

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670499

研究課題名(和文)筋ジストロフィー原因糖鎖の解析と神経機能障害の治療法開発

研究課題名(英文) Analysis of the causative glycan for muscular dystrophy and exploration of the therapeutic possibility of its neuronal dysfunction

研究代表者

小林 千浩 (Kobayashi, Kazuhiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90324780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィーの原因ともなる ジストログリカン(a-DG)上のO-Man型糖鎖の未知部分の構造決定と生合成過程解明、神経機能障害との関連と治療の可能性の検討を目的とした。未知糖鎖部分は、 a-DG組換え体を大量精製し、質量分析にて構造を一部決定した。いくつかの筋ジストロフィー原因遺伝子の機能を同定し、それらにより合成した糖鎖について質量分析とNMRにて構造を一部決定した。新たなO-Man型糖鎖修飾タンパク質と a-DGのリガンドを検索したが、見出せなかった。モデルマウスの行動解析では、表現型が明確でなかった。モデルマウスのアンチセンス核酸脳内投与治療を検討している。さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to delineate the full O-Man glycan structure of a-dystroglycan (a-DG) whose abnormalities cause muscular dystrophy, to clarify the biosynthesis pathway of the glycan, to understand the pathology of neuronal dysfunction of the disease, and to explore its therapeutic possibility. We determined the unknown glycan structure in part by MS analysis of a large quantity of the purified a-DG recombinant protein. We also identified the functions of some genes that are responsible for muscular dystrophy, and determined the detailed structure of the glycan in part that was synthesized using the gene products by MS and NMR analyses. We could not find a novel protein modified with the O-Man glycan or a novel a-DG ligand. We could not see the phenotype of the model mice by behavioral analysis. We are trying the intracerebral administration of antisense oligonucleotides to the model mice. Further investigations are required.

研究分野：人類遺伝学、ゲノム医科学

キーワード：糖鎖 ジストログリカノパチー 福山型筋ジストロフィー 質量分析 NMR構造解析 糖転移酵素 a-dystroglycan 神経機能障害

1. 研究開始当初の背景

福山型筋ジストロフィー、muscle-eye-brain 病、Walker-Warburg 症候群は、先天性筋ジストロフィー、II 型滑脳症、眼奇形の 3 症状を示す代表的な常染色体劣性神経筋疾患である。患者において、細胞膜と基底膜を繋ぐ -dystroglycan(-DG)の O-マンノース(O-Man)型糖鎖修飾に異常がみられ、 -ジストログリカノパチー(-DGpathy)という新しい疾患概念が確立された。

DG は骨格筋、心筋、脳に多く発現する糖タンパク質で、細胞外サブユニット(-DG)が細胞外成分と、膜貫通サブユニット(-DG)が骨格系タンパク質や細胞内シグナル分子と結合し、細胞膜構造の維持や細胞内シグナルに参与する。細胞外の -DG のリガンドには laminin などの基底膜分子があるが、その結合には -DG 上への O-Man 型の糖鎖修飾が必須である。 -DGpathy 患者の骨格筋では、O-Man 型糖鎖異常により、laminin との結合能が低下し、筋細胞膜が脆弱化、筋細胞が壊死・変性に陥る。脳奇形は、脳表基底膜中の laminin との結合能の低下、それによるグリア境界膜の脆弱化・破綻、神経細胞移動異常(過遊走)に起因すると考えられている。現在までに -DGpathy の原因遺伝子が次々と同定され、さらに機能的に原因遺伝子になりうる候補もいくつか同定されている。

O-Man 型糖鎖は哺乳類では珍しい糖鎖で、 -DG には 4 糖から成る構造が見つかった。しかし、この構造は laminin などとの結合能には必須ではないことがわかり、新たな糖鎖構造解明への競争が激化した。最近までにある程度の糖鎖構造と原因遺伝子の機能が判明してきたが、重要な部分は未知のまま残っている。

-DGpathy は精神遅滞を伴うが、自閉症を合併する患者例も報告されている。また -DG のリガンドであるシナプスの neurexin は自閉症の関連遺伝子である。つまり O-Man 型糖鎖は脳の形態だけでなく、神経機能の発達・獲得にも重要であり、精神遅滞・自閉症などの脳発達障害の発症に関与していると考えられる。脳奇形には胎生期の治療が必要ではあるが、神経機能障害に対しては生後の治療が可能かもしれない。

2. 研究の目的

laminin との結合に重要で疾患の原因となる -DG 上の O-Man 型糖鎖の側鎖には、mannose の 6 位炭素にリン酸基 P を介して未知の構造が結合しており、キシロースとグルクロン酸の 2 糖の繰り返しが続くと考えられている。ここ十年程、世界中で -DG の糖鎖構造決定の研究競争が激しく、いくつも論文が発表されてきたが、疾患には関係のない糖鎖ばかり明らかになるだけで、この重要な側鎖、特にリン酸基直後の構造については、未だに決定されていない。本研究では、この構

造と生合成機構の解明を目的とする。

-DGpathy の多くは脳奇形を合併する。これは、 -DG の O-Man 型糖鎖の異常による脳表基底膜中の laminin との結合能の低下、それによるグリア境界膜の脆弱化・破綻、神経細胞移動異常(過遊走)に起因すると考えられている。しかし、中枢神経系における O-Man 型糖鎖の意義は、殆ど解明されていない。

fukutin 遺伝子は神経細胞に発生段階初期から発現している。また、神経細胞の fukutin 遺伝子を in utero でノックダウンすると(グリア細胞は正常)、神経細胞は脳室周辺に留まるという、疾患病態の過遊走とは異なる現象が報告されている。一方で、発達性読み書き障害の関連遺伝子である KIAA0319 遺伝子のノックダウンは、fukutin と酷似した現象を示し、さらに KIAA0319 には -DG の O-Man 型糖鎖修飾部位と相同性の高いドメインが存在し、高度の O 型糖鎖修飾を受けることが知られている。これらは、グリア細胞における fukutin とグリア境界膜-基底膜の脆弱化との関連、神経細胞における fukutin の未知の機能の存在、新たな O-Man 型糖鎖修飾標的分子の存在と他疾患との関連を示唆し、O-Man 型糖鎖が脳の形態形成の様々な側面で重要であることが考えられる。

また -DGpathy は精神遅滞を伴うが、自閉症を合併する患者例も報告されている。一方で、 -DG のリガンドであるシナプスの neurexin は自閉症の関連遺伝子として知られている。研究代表者らは眼において、新たな -DG リガンドである網膜特異的な pikachurin の欠損により、 -DGpathy の眼症状の一部が説明されることを示しており、これらの事実は、 -DGpathy の高次脳機能障害の発症が、neurexin や未知の脳特異的なリガンドと関わっている可能性を示唆している。つまり O-Man 型糖鎖は脳の形態形成だけでなく、神経細胞機能の発達・獲得にも重要であり、精神遅滞・自閉症などの脳発達障害の発症に関与していると考えられる。

そこで本研究ではさらに、患者変異 fukutin ノックインマウス、中枢神経系特異的 fukutin ノックアウトマウスを用いて、fukutin の中枢神経における機能解析、新たな O-Man 型糖鎖修飾標的タンパク質、新たな -DG のリガンドの同定を行い、O-Man 型糖鎖の脳における意義を明らかにする。同時に、モデルマウスの行動や LTP などを解析することにより、神経機能障害への関連を検討し、研究代表者らが FCMD 骨格筋ですでに成功しているアンチセンス治療法や、AAV ベクターを用いた遺伝子治療法により、その症状の回復を評価する。これにより、 -DGpathy に神経機能障害が存在し、それを回復させるための生後の脳の治療が可能であることが新規に判明すれば、これまで考えられてきた倫理面や技術面で多くの課題が残る胎児治療が不要になるかもしれない。

3. 研究の方法

(1) O-Man 型糖鎖のリン酸基に結合した未知構造の決定

側鎖そのものを大量精製して構造を決定する。

- ・質量分析で検出に成功している目的のピークを大量に分取する。
- ・キシロシダーゼ、グルクロニダーゼで処理し、LARGE による付加糖を消化する。さらにフッ化水素により、リン酸基 P との結合を切断し、目的の未知構造部分を大量に精製する。
- ・NMR を用いて構造を決定する。

(2) 機能未知の -DGpathy 原因遺伝子の機能解析

未知構造合成に関わると考えられる fukutin、FKRP、TMEM5、B3GNT1、ISPD の機能未知の原因遺伝子産物の機能を同定する。これにより、未知構造の生合成過程を解明する。また一方で、転移酵素活性を先に同定できれば、未知構造の推測を行うこともできる。

- ・各遺伝子を動物細胞強制発現系で発現させタンパク質を精製する。
- ・-DG を安定に強発現する細胞株において各遺伝子をゲノムエディティングによりノックアウトし、-DG を精製することにより、各タンパク質の修飾ターゲット基質とする。
- ・いろいろなドナー基質を用いて転移活性を測定する。

(3) 新たな O-Man 型糖鎖修飾標的タンパク質、新たな -DG のリガンドの同定

患者変異 fukutin ノックインマウス、中枢神経特異的 fukutin ノックアウトマウスの脳組織を用いる。同定される新規タンパク質は、神経機能、高次脳機能に関わる可能性がある。

- ・fukutin 欠損により糖鎖変化が生じる糖タンパク質の探索
- ・fukutin 欠損により -DG との結合が変化するタンパク質の探索

(4) モデルマウスを用いた行動や LTP の神経機能解析

すでに作製済みの患者変異 fukutin ノックインマウス、中枢神経特異的 fukutin ノックアウトマウスを用いて、行動や LTP の解析をする。

- ・マウスの学習記憶能力と社会的行動を解析する。
- ・マウス脳の海馬あるいは小脳のスライスを用いて LTP を測定する。

(5) モデルマウスを用いた脳内投与治療の検討

上記(4)で見出された患者変異 fukutin ノックインマウス、中枢神経特異的 fukutin ノックアウトマウスの表現型が、治療により回復するかどうかを検討する。治療分子は、研究代表者らがすでに骨格筋で有効性を報告している、アンチセンス核酸と fukutin 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを用いる。

- ・マウス脳への治療分子の脳室内投与、表現形回復の評価

4. 研究成果

-DGpathy は -DG 上の O-Man 型糖鎖、特にマンノースの 6 位炭素からリン酸基を介して伸びる側鎖の欠如が主要原因であると考えられているが、その構造や生合成機構は未解明である。また、本疾患群の精神遅滞は脳奇形ばかりでなく、神経の機能障害による可能性もある。本研究では、この側鎖の未知部分の構造決定と生合成過程解明、神経機能障害との関連とその治療の可能性について検討してきた。

(1) O-Man 型糖鎖のリン酸基に結合した未知構造の決定

独自に作成していた、十分に糖鎖修飾を受けた -DG を安定に強発現する細胞株を大量に培養し、-DG 組換え体を大量精製した。フッ化水素によりリン酸結合を切断するなどした組換え体と比較しながら、MS 解析、MS/MS 解析などを駆使して構造を調べたところ、キシロースとグルクロン酸のリピートと CoreM3 と呼ばれる O-Man 型糖鎖結合が、六単糖ではない物質で構成されていることがわかった。さらに、必ずしもマンノースに結合したリン酸基につながっているとは限らないことも判明した。

下記(2)に述べる機能の判明した遺伝子産物の精製組換え体を用いて、ラベルされた糖から酵素反応させて糖鎖を大量に合成し、MS 解析および NMR 解析を行うことで、構造と詳細な結合様式を決定した。

(2) 機能未知の -DGpathy 原因遺伝子の機能解析

上記(1)の未知構造の生合成に関わると考えられる fukutin、FKRP、TMEM5、ISPD の機能未知の原因遺伝子産物の機能同定を試みた。

ISPD に関しては、そのアミノ酸配列から機能を推定し、実際に基質と反応させ HPLC で分離、MS 解析を行ったところ、ある種の糖供与体を合成する酵素であることがわかった。患者で見られる遺伝子変異の組換え体を作成してその反応を HPLC で検討したところ、酵素活性が明らかに落ちていることがわかった。

HeLa 細胞から -DG 組換え体を大量精製すると、O-Man 型糖鎖修飾が不十分で途中で合成が止まっている組換え体が混在していることが MS 解析でわかった。そこでその組換え体を糖鎖修飾のされ方によって HPLC で分離し、糖転移酵素反応の標的基質とした。ISPD の酵素反応産物を糖供与体として用いて反応させ、MS 解析をしたところ、CoreM3 に糖を 1 個転移させるのが fukutin で、糖が 1 個付いた状態にさらに同じ糖を 1 個転移させるのが FKRP で、糖が 2 個付いた状態にさらに別の糖を 1 個転移させるのが TMEM5 であることが判明した。

培養細胞株をゲノムエディティングによ

り各種遺伝子のノックアウト細胞を作成し、-DG組換え体を大量精製してMS解析を行った。すると、上記の結果から予想される通りに、その遺伝子が担う糖鎖修飾部位のところで糖鎖合成が止まっていることが判明し、さらに当該遺伝子を導入すると元の完全な糖鎖に戻るということがわかった。

CoreM3 を構成成分である 1 糖あるいは 2 糖にラベルされたものを標的基質とし、ISPD の酵素反応産物を糖供与体として用いて fukutin で反応させたもの、その産物をさらに ISPD の酵素反応産物を糖供与体として用いて FKRP で反応させたもの、その産物をさらに別の糖供与体を用いて TMEM5 で反応させたものを、HPLC で分離したところ、fukutin と FKRP では新たなピークを示し、さらに MS 解析をしたところ、糖が 1 個ずつ付いていることが判明した。よって、fukutin と FKRP は ISPD の酵素反応産物を糖供与体とした糖転移酵素であることが明らかになった。患者で見られる遺伝子変異の組換え体を作成してその反応を HPLC で検討したところ、酵素活性が明らかに落ちていることがわかった。一方、TMEM5 では糖転移反応が見られず、正確な機能が明らかにはならなかった。基質特異性の問題であると推定される。

(3) 新たな O-Man 型糖鎖修飾標的タンパク質、新たな -DG のリガンドの同定

中枢神経特異的 fukutin ノックアウトマウスおよび正常コントロールマウスの脳組織より抽出した全タンパク質、および膜タンパク質を用いて電気泳動し、差のあるバンドの有無を検索したが、目的のタンパク質を見出すことができなかった。糖鎖と結合するレクチンを利用して、ノックアウトマウスと正常で結合が変化するタンパク質を検索する準備を進めている。また、遺伝子編集した fukutin 欠損細胞より抽出した膜タンパク質を用い、-DG との結合が変化するタンパク質を検索したが、正常と差のあるものを見出すことができなかった。

(4) モデルマウスを用いた行動や LTP の神経機能解析

患者変異 fukutin ノックインマウスを交配増殖させ、ノックインマウスの雄を 20 匹、正常コントロールマウスの雄を 20 匹準備した。包括型脳科学研究推進支援ネットワークの支援を受け、行動テストバッテリーを用いて行動解析を行った。特に明らかになった表現型は現在のところ確認できていないが、さらなる解析が必要であると考えられた。また、中枢神経特異的 fukutin ノックアウトマウスを用いて行動解析を行うことについて検討しているところである。LTP に関しては、本研究の行動解析で表現型が確認できなかったこともあり、再検討中である。

(5) モデルマウスを用いた脳内投与治療

の検討

アンチセンス核酸を用いた患者変異 fukutin ノックインマウスへの脳内投与治療を検討している。患者変異 fukutin ノックインマウスの行動解析で表現型が明確でなかったため行動による治療効果の評価はできておらず、神経機能障害への効果の検討は現在のところ出来ていないが、-DG の糖鎖に対する抗体を用いた生化学的な治療効果の検討を行っている。

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 4 件)

Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Many H, Kuga A, Yamaguchi Y, Akasaka-Manyu 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 14: 2209-2223, 2016, 査読有, doi:10.1016/j.celrep.2016.02.017

Oda T, Xiong H, Kobayashi K, Wang S, Satake W, Jiao H, Yang Y, Cha PC, Hayashi YK, Nishino I, Suzuki Y, Sugano S, Wu X, Toda T. A *de novo* mutation of the *MYH7* gene in a large Chinese family with autosomal dominant myopathy. Hum Genome Var, 2: 15022, 2015, 査読有, doi:10.1038/hgv.2015.22

Yang H, Kobayashi K, Wang S, Jiao H, Xiao J, Toda T, Wu X, Xiong H. Founder mutation causes classical Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) in Chinese patients. Brain Dev 37: 880-886, 2015, 査読有, doi:10.1016/j.braindev.2015.02.010

Ohtsuka Y, Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Chiyo T, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, Toda T. Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression. Sci Rep 5: 8316, 2015, 査読有, doi:10.1038/srep08316

[学会発表](計 2 件)

大塚 喜久、金川 基、千代 智子、小林 千浩、岡田 尚巳、武田 伸一、戸田 達史、糖転移酵素 LARGE 活性を応用したジストログリカノパチー治療の検討、第 34 回日本糖質学会年会、2015 年 7 月 31 日~8 月 1 日、東京大学(東京都)

大塚 喜久、金川 基、游 智傑、伊藤 千

代美、千代 智子、小林 千浩、岡田 尚
巳、 武田 伸一、戸田 達史、Fukutin
is prerequisite to ameliorate muscular
dystrophy by LARGE expression、第56
回日本神経学会学術大会、2015年5月20
日~23日、朱鷺メッセ(新潟県)

〔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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 千浩 (KOBAYASHI, Kazuhiro)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90324780

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：