

神経系におけるジストログリカンの機能 コンディショナルノックアウトマウスの解析から何がわかったか

斉藤史明・松村喜一郎・Kevin P. Campbell

ジストログリカンは、これまで筋ジストロフィーの発症に重要な役割を果たすと考えられてきた。一方、ジストログリカンは神経系にも発現しているが、同部位における機能は不明であった。筆者らは、神経系においてジストログリカンを欠損したマウスを作製、解析した。同マウスの脳では大脳皮質層構造の乱れと、脳表のグリア境界膜の破綻を、末梢神経では髄鞘の形成不全とNaチャンネルのランビエ絞輪へのクラスタリングの異常を認めた。このようにジストログリカンは神経系において多彩な機能を担っていることが明らかとなった。



ジストログリカン 神経細胞遊走 グリア境界膜 髄鞘形成 Naチャンネル

●はじめに

ジストログリカンは、Duchenne型筋ジストロフィーの原因蛋白質であるジストロフィンと結合する蛋白質として1992年にクローニングされた¹⁾。ジストログリカンは第3染色体長腕上に存在する遺伝子(DAG1)にコードされ²⁾、翻訳後修飾の結果 α -ジストログリカンと β -ジストログリカンに切断される³⁾。細胞外蛋白質である α -ジストログリカンは、細胞外マトリックスの蛋白質であるラミニン、パーレカン、アグリンなどと結合すると同時に^{4,5)}、そのC末端側にて膜貫通型の蛋白質である β -ジストログリカンと結合することで細胞表面につき留められている⁶⁾。 α -ジストログリカンのムチンドメインには多量のO結合型糖鎖が付着し、その特異的な糖鎖構造がラミニンをはじめとするリガンドとの結合に重要であることがわかっている⁵⁾。一方、 β -ジストログリカンは細胞内においてジストロフィンと結合し、さらにジストロフィンはアクチンを介して細胞骨格系と結合する⁶⁾。このようにジストログリカンは細胞外マトリックスと細胞骨格とを連携している蛋白質であり、絶えず収縮、弛緩という物理的なストレスにさらされている骨格筋の細胞膜を保護する役割を担っている蛋

白質と考えられるようになったのである。ジストログリカンやジストロフィンほさらにサルコグリカン、サルコspan、シントロフィン、ジストロブレビンなどと結合し、ジストロフィン-糖蛋白質複合体(dystrophin-glycoprotein complex; DGC)を形成している⁷⁾。

DGCの構成蛋白質の遺伝子変異により、各種の筋ジストロフィーが発症することが知られている。すなわちジストロフィン、サルコグリカン、ラミニン2の変異によりDuchenne型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィーがそれぞれ発症する^{8,9)}。これまでにジストログリカン遺伝子の変異により発症する疾患は知られていないが、近年、脳奇形や眼球異常を伴う一群の先天性筋ジストロフィーにおいて α -ジストログリカンの糖鎖異常が注目されている。福山型先天性筋ジストロフィー(Fukuyama type congenital muscular dystrophy; FCMD)や筋-眼-脳病(muscle-eye-brain disease; MEB)、Walker-Warburg症候群(Walker-Warburg syndrome; WWS)では*fukutin*、*POMGnT1*、*POMT1*の遺伝子異常がそれぞれ知られており^{10~12)}、同じく先天性筋ジストロフィーの一型であるMDC1CとMDC1Dでは*fukutin related protein*および*Large*の変異

Fumiaki Saito¹, Kiichiro Matsumura¹, Kevin P. Campbell², ¹帝京大学神経内科, ²Howard Hughes Medical Institute, Department of Physiology and Biophysics, University of Iowa, College of Medicine E-mail: f-saito@med.teikyo-u.ac.jp
Function of dystroglycan in the nervous system

が報告されている^{13,14}。これら一連の遺伝子産物は糖転移酵素であると考えられている^{11,15}。 α -ジストログリカンとラミニンとの結合には α -ジストログリカン上に存在する特殊なO-マンノシルグリカンであるSia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man-Ser/Thrが重要な役割を果たしていることから¹⁶、これら糖転移酵素の異常の結果 α -ジストログリカンの糖鎖構造に変化が生じ、この結合が破綻することが、これらの疾患の原因であると考えられるようになってきているのである¹⁷。

このような歴史的背景もあり、ジストログリカンの研究はこれまで主として筋ジストロフィーとの関連において進められてきたわけであるが、ジストログリカンは骨格筋、心筋以外に脳、末梢神経、肺、腎臓、血管内皮をはじめとする臓器において広範に発現している^{1,18~21}。なかでも脳におけるジストログリカンの機能を明らかにすることはFCMDなどにおける脳奇形の発症機序を探るうえで重要な課題である。また、ジストログリカンの末梢神経における局在から、筆者らは以前よりジストログリカンは髄鞘形成に重大な影響を及ぼすとの仮説を立てていたが²²、近年ジストログリカンと細胞内でDRP2を介して結合するL-ペリアキシンの変異がCharcot-Marie-Tooth病タイプ4Fで明らかにされた^{23,24}。これらのことから末梢神経におけるジストログリカンの機能が広く注目されるに至っている。本稿では筆者らが作製した中枢神経および末梢神経においてジストログリカンを特異的に欠損したマウスの解析を通して得られた知見を中心に、神経系におけるジストログリカンの役割について解説する。

I. ジストログリカンコンディショナルノックアウトマウスの作製

1997年、通常のconstitutiveな相同的組換えを利用したジストログリカンノックアウトマウスの作製が試みられたが、同マウスは胎生致死であることが明らかとなった²⁵。このマウスでは、胎生期に母体と胎児とを隔ているReichert膜とよばれる基底膜が破綻しており、同部位へのラミニンの取込みが減少していることが観察された。さらに、ジストログリカンを欠損したES細胞を用いた実験から、ジストログリカンは細胞外基底膜の形成という発生、分化の根本にかかわる重要な機能を有していることが明らかにされた²⁶。これらのことから、

ジストログリカンの各種臓器における機能を生きたマウスを用いて*in vivo*で明らかにするためには、それぞれの臓器においてのみ特異的にジストログリカンを欠損したコンディショナルノックアウトマウスを作製することが不可欠となったのである。

従来のノックアウトマウスでは、その蛋白質の生命現象への関与が大きいほど胎生致死となる可能性が高く、この欠点を克服するために開発された技術がコンディショナルノックアウトマウスである^{27~29}。コンディショナルノックアウトマウスの作製にはCre-loxPシステムが用いられることが多い。このシステムを用いたノックアウトマウスの作製には2系統のマウスが必要となるが、一つは相同的組換えにより目的遺伝子(あるいはその一部)の両端にloxP配列を導入したマウス(floxedマウス)、もう一つはCre遺伝子を導入したトランスジェニックマウスで、上流に特定の組織で発現するプロモーターをもつものである(Creトランスジェニックマウス)。これら2系統のマウスを掛け合わせることにより、ある特定の組織でのみCreが発現し、その結果、その組織でのみ目的遺伝子が切り出され、組織特異的なノックアウトマウスが誕生する。さて、筆者らはジストログリカンコンディショナルノックアウトマウスの第1段としてジストログリカンのfloxedマウスをMCKをプロモーターとしてもつCreトランスジェニックマウスと交配し、横紋筋特異的にジストログリカンを欠損したマウスを作製することを試みた。そしてこのマウスは成育可能であり、予想どおり筋ジストロフィーを発症したのである³⁰。

II. 脳特異的ジストログリカンノックアウトマウス

ジストログリカンは脳において、血管周囲におけるアストロサイトの足突起および、脳表面の基底膜と接してその内側に存在するグリア境界膜で強い発現がみられ、両者ともアストロサイトにより産生されていると考えられている^{31,32}。さらにジストログリカンはニューロンにおいても産生されることが明らかとなり、大脳皮質、海馬、嗅球、基底核、視床、視床下核や小脳のプルキンエ細胞に局在することが示された^{31,32}。またジストログリカンは、海馬の培養神経細胞を用いた実験からGABAの抑制系ニューロンのシナプスに、さらに免疫電子顕微鏡を用いた観察からシナプス後膜に存在することが示唆された^{32,33}。さらに、シナプスにおいてジストログリカ

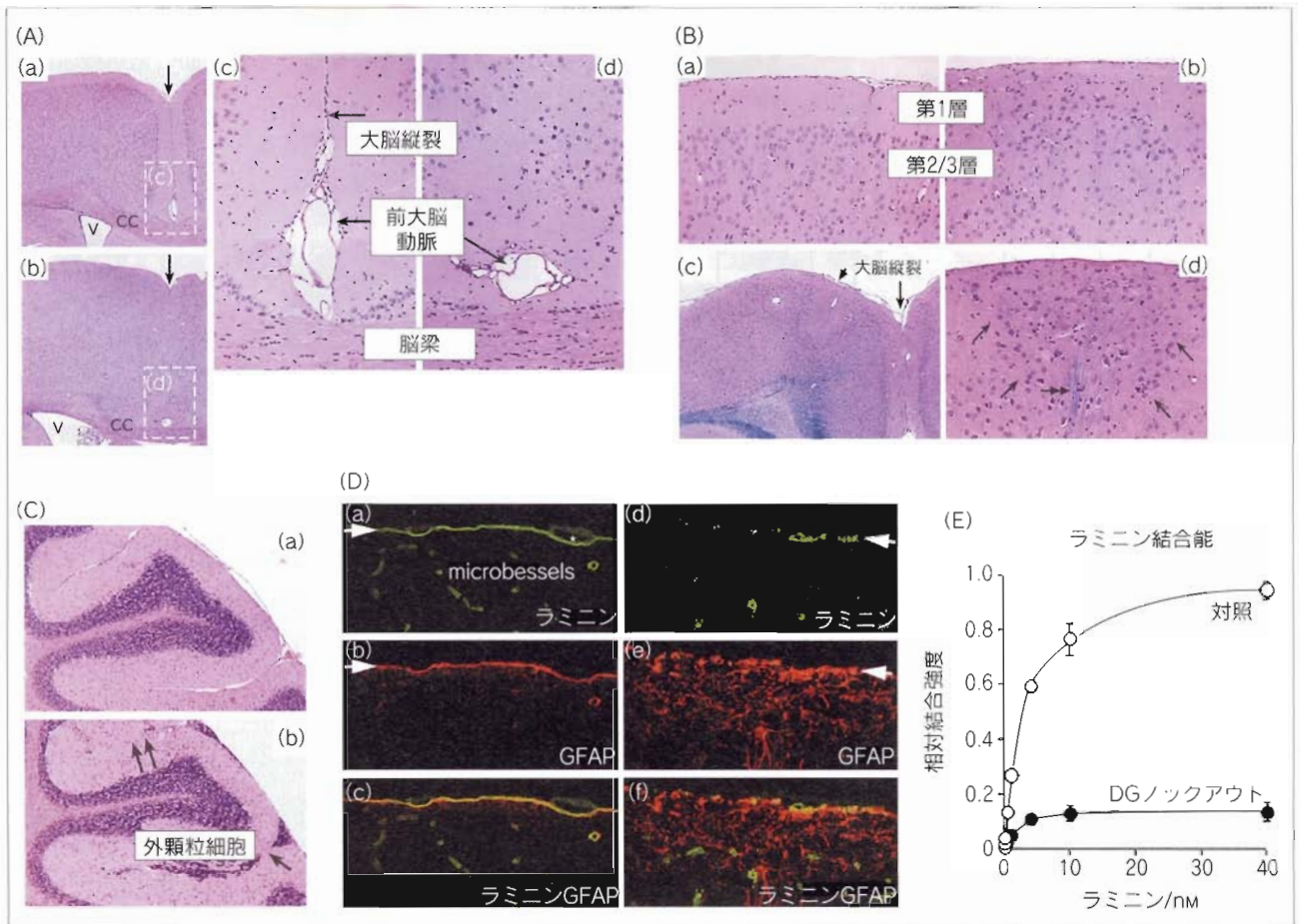


図1 脳特異的ジストログリカンノックアウトマウスにおける神経細胞遊走障害

(A) 大脳半球の癒合. 対照のマウス脳 (a) と比較してノックアウトマウス (b) では、左右大脳半球を境する大脳縦裂が消失している. (c), (d) はその強拡大. v: 脳室, cc: 脳梁. (B) 大脳皮質の層構造の欠如. 対照マウスの大脳皮質 (a) で見られる層構造が、ノックアウトマウス (b) では欠如している. また、小多脳回に類似した皮質構造の異常 (c, 短い矢印) や、異所性の神経細胞の集簇 (d, 矢印) が認められる. (C) 小脳表面における外顆粒細胞の残存. 対照マウス (a) に比べて、ノックアウトマウス (b) では小脳表面に外顆粒細胞が残存している (矢印). (D) 免疫蛍光抗体法による脳表面の観察. 対照マウス (a, b, c) ではグリア境界膜-基底膜複合体におけるラミニン (緑) と GFAP (赤) のシグナルが直線状に観察されるが (矢印), ノックアウトマウス (d, e, f) ではその連続性が破綻している (矢印). (E) 対照に比較してノックアウトマウス脳のラミニン結合能は著減している. (文献37より改変)

ンはニューレキシンと結合することから、シナプス形成に重要な役割を果たしているものと推測されている³⁴⁾.

既述したように、FCMDやMEB, WWSなどの疾患では脳奇形を合併することが知られている. 筆者らはこれまでの研究から、これら脳奇形を合併する先天性筋ジストロフィーでは α -ジストログリカンの糖鎖異常によりラミニンとの結合に障害が生じ、その結果筋細胞壊死ばかりでなく脳奇形までもが生じることを示唆する興味深いデータを得ていた³⁵⁾. またこれらの疾患における脳奇形で、脳表面のグリア境界膜の連続性が破綻しているとの報告がなされていたことから³⁶⁾, 筆者らは同部位においてアストロサイトにより産生されているジスト

ログリカンに注目した. そしてアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) をプロモーターにもつ Cre トランスジェニックマウスとジストログリカン floxed マウスを交配して、脳特異的 (アストロサイト特異的) なコンディショナルノックアウトマウス (GFAP-DG ノックアウトマウス) を作製した³⁷⁾. GFAP-DG ノックアウトマウスは正常に発育し、交配も可能である. しかし、同マウスの脳を肉眼的に観察したところ、対照に比して有意に大きく、脳重も約20%増加していることがわかった. この脳を光学顕微鏡で観察すると、驚くべきことに、小多脳回、大脳皮質層構造の欠如、大脳半球の癒合、クモ膜下腔へのグリアニューロ

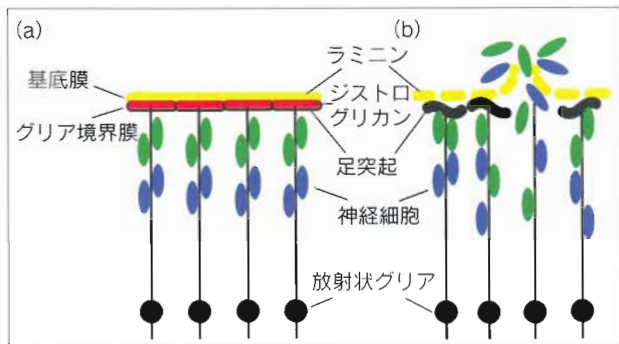


図2 先天性筋ジストロフィーにおける脳奇形の発症機序
 (a) 正常な脳ではグリア境界膜中のジストログリカンと基底膜中のラミニンが強固に結合することでこれらの複合体がバリアとしてはたらき、神経細胞の遊走を制御している。(b) 福山型をはじめとする先天性筋ジストロフィーでは、ジストログリカンがラミニンと結合しないためにグリア境界膜-基底膜複合体が破綻し、神経細胞の遊走障害が生じるものと考えられる。
 (文献50より改変)

ンヘテロトピアなどが認められ、小脳表面には顆粒細胞の残存が観察されたのである(図1A~C)。これらの変化はFCMDやMEB、WWSの脳病理所見に酷似した所見である。さらに電子顕微鏡により同マウスにおけるグリア境界膜の連続性の欠如が確認され、免疫蛍光抗体法により脳表面のグリア境界膜や基底膜におけるGFAPやラミニンの染色の不連続性も確認されたことから、同構造が破綻していることが明らかとなった(図1D)。また、同マウスの脳のラミニン結合能は著しく減弱していることがsolid-phase binding assayによって示された(図1E)。

このように、ジストログリカンの欠損により、先天性筋ジストロフィーにきわめて類似した脳奇形が発症することが明らかとなったわけであるが、その発症機序を模式的に図2に示した。脳の発生過程においてニューロンは放射状グリアに沿って脳表面近くまで遊走するが、正常な脳ではこの遊走は秩序立った制御を受け、大脳皮質の層構造が形成される(図2a)。正常なラミニン結合能をもったジストログリカンが欠損した脳においては、足突起に面した基底膜へのラミニンのアセンブリーがうまくいかず、その結果グリア境界膜、基底膜の破綻が生じる。このグリア境界膜-基底膜複合体は脳実質と脳脊髄液を境するバリアーとしてはたらくしているのだが、この破綻部分からニューロンのクモ膜下腔へのオーバーマイグレーションが起こる結果、大脳の層構造の乱れや、さらには脳回、大脳半球の癒合が生じるものと推測される

(図2b)。このように、先天性筋ジストロフィーにおける多彩な脳奇形のうちの少なくとも一部の発症機序において、糖転移酵素異常の下流にはジストログリカンの機能異常があることはほぼ間違えないものと考えられるのである。

III. 末梢神経特異的ジストログリカンノックアウトマウス

筆者らはこれまでの研究から、末梢神経においてジストログリカンはシュワン細胞あるいは髄鞘の最外層に局在し、細胞外において神経周膜に存在するラミニン、アグリニンと、細胞内においてジストロフィンアイソフォームであるDP116と結合することを明らかにしてきた(図3)^{19,38,39}。また、発生、再生の過程においてジストログリカンとラミニンの発現はパラレルであることを示してきた^{40,41}。そして、多くの*in vitro*の実験からラミニンが末梢神経の髄鞘形成に必須であるとの概念が確立されていたこと⁴²、ラミニン2を欠損した先天性筋ジストロフィーやそのモデル動物である*dy/dy*マウスには末梢神経障害が合併するとの報告が相次いだこと^{43~45}をふまえ、筆者らはジストログリカンが末梢神経においてラミニンレセプターとして、髄鞘形成に重要な役割を果たしているとの仮説を提唱してきた²²。この仮説を*in vivo*の系を用いて検証するために、末梢神経特異的(シュワン細胞特異的)ジストログリカンノックアウトマウス(P0-DGノックアウトマウス)を作製した。上述のようにジストログリカンはシュワン細胞において産生され

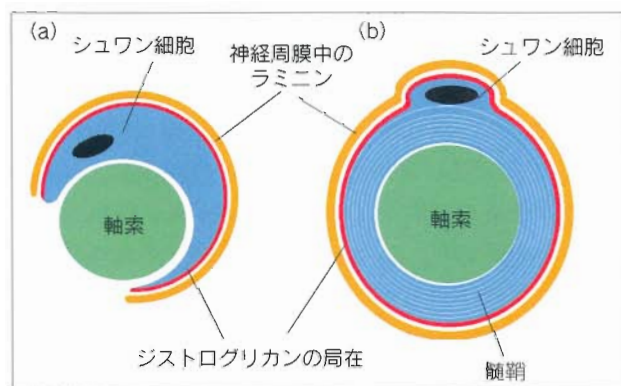


図3 末梢神経におけるジストログリカンの局在
 ジストログリカンはシュワン細胞あるいは髄鞘の最外層に局在し(赤)、その周囲を取り巻く神経周膜中のラミニン(オレンジ)と結合している。(a)は発生初期の。(b)は髄鞘形成後の末梢神経の横断面を示す。

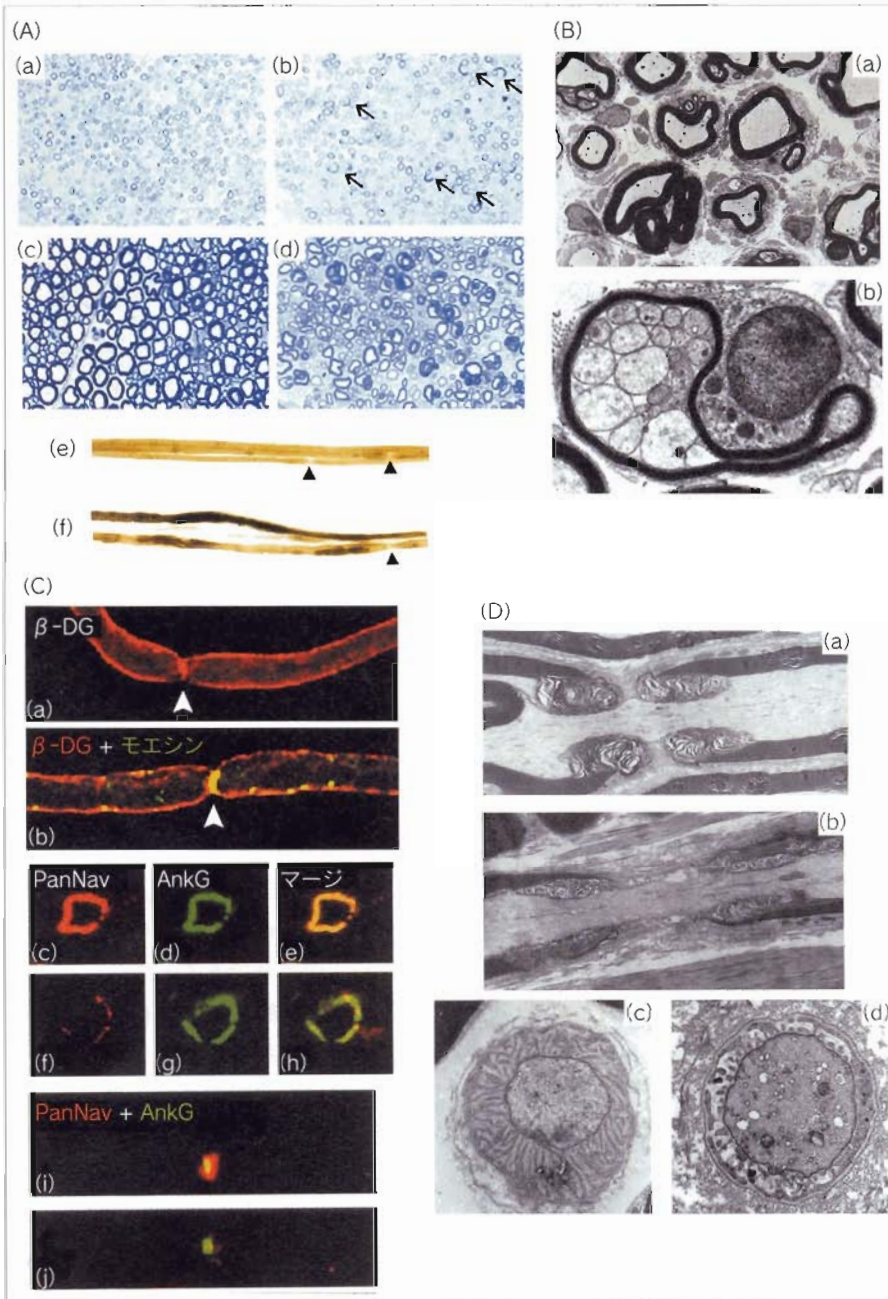


図4 末梢神経特異的ジストログリカンノックアウトマウスにおける髄鞘形成とNaチャンネルのクラスタリングの異常

(A) 髄鞘の異常：光学顕微鏡による観察。生後1週齢 (a, b) ではノックアウトマウスでredundant myelin loopが散見される (矢印)。12カ月齢 (c, d) ではノックアウトマウスで髄鞘の不規則な肥厚を認める。ときほぐし法 (e, f) にもノックアウトマウスの髄鞘は不規則に肥厚している。(a, c, e) 対照マウス。(b, d, f) ノックアウトマウス。

(B) 髄鞘の異常：電子顕微鏡による観察。ノックアウトマウスでは多くの神経線維で髄鞘のout-foldingを認める (a)。また、一つの髄鞘が複数の軸索を取り巻く像を認める (b)。

(C) ランビエ絞輪におけるNaチャンネルのクラスタリングの消失。ジストログリカンはランビエ絞輪においてモエシンと共局在を示す (a, b)。対照 (c, d, e, i) に比較してノックアウトマウス (f, g, h, j) では同部位におけるNaチャンネルのシグナルが著減している。(c, d, e, f, g, h) 横断像, (i, j) ときほぐし法による観察。DG：ジストログリカン, PanNav：pan-voltage gated Na channel, AnkG：アンキリンG。

(D) ランビエ絞輪の微細構造。対照 (a, c) と比較してノックアウトマウス (b, d) ではランビエ絞輪の微絨毛の形態異常が認められる。(a, b) 縦断像, (c, d) 横断像。

(文献46より改変)

ていることから、シュワン細胞のマーカーであるP0をプロモーターにもつCreトランスジェニックマウスを用いた⁴⁶⁾。

P0-DGノックアウトマウスは正常に発育し交配も可能であるが、神経学的な異常を解析するためにロータロッド試験を行ったところ、同マウスは対照と比べて回転軸から有意に落下しやすいことが判明した⁴⁶⁾。また、熱刺激に対する逃避反応は遅延する一方、痛覚刺激に対しては過敏に逃避反応を示すなど、感覚系の異常も明ら

かとなった⁴⁶⁾。さらに、同神経のラミニン結合能は著しく減弱し、培養シュワン細胞を用いた実験から、細胞表面へのラミニンのクラスタリングが欠如していることがわかった⁴⁶⁾。次に、同マウスの坐骨神経を光学顕微鏡で調べてみた。すると生後7日齢のマウスでは、対照と比べてredundant myelin loopとよばれる髄鞘の側方への細長い突出が多数認められた (図4Aa, b)。そして、これらの異常な髄鞘構造は時間の経過とともにその複雑さを増し、12カ月齢のマウスでは髄鞘の不規則な肥厚

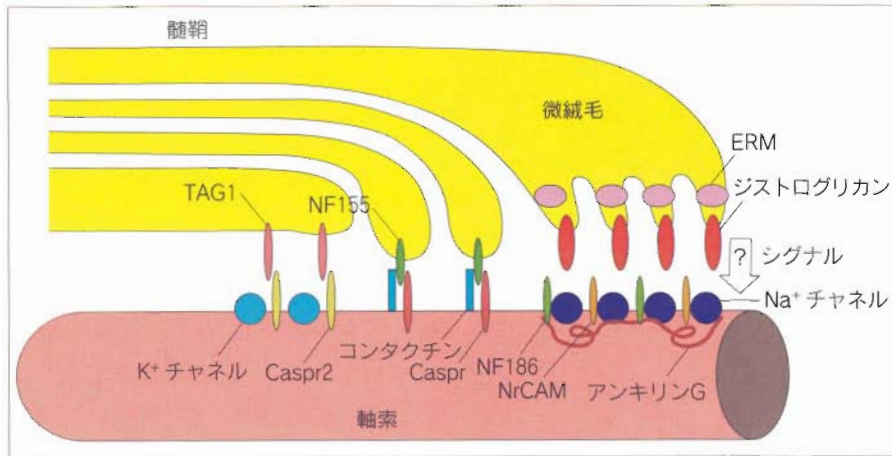


図5 ランビエ絞輪におけるジストログリカンの局在とその機能
ジストログリカンはランビエ絞輪の微絨毛に局在し、Naチャンネルのクラスターリングに必要なシグナルを軸索側へと伝達していると推測される。

を多数の神経線維において認めたのである(図4Ac, d)。この不規則な髓鞘の肥厚は解きほぐし法にても、はっきりと認められた(図4Ae, f)。さらに電子顕微鏡による観察から、髓鞘の不規則な肥厚は、ミエリンのout-foldingとよばれる本来の髓鞘の周囲に形成される余分な髓鞘によって形成されていることがわかった(図4Ba)。また、通常は有髓線維においては一つの髓鞘が一つの軸索を取り巻くのが原則であるが、同マウスでは一つの髓鞘が複数の軸索を取り巻いている像が散見された(図4Bb)。このようにジストログリカンは末梢神経において髓鞘の形成およびその維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、上に述べた筆者らの仮説は実証されたのである。

さて、P0-DGノックアウトマウスにはこのようにさまざまな髓鞘の異常が認められたわけであるが、脱髄性の変化はきわめて軽度である。ところが神経伝導速度を測定してみると、多くの神経で正常の1/2から1/5程度と著しい遅延を示した⁴⁶⁾。このような高度な伝導遅延はこのマウスにみられた髓鞘の変化からだけではどうしても説明が困難であった。そこで筆者らは、末梢神経における跳躍伝導の解剖学的基盤ともいえるランビエ絞輪に注目したのである。そして、ジストログリカンはランビエ絞輪のシュワン細胞側にある微絨毛に局在することを明らかにした(図4C)。ランビエ絞輪のノードにはNaチャンネルが局在し、跳躍伝導に必要な膜電位の変化をひき起こしている。そこでP0-DGノックアウトマウスにおける同蛋白質の局在を調べた結果、ノードにおけるNaチャンネルのクラスターリングが特異的に減少していることが明らかとなったのである(図4C)。Kチャンネル、アンキリンG、モエシン、ニューロファシン、Caspr2

など、ランビエ絞輪に局在する他の蛋白質の発現は対照と比較して異常は認められなかった。また、電子顕微鏡を用いた観察では、微絨毛の幅が浅くなり、正常の横断面でみられる放射状構造も不明瞭となっていた(図4D)。このように末梢神経におけるジストログリカンは、当初考えられていた髓鞘形成以外に、ランビエ絞輪におけるNaチャンネルのクラスターリングにも重要な影響を及ぼしていることが明らかとなった。Naチャンネルのランビエ絞輪へのクラスターリングには、これまで軸索の細胞内蛋白質であるアンキリンGとの相互作用が重要であると考えられてきたが⁴⁷⁾、さらにシュワン細胞の微絨毛から軸索への何らかのシグナルが必要であるとの報告がなされた^{48,49)}。これらのことから、微絨毛に存在するジストログリカンはこのNaチャンネルのクラスターリングに必要なシグナルを軸索側へと伝達している蛋白質である可能性が考えられるのである(図5)。

●おわりに

ジストログリカンは神経系において、神経細胞遊走、髓鞘形成、ランビエ絞輪の形成といった多彩かつ、神経系の発生・分化にきわめて重要な過程に不可欠な蛋白質であることが明らかになりつつある。脳においては、アストロサイトで産生されるジストログリカンは神経細胞遊走を調節し、その機能欠損が脳奇形の発生に深く関与しているわけであるが、神経細胞遊走を制御しているとされるリーリンなどの経路のなかで今後ジストログリカンのどのように位置づけられていくのか、興味をもたれるところである。また、血管周囲の足突起に局在するジストログリカンの脳血液関門形成への関与についても、GFAP-DGノックアウトマウスを用いた解析が進展して

いくものと期待される。さらに、脳におけるもう一つのジストログリカン産生細胞であるニューロンにおける機能も、シナプス形成といった観点を中心に今後検討されるべき課題である。一方で末梢神経に目を転じると、今後は末梢神経障害の原因蛋白質としてジストログリカンが注目されていくものと予想される。末梢神経においてジストログリカンと結合するラミニン2やL-ペリアキシンの変異により遺伝性の末梢神経障害が生じることは既述のとおりであり、ジストログリカンを軸とした細胞内外の連携は末梢神経における髄鞘の形成、維持にきわめて重要なはたらきをしていると考えられる。ジストログリカンやその結合蛋白質の機能不全と末梢神経障害の関連について、今後もさらなる検討が必要であろう。

文 献

- 1) Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., Campbell, K. P. : *Nature*, **355**, 696-702(1992)
- 2) Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Milatovich, A., Ozcelik, T., Yang, B., Koepnick, K., Francke, U., Campbell, K. P. : *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 1651-1657(1993)
- 3) Bowe, M. A., Deyst, K. A., Leszyk, J. D., Fallon, J. R. : *Neuron*, **12**, 1173-1180(1994)
- 4) Peng, H. B., Ali, A. A., Daggett, D. F., Rauvala, H., Hassell, J. R., Smalheiser, N. R. : *Cell Adhes. Commun.*, **5**, 475-489(1998)
- 5) Ervasti, J. M., Campbell, K. P. : *J. Cell Biol.*, **122**, 809-823(1993)
- 6) Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. S., Campbell, K. P. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 27305-27310(1995)
- 7) Ervasti, J. M., Campbell, K. P. : *Cell*, **66**, 1121-1131(1991)
- 8) Cohn, R. D., Campbell, K. P. : *Muscle Nerve*, **23**, 1456-1471(2000)
- 9) Tome, F. M. S. : *Neuropediatrics*, **30**, 55-65(1999)
- 10) Kobayashi, K., Nakahori, Y., Miyake, M., Matsumura, K., Kondo-Iida, E., Nomura, Y., Segawa, M., Yoshioka, M., Saito, K., Osawa, M., Hamano, K., Sakakihara, Y., Nonaka, I., Nakagome, Y., Kanazawa, I., Nakamura, Y., Tokunaga, K., Toda, T. : *Nature*, **394**, 388-392(1998)
- 11) Yoshida, A., Kobayashi, K., Many, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Toda, T., Endo, T. : *Dev. Cell*, **1**, 717-724(2001)
- 12) Beltran-Valero De Bernabe, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., Van Beusekom, E., Van Der Zwaag, B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W. B., Cormand, B., Lehesjoki, A. E., Cruces, J., Voit, T., Walsh, C. A., van Bokhoven, H., Brunner, H. G. : *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 1033-1043(2002)
- 13) Brockington, M., Blake, D. J., Prandini, P., Brown, S. C., Torelli, S., Benson, M. A., Ponting, C. P., Estournet, B., Romero, N. B., Mercuri, E., Voit, T., Sewry, C. A., Guicheney, P., Muntoni, F. : *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, 1198-1209(2001)
- 14) Longman, C., Brockington, M., Torelli, S., Jimenez-Mallebrera, C., Kennedy, C., Khalil, N., Feng, L., Saran, R. K., Voit, T., Merlini, L., Sewry, C. A., Brown, S. C., Muntoni, F. : *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2853-2861(2003)
- 15) Many, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis, R. U., Endo, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 500-505(2004)
- 16) Chiba, A., Matsumura, K., Yamada, H., Inazu, T., Shimizu, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Kobata, A., Endo, T. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 2156-2162(1997)
- 17) Michele, D. E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R. D., Satz, J. S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R. I., Somer, H., Straub, V., Mathews, K. W., Moore, S. A., Campbell, K. P. : *Nature*, **418**, 417-422(2002)
- 18) Tian, M., Jacobson, C., Gee, S. H., Campbell, K. P., Carbonetto, S., Jucker, M. : *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 2739-2747(1996)
- 19) Matsumura, K., Yamada, H., Shimizu, T., Campbell, K. P. : *FEBS Lett.*, **334**, 281-285(1993)
- 20) Durbeej, M., Campbell, K. P. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 26609-26616(1999)
- 21) Shimizu, H., Hosokawa, H., Ninomiya, H., Miner, J. H., Masaki, T. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 11995-2000(1999)
- 22) Matsumura, K., Yamada, H., Saito, F., Sunada, Y., Shimizu, T. : *Neuromuscul. Disord.*, **7**, 7-12(1997)
- 23) Sherman, D. L., Fabrizi, C., Gillespie, C. S., Brophy, P. J. : *Neuron*, **30**, 677-687(2001)
- 24) Guilbot, A., Williams, A., Ravise, N., Verny, C., Brice, A., Sherman, D. L., Brophy, P. J., LeGuern, E., Delague, V., Bareil, C., Megarbane, A., Claustres, M. : *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 415-421(2001)
- 25) Williamson, R. A., Henry, M. D., Daniels, K. J., Hrstka, R. F., Lee, J. C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Campbell, K. P. : *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 831-841(1997)
- 26) Henry, M. D., Campbell, K. P. : *Cell*, **95**, 859-870(1998)
- 27) Kuhn, R., Schwenk, F. : *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 183-188(1997)
- 28) Sauer, B. : *Methods*, **14**, 381-392(1998)
- 29) Schipani, E. : *Calcif. Tissue Int.*, **71**, 100-102(2002)
- 30) Cohn, R. D., Henry, M. D., Michele, D. E., Barresi, R., Saito, F., Moore, S. A., Flanagan, J. D., Skwarchuk, M. W., Robbins, M. E., Mendell, J. R., Williamson, R. A., Campbell, K. P. : *Cell*, **110**, 639-648(2002)
- 31) Tian, M., Jacobson, C., Gee, S. H., Campbell, K. P., Carbonetto, S., Jucker, M. : *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 2739-2747(1996)
- 32) Zaccaria, M. L., Di Tommaso, F., Brancaccio, A., Paggi, P.,

- Petrucci, T. C. : *Neuroscience*, **104**, 311-324 (2001)
- 33) Levi, S., Grady, R. M., Henry, M. D., Campbell, K. P., Sanes, J. R., Craig, A. M. : *J. Neurosci.*, **22**, 4274-4285 (2002)
- 34) Sugita, S., Saito, F., Tang, J., Satz, J., Campbell, K., Sudhof, T. C. : *J. Cell Biol.*, **154**, 435-445 (2001)
- 35) Michele, D. E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R. D., Satz, J. S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R. I., Somer, H., Straub, V., Mathews, K. D., Moore, S. A., Campbell, K. P. : *Nature*, **418**, 417-422 (2002)
- 36) Saito, Y., Murayama, S., Kawai, M., Nakano, I. : *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **98**, 330-336 (1990)
- 37) Moore, S. A., Saito, F., Chen, J., Michele, D. E., Henry, M. D., Messing, A., Cohn, R. D., Ross-Barta, S. E., Westra, S., Williamson, R. A., Hoshi, T., Campbell, K. P. : *Nature*, **418**, 422-425 (2002)
- 38) Yamada, H., Denzer, A. J., Hori, H., Tanaka, T., Anderson, L. V., Fujita, S., Fukuta-Ohi, H., Shimizu, T., Ruegg, M. A., Matsumura, K. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 23418-23423 (1996)
- 39) Saito, F., Masaki, T., Kamakura, K., Anderson, L. V., Fujita, S., Fukuta-Ohi, H., Sunada, Y., Shimizu, T., Matsumura, K. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 8240-8246 (1999)
- 40) Masaki, T., Matsumura, K., Saito, F., Sunada, Y., Shimizu, T., Yorifuji, H., Motoyoshi, K., Kamakura, K. : *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **99**, 289-295 (2000)
- 41) Masaki, T., Matsumura, K., Hirata, A., Yamada, H., Hase, A., Arai, K., Shimizu, T., Yorifuji, H., Motoyoshi, K., Kamakura, K. : *Exp. Neurol.*, **174**, 109-117 (2002)
- 42) Bunge, M. B. : In peripheral neuropathy, pp.299-316, F. Saunders, Philadelphia (1993)
- 43) Shorer, Z., Philpot, J., Muntoni, F., Sewry, C., Dubowitz, V. : *J. Child Neurol.*, **10**, 472-475 (1997)
- 44) Di Muzio, A., De Angelis, M. V., Di Fulvio, P., Ratti, A., Pizzuti, A., Stuppia, L., Gambi, D., Uncini, A. : *Muscle Nerve*, **27**, 500-506 (2003)
- 45) Bradley, W. G., Jenkinson, M. : *J. Neurol. Sci.*, **18**, 227-247 (1973)
- 46) Saito, F., Moore, S. A., Barresi, R., Henry, M. D., Messing, A., Ross-Barta, S. E., Cohn, R. D., Williamson, R. A., Sluka, K. A., Sherman, D. L., Brophy, P. J., Schmelzer, J. D., Low, P. A., Wrabetz, L., Feltri, M. L., Campbell, K. P. : *Neuron*, **38**, 747-758 (2003)
- 47) Girault, J. A., Peles, E. : *Curr. Opin. Neurobiol.*, **12**, 476-485 (2002)
- 48) Ching, W., Zanazzi, G., Levinson, S. R., Salzer, J. L. : *J. Neurocytol.*, **28**, 295-301 (1999)
- 49) Melendez-Vasquez, C. V., Rios, J. C., Zanazzi, G., Lambert, S., Bretscher, A., Salzer, J. L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1235-1240 (2001)
- 50) 齊藤史明, Kevin P. Campbell : *実験医学*, **20**, 2648-2650 (2002)