

令和元年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15094

研究課題名(和文)新規C型糖転移酵素の探索と同定

研究課題名(英文)Exploration and identification of novel C-mannosyltransferase

研究代表者

丹羽 祐貴(Niwa, Yuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・産総研特別研究員

研究者番号：20756077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新たなC型糖転移酵素を探索し同定することを目的とした。新規C型糖転移酵素を探索するため、2つのスクリーニング系を考案し、その系の構築を完了した。しかし他の研究により、本研究の目的としていた新規C型糖転移酵素が存在しない可能性が示唆された。そこで様々な角度からその検証を行った。その結果、C型糖転移酵素活性を有していないはずであるS2細胞において、特定のタンパク質でC型糖修飾が確認された。さらにS2細胞のdpy19をノックアウトした結果、本タンパク質のC型糖修飾の減少が確認された。つまり新規C型糖転移酵素は存在しない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、当初の目的としていた新規C型糖転移酵素は存在しない可能性が示唆された。これによりC型糖修飾の修飾機構はDPY19の経路のみである可能性が示唆され、C型糖修飾の機構と生物学的意義を考察していく上で学術的に意義深い結果が得られた。一方でショウジョウバエS2細胞の有するdpy19についても酵素活性を有する可能性が示唆され、これまで様々なタンパク質に対しC型糖転移酵素を示さなかった原因について探索することで新たな発見につながると考えられ、その結果からヒトにフィードバックすることで疾患との関連など、新たな発見につながる可能性を秘めており、その点においても意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to explore and identify novel C-mannosyltransferase. In order to search for a novel C-mannosyltransferase, we designed first and second screening systems and validated these screening systems. However, another study suggested that the novel C-mannosyltransferase, which is the purpose of this study, may not exist. Thus, the verification is required. As a result, in S2 cells, which should not have C-mannosyltransferase activity, C-mannosylation was detected in a specific protein. Furthermore, as a result of knockout of dpy19 in S2 cells, reduction of C-mannosylation of this protein was confirmed. These results suggested that the novel C-mannosyltransferase may not exist.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：C型糖修飾 糖転移酵素 DPY19

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾はタンパク質の翻訳後修飾の1つであり、主にタンパク質の安定性や立体構造の形成などに寄与している。また糖鎖修飾の異常は癌や糖尿病の病因となることが報告されており、糖鎖修飾がこれらの疾患の治療標的やバイオマーカーになることが期待されている。申請者は以前より、糖鎖修飾の中でも C 型糖修飾に焦点を絞り研究を進めている。C 型糖修飾は、Trp 残基に単糖のマンノースが炭素-炭素結合を介して結合する、他の糖鎖修飾には無いユニークな特徴を有する(図1)。一方で C 型糖修飾の機構や生物学的意義などは未解明であり、その解明が望まれていた。このような状況下において、近年我々は C 型糖修飾の新規標的タンパク質として R-spondin1 (Rspo1) や hyaluronidase1 など多くのタンパク質を同定し、その機能に与える影響を報告した(Niwa, Y. *et al. Mol. Biol. Cell*, 2016)。特に Rspo1 に関して、Trp153 及び Trp156 の 2ヶ所の C 型糖修飾を発見し、それらが Rspo1 の分泌やシグナル増強活性に重要であることを証明した。一方で近年、線虫の dpy19 タンパク質が TSR1 ドメイン中の Trp 残基の C 型糖転移酵素であることが報告された(Buettner, F.F. *et al. Mol. Cell*, 2013)。そこで我々は、線虫の dpy19 のヒトホモログである DPY19L1 ~ L4 の 4 つの中にヒト Rspo1 の C 型糖転移酵素があると考え、その同定を行った。その結果、Trp156 に対する C 型糖転移酵素として DPY19L3 を同定したが、Trp153 に対する C 型糖転移酵素の同定には至らなかった。つまり、ヒトにおける世界初の C 型糖転移酵素の同定に成功した一方、全ての DPY19 family 遺伝子が Trp153 に対し C 型糖転移酵素として機能しなかったことから、DPY19 family 以外の新規 C 型糖転移酵素の存在が示唆された。

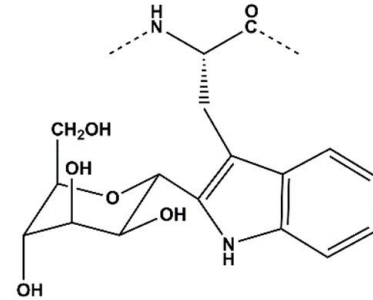


図1 C型糖修飾の構造

### 2. 研究の目的

先行研究により DPY19 family 以外の新規 C 型糖転移酵素の存在が示唆された。新規 C 型糖転移酵素の同定は C 型糖修飾の全容の理解に必須であり、機能が示されつつある C 型糖修飾のさらなる研究発展にとって非常に重要な課題である。また C 型糖転移酵素である DPY19 family の異常は疾患との関連が示唆されており、新規 C 型糖転移酵素も疾患と関連がある可能性を有している。つまり新規 C 型糖転移酵素の同定は、がんや糖尿病といった疾患の新たな分子標的の提示につながる可能性を秘めている。そこで本研究では Rspo1 の Trp153 に対する C 型糖転移酵素の同定を研究目的と定めた。

### 3. 研究の方法

先行研究において Rspo1 の C 型糖修飾の阻害はその分泌を抑制することが示されている(Niwa, Y. *et al. Mol. Biol. Cell*, 2016)。そこでこの性質を利用し 1 次スクリーニング系の構築を試みた。Rspo1 に対し分泌型ルシフェラーゼである *Gussia luciferase* (Gluc) を融合したタンパク質(Rspo1-Gluc)を過剰発現する細胞を樹立した。その後、Rspo1-Gluc の分泌が C 型糖修飾により制御されていることを検証し、1 次スクリーニング系が正しく機能することを確認した。次に 1 次スクリーニングでヒットした遺伝子のさらなる検証のため、2 次スクリーニング系を考案した。2 次スクリーニングはより精度高く簡便に C 型糖修飾の有無を判別できる系が必要とされるため、SDS-PAGE を用いたタンパク質の分離により C 型糖修飾の有無を判別できる系の構築を行った。

一方で、本研究を遂行中に他の研究グループよりマウス DPY19L1 および DPY19L3 が TSR1 ドメイン中の Trp 残基の C 型糖転移酵素であることが報告された(図2; Shcherbakova, A. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017)。本研究の結果を踏まえると、Rspo1 の Trp153 の C 型糖転移酵素は DPY19L1 である可能性が考えられた。これは本研究目的の根幹にかかわる部分であるため、その検証をする必要性が生じた。我々の先行研究と他グループで行われたこの研究では研究手法が異なっており、それにより我々の研究では Rspo1 の Trp153 の C 型糖修飾が DPY19L1 により触媒されなかった可能性があった。そこで他グループの用いた手法である CRISPR/Cas9 を利用し、ヒト細胞において DPY19L1 ~ L4 のノックアウト(KO)を試みた。

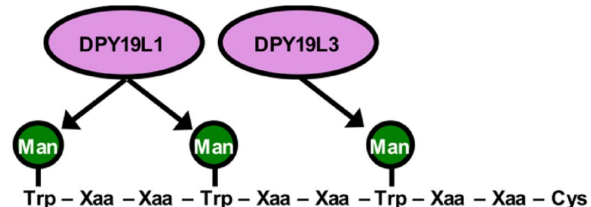


図2 DPY19L1 と DPY19L3 による C 型糖修飾

さらに、我々の研究グループで発見した C 型糖修飾がおこる複数のタンパク質で DPY19 family による C 型糖修飾の確認を行った。ショウジョウバエ由来 S2 細胞は C 型糖修飾の起こらない細胞株として知られている。そこで S2 細胞に DPY19 family と C 型糖修飾候補タンパク質を共発現させ、精製したサンプルを質量分析により解析することにより、様々なタンパク質において DPY19 family による C 型糖修飾の確認を行った。

#### 4. 研究成果

まず、新規 C 型糖修飾酵素をスクリーニングするための 2 段階の系を構築した。1 次スクリーニング系として考案した Rspo1-Gluc を過剰発現する細胞を樹立し、Rspo1-Gluc の分泌が C 型糖修飾により制御されるか否かを評価した。野生型 Rspo1-Gluc と C 型糖修飾の起こらない変異体 Rspo1-Gluc の過剰発現細胞を樹立し、その培養上清の Gluc 活性を測定した結果、野生型と比較し変異体 Rspo1-Gluc の Gluc 活性は抑制されたことから、Rspo1-Gluc においても C 型糖修飾がその分泌を制御していることが示唆された。さらに野生型 Rspo1-Gluc 過剰発現細胞に対し、siRNA による DPY19L3 の機能抑制を行った結果、同様に Rspo1-Gluc の Gluc 活性は抑制されたことから、Rspo1-Gluc の分泌が C 型糖修飾により制御されていることが確かめられた。以上のことより Rspo1-Gluc を用いた 1 次スクリーニング系の構築が完了した。

次に 2 次スクリーニング系の構築を行った。C 型糖修飾ではマンノース 1 つ (162 Da) の修飾がおこる。Rspo1 の場合は 2 ヶ所において C 型糖修飾がおこるため、C 型糖修飾がある Rspo1 と無い Rspo1 では 324 Da (0.324 kDa) の分子量変化がおこる。しかしこれは Rspo1 の分子量 (約 36 kDa) と比較し非常に小さい (約 1%) ため、SDS-PAGE による分離においては C 型糖修飾の有無による分離は困難であった。そこで Rspo1 の C 型糖修飾がおこるドメインである TSR1 ドメインのみを用い、遺伝子改変により TSR1 を 2 回連結させた人工タンパク質 (2×TSR1) を作製した。2×TSR1 は約 18 kDa の分子量であり、かつ C 型糖修飾部位は 4 ヶ所へと増加していることから、C 型糖修飾の有無により 0.648 kDa (2×TSR1 の分子量の約 4%) の分子量変化がおこると想定された。そこでこの人工タンパク質 2×TSR1 において C 型糖修飾の有無により SDS-PAGE による分離が可能か否かを検討した結果、C 型糖修飾が無い場合において 2×TSR1 は低分子量方向へバンドシフトし、C 型糖修飾の有無により分離が可能であることが示された (図 3)。以上のことから SDS-PAGE を用いた 2 次スクリーニング系の構築が完了した。

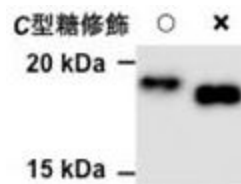


図 3 C 型糖修飾の有無によるバンドシフト

上記の通り当初の予定通りに 2 種類のスクリーニング系の構築が完了した。しかしこのスクリーニング系を構築している最中に他の研究グループによりマウス DPY19L1 および DPY19L3 が TSR1 ドメイン中の Trp 残基の C 型糖転移酵素であることが報告された (Shcherbakova, A. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2017)。この研究の結果を踏まえると、Rspo1 の Trp153 の C 型糖転移酵素は DPY19L1 である可能性が考えられ、探索を予定していた新規 C 型糖転移酵素は存在していない可能性が生じた。そこでその検証のため、Shcherbakova らと同様の手法である CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子ノックアウトにより Rspo1 の Trp153 の C 型糖修飾が DPY19L1 により触媒されるか否かを検討することとした。DPY19L1、DPY19L2、DPY19L3、DPY19L4 のそれぞれについて特異的な gRNA の設計を行い、その gRNA によりそれぞれの遺伝子がゲノム編集出来ることを確認した。現在、各遺伝子のノックアウト細胞の樹立を試みている。

一方で我々の研究グループで発見した C 型糖修飾がおこる複数のタンパク質で DPY19 family による C 型糖修飾の確認を行った。ショウジョウバエ由来 S2 細胞は C 型糖修飾の起こらない細胞株として知られている。そこで S2 細胞に DPY19 family と C 型糖修飾候補タンパク質を共発現させ、精製したサンプルを質量分析により解析することにより、様々なタンパク質において DPY19 family による C 型糖修飾の確認を行った。その結果、DPY19L3 が複数のタンパク質に対し C 型糖転移酵素活性を示した一方で、DPY19L1、DPY19L2、DPY19L4 が活性を示したタンパク質は無かった。これが S2 を用いたことによるものであるかは、先述のヒト細胞において DPY19L1 ~ DPY19L4 をノックアウトした細胞を用いることでさらなる検証を行う必要がある。一方で、S2 細胞を用いた場合でも特定のタンパク質において C 型糖修飾が起こることが示唆された。そこでショウジョウバエの遺伝子をデータベースで確認したところ、dpy19 遺伝子は存在していた。また S2 細胞における遺伝子発現を確認したところ、dpy19 遺伝子の発現が確認された。そこで S2 細胞の dpy19 をゲノム解析したところ、2 ヶ所においてデータベースに登録された配列と異なる塩基が確認された。さらにその内の 1 ヶ所はアミノ酸変異を伴う変異であった。このことから、このアミノ酸変異が S2 細胞において dpy19 が活性を持たない原因である可能性が示唆された。さらに、S2 細胞中で C 型糖修飾が確認されたタンパク質について、S2 細胞で dpy19 をノックアウトしたところ、その C 型糖修飾が減少することが確認された。以上の結果から、当初の目標としていた新規 C 型糖転移酵素は存在しない可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Mizuta H, Kuga K, Suzuki T, Niwa Y, Dohmae N, Simizu S “ C-mannosylation of R-spondin2 activates Wnt/ -catenin signaling and migration activity in human tumor cells ” International Journal of Oncology、査読有、Vol. 54、No. 6、2019、pp. 2127-2138 DOI: 10.3892/ijo.2019.4767
- (2) Kawahara R, Niwa Y, Simizu S “ Integrin 1 is an essential factor in vasculogenic mimicry of human cancer cells ” Cancer Science、査読有、Vol. 109、No. 8、2018、pp. 2490-2496

DOI: 10.1111/cas.13693

- (3) Niwa Y, Simizu S “C-Mannosylation: Previous Studies and Future Research Perspectives” Trends in Glycoscience and Glycotechnology、査読有、Vol. 30、No. 177、2018、pp. E231-E238  
DOI: 10.4052/tigg.1755.1E
- (4) Otani K, Niwa Y, Suzuki T, Sato N, Sasazawa Y, Dohmae N, Simizu S “Regulation of granulocyte colony-stimulating factor receptor-mediated granulocytic differentiation by C-mannosylation” Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、Vol. 498、No. 3、2018、pp. 466-472  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.210
- (5) Niwa Y, Nakano Y, Suzuki T, Yamagishi M, Otani K, Dohmae N, Simizu S “Topological analysis of DPY19L3, a human C-mannosyltransferase” The FEBS Journal、査読有、Vol. 285、No. 6、2018、pp. 1162-1174  
DOI: 10.1111/febs.14398
- (6) Morishita S, Suzuki T, Niwa Y, Dohmae N, Simizu S “Dpy-19 like 3-mediated C-mannosylation and expression levels of RPE-spondin in human tumor cell lines” Oncology Letters、査読有、Vol. 14、No. 2、2017、pp. 2537-2544  
DOI: 10.3892/ol.2017.6465

[学会発表](計 21 件)

- (1) 西谷拓海、鈴木健裕、丹羽祐貴、三浦一輝、堂前直、清水史郎「R-spondin1 におけるリン酸化の機能解析」日本農芸化学会関東支部 2018 年度支部大会、2018
- (2) 横山典弘、柳原凌太郎、三浦一輝、丹羽祐貴、清水史郎「トポロジー解析による DPY19L1 の C-mannosyltransferase 活性中心の探索」日本農芸化学会関東支部 2018 年度支部大会、2018
- (3) 水田隼斗、丹羽祐貴、清水史郎「R-spondin2 の C 型糖修飾はがんのバイオマーカーに成り得る」第 77 回日本癌学会学術総会、2018
- (4) 石沢雄大、丹羽祐貴、鈴木健裕、堂前直、清水史郎「CCN1 における glucosyl-galactosyl-hydroxylation の機能解析」第 37 回日本糖質学会年会、2018
- (5) 横山典弘、柳原凌太郎、小松良亮、三浦一輝、丹羽祐貴、清水史郎「トポロジー解析による DPY19L1 の活性中心の探索」第 37 回日本糖質学会年会、2018
- (6) 齊藤佐代子、箕嶋文、清井佳代、丹羽祐貴、舘野浩章「ヒト iPS 細胞由来エクソソームのグライコーム解析」第 37 回日本糖質学会年会、2018
- (7) 丹羽祐貴、舘野浩章「レクチンによるエクソソーム送達システムの開発」第 37 回日本糖質学会年会、2018
- (8) 川原遼太、丹羽祐貴、清水史郎「インテグリン 1 は血管擬態形成に重要な因子である」第 27 回日本がん転移学会学術集会・総会、2018
- (9) Ishizawa Y, Niwa Y, Suzuki T, Dohmae N, Simizu S “Glucosyl-galactosyl-hydroxylation of CCN1 regulates its secretion” 29th International Carbohydrate Symposium、2018
- (10) Otake K, Muroi M, Niwa Y, Takao K, Osada H, Simizu S “Identification of molecular targets on inhibitory activity of cell proliferation by cytosporolide analogs” The 9th Japan-Korea Chemical Biology Symposium、2018
- (11) 大竹慶祐、室井誠、丹羽祐貴、宮寄奏、笹澤有紀子、長田裕之、清水史郎「Cytosporolide 類の細胞増殖抑制活性における責任分子標的の同定」第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2018
- (12) 水田隼斗、丹羽祐貴、堂前直、清水史郎「C-mannosylation による R-spondin2 の機能制御」第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2018
- (13) Ishizawa Y, Niwa Y, Suzuki T, Dohmae N, Simizu S “Glucosyl-galactosyl-hydroxylation of CCN1 regulates its secretion” International Symposium on ER stress, glycosylation, homeostasis, and diseases、2018
- (14) Kawahara R, Niwa Y, Simizu S “Integrin 1 plays a crucial role on vasculogenic mimicry formation” AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics、2017
- (15) 川原遼太、丹羽祐貴、清水史郎「ヒトがん細胞における血管擬態は integrin beta1 依存である」第 76 回日本癌学会学術総会、2017
- (16) 丹羽祐貴、清水史郎「顆粒球コロナー刺激因子受容体の C 型糖修飾はその機能に重要である」第 76 回日本癌学会学術総会、2017
- (17) Komatsu R, Suzuki T, Niwa Y, Shimizu E, Dohmae N, Simizu S “Premelanosome Protein (PMEL) is C-Mannosylated at W104, W153 and W156” 24th International Symposium on Glycoconjugates、2017
- (18) Niwa Y, Nakano Y, Suzuki T, Yamagishi M, Otani K, Dohmae N, Simizu S “Identification of membrane topology of human DPY19L3 reveals that C-terminal region is essential

for C-mannosyltransferase activity” 24th International Symposium on Glycoconjugates, 2017

- (19) 川原遼太、丹羽祐貴、清水史郎「がん細胞の血管擬態形成における integrin beta1 の役割解析」第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会、2017
- (20) 小松良亮、丹羽祐貴、鈴木健裕、清水映輪奈、堂前直、清水史郎「メラノソーム関連タンパク質 PMEL における C-mannosylation の解析」第 36 回日本糖質学会年会、2017
- (21) 丹羽祐貴、中野圭彦、鈴木健裕、山岸瑞生、大谷慧、堂前直、清水史郎「C 型糖修飾酵素 DPY19L3 のトポロジー解析と活性点の探索」第 36 回日本糖質学会年会、2017

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。