

201224107A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

中枢神経症状を伴う筋疾患 α -ジストログリカノパチーの
分子病態と治療法開発に関する研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 萬谷 博

平成25（2013）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

中枢神経症状を伴う筋疾患 α -ジストログリカノパチーの分子病態と
治療法開発に関する研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 萬谷 博

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

中枢神経症状を伴う筋疾患 α -ジストログリカノパチーの
分子病態と治療法開発に関する研究

萬谷 博

----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 5

中枢神経症状を伴う筋疾患 α -ジストログリカノパチーの分子病態と治療法開発に関する研究

研究代表者 萬谷 博、 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター、主任研究員

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) の原因遺伝子産物 POMGnT1 と POMT1、POMT2 が *O*-マンノース型糖鎖を合成する糖転移酵素あることを示し、MEB と WWS が *O*-マンノース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*-マンノース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示している。最近、 α -ジストログリカノパチー様の症状を呈する *DPM3* 遺伝子の変異が報告され、*O*-マンノース型糖鎖の生合成が選択的に抑制されていることが示された。そこで、*O*-マンノース型糖鎖修飾と *DPM3* の関係について検討した。

A. 研究目的

福山型先天性筋ジストロフィー症 (FCMD)、Muscle-eye-brain 病 (MEB)、Walker-Warburg 症候群 (WWS) は中枢神経系の障害を伴う先天性筋ジストロフィー症である。これらの疾患はジストロフィン糖蛋白質複合体の構成分子である α -ジストログリカンの *O*-マンノース型糖鎖不全を起因とし、 α -ジストログリカノパチーと総称される。本研究では、 α -ジストログリカノパチーの原因遺伝子産物及び *O*-マンノース型糖鎖の機能を解明することで、病態解明から診断・治療法への応用を目指している。

我々はこれまでに、MEB と WWS の原因遺伝子産物 Protein *O*-linked mannose β 1,2-*N*-acetyl glucosaminyltransferase 1 (POMGnT1) と protein *O*-mannosyltransferase 1 (POMT1) 及び POMT2 が *O*-マンノース型糖鎖 (Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man-Thr/Ser) 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。

O-マンノース型糖鎖の合成開始酵素である *O*-マンノース転移酵素は 2 つのサブユニット POMT1 と POMT2 の複合体として小胞体 (ER) 膜に局在し、ドリコールリン酸マンノース (Dol-P-Man) を糖供与体としてタンパク質の Ser/Thr にマンノースを転移する。ER 膜には Dol-P-Man を供給する Dol-P-Man 合成酵素 (DPM) も局在しており、DPM は 3 つのサブユニット DPM1、DPM2、DPM3 からなる複合体である。

最近、 α -ジストログリカノパチー様の症状を呈する *DPM3* 遺伝子の変異が報告され、*O*-マンノース型糖鎖の合成が選択的に抑制されていることが示された。Dol-P-Man は *O*-マンノース型以外にも、*N*型糖鎖、*C*-マンノース型糖鎖、GPI-アンカー型糖鎖の合成に利用されることから、一般的に DPM の異常は広範囲な糖鎖異常とし

て現れると予測される。実際、*DPM1* を原因遺伝子とする先天性グリコシル化異常症 *Ie* 型 (*CDG-Ie*) では、*Dol-P-Man* を利用する全ての糖鎖で異常が検出される。*DPM3* 遺伝子変異による疾患は *CDG-Io* に分類され、比較的軽度な α -ジストログリカノパチーに相当し、筋ジストロフィー症状を呈するが、脳の障害はほとんど認められないという臨床症状が報告されている。生化学的には α -ジストログリカンの *O*-マンノース型糖鎖不全として検出され、他のタイプの糖鎖への影響は少ない。このことから、*DPM3* が *O*-マンノース型糖鎖の生合成に選択的に関与している可能性が考えられる。そこで本年度は、*POMT1* および *POMT2* と *DPM3* の複合体形成について検討した。

B. 研究方法

HEK293T 細胞に *POMT1* および *POMT2* と *DPM3* を共発現し、免疫沈降法により複合体の形成の有無を調べた。*POMT1* と *DPM3* にはそれぞれ Myc タグと HSV タグの融合タンパク質を使用し、免疫沈降には抗 myc タグ抗体および抗 HSV タグ抗体を使用した。また、*CDG-Io* で検出された変異 (*L85S*) を導入した変異型 *DPM3* を site-direct mutagenesis 法により作製し、変異の影響を調べた。共発現した細胞の膜成分タンパク質を用いて、*DPM3* および変異型 *DPM3* との共発現による *POMT* 活性への影響を確認した。

(倫理面への配慮)

実験動物の使用に関しては、「動物愛護管理法」および「動物実験に関する指針」に基づい

て動物愛護に十分配慮するとともに、所内実験動物委員会の承認を受けている。放射性同位元素の使用に関しては「放射線障害防止法関連法令」および「所内規定」に基づき安全を確保する。組換え DNA 実験に関しては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づくとともに所内組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

抗 myc 抗体および抗 HSV 抗体を用いた免疫沈降法により *POMT1* と *POMT2*、*DPM3* のすべての共沈が確認されたことから *POMT1-POMT2* と *DPM3* は複合体を形成することが明らかとなった。変異型 *DPM3* も *POMT1-POMT2* との共沈が確認されたことから、*L85S* 変異による複合体形成への影響は認められなかった。また、今回の強制発現実験では、*POMT1-POMT2* に *DPM3* および変異型 *DPM3* を共発現した場合と *POMT1-POMT2* のみを発現させた場合で *POMT* 活性に有為な差は認められなかった。

D. 考察

POMT1-POMT2 と *DPM* は *DPM3* を介して複合体を形成するが、*DPM3* の *POMT1-POMT2* への結合は直接 *POMT* 活性に影響するものではないことが示唆された。*DPM3* に変異がある細胞では、*O*-マンノース型糖鎖合成が選択的に抑制されることが報告されていることから、*POMT1-POMT2* は *DPM* と複合体を形成することによって、*DPM* により合成された *Dol-P-Man* を効率良く利用するシステムが存在する可能性が考えられた。 α -ジストログリカノパチーは

O-マンノース型糖鎖の構造異常を起因とするが、糖転移酵素だけではなく糖供与などの制御異常に因り糖鎖異常が生じる複雑な疾患群であることを示唆している。今後、こうした複数の膜タンパク質からなる複合体の存在を証明し、機能や構造を解析する必要がある。

E. 結論

POMT1-POMT2 は DPM3 を介して DPM と複合体を形成することが明らかとなった。

F. 研究発表

I. 論文発表

1. Mamoru Mizuno, Kenji Osumi, Yuriko Hirose, Hiroshi Manya, Tamao Endo: Synthesis of glycopeptide containing 6-O-phosphorylated mannose for an α -dystroglycan/laminin interaction study. *Pept. Sci.* 2011, 127-130, 2012

2. Atsushi Kuga, Motoi Kanagawa, Atsushi Sudo, Yiumo Michael Chan, Michiko Tajiri, Hiroshi Manya, Yamato Kikkawa, Motoyoshi Nomizu, Kazuhiro Kobayashi, Tamao Endo, Qi L. Lu, Yoshinao Wada, Tatsushi Toda: Absence of post-phosphoryl modification in dystroglycanopathy mouse models and wild-type tissues expressing a non-laminin binding form of α -dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, 287(12), 9560-9567, 2012

3. Naoki Nakagawa, Hiroshi Manya, Tatsushi Toda, Tamao Endo, Shogo Oka: Human natural killer-1 sulfotransferase (HNK-1ST)-induced

sulfate-transfer regulates laminin-binding glycans on α -dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, 287(36), 30823-30832, 2012

4. Eriko Avşar-Ban, Hisayoshi Ishikawa, Shin'ichi Akiyama, Hiroshi Manya, Tamao Endo, Yutaka Tamaru: Functional and heterologous expression of human protein O-linked mannose β -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 in zebrafish. *J. Biosci. Bioengineer.*, 114(2), 237-239, 2012

5. 萬谷博、遠藤玉夫: 最前線 糖鎖異常による筋ジストロフィー症研究の新たな展開. ファルマシア, 48(8), 718-732, 2012

6. 萬谷博、遠藤玉夫: 今日の話題 O-マンノース型糖鎖異常による筋ジストロフィー症 糖鎖分析技術の高感度化がもたらす糖鎖研究の新たな展開. 化学と生物, 51(1), 702-704, 2013

II. 学会発表

1. Eriko Avşar-Ban, Hiroshi Manya, Tamao Endo, Yutaka Tamaru: Study on α -dystroglycanopathy related enzymes in zebrafish. The 5th Annual Zebrafish Disease Models Meeting, Suzhou, China, 2012.4.16-20

2. 萬谷博、赤坂一萬谷啓子、遠藤玉夫: O-マンノース転移酵素とドリコールリン酸マンノース合成酵素の相互作用の解析. 第31回日本糖質学会年会, 鹿児島, 2011.6.17-20

3. 中川直樹、萬谷博、遠藤玉夫、岡昌吾: α -ジストログリカン上の機能性糖鎖発現における HNK-1ST の新たな役割. 第 31 回日本糖質学会年会, 鹿児島, 2011.6.17-20
4. 萬谷博、赤阪-萬谷啓子、水野真盛、遠藤玉夫: α -ジストログリカノパチーの原因遺伝子産物 POMGNT1 による O-マンノース型糖鎖合成機構の解析. 包括脳科学研究推進ネットワーク平成 24 年度夏のワークショップ. 仙台, 2011.7.24-27
5. 川村方希、萬谷博、赤阪-萬谷啓子、林昌美、
遠藤玉夫: O-マンノース型糖鎖合成におけるド
リコールリン酸マンノース合成酵素の関与. 首
都大学東京バイオコンファレンス 2012, 東京,
2012.11.9
6. 萬谷博、赤阪-萬谷啓子、林昌美、遠藤玉夫:
小胞体における O-マンノース転移酵素複合体の
解析. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡,
2012.12.14-16
7. 辛欣、萬谷博、赤阪-萬谷啓子、遠藤玉夫: ヒ
ト POMGnT1 の O 型糖鎖修飾の解析. 日本薬学
会第 133 年会, 横浜, 2013.3.27-30

研究成果の刊行に関する一覧表

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
なし							

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
なし					

