

桐野 陽平

(Department of Biomedical Sciences,
Cedars-Sinai Medical Center)The role of arginine methylation in the Piwi-interacting
RNA pathwayYohei Kirino (Department of Biomedical Sciences, Cedars-
Sinai Medical Center, 5017 Davis Research Building, 8700
Beverly Blvd., Los Angeles, CA 90048, U.S.A.)シアル酸の低下により引き起こされる骨格
筋疾患

1. はじめに

シアル酸は、9炭糖であるノイラミン酸の*N*-, *O*-シアル誘導体の総称であり、植物を除く生物界に広く分布している。その存在は50年以上前から知られている。シアル酸は通常、遊離の状態では存在せず、モノあるいはポリシアル酸として、糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の非還元末端に結合した状態で存在する。シアル酸は、細胞間認識、細胞-基質認識および糖タンパク質の安定性などに働き、特に、神経発生や病原体感染、免疫システムに重要な機能を果たすことが予想されていた。縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles: DMRV) は、遠位筋である前脛骨筋が好んで侵される遺伝性筋疾患である。この疾患はシアル酸の生合成に関わる酵素遺伝子の変異によることが示され、患者の骨格筋ではシアル酸の低下が見出された。一見、全く関連のなさそうなシアル酸の減少が、なぜ骨格筋の筋力低下、筋変性を引き起こすのであろうか。

2. シアル酸生合成酵素遺伝子の変異が遠位型ミオパチーの原因である

DMRV は、15~35歳で発症する常染色体劣性の遺伝性筋疾患であり、欧米では遺伝性封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy: hIBM) と呼ばれている¹⁾。日本には約150-400人の患者がいると推定されている。臨床的には、前述のように、前脛骨筋に進行性の筋萎縮と筋力低下を特徴とし、近位筋である大腿四頭筋は発症初期には侵されない^{2,3)}。症状は比較的ゆっくりと進行し、発症後平均12年間で歩行不能となる。罹患筋には、縁取り空胞、

萎縮した小角化線維、筋線維内にアミロイド様のタンパク質の蓄積など特徴的な筋病理所見が見られる。電子顕微鏡観察では、多数の自己貪食空胞の集積が観察される。

2001年に連鎖解析によりこのDMRV/hIBMの原因遺伝子として、シアル酸生合成経路の律速酵素であるウリジン二リン酸-*N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) 2-エピメラーゼ/*N*-アセチルマンノサミンキナーゼ (GNE/MNK) をコードする *GNE* 遺伝子が単離された⁴⁾。*GNE* 遺伝子には、選択的スプライシングによる3種類の転写アイソフォームの存在が知られているが、そのすべてのアイソフォームは全身で発現している。しかしながら、特に、肝臓、腎臓で強く発現しており、骨格筋での発現は非常に低いレベルである。最も長いアイソフォームが酵素活性を担っていると考えられるが、酵素活性も肝臓、腎臓で検出できるのみで、他の臓器ではきちんと測定されていない。シアル酸は外部から食物として摂取され、細胞に取り込まれる、または、リソソーム系での分解を経て再利用される他、全身の細胞で新たに生合成されている。哺乳類などの高等生物においては、シアル酸生合成経路は唯一つしかない (図1)。その経路において GNE/MNK は、一つのタンパク質が GNE 活性と MNK 活性の二つの酵素活性を担い、シアル酸の合成のスイッチを入れる鍵酵素である⁵⁾。シアル酸生合成は、*N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を経て、シチジンモノリン酸-*N*-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) を合成するが、この経路の最終合成産物である CMP-NeuAc のネガティブフィードバック効果により、詳しくは、CMP-NeuAc が GNE/MNK のアロステリック部位に直接結合してこの GNE 反応過程を阻害することで、全体の合成経路の進行を調節していることが知られている⁶⁾。シアル酸生合成は GNE/MNK のステップが進むかどうかで決定されている。このことから、*GNE* 遺伝子の変異をもつ DMRV/hIBM 患者の組織内ではシアル酸合成が低下していることが予測された。

3. *GNE* 遺伝子変異の特徴と酵素活性

我々は、日本人 DMRV/hIBM 患者で遺伝子変異を解析した。さらに、見出された変異をもつ組換えタンパク質を動物細胞にて発現させ、GNE/MNK 酵素活性と多量体形成能を測定した。GNE/MNK は、12分子によりホモ多量体を形成して存在することがわかっている。その結果、① DMRV/hIBM 患者は二つのアレルに *GNE* 遺伝子変異をもつが、少なくとも一つのアレルはミスセンス変異である⁷⁾、② *GNE* 遺伝子の各 GNE または MNK ドメインの変異は、

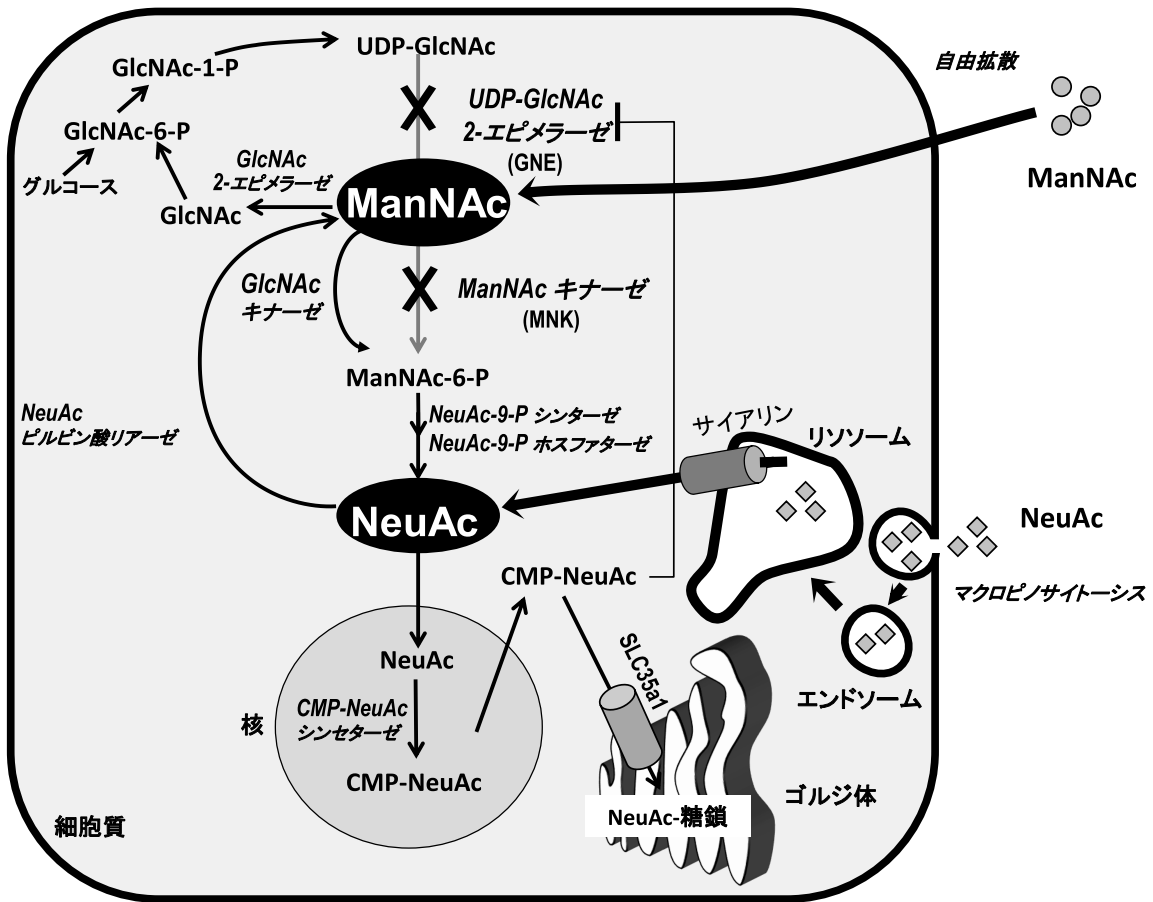


図1 哺乳類細胞でのシアル酸合成経路と外来性の NeuAc, ManNAc の取り込み経路
 DMRV/hIBM では、UDP-GlcNAc 2-エピメラーゼ (GNE)/ManNAc キナーゼ (MNK) の酵素活性が低下し、シアル酸合成が低下していると思われる。細胞外より、ManNAc または NeuAc を投与すると、両者は異なる経路で細胞内に取り込まれ、シアル酸の生合成が回復する。

GNE または MNK それぞれの活性の顕著な低下をもたらすが、他のドメインの活性への影響は小さい、③GNE ドメインの変異は酵素の完全な多量体形成を抑える、④スプライシング変異はタンパク質の安定化を著しく低下させる、ことがわかった⁸⁾。つまり、GNE/MNK は二つの酵素活性をもつが、変異によりどちらかの酵素活性が著しく低下していた。さらに、DMRV/hIBM 患者の骨格筋組織、血清、細胞ではシアル酸レベルの低下が認められた⁸⁾。面白いことに DMRV/hIBM 患者には、片方のアレルは GNE ドメインに変異をもち、一方のアレルは MNK ドメインに変異がある、異なるドメインに複合ヘテロ変異をもつ患者が存在する。この患者においても、シアル酸の低下が検出される。このことから、GNE/MNK 酵素不完全多量体中では、異なるサブユニット分子間での中間生成物 ManNAc の受け渡しはほとんどないと考えられ、一連の合成反応に

おいて GNE/MNK はサブユニット分子内でのみ反応が進むものと考えられた。後述するが、GNE^{-/-}細胞では、外来性に取り込まれた ManNAc から細胞内に大量に存在する GlcNAc キナーゼにより、シアル酸合成が行われる。ここで、GlcNAc キナーゼが細胞内に大量に存在すれば、ManNAc 合成ができるはずの MNK ドメインにのみ変異をもつ患者ではシアル酸が合成されるはずであるが、実際にはシアル酸量の低下が見られる。これは、変異した GNE/MNK から GlcNAc キナーゼへ ManNAc が受け渡されないからかもしれない。

4. DMRV/hIBM のモデルマウスの作成

遺伝子工学的手法により *Gne* 遺伝子进行操作することで、DMRV/hIBM に対するモデルマウスの作成を試みた。*Gne* 遺伝子ノックアウトマウス (*Gne*^{-/-}) は、胎生 9.5 日

齢で致死を示し、哺乳類の発生におけるシアル酸の重要性を示したが、同時に *Gne* 遺伝子が欠失すると生存できないことを示していた⁹⁾。これは前述の、DMRV/hIBM 患者では、少なくとも片方のアレルはミスセンス変異であること、いずれの変異酵素でも GNK または MNK の酵素活性がまったく活性が失われているものはなかったことと矛盾しない。そこで、ヒト変異 *GNE* (D176V 変異) を発現するトランスジェニックマウスを作製し、*Gne* 遺伝子ノックアウトヘテロマウス (*Gne* +/-) と掛け合わせることで、内在性 *Gne* 遺伝子が破壊されヒト変異 *GNE* だけを発現するマウス (*Gne* -/-h*GNED176VTg*) を作製した⁹⁾。このマウスは胎生致死を免れ、ほぼメンデル則に従い産出した。出生時に外見上の異常は認められなかったが、各臓器のシアル酸レベルは低下していた。興味深いことに、このマウスは加齢に伴い生存率が低下したが、ヒト DMRV/hIBM 患者に見られるほとんどのミオパシー症状の特徴を再現していた (図 2)⁹⁾。20 週齢を過ぎると、*Gne* -/-h*GNED176VTg* マウスは筋力低下と骨格筋の萎縮を示した。しかしながら、筋断面積当たりの収縮力 (比収縮力) は正常と変わらないことから、この週齢での骨格筋の筋力低下はむしろ骨格筋が萎縮することだけが原因であると考えられた¹⁰⁾。筋病理観察ではこの骨格筋萎縮は筋線維数の低下によるのではなく、それぞれの筋線維が萎縮した (小角化線維数の増加) ためであった。しかしながら、30 週齢を過ぎると、運動能力のさらなる低下とともに、比収縮力の低下が認められ、筋自体の収縮性能の低下が明らかとなった。筋病理観察では、さらに筋線維の大小不同が進むとともに、特に、腓腹筋では筋線維内にアミロイドなどの多数のタンパク質の蓄積が見られた。さらに、40 週齢を過ぎると、腓腹筋で筋収縮力の一層の悪化が見られた。こ

の筋収縮の悪化とともに、筋線維には縁取り空胞が見られ始め、電子顕微鏡観察により自己貪食空胞の蓄積が確認された¹¹⁾。これらの結果から、この *Gne* -/-h*GNED176VTg* マウスは、ヒト DMRV/hIBM の症状を再現する病態モデル動物であると受け入れられている。また、患者で見られる遺伝子変異を導入した *Gne* 遺伝子ノックインマウス (*Gne*^{M712T/M712T}) が作成されているが、ヒト DMRV/hIBM の症状を再現する動物は得られていない。

5. シアル酸代謝物投与による治療実験

シアル酸合成経路において、*GNE*/*MNK* 以外のシアル酸合成に関わる酵素は正常であると考えられたため、*GNE*/*MNK* 以降のステップで合成される代謝物を体外から補充することにより、シアリル化レベルが回復することが期待された (図 1)。*GNE*/*MNK* の欠失したリンパ腫細胞 BJA-B K20 及び K6 株や CHO 細胞株から単離された LEC3 細胞では、培地に ManNAc や NeuAc を添加することにより、細胞シアル酸レベルが回復することが報告されている¹²⁾。そこで、我々は、DMRV/hIBM 患者細胞を用いて、両物質の投与により、細胞のシアリル化レベルが回復するかを調べた⁸⁾。患者由来の骨格筋細胞では、ManNAc、NeuAc とともに、正常レベルまで細胞内シアル酸量を回復させた。この結果は、必ずしも DMRV/hIBM 患者への治療にあてはまるわけではないが、細胞レベルでの両物質の有効性を示していた。興味深いことに、最近の研究では、ManNAc と NeuAc の細胞内への取り込み経路が異なることが示されている。ManNAc は、拡散により細胞膜を透過し取り込まれると考えられており、NeuAc はマクロピノサイトーシスにより、エンドソーム・リソソーム系を介して取り込まれることが報告されている¹³⁾。

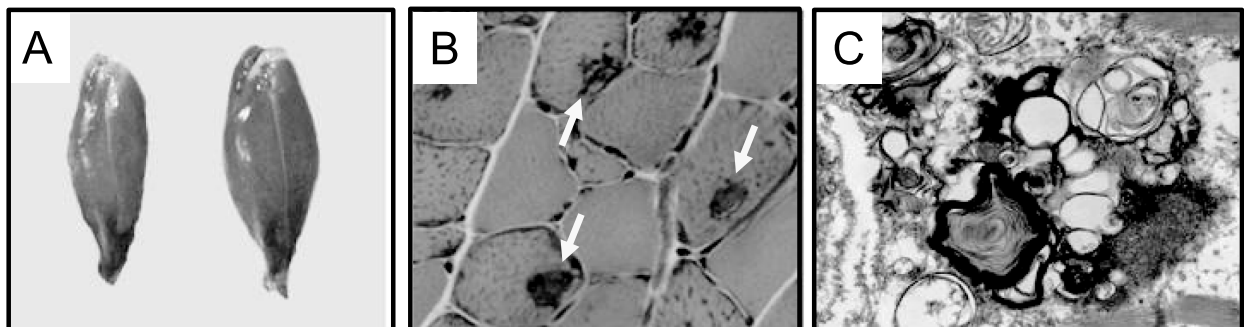


図 2 モデルマウスはヒト DMRV/hIBM の症状を再現する

A, 左: モデルマウス腓腹筋, 右: コントロールマウス腓腹筋. B, モデルマウス腓腹筋 HE 染色. 縁取り空胞 (矢印) が形成されている. C, モデルマウス腓腹筋電子顕微鏡像, 多数の自己貪食空胞とタンパク質の蓄積が認められる.

以前より、外来性のシアル酸の代謝試験が行われてきたが、すべての研究で投与されたシアル酸の急速な尿中への排出を示した。そこでまず、我々は、正常マウスへの NeuAc および ManNAc の投与法を検討した¹⁴⁾。腹腔内投与に比べ、経口投与のほうが尿中に排出されるまでの保持時間および2時間後の投与物の血中レベルにおいて優れていることがわかった。また、一度に大量に投与しても2時間後の血中レベルはほとんど変わらなかった。このことから、モデルマウスへの NeuAc および ManNAc の投与方法として、自由飲水により経口投与を用いることにした。

ミオパチー発症に対する予防効果を測定することを目的に、DMRV/hIBM モデルマウスへの糖化合物の投与試験を行った¹⁴⁾。発症前の5-15週齢から投与を開始し、すべての症状が観察される55週齢まで投与を続け、55週齢において、マウスの表現型により治療効果を判定した。はじめに、異なる用量(20, 200, 2000mg/kg 体重/日)での ManNAc 投与試験を検討したが、すべての用量で生存率の顕著な増加が見られた。マウスの表現型では、血清クレアチンキナーゼ活性低下と、運動能力および骨格筋の収縮力が、ほぼ正常レベルまで回復した。さらに、筋病理像にも顕著に改善が見られ、疾患に特徴的な筋線維内タンパク質の蓄積や縁取り空胞は全く見られなかった。ManNAc 投与マウスのシアル酸レベルは、様々な臓器で上昇していたが、特に骨格筋においてはほぼ正常の7割程度まで回復していた。次に、ManNAc と並行して、低用量(20mg/kg 体重/日)での NeuAc および天然に存在するシアル酸化合物として乳中に存在するシアリル乳糖の投与試験を行った。シアル酸による糖タンパク質の修飾はタンパク質のターンオーバーを伸ばすことが知られており、取り込まれたシアリル乳糖が、NeuAc と比較して体内により安定的に保持されることが期待された。ManNAc 投与と同様に、NeuAc とシアリル乳糖の投与においても、生存率、運動能力、骨格筋収縮力に顕著に改善が見られ、筋病理像はほぼ正常化していた。骨格筋シアル酸レベルでは、ManNAc 投与と同様の上昇が見られた。用いた3種類の化合物の長期投与における肝機能と腎機能への毒性は検出されなかった。

6. ま と め

上述のように、原因遺伝子が発見されて以来、シアル酸の低下と筋疾患発症との関連が議論的であった。我々を含むいくつかのグループで DMRV/hIBM 患者での低シアル酸を報告しているものの⁸⁾、他のグループは、DMRV/

hIBM 筋細胞やリンパ球では、ほとんどシアル酸の低下はないと報告している。さらに、*GNE* 遺伝子産物の機能についてシアル酸生合成とは別の機能に関わる可能性を報告している¹⁵⁾。我々は *GNE* 遺伝子産物が他の機能に関わっている可能性を否定するわけではないが、モデルマウスにより得られた一連の結果は、低シアル酸こそがこのミオパチー発症の最も重要な因子であることを示している。つまりシアル酸生合成経路の代謝物投与により骨格筋のシアル酸レベルを上昇させると、ミオパチーをも抑制できることを示した¹⁴⁾。今後は、シアル酸の骨格筋での生理的役割とともに、シアル酸低下から DMRV/hIBM 骨格筋で見られる症状(筋萎縮、筋力低下および筋変性)に至る分子メカニズムを解明する必要がある。

モデルマウスにおいて外来の NeuAc や ManNAc の摂取により、ミオパチー発症をほぼ完全に抑制できることが明らかになった。このことは、DMRV/hIBM の根本的治療実現の可能性が初めて科学的に示されたことを意味しており、今後の治療薬開発に向けた取り組みに科学的根拠を与えるものである。

- 1) Nishino, I., Malicdan, M.C., Murayama, K., Nonaka, I., Hayashi, Y.K., & Noguchi, S. (2005) *Acta Myol.*, 24, 80-83.
- 2) Nonaka, I., Noguchi, S., & Nishino, I. (2005) *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 5, 61-65.
- 3) Argov, Z. & Yarom, R. (1984) *J. Neurol. Sci.*, 64, 33-43.
- 4) Eisenberg, I., Avidan, N., Potikha, T., Hochner, H., Chen, M., Olender, T., Barash, M., Shemesh, M., Sadeh, M., Grabov-Nardini, G., Shmilevich, I., Friedmann, A., Karpati, G., Bradley, W.G., Baumbach, L., Lancet, D., Asher, E.B., Beckmann, J.S., Argov, Z., & Mitrani-Rosenbaum, S. (2001) *Nat. Genet.*, 29, 83-87.
- 5) Keppler, O.T., Hinderlich, S., Langner, J., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W., & Pawlita, M. (1999) *Science*, 284, 1372-1376.
- 6) 野口 悟, 埜中征哉 (2005) 生体の化学, 56, 384-385.
- 7) Nishino, I., Noguchi, S., Murayama, K., Driss, A., Sugie, K., Oya, Y., Nagata, T., Chida, K., Takahashi, T., Takusa, Y., Ohi, T., Nishimiya, J., Sunohara, N., Ciafaloni, E., Kawai, M. Aoki, M., & Nonaka, I. (2002) *Neurology*, 59, 1689-1693.
- 8) Noguchi, S., Keira, Y., Murayama, K., Ogawa, M., Fujita, M., Kawahara, G., Oya, Y., Imazawa, M., Goto, Y., Hayashi, Y.K., Nonaka, I., & Nishino, I. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 11402-11407.
- 9) Malicdan, M.C., Noguchi, S., Nonaka, I., Hayashi, Y.K., & Nishino, I. (2007) *Hum. Mol. Genet.*, 16, 2669-2682.
- 10) Malicdan, M.C., Noguchi, S., Hayashi, Y.K., & Nishino, I. (2008) *Physiol. Genomics*, 17, 106-115.
- 11) Malicdan, M.C., Noguchi, S., & Nishino, I. (2007) *Autophagy*, 3, 396-398.
- 12) Hong, Y. & Stanley, P. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 53045-53054.

- 13) Bardor, M., Nguyen, D.H., Diaz, S., & Varki, A. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 4228-4237.
- 14) Malicdan, M.C., Noguchi, S., Hayashi, Y.K., Nonaka, I., & Nishino, I. (2009) *Nat. Med.*, 15, 690-695.
- 15) Amsili, S., Shlomai, Z., Levitzki, R., Krause, S., Lochmuller, H., Ben-Bassat, H., & Mitrani-Rosenbaum, S. (2007) *Cell Death Differ.*, 14, 1916-1924.

野口 悟

(独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第一部)

Sialic acid-deficient myopathy

Satoru Noguchi (Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1, Ogawahigashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan)

オリゴデンドロサイトの発生過程と中枢脱 ミエリン疾患における Cdk5 の新しい役割

1. はじめに

哺乳類の中枢神経系を構成するグリア細胞はアストロサイト、上衣細胞、ミクログリア、そしてオリゴデンドロサイトから成る。このうちオリゴデンドロサイトの主な機能は、ニューロンの軸索周囲にミエリン（髄鞘）という分厚い絶縁層を作ることによって神経電気信号の跳躍伝導を可能にし、神経電位を軸索末端側へすばやく伝達すると同時に、軸索を強固に保護することである^{1,2)} (図 1)。そのため、発生期におけるミエリンの発達不全や脊索損傷などによるミエリン層の脱落は、神経伝達速度の低下、さらには知的障害および運動障害などの原因となることが知られている^{1,2)}。このように、グリア細胞はニューロンと互いに密接な関係を保ちながら、複雑で多機能な脳活動を支えている。我々のグループは、未だブラックボックスが多く残されているミエリンの発生メカニズムを探るべく、独自の培養系を構築し、研究を行っている。

2. Cdk5 とオリゴデンドロサイトのミエリン形成過程

1) ミエリン形成の三過程

「グリア細胞のミエリン形成過程は、ニューロンの軸索との密接な相互作用によって進行する」という観点から、我々のグループはその過程をグリア細胞の形態学的相違に基づき、三過程に分類している。stage I；軸索上でグリア

細胞が遊走・増殖する時期、stage II；グリア細胞の突起が伸長し始める分化期、stage III；軸索の周りに幾重もの層を形成していくミエリン成熟期、の三期である (図 1)。このうち、stage I と stage II 前期における中枢グリア細胞は、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell；OPC) とよばれている。

我々は、胎生 15 日目のラット大脳皮質から数回の継代とペトリ皿を用いることにより、精製度と分化能の高い OPC を得る培養系を構築した^{3,4)}。この培養系を用いると、stage I から III への変遷を試験管内で観察することが可能であると同時に、各過程を抽出して解析することができる。また、神経細胞との共培養によって、*in vivo* に近い条件下で、両者の相互作用を検出することができる。

2) サイクリン依存性キナーゼ 5

サイクリン依存性キナーゼ 5 (cyclin-dependent kinase；Cdk5) は、Cdk ファミリーに属するプロリン指向性のセリン・スレオニンキナーゼである。Cdk ファミリーのほとんどのメンバーは、サイクリンと結合して活性化され、増殖している細胞において細胞周期の制御に関与している。このなかで Cdk5 のみ、分裂を終えた神経細胞に高発現している。また、Cdk5 の活性化因子である p35 と p39 は脳に特異的に発現しているため、Cdk5 は主にニューロンで活性を示すと言われ、これまで多くの研究者によってニューロンにおける役割について数多くの報告がなされてきた。Cdk5 欠損マウスでは、発生期におけるニューロンの移動が正常に起こらず、大脳の構造に異常が生じることが知られている⁵⁾。また、Cdk5 がアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患に関与していることを示唆する報告がなされている^{6,7)}。このような背景のもと、Cdk5 がオリゴデンドロサイトにおいても、何らかの機能を果たしていると考え、その役割を探ることとした。

3) オリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走過程と Cdk5

オリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走過程は、様々な液性因子によって、時空間的に厳密に制御されている。このうち、platelet-derived growth factor (PDGF) AA は、ニューロンやアストロサイトから分泌され、OPC の PDGF α 受容体に作用して遊走・増殖期を正に司る、主要な液性因子の一つとして知られている^{8,9)}。そこで、Cdk5 が PDGF-AA リガンドによる OPC の遊走促進経路上に介在するかどうかを検討するため、Cdk5 の阻害剤として汎用されている roscovitine 存在下で PDGF による OPC の遊走実験を行った。その結果、roscovitine 存在下で、PDGF による OPC の遊走促進効果が強く抑制されることが判明した (図 2A)。