

平成22年 6月15日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19790244  
 研究課題名(和文) 筋ジストロフィー症の発症に関わる糖鎖合成酵素の機能解析とその破綻  
 研究課題名(英文) Glycosyltransferases on muscular dystrophy and their breakdown.

研究代表者  
 萬谷 啓子 (MANYA KEIKO)  
 地方独立行政法人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)  
 東京都健康長寿医療センター研究所・研究員  
 研究者番号：70415496

研究成果の概要(和文)：POMT1、POMT2 と POMGnT1 は  $\alpha$ -ジストログリカンの主要糖鎖である *O*-マンノース型糖鎖の生合成を担う糖転移酵素であり、先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子である。本研究では、POMT1、POMT2 と POMGnT1 の触媒活性制御機構や基質特異性の解析を行った。その結果、特定のアミノ酸配列が *O*-マンノース型糖鎖修飾を受けることや POMT1 と POMT2 の *N*型糖鎖は POMT 活性に必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：POMT1, POMT2 and POMGnT1 are glycosyltransferases and mutations in them cause congenital muscular dystrophies. Substrate specificity of these glycosyltransferases and the mechanisms regulating catalysis were investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：筋ジストロフィー症、糖鎖、糖転移酵素

## 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーとは筋線維の壊死や変性により進行性の筋力低下や筋萎縮を呈する遺伝性疾患の総称である。これまでに数々の筋ジストロフィーの原因遺伝子が発見されてきた。その多くは筋細胞膜上に存在するジストロフィン-糖タンパク質複合体(DGC)に関与していることから、筋組織の正常な発生や機能におけるDGCの重要性が注目されている。近年、DGCの構成分子である $\alpha$ -ジスト

ログリカン( $\alpha$ -DG)の糖鎖異常が、中枢神経障害を伴う先天性筋ジストロフィーの発症に関わることが相次いで報告されている。これらの発見は糖鎖が筋組織の発生や機能に重要であることを示しており、筋ジストロフィーや滑脳症の発症に糖鎖異常が関与するという、新たな病態メカニズムが提唱された。 $\alpha$ -DGは糖鎖を介してラミニンなどの基底膜の分子に結合することで神経や筋組織を正常に保つことが知られている。 $\alpha$ -DGの糖鎖異

常は、ラミニンとの結合障害を起こし、筋ジストロフィーと中枢神経障害の両方の発症の原因となるということが示唆されている。これまでに、 $\alpha$ -DG の主要糖鎖が *O*-マンノース型糖鎖 ( $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}$ ) であること、先天性筋ジストロフィーの Walker-Warburg syndrome (WWS) と muscle-eye-brain 病 (MEB 病) の原因遺伝子産物である POMT1、POMT2 と POMGnT1 が本糖鎖の生合成を担う糖転移酵素であることなどが明らかにされている。POMT1、POMT2 はタンパク質のセリン/スレオニン残基にマンノースを転移する、*O*-マンノース型糖鎖生合成の最初のステップで働く酵素であり、POMGnT1 はその次のステップである GlcNAc $\beta$ 1-2Man を合成する酵素である。

*O*-マンノース型糖鎖は酵母では一般的に見られる糖鎖構造であるが、哺乳類では非常に珍しく、これまでに  $\alpha$ -DG 以外にこの糖鎖修飾を受ける蛋白質は見つけられていない。

研究代表者はこれまでに POMGnT1 の構造解析により触媒活性領域を同定し、さらに免疫沈降法により POMT1-POMT2 複合体の形成が酵素活性に必要であることを証明している。*O*-マンノース型糖鎖生合成における分子機構を明らかにすることにより、神経・筋組織の形成、機能維持における *O*-マンノース型糖鎖の役割、さらには糖鎖異常による先天性筋ジストロフィーの発症メカニズムを解明することを目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では、POMT1、POMT2 と POMGnT1 の触媒活性制御機構や基質特異性の解析を行い、*O*-マンノース型糖鎖生合成における分子機構を明らかにすることにより、*O*-マンノース型糖鎖の生体内における局在や機能を解明することを目指す。

1) POMT1、POMT2 の基質特異性の解析: *O*-マンノース型糖鎖は  $\alpha$ -DG に特異的である可能性が示唆されており、WWS 患者では  $\alpha$ -DG に対する *O*-マンノース転移活性が欠損していることが明らかにされているが、変異によって病状が異なることから  $\alpha$ -DG 以外の蛋白質への POMT1、POMT2 の関与は否定できない。そこで POMT1、POMT2 の基質特異性を調べ、他の蛋白質への修飾の有無あるいは  $\alpha$ -DG に特異的である意義を明らかにする。

2) POMT の複合体形成の解析: これまでの研究により POMT1-POMT2 複合体の形成を証明している。*O*-マンノース転移活性発現において POMT1-POMT2 複合体形成が必要であることから、本酵素および *O*-マンノース型糖鎖の生理機能を考える上で、複合体形成の意義を明らかにすることは、次の重要な課題である。同様に複合体を形成する糖転移酵素の Cosmc では一方の分子がシャペロンとして機能する

ことが知られ、POMT1/POMT2 でも触媒サブユニットと調節サブユニットのように別の機能を分担している可能性が考えられる。そこで、変異体を用いて複合体形成および基質特異性への影響の解析を行う。

## 3. 研究の方法

1) POMT1、POMT2 の基質特異性の解析: *O*-マンノース型糖鎖が結合していると推測される  $\alpha$ -DG のムチン様ドメインの配列をもとにセリン/スレオニン残基を含む様々なペプチドを作製する。これらのペプチドを用いて POMT の活性測定を行い、コンセンサス配列の有無を調べる。得られた配列を用いてデータベースより候補となる蛋白質を検索する。

2) POMT の複合体形成の解析: WWS 患者で見いだされた変異を挿入した POMT1、POMT2 を用い、変異による複合体形成および基質特異性への影響の解析を行う。また、POMT1、POMT2 のアミノ酸置換体や欠失変異体などを作製して酵素活性、複合体形成に関わる領域、アミノ酸を同定する。特に POMT1、POMT2 上の *N*型糖鎖の複合体形成における役割についてアミノ酸置換体などを用いて調べる。

## 4. 研究成果

1) POMT1、POMT2 の基質特異性の解析: *O*-マンノース型糖鎖が結合していると推測される  $\alpha$ -DG のムチン様ドメインの配列をもとに作製したペプチドを用いて *O*-マンノース転移活性測定を行い、コンセンサス配列の有無を調べた。その結果、測定に用いたペプチドのうち2つのペプチドに高効率にマンノースが転移されていた。この2つの配列を比較すると保存された配列があり、特定のアミノ酸配列が *O*-マンノース型糖鎖修飾を受けることが明らかになった。そこで得られた配列を用いてデータベースより候補となる蛋白質の検索を行った。また、質量分析により、ペプチド内の特定のアミノ酸を起点として連鎖的に *O*-マンノース転移反応が進むことが明らかになった。

2) POMT の複合体形成の解析: WWS でみられる POMT1 および POMT2 の遺伝子変異は POMT 活性を失活させる。変異による活性消失のメカニズムについてはよく分かっていないが、変異が POMT1 および POMT2 の広範囲に散在していることから、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。POMT1 と POMT2 は多回数膜貫通型タンパク質と予測されているが、その構造情報は未だ不明である。ところで、*N*型糖鎖の修飾は小胞体およびゴルジ体の内腔側でしか起こらないことから、膜タンパク質の膜に対する配向性の指標として利用できる。ヒト POMT1 と POMT2 には *N*型糖鎖修飾のコンセンサス配列

(Asn-X-Ser/Thr) がそれぞれ 4 ヶ所と 5 ヶ所存在する。そこで、*N* 型糖鎖修飾され得る Asn を Gln に置換した変異体を作製し、分子量の変化から *N* 型糖鎖の修飾部位を決定した。また、変異による POMT 活性への影響を調べた。

変異体の解析から POMT1 では 3 ヶ所に、POMT2 では 5 ヶ所全てに *N* 型糖鎖が修飾されることが分かり、この結果は現在予測されている膜配向性モデルを支持するものであった。また、POMT1 あるいは POMT2 の Asn を 1 ヶ所置換しても、POMT 活性にはほとんど影響しないことが分かった。さらに、POMT1 か POMT2 のどちらか一方の Asn をすべて置換して *N* 結合型糖鎖を欠失させると、POMT 活性が完全に消失した。これらの結果から、POMT1 と POMT2 の *N* 型糖鎖は POMT 活性に必要であることが明らかとなった。

また、POMT の複合体形成や活性発現機構における *N* 型糖鎖の役割について検討した。上記の通り、POMT1 では 3 ヶ所、POMT2 では 5 ヶ所の Asn で糖鎖修飾が確認されている。POMT1 または POMT2 の一方の Asn を Gln に 1 ヶ所置換しても、POMT 活性にはほとんど影響しないが、どちらか一方の Asn をすべて Gln に置換して *N* 結合型糖鎖を欠失させると、複合体は形成されるものの不溶性となり、POMT 活性が完全に消失することが分かった。また、糖鎖修飾阻害剤のツニカマイシンで、*N* 型糖鎖の修飾を阻害した場合も同様に不溶性となり POMT 活性は消失した。これらの結果から、POMT1 と POMT2 の *N* 型糖鎖は POMT 活性に必要であることが明らかとなった。さらに、*N* 型糖鎖をエンドグリコシダーゼ H で処理したところ、POMT1 と POMT2 の分子量が低下したことから、POMT1 と POMT2 には高マンノース型糖鎖が結合している、つまり小胞体に局在していることが示唆された。これは、以前の免疫染色の結果と一致していた。

#### 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 Manya, Keiko Akasaka-Manya, Ai Nakajima, Masao Kawakita, and 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 Hiroshi Manya, Takehiro Suzuki, Keiko Akasaka-Manya, Hide-Ki Ishida, Mamoru Mizuno, Yasushi Suzuki, Toshiyuki

Inazu, Naoshi Dohmae, Tamao Endo: Regulation of mammalian protein *O*-mannosylation: Preferential amino acid sequence for *O*-mannose modification. *J. Biol. Chem.*, 282(28), 20200-20206, 2007

[学会発表] (計 10 件)

- ① 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
- ② 遠藤玉夫、赤坂-萬谷啓子、萬谷博: 先天性筋ジストロフィーにおける糖鎖異常. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10. 21-24
- ③ Hiroshi Manya, Keiko Akasaka-Manya, 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
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 遠藤玉夫、萬谷博、赤坂啓子: 先天性筋ジストロフィーと糖鎖異常. *Biochemistry and Molecular biology* 2007 (BMB2007), Yokohama, 2007. 12. 11-15
- ⑧ Hiroshi Manya, Naoshi Dohmae, Keiko Akasaka, Toshiyuki Inazu, Tamao Endo: Identification of preferential sequence for protein *O*-mannosylation. *Biochemistry and Molecular biology* 2007 (BMB2007), Yokohama, 2007. 12. 11-15
- ⑨ Hiroshi Manya, Takehiro Suzuki, Keiko

Akasaka-Manya, Naoshi Dohmae, Tamao Endo: Biochemical approach for  $\alpha$ -dystroglycanopathies: Identification of consensus sequence for protein O-mannosylation. 12th International Congress of the World Muscle Society, Taormina, Italy, 2007.10.17-20

- ⑩ Hiroshi Many, Takehiro Suzuki, Keiko Akasaka-Manya, Naoshi Dohmae, Tamao Endo: Preferential amino acid sequence for protein O-mannosylation. XIX International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-19), Cairns, Australia, 2007.7.15-20

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

萬谷 啓子 (MANYA KEIKO)

地方独立行政法人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)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号 : 70415496

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :