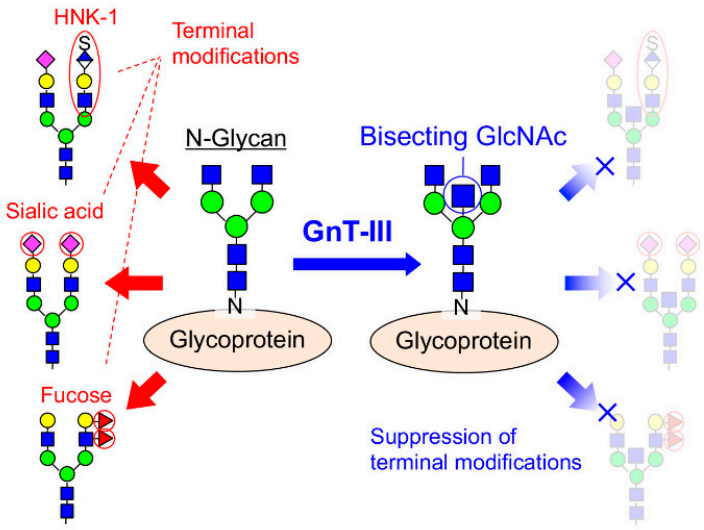
130　バイセクト糖鎖の選択的発現機構と作動原理の解明	木塚　康彦

【目的】本研究では、「神経系の糖鎖」に着目し、その発現制御機構と作動原理の解明を目的とする。特に、我々の研究によりアルツハイマー病発症を促進させることが見出された「バイセクト糖鎖」に焦点を絞り、いまだ不明であるバイセクト糖鎖の発現制御メカニズムと作動原理を明らかにする。具体的には、本糖鎖がどのように限られたタンパク質に発現するのか、そしてその発現が疾患でどのように破綻するのか、また本糖鎖が物理的にどう働いているのか、という未解決の基本的な問に対する答えを探す。これにより、アルツハイマー病の病態形成メカニズムの解明や新規治療薬の開発へ貢献し、基礎科学・医学の発展に資する基礎研究を目指す。

【方法】バイセクト糖鎖合成酵素 GnT-Ⅲや神経系の糖鎖制御因子であるアルギニンメチル化酵素 PRMT1 の遺伝子欠損マウスの脳を対象とし、グライコミクス解析、糖転移酵素の活性測定、遺伝子発現解析、プロテオミクス解析等を行った。

【結果】バイセクト糖鎖の生理機能を明らかにするため、GnT-Ⅲ欠損マウスの脳のグライコミクス解析を行ったところ、ルイス型フコース、シアル酸、HNK-1 抗原など、N 型糖鎖の末端構造がおしなべて増加していることがわかった。このメカニズムを詳細に解析した結果、これらの糖鎖末端構造を合成する酵素は、バイセクト型の糖鎖構造に対して親和性が低く、非バイセクト型の糖鎖に比べて低い活性しか示さないことがわかった。このメカニズムを調べるために MD 計算を行ったところ、N 型糖鎖がバイセクト型になると、糖鎖全体のコンフォメーションが変化して、修飾酵素との相互作用が失われて親和性が低下することが推定された。このことから、バイセクト糖鎖は N 型糖鎖の末端修飾全体の生合成を抑制する働きがあると考えられる（下図）。また、生理的な条件の脳でバイセクト糖鎖が付加されているタンパク質を同定するため、野生型と GnT-Ⅲ欠損マウスの糖タンパク質をトリプシンで消化し、バイセクト糖鎖を認識する E4-PHA レクチンで濃縮した糖ペプチドをプロテオミクス解析した。その結果、バイセクト糖鎖が付加されている 32 の N 型糖鎖付加部位を同定した。それらの N 型糖鎖付加部位周辺には特徴的なモチーフは見出されなかったことから、GnT-Ⅲは立体構造や局在制御など、異なるメカニズムで基質タンパク質を選別していると考えられた。さらに、神経の糖鎖の発現を小脳特異的に抑制する因子として、アルギニンメチル化酵素 PRMT1 を新規に同定した。これまでアルギニンのメチル化と糖鎖修飾の関連性は報告がないことから、小脳における新たな糖鎖発現制御機構の存在が示唆された。

バイセクト糖鎖はN型糖鎖の末端構造の修飾を抑制する生理機能を持つ



130. バイセクト糖鎖の選択的発現機構と作動原理の解明

木塚　康彦

岐阜大学 研究推進社会連携機構 生命の鎖統合研究センター

Key words : バイセクト糖鎖，糖転移酵素，糖鎖生物学，神経系，GnT-Ⅲ

緒　言

哺乳動物の半数以上のタンパク質は糖鎖を持っている。この最も豊富な翻訳後修飾である糖鎖付加が、発生・免疫・神経機能など、生体の基礎をなす生命現象に深く関わることは想像に難くない。また、それぞれの糖鎖の発現は、細胞ごと、タンパク質ごとに厳密に制御され、各糖鎖の付加異常はがん・アルツハイマー病（AD）・糖尿病などの疾患発症に関わることが知られている［1，2］。これらのことから、糖鎖の発現機構と機能を理解し、それを医療応用することは、現代生物学が解決すべき重要な課題の一つである。

我々はこれまで一貫して、神経系における糖鎖の発現と機能に関する研究を続けてきた。神経系は他の組織には見られない特徴的な機能糖鎖を発現しており、それらは記憶・学習や神経ネットワーク形成などの高次機能に必須である　［3］。我々は、こうした神経系糖鎖の発現が様々なレベルで厳密に制御されていることを見出してきた。例えば糖鎖合成酵素遺伝子の転写、合成酵素の局在、合成酵素の複合体形成などである。また最近では、これらの糖鎖の発現を制御する化合物の開発も行っている。さらに疾患との関連性において、「バイセクト糖鎖」と呼ばれる糖鎖を欠損させると、アルツハイマー病（AD）の原因となるAβペプチドの産生が劇的に抑制され、AD 病態が大幅に改善されることを見出した［4～6］。そしてこの原因が、Aβペプチドを産生するBACE1 プロテアーゼの機能抑制であり、BACE1 が選択的にバイセクト糖鎖を持つ糖タンパク質であること、AD 患者でBACE1 上のバイセクト糖鎖の発現量が上昇していることも明らかにした。これらの事実は、バイセクト糖鎖が神経変性に促進的に働く糖鎖であり、バイセクト糖鎖生合成酵素 GnT-Ⅲが AD の新規治療ターゲットとなりうることを示している。一方で、このバイセクト糖鎖の発現制御機構や、物理的な機能についてはまだよくわかっていない。そこで本研究ではこのバイセクト糖鎖に着目し、その選択的発現と作動原理の解明に迫ることを目的とした。

方　法

1.　遺伝子欠損（KO）マウスの作製と脳膜画分の調製

GnT-Ⅲ（*Mgat3*）KO マウスは過去に作製されたもの（Priatel et al., Glycobiology, 1997, 7, 45-56）を実験に使用した。マウスはUCSD のJamey Marth 博士から御供与いただいた。神経特異的なPRMT1（*Prmt1*）KO マウスは過去に作製されたもの（Hashimoto et al., J. Biol. Chem., 2016, 291, 2237-2245）を使用した。マウス脳を摘出後、7 倍 volume の TBS（プロテアーゼインヒビターを含む）でホモジナイズし、100,000×g、4℃で 30 分間遠心することにより膜画分を得、次の実験に使用した。

2.　質量分析による糖鎖構造解析

マウス脳膜画分から 8 M 尿素を含むバッファーでタンパク質を抽出し、PVDF 膜にスポットした。N 型糖鎖をPNGaseF により遊離させ、還元末端を TMT6 で標識した。標識後の N 型糖鎖を LC-ESI-MS/MS（Orbitrap、ThermoFisher）で分析し、糖鎖構造と単糖組成をGlycoMod software で推定した。

3.　細胞培養と遺伝子導入

Neuro2A、COS7、HEK293 などの培養細胞は 10%FBS を含む DMEM で培養した。Dish に播種した翌日、50～80%コンフルエントの細胞に対して Lipofectamine3000 を用いてプラスミドを導入した。Transfection 後、

48 時間で細胞を回収し、タンパク質、遺伝子解析を行った。

4. 糖転移酵素の活性測定

精製した酵素あるいは抽出液（脳もしくは細胞）を、2-アミノピリジンで蛍光標識した N 型糖鎖（GnGnbi-PA、GGnGGnbi-PA）および糖ドナー基質と 125 mM MES pH6.2 バッファー（10 mM $MnCl_2$、0.2 M GlcNAc、0.5% Triton X-100、1 mg/ml BSA）中、37℃で混合することで糖を転移させた。95℃で 3 分間インキュベートすることで反応を停止させ、純水で希釈後に 20,000×g、4℃、10 分遠心し、上清を逆相 HPLC（ODS カラム）で分離分析した。

5. 電気泳動、ウエスタンブロット、レクチンブロット

タンパク質を Laemmli sample buffer 中で 95℃、5 分間インキュベートし、5～20% SDS-PAGE により分離した。分離後のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、ウエスタンブロットもしくはレクチンブロットを行った。ウエスタンブロットでは 5% スキムミルク／TBS-T でブロッキングと抗体希釈を行い、HRP 標識された二次抗体を反応させた。レクチンブロットは、TBS-T でブロッキングとレクチン希釈を行なった。ビオチン標識レクチンを反応させたのち、HRP 標識されたストレプトアビジンを反応させた。HRP の化学発光を Fusion SOLO.7S にて検出した。

6. mRNA 発現解析（realtime PCR）

組織もしくは細胞から total RNA を TRI Reagent を用い、付属プロトコルに従って抽出した。得られた total RNA 1 μg を、superscript Ⅳ First Strand Synthesis System により逆転写した。逆転写後の cDNA を、ABI 社の TaqMan probe primer mix および TaqMan Gene Expression Master Mix と混合し、CFX Connect（バイオラッド）を用いて DNA 増幅と定量解析を行った。

結　果

1. バイセクト糖鎖は N 型糖鎖の末端修飾を抑制する

いまだ明らかになっていないバイセクト糖鎖の生理機能を明らかにするため、バイセクト糖鎖生合成酵素である GnT-Ⅲ（*Mgat3* 遺伝子によりコード）を欠損した KO マウスの N 型糖鎖の構造解析を LC-MS/MS を用いて行った。組織は *Mgat3* の mRNA 発現が最も高い脳を対象とした。その結果、N 型糖鎖の末端に存在するルイス型フコース、シアル酸、HNK-1 抗原など、糖鎖末端エピトープの発現が KO マウスでおしなべて増加していることがわかった[7]。このメカニズムを明らかにするため、糖鎖末端エピトープの生合成に関わる各種糖転移酵素の mRNA 発現、酵素活性測定などを行ったところ、これらの酵素は共通して、バイセクト型糖鎖より非バイセクト型糖鎖に対して高い活性を有することがわかった（図 1）。さらに、これらの酵素の X 線結晶構造とバイセクト糖鎖の構造ドッキングモデルの MD 計算の結果から、N 型糖鎖がバイセクト型になると conformation が大きく変わり、alpha1、6 側のアームが根元側へ大きくシフトすることがわかった。これにより、末端を修飾する酵素との親和性が低下すると考えられた。以上の結果から、バイセクト型の糖鎖は、糖鎖全体の conformation を変えることで、糖鎖末端の修飾を抑制する生理機能を持つことがわかった。以上の成果は Mol. Cell. Proteomics 誌に掲載された。

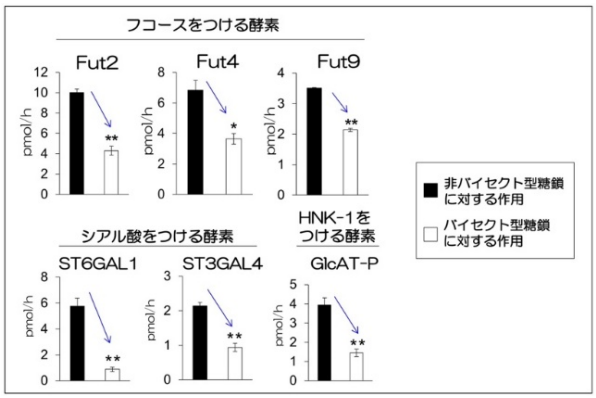


図1. バイセクト糖鎖および非バイセクト糖鎖に対する糖鎖末端修飾酵素の作用
N 型糖鎖の末端に作用するフコース転移酵素（FUT2、4、9）、シアル酸転移酵素（ST6GAL1、ST3GAL4）、HNK-1 合成酵素（GlcAT-P）の、バイセクト型（bisectGGnGGnbi-PA）と非バイセクト型（GGnGGni-PA）の糖鎖に対する *in vitro* の活性。（n = 3、Mann-Whitney U-test、*p＜0.05、**p＜0.01）。

2. バイセクト糖鎖のタンパク質選択的発現メカニズム

次に、バイセクト糖鎖が生理的条件でどのような標的タンパク質に付加されているのかを明らかにすることを試みた。野生型（WT）と *Mgat3* KO マウスの脳から膜画分を調製し、トリプシンで消化後、バイセクト糖鎖を認識する植物レクチンである E4-PHA が架橋されたビーズとインキュベートすることにより、バイセクト糖鎖付加糖ペプチドを濃縮した。得られたサンプルをショットガンプロテオミクスにより分析し、KO に比べて WT でシグナルが強く観察された糖ペプチド 32 を同定した（図 2a）[8]。これらは、生理的条件の脳でバイセクト糖鎖を持つことが強く示唆された。これらの糖タンパク質のうち、contactin-2、GluA1、L1CAM の 3 つについて、脳膜画分可溶化液を E4-PHA ビーズで処理したサンプルのウエスタンブロットによって、確かに GnT-Ⅲによってバイセクト修飾されていることが確認できた（図 2b）。同定された 32 の糖ペプチドについて、N 型糖鎖付加部位周辺に特徴的なモチーフがないか *in silico* で探索したが、発見できなかった。同定された GluA1 に関して、クライオ電顕の立体構造とのドッキングモデルから、バイセクト修飾されることが同定されたサイトは運動性の高い領域であり、立体的な酵素のアクセスのしやすさが、修飾のされやすさと関係している可能性が示唆された。以上の結果は論文として、Mol. Omics 誌に投稿中である［2］。

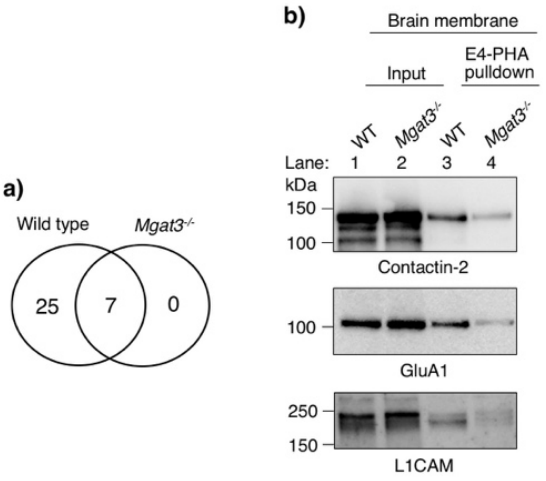


図 2. 脳においてバイセクト糖鎖のキャリアと同定された糖タンパク質
a) トリプシン消化後、E4-PHA レクチンで濃縮された脳内の糖ペプチド。
b) 脳膜画分を可溶化し、E4-PHA レクチンビーズでプルダウン後、示された抗体でウエスタンブロットした結果。

3. アルギニンメチル化による神経糖鎖の新規発現制御メカニズム

バイセクト糖鎖などの神経糖鎖の発現制御メカニズムはあまりよくわかっていない。特に、転写調節やエピジェネティクスに関わる因子による糖鎖発現制御機構は不明な点が多い。そこで我々は、アルギニンのメチル化に着目した。アルギニンのメチル化は転写やエピジェネティクスなどに関わる因子が受ける修飾であるが、まだ標的タンパク質も含めて研究が少なく不明な点が多い。これまでに、アルギニンをメチル化する最も主要な酵素 PRMT1 の神経特異的な KO マウスはミエリンの形成異常など、特徴的な表現型を示すことから、神経の発生や機能に重要な役割を果たすことが知られている。一方、アルギニンのメチル化がどのような仕組みで神経機能を制御しているかはわかっていない。そこでアルギニンのメチル化によって糖鎖発現が制御されうるという仮説を立て、検証することとした。これまでアルギニンのメチル化と糖鎖発現に関する報告例はなく、新たな研究展開が期待できると考えられた。

神経特異的 *Prmt1* KO マウスの脳の糖鎖発現を種々の抗体やレクチンを使って解析したところ、HNK-1 と呼ばれる神経特異的糖鎖抗原の発現が KO 小脳で著しく増加していることがわかった（図 3a 左）[9]。一方この増加は KO マウスの大脳皮質では見られなかったことから、領域特異的な制御であることが明らかになった。さらにこの小脳特異的な HNK-1 の発現制御のメカニズムを明らかにするため、HNK-1 の生合成酵素やキャリアタンパク質について解析したところ、KO マウスでは HNK-1 の主要な合成酵素である GlcAT-P が mRNA レベルで増加していること、また HNK-1 の主要なキャリアタンパク質である NCAM なども転写レベルで発現上昇していることが明らかになった。すなわち、PRMT1 は小脳特異的に HNK-1 の合成酵素やキャリアタンパク質の発現を抑制している糖鎖発現制御因子であることが新たにわかった（図 3b）。

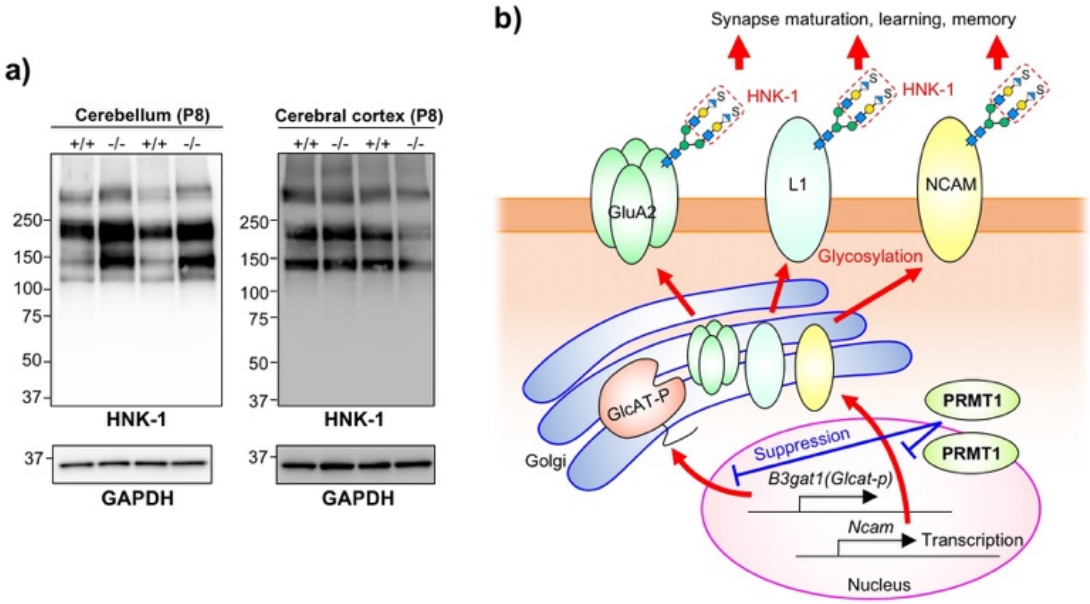


図 3. 神経特異的 *Prmt1* KO マウス脳における HNK-1 糖鎖の発現増加

a）生後 8 日齢の *Prmt1* KO マウスの小脳と大脳皮質膜画分のウエスタンブロット。

b）*Prmt1* KO マウス小脳で HNK-1 糖鎖抗原の発現が増加するメカニズムのモデル。

考　察

本研究により、バイセクト糖鎖が脳において N 型糖鎖の末端修飾の共通の抑制因子であることが明らかになった。また、生理的な脳においてバイセクト修飾を受ける 32 の糖鎖付加部位を新規に同定した。さらに、アルギニンメチル化酵素 PRMT1 が、小脳特異的に HNK-1 糖鎖の発現を転写レベルで抑制していることを明らかにした。これらの結果により、脳における糖鎖の発現制御の仕組みやその生理機能について新たな知見が得られた。

一方で、同定された 32 の糖鎖付加部位周辺のアミノ酸配列に特徴的なモチーフが見出せなかったことから、なぜバイセクト糖鎖が限られた糖タンパク質にしか付加されないのか、そのメカニズムはいまだ不明なままである。可能性として、バイセクト糖鎖合成酵素である GnT-Ⅲが基質糖タンパク質の立体構造を認識しているかもしれないことや、生きた細胞の中のゴルジ体では、限られたタンパク質のみが GnT-Ⅲと出会う仕組みが存在するかもしれない。これらは今後の検討課題である。また、バイセクト糖鎖に関しては、アルツハイマー病の原因となるアミロイドβ産生酵素である BACE1 のリソソーム局在を制御していることを我々は報告している。バイセクト糖鎖の有無がどのようにキャリアタンパク質の細胞内トラフィックを制御しているのか、まだ不明であるその仕組みを解明することも今後の課題である。N 型糖鎖の分岐を作るこれらの糖転移酵素の制御や機能についてはまだ不明な点も多いが、これまでに明らかにされた研究結果を総説として発表した［10］。

また本研究により、アルギニンのメチル化による神経糖鎖の発現制御という新たな翻訳後修飾のクロストーク機構を発見した。これまでアルギニンのメチル化と糖鎖修飾の関連性については報告がなく、今後の展開が期待される。特に、まだ機能が十分に研究されていない翻訳後修飾も多く、修飾同士の相互制御の有無を検証することによって今後新たな糖鎖研究の展開が期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究の主な共同研究者は、広島大学大学院統合生命科学研究科の中ノ三弥子准教授、大阪大学微生物病研究所分子免疫制御分野の長江雅倫助教、岐阜大学大学院自然科学技術研究科生物化学研究室の橋本美涼助教、大阪国際がんセンター研究所糖鎖オンコロジー部の大川祐樹研究員です。その他、岐阜大学糖鎖生化学研究室、大阪国際がんセンター研究所糖鎖オンコロジー部の研究室員の皆様に多くの御支援をいただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. Adv Cancer Res. 2015;126:11-51. Epub 2015 Feb 7. PMID: 25727145 doi: 10.1016/bs.acr.2014.11.001.

2) Kizuka Y, Kitazume S, Taniguchi N. N-glycan and Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2017 Oct;1861(10):2447-2454. Epub 2017 Apr 29. PMID: 28465241 doi: 10.1016/j.bbagen.2017.04.012.

3) Kizuka Y, Oka S. Regulated expression and neural functions of human natural killer-1 (HNK-1) carbohydrate. Cell Mol Life Sci. 2012 Dec;69(24):4135-47. Epub 2012 Jun 6. PMID: 22669261 doi: 10.1007/s00018-012-1036-z.

4) Kizuka Y, Kitazume S, Fujinawa R, Saito T, Iwata N, Saido TC, Nakano M, Yamaguchi Y, Hashimoto Y, Staufenbiel M, Hatsuta H, Murayama S, Manya H, Endo T, Taniguchi N. An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease. EMBO Mol Med. 2015 Feb;7(2):175-89. PMID: 25592972 doi: 10.15252/emmm.201404438.

5) Kizuka Y, Nakano M, Kitazume S, Saito T, Saido TC, Taniguchi N. Bisecting GlcNAc modification stabilizes BACE1 protein under oxidative stress conditions. Biochem J. 2016 Jan 1;473(1):21-30. Epub 2015 Oct 14. PMID: 26467158 doi: 10.1042/BJ20150607.

6) Kizuka Y, Kitazume S, Sato K, Taniguchi N. Clec4g (LSECtin) interacts with BACE1 and suppresses Aß generation. FEBS Lett. 2015 Jun 4;589(13):1418-22. Epub 2015 May 7. PMID: 25957769 doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.060.

7) Nakano M, Mishra SK, Tokoro Y, Sato K, Nakajima K, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kizuka Y. Bisecting GlcNAc Is a General Suppressor of Terminal Modification of N-glycan. Mol Cell Proteomics. 2019 Oct;18(10):2044-2057. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31375533 doi: 10.1074/mcp.RA119.001534.
8) #Ohkawa Y., #Kizuka Y. (#equal contribution), Ito E., Mishra K. S., Akatsuka H., Harada Y., Taniguchi N. Peptide sequence mapping around bisecting GlcNAc-bearing N-glycans in mouse brain. Mol Omics. in revision.
9) Hashimoto M, Hirata T, Yonekawa C, Takeichi K, Fukamizu A, Nakagawa T, Kizuka Y. Region-specific upregulation of HNK-1 glycan in the PRMT1-deficient brain. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2020 Mar;1864(3):129509. Epub 2019 Dec 27. PMID: 31884067 doi: 10.1016/j.bbagen.2019.129509.
10) Nagae M, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kizuka Y. 3D Structure and Function of Glycosyltransferases Involved in N-glycan Maturation. Int J Mol Sci. 2020 Jan 9;21(2). pii: E437. PMID: 31936666 doi: 10.3390/ijms21020437.