

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860682

研究課題名(和文)先天性筋ジストロフィー症の脳形成異常における糖鎖機能の解析

研究課題名(英文)Function of sugar chain in congenital muscular dystrophy

研究代表者

山田 健之(Yamada, Takeyuki)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：40725199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜に存在するジストロフィン糖タンパク質複合体はO-マンノース型糖鎖を介して細胞外マトリックスと結合している。このO-マンノース型糖鎖に異常が生じることにより、脳や眼の異常を伴う先天性筋ジストロフィー症を発症することが知られている。今回、網膜色素変性症の患者から糖転移酵素POMGNT1の新規変異が同定された。これらの変異POMGNT1は酵素活性が10-30%に減弱していた。一方、先天性筋ジストロフィー症の患者で見つかるPOMGNT1の変異体は酵素活性が完全に消失している。以上の結果より、糖鎖を少し合成できると先天性筋ジストロフィー症の発症は抑えられるが、網膜色素変性症を発症すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：O-mannose-type glycosylation of α -dystroglycan (α -DG) is required for its extracellular matrix binding activities. Aberrant α -DG glycosylation causes congenital muscular dystrophy (CMD), accompanying neurological and ocular abnormalities. Here, we identified novel mutations in POMGNT1, which encodes an essential component in O-mannosylation pathway, in retinitis pigmentosa. Enzymatic assay showed that the mutants POMGNT1 impaired its enzymatic activities, with only 10 to 30% of the wild type level retained. On the other hand, mutants POMGNT1 identified from CMD nearly abolished its enzymatic activities. These results suggest that a few O-mannose-type glycosylation syntheses suppress CMD, but develop RP.

研究分野：分子生物学

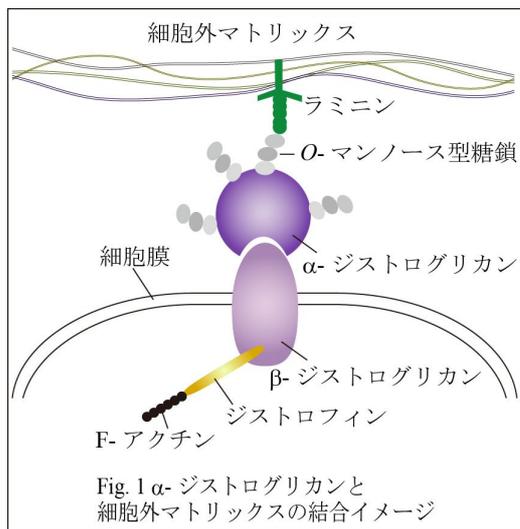
キーワード：O-マンノース型糖鎖

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々はタンパク質に修飾された糖鎖構造を明らかにし、老化に伴う糖鎖構造の変化やタンパク質の機能における糖鎖構造の重要性を示してきた。その一連の研究において、*O*-マンノース型糖鎖を発見し、タンパク質のセリンあるいはスレオニンにマンノースを転移させる酵素である POMT1, POMT2、そのマンノースに *N*-アセチルグルコサミンを転移する酵素 POMGNT1 を同定した。このような *O*-マンノース型糖鎖の合成に関わる酵素をコードする遺伝子は先天性筋ジストロフィー症の原因遺伝子であったことから、*O*-マンノース型糖鎖の合成異常が先天性筋ジストロフィー症の発症原因になることが明らかになった。また、POMT1, POMT2 の異常により生じる Walker-Warburg 症候群や POMGNT1 の異常により生じる muscle-eye-brain 病などは、脳などの中枢神経系や眼にも発生異常を引き起こす重篤な症状が現れることが知られている。

細胞膜にはジストロフィン、 α -ジストログリカン、 β -ジストログリカンなどにより構成されているジストロフィン糖タンパク質複合体が存在している (Fig.1)。この複合体は細胞内の細胞骨格系ネットワークと細胞外の細胞外マトリックス (ラミニン、ピカチュリンなど) と連結する働きをしている。

β -ジストログリカンは *O*-マンノース型糖鎖が修飾されており、この糖鎖により細胞外マトリックスと結合していることが知られている。POMT1 や POMGNT1 に異常が生じると、この *O*-マンノース型糖鎖が正常な構造を作れなくなり、細胞外マトリックスとの結合が出来なくなることで、先天性筋ジストロフィー症が発症すると考えられているが、詳細な分子メカニズムは未だに解明されていない。



網膜色素変性症は網膜視細胞の変性により、夜盲や視野狭窄、視力低下などの進行性の視覚障害を生じる遺伝性疾患である。網膜色素変性症の原因遺伝子として視細胞に存在するロドプシンなど約 80 個の遺伝子が同定されているが、未だ約 40% は原因が不明な

ままである。網膜色素変性症の進行は個人差によるものが大きく、10代の頃から異変に気づくことがある一方で、高齢になっても視力を保っている例もある。

2. 研究の目的

(1) *O*-マンノース転移酵素 POMT1 の欠損により発症する Walker-Warburg 症候群は無脳回症や小脳奇形といった中枢神経障害を伴う先天性筋ジストロフィー症である。そこで、POMT1 の欠損による *O*-マンノース型糖鎖の合成異常が神経細胞の分化、性質にどのような影響を与えるかを解析する。これにより、先天性筋ジストロフィー症の病態解明が期待される。

(2) 網膜色素変性症はこれまでに多くの原因遺伝子が同定されているが、未だに約 40% の患者さんは原因が不明なままである。今回新たに、網膜色素変性症の患者さんより POMGNT1 の新規変異が発見されたため、この変異が POMGNT1 の機能に与える影響を解析する。これにより、出生直後は異常な症状が見られないにもかかわらず、加齢に伴い症状が進行していく網膜色素変性症と、*O*-マンノース型糖鎖異常の関係を調べる。

3. 研究の方法

(1) Cre-loxP システムによって糖転移酵素 POMT1 を脳特異的に欠損しているマウスから、多能性幹細胞を作製する。作製した多能性幹細胞を神経系細胞へと分化させる。また分化した神経系細胞の移動能などの性質を解析する。これにより、POMT1 による神経系細胞への分化に与える影響、また分化した神経系細胞の性質に与える影響について解析を行う。

(2) 網膜色素変性症の患者さんから見つかった POMGNT1 の変異の解析を行う。変異型 POMGNT1 を培養細胞中に発現させ、そのタンパク質を抽出する。抽出したタンパク質中に含まれる POMGNT1 の酵素活性を測定する。これにより、POMGNT1 が *O*-マンノース型糖鎖異常による先天性筋ジストロフィー症以外の病態に与える影響について解析を行う。

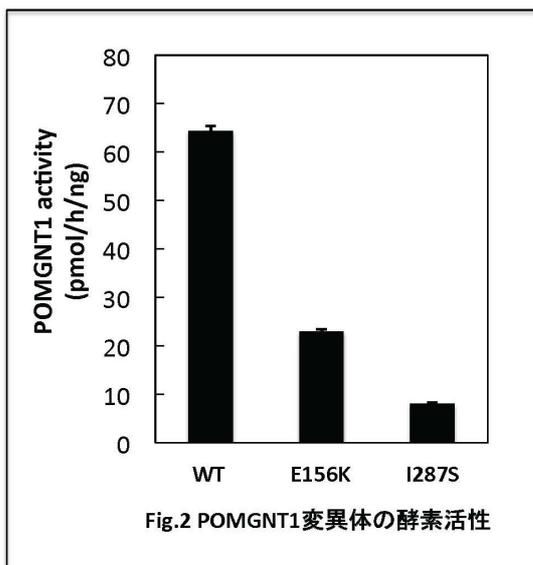
4. 研究成果

(1) Cre-loxP システムにより脳特異的に POMT1 を欠損しなくなるマウスの受精卵より多能性幹細胞 (ES 細胞) の作製を試みた。しかし、培養条件下でうまく胚盤胞期までの発生を再現することが出来なかった。バックグラウンドである Cre マウスの受精卵では胚盤胞期まで発生が進み、その後 ES 細胞の作製も問題なく行えた。このことから、POMT1 の欠損による影響があると考えられたが、その原因は不明なままである。

(2) 原因遺伝子が同定されていない網膜色

素変性症の3家系の患者さんより新規のPOMGNT1変異が同定された(156番目のグルタミン酸がリシンに変異:E156K、287番目のイソロイシンがセリンに変異:I287S、502番目のグリシンがアラニンに変異:G502A)。この変異が同定された患者さんは30歳代~70歳代の患者さん達で、皆10代などの若い時から視覚に異変を感じていた。現在、失明はしていないものの健常者の1/2~1/10程度の視力しか持っていない。また今回新たに見つかった変異部分のアミノ酸は脊椎動物において種を超えて保存されていることから、重要なアミノ酸だと考えられる。

これらのPOMGNT1変異体のうちE156KとI287SをHEK293T細胞に導入し、抽出したタンパク質を解析した。まず、タンパク質の発現量について解析した結果、野生型(WT)のPOMGNT1とほとんど変わらない発現がE156K、I287Sで見られた。そこでこれら変異のPOMGNT1の酵素活性について解析をした。その結果、E156KではWTに比べて約30%に、I287Sでは約10%にその活性が減少していることがわかり、酵素活性が完全に消失しているのではなく、減弱していることが明らかになった(Fig.2)。それに対して先天性筋ジストロフィー症のmuscle-eye-brain病で同定されてきたPOMGNT1の変異ではPOMGNT1の活性がほぼ完全に消失していることがこれまで明らかにされている。



以上の結果より、muscle-eye-brain病などのO-マンノース型糖鎖異常による先天性筋ジストロフィー症では糖転移酵素の酵素活性が完全に消失しており、それにより糖鎖の合成がされず、細胞外マトリックスと細胞骨格系ネットワークの連結が完全に失われると考えられる。それにより筋肉や眼、脳に先天性の異常が生じると考えられる。一方で、今回網膜色素変性症で同定されされた新規のPOMGNT1変異では酵素活性が減弱しただけで、まだ活性は残っていた。それにより、正常な糖鎖を多少合成することが出来、細胞外マトリックスと細胞骨格系ネットワークの

連結が弱いながらも維持されていると考えられることが出来る。この弱い連結により先天性筋ジストロフィー症の発症は抑えられるが、加齢とともに細胞外マトリックスの減少や、光刺激の蓄積などにより網膜色素変性症が発症すると考えられる(Fig.3)。本研究から、O-マンノース型糖鎖異常による先天性筋ジストロフィー症と網膜色素変性症に共通するメカニズムの存在が示唆され、両疾患の病態解明、診断・治療法の開発に活用されることが期待される。

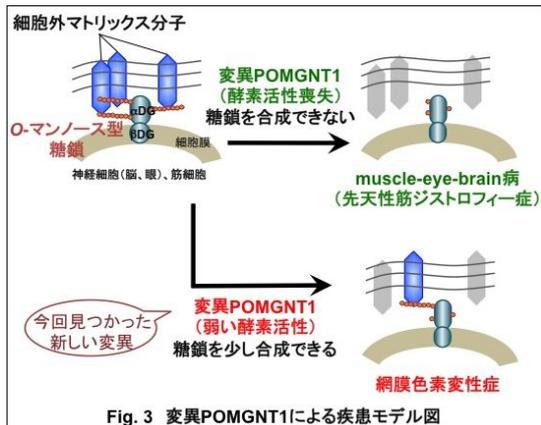


Fig.3 変異POMGNT1による疾患モデル図

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)

Mingchu Xu, Takeyuki Yamada, Zixi Sun, Aiden Eblimit, Irma Lopez, Feng Wang, Hiroshi Manya, Shan Xu, Li Zhao, Yumei Li, Adva Kimchi, Dror Sharon, Ruifang Sui, Tamao Endo, Robert K. Koenekoop and Rui Chen, "Mutations in POMGNT1 cause non-syndromic retinitis pigmentosa" Human molecular Genetics, 2016, 25(8), 1479-1488, doi: 10.1093/hmg/ddw022, 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

萬谷 博、山田 健之、遠藤 玉夫、" -ジストログリカノパチー原因遺伝子POMGNT1の変異による網膜色素変性症"、第2回日本筋学会学術集会、2016年8月5日-8月6日、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター(東京都・小金井市)

山田 健之、萬谷 博、Mingchu Xu, Rui Chen, 遠藤 玉夫、" POMGNT1の変異が網膜色素変性症を引き起こす"、第39回日本基礎老化学会大会、2016年5月27日-5月28日、伊勢原市民文化会館(神奈川県・伊勢原市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健之 (Yamada, Takeyuki)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号：40725199

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：