

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04352

研究課題名(和文) 新型の翻訳後修飾“ポストリン酸糖鎖”の全構造・修飾機序・病態生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of structure, modification mechanism, pathophysiological roles of a novel posttranslational modification, post-phosphoryl sugar chain

研究代表者

金川 基 (Kanagawa, Motoi)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：00448044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ポストリン酸糖鎖は、その異常が筋ジストロフィーや脳奇形に直結することから、重要な生理的役割を担っていると考えられる。しかし、その構造、修飾機序、生理機能について不明な点が多い。本研究では、ポストリン酸糖鎖の実体として、リビトールリン酸という哺乳類ではこれまで知られていなかった新規の修飾体が二つ連なった構造を同定した。更に、この構造の生合成に関わる酵素として、4種の筋ジストロフィー原因遺伝子の機能を明らかにした。また、リビトールリン酸不全型の疾患モデルを作出し、脳病態の発症機構を明らかにし、新たな治療戦略の構築に至った。

研究成果の概要(英文)：Post-phosphoryl sugar chain is associated with muscular dystrophy and brain malformation and thus is believed to play important physiological roles. However, its structure, modification mechanism, and physiological functions are remained to be elucidated. In this study, we identified tandemly connected ribitol-phosphate, a novel post-modification unit in mammals, as a substance of post-phosphoryl modification. We also identified four enzymes involved in the biosynthesis of ribitol-phosphate modification. These enzymes are encoded by genes responsible for muscular dystrophy. Furthermore, we generated model mice for ribitol-phosphate deficiency and revealed pathomechanism of brain abnormality in muscular dystrophy patients, leading to a proposal of novel therapeutic strategies.

研究分野：機能生物化学

キーワード：糖鎖 筋ジストロフィー リビトールリン酸

## 1. 研究開始当初の背景

核酸、タンパク質に次いで、第3の生命鎖とよばれる糖鎖は、脂質やタンパク質に修飾された形で存在し、多様な生理的役割を担っている。また、先天性糖鎖不全症をはじめ、ガン、免疫・感染症など、糖鎖が関与する疾患も多く存在する。一方で、ゲノムやタンパク質に比べ、複雑な構造と修飾機序がネックになり、研究の進展が相対的に遅れている感否めない。しかし、逆にいえば、糖鎖がコードする生物学的情報を読み解くことで、今まで明らかにされなかった生命現象や病態機序が解明できると考えられ、その可能性に期待がもたれている。

ポストリン酸糖鎖と呼ばれる修飾は、基底膜分子やシナプス分子の膜受容体糖タンパク質であるジストログリカンから発見された(引用文献①)。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だが、中でも、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ユニークなポストリン酸糖鎖がリガンド結合に関与することが明らかになってきた。ポストリン酸糖鎖の構造、修飾機序、生物学的な意義は依然として不明であるが、その不全が、筋ジストロフィー、心筋症、精神発達遅滞の発症に直結することから、生命にとって重要な翻訳後修飾のひとつであることは明白である。

ジストログリカンの糖鎖異常をみとめる疾患は、ジストログリカノパチーと総称されており、この数年で続々と新しい原因遺伝子が発見され、研究に新たな潮流がもたらされている。例えば、糖転移酵素とキナーゼによって段階的に制御される修飾機序や、(GlcA-Xyl)リピートの合成に関わる LARGE 活性が発見され(引用文献②③)、機能未知のジストログリカノパチー原因遺伝子産物(フクチン、FKRP、TMEM5、ISPD)の生理的役割や、ジストログリカン糖鎖の構造と機能について、世界中で熾烈な研究が繰り広げられている。ポストリン酸糖鎖修飾は、まったく新しい翻訳後修飾である。従って、その構造や形成機序、生理的役割を明らかにすることは、翻訳後修飾の新たな原理の確立、さらには、疾患機序の解明や治療法の開発にもつながるため、解明が急がれる重要な課題である。

## 2. 研究の目的

新型の翻訳後修飾体として発見されたポストリン酸糖鎖は、その異常が筋ジストロフィーや精神発達遅滞などの疾患に直結することから、生体において重要な役割を担っていると考えられる。しかし、その構造、修飾機序、生理機能について不明な点が多い。本研究では、まず、ポストリン酸糖鎖の構造全貌と修飾に関わる酵素活性を決定する。更に、修飾不全の疾患モデルマウスを用い、ポストリン酸糖鎖が制御する筋再生、心機能成熟、神経機能に重要な細胞内パスウェイを同定

し、生理機能の発動の仕組みと、破綻による病態を分子レベルで解明し、効果的な治療標的を見出ししていく。ポストリン酸糖鎖に未知の修飾体が含まれていることは明白であり、本研究によって、翻訳後修飾という重要な生体反応に新たな原理を追加でき、また、糖鎖不全症の克服にむけたトランスレーショナル研究に有益な基盤情報が得られる。

## 3. 研究の方法

本研究では、新型の翻訳後修飾ポストリン酸糖鎖修飾の全貌と生理的役割を明らかにし、更に、ポストリン酸糖鎖不全症の分子病態機序と治療法を確立することを目的とする。具体的には、①ポストリン酸糖鎖が効率的に修飾された独自の組換え体と、糖質化学的手法を駆使して、ポストリン酸糖鎖の全構造を決定する、②ポストリン酸糖鎖修飾に関わるフクチン、FKRP、TMEM5、ISPDの酵素活性を決定し、修飾機序を明らかにする、③ポストリン酸糖鎖不全マウスを用い、骨格筋、心筋、中枢神経におけるポストリン酸糖鎖の生理機能と病態との関わりを分子レベルで解明する、④ポストリン酸糖鎖不全症の克服を可能にする治療標的分子を同定する。

## 4. 研究成果

### (1) ポストリン酸糖鎖の構造同定

O-マンノース型糖鎖の構造が複雑多様であるため、これまでジストログリカン糖鎖の構造解析は困難を極めてきた。我々は、ポストリン酸糖鎖の構造解析に向けて組換え糖ペプチドの作出を計画したが、組換え体に生理的な糖鎖修飾が起こるとは限らない。また、ジストログリカンには糖鎖修飾部位が40箇所以上存在すること、更に、(GlcA-Xyl)リピートという高分子量の修飾が、構造解析の障壁になっていた。我々はこれらの問題点を解決すべく、糖鎖修飾部位を限定した糖ペプチドを設計し、生理的な糖鎖修飾が生じる培養系を開発した。得られた糖ペプチドから(GlcA-Xyl)リピートを外す処理、あるいは、リピート修飾が生じない糖ペプチドなどを対照とすることで、ポストリン酸部位のみを含む成分の単離に成功した。

この部分を精密質量分析法やガスクロマトグラフィー/質量分析法で解析することで、ポストリン酸糖鎖の中には、リビトールリン酸(RboP)というこれまで哺乳類で知られていなかった化合物が二つ連なった形で存在することが明らかになった。後述するリビトールリン酸糖鎖の生合成酵素活性の同定と合わせ、ポストリン酸糖鎖構造が、GlcA-Xyl-RboP-RboPであることが明らかになり、ジストログリカン糖鎖構造の全容を解明できた。

### (2) ポストリン酸糖鎖の修飾機序の解明

リビトールリン酸はキシリトール系の糖アルコールリン酸で、バクテリアや植物での

存在が確認されているものの、哺乳類で糖鎖ユニットとして機能していることは知られていなかった。バクテリアではCDP-リビトールを糖供与体にして、リビトールリン酸が糖鎖に組み込まれる。ジストログリカノパチーの原因遺伝子である ISPD はバクテリアのCDP-リビトール合成酵素と類似性を示しており、実際にリビトール5リン酸とCTPからCDP-リビトールを合成する活性をもっていた。また、フクチンとFKRPはCDP-リビトールを糖供与体にして、リビトールリン酸を糖鎖に順に組み込むリビトールリン酸転移酵素であることも明らかになった。更に、TMEM5はXyl1をリビトールリン酸に転移する酵素で、(GlcA-Xyl1)リピートとリビトールリン酸構造を結ぶ役割を果たしていることを見出した。以上より、ポストリン酸糖鎖の生合成に関わる酵素4種を同定し、修飾機序を確立した。

### (3) ポストリン酸糖鎖不全症の病態機序

ジストログリカノパチー患者は、典型的には重篤な脳の形成異常、及びそれに起因する精神発達遅滞・難治性てんかんを合併する。しかし、一部の患者では脳の形成異常をほとんど認めずに平均的な知能を有する例が知られている。遺伝子変異のタイプと疾患の重篤度との関連は示唆されているものの、ジストログリカノパチー患者の脳病変に見られる広い臨床スペクトラムの根底にある機序は明らかではない。我々はポストリン酸糖鎖不全型のジストログリカノパチーのモデルとして、脳特異的はフクチン欠損マウスを用いて病態機序の解析を行った。その結果、胎仔期の大脳皮質の形成過程におけるリビトールリン酸糖鎖の病態生理的重要性を明らかにした。脳形成過程で放射状グリアに発現している糖鎖の有無が、その後の脳病変の重篤度に寄与する可能性が示唆された。これらの知見は糖鎖異常型筋ジストロフィー患者の脳病変に見られる臨床的多様性を考える上で興味深く、胎児期の糖鎖修飾の制御が脳病変に対する新たな治療戦略になりうる可能性を示唆している。

### (4) ポストリン酸糖鎖不全症の治療標的分子

ポストリン酸糖鎖不全症のうち ISPD 欠損型は細胞内での CDP-リビトールの合成障害が発症要因となる。従って、細胞外から CDP-リビトールを補充することで糖鎖不全を解消できる可能性があげられる。ISPD 欠損の疾患モデル細胞を作出し、この補充療法によって糖鎖異常を解消できることを示し、新たな治療戦略として提唱した。

#### <引用文献>

- ① Science 327, 88-92 (2010)
- ② Science 341, 896-899 (2013)
- ③ Science 335, 93-86 (2012)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ① Nishihara R, Kobayashi K, Imae R, Tsumoto H, Manya H, Mizuno M, Kanagawa M, Endo T, Toda T, Cell endogenous activities of fukutin and FKRP coexist with the ribitol xylosyltransferase, TMEM5, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018, 497, 1025-1030, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.162. 査読有
- ② Kanagawa M, Toda T, Ribitol-phosphate—a newly identified posttranslational glycosylation unit in mammals: structure, modification enzymes and relationship to human diseases, J. Biochem. 2018, 163, 359-369, doi: 10.1093/jb/mvy020. 査読有
- ③ Sudo A, Kanagawa M, Kondo M, Ito C, Kobayashi K, Endo M, Minami Y, Aiba A, Toda T, Temporal requirement of dystroglycan glycosylation during brain development and rescue of severe cortical dysplasia via gene delivery in the fetal stage, Hum. Mol. Genet. 2018, 27, 1174-1185, doi: 10.1093/hmg/ddy032. 査読有
- ④ Kanagawa M, Toda T, Muscular dystrophy with ribitol-phosphate deficiency: a novel post-translational mechanism in dystroglycanopathy, J. Neuromuscul. Dis. 2017, 4, 259-267, doi: 10.3233/JND-170255. 査読有
- ⑤ Kamizaki K, Doi R, Hayashi M, Saji T, Kanagawa M, Toda T, Fukada SI, Ho HYH, Greenberg ME, Endo M, Minami Y, The Ror1 receptor tyrosine kinase plays a critical role in regulating satellite cell proliferation during regeneration of injured muscle, J. Biol. Chem. 2017, 292, 15939-15951, doi: 10.1074/jbc.M117.785709. 査読有
- ⑥ Kuwabara N, Manya H, Yamada T, Tateno H, Kanagawa M, Kobayashi K, Akasaka-Manyu K, Hirose Y, Mizuno M, Ikeguchi M, Toda T, Hirabayashi J, Senda T, Endo T, Kato R, Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of  $\alpha$ -dystroglycan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016, 113, 9280-9285, doi: 10.1073/pnas.1525545113. 査読有
- ⑦ Manya H, Yamaguchi Y, Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Akasaka-Manyu K, Kawakami H, Mizuno M, Wada Y, Toda T, Endo T, The muscular dystrophy gene TMEM5 encodes a ribitol  $\beta$ 1-4

Xylosyltransferase required for the functional glycosylation of dystroglycan, *J. Biol. Chem.* 2016, 291, 24618-24627, doi: 10.1074/jbc.M116.751917. 査読有

- ⑧ Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Manya H, Kuga A, Yamaguchi Y, Akasaka-Manyu K, Furukawa J, Mizuno M, Kawakami H, Shinohara Y, Wada Y, Endo T, Toda T, Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy, *Cell Reports* 2016, 14, 2209-2223, doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.017. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① Motoi Kanagawa, Mechanobiology of muscle and sugar chain, The 3rd International Symposium on Mechanobiology, 2017/12/10-13, シンガポール (シンガポール)
- ② 金川 基, 筋ジストロフィー発症に関わる糖鎖構造の解明と修飾酵素の同定, 生命科学系学会合同年次大会, 2017/12/6-9, 神戸国際会議場 (神戸市・兵庫)
- ③ Motoi Kanagawa, Kazuhiro Kobayashi, Michiko Tajiri, Hiroshi Manya, Atsushi Kuga, Yoshiki Yamaguchi, Yoshinao Wada, Tamao Endo, Tatsushi Toda, Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy: Roles of ISPD, fukutin, and FKR in  $\alpha$ -dystroglycan glycosylation *Experimental Biology* 2017, 2017/4/22-26, シカゴ(アメリカ)
- ④ 金川 基, 小林 千浩, 田尻 道子, 萬谷 博, 久我 敦, 山口 芳樹, 和田 芳直, 遠藤 玉夫, 戸田 達史, 新型の翻訳後修飾体「リビトールリン酸」の同定～修飾機序と筋ジストロフィー病態への関与, 第 9 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)
- ⑤ Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Manya H, Kuga A, Yamaguchi Y, Wada Y, Endo T, Toda T, Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy: Roles of ISPD, fukutin, and FKR in alphadystroglycan glycosylation, *New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference*, 2016/6/29-7/2, オーランド (アメリカ)
- ⑥ 金川 基, 小林 千浩, 田尻 道子, 萬谷 博, 久我 敦, 山口 芳樹, 和田 芳直,

遠藤 玉夫, 戸田 達史, 新規糖鎖ユニット“リビトールリン酸”の同定と筋ジストロフィーへの関与, 第 63 回日本生化学会近畿支部例会, 2016/5/31, 神戸薬科大学 (兵庫県・神戸市)

- ⑦ 金川 基, 新型の翻訳後修飾ユニット“リビトールリン酸”と筋ジストロフィー, 関西グライコフォーラム, 2016/5/14, 大阪市立大学 (大阪市・大阪府)
- ⑧ 金川 基, Pathological roles of abnormal glycosylation of dystroglycan in congenital muscular dystrophy with brain anomaly, The 3rd International Symposium on Glyco-Neuroscience, 2016/1/14-1/16, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)
- ⑨ 金川 基, 戸田 達史, 糖鎖修飾異常型筋ジストロフィーの病態機序と治療戦略, 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会年会合同大会, 2015/12/1-4, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑩ 金川 基, 大塚 喜久, 小林 千浩, 千代 智子, 岡田 尚巳, 武田 伸一, 戸田 達史, 糖鎖異常型筋ジストロフィーモデルに対する遺伝子治療, 第 1 回日本筋学会学術集会, 2015/8/8, 国立精神・神経医療センター研究所 (東京都・小平市)
- ⑪ 大塚 喜久, 金川 基, 千代 智子, 小林 千浩, 岡田 尚巳, 武田 伸一, 戸田 達史, 糖転移酵素 LARGE 活性を応用したジストログリカノパチー治療の検討, 第 34 回日本糖質学会年会, 2015/7/31-8/2, 東京大学 (東京都・文京区)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤

発明者: 戸田 達史、小林 千浩、金川 基、他

権利者: 国立大学法人神戸大学、他

種類: 特許

番号: 特願 2016-160390

出願年月日: 2016 年 08 月 18 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

神戸大学医学研究科分子脳科学  
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/clgene/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金川 基 (Kanagawa, Motoi)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 00448044

(2) 研究分担者

片野坂 友紀 (Katanosaka, Yuki)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：60432639

山口 芳樹 (Yamaguchi, Yoshiki)  
国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究  
本部・研究員  
研究者番号：90323451

永森 收志 (Nagamori, Shushi)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90467572