

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24687017

研究課題名(和文)新しい翻訳後修飾“ポストリン酸糖鎖”がコードする生物学的情報の解明と病態への関与

研究課題名(英文)Structural, functional, and pathological studies on a novel "post-phosphoryl sugar chain"

研究代表者

金川 基 (Kanagawa, Motoi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00448044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、「ポストリン酸糖鎖」とよばれる新しい翻訳後修飾体の構造・修飾機序・生理的意義を解明すること、およびポストリン酸糖鎖不全症の病態の理解と治療法の開発を目的とした。独自の組み換え体を用いた糖鎖構造解析、ポストリン酸糖鎖不全症の原因遺伝子産物の機能解析を通し、ポストリン酸糖鎖の全容解明への道筋がひらかれた。また、ポストリン酸糖鎖不全症の原因遺伝子欠損マウスの解析から、新たな筋病態機序が見出され、それにもとづいた治療戦略の提唱に至った。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at understanding of structure, modification mechanism, and physiological roles of novel post-translational modification termed “post-phosphoryl sugar chain”. We also examined the pathogenesis of diseases caused by defects in post-phosphoryl modification in order to develop therapeutic strategies. Structural analysis on unique recombinant glycoprotein and functional analysis of the disease gene products opened a new roadmap toward full understanding of the molecular basis of post-phosphoryl modification. Analysis on disease mouse models revealed a new pathogenesis of muscular dystrophy, which led us to propose an effective therapeutic strategy for muscular dystrophy.

研究分野：機能生物化学

キーワード：糖鎖 筋ジストロフィー ジストログリカン 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

ジストログリカンは基底膜成分やシナプス分子の膜受容体として、様々な組織で生理機能を発揮する糖タンパク質である。リガンド分子との結合には *O*-マンノース型の糖鎖修飾が必要であるが、一方で、その糖鎖異常は、心筋症や中枢神経障害を併発する筋ジストロフィーの発症にかかわることも知られている。糖鎖異常型の筋ジストロフィーの代表的なものとして、本邦に多い福山型筋ジストロフィーが挙げられる。福山型筋ジストロフィーは先天性の遺伝性疾患で、1998年に原因遺伝子フクチンが発見された。また、2001年には、福山型患者における糖鎖異常が見出された。これら本邦の研究者の発見を契機に、世界中からジストログリカンの糖鎖異常を認める筋ジストロフィーが相次いで報告され、その後、これらの疾患は、ジストログリカノパチーと総称されるようになった。1998年から2005年にかけて、フクチン、POMGnT1、POMT1、POMT2、FKRP、LARGEの6種の遺伝子が原因遺伝子として同定されている。ジストログリカンは、哺乳類では稀な *O*-マンノース型糖鎖 (Sia-Gal-GlcNAc-Man) が存在するが、ジストログリカノパチー遺伝子のうち、POMT1/2複合体が Man を Ser/Thr に転移する酵素、POMGnT1 が *O*-Man に GlcNAc を転移する酵素であることが本邦の研究者の手によって報告されている。

近年のゲノム解析技術の発展にともなって、2012年以降、新たなジストログリカノパチー遺伝子が続々と報告され、現在、その数は18種にのぼる。2010年、米国のグループが、新たな *O*-マンノース型糖鎖 (GalNAc-GlcNAc-Man) を発見し CoreM3 と名付けたが、新規ジストログリカノパチー遺伝子のうち、POMGnT2 と B3GALNT2 がこの合成にかかわり、SGK196 は Man をリン酸化する活性をもつ。また、2013年には長年の疑問であった、リガンド結合性の糖鎖構造が、LARGE が合成する、キシロースとグルクロン酸の2糖繰り返し構造であることが示された。一方で、リン酸化 CoreM3 構造とキシロース/グルクロン酸繰り返し構造をつなぐ修飾体は同定されておらず、便宜的に“ポストリン酸糖鎖”と呼ばれている。このポストリン酸糖鎖の構造と修飾機序は不明であるが、その異常は、ジストログリカンの機能障害、筋ジストロフィー発症に直結することから、生命にとって重要な翻訳後修飾のひとつであることは明白である。

研究開始当時は、続々とジストログリカノパチー遺伝子が同定され、ジストログリカノパチーと診断される患者数が増加の一途をたどっていた。従って、ポストリン酸糖鎖の分子基盤の理解のみならず、その生理的意義と病態の解明が強く望まれていた。しかしながら、ジストログリカノパチー原因遺伝子を欠損させたマウスは胎生致死に至る場合が多く、病態解明や治療法開発に有効な新たな

疾患モデルが必要とされていた。

2. 研究の目的

哺乳類において、ポストリン酸糖鎖修飾は、まったく新しい翻訳後修飾である。従って、その構造や形成機序、生理的役割を明らかにすることは、翻訳後修飾の新たな原理の確立、さらには、疾患機序の解明や治療法の開発にもつながるため、重要であり、解明が急がれる課題である。そこで、本研究では、ポストリン酸糖鎖の構造と修飾機序を明らかにすることを目的とした。また、ポストリン酸糖鎖欠損モデルを開発し、骨格筋幹細胞や心筋細胞におけるポストリン酸糖鎖の生理的役割と、その不全による発症メカニズムを解明することを目指した。得られる知見に基づき、筋ジストロフィーの克服にむけたトランスレーショナル研究に重要な情報が得られると期待される。

3. 研究の方法

(1) ポストリン酸糖鎖の構造解析

ポストリン酸糖鎖が効率的に修飾された独自の組換え体モデルと、質量分析、糖質化学的手法を駆使して、ポストリン酸糖鎖の構造を同定する。

(2) ポストリン酸糖鎖修飾機序の解析

ジストログリカノパチー原因遺伝子のうち機能未知であるフクチンと FKRP の活性を明らかにし、ポストリン酸糖鎖の修飾機序を解明する。

(3) ポストリン酸糖鎖の生理的意義と病態の解明

ポストリン酸糖鎖不全の疾患モデルとしてフクチン cKO マウスを作出し、骨格筋幹細胞と心筋におけるポストリン酸糖鎖の生理機能、および病態機序を解明する。

(4) 筋ジストロフィー克服にむけた遺伝子治療

ポストリン酸糖鎖不全の疾患モデルとしてフクチン cKO マウスと LARGE 変異マウスを用い、筋線維選択的な遺伝子治療の有効性、および最適な治療条件を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ポストリン酸糖鎖の構造解析

生体組織のジストログリカンは発現量が低く、糖鎖解析に十分な量は確保できないため、組換え体を用いる必要があった。しかし、ポストリン酸糖鎖が効率的に修飾される組換え体の発現は世界的にみても前例がない。我々は、ポストリン酸糖鎖が効率的に修飾される培養条件を見出し、得られた糖ペプチドを質量分析法で解析した。現在、ポストリン酸糖鎖が修飾された糖ペプチドが同定できており、今後の NMR 解析などに重要な知見・基盤となることが期待される。

(2) ポストリン酸糖鎖修飾機序の解析

ポストリン酸糖鎖の構造が決定された際、フクチンと FKRP が、その生合成に関わる酵素

であるか検証するために、それぞれの組換え体を作成した。また、ジストログリカノパチー患者で見出されている点変異を導入した組換え体も作成した。さらに、フクチンあるいは FKRP が欠損した細胞をゲノム編集技術によって作成した。本研究により、ポストリン酸糖鎖修飾機序の解明に有効な研究ツールが得られた。

(3) ポストリン酸糖鎖の生理的意義と病態の解明

ポストリン酸糖鎖不全の疾患モデルとして、ポストリン酸糖鎖修飾に関与するフクチンの遺伝子欠損マウスが有効と考えられるが、全身性の欠損マウスは胎生致死であり、患者変異のノックインマウスは病態を示さない。そこで、フクチンの LOX マウスと Cre マウスを掛け合わせることで、骨格筋選択的なフクチン欠損マウスを作成した。本研究では、MCK-Cre マウスあるいは Myf5-Cre マウスとフクチン LOX マウスを掛け合わせることで、それぞれ筋管選択的フクチン欠損マウス (MCK-フクチン cKO) と筋前駆細胞選択的フクチン欠損マウス (Myf5-フクチン cKO) を得た。MCK-Cre マウスの病理解析から、筋細胞膜の脆弱化が発症の引き金になることの直接の証拠が得られた。しかし、このマウスは非常に軽度な筋ジストロフィー病態しか示さなかった。一方で、Myf5-フクチン cKO では、発症時期が早く、病態進行度・程度も重篤な症状を示していた。Myf5-フクチン cKO マウスから筋衛星細胞を調製し、その細胞活性を測定したところ、増殖・分化能が低下しており、その結果、組織再生能も悪化していた。つまり、ポストリン酸糖鎖不全を起因とする筋前駆細胞機能の低下が、筋ジストロフィー病態の重篤度に関与することが初めて明らかになった。

フクチン欠損型のポストリン酸糖鎖不全症は、筋病変にくわえ、中枢神経・心病変も伴うが、本研究期間では、フクチン LOX マウスを用いて、心筋選択的フクチン欠損マウス、中枢神経選択的フクチン欠損マウスも作成した。これらのモデルマウスの病態解析も進行中で、今後の組織病態の解明に重要なツールになると予想される。

(4) 筋ジストロフィー克服にむけた遺伝子治療

前項の結果から、ポストリン酸糖鎖不全症の治療法を考えるに、筋細胞膜の脆弱化の抑制と筋前駆細胞機能低下の防止、という2つのアプローチが考えられる。しかし、筋細胞膜の脆弱化を抑制できれば、筋前駆細胞の不要な活性化と枯渇の抑制につながり治療効果が得られると予想される。この治療戦略を検証するために、筋管選択的にフクチンを発現させる遺伝子治療を検証した。モデルマウスとしては重篤型の Myf5-フクチン cKO マウス、筋管選択的にフクチンを発現させるため、筋管選択的プロモーター MCK の下流にフクチン cDNA を配した、アデノ随伴9型ウイルスベク

ター (AAV9-MCK-フクチン) を作製した。遺伝子治療開始時期として発症前と発症後、導入方法として筋注射による局所導入と経静脈による全身性導入を検証した。その結果、発症後の介入であっても筋管選択的なフクチン遺伝子発現によって有意な治療効果が得られた。また、それに必要なベクター量も既報告例に比べ、はるかに少量で済むことも明らかになり、ベクターに由来する副作用を低減できる可能性がある。これらの結果から、ポストリン酸糖鎖不全症に対して遺伝子治療が有効であることが示された。

ジストログリカン糖鎖不全症に対して、その原因遺伝子の種にかかわらず、LARGE 活性を増強させることで、キシロース/グルクロン酸の繰り返し構造を増加させ糖鎖不全を解消する、といった糖鎖治療の概念が提唱されている。この可能性を検証するために、Myf5-フクチン欠損マウスに対して LARGE 遺伝子治療を行ったが、有意な治療効果は得られなかった。これまで LARGE 糖鎖治療は細胞レベルあるいは糖鎖残存型のモデルマウスでの研究が主になされてきたが、今回、LARGE 糖鎖治療が効果を発揮するためには、フクチン依存の修飾が必要であることが初めて示され、今後の LARGE 糖鎖治療法の開発に重要な知見をもたらした。

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6件)

- ① Ohtsuka, Y., Kanagawa, M., Yu, C.C., Ito, C., Chiyo, T., Kobayashi, K., Okada, T., Takeda, S., and Toda, T. Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression. *Sci. Rep.* 5, 8316 (2015). doi: 10.1038/srep08316. 査読有
- ② Kanagawa, M., Lu, Z., Ito, C., Matsuda, C., Miyake, K., and Toda, T. Contribution of dysferlin deficiency to skeletal muscle pathology in asymptomatic and severe dystroglycanopathy models: generation of a new model for Fukuyama congenital muscular dystrophy. *PLoS ONE* 9, e106721 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0106721. 査読有
- ③ Saito, F., Kanagawa, M., Ikeda, M., Hagiwara, H., Masaki, T., Ohkuma, H., Katanosaka, Y., Shimizu, T., Sonoo, M., Toda, T., and Matsumura, K. Overexpression of LARGE suppresses muscle regeneration via down-regulation of insulin-like growth factor 1 and aggravates muscular dystrophy in mice. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4543-4558 (2014) 査読有
- ④ Katanosaka, Y., Iwasaki, K., Ujihara, Y., Takatsu, S., Nishitsuji, K., Kanagawa, M.

Sudo, A., Toda, T., Katanosaka, K., Mohri, S., and Naruse, K. TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. *Nat. Commun.* 5, 3932 (2014). doi:10.1038/ncomms4932. 査読有

- ⑤ **Kanagawa, M.**, Yu, C.C., Ito, C., Fukada, S-I., Hozoji-Inada, M., Chiyo, T., Kuga, A., Matsuo, M., Sato, K., Yamaguchi, M., Ito, T., Ohtsuka, Y., Katanosaka, Y., Miyagoe-Suzuki, Y., Naruse, K., Kobayashi, K., Okada, T., Takeda, S., and Toda, T. Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3003-3015 (2013) 査読有
- ⑥ Ogawa, M., Nakamura, N., Nakayama, Y., Kurosaka, A., Manya, H., **Kanagawa, M.**, Endo, T., Furukawa, K., and Okajima, T. GTDC2 modifies O-mannosylated α -dystroglycan in the endoplasmic reticulum to generate N-acetyl-glucosamine epitopes reactive with CTD110.6 antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 88-93 (2013) 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① **Kanagawa, M.**, Yu, C.C., Fukada, S-I., Ohtsuka, Y., Ito, C., Chiyo, T., Okada, T., Takeda, S'I., and Toda, T. "Pathophysiological roles for dystroglycan glycosylation in skeletal muscle and gene therapy challenge using glycosylation-deficient muscular dystrophy models" Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of carbohydrate Research (JSCR) 2014 Joint Annual Meeting, 2014.11.19, Honolulu (USA)
- ② **Kanagawa, M.**, Sudo, A., Ito, C., and Toda, T. "Pathological analysis of central nervous system in fukutin-deficient mouse models for Fukuyama congenital muscular dystrophy" Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of carbohydrate Research (JSCR) 2014 Joint Annual Meeting, 2014.11.16, Honolulu (USA)
- ③ **金川 基**, 戸田 達史「糖鎖異常型筋ジストロフィーの病態と治療」第 87 回日本生化学会大会、2014.10.17、京都国際会館 (京都府)
- ④ **金川 基**, 大塚 喜久、游 智傑、伊藤 千代美、千代 智子、岡田 尚巳、武田 伸一、戸田 達史「糖鎖異常型筋ジストロフィーに対する遺伝子治療」第 33 回日本糖質学会、2014.8.12、名古屋大学 (愛知県)
- ⑤ **Kanagawa, M.**, Yu, C.C., Ito, C., Fukada, S-I., Chiyo, T., Kobayashia, K., Okada, T.,

Takeda, S'I., and Toda, T. "Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression" 13th International Congress on Neuromuscular Diseases, 2014.7.8, Nice (France)

- ⑥ **Kanagawa, M.**, Yu, C.C., Ito, C., Fukada, S-I., Chiyo, T., Kobayashia, K., Okada, T., Takeda, S'I., and Toda, T. "Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression" 6th New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference, 2014.7.1, Chicago (USA)
- ⑦ **Kanagawa, M.** "Pathological roles of abnormal glycosylation of dystroglycan in congenital muscular dystrophy with brain anomaly" International Symposium on Glyco-Neuroscience, 2014.1.11, Awaji (Japan)
- ⑧ **金川 基**, 戸田 達史「ジストログリカンのユニークな翻訳後修飾とその破綻による病態」第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.4、神戸国際会議場 (兵庫県)
- ⑨ **Kanagawa, M.**, Yu, C.C., Ito, C., Fukada, S-I., Chiyo, T., Kobayashia, K., Okada, T., Takeda, S'I., and Toda, T. "Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression" 18th International Congress of the World Muscle Society, 2013.10.2, Asilomar (USA)
- ⑩ **Kanagawa, M.**, Yu, C.C., Ito, C., Fukada, S-I., Chiyo, T., Kobayashia, K., Okada, T., Takeda, S'I., and Toda, T. "Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression" EMBO Workshop - Molecular Mechanisms of muscle growth and wasting in health and disease, 2013.9.19, Ascona (Switzerland)
- ⑪ **金川 基**, 游 智傑、伊藤 千代美、深田 宗一郎、千代 智子、小林 千浩、岡田 尚巳、武田 伸一、戸田 達史「2 種類のフクチン欠損マウスを用いた福山型筋ジストロフィーの病態解析と遺伝子治療」第 86 回日本生化学会大会、2013.9.11、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑫ **金川 基**「糖鎖機能と修飾機序の解明にもとづく筋ジストロフィー病態と治療法に関する研究」第 86 回日本生化学会大会、2013.9.13、パシフィコ横浜 (神奈川県)

- ⑬ **金川 基**「糖鎖機能解析に基づく筋ジストロフィー病態の解明と治療法の開発」第 33 回日本糖質学会年会、2013.8.5、大阪国際交流センター（大阪府）
- ⑭ **金川 基**、戸田 達史「福山型筋ジストロフィーの発症機序と治療戦略」第 33 回日本糖質学会年会、2013.8.5、大阪国際交流センター（大阪府）
- ⑮ **金川 基**、伊藤 千代美、深田 宗一郎、游 智傑、久我 敦、小林 千浩、戸田 達史「ジストログリカンに見出された新規糖鎖修飾体の生理機能と筋ジストロフィー病態への関与」第 85 回日本生化学会大会、2012.12.16、福岡国際会議場（福岡県）
- ⑯ 首藤 篤史、**金川 基**、辻 沙織、伊藤 千代美、戸田 達史「福山型筋ジストロフィーモデルマウスの中樞神経病態の解析」第 85 回日本生化学会大会、2012.12.16、福岡国際会議場（福岡県）
- ⑰ **金川 基**、戸田 達史「糖鎖異常型筋ジストロフィーの発症機序と治療戦略」第 35 回日本分子生物学会年会、2012.12.12、福岡国際会議場（福岡県）
- ⑱ **金川 基**、久我 敦、首藤 篤史、田尻 道子、萬谷 博、吉川 大和、野水 基義、小林 千浩、遠藤 玉夫、和田 芳直、戸田 達史「ジストログリカンに見出された新規糖鎖修飾による機能制御と病態」第 32 回日本糖質学会年会、2012.9.20、鹿児島市民文化ホール（鹿児島県）

〔図書〕（計 1 件）

- ① **Kanagawa, M.**, and Toda, T. Fukutin and Fukutin-Related Protein (FKRP). Springer, Tokyo, *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes 2nd ed* (Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T. eds.) 2014, 1181-1190

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/clgene/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金川 基 (Kanagawa, Motoi)

神戸大学・大学院・医学研究科・講師

研究者番号：00448044

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし