

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 3 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790884

研究課題名(和文) 福山型筋ジストロフィーの治療を目指した ジストログリカン糖鎖修飾構造の解析

研究課題名(英文) Analysis on the glycan structure of alpha-dystroglycan and the therapeutic approach for Fukuyama-congenital muscular dystrophy

研究代表者

久我 敦 (Kuga, Atsushi)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30608790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ジストログリカン(-DG)の糖鎖修飾異常は滑脳症と筋ジストロフィーを引き起こす。我々は-DG中にリビトール5リン酸(Rbo5P)のタンDEMリピート構造を証明した。Isoprenoid synthase domain-containing(ISPD)という遺伝子産物はCDP-リビトール合成酵素でfukutinとfukutin-related proteinはCDPリビトールを用いるRbo5P transferaseだった。ISPD欠損細胞の糖鎖修飾はCDP-リビトールの補充で回復した。今回の我々の知見は哺乳動物におけるRbo5P糖鎖修飾の基礎を確立し、-DG異常症の病態と治療戦略を示した。

研究成果の概要(英文)：Aberrant glycosylation of α -dystroglycan (α -DG) causes muscular dystrophy and lissencephaly, which we call α -dystroglycanopathies. Here we identified the previously unknown glycan unit ribitol 5-phosphate (Rbo5P) in α -DG. Rbo5P forms a tandem repeat and functions as a scaffold for the formation of the ligand-binding moiety. We found the enzyme activities of three major α -dystroglycanopathy-causing proteins to be involved in the synthesis of tandem Rbo5P. Isoprenoid synthase domain-containing (ISPD) is cytidine diphosphate ribitol (CDP-Rbo) synthase. Fukutin and fukutin-related protein are Rbo5P transferases that use CDP-Rbo. Supplementation of CDP-Rbo to ISPD-deficient cells restored α -DG glycosylation. These findings establish the molecular basis of mammalian Rbo5P glycosylation, and reveal the pathogenesis and therapeutic strategies of α -DG-associated diseases.

研究分野：筋ジストロフィーの分子病態

キーワード：dystroglycan fukutin FKRP リビトール

1. 研究開始当初の背景

福山型筋ジストロフィー (FCMD) は我が国の福山によって報告された中枢神経の発生異常を伴う先天性筋ジストロフィーである。FCMD の病態は α ジストログリカン (α DG) の糖鎖修飾異常にあり、同じ病態の類縁疾患とともに α α ジストログリカノパチーと総称される。 α DG は骨格筋や脳の細胞膜に存在するタンパク質で、基底膜側のラミニンやアグリニンなど様々な分子と結合する。 α DG は複雑な糖鎖修飾構造を有しており、この構造がその生理的機能の発現に必須である。FCMD 患者では原因遺伝子 fukutin の異常により、この糖鎖修飾が正常に行われず、細胞膜・基底膜間の機能的連関が崩れることで、疾患を発症する。研究開始当初、 α DG の糖鎖修飾構造にキシロース・グルクロン酸繰り返し構造が含まれることも明らかとなり、完全解明は間もないと考えられていた。しかし、構造の最重要部分の同定は難航し、fukutin の生理機能も証明されないままであった。

2. 研究の目的

α DG の糖鎖修飾構造を明らかにする。この構造の生合成に関与すると考えられる先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子の酵素活性を明らかにする。

3. 研究の方法

培養細胞に発現させた組み換え型 α DG を大量調製する。その α DG の中から機能的糖鎖構造を有した α DG のみを選択的に精製し、質量分析を用いて糖鎖構造の質量を測定する。測定した結果から糖鎖構造を推定し、in vitro で酵素活性の検証して、合成された糖鎖構造を NMR を用いて最終決定する。

4. 研究成果

成果①

哺乳類で初めてとなる5炭糖による糖鎖修飾構造を同定した。

先行研究で α DG の機能的糖鎖構造としてリン酸化された CoreM3 糖鎖構造 (GalNAc-beta1,3-GlcNAc-beta1,4-Man(6P)-O-Thr) というものが明らかにされていた (Yoshida-Moriguchi T, et al. 2013)。またラミニンと結合する糖鎖構造としてキシロースとグルクロン酸のリピート構造 ($[-3Xyl\alpha 1,3GlcA\beta 1-]_n$) が報告されていた (Inamori K, et al. 2012)。両者を結び付ける鍵となる構造はマンノース6位炭素リン酸化部位からホスホジエステル結合で連なっていくものと予想されていた。そのためその構造はポストリン酸構造と呼ばれていた。

我々は正常の糖鎖構造を持った組み換え α DG を調製する方法論を確立していたが、質量分析ではグルクロン酸のもつ陰性荷電のために測定が非常に難しく、ポストリン酸構造の質量の測定は困難であった。そこで2011年にHaraらが報告した症例に注目した。この症例は知能障害を合併した筋疾患と診断されていたが、のちに糖鎖修飾に重要な α DG ムチン領域内のアミノ酸変異が明らかとなった特異な一例であった。我々はマウス α DG 遺伝子内に相同の変異を導入するとキシロース・グルクロン酸リピート構造が合成されないことを確認することができ、その結果、ポストリン酸構造の質量測定を可能にすることができた。測定された質量は約214で精密質量分析による元素組成の推定、これまでこれは5炭糖(134)とP03-(80)の存在を強く示唆した。NMRを用いた測定の結果、リビトール5リン酸タンデム構造が明ら

かとなった。

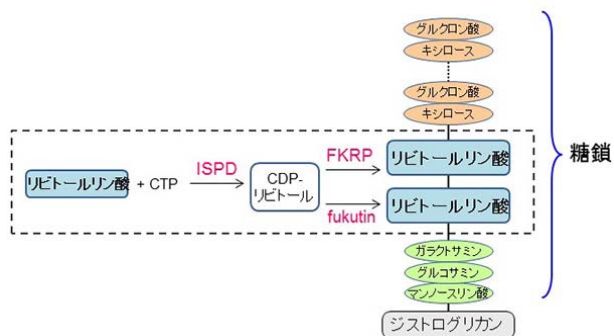
成果②

先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子 fukutin/fukutin-related protein (FKRP)/ISPD の酵素活性を実証し、リビトール5リン酸タンデム構造の生合成に関与していることを証明した。質量134の5炭糖はリビトールのほかにキシリトール、アラビトールの2つが考えられたが、成果①で構造を明らかにしていく過程と並行して、酵素活性について検証することが成果②へと結びついた。2012年に新規原因遺伝子として報告された ISPD の遺伝子配列はグラム陽性菌の TarI の配列とホモロジーがあり、TarI は CDP-リビトール合成酵素であることがわかっていた。同様の代謝経路が哺乳類にも存在するとすれば、5炭糖はリビトールであるはずだ、と考えられた。fukutin と FKRP は CDP-リビトールを基質としてリビトールリン酸を α DG の糖鎖構造へ転移する活性を持っていた。

成果③

ISPD 欠損による筋ジストロフィーの治療法を検証する実験を行った。

ISPD 欠損細胞に CDP-リビトールを補充することで糖鎖修飾構造が正常化することを確認することができた。ISPD 遺伝子の異常による筋ジストロフィー患者の治療法として CDP-リビトール補充は有効である可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Many H, Kuga A, Yamaguchi Y, Akasaka-Many K, Furukawa J, Mizuno M, Kawakami H, Shinohara Y, Wada Y, Endo T, Toda T. Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy.

Cell Rep. 2016 Mar 8;14(9):2209-23. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.017. Epub 2016 Feb 25.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016_02_26_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久我 敦 (KUGA, Atsushi)
神戸大学医学部附属病院・助教
研究者番号: 30608790

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

和田 芳直 (Wada, Yoshinao)
大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合
医療センター・研究所長
研究者番号 : 00250340

戸田 達史 (TODA, Tatsushi)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 30262025