

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18496

研究課題名(和文)ジストログリカノパチーの機構解明へ向けた構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural studies on the pathological mechanism of dystroglycanopathy

研究代表者

長江 雅倫 (Nagae, Masamichi)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任研究員

研究者番号：60619873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィーは進行性の筋力低下を伴う重篤な遺伝子疾患の総称であり、基底膜上のラミニンと筋細胞表面のジストログリカン複合体の結合が損なわれることによって生じる。ラミニンはジストログリカン複合体に含まれるAlpha-ジストログリカン上のO-マンノース型糖鎖依存的に結合しており、糖鎖修飾の異常が病状に直結している。本研究ではO-マンノース型糖鎖修飾に関わるリン酸化酵素Protein O-mannosyl Kinase (POMK)について構造生物学的研究によって触媒機構および基質認識機構を明らかにした。この成果は筋ジストロフィー発症のメカニズム解明の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Congenital muscular dystrophy is a group of diseases caused by defects in O-mannose glycosylation of the alpha-subunit of dystroglycan and progressive weakness and wasting of skeletal muscle are commonly observed. Alpha-dystroglycan (α-DG) is a component of the dystrophin-glycoprotein complex of skeletal muscle cells and directly links several other components to the basement membrane. The abnormal O-mannosylation of α-DG leads to severe congenital muscular dystrophies due to detachment of extracellular matrix proteins from the basal membrane. Phosphorylation at C6-position of O-mannose catalyzed by protein O-mannosyl kinase (POMK) is a crucial step in the biosynthetic pathway of O-mannose glycan. In this project, we solved the crystal structures of POMK catalytic domain in the absence and presence of substrates. These structures provides atomic insights into catalytic reaction mechanism and substrate recognition. These results lead to clinical approach to this severe disease.

研究分野：構造生物化学

キーワード：糖鎖生物学 X線結晶構造解析 生化学

### 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは進行性の筋力低下を伴う重篤な遺伝子疾患の総称であり、基底膜上のラミニンと筋細胞表面のジストログリカン複合体との結合が損なわれることで生じる。これまで筋ジストロフィーの発症メカニズムに関する研究は、ラミニンやジストログリカン複合体の構成蛋白質やジストログリカン複合体と細胞骨格をつなぐ蛋白質に関する研究が中心であった。しかしここ数年の研究で、ラミニンはジストログリカン複合体に含まれる alpha-ジストログリカン ( $\alpha$ -DG) 上の O-マンノース型糖鎖修飾依存的に結合しており、糖鎖合成の異常が病状と直結していることが明らかになった。昨年、神戸大学の金川基講師らのグループによって O-マンノース型糖鎖修飾の全容が明らかになり、研究のフェーズが分子の同定からより高次の機能解明に移っていった。

こうした重要性に比して O-マンノース型糖鎖修飾に関する酵素群に対する構造生物学的研究は世界的にも例が限られていた。私はこれまで蛋白質と糖鎖との相互作用や糖蛋白質上の糖鎖の構造と機能の関係について、X線結晶構造解析を中心手法とした構造生物学によって明らかにする研究を続けてきた。

そこで本研究では O-マンノース型糖鎖と蛋白質との相互作用や O-マンノース型糖鎖の生合成メカニズムに焦点を当てて研究を行うことにした。

### 2. 研究の目的

本研究の計画段階での目的は以下の二つであった。

1) ラミニンと  $\alpha$ -DG 特異的 O-マンノース型糖鎖との相互作用様式を構造生物学的に明らかにする。

2) O-マンノース型糖鎖修飾の生合成経路に関わる SGK196 (別名 Protein O-mannosyl Kinase, POMK) の基質認識および反応機構を構造生物学的に明らかにする。

### 3. 研究の方法

私の専門は X 線結晶構造解析を中心とした構造生物学であり、興味を中心は糖鎖の果たす生物学的役割を明らかにする糖鎖生物学である。本研究も X 線結晶構造解析、NMR 測定、分子動力学シミュレーションやドッキングモデルの作成などを用いて研究を行った。

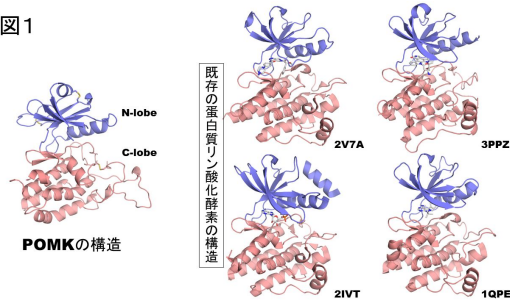
### 4. 研究成果

研究目的 1 については、研究の開始直後に全く同様の研究をアイオワ大学のキャンベル教授らのグループから報告されてしまった (Briggs et al., Nat.Chem.Biol. 2016)。このため、この研究に関しては撤退を余技なくされた。

そこで研究目的 2 に注力し、マウス由来 POMK 触媒ドメインの X 線結晶構造解析に取り

組んだ。POMK は細胞内腔で働く高難度発現蛋白質である。そこで創薬プラットフォーム支援事業のサポートを受け、横浜市立大学の禾晃和准教授、明石知子准教授、根谷崎牧子氏、大井里香氏にご協力いただき均一な糖蛋白質の大量発現・精製・結晶化に成功した。さらに同事業の追加サポートを受け、高エネルギー加速器研究機構の千田俊哉教授、松垣直宏准教授のご協力で低エネルギー X 線を用いた単波長異常分散法 (SAD 法) による位相決定にも成功した。こうして得られた POMK 触媒ドメインの全体構造は蛋白質リン酸化酵素のフォールドと同じであった (図 1)。

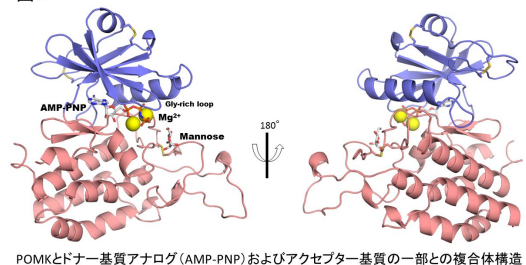
図 1



POMK は  $\alpha$ -DG 上の糖鎖修飾のうち四番目に働く酵素で GalNAc( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-4)Man という三糖が結合した  $\alpha$ -DG に対して ATP をドナー基質として、マンノースの 6 位の OH 基にリン酸を転移する酵素である。POMK の基質認識および反応機構を明らかにするために、ATP の非加水分解アナログである AMP-PNP と  $\alpha$ -DG 糖鎖修飾ペプチドとの複合体の結晶構造解析を行った (図 2)。糖ペプチドは東京都健康長寿医療センターの遠藤玉夫副所長、萬谷博研究副部長から供与を受けた。その結果、ドナー基質が分子中央の窪みにはまっていること、その隣のやや開けたクレフトに  $\alpha$ -DG 糖鎖修飾ペプチドがはまることが明らかになった。驚いたことに、POMK は糖鎖部分のみを認識していることなどが明らかになった。

こうした一連の解析によって筋ジストロフィー発症のメカニズムに対する分子基盤の一端が明らかになった。今後は筋ジストロフィー治療に向けて、立体構造を基にした新たな POMK 賦活化剤のデザインなどの応用展開が考えられる。

図 2



POMK とドナー基質アナログ (AMP-PNP) およびアクセプター基質の一部との複合体構造

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

1. Masamichi Nagae, Sushil K. Mishra, Makiko Neyazaki, Rika Oi, Akemi Ikeda, Naohiro Matsugaki, Satoko Akashi, Hiroshi Many, Mamoru Mizuno, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Toshiya Senda, Tamao Endo, Terukazu Nogi and Yoshiki Yamaguchi

3D structural analysis of Protein O-Mannosyl Kinase POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy  
*Genes to Cells* **22** (4): 348-359 (2017)

2. Masamichi Nagae, Dorothee Liebschner, Yusuke Yamada, Kana Morita-Matsumoto, Naohiro Matsugaki, Toshiya Senda, Morihisa Fujita, Taroh Kinoshita and Yoshiki Yamaguchi

Crystallographic analysis of murine p24y2 Golgi Dynamics (GOLD) domain  
*Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **85** (4): 764-770 (2017)

3. Masamichi Nagae, Tetsuya Hirata, Kana Morita-Matsumoto, Romina Theiler, Morihisa Fujita, Taroh Kinoshita and Yoshiki Yamaguchi

3D structure and interaction of p24β and p24δ Golgi dynamics domains: implication for p24 complex formation and cargo transport

*Journal of Molecular Biology* **428**, 4087-4099 (2016)

4. Hari Prasad Dulal, Masamichi Nagae, Akemi Ikeda, Kana Morita-Matsumoto, Yoshiyuki Adachi, Naohito Ohno, and Yoshiki Yamaguchi

Enhancement of solubility and yield of a β-glucan receptor Dectin-1 C-type

lectin-like domain in Escherichia coli with a solubility-enhancement tag.

*Protein Expression and Purification* **123**, 97-104 (2016)

5. Masamichi Nagae, Akemi Ikeda, Shinya Hanashima, Takumi Kojima, Naoki Matsumoto, Kazuo Yamamoto and Yoshiki Yamaguchi

Crystal structure of human dendritic cell inhibitory receptor (DCIR) C-type lectin domain reveals the binding mode with N-glycan

*FEBS Letter* **590**(8), 1280-8 (2016)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 長江雅倫、山口芳樹  
N型糖鎖の立体構造のレクチンを使った可視化  
第35回日本糖質学会年会、2016年9月3日

〔図書〕(計 0 件)

〔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  
長江 雅倫 (NAGAE, Masamichi)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員

研究者番号：60619873

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )