

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82675

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21495

研究課題名（和文）パスポート配列の導入による糖タンパク質の分泌経路と糖鎖修飾の制御

研究課題名（英文）Control of secretory pathways and protein glycosylation by incorporating passport sequences

研究代表者

加藤 晃一（Kato, Koichi）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・教授

研究者番号：20211849

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：血液凝固因子由来のパスポート配列が糖鎖修飾コードとして機能する仕組みの解明に取り組んだ。パスポート配列を付与した糖タンパク質が分泌経路において特異的なルートを通ることを見出すとともに、そのルート上においてパスポート配列を認識する新たなタンパク質を同定した。さらに本タンパク質が、ガラクトース転移酵素と複合体を形成し、パスポート配列を携えたカーゴ糖タンパク質のガラクトシル化を亢進することを示した。一方、糖転移酵素がトランスゴルジ中で異なる局在を示すデータも得ている。本研究は、これまであたかも無秩序に進行するようにみなされていたタンパク質の糖鎖修飾を規定する分子機構の一端を明らかにするものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、糖タンパク質の細胞内輸送ルートを制御することを通して糖鎖修飾をコントロールする新たな研究の方向性を示すものである。実際、本研究に端を発して、糖転移酵素のゴルジ体内での局在を体系的に調査するプロジェクトが発動している。こうした研究を展開することで、これまでのゲノム研究では見出すことができなかった糖鎖修飾のブループリントを解読することが現実のものとなり、それに基づいてタンパク質の糖鎖修飾を自在に制御する道が拓けるものと期待される。このように本研究の成果は、基礎生命科学のみならずバイオ医薬・細胞医薬の次世代化を推進することで薬学領域に大きな波及効果をもたらす基盤を構成するものである。

研究成果の概要（英文）：This study attempted to elucidate the mechanism by which the passport sequences derived from blood coagulation factors function as a glycosylation code. It was found that glycoproteins having the passport sequence follow a specific route in the secretory pathway. Furthermore, this study identified a new protein that recognizes the passport sequence along the route. Furthermore, it was shown that this protein forms a complex with galactosyltransferases and enhances galactosylation of cargo glycoproteins carrying the passport sequence. On the other hand, data have also been obtained showing distinct localizations of glycosyltransferases in the trans-Golgi. This study reveals part of the molecular mechanisms governing protein glycosylation, which has been regarded as if it proceeds in an unpredictable manner.

研究分野：構造生物学

キーワード：糖鎖 糖転移酵素 ゴルジ体 分泌経路

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私たちのグループは、血液凝固第因子の細胞内輸送を担うカーゴ受容体 (MCFD2/ERGIC-53 複合体) の構造生物学研究を行う過程で、第 8 因子分子中に存在する 10 残基のアミノ酸配列が同受容体により認識されることを通じて効率的な分泌に寄与していることを明らかにした。興味深いことに、このアミノ酸配列をエリスロポエチン (EPO) の C 末端に連結させただけで、その分泌効率を高めることが可能であり、しかもこうして分泌された EPO は通常とは異なるシアリル化修飾 (2,3 シアリル化) を受けるようになることが明らかとなった。この配列はタンパク質の細胞内輸送経路を指定する“パスポート”として機能している可能性があり、それにより特定の糖タンパク質と特定のシアル酸転移酵素との会話が制御されている可能性が想定される。

### 2. 研究の目的

タンパク質の構造はゲノムの中に書き込まれているが、糖鎖修飾は遺伝子による直接支配を受けていないと考えられており、それぞれのタンパク質がいかなる糖鎖を身に纏うかということについての法則性はこれまで明らかとなっていない。実際、タンパク質を修飾する糖鎖は著しい不均一性を示し、加齢や病態によって糖鎖の修飾パターンは有意に変動することが知られている。それにもかかわらず、タンパク質のアミノ酸配列の中に一定のロバストな糖鎖修飾をもたらす暗号 (糖鎖修飾コード) が刻まれている可能性を我々は見出してきた。本研究の成果は、これまでのゲノム研究では見出すことができなかった糖鎖修飾の設計図を解読することに繋がり、それに基づいてタンパク質の糖鎖修飾を制御する道を拓く可能性がある。

### 3. 研究の方法

パスポート配列が糖タンパク質の細胞内輸送経路を決定しており、糖転移酵素もまた特定の細胞内区画に局在するものと想定し、こうした現象の背後にある分子機構を探究する。具体的には、蛍光バイオイメージングにより、パスポート配列の有無による糖タンパク質の挙動の違いや糖転移酵素のゴルジ体内における局在の違いを探索する。さらには、近接依存性標識により、モデル糖タンパク質が細胞内輸送経路で遭遇した分子を標識するとともに、糖転移酵素を取り巻く細胞内区画の分子ネットワークを捕捉する。そして質量分析を利用したプロテオミクス解析により、パスポート配列に依存した糖タンパク質の分泌経路と糖鎖修飾の制御機構の分子基盤を明らかにする。

### 4. 研究成果

これまでの研究により、血液凝固因子由来の 10 残基のアミノ酸配列を C 末端に連結させることで糖タンパク質の分泌効率を高めることが可能であり、こうして分泌された糖タンパク質は通常とは異なるシアリル化修飾 (2,3 シアリル化) を受けるようになることを明らかとした。本研究では、こうした現象の背景にある分子メカニズムの探究に取り組んだ。

免疫染色や蛍光タンパク質を利用した超解像蛍光顕微鏡観察を実施することで、2,3 シアル酸転移酵素と 2,6 シアル酸転移酵素の細胞内分布の違いがあることを見出した。一方、蛍光タンパク質を融合して EPO の細胞内の局在を調べたところ、パスポート配列の付加に伴ってゴルジ体内の異なる領域に滞留するようになることを見出した。これにより、パスポート配列に依存した細胞内輸送ルートの存在が示唆された。

パスポート配列の付加に伴う糖タンパク質への 2,3 シアリル化糖鎖の増加を、より詳細に調べるため、モデル糖タンパク質のエリスロポエチンの N 型糖鎖分析を行った。その結果、パスポート配列の付加に伴って、2,3 シアル酸含有糖鎖だけでなく、シアル酸のアクセプターとなるガラクトース残基を有する N 型糖鎖の割合も増加していることが判明した。

分泌経路の特定の区画やルートに存在する分子を同定するために、近接依存性標識のプロトコルを検討した。パスポート配列の負荷にともないガラクトース修飾が増加することから、ガラクトース転移酵素とパスポート配列を付加した EPO のいずれの近傍にも存在し得る分子を近接依存性標識により探索した。そして、上記の条件を満たす分子として NUCB1 が浮かび上がった。NUCB1 の発現を抑制すると、パスポート配列によってもたらされた EPO のガラクトシル化およびシアリル化の亢進が減弱することが明らかとなった。さらに、プルダウンアッセイにより、EPO が NUCB1 とパスポート配列を介して相互作用すること、そして NUCB1 と B4GALT1 が複合体を形成することが示唆された。

これらの結果より、パスポート配列を携えた糖タンパク質は、MCFD2 に認識されることにより、分泌経路において特異的なルートを辿るようになり、さらにその途上で NUCB1/ B4GALT1 複合体と相互作用することでガラクトース修飾が促されているものと考えられる。

以上述べた通り、本研究は、パスポート配列による細胞内輸送経路を見出すとともに、パスポート配列を認識する新たなタンパク質を同定することに成功した。本研究の成果は、糖タンパク質の細胞内輸送ルートを制御することを通じて糖鎖修飾をコントロールする新たな研究の方向性を示すものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito Taiki, Yagi Hirokazu, Kuo Chu-Wei, Khoo Kay-Hooi, Kato Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 An Embeddable Molecular Code for Lewis X Modification Through Interaction with Fucosyltransferase 9	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Resarch Square	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-1168711/v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 矢木宏和, 加藤晃一	4. 巻 79
2. 論文標題 糖タンパク質の小胞体からゴルジ体への輸送効率を高めるペプチド配列の発見と応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとバイオインダストリー	6. 最初と最後の頁 472-467
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 無
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16件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齋藤泰輝, 矢木宏和, Chu-Wei Kuo, Kai-Hooi Khoo, 加藤晃一
2. 発表標題 Lewis X 修飾をもたらす暗号がキャリアタンパク質の アミノ酸配列にコードされている
3. 学会等名 第84回 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田梨乃, 矢木宏和, Charles Hellec, 本田怜奈, 矢木真穂, 青木一洋, 加藤晃一
2. 発表標題 パスポート配列の付加による糖タンパク質の 2,3-シアリル化亢進のメカニズム
3. 学会等名 第84回 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤泰輝, 矢木宏和, Chu-Wei Kuo, Kai-Hooi Khoo, 加藤晃一
2. 発表標題 Lewis X修飾暗号が組み込まれたタンパク質はFUT9の局在する細胞内空間に導かれる
3. 学会等名 第39回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蜷川 暁, Ginto George, 矢木宏和, 齋藤泰輝, 住友嘉樹, 石川時郎, 佐久間哲史, 山本 卓, 今見考志, 石濱 泰, 加藤晃一, 岡田徹也, 森 和俊
2. 発表標題 EDEM2酵素活性発揮には、TXNDC11とのジスルフィド結合形成が必要である
3. 学会等名 第39回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumiko Umezawa, Hirokazu Yagi, Chu-Wei Kuo, Kay-Hooi Khoo, and Koichi Kato
2. 発表標題 A novel mammalian post-translational modification governed by a CDP-glycerol synthase
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirokazu Yagi, Taiki Saito, Rino Yamada, Saeko Yanaka, Maho Yagi-Utsumi, Tadahiko Satoh, Tatsuya Suzuki, Satoshi Goto, Tomomi Nemoto, Yusaku Ohta, Kazuhiro Aoki, Shinji Takada, and Koichi Kato
2. 発表標題 Protein-specific glycosylation controlled by sub-Golgi resident glycosyltransferases
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅野早知, 田中秀則, 今村彰宏, 石田秀治, 矢木宏和, 加藤晃一, 水上大輝, 平井 剛, 安藤弘宗
2. 発表標題 細胞膜ラフト親和性相互作用の理解に向けた光親和性スフィンゴ糖脂質プローブの開発研究
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第16回「若手の力」フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤泰輝, 矢木宏和, Chu-Wei Kuo, Kai-Hooi Khoo, 加藤晃一
2. 発表標題 糖タンパク質に組み込まれたLewis X修飾暗号はFUT9との相互作用を規定する
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第16回「若手の力」フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅澤英美子, 矢木宏和, 山崎郁弥, Chu-Wei Kuo, Kay-Hooi Khoo, 志村貴也, 川島博人, 加藤晃一
2. 発表標題 真核生物のグリセロールリン酸修飾の生合成関連酵素であるCDP-グリセロール合成酵素の同定
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第16回「若手の力」フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅野早知, 田中秀則, 今村彰宏, 石田秀治, 矢木宏和, 加藤晃一, 水上大輝, 平井 剛, 安藤弘宗
2. 発表標題 新規光反応性基「セレノフェン-2-イル置換型 -ケトアミド」を用いた光親和性スフィンゴ糖脂質プローブの開発と細胞膜ラフト親和性相互作用の理解に向けた応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅澤芙美子, 矢木宏和, 山崎郁弥, Kuo Chu-Wei, Khoo Kay Hooi, 志村貴也, 川島博人, 加藤晃一
2. 発表標題 真核生物におけるグリセロールリン酸修飾の生合成に関わるCDP-グリセロール合成酵素の同定
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤晃一
2. 発表標題 糖鎖生合成アトラスの編纂に向けて：生命創成探究センターにおける糖鎖研究の取り組み
3. 学会等名 ヒューマングライコムプロジェクト特別シンポジウム～糖鎖ビッグデータから生命科学・医療の革新へ～（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤晃一
2. 発表標題 生命分子科学からExCELLSへの研究展開
3. 学会等名 第4回 ExCELLSシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taiki Saito, Hirokazu Yagi, Chu-Wei Kuo, Kay-Hooi Khoo, and Koichi Kato
2. 発表標題 An embeddable molecular code for Lewis X modification through interaction with FUT9
3. 学会等名 3rd Australasian Glycoscience Symposium (3rd AGS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田梨乃, 矢木宏和, 戸島拓郎, 青木一洋, 本田怜奈, 矢木真穂, 足達俊吾, 加藤晃一
2. 発表標題 パスポート配列の付加による糖タンパク質の特異的な糖鎖修飾メカニズム
3. 学会等名 第40回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Emiko Nishi, Hirokazu Yagi, Satoshi Goto, Tomomi Nemoto, Yusaku Ohta, Kazuhiro Aoki, Shinji Takada, and Koichi Kato
2. 発表標題 Technical basis for the compilation of the Golgi Atlas based on the localization of glycosyltransferases
3. 学会等名 第4回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Tadashi Satoh and Koichi Kato	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 717
3. 書名 Lectin Purification and Analysis	

1. 著者名 北島 健、佐藤 ちひろ、門松 健治、加藤 晃一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 名古屋大学出版会	5. 総ページ数 306
3. 書名 糖鎖生物学	

〔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
---------	---------