

N型糖鎖分岐形成酵素の 活性・特異性の制御と疾患関連性



東海国立大学機構 岐阜大学
糖鎖生命コア研究所 (iGCORE)

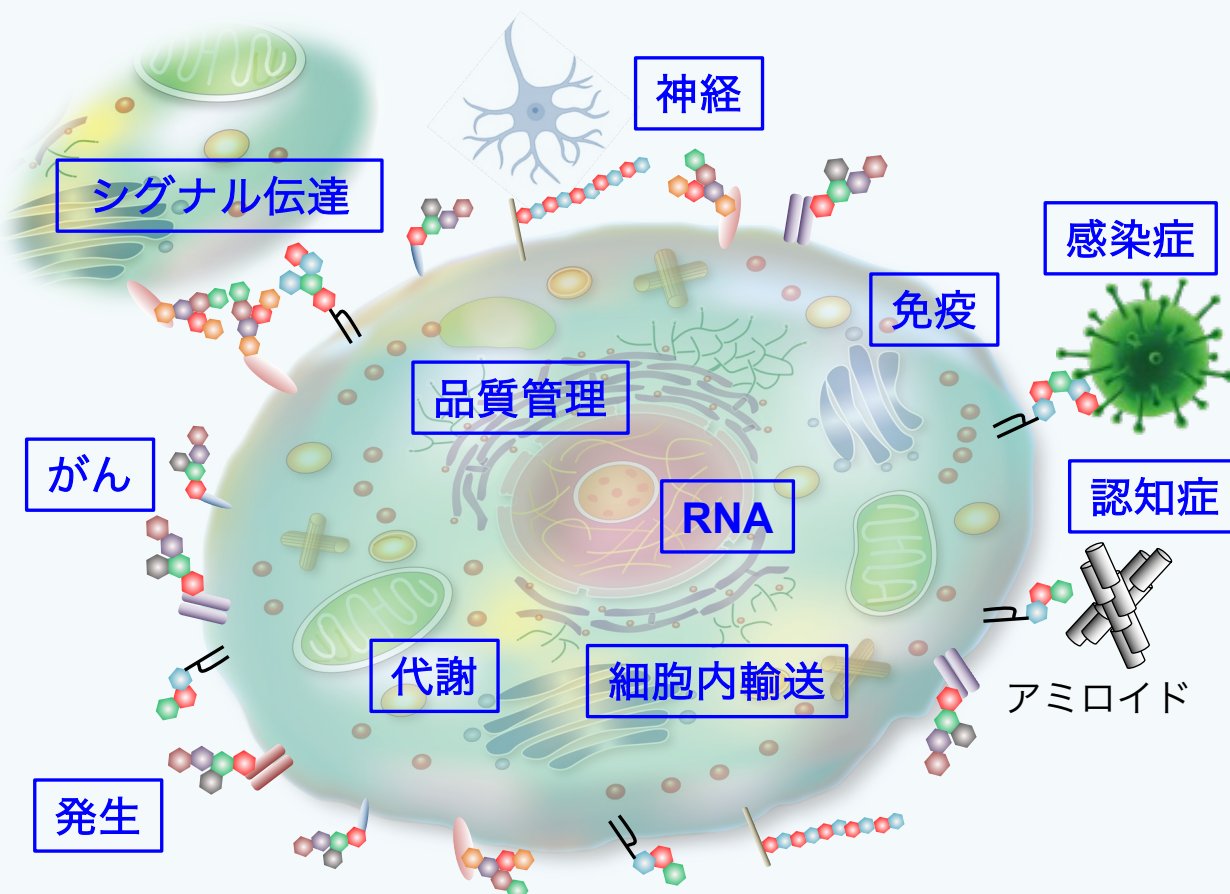
木塚 康彦

背景：タンパク質の糖鎖修飾

糖鎖と生命現象

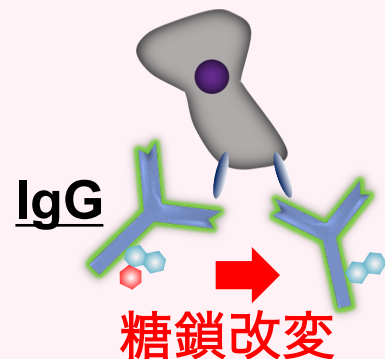
糖鎖

- ・ 全ての細胞を覆う
- ・ 50%以上のタンパク質は糖鎖を持つ



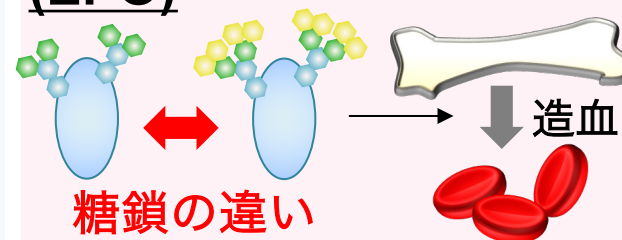
糖鎖は様々な生命現象・疾患に関与

糖鎖構造と機能



ADCC(抗体依存性細胞傷害)
活性 ~100倍 (ポテリジェント)

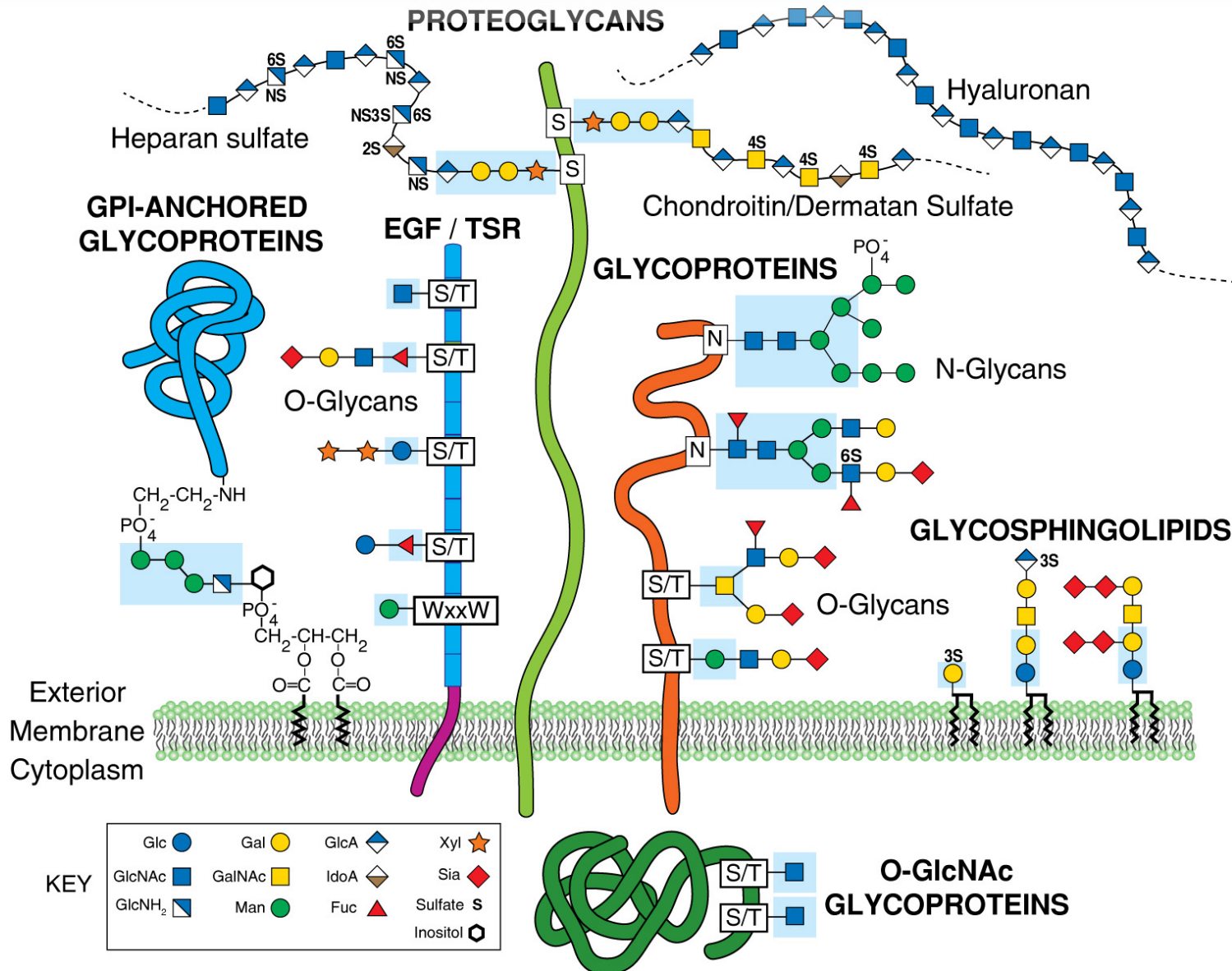
エリスロポエチン
(EPO)



血中安定性に違い

糖鎖の違いはタン
パク質機能を制御

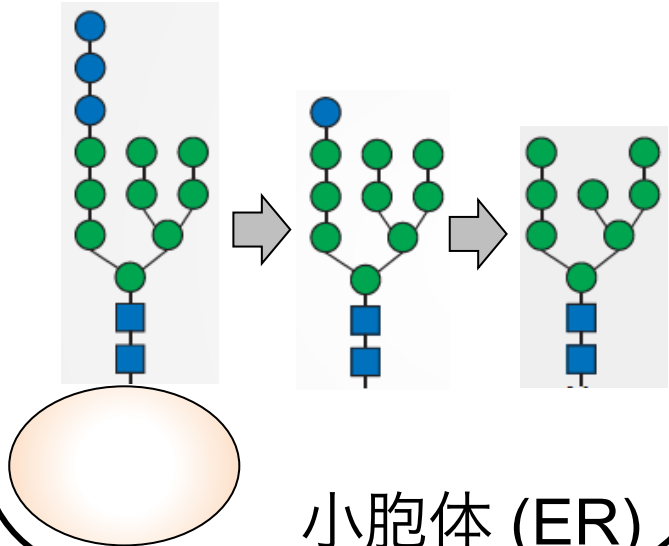
哺乳類の糖鎖



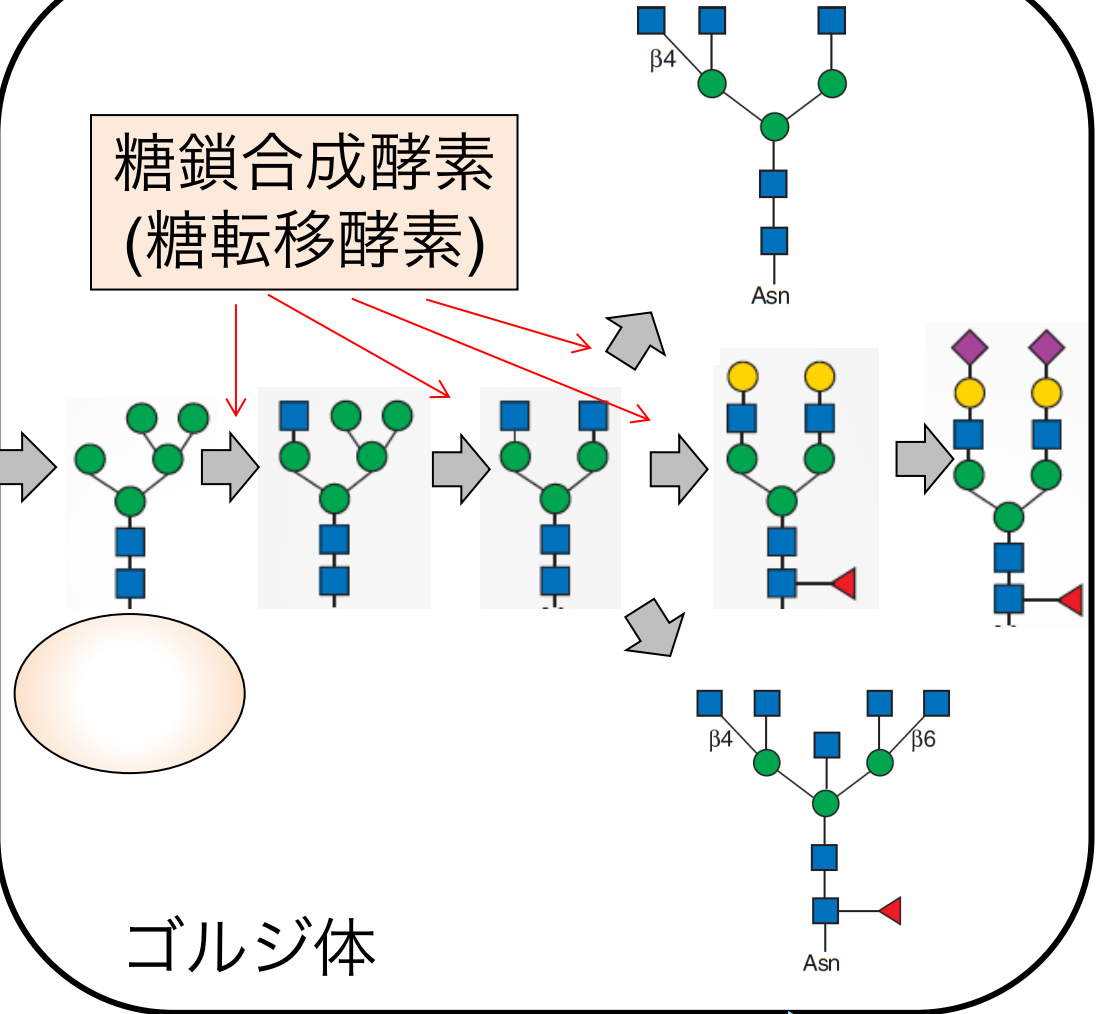
→ 広範な種で保存

動物のN型糖鎖の生合成ステップ

最初は (種やタンパク
同じ形 によらない)



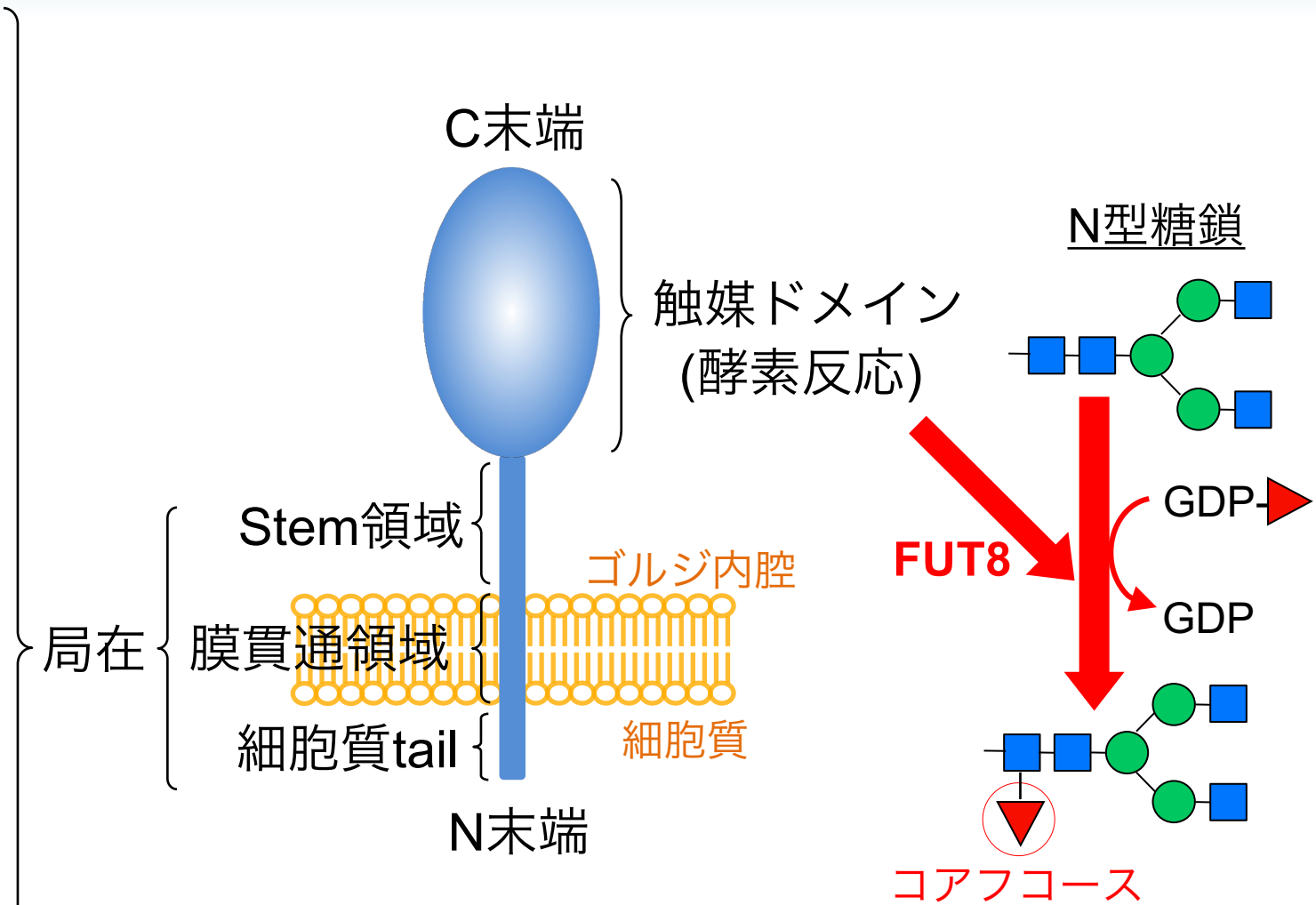
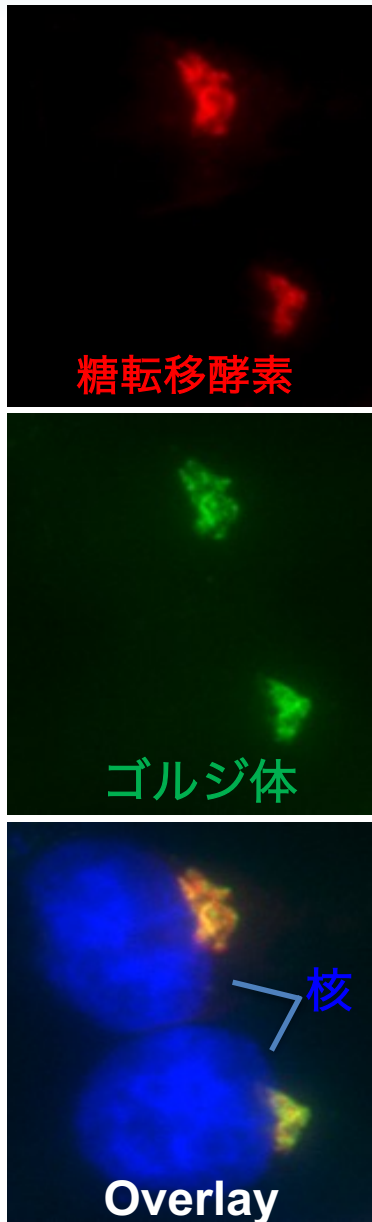
糖鎖合成酵素
(糖転移酵素)



均一

多様化

ゴルジ体の糖転移酵素の一般構造



酵素反応(糖転移)については多くの知見があるが、局在の仕組みはまだあまりよくわかっていない

知りたいこと

生物機能・疾患(がん・アルツハイマー病など)

糖鎖の大きな謎

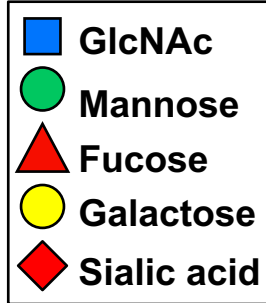
タンパク質毎に作られる糖鎖構造が少しずつ異なる

多様な糖鎖構造

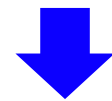
糖タンパク質

細胞膜

ゴルジ体



酵素は出そろった



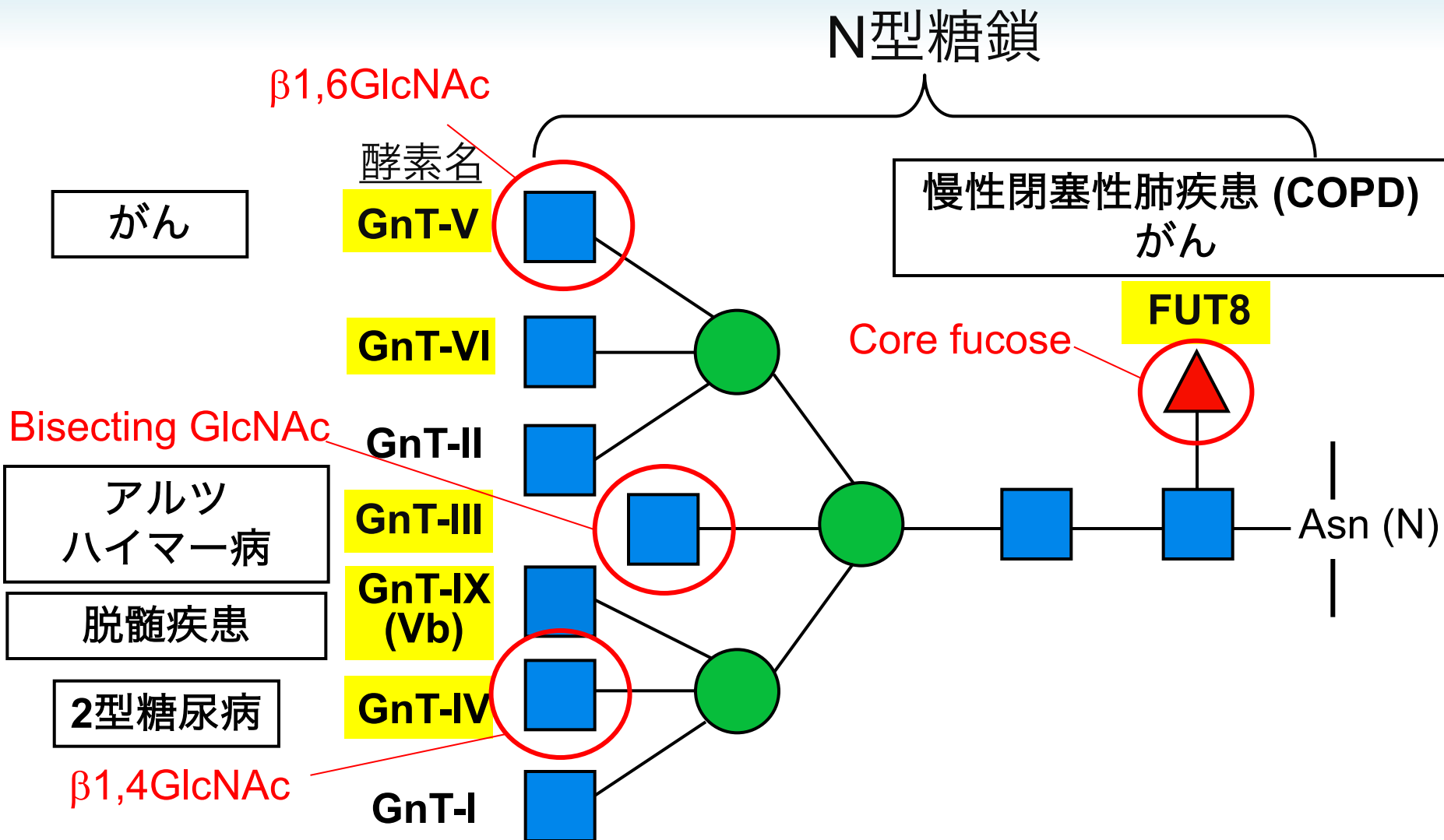
どう働いているかわからない

糖転移酵素(約180種)

明らかにしたいこと

糖転移酵素によるタンパク質特異的な糖鎖修飾の原理

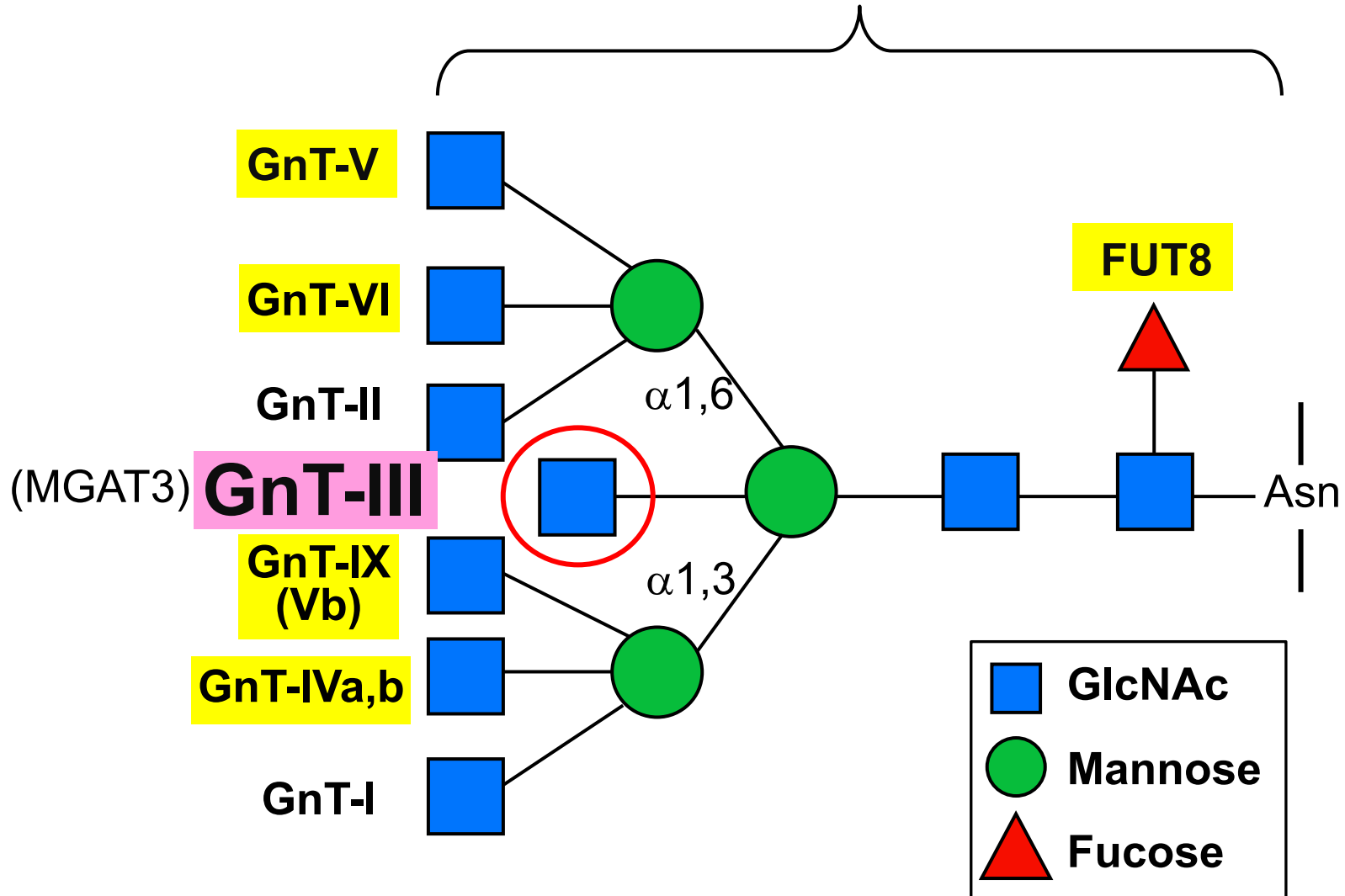
研究標的: N型糖鎖の枝分かれ構造



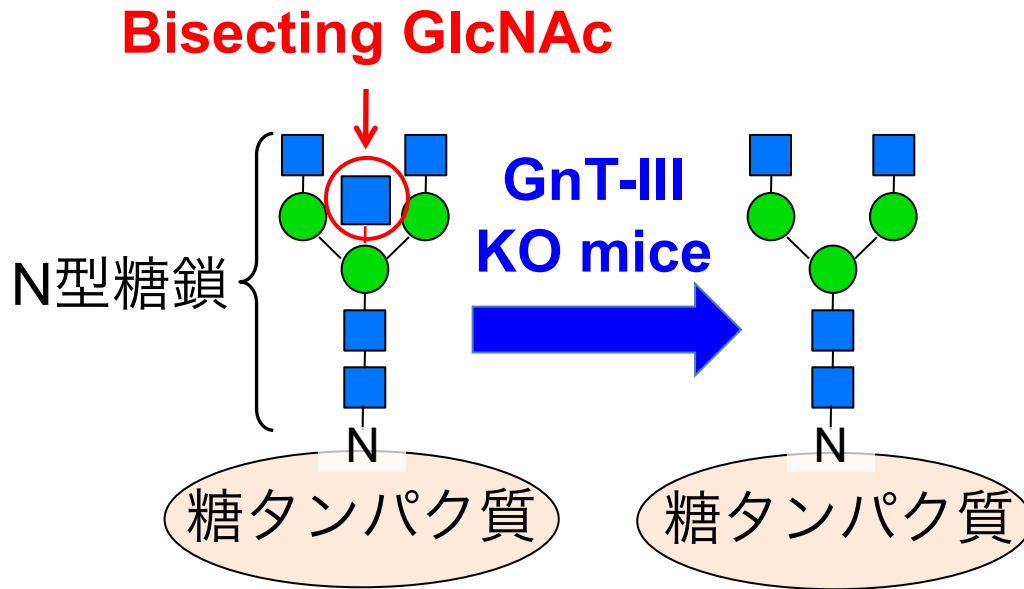
どうやってタンパク質特異的に作られるのか?
疾患につながるメカニズムは?

Topic 1 : GnT-III

N型糖鎖



Bisecting GlcNAcとアルツハイマー病



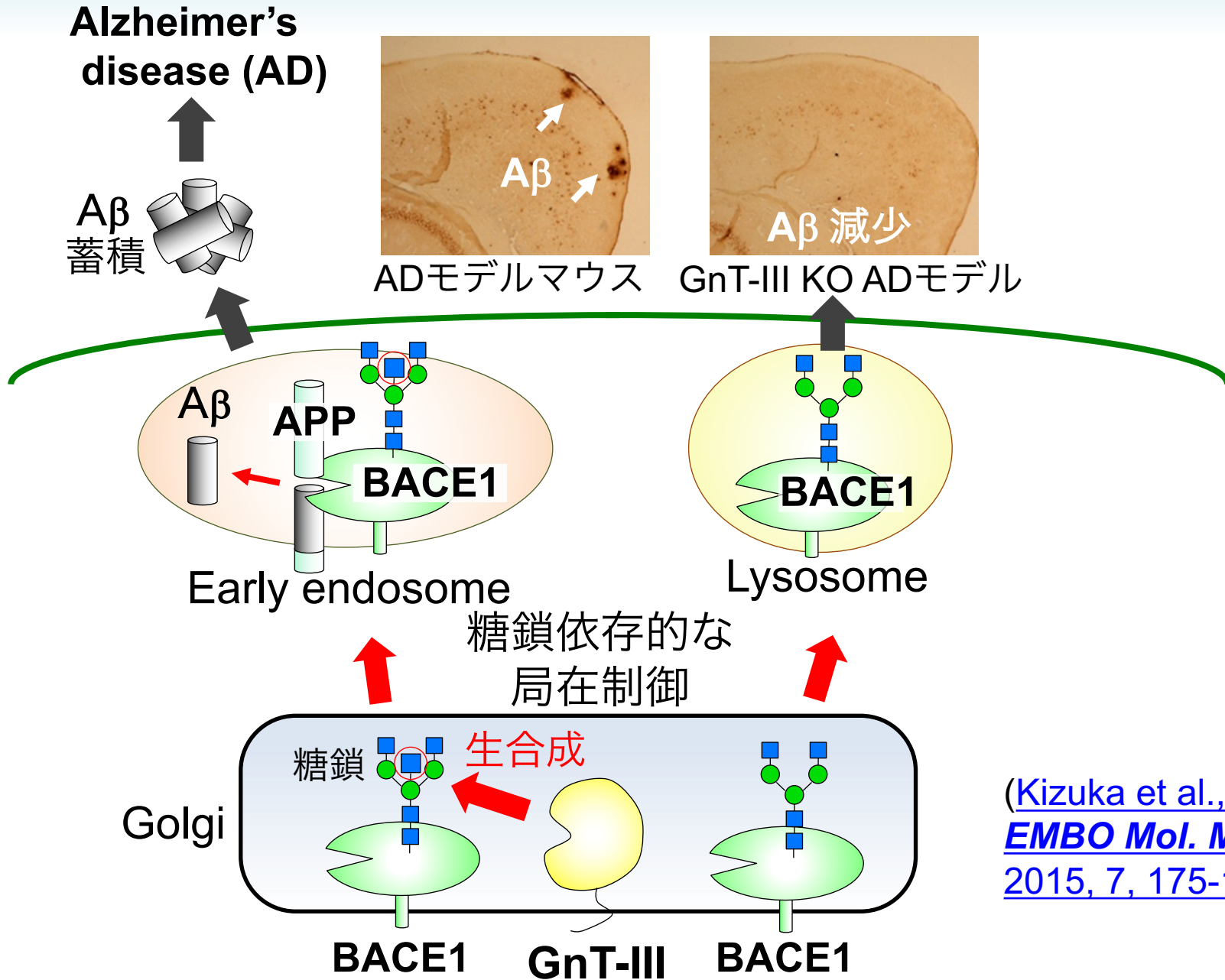
Alzheimer's Disease (AD)
patients

GnT-III mRNA

Control eAD AD
発現増加

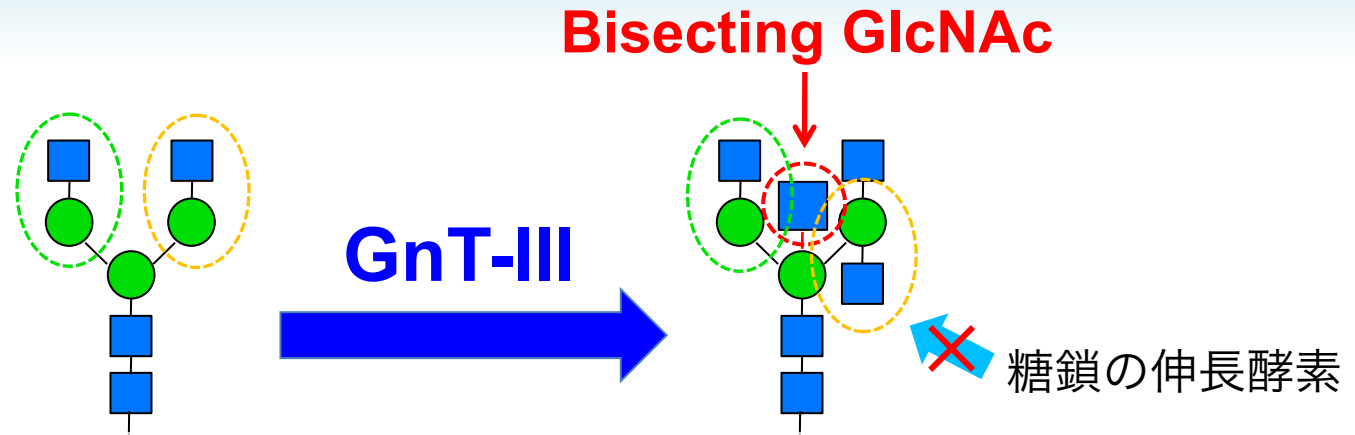
([Akasaka-Manyu et al.](#)
[Glycobiology 2010, 20, 99-106](#))

Bisecting GlcNAcとアルツハイマー病

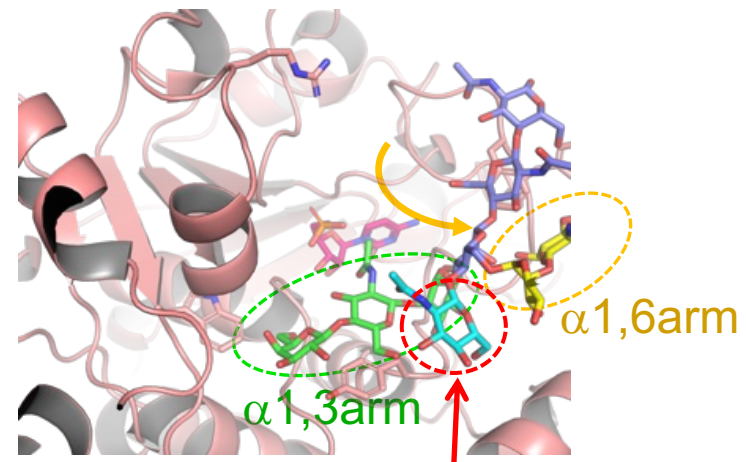
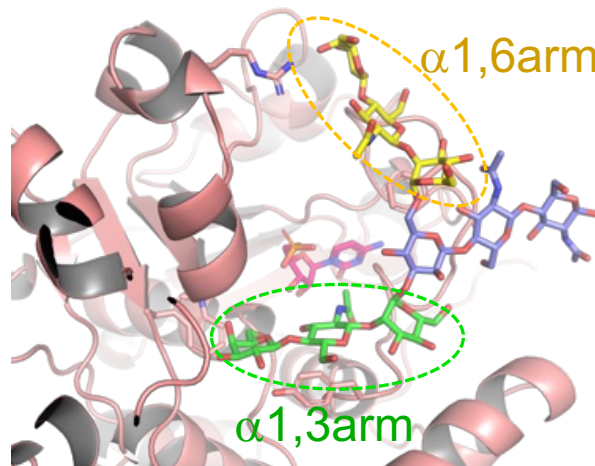


(Kizuka et al.,
EMBO Mol. Med.,
2015, 7, 175-189)

Bisecting GlcNAcは糖鎖合成の鍵構造

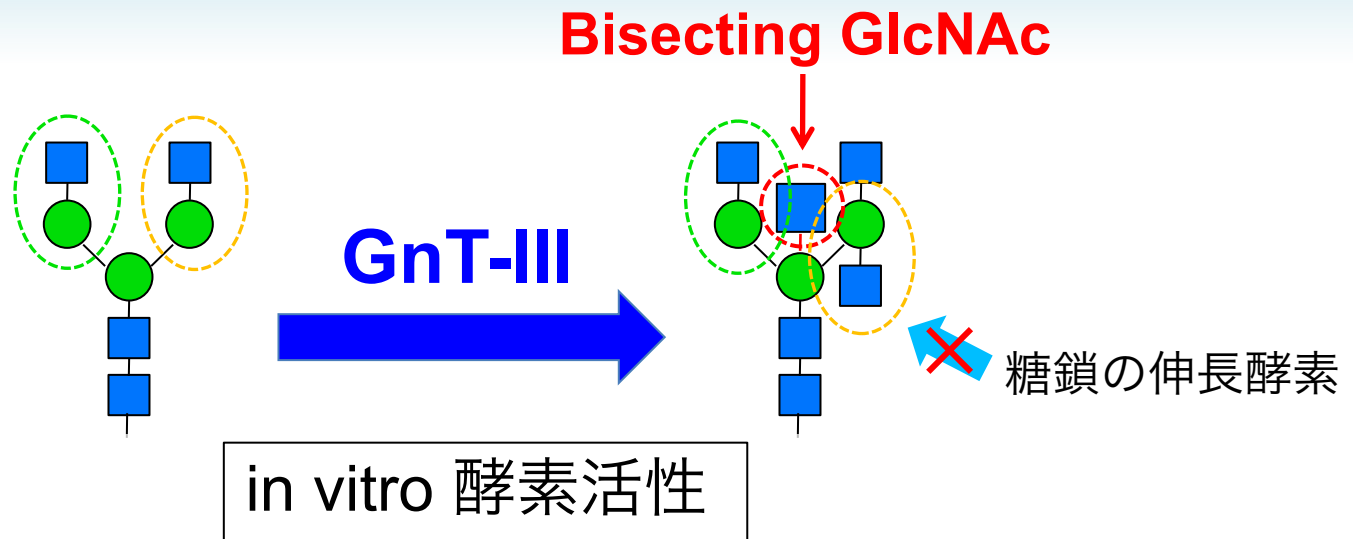


MD (Molecular dynamics) simulation

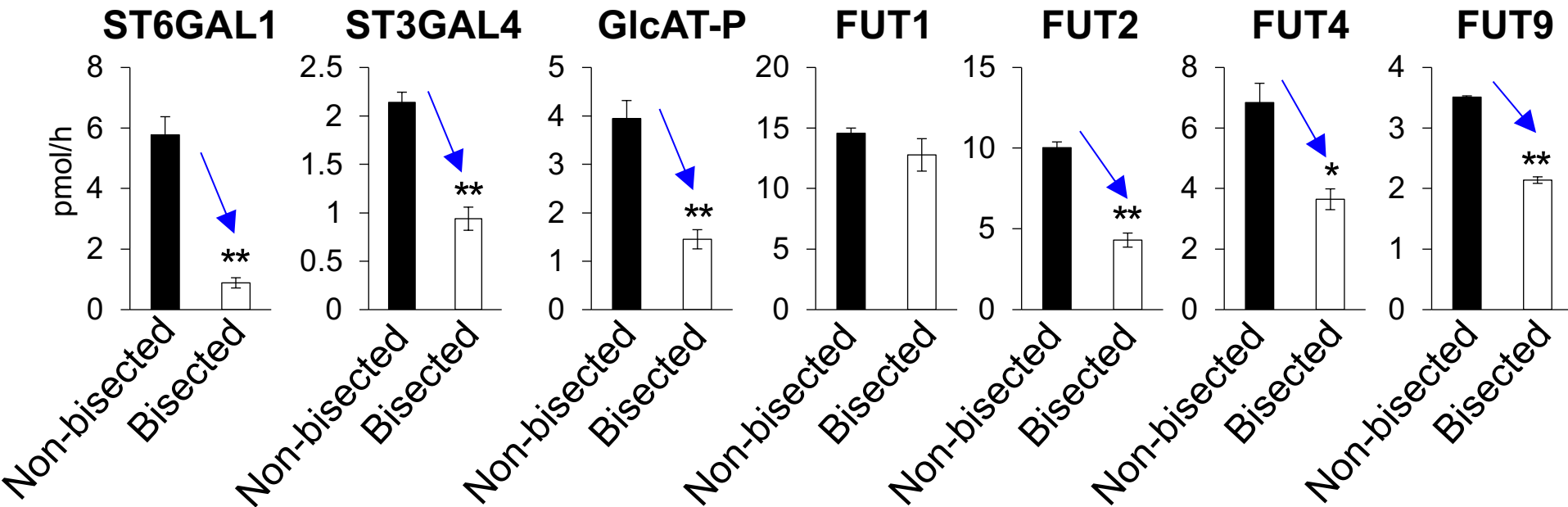


Bisecting GlcNAc

Bisecting GlcNAcは糖鎖合成の鍵構造

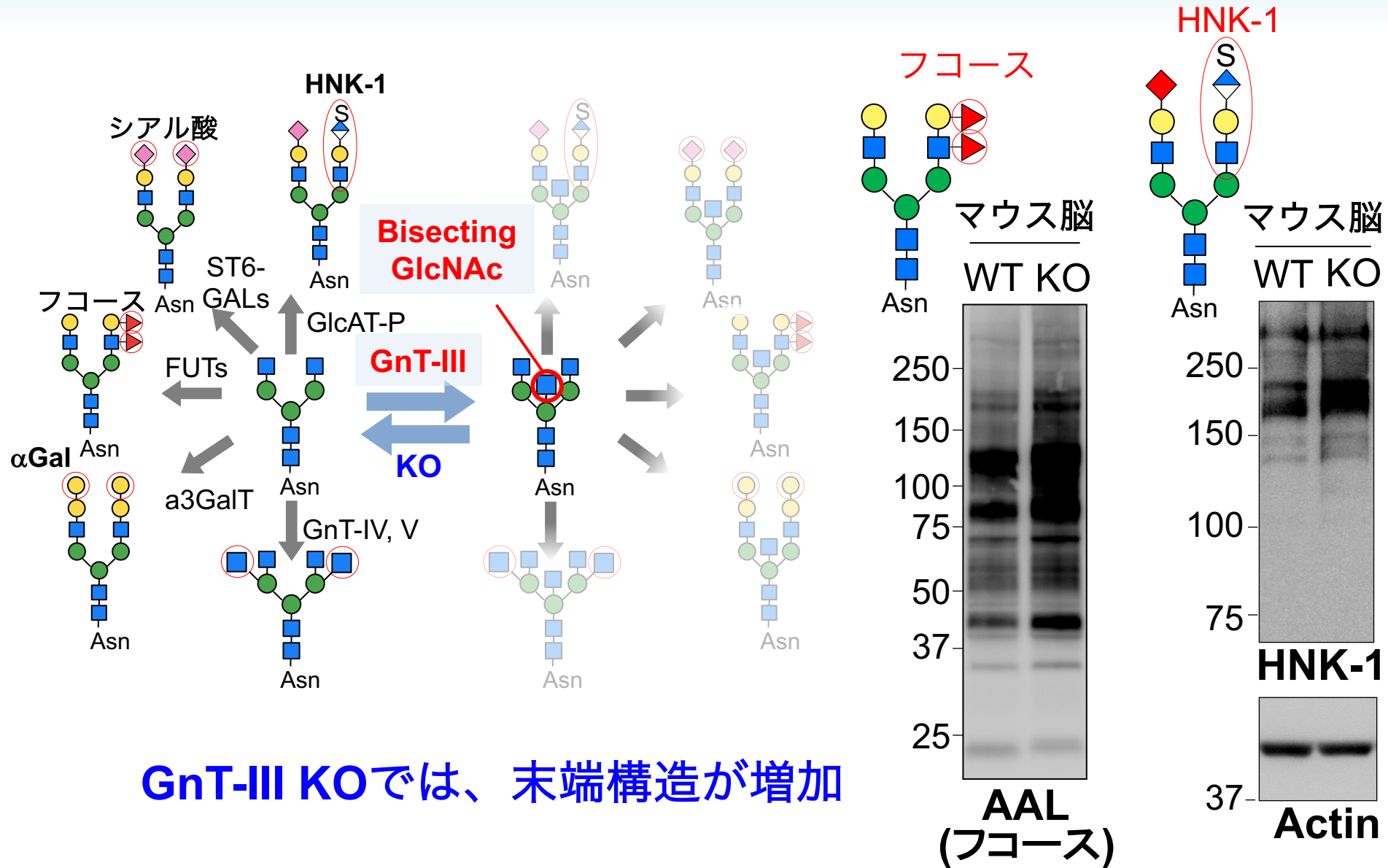


◆ シアル酸転移酵素 ◆ グルクロン酸転移酵素 ▶ フコース転移酵素



(Nakano et al., *Mol. Cell. Proteomics*, 2019, 18, 2044-2057)

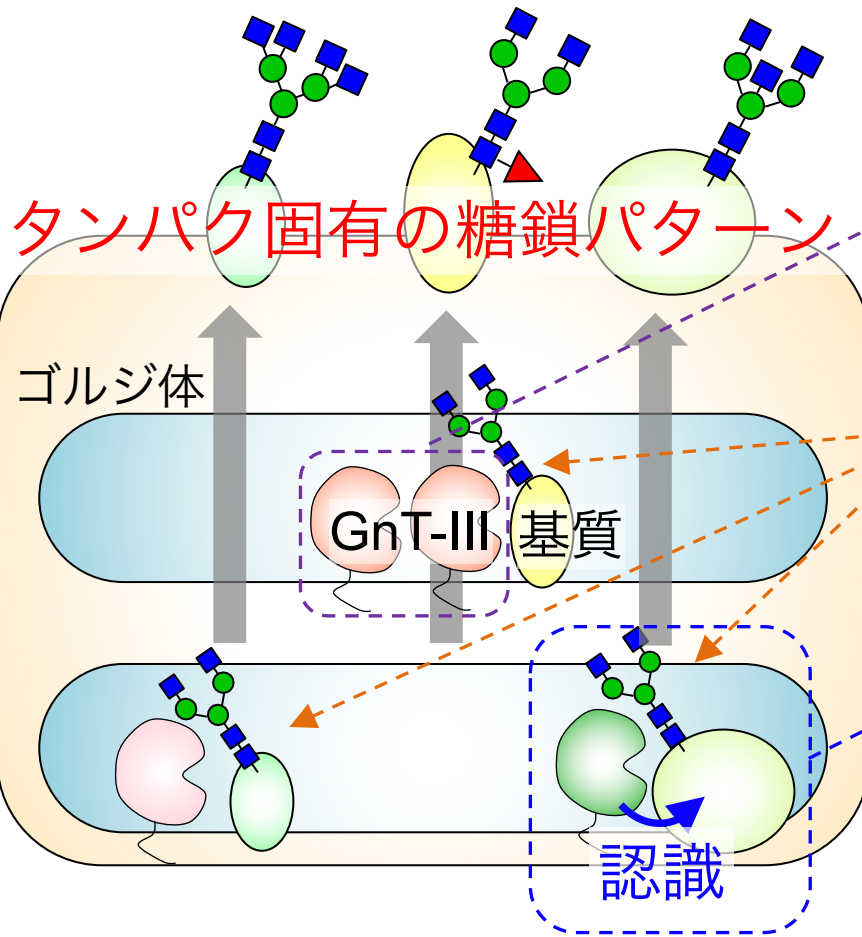
Bisecting GlcNAcは糖鎖末端修飾を抑制



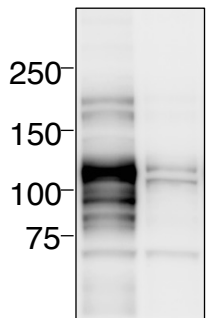
GnT-III KOでは、末端構造が増加

疑問点：GnT-IIIによる修飾のタンパク特異性と機能

タンパク選択的
な糖鎖発現



GnT-III WTKO



Bisecting
GlcNAc

GnT-IIIの

1. 量 (発現)

➔ mRNA、タンパク
(分泌、分解)

2. 場所 (局在)

➔ ゴルジ槽の中
の精密局在

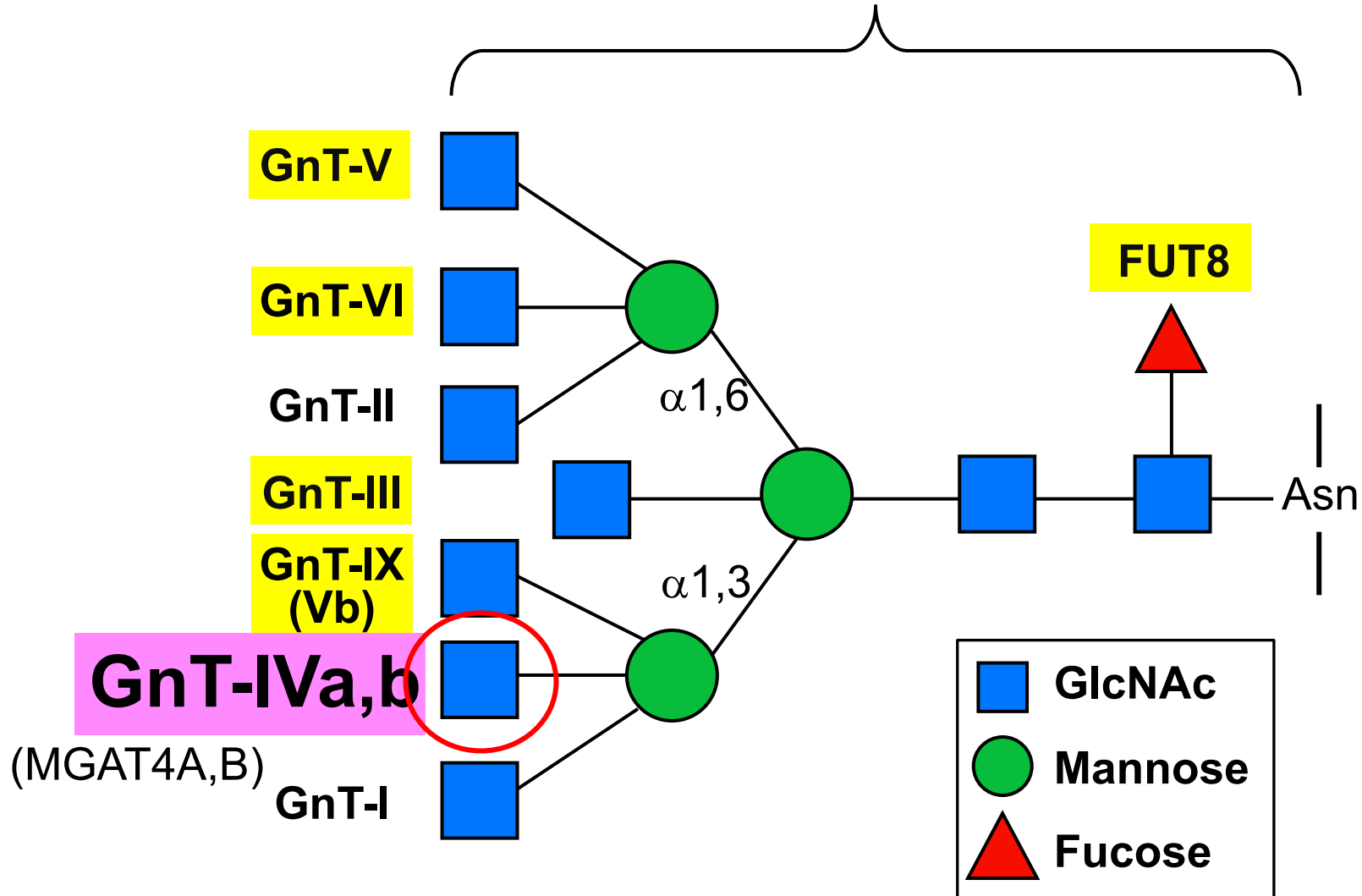
3. 反応 (認識)

➔ ポリペプチドの
認識 (or排除)

生物機能・疾患の理解

Topic 2 : GnT-IV

N型糖鎖



GnT-IVa (MGAT4A) と2型糖尿病

GnT-IVaは膵臓、
腸で発現が高い

大坪先生
(熊本大)

Insulin分泌
血糖調節

GnT-IVa KOマウスは高血糖

Glucose transporter-2 in pancreas
→ enhanced endocytosis



Type2 diabetes (糖尿病)

[\(Ohtsubo et al., Cell, 2005, 123, 1307-1321\)](#)

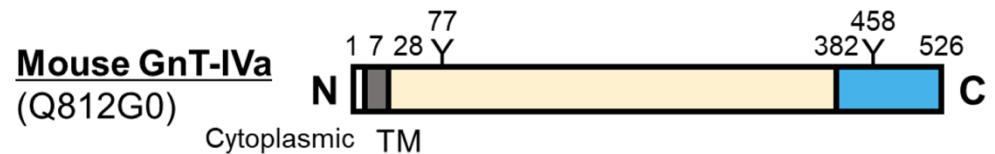
[\(Ohtsubo et al., Nat. Med., 2011, 17, 1067-1075\)](#)

不明な点

GnT-IVaの構造・特異性

→立体構造解析

長江先生と共同
(大阪大)



糖転移酵素の触媒ドメインと
しては大きい



複数のドメインからなる？


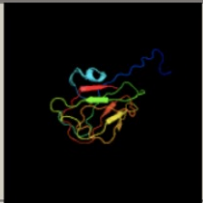


[\(Nagae et al., Commun. Biol., 2022, 5, 695\)](#)

GnT-IVaはレクチンドメインを持つ

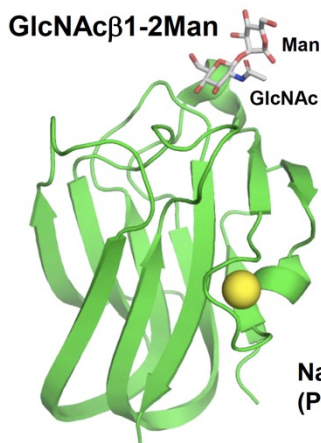
Phyre2サーバ(タンパク質のfold予測)の相同性検索

(Kelley et al., *Nat. Protocols*, 2015, 10, 845-858)

C末端側は細菌タンパクNagHのレクチンドメインと類似

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
1	c2Is6A_	 Alignment		99.0	14	PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: hyaluronoglucosaminidase; PDBTitle: solution nmr structure of a non-canonical galactose-binding cbm32 from2 clostridium perfringens
2	c5vcmA_	 Alignment		97.7	15	PDB header: transferase Chain: A: PDB Molecule: alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-n- PDBTitle: alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-n-acetylglucosaminyltransferase2 with bound udp and manganese

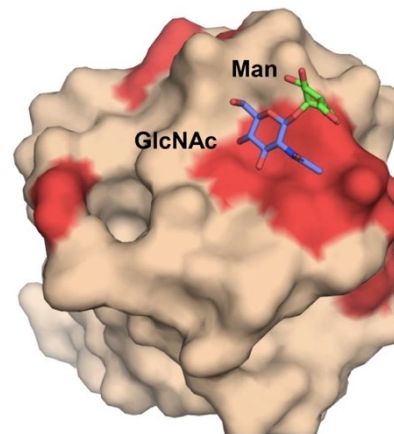
N末端側は糖転移酵素GnT-IIと類似



GlcNAcと結合

ウェルシュ菌
glycosidaseの糖
鎖結合ドメイン

NagH CBM32
(PDB code: 2WDB)



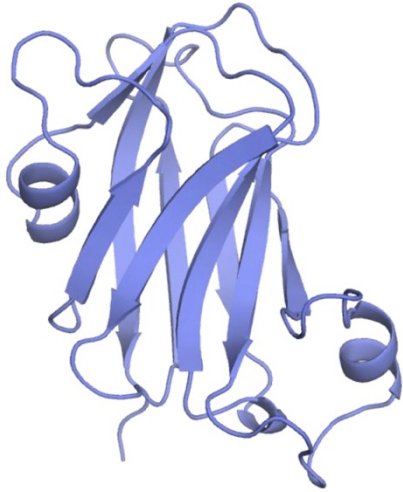
NagHの構造中で
GnT-IVaにも保存さ
れている残基(赤)



糖鎖と結合するレク
チンドメインの可能
性大

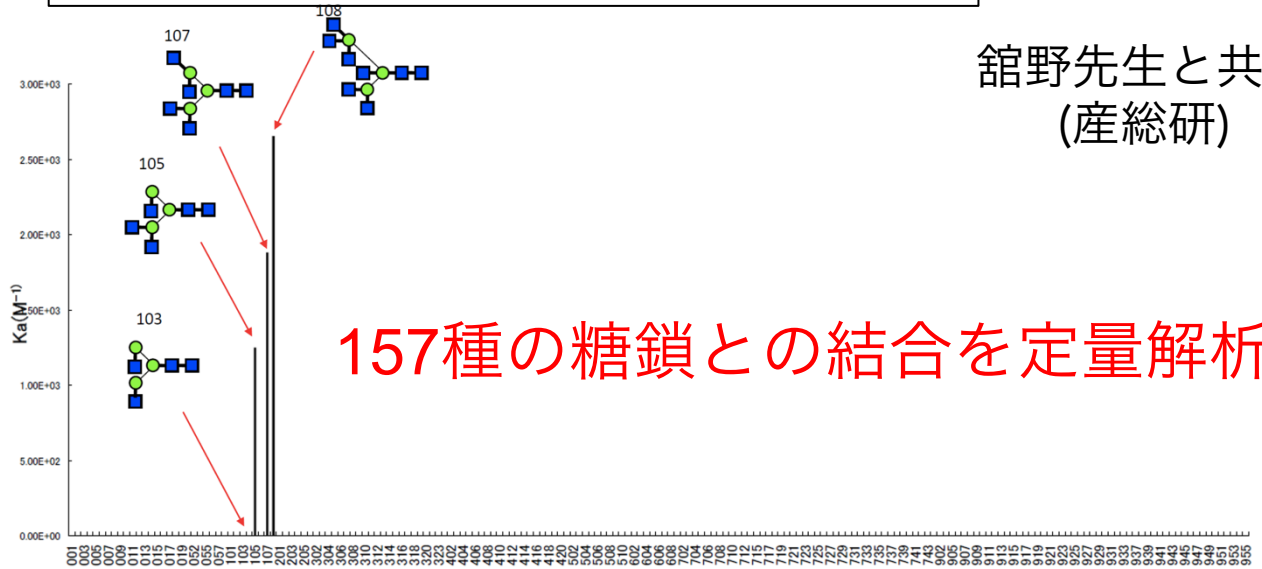
Lectin domainの結晶構造

GnT-IVa lectin domain



結晶化に成功

Frontal affinity chromatography



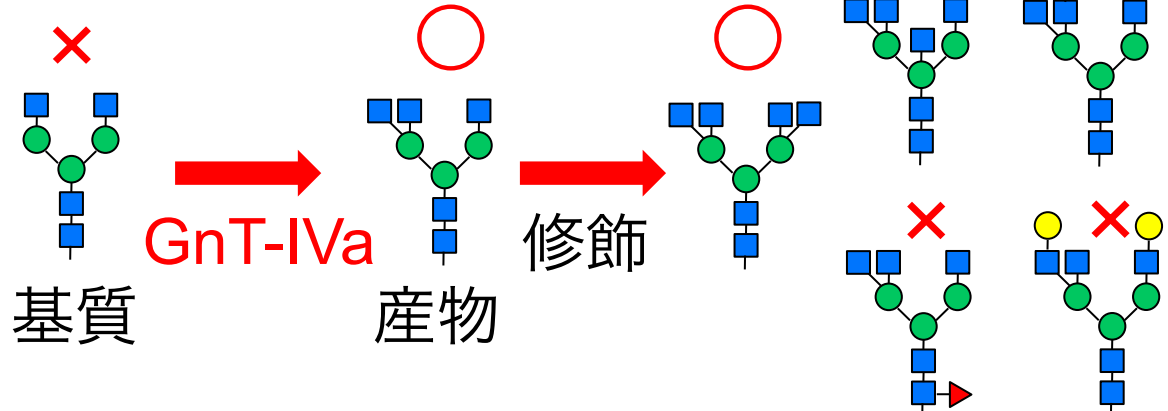
舘野先生と共同
(産総研)

157種の糖鎖との結合を定量解析

NagH



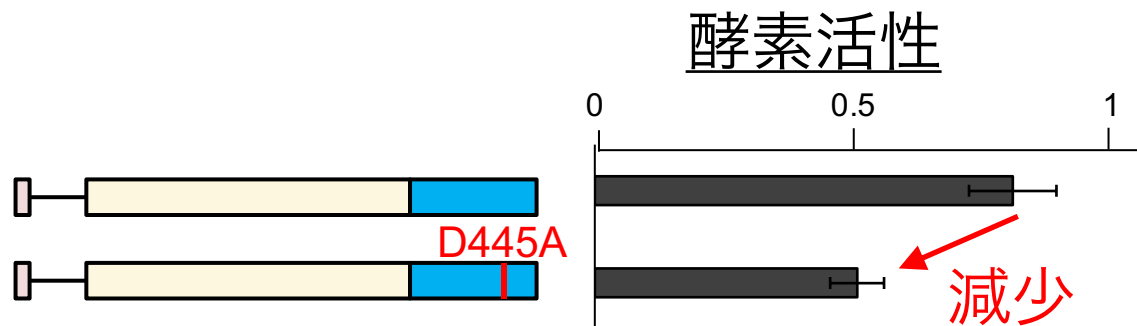
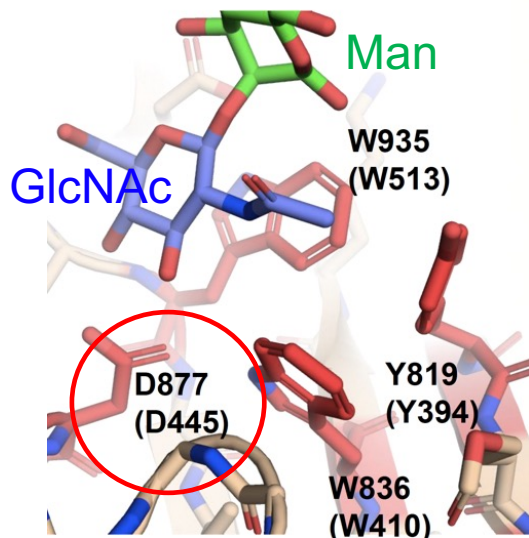
→ NagHと類似



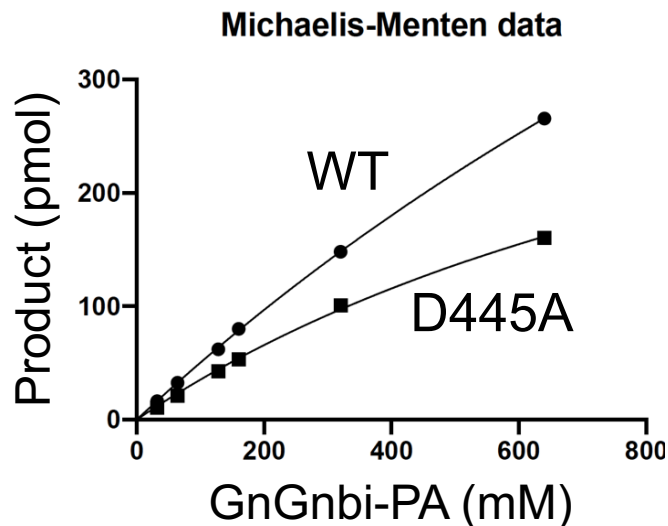
レクチンドメインは反応直後の産物を認識

レクチンドメインは酵素活性に必須

NagHの糖鎖結合部位



レクチンドメインは酵素活性に必要



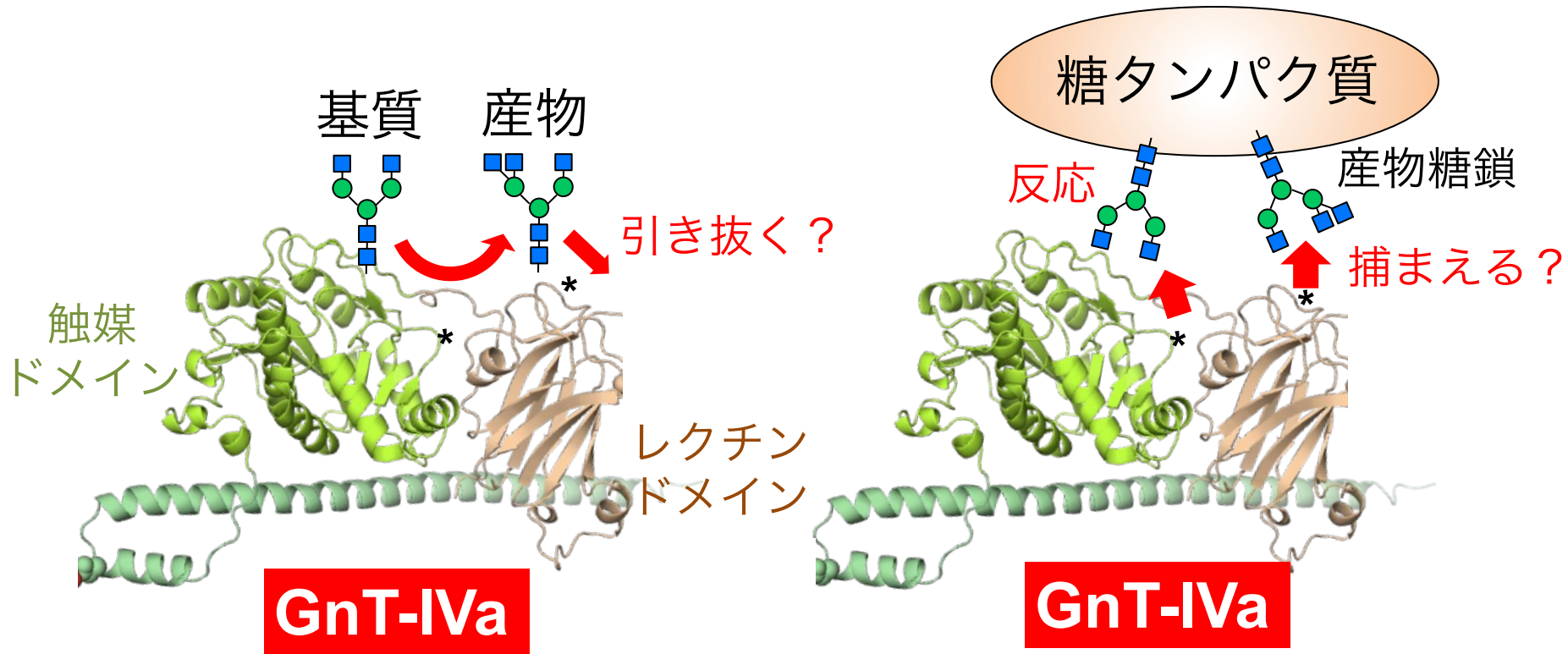
	Km for donor (mM)	Km for acceptor (μ M)
WT	3.24	2444
D445A	3.95	1251

あまり変化なし

変異体の親和性が高い
(V_{max} は半分程度)

([Nagae et al., Commun. Biol., 2022, 5, 695](#))

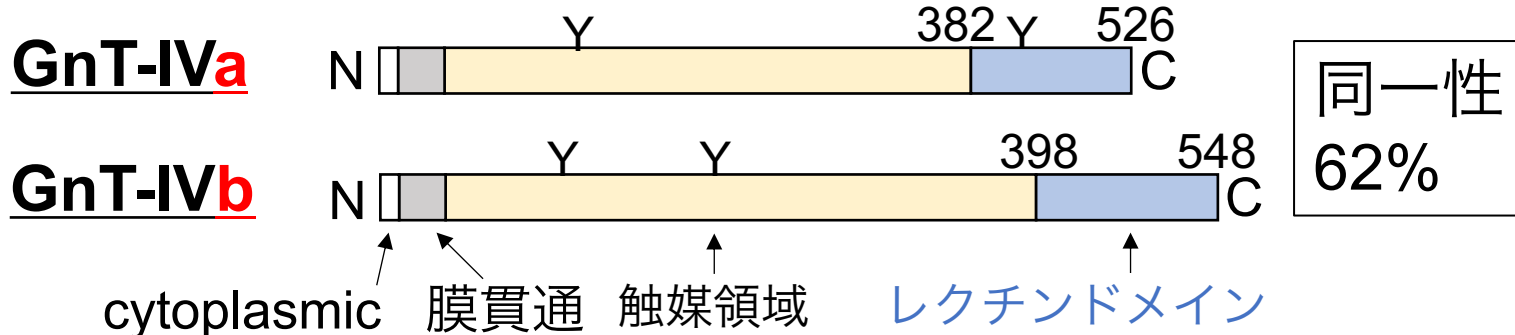
2つのモデル



酵素反応自体の高速化に寄与

一つの糖タンパク質に対して複数箇所作用しやすくなる

GnT-IVa, -IVb : なぜ2つあるのか？



組織分布

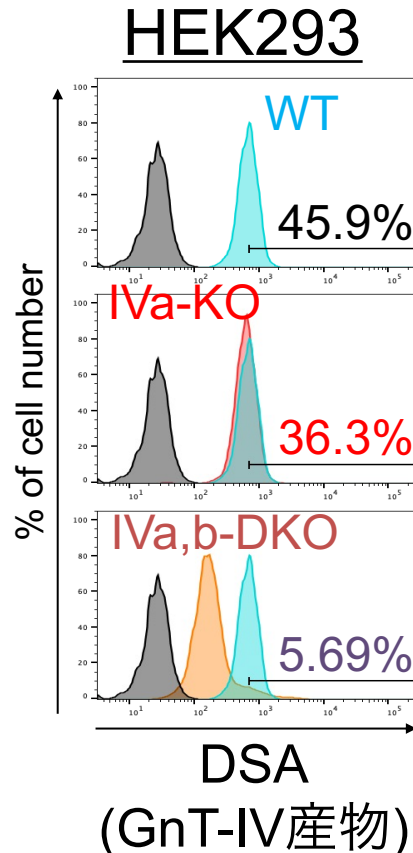
GnT-IVa
(MGAT4A)

膵臓

GnT-IVb
(MGAT4B)

Ubiquitous

(Yoshida et al., *Glycoconj. J.*, 1998, 15, 1115-1123)



同一細胞内で
2つが機能



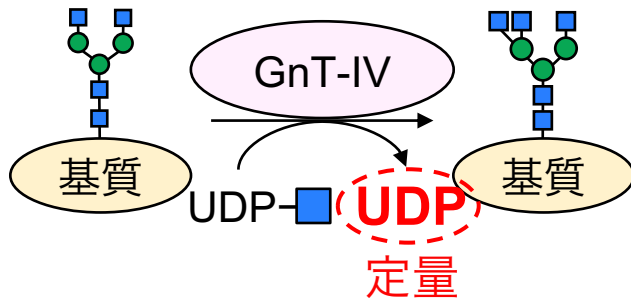
異なる役割を
持つのか？



タンパク質選択性は？
(糖鎖に対する基質特異性はほぼ同じ)

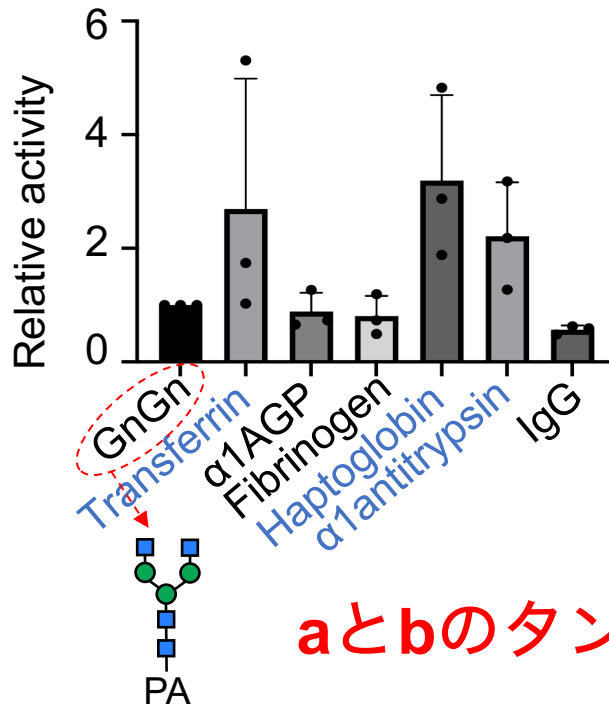
糖タンパク質に対する酵素活性

UDP-Glo assay

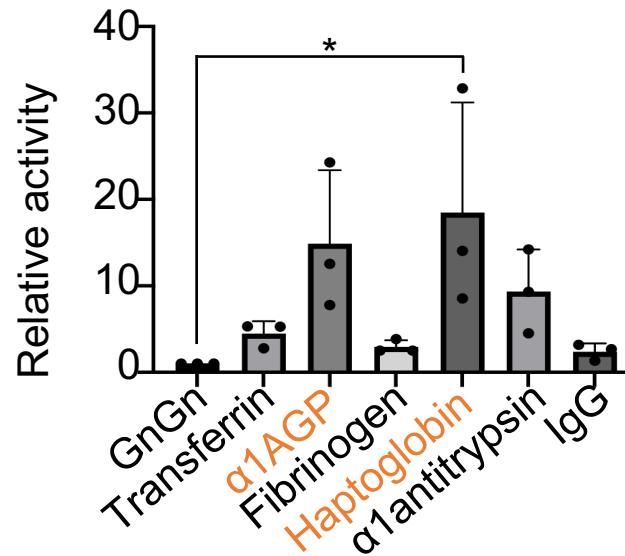


6種の糖タンパク質に対する活性を測定

GnT-IV^a activity
(relative to GnGn)



GnT-IV^b activity
(relative to GnGn)

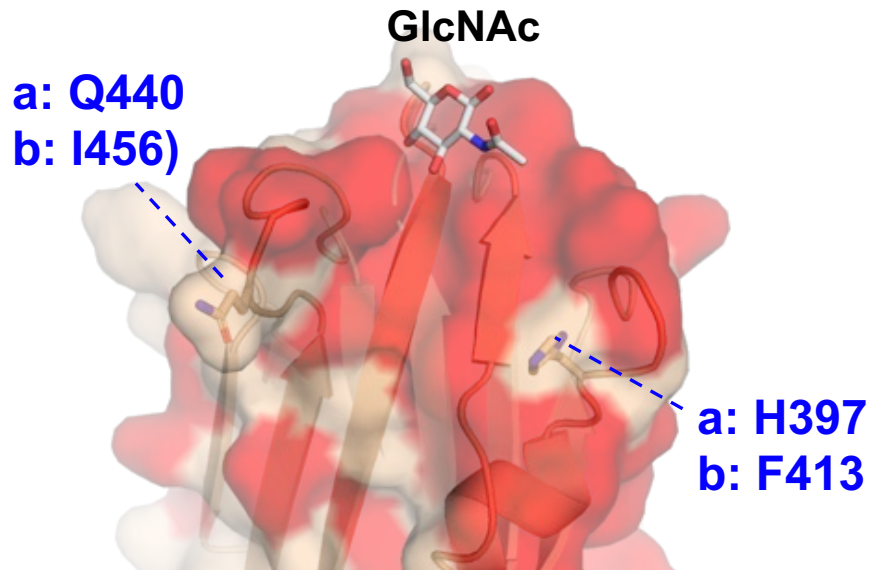


aとbのタンパク質選択性は異なる

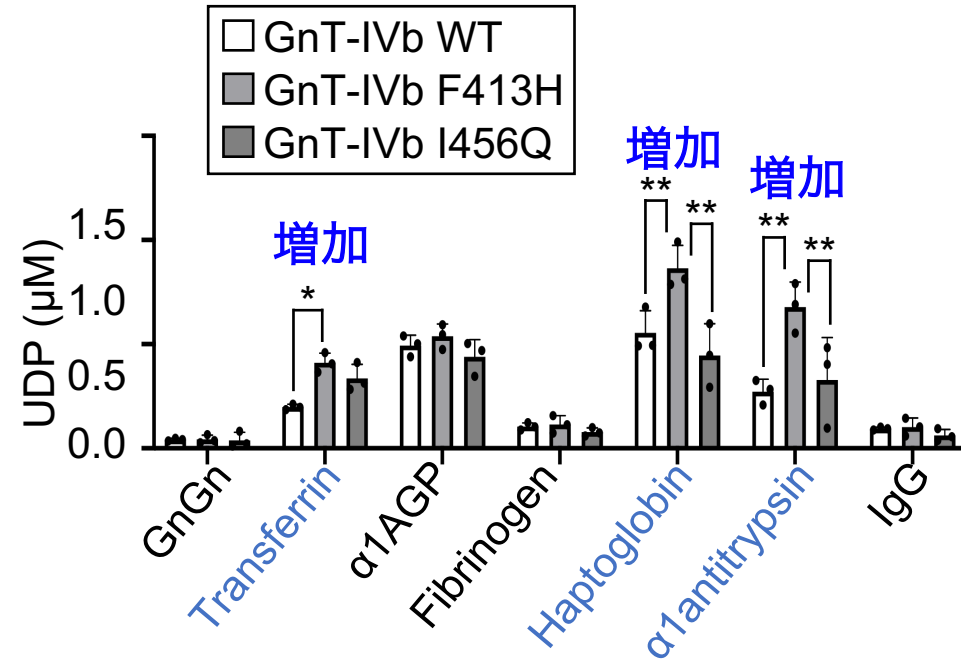
レクチンドメインが特異性決定に関与

レクチンドメインの構造

赤い領域：aとbで保存



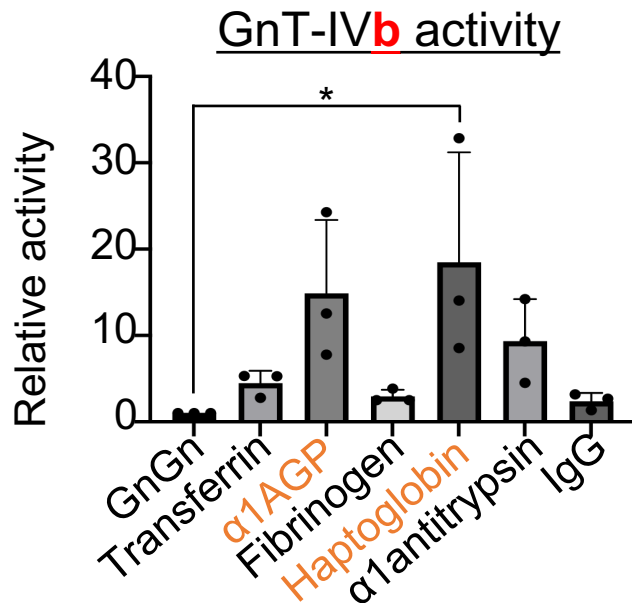
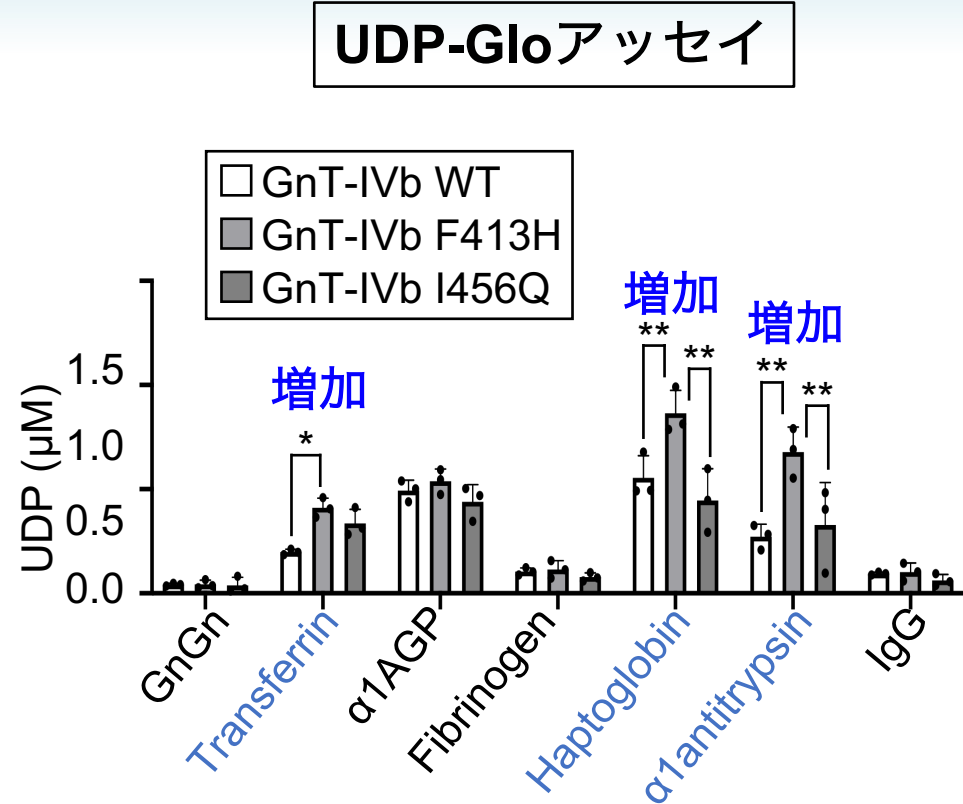
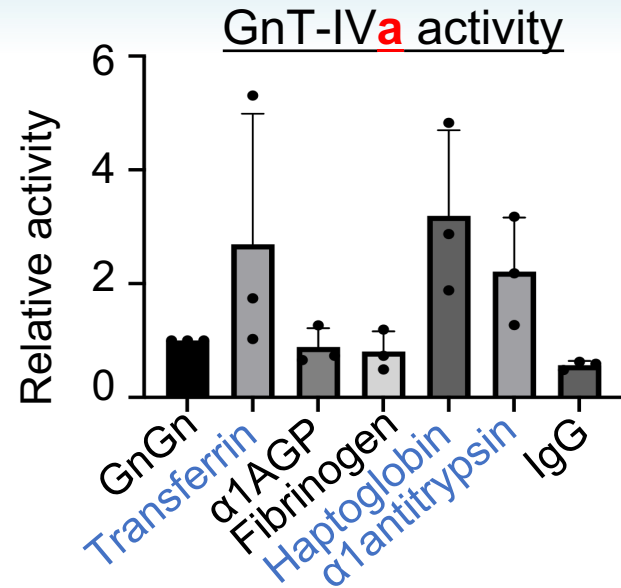
UDP-Gloアッセイ



保存されていないアミノ酸2ヶ所

→ GnT-IVaと同じアミノ酸に置換したbを精製

レクチンドメインが特異性決定に関与

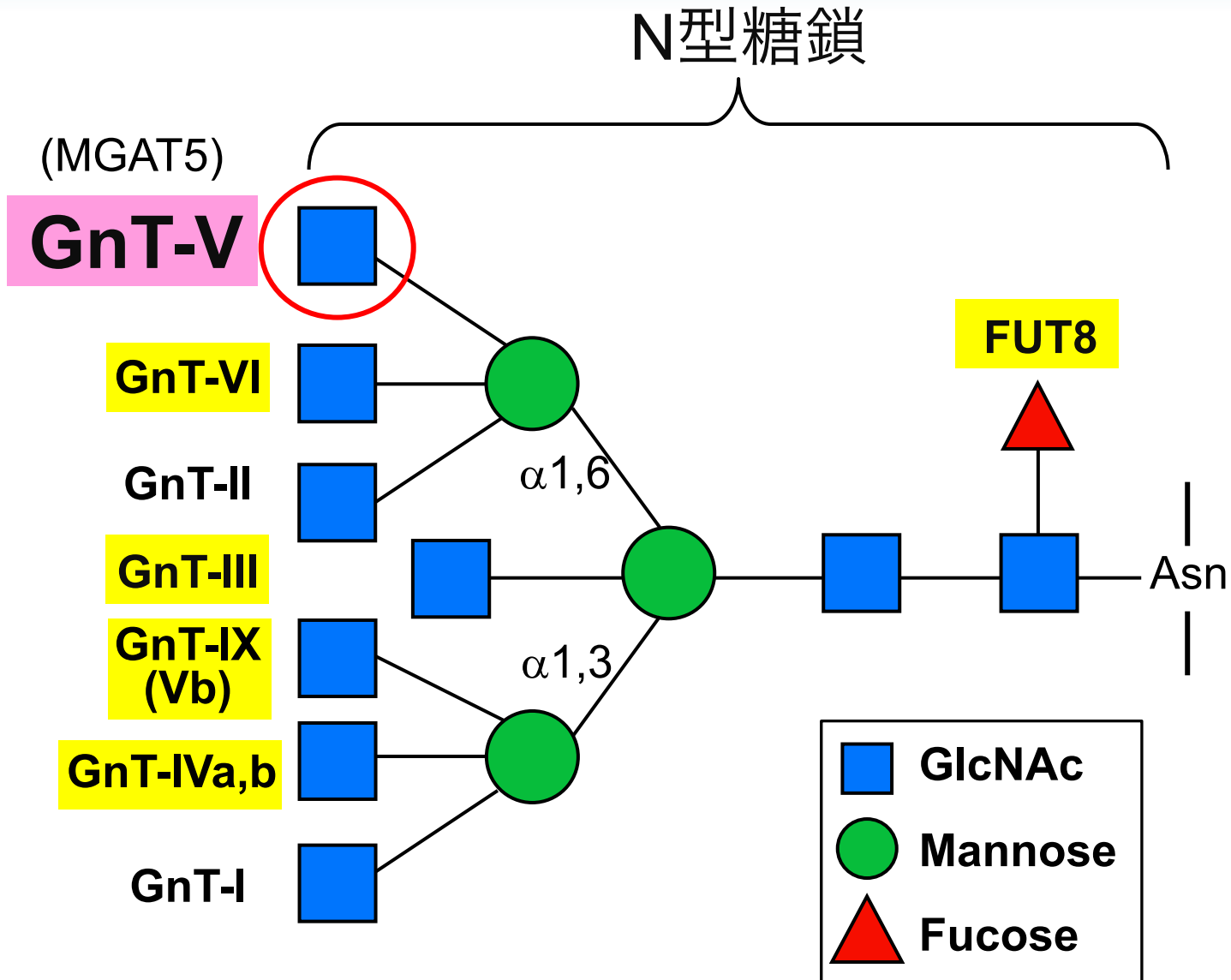


GnT-IVbのレクチンドメイン変異体 F413HはIVaに近い基質選択性を示す



GnT-IVa,bはタンパク質選択性が異なり、レクチンドメインが制御

Topic 3 : GnT-V



GnT-Vの阻害剤はがん治療薬の有力な候補の一つ

GnT-V (MGAT5)の立体構造

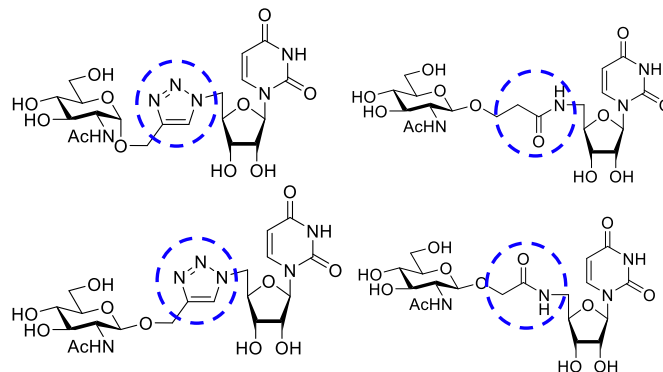
構造を基盤とした阻害剤デザイン

有機化学

安藤先生 田中先生

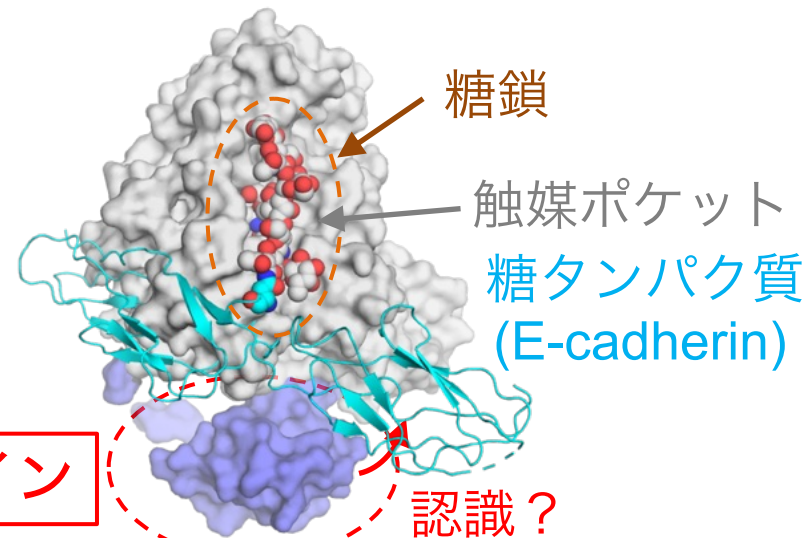
(岐阜大)

と共同



(Vibhute, et al., *BBA Gen. Subj.*, 2021, 1866, 130118)

基質タンパク質の認識

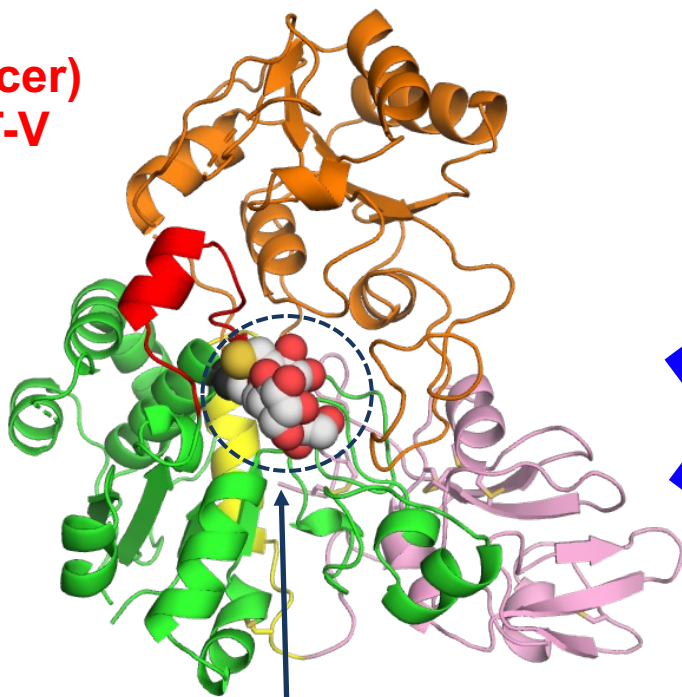
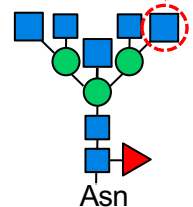


(Osuka et al., *J. Biol. Chem.*, 2022, 298, 101666)

GnT-Vの立体構造

長江先生
と共同

(cancer)
GnT-V



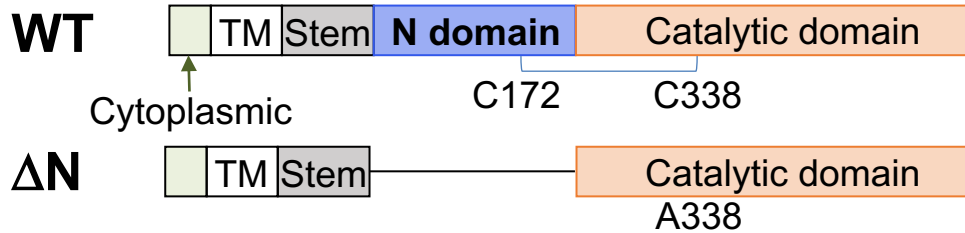
基質アナログ

基質糖鎖を認識する
メカニズムを解明

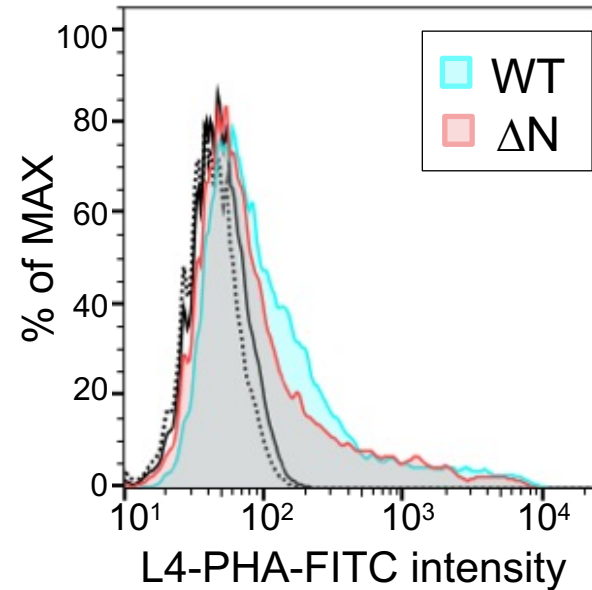
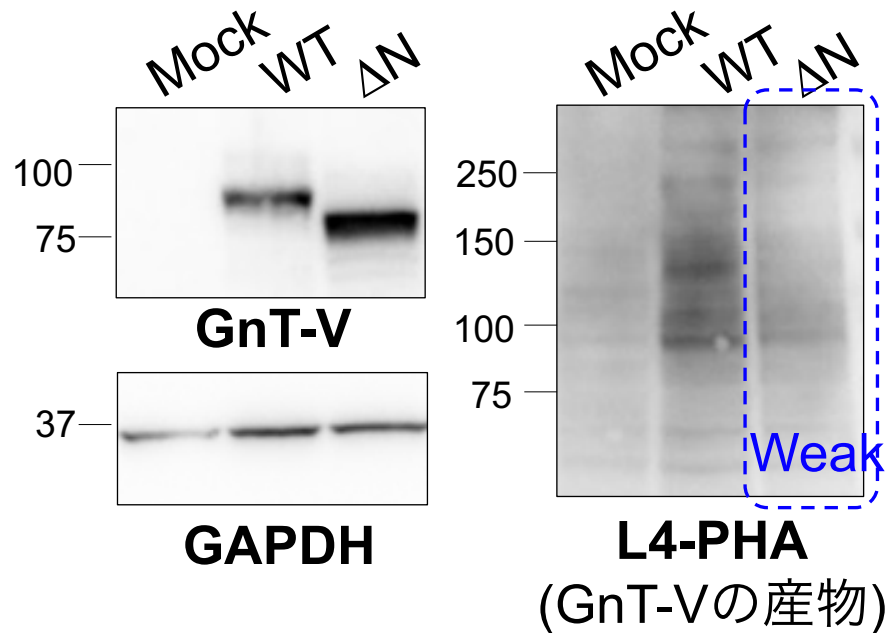
(Nagae# and Kizuka#, *Nat. Commun.*, 2018, 9, 3380)

ΔN は細胞内での糖鎖合成能力が低下

GnT-V



HEK293 GnT-V KO

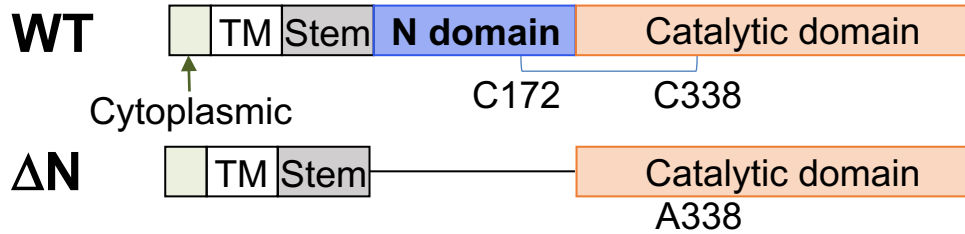


Nドメインは、細胞内での効率的な糖鎖合成に必要

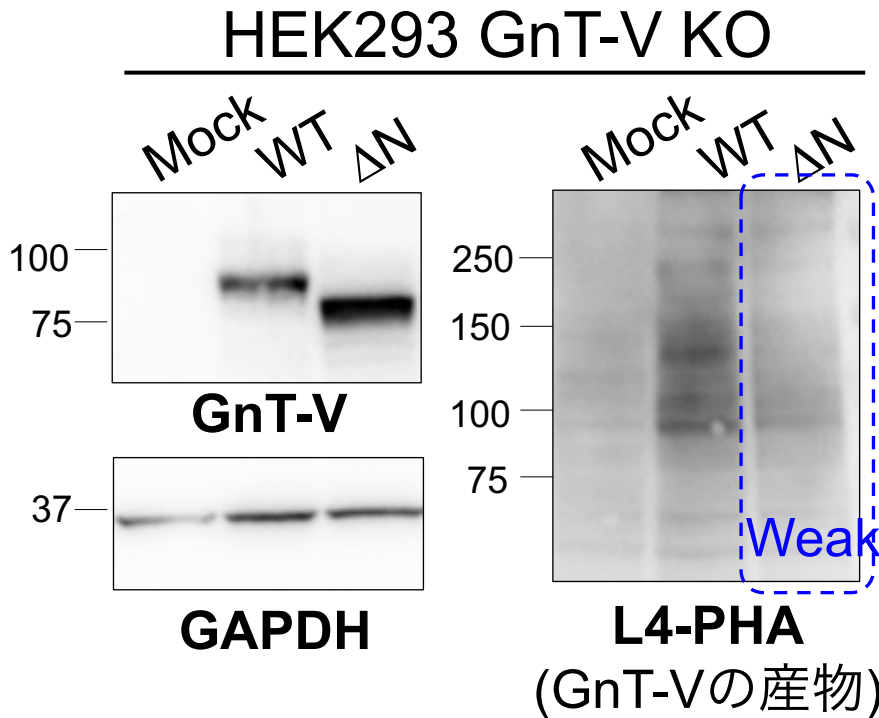
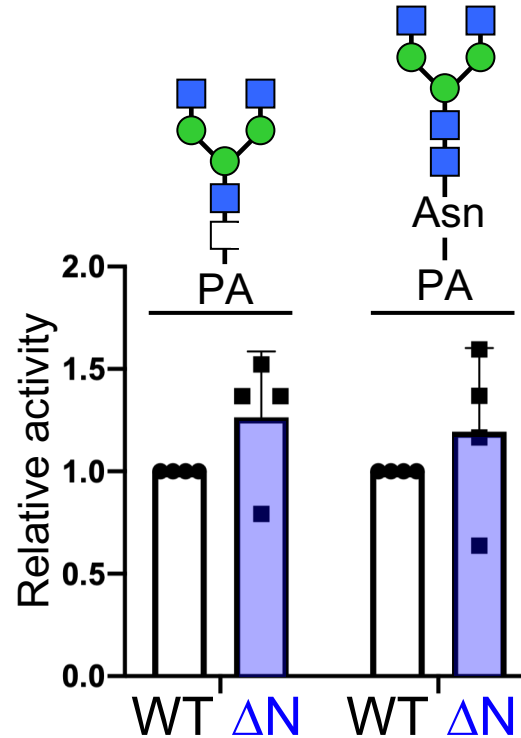
(Osuka et al., *J. Biol. Chem.*, 2022, 298, 101666)

ΔN は細胞内での糖鎖合成能力が低下

GnT-V



In vitro GnT-V 活性

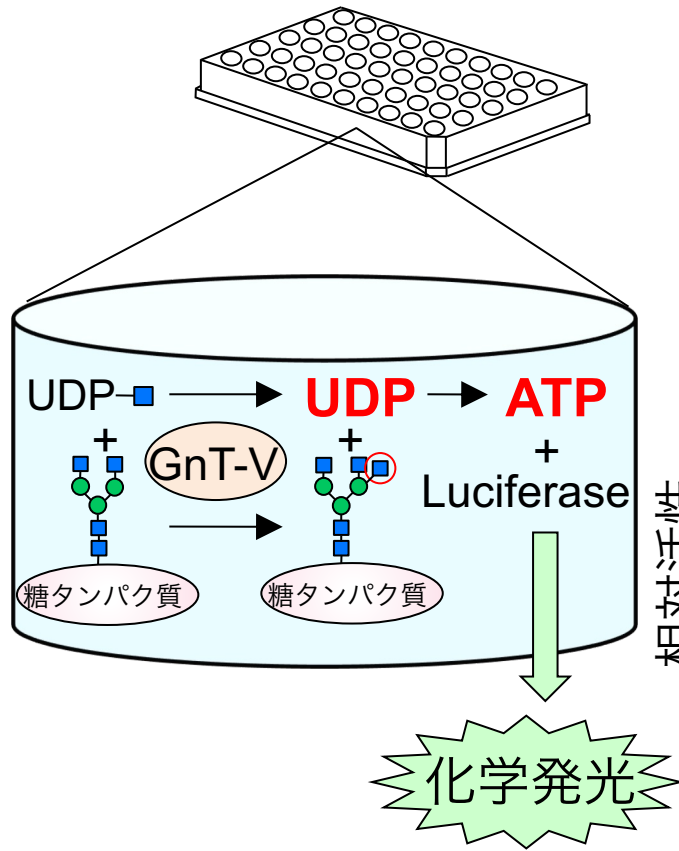


GnT-V ΔN は糖鎖に対する活性は完全に保持

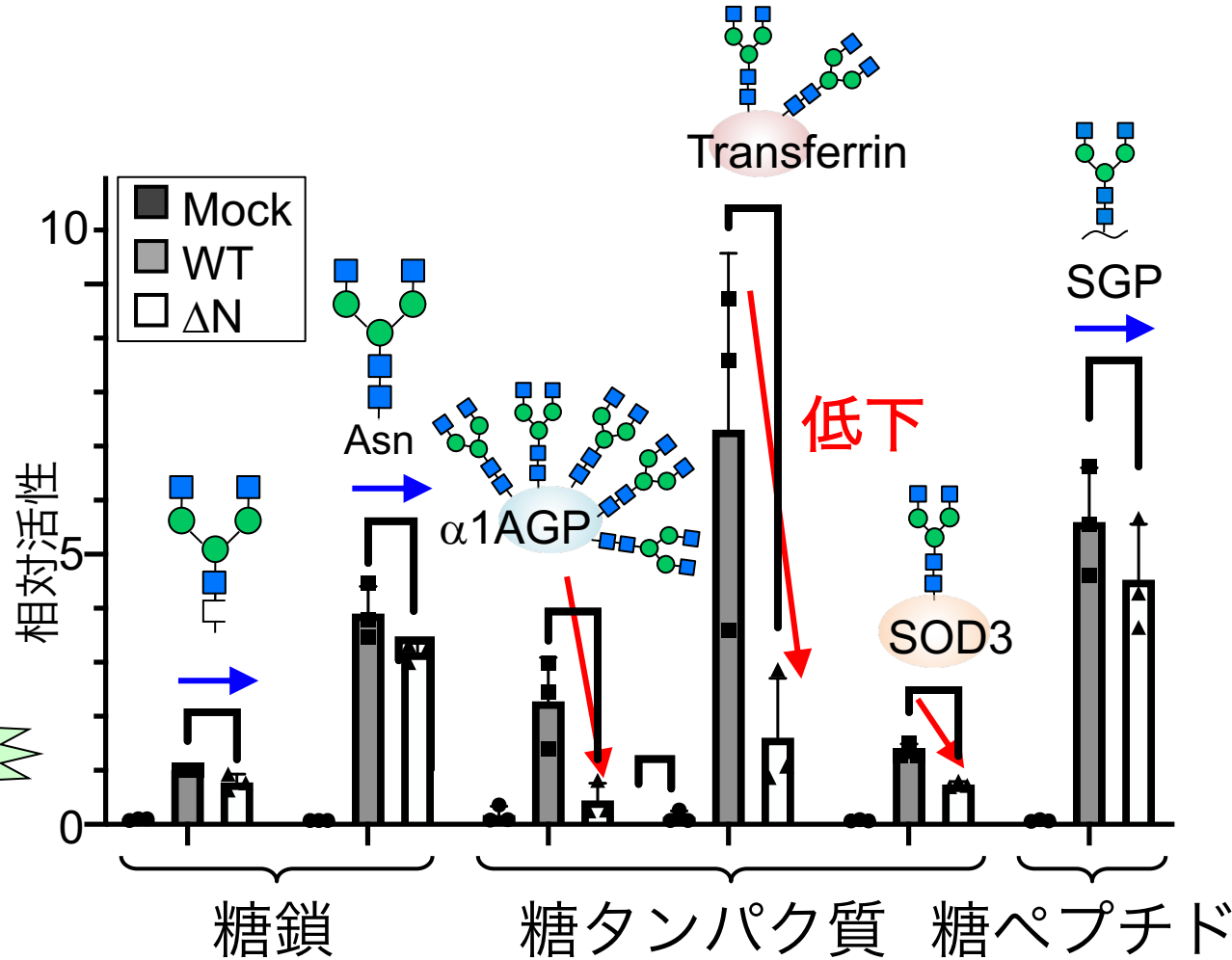
Nドメインは、細胞内での効率的な糖鎖合成に必要

糖タンパク質に対する活性測定 (UDP-Glo)

UDP-Glo assay



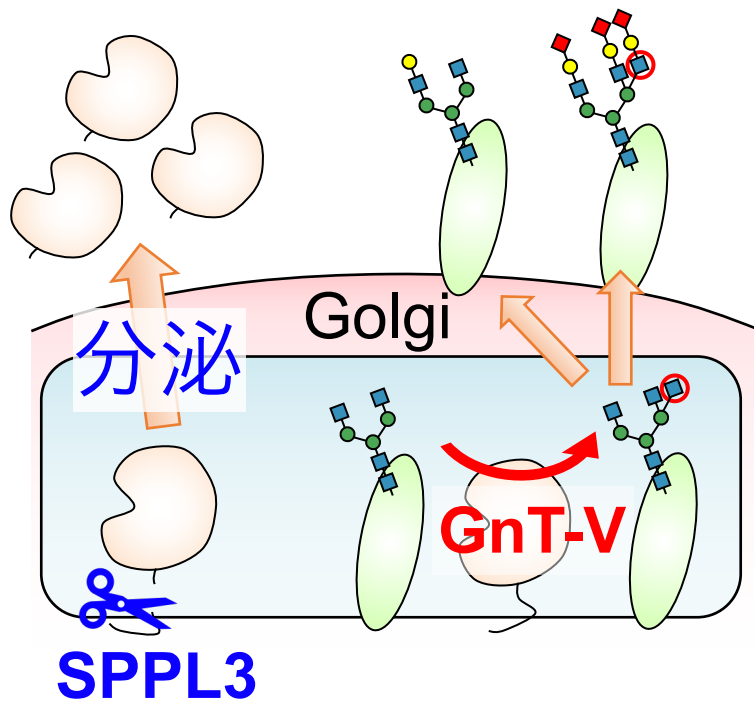
GnT-V 活性 (UDP-Glo)



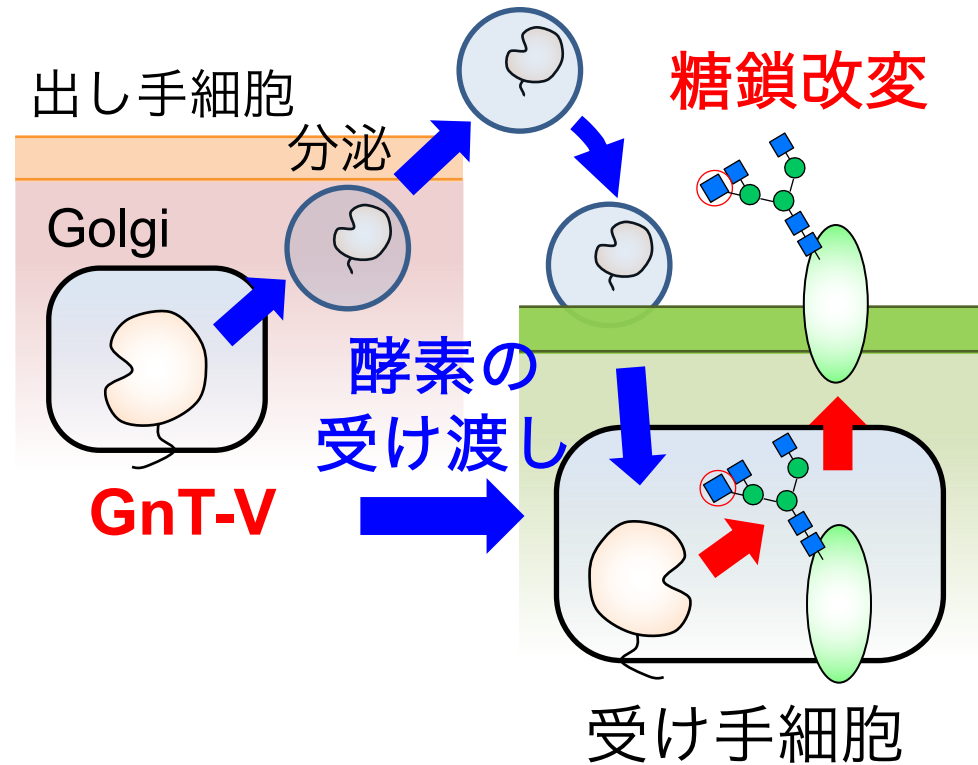
Nドメインは、糖タンパク質基質に対する活性に不可欠

GnT-Vのタンパク質量の制御

細胞外小胞 (sEV) (exosomeなど)



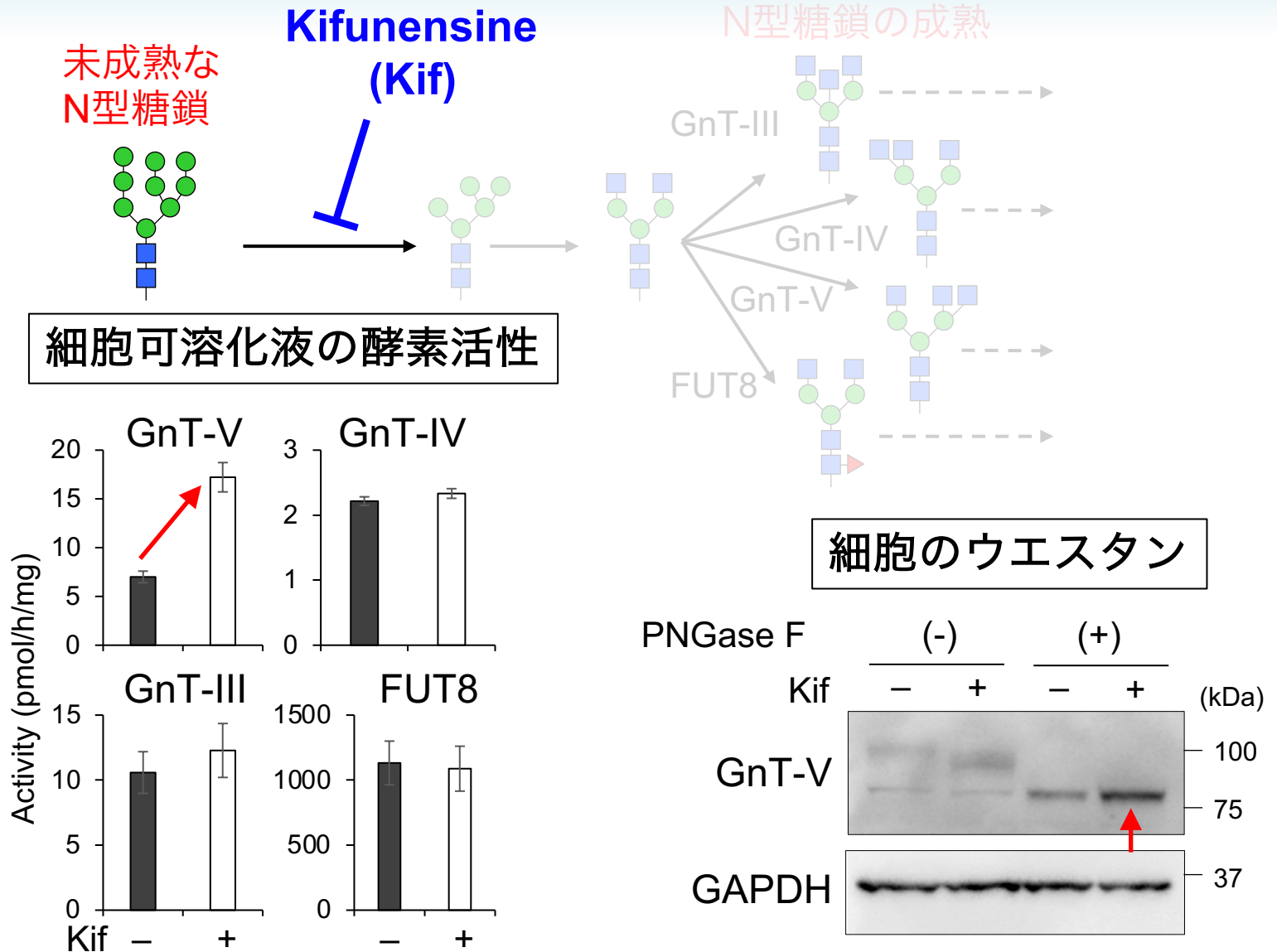
GnT-Vは切断・分泌される



GnT-VはsEVに存在している

(Hirata, et al., *Commun. Biol.*, 2022, 5, 743) (Hirata, et al., *iScience*, 2022, 26, 105747)

N型糖鎖の成熟阻害でGnT-Vの量が増加



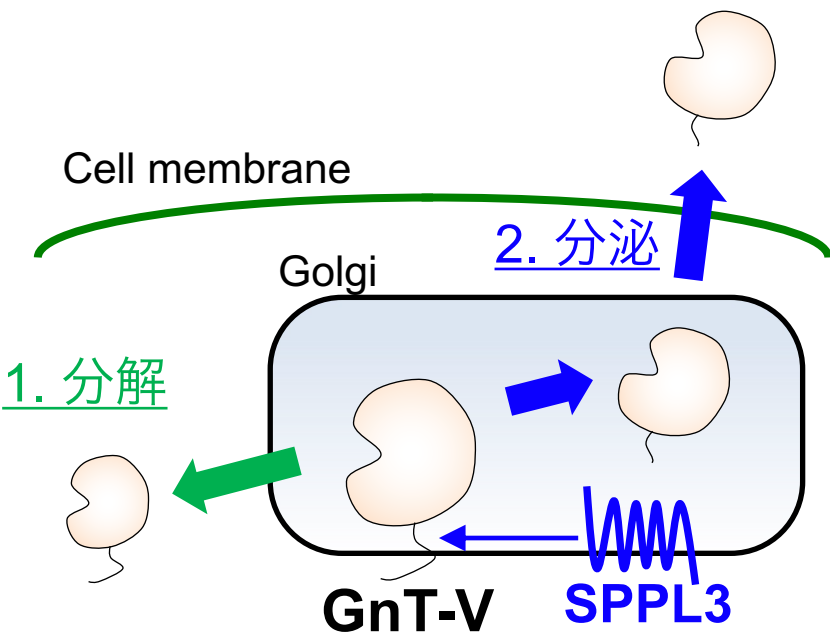
N型糖鎖の成熟が阻害されると、GnT-Vの量が増加する

(Hirata, et al., *Commun. Biol.*, 2022, 5, 743)

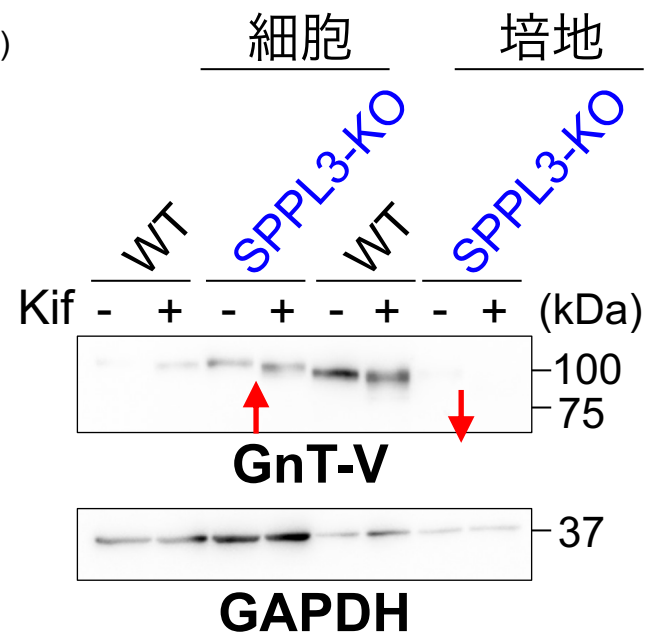
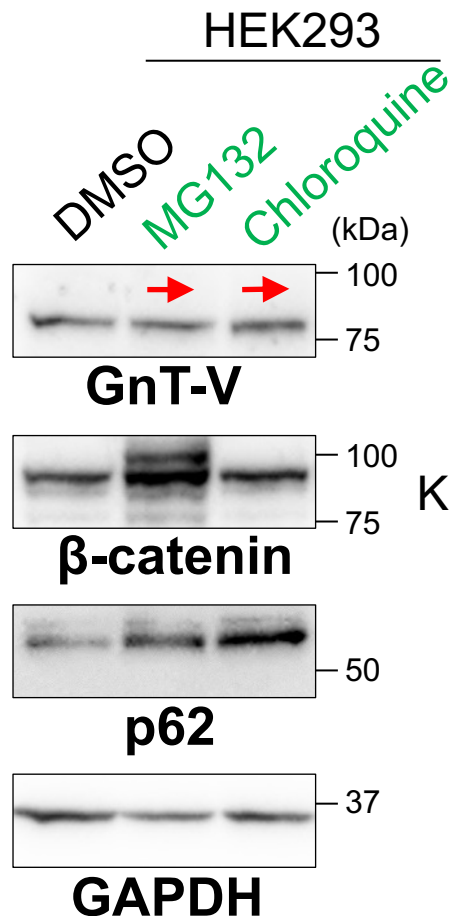
SPPL3によるGnT-Vの切断

GnT-Vのタンパクレベル制御

MG132: プロテアソーム阻害剤
Chloroquine: リソソーム阻害剤



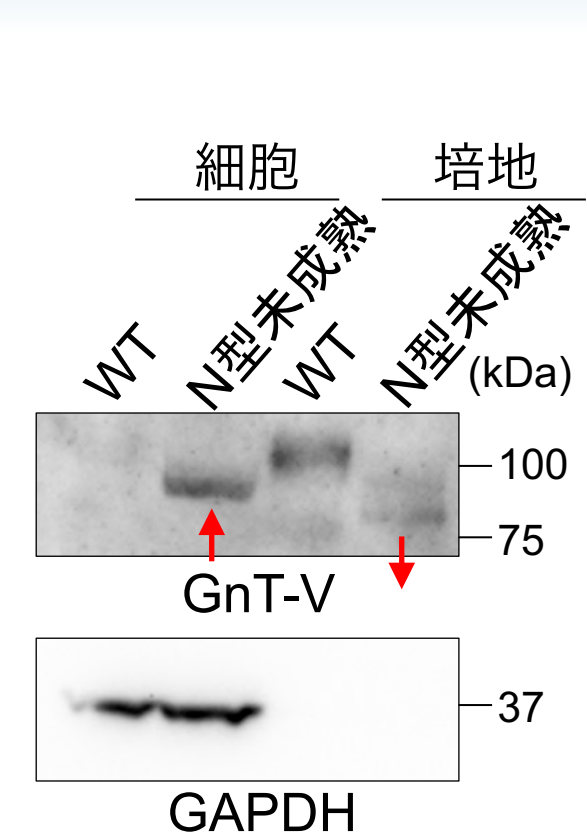
どちらがGnT-Vのタンパクレベルを主に制御？



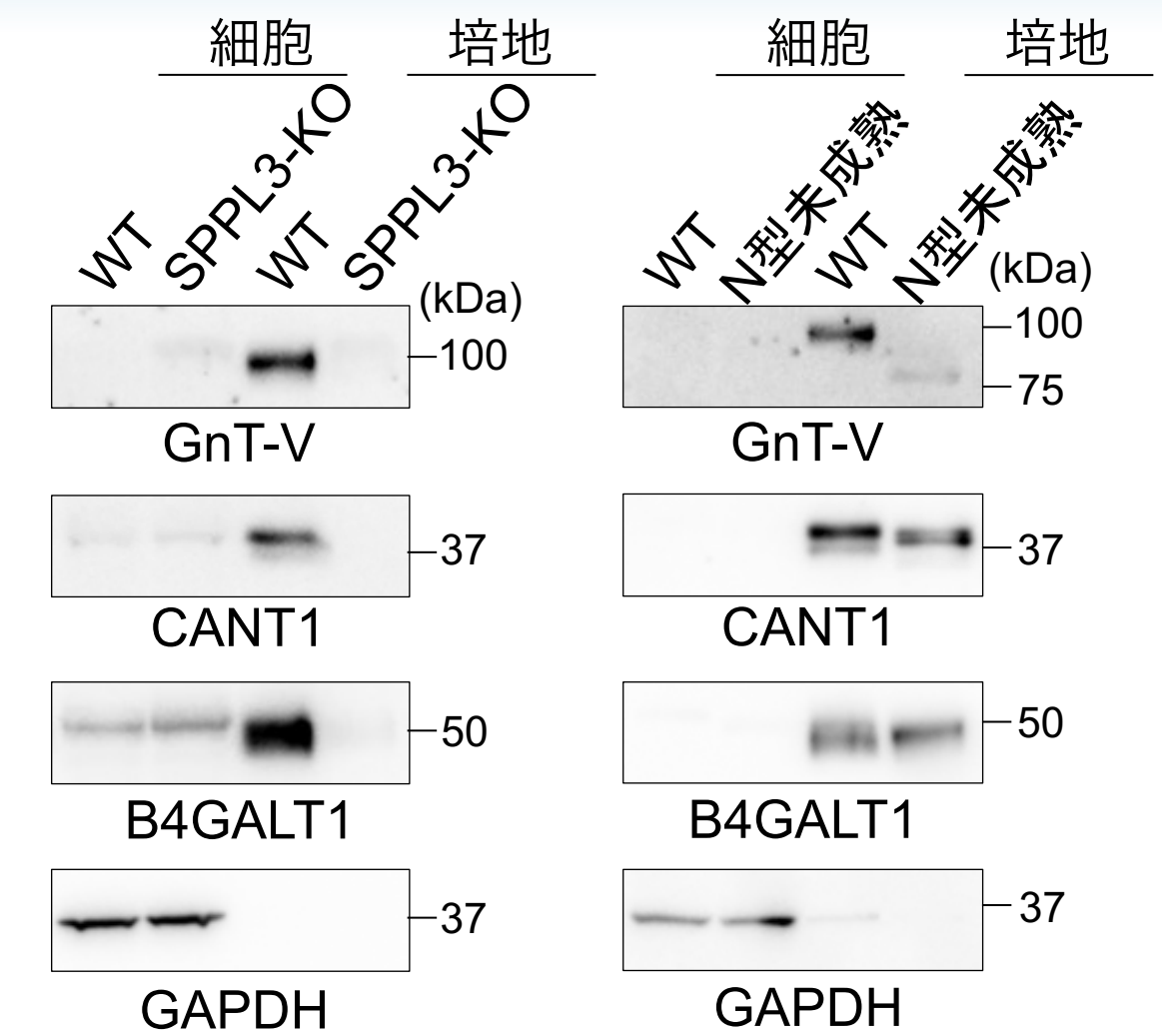
SPPL3依存的な分泌がGnT-Vのタンパクレベルを主に制御

([Hirata, et al., Commun. Biol., 2022, 5, 743](#))

N型糖鎖の成熟阻害によりGnT-Vの分泌が低下



SPPL3依存的な分泌
が低下

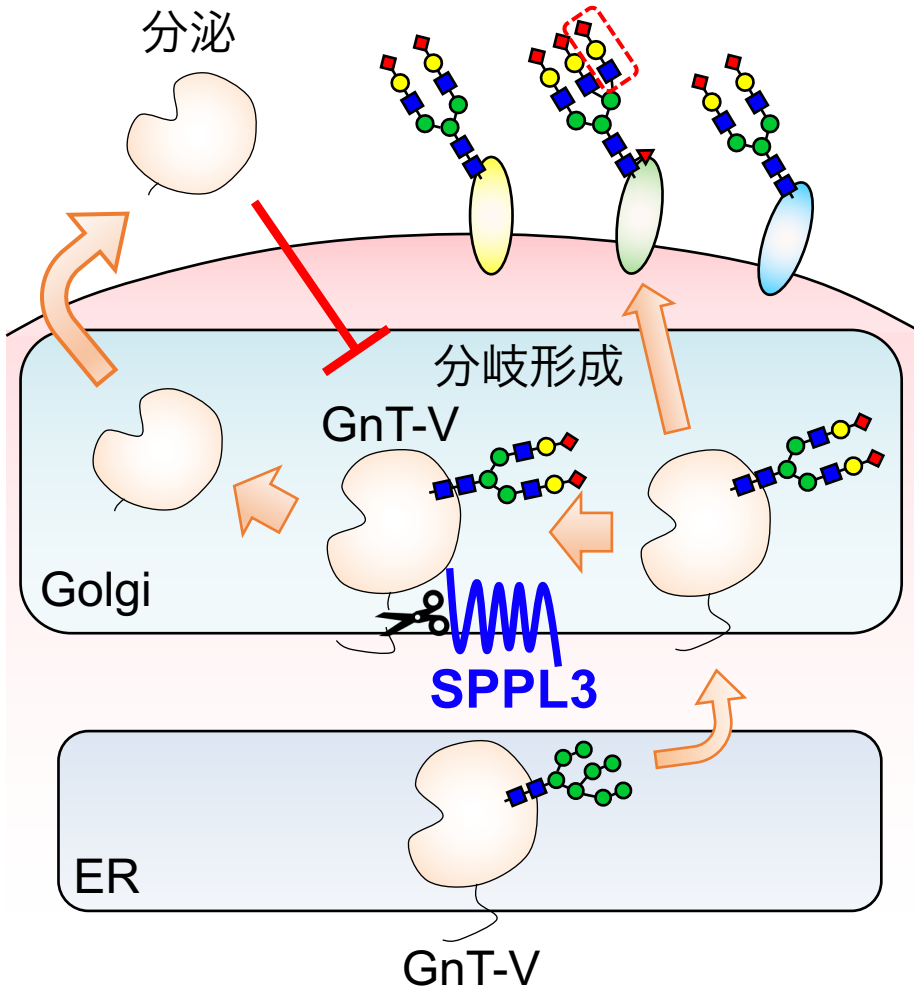


全てSPPL3の基質

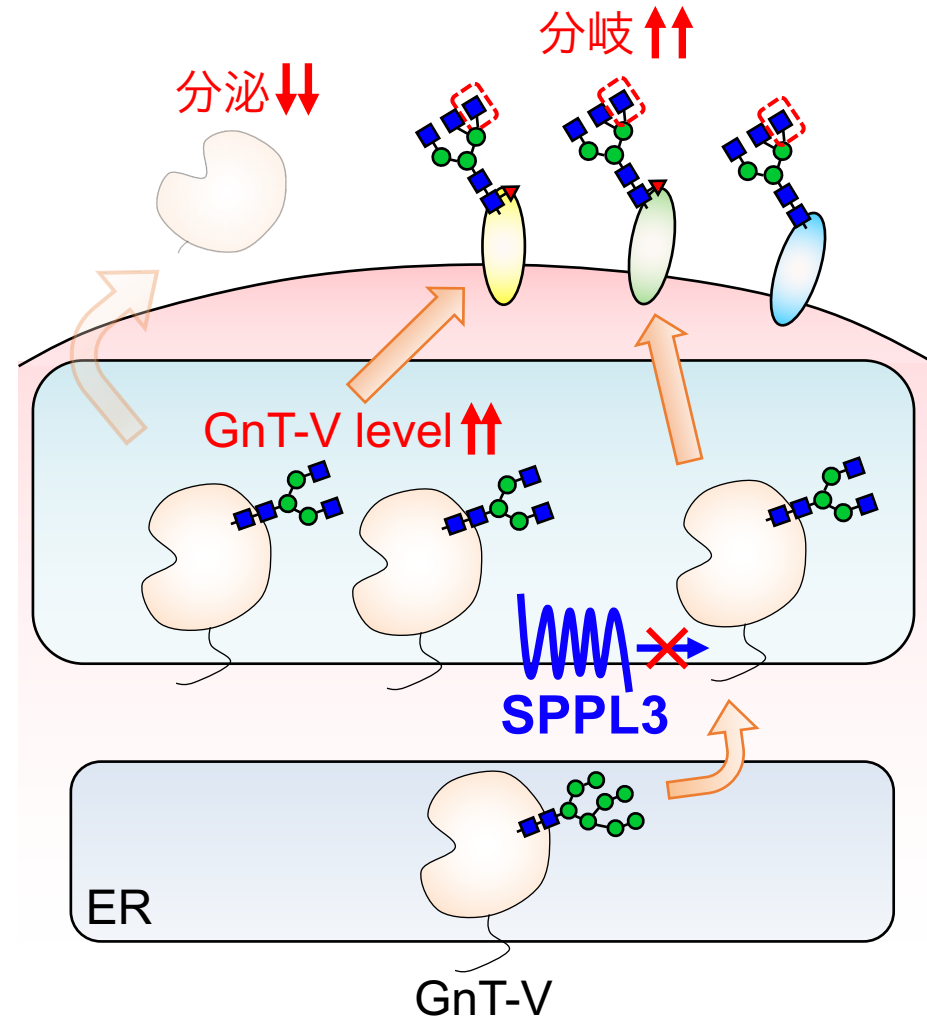
分泌量の変化はGnT-Vで最も大きい
([Hirata, et al., Commun. Biol., 2022, 5, 743](#))

GnT-Vの分泌制御機構

通常状態



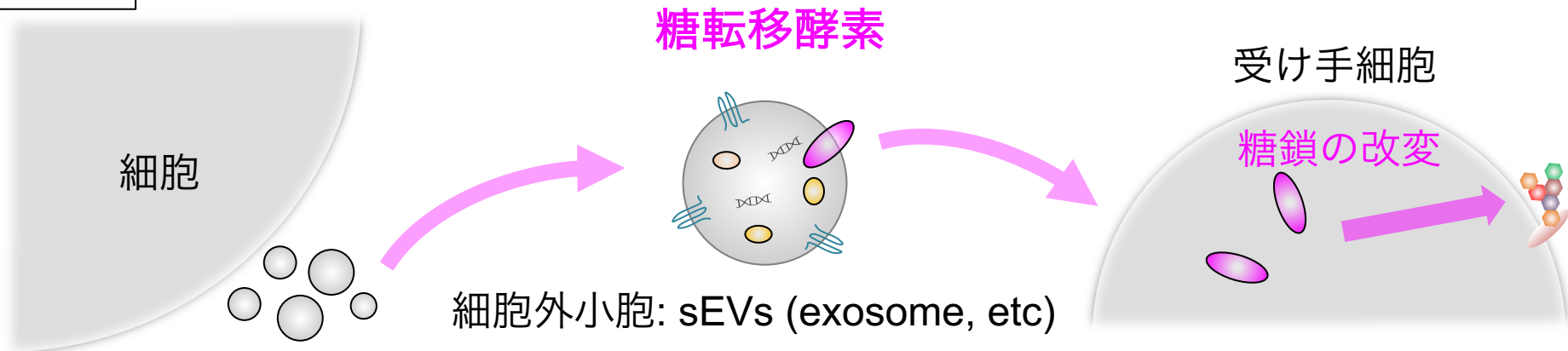
N型糖鎖が未成熟



GnT-Vの活性(タンパク量)は、細胞のN型糖鎖の成熟度に依存
([Hirata, et al., Commun. Biol., 2022, 5, 743](#))

細胞外小胞における糖転移活性

仮説



がん細胞からのsEVsの調製

粒子サイズ (qNano)

B16

Neuro2A

$106 \pm 32.6 \text{ nm}$

$108 \pm 24.3 \text{ nm}$

Exosome markers

B16

Neuro2A

Cell

sEV

(kDa)

Cell

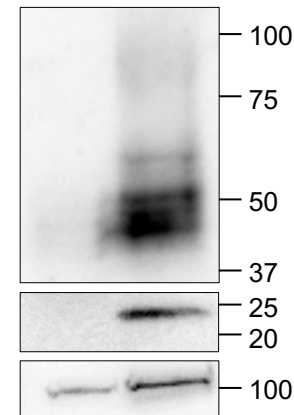
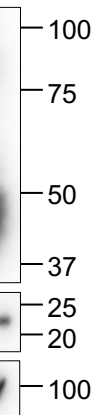
sEV

(kDa)

CD63

CD81

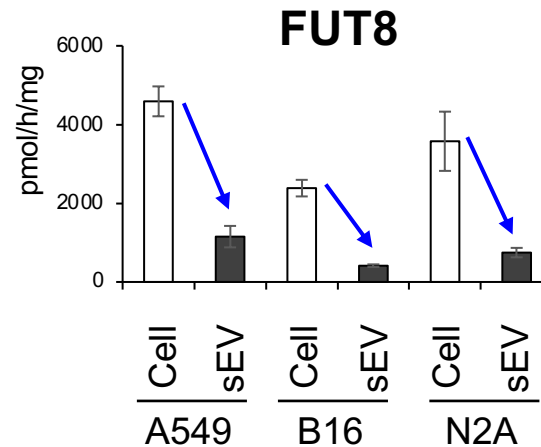
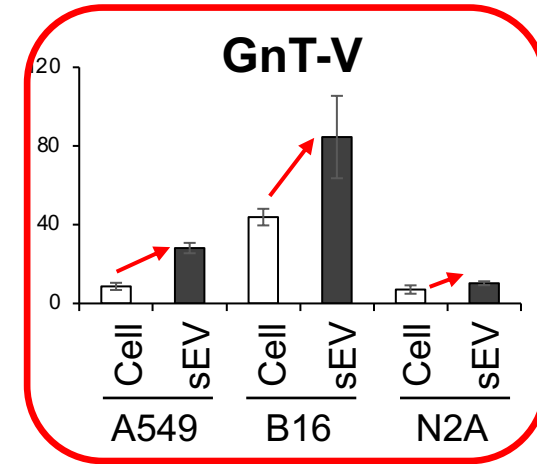
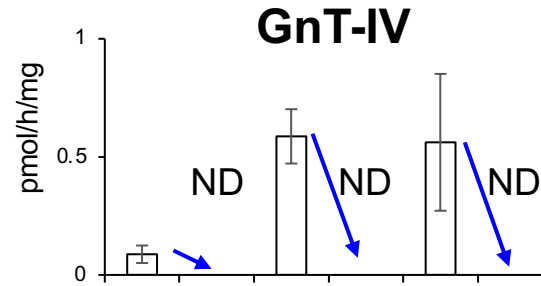
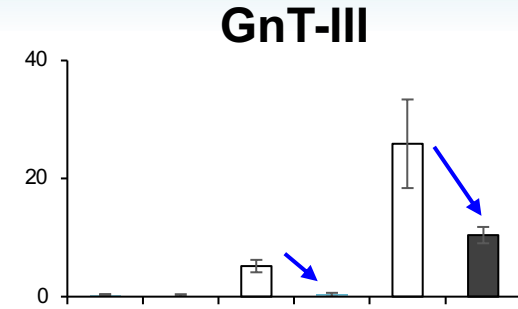
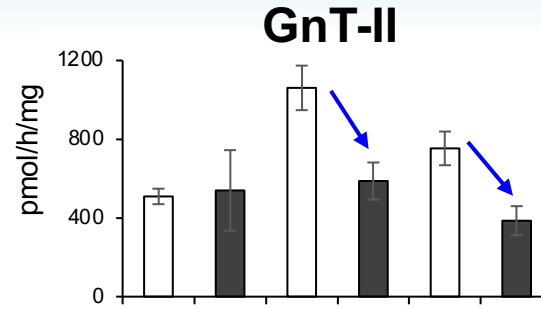
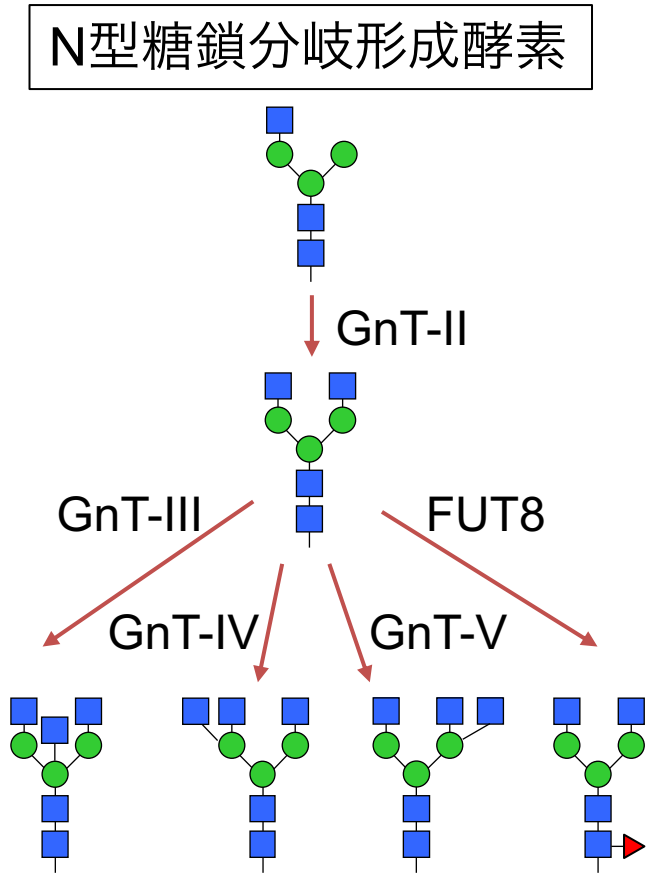
Alix



Exosomeを多く含む小胞を調製

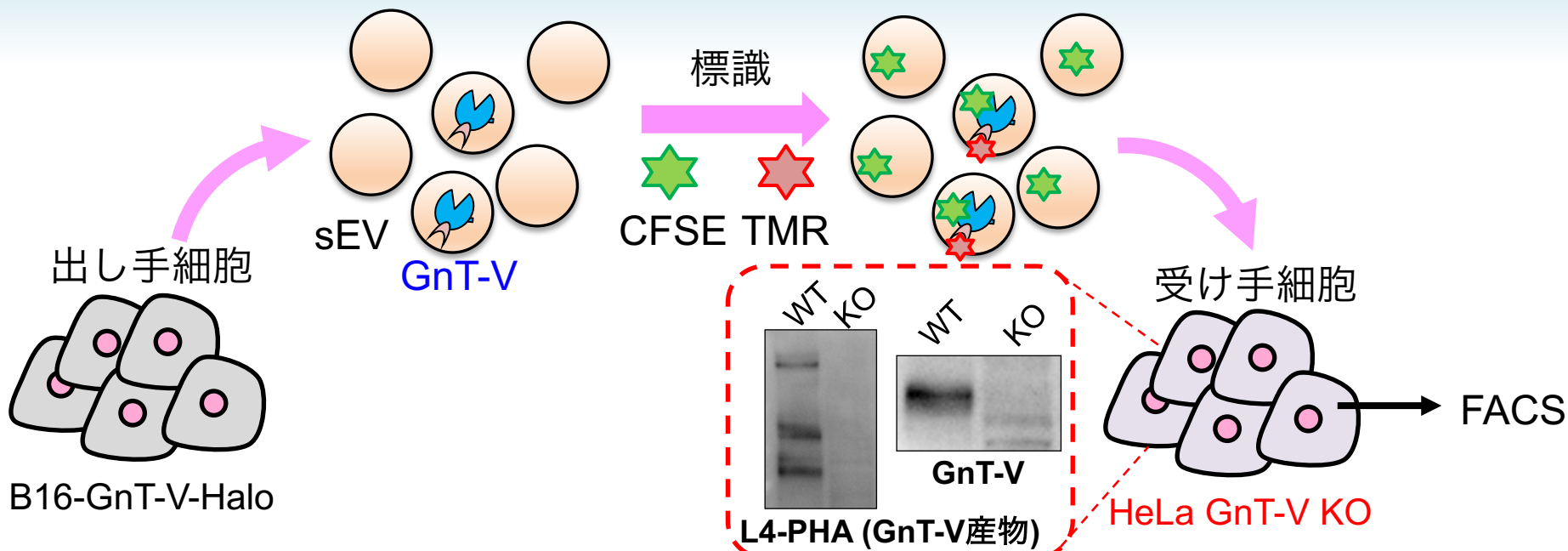
(Hirata, et al., *iScience*, 2022, 26, 105747)

細胞外小胞における糖転移活性



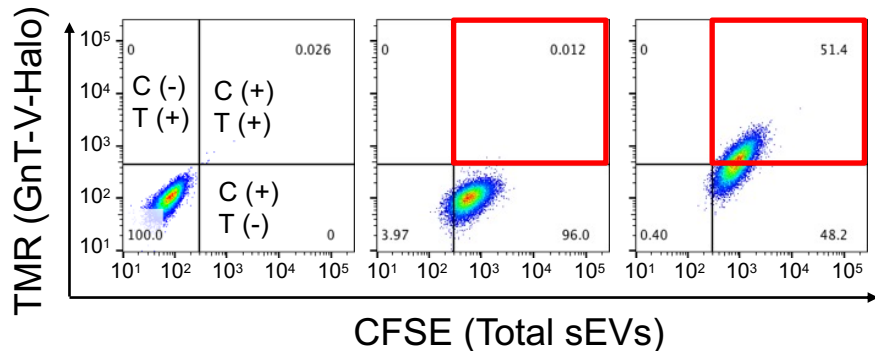
GnT-Vの活性のみが、細胞外小胞に濃縮されていた

GnT-Vを含む小胞は受け渡されて糖鎖を改変する



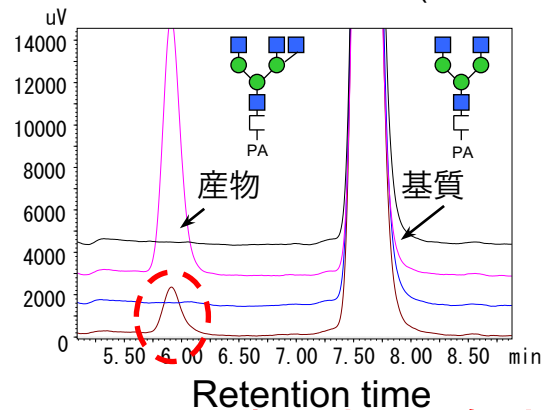
GnT-Vの取り込み

		B16	B16-GnT-V-Halo
sEVs	-		
CFSE	-	+	+
TMR	-	+	+

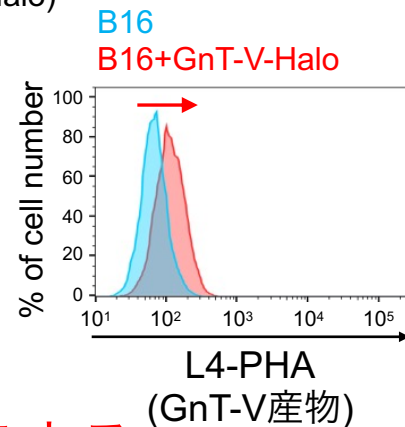


GnT-V活性(受け手細胞)

— No enzyme — sEVs (B16)
— GnT-V — sEVs (GnT-V-Halo)



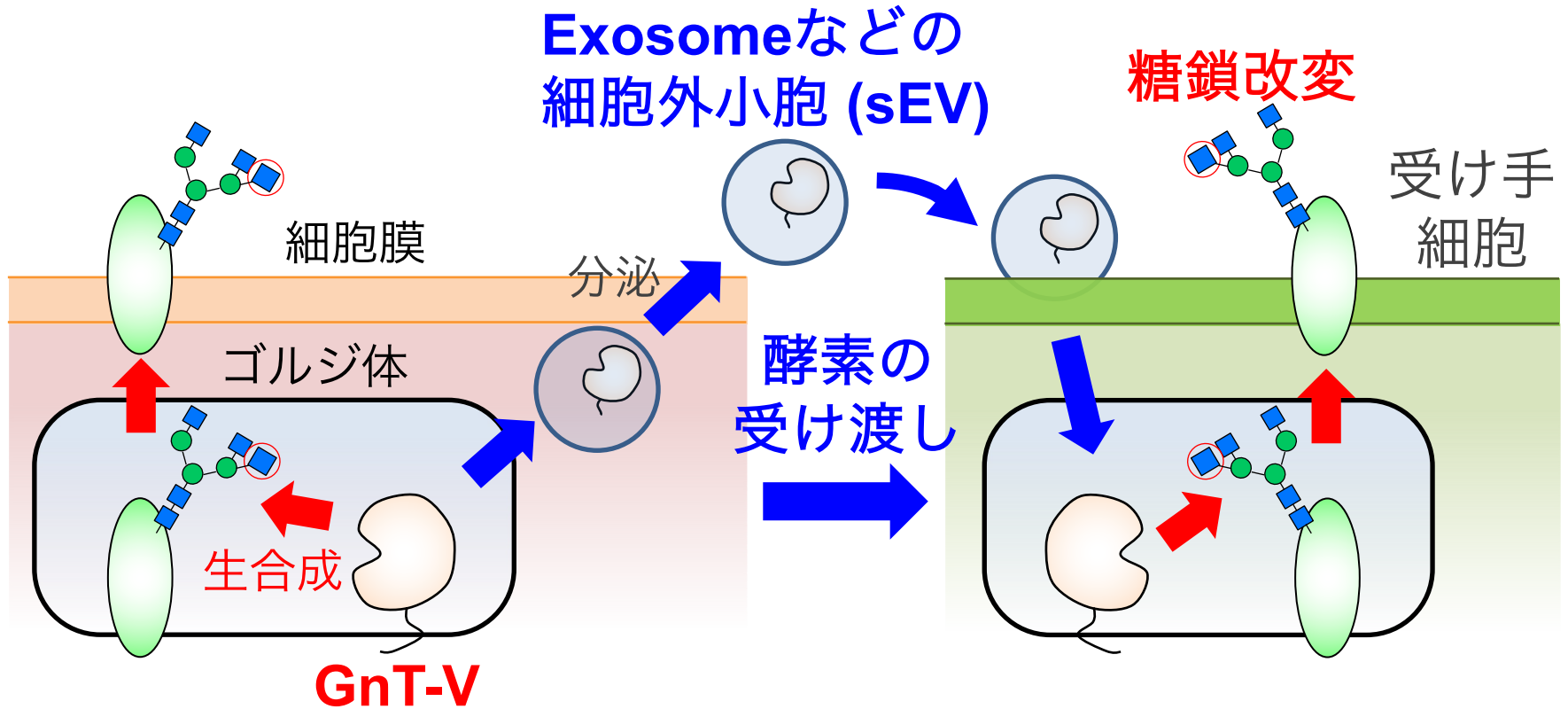
糖鎖変化(受け手細胞)



GnT-V-sEVsは伝達されて、糖鎖を改変する

(Hirata, et al., *iScience*, 2022, 26, 105747)

細胞外小胞(sEV)を介したGnT-Vの細胞間伝達



酵素の遺伝子発現を介さない糖鎖発現機構の存在を示唆

まとめ

疾患・生命現象

イベント自体を理解

- ・ 立体構造
- ・ 基質特異性

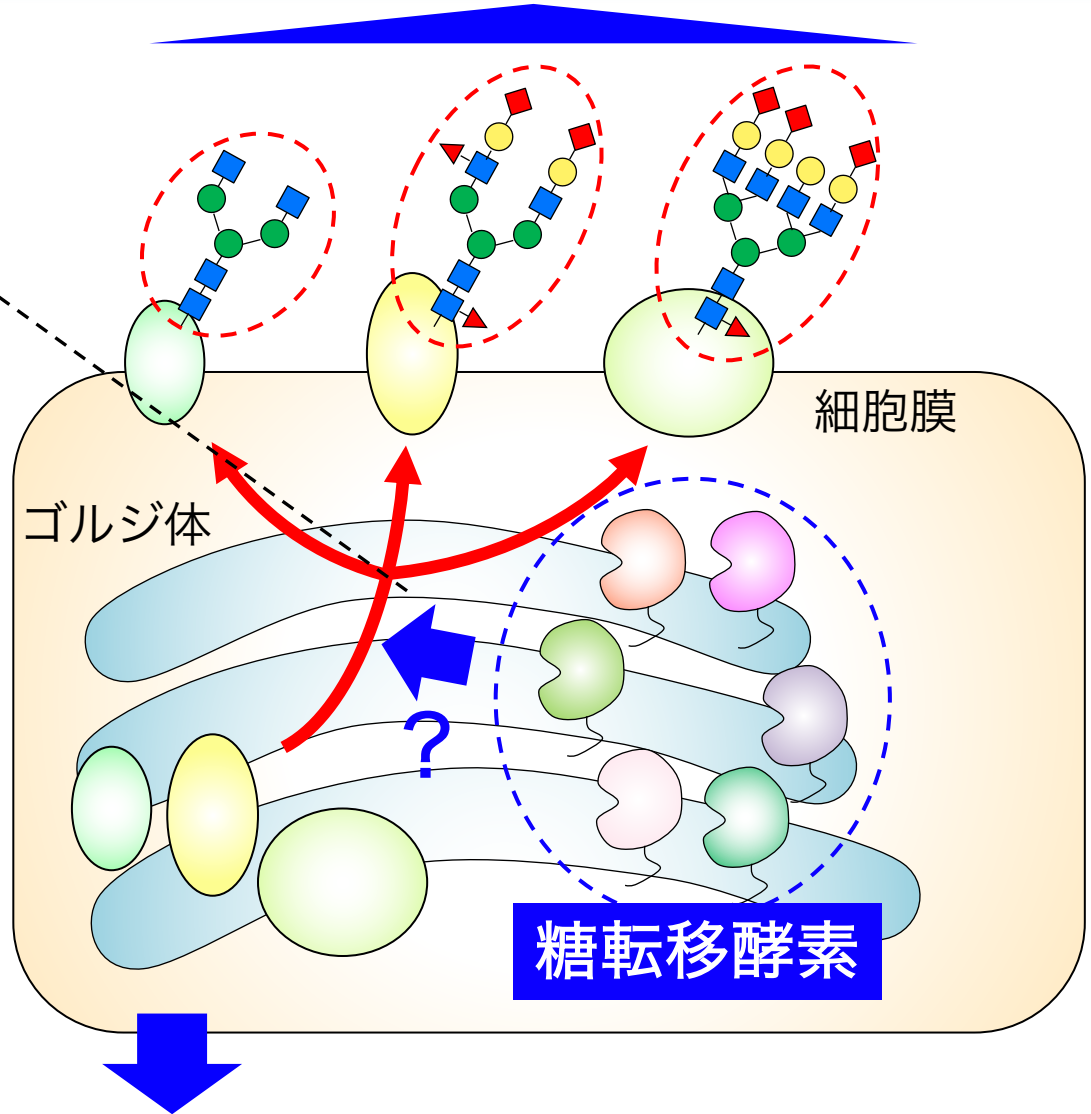


イベントを制御する仕組みを理解

- ・ 局在・分泌
- ・ 制御因子

将来展望

糖転移酵素のタンパク質特異的な糖鎖改変と医療応用



謝辞 (敬称略)

Lab member

平田 哲也 ※現デューク大

所 裕子

中島 美咲

森 恵美子

富田 晟太

大須賀 玲奈

川出 遥加

清水 菜津葵

長田 菜緒子

橋本 雄太

中石 大智

林 鈴音

伊藤 智哉

森後 碧玲

大阪大学

長江 雅倫

広島大学

中の 三弥子

産総研

舘野 浩章

Univ. Mississippi

Sushil K. Mishra

Robert Doerksen

岐阜大 iGCORE

安藤 弘宗

田中 秀則

中嶋 和紀

鈴木 健一

京都大学

岡 昌吾

大阪国際がんセンター

谷口 直之

原田 陽一郎

その他多くの先生方にご協力いただきました。
この場を借りて感謝申し上げます。