

筋ジストロフィー症原因遺伝子産物FKRPによる リビトールリン酸含有糖鎖の合成機構

今江 理恵子¹, 萬谷 博¹, 桑原 直之^{2,†}, 加藤 龍一², 遠藤 玉夫¹

1. はじめに

ジストロフィン-糖タンパク質複合体 (dystrophin-glycoprotein complex : DGC) は形質膜に存在するタンパク質複合体である。DGCは形質膜の外側に存在する α -ジストログリカン (α -dystroglycan : α -DG) に付加している糖鎖を介して、ラミニンなどの細胞外マトリックス分子と結合する (図1A)。一方、DGCの細胞質側に存在するジストロフィンはアクチン細胞骨格と結合する。このように、DGCは細胞外マトリックスと細胞骨格系をつなぐことで、筋細胞が収縮・弛緩を繰り返す際に生じる物理的負荷から筋形質膜を保護するのに重要な役割を果たしており、DGC構成分子の欠損は、全身の筋力が徐々に低下する遺伝性疾患群である筋ジストロフィー症の原因となる。この疾患にはいまだ有効な治療法がなく、厚生労働省の指定難病である。本稿で取り上げる α -DGの糖鎖合成不全に起因する疾患群は特に「ジストログリカノパチー」と総称され、筋ジストロフィーの症状に加えて、中枢神経系の障害を伴う最重症タイプである。本疾患群にみられる筋膜の脆弱性や神経細胞の移動障害は、糖鎖不全による α -DGとラミニンなどの細胞外マトリックスとの結合が破綻することで惹起される (図1A)。これは、糖鎖の新たな機能を明らかにした研究であり、糖鎖の利用による治療法

開発への応用が期待される。現在までにジストログリカノパチーの原因遺伝子は18種が同定されており、その遺伝子産物は α -DGそのものおよび α -DG上のユニークなO-マンノース (Man) 型糖鎖 (後述) の合成に関わる酵素群である¹⁾。近年、我々を含むいくつかのグループにより、この糖鎖構造の全貌およびその合成酵素がすべて明らかになった¹⁾。その過程で我々は、この糖鎖はこれまで哺乳動物の糖鎖では見いだされたことのない「リビトールリン酸 (RboP)」 (図1B) がタンデムにつながった構造を含む非常にユニークなものであること、RboPはジストログリカノパチーの原因遺伝子産物である fukutin (FKTN) とその相同分子 fukutin-related protein (FKRP) によって順に糖鎖に転移されることを明らかにした²⁾。RboPは、グラム陽性菌の細胞壁の主成分であるタイコ酸の構成分子として知られていたが³⁾、哺乳動物の糖鎖では初めての例である。本稿では、まず α -DGのO-Man型糖鎖の合成機構について概説し、RboP転移機構の最新の知見として、RboP転移酵素であるFKRPについて最近我々が行った解析結果について紹介する。

2. α -DGにおけるO-Man型糖鎖の合成機構

タンパク質を修飾する糖鎖はN結合型とO結合型に大別され、それぞれAsn側鎖の窒素原子、Ser/Thr側鎖の酸素原子に結合する。O結合型糖鎖のうち、Ser/Thrに結合する糖がManであるものをO-Man型糖鎖と呼ぶ。我々は1997年に α -DGがO-Man型糖鎖で修飾されることを発見し、その構造や合成機構を明らかにしてきた¹⁾。 α -DGは多数のO-Man型糖鎖で修飾されており、これらの糖鎖は、根元のManとN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の結合様式の違いにより三つのコア構造に分類される [core M1 : GlcNAc β 1-2Man, core M2 : GlcNAc β 1-2 [GlcNAc β 1-6] Man, core M3 : GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-4Man (GalNAc : N-アセチルガラクトサミン)] (図1C)。骨格筋などの α -DGを修飾する主要なO-Man型糖鎖はcore M1型であるが、細胞外マトリックス分子との結合において重要な役割を果たすのはcore M3型糖鎖であり、これまで α -DGでのみ検出されている¹⁾。 α -DG上のcore M3型糖鎖修飾位置は、Thr317, Thr319, Thr379の3か所が報告されている^{4,5)}。

¹ 東京都健康長寿医療センター研究所 (〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2)

² 高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 (〒305-0801 茨城県つくば市大穂1-1)

Biosynthetic mechanisms of ribitol phosphate-containing glycan by FKRP, a muscular dystrophy gene product

Rieko Imae¹, Hiroshi Many¹, Naoyuki Kuwabara^{2,†}, Ryuichi Kato² and Tamao Endo¹ (¹Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan, ²Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization (KEK), 1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan)

[†] 現所属：ペプチドリーム株式会社 [Current affiliation: Peptidream Inc.]

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920811

© 2020 公益社団法人日本生化学会

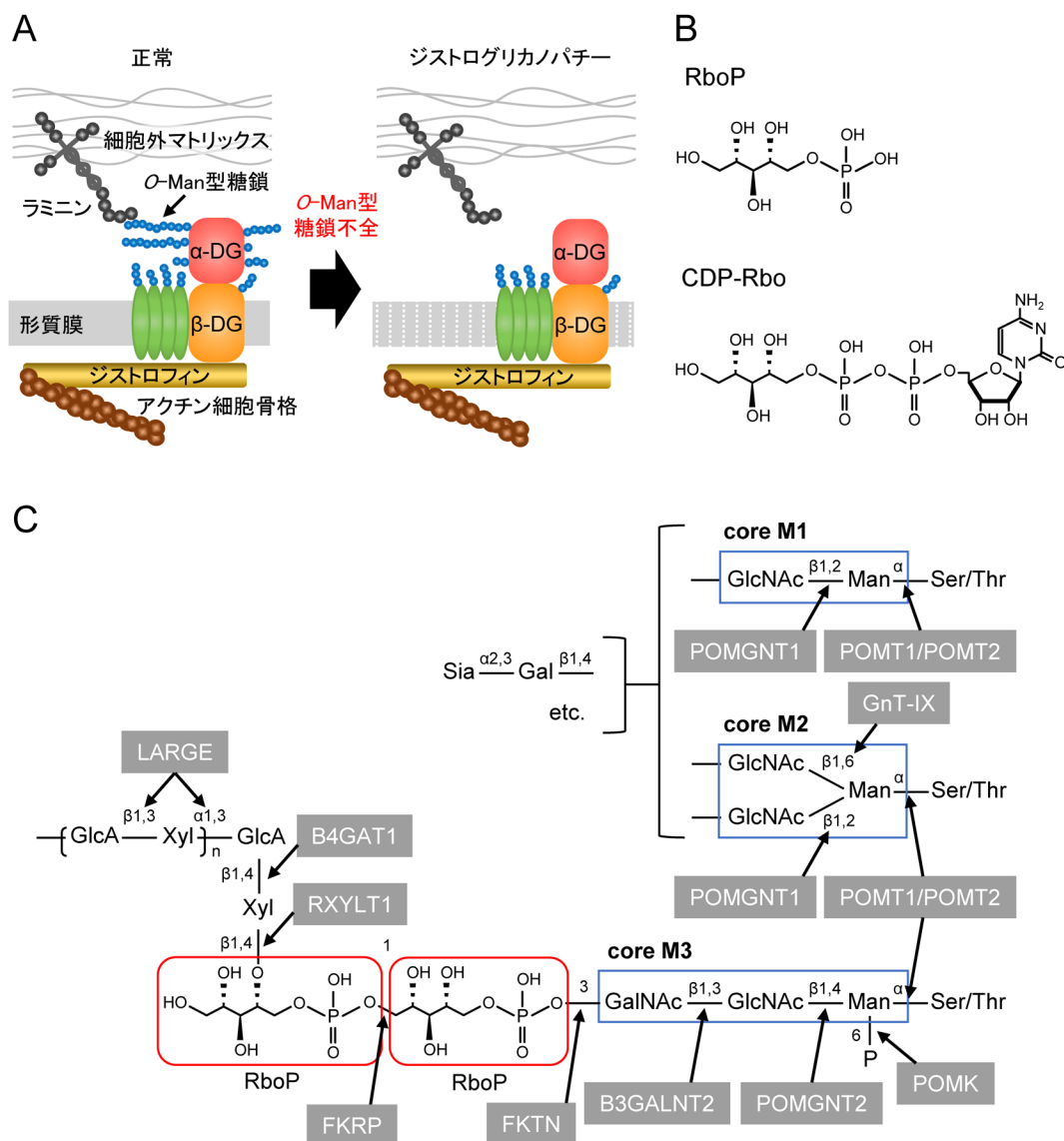


図1 α-DGのO-Man型糖鎖

(A) DGCの構造とO-Man型糖鎖不全によるジストログリカノパチー。左(正常): α-DGのO-Man型糖鎖がラミニンなどと結合し、ジストロフィンがアクチン細胞骨格と結合することで、細胞外マトリックスと細胞骨格系をつなぐ役割を果たす。右(ジストログリカノパチー): O-Man型糖鎖不全によりラミニンなどと結合できないことで筋形質膜が脆弱になり、筋細胞が壊れやすくなる。(B)上: RboPの構造。Rboの5位にリン酸基が結合している。下: CDP-Rboの構造。(C) O-Man型糖鎖の構造と合成酵素。core M3型糖鎖合成の過程で、FKTNは一つ目のRboP、FKRPは二つ目のRboPをそれぞれ転移する。Man: マンノース, GlcNAc: N-アセチルグルコサミン, Gal: ガラクトース, Sia: シアル酸, GalNAc: N-アセチルガラクトサミン, Xyl: キシロース, GlcA: グルクロン酸。

三つのコア構造の合成は、いずれも小胞体(ER)におけるPOMT1/POMT2ヘテロ複合体によるSer/ThrへのManの転移により開始される(図1C)。core M1については、その後ゴルジ体においてPOMGNT1により合成され、core M2はcore M1を元にしてGnT-IX(別名GnT-Vb)により合成される。一方core M3は、初めのManが転移された後、ERにてPOMGNT2によりGlcNAcがβ1-4結合で転移され、B3GALNT2によりGalNAcがβ1-3結合で転移されることで合成される(図1C)。その後、POMKによりManの

6位がリン酸化されてリン酸化core M3となった後、ゴルジ体に移行してさらなる糖鎖の伸長を受ける。次のステップで、RboPがタンデムにつながったユニークな構造が形成される。リビトール(Rbo)は五炭糖アルコールで、炭素五つが直鎖状につながった構造を持つ(図1B)。まず、FKTNにより一つ目のRboPがGalNAcの3位に転移され、次にFKRPにより、二つ目のRboPが一つ目のRboPの1位に転移される。FKTNとFKRPのドナー基質はCDP-Rboであるが、これはCTPとRboPからCRPPA(別名ISPD)に

よって合成される²⁾。その後、RXYLT1（別名TMEM5）によってキシロース（Xyl）が二つ目のRboPに β 1-4結合で転移され、B4GAT1によってグルクロン酸（GlcA）が β 1-4結合で転移される。最後に、Xylを α 1-3結合で転移する活性とGlcAを β 1-3結合で転移する活性の二つの酵素活性を持つLARGEによって、GlcAとXylのリピート構造 $[3\text{GlcA}\beta$ 1-3 $\text{Xyl}\alpha$ 1] $_n$ が形成される。このリピート構造がラミニンなどの細胞外マトリックス分子との結合部位であり、この部分まで合成されて初めて機能糖鎖となる。なお、core M3型糖鎖の合成に関わるすべての酵素遺伝子は、ジストログリカノパチーの原因遺伝子であった。

core M3型糖鎖は、がんの増殖や転移、DGCを介した細胞内シグナルへの関与も知られており^{6,7)}、さまざまな局面でcore M3型糖鎖の合成が制御されている可能性がある。たとえば、core M3型糖鎖伸長は、硫酸基転移酵素HNK-1STによる制御が報告されており、HNK-1STにより糖鎖末端のGlcAの3位が硫酸化されると、LARGEによるGlcA-Xylリピートの伸長が阻害される^{8,9)}。メラノーマや脳においては、こうしてGlcA-Xylリピートの長さが調節されることが報告されている^{8,9)}。また最近我々は、FKTNとFKRPはRboP転移活性だけでなく、CDP-グリセロールをドナーとしてグリセロールリン酸（GroP）を転移する活性も有しており、GroPが転移されると以降の糖鎖合成が停止することを明らかにしている¹⁰⁾。これらの詳細については今後の課題である。

O-Man型糖鎖の合成に関わるいくつかの糖転移酵素は互いに複合体を形成する^{6,11,12)}。たとえば、core M1の合成に関わるPOMGNT1はFKTNと複合体を形成し、POMGNT1が特定の糖鎖を認識するドメインを有することで、FKTNをcore M3型糖鎖合成の場にリクルートすることが示唆されている¹²⁾。このような糖転移酵素どうしの相互作用は、 α -DGに特異的な糖鎖構造を効率的に合成するのに重要なものかもしれない。

3. FKRPによるRboP転移機構

RboPを持つユニークな糖鎖の合成メカニズム、すなわち、どのように基質が認識されRboP転移反応が進行するか、はまったく不明であった。最近我々は、二つ目のRboPを転移するFKRPのX線結晶構造解析に成功し、FKRPの基質認識機構や酵素反応機構についての重要なデータを得た¹³⁾。

1) FKRPの全体構造と四量体の形成

FKRPは多くのゴルジ体局在の糖転移酵素と同様、II型膜貫通タンパク質であり、N末端の短い領域が細胞質側に位置し、膜貫通領域の後、触媒ドメインを含むC末端

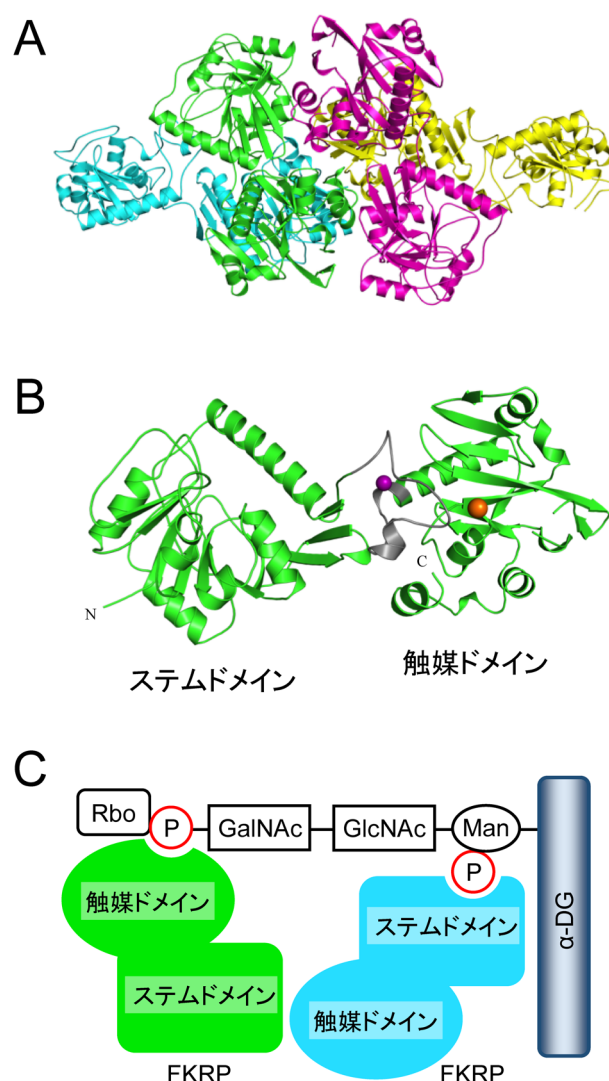


図2 FKRPの結晶構造とアクセプター糖鎖の認識機構
(A)四量体の構造。(B)単量体の構造。(C)アクセプター糖鎖認識の模式図。糖鎖還元末端側のManの6位のリン酸基を一つのプロトマーのステムドメインが、糖鎖先端のRboPのリン酸基をもう一つのプロトマーの触媒ドメインがそれぞれ認識する。(A),(B)は文献13より一部改変して引用。

側の領域がゴルジ体内腔に位置する。我々は、N末端から膜貫通領域までを除いた451アミノ酸からなる可溶性FKRP (soluble FKRP: sFKRP)を用いて研究を進めた。まず、基質非存在下で結晶構造を決定したところ、sFKRPは四量体を形成していた(図2A)。単量体としてのsFKRPの構造は図2Bに示すとおりであり、N末端側にステムドメイン(アミノ酸残基45~287)、C末端側に触媒ドメイン(アミノ酸残基288~495)を有する。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(nucleotidyltransferase: NTase)のスーパーファミリーに属することが示唆されており、転移活性に必須な三つのAsp残基も保存されている(Asp362, Asp364, Asp416)¹⁴⁾。我々

の構造解析結果からも、NTaseスーパーファミリーに共通の α/β フォールドが確認され、FKRPがこのファミリーに属することが明確に示された。これまでに知られているほぼすべてのNTaseファミリータンパク質は、ヌクレオシド三リン酸 (NTP) からヌクレオシドーリン酸 (NMP) をアクセプター分子に転移する活性を持ち、カナマイシン耐性タンパク質であるANT (2")-IaやRNAポリメラーゼ β などが含まれる。一方、FKRPは(CDP-Rbo \rightarrow CMP+RboPで生じる)CMPではなくRboPの転移を触媒する。このため、一般的なNTaseとは異なる触媒機構を持つと考えられる。

sFKRPの結晶構造では、単量体サブユニット(プロトマー)の二量体どうしがさらに二量体を形成した四量体の形をとる。この四量体形成には特にステムドメインどうしの相互作用が重要な役割を担う。また、サイズ排除クロマトグラフィー-X線小角散乱法(SEC-SAXS)により、sFKRPは溶液中においても四量体として存在することが確認された。さらに、ジストログリカノパチーを引き起こすFKRPの患者変異は多数報告されているが、いくつかの変異はプロトマー間やドメイン間の相互作用界面に存在することから、四量体であることの重要性が示唆された。そこで、それらの三つのミスセンス変異(Tyr88Phe, Ser221Arg, Leu276Ile)について、四量体形成状態と酵素活性を調べた(FKRPのLeu276Ile変異は、欧州でのジストログリカノパチーにおいて最も高頻度でみられる変異)。その結果、いずれの変異体も四量体を形成できなくなっており、酵素活性も大きく低下していた。このことから、FKRPが四量体を形成することは酵素活性に重要であり、四量体形成不全は疾患の原因となることが明らかになった。

2) FKRPのドナー基質 (CDP-Rbo) の認識機構

通常NTaseスーパーファミリーに属する分子では、基質との結合において活性部位に二つの2価金属イオンが配位することが必要である。Mg²⁺存在下で結晶化したsFKRPにおいても、触媒ドメインの同様の部位に二つのMg²⁺が配位していた(サイトI, サイトII)。サイトIではMg²⁺とAsp360, Asp362, Asp364が、サイトIIではMg²⁺とAsp362, Asp364, Asp416が相互作用していた。サイトI, IIで相互作用するこれらのAspをAlaに置換した変異体では、いずれも酵素活性が完全に失われたことから、サイトI, IIでの2価金属イオンの結合は酵素活性に必須であることが明らかになった。次に、ドナー基質であるCDP-Rboを結合したsFKRPの結晶構造を決定した。その結果、CDP-Rboのリン酸基部分が、サイトI, II両方の2価金属イオンと相互作用することが予想された。一方、典型的なNTaseでは、サイトIはドナー基質、サイトIIはアクセプター基質と相互作用する¹⁵⁾。この違いは、FKRPが典型的なNTaseと異な

り、CMPではなくRboPを転移することに関係するのかもしれない。また、触媒ドメイン内にCDP-RboのRbo部分と相互作用して安定化するループ領域が見いだされ、Rbo認識部位であると考えられた。

3) FKRPのアクセプター糖鎖の認識機構

次に、CDP-Rboに加え、FKRPのアクセプター糖鎖[RboP-3GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-4(phospho-6)Man α 1-]を持つ糖ペプチドを結合した三者複合体の結晶構造を決定した。アクセプター糖鎖の先端のRbo部分は、その高い運動性のためか、検出できなかった。しかし、検出できた部分の解析から、四量体sFKRPのうちの二量体を構成する二つのプロトマーを使って糖鎖を認識するという、興味深いアクセプター認識機構が明らかになった。具体的には、片方のプロトマーのステムドメインのHis252とLys256が糖鎖の根元のManの6位のリン酸基と相互作用し、もう片方のプロトマーの触媒ドメインのArg295とVal300が糖鎖の先端側のリン酸基(RboPのリン酸基)と相互作用していた(図2C)。この相互作用の重要性を確かめるため、His252Ala, Lys256Ala, Arg295Alaの各変異体の酵素活性を調べた。その結果、His252Ala, Lys256Alaでは酵素活性が顕著に低下しており、Manの6位のリン酸基とステムドメインの相互作用の重要性が示された。Manの6位のリン酸基の重要性は、このリン酸基を除去するとFKRPのアクセプターにならないことから確認された。また、Arg295Alaでは活性が完全に失われており、RboPのリン酸基と触媒ドメインのArg295との相互作用は酵素活性に必須であることがわかった。これらの結果から、FKRPの機能単位は二量体であり、ステムドメインと別のプロトマーの触媒ドメインでアクセプター糖鎖を認識していることが明らかになった。

4. おわりに

FKRPの構造を解明したことにより、ユニークなRboP含有糖鎖の合成メカニズムが明らかになってきた。すなわち、FKRPはNTaseスーパーファミリーと類似した機構で、ドナー基質CDP-Rboを認識してRboP転移反応を行うこと、さらに、FKRPは四量体を形成し、そのうち二つのプロトマーの異なるドメインを用いてアクセプター糖鎖の還元末端側と先端側のそれぞれのリン酸基を同時に認識するという興味深いアクセプター認識機構を持つことが明らかになった。このような機構は、RboPを転移すべき糖鎖を厳密に識別するために必要なのかもしれない。また、ステムドメインが、四量体形成やアクセプターの認識において重要な役割を果たすことも、構造を解明したことで初めてわかった。FKRPの四量体形成不全とジストログリカノパチーとの関係も明らかになり、新たな発症メカニズムの

発見にもつながった。今後、もう一つのRboP転移酵素であるFKTNの構造解析も行うことで、RboP含有糖鎖の合成機構についての理解が進み、治療法開発にも役立つことが期待される。

文 献

- 1) Many, H. & Endo, T. (2017) Glycosylation with ribitol-phosphate in mammals: New insights into the *O*-mannosyl glycan. *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 2462–2472.
- 2) Kanagawa, M., Kobayashi, K., Tajiri, M., Many, H., Kuga, A., Yamaguchi, Y., Akasaka-Many, K., Furukawa, J.I., Mizuno, M., Kawakami, H., et al. (2016) Identification of a posttranslational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. *Cell Rep.*, **14**, 2209–2223.
- 3) Brown, S., Santa Maria, J.P. Jr., & Walker, S. (2013) Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **67**, 313–336.
- 4) Hara, Y., Kanagawa, M., Kunz, S., Yoshida-Moriguchi, T., Satz, J.S., Kobayashi, Y.M., Zhu, Z., Burden, S.J., Oldstone, M.B., & Campbell, K.P. (2011) Like-acetylglucosaminyltransferase (LARGE)-dependent modification of dystroglycan at Thr-317/319 is required for laminin binding and arenavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17426–17431.
- 5) Yoshida-Moriguchi, T., Yu, L., Stalnaker, S.H., Davis, S., Kunz, S., Madson, M., Oldstone, M.B., Schachter, H., Wells, L., & Campbell, K.P. (2010) *O*-mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding. *Science*, **327**, 88–92.
- 6) Bao, X., Kobayashi, M., Hatakeyama, S., Angata, K., Gullberg, D., Nakayama, J., Fukuda, M.N., & Fukuda, M. (2009) Tumor suppressor function of laminin-binding α -dystroglycan requires a distinct β 3-*N*-acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12109–12114.
- 7) Constantin, B. (2014) Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 635–642.
- 8) Nakagawa, N., Many, H., Toda, T., Endo, T., & Oka, S. (2012) Human natural killer-1 sulfotransferase (HNK-1ST)-induced sulfate transfer regulates laminin-binding glycans on α -dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, **287**, 30823–30832.
- 9) Sheikh, M.O., Venzke, D., Anderson, M.E., Yoshida-Moriguchi, T., Glushka, J.N., Nairn, A.V., Galizzi, M., Moremen, K.W., Campbell, K.P., & Wells, L. (2020) HNK-1 Sulfotransferase modulates α -dystroglycan glycosylation by 3-*O*-sulfation of glucuronic acid on matriglycan. *Glycobiology*, **30**, 817–829.
- 10) Imae, R., Many, H., Tsumoto, H., Osumi, K., Tanaka, T., Mizuno, M., Kanagawa, M., Kobayashi, K., Toda, T., & Endo, T. (2018) CDP-glycerol inhibits the synthesis of the functional *O*-mannosyl glycan of α -dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, **293**, 12186–12198.
- 11) Nishihara, R., Kobayashi, K., Imae, R., Tsumoto, H., Many, H., Mizuno, M., Kanagawa, M., Endo, T., & Toda, T. (2018) Cell endogenous activities of fukutin and FKRP coexist with the ribitol xylosyltransferase, TMEM5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **497**, 1025–1030.
- 12) Kuwabara, N., Many, H., Yamada, T., Tateno, H., Kanagawa, M., Kobayashi, K., Akasaka-Many, K., Hirose, Y., Mizuno, M., Ikeguchi, M., et al. (2016) Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates *O*-mannosylation sites of α -dystroglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 9280–9285.
- 13) Kuwabara, N., Imae, R., Many, H., Tanaka, T., Mizuno, M., Tsumoto, H., Kanagawa, M., Kobayashi, K., Toda, T., Senda, T., et al. (2020) Crystal structures of fukutin-related protein (FKRP), a ribitol-phosphate transferase related to muscular dystrophy. *Nat. Commun.*, **11**, 303.
- 14) Kuchta, K., Knizewski, L., Wyrwicz, L.S., Rychlewski, L., & Ginalski, K. (2009) Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: Identification of novel families and their representatives in human. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 7701–7714.
- 15) Cox, G., Stogios, P.J., Savchenko, A., & Wright, G.D. (2015) Structural and molecular basis for resistance to aminoglycoside antibiotics by the adenylyltransferase ANT(2'')-Ia. *MBio*, **6**, e02180-14.

著者寸描

●今江 理恵子 (いまえ りえこ)



地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター 研究員 (主任級). 薬学博士.

■略歴 2010年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了, 同年東京大学大学院薬学系研究科特任助教, 11年東京女子医科大学医学部助教, 14年東京大学大学院薬学系研究科助教, 17年より現職.

■研究テーマと抱負 疾患や老化における糖鎖の役割の解明. 糖鎖の新しい機能

を見出すことで, 生命現象や疾患の理解を深め, 治療法の開発につなげたい.

■ウェブサイト http://www.tmgig.jp/J_TMIG/J_index.html

■趣味 読書, ジョギング.

●萬谷 博 (まんや ひろし)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター 研究副部長. 薬学博士.

■略歴 1995年帝京大学大学院薬学研究科修士課程修了, 同年から東京大学大学院薬学系研究科研究生, 98年から(財)東京都老人総合研究所 (現東京都健康長寿医療センター研究所) 研究員, 2013年より現職.

■研究テーマと抱負 老化に関わる糖鎖の重要な働きを明らかにしたい.

■ウェブサイト http://www.tmgig.jp/J_TMIG/J_index.html

■趣味 家族旅行.

●桑原 直之 (くわばら なおゆき)

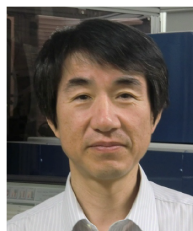


ペプチドリーム株式会社 上席研究員. 博士 (理学).

■略歴 2009年大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻博士後期課程修了. 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科博士研究員, 東京大学大学院薬学系研究科特任助教, 高エネルギー加速器研究機構構造生物学研究センター研究員を経て, 18年より現職.

■趣味 サウナ.

●加藤 龍一 (かとう りゅういち)



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 准教授. 理学博士.

■略歴 1962年兵庫県西宮市に生る. 86年大阪大学理学部生物学科卒業. 92年大阪大学で理学博士を取得. 91~2001年大阪大学理学部助手. 01年より現職. 総合研究大学院大学 (02年より現在) および東京大学 (06~18年) の准教授も兼任.

■研究テーマと抱負 生命現象における糖鎖とその関連タンパク質の役割を, 分子レベルで明らかにしていきたい. また, 抗体に代表される病原体の感染制御機構の解明にも興味がある. それらをX線結晶構造解析を中心に進めたい.

●遠藤 玉夫 (えんどう たまお)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター シニアフェロー.

2019年より現職. その他については本誌89巻5号 (2017), p. 612をご参照ください.