

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18509

研究課題名(和文) 糖尿病関連タンパク質GLUT4の糖鎖依存的輸送機構の解明

研究課題名(英文) Profiling of N-glycan structure on GLUT4 glucose transporter critical for intracellular trafficking

研究代表者

芳賀 淑美 (HAGA, Yoshimi)

公益財団法人がん研究会・ゲノムセンター・研究員

研究者番号：40525789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンはグルコーストランスポーターであるGLUT4の局在を細胞内の貯蔵小胞から細胞膜上に変化させることによって、グルコースホメオスタシスを制御している。本研究では、細胞内輸送制御に関わるGLUT4糖鎖の役割の解明を目指した。質量分析法によりGLUT4のN型糖鎖構造の相対定量解析を行った。その結果、シアル酸、フコースを含む高分岐糖鎖が多数同定され、非常に大きな構造の特殊な糖鎖が機能に参与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The facilitative glucose transporter GLUT4 plays a key role in regulating whole-body glucose homeostasis. To elucidate the functional significance of the sole N-glycan chain on GLUT4, wild-type GLUT4 and a GLUT4-glycosylation mutant conjugated with EGFP were stably expressed in HeLa cells and its N-glycoforms were analyzed by mass spectrometer. Kifunensine-treated cells lost sensitivity to insulin, suggesting the functional importance of the N-glycan structure for GLUT4 trafficking. Large, unique structures were detected on insulin-responsive GLUT4, suggesting that a specific structural element of N-glycan may be critical for the localization of GLUT4 to the appropriate intracellular pool essential for insulin-mediated translocation, and part of the N-glycan structure has the potential to act as a sorting signal.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 質量分析 GLUT4

1. 研究開始当初の背景

インスリン応答性グルコース輸送体 GLUT4 は、主に脂肪細胞や筋肉に存在する 12 回膜貫通型タンパク質で、血中グルコース濃度の恒常性維持に重要な役割を果たしている。インスリン刺激下における GLUT4 の応答性低下は 2 型糖尿病の発症に深く関与しているため、インスリン依存的な GLUT4 の細胞内動態研究は古くから活発に行われてきた。これまでの研究から、インスリンはグルコーストランスポーターである GLUT4 の局在を細胞内の貯蔵小胞から細胞膜上に変化させることによって、血中グルコースの筋肉や脂肪組織への取り込みを増加させ、グルコースホメオスタシスを制御していることが明らかになっている。しかし、その輸送を正確に制御する細胞内情報伝達機構は複雑であり、局在変化の制御メカニズムはいまだ不明な点が多い。

一般に、細胞膜タンパク質や分泌タンパク質の大部分は糖鎖修飾を受けた糖タンパク質である。糖鎖がタンパク質の輸送や機能発現をはじめとした様々な生理的・病理的現象に関わっている例が数多く報告されている。GLUT4 もまた、N 型糖鎖をもつ糖タンパク質である。GLUT4 がインスリンに応答するメカニズムについては古くから研究されてきたが、N 型糖鎖がその性質や機能にどのように影響するかは、これまで全く調べられていなかった。

GLUT4 は他の GLUT ファミリータンパク質 (拡散促進型輸送体) と同様、細胞外部分に 1 本 N 型糖鎖をもつ。申請者は C 末端に GFP を融合させた野生型 GLUT4 と、その糖鎖欠損変異体 (N57Q 変異体) を構築し、機能解析を行った。ライブセルイメージングによってインスリンに応答して GLUT4 が細胞膜に移動してくる様子を顕微鏡で観察したところ、野生型 GLUT4 ではインスリン刺激依存的な GLUT4 貯蔵小胞 細胞膜間の可逆的な小胞輸送が観察されたのに対し、N57Q 変異体はインスリン応答性を失い、細胞内における局在も野生型と異なるという驚くべき結果を得た。さらに薬剤処理により糖鎖構造を変化させた GLUT4 の解析も行い、糖鎖構造を変化させた GLUT4 も、N57Q 糖鎖変異体と同様の挙動を示すことを確認した。これらの結果から、GLUT4 上の N 型糖鎖の特定の構造が正しい経路を通るための指標となっている可能性を示した (引用文献 1)。さらに、標的糖タンパク質のうち特定の糖鎖修飾を受けたものだけを区別して可視化する技術を開発し、糖鎖構造の微細な違いがインスリンに応答した GLUT4 の細胞内取り込み速度にも影響する可能性があることを世界に先駆けて示している (引用文献 2)。一方、GLUT4 のグルコース輸送活性には糖鎖付加の有無による差が見られなかったことから、糖鎖付加はトランスポーターとしての輸送活性に及ぼす影響は小さいと考えられる。さ

らに糖鎖付加は新たに合成された GLUT4 の安定性に寄与しており、糖鎖が付加しないものの一部は ERAD (小胞体関連分解) で分解されることを明らかにし、N 型糖鎖が GLUT4 の品質管理に重要な役割を果たしていることも見出した。

2. 研究の目的

上述のように、糖鎖は GLUT4 の特徴的な輸送過程に重要な役割を果たしていることが予想された。GLUT4 の選別輸送にはレクチン等の糖鎖認識分子の関与が考えられるが、現在までにその因子は明らかにされていない。

そこで本研究では、GLUT4 研究においてこれまで全く焦点が当てられることのなかった「糖鎖」に着目し、細胞内輸送制御に関わる糖鎖の役割の解明と、選別輸送メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

インスリン応答性・非応答性の細胞を用い、GLUT4 上の N 型糖鎖の構造をウエスタンブロットティング、レクチンブロットティングにより解析した。薬剤によって糖鎖構造を変化させ、挙動解析も行った。

また、質量分析法によって詳細な糖鎖構造解析を試みた。

4. 研究成果

(1) 生化学的手法による GLUT4 糖鎖構造解析

図 1 は C 末端に GFP を融合させた野生型 GLUT4 と、その糖鎖欠損変異体 (N57Q 変異体) のウエスタンブロットティングの結果である (HeLa 細胞)。HeLa 細胞はインスリン受容体や下流のシグナル伝達因子を発現していることが知られ、HeLa 細胞に発現させた GLUT4-EGFP はインスリン応答性を示すことから、糖鎖依存的に輸送を制御する糖鎖認識分子も存在している可能性が高い。GLUT4 には N 型糖鎖が 1 ヶ所しか結合しないにも関わらず、PNGase F で N 型糖鎖を脱離した場合や、N57Q 変異体と比較して、相対的な分子量が 20 kDa 程も違う。分子量シフトの原因としてシアル酸付加の影響が考えられたが、野生型 GLUT4 をシアリダーゼで処理をしても分子量への影響は小さかった。このことから、GLUT4 には非常に大きな構造の特殊な糖鎖が結合していることが予測された。

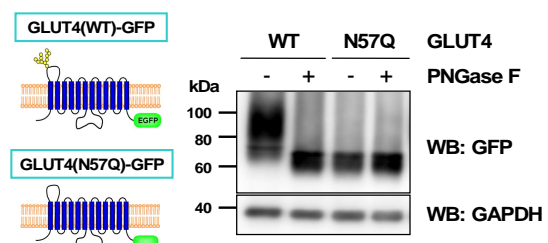


図 1 野生型 GLUT4 とその糖鎖欠損変異体

次に、GLUT4 が本来発現している細胞である繊維芽細胞と脂肪細胞で同様の分析を行った。GLUT4 のソーティング制御の仕組みは未分化な繊維芽細胞(前脂肪細胞)や筋芽細胞では未発達であり、分化誘導によって Sortilin 等の分子の発現が誘導されることによって初めて発達していくことが知られている。分化の前後で糖鎖構造に変化があるかレクチンを用いて調べたところ、分化誘導前の 3T3-L1 繊維芽細胞と比べて分化後の脂肪細胞では糖鎖構造のプロファイルが明らかに変化し、ポリラクタサミン(poly LacNAc)と呼ばれる長鎖構造が増えることが明らかになった(図2)。このことから、分化後の脂肪細胞 GLUT4 にのみ存在する糖鎖構造が輸送に参与しているのではないかと推定された。

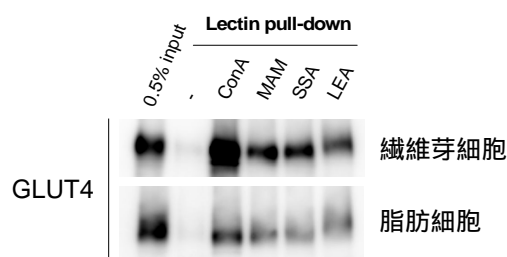


図2 分化の前後における GLUT4 の糖鎖プロファイルの変化

(2) 質量分析法による GLUT4 上の N 型糖鎖構造プロファイリング

HeLa 細胞に GLUT4-EGFP を発現させ、細胞溶解液を調製後、免疫沈降法により GLUT4-EGFP を回収した。SDS-PAGE を行い、バンドを上下に切り出してゲル内消化を行った。得られたトリプシン消化物は LTQ-Orbitrap-Velos 質量分析計 (Thermo Scientific 社) にて分析を行った。その後取得した質量分析データを Expressionist プロテオームデータベースサーバー (Genedata 社) に転送し、必要なデータ処理後に検出された糖鎖構造を比較した。高分子量側のバンドからは予想通り、高分岐の複雑な構造が検出された一方で、低分子量側のバンドからは主にハイマンノース型の糖鎖構造が検出された。

次に溶液内消化での糖ペプチドの調製を試みた。GLUT4-EGFP の第一細胞外ループ(N 型糖鎖付加部位の近傍)に HA タグを導入したコンストラクトを構築し、GFP 抗体と HA 抗体の 2 段階の免疫沈降を行い、純度を上げた。HA ペプチドによって濃縮した GLUT4 糖ペプチドを溶出し、質量分析を行ったが、ゲル内消化で得られた結果以上の糖鎖構造は得られなかった。

糖鎖構造を確定させるに至らなかった理由として、GLUT4 が 12 回膜貫通型タンパク質であることから疎水性が非常に高く、界面活性剤を使わない方法では限界があるためで

あると考えられた。

そこで、免疫沈降で精製した GLUT4 を、質量分析に使用可能な界面活性剤を用いて溶出し、トリプシン消化を行って糖ペプチドを濃縮した。得られた糖ペプチドに対して特定の糖鎖付加部位に結合した糖鎖パリエーションを一斉定量できる質量分析技術 Energy Resolved Oxonium Ion Monitoring Technology (Erexim)法を用い、GLUT4 の N 型糖鎖構造の相対定量解析を行った。その結果、73 構造もの N 型糖鎖が同定され、シアル酸、フコースを含む高分岐糖鎖が多く含まれることが明らかになった。

<引用文献>

1. Yoshimi Haga, Kumiko Ishii and Tadashi Suzuki; N-glycosylation is critical for the stability and intracellular trafficking of glucose transporter GLUT4, the Journal of Biological Chemistry, 286(36):31320-7 (2011)
2. Yoshimi Haga, Kumiko Ishii, Kayo Hibino, Yasushi Sako, Yukishige Ito, Naoyuki Taniguchi and Tadashi Suzuki; Visualizing specific protein glycoforms by transmembrane fluorescence resonance energy transfer, Nature Communications, 3:907 (2012)

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 1 件)

1. Yunus Emre Tarhan, Taigo Kato, Miran Jang, Yoshimi Haga, Koji Ueda, Yusuke Nakamura and Jae-Hyun Park; Morphological Changes, Cadherin Switching, and Growth Suppression in Pancreatic Cancer by GALNT6 Knockdown, Neoplasia, 査読有, 18(5):265-72 (2016)
DOI: 10.1016/j.neo.2016.03.005

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Yoshimi Haga, Motohide Uemura and Koji Ueda; Development of rapid glycoform analysis for specificity-enhanced PSA screening, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 8 日, 横浜
2. Yoshimi Haga, Naomi Saichi, Motohide Uemura and Koji Ueda; Development of specificity-enhanced PSA screening by rapid glycoform analysis, Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research, 2016 年 2 月 19 日, ハワイ (USA)
3. Yoshimi Haga, Naomi Saichi, and Koji

Ueda; Development of
specificity-enhanced PSA by rapid
glycan profiling, HUP02015, 2015年9
月28日, バンクーバー(カナダ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳賀 淑美 (HAGA, Yoshimi)
公益財団法人がん研究会・ゲノムセンター・
研究員

研究者番号：40525789