

# 筋ジストロフィーに関わる糖修飾酵素 POMGnT1 の構造機能解析 Structure-Function Analysis of POMGnT1 Involved in Muscular Dystrophy

桑原直之\*、千田俊哉、加藤龍一

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・構造生物学研究センター  
〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Naoyuki Kuwabara, Toshiya Senda and Ryuichi Kato

<sup>1</sup> High Energy Accelerator Research Organization (KEK), Institute of Materials Structure Science,  
Structural Biology Research Center

## 1 はじめに

ジストロフィン糖タンパク質複合体 (DGC) は、細胞膜と基底膜を結合させる働きによって筋肉の維持など様々な生命現象において重要な働きしている。この細胞膜と基底膜の結合には、 $\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ -DG) と呼ばれる細胞膜表面に局在するサブユニットの *O*-マンノース型糖鎖とラミニン (基底膜のタンパク質) との結合が重要であることがわかっている。実際に $\alpha$ -DG に修飾された *O*-マンノース型糖鎖の一種であるキシロース (Xyl)-グルクロン酸 (GlcA) の繰り返し構造がラミニンとの直接相互作用している。さらに Xyl-GlcA 繰り返し構造およびその足場となる糖鎖構造形成に関わる酵素の遺伝子群の欠損が先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子と同定されている。

しかし、その Xyl-GlcA 繰り返し構造の足場構造には不明な点が多く、さらに $\alpha$ -DG の配列特異性も未知な部分がある。本研究では POMGnT1 (protein *O*-mannose  $\beta$ -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase) に注目した。POMGnT1 は先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子として昔から同定されていた。しかし、POMGnT1 は Xyl-GlcA 繰り返し構造およびその足場となる糖鎖構造形成とは無関係とされる GlcNAc- $\beta$ 1,2-Man-*O*-構造形成に関わる糖修飾酵素であるため、POMGnT1 の機能と疾患との関連は全く不明であった。

そこで我々は POMGnT1 の構造を明らかにし、その高分解能構造からこれまで明らかにならなかった POMGnT1 の機能の詳細を明らかにすることで、POMGnT1 による筋ジストロフィー疾患発症機構を明らかにした。

## 2 実験

POMGnT1 はゴルジ体に局在する II 型膜タンパク質である。これまでに大腸菌や昆虫細胞での発現系による発現・精製が行われていたが、精製・結晶化には成功していなかった。そこで哺乳類細胞発現系を利用することで、単分散性の良い試料を調製することに成功した。その試料を用いることにより、結晶構造解析を遂行することができた[1]。また結晶

の位相決定ではヨウ素を用いた I-SAD 法を用いた (図 1)。

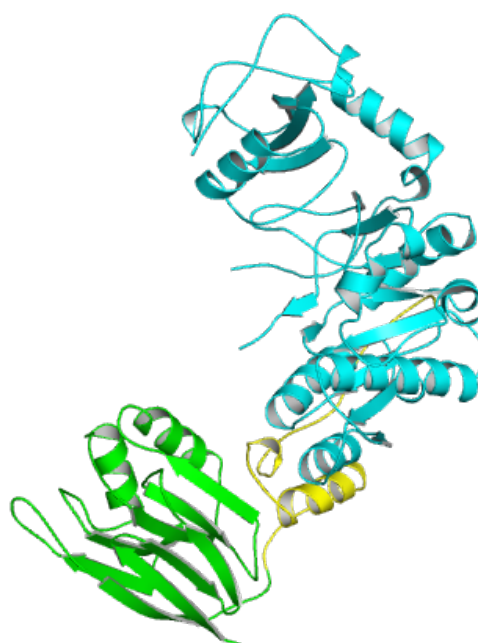


図 1. POMGnT1 の全体構造

水色で触媒ドメイン、緑色でステムドメインを示している。二つのドメイン間にある黄色で示した領域はリンカー領域と定義した。

## 3 結果および考察

結晶構造から POMGnT1 のゴルジ内腔側には二つのドメイン(ステムドメイン、触媒ドメイン)を形成していることを明らかにした(図 1)。触媒ドメインは POMGnT1 の本体であり、Man-*O*-サイトに GlcNAc- $\beta$ 1,2 を修飾する。活性中心の表面構造および Man-*O*-ペプチド複合体との構造から、Man-*O*-サイト周辺領域をペプチドの疎水性で認識し、GlcNAc- $\beta$ 1,2 を修飾することが明らかになった。このことは、POMGnT1 は特定のペプチド配列を認識していないことを意味しており、実際に $\alpha$ -DG に存在する 10 個

以上の GlcNAc- $\beta$  1,2-Man-O-サイト周辺の配列に共通配列が見られない事と合致していた。

さらに結晶構造解析およびその構造に基づく機能解析を行った結果、ステムドメインが糖鎖を認識できることを明らかにした。ステムドメインは $\beta$ 結合した GlcNAc (or Glc, Man) に特異性を持ち、細胞内では POMGnT1 の酵素生成物である GlcNAc- $\beta$  1,2-Man-O-および Xyl-GlcA 繰り返し構造の足場構造 (GalNAc- $\beta$  1,3-GlcNAc- $\beta$  1,4-Man(-6-phospho)-O-)を結合できることがわかった。この発見は GlcNAc- $\beta$  1,2-Man-O-サイト周辺の配列に共通配列が見られない事、さらに POMGnT1 による(Fukutin を介した)疾患発症機構を明らかにできたと考えている。

- 1) POMGnT1 のステムドメインが ER で形成される足場構造 (GalNAc- $\beta$  1,3-GlcNAc- $\beta$  1,4-Man(-6-phospho)-O-)を認識する事で近くに存在する Man-O-サイトの触媒ドメインによる修飾を促す。
- 2) POMGnT1 は Fukutin と呼ばれる足場構造形成に関与する糖修飾酵素と複合体を形成する事から、ステムドメインと足場構造への相互作用により Fukutin の足場構造への相互作用を助け、Fukutin による足場構造修飾を促す。
- 3) 足場構造及び POMGnT1 自身の酵素生成物 (GlcNAc- $\beta$  1,2-Man-O-)をステムドメインが認識することで、そのサイト付近の Man-O-サイトを POMGnT1 が修飾することで $\alpha$ -DG にある GlcNAc- $\beta$  1,2-Man-O-サイトのアミノ酸配列非依存のクラスタリングを実現する。

ステムドメインの糖鎖認識発見から、以上のような3点の機能モデルを提唱し、これまで未解明であった、POMGnT1 の糖修飾機構及び疾患発症機構を提唱できた[2]。

#### 4 まとめ

本研究では結晶構造に基づく POMGnT1 の構造機能相関に注目した研究である。そのため、結晶構造を得るという研究の初期段階で放射光ビームライン使用は必須なものであった。さらに本研究では、ステムドメインと糖鎖複合体構造が意図せずに明らかにできたことで、ステムドメインの機能同定を進めることができた。また本研究により POMGnT1 の糖修飾活性と筋ジストロフィー疾患発症機構を分けることができ、O-マンノース型糖鎖修飾機構と筋ジストロフィー疾患発症機構の解明につながるものと考えている。

#### 参考文献

- [1] X. Xin *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* vol.38, pp1389-1394, (2015)
- [2] N. Kuwabara *et al.*, *PNAS* (in press).

#### 成果

1. N. Kuwabara *et al.*, Excellent poster award, The 3rd International Symposium on Glyco-Neuroscience (2016)

\* naoyuki.kuwabara@kek.jp