

S1

糖鎖合成機構とその破綻による先天性筋ジストロフィー

遠藤玉夫

都健康長寿研

糖鎖は構造の多様性や複雑さにより機能解明が遅れていたが、糖鎖構造解析技術の進歩、糖鎖遺伝子のクローニング、糖鎖遺伝子のノックアウト体の解析などにより、免疫、がん、感染、神経・筋、脳、再生医療、発生・分化など生体における糖鎖の重要性や疾患との関わりが明らかになりつつある。

筋ジストロフィーは臨床的に筋力低下を主徴とし、病理学的には筋変性を主病変とする一群の遺伝子疾患の総称である。これまで筋ジストロフィーの主な原因は、ジストロフィンなど筋の構造タンパク質の異常によるものが報告されていたが、我々はタンパク質の翻訳後修飾である糖鎖の異常が原因であるという新しい病態メカニズムを明らかにした。

筋タンパク質 α ジストログリカンの糖鎖解析により、*O*-マンノース型糖鎖を発見した。この糖鎖の生合成経路の解明に取り組み、糖転移酵素 POMGnT1 と POMT1/2 を明らかにした。その後 POMGnT1 は muscle-eye-brain 病、POMT1/2 は Walker-Warburg 症候群の原因であることを明らかにした。両疾患ともに筋ジストロフィーに加えて滑脳症といった中枢神経系の形成異常を伴うのが特徴である。これらの疾患では α ジストログリカンの糖鎖不全が共通に観察される。糖鎖の異常が先天性筋ジストロフィーの原因となることが明らかになった初めての例であり、同時に脳神経や筋における糖鎖の重要性が明らかになった。その後臨床症状が類似する他の先天性筋ジストロフィーでも α ジストログリカンの糖鎖異常が示され、我が国における小児筋ジストロフィーの代表疾患である福山型先天性筋ジストロフィーも含まれる。これらの疾患群は α ジストログリカンの糖鎖異常を伴うことより、 α ジストログリカノパチーと総称される。我々の研究を切っ掛けに研究が盛んになり、*O*-マンノース型糖鎖はリン酸を含むなど多様な構造であることやキシロース/グルクロン酸の繰り返し糖鎖が基底分子との結合に重要であることなどユニークな特徴を持つことが分かってきた。さらに、現在までに機能不明も含め 18 種類の α ジストログリカノパチーの原因遺伝子が明らかになっている。

最近我々はリビートルリン酸 2 個からなるタンデム構造を *O*-マンノース型糖鎖上に見いだし、これまで機能が不明であったフクチン、FKRP、ISPD がこの新規構造の合成に関わることを明らかにした。

本講演では、最近の知見も含め *O*-マンノース型糖鎖合成機構とその破綻による α ジストログリカノパチーについて議論したい。

S2

硫酸化糖鎖によるオートファジーと軸索再生の制御

○門松健治¹、坂元一真¹、尾崎智也¹、Yuanhao Gong¹¹名古屋大学大学院医学系研究科

一度傷ついた中枢神経軸索は再生しない。その理由は元来の再生能力の弱さに加えて、損傷に伴って発現が誘導される軸索再生阻害因子のためである。特にこの 20 年間は阻害因子の探索と同定に費やされた。阻害因子は、(1) 軸索ガイダンス因子 (Semaphorin、Slit など) (2) ミエリン由来因子 (Nogo、MAG、Omgp) (3) 硫酸化糖鎖 (コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸) に大きく分類できる。中でもコンドロイチン硫酸 (CS) については近年特に注目されている。すなわち、その酵素分解は、脊髄損傷動物モデルの機能回復をもたらす。加えて、幼少時に見られる眼優位性可塑性、記憶消去可塑性などの神経可塑性をも成体に蘇らせることができる。

我々は、CS による軸索再生阻害に際して現れる軸索先端の変形 (dystrophic endball) に注目し、そこから再生阻害の機構に迫ろうとした。その結果、dystrophic endball 形成はオートファゴゾームの蓄積を伴うことが判明した。この現象は *in vitro*、*in vivo* 両方の dystrophic endball 形成で見られた。詳細な解析の結果、この現象はオートファジーが中断されるために起こることが判り、その上流で CS とその受容体 PTPRσ の結合が必要であることが分かった。

もう一つ面白い現象として、CS は軸索再生を抑制するが、CS に酷似した構造を示す硫酸化糖鎖ヘパラン硫酸 (HS) はむしろ促進することが知られている。しかも CS と HS は共通の受容体として PTPRσ を持つ。我々は、この機構に迫った。PTPRσ との結合様式を解析することにより、天然の CS と HS には独自の暗号が隠されており、それによって正反対の受容体の制御が行われることが判明した。

本講演では、CS と HS という硫酸化糖鎖とその受容体によるシグナルがどのようにオートファジーを制御し軸索再生を制御するか、について議論したい。

多能性幹細胞の心血管分化機構と再生医療応用

山下 潤

京都大学・iPS 細胞研究所・増殖分化機構研究部門

我々は 1998 年頃から多能性幹細胞を用いて心血管細胞の分化再生研究を行ってきた。まず ES 細胞から系統的に血管細胞の分化と血管形成を再現できる独自の分化誘導系を開発した (**Nature**, 2000)。これをもとに心血管系細胞の分化機構に関する様々な解析を行ってきた(**FASEB J**, 2005; **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006a, 2006b; **Blood**, 2009; **J Cell Biol**, 2010; **Blood**, 2011(表紙); **Stem Cells**, 2012a; **Cell Stem Cell**, 2012)。またマウス iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導 (**Circulation**, 2008) およびヒト iPS 細胞の効率的な心筋細胞分化誘導及び純化に成功している (**PLoS One**, 2011a, 2011b)。

これら幹細胞生物学の知見・技術と細胞シート作製技術(東京女子医大)を組み合わせ、心臓組織を作る細胞群(心筋・血管・間質)を多能性幹細胞から誘導して混合細胞シートを作製し、心筋梗塞モデルにおける移植効果とその機構を明らかにした(**Stem Cells**, 2012b)。VEGF などシート由来液性因子の発現が内皮細胞と心筋細胞の共存により増強されることなど、細胞間相互作用の重要性を明らかにした。ヒト iPS 細胞からも心臓組織シート作製と移植効果を示した (**Sci Rep**, 2014)。さらに厚く且つ血液供給が保たれた 3 次元的心臓組織を構築するため、ゼラチンハイドロゲル技術(京都大学再生医科学研究所)を導入し、10 数枚以上の細胞シートを簡便に積層化し培養・移植する新手法を開発した(**Sci Rep**, 2015)。積層化シート移植により、細胞生着効率は飛躍的に向上し、梗塞後の心機能回復の促進と持続を認めた。移植後 3 ヶ月の組織所見において、移植グラフト内に豊富な毛細血管が誘導されており、移植細胞による充実した心臓組織様構造を認めた。血管を含む 3 次元的心臓組織形成は、細胞移植による心臓再生の有力な新規戦略となり得る。

神経障害後の機能回復のためには神経回路が適切に再建されなければならない。すなわち細胞死を免れた神経細胞の軸索から標的ニューロンへの新たな軸索再生が不可欠である。神経回路の再生は軸索の伸展と誘導、シナプス形成、そして不要な回路の刈り込みなど多段階のステップからなると考えられる。しかしながら、損傷された神経回路の再生現象については、徐々に知見が集積されつつあり、臨床応用への期待が高まっている。

たとえば、神経系には軸索の伸展を阻害する機構が存在している。グリア細胞や免疫系の細胞に発現している軸索再生阻害タンパク質と呼ばれている複数の因子が、成体の神経回路の安定性を保つ役割を担っている。これらが損傷した軸索の先端部に働きかけて、軸索再生を抑制する。ミエリンに存在している myelin-associated glycoprotein (MAG) や Nogo などの糖タンパク質は、神経細胞上の受容体を介して、細胞内で small GTPase である RhoA を活性化することで、軸索の伸展抑制をもたらす。RhoA はアクチン骨格系あるいはチューブリンを制御することにより、細胞の形態形成の鍵となるタンパク質のひとつである。また Semaphorin や RGM などの蛋白質も生体の神経系においては軸索再生阻害蛋白質として働き、軸索再生を強力に阻止していることがわかっている。これらの因子をターゲットとした分子標的治療法が開発され、神経障害動物モデルで薬効が検証され、一部は臨床試験に至っている。「神経軸索再生阻害機序」を制御する分子標的治療法の開発は、実用化の段階へと至っている。

さらに軸索の誘導やシナプス形成、不要なシナプス・軸索の刈り込みのメカニズムも明らかになりつつある。これらの現象には、神経細胞同士の機能連関が重要であることはいうまでもないが、病態下においては神経系のみならず脈管系、免疫系など様々な生体システムに時空間的变化をきたし、一連の過程が制御されていることが明らかになってきている。我々は、脈管系と免疫系が神経回路の機能回復の過程を正に制御していることを見だし、それらのメカニズムの一端を明らかにした。

本講演では、生体システムのダイナミクスの観点から神経回路の修復現象を捉え、一連の反応の機構と意義について考察したい。

- 【文献】
1. van Erp S, et al. (2015) *Dev Cell* 35: 537-552
 2. Tanabe S, and Yamashita T (2014) *Cell Rep* 9: 1459-1470.
 3. Ueno M, Fujita Y, et al. (2013) *Nat Neurosci* 16: 543-551.
 4. Muramatsu R, Takahashi C, et al. (2012) *Nat Med* 18: 1658-1664.
 5. Muramatsu R, Kubo T, et al. (2011) *Nat Med* 17: 488-494.

α-klotho はヒトの老化疾患に類似の変異表現型を示す突然変異マウスの原因遺伝子として同定されたが、その後の機能解析により電解質代謝の制御因子であることが明らかとなった。即ち、*α-Klotho* は細胞膜上で FGF23、FGFR1 と複合体を形成し、腎臓におけるビタミン D の合成、リンの再吸収を抑えるシグナルを制御する。また、細胞内タイプの *α-Klotho* はゴルジ装置で NaK-ATPase 複合体と結合し、Endosome に集積しているが、細胞外カルシウムの低下に瞬時に応答して細胞表面へと移動する。その結果として起こる細胞膜における Na^+ の濃度勾配、膜電位の変化が脈絡叢における脳脊髄液へのカルシウムの移送、腎尿細管におけるカルシウムの再吸収、副甲状腺における PTH の分泌を制御する。

α-Klotho は多様な蛋白質と結合する。知られている *α-Klotho* 結合蛋白質には構造上の共通性が見いだされないが特異的、選択的に *α-Klotho* と結合する。一方、*α-Klotho* は β グリコシダーゼのホモログであり、糖鎖修飾酵素として機能する可能性と糖鎖結合タンパクとして機能する可能性が示唆されていたが、極弱いグルクロニダーゼ活性が認められ、グルクロン酸認識ドメインをもつことが明らかとなった。そこで *α-Klotho* 結合蛋白質の糖鎖を解析したところ、FGF23 には新規 O 型糖鎖が、FGFR1、NaK-ATPase β -サブユニット、その他の FGF23 以外の *α-Klotho* 結合タンパク質の N 型糖鎖には共通の糖鎖がついていた。興味深いことに上記の新規 O 型糖鎖、N 型糖鎖の末端には共通構造（リン酸化グルクロン酸）が見いだされた。次いで *α-Klotho* の結晶構造解析とその分子動力的解析、ドッキングシミュレーションにより、蛋白質間相互作用における *α-Klotho* の分子動態と結合相手の糖鎖の機能を解析し、*α-Klotho* はグルクロン酸を認識する新規レクチン様分子であることを見いだした。

本講演では *α-Klotho* の結晶構造解析によって明らかとなった蛋白質間相互作用、シグナル伝達における糖鎖の新たな機能を中心に議論したい。