

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18521

研究課題名(和文)新規エンド0-マンノシダーゼの同定 新たな脱糖鎖ツールの開発に向けて-

研究課題名(英文) Identification of a novel endo-0-mannosidases for developing a new tool for de-glycosylation of 0-glycans

研究代表者

平山 弘人(Hirayama, Hiroto)

国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・客員研究員

研究者番号：50525847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質への糖鎖修飾は真核生物に共通して見られる翻訳後修飾の一つであり、様々な生体内プロセスに深く関わっていることが知られている。我々は細胞質における糖鎖の分解・代謝の生物学的意義を解明するために、出芽酵母を用いて研究を行っている。その過程で、炭素源マンノースへと変化させた細胞培養条件では、新規0-マンノシダーゼ(EOM)の活性が細胞内で上昇すること、その結果、タンパク質上の0-結合型糖鎖が切り出され、大量の遊離0型糖鎖(fOGs)が生成されることを偶然にも見出した。そこで、出芽酵母が有する新規EOM遺伝子の同定を行ない、同定したEOMを解析ツールとして応用することを目的に研究を行った。

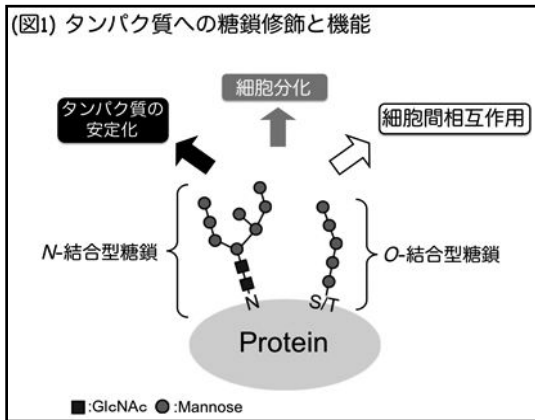
研究成果の概要(英文)：Glycosylation for the nascent proteins are one of the most common co- and post- translational modifications. This modification is well known to play a critical role in the various biological processes. It is known that free-formed N-glycans, designated as free N-glycans (fNGs), which are liberated from glycans on the glycoproteins, are accumulated in the cytosol. However biological meaning of the accumulation of fNGs is unclear. Unexpectedly, we found that under specific culture condition, yeast cells generate novel free glycans derived from 0-linked sugar chains on the glycoproteins, suggesting yeast cells possess a novel endo 0-mannosidase (EOM). Our goal of this study, therefore, is not only identification of the gene coding EOM and gain deeper insight into biological and physiological meaning of the generation of the free glycans derived from 0-glycans(fOGs) but also providing this enzyme as a tool for structural/functional analysis of 0-glycan on glycoproteins.

研究分野：糖鎖生物学

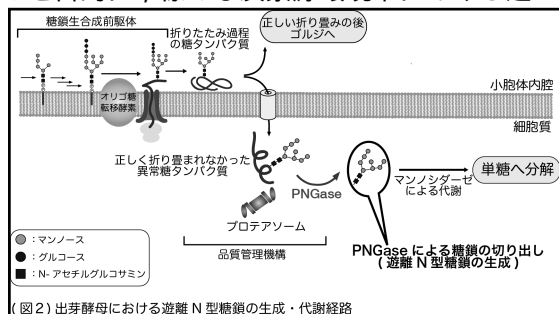
キーワード：糖鎖 代謝 遊離糖鎖 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

細胞内で合成されたタンパク質への糖鎖付加は、真核生物に共通する翻訳後修飾の一つであり、その結合様式の違いにより、アスパラギン残基に結合する N-結合型糖鎖、セリンまたはトレオニン残基に結合する O-結合型糖鎖に分類することが出来る(図1)。これらの糖鎖修飾は、タンパク質自体の安定化を促すだけでなく、細胞の発生・分化、細胞間相互作用、組織形成などの様々な生体内のプロセスにおいて重要な役割を果たしている [Varki, (1993) *Glycobiology*] (図1)。近年、糖鎖の生合成欠損が様々な疾患を引き起こすことや、細胞のがん化によって細胞表面に

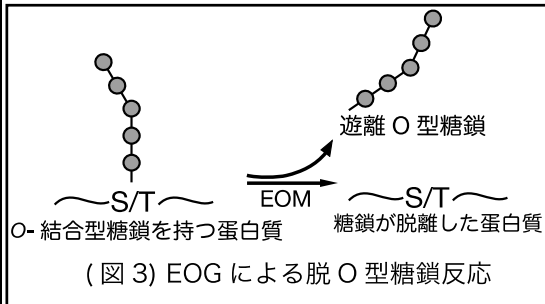


発現するタンパク質上の糖鎖構造が劇的に変化し、がん細胞の転移が促進されるという報告もあり、糖鎖修飾の重要性はますます注目されている。真核生物の細胞質では、正しく折り畳まれなかった異常タンパク質上の N-結合型糖鎖が、ペプチド:N-グリコナーゼ (PNGase) 依存的に切り離されることが知られている。その結果生成された遊離 N 型糖鎖は、マンノシダーゼなどの細胞質に存在する加水分解酵素によって、さらに代謝される(図2)。しかしながら、この遊離 N 型糖鎖代謝の生物学的意義については不明な点が多い。このような背景のもと、申請者らは 2008 年より HPLC を用いて出芽酵母で生成される遊離 N 型糖鎖の詳細な構造を解析する技術を確立し、生成される全て(約 20 種類)の遊離 N 型糖鎖の構造を同定した [Hirayama et al., (2010) *JBC*; Hirayama et al., (2011) *Glycobiology*]。この手法を用いて、遊離 N 型糖鎖代謝の生物学的意義を探ることを目的に、様々な炭素源環境下における遊



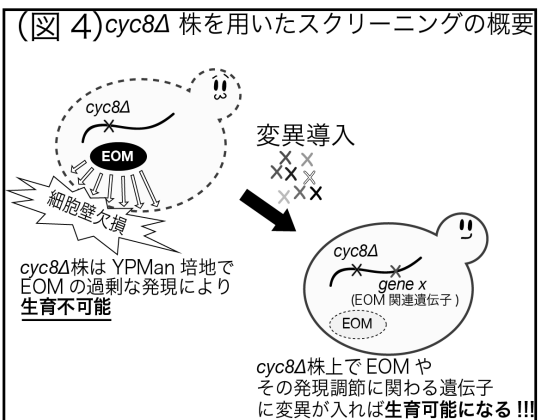
(図2) 出芽酵母における遊離 N 型糖鎖の生成・代謝経路

離 N 型糖鎖の代謝を解析した。その結果、予想外にも、マンノースを炭素源として出芽酵母の培養を行うと、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興味深い実験結果を得た。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 (fOGs)) であることが、次の 2 つの実験結果から示唆された。[結果 1] 未知の遊離糖鎖は、-1,2 および -1,3 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-結合型糖鎖と結合様式が一致すること。[結果 2] タンパク質上の Ser/Thr へマンノースを最初に転移する糖転移酵素 (Pmt1, Pmt2) 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 fOGs の生成量は著しく減少する。つまり、これらの遊離糖鎖は細胞内で無秩序に重合して生成されたのではなく、一度タンパク質を修飾した糖鎖が切り出されて生成されたものであることが強く示唆された。これらのことから、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、エンドマンノシダーゼ (EOM) によってタンパク質上から切り出されている可能性が強く示唆された(図3)。マンノース添加時に EOM の発



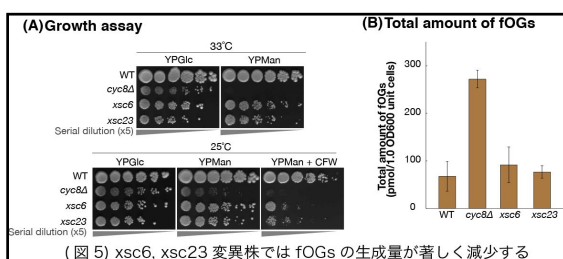
(図3) EOM による脱 O 型糖鎖反応

現量は転写レベルで制御されているのかを更に検討するため、種々の転写因子欠損株における fOGs の生成量を解析した。その結果、Cyc8 と呼ばれる転写抑制因子の欠損株 (*cyc8Δ*) は、マンノース培養条件下 (YPMAN 培地) で、野生と比べて、過剰な fOGs を生成することを見出した(図5B, WT vs *cyc8Δ*)。この EOM 活性化による糖タンパク質からの過剰な糖鎖脱離の結果、細胞壁ストレスが起こり、最終的に生育阻害という表現型を示すことが判明した。(図4および図5A, *cyc8* の spot 写真)。現段階において、EOM の転写



(図4) *cyc8Δ* 株を用いたスクリーニングの概要

調節メカニズムについての詳細は不明であるが、EOMの活性は転写抑制因子Cyc8により厳密に制御されていることが示唆される。これらのごとを踏まえ、EOMをコードする遺伝子を取得するために、cyc8株の生育を指標としたスクリーニングを考案・実施した(図4)(詳細は研究計画・方法欄),その結果、2種類の劣勢変異株の取得に成功した(図5)。この2種類の変異株の変異点については、次世代シーケンシングによる全ゲノム配列の解読により現在、同定に至っている。本研究提案では、現在取得している2種類の変異株の解析を基づいたEOM遺伝子の同定を行なう。さらに、脱糖鎖ツールとしてのEOMの高機能化に取り組み、EOMをO-型糖鎖を外すための有用なツールへと改良し、世の中へ普及させることを最終目標とする。



(図5) xsc6, xsc23 変異株では fOGs の生成量が著しく減少する

2. 研究の目的

上記研究背景をもとに、本研究提案では新規EOM依存的なfOGs生成の生物学的意義を明らかにすることを最終目標とする。具体的には以下の事柄を明らかにする。

(1)新規エンド O-マンノシダーゼ(EOM)の同定

現在取得している2種類の変異株の変異遺伝子解析から、EOM遺伝子を同定する(図4)

(バックアッププラン) cyc8Δ株とその他全ての遺伝子変異株を掛け合わせ、cyc8Δ株の表現型をレスキューする遺伝子変異株を探索する

非必須遺伝子破壊株コレクションを用いたfOGs生成に関連する遺伝子群の生化学的同定

(2)細胞内におけるEOMの機能を解析

(3)脱糖鎖ツールとしてのEOMの開発

EOMの立体構造および、反応機構の解明

EOMの高機能化

3. 研究の方法

(1)新規エンド O-マンノシダーゼ(EOM)の同定

現在取得しているEOM活性を欠損した変異体の解析

cyc8株はマンノースを炭素源とした培地(YPMan)では、過剰なfOGsの生成に起因する生育阻害を示すことが現在までに明らかとなっている(図5A)。この表現型を指標に、EOM

をコードする遺伝子およびEOM活性に関わる遺伝子のスクリーニングを行った(図4)。具体的には、cyc8株を突然変異誘起剤EMSで処理し突然変異を促し、これらの変異細胞群の中で、生育可能となった株を取得した。その結果、YPMan上で生育可能になった16クローンの変異体を得ることに成功した。これらの株はxsc変異株(Extragenic suppressor of cell wall defect of cyc8 mutant)と名付け、更にこの16クローンについて、細胞壁合成阻害剤 Calucofluore white に対する感受性の抑圧および、fOGs生成の減少の有無について検討した。その結果、EOMの生成に欠損が生じている2種類の劣勢変異株(xsc6, xsc23)を取得することに成功した(図5)。これらの株の持つ変異点を同定するために、次世代シーケンサー(Illumina HiSeq 2500)による全ゲノム配列解析を行ったところ、それぞれの変異株において、それぞれ別の機能未知なORF内にフレームシフトおよびstopコドンの挿入変異が同定された。この遺伝子産物が実際にEOMをコードしているのかをin vivo およびin vitroで解析・検討する。具体的には、現在得ているxsc6およびxsc23変異の原因遺伝子の過剰発現および破壊を行い、それに伴うfOGsの増減が見られるかを確認する。期待する結果が得られた場合は、粗精製したそれぞれの候補遺伝子産物を酵素源として、我々が有する人工基質(N末端がBODIPYで蛍光ラベルされたペプチド上のSer残基がO-マンノースで修飾されたもの)を用いたEOMの活性測定を行い、活性の有無を検討する。

(バックアッププラン1) cyc8Δ株とその他全ての遺伝子変異株を掛け合わせ、cyc8Δ株の表現型をレスキューする遺伝子変異株を探索する。上記xsc mutantの変異点の同定を行った結果、その変異が仮にEOMの活性と関係ない場合は、cyc8Δ株とその他全ての遺伝子(6000遺伝子)の掛け合わせを行い、CYC8遺伝子とそれ以外の遺伝子の二重破壊株を作成する(cyc8Δ xxxΔ)。具体的には、トロント大学のCharlie Boon教授の研究室で、出芽酵母の全遺伝子の遺伝子相互作用(genetic interaction)を解析するために開発されたSynthetic Genetic Array(SGA)解析法[Baryshnikova A et al., (2010) Methods Enzymol. (PMID: 20946810)]を利用することで、cyc8Δ株とそれ以外の全ての遺伝子の2重変異株(cyc8Δ xxxΔ)を簡便かつ迅速に作成する。作成した二重破壊株の中で、cyc8Δ株のマンノース感受性をレスキューする株を漏れなく同定することで、EOMをコードする遺伝子を同定できるだけでなく、マンノース培養時に活性化するEOMの分子調節機構が明らかになる可能性が高い。

(バックアッププラン2) 非必須遺伝子破壊株コレクションを用いたfOGs生成に関連する遺伝子群の生化学的同定

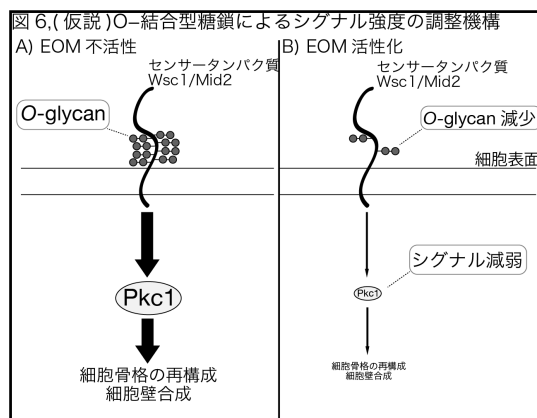
上記スクリーニング方法がうまく働かなかったさいのさらなるバックアッププランとして、破壊株シリーズを使った fOGs 生成に関わる遺伝子の探索を生化学的に行う計画である。具体的には破壊株を一株ずつ培養し、各破壊株から遊離糖鎖を抽出、精製する。その後還元末端に対してピリジルアミノ化を行ない、HPLC にて有利 O-型糖鎖の定量的解析を行うことで、fOGs を生成することのできなくなった遺伝子破壊株を同定し、fOGs の生成に関わる遺伝子を絞り込むというアプローチをとる予定である。

(2)細胞内における EOM の機能を解析

EOM をコードする遺伝子の同定後は、その遺伝子破壊株の表現系解析を行う。以下に、現在考えられる仮説を挙げ、この仮説に基づいた研究計画を示す。

-EOM が細胞表面のセンサータンパク質の糖鎖を外すことで感度を微調整している可能性についての検討-

Pmt 転移酵素群 (O-結合型糖鎖を新たに合成されたタンパク質の Ser/Thr に転移する酵素) の破壊株の解析から、O-結合型糖鎖が欠損すると細胞表面のセンサータンパク質 Wsc1 と Mid2 の糖鎖修飾量が減少し、その下流の PKC 経路によるシグナルの伝達が減弱、高温感受性を示すことが知られている [Lommel M *et al.*, (2004) *Mol. Cell. Biol.*, 24(1):46-57.]. また、このシグナル減弱と高温感受性は、細胞表面の Wsc1, または Mid2 を過剰発現させることで回復する。一方、過剰な fOGs を生成する *cyc8Δ* 株のマンノース感受性も Wsc1, Mid2 の過剰発現によって抑圧されることから (未発表データ), EOM は細胞表面のセンサータンパク質の糖鎖量を変化させ、タンパク質自体の機能を微調整している可能性が示唆された (図 6)。そこで、この仮説を確かめるために、PKC 経路および (b) の解析を通じて得られた EOM 基質のなかで、細胞表面に存在するセンサー/レセプターがあれば、その下流に存在するシグナルが、EOM 過剰発現で変化するか検討する。具体的には、対象となるシグナル系の最下流に位置する遺伝子の発現レベルをルシフェラーゼによるレポーターアッセイで解析する。その



結果、EOM の発現変化によるレセプタータンパク質上の糖鎖修飾変化に依存したシグナルの増減が観察出来れば、更に解析を進める。

(3)脱糖鎖ツールとしての EOM の開発

EOM の立体構造および、反応機構の解明 EOM を種々の O-マンノシル型糖鎖をタンパク質から外すためのツールとしての開発を行うためには、EOM の構造と触媒機構を明らかにすることが、必須である。まず最初に、大腸菌を発現系として EOM を発現・精製する系を立ち上げる。もし大腸菌で発現しない場合は、出芽酵母を発現系として用いて、発現・精製を行う予定である。その後、結晶化、立体構造解析は当研究グループの構造解析チームと共同で行っていく予定である。

EOM の高機能化

基質と EOM の共結晶化データから、EOM の反応機構を予測し活性中心や脱糖鎖反応に必要な残基を推定する。これらの情報を元にアミノ酸置換を行い、活性が上昇する変異体を探索する。また、O-マンノシル化糖鎖修飾は真核生物に広く保存されているものの、その末端 (非還元末端) の構造には多様性がある、そこで、本酵素が様々な構造に対して幅広い基質特異性を持つか検討する。幅広い基質特異性を有さない場合は、上記手法、つまり、構造情報に基づいた反応機構メカニズムを元にアミノ酸置換を行い、基質特異性の幅を広げる試みを行う。EOM の高機能化に成功すれば、出芽酵母を発現系として有用タンパク質を産生した際にみられ、ヒトの体内では抗原になり得る O-マンノース型糖鎖を脱離することができるので、出芽酵母を用いた有用タンパク質の分泌生産/品質管理に貢献できる可能性が高い。

4. 研究成果

(1)新規エンド O-マンノシダーゼ (EOM) の同定

現在取得している EOM 活性を欠損した変異体の解析

上述のように同定した候補変異株、*xsc6* および *xsc23* について戻し交配を数回実施した後、次世代シーケンサーによる変異点同定を行った。その結果、両変異株で複数の遺伝子変異が同定された。従って変異が見つかった全ての遺伝子について、その遺伝子破壊株を用意し、fOGs の生成が欠損しているかを検討した。その結果、全ての変異点が見つかった遺伝子の破壊株で fOGs の生成低下は見られなかった。従って *xsc6*, *xsc23* の変異は EOM 本体の変異ではなかったことが示唆される。

(バックアッププラン 1) *cyc8Δ* 株とその他全ての遺伝子変異株を掛け合わせ、*cyc8Δ* 株の表現型をレスキューする遺伝子変異株を探索する

予想通り上述 (a) のアプローチでは EOM をコードしている遺伝子には到達できなかった

ので、*cyc8Δ*の表現型(マンノース培地における生育阻害)を抑圧するような遺伝子群をSGAによるスクリーニングによって同定することを試みた。通常SGA法でスクリーニングを行うには*cyc8*変異株と*cyc8*以外の全ての非必須遺伝子破壊株の掛け合わせにより二倍体を形成させ、その後減数分裂を促し胞子形成を経て二重破壊株を取得するというプロセスを取る。しかしながら、*cyc8Δ*株は胞子を形成しないという表現型を示すことが判明したので、CYC8遺伝子のシャットダウン株を作成してSGA解析を行うことを目指した。

シャットダウン株はdoxycyclinによって遺伝子発現が抑制される、*TEToff-CYC8*株とエストロゲン(-estradiol)添加によって発現が止まる(Z3EV)x2-*CYC8*株を作成し、どちらの系が必要な時に遺伝子の発現を確実に止めることができるか検討した。その結果(Z3EV)x2-*CYC8*株は*TEToff-CYC8*株に比べ、-estradiolを加えると迅速で確実な遺伝子のコントロール(抑制)が可能であったことから(Z3EV)x2-*CYC8*を用いてSGA解析を行った。しかしながら、SGAのシステムでは-estradiol添加/非添加で表現型の差が確認できなかった。この系でスクリーニングを行うにはSGAシステムのさらなる改良が必要ながことが判明し、現在取り組んでいる。

(バックアッププラン 2) 非必須遺伝子破壊株コレクションを用いたfOGs生成に関連する遺伝子群の生化学的同定
上記(バックアッププラン 1)を用いた解析にしばらく時間がかかりそうであったため、並行して非必須遺伝子破壊株コレクションを用いたfOGs生成に関する遺伝子破壊株の同定を試みた。具体的には、破壊株コレクションを用いて、それぞれの株が生成するfOGsに減少が見られる株の同定を行う方法である。現在のところfOGsの生成に直接関係ないO-結合糖鎖生成に関わる糖転移酵素をコードする遺伝子破壊株や、液胞のpH及び恒常性維持に関わる一部の遺伝子破壊株においてfOGsの減少が見られるものの、fOGsを全く生成しなくなるような遺伝子破壊株は同定できていないのが現状である。以上の結果からEOMをコードする遺伝子が複数ありそれぞれ相補的に働いている可能性と、EOMをコードする遺伝子が必須遺伝子である可能性を念頭において、さらに継続して解析を進める予定である。

以上のように未だEOMをコードする遺伝子の同定には至っていないものの、新たなアプローチとして、CYC8破壊株をマンノース含有培地にて培養した際にのみ発現量が上昇するような遺伝子のRNAseqを用いた同定を行ない、この情報も合わせて破壊株を用いた生化学的解析を継続する予定である。

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 0 件)
現在投稿中
[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 弘人(Hirayama, Hiroto)

国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝
学研究チーム・客員研究員

研究者番号: 50525847

(2)研究分担者
分担者なし

(3)連携研究者
連携者なし

(4)研究協力者
研究協力者なし