

# α-ジストログリカノパチー とLARGE

α-Dystroglycanopathy and LARGE

金川 基・Kevin P. Campbell

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



金川 基 (かながわ もとひ) 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(谷口和弥研究室)。2001年4月より、アイオワ大学にて、ハワードヒューズ医学研究所博士研究員(Kevin Campbell研究室)。研究テーマは細胞外マトリックス受容体の機能、および膜タンパク質の発現機構と筋ジストロフィー発症機序の解析。

→Key Words:  
Dystroglycan, LARGE,  
congenital muscular dystrophy,  
O-glycosylation

## Abstract

骨格筋細胞では、ラミニン受容体であるジストログリカン(DG)によって細胞外マトリックスと細胞骨格が結びつけられており、この分子連携が収縮運動によるダメージから筋細胞を保護している。α-DGの糖鎖修飾異常に起因するラミニン結合能の低下が、α-ジストログリカノパチーと総称される先天性筋ジストロフィーの発症と関連していることが明らかになってきた。Large<sup>md</sup>マウスはα-ジストログリカノパチーのモデルであり、糖転移酵素と推定されるLARGEに変異が生じている。最近、LARGEとの相互作用がDGの成熟過程において重要なステップであることが示された。更に、LARGEを過剰発現させることでα-DGの糖鎖修飾とラミニン結合能の増加が観察されたことから、α-ジストログリカノパチーの治療にむけて、LARGEをターゲットとする新たな可能性が提起された。

### ■1. ジストログリカンと先天性筋ジストロフィー

ジストロフィン-糖タンパク質複合体(dystrophin-glycoprotein complex: DGC)は、骨格筋で固定された膜結合性タンパク質の集合体で、その構成分子の変異は様々な型の筋ジストロフィーの原因となることから、収縮運動によるダメージから筋細胞を保護する役割を果たしていると考えられている。ジストログリカン(dystroglycan: DG)は、DGCにおいて中心的な役割を担う糖タンパク質で、細胞外に存在するαサブユニット(α-DG)と膜貫通型のβサブユニット(β-

DG)からなる。α-DGは、細胞外マトリックスの成分であるラミニンと結合し、β-DGは、細胞外でα-DGと、細胞内でジストロフィンを介してアクチンと結合する。このようなDGを中心とした細胞外マトリックス-筋細胞骨格間の連携が、筋細胞膜の強度の維持に重要と考えられている(図1A)。実際、DGのキメラマウスや骨格筋特異的ノックアウトマウスは筋細胞壊死を呈することからも、筋細胞機能におけるDGの重要性が示されている。

α-DGは、N末端とC末端に存在する球状領域と、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成る(図1B)。α-DGの糖鎖修飾の程度は組織によって異なるものの、成体の骨格筋型では分子量の半分以上が糖鎖によるもので、ムチン様領域に多量のO型糖鎖が付加されていると考えられる。α-DGのO型糖鎖を化学的に脱糖鎖処理するとラミニン結合能が消失すること、また、α-DGの糖鎖を認識する抗体がラミニンとの結合を阻害することから、α-DGの糖鎖はラミニン結合能に必須であることが知られている。

α-DGには哺乳類では珍しいO-マンノース型糖鎖が存在するが、この糖鎖の合成に関わる糖転移酵

■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

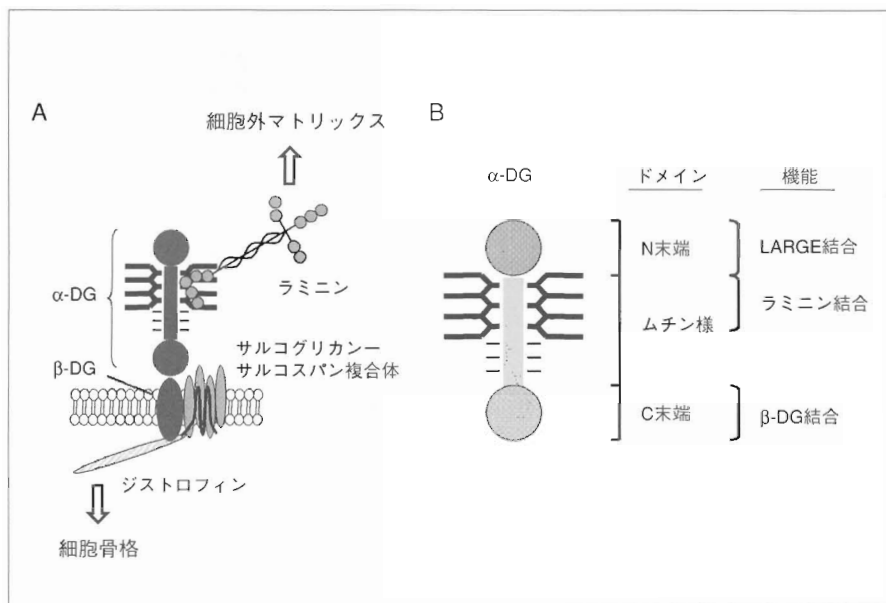


図1 ジストロフィン-糖タンパク質複合体とα-ジストログリカンの構造  
A) DGによって結ばれる細胞外マトリックスと細胞骨格の連携を模式的に示した。サルコグリカン-サルコスパン複合体は、DGの細胞膜上での安定性に関与すると考えられている。  
B) DGの機能領域。DG前駆体は、翻訳後修飾過程でα-DGとβ-DGに切断される。α-DGのN末端領域はLARGEによる認識部位で、α-DGのムチン様領域に生じる機能的な糖鎖修飾に重要である。α-DGのC末端領域とβ-DGが相互作用することで、α-DGは細胞膜上に保持される。

素protein O-mannosyltransferase 1 (POMT1)とprotein O-mannose β-1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1)の変異は、それぞれ先天性筋ジストロフィーであるWalker-Warburg syndrome (WWS)とmuscle-eye-brain disease (MEB)の原因となる<sup>1,2)</sup>。福山型先天性筋ジストロフィー(Fukuyama congenital muscular dystrophy: FCMD)では、糖転移酵素をコードしていると推定される*tukutin*に変異が生じている<sup>3)</sup>。これらの疾患の骨格筋では、変異が生じている糖転移酵素の種にかかわらず、α-DGの糖鎖修飾異常とラミニン結合能の著しい低下が観察される。このようなα-DGの翻訳後修飾経路に異常が見られる先天性筋ジストロフィーは、最近になってα-ジストログリカノパチーと総称されるようになり、α-DGの機能不全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共通した発症メカニズムと考えられている(図2)<sup>1)</sup>。

## ■ 2. LARGEによるα-ジストログリカンの糖鎖修飾

Large<sup>md</sup>マウスは脳の異常を伴う先天性筋ジストロフィーのモデルマウスであり、その病理学的特徴はFCMDやMEBの病理所見と類似している。Grewalらは、Large<sup>md</sup>マウスでは、LARGE (like-acetylglucosaminyltransferase)遺伝子のエキソン5-7が

欠損しており、フレームシフトによる終止シグナルが生じていることを明らかにした<sup>4)</sup>。LARGEは膜貫通領域、coiled-coil領域、DXDモチーフをもつ独立した二つの領域から成る糖転移酵素と推定されており(図3A)<sup>6)</sup>、Large<sup>md</sup>マウスでは、変異によってこれらの推定触媒領域が欠損しているため、LARGEの糖転移酵素活性が失われていると考えられる。Large<sup>md</sup>マウスの脳と骨格筋では、MEBやFCMDと同様に、α-DGの糖鎖異常とラミニン結合能の低下が観察されることから(図3B)、LARGEはα-DGの糖鎖修飾経路に関与すると考えられる<sup>7)</sup>。興味深いことに、LARGEは、骨格筋、心臓、脳で特に強く発現しており、これらはLarge<sup>md</sup>マウスで顕著な病変を示す組織と一致している。Longmanらはα-DGの糖鎖異常を伴った先天性筋ジストロフィー患者のLARGE遺伝子を解析した結果、複合ヘテロ変異が見られた患者一例を報告し、LARGEの変異によって生ずるα-ジストログリカノパチーを先天性筋ジストロフィーID (congenital muscular dystrophy ID: MDC1D)と分類した<sup>8)</sup>。

我々は、α-DGの糖鎖修飾に及ぼすLARGEの影響を検討するため、アデノウイルスベクターを用いて、Large<sup>md</sup>あるいは野生型マウスの筋肉にLARGE遺伝子を導入した。その結果、いずれのマウスにおいて

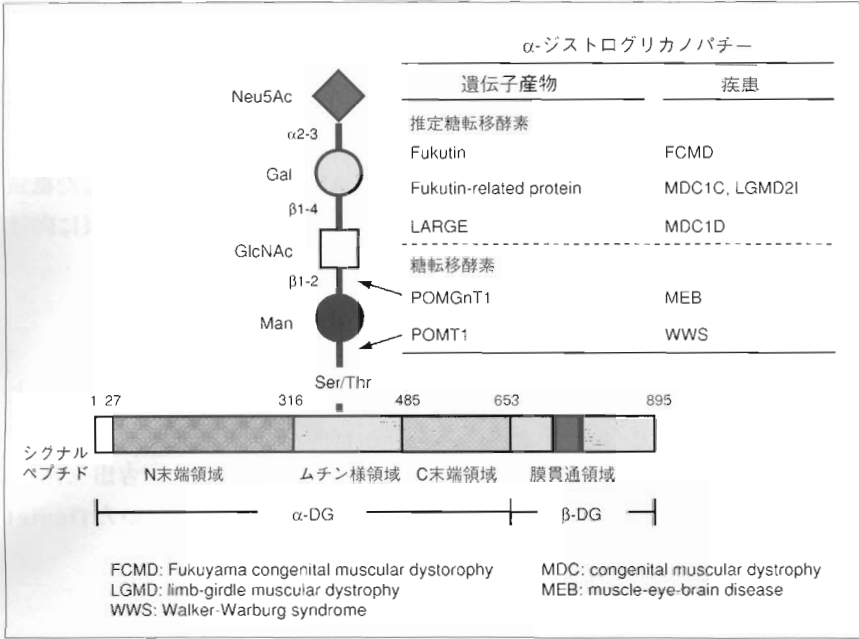


図2 糖転移酵素とα-ジストログリカノパチー  
 現在までに報告されているα-ジストログリカノパチーと、その原因となる糖転移酵素を示した。

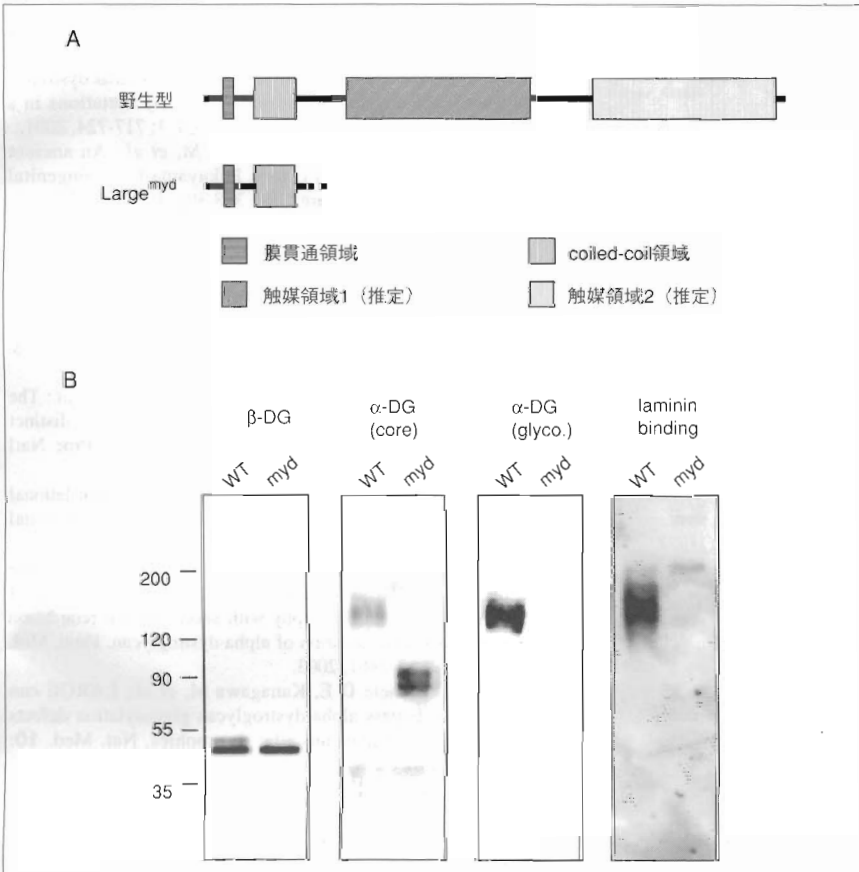


図3 LARGEの変異によるα-ジストログリカンの糖鎖異常  
 A) LARGEのドメイン構造を模式的に示した。破線は変異したリーディングフレーム。  
 B) 野生型(WT),あるいはLarge<sup>myd</sup> (myd)マウスの骨格筋より調整したDG標品のウエスタンブロットとラミニンオーバーレイ解析。Large<sup>myd</sup>マウスの骨格筋では、野生型と同程度のDGの発現量が検出されるものの(β-DG), α-DGの分子量は著者に低下している(α-DG core)。更に、糖鎖修飾型α-DGを認識する抗体との反応性(α-DG glyco.)やラミニン結合能(laminin binding)は著しく減少している。

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。更に、遺伝子導入によりLARGEを発現したLarge<sup>myo</sup>マウスの筋繊維では、 $\alpha$ -DGのラミニン結合能の回復と筋ジストロフィー症状の抑制が観察された<sup>9)</sup>。これらよりLARGEが $\alpha$ -DGの機能的な糖鎖修飾に関与することが改めて確認された。次いで我々は、LARGE依存的なDGの糖鎖修飾領域を明らかにする目的で、DGの部位欠損変異体を作成した。変異体とLARGEの共発現実験から、LARGE依存的に合成されるラミニン結合性糖鎖は $\alpha$ -DGのムチン様領域前半部に付加されることが示された。更に、 $\alpha$ -DGのN末端領域とLARGEの分子結合が検出されたことから、 $\alpha$ -DGのN末端領域はDGの糖鎖修飾に関与する糖転移酵素によって認識されるモチーフとして機能していることが示唆される。実際、N末端領域を欠損させたDG変異体は、ムチン様領域が存在するにもかかわらず、*in vitro*, *in vivo*いずれの場合もラミニン受容体として機能的に発現しないことから、N末端領域を介したDG-LARGE複合体形成がDGの成熟過程において重要なステップであることが示された<sup>10)</sup>。

### ■ 3. $\alpha$ -ジストログリカノパチーの糖鎖治療の可能性

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関わらず、いずれの細胞においてもDGのラミニン結合能の回復がみられることから、過剰発現した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<sup>9)</sup>。この結果は、 $\alpha$ -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、LARGEの発現や活性を増加させることで、機能的なDGの合成が促進されうること示唆している。これに基づき、 $\alpha$ -ジストログリカノパチーの糖鎖治療へのアプローチ法として、DGの糖鎖修飾経路に関与する内因性タンパク質であるLARGEをターゲットとする新たな可能性が提起された。今後、モデルマウスを用いたLARGE過剰発現の長期的な効果、および他

の糖タンパク質活性に及ぼす影響の検討が急がれる。また、LARGEの酵素活性は未だ明かにされず、LARGE依存的なDGの翻訳後修飾機序とラミニン結合型糖鎖の解析など明らかにすべき課題は多いものの、LARGEをターゲットとした糖鎖治療が、 $\alpha$ -ジストログリカノパチーの克服に向けて有効な手段となることを期待したい。

### ■ 謝 辞

本稿執筆の機会を与えてくださいました大阪大学 谷口直之教授に深謝致します。執筆にあたり適切な助言をいただいた斉藤史明博士、吉田（森口）貴子博士、図の作成に協力いただいたDaniel Michele博士に感謝します。

### 文 献

- 1) Many H, Chiba A, Yoshida A, *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.
- 2) Yoshida A, Kobayashi K, Many H, *et al.*: Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell.* 1: 717-724, 2001.
- 3) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, *et al.*: An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature.* 394: 388-392, 1998.
- 4) Muntoni F, Brockington M, Torelli S, *et al.*: Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr. Opin. Neurol.* 17: 205-209, 2004.
- 5) Grewal P K, Holzfeind P J, Bittner R E, *et al.*: Mutant glycosyltransferase and altered glycosylation of alpha-dystroglycan in the myodystrophy mouse. *Nat. Genet.* 28: 151-154, 2001.
- 6) Peyrard M, Seroussi E, Sandberg-Nordqvist A C, *et al.*: The human LARGE gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 598-603, 1999.
- 7) Michele D E, Barresi R, Kanagawa M, *et al.*: Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature.* 418: 417-422, 2002.
- 8) Longman C, Brockington M, Torelli S, *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.
- 9) Barresi R, Michele D E, Kanagawa M, *et al.*: LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat. Med.* 10: 696-703, 2004.
- 10) Kanagawa M, Saito F, Kunz S, *et al.*: Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell.* 117: 953-964, 2004.