

200500768A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

$\alpha$ -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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清水 輝夫

平成18(2006)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

$\alpha$ -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

1. 福山型筋ジストロフィー創始者レトロポゾン挿入変異ノックインマウスの作製と解析

戸田 達史 ----- 6

2. 福山型先天性筋ジストロフィーに対する骨髄移植法の効果の検討

砂田 芳秀 ----- 9

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 ----- 13

4. 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

寺島 俊雄 ----- 17

5. Dystroglycanの異常による神経筋細胞機能障害の解析

松村 喜一郎 ----- 22

6. Protein O-mannosyl transferase (POMT) 遺伝子の脳組織内発現の検討

千葉 厚郎 ----- 25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

**$\alpha$ -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・教授

研究要旨

$\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$  DG) の O-mannose 型糖鎖の先天性形成不全が推定される先天性筋ジストロフィー群、特に本邦独特の福山型先天性筋ジストロフィーFCMD、フィンランドにみられる Muscle-eye-brain 病 MEB、および Walker-Warburg 症候群 WWS の分子病態解明と治療法の開発を行った。その結果、筋基底層蛋白 laminin  $\alpha$  2 に結合する成分である  $\alpha$  DG の O-mannosyl glycan (Sia  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-2Man  $\alpha$  1-0 Ser/Thr) の合成過程の障害で当該 3 疾患が発症することを確立した。即ち、①当該 3 疾患筋は、抗 $\alpha$ DG 糖鎖抗体の染色性不良、抗 $\alpha$ DG コア蛋白質抗体の染色性良好、オーバーレイアッセイでの  $\alpha$  DG・ラミニン結合不良の 3 特徴を共通してもつ。②第 2 段階 GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 2Man  $\alpha$  1-0 Ser/Thr の転移酵素 POMGnT1 (1p33-34) の遺伝子の点変異や小欠失により POMGnT1 活性が完全消失して MEB が発する、③第 1 段階糖転移酵素活性 POMT (Man  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 0 Ser/Thr) は 2 つの成分 POMT1/2 の複合体として機能し、dolchol-phosphate、mannose の存在下で酵素活性が確認された。POMT1 (9q34.1) と POMT2 (14q24.3) それぞれの点変異や小欠失により POMT 活性が完全消失して WWS (約 1 割) が発症する、④FCMD (9q31) の責任蛋白質 fukutin には、POMGnT1 に類似して N 端に膜貫通ドメインと幹領域、C 端に DxD motif をもつ糖転移酵素類似ドメインがあるが糖転移酵素活性はなく、N 端の膜貫通ドメインを介して POMGnT1 と結合するゴルジ体膜蛋白質であり、POMGnT1 活性の modulator と推量される、⑤  $\alpha$  DG の O-mannosyl glycan 合成の第 3 段階 (Gal  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcNAc  $\beta$  1-2Man  $\alpha$  1-0 Ser/Thr)、4 段階 (Sia  $\alpha$  2 $\rightarrow$ 3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-2Man  $\alpha$  1-0 Ser/Thr) の酵素活性の異常をきたす疾患はみつからない。⑥  $\alpha$  DG の O-mannosyl glycan 異常によるラミニン結合不全は当該 3 疾患の骨格筋以外に、末梢神経系（基底層と Schwann 細胞の髄鞘最外側膜の間）、脳表（基底層と脳表アストログリア限界膜の間）にもあてはまる。⑦ RNAi の実験から、この糖鎖形成を障害すると体壁骨格筋の形成障害がショウジョウバエでも再現され、この糖鎖は骨格筋発生に必須の成分である、⑧治療面で、 $\beta$  DG 分解系として matrix metalloproteinase type 2 & 9 が同定され、この分解系は Duchenne 型および肢帯型筋ジストロフィー-sarcoglycanopathy にて特異的に亢進する。しかし FCMD では非亢進であり FCMD の治療には応用できない。FCMD など基底膜が損傷する疾患には、むしろ骨髄移植による幹細胞導入の方が有望である、などが結論された。類似疾患 FKRП 異常症、Large 異常症と dystrophy chicken、およびこれらの治療法は今後に残された。

分担研究者

戸田達史 大阪大学大学院医学系研究科

砂田芳秀 川崎医科大学医学部

遠藤玉夫 (財) 東京都高齢者研究・福祉振興財団・  
東京都老人総合研究所

寺島俊雄 神戸大学大学院医学系研究科

松村喜一郎 帝京大学医学部

千葉厚郎 杏林大学医学部

A. 研究目的

$\alpha$ -Dystroglycan ( $\alpha$  DG) 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群 ( $\alpha$ -dystroglycanopathy; 日本独特の福山型先天性筋ジストロフィーFCMD、フィンランドにみられる Muscle-eye-brain 病 MEB、Walker-Warburg 症候群 WWS など) の分子病態解明と治療法の開発のため、

①  $\alpha$  DG の 0-mannosyl glycan (Sia  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-2Man  $\alpha$  1-0 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

① 0-mannosyl glycan 合成の各段階の酵素の遺伝子解析と酵素活性の生化学的測定法を確立する。② fukutin の生化学的糖転移酵素活性を検討し、fukutin 結合分子を解析する。③ フクチン欠損キメラマウスの脳・末梢神経病態を病理形態学的方法で検討する。④ 治療法に関連して、1) 薬物治療のため、ジストロフィー筋の DG 分解系 metalloproteinase 活性の関与とその阻害薬効果を蛋白生化学的に検討する、2) 遺伝子・細胞治療のため基盤研究を行う。

(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)  $\alpha$  DG の 0-mannosyl glycan 合成の第二段階酵素 POMGnT1 (GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 2Man  $\alpha$  1-0 Ser/Thr) の遺伝子を解明し (1p33-34)、その点変異、小欠失により loss of function ( $\alpha$  DG の 0-mannosyl glycan の形成障害 $\rightarrow$  laminin  $\alpha$  2 との結合不全) をきたし muscle-eye-brain 病 MEB が発症する。

(2)  $\alpha$  DG の 0-mannosyl glycan 合成の第一段階酵素 POMT 活性 (Man  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 0 Ser/Thr) はヒト・ラットを含む哺乳類、ショウジョウバエなど高等動物では POMT1/POMT2 複合体として ER 膜にて機能する。

(3) Walker-Warburg 症候群 WWS で見ついている変異型 POMT1 と野生型 POMT2 および野生型 POMT1 と報告された変異型 POMT2 の発現系では、いづれも POMT1 または POMT2 欠損のため POMT 活性が完

全に失われ (1) と同様の機序で WWS が発症する。

(4) POMT1/POMT2 遺伝子のいずれの RNAi でも、ショウジョウバエ体壁骨格筋の形成に重篤な障害をきたし、体壁のねじれをおこす。(1)-(4) から、 $\alpha$  DG の 0-mannosyl glycan は骨格筋の形成に必須の成分であることが確認され、その異常は脳奇形を伴う先天性筋ジストロフィーを発症させる。

(5) fukutin には糖転移酵素活性はなく、N 端にある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。Fukutin は POMGnT1 と複合体を形成し、 $\alpha$  DG の 0-mannosyl glycan 合成の第二段階 (GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 2Man  $\alpha$  1-0 Ser/Thr) に関与する modulator と推定される。

(6) fukutin 欠損キメラマウスの末梢神経 (根) 有髄線維および神経筋接合部に著しい異常があり、末梢神経 Schwann 細胞の髄鞘最外周膜  $\alpha$  DG のラミニン結合能は著減している。従って、末梢神経にも中枢神経同様の病態がある。

(7) fukutin 欠損キメラマウスの大脳皮質層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グリア境界膜を越えて過遊走している。

(8) 新たに作成できた fukutin 創始者変異ノックインマウスでは、POMGnT 活性が約 80% 低下はあるものの筋ジス発症はなく、大脳層構造異常が軽微にみられるのみである。治療へのヒントの可能性がある。

(9)  $\beta$  DG 分解系 metalloproteinase は分泌型タイプ 2 と 9 で行われ、DMD、sarcoglycanopathy にて特異的亢進が見られるが、 $\alpha$ -dystroglycanopathy では存在せず阻害薬による薬物治療の可能性はない。

(10) 正常マウスの骨髄由来 ES 細胞を中胚葉へ分化・誘導すると、沿軸中胚葉細胞群の中に筋原細胞が存在する。骨髄移植法にて筋基底膜が障害されるラミニン欠損症マウスや mdx マウスに経静脈的に導入すると骨格筋に豊富に生着分化することが判明し、FCMD モデルマウスで試みる価値がある。

## D. 結論

$\alpha$ DG の O-mannosyl glycan 合成の各段階酵素の遺伝子構造、酵素活性機序が判明し、GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 2Man  $\alpha$  1-0 Ser/Thr の酵素 POMGnT1(1p33-34) 異常症として MEB が発症する、Man  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 0 Ser/Thr の酵素活性には 2 つの成分 POMT1/2 複合体が担い、POMT1 (9q34.1) 異常症、POMT2(14q24.3) 異常症として WWS が発症する。いずれも点変異ないし小欠失である。FCMD(9q31) の責任蛋白質 fukutin は酵素そのものではなく、その N 端の膜貫通ドメインを介して POMGnT1 に結合して第 2 段階酵素活性 (GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 2Man  $\alpha$  1-0 Ser/Thr) に関与する Golgi 体膜成分である。いずれの疾患も  $\alpha$ DG・laminin 結合不全を共通の機序として発症し、筋以外に脳および末梢神経系にもあてはまる。 $\alpha$ DG の O-mannosyl glycan は筋形成のみならず脳および末梢神経形成に決定的影響を持つことが結論される。

#### E. 研究発表

1. Matsumura K., Zhong D., Arai K., Saito F., Adachi K., Kawai H., Higuchi I., Nishino I., Shimizu T. Proteolysis of  $\beta$ -dystroglycan in muscular diseases. *Neuromusc. Disord.*, 15: 336-341, 2005.
2. Saito F., Blank M., Schröder J., Manya H., Shimizu T., Campbell K.P., Endo T., Mizutani M., Kröger S., Matsumura K. Aberrant glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan causes defective binding of laminin in the muscle of chicken muscular dystrophy. *FEBS Lett.*, 579: 2359-2363, 2005.
3. Ohsawa Y., Kurokawa K., Sonoo M., Yamada H., Hemmi S., Iwatsuki K., Hagiwara H., Murakami T., Shirabe T., Shimizu T., Sunada Y. Reduced amplitude of the sural nerve sensory action potential in PARK2 patients. *Neurology*, 65: 459-4642, 2005.
4. 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.*, 25: 165-169, 2005.
5. 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.*, 19: 208-217, 2005.
  6. Chiyonobu T., Sasaki J., Nagai Y., Takeda S., Funakoshi H., Nakamura T., Sugimoto T., Toda T. Effects of fukutin deficiency in the developing mouse brain. *Neuromuscul. Disord.* 15: 416-426, 2005.
  7. Li Y., Tomiyama H., Sato K., Hatano Y., Yoshino H., Atsumi M., Kitaguchi M., Sasaki S., Kawaguchi S., Miyajima H., Toda T., Mizuno Y., Hattori N. Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology*, 64: 1955-1957, 2005.
  8. Sasaki N., Manya H., Okubo R., Kobayashi K., Ishida H., Toda T., Endo T., Nishihara S. b4GalT-II is a key regulator of glycosylation of the proteins involved in neuronal development. *Biochem Biophys Res Commun*, 333: 131-137, 2005.
  9. Fujikake N., Nagai Y., Popiel HA., Kano H., Yamaguchi M., Toda T. Alternative splicing regulates the transcriptional activity of Drosophila heat shock transcription factor in response to heat/cold stress. *FEBS Lett.*, 579: 3842-3848, 2005.
  10. Ishikawa K., Toru S., Tsunemi T., Li M., Kobayashi K., Yokota T., Amino T., Owada K., Fujigasaki H., Sakamoto M., Tomimitsu H., Takashima M., Kumagai J., Noguchi Y., Kawashima Y., Ohkoshi N., Ishida G,

- Gomyoda M, Yoshida M, Hashizume Y, Saito Y, Murayama S, Yamanouchi H, Mizutani T, Kondo I, Toda T, Mizusawa H. An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a novel protein with spectrin repeat and rho Guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet*, 77: 280-296, 2005.
11. Watanabe M, Kobayashi K, Jin F, Park KS, Yamada T, Tokunaga K, Toda T. Founder SVA retrotransposal insertion in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and its origin in Japanese and Northeast Asian populations. *Am J Med Genet*, 138: 344-348, 2005.
12. Saito Y, Motoyoshi Y, Kashima K, Izumiya-Shimomura N, Toda T, Nakano I, Hasegawa M, Murayama S. Unique tauopathy in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *J Neuropath Exp Neurol*, 64: 1118-1126, 2005.
13. Kano H, Kurosawa K, Horii E, Ikegawa S, Yoshikawa H, Kurahashi H, Toda T. Genomic rearrangement at 10q24 in non-syndromic split-hand/split-foot malformation. *Hum Genet*, 118: 477-483, 2005.
14. Kariya S, Hirano M, Uesato S, Nagai Y, Nagaoka Y, Furiya Y, Asai H, Fujikake N, Toda T, Ueno S. Cytoprotective effect of novel histone deacetylase inhibitors against polyglutamine toxicity. *Neurosci Lett*, 392: 213-215, 2006.
15. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, Hattori N. Clinical heterogeneity of  $\alpha$ -synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* (in press).
16. Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Hasegawa K, Yoshino H, Kubo S, Sato K, Hattori T, Lu CS, Inzelberg R, Djaldetti R, Melamed E, Amouri R, Gouider-Khouja N, Hentati F, Hatano Y, Wang M, Imamichi Y, Mizoguchi K, Miyajima H, Obata F, Toda T, Farrer MJ, Mizuno Y, Hattori N. Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries. *Mov Disord* (in press).
17. Toda T, Chiyonobu T, Xiong H, Tachikawa M, Kobayashi K, Manya H, Takeda S, Taniguchi M, Kurahashi H, Endo T. Fukutin and  $\alpha$ -dystroglycanopathies. *Acta Myologica* (in press).
18. Taniguchi M., Kurahashi H., Noguchi S., Sese J., Okinaga T., Tsukahara T., Guicheney P., Ozono K., Nishino I., Morishita S., Toda T. Expression profiling of muscles from Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and laminin- $\alpha$ 2 deficient congenital muscular dystrophy; is congenital muscular dystrophy a primary fibrotic disease? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press).
19. Endo T. Aberrant glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan and congenital muscular dystrophies. *Acta Myologica*, (in press).
20. Katsuyama Y, Okada T, Matsumoto J, Ohtsuka Y, Terashima T, Okamura Y, Early specification of ascidian larval motor neurons, *Dev Biol.* 15, 278(2): 310-322, 2005.
21. 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, Kataoka T, Congenital Semilunar Valvulogenesis Defect in Mice Deficient in Phospholipase C{varepsilon}. *Mol Cell Biol.*, 25(6): 2191-2199, 2005.

22. Okuyama-Yamamoto A, Yamamoto T, Miki A, and Terashima T, Expressional changes of reelin in the mouse olfactory bulb after chemical lesion to the olfactory epithelium, *Eur J Neurosci.*, 21(9): 2586-92, 2005.

23. Arakawa T, Sekiya S, Kumaki K and Terashima T, Ramification pattern of the deep branch of the lateral plantar nerve in the human foot, *Ann Anat.*, 187(3): 287—296, 2005.

24. Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, Watanabe M, Bito H, Terashima T, Wright CV, Kawaguchi Y, Nakao K, Nabeshima YI. Ptfla, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum, *Neuron*, 47(2): 201-213, 2005.

25. Takaoka Y, Setsu T, Misaki K, Yamauchi T, Terashima T, Expression of reelin in the dorsal cochlear nucleus of the mouse, *Brain Res Dev Brain Res.*, 159(2): 127-134, 2005.

26. Doi K, Nibu K, Ishida H, Okado H, Terashima T. Adenovirus-mediated gene transfer in olfactory epithelium and olfactory bulb: a long-term study. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, 114(8): 629-633, 2005.

## $\alpha$ -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

福山型筋ジストロフィー創始者レトロポゾン挿入変異ノックインマウスの作製と解析

分担研究者 戸田 達史 大阪大学医学系研究科臨床遺伝学・教授

研究要旨 FCMD 創始者変異ノックイン (KI) マウスを作製した。mutant *lox* system を用いた遺伝子組換えにより、マウス *fukutin* の exon 10 にかえて創始者変異をもつヒト患者型 exon 10 を KI した (KIHp)。対照としてヒト正常型 exon 10 を KI したマウスも作製した (KIHn)。KIHn/KIHn、KIHp/KIHp、KIHp/KO はいずれも外観と一般行動に wt/wt との差を認めなかった。 $\alpha$ DG のウエスタンブロットでは、KIHn/KIHn、KIHp/wt、KO/wt では wt/wt と差を認めなかったが、KIHp/KIHp で一部の $\alpha$ DG に糖鎖修飾異常を認め、KIHp/KO ではさらに強い糖鎖異常を認めた。KIHp/KIHp、KIHp/KO では wt/wt に比べ有意に POMGnT1 活性の低下を認めた。組織学的検討では KIHp/KIHp、KIHp/KO はいずれも筋ジストロフィーを発症しなかったが、KIHp/KO では大脳皮質に軽度の層構造異常を認めた。FCMD 創始者変異 KI マウスは $\alpha$ DG の糖鎖異常を認め、生化学的に FCMD の病態を再現したが、表現型は非常に軽微である。一部の $\alpha$ DG に正常な糖鎖修飾が残存すれば、かなり表現型が改善すると考えられ、治療的意義を示唆する。

### 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福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は大脳皮質形成異常、眼症状を伴い、*fukutin* の機能喪失変異により発症する。ほとんどすべての患者は *fukutin* の 3'非翻訳領域 (exon 10) に約 3kb のレトロトランスポゾン挿入変異をホモ接合または他の変異との複合ヘテロ接合で認め、この挿入変異は今から約 100 世代前の一人の祖先から受け継がれた創始者変異である。

遺伝子産物 *fukutin* は、 $\alpha$ ジストログリカン ( $\alpha$ DG) の糖鎖修飾に関わっていることが示されている。さらに昨年我々は muscle-eye-brain 病の原因遺伝子産物である糖転移酵素 POMGnT1 と *fukutin* が複合体を形成し、機能的連関が推定されることを報告した。

また、以前から我々は FCMD モデルマウスの作製に取り組んでいる。FCMD 患者表現型から推定されるように *fukutin* KO マウス (KO/KO) は胎生致死であったが、*fukutin* ホモ欠損 ES 細胞に由来する

キメラマウスは筋・脳・眼に FCMD 病変を再現した。今回我々は FCMD 創始者レトロポゾン挿入変異ノックイン (KI) マウスを作製したので、その表現型につき報告する。

### B. 研究方法

mutant *lox* system を利用した遺伝子組換えにより、マウス *fukutin* の exon 10 にかえて創始者挿入変異をもつヒト患者型 exon 10 を KI した (KIHp)。対照としてヒト正常型 exon 10 を KI したマウスも作製した (KIHn)。交配により、KIHn/KIHn、KIHp/KIHp、KIHp/KO を作出し、解析を行なった。

### C. 研究結果

KIHn/KIHn、KIHp/KIHp、KIHp/KO はいずれも外観と一般行動に wt/wt との差は認めなかった。 $\alpha$ DG のウエスタンブロットでは、KIHn/KIHn、KIHp/wt、KO/wt では wt/wt と差を認めなかったが、KIHp/KIHp で一部の $\alpha$ DG に糖鎖修飾の異常を認め、POMGnT1 活性が約 30% 低下していた。また KIHp/KO ではさらに強い糖鎖修飾異常を認めた。

組織学的検討では KIHp/KIHp、KIHp/KO はいず



れも筋ジストロフィーを発症しなかったが、KIHp/KO では大脳皮質に軽度の層構造異常を認めた。

#### D. 考察

昨年のデータと今回のKIマウスのPOMGnT1活性のデータから、fukutinはPOMGnT1と複合体を形成し、その活性に影響を与えることが考えられた。

FCMD創始者変異KIマウスは $\alpha$ DGの糖鎖修飾異常を認め、生化学的にFCMDの病態を再現したが、表現型はヒトより軽い。KIHp/KIHpやKIHp/KOで筋ジストロフィーが発症しないのは、一部の $\alpha$ DGに正常な糖鎖修飾が残存すれば、かなり表現型はrescueされると考えられ、治療的意義を示唆する。

#### E. 研究発表

1. 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* 19:208-217, 2005
2. Chiyonobu T, Sasaki J, Nagai Y, Takeda S, Funakoshi H, Nakamura T, Sugimoto T, Toda T. Effects of fukutin deficiency in the developing mouse brain. *Neuromuscul Disord* 15:416-426, 2005
3. Sasaki N, Manya H, Okubo R, Kobayashi K, Ishida H, Toda T, Endo T, Nishihara S. b4GalT-II is a key regulator of glycosylation of the proteins involved in neuronal development. *Biochem Biophys Res Commun* 333:131-137, 2005
4. Watanabe M, Kobayashi K, Jin F, Park KS, Yamada T, Tokunaga K, Toda T. Founder SVA retrotransposal insertion in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and its origin in

Japanese and Northeast Asian populations. *Am J Med Genet* 138:344-348, 2005

5. Saito Y, Motoyoshi Y, Kashima K, Izumiyama-Shimomura N, Toda T, Nakano I, Hasegawa M, Murayama S. Unique tauopathy in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *J Neuropath Exp Neurol* 64:1118-1126, 2005

6. Toda T, Chiyonobu T, Xiong H, Tachikawa M, Kobayashi K, Manya H, Takeda S, Taniguchi M, Kurahashi H, Endo T. Fukutin and  $\alpha$ -dystroglycanopathies. *Acta Myologica* (in press)

7. Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Sese J, Okinaga T, Tsukahara T, Guicheney P, Ozono K, Nishino I, Morishita S, Toda T. Expression profiling of muscles from Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and laminin- $\alpha$ 2 deficient congenital muscular dystrophy; is congenital muscular dystrophy a primary fibrotic disease? *Biochem Biophys Res Commun* (in press)

8. 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* 25:165-169, 2005

9. Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hatano Y, Yoshino H, Atsumi M, Kitaguchi M, Sasaki S, Kawaguchi S, Miyajima H, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology* 64:1955-1957, 2005

10. Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, Kano H, Yamaguchi M, Toda T. Alternative splicing regulates the transcriptional activity of Drosophila heat shock transcription factor in response to heat/cold stress. *FEBS Lett* 579:3842-3848, 2005
11. Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, Kobayashi K, Yokota T, Amino T, Owada K, Fujigasaki H, Sakamoto M, Tomimitsu H, Takashima M, Kumagai J, Noguchi Y, Kawashima Y, Ohkoshi N, Ishida G, Gomyoda M, Yoshida M, Hashizume Y, Saito Y, Murayama S, Yamanouchi H, Mizutani T, Kondo I, Toda T, Mizusawa H. An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a novel protein with spectrin repeat and rho Guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet* 77:280-296, 2005
12. Kano H, Kurosawa K, Horii E, Ikegawa S, Yoshikawa H, Kurahashi H, Toda T. Genomic rearrangement at 10q24 in non-syndromic split-hand/split-foot malformation. *Hum Genet* 118:477-483, 2005
13. Kariya S, Hirano M, Uesato S, Nagai Y, Nagaoka Y, Furiya Y, Asai H, Fujikake N, Toda T, Ueno S. Cytoprotective effect of novel histone deacetylase inhibitors against polyglutamine toxicity. *Neurosci Lett* 392:213-215, 2006
14. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, Hattori N. Clinical heterogeneity of a-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* (in press)
15. Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Hasegawa K, Yoshino H, Kubo S, Sato K, Hattori T, Lu CS, Inzelberg R, Djaldetti R, Melamed E, Amouri R, Gouider-Khouja N, Hentati F, Hatano Y, Wang M, Imamichi Y, Mizoguchi K, Miyajima H, Obata F, Toda T, Farrer MJ, Mizuno Y, Hattori N. Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries. *Mov Disord* (in press)

福山型先天性筋ジストロフィーに対する骨髄移植法の効果の検討

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:福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD)は、 $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖の付加に関わっていると考えられているフクチンの異常によって起こる。しかしその具体的なメカニズムは未だに解明されておらず、またその治療法にいたっては有効な治療法の糸口すら見いだされていない。我々は治療法の選択肢の一つとして、既に臨床的に確立した治療法で再生治療の有効な手段として注目されている骨髄移植法が有望ではないかと考えている。本年度はまず様々な種類の筋ジストロフィーのモデルマウスに対して骨髄移植法の効果を検討した。今回モデルマウスとして *dy*マウス、*mdx*マウスを用いそれらに骨髄移植法を実施しその有効性を評価した。その結果、骨髄移植法は筋ジストロフィーの治療法としても有効であると考えられ、とりわけ *dy*マウスにおいては臨床症状の著明な改善が認められた。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD)はフクチンの異常によって起こることが我が国の研究グループにより明らかにされた。フクチンの機能は類縁分子との検討からは、筋膜の構成分子である  $\alpha$ -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。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。このように原因や臨床像の解明は進んできたが、

その治療法にいたっては有効な治療法の糸口すら見いだされていない。我々は治療法の選択肢の一つとして、既に臨床的に確立した治療法で再生治療の有効な手段として注目されている骨髄移植法が有望ではないかと考えている。すなわち骨髄細胞中に存在している myogenic stem cellを骨格筋細胞へと分化誘導し、罹患筋中に健常筋を再生させるという再生治療法がこの疾患に有効ではないかと期待している。このことを検討するため、このFCMDのモデル動物で骨髄移植法を実施しその有効性を検討することを計画している。しかしフクチンの欠損マウスは胎生致死であり、現状で

はFCMDの適当なモデル動物は入手が難しい状況である。したがって、まず現在よく用いられている筋ジストロフィーのモデルマウスに対して骨髄移植法の効果を検討した。本年度はモデルマウスとして *dy*マウス、*mdx*マウスを用いそれらに骨髄移植法を実施しその有効性を評価した。

## B. 研究方法

### 1)筋ジストロフィーモデルマウスに対する骨髄移植療法

筋ジストロフィーのモデルマウスとして、*dy*マウスと、*mdx*マウスを用いた。これらマウスは進行性の筋力低下を示し、*dy*マウスは基底膜蛋白であるラミニン2の  $\alpha$ サブユニットに、*mdx*マウスは筋細胞質内のジストロフィンに異常があることが示されている。この *dy*マウス、*mdx*マウスに健常マウス由来の骨髄細胞を移植して *dy*マウス、*mdx*マウス再生筋中に健常マウス由来の筋が出現するかを検討した。この際健常マウス(骨髄細胞ドナー)として GFP遺伝子導入マウス(GFPマウス)を用い、*dy*マウス、*mdx*マウス(レシピエント)由来の細胞との識別を行った。もしレシピエントマウス再生筋中に GFP陽性筋が見られた場合、この筋は移植骨髄細胞中のmyogenic stem cellより分化したものと考えられる。このことは骨髄移植により、ジストロフィー筋に健常筋が再生しうることを示すものである。

### 2)骨髄移植治療効果の評価

解析は以下のように実施した。1, *dy*マウス、

*mdx*マウスをレシピエント、EGFPマウスをドナーとして、尾静脈より骨髄移植を行った。その後レシピエントのモデルマウスに対して、2, ドナー由来筋の発現の解析 3, 外見、体重、寿命等臨床所見の解析 4, 生理学的機能として握力の測定、呼吸機能の解析、5,レシピエント筋の病理組織学的解析を行った。

## C. 研究結果

モデルマウスの *dy*、*mdx*マウスいずれもドナー由来の細胞の生着が認められた。生着の組織像は両者で異なっていた。また *mdx*マウスに比較して、*dy*マウスでは骨髄移植群は移植非実施のコントロール群と比較して体重や寿命また筋力、呼吸機能の有意な改善が認められた。

具体的には、*mdx*マウスでは、骨髄移植群は移植非実施のコントロール群と比較して、寿命や体重および筋力、呼吸機能に明らかな差は認められなかった。また骨髄移植群のdystrophin発現はGFP陽性細胞に比し、一部にとどまった。

一方 *dy*マウスでは、骨髄移植群は移植非実施のコントロール群と比較して、寿命や体重および筋力、呼吸機能に有意な改善が認められた。また骨髄移植群において lamininの発現は GFP陽性細胞にとどまらず、GFP陰性細胞にも発現がみられた。

## D. 考察

モデルマウスの *dy*、*mdx*マウスいずれもド

ナー由来の細胞の生着が認められた。生着の組織像は両者で異なっていた。また *dy* マウスにおいては、骨髄移植群は移植非実施のコントロール群と比較して体重や寿命また筋力、呼吸機能の有意な改善が認められた。すなわち骨髄移植療法は *mdx* マウスより *dy* マウスにおいてより有効であった。骨髄移植による *dy* マウスに対する治療効果は、横隔膜の機能が改善することによるところが大きいと考えられた。また、細胞外マトリックスの異常 (*dy* マウス:先天性筋ジストロフィーのモデル)と筋細胞膜構成成分の異常 (*mdx* マウス:デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデル)という筋ジストロフィーの発症機序の相違によって、骨髄移植の効果が異なる可能性が示唆された。

最近になって、フクチン異常モデルマウス(キメラマウス、ノックインマウス)が作製されてきた。今後これらに対して同様に骨髄移植を試みて治療効果を検討する予定である。

#### E. 結論

骨髄移植法は筋ジストロフィーの治療法としても有効であると考えられた。両者のうち *dy* マウスでより効果があったということは、同じく基底膜の異常である FCMD に対する治療効果を十分期待させるものとする。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M, Nishi M, Yasue A, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y. Dramatic Reversal of Muscular Atrophy in Caveolinopathy by Myostatin Blockade. 投稿中

#### 2. 学会発表

1) 砂田芳秀、萩原宏毅、大澤 裕、朝倉昇司、村上龍文、豊嶋崇徳:筋ジストロフィーモデルマウスに対する骨髄移植療法の治療効果の検討. 平成 17 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよびその関連する疾患の病態生理の解明と治療薬物の開発に関する研究」清水班班会議, 東京, 12月3日, 2005

2) 砂田芳秀、大澤 裕、萩原宏毅、村上龍文、土田邦博、今村健志、宮園浩平、濃野勉、野地澄晴:Caveolin-3による myostatin signalの制御. 平成 17 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよびその関連する疾患の病態生理の解明と治療薬物の開発に関する研究」清水班班会議, 東京, 12月3日, 2005

3) 大澤裕, 萩原宏毅, 村上龍文, 野地澄晴, 砂田芳秀:ミオスタチンプロドメインによる変異カベオリン3トランスジェニックマウス表現型の改善. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 5月27日, 2005

4) 萩原宏毅, 大澤裕, 村上龍文, 豊嶋崇徳, 砂田芳秀:筋ジストロフィーモデルマウスに対

する骨髄移植法の治療効果の検討. 第46回  
日本神経学会総会, 鹿児島, 5月26日, 2005

#### 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・研究部長

**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 $\alpha$ -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 *POMT1* と *POMT2* は先天性筋ジストロフィー症 Walker-Warburg syndrome (WWS) の原因遺伝子であることから、*O*-mannose型糖鎖の機能やその生合成機構を理解することは、先天性筋ジストロフィーの病態を解明する上で重要である。*POMT1* と *POMT2* は蛋白質の Ser/Thr 残基に mannose を転移する *O*-mannose 転移酵素である。培養細胞を用いた強制発現実験において、それぞれ単独発現では *O*-mannose 転移活性を示さず、共発現した場合のみ活性が認められることから、*POMT1* と *POMT2* が複合体を形成する可能性が示唆されていた。そこで、*O*-mannose 転移活性の発現における *POMT1*-*POMT2* 複合体形成の必要性を検討した。免疫沈降法による解析の結果、*POMT1* と *POMT2* の共発現により *POMT1*-*POMT2* 複合体が形成されることが明らかになった。さらに、免疫沈降物 (*POMT1*-*POMT2* 複合体) の *O*-mannose 転移活性を検出し、*POMT1* と *POMT2* は複合体として機能していることを明らかにした。また、*O*-mannose 型糖鎖 (Sia $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man) の生合成経路において、galactose と sialic acid を転移する酵素についてはまだ分かっていない。そこで本年度は、galactose 転移酵素の同定を試みた。これまでに明らかにされている7種のヒト $\beta$ 1,4galactosyltransferase ( $\beta$ 1,4GalT; GalTI-VII) の組織分布と基質特異性を解析し、GalTIIIが*O*-mannose型糖鎖合成に関与することを示した。

#### 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。これまでに多くの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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖解析から哺乳類で初めて *O*-mannose 型糖鎖 (Sia $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man) の構造を明らかにし、この糖鎖の GlcNAc $\beta$ 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* と *POMT2* 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 型糖鎖の機能および生合成機構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。

本年度は、*O*-mannose 型糖鎖の生合成機構の解明

を目指し、以下の2つの課題を中心に研究を行った。

(1) *POMT1* と *POMT2* による *O*-mannose 転移酵素活性の発現機構の解析：*POMT1* と *POMT2* は培養細胞を用いた強制発現実験において、それぞれ単独発現では *O*-mannose 転移活性を示さず、共発現した場合のみ活性が認められることから *POMT1* と *POMT2* が複合体を形成する可能性が示唆されていた。そこで、*O*-mannose 転移活性の発現における *POMT1*-*POMT2* 複合体形成の必要性を検討した。

(2) *O*-mannose 型糖鎖生合成に関与する galactose 転移酵素の同定：我々はこれまでに *O*-mannose 型糖鎖の生合成において GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Thr/Ser 形成までを担う酵素 *POMT1*, 2 と *POMGnT1* を明らかにしている。しかし、galactose と sialic acid を転移する酵素については未だ不明である。*O* 結合型や *N* 結合型など様々な糖鎖合成において、Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc 形成を担う  $\beta$ 1,4galactosyltransferase ( $\beta$ 1,4GalT) は、現在までに7種の遺伝子 (*GalTI*-*VII*) がヒトで単離されており、異なる基質特異性と組織分布を示すことが報告されている。そこで今回は *O*-mannose 型糖鎖の Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc 形成に関わる酵素について検討した。

#### B. 研究方法

(1) Myc-tag を C 末に付加したヒト *POMT1* (*POMT1*myc) と *POMT2* をヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞を用いて共発現させた。細胞から膜画分を回収し、界面活性剤 (*n*-octylthioglucoside) 存在下で可溶化後、anti-myc agarose を用いた免疫沈降法により、*POMT1*-*POMT2* 複合体の検出を試みた。さらに、免疫

沈降物中の *O*-mannose 転移活性を測定した。また、WWS 患者由来の変異を導入した変異 POMT1myc を POMT2 と共発現させ複合体形成を調べた。

(2) ヒトβ1, 4GalT I ~VII のそれぞれの酵素触媒活性部位を FLAG-tag との融合蛋白質として、baculo virus 発現系により昆虫細胞培養上清中に分泌させた。抗 FLAG 抗体により各酵素を精製し、GlcNAcβ1→2Man-2AB と GlcNAcβ1→2Man-peptide を基質として各β1, 4GalT の酵素活性を測定した。また、real time PCR により、ヒトの各組織における各β1, 4GalT mRNA の発現量を定量的に解析した。

### C. 研究結果

(1) POMT1myc と POMT2 を共発現させた細胞膜画分を用いて、anti-myc agarose により POMT1myc を免疫沈降した結果、免疫沈降画分に POMT2 の共沈が観察され、POMT1 と POMT2 は複合体を形成することが明らかになった。また、免疫沈降物 (POMT1-POMT2 複合体) に *O*-mannose 転移活性が検出されたことから、複合体の形成が *O*-mannose 転移活性の発現に必要であることが明らかとなった。一方、POMT1myc および POMT2 をそれぞれ単独発現させた細胞の混合膜画分を用いた免疫沈降では POMT1myc と POMT2 の共沈は観察されなかった。また、今回調べた変異型 POMT1myc は POMT2 と共発現しても酵素活性は検出されなかった。しかし、免疫沈降で POMT2 を共沈させることから、複合体を形成できることが分かった。

(2) 使用した基質 GlcNAcβ1→2Man-2AB と GlcNAcβ1→2Man-peptide に対する各β1, 4GalT の galactose 転移活性は GalT II が最も高く、GalT II を 100% とした時に GalT I が約 70%、GalT III は 20%、GalT IV ~VI は 5%以下であった。GalT VII は両基質に対し全く転移活性を示さなかった。このことから、β1, 4GalT II が *O*-mannose 型糖鎖の合成における galactose 転移酵素として機能している可能性が考えられる。また、各β1, 4GalT mRNA 発現量の定量解析から、GalT II は脳での発現が高いことが分かった。脳における各β1, 4GalT の発現量を比較すると、GalT II と III の発現が最も高く、GalT I、GalT IV ~VII の発現は非常に低いレベルだった。特に成体に比較して胎児期の脳における GalT II と III の発現量は約 4 倍も高く、両酵素の中枢神経系の形成における重要性が示唆された。

### D. 考察

(1) POMT1 と POMT2 の単独発現させた膜画分の混合では複合体を形成できず、酵素活性も検出されないことから、複合体の形成には蛋白質合成の際に POMT1 と POMT2 が同時期に翻訳される必要があるものと考えられる。POMT1 と POMT2 の mRNA の各組織における発現量のパターンが一致することが報告されていることから、両者が同時期に同じ量存在することがこの酵素の機能に重要であることが予想され

る。したがって、POMT1 や POMT2 遺伝子に変異がない場合でも、どちらか一方の発現量を著しく変化させるような異常によって、*O*-mannose 転移活性が減少し WWS 様の疾患が発症する可能性が考えられる。

また、今回調べた WWS 患者由来の変異型 POMT1 は POMT2 と複合体を形成するが酵素活性はないことから、基質認識に異常を起こす変異である可能性が考えられる。

(2) 基質特異性の解析から *O*-mannose 型糖鎖の Galβ1→4GlcNAc 形成を担う galactose 転移酵素は β1, 4GalTII であることが示唆された。特に β1, 4GalTII は胎児期の脳での発現が高く、また脳では β1, 4GalTI がほとんど発現していないことから、β1, 4GalTII が脳における *O*-mannose 型糖鎖合成酵素として機能していることが考えられ、中枢神経系の形成に重要であることが示された。これまでに、β1, 4GalT ファミリー遺伝子の異常による筋ジストロフィーは報告されていないが、今後の研究によって β1, 4GalT の変異による新たな筋ジストロフィーが見つかる可能性も考えられる。

### E. 結論

先天性筋ジストロフィー症 WWS の原因遺伝子産物 POMT1 と POMT2 は、POMT1-POMT2 複合体を形成することにより、*O*-mannose 転移酵素として機能することが明らかとなった。

また、*O*-mannose 型糖鎖の Galβ1→4GlcNAc 形成を担う galactose 転移酵素は β1, 4GalTII であることが示唆され、中枢神経系の形成に深く関与することが示された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Tamao Endo, Hiroshi Manya: *O*-Mannosylation in Mammalian Cells. Protocol for Methods in Molecular Biology (Ed. Brockhausen, I), *Humana Press*, New Jersey, in press

Tamao Endo: Aberrant glycosylation of α-dystroglycan and congenital muscular dystrophies. *Acta Myol.*, in press

Tatsushi Toda, Tomohiro Chiyonobu, Hui Xiong, Masaji Tachikawa, Kazuhiro Kobayashi, Hiroshi Manya, Satoshi Takeda, M Taniguchi, H Kurahashi, Tamao Endo: Fukutin and α-dystroglycanopathies. *Acta Myol.*, in press

Norihiko Sasaki, Hiroshi Manya, Reiko Okubo, Kazuhiro Kobayashi, Hideki Ishida, Tatsushi Toda, Tamao Endo, Shoko Nishihara: β4GalT-II is a key regulator of glycosylation of the proteins involved in neuronal development. *Biochem. Biophys. Res.*



Fumiaki Saito, Martina Blank, Jörn Schröder, Hiroshi Many, Teruo Shimizu, Kevin P. Campbell, Tamao Endo, Makoto Mizutani, Stephan Kröger, Kiichiro Matsumura: Aberrant glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan causes defective binding of laminin in the muscle of chicken muscular dystrophy. *FEBS Lett.*, 579, 2359-2363, 2005

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

遠藤玉夫: 筋ジストロフィー: Muscle-eye-brain 病と Walker-Warburg 症候群. 遺伝子医学MOOK 糖鎖と病気, 43-48, 2005

遠藤玉夫、萬谷 博: 筋ジストロフィー. 「糖鎖科学の新展開」 NTS inc., 159-165, 2005

萬谷 博、遠藤玉夫: O-結合マンノース $\beta$ 1,2-Nアセチルグルコサミン転移酵素 (POMGnT1). 生体の科学, 56(5), 380-381, 2005

遠藤玉夫: 未来を拓く糖鎖科学 (監修 永井克孝) O-マンノース型糖鎖合成酵素の同定と機能解析 151-153, 2005

遠藤玉夫: 未来を拓く糖鎖科学 (監修 永井克孝) 糖鎖異常による先天性筋ジストロフィー 344-348, 2005

遠藤玉夫: Muscle-eye-brain 病 小児科診療 印刷中

## 2. 学会発表

赤坂—萬谷啓子、萬谷博、遠藤玉夫: 哺乳類 O-マンノース転移酵素 POMT1 と POMT2 の複合体形成による触媒活性の発現. 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005.12.7-10

遠藤玉夫: 糖鎖異常による先天性筋ジストロフィー. 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005.12.7-10

Masaji Tachikawa, Hui Xiong, Kazuhiro Kobayashi, Hiroshi Many, Tomohiro Chiyonobu, Yoshitaka Nagai, Tamao Endo, Tatsushi Toda: Fukutin Interacts with and Modulates POMGnT1. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005, 10, 19-22

Hiroshi Many, Keiko Akasaka-M, Tamao Endo: Determination of consensus sites for protein

O-mannosylation. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005, 10, 19-22

Tamao Endo, Shoko Nishihara, Tatsushi Toda, Hiroshi Many: Glycosyltransferases responsible for congenital muscular dystrophies. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005, 10, 19-22

Tamao Endo: Initiation of protein O-mannosylation and Walker-Warburg syndrome. European-Japanese Glycomics Workshop. Florence, Italy. September 3-4, 2005

Tamao Endo, Keiko Akasaka, Shoko Nishihara, Tatsushi Toda, Hiroshi Many: Congenital muscular dystrophies due to glycosylation defect of protein O-mannosylation. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Florence, Italy. September 4-9, 2005

Tamao Endo: O-マンノース糖鎖異常と先天性筋ジストロフィー. Protein O-mannosylation and congenital muscular dystrophy. 第 28 回日本神経科学大会, 横浜, 2005, 7, 26-28

萬谷博、赤坂啓子、遠藤玉夫: 先天性筋ジストロフィー原因遺伝子 *POMT1* の変異による O-マンノース型糖鎖生合成への影響. 第 25 回日本糖質学会年会, 大津, 2005. 7. 20-22

Tamao Endo: Protein glycosylation and congenital muscular dystrophy. 30<sup>th</sup> FEBS Congress - 9<sup>th</sup> IUBMB Conference: The Protein World. Budapest, Hungary. July 2-7, 2005

Tamao Endo, Shoko Nishihara, Hiroshi Many: Initiation of protein O-mannosylation and congenital muscular dystrophy. Sixth-French-Japanese Workshop on muscular Dystrophy "Further progress toward therapy for muscular dystrophies". Paris, France, July 1-2, 2005

Hui Xiong, Kazuhiro Kobayashi, Masaji Tachikawa, Hiroshi Many, Tomohiro Chiyonobu, Tamao Endo, Tatsushi Toda: Fukutin Interacts with and Modulates POMGnT1. Sixth-French-Japanese Workshop on muscular Dystrophy "Further progress toward therapy for muscular dystrophies". Paris, France, July 1-2, 2005

Hiroshi Many, Tamao Endo: Defect of protein O-mannosylation in Walker-Warburg Syndrome. Glycoproteomics-protein modifications for versatile functions, Dubrovnik, Croatia, June 28 - 30, 2005

Tamao Endo: Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. Myology 2005, Nantes, France. May 9-13

Shoko Nishihara, Yoshiko Ohmae, Tomomi Ichimiya, Hiroshi Many, Hideki Yoshida, Hidenao Toyoda, Tamao Endo, Ryu Ueda: Functional analysis of *Drosophila* glycosyltransferases using RNAi mutant flies. The 2nd Japan-The Netherlands Glycobiology

Symposium, Utrecht, The Netherlands. April 18-20, 2005

Tamao Endo: Congenital muscular dystrophies due to glycosylation defects. The 2nd Japan-The Netherlands Glycobiology Symposium, Utrecht, The Netherlands. April 18-20, 2005

G. 知的所有権の取得状況  
該当致しません。

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

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

*fukutin* 遺伝子の異常と脳形成、特にグリア性境界膜形成およびニューロンの細胞移動の障害の関連を分子、細胞レベルで明らかにするために、ゼブラフィッシュをモデルシステムとし、*fukutin* および関連分子の遺伝子破壊、発現抑制、変異体の強制発現などを行い、結果として表れる脳形成異常を一般細胞染色、ニューロンやグリアの各種マーカー分子の発現パターン解析などにより形態学的に解析した。その結果、*fukutin* 遺伝子は、哺乳動物のみならず広く脊椎動物において保存された構造と分布パターンをもつことより、筋肉の発生、維持に必須の役割を果たすだけでなく、脳の発生においても脊椎動物に共通の基本的な役割を担っていることが予想された。今後は、体外発生という魚類の特性を生かし、脳発生過程における Fukutin およびジストログリカン複合体の働きについて詳細な検討を続ける予定である。

A. 研究目的

脳の内外を境界するグリア性境界膜は、互いに密に結合し合ったアストログリアの突起とこれが堅く結合する基底膜・軟膜からなる構造で、脳脊髄液・脳関門（CSF-B-B）の本体を成す、いわば脳を外界より守るバリアーである。このグリア性境界膜の形成不全・崩壊は、脳の形成、ことにニューロンの細胞移動の異常による皮質層構築障害を引き起こすことより、グリア性境界膜は脳の単なる“外壁”ではなく、脳の発生過程においても重要な役割を果たしていることが判ってきた。戸田らの研究グループにより *fukutin* 遺伝子は福山型先天性筋ジストロフィー

（FCMD）の原因遺伝子として同定され、この遺伝子の変異により FCMD を発症することが既に証明されている（Toda et al., Nature Genetics 5:283-286, 1993; Kobayashi et al., Nature 394:388-392, 1998）。FCMD 患者は胎性期の脳の形成不全・奇形により重篤な精神発達障害を呈するが、*fukutin* 遺伝子を部分的に欠損するキメラマウスの脳の解析から、この遺伝子の欠損によりグリア性境界膜の形成不全・崩壊ならびにニューロンの細胞移動障害が生じる（Takeda et al., Human Mol Genet 12:1449-1459, 2003）。Fukutin 蛋白質はグリア性境界膜の形成に中心的な役割を果たす細胞外糖蛋白質である  $\alpha$ ジストログリカン（ $\alpha$ DG）の糖鎖修飾に

関わる酵素であると推定されており、実際に Fukutin の異常により脳や筋肉組織において  $\alpha$  DG の糖鎖構造に異常が認められている。以上の点を踏まえ、本年は fukutin 遺伝子の異常とグリア性境界膜形成およびニューロンの細胞移動の障害の関連に焦点を絞り、モデル系としてゼブラフィッシュの脳を対象にゼブラフィッシュ胚および成体脳における fukutin の発現パターンを詳細に調べる。さらにモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) の受精卵への注入により fukutin 遺伝子をノックダウンし、グリア性境界膜やニューロンの細胞移動への影響について免疫組織化学法などを用いて検討することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. ゼブラフィッシュ fukutin 遺伝子の塩基配列の決定

既知のマウスおよびヒト fukutin 遺伝子 1 次塩基配列をもとにプライマーを作成し、RT-PCR 法により完全長 cDNA をクローニングし、塩基配列を決定する。

### 2. 胚および成体中枢神経系における

#### fukutin の発現解析

受精後数時間胚より成体まで様々な発生ステージにおけるゼブラフィッシュの whole mount およびパラフィン包埋切片を用いた in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法により、fukutin 遺伝子の発現パターンを中枢神経系を中心に解析する。

ゼブラフィッシュ fukutin 遺伝子を鋳型にジゴキシゲニン (DIG) 標識アンチセンスおよびセンス (ネガティブコントロール用) RNA を in vitro 転写法により合成しプローブとする。発生の早い段階では whole mount 法を、発生後期から成体にかけては切片を用いた解析を行う。

### 3. モルフォリノアンチセンスオリゴヌク

#### レオチドによる fukutin ノックダウン

ゼブラフィッシュ fukutin 遺伝子に対するモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を 1 ないし 2 細胞期の受精卵に顕微注入し、fukutin 遺伝子の翻訳あるいはスプライシングをブロックすることにより Fukutin 蛋白質の発現を抑制 (ノックダウン) する。合成する MO の塩基配列は、すでに決定済のゼブラフィッシュ fukutin 遺伝子の非翻訳領域を含む塩基配列をもとに合成する。配列デザインにあたっては、翻訳の阻害は開始メチオニン周辺の配列を、スプライシングの阻害は cDNA の塩基配列とゲノムデータベース上のゲノム DNA の配列を比較し得られるスプライシング部位周辺の配列を利用する。

## C. 研究結果

ゼブラフィッシュ fukutin 遺伝子を単離し、その全一次構造を決定した (図 1)。既知のマウスおよびヒト fukutin の塩基配列と比較したところ、翻訳領域の塩基配列はよく保存されていた。興味深いことに、3' 非翻訳領域に複数の配列パターンが認められ、多型が存在する可能性がある。