

高分子の EED1 を含む複合体がリンカーヒストン H1 の 26 番目のリジン残基をメチル化するという報告がある<sup>15)</sup>。H1 K26 のメチル化の機能についてはまだ不明な点が多いが、メチル化 H1K26 に HP1 が結合することが明らかにされ、ヘテロクロマチンの形成に関与している可能性が示唆されている。

### 3. ヒストンのアルギニン残基のメチル化と転写制御

リジン残基に加え、ヒストンのアルギニン残基もメチル化される。これまでに知られている主なメチル化部位は、ヒストン H3 の R2, R8, R17, R26 やヒストン H4 の R3 で、核内レセプターをはじめ様々なアクチベーターによる転写活性化に関与することが報告されている。ヒストンのアルギニンメチル化酵素は PRMT1, PRMT4 (CARM1), PRMT5 などが知られ、脱メチル化酵素として PADI4 が同定されている。

### おわりに

以上のように、ヒストンのメチル化にはさまざまな分子が関与し、クロマチンの構造変化や遺伝子発現の制御など多彩な機能がある。しかし、未同定の分子も数多く残されており、一つ一つの現象を分子レベルで解明するためにはさらなる研究が必要である。ヒストンのメチル化は、ゲノムインプリンティングや X 染色体の不活化のみならずがんなどの疾病との関連も示唆されており、クロマチンの修飾を介した遺伝子の発現制御機構を解明することはさまざまな生物現象を理解するうえで非常に重要であると思われる。

- 1) Strahl B.D., Ohba, R., Cook, R.G., & Allis, C.D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14967–14972.
- 2) Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C.T., Schreiber, S.L., Mellor J., & Kouzarides, T. (2002) *Nature*, **419**, 407–411.
- 3) Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., & Struhl, K. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 709–719.
- 4) Sims, R.J. 3rd, Chen, C.-F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S., & Reinberg, D. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 41789–41792.
- 5) Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., Wu, C., & Allis, C.D. (2006) *Nature*, **442**, 86–90.
- 6) Pena, P.V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K.L., Verkhusha, V. V., Gozani, O., Zhao, R., & Kutateladze, T.G. (2006) *Nature*, **100**–103.
- 7) Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., & Shi, Y. (2004) *Cell*, **119**, 941–

- 953.
- 8) Okada, Y., Feng, Q., Lin, Y., Jiang, Q., Li, Y., Coffield, V.M., Su, L., Xu, G., & Zhang, Y. (2005) *Cell*, **121**, 167–178.
- 9) Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I.S., & Martienssen, R.A. (2002) *Science*, **297**, 1833–1837.
- 10) Hall, I.M., Shankaranarayana, G.D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A., & Grewal, S.I.S. (2002) *Science*, **297**, 2232–2237.
- 11) Cloos, P.A., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H., & Helin, K. (2006) *Nature*, **442**, 307–311.
- 12) Wang, L., Brown, J.L., Cao, R., Zhang, Y., Kassiss, J.A., & Jones, R.S. (2004) *Mol. Cell*, **14**, 637–646.
- 13) Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., de Launoit, Y., & Fuks, F. (2006) *Nature*, **439**, 871–874.
- 14) Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Kocher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M., & Muller, J. (2006) *Genes & Dev.*, **20**, 1110–1122.
- 15) Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P., Reinberg, D. (2004) *Mol. Cell*, **14**, 183–193.

福田 綾, 久武 幸司

(筑波大学大学院人間総合科学研究科)

Histone methylation and transcriptional regulation  
Aya Fukuda and Koji Hisatake (Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Ten-noudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan)

## ペプチド-GalNAc 転移酵素の立体構造： レクチンドメインと糖転移活性ドメイン

### 1. はじめに

糖鎖修飾は約 50% のタンパク質になされ<sup>1)</sup>、その構造と機能は多様である。糖タンパク質は糖鎖修飾によってアミノ酸配列が同じでも機能や局在が異なる多くのバリエーションを得ている。糖鎖そのものの構造解析や機能の研究と並んで、機能的糖鎖がどのように合成されるか、換言すればどのように遺伝情報としてコードされ翻訳されているかを解明することは、ポストゲノム時代の大きな課題の一つである。

糖鎖の伸張反応は糖転移酵素によって触媒される。現在 200 近くのヒト由来酵素がクローニングされ、活性が同定されている。大部分の糖転移酵素は糖ヌクレオチドを糖供与体基質とし、単糖を受容体基質へ転移する。糖転移酵素の基質特異性は厳密で、どの供与体からどの受容体へ、ど

のような結合様式で転移するかが決まっている。最初にクローニングされた糖転移酵素  $\beta 4\text{GalT1}$  の例で示すと、UDP-ガラクトースからガラクトースを  $\beta$  結合で *N*-アセチルグルコサミンの 4 位の水酸基に転移する酵素である<sup>2)</sup>。糖転移酵素の機能を解明するということは、供与体基質と受容体基質をどのように認識し、それらをどのような空間的位置関係に配向し、新しいグリコシド結合を作るかを理解することにある。

同じ供与体基質を利用し同じグリコシド結合を作る酵素はアミノ酸配列の類似性が明らかで、ファミリーとして分類可能である。一方で、受容体基質に関しては、アミノ酸配列からの予想分類はなされていない。従って酵素の機能解析においても、細胞内での本来の受容体基質を解明することが酵素の機能を理解することと同義となっている。

酵素の触媒機構を理解するためには酵素の立体構造の情報に不可欠である。これまでに哺乳類由来の 14 種類の糖転移酵素が構造解析されている (表 1)。上述したように糖転移酵素の場合、同一ファミリー内での微妙な受容体基質の差異を明らかにすることが最終目標で、それを可能にするためには比較対照としてファミリー内の酵素の構造が挙げられていることが必須である。グルクロン酸転移酵素の例では受容体基質の認識機構の違いが立体構造の上で明確に議論されているが、これはむしろ希有な例である<sup>3)</sup>。

近年、ポリペプチド鎖に *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を転移する酵素、pp-GalNAc-T ファミリーから -T1<sup>4)</sup>、-T2<sup>5)</sup>、-T10<sup>6)</sup> (以後単に T1 等と表記) の構造が報告された。pp-GalNAc-T はタンパク質のセリンまたはスレオニン残基の水酸基に  $\alpha$  結合で GalNAc を転移する酵素で、ムチン型 *O*-グリカンの根本構造 (Tn 構造) を作る<sup>7)</sup>。この酵素はどのタンパク質のどの残基の上に *O*-グリカンをつけるのかを支配している。そして、この GalNAc の上にさらに複雑な糖鎖構造が合成されていく。これまでにヒトで 15 種類のアイズイムがクローニングされ、受容体ペプチド基質の特異性や組織特異的な発現などの各酵素の特徴が報告されている。

本稿前半では三つの pp-GalNAc-T の構造を比較して、T10 の基質特異性を生み出している要因について述べる。後半ではこのファミリー共通の触媒機構、特に供与体基質結合に伴う酵素の構造変化について推測する。

## 2. 基質特異性を規定する構造的因子

我々は、T10 が GalNAc 修飾のないペプチド基質に対しては活性を示さず、逆に GalNAc 付加された基質に活性を

示すことを報告した<sup>8)</sup>。ムチンボックスのように *O*-グリカンは密集して付加されることが多い。多くの pp-GalNAc-T は GalNAc 修飾のない基質にもある基質にも反応する。一般に GalNAc の存在は基質結合において立体障害を引き起こすため、GalNAc 修飾が多くなるほど反応性は低下してくる<sup>9)</sup>。一方で、全ての pp-GalNAc-T はレクチンドメインを持っていて、GalNAc 付加基質を認識し反応性に正の寄与を与えると信じられているが、その証明は GalNAc 未修飾の基質との反応が分離できないため困難である。T10 は GalNAc 未修飾の基質とほとんど反応しないため、レクチンドメインの反応に対する寄与を調べるには格好の材料である。

図 1A に T1, T2, T10 のリボンモデルによる全体構造を示す。三つの酵素共に、N 末端側約 400 残基の触媒ドメイン (水色) と C 末端側約 150 残基のレクチンドメイン (緑色) が十数残基ほどのリンカー (赤色) で繋がれている。触媒ドメインはロスマンフォールドで、GT-A 型に分類される他の糖転移酵素と類似している<sup>10)</sup>。いずれの結晶構造中にも触媒中心には Mn イオンが配位しており、活性中心を示している (図中紫色の空間充填モデル)。レクチンドメインは R 型レクチンに分類され、 $\alpha\beta\gamma$  の三つのサブドメインからなる。他のレクチンとのアミノ酸配列比較解析から、T1, T2 は  $\alpha$  のみに糖結合活性を有することが予測されている<sup>11)</sup>。一方、T10 ではレクチンの  $\beta$  サブドメインに糖 (GalNAc-Ser) が結合することが X 線結晶学的に証明されている。このことはアミノ酸配列の保存性とも一致していて、T10 の特徴である。

三つの酵素のドメイン間の配向を比較すると T10 だけが他の二つと大きく異なることが分かる。T1, T2 では比較的フラットで、活性中心が露出しているのに対し、T10 ではレクチンドメインは活性中心をカバーするような位置にあり、活性中心に至る溝構造を造っている。T1, T2 は GalNAc 未修飾の基質にも反応することから、我々はドメイン間の配向が基質結合に影響を及ぼしている可能性を指摘し、T10 の触媒ドメインとレクチンドメインを T1 のリンカー配列で繋いだキメラ酵素が GalNAc 未修飾の基質にも反応することを示した<sup>8)</sup>。また、T10 は GalNAc 修飾基質に活性を示すが、T10 レクチンドメインの  $\beta$  サブドメインにある糖鎖結合部位はこの溝の一方の内壁に位置するので、このこともよく一致している。

pp-GalNAc-T のドメイン間配向を決めているのは、おもに各ドメインとリンカー部分との相互作用とリンカー部分の立体構造である。リンカー部分のアミノ酸配列アライン

表1 立体構造が解明された哺乳類由来の糖転移酵素

酵 素	発 現 系	生 物 種	文 献
$\beta$ 1, 4-GalT1	NSO 哺乳類培養細胞	ウシ	Gastinel <i>et al.</i> 1999 Embo J. 18, 3546
GnTI ( $\beta$ 1, 2-GnT)	バキュロウイルス	ラット	Unligil <i>et al.</i> 2000 Embo J. 19, 5269
$\beta$ 1, 3-GlcAT1	大腸菌	ヒト	Pedersen <i>et al.</i> 2000 J. Biol. Chem. 275, 34580
$\alpha$ 1, 3-GalT	大腸菌	ウシ	Gastinel <i>et al.</i> 2001 Embo J. 20, 638
ABO Gal/GalNAcT	大腸菌 (リフォールディング)	ヒト	Patenaude <i>et al.</i> 2002 Nat. Struct. Biol. 9, 685
EXTL2 ( $\alpha$ 1, 4-GlcNAc/GalNAcT)	大腸菌	ヒト	Pedersen <i>et al.</i> 2003 J. Biol. Chem. 278, 14420
pp-GalNAc-T1	メタノール酵母	マウス	Fritz <i>et al.</i> 2004 PNAS 101, 15307
$\beta$ 1, 3-GlcAT-P (HNK)	大腸菌	ヒト	Kakuda <i>et al.</i> 2004 J. Biol. Chem. 279, 22693
pp-GalNAc-T2	メタノール酵母	ヒト	Fritz <i>et al.</i> 2006 J. Biol. Chem. 281, 8613
pp-GalNAc-T10	メタノール酵母	ヒト	Kubota <i>et al.</i> 2006 J. Mol. Biol. 359, 708
$\beta$ 1, 3-GlcAT-S (HNK)	大腸菌	ヒト	Shiba <i>et al.</i> 2006 Proteins; online 16897771
C2GnT-L	CHO 哺乳類培養細胞	マウス	Pak <i>et al.</i> 2006 J. Biol. Chem. 281, 26693
$\beta$ 1, 3-GnT (Fringe)	バキュロウイルス	マウス	Jinek <i>et al.</i> 2006 Nat. Struct. Mol. Biol. 13, 945
FUT8	バキュロウイルス	ヒト	Ihara <i>et al.</i> 2007 Glycobiology 14, 139

「日本結晶成長学会誌」Vol. 33, No. 5 (2006), p. 376 より一部改変して掲載

メントを見ると (図1B), 中心のプロリンを除いてほとんど保存されていないことが分かる。従って, pp-GalNAc-T間でリンカーとの相互作用やリンカーの構造が異なっていることが予想され, そのことからドメイン間配向が異なり, さらには基質特異性が異なることが当然類推される。しかしながら, リンカーの構造/相互作用予測は困難で, まだ構造解析されていない pp-GalNAc-Tのドメイン間配向と基質特異性の関連を解析するには, その酵素の立体構造解析が必須である。

### 3. 反応機構-基質結合に伴う構造変化

pp-GalNAc-TはUDP- $\alpha$ -GalNAcからGalNAcを転移し, GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr構造を作る保持型糖転移酵素である。この型の糖転移酵素反応は反転型求核置換反応が二回起こるメカニズムが, 保持型グルコシダーゼのアナロジーとして提唱されている<sup>12)</sup>。この場合, GalNAcが酵素と共有結合した反応中間体が形成されるが, 糖転移酵素で同定された例はない<sup>13)</sup>。

三つの酵素は, 全て異なる基質との複合体として構造解析されていて, それらを比較することで, 三者で共通だと

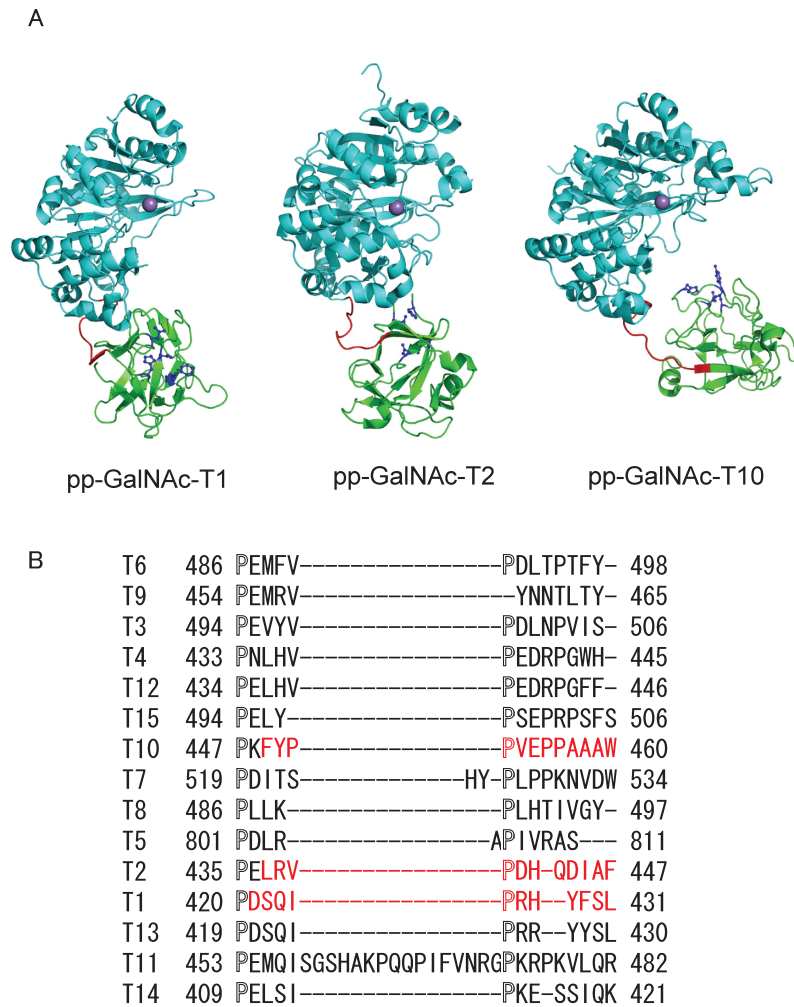


図1 A 三つの pp-GalNAc-T1, -T2, -T10 の結晶構造. 触媒ドメイン (水色) の C $\alpha$  が最もよく重なるように配置した. レクチンドメインを緑色で示し, さらに糖鎖付加予測部位 (T10 に関しては結晶構造で確認) の残基を青色のボール-アンド-スティックモデルで示す. 活性中心の位置として Mn イオンを紫色のボールで示す. 二つのドメインはリンカー配列 (赤色) により繋がれている. B リンカー配列のアミノ酸配列. パネル A で赤色で示されている T1, T2, T10 のリンカーを赤字で示す. シークエン্সアライメント上保存されているプロリンを袋字で示す.

思われる反応機構を考察することが可能である. 三者の触媒ドメインを比較すると基本的なフォールディング構造は極めて類似しているが, WGGE モチーフのループ構造と Mn イオンに配位しているヒスチジン直後の十数残基のループ構造が大きく異なっていることが分かった. T1 は基質を含まない構造, T2 のペプチド基質との複合体構造, T10 を受容体基質との複合体構造と見立てて, その構造変化を類推することができる (図 2A).

まず, UDP-GalNAc が酵素に結合し, WGGE ループが

構造変化する. さらにその上から, UDP-GalNAc を押さえ込むように大きなループの構造変化が起こる. これにより, ペプチド基質が入るためのポケットが完成, 受容体基質が酵素に結合する. 糖転移反応の後, 糖ペプチド, UDP の順に解離し, サイクルが完成する. 一連の構造モデルは, この酵素の初期定常状態の速度論がシークエンシャル機構であることと完全に一致する. また WGGE ループの構造変化は別のファミリーの  $\beta$ 4GalT1 で報告されている変化と酷似している<sup>10)</sup>.

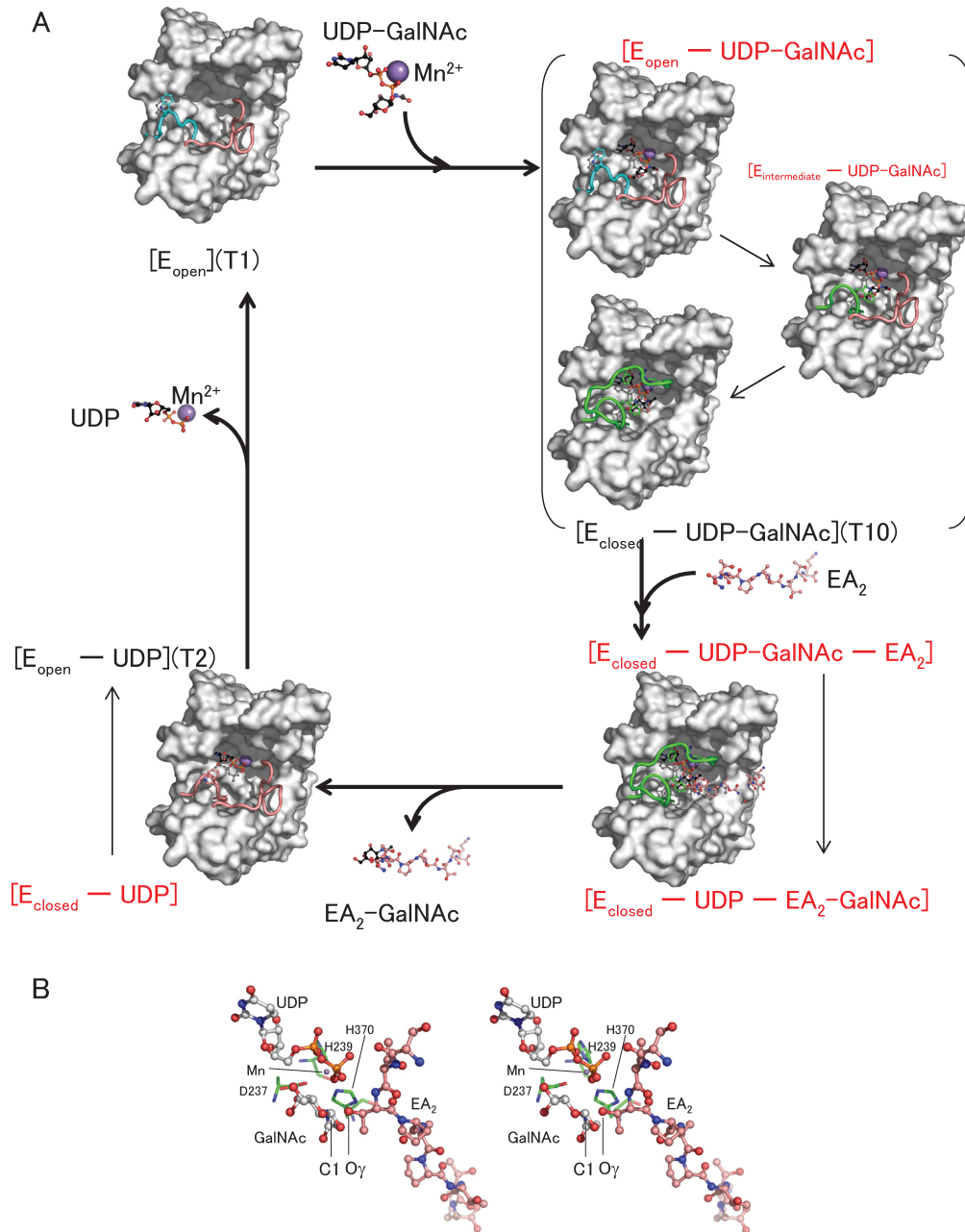


図2 A pp-GalNAc-T反応サイクルにおける構造変化. WGGEループ (G338~Q346: T10) と大きなループ (I371~A387: T10) を除いた触媒ドメインの空間充填モデル (灰色) は T10 (PDB: 2D71) より. [ ] 内は酵素複合体分子種を示し, 黒字は実際に構造解析されたもので, T1 (PDB: 1XHB), T2 (PDB: 2FFV). 赤字は三つの構造よりモデル作成したもの. 各ループの構造は各酵素との重ね合わせ図より抽出した (T1: 青色, T2: ピンク色). 基質/生成物はボール-アンド-スティックで表示. B [酵素-UDP-GalNAc-EA<sub>2</sub>] 複合体モデルのステレオ図. T10 (PDB: 2D71) と T2 (PDB: 2FFV) との酵素部分の重ね合わせ図よりそのまま抜き出した. GalNAc の C1 炭素と EA<sub>2</sub> の糖鎖付加を受けるスレオニン残基の γ 酸素原子の位置に注目. ラインモデルとして, Mn イオンに配位している (DxH+H) モチーフの残基を示す.

T10の構造ではUDP-GalNAcは分解されているが、分解後のUDPを遊離させない機構を備えていることの意義は何であろうか。T10に見られるUDPとGalNAcの構造ではGalNAcのアノマー炭素原子の $\alpha$ 位側が広く空いている。T10のGalNAcの位置と、T2のペプチド基質の位置は反応生成物であるGalNAc- $\alpha$ -Serがそのままおけるような位置関係にあって非常に合理的であり、T10の構造が反応中間体の構造を反映していることを示唆している(図2B)。T2の構造ではGalNAcを攻撃する受容体基質のスレオニンの水酸基はUDPのリン酸基と水素結合している。二回目の求核置換反応のためスレオニンのプロトンが引き抜かれるが、そのルイス塩基はアミノ酸側鎖ではなく、UDPのリン酸基かもしれない<sup>15)</sup>。UDPは二回目の反応の活性基であるので、そのまま遊離させないように酵素は固く保持しているのだろう。図の反応サイクル中には、例えば酵素とUDP-GalNAcとのES複合体など、まだ予想にすぎない分子種が多く残っている。今後の構造解析の進展を待ちたい。

#### 4. おわりに

糖転移酵素は供与体基質と結合様式の特異性からいくつかのファミリーを形成していて、アミノ酸配列比較の類似性もはっきりしている。また、計算機科学によりファミリーの構造が一つ解ければドメインの構造予測は可能である。しかしながら糖転移酵素の場合、ファミリー内で受容体基質の特異性の違いを明らかにすること、その違いを生み出す機構を理解することが重要である。アミノ酸配列比較から「違い」において重要な残基を予測することは困難であるし、その違いはどのような相互作用に拠っているかを理解することは不可能である。pp-GalNAc-Tでは二つのドメインからなる酵素で、ドメイン間配向が重要である場合、その予測はますます困難であろう。これら「違い」の解明には、立体構造の情報は不可欠である。しかも、ファミリーの一員の構造が解けたから終わりではなく、複数のメンバーの構造を解き比較することで初めて基質特異性の違いの真相に迫れる。今後とも哺乳類由来の糖転移酵素の構造解析は報告され続けるであろうし、たくさんの比較対象としての構造が枚挙されることにより、基質認識の全体像が見えてくるものであらうと思われる。

- 1) Apweiler, R., Hermjakob, H., & Sharon, N. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1473, 4-8.
- 2) Narimatsu, H., Sinha, S., Brew, K., Okayama, H., & Qasba, P.

- K. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4720-4724.
- 3) 志波智生, 角田品子, 岡 昌吾, 石黒正路, 川崎俊祐, 若槻壮市, 加藤龍一 (2005) *生化学*, 77, 153-158.
- 4) Fritz, T.A., Hurley, J.H., Trinh, L.B., Shiloach, J., & Tabak, L.A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 15307-15312.
- 5) Fritz, T.A., Raman, J., & Tabak, L.A. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 8613-8619.
- 6) Kubota, T., Shiba, T., Sugioka, S., Furukawa, S., Sawaki, H., Kato, R., Wakatsuki, S., & Narimatsu, H. (2006) *J. Mol. Biol.*, 359, 708-727.
- 7) Ten Hagen, K.G., Fritz, T.A., & Tabak, L.A. (2003) *Glycobiology*, 13, 1R-16R.
- 8) Cheng, L., Tachibana, K., Zhang, Y., Guo, J., Kahori Tachibana, K., Kameyama, A., Wang, H., Hiruma, T., Iwasaki, H., Togayachi, A., Kudo, T., & Narimatsu, H. (2002) *FEBS Lett.*, 531, 115-121.
- 9) Gerken, T.A., Zhang, J., Levine, J., & Elhammer, A. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 49850-49862.
- 10) Kikuchi, N., Kwon, Y.D., Gotoh, M., & Narimatsu, H. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 574-579.
- 11) Tenno, M., Saeki, A., Kezdy, F.J., Elhammer, A.P., & Kurosaka, A. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 47088-47096.
- 12) Zechel, D.L. & Withers, S.G. (2000) *Acc. Chem. Res.*, 33, 11-18.
- 13) Lairson, L.L., Chiu, C.P., Ly, H.D., He, S., Wakarchuk, W.W., Strynadka, N.C., & Withers, S.G. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 28339-28344.
- 14) Qasba, P.K., Ramakrishnan, B., & Boeggeman, E. (2005) *Trends Biochem. Sci.*, 30, 53-62.
- 15) Persson, K., Ly, H.D., Dieckelmann, M., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G., & Strynadka, N.C. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, 8, 166-175.

久保田 智巳

(産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター)

Crystal structure of polypeptide-GalNAc transferases: Lectin domain and catalytic domain  
Tomomi Kubota (Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Central-2, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki, zip 305-8568, Japan)

### 中枢神経系に特異的に発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ニューログリカンCの機能

#### 1. はじめに

プロテオグリカン (PG) は硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) 鎖が共有結合したタンパク質の総称である。