

700500788A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

糖鎖修飾異常による遺伝性筋疾患の病態解明と

治療法の開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西 野 一 三

平成18（2006）年4月

目 次

I.	総括研究報告	
	糖鎖修飾異常による遺伝性筋疾患の病態解明と治療法の 開発に関する研究	1
	西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	
II.	分担研究報告	
1.	α -ジストログリカノパチー関連分子複合体の 機能に関する研究	5
	西野 一三 (国立精神・神経センター神経研究所)	
2.	本邦における α -ジストログリカノパチーに関する研究	9
	林 由起子 (国立精神・神経センター神経研究所)	
3.	脳組織からのジストログリカン複合体の精製と その特性づけ	11
	野口 悟 (国立精神・神経センター神経研究所)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV.	研究成果の刊行物・別刷	15

I. 総括研究報告

糖鎖修飾異常による遺伝性筋疾患の病態解明と 治療法の開発に関する研究

主任研究者 西野 一三 国立精神・神経センター神経研究所部長

研究要旨 筋細胞膜タンパク質 α -ジストログリカン (α DG) の糖鎖修飾不全を原因とする α -ジストログリカノパチー (α DGP) やシアル酸合成酵素遺伝子の異常を原因とする縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) などは、糖修飾異常をその病態とする疾患である。本邦に患者数が多く、一日も早い治療法の開発が望まれている。本プロジェクトにおいては、これらの筋疾患の病態解明と治療法開発を目指して、研究を進めている。

α DGP は生後早期に発症する先天性筋ジストロフィー (CMD) で症状の類似した疾患群である。福山型 CMD (FCMD)、Walker-Warburg 症候群 (WWS)、muscle-eye-brain 病 (MEB)、MDC1C、MDC1D 及び Large^{myd} マウスはそれぞれ、フクチン、POMT1、POMGnT1、FKRP、Large 遺伝子の変異により引き起こされる。これらの遺伝子産物 (α DGP 関連分子) のうち、POMT1 および POMGnT1 は糖転移活性が示されているが、他の3つについては糖転移酵素であろうと推測されているだけである。我々は、フクチン、LARGE および POMGnT1 が複合体として共局在しているのみならず、フクチン・LARGE の変異体は POMGnT1 活性低下を引き起こすことを初めて明らかにした。また、脳組織からのジストログリカン複合体の精製を試みた。その結果、脳組織のジストログリカン複合体は異なるジストロフィン分子種を含み数種類ある可能性が示された。

分担研究者

西野 一三

国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 部長

林 由起子

国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 室長

野口 悟

国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一部 室長

の開発が望まれている。本申請研究はこれら糖修飾異常を病態とする疾患の病態解明と治療法開発を目指すものである。

α DGP は生後早期に発症する CMD で症状の類似した疾患群である。FCMD、WWS、MEB、MDC1C、MDC1D 及び Large^{myd} マウスはそれぞれ、fukutin、POMT1、POMGnT1、FKRP、Large 遺伝子の変異により引き起こされる。これらの遺伝子産物 (α DGP 関連分子) のうち、POMGnT1 は糖転移活性が示されているが、他の4つについては糖転移酵素であろうと推測されているだけである。我々は、これらの α -DGP 関連分子の機能を明らかにし、 α -DGP の分子病態を明らかにすることを目的としている。

A. 研究目的

筋細胞膜タンパク質 α DG の糖鎖修飾不全を原因とする α DGP やシアル酸合成酵素遺伝子の異常を原因とする DMRV は、本邦に患者数の多い難病であり、一日も早い治療法

B. 研究方法

α -DGP 各責任遺伝子産物に対する抗体を作製し、その細胞内局在を検討した。また、fukutin, Large, POMGnT1 の組み換え蛋白質を作製して COS7 細胞および C2C12 筋管細胞に導入し、細胞内局在を検討するとともに、免疫沈降を行い、これら 3 分子の相互作用について検討した。また、FCMD 患者細胞において、 ^3H ラベルした GlcNAc の α -DG への取り込みを観察した。さらに、fukutin, LARGE, POMGnT1 複合体として、POMGnT1 活性を発揮しているかを検討するために、fukutin, LARGE の mutant を作製して、複合体の POMGnT1 活性を測定した。

さらに、5 ヶ月齢のウサギ全脳を用いた脳組織からのジストログリカン複合体の精製を試みた。また、本邦 α DGP の頻度を明らかにすべく、国立精神・神経センターの生検骨格筋レポジトリーの中で臨床筋病理学的に確定診断のついていないジストロフィー骨格筋について α -DG (VIA4-1) 抗体を用いた α -DG の糖鎖修飾異常のスクリーニングを行い、免疫染色で異常を認められた例についてフクチンならびに関連遺伝子の変異解析を行うとともに臨床病理学的解析をすすめた。

(倫理面への配慮)

本研究において使用する全てのヒト検体は、国立精神・神経センター倫理委員会で承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可（インフォームドコンセント）を得たものである。検体を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。検体の保存ならびに匿名化したうえでの破棄は、患者および家族の意思を尊重している。遺伝子解析に関してはヒトゲノム解析研究に関する共通指針を遵守した。また、すべての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従って行った。研究に使用する際には、必要最小限の動物を使用するとともに、動物に苦痛を与えないよう最大限の注意を払った。

C. 研究結果

これまでの研究結果から、POMGnT1、フクチン、LARGE がゴルジ体シス領域に存在し、複合体を形成している可能性についての知見を得ている。各組み換えタンパク質を発現させた後、免疫沈降法にてフクチンタンパク質とともに POMGnT1、LARGE は沈降した。FKRP を用いた時は、両タンパク質は免疫沈降しなかった。架橋実験では POMGnT1、LARGE、フクチンからなる産物が観察された。未変性条件下でのゲル濾過クロマトグラフィーでは、3 分子はほぼ同じパターンで溶出された。おもに、3 分画が得られ、350、750、1500kDa だった。

0-マンノースへの GlcNAc 転移活性では、単独では POMGnT1 のみが活性を示し、フクチン、LARGE、FKRP には活性はなかった。POMGnT1 とフクチンまたは LARGE を共発現すると、各々 2.5 倍、3.2 倍の活性化が観察され、3 分子ともに発現した時は 4.5 倍活性化した。

フクチンの変異体は発現量が正常に比べて低かった。しかし、POMGnT1 の分布には変化はなかった。フクチンによる POMGnT1 の活性化はほとんど見られなかった。

ウサギ脳組織を用いた解析では、脳組織のジストログリカン複合体は異なるジストロフィン分子種を含み数種類ある可能性が示された。 α -ジストログリカンパチーモデルマウスのジストログリカン複合体は幅広い電荷不均一性を示した。

日本人の α DGP 患者の頻度は、 α DG の糖鎖部分を認識する抗体 (VIA4-1) を用いた免疫組織化学法で、国立精神・神経センターの生検骨格筋レポジトリーを大規模にスクリーニングすることによって行った。その結果、臨床筋病理学的に筋ジストロフィーと診断されている骨格筋検体 653 例中 72 例に VIA4-1 の免疫反応に異常が認められた。このうち、二次的に α DG の染色が変化しうることの知られているジストロフィンパチーを除くと 13 例 (2.0% ; 欠損 4 例、減弱 9 例) が α DGP であると考えられた。これらの症例に対しフクチン遺伝子変異

解析を行った結果、6例がFCMDと診断された。現在、原因の明らかでない7人について5つの α DGP関連遺伝子の変異解析を進めている。

D. 考察

POMGnT1、LARGE、フクチンはともに、会合して複合体を形成していた。少なくとも、POMGnT1-フクチン、LARGE-フクチンだけでも、両者の間に会合性が見られた。内在性のタンパク質を介して両者が結合している可能性は否定出来ないが、架橋実験の架橋物の大きさからは直接結合している可能性が示唆された。今後は、欠失変異体を作製して、結合部位の同定を進めて行きたい。また、ゲル濾過クロマトグラフィーから得られた結果は3分子の複合体が巨大分子複合体を形成している可能性を示唆していた。今後は会合しているタンパク質を解析することで、未知の α DGP原因遺伝子の同定に繋げて行きたいと考えている。

In vitroでのGlcNAc転移活性測定によってフクチンとLARGEはPOMGnT1の活性化を行っていることが示唆された。 α DGPはそれぞれ、よく似た症状を示す疾患であるが、フクチンとLARGEの遺伝子変異がどのように病態形成に関わるのか不明であった。今回の解析結果は、両分子の遺伝子変異も同様に、POMGnT1の活性低下に関わることを示しており、3疾患が同様のメカニズムによって発症する可能性を示唆している。しかし、3疾患の間には多少差異も見られることから、より詳しい分子機能の解析が必要であると考えられる。

フクチン変異体は、ほとんど発現が見られなかった。このことは、発見されている点変異のほとんどが、フクチン分子の不安定化に寄与していることを示唆している。また、今まで報告のあるフクチンの局在に必要な領域だけでなく、分子全体にわたってフクチンの構造を安定に保つのに必要な残基が存在すると考えられる。

患者の脳組織でのPOMGnT1活性の低下は上記の考えを指示するものであ

た。また、治療法を考える上で、低下したPOMGnT1活性の回復は治療の標的であると考えられた。今後は、如何に酵素活性の低下を防ぐのが課題となる。

E. 結論

フクチンおよびLARGEは、POMGnT1と共にシスゴルジ体において複合体を形成し、POMGnT1の活性化に機能していた。両遺伝子の変異はPOMGnT1活性の低下を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsumura K, Zhong Di, Saito F, Arai K, Adachi K, Kawai H, Higuchi I, Nishino I, Shimizu T: Proteolysis of β -dystroglycan in muscular diseases. *Neuromuscul Disord* 15:336-341, 2005.

2) Matsumoto H, Hayashi YK, Kim DS, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa T, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, Nishino I: Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of α -dystroglycan in Japan. *Neuromuscul Disord* 15:342-348, 2005.

3) Amouri R, Driss A, Murayama K, Kefi M, Nishino I, Hentati F: Allelic heterogeneity of GNE gene mutation in two Tunisian families with autosomal recessive inclusion body myopathy. *Neuromuscul Disord* 15:361-363, 2005.

4) Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, Ari-kawa-Hirasawa E, Tanaka M, Yan C, Saftig P, Figura KV, Hirano M, Ueno S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic Vacuoles with Sarcolemmal Features Delineate Danon Disease and Related Myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:513-522, 2005.

5) Nakagawa O, Arnold M, Nakagawa M, Hamada H, Shelton JM, Kusano H, Harris TM, Childs G, Campbell KP, Richardson JA, Nishino I, Olson EN: Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. *Genes Dev* 19: 2066-2077, 2005.

6) Nishino I, Malicdan MC, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S: Molecular pathomechanism of distal myopathy with rimmed vacuoles. *Acta Myol* 24: 80-83. 2005.

7) Urtizberea JA, Thambyayah M, Nishino I, Megarbane A: Non-collagenic etiologies of muscle weakness with joint deformities: about two paradigmatic case reports. *Acta Myol* 24:78-79. 2005.

8) 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- α 2 deficient congenital muscular dystrophy; is congenital muscular dystrophy a primary fibrotic disease? *Biochem Biophys Res Commun* 342:489-502. 2006.

2. 学会発表

1) Urtizberea JA, Tambyayah M, Nishino I, Megarbane A: Enlarged joints and muscle weakness: two paradigmatic case reports. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.1, 2005.

2) Nishino I, Malicdan M, Murayama K, Noguchi S, Nonaka I: Distal myopathy with rimmed vacuoles: molecular pathomechanism. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.1, 2005.

3) Hayashi YK, Ozawa R, Ogawa M, Uematsu

F, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Animal model of emerinopathy. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.1, 2005.

4) Noguchi S, Fujita M, Sasaoka T, Nishino I: IGF-1 signaling pathway in skeletal muscle -Evaluation of the therapeutic effect of insulin-like growth factor 1 on muscular dystrophy by gene expression analysis-. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.2, 2005.

5) Nishino I: Diagnostic approaches for muscle diseases I. Molecular biological approach. The 2nd Malaysian-Japanese Neuromuscular Conference, Kuala Lumpur, Malaysian, 9.15, 2005.

6) 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病態. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.26, 2005.

7) 村山久美子, 笠畑尚喜, 埜中征哉, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの遺伝子解析. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.26, 2005.

8) 村上てるみ, 松本 浩, 小川 恵, 後藤加奈子, 野口 悟, 埜中征哉, 林由起子, 西野一三: 本邦で見いだされたMDC1C/LGMD2I. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.26, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

II. 分担研究報告

α-ジストログリカノパチー関連分子複合体の機能に関する研究

分担研究者 西野 一三 国立精神・神経センター神経研究所部長

研究要旨 フクチンおよびLARGEは、POMGnT1と共にシスゴルジ体において複合体を形成し、POMGnT1の活性化に機能していた。両遺伝子の変異はPOMGnT1活性の低下を示した。

A. 研究目的

α-DGの糖鎖修飾異常は、本邦に特異的に見られる福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）をはじめ、Walker-Warburg症候群（WWS）、筋-眼-脳症候群（MEB）、先天性筋ジストロフィー（MDC）1D、MDC1c/LGMD2Iなど複数の重篤な筋ジストロフィーの病態と深く関わっている。これら疾患の責任遺伝子産物はいずれもα-DGの糖鎖修飾に関与すると考えられている。このうち、POMT1、POMT2、POMGnT1は糖修飾酵素であることが明らかとなっているが、それ以外はFCMDの原因遺伝子産物フクチンをはじめ、いまだ明らかでない。昨年度は、POMGnT1、フクチン、LARGEがゴルジ体シス領域に存在し、複合体を形成している可能性があること、FCMD患者細胞でGlcNAcのα-DGへの取り込みが起らないことを示し、フクチン、LARGEのPOMGnT1機能への関与を示唆した。今年度は、直接にこれらのタンパク質複合体の機能を評価することを試みた。

B. 研究方法

フクチン、POMGnT1、LARGE cDNAをMycタグまたはFLAGタグ融合タンパク質発現用ベクターにクローン化し、発現用コンストラクトを作成した。これらのベクターを、各々、または組み合わせて骨格筋株化細胞で発現させ、複合体形成能とPOMGnT1活性測定用の試料を作製した。複

合体形成は、タグ抗体を用いた免疫沈降法、架橋剤による架橋実験およびゲルろ過クロマトグラフィーでの分子量測定により行った。POMGnT1活性は0-マンノシル化α-DGペプチドに対する³H-GlcNAcの転移速度により測定した。フクチン変異体は、今まで報告されている点変異と欠失変異に関してsite-directed mutagenesisによって作成した。αDGPモデルマウスはJackson研究所から供与を受けた。FCMD患者、αDGPモデルマウス脳からの粗ミクロソームの調製は、組織をホモジナイズ後、遠心操作を繰り返すことで調製した。細胞培養その他は定法に従い行った。免疫組織化学は間接蛍光抗体法を用いて行った。

（倫理面への配慮）

本研究において使用する全てのヒト検体は、国立精神・神経センター倫理委員会承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可（インフォームドコンセント）を得たものである。検体を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。検体の保存ならびに匿名化したうえでの破棄は、患者および家族の意思を尊重している。遺伝子解析に関してはヒトゲノム解析に関する共通指針を遵守した。また、すべての動物実験は、

国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従って行った。研究に使用する際には、必要最小限度の動物を使用するとともに、動物に苦痛を与えないよう最大限の注意を払った。

C. 研究結果

昨年度報告したように、POMGnT1、フクチン、LARGE がゴルジ体シス領域に存在し、複合体を形成している可能性があることが示唆されていた。各組み換えタンパク質を哺乳類細胞で発現させた後、免疫沈降法にてフクチンタンパク質とともに POMGnT1、LARGE が沈降した。FKRP を用いた時は、両タンパク質は免疫沈降しなかった。架橋実験では POMGnT1、LARGE、フクチンからなる産物が観察された。未変性条件下でのゲル濾過クロマトグラフィーでは、3 分子はほぼ同じパターンで溶出された。おもに、3 分画が得られ、350、750、1500kDa だった。

0-マンノースへの GlcNAc 転移活性では、単独では POMGnT1 のみが活性を示し、フクチン、LARGE、FKRP には活性はなかった。POMGnT1 とフクチンまたは LARGE を共発現すると、各々 2.5 倍、3.2 倍の活性化が観察され、3 分子ともに発現した時は 4.5 倍活性化した。

フクチンの変異体は発現量が正常に比べて低かった。しかし、POMGnT1 の分布には変化はなかった。変異フクチンによる POMGnT1 の活性化はほとんど見られなかった。

FCMD 患者の脳組織および LARGE 遺伝子に変異のある α DGP モデルマウスの脳組織では POMGnT1 の発現は少ないものの、その分布に変化はなかった。POMGnT1 の活性は正常の 50-80% に低下していた。

D. 考察

POMGnT1、LARGE、フクチンはともに、会合して複合体を形成していた。少なくとも、POMGnT1-フクチン、LARGE-フクチンだけでも、両者の間に会合性が見られた。内在性のタンパク質を介して両者が結合している可能性は否定出来ないが、架橋実験の架橋物の大きさからは直接結合している可能性が示唆された。今後は、欠

失変異体を作製して、結合部位の同定を進めて行きたい。また、ゲル濾過クロマトグラフィーから得られた結果は 3 分子の複合体が巨大分子複合体を形成している可能性を示唆していた。今後は会合しているタンパク質を解析することで、未知の α DGP 原因遺伝子の同定に繋げて行きたいと考えている。

In vitro での GlcNAc 転移活性測定によってフクチンと LARGE は POMGnT1 の活性化を行っていることが示唆された。aDGP はそれぞれ、よく似た症状を示す疾患であるが、フクチンと LARGE の遺伝子変異がどのように病態形成に関わるのか不明であった。今回の解析結果は、両分子の遺伝子変異も同様に、POMGnT1 の活性低下に関わることを示しており、3 疾患が同様のメカニズムによって発症する可能性を示唆している。しかし、3 疾患の間には多少差異も見られることから、より詳しい分子機能の解析が必要であると考

えている。フクチン変異体は、ほとんど発現が見られなかった。このことは、発見されている点変異のほとんどが、フクチン分子の不安定化に寄与していることを示唆している。また、今まで報告のあるフクチンの局在に必要な領域だけでなく、分子全体にわたってフクチンの構造を安定に保つのに必要な残基が存在すると考えられた。

患者の脳組織での POMGnT1 活性の低下は上記の考えを指示するものであった。また、治療法を考える上で、低下した POMGnT1 活性の回復は治療の標的であると考えられた。今後は、如何に酵素活性の低下を防ぐのかが課題となる。

E. 結論

フクチンおよび LARGE は、POMGnT1 と共にシスゴルジ体において複合体を形成し、POMGnT1 の活性化に機能していた。両遺伝子の変異は POMGnT1 活性の低下を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumura K, Zhong Di, Saito F, Arai K, Adachi K, Kawai H, Higuchi I, Nishino I, Shimizu T: Proteolysis of β -dystroglycan in muscular diseases. *Neuromuscul Disord* 15:336-341, 2005.
- 2) Matsumoto H, Hayashi YK, Kim DS, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa T, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, Nishino I: Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of α -dystroglycan in Japan. *Neuromuscul Disord* 15:342-348, 2005.
- 3) Amouri R, Driss A, Murayama K, Kefi M, Nishino I, Hentati F: Allelic heterogeneity of GNE gene mutation in two Tunisian families with autosomal recessive inclusion body myopathy. *Neuromuscul Disord* 15:361-363, 2005.
- 4) Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, Arikawa-Hirasawa E, Tanaka M, Yan C, Saftig P, Figura KV, Hirano M, Ueno S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic Vacuoles with Sarcolemmal Features Delineate Danon Disease and Related Myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:513-522, 2005.
- 5) Nakagawa O, Arnold M, Nakagawa M, Hamada H, Shelton JM, Kusano H, Harris TM, Childs G, Campbell KP, Richardson JA, Nishino I, Olson EN: Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. *Genes Dev* 19: 2066-2077, 2005.
- 6) Nishino I, Malicdan MC, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S: Molecular pathomechanism of distal myopathy with rimmed vacuoles. *Acta Myol* 24: 80-83. 2005.
- 7) Urtizbera JA, Thambyayah M, Nishino I, Megarbane A: Non-collagenic etiologies of

muscle weakness with joint deformities: about two paradigmatic case reports. *Acta Myol* 24:78-79. 2005.

- 8) 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- α 2 deficient congenital muscular dystrophy; is congenital muscular dystrophy a primary fibrotic disease? *Biochem Biophys Res Commun* 342:489-502. 2006.

2. 学会発表

- 1) Urtizbera JA, Thambyayah M, Nishino I, Megarbane A: Enlarged joints and muscle weakness: two paradigmatic case reports. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.1, 2005.
- 2) Nishino I, Malicdan M, Murayama K, Noguchi S, Nonaka I: Distal myopathy with rimmed vacuoles: molecular pathomechanism. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.1, 2005.
- 3) Hayashi YK, Ozawa R, Ogawa M, Uematsu F, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Animal model of emerinopathy. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.1, 2005.
- 4) Noguchi S, Fujita M, Sasaoka T, Nishino I: IGF-1 signaling pathway in skeletal muscle -Evaluation of the therapeutic effect of insulin-like growth factor 1 on muscular dystrophy by gene expression analysis-. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.2, 2005.
- 5) Nishino I: Diagnostic approaches for muscle diseases I. Molecular biological approach. The 2nd Malaysian-Japanese Neuromuscular Conference, Kuala Lumpur,

Malaysian, 9.15, 2005.

6) 西野一三 : 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの分子病態. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.26, 2005.

7) 村山久美子, 笠畑尚喜, 埜中征哉, 西野一三 : 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの遺伝子解析. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.26, 2005.

8) 村上てるみ, 松本 浩, 小川 恵, 後藤加奈子, 野口 悟, 埜中征哉, 林由起子, 西野一三 : 本邦で見いだされた MDC1C/LGMD2I. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.26, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

本邦における α -ジストログリカノパチーに関する研究

分担研究者 林 由起子 国立精神・神経センター神経研究所室長

研究要旨 α -ジストログリカン(α -DG)の糖鎖修飾異常を示す疾患群(α -ジストログリカノパチー; α -DGP)について臨床病理学的、分子細胞生物学的解析を行った。

A. 研究目的

α -DGの糖鎖修飾異常は、本邦に特異的にみられる福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)をはじめ、Walker-Warburg症候群(WWS)、筋-眼-脳症候群(MEB)、MDC1D、MDC1C/LGMD2I、LGMD2Kなど複数の重篤な筋ジストロフィーの病態と深く関わっている。これら疾患の責任遺伝子産物はいずれも α -DGの糖鎖修飾に関与していると考えられている。このうち、POMT1、POMT2、POMGnT1は糖転移酵素であることが明らかとなっているが、それ以外はFCMDの原因遺伝子産物フクチンをはじめ、未だその機能は明らかでない。

我々は昨年度に引き続き α -DGPの病態解明に向けた研究を進めている。

B. 研究方法

国立精神・神経センターの生検骨格筋レポジトリーの中で臨床筋病理学的に確定診断のついていないジストロフィー骨格筋について α -DG(VIA4-1)抗体を用いた α -DGの糖鎖修飾異常のスクリーニングを行い、免疫染色で異常を認めた例についてフクチンならびに関連遺伝子の変異解析を行うとともに臨床病理学的解析をすすめた。

(倫理面への配慮)

本研究において使用する全てのヒト検体は、国立精神・神経センター倫理委員会承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研

究使用に対する検体の使用許可(インフォームドコンセント)を得たものである。検体を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。検体の保存ならびに匿名化したうえでの破棄は、患者および家族の意思を尊重している。遺伝子解析に関してはヒトゲノム解析研究に関する共通指針を遵守した。また、すべての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従って行った。研究に使用する際には、必要最小限度の動物を使用するとともに、動物に苦痛を与えないよう最大限の注意を払った。

C. 研究結果

日本人の α -DGP患者の頻度は、 α -DGの糖鎖部分を認識する抗体(VIA4-1)を用いた免疫組織化学法で、国立精神・神経センターの生検骨格筋レポジトリーを大規模にスクリーニングすることによって行った。その結果、臨床筋病理学的に筋ジストロフィーと診断されている骨格筋検体653例中72例にVIA4-1の免疫反応に異常が認められた。このうち、二次的に α -DGの染色が変化していることの知られているジストロフィノパチーを除くと13例(2.0%;欠損4例、減弱9例)が α -DGPであると考えられた。これらの症例に対しフクチン遺伝子変異解析を行った結果、6例がFCMDと診断された。現在、原因の明らかでない7人について5つの α -DGP関連遺伝子の変異解析を進めている。また一方で、前年度見出していた α -DGP症

例のうち本邦で初めてPOMT2変異を有する先天性筋ジストロフィー症例を見出した。POMT2の変異は世界的にもまだ数例の報告のみであり、その臨床・筋病理学的情報は極めて重要であると考えている (paper in preparation)。

D. 考察

以上の結果より、本邦における α -DGPの頻度は筋ジストロフィーの約2%であり、その半数がFCMDであることを明らかにした。今後、原因遺伝子の明らかでない α -DGP症例についての遺伝子変異解析を進めることによってさらに詳細な疾患頻度を明らかにする予定である。

E. 結論

現在、変異の見出されていない α -DGP患者についてさらなる遺伝子変異解析を行っている。また、 α -DGPの病態解明に向けて、genotype-phenotype correlationについての解析を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsumoto H, Hayashi YK, Kim DS, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa T, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, Nishino I :Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of α -dystroglycan in Japan. *Neuromuscul Disord* 15:342-348, 2005.

2) Nishino I, Malicdan MC, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S: Molecular pathomechanism of distal myopathy with rimmed vacuoles. *Acta Myol* 24: 80-83. 2005.

2. 学会発表

3) Hayashi YK, Ozawa R, Ogawa M, Uematsu F, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Animal model of emerinopathy. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystro-

phies, Paris, 7.1, 2005.

2) 村上てるみ, 松本 浩, 小川 恵, 後藤加奈子, 野口 悟, 埜中征哉, 林由起子, 西野一三: 本邦で見いだされたMDC1C/LGMD2I. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.26, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

脳組織からのジストログリカン複合体の精製とその特性づけ

分担研究者 野口 悟 国立精神・神経センター神経研究所室長

研究要旨 脳組織からのジストログリカン複合体の精製を試みた。脳組織のジストログリカン複合体は異なるジストロフィン分子種を含み数種類ある可能性が示された。 α -ジストログリカノパチーモデルマウスのジストログリカン複合体は幅広い電荷不均一性を示した。

A. 研究目的

ジストログリカン（DG）複合体は、骨格筋の筋鞘膜に存在し、細胞内のジストロフィンと細胞外の基底膜成分ラミニンとをつなぐ分子である。この構造により、骨格筋線維の細胞膜を筋収縮による強いストレスから保護していると考えられている。DG 複合体構成成分である α DG はその糖鎖を介して基底膜ラミニンと結合している。最近、 α DG の糖鎖合成不全による先天性筋ジストロフィー（ α DGP）が発見されている。 α DGP では主に脳・眼・心臓・骨格筋に症状を示すが、 α DGP での、これらの組織での α DG 糖鎖構造変化に注目が集まっている。DG 複合体の単離法はウサギ骨格筋では確立されているものの、他の臓器ではリガンドであるラミニンとの結合を用いた簡易な方法しかなく、ラミニンとの結合性の消失したDG 複合体には用いることが出来ない。そこで、今年度の研究では、脳における DG 複合体の単離法を確立すべく解析を行った。

B. 研究方法

材料として、5ヶ月齢のウサギ全脳を用いた。脳からマイクロソーム画分を調整後、1% digitonin にて可溶化した。可溶化画分はレクチンクロマトグラフィーにて、吸着するタンパク質を集めた。さらに、

陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。DG 複合体やその他の結合タンパク質の検出には特異抗体でのウェスタンブロットを用いた。

また、 α DGP モデルマウス骨格筋からも同様に精製を試みた。等電点の解析には 0' Farrel の二次元電気泳動を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究において使用する全てのヒト検体は、国立精神・神経センター倫理委員会で承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究使用に対する検体の使用許可（インフォームドコンセント）を得たものである。検体を使用するに当たっては、プライバシーを尊重し、匿名化した上で使用した。検体の保存ならびに匿名化したうえでの破棄は、患者および家族の意思を尊重している。遺伝子解析に関してはヒトゲノム解析研究に関する共通指針を遵守した。また、すべての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従い行った。研究に使用する際には、必要最小限度の動物を使用するとともに、動物に苦痛を与えないよう最大限の注意を払った。

C. 研究結果

以前の報告では、マウス脳からの DG 複合体の精製にはコンカナバリン A が用いられていたが、より選択的に精製しようと思われる小麦胚芽レクチンと比較検討した。どちらも定量的に DG 複合体を結合したが、より回収される総タンパク質量の少ない小麦胚芽レクチンアフィニティークロマトグラフィーを用いることにした。次に、Hi-trap Q を用いたイオン交換クロマトグラフィーでは骨格筋よりも低いイオン強度で溶出された。ゲル濾過クロマトグラフィーでは、DG 複合体を含む分子量の異なる多成分(少なくとも 3 種類)に分離され、異なるジストロフィンアイソフォーム (Full length, DP140, DP71) とともに大複合体をとると考えられた。骨格筋に比べ、大複合体の分子量はむしろ小さいものであった。

α DGP モデルマウス骨格筋からも 0.1% ジギトニンによって、DG 複合体は定量的に抽出された。 α DGP モデルマウスでは α DG は糖鎖伸長が悪いことが報告されているが、非還元末端に存在するシアル酸のクラスター構造に結合する小麦胚芽レクチンでもすべてが結合性を示した。しかしながら、イオン交換クロマトグラフィーでは、コントロール由来物が 0.35M で溶出されるのに対して、 α DGP モデルマウスでは 0.15-0.35M までの幅広いイオン強度で溶出され、広い電荷不均一性を示していた。さらに、二次元電気泳動においても α DGP モデルマウス由来の α DG はむしろ広い等電点範囲を示した。

D. 考察

今までに、脳組織に存在するジストロフィン-DG 複合体の精製に関する報告はなかった。特異抗体により、免疫化学的に DG 複合体の存在と結合タンパク質についての情報が報告されているのみである。また、骨格筋以外の組織から行われている精製法は、 α DG 糖鎖のラミニン結合性を利用しているため、ラミニン結合性の消失した α DGP 患者、モデルマウス由来の DG 複合体の精製には使えない。そこで、 α DG の分子機能を用いない精製法の確立

が望まれていた。しかしながら、筋細胞膜タンパク質の 0.5% 以下しか存在しないため、ステップをなるべく減らしたタンパク質精製系を構築する必要があった。本実験では、すでに確立されているウサギ骨格筋からのジストロフィン-DG 複合体の精製法を応用することで、全脳からの DG 複合体の精製法の確立を試みた。脳組織からのマイクロソーム画分から 1% ジギトニンで良好に抽出され、骨格筋とほぼ同様のクロマトグラフィー条件が使えることがわかった。タンパク質量も低く、比較的きれいな可溶化画分を調製出来た。レクチンクロマトグラフィーでは小麦胚芽レクチンが使用出来ることがわかり、安定的な条件下での精製が可能であった。ところが、最終段階のゲル濾過クロマトグラフィーでは、多成分に分離された。この結果については、次のことが考えられた。①脳組織は様々な細胞種からなるため、由来の異なる不均一な複合体組成を示した。②脳組織の DG 複合体は、界面活性剤や内在性のプロテアーゼに高い感受性を示し、大複合体が解離したため。脳組織の DG 複合体は均一な分子量を示すことから、限られた細胞集団に発現するものとも考えられたが、3種類のジストロフィンのアイソフォームが存在することからも①の可能性が強く示唆された。②については、否定出来ないが、ゲル濾過クロマトグラフィーまで各複合体が分離されなかったことを考えると可能性は低いと思われた。

α DGP モデルマウス骨格筋からの DG 複合体は電荷不均一性を示した。以前から、このマウスでは糖鎖が短いことが示されていたが、この結果は、単に糖鎖が伸長せずにいるというよりは、他の構造へと置き換わっている可能性を示唆していた。結論をつけるには糖鎖構造解析に委ねるしかないが、DG 複合体の広い電荷不均一性は、この精製が非常に難しい可能性があることを示している。

E. 結論

脳組織のジストログリカン複合体は異なるジストロフィン分子種を含む数種類

からなる可能性が示された。 α -ジストログリカノパチーモデルマウスのジストログリカン複合体は幅広い電荷不均一性を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1) Matsumoto H, Hayashi YK, Kim DS, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa T, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, Nishino I: Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of α -dystroglycan in Japan. *Neuromuscul Disord* 15:342-348, 2005.

2) Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, Arikawa-Hirasawa E, Tanaka M, Yan C, Saftig P, Figura KV, Hirano M, Ueno S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic Vacuoles with Sarcolemmal Features Delineate Danon Disease and Related Myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:513-522, 2005.

3) Nishino I, Malicdan MC, Murayama K, Nonaka I, Hayashi YK, Noguchi S: Molecular pathomechanism of distal myopathy with rimmed vacuoles. *Acta Myol* 24: 80-83, 2005.

4) 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- α 2 deficient congenital muscular dystrophy; is congenital muscular dystrophy a primary fibrotic disease? *Biochem Biophys Res Commun* 342:489-502, 2006.

2. 学会発表

1) Nishino I, Malicdan M, Murayama K, Noguchi S, Nonaka I: Distal myopathy with rimmed vacuoles: molecular pathomechanism. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.1, 2005.

2) Hayashi YK, Ozawa R, Ogawa M, Uematsu F, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Animal model of emerinopathy. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.1, 2005.

4) Noguchi S, Fujita M, Sasaoka T, Nishino I: IGF-1 signaling pathway in skeletal muscle -Evaluation of the therapeutic effect of insulin-like growth factor 1 on muscular dystrophy by gene expression analysis-. Sixth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Paris, 7.2, 2005.

4) 村上てるみ, 松本 浩, 小川 恵, 後藤加奈子, 野口 悟, 埜中征哉, 林由起子, 西野一三: 本邦で見いだされた MDC1C/LGMD2I. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 5.26, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名 : 論文タイトル名. 発表誌名 巻号 : ページ, 出版年
Matsumura K, Zhong Di, Saito F, Arai K, Adachi K, Kawai H, Higuchi I, Nishino I, Shimizu T: Proteolysis of β -dystroglycan in muscular diseases. <i>Neuromuscul Disord</i> 15:336-341, 2005.
Matsumoto H, Hayashi YK, Kim DS, Ogawa M, Murakami T, Noguchi S, Nonaka I, Nakazawa T, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, Nishino I :Congenital muscular dystrophy with glycosylation defects of α - dystroglycan in Japan. <i>Neuromuscul Disord</i> 15:342-348, 2005.
Amouri R, Driss A, Murayama K, Kefi M, Nishino I, Hentati F: Allelic heterogeneity of GNE gene mutation in two Tunisian families with autosomal recessive inclusion body myopathy. <i>Neuromuscul Disord</i> 15:361-363, 2005.
Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, Arikawa-Hirasawa E, Tanaka M, Yan C, Saftig P, Figura KV, Hirano M, Ueno S, Nonaka I, Nishino I: Autophagic Vacuoles with Sarcolemmal Features Delineate Danon Disease and Related Myopathies. <i>J Neuropathol Exp Neurol</i> 64:513-522, 2005.
Nakagawa O, Arnold M, Nakagawa M, Hamada H, Shelton JM, Kusano H, Harris TM, Childs G, Campbell KP, Richardson JA, Nishino I, Olson EN: Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. <i>Genes & Dev</i> 19: 2066-2077, 2005.
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- α 2 deficient congenital muscular dystrophy; is congenital muscular dystrophy a primary fibrotic disease? <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 342:489-502. 2006.

IV. 研究成果の刊行物・別刷