB や WWS や FCMD と類似の病態を呈する先天性筋ジストロフィー 1C 型 (MDC1C)、先天性筋ジストロフィー 1D 型 (MDC1D)、筋ジストロフィーモデル (*myd*) マウスなど他の筋ジストロフィーでも、いずれも α -dystroglycan の糖鎖修飾異常が認められている。今後これらの異常を具体的に明らかにすることは、筋ジストロフィーの糖鎖病理機序の解明に向け新たな道を拓くことが期待される。

E. 結論

本年度得られた結果より、我々は中枢神経障害を伴う先天性筋ジストロフィー症 MEB は、糖転移酵素 *POMGnT1* の機能喪失による *O*-mannose 型糖鎖不全疾患であることを明らかにした。

哺乳類における *O*-mannose 転移酵素活性の測定法を確立し、MEB と類似の病態を示す WWS の原因遺伝子 *POMT1* は、*O*-mannose 転移酵素であることを証明した。ただし活性発現には、もうひとつのホモログである POMT2 との間で POMT1-POMT2 複合体形成が必要であった。以上の結果、WWS の原因が *O*-mannose 型糖鎖不全であることが確認され、MEB とともに神経細胞移動障害を伴う筋ジストロフィーの発症機序に *O*-mannose 型糖鎖が深く関わりが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Manya, H., Sakai, K., Kobayashi, K., Taniguchi, K,

Kawakita, M., Toda, T., and Endo, T. (2003) Loss-of-function of an *N*-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 93-97.

Toda, T., Kobayashi, K., Takeda, S., Sasaki, J., Kurahashi, H., Kano, H., Tachikawa, M., Wang, F., Nagai, Y., Taniguchi, K., Taniguchi, M., Sunada, Y., Terashima, T., Endo, T., and Matsumura, K. (2003) Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) and α -dystroglycanopathy. *Congenit. Anom. Kyoto*, **43**, 97-104.

Endo, T., and Toda, T. (2003) Glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1641-1647.

Manya, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis, R.U., and Endo, T. (2004) Demonstration of mammalian protein *O*-mannosyltransferase activity: Coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 500-505.

2. 学会発表

Tamao Endo, Disruption of linkage between dystroglycan and ECM due to defective glycosylation in congenital muscular dystrophy, 5th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, June 3 – 7, 2003, Ube

Tatsushi Toda, Kazuhiro Kobayashi, Satoshi Takeda, Junko Sasaki, Yoshihide Sunada, Toshio Terashima, Kiichiro Matsumura and Tamao Endo, Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) and α -dystroglycanopathy, Vth Japanes-French Workshop on Muscular Dystrophies, June 12 – 13, 2003, Tokyo

Tamao Endo and Tatsushi Toda, Identification of a mutant glycosyltransferase for muscle-eye brain disease and its pathomechanism, Vth Japanes-French Workshop on Muscular Dystrophies, June 12 – 13, 2003, Tokyo

遠藤玉夫、萬谷 博、小林千浩、谷口妃代美、戸田達史、*O*-Man 型糖鎖不全と神経細胞遊走異常を伴う先天性筋ジストロフィー、第46回日本神経化学会・第41回日本生物物理学会 新潟 平成15年9月24日～26日

Hiroshi Manya, Keiwa Sakai, Kazuhiro Kobayashi, Kiyomi Taniguchi, Keiko Akasaka, Masao Kawakita, Tatsushi Toda, and Tamao Endo, Loss-of-function of an *N*-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in Muscle-Eye-Brain Disease, 第76回日本生化学大会 横浜 平成15年10月15日～18日

Tatsushi Toda, Kazuhiro Kobayashi, Satoshi Takeda, Toshio Terashima, Kiichiro Matsumura, Tamao Endo, Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) and abnormal glycosylation of α -dystroglycan

第76回日本生化学大会 横浜 平成15年10月15日～18日

Tamao Endo, Hiroshi Manya, Kazuhiro Kobayashi, Kiyomi Taniguchi, Tatsushi Toda, Congenital muscular dystrophy due to glycosylation defect of the central extracellular matrix receptor, dystroglycan (Symposium), 第76回日本生化学大会 横浜 平成15年10月15日～18日

Kazuhiro Kobayashi, Hiroshi Manya, Tamao Endo, Tatsushi Toda, Loss-of-function of an *N*-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease, 53rd Annual meeting of the American Society of Human Genetics, November 4 – 8, 2003, Los Angeles, California, USA

遠藤玉夫、*O*-マンノース型糖鎖と先天性筋ジストロフィー (シンポジウム)、第26回日本分子生物学会年会 神戸 平成15年12月10日～13日

G. 知的所有権の取得状況
該当致しません。