

ヒト O-マンノース型糖鎖生合成に関与する 酵素間の相互作用の解析

高橋 哲夫*

Analyses of the Physical Interactions among Human Glycosyltransferases Involved in Biosynthesis of O-Mannose Type Glycan

by

Tetsuo TAKAHASHI*

(Received on X. x, 2010 and accepted on Y. x, 2010)

Abstract

Eukaryote-specific O-mannose type glycan on the glycoprotein is restrict to be expressed in the muscle and nerve tissues, possibly due to limited expression of glycosyltransferases involved in biosynthesis of O-mannose type glycan. They are known to be localized on the membranes of rough endoplasmic reticulum (rER) and Golgi apparatus, and catalyze transfer of mannose, N-acetylglucosamine (GlcNAc), galactose (Gal), or sialic acid (Sia) in the stepwise manner. However, any physical interaction among them localized on the membranes of rER and Golgi apparatus has not yet been investigated. In this paper, in order to reveal the physical interactions among them in human, the yeast split-ubiquitin system which was devised to detect specifically detect physical interactions between two membrane-bound proteins was applied. Two of three known human glycosyltransferases [dolichol-P-mannose synthase (DPMS), protein O-mannosyltransferase (POMT1/POMT2) and GlcNAc transferase (POMGnT1)] and four membrane proteins [Mannose-P-dolichol utilization1 (MPDU1), Fukutin, Fukutin-related protein (FKRP) and LARGE] were co-expressed in the same yeast NMY51 reporter cell, and the physical interactions between them were assayed for interaction-dependent viability on the selective media. In this assay, several novel types of interaction were detected among membrane proteins involved in assembly of O-mannose type glycan.

Keywords: Glycosyltransferase, O-mannose type glycan, Split-ubiquitin system

1. 緒言

ヒトにおいて、O-マンノース (O-Man) 型糖鎖を有する α -ジストログリカン (α -DG) は、筋肉・神経組織に特異的に発現している。 α -DG の O-Man 型糖鎖の生合成不全は、Walker-Warburg 症候群、福山型筋ジストロフィー (FMD)、MEB 病などといった深刻な筋・神経の変性疾患を引き起こすことから、この糖鎖生合成の重要性が実証されている。

O-Man 型糖鎖の生合成では、最初に粗面小胞体 (rER) 膜上に局在する蛋白質 O-Man 転移酵素 (POMT1 及び POMT2 からなる複合体) により α -DG のセリン/スレオニン残基に Man が付加される (Fig. 1)。その際にこの酵素の供与体基質であるドリコールリン酸マンノース (DPM) を合成する DPM 合成酵素 (DPM1, DPM2 及び DPM3 からなる複合体) 及び細胞質側で生じた DPM を rER 膜の内腔側へ転送するのに重要な役割を果たしている MPDU1 も rER 膜に局在している (Fig. 1)。次に、ゴルジ体に輸送された α -DG の O-Man に対して、ゴルジ体膜に局在する N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 転移酵素 (POMGnT1)、ガラクトース (Gal) 転移酵素 (GalT) 及びシアル酸 (Sia) 転移酵素 (SiaT) が作用し、

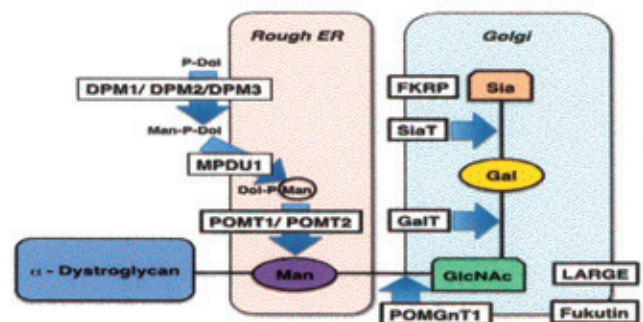


Fig.1 Biosynthesis of O-mannose type glycan on the membranes of rough endoplasmic reticulum (rER) and Golgi apparatus..

四糖からなる O-Man 型糖鎖が完成される (Fig. 1)。これら以外にゴルジ体膜には、酵素活性は未検出だが、O-Man 型糖鎖の生合成への関与が報告されている Fukutin, Fukutin-related protein (FRP) 及び LARGE といった膜蛋白質が局在している (Fig. 1)。

著者はこれまでに N-グリカン生合成に働く rER 膜に局在する糖転移酵素群に関して、分割ユビキチンシステム (Fig. 2) を利用して酵素間の物理的相互作用の解析を行ってきた^{1,2)}。本研究では、このシ

* 工学部生命化学科 准教授

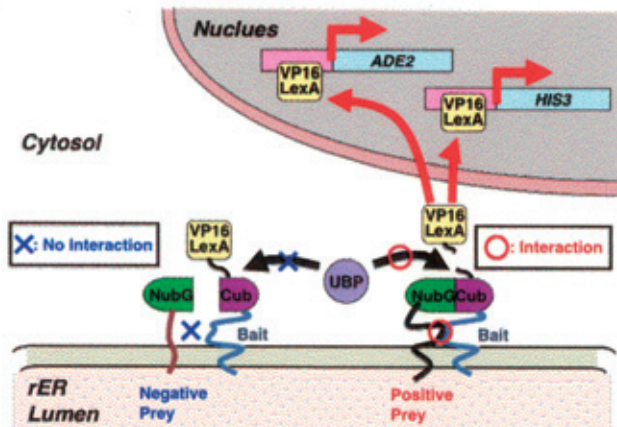


Fig.2 Split-ubiquitin system for detection of physical interactions among glycosyltransferases/proteins involved in biosynthesis of O-mannose type glycan.

システムを利用して、O-Man 型糖鎖生合成に関与する rER 膜またはゴルジ体膜に局在するこれらのヒト酵素/膜蛋白質の間に、物理的相互作用が存在するかどうかを、その局在場所 (rER 膜及びゴルジ体膜) 毎に体系的に検証することにした。

2. 材料及び方法

対象となるヒトの酵素/膜蛋白質の各遺伝子を、遺伝子毎に設計した特異的プライマーを用いて、ヒト cDNA プールを鋳型とした PCR により増幅した (Fig.3)。増幅した遺伝子を、各蛋白質の N-末端または C-末端に、分割ユビキチンのレポータータグの一つである Cub/転写因子を融合するための発現ベイトベクター (pBT3-N または pBT3-STE) にクローニングし、ベイトコンストラクトを作製した。同様に各遺伝子を、各蛋白質の N-末端または C-末端に、分割ユビキチンのレポータータグの一つである NubG を融合するための発現プレイベクター (pPR3-N または pPR3-STE) にサブクローニングし、プレイベクトルを作製した。次に、作製した 2 種のコンストラクトを 1:1 で任意に組み合わせ、酵母レポーター株である NMY51 株に同時に形質転換した。形質転換用の選択培地である SD-LW 培地上で得られた二重形質転換株 (ベイト/プレイの共発現株) に関して、さらに相互作用検出用の選択培地 (SD-LWH 培地及び SD-LWHA 培地) を用いて増殖性試験を行った。

3. 結果及び考察

まず、rER 膜で働く DPM 合成酵素複合体のサブユニット (DPM1, DPM2, DPM3), MPDU1 蛋白質, 蛋白質 O-Man 転移酵素複合体のサブユニット (POMT1, POMT2) をベイト/プレイとして相互作用を解析した。その結果、これまで報告されていない新規の相互作用が見出された。これらの結果の詳細に関しては、現在論文での公表を準備している。

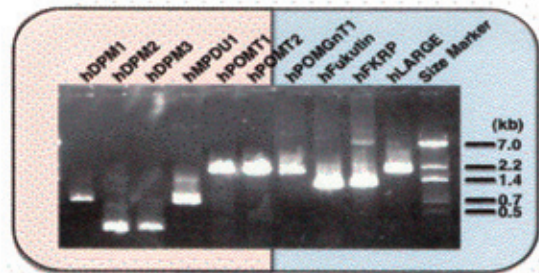


Fig.3 PCR amplification of the human genes encoding rER/Golgi membrane-resident glycosyltransferases/proteins involved in biosynthesis of O-mannose type glycan.

次にゴルジ体膜上で働く GlcNAc 転移酵素 (POMGnT1) と 3 種類の膜蛋白質 (Fukutin, FKRIP 及び LARGE) をベイト/プレイとして相互作用を解析したところ、3 種類の膜蛋白質間及びこれらと POMGnT1 の間に相互作用が見出された。

これらの成果を総合して考えると、rER 膜で O-Man 型糖鎖の生合成に働く 3 種類の酵素/蛋白質には、O-Man 型糖鎖の生合成を効率良く実行あるいは調節するための機構が存在していることが示唆される。一方でゴルジ体膜でも、3 種類の膜蛋白質と POMGnT1 間で弱い相互作用が検出されたことから、これらが POMGnT1 などのゴルジ体膜局在酵素と一過的に複合体を形成している可能性が示唆される。また最近、Fukutin や LARGE が、 α -DG の O-Man 残基のリン酸化後の修飾において、後のラミニンとの結合に必須な役割を果たしていることが、細胞生化学的に実証された³⁾。本研究で検出されたこれらの物理的相互作用は、この報告を強く傍証している。今後さらに詳細に相互作用の解析を行い、相互作用に必要なドメインを限定していく予定である。

謝 辞

本研究の遂行にあたり POMT1, POMT2 及び POMGnT1 の 3 遺伝子を御供与頂きました東京都老人総合研究所の遠藤玉夫博士に厚く御礼申し上げます。ならびに 2009 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、ここに深く感謝いたします。

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) 高橋哲夫: 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, 東海大学紀要工学 Vol. 49 (2009), No. 2, 127-128.
- 3) T. Yoshida-Moriguchi, L. Yu, S. H. Stalnaker, S. Davis, S. Kunz, M. Madson, M. B. A. Oldstone, H. Schachter, L. Wells, K. P. Campbell: O-Mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding, Science Vol. 327 (2010), 88-92.