

ヒト・マンノース転移酵素複合体の全容解明

高橋 哲夫*

Comprehensive Analysis of Human Mannosyltransferase Complex

by

Tetsuo TAKAHASHI*

Abstract

The biosynthesis of the eukaryotic N-glycan precursor, lipid-linked oligosaccharide (LLO), is carried out by a series of glycosyltransferases localized on the rough endoplasmic reticulum (rER) membrane. In the early assembly process, five mannosyltransferase activities are required, which are carried out by three mannosyltransferases. To analyze the physical interaction among them in human, the yeast split-ubiquitin system was applied, which can detect protein-protein interaction on the rER membrane *in vivo*. Three human mannosyltransferase genes (*Hmat-1*, *Hmat-3* and *Hmat-5*) were subcloned into a bait or prey vector, and introduced into the yeast *NMY51* strain (host cell). Cotransformants with bait and prey constructs were assayed for reporter expression indicating physical interaction. In this assay, three types of interaction were revealed.

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

1. 緒言

真核生物において普遍的に産生される糖タンパク質中の N-グリカン(アスパラギン結合型糖鎖)は、すべて粗面小胞体(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。特に LLO の生合成初期に rER 膜の細胞質側で集合する糖鎖部分 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -は、N-グリカンのコア構造の形成に重要である。この初期 LLO 構造を形成する 7 段階の糖転移のうち、5 段階のマンノース転移反応は、ER 膜に局在する 3 種のマンノース転移酵素により達成されることが報告されている¹⁾(Fig. 1)。すなわち、これら 3 種のヒト・マンノース転移酵素が rER 膜上で酵素複合体を形成して、 GlcNAc_2 -から $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -までの糖鎖アセンブリに協調的に働いていることが想定される。そこで、本研究では、ヒトにおけるマンノース転移酵素複合体の存在を検証するために、rER 膜上で 3 種の酵素が物理的に相互作用しているかどうかを、酵母分割ユビキチンシステムを適用して調べることにした。

酵母分割ユビキチンシステムとは、2 種の膜タンパク質間の物理的な相互作用を酵母細胞内(*in vivo*)で検出するシステムである(Fig. 2)。解析対象となる 2 種の膜タンパク質のうち、一方の末端にユビキチンの C-末端側断片(Cub)と転写因子(LexA-VP16)を融合したベイトタンパク質を作製する。また他方のタンパク質については、ユビキチンの変異 N-末端側断片(NubG)を融合したプレイトタンパク質を作製する。これらと同じ酵母細胞で共発現させた場合、2 種の膜タンパク質間で物理的に相互作用し、NubG と Cub が近位に配置された場合、ユビキチンが

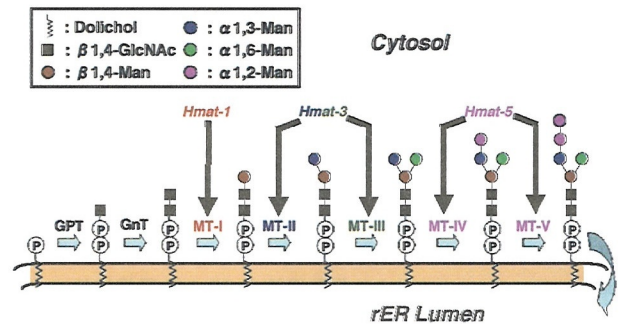


Fig. 1 Early assembly of LLO on the cytoplasmic side of the rER membrane.

再構成される(これを分割ユビキチンと呼ぶ)。分割ユビキチンは、ユビキチン特異的プロテアーゼ UBQ により認識され、その結果、UBQ は Cub-LexA-VP16(CLV)部分の Cub と LexA-VP16 の間を切断する。切断により生じた転写因子 LexA-VP16 は、細胞核に移行し、2 つのレポーター遺伝子 *HIS3* 及び *ADE2* の発現を誘導する。すなわち、相互作用が生じれば、共発現株は、ヒスチジンを欠如した選択培地(SD-LWH)あるいはヒスチジンとアデニンを欠如した選択培地(SD-LWHA)で生育可能となり、相互作用が生じなければ、死滅することになる。本研究では、ベイトタンパク質及びプレイトタンパク質として 3 種のヒト・マンノース転移酵素を使用して、それらの相互作用の有無を検証した。

* 工学部生命化学科助教授

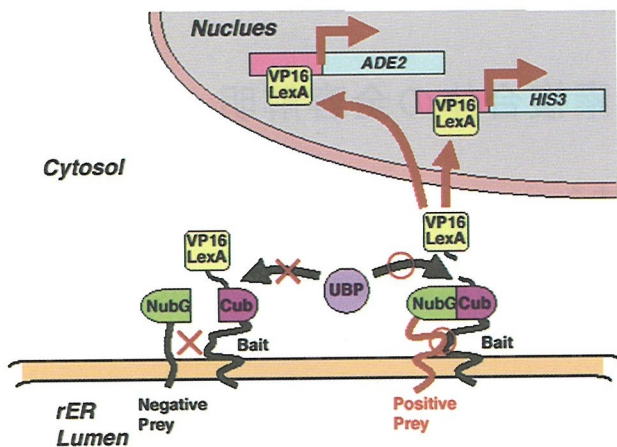


Fig. 2 The yeast split-ubiquitin system.

2. 材料及び方法

LLO 生合成初期に働く 3 種のマンノース転移酵素は、いずれも rER 膜に結合した酵素であり、これらをコードするヒト遺伝子は、既に *Hmat-1*、*Hmat-3* 及び *Hmat-5* として本研究室で同定され、クローニングされている^{2~4)}。*Hmat-1* は β -1,4 マンノース転移酵素を、*Hmat-3* は、 α -1,3 及び α -1,6 マンノース転移酵素を、そして *Hmat-5* は α -1,2 マンノース転移酵素をそれぞれコードしている。そこで、これらのヒト遺伝子(cDNA)を、Cub-LexA-VP16 融合ベイトタンパク質発現用ベクターにそれぞれサブクローニングしたベイトコンストラクトを作製した(*Hmat-1*-CLV、*Hmat-3*-CLV、*Hmat-5*-CLV)。また、*Hmat-1* を NubG 融合プレイトタンパク質発現ベクターにサブクローニングしたプレイコンストラクトを作製した(*Hmat-1*-NubG)。

次に 3 種のベイトコンストラクトを用いて酵母 *NMY51* 株を形質転換し、SD-L 寒天選択培地上で各ベイトコンストラクト発現株を取得した。これらに対して、プレイコンストラクト *Hmat-1*-NubG で二度目の形質転換を行い、*Hmat-1*-CLV / *Hmat-1*-NubG 共発現株、*Hmat-3*-CLV / *Hmat-1*-NubG 共発現株及び *Hmat-5*-CLV / *Hmat-1*-NubG 共発現株を SD-LW 選択培地上で取得した。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 3 段階の希釈濃度で菌体をスポットして(O.D.₆₀₀=0.2, 0.02, 0.002)、30°C で 3 日間培養し、増殖性を観察した。

3. 結果及び考察

3 種の共発現株について、SD-LW 寒天培地上の増殖性は、ほぼ一定であり、導入したベイト及びプレイコンストラクト両方とも宿主細胞内で安定に保持されていることが分かる(Fig. 3、SD-LW)。共発現株において、ベイトタンパク質とプレイトタンパク質が相互作用した場合のみ、*HIS3* 遺伝子の発現が誘導され SD-LWH 培地上での増殖を生じる。また、相互作用が強い場合はさらに *HIS3* 遺伝子に加えて *ADE2* 遺伝子の転写も誘導されるため、SD-LWHA 培地での増殖も生じる。3 種の共発現株は、いずれも SD-LWH 培地での増殖を生じた(Fig. 3、SD-LWH)。この結果は、 β -1,4 マンノース転移酵素のホモダイマー、 β -1,4 マンノース転移酵素/ α -1,3(α -1,6)マンノース転移酵素のヘテロダイマー、 β -1,4 マンノース転移酵素/ α -1,3(α -1,6)マンノ

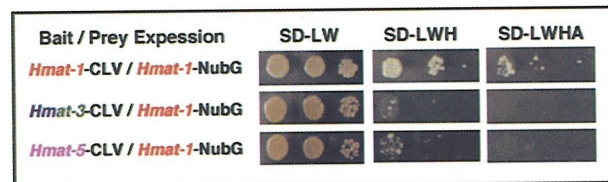


Fig. 3 Growth of co-transformants on selective media.

ース転移酵素のヘテロダイマーが rER 膜上で形成されていることを示している。また、*Hmat-1*-CLV / *Hmat-1*-NubG 共発現株は、SD-LWHA 培地でも増殖が観察されたことから(Fig. 3、SD-LWHA)、 β -1,4 マンノース転移酵素同士の相互作用は、他の 2 種の相互作用に比べて量的または質的に強固であることが明らかとなった。以上の結果を総合すると、3 種のマンノース転移酵素が β -1,4 マンノース転移酵素を中心として rER 膜上で会合し、マンノース転移酵素複合体を形成していることが示唆される。なお、本研究の成果の一部は、既に公表済である^{5~6)}。

現在、これらの相互作用に必要な各ヒト・マンノース転移酵素中のアミノ酸領域の限定を進めている。また、酵母・マンノース転移酵素とヒト酵素間の相互作用の有無に関して、分割ユビキチンシステムによる検討を加える予定である。マンノース転移酵素間の相互作用を、両生物間で詳細に解析することにより、酵母の N-グリカン生合成を特異的に阻害する抗真菌剤開発の基盤となることを期待している。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、2005 年度工学部研究教育補助金の助成をいただきました。ここに深謝いたします。

参考文献

- 1) M.K. O'Reilly, G. Zhang, and B. Imperiali, In vitro evidence for the dual function of Alg2 and Alg11: essential mannosyltransferases in N-linked glycoprotein biosynthesis, *Biochemistry*, **45**, 9593-9603, 2006.
- 2) T. Takahashi, R. Honda and Y. Nishikawa, Cloning of the human cDNA which can complement the defect of the yeast mannosyltransferase I-deficient mutant *alg1*, *Glycobiology*, **10**, 321-327, 2000.
- 3) T. Takahashi, R. Katoh, S. Okutomi, K. Suzuki, Y. Takizawa and Y. Nishikawa, DDBJ/EMBL/Genbank Accession number AB161356
- 4) Y. Nishikawa and T. Takahashi, Cloning and expression of human mannosyltransferases involved in the early steps of assembly of the lipid-linked oligosaccharide, *SEIKAGAKU*, **75**, 691, 2003.
- 5) 加藤直也, 佐々木一之, 高橋哲夫, リピド中間体生合成に働くヒト β -1,4-マンノース転移酵素の分割ユビキチン法による解析, 日本農芸化学会 2006 年度大会講演要旨集, 138, 2006.
- 6) N. Katoh, K. Sasaki, T. Takeuchi, T. Murata, N. Mutoh and T. Takahashi, Studies on interactions among the human Glycosyltransferases involved in the early assembly of lipid-linked oligosaccharide, IN Abstracts of 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 108, 2006.