

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650041

研究課題名(和文) 特定糖タンパク質の可視化による "フコシル化タンパク質特異的極性輸送" 仮説の検証

研究課題名(英文) Validation of hypothesis for "fucose-dependent polarized transport system" by visualizing specific glycoforms of glycoproteins

研究代表者

鈴木 匡 (Suzuki, Tadashi)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90345265

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)：我々は、最近目的の糖タンパク質のうち、特定の糖を持つタンパク質のみを可視化する新技術の開発に成功した。そこで本研究では、この新技術を利用してフコースという単糖の修飾に依存的な極性輸送のメカニズム解明を目指した。基質となるアルファ-フェトプロテイン(AFP)の発現系を確立し、また肝細胞由来のHepG2細胞で極性輸送をモニターできることを確認したものの、アジド修飾糖の細胞への取り込みに問題があり、AFPの極性輸送のアッセイを確立するにはいたらなかった。今後この実験系がうまく動くためにはtransfectionの効率の向上、または修飾糖の取り込み効率の増加に工夫が必要である。

研究成果の概要(英文)：Previously we have established a novel method for visualization of glycoforms of specific glycoforms of a protein of interest. This research proposal aimed to clarify the molecular mechanism of fucose-dependent polarized transport of alpha-fetoprotein (AFP) in hepatocytes by utilizing the new technique we developed. While we could successfully establish the expression system of AFP in hepatocyte-derived HepG2 cells, we had difficulty to find a conditions to allow cells to incorporate azide-modified fucose in cells. In the future, we need to establish (1) more efficient transfection method for AFP and (2) improvement of incorporation efficiency for azide-fucose into HepG2 cells to establish the assay method for polarized transport of AFP.

研究分野：生物学

キーワード：AFP 糖鎖 アピカル 極性輸送 フコース イメージング

1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾は真核細胞のタンパク質にとって最も主要な翻訳後修飾機構のひとつであり、様々な疾病において糖鎖構造の違いがタンパク質の機能や安定性の変化をもたらしている例はこれまで数多く報告されている。それゆえ、特定の糖鎖構造をもつタンパク質の動態解析は、糖鎖依存的に引き起こされる生命現象の詳細を解明する上で非常に重要である。たとえばこれまで糖タンパク質がその糖鎖の成分である“フコース”と呼ばれる単糖に依存したタンパク質の極性輸送機構の存在が様々な状況証拠から示唆されているものの、その分子機構はまったく不明である。

2. 研究の目的

これまでわれわれは目的の糖タンパク質のうち、シアル酸やフコースなど、特定の糖鎖を持つタンパク質(“グリコフォーム”)のみを可視化する技術を開発した。そこでこの技術を用いて、フコース依存的な極性輸送の分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではまずタンパク質の極性輸送のアッセイ系のモデルタンパク質として、フコース依存的な極性輸送が示唆されている - フェトプロテイン(AFP)に GFP を結合させたタンパク質の発現系の確立を目指した。極性輸送のアッセイについてはヒト肝がん細胞由来の HepG2 を用いて検討を行った。

4. 研究成果

AFP は分子中に N 型糖鎖の付加可能部位が一箇所 (Asn251) だけ存在するが、その Asn を Gln に変えた変異体 (N251Q) を含め、コンストラクトの作成に成功した。AFP-GFP は細胞に発現した。予想通り野生型には N 型糖鎖の付加が確認されたが、その糖鎖は酵素的な切断に抵抗性を示した(図 1、レーン 3/4)。興味深いことに、AFP-GFP が培養中に分泌する際には野生型、N251Q 変異体ともに分子量の増加が認められた(図 1、レーン 5-8)。この分子量の違いはタンパク質修飾によるものと思われるが、その詳細は不明である。

また、HepG2 細胞については既報通り毛細胆管様構造が出来ることを確認し、極性輸送のいいモデル系となることが確認できた。そこでこの細胞を用いて Glycoform からのシグナルと思われる FRET シグナルの検出を試みたが、発現効率が思いのほか悪く、特異的なシグナルの検出には至らなかった。発現効率の悪さは細胞を変えても同様であった一方、別のタンパク質の発現ではそのような傾向は見られなかったので、AFP-GFP タンパク質自身の問題であると考えられる。今後この実験系を動かすには、発現効率の向上が喫緊の課題であり、そのためにはコンストラクトの抜本的な見直しも視野に入れる必要がある。

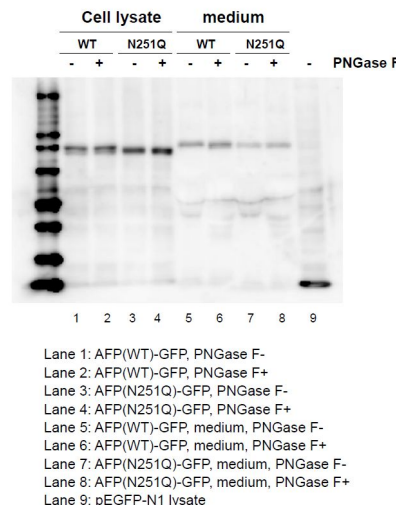


図 1 AFP-GFP および糖鎖なし変異体の Western Blotting による発現確認

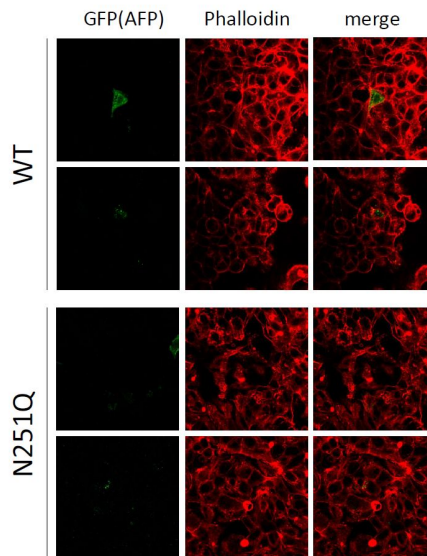


図 2 HepG2 細胞における AFP-GFP および糖鎖なし変異体の細胞染色 AFP の発現効率が非常に低いことが分かる

また、Alk-Fuc の取り込みが非常に低いことも FRET の検出を難しくしている。Fuc はサルベージ回路があまり働いていないことがよく知られており、GDP-Fuc の de novo 生合成経路を抑えた細胞を用いるなど、取り込み効率の向上に工夫が必要である。

本研究の当初の目的ではなかったものの、本研究によって(1) AFP 上の糖鎖が非常に PNGase F 消化に抵抗性を見せた、(2) 分泌される AFP には N 型糖鎖以外の翻訳後修飾が観察された、など、予想外の新たな知見を得ることも出来た。今後詳しく解析されるべき現象であると思われる。

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2件)

1. Yoshimi Haga and Tadashi Suzuki (2014) Use of transmembrane FRET to investigate the internalization of glycosylated proteins. *Methods in Molecular Biology* **1174**, 225-230.(査読有)
2. 芳賀 淑美、鈴木 匡 (2014) 特定の糖鎖構造をもつ標的タンパク質の蛍光イメージングと細胞内動態解析 **化学と生物** **52**, 100-105. (査読無)

[学会発表](計9件)

1. Yoshimi Haga, Kumiko Ishii, Kayo Hibino, Yasushi Sako, Yukishige Ito, Naoyuki Taniguchi and Tadashi Suzuki Glycoform imaging: use of transmembrane FRET to investigate the internalization of glycosylated proteins. *Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research* at Honolulu (HI), USA 2014年11月17日
2. Yoshimi Haga, Kumiko Ishii, Kayo Hibino, Yasushi Sako, Yukishige Ito, Naoyuki Taniguchi and Tadashi Suzuki Glycoform imaging: use of transmembrane FRET to investigate the internalization of glycosylated proteins. *2014 SFG & JSCR Joint Meeting Satellite Symposium II Glycans in Neuroscience* at Honolulu (HI), USA 2014年11月16日
3. 芳賀 淑美、石井 久美子、日比野 佳代、佐甲 靖志、伊藤 幸成、谷口 直之、鈴木 匡 特定の糖鎖構造を持つ標的タンパク質の蛍光イメージングと細胞内動態解析 第86回日本生化学会大会パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)2013年9月12日(ポスター); 13日(口頭)
4. 芳賀 淑美、石井 久美子、日比野 佳代、佐甲 靖志、伊藤 幸成、谷口 直之、鈴木 匡 標的タンパク質の糖鎖修飾蛍光イメージングと細胞内動態解析 第32回日本糖質学会年会 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)2013年8月6日(第16回日本糖質学会ポスター賞受賞:芳賀 淑美)
5. Yoshimi Haga, Kumiko Ishii, Kayo Hibino, Yasushi Sako, Yukishige Ito, Naoyuki Taniguchi and Tadashi Suzuki Imaging of

glycoforms as a sweet tool to visualize the dynamics of specific glycoproteins. *The 3rd Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology* 理化学研究所(埼玉県・和光市)2013年7月2日

6. Tadashi Suzuki Exploring the "life" of N-glycans on glycoproteins. *22nd International Symposium on Glycoconjugates* at Dalian (China) 2013年6月28日 (Oral presentation)
7. 鈴木 匡 糖鎖の一生を追いかける(招待講演) 第5回岡山大&理研ジョイントシンポジウム 最先端計測技術のトレンド 岡山大学(岡山県・岡山市)2013年6月24日
8. Yoshimi Haga, Kumiko Ishii, Kayo Hibino, Yasushi Sako, Yukishige Ito, Naoyuki Taniguchi, and Tadashi Suzuki Imaging of glycoforms as a sweet tool to visualize the dynamics of specific glycoproteins. *RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Glycobiology The Second Symposium* 理化学研究所(埼玉県・和光市)2013年4月16日
9. Tadashi Suzuki Exploring the "life" of glycans. (Invited Lecture) *RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Glycobiology The Second Symposium* 理化学研究所(埼玉県・和光市)2013年4月16日

[図書](計3件)

1. 鈴木 匡 糖鎖の蛍光イメージング 糖鎖の新機能開発応用ハンドブック(秋吉一成 監修)NTS出版 印刷中
2. Yoshimi Haga and Tadashi Suzuki Glycoform Imaging. In *Glycoscience: Biology and Medicine*. (N. Taniguchi, T. Endo, G. W. Hart, P. Seeberger, and C.-H. Wong eds) pp491-494. Springer 2014
3. 芳賀 淑美、鈴木 匡 FRETを使った特定糖タンパク質の可視化第三の生命鎖研究の最前線 糖鎖の機能・作動原理と疾患 実験医学(門松 健治、遠藤 玉夫、岡 昌吾、北川 裕之 編集) pp186-191 実験医学(羊土社)2013

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/grc/riken_max_planck/sys_glycobiol/glycometabolome/

6. 研究組織

(1) 研究代表

鈴木 匡 理化学研究所 糖鎖代謝学研究
チーム チームリーダー

研究者番号：90345265

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

芳賀 淑美 理化学研究所 糖鎖代謝学研究
チーム 特別研究員（現所属 東京大学大
学院 特別研究員）

研究者番号： 40525789