

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06520

研究課題名（和文）4Gal転移酵素はどのように基質の糖タンパク質/糖脂質部分を識別するのか？

研究課題名（英文）How do alpha4-galactosyltransferases distinguish glycoproteins/glycolipids as substrates?

研究代表者

鈴木 詔子 (Suzuki, Noriko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・研究員

研究者番号：50401237

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）：4-ガラクトース転移酵素(4GalT)は細胞表面上のGal 1-4Galを生成する。このうちハト 4GalT1は糖脂質に、ハト 4GalT2は主に糖タンパク質に作用する。本研究ではこれらの酵素の配列を比較し、基質の識別に必要な酵素上の部位を特定した。また、ヒト 4GalT上のある特定のアミノ酸残基を複数箇所同時に置換することで、ハト 4GalT1と同様に基質特異性の変換に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞表面上の糖鎖は主に糖タンパク質や糖脂質など複合糖質として存在し、細胞接着や分子間相互作用、病原体の感受性などに影響する。糖鎖配列が類似でも非糖鎖部位が異なれば、その役割も異なる場合がある。したがって、細胞表面上のある特定の糖鎖配列を糖タンパク質や糖脂質の一方あるいは両方に自由に付加できる技術があれば、糖鎖工学技術の発展に繋がる。得られた知見を基に細胞表面上の糖鎖構造を改変することが可能となり遺伝子治療や感染症対策に役立ち、社会的な利用価値も高まる。

研究成果の概要（英文）：4-Galactosyltransferases (4GalTs) produce Gal 1-4Gal on the cell surface. While pigeon 4GalT1 and human 4GalT act on glycolipids, pigeon 4GalT2 acts mainly on glycoproteins. In this study, we compared the sequences of pigeon 4GalT1 and 4GalT2, and identified the sites on the enzymes necessary for substrate discrimination. Furthermore, similar to pigeon 4GalT1, the substrate specificity of human 4GalT was successfully converted by simultaneously replacing several specific amino acid residues on this enzyme.

研究分野：生化学、糖質科学

キーワード：糖転移酵素 糖タンパク質 糖脂質 基質特異性 志賀毒素 糖鎖 遺伝子重複

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の表面に発現する糖タンパク質や糖脂質上の糖鎖は、細胞間相互作用に関与すると同時に、外来から侵入する細菌やウイルスの標的分子として利用される。糖鎖部分の配列は同じでも、糖タンパク質と糖脂質では、糖鎖を介したウイルスや毒素の細胞内取込みや輸送経路が異なり感受性にも相違が見られる。例えば、Gal $\alpha$ 1-4Gal という糖鎖配列は尿路病原性大腸菌や志賀毒素によって認識される。この糖鎖配列は、ヒトやマウスなど哺乳類では糖脂質上に発現し志賀毒素の細胞内取込みを媒介し細胞死へと導く。ほとんどの哺乳類では Gal $\alpha$ 1-4Gal の生合成に関わる  $\alpha$ 4-ガラクトース転移酵素 ( $\alpha$ 4GalT) をコードする遺伝子がゲノム上に1つ存在し、この酵素は糖脂質に作用して Gb3 (Gal $\alpha$ 1-4Gal1-4Glc-Cer, Cer:セラミド) を生成する。一方、ハトやセキセイインコなど、ある種の鳥類ではこの Gal $\alpha$ 1-4Gal 配列が糖タンパク質上にも存在する。私たちはこれまでに、 $\alpha$ 4GalT 遺伝子がこれらの鳥類ではゲノム上に隣接して複数存在し、そのうちの1つである  $\alpha$ 4GalT1 は糖脂質に、別の1つである  $\alpha$ 4GalT2 は糖タンパク質に優先的に作用する酵素の遺伝子であることを発見した。しかも、糖タンパク質上に Gal $\alpha$ 1-4Gal が存在する場合には、志賀毒素の細胞内取込みがむしろ阻害されることを見出した。ハト  $\alpha$ 4GalT1 と  $\alpha$ 4GalT2 の酵素の配列は 72.5% の同一性があり、 $\alpha$ 4GalT1 遺伝子の重複と変異により  $\alpha$ 4GalT2 遺伝子が創られたと考えられる。しかし、 $\alpha$ 4GalT1/ $\alpha$ 4GalT2 のどの部位が糖タンパク質 / 糖脂質の基質特異性に寄与しているのか、またその基質識別のメカニズムについては不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、類似のアミノ酸配列をもつ2つの  $\alpha$ 4GalT (ハト  $\alpha$ 4GalT1 と  $\alpha$ 4GalT2) のキメラ体を作製し、糖タンパク質 / 糖脂質の基質特異性を決定している配列や部位を同定することを目的とする。さらに、その酵素活性の調節に関わる制御分子との相互作用に影響する部位の同定を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) ハト $\alpha$ 4GalT1/ $\alpha$ 4GalT2 の HeLa 細胞における発現

ヒト  $\alpha$ 4GalT 遺伝子をノックアウトして Gal $\alpha$ 1-4Gal を発現しなくなった HeLa 細胞にハト  $\alpha$ 4GalT1、ハト  $\alpha$ 4GalT2 およびそれらのキメラ体を遺伝子導入した。酵素の働きにより細胞表面に発現された Gal $\alpha$ 1-4Gal を特異的抗体 (糖脂質上の Gal $\alpha$ 1-4Gal は抗 Gb3 抗体、糖タンパク質上の Gal $\alpha$ 1-4Gal は抗 P1 (Gal $\alpha$ 1-4Gal1-4GlcNAc-) 抗体) を用いて FACS により簡易的に検出した。また、糖タンパク質上の Gal $\alpha$ 1-4Gal は抗 P1 抗体を用いてウェスタンブロット法によっても確認した。さらに、 $\alpha$ 4GalT の発現をタンパク質レベルで確認するため、各酵素の C 末端側に HA タグを付加したものを HeLa 細胞に発現させた。細胞抽出液中の各酵素の発現と分子量を抗 HA タグ抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した。

#### (2) ハト $\alpha$ 4GalT1/ $\alpha$ 4GalT2 のキメラ体の作製

$\alpha$ 4GalT はそのアミノ酸配列の特徴に基づいて、N 末端側から「細胞質領域」、「膜貫通領域」、「ステム領域」、「糖転移酵素-糖結合領域」、および「 $\alpha$ 4-糖転移酵素保存領域」に区分できる。そこでまず、これらの各領域を部分的にハト  $\alpha$ 4GalT1 由来あるいは  $\alpha$ 4GalT2 由来の配列に置換した配列を持つキメラ体を作製した。方法としては、ベクターに導入したハト  $\alpha$ 4GalT1 および  $\alpha$ 4GalT2 遺伝子の 3'末端側に HA タグ遺伝子を付加したものを鋳型として特定の領域のみを含む遺伝子および含まない遺伝子をそれぞれ PCR および inverse PCR (iPCR) で増幅させた後、シームレスクローニングにより遺伝子を融合させた。

#### (3) ハト $\alpha$ 4GalT1 およびヒト $\alpha$ 4GalT の変異体の作製

ベクターに導入したハト  $\alpha$ 4GalT1 およびヒト  $\alpha$ 4GalT 遺伝子 (3'末端側に HA タグ遺伝子を付加したものを) を鋳型として iPCR を行った。この時、iPCR 用のプライマーの配列を目的の遺伝子配列に置換することで変異を導入した。

#### (4) AlphaFold2 によるハト $\alpha$ 4GalT1/ $\alpha$ 4GalT2、ヒト $\alpha$ 4GalT の立体構造予測

ハトおよびヒト由来の  $\alpha$ 4GalT 遺伝子から推定されるアミノ酸配列を用い、AlphaFold2 により立体構造予測をした。

### 4. 研究成果

#### (1) ハト $\alpha$ 4GalT1/ $\alpha$ 4GalT2 のキメラ体を用いた基質特異性決定部位の同定

ハト  $\alpha$ 4GalT1/ $\alpha$ 4GalT2 の領域別キメラ体を用いた場合

ハト  $\alpha$ 4GalT1 の N 末端側から「細胞質領域」、「膜貫通領域」、「ステム領域」、「糖転移酵素-糖結合領域」、および「 $\alpha$ 4-糖転移酵素保存領域」の各領域の境界付近までをハト  $\alpha$ 4GalT2 の相同配列に置換したキメラ体を作製し、HeLa 細胞上の Gal $\alpha$ 1-4Gal の発現を調べた。その結果、N 末端

側から「細胞質領域」、「膜貫通領域」、「ステム領域」までを置換した場合は野生型と同様に糖脂質に対する活性が見られたが、N末端側から「糖転移酵素-糖結合領域」あるいはN末端側から「 $\alpha$ 4-糖転移酵素保存領域」にかけての領域までをハト  $\alpha$ 4GalT2 の配列に置換すると糖脂質に対する活性は著しく低下した。逆に、ハト  $\alpha$ 4GalT2 のN末端側から「細胞質領域」、「膜貫通領域」、「ステム領域」、「糖転移酵素-糖結合領域」、および「 $\alpha$ 4-糖転移酵素保存領域」の各領域の境界付近までをハト  $\alpha$ 4GalT1 の相同配列に置換すると、N末端側から「細胞質領域」、「膜貫通領域」、「ステム領域」までの置換では野生型と同様に糖タンパク質に対する活性が見られたが、N末端側から「糖転移酵素-糖結合領域」あるいはN末端側から「 $\alpha$ 4-糖転移酵素保存領域」にかけての領域までをハト  $\alpha$ 4GalT1 の配列に置換すると糖タンパク質に対する活性は著しく低下した。したがって、 $\alpha$ 4GalT の糖タンパク質/糖脂質の識別は「糖転移酵素-糖結合領域」から「 $\alpha$ 4-糖転移酵素保存領域」にかけての触媒部位が主に担っていると予想された。

しかし、「ステム領域」の置換の有無でも糖タンパク質/糖脂質に対する酵素活性が若干変化することから、この領域の配列も直接的あるいは間接的に基質の識別に関与している可能性は残された。

#### ハト $\alpha$ 4GalT1/ $\alpha$ 4GalT2 の触媒部位のキメラ体を用いた場合

触媒部位の配列において特に基質の識別に重要な配列を絞り込むために、触媒領域の一部分の配列のみをハト  $\alpha$ 4GalT1 からハト  $\alpha$ 4GalT2 に置換したキメラ体、あるいは逆にハト  $\alpha$ 4GalT2 からハト  $\alpha$ 4GalT1 に置換したキメラ体を作製した。その結果、ハト  $\alpha$ 4GalT1 上の「糖転移酵素-糖結合領域」のC末端側の配列と「 $\alpha$ 4-糖転移酵素保存領域」のC末端側の配列をハト  $\alpha$ 4GalT2 の配列に同時に置換すると糖タンパク質にも作用するように変化した。逆に、ハト  $\alpha$ 4GalT2 上の「糖転移酵素-糖結合領域」のC末端側の配列と「 $\alpha$ 4-糖転移酵素保存領域」のC末端側の配列をハト  $\alpha$ 4GalT1 の配列に置換すると糖脂質にも作用するように変化した。したがって、この部分の配列が基質の識別に重要であると考えられた。

#### ハト $\alpha$ 4GalT1 の変異体を用いた場合

ハト  $\alpha$ 4GalT1/ $\alpha$ 4GalT2 の糖タンパク質/糖脂質の識別に特に重要な部位は「糖転移酵素-糖結合領域」のC末端側と「 $\alpha$ 4-糖転移酵素保存領域」のC末端側に絞られたため、この部位のアミノ酸配列をヒト  $\alpha$ 4GalT の他、セキセイインコやアデリーペンギン由来の  $\alpha$ 4GalT1/ $\alpha$ 4GalT2 のアミノ酸配列と比較した。ハトと同様にセキセイインコやアデリーペンギンも糖タンパク質上に Gal $\alpha$ 1-4Gal を発現しており、またアミノ酸配列の相同性を考慮するとこれらの鳥類の  $\alpha$ 4GalT1/ $\alpha$ 4GalT2 もそれぞれ糖脂質/糖タンパク質を主に基質として作用することが予想された。そして、これらのアミノ酸配列を比較すると触媒領域において  $\alpha$ 4GalT1 間と  $\alpha$ 4GalT2 間でそれぞれよく保存されており、かつ  $\alpha$ 4GalT1 と  $\alpha$ 4GalT2 で異なるアミノ酸残基が複数存在していた。したがって、これらのアミノ酸残基のいずれかが糖タンパク質/糖脂質の識別に重要であると予想した。そこで、ハト  $\alpha$ 4GalT1 上のこれらのアミノ酸残基を一つずつあるいは同時にハト  $\alpha$ 4GalT2 上に存在するアミノ酸残基に置換して酵素活性を調べたところ、複数のアミノ酸残基を同時に置換した場合のみ基質特異性に変化が見られた。

#### (2) ヒト $\alpha$ 4GalT の基質特異性の改変

ヒト  $\alpha$ 4GalT のアミノ酸配列はハト  $\alpha$ 4GalT1 および  $\alpha$ 4GalT2 の配列とそれぞれ 65.5%および 57.9%の同一性がある。上記の(1)で示した通り、ハト  $\alpha$ 4GalT1 上の数力所のアミノ酸残基を  $\alpha$ 4GalT2 上の配列になるように置換すると糖タンパク質にも作用するように変化したことから、類似の変化をヒト  $\alpha$ 4GalT にも導入可能かどうか調べた。その結果、ハト  $\alpha$ 4GalT1 とほぼ同様の結果が得られた。したがって、この同時に変異を導入した部分がヒト  $\alpha$ 4GalT の基質の識別にも重要であると考えられる。

#### (3) ハトおよびヒト由来 $\alpha$ 4GalT の AlphaFold2 による立体構造予測

上記の(1)および(2)の結果を踏まえ AlphaFold2 を利用して、ハト  $\alpha$ 4GalT1、ハト  $\alpha$ 4GalT2、およびヒト  $\alpha$ 4GalT のアミノ酸配列に基づいた各酵素の立体構造予測を行った。その結果、これらの  $\alpha$ 4GalT の基質識別に重要と考えられるアミノ酸の位置が一次構造上は離れていても立体構造上は互いに近傍に存在しているという予想が示された。しかも、この領域は触媒領域の外側に面しており、外部に存在するアクセプター基質と直接相互作用できる位置にあると推測される。したがって、この立体構造的に隣接している領域の構造の違いが糖タンパク質/糖脂質との相互作用を規定している可能性がある。

#### (4) 今後の展望

本研究により、ヒトやハト由来の  $\alpha$ 4GalT が基質として糖タンパク質/糖脂質を識別する際に重要な部位を同定した。これまで国内外の研究で、糖転移酵素がアクセプター基質である複合糖質上の糖鎖以外の部位をどのように識別するのか調べられた例は限られており、本研究の成果は貴重な情報を提供するものと位置づけられる。また、 $\alpha$ 4GalT 以外の糖転移酵素でもどのように基質を識別するのか調べる際の手掛かりとなる。今後は、この部位が実際に基質である糖タン

パク質 / 糖脂質と直接相互作用するのか、あるいは酵素活性の調節に関わる制御分子との相互作用に影響するのか調べる必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ken Hanzawa, Miki Tanaka-Okamoto, Hiroko Murakami, Noriko Suzuki, Mikio Mukai, Hidenori Takahashi, Takeshi Omori, Kenji Ikezawa, Kazuyoshi Ohkawa, Masayuki Ohue, Shunji Natsuka, Yasuhide Miyamoto	4. 巻 17
2. 論文標題 Increased levels of acidic free-N-glycans, including multi-antennary and fucosylated structures, in the urine of cancer patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0266927	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Noriko	4. 巻 1
2. 論文標題 Tissue N Glycan Analysis Using LC MS, MS/MS, and MSn	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Protocols	6. 最初と最後の頁 e200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpz1.200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Noriko, Abe Tatsuya, Natsuka Shunji	4. 巻 12
2. 論文標題 Structural analysis of N-glycans in chicken trachea and lung reveals potential receptors of chicken influenza viruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05961-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Kanta, Suzuki Noriko, Tanida Isei, Kakuta Soichiro, Furuta Yoko, Uchiyama Yasuo, Hanada Kentaro, Suzuki Yusuke, Yamaji Toshiyuki	4. 巻 295
2. 論文標題 Blood group P1 antigen-bearing glycoproteins are functional but less efficient receptors of Shiga toxin than conventional glycolipid-based receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9490 ~ 9501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Tatsuya, Kameyama Akihiko, Natsuka Shunji, Suzuki Noriko	4. 巻 606
2. 論文標題 Sequential modifications of glycans by linkage-specific alkylamidation of sialic acids and permethylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113861 ~ 113861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.113861	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Noriko, Abe Tatsuya, Hanzawa Ken, Natsuka Shunji	4. 巻 11
2. 論文標題 Toward robust N-glycomics of various tissue samples that may contain glycans with unknown or unexpected structures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84668-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Noriko Suzuki
2. 発表標題 N-Glycan structures of chicken trachea, lung, and colon
3. 学会等名 Sialoglyco2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木詔子
2. 発表標題 二ワトリ組織の糖鎖構造解析
3. 学会等名 日本糖質学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木詔子
2. 発表標題 欲張りなN-グリコミクス
3. 学会等名 日本糖質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本貴太、鈴木詔子、谷田以誠、角田宗一郎、古田陽子、内山安男、花田賢太郎、鈴木佑典、山地俊之
2. 発表標題 P1糖鎖エピトープを有する糖タンパク質の志賀毒素受容体としての機能解析
3. 学会等名 日本糖質学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Noriko Suzuki
2. 発表標題 Gain and Loss of 4-Galactosyltransferase-like Genes in the Course of Vertebrate Evolution
3. 学会等名 Glyco26 (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------