【352】

氏　名（本籍）	藤（ふじ）村（むら）克（かつ）也（や）（三重県）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博　乙　第　2303　号
学位授与年月日	平成19年4月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	**LARGE2 facilitates the maturation of α-dystroglycan more effectively than LARGE** （LARGEよりもα－ジストログリカンの糖鎖付加を効率的に促進するLARGE2の解析）

主　査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保
副　査	筑波大学教授	医学博士	玉岡　晃
副　査	筑波大学准教授	博士（医学）	一條裕之
副　査	筑波大学講師	獣医学博士	國田　智
副　査	筑波大学講師	博士（理学）	三輪佳宏

論文の内容の要旨

（目的）

α－ジストログリカンの糖鎖修飾異常が原因で発生すると考えられている疾患として筋眼脳病，Walker-Warburg症候群，福山型筋ジストロフィーなどが知られている。ヒト第22番染色体にあるLARGE遺伝子は，髄膜腫を起こす遺伝子変異をもつことにより見い出されたが，まもなく筋ジストロフィーを起こす疾患（MDC1D）の原因遺伝子で，その欠損により組織中のα－ジストログリカンに糖鎖修飾異常を起こすことが報告された。LARGEは糖転移酵素に特徴的なアミノ酸配列を持つが，その活性はいまだ明らかにされていない。本論文ではLARGEとホモロジーを持つLARGE2を新たにクローニングし，LARGEと共にその性質を明らかにすることを試みた。

（対象と方法）

ホモロジー検索を用いた新規遺伝子の候補LARGE2を得た。LARGEとLARGE2はRT-PCRを利用してヒト腎RNAから作製した。増幅した断片は動物細胞用の発現ベクターpcDNA3.1に挿入された。α－ジストログリカンをコードするcDNA断片も同様にヒト腎臓RNAからRT-PCRで得た。作製された断片は，発現ベクターのpcDNA3.1とpFLAG-CMV-3，p3xFLAG-CMV-13から作製したベクターに挿入された。ヒト胎児腎臓由来293T細胞にリポフェクタミン2000を用いてα－ジストログリカン，LARGEやLARGE2を発現するプラスミドを一過性にトランスフェクトしα－ジストログリカンを培地中に分泌させた。発現産物を含んだ培地はトランスフェクション後24時間以降に回収した。発現産物は精製後，電気泳動してウエスタンブロット法や銀染色法で分析した。ウエスタンブロットのプローブとしてラミニン（laminin overlay）と糖鎖抗原認識抗体を使用した。ラミニンは細胞外マトリックスに存在し，糖鎖を介してα－ジストログリカンと結合する。タンパク質間の相互作用を調べるためヒト胎児腎臓由来293T細胞を用いて対象となるタンパク質を一過性に発現し細胞溶解後，プロテインAセファロースを用いたIn vitro pull-downアッセイを行った。ヒト

組織中の転写産物の量はクロンテックから購入した各種組織のRANからcDNAを合成しreal-time PCRで測定した。

（結果）

LARGE2は糖転移酵素の特徴を持つ721個のアミノ酸配列をコードし，LARGEと64.2％のホモロジーを持っていた。LARGE，LARGE2の転写産物の組織分布を調べたところ両者ともにほぼすべての組織で発現が認められたが，脳においてはLARGE2の発現は認められなかった。組み換えLARGE2をヒト胎児腎臓由来293T細胞中でα－ジストログリカンと共に発現した。ウエスタンブロットで調べたところLARGE2を用いるとLARGEよりも高度に糖鎖が付加し，ラミニンと良好な反応性を持つα－ジストログリカンが得られることがわかった。α－ジストログリカンに付けられたタグに対するモノクロナール抗体を使用して，そのペプチド部分のウエスタンブロットを行った。LARGEと共に発現すると糖鎖付加不良の低分子量α－ジストログリカンの残存が認められたが，LARGE2の場合はほとんど認められなかった。MDC1Dの筋ジストロフィー患者の突然変異をLARGE遺伝子に導入すると，正常な糖鎖付加が認められなかった。糖鎖抗原を持つα－ジストログリカンの分子量やラミニン結合活性はO-グリカンの消化酵素以外の酵素で消化しても大きな変化はなく，LARGEやLARGE2によって付加される糖鎖抗原はO-グリカン上にあると考えられた。欠失変異体を用いて糖鎖抗原のα－ジストログリカン結合位置を調べたところムチン領域である事が強く示唆された。ツニカマイシンはタンパク質の分泌と関係の深いN-グリカンの合成阻害剤として知られている。細胞をこの薬剤で処理すると糖鎖付加不良の低分子量α－ジストログリカンは培地中に分泌されなくなったが，高度に糖鎖が付加したα－ジストログリカンが分泌されていた。従って，正常なα－ジストログリカンの分泌経路は，N-グリカンが関与する経路とは異なることを示している。またIn vitro pull-downアッセイを用いてα－ジストログリカンのN末端部分をLARGEと同様にLARGE2が認識し結合することを示した。

（考察）

我々はLARGE2がα－ジストログリカンを認識し，その上にラミニンと結合する糖鎖抗原の付加を促進することを示した。LARGEの先天的欠損（MDC1D）は，胎児致死ではなく進行性の筋ジストロフィーを引き起こす。筋肉においてはLARGE，LARGE2共に発現が認められ，欠損したLARGEに代ってLARGE2がα－ジストログリカン上の糖鎖抗原の形成を助けているのかも知れない。脳ではLARGEを発現するがLARGE2は，ほとんど発現していない。脳においてはLARGEの欠損をLARGE2によって相補することができないと考えられ，重大な精神遅滞を引き起こすMDC1D患者の表現型を良く説明できる。

LARGE遺伝子を使用した筋ジストロフィーの遺伝子治療は現在トピックとして取り上げられている。LARGE2はLARGEよりも糖鎖修飾を効率的に促進し，糖鎖付加不良の低分子α－ジストログリカンの発現を抑える性質を持つので，よりよい遺伝子治療の道具になるかも知れない。更に，α－ジストログリカンは組織によって分子量が異なり，また各種のリガンドがあることが報告されているが，正常組織におけるα－ジストログリカンの糖鎖構造の本質的な違いは全くわかっていない。LARGEとLARGE2の遺伝子操作はα－ジストログリカンの糖鎖構造を抑制するのに適した技術となることが期待される。

審　査　の　結　果　の　報　告

学位論文審査委員会において審査委員全員出席のもとに学力の確認を行い，論文について説明をもとめ，関連事項について質疑応答を行った結果，審査委員全員によって合格と判定された。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。