

機関番号：82118

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370053

研究課題名（和文） 中枢異常を伴う筋疾患の原因となる酵素群の構造機能解析

研究課題名（英文） Structural and functional study of enzymes which are related to central nervous system disorders with muscle deficiency

研究代表者

加藤 龍一（KATO Ryuichi）

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号：50240833

研究成果の概要（和文）：

当該疾患の原因遺伝子産物群の機能解析を行い、PomT1, T2 については付加糖鎖が酵素活性に必須であること、複合体の形成のメカニズムがヒトと酵母では異なるがゼブラフィッシュでは同様であること、を明らかにした。また、構造解析に向けたタンパク試料の大量発現系と精製を試み、PomGnT1 については無細胞系で可溶性画分として発現させることに成功した。fukutin と FKRP については大腸菌を宿主とした系で沈殿画分から変性再生により可溶化に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We elucidated PomT1 and T2 require sugar modification on their proteins for the activity. We also showed that mechanism of PomT1-T2 complex formation is different between human and yeast but similar between human and zebra-fish. Over expression and purification of PomGnT1 protein for X-ray structural determination was successful by wheat germ cell free expression system. Over expression and purification of fukutin and FKRP proteins were also successful by E. coli expression system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：糖鎖生物学

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは、未だ治療法が無い遺伝子異常による疾患である。その中でも中枢異常を伴うより重篤な病態を示す一群がある。これらは糖鎖異常によるものであり、日本で患者数が多い福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）を含む。糖鎖異常による筋ジストロフィー発症機構の研究の発展のきっかけは、研究分担者らによる一連の発見に基づいている。ジストログリカンの0-マンノー

ス型糖鎖の発見、0-マンノース型糖鎖の合成に関わる GlcNAc 転移酵素遺伝子 POMGnT1 が先天性筋ジストロフィーである muscle-eye-brain 病（MEB）の原因遺伝子であること、MEB の類縁疾患である Walker-Warburg 症候群（WWS）の原因遺伝子である POMT1 と POMT2 が 0-Man 転移酵素であること、などである。これらの発見により、糖鎖異常と筋ジストロフィーという新たな病態メカニズムを提唱した。しかしながら、

それら酵素の立体構造は明らかにされておらず、その分子機構は未解明である。

また、その後 MEB と WWS と同じく α ジストログリカンの糖鎖異常が観察される類縁疾患である FCMD、先天性筋ジストロフィー1C (MDC1C) と肢帯型筋ジストロフィー2I 型 (LGMD2I)、先天性筋ジストロフィー1D (MDC1D) が明らかになったが、いずれも原因遺伝子産物 (FCMD, fukutin; MDC1C, LGMD2I, FKRP; MDC1D, LARGE) の機能および立体構造については解明されていない。

2. 研究の目的

(1) 筋ジストロフィーの MEB 患者における原因が GlcNAc 転移酵素遺伝子 POMGnT1 の活性消失であることは明らかにされているが、どのような分子機構であるのかは未解明であり、それを議論する基礎となる酵素の立体構造も明らかにされていない。そこで、POMGnT1 の活性発現の分子機構を明らかにするために、X線結晶構造解析によるタンパク質の立体構造解析を目指し、発現系の構築および精製法の確立について検討した。

(2) WWS 患者における POMT1 および POMT2 の変異による活性消失のメカニズムとしてタンパク質の構造異常がひとつの要因として考えられる。しかし、POMT1 と POMT2 は構造解析が困難な複数回膜貫通型タンパク質であるため、その構造情報は未だ解明されていない。そこで、タンパク質の N 型糖鎖修飾の特性を利用して、膜配向性などの構造情報を解析し、複合体形成や活性発現機構、各変異による影響について検討した。

(3) POMT1 と POMT2 は POMT1-POMT2 複合体を形成することで酵素活性を発現する。出芽酵母の POMT ホモログ ScPmt1 と ScPmt2 も複合体形成が示されている。ScPmt1 は 7 回膜貫通型タンパク質であり小胞体内腔側の loop5 が活性中心と予想されているが、loop1 に位置する Arg64、Glu78、Arg138 も酵素活性に重要であり、特に Arg138 は複合体形成に必須であることが報告されている。これらのアミノ酸が POMT1 (Arg30, Glu44, Arg105) と POMT2 (Arg72, Glu86, Arg145) で保存されていたことから、これらのアミノ酸の重要性について検討した。

(4) ゼブラフィッシュは、遺伝子操作が簡易である、繁殖しやすい、表現型を解析しやすい、ことなどから、遺伝子の機能解析や生化学的研究に用いられている。また、ゼブラフィッシュは、タンパク質の大量生産のための宿主動物のひとつとしても期待されている。そこで、ゼブラフィッシュの哺乳類 0-Man

転移酵素オルソログと考えられる、zPOMT1、zPOMT2 の生化学的性質を解析した。

(5) WWS 患者における POMT1 および POMT2 の活性消失の原因として、タンパク質の立体構造異常が考えられる。そこで、これらの立体構造を X線結晶構造解析を用いて決定することを目指し、発現系の構築および精製法の確立について検討した。

(6) FMCD 患者、MDC1C および LGMD2I 患者のそれぞれの原因遺伝子である fukutin, FKRP についても立体構造は明らかにされておらず、病気発症の分子機構は未解明である。これを明らかにするため、これら遺伝子産物の立体構造を X線結晶構造解析を用いて決定することを目指し、発現系の構築および精製法の確立について検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト POMGnT1 は 1 回膜貫通の膜タンパク質で、活性領域は C 末端部にあると予想されている。昆虫培養細胞で全長を発現させた試料は結晶化に用いるには量が少なかったため、プロテアーゼ限定分解を行い、ドメインマッピングを行った。また、2 次構造予測と欠損変異体の酵素活性測定などの結果も併せ、膜貫通部を欠いた多数のコンストラクトを作成し、昆虫培養細胞で発現を検討した。また、同様に膜貫通部を欠いた複数のコンストラクトの大腸菌での発現について検討を行った。さらに、小麦胚芽を用いた無細胞発現系についても検討を行った。

(2) ヒト POMT1 と POMT2 の二次構造を SOSUI 等の予測アルゴリズムにより解析した。POMT1 および POMT2 の N 型糖鎖修飾され得る Asn を Gln に置換した。ウェスタンブロットで各変異体の分子量の変化を解析し、N 型糖鎖の修飾部位を決定した。

(3) ヒト POMT1 の Arg30、Glu44、Arg105 および POMT2 の Arg72、Glu86、Arg145 をそれぞれ Ala に置換し (R30A、E44A、R105A および R72A、E86A、R145A と略称)、酵素活性と複合体形成への影響を調べた。ウェスタンブロットにより各タンパク質の発現量を定量し、発現量当たりの酵素活性を測定した。複合体形成は免疫沈降法により確認した。

(4) zPOMT1 および zPOMT2 遺伝子をクローニングし、HEK293T 細胞を用いて両タンパク質を単独あるいは同時に発現させて酵素活性を測定した。RT-PCR 法および whole-mount in situ hybridization (WISH) 法により両遺伝子の発現解析を行った。さらに、両遺伝子に

対するアンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) を用いて、ノックダウンによる発生への影響を解析した。

(5) POMT1 および POMT2 は、複数膜貫通型の膜タンパク質で発現も精製も困難であることが予想された。そこで、大腸菌での発現検討にあたっては、ヒト由来の遺伝子の他、ラット、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、酵母由来の遺伝子も材料とした。全長での発現に際しては MYSTIC タグを用いて可溶化改善の検討を行い、また、活性中心を含むと予想されている小胞体内腔側の loop5 領域 (MIR ドメイン) を切り出しその発現についても検討を行った。酵母の発現系では GFP を可溶化タグおよび発現マーカーとして用いた。POMT1 および POMT2 は共存しないと酵素活性がないことから、昆虫培養細胞を用いた共発現系の構築も行った。

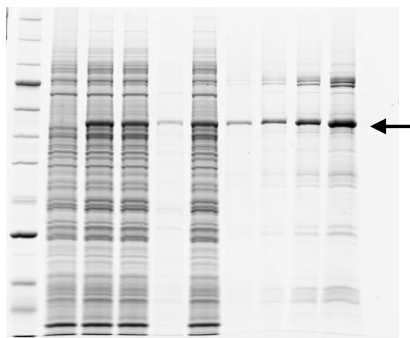
(6) fukutin, FKRП とも 1 回膜貫通型の膜タンパク質である。そこで、膜貫通領域を欠いたコンストラクトの作成を行い、大腸菌での発現の検討と、発現サンプルの精製を行い、得られたサンプルについて結晶化の初期スクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) ヒト POMGnT1 について、細胞内発現系として 20 個のコンストラクトの作成を試みた。作成に成功したもの 14 個について昆虫培養細胞で発現の検討を行ったが、発現量は少ないか沈殿であった。分泌系発現系として 20 個のコンストラクトを作成し、昆虫培養細胞で発現の検討を行ったが、発現量は極めて少ないか全く観察されなかった。

大腸菌での発現系として、10 個のコンストラクトを作成し、培養条件や菌株を変えて発現の検討を行ったが、いずれも十分な発現量は得られなかった。

小麦胚芽を用いた無細胞発現系では少量ではあるが可溶化画分にサンプルが観察され (右図、矢印)、今後のスケールアップにより結晶化実験を行える目処をつけることができた。



(2) 二次構造解析の結果、POMT1 は 7 回、POMT2 は 9 回膜貫通型のモデルが示された。N 型糖

鎖は小胞体内腔側でのみ起こる修飾反応である。組換え型 POMT1 と POMT2 を培養細胞に発現させ、N 型糖鎖修飾される部位を特定した結果、予測した二次構造モデルは支持され、POMT1 と POMT2 ともに N 末端を細胞質側、C 末端を内腔側とする膜配向性が明らかとなった。また、N 型糖鎖を欠失した POMT1-POMT2 複合体は不溶性になり、酵素活性を消失することが明らかとなった。

(3) POMT1 変異体 (R30A, E44A, R105A) と野生型 POMT2 との共発現では酵素活性は減少した。一方、野生型 POMT1 と POMT2 変異体 (R72A, E86A, R145A) との共発現では酵素活性の減少は認められなかった。免疫沈降実験では、すべての組み合わせにおいて共沈が観察され、いずれの変異体も複合体を形成できることが確認された。この結果、ScPmt1 と同様に POMT1 の loop1 が酵素活性に必要であるが、複合体形成のメカニズムはヒトと酵母で異なっており、そうした相違が基質特異性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(4) zPOMT1 および zPOMT2 はそれぞれ 720 アミノ酸および 756 アミノ酸をコードしていた。POMT 活性には zPOMT1 と zPOMT2 を共発現する必要があった。この結果、哺乳類の POMT と同様のメカニズムがあることが明らかとなり、複合体形成による活性発現機構が種を越えて保存されていた。両遺伝子は発生過程を通してほぼ全身で発現していることが確認された。また、POMT1 ノックダウン体では心膜の浮腫や尾部の形成異常、POMT2 ノックダウン体では心膜の浮腫や尾部の形成異常、眼の色素異常がみられた。いずれのノックダウン体においても α -ジストログリカンの O-Man 型糖鎖の著しい減少が確認された。ゼブラフィッシュによる zPOMT1 と zPOMT2 の発現は、機能膜タンパク質の構造解析に向けた有力な大量発現系であると考えられる。

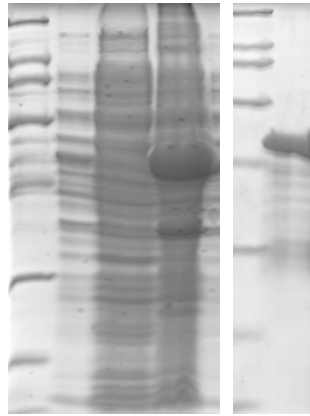
(5) POMT1 および POMT2 の全長それぞれについて、大腸菌 (ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、ラット) および酵母 (ヒト、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、ラット) の系で発現を検討した。一部発現したものもあったが、発現量が少なく不安定なものもあり、精製には至らなかった。

ヒト由来 MIR ドメインについては発現に成功したが、やはり発現量が少なくまた大腸菌由来タンパクの混入で精製に至らなかった。

昆虫培養細胞を用いての共発現系の構築を進め、感染細胞を得ることができた。今後、これを用いて結晶化に向けて発現の検討を行う予定である。

(6) fukutin, FKRП とも、その N 末端の膜貫

通領域を欠いた4個のコンストラクトをそれぞれ作成し、発現させる大腸菌株の検討を行ったところ、沈殿の状態ではあったが比較的多量の発現が確認された(右図、左パネル)。そこで、変性剤を用いて沈殿タンパク質



の可溶化を行い、リフォールディングによって可溶化を行った(上図、右パネル)。得られた可溶化サンプルを用いて結晶化の初期スクリーニングを行ったが、結晶を得ることはできなかった。リフォールディングによる精製法の確立は行うことができたので、より広範囲の結晶化条件の探索を行うことで、立体構造解析に向けた結晶の作成に路を開くことができたと言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Hiroshi Many, Keiko Akasaka-Many, Ai Nakajima, Masao Kawakita, Tamao Endo: Role of *N*-glycans in maintaining the activity of protein *O*-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. *J. Biochem.*, 147(3), 337-344, 2010

2. Eriko Avşar-Ban, Hisayoshi Ishikawa, Hiroshi Many, Masatoki Watanabe, Shinichi Akiyama, Hideo Miyake, Tamao Endo, Yutaka Tamaru: Protein *O*-mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish. *Glycobiology*, 20(9), 1089-1092, 2010

[学会発表] (計13件)

1. 遠藤玉夫、萬谷博、赤坂-萬谷啓子: 神経移動障害を伴う先天性筋ジストロフィー. 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008.7.9-11

2. 萬谷博、赤坂-萬谷啓子、遠藤玉夫: *O*-マンノース転移酵素における *N*型糖鎖の役割. 第28回日本糖質学会年会, つくば, 2008.8.18-20

3. 萬谷博、赤坂-萬谷啓子、遠藤玉夫: *O*-マ

ンノース転移酵素における *N*型糖鎖の役割. 第81回日本生化学会大会, 神戸, 2008.12.9-12

4. 遠藤玉夫、萬谷博: ジストログリカンの糖鎖修飾と筋ジストロフィー. 第81回日本生化学会大会, 神戸, 2008.12.9-12

5. 坂恵利子、萬谷博、遠藤玉夫、田丸浩: 培養細胞を用いたゼブラフィッシュ *POMT* 遺伝子の発現とその酵素活性の検討. 第81回日本生化学会大会, 神戸, 2008.12.9-12

6. 坂恵利子、萬谷博、三宅英雄、遠藤玉夫、田丸浩: ゼブラフィッシュにおける *POMT* および *POMGnT1* による *O*-mannosylation. 日本農芸化学会2009年度大会, 2009.3.27-29

7. Hiroshi Many, Keiko Akasaka-Many, Tamao Endo: Role on *N*-glycans on protein *O*-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. Austria/Japan Seminar on Comparative Glycobiology and Developmental Biology, Hayama, Japan, 2009.9.21-22

8. 遠藤玉夫、萬谷博: *O*-マンノース型糖鎖修飾と病態. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.12.9-12

9. 萬谷博、赤坂-萬谷啓子、遠藤玉夫: ヒト *O*-マンノース転移酵素における *N*型糖鎖修飾の解析. 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010.3.27-30

10. Hiroshi Many, Keiko Akasaka-Many, Tamao Endo: Role of *N*-glycans on protein *O*-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. XXV International Carbohydrate Symposium, Tokyo, 2010.8.1-6

11. Tamao Endo, Eriko Avsar-Ban, Hiroshi Many, Yutaka Tamaru: Investigation the role of protein *O*-mannosylation during development. Annual Conference of the Society for Glycobiology, St Pete Beach, FL, USA, 2010.11.7-10

12. 赤坂啓子、萬谷博、水野真盛、稲津敏行、遠藤玉夫: *POMGnT1* の基質特異性の解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010.12.7-10

13. アヴシャル-坂恵利子、石川文啓、萬谷博、渡部正利喜、秋山真一、三宅英雄、遠藤玉夫、田丸浩: ゼブラフィッシュ初期発生過程において *O*-マンノース型糖鎖修飾が必要である. 第33回日本分子生物学会年会・第

83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸,
2010.12.7-10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 龍一 (KATO Ryuichi)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授
研究者番号: 50240833

(2) 研究分担者

遠藤 玉夫 (ENDO Tamao)
地独東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
研究者番号: 30168827

川崎 政人 (KAWASAKI Masato)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・助教
研究者番号: 00342600

(3) 連携研究者

なし