

201224107B

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

中枢神経症状を伴う筋疾患 α -ジストログリカノパチーの
分子病態と治療法開発に関する研究

平成22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 萬谷 博

平成25（2013）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

中枢神経症状を伴う筋疾患 α -ジストログリカンパチーの分子病態と
治療法開発に関する研究

平成22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 萬谷 博

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

中枢神経症状を伴う筋疾患 α -ジストログリカノパチーの
分子病態と治療法開発に関する研究

萬谷 博 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 10

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 11

中枢神経症状を伴う筋疾患 α -ジストログリカノパチーの分子病態と治療法開発に関する研究

研究代表者 萬谷 博、 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター、主任研究員

研究要旨 福山型先天性筋ジストロフィー症（FCMD）、muscle-eye-brain 病（MEB）、Walker-Warburg 症候群（WWS）は中枢神経系の障害を伴う先天性筋ジストロフィー症である。これらの疾患はジストロフィン糖蛋白質複合体の構成分子である α -ジストログリカン（DG）の *O*-マンノース（Man）型糖鎖不全を起因とし、 α -ジストログリカノパチーと総称される。本研究では、 α -ジストログリカノパチーの病態を解明し、診断・治療法開発に応用することを目的として、原因遺伝子産物である *O*-Man 型糖鎖合成酵素の機能及び *O*-Man 型糖鎖の機能について解析した。

A. 研究目的

遺伝性の神経疾患や筋疾患は進行性で極めて難治性であり、その代表的疾患として筋ジストロフィーがある。筋ジストロフィーは一般的に単一遺伝子の異常によるもので、これまでに多くの原因遺伝子が発見され、発症メカニズムの解明や治療法開発に期待が寄せられている。

我々はこれまでに、先天性筋ジストロフィーに分類される muscle-eye-brain 病（MEB）と Walker-Warburg syndrome（WWS）の原因遺伝子産物 POMGnT1 と POMT1、POMT2 が *O*-マンノース（Man）型糖鎖を合成する糖転移酵素であることを示し、MEB と WWS が *O*-Man 型糖鎖不全を起因とする疾患であることを明らかにした。これらの疾患ではジストロフィン糖蛋白質複合体の構成分子である α -ジストログリカン（ α -DG）の糖鎖不全を呈することから、 α -ジストログリカノパチーと総称される。

本研究では、原因遺伝子産物及び *O*-Man 型糖鎖の機能解析から、 α -ジストログリカノパチーの病態を解明し、診断・治療法に応用すること

を目的とする。

① 酵母 ScPmt1 の重要アミノ酸のヒト POMT1 および POMT2 における重要性の解析

WWS の原因遺伝子産物は *O*-Man 型糖鎖の合成開始酵素 protein *O*-mannosyltransferase（POMT）である。POMT には2つのサブユニット POMT1 と POMT2 からなり、酵素活性の発現には POMT1-POMT2 複合体の形成が必要である。しかし、各サブユニットの役割や複合体形成のメカニズムはよく分かっていない。出芽酵母（*S. cerevisiae*）の POMT ホモログである ScPmt1 と ScPmt2 は複合体を形成する。ScPmt1 は7回膜貫通型タンパク質であり小胞体内腔側に位置する loop 5 が活性中心と予想されているが、loop 1 に位置する Arg64、Glu78、Arg138 も酵素活性に重要であり、特に Arg138 は複合体形成に必須であることが報告されている。我々はこれまでにヒト POMT の二次構造を解析し、ScPmt1 と同様の膜配向性をとることを明らかにした。また、ScPmt1 の Arg64、Glu78、Arg138 は POMT1（Arg30、Glu44、Arg105）と POMT2

(Arg72, Glu86, Arg145) ですべて保存されていた。そこで、これらのアミノ酸の重要性について検討した。

② O-Man 型糖鎖合成と DPM の関係の解析

POMT1-POMT2 複合体は小胞体 (ER) 膜に局在し、ドリコールリン酸マンノース (Dol-P-Man) を糖供与体として蛋白質の Ser/Thr に Man を転移する。ER 膜には Dol-P-Man を供給する Dol-P-Man 合成酵素 (DPM) も局在しており、DPM は 3 つのサブユニット DPM1、DPM2、DPM3 からなる複合体である。

最近、 α -ジストログリカノパチー様の症状を呈する DPM3 遺伝子の変異が報告され、O-Man 型糖鎖の合成が選択的に抑制されていることが示された。Dol-P-Man は O-Man 型以外にも、N 型糖鎖、C-Man 型糖鎖、GPI-アンカー型糖鎖の合成に利用されることから、一般的に DPM の異常は広範囲な糖鎖異常として現れると予測される。実際、DPM1 を原因遺伝子とする先天性グリコシル化異常症 Ie 型 (CDG-Ie) が知られており、Dol-P-Man を利用する全ての糖鎖で異常が検出される。DPM3 変異による疾患は CDG-Io に分類され、比較的軽度な α -ジストログリカノパチーに相当し、筋ジストロフィー症状を呈するが、脳の障害はほとんど認められないという臨床症状が報告されている。生化学的には α -DG の O-Man 型糖鎖不全として検出され、他の糖鎖への影響は少ない。このことから、DPM3 が O-Man 型糖鎖合成に積極的に関与している可能性が考えられたので、POMT1, 2 と DPM3 の複合体形成について検討した。

③ POMGnT1 の基質特異性とリン酸化 Man の合成経路の解析

MEB の原因遺伝子産物 Protein O-linked mannose β -1,2-N-acetyl glucosaminyltransferase 1 (POMGnT1) は O-Man 型糖鎖の生合成において、Man に β 1-2 結合で GlcNAc を転移する酵素である。

哺乳類の O-Man 型糖鎖は α -DG などの限られた蛋白質でしか検出されないことから、特定のアミノ酸配列に特異的な修飾である可能性がある。Man 修飾の特異性は主に POMT に依存すると考えられるが、POMGnT1 は GlcNAc 以降の構造の部位特異性に関与する可能性がある。また昨年度に、Man の 6 位がリン酸化され、リン酸ジエステルを介して糖鎖が付加する可能性が報告された。さらに、リン酸ジエステルが α -DG とラミニンの結合に関与することが示唆された。そこで、POMGnT1 の基質特異性および生合成過程における Man のリン酸化と POMGnT1 の関係について検討した。

④ ゼブラフィッシュを用いた α -ジストログリカノパチーモデルの開発

ゼブラフィッシュは、遺伝子操作が容易である、繁殖しやすい、表現型を解析しやすい、脊椎動物である、ことなどから、近年、遺伝子の機能解析や疾患モデル動物として用いられている。特に薬剤を投与しやすく、化合物のスクリーニングなど治療法開発を目指す上での利用価値は高い。そこで、ゼブラフィッシュの O-Man 関連酵素 zPOMT1、zPOMT2 を解析し、筋ジストロフィー症モデルとしての可能性について検討した。

B. 研究方法

① 酵母 ScPmt1 の重要アミノ酸のヒト POMT1 お

よび POMT2 における重要性の解析

site-directed mutagenesis 法によりヒト POMT1 の Arg30、Glu44、Arg105 および POMT2 の Arg72、Glu86、Arg145 をそれぞれ Ala に置換した変異体 (R30A、E44A、R105A、R72A、E86A、R145A) を HEK293T 細胞に共発現させ、酵素活性と複合体形成への影響を調べた。ウェスタンブロットにより各タンパク質の発現量を定量し、発現量当たりの酵素活性を測定した。複合体形成は免疫沈降法により確認した。

② O-Man 型糖鎖合成と DPM の関係の解析

HEK293T 細胞に POMT1 および POMT2 と DPM3 を共発現し、免疫沈降法により複合体の形成の有無を調べた。また、CDG-Io で検出された変異 (L85S) を導入した変異型 DPM3 を作製し、変異の影響を調べた。

③ POMGnT1 の基質特異性とリン酸化 Man の合成経路の解析

α -ジストログリカンのアミノ酸配列を基に Man-O-Thr を含むペプチドを有機化学的に合成し、アミノ酸組成や残基数の影響を反応速度論的に解析した。また、Man の 6 位をリン酸化した Man-6-リン酸化ペプチド (Man6P-pept) を合成し POMGnT1 の基質となるか調べた。

④ ゼブラフィッシュを用いた α -ジストログリカノパチーモデルの開発

ゼブラフィッシュ初期胚から *zPOMT1* および *zPOMT2* 遺伝子をクローニングし、HEK293 細胞に発現させて酵素活性を測定した。また、定量 RT-PCR 法および *whole-mount in situ hybridization* (WISH) 法により発現解析を行った。さらに、アンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) を用いたノックダウン解析および免疫

組織染色による解析を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物の使用に関しては、「動物愛護管理法」および「動物実験に関する指針」に基づいて動物愛護に十分配慮するとともに、所内実験動物委員会の承認を受けている。放射性同位元素の使用に関しては「放射線障害防止法関連法令」および「所内規定」に基づき安全を確保する。組換え DNA 実験に関しては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づくとともに所内組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

① 酵母 ScPmt1 の重要アミノ酸のヒト POMT1 および POMT2 における重要性の解析

変異型 POMT1 (R30A、E44A、R105A) と野生型 POMT2 との共発現では酵素活性は著しく減少した。一方、野生型 POMT1 と変異型 POMT2 (R72A、E86A、R145A) との共発現では酵素活性の減少は認められなかった。また、免疫沈降実験では、すべての組み合わせにおいて共沈が観察され、いずれの変異体も複合体を形成することが確認された。

② O-Man 型糖鎖合成と DPM の関係の解析

免疫沈降法により POMT1-POMT2 と DPM3 が複合体を形成することが確認された。DPM3 の変異による複合体形成への影響は認められなかった。また、今回の強制発現実験では、DPM3 および変異型 DPM3 との共発現による POMT 活性への影響は認められなかった。

③ POMGnT1 の基質特異性とリン酸化 Man の合

成経路の解析

アミノ酸残基数 3~8 ではペプチドの伸長に伴って K_m 値は減少、 V_{max} 値は増加した。また、合成ペプチドのアミノ酸組成は K_m 値、 V_{max} 値に影響した。また、POMGnT1 は Man6P-pept に GlcNAc を転移することができなかった。

④ゼブラフィッシュを用いた α -ジストログリカノパチーモデルの開発

zPOMT1 および zPOMT2 はそれぞれ 720 アミノ酸および 756 アミノ酸をコードしていた。活性測定を行った結果、両タンパク質を共発現させた場合に高い POMT 活性が検出された。定量 RT-PCR 法および WISH 法の結果より、両遺伝子は受精直後より発現しており、発生過程を通してほぼ全身で発現していることが確認された。一方、アンチセンス MO による遺伝子ノックダウンの結果、zPOMT1 ノックダウン体では心膜の浮腫や尾部の形成異常、zPOMT2 ノックダウン体では心膜の浮腫や尾部の形成異常、眼の色素異常がみられた。また、いずれの表現型においても α -ジストログリカンの O-Man 型糖鎖修飾の減少が確認された。

D. 考察

①酵母 ScPmt1 の重要アミノ酸のヒト POMT1 および POMT2 における重要性の解析

変異型 POMT1 では酵素活性が減少したことから、POMT1 の loop1 は ScPmt1 と同様に酵素活性に必要であることが示された。一方、POMT2 の変異は酵素活性に影響しなかったことから、POMT1 と POMT2 では loop1 の働きは異なると考えられる。この結果は、POMT1 と POMT2 が機能的に異なることを示唆している。

また、複合体の形成に関しては POMT1、POMT2 ともに変異の影響を受けなかったことから、複合体形成のメカニズムは酵母とヒトで異なると考えられる。

② O-Man 型糖鎖合成と DPM の関係の解析

POMT1-POMT2 と DPM は DPM3 を介して複合体を形成するが、DPM3 の POMT1-POMT2 への結合は直接 POMT 活性に影響するものではないことが示唆された。CDG-Io における DPM3 の変異で O-Man 型糖鎖合成が選択的に抑制されることから、POMT1-POMT2 は DPM と複合体を形成することによって、DPM により合成された Dol-P-Man を効率良く利用するシステムが存在する可能性が考えられた。今後この解明には複数の膜タンパク質からなる複合体の立体構造解析が必要となる。 α -ジストログリカノパチーは O-Man 型糖鎖の構造異常を起因とするが、糖転移酵素だけではなく糖供与などの制御異常に因り糖鎖異常が生じる複雑な疾患群であることを示唆している。

③ POMGnT1 の基質特異性とリン酸化 Man の合成経路の解析

POMGnT1 はアミノ酸 1 つからなるマンノシルスレオニン (Man-O-Thr) に GlcNAc を転移することができず、基質として認識するためには少なくとも Man に 3 残基以上のアミノ酸が結合している必要があると考えられる。さらにアミノ酸の長さや配列により GlcNAc への転移効率に変化したことから、POMGnT1 がアミノ酸配列をある程度認識していると考えられる。また、POMGnT1 が Man6P-pept に GlcNAc を転移できなかったことから、Man のリン酸化は POMGnT1 による GlcNAc β 1-2Man 形成の後に起こる必要

がある。このことから、GlcNAc β 1-2Man 形成が Man の 6 位のリン酸化により制御されている可能性が考えられる。さらに、Man の 6 位には GnT-IX (VB)により GlcNAc が転移され、分岐構造 GlcNAc β 1-2 (GlcNAc β 1-6)Man が形成されることも報告されていることから、Man の 6 位では GlcNAc 化とリン酸化が競合する可能性が考えられる。こうした生合成の制御機構が O-Man 型糖鎖の機能調節に関与する可能性が示された。

④ ゼブラフィッシュを用いた α -ジストログリカノパチーモデルの開発

POMT 活性の検出に zPOMT1 と zPOMT2 を共発現する必要があることから、酵素活性の発現に zPOMT1-zPOMT2 複合体の形成が必要であるという、哺乳類の POMT と同様のメカニズムがあることが明らかとなった。zPOMT1 および zPOMT2 遺伝子のノックダウン体では、ヒトの WWS と同様に α -DG の O-Man 型糖鎖異常と、筋（心臓、尾部）および眼の発生異常が観察された。この結果は、ゼブラフィッシュにおいても神経や筋の発生に O-Man 型糖鎖が重要であることを示しており、 α -ジストログリカノパチーの病態モデルとしてゼブラフィッシュが有用であることを示している。

E. 結論

ヒト POMT1 の loop1 も酵母 ScPmt1 と同様に酵素活性の発現に重要であることが明らかとなった。しかしながら、複合体形成のメカニズムはヒトと酵母では異なると考えられた。POMT1 と POMT2 の働きが異なる可能性を示した。

α -ジストログリカノパチーは O-Man 型糖鎖の構造異常を基本とするが、それらの異常は糖

転移酵素だけではなく糖供与など制御異常に因る複雑な疾患群であることが示唆された。

O-Man 型糖鎖の生合成における Man6 位のリン酸化は、POMGnT1 による GlcNAc β 1-2Man 形成の後に起こることが明らかとなった。

ゼブラフィッシュの zPOMT1、zPOMT2 を同定し、 α -ジストログリカノパチーの病態モデルとしてのゼブラフィッシュの有用を示した。

F. 研究発表

I. 論文発表

1. Eriko Avşar-Ban, Hisayoshi Ishikawa, Hiroshi Manya, Masatoki Watanabe, Shinichi Akiyama, Hideo Miyake, Tamao Endo and Yutaka Tamaru: Protein O-mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish. *Glycobiology*, 20(9), 1089-102, 2010
2. Tamao Endo, Hiroshi Manya, Nathalie Seta and Pascale Guicheney: POMGnT1, POMT1, and POMT2 Mutations in Congenital Muscular Dystrophies. (Ed. Fukuda, M.), *Methods Enzymol.* Elsevier, San Diego, 479, 343-352, 2010
3. Hiroshi Manya, Tamao Endo: Enzyme assay of protein O-mannosylglycan glycosyltransferases., *Glycoscience Protocol Online Database (GlycoPOD)*, <http://jcgdb.jp/GlycoPOD/>, 2010
4. Nigel F Clarke, Svetlana Maugenre, Aurélie Vandebrouck, J. Andoni Urtizberea, Tobias Willer, Rachel Peat, Françoise Gray, Céline Bouchet, Hiroshi Manya, Sandrine Vuillaumier-Barrot,

- Tamao Endo, Eliane Chouery, Kevin P. Campbell, André Mégarbané, Pascale Guicheney: Congenital Muscular Dystrophy type 1D (MDC1D) due to a large intragenic insertion/deletion involving intron 10 of the LARGE gene. *Eur. J. Hum. Genet.*, 19(4), 445-451, 2011
5. Keiko Akasaka-Manyá, Hiroshi Manyá, Mamoru Mizuno, Toshiyuki Inazu, Tamao Endo: Effects of length and amino acid sequence of *O*-mannosyl peptides on substrate specificity of protein *O*-linked mannosyl β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase 1 (POMGnT1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 410(3), 632-636, 2011
6. Keiko Akasaka-Manyá, Hiroshi Manyá, Masami Hayashi, Tamao Endo: Different roles of the two components of human protein *O*-mannosyltransferase, POMT1 and POMT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 411(4), 711-725, 2011
7. Christian St.-Pierre, Hiroshi Manyá, Michel Ouellet, Gary F. Clark, Tamao Endo, Michel J. Tremblay, Sachiko Sato: Host-soluble Galectin 1 promotes HIV-1 replication through a direct interaction with glycans of viral gp120 and host CD4. *J. Virol.*, 85(22), 11742-11751, 2011
8. Hiroshi Manyá: Biosynthetic pathway of *O*-mannosyl glycan in mammals. *Trends Glycosci. Glycotech.*, 23(134), 272-283, 2011
9. Mamoru Mizuno, Kenji Osumi, Yuriko Hirose, Hiroshi Manyá, Tamao Endo: Synthesis of glycopeptide containing 6-*O*-phosphorylated mannose for an α -dystroglycan/laminin interaction study. *Pept. Sci.* 2011, 127-130, 2012
10. Atsushi Kuga, Motoi Kanagawa, Atsushi Sudo, Yiumo Michael Chan, Michiko Tajiri, Hiroshi Manyá, Yamato Kikkawa, Motoyoshi Nomizu, Kazuhiro Kobayashi, Tamao Endo, Qi L. Lu, Yoshinao Wada, Tatsushi Toda: Absence of post-phosphoryl modification in dystroglycanopathy mouse models and wild-type tissues expressing a non-laminin binding form of α -dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, 287(12), 9560-9567, 2012
11. Naoki Nakagawa, Hiroshi Manyá, Tatsushi Toda, Tamao Endo, Shogo Oka: Human natural killer-1 sulfotransferase (HNK-1ST)-induced sulfate-transfer regulates laminin-binding glycans on α -dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, 287(36), 30823-30832, 2012
12. Eriko Avşar-Ban, Hisayoshi Ishikawa, Shin'ichi Akiyama, Hiroshi Manyá, Tamao Endo, Yutaka Tamaru: Functional and heterologous expression of human protein *O*-linked mannosyl β -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase 1 in zebrafish. *J. Biosci. Bioengineer.*, 114(2), 237-239, 2012
13. 萬谷博、遠藤玉夫: 最前線 糖鎖異常による筋ジストロフィー症研究の新たな展開. *ファルマシア*, 48(8), 718-732, 2012

14. 萬谷博、遠藤玉夫: 今日の話題 *O*-マンノース型糖鎖異常による筋ジストロフィー症 糖鎖分析技術の高感度化がもたらす糖鎖研究の新たな展開. 化学と生物, 51(1), 702-704, 2013

II. 学会発表

1. Hiroshi Manya: Protective effect of *N*-glycan bisecting GlcNAc residues on β -amyloid production in Alzheimer's disease. The 28th Naito Conference Glycan Expression and Regulation [I], Hayama, Japan, 2010.7.27-30

2. Keiko Akasaka-Manya, Hiroshi Manya, Yoko Sakurai, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Tamao Endo: Structural alteration of *N*-glycan on APP and β -amyloid production. The 7th GlycoT, Tokyo, 2010.7.30-8.1

3. Hiroshi Manya, Keiko Akasaka-Manya, Tamao Endo: Role of *N*-glycans on protein *O*-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. XXV International Carbohydrate Symposium, Tokyo, 2010.8.1-6

4. Tamao Endo, Eriko Avsar-Ban, Hiroshi Manya, Yutaka Tamaru: Investigation the role of protein *O*-mannosylation during development. Annual Conference of the Society for Glycobiology, St Pete Beach, FL, USA, 2010.11.7-10

5. Hiroshi Manya, Keiko Akasaka-Manya, Tamao Endo: Inhibitory effect of

N-acetylglucosaminyltransferase III on β -amyloid production in Alzheimer's disease. Neuroscience 2010, San Diego, CA, USA, 2010.11.13-17

6. 赤阪啓子、萬谷博、水野真盛、稲津敏行、遠藤玉夫: POMGnT1 の基質特異性の解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010.12.7-10

7. アヴシヤル-坂恵利子、石川文啓、萬谷博、渡部正利喜、秋山真一、三宅英雄、遠藤玉夫、田丸浩: ゼブラフィッシュ初期発生過程において *O*-マンノース型糖鎖修飾が必要である. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010.12.7-10

8. Tamao Endo, Hiroshi Manya, Keiko Akasaka-Manya: Regulation of beta-amyloid production in Alzheimer's disease by *N*-Glycan processing. The 10th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD 2011), Barcelona, Spain, 2011.3.9-13

9. アヴシヤル-坂恵利子、萬谷博、遠藤玉夫、田丸浩: ゼブラフィッシュ初期発生過程における *POMGnT1* 遺伝子の発現解析. 第75回日本生化学会中部支部シンポジウム, 静岡, 2011.5.28

10. 萬谷博: 第13回奨励賞受賞講演 “糖鎖合成機構の解析とその異常による疾患に関する研究”. 第30回日本糖質学会年会, 長岡, 2011.7.11

11. 赤阪-萬谷啓子、萬谷博、水野真盛、稲津敏

- 行、遠藤玉夫: POMGnT1 の基質特異性の解析. 第 30 回日本糖質学会年会, 長岡, 2011.7.11-13
12. Keiko Akasaka-Manyu, Hiroshi Manyu, Tamao Endo Human protein O-mannosyltransferase POMT1 and POMT2 have different roles. The 31st Naito Conference Glycan Expression and Regulation [II], Sapporo, Japan, 2011.9.13-16
13. 赤阪-萬谷啓子、萬谷博、遠藤玉夫: 酵母 ScPmt1 の重要アミノ酸のヒト POMT1, 2 におけるアミノ酸置換の影響. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9.21-24
14. アヴシャル-坂恵利子、秋山真一、萬谷博、遠藤玉夫、田丸浩: ゼブラフィッシュ初期発生過程における POMGnT1 遺伝子の機能解析. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9.21-24
15. 秋山真一、アヴシャル-坂恵利子、石川文啓、田守彩子、萬谷博、遠藤玉夫、田丸浩: 魚類発現系による活性型組換えヒト POMGnT1 タンパク質の生産. 第 63 回日本生物工学会大会, 東京, 2011.9.26-28
16. Mamoru Mizuno, Kenji Osumi, Yuriko Hirose, Hiroshi Manyu, Tamao Endo: Synthesis of glycopeptide, containing 6-O-phosphorylated mannose for an α -dystroglycan/laminin interaction study. 第 48 回ペプチド討論会, 札幌, 2011.9.27-29
17. 赤阪-萬谷啓子、萬谷博、林昌美、遠藤玉夫: Different roles of human protein O-mannosyltransferase, POMT1 and POMT2. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12.13-16
18. 萬谷博、赤阪-萬谷啓子、水野真盛、稲津敏行、遠藤玉夫: 哺乳類 O-マンノース型糖鎖合成機構の解析—POMGnT1 の基質特異性からのアプローチ—. 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012.3.27-31
19. Eriko Avşar-Ban, Hiroshi Manyu, Tamao Endo, Yutaka Tamaru: Study on α -dystroglycanopathy related enzymes in zebrafish. The 5th Annual Zebrafish Disease Models Meeting, Suzhou, China, 2012.4.16-20
20. 萬谷博、赤阪-萬谷啓子、遠藤玉夫: O-マンノース転移酵素とドリコールリン酸マンノース合成酵素の相互作用の解析. 第 31 回日本糖質学会年会, 鹿児島, 2011.6.17-20
21. 中川直樹、萬谷博、遠藤玉夫、岡昌吾: α -ジストログリカン上の機能性糖鎖発現における HNK-1ST の新たな役割. 第 31 回日本糖質学会年会, 鹿児島, 2011.6.17-20
22. 萬谷博、赤阪-萬谷啓子、水野真盛、遠藤玉夫: α -ジストログリカンノパチーの原因遺伝子産物 POMGNT1 による O-マンノース型糖鎖合成機構の解析. 包括脳科学研究推進ネットワーク平成 24 年度夏のワークショップ. 仙台, 2011.7.24-27

23. 川村方希、萬谷博、赤阪-萬谷啓子、林昌美、遠藤玉夫: *O*-マンノース型糖鎖合成におけるドリコールリン酸マンノース合成酵素の関与. 首都大学東京バイオコンファレンス 2012, 東京, 2012.11.9
24. 萬谷博、赤阪-萬谷啓子、林昌美、遠藤玉夫: 小胞体における *O*-マンノース転移酵素複合体の解析. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012.12.14-16
25. 辛欣、萬谷博、赤阪-萬谷啓子、遠藤玉夫: ヒト POMGnT1 の *O* 型糖鎖修飾の解析. 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013.3.27-30

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Mizuno M, Osumi K, Hirose Y, Manya H, Endo T	Synthesis of glycopeptide containing 6- <i>O</i> -phosphorylated mannose for an α -dystroglycan/laminin interaction study.	Sakaguchi K.	Peptide Science 2011	The Japanese Peptide Society	Tokyo	2012	127-130

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Avşar-Ban E, Ishikawa H, Manya H, Watanabe M, Akiyama S, Miyake H, Endo T, Tamaru Y	Protein <i>O</i> -mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish.	Glycobiology	20 巻 9 号	1089-1102	2010
Akasaka-Manya K, Manya H, Mizuno M, Inazu T, Endo T	Effects of length and amino acid sequence of <i>O</i> -mannosyl peptides on substrate specificity of protein <i>O</i> -linked mannose β 1,2- <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase 1 (POMGnT1)	Biochem. Biophys. Res. Commun.	410 巻 3 号	632-636	2011
Akasaka-Manya K, Manya H, Hayashi M, Endo T	Different roles of the two components of human protein <i>O</i> -mannosyltransferase, POMT1 and POMT2.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	411 巻 4 号	711-725	2011

研究成果の刊行物・別刷

Synthesis of Glycopeptide Containing 6-*O*-Phosphorylated Mannose for an α -Dystroglycan/Laminin Interaction Study

Mamoru Mizuno¹, Kenji Osumi¹, Yuriko Hirose¹, Hiroshi Manya², Tamao Endo²

¹Laboratory of Glyco-organic Chemistry, The Noguchi Institute 1-8-1, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo, 173-0003, Japan, and ²Molecular Glycobiology, Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan
email: mmzino@noguchi.or.jp

*α -Dysrtoglycan (α -DG) is one of the best known O-mannosylated proteins in mammals, and O-mannosyl glycan of α -DG play an important role in its binding to laminin. Recently, new glycan containing phosphorylated mannose residue was found. In order to study α -DG/laminin interaction, 6-*O*-phosphorylated mannosyl peptide was synthesized.*

Keywords: 6-*O*-phosphorylated mannose, α -dystroglycan, laminin, POMGnT1

Introduction

Dystroglycan (DG) is a membrane protein and is a component of the dystrophin-glycoprotein-complex in skeletal muscle. DG is composed of an extracellular α -DG subunit and a transmembrane β -DG subunit, and α -DG binds to laminin. Some muscular dystrophies, such as muscle-eye-brain disease (MEB) and Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD), are caused by deletion of α -DG/laminin interaction [1]. It was found that *O*-mannosyl tetrasaccharide (NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man) exists in brain and muscle α -DG, and this mannosyl saccharide was required for laminin binding [2]. In the previous study, we found protein *O*-linked mannose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (POMGnT1) which catalyzes the transfer of GlcNAc to *O*-mannose of glycoproteins. Additionally, we have shown that mutations in the *POMGnT1* gene cause MEB.

Recently, laminin-binding activity of trisaccharide containing 6-*O*-phosphorylated mannose residue (GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-4Man-6-P) was reported, and it was found that this phosphorylation occurs independently from the mannose-6-phosphate synthetic pathway that is required for lysosomal protein modification [3]. In order to study α -DG/laminin interaction, glycopeptide containing 6-*O*-phosphorylated mannose was synthesized. Additionally, to obtain information about the step of phosphorylation in *O*-mannosyl glycan biosynthesis, we examined whether or not 6-*O*-phosphorylated mannosylpeptide worked as an acceptor substrate of POMGnT1.

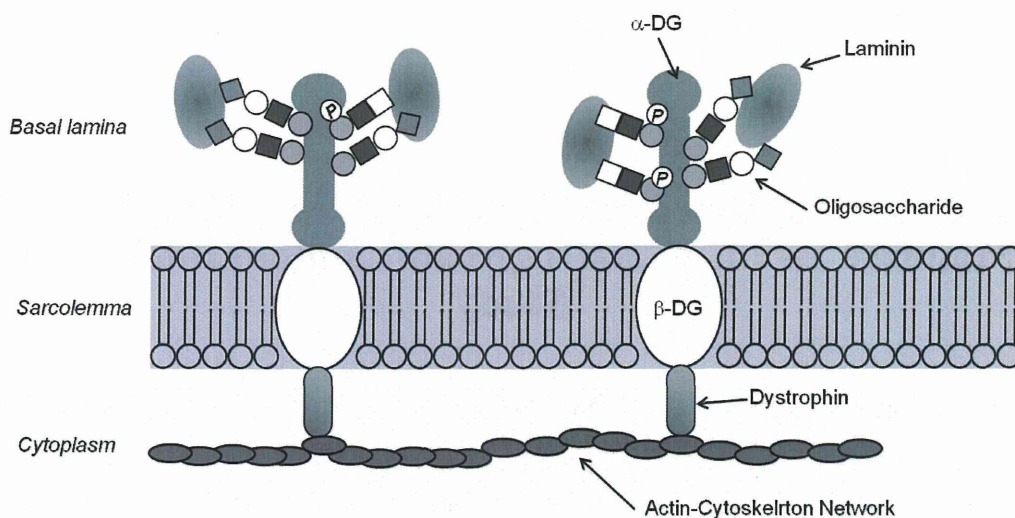


Fig.1 Schematic model of the dystrophin-glycoprotein complex as a transsarcolemmal linker between the subsarcolemmal cytoskeleton and extracellular matrix.

Results and Discussion

The synthetic route of building block Fmoc-Thr[α -Man{2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-P(OCH₂CCl₃)₂}-OPfp **5a** is shown in Fig. 2. In this study, odourless thiol, 2-methyl-5-tert-butylthiophenol (MbpSH) [4], was used to provide thioglycoside donor. The thioglycoside **2** was prepared from the mannose peracetate **1** and Mbp-SH in presence of the BF₃ diethyl ether complex. After removal of O-Ac groups, the trityl group was used for the protection of the C-6 hydroxyl and the benzyl (Bn) ethers for the C-2 and C-3, C-4 hydroxyls.

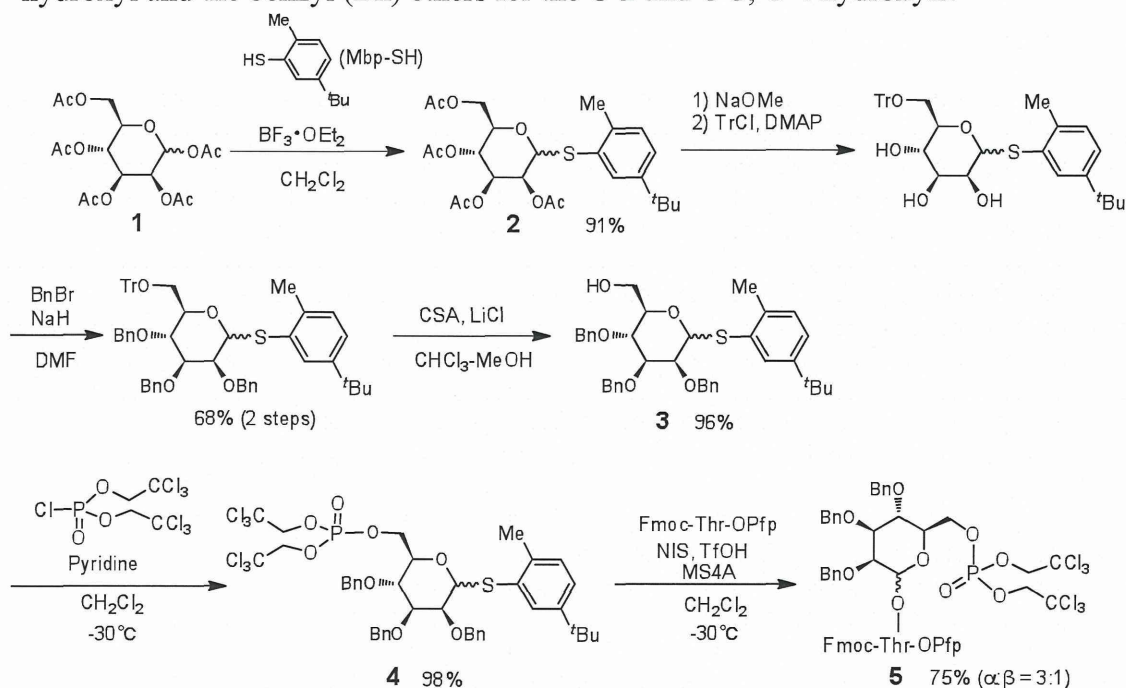


Fig.2 Synthesis of 6-*O*-phosphorylated mannosyl threonine derivative.

The cleavage of C-6 trityl group using 10-camphorsulfonic acid (CSA) and lithium chloride gave compound **3**. Reaction of compound **3** with bis (2,2,2-trichloroethyl) phosphorochloridate [5] and pyridine in CH₂Cl₂ yielded the thioglycoside **4** in almost quantitative yield (98%). The thioglycoside **4** was coupled with Fmoc-threonine Pfp ester using NIS-TfOH to give mannosyl threonine **5** as the anomeric mixture (75% α : β = 3:1). After silica-gel column purification, α -glycoside **5 α** was isolated and used as the building block of glycopeptides synthesis

Next, phospho-mannosyl peptide was prepared by solid-phase manner (Fmoc chemistry). Amino acid sequence of mannosyl peptide was selected same sequence as our previous studies [6, 7]. Starting from Fmoc-Pro-CLEAR-amide resin, peptide synthesis was carried out with a five-fold excess of amino acids and using PyBOP as the activator system. The introduction of mannosyl threonine residue was performed using one equivalent of Pfp ester **5 α** by a double coupling method. Finally, N-terminal amino group was capped with acetyl group. The resulting glycopeptides resin was treated with 95% aqueous TFA to give the crude product of protected phospho-mannosyl peptide. Removal of trichloroethyl groups of phosphoryl moiety and benzyl ethers of mannose moiety was accomplished by hydrogenolysis over palladium hydroxide on carbon in MeOH for 2 hours. After HPLC purification, the target phospho-mannosyl peptide **6** was obtained in 3.9% overall yield from the starting resin.

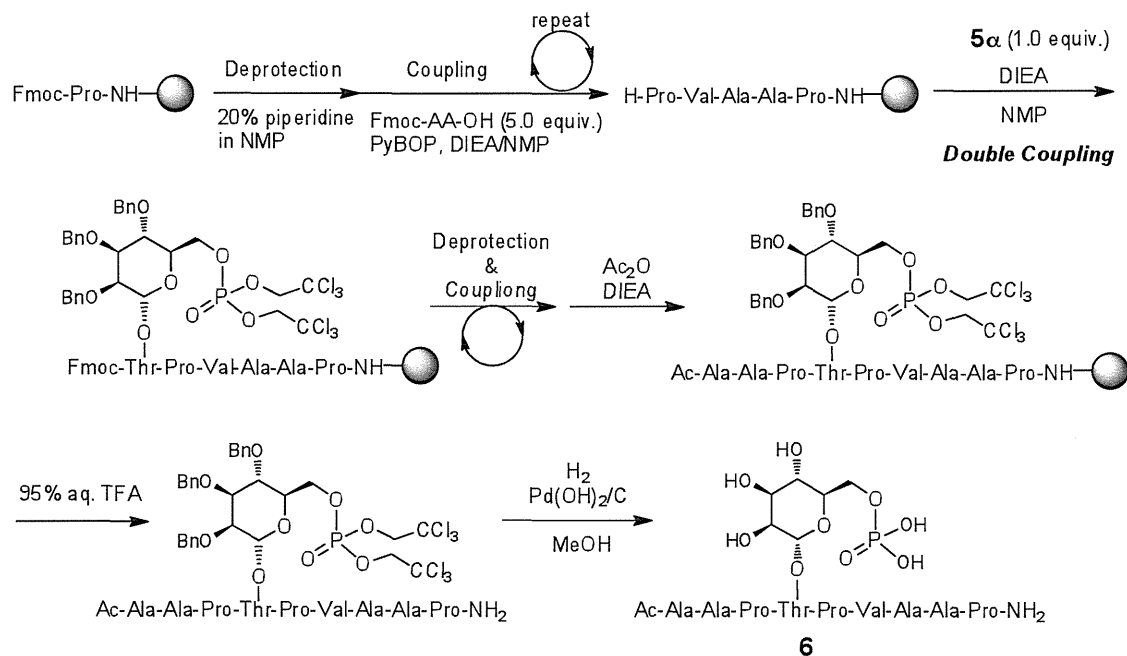


Fig.3 Synthesis of phospho-mannosyl peptide.

The POMGnT1 activity was obtained from the amount of [³H]GlcNAc transferred from UDP-GlcNAc to a substrate [2]. The reaction product was purified with a reverse-phased HPLC and radioactivity was measured. The mannosyl peptide (Man-peptide, Ac-AAPT(Man)PVAAP-NH₂) and the 6-O-phosphorylated mannosyl peptide **6** were used as substrates. The soluble form of human POMGnT1 used as an enzyme source was described previously [7]. The mannosyl peptide was worked as an acceptor for POMGnT1 (*K_m* and *V_{max}* values are 3.6 mM and 0.6 μ mol/min/mg, respectively), whereas the POMGnT1 activity against the phospho-mannosyl peptide **6**

was not detected. This result demonstrated that the POMGnT1 cannot recognize the 6-*O*-phosphorylated mannose as an acceptor. Thus, if the phosphorylation of mannose occurred earlier than POMGnT1 reaction, the formation of GlcNAc β 1-2Man linkage should be inhibited. Taken together, it is possible that the phosphorylation of mannose may occur after forming GlcNAc β 1-2Man linkage. Not only 6-*O*-phosphorylated mannose structure, Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man(6-P) [3], but also the 2,6-substituted *O*-mannose structure, GlcNAc β 1-2(GlcNAc β 1-6)Man, have been identified in α -DG [8]. The GlcNAc β 1-6Man linkage was formed by GnT-IX (GnT-VB). Because the transfer of GlcNAc to C6-position of *O*-mannose by GnT-IX (GnT-VB) requires also the GlcNAc β 1-2Man structure [9, 10], the phosphorylation and GlcNAcylation of C6-position of mannose may be competitive mutually.

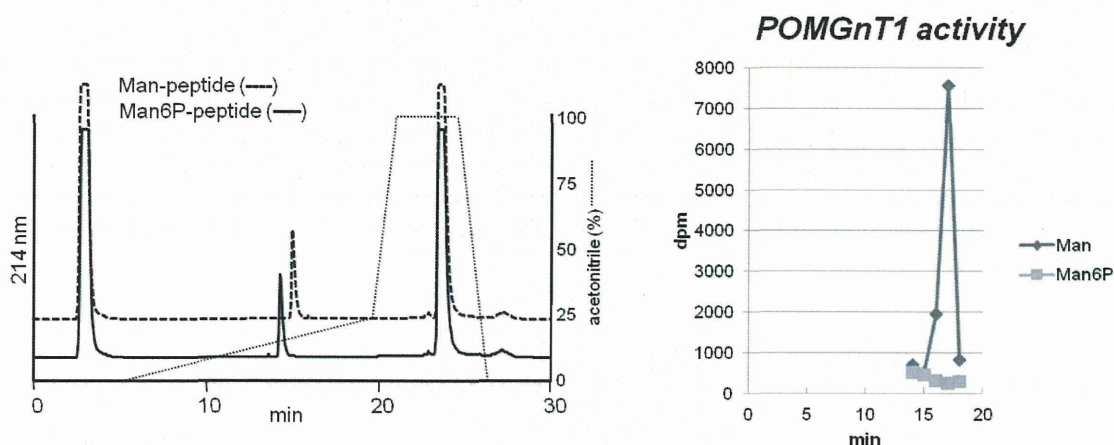


Fig.4 POMGnT1 activity against the phospho-mannosyl peptide **6** and mannosyl peptide. The radioactivity of each fraction (Fr.=1ml/min, count=0.5ml) was measured using a liquid scintillation counter.

In conclusion, synthesis of 6-*O*-phosphorylated mannosyl peptide was achieved. It was found that 6-*O*-phosphorylated mannosyl peptide does not work as an acceptor substrate of POMGnT1. Future studies are necessary to clarify the phosphorylation mechanism of *O*-mannosyl glycan.

References

1. Campbell, K.P. (1995) *Cell* **80**, 675–679.
2. Yoshida, A., Endo, T., et al. (2001) *Dev. Cell* **1**, 717-724.
3. Yoshida-Moriguchi, T., Campbell, K.P., et al. (2010) *Science* **327**, 88-92.
4. Collot, M., Savreux, J., Mallet, J.-M. (2008) *Tetrahedron* **64**, 1523-1535
5. Christensen, M. K., Meldal, M. and Bock, K., (1993) *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 1453-1460
6. Mizuno, M., Ishida, H-k., Ito, F., Endo, T., Inazu, T., (2002) *Peptide Science 2001*, 85-88.
7. Akasaka-Manyu, K., Manyu, H., Mizuno, M., Inazu, T., Endo, T., (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 632-636
8. Endo, T. (2004) *Glycoconjugate J.* **21**, 3-7
9. Inamori, K., Endo, T., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 2337-2340.
10. Kaneko, M., Alvarez-Manilla, G. et al. (2003) *FEBS Lett.* **554**, 515-519.

Protein *O*-mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish

Eriko Avşar-Ban^{2,*}, Hisayoshi Ishikawa^{2,*},
Hiroshi Many³, Masatoshi Watanabe²,
Shinichi Akiyama^{2,5}, Hideo Miyake^{2,4}, Tamao Endo³,
and Yutaka Tamaru^{1,2,4}

²Department of Life Science, Mie University Graduate School of Bioresources, 1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan, ³Glycobiology Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Foundation for Research on Aging and Promotion of Human Welfare, 35-2 Sakaecho, Itabashi, Tokyo 173-0015, Japan, and ⁴Laboratory of Applied Biotechnology, Mie University Venture Business Laboratory, 1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan

Received on November 26, 2008; revised on April 28, 2010; accepted on May 2, 2010

Two distinct cDNAs corresponding to two zebrafish protein *O*-mannosyltransferase genes, *zPOMT1* and *zPOMT2*, were cloned from early developmental embryos. Gene expression analysis revealed that *zPOMT1* and *zPOMT2* were expressed in similar patterns during early embryonic development and in all adult tissues. To study the regulation of *zPOMT1* and *zPOMT2* mRNA distribution during zebrafish embryogenesis, we injected enhanced green fluorescent protein (EGFP) mRNA fused to the 3′ untranslated regions of each *zPOMT* gene. The distribution of EGFP resulting from the two constructs was similar. Injection of antisense morpholino oligonucleotides of *zPOMT1* and *zPOMT2* resulted in several severe phenotypes—including bended body, edematous pericardium and abnormal eye pigmentation. Immunohistochemistry using anti-glycosylated α -dystroglycan antibody (IIH6) and morphological analysis revealed that the phenotypes of *zPOMT2* knockdown were more severe than those of *zPOMT1* knockdown, even though the IIH6 reactivity was lost in both *zPOMT1* and *zPOMT2* morphants. Finally, only when both *zPOMT1* and *zPOMT2* were expressed in human embryonic kidney 293T cells were high levels of protein *O*-mannosyltransferase activity detected, indicating that both *zPOMT1* and *zPOMT2* were required for full enzymatic activity. Moreover, either heterologous combination, *zPOMT1* and human *POMT2* (*hPOMT2*) or *hPOMT1* and *zPOMT2*, resulted in enzymatic activity in cultured cells. These results indicate that the protein *O*-mannosyltransferase machinery

in zebrafish and humans is conserved and suggest that zebrafish may be useful for functional studies of protein *O*-mannosylation.

Keywords: development/glycosylation/POMT1 and POMT2/protein *O*-mannosyltransferase activity/zebrafish

Introduction

Posttranslational modification of proteins by glycosylation has critical biological functions at both the cellular and organismal levels (Haltiwanger and Lowe 2004; Ohtsubo and Marth 2006). In addition to the generally observed types of glycosylation such as *N*-glycosylation and mucin-type *O*-glycosylation, several unique glycans have recently been found to play important roles in a variety of biological processes. According to current knowledge, protein *O*-mannosylation in mammals is found on a relatively small number of proteins in the brain, nerves and skeletal muscle (Krusius et al. 1986; Chiba et al. 1997; Sasaki et al. 1998; Endo 1999). In contrast to yeast cells, where *O*-mannose is elongated by neutral, linear oligomannose chains (Strahl-Bolsinger and Tanner 1991), the mannose residue of mammalian *O*-mannosylglycans is extended with complex glycans terminating with sialic acid, sulfate or fucose (Endo 1999). The structure Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-Ser/Thr is required for binding between α -dystroglycan (α -DG) and laminin G domain (Chiba et al. 1997; Endo 1999; Montanaro and Carbonetto 2003).

Muscular dystrophies are genetic diseases characterized by progressive muscle degeneration and muscular weakening. They can be classified into a number of disease types, and some causative genes have been identified (Burton and Davies 2002). For example, dystrophin forms a dystrophin–glycoprotein complex (DGC), and Duchenne muscular dystrophy is caused by mutations in the gene encoding dystrophin. Mutations in other components of DGC are involved in other muscular dystrophies. Defects in glycosylation of α -DG, one of the DGC components, are responsible for certain congenital muscular dystrophies (Endo and Toda 2003; Michele and Campbell 2003). These kinds of muscular dystrophies, including diseases such as Walker–Warburg syndrome (WWS) and muscle–eye–brain disease, are called α -dystroglycanopathies. Protein *O*-mannosyltransferases (POMT1 and POMT2) catalyze the first step in *O*-mannosyl glycan synthesis (Many et al. 2004), and defects in human POMT1 (*hPOMT1*) or *hPOMT2* result in WWS, an autosomal recessive disorder associated with severe congenital muscular dystrophy, abnormal

¹To whom correspondence should be addressed: Tel/Fax: +81-59-231-9560; e-mail address: ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

⁵Present address: Department of Nephrology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai, Showa, Nakagawa, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan

*These authors contributed equally.

A 1 GAACAGACCGTTGCTTTATTTACAGTGTTTAGTGGCTTTATTTAAAGCGTAAAGTTGTCGTATATGCCTAAGCAATGGCATTATTTATTT 90
91 GTTTTATTTTTCTTGACCAATTCAGTTTTAGCGAATTTTTTTTACATAATTTACTGCTAAAAGACCGCGCATGGTGGTGGAAAGCA 180
181 GCACCTGTTCCACCTATGATTCGCAAAATCCAGAGGAAAAAAGTGAATCAAGTCAGGATTGAGCATGCAAGTGTGTTAAACTGCCCTCAGTGT 270
M Q C V K L P V S V
271 GACAGTGGAGATAAATGTGCTGCTGCTGGCGGTTACAGCACTTGCCTCTTTACTCGACTTTATGGCATTCACTTTCCCAAAGCTGTAGT 360
T V E I N V L L L A V T A L A L F T R L Y G I H F P K A V V
361 GTTTGATGAGTTTTATTATGGACAGTTCCTGTATTGTACATGAAGCAGGTTTTTTTCATGATGAAGCGGTCCTCCTTTGGACACAT 450
F D E V Y Y G Q F L S L Y M K Q V F F I D E S G P P F G H M
451 GATACTTGCTTTAGGACGCTATTAGGAGGATTTGATGGCACTTTGTTGGAAACAGAATTGGAGCAGAATACCCTGGTAAATGCCCTGT 540
I L A L G A Y L G G F D G N F V W N R I G A E Y P G N V P V
541 TTGGACCTTCGACTGATACCGGCTCTAGCAGGCTCTTTTGTGTGCCACTTGCAATCTGTAGTAGTGGAGCTGGGATACCTCCACTT 630
W S L R L I P A L A G S F C V P L A Y L V V V E L G Y S H F
631 CTCGGCACTGGGGCCTGTGCACCTTCTCTCATGAAACTCCCTGATTGTGCAATCGCGCTTTCATGCTGCTGGAGCTGTTTAAATTTT 720
S A L G A C A L L L M E N S L I V Q S R F M L L E S V L I F
721 CTTCTGTGCTTTGGCTGTGCTCTTACCTCCGCTTTCCCAAGCAAGCAACTCATTTTTCAAGTGGTCTGGCTTTGGATCTGTGGGGT 810
F L L L A V L S Y L R F P Q A R N S F F K W F W L V I C G V
811 CAGCTGTGCATTGGGAATTGGGGTAAAGTACATGGGTATGTTACATACCTTTCTACTGCTGAGCCTGGCAGCTGTACACACTGGCAGCT 900
S C A F G I G V K Y M G M F T Y F L L L S L A A V H T W Q L
901 TATTGGAGATCGAACCTTGAGCCATGGCAAGTAATGTTCCAGGTATTAGTTCGCTTCTTGGCACTCGTGGTGTCTACTGTGCATCATTTA 990
I G D R T L S H G K V M F Q V L V R F L A L V V L P V I I Y
991 CTTTGGGTTTTCTACATTCACTGACCTTGTCTATATCGCAGTGGACCTTCTGACCAGATGATGAGCAGTGCCTTTCAAGCAAGTCTAGA 1080
L G F F Y I H L T L L Y R S G P S D Q M M S S A F Q A S L E
1081 GGTGGTCTTGGCCGATCACTCAGGGGACGCTTTAGATGTAGCGTTCGGCTCACAGGTCACTCTCCGACAGTCTCCGGTAAACCTGT 1170
G G L A R I T Q G Q P L D V A F G S Q V T L R T V S G K P V
1171 GCCTTGTGGCTTCACTCACAAAGCCAACTATCCCATCAGGTATGAAATGGCCGTGGAAGCTCCCAAGCAGCAGGTGACCTGCTA 1260
P C W L H S H K A N Y P I R Y E N G R G S S H Q Q Q V T C Y
1261 TCCTTCAAGATGTCACAACTGTTGATTAACAAGACCTTGGGGCGCAAGTCTTGTGGTCAGCAGCCACCCAGACTGTGAGACA 1350
P F K D V N N W W I I K D P G R Q S L V V S S P P R P V R H
1351 TGGGATATTATTGATGCTGCTGGAATGACAACCTGCTACCTGAAACACACATGATGTTGACCCCCATGAGTCTCATCAGCAGGA 1440
G D I I Q L L H G M T T R Y L N T H D V A A P M S P H S Q E
1441 AGTTTCGGGCTATATGACTTTAACGTGCTATGCCAGCCAGAACTCTGAGAGTGGATATTGTGAACAGGGAGTCTGAGAAGAGAT 1530
V S G Y I D F (N) V S M P A Q N L W R V D I V N R E S E K E I
1531 CTGGAAGACCAATTTATCAGAGGTGCGACTAGTCCACCTGAAACCTCAGCTGTTTTAAAGCTCAGTGGAGCCTCTCTGCGGAGTGGGG 1620
W K T I L S E V R L V H V (N) T S A V L K L S G A S L P E W G
1621 TTTAAACAGCTGGAGGTGGTGGTGATAAGATTTATAAAGGCTACCAGCAGACCGGATGTGGAACCTGGAGGAGCACCGCTATGGCAG 1710
F K Q L E V V G D K I Y K G Y Q Q T G M W N V E E H R Y G R
1711 AAGTCAGAAACCAAGGAAGGGAGTTGGAGCTGAAGTCTCCTACTCACAGCATGTCAACAAAATCTCACATTTATGGCCAAATTTCT 1800
S Q E P K E R E L E L K S P T H S D V N K (N) L T F M A K F L
1801 GGAGCTGCACTGGAAGATGCTGACAGTAAAGAACGAAGAGTCAAGACCAAAATATAGTTCATCACCTCTTGAATGGATCACATGGACAC 1890
E L Q W K M L T V K N E E S E H K Y S S S P L E W I T M D T
1891 CAACATTGCATATGGGCTTCATCCTTCAAGTAATGCACAGATTCACCTTTATAGGCAATATTGTTACTTGGACCACTGGAAACATTACACT 1980
N I A Y W L H P S S N A Q I H F I G N I V T W T T G (N) I T L
1981 GGTGTGACTGCTCTGTTTTAACATACTACTAAGACGGAGGAAAGTTGAAGACATCCCAAGACTCTTGGGAACAGCTTGGC 2070
V V Y C L L F L T Y L L R R R R K V E D I P Q D S W E Q L A
2071 TTGGCTGTGTTGCTTGGAGGCTGGGAGTGAATACCTGCCATTCTTCTAATGGAGAAGACTCTCTTTCTATATCACTATCT 2160
L A G V V C F G G W A V N Y L P F F L M E K T L F L Y H Y L
2161 CCCAGCACTCACCTCAAGATCTTGCAAAATACCTATAGTACAGAGCACTGTACATCCACGATTTGAGATCCTCAGCTCAACAGAAAGC 2250
P A L T F K I L Q I P I V T E H L Y I H V L R S S A Q Q K A
2251 ATTTGGTGGTGAATTTAGCAGTCTTTGTTGATACATGCTTACCACAGCTTGTGCTCTCACGTATGGCCAGCCAGCGTTAAC 2340
F G G V I L A V L C S V Y M S Y H S L S P L T Y G Q P A L T
2341 ATCAGACAAGCTCGCTGAGCTGCGCTGGAGGGAGTGGGATATTCTTACGCAAAACGCTAAAATATCCTTTATTTTTTAAAGACAA 2430
S D K L A E L R W R E S W D I L L R K R *
2431 GATAATTCATGGTCAAAATTTAAATCGAGATGACTGATAGGGCTGATGGATTTTGTGAGAAATGGATTCTGATTGCAAAATGCATCA 2520
2521 CTTTTCTGCTTGAATGGATTCTGAGCTCAGTGTTAACAGGAGATTATACCATATGCTTTACAAACTCTGCTTCTCCAATTCCTTAC 2610
2611 AATACCACATGAATCTAAGTAACTCAGTAAAGTGAAGTTCAAATTAGCCAAATACAAAAGTGTTTTTAGTGGAGCTTTACATTAACTTGT 2700
2701 TCATAAAGGCCAACTTACATGAAGCACAGCAATATATGGTTTGAAGAACTAGTCAAGAGTGCACATGCTGTATAAAACTAAAGTTTAGAA 2790
2791 TCACTTCAAGAGAGAATAGCAACGCATTTTGAATCAATTTTTCAATATTACACCATAGTTTTTATGGATTCCAGAAAGCTGTGAAGCAC 2880
2881 TATTTCTAGGCTCTGTCGCCAAACATAAATAATGTGAAAAAAACTCATGCTGCTGAATCTGAAAACCTTAAACCAATGGACTCTGAAGC 2970
2971 ACAATTTCCGTGCTACATTTATCATGCTCGTATGTTTACATATTACTCTGTTTGTATAGCGATTTTATTGTATTTTATAGAGACTGTTA 3060
3061 AACTAATAAGATGCAATTCATTTTAAATATGTTTTATTGATTCTGCACAACAGAAAAAAGCGTTAATAAACGTTTATATGACAT 3150
3151 TAAAAAATAAAAAAAAAA 3169