

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05955

研究課題名(和文)糖鎖による糖タンパク質寿命決定メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of lifespan determination of glycoproteins by N-glycans

研究代表者

上村 聡志 (Uemura, Satoshi)

東北医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：10399975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質のアスパラギン残基に結合する糖鎖が、当該タンパク質の寿命決定に関与しているかを調べた。解析対象は出芽酵母のスフィンゴ糖脂質をゴルジ体で合成する糖転移酵素、Sur1とCsh1である。これら酵素のアミノ酸配列は非常によく似ているが、細胞内でのSur1の安定性は、Csh1よりも著しく高い。この安定性の違いはCsh1だけに結合する特徴的な構造を持つマンナン型糖鎖に起因するものではなかった。しかし、マンナン糖鎖を人為的に導入したSur1変異体の安定性は、著しく低下することを見出した。つまり、マンナン型糖鎖が酵素の立体構造変化を介して安定性に影響を与えたということを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、出芽酵母において、細胞外に分泌されるタンパク質に結合するマンナン型糖鎖が、なぜ細胞内に留まる糖転移酵素Csh1に結合しているのか、という長年の疑問に対する答えが出せたことは学術的に意義がある。このマンナン型糖鎖が作られるかどうかは、その糖鎖結合位置だけで決まるという事実は、細胞内に留まるタンパク質の中にマンナン型糖鎖を持つものがまだ眠っている可能性を期待させるものである。また、細胞内タンパク質に結合するマンナン型糖鎖がタンパク質の安定性に影響を与えることを明らかにできたことも重要な一歩である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether the glycans attached to asparagine residues of proteins are involved in determining the lifespan. The target proteins were two yeast glycosyltransferases, Sur1 and Csh1, which synthesize glycosphingolipids in the Golgi apparatus. Although the amino acid sequences of these enzymes are very similar, the intracellular stability of Sur1 was significantly higher than that of Csh1. This difference in stability was not caused by the N-glycan of mannan-type, which has a unique structure, attached to only Csh1. However, the stability of the Sur1 mutant, in which the N-glycan of mannan-type was artificially introduced into Sur1, was markedly reduced. Therefore, these results suggest that the N-glycan of mannan-type affected the enzyme stability via the conformational changes.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：アスパラギン結合型糖鎖 糖転移酵素 マンナン修飾 出芽酵母

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母の細胞膜には、哺乳動物と同じようにセラミド骨格を疎水性部分にも持つ 3 種類のスフィンゴ糖脂質 (正確には複合型スフィンゴ脂質) イノシトールホスホリルセラミド (IPC)、マンノシルホスホリルセラミド (MIPC)、マンノシルジホスホリルセラミド (M(IP)₂C) が含まれている。スフィンゴ糖脂質を合成するステップの中で、小胞体で合成されたセラミドへの糖鎖修飾はゴルジ体で行われており、本研究では IPC にマンノースを付加することで MIPC を合成する二つの酵素、Sur1/Csg1 と Csh1 に着目した。相補的に機能する Sur1 と Csh1 はどちらも二回膜貫通型のタンパク質であり、数アミノ酸の短い N 末端側の細胞質領域、内腔側にマンノース転移酵素で保存された配列を含む大きな領域 (約 240 アミノ酸) C 末端側に 80~100 アミノ酸からなる細胞質側領域を持つ¹。Sur1 と Csh1 のアミノ酸配列は、C 末の細胞質領域以外で非常に類似しており、90%以上の相同性を示すが、自身のアスパラギン結合型糖鎖の結合位置 (Sur1: Asn-244、Csh1: Asn-51 と Asn-247) やその構造、MIPC 合成の基質となる IPC のサブタイプ (IPC-A、-B、-B'、-C、-D) への親和性が異なる^{1,2}。特に、Csh1 の Asn-51 に結合する糖鎖は、細胞外へ分泌されるタンパク質で見られるマンナンという多数のマンノースが連なった巨大な構造をしており、なぜ細胞内のゴルジ体で機能する Csh1 にこのような糖鎖が付加しているのか、長らく謎であった。

2. 研究の目的

糖タンパク質に結合した糖鎖の代表的な機能として、小胞体に存在するレクチンシャペロンとの相互作用で糖タンパク質自身の折りたたみを促進させるというものがある。また、糖鎖自体がおそらく立体構造の一部を担っており、糖鎖を持つ酵素タンパク質の中には、自身の糖鎖を欠失することで酵素活性が著しく低下するものもある。一方で、我々の過去の研究では、哺乳動物のゴルジ体において、スフィンゴ糖脂質合成酵素に付加するアスパラギン結合型糖鎖の修飾が進行するためには、ゴルジ体間の逆行輸送を伴った複数回のゴルジ体通過が必要であり、糖鎖がタンパク質の細胞内での寿命タイマーとして働いている可能性を示唆していた³。そこで、新たな糖鎖機能の可能性を探るために、出芽酵母の糖タンパク質であり、ゴルジ体において従来の細胞内タンパク質とは異なる糖鎖修飾を受けると考えられる Csh1 (MIPC 合成酵素) について、その糖鎖が Csh1 の機能や寿命に与える影響を調べた。

3. 研究の方法

- (1) Csh1、Sur1、Csh1 と Sur1 の糖鎖結合部位に変異を導入した変異体のそれぞれの C 末端側に myc タグまたは GFP を融合させて、出芽酵母に発現させるプラスミドを作製した。これらプラスミドを出芽酵母に導入し、酵母が発現するスフィンゴ糖脂質を薄層クロマトグラフィー (TLC) で解析することで *in vivo* の酵素活性、共焦点顕微鏡で観察することで細胞内局在、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加してからの経時的な Csh1 や Sur1 の発現量をウエスタンブロッティングで調べることでタンパク質の寿命を解析した。
- (2) Csh1 にマンナン糖鎖修飾が進むメカニズムを調べるために、マンナン修飾が元々起こらない Sur1 に様々な変異を導入し、Sur1 でもマンナン修飾起こるようになる条件を探索した。マンナン修飾が起こると、分子量が 20 kDa 程度大きくなるので、その分子量変化をウエスタンブロッティングで調べた。
- (3) マンナン修飾を受けようになった Sur1 変異体の酵素活性、細胞内局在、タンパク質の安定性を (1) と同じ方法で解析した。

4. 研究成果

(1) 糖鎖と酵素の基質特異性および寿命

出芽酵母のスフィンゴ糖脂質にはセラミド部分への水酸基の導入位置と数の違いで A、B、B'、C、D の 5 種類のサブタイプが存在する。過去の研究で、Csh1 が特に MIPC-C と MIPC-B の合成活性が Sur1 よりも低いことがわかっていた。この違いが Csh1 や Sur1 のアスパラギン結合型糖鎖によって生じているかを調べるために、糖鎖付加部位のアスパラギンをグルタミンに置換した Csh1-N51Q 変異体、Csh1-N247Q 変異体、Sur1-N224Q 変異体を *ipt1Δsur1Δcsh1Δ* 変異体に発現させ、出芽酵母が発現するスフィンゴ糖脂質を定量した。ここで *ipt1Δ* 変異を導入した株を使ったのは、MIPC から M(IP)₂C への合成を抑えて、IPC から MIPC の変換量をより正確に定量するためである。その結果、Csh1-N247Q 変異体は野生型と酵素活性に違いはなかったが、マンナン型糖鎖を欠失する Csh1-N51Q 変異体は野生型に比べて、MIPC-C の合成活性のみが顕著に低下した。それに対して、Sur1-N224Q 変異体は MIPC-A と MIPC-B/B' の合成活性は低下したが、MIPC-C の合成活性が上昇した。これらの結果は Csh1 の Asn-51 と Sur1 の Asn-224 に結合した糖鎖が酵素の基質特異性に関係していることを示す結果ではあるが、Csh1 と Sur1 の基質特異性の違いを糖鎖の数や構造の違いで説明することはできなかった。

Csh1 と Sur1 のタンパク質としての寿命を測定するために、出芽酵母をタンパク質合成阻害剤

であるシクロヘキシミドで処理し、各タンパク質の経時的な発現量変化をウエスタンブロットイングで定量した。その結果、Csh1 は Sur1 と比較すると顕著に寿命が短かった。この寿命の違いが糖鎖で説明できるかを調べるために、糖鎖結合部位の変異体を用いて同様の検討をした。その結果、マンナン型糖鎖を欠失する Csh1-N51Q 変異体も Csh1-N247Q 変異体も野生型と同じような経時変化を示した。また、Sur1-N224Q 変異体に関して、野生型よりも少し寿命が短くなる程度にとどまり、ここでは糖鎖の存在と酵素の寿命に関係性を見出すことはできなかった。

この Csh1 と Sur1 の寿命の違いが、細胞内局在に反映されるのかどうかを調べるために、各タンパク質の C 末端側に GFP を融合させて、出芽酵母に発現させた。その結果、Csh1 と Sur1 のどちらも速やかに液胞で分解されるため、プロテアーゼに強い GFP の光の大部分は液胞内部に観察されたが、その一部はトランスゴルジにも局在することが確認できた。その共局在の割合をトランスゴルジのマーカーである Sys1-mCherry を利用して算出したところ、Csh1 のトランスゴルジマーカーとの共局在の割合が Sur1 のそれよりも有意に低かった。つまり、この結果は寿命の短い Csh1 の方がトランスゴルジに長く留まらず、液胞に輸送されることを反映していると考えられる。

(2) マンナン型糖鎖修飾の条件

通常、細胞外へ分泌されるタンパク質で起こるマンナン型糖鎖修飾が、ゴルジ体で機能する Csh1 が起こるのは非常に稀な現象である。事実、MIPC 合成活性を持ち、アミノ酸配列の相同性も高い Sur1 の持つ糖鎖上ではマンナン型糖鎖の合成は起らない。この Csh1 へのマンナン修飾がなぜ起こるのかを明らかにするために、Csh1 と Sur1 のアミノ酸配列を比較しながら、幾つかの Sur1 変異体を作製した。その結果、Sur1 の 51 番目に Asn-Ser-Thr (NST) 配列 (アスパラギン結合型糖鎖付加配列) を挿入した変異体 (Sur1-NST51) でのみ、その Asn-51 上でマンナン糖鎖修飾が観察された。この結果は、Csh1 と Sur1 においては、糖鎖付加部位の位置情報がマンナン型糖鎖修飾に重要な要因であり、その他、例えば Csh1 と Sur1 で大きく配列の異なる C 末端の細胞質領域は、マンナン修飾に無関係であった。

(3) Sur1 におけるマンナン糖鎖の機能

マンナン型糖鎖の機能をさらに調べるために、マンナン修飾が起こるようになった Sur1-NST51 変異体を使って、(1)と同様の方法で酵素活性、タンパク質の寿命、細胞内局在を Sur1 と比較した。その結果、Sur1-NST51 の酵素活性に変化は認められないが、マンナン修飾を受けた Sur1-NST51 の寿命は短くなり、それに伴ってトランスゴルジへの局在も Sur1 よりも減少した。Csh1 のマンナン型糖鎖の欠失変異体において、その寿命の延長というのが見られないことを考えると、マンナン型糖鎖自身にタンパク質の寿命をコントロールする機能はないと考えられる。現状、Sur1 がなぜ Csh1 よりも長い寿命を獲得しているのか、その理由については不明なままであるが、そこにはゴルジ体間の逆行輸送によるゴルジ体滞留時間延長が重要な鍵だと考えている。これには COPI 小胞が関わるため、普通に考えると、輸送される側の細胞質領域がその決定権を持っていそうである。しかし、Sur1 の場合は膜を隔てた内腔側のマンナン型糖鎖によって安定なゴルジ滞留が乱されるという結果であった。Sur1 の寿命決定に、この Asn-51 近傍の構造がどのように関わっているのかを明らかにすることが今後の課題である。

(参考文献)

1. Uemura, S., Kihara, A., Iwaki, S., Inokuchi, J., and Igarashi, Y. (2007) Regulation of the transport and protein levels of the inositol phosphorylceramide mannosyltransferases Csg1 and Csh1 by the Ca²⁺-binding protein Csg2. *J. Biol. Chem.* **282**, 8613-8621.
2. Uemura, S., Kihara, A., Inokuchi, J., and Igarashi, Y. (2003) Csg1p and Newly Identified Csh1p Function in Mannosylinositol Phosphorylceramide Synthesis by Interacting with Csg2p. *J. Biol. Chem.* **278**, 45049-45055.
3. Uemura, S., Yoshida, S., Shishido, F., and Inokuchi, J. (2009) The cytoplasmic tail of GM3 synthase defines its subcellular localization, stability, and *in vivo* activity. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3088-3100.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上村聡志
2. 発表標題 出芽酵母におけるMIPC合成酵素に付加する細胞内マンナン糖鎖が酵素活性と安定性に与える影響
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上村聡志、望月貴博、渡辺理世子、 淵田真衣、山田真緒、野田陽一、阿部文快
2. 発表標題 出芽酵母における静水圧ストレス適応に関与するEhg2の機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------