

小胞体での N-グリカン生合成に働く ヒト糖転移酵素間の相互作用の解析

高橋 哲夫*

Analyses of Physical Interactions among Human Glycosyltransferases Involved in Biosynthesis of N-glycan in the Endoplasmic Reticulum

by

Tetsuo TAKAHASHI*

(Received on Sep. 30, 2009 and accepted on Nov. 24, 2009)

Abstract

Eukaryote-specific N-glycan is derived from lipid-linked oligosaccharide (LLO) which is biosynthesized by a series of glycosyltransferases localized on the rough endoplasmic reticulum (rER) membrane. In the early assembly of LLO, a total of five glycosyltransferases are involved. To analyze the physical interactions among them in human, the yeast split-ubiquitin system which can specifically detect physical interactions between two membrane-bound proteins was used. Two of the five human glycosyltransferases were coexpressed in the same yeast *NMY51* cell (reporter strain), and the physical interactions between them were assayed for interaction-dependent viability on the selective media. In this assay, novel types of interaction were detected.

Keywords: Glycosyltransferase, Lipid-linked oligosaccharide, Split-ubiquitin system

1. 緒言

真核細胞において多様な局面で機能する糖タンパク質中の N-グリカン(N-結合型糖鎖)は、粗面小胞体(rough endoplasmic reticulum; rER)で生合成されるリポド中間体(lipid-linked oligosaccharide; LLO)に由来する。LLO 生合成初期においては rER 膜に局在する 5 種類の糖転移酵素が 7 段階で働くことにより 7 糖($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -)を有する LLO が細胞質側で集合することになる (Fig.1)。このうち、ER 膜に局在する 3 種類のマンノース転移酵素 (MT-I, MT-II/III 及び MT-IV/V) に関して、我々はこれまでに酵母分割ユビキチンシステムを用いて膜結合酵素間の物理的相互作用の有無を検証し、これらの酵素が rER 膜上で複合体を形成していることを示す結果を報告した¹⁾。本研究では、解析対象となる糖転移酵素を LLO 生合成の第一段階に働く N-アセチルグルコサミン-リン酸転移酵素 (GPT) 及び第二段階に働く N-アセチルグルコサミン転移酵素 (NAGT) を含めた 5 種類に拡張し、分割ユビキチンシステムを用いて LLO 生合成の初期過程全体におけるヒト糖転移酵素間の相互作用を解析することにした。

2. 材料及び方法

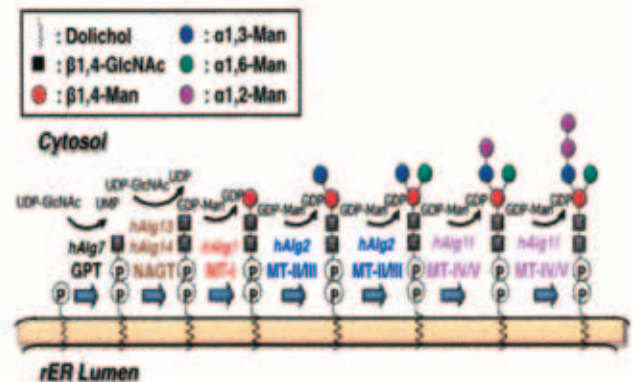


Fig.1 Early assembly of LLO on the cytoplasmic side of the rER membrane.

3 種類のマンノース転移酵素 (MT-I, MT-II/III 及び MT-IV/V) に関しては、分割ユビキチンシステム用ベクターへサブクローニングを行い、ベイトコンストラクト (hAlg1-CLV, hAlg2-CLV, hAlg11-CLV) 及びプレイコンストラクト (hAlg1-NubG, hAlg2-NubG, hAlg11-NubG) を既に作製している。そこでヒト GPT 遺伝子 (hAlg7) 及び NAGT の二つのサブユニットの各遺伝子 (hAlg14 及び hAlg13) をヒト cDNA プールから PCR により増幅し、各ベクターにクローニングして、ベイトコンストラクト (CLV-hAlg7, hAlg7-CLV, CLV-hAlg14, hAlg14-CLV) とプレイコンストラクト (NubG-hAlg7, hAlg7-NubG, NubG-hAlg14, hAlg14-NubG, NubG-hAlg13, hAlg13-NubG) を新たに作製した。

* 工学部生命化学科准教授

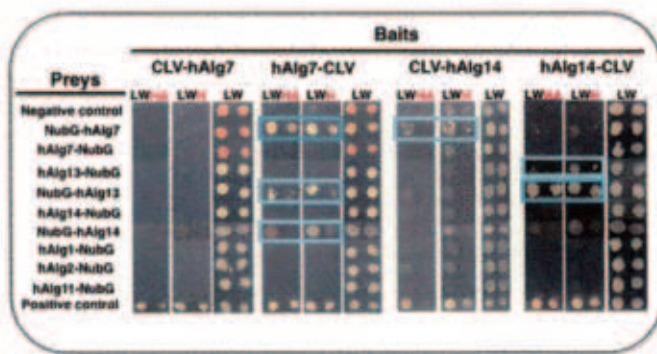


Fig.2 Physical interactions of GPT & NAGT.

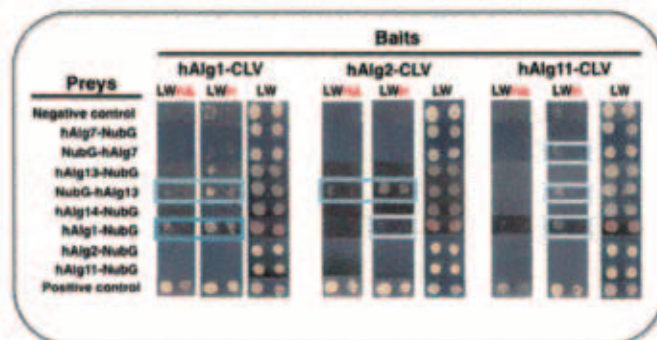


Fig.3 Physical interactions of mannosyltransferases.

次に、これらのベイトコンストラクト/プレイコンストラクトを任意に組み合わせて、酵母 *MY51* 株を同時形質転換し、SD-LW 寒天選択培地上で各ベイト/プレイ共発現株を取得した。これらの共発現株をレポーターアッセイ用の SD-LWH 及び SD-LWHA 選択培地に 2 段階の希釈濃度で菌体をスポットして (O. D.₆₀₀=0.02, 0.002), 30°C で 3 日間培養した後、増殖性を観察した。

3. 結果及び考察

まず、N-グリカン合成初期の第一段階に働く GPT と第二段階に働く NAGT をベイトとして相互作用を解析した。その結果、1) 小胞体膜上で GPT (hAlg7) 同士が相互作用していること、2) hAlg7 の C-末端に対して、NAGT の膜貫通サブユニット (hAlg14) の N-末端が弱く相互作用していることが明らかになった (Fig. 2)。また、hAlg14 の C-末端は、本来のパートナーである Alg13 の他に、hAlg7 の N-末端に対して弱い相互作用を示した (Fig. 2)。次に 3 種の MT をベイトとして相互作用を解析したところ、3) hAlg11 の C-末端に対して hAlg7 の N-末端が弱く相互作用することが見出された (Fig. 3)。また、どちらの解析においても、4) NAGT の細胞質サブユニット (hAlg13) は、本来のパートナーである hAlg14 以外の 4 種の酵素に対して弱く相互作用していた (Fig. 2 及び Fig. 3)。これら 1)~4) の成果に基づいて、Fig. 4 に示すような 5 酵素による複合体モデルを構築した。すなわち、N-グリカン合成初期に働く 5 種のヒト糖転移酵素のうち、前半の 2

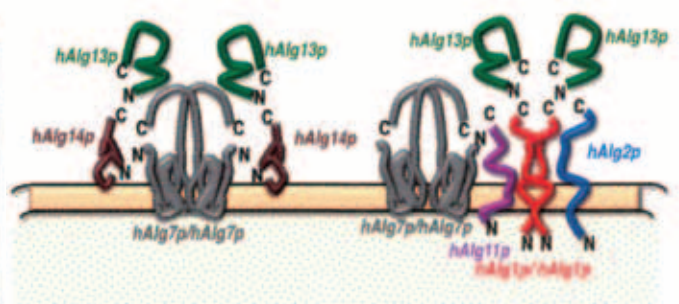


Fig.4 Model of GPT/NAGT complex and GPT/MTs complex.

酵素である GPT と NAGT は強固な複合体を形成しているが、GPT の方は 3 種マンノース転移酵素からなる MT 複合体との間でも、hAlg11 を介して一過的にコンタクトをとっていることが想定されるのである。また、hAlg13 (NAGT の細胞質サブユニット) の方は、hAlg14 以外に、4 酵素に対して同様に弱い相互作用を示したことから、一過的に GPT/NAGT/MT の 5 酵素複合体が形成されている可能性も考えられる。そしてこれらの結果は、GPT/NAGT 複合体と GPT/MT 複合体の二つの形態が、LLO の合成を量的に調節する際に重要な役割を果たしていることを示唆している。以上で述べた本研究の成果は既に公表済である^{2~4)}。さらに、酵母において対象の 5 酵素間の相互作用を調べた結果、ヒトの場合と若干違う結果が現在得られている⁴⁾。今後、これらの差異に着目することにより、真菌の酵素間相互作用のみを特異的に阻害する性質を有する抗真菌剤の開発につながることを期待している。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、2007 年度工学部研究教育補助金の助成をいただきましたことを、ここに深謝いたします。

参考文献

- 1) 高橋哲夫:ヒト・マンノース転移酵素複合体の全容解明, 東海大学紀要工学 Vol. 46 (2006), No. 2, 151-152.
- 2) 石井博明, 保知学, 高橋哲夫: LLO 合成初期に働く 3 種のヒトマンノース転移酵素の分割ユビキチンシステムによる解析他 3 報, 第 80 回日本生化学会大会講演要旨集 (2007), 725.
- 3) 黒土将徳, 飯塚昌平, 西村一寛, 田中智恵美, 高橋哲夫: リピド中間体合成初期に働く糖転移酵素間における相互作用の解析, 日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨集 (2008), 56.
- 4) 黒土将徳, 飯塚昌平, 西村一寛, 前田直彦, 高橋哲夫: LLO 合成初期における酵母及びヒトの糖転移酵素間の相互作用の解析, 第 81 回日本生化学会大会講演要旨集 (2008), 522.