

厚生労働科学研究研究費補助金

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清水 輝夫

平成17(2005)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 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 ----- 1
清水 輝夫

II. 分担研究報告

1. フクチンとPOMGnT1との機能的連関と α ジストログリカノパチーの神経筋接合部異常について ----- 6
戸田 達史
2. 筋肉の発生におけるfukutinの役割 ----- 9
砂田 芳秀
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 ----- 12
遠藤 玉夫
4. 脳髄膜の形成におけるフクチンおよびリーリントンパクの機能的意義の解明 ----- 16
寺島 俊雄
5. 筋ジストロフィーの発病機序としてのdystroglycanのプロセッシング ----- 21
松村 喜一郎
6. Fukutin欠損キメラマウス脳組織における糖蛋白質糖鎖修飾パターンのレクチンプロットによる検討 ----- 24
千葉 厚郎

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 26

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

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

主任研究者 清水 輝夫 帝京大学医学部教授

研究要旨 α -Dystroglycan の O-mannose 型糖鎖の合成 4 段階のうち、第 2 段階 (GlcNAc \rightarrow Man 添加酵素=MEB の責任蛋白) の解明に続き、第 1 段階 (Man \rightarrow ser/thr 添加酵素活性) が生化学的・分子生物学的に解明され、酵母の pmt 遺伝子ホモログ POMT1 と POMT2 の遺伝子産物両者により活性が発現すること、POMT1 異常により POMT 活性が失われて WWS が発症すること、FCMD の責任蛋白 fukutin は糖添加活性はなくゴルジ体で POMT \rightarrow T1 に結合して第 2 段階酵素活性発現に関与するモデュレータの可能性があり、などが判明した。さらに、Glc 添加過程、シアール酸添加過程と fukutin 生理活性の最終確認、脳病態の解析、治療法開発を継続する。

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

α -Dystroglycan (α DG) の O-mannose 型糖鎖と細胞外 matrix (laminin) 結合に異常をきたす先天性筋ジストロフィー (α -dystroglycanopathy) の病態解明と治療法の開発のため、①筋膜蛋白 α -dystroglycan (α DG) の O-mannosyl glycan (Sia-Gal-GlcNAc-Man-Ser/Thr) の合成各段階の酵素の同定、②福山型先天性筋ジストロフィーの原因蛋白質 fukutin の生理機能の解明、③脳・末梢神経病態の解明、④治療法の開発を行う。

B. 研究方法

①O-mannosyl glycan 合成の各段階の酵素活性の生化学的測定法を確立する。②fukutin の生化学的糖転移活性を検討し、fukutin に結合する成分を解析する。③脳・末梢神経病態について、病理学および逆行性標識法にてフクチン欠損キメラマウスを検討する。④治療法に関連して、1) 薬物治療のため、Duchenne 型/肢帯型筋ジストロフィーの筋崩壊に関係する膜結合型 metalloproteinase 活性の関与とその阻害薬効果を検討する、2) 細胞治療のため、培養系でマウス正常 ES 細胞からの筋原細胞の確立をはかる。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日文科省・厚労省・経済省告示第 1 号)」、国立精神・神経センター倫理

規定を遵守し、各研究施設の定める倫理規定にもとづいた倫理委員会の承認を得るものとする。

C. 研究結果・考察

(1) O-mannosyl glycan 合成の第一段酵素 POMT(H16)、第二段酵素 POMGnT1(H15)を解明できた。

(2) ヒトを含む哺乳類の POMT 活性の生化学的測定法を確立した。ヒト α DG の mucin-like region である 316-488aa の合成ペプチドを基質に、dolichol-phosphate-D- 3 H]mannose を mannose donor に、酵母の時とは異なる detergent:n-octyl- β -D-thiogluco-side を加えて、種々のヒトを含む哺乳類材料(培養細胞、組織ホモジェネート)で、 α DG への mannose 添加活性を確認した。

(3) POMT 活性には POMT1/POMT2 の2つの成分が必要で、どちらか一方では活性はない。また、両者はゴルジ体でなく小胞体膜に局在する。

(4) Walker-Warburg 症候群 WWS で見つかった7種の POMT1 変異では、変異 POMT1 と POMT2 の共発現系での mannose 添加活性は完全に失われており、loss of function により発症していることが確認された。また POMT2 異常症は見つからなかった。

(5) POMT1/POMT2 のいずれかのノックダウン(ショウジョウバエ)で体壁筋形成に重篤な障害をきたす

(6) 従って、WWS の約10%は α DG の O-mannosyl glycan 合成の第一段階(mannose 添加)の障害であり、昨年度の結果から第二段階酵素 POMGnT1(GlcNAc 添加)の異常により MEB が発症することが判明した。

(7)FCMD の責任蛋白質 fukutin には O-mannosyl glycan 合成に係る糖添加活性はなく、N 端の 6-27aa の膜貫通ドメインを介して POMGnT1 と結合する Golgi 体膜蛋白質である。

(8) Y371C ミスセンス変異 fukutin は、Golgi ではなく小胞体に POMGnT1 とともに発現する。Fukutin は POMGnT1 の小胞体からゴルジ体への移動に関与するか、POMGnT1 を含む複数の結合体となって GlcNAc 添加過程に関与する可能性がある(継続検討事項)。

(9) 福山型の骨格筋は神経筋接合部の形成が幼若な段階にとどまり、 α DG の筋膜上の集簇が不良であり、後期筋発生の転写因子 myf 6、myosin heavy chain 2,7 の発現が低下している。そこに筋崩壊(筋ジス)が生じているが、それには他の筋ジスでみられる膜型 Metalloproteinase MMP による崩壊機序はない。従って、MMP 阻害薬による薬物治療の可能性はない。

(10) 福山型の大脳皮質構築異常について第1層のカハール・レチウス細胞、第5層の錐体路ニューロンが脳境界を越えて遊出している。

(11) dystrophy chicken が新しい α -dystroglycanopathy である(H15)。

(12) 正常のマウス ES 細胞(骨髄由来)を中胚葉へ分化・誘導し、一部で筋原細胞を作ること成功した。

D. 結論

α DG の O-mannosyl glycan 合成の第1、2段階の酵素(POMT1/2、POMGnT1)が解明され、fukutin は酵素そのものではなく、POMGnT1 に結合して第2段階酵素活性発現に関与する Golgi 体膜成分であった。先天性筋ジストロフィー(福山型、MEB、

WWS) の遺伝子・蛋白質解析、ノックダウン実験から、 α DG の O-mannosyl glycan は筋発生に決定的影響を持つことが結論された。従って、 α DG-laminin 結合能は筋発生に必須であり、先天性筋ジストロフィーは α -dystroglycanopathy であるとの作業仮説が裏付けされつつある。Fukutin 生理機能能の最終結論、O-mannosyl glycan 合成の第 3、4 段階の解明、脳・末梢神経病態の解明が待たれる。

E. 研究発表

1. Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin M-C, Gasser T, Kroeger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JPA, de Andrade M, Rocca WA, the UCHL1 Global Genetics Consortium. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 55:512-521, 2004
2. Popiel HA, Nagai Y, Onodera O, Inui T, Fujikake N, Urade Y, Strittmatter WJ, Burke JR, Ichikawa A, Toda T. Disruption of the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch leads to suppression of aggregate formation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 317:1200-1206, 2004
3. Akasaka-Manyo K, Manyo H, Kobayashi K, Toda T, Endo T. Structure-function analysis of human protein O-linked mannose 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1, POMGnT1. *Biochem Biophys Res Commun* 320:39-44, 2004
4. Longman C, Mercuri E, Cowan F, Allsop J, Brockington M, Jimenez-Mallebrera C, Kumar S, Rutherford M, Toda T, Muntoni F. Antenatal and postnatal brain magnetic resonance imaging in muscle-eye-brain disease. *Arch Neurol* 61:1301-1306, 2004
5. Kurahashi H, Inagaki H, Yamada K, Ohye T, Taniguchi M, Emanuel BS, Toda T. Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations. *J Biol Chem* 279:35377-35383, 2004
6. Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Hassin-Baer S, Lu CS, Ng AR, Rosales RL, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56:424-427, 2004
7. Ohtake H, Limprasert P, Fan Y, Onodera O, Kakita A, Takahashi H, Bonner LT, Tsuang DW, Murray IV, Lee VM, Trojanowski JQ, Ishikawa A, Idezuka J, Murata M, Toda T, Bird TD, Leverenz JB, Tsuji S, La Spada AR. b-synuclein gene alterations in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 63:805-811, 2004
8. Hatano Y, Sato K, Eibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng AR, Rosales RL, Hassin-Baer S, Shinar Y, Lu CS,

- Chang HC, Wu-Chou YH, Atac FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology* 63:1482-1485, 2004
9. Kariya S, Hirano M, Nagai Y, Furiya Y, Fujikake N, Toda T, Ueno S. Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches. *J Mol Neurosci* (in press)
10. Kurahashi H, Taniguchi M, Meno C, Taniguchi Y, Takeda S, Horie M, Otani H, Toda T. Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in fukutin-null mice. *Neurobiol Dis* (in press)
11. Endo T. O-Mannosylation. in *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. in press.* John Wiley & Sons, West Sussex, UK, 2005.
12. Akasaka-Manyu K., Manyu H., Endo T. Mutations of the *POMT1* gene found in patients with Walker-Warburg syndrome lead to a defect of protein O-mannosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325: 75-79, 2004
13. Endo T. Human genetic deficits in glycan formation. *Proc. Japan Acad.*, 80B: 128-139, 2004.
14. Endo T. Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconjugate J.*, 21: 3-7, 2004.
15. Ichimiya T., Manyu H., Ohmae Y., Yoshida H., Takahashi K., Ueda R., Endo T., Nishihara S. The twisted-abdomen phenotype of *Drosophila POMT1* and *POMT2* mutants coincides with their heterophilic protein O-mannosyltransferase activity. *J. Biol. Chem.*, 279: 42638-42647, 2004
16. Manyu H., Chiba A., Yoshida A., Wang X., Chiba Y., Jigami Y., Margolis RU., 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.
17. Sasaki T., Hirabayashi J., Manyu H., Kasai K., Endo T. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology*, 14: 357-363, 2004.
18. 遠藤玉夫: O-マンノース型糖鎖合成酵素とその異常による筋ジストロフィー. *実験医学*, 22(7): 934-939, 2004.
19. 萬谷博、遠藤玉夫 O-マンノース型糖鎖不全による先天性筋ジストロフィー. *蛋白質・核酸・酵素* 11月号増刊「神経糖鎖生物学」(編集:柳澤勝彦、遠藤玉夫、古川鋼一、大平敦彦) 49(15): 2451-2456, 2004.
20. Misaki K, Kikkawa S, and Terashima T, Reelin Expressing Neurons in the

- anterior commissure and corpus callosum of the rat, *Dev. Brain Res*, 148(1):89-96, 2004.
- 2 1. Inoue K, Terashima T, Nishikawa T, Takumi T. Fezl is layer-specifically expressed in the adult mouse neocortex. *Eur J Neurosci.*, 20(11):2909-16, 2004.
- 2 2. Tadano M, Edamatsu H, Minamisawa S, Yokoyama U, Ishikawa Y, Suzuki N, Saito H, Wu D, Masago-Toda M, Yamawaki-Kataoka Y, Setsu T, Terashima T, Maeda S, Satoh T, and Kataoka T: Congenital semilunar valvulogenesis defect in mice deficient in phospholipase C epsilon, *Moll Cell Biol*, (印刷中)
- 2 3. Katsuyama Y, Okada T, Matsumoto J, Ohtsuka Y, Terashima T, and Okamura Y: Early specification of ascidian larval motor neurons, *Develop Biol*, (印刷中)
- 2 4. 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.* 14: 158-161, 2004.
- 2 5. 松村喜一郎. 第16章, 筋疾患(16.5 先天性ミオパチー, 16.6代謝性ミオパチー), 豊倉康夫総編集, 神経内科学書, 第2版, 朝倉出版, 852-867, 2004.
- 2 6. 斉藤史明, 松村喜一郎, Campbell, K.P. 神経系におけるdystroglycanの機能: conditional knockout mouseの解析から何がわかったか。蛋白質核酸酵素 49: 2437-2444, 2004.
- 2 7. Matsumura, K., Zhong, D., Saito, F., Arai, K., Adachi, K., Kawai, H., Higuchi, I., Nishino, I. and Shimizu, T. Proteolysis of b-dystroglycan in muscular diseases. Submitted.
- 2 8. Saito, F., Blank, M., Schröder, J., Many, H., Shimizu, T., Campbell, K.P., Endo, T., Mizutani, M., Kröger, S., and Matsumura, K. Aberrant glycosylation of a-dystroglycan causes defective binding of laminin in the muscle of chicken muscular dystrophy. Submitted.

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

フクチンと POMGnT1 との機能的連関と α ジストログリカノパチーの神経筋接合部異常について

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 フクチンと muscle-eye-brain (MEB) 病原因糖転移酵素 POMGnT1 は、両者ともゴルジ体に局在し、フクチンの膜貫通領域を通して結合していることを示した。正常型フクチンの代わりに Y371C 変異フクチンと共発現させると、POMGnT1 の局在も小胞体へと変化した。フクチンには明らかな糖転位活性が検出されないことから、フクチンは POMGnT1 と複合体を形成し、活性を修飾していると考えられる。また cDNA マイクロアレイによる発現解析から、FCMD 及び myd の筋線維では、筋分化過程後期に発現する転写因子である myf6 や myosin heavy chain2, 7 の発現低下をきたし、また電顕的観察において、筋細胞の核及び筋線維の成熟障害を呈した。また神経筋接合部では免疫染色および電顕的観察において、著しい異常像を認め、 α -dystroglycan のクラスタリングも不良であった。FCMD だけでなく α -dystroglycanopathy の主要病態として、ジストロフィー以外に、新たに神経筋接合部障害による筋線維の成熟障害を提唱した。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー症 (FCMD) は II 型滑脳症及び眼奇形を伴う、日本で二番目に多い小児期の常染色体劣性遺伝性筋疾患である。我々はその原因遺伝子を 9q31 にマップし、ポジショナルクローニングにより同定してきた。責任遺伝子である fukutin は筋細胞膜上の α -dystroglycan (α -DG) の O-マンノース型糖鎖修飾に関与すると推定されている。また、さらに平成 13 年に、muscle-eye-brain (MEB) 病の原因遺伝子が protein O-linked mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (POMGnT1) 糖転移酵素遺伝子である事を、報告した。その遺伝子産物は O 型マンノースに特異的に GlucNAc を転移する糖転移酵素である。この一連の糖転移酵素に変異をもつ muscle-eye-brain (MEB) 病や、Walker-Warburg 症候群 (WWS) においても、FCMD 同様、 α -DG と筋基底膜間の結合性の低下をきたし、重度の先天性筋ジストロフィーを呈する。これらは類縁疾患とされ、 α -ジストログリカノパチー (α -dystroglycanopathy) と総称される。

本研究ではフクチンの構造と機能の解析、新たな病態の検索を行った。

B. 研究方法・研究結果

<フクチンの構造と機能の解析と MEB 病原因糖転

位酵素 POMGnT1 との連関に関する検討>

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たところ、現在のところ、フクチンには明らかな糖転位活性は認められていない。

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を観察したところ、フクチンはゴルジ体に局在し、フクチンの膜貫通領域にゴルジ体局在シグナルの存在が示唆された。一方 FCMD 患者で見られた Y371C ミスセンス変異体は小胞体に局在した。

POMGnT1 も同様にゴルジ体に局在した。さらに POMGnT1 とフクチンを共発現させると両者は共にゴルジ体に局在するが、正常型フクチンの代わりに Y371C 変異フクチンと共発現させると、POMGnT1 の局在も小胞体へと変化した。フクチンや POMGnT1 と同様に、 α -dystroglycan の糖鎖修飾に関わっているとされる Large では、Y371C ミスセンス変異フクチンを共発現させても局在の変化は観察されなかった。また免疫沈降法による実験では、フクチンと POMGnT1 は共沈した。この結合は two-hybrid 法でも確かめられた。フクチンの膜貫通領域のみを GFP と融合させた蛋白質を用いた実験でも、POMGnT1 の共沈が観察された。これらの結果から、フクチンと POMGnT1 は細胞

内において、膜貫通領域を通して結合していると考えられた。

<αジストログリカノパチーの神経筋接合部異常と筋分化遅延について>

FCMD 患者の骨格筋を NCNP で独自に開発された cDNA マイクロアレイにより発現解析を行い、また、α-dystroglycanopathy の一疾患である LARGE 変異モデルマウス (myd マウス) を用い、α-dystroglycanopathy における発現解析及び病態解析を行った。

FCMD 及び myd の筋線維では、筋分化過程後期に発現する転写因子である myf6 や myosin heavy chain2, 7 の発現低下をきたし、また電顕的観察において、筋細胞の核及び筋線維の成熟障害を呈した。また神経筋接合部では免疫染色および電顕的観察において、著しい異常像を認め、α-dystroglycan のクラスタリングも不良であった。これらのことより、神経筋接合部由来の筋分化シグナルが基底膜障害により不完全となり、筋線維の成熟障害を起こすことが、α-dystroglycanopathy の筋ジストロフィー以外の主要な病態生理である可能性が示唆された。

C. 考察

α-dystroglycanopathy の一連の原因遺伝子の中で、その活性がわかっているのは、POMGnT1 と POMT1 だけである。α-dystroglycan の糖鎖修飾に異常をきたす各 α-ジストログリカノパチーにおいて、コア蛋白質に対する抗体でみた α-dystroglycan はいずれも同程度の分子量を示し、またフクチンには α-dystroglycan と laminin の結合に関わる糖鎖に関して明らかな糖転位活性が検出されないことから、フクチンは POMGnT1 と複合体を形成し、POMGnT1 の活性を調節していると思われる。

またチップ解析から FCMD を含む α-dystroglycanopathy の筋病変は、単純な筋ジストロフィーだけでなく、神経筋接合部の異常による筋線維の成熟障害であると思われた。

D. 研究発表

1. Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin M-C, Gasser T, Kroeger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JPA, de Andrade M, Rocca WA, the UCHL1 Global Genetics Consortium. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann*

Neurol 55:512-521, 2004

2. Popiel HA, Nagai Y, Onodera O, Inui T, Fujikake N, Urade Y, Strittmatter WJ, Burke JR, Ichikawa A, Toda T. Disruption of the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch leads to suppression of aggregate formation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 317:1200-1206, 2004

3. Akasaka-Manyu K, Manyu H, Kobayashi K, Toda T, Endo T. Structure-function analysis of human protein O-linked mannanose β1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1, POMGnT1. *Biochem Biophys Res Commun* 320:39-44, 2004

4. Longman C, Mercuri E, Cowan F, Allsop J, Brockington M, Jimenez-Mallebrera C, Kumar S, Rutherford M, Toda T, Muntoni F. Antenatal and postnatal brain magnetic resonance imaging in muscle-eye-brain disease. *Arch Neurol* 61:1301-1306, 2004

5. Kurahashi H, Inagaki H, Yamada K, Ohye T, Taniguchi M, Emanuel BS, Toda T. Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations. *J Biol Chem* 279:35377-35383, 2004

6. Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Hassin-Baer S, Lu CS, Ng AR, Rosales RL, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56:424-427, 2004

7. Ohtake H, Limprasert P, Fan Y, Onodera O, Kakita A, Takahashi H, Bonner LT, Tsuang DW, Murray IV, Lee VM, Trojanowski JQ, Ishikawa A, Idezuka J, Murata M, Toda T, Bird TD, Leverenz JB, Tsuji S, La Spada AR. β-synuclein gene alterations in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 63:805-811, 2004

8. Hatano Y, Sato K, Eibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng AR, Rosales RL, Hassin-Baer S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu-Chou YH, Atac FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology* 63:1482-1485, 2004

9. Kariya S, Hirano M, Nagai Y, Furiya Y, Fujikake N, Toda T, Ueno S. Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches. *J Mol Neurosci* (in press)

10. Kurahashi H, Taniguchi M, Meno C, Taniguchi

Y, Takeda S, Horie M, Otani H, Toda T. Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in fukutin-null mice. *Neurobiol Dis* (in press)

筋肉の発生における fukutin の役割

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:Fukutin (フクチン)の機能は未だに解明されていないが、福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD)の臨床像やホモ欠損マウスの観察から、発生過程において何らかの重要な機能を果たしていることが推測される。我々はこの fukutinの発生、特に筋肉の発生過程における役割を知るために、ES細胞を用いた系での検討を行っている。すなわち、正常およびフクチン欠損ES細胞をそれぞれ筋肉へと分化誘導させ、その過程を比較検討することによって、fukutinが筋発生のどの過程にどのように関与しているか解明することを目指している。本年度はまず正常の ES細胞を用いてそれを筋肉へと分化誘導させることが可能かどうか検討を行い、その中に一部ではあるが筋原細胞の性質を持つ細胞を見出した。

A. 研究目的

Fukutinの機能は未だに解明されていない。類縁分子との検討からは、筋膜の構成分子である α -ジストログリカンの糖鎖の付加に関わっているものと考えられている。一方、福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD)においては、骨格筋基底膜の脆弱性に加えて、脳表の神経細胞の移動を阻止する機構や、眼の網膜境界の形成に異常が見出されており、何らかの発生過程での異常が推測されている。

哺乳類では受精卵から胞胚へと分化した後、原腸胚形成の際、胞胚を形成する上皮組織の一定領域から離脱した予定中胚葉細胞が胚の内部に入り込み、予定外胚葉と予定内胚葉の間を移動して中胚葉を形成する。この時期、最も腹側の中胚葉細胞群を側板中胚葉 (Lateral mesoderm)と呼ぶが、これらは主に将来、血管、血液細胞へと分化する。一方、筋肉、骨、軟骨へと分化する中胚葉系細胞は背側軸のすぐ近傍の両側に存在し、沿軸中胚葉 (Paraxial mesoderm)と呼ばれている。

Fukutinのホモ欠損マウスは胎生致死である

が、その時期 (マウス embryoのDay 6.5-7.5) はまさしくこれら一連の発生過程が起こる時期に相当する。

これら臨床像や、fukutin ホモ欠損マウスの観察結果を合わせて考えると、fukutin は発生過程において何らかの重要な役割を果たしていると予想される。

我々はこの fukutinの発生、特に筋肉の発生過程における役割を知るために、以下の実験系を用いて解析を行っている。上述のように

Fukutinのホモ欠損マウスは胎生致死であるため、我々はキメラマウスよりホモ欠損 ES細胞を単離した。このフクチン欠損ES細胞および正常ES細胞をそれぞれ筋肉へと分化誘導させ、その過程を比較検討することによって、fukutinが筋発生のどの過程にどのように関与しているか解明することを目指している。本年度はまず第1段階として、正常の ES細胞を用いてそれより中胚葉系細胞を分離し、さらにそれを筋肉へと分化誘導させることが可能かどうか検討を行った。

B. 研究方法

1) 中胚葉系幹細胞の同定、分離

我々は理化学研究所と協同研究で、*In vitro* で ES 細胞を分化させるシステムを用いて、中胚葉系幹細胞を可視化、同定し、その分離を試みた。マウス embryo の Day7.5 では Platelet derived growth factor receptor (PDGFR)が沿軸中胚葉に、また Fetal liver kinase 1 (FLK1)が側板中胚葉に特異的に発現することが判明している。したがって、これらの細胞表面マーカーの組み合わせは、分化した正常 ES 細胞から中胚葉系の細胞を分離するうえで有用であることが予想される。そこで、これらを認識するモノクローナル抗体を用いて中胚葉系細胞の分離、純化を試みた。

2) 筋細胞への誘導

上記方法にて分離した中胚葉系細胞のうち沿軸中胚葉細胞を選別した上で筋細胞に至適な条件で培養を継続し、筋原細胞へ誘導されるか検討した。

C. 研究結果

1) 沿軸中胚葉に特異的に発現する分子が PDGFR陽性、FLK1陰性分画特異的に発現し、側板中胚葉特異的に発現する分子が FLK1陽性分画に特異的に発現していた。この結果は、*in vivo*での mesoderm cellのこれらの分子の発現パターンに極めて類似していた。

2) 上記にて分離した沿軸中胚葉細胞を選別しさらに筋細胞に至適な条件で培養を継続したところ、その中に一部ではあるが筋原細胞の性質を持つ細胞を見出した。

D. 考察

正常 ES 細胞から特異的マーカーを用いて中胚葉系細胞を分離し、一部ではあるが筋細胞へ分化誘導させることが可能であった。

来年度は fukutin 欠損 ES 細胞において、正常 ES 細胞同様分化誘導を試みる予定である。まず中胚葉まで分化するかどうか、正常との比較検討を行う。もし分離あるいは分化誘導の過程で何らかの異常が見られた場合、fukutin が筋肉への分化の過程において重要な役割を担っていることの明確な裏付けになると考えられる。

またこの fukutin 欠損 ES 細胞に外来の糖鎖付加に関わる遺伝子を導入し、fukutin の機能が代償されるかどうかにも検討を行いたい。

E. 結論

正常の ES細胞を中胚葉へ分化誘導し、細胞表面マーカーを用いて沿軸中胚葉細胞と側板中胚葉細胞を同定した。そのうち沿軸中胚葉細胞を選別し培養を継続し、その中に一部ではあるが筋原細胞を見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. 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. *Hum Mol Genet.* 2003;12(12):1449-59.

2. 学会発表

1) 砂田芳秀、萩原宏毅、大澤裕、西真寿美、泰江章博、野地澄晴、篠野静香、森弥生、村上龍文. Myostatin prodomain 発現トランスジェニックマウスの解析. 平成 16 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 3 日, 2004

2) 砂田芳秀、大澤裕、萩原宏毅、土田邦博、野地澄晴、武田伸一、篠野静香、森弥生、村上龍文. Myostatin prodomain による変異 caveolin-3 トランスジェニックマウス表現型改善. 平成 16 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 3 日, 2004

3) Skeletal muscle hyperplasia in the transgenic mice overexpressing the myostatin prodomain. Hagiwara H, Ohsawa Y, Sasano S, Nishi M, Yasue A, Noji S, Sunada Y. *Neuromuscular Disorders* 14(8-9):610, 2004 (9th International Congress of the World

Muscle Society)

4) Restoration of a myopathic phenotype of mutant caveolin-3 transgenic mice by crossing with mutant myostatin transgenic mice. Ohsawa Y, Hagiwara H, Sasano S, Nishi N, Yasue A, Noji S, Sunada Y. *Neuromuscular Disorders* 14(8-9):610, 2004 (9th International Congress of the World Muscle Society)

5) 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ーパイグリカン. 萩原宏毅, 砂田芳秀. 第 45 回日本神経学会総会, 東京, 5 月 14 日, 2004

H. 知的財産権の出願・登録情報

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は*O*-mannose型糖鎖と呼ばれる特殊な糖鎖を有する。*O*-mannose型糖鎖の合成に関わる酵素遺伝子 *POMGnT1* と *POMT1* はそれぞれ先天性筋ジストロフィー症の muscle-eye-brain 病 (MEB) と Walker-Warburg syndrome (WWS) の原因遺伝子であることから、*O*-mannose型糖鎖の機能を解析することにより、先天性筋ジストロフィーの病態解明への重要な知見が得られることが期待される。本年度は、WWS 発症における *O*-mannose型糖鎖の関与を明らかにする目的で、WWS 患者からみいだされた *POMT1* 遺伝子の変異による酵素活性への影響を検討した。この結果、調べた全ての変異 *POMT1* は酵素活性を失っていたことから、WWS が糖転移酵素 *POMT1* の機能喪失による *O*-mannose型糖鎖不全疾患であることが明らかとなった。また、MEB でみいだされた *POMGnT1* 遺伝子の 13 種の変異のうち 2 種において、*POMGnT1* を膜結合型から可溶性に換えることで、酵素活性が回復されることを明らかにした。この発見は MEB の治療法開発への新たな可能性を示すものである。さらに、ショウジョウバエの *POMT* ホモログにヒトと同様の *O*-mannose 転移酵素活性があることを示した。また、RNAi によりショウジョウバエの *POMT* の発現を抑制すると、筋形成に異常が生じることを見いだした。これらの結果は、脊椎動物と無脊椎動物を問わず筋形成において *O*-mannose 型糖鎖が重要であることを示している。

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 (Siac2 \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。また、哺乳類の *O*-mannose 型糖鎖生合成の最初の反応を担う、*O*-mannose 転移酵素の活性測定法を確立し、MEB の類縁疾患である Walker-Warburg syndrome (WWS) の原因遺伝子 *POMT1* が *O*-mannose 転移酵素であることを明らかにした。これらの発見は、糖鎖異常が筋ジストロフィーや滑脳症の発症に関与することを示すものである。したがって、*O*-mannose 型糖鎖および糖鎖修飾酵素の神経や筋組織の発生や機能における機能を解析することによって、筋ジストロフィーの病態解明のための重要な知見が得られることが期待される。

そこで本年度は、糖鎖修飾酵素遺伝子の変異によ

る筋ジストロフィーの発症と *O*-mannose 型糖鎖の関係をより詳細に明らかにするため、(1) これまでに WWS 患者から検出されている *POMT1* 遺伝子の変異による *O*-mannose 転移活性への影響の解析と、(2) *POMGnT1* 蛋白質のドメイン構造解析による触媒活性領域の決定、を行った。また、筋発生における *O*-mannose 型糖鎖の機能を解析する一つの手段として、(3) 近年、遺伝子の機能解析研究によく利用されているショウジョウバエを用いて、*O*-mannose 転移酵素の解析を行った。

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) WWS 患者から検出された *POMT1* 遺伝子の変異による酵素活性への影響の解析。WWS 患者の遺伝子解析からこれまでに 7 種の変異が見つかった。このうち 2 種は酵素タンパク質の大部分が欠失するため活性はないと考えられることから、残り 5 種について各変異を導入した変異型 *POMT1* cDNA を作製した。我々はこれまでに哺乳類における *O*-mannose 転移活性の発現には *POMT1* と *POMT2* が共発現する必要があることを示している。そこで、HEK293T 細胞に各変異型 *POMT1* と *POMT2* を共発現させ、酵素活性を測定した。

(2) *POMGnT1* の触媒活性領域の決定。N 末端から、246、273、299 アミノ酸、及び C 末端側から 9、19、27 アミノ酸を削った *POMGnT1* を HEK293T 細胞に発現させ、酵素活性を測定することにより触媒活性に必要な領

域を決定した。

(3) ショウジョウバエの POMT ホモログの解析。
ショウジョウバエにも哺乳類の POMT1 と POMT2 に相当する 2 つの POMT ホモログ、dPOMT1 と dPOMT2 が存在する。そこで、これらのホモログも哺乳類と同様に *O*-mannose 転移酵素であるのか、バキュロウイルス発現系により、dPOMT1 と dPOMT2 を Sf21 細胞に発現させて酵素活性を調べた。さらに、RNAi により dPOMT1 と dPOMT2 の発現をそれぞれ抑制したショウジョウバエを作製し、発生への影響を調べた。

C. 研究結果

我々はこれまでに、哺乳類の *O*-mannose 転移酵素活性を測定する方法を確立し、WWS の原因遺伝子産物である POMT1 が POMT2 との共発現で *O*-mannose 転移酵素として機能することを明らかにしている。そこで、WWS 患者から検出されている *POMT1* 遺伝子の変異による酵素活性への影響を調べた。その結果、調べた全ての変異体はいずれも活性を失っていることが明らかとなった。

MEB からはこれまでに *POMGnT1* 遺伝子の変異が 13 種検出されている。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、*POMGnT1* 遺伝子全体に散在していた。そこで、これらの変異が酵素活性を消失させる機構について検討するため、N 末端及び C 末端側からアミノ酸を削った POMGnT1 を作製し触媒活性領域を決定した。その結果、N 末端から 298 アミノ酸を削っても活性には影響がなかったが、311 アミノ酸を削ると完全に活性を消失した。一方、C 末端は 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失った。以上の結果、353 アミノ酸から構成される領域によって触媒活性は担われていることが明らかになった。この結果から、MEB の変異のうち 2 例は、触媒領域ではない幹領域の 1 アミノ酸置換であることがわかった。さらに、この 2 つの変異体の膜貫通領域を除いて発現させたところ、酵素活性が回復することを見いだした。

ショウジョウバエにも 2 つの *POMT* ホモログ、dPOMT1 と dPOMT2 が報告されている。そこで、これらのホモログにもヒトと同様の機能があるか調べた。その結果、ヒトの *POMT* と同様に、それぞれの単独発現では活性は全く検出されないが、共発現によって、*O*-mannose 転移活性が顕著に上昇することを明らかにした。さらに、RNAi によって dPOMT1 と dPOMT2 の発現をそれぞれ抑制すると、幼虫の *O*-mannose 転移活性が低下することが確認された。そこで、RNAi により *O*-mannose 転移活性を低下させた状態における発生過程を観察した結果、筋形成がうまくできず体がねじれてしまうことを明らかにした。これらの結果は、脊椎動物と無脊椎動物を問わず筋形成における *O*-mannose 型糖鎖の重要性を示し

ている。

D. 考察

WWS 患者よりみいだされた *POMT1* の変異体は、いずれも活性を消失していたことから、*POMT1* 遺伝子に変異を持つ WWS 患者の組織では *O*-mannose 型糖鎖が合成されないことが示唆された。したがって、WWS の原因は *O*-mannose 転移機能の喪失による *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示された。*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。

POMGnT1 の触媒領域の決定により、これまでに MEB 患者で見つかった変異のうち 2 例は、触媒活性の発現には必要ない領域の 1 アミノ酸置換であることが分かった。*POMGnT1* は本来膜結合型蛋白質であるが、今回の解析で、これら 2 例の変異体は膜結合領域を除いて可溶型として発現させると、酵素活性が回復することが明らかとなった。これらの変異は幹領域を含めた全体の立体構造を変化させることによって酵素活性を阻害することが考えられた。この結果は、これらの変異を起因とする MEB において、*POMGnT1* を膜から切り離すことによって、酵素活性を回復させ、正常な糖鎖修飾を誘導する新たな治療法の可能性を示している。

ショウジョウバエの 2 つの *POMT* ホモログも *O*-mannose 転移酵素であり、ヒトの場合と同様に *POMT* 活性発現には両ホモログの共存が必要であることが明らかとなった。このことから、*O*-mannose 型糖鎖がショウジョウバエにも存在し、筋形成に関与していることが示された。ショウジョウバエにも α -dystroglycan のホモログが存在することから、*O*-mannose 型糖鎖修飾の標的分子となっていることが予想される。以上より、筋組織や神経の発生において、ショウジョウバエとヒトに α -dystroglycan を介した共通のメカニズムが存在する可能性が考えられる。

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 WWS は、*O*-mannose 転移酵素の機能喪失による *O*-mannose 型糖鎖不全疾患であることを明らかにした。また、*POMGnT1* の触媒活性領域を決定し、触媒領域の外に位置する 2 例の変異は、立体構造を変化させることによって酵素活性を阻害する変異であることを示した。さらにショウジョウバエの *POMT* ホモログが *O*-mannose 転移酵素として機能していることを明らかにし、RNAi の解析から、*O*-mannose

型糖鎖が脊椎動物と無脊椎動物を問わず筋形成において重要な役割を担っていることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tamao Endo: *O*-Mannosylation. in *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. in press.* John Wiley & Sons, West Sussex, UK, 2005.

Keiko Akasaka-Manyu, Hiroshi Manyu, Tamao Endo: Mutations of the *POMT1* gene found in patients with Walker-Warburg syndrome lead to a defect of protein *O*-mannosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 75-79, 2004

Tamao Endo: Human genetic deficits in glycan formation. *Proc. Japan Acad.*, 80B, 128-139, 2004.

Tamao Endo: Structure, function and pathology of *O*-mannosyl glycans. *Glycoconjugate J.*, 21, 3-7, 2004.

Tomomi Ichimiya, Hiroshi Manyu, Yoshiko Ohmae, Hideki Yoshida, Kuniaki Takahashi, Ryu Ueda, Tamao Endo, Shoko Nishihara: The twisted-abdomen phenotype of *Drosophila POMT1* and *POMT2* mutants coincides with their heterophilic protein *O*-mannosyltransferase activity. *J. Biol. Chem.*, 279, 42638-42647, 2004

Keiko Akasaka-Manyu, Hiroshi Manyu, Kazuhiro Kobayashi, Tatsushi Toda, Tamao Endo: Structure-function analysis of human protein *O*-linked mannose β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase 1, *POMGnT1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 39-44, 2004

Hiroshi Manyu, Atsuro Chiba, Aruto Yoshida, Xiaohui Wang, Yasunori Chiba, Yoshiro Jigami, Richard U Margolis, Tamao Endo: 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.

Tasuku Sasaki, Jun Hirabayashi, Hiroshi Manyu, Ken-ichi Kasai, Tamao Endo: Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology*, 14, 357-363, 2004.

遠藤玉夫: *O*-マンノース型糖鎖合成酵素とその異常による筋ジストロフィー. 実験医学, 22(7),

934-939, 2004.

萬谷博、遠藤玉夫: *O*-マンノース型糖鎖不全による先天性筋ジストロフィー. 蛋白質・核酸・酵素 11月号増刊「神経糖鎖生物学」(編集:柳澤勝彦、遠藤玉夫、古川綱一、大平敦彦) 49(15), 2451-2456, 2004.

2. 学会発表

Tamao Endo: *O*-mannosylation in yeast and mammals Dystroglycan glycosylation and structure function-relationship Walker Warburg syndrome and *POMT1*. 9th INTERNATIONAL CMD WORKSHOP, Nardeen, Amsterdam, the Netherlands, 2005.1.21-23

Tamao Endo: Genotype-phenotype correlation and *POMT1* enzymatic function. . 9th INTERNATIONAL CMD WORKSHOP, Nardeen, Amsterdam, the Netherlands, 2005.1.21-23

遠藤玉夫: Protein *O*-mannosylation and its pathology. 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 2004.12.8-11

一宮 智美、萬谷 博、大前佳子、吉田英樹、上田 龍、遠藤玉夫、西原祥子: ショウジョウバエ *O*-マンノース転移酵素 (*POMT*:protein *O*-mannosyltransferase) の RNAi knock down 体を用いた機能解析. 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 2004.12.8-11

Tomomi Ichimiya, Hiroshi Manyu, Yoshiko Ohmae, Hideki Yoshida, Ryu Ueda, Tamao Endo, Shoko Nishihara: The functional analysis of *Drosophila* protein *O*-mannosyltransferases using RNAi mutant flies. US/Japan Glyco 2004 Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, Honolulu, Hawaii, 2004.11.17-20

Tamao Endo: Protein *O*-mannosylation and its pathology. US/Japan Glyco 2004 Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, Honolulu, Hawaii, 2004.11.17-20

Xiong Hui, Kazuhiro Kobayashi, Masaji Tachikawa, Nobuhiro Fujikake, Yoshitaka Nagai, Hiroshi Manyu, Tamao Endo, Tatsushi Toda: Fukutin and dystroglycanopathy. International Symposium Organized by Japanese Muscular Dystrophy Research Group, Molecular Therapy of Muscular Dystrophy / Part II, Tokyo, 2004.11. 12-13

Tamao Endo: Protein O-mannosylation and congenital muscular dystrophy, 4th International Symposium on Glycosyltransferases GlycoT2004, Le Touquet, France, 2004.11.4-7

遠藤玉夫、千葉厚郎、地神芳文、戸田達史、萬谷博: タンパク質の O-マンノシル化異常による先天性筋ジストロフィー. 第 77 回日本生化学会, 東京, 2004.10.13-16

遠藤玉夫、赤阪啓子、萬谷博、小林千浩、戸田達史: O-マンノース型糖鎖特異的に働く GlcNAc 転移酵素、POMGnT1 の構造と機能解析. 第 77 回日本生化学会, 東京, 2004.10.13-16

一宮智美、萬谷博、大前佳子、吉田英樹、上田龍、遠藤玉夫、西原祥子: ショウジョウバエ O-マンノース転移酵素の RNAi 変異体の解析. 第 77 回日本生化学会, 東京, 2004.10.13-16

萬谷博、千葉厚郎、吉田有人、Xiaohui Wang、千葉靖典、地神芳文、Richard U. Margolis、遠藤玉夫: 先天性筋ジストロフィー症原因遺伝子 *POMT1* による O-マンノース型糖鎖生合成機構. 第 77 回日本生化学会, 東京, 2004.10.13-16

遠藤玉夫: 糖鎖異常による先天性筋ジストロフィー. 第 2 回糖鎖科学コンソーシアム (JCGG) シンポジウム, 東京, 2004.8.25

Tamao Endo, Atsuro Chiba, Yoshiro Jigami, Tatsushi Toda, Hiroshi Many: Defective protein O-mannosylation in muscular dystrophy. HGPI Workshop: Functional Glycomics in Disease, 大阪, 2004.8.23-24

赤阪啓子、萬谷博、小林千浩、戸田達史、遠藤玉夫: 先天性筋ジストロフィー原因遺伝子糖転移酵素 POMGnT1 の機能ドメインの解析. 第 9 回 FCCA 若手フォーラム, 東京, 2004.7.9-10

遠藤玉夫: 糖鎖修飾異常による先天性筋ジストロフィー. 平成 16 年度生理研究所研究会 糖鎖病態研究会, 岡崎, 2004.7.8-9

千葉厚郎、萬谷博、吉田有人、Xiaohui Wang、千葉靖典、地神芳文、Richard U Margolis、遠藤玉夫: Walker-Warburg syndrome 原因遺伝子 *POMT1* の遺伝子産物は O-マンノース転移酵素である. 第 45 回日本神経学会総会, 東京, 2004.5.11-14

G. 知的所有権の取得状況
該当致しません。

厚生労働科学研究費補助金 分担研究報告書

脳髄膜の形成におけるフクチンおよびリーリントシン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

今回、我々はフクチン欠損キメラマウスの大脳皮質の層形成を神経回路標識法およびリーリン、ラミニンの抗体を用いた免疫組織化学法により検討した。生後2ヶ月例の正常およびキメラマウスの脊髄にファーストブルー（Fast Blue）を注入し、逆行性に皮質脊髄路ニューロンをファーストブルーにて蛍光標識し、同一切片をラミニン免疫染色した。正常動物では標識ニューロンは皮質第5層に限局したが、キメラマウスでは、局所的に標識ニューロンが異所性に分布した。ファーストブルーの観察に用いた切片をラミニン免疫染色すると、異所性皮質脊髄路ニューロンの分布領域に一致して、ラミニン陽性の軟膜・グリア性境界膜が細断し、細かな免疫陽性産物がニューロピルに分布していることが明らかとなった。ついで我々は、コムギ胚ワサビ過酸化酵素（WGA-HRP）を視床外側腹側核に注入し、皮質視床路ニューロンを逆行性に標識したところ、標識ニューロンは、正常マウスでは皮質の第6層を占めていたが、キメラマウスでは一部の皮質においてその全層に異所性に分布していた。さらに胎齢15日胚の正常およびキメラマウスの大脳皮質を用いてリーリン免疫染色をしたところ、正常マウスでは皮質第1層のカハール・レチウス細胞がリーリン免疫陽性であったが、キメラマウスではリーリン陽性のカハール・レチウス細胞が軟膜外に遊出し、しかもラミニン染色により、同部位の軟膜グリア性境界膜が分断していた。今回、我々はフクチン欠損キメラマウスの皮質第1層、第5層、第6層ニューロンの分布を逆行性標識法、免疫組織化学法により検討し、軟膜・グリア性境界膜異常の部位と一致して、異所性ニューロンがあることを証明した。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィーは常染色体劣性遺伝性の疾患で、新生児期や乳児期早期より全身の筋力低下と筋緊張低下（floppy infant）を発症する。戸田らによりその原因遺伝子が発見され、その遺伝子産物（タンパク質）はフクチン Fukutin と名付けられた。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とより、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と思われる。我々は、フクチンの細胞生物学的な機能を明らかにする目的で、フクチンキメラマウスを作成した。本年度は、フクチン欠損マウスの大脳皮質の層構造異常と髄膜の破綻について、逆行性神経回路標識法

と抗ラミニン抗体および抗リーリン抗体を用いた免疫組織化学法により検討した。

B. 研究方法

1 逆行性神経回路標識法と抗ラミニン免疫染色

皮質脊髄路ニューロンの分布を調べるために、6~8週令の正常マウスとフクチン欠損キメラマウスの脊髄にファーストブルー (Fast Blue, FB) を注入した。3ないし5日後に4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、完全連続凍結切片を作成した。切片を1枚おきにスライドガラスにマウントし、UV励起にて標識ニューロンを観察した。良好な蛍光標識が得られた場合、隣接切片をラミニン一次抗体に浸漬し、Cy3結合二次抗体に浸漬して蛍光観察した。次に皮質視床路ニューロンの分布を調べるために、正常及びキメラマウスの視床外側腹側核にWGA-HRPを微量注入した。注入後2日間に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し、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. 抗リーリン免疫染色と抗ラミニン免疫染色

胎齢15日令の正常およびフクチンキメラマウス胚を母親マウスより取り出し、4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定してクリオスタット切片を作成した。同一切片

をラミニン一次抗体 (マウスモノクローナル) とリーリン一次抗体 (ラビットポリクローナル) に浸漬し、二次抗体 (Cy3結合抗マウスIgG、FITC結合抗ラビットIgG) に浸漬して、オリンパス蛍光顕微鏡あるいはツアイス共焦点顕微鏡にて観察した。

(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. 異所性皮質脊髄路ニューロンと髄膜破綻

生後2ヶ月令の正常マウスの脊髄にFB注入後、逆行性に標識されるニューロンすなわち皮質脊髄路ニューロンは運動性皮質の第5層に限局していた。同様の注入をキメラマウスに行うと、大部分の運動性皮質においてその第5層に標識ニューロンが分布したが、ごく一部の領域において標識ニューロンが異所性に分布した。同一切片をラミニン免疫染色すると、異所性皮質脊髄路ニューロンが存在する部位のラミニンは細かく細断されていた。このような細断されたラミニン免疫陽性産物の外側 (クモ膜下腔側) にファーストブルーで標識された皮質脊髄路ニューロンが分布していた。

2. 異所性皮質視床路ニューロン

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。

3. 異所性カハール・レチウスニューロン

胎生 15 日令の正常マウス大脳皮質の抗リーリン免疫染色により、皮質第 1 層のカハール・レチウス細胞が強く染色された。同様にキメラマウス 15 日令胚大脳皮質のリーリン免疫染色により、ごく一部のカハール・レチウス細胞が髄膜外に異所性に分布していた。さらに同一切片をラミニン染色すると、異所性カハール・レチウスニューロンの分布する領域に一致して、ラミニン免疫陽性の軟膜・グリア性境界膜が細断されていた。

D. 考察

武田らは、フクチン欠損キメラマウスの皮質脊髄路ニューロンが異所性分布に分布することをワサビ過酸化酵素の逆行性軸索輸送法により証明した (Takeda et al., *Human Mol Genetics*, 12: 1449-59, 2003)。今回、我々は、ワサビ過酸化酵素のかわりに蛍光色素のファーストブルーをトレーサーとして選択し、さらにラミニン免疫染色との二重蛍光染色を行うことにより、フクチン欠損キメラマウスの髄膜の構築と異所性皮質脊髄路ニューロンの相互関係を直接的に調べた。その結果、髄膜の破綻部位に一致してファーストブルーで逆行性に標識された皮質脊髄路ニューロンが異所性に分布していることを証明できた。

それでは皮質の他の層を構成するニューロンはどうであろうか。まず、我々は高感度トレーサーである WGA-HRP を視床外側腹側核に注入し、皮質第 6 層を占める皮質視床路ニューロンを逆行性に標識することを試みた。その結果、キメラ動物では層構造が乱れている領域で、皮質の全層に標識ニューロンが分布していた。つまり、皮質第 5 層ニューロンと同様に皮質第 6 層ニューロンも異所性に分布していることが判明した。

大脳皮質は表層の第 1 層は線維層であるが、ごく少数のニューロン成分がある。これをカハール・レチウス細胞という。カハール・レチウス細胞はおよそ百年前にカハールとレチウスが独立して発見した細胞であるが、その機能は長く不明であった。一方、リーラーマウスは 1951 年に発見された常染色体劣性遺伝性の神経奇形マウスである。長い間、その原因遺伝子は不明であったが、1995 年にリーラー変異の原因遺伝子リーリンが単離された。リーリンがコードするリーリントタンパクはカハール・レチウス細胞が分泌する巨大なタンパクで、これを欠損すると大脳皮質の層構造が逆転する。今回、我々は皮質第 1 層の構成ニューロンであるカハール・レチウス細胞の分布をキメラマウス 15 日令の胚を用いて抗リーリン免疫染色により調べたところ、リーリン陽性カハール・レチウスニューロンが髄膜外に分布している像を得た。しかもこのような領域の髄膜はラミニン染色により破綻していることが証明された。