

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

神経移動障害を伴う筋疾患の病態解明と治療法実現に向けた技術集約的研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 萬谷 博

平成18（2006）年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

神経移動障害を伴う筋疾患の病態解明と  
治療法実現に向けた技術集約的研究

萬谷 博

----- 1

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 4

### III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 5

神経移動障害を伴う筋疾患の病態解明と治療法実現に向けた技術集約的研究

主任研究者 萬谷 博、(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、研究員

**研究要旨** 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。筋ジストロフィーは一般的に単一遺伝子の異常によるもので、これまでに多くの原因遺伝子が発見され、発症メカニズムの解明や治療法開発に期待が寄せられている。我々はこれまでに、先天性筋ジストロフィーに分類される muscle-eye-brain 病 (MEB) と Walker-Warburg syndrome (WWS) の原因遺伝子 POMGnT1 と POMT1 および POMT2 が O-mannose 型糖鎖を合成する糖転移酵素であることを示し、MEB と WWS が O-mannose 型糖鎖不全を起因とする疾患であることを明らかにしている。これらの知見は O-mannose 型糖鎖が神経や筋組織の正常な発生や機能に重要な役割を果たしていることを示している。本年度は、遺伝子診断に代わる MEB や WWS の簡便迅速な診断法に、我々の開発した酵素活性測定法を応用するため、酵素活性測定用の酵素原試料を検討し、リンパ球が有効な酵素原となることを見いだした。また、O-mannose 型糖鎖 (Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man) 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、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、GalTII が O-mannose 型糖鎖合成に関与することを示した。

A. 研究目的

Muscle-eye-brain 病 (MEB) と Walker-Warburg 症候群 (WWS) は臨床的に福山型に類似しており、先天性の筋ジストロフィー症に中枢神経系の形成障害を伴う疾患である。これらの類縁疾患では共通して、ジストロフィン糖タンパク質複合体の構成分子である  $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖異常が観察される。

我々はこれまでに、 $\alpha$ -dystroglycan の糖鎖解析から O-mannose 型糖鎖 (Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man) を発見し、MEB と WWS の原因遺伝子産物 POMGnT1 と POMT1 及び POMT2 がこの糖鎖の生合成に関わる糖転移酵素であることを明らかにしている。さらに、これらの糖転移酵素遺伝子に MEB 及び WWS 患者に見られる変異を導入すると酵素活性が消失することを示した。これらの知見は、MEB と WWS が O-mannose 型糖鎖の修飾不全による疾患であることを示しており、この糖鎖が脳や筋の発生や機能において重要な役割を担っていることを意味している。したがって、O-mannose 型糖鎖の機能および生合成機構の解明は、筋ジストロフィーの病態を理解する上で重要である。

本年度は以下の2つの課題を中心に研究を行った。

(1) 酵素活性測定法による診断法の開発：遺伝子診断に代わる MEB や WWS の簡便迅速な診断法としての酵素活性測定法の可能性を探るため、ラット組織及びヒト由来培養細胞株を用いて酵素活性の組織分布を解析し、診断に最適な酵素原を検討した。

(2) O-mannose 型糖鎖の Gal $\beta$ 1-4GlcNAc 形成を担う galactose 転移酵素の検討：O-mannose 型糖鎖 (Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man) 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。O 結合型や N 結合型など様々な糖鎖合成において、Gal $\beta$ 1-4GlcNAc 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 $\beta$ 1-4GlcNAc 形成に関わる酵素について検討した。

B. 研究方法

(1) ラット各臓器及びヒト由来培養細胞株より

膜画分タンパク質を調製し、POMGnT1 と POMT 活性を測定した。

(2) ヒト $\beta$ 1,4GalTI ~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、GlcNAc $\beta$ 1-2Man-2AB と GlcNAc $\beta$ 1-2Man-peptide を基質として各 $\beta$ 1,4GalT 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 $\beta$ 1,4GalT mRNA の発現量を定量的に解析した。

### C. 研究結果および考察

(1) ラットにおける POMGnT 活性と POMT 活性の臓器分布は類似しており、脳が最も活性が高く、以下、腎臓、肝臓、心筋、肺、骨格筋の順に検出された。培養細胞では今回調べた全ての株で POMGnT 活性と POMT 活性が検出され、細胞株による活性の強さには特に差は認められなかった。これまで、POMGnT1 と POMT1,2 の組織分布に関しては mRNA の発現しか報告がなかった。その理由として特異的抗体が存在しないこと、組織での酵素活性測定法の感度が低いことが挙げられる。我々の開発した高感度活性測定法により、今回初めて POMGnT1 と POMT 活性の組織分布が明らかになった。また、培養細胞では臓器に比較して基質の分解活性が非常に弱く、活性測定が容易であった。そこで、細胞を簡単に単離でき、採取が容易な血球系の細胞に着目した。MEB 病および WWS 患者由来のリンパ球と正常ヒトリンパ球を EB ウイルスにより不死化させた培養リンパ球の POMGnT1 活性と POMT 活性を測定した。その結果、正常リンパ球では高感度に両活性とも検出され、患者リンパ球ではそれぞれの活性は検出されなかった。

(2) 糖受容体基質 GlcNAc $\beta$ 1-2Man-2AB と GlcNAc $\beta$ 1-2Man-peptide に対する各 $\beta$ 1,4GalT 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、 $\beta$ 1,4GalT 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 $\beta$ 1,4GalT 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 $\beta$ 1,4GalT 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、両酵素の中樞神経系の形成における重要性が示唆された。この結果から、O-mannose 型糖鎖の Gal $\beta$ 1-4GlcNAc 形成を担う galactose 転移酵素は $\beta$ 1,4GalTII であることが示唆された。特に $\beta$ 1,4GalTII は胎児期の脳での発現が高く、また脳では $\beta$ 1,4GalTI がほとんど発現していないことから、 $\beta$ 1,4GalTII 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、中樞神経系の形成に重要であることが示された。これまでに、 $\beta$ 1,4GalT 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 $\beta$ 1,4GalT 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。

### D. 結論

血球系のリンパ球で高感度に酵素活性の検出ができたことは、検体採取時の簡便性や患者の負担を考慮する上で極めて重要である。また、O-mannose型糖鎖のGal $\beta$ 1-4GlcNAc形成を担うgalactose転移酵素は $\beta$ 1,4GalTIIであることが示唆され、中樞神経系の形成に深く関与することが示された。

### E. 論文発表

1. Toda, T., Chiyonobu, T., Xiong, H., Tachikawa, M., Kobayashi, K., Manya, H., Takeda, S., Taniguchi, M., Kurahashi, H., Endo, E.: Fukutin and  $\alpha$ -dystroglycanopathies. *Acta Myol.*, 16(2), 60-63, 2005
2. Sasaki, N., Manya, H., Okubo, R., Kobayashi, K., Ishida, H., Toda, T., Endo, T., Nishihara, S.:  $\beta$ 4GalT-II is a key regulator of glycosylation of the proteins involved in neuronal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 333(1), 131-137, 2005
3. Saito, F., Blank, B., 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(11), 2359-2363, 2005

4. Endo, T., Manya, H.: *O*-Mannosylation in Mammalian Cells. Protocol for Methods in Molecular Biology (Ed. Brockhausen, I), *Humana Press*, New Jersey, 2006, in press

5. 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

6. 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

#### F. 学会発表

1. 萬谷博、赤阪啓子、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. 日本薬学会第126年会, 仙台, 2006.3.28-30

2. 赤阪—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

3. Tachikawa, M., Xiong, H., Kobayashi, K., Manya, H., Chiyonobu, T., Nagai, Y., Endo, T., Toda, T.: Fukutin Interacts with and Modulates POMGnT1. 第78回日本生化学会大会, 神戸, 2005, 10, 19-22

4. Manya, H., Akasaka-M, K., Endo, T.: 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

5. Endo, T., Nishihara, S., Toda, T., Manya, H.:

Glycosyltransferases responsible for congenital muscular dystrophies. 第78回日本生化学会大会, 神戸, 2005, 10, 19-22

6. Endo, T., Akasaka, K., Nishihara, S., Toda, T., Manya, H.: Congenital muscular dystrophies due to glycosylation defect of protein *O*-mannosylation. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Florence, Italy. September 4-9, 2005

7. 萬谷博、赤阪啓子、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

8. Endo, T., Nishihara, S., Manya, H.: 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

9. Manya, H., Endo, T.: Defect of protein *O*-mannosylation in Walker-Warburg Syndrome. Glycoproteomics-protein modifications for versatile functions, Dubrovnik, Croatia, June 28 - 30, 2005

10. Nishihara, S., Ohmae, Y., Ichimiya, T., Manya, H., Yoshida, H., Toyoda, H., Endo, T., Ueda, R.: Functional analysis of *Drosophila* glycosyltransferases using RNAi mutant flies. The 2nd Japan-The Netherlands Glycobiology Symposium, April 18-20, 2005, Utrecht, The Netherlands

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

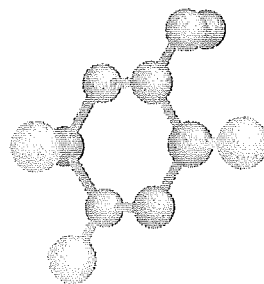
著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
遠藤玉夫 萬谷博	筋ジストロフィー	谷口 直之 伊藤 幸成	糖鎖科学の 新展開	NTS Inc.	東京	2005	159-165
Endo, T., Manya, H.	<i>O</i> -Mannosylation in Mammalian Cells.	Brockhausen, I.	Protocol for Methods in Molecular Biology	Humana Press Inc.	NJ, USA	印刷中	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
萬谷博、遠藤玉夫	<i>O</i> -結合マンノース $\beta$ 1,2- <i>N</i> アセチルグルコサミン転 移酵素 (POMGnT1)	生体の科学	56 巻 5 号	380-381	2005
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 Letter	579 巻 11 号	2359-2363	2005
Sasaki, N., Manya, H., Okubo, R., Kobayashi, K., Ishida, H., Toda, T., Endo, T., Nishihara, S.	$\beta$ 4GalT-II is a key regulator of glycosylation of the proteins involved in neuronal development.	Biochemical and Biophysical Research Communications	333 巻 1 号	131-137	2005
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	16 巻 2 号	60-63	2005

## 第3節

### 筋ジストロフィー

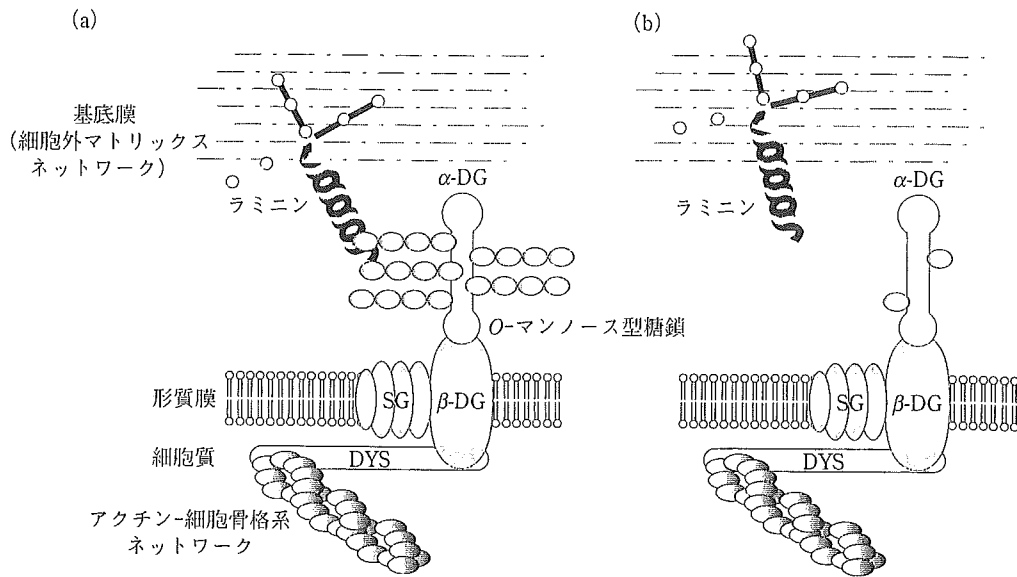


#### ① ジストログリカンと筋ジストロフィー

筋ジストロフィーは、筋線維の変性・壊死を主病変とし、進行性の遺伝子疾患群であり、世界中で多くの患者が苦しんでいる<sup>1)</sup>。運動機能や神経機能に重篤な障害をきたす難病で、病態の解明と効果的な治療法の開発が強く望まれている。原因は多岐にわたり、臨床症状や発症時期、頻度などが異なる多くの病型が存在する。近年の分子遺伝学の進歩に伴い多くの病型で原因遺伝子が明らかにされ、細かな分類が可能になると共に、病態の分子メカニズムに関する研究も急速に発展してきた。1987年に Kunkel らによって筋ジストロフィーの約半数を占めるデュシャンヌ型の原因遺伝子がジストロフィンというタンパク質をコードしていることが報告されたのを皮切りに、ラミニン  $\alpha 2$  欠損によるメロシン欠損型筋ジストロフィーやサルコグリカン欠損による肢帯型筋ジストロフィーなど、原因遺伝子の多くが筋形質膜のジストロフィン-糖タンパク質複合体 (dystrophin-glycoprotein-complex; DGC, 図 1(a)参照)に関連していることが明らかになった。DGC は  $\alpha$  および  $\beta$ -ジストログリカン ( $\alpha$ -DG、 $\beta$ -DG ; ジストログリカンは一つの遺伝子にコードされており、一つのタンパク質として翻訳された後で  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットに切断される) とジストロフィンを中心にいくつかのタンパク質によって構成されている。形質膜を貫通する  $\beta$ -DG は細胞の外側で  $\alpha$ -DG、細胞の内側でジストロフィンと結合し、さらに  $\alpha$ -DG はラミニンなど基底膜の分子と、ジストロフィンは細胞骨格系の分子と結合している。DG はこのように細胞骨格系と基底膜を連結している。

この DGC の構造は、筋肉の収縮弛緩という激しい運動を絶えず要求される過酷な環境から筋形質膜を保護する役割を担っており、DGC の異常による細胞骨格系と基底膜の連結不全が、筋形質膜の脆弱化を招き筋線維の崩壊を引き起こすと考えられている。このように筋ジストロフィーの発症において DGC の重要性が注目される中、我々は  $\alpha$ -DG の糖鎖の異常が先天性筋ジストロフィーの発症に関与するという新たな病態メカニズムを明らかにし、「 $\alpha$ -ジストログリカンノパチー」という新たな疾患概念を提唱した。

胎生致死となってしまうジストログリカン遺伝子破壊マウスの解析から、ジストログリカンは細胞外マトリックス分子を集合させて、基底膜を形成するために必要であることが考えられた。細胞外マトリックス分子であるラミニンと  $\alpha$ -DG との結合には  $\alpha$ -DG の糖鎖が重要であるということが示唆されていたので、我々はまずラミニンと  $\alpha$ -DG と



健常(左図)では $\alpha$ -DGに完成したO-Man型糖鎖が存在するため、DGCはラミニンなどの基底膜の分子と結合し、細胞内外を繋ぐ安定な連結軸を形成する。しかし、*POMT1*や*POMGnT1*遺伝子の変異により糖鎖不全となると、基底膜の分子に結合できなくなるため連結軸が形成できない。こうしたDGCの破綻がMEBやWWSで見られる脳の形態形成の異常や、筋障害の引き金となっていると考えられる。ジストロフィンやラミニン、サルコグリカン欠損でもDGC破綻となり別のタイプの筋ジストロフィーを発症する。 $\alpha$ -DG:  $\alpha$ -ジストログリカン,  $\beta$ -DG:  $\beta$ -ジストログリカン, SG: サルコグリカン, DYS: ジストロフィン

図1 ジストロフィン-糖タンパク質複合体(DGC)の構造(a)と $\alpha$ -DGの糖鎖異常による筋細胞膜-基底膜間の連結軸の破綻(b)

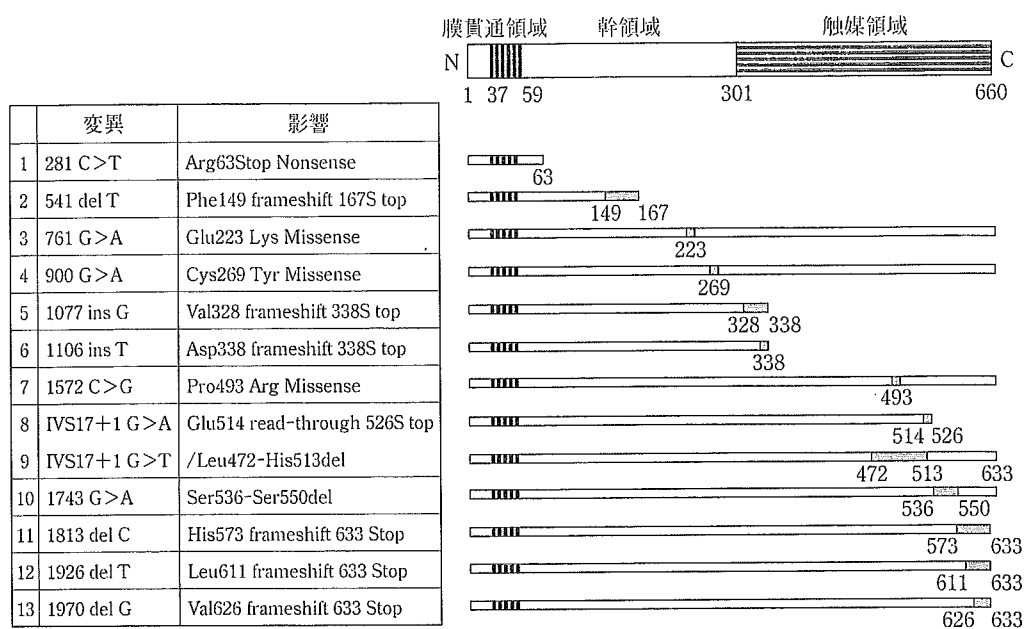
の結合について糖鎖の役割を解析した。

## ② O-マンノース(O-Man)型糖鎖とその異常による筋ジストロフィー

ラミニンと $\alpha$ -DGの結合にはシアル酸を含むO結合型糖鎖が関与することがわかった。そこで、 $\alpha$ -DGの糖鎖構造を分析し主要なO結合型糖鎖は、 $\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}$ であることを明らかにした<sup>2)</sup>。この糖鎖はマンノースを介してタンパク質に結合するO-マンノース(O-Man)型であり、哺乳類では、この報告が世界で初めてとなる新しい糖鎖構造だった。このO-Man型糖鎖は、ラミニンと $\alpha$ -DGとの結合を阻害したことから、ラミニンがO-Man型糖鎖を介して $\alpha$ -DGに結合していることが示唆された。一方その後いくつかのグループによりO-Man型糖鎖の多様性が報告された(図2参照)。O-Man型糖鎖は酵母や真菌では多く見られ、細胞壁の主要糖鎖として細胞の生育に必要な不可欠な糖鎖である<sup>3)</sup>。しかし、図2からわかるように哺乳類と酵母のO-Man型糖鎖は、タンパク質に最初に結合している糖がManであるところ以外は全く異なる構造をしている。酵母のO-Man型糖鎖は数残基のManのみで構成されており、 $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}$ という構造は存在しないなど、哺乳類のO-Man型糖鎖の構造とは大きく異なる。酵母と哺乳類におけるこのような違いにどれほどの生物学的意味があるのか







すべての変異で酵素活性を失っている。図中の数字はアミノ酸の位置を示している

図3 これまでに見つかっている MEB における POMGnT1 変異

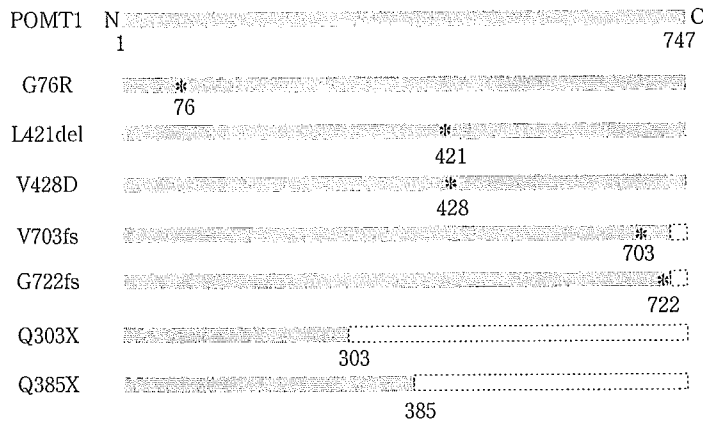
利用し POMT1 が O-Man 転移酵素であることを明らかにした<sup>10)</sup>。さらに、POMT1 が O-Man 転移酵素として機能するためには、もう一つのホモログである POMT2 が共存する必要があることを示した。これまでに WWS 患者から POMT1 遺伝子に 7 種類の変異が見つかっているが、すべての POMT1 変異体は酵素活性を失っていた<sup>11)</sup>(図4参照)。このことから、WWS も MEB 同様、O-Man 型糖鎖不全による疾患であると結論した。ところで、POMT1 が原因ではない WWS についてはいまだ原因遺伝子が分かっていない。WWS は MEB と異なって遺伝的に不均一であり、WWS 家系の連鎖解析から少なくとも 4 カ所の遺伝子座の存在が報告されている。POMT2 も O-Man 転移活性に必要であることから、POMT2 が WWS の原因遺伝子である可能性も考えられるが、これまでに POMT2 変異の患者は見つかっていない。

以上の知見から、WWS の  $\alpha$ -DG では O-Man 型糖鎖が完全に消失し、MEB では最初の Man のみ付加され GlcNAc 以降がないと考えられる。一般的に MEB に比較して WWS の症状の方が重いことが知られている。MEB も WWS もラミニンなどのリガンドと結合できなくなることで発症すると予想されるが、糖一つの違いが  $\alpha$ -DG の立体構造や安定性に影響するなどして、それが症状の違いとなっている可能性が考えられる。

### 3 糖鎖異常を伴う他の筋ジストロフィー

ここ数年の間に、MEB と WWS 以外の先天性筋ジストロフィーでも  $\alpha$ -DG の糖鎖異常を示す知見が相次いで報告されている(表1参照)。日本でデュシャンヌ型について

	変異	影響
1	226 G > A	Gly 76 Arg Missense (G76R)
2	907 C > T	Gln303 Nonsense (Q303X)
3	1153 C > T	Gln385 Nonsense (Q385X)
4	1260 to 1262 del CCT	Leu421 deletion (L421del)
5	1283 T > A	Val428 Asp Missense (V428D)
6	2110 ins G	Val703 frameshift 729 Stop (V703fs)
7	2167 ins G	Gly722 frameshift 729 Stop (G722fs)



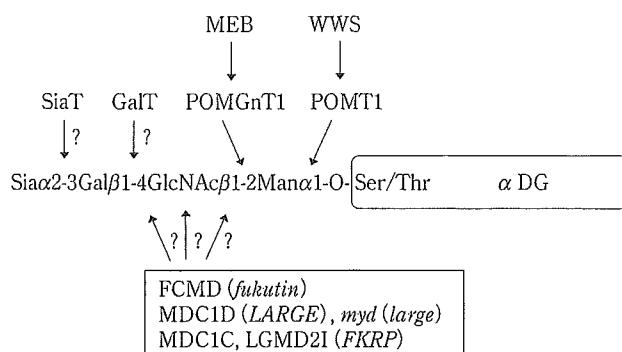
すべての変異で酵素活性を失っている。図中の数字はアミノ酸の位置を示している

図4 これまでに見つかっている WWS における *POMT1* 変異

表1  $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖異常が見られる筋ジストロフィー

病型分類	遺伝子座	遺伝子	遺伝子産物の機能
muscle-eye-brain 病 (MEB)	1p33	<i>POMGnT1</i>	GlcNAc 転移酵素
Walker-Warburg 症候群 (WWS)	9p31	<i>POMT1</i>	O-Man 転移酵素
福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD)	9p34	<i>fukutin</i>	糖転移酵素 (推定)
肢帯型筋ジストロフィー 2I (LGMD2I) 先天性筋ジストロフィー 1C (MDC1C)	19p13.3	<i>FKRP</i>	糖転移酵素 (推定)
先天性筋ジストロフィー 1D (MDC1D)	22q12.3-13.1	<i>LARGE</i>	糖転移酵素 (推定)
筋ジストロフィーマウス ( <i>myd</i> )	8 (マウス)	<i>large</i>	糖転移酵素 (推定)

多い福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) も MEB と WWS と同様の症状を呈し、原因遺伝子として *fukutin* が同定されている<sup>12)</sup>。*fukutin* は糖転移酵素あるいは糖鎖修飾関与する分子ではないかと推定されているが、酵素活性などの機能は分かっていない。また、先天性筋ジストロフィー 1C 型 (MDC1C) や肢帯型筋ジストロフィー 2I 型 (LGMD2I) の原因遺伝子 *FKRP* (fukutin-related protein) は、*fukutin* の相同遺伝子であるが、*fukutin* と同様に機能はまだ不明である<sup>13)14)</sup>。筋ジストロフィーモデルマウスとして知られる *myd* マウスも  $\alpha$ -DG の糖鎖異常が原因であると考えられており、その原因遺伝子 *large*



POMT1 および POMGnT1 の変異により O-Man 型糖鎖不全となり、それぞれ WWS と MEB が発症する。他の  $\alpha$  ジストログリカノパチーの原因遺伝子産物の機能はまだ解明されていない。また O-Man 型糖鎖伸長酵素であるガラクトース転移酵素やシアル酸転移酵素についてはまだ明らかになっておらず、それらが原因となる筋ジストロフィーの有無についても不明である。Sia: シアル酸, Gal: ガラクトース, GlcNAc: N-アセチルグルコサミン, Man: マンノース

図5 哺乳類における O-Man 型糖鎖の生合成と筋ジストロフィー

も糖転移酵素との相同性が示されている<sup>15)</sup>。最近、*LARGE* の変異がヒトの先天性筋ジストロフィー 1D 型 (MDC1D) の原因となることが報告された<sup>16)</sup>。一方、Campbell らのグループにより *LARGE* の過剰発現により、*myd* や MDC1D だけでなく WWS、FCMD、MEB 由来の筋芽細胞や線維芽細胞などでも  $\alpha$ -DG の糖鎖修飾が回復しラミニンなどとの結合も回復するという報告がなされ、 $\alpha$ -DG の糖鎖修飾に *LARGE* 分子が重要であることが示唆された<sup>17)</sup>。詳細については今後明らかになることが期待される。

これらの遺伝子の変異による筋ジストロフィーでは、 $\alpha$ -DG の糖鎖異常によりラミニンやニューレキシン、アグリンなどの細胞外マトリックス分子との結合障害が起こることで、筋変性と神経細胞移動の異常が生じるものと考えられる (図 1(b) 参照)。しかし、これらの原因遺伝子は糖転移酵素との相同性が認められているだけであり、POMT や POMGnT1 以外には機能はまだ分かっていない (図 5 参照)。今後、これらの遺伝子産物の機能を明らかにし、O-Man 型を含む  $\alpha$ -DG の糖鎖の生物学的意義を理解していくことによって、筋ジストロフィーの病態解明さらに治療法確立への道が拓かれることが期待される<sup>18)</sup>。

【参考・引用文献】

- 1) E. A. Burton and K. E. Davies: *Cell*, **108**, 5-8(2002).
- 2) A. Chiba, K. Matsumura, H. Yamada et al.: *J. Biol. Chem.*, **272**, 2156-2162(1997).
- 3) T. Endo: *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 237-246(1999).
- 4) A. Yoshida, K. Kobayashi, H. Many et al.: *Dev. Cell*, **1**, 717-724(2001).
- 5) K. Taniguchi, K. Kobayashi, K. Saito et al.: *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 527-534(2003).
- 6) H. Many, K. Sakai, K. Kobayashi et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 93-97(2003).
- 7) D. Beltran-Vlerio de Brenade, S. Currier, A. Steinbrecher et al.: *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 1033-1043(2002).
- 8) L. A. Juradp, A. Coloma and J. Cruces: *Genomics*, **58**, 171-180(1999).
- 9) T. Willer, W. Amselgruber, R. Deutzmann et al.: *Glycobiology*, **12**, 771-783(2002).

- 10) H. Manya, A. Chiba, A. Yoshida et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 500–505(2004).
- 11) K. Akasaka-Manyu, H. Manya and T. Endo: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 75–79(2004).
- 12) K. Kobayashi, Y. Nakahori, M. Miyake et al.: *Nature*, **394**, 388–392(1998).
- 13) M. Brockington, D. Blake, P. Prandini et al.: *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, 1198–1209(2001).
- 14) M. Brockington, Y. Yuva, P. Brown et al.: *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2851–2859(2001).
- 15) P. K. Grewal, P. J. Holzfeund, R. E. Bittner et al.: *Nat. Genet.*, **28**, 151–154(2001).
- 16) C. Longman, M. Brockington, S. Torelli et al.: *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2853–2861(2003).
- 17) R. Barresi, D.E. Michele, M. Kanagawa et al.: *Nat. Med.*, **10**, 696–703(2004).
- 18) T. Endo: *Glycoconjugate J.*, **21**, 3–7(2004).

<遠藤 玉夫／萬谷 博>

2. 酵素および酵素制御

**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)**

萬谷 博 遠藤 玉夫

蛋白質のセリン(Ser)あるいはスレオニン(Thr)のヒドロキシル基にマンノース(Man)が結合した糖鎖を O-Man 型糖鎖という。哺乳類の O-Man 型糖鎖の主要な構造として, Sia $\alpha$ 2-3 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man-Ser/Thr が報告されている<sup>1)</sup>。Protein O-mannose  $\beta$ 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (POMGnT1) は O-Man 型糖鎖の生合成において, UDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)を糖供与基質として GlcNAc を  $\beta$ 1-2 結合で Man に転移する酵素である。一方, N-結合型糖鎖の生合成過程における GlcNAc $\beta$ 1-2Man を合成する酵素として  $\beta$ 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase-I (GnT-I) と GnT-II が知られており, POMGnT1 はこれらとの相同性をもとにクローニングされた。しかし, GnT-I, II と POMGnT1 の糖受容基質に対する特異性は完全に異なり, GnT-I, II が O-Man 型, あるいは POMGnT1 が N-結合型糖鎖の生合成酵素として機能することはできない<sup>2)</sup>。

POMGnT1 は 660 個のアミノ酸からなり, N 末側の約 40 アミノ酸が細胞質側, 幹領域と触媒活性領域を含む C 末側の大部分が管腔側に存在する II 型膜結合蛋白質である。POMGnT1 の Arg367-Gly505 の領域は GnT-I の触媒活性領域との相同性が高く, POMGnT1 の N 末端側から 298 個および C 末端側から 9 個のアミノ酸を除いても触媒活性は保持されることから, Val299-Glu651 が触媒活性領域であると考えられる<sup>3)</sup>。GnT-I の X 線構造解析から, 触媒活性領域にある 16 個のアミノ酸が UDP-GlcNAc と Mn<sup>2+</sup> の結合に必要であることが示されており, 糖転移酵素に特徴的な D/E-X-D モチーフがこの中に含まれている<sup>4)</sup>。

これら 16 個のアミノ酸のうち D/E-X-D モチーフと, 触媒活性中心と予想されるアスパラギン酸残基を含む 10 個のアミノ酸が POMGnT1 で保存されている。また, GnT-I の触媒領域でジスルフィド結合を形成することが示されている二つのシステイン残基も POMGnT1 で保存されており, POMGnT1 も GnT-I の触媒活性ポケットと同様の構造を形成するものと予想される<sup>2)</sup>。

*POMGnT1* 遺伝子は第 1 染色体短腕(1p34.1) にマップされ, 9.76 kb の領域に 22 のエクソンよりなる<sup>2)</sup>。ノーザンブロット解析から, *POMGnT1* は全組織に広範囲に発現し, 特に筋組織と精巣で発現が強いことが示されている。

筋・眼・脳病(muscle-eye-brain, MEB 病; OMIM253280)は先天性の筋ジストロフィーに, 神経細胞遊走障害を由来とする II 型滑脳症を伴う常染色体劣性遺伝病である。臨床的特徴は重度の精神遅滞, 筋ジストロフィーのほかに網膜異常や視神経萎縮などの眼の障害を伴うことである。MEB 病家系の連鎖解析から 1p34 周辺に原因遺伝子が存在する可能性は示されていたが, MEB 病患者の *POMGnT1* ゲノム配列の解析から, *POMGnT1* が MEB 病の原因遺伝子であることが明らかになった<sup>2)</sup>。原因遺伝子が判明したことにより, これまでフィンランドを中心としたヨーロッパでしか症例が報告されていなかったが, 日本を含む世界各国に広く存在することがわかった<sup>5)</sup>。

現在までに MEB 病患者から *POMGnT1* 遺伝子に置換や欠失, フレームシフトなど 13 種類の変異が検出されている<sup>2,5)</sup>。これらの変異を導入した遺伝子組換え型 POMGnT1 はすべて触媒活性を

失うことが示されたことから<sup>2,6)</sup>, MEB病がO-Man型糖鎖不全による疾患であることが明らかになり, 神経および筋組織の発生におけるO-Man型糖鎖の機能が, 筋ジストロフィーの病態解明や治療に対する新たな標的として注目されている。

哺乳類におけるO-Man型糖鎖の組織分布や修飾蛋白質については, いまだ未解明な部分が多いが, 現在までに $\alpha$ -ジストログリカン( $\alpha$ -DG)がO-Man型糖鎖修飾を受けることが確認されている<sup>7)</sup>。 $\alpha$ -DGは多くの筋ジストロフィーの病態に関与するジストロフィン-糖蛋白質複合体(dystrophin-glycoprotein-complex, DGC)の構成分子として知られる。筋形質膜に存在するDGCはジストログリカン(DG)とジストロフィン, サルコグリカン複合体のほかいくつかの蛋白質によって構成されている。DGは翻訳後に切断されて $\alpha$ -と $\beta$ -DGになり, 形質膜を貫通する $\beta$ -DGの細胞外側に $\alpha$ -DG, 細胞内側にジストロフィンが結合する。さらに $\alpha$ -DGはラミニンなど基底膜の分子に, ジストロフィンはアクチンなど細胞骨格系の分子に結合して基底膜から細胞骨格を連結する構造となる。一般的にDGCの異常による基底膜-細胞骨格間の連結不全が筋ジストロフィーの発症メカニズムとして考えられており, ジストロフィン欠損によるデュシャンヌ/ベッカー型やラミニン2 $\alpha$ 鎖欠損によるメロシン欠損型などが有名である。

DGCにおけるラミニンと $\alpha$ -DGの結合に関してO-Man型糖鎖の構造研究から, O-Man型糖鎖が $\alpha$ -DGの主要なO-結合型糖鎖であること, N-結合型糖鎖の除去は結合に影響しないこと, O-結合型糖鎖の除去により結合能が失われることが示された<sup>7)</sup>。さらに, MEB病患者骨格筋由来

の $\alpha$ -DGは糖鎖部分に対する抗体への反応性が消失し, コア蛋白質に対する抗体で分子量の減少が観察されること, ラミニンとの結合性が消失していることが示されたことから<sup>8,9)</sup>,  $\alpha$ -DGが*in vivo*におけるPOMGnT1の糖鎖修飾の標的であり, O-Man型糖鎖がラミニンと $\alpha$ -DGの結合に必要であることが明らかとなった。

$\alpha$ -DGは筋組織のほか, 脳など広範な組織で発現しており, ラミニン以外にもアグリンやニューレキシンといった基底膜分子が糖鎖を介して結合することが示されている。MEB病に見られる神経細胞移動の異常もこれら基底膜分子の結合不全によることが明らかにされている<sup>10)</sup>。

近年, MEB病と同様の症状を示すいくつかの先天性筋ジストロフィーも $\alpha$ -DGの糖鎖異常に起因することが示され<sup>11)</sup>, O-Man型糖鎖と病態との関連が徐々に明らかになってきた。 $\alpha$ -DG以外のO-Man型糖鎖修飾の標的分子の同定など, O-Man型糖鎖の修飾機構や生理機能の全容解明に期待が寄せられている。

#### 文 献

- 1) Chiba A et al : *J Biol Chem* **272** : 2156-2162, 1997
- 2) Yoshida A et al : *Dev Cell* **1** : 717-724, 2001
- 3) Akasaka-Manyo K et al : *Biochem Biophys Res Commun* **320** : 39-44, 2004
- 4) Unligil UM et al : *EMBO J* **19** : 5269-5280, 2000
- 5) Taniguchi K et al : *Hum Mol Genet* **12** : 527-534, 2003
- 6) Manyo H et al : *Biochem Biophys Res Commun* **306** : 93-97, 2003
- 7) Endo T : *Biochim Biophys Acta* **1473** : 237-246, 1999
- 8) Kano H et al : *Biochem Biophys Res Commun* **291** : 1283-1286, 2002
- 9) Michele DE et al : *Nature* **418** : 417-422, 2002
- 10) Michele DE et al : *J Biol Chem* **278** : 15457-15460, 2003
- 11) Endo T : *Glycoconj J* **21** : 3-7, 2004

# Aberrant glycosylation of $\alpha$ -dystroglycan causes defective binding of laminin in the muscle of chicken muscular dystrophy

Fumiaki Saito<sup>a,\*</sup>, Martina Blank<sup>b</sup>, Jörn Schröder<sup>b</sup>, Hiroshi Manyá<sup>c</sup>, Teruo Shimizu<sup>a</sup>, Kevin P. Campbell<sup>d</sup>, Tamao Endo<sup>c</sup>, Makoto Mizutani<sup>e</sup>, Stephan Kröger<sup>b</sup>, Kiichiro Matsumura<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurology and Neuroscience, Teikyo University, 2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan

<sup>b</sup> Institute for Physiological Chemistry, University of Mainz, Duesbergweg 6, D-55099 Mainz, Germany

<sup>c</sup> Glycobiology Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

<sup>d</sup> Howard Hughes Medical Institute, Department of Physiology and Biophysics and Department of Neurology, The University of Iowa, Roy J.

and Lucille A. Carver College of Medicine, 400 Eckstein medical research building, Iowa City, IA 52242-1101, USA

<sup>e</sup> Nippon Institute for Biological Science, 3331-114 kamisasa, kobuchisawa-cho, Yamanashi prefecture 408-0041, Japan

Received 17 February 2005; revised 9 March 2005; accepted 9 March 2005

Available online 25 March 2005

Edited by Sandro Sonnino

**Abstract** Dystroglycan is a central component of dystrophin–glycoprotein complex that links extracellular matrix and cytoskeleton in skeletal muscle. Although dystrophic chicken is well established as an animal model of human muscular dystrophy, the pathomechanism leading to muscular degeneration remains unknown. We show here that glycosylation and laminin-binding activity of  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) are defective in dystrophic chicken. Extensive glycan structural analysis reveals that Gal $\beta$ 1-3GalNAc and GalNAc residues are increased while Sia $\alpha$ 2-3Gal structure is reduced in  $\alpha$ -DG of dystrophic chicken. These results implicate aberrant glycosylation of  $\alpha$ -DG in the pathogenesis of muscular degeneration in this model animal of muscular dystrophy.

© 2005 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Dystroglycan; Laminin; Muscular dystrophy; Glycosylation; Dystrophic chicken

## 1. Introduction

The dystroglycan complex is composed of two proteins,  $\alpha$ - and  $\beta$ -dystroglycan ( $\alpha$ - and  $\beta$ -DG), which are encoded by a single gene and cleaved by posttranslational processing [1].  $\alpha$ -DG is a highly glycosylated extracellular peripheral membrane protein and binds to several extracellular matrix (ECM) proteins including laminin, agrin, and perlecan [2–4]. In turn, the transmembrane protein  $\beta$ -DG anchors  $\alpha$ -DG at the extracellular surface of the plasma membrane, while its cytoplasmic domain interacts with dystrophin, a large cytoplasmic protein that binds to F-actin [5]. Thus, the DG complex plays a crucial role to stabilize the plasma membrane by acting as an axis through which the ECM is tightly linked to the cytoskeleton.

Recently, primary mutations in the genes encoding putative glycosyltransferases have been identified in several types of congenital muscular dystrophies including Fukuyama-type congenital muscular dystrophy, muscle–eye–brain disease, Walker–Warburg syndrome, congenital muscular dystrophy 1C (MDC1C) and 1D (MDC1D) [6–10]. Because glycosylation and laminin-binding activity of  $\alpha$ -DG are defective in these diseases [11], they are collectively called  $\alpha$ -dystroglycanopathy [12]. However, the precise oligosaccharide structures defective in  $\alpha$ -dystroglycanopathy have not been elucidated.

Muscular dystrophy in chicken was first described in 1956 [13]. Although dystrophic chicken has been established as an animal model of muscular dystrophy, the primary mutation has not yet been identified [14] and the pathomechanism leading to muscle cell degeneration remains unknown. We demonstrate here that glycosylation and laminin-binding activity of  $\alpha$ -DG are defective in the skeletal muscle of dystrophic chicken. Extensive glycan structural analysis reveals that, compared to control chicken, the amount of Gal $\beta$ 1-3GalNAc and GalNAc residues are increased, whereas Sia $\alpha$ 2-3Gal structure is reduced in  $\alpha$ -DG of dystrophic chicken.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Antibodies

Mouse monoclonal antibody against sugar chain moiety of  $\alpha$ -DG (IIH6) and sheep polyclonal antibody against core protein of  $\alpha$ -DG (sheep anti- $\alpha$ -DG) were described previously [2,15]. Mouse monoclonal antibody against sugar chain moiety of  $\alpha$ -DG (IVA4-1) was obtained from Upstate Biotechnology. Mouse monoclonal antibody against  $\beta$ -DG (8D5),  $\beta$ -sarcoglycan (5B1) and  $\gamma$ -sarcoglycan (21B5) were kind gifts from Dr. L.V.B. Anderson (Newcastle General Hospital). Mouse monoclonal anti-dystrophin (MANDRA 1) and affinity isolated rabbit anti-laminin were obtained from Sigma. Mouse monoclonal anti-dystrobrevin was purchased from BD Biosciences.

### 2.2. Lectin chromatography

Dystrophic chicken used in this study is New Hampshire, line 413, the colony of which is maintained homozygously. Line GSN/1, was used as a control. Pectoralis muscle of dystrophic and control chicken of 3 months of age were used. Skeletal muscle was disrupted with a polytron followed by Dounce homogenization and incubation in 50 mM Tris–HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.6  $\mu$ g/ml pepstatin A, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.5  $\mu$ g/ml aprotinin, 0.75 mM benzamide, and 0.1 mM PMSF. The extract was incubated with lectin

\*Corresponding author. Fax: +813 3964 6394.

E-mail address: f-saito@med.teikyo-u.ac.jp (F. Saito).

**Abbreviations:** DG, dystroglycan; DGC, dystrophin–glycoprotein complex



agarose, including wheat germ agglutinin (WGA), concanavalin A (Con A), peanut agglutinin (PNA), *Vicia villosa* agglutinin isolectin B<sub>4</sub> (VVA-B<sub>4</sub>), *Maackia amurensis* lectin (MAM) and lentil lectin (LCA). Bound proteins were eluted by boiling the beads in sample buffer (65 mM Tris-HCl, pH 6.9, 3% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 115 mM sucrose, and 0.0004% bromophenol blue) and the eluates were analyzed by Western blotting using sheep anti- $\alpha$ -DG.

### 2.3. Miscellaneous

Chemical deglycosylation was described previously [2]. Sialidase digestion was performed using sialidase from *Clostridium perfringens* (Roche) according to the procedure described elsewhere [16]. Immunofluorescent microscopic analysis, Western blotting and blot overlay assay were performed as described elsewhere [11]. The amount of glycosidically bound sialic acid was compared by periodate–resorcinol method [17] and statistical significance was evaluated by *t* test. Solid-phase assay was performed as previously mentioned [11] except that WGA eluates were coated on 96 wells EIA/RIA plates (Coaster) after measuring the band intensity of  $\alpha$ -DG on Western blots so that each well contained the same amount of  $\alpha$ -DG.

## 3. Results

### 3.1. Decreased immunoreactivity of $\alpha$ -DG in the skeletal muscle of dystrophic chicken

We first performed immunofluorescent microscopic analysis. The immunoreactivity of  $\alpha$ -DG revealed by antibody against sugar chain moiety of  $\alpha$ -DG was significantly decreased in dystrophic chicken, whereas the immunoreactivity of  $\alpha$ -DG was indistinguishable between control and dystrophic chicken when detected by antibody against core protein of  $\alpha$ -DG. The other components of dystrophin–glycoprotein complex (DGC) were normally expressed in dystrophic chicken (Fig. 1). Consistent with the immunofluorescent analysis, Western

blotting with antibody against sugar chain moiety of  $\alpha$ -DG demonstrated reduced immunoreactivity of  $\alpha$ -DG in dystrophic chicken (Fig. 2). In addition,  $\alpha$ -DG of dystrophic chicken migrated at 160 kD, faster than that of control which migrated at 200 kD (Fig. 2). The expression and molecular mass of the other components of the DGC were not altered (Fig. 2).

### 3.2. Altered glycosylation of $\alpha$ -DG in the skeletal muscle of dystrophic chicken

The results described above raise the possibility that the glycosylation, rather than expression, of  $\alpha$ -DG in dystrophic chicken may be altered. In order to test this possibility,  $\alpha$ -DG was enriched by WGA chromatography and chemically deglycosylated with trifluoromethanesulfonic acid. Similar to the antibody against sugar chain moiety of  $\alpha$ -DG, antibody against core protein of  $\alpha$ -DG recognized  $\alpha$ -DG species migrating around 200 and 160 kD in control and dystrophic chicken, respectively (Fig. 3, deglycosylation –). In addition, however, the anti-core protein antibody also detected  $\alpha$ -DG species with a lower molecular mass of 110 kD in control and 70–120 kD in dystrophic chicken (Fig. 3, deglycosylation –). In this report, we tentatively call the larger and smaller  $\alpha$ -DG species as L- $\alpha$ -dystroglycan (L- $\alpha$ -DG) and S- $\alpha$ -dystroglycan (S- $\alpha$ -DG), respectively. Upon chemical deglycosylation, the molecular mass of  $\alpha$ -DG was reduced to 55 kD both in control and dystrophic chicken equally, eliminating the difference in molecular mass (Fig. 3, deglycosylation +). These data indicate that  $\alpha$ -DG is aberrantly glycosylated in the skeletal muscle of dystrophic chicken. We also examined various tissues of dystrophic chicken to see if defective glycosylation of  $\alpha$ -DG was present. Western blot analysis using antibody against core protein of  $\alpha$ -DG demonstrated a

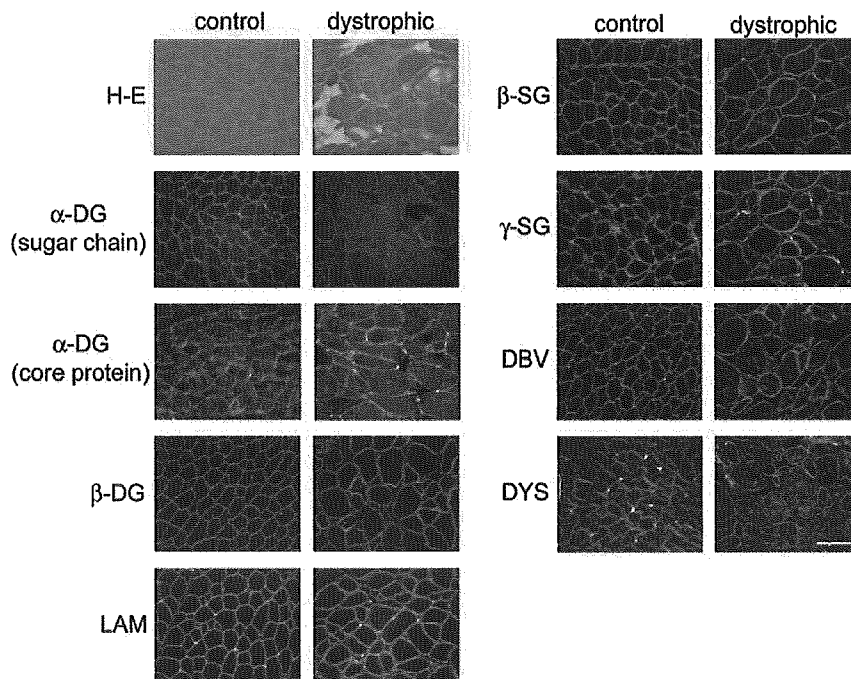


Fig. 1. Immunoreactivity of  $\alpha$ -dystroglycan is reduced in the skeletal muscle of dystrophic chicken when probed by antibody against sugar chain moiety. Expression and localization of each component of the DGC were analyzed by immunofluorescent microscopy. The immunoreactivity of  $\alpha$ -DG, as revealed by antibody against sugar chain moiety of  $\alpha$ -DG (IH6), is reduced in dystrophic chicken. However, the expression of  $\alpha$ -DG core protein is not altered. DG, dystroglycan; LAM, laminin; SG, sarcoglycan; DBV, dystrobrevin; DYS, dystrophin. Bar indicates 100  $\mu$ m.

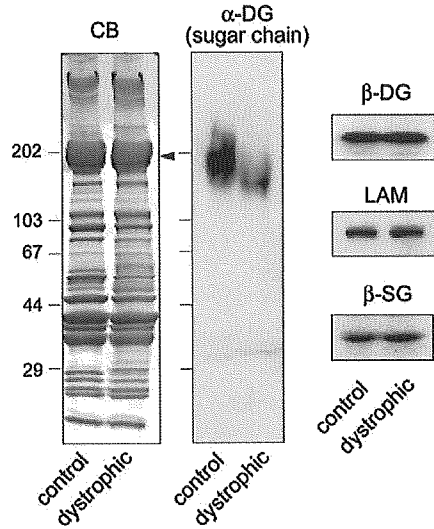


Fig. 2. The molecular mass of  $\alpha$ -DG is decreased in the skeletal muscle of dystrophic chicken. Western blotting was performed to examine the expression of  $\alpha$ -DG using whole skeletal muscle homogenates. The amount of protein loaded for each lane was normalized using myosin heavy chain as internal standard (arrowhead in the panel CB).  $\alpha$ -DG in dystrophic chicken migrates faster than that in control and the immunoreactivity of  $\alpha$ -DG is decreased in dystrophic chicken using antibody against sugar chain moiety of  $\alpha$ -DG (IIH6). The expression of other components of the DGC is not altered. CB, Coomassie blue staining; DG, dystroglycan; LAM, laminin; SG, sarcoglycan.

downward shift in the molecular mass of  $\alpha$ -DG in cardiac muscle, but not in other tissues including brain, peripheral nerve, kidney, spleen and liver (data not shown), indicating

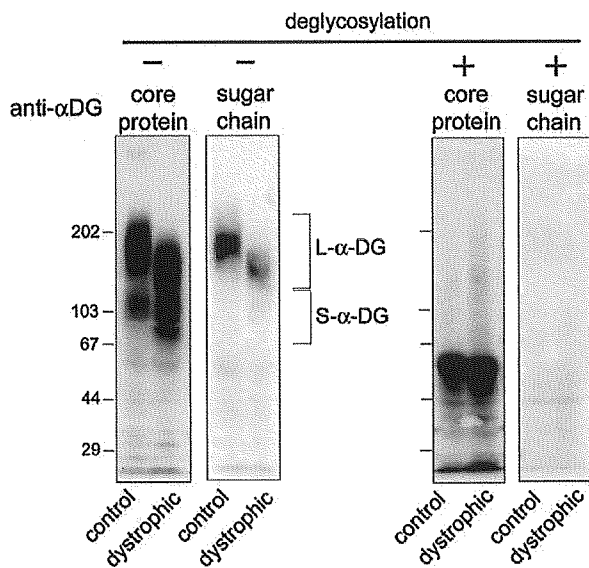


Fig. 3. Deglycosylation eliminates the difference in molecular mass of  $\alpha$ -DG between control and dystrophic chicken.  $\alpha$ -DG was enriched by WGA chromatography and chemically deglycosylated with trifluoromethanesulfonic acid. Antibody against core protein of  $\alpha$ -DG recognizes  $\alpha$ -DG species with higher molecular mass (L- $\alpha$ -DG), which are also detected by antibody against sugar chain moiety of  $\alpha$ -DG (VIA4-1). In addition, the anti-core protein of  $\alpha$ -DG recognizes  $\alpha$ -DG species with lower molecular mass (S- $\alpha$ -DG). After deglycosylation, the molecular mass of  $\alpha$ -DG decreases to 55 kDa in both control and dystrophic chicken equally (deglycosylation +).

that glycosylation of  $\alpha$ -DG was also altered in the cardiac muscle of dystrophic chicken.

3.3. Laminin-binding activity of  $\alpha$ -DG is decreased in the skeletal muscle of dystrophic chicken

Blot overlay assays demonstrated that the binding of laminin 1 and 2 to  $\alpha$ -DG was greatly reduced in dystrophic chicken (Fig. 4A). Notably, both laminin 1 and 2 bound to L- $\alpha$ -DG, but not S- $\alpha$ -DG (Fig. 4A). The band intensity of S- $\alpha$ -DG and L- $\alpha$ -DG was measured and the ratio of S- $\alpha$ -DG against total  $\alpha$ -DG (intensity of S- $\alpha$ -DG/intensity of S- $\alpha$ -DG + L- $\alpha$ -DG) was calculated. The ratio of S- $\alpha$ -DG was  $16.8 \pm 4.5\%$  in control versus  $40.9 \pm 4.1\%$  in dystrophic chicken (Fig. 4B), indicating that many more  $\alpha$ -DG molecules in dystrophic chicken lack the laminin-binding activity than control. Next, we performed quantitative solid-phase assay. The total laminin-binding activity was significantly decreased in the skeletal muscle of dystrophic chicken (Fig. 4C).

3.4. Glycosylation defects of dystrophic chicken  $\alpha$ -DG analyzed by lectin chromatography

To investigate the change in glycan structure of  $\alpha$ -DG in dystrophic chicken, we performed a set of lectin chromatographies.

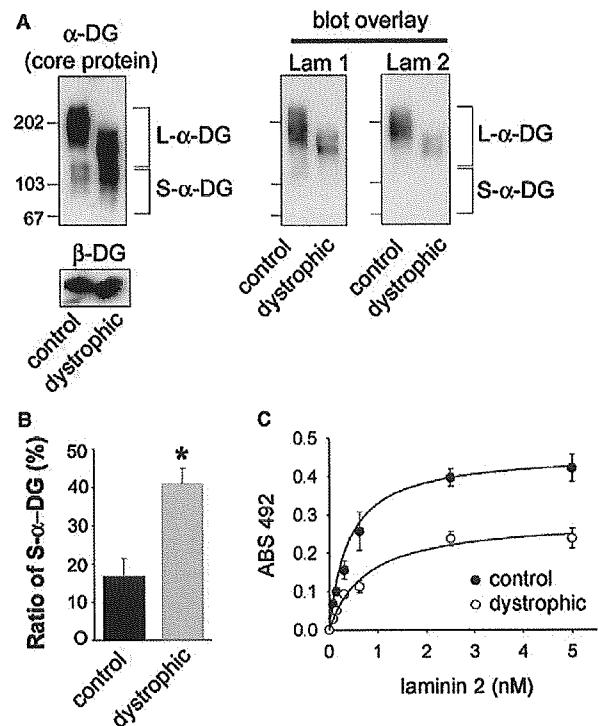


Fig. 4. Laminin-binding activity of  $\alpha$ -DG is decreased in the skeletal muscle of dystrophic chicken. (A) Equal amount of DG was transferred to PVDF membranes as revealed by Western blotting for  $\alpha$ -DG and  $\beta$ -DG. Blot overlay assays demonstrate that the binding of both laminin 1 and 2 to  $\alpha$ -DG is substantially decreased in dystrophic chicken. Both laminin 1 and 2 bind to L- $\alpha$ -DG, but not S- $\alpha$ -DG. Lam 1, laminin 1; Lam 2, laminin 2. (B) The band intensity of L- $\alpha$ -DG and S- $\alpha$ -DG was measured and the ratio of S- $\alpha$ -DG against total  $\alpha$ -DG was calculated. The ratio of S- $\alpha$ -DG is significantly higher in dystrophic chicken. \* $P < 0.003$ . (C) Solid-phase assay reveals that laminin-binding activity is significantly reduced in the skeletal muscle of dystrophic chicken.

As shown in Fig. 5A, Con A bound most of the  $\alpha$ -DG species, whereas LCA had no significant interaction with any  $\alpha$ -DG species (Fig. 5A). In sharp contrast, MAM bound L- $\alpha$ -DG in control, while it interacted only weakly with  $\alpha$ -DG in dystrophic chicken (Fig. 5A), indicating that Sia $\alpha$ 2-3Gal moieties are profoundly reduced in  $\alpha$ -DG of dystrophic chicken. Interestingly, PNA bound to a fraction of S- $\alpha$ -DG in dystrophic chicken, while no binding to  $\alpha$ -DG occurred in control (Fig. 5B, sialidase -). VVA-B<sub>4</sub> bound weakly to S- $\alpha$ -DG in control, whereas it strongly interacted with L- $\alpha$ -DG and S- $\alpha$ -DG in dys-

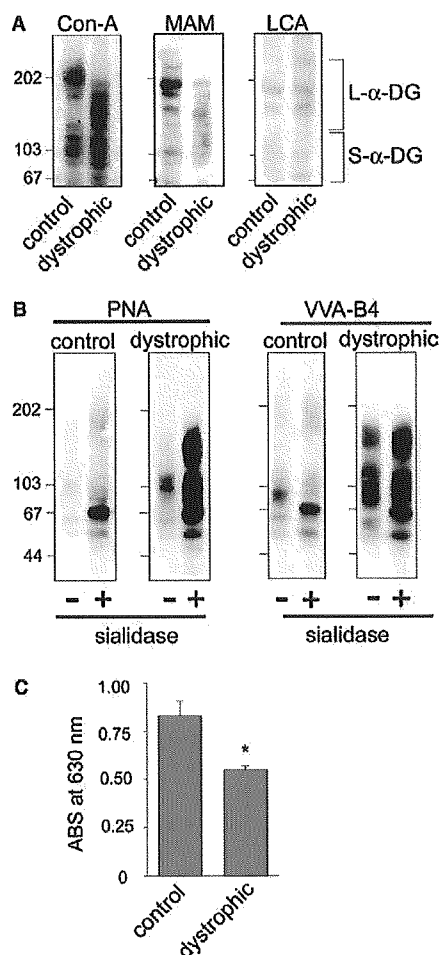


Fig. 5. Glycosylation of  $\alpha$ -DG is altered in the skeletal muscle of dystrophic chicken. (A)  $\alpha$ -DG was extracted using Triton X-100 and applied to lectin chromatography. The bound  $\alpha$ -DG was visualized by Western blotting using antibody against core protein of  $\alpha$ -DG. Con-A binds most of the  $\alpha$ -DG species, while LCA does not interact with any  $\alpha$ -DG species significantly. MAM strongly binds only to L- $\alpha$ -DG in control. (B) The Triton X-100 extracts were applied to PNA or VVA-B<sub>4</sub> chromatography with or without prior digestion by sialidase. Without sialidase treatment, PNA binds S- $\alpha$ -DG in dystrophic chicken, while it does not interact with  $\alpha$ -DG in control (sialidase -). VVA-B<sub>4</sub> binds S- $\alpha$ -DG in control only weakly, while it interacts strongly with both L- and S- $\alpha$ -DG in dystrophic chicken (sialidase -). With sialidase digestion, both PNA and VVA-B<sub>4</sub> bind extensively to L- $\alpha$ -DG and S- $\alpha$ -DG in dystrophic chicken compared to control (sialidase +). (C) Quantification of sialic acid by periodate-resorcinol method reveals that the amount of glycosidically bound sialic acids in the skeletal muscle of dystrophic chicken is significantly less than that of control chicken. \* $P < 0.001$ .

trophic chicken. Because the reactivity of these lectins are known to be severely decreased when sialic acids are attached to non-reducing termini of their binding sugar chain moieties [18], we enzymatically removed sialic acids by sialidase and repeated the experiments. After sialidase digestion, both S- $\alpha$ -DG and L- $\alpha$ -DG extensively interacted with PNA in dystrophic chicken, whereas only a small amount of S- $\alpha$ -DG was recovered in control. These results indicate that Gal $\beta$ 1-3GalNAc moieties are much more abundant on  $\alpha$ -DG in dystrophic chicken than that in control (Fig. 5B, sialidase +). Similar result was obtained with VVA-B<sub>4</sub>, indicating that GalNAc structures are much more abundant on  $\alpha$ -DG of dystrophic chicken (Fig. 5B, sialidase +). The amount of glycosidically bound sialic acids quantified by periodate-resorcinol method was substantially reduced in dystrophic chicken (Fig. 5C), which is consistent with the result of MAM lectin chromatography.

#### 4. Discussion

The mucin-like domain of  $\alpha$ -DG is heavily glycosylated by O-linked glycans [19], with the sugar chain moieties constituting up to two-thirds of its total molecular mass [1,2]. The antibody against sugar chain moiety of  $\alpha$ -DG detected only L- $\alpha$ -DG, while anti- $\alpha$ -DG core protein detected both L- $\alpha$ -DG and S- $\alpha$ -DG (Figs. 2 and 3), indicating diverse glycosylation of  $\alpha$ -DG in vivo. Notably, laminin bound to L- $\alpha$ -DG, but not to S- $\alpha$ -DG, in both control and dystrophic chicken (Fig. 4), indicating that the interaction of laminin with  $\alpha$ -DG is strictly regulated through glycosylation of  $\alpha$ -DG and that a fraction of  $\alpha$ -DG does not possess the sugar chain moieties necessary for the binding of laminin in vivo. Furthermore, the ratio of non-laminin-binding  $\alpha$ -DG (S- $\alpha$ -DG) is greatly increased in dystrophic chicken compared to control (Fig. 4). It would be intriguing to postulate that the increase of non-laminin-binding  $\alpha$ -DG may contribute to the dystrophic phenotype by exerting a dominant negative effect in dystrophic chicken, where non-laminin-binding  $\alpha$ -DG competes with laminin-binding  $\alpha$ -DG for the cytoskeletal linkage via dystrophin. Consistent with this hypothesis, we have observed that adenovirus mediated gene transfer of non-laminin-binding  $\alpha$ -DG constructs results in the degeneration of skeletal muscle in mice (Saito and Campbell, unpublished observation).

The results of lectin chromatography indicate that, compared to control chicken, the amount of Gal $\beta$ 1-3GalNAc and GalNAc residues are increased significantly while Sia $\alpha$ 2-3Gal structure is severely decreased in  $\alpha$ -DG of dystrophic chicken (Fig. 5). The reduction in the amount of sialic acids was confirmed by periodate-resorcinol sialic acid assay (Fig. 5). However,  $\alpha$ -DG appears to be hyposialylated rather than asialylated (Fig. 5C). We have reported recently that hyposialylation of  $\alpha$ -DG alone is not enough to abolish its laminin-binding activity in vivo [20]. It remains to be determined if hyposialylation in dystrophic chicken reflects the reduction of the sialyl O-mannosyl glycan, Sia2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man-Ser/Thr, implicated in the binding of laminin [21,22].

Pavoni et al. [23] reported recently that antibody against C-terminal portion of  $\alpha$ -DG core protein detected  $\alpha$ -DG with molecular mass of 109 kD in the skeletal muscle of normal chicken. Our S- $\alpha$ -DG may correspond to this small  $\alpha$ -DG, as judged by molecular mass. Pavoni et al. further postulated that this 109 kD  $\alpha$ -DG might be a partially glycosylated form of

$\alpha$ -DG. In the present study, we provided clear evidence of actual alteration of glycosylation of this small  $\alpha$ -DG molecule (Figs. 3 and 5). The molecular mass of  $\alpha$ -DG in the skeletal muscle of normal chicken was reported to change during development [24]. It would be thus interesting to see if the molecular mass of  $\alpha$ -DG in the skeletal muscle of dystrophic chicken also changes during development by future studies.

In conclusion, we have demonstrated altered glycosylation and decreased laminin-binding activity of  $\alpha$ -DG in chicken muscular dystrophy. Furthermore, we have demonstrated that Sia $\alpha$ 2-3Gal structure is reduced, while Gal $\beta$ 1-3GalNAc and GalNAc moieties are increased on  $\alpha$ -DG of this animal model of muscular dystrophy. These data would contribute to further understand the molecular mechanism of muscular degeneration caused by disturbed glycosylation of  $\alpha$ -DG in human muscular dystrophies.

**Acknowledgments:** We thank Hiroko F. Ohi, Miki Yamanaka and Yuka Sasayama for their expert technical assistance. This work was supported by [1] Research Grants 14B-4 and 16B-1 for Nervous and Mental Disorders (Ministry of Health, Labor and Welfare), [2] Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health (Ministry of Health, Labor and Welfare), [3] Research Grant 16390256 and "High-Tech Research Center" Project for Private Universities: matching fund subsidy from MEXT (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology), 2004–2008, and [4] a research grant from the Ichiro Kanahara Foundation.

## References

- [1] Ibraghimov-Beskrovnyaya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W. and Campbell, K.P. (1992) Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355, 696–702.
- [2] Ervasti, J.M. and Campbell, K.P. (1993) A role for the dystrophin–glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell. Biol.* 122, 809–823.
- [3] Bowe, M.A., Deyst, K.A., Leszyk, J.D. and Fallon, J.R. (1994) Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron* 12, 1173–1180.
- [4] Peng, H.B., Ali, A.A., Daggott, D.F., Rauvala, H., Hassell, J.R. and Smalheiser, N.R. (1998) The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction. *Cell Adhes. Commun.* 5, 475–489.
- [5] Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J.S. and Campbell, K.P. (1995) Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on  $\beta$ -dystroglycan. *J. Biol. Chem.* 270, 27305–27310.
- [6] Kobayashi, K., Nakahori, Y., Miyake, M., Matsumura, K., Kondo-Iida, E., Nomura, Y., Segawa, M., Yoshioka, M., Saito, K., Osawa, M., Hamano, K., Sakakihara, Y., Nonaka, I., Nakagome, Y., Kanazawa, I., Nakamura, Y., Tokunaga, K. and Toda, T. (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394, 388–392.
- [7] Yoshida, A., Kobayashi, K., Many, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Toda, T. and Endo, T. (2001) Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell* 1, 717–724.
- [8] Beltran-Valero De Bernabe, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., Van Beusekom, E., Van Der Zwaag, B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W.B., Cormand, B., Lehesjoki, A.E., Cruces, J., Voit, T., Walsh, C.A., van Bokhoven, H. and Brunner, H.G. (2002) Mutations in the *O*-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker–Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1033–1043.
- [9] Brockington, M., Blake, D.J., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., Ponting, C.P., Estournet, B., Romero, N.B., Mercuri, E., Voit, T., Sewry, C.A., Guicheney, P. and Muntoni, F. (2001) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin  $\alpha$ 2 deficiency and abnormal glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1198–1209.
- [10] Longman, C., Brockington, M., Torelli, S., Jimenez-Mallebrera, C., Kennedy, C., Khalil, N., Feng, L., Saran, R.K., Voit, T., Merlini, L., Sewry, C.A., Brown, S.C. and Muntoni, F. (2003) Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2853–2861.
- [11] Michele, D.E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R.D., Satz, J.S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R.I., Somer, H., Straub, V., Mathews, K.D., Moore, S.A. and Campbell, K.P. (2002) Posttranslational disruption of dystroglycan–ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418, 417–422.
- [12] Michele, D.E. and Campbell, K.P. (2003) Dystrophin–glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J. Biol. Chem.* 278, 15457–15460.
- [13] Asmundson, V.S. and Julian, L.M. (1956) Inherited muscle abnormality in the domestic fowl. *J. Hered.* 47, 248–252.
- [14] Lee, E.J., Yoshizawa, K., Mannen, H., Kikuchi, H., Kikuchi, T., Mizutani, M. and Tsuji, S. (2002) Localization of the muscular dystrophy AM locus using a chicken linkage map constructed with the Kobe University resource family. *Anim. Genet.* 33, 42–48.
- [15] Herrmann, R., Straub, V., Blank, M., Kutzick, C., Franke, N., Jacob, E.N., Lenard, H.G., Kroger, S. and Voit, T. (2000) Dissociation of the dystroglycan complex in caveolin-3-deficient limb girdle muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2335–2340.
- [16] Yamada, H., Chiba, A., Endo, T., Kobata, A., Anderson, L.V., Hori, H., Fukuta-Ohi, H., Kanazawa, I., Campbell, K.P., Shimizu, T. and Matsumura, K. (1996) Characterization of dystroglycan–laminin interaction in peripheral nerve. *J. Neurochem.* 66, 1518–1524.
- [17] Jourdain, G.W., Dean, L. and Roseman, S. (1971) The sialic acids. XI. A periodate–resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J. Biol. Chem.* 246, 430–435.
- [18] Ervasti, J.M., Burwell, A.L. and Geissler, A.L. (1997) Tissue-specific heterogeneity in  $\alpha$ -dystroglycan sialoglycosylation. Skeletal muscle  $\alpha$ -dystroglycan is a latent receptor for *Vicia villosa* agglutinin B4 masked by sialic acid modification. *J. Biol. Chem.* 272, 22315–22321.
- [19] Brancaccio, A., Schulthess, T., Gesemann, M. and Engel, J. (1995) Electron microscopic evidence for a mucin-like region in chick muscle  $\alpha$ -dystroglycan. *FEBS Lett.* 368, 139–142.
- [20] Saito, F., Tomimitsu, H., Arai, K., Nakai, S., Kanda, T., Shimizu, T., Mizusawa, H. and Matsumura, K. (2004) 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 (GNE) gene accompanied by hyposialylation of skeletal muscle glycoproteins. *Neuromuscul. Disord.* 14, 158–161.
- [21] Chiba, A., Matsumura, K., Yamada, H., Inazu, T., Shimizu, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Kobata, A. and Endo, T. (1997) Structures of sialylated *O*-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve  $\alpha$ -dystroglycan. *J. Biol. Chem.* 272, 2156–2162.
- [22] Sasaki, T., Yamada, H., Matsumura, K., Shimizu, T., Kobata, A. and Endo, T. (1998) Detection of *O*-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle  $\alpha$ -dystroglycan. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 599–606.
- [23] Pavoni, E., Sciandra, F., Barca, S., Giardina, B., Petrucci, T.C. and Brancaccio, A. (2005) Immunodetection of partially glycosylated isoforms of  $\alpha$ -dystroglycan by a new monoclonal antibody against its  $\beta$ -dystroglycan-binding epitope. *FEBS Lett.* 579, 493–499.
- [24] Leschziner, A., Moukhes, H., Lindenbaum, M., Gee, S.H., Butterworth, J., Campbell, K.P. and Carbonetto, S. (2000) Neural regulation of  $\alpha$ -dystroglycan biosynthesis and glycosylation in skeletal muscle. *J. Neurochem.* 74, 70–80.