

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

分担研究者 寺島俊雄 神戸大学大学院医学系研究科・教授（脳科学講座神経発生学分野）

研究要旨

福山型筋ジストロフィー患者の脳の髄膜は崩壊し、脳脊髄液・脳・関門 Cerebrospinal Fluid Brain Barrier (CSFBB) が破れて、移動中のニューロンが本来の脳境界を越えて脳表面に遊出し小瘤を形成する。この現象は、福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子がコードするフクチンが脳髄膜の形成とその保持に大きな役割を果たしていることを示唆している。一方、正常動物の海馬裂の表面を覆う髄膜はいったん形成された後に退行するが、リーリン欠損動物の海馬裂の脳髄膜は崩壊しない。これらの事実は脳髄膜の形成とその保持あるいは崩壊には、いくつかの分子メカニズムが働いていることが予想される。そこで、フクチンキメラマウスとリーリン欠損マウス・リーラーを用い、大脳表面と海馬裂における脳髄膜の形成とその保持と崩壊過程を形態学的に調べ、さらに脳構築異常や神経回路形成との関連を調べることにより脳髄膜の機能的意義を解明することを本研究の最終的な目的とする。本年度は、フクチン欠損キメラマウスの皮質脊髄路と皮質視床路ニューロンの分布を逆行性標識法により調べ、皮質第5層、6層ニューロンが異所性に分布することを証明した。また GFAP 抗体によりリーリン欠損マウスリーラーの海馬裂にアストログリアが増生していることを証明し、海馬裂と対向する皮質表面のグリア性境界膜が肥厚し、そのために海馬貫通線維が海馬裂を貫通できず、迂回してその標的（歯状回）に至ることを証明した。

A. 研究目的

正常動物の大脳皮質表面を覆う軟膜・基底膜・グリア性境界膜は脳脊髄液・脳・関門 Cerebrospinal Fluid-Brain-Barrier (CSFBB) として脳を外界より遮蔽する重要な構造物である。福山型筋ジストロフィーでは、軟膜を越えてニューロンがクモ膜下腔へ遊出し、また大脳皮質の層構築異常が生じることが知られている。中野らは、福山型筋ジストロフィーでは脳表面のグリア性境界膜が破綻していることを形態学的に明らかにした (Nakano et al., 1996)。さらに戸田らの研究

グループは、福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子フクチンの欠損キメラマウスの大脳表面を覆う脳軟膜・グリア境界は発生過程で断裂・消失し、皮質板ニューロンが分裂・破砕した軟膜を越えて大脳表面に遊出することを示した (Takeda et al., 2003)。軟膜・グリア性境界は、脳の区画を限界し、外部環境から脳を守り、さらに脳の細胞構築の形成にも関与している。一方、正常動物では発生過程で消失する海馬裂の軟膜・グリア境界が、リーリンを欠損するリーラーマウスや SRK ラットの海馬裂の軟膜・グリア境界は遺残する。

この海馬裂の軟膜・グリア性境界が正常動物では消失し、リーリン欠損動物では遺残する現象は、（海馬裂を除く）脳表面の軟膜・グリア性境界膜の形成とフクチン欠損時における破綻のメカニズムと好対照をなしている。

本研究は、フクチン欠損マウス大脳皮質の脳軟膜・グリア境界の消失と、リーリン欠損動物の海馬裂の脳軟膜・グリア境界膜の遺残のメカニズムを、形態学的、分子生物学的手法を用いて明らかにすることにより、フクチンやリーリンが脳軟膜やアストログリアに対する作用を明らかにすることを目的とする。本年度は、成体フクチン欠損マウスの大脳皮質の層構造異常とリーリン欠損動物の海馬裂の構造と貫通線維の走行に焦点を絞って研究した。

B. 研究方法

1 大脳皮質神経回路網

6～8 週令の正常マウスとフクチン欠損キメラマウスの視床外側腹側核に WGA-HRP を視床外側腹側核に微量注入した。またワサビ過酸化酵素 HRP を実験動物の腰髄に注入した。注入後 2 日間をおいて動物を灌流固定し、抜脳して、脳の完全連続切片を作成、HRP 組織化学を行った。切片をゼラチンスライドに切片をマウントし、ニュートラルレッドにて対比染色を行い、脱水・透徹後、カバーガラスにて封入した。

2 海馬裂の構築と貫通線維

胎生 15 日胚～生後発育期の正常動物およびリーラーマウスの脳を灌流固定し、アスト

ログリアのマーカーである GFAP 抗体を用いて免疫染色を行い、海馬裂に対向する大脳皮質表面におけるグリア性境界膜の構築を光学顕微鏡レベルで調べた。さらにラミニン γ 3 抗体、メロシン抗体を用いて海馬裂における基底膜の連続性を調べた。

リーラーマウスの 15 日目から 21 日目の胎児をパラホルムアルデヒド溶液にて固定し、抜脳後、嗅内野にカルボシアニン蛍光色素の DiI の微小結晶を置き、数週間後にマイクロスライサーにて海馬体を水平断して、蛍光顕微鏡および共焦点蛍光顕微鏡にて DiI で標識された貫通線維を観察した。

（倫理面への配慮）

全ての研究が動物実験であり、ヒト ES 細胞やヒトの組織標本は用いていない。

C. 研究結果

1 フクチンキメラマウスの皮質神経回路網

WGA-HRP を視床外側腹側核に微量注入すると、正常動物では運動野の第 6 層（多形細胞層）に標識ニューロンが認められたが、フクチンキメラマウスでは、層構造が乱れた部位に限定して皮質の表層から最深層に至るまで標識ニューロンが分布した。HRP を正常動物の腰髄に注入すると、逆行性に層構造が乱れていない皮質領域では、正常動物と同様に第 6 層に標識ニューロンが分布していた。HRP を腰髄に注入し、皮質脊髄路ニューロンを逆行性に標識すると、標識ニューロンは大脳皮質の第 5 層に局限して分布した。キメラマウスでは層構造に異常の有る領域では標識ニューロンは皮質表層より深層に至るまで

異所性に分布していたが、層構築が正常の領域では標識ニューロンは正常と同様に第5層に局限していた。

2 リーラーの海馬裂の構造と貫通線維

1) 免疫組織化学：Laminin 抗体を用いて免疫染色を行うと、対照動物では海馬裂にLaminin の発現はなかったが、リーラーマウスでは強い発現が確認された。グリア性境界膜の形成を調べるためにグリア細胞に特異的な抗 GFAP 抗体を用いて免疫染色を行なったところ、対照動物では海馬裂に GFAP の発現が見られなかった。しかし、リーラーマウスでは、この海馬裂において多くの GFAP 陽性の細胞が確認された。これは、リーラーマウスでは対照動物では存在しないアストログリアが海馬裂に多数存在しているという事が示された。

2) 内嗅領歯状回投射（海馬貫通線維）の標識：対照動物において嗅内野から海馬への貫通線維は嗅内野外側部皮質からの線維より嗅内野外側部皮質からの線維の方が優位に多かった。リーラーでも同様の傾向が見られた。嗅内野外側部皮質の場合、対照動物の貫通線維は海馬裂に対して直行するように海馬裂を越え歯状回の分子層に伸びていたが、リーラーではこの海馬裂を越える線維は観察されず、海馬裂に直角に走行した後、その手前で方向転換し海馬裂と平行して線維が走っていた。

D. 考察

福山型筋ジストロフィー患者の脳の剖検例より、大脳皮質の6層構築が乱れことが知ら

れているが、層構築とその投射の関係から福山型筋ジストロフィー脳の形態学的研究は存在しない。神経回路標識法は、トレーサーの注入後、適当な生存期間を要するために、ヒトを用いた神経回路の研究は倫理的に許されない。したがって人脳の神経回路網の研究は事故による脳損傷や血管障害（脳卒中など）後に、不幸にして死亡した患者の脳を変性鍍銀法などで丹念に追求するしか方法がない。したがって福山型筋ジストロフィーの大脳皮質の層構築と神経回路の関係は、ほとんど研究する機会がない。しかし、今回のフクチンキメラマウスの研究により、皮質第5層を占める皮質脊髄路ニューロンや第6層の皮質視床路ニューロンが異所性に分布することが判明し、断片的ながら、福山型筋ジストロフィーの大脳皮質の層構築異常について理解が進んだ。今後、さらに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明らかにするなど、研究を進めたい。また、前述のように通常の神経回路標識法では倫理的に人脳の神経回路の標識実験は許されないが、ホルマリン固定脳を用いてカルボシアニン蛍光色素による死後脳標識法 *postmortem labeling* を用いれば、ごく限られた範囲であるが、人脳の神経回路標識の研究が可能である。将来、福山型筋ジストロフィー患者の剖検脳の一部を用いて、患児の脳の構築異常を明らかにしたい。

本研究により正常で境界が失われる軟膜・グリア性境界膜が失われる海馬裂が、リーリンを欠損するリーラーマウスで遺残し、しかも海馬裂をはさんで対向する皮質表面にアス

トログリアの増殖が起こることが明らかとなった。さらにカルボシアニン蛍光色素を用いた内嗅領歯状回投射（ことに海馬貫通線維）の走行と終末を調べたところ、リーラーの貫通線維は海馬裂を迂回し、標的に向かうことが判明した。またその終末分布に正常とリーラー間で差異が認められた。以上よりリーラー海馬裂の軟膜・グリア性境界膜の退行にはリーリタンパクが必須であることが判明した。

E. 結論

フクチン欠損キメラマウスの大脳皮質の層構築異常を神経回路標識法を用いて明らかにした。また海馬裂における軟膜・グリア性境界膜の退行にリーリタンパクが関与していることを解明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakakibara S, Misaki K, Terashima T, Cytoarchitecture and fiber pattern of the Superior colliculus are disrupted in the Shaking Rat Kawasaki, *Dev. Brain Res.*, 2003; 141(1-2): 1-13.
- 2) Yamamoto T, Sakakibara S, Mikoshiba K, Terashima T, Ectopic corticospinal tract and corticothalamic tract neurons in the cerebral cortex of the yotari and reeler mice, *J. Comp. Neurol.*, 2003;461(1):61-75.
- 3) 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.*, 2003;463(3):303-315.

- 4) 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.* 2003;17(8):1571-80.
- 5) 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 and Toda T; Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis, and normal eye development, *Human Mol Genetics*, 2003;12(12):1449-59.
- 6) Tsukamoto Y, Yamamoto T, Okado H, Nibu K, and Terashima T, Retrograde labeling of Mouse Spinal Descending Tracts by Recombinant Adenovirus, *Arch Histol Cytol.*, 2003; 66(3): 209-220.
- 7) Aoki T, Watanabe Y, Terashima T, Axonal branchings of callosal

commissural neurons in the two neurological mutant mice, reeler and yotari, submitted.

- 8) 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.

2. 学会発表

- 1) フクチン欠損キメラマウスにおける大脳皮質層構造異常 寺島俊雄、美崎佳寿代、武田聖、近藤万里、佐々木淳子、戸田達史 第 108 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2003 年 4 月 1 日～4 月 3 日 (福岡)
- 2) リーラー貫通線維 (嗅内野海馬投射) の経路異常 村岡大輔、寺島俊雄 2003 年 11 月 29 日 (吹田)

G. 知的所有権の取得状況

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 松村喜一郎 帝京大学医学部 神経内科助教授

研究要旨 福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD), muscle-eye-brain 病, Walker-Warburg 症候群, MDC1C, MDC1D などの先天性筋ジストロフィーの発症には糖転移酵素をコードする遺伝子の変異により引き起こされる α -dystroglycan (α DG)の糖鎖異常とその結果生じる laminin 結合能の低下が関与しているものと考えられ, これらの疾患は α -dystroglycanopathy と総称されている. 本研究ではまず筋ジストロフィーのモデル動物として知られる筋ジストロフィー鶏が α -dystroglycanopathy のモデル動物ではないかとの仮説を立て, これを蛋白生化学的に検討した. また rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuole: DMRV) は UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) 遺伝子の変異で生じることが知られている. GNE はシアル酸合成に必須の酵素でありその機能異常では糖蛋白のシアル酸付加に異常を生じる可能性が推測されており, 本疾患では α DG の機能障害が存在する可能性がある. そこで DMRV 患者の骨格筋における糖蛋白のシアル酸負荷の異常, α DG の機能障害を検討した. その結果, 筋ジストロフィー鶏の筋では α DG の糖鎖負荷に異常があり, laminin 結合能が減少していた. また糖鎖異常の一つとしてシアル酸の減少が認められた. つまり同鶏は α -dystroglycanopathy のモデル動物として有用であることが明らかとなった. 今後, 同鶏を用いた研究によって α -dystroglycanopathy の分子発病機序の理解が飛躍的に進展することが期待される. 一方, DMRV 患者7名のうち1名において骨格筋糖蛋白のシアル酸負荷が著減していることを見いだした. 同患者は GNE 遺伝子の epimerase domain に稀な点変異を有していた. しかしながら7名の患者全てにおいて α DG の発現, laminin 結合能は正常であり, 本疾患の発症に α DG の機能障害は関与していないと考えられた.

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) の原因蛋白 fukutin は糖転移酵素またはその modulator である可能性が高い. 我々は「dystrophin 糖蛋白複合体の中核である dystroglycan (DG) 複合体の機能異常こそが各種の重症型筋ジストロフィーに共通する筋変性発症機序である」との仮説を立て研究を展開して来た. その成果の1つとして α DG のムチンドメインの特異な糖鎖構造が基底膜の

laminin との結合に重要な役割を果たすことを明らかにした. 近年の研究により FCMD では fukutin の欠損により α DG の糖鎖修飾に異常を来し laminin との結合が障害されることが報告され, 我々の仮説が正しかったことが確認されつつある.

FCMD, muscle-eye-brain 病, Walker-Warburg 症候群, MDC1C, MDC1D などの先天性筋ジストロフィーの発症には糖転移酵素をコードする遺伝子の変異により引き起こされる α DG の糖

鎖異常とその結果生じる laminin 結合能の低下が関与しているものと考えられており、これらの疾患は α -dystroglycanopathy と総称されている。本研究ではまず筋ジストロフィーのモデル動物として知られる筋ジストロフィー鶏が α -dystroglycanopathy のモデル動物ではないかとの仮説を立て、これを蛋白質化学的に検討した。

一方、rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuole: DMRV) は UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) 遺伝子の変異で生じることが知られている。GNE はシアル酸合成に必須の酵素でありその機能異常では糖蛋白のシアル酸付加に異常を生じる可能性が推測されており、本疾患では α DG の機能障害が存在する可能性がある。そこで DMRV 患者の骨格筋における糖蛋白のシアル酸負荷の異常、 α DG の機能障害を検討した。

B. 研究方法

① α DG および DG 複合体の各構成蛋白に対する抗体を用いて免疫蛍光抗体法、ウェスタンブロット法により筋ジストロフィー鶏の骨格筋における各蛋白の発現を検討した。trifluoromethanesulfonic acid (TFMS) による化学的脱糖鎖を行い α DG の分子量の変化をウェスタンブロット法にて観察した。また α DG の laminin 結合能をブロットオーバーレイアッセイ、ソリッドフェーズアッセイにより検討した。さらにレクチンを用いて同鶏の α DG における糖鎖の変化を観察した。

②病理学的に診断された日本人 DMRV 患者 7 名の生検骨格筋より蛋白を抽出し、電気泳動、転写の後にレクチンブロットを行いシアル酸

の変化を検討した。免疫染色、ウェスタンブロットにより同患者骨格筋における α DG の発現を検討するとともにブロットオーバーレイアッセイにより laminin 結合能を検討した。

C. 研究結果

① α DG の糖鎖部分に対する抗体 (IIH6) を用いた免疫蛍光抗体法の結果、 α DG の免疫反応性は減少していたが他の DG 複合体構成蛋白の発現は正常であった。IIH6 を用いたウェスタンブロットでは α DG の分子量の低下と免疫反応性の減弱を認めたが core protein に対する抗体では α DG の分子量の低下のみを認め免疫反応性は保たれていた。TFMS による脱糖鎖後にウェスタンブロットを行うとコントロールとの分子量の差はなくなることからこの α DG の分子量の低下は糖鎖修飾の異常に起因するものと考えられた。ブロットオーバーレイアッセイ、ソリッドフェーズアッセイの結果、 α DG の laminin 結合能は減少していた。レクチンを用いた糖鎖解析の結果、同鶏の α DG にはコントロールと比較して Gal β 1-3GalNAc が多く逆にシアル酸が少ないことが明らかとなった。

②7名中1名の DMRV 患者においてシアル酸認識レクチンである wheat germ agglutinin (WGA), *sambucus nigra* agglutinin (SNA), *maackia amurensis* lectin (MAM) の反応性の著明な低下を認めシアリダーゼ処理後にはこれらコントロールとの差異は消失したことから、同骨格筋における糖蛋白のシアル酸負荷の減少が明らかとなった。遺伝子解析の結果、本患者は GNE の epimerase domain に Cys13Ser、Asp176Val という稀な点変異を有することがわかった。7名全ての DMRV 患者において α DG の発現は正常であり、明らかな laminin 結合

能の低下も認められなかった。

D. 考察

我々はこれまで「DG 複合体の機能異常こそが各種の重症型筋ジストロフィーに共通する筋変性発症機序である」との仮説を立て研究を展開して来た。その中で α DG のムチンドメインの特異な糖鎖構造が基底膜の laminin との結合に重要な役割を果たすことを明らかにした。近年の研究により FCMD では fukutin の欠損により α DG の糖鎖異常が起こり laminin との結合が障害されることが報告され、我々の仮説が正しかったことが確認されつつある。

さて、今回の結果より筋ジストロフィー鶏における筋線維の変性、壊死には α DG の糖鎖異常と laminin 結合能の減少が関与していると考えられ、同鶏は α -dystroglycanopathy のモデル動物として有用であることが明らかとなった。我々はこれまでに α DG の laminin との結合には α DG のシアル酸が重要な役割を果たしていることを報告しており、同鶏における α DG の laminin 結合能の減少の一因は α DG のシアル酸含量の減少にある可能性が考えられた。今後、同鶏を用いた研究によって α -dystroglycanopathy の分子発症機序の理解が飛躍的に進展することが期待される。

また、両アリアル共に epimerase domain に変異を有する DMRV 患者において骨格筋蛋白のシアル酸負荷の減少を認めたが kinase domain に変異を持つ他の DMRV 患者ではレクチンプロットに明らかな変化は認められなかった。GNE と同様の kinase 活性をもつ酵素 GlcNAc kinase の存在が知られており kinase domain に変異を持つ患者では同酵素により GNE の活性低下が代償されている可能性が推測された。しかしながら DMRV においては α DG

の発現、laminin 結合能は正常であり α DG 以外の蛋白の機能異常が本疾患の発症に関わっているものと考えられた。

E. 結論

①筋ジストロフィー鶏の α DG は糖鎖負荷の異常の結果 laminin 結合能が減少していることを見いだした。糖鎖異常の一つとしてシアル酸の減少が認められた。今後、同鶏を用いた研究によって α -dystroglycanopathy の分子発症機序の理解が飛躍的に進展することが期待される。

②DMRV 患者7名のうち1名において骨格筋糖蛋白のシアル酸負荷が著減していることを見いだした。同患者は GNE 遺伝子の epimerase domain に稀な点変異を有していた。7名の患者全てにおいて α DG の発現、laminin 結合能は正常であった。

F. 研究（論文）発表

1. Matsumura, K., Yamada, H., Fukuta-Ohi, H., Arai, K. and Shimizu, T. (2002) The role of dystroglycan in the molecular pathogenesis of neuromuscular diseases. *Current Topics in Neurochemistry* 3, 131-140.
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., and Toda, T. (2003) Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis, and normal eye

- development. *Hum. Molec. Genet.* 12, 1449-1459.
3. 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. *Congenital Anomalies* 43, 97-104.
 4. Saito, F., Ohi, H.F., Shimizu, T. and Matsumura, K. (2003) The role of dystroglycan in the pathogenesis of neuromuscular disorders and infectious diseases. *Recent Res. Devel. Biochem.* 4, 561-573.
 5. Matsumura, K., Arai, K., Zhong, D., Saito, F., Ohi, H.F., Maekawa, R., Yamada, H. and Shimizu, T. (2003) Disruption of dystroglycan axis by β -dystroglycan processing in cardiomyopathic hamster muscle. *Neuromusc. Disord.* 13, 796-803.
 6. Matsumura, K., Arai, K., Zhong, D., Saito, F., Fukuta-Ohi, H., Maekawa, R., Yamada, H. and Shimizu, T. (2003) Matrix metalloproteinase activity that disrupts the dystroglycan complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Basic and Applied Myology*, in press.
 7. 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 and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. *Basic and Applied Myology*, in press.
 8. Masaki, T., Matsumura, K., Saito, F., Kamakura, K., Yorifuji, H. and Shimizu, T. (2003) Association of dystroglycan and laminin-2 co-expression with myelinogenesis. *Medical Electron Microscopy*, in press.
 9. Saito, F., Tomimitsu, H., Arai, K., Kanda, T., Mizusawa, H., Shimizu, T. and Matsumura, K. (2003) 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.

Rat *POMT1* 相同遺伝子産物の O-マンノース転移活性の検討

分担研究者 千葉厚郎 杏林大学医学部 第一内科・助教授

研究要旨：我々が先に同定した rat の *POMT1* 相同遺伝子についてその遺伝子産物の O-マンノース転移活性を、新たに確立したアッセイ系により検討した。この *POMT1* 遺伝子産物が実際に POMT 活性を有すること、またその酵素活性の発現には human の場合と同様に *POMT2* の共発現が必要であることを強く示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

我々は先に α -dystroglycan の O 結合型糖鎖の構造解析を行い O-マンノース型糖鎖の存在を報告した¹⁾。これまでにその糖鎖構造の合成に関わる糖転移酵素遺伝子の2つが、中枢神経発生異常を伴う先天性筋ジストロフィー症の原因遺伝子であることが示されている^{2,3)}。その一つとして Ser/Thr に O-glycoside 結合でマンノースを転移し O-マンノース型糖鎖合成の起点となる protein-O-mannosyl transferase (POMT) の酵母遺伝子 *pmt1* のヒト相同遺伝子 *POMT1* が Walker-Warburg syndrome (WWS) の一部症例の原因遺伝子であることが示されている³⁾。しかしその遺伝子産物が実際に糖転移活性を有することは証明されていなかった。先頃我々は哺乳動物細胞の POMT 活性を検出するアッセイ系を確立し human *POMT1* の遺伝子産物の酵素活性を証明し、WWS が O-マンノース型糖鎖の合成障害であることを示した⁴⁾。このことは O-マンノース型糖鎖の合成系の全容の解明が、中枢神経発生異常を伴う先天性筋ジストロフィー症の病態機序の解明とその治療法の開発につながりうるといふ考え方をさらに支持するものである。

哺乳類における O-マンノース型糖鎖は rat において中枢神経特異的プロテオグリカンである neurocan, phosphacan で最初に報告されたが、O-マンノース型糖鎖修飾異常による先天性筋ジストロフィー症の中枢神経異常には、 α -dystroglycan のみならずこれらの糖蛋白質における O-マンノース型糖鎖修飾の異常も関与している可能性がある。Neurocan, phosphacan の生化学的研究は rat 由来のもので最も進んでおり、その点において rat における O-マンノース型糖鎖合成酵素の同定と解析もまた、先天性筋ジストロフィー症の病態解明に寄与しうる可能性がある。我々は既に rat の *POMT1* 相同遺伝子を同定していたが、今回更に遺伝子産物の酵素活性の存在を示唆する結果を得たことを報告する。

B. 研究方法

Rat 脳よりクローニングした *POMT1* 相同遺伝子 (GenBank accession: AF192388) の cDNA を、培養哺乳動物細胞に導入し強制発現させ、その総膜画分を酵素原として我々が最近確立した哺乳動物細胞 POMT 酵素活性アッセイ系⁴⁾により酵素活性を検討した。

(倫理面への配慮) 該当事項無し

C. 研究結果

HEK293T cell に強制発現させた場合、rat *POMT1* 単独では有意な O-マンノース転移活性の上昇は認めなかったが、human *POMT1* の場合と同様に *POMT2* (ただし rat の相同遺伝子は未同定のため、今回の検討では human のもので検討) と共発現させると有意な転移活性の上昇を認めた。

D. 考察

我々のクローニングした rat *POMT1* は 747 個のアミノ酸をコードする 2241 塩基の open reading frame を持ち、翻訳産物の計算される分子量は 85.5kDa で、mouse *POMT*, human *POMT1* とそれぞれ 89%と 84%のアミノ酸配列の相同性を有している。Northern blot による解析では約 3.3kbp の mRNA が脳・骨格筋・心筋・腸・肺に発現している。N 末端側に N-terminal ER membrane retention signal の存在が予測されており、強制発現させた遺伝子産物は細胞内で主として ER への局在が観察されている。

今回の検討に際しては human *POMT2* の rat 相同遺伝子 (rat *POMT2*) は未同定のため、human *POMT2* との共発現を試みたが、human の場合と同様にその酵素活性の発現には *POMT2* との共発現が必要であることが推定された。但しこの点に関してしては今後 rat *POMT2* を用いての証明が必要である。また我々の得た rat *POMT1* は報告されている human *POMT1* と 84%のアミノ酸配列の相同性を有していたが、ともに human *POMT2* との共発現で酵素活性を

示すことから、機能的にもその相同性が示唆された。

E. 結論

Rat *POMT1* 相同遺伝子は実際に *POMT* をコードしており、その酵素活性の発現には *POMT2* 遺伝子の共発現が必要であることが強く示唆された。また我々のクローニングした Rat *POMT1* は機能的にも報告されている human *POMT1* の相同遺伝子であることが示唆された。

(参考文献)

- 1) Chiba A, et al. (1997) *J Biol Chem*, 272, 2156-2162.
- 2) Yoshida A, et al. (2001) *Dev Cell*, 1, 717-724.
- 3) Beltrán-Valero de Bernabé D, et al. (2002) *Am J Hum Genet*, 71, 1033-1043.
- 4) Manya H, et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 500-505.

F. 研究発表

1. 論文発表

Manya H, Chiba A, Yoshida A, Wang X, Chiba Y, Jigami Y, Margolis RU, 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.

G. 知的所有権の取得状況

該当無し

研究成果の刊行に関する一覧表 (1)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
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
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	Basic and Applied Myology		(in press)	
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)	
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 hypoglycosylation of skeletal muscle glycoproteins.	Neuromusc. Disord.		(in press)	
Taniguchi K., Kobayashi K., Saito K., Yamanouchi H., Ohnuma A., Hayashi Y.K., Many H., Jin D.K., 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
Kurahashi H., Shaikh T., Takata M., Toda T., Emanuel B.S.	The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats.	Am. J. Hum. Genet.	72	733-738	2003
Silan F., Yoshioka M., Kobayashi K., Simsek E., Turc 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
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
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
Nagai Y., Fujikake N., Ohno K., Higashiyama H., Popiel H.A., Rahadian J., Yamaguchi M., Strittmatter W.J., Burke J.R., Toda T.	Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in Drosophila.	Hum. Mol. Genet.	12	1253-1259	2003

研究成果の刊行に関する一覧表 (2)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
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
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
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
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 (suppl 3)	40-43	2003
Endo T., Toda T.	Glycosylation in congenital muscular dystrophies.	Biol. Pharm. Bull.	26	1641-1647	2003
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)	
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)	
Maraganore D.M., Lesnick T.G., Elbaz A., Chartier-Harlin M-C., Gasser T., Kruger R., Hattori N., Mellick G.D., Quattrone A., Satoh J-I, Toda T., Wang J., Ioannidis J.P.A., Rocca W.A., and the UCHL1 Global Genetics Consortium.	UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene.	Ann. Neurol.		(in press)	
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
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

研究成果の刊行に関する一覧表 (3)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Manya, 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
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	1-13	2003
Yamamoto T., Sakakibara S., Mikoshiba K., Terashima T.	Ectopic corticospinal tract and corticothalamic tract neurons in the cerebral cortex of the yotari and reeler mice.	J. Comp. Neurol.	461	61-75	2003
Kikkawa S., Yamamoto T., Misaki K., Ikeda Y., Okado H., Ogawa M., Woodhmas P.L., 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	303-315	2003
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	1571-80	2003
Tsukamoto Y., Yamamoto T., Okado H., Nibu K., Terashima T.	Retrograde labeling of Mouse Spinal Descending Tracts by Recombinant Adenovirus.	Arch. Histol. Cytol.	66	209-220	2003
Aoki T., Watanabe Y., Terashima T.	Axonal branchings of callosal commissural neurons in the two neurological mutant mice, reeler and yotari.			(submitted)	
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)	