



## LARGE によるジストログリカンの翻訳後修飾と先天性筋ジストロフィー

金川 基, Kevin P. Campbell

ジストログリカンがラミニン受容体として機能的に発現するためには、ムチン様領域に生ずる糖鎖修飾に加え、N末端領域が必須であることが明らかになった。さらにLARGEによるジストログリカンの糖鎖修飾が、先天性筋ジストロフィーにみられるジストログリカンの機能不全を回復できることが示された。

$\alpha$ -ジストログリカン (dystroglycan : DG) は、細胞外マトリックスの主要な成分であるラミニンの細胞表面受容体である。膜貫通型の $\beta$ -DGは、細胞外で $\alpha$ -DGと、細胞内でジストロフィンを経介してアクチンと結合する。このDGを中心軸とした細胞外マトリックス-細胞骨格間の連携が、筋肉の収縮運動に耐えうる筋細胞膜の強度の維持に重要な役割を果たしている。近年、糖転移酵素の変異が、いくつかの先天性筋ジストロフィーと関連していることが明らかになった(図1)。これらの疾患において、変異が生じた糖転移酵素の種にかかわらず、 $\alpha$ -DGの糖鎖異常と、それに伴うラミニン結合能の低下が共通して観察される。これらの知見より、DGの糖鎖修飾経路の異常に起因する細胞外マトリックス-細胞骨格の連携の破綻が、ジストログリカンパチーと総称される先天性筋ジストロフィーの発症メカニズムとして提唱されている<sup>1)</sup>。

マウスにおいて、糖転移酵素と推定されるLARGEに変異が生じている。いずれの場合も、 $\alpha$ -DGの糖鎖異常が観察されることから、LARGEは $\alpha$ -DGの翻訳後修飾に関与すると考えられている<sup>2) 3)</sup>。われわれは、 $\alpha$ -DGの糖鎖修飾に及ぼすLARGEの影響を検討するために、アデノウイルスベクターを用いて、Large<sup>myd</sup>あるいは野生型マウスの筋肉にLARGE遺伝子を導入した<sup>4)</sup>。その結果、いずれのマウスにおいても、遺伝子導入を行わなかった野生型コントロールと比べて、より多量の糖鎖を付加した $\alpha$ -DGが検出された。この高度に糖鎖修飾された $\alpha$ -DGは、ラミニンと高親和的に結合する。さらに、LARGEを発現したLarge<sup>myd</sup>マウスの筋繊維では、筋ジストロフィー症状の抑制が観察された。以上より、LARGE依存的な $\alpha$ -DGの糖鎖修飾は筋細胞の機能維持に重要であることが明らかになった。

### LARGEの過剰発現は高度に糖鎖修飾された $\alpha$ -ジストログリカンの合成を引き起こす

先天性筋ジストロフィー1D (congenital muscular dystrophy 1D : MDC1D) とそのモデルのLarge<sup>myd</sup>

### ジストログリカンのN末端領域は、ムチン様領域に生ずる機能的な糖鎖修飾に必須である

われわれは、DGの糖鎖修飾領域を明らかにする目的で、 $\alpha$ -DGの部位欠損変異体を作製し、そのラミニ

#### Dystroglycan posttranslational modification by LARGE and congenital muscular dystrophy

Motoi Kanagawa/Kevin P. Campbell : Howard Hughes Medical Institute, Department of Physiology and Biophysics and Department of Neurology, The University of Iowa Roy J. and Lucille A. Carver College of Medicine [ハワードヒューズ医学研究所, アイオワ大学 (医学部生理学生物物理学部門・神経学部門)]

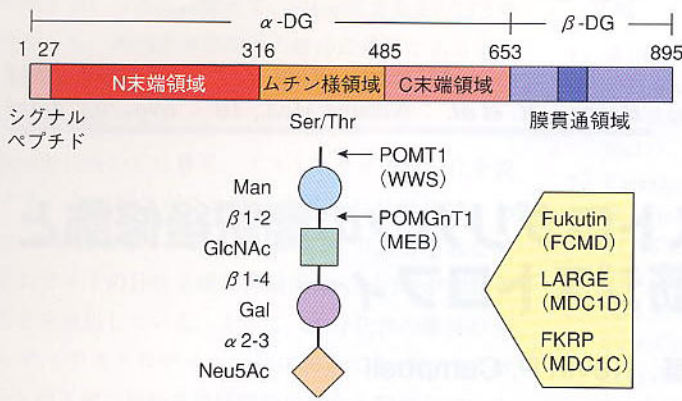


図1 ジストログリカンの構造と、糖鎖異常を伴う先天性筋ジストロフィー

DG前駆体は、翻訳後修飾過程で $\alpha$ -DGと $\beta$ -DGに切断される。 $\alpha$ -DGは、N末端とC末端の球状領域と、それらに挟まれた、セリン、スレオニン残基に富むムチン様領域からなる。 $\alpha$ -DGのO-マンノース型糖鎖はラミニンとの結合に重要で、その合成にかかわるPOMT1とPOMGnTは、それぞれWWSとMEBの原因となる糖転移酵素である<sup>6) 7)</sup>。活性は同定されていないが、糖転移酵素と推定されるfukutin, fukutin-related protein (FKRP), LARGEの変異も、それぞれFCMD, 先天性筋ジストロフィーIC (congenital muscular dystrophy IC: MDC1C), MDC1Dの原因となることから、これらもDGの機能的な糖鎖修飾に関与すると考えられている

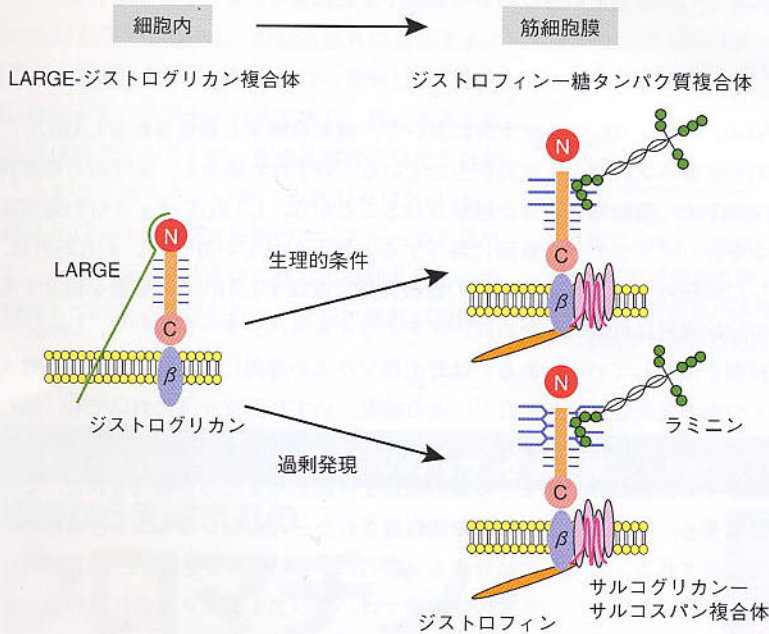


図2 ジストログリカンの成熟過程における機能領域

DGのN末端領域は細胞内でLARGEと複合体を形成する。ラミニンとの結合に必要な糖鎖修飾はムチン様領域の前半部に生ずる。DGのC末端領域と $\beta$ -DGは、ジストロフィン-糖タンパク質複合体の細胞膜上でのアッセムリーに関与する<sup>5)</sup>。LARGEを過剰発現することで生ずる高度に糖鎖修飾された $\alpha$ -DGは、O-マンノース型糖鎖修飾経路の異常に起因する $\alpha$ -DGのラミニン結合能の低下を、代替的に回復することができる

ン結合能を解析した<sup>5)</sup>。ラミニンとの結合に必要な糖鎖修飾は、ムチン様領域前半部に生じた一方、その機能的な修飾のためには、N末端領域が必要であった。しかしながら、N末端領域は翻訳後修飾の過程でプロテアーゼにより切断され、成熟した $\alpha$ -DGから検出されなかった。よって、N末端領域はラミニンとの結合に、直接は関与しないことが示唆された。一方で、細胞内に存在する糖鎖修飾が未成熟なDGからは、N末

端領域が検出された。そこでわれわれは、N末端領域は、糖転移酵素がDGを基質として認識するために存在すると考え、DGの部位欠損変異体とLARGEの分子相互作用を検討した。その結果、DGのN末端領域とLARGEの結合が検出され、N末端領域を介したDG-LARGE複合体形成が、DGの成熟過程に必須であることが示唆された(図2)。

## LARGE は筋ジストロフィーの糖鎖治療に有効か？

$\alpha$ -DG の O-マンノース型糖鎖はラミニンとの結合に重要であり、この糖鎖の生成にかかわる糖転移酵素 POMT1 と POMGnT の変異は、それぞれ Walker-Warburg syndrome (WWS) と muscle-eye-brain disease (MEB) の原因となる (図 1)。また、糖転移酵素と推定される fukutin の変異は、 $\alpha$ -DG の糖鎖異常を伴う福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama congenital muscular dystrophy: FCMD) の原因となる。われわれは、 $\alpha$ -DG の LARGE 依存的な糖鎖修飾が、O-マンノース型糖鎖修飾に異常がある細胞においても生ずるか検討した<sup>4)</sup>。興味深いことに、FCMD, MEB, WWS 由来の細胞に LARGE を過剰発現させると、欠損している糖転移酵素の種にかかわらず、いずれの細胞においても高度に糖鎖修飾されたラミニン結合性の DG が生成した。したがって、過剰に発現した LARGE は既知の O-マンノース型糖鎖と異なるラミニン高親和性糖鎖の合成に関与する可能性が考えられる。一方で、通常の発現レベルでは、LARGE は O-マンノース型の糖鎖修飾経路を調節している可能性も考えられる (図 2)。いずれにせよ、これらの結果は、内因性タンパク質である LARGE が、ジストログリカノパチー発症の遺伝的背景にかかわらず、機能的な DG の生成経路を調節できることを示唆している。LARGE の活性や発現を調節することが、糖転移酵素の変異によって生ずる一連の筋ジストロフィーの有効な治療手段になることを期待したい。しかしながら、LARGE の酵素活性ははまだ明らかにされてはおらず、LARGE 依存的な DG の翻訳後修飾機構とラミニン結合型糖鎖の解析が今後の重要な課題であろう。

## 文献

- 1) Muntoni, F. et al.: Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr. Opin. Neurol.*, 17: 205-209, 2004
- 2) Michele, D. E. et al.: Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*, 418: 417-422, 2002
- 3) Longman, C. et al.: Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 2853-2861, 2003
- 4) Barresi, R. et al.: LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nature Med.*, 10: 696-703, 2004
- 5) Kanagawa, M. et al.: Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell*, 117: 953-964, 2004
- 6) Yoshida, A. et al.: Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell*, 1: 717-724, 2001
- 7) Many, H. et al.: Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 500-505, 2004

## ● 筆頭著者プロフィール ●

金川 基: 2001年北海道大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了。大学院時代は、谷口和弥教授の指導の下、胃プロトンポンプの調節に関する研究を行った。'01年4月より、ハワードヒューズ医学研究所の博士研究員として、アイオワ大学にて、細胞外マトリックス受容体の機能解析と筋ジストロフィーの発症機構に関する研究を行っている。

# バイオ試薬調製 ポケットマニュアル

■B6変型判 ■2色刷り ■286頁 ■ISBN4-89706-875-4

田村隆明(千葉大学大学院自然科学研究科) / 著  
■定価 3,045円(本体2,900円+税5%)

欲しい溶液・試薬が  
すぐつくれるデータと  
基本操作

たちまち  
増刷!



発行 羊土社 溶液・試薬データ編と基本操作編の2部構成!