

糖アルコールリン酸修飾のバイオロジー

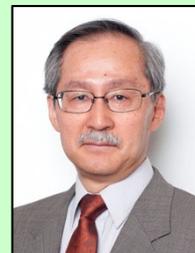
A Biology of sugar-alcohol modification in glycan

課題番号：19H05648

遠藤 玉夫（ENDO Tamao）

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）・シニアフェロー



研究の概要（4行以内）

糖アルコールリン酸（リビトールリン酸）は、哺乳類では新奇の翻訳後修飾体として、最近代表者らが発見した。リビトールリン酸修飾の異常は先天性筋ジストロフィー症など重篤な疾患の原因となるが、その代謝経路や機能などの多くは未解明である。本研究ではリビトールリン酸修飾の物理化学特性や生理機能を解明し生物学的意義を確立することを目的とする。

研究分野：機能生物化学、構造生物化学

キーワード：糖鎖、糖アルコールリン酸、翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、細胞表面や細胞間に存在する多くの分子の機能制御を司る重要な翻訳後修飾体のひとつであり、分子間の相互作用や細胞間情報伝達などにおいて多様な生理機能を発揮する。我々は、哺乳類の糖鎖に糖アルコールリン酸（リビトールリン酸、グリセロールリン酸）という新たな翻訳後修飾体を発見し、その修飾に関わる一連の酵素群を同定した。その結果、リビトールリン酸修飾の異常が先天性筋ジストロフィー症や滑脳症など重篤な疾患の原因となることが明らかとなった。一般的に糖鎖は、単糖がグリコシド結合により繋がったものであるが、糖アルコールリン酸修飾は、リビトールあるいはグリセロールがリン酸を介して糖に結合するリン酸ジエステル結合である。こうした糖アルコールリン酸による修飾は、これまで細菌類の細胞壁成分としては知られていたが、哺乳類では初めての発見であった。細菌類とは異なる形で哺乳類に保存されており、しかも重篤な疾患に関わる修飾体として存在していたことは驚くべきことであった。しかし、哺乳類における糖アルコールリン酸の前駆体や代謝経路などの基礎的な情報やリン酸ジエステル結合を利用して糖鎖に結合するメリットなどは不明である。

2. 研究の目的

新たな翻訳後修飾体としての糖アルコール

リン酸の生物学的意義を確立することを目的とする。哺乳類における新たな翻訳後修飾体である糖アルコールリン酸の生物学的意義を統合的・多階層的に明らかにすることで、翻訳後修飾の学術的理解を深め、基礎生物学分野の発展に貢献する。さらに、先天性筋ジストロフィー症という難病の克服に向けた基礎的知見を得ることで、病態解明や治療法開発など社会的にも貢献したい。

3. 研究の方法

本研究では、以下の5点に焦点を当て研究を推進する。

- ①物理化学的特性：糖アルコールリン酸を含むモデル糖鎖を有機化学的に合成し、物理化学的手法および計算科学を駆使し動的立体構造を解析する。
- ②修飾メカニズム：糖アルコールリン酸修飾に関わる酵素の構造生物学により修飾反応の分子メカニズムを解明する。
- ③代謝経路：糖アルコールリン酸の前駆体の合成・代謝に関わる酵素を生化学的に同定する。
- ④修飾標的分子：抗体・レクチン様分子やケミカルバイオロジーにより糖アルコールリン酸修飾の特異的検出法を開発する。
- ⑤生物学的意義：遺伝子組み換えにより糖アルコールリン酸を欠損した細胞や動物を作製し、生物機能への影響や疾患との関連を解析する。

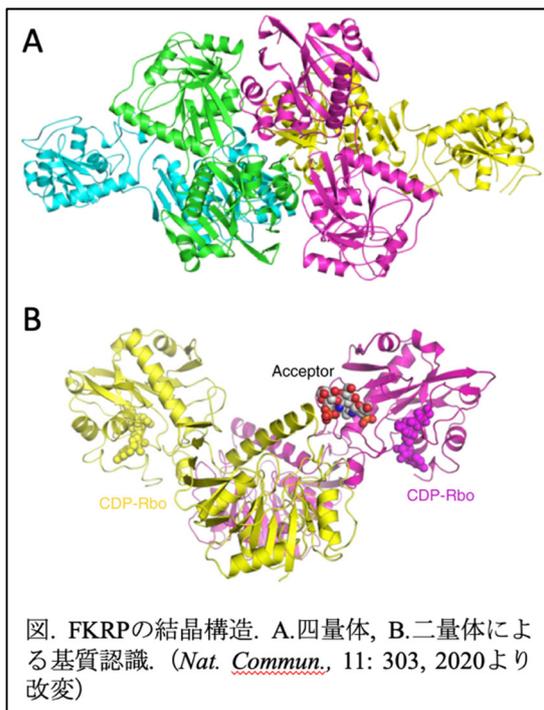
4. これまでの成果

①リビトールリン酸含有糖鎖の有機化学合成
哺乳動物細胞から検出されたリビトールリン酸 (RboP) 修飾糖鎖の構造[---GlcA-Xyl-RboP-RboP-GalNAc-GlcNAc-ManP-Thr]には、タンデム RboP 構造 (RboP-RboP-) が存在する。今回、本研究においてもっとも重要なモデル糖鎖となる RboP-GalNAc と RboP-RboP-GalNAc の骨格合成に成功した (論文 1)。

②構造解析による修飾メカニズムの解明

X 線結晶構造解析によりタンデム構造の 2 番目の RboP を転移する酵素 FKRP の構造を決定した (論文 2)。

これまでに FKRP は、触媒ドメインの配列から、ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (NTase) スーパーファミリーに属することが予想されていたが、本構造解析から、触媒ドメイン中に、NTase スーパーファミリーに共通の α/β フォールドの存在が確認され、FKRP がこのファミリーに属することが裏付けられた。また、FKRP は結晶中で、2 量体が 2 量体を形成する形でホモ 4 量体を形成していた。FKRP は溶液中でも 4 量体として存在することが確認された。さらに、筋ジストロフィー症患者から見出されたいくつかの変異は、FKRP プロトマー間やドメイン間のインターフェースに位置していることが分かった。そこで、このうち 3 つの変異 (Y88F、S221R、L276I) について、重合体形成状態と酵素活性に与える影響を調べた。その結果、いずれの変異体も 4 量体を形成できず、酵素活性も大



きく低下していたことから、FKRP の 4 量体形成は酵素活性に重要であることが示された。次に、FKRP の基質認識機構を解析した。ドナー基質である CDP-Rbo の認識機構を調べたところ、NTase の活性部位に相当する保存されたアスパラギン酸が、2 価金属イオンを介して CDP-Rbo のリン酸基部分を認識することが分かった。さらに、アクセプターである糖鎖構造[RboP-GalNAc-GlcNAc-ManP-Thr]を持つ糖ペプチドの認識機構を調べたところ、FKRP4 量体のうちの 2 つのプロトマーを使って糖鎖を結合するという、興味深いアクセプター認識機構が明らかになった。すなわち、1 つの FKRP プロトマーのステムドメインが糖鎖の根元のマンノースリン酸 (ManP) のリン酸基を認識し、もう 1 つの FKRP プロトマーの触媒ドメインがリビトールリン酸 (RboP) のリン酸基を認識することが分かった。以上の結果から、FKRP は 2 量体を機能単位とする 4 量体を形成していることが分かり、ユニークな RboP 含有糖鎖を合成するための重要な構造的基盤が明らかになった。

5. 今後の計画

①今回合成した RboP-GalNAc、RboP-RboP-GalNAc の前後を付加した構造 Xyl-RboP-RboP-GalNAcなどの合成を進める、と同時に、物理化学的手法および計算科学による RboP 修飾体の動的立体構造の解析を進める。

②構造解析については、1 番目の RboP を転移する酵素 FKTN と RboP にキシロース (Xyl) を転移する酵素 TMEM5/RXYLT1 の結晶構造解析を進め、RboP 修飾体の生合成機構の全容解明を目指す。

③代謝経路④修飾標的分子⑤生物学的意義についても引き続き進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1) Tamura T, Omura Y, Tamura J. Stereo- and Regioselective Synthesis of *O*-Mannosyl Glycan Containing Matriglycan and a Part of Tandem Ribitol Phosphate. *J. Org. Chem.*, 85: 12935-12946 (2020)

2) Kuwabara N, Imae R, Many H, Tanaka T, Mizuno M, Tsumoto H, Kanagawa M, Kobayashi K, Toda T, Senda T, Endo T, Kato R. Crystal structures of fukutin-related protein (FKRP), a ribitol-phosphate transferase related to muscular dystrophy. *Nat. Commun.*, 11: 303 (2020)

7. ホームページ等

<https://www.tmgihg.jp/research/>