

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2012～2013

課題番号：23770138

研究課題名（和文） 非Sequon配列への糖鎖付加とその品質管理における重要性の研究

研究課題名（英文） Requirement of atypical *N*-glycosylation motif for the surface expression and the intracellular signaling

研究代表者

安田 大恭（YASUDA DAISUKE）

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70594951

研究成果の概要（和文）：非Sequon配列（典型的なAsn-x-Ser/Thrではない配列）へのN型糖鎖付加の機構とその細胞内における役割については、その多くが未解明のまま残されている。我々はGPR109Aが有する唯一のN型糖鎖修飾部位が非Sequon配列であることを見出し、N型糖鎖欠損型GPR109Aを用いた解析により、この糖鎖修飾が正常な受容体膜発現に重要であることを明らかにした。また、オリゴ糖転移酵素のsiRNAを用いた解析により、非Sequon配列へのN型糖鎖修飾に寄与するSTT3アイソザイムはSTT3Bであることを見出した。さらにこの糖鎖修飾部位が非Sequon配列であることの必要性を細胞内シグナル伝達の観点から明らかにした。具体的には、非Sequon配列をSequon配列に置き換えたGPR109Aは、N型糖鎖修飾を受けて正常な形質膜への発現を示すものの、ニコチン酸刺激依存的な細胞内シグナル伝達能は野生型と比較して顕著に減弱していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We currently found that GPR109A, which is known as a nicotinic acid (niacin) receptor, is modified with *N*-glycan, even through lacking the sequon motif in the extracellular regions. Here, we demonstrate that Asn¹⁷-X-Cys¹⁹, termed non-sequon motif, within the *N*-terminus of this receptor contributes to the *N*-glycosylation of GPR109A. This modification is indispensable for GPR109A because non-glycosylated GPR109A mutants, GPR109A/N17A and GPR109A/C19A, showed impaired cell surface expression, although GPR109A/C19S and GPR109A/C19T mutants, in which receive *N*-glycosylation at Asn¹⁷, exhibited similar expression to wild-type receptor. We further suggest that the oligosaccharyltransferase catalytic subunit STT3B, but not STT3A isoform, is implicated in the *N*-glycan conjugation on the non-sequon motif of GPR109A. Intriguingly, defect in the di-cysteine in the non-sequon motif, Cys¹⁸-Cys¹⁹, resulted in the impairment of the Gi-mediated signaling via GPR109A, e.g., nicotinic acid-elicited reduction of cAMP synthesis and elevation of intracellular [Ca²⁺]. Since this deficiency was not compensated by the replacement of Cys¹⁹ to Ser or Thr, the impaired function of the di-cysteine defective GPR109A is not due to the lack of *N*-glycan.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：N型糖鎖修飾・Sequon 配列・GPR109A・STT3・シグナル伝達・形質膜発現

1. 研究開始当初の背景

タンパク質への糖鎖修飾の研究は翻訳後修飾の一つとして広く進められ、糖鎖の多彩な役割と多様な疾患への関与が明らかにされてきた。さらに近年では、アスパラギン結合型（N型）糖鎖修飾に必須の糖転移酵素の構成成分 STT3A と STT3B は、構造の異なる基質を識別することが報告され、N型糖鎖修飾の研究は大きな進展を見せつつある。しかしながら、これらの報告は全て Sequon 配列への糖鎖付加について解明されたものであり、非 Sequon 配列への糖鎖修飾の研究については N型糖鎖の構造は解析されているものの、付加された N型糖鎖の生理的意義や疾患との関連性、及び機構は全くわかっていない。

また、本研究の対象となった GPR109A は、ニコチン酸により活性化されて脂質代謝改善作用を発揮する GPCR として知られており、脂質異常症に対する創薬ターゲットとして臨床的にも注目されている分子である。

2. 研究の目的

本研究は、未だ報告例のない非 Sequon 配列への N型糖鎖付加の機構とその糖鎖の細胞内における役割の解明、および GPR109A が Sequon 配列ではなく非 Sequon 配列であるための意義を受容体機能の観点から見出すことを目的として進められた。

具体的には、非 Sequon 配列のみに N型糖鎖付加されることを見出した GPR109A を用いて、そのアミノ酸点変異体の糖鎖付加の有無を解析し、糖鎖付加に重要なアミノ酸を同定する。得られた糖鎖欠損型 GPR109A 変異体の形質膜発現解析を行い、受容体の細胞膜輸送における糖鎖付加の役割を検証する。さらに、GPR109A の非 Sequon 配列におけるアミノ酸点変異体の細胞内シグナル伝達機能の解析により、GPR109A の非 Sequon 配列の細胞内機能における意義を見出す。また、オリゴ糖転移酵素の活性中心成分 STT3 の siRNA 解析により、GPR109A の非 Sequon 配列への糖鎖付加を担う STT3 アイソザイムを同定する。

3. 研究の方法

(1) GPR109A の N型糖鎖付加部位の解析

ヒト GPR109A の細胞外領域の6つのアスパラギン(Asn, N)をアラニン(Ala, A)に置換した変異体のプラスミドをそれぞれ作製した。作製プラスミドにはヘマグルチニン(HA)タグを GPR109A の N 末端に付加した。培養細胞にそれらのプラスミドを導入し、一過性に過剰発現させた後に、その細胞からタンパク質

を抽出した。

N型糖鎖を付加された受容体は分子量が増加するので、SDS-PAGE 後にウェスタンブロット解析して付加されていない受容体を区別した。N型糖鎖付加の有無が明確ではない場合は、N-グリコシダーゼ処理によって N型糖鎖を除去し、糖鎖欠損型受容体のバンド濃度の増加率を定量化して評価した。

(2) GPR109A の非 Sequon 配列の N型糖鎖付加における重要性の解析

GPR109A の糖鎖付加部位近傍のアミノ酸のアラニン置換体のプラスミドを作製し、実験方法(1)と同様に糖鎖付加の程度を評価した。

(3) GPR109A の形質膜発現における N型糖鎖の重要性の解析

実験(1)で得られた N型糖鎖欠損型 GPR109A を一過性に過剰発現させた後に細胞を回収し、抗 HA タグ抗体と蛍光標識二次抗体を処理した後、フローサイトメトリーを用いて細胞膜表面に発現している受容体量を定量して、野生型 GPR109A (WT) と比較した。

(4) GPR109A の糖鎖付加に寄与する STT3 アイソザイムの解析

STT3A と STT3B の siRNA をそれぞれ処理した HeLa 細胞に、GPR109A を一過性に過剰発現させた後に、その細胞からタンパク質を抽出し、実験方法(1)と同様に糖鎖付加の程度を評価した。

(5) GPR109A の非 Sequon 配列の細胞内機能における重要性の解析

GPR109A の非 Sequon 配列の Ala もしくはセリン(Ser, S)やスレオニン(Thr, T)の置換体プラスミドを実験方法(1)と同様に細胞に過剰発現させた。細胞を回収し、そのニコチン酸刺激依存的な細胞内 cAMP 濃度の低下作用や細胞内 Ca イオンの上昇作用の程度を野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) GPR109A が N型糖鎖付加される受容体かどうかを確かめるために、2種の N-グリコシダーゼ(Endo-H と PNGaseF)をそれぞれ前処理して、ウェスタンブロット解析により GPR109A の大きさを比較した。N-グリコシダーゼ未処理の細胞において、34kDa と 40-70kDa の大きさの位置に検出されたシグナルは、Endo-H と PNGaseF を処理することに

よりそれぞれ消失し、糖鎖欠損型 GPR109A の位置 (30kDa) に収束していたことから、GPR109A はコアの N 型糖鎖および複合型の N 型糖鎖を有する糖タンパク質であることがわかった (図 1)。

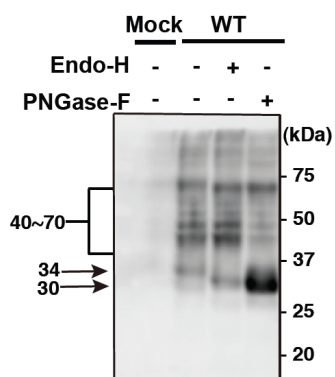


図 1 : N 型糖鎖付加された GPR109A

また、GPR109A の細胞外領域にある 6 つの Asn の点変異体のうち、Asn¹⁷ 変異体のみ N 型糖鎖付加された大きさの受容体が検出されなかったことから、GPR109A は Asn¹⁷ に N 型糖鎖が付加されることが明らかになった (図 2)。

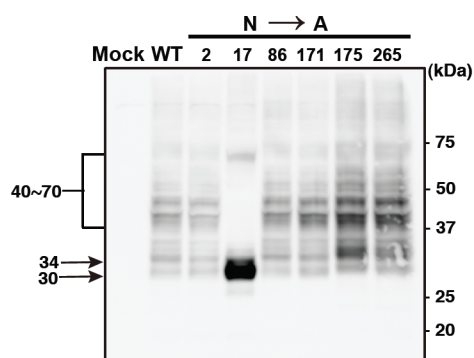


図 2 : GPR109A の Asn¹⁷ への N 型糖鎖付加

これらの結果から、GPR109A は非 Sequon 配列 (Asn¹⁷-Cys¹⁸-Cys¹⁹) の Asn¹⁷ にのみ N 型糖鎖付加されるタンパク質であることがわかった。

(2) N 型糖鎖の細胞内における役割を明らかにするために、糖鎖欠損型 GPR109A (N17A) と WT の形質膜での発現量を比較したところ、トランスフェクションして 12 時間または 24 時間経過後に N17A は WT より有意に発現が低下していた (図 3)。また、WT のツニカマイシン (TM) 処理は同様に形質膜発現を低下させることがわかった。

これらの結果から、GPR109A の N 型糖鎖は受容体本来の形質膜発現のために重要であることが示唆された。

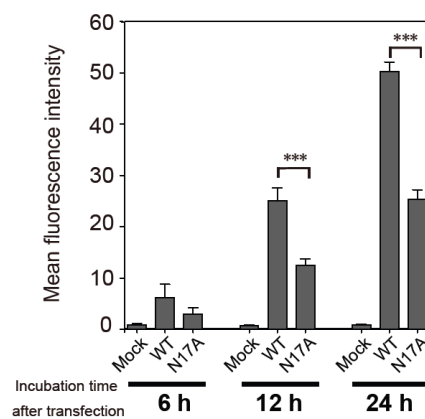


図 3 : N17A の形質膜発現の低下

(3) 非 Sequon 配列への N 型糖鎖付加機構を調べる目的で、オリゴ糖転移酵素の活性中心成分である STT3 アイソザイムが GPR109A の N 型糖鎖付加に重要であるか検証した。まず合成した STT3A と STT3B それぞれの siRNA が特異的に発現抑制することを RT-qPCR により確認した。

ウェスタンブロット解析の結果、STT3B-siRNA 処理や STT3A と STT3B の siRNA 処理細胞では、Control-siRNA 処理細胞に比べて複合型糖鎖を有する受容体量が低下し、ツニカマイシン (TM) 処理細胞で見られた様に糖鎖欠損型 GPR109A の量が顕著に増加していた (図 4)。そのため GPR109A の N 型糖鎖付加は、STT3A ではなく STT3B が寄与することが示唆された。

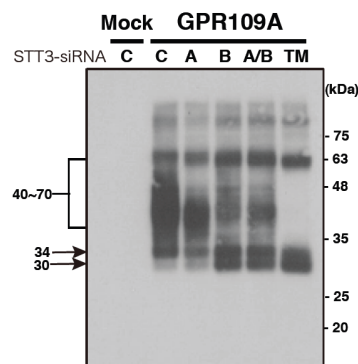


図 4 : STT3B-siRNA 処理による GPR109A の N 型糖鎖付加の抑制

(4) GPR109A の N 型糖鎖修飾部位が Sequon 配列ではなく非 Sequon 配列であるための必要性を受容体の細胞内シグナル機能の観点から検証した。

GPR109A の Cys¹⁹ を Ser や Thr に置換した Sequon 配列含有 GPR109A 変異体 (C19S と C19T) をそれぞれ作製し、まず、受容体の N 型糖鎖付加の有無や形質膜での受容体発現量を評価した。ウェスタンブロット解析の結果、C19S や C19T は WT と同程度にコアおよび複合

型の N 型糖鎖が付加されていた (図 5)。

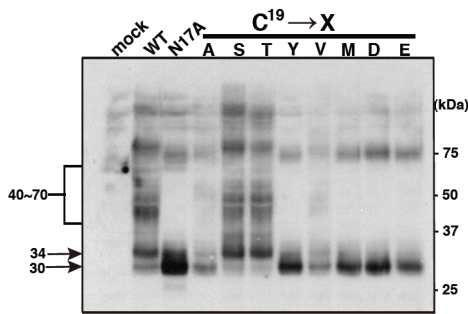


図 5 : Cys¹⁹ 点変異体の N 型糖鎖付加

次に、形質膜の発現量を検証した。フローサイトメトリー解析の結果、C19S および C19T 点変異体は WT と比較して有意な形質膜発現量の違いは見られなかった。

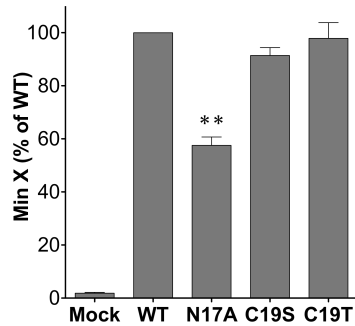


図 6 : Cys¹⁹ 点変異体の形質膜発現

そこで次に、受容体の細胞内シグナル伝達機能の解析を試みた。

リガンドであるニコチン酸の刺激により、WT の過剰発現細胞は顕著な細胞内 cAMP 濃度の低下作用 (Gi タンパク質の活性化) を示したが、C19S や C19T の過剰発現細胞はその作用が著しく減弱していた (図 7)。

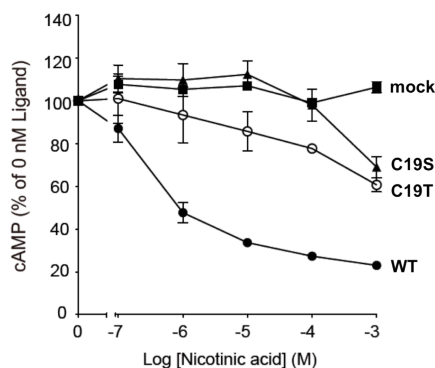


図 7 : Cys¹⁹ 点変異体のニコチン酸刺激依存的な細胞内 cAMP 濃度低下作用の減弱

さらに、受容体の細胞内シグナルの指標と

して細胞内 Ca イオン濃度の上昇作用を検証した。WT の過剰発現細胞では低濃度のニコチン酸刺激により十分な細胞内 Ca イオン濃度の上昇が観察されたが、C19S や C19T の過剰発現細胞では非常に高濃度のニコチン酸刺激を必要とすることがわかった (図 8)。

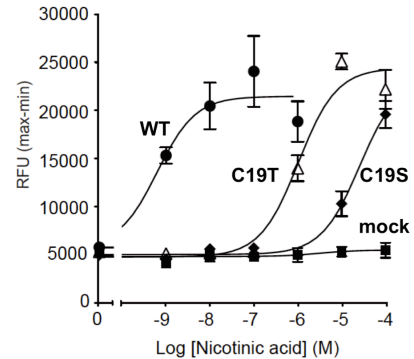


図 8 : Cys¹⁹ 点変異体のニコチン酸刺激依存的な細胞内 Ca イオン濃度上昇作用の減弱

これらの結果より、GPR109A の Cys¹⁹ は受容体のニコチン酸刺激依存的な細胞内シグナル伝達機能に必須であり、N 型糖鎖付加される非 Sequon 配列の重要性が示唆された。

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 2 件)

(1) ニコチン酸受容体 GPR109A が有する N 型糖鎖付加のための非 Sequon 配列の重要性について

安田大恭、井村祐己、石井聡、清水孝雄、中村元直 第 85 回日本生化学会大会 (福岡) (2012)

(2) GPR109A 受容体の非典型的な配列に付加する N 型糖鎖修飾の重要性

安田大恭、清水孝雄、中村元直 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会年会合同大会 (神戸) (2010)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bougyo/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 大恭 (YASUDA DAISUKE)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 7 0 5 9 4 9 5 1