

200632017B

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16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 西野 一三

平成19(2007)年4月

目 次

I.	総合研究報告	
	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	
	西野 一三 (国立精神・神経センター 神経研究所)	1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	12
III.	研究成果の刊行物・別刷	14

I. 総合研究報告

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) と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) は、どちらも本邦に患者数の多い難病であり、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、両疾患の病態解明と治療法開発を目指して、研究を進めてきた。その中で、極軽度の肢体型筋ジストロフィーと拡張型心筋症を呈する新しいフクチン変異の臨床型を 4 家系 6 例の患者に見だし、LGMD 2L と名付けた。また、先天性筋ジストロフィー患者の中で、POMT2 遺伝子変異を有する例を初めて見出した。 α -DGP の原因遺伝子産物のうち、フクチン、LARGE および POMGnT1 が複合体として一つの機能単位であること、また、FKRP と POMT1 が同局在していることを見出すとともに、フクチン・LARGE の変異体は POMGnT 活性低下を引き起こすことを初めて明らかにした。培養筋管細胞を用いて α -DG 依存的なアセチルコリン受容体の集合を指標に、新規な原因タンパク質の評価法の開発を試みた。

DMRV は、シアル酸合成酵素 GNE 遺伝子の変異により起こること、変異蛋白質の酵素活性が減少していること、DMRV 骨格筋・培養細胞でシアル酸含量が減少していることを明らかにした。ヒト GNE ミスセンス変異をノックアウトバックグラウンドで発現する DMRV モデルマウスを作製した。このマウスは、臨床的・病理学的・生化学的に DMRV を再現する世界初の DMRV モデルマウスであることを示した。このマウスの開発により、初めて前臨床試験の施行が可能となった

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

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) は、どちらも本邦に患者数の多い難病であり、一日も早い治療法の開発が望まれている。本申請研究は両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、フクチン、POMT1、POMT2、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、POMT1 および POMT2 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、これらの α -DGP 関連

A. 研究目的

筋細胞膜タンパク質 α -ジストログリカン (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) とシアル

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。一方、DMRV に関しては、2001 年、イスラエルの Eisenberg らが、GNE 遺伝子変異が認められることを報告したことを契機に、多数の患者において様々な GNE 変異が見出されてきている。この遺伝子は、シアル酸生合成経路の律速段階を触媒する 2 つの酵素活性 (UDP-GlcNAc2-epimerase: GNE および ManNAc6-kinase: MNK) を持つ蛋白質をコードしている。そこで、変異 GNE 遺伝子産物の機能を評価した。また、モデルマウスの作製を目指した。

B. 研究方法

α -DGP に関しては、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または肢帯型筋ジストロフィーについて、 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。ウエスタンブロット及びラミネンオーバーレイは定法に従って行なった。同定した変異を POMT2cDNA に site directed mutagenesis で導入した。POMT1 及び POMT2 は FLAG タグ融合タンパク質として、HEK293 細胞で発現した。定法に従って、POMT1/POMT2 活性を測定した。

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、フクチン、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・架橋実験を行い、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、フクチン、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、フクチン、POMGnT1 および LARGE の組み換えタンパク質を調製し、in vitro での放射性 GlcNAc 転移活性を測定した。さらに、フクチン変異体を作製し、その発現量と複合体の POMGnT1 活性を測定

した。

また、放射性ラベルを用いない活性測定法を確立した。POMGnT1 活性は O-マンノシル化 α -DG ペプチドに対して GlcNAc を転移させ、産物をアビジンビーズで部分精製後、アミド樹脂を用いた HPLC により分離した。反応産物の質量分析は、MALDI-TOF mass (Perseptive Voyager) によって解析した。

5 ヶ月齢のウサギ全脳を用い脳組織からの DG 複合体の精製を、各種クロマトグラフィーを用いて試みた。

培養細胞はマウス C2C12 細胞を用いた。培養基質として、ポリオルニチン添加ラミネンコートを用いた。筋管細胞への分化は定法に従い、血清を除去することで分化を誘導した。DG 及びフクチン siRNA は Invitrogen から購入した。遺伝子ノックダウン効果は DG の発現レベルとフクチンの mRNA 量により測定した。培養筋細胞への導入には Lipofectamine RNAiMAX 試薬 (Invitrogen) を用いた。アセチルコリン受容体の検出には TRITC ラベル α -ブングロトキシンを用いた。クラスタリングの計測は、オリンパス Fluoview 共焦点レーザー顕微鏡により行い、定量した。

一方、DMRV に関しては、これまでに、同定されているミスセンス変異を有する組み換え蛋白質を作製し、酵素活性の測定を行った。また、GNE/MNK がシアル酸生合成経路の重要な酵素であるならば、DMRV/HIBM 患者においては、当然、シアリル化異常があることが予想される。我々は、患者培養細胞に対して、各種 lectin を用いることで、患者細胞におけるシアリル化状態を検討した。また、見出されたシアリル化異常が、GNE/MNK の代謝産物の添加により、回復可能であるかどうかを検討した。さらに、患者筋組織において、lectin 染色を行い、組織学的にシアリル化異常を評価するとともに、2 次元電気泳動を行い、特に α -DG とリソソーム膜蛋白質に糖鎖異常があるかどうか注目して検討した。

DMRV のモデルマウスは、GNE-KO マウスと変異 GNE トランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製した。表現型の解析は行動解析、病理解析、生化学解析により行な

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。

G. 研究結果

フクチン、Large, POMGnT1 は、何れも cis-Golgi マーカーである GM130 と共局在していた。さらに、それぞれの分子の二重免疫染色でも共局在を確認した。また、cis-Golgi 変性剤である Brefeldin 処理により、これら分子の細胞内局在が変化することも確認した。免疫沈降では、フクチンと POMGnT1、フクチンと Large が共沈し、さらに、フクチン、Large, POMGnT1 の共沈も認められた。POMGnT1 抗体は、内在性分子も認識することが可能であった。骨格筋での発現パターンは cis-Golgi の分布として報告されているものに一致していた。³H ラベルした GlcNAc の α -DG への取り込みは、コントロール細胞では正常に取り込みが認められたが、FCMD 患者由来の筋管細胞では、GlcNAc 取り込みが認められなかった。

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-マンノースペプチドへの 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。また、ラジオアイソトープを用いない活性測定方法を試みて、順相クロマトグラフィーにより、良好に酵素産物を、反応物から分離出来ることがわかった。酵素産物は、4 つのピークを与えた。質量分析の結果から、それぞれ、GlcNAc が 1-3 残基転移されたペプチドであることがわかった。酵素として POMGnT1 を用いて、異なる基質濃度に対する反応産物の生成速度を調べた。GlcNAc を 1 残基をもつ生成物を産生する反応を Michaelis 反応に近似させた。この場合、 $K_m = 0.1$ nM 程度であった。

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 DG 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 -DGP モデルマウスの DG 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 の染色が変化するもの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

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。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た結果、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。HEK293細胞で発現した、変異を導入したPOMT2/POMT1複合体の酵素活性は、POMT1単独での酵素活性とほぼ同様に減少していた。

また、臨床病理学的に肢帯型筋ジストロフィーに分類された症例から α -DGPを、スクリーニングした。さらに、VIA4-1の免疫反応に異常が認められた症例に対しフクチン遺伝子変異解析を行った結果、4家系6例に変異が認められた。いずれの症例も福山型先天性筋ジストロフィー患者で認められる3'非翻訳領域の3 kb挿入変異と翻訳領域のミスセンス変異の複合ヘテロ接合型変異を認めた。何れの患者も知能は全く正常で、筋力低下も極軽度であったが、拡張型心筋症を伴っていた。ウエスタンブロット解析では、いずれの症例でも、 α -DGの糖鎖に対する抗体では、非常に弱い抗体反応を示し、タンパク質のサイズも減少した。また、ペプチド鎖に対する抗体でも弱く、ブロードなバンドを与えた。ラミニンオーバーレイでは、患者の α -DGは弱いラミニン反応性を示した。この患者群を、LGMD 2Lと名付けた。

α -DGP原因遺伝子候補の簡便なスクリーニング法の確立を行なった。モデルとして、DGおよびフクチンmRNAに対するそれぞれ2および3種のsiRNAを試した。2種のDGsiRNA処理下での β -DG発現レベルは、未処理のコントロールに比べ、72及び11%の発現抑制が見られた。培養筋管細胞は、基質に1型コラーゲンを用いた場合、長さが数 μ m程度の線状のアセチルコリン受容体の集合体を形成したが、配向したラミニンを用いて培養した場合、直径10 μ m程度の楕円状の"Pretzel"と呼ばれる集合体(クラスタリング構造)を形成した。このPretzel構造は、DGおよびフクチンsiRNA処理によって、その数、面積ともに、明らかに減少した。未処理の筋管細胞では、

単位面積あたり、45個のPretzelが観察されたが、DGsiRNA処理では、13-23個、フクチンsiRNA処理では、14-35個に減少していた。ひとつのPretzel構造の面積は、コントロールでは $95 \pm 123 \mu\text{m}^2$ であるのに対し、最も効果のあったDGsiRNA処理により $40 \pm 23 \mu\text{m}^2$ であった。また、最も効果のあった1種のフクチンsiRNA処理では $74 \pm 101 \mu\text{m}^2$ と減少を示した。他の2種ではPretzel数に減少がみられたものの、面積には変化が見られなかった。

一方、DMRVの解析では、GNE組み換え蛋白質に対して、GNEとMNKそれぞれの酵素活性の評価を行った。その結果、GNEドメインの変異ではGNE活性が、MNKドメインでの変異ではMNK活性がそれぞれ特異的に阻害されていた。WGA, SBAを含む各種レクチンを用いた患者培養細胞の糖修飾の評価では、線維芽細胞・筋管細胞ともに、WGAでのシグナルが減少し、SBAのシグナルが上昇していた。WGAはシアル酸を、SBAはGalNAcを認識することから、DMRV患者細胞においては、シアリル化が低下し、代わりにGalNAcが露出していることが明らかになった。さらに、GNE代謝産物ManNAcおよびシアル酸そのものであるNeuAcを培養液に加えると、シアリル化が回復した。また、患者筋組織において、lectin染色を行ったところ、縁取り空胞を認める萎縮線維中心に染色異常を認めた。患者筋組織では、縁取り空胞を伴う萎縮筋にのみ低シアリル化とSBAシグナルの上昇を認めた。このことは、ごく一部の筋線維にのみシアリル化異常が認められることを示している。患者筋組織を用いて2次元電気泳動を行い、 α -DGおよびリソソーム膜蛋白質LAMP-2に注目した解析を行ったが、正常筋と比較して有意な差は認めなかった。

GNE-KOマウスと変異GNEトランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製したDMRVのモデルマウスは、30週齢以降、顕著な骨格筋の筋力低下を示し、病理学的にも、人のDMRVのそれを再現していた。シアル酸量は骨格筋をはじめとする各種臓器で減少していた。

D. 考察

本研究で見いだされたフクチン遺伝子変

異をもつ患者の臨床像は福山型先天性筋ジストロフィーのそれとは、完全に異なっていた。何れの患者も知能は全く正常で、筋力低下も極軽度であったが、拡張型心筋症を伴っていた。筋病理所見も最も軽いジストロフィー変化を示した。患者筋からの α -DGは、福山型先天性筋ジストロフィー患者のものよりも明らかに大きな分子量を示し、FKRPの変異で引き起こされる肢帯型筋ジストロフィーLGMD2I型で見られるものと同様であった。これらの結果は骨格筋でのフクチンの機能が部分的に保たれていることを示していると考えられた。

心症状はこれらの患者の最も顕著な発見であった。すべての患者は拡張型心筋症を示し、うち2例では非常に重い進行性の症状であった。しかしながら、軽い骨格筋の症状に比べると心筋症状は重く、また、このような心筋症状は他の α -DGPではほとんど報告は無い。その理由として、軽い骨格筋の症状をもつ患者は健常人と同様に生活したり、運動したりしているが、このような運動が心臓に負担をかけ、症状を重くしていると考えられた。今回認められた患者を含め、フクチン遺伝子の変異により引き起こされる疾患は、非常に幅広いスペクトラルを示すことがわかった。この知見をふまえ、家族性の拡張型心筋症の診断にフクチン遺伝子の変異を含めることが重要であると考えられた。

上記の結果は、フクチン、Large, POMGnT1が cis-Golgi において複合体を形成していること、さらには、この複合体自体が α -DGに対するGlcNAc転移能を有していることを示唆している。POMGnT1、LARGE、フクチンはともに、会合して複合体を形成していたが、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。この複合体に会合している

タンパク質は、 α DGP 原因遺伝子の同定に繋がる可能性が示唆された。

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。酵素反応の詳細解析ではPOMGnT1、フクチン、LARGE複合体は酵素反応により、GlcNAcが1、2および3残基転移されたペプチドを生成した。POMGnT1のみの場合にも、ほぼ同様の比で産物が生成されたことを考えると、複合体形成は基質特異性を変えているわけではなく、むしろ反応速度を変化させている可能性が考えられた。しかしながら、大量の酵素複合体を生成させることが難しかったため、この複合体での反応パラメーターの測定にはいたらなかった。POMGnT1のみでは非常に小さいKmが測定され、基質が酵素に取り込まれやすいことを示した。

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。

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思われる。

今までの α -DGP患者の検索では、約20%の患者で、同定されている既知の原因遺伝子に変異が見られなかった。このことは、新たな原因遺伝子の可能性を示唆していた。さらに、我々は、昨年報告したフクチンを含む複合体への結合タンパク質を同定しているが、これが原因遺伝子である可能性を簡便に解析するシステムが必要であった。今回の方法ではっきりと、DG遺伝子のノックダウン効果、またはDG修飾タンパク質遺伝子

のノックダウン効果を、筋管細胞でのアセチルコリン受容体のクラスターリングによって評価出来ることが出来た。この方法を用いれば、DNAの配列解析の前段階として、候補遺伝子をDGの機能解析を通して、絞り込むことが可能になると考えている。

DMRV/HIBM患者のGNE遺伝子変異が機能喪失型変異であること、この変異により細胞・組織の低シリアル化を来していること、そしてこの低シリアル化はGNE代謝産物の投与によって回復可能であることを、明らかにした。このことは、少なくともin vitroでは、DMRV/HIBMが治療可能であることを示している。当然のことながら、このような代謝産物投与によりin vivoにおいても、何らかの治療が出来る可能性を示唆している。GNE-KOマウスと変異GNEトランスジェニックマウスの掛け合わせにより作製したモデルマウスは、生理学的、病理学的に、生化学的に、ヒトのDMRVの症状を再現しており、この疾患のモデルマウスと考えられた。このマウスは、今後、病態解析や治療法の開発に大いに役立つものと考えている。

E. 結論

世界で初めて、フクチン変異による肢帯型筋ジストロフィー患者を見出した。また、POMT2変異による先天性筋ジストロフィー患者を見出した。フクチンがLARGEおよびPOMGnT1との複合体を形成し、この複合体がGlcNAc転移活性を有することを明らかにした。世界に先駆けて、ヒトDMRVを再現するモデルマウスの作製に成功し、前臨床試験への体制が整った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Murakami N, Sakuta R, Mochizuki M, Michele DE, Campbell KP, Nonaka I, Nishino I: *POMT1* mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in α -DG.

Neurology 62: 1009-1011, 2004

Ohashi Y, Hasegawa Y, Murayama K, Ogawa M, Hasegawa T, Kawai M, Sakata N, Yoshida K, Yarita H, Imai K, Kumagai I, Murakami K, Hasegawa H, Noguchi S, Nonaka I, Yamaguchi S, Nishino I: A new diagnostic test for VLCAD deficiency using immunohistochemistry. *Neurology* 62: 2209-2213, 2004

Barresi R, Michele DE, Kanagawa M, Harper HA, Dovico SA, Satz JS, Moore SA, Zhang W, Schachter H, Dumanski JP, Cohn RD, Nishino I, Campbell KP: LARGE can functionally bypass α -dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 10: 696-703, 2004

Matsumoto H, Noguchi S, Sugie K, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. *J Biochem* 135, 709-712, 2004

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

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

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

- 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
- 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
- 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
- Goto K, Nishino I, Hayashi YK: Rapid and accurate diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 16:256-261. 2006
- Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Fukudome T, Okinaga T, Tsukahara T, Tajima Y, Ozono K, Nishino I, Nonaka I, Toda T: Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in α -dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet* 15:1279-1289. 2006
- Wu S, Ibarra MCA, Malicdan MCV, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain* 129: 1470-1480, 2006
- Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi, YK, Nishino I: A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16: 115-128, 2007
- Osawa M, Liewluck T, Ogata K, Iizuka T, Hayashi YK, Nonaka I, Sasaki M, Nishino I: Familial reducing body myopathy. *Brain Dev* 29: 112-116, 2007
- Liewluck T, Hayashi YK, Osawa M, Kurokawa R, Fujita M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Unfolded protein response and aggresome formation in hereditary reducing body myopathy. *Muscle Nerve* 35:322-326, 2007
- Keira Y, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Minami N, Hayashi YK, Kato T, Nishino I: Characterization of lobulated fibers in limb girdle muscular dystrophy type 2A by gene expression profiling. *Neurosci Res* 57:513-521, 2007
2. 学会発表
- Noguchi S, Nishino I: Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. BMB Annual Meeting and 8th IUBMB Conference, Boston, USA, 6.13, 2004
- Hayashi YK, Ozawa R, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Goto K, A Muchir, G Bonne, Nishino I: Microarray analysis of nuclear envelopathy. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.2, 2004.
- Noguchi S, Fujita M, Uematsu F, Kurokawa R, Murayama K, Minami N, Nonaka I, Nishino I: Gene expression analyses of X-linked myotubular myopathy. 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.4, 2004

Nishino I, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Restoration of sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy: a potential therapeutic strategy? 9th International Congress of the World Muscle Society, Goteborg, Sweden, 9.4, 2004

Nishino I, Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Hayashi YK, Nonaka I: Reduction of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Honolulu, Hawaii, 11.20, 2004

Noguchi S, Matsumoto H, Sugie K, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Honolulu, Hawaii, 11.20, 2004

Nishino I, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Restoration of sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy. 11th Asian Oceanic Congress of Neurology, Singapore, 11.28, 2004

西野一三, 野口 悟, 村山久美子, 小川 恵, 計良陽子, 川原玄理, 大矢 寧, 埜中征哉: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(DMRV)における GNE 酵素活性とシアリル化異常. 第 45 回日本神経学会総会 東京 5.13, 2004.

林由起子, 松田知栄, 小川 恵, 後藤加奈子, 西野一三: ジスフェルリン関連蛋白質の解析. 第 45 回日本神経学会総会 東京 5.14, 2004

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

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

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

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

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

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

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

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

村上てるみ, 田辺雄三, 松本浩, 小川恵, 埜中征哉, 野口 悟, 林由起子, 西野一三: フクチン遺伝子 (FKTN) 変異による多様な臨床病態. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006

西野一三, Wu Shiwen, Ibarra Carlos, Malicdan May, 村山久美子, 埜中征哉, 野口 悟, 林由起子: セントラルコア病の大半は RYR1 変異による. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006

Malicdan May, 野口 悟, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) のモデルマウス作製. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.12, 2006

高橋俊明, 青木正志, 小野寺好明, 鈴木直輝, 豎山真規, 今野秀彦, 林由起子, 西野一三, 埜中征哉, 木村格, 糸山泰人: Dysferlin 遺伝子変異の確定した肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 2B 型の筋障害の分布. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.13, 2006

村上てるみ, 田辺雄三, 埜中征哉, 小川 恵, 野口 悟, 林由起子, 大澤真木子, 西野一三: 肢帯型筋ジストロフィー 2L 型? FKTN 遺伝子異常の最軽症例. 第 23 回小児神経筋疾患懇話会. 東京, 8.19, 2006

Nishino I, Wu S, Ibarra C, Malicdan M, Murayama K, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I: Central Core Disease Is Due to RYR1 Mutations in More Than 90% of Patients. 58th Annual Meeting of American Academy of Neurology. San Diego, CA, USA. 4.5, 2006

Nishino I: The Muscle Dystrophies. 5th Asian and Oceanian Myology Center Meeting and 12th Philippine Neurological Association Midyear convention. Cebu, Philippines, 5.25, 2006

Noguchi S, Ogawa M, Murayama K, Matsumoto

H, Imamura M, Hayashi YK, Nishino I: Fukutin and LARGE Cooperatively work with POMGnT1 on N-acetylglucosamine transfer in O-mannosylglycan synthesis of alpha-dystroglycan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006

Astejada M, Hayasi YK, Fujita M, Uematsu F, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Disruption of the in vivo regeneration process in cardiotoxin-injected Emdy/-Mice. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006

Keira Y, Kurokawa R, Fujita M, Minami N, Hayashi YK, Noguchi S, Kato T, Nishino I: Gene expression of Limb girdle muscular dystrophy type 2A. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006

Murakami T, Tanabe Y, Ogawa M, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: Fukutin (FKTN) mutations can cause cardiomyopathy. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006

Hayashi YK, Goto K, Nagano A, Ura S, Kawahara G, Astejada M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I: Emerinopathy and laminopathy in Japan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006

Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra MCA, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: A heterozygous COL6A1 glycine substitution that influences cell attachment in fibroblasts causes sarcolemma-specific collagen VI deficiency (SSCD). XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006

Okada M, Kawahara G, Nonaka I, Noguchi S,

Hayashi YK, Nishino I: Collagen VI deficiency is the second leading cause of congenital muscular dystrophy in Japan. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006

Kasahata N, Hayashi YK, Laing NG, Uematsu F, Nonaka I, Nishino I: Clinical, pathological and immunohistochemical findings of nemaline myopathy, comparing adult-onset and congenital patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 3 July 2006

Nishino I: Myopathies with autophagy. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006

Malicdan MCV, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: A GNE knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV). XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006

Sato I, Ibarra MCA, Wu S, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: RYR1 mutation in congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006

Ohkuma A, Murayama K, Ogawa M, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: The genetic cause of lipid storage myopathy is unknown in more than 80% of the cases. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006

Sugie K, Yamamoto KA, Murayama K, Malicdan MCV, Ueno S, Nonaka I, Nishino I: Clinicopathological features of cardiac involvement in

genetically-confirmed Danon disease patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 4 July 2006

Ibarra MCA, Malicdan MCV, Wu S, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Pathological findings in muscle from malignant hyperthermia-susceptible patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 6 July 2006

Arahata H, Fujita M, Murayama K, Ogawa M, Noguchi S, Hayashi YK, Raheem O, Udd B, Nishino I: The identification of non-DM1, non-DM2 Patient in clinical DM patients. XIth International Congress on Neuromuscular Diseases. Istanbul, Turkey, 6 July 2006

Nishino I: Molecular pathomechanism of muscular dystrophy. Special Seminar. Bhumibol Adulyadej Hospital, Bangkok, Thailand, 9.15, 2006

Noguchi S, Fujita M, Sasaoka T, Nishino I: The therapeutic effect of myostatin-blockade on muscular dystrophic mice and gene expression analysis of the treated muscles. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 6 October 2006

Hayashi YK, Astejada MN, Ozawa R, Fujita M, Noguchi S, Nonaka I, Stewart CL, Nishino I: Three kinds of model mice for nuclear envelopathy. 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 5 October 2006

Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: A GNE knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to Nonaka myopathy or distal myopathy with rimmed vacuoles

(DMRV). 11th International Congress of the World Muscle Society. Bruges, Belgium, 4 October 2006

Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, Nonaka I, Campbell KP, Osawa M, Nishino I: Fukutin gene mutations can cause familial dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness and normal intelligence. The 9th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology. Cebu Philippine, 24 Jan 2007

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. 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
Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Murakami N, Sakuta R, Mochizuki M, Michele DE, Campbell KP, Nonaka I, Nishino I: <i>POMTI</i> mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in α -DG <i>Neurology</i> 62: 1009-1011, 2004
Ohashi Y, Hasegawa Y, Murayama K, Ogawa M, Hasegawa T, Kawai M, Sakata N, Yoshida K, Yarita H, Imai K, Kumagai I, Murakami K, Hasegawa H, Noguchi S, Nonaka I, Yamaguchi S, Nishino I: A new diagnostic test for VLCAD deficiency using immunohistochemistry. <i>Neurology</i> 62: 2209-2213, 2004.
Barresi R, Michele DE, Kanagawa M, Harper HA, Dovico SA, Satz JS, Moore SA, Zhang W, Schachter H, Dumanski JP, Cohn RD, Nishino I, Campbell KP: LARGE can functionally bypass α -dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. <i>Nat Med</i> 10: 696-703, 2004.
Matsumoto H, Noguchi S, Sugie K, Ogawa M, Murayama K, Hayashi YK, Nishino I: Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. <i>J Biochem</i> 135, 709-712, 2004.
Matsumura K, Zhong Di, Saito F, Arai K, Adachi K, Kawai H, Higuchi I, <u>Nishino I</u> , Shimizu T: Proteolysis of β -dystroglycan in muscular diseases. <i>Neuromuscul Disord</i> 15:336-341, 2005
Matsumoto H, <u>Hayashi YK</u> , Kim DS, Ogawa M, Murakami T, <u>Noguchi S</u> , Nonaka I, Nakazawa T, Matsuo T, Futagami S, Campbell KP, <u>Nishino I</u> :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, <u>Nishino I</u> , 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, <u>Noguchi S</u> , Kozuka Y, Arikawa-Hirasawa E, Tanaka M, Yan C, Saftig P, Figura KV, Hirano M, Ueno S, <u>Nonaka I</u> , <u>Nishino I</u> : 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, <u>Nishino I</u> , 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

発表者氏名 : 論文タイトル名. 発表誌名 巻号 : ページ, 出版年
Taniguchi M, Kurahashi H, <u>Noguchi S</u> , Sese J, Okinaga T, Tsukahara T, Guicheney P, Ozono K, <u>Nishino I</u> , 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
Goto K, <u>Nishino I</u> , <u>Hayashi YK</u> : Rapid and accurate diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. <i>Neuromuscul Disord</i> 16:256-261. 2006
Taniguchi M, Kurahashi H, <u>Noguchi S</u> , Fukudome T, Okinaga T, Tsukahara T, Tajima Y, Ozono K, <u>Nishino I</u> , Nonaka I, Toda T: Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in α -dystroglycanopathies. <i>Hum Mol Genet</i> 15:1279-1289. 2006
Wu S, Ibarra MCA, Malicdan MCV, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Nonaka I, <u>Noguchi S</u> , <u>Hayashi YK</u> , <u>Nishino I</u> : Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. <i>Brain</i> 129: 1470-1480, 2006
Malicdan MC, <u>Noguchi S</u> , Nonaka I, <u>Hayashi YK</u> , <u>Nishino I</u> : A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. <i>Hum Mol Genet</i> 16: 115-128, 2007
Osawa M, Liewluck T, Ogata K, Iizuka T, <u>Hayashi YK</u> , Nonaka I, Sasaki M, <u>Nishino I</u> : Familial reducing body myopathy. <i>Brain Dev</i> 29: 112-116, 2007
Liewluck T, <u>Hayashi YK</u> , Osawa M, Kurokawa R, Fujita M, <u>Noguchi S</u> , Nonaka I, <u>Nishino I</u> : Unfolded protein response and aggresome formation in hereditary reducing body myopathy. <i>Muscle Nerve</i> 35:322-326, 2007
Keira Y, <u>Noguchi S</u> , Kurokawa R, Fujita M, Minami N, <u>Hayashi YK</u> , Kato T, <u>Nishino I</u> : Characterization of lobulated fibers in limb girdle muscular dystrophy type 2A by gene expression profiling. <i>Neurosci Res</i> 57:513-521, 2007

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in α -DG

D.-S. Kim, MD, PhD; Y.K. Hayashi, MD, PhD; H. Matsumoto, MD; M. Ogawa, BS; S. Noguchi, PhD; N. Murakami, MD, PhD; R. Sakuta, MD, PhD; M. Mochizuki, MD, PhD; D.E. Michele, PhD; K.P. Campbell, PhD; I. Nonaka, MD, PhD; and I. Nishino, MD, PhD

Abstract—Walker–Warburg syndrome (WWS) is a congenital muscular dystrophy associated with neuronal migration disorder and structural eye abnormalities. The mutations in the *O*-mannosyltransferase 1 gene (*POMT1*) were identified recently in 20% of patients with WWS. The authors report on a patient with WWS and a novel *POMT1* mutation. Their patient expressed α -dystroglycan (α -DG) core protein, but fully glycosylated α -DG antibody epitopes were absent, associated with the loss of laminin-binding activity.

NEUROLOGY 2004;62:1009–1011

Walker–Warburg syndrome (WWS; MIM 236670), Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD; MIM 253800), and muscle-eye-brain disease (MEB; MIM 253280) are closely related congenital muscular dystrophies (CMDs) with cobblestone lissencephaly and eye abnormalities. Although they are known to be caused by the mutations of different genes encoding putative glycosyltransferases,¹ it now is clear that the mutations of each gene produce overlapping clinical phenotypes.^{2,3} In addition, they share a similar pattern of selective loss of α -dystroglycan (α -DG) on immunohistochemical study.¹ A recent study showed hypoglycosylation of α -DG and loss of binding activity of α -DG to laminin, neurexin, and agrin in FCMD, MEB, and the mutant myodystrophy (*Large^{myd}*) mouse, suggesting a defect in the same post-translational modification pathway of glycosylation in α -DG.⁴

Mutations in the *O*-mannosyltransferase 1 gene (*POMT1*) were implicated recently in 20% of patients with WWS.⁵ The laminin-binding site in α -DG is thought to reside in *O*-mannosyl-linked carbohydrate side chains, which may require *POMT1* for synthesis.⁶

We report our experience with a Japanese boy with WWS and a novel *POMT1* mutation, who

showed reduced glycosylation and loss of laminin-binding activity of α -DG in skeletal muscle.

Methods. *Patient.* The patient was a Japanese boy aged 3.5 years from apparently nonconsanguineous parents. No other family member was affected. Prenatal ultrasonography showed that the patient had a meningoencephalocele. He was born at gestational week 38 by Cesarean section with a body weight of 2,042 g. He was floppy with an enlarged head. He underwent surgery to remove a meningoencephalocele, and a ventriculoperitoneal shunt was added 21 days after birth. Mild microphthalmia and corneal clouding also were observed. Serum creatine kinase levels were markedly elevated to 600 to 31,000 IU/L (upper normal limit, 70 IU/L). He exhibited markedly delayed milestones. He could not control his head, roll over, or sit. He showed lack of facial expression with an inability to smile and never developed the ability to speak. Brain MRI revealed agyric frontal and temporo-occipital lobes mixed with pachygyric parietal cortex. Hypoplasia of brain stem and cerebellum also was observed (figure 1). EEG showed multifocal spikes, and the muscle biopsy showed marked increase in fatty tissue with evidence of necrosis and regeneration. The mutational analysis for fukutin and protein *O*-mannose β -1,2-N-acetylglucosaminyl-transferase gene (*POMGnT1*) did not show any abnormalities.

Immunohistochemistry and immunoblotting studies. The following antibodies were used: monoclonal anti- α -DG (VIA4-1, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), polyclonal goat anti- α -DG (GT20ADG),⁴ monoclonal anti- β -DG (43DAG1/8D5, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK), monoclonal anti-laminin- α 2 chain (5H2, Chemicon, Temecula, CA), monoclonal antidystrophin C-terminal (Dy8/6C5, Novocastra Laboratories), and monoclonal antisarcoglycan antibodies (Novocastra Laboratories). The detailed techniques of the immunohistochemistry, immunoblotting, and laminin overlay assays have been described previously.^{4,7}

Mutation analysis. Genomic DNA was extracted from frozen muscle tissue using standard method with informed consent. Primer

Additional material related to this article can be found on the Neurology Web site. Go to www.neurology.org and scroll down the Table of Contents for the March 23 issue to find the title link for this article.

From the Department of Neuromuscular Research (Drs. Kim, Hayashi, Matsumoto, Noguchi, and Nishino, M. Ogawa), National Institute of Neuroscience, National Center for Neurology and Psychiatry (NCNP), Tokyo, Japan; Department of Neurology (Dr. Kim), Pusan National University Hospital, Korea; Department of Pediatrics (Drs. Murakami and Sakuta), Dokkyo Medical School, Saitama, Japan; Department of Neurology (Dr. Mochizuki), Saitama Children's Medical Center, Japan; Howard Hughes Medical Institute, Department of Physiology and Biophysics (Drs. Michele and Campbell), University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA; and National Center Hospital for Mental, Nervous, and Muscular Disorders (Dr. Nonaka), NCNP, Tokyo, Japan.

Supported by Grants-in-Aid for Research on Psychiatric and Neurologic Diseases and Mental Health from the Ministry of Health, Labor, and Welfare and the Ichiro Kanehara Memorial Foundation, Japan. K.P.C. is an investigator for the Howard Hughes Medical Institute.

Received May 27, 2003. Accepted in final form November 10, 2003.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Yukiko K. Hayashi, Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawa-higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan; e-mail: hayasi_y@ncnp.go.jp

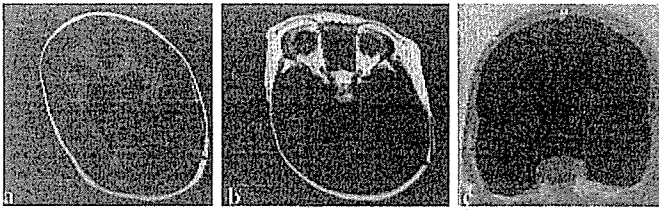


Figure 1. Brain MRI of patient at age 3 years shows agyric frontal and temporo-occipital lobes mixed with pachygyric parietal cortex, hypoplasia of brain stem and cerebellum, and defect of septum pellucidum. The periventricular white matter change (A and B, TR540/TE15; C, TR5400/TE90) also is seen.

pairs were designed to amplify all coding exons and flanking intronic sequences of *POMT1*. The amplified products were sequenced using an ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). For the detection and screening of L421del (1260 to 1262 delCCT) in exon 13 of *POMT1*, primers F-CAGTAGCAGCAACTCATGGG, R-ACGGT-TGTGGCTGCTATAGC, and restriction enzyme *AvaI* were used. One hundred healthy Japanese individuals served as control subjects.

Results. Immunohistochemical and immunoblotting analyses. The immunohistochemical analysis revealed an almost complete loss of immunoreactivity with VIA4-1 anti- α -DG antibody in the patient, whereas anti- α -DG core protein GT20ADG showed membrane staining in each muscle fiber (figure 2). Immunoreaction against the laminin- α 2 chain was reduced slightly, but β -DG (see figure 2), dystrophin, and sarcoglycans (not shown) were well preserved.

Immunoblotting analysis using GT20ADG showed a band with a reduced molecular mass, whereas VIA4-1

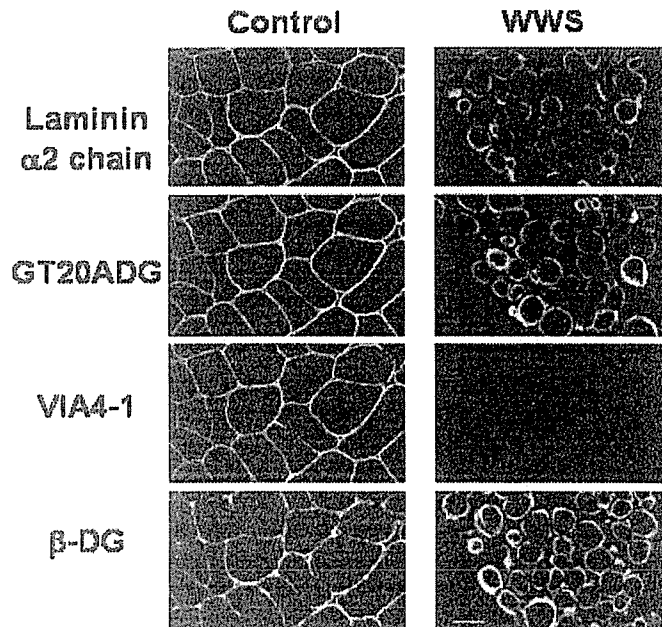


Figure 2. In the patient (with Walker-Warburg syndrome [WWS]), a complete loss of immunoreactivity is observed with the monoclonal antibody VIA4-1 against α -dystroglycan (α -DG), whereas it appears normal around muscle fibers when the polyclonal antibody GT20ADG against α -DG was used. β -DG is well preserved, but the laminin- α 2 chain shows mild reduction; bar = 20 μ m.

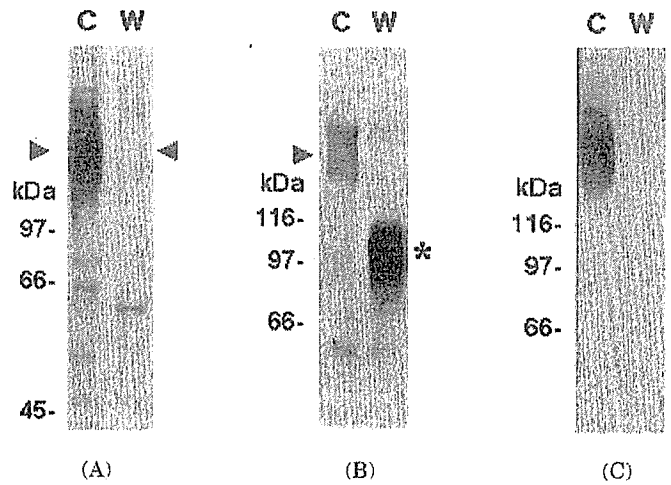


Figure 3. (A) The immunoblotting study using the antibody VIA4-1 showed a broad band around 156 kDa (arrowheads) in control skeletal muscle (C) that is undetectable in the patient (W). (B) The immunoblotting study using the antibody GT20ADG showed a band with a reduced molecular mass (\approx 90 kDa, asterisk) in the patient, whereas the normal band of α -dystroglycan (α -DG) at 156 kDa was detected in the control. (C) The laminin overlay assay showed loss of band in the patient, suggesting there is an almost complete loss of laminin-binding activity in α -DG from the patient's muscle. M = molecular mass.

showed no detectable band for α -DG in the patient (figure 3, A and B). The molecular weight shift observed in our patient ($>$ 60 kDa) was almost identical to those reported in FCMD and MEB.⁴ On laminin overlay assay, the patient's muscle showed an almost complete loss of laminin-binding activity of α -DG (figure 3C).

Mutation analysis. We found a homozygous deletion of three base pairs (1260 to 1262 delCCT) in *POMT1*, which is expected to delete single amino acid leucine at position 421 (see figure E-1A on the Neurology Web site). No identical mutation was present in 100 normal Japanese control subjects (see figure E-1B on the Neurology Web site). The amino acid sequence alignment showed that the deleted amino acid leucine and surrounding primary sequence are highly conserved among different species (see figure E-1C on the Neurology Web site).

Discussion. In this study, we identified a deletion of the single amino acid leucine at position 421 of *POMT1* from the patient's DNA. This is considered to be a causative mutation for several reasons. First, the same change was not found among 100 Japanese control subjects. Next, the deleted amino acid leucine is located within a highly conserved region of the gene and is conserved among different species. A previously reported V428D mutation also is only seven amino acids downstream to ours.⁵ These findings suggest that this conserved region plays an important role in the proper function of the protein.

Our patient showed exceptionally long survival for WWS because most patients with WWS die during infancy and rarely survive beyond age 3