

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：24770134

研究課題名(和文)小胞体内腔における遊離糖鎖生成機構の解明

研究課題名(英文) Generation mechanism of free oligosaccharides in the lumen of the endoplasmic reticulum

研究代表者

原田 陽一郎 (Harada, Yoichiro)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・特別研究員

研究者番号：80464147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小胞体内腔において、糖鎖の代謝に関わる酵素の同定に成功した。N型糖鎖修飾はタンパク質の翻訳後修飾の一つで、タンパク質の立体構造の形成や分解などを調節する役割を持つ。N型糖鎖修飾を行う酵素はオリゴ糖転移酵素(OST)と呼ばれ、ドリコール結合型糖鎖(DLOs)をタンパク質中の特定のアスパラギン残基に転移する。本研究では、出芽酵母および哺乳動物細胞を用いて、OSTがDLOsを加水分解する活性を持つことを証明した。本活性は、30年以上前から知られていたが、原因酵素とその生理機能は不明のままであった。本研究によって、この新たな糖鎖の代謝機構の生理機能の解明に向けた分子基盤が確立された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I identified an enzyme involved in the metabolism of glycans in the lumen of the endoplasmic reticulum. Asparagine (N)-linked glycosylation is one of the posttranslational modifications, which modulates protein folding and degradation. The enzyme that mediates N-glycosylation is called oligosaccharyltransferase (OST). This enzyme transfers dolichol-linked oligosaccharides (DLOs) onto the specific asparagine residue of proteins. This study uncovered that OST also mediates a hydrolysis of DLOs in budding yeast and mammalian cells. This enzymatic activity has been known for over 30 years, but the responsible enzyme and its biological function were unknown. This study established the molecular basis of the DLO degradation, and opens a new avenue for understanding the biological functions of this novel glycan metabolic pathway.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、機能生物学

キーワード：糖鎖代謝 オリゴ糖転移酵素 ドリコール結合型糖鎖

1. 研究開始当初の背景

アスパラギン残基の糖鎖修飾(N型糖鎖修飾)は、タンパク質の物性や機能を調節する重要な役割を持つ。古くから、N型糖鎖修飾中に遊離型の糖鎖(遊離糖鎖)が生成することが知られていた。これまでの研究から、遊離糖鎖は、N型糖鎖の供与体基質であるドリコール結合型糖鎖の加水分解、または変成糖タンパク質からの脱糖鎖反応によって生成することが知られている。脱糖鎖反応を触媒する酵素は細胞質 peptide:N-glycanase (PNGase)である。さらに、近年、細胞質 endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase)も類似した脱糖鎖反応を触媒することが示唆されている。一方、ドリコール結合型糖鎖の加水分解を触媒する酵素は、N型糖鎖修飾を触媒するオリゴ糖転移酵素(OST)であることが示唆されていたが、実験的な証明はなされていなかった。その理由は、(1)オリゴ糖転移酵素は複数の膜タンパク質から構成される酵素複合体で、生化学的にOSTを単離、精製することが非常に困難であったため、精製酵素を用いた各紙分解活性の検証を行うことが困難であったこと、および(2)生細胞内において、ドリコール結合型糖鎖または変成糖タンパク質に由来する遊離糖鎖の分解経路は共通しており、検出される遊離糖鎖の由来を同定するのが困難であったため、*in vivo*における酵素の同定が困難であった。(1)の問題は、研究代表者(原田)が留学先の研究室(Stony Brook University, NY, USA)で出芽酵母を用いてOSTを精製する手法を獲得しており、この精製酵素を用いて*in vitro*におけるドリコール結合型糖鎖の加水分解活性を検証することが可能になった。(2)の問題を解決するために、研究代表者(原田)の所属する研究室では、PNGaseとENGaseの遺伝子を欠損したマウスを作出し、それらの胎児線維芽細胞(MEF)を調製した。このMEF内で検出される遊離糖鎖はドリコール結合型糖鎖由来であるため、*in vivo*におけるOSTの加水分解活性の検証を実施することが出来ると考えた。

2. 研究の目的

小胞体内腔における遊離糖鎖生成機構の解明を目的とする。 哺乳動物細胞は小胞体内腔において糖タンパク質を合成するとともに、遊離型の糖鎖(遊離糖鎖)を生成する。オリゴ糖転移酵素は糖タンパク質の合成において中心的な役割を果たす。興味深いことに、試験管内においてオリゴ糖転移酵素が遊離糖鎖を生成する活性を持つ可能性が示されている。これまで、オリゴ糖転移酵素の遊離糖鎖生成活性を培養細胞レベルで検証することは技術的に不可能であった。しかし、私はこの問題を解決することに成功した。この技術革新を受け、本研究では生細胞レベルでオリゴ糖転移酵素が遊離糖鎖生成活性を持つか否かを検証する。さらに、小胞体内腔で遊

離糖鎖が生成することの生理学的役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)ドリコールピロリン酸結合型糖鎖から遊離糖鎖を生成する酵素の同定。1.RNAi法を用いてオリゴ糖転移酵素の遊離糖鎖生成活性を検証する。2.精製されたオリゴ糖転移酵素とドリコールピロリン酸結合型糖鎖を用いて遊離糖鎖生成反応を再構成し、酵素学的解析を行う。

(2)細胞に供給されるグルコース量が、ドリコールピロリン酸結合型糖鎖の合成、糖タンパク質の合成およびドリコールピロリン酸結合型糖鎖からの遊離糖鎖の生成に及ぼす影響の解析。

4. 研究成果

(1)RNAi法を用いた *Stt3A* および *Stt3B* のノックダウンによるOSTの遊離糖鎖生成活性の検証 PNGaseとENGaseを欠損したMEFに、レンチウイルスを用いてmouse *Stt3A*または*Stt3B*特異的な5種類のshort hairpin (sh) RNAを導入した。shRNAをコードするプラスミドはピューロマイシン耐性遺伝子(*puro'*)を持つため、ピューロマイシンを用いて感染細胞を選択した結果、感染率は90%程度であった。感染後、3週間、ピューロマイシン処理による細胞の選択を行った。その後、総RNAを調製し、逆転写後、定量的PCRで*Stt3A*および*Stt3B*遺伝子の発現レベルを定量した。コントロールとして*GAPDH*遺伝子を用いた。その結果、それぞれの5種類のshRNAのうち、2種類が40-50%の遺伝子抑制効果を示したが、遊離糖鎖の量に変化は無かった。次に、遺伝子発現抑制効果が見られたshRNAを用いて、一過的なshRNAの発現による遺伝子抑制を検討したが、*Stt3A*および*Stt3B*のいずれの遺伝子の発現も抑制されなかった。これらの結果から、本shRNAを用いたOSTの遊離糖鎖生成活性の検証は不可能であると判断した。そこで、遺伝子操作が容易である出芽酵母を用いて検証を行うことにした。

(2)出芽酵母を用いたOSTの遊離糖鎖生成活性の検証(雑誌論文) PNGase(PNG1)と遊離糖鎖の分解に関わる α -マンノシダーゼ(*AMS1*)を欠損した出芽酵母変異株(出芽酵母のゲノムには、ENGaseは存在しない)において、遊離糖鎖が生成されることを突き止めた。この遊離糖鎖がOSTによって生成されるかどうかを検証した。出芽酵母のOSTは8つの膜タンパク質から構成される複合体酵素で、それぞれのタンパク質は*STT3*(触媒サブユニット)を含む5つの必須遺伝子(*STT3*, *WBP1*, *SWP1*, *OST1*, *OST2*)と3つの非必須遺伝子(*OST4*, *OST5*および*OST3*または*OST6*)によってコードされる。非必須遺伝子は、出芽酵母の生育には必要ないが、OSTが最大活

性を示すのに必要である。従って、OST サブユニットのうち、非必須遺伝子を欠損させた *ams1Δ png1Δ* 変異株において、遊離糖鎖の生成が減少するかどうかを調べた。非必須遺伝子のうち、酵母の生育にほとんど影響を与えない *OST3*, *OST5* および *OST6* のそれぞれを、*ams1Δ png1Δ* 変異株で欠損させたところ、*ost3Δ ams1Δ png1Δ* 変異株および *ost5Δ ams1Δ png1Δ* 変異株において、遊離糖鎖の量が *ams1Δ png1Δ* 変異株に比べてそれぞれ 90%と 50%減少した。*OST3* のパラログである *OST6* は、タンパク質の発現量が低いことが知られており、遊離糖鎖の量の変化が検出できなかったと考えられる。この結果から、OST の活性と、遊離糖鎖の生成活性が相関することが明らかとなった。

次に、遊離糖鎖は、糖鎖供与体基質が分解されることによって生成されるかどうかを調べた。出芽酵母 OST は、 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dolichol}$ を最適な基質として *N* 型糖鎖修飾反応を行うが、短い糖鎖を持つ $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dolichol}$ を効率的に利用することができない。そこで、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dolichol}$ が蓄積する *alg6Δ ams1Δ png1Δ* 変異株を用いて遊離糖鎖の定量を行ったところ、遊離糖鎖が 90%程度減少した。このことから、遊離糖鎖は、OST が糖鎖供与体基質を分解することによって生成することが示唆された。

次に、触媒サブユニット *Stt3* が遊離糖鎖生成活性を持つかどうかを調べるために、*Leishmania major* 由来の *Stt3* を用いた。*L. major* は、出芽酵母や哺乳動物と異なり、*Stt3* のみを OST サブユニットとして持ち、出芽酵母に発現させても他の出芽酵母由来 OST サブユニットとは複合体を形成せず、*Stt3* 単独で活性を示すことが知られている。さらに、*L. major* *Stt3* は短い糖鎖を持つ $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dolichol}$ を効率的に利用することができる。そこで、*L. major* *STT3D* アイソフォーム (4 つ存在するアイソフォームのうち、*Stt3D* が出芽酵母内で最も活性が高い) を *alg6Δ ams1Δ png1Δ* 変異株に過剰発現させたところ、遊離糖鎖が生成されることが分かった。このことから、OST の触媒サブユニットである *Stt3* が遊離糖鎖の生成に関与することが明らかとなった。

最後に、精製 OST による遊離糖鎖生成反応の再構成を行った。出芽酵母ゲノムの *OST4* locus に FLAG タグを導入し、OST 複合体を免疫沈降法によって調製した。この精製酵素と出芽酵母から抽出した糖鎖供与体基質と混合し、反応後、遊離糖鎖の解析を行った。その結果、酵素と供与体基質の両者が存在するときだけ遊離糖鎖が生成することが明らかとなった。さらに、OST の受容体基質ペプチドを用いた研究から、遊離糖鎖の生成は、OST の *N* 型糖鎖修飾反応と競合することが示された。

これら全ての結果から、出芽酵母において

OST は遊離糖鎖生成活性を示すところが明らかとなった。

(3) セミンタクト細胞を用いた哺乳動物 OST の遊離糖鎖生成活性の検証 (投稿準備中)

出芽酵母では OST が遊離糖鎖生成活性を持つことが明らかとなったが、哺乳動物 OST も同様の活性を示すかどうかを、セミンタクト細胞を用いて検証した。*PNGase* と *ENGase* を欠損した MEF を 0.025% のジギトニンで処理し、細胞小器官を破壊すること無く、細胞膜に孔をあけ、セミンタクト細胞を調製することに成功した。次に、緩衝液を用いてセミンタクト細胞から細胞質成分を洗い流し、残った膜画分を酵素と基質源とし、37 °C で反応させた。反応液から遊離糖鎖画分を調製し、解析したところ、経時的に遊離糖鎖が生成することが明らかとなった。反応中に、OST の受容体基質ペプチドを共在させると、遊離糖鎖の生成が抑制されたことから、哺乳動物細胞においても OST が遊離糖鎖生成活性を持つことが強く示唆された。

(4) 哺乳動物細胞の培地中のグルコース濃度が遊離糖鎖の生成に及ぼす影響 (雑誌論文)

OST の糖鎖供与体基質であるドリコール結合型糖鎖は、グルコースを主な炭素源として合成される。そこで、MEF を培養する培地中のグルコース濃度によって、OST が生成する遊離糖鎖の量が調節されるかどうかを調べた。すなわち、グルコース量が低い場合、ドリコール結合型糖鎖の量が減少し、それに伴って生成される遊離糖鎖の量が減少すると予想される。しかし、グルコース量を通常 5 mM から 0.5 mM に減少させても定常状態における遊離糖鎖の量は変化しなかった。一方、この低グルコース培養条件において、リン酸化された糖鎖 (リン酸化糖鎖) が細胞質に顕著に蓄積することを発見した。リン酸化糖鎖の構造解析から、低グルコース培養条件では、合成途中のドリコール結合型糖鎖が未同定のピロフォスファターゼによって分解を受け、リン酸化糖鎖が生成することが判明した。この分解反応は、ドリコール結合型糖鎖の合成に必須な糖供与体基質の 1 つである GDP-マンノースの量によって制御されることが明らかとなった。GDP-マンノースは、グルコースを主な炭素源として合成される。以上のことから、細胞が利用できるグルコースが減少すると、GDP-マンノースの量が減少し、ドリコール結合型糖鎖の合成が GDP-マンノースが関与する段階で停止する。その結果生成したドリコール結合型糖鎖の合成中間体が未知のピロフォスファターゼによって分解されることが示唆された。

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)

〔雑誌論文〕(計 2件)

Harada Y, Nakajima K, Masahara-Negishi Y, Freeze HH, Angata T, Taniguchi N, Suzuki T. (2013) Metabolically programmed quality control system for dolichol-linked oligosaccharides. Proc Natl Acad Sci U S A. **110**:19366-19371. doi: 10.1073/pnas.1312187110. 査読あり

Harada Y, Buser R, Ngwa EM, Hirayama H, Aebi M, Suzuki T. (2013) Eukaryotic oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation. J Biol Chem. **288**:32673-32684. doi: 10.1074/jbc.M113.486985. 査読あり

〔学会発表〕(計 4件)

原田陽一郎、中嶋和紀、根岸由紀、安形高志、谷口直之、鈴木匡 ドリコールオリゴ糖の品質管理機構の同定 第86回日本生化学会(2013, 9/11-9/13、横浜、パシフィコ横浜)

原田陽一郎、中嶋和紀、根岸由紀、安形高志、谷口直之、鈴木匡 ドリコールオリゴ糖の品質管理機構 第32回日本糖質学会(2013, 8/5-8/7、大阪、大阪国際交流センター)

Yoichiro Harada The generation of free oligosaccharides in eukaryotes The 3rd Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology(2013, 7/1-7/3、埼玉、理研) 招待講演

Yoichiro Harada and Tadashi Suzuki Yeast oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation The Second Symposium RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology(2013, 4/16-4/17、埼玉、理研)

〔図書〕(計 1件)

Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T. (Eds.) (2014) Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (Springer), In press.

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 陽一郎 (HARADA, Yoichiro)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・特別研究員

研究者番号：80464147

(2)研究分担者

なし。