

O-マンノシル型糖鎖とその異常による先天性筋ジストロフィー

遠藤玉夫

Finding of O-mannosyl Glycan in Mammals and Congenital Muscular Dystrophies due to Glycosylation Defects

Tamao ENDO

Glycobiology Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Foundation for Research on Aging and Promotion of Human Welfare, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

(Received July 10, 2003)

Most proteins within living organisms contain glycans. Glycan structures can modulate the biological properties and function of glycoproteins. Developments in glycobiology have revealed a new type of glycosidic linkage to the peptide portion, the O-mannosyl linkage in mammals, although heretofore it had been thought to be specific to yeast. One of the best known O-mannosyl-modified glycoproteins is dystroglycan, which is a central component of dystrophin-glycoprotein complex isolated from skeletal muscle membranes. We identify and characterize a glycosyltransferase, UDP-N-acetylglucosamine: protein O-mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1), involved in the biosynthesis of mammalian type O-mannosyl glycans. Finally, we find that the *POMGnT1* gene is responsible for muscle-eye-brain disease (MEB). MEB is an autosomal recessive disorder characterized by congenital muscular dystrophy, ocular abnormalities and brain malformation (type II lissencephaly). Like MEB, recent data suggest that the aberrant protein glycosylation of a specific glycoprotein, α -dystroglycan, is the primary cause of some forms of congenital muscular dystrophy. Here I review the new insight into glycobiology of muscular dystrophy and neuronal migration disorder.

Key words—O-mannosylation; dystroglycan; muscular dystrophy; glycosyltransferase; muscle-eye-brain disease; neuronal migration disorder

1. はじめに

ヒトのゲノム構造、いわばヒトの体の設計図がほぼ明らかになり、単語を網羅した辞書ができ上がった。現在辞書にあるそれぞれの単語からどのように意味のある文章が作られるか、つまり各遺伝子から翻訳されて作られるタンパク質の機能や生体内における役割を明らかにし、多くの生命現象を理解しようとする、いわゆるポストゲノム研究が盛んに行われている。ところでタンパク質はリン酸化や糖鎖付加などいわゆる翻訳後修飾を受けることはよく知られており、こうした修飾を受けることによって初めて機能を持つようになることは決して少なくない。データベースからいろいろな翻訳後修飾の頻度

を予測してみると、糖鎖修飾が約半数と圧倒的に多く、タンパク質の50%以上は糖鎖が付加されていると考えられている。糖鎖がタンパク質機能に対していかに関与し、機能的に不完全なタンパク質に機能を付加するかは、ポストゲノム研究として避けて通れない重要な研究テーマであり、事実糖鎖付加の必要性が数多く報告されている。糖鎖がどのような構造を持ち、その糖鎖がどのような生物学的あるいは病理的な意義を持つのかを明らかにすることは、多細胞生物で営まれている様々な生命現象を理解する上で今後ますます重要な研究分野となるであろう。

糖鎖は単糖が1つ1つ付加されて作られる。この糖の付加は、糖転移酵素によって行われる。糖転移酵素はタンパク質であり、遺伝子によってコードされている。糖転移酵素遺伝子は300程度あると考えられているが、これまでにおよそ120が明らかにされている。糖転移酵素によって作られる糖鎖は遺伝子の直接の産物ではなく、遺伝子の2次産物である

助東京都高齢者研究・福祉振興財団東京都老人総合研究所糖蛋白質研究グループ(〒173-0015 板橋区栄町35-2)

e-mail: endo@tmig.or.jp

*本総説は、平成15年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである。

と言える。Figure 1 (A)に模式的な例を示したが、この例では6つの糖転移酵素が1から順番に働き6つの糖からなる糖鎖が最終的に形成されるとする。もし仮に途中で働く糖転移酵素4が活性を失ってしまうと、例えば次に働く糖転移酵素5や糖転移酵素6があっても最終的に形成される糖鎖は3までで終わってしまう (Fig. 1 (B))。なぜならば糖転移酵素には厳密な基質特異性があり、糖転移酵素5や糖転移酵素6は糖3に直接働いて糖鎖を伸ばすことができないからである。したがって、1つの糖転移酵素の異常は、最終的に作り出される糖鎖に大きな影響を及ぼすことが分かるであろう。糖鎖の作られ方にはこうした特徴がある。

本稿では、ユニークな糖鎖の発見と、その糖鎖がきちんとできないと我々の体は大きな不都合が生じ、神経細胞遊走異常を伴う筋ジストロフィーになると言う最近の糖鎖生物学の新知見を紹介したい。

2. ジストログリカンとそのユニークな糖鎖

筋ジストロフィーは、筋肉が徐々に弱まり失われる遺伝子疾患である。¹⁾ここ15年の間にいくつかの筋ジストロフィーの原因遺伝子が同定された。その中で最も患者数の多いデュシェンヌ型筋ジストロフィーは、人口10万人当たり2—3人、出生男児10万人当たり13—33人の患者がいると言われている。この病型はジストロフィンと呼ばれる細胞内タンパク質をコードする遺伝子の変異によることが明

らかにされた。しかしながら、細胞内のタンパク質であるジストロフィンがなくなるとなぜ筋細胞が変性や壊死を起こすのかは依然として不明であった。その後研究が進み、ジストロフィンと複合体を形成している一群の膜タンパク質、特に糖タンパク質が多いことからジストロフィン・糖タンパク質複合体 (Dystrophin-glycoprotein complex, DGC) と呼ばれる集合体が発見された (Fig. 2)。²⁾デュシェンヌ型筋ジストロフィーでは、ジストロフィンがなくなることによりDGCがうまく膜上で集合体を形成できず、結果として膜の不安定化を招き最終的に筋破壊に至ると考えられるようになった。その後DGCの成分のいくつかは、他の筋ジストロフィーの発症において深く関わるのが次々と明らかになり、あらためてDGCの重要性に注目が集まっている。ところで、出生時あるいは出生後まもなくから筋の異常が認められる先天性筋ジストロフィーは、筋ジストロフィーの中で1つのグループを構成している。最近特定の糖タンパク質、DGCの構成成分である α -ジストログリカンの糖鎖異常が、ある病型の先天性筋ジストロフィーの原因であることが分かってきた。

ジストログリカンは1つの遺伝子でコードされており、タンパク質に翻訳された後 α -ジストログリカンと β -ジストログリカンに切断される。³⁾骨格筋において、ジストログリカンは、DGCの主要構成成分の1つである (Fig. 2)。 α -ジストログリカン

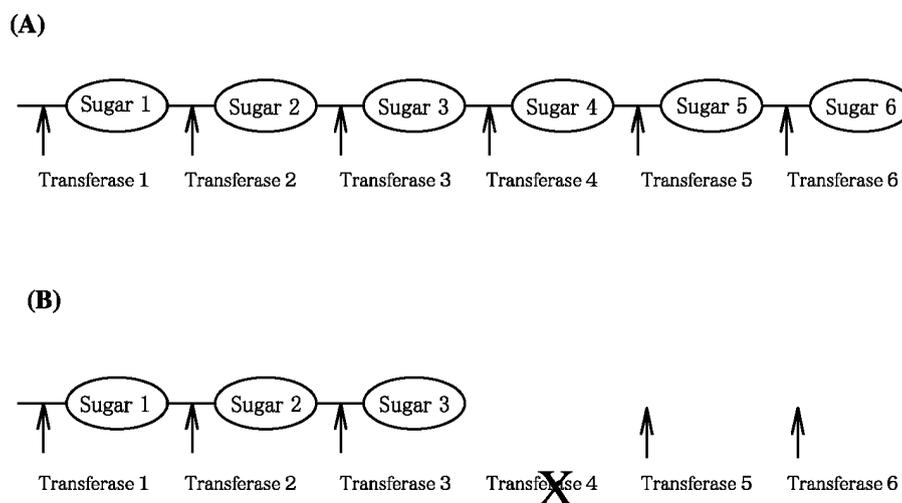


Fig. 1. Biosynthesis of Sugar Chains (Model)

(A) Specific glycosyltransferases work sequentially. Glycosyltransferases 1—6 work sequentially and form oligosaccharide 1—6. (B) If loss-of function of glycosyltransferase 4 has occurred, for example, only oligosaccharide 1—3 could be formed as a final structure even if glycosyltransferases 5 and 6 were present. They cannot act on sugar 3 directly due to the fine substrate specificity of glycosyltransferase.

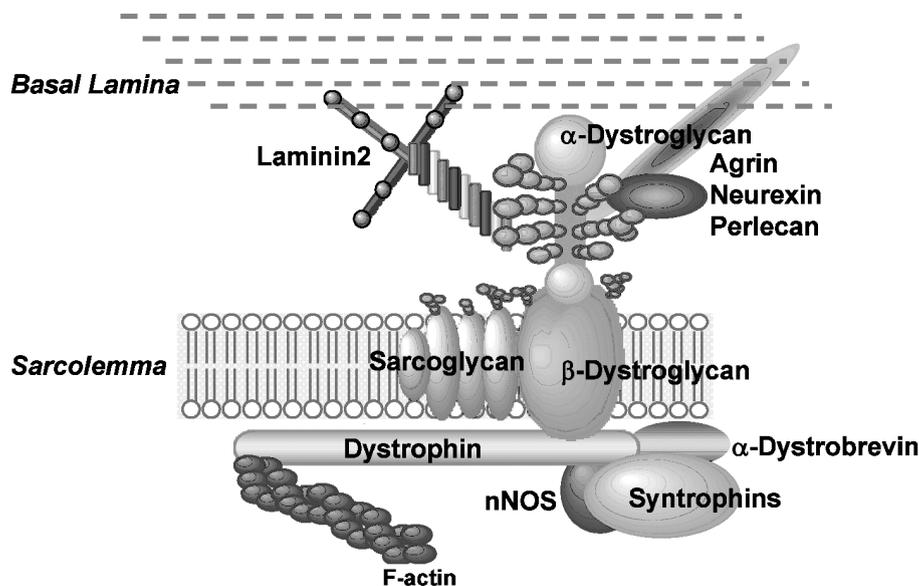


Fig. 2. Dystrophin-Glycoprotein Complex (DGC) and Linkage between Laminin-2 in the Extracellular Matrix and Actin in the Sub-sarcolemmal Cytoskeleton

α -Dystroglycan is a key component of the DGC and is modified by *O*-mannosyl glycan and bind laminin 2 via its glycan. α -Dystroglycan is also known to bind to other extracellular matrix proteins containing LamG domains, such as neurexin, agrin, and perlecan. On the other hand, inside cell, β -Dystroglycan is known to bind to several components directly or indirectly.

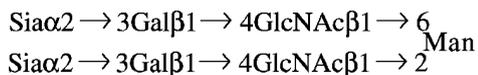
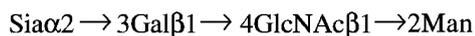
は細胞膜外表面性糖タンパク質であり、膜貫通糖タンパク質 β -ジストログリカンに結合することにより膜にくっついている。 α -ジストログリカン・ β -ジストログリカン複合体は、細胞外マトリックスと細胞骨格を結ぶ連結軸として細胞膜の安定化に寄与していると考えられている。 α -ジストログリカンは細胞外マトリックスのラミニンと結合し、細胞内では β -ジストログリカンがジストロフィンを紹介してさらにアクチン繊維と結合している。^{2,4)} このようにジストログリカンは DGC 構成成分の中でも、細胞外マトリックスと細胞骨格タンパク質とをつなぐ連結軸の形成において中心的な役割を果たしている。なお、 α -ジストログリカン・ β -ジストログリカン複合体は生体に広く分布している。ジストログリカンの果たす役割を明らかにしようと、遺伝子破壊マウスの作製が試みられた。しかしながら、ホモ欠損マウスは卵円筒期（交尾後 5.5 日から 6.5 日）以降発達異常となり、最終的には胎生致死となってしまった。⁵⁾ その原因は最初に形成される基底膜の 1 つである Reichert 膜の形成がうまくできないためであることが分かった。さらに解析を進めた結果、ジストログリカンがないとラミニンを始めとする細胞外マトリックス成分をうまく集合させることができず結果として基底膜がうまく形成できないためと

考えられた。⁶⁾ つまり、ジストログリカンは基底膜構成成分の集合に不可欠であり、恐らくこの不都合は生体いたるところで見られ、その影響は甚大なものとなり結果として胎生致死となってしまうのであろう。その後、脳、筋、末梢神経と部位特異的なジストログリカン遺伝子破壊マウスが作製され、それぞれ興味深い知見が得られているがそれについては後述する。

α -ジストログリカンは糖鎖を多く含む糖タンパク質であり、その糖鎖はラミニン、ニューレキシン、アグリニンなどの結合に関与する。我々はシアル酸、それも *O*-結合型糖鎖に乗っているシアル酸がラミニンとの結合に必要なことを明らかにした。⁷⁾ そこでどのような糖鎖なのかを明らかにするために、ウシ末梢神経 α -ジストログリカンの *O*-結合型糖鎖の構造解析を行い、ユニークな *O*-マンノース型糖鎖、 $\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}$ を発見した。⁸⁾ さらに、ウサギ骨格筋 α -ジストログリカンの糖鎖解析を行い、やはり同じ *O*-マンノース型糖鎖を持つことを明らかにした。⁹⁾ また、このシアル酸を持つ *O*-マンノース型糖鎖、 $\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}$ が α -ジストログリカン上のラミニンリガンドであることを明らかにした。⁸⁾ 我々がシアル酸を持つ *O*-マンノース型糖鎖の存在を明ら

かにした後、*N*-アセチルグルコサミンがマンノースの2位に結合するだけでなく、2,6分岐のものや、¹⁰⁾ 様々な末端構造を持つ一連の*O*-マンノース型糖鎖構造が報告された (Fig. 3).^{11,12)} 現在のところ哺乳類における*O*-マンノース型糖鎖は、脳、神経、筋などの限られた糖タンパク質、特に α -ジストログリカンにみられる珍しいタイプの糖鎖修飾である。¹³⁾ 一方、*O*-マンノース型糖鎖は酵母では古くから知られた糖鎖修飾であり、酵母の細胞壁にはマンノースが数残基つなげたオリゴマンノース型糖鎖修飾を受けた糖タンパク質がたくさんある (Fig. 3).¹⁴⁾ 今後の研究によって、哺乳類の組織で*O*-マンノース型糖鎖がどのような分布を示すか、

O-Mannosyl glycan in mammals



O-Mannosyl glycan in yeast



Fig. 3. *O*-Mannosyl Glycan in Mammals and Yeast

あるいは α -ジストログリカン以外にどのような糖タンパク質が*O*-マンノース型糖鎖の修飾を受けているかなどが明らかになることを期待したい。

酵母における*O*-マンノース型糖鎖の生合成経路は、マンノースが1個ずつ伸びる経路が既に明らかにされているが、哺乳類では全く不明である (Fig. 4). 哺乳類における*O*-マンノース型糖鎖の生合成経路を明らかにすることは、*O*-マンノース型糖鎖の発現調節機構だけでなく*O*-マンノース型糖鎖の生物学的意義を理解するためにも重要である。哺乳類の*O*-マンノース型糖鎖の生合成に関わる酵素を同定しその性質を明らかにすることは、*O*-マンノース型糖鎖の理解に向けて重要なステップである。酵母型と哺乳類型の*O*-マンノース型糖鎖の構造上の大きな違いは、哺乳類型の*O*-マンノース型糖鎖はGlcNAc β 1-2Man結合を持つことである (Fig. 3). この結合は、UDP-GlcNAcから糖タンパク質の*O*-マンノース残基に*N*-アセチルグルコサミンを転移させる糖転移酵素、UDP-*N*-acetylglucosamine: protein *O*-mannose β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT)により形成されるのであろうと仮定した。そこでまず特別な基質を使用したPOMGnTの活性測定法を独自に開発し、いくつかの動物脳で酵素活性を確認した。¹⁵⁾ ところで、GlcNAc β 1-2Man構造は*N*型糖鎖に既に2つあることはよく知られており、UDP-*N*-acetylglucosamine: α -3-D-mannoside β -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I)とUDP-*N*-acetylglucosa-

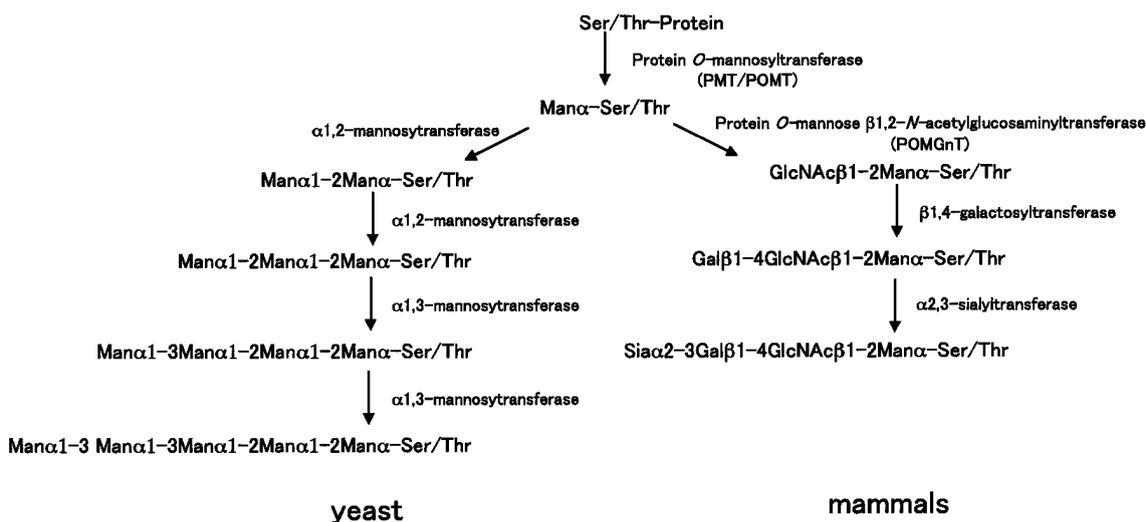


Fig. 4. Biosynthetic Pathway of Yeast *O*-Mannosyl Glycan and Proposed Pathway of Mammalian *O*-Mannosyl Glycan

mine: α -6-D-mannoside β -1,2-N-acetylglucosaminyl-transferase II (GnT-II) の2つの酵素の働きによりそれぞれ形成される。しかしながら、O-マンノース型糖鎖上の GlcNAc β 1-2Man 結合は、GnT-I と GnT-II により形成されるのではないことが分かり、新しい酵素の存在が示唆された。そこでヒト GnT-I 遺伝子のホモログを探しヒト *POMGnT1* 遺伝子を取得した。¹⁶⁾ヌクレオチド配列から *POMGnT1* は、推定分子量 71.5 KDa の 660 アミノ酸からなるタンパク質であった。ゴルジ体に存在する他の糖転移酵素と同じく II 型の膜タンパク質であると予想される。この遺伝子産物は確かに *POMGnT* 活性のみを示し、GnT-I や GnT-II 活性を持っていないことが明らかになった (Table 1)。また、繰り返しになるが GnT-I には *POMGnT* 活性がないことより、もし *POMGnT* になんらかの異常が起こった場合、GnT-I は *POMGnT* の機能を補うことができないと思われる。なお、ノーザン解析において *POMGnT1* は調べた 20 以上のすべての組織や培養細胞で構成的に発現しており、O-マンノース型糖鎖の脳や神経などにおける特異的発現は、*POMGnT1* の発現以外で制御されていると推定された。

3. 筋・眼・脳 (MEB) 病の原因遺伝子の同定

ヒト *POMGnT1* 遺伝子は染色体 1p33 に存在し、まだ原因遺伝子が分かっていない MEB [Muscle-eye-brain disease, MEB: OMIM 253280, OMIM= Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nih.gov/>)] の遺伝子座の近くにあることに気

が付いた。MEB は、先天性筋ジストロフィーに眼奇形と脳 (II 型滑脳症) の形態形成異常を伴った常染色体劣性遺伝病である。¹⁷⁾臨床的には、運動発達の遅延を認め、多くの症例で独歩を確保するに至らない。またそれに加えて、脳では神経細胞遊走異常による脳の奇形が観察され、知的発達障害は高度でいくつかの単語を獲得する程度である。MEB 患者はこのような重篤な症状を呈するが、成人に達することもある。患者はフィンランドを中心にヨーロッパで認められ、患者は近親婚や近隣の男女の間に誕生している。DGC を構成する成分の欠損は筋ジストロフィーを起こすことや α -ジストログリカンの O-マンノース型糖鎖がラミニンとの結合に必要なことなどから、*POMGnT1* 遺伝子変異と MEB とは関連するのではないだろうかと考え、この可能性について検討することにした。

この仮説を検証するために、MEB 患者の *POMGnT1* 構造遺伝子領域とエクソン/イントロン境界のゲノム配列について変異の有無を調べた。その結果、患者において 6 個の変異を見出した。¹⁶⁾その後さらに検索を進めた結果、7 個の新たな変異を見つけ合計 13 個の変異を見出した (Fig. 5)。¹⁸⁾これらの変異は健常人では全く見つからなかったことから、これらの変異は病気の原因であり、*POMGnT1* 遺伝子は MEB の原因遺伝子であるという結論に至った。なお、この調査過程で患者はフィンランドを中心にしたヨーロッパに限らず広く世界中に分布しており、日本や韓国にも存在することが確認された。これらの変異により O-マン

Table 1. Comparative Activities of Soluble *POMGnT1* and GnT-I to Various Substrates

Substrates	Specific activity (pmol/min/mg protein)	
	<i>POMGnT1</i>	GnT-I
<u>Mannose-nano-peptide</u>		
$\begin{array}{c} \text{Man} \\ \\ \text{Ac-Ala-Ala-Pro-Thr-Pro-Val-Ala-Ala-Pro-NH}_2 \end{array}$	18.2	ND
<u>M5-PA</u>		
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc} \rightarrow \text{PA} \end{array}$	ND	28.3
<u>M3-PA</u>		
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc} \rightarrow \text{PA} \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array}$	ND	12.8

ND: not detected, and PA: pyridylamino.

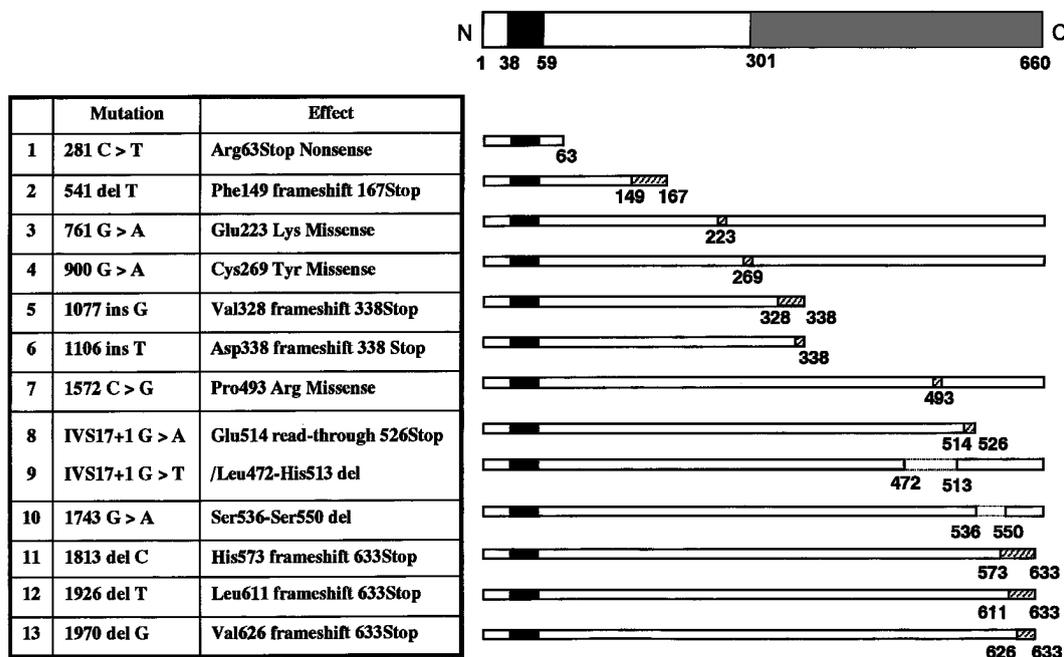


Fig. 5. Schematic Representation of POMGnT1 and the Predicted Products Corresponding to Each Mutation, and a Summary of Mutations of MEB Patients

Each protein is represented by a box with its N terminus to the left. Each box from the left indicates a cytoplasmic tail (white box), a transmembrane domain (black box), a stem domain (white box), and the catalytic domain (gray box). The hatched boxes and dotted-line boxes represent mutated amino acids and deletion regions, respectively. The numbers below the boxes indicate the amino acid residue numbers of POMGnT1 and each mutant.

ノース型糖鎖の合成が損なわれるかどうかを確認するために、これらの変異体酵素を発現させ糖転移酵素活性を調べ、すべての変異体で酵素活性が失われていることを明らかにした。^{16,19)} 以上の結果より、MEBはPOMGnT1の酵素機能喪失による遺伝病であると結論した。もしPOMGnT1が機能しなければ、Fig. 3に示したようなO-マンノース型糖鎖で見られる末端構造(Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, HSO $_3$ -3GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc)はすべて形成されないことになる。これらの構造は接着に関わることが知られているので、O-マンノース型糖鎖の欠損は細胞移動や細胞接着に大きな影響を及ぼすことが考えられる。さらに、MEBでは α -ジストログリカンの選択的な欠損が見つかった。²⁰⁾ この結果は、 α -ジストログリカンはPOMGnT1の標的分子の1つであること、 α -ジストログリカンの糖鎖異常はMEBの病態発症と大きな関係があることを示唆していると考えられる。MEBで見られる筋と脳の異常は、O-マンノース型糖鎖の異常による α -ジストログリカンの機能喪失によるのであろう。

4. 他の筋ジストロフィーにおける α -ジストログリカンの糖鎖異常

最近の研究により、福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD: OMIM 253800)、先天性筋ジストロフィー1C型(MDC1C: OMIM 606612)、Walker-Warburg症候群(WWS: OMIM 236670)、筋ジストロフィーモデル(*myd*)マウスなど他の筋ジストロフィーも、 α -ジストログリカンの糖鎖異常によることが示唆されている(Table 2)。これらの異常を具体的に明らかにすることは、筋ジストロフィーの糖鎖病理機序の解明の新たな道を拓くことが期待される。

MEBと同じように、FCMDとWWSは先天性筋ジストロフィー、滑脳症と眼奇形を伴う常染色体劣性遺伝病である。^{21,22)} FCMDは日本においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーについて多い小児筋ジストロフィーである。²¹⁾ 発症頻度は人口100000人当たりおよそ3人であり、日本では約90人に1人が保因者となる。小林らはFCMDの原因遺伝子を9q31に特定し、それはフクチンと名付けた461アミノ酸から成るタンパク質をコードしていることを明らかにした。²³⁾ フクチンの機能はまだ不明だが、

Table 2. Possible Muscular Dystrophies with Alterations in the Glycosylation of α -Dystroglycan

Disease	Gene	Protein function	Reference
Muscle-eye-brain disease (MEB)	<i>POMGnT1</i>	O-mannosyl glycan GlcNAc transferase	16
Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD)	<i>Fukutin</i>	Putative glycosyltransferase	23
Walker-Warburg syndrome (WWS) (partly*)	<i>POMT1</i>	Putative O-mannosyltransferase	25
MDC1C and limb-girdle muscular dystrophy 2I (LGMD2I)	Fukutin-related protein (<i>FKRP</i>)	Putative glycosyltransferase	28 29
Myodystrophy (<i>myd</i>) mouse	<i>Large</i>	Putative glycosyltransferase	31

* 20%

N末端にシグナル配列か膜貫通領域と思われる疎水領域を持っており、ゴルジに局在しているようである。糖転移酵素にみられるDXDという2価カチオン結合に必要なアミノ酸配列が存在することから、細胞表面の糖タンパク質あるいは糖脂質を修飾する酵素を予想させる。最近武田らはフクチンホモ欠損型胎児性幹細胞に由来するキメラマウスを作製した。²⁴⁾ フクチン欠損細胞の占める割合の高いキメラマウスは、筋力低下、運動失調様行動を呈した。また、FCMDと同じように α -ジストログリカンを選択的に欠損しラミニン結合性を失っていた。さらに、脳と眼の異常も示した。以上の結果より、フクチンは筋、脳、眼の正常な発達に必要であり、フクチンと α -ジストログリカンの密接な関係を示唆している。

WWSは、特に重篤な脳の形態異常、典型的なII型滑脳症、眼奇形を示すもう1つの先天性筋ジストロフィーである。WWS患者は出生時から重篤であり、ほとんど一年以内に死亡してしまう。²²⁾ 患者は世界中でみられる。最近、患者の20% (30人の患者中6人) でprotein O-mannosyltransferase 1 (*POMT1*) に変異が見つかった。*POMT1*は7つある酵母のO-マンノース転移酵素のホモログであることから、セリンあるいはスレオニン残基にマンノースを転移する酵素であると予想されている (Fig. 4)。²⁵⁾ *POMT1*は胎児脳、精巣、骨格筋と言うWWSで影響がみられる組織で特に高頻度で発現している。なおこれら30人の患者では、もう1つのホモログである*POMT2*の変異は全く見つからなかった。このことは、この症候群では未知の原因遺伝子があることを示している。しかしながら、いまのところ脊椎動物の*POMT*ホモログで

O-マンノース転移酵素の活性の検出には成功しておらず、*POMT1*と*POMT2*が実際にO-マンノース転移酵素であるかどうかは不明である。MEBとFCMDと同じように、WWSの骨格筋でも β -ジストログリカンやラミニンは正常に発現しているにもかかわらず、やはり選択的な α -ジストログリカンの欠損がみられた。^{20,25,26)} ところで、ショウジョウバエでは筋肉の形成がうまくできないために体がねじれてしまう*rt*変異体というのが知られているが、この原因遺伝子は*POMT1*のホモログである。²⁷⁾ *rt*遺伝子産物がO-マンノース転移酵素であるかどうかはやはり不明であるが、ひょっとするとO-マンノシル化は脊椎動物や無脊椎動物を問わず、筋の正常な発生に不可欠な糖鎖修飾かもしれない。

これらに加えて、フクチンのホモログ (fukutin-related protein, *FKRP*) の変異によって起こるMDC1Cでも α -ジストログリカンの糖鎖異常が観察される。²⁸⁾ MDC1Cは重篤な筋衰弱と変性、心筋症を特徴とする。精神遅延や小脳嚢胞が観察されることもある。*FKRP*遺伝子の対立変異は、しばしば心筋症を併発し、青年期から成人期と幅広い発症時期を示す肢帯型筋ジストロフィー2I型 (LGMD2I: OMIM 607155) の原因ともなる。²⁹⁾ *FKRP*遺伝子の変異を持つ患者は、やはり α -ジストログリカンの発現が低下し、その程度は病気の重症度と一致 (重症なものほど α -ジストログリカンの発現がより低下) し、さらにウェスタンブロット解析を行うと糖鎖をより多く持つと思われる高分子量の α -ジストログリカンが明らかに減少していることが分かる。*FKRP*の機能は不明だが、フクチンと同じように糖転移酵素あるいは糖鎖修飾調節因子として α -ジス

トログリカンの糖鎖修飾に関与すると考えられている。FKRPはフクチンとともにゴルジ局在タンパク質だと考えられるので、³⁰⁾ これらのタンパク質の欠損が α -ジストログリカンの糖鎖修飾を含めた正常な成熟を妨げることは十分に考えられることである。

最後に、恐らく糖転移酵素遺伝子と思われる *large* 遺伝子の変異による筋ジストロフィーモデルマウス (*myd* マウス³¹⁾) を紹介する。しかしながら、*large* 遺伝子産物の酵素活性は証明されていない。*myd* マウスでの変異は、*large* 遺伝子のエクソン5-7の欠失である。この欠失は対応する mRNA のフレームシフトを引き起こし、未成熟な終止コドンを生じさせる。*myd* マウスは、進行性の筋ジストロフィー、眼の異常、さらに大脳皮質、小脳、海馬での神経細胞の遊走異常と基底膜の亀裂を特徴とする中枢神経系の異常を起こす。^{32,33)} *myd* マウスにおける筋と脳での α -ジストログリカンの糖鎖修飾低下は、MEBとFCMD患者と同様に観察される。

以上まとめると、MEB、FCMD、*myd* マウスの筋細胞膜で観察される α -ジストログリカンの糖鎖修飾低下は、ラミニン、ニューレキシン、アグリンといったリガンドに対する α -ジストログリカンの結合能を弱めているらしい (Fig. 6)。³³⁾ つまり、糖転移酵素と予想される遺伝子の変異による α -ジストログリカンの糖鎖異常は、細胞外成分との結合異常を起こしMEB、WWS、FCMD、MDC1C、*myd* マウスで共通にみられる筋変性と脳の形態異常を引き起こしていると考えられる。しかしながら、これらの

原因遺伝子が糖転移酵素だとしたら、POMGnT1以外は基質が全く分かっていない (Fig. 7)。それぞれの酵素を同定し性質を明らかにすることは、脳の異常を伴う先天性筋ジストロフィーの分子レベルでの発症機構の解明に大いに役立つことが期待される。

最近、糖鎖異常が先天性ではない筋ジストロフィー疾患の原因であることが報告された。それは下腿の筋力低下が特徴的な hereditary inclusion body myopathy (HIBM; OMIM 600737) で、9p12-13にマップされる UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase の変異によることが明らかとなった。³⁴⁾ この酵素は、多くの糖鎖の非還元末端を占めるシアル酸

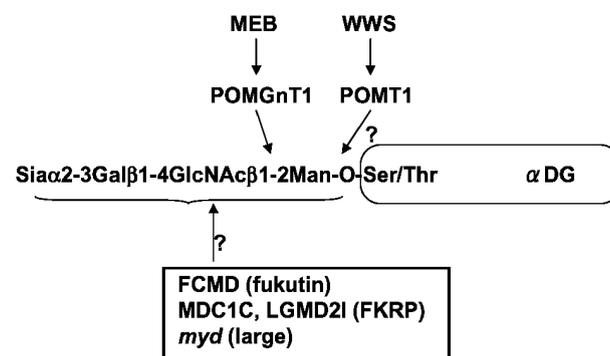


Fig. 7. Possible Defects of O-Mannosylglycosylation of α -Dystroglycan in Muscular Dystrophy

Mutations in *POMGnT1*, *POMT1*, *fukutin*, *FKRP*, and *large* cause defects in the glycosylation of α -dystroglycan resulting in muscular dystrophy. The substrates of these putative enzymes, with the exception of *POMGnT1*, are largely unknown. *POMT1* is thought to initiate the biosynthesis of O-mannosyl glycan.

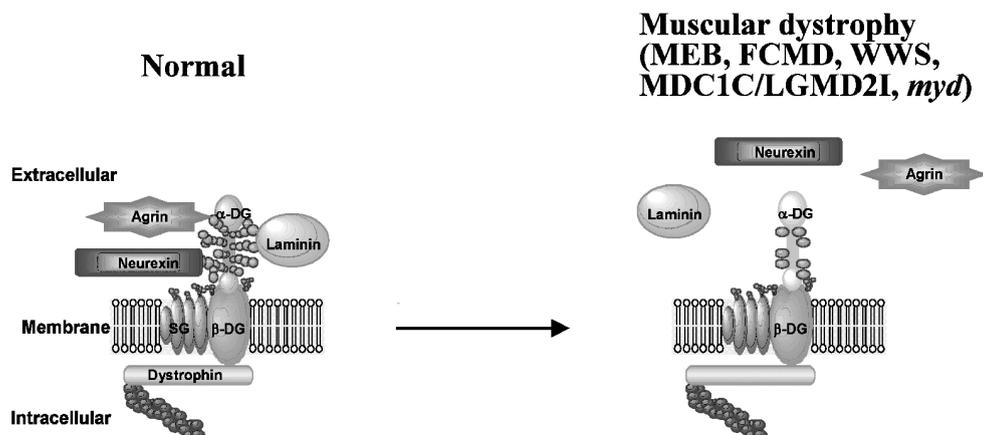


Fig. 6. DGC in Muscular Dystrophies

In normal muscle, glycans attached to α -dystroglycan linked the DGC to extracellular matrix proteins (agrin, neurexin and laminin). Loss of glycosylation of α -dystroglycan in muscular dystrophies disrupts the link to these components. α -DG: α -dystroglycan, β -DG: β -dystroglycan, and SG: sarcoglycan.

の合成経路の中間段階の反応, UDP-GlcNAc から ManNAc-6-リン酸への2段階の反応を触媒する. ユダヤ人を中心とする解析結果では, 遺伝子変異に伴うアミノ酸の置換による活性低下のためと推定されたが, 完全に活性を失っていると考えられる患者は見い出されなかった. シアル酸は様々な細胞間相互作用に関与して生体維持に必須と推測されており, 完全な活性の消失は致死的であると思われるが,³⁵⁾ シアル酸量の低下によってどのような分子間に変化が起きるのか興味もたれる.

筋細胞膜を激しい筋肉の動きから守るために細胞内外を結ぶ連結軸が重要であり, ジストロフィン—ジストログリカン—ラミニンと言う連結軸の破綻による筋ジストロフィー発症モデルが提唱されている. これまでにこの連結軸形成に関わる, ジストロフィン欠損によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー, ラミニン欠損による筋ジストロフィーは知られていたが,⁴⁾ ジストログリカン欠損あるいはジストログリカンの変異が原因の筋ジストロフィーは知られていない. これはジストログリカンを欠くとマウスでは胎生致死となり, 恐らくヒトの場合も生まれて来ないためではないかと考えられる. 本研究により, 我々はジストログリカンの糖鎖異常による筋ジストロフィーを明らかにし, 新しい病態発症モデルを提唱した.

最近, 脳, 筋, 末梢神経と部位特異的なジストログリカン遺伝子破壊マウスが作成され, それぞれ興味深い知見が得られている. 簡単に紹介すると, 脳でのみ特異的にジストログリカンを欠くと, 大脳皮質層構造の欠如, 異常脳回, グリア性境界膜—基底膜の破壊などの脳奇形,³⁶⁾ 筋でのみ特異的にジストログリカンを欠くと, DGCの構成成分の消失, 緩和な筋ジストロフィー,³⁷⁾ 末梢神経でのみ特異的にジストログリカンを欠くと, ミエリンと絞輪の形成不全, ランヴェエ絞輪でのナトリウムチャネルの減少,³⁸⁾ などが観察され, あらためてジストログリカンの重要性が認識された. これらの異常にジストログリカンの糖鎖がどの位関与するか興味もたれる.

5. おわりに

筋ジストロフィー以外でジストログリカンに関して2つの興味ある報告を紹介しよう.^{39,40)} それは, 異なる感染因子がジストログリカンを標的分子として利用することである. 1つはラッサ熱ウィルスを

始めとするアレナ属ウィルス感染であり, もう1つはらい菌感染である. 特に興味深いのはともに糖鎖の関与が示唆されていることである. 詳細はまだ不明であるが, 我々が見つけたジストログリカンに含まれるO-マンノース型糖鎖は, これらの感染因子に対する感染阻止剤開発に向けた候補分子の1つとなるかも知れない.

糖鎖は分子間認識で重要な働きをしており, 糖鎖の異常が疾患につながることは容易に想像される. これまでに糖タンパク質のN型糖鎖の付加異常によって起こる先天性グリコシル化異常症候群 (Congenital disorders of glycosylation: CDG) が知られている.⁴¹⁾ 1980年に最初の報告がありその後現在までに10種類以上のCDGのタイプが知られている. これらの疾患はN型糖鎖がタンパク質に転移される前の異常 (CDGI型, 糖鎖そのものの欠損を起こす) とタンパク質に転移された後の異常 (CDGII型, 糖鎖構造異常を起こす) に大別される. 症状は全身的に現れ, N型糖鎖不全が各種臓器の様々な糖タンパク質の機能に影響を及ぼしていることが予想される. しかしながら本稿で紹介した筋ジストロフィーはN型糖鎖合成には関与しない糖転移酵素の変異によると考えられる. これらの遺伝子産物の本質を解明することは, 筋ジストロフィーと言う難病の解明に役立つことが期待される. 筋, 脳などで発現している α -ジストログリカンの糖鎖異常は, これら筋ジストロフィーに共通しており, α -ジストログリカンは, 神経細胞遊走異常を伴う筋ジストロフィーに対する糖鎖治療学と言う新しい分野を切り開くキーワードとなるであろう.

ここ1年足らずの間に, 筋ジストロフィーに糖鎖異常と言う新しい病態メカニズムを提唱する報告が相ついで発表され, 大変興味深い展開となっている. 糖鎖構造から始まった我々の研究は, こうした新しい領域の扉を開くことに少しでも貢献できたと思う. 本稿では触れることができなかったが, 時を同じくして大きな展開をみせているNotch受容体を介した情報伝達において重要なO-フコース型糖鎖 (Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Fuc-Ser/Thr) も構造研究に諸を発している. 今後次々と新しいタイプの糖鎖が発見され, 糖鎖の新たな機能解明につながる糸口となることを期待したい.

謝辞 本研究は数多くの共同研究の成果であり、最後にこの場を借りて共同研究者各位に深謝致します。

REFERENCES

- 1) Emery A. E., *Lancet*, **359**, 687–695 (2002).
- 2) Ervasti J. M., Campbell K. P., *Cell*, **66**, 1121–1131 (1991).
- 3) Ibraghimov-Beskrovnaya O., Ervasti J. M., Leveille C. J., Slaughter C. A., Sernett S. W., Campbell K. P., *Nature*, **355**, 696–702 (1992).
- 4) Montanaro F., Carbonetto S., *Neuron*, **37**, 193–196 (2003).
- 5) Williamson R. A., Henry M. D., Daniels K. J., Hrstka R. F., Lee C., Sunada Y., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Campbell K. P., *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 831–841 (1997).
- 6) Henry M. D., Campbell K. P., *Cell*, **95**, 859–870 (1998).
- 7) Yamada H., Chiba A., Endo T., Kobata A., Anderson L. V. B., Hori H., Fukuta-Ohi H., Kanazawa I., Campbell K. P., Shimizu T., Matsumura K., *J. Neurochem.*, **66**, 1518–1524 (1996).
- 8) Chiba A., Matsumura K., Yamada H., Inazu T., Shimizu T., Kusunoki S., Kanazawa I., Kobata A., Endo T., *J. Biol. Chem.*, **272**, 2156–2162 (1997).
- 9) Sasaki T., Yamada H., Matsumura K., Shimizu T., Kobata A., Endo T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1425**, 599–606 (1998).
- 10) Chain W., Yuen C.-T., Kogelberg H., Caruthers R. A., Margolis R. U., Feizi T., Lawson A. M., *Eur. J. Biochem.*, **263**, 879–888 (1999).
- 11) Yuen C.-T., Chai W., Loveless R. W., Lawson A. M., Margolis U., Feizi T., *J. Biol. Chem.*, **272**, 8924–8931 (1997).
- 12) Smalheiser N. R., Haslam S. M., Suton-Smith M., Morris H. R., Dell A., *J. Biol. Chem.*, **273**, 23698–23703 (1998).
- 13) Endo T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 237–246 (1999).
- 14) Strahl-Bolsinger S., Gentsch M., Tanner W., *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 297–307 (1999).
- 15) Takahashi S., Sasaki T., Manya H., Chiba Y., Yoshida A., Mizuno M., Ishida H., Ito F., Inazu T., Kotani N., Takasaki S., Takeuchi M., Endo T., *Glycobiology*, **11**, 37–45 (2001).
- 16) Yoshida A., Kobayashi K., Manya 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., Endo T., *Dev. Cell*, **1**, 717–724 (2001).
- 17) Santavuori P., Somer H., Sainio K., Rapola J., Kruus S., Nikitin T., Ketonen L., Leisti J., *Brain Dev.*, **11**, 147–153 (1989).
- 18) Taniguchi K., Kobayashi K., Saito K., Yamanouchi H., Ohnuma A., Hayashi Y. K., Manya H., Jin D. K., Lee M., Parano E., Fal-saperla R., Pavone P., Van Coster R., Talim B., Steinbrecher A., Straub V., Nishino I., Topaloglu H., Voit T., Endo T., Toda T., *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 527–534 (2003).
- 19) Manya H., Sakai K., Kobayashi K., Taniguchi K., Kawakita M., Tota T., Endo T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 93–97 (2003).
- 20) Kano K., Kobayashi K., Herrmann R., Tachikawa M., Manya H., Nishino I., Nonaka I., Straub V., Talim B., Voit T., Topaloglu H., Endo T., Yoshikawa H., Toda T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 1283–1286 (2002).
- 21) Fukuyama Y., Osawa M., Suzuki H., *Brain Dev.*, **3**, 1–29 (1981).
- 22) Dobyns W. B., Pagon R. A., Armstrong D., Curry C. J., Greenberg F., Grix A., Holmes L. B., Laxova R., Michels V. V., Robinow M., *Am. J. Med. Genet.*, **32**, 195–210 (1989).
- 23) 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., Toda T., *Nature*, **394**, 388–392 (1998).
- 24) Takeda S., Kondo M., Sasaki J., Kurahashi H., Kano H., Arai K., Misaki K., Fukui T., Kobayashi K., Tachikawa M., Imamura M., Nakamura Y., Shimizu T., Murakami T., Sunada Y., Fujikado T., Matsumura K., Terashima T., Toda T., *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 1449–1459 (2003).
- 25) 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., Leshjoki A. E., Cruces J., Voit T., Walsh C. A., van Bokhoven H., Brunner H. G., *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 1033–1043 (2002).
- 26) Hayashi Y. K., Ogawa M., Tagawa K., Noguchi S., Ishihara T., Nonaka I., Arahata K., *Neurology*, **57**, 115–121 (2001).
- 27) Martin-Blanco E., Garcia-Bellido A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 6048–6052 (1996).
- 28) 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., Muntoni F., *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, 1198–1209 (2001).
- 29) Brockington M., Yuva Y., Prandini P., Brown S. C., Torelli S., Benson M. A., Herrmann R., Anderson L. V. B., Bashir R., Burgunder J., Fallet S., Romero N. B., Fardeau M., Straub V., Storey G., Pollitt C., Richard I., Sewry C. A., Bushby K., Voit T., Blake D. J., Muntoni F., *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2851–2859 (2001).
- 30) Esapa C. T., Benson M. A., Schröder J. E., Martin-Rendon E., Brockington M., Brown S. C., Muntoni F., Kröger S., Blake D. J., *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 3319–3331 (2002).
- 31) Grewal P. K., Holzfeind P. J., Bittner R. E., Hewitt J. E., *Nat. Genet.*, **28**, 151–154 (2001).
- 32) Holzfeind P. J., Grewal P. K., Reitsamer H. A., Kechvar J., Lassmann H., Hoeger H., Hewitt J. E., Bittner R. E., *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2673–2687 (2002).
- 33) 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., Campbell K. P., *Nature*, **418**, 417–422 (2002).
- 34) Eisenberg I., Avidan N., Rotikha T., Hochner H., Chen M., Olender T., Barash M., Shemesh M., Sadeh M., Grabov-Nardini G., Shmilevich I., Friedmann A., Karpati G., Bradley W. G., Baumbach L., Lancet D., Asher E. B., Beckmann J. S., Argov Z., Mitrani-Rosenbaum S., *Nat. Genet.*, **29**, 83–87 (2001).
- 35) Schwarzkopf M., Knobeloch K.-P., Rohde E., Hinderlich S., Wiechens N., Lucka L., Horak I., Reutter W., Horstkorte R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 5267–5270 (2002).
- 36) Moore S. A., Saito F., Chen J., Michele D. E., Henry M. D., Messing A., Cohn R. D., Ross-Barta S. E., Westra S., Williamson R. A., Hoshi T., Campbell K. P., *Nature*, **418**, 422–425 (2002).
- 37) Cohn R. D., Henry M. D., Michele D. E., Barresi R., Saito F., Moore S. A., Flanagan J. D., Skwarchuk M. W., Robbins M. E., Mendell J. R., Williamson R. A., Campbell K. P., *Cell*, **110**, 639–648 (2002).
- 38) Saito F., Moore S. A., Barresi R., Henry M. D., Messing A., Ross-Barta S. E., Cohn R. D., Williamson R. A., Sluka K. A., Sherman J. D., Brophy P. J., Schmelzer J. D., Low P. A., Wrabetz L., Feltri M. L., Campbell K. P., *Neuron*, **38**, 747–758 (2003).
- 39) Rambukkana A., Yamada H., Zanazzi G., Mathus T., Salzer J. L., Yurchenco P. D., Campbell K. P., Fischetti V. A., *Science*, **282**, 2076–2079 (1998).
- 40) Cao W., Henry M. D., Borrow P., Yamada H., Elder J.H., Ravkov E.V., Nichol S. T., Compans R. W., Campbell K. P., Oldstone M. B. A., *Science*, **282**, 2079–2081 (1998).
- 41) Freeze H., *Glycobiology*, **11**, 129R–143R (2001).