Dystroglycan Glycosylation and Its Involvement in Muscular Dystrophy

ジストログリカンの糖鎖修飾と筋ジストロフィー

Kanagawa, Motoi

Division of Molecular Brain Science, Kobe University Graduate School of Medicine Kobe, Hyogo 650–0017, Japan

FAX: +81–78–382–6288, E-mail: kanagawa@med.kobe-u.ac.jp

(Received on March 12, 2014, accepted on March 31, 2014)

Key Words: *dystroglycan, O-mannosyl glycosylation, muscular dystrophy, fukutin, gene therapy*

Abstract

Dystroglycan is a highly glycosylated peripheral membrane protein that functions as a cell surface receptor for proteins in the extracellular matrices and synapses. *O*-Mannosyl glycosylation is necessary for the ligand-binding activities of dystroglycan and a unique “post-phosphoryl moiety” modified *via* a phosphodiester linkage on the *O*-mannose likely forms the ligand-binding domain. Several proteins are involved in the process of this modification, the mechanism for which appears highly ordered. In various tissues, dystroglycan plays important physiological roles such as maintenance of muscle cell viability and structural development of the brain. Conversely, abnormal glycosylation causes a group of muscular dystrophy, collectively called “dystroglycanopathy,” which is often associated with brain abnormalities including type II lissencephaly and mental retardation. Here, we will be reviewing the structure, modification pathway, and physiological roles of dystroglycan glycosylation as well as their involvement in human diseases.

要 約

ジストログリカンは高度な糖鎖修飾をうける膜タンパク質で、細胞外マトリックスやシナプス分子の細胞表面受容体として機能する。ジストログリカンがリガンドと結合するためには、*O*-マンノース型の糖鎖修飾が必要で、なかでも、*O*-マンノース上にリン酸ジエステル結合を介して存在する“ポストリン酸構造”と呼ばれる修飾体が、リガンド結合に直接関与するドメインと考えられている。最近、ポストリン酸修飾にかかわる分子がいくつか同定され、精密な機序によって修飾が制御されていることがわかってきた。ジストログリカンは骨格筋の維持や脳の形成など、さまざまな組織で重要な役割を担っているが、その一方で、ジストログリカンの糖鎖異常はジストログリカノパチーと総称される、脳奇形（II型滑脳症）や精神発達遅滞などの中枢神経障害を伴う筋ジストロフィーの原因になる。本稿では、ジストログリカンの糖鎖構造、修飾機序、糖鎖機能と疾患との関連について概説する。

A. Introduction

Dystroglycan (DG) was originally identified from the skeletal muscle as a component of the dystrophin–glycoprotein complex (DGC) (1). DGC forms a structural linkage between the basement membranes and actin cytoskeletons, which provides physical strength to the skeletal muscle cell membrane. Within the DGC, the DG functions as a central axis by anchoring the dystrophin underneath the cell membrane, and binding to the basement membrane proteins such as laminin outside of the cells (2) (Fig. 1A). DG consists of α and β subunits, both of which are expressed from a single mRNA and cleaved into α DG and β DG during post-translational modifications (3). α DG is a highly glycosylated extracellular protein and functions as a ligand-binding subunit for binding to several ligand proteins, which commonly contain laminin G-like (LG) domains. β DG is a transmembrane subunit that anchors the α DG on the cell surface and binds to dystrophin inside the cells. β DG also possibly serves as a signaling molecule since it can be phosphorylated, and it interacts with several adaptor proteins (2,

A. はじめに

ジストログリカン (dystroglycan; DG) は、ジストロフィン–糖タンパク質複合体 (Dystrophin–glycoprotein complex; DGC) の成分として、骨格筋から発見されたのがはじめである (1)。DGCは、基底膜とアクチン骨格を結ぶ構造を形成しており、この連携によって筋細胞膜の物理的強度が維持されると考えられている。DGC内において、DGはジストロフィンを細胞膜直下につなぎとめる一方で、細胞外ではラミニンなどの基底膜分子と結合しており、細胞骨格と基底膜間を結ぶ分子軸として機能している (2) (図1A)。DGは α と β の二つのサブユニットからなるが、両者は単一のmRNAにコードされており、翻訳後修飾の過程で α DGと β DGに切断される (3)。 α DGは糖鎖が高度に修飾された細胞外サブユニットで、リガンドと結合する機能を担っている。 α DGのリガンド分子はいくつか知られているが、いずれも共通してラミニンG(LG)ドメインを持つ。 β DGは膜貫通型サブユニットで、細胞外では α DGを細胞膜表面につなぎとめておく一方で、細胞内ではジストロフィン

Fig. 1. Schematic representation of the dystrophin-glycoprotein complex and dystroglycan. (A) The dystrophin-glycoprotein complex (DGC). (B) The domain structure of dystroglycan. SP, signal peptide; and TM, transmembrane.

4). α DG consists of three domains, two globular domains at the N- and C-termini and a mucin-like domain between them (Fig. 1B). The mucin-like domain contains more than 40 Ser/Thr residues that form *O*-glycan clusters. The N-terminal globular domain is essential for *O*-glycosylation to proceed in the mucin-like domain; however, the N-terminal domain is cleaved and shed from the α DG core portion after the completion of glycosylation, and therefore not present in mature α DG (5).

In 1997, Endo and colleagues discovered a unique *O*-mannosyl glycan on α DG (Sia α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 2Man) (6), which is the first *O*-mannose (*O*-Man) type glycan identified in mammals. In 2010, Campbell and colleagues reported the presence of a novel moiety that is modified on *O*-Man via a phosphodiester linkage, and proposed that this moiety forms a ligand-binding domain (7). In the early 2000s, there were consecutive reports from several groups about the incidence of abnormal α DG glycosylation in congenital and limb-girdle type muscular dystrophies, which included Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD), Walker-Warburg syndrome (WWS), and muscle-eye-brain (MEB) disease (8, 9). The abnormal glycosylation of α DG corresponds to reduction in ligand-binding activities and is a common characteristic of these disorders, which are therefore collectively termed as

と結合している。 β DGはタンパク質リン酸化をうけることや、アダプター分子と結合することなどから、シグナル分子としての機能を持つことも知られている(2, 4)。 α DGはN末とC末にある二つの球状ドメインと、それらに挟まれるムチン様ドメインに分けられる(図1B)。ムチン様ドメインには40以上のセリンやスレオニン残基が存在し、*O*型糖鎖のクラスターが形成されている。N末球状ドメインはムチン様ドメインに生じる*O*型糖鎖修飾に不可欠な領域であるが、糖鎖修飾完了後にプロセッシングされるため、細胞膜上に発現している成熟型 α DGには存在しない(5)。

1997年、遠藤らは α DGにユニークな*O*-マンノース(*O*-Man)型糖鎖(Sia α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 2Man)が存在することをつきとめた(6)。この構造は哺乳類で初めて発見された*O*-Man型糖鎖である。2010年、Campbellらは*O*-Man上にリン酸ジエステル結合を介して存在する新規修飾構造が存在することを報告し、これがリガンド結合に関与すると提唱した(7)。2000年代前半には、福山型筋ジストロフィー(FCMD)、Walker-Warburg症候群(WWS)、筋眼脳病(MEB病)をはじめ、先天型や肢帯型筋ジストロフィー患者において α DGの糖鎖修飾に異常が見られることが連続的に報告さ

Table 1. Dystroglycanopathy genes and their functions.

Dystroglycanopathy genes	Gene functions
<i>POMT1</i>	<i>O</i> -Mannosyl transferase (POMT1/2 complex)
<i>POMT2</i>	<i>O</i> -Mannosyl transferase (POMT1/2 complex)
<i>POMGNT1</i>	Protein <i>O</i> -mannose β 1,2-GlcNAc transferase
<i>FKTN</i>	Unknown, involved in post-phosphoryl modification?
<i>FKRP</i>	Unknown, involved in post-phosphoryl modification?
<i>LARGE</i>	Synthesis of Xyl-GlcA repeating units
<i>ISPD</i>	Unknown
<i>GTDC2/POMGNT2</i>	Protein <i>O</i> -mannose β 1,4-GlcNAc transferase
<i>DAG1</i>	Dystroglycan, reduced interaction with LARGE
<i>TMEM5</i>	Unknown
<i>B3GALNT2</i>	β 1,3-GalNAc transferase
<i>SGK196/POMK</i>	<i>O</i> -Man kinase
<i>B3GNT1</i>	β 1,3-GlcNAc transferase
<i>GMPPB</i>	GDP-mannose pyrophosphorylase B
<i>DPM1</i>	Dol-P-Man synthesis
<i>DPM2</i>	Dol-P-Man synthesis
<i>DPM3</i>	Dol-P-Man synthesis
<i>DOLK</i>	Dolichol phosphate synthesis

“dystroglycanopathy” (10, 11). Apart from skeletal muscles, dystroglycanopathy is also associated with abnormalities in the central nervous system and the eyes, which signifies the physiological importance of α DG glycosylation in various tissues. Currently, more than 15 genes, in which mutations cause abnormal glycosylation of α DG resulting in human disease, have been identified (Table 1). In this review, I will introduce the recent advances that have contributed to the understanding of α DG, especially its sugar chain structure, modification pathway, physiological roles, and relationship with human diseases.

B. Sugar Chain Structure and Modification Mechanism of Dystroglycan

The currently known *O*-mannosyl glycan structures of α DG and dystroglycanopathy genes are shown in Fig. 2 and Table 1, respectively. Core M1 and Core M3 were originally identified from the bovine peripheral nerve (6) and HEK293 cells that expressed recombinant α DG proteins (7), respectively. Core M2 is an unidentified structure to date that presumably exists since *N*-acetylglucosaminyltransferase IX (GnT-IX) can transfer GlcNAc to *O*-Man (12). The *O*-Man in Core M3 is phosphorylated and a unique moiety is modified through a phosphodiester linkage on the *O*-Man. Since its complete structure has not yet been elucidated, this

れた(8, 9)。 α DGの糖鎖異常とリガンド結合能の消失が共通した分子病態であることから、これらの疾患はジストログリカノパチーと総称される(10, 11)。ジストログリカノパチーは筋病変のみならず、中枢神経障害や眼症状を伴う場合も多く、 α DGの糖鎖がさまざまな組織において重要な働きをしていることが示唆される。現在では15種以上の遺伝子が α DG糖鎖修飾や病変に関与することが知られている(表1)。本稿では、 α DGの糖鎖構造、修飾機序、生理機能、疾患とのかかわりについて最近の知見を概説する。

B. ジストログリカンの糖鎖構造と修飾機序

現在のところ明らかになっている α DGの*O*-Man型糖鎖構造を図2に、ジストログリカノパチー原因遺伝子を表1に記す。Core M1はウシ末梢神経より精製した α DGから(6)、Core M3はHEK293細胞に発現させた組み換え α DGから最初に発見された(7)。*N*-Acetylglucosaminyltransferase IX (GnT-IX)が*O*-ManにGlcNAcを転移する活性があるため、Core M2が修飾されている可能性も示唆される(12)。Core M3の*O*-Manはリン酸化されており、さらにリン酸ジエステル結合を介して修飾される構造が存在すると示唆されている。この修飾構造の詳細は完全には明らかにされていないため、“ポ

Fig. 2. Sugar chain structures of α DG. Unique O-Man glycans of α DG are illustrated.

structure has been tentatively termed as the “post-phosphoryl moiety” or “post-phosphoryl modification.” It is likely that this post-phosphoryl moiety contains repeat units consisting of xylose (Xyl) and glucuronic acid (GlcA), which are assembled as a result of the enzymatic activity of LARGE (like-acetylglucosaminyltransferase) (13). The details of the linker structure between the phosphorylated Man (Man-P) and the Xyl-GlcA repeats are unknown to date.

Protein O-mannosyltransferase (POMT) 1 and POMT2 were both identified as the genes responsible for WWS (14, 15). POMT1 and POMT2 localize to the endoplasmic reticulum (ER) and form a POMT1/POMT2 heterocomplex (16). This POMT complex catalyzes the transfer of a mannosyl residue from dolicholphosphate mannose (Dol-P-Man) to the Ser and Thr residues of α DG. Protein O-linked mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase1 (POMGNT1) was cloned from a cDNA sequence that is homologous to N-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I, encoded by *MGAT1*), and was identified as a causative gene for MEB (17). POMGnT1 is a glycosyltransferase that catalyzes the formation of the GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 2Man linkage by transferring GlcNAc from a UDP-GlcNAc to O-Man. It has been reported that the enzymatic removal of NeuAc, Gal, and GlcNAc from Core M1 does not affect the ligand-binding activity of α DG, which suggests that Core M1 may not directly serve as a ligand-binding domain (18). However, in POMGnT1-deficient mice and fibroblasts from MEB patients, the post-phosphoryl modification is partially disrupted, raising the possibility that the structure of Core M1 may influence the biosynthesis of Core M3/post-phosphoryl moiety (7, 19).

Glycosyltransferase-like domain containing 2 (GTDC2, POMGNT2), β 1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (B3GALNT2), and SGK196 (POMK) are newly discovered dystroglycanopathy gene products that are involved in the synthesis of Core M3 (20–23). GTDC2 (alternatively called AGO61) is localized in the ER, and it catalyzes the formation of the GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 4Man linkage by the transfer of GlcNAc from a UDP-GlcNAc to the O-mannosyl peptide derived from α DG. B3GALNT2 is also localized in the ER, and it catalyzes the formation of the

ストリン酸構造”や“ポストリン酸修飾”と呼ばれている。ポストリン酸構造には、LARGE (like-acetylglucosaminyltransferase) の糖転移酵素活性によって形成されるキシロース (Xyl) とグルクロン酸 (GlcA) からなる繰り返し構造が含まれる可能性が高い(13)。リン酸化ManとXyl-GlcAリピートを結ぶ構造はまだ明らかにされていない。

Protein O-mannosyltransferase (POMT) 1とPOMT2は、いずれもWWS原因遺伝子として同定された(14, 15)。両者は小胞体 (ER) に局在し、POMT1/POMT2複合体を形成したうえで、ドリコールリン酸マンノース (Dol-P-Man) を糖供与体として、 α DGのセリン/スレオニン残基へのMan転移反応を触媒する(16)。Protein O-linked mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase1 (POMGNT1) は、N-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I; 遺伝子名*MGAT1*) との相同性をもとにクローニングされ、MEB病の原因遺伝子としても同定された(17)。POMGnT1は、UDP-GlcNAcを糖供与体として、GlcNAcを β 1,2結合でO-Manに転移する酵素である。Core M1から酵素的にNeuAc、Gal、GlcNAcを除去しても α DGのリガンド結合能が維持されているとの報告があり、Core M1はリガンド結合部位として機能していない可能性も報告されている(18)。一方、POMGnT1-欠損マウスやMEB病患者由来の細胞では、Core M1のみならず、ポストリン酸修飾も部分的に不全となるため、Core M1がCore M3/ポストリン酸修飾を調節している可能性が考えられる(7, 19)。

Glycosyltransferase-like domain containing 2 (GTDC2, POMGNT2)、 β 1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (B3GALNT2)、SGK196 (POMK) は、比較的新しく同定されたジストログリカノパチー原因遺伝子産物で、Core M3の生合成に関与する(20–23)。GTDC2 (AGO61とも呼ばれる) はUDP-GlcNAcを糖供与体としてO-ManにGlcNAcを β 1 $\rightarrow$ 4結合で、B3GALNT2はUDP-GalNAcを糖供与体としてGlcNAc β 1 $\rightarrow$ 4ManのGlcNAc残基にGalNAcを β 1 $\rightarrow$ 3結合で転移させる酵素で、いずれもERに局在することが示唆さ

GalNAc β 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc linkage by transferring GalNAc from a UDP-GalNAc. SGK196 catalyzes the addition of a phosphate group from ATP to position 6 on the *O*-Man residues in the Core M3 structure. SGK196 cannot phosphorylate an *O*-mannosyl or a GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 4Man peptide, indicating that the GalNAc β 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 4Man structure serves as a recognition motif for SGK196. Mutations in any molecule that participates in the synthesis of Core M3 result in dystroglycanopathy. Therefore, highly ordered and sequential actions of the POMT complex, GTDC2, B3GALNT2, and SGK196 are required for subsequent post-phosphoryl modifications. It is not known whether Core M1 and Core M3 can be simultaneously modified on the same *O*-Man residues. In addition, since defects in either Core M1 or Core M3 synthesis result in the loss of ligand-binding activities of α DG, it is necessary to uncover the nature of their relationship in the biosynthetic pathway, and/or in the state of ligand-binding.

LARGE was originally discovered as a gene that was defective in meningiomas (24), and later shown to be causative for spontaneous muscular dystrophy in *Large*^{myd} mice (25) and congenital muscular dystrophy 1D (MDC1D) in humans (26). LARGE possesses both xylosyltransferase and glucuronyltransferase activities that produce repeating units of [-3Xyl α 1 $\rightarrow$ 3GlcA β 1-] using UDP-GlcA and UDP-Xyl as donor substrates (13). Enzymatically synthesized Xyl-GlcA repeats bind to laminin, and their ligand-binding capacity is associated with the length of the repeats (27). Overexpression of LARGE produces hyperglycosylated α DG that has increased ligand-binding activity, which is likely due to the formation of longer and/or more repeating units. Taken together, it appears that the repeating Xyl-GlcA units function as the ligand-binding epitopes of α DG. For the functional maturation of α DG, the enzymatic activities of LARGE as well as the physical interaction between LARGE and the α DG N-terminal domain are required (5). Thus, the N-terminal domain serves as a recognition motif for LARGE, thereby providing substrate specificity for this unique modification. The N-terminal domain of α DG is cleaved by furin-like proteases after the glycosylation is completed, and therefore not present in the mature form of α DG. The significance of this cleavage has not yet been understood. Since glycosylation, which is necessary for ligand-binding takes place at a few amino acids downstream of the cleavage site, it possibly provides a stereochemically efficient structure for interaction with the ligands (28). It has been shown that LARGE forms a complex with β 3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (β 3GnT1, encoded by *B3GNT1*), an enzyme that synthesizes i-antigen (a linear poly-*N*-acetylglucosamine), and this complex is necessary for the functional glycosylation of α DG (29). Mutations in *B3GNT1* were identified in WWS patients (30); however, the roles of β 3GnT1 or the LARGE/

SGK196はATPを基質にCore M3のMan6位をリン酸化する活性を持つ。SGK196は、*O*-マンノシルペプチドやGlcNAc β 1 $\rightarrow$ 4Manペプチドをリン酸化できないため、GalNAc β 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 4Man構造がSGK196の認識モチーフになっていると考えられる。Core M3形成に関与するいずれの遺伝子に変異が生じてもジストログリカノパチーとなるため、POMT複合体、GTDC2、B3GALNT2、SGK196が順序だって酵素活性を発揮することが、ポストリン酸修飾に必要である、という秩序だった機序が成立している。一方で、Core M1、Core M3いずれの異常によっても α DGのリガンド結合能が消失するため、生合成過程やリガンド結合状態における両者の関係性に興味を持たれる。

*LARGE*は髄膜腫で頻繁に見られる欠失領域に位置する遺伝子として報告され(24)、後に、自然発症の筋ジストロフィーマウスである*Large*^{myd}マウスの原因遺伝子(25)、次いで、先天性筋ジストロフィー(MDC)1D型の原因遺伝子であることが明らかになった(26)。LARGEはキシロース転移酵素活性とグルクロン酸転移酵素活性をもち、UDP-XylとUDP-GlcAを糖供与体として[-3Xyl α 1 $\rightarrow$ 3GlcA β 1-]の繰り返し構造を生成する(13)。試験管内で合成したXyl-GlcA繰り返し構造には、ラミニン結合活性があること、また、繰り返し鎖長とリガンド結合量が相関することも示されている(27)。LARGEを過剰発現させると α DGの糖鎖修飾が高度に進行し、リガンド結合活性も増強するが、これは繰り返し鎖長や修飾部位が増加するためであろう。以上より、Xyl-GlcA繰り返し構造は α DGのリガンド結合部位として機能していると考えられる。LARGE酵素活性に加えて、LARGEと α DGのN末球状領域とのタンパク質相互作用もまた α DGの機能的発現に必要である(5)。 α DGのN末領域がLARGEによって認識されることが、LARGE依存のユニークな翻訳後修飾の特異性に必要と考えられる。N末領域は、糖鎖修飾完了後、furin型のプロテアーゼによって切断されるため、成熟した α DGには存在しない。このプロセシングの意義は明らかになっていないが、リガンド結合にかかわる糖鎖修飾部位が切断部位の直後に位置することから、リガンドと糖鎖の結合をより効率的に行うためと推察される(28)。LARGEは β 3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (β 3GnT1; 遺伝子名*B3GNT1*)と結合することも報告されている(29)。 β 3GnT1はi抗原(poly-*N*-acetylglucosamine)の合成に関与する糖転移酵素で、 β 3GnT1/LARGE複合体形成が α DG糖鎖修飾に必要とされる。*B3GNT1*変異がWWS患者に見いだされているが(30)、 β 3GnT1活性や β 3GnT1/LARGE複合体が、どのように α DG糖鎖修飾に関与しているかは明らかにされていない。

β 3GnT1 complex in the functional maturation of α DG remain unknown.

Fukutin (FKTN) was identified as the gene responsible for FCMD (31), and a homolog for fukutin was later identified based on sequence homology. The gene product of this homolog was called fukutin-related protein (FKRP) (32). Mutations in FKRP were reported in patients with MDC1C and limb-girdle muscular dystrophy type 2I (LGMD2I) (32, 33). Both fukutin and FKRP proteins are localized in the Golgi apparatus and are involved in the post-phosphoryl modifications of α DG (7, 19); however, their exact functions remain unknown. A region in the fukutin protein is homologous to bacterial proteins involved in polysaccharide/phosphorylcholine modifications and a yeast protein involved in the mannosyl phosphorylation of oligosaccharides (34). Another report proposed that fukutin and FKRP belong to the nucleotidyltransferase (NTase) fold protein superfamily (35). These database retrieval studies may provide some hints about the functions of fukutin and FKRP. *TMEM5* is a newly discovered dystroglycanopathy gene that encodes the transmembrane protein 5 (22, 36). *TMEM5* protein contains the exostosin-family domain found in *EXT1*, a glycosyltransferase required for the biosynthesis of heparan sulfate. Even though the exact function of *TMEM5* is unknown, it is believed to be a glycosyltransferase. The isoprenoid synthase domain-containing protein (ISPD) belongs to the family of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) synthase, and mutations in the *ISPD* gene were found in WWS patients (37, 38). *IspD* contributes to the synthesis of isoprenoid precursors in the methylerythritol phosphate (MEP) pathway in *Escherichia coli*; however, it is postulated that the MEP pathway is absent in mammals. Therefore, specific roles of ISPD especially in relation to α DG glycosylation are still unknown in humans. It has been proposed that the function of ISPD is crucial for the efficient POMT-dependent *O*-mannosylation or synthesis of a novel nucleotide sugar that is required for α DG glycosylation.

Dolichol-phosphate mannose (Dol-P-Man) acts as a mannose donor in reactions that include *N*-glycosylation, *O*-mannosylation, and glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor biosynthesis in the ER lumen. The synthesis of Dol-P-Man from GDP-Man and dolichol phosphate is catalyzed by the DPM complex, which consists of the catalytic component DPM1 and the ER-localized transmembrane proteins, DPM2 and DPM3. Mutations in *DPM1*, *DPM2*, or *DPM3* have been identified in patients that show dystroglycanopathy with a type I congenital disorder of glycosylation (CDG) (39–41). CDG is a heterogeneous group of rare genetic disorders that were originally defined as defects in the *N*-glycosylation process, and now reclassified to include *O*-linked and lipid glycosylation defects. In addition, mutations in the gene for dolichol kinase (*DOLK*),

フクチン (fukutin; *FKTN*) はFCMD原因遺伝子として同定された(31)。その後、フクチンと相同性のある分子として *fukutin-related protein (FKRP)* がクローニングされ(32)、その変異がMDC1Cや肢帯型筋ジストロフィー2Iの原因となることが報告された(32, 33)。フクチンとFKRPはゴルジ体に局在し、 α DGのポストリン酸修飾に関与することが示唆されているが(7, 19)、現在のところ、両者の活性については明らかにされていない。フクチンは、バクテリアの多糖やコリンリン酸修飾にかかわるタンパク質や、酵母多糖のマンノシルリン酸化にかかわるタンパク質と相同性領域を含むこと(34)、また、フクチンとFKRPは、nucleotidyltransferase (NTase) foldスーパーファミリーに分類されることが報告されており(35)、フクチンやFKRP活性同定の手がかりになるかもしれない。最近発見されたジストログリカノパチー原因遺伝子の *TMEM5* は、exostosin glycosyltransferase 1 (*EXT1*) に見られる exostosin ファミリー領域を含む膜貫通型のタンパク質と予想される(22, 36)。EXT1はヘパリン硫酸の生合成に必要な糖転移酵素であるため、TMEM5もまた糖転移酵素と考えられるが、その活性はまだ明らかにされていない。Isoprenoid synthase domain containing protein (ISPD) は4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) synthase ファミリーに属し、*ISPD* 遺伝子変異がWWS患者において同定されている(37, 38)。大腸菌 *IspD* は、イソプレノイド前駆体の合成にかかわるメチルエリスリトールリン酸 (methylerythritol phosphate; MEP) 経路にかかわるが、哺乳類に MEP 経路は存在せず、ヒトにおける ISPD の機能、特に α DG 糖鎖修飾にどのようにかかわっているかは不明である。ISPDがPOMT依存の*O*-マンノシル化に関与しているとの説や、 α DGの糖鎖修飾に必要な新規の糖ヌクレオチドの生合成にかかわるとの推察もある。

ドリコールリン酸マンノース (Dolichol-phosphate mannose; Dol-P-Man) は、小胞体での*N*型糖鎖修飾、*O*型糖鎖修飾、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー (GPI) などの生合成にかかわるマンノシル化の供与体で、DPM合成複合体によって、GDP-Manとドリコールリン酸から合成される。DPM合成複合体は、触媒酵素DPM1と、ER局在型膜タンパクのDPM2とDPM3からなる。ジストログリカノパチー症状と先天性糖鎖異常症 (Congenital disorders of glycosylation; CDG) I型を合併する症例において、*DPM1*、*DPM2*、*DPM3*の変異が同定されている(39–41)。CDGは*N*型糖鎖修飾経路の異常を伴った希少疾患群と定義されていたが、最近では、*O*型糖鎖や糖脂質合成経路の異常も含まれる。DPM合成複合体の変異以外にも、ドリコールリン酸生成に

which is responsible for the formation of dolichol phosphate, were discovered in patients with CDG and dilated cardiomyopathy. The heart tissues in these patients showed abnormal *O*-mannosylation of α DG (42). Mutations in the GDP-mannose pyrophosphorylase B (*GMPPB*) gene were recently reported in dystroglycanopathy patients (43). Presumably, mutations in *GMPPB* result in a decrease in GDP-Man, and consequently Dol-P-Man levels. Taken together, the defects in the Dol-P-Man synthesis pathway should perturb *O*-mannosylation of α DG. However, it is expected that defects in the Dol-P-Man synthesis would also affect *O*-mannosylation, *N*-glycosylation, and GPI anchor formation of other proteins. In fact, defects in *N*-glycosylation have been revealed in patients with DPM mutations. On the other hand, it is interestingly to note that in all the originally reported cases of *GMPPB* mutations, there was no evidence of perturbed *N*-glycosylation. It is not clear why *O*-mannosylation of α DG is selectively affected in such cases; however, this finding suggests that there may be some competition and/or preference for a common substrate for the *N*- and *O*-glycosylation pathways. The questions, whether gene mutations in the Dol-P-Man biosynthesis pathway can be attributed to a cause of dystroglycanopathy, remains controversial.

C. Ligand Proteins of DG

Several extracellular matrix and synaptic proteins such as laminins (44–47), agrin (48, 49), perlecan (50), neuexin (51), pikachurin (52), and Slit (53) are known to be ligands of α DG. All these ligand proteins contain LG domains, which function as binding sites for α DG. Since *O*-mannosylations and post-phosphoryl modifications are required for the ligand-binding activities of α DG, the DG–ligand interactions are dramatically reduced in dystroglycanopathy.

Laminin is a major component of the basement membrane and is composed of three subunits (α , β , and γ) (54). The expression patterns of each isoform of laminin (currently more than 15 different isoforms are known) differ among different tissues and cells. In the skeletal muscle basement membrane, the laminin α 2 subunit of the main laminin isoform (laminin-211, composed of α 2, β 1, and γ 1 subunits) interacts with the α DG on the muscle cell surface. Mutations in the coding regions of the laminin α 2 chain gene are the causative factors for MDC1A, which substantiates the biological importance of laminin–DG interactions (55). Agrin is a heparan sulfate proteoglycan and agrin–DG interactions play important roles in the structural maintenance and stabilization of neuromuscular junctions (56). Perlecan is also a heparan sulfate proteoglycan and one of the major components of basement membranes. The relatively high binding affinities in perlecan–DG interactions possibly indicate certain specific roles of these interactions (45).

関与するドリコールキナーゼ (*DOLK*) 変異も拡張型心筋症と CDG を合併した患者から同定されており、患者心筋での α DG 糖鎖異常が認められている (42)。また、GDP-mannose pyrophosphorylase B 遺伝子 (*GMPPB*) の変異もジストログリカノパチー患者から報告されている (43)。GMPPB 変異によって、GDP-Man の合成量が減少し、結果として Dol-P-Man 量も低下すると推察される。つまり、これらの疾患では、Dol-P-Man 合成経路の異常によって、 α DG の糖鎖修飾にも影響が及んだものと考えられる。しかし、Dol-P-Man 合成障害は、 α DG 以外の *O*-マンノシル化や *N*型糖鎖修飾、GPI アンカーの形成などにも影響するはずである。実際、DPM 変異患者は *N*型糖鎖修飾異常も併せ持つ。一方で、GMPPB 変異患者では *N*型糖鎖異常を認めないケースもある。このケースのように Dol-P-Man 合成経路の異常が、 α DG の *O*-マンノシル化に選択的に作用する理由は不明だが、*O*-マンノシル化経路と *N*型糖鎖修飾経路の競合や共通基質の選択性の違いなどが原因かもしれない。Dol-P-Man 合成経路に関する遺伝子変異が、ジストログリカノパチー原因遺伝子と定義できるかについては議論の余地が残されている。

C. DG のリガンド

α DG のリガンドとしては、ラミニン (44–47)、アグリン (48, 49)、パールカン (50)、ニューレキシシン (51)、ピカチュリン (52)、Slit (53)、といった細胞外マトリクス分子やシナプス分子などが知られている。いずれもラミニン G (LG) ドメインを含む構造を持つが、この LG ドメインが α DG との結合部位になっている。*O*-Man 型糖鎖修飾とポストリン酸修飾は α DG のリガンド結合活性に不可欠なため、ジストログリカノパチーでは、 α DG のリガンド結合活性が劇的に低下している。

ラミニンは基底膜を構成する主要成分の一つで、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の三つのサブユニットからなる (54)。現在 15 種以上のアイソフォームが知られているが、それぞれの発現は組織や細胞によって異なる。骨格筋の基底膜では、ラミニン 211 (α 2, β 1, γ 1) が主に発現しており、ラミニン α 2 鎖を介して筋細胞表面の α DG と結合している。ラミニン α 2 遺伝子の変異が MDC1A の原因になることから、ラミニンと DG 結合の重要性がうかがえる (55)。アグリンはヘパラン硫酸プロテオグリカンで、DG との結合は神経筋接部の構造的な維持や安定性に重要とされている (56)。パールカンもまた基底膜を構成する主要なヘパラン硫酸プロテオグリカンのひとつである。パールカンは DG に対して比較的高い結合親和性を示すことから、パールカンと DG との結合は何らかの特異的

Neurexins are transmembrane proteins that are expressed in the nervous system. There are two families of neurexins, α - and β -neurexins, and both families can bind to α DG. Neurexins are cell adhesion molecules, which are mostly located on the presynaptic membranes; whereas, evidence suggests that the synaptic α DG is expressed on the postsynaptic membranes (57). The significance of the neurexin-DG interactions is still unclear, but it may possibly be involved in synapse formation and/or maintenance. Pikachurin is expressed in the synaptic clefts of the photoreceptor ribbon synapses. The pikachurin-DG interactions play important roles in the maintenance of retinal synapse structures, synaptic signal transmissions, and visual functions (52, 58). Slit is a protein widely referred to as a repulsive axon guidance cue and Robo is its known transmembrane receptor. Slit-DG interactions are required for the proper localization of Slit, suggesting a new function for α DG as an extracellular scaffold for controlling axon guidance (53).

α DG-ligand interactions are calcium-dependent, and the LG domains in the ligand proteins commonly contain Ca^{2+} -coordinating residues (59, 60). Some ligand proteins contain several LG domains, which exhibit higher affinity to α DG when they are adjacent to each other and in tandem, than when present as a single LG domain. This indicates that these tandem LG domains lead to the formation of multiple Ca^{2+} binding sites and therefore stable interactions with negatively-charged post-phosphoryl moieties of α DG. DG is expressed in almost all tissues and cells, but its glycosylation patterns differ among various tissues (19). It is possible that the variable glycosylation pattern of α DG leads to ligand selectivity. A recent study has suggested that the length of repeating units of Xyl-GlcA is a determinant for the ligand binding capacity (27). In some normal tissues, the post-phosphoryl modifications are either lacking (testis) or less modified (lung) (19). Therefore, it is believed that various parameters including α DG glycosylation patterns, local concentrations of ligand proteins on the cell surface, and ligand binding affinities are critical for the various physiological functions of α DG-ligand interactions (61).

α DG is also known as a cellular receptor for arenaviruses such as lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) and Lassa fever virus (LASV), and serves as an entry route for these viruses into host cells (62–64). The α DG-viral interactions also require *O*-mannosyl glycosylation and LARGE-dependent modifications. The viral binding sites partly overlap with those of the matrix ligands. It is believed that the viral envelope glycoprotein, GP1 mediates receptor binding and subsequent cell entry. There are some differences between the LG-domain ligands and the viruses in their binding properties, e.g., binding of the viruses is not calcium-dependent whereas LG domain binding is calcium-dependent.

な役割を担っている可能性が考えられる(45)。

ニューレキシンは神経組織に発現する膜貫通型の分子で、 α と β の2種類のニューレキシンがあるが、いずれも α DGと結合する。ニューレキシンと α DGとの結合の生理的意義は解明されていないが、ニューレキシンがプレシナプスに発現する細胞接着分子であること、そしてDGがポストシナプスに発現していることから(57)、シナプスの形成や維持に関与している可能性がある。ピカチュリンは網膜光受容体のリボンシナプスに発現しており、DGとの結合は網膜シナプスの構造、信号伝達、視覚機能の維持に重要とされている(52, 58)。Slitは軸索伸長を反発する効果を持つ軸索誘導因子で、その膜型受容体としてはRoboが知られている。DGとの結合はSlitの正常な局在に必要とされることから、DGが軸索誘導を制御する細胞外の足場として機能している新たな可能性が考えられる(53)。

α DGとリガンドとの結合はカルシウム依存的であり、リガンド分子のLGドメインには Ca^{2+} を配位するアミノ酸残基が保存されている(59, 60)。リガンド分子の多くは複数のLGドメインを持つが、個々のLGドメイン単独よりも、LGドメインがタンデムになることで、 α DGへの結合親和性が増加することが多い。LGドメインがタンデムになることで複数の Ca^{2+} 結合部位が生まれ、負電荷性のポストリン酸糖鎖とより効率的に結合できると考えられる。DGはほとんどすべての組織で発現しているが、糖鎖修飾パターンは組織や細胞によって異なる(19)。このような糖鎖修飾パターンの違いがリガンド選択性に関与する可能性が考えられる。例えば、Xyl-GlcAの繰り返し鎖長がリガンド結合量に関係することが明らかになった一方で(27)、正常組織であってもポストリン酸糖鎖が全く修飾されない組織(精巣)や、その量が極めて少ない組織(肺)もある(19)。つまり、 α DG糖鎖修飾パターン、リガンド分子の細胞表面での局在・濃度、DG親和性や結合量などの要素が、種々のリガンド-DG結合に多様な生理的意義を与えていると推察される(61)。

ところで、 α DGはリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)やラッサ熱ウイルス(LASV)などのアレナウイルスの細胞受容体であり、これらのウイルスの細胞侵入経路にもなる(62–64)。LGドメインを持つリガンド分子の場合と同様に、*O*-Man型糖鎖修飾とLARGE依存の修飾がウイルスとの結合に必要である。また、ウイルス結合部位もLGドメイン含有リガンド分子の結合部位と部分的に重なっている。ウイルスエンベロープの糖タンパク質GP1が結合にかかわるとされるが、カルシウム非依存的な結合など、LGドメイン含有リガンド分子との結合様式とは若干の違いがある。

D. Human Disorders Caused by Abnormal Glycosylation of α -DG (Dystroglycanopathy)

Muscular dystrophy is a heterogeneous group of genetic disorders that is characterized by the progressive loss of muscle strength and integrity (65). To date, more than 40 genes that are responsible for muscular dystrophy have been identified. In 2001, Hayashi and colleagues reported that the reactivity of the monoclonal antibody IIH6, which is believed to recognize a portion of the *O*-glycan structure of α DG, is dramatically reduced in FCMD patients (8). Subsequently, Campbell and colleagues confirmed that the α DG proteins from FCMD, WWS, and MEB patients are abnormally glycosylated, and have lost their ligand-binding activities (9). Later, mutations in *FKRP* and *LARGE* genes were identified in congenital and limb-girdle type muscular dystrophy patients who also exhibited abnormal α DG glycosylation (25, 32, 33). These discoveries established a new disease entity called muscular dystrophy that is caused by the abnormal glycosylation of α DG, collectively called dystroglycanopathy (10, 11). As mentioned before, around 15 dystroglycanopathy genes are known to date, and they are involved in α DG glycosylation either directly or indirectly. A missense mutation in the *DAG1* gene, which encodes DG, was identified in a dystroglycanopathy patient (66). This missense mutation is located within the N-terminal globular domain of α DG and leads to reduced interactions with *LARGE*, which likely results in the impaired formation of Xyl-GlcA repeating units.

A number of studies on the genotype-phenotype correlation within large cohorts of dystroglycanopathy patients have revealed that there is a wide clinical spectrum associated with mutations in specific causative genes (67, 68). The most severe end of the spectrum is characterized by congenital muscular dystrophy with severe structural abnormalities in the brain and eyes, which usually results in early infantile death. Patients at the mildest end of the spectrum may present in adult life with limb-girdle muscular dystrophy, without the involvement of the brain or eyes. In 2007, Muntoni and colleagues proposed a clinical classification system comprising of seven broad phenotypic categories (67). Later, new Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) entries created a simplified version for classification by combining three broad phenotypic groups and gene defects. There are still some unidentified causative genes for dystroglycanopathy, which could possibly be identified in the near future.

FCMD is the dystroglycanopathy that was first identified, and is the second most common childhood muscular dystrophy in Japan (69). The incidence is around 3/100,000 persons, and one in ~90 persons is expected to be a heterozygous carrier. FCMD is characterized by congenital muscular dystrophy in combination with abnormalities of the central nervous system (brain malforma-

D. DG糖鎖異常症（ジストログリカノパチー）

筋ジストロフィーは進行性の筋力低下を認める遺伝性疾患の総称で、現在のところ40種以上の原因遺伝子が知られている(65)。2001年、林らはFCMD患者において、糖鎖修飾型 α DGを認識するIIH6抗体の反応性が著減していることを報告した(8)。翌年、Campbellらのグループが、FCMD、WWS、MEB病患者では α DGに糖鎖異常が生じ、リガンド結合能が消失していることを実証した(9)。これらの報告に続いて、 α DGの糖鎖異常を認める先天型や肢帯型筋ジストロフィー患者に*FKRP*変異や*LARGE*変異が見いだされた(25, 32, 33)。このようにして、 α DGの糖鎖異常を発症要因とする筋ジストロフィー（ジストログリカノパチー）という新しい疾患概念が確立されたのである(10, 11)。現在のところ15種類程度の遺伝子がジストログリカノパチー原因遺伝子として知られており、いずれも α DGの糖鎖修飾に関与するが、DG遺伝子(*DAG1*)の変異による症例も報告されている(66)。この症例で報告された*DAG1*遺伝子のミスセンス変異は、 α DGのN末球状領域内に存在しており、変異によって*LARGE*結合活性が低下し、正常なXyl-GlcA繰り返し構造の修飾が進行しないため発症に至ったと考えられる。

ジストログリカノパチーの遺伝型と表現型の相関に関する研究から、原因遺伝子が同一であっても臨床像に大きな広がりがあることが知られている(67, 68)。最重篤型では、重度の先天性筋ジストロフィーに加え、脳奇形や眼異常を伴い、乳児期初期で致死に至る。最軽症型では、脳・眼異常を伴わない成年発症の肢帯型筋ジストロフィーにとどまる。2007年、Muntoniらはジストログリカノパチー病型を重篤度に応じて7種に分類することを提唱し(67)、また、最新のOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM)では、簡素化した3種の臨床像と原因遺伝子種の組み合わせによって区分することを提唱している。なお、いまだに原因遺伝子が同定されていないジストログリカノパチー症例も数多く存在しており、今後、さらに新しい疾患遺伝子が発見されると予想される。

FCMDは最初に同定されたジストログリカノパチーで、本邦の小児期筋ジストロフィーのなかではデュシェンヌ型に次いで多く見られる(69)。発症頻度は10万人あたり3人ほどで、日本人の約90人に1人が保因者と推定される。本症は先天性筋ジストロフィーに加え、大脳および小脳に多小脳回を基本とする高度の脳奇形(II型滑脳症)と重度の精神発達遅滞を認める(70)。眼症状としては、近視、白内障、視神経低形成、網膜異形成などが挙げられる。ほとんどの患者は生

tion characterized by micropolygyria of the cerebrum and cerebellum, type II lissencephaly) and eye (severe myopia, cataract, optic nerve hypoplasia, retinal dysplasia, etc.) (70). Severe mental retardation is observed in all the cases. Most patients are never able to work, and they die by the age of 20 years. The major mutation in FCMD is a SINE-VNTR-*Alu* (SVA) retrotransposon insertion in the 3' noncoding region of the *fukutin* gene, which accounts for ~87% of the FCMD chromosome (31). Worldwide, other mutations in *fukutin* such as frame shift, nonsense, and missense have been also reported. The retrotransposon insertion causes abnormal mRNA splicing, which is induced by a strong acceptor site in SVA and a rare alternative donor site in the exon 10 of *fukutin*, to produce an aberrantly spliced fukutin protein that lacks 38 amino acids from the C-terminus but contains 129 amino acids derived from the SVA sequence (71). This mutant fukutin protein localizes to the ER. It is believed that this mislocalization and/or lack of a portion of the C-terminal sequence leads to disruption in the activity of fukutin. Several disease-causing point mutations cause misfolding of the fukutin protein resulting in change in its cellular localization from the Golgi apparatus to the ER, which triggers abnormal glycosylation of α DG (72).

E. Physiological Roles of α DG Glycosylation and Its Relevance to Diseases Pathogenesis

In dystroglycanopathy, the loss of ligand-binding activity of α DG due to abnormal glycosylation leads to the disruption of the linkage between the basement membrane and the cytoskeleton. Indeed, an ultrastructural abnormality, in which the basement membrane was detached from the muscle cell membrane, was shown in the skeletal muscle of certain DG-deficient mice as well as a Large-defective *Large*^{myd} dystroglycanopathy mouse (73). These structural abnormalities likely render muscles prone to contraction-induced injuries, eventually leading to the necrosis of muscle cells. Recently, we showed that membrane weakness precedes disease onset, by using myofiber-selective fukutin conditional knockout (MCK-fukutin-cKO) mice, thus demonstrating through proof-of-principle studies that membrane fragility triggers disease manifestation (74). Interestingly, these MCK-fukutin-cKO mice exhibited only mild muscular dystrophy, indicating that membrane fragility is not sufficient for explaining the severe muscle pathology of dystroglycanopathy. When myofibers are damaged, satellite cells (muscle-specific stem cells) are activated for differentiation into muscle precursor cells (MPCs), followed by myoblasts, and eventual fusion into myotubes. Thus, the skeletal muscle can undergo regeneration by means of this process. MPC-selective Myf5-fukutin-cKO, which is another fukutin cKO mouse showed severe muscular dystrophy with a reduction in the number of satellite

涯にわたり歩行能力を獲得できず、平均寿命は20歳くらいである。FCMD患者で最も多く見られる変異はフクチン遺伝子3'非翻訳領域内へのSINE-VNTR-*Alu* (SVA) レトロトランスポゾン挿入変異で、この変異はFCMD染色体の約87%を占める(31)。挿入変異以外にも、フレームシフト、ノンセンス・ミスセンス変異も国内外から報告されている。SVA挿入変異内には強力なスプライシング受容部位が存在しており、フクチン遺伝子のエクソン10内にある潜在的なスプライシング供与部位が活性化されることで、異常スプライシングが生じる(71)。その結果、フクチンのC末端38残基が欠損し、代わりにSVA配列由来の129残基が付加された異常フクチンが産出される。正常フクチンはゴルジ体に局在するが、この異常フクチンはERに局在する。局在異常やC末端配列の変化によって、フクチン機能欠損に至ると考えられる。また、いくつかの点変異はフクチンのフォールディング異常を引き起こすが、その結果、フクチンの局在がゴルジ体からERに変化し、 α DG糖鎖修飾異常が生じると考えられている(72)。

E. DG糖鎖の生理的役割と病態への関与

ジストログリカノパチーでは、糖鎖不全によって α DGのリガンド結合能が低下しているため、基底膜と細胞骨格の連携が弱化していると考えられる。実際、骨格筋選択的DG欠損マウスやジストログリカノパチーモデルであるLarge変異*Large*^{myd}マウスの骨格筋において、基底膜-細胞膜構造の異常(基底膜の遊離)がみられる(73)。このような構造異常を認める筋細胞は収縮弛緩に伴う機械的負荷に耐えられず障害をうけ、最終的には筋壊死に至ると推察される。われわれは α DGの糖鎖不全を示す筋線維選択的フクチンconditional KO (MCK-fukutin-cKO) マウスを用いて、細胞膜の脆弱化が病態に先行して発生していることを明らかにしたが、これは膜脆弱化が発症の引き金になることの証拠といえる(74)。ただし、MCK-fukutin-cKOマウスの病態は軽症で、細胞膜の脆弱性だけではジストログリカノパチーの重篤な筋病態を説明できない。骨格筋は損傷すると、衛星細胞と呼ばれる幹細胞が活性化し、筋前駆細胞 (muscle precursor cell; MPC)、筋芽細胞、最終的には筋管へと分化することで骨格筋は再生する。MCK-fukutin-cKOマウスとは異なり、筋前駆細胞選択的フクチンcKOマウス (Myf5-fukutin-cKO) では重篤な筋病態を認め、加えて、衛星細胞数、筋前駆細胞の増殖・分化活性、筋再生能が低下していた(74)。これらの異常は病態の進行に

cells, proliferation/differentiation activities of MPCs, and muscle regeneration activity (74). These abnormalities become more severe as the disease progresses. These studies revealed that fukutin-dependent modification of α DG plays important roles in the maintenance of satellite cell viability and MPC activities, whereas defects in their functions correlate with the severity of the disease. It has been proposed that the absence of α DG glycosylation during postnatal/juvenile muscle growth and development may have a high impact on muscle degeneration and/or dystrophic pathology in later stages (75). In FCMD and *Large*^{myd} mice, the aberrant formation of neuromuscular junctions and the presence of many immature muscle fibers suggest that impaired differentiation signals from these aberrant neuromuscular junctions and maturational delays in muscle fibers underlie the etiology of dystroglycanopathy (76). In addition to muscle membrane fragility, it appears that muscle maturation and regeneration processes are involved in the pathogenesis of dystroglycanopathy.

Abnormal glycosylation of α DG is also considered as one of the main causes of brain malformation, characterized by polymicrogyria. The surface of the cerebral cortex is covered by the glia limitans/basement membrane complex, which prevents the overmigration of neurons. In FCMD (77) and other dystroglycanopathy models (9, 78), there is a breakdown in the basement membrane leading to the protrusion of neurons into the subarachnoid space where the basement membrane breaches are observed. These abnormalities are possibly the underlying causes of cortical dysplasia and type II lissencephaly. α DG is expressed in radial glia and presumably plays a role in physically connecting the glia limitans to the basement membrane (78, 79). During the developmental growth of embryonic brain, abnormally glycosylated α -DG may not be able to maintain sufficient physical strength and/or plasticity of the glia limitans–basement membrane complex against an expanding cortical surface area. Interestingly, the neuron-selective DG cKO (NEX-DG-cKO) and *Large*^{myd} mice show impairment of long-term potentiation at CA3–CA1 synapses (80). DG is expressed at the postsynaptic apparatus (57) but the precise mechanism mediating the impairment of synaptic plasticity is unknown. Finally, it has been shown that the status of α DG glycosylation is related to tumor progression (29, 81, 82). In aggressive prostate and breast carcinoma cell lines, there is a dramatic decrease in laminin-binding glycan levels, suggesting that Xyl-GlcA repeating units may have a tumor-suppressor function.

F. Therapeutic Strategies for Dystroglycanopathy

In spite of recent progress in identification of disease-causing genes and a deeper understanding of their pathomechanisms, effective therapies for dystroglycanopathy have not yet been estab-

lished. つまみ、フクチン依存的に修飾される α DG の糖鎖は、筋衛星細胞や筋前駆細胞の生存や機能維持に重要な役割を担っており、その異常が病態重篤度に関与していると考えられる。また、出生後や発育期の筋形成・成熟過程における糖鎖異常が、その後の筋病態に多大な影響を及ぼす可能性を示唆する報告もある (75)。さらに、FCMD 患者や *Large*^{myd} マウスでは、神経筋接合部の形態異常が生じており、未成熟な筋線維も多く認められる (76)。異常な神経筋接合部由来の筋分化シグナル不全や、筋線維の成熟障害もジストログリカノパチー病態に関与していると考えられる。このように、従来から考えられてきた筋細胞膜の脆弱性に加え、筋形成や再生などのプロセスもまた病態に関与することが明らかになってきた。

多小脳回を基本とする脳奇形の発生においても、 α DG 糖鎖異常が病態の中心と考えられる。通常、大脳皮質の表面はグリア境界膜–基底膜複合体によって覆われており、神経組織が露出することはない。FCMD 患者やジストログリカノパチーモデルでは、脳表基底膜の連続性の破綻と、破綻箇所からクモ膜下腔への神経細胞の迷出が観察される (9, 77, 78)。このような異常が皮質形成障害や II 型滑脳症の発生要因と推察されている。 α DG は放射状グリアにも発現しており、グリア境界膜と基底膜の連携に関与していると考えられるが (78, 79)、糖鎖異常型 α DG では、胎仔脳の成長に伴う脳表拡張に対して、グリア境界膜–基底膜複合体の物理的強度や可塑性を維持することができず、基底膜が破綻してしまうのかもしれない。また、神経細胞選択的 DG 欠損マウス (NEX-DG-cKO) や *Large*^{myd} マウスでは、海馬 CA3–CA1 シナプスの長期増強が低下しているとの報告もある (80)。DG はポストシナプスにも発現しているが (57)、シナプス可塑性障害のメカニズムについて今後の展開に興味を持たれる。最後に、 α DG の糖鎖修飾が腫瘍悪性度に関与する可能性を紹介しておく (29, 81, 82)。悪性の前立腺癌細胞や乳癌細胞では、 α DG のラミニン結合活性が低下していることが知られているが、これは Xyl-GlcA 繰り返し構造が腫瘍抑制性作用を持つ可能性を示唆しているのかもしれない。

F. ジストログリカノパチー治療戦略

相次ぐ疾患遺伝子の発見や病態の解明が進んできたにもかかわらず、ジストログリカノパチーに有効な治療法は未だに存在しない。われわれは、治療法の開発を目的に、ジス

lished. In order to develop therapeutic strategies, we have generated fukutin-deficient mouse models for dystroglycanopathy. Fukutin knockout mice that were generated by the targeted disruption of *fukutin* were embryonic lethal (83), and chimeric fukutin mice showed a high variability in chimerism amongst individuals and their tissues (84). Although these models proved the biological significance of fukutin-dependent α DG glycosylation, they are not effective for establishing therapeutic strategies. A transgenic knock-in (KI) mouse model carrying a retrotransposal insertion in the *fukutin* gene (*fukutin*^{Hp/Hp}, *fukutin*^{Hp/-}) exhibited hypoglycosylation of α DG, but did not show any signs of muscular dystrophy due to the presence of minor levels of intact α DG with residual laminin-binding activities (85). This study implicates that even a small amount of intact α DG is sufficient for maintaining skeletal muscle function, and suggests that the treatment of dystroglycanopathy might not require a full recovery of glycosylation.

Considering the pathomechanisms revealed by analyses of the fukutin cKO and KI mice, it is clear that any therapeutic strategy must involve (i) prevention of myofiber membrane weakness and/or (ii) rescue of the substantial loss and dysfunction of MPCs (74). Since frequent cycles of degeneration and regeneration of myofibers accelerate the substantial and/or functional loss of MPCs, it is expected that protection from disease-triggering myofiber degeneration will provide therapeutic effects even in skeletal muscles that contain MPC defects. Therefore, the therapeutic benefits of rescuing fukutin expression that is limited in myofibers were tested. This gene therapy study was conducted by using recombinant adeno-associated virus 9 (AAV9) vectors containing the mouse fukutin cDNA under the control of the MCK promoter, which allowed fukutin expression in differentiated myofibers (74). Results showed that systemic gene delivery into adolescent Myf5-fukutin cKO mice with early-stage muscular dystrophy dramatically ameliorated the dystrophic phenotype and restored muscle function to the same levels, as seen in the wild-type mice. Gene replacement studies using newborn *Large*^{myd} and adolescent FKRP-mutant mice have been also reported (86–88). Many genes associated with dystroglycanopathy code for enzymes, and therefore it is expected that even small quantities of exogenously delivered genes that express normal proteins can compensate for the mutant genes. In fact, the therapeutic effects from the *fukutin* gene transfer were achieved with much lower AAV titers than those used in other types of muscular dystrophy models that had defects in structural proteins. In addition, the therapeutic benefits can be attained even after the manifestation of the disease; therefore, we have proposed gene therapy as a feasible treatment for the wide range of dystroglycanopathies. However, the glycosylation status of α DG varies during myogenesis and muscle regeneration, suggesting that expression patterns

トログリカノパチー疾患モデルとしてさまざまなフクチン変異マウスを作出してきた。フクチン遺伝子を破壊した全身性のフクチン欠損マウス (*fukutin* KO) は胎生致死であり (83)、フクチン欠損キメラマウスは個体・組織ごとにキメラ率が異なる (84)。フクチン依存的に修飾される α DG 糖鎖の生物学的重要性は証明されたものの、これらのモデルは治療モデルとしては有効ではなかった。レトロトランスポゾン挿入変異を持つノックインマウス (フクチン KI; *fukutin*^{Hp/Hp}, *fukutin*^{Hp/-}) は α DG 糖鎖異常を示したものの、筋ジストロフィー症状は認められなかった (85)。ノックインマウス骨格筋では、正常糖鎖型 α DG が残存しており、ラミニン結合能も維持されているため、発症に至らなかったと考えられる。しかし逆に言えば、ジストログリカノパチー治療を考えるに、糖鎖異常を完全に解消する必要はなく、部分的にでも回復できれば治療効果が得られるとの予測も成立する。

フクチン cKO マウスや KI マウスを用いた研究から明らかになった発症機序を考慮すると、①発症の引き金になる筋細胞膜の脆弱化を抑制すること、②筋前駆細胞の量的・質的な枯渇を抑制すること、が治療戦略として有効と考えられる (74)。ただし、筋細胞膜の脆弱化を抑制できれば、筋壊死／再生の頻発のみならず、それに起因する筋前駆細胞の質的・量的な枯渇も抑制できるため、仮に筋前駆細胞に異常があったとしても治療効果が得られると期待できる。そこでわれわれは、筋線維選択的なフクチン遺伝子発現が治療効果をもたらすか検証するために、筋線維選択的な MCK プロモーターの下流にフクチン cDNA を配したアデノ随伴ウイルスベクター (AAV9-MCK-fukutin) を設計した。発症直後の若い Myf5-fukutin-cKO マウスに対して全身性の遺伝子導入を行ったところ、劇的な病態改善効果が得られ、また、治療によって筋力を野生型と同等のレベルにまで改善することに成功している (74)。フクチン変異マウス以外にも、新生 *Large*^{myd} マウスや FKRP 変異マウスへの AAV 遺伝子治療例も報告されている (86–88)。ジストログリカノパチー遺伝子の多くは酵素をコードしているため、少量の遺伝子導入でも十分な治療効果が得られると予想される。実際、フクチン遺伝子治療の場合、構造タンパク異常の筋ジストロフィーモデルへの遺伝子治療に比べ、1/10～1/100 程度のベクター量で治療効果が得られている。また、発症後の介入であっても治療効果が得られたことから、遺伝子治療はジストログリカノパチーに有効な治療法と考えられる。一方で、 α DG の糖鎖修飾様式は筋形成や再生の過程で変化するため、 α DG 糖鎖修飾に関与する遺伝子 (ジストログリカノパチー遺伝子) の発現や遺伝

and activities of genes involving α -DG glycosylation, such as dystroglycanopathy genes are strictly controlled. Therefore, in order to achieve effective therapeutic intervention, it is important to consider the timing of intervention, nature of the targeted cells, and the types of promoters used for driving gene expression.

It has been shown that overexpression of LARGE generates hyperglycosylated α -DG, with increased ligand-binding activities in wild-type cells as well as in genetically distinct dystroglycanopathy cells such as from patients that are fukutin-deficient or POMGnT1-deficient (86). These unique characteristics of LARGE led to the development of a novel strategy for treating dystroglycanopathies by enhancing or bypassing the DG–ligand linkage. It has been demonstrated that viral vector-mediated gene transfer of *LARGE* into POMGnT1-deficient mice improves their motor performance (87). In contrast, a recent report has shown that transgenic overexpression of LARGE in FKRP-mutant mice resulted in a worsening of the muscle pathology (89). Constitutively hyperglycosylated α DG may have a negative impact in several biological processes. In addition, it has been revealed that LARGE-dependent hyperglycosylation requires *O*-mannosyl phosphorylation and therefore does not always occur in all types of dystroglycanopathies (38, 90). Currently, it is not conclusive whether overexpression of LARGE possesses any therapeutic benefits or not.

Finally, I introduce a novel antisense oligonucleotides therapeutic strategy, which is based on the pathogenesis of FCMD (71). As mentioned before, most FCMD patients carry the founder SVA retrotransposal insertion in the 3'-UTR region of *fukutin*. This insertion contains a strong splice acceptor site, which induces a rare alternative donor site in the last exon, thus causing abnormal mRNA splicing (exon trapping). The introduction of antisense oligonucleotides that target the splice acceptor, the predicted exonic splicing enhancer, and the intronic splicing enhancer prevented the pathogenic exon trapping by SVA in the cells of FCMD patients as well as model mice. This resulted in the rescue of normal *fukutin* mRNA expression, protein production, and consequently the restoration of α DG glycosylation and laminin-binding activity. This treatment strategy can potentially be applied to almost all FCMD patients in Japan, and can therefore be the first radical clinical treatment for dystroglycanopathies.

G. Conclusion

More than a decade has passed since the discovery of dystroglycanopathy. During this period, there have been advances in identification of the genes responsible for this disorder and in understanding the functions of these genes, the molecular and cellular pathogenesises, as well as the structure and modification pathway of α -DG. The issues that remain unresolved include complete

子産物の活性も厳密に制御されている可能性が高い。遺伝子治療の場合は、介入時期にくわえ、治療標的細胞や遺伝子発現プロモーターについても考慮する必要がある。

LARGEを過剰発現させると、正常型 α DGのみならず、フクチン変異やPOMGnT1変異の細胞に由来する糖鎖異常型 α DGにも、ラミニン結合性の糖鎖が新たに修飾される(86)。このLARGEのユニークな特性に基づき、DG-リガンド結合の増強/バイパスを狙った、原因遺伝子の種に因らない糖鎖治療の概念が提唱されている。現在のところ、ウイルスベクターを用いたLARGE遺伝子導入によってPOMGnT1欠損マウスの運動機能が向上したとの報告はあるが(87)、LARGE過剰発現トランスジェニックマウスとの掛け合わせによってFKRP変異マウスの病態が悪化したとの報告もある(89)。常時過剰に増強された糖鎖が負の影響をもたらしている可能性がある。また、LARGEによる糖鎖増強は、すべてのジストログリカノパチーで生じるわけではなく、 α DGのマノシルリン酸化が必要であることも明らかになってきた(38, 90)。現在のところ、LARGE特性を応用した治療戦略の有効性については議論の余地が残される。

最後に、FCMD発症機序に基づいた新たなアンチセンス療法(エクソントラップ阻害療法)を紹介する(71)。先にも紹介したように、ほとんどのFCMD患者がレトロトランスポゾン挿入変異を持つが、この挿入変異のなかには強力なスプライシング受容部位が存在し、タンパク質をコードする最終エクソン内の潜在的なスプライシング供与部位を活性化させることで(エクソントラッピング)、フクチンのスプライシング異常が発生する。異常スプライシングに関与する配列(スプライシング受容部位、スプライシングエンハンサー領域)に対するアンチセンス核酸を患者由来細胞や挿入変異ノックインマウスに投与したところ、スプライシング異常が是正され、機能的なフクチンタンパク質が発現し、 α DGの糖鎖修飾とラミニン結合活性を正常に戻せることがわかった。この治療法は国内におけるほぼ全例のFCMD患者を対象に同一の方法で行えるため、根本的分子標的治療として有望であり、今後の臨床試験の実現が期待される。

G. おわりに

ジストログリカノパチーという疾患概念が確立されてから10年余が経つ。その間、新規疾患遺伝子やその機能、分子・細胞病態、 α DGの糖鎖構造や修飾機序が続々と明らかになった。ポストリン酸化構造の全容や、未知のジストログリカノパチー遺伝子の同定などが今後の課題として残されているものの、その解明によって、糖鎖生物学や筋ジストロ

understanding of the post-phosphoryl structures and functions of any unknown dystroglycanopathy genes. Elucidation of these problems should lead to additional breakthroughs in glycobiology and muscular dystrophy research. The effectiveness of antisense and gene replacement therapies raises expectations for future translational research. It is evident that glycobiological and biochemical research has significantly contributed to a deeper understanding of dystroglycanopathy, similar to the manner in which physiological and pathological research has benefitted basic research. Our aim in future research is to study the structures and functions of the sugar chains, for achieving a better understanding and possible cure for dystroglycanopathy.

Acknowledgments

I would like to thank my former and current mentors, Drs. Kazuya Taniguchi, Kevin P. Campbell, and Tatsushi Toda for their supervision and encouragement. I would also like to thank all the collaborators and members of the laboratories of Dr. Toda and Dr. Campbell for their wonderful support and fruitful discussions.

References

1. Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G., and Campbell, K. P. (1990) *Nature* **345**, 315–319.
2. Barresi, R., and Campbell, K. P. (2006) *J. Cell Sci.* **119**, 199–207.
3. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., and Campbell, K. P. (1992) *Nature* **355**, 696–702.
4. Moore, C. J., and Winder, S. J. (2012) *Neuromuscul. Disord.* **22**, 959–965.
5. Kanagawa, M., Saito, F., Kunz, S., Yoshida-Moriguchi, T., Barresi, R., Kobayashi, Y. M., Muschler, J., Dumanski, J. P., Michele, D. E., Oldstone, M. B., and Campbell, K. P. (2004) *Cell* **117**, 953–964.
6. Chiba, A., Matsumura, K., Yamada, H., Inazu, T., Shimizu, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Kobata, A., and Endo, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2156–2162.
7. Yoshida-Moriguchi, T., Yu, L., Stalnaker, S. H., Davis, S., Kunz, S., Madson, M., Oldstone, M. B., Schachter, H., Wells, L., and Campbell, K. P. (2010) *Science* **327**, 88–92.
8. Hayashi, Y. K., Ogawa, M., Tagawa, K., Noguchi, S., Ishihara, T., Nonaka, I., and Arahata, K. (2001) *Neurology* **57**, 115–121.
9. 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., and Campbell, K. P. (2002) *Nature* **418**, 417–422.
10. Toda, T., Kobayashi, K., Takeda, S., Sasaki, J., Kurahashi, H., Kano, H., Tachikawa, M., Wang, F., Nagai, Y., Taniguchi, K., Taniguchi, M., Sunada, Y., Terashima, T., Endo, T., and Matsumura, K. (2003) *Congenit. Anom. (Kyoto)* **43**, 97–104.
11. Michele, D. E., and Campbell, K. P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15457–15460.
12. Inamori, K., Endo, T., Gu, J., Matsuo, I., Ito, Y., Fujii, S., Iwasaki, H., Narimatsu, H., Miyoshi, E., Honke, K., and Taniguchi, N. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 2337–2340.
13. Inamori, K., Yoshida-Moriguchi, T., Hara, Y., Anderson, M. E., Yu, L., and Campbell, K. P. (2012) *Science* **335**, 93–96.
14. Beltrán-Valero de Bernabé, 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., and Brunner, H. G. (2002) *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1033–1043.
15. van Reeuwijk, J., Janssen, M., van den Elzen, C., Beltrán-Valero de Bernabé, D., Sabatelli, P., Merlini, L., Boon, M., Scheffer, H., Brockington, M., Muntoni, F., Huynen, M. A., Verrips, A., Walsh, C. A., Barth, P. G., Brunner, H. G., and van Bokhoven, H. (2005) *J. Med. Genet.* **42**, 907–912.
16. Many, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis, R. U., and Endo, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 500–505.
17. Yoshida, A., Kobayashi, K., Many, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsunashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Toda, T., and Endo, T. (2001) *Dev. Cell* **1**, 717–724.
18. Combs, A. C., and Ervasti, J. M. (2005) *Biochem. J.* **390**, 303–309.
19. Kuga, A., Kanagawa, M., Sudo, A., Chan, Y. M., Tajiri, M., Many, H., Kikkawa, Y., Nomizu, M., Kobayashi, K., Endo, T., Lu, Q. L., Wada, Y., and Toda, T. (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 9560–9567.
20. Manzini, M. C., Tambunan, D. E., Hill, R. S., Yu, T. W., Maynard, T. M., Heinzen, E. L., Shianna, K. V., Stevens, C. R., Partlow, J. N., Barry, B. J., Rodriguez, J., Gupta, V. A., Al-Qudah, A. K., Eyaid, W. M., Friedman, J. M., Salih, M. A., Clark, R., Moroni, I., Mora, M., Beggs, A. H., Gabriel, S. B., and Walsh, C. A. (2012) *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 541–547.
21. Stevens, E., Carss, K. J., Cirak, S., Foley, A. R., Torelli, S., Willer, T., Tambunan, D. E., Yau, S., Brodd, L., Sewry, C. A., Feng, L., Haliloglu, G.,

フィー研究に新たなブレイクスルーがもたらされることは想像に難くない。さらに、アンチセンス核酸を用いた分子標的治療や遺伝子治療が有効であることが示され、今後のトランスレーショナルリサーチへの期待も高まっている。糖鎖生物学・生化学研究がジストログリカノパチーの解明に多大な貢献を果たしてきたことは言うまでもないが、一方で、臨床研究や病理学的研究が重要な生物学的発見にもつながっている。われわれも、糖鎖構造・機能の解明を基盤にジストログリカノパチーの克服を目指し、ますます努力を続けていきたいと思う。

謝 辞

この場をお借りして、懇切なるご指導を賜りました谷口和弥先生、Kevin P. Campbell先生、戸田達史先生に深謝申し上げます。また、長年にわたりご指導いただいております遠藤玉夫先生、和田芳直先生をはじめ、多くの共同研究者の先生、日々研究をとに行っている教室員の皆様に深く感謝申し上げます。

- Orhan, D., Dobyns, W. B., Enns, G. M., Manning, M., Krause, A., Salih, M. A., Walsh, C. A., Hurles, M., Campbell, K. P., Manzini, M. C., Stemple, D., Lin, Y. Y., and Muntoni, F.; UK10K Consortium. (2013) *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 354–365.
22. Jae, L. T., Raaben, M., Riemersma, M., van Beusekom, E., Blomen, V. A., Velds, A., Kerkhoven, R. M., Carette, J. E., Topaloglu, H., Meinecke, P., Wessels, M. W., Lefeber, D. J., Whelan, S. P., van Bokhoven, H., and Brummelkamp, T. R. (2013) *Science* **340**, 479–483.
23. Yoshida-Moriguchi, T., Willer, T., Anderson, M. E., Venzke, D., Whyte, T., Muntoni, F., Lee, H., Nelson, S. F., Yu, L., and Campbell, K. P. (2013) *Science* **341**, 896–899.
24. Peyrard, M., Seroussi, E., Sandberg-Nordqvist, A. C., Xie, Y. G., Han, F. Y., Fransson, I., Collins, J., Dunham, I., Kost-Alimova, M., Imreh, S., and Dumanski, J. P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 598–603.
25. Grewal, P. K., Holzfeind, P. J., Bittner, R. E., and Hewitt, J. E. (2001) *Nat. Genet.* **28**, 151–154.
26. 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., and Muntoni, F. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2853–2861.
27. Goddeeris, M. M., Wu, B., Venzke, D., Yoshida-Moriguchi, T., Saito, F., Matsumura, K., Moore, S. A., and Campbell, K. P. (2013) *Nature* **503**, 136–140.
28. Hara, Y., Kanagawa, M., Kunz, S., Yoshida-Moriguchi, T., Satz, J. S., Kobayashi, Y. M., Zhu, Z., Burden, S. J., Oldstone, M. B., and Campbell, K. P. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 17426–17431.
29. Bao, X., Kobayashi, M., Hatakeyama, S., Angata, K., Gullberg, D., Nakayama, J., Fukuda, M. N., and Fukuda, M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 12109–12114.
30. Buysse, K., Riemersma, M., Powell, G., van Reeuwijk, J., Chitayat, D., Roscioli, T., Kamsteeg, E. J., van den Elzen, C., van Beusekom, E., Blaser, S., Babul-Hirji, R., Halliday, W., Wright, G. J., Stemple, D. L., Lin, Y. Y., Lefeber, D. J., and van Bokhoven, H. (2013) *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1746–1754.
31. 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., and Toda, T. (1998) *Nature* **394**, 388–392.
32. 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., and Muntoni, F. (2001) *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 1198–1209.
33. Brockington, M., Yuva, Y., Prandini, P., Brown, S. C., Torelli, S., Benson, M. A., Herrmann, R., Anderson, L. V., Bashir, R., Burgunder, J. M., Fallet, S., Romero, N., Fardeau, M., Straub, V., Storey, G., Pollitt, C., Richard, I., Sewry, C. A., Bushby, K., Voit, T., Blake, D. J., and Muntoni, F. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2851–2859.
34. Aravind, L., and Koonin, E. V. (1999) *Curr. Biol.* **9**, R836–R837.
35. Kuchta, K., Knizewski, L., Wyrwicz, L. S., Rychlewski, L., and Ginalski, K. (2009) *Nucleic Acids Res.* **37**, 7701–7714.
36. Vuillaumier-Barrot, S., Bouchet-Séraphin, C., Chelbi, M., Devisme, L., Quentin, S., Gazal, S., Laquerrière, A., Fallet-Bianco, C., Loget, P., Odent, S., Carles, D., Bazin, A., Aziza, J., Clemenson, A., Guimiot, F., Bonnière, M., Monnot, S., Bole-Feysot, C., Bernard, J. P., Loeuillet, L., Gonzales, M., Socha, K., Grandchamp, B., Attié-Bitach, T., Encha-Razavi, F., and Seta, N. (2012) *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 1135–1143.
37. Roscioli, T., Kamsteeg, E. J., Buysse, K., Maystadt, I., van Reeuwijk, J., van den Elzen, C., van Beusekom, E., Riemersma, M., Pfundt, R., Vissers, L. E., Schraders, M., Altunoglu, U., Buckley, M. F., Brunner, H. G., Grisart, B., Zhou, H., Veltman, J. A., Gilissen, C., Mancini, G. M., Delrée, P., Willemsen, M. A., Ramadza, D. P., Chitayat, D., Bennett, C., Sheridan, E., Peeters, E. A., Tan-Sindhunata, G. M., de Die-Smulders, C. E., Devriendt, K., Kayserili, H., El-Hashash, O. A., Stemple, D. L., Lefeber, D. J., Lin, Y. Y., and van Bokhoven, H. (2012) *Nat. Genet.* **44**, 581–585.
38. Willer, T., Lee, H., Lommel, M., Yoshida-Moriguchi, T., de Bernabe, D. B., Venzke, D., Cirak, S., Schachter, H., Vajsar, J., Voit, T., Muntoni, F., Loder, A. S., Dobyns, W. B., Winder, T. L., Strahl, S., Mathews, K. D., Nelson, S. F., Moore, S. A., and Campbell, K. P. (2012) *Nat. Genet.* **44**, 575–580.
39. Yang, A. C., Ng, B. G., Moore, S. A., Rush, J., Waechter, C. J., Raymond, K. M., Willer, T., Campbell, K. P., Freeze, H. H., and Mehta, L. (2013) *Mol. Genet. Metab.* **110**, 345–351.
40. Barone, R., Aiello, C., Race, V., Morava, E., Foulquier, F., Riemersma, M., Passarelli, C., Concolino, D., Carella, M., Santorelli, F., Vleugels, W., Mercuri, E., Garozzo, D., Sturiale, L., Messina, S., Jaeken, J., Fiumara, A., Wevers, R. A., Bertini, E., Matthijs, G., and Lefeber, D. J. (2012) *Ann. Neurol.* **72**, 550–558.
41. Lefeber, D. J., Schönberger, J., Morava, E., Guillard, M., Huyben, K. M., Verrijp, K., Grafakou, O., Evangelidou, A., Preijers, F. W., Manta, P., Yildiz, J., Grünwald, S., Spilioti, M., van den Elzen, C., Klein, D., Hess, D., Ashida, H., Hofsteenge, J., Maeda, Y., van den Heuvel, L., Lammens, M., Lehle, L., and Wevers, R. A. (2009) *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 76–86.
42. Lefeber, D. J., de Brouwer, A. P., Morava, E., Riemersma, M., Schuurs-Hoeijmakers, J. H., Absmanner, B., Verrijp, K., van den Akker, W. M., Huijben, K., Steenbergen, G., van Reeuwijk, J., Jozwiak, A., Zucker, N., Lorber, A., Lammens, M., Knopf, C., van Bokhoven, H., Grünwald, S., Lehle, L., Kapusta, L., Mandel, H., and Wevers, R. A. (2011) *PLoS Genet.* **7**, e1002427.
43. Carss, K. J., Stevens, E., Foley, A. R., Cirak, S., Riemersma, M., Torelli, S., Hoischen, A., Willer, T., van Scherpenzeel, M., Moore, S. A., Messina, S., Bertini, E., Bönnemann, C. G., Abdenur, J. E., Grosman, C. M., Kesari, A., Punetha, J., Quinlivan, R., Waddell, L. B., Young, H. K., Wraige, E., Yau, S., Brodd, L., Feng, L., Sewry, C., Macarthur, D. G., North, K. N., Hoffman, E., Stemple, D. L., Hurles, M. E., van Bokhoven, H., Campbell, K. P., Lefeber, D. J., Lin, Y. Y., and Muntoni, F.; UK10K Consortium. (2013) *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 29–41.
44. Ervasti, J. M., and Campbell, K. P. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 809–823.
45. Talts, J. F., Andac, Z., Göhring, W., Brancaccio, A., and Timpl, R. (1999) *EMBO J.* **18**, 863–870.
46. Ido, H., Harada, K., Futaki, S., Hayashi, Y., Nishiuchi, R., Natsuka, Y., Li, S., Wada, Y., Combs, A. C., Ervasti, J. M., and Sekiguchi, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 10946–10954.
47. Yoon, J. H., Chandrasekharan, K., Xu, R., Glass, M., Singhal, N., and Martin, P. T. (2009) *Mol. Cell. Neurosci.* **41**, 448–463.
48. Gee, S. H., Montanaro, F., Lindenbaum, M. H., and Carbonetto, S. (1994) *Cell* **77**, 675–686.
49. Bowe, M. A., Deyst, K. A., Leszyk, J. D., and Fallon, J. R. (1994) *Neuron* **12**, 1173–1180.
50. Peng, H. B., Ali, A. A., Daggett, D. F., Rauvala, H., Hassell, J. R., and Smalheiser, N. R. (1998) *Cell Adhes. Commun.* **5**, 475–489.

51. Sugita, S., Saito, F., Tang, J., Satz, J., Campbell, K., and Südhof, T. C. (2001) *J. Cell Biol.* **154**, 435–445.
52. Sato, S., Omori, Y., Katoh, K., Kondo, M., Kanagawa, M., Miyata, K., Funabiki, K., Koyasu, T., Kajimura, N., Miyoshi, T., Sawai, H., Kobayashi, K., Tani, A., Toda, T., Usukura, J., Tano, Y., Fujikado, T., and Furukawa, T. (2008) *Nat. Neurosci.* **11**, 923–931.
53. Wright, K. M., Lyon, K. A., Leung, H., Leahy, D. J., Ma, L., and Ginty, D. D. (2012) *Neuron* **76**, 931–944.
54. Yurchenco, P. D. (2011) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004911.
55. Gawlik, K. I., and Durbeej, M. (2011) *Skelet. Muscle* **1**, 9.
56. Singhal, N., and Martin, P. T. (2011) *Dev. Neurobiol.* **71**, 982–1005.
57. Zaccaria, M. L., Di Tommaso, F., Brancaccio, A., Paggi, P., and Petrucci, T. C. (2001) *Neuroscience* **104**, 311–324.
58. Kanagawa, M., Omori, Y., Sato, S., Kobayashi, K., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Endo, T., Furukawa, T., and Toda, T. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 31208–31216.
59. Hohenester, E., Tisi, D., Talts, J. F., and Timpl, R. (1999) *Mol. Cell* **4**, 783–792.
60. Timpl, R., Tisi, D., Talts, J. F., Andac, Z., Sasaki, T., and Hohenester, E. (2000) *Matrix Biol.* **19**, 309–317.
61. Kanagawa, M., Michele, D. E., Satz, J. S., Barresi, R., Kusano, H., Sasaki, T., Timpl, R., Henry, M. D., and Campbell, K. P. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 4792–4796.
62. Cao, W., Henry, M. D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J. H., Ravkov, E. V., Nichol, S. T., Compans, R. W., Campbell, K. P., and Oldstone, M. B. (1998) *Science* **282**, 2079–2081.
63. Kunz, S., Sevilla, N., McGavern, D. B., Campbell, K. P., and Oldstone, M. B. (2001) *J. Cell Biol.* **155**, 301–310.
64. Oldstone, M. B., and Campbell, K. P. (2011) *Virology* **411**, 170–179.
65. Davies, K. E., and Nowak, K. J. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 762–773.
66. Hara, Y., Balci-Hayta, B., Yoshida-Moriguchi, T., Kanagawa, M., Beltrán-Valero de Bernabé, D., Gündesli, H., Willer, T., Satz, J. S., Crawford, R. W., Burden, S. J., Kunz, S., Oldstone, M. B., Accardi, A., Talim, B., Muntoni, F., Topaloglu, H., Dinçer, P., and Campbell, K. P. (2011) *N. Engl. J. Med.* **364**, 939–946.
67. Godfrey, C., Clement, E., Mein, R., Brockington, M., Smith, J., Talim, B., Straub, V., Robb, S., Quinlivan, R., Feng, L., Jimenez-Mallebrera, C., Mercuri, E., Manzur, A. Y., Kinali, M., Torelli, S., Brown, S. C., Sewry, C. A., Bushby, K., Topaloglu, H., North, K., Abbs, S., and Muntoni, F. (2007) *Brain* **130**, 2725–2735.
68. Godfrey, C., Foley, A. R., Clement, E., and Muntoni, F. (2011) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 278–285.
69. Fukuyama, Y., Osawa, M., and Suzuki, H. (1981) *Brain Dev.* **3**, 1–29.
70. Toda, T., Kobayashi, K., Kondo-Iida, E., Sasaki, J., and Nakamura, Y. (2000) *Neuromuscul. Disord.* **10**, 153–159.
71. Taniguchi-Ikeda, M., Kobayashi, K., Kanagawa, M., Yu, C. C., Mori, K., Oda, T., Kuga, A., Kurahashi, H., Akman, H. O., DiMauro, S., Kaji, R., Yokota, T., Takeda, S., and Toda, T. (2011) *Nature* **478**, 127–131.
72. Tachikawa, M., Kanagawa, M., Yu, C. C., Kobayashi, K., and Toda, T. (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 8398–8406.
73. Han, R., Kanagawa, M., Yoshida-Moriguchi, T., Rader, E. P., Ng, R. A., Michele, D. E., Muirhead, D. E., Kunz, S., Moore, S. A., Iannaccone, S. T., Miyake, K., McNeil, P. L., Mayer, U., Oldstone, M. B., Faulkner, J. A., and Campbell, K. P. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 12573–12579.
74. Kanagawa, M., Yu, C. C., Ito, C., Fukada, S., Hozoji-Inada, M., Chiyo, T., Kuga, A., Matsuo, M., Sato, K., Yamaguchi, M., Ito, T., Ohtsuka, Y., Katanosaka, Y., Miyagoe-Suzuki, Y., Naruse, K., Kobayashi, K., Okada, T., Takeda, S., and Toda, T. (2013) *Hum. Mol. Genet.* **22**, 3003–3015.
75. Beedle, A. M., Turner, A. J., Saito, Y., Lueck, J. D., Foltz, S. J., Fortunato, M. J., Nienaber, P. M., and Campbell, K. P. (2012) *J. Clin. Invest.* **122**, 3330–3342.
76. Taniguchi, M., Kurahashi, H., Noguchi, S., Fukudome, T., Okinaga, T., Tsukahara, T., Tajima, Y., Ozono, K., Nishino, I., Nonaka, I., and Toda, T. (2006) *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1279–1289.
77. Nakano, I., Funahashi, M., Takada, K., and Toda, T. (1996) *Acta Neuropathol.* **91**, 313–321.
78. 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., and Campbell, K. P. (2002) *Nature* **418**, 422–425.
79. Myshra, T. D., Moore, S. A., Ostendorf, A. P., Satz, J. S., Kowalczyk, T., Nguyen, H., Daza, R. A., Lau, C., Campbell, K. P., and Hevner, R. F. (2012) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **71**, 1047–1063.
80. Satz, J. S., Ostendorf, A. P., Hou, S., Turner, A., Kusano, H., Lee, J. C., Turk, R., Nguyen, H., Ross-Barta, S. E., Westra, S., Hoshi, T., Moore, S. A., and Campbell, K. P. (2010) *J. Neurosci.* **30**, 14560–14572.
81. de Bernabé, D. B., Inamori, K., Yoshida-Moriguchi, T., Weydert, C. J., Harper, H. A., Willer, T., Henry, M. D., and Campbell, K. P. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 11279–11284.
82. Henry, M. D., Cohen, M. B., and Campbell, K. P. (2001) *Hum. Pathol.* **32**, 791–795.
83. Kurahashi, H., Taniguchi, M., Meno, C., Taniguchi, Y., Takeda, S., Horie, M., Otani, H., and Toda, T. (2005) *Neurobiol. Dis.* **19**, 208–217.
84. Takeda, S., Kondo, M., Sasaki, J., Kurahashi, H., Kano, H., Arai, K., Misaki, K., Fukui, T., Kobayashi, K., Tachikawa, M., Imamura, M., Nakamura, Y., Shimizu, T., Murakami, T., Sunada, Y., Fujikado, T., Matsumura, K., Terashima, T., and Toda, T. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1449–1459.
85. Kanagawa, M., Nishimoto, A., Chiyonobu, T., Takeda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Wang, F., Fujikake, N., Taniguchi, M., Lu, Z., Tachikawa, M., Nagai, Y., Tashiro, F., Miyazaki, J., Tajima, Y., Takeda, S., Endo, T., Kobayashi, K., Campbell, K. P., and Toda, T. (2009) *Hum. Mol. Genet.* **18**, 621–631.
86. Barresi, R., Michele, D. E., Kanagawa, M., Harper, H. A., Dovico, S. A., Satz, J. S., Moore, S. A., Zhang, W., Schachter, H., Dumanski, J. P., Cohn, R. D., Nishino, I., and Campbell, K. P. (2004) *Nat. Med.* **10**, 696–703.
87. Yu, M., He, Y., Wang, K., Zhang, P., Zhang, S., and Hu, H. (2013) *Hum. Gene Ther.* **24**, 317–330.
88. Xu, L., Lu, P. J., Wang, C. H., Keramaris, E., Qiao, C., Xiao, B., Blake, D. J., Xiao, X., and Lu, Q. L. (2013) *Mol. Ther.* **21**, 1832–1840.
89. Whitmore, C., Fernandez-Fuente, M., Boller, H., Parr, C., Kavishwar, M., Ashraf, A., Lacey, E., Kim, J., Terry, R., Ackroyd, M. R., Wells, K. E., Muntoni, F., Wells, D. J., and Brown, S. C. (2014) *Hum. Mol. Genet.* in press.
90. Yagi, H., Nakagawa, N., Saito, T., Kiyonari, H., Abe, T., Toda, T., Wu, S. W., Khoo, K. H., Oka, S., and Kato, K. (2013) *Sci. Rep.* **3**, 3288.

Profile of the Authors

Motoi Kanagawa received his Ph.D. in 2001 at the Graduate School of Science, Hokkaido University in the laboratory of Prof. Kazuya Taniguchi. He then joined the Howard Hughes Medical Institute, the Department of Molecular Physiology and Biophysics, the University of Iowa in the laboratory of Prof. Kevin P. Campbell as a postdoctoral fellow. In 2006, he joined the Department of Clinical Genetics, Osaka University Graduate School of Medicine in the laboratory of Prof. Tatsushi Toda, and in 2009 moved to the Division of Molecular Brain Science, Kobe University Graduate School of Medicine. His research interests are focused on studying the molecular mechanism, including post-translational modifications that are involved in the pathogenesis of human diseases.