

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770136

研究課題名(和文)炭素源変化により亢進するO型糖鎖の脱離反応はどのような生理機能を持っているのか？

研究課題名(英文)Study of the biological functions of the generation of free oligosaccharides

研究代表者

平山 弘人(Hirayama, Hiroto)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・協力研究員

研究者番号：50525847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質への糖鎖付加は真核生物に共通の翻訳後修飾であり、様々な生体内プロセスにおいて重要な役割を果たしている。細胞質にはタンパク質と結合しない状態の糖鎖(遊離糖鎖)が存在することが知られるが、この遊離糖鎖生成・代謝の生物学的意義については不明な点が多い。我々は、マンノースを炭素源とした培養条件下で出芽酵母は、今まで報告のないようなO-結合型糖鎖と同じ構造を持つ遊離糖鎖を生成することを見出した。また、培地へのグルコースの添加が遊離O型糖鎖の生成を阻害この阻害は、ある転写抑制因子依存的なことを明らかにした。これらのことから遊離O型糖鎖の生成は転写レベルで厳密に制御されていることが強く示唆される。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotes, free N-glycans (fNGs), derived from either N-glycans from glycoproteins or their dolichol-linked precursors, are accumulated in the cytosol [1,2]. To gain insight into the biological significance of fNGs in budding yeast (*S. cerevisiae*), the free glycans under various culture conditions were examined. We then serendipitously observed the accumulation of novel types of free glycans when cells were cultured with a media containing mannose as a sole carbon source. The generation of the novel free glycans was repressed by the presence of glucose in media. Furthermore, cells defect in one of transcription factor caused excess formation of the free glycans and show cell wall defect. These results clearly indicate that the generation of the novel free glycans is tightly regulated specifically with the transcription factor, and that excess generation of free glycans may lead to the compromised cell wall formation.

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：糖鎖代謝 遊離糖鎖 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

タンパク質への糖鎖修飾は、真核生物に普遍的に起こる翻訳後修飾の一つであり、糖鎖付加によるタンパク質自体の安定化などのタンパク質自体の物理化学的安定への寄与や、細胞間接着、細胞内シグナル、がん細胞の転移などの様々な生理機能に糖鎖が関わっていることが知られている。一方、糖タンパク質が代謝される際には糖鎖が切り出され、遊離糖鎖が生成されることが知られている。しかしながら、この遊離糖鎖の代謝・分解機構についての詳細は未だ不明な点が多い。そこで、我々は真核生物の中でもシンプルかつ解析が容易なモデル生物、出芽酵母を用いて糖鎖代謝の分子メカニズムについて解析することにした。その結果、出芽酵母は、細胞質に局在するペプチド:N-グリコナーゼ (Png1) 依存的に糖タンパク質を切り出すことで遊離糖鎖を生成し、さらに細胞質マンノシダーゼ (Ams1) による遊離糖鎖の分解を行っていることが明らかとなった。この分解経路は高等生物のものと非常に類似していることから、遊離糖鎖の代謝経路は真核生物において広く保存されていることが示唆された。

2. 研究の目的

出芽酵母の遊離糖鎖の経路について明らかになったものの、遊離糖鎖代謝自体の生物学的意義は未だに不明であった。そこで、我々は、様々な生育環境における遊離糖鎖生成の生物学的意義を解明するために、培養液に加える炭素源を変化させて、遊離糖鎖の量および質の変化に着目した解析を行った。その結果、マンノースを炭素源として出芽酵母を培養すると、遊離 N 型糖鎖ではない、未知の遊離糖鎖が多量に生成されるという非常に興味深い実験結果を得た。そこで、この未知の遊離糖鎖の構造を詳細に解析したところ、これらの遊離糖鎖は、今までに報告の無い O-結合型糖鎖由来の遊離糖鎖 (遊離 O 型糖鎖) であることが 2 つの予備的実験結果 ; (1) 未知の遊離糖鎖が O-結合型糖鎖と同様、-1,2 および -1,3 グリコシド結合のマンノースみによって構成され、タンパク質を修飾する O-結合型糖鎖に構造が類似していること。(2) O-結合型糖鎖をタンパク質へ転移する糖転移酵素を破壊した細胞株では、この O-結合型糖鎖由来と考えられる遊離糖鎖は生成されないこと、によって示唆された(未発表データ)。このことから、出芽酵母の O-結合型糖鎖はマンノース培養時に、今まで知られていない酵素、エンド O-グリコナーゼ (EOG) によってタンパク質から切り出されているのではないかと考えた。そこで、EOG をコードする遺伝子の同定を行ない、EOG コード遺伝子の解析から、マンノースへの培養環境の変化と細胞内応答としての遊離 O 型糖鎖生成の関連について検討する。

3. 研究の方法

(1) 遊離 O 型糖鎖の生成条件および生物学的意義の詳細な検討

遊離 O 型糖鎖がどのような培養条件で効率よく生成されるかを検討した。主に検討したパラメーターは培養時間、培養液中のマンノースの濃度である。この最適条件を基に、マンノースを炭素源とした培養条件ではどのような遺伝子の変動があるのかを DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを行い、細胞にとって、マンノース培養環境がどのような環境ストレスになるのかを解析する。

(2) 遊離 O 型糖鎖生成に関わる因子の発現調節について

DNA マイクロアレイによる遺伝子プロファイルから明らかとなった転写レベルでの遺伝子変化を示すデータを基に、出芽酵母の持つ転写因子のなかでマンノース培養環境下で発現レベルが大きく変化しているものを探し、その中で、遊離 O 型糖鎖生成に関わる因子の調節に関わっていそうな因子を同定する。この同定した候補転写因子が調節している遺伝子の中に遊離糖鎖生成に関わる遺伝子群が多く含まれている可能性が高いので、網羅的クロマチン IP 解析により明らかになっている、特定の転写因子により調節されている遺伝子の破壊株をすべて解析し、遊離 O 型糖鎖生成に関わる遺伝子群を同定する予定である。

4. 研究成果

1) 遊離 O 型糖鎖を生成する培養環境の詳細な解析

前述のように、2%マンノースを炭素源とした培養条件で出芽酵母を培養すると、遊離 O 型糖鎖が多量に生成されることが我々の研究から明らかになっている。そこで、マンノースとグルコースを共に含んだ培地で培養した場合でも遊離 O 型糖鎖が生成されるかを検討した。その結果、マンノース 1%、グルコース 1% を共に含む培養条件下では遊離 O 型糖鎖が著しく抑制され、殆ど生成されないことが判明した (図 1)。このことから細胞中のグルコースが EOG の活性を負に調節していることが示唆された。つまり、遊離 O 型糖鎖の生成に関わる因子は転写レベルで発現制御されている可能性が高いと考えられる。

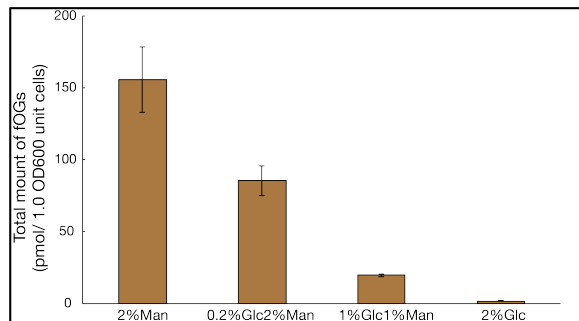


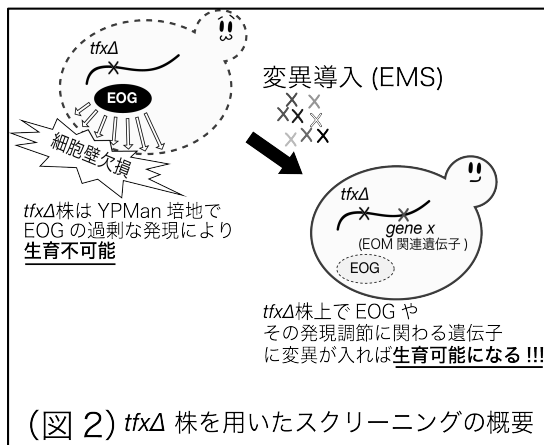
図 1 グルコース、マンノース混合培地における遊離 O 型糖鎖生成の抑制

(2) グルコースによる転写抑制・脱抑制機構に関わる因子はEOGの発現調整に関わっているか？

グルコースが豊富な環境下では、非発酵性炭素源の代謝に関わる酵素群の発現は転写レベルで抑制を受けているが、グルコースが枯渇すると非発酵性炭素源を代謝するためにこれらの酵素群の遺伝子発現が促進されることが知られている(グルコース抑制・脱抑制機構)。他方、遊離 O 型糖鎖の生成もグルコースを含む培養条件下で抑制されるので、EOG 依存的な遊離 O 型糖鎖の生成が、グルコース抑制・脱抑制機構に関わる転写因子群の欠損株で変化するかを検討し、EOG 依存的な遊離 O 型糖鎖の生成機構の解析を行った。その結果、グルコース抑制に関わるある転写因子(TFX)を欠損させた変異体では、野生株の遊離 O 型糖鎖生成量に比べ、約 10 倍の増加が見られた。また、この過剰な脱遊離 O 型糖鎖反応により、細胞表面の糖タンパク質から多くの糖鎖が切り出されるため、細胞壁の恒常性が維持できなくなり、TFX の欠損株 (*tfxΔ*) はマンノースを含む培地では細胞壁欠損による生育阻害を示すことが明らかとなった。

(3) *tfxΔ*の表現系を指標にした EOG をコードする遺伝子のスクリーニング

*tfxΔ*株はマンノースを炭素源とした培地では、過剰な遊離 O 型糖鎖の生成に起因する生育阻害を示す。この表現型を指標に EOG コード遺伝子の同定を行った。具体的には、*tfxΔ*株を突然変異誘起剤 EMS で処理し突然変異を促す。その後、これらの細胞を YPMan プレートに播き、生育可能となった株を取得した(一次スクリーニング)。次にこの YPMan プレート上での生育阻害を抑圧した株の中で、遊離 O 型糖鎖の生成量が著しく減少している変異株を選抜した(二次スクリーニング)(図 2)。この一連のスクリーニングにより、二種類の独立した変異クローンの取得に成功した。現在、2 クローンの変異点を同定するために、次世代シーケンサーによる配列解析を行っている。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. Harada Y., Buser R., Ngwa EM., Hirayama H., Aebi M., Suzuki T., "Eukaryotic oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation." J Biol Chem. 2013 Nov 8;288(45):32673-84. doi: 10.107 (査読あり)

[学会発表](計 8 件)

1. 平山弘人、鈴木匡、「出芽酵母の生成する O-結合型糖鎖様構造を持つ遊離糖鎖とその機能について」第 86 回 日本生化学会年会 2013 年 9 月 11-14 日 (横浜)
2. 平山弘人、鈴木匡、「出芽酵母の遊離糖鎖生成とその調節について」第 45 回 酵母遺伝学フォーラム 2013 年 9 月 8-10 日(仙台)
3. 平山弘人、鈴木匡、「出芽酵母の生成する O-結合型糖鎖様構造を持つ遊離糖鎖とその機能について」第 32 回 日本糖質学会 2013 年 8 月 5-7 日, (大阪)
4. Hiroto Hirayama, Tadashi Suzuki, "Discovery of the novel type of free glycans in *Saccharomyces cerevisiae*"Japan-Austria joint seminar, (2013)Jul., 1st-3rd, (Wako, Japan)
5. Hiroto Hirayama, Tadashi Suzuki, "Discovery of the novel type of free glycans in *Saccharomyces cerevisiae*"RIKEN - Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology The 2nd Symposium, (2013)Apr., 15th-17th, (Wako, Japan)
6. 平山弘人、鈴木匡、「出芽酵母における遊離 O-型糖鎖の生成およびその調節機構について」第 85 回 日本製科学会年会 2012 年 12 月 4-6 日(福岡)
7. 平山弘人、鈴木匡、「出芽酵母の持つ未知のエンド型 O-マンノシダーゼによる遊離糖鎖の生成」第 31 回 日本糖質学会 2012 年 9 月 17-20 日, (鹿児島)
8. 平山弘人、鈴木匡、「未知のエンド型 O-マンノシダーゼによる遊離糖鎖の生成機構について」第 44 回 酵母遺伝学フォーラム 2012 年 9 月 4-6 (京都)

〔図書〕(計1件)

1. Hirayama H., Suzuki T., “GMPPA, B”
(2013) Handbook of
glycosyltransferases and related
genes (Springer Japan)

〔その他〕

ホームページ

- Hirayama H., “Purification and
Analysis of Free Oligosaccharides in
Saccharomyces cerevisiae”
Glycoscience Protocol Online
Database
(URL) <http://jcggdb.jp/GlycoPOD/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山弘人 (HIRAYAMA Hiroto)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究

チーム・協力研究員

研究者番号：50525847