

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780308

研究課題名(和文)

脊椎動物CMP-シアル酸合成酵素の核局在化の生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Investigation of biological meaning of nuclear localization in vertebrate CMP-Sia synthetase

研究代表者：

藤田 明子 (FUJITA AKIKO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・研究員

研究者番号：60535003

研究成果の概要(和文)：

CMP-シアル酸合成酵素(CSS)は、核に局在するシアル酸の発現に必須の酵素である。本研究では、核局在の分子機構を明らかにする過程で、まずCSSのタンパク質発現がプロテアソームにより制御されていることを明らかにした。個体におけるCSSの重要性の検証では、メダカの初期胚のノックダウン実験から、メダカ初期発生においてCSSが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CMP-sialic acid synthetase (CSS) is a prerequisite enzyme in sialic acid biosynthesis and localizes in the nucleus. First, we showed that the protein expression of CSS was regulated by proteasome in NIH3T3 cells. Then, The knockdown of CSS in medaka (*Oryzias latipes*) embryo using morpholino antisense oligo technique lead to the fatal lethality.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：糖鎖生物学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：シアル酸、CMP-シアル酸合成酵素、細胞内局在、生合成

1. 研究開始当初の背景

シアル酸は糖鎖の非還元末端に位置する酸性糖で、個体発生に必須な成分である。胚発生や分化、免疫応答、がん転移やウイルス感染などにおいて中心的役割を果たしている。タンパク質や脂質上のシアル酸残基は、ゴルジ装置において、シアル酸転移酵素の働きでその供与体基質 CMP-シアル酸から転移される。この供与体基質の合成を担う酵素は、CMP-シアル酸合成酵素(CSS)である(反応：シアル酸 + CTP → CMP-シアル酸 + PPi)。CSSは、他の糖の供与体基質合成酵素と異なり核に局在するという際だった特徴をもつ。1970年に核局在が証明されて以来、長い研究の歴史があるにも関わらず、未だにCSSが核

局在する生物学的意義は明らかにされていない。報告者はCSSの細胞内局在を決定する構造要因を独自に、および海外研究者と共同して解明した。その背景をもとに、CSSは酵素としてシアル酸を細胞表面に発現する役割(外向シグナル発信)と核移行して行う何らかの機能(内向シグナル発信)の2つの役割をもつという仮説をたてるに至った。本研究はこの仮説を証明することによって、CSSの核移行の意義の解明に挑戦する。具体的には、CSSが核移行する必然性の有無を証明することと、核におけるCSSの役割を究明することを目的とした。

2. 研究の目的

シアル酸は約 50 種の分子種をもつという他の単糖にはない構造多様性を示す(北島, 郷, 藤田, 佐藤, *細胞工学* **26**, 629-634, 2007)。このシアル酸の分子種多様性によって、糖タンパク質、糖脂質の多様な機能が生み出される。CSS はシアル酸の多様な分子種を細胞表面に発現する分子機構において、重要な位置を占める。報告者は、脊椎動物由来 CSS のシアル酸分子種認識機構の解明に取り組み、構造活性相関解析の結果、CSS 上の 11 アミノ酸残基によって制御されることを明らかにした (Fujita *et al.*, *Anal Biochem.* **337**, 12-21, 2005; Fujita *et al.*, *XVIII International Symposium on Glycoconjugates*, Italy, 2005 年)。一方、脊椎動物 CSS のもう一つの重要な側面として、核局在がある。近年、脊椎動物 CSS の核局在化の分子機構が解明された。まず、マウス CSS に核移行シグナル (NLS) が同定され (Münster *et al.*, *J. Biol. Chem.* **277**, 19688-19696, 2002)、続いて報告者によってニジマス CSS にマウスとは異なるタイプの NLS が同定された (Tiralongo & Fujita *et al.*, *Glycobiology*, **17**, 945-954, 2007)。一方、報告者は核移行後の CSS の動態を調べる過程で、2 つの核外移行シグナル (NES) を同定し、CSS が核-細胞質間を交互移行できることを明らかにした (Fujita *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 174-180, 2007) (図 1)。CSS は大腸菌からヒトまで広く分布する酵素である (Kean, *Glycobiology*, **1**, 441-447, 1990)。脊椎動物の CSS は、酵素活性をもち大腸菌 CSS と類似の構造をもつ N 末端領域と機能未知の C 末端領域から構成される。NLS は N 末端領域に存在し、NES は N および C 末端領域の一つずつ存在する。報告者はマウスとニジマス両酵素の NLS 欠失体が酵素活性を保持していることを示し、核移行が酵素活性とは独立していることを証明した。また、報告者は、脊椎動物を含む新口動物 CSS は NLS と NES をもっている一方、旧口動物のショウジョウバエはもたないことを明らかにした。実際、最近ショウジョウバエ酵素はゴルジ局在することが報告され (Viswanathan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 15929-15940, 2006)、酵素としての CSS は必ずしも核に存在する必要はないことが示唆されている。以上のことから、報告者は、CSS は酵素としてシアル酸を発現すること (外向シグナル発信) と、核移行してそこで機能すること (内向シグナル発信) の 2 つの役割をもつ多機能分子であると考えに至った。CSS の内向シグナルに関して、興味深いことは、CSS の C 末端領域は *Haemophilus influenzae* ホスファターゼと相同性があり、微弱ながらホスファターゼ活性が検出された点である (報告者の未発表データ)。後に

Haemophilus influenzae ホスファターゼの基質は KDO 8-P を基質とすることが報告された。シアル酸代謝における中間体シアル酸 9-P に対する脱リン酸化活性を調べたが、活性は見出されなかった。これは、他の分子のリン酸化/脱リン酸化を介するシグナル伝達系に関わる可能性がある。CSS の多機能性に着目することによって、シアル酸代謝酵素研究の新局面を開拓することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、脊椎動物 CSS の核局在することの重要性の有無を検証すること、および CSS の核においてシグナル機能があるのかどうかを検証することの 2 つを柱とした。CSS の核局在の重要性の検証では、CSS を細胞内に異所的発現させた細胞を用いて、単層培養細胞系で評価した。次に、個体レベルでの解析を目的として、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いて、メダカにおける CSS の初期発生の重要性を検証した。CSS の核におけるシグナル機能解明では、マウス CSS 結合分子の同定のために抗 CSS 抗体を作製し、CSS の細胞内における細胞内局在と代謝を検証した。

(1) CSS の核局在の重要性の検証

培養細胞は、遺伝子導入や遺伝子抑制技術によって、CSS の遺伝子改変と発現制御を比較的容易に行うことができる。まず、マウス NIH3T3 細胞株を用いて、CSS を細胞内で核以外で異所的発現させた場合の CSS の代謝を追跡した。

①細胞内異所的発現変異体を用いた CSS の細胞レベルでの役割解析

マウス CSS の NLS 欠失体およびニジマス CSS の NLS に相当する部位を欠失した変異体のコンストラクトを pcDNA3 ベクターにて作製した。N 末端に Flag、Myc 標識または C 末端に Myc、V5 標識したタンパク質を発現するように設計した。以上のコンストラクトをマウス繊維芽細胞 NIH3T3 細胞に導入し、過剰発現させた。また NIH3T3 細胞に導入後、G418 による薬剤選択をかけ、各 CSS 安定発現株を得た。

次に、細胞内局在を観察するため、過剰発現細胞は遺伝子導入の 2 日後、安定発現株は薬剤選択による培養後継代し、細胞を固定した。細胞内局在は抗 Myc 抗体による免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。また、各細胞を回収して、可溶性画分をウェスタンブロッティング法により CSS のタンパク質発現量を評価した。

安定発現株における CSS のタンパク質発現の制御を調べるため、種々のプロテアーゼ阻害剤の添加による変化を観察した。プロテ

アソーム阻害剤として、MG132、lactacystin、epoxomycin をそれぞれ添加した。オートファゴソームを蓄積させる vinblastine、オートファゴソーム形成阻害剤として 3-MA を使用した。リソソームプロテアーゼの阻害剤として E64d を、非リソソーム阻害剤として calpain inhibitorII、granzymeB を使用した。各細胞をプロテアーゼ阻害剤存在下で培養後固定し、免疫染色により CSS の細胞内局在を観察した。

② CSS の核局在と翻訳後修飾の関連性

CSS の細胞内局在およびタンパク質発現の制御機構を解明するため、CSS の翻訳後修飾の有無を検証した。

リン酸化 - CSS 安定発現株から調製した可溶性画分を抗セリン、抗スレオニン、抗チロシン抗体にて Western blotting を行った。また、リン酸化セリン、スレオニンホスファターゼ阻害剤オカダ酸による阻害実験を行った。

O-GlcNAc 化 -小麦胚芽レクチン WGA lectin, rabbit anti WGA antibody によるレクチン染色を行った。また、GlcNAcase 阻害剤である PUGNAc による阻害実験を行った。

ユビキチン化 - MG132 存在下で培養した CSS 安定発現株の可溶性画分を抗 Myc 抗体で免疫沈降を行い、抗ユビキチン抗体により Western blotting を行った。

SUMO 化 - MG132 存在下で培養した CSS 安定発現株の可溶性画分を抗 Myc 抗体で免疫沈降を行い、抗 SUMO1 抗体または抗 SUMO2/3 抗体により Western blotting を行った。

(2) CSS の核におけるシグナル機能の探求

抗 CSS 抗体の作製 - マウス CSS の N 末端および C 末端のペプチド 15 アミノ酸残基を合成し、KLH 架橋したものをラットに供した。5 回免疫後、全採血を行い、得られた血清を proteinG-sepharose カラムにて精製した。

(3) CSS 複合体形成の検証

大腸菌から調製したマウス CSS は X 線結晶構造解析より、四量体を形成すると推測されている。多量体化が局在の変化に影響する可能性もあるため、哺乳類細胞から種々の組換え体 CSS 変異体を調製し、Sephacryl S-300 HR によるゲル濾過クロマトグラフィー、DSS 架橋による多量体形成の変化を調べた。

(4) CSS の核局在の重要性の検証

個体レベルにおける CSS の核局在の重要性の検証—メダカ初期胚における CSS の重要性

①メダカ CSS の性質を調べるため、メダカ

CSS をクローニングし、Neu5Ac、KDN、Neu5Gc に対する活性測定を行った。また、メダカ CSS のメダカ細胞における細胞内局在を免疫染色によって観察し、種々の変異体による NLS の同定を試みた。

② CSS の初期発生における重要性を検証した。メダカ CSS に対するモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を、開始コドンおよびエキソン 5 の領域で合成した。1 細胞期の初期胚に対し、マイクロインジェクション法により注入した。3 時間後、各 MO の 3'末端側に修飾されたフルオレセインを検出することによって、注入を確認し、28°C で培養した。

メダカ CSS 遺伝子の発現解析は、MO を注入および未処理の発生段階をそろえたメダカ胚から全 RNA を調製し、逆転写反応による cDNA を合成した。メダカ CSS の mRNA 発現を調べるため、メダカ CSS およびアクチンに対する PCR を行った。

4. 研究成果

1) CSS の核局在の重要性の検証

マウス NIH3T3 細胞株を用いて、CSS を細胞内で核以外に異所的発現させた場合の CSS の代謝を追跡した。

①細胞内異所的発現変異体を用いた CSS の細胞レベルでの役割解析

マウス CSS はマウス NIH3T3 細胞内において核に局在する。一方、NLS 欠失体は細胞質ゾルに局在した。またニジマス NLS に相当する部位の欠失体は核に局在したことから、マウスニジマスの NLS は異なる部位に存在することが確認された。CSS の N 末端標識および C 末端標識は細胞内局在に影響しないことが確認された。

細胞質ゾル局在の CSS は、細胞染色の蛍光強度および Western blotting によるタンパク質発現が wild-type に対して顕著に減少していた。核局在 CSS と細胞質ゾル局在 CSS はタンパク質発現に変化を与えることが示唆された。細胞質ゾル局在 CSS は発現しないか発現後速やかに分解されていると考えた。そこで、種々のプロテアーゼ阻害剤により、タンパク質発現後の分解が CSS 発現に影響するかどうかを調べた。プロテアソーム、オートファジー、リソソーム酵素および細胞質ゾル酵素に対する阻害剤を細胞に添加した結果、プロテアソーム阻害剤によって CSS の発現が増加した。他の阻害剤による効果は観察されなかった。驚いたことに、細胞質ゾル局在 CSS のみならず、核局在 CSS もプロテアソーム阻害剤 MG132 によりタンパク質量が増加することが明らかになった。CSS は核か

ら細胞質ゾルへ NES により移行し、分解を受けるが MG132 の添加により分解が阻害され、結果として核内に CSS が蓄積し、タンパク質発現の増加につながったと考えられる。

② CSS の核局在と翻訳後修飾の関連性

タンパク質相互作用を検出するために、酵母ツーハイブリッド法がよく利用される。しかし、報告者が行ったところでは、特異的に結合するタンパク質は同定されず、タンパク質の細胞特異的修飾が重要である可能性が示唆された。そこで、CSS とその相互作用分子の複合体形成の分子機構を、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化等の修飾による立体構造の変化により起こるかどうかを目的に調べた。しかし、各修飾に対する抗体では CSS の修飾を判定できなかった。翻訳後修飾は存在したとしても、非常に微量であると考えられる。

(2) CSS 複合体形成の検証

大腸菌から調製したマウス CSS は X 線結晶構造解析より、四量体を形成すると推測されている。多量体化が局在の変化に影響する可能性もあるため、哺乳類細胞から種々の組換え体 CSS 変異体を調製し、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび DSS による分子架橋によって多量体形成の変化を調べた。ゲル濾過クロマトグラフィーの結果、CSS は細胞内において二量体および四量体で存在することが明らかになった。また、DSS による分子間相互作用の有無を検証では、CSS は二量体および四量体の分子量で検出され、さらに高分子量領域でも検出された。このことから、CSS 間の複合体形成の他に CSS と相互作用する分子の存在が示唆された。

(3) 抗 CSS 抗体の作製

ラットからマウス CSSN 末端 15 アミノ酸残基または C 末端 15 アミノ酸残基に対する抗 CSS 抗体を作製した。これにより、動物細胞内の CSS の検出が可能になった。

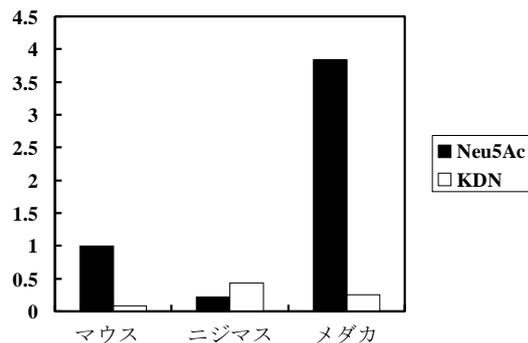
(4) CSS の核局在の重要性の検証

個体レベルにおける CSS の核局在の重要性の検証—メダカ初期胚における CSS の重要性

細胞培養は、生体内では解析が不可能な現象を解析可能にできるが、生体内における CSS の核局在機能が発揮されない可能性もないとは言えない。CSS は、シアル酸代謝において必須の酵素であり、この代謝において CSS の上流に位置する UDP-GlcNAc/ManNAc kinase のノックアウトマウスは胎生致死であることから、CSS ノックアウトマウスも胎生

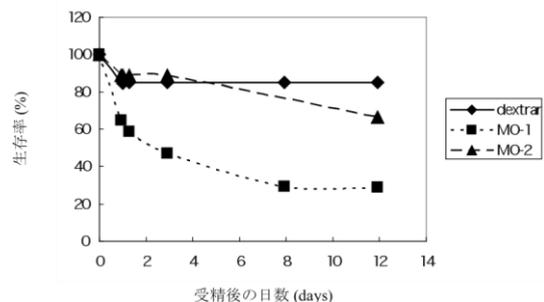
致死である可能性が大きい。生体内における CSS 存在そのものの重要性ではなく、核局在の重要性を検証するためには、ジーンターゲットング法を用いた細胞質ゾル局在する CSS のトランスジェニック動物の解析が適当と考えられる。そこで、初期発生の観察が可能なメダカを用いることにした。

① RT-PCR によって、メダカ CSS は、メダカ各組織に存在することを確認した。大腸菌発現用ベクターにサブクローニングし、活性測定を行った。メダカ CSS は、マウスニジマス CSS に対して活性が高かった。基質特異性は、マウス様の Neu5Ac 優先的活性であった。



細胞内局在については、メダカひれより初代培養細胞を作製し、wild-type について核局在することを確認した。しかし、NLS の同定については、現在解析中である。

② CSS の初期胚における重要性を検証するため、1 細胞期のメダカ初期胚にモルフォリノオリゴ (MO) を注入した。同時に注入した蛍光の局在が確認された胚の観察を行った結果、開始コドンの領域で作製した MO によって、発生が止まった。一方、エキソン 5 の領域で合成した MO では、顕著な異常は観察されなかった。これは、母方由来の CSS 遺伝子が存在し、発現しているためと考えられる。メダカの初期発生において、CSS の発現が重要であることが明らかになった。今後は、細胞質ゾル局在 CSS の過剰発現によって、CSS の核局在の重要性を検証していき、その生物学的意義を明らかにしていく。



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)

[学会発表] (計 7 件)

1. 藤田明子、安川裕子、佐藤ちひろ、澤田均、窪川かおる、Guerardel Yann、北島健、原索動物由来 CMP-シアル酸合成酵素の性質、日本農芸化学会 2011 年度大会、要旨集
2. Fujita, A.; Yasukawa, Y.; Sato, C.; Kitajima, K. 、 Investigation of evolutionarily conserved CMP-sialic acid synthetases activity for Sia species from prochordate、BMB2010 (第 83 回日本生化学会大会)、2010 年 12 月 10 日、神戸
3. A. Fujita, C. Sato, Y. Yasukawa, K. Kitajima、Further characterization of the evolutionally conserved sialic acid recognition region of CMP-sialic acid synthetases、Sialoglyco2010、2010 年 8 月 22 日、Potsdam, Germany
4. A. Fujita; Y. Yasukawa, K. Shimano, S. Go, C. Sato, K. Kitajima 、 Is CMP-Sia Synthetase (CSS) a Sole Determinant of the Sialic Acid Species expressed on the Cell Surface? 、 The 25th International Carbohydrate Symposium、2010 年 8 月 2 日、東京
5. Fujita, A., Sato, C., Yasukawa, Y., Münster-Kühnel, A. K., Gerardy-Schahn, R., Kitajima, K. 、 Structural bases for the Sia substrate recognition of CMP-sialic acid synthetases、20th International Symposium on Glycoconjugates、2009 年 12 月 3 日、Perto Rico
6. 藤田 明子、佐藤ちひろ、安川 裕子、北島 健、CMP-シアル酸合成酵素のシアル酸分子種認識および核局在決定領域の生物種間比較 (優秀プレゼンテーション賞受賞)、第 82 回生化学会、2009 年 10 月 24 日、神戸
7. 藤田 明子、佐藤ちひろ、安川 裕子、北島 健
CMP-シアル酸合成酵素の基質認識および細胞内局在決定領域の生物種間比較、第 29 回日本糖質学会年会、2009 年 9 月 11 日、高山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 明子 (FUJITA AKIKO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・研究員

研究者番号：60535003

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし