

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82118

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840029

研究課題名(和文)筋ジストロフィー疾患を引き起こす糖転移酵素の構造機能相関

研究課題名(英文) Structure-function relationships of glycosyltransferases involved in muscular dystrophy disease.

研究代表者

桑原 直之 (Kuwabara, Naoyuki)

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・研究員

研究者番号：70506253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

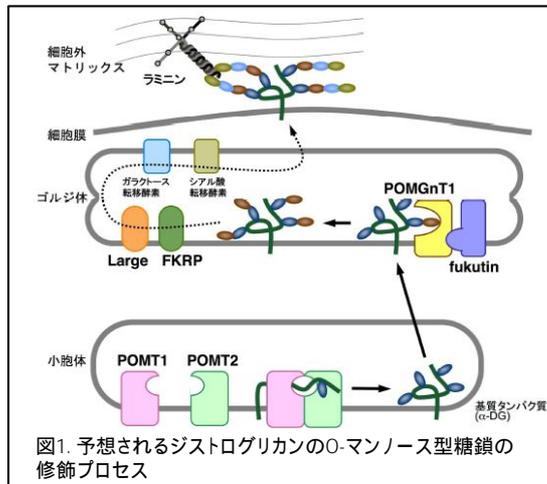
研究成果の概要(和文)： α -ジストログリカン(aDG)は細胞表面に局在する糖タンパク質であり、ラミニンなどの細胞外マトリックス局在タンパク質との相互作用に直接関与している。本研究ではその疾患原因遺伝子の一つとして同定されているPOMGnT1に注目した。POMGnT1はMan-Ser/ThrにGlcNAc-b1,2結合を付加する事が明らかになっていたが、筋ジストロフィー疾患発症におけるPOMGnT1の役割は未解明であった。本研究ではPOMGnT1のステムドメインと触媒ドメインを含む領域の構造機能解析を行い、POMGnT1の機能不全による筋ジストロフィー疾患発症機構モデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：A 0-mannose type GalNAc-b1,3-GlcNAc-b1,4-(phosphate-6)-Man (core M3) structure of α -dystroglycan (aDG), a subunit of the complex that is anchored to the cell membrane, directly interacts with laminin. Defects in POMGnT1, a glycosyltransferase that participates in formation of GlcNAc-b1,2-Man glycan, are causally related to muscle-eye-brain disease (MEB), a congenital muscular dystrophy, although the role of POMGnT1 in post-phosphoryl modification of core M3 glycan remains elusive. we found that the stem domain of POMGnT1 recognizes the b-linked GlcNAc of 0-mannose glycan. This recognition may also recruit other enzymes that interact with POMGnT1, which is required for further modification of the core M3 glycan. On the basis of our findings, we propose a mechanism for the deficiency in the post-phosphoryl modification of the glycan observed in POMGnT1 KO mice and MEB patients.

研究分野：構造生物学

キーワード：糖転移酵素 ジストログリカン

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（修飾糖鎖がない、修飾糖鎖が少ない ジストログリカンの発現）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、研究協力者（東京都健康長寿医療センター研究所の遠藤博士、萬谷博士）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 O-マンノース型糖鎖の発見、O-マンノース型糖鎖の合成に関わる GlcNAc 転移酵素をコードする *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* がコードする O-Man 転移酵素がヘテロダイマーを形成して働くこと、が研究協力者グループによって見出されている。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が提唱された(図 1、Endo T. Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconj. J.* (2004) 21, 3-7)。しかしながら、*POMGnT1*、*POMT1*、*POMT2* 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、その後見出された 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の原因遺伝子 (*fukutin*, *FKRP*, *LARGE*) の産物の機能は、いまだ不明である (図 1)。重要な事は *POMT1*、*POMT2* が ジストログリカンにマンノースを付加することで、*POMGnT1* を初めとした別の糖転移酵素がこれを認識し、他の糖鎖とは異なる構造を持つ糖鎖が修飾される点である。この構造は細胞外マトリックスに存在するラミニンなどのタンパク質が相互作用するのに必須であり、この相互作用不全により筋ジストロフィー疾患が発症する。

2. 研究の目的

申請者は X 線結晶構造解析、X 線小角散乱解析を中心とした構造解析により、蛋白質の分子機構及び蛋白質複合体の相互作用機構の立体構造に基づいた理解を目指してきた。本申請ではその疾患原因変異が最も深刻な筋ジストロフィー症状を示す *POMGnT1* に注目した。申請者は *POMGnT1* の立体構造や基質の ジストログリカンなどのリガンドとの相互作用機構や変異による構造変化を解析する事で、O-マンノシル型糖鎖修飾機構だけではなく、筋ジストロフィー疾患の全体像解明に大きく貢献できると考えた。

3. 研究の方法

POMGnT1 は N 末端側に膜貫通領域を持つ II 型膜蛋白質である。*POMGnT1* は GlcNAc を ジストログリカンの O-マンノースに付加する触媒ドメインを持つ。さらに膜貫通領域と触媒ドメインの間のステムドメインの二つのドメインを持つ。疾患原因変異はこの二つのドメイン両方に存在するため、ステムドメインが触媒ドメインと相互作用していると考えられる。これまでに、膜貫通領域のみを削除し、ステムドメインと触媒ドメインを含んだ変異体 (*sPOMGnT1*) の発現、精製に成功し、これが野生型と同様の活性を持つことを明らかにしている。さらにこの変異体の結晶化を行い、*POMGnT1* の高分解能構造を明らかにする。これまでに多くの糖転移酵素の高分解能構造が明らかになっており、それらと比較する事で、基質認識機構や活性の分子機構について多くの知見が得られると考えられる。また、ステムドメインと触媒ドメインとの相互作用様式についても明らかにできる。

4. 研究成果

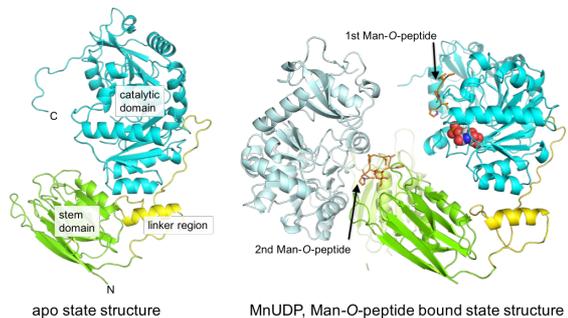


図 2 *POMGnT1* の結晶構造全体像

sPOMGnT1 のアポ体の高分解能結晶の作成に成功し、ヨウ素を用いた SAD 法により位相決定を行った(図 2 左)。この実験により、*POMGnT1* は内腔側にステムドメインと触媒ドメインを持ち、さらにそれぞれのドメインの直接の相互作用はなく、50 残基程度のリ

ンカー領域によりつなげられていることを明らかにした。

さらに基質である UDP やマンノシル化ペプチドとの複合体構造解析にも成功した(図 2 右)。マンノシル化ペプチドは触媒ドメインの活性中心の近くに存在し、相互作用のほとんどすべては疎水性相互作用であった。このことはこれまで報告されている基質特異性解析の結果と合致しており、触媒ドメインは主にペプチドの疎水性度が重要であり、特異的な配列を認識していないことが確認できた。興味深いことに、この複合体結晶構造中ではもう一つのマンノシル化ペプチドがステムドメインに結合していることが明らかになった。ペプチド部分の相互作用は結晶中の非対称分子との相互作用もあるため、クリスタルパッキングによる影響が大きい。マンノース部分はステムドメインの荷電残基と特異的な相互作用を起こしていることから、これらの荷電残基が糖鎖を認識できることが示唆された。

そこで frontal affinity chromatography(FAC)及び surface plasmon resonance (SPR)によりステムドメインに結合できる糖鎖の探索を行った。その結果、ステムドメインは自身の酵素生成物である GlcNAc-1,2-Man- α - をできることと、Core M3 と呼ばれる GalNAc-1,3-GlcNAc-1,4-Man(6P)- の一部である GalNAc-1,3-GlcNAc- を認識できることを明らかにした。さらにその 2 種類の基質との複合体構造をそれぞれ明らかにし、ステムドメインは GlcNAc- α - 構造を特異的に認識することを構造生物学的に明らかにした。

以上の結果から、POMGnT1 のステムドメインが新規な carbohydrate binding domain、lectin domain であることを明らかにした。このことは ジストログリカンが受ける GlcNAc-1,2-Man- α - 修飾が高度にクラスターリングしていることを構造機能的に説明でき、ステムドメインが GlcNAc-1,2-Man- α - を認識することで、GlcNAc-1,2-Man- α - の近くの Man- α - 部位に触媒ドメインが GlcNAc-1,2-修飾をしやすいという機能モデルを提唱できた。

また、さらに core M3 構造は ジストログリカンの細胞接着機能に置いて必須な GlcA-Xyl リピート修飾を受けるのに必要な構造であり、疾患変異から POMGnT1 はこの GlcA-Xyl リピート修飾経路への関与がしめされていた。しかしこれまでにその機構は未知出会ったが、本研究によるステムドメインの core M3 結合能の発見から、この活性を介したその他の糖転移酵素の調節機構モデルを提唱した。このモデルは POMGnT1 欠損株を用いた変異体実験により検証を行い、POMGnT1 のステムドメインの結合活性が、触媒ドメインの触媒活性よりも、GlcA-Xyl リピート修飾にとって重要であるという結果が得られた。このことから研究代表者グル

ープが提唱したモデルの確からしさを示すことができた。

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 4 件)

Toma-Fukai S, Kim JD, Park KE, Kuwabara N, Shimizu N, Krayukhina E, Uchiyama S, Fukamizu A, Shimizu T. Novel helical assembly in arginine methyltransferase 8. *J. Mol. Biol.* 査読有り、vol.208、2016、pp.1197-1208.

A conserved island of BAG6/Scythe is related to ubiquitin domains and participates in short hydrophobicity recognition. Tanaka H, Takahashi T, Xie Y, Minami R, Yanagi Y, Hayashishita M, Suzuki R, Yokota N, Shimada M, Mizushima T, Kuwabara N, Kato R, Kawahara H 査読有り、*FEBS J.* vol. 283、2016、pp.662-677

Xin X, Akasaka-Manyu K, Manyu H, Furukawa J, Kuwabara N, Okada K, Tsumoto H, Higashi N, Kato R, Shinohara Y, Irimura T, Endo T. POMGNT1 is glycosylated by mucin-type O-glycans. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有り、vol.38、2015、pp.1389-1394

Structure of a BAG6 (Bcl-2-associated athanogene 6)-Ubl4a (ubiquitin-like protein 4a) complex reveals a novel binding interface that functions in tail-anchored protein biogenesis. Kuwabara N, Minami R, Yokota N, Matsumoto H, Senda T, Kawahara H, Kato R. 査読有り、*J. Biol. Chem.* vol. 290、2015、pp. 9387-9398.

(学会発表)(計 5 件)

Kuwabara N, Manyu H, Yamada T, Tateno H, Hirose Y, Mizuno M, Ikeguchi M, Hirabayashi J, Senda T, Endo T, Kato R. A novel carbohydrate binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of alpha-dystroglycan.、*GlycoT2016*、トロント(カナダ)、2016年6月

桑原直之、萬谷博、山田健之、館野浩章、平林淳、千田俊哉、遠藤玉夫、加藤龍一、糖転移酵素 POMGnT1 のステムドメインは糖鎖を認識し、O-Man 型修飾部位の制御を行う。第 16 回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、2016年6月

Kuwabara N, Many H, Yamada T, Tateno H, Hirose Y, Mizuno M, Ikeguchi M, Hirabayashi J, Senda T, Endo T, Kato R. A novel carbohydrate binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of alpha-dystroglycan. The 3rd International Symposium on Glyco-Neuroscience, 淡路夢舞台 (兵庫県淡路市), 2016年1月

桑原直之、萬谷博、山田健之、舘野浩章、平林淳、千田俊哉、遠藤玉夫、加藤龍一、糖転移酵素 POMGnT1 の糖鎖認識機構解析、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学大会合同大会)、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)、2015年12月

桑原直之、萬谷博、山田健之、舘野浩章、平林淳、千田俊哉、遠藤玉夫、加藤龍一、糖転移酵素 POMGnT1 ステムドメインの機能同定と糖鎖認識機構解析、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2014年12月

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kek.jp/imss/sbrc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 直之 (KUWABARA, Naoyuki)

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・研究員

研究者番号：70506253