

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 7 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度

課題番号：22570124

研究課題名（和文）C-マンノシル化タンパク質の糖修飾機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of protein C-mannosylation mechanism

研究代表者

井内 陽子（Yoko Inai）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20316087

研究成果の概要（和文）：

タンパク質 C-マンノシル化機構の解明のため、細胞の C-マンノシル化能の評価とこの修飾がタンパク質の分泌に与える影響の検討に取り組んだ。C-マンノシル化されるモデルタンパク質 A（TSR タンパク質 A とする）において、トリプトファンのアラニンあるいはフェニルアラニンへの変異がその分泌を顕著に抑制し、小胞体からゴルジ体への移行を抑制することが明らかとなった。C-Man 化タンパク質 A 分泌量の検討により、細胞の C-マンノシル化能を検討できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

To better understand of mechanism of protein C-mannosylation, we tried to develop a simple approach to assess this modification of cell lines. We have used site-directed mutagenesis to alter the tryptophan, a predicted C-mannosylation site in TSR protein A, to alanine or phenylalanine. Both mutations resulted in decreased secretion of the protein, and the mutants were retained in the endoplasmic reticulum. These results suggested the possibility that the secretion of the protein may represent the protein C-mannosylation in the cell lines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：翻訳後修飾、C-マンノシル化

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の C-マンノシル化（C-Man 化）は 1994 年に Hofsteenge らにより、尿中の RNase2 で初めて発見された。この修飾では 1 分子のマンノースが、RNase2 N 末端付近のトリプトファン残基（Trp）のインドール

環に炭素-炭素結合で付加しており、この修飾の認識配列は Trp-X-X-Trp であることも決定された。Trp-X-X-Trp モチーフは thrombospondin type 1 repeat（TSR）と呼ばれる機能ペプチドモジュールに含まれることが知られている。最初に同定がおこな

れた RNase2 はこのモチーフをもたないが、TSR を含む TSR ファミリータンパク質は、C-マンノシル化される基質群として認識されてきた。

この修飾を受けるタンパク質の報告例が増加する一方、その生理的意義はあまり明らかになっていない。上述の TSR 内の Trp-X-X-Trp モチーフにおいて、トリプトファンを修飾するマンノースはタンパク質表面に露出していると考えられるため、この領域を介しておこる様々な分子との相互作用にこの修飾が影響を与える可能性がある。thrombospondin の Trp-X-X-Trp あるいはこれを含むより大きな領域はコラーゲン、ヘパリン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどと相互作用することが知られており、細胞の接着や伸展、これにともなう細胞内シグナルへの関与が考えられる。さらに Trp-X-X-Trp を含むモチーフは神経細胞における神経突起の伸張も誘導する。しかし、これらの多くの研究は基本的に C-Man 化修飾を含まない合成ペプチドを用いて行われており、Trp-X-X-Trp モチーフについての既報の研究は、C-Man 化の存在をふまえての再検討が必要であろう。

また、C-Man 化をうけるムチン MUC5AC、MUC5B や ADAMTS5 では、C-Man 化 Trp-X-X-Trp モチーフへの mutation 導入によって C-Man 化の喪失と分泌低下がおり、これらはタンパク質フォールディングと細胞内輸送における C-Man 化の生理的意義を提示する数少ない報告であった。

このような状況下で、C-Man 化の生理的意義を明確にするためには、その修飾に関与する酵素の同定が必要と考えられる。この酵素の同定により、cDNA 導入による過剰発現、RNAi による発現抑制、ノックアウトマウスの作製などの多くの手法の利用が可能となる。しかし、研究開始当初、この糖付加修飾に関してわかっていることは、1)この修飾は小胞体内に存在する酵素によっておこなわれること、2)トリプトファン上に付加されるマンノースの供与体がドリコールリン酸マンノースであることの2点であった。

2. 研究の目的

このように C-Man 化研究の進展が限局されているのは、研究手法が確立していないことが最も大きな原因である。他の糖修飾と異なり、レクチンによる修飾の確認法が確立されておらず、これまで C-Man 化修飾は質量分析によって確認されてきた。そこで、C-Man 化機構と生理的意義の検討のため、抗 C-Man-トリプトファン抗体を用いた C-Man 化定量法、培養細胞を用いた C-Man 修飾実験系の確立に取り組み、C-Man 化修飾機構とその生理的意義の検討を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗 C-Man 化抗体による C-Man 化修飾の定量

我々の研究室では C-Man 化トリプトファンを抗原として、マウスモノクローナル、ウサギポリクローナルを含む複数の抗 C-Man 化トリプトファン抗体を作製してきた。この抗体を用いては乳類培養細胞株のタンパク質 C-Man 化能を検討するため、既知の C-Man 化基質タンパク質の発現系を作製し、複数の細胞株へ導入した。発現したタンパク質の C-Man 化を抗 C-Man 化トリプトファン抗体を用いた Western Blotting 法、Flow cytometry 法、ELISA 法で検討した。

(2) C-Man 化タンパク質における C-Man 化修飾の細胞内輸送に及ぼす効果の検討

C-Man 化が基質タンパク質に与える効果を検討するため、TSR ドメイン (thrombospondin の 2 番目の TSR を利用) に myc および His-tag 配列を連結したものを作製した。また TSR 含有タンパク質である mindin をベースとして myc および His-tag 配列を連結したモデルタンパク質の発現系を作製し、TSR タンパク質 A とした。さらにこれらの C-Man 化修飾されるトリプトファンをアラニンあるいはフェニルアラニンに変異させたものを作製した。TSR タンパク質 A については膜結合型になるよう PDGF 受容体の貫通領域を連結したものと、TSR ドメインのみにしたものも作製した。

作製したプラスミドを用いて、C-Man 化タンパク質の分泌がトリプトファンへの変異導入によりどのような影響を受けるかを検討した。複数の細胞株への作製したプラスミドの導入の後、TSR ドメインあるいは TSR タンパク質 A の細胞外への分泌の様子を導入細胞および培養上清の Western blotting 法により解析した。細胞内における分布については免疫抗体法およびショ糖密度勾配遠心法により調べた。

4. 研究成果

(1) 抗 C-Man 化抗体による C-Man 化修飾の定量の試み

thrombospondin をはじめとする TSR-1 ファミリーのタンパク質について、C-Man 化の報告がなされてきている。その中で機能的なまとまりをもつグループとして、補体成分である C6、C7、C8、C9 と補体調節因子 properdin があげられる。これら自然免疫で機能する血液タンパク質はいずれもその TSR 上のトリプトファンが C-Man 化されるが、なかでも properdin はその構造のほとんどが 6 回連続した TSR で占められており、1 分子中の

C-Man 化修飾がこれまでに報告されている中で最も多い。このため、properdin を基質タンパク質とし、myc および His-tag を連結した組換えタンパク質発現用プラスミドを作製した。さらにこれを PDGF 受容体の膜貫通部分を連結させた膜結合型 properdin、分泌シグナルを除去して細胞質内に発現させた細胞質型 properdin も作製した。これらのプラスミドを RNase2 に対する C-Man 化能が確認されている CHO、HEK293 細胞株に導入した。抗 myc 抗体による発現の確認により、分泌型は細胞内と培養上清中に、膜結合型および細胞質型は細胞内に発現が確認できた。細胞質型は他より顕著に発現量が低く、細胞内局在の変化による安定性の低下が確認された。さらに我々の研究室で作製した複数の抗 C-Man 化トリプトファン抗体により、作製した properdin の C-Man 化を検討した。ELISA 法、および Flow cytometry 法によっては C-Man 化トリプトファン抗体によるシグナルは検出限界以下であった。また、Western blotting 法によっては抗 myc 抗体によるシグナルと同位置に抗 C-Man 化トリプトファン抗体によるわずかなシグナルが認められたが、その強度は低く、C-Man 化の程度を定量化するには不十分であった。

さらに単純化した系で検討するべく thrombospondin の 2 番目の TSR を用いた同様の実験も行った。thrombospondin は、N 末球状ドメイン、プロコラーゲンドメイン、TSR ドメイン (3 つ連続)、EGF type repeat ドメイン、Ca 結合ドメインなどを含み、分子量は 160 kDa 以上である。そこで 2 番目の TSR の N 末端に分泌シグナルを C 末端側に myc および His-tag を連結した発現系を作製し、抗 C-Man 化トリプトファン抗体により検討を行ったが、この系でも十分な C-Man 化シグナルの検出には至らなかった。

(2) C-Man 化トリプトファンへの変異導入とタンパク質の分泌の検討

次に C-Man 化は基質タンパク質の分泌に重要であるという既報に基づき、タンパク質の C-Man 化能を基質タンパク質の分泌により検討する系の作製に取り組んだ。まず始めに基質タンパク質として前述の thrombospondin の 2 番目の TSR を用いた。この系では、Trp-X-X-Trp モチーフが 2 つつながった構造 (Trp*-X-X-Trp*-X-X-Trp) が含まれ、C-Man 化を受ける 2 つのトリプトファン(*)が存在する。2 つのトリプトファンに独立に、あるいは両方にアラニンへ変化させ、HEK293 細胞に導入し、培地中に分泌される量を細胞内および培養上清の Western blotting 法によって検出した。その結果、アラニンへの変異の数が増えるとともに分泌

量の低下が観察された。しかし、トリプトファンをフェニルアラニンに変異させた場合は、アラニン変異の場合と比較して、分泌量の低下は非常に緩やかであった。この結果から、アラニンへの変異導入によって観察された結果は、C-Man 化の影響以外に構造的な変化を大きく反映している可能性が高いと考えられ、より C-Man 化の影響を直接的に受ける系が必要であると考えた。

そこで、次に基質としてモデル TSR タンパク質 A を用いた。ベースとした TSR 含有タンパク質は比較的単純な構造の分泌タンパク質で、マウス組織より単離したその cDNA を用いては乳類細胞における発現プラスミドを構築し、RNase2 を基質として C-Man 化を行うことが報告されている COS7 細胞、HEK293 細胞、NIH3T3 細胞にこのプラスミドを導入すると、一過性発現系によっても Western blotting 法による検出に十分な量が発現された。さらに細胞内外での発現を比較したところ、発現された TSR タンパク質 A の多くが分泌されていることも確認された。TSR タンパク質 A のトリプトファンをアラニンあるいはフェニルアラニンとする変異を導入した。これらのプラスミドを COS7 細胞、HEK293 細胞、NIH3T3 細胞に導入し発現を確認したところ、いずれの細胞でもアラニン、フェニルアラニン両方の変異により細胞外液への分泌の明らかな減少が認められ、TSR タンパク質 A の分泌を指標とした細胞の C-Man 化能の測定系が作製できる可能性が示された (図 1)。

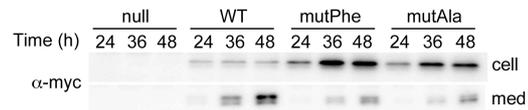


図 1 COS7 細胞における野生型および変異型 TSR タンパク質 A の発現と分泌

さらにこの実験系に必要な最小の領域を探るべく、TSR タンパク質 A の TSR ドメインのみに分泌シグナルを連結したもの、さらにアラニンあるいはフェニルアラニンとする変異を導入したものを作製した。これらのプラスミドの導入によって COS7 細胞では C-Man 化タンパク質 A よりも低分子の分泌タンパク質が検出された。またこの TSR ドメインも変異導入により培養上清中の存在量が低下した。しかし、その発現量は野生型においても TSR タンパク質 A 全長の場合よりも著しく低く、安定性が低下しているものと示唆され、今後の検討には TSR タンパク質 A 全長を用いた系がより望ましいと考えられた。一方、TSR ドメインを除いた場合は、全長の場合と遜色なく発現・分泌された。

(3) 変異型 TSR タンパク質 A の細胞内局在の変化

TSR タンパク質 A の C-Man 化トリプトファンへの変異導入は COS7 細胞において分泌量の低下にともなう細胞内への貯留を引き起こした。そこで、C-Man 化を受けていない TSR タンパク質 A の細胞内部での分布を検討した。免疫蛍光法により細胞内に存在する TSR タンパク質 A を観察すると、野生型の TSR タンパク質 A は、細胞質に加えてゴルジ体マーカーである GS28 との共局在を示し、小胞体内での合成と分泌にともなうゴルジ体への集積を示唆した。これに対し、アラニンおよびフェニルアラニン変異型の TSR タンパク質 A は GS28 との共局在が低下していた(図 2A)。さらにシヨ糖密度勾配法によって、TSR タンパク質 A の細胞内分布を検討したところ、アラニンおよびフェニルアラニン変異型の TSR タンパク質 A は野生型に比較して小胞体画分における存在量が高くなっていった(図 2B)。以上の結果から、TSR タンパク質 A の C-Man 化はその分泌過程において、小胞体からゴルジ体への移行に寄与していると考えられた。

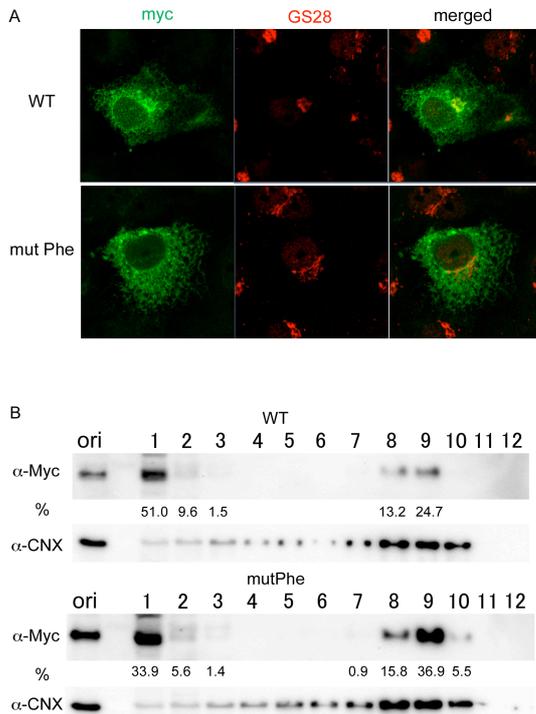


図 2 COS7 細胞における野生型および変異型 TSR タンパク質 A の細胞内局在 A; 免疫抗体法、B; シヨ糖密度勾配遠心法

(4) 膜結合型 TSR タンパク質 A に対する

C-Man 化の影響

細胞の C-Man 化能の測定にこの系を応用する場合、細胞外液の TSR タンパク質 A の検出では個々の細胞の C-Man 化を検討することは困難である。C-Man 化は分泌タンパク質に加え、膜結合タンパク質でも認められている。そこで個々の細胞における C-Man 化を観察するために膜結合型 TSR タンパク質 A を発現する系を作製して COS7 細胞に導入した。蛍光免疫法でその分布を観察したところ、野生型膜結合型 TSR タンパク質 A を発現した COS7 細胞では、細胞質内に加え細胞全体が染色された。野生型 TSR タンパク質 A と比較して、アラニンあるいはフェニルアラニン変異型の TSR タンパク質 A では細胞質内での発現量が高い様子が観察された。

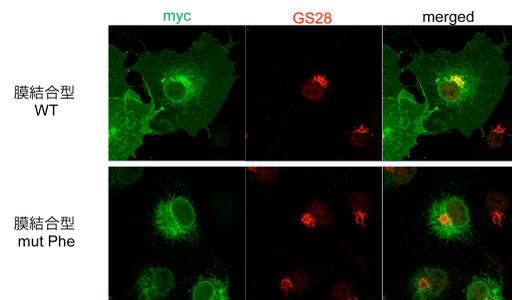


図 3 COS7 細胞における野生型および変異型膜結合型 TSR タンパク質 A の細胞内局在

本計画研究遂行中に Buettner らのグループにより、線虫の C-マンノース転移酵素 (DPY-19) の同定が報告された。そのホモログ (Dpy19L1) がこれまで報告されてきたほ乳類動物における C-Man 化責任酵素か否か、また他に同様の活性をもつタンパク質が存在するか否かは、今後の重要な検討課題である。また、ドリコールリン酸マンノース合成酵素に異常をもつ患者でも血中 properdin の C-Man 化が観察されることから、ドリコールリン酸マンノース以外のドナーを用いた C-Man 化修飾の可能性も完全には否定できない。今後は、Dpy19L1 の関連を含め、今回発見した TSR タンパク質 A の C-Man 化と分泌および細胞局在の変化を利用し、C-Man 化修飾機構の解明に取り組む予定である。

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 2 件)

- ① Ihara Y, Inai Y, and Ikezaki M: Protein C-mannosylation and its prospective functions in the cell.

Trends Glycosci. Glycotechnol., 23, 1-13, 2011, doi: 10.4052/tigg.23.1 査読有り

- ② Ihara Y, Manabe S, Ikezaki M, Inai Y, Matsui I-S L, Ohta Y, Muroi E, and Ito Y: C-Mannosylated peptides derived from the thrombospondin type 1 repeat interact with Hsc70 to modulate its signaling in RAW264.7 cells. Glycobiology 20: 1298-1310, 2010, doi: 10.1093/glycob/cwq096 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① Ihara Y: Modulation of TGF- β signaling through thrombospondin type 1 repeat (TSR) derived-peptides with C-mannose. Shandong-Wakayama Medical and Nursing Symposium 2012, 2012. 11, Wakayama, Japan
- ② Ihara Y, Ikezaki M, Inai Y, Matsui I-L, Muroi E, Shibukawa Y, Wada Y, Manabe S, and Ito Y: The search for proteins bound to C-mannosylated TSR-derived peptides involved in the regulation of TGF- β signaling in cultured fibroblasts. Glycobiology, 22, 1520, (7). Joint Meeting of the Society for Glycobiology and American Society for Matrix Biology, 2012. 11, San Diego, USA
- ③ 池崎みどり, 井内陽子, 松井仁淑, 室井栄治, 渋川幸直, 和田芳直, 眞鍋史乃, 伊藤幸成, 井原義人: 「TGF- β シグナル制御に関わる C-Man-TSR 由来ペプチドの標的分子の探索」. 第 84 回 日本糖質学会年会, 2012. 9. 鹿児島
- ④ 井原義人: 「C-マンノシル化糖修飾による細胞増殖の調節」. 第 10 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 2012. 8. 東京
- ⑤ Ihara Y, Ikezaki M, Inai Y, Matsui I, Muroi E, Manabe S, and Ito Y. (2011) Effects of C-mannosylated TSR-derived peptides on TGF- β signaling in kidney derived NRK-49F fibroblasts. GLYCO XXI: 21st International Symposium on Glycoconjugates, August 21-26, 2011, Vienna, Austria
- ⑥ Ihara Y, Manabe S, Ikezaki M, Inai Y, Matsui I-S L, Ohta Y, Muroi E, and Ito

Y: C-Mannosylated Peptides Derived from the Thrombospondin Type 1 Repeat Interact with Hsc70 to Enhance the Signaling in RAW264.7 Cells. C-P3-017. 25th International Carbohydrate Symposium, 2010, 8, Tokyo, Japan

- ⑦ Ihara Y, Manabe S, Ikezaki M, Inai Y, Matsui I-S L, Ohta Y, Muroi E, and Ito Y: C-Mannosylated TSR-derived Peptides Interact with Hsc70 to Enhance its Signaling in RAW264.7 Cells. PS[I]-17. The 28th Naito conference on glycan expression and regulation [I]: Functions and disease mechanisms, 2010, 7, Kanagawa, Japan

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 井内 陽子 (Yoko Inai)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20316087
- (2) 研究分担者 井原 義人 (Yoshito Ihara)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70263241