

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07935

研究課題名(和文)筋ジストロフィー原因遺伝子産物LARGEによる糖鎖の伸長機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of sugar chain elongation catalyzed by muscular dystrophy cause gene product LARGE

研究代表者

矢木 宏和 (Yagi, Hirokazu)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：70565423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子産物の1つであるLARGEは2つの糖転移ドメインを有し、キシロースとグルクロン酸のリピート配列を形成する酵素である。本研究では、こうした2つの糖転移ドメインを有する糖転移酵素を対象にして、酵素がいかにして効率よく、一連の糖鎖伸長反応を行っているかという動的な作動メカニズムの解明を目指した。その結果、2つの糖転移ドメインを有する酵素は、各ドメインの配向を柔軟に変化させることにより、ドメイン間で基質糖鎖を受け渡し、糖鎖のリピート構造の伸長を効率的に行っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：LARGE (Like-acetylglucosaminyltransferase) is the causative gene product for congenital muscular dystrophy which possesses two catalytic domains with homology to members of glycosyltransferases to form a repeat sequence of xylose and glucuronic acid residues. In this study, we have performed a molecular dynamics study to characterize the mechanism that the enzymes composed of these two catalytic domains catalyze the elongation reactions of sugar chains. As a result, the enzymes exhibited dynamic motions involving domain-domain association and dissociation during the reaction, indicating that orientation between the two domains would contribute to the elongation efficiency to exchange the substrate sugar chain.

研究分野：糖鎖生化学

キーワード：LARGE K4CP 糖転移酵素 高速AFM

1. 研究開始当初の背景

ジストログリカノパチーは、脳と目に重篤な病変を伴う先天性筋ジストロフィーの一種である。これらの疾患患者には、 β -ジストログリカン(DG)上の糖鎖の発現異常が認められる。

DG上の糖鎖は、ラミニンなどの細胞外マトリックスタンパク質との相互作用を通じて細胞の基底膜と細胞膜を繋ぎとめている。このラミニンへの結合性を示す糖鎖は、独特な構造を有していると考えられているが、研究当初はその全体構造は明かかとなっていなかった。近年のDNAシーケンシング技術の進展により、多くの糖転移酵素や糖転移酵素様遺伝子が、ジストログリカノパチーの原因遺伝子として同定を通じて、ラミニン結合性糖鎖の構造情報が蓄積され、2016年にはその全体構造が明らかにされている(Cell Rep. 2016, 14:2209-2223)。たとえば、ラミニン結合性糖鎖の非還元末端はリン酸化3糖構造を形成しており、ラミニンへの結合性を示すキシロース(Xyl)とグルクロ酸(GlcA)のリピード配列が結合していることが報告されてきている(Science 2012, 335:93-6 and Science 2013, 341:896-899)。このラミニンの結合領域であるXyl-GlcAリピード配列を合成する糖転移酵素 LARGE は、ジストログリカノパチーの原因遺伝子産物の1つである。

LARGE は、キシロース転移活性とグルクロン酸転移活性の2つの糖転移活性部位を有し、単一のタンパク質で糖鎖伸長を行う二重機能を持つユニークな酵素である。一般的には、糖転移酵素は2型の膜貫通型タンパク質であり、一つの糖転移活性部位を有する。哺乳細胞においては、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸にみられるリピード構造は、いずれも単一の糖転移活性を有する糖転移酵素がリピード配列の生合成に2種類以上関与している。

糖転移酵素が、2つの触媒ドメインをいかにして獲得してきたかについては進化的にも大変興味深い。こうしたユニークな酵素による糖鎖伸長の詳細なメカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

筋ジストロフィーの原因遺伝子産物である LARGE は、Xyl 転移、GlcA 転移の2つの活性を有する特異な酵素である。本研究では、LARGE の高次構造解析を行うことで、2つの活性部位を有するタンパク質がいかにして、一連の糖鎖伸長反応を行っているかという動的な作動メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

本申請研究では LARGE によるユニークな糖鎖伸長反応のメカニズムを構造生物学的なアプローチから迫るものである。そのための第一歩として、動物細胞やカイコ発現系を利用し、LARGE の大量発現系を構築する。こうしたリコンビナント LARGE を対象にして、非変性質量分析、X線小角散乱(SAXS)、高速原子間力顕微鏡(AFM)を利用して、糖鎖伸長の機構の分子基盤を解明する。

また、研究当初は大腸菌の莢膜の構成成分で

あるコンドロイチンを合成に関わる2つの転移活性を有する Chondroitin Polymerase (K4CP) にも着目して研究を展開する。

4. 研究成果

本研究は、2つの糖転移ドメインを有する糖転移酵素(LARGE および K4CP)の糖鎖伸長機構の解明を目指すものである。

LARGE の構造解析を行うため、LARGE の大量発現系の構築を試みた。カイコを利用した大量発現を試みたが、大部分のタンパク質が不溶性分画に発現してしまい、構造解析に十分量のタンパク質を得ることができなかった。しかしながら、哺乳細胞を用いた浮遊培養や高密度培養を試みた結果、細胞 1L 培養あたり 5 mg タンパク質を精製することに成功した。さらには、LARGE のアクセプター基質を調製するために、4-Methylumbelliferyl- β -D-xylopyranoside 対して、酵素反応を行い、重合度の異なる糖鎖(3糖、4糖)を調製することにも成功した。

以上のように、リコンビナントタンパク質と基質の安定的な調製法を確立したことで、LARGE の構造解析を行うためのタンパク質を行うことが可能となった。

哺乳細胞を用いた LARGE や大腸菌で発現させた K4CP を対象にして、非変性質量分析、SAXS を行なったところ、両タンパク質は溶液中では2量体を形成していることが明らかとなった。一方で、超遠心分析を利用した濃度依存性を測定したところ、LARGE および K4CP は非変性質量分析や SAXS を測定した 0.2 mg/mL 以上の測定領域では2量体として存在しているが、0.05 mg/mL 以下の濃度域では単量体として存在していた。

一方で、高速 AFM によって K4CP に由来する2輝点が近接している像が観測され、2つの輝点が揺動している様子を観察することに成功した。さらに、基質を加えることで、時間の経過とともに合成された糖鎖と考えられるシート状の構造体が増えてくる様子が確認され、K4CP による糖鎖合成の過程を捉えることができた。高速 AFM によって K4CP に由来する2輝点が近接している像が観測された濃度は K4CP が単量体として存在している濃度であり、輝点1つが1つのドメインあることが考えられる。同様に LARGE に関しても、AFM による観測により、2つの輝点が揺動している様子を捉えることができた。さらに基質を加えることで、時間の経過とともに糖鎖が伸延する様子が確認され、LARGE による糖鎖合成の過程を捉えることにも成功した。

また、全反射蛍光顕微鏡による1分子 FRET 単独の計測を行うことで、K4CP の糖鎖伸長過程を捉えることを試みた。その結果、高濃度の K4CP-Alexa647 をガラス基板へ吸着させ、糖基質 CH4-Cy3 を結合させる条件で FRET が検出することに成功した。さらに、K4CP-Alexa647 に糖基質 CH4-Cy3 を加え、UDP-GalNAc と

UDP-GlcA を加えると、段階的に FRET 効率が減少する分子が見られた。これは、K4CP-Alexa647 へ CH4-Cy3 が結合し FRET を起こし、糖鎖が伸長することで、K4CP-Alexa647 と CH4-Cy3 が離れ、FRET 効率が下がったものと考えられる。

以上より、LARGE や K4CP といった 2 つの糖転移ドメインを有する糖転移酵素は、各ドメインの配向を柔軟に変化させることにより、ドメイン間で基質糖鎖を受け渡し、糖鎖のリピート構造の伸長を効率的に行っているものと考えられる。

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 17 件)

S.Yanaka, H.Yagi,(3 名省略), Stable isotope labeling approaches for NMR characterization of glycoproteins using eukaryotic expression systems, *Journal of Biomolecular NMR*, 査読有, 2018, 1-10, DOI: 10.1007/s10858-018-0169-2
H.Yagi, G.Yan,(4 名省略), Lewis X-Carrying Neoglycolipids Evoke Selective Apoptosis in Neural Stem Cells, *Neurochemical Research*, 査読有, 43, 2018, 212-218, DOI: 10.1007/s11064-017-2415-5
H.Yagi, D.Takakura, L.T.Roumenina, (4 名省略), Site-specific N-glycosylation analysis of soluble Fc γ receptor IIIb in human serum, *Scientific Reports*, 査読有, 8, 2018, art.no.2719, DOI: 10.1038/s41598-018-21145-y
Y.Sakae, T.Satoh, H.Yagi, (6 名省略), Conformational effects of N-glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its interaction with Fc γ receptor IIIa, *Scientific Reports*, 査読有, 7, 2017, Art.no.13780, DOI: 10.1038/s41598-017-13845-8
R.Yogo, S.Yanaka, H.Yagi, (7 名省略), Characterization of conformational deformation-coupled interaction between immunoglobulin G1 Fc glycoprotein and a low-affinity Fc γ receptor by deuteration-assisted small-angle neutron scattering, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 査読有, 12, 2017, 1-4, DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.08.004
K.Kato, S.Yanaka, H.Yagi, Technical basis for nuclear magnetic resonance approach for glycoproteins, *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy: Methodology and Application to Life Science and Materials Science*, 査読有, 2017, 415-438, DOI: 10.1007/978-981-10-5966-7_15
S.Yanaka, T.Yamazaki, R.Yogo, M.Noda, S.Uchiyama, H.Yagi, K.Kato, NMR

detection of semi-specific antibody interactions in serum environments, *Molecules*, 査読有, 22, 2017, art.no.1619, DOI: 10.3390/molecules22101619
T.Kato, K.Kikuta, A.Kanematsu, S.Kondo, H.Yagi,(2 名省略), Alteration of a recombinant protein N-glycan structure in silkworms by partial suppression of N-acetylglucosaminidase gene expression, *Biotechnology Letters*, 査読有, 39, 2017, 1299-1308, DOI: 10.1007/s10529-017-2361-y
M.Nagae, S.K.Mishra,(7 名省略)H.Yagi,(5 名省略), 3D structural analysis of protein O-mannosyl kinase, POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy, *Genes to Cells*, 査読有, 22, 2017, 348-359, DOI: 10.1111/gtc.12480
T.Yoshimura, A.Hayashi, M.Handa-Narumi, H.Yagi,(11 名省略), GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system, *Scientific Reports*, 査読有, 7, 2017, art.no.42257, DOI:10.1038/srep42257
H.Yagi and K.Kato, Functional roles of glycoconjugates in the maintenance of stemness and differentiation process of neural stem cells, *Glycoconjugate J.*, 34, 2017, 757-763, DOI:10.1007/s10719-016-9707-x
H.Yagi, C.-W.Kuo,(4 名省略), Direct mapping of additional modifications on phosphorylated O-glycans of o-dystroglycan by mass spectrometry analysis in conjunction with knocking out of causative genes for dystroglycanopathy, *Mol. Cell Proteomics*, 査読有, 15, 2016, 3424-3434, DOI:10.1074/mcp.M116.062729
H.Ito, H.Kaji,(11 名省略)H.Yagi,(16 名省略), Comparison of analytical methods for profiling N- and O-linked glycans from cultured cell lines: HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study, *Glycoconjugate J.*, 査読有, 33, 2016, 405-415, DOI:1007/s10719-015-9625-3
S.H.Kang, H.S.Jung,(16 名省略)H.Yagi,(3 名省略), Glycan structure and serum half-life of recombinant CTLA4Ig, an immunosuppressive agent, expressed in suspension-cultured rice cells with coexpression of human β 1,4-galactosyltransferase and human CTLA4Ig, *Glycoconjugate J.*, 査読有, 32, 2015, 161-172, DOI:10.1007/s10719-015-9590-x
Y.Isoda, H.Yagi,(6 名省略), Importance of the side chain at position 296 of antibody Fc in interactions with Fc γ RIIIa and other Fc γ receptors, *PLoS ONE*, 査読有, 10, 2015,

e0140120,
DOI:10.1371/journal.pone.0140120
N.Nakagawa, H.Yagi,(3 名省略)、Ectopic clustering of Cajal-Retzius and subplate cells is an initial pathological feature in Pomgnt2-knockout mice, a model of dystroglycanopathy, Scientific Reports、査読有、5、2015、art.no.11163、
DOI:10.1038/srep11163
H.Yagi, M.Nakamura,(11 名省略)、Stable isotope labeling of glycoprotein expressed in silkworms using immunoglobulin G as a test molecule、Journal of Biomolecular NMR、査読有、62、2015、157-167、
DOI:10.1007/s10858-015-9930-y

〔学会発表〕(計 15 件)

矢木宏和、糖タンパク質糖鎖の機能解明のための構造生物学的アプローチ法の開発と応用、第 26 回 日本バイオイメージング学会学術集会、2017

矢木宏和、糖タンパク質糖鎖の構造解析法の開発と糖鎖機能解析への応用、第 2 回 G-CHAIN セミナー、2017

Hirokazu Yagi、The characterization of the laminin-binding glycans on alpha-dystroglycan catalyzed by several causative gene products of dystroglycanopathy、The 1st International Conference on the Glycobiology of Nervous System、2017

矢木宏和、糖タンパク質糖鎖の機能解明のための構造解析技術の開発と応用、第 1 回触発型有機化学研究会、2017

矢木宏和、糖タンパク質における糖鎖の生物機能と高次構造への影響、第 58 回 日本生化学会中国四国支部例会、2017

矢木宏和、 α -ジストログリカンのラミニン結合性糖鎖形成するポストリン酸修飾の構造解析、日本薬学会第 137 年会、2017

Hirokazu Yagi、Development and application of glycosylation-profiling techniques for functional glycomics in the nervous system、11th International Symposium on Cell Surface Macromolecules、2017

矢木宏和、細胞膜上の糖鎖の機能解明のための糖鎖クラスターの設計と創生、第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2016

矢木宏和、ヒト血清由来の可溶性 Fc γ レセプターIIIb の部位特異的な N 型糖鎖の構造解析、第 35 回日本糖質学会年会、2016

矢木宏和、分子、細胞、組織レベルにおける糖鎖の機能解析、日本大学理工学部インフォーマルセミナー、2016

Hirokazu Yagi、Functional analysis of causative gene products of α -dystroglycanopathy associated with the formation of laminin-binding glycans、

The 3rd International Symposium on Glyco-Neuroscience、2016
Hirokazu Yagi、Functional analysis of enzymes involved in the formation of laminin-binding glycans displayed on α -dystroglycan、BMB2015、2015
Hirokazu Yagi、Application of N-glycosylation profiling by using HPLC mapping、糖鎖科学中部拠点/日本ウォータース共催セミナー、2015
矢木宏和、神経系における糖鎖の機能解明のための糖鎖プロファイリング技術の開発とその応用、第 34 回日本糖質学会年会、2015
矢木宏和、HPLC および質量分析による糖鎖の構造解析、技術情報協会セミナー「バイオ/抗体医薬品における糖鎖・タンパク質解析の基礎とバリデーション」、2015

〔図書〕(計 1 件)

矢木宏和、加藤晃一、エヌ・ティー・エス出版、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック～創薬・医療から食品開発まで～、2015、6 ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者 矢木 宏和(YAGI, Hirokazu)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号：70565423

(2)研究分担者

(3)連携研究者 加藤 晃一(KATO, Koichi)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号： 20211849

連携研究者 杉山 正明 (SUGIYAMA, Masaaki)
京都大学・複合原子力科学研究所・教授
研究者番号： 10253395

連携研究者 佐藤 匡史 (SATO, Tadashi)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号： 80532100

連携研究者 山口 拓実 (YAMAGUCHI, Takumi)
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス系・准教授
研究者番号： 60522430

(4)研究協力者