

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20410

研究課題名（和文）タンパク質の細胞内での動きに注目した糖鎖修飾糖種判別法の開発

研究課題名（英文）Development of a sugar type discrimination in protein glycosylation based on protein subcellular localization

研究代表者

越中谷 賢治（Etchuya, Kenji）

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：90806499

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Uniprot KB/Swiss-ProtからO型糖鎖修飾を受けている糖タンパク質について、細胞内局在・糖鎖修飾情報をもとに、細胞内での局在化経路および糖種に応じて分類した。シグナルペプチドや膜貫通領域の有無で、細胞内在型・分泌型・シグナルアンカー型・膜貫通型の4グループに分類し、O型糖鎖修飾の糖種を調査した。細胞内局在によって糖種の分布が異なり、核や細胞質、ミトコンドリアには特異的な糖種の修飾が見られた。上記の結果を、O型糖種判別法に応用することで高精度な糖種判別法の開発が可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の糖鎖修飾システムを考える上で、タンパク質が翻訳後に修飾を受けることに焦点を合わせたタンパク質の細胞内局在性に寄与する分類と糖種との相関をもとに、タンパク質の細胞内局在に応じた糖鎖修飾分布を明らかにすることは重要である。タンパク質の糖鎖修飾を高精度で判別できる手法の開発により、当該タンパク質がどの糖種を修飾されるのか、高精度で予測できることにより、近年のIT分野の著しい発展から地図アプリにより渋滞が回避できるように、糖種分布マップに沿って細胞内局在シグナルをタンパク質に導入することで、目的の糖種のみを回避するようなタンパク質デザインが可能となる。

研究成果の概要（英文）：Glycoproteins with O-glycosylation from Uniprot KB/Swiss-Prot were classified according to signal sequences and O-glycosylations. Datasets were classified into four groups including intracellular, secretory, signal-anchor, and transmembrane proteins based on the signal peptides and transmembrane domains. The distribution of sugar chains differed depending on the intracellular localization, and specific sugar chain modifications were observed in the nucleus, cytoplasm, and mitochondria. This results shown that the O-glycosylation of sugar chains discrimination methods could be applied to developing a highly accurate sugar species discrimination method.

研究分野：分子生物学

キーワード：糖鎖修飾 バイオインフォマティクス 細胞内局在

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸やタンパク質に次ぐ第三の生命鎖として知られ、糖鎖を形成する糖の種類(糖種)には多くのバリエーションがあり、それぞれが特異的な生化学反応と密接に関連している。とりわけ、O型糖鎖修飾は細胞膜表面に存在するタンパク質に多く見られることから、ゴルジ体で修飾されると考えられてきた。ところが、糖鎖の研究が進むにつれ、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)修飾が核や細胞質、ミトコンドリアに存在する糖タンパク質に多く含まれることが報告されるようになった(Kreppel, L.K, et al.: *J. Biol. Chem.*, 1997; Cao, W. et al.: *PLoS ONE*, 2013)。したがって、細胞内の糖鎖修飾システムの理解には、タンパク質が翻訳後に糖鎖修飾を受ける一面に着目し、細胞内局在や局在化経路に応じて糖タンパク質を分類し、修飾された糖種を明らかにすることが必要不可欠である。

本研究では『タンパク質の糖鎖修飾は細胞内局在あるいは輸送経路に基づいて判別化ができるか』を問題とし、焦点を当てている。糖タンパク質を細胞内局在化という切り口で解析し、糖鎖修飾機構の解明を目指すバイオインフォマティクス研究は前例がない。また、糖種も含めて糖鎖修飾を予測する方法は申請者が世界初の糖種判別法を発表していることから、細胞内局在化経路と併せた糖種判別法の開発およびWeb公開は新規性が高く急務である。

2. 研究の目的

近年の糖鎖研究により、多様な糖種が様々な生命現象に関与していることが徐々に明らかにされつつある(Alfaro, JF., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109, 7280-7285, 2012; Barone, R., et al.: *Am. Neuro. Assoc.*, 72, 550-558, 2012)。加えて、細胞内の至るところで様々な糖種が報告されている。しかしながら、既存の予測ツールは糖鎖修飾を受けるアミノ酸配列のみを解析対象として糖鎖修飾の有無を予測するに留まり、糖種を判別することはできず予測可能な糖種も少ない。したがって、細胞内の糖鎖修飾システムを考える上で、タンパク質が翻訳後に修飾を受けることに焦点を合わせたタンパク質の細胞内局在性に寄与する分類と糖種との相関をもとに、タンパク質の細胞内局在に応じた糖鎖修飾分布を明らかにすることは重要である。タンパク質の細胞内局在化経路に関する情報を加味した糖鎖修飾知識ベース「糖鎖修飾糖種分布マップ」の開発は、近年のIT分野の著しい発展から地図アプリにより渋滞が回避できるように、糖種分布マップに沿って細胞内局在シグナルをタンパク質に導入することで、目的の糖種のみを回避するようなタンパク質デザインが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、タンパク質の細胞内局在に寄与する因子による分類と糖種の相関をもとに、タンパク質の細胞内局在性に応じた糖鎖修飾分布をあきらかにすることを目的とする。また、バイオインフォマティクス解析で得られた知見を知識ベースとして公開しつつ、応用した糖種判別法の開発を目指す。

(1) 糖鎖修飾における糖の種類と細胞内局在化経路との相関解析

タンパク質配列データベース Uniprot KB/Swiss-Prot や、糖タンパク質データベース GlycoProtDB から、O型糖鎖修飾を受けるヒトのタンパク質を抽出する。次に、データベース中の細胞内局在性に関するアノテーションや、オルガネラ局在化シグナル配列を手掛かりに、細胞内局在化経路を分類する。その後、糖タンパク質に修飾されている糖種を局在化経路ごとに分類し、糖種と局在化経路との相関を見出す。

また、複数の糖種が修飾されている場合、同一の局在化経路上の糖種パターンをとらえるこ

とができる。各糖種の修飾に関わる糖転移酵素群の細胞内局在性を調査し、糖タンパク質局在化経路や糖種との相関を考察する。

(2) タンパク質糖鎖修飾知識ベース『糖種分布マップ』の開発

タンパク質の細胞内局在化経路や糖転移酵素の局在位置に沿って糖種を分類・整理することは、そのアミノ酸配列—局在化経路—糖鎖修飾の関係を収集した知識ベースとなり得る。上記(1)で得られたタンパク質の局在化経路と糖種の相関をもとに、タンパク質の細胞内局在化経路に応じた『糖種分布マップ』を作成し、糖鎖修飾知識ベースとして開発を行う。

(3) タンパク質の局在化経路に基づいた糖種判別法の開発

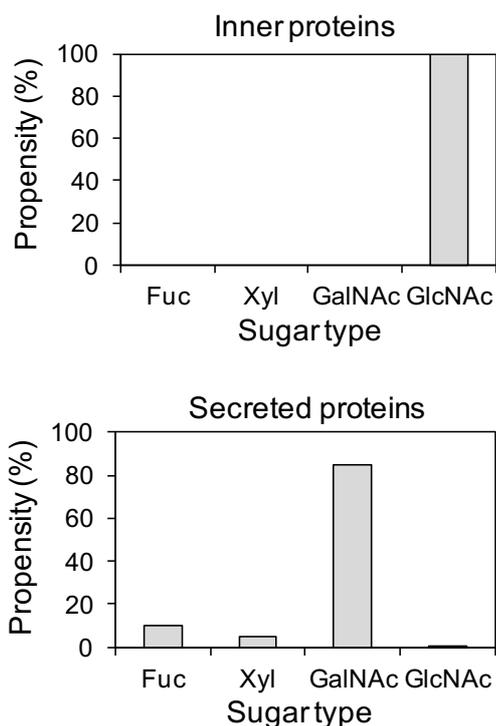
上記解析結果から得られた知見を学習データとして、糖種判別法の開発を行う。具体的には、タンパク質の細胞内局在を予測し、その後予測結果に応じた糖種判別を行い、当該部位の糖鎖修飾を予測する。Web公開を視野に入れ、利便性を考慮しタンパク質のアミノ酸配列を入力することで、細胞内局在化経路と修飾される糖種を判別し、細胞内のタンパク質の動きと糖鎖修飾を可視化できるツールの開発を行う。

4. 研究成果

(1) UniportKB/Swiss-Prot から O 型糖鎖修飾があること、細胞内シグナル、膜貫通領域の有無を条件にタンパク質を抽出し、細胞内局在経路に基づいて糖種を分類した。修飾された糖種を算出し、細胞内局在ごとに出現頻度を明らかにした。内在性タンパク質は核や細胞質、ミトコンドリアに局在化し、すべて GlcNAc 修飾のみが見られた。GlcNAc 修飾はリン酸化と相互反応し、タンパク質の機能活性をコントロールすることが報告されている。また、分泌タンパク質では、ほとんどが GalNAc 修飾であり、一部 Fuc 修飾、Xyl 修飾が確認された。分泌タンパク質はシグナルペプチドを持ち、シグナル伝達やシグナル因子、細胞外基質を構成する。Fuc 修飾は活性因子である、シグナル伝達の開始を担うことが知られている。GalNAc 修飾は細胞外基質を構成することから、高頻度で出現しているのがわかった。一方で、GlcNAc 修飾が 1 つ確認された。しかし、GlcNAc 修飾を受けたタンパク質はエキソソームに存在し、エキソソームは核に内包されているため、核に GlcNAc 修飾が見られることが一致した。シグナルアンカー型タンパク質では、Xyl 修飾、GalNAc 修飾、GlcNAc 修飾が確認された。一方で、Fuc 修飾は確認されなかった。2 個の GlcNAc 修飾が確認されたが、これらの糖

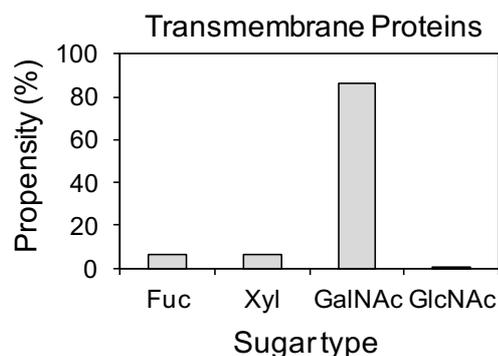
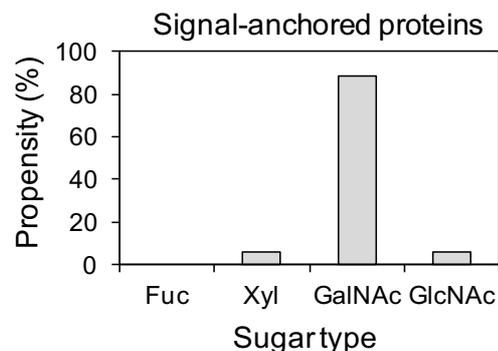
表 1 糖鎖修飾の分類

	Signal - peptide	Trans membrane	Entry
Inner proteins	—	—	59
Secreted proteins	+	—	105
Signal-anchored proteins	—	+	18
Transmembrane proteins	+	+	48



タンパク質は核膜とミトコンドリア膜への局在が明らかになった。膜タンパク質のほとんどはGalNAc修飾を受けており、細胞膜に局在化していた。また、一部のシグナルペプチドを持つ膜タンパク質はFuc修飾を受けている可能性が示唆された。

(2) 上記の結果からO型糖鎖修飾を受けている糖タンパク質について、細胞内局在・糖鎖修飾情報をもとに、細胞内での局在化経路および糖種に応じて分類した。糖タンパク質をシグナルペプチドや膜貫通領域の有無で、細胞内在型・分泌型・シグナルアンカー型・膜貫通型の4グループに分類し、O型糖鎖修飾の糖種を調査した。シグナルペプチドもしくは膜貫通領域を有する分泌型・シグナルアンカー型、あるいはその両方を有する膜貫通型の糖タンパク質は、トランスロコンから小胞体に挿入され、小胞体を経由する局在化経路(小胞体・ゴルジ体・細胞膜・細胞外分泌)を通る。小胞体経由の3グループにおいては、主としてFuc・Xyl・GalNAcの修飾が見られた。一方、小胞体を経由しない局在化経路(核・細胞質・ミトコンドリア)を通る細胞内在型タンパク質においては、O型糖鎖修飾の100%がGlcNAcによることがわかった。上記の結果は、O-Fuc・O-Xyl・O-GalNAc・O-GlcNAc転移酵素の細胞内局在性とよく一致した。



(3) 上記の結果をもとに、それぞれの糖種を分類し、糖種判別法の開発を行った。Uniprot/KB Swiss-Prot からO型糖鎖修飾を受けるタンパク質を対象に修飾部位を中心に21残基抽出した。修飾された糖種に応じて、分類を行い、アミノ酸出現傾向を算出した。アミノ酸出現傾向をもとに、位置特異的スコアマトリックス (PSSM) を作成し、それぞれの糖種を判別した。基本的に予測精度は8割を超えていたが、一部の糖種では5割程度の精度であった。Fuc修飾、Xyl修飾に関しては非常に精度が高く判別ができ、特にFuc修飾は10割の精度であった。GalNAc修飾の予測精度は最低でも8割を超えており、よく判別できると示された。一方で、GlcNAc修飾は精度が悪く、特徴的なFuc修飾、Xyl修飾には良い精度を示すものの、GalNAc修飾とでは、精度が5割程度であった。このことから、GlcNAc修飾をアミノ酸配列から判別することは難しいことが示唆された。しかしながら、(1)の結果から、GlcNAc修飾を受けるタンパク質は核や細胞質、ミトコンドリア局在のタンパク質にしか見られず、糖種判別法を用いる前にシグナルペプチドや膜貫通領域予測法を用いることで、予め除外できることが可能で、小胞体や、ゴルジ体、細胞膜、分泌経

表2 糖種判別法の予測精度

Sugar Type	5-fold cross-validation test		
	Sens. (%)	Spec. (%)	Success rate
Xyl VS Fuc	100	100	1.00
GalNAc VS Fuc	97.1	95.0	0.960
GalNAc VS Xyl	83.3	96.0	0.883
GlcNAc VS Fuc	100	100	1.00
GlcNAc VS Xyl	88.3	83.0	0.847
GlcNAc VS GalNAc	55.4	54.7	0.549

路を經由するタンパク質を対象に本研究の糖種判別法を用いることで、高精度で糖種を判別できることが明らかになった。

近年では、ゴルジ体の一部の領域が糖鎖修飾を担うことが明らかにされてきており、細胞内小器官同士の連携に焦点が移りつつある。本研究は、糖鎖修飾がタンパク質の細胞内を輸送される過程で起こるといふ一面に着目し、細胞内の糖種分布マップの開発を行い、タンパク質の輸送と糖種との相関を明らかにした。また、実験的アプローチが増えつつある現状では、本研究により開発された知識ベースや糖種判別法の公開・利用が期待され、良い循環をもたらすことができる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 K. Etchuya, M. Doi, Y. Mukai	4. 巻 -
2. 論文標題 Sugar Type Discrimination of Protein Sugar Modification based on Subcellular Localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the Eighteenth International Conference on Flow Dynamics	6. 最初と最後の頁 442-443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Etchuya, Makoto Ohta, Yuri Mukai	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of Sugar Type Distribution by Glycosylation Based on Protein Subcellular Localization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the 19th International Conference on Flow Dynamics	6. 最初と最後の頁 170-171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 K. Etchuya, M. Doi, Y. Mukai
2. 発表標題 Sugar Type Discrimination of Protein Sugar Modification based on Subcellular Localization
3. 学会等名 Eighteenth International Conference on Flow Dynamics, Sendai（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 K. ETCHUYA, M. Ohta, Y. MUKAI
2. 発表標題 development of sugar type distribution by glycosylation based on protein subcellular localization
3. 学会等名 Proceedings of the Twentieth International Symposium on Advanced Fluid Information（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Y. Mukai, T. Kikegawa, M. Ohta and K. Etchuya
2. 発表標題 The Role of Signal-anchor Region of Type II Transmembrane Protein in Subcellular Localization
3. 学会等名 Proceedings of the Twentieth International Symposium on Advanced Fluid Information (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Kenji Etchuya, Makoto Ohta, Yuri Mukai
2. 発表標題 Development of Sugar Type Distribution by Glycosylation Based on Protein Subcellular Localization
3. 学会等名 International Conference on Flow Dynamics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 分担執筆: 越中谷 賢治, 向井 有理, 園山正史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 624
3. 書名 『膜タンパク質工学ハンドブック (第2編5節 膜タンパク質を対象としたアミノ酸配列解析とその応用)』	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------