

東北医科薬科大学  
審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	シト <sup>ド</sup> マ 宍戸 史（宮城県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	薬科第5号
学位授与の日付	令和2年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条2項該当
学位論文題名	ガングリオシド GM3 合成酵素及び GM2 合成酵素における細胞内輸送機構の解析
論文審査委員	主査 教授 顧 建国
	副査 教授 山口 芳樹
	副査 特任教授 井ノ口 仁一

ガングリオシド GM3 合成酵素及び  
GM2 合成酵素の細胞内輸送機構の解析

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

機能病態分子学教室

宍戸 史



## 目次

緒言.....	3
第1章 GM3 合成酵素の肝臓特異的な新規 mRNA バリエントの同定.....	14
第1節 序論.....	14
第2節 結果.....	16
第1項 ST3GAL5-Ex3-KO マウス組織（肝臓，脳）の糖脂質解析.....	16
第2項 ST3GAL5-Ex3-KO マウス肝臓の mRNA（a-type, b-type）発現解析.....	16
第3項 新規 <i>ST3GAL5</i> mRNA バリエント（c-type）は肝臓特異的に発現する.....	17
第4項 新規 <i>ST3GAL5</i> mRNA トランスクリプショナルバリエント（c1-type）の転写開始地点の解析.....	18
第5項 M <sup>*</sup> -ST3GAL5 の細胞内局在と in vivo における酵素活性の評価.....	19
第3節 考察.....	21
第4節 材料と方法.....	23
第2章 逆行輸送シグナル配列（R-based motif）が B4GALNT1 のゴルジ体繫留機構に与える影響.....	46
第1節 序論.....	46
第2節 結果.....	48
第1項 新規 <i>B4GALNT1</i> mRNA バリエント（variant 2）の同定.....	48
第2項 新規 <i>B4GALNT1</i> mRNA バリエント（variant 2）の転写開始地点の解析.....	49
第3項 新規 B4GALNT1 アイソフォーム（M1-B4GALNT1）のアミノ酸配列.....	49
第4項 B4GALNT1 アイソフォームの産生機構の解析.....	50
第5項 M1-B4GALNT1(N)-GFP キメラタンパク質の R-based motif による逆行輸送機構の解析.....	51
第6項 全長 B4GALNT1 の R-based motif による逆行輸送機構の解析.....	52
第7項 B4GALNT1 の in vivo における酵素活性の評価.....	53
第8項 M1/M2 ヘテロダイマー形成が B4GALNT1 の細胞内局在と酵素安定性に与える影響.....	54
第3節 考察.....	57
第4節 材料と方法.....	62
第3章 小胞体搬出シグナル配列（R/K-based motif）が M3-ST3GAL5 のゴルジ体繫留機構に与える影響.....	100
第1節 序論.....	100
第2節 結果.....	102
第1項 M3-ST3GAL5(N)-GFP, M2-B4GALNT1(N)-GFP の小胞体搬出機構の解析.....	102
第2項 R/K-based motif による全長 M3-ST3GAL5 の小胞体搬出機構の解析.....	104

第3項 R/K-based motif による全長 M3-ST3GAL5 のゴルジ体繫留機構の解析	105
第4項 R/K-based motif が M3-ST3GAL5 の糖鎖成熟と酵素安定性にもたらす影響 の解析.....	106
第3節 考察 .....	108
第4節 材料と方法 .....	113
総括ならびに結論 .....	140
謝辞.....	143
参考文献.....	144

## 緒言

糖転移酵素は、糖供与体である糖ヌクレオチドから基質となる受容体にその糖部分を転移する反応を触媒する酵素であり、糖脂質、N 結合型糖鎖、O 結合型糖鎖、プロテオグリカンなど多様な糖鎖を生合成する過程において欠かせない役割を担っている。本研究では、シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドの生合成に関わる糖転移酵素に着目し、遺伝子制御による組織特異的な糖脂質発現制御の可能性、および糖転移酵素の細胞内局在の調節機構について解析を行った。

ガングリオシドはシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipids : GSLs) の総称で、一つの分子内に親水性部分と疎水性部分の両方を持つ両親媒性の分子である。その分子種は非常に多く、親水性の糖鎖部分の多様性と疎水性のセラミド脂質部分のアシル鎖の飽和度の高さにより特徴付けられる (Fig. 1A, Fig. 2)。生体内での生合成は精密に制御されており、小胞体 (ER) で合成されたセラミドが小胞体膜、およびゴルジ体 cis 槽でグルコシルセラミド (GlcCer) に変換され、cis 槽・medial 槽・trans 槽・トランスゴルジネットワーク (TGN) を経る過程でゴルジ体に局在する糖転移酵素によって単糖が順次転移される。合成されたガングリオシドは主に細胞膜外層に存在し、コレステロールと共に脂質マイクロドメインと呼ばれる膜タンパク質の動きを制限する微小領域を作り出す。脂質マイクロドメインには増殖因子受容体などの細胞膜タンパク質の多くが集まり [1]、シグナル伝達の中継地点となる。ガングリオシドはこの脂質マイクロドメインで多様な糖鎖構造を駆使してタンパク質の機能を正または負に制御する調節因子としての機能が想定されている。

ガングリオシド合成の場となるゴルジ体はゴルジ槽板の生成と消失を繰り返す非常にダイナミックに動く細胞小器官である [2,3]。そのため、安定したガングリオシド供給のためには、小胞体で合成されたガングリオシド合成酵素はゴルジ体に運ばれた後、その機能を発揮する場であるゴルジ体内に一定時間繫留される必要がある。しかしながら、それらに関わる詳細なメカニズムはほとんどわかっていない。そこで、本研究ではガングリオシド合成酵素の細胞内輸送機構の解明を目的として、ガングリオシド

GM3 合成酵素 ( $\alpha$ -2,3-sialyltransferase : ST3GAL5) および GM2 合成酵素 ( $\beta$ -1,4 *N*-acetylgalactosaminyltransferase : B4GalNAcT1, B4GALNT1) の種々の変異体を作製し解析を行った.

スフィンゴ糖脂質は細胞膜外層に存在する主要な糖脂質であり, 親水性の糖鎖部分と疎水性の脂質部分から構成される両親媒性の分子である. 主要な分子としては, 糖鎖にシアル酸を含むガングリオシド, セラミド構造にガラクトースが付加したガラクトシルセラミド, ガラクトシルセラミドに硫酸基が付加したスルファチドが挙げられる. おおむね 9 種の単糖が構成成分となる糖鎖部分の構造多様性は数百種類に及び, その構造の特異性は抗原や受容体として相互認識に関わっている. 疎水性部分は膜を構成するリン脂質と比較して 6~8 炭素長い構造のセラミド鎖の脂肪酸構造をもち, 脂質二重膜の外層と内層を橋渡しすることにより物質輸送や情報伝達に不可欠な構造を備えている (Fig. 1A). ガングリオシド GM3 は全てのガングリオシドの前駆体となる鍵分子であり, 本研究で着目した GM3 合成酵素 (ST3GAL5) によって, トランスゴルジの内腔側でラクトシルセラミド (lactosylceramide : LacCer) にシアル酸が転移して合成される. 本研究で着目したもう 1 つの糖転移酵素である GM2 合成酵素 (B4GALNT1) は, 主に脊椎動物の脳神経系に発現し複合型ガングリオシド生合成の鍵となる酵素で, GM3, GD3, GT3, LacCer に *N*-アセチルガラクトサミン (*N*-acetylgalactosamin : GalNAc) を転移して GM2, GD2, GT2, GA2 を合成する (Fig. 2B).

古典的なガングリオシド研究では, 生物種, 組織, 病態特異的, あるいは分化, 成長段階などによる生体内ガングリオシド発現パターンの解析が行われており, その発現はほぼ全ての組織で見られる普遍的な分子群であるが, 分化やがん化といった細胞の性状変化に伴って大きく発現パターンが変化することが明らかにされてきた. 特にがん化における糖鎖変化の研究からは多くのがん関連糖脂質が同定され[4-7], がん化に伴う特徴的ながん性糖鎖発現メカニズムの解析も行われてきた[8].

分化・増殖への影響は培養細胞へのガングリオシド添加実験が多く行われ, GM3 を

添加した HL60 細胞で単球系細胞への分化の誘導が生じ、ネオラクト系ガングリオシドの添加では顆粒球系細胞への分化の誘導が生じること[9]、GM3 は baby hamster kidney (BHK) 細胞において basic fibroblast growth factor (bFGF) で誘導される増殖を抑制し、human epidermoid carcinoma 細胞 (A431) において epidermal growth factor (EGF) で誘導される増殖を抑制する[10]ことなどが報告された。

ガングリオシドの分子レベルでの作用機序としては、その発現変動による脂質マイクロドメインの構築と機能異常が考えられている。ガングリオシドは脂質二重膜に疎水性側鎖を埋め込み、細胞膜外層直上に親水性部分の糖鎖を配置することで、コレステロールとともに脂質マイクロドメインを形成する (Fig. 1B)。脂質マイクロドメインは膜タンパク質と相互作用することで細胞外からのシグナルを細胞内に伝えるための中継地点として機能しており、増殖因子受容体などの細胞膜タンパク質や細胞内のシグナル伝達分子は脂質マイクロドメインに集積する[11,12,13,14]。

GM3 の分子レベルでの作用機序が明らかとなった代表例としては、インスリン受容体の機能制御である。最初の発見の肥満モデル動物の Zucker fa/fa ラットと ob/ob マウスの脂肪組織において *ST3GAL5* の増加に伴い GM3 発現量が著しく増加するという報告を契機に[15]、*ST3GAL5* ノックアウトマウスでインスリン感受性の亢進が観察される[16]、GM3 発現量を低下させるグルコシルセラミド (glucosylceramide : GlcCer) 合成酵素阻害剤 (D-PDMP) を処理することで、肥満モデル動物のインスリン抵抗性が改善する[17,18]などの報告が相次ぎ、GM3 と 2 型糖尿病との関わりに注目が集まった。現在では、このような GM3 発現量の増加によるインスリンシグナル抑制の効果は、インスリン受容体はカベオラと呼ばれる細胞膜上のくぼみ構造に存在することでインスリンによるシグナル伝達を行うが、肥満に伴いカベオラとは別のマイクロドメインを形成している GM3 が膜上に増加することでインスリン受容体の膜直上のリシン残基と GM3 の静電的相互作用が生じ、インスリン受容体がカベオラから解離すると説明されている[19,20]。

培養細胞や肥満モデルマウスによる解析と並行してガングリオシド合成酵素遺伝

子のノックアウトマウスも作製され、生体内におけるガングリオシドの機能解析が進められてきた。GM3 以降のガングリオシドを欠損する *ST3GAL5* ノックアウトマウスは、内耳コルチ器有毛細胞の聴毛の融合が生じることで難聴を呈する。内有毛細胞、および外有毛細胞の細胞膜上・細胞質内の両方において、聴覚維持に関連する聴毛内分子がそれぞれ特徴的な局在を保つことで聴毛は機能を維持している。この聴毛の形態と機能の維持は同一有毛細胞の聴毛間での分子連結に依存するが、*ST3GAL5* ノックアウトマウスでは、内有毛細胞で聴毛間の融合、聴毛内分子の局在の変化が聴覚消失時期と同時期に生じており、この聴毛内分子の局在の変化による聴毛融合が難聴を引き起こすと考えられる。細胞膜に存在する GM3 は、有毛細胞の機能性膜領域の形成・維持に重要であることが示唆されている[21,22]。全ての複合型ガングリオシドを欠損する *B4GALNT1* ノックアウトマウスにおいては、出生直後は精子形成不全による男性不妊症の他に顕著な異常は見られないが、長期観察の結果、加齢に伴う神経系の退化(坐骨神経や脊髄の著しい変性と脱髄、舌下神経を切除した際の再生能の低下)が生じることが明らかとなり、複合型ガングリオシドが神経組織の健全性維持や修復に重要であることが示されている[23-25]。*ST3GAL5*、または *B4GALNT1* のノックアウトマウスが比較的軽度な表現型であるのに対し、全てのガングリオシドを欠損する *ST3GAL5/B4GALNT1* ダブルノックアウトマウスは、生後すぐに重篤な中枢神経障害を示し、早期に死亡する[26]。*ST3GAL5* ノックアウトマウスのほぼすべての臓器において a-, b-系列のガングリオシドが消失するが、野生型マウスでは発現がみられない o-系列のガングリオシドが発現する (Fig. 2)。o-系列も発現しない *ST3GAL5/B4GALNT1* ダブルノックアウトマウスが早期に死亡することから、*ST3GAL5* ノックアウトマウスにおいては o-系列のガングリオシドが生命維持に重要な a-系列, b-系列のガングリオシドの機能を代替していると考えられる。*B4GALNT1* ノックアウトマウスにおいては、残存する GM3, GD3, スルホ系糖脂質の SM3 などが代替機能をもつのかもしれない。

近年ヒトにおいて、早発性難治性てんかん患者、および salt-and-pepper 症候群(重

度の知的障害，てんかん，脊柱側弯症，脊椎麻痺，顔面形成異常，皮膚色素沈着などを特徴とする症候群) の患者から *ST3GAL5* の疾患遺伝子変異が同定されている[27-30]。アーミッシュ家系で見出された *ST3GAL5* 欠損患者はヒト *GSLs* 合成酵素欠損の最初の報告であり，幼児期に発症する重篤なてんかん症状と視覚異常を呈し，20 歳前後で死亡する。また，その後フランスで見出された *ST3GAL5* 欠損患者では難聴も報告されている。*B4GALNT1* の疾患遺伝子変異はクウェート，イタリア，オールド・オーダー・アーミッシュの家系（7 世紀に米国ペンシルバニア州に移住した保守派アーミッシュ家系）において，複合型遺伝性痙攣性対麻痺（ニューロパチー，小脳失調，脳梁の菲薄化，精神発達遅延，痙攣，難聴，網膜色素変性症，魚鱗癬などをともなう疾患）様の症状がある患者で同定されている[31-33]。ノックアウトマウスとヒト欠損患者を比較すると，ヒトの表現型がより重篤であることがわかる。ヒトとマウスの表現型の違いを解明するには，ガングリオシド組成，遺伝子発現等をさらに比較検討していく必要があり，今後の課題である。

*ST3GAL5* は II 型の膜タンパク質であり，その内腔側に多くの生物種のシアル酸転移酵素で高度に保存されたシアリルモチーフ L, S, VS をもつ。また，*ST3GAL5* はシアル酸を転移するガングリオシド合成酵素であるが，同時に自身が N 結合型糖鎖修飾を受ける糖タンパク質である。N 結合型糖鎖はタンパク質のアミノ酸配列 Asn-X-Ser/Thr 配列のアスパラギン (Asn : N) 側鎖のアミド窒素原子に糖鎖が結合するもので (X : 任意のアミノ酸残基, Ser : セリン, Thr : スレオニン)，高マンノース型 (high mannose)，混合型 (hybrid)，複合型 (complex) 糖鎖に分類される。一般に，脊椎動物において，高マンノース型糖鎖は小胞体で翻訳と同時に付加される。その後，正しくフォールディングしゴルジ体に運ばれた糖タンパク質はさらなる糖鎖修飾を受け，ハイブリット型やコンプレックス型に糖鎖成熟が進む。マウス *ST3GAL5* は合成過程で内腔側に 3 カ所 (<sup>180</sup>N, <sup>224</sup>N, <sup>334</sup>N) N 結合型糖鎖の修飾を受け，これらの糖鎖は酵素活性に必須である[34]。

マウス *ST3GAL5* には転写開始地点の異なる 2 種類の mRNA バリエント (a-type, b-type) が存在する. 肝臓組織において mRNA 発現量が a-type, b-type 共に他臓器に比べて著しく低いにも関わらず, GM3 合成活性が認められるという説明が付き難い結果が得られていたことから, 組織特異的な新規 mRNA バリエントが存在することが考えられた. *ST3GAL5* の発現調節は転写だけでなく翻訳レベルでも行われており, a-type からは N 末端の長さが異なる 3 種類のアイソフォーム (M1-*ST3GAL5* : 69 aa, M2-*ST3GAL5* : 42 aa, M3-*ST3GAL5* : 14 aa, 数字は細胞質側 N 末端アミノ酸数を示す) が, b-type からは 2 種類のアイソフォーム (M2-*ST3GAL5*, M3-*ST3GAL5*) が合成される [35] (Fig. 3). *ST3GAL5* の各アイソフォーム (M1-*ST3GAL5*, M2-*ST3GAL5*, M3-*ST3GAL5*) の細胞内局在を比較すると, M1-*ST3GAL5* は小胞体に, M2-*ST3GAL5* はゴルジ体とリソソームに, M3-*ST3GAL5* はゴルジ体に局在し, M1-*ST3GAL5* の小胞体局在化は M1-*ST3GAL5* の細胞質領域のみに存在するゴルジ体-小胞体間逆行輸送シグナル (R-based motif) によることを報告している [35]. R-based motif は主に II 型膜タンパク質の逆行輸送シグナルとして機能することが知られているが [36], 哺乳類のガングリオシド合成酵素における報告は *ST3GAL5* が最初である [35]. ゴルジ体で機能する *ST3GAL5* が小胞体に局在するアイソフォームをもつことの生理的意義は現在のところ不明であるが, M1-*ST3GAL5* が GM3 生合成において重要な役割を担うと仮定すると, 他のガングリオシド合成酵素でも同様のアイソフォームが存在する可能性が考えられた. M3-*ST3GAL5* は安定してゴルジ体に局在し, GM3 を合成するが, そのゴルジ体繫留メカニズムは明らかになっていない. ゴルジ体の槽は一過的な構造であり, 小胞体から搬出された COP II 被覆小胞どうしが融合してシス槽を形成し, 徐々にメディアル槽, トランス槽と成熟し, トランスゴルジ網へ性質を変え槽は消失する. 安定してゴルジ体に局在し続けながら修飾を行うガングリオシド合成酵素は, 成熟した槽からより未熟な槽へ, ガングリオシド合成が行われる場へ常に輸送されることが必要なのである.



第1章では、肝臓において GM3 合成酵素の mRNA (a-type, b-type) 発現量が低いにも関わらず GM3 合成活性が検出される理由として、肝臓特異的に高い新規 mRNA バリエント (c-type) の発現があることを示した[37].

第2章では、B4GALNT1 が新規 mRNA バリエント (variant 2) をもち、この新規 mRNA から R-based motif をもつ M1-B4GALNT1 が翻訳されることを示した。さらに、R-based motif をもたない既知のアイソフォームである M2-B4GALNT1 と M1-B4GALNT1 がヘテロダイマーを形成することで、M2-B4GALNT1 ホモダイマーよりも高い安定性をもつことが示された。興味深いことに、この安定性の向上は小胞体への逆行輸送ではなくゴルジ体繫留に依存するものであり、B4GALNT1 において R-based motif がゴルジ体繫留シグナルとして機能することが示唆された[38].

第3章では、ST3GAL5, および B4GALNT1 の小胞体からゴルジ体への搬出シグナルとされる [R/K](X)[R/K] 配列の解析を行った。細胞質領域の膜貫通領域近傍には、小胞体からゴルジ体への搬出に必要な [R/K](X)[R/K] 配列が存在すると報告されている[39]. この配列が全長 M3-ST3GAL5, および全長 M2-B4GALNT1 に及ぼす影響を精査した結果、[R/K](X)[R/K] 配列よりもブロードなアミノ酸配列 (R/K-based motif) が ST3GAL5 の小胞体搬出に関与すること、B4GALNT1 は R/K-based motif の他に内腔側領域が関わる小胞体搬出機構があることを明らかにした。さらに、M3-ST3GAL5 の R/K-based motif の部分変異体では、細胞内局在の変化、内腔側領域の N 結合型糖鎖の成熟度の変化、および酵素の安定性の減少が生じることを見出した。これらの結果から、細胞質領域の R/K-based motif は小胞体搬出のみならず、M3-ST3GAL5 の安定したゴルジ体繫留機構にも重要な役割をもつことが示唆された[40].

以上のことから、B4GALNT1 では逆行輸送シグナルとして機能する R-based motif が、ST3GAL5 では小胞体搬出シグナルとして機能する R/K-based motif が、それぞれゴルジ体繫留機構にも寄与しているという新知見が得られた。糖転移酵素の細胞内輸送機構に関わる因子は出芽酵母から哺乳類まで広く保存されていることから、本研究で得られた知見をもとに輸送に関わる分子の同定を進めていくことで、多くの生物

種の糖転移酵素の細部内動態の解明に繋がることが期待される.

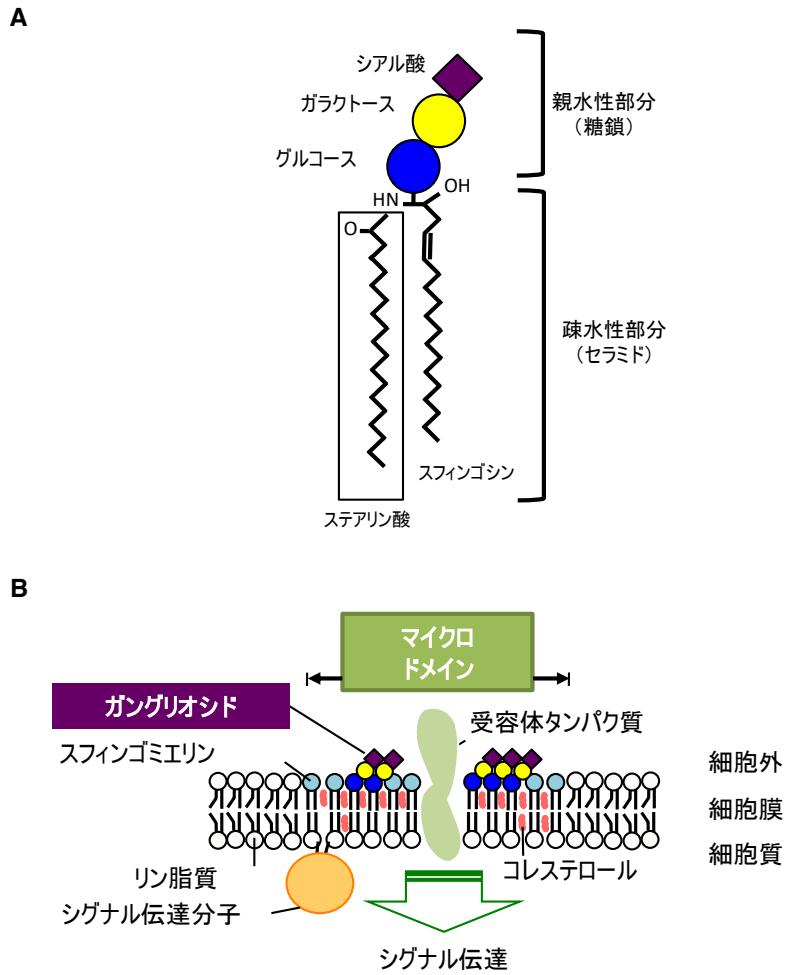


Figure 1. スフィンゴ糖脂質の構造

(A) ガングリオシドGM3の構造を示す。疎水性のセラミド構造と親水性の糖鎖構造をもつ両親媒性分子である。  
 (B) スフィンゴ糖脂質は細胞膜の外層に存在し、スフィンゴミエリンやコレステロールと共にガングリオシドの豊富な領域であるマイクロドメインを形成することでシグナル伝達の中継地点となる足場を提供する。

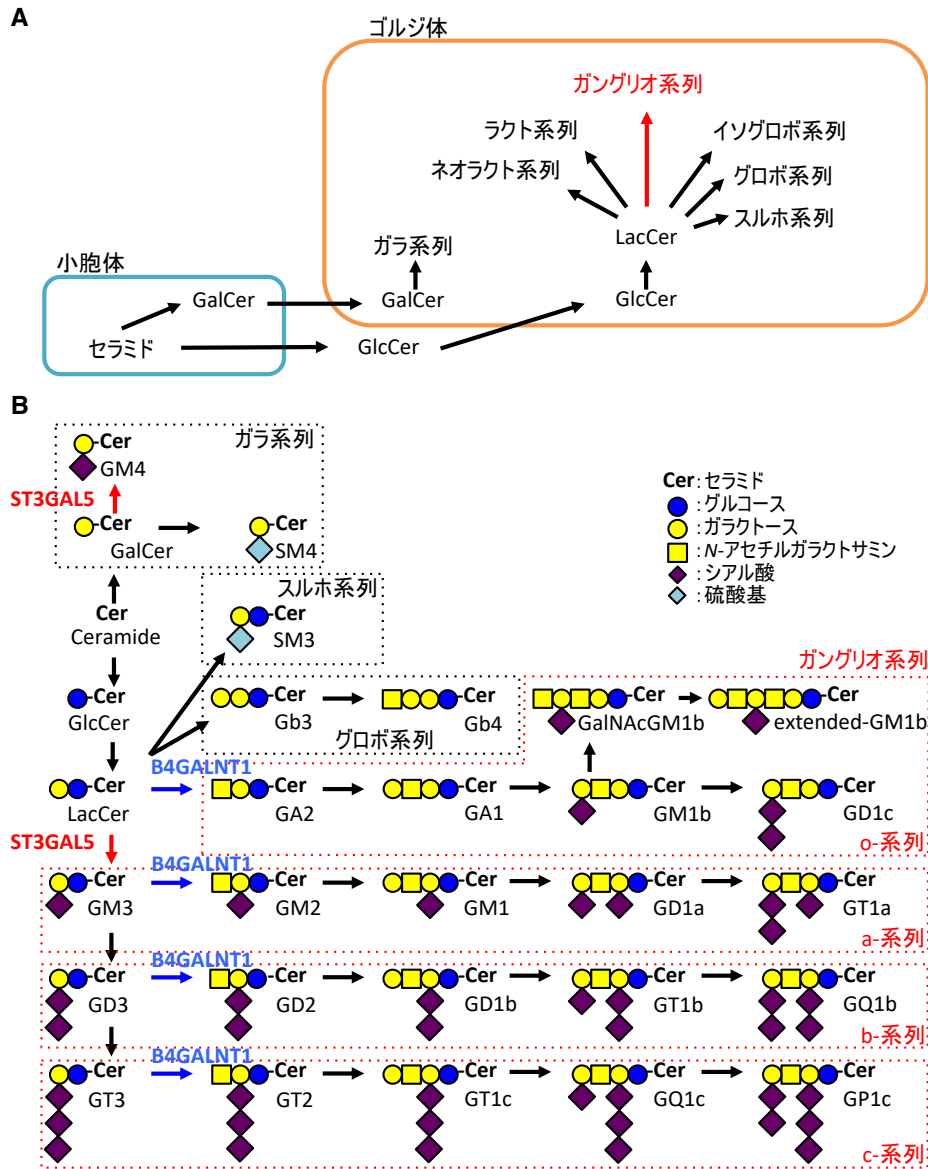


Figure 2. スフィンゴ糖脂質の生合成  
 (A) 細胞内小器官におけるスフィンゴ糖脂質の生合成.  
 (B) ガングリオ系列, ガラ系列, グロボ系列, スルホ系列の生合成経路.

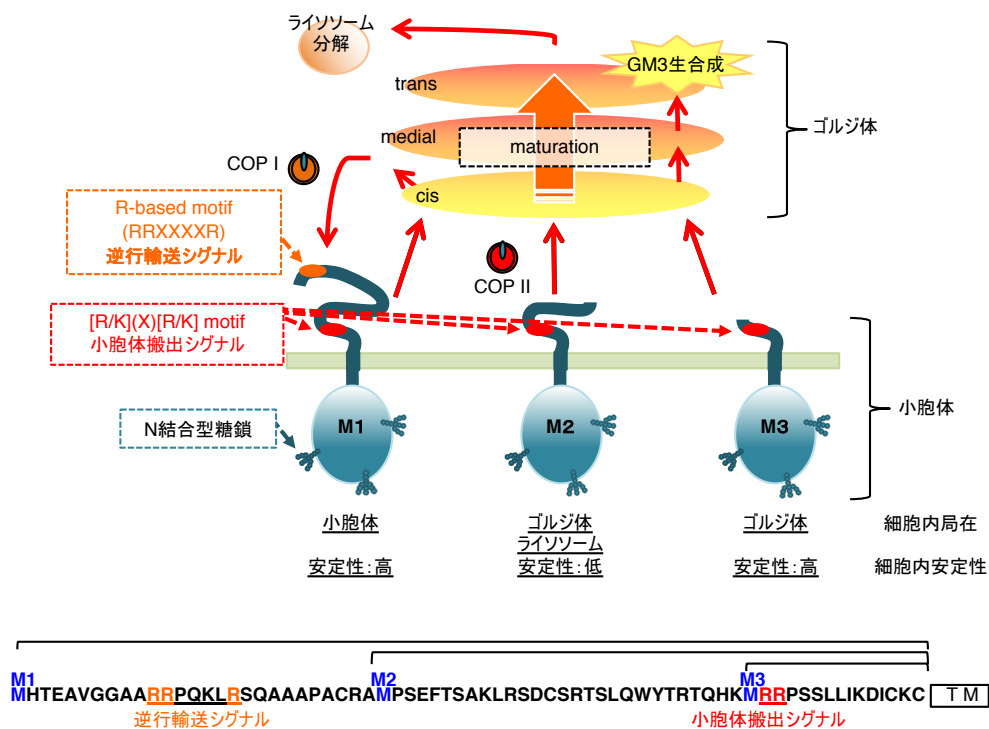


Figure 3. ST3GAL5アイソフォームの細胞内動態のまとめ

ST3GAL5は2型の膜タンパク質で、内腔側にシアル酸転移を触媒する領域と、酵素活性に必要なアスパラギン結合型糖鎖をもつ。細胞質側には細胞内動態に関わるシグナル配列が存在する。

ST3GAL5にはN末の長さや局在が異なる3つのアイソフォーム(M1,M2,M3型)が存在する。全てのアイソフォームは小胞体搬出シグナルをもっているため、COP II小胞によって小胞体からゴルジ体へ運ばれる。その後、M1型は、M1のみに存在する逆行輸送シグナルによってゴルジ体から小胞体へ逆輸送されるため、定常状態において小胞体に局在する。M2型は、ゴルジ体に運ばれた後、速やかに分解系に運ばれるのに対し、M3型はゴルジ体に安定して局在し、GM3生成を行う。M3型がゴルジ体に安定して局在するためにはST3GAL5のゴルジ体繫留機構が存在すると考えられるが、その詳細なメカニズムは未だ不明である。

## 第1章 GM3 合成酵素の肝臓特異的な新規 mRNA バリエントの同定

### 第1節 序論

GM3 の生理学的重要性を解明するために、ST3GAL5 ノックアウトマウスが作製され、その機能が精査されてきた。現在、ST3GAL5-KO マウスは、ST3GAL5-Exon3-KO (ST3GAL5-Ex3-KO, Ex3: 開始コドンが存在する) と、ST3GAL5-Exon5-KO (ST3GAL5-Ex5-KO, Ex5: 触媒領域が存在する) の2つの系統がある (Fig. 4) [41,16]。初めに、シアル酸転移の触媒領域であるシアリルモチーフ L をコードするエキソン 5 (Exon5: Ex5) をネオマイシン (Neo) 耐性遺伝子に置き換えた ST3GAL5-Ex5-KO マウスが作製された。ST3GAL5-Ex5-KO マウスの脳、骨格筋、脂肪組織で GM3 合成が消失することが報告されている[16]。開始コドンが存在する Ex3 を Neo 耐性遺伝子に置き換えた ST3GAL5-Ex3-KO マウスの解析からは、内耳、胸腺細胞、T 細胞において GM3 合成が消失することを報告された[21,22,42]。これらの解析から、ST3GAL5 は Ex5, 又は Ex3 が欠損すると GM3 合成活性は失われると考えられた。しかしながら、ST3GAL5-Ex3-KO マウスを用いた解析を進める中で、ST3GAL5-Ex3-KO の肝臓においてわずかながら GM2 が検出されること、即ち、GM3 合成活性が残存していることを見出した。ST3GAL5-Ex5-KO マウスの肝臓では GM3, GM2 の発現は見られなかった。

これまでの野生型マウスの解析においても、肝臓組織で高い GM3 合成活性が認められるにも関わらず、a-type, b-type 両方の mRNA 発現量が他臓器に比べて著しく低いという矛盾が存在していた[35]。この現象を説明する可能性として、組織特異的な新規 mRNA バリエントが存在することが考えられた。本章では、肝臓における ST3GAL5 の発現機構の解明を目的として、肝臓組織の cDNA を用いた詳細な解析を行った。

マウスでは、ST3GAL5 をコードする mRNA として、転写開始位置が異なる a-type と b-type が報告されている[43,44]。a-type では Ex1 に開始コドン M1 が存在するが、リーキースキャニングシステムによって、Ex3 に存在する開始コドン M2, M3 から翻訳が生じる。一方、b-type では転写開始地点の Ex2 には開始コドンが無く、a-type と共通の開始コドン M2, M3 から翻訳が生じる[35]。これらの M2, M3 の開始コドンが存在する Ex3

を Neo 耐性遺伝子に置換した場合、a-type からの転写産物は GM3 合成活性を持たない不完全なタンパク質が合成され、b-type からは転写自体が起こらない。これらのことから、a-type, b-type 以外の新規 mRNA バリエントが肝臓で発現していることが予想された。

野生型マウスの肝臓から抽出した totalRNA を用いた 5'-RACE 解析等を行うことにより、肝臓には高い発現を示す新規 mRNA バリエント (c-type) が発現していることが明らかとなった。

以上のことから、野生型マウスの肝臓で a-type, b-type の発現量が低いにも関わらず高い GM3 合成活性が認められる現象は肝臓特異的に発現する c-type の存在に由来していたこと、また、c-type から翻訳される人工的なスプライシングアイソフォームが合成されることが Ex3-KO の肝臓における GM3 合成活性の残存の理由であることを明らかにした [37].

## 第2節 結果

### 第1項 ST3GAL5-Ex3-KO マウス組織（肝臓, 脳）の糖脂質解析

野生型および Ex3-KO の肝臓から総脂質を抽出し、酸性糖脂質と中性糖脂質の組成を比較した。野生型の肝臓の主なガングリオシドは GM2 であり, GM3 もわずかに検出された。それに対し, Ex3-KO の酸性画分の GM2 は野生型と比較して約 50%に減少し, 硫酸化糖脂質（スルホ系列）の SM3, SM2a が検出された。中性画分では, 野生型で何も検出されないのに対し, Ex3-KO では LacCer と o-系列の GA2 が検出された (Fig. 5A)。Ex3-KO の肝臓において確認された LacCer の蓄積, および GA2, SM3, SM2a 合成の亢進は GM3 合成活性の低下を示唆しているが, GM2 が検出されたことで完全には GM3 合成活性が消失していないことを示している。

さらに, 脳の脂質組成を野生型と Ex3-KO で比較した。野生型の酸性画分では, GM3 にさらに糖が転移して合成される a-, b-, c-系列 (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) が発現しているのに対し, Ex3-KO では LacCer で分岐する o-系列 (GM1b, GD1 $\alpha$ ), およびスルホ系列の SM1a にシフトした。中性画分では, 野生型で検出されなかった LacCer, GA2, GA1 が, Ex3-KO で検出された (Fig. 5B)。これらの結果は, 脳で完全に GM3 合成活性が消失したことを示している。

### 第2項 ST3GAL5-Ex3-KO マウス肝臓の mRNA (a-type, b-type) 発現解析

マウス *ST3GAL5* の mRNA には, 二つのトランスクリプショナルバリエント (a-type と b-type) が報告されている。Fig. 6A に示すように, a-type は Ex1 から転写が開始されるが, Ex2 がスプライシングされるため, Ex1 から Ex3 に連結される。従って, Ex1 と Ex4 に設計したプライマー (F1-primer と R4-primer) を用いて PCR を行うと 321bp の断片が増幅される。一方, b-type は Ex2 から転写が開始され, Ex3 に連結されるため, Ex2 と Ex4 に設計したプライマー (F2-primer と R4-primer) を用いて同様に PCR を行うと 265bp の断片が増幅される。Ex3 を Neo 耐性遺伝子で置換された Ex3-KO において,



Neo 耐性遺伝子がスプライシングされることで、a-type では Ex1 から Ex4 へ、b-type では Ex2 から Ex4 へ直接連結される可能性がある。その場合、F1-, R4-primer では 197bp の断片 a-type<sup>+</sup>が、F2-, R4-primer では 141bp の断片 b-type<sup>+</sup>がそれぞれ増幅されると予想される。

野生型および Ex3-KO の脳と肝臓から合成した cDNA を鋳型とし、F1-, F2-, R4-primer のプライマーを用いた RT-PCR を行い、それぞれの組織での a-, b-type の mRNA 発現を検証した (Fig. 6B)。その結果、野生型の脳で a-, b-type の両方の発現が、肝臓で a-type のみの発現が検出され、これらは我々が以前報告したリアルタイム PCR の結果と一致した [35]。また、Ex3-KO の脳では a-type<sup>+</sup>と b-type<sup>+</sup>が、肝臓では a-type<sup>+</sup>の発現が検出され、それぞれの発現量も野生型と類似していた。これらの結果は、Ex3-KO において、ST3GAL5 の mRNA は Neo 耐性遺伝子に置換された領域がスプライシングされた a-type<sup>+</sup>と b-type<sup>+</sup>として発現していることを示している。しかしながら、a-type<sup>+</sup>および b-type<sup>+</sup>からは、フレームシフト、開始コドンの欠損により GM3 合成活性のある ST3GAL5 が合成されることはなかった。

### 第3項 新規 ST3GAL5 mRNA バリエント (c-type) は肝臓特異的に発現する

Ex3-KO の肝臓で GM3 合成活性が残存する理由として、Neo 耐性遺伝子と置換した Ex3 領域がスプライシングされても GM3 合成活性を失わない新規の mRNA バリエントが存在すると予想した。NCBI Gene データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) に登録された ST3GAL5 の mRNA バリエントのまとめを Fig. 7 に示す。これまでに9つの mRNA が報告されており、新規 ExX<sup>1</sup>, ExX<sup>2</sup>が存在する mRNA も新たに報告されていた。これら mRNA を転写開始地点によって大きく以下の4つに分類した。転写開始地点が① Ex1 である a-type (a1-, a2-, a3-, a4-type), ② Ex2 である b-type (b1-, b2-type), ③ 新規 ExX<sup>2</sup>である c-type (c1-, c2-type), ④ Ex1 より上流から転写され、イントロン, Ex2, 新規 ExX<sup>1</sup> までがスプライシングされずに全て含まれる d-type, である。これらのうち、Ex4 がスプライシングされる4つのバリエント (a3-, a4-, b2-, c2-type) は、シアル酸転移の触媒部位が存在するが、膜貫通領域と予測される Ex.4 の欠失のため、細胞内で GM3

合成に関与することはないと考えられる。よって、*ST3GAL5* をコードする mRNA は、a1-, a2-, b1-, c1-, d1-type であり、これらのバリエーションの中で、Ex3 がスプライシングされた mRNA が *ST3GAL5* をコードする ORF をもつと予測されるのは c1-type のみである。野生型マウスにおいて c1-type の転写開始地点である ExX<sup>2</sup> に *ST3GAL5* の開始コドンは存在せず、Ex3 に存在する開始コドン M2, M3 から翻訳が行われると考えられる。一方、Neo に置換された Ex3 領域がスプライシングされた Ex3-KO マウスの mRNA (c1-type<sup>+</sup>) では、フレームシフトによって ExX<sup>2</sup> にアーティフィシャルな開始コドン M\* が新たに生じ、これにより、野生型と細胞質領域の N 末端アミノ酸配列だけが異なり、触媒領域は残存する *ST3GAL5* (M\*型) が翻訳されると予想される (Fig. 8A, B)。そこで、c1-type の発現を確認するため、野生型および Ex3-KO の肝臓から合成した cDNA を鋳型とし、ExX<sup>2</sup> と Ex4 に設計したプライマー (FX-primer と R4-primer) を用いて RT-PCR を行ったところ、予測通り野生型で 261bp, Ex3-KO で 137bp の断片が増幅された (Fig. 8C, D)。これらの結果は、野生型の肝臓において、新規 mRNA バリエーションの c1-type が発現していること、および、Ex3-KO の肝臓において、*ST3GAL5* の mRNA は Neo 耐性遺伝子に置換された領域がスプライシングされた c1-type<sup>+</sup> が発現していることを示し、Ex3-KO の肝臓で M\*-*ST3GAL5* が発現することを示唆している。

次に、肝臓以外の組織でも c1-type の発現が見られるのか、野生型マウスの組織から合成した cDNA を用いてリアルタイム PCR で解析した。脳、肺、心臓、大腸、胸腺、脾臓、胃、精巣、膵臓、腎臓、肝臓、小腸、脂肪、膀胱を用いた解析の結果、肝臓で著しく高い発現が認められた (Fig. 9A)。

さらに、胎生 14.5 日、出生後 10 日、14 日、6 週齢、25 週齢の野生型マウスの肝臓から合成した cDNA を用いて各 mRNA バリエーションの発現をリアルタイム PCR で解析した (Fig. 9B)。胎生 14.5 日では主に a-type が発現しているが、ステージが進むに連れて c1-type の発現が著しく上昇していた。この結果は、肝臓における *ST3GAL5* 転写制御機構が発生・成長のステージによりシフトすることを示唆している。

#### 第 4 項 新規 *ST3GAL5* mRNA トランスクリプショナルバリエーション (c1-type) の転写開

### 始地点の解析

c1-type の転写開始地点 : Transcriptional start sites (TSSs) を明らかにするために、野生型マウスの肝臓から抽出した totalRNA を用いて 5'-RACE 解析を行い、c1-type の 5' 末端配列を含む 34 個のクローンを得、それらの配列を決定した (Fig. 10). 開始コドン M\* より上流から転写が開始されるクローンは 34 個中 1 個のみであった。以上の結果は、肝臓において c1-type は高い発現が見られるが、M\*-ST3GAL5 を翻訳出来る c1-type は非常に限定されることを示唆している。

### 第 5 項 M\*-ST3GAL5 の細胞内局在と in vivo における酵素活性の評価

M\*-ST3GAL5 の *in vivo* における GM3 合成活性を調べるために、Ex3-KO マウス由来の胎児繊維芽細胞 MEF<sup>ST3GAL5<sup>-/-</sup></sup> (mouse embryonic fibroblasts) に、M3-ST3GAL5 および M\*-ST3GAL5 をレンチウイルスで安定発現させ、抗 ST3GAL5 抗体でウェスタンブロッティングを行った (Fig. 11A). M3-ST3GAL5, M\*-ST3GAL5 はともにシングルバンドで検出され、M\*-ST3GAL5 の発現量は M3-ST3GAL5 と比較してわずかに低かった。次に、これらの細胞から総脂質を抽出し、脂質解析を行った (Fig. 11B). MEF<sup>ST3GAL5<sup>-/-</sup></sup> の酸性画分では o-系列ガングリオシドである GM1b のみ、中性画分ではグルコシルセラミド (GlcCer), LacCer, グロボ系列の Gb3, Gb4 が検出された。MEF<sup>ST3GAL5<sup>-/-</sup></sup> に M3-ST3GAL5 または M\*-ST3GAL5 を発現させた場合、両方で酸性画分に a-系列ガングリオシドである GM3, GM2, GM1, GD1a が新たに合成され、中性画分で LacCer, Gb3, Gb4 の減少が確認された。M3-, M\*-ST3GAL5 の脂質組成は種類、発現量ともに類似しており、M\*-ST3GAL5 は *in vivo* で M3-ST3GAL5 と同様の酵素活性を持つことが示された。

ST3GAL5 において、細胞質領域の N 末端アミノ酸配列は、細胞内輸送に関わることを示されている [35]。M\*-ST3GAL5 の N 末端アミノ酸配列は M3-ST3GAL5 と大きく異なるため (Fig. 8B), MEF<sup>ST3GAL5<sup>-/-</sup></sup> に発現させた M\*-ST3GAL5 の細胞内局在を抗 ST3GAL5 抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察した (Fig. 11C)。MEF<sup>ST3GAL5<sup>-/-</sup></sup> に抗 ST3GAL5 抗体を反応させても蛍光は観察されなかった一方で、M3-ST3GAL5, および M\*-ST3GAL5 を発現した細胞ではゴルジ体のマーカータンパク質である GM130 と一部共局在を示す細胞内

区画が染色された。この結果は、M\*-ST3GAL5 は M3-ST3GAL5 と同様に、小胞体からゴルジ体へ輸送されることを示している。

### 第3節 考察

本章の結果は、ST3GAL5-Ex3-KO マウスの肝臓において GM3 合成の残存活性が認められることは、肝臓特異的な新規 mRNA バリエントの存在に由来するという仮説を支持している。以下に、その根拠を述べる。

一般に、遺伝子転写はゲノムがクロマチン構造をとることで制御され、ヒストンの翻訳後修飾は他のクロマチン因子とともに転写レベルを調節することが知られている。遺伝子転写制御機構において、クロマチンを構成するヒストン H2A, H2B, H3, H4 のアセチル化やメチル化の翻訳後修飾が重要であり、ヒストン H3 アミノ末端からの 4 番目のリシン (K) のモノメチル化 (H3K4me1) はエンハンサー領域に、トリメチル化 (H3K4me3) はプロモーター領域に存在し、どちらも転写活性化と関連する[45,46]。このような転写制御機構を解析するツールの一つとして、ChIP-seq 法が挙げられる。ChIP-seq 法は、クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation: ChIp) と次世代シーケンサーを組み合わせた解析法であり、免疫沈降により回収した DNA 断片の超高速シーケンシングを行うことで、ヒストンメチル化などクロマチン構造変化のエピジェネティックな修飾や転写調節因子のゲノム上の結合部位を網羅的に解析することが出来る。国際エピゲノムプロジェクト等で得られた様々な動物種、細胞の ChIP-seq 解析データは、encyclopedia of DNA elements: ENCODE (<https://www.encodeproject.org>) や ChIP-Atlas (<http://chip-atlas.org/>) といったデータベース上でその多くが公開されている。

ST3GAL5 遺伝子のプロモーター部位の探索のため、ENCODE (<https://www.encodeproject.org>) に登録されているマウス組織 (胎生 14.5 日 (E14.5), 8 週齢 (8w), 24 週齢 (24w)) の H3K4me3 の ChIP-seq 法を用いた解析結果を USCS genome browser (<https://genome.ucsc.edu>) でまとめたものを Fig. 12 に示す。全てのサンプルで a-type, b-type の TSSs 領域である Ex1 と Ex2 の近傍で H3K4me3 のピークが検出された。興味深いことに、ExX<sup>2</sup>近傍の H3K4me3 ピークは 8 週齢の肝臓、骨髄、褐色脂肪細胞 (BAT) のみで検出された。このような組織特異性を示す遺伝子発現制御は、転写開始位置から離れて位置するエンハンサーが機能しており、H3K4me1 の関与が知ら

れている。H3K4me3 と同様に、USCS genome browser を用いて肝臓における H3K4me1 の ChIP-seq 法の解析結果をまとめたものを Fig. 13 に示す。E14.5 で H3K4me1 のピークは Ex1～ExX2, および Ex4 近傍で検出された。一方、8 週齢のピークパターンは ST3GAL5 コード領域のゲノム全体で検出された。以上のことから、ST3GAL5 は遺伝子発現の時空間的な制御（時期特異的制御，組織特異的制御）を受けており，特に肝臓においてはその発生・分化時期に応じて他組織と異なる領域が活性化されると予測される。これら ChIP-seq で得られた H3K4me3, H3K4me1 の解析結果は本章のリアルタイム PCR による解析結果を支持しており，肝臓で a-, b-type から c-type への遺伝子転写制御機構のシフトが行われていることを示唆している。

転写因子結合部位探索ソフトである TFBIND (tfbind.hgc.jp) [47]プログラムを用いて、c-type の TSSs から 5'上流領域（～200bp）における転写因子の結合部位を検索し予測した (Fig. 14)。複数の肝細胞特異的遺伝子の発現を調節し、肝臓の分化と再生に関与する C/EBP (CCAAT/エンハンサー結合タンパク質) [48]は、抽出された転写因子の中に含まれていた。また、成体マウス肝臓で発現する転写因子である DBP (D-site of albumin promoter binding protein) と相同性の高い配列 (5'-(A/G)TTA(C/T)GTAA(C/T)-3') [49-51]も確認されたが、この配列は TFBIND プログラムのリストには含まれていなかった。

今日まで、ガングリオシド合成酵素の遺伝子発現制御機構はほとんど明らかになっていない。プロモーター活性を有する領域の組織特異的な転写因子を同定することにより、生体内のガングリオシド合成の鍵となる ST3GAL5 の組織特異的な発現制御機構を明らかにすることができるかと期待される。

#### 第4節 材料と方法

##### 実験試薬・実験材料

RNA*later* Solution : Ambion

RNeasy Lipid Tissue Mini kit : QIAGEN

RNeasy Mini kit : QIAGEN

QIAzol Lysis Reagent : QIAGEN

ジルコニアビーズ (ZB-50) : TOMY

First-Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR : Roche Diagnostics

2×TaqMan Universal Master Mix : Applied Biosystems

SMARTer RACE 5'/3' Kit : Takara

KOD FX : TOYOBO

KOD FX Neo : TOYOBO

DMEM (4.5g/l Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid : Nacalai Tesque

DMEM(1.0g/l Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid : Nacalai Tesque

poly-L-lysine : SIGMA

Penicillin-streptomycin mixed Solution Stabilized : Nacalai Tesque

Fetal Bovine Serum (FBS) : Biosera

CELLBANKER 1 : 日本全薬工業

Lipofectamine 2000 Regent : Invitrogen

Forskolin : SIGMA

cOmplete, EDTA-free protease inhibitor cocktail : Roche Diagnostics

Peptide: N-glycosidase F (PNGase F) : New England Biolabs

Pierce BCA protein assay kit : Thermo Fisher Scientific

Prestained XL-Ladder : APRO

PVDF 膜 : MILLIPORE

Amersham™ ECL Select Western Blotting detection Reagents : GE Healthcare

DEAE Sephadex A-25 : GE Healthcare

Sep-Pak Plus C18 : Waters

Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 : TOYOBO

Image it Fx signal enhancer : Invitrogen

ProLong Gold antifade reagent : Thermo Fisher

pGEM-T Easy Vector : Promega

pENTR/D-TOPO vector : Life Technologies

CSII-CMV-RfA : Life Technologies

Gateway LR Clonase enzyme mix II : Invitrogen

TLC Silica gel 60 : Merck

#### 緩衝液

• buffer A : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 4 M urea, 1x

cOmplete protease inhibitor mixture

• 2x SDS sample buffer : 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, trace

amount of bromophenol blue

• SDS-PAGE running buffer : 25 mM Tris(pH 8.9)、192 mM glycine、0.1% SDS

• transfer buffer : 25 mM Tris、192 mM glycine、20% methanol

blocking buffer : 0.5%スキムミルク/TBS-T

• PBS : 137 mM NaCl、2.68 mM KCl、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

• TBS-T : 137 mM NaCl、20 mM Tris(pH 7.5)、0.05% Tween20

• Saline : 0.9% NaCl

#### 抗体

• ウェスタンブロッティング用一次抗体



抗 ST3GAL5 抗体(C-term) : ST3GAL5 の C 末端側 51 残基を抗原として作製した rabbit ポリクローナル抗体

抗 $\beta$ -actin 抗体 : SIGMA

・ウエスタンブロッティング用二次抗体

抗 rabbit IgG HRP 抗体 : GE Healthcare

抗 mouse IgG HRP 抗体 : GE Healthcare

・間接蛍光抗体法用一次抗体

抗 ST3GAL5 抗体(9129) : ST3GAL5 内腔側 326 残基を抗原として作製した rabbit ポリクローナル抗体

抗 KDEL 抗体 : StressGen Bioreagents

抗 GM130 抗体 : BD Bioscience

・間接蛍光抗体法用二次抗体

抗 mouse IgG Alexa 594 抗体(Alexa Fluor 594) : Invitrogen

抗 rabbit IgG Alexa 488 抗体(Alexa Fluor 488) : Invitrogen

### 実験動物

C57BL/6 マウス, KK/TaJcl マウス (*St3gal5*<sup>+/+</sup>) は日本クレアより購入した. *St3gal5* ノックアウトマウス (*St3gal5*<sup>-/-</sup>, *St3gal5-Ex3-KO*) は KK/TaJcl をバックグラウンドにもつ系統を用いた. マウスはプラスチックケージ (20 x 30 x 15 cm) に収容し, 室温 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 湿度 60 $\pm$ 2%, 12 時間の明暗サイクル (午前 7 時点灯) の環境下で飼育した. 水, および餌 (CE2; 日本クレア) は自由に摂取出来るようにした.

全ての実験動物は, 東北医科薬科大学動物実験委員会の動物実験倫理規定に準じて飼育, および使用された.

### mRNA variant 特異的配列の増幅

17 週齢の KK/TaJcl マウス (*St3gal5<sup>+/+</sup>*, *St3gal5<sup>-/-</sup>*) を麻酔下で断頭、開腹切開し、脳および肝臓組織を摘出した。5 mm 角のサイズに刻み *RNAlater Solution* に浸し、4°C で 1 週間浸透させた。2 ml コニカル型チューブに組織片、ジルコニアビーズ、QIAzol 1 ml を入れ、ビーズ式細胞破碎装置 (Micro Smash MS-100, TOMY) を用いて破碎した。破碎条件は室温、4000 rpm、30 秒間を 2 回行った。室温で 5 分間静置し、破碎液を別チューブに移し、200  $\mu$ l のクロロホルムを加えて転倒混和後に室温で 2 分間静置した。4°C、12,000 x g、15 分間の遠心により相分離を行った。上層の水層を別チューブに移し、600  $\mu$ l の 70%エタノールを加えて攪拌し、RNeasy lipid tissue mini kit のカラムに添加した。この先は RNeasy lipid tissue mini kit の標準的なプロトコルに準じて行い、最終的に得られた溶出液を total RNA 溶液とした。total RNA は NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) を用いて 260 nm の吸光度を測定することにより濃度を算出した。

逆転写反応は First-Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (AMV; Roche Diagnostics; Basel, Switzerland) を用いた。total RNA 2.5  $\mu$ g 分、10x reaction buffer 5  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ l、Deoxynucleotide Mix 5  $\mu$ l、RNase free water を加え全量で 43.2  $\mu$ l に調整した。攪拌した後、65°C で 5 分間インキュベートして RNA の変性を行った。RNase Inhibitor 1  $\mu$ l と AMV Reverse Transcriptase 0.8  $\mu$ l を加え、37°C 10 分、42°C 60 分で逆転写反応した後、95°C 5 分間の酵素失活反応を行った。得られた溶液を cDNA 溶液として用いた。

PCR は KOD FX polymerase (TOYOBO) と LifeECO (日本ジェネティクス) を使用し、標準的な KOD FX プロトコルに準じて行った。プライマーは以下を使用した。

• a-type

F1-primer: 5'-TCCCTAGCATGCACACAGAGG-3'

R4-primer: 5'-TTATCCGGTCAGGGTCCACATAGTGC-3'

• b-type

F2-primer: 5'-AGCCTGCGCAGGTGTGGAC-3'

R4-primer: 5'-TTATCCGGTCAGGGTCCACATAGTGC-3'

• c-type

FX-primer: 5'-GATTTCTCGACACCTCTACTCACACAG-3'

R4-primer: 5'-TTATCCGGTCAGGGTCCACATAGTGC-3'

PCRはそれぞれ 50 ng の cDNA を鋳型とし, 94°C 2 分の後, 98°C 10 秒, (a/b/c, 59/60/61°C) 30 秒, 68°C 20 秒を 26 サイクルで行った.

### Plasmids

下記のクローニング操作はそれぞれ標準的なプロトコルに準じて行った.

• pGEM-T Easy vector へのクローニング

マウス肝臓組織由来の cDNA を鋳型とし, PCR で目的配列を増幅した. 増幅産物は必要な場合 A 付加を行い, アガロースゲル電気泳動で分離・精製後, pGEM-T Easy vector に T/A cloning で組込んだ. 得られたクローンは DNA シーケンサ (Applied Biosystems 3130, Thermo Fisher Scientific) と ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した.

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 615	St3gal5-Ex3-KO マウス肝臓 cDNA	M*- ST3GAL5	5'- ATGTCCTTGGCTGGACACGTTC -3' 5'- GGTTTGCCGTGTTCCGAGTTC -3'

• pENTR-D TOPO vector へのクローニング

pGEM-T easy vector にクローニングしたプラスミドを鋳型とし, PCR で目的配列を増幅した. アガロースゲル電気泳動で分離・精製後, pENTR-D TOPO vector に topo cloning で組込んだ. 得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した.

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pSU 212	M3- ST3GAL5/pcD NA3.1zeo(+) [52]	M3- ST3GAL5	5'- CACCATGAGAAGAC CCAGCTTGTTAATAAAAAGA -3' 5'- TTCAGTGG ATGCCGCCGCTGAGGTCCTC -3'
pFS 617	pFS 615	M*- ST3GAL5	5'- CACCATGTCCTTGGCTGGACACGTTC -3' 5'- GGTTTGCCGTGTTCCGAGTTC -3'

・ CSII-CMV-RfA vector へのクローニング

pENTR-D TOPO vector にクローニングしたプラスミドと CSII-CMV-RfA vector を混合し、LR clonase enzyme mix II を添加して LR 反応による組換えを行った。得られたクローンは制限酵素処理を行い、アガロースゲル電気泳動でバンドサイズを確認した。

ORF	pENTR-D TOPO	CSII-CMV-RfA
M3-ST3GAL5	pSU 212	pFS 311
M*-ST3GAL5	pFS 617	pFS 620

Real-time PCR

各週齢の C57BL/6 マウスを麻酔下で断頭、開腹切開し、組織を摘出した。上述の「mRNA variant 特異的配列の増幅」と同様の方法で処理し、total RNA を抽出し、cDNA に逆転写した。但し、変更点として RNeasy Lipid Tissue Mini kit ではなく、RNeasy Mini kit を用いた。Real-time PCR は 2×TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) と 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を使用し、標準的な TaqMan PCR プロトコルにより行った。プライマー・プローブは Applied Biosystems で購入し使用した。

・ a-type

probe

5'-TGCCGAGCAATGCCAA-3'

primers

5'-TGCGAAGCCAAGCAGCG-3'

5'-AGCAATCACTTCTCAGCTTTG-3'

• b-type : Mm00488232\_m1

• c1-type

probe

5'-ATTTAAGCCCTCATGGACGCCGCTC-3'

primers

5'-ACTCAGAGGCTGTTTGAAACAGTCT-3'

5'-GTGAGTAGAGGTGTCGAGAAATCCAT-3'

• 18S rRNA : Hs99999901-s1

検量線を作製し、各サンプルのコピー数を算出した。

#### 5'-RACE analysis

SMARTer RACE 5'/3' Kit と、上述の「mRNA variant 特異的配列の増幅」で調整した KK/TaJcl マウス (*St3gal5<sup>+/+</sup>*) 肝臓の total RNA を使用し、標準的な SMARTer RACE 5'/3' Kit プロトコルを一部変更して行った。

5x First strand buffer 4 µl, 100 mM DTT 0.5 µl, 20 mM dNTPs 1 µl を混合後, 40 U/µl RNase inhibitor 0.5 µl, 100U SMART Scribe Reverse Transcriptase 2 µl を添加し, マスターミックスとした。total RNA 1 µg 分と 5'-CDS Primer A 1 µl に Sterile H<sub>2</sub>O を加えて 11 µl とし, 攪拌後, 72°C で 3 分間, 42°C で 2 分間インキュベーションを行い RNA の変性を行った。常温で静置した total RNA, 上記で調整したマスターミックス, SMARTerII A Oligonucleotide 1µl を混合し, 42°C で 90 分間逆転写反応を行った後, 70°C で 10 分間の酵素失活処理をした。4°C で冷却後に Tricine-EDTA buffer 10 µl を加えて 5'-RACE ready cDNA 溶液とした。

primary PCR は 1.25 µl の 5'-RACE ready cDNA を鋳型とし, KOD-FX Neo polymerase を用いて 25 µl の系で増幅を行った。94°C 2 分の後, 98°C 10 秒に続く 68°C 1 分 30 秒を 45 サイクルで行った。

• primary PCR 用プライマー配列

10x UPM

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

5'GSP

5'-GATTACGCCAAGCTTGCATTGCTGTGTGAGTAGAGGTGTCGAGAAATCC-3'

増幅産物を Sterile H<sub>2</sub>O で 50 倍に希釈した内の 2.5 μl を鋳型とし, KOD-FX Neo polymerase を用いて 25 μl の系で secondary PCR を行った. 増幅は 94°C2 分の後, 98°C 10 秒, 52°C30 秒, 68°C1 分 30 秒を 35 サイクルで行った.

・ secondary PCR 用プライマー配列

UPM-short : 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

5'GSP-short : 5'-GATTACGCCAAGCTTGCATTG-3'

PCR 産物のうち 10 μl をアガロース電気泳動に用いて確認した結果, 200 bp にシングルバンドが検出された. 残りの PCR 産物の 5 μl と cloning enhancer 2 μl を混合し, 37°C20 分間, 80°C15 分間の cloning enhancer 処理を行い, RACE products とした. RACE products 5 μl, 50 ng/μl linearized pRACE vector 1μl, In-Fusion HD Master Mix 2μl に Sterile H<sub>2</sub>O を加えて 10 μl とし, 攪拌後, 50°Cで 15 分間インキュベートしてディレクショナルクローニングを行った. このうち 2.5 μl を用いて Stellar Competent Cell 50 μl を形質転換した. 得られたクローンは DNA シーケンサ (Applied Biosystems 3130, Thermo Fisher Scientific) を用いて M13F-primer : 5'-GTTTTCCAGTCACGACGTT-3', M13R-primer : 5'-GGAAACAGCTATGACCATGA-3'で配列を決定した.

#### 細胞培養法

Mouse embryonic fibroblasts derived from *St3gal5*-Ex3-KO mice (MEF<sup>-/-</sup>)細胞 : low-glucose DMEM

293T 細胞 : high-glucose DMEM

上記の培地に最終濃度 10% (v/v) FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μg/ mL streptomycin で添加し基本培地とした. 5% CO<sub>2</sub>, 37°C条件下において基本培地で培養した.

### レンチウイルス調製法

poly-L-lysine コートした 60 mm dish に 293T 細胞を ( $0.5 \times 10^6$ ) 播種し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> で 24 時間培養後に以下のプラスミドを Lipofectamine 2000 reagent 10  $\mu$ l でトランスフェクションした.

・ pFS311 (mM3-ST3GAL5/CSII-CMV-RfA), 又は pFS620 (mM\*-ST3GAL5/CSII-CMV-RfA): 3  $\mu$ g

・ pCAG-HIVgp : 1.5  $\mu$ g

・ pCMV-VSV-G-RSV-Rev : 1.5  $\mu$ g

37°C, 5%CO<sub>2</sub> で 16 時間培養後, 最終濃度 10  $\mu$ M で forskolin を添加した high-glucose DMEM 基本培地 4 mL に培地交換を行った. さらに 37°C, 5%CO<sub>2</sub> で 24 時間培養後, 32°C, 5%CO<sub>2</sub> に移し 24 時間培養し, 200 x g で 3 分間遠心を行い, 上清を 0.45  $\mu$ m シリジフィルターに通し細胞残渣を取り除いた. 得られたレンチウイルス溶液は液体窒素で凍結後, -80°C で保存した.

### レンチウイルス感染による遺伝子導入 (安定発現株の作製)

60 mm dish に MEF<sup>-/-</sup>細胞を播種し 50-60%confluency まで培養後, 培地を除去しレンチウイルス溶液 4 ml を添加した. 32°C, 5%CO<sub>2</sub> で 24 時間培養後, low-glucose DMEM 基本培地に交換し 37°C, 5%CO<sub>2</sub> で培養した. 基本培地で 1 週間培養した細胞を安定発現株とし, CELLBANKER 1 に懸濁して-80°C で保存した.

### SDS-PAGE 用膜画分試料の調製法

細胞を PBS で 2 回洗浄した後, 400  $\mu$ l の buffer A で回収し, ソニケーションで細胞を破碎した. 4°C, 1,000 x g, 3 分間の遠心により細胞残渣を沈殿させた後, 上清 (total cell lysates) を移し 4°C, 100,000 x g, 60 分間の超遠心を行った. 超遠心後に得られた沈殿物を膜画分 (integral membrane protein fraction) とした. この間, 操作は全て氷上で行った. 5%で BMe を添加した 2x SB を膜画分に加え, ボルテックスミキサーで 5 分間攪拌した. 37°C で 5 分間加熱変性処理をした後, 再びボルテックスミキサーで 2 分間攪拌した.

続いて、PNGase F を添加して 37°C で 1 時間糖鎖切断処理を行った。また、タンパク質濃度は BCA protein assay kit と total cell lysates を用いて、標準的な BCA タンパク質定量アッセイプロトコルに従って行った。

### SDS-PAGE

Laemmli の方法に準じて行った。濃縮ゲルは 4%，分離ゲルは検出目的タンパク質の分子量に応じて 7.5-12% のポリアクリルアミドゲルを用いた。ミニリアルスラブゲル電気泳動装置（バイオクラフト）を用い、濃縮ゲルでは 20 mA，分離ゲルでは 30 mA の一定電流で泳動を行った。分子量の測定には分子量マーカー（Prestained XL-Ladder）を用いた。

### ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE を行ったゲルと、メタノールに 10 秒間浸して活性化させた PVDF 膜を transfer buffer で 5 分間震とうし平衡化した。ゲル中のタンパク質はセミドライ型転写装置 Trans-blot SD（BIO-RAD）を用い、10 V の一定電圧で 30 分間 PVDF 膜上に転写した。転写後の PVDF 膜を blocking buffer に浸し、室温で 20 分間振とうしブロッキング処理を行った。blocking buffer で 1:1000 に希釈した一次抗体溶液中で室温、60 分振とうした後、TBS-T で 1:20000 に希釈した二次抗体中で室温、60 分間浸透した。なお、一次抗体のうち抗 ST3GAL5 抗体（C-term）は Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 で 1:1000 に希釈して用いた。発色は ECL Select kit を用い、LAS-3000（FUJIFILM）で検出した。また、必要があれば各抗体反応の前後に TBS-T で 10 分間 3 回の洗浄を行った。

### 間接蛍光抗体法による細胞内局在の観察

カバーガラスに細胞を播種し 70% confluency まで培養し、PBS で 2 回洗浄後、室温で 15 分間 3.7% formaldehyde in PBS にカバーガラスごと浸し固定した。必要があれば 0.5% SDS in PBS，または 0.5% Triton X-100 in PBS で室温、5 分間 permeabilized 処理を行った。Image-iT FX Signal Enhancer を滴下し室温で 30 分間ブロッキング処理をした後、1% BSA in PBS で 1:100 に希釈した一次抗体を室温で 60 分間反応させた。続いて、1%



BSA in PBS で 5  $\mu\text{g/ml}$  に希釈した二次抗体を室温で 30 分間反応させ、ProLong Gold antifade reagent で封入した。ブロッキング、一次抗体、二次抗体の反応はモイストチャンバー内で行った。全ての行程間で PBS を用いて 3 分間 3 回の洗浄を行った。完成した細胞試料は共焦点蛍光顕微鏡 (FV1000, Olympus) で観察した。

### 脂質抽出法

#### ・動物組織からの脂質抽出

KK/TaJcl マウス (*St3gal5*<sup>+/+</sup>, *St3gal5*<sup>-/-</sup>) を麻酔下で断頭、開腹切開し、脳および肝臓組織を摘出した。液体窒素で凍結後、凍結乾燥機 (FDU-2200 型, EYELA) で乾燥させた。

#### ・培養細胞からの脂質抽出

150 mm dish に細胞を播種し 90%confluency まで培養し、Saline で 2 回洗浄後、8 ml の Saline で 15 ml ガラス遠沈管に回収した。室温、1,000 x g, 5 分間の遠心により細胞を沈殿させた後、上清を除去した。

上記の処理を施した組織または細胞に  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/1, v/v) を 8 ml 加え、5 分間のソニケーションを行った後、40°C で 60 分間インキュベートした。室温、2,000 rpm, 5 分間の遠心により細胞を沈殿させた後、上清をナス型フラスコに回収した。沈殿物に再度  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/2, v/v) を 6 ml 加え、同様に処理をした後、同じナス型フラスコに回収し、総脂質溶液とした。得られた総脂質溶液はエバポレーター (CCA-1111 型, EYELA) で乾固させた。総脂質の酸性・中性脂質に分離するため、ナス型フラスコ内の総脂質に  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (30/60/8, v/v/v) を加えて溶解し、DEAE-Sephadex A-25 カラムに添加した。カラム体積の 5 倍量の  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (30/60/8, v/v/v) を加えて中性脂質を溶出、回収した後、同量の  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/1\text{M AcONa}$  (30/60/8, v/v/v) を加えて酸性脂質を溶出、回収した。それぞれの溶出液を窒素気流により乾固させた後、グリセロ脂質分解処理のため 5 ml の 0.1N NaOH in MeOH を加え 40°C で 120 分間インキュベートを行い、1N HCl in MeOH で中和処理をした。続いて 6 ml の 50 mM NaCl を加え、Sep-Pak Plus C18 カートリッジに添加した後、40 ml の精製水で脱塩を行った。10 ml の MeOH と 10 ml の  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2/1, v/v) で脂質を抽出しナス型フラスコに回収した。脂質溶液はエ

バポレーター (CCA-1111 型, EYELA) で乾固させた後, 少量の MeOH で溶解しマイクロチューブに回収し, 窒素乾固させた.

また, タンパク質濃度は BCA protein assay kit と総脂質抽出後の沈殿物を用いて, 標準的な BCA タンパク質定量アッセイプロトコルに従って行った. 総脂質抽出後の沈殿物は, 5 ml の 0.5N NaOH で溶解してから定量に用いた.

### 脂質解析法

脂質解析は薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて行った. 抽出した脂質を  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/2, v/v) で溶解し, TLC プレートにスポットし, 展開した. 展開溶媒は, 酸性画分は  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.2\% \text{CaCl}_2$  (55/45/10, v/v/v), 中性画分は  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (60/25/4, v/v/v) をそれぞれ用いた. 展開後, よく乾燥させた TLC プレートにオルシノール硫酸試薬を噴霧し, 100°C ホットプレートで焼成した. 糖脂質は赤紫色を呈する.

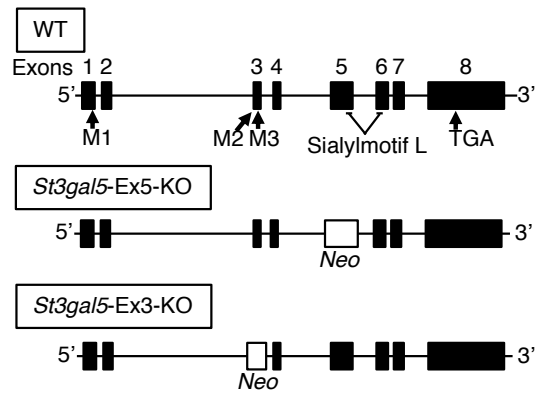


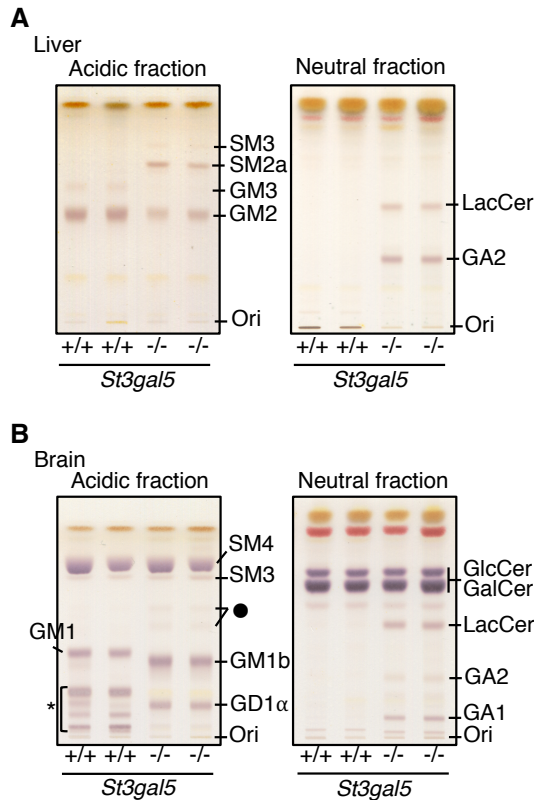
Figure 4. *St3gal5* knockout (*St3gal5*-Ex5-KO と *St3gal5*-Ex3-KO) マウスの遺伝子構造

*St3gal5* 遺伝子は8個のエキソンから構成される。

*St3gal5*-Ex5-KO マウスは、シアルルモチーフLを含むEx5領域をネオマイシン耐性遺伝子配列に置換することで作製された。

*St3gal5*-Ex3-KO マウスは、開始コドンM2, M3を含むEx3領域をネオマイシン耐性遺伝子配列に置換することで作製された。

■: exons, —: introns



サンプル量: 2 mg protein  
 発色試薬: orcinol/sulfuric acid.  
 酸性展開溶媒: C/M/0.2%CaCl<sub>2</sub> (55/45/10) 中性展開溶媒: C/M/W (60/25/4)

Figure 5. *St3gal5*-Ex3-KOマウスの肝臓と脳組織のGSLs組成

野生型マウス(+/+)と*St3gal5*-KOマウス(-/-)におけるGSLs組成の比較. KOマウスはLacCerの蓄積とo-系列の発現が見られた.

(A) 肝臓組織の酸性糖脂質および中性糖脂質. 中性GSLsでは, KOマウスでGM3の基質となるLacCerの蓄積と, 野生型で発現していないo-系列のGA2の発現が見られた. 酸性GSLsでは, スルホ系列のSM3, SM2aの発現が見られた. GM2の残存も確認された.

(B) 脳組織の酸性糖脂質および中性糖脂質. 中性GSLsでは, KOマウスでGM3の基質となるLacCerの蓄積と, 野生型で発現していないo-系列のGA2, GA1の発現が見られた. 酸性GSLsでは, スルホ系列下流と予測される糖脂質 (●) の発現が見られた. GM2の残存はなく, 野生型で発現していないo-系列のGM1b, GD1αの発現が見られた.

★: GD1a, GD1b, and GT1b ●: unidentified GSL

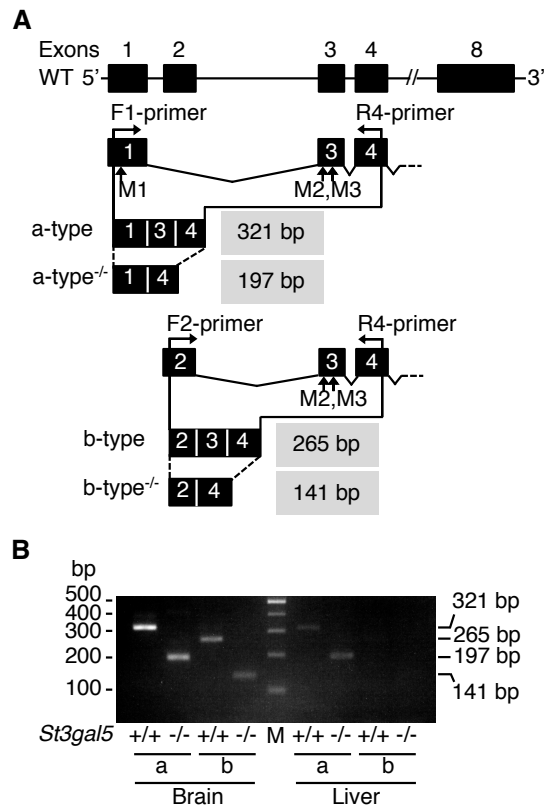


figure 6. *St3gal5*-Ex3-KOマウスの肝臓と脳組織のmRNA variant (a-typeとb-type) 発現量比較

野生型マウス(+/+)と*St3gal5*-KOマウス(-/-)におけるGSLs組成の比較. KOマウスはEx3がスプライシングされたバンドサイズが検出された.

(A) *St3gal5*遺伝子構造とmRNA variantsの模式図 (a-type, a-type<sup>-/-</sup>, b-type, b-type<sup>-/-</sup>). a-type<sup>-/-</sup>とb-type<sup>-/-</sup>はそれぞれEx3がスプライシングにより除かれた構造の転写産物の産生が予想された.

■: exons, —: introns, M1, M2, M3: 開始コドン, ■: 増幅産物のバンドサイズ

(B) 脳組織および肝臓組織のcDNAをPCRを用いてF1/R4-primersまたはF2/R4-primersで増幅した.

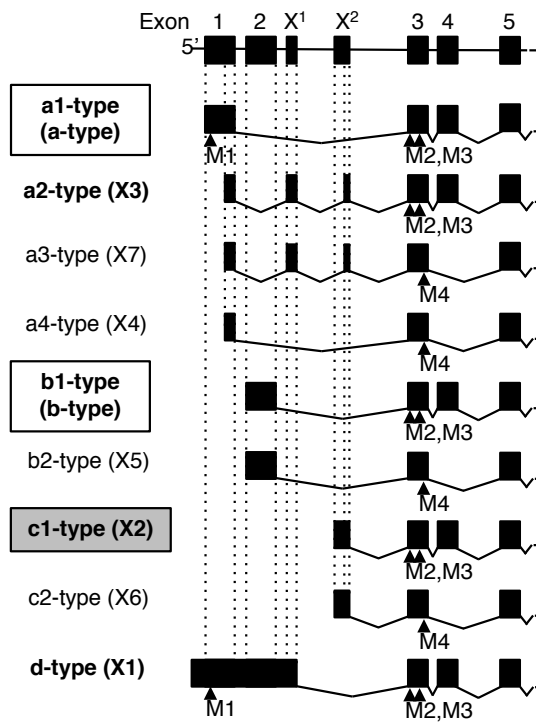


Figure 7. マウス*St3gal5* 遺伝子の構造と産生されるmRNA variants

NCBIデータベースから作製した*St3gal5* mRNA variants (a-type, b-type, X1~ X7) を示す. 転写産物はその構造からa-, b-, c-, d-typeの4種類に分類された. ExX<sup>1</sup>とExX<sup>2</sup>は, 既知のバリエーションであるa1-typeとb1-typeで報告の無い新規のエキソンである.

■: exons, —: introns, M1, M2, M3, M4: 開始コドン

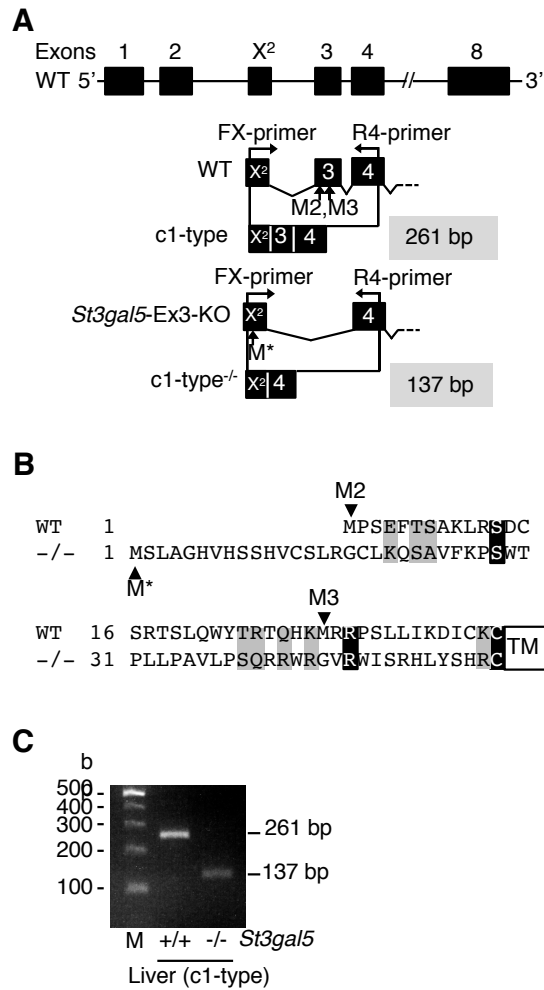


Figure 8. 野生型マウスと*St3gal5*-Ex3-KOマウスにおけるc1-type mRNA発現の比較

(A) *St3gal5*遺伝子構造とmRNA variantsの模式図(c1-type, c1-type<sup>-/-</sup>). c1-type<sup>-/-</sup>はそれぞれEx3がスプライシングにより除かれた構造の転写産物の産生が予想された。

■: exons, —: introns, M2, M3, M\*: 開始コドン, ■: 増幅産物のバンドサイズ

(B) 野生型マウスと*St3gal5*-Ex3-KO (-/-) マウスの細胞質領域N末端アミノ酸配列の比較。

■: 同一アミノ酸残基, ■: 類似アミノ酸残基, M2, M3, M\*: 開始コドン, TM: 膜貫通領域

(C) 野生型マウスと*St3gal5*-Ex3-KO (-/-) マウスの肝臓組織のcDNAをPCRを用いてFX/R4-primersで増幅した。

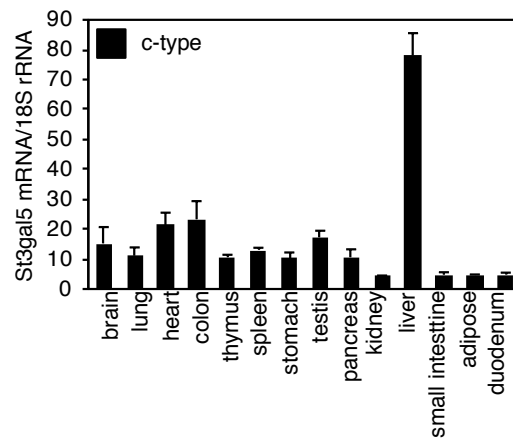
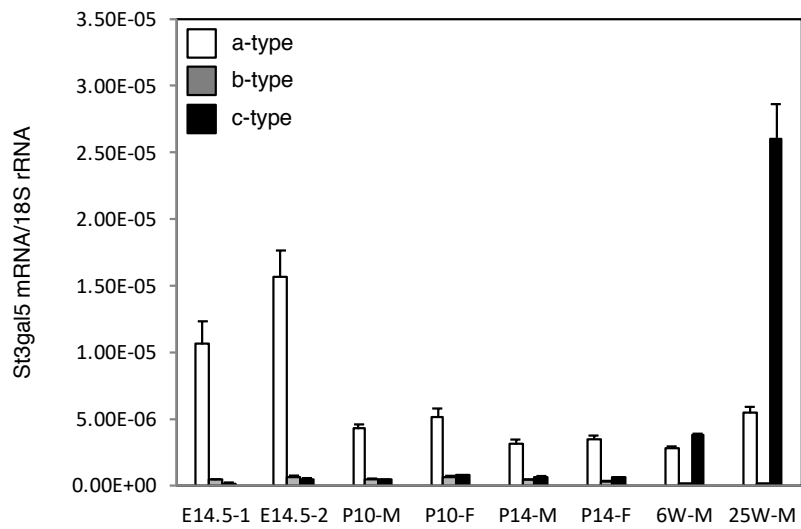
**A****B**

Figure 9. マウスにおけるST3GAL5 mRNA発現量の比較

(A) マウス組織におけるST3GAL5 mRNA c-typeの発現量をリアルタイムPCRで定量した。内在性コントロールには18s rRNAを用いた。

(B) マウス肝臓におけるST3GAL5 mRNA 各バリエーションの発現量をリアルタイムPCRで定量した。内在性コントロールには18s rRNAを用いた。

E14.5: 胎生14.5日, P10: 生後10日, P14: 生後14日, 6W: 6週齢, 25W: 25週齢, F: 雌, M: 雄



Exon X<sup>2</sup>

```

      1
      ●
1  CCCACAGATTTTATCCCCATGTCCTTGGCT  30
      1 29
      ●
31  GGACACGTTCTCCTCCAGTCATGTTGCTCA  60
      21
      ●
61  CTCAGAGGCTGTTTGAAACAGTCTGCAGTA  90
      ●
91  TTTAAGCCCTCATGGACGCGCTCCTGCCT  120
      ●
121 GCTGTCCTTCCCTCGCAGCGGAGGTGAGA  150
      ●
151 GGGGTGAGATGGATTTCTCGACACCTCTAC  180
      ●
181 TCACACAG

```

Figure 10. マウス*St3gal5* c1-typeにおける転写開始地点 (Transcriptional start sites: TSSs)

マウス*St3gal5*のexon X<sup>2</sup>塩基配列を示す。

●: TSSs, ●上の数字: 5'-RACE analysisで決定されたクローン数, M\*: 開始コドン

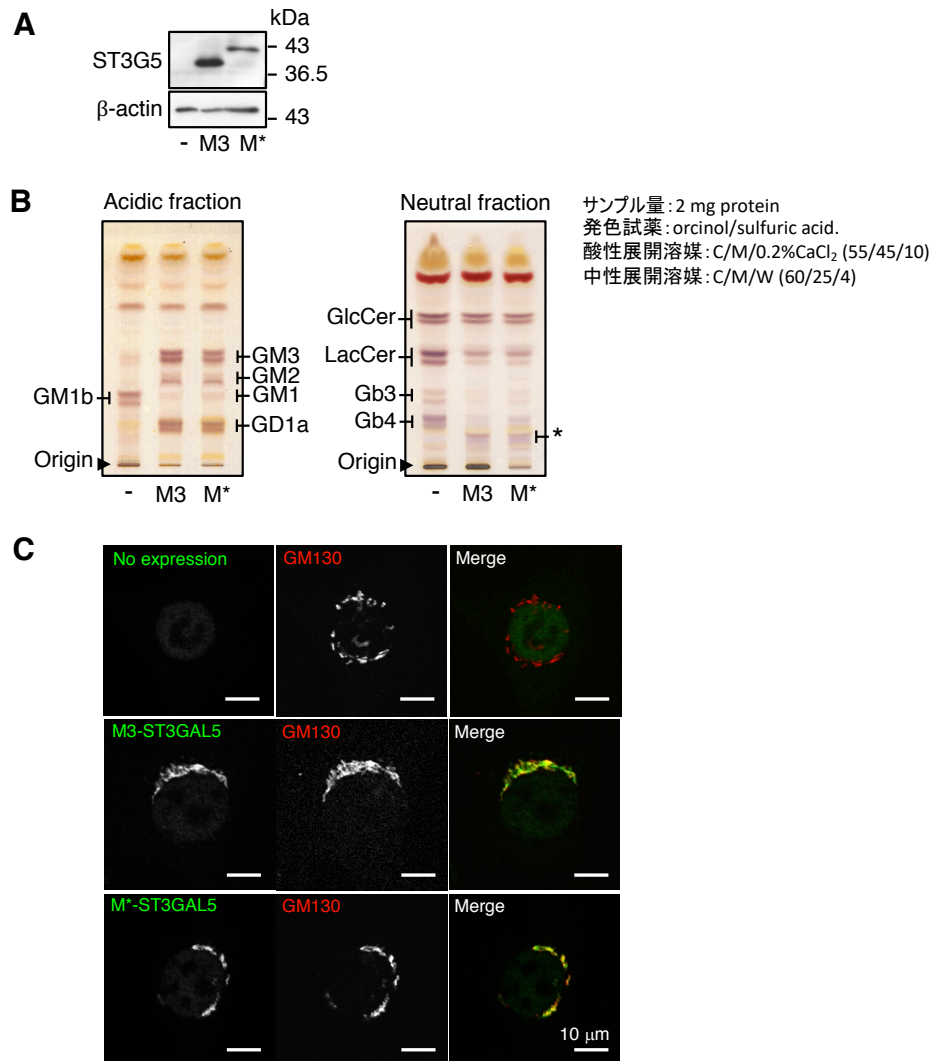


Figure 11. M3-ST3GAL5とM\*-ST3GAL5における *In vivo* 酵素活性と細胞内局在の比較

*St3gal5*-Ex3-KOマウス由来のMEF細胞にレンチウイルスを用いてM3-ST3GAL5 (M3)またはM\*-ST3GAL5 (M\*) を安定発現させた。(-): no transfectionを示す。

(A) 細胞から膜画分 (integral membrane protein fractions), 上清 (total cell lysates) を回収し, 膜画分は PNGase Fで糖鎖切断処理を行った。ウエスタンブロッティングを行い, それぞれ抗ST3GAL5抗体, 抗actin抗体で検出した。

(B) 酸性糖脂質および中性糖脂質の組成を比較した。M\*-ST3GAL5はM3-ST3GAL5と同様にGM3合成活性が認められた。

(C) 細胞内局在を比較した。M\*-ST3GAL5はM3-ST3GAL5と同様にゴルジ体に局在した。Bar: 10 μm.

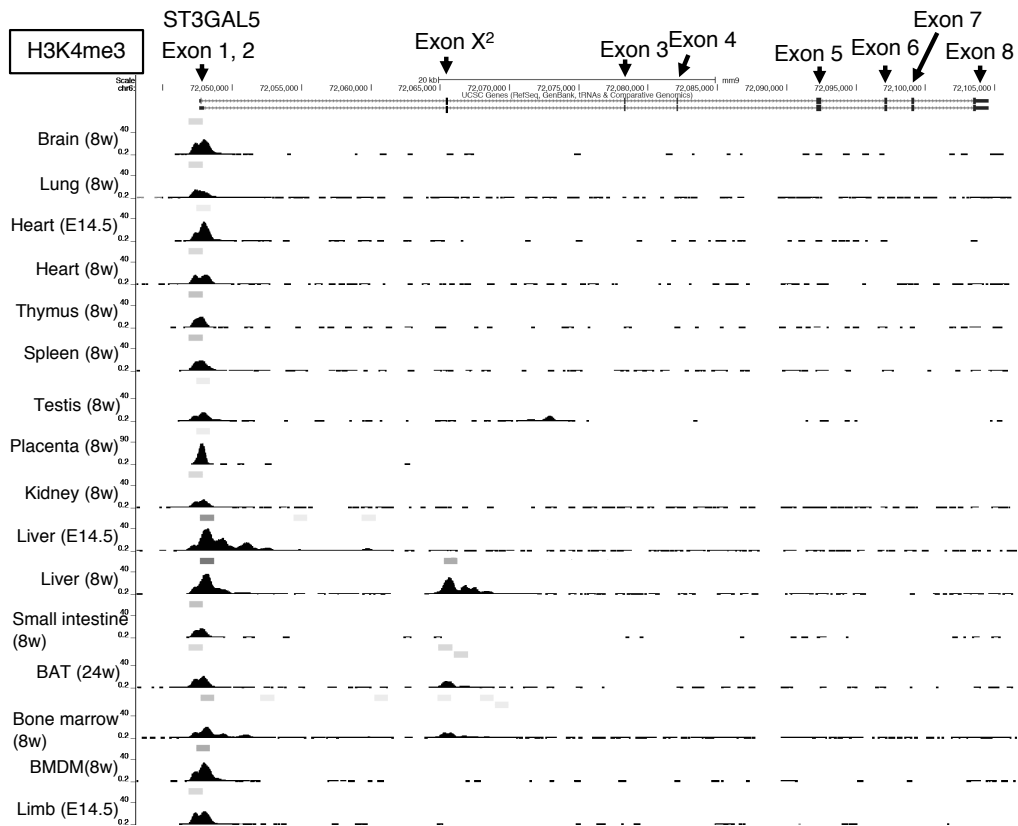


Figure 12. Chip-seq法を用いた*ST3GAL5*遺伝子のプロモーター部位の探索

encyclopedia of DNA elements: ENCODE (<https://www.encodeproject.org>)に登録されているマウス組織(胎生14.5日(E14.5), 8週齢(8w), 24週齢(24w))のH3K4me3のChIP-seq法を用いた解析結果. UCSC genome browser(<https://genome.ucsc.edu>)を用いてまとめた.

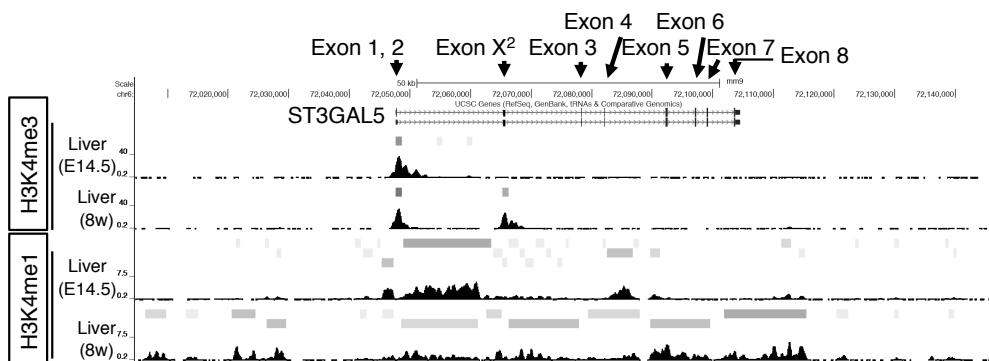


Figure 13. Chip-seq法を用いた*ST3GAL5*遺伝子のプロモーター部位の探索

encyclopedia of DNA elements: ENCODE (<https://www.encodeproject.org>)に登録されているマウス肝臓(胎生14.5日 (E14.5), 8週齢 (8w))のH3K4me3, およびH3K4me1のChIP-seq法を用いた解析結果. USCS genome browser (<https://genome.ucsc.edu>)を用いてまとめた.

```

                    AP2(-)                                CAP(+)
GGTCCTCTCAGGGCGGGGGGCCCCCCAGGTTCCTCATTC

      AML1(-)      C/EBP(-)
ACCTTTGAGACCGCAGCAGTGTGTGCCAGGTCTTACCTC
δEF1(+)      AP4(+)      DBP(+)

      Tst1(-)
ACAGTCAATGCGAATGTAGGGTTCAGCCAAGTAGGCTAAT

      C/EBP(+)
TCCTATCTGTGGTGAAATCCATTTCTCACAGACCTCCAC
|       └───┬───┘ AML1(+)
GATA3(-)/LMO2 complex(-)

CCACAGATTTTATCCCATGTTCCTTGGCTGGACACGTTCC
      GATA (-)   MZF1 (-)

●
ACTCCAGTCATGTTTGCTCACTCAGAGGCTGTTTGAAACA

```

Figure 14. 転写因子結合部位探索ソフトであるTFBIND (tfbind.hgc.jp) プログラムを用いた転写因子結合部位予測

c-typeのTSSsから5'上流領域(～200bp)における転写因子の結合部位を検索し予測した。

## 第2章 逆行輸送シグナル配列 (R-based motif) が B4GALNT1 のゴルジ体繫留機構に与える影響

### 第1節 序論

GM3 合成酵素 (ST3GAL5) は細胞質領域の N 末端の長さのみが異なる複数のアイソフォームを持つことが知られており, この N 末端は酵素の細胞内局在や安定性, 活性の制御に寄与している.

マウス ST3GAL5 には転写開始地点 (TSSs) の異なる 3 種類の mRNA バリエント (a-, b-, c-type) が存在する. 一般に, 翻訳開始機構は, Kozak のスキヤニングモデルによって説明され, 開始コドン AUG が GCCGCC(A/G)CCAUGG という配列 (Kozak sequence) 中にある場合, 翻訳開始効率が上昇すると示されている[53]. 一方, mRNA の最初の AUG だけでなく, さらに下流の AUG も開始コドンと認識してタンパク質の翻訳が行われるリーキスキヤニングは, 最初の AUG がリボソームによって開始コドンとして認識される効率が低下しているときに起こるとされているが, その詳細なメカニズムは明らかになっていない[53]. マウス ST3GAL5 はリーキスキヤニングを受けて一本の mRNA から N 末端の異なる複数のアイソフォームが産生され, a-type からは M1 型, M2 型, M3 型の 3 種類が, b-type からは M2 型, M3 型の 2 種類のアイソフォームが翻訳される (Fig. 3) [35]. 本論文第1章で報告した c-type は a-, b-type と転写制御が異なるが, 翻訳されるアイソフォームは b-type と同じ M2 型と M3 型である. これら 3 種類のアイソフォームは N 末端側の細胞質領域の長さ, 細胞内局在, 酵素安定性, 比活性など, 性質がそれぞれ異なる (Fig. 3). 全てのアイソフォームは小胞体で合成された後, ゴルジ体へ輸送されて GM3 を合成する. M1-ST3GAL5 は, その長い細胞質領域にゴルジ体から小胞体への逆行輸送シグナルとして機能するアルギニン (R) 配列 (R-based motif) をもつため, 大部分が小胞体に局在し, 高い安定性を示す. また, M2-ST3GAL5 はゴルジ体からライソソームへ運ばれて速やかに分解されるのに対し, M3-ST3GAL5 はゴルジ体に安定に局在し, GM3 合成の主役を担う [35].

ガングリオシド合成酵素の大部分は主な糖鎖修飾の場であるゴルジ体に局在しており,

哺乳類のガングリオシド合成酵素において R-based motif により小胞体に逆行輸送されるという報告は ST3GAL5 が最初である。しかしながら、GM3 生合成の糖供与体（ドナー基質）である CMP-シアル酸はサイトゾルで合成された後にゴルジ体に輸送されること、糖受容体（アクセプター基質）である LacCer はゴルジ体内腔で合成されることから、小胞体で GM3 合成が行われることは考え難い。そのため、M1-ST3GAL5 が小胞体に局在する生理学的意義は未だ明らかにされていない。ST3GAL5 のように異なる性質の複数のアイソフォームをもつガングリオシド合成酵素において、各アイソフォーム間の量的バランスや輸送のメカニズム、およびその生理学的意義を明らかにすることは、ガングリオシド合成の制御を理解する上で重要である。

本章では、R-based motif をもつ新規のアイソフォームがヒトとマウスの GM2 合成酵素 (B4GALNT1, GM2/GD2/GT2/GA2 synthase) に存在し、R-based motif が B4GALNT1 のゴルジ体繫留機構にも寄与しているという新知見を報告する。

B4GALNT1 は、複雑な糖鎖構造を持つコンプレックス型ガングリオシドの生合成に関わる最初の酵素である (Fig. 2B)。はじめに、NCBI データベースで EST clone の解析を行い、ヒトとマウスの *B4GALNACT1* 遺伝子 (*B4GALNT1* 遺伝子)における新規の mRNA バリエント (variant 2 とする)を見出した。variant 2 からは新規のアイソフォームである M1-B4GALNT1 が翻訳された。M1-B4GALNT1 は小胞体とゴルジ体の両方に局在し、M2-B4GALNT1 と比較して安定性が高いこと、M2-B4GALNT1 は M1-B4GALNT1 とヘテロダイマーを形成することで安定性が向上することを示した。さらに、M1-/M2-B4GALNT1 ヘテロダイマーは小胞体に局在しないことから、全体の安定化はゴルジ体から小胞体への逆輸送によるものではなく、ゴルジ体繫留の延長によることが示唆された[38]。

## 第2節 結果

### 第1項 新規 *B4GALNT1* mRNA バリエント (variant 2) の同定

複数のアイソフォームが細胞内に共発現することの生理学的重要性を明らかにするために、既知のアイソフォームと異なる長さの N 末端を細胞質領域にもつガングリオンド合成酵素の探索を行った。データベースを用いた探索の結果、*B4galnact1* において新規 mRNA を見出した。

ヒト *B4GALNT1* (*hB4GALNT1*) の mRNA は、TSSs (Ex1a, Ex1b, Ex1c) の違いで 3 種類のバリエント (variant 1a, 1b, 1c) に分類される。全てのバリエントで転写開始地点のエキソン中に開始コドンは存在せず、Ex2 の開始コドン (M2) から翻訳が開始され、hM2-B4GALNT1 のみが発現することが報告されている[54]。NCBI-BLAST プログラム (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて開始コドン M2 の上流配列を含む EST クローンを検索し、variant 1a, 1b, 1c と同一の配列をもつクローンを除いた結果、4 個の EST クローン (DC30908, DC341828, DC400781, DC302562) が得られた。これらの EST クローンは、全て Ex1a, 1b と 1c の間、若しくは Ex1c と Ex2 の間から開始され、Ex2 が 5' 上流側に延長した配列をもつ。この領域を Ex2' とし、Ex2' に TSSs をもつ新規 mRNA を variant 2 とした (Fig. 15A, Fig. 16)。Ex2' には、M2 の上流に新規の開始コドン (M1) が存在することから、新規 B4GALNT1 アイソフォーム (hM1-B4GALNT1) が variant 2 から翻訳されると予測出来る。

同様の解析により、マウス *B4GALNT1* (*mB4GALNT1*) においても *hB4GALNT1* mRNA variant 2 と類似した 25 個の EST クローンが得られた。*mB4GALNT1* の mRNA としては variant 1 が報告されており、Ex2 の開始コドン (M2) から翻訳が開始される mM2-B4GALNT1 のみが発現することが報告されている[55,56]。得られた EST クローンは、その多くが Ex1 と Ex2 の間から開始され、Ex2 が 5' 上流側に延長した配列をもつ。この領域を Ex2' とし、Ex2' に TSSs をもつ新規 mRNA を variant 2 とした (Fig. 15B, Fig. 17)。Ex2' には、M2 の上流に新規の開始コドン (M1) が存在することから、ヒトと同様にマウ



スにおいても新規 B4GALNT1 アイソフォーム (mM1-B4GALNT1) が variant 2 から翻訳されると予測出来る。

次に, variant 2 の発現量を調べるため, GM2 の合成量が比較的多いと報告されているヒトとマウスの脳, およびマウスの肝臓の totalRNA から合成した cDNA を鋳型とした RT-PCR を行った (Fig. 15C). プライマーは, variant 2 のみ, 若しくは全てのバリエーションを増幅する配列を用いた. その結果, *B4GALNT1* の全体の発現量に対する variant 2 の発現量の比率は, ヒトの脳で  $18.5 \pm 5\%$ , マウスの脳で  $9.4 \pm 2.7\%$ , マウスの肝臓で  $11.2 \pm 2.3\%$  であり, variant 2 はその発現レベルは低いながらも確かに検出された. さらに, GM2 が発現しているヒト組織, およびヒト由来細胞株 (ヒトの脳, 前立腺, 骨格筋, 293T 細胞, HAP1 細胞) の totalRNA から合成した cDNA を鋳型としたリアルタイム PCR を行った (Fig. 15D). その結果, 全発現量に対する variant 2 の比率は脳で  $13.5 \pm 0.44\%$  であり, RT-PCR の結果と類似していた. 脳以外の組織, 細胞株では *B4GALNT1* の発現量は低く, variant 2 の占める割合も低かった (前立腺:  $4.3 \pm 0.5\%$ , 骨格筋:  $3.2 \pm 0.4\%$ , 293T:  $1.0 \pm 0.2\%$ , HAP1:  $1.1 \pm 0.07\%$ ).

## 第2項 新規 *B4GALNT1* mRNA バリエント (variant 2) の転写開始地点の解析

*B4GALNT1* mRNA variant 2 の転写開始地点 (TSSs) を明らかにするために, ヒト, およびマウスの脳から抽出した totalRNA を用いて 5'-RACE 解析を行った. マウス脳を用いた解析から, variant 2 の 5'末端配列を含む多数のクローンが得られ, その配列が決定された (Fig. 17). ほぼ全てのクローンが Ex1 より上流から転写が開始され, TSSs から Ex2 までスプライシングは受けていなかった. ヒト脳を用いた解析では, variant 2 に特異的な Ex1c-Ex2 間と相同性の高い配列を含む *hB4GALNT1* 以外の複数の増幅産物が得られ, *hB4GALNT1* mRNA variant2 を含むクローンは得られなかった. プライマーの変更, 鋳型の変更 (293T 細胞, HAP1 細胞) を行った解析においても同様の結果となった.

## 第3項 新規 B4GALNT1 アイソフォーム (M1-B4GALNT1) のアミノ酸配列

ヒト, およびマウスの *B4GALNT1* mRNA variant 2 から翻訳される新規 B4GALNT1

アイソフォーム (hM1-B4GALNT1, mM1-B4GALNT1) の細胞質領域 N 末端側のアミノ酸配列を比較した (Fig. 18). M2-B4GALNT1 の細胞質領域 N 末端はヒト, マウス共に 6 aa であるのに対し, hM1-B4GALNT1 は 83 アミノ酸 (aa), mM1-B4GALNT1 は 42 アミノ酸 (aa) であった. さらに, その長い細胞質領域において, hM1-B4GALNT1 は M1 開始コドンから数えて 4, 6, 7 番目に, mM1-B4GALNT1 は 8, 11, 12, 13, 14 番目にアルギニンを持つことから, M1-ST3GAL5 と同様に R-based motif によるゴルジ体から小胞体への逆行輸送が行われることが示唆された.

#### 第 4 項 B4GALNT1 アイソフォームの産生機構の解析

次に, *B4GALNT1* mRNA variant 2 においてリーキースキャニングによって M1-, M2-B4GALNT1 の両アイソフォームが産生されるかどうか検討した. mRNA variant 2 の開始コドン M1 前後の配列は, ヒト, マウスでそれぞれ ACCGAG[AUG]T, GCCGAG[AUG]G である. 開始コドンの認識は [AUG] の 3 塩基前 (-3) の purine 塩基 (A または G) が最も重要であることから, mRNA variant 2 の開始コドン M1 は十分に認識される可能性が高い. まず, 各アイソフォームの分子量比較のため, リーキースキャニングの大部分を抑えるとされるコザック配列 (Kozak sequences : ks) 「GCCACC」 [53,35] を開始コドン前に付加したコンストラクト (ks-hM1-B4GALNT1-FLAG, ks-hM2-B4GALNT1-FLAG, ks-mM1-B4GALNT1-FLAG, ks-mM2-B4GALNT1-FLAG) を作製し, それぞれを CHO-K1 細胞に一過的に発現させた (Fig. 19A). 膜タンパク質画分を回収し, 糖鎖修飾による見かけの分子量の増加を解消するために PNGase F で糖鎖を切断後, 抗 FLAG 抗体でウエスタンブロッティングを行った (Fig. 19B, C). hM1-, hM2-, mM1-, mM2-B4GALNT1-FLAG タンパク質はそれぞれ 57.1, 49.6, 52.6, 51.0 kDa のシングルバンドとして検出された. 次に, 開始コドン前を mRNA variant 2 のオリジナル配列で作製したコンストラクト (hM1-B4GALNT1-FLAG\*, mM1-B4GALNT1-FLAG\*) を作製し, 前述と同様の解析を行った. その結果, hM1-B4GALNT1-FLAG\* タンパク質は ks-hM1-B4GALNT1-FLAG タンパク質と同様に 57.1 kDa のシングルバンドとして検出され, mM1-B4GALNT1-FLAG\* タンパク質も ks-mM1-B4GALNT1-FLAG タンパク質と同様に 52.6 kDa のシング

ルバンドとして検出された。以上のことから、ヒトおよびマウスの *B4GALNT1* mRNA variant 2 からは M1-B4GALNT1 のみが産生され、リーキースキャニングによる M2-B4GALNT1 産生は生じないことが示された。

#### 第5項 M1-B4GALNT1(N)-GFP キメラタンパク質の R-based motif による逆行輸送機構の解析

ヒトとマウスの M1-B4GALNT1 は、細胞質領域に RR, RXR 配列 (R-based motif) をもつ。R-based motif が逆行輸送シグナルとして機能するためには、膜貫通領域からの距離が必要である [57]。この距離はタンパク質の種類や R-based motif 中の R の数によって異なるが、マウス ST3GAL5 では膜貫通領域から約 30 アミノ酸程度であることがわかっている [35]。この R-based motif が逆行輸送シグナルとして機能するかどうかの詳細な検討を行うために、hM1-, hM2-, mM1-, mM2-B4GALNT1 の膜貫通領域 (TM) を含む N 末端に緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein : GFP) を付加したコンストラクト (hM1-, hM2-, mM1-, mM2-B4GALNT1(N)-GFP) を作製し、CHO-K1 細胞に一過性に発現させた (Fig. 20A)。発現確認のため、膜タンパク質画分を回収し、抗 GFP 抗体でウェスタンブロッティングを行った (Fig. 20B)。hM1-, hM2-, mM1-, mM2-B4GALNT1(N)-GFP タンパク質 (予想分子量 : 39.5, 31.5, 37.9, 33.6 kDa) は 40.0, 28.0, 38.0, 30.0 kDa のバンドで検出された。

次に、CHO-K1 細胞に発現させた各 GFP 融合タンパク質の細胞内局在を、抗 GFP 抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察した。R-based motif をもたない hM2- B4GALNT1(N)-GFP, および mM2-B4GALNT1(N)-GFP は、核周辺にドット状に観察されるゴルジ体に特徴的な局在が見られ、ゴルジ体のマーカータンパク質である GM130 と部分的に共局在を示した。それに対し、R-based motif をもつ hM1-B4GALNT1(N)-GFP, および mM1-B4GALNT1(N)-GFP は細胞質領域に網目状に観察される小胞体に特徴的な局在が見られ、抗小胞体繫留シグナル KDEL 抗体と共局在を示した (Fig. 21A, B, Fig. 22, Fig. 23, Fig. 24)。以上の結果は、ヒトとマウスの M1-B4GALNT1 の N 末に存在する R-based motif がゴルジ体から小胞体への逆行輸送シグナルとして機能することを示唆している。

逆行輸送に関わるアルギニン残基 (R) を同定するため、hM1-B4GALNT1(N)-GFP の R-based motif に変異を入れたコンストラクトを作製し、その細胞内局在を観察した。4, 6, 7 番目の R をそれぞれセリン (S) に置換した変異体 (hM1-B4GALNT1(N)-GFP-R4S, -R6S, -R7S) を発現させた場合、大部分がゴルジ体と小胞体の両方に局在した。6, 7 番目の R を同時に S に置換する (hM1-B4GALNT1(N)-GFP-R6S/R7S) と、ゴルジ体局在の比率が増加した。4, 6, 7 番目の全ての R を同時に S に置換する (hM1-B4GALNT1(N)-GFP-R4S/R6S/R7S) と、完全にゴルジ体に局在がシフトした (Fig. 21A, 24)。以上の結果から、<sup>4</sup>R<sup>6</sup>R<sup>7</sup>R は hM1-B4GALNT1(N)-GFP タンパク質の小胞体局在化に重要であり、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送シグナルとして機能することが示された。

次に、mM1-B4GALNT1(N)-GFP の 8, 11, 12, 13, 14 番目の R を S に置換した変異体 ( mM1-B4GALNT1(N)-GFP-R8S , -R11S , -R12S , -R13S , -R14S , -R11S/R12S/R13S/R14S) を発現させ、同様の解析を行った。mM1-B4GALNT1(N)-GFP-R8S は野生型と同様に小胞体局在を示したが、mM1-B4GALNT1(N)-GFP-R11S, -R12S, -R13S, -R14S はゴルジ体局在の比率が増加した。さらに、mM1-B4GALNT1(N)-GFP-R11S/R12S/R13S/R14S は完全にゴルジ体に局在した (Fig. 21B, 23)。以上の結果から、<sup>11</sup>R<sup>12</sup>R<sup>13</sup>R<sup>14</sup>R は mM1-B4GALNT1(N)-GFP タンパク質の小胞体局在化に重要であり、ヒトと同様にゴルジ体から小胞体への逆行輸送シグナルとして機能することが示された。

#### 第 6 項 全長 B4GALNT1 の R-based motif による逆行輸送機構の解析

M1-B4GALNT1(N)-GFP 融合タンパク質で逆行輸送シグナルとして機能していた R-based motif が全長 B4GALNT1 でも同様の機能を示すか確かめるために、hM1-B4GALNT1-FLAG, hM1-B4GALNT1-FLAG- R4S/R6S/R7S, および hM2-B4GALNT1-HA をレンチウイルスで CHO-K1 細胞に安定発現させた (Fig. 25A, Fig. 26)。それぞれの細胞内局在は抗 FLAG 抗体、もしくは抗 HA 抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察した。hM1-B4GALNT1-FLAG は部分的にゴルジ体 (GM130)、小胞体 (KDEL) マーカーと共局在を示した。R-based motif に変異を導入した hM1-B4GALNT1-FLAG- R4S/R6S/R7S が完全にゴルジ体に局在したことから、hM1-B4GALNT1-FLAG の部分的な小胞体への局

は逆行輸送によるものと考えられる。R-based motif をもたない hM2-B4GALNT1-HA は、ほぼ完全にゴルジ体に局在した。M1-ST3GAL5 は R-based motif による逆行輸送機構によってその大部分が小胞体に局在することから、hM1-B4GALNT1-FLAG の逆行輸送は M1-ST3GAL5 と比較すると効率が低いことが示唆される。

次に、mM1-B4GALNT1-FLAG, mM1-B4GALNT1-FLAG-R11S/R12S/R13S/R14S, および mM2-B4GALNT1-HA をレンチウイルスで CHO-K1 細胞に安定発現させた (Fig. 25B, Fig. 26)。それぞれの細胞内局在を抗 FLAG 抗体、もしくは抗 HA 抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察した。mM1-B4GALNT1-FLAG はゴルジ体と小胞体の両方に局在を示し、R-based motif に変異を導入した mM1-B4GALNT1-FLAG-R11S/R12S/R13S/R14S は完全にゴルジ体に局在した。R-based motif をもたない mM2-B4GALNT1-HA は、ほぼ完全にゴルジ体に局在した。これらの結果は、上記のヒトの場合と同様に、mM1-B4GALNT1-FLAG の部分的な小胞体への局在は、R-based motif が逆行輸送シグナルとして機能した結果であること、また効率は低いことを示唆している。

最後に、全長 B4GALNT1 のタグ (FLAG, HA) 付加による細胞内局在への影響の有無を確認した。タグ付加されていない mM1-B4GALNT1, および mM2-B4GALNT1 をレンチウイルスで CHO-K1 細胞に安定発現させ、それぞれの細胞内局在を抗 mB4GALNT1 抗体 (9535Ex\_ProteinA) を用いた間接蛍光抗体法で観察した (Fig. 27)。mM1-B4GALNT1 はゴルジ体と小胞体の両方に、mM2-B4GALNT1 はゴルジ体に局在し、それぞれ mM1-B4GALNT1-FLAG, mM2-B4GALNT1-HA と同様の局在パターンを示した。これらの結果から、全長 B4GALNT1 の細胞内局在はタグ付加による影響を受け無いことが示された。

#### 第7項 B4GALNT1 の *in vivo* における酵素活性の評価

hB4GALNT1 各アイソフォームの *in vivo* における酵素活性を調べるために、CHO-K1 細胞に hM1-B4GALNT1-FLAG および hM2-B4GALNT1-FLAG をレンチウイルスを用いて安定に発現させた。発現株作製に用いた CHO-K1 細胞は GM2 以降のガングリオシドは発現していないため、内在性の GM2 合成活性に影響を受けることはない。膜タンパク質画分を回収し、PNGase F で糖鎖を切断後、抗 FLAG 抗体でウェスタンブロッティングを

行った (Fig. 27A). hM1-, および hM2-B4GALNT1-FLAG はともにシングルバンドで検出され, ほぼ等しい発現量であることが確認された. 次に, これらの細胞から総脂質を抽出し, 脂質解析を行った. 総脂質を抽出後, 酸性脂質と中性脂質に分画し, これらの脂質を TLC で分離後, オルシノール硫酸試薬で呈色させた (Fig. 27B). CHO-K1 に hM1-B4GALNT1-FLAG, または hM2-B4GALNT1-FLAG を発現させた場合, 両者で酸性画分に GM3 より下流の  $\alpha$ -シリーズガングリオシドである GM2, GD1a が新たに合成され, 中性画分で LacCer, Gb4 の減少が確認された. hM1-, hM2-B4GALNT1-FLAG の脂質組成は種類, 発現量ともに類似しており, hM1-B4GALNT1-FLAG の *in vivo* における酵素活性は hM2-B4GALNT1-FLAG と差がないことが示された.

#### 第 8 項 M1/M2 ヘテロダイマー形成が B4GALNT1 の細胞内局在と酵素安定性に与える影響

ヒトとマウスの脳組織中の B4GALNT1 mRNA variant 2 の発現量解析の結果から, M1-B4GALNT1 はマイナーアイソフォームであるが, M1-B4GALNT1, および M2-B4GALNT1 の両アイソフォームは脳組織中で共発現していると予想される (Fig. 15C, D). また, M2-B4GALNT1 は  $^{80}\text{C}^{82}\text{C}$  のジスルフィド結合によりホモダイマーを形成する [58]ことが報告されており, M1/M1, M2/M2 ホモダイマー, M1/M2 ヘテロダイマーが形成されることが示唆される. M1-, M2-B4GALNT1 が細胞内で共発現することで生じるダイマー形成とその生理学的重要性を精査するため, hM1-B4GALNT1-FLAG と hM2-B4GALNT1-HA をレンチウイルスで CHO-K1 細胞に安定的に共発現させた.

還元剤によるジスルフィド結合の切断 (モノマー化) の影響を考慮し, 膜タンパク質画分を還元剤有/無 ( $\beta$ -Me(+)/ $\beta$ -Me(-)) で調整した. PNGase F で糖鎖を切断後, 抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体でウエスタンブロッティングを行った (Fig. 29A). hM1-B4GALNT1-FLAG (予想分子量: 68.2 kDa), hM2-B4GALNT1-HA (予想分子量: 60.2 kDa) を単独で CHO-K1 細胞に発現させた場合,  $\beta$ -Me(-) (還元剤無し) ではそれぞれ 150 kDa (M1/M1 ホモダイマー), 125 kDa (M2/M2 ホモダイマー) に検出された. hM1-B4GALNT1-FLAG と hM2-B4GALNT1-HA を共発現させると, 抗 FLAG 抗体, 抗 HA 抗体の両方でホモダ

イマーのバンドに加えて 130 kDa の位置に M1/M2 ヘテロダイマーが検出された。このことから、細胞に hM1-B4GALNT1-FLAG と hM2-B4GALNT1-HA が共発現する場合、両アイソフォームのホモダイマーとヘテロダイマーが形成されることが示唆された。単独発現と共発現におけるそれぞれのアイソフォーム（モノマー）の発現量を $\beta$ -Me(+)（還元剤有り）で比較すると、その発現量に差は見られなかった。また、共発現細胞において、ホモダイマーとヘテロダイマーの発現量に差が見られないことから、ダイマー形成効率においても差がないことが示された。

次に、hM1-B4GALNT1-FLAG と hM2-B4GALNT1-HA を共発現させた時の細胞内局在を抗 FLAG 抗体、もしくは抗 HA 抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察した (Fig. 29B, Fig. 30)。共発現細胞においても、hM1-B4GALNT1-FLAG はゴルジ体と小胞体の両方に局在し、hM2-B4GALNT1-HA はゴルジ体に局在した。これらは、それぞれを単独発現させた時の細胞内局在とほぼ同様の結果であった。以上の結果は、M1/M2 ヘテロダイマーは逆行輸送による小胞体への局在は生じないこと、M1/M1 ホモダイマーの部分的な小胞体への局在は M1/M2 ヘテロダイマーによる影響はないことを示唆している。

次に、M1/M2 ヘテロダイマーの形成が酵素安定性に与える影響を調べた。hM1-B4GALNT1-FLAG と hM2-B4GALNT1-HA をレンチウイルスで単独発現、共発現させた CHO-K1 細胞に、タンパク質合成阻害剤 (cycloheximide : CHX) を 5 時間処理した。CHX 処理後、膜タンパク質画分を回収し、PNGase F で糖鎖を切断後、抗 FLAG 抗体または抗 HA 抗体でウエスタンブロッティングを行った (Fig. 29C, D)。CHX 未処理 B4GALNT1 タンパク量を 100%とした際の CHX 処理後タンパク質量の比は、単独発現の場合 hM1-B4GALNT1-FLAG は  $58 \pm 12\%$ 、hM2-B4GALNT1-HA は  $30 \pm 11\%$  である。一方、共発現させた場合、hM1-B4GALNT1-FLAG は  $51 \pm 17\%$ 、hM2-B4GALNT1-HA は  $55 \pm 6\%$  であった。これらの結果は、hM2-B4GALNT1-HA の安定性が、hM1-B4GALNT1-FLAG と共発現することにより hM1-B4GALNT1-FLAG と同程度まで顕著に上昇することを示している。M1/M2 ヘテロダイマーは小胞体への逆行輸送が生じないことから、共発現時の hM2-B4GALNT1-HA における酵素安定性の向上はゴルジ体繫留の延長によるものと示唆され

る.



### 第3節 考察

本章では、ヒトおよびマウスの B4GALNT1 に焦点を当て、複数のアイソフォームが細胞内で共発現していることの生理学的意義の解明を目的とした解析を報告した。GM3 合成を行う ST3GAL5 は、細胞質領域の N 末端の長さが異なる 3 つのアイソフォーム (M1-, M2-, M3-ST3GAL5) をもつ [35]。ST3GAL5 の細胞質領域は、細胞内局在、酵素安定性、酵素活性の制御に関与しており、N 末端配列の差がそれぞれのアイソフォームの細胞内動態の差に反映されている。最も長い細胞質領域をもつ M1-ST3GAL5 は、逆行輸送シグナル R-based motif ( $^{11}\text{R}^{12}\text{R}^{17}\text{R}$  の 2 つの R :  $^{11}\text{R}^{12}\text{R}$ ,  $^{11}\text{R}[\text{X}]_4^{17}\text{R}$ ,  $^{12}\text{R}[\text{X}]_4^{17}\text{R}$ ) によって小胞体に安定して局在する。小胞体における M1-ST3GAL5 の生理的意義については、基質となる LacCer, CMP-シアル酸が存在しないことから GM3 合成を行うためとは考え難い。可溶性タンパク質である O-フコース転移酵素 1 (OFUT1) は、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送に関わる小胞体局在化シグナルである KDEL 配列をもち、小胞体に局在する。OFUT1 は、ゴルジ体におけるフコース転移酵素活性の他に、小胞体におけるシャペロン活性も有することが報告されている [59]。M1-ST3GAL5 においても、小胞体で GM3 合成以外の機構に関与する可能性が残るものの、その機能の存在は未だ不明である。一方、M1-ST3GAL5 を過剰発現させた実験系において GM3 合成が検出されることから、M1-ST3GAL5 の一部は小胞体への逆行輸送から免れゴルジ体で GM3 合成に寄与することも示唆される [35]。

NCBI データベースに登録された EST クローンを解析することで、ヒトとマウスの B4GALNT1 における新規の mRNA バリエント (variant 2) を見出した (Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17)。variant 2 からは既知のアイソフォーム M2-B4GALNT1 と比較して長い細胞質領域の N 末端をもつ M1-B4GALNT1 が翻訳される可能性が高い (Fig. 18)。ヒトとマウスの M2-B4GALNT1 の N 末端はどちらも 6 aa, hM1-B4GALNT1 は 81 aa, mM1-B4GALNT1 は 40 aa であり、hM1-と mM1-B4GALNT1 の N 末端のアミノ酸配列の相同性は低い。しかしながら、両者はどちらも M2-B4GALNT1 には無い R-based motif をもち、内腔側を GFP に置換した hM1-B4GALNT1(N)-GFP, および mM1-B4GALNT1(N)-

GFP は R-based motif による逆行輸送機能で小胞体に局在した。脂質二重膜からある程度の距離をもった R-based motif は、COP I 被覆小胞のサブユニットである $\beta$ -COP と $\delta$ -COP が形成する酸性ポケットに結合することで COP I 被覆小胞に積み込まれ、ゴルジ体から小胞体へ逆行輸送される [36]。hM1-B4GALNT1(N)-GFP では  $^4\text{RX}^6\text{R}^7\text{R}$  が、mM1-B4GALNT1(N)-GFP では  $^{11}\text{R}^{12}\text{R}^{13}\text{R}^{14}\text{R}$  が R-based motif として機能していた (Fig. 20, Fig. 21, Fig. 22, Fig. 23)。一方、全長 hM1-B4GALNT1 と mM1-B4GALNT1 においては、その多くがゴルジ体に局在することが示された。hM1-B4GALNT1-R4S/R6S/R7S, および mM1-B4GALNT1-R11S/R12S/R13S/R14S の局在はゴルジ体であることから、hM1-B4GALNT1, および mM1-B4GALNT1 の部分的な小胞体局在が R-based motif の逆行輸送によることは明らかである (Fig. 25, Fig. 26, Fig. 27)。

R-based motif が逆行輸送シグナルとして機能するためには、脂質二重膜との距離が必要であると示唆されている [57]。function distance は R-based motif から脂質二重膜までのアミノ酸残基の数で表され、mST3GAL5 の  $^{11}\text{R}^{12}\text{R}$ ,  $^{11}\text{R}[\text{X}]_4^{17}\text{R}$ ,  $^{12}\text{R}[\text{X}]_4^{17}\text{R}$  でそれぞれ 30 aa, 45 aa, 53 aa である [35]。これらのことから、全長 M1-B4GALNT1 で見られた R-based motif の機能低下の原因の 1 つは、細胞質側のアミノ酸配列によるもの、すなわち、脂質二重膜と R-based motif までの距離によるものであると推測された。mM1-B4GALNT1 の細胞質側のアミノ酸の中で、 $^8\text{R}$ ,  $^{11}\text{R}$ ,  $^{12}\text{R}$ ,  $^{13}\text{R}$ ,  $^{14}\text{R}$  が R-based motif として機能する function distance をもつと仮定して解析した結果、mM1-B4GALNT1(N)-GFP-R11S, -R12S, -R13S, -R14S の変異体が主にゴルジ体に局在した (Fig. 21B)。mM1-B4GALNT1(N)-GFP-R8S の局在は小胞体から変化が無く、 $^8\text{R}$  は逆行輸送には関与しないことが示された (Fig. 21B)。 $^{11}\text{R}^{12}\text{R}^{13}\text{R}^{14}\text{R}$  と脂質二重膜の距離は 28 aa であり、この R-based motif が mM1-B4GALNT1(N)-GFP の逆行輸送シグナルとして機能するためには、RRR, RXR, RR ではなく RRRR が必要であることを示している。hM1-B4GALNT1 も  $^{11}\text{R}^{12}\text{R}^{13}\text{R}^{14}\text{R}$  と相同な位置に  $^{51}\text{R}$ ,  $^{53}\text{R}$  をもち、脂質二重膜との距離は 32, 30 aa である (Fig. 18)。mM1-B4GALNT1(N)-GFP の function distance を考慮すると、 $^{51}\text{RX}^{53}\text{R}$  が逆行輸送シグナルとして機能するには距離が不足しているため、シグナル配列に関わらな

いと予測出来る。hM1-B4GALNT1 は、脂質二重膜との距離が 75 aa である  $^4\text{RX}^6\text{R}^7\text{R}$  をもつ。hM1-B4GALNT1(N)-GFP-R4S, -R6S, -R7S の変異体はゴルジ体と小胞体の両方に局在することから、RR, RXR, R(X)<sub>2</sub>R がある程度逆行輸送シグナルとして機能していることを示している (Fig. 21A)。また、hM1-B4GALNT1(N)-GFP-R6S/R7S 変異体においてもゴルジ体と小胞体の両方に局在するが、これまでに単独の R のみが逆行輸送シグナルとして機能する報告はない。したがって、8 番目の K, 12 番目の R も逆行輸送シグナルとして関わる可能性があり、今後の検討が必要である。以上の結果は、R-based motif と脂質二重膜の距離が逆行輸送に関与しているという仮定を支持し、細胞質側のアミノ酸配列が逆行輸送効率を決定する一因であることを示している。

R-based motif の機能低下のもう 1 つの原因として、内腔側分子量の増加による COP I 被覆小胞への積み込み阻害が挙げられる。COP I 被覆小胞は B-subcomplex ( $\alpha$ - $\beta'$ - $\epsilon$ -COP) と F-subcomplex ( $\gamma$ - $\zeta$ - $\beta$ - $\delta$ -COP) タンパク質複合体から形成され、低分子量 GTPase (Arf ファミリー) の制御を受けて積荷を選択的に濃縮し輸送する[60]。R-based motif が結合する F-subcomplex は、B-subcomplex と相互作用していることから、B-subcomplex と結合する別の逆行輸送シグナル K(X)KXX motif をもつ積荷タンパク質と内腔側で非常に近接した配置をもつと予想される[61-63]。これらのことから、COP I 被覆小胞への積み込みには同梱される積荷タンパク質と立体障害を起こす内腔側分子量があり、それにより M1-B4GALNT1 の積み込み阻害が生じていると仮定し、検討を行った。

mM1-ST3GAL5(N)-GFP, mM1-B4GALNT1(N)-GFP, mM1-ST3GAL5, mM1-B4GALNT1 の内腔側分子量は、順に 26.8, 26.8, 37.1, 56.5 kDa である。mM1-B4GALNT1 はダイマーを形成するため、見かけの分子量は M1/M2-, M2/M2-B4GALNT1 とともに 113 kDa である。さらに、内腔側 GFP をタンデムに接続した mM1-B4GALNT1(N)-2GFP (内腔側分子量 53.6 kDa) を作製し、細胞内局在を調べた。予想通り、mM1-B4GALNT1(N)-GFP は完全に小胞体に局在したのに対し、mM1-B4GALNT1(N)-2GFP は一部が逆行輸送されずにゴルジ体に局在していた。これらは、内腔側分子量の増加が逆行輸送効率を低下させているという仮定を支持している (Fig. 31)。以上のことから、COP I 被覆小胞への

積み込みは、内腔側分子量による制御を受けることが示唆された。

mM1-ST3GAL5 は逆行輸送により小胞体に局在するが、逆行輸送を免れた一部はゴルジ体での GM3 合成に参加する。しかしながら、*in vitro* の酵素活性は mM3-ST3GAL5 と比較してやや低いことが示されている [35]。

hM1-B4GALNT1 は部分的に小胞体に局在するが、*in vivo* における酵素活性は hM2-B4GALNT1 の酵素活性と同一であった (Fig. 25, Fig. 28B)。*in vivo* 酵素活性に用いた細胞は、レンチウイルス発現系を用いて CHO-K1 細胞に安定発現させており、内在性タンパク質発現と比較して過剰なタンパク質発現をもたらす。この実験系において、ゴルジ体における hM1-B4GALNT1 発現量が飽和状態にあると仮定すると、hM1-B4GALNT1 および hM2-B4GALNT1 間の細胞内局在の差は酵素活性の差に反映されていない可能性がある。実際に、内在性糖転移酵素の発現は微量であり、マウスの脳、および肝臓を用いて内在性 B4GALNT1 の検出を試みたが、検出限界以下であった (Fig. 32)。*in vitro* の系による酵素活性の測定は今後の課題である。

B4GALNT1 の各アイソフォームの細胞内安定性を調べたところ、hM1-B4GALNT1 は hM2-B4GALNT1 と比較して安定性が増加していた (Fig. 29C, D)。また、hM1-B4GALNT1-R4S/R6S/R7S 変異体は hM2-B4GALNT1 と同程度の安定性を示すことから、hM1-B4GALNT1 の安定性は R-based motif による部分的な小胞体への局在が寄与していることが示唆された。対照的に、hM2-B4GALNT1 と hM1-B4GALNT1 を共発現させた細胞において、hM1/M2-B4GALNT1 は小胞体に局在しないにも関わらず、hM2-B4GALNT1 の安定性が増加していた (Fig. 29B, C, D)。

以上のことから、hM1-/M2-B4GALNT1 ヘテロダイマーは、hM1-B4GALNT1 の R-based motif による小胞体への逆行輸送は行われませんが、hM2-B4GN1 ホモダイマーよりも安定であることが示唆された (Fig. 33)。第 3 章で述べるが、ゴルジ体に安定して局在する mM3-ST3GAL5 は、ゴルジ体の槽間の逆行輸送によりゴルジ体に繫留されており、細胞質領域に存在する R/K-based motif がゴルジ体繫留に関与することが示唆されている [40]。hM1-B4GALNT1 の R-based motif (<sup>4</sup>RX<sup>6</sup>R<sup>7</sup>R 配列) は、ゴルジ体間の逆行輸送を促進する、ま

たはゴルジ体からのヘテロダイマーの輸送を抑制するなど、B4GALNT1 全体のゴルジ体  
繫留の延長に関与するのかもしれない。

M1-B4GALNT1 は mRNA variant 2 からのみ産生されるため、mRNA variant 2 の発現  
レベルがヒトおよびマウス脳組織において全 *B4GALNT1* mRNA 発現量の 10~20% であ  
る (Fig. 15) ことを考慮すると、生体内における M1-B4GALNT1 の発現レベルは M2-  
B4GALNT1 よりも低い。そのため、細胞では大部分が M2-B4GALNT1 のホモダイマーで  
あり、そのごく一部が M1-/M2-B4GALNT1 のヘテロダイマーを形成していると予想され  
る。このわずかなヘテロダイマー形成による B4GALNT1 の安定化が脳組織などにおける  
ガングリオシド合成にどのような影響を与えているのか、今後明らかにしていく必要があ  
る。

#### 第4節 材料と方法

##### 実験試薬・実験材料

Lipofectamine 2000 Regent : Invitrogen

Ham's F-12 : Wako

poly-L-lysine : SIGMA

DMEM (4.5g/l Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid : Nacalai Tesque

IMDM with L-Gln and HEPES, liquid: Nacalai Tesque

Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (HAM/D-MEM) :  
SIGMA

Penicillin-streptomycin mixed Solution Stabilized : Nacalai Tesque

Fetal Bovine Serum (FBS) : Biosera

CELLBANKER 1 : 日本全薬工業

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover : Toyobo

First-Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR : Roche Diagnostics

Sepasol-RNA I Super G : Nacalai Tesque

Forskolin : SIGMA

cOmplete, EDTA-free protease inhibitor cocktail : Roche Diagnostics

Peptide: N-glycosidase F (PNGase F) : New England Biolabs

Pierce BCA protein assay kit : Thermo Fisher Scientific

Prestained XL-Ladder : APRO

PVDF 膜 : MILLIPORE

Amersham™ ECL Western Blotting detection Reagents : GE Healthcare

Amersham™ ECL Select Western Blotting detection Reagents : GE Healthcare

X線フィルム RX-U : FUJIFILM

DEAE Sephadex A-25 : GE Healthcare

Sep-Pak Plus C18 : Waters

Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 : TOYOBO

Image it Fx signal enhancer : Invitrogen

Protein A : Thermo Fisher Scientific

Protein A/G plus-agarose : Santa Cruz Biotechnology

SMARTer RACE 5'/3' Kit : Takara Bio

MagExtractor-PCR&Gel Clean up kit : TOYOBO

cycloheximide : SIGMA

ProLong Gold antifade reagent : Thermo Fisher

KOD FX Neo : TOYOBO

2×TaqMan Universal Master Mix II : Applied Biosystems

pGEM-T Easy Vector : Promega

pENTR/D-TOPO vector : Life Technologies

CSII-CMV-RfA : Life Technologies

Gateway LR Clonase enzyme mix II : Invitrogen

TLC Silica gel 60 : Merck

PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit : TAKARA

pEGFP-N1 : Addgene

In-Fusion HD Cloning Kit : TAKARA

## 抗体

・ウエスタンブロッティング用一次抗体

抗 B4GALNT1 抗体 (9535\_Ex\_ProteinA) : GM2S 内腔側(504 残基)を抗原として作製した

Rabbit ポリクローナル抗体. ProteinA で精製した.

抗 B4GALNT1 抗体 (ab135902) : Abcam

抗 calnexin (H-70)抗体 : Santa Cruz Biotechnology

抗 $\beta$ -actin 抗体 : SIGMA

抗 FLAG 抗体 : Agilent Technologies

抗 HA 抗体 : InvivoGen

抗 GFP 抗体 (IgY fraction) : Aves Labs

・ウエスタンブロッティング用二次抗体

抗 mouse IgG HRP 抗体 : GE Healthcare

抗 chicken IgY HRP 抗体 : Aves Labs

Rabbit IgG TrueBlot : eBioscience,

・間接蛍光抗体法用一次抗体

anti-FLAG (monoclonal antibody: Agilent; polyclonal antibody: Sigma)

抗 B4GALNT1 抗体 (9535\_Ex\_ProteinA) : GM2S 内腔側(504 残基)を抗原として作製した

Rabbit ポリクローナル抗体. ProteinA で精製した.

抗 KDEL 抗体 : StressGen Bioreagents

抗 GM130 抗体 : BD Bioscience

・間接蛍光抗体法用二次抗体

抗 mouse IgG Alexa 594 抗体(Alexa Fluor 594) : Invitrogen

抗 rabbit IgG Alexa 488 抗体(Alexa Fluor 488) : Invitrogen

緩衝液

・ buffer A : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 4 M urea, 1x cOmplete protease inhibitor mixture

・ 2x SDS sample buffer : 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, trace amount of bromophenol blue



- SDS-PAGE running buffer : 25 mM Tris(pH 8.9)、192 mM glycine、0.1% SDS
- transfer buffer : 25 mM Tris、192 mM glycine、20% methanol
- blocking buffer : 0.5% スキムミルク/TBS-T
- TBS-T : 137 mM NaCl、20 mM Tris(pH 7.5)、0.05% Tween20
- PBS : 137 mM NaCl、2.68 mM KCl、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Saline : 0.9%NaCl
- immunoprecipitation (IP) buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM NaF, 1 mM EDTA, 1% TritonX-100, and 1x Complete
- washing buffer : 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, and 0.05% Tween 20

#### 実験動物

BALB/cCrSlc マウス (*B4GALNT1*<sup>+/+</sup>) は Japan SLC より購入した。 *B4GALNT1* ノックアウトマウス (*B4GALNT1*<sup>-/-</sup>) は BALB/cCrSlc をバックグラウンドにもつ系統を用いた。飼育条件は第 1 章第 4 節の「実験動物」と同様である。

#### Plasmids

本章で使用したプラスミド一覧

Plasmid name	Inserted ORF	Vector
pFS 444	hM1-B4GALNT1-FLAG	pcDNA3-FLAG4
pFS 471	hM1-B4GALNT1-FLAG*	pcDNA3-FLAG4
pFS 452	hM2-B4GALNT1-FLAG	pcDNA3-FLAG4
pKM 6	mM1-B4GALNT1-FLAG	pcDNA3-FLAG4
pKM 15	mM1-B4GALNT1-FLAG*	pcDNA3-FLAG4
pKM 5	mM2-B4GALNT1-FLAG	pcDNA3-FLAG4
pKM 22	mM1-B4GALNT1	pcDNA3.1zeo(+)
pKM 23	mM2-B4GALNT1	pcDNA3.1zeo(+)
pFS 446	hM1-B4GALNT1(N)-GFP	pEGFP-N1
pFS 468	hM1-B4GALNT1(N)-GFP R4S	pEGFP-N1
pFS 469	hM1-B4GALNT1(N)-GFP R6S	pEGFP-N1
pFS 470	hM1-B4GALNT1(N)-GFP R7S	pEGFP-N1

pFS 460	hM1-B4GALNT1(N)-GFP R6/7S	pEGFP-N1
pFS 611	hM1-B4GALNT1(N)-GFP R4/6/7S	pEGFP-N1
pFS 453	hM2-B4GALNT1(N)-GFP	pEGFP-N1
pFS 222	mM1-B4GALNT1(N)-GFP	pEGFP-N1
pFS 398	mM1-B4GALNT1(N)-GFP R8S	pEGFP-N1
pFS 262	mM1-B4GALNT1(N)-GFP R11S	pEGFP-N1
pFS 424	mM1-B4GALNT1(N)-GFP R12S	pEGFP-N1
pFS 425	mM1-B4GALNT1(N)-GFP R13S	pEGFP-N1
pFS 426	mM1-B4GALNT1(N)-GFP R14S	pEGFP-N1
pFS 265	mM1-B4GALNT1(N)-GFP R11/12/13/14S	pEGFP-N1
pKM 9	mM2-B4GALNT1(N)-GFP	pEGFP-N1
pKM 82	mM1-B4GALNT1(N)-2GFP	pEGFP-N1
pFS 473	hM1-B4GALNT1-FLAG	CSII-CMV-RfA
pFS 527	hM1-B4GALNT1-FLAG R4/6/7S	CSII-CMV-RfA
pFS 493	hM2-B4GALNT1-FLAG	CSII-CMV-RfA
pFS 563	hM2-B4GALNT1-HA	CSII-CMV-RfA
pFS 571	mM1-B4GALNT1-FLAG	CSII-CMV-RfA
pFS 577	mM1-B4GALNT1-FLAG R11/12/13/14S	CSII-CMV-RfA
pFS 573	mM2-B4GALNT1-HA	CSII-CMV-RfA

上記一覧のプラスミドの作製手順を以下に示す。クローニング操作はそれぞれ標準的なプロトコルに準じて行った。

・ pGEM-T Easy vector へのクローニング

組織由来の cDNA を鋳型とし，PCR で目的配列を増幅した．増幅産物は A 付加を行い，アガロースゲル電気泳動で分離・精製後，pGEM-T Easy vector に T/A cloning で組込んだ．得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した．

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 432	ヒト脳 cDNA	hM1- B4GALNT1	5'- ATGCAGGAGAGGGCGAGAAGAAAG -3' 5'- TCACTGGGAGGTCATGCACTGCAG -3'
pKM 2	マウス脳 cDNA	mM1- B4GALNT1	5'- ATGGCTGGCCTTGGGTACCTGCGCGAGCCCTC GG -3' 5'- TACAGTGCATGACCGCCGAGTGA -3'
pKM 1	マウス脳 cDNA	mM2- B4GALNT1	5'- ATGCGGCTAGACCGCCGGGCCCTC -3' 5'- TACAGTGCATGACCGCCGAGTGA -3'

・ pGEM-T Easy vector へのクローニング (pcDNA3 vector への組み込み用)

pKM2 (mM1-B4GALNT1)，pKM1 (mM2-B4GALNT1) を鋳型とし，kozak 配列を付加するプライマーを用いて PCR で増幅を行い，上述の方法で pGEM-T Easy vector に組み込み，pKM4，pKM3 とした．また，pKM2 (mM1-B4GALNT1) を鋳型とし，開始コドン M1 直前の GCGGAG 配列を付加するプライマーを用いて同様にを行い，pKM11 とした．

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pKM 4	pKM 2	mM1-B4GALNT1	5'- GGATCCGCCACCATGGCTGGCCTTGGGTACC TG -3' 5'- TGGATCCTCGGCGGTCATGCACTGTAGCC -3'
pKM 11	pKM 2	mM1-B4GALNT1	5'- GGATCCGCGGAGATGGCTGGCCTTGGGTACC TG -3' 5'- TGGATCCTCGGCGGTCATGCACTGTAGCC -3'
pKM 3	pKM 1	mM2-B4GALNT1	5'- GGATCCGCCACCATGCGGCTAGACCGCCGGG CCCTC -3' 5'- TGGATCCTCGGCGGTCATGCACTGTAGCC -3'

・ pGEM-T Easy vector へのクローニング (pEGFP-N1 vector への組み込み用)

pKM6 (mM1-B4GALNT1-FLAG), pKM5 (mM2-B4GALNT1-FLAG) を鋳型とし, 内腔側配列を含まない配列を増幅するプライマーを用いて PCR を行い, 上述の方法で pGEM-T Easy vector に組み込み, pKM8, pKM7 とした.

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pKM 8	pKM 6	mM1-B4GALNT1(N)	5'- GACTTTCATTGACGTCAATGGG -3' 5'- CCCGGGCAAGGTCTAGCAGATCGAGTCTCG -3'
pKM 7	pKM 5	mM2-B4GALNT1(N)	5'- GACTTTCATTGACGTCAATGGG -3' 5'- CCCGGGCAAGGTCTAGCAGATCGAGTCTCG -3'

pKM6 (mM1-B4GALNT1-FLAG) を鋳型とし, 2 段階 PCR 法で R-based motif に変異を導入した. まず, primary PCR として primer-F1/R1, primerF2/R2 でそれぞれ増幅した. 精製した PCR 産物を混合して鋳型とし, primerF1/R2 で secondary PCR を行った. 上述の方法で pGEM-T Easy vector に組込んだ.

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 235	pKM 6	mM1-B4GALNT1(N)-R11S	F1 : 5'- GACTTTCATTGACGTCAATGGG -3' R1 : 5'- CCCGCCGCTCGAAGGCTCGCGC -3' F2 : 5' GCGGAGCCTTCGAGGCGGCGGG 3' R2 : 5' CCCGGGCAAGGTCTAGCAGATCGAGTCTCG 3'
pFS 236	pFS 235	mM1-B4GALNT1(N)-R11/12S	F1 : 5'- GACTTTCATTGACGTCAATGGG -3' R1 : 5'- GACCCCGCCGGCTCGAAGGCTCGC -3' F2 : 5' GCGAGCCTTCGAGCCGGCGGGGTC 3' R2 : 5' CCCGGGCAAGGTCTAGCAGATCGAGTCTCG 3'
pFS 237	pFS 236	mM1-B4GALNT1(N)-R11/12/13S	F1 : 5'- GACTTTCATTGACGTCAATGGG -3' R1 : 5'- CTGGACCCGACTGCTCGAAGGC -3' F2 : 5' GCCTTCGAGCAGTCGGGGTCCAG 3' R2 : 5' CCCGGGCAAGGTCTAGCAGATCGAGTCTCG 3'
pFS238	pFS 237	mM1-B4GALNT1(N)-R11/12/13/14S	F1 : 5'- GACTTTCATTGACGTCAATGGG -3' R1 : 5'- CTCTGGACCCGAAGTCTCGAAGG -3' F2 : 5' CCTTCGAGCAGTTCGGGTCCAGAG 3' R2 : 5' CCCGGGCAAGGTCTAGCAGATCGAGTCTCG 3'

・ pGEM-T Easy vector へのクローニング (Real-time PCR 検量線用)

ヒト脳組織由来の cDNA を鋳型とし, 18S rRNA 配列, および 5'-UTR を含む mM1-B4GALNT1 配列を PCR で増幅した. 増幅産物は上述の方法で pGEM-T Easy vector に組

込んだ。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 635	ヒト脳 cDNA	5'-UTR-hM1- B4GALNT1	5'- GCTTGCCGAGGCCACTCATCG -3' 5'- CCCGGGTGCTCGCGTACAGG -3'
pFS 636	ヒト脳 cDNA	18S rRNA	5'- TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG -3' 5'- TAATGATCCTTCCGCAGGTTCCACC -3'

・ pcDNA3 vector へのクローニング

hM1-B4GALNT1-FLAG は、pFS432 を鋳型として増幅した PCR 産物を pcDNA3

FLAG4 vector の HindIII-BamHI サイトへ In-Fusion 反応で組み込み作製した。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 444	pFS 432	hM1- B4GALNT1 -FLAG	5'- AGGGAGACCCAAGCTTCACCATGCAGGAGAGGGCGAG AA -3' 5'- CTTGTAATCGGGATCCTGGGAGGTCATGCACTGCAG -3'

hM1-B4GALNT1-FLAG\*は、pFS444 を鋳型とし、PCR で開始コドン M1 直前に  
ACCGAG を挿入し作製した。

hM2-B4GALNT1-FLAG は、pFS444 を鋳型とし、PCR で欠失変異を導入し作製した。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 471	pFS 444	hM1- B4GALNT1 -FLAG*	5'- CACCACCGAGATGCAGGAGAGGGCGAGA -3' 5'- TGCATCTCGGTGGTGAAGCTTGGGTCTCC -3'
pFS 452	pFS 444	hM2- B4GALNT1 -FLAG	5'- CTTACCATGTGGCTGGGCCGCCGG -3' 5'- AGCCACATGGTGAAGCTTGGGTCTCC -3'

hM2-B4GALNT1-HA は、pFS452 を制限酵素 HindIII, BamHI で処理して得られた

hM2-B4GALNT1-HA フラグメントを、同様に HindIII, BamHI で処理した pcDNA3

HA4 vector に組み込み作製した。

Plasmid	鋳型	ORF
pFS 555	pFS 452	hM2-B4GALNT1-HA

mM1-B4GALNT1-FLAG, mM1-B4GALNT1-FLAG\*, mM2-B4GALNT1-FLAG は、

pKM4, pKM11, pKM3 をそれぞれ制限酵素 BamHI で処理し、得られた各フラグメン

トを、同様に BamHI で処理した pcDNA3 FLAG4 vector に組み込み作製した。mM2-

B4GALNT1-HA は、pKM5 を制限酵素 HindIII, BamHI で処理して得られたフラグメントを、同様に HindIII, BamHI で処理した pcDNA3 HA4 vector に組み込み作製した。

Plasmid	鋳型	ORF
pKM 6	pKM 4	mM1-B4GALNT1-FLAG
pKM 15	pKM 11	mM1-B4GALNT1-FLAG*
pKM 5	pKM 3	mM2-B4GALNT1-FLAG
pFS 555	pKM 5	mM2-B4GALNT1-HA

・ pEGFP-N1 vector へのクローニング

hM1-B4GALNT1(N)-GFP は、pFS432 を鋳型として増幅した PCR 産物を pEGFP-N1 vector の HindIII-BamHI サイトへ In-Fusion 反応で組み込み作製した。得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 446	pFS 432	hM1-B4GALNT1(N)-GFP	5'- CACCATGGCTGGCCTTGGGTACCT -3' 5'- GGATCCTCACTCGGCGGTCATGCACTG -3'

変異体は PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いて作製した。hM1-B4GALNT1(N)-GFP 変異体は、pFS446 を鋳型とし、PCR で点変異を加え作製した。hM2-B4GALNT1(N)-GFP は、pFS446 を鋳型とし、PCR で欠失変異を加え作製した。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 468	pFS 446	hM1-B4GALNT1(N)-GFP-R4S	5'- CAGGAGAGCGCGAGAAGAAAGGAGGCC -3' 5'- TCTCGCGCTCTCCTGCATGGTGAAGCT -3'
pFS 469	pFS 446	hM1-B4GALNT1(N)-GFP-R6S	5'- TCCTTTCTGCTCGCCCTCTCCTGCATGG -3' 5'- AGGGCGAGCAGAAAGGAGGCCGGGAGA -3'
pFS 470	pFS 446	hM1-B4GALNT1(N)-GFP-R7S	5'- GCCGAGATCCAAGGAGGCCGGGAGACCC -3' 5'- CTCCTTGGATCTCGCCCTCTCCTGCAT -3'
pFS 460	pFS 446	hM1-B4GALNT1(N)-GFP-R6/7S	5'- GCGAGCTCCAAGGAGGCCGGGAGACCC -3' 5'- CTCCTTGGAGCTCGCCCTCTCCTGCATGGT -3'

pFS 611	pFS 446	hM1- B4GALNT1(N)- GFP-R4/6/7S	5'- AGGAGAGCGCGAGCTCCAAGGAGGCC -3' 5'- AGCTCGCGCTCTCCTGCATGGTGAAG -3'
pFS 453	pFS 446	hM2- B4GALNT1(N)- GFP	5'- CTTACCCATGTGGCTGGGCCCGCCGG -3' 5'- AGCCACATGGTGAAGCTTGAGCTCGA -3'

mM1-B4GALNT1(N)-GFP, mM2-B4GALNT1(N)-GFP, mM1-B4GALNT1(N)-GFP-R11S, mM1-B4GALNT1(N)-GFP-R11/12/13/14S は、それぞれ pKM8, pKM7, pFS235, pFS238 を制限酵素 EcoRI, SmaI で処理して得られた mM1-B4GALNT1(N) フラグメントを、同様に EcoRI, SmaI で処理した pEGFP-N1 vector に組み込み作製した。

Plasmid	鋳型	ORF
pFS 222	pKM 8	mM1-B4GALNT1(N)-GFP
pKM 9	pKM 7	mM2-B4GALNT1(N)-GFP
pFS 262	pFS 235	mM1-B4GALNT1(N)-GFP-R11S
pFS 265	pFS 238	mM1-B4GALNT1(N)-GFP-R11/12/13/14S

その他の mM1-B4GALNT1(N)-GFP 変異導入プラスミドは、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いて作製した。ターゲット領域を導入したプラスミドを鋳型とし、PCR で点変異を導入した。得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 398	pFS 222	mM1- B4GALNT1(N)- GFP-R8S	5'- TACCTGAGTGAGCCTCGGAGGCGGCCGG -3' 5'- AGGCTCACTCAGGTACCCAAGGCCAGCCA -3'
pFS 424	pFS 222	mM1- B4GALNT1(N)- GFP-R12S	5'- TCGGAGTAGACGGGGTCCAGAGTCCCGG -3' 5'- CCCCCTCTACTCCGAGGCTCGCGCAGG -3'
pFS 425	pFS 222	mM1- B4GALNT1(N)- GFP-R13S	5'- CGGAGGAGTCGGGGTCCAGAGTCCCGG -3' 5'- ACCCCGACTCCTCCGAGGCTCGCGCAG -3'
pFS 426	pFS 222	mM1- B4GALNT1(N)- GFP-R14S	5'- AGGCGGTCGGGTCCAGAGTCCCGGCC -3' 5'- TGGACCCGACCGCCTCCGAGGCTCGCG -3'

・ pEGFPx2-N1 vector へのクローニング

pEGFP-N1 vector を鋳型とし、PCR で増幅した EGFP フラグメントに A 付加を行い、アガロースゲル電気泳動で分離・精製後、pGEM-T Easy vector に T/A cloning で組込んで作製した。得られたクローンは DNA シーケンサ (Applied Biosystems 3130, Thermo Fisher Scientific) と ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認し、pKM73 (EGFP/pGEM-T Easy vector) とした。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pKM 73	pEGFP-N1 vector	EGFP	5'- ATTCTGCAGTCGACGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG AG -3' 5'- GGCGACCGGTGGATCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA -3'

pKM73 を制限酵素 KpnI, BamHI で処理して得られた EGFP フラグメントを、同様に KpnI, BamHI で処理した pEGFP-N1 vector に組み込み pEGFPx2-N1 vector とした。mM1-B4GALNT1(N)-2GFP は、pKM6 を鋳型として増幅した PCR 産物を pEGFPx2-N1 vector の EcoRI-KpnI サイトへ In-Fusion 反応で組み込み作製した。得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pKM 82	pKM 6	mM1-B4GALNT1(N)-2GFP	5'- CTCAAGCTTCGAATTCGCAATAGGGACTTTCCA TTGACG -3' 5'- CCCTTGCTCACCATGGTACCGGCAAGGTCTAGCAG ATCGAGTC -3'

・ pENTR-D TOPO vector へのクローニング

pGEM-T easy vector, または pcDNA3 vector にクローニングしたプラスミドを鋳型とし、PCR で目的配列を増幅した。アガロースゲル電気泳動で分離・精製後、pENTR-D TOPO vector に topo cloning で組込んだ。得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pKM 88	pKM 2	mM1-B4GALNT1	5'- CACCATGGCTGGCCTTGGGTACCT -3' 5'- GGATCCTCACTCGGCGGTTCATGCACTG -3'
pKM 89	pKM 1	mM2-B4GALNT1	5'- CACCATGCGGCTAGACCGCC -3' 5'- GGATCCTCACTCGGCGGTTCATGCACTG -3'



pFS 466	pFS 444	hM1-B4GALNT1 -FLAG	5'- CACCATGCAGGAGAGGGCGA -3' 5'- TCAGATCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC -3'
pFS 492	pFS 452	hM2-B4GALNT1 -FLAG	5'- CACCATGTGGCTGGGCCCGGGC -3' 5'- TCAGATCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC -3'
pFS 558	pFS 555	hM2-B4GALNT1 -HA	5'- CACCATGTGGCTGGGCCGCC -3' 5'- TCAAGCGTAATCTGGGACGTCGTATG -3'
pFS 567	pKM 6	mM1- B4GALNT1 -FLAG	5'- CACCATGGCTGGCCTTGGGTACCTGC -3' 5'- TCAGATCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC -3'
pFS 569	pFS 557	mM2- B4GALNT1 -HA	5'- CACCATGCGGCTAGACCGCC -3' 5'- TCAAGCGTAATCTGGGACGTCGTATG -3'

変異導入プラスミドの作成は、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いた。ターゲット領域を導入したプラスミドを鋳型とし、PCR で点変異を導入した。得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 526	pFS 466	hM1-B4GALNT1 -FLAG-R4/6/7S	5'- AGGAGAGCGCGAGCTCCAAGGAGGCC -3' 5'- AGCTCGCGCTCTCCTGCATGGTGAAG -3'
pFS 575	pFS 567	mM1- B4GALNT1 -FLAG-R11/12/ 13/14S	5'- CTTGAGTAGCTCGGGTCCAGAGTCCCGGCC -3' 5'- CCGAGCTACTCGAAGGCTCGCGCAGGTACCC -3'

#### ・ CSII-CMV-RfA vector へのクローニング

pENTR-D TOPO vector にクローニングしたプラスミドと CSII-CMV-RfA vector を混合し、LR clonase enzyme mix II を添加して LR 反応による組換えを行った。得られたクローンは制限酵素処理を行い、アガロースゲル電気泳動でバンドサイズを確認した。

ORF	pENTR-D TOPO	CSII-CMV-RfA
mM1-B4GALNT1	pKM 88	pKM 90
mM2-B4GALNT1	pKM 89	pKM 91
hM1-B4GALNT1-FLAG	pFS 466	pFS 473
hM1-B4GALNT1-FLAG-R4/6/7S	pFS 526	pFS 527
hM2-B4GALNT1-FLAG	pFS 492	pFS 493
hM2-B4GALNT1-HA	pFS 558	pFS 563
mM1-B4GALNT1-FLAG	pFS 567	pFS 571

mM1-B4GALNT1-FLAG-R11/12/13/14S	pFS 575	pFS 577
mM2-B4GALNT1-HA	pFS 569	pFS 573

#### Semi-quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR)

ヒト脳, マウス組織 (脳, 肝臓) の total RNA は全て TAKARA より購入した. 逆転写反応は First-Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (AMV; Roche Diagnostics; Basel, Switzerland)を用いた. total RNA 2.5 µg 分, 10x reaction buffer 5 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 10 µl, Deoxynucleotide Mix 5 µl, RNase free water を加え全量で 43.2 µl に調整した. 攪拌した後, 65°C で 5 分間インキュベートして RNA の変性を行った. RNase Inhibitor 1 µl と AMV Reverse Transcriptase 0.8 µl を加え, 37°C 10 分, 42°C 60 分で逆転写反応した後, 95°C 5 分間の酵素失活反応を行った. 得られた溶液を cDNA 溶液として用いた. RT-PCR は KOD FX polymerase (TOYOBO) と LifeECO (日本ジェネティクス) を使用し, 標準的な KOD FX プロトコルに添って行った. プライマーは以下を使用した.

- B4GN1 all variants

5'-GCTGGCAGTGCAAACCCTAGC-3'

5'-GTGAAAGCAGCCTCATGTCCCT-3'

- B4GN1 variant 2

5'-ATGCAGGAGAGGGCGAGAAGA-3'

5'-GGCTGAACTTCCACACCCTGTAGG-3'

- mB4GN1 all variants

5'-CTAGTCTTGCTGCTCGCCTG-3'

5'-GCCACGTCCCAGGTGCCTAG-3'

- mB4GN1 variant 2

5'- CTCACGTTCTCTGAGAGCCTGG-3'

5'- GCCACGTCCCAGGTGCCTAG-3'.

PCR はそれぞれ 50 ng の cDNA を鋳型とし, 94°C 2 分の後, 98°C 10 秒に続く 68°C 40 秒

を 34 サイクルで行った。増幅産物のバンドサイズは hB4GN1 all variants (599 bp) , hB4GN1 variant2 (698 bp) , mB4GN1 all variants (539 bp) , mB4GN1 variant2 (618 bp) で検出された。

### Real-time PCR

ヒト組織（脳，前立腺，骨格筋）の total RNA は全て TAKARA より購入した。293T 細胞，および HAP1 細胞の total RNA は以下の方法で抽出した。35 mm dish に播種し，90%confluency まで培養した細胞を Saline で洗浄し，1 ml の Sepasol<sup>®</sup>-RNA I Super G を加えて細胞を溶解させ，1.5 ml チューブに回収した。ボルテックスミキサーで攪拌後，室温で 5 分間静置した。200  $\mu$ l のクロロホルムを加えて転倒混和し，室温で 3 分間静置した。4 $^{\circ}$ C，12,000 x g，15 分間の遠心により相分離を行った。上層の水層を別チューブに移し，500  $\mu$ l の 2-プロパノールを加えて攪拌し，室温で 10 分間静置した。4 $^{\circ}$ C，12,000 x g，10 分間の遠心により RNA を析出させた。上清を除去し，1 ml の 75%エタノールを加えて攪拌し，4 $^{\circ}$ C，12,000 x g，5 分間の遠心後上清を除去し風乾させた。RNase free water を加えて total RNA 溶液とし，NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) を用いて 260 nm の吸光度を測定することにより濃度を算出した。逆転写反応は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo) を用いた。total RNA 2.5  $\mu$ g 分を RNase free water で希釈し，30  $\mu$ l にした後，65 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートして RNA の変性を行った。4x DN Master Mix を 10  $\mu$ l 加えて軽く攪拌した後，37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートしゲノム DNA の除去を行った。氷上で 5x RT Master Mix II を 10  $\mu$ l 加え，37 $^{\circ}$ C 15 分間の逆転写反応後，98 $^{\circ}$ C 5 分間の酵素失活反応を行った。得られた溶液を cDNA 溶液として用いた。Real-time PCR は 2 $\times$ TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems) と Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems) を使用し，標準的な TaqMan PCR プロトコルにより行った。プライマー・プローブは以下を使用した。

・ hB4GN1 all variant : Hs00155195\_m1 (Applied Biosystems)

・ hB4GN1 variant2 : (IDT)

probe

5'-TCGGGTGTGTGAGGAAACCGAGATG-3'

primers

5'-CATCCAAATGTCTTCAGCATTAAGAT-3'

5'-TCTCCCGGCCTCCTTTCTTCT-3'

・ 18S rRNA : Hs.PT.39a.22214856.g (IDT)

検量線は pFS466 (hB4GN1 all variant, pFS635 (hB4GN1 variant2), pFS636 (18S rRNA) で作製し、各サンプルのコピー数を算出した。

### 細胞培養法

CHO-K1 細胞 : Ham's F-12

293T 細胞 : high-glucose DMEM

HAP1 細胞 : low-glucose IMDM

上記の培地に最終濃度 10% (v/v) FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/ mL streptomycin で添加し基本培地とした。5% CO<sub>2</sub>, 37°C 条件下において基本培地で培養した。

### Lipofectamine™ 2000 による遺伝子導入 (一過性発現株の作製)

35 mm dish に CHO-K1 細胞を播種し 70%confluency まで培養後、一過性発現用プラスミド 2 µg と Lipofectamine™ 2000 reagent 10 µl を使用し、標準的なプロトコルに添って行った。

### レンチウイルス調整法

第 1 章第 4 節の「レンチウイルス調整法」と同様に行った。

### レンチウイルス感染による遺伝子導入 (安定発現株の作製)

60 mm dish に CHO-K1 細胞を播種し 10-20%confluency まで培養後、HAM/D-MEM(10% (v/v) FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/ mL streptomycin) に培地交換を行う。37°C, 5%CO<sub>2</sub> で 24 時間培養後、培地を除去しレンチウイルス溶液 4 ml を添加した。32°C, 5%CO<sub>2</sub> で 24 時間培養後、Ham's F12 基本培地に交換し 37°C, 5%CO<sub>2</sub> で培養した。基本培地で 1

週間培養した細胞を安定発現株とし、CELLBANKER 1 に懸濁して-80℃で保存した。

#### SDS-PAGE 用膜画分試料の調整法

第 1 章第 4 節の「SDS-PAGE 用膜画分試料の調整法」と同様に行った。

#### SDS-PAGE

第 1 章第 4 節の「SDS-PAGE」と同様に行った。

#### ウエスタンブロッティング

第 1 章第 4 節の「ウエスタンブロッティング」と同様に行った。

なお、一次抗体のうち抗 B4GALNT1 抗体（9535\_Ex\_ProteinA）は Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 で 1:1000 に希釈して用いた。

#### 間接蛍光抗体法による細胞内局在の観察

第 1 章第 4 節の「間接蛍光抗体法による細胞内局在の観察」と同様に行った。

#### 脂質抽出法

第 1 章第 4 節の「脂質抽出法」の培養細胞からの抽出と同様に行った。

#### 脂質解析法

第 1 章第 4 節の「脂質解析法」と同様に行った。

#### Cycloheximide chase

CHO-K1 安定発現株（hM1-B4GN1-FLAG, hM1-B4GN1-FLAG R4S/R6S/R7S 変異体, hM2-B4GN1-FLAG, hM1-B4GN1-FLAG と hM2-B4GN1-HA の共発現）を Ham's F-12 基本培地に 50 µg/mL で cycloheximide を添加し、37℃で 5 時間処理を行った。コントロールとして cycloheximide 無添加も行った。前述に従い、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングを行った。

## 5'-RACE

SMARTer RACE 5'/3' Kit とマウス脳の total RNA を使用し、標準的な SMARTer RACE 5'/3' Kit プロトコルを一部変更して行った。

5x First strand buffer 4  $\mu$ l, 100 mM DTT 0.5  $\mu$ l, 20 mM dNTPs 1  $\mu$ l を混合後, 40 U/ $\mu$ l RNase inhibitor 0.5  $\mu$ l, 100U SMART Scribe Reverse Transcriptase 2  $\mu$ l を添加し, マスターミックスとした。total RNA 1  $\mu$ g 分と 5'-CDS Primer A 1  $\mu$ l に Sterile H<sub>2</sub>O を加えて 11  $\mu$ l とし, 攪拌後, 72°C で 3 分間, 42°C で 2 分間インキュベートを行い RNA の変性を行った。常温で静置してた total RNA, 上記で調整したマスターミックス, SMARTerII A Oligonucleotide 1 $\mu$ l を混合し, 42°C で 90 分間逆転写反応を行った後, 70°C で 10 分間の酵素失活処理をした。4°C で冷却後に Tricine-EDTA buffer 10  $\mu$ l を加えて 5'-RACE ready cDNA 溶液とした。

primary PCR は 1.25  $\mu$ l の 5'-RACE ready cDNA を鋳型とし, KOD-FX Neo polymerase を用いて 25  $\mu$ l の系で増幅を行った。94°C 2 分の後, 98°C 10 秒に続く 68°C 1 分 30 秒を 45 サイクルで行った。

・ primary PCR 用プライマー配列

10x UPM

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

5'GSP

5'-GATTACGCCAAGCTTTAGCCGCATCCTGATATGGGGGAGGGTG-3'

増幅産物を Sterile H<sub>2</sub>O で 50 倍に希釈した内の 2.5  $\mu$ l を鋳型とし, KOD-FX Neo polymerase を用いて 25  $\mu$ l の系で secondary PCR を行った。増幅は 94°C 2 分の後, 98°C 10 秒, 52°C 30 秒, 68°C 1 分 30 秒を 35 サイクルで行った。

・ secondary PCR 用プライマー配列

UPM-short : 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

5'GSP-short : 5'-GATTACGCCAAGCTTTAGCC-3'

1000 bp に検出されたバンドを切り出し, MagExtractor-PCR&Gel Clean up kit で精製

し、10  $\mu$ l で抽出し、RACE products とした。

RACE products 5  $\mu$ l, 50 ng/ $\mu$ l linearized pRACE vector 1 $\mu$ l, In-Fusion HD Master Mix 2 $\mu$ l に Sterile H<sub>2</sub>O を加えて 10  $\mu$ l とし、攪拌後、50°C で 15 分間インキュベートしてディレクショナルクローニングを行った。このうち 2.5  $\mu$ l を用いて Stellar Competent Cell 50  $\mu$ l を形質転換した。得られたクローンは DNA シーケンサ (Applied Biosystems 3130, Thermo Fisher Scientific) と用いて M13F プライマー: 5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTT-3', M13R プライマー: 5'-GGAAACAGCTATGACCATGA-3' で配列を決定した。

#### 脳と肝臓のミクロソーム画分調整法

マウス (B4galnt1<sup>+/+</sup>, B4galnt1<sup>-/-</sup>) を麻酔下で開腹切開し、Saline で灌流処理を行った。脳および肝臓組織は細かく刻んだ後、テフロンホモジナイザーを用いて 1x cOplete を含む 0.25M スクロース中でホモジナイズ (10 ストローク) した。4°C, 1000 x g で 10 分間の遠心を行い核、細胞残渣を沈殿させた後、上清を 4°C, 8000 x g で 10 分間遠心してミトコンドリアを沈殿させた。上清を 4°C, 100000 x g で 60 分間遠心し、得られた沈殿物をミクロソーム画分とした。ミクロソーム画分に IP buffer を加え懸濁した。

#### 免疫沈降

上記の方法で調整したミクロソーム画分、および SDS-PAGE 用膜画分調整法と同様の方法で調整し IP buffer に懸濁した膜画分 (integral membrane protein fraction) に Protein A/G plus-agarose を加え、4°C で 30 分間ローテーターを用いて転倒混和した。4°C, 2300 x g で 3 分間の遠心後に上清を回収し、抗 B4GALNT1 抗体 (9535\_Ex\_ProteinA) と Protein A/G plus-agarose を加え、再度 4°C で 60 分間ローテーターを用いて転倒混和した。4°C, 2300 x g で 3 分間の遠心して agarose beads を沈殿させ、上清を除去した。沈殿させた agarose beads に washing buffer を加え、4°C, 2300 x g で 3 分間の遠心で洗浄を行った (5 回)。5% で  $\beta$ Me を添加した 2x SB を加え、100°C で 5 分間加熱変性処理をした後、PNGase F を添加して 37°C で 1 時間糖鎖切断処理を行った。得られた試料は前述の方法に従い、抗 B4GALNT1 抗体(ab135902)と Rabbit IgG TrueBlot を用いてウエスタンブロッ

ディングにより検出した.



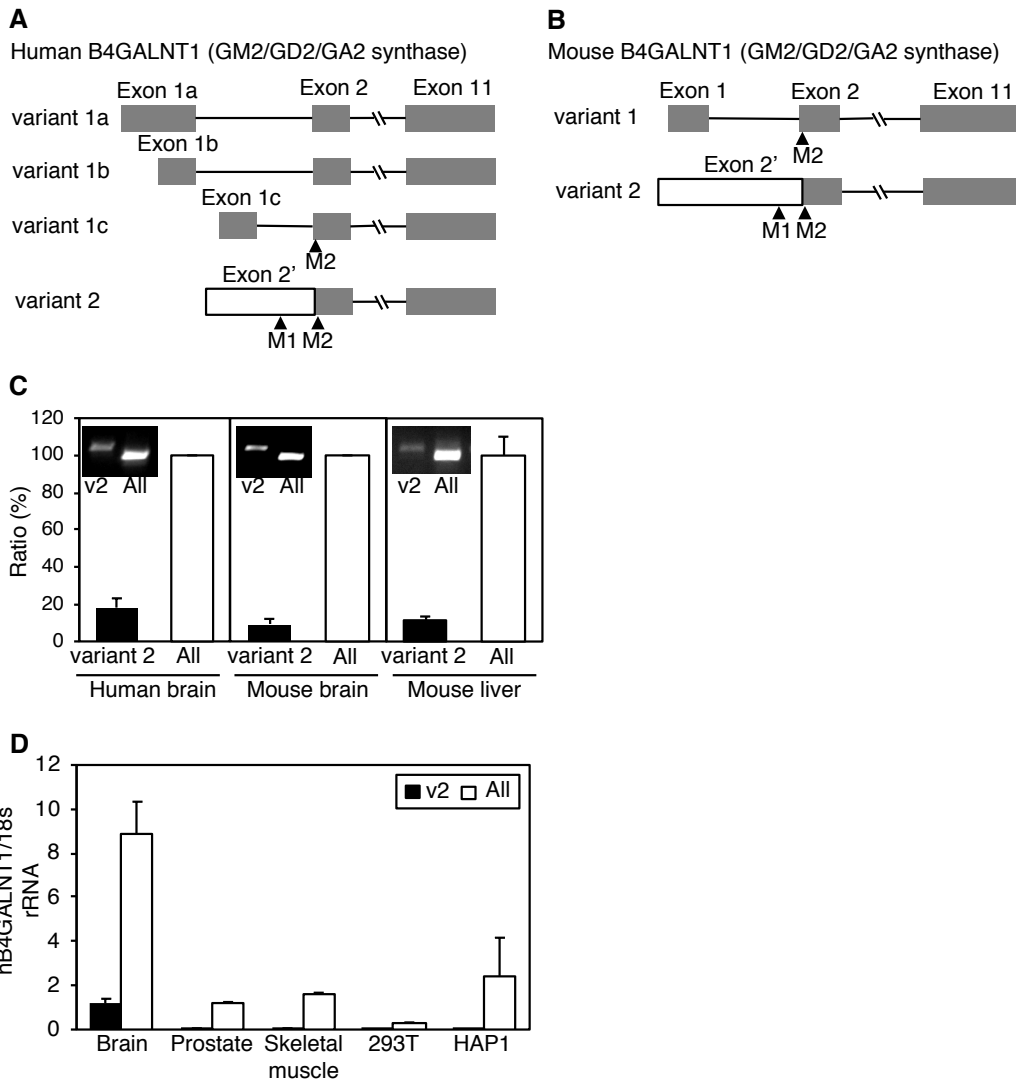


Figure 15. ヒトとマウスの*B4GALNT1*新規mRNA variant (variant 2)の構造模式図と発現量の解析

(A) ヒト*B4GALNT1*の遺伝子構造とmRNA variants. variant 2のaccession number: LC273521

(B) マウス*B4GALNT1*の遺伝子構造とmRNA variants. variant 2のaccession number: LC273292

■: exons, □: 新規exon, —: introns, M1, M2: 開始コドン

(C) ヒト脳組織およびマウス組織(脳, 肝臓)*B4GALNT1*のmRNA variant 2発現量の比較(RT-PCR). variant 2発現量は*B4GALNT1*全mRNA量を100%として算出した.

(D) ヒト組織および細胞(脳, 前立腺, 骨格筋, 293T細胞, HAP1細胞)における*B4GALNT1*のmRNA発現量の比較(Real-time PCR). 内在性コントロールには18S rRNAを用いた.

ヒトB4GALNT1 (GM2/GD2/GA2 synthase)

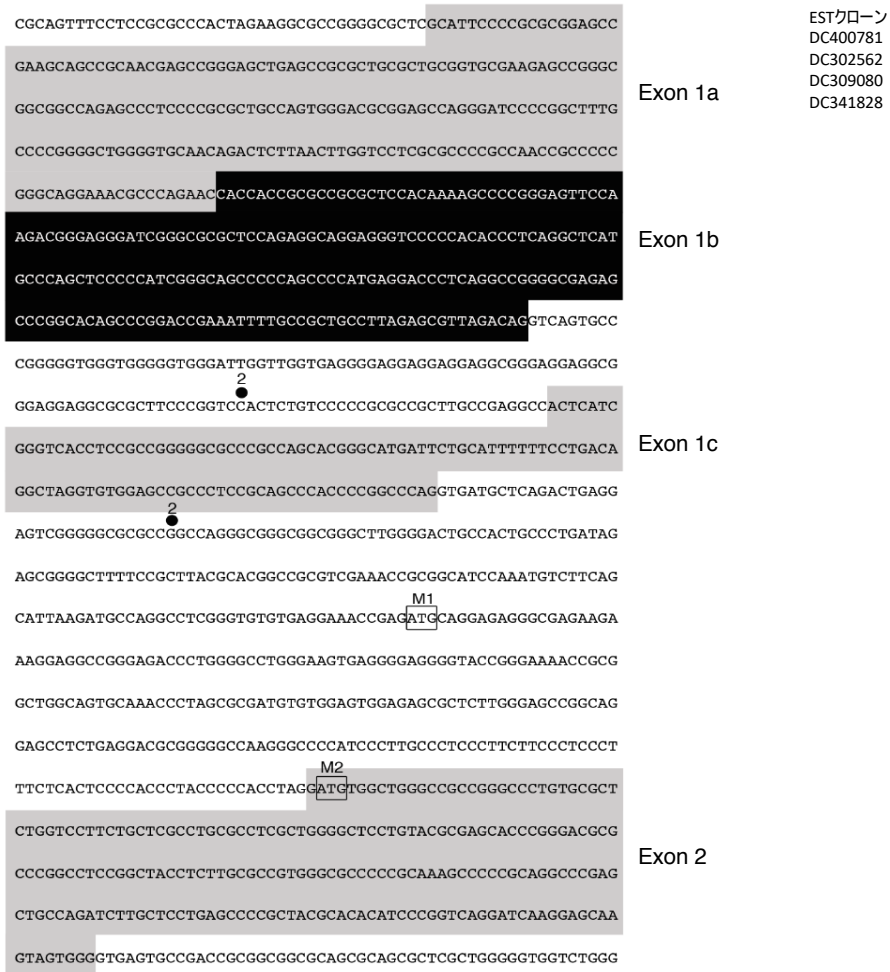


Figure 16. ヒトB4GALNT1のゲノム配列.

■ : exons, □ : introns, ● : start positions of EST clones, ●上の数字 : 登録されているEST clones数, M1, M2 : 開始コドン

マウスB4GALNT1 (GM2/GD2/GA2 synthase)

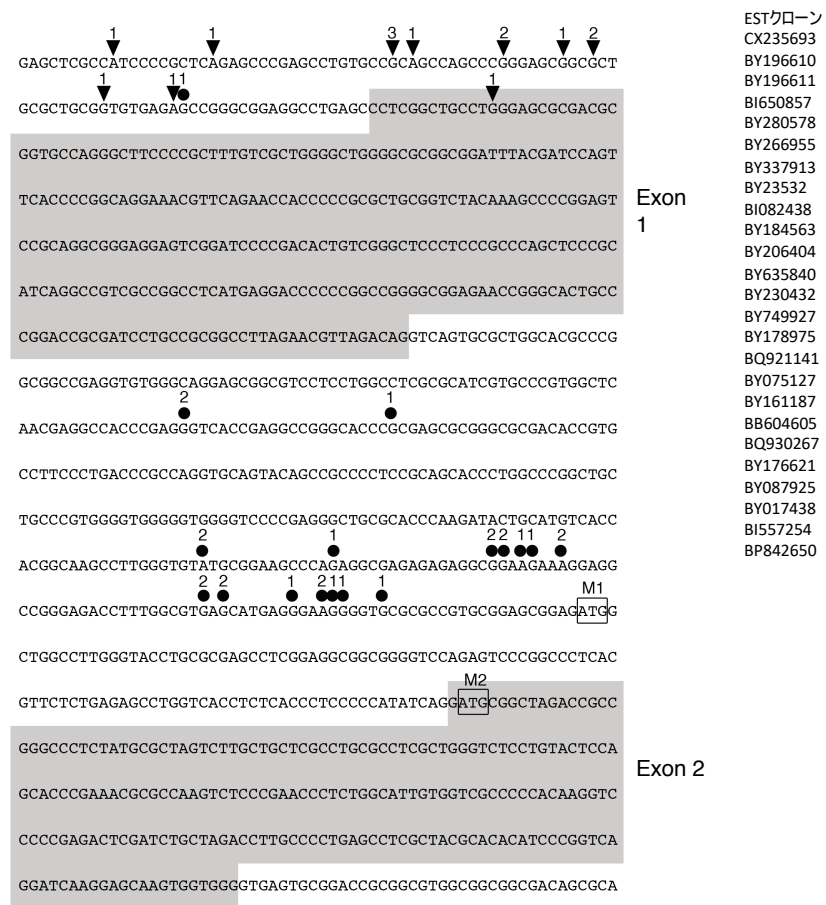


Figure 17. マウスB4GALNT1のゲノム配列.

■: exons, □: introns, ●: start positions of EST clones, ●上の数字: 登録されているEST cloneの数, ▼: 5'-RACE analysisで決定されたクローンの数, M1, M2: 開始コドン

human 1 **M**QERARRKEAGRPWGLGSEGRGTGKTAAGS  
 mouse 1 MQERARRKEAGRPWGLGSEGRGTGKTAAGS

human 31 ANPSAMCGVESALGSROEPLLRTRGPRAPSL  
 mouse 1 MAGLGYLREFFRRRRGP--ESR

human 61 ALPSSLPFSLPTLPPPRMLGRR TM  
 mouse 20 PSRSLRAWSPLTLPHIRMRLDRR TM

M1  
 M1  
 M2

Figure 18. ヒトとマウスのB4GALNT1における細胞質領域N末端アミノ酸配列の比較  
 ■: 同一アミノ酸残基, ■: 類似アミノ酸残基, M1, M2, M3: 開始コドン, TM: 膜貫通領域  
 下線: R-based motif

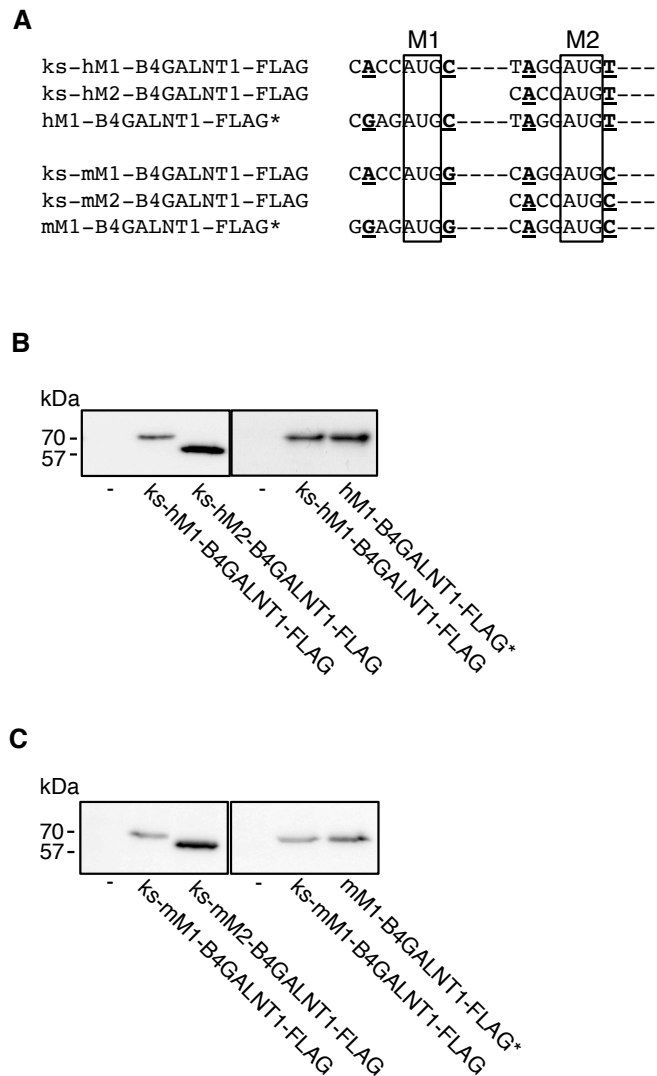


Figure 19. ヒトおよびマウスB4GALNT1のリーキースキャニングシステムによる転写機構の解析

(A) リーキースキャニングシステムによる転写制御機構の確認のため作製したプラスミドの開始コドン周辺の塩基配列を示す。全てのプラスミドはC末端にFLAGタグを付加した。kozak配列(ks)はCACCTとし、ks無しはB4GALNT1 mRNA由来の配列を付加し、「FLAG\*」で記載した。

(B) ks-hM1-B4GALNT1-FLAG, ks-hM2-B4GALNT1-FLAG, hM1-B4GALNT1-FLAG\*のウエスタンブロット解析結果。ksの有無によらずM1型からはシングルバンドが検出されたことから、リーキースキャニングによるM2型のアイソフォーム産生は生じないことが示された。

(C) ks-mM1-B4GALNT1-FLAG, ks-mM2-B4GALNT1-FLAG, mM1-B4GALNT1-FLAG\*のウエスタンブロット解析結果。ksの有無によらずM1型からはシングルバンドが検出されたことから、ヒトと同様リーキースキャニングによるM2型のアイソフォーム産生は生じないことが示された。

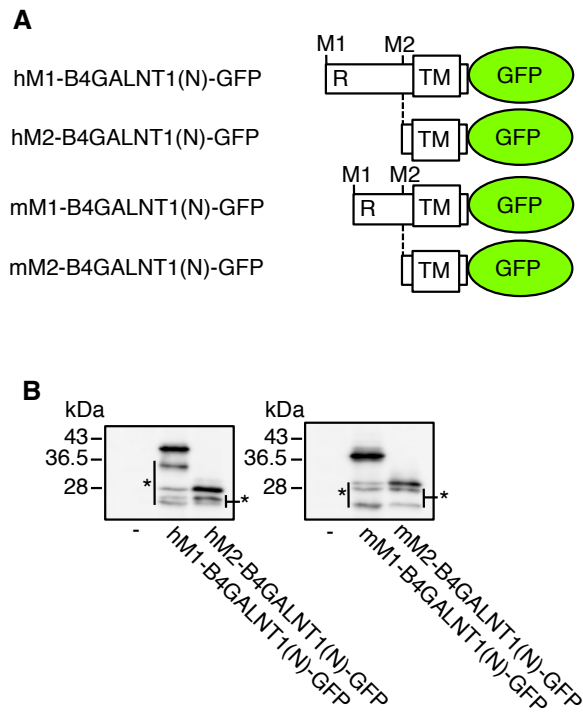


Figure 20. R-based motifによるM1-B4GALNT1(N)-GFPのゴルジ体-小胞体間逆行輸送シグナルの解析(1)

(A) 逆行輸送シグナルの解析に用いたGFP融合B4GALNT1タンパク質作成用プラスミドの模式図. hM1-B4GALNT1, hM2-B4GALNT1, mM1-B4GALNT1, mM2-B4GALNT1の膜貫通領域(TM)を含む細胞質領域N末端配列とGFPを融合させ. hM1-B4GALNT1(N)-GFP, hM2-B4GALNT1(N)-GFP, mM1-B4GALNT1(N)-GFP, mM2-B4GALNT1(N)-GFPとした. TM: 膜貫通領域, M1, M2: 開始コドン, R: Arginine (R)-based motif.

(B) CHO-K1細胞に一過性に発現させ, 抗GFP抗体でウェスタンブロット解析を行った. 解析はpcDNA3 vector (-), hM1-B4GALNT1(N)-GFP, hM2-B4GALNT1(N)-GFP, mM1-B4GALNT1(N)-GFP, mM2-B4GALNT1(N)-GFPを遺伝子導入して行った. \*: 分解産物

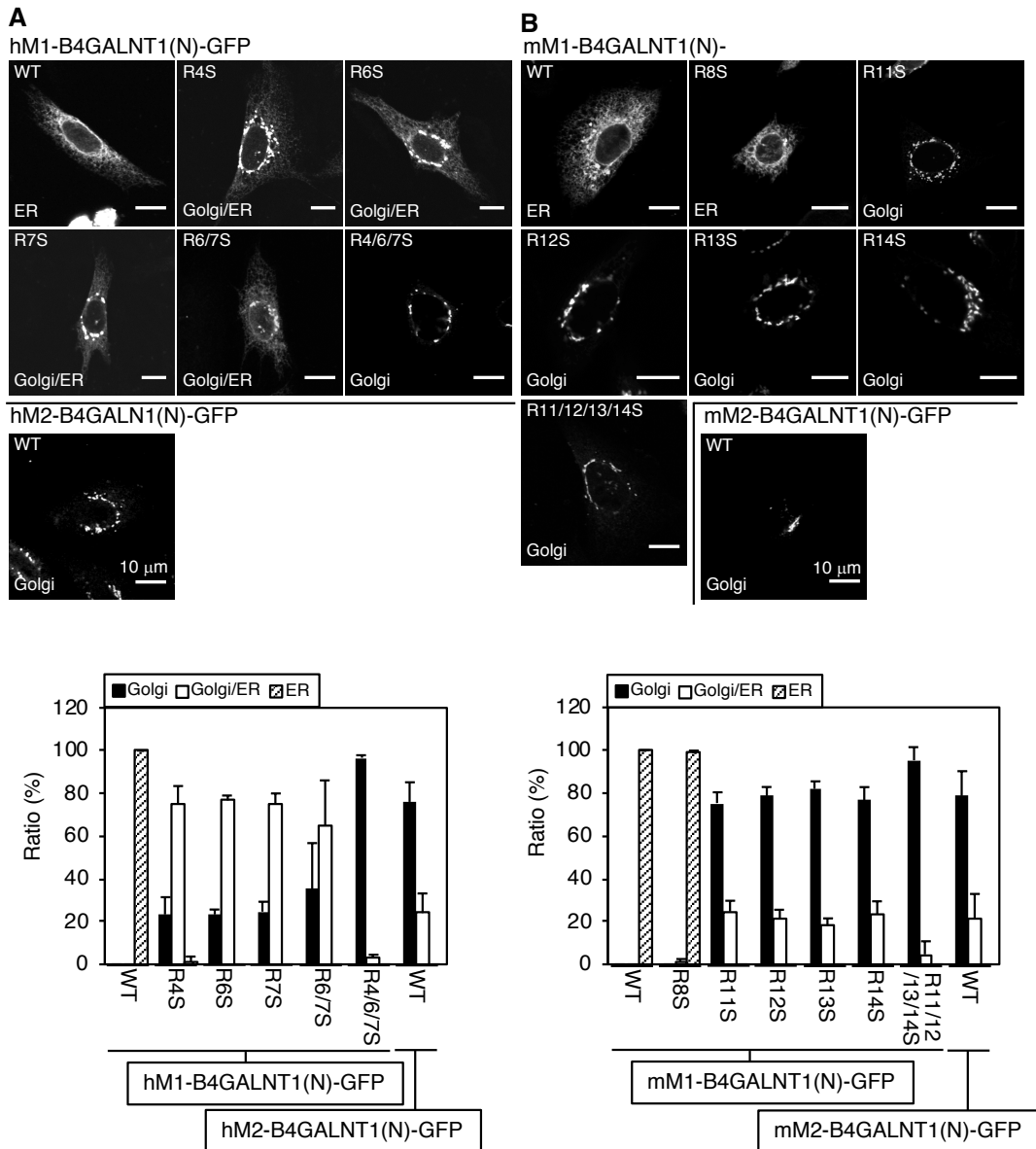


Figure 21. R-based motifによるM1-B4GALNT1(N)-GFPのゴルジ体-小胞体間逆行輸送シグナルの解析(2)

CHO-K1細胞に一過性に発現させ、抗GFP抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在を観察した。解析はpcDNA3 vector (-), hM1-B4GALNT1(N)-GFP, hM2-B4GALNT1(N)-GFP, mM1-B4GALNT1(N)-GFP, mM2-B4GALNT1(N)-GFPを遺伝子導入して行った。

(A) ヒトB4GALNT1(N)-GFP, (B) マウスB4GALNT1(N)-GFPの細胞内局在をそれぞれ定量した。局在パターンは3回以上の定量を行った。Bar: 10  $\mu$ m.

hM1-B4GALNT1(N)-GFP

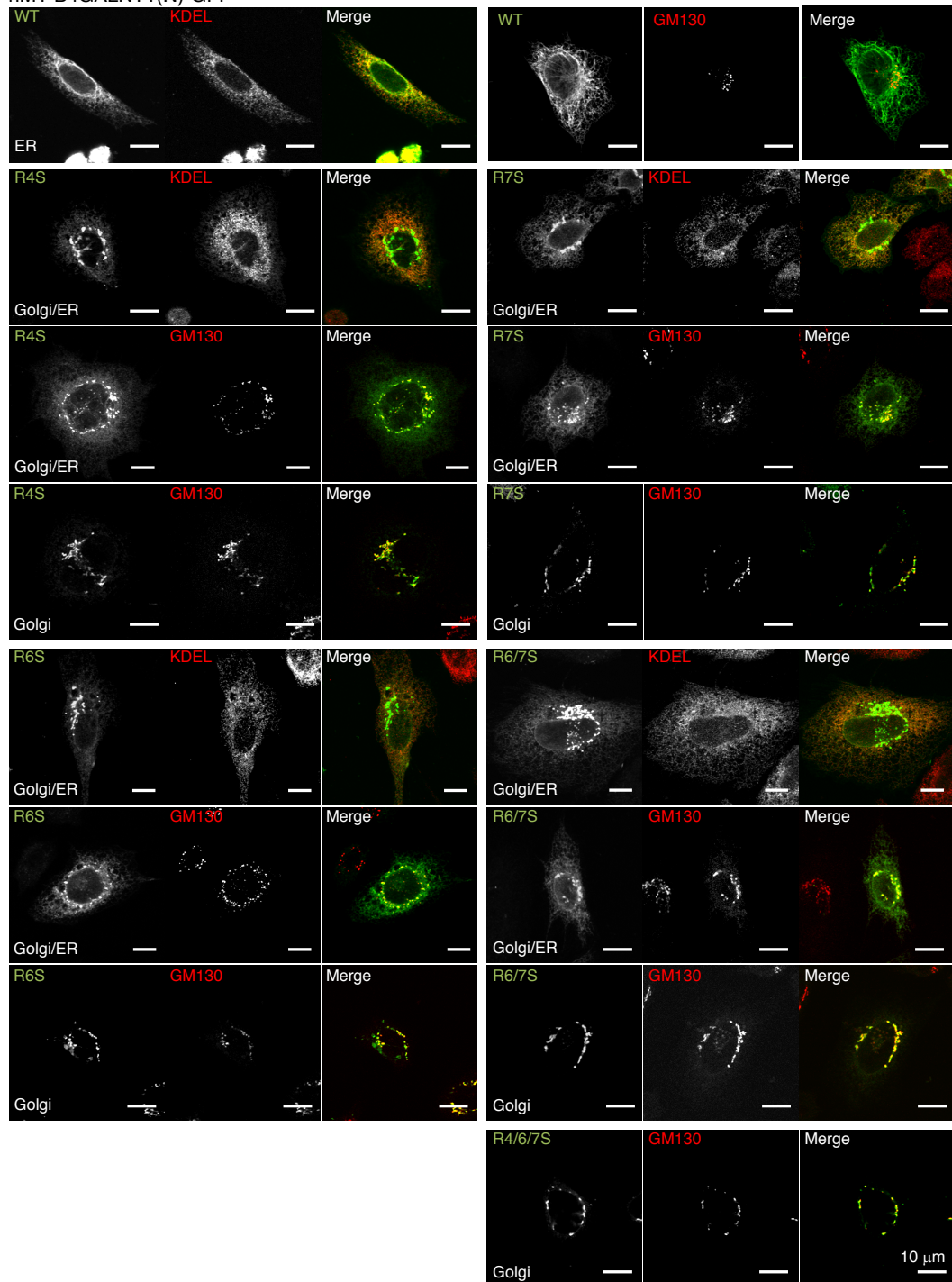


Figure 22. R-based motifによるM1-B4GALNT1(N)-GFPのゴルジ体-小胞体間逆行輸送シグナルの解析(3)

CHO-K1細胞に一過性にヒトB4GALNT1(N)-GFP(WT, 変異体)を発現させ、抗GFP抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在を観察した。Bar: 10 μm.



hM2-B4GALNT1(N)-GFP

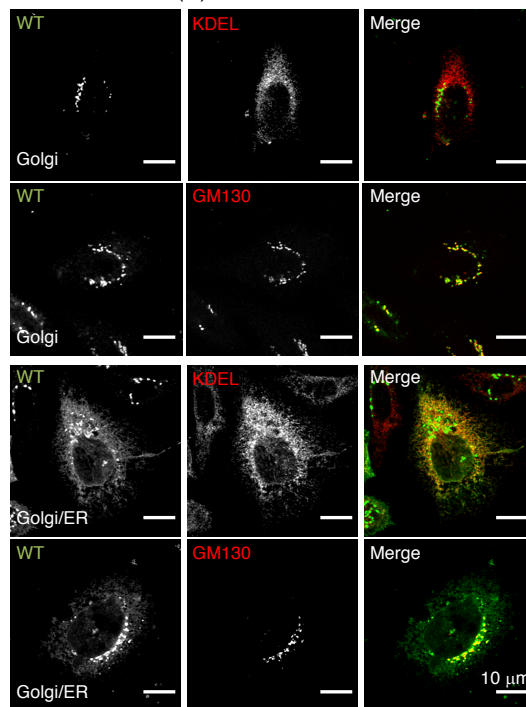


Figure 23. R-based motifによるM1-B4GALNT1(N)-GFPのゴルジ体-小胞体間逆行輸送シグナルの解析(4)

CHO-K1細胞に一過性にヒトM2-B4GALNT1(N)-GFPを発現させ、抗GFP抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在を観察した。Bar: 10  $\mu$ m.

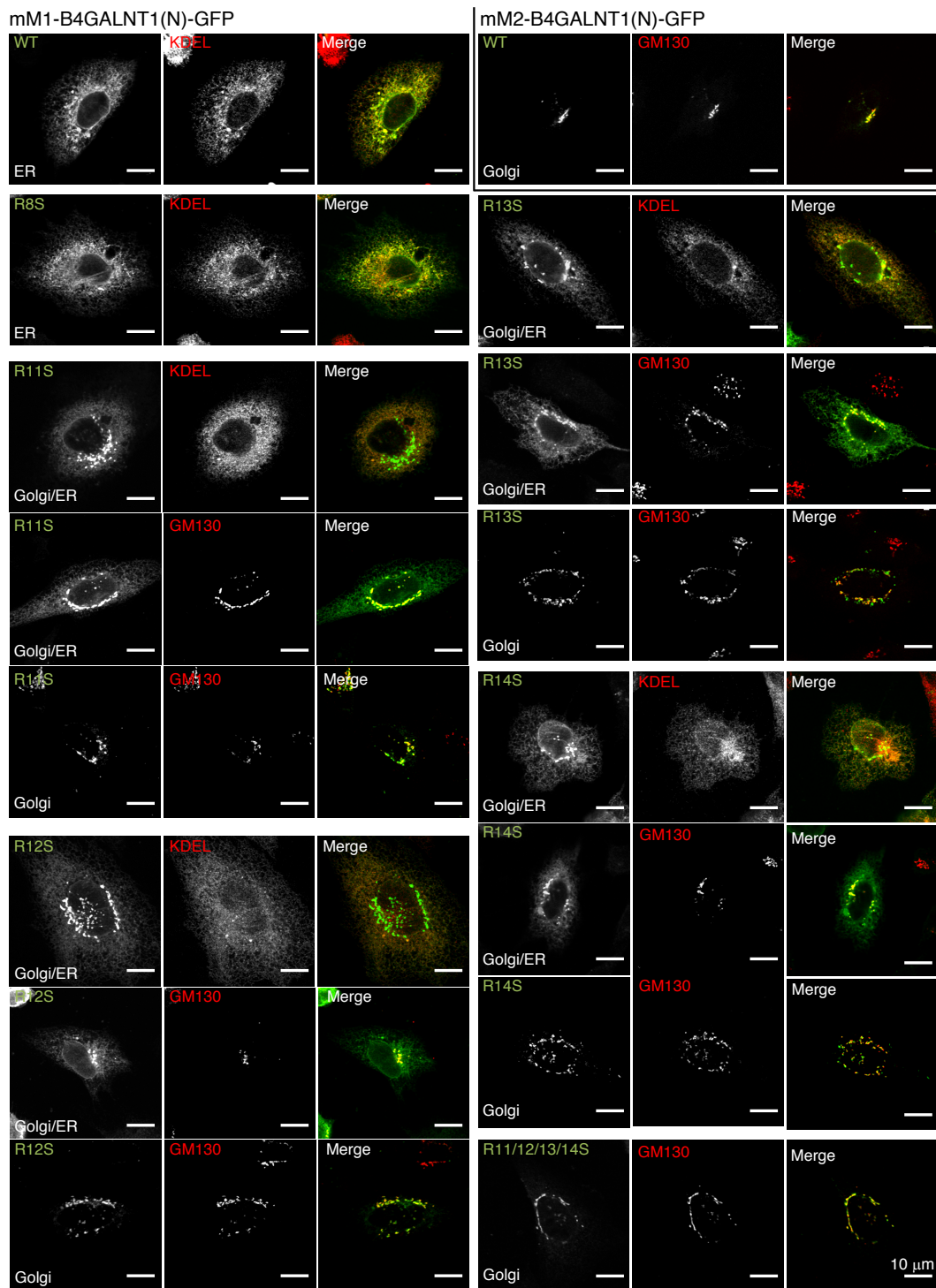


Figure 24. R-based motifによるM1-B4GALNT1(N)-GFPのゴルジ体-小胞体間逆行輸送シグナルの解析(5)

CHO-K1細胞に一過性マウスB4GALNT1(N)-GFP(WT, 変異体)を発現させ、抗GFP抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在を観察した。Bar: 10  $\mu$ m.

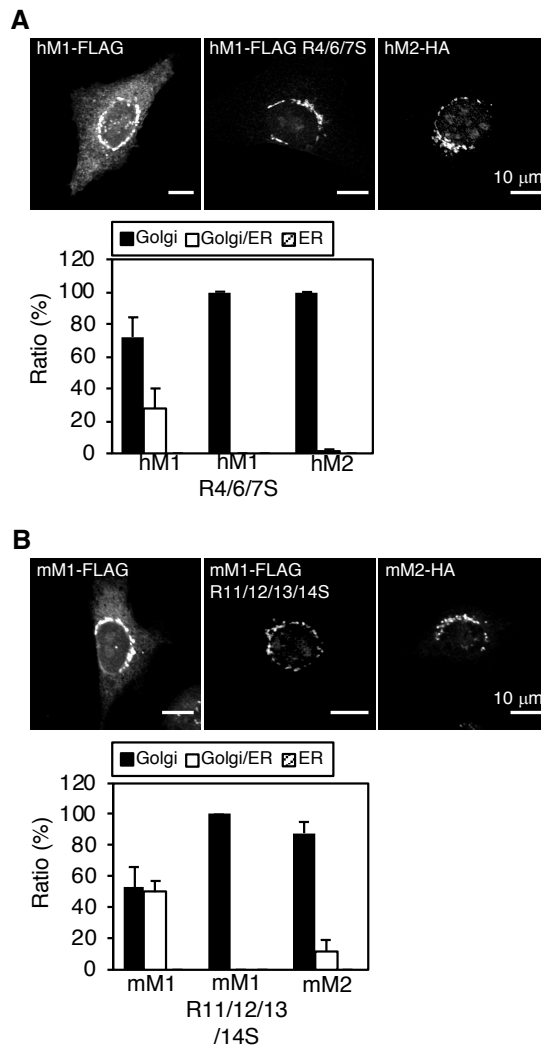


Figure 25. R-based motifによる全長M1-B4GALNT1, 全長M2-B4GALNT1のゴルジ体-小胞体間逆行輸送シグナルの解析(1)

CHO-K1細胞に安定発現させ、抗FLAG抗体又は抗HA抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在を観察した。解析は(A) hM1-B4GALNT1-FLAG, hM1-B4GALNT1-FLAG-R4/6/7S, hM2-B4GALNT1-HA, (B) mM1-B4GALNT1-FLAG, mM2-B4GALNT1-FLAG-R11/12/13/14S-FLAG, mM2-B4GALNT1-HAをレンチウイルスで遺伝子導入し、細胞内局在をそれぞれ定量した。局在パターンは3回以上の定量を行った。Bar: 10  $\mu$ m.

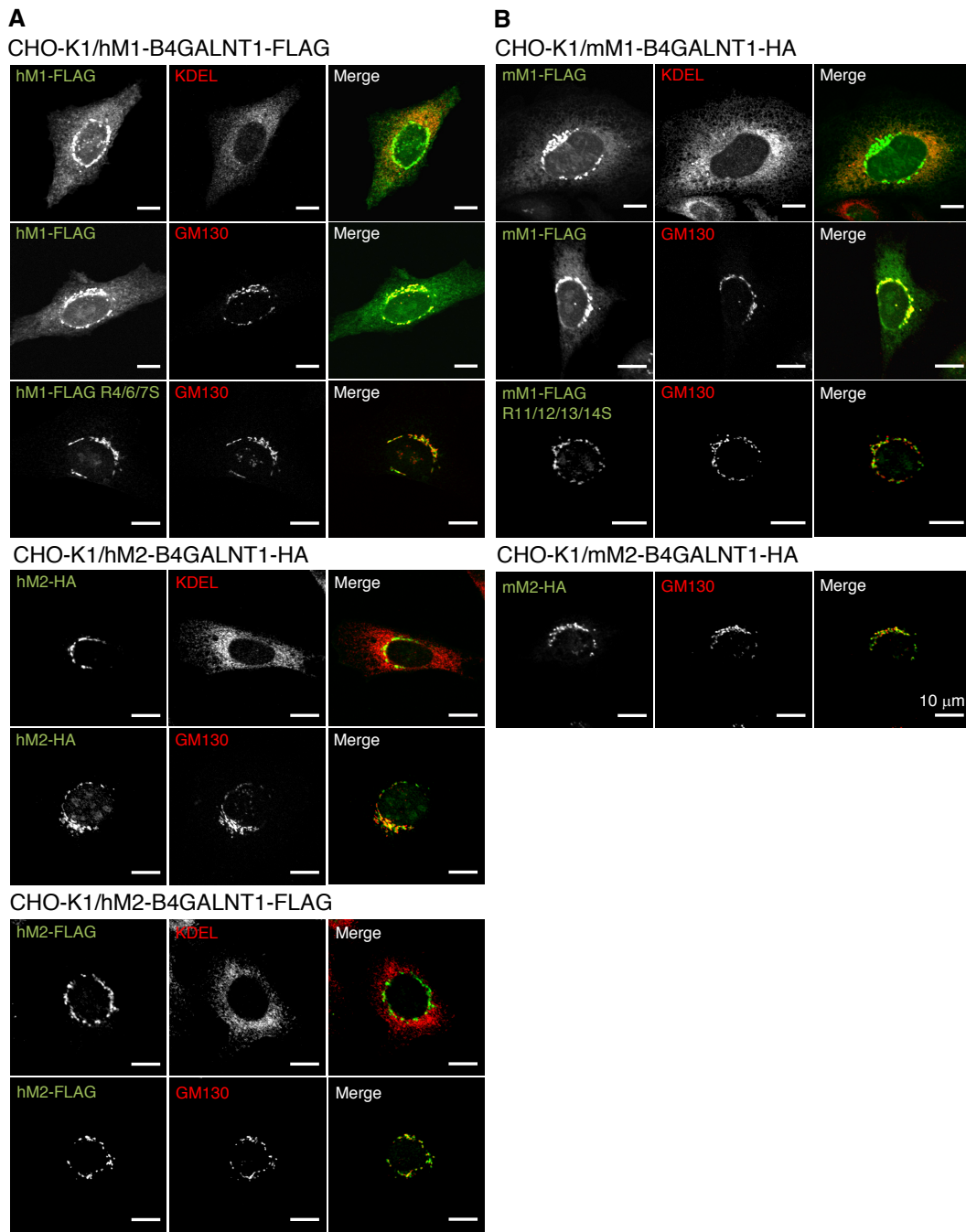
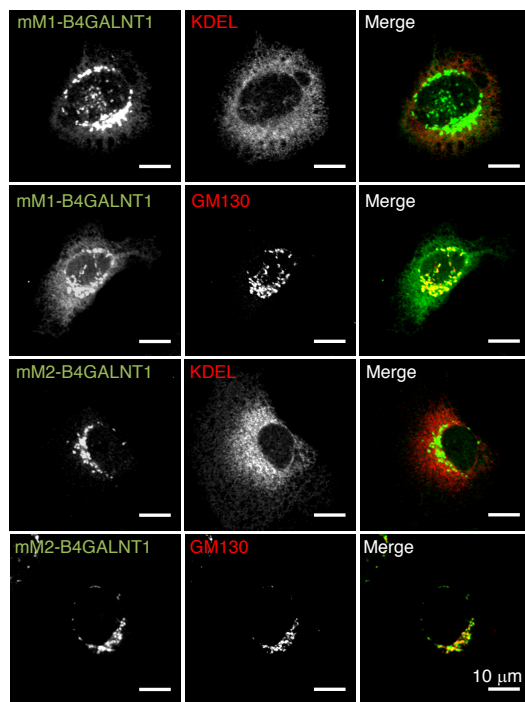


Figure 26. R-based motifによる全長M1-B4GALNT1, 全長M2-B4GALNT1のゴルジ体-小胞体間逆行輸送シグナルの解析(2)

CHO-K1細胞に安定発現させ、抗FLAG抗体又は抗HA抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在を観察した。解析は(A) hM1-B4GALNT1-FLAG, hM1-B4GALNT1-FLAG-R4/6/7S, hM2-B4GALNT1-HA, hM2-B4GALNT1-FLAG, (B) mM1-B4GALNT1-FLAG, mM2-B4GALNT1-FLAG-R11/12/13/14S-FLAG, mM2-B4GALNT1-HAをレンチウイルスで遺伝子導入し、細胞内局在をそれぞれ観察した。Bar: 10 μm.



anti-B4GALNT1 Ab  
(9535Ex\_ProteinG)

Figure 27. 全長M1-B4GALNT1, 全長M2-B4GALNT1の細胞内局在の観察

CHO-K1細胞にタグ無し全長mM1-B4GALNT1とmM2-B4GALNT1を安定発現させ, 抗B4GALNT1抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在を観察した. Bar: 10 μm.

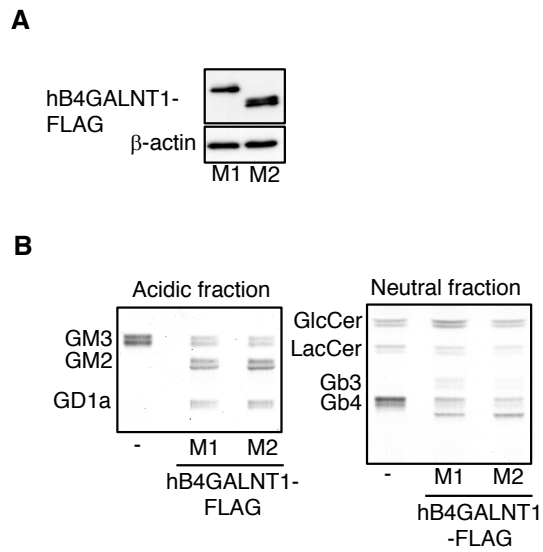


Figure 28. M1-B4GALNT1とM2-B4GALNT1における *In vivo* 酵素活性の比較

CHO-K1細胞にレンチウイルスを用いてM1-B4GALNT1-FLAG(M1)またはM2-B4GALNT1-FLAG (M2) を安定発現させた. (-):no transfectionを示す.

(A) 細胞から膜画分 (integral membrane protein fractions), 上清 (total cell lysates) を回収し, 膜画分は PNGase Fで糖鎖切断処理を行った. ウェスタンブロッティングを行い, それぞれ抗FLAG抗体, 抗actin抗体で検出した.

(B) 酸性糖脂質および中性糖脂質の組成を比較した. M1-B4GALNT1はM2-B4GALNT1と同様にGM2合成活性が認められた.

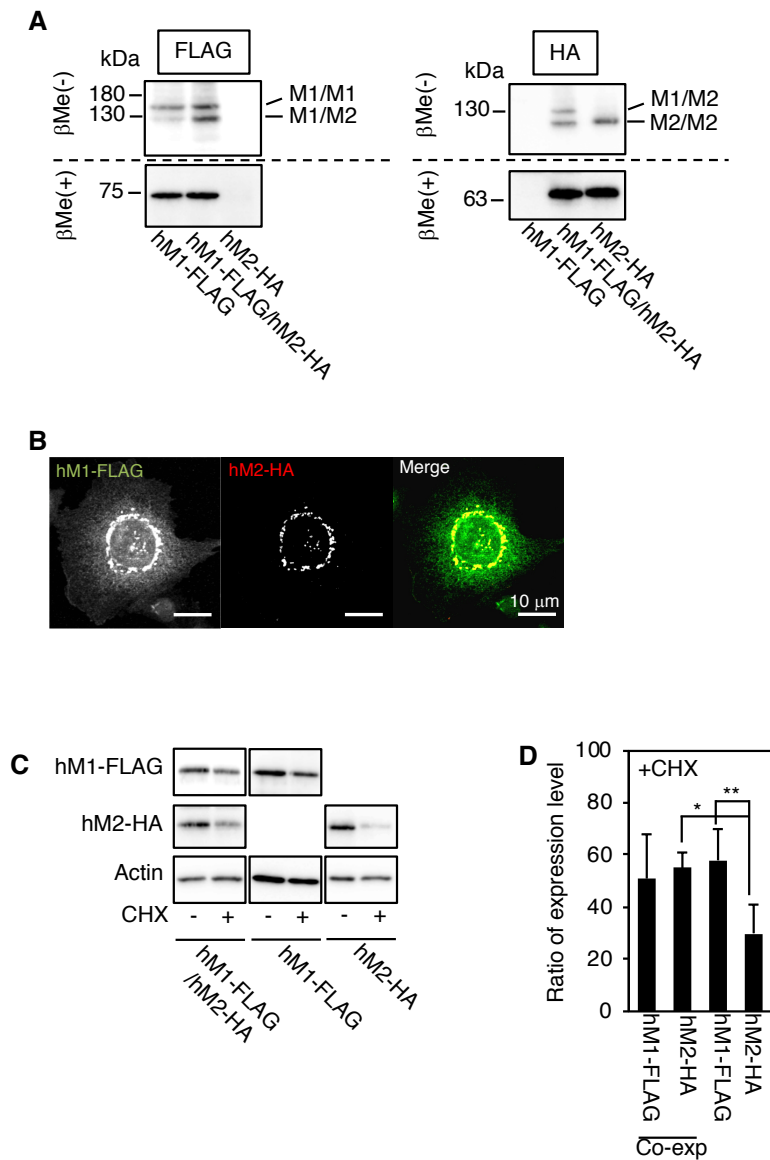


Figure 29. hM1-B4GALNT1, hM2-B4GALNT1 ダイマーが細胞内局在と酵素安定性に与える影響

CHO-K1細胞にレンチウイルスを用いてhM1-B4GALNT1-FLAG(hM1-FLAG), hM2-B4GALNT1-HA (hM2-HA) をそれぞれ単独, または共発現させた.

(A) 細胞から膜画分 (integral membrane protein fractions) を回収し, 還元剤添加有り, 無しでSBで処理後, PNGase Fで糖鎖切断処理を行った. ウエスタンブロッティングを行い, それぞれ抗FLAG抗体, 抗HA抗体で検出した.

(B) hM1-B4GALNT1-FLAG(hM1-FLAG), hM2-B4GALNT1-HA (hM2-HA) を共発現させたCHO-K1細胞を抗FLAG抗体, および抗HA抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在を観察した. Bar: 10 μm.

(C, D) CHO-K1/hM1-B4GALNT1-FLAG, CHO-K1/hM2-B4GALNT1-HA, CHO-K1/hM1-B4GALNT1-FLAG/hM2-B4GALNT1-HAを50 μg/mL cycloheximide (CHX)添加有り, 無しで37°Cで5 h処理し, ウエスタンブロッティングを行いタンパク質量をそれぞれ定量した. 同様に3回以上の定量を行った.

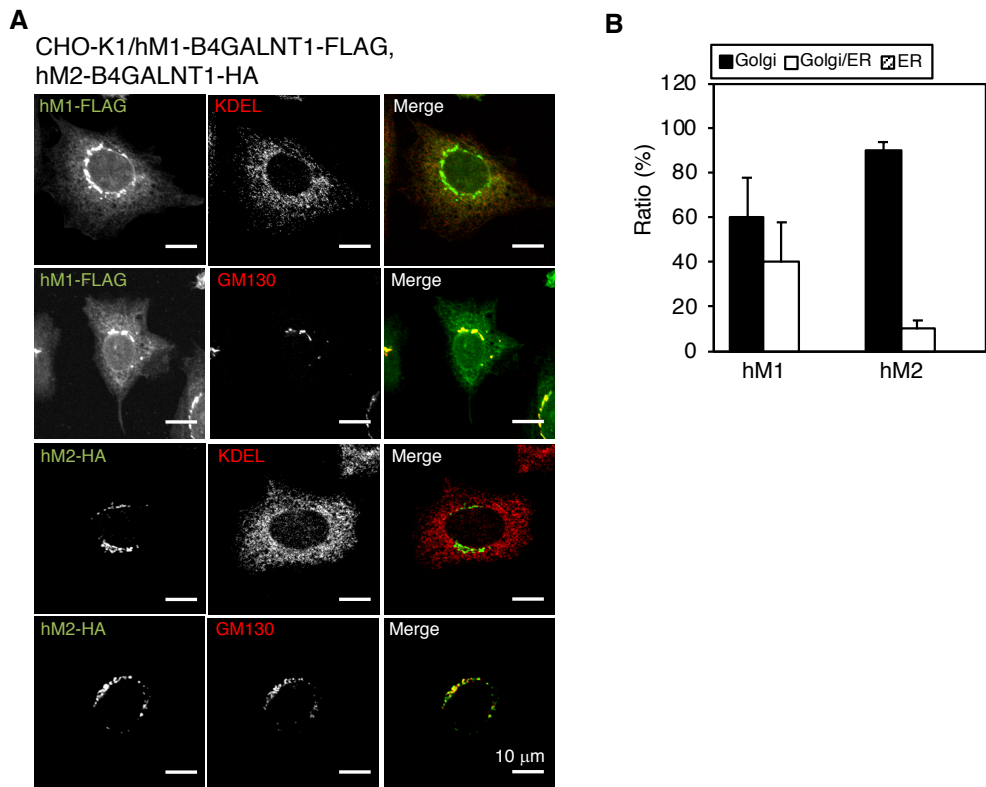


Figure 30. hM1-B4GALNT1, hM2-B4GALNT1の共発現時の細胞内局在  
CHO-K1細胞にレンチウイルスを用いてhM1-B4GALNT1-FLAG(hM1-FLAG), hM2-B4GALNT1-HA  
(hM2-HA)を共発現させた。

(A, B) hM1-B4GALNT1-FLAG(hM1-FLAG), hM2-B4GALNT1-HA (hM2-HA)を共発現させたCHO-K1細胞を抗FLAG抗体, および抗HA抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在を観察し定量した。局在パターンは3回以上の定量を行った。Bar: 10  $\mu$ m。



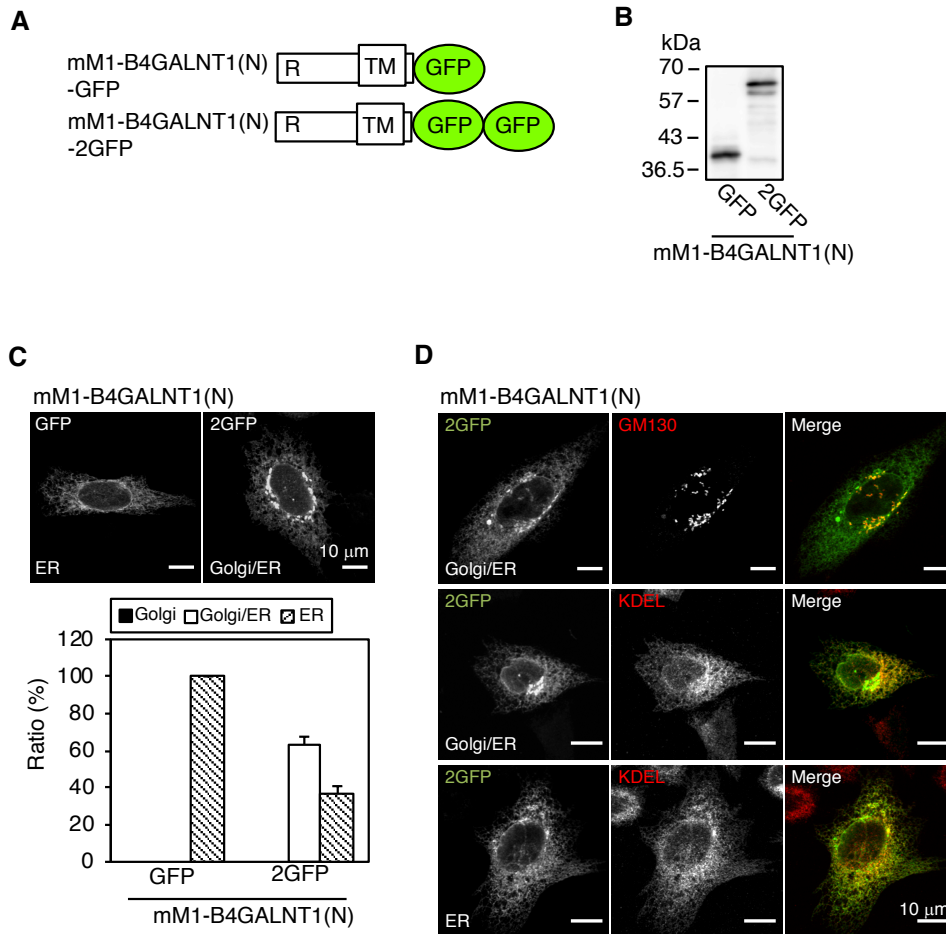


Figure 31. B4GALNT1の内腔側領域がR-based motifによるゴルジ体-小胞体間逆行輸送機構に与える影響

(A) 内腔側分子量が逆行輸送に与える影響を調べるため作製したB4GALNT1(N)-GFP, -2GFPの模式図.

TM: 膜貫通領域, R: Arginine (R)-based motif.

(B) CHO-K1細胞に一過性に発現させ, 抗GFP抗体でウェスタンブロット解析を行った.

(C, D) mM1-B4GALNT1(N)-GFP, mM1-B4GALNT1(N)-2GFPの細胞内局在をそれぞれ定量した. 局在パターンは3回以上の定量を行った. Bar: 10  $\mu$ m.

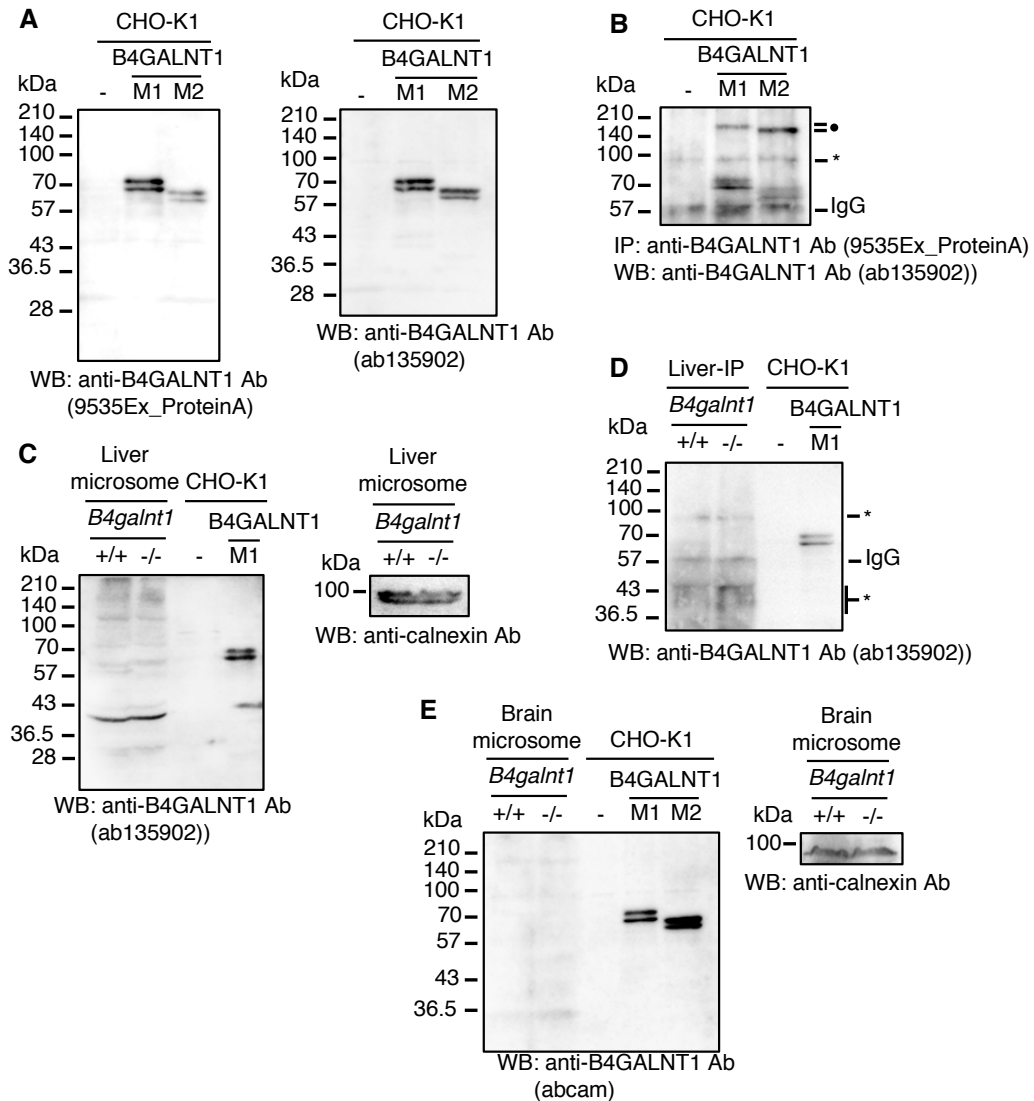


Figure 32. マウス組織(肝臓, 脳)を用いた内在性B4GALNT1の検出検討(ウエスタンブロットング)

(A)CHO-K1細胞に一過性発現させたmM1-B4GALNT1 (M1), mM2-B4GALNT1 (M2)を抗B4GALNT1抗体(9535Ex\_ProteinA), 又は(ab135902)で検出した. (-):no transfectionを示す. このサンプルは(C), (D), (E)のポジティブコントロールとしても用いた.

(B) CHO-K1細胞に一過性発現させたmM1-B4GALNT1 (M1), mM2-B4GALNT1 (M2)を抗B4GALNT1抗体(9535Ex\_ProteinA)で免疫沈降し, 抗B4GALNT1抗体(ab135902)とRabbit IgG Trueblotで検出した. ●, ★:nonspecific and unknown band

(C)マウス肝臓組織(*B4galnt1*<sup>+/+</sup>と*B4galnt1*<sup>-/-</sup>)のマイクロソーム画分を抗B4GALNT1抗体(ab135902), 抗カルネキシン抗体で検出した.

(D)マウス肝臓組織(*B4galnt1*<sup>+/+</sup>と*B4galnt1*<sup>-/-</sup>)のマイクロソーム画分を抗B4GALNT1抗体(9535Ex\_ProteinA)で免疫沈降し, 抗B4GALNT1抗体(ab135902)とRabbit IgG Trueblotで検出した. ★:nonspecific band

(E)マウス脳組織(*B4galnt1*<sup>+/+</sup>と*B4galnt1*<sup>-/-</sup>)のマイクロソーム画分を抗B4GALNT1抗体(ab135902), 抗カルネキシン抗体で検出した.

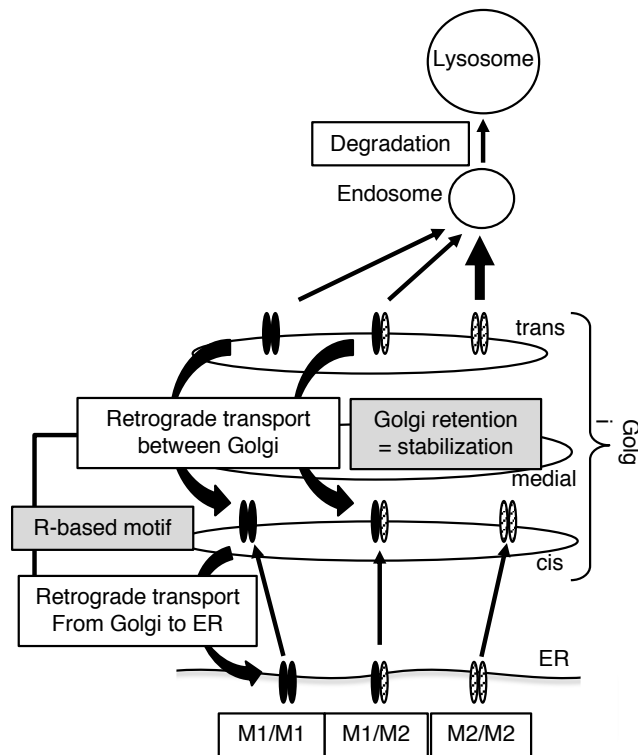


Figure 33. B4GALNT1の細胞内動態のまとめ

M1/M1ホモダイマーはゴルジ体と小胞体の両方に局在する。M1型が細胞質領域のN末端にもつR-based motifは、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送、およびゴルジ体繫留機構の両方に関与している。R-based motifをもたないM2/M2ホモダイマーは定常状態でゴルジ体に局在する。M1/M2ヘテロダイマーはR-based motifをもつものの小胞体への局在は見られない。しかしながら、M2/M2ホモダイマーと比較して安定性が向上しており、これはゴルジ体繫留時間の延長によるものと示唆される。

### 第3章 小胞体搬出シグナル配列 (R/K-based motif) が M3-ST3GAL5 のゴルジ体繫留機構に与える影響

#### 第1節 序論

GM3 合成酵素 ( $\alpha$ -2,3-sialyltransferase : ST3GAL5, ST3GAL5) は, ガングリオシドの中で最初に生合成される GM3 を合成する酵素であり, ガングリオシドファミリー発現の律速酵素である. 今日まで, マウス ST3GAL5 における転写開始地点の異なる 3 種類の mRNA バリエント (a-, b-, c-type) の転写制御機構, それらから合成される 3 種類のアイソフォーム (M1-, M2-, M3-ST3GAL5) の産生機構, 細胞内局在, 比活性, 内腔側の糖鎖修飾が GM3 合成活性へ及ぼす影響などが解析されている.

小胞体は膜タンパク質や分泌系タンパク質の合成の場である. 翻訳直後の未熟な膜タンパク質は, N 結合型糖鎖 (ハイマンノース型) の付加, ジスルフィド結合の形成などを経て, 機能的な高次構造に正しくフォールディングされた後に小胞体の積荷搬出領域 (ER exit sites : ERES) から COP II 小胞 (coat protein complex II) により搬出される. ガングリオシド合成酵素などの II 型膜タンパク質は, [R/K](X)[R/K]配列と small GTPase (Sar1) が相互作用し, COP II 小胞に積み込まれることでゴルジ体へ小胞輸送されることが示唆されている [39]. COP II 小胞は Sar1, COP II 被覆タンパク質である Sec23, Sec24, Sec13, Sec31 から構成される. COP II 小胞に積み込まれる積荷タンパク質は小胞体搬出シグナルとして機能する塩基性アミノ酸に富む [R/K](X)[R/K]配列をもち, この配列が Sar1 と相互作用する. Sar1 には 3 つの結合ポケット (site-A, -B, -C) が存在し, [R/K](X)[R/K]配列は site A の 198 番目のアスパラギン酸 (<sup>198</sup>D) と結合する [39]. しかし, この検討は膜貫通領域 (TM) を含む N 末端配列に GFP を付加したキメラタンパク質を一過性に発現させる実験系で行われており, 全長の糖転移酵素で [R/K](X)[R/K]配列が小胞体からの搬出シグナルとして機能するか未検討である. GFP は細胞や生体中の特定のタンパク質を観察するための強力なツールであるが, その一方, GFP キメラタンパク質を一過性に過剰発現させた実験系において, しばしば全長タンパク質を安定発現させた実験系と異なる挙動を示すという問題点が挙げられている [64-66]. したがって, タンパク質の細胞内動態を正確に理

解するためには、GFP キメラタンパク質の動態だけでなく、全長を安定発現させたタンパク質による解析が重要である。

ST3GAL5, および B4GALNT1 の細胞質領域の膜貫通領域近傍には、小胞体から搬出機構に必要な[R/K](X)[R/K]配列が存在する。本章では、ST3GAL5, B4GALNT1 の輸送制御機構の解明を目的とし、この配列が全長 M3-ST3GAL5, および全長 M2-B4GALNT1 の細胞内動体に及ぼす影響を精査した。その結果、[R/K](X)[R/K]配列よりもブロードなアミノ酸配列 (R/K-based motif) が ST3GAL5 と B4GALNT1 の小胞体搬出に関与することを明らかにした。さらに、M3-ST3GAL5 の R/K-based motif の部分変異体では、細胞内局在の変化、内腔側領域の N 結合型糖鎖の成熟度の変化、および酵素の安定性の減少が生じることを見出した。これらの結果は、細胞質領域の R/K-based motif は小胞体搬出のみならず、M3-ST3GAL5 の安定したゴルジ体繫留機構にも重要な役割をもつことを示唆している。

## 第2節 結果

### 第1項 M3-ST3GAL5(N)-GFP, M2-B4GALNT1(N)-GFPの小胞体搬出機構の解析

糖転移酵素において、細胞質領域の N 末端に存在する[R/K](X)[R/K]配列は小胞体搬出シグナルとして機能することが報告されている[39]. この配列は, mM3-ST3GAL5 では 2, 3 番目のアルギニン (<sup>2</sup>R<sup>3</sup>R), mM2-B4GALNT1 では 5, 6 番目のアルギニン (<sup>5</sup>R<sup>6</sup>R) が相当する (Fig. 34A). この RR 配列が小胞体搬出シグナルとして機能するかどうかの詳細な検討を行うために, mM3-ST3GAL5, mM2-B4GALNT1 の膜貫通領域 (TM) を含む N 末端に GFP を付加したコンストラクト (mM3-ST3GAL5(N)-GFP, mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A, mM2-B4GALNT1(N)-GFP, mM2-B4GALNT1(N)-GFP-R5A/R6A) を作製し, これらを CHO-K1 細胞に一過的に発現させ, 抗 GFP 抗体を用いて細胞内局在を間接蛍光抗体法で観察した.

mM3-ST3GAL5(N)-GFP は, 核周辺にドット状に観察されるゴルジ体に特徴的な局在が見られ, ゴルジ体のマーカータンパク質である GM130 と共局在を示した (Fig. 34B, Fig. 35). mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A は, 部分的にゴルジ体に局在するものの, 主に細胞質領域に網目状に観察される小胞体に特徴的な局在を示し, 抗小胞体繫留シグナル KDEL 抗体と共局在していた (Fig. 34B, Fig. 35). mM2-B4GALNT1(N)-GFP はゴルジ体への局在が確認された. 一方で, mM2-B4GALNT1(N)-GFP-R5A/R6A は部分的に小胞体に局在するものの, 大部分はゴルジ体に局在していた (Fig. 34C, Fig. 36). この結果は, mM2-B4GALNT1(N)-GFP において <sup>5</sup>R<sup>6</sup>R 以外の小胞体搬出に関わるアミノ酸の存在があることを示唆している. mM2-B4GALNT1(N)-GFP は <sup>5</sup>R<sup>6</sup>R 以外の塩基性アミノ酸として <sup>2</sup>R をもつことから, mM2-B4GALNT1(N)-GFP-R2A, および mM2-B4GALNT1(N)-GFP-R2A/R5A/R6A を作製し, CHO-K1 細胞に一過性に発現させて局在を観察した. mM2-B4GALNT1(N)-GFP-R2A を発現させた場合, 大部分が mM2-B4GALNT1(N)-GFP と同様にゴルジ体に局在した. しかし, 2, 5, 6 番目の全ての R を同時に A に置換する (mM2-B4GALNT1(N)-GFP-R2A/R5A/R6A) と, 完全に小胞体に局在がシフトした (Fig. 34C, Fig. 36). 以上の結果から, mM3-ST3GAL5(N)-GFP で <sup>2</sup>R<sup>3</sup>R 配列が, mM2-B4GALNT1(N)-

GFP で  $^2R(X)_2^5R^6R$  配列がゴルジ体局在化に重要であり、小胞体からゴルジ体への搬出シグナルとして機能することが示された。

次に、mM3-ST3GAL5(N)-GFP, mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A, mM2-B4GALNT1(N)-GFP, mM2-B4GALNT1(N)-GFP-R2A/R5A/R6A をレンチウイルスを用いて CHO-K1 細胞に安定に発現させ、その細胞内局在を抗 GFP 抗体を用いて間接蛍光抗体法で観察した。mM2-B4GALNT1(N)-GFP はゴルジ体に、mM2-B4GALNT1(N)-GFP-R2A/R5A/R6A は小胞体に局在し、一過性発現と同様の結果を示した (Fig. 37B, Fig. 38B)。以上の結果は安定発現した mM2-B4GALNT1(N)-GFP の  $^2R(X)_2^5R^6R$  配列が、小胞体からゴルジ体への搬出シグナルとして機能することを示している。一方、mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A は一過性発現でその多くが小胞体に局在していたにもかかわらず、安定発現では主にゴルジ体に局在していた (Fig. 37A, Fig. 38A)。以上の結果は、mM3-ST3GAL5(N)-GFP の安定発現株において R2A/R3A の変異導入では小胞体搬出の抑制に不十分であり、 $^2R^3R$  以外の小胞体搬出に関わるアミノ酸の存在があることを示唆している。

mM3-ST3GAL5(N)-GFP は  $^2R^3R$  を除いて 12 個のアミノ酸を細胞質領域にもつ。小胞体搬出に寄与するアミノ酸の同定のため、細胞質領域の残りのアミノ酸に 2 個ずつ変異を導入したコンストラクト (mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/P4A/S5A, -R2A/R3A/L6A/L7A, -R2A/R3A/I8A/K9A, -R2A/R3A/D10A/I11A, -R2A/R3A/C12A/K13A) を作製し、CHO-K1 細胞に安定に発現させて局在を観察した (Fig. 39A)。その結果、mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/I8A/K9A, および-R2A/R3A/C12A/K13A を発現させた細胞で小胞体局在が増加した。また、他の 3 種の変異体を発現させた場合にはゴルジ体局在からの変化は見られなかった。小胞体局在の増加が見られた mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/I8A/K9A, および-R2A/R3A/C12A/K13A に共通して含まれるアミノ酸は 9, 13 番目のリジン (K) であり、Sar1 との相互作用に重要とされている塩基性アミノ酸であることから、 $^9K$  と  $^{13}K$  が小胞体搬出に関わると予想した。そこで、mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/K9A, -R2A/R3A/K13A, -R2A/R3A/K9A/K13A を同様に発現させて局在を観察したところ、予想通り R2A/R3A/K9A, R2A/R3A/K13A の変異で小胞体局在の増加が観察

され, R2A/R3A/K9A/K13A で完全に小胞体に局在した (Fig. 39B, Fig. 40). また, mM3-ST3GAL5(N)-GFP- K9A/K13A はゴルジ体, 小胞体の両方に局在し, 十分な小胞体搬出抑制は生じていなかった (Fig. 39B, 40). 以上の結果から, 安定発現系の mM3-ST3GAL5(N)-GFP で  $^2R^3R(X)_5^9K(X)_3^{13}K$  が小胞体からゴルジ体への搬出シグナルとして機能することが示された. mM3-ST3GAL5(N)-GFP で  $^2R^3R(X)_5^9K(X)_3^{13}K$  配列が, mM2-B4GALNT1(N)-GFP で  $^2R(X)_2^5R^6R$  配列が小胞体搬出シグナルとして機能する. これらは [R/K](X)[R/K] 配列に適用されない新規の配列であるため, R/K-based motif と提唱する.

## 第2項 R/K-based motifによる全長 M3-ST3GAL5の小胞体搬出機構の解析

次に, R/K-based motif が全長の M3-ST3GAL5 と M2-B4GALNT1 の輸送においても小胞体搬出シグナルとして機能するか検討を行った. 全長 mM3-ST3GAL5 (mM3-ST3GAL5-R2A/R3A/K9A, -R2A/R3A/K13A, -R2A/R3A/K9A/K13A), および全長 mM2-B4GALNT1 (mM2-B4GALNT1-R2A/R5A/R6A) のコンストラクトを作製し, CHO-K1 細胞にレンチウイルスを用いて安定に発現させた. mM3-ST3GAL5 と mM2-B4GALNT1 は, それぞれ抗 ST3GAL5 抗体, 抗 B4GALNT1 抗体を用いた間接蛍光抗体法で細胞内局在を観察した (Fig. 41, Fig. 42). なお, 解析で用いた抗 ST3GAL5 抗体, 抗 B4GALNT1 抗体は, CHO-K1 細胞内在性のタンパク質は検出しないことを確認した (Fig. 43).

全長 mM3-ST3GAL5 は主に GM130 と共局在を示し, ゴルジ体に局在した. 3カ所に変異を導入した mM3-ST3GAL5-R2A/R3A/K9A と -R2A/R3A/K13A は, KDEL と共局在を示し, 主に小胞体に局在した. R-based motif の4カ所全てに変異を導入した mM3-ST3GAL5-R2A/R3A/K9A/K13A は, 細胞内の発現量が低く, 検出限界以下であった (Fig. 41A, Fig. 42A). これらの結果は GFP キメラタンパク質と同様の結果を示しており, 全長 mM3-ST3GAL5 において R/K-based motif が小胞体搬出シグナルとして機能していることを示している.

対照的に, 全長 mM2-B4GALNT1-R2A/R5A/R6A は部分的に小胞体への局在が確認されたものの, その大部分がゴルジ体に局在し, R2A/R5A/R6A 変異による小胞体への搬出抑制は十分に観察されなかった. この結果は mM2-B4GALNT1 の小胞体搬出に R/K-based



motif が必須ではないことを示唆している (Fig. 41B, Fig. 42B). mM2-B4GALNT1 は、内腔側の 2 カ所のジスルフィド結合によりダイマーを形成しており、ダイマー形成に関わるシステイン (<sup>80</sup>C, <sup>82</sup>C) 残基に変異を導入すると小胞体への搬出が抑制されると報告されている [58]. 実際に全長 mM2-B4GALNT1-C80S/C82S を発現させたところ、主に小胞体に局在することが確認された. 以上のことから、mM2-B4GALNT1 において R/K-based motif は効率的な小胞体からの搬出に寄与しているが、内腔側ジスルフィド結合によるダイマー形成がより重要であることが示された.

### 第 3 項 R/K-based motif による全長 M3-ST3GAL5 のゴルジ体繫留機構の解析

前項で、R/K-based motif の 3 カ所のアミノ酸に変異を導入すると、完全に小胞体からの搬出が抑制されることを示した (Fig. 41A, Fig. 42A). 興味深いことに、全長 mM3-ST3GAL5-R2A/R3A をレンチウイルスで発現させた CHO-K1 細胞において、ゴルジ体だけでなく、細胞質領域にドット状の局在が観察された (Fig. 44A, Fig. 45). これらのドットは Rab5 (初期エンドソームのマーカータンパク質)、Rab7 (後期エンドソームのマーカータンパク質) と一部が共局在していた. ゴルジ体に発現が確認された細胞において、Rab5 と共局在を示す細胞の割合は、mM3-ST3GAL5 の約 20% に対し、mM3-ST3GAL5-R2A/R3A は 100% とほぼ全ての細胞で確認された (Fig. 44B). 以上の結果は、mM3-ST3GAL5-R2A/R3A はゴルジ体から初期エンドソーム、および後期エンドソームへ輸送されたことを示している.

<sup>2</sup>R<sup>3</sup>R を K に置換した変異体 (mM3-ST3GAL5-R2K/R3K) を発現させた細胞においても、エンドソームへの輸送は R2A/R3A と同様の結果となった. このことから、ゴルジ体への繫留において、2 番目と 3 番目のアミノ酸は R が重要であることが示唆された. さらに、mM3-ST3GAL5-R2A, -R3A, -K9A/K13A を発現させた場合も、ゴルジ体、初期エンドソーム、後期エンドソームの局在が観察され、ゴルジ体から初期エンドソームへ輸送される細胞の割合は mM3-ST3GAL5 の 2~4 倍となった (Fig. 44, Fig. 45). 以上のことから、全長 mM3-ST3GAL5 において R/K-based motif はゴルジ体繫留に重要な機能を持つことが示唆された.

#### 第4項 R/K-based motifがM3-ST3GAL5の糖鎖成熟と酵素安定性にもたらす影響の解析

mST3GAL5は内腔側にN結合型糖鎖をもつ糖タンパク質である[34]。M3-ST3GAL5のもつ糖鎖の大部分は成熟が進んだ複合型糖鎖であり、ハイマンノース型糖鎖のみを切断する酵素(Endo H)耐性を示す。一方、M2-ST3GAL5は、ゴルジ体に輸送された後、速やかにライソソームに運ばれ分解を受ける。このため、M3-ST3GAL5と比較して*in vivo*での酵素安定性は低く、糖鎖修飾も未熟で複合型糖鎖の割合は少ない[35]。このことから、ゴルジ体からエンドソームへ運ばれるR/K-based motifに変異を導入したM3-ST3GAL5において、N結合型糖鎖の構造変化が生じると予測し解析を行った。

M3-ST3GAL5、およびM3-ST3GAL5変異体(-R2A/R3A, -R2K/R3K, -R2A, -R3A, -K9A/K13A, -R2A/R3A/K9A, -R2A/R3A/K13A)をレンチウイルスを用いてCHO-K1細胞に安定発現させ、膜タンパク質画分を回収し、N結合型糖鎖を全て切断するPNGase F、およびハイマンノース型糖鎖を切断するEndo Hで糖鎖を切断後、抗ST3GAL5抗体でウェスタンブロッティングを行った(Fig. 46, Fig. 47)。糖鎖切断未処理のM3-ST3GAL5は43 kDaと44.5-48 kDaのバンドが検出される。これらの分子量のバンドはEndo H処理で36-43 kDaの帯状のバンドに、PNGase F処理で全てのバンドが36 kDaにシフトする。これらの結果は、M3-ST3GAL5の大部分が成熟したN結合型糖鎖をもつことを示している。これに対し、M3-ST3GAL5-R2A/R3A変異体では、糖鎖切断未処理で43 kDaのバンドが増加し、44.5-48 kDaのバンドは顕著に減少している。また、Endo H処理において大部分が36 kDaにシフトすることから、M3-ST3GAL5-R2A/R3A変異体では未成熟なN結合型糖鎖であるハイマンノース型を多くもつことが示された。同様に、エンドソームへ運ばれるその他の変異体(M3-ST3GAL5-R2K/R3K, -R2A, -R3A, -K9A/K13A)もM3-ST3GAL5と比較してEndo H耐性のバンドが減少していることが確認された。また、小胞体への局在が観察された変異体M3-ST3GAL5-R2A/R3A/K9A, -R2A/R3A/K13Aにおいて、全ての糖鎖がEndo Hで切断されたことから、成熟したN結合型糖鎖をもたないことが示された。これらは、M3-ST3GAL5-R2A/R3A/K9A, -R2A/R3A/K13A変異体で小胞体

からの搬出が抑制されるという結果を支持している。

次に、ゴルジ体繫留の抑制による ST3GAL5 の酵素安定性に関わる影響を精査した。M3-ST3GAL5, および M3-ST3GAL5 変異体 (-R2A/R3A, -R2K/R3K, -K9A/K13A) をレンチウイルスで発現させた CHO-K1 細胞に、タンパク質合成阻害剤 (cycloheximide: CHX) を 3 時間処理した。CHX 処理後、膜タンパク質画分を回収し、PNGase F で糖鎖を切断後、抗 ST3GAL5 抗体でウエスタンブロッティングを行った (Fig. 48)。M3-ST3GAL5 は CHX 処理後も明瞭なバンドが検出され、以前の我々の報告と同様の結果を示した[35]。一方、M3-ST3GAL5-R2K/R3K, -K9A/K13A で CHX 後の減少が見られ、-R2A/R3A ではほぼ全てが消失した。M3-ST3GAL5, および M3-ST3GAL5 各変異体の酵素安定性と N 結合型糖鎖の成熟度には相関が見られた。

以上のことから、R/K-based motif は、M3-ST3GAL5 のゴルジ体繫留機構、N 結合型糖鎖の成熟、酵素の安定性に影響を与えることが示唆された。

### 第3節 考察

本章では、ゴルジ体におけるガングリオシド合成機構の解明を目的として、ST3GAL5 および B4GALNT1 の細胞内動態、特に小胞体搬出機構とゴルジ体繫留機構に焦点を当てた解析結果を報告した (Fig. 49).

これまでに、ガングリオシド合成酵素の細胞内輸送機構の解明のため、様々な解析が行われている。その一つとして、小胞体からの搬出機構が取り上げられており、細胞質領域の N 末端に存在する [R/K](X)[R/K] 配列が小胞体搬出シグナルとして機能することが報告されている [39]。確かに、ST3GAL5 の [R/K](X)[R/K] 配列に変異を導入した M3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A 一過性発現系において、小胞体搬出は抑制された (Fig. 34B, 35)。しかしながら、M3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A を安定に発現させると、その多くがゴルジ体局在を示した (Fig. 37A, Fig. 38)。これらのことから、小胞体からの搬出シグナルとして機能するためには、[R/K](X)[R/K] 配列だけでは不十分であることが示唆された。小胞体搬出に関与するアミノ酸残基の探索の結果 (Fig. 3A),  $^2R^3R$  配列の下流に位置する 2 つの K ( $^9K$ ,  $^{13}K$ ) を含む変異体 M3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/K9A, -R2A/R3A/K13A, -R2A/R3A/K9A/K13A で小胞体搬出の抑制が観察された (Fig. 39B, Fig. 40)。これらは、全長 M3-ST3GAL5 においても同様となった (Fig. 41A, Fig. 42A)。以上のことから、 $^2R^3R(X)_5^9K(X)_3^{13}K$  配列が新規の小胞体搬出シグナルとして機能することを見出し、「R/K-based motif」と名付けた。

B4GALNT1 においても、[R/K](X)[R/K] 配列に変異を導入した M2-B4GALNT1(N)-GFP-R5A/R6A の安定発現では小胞体からの搬出は止まらず、 $^5R^6R$  配列の上流に位置する  $^2R$  を含む変異体 M2-B4GALNT1(N)-GFP-R2A/R5A/R6A で小胞体搬出が抑制された (Fig. 34C, Fig. 36, Fig. 37B, Fig. 38B)。このことから、 $^2R(X)_2^5R^6R$  配列 (R/K-based motif) が小胞体搬出シグナルとして機能することが示された。しかしながら、R/K-based motif が全長でも同様に小胞体搬出シグナルとして機能した ST3GAL5 と異なり、全長 M2-B4GALNT1 は R/K-based motif に依存しない小胞体搬出が行われていた (Fig. 41B, Fig. 42B)。この結果は、小胞体搬出に B4GALNT1 の内腔側領域も関わることを示唆している。

M2-B4GALNT1 は内腔側  $^{80}\text{C}^{82}\text{C}$  のジスルフィド結合によりダイマーを形成しており、ダイマー形成を阻害する変異 (M2-B4GALNT1-C80S/C82S) を導入することで小胞体搬出が止まることが報告されている [58]. これは、ダイマー形成が機能的な B4GALNT1 の高次構造の形成に重要であり、C80S/C82S 変異体は異常構造と認識され COP II 小胞への濃縮が抑制されることが原因と予想される. このことから、正しくフォールディングされた B4GALNT1 の内腔側を認識する積荷受容体が存在し、それにより COP II 小胞に濃縮されることが示唆された.

小胞体で合成された糖転移酵素は、COP II 被覆小胞を構成するタンパク質複合体が低分子量 GTPase (Sar1) の制御を受けて小胞体膜状に集積する過程で、積荷タンパク質として小胞内に取り込まれることでゴルジ体へ運ばれる. 小胞体中に高濃度で存在する水溶性の不活性型 Sar1-GDP は、Sar1 特異的グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor : GEF) である Sec12 に結合し、GDP を放出して GTP と結合する. GTP 結合型となった活性型 Sar1-GTP は構造変化を生じ、露出した両親媒性のヘリックスが小胞体膜に挿入され結合する. 膜に固定された Sar1-GTP は小胞体膜上に Sec23/24 複合体をリクルートし、出芽前駆複合体を形成する. Sar1-GTP は Sec23 を介して Sec23/24 複合体と結合し、同時に Sec24 が積荷タンパク質と結合する. 積荷タンパク質のうち、膜タンパク質は細胞質にもつ小胞体搬出シグナル (DXE, FF 配列など) によって Sec24 と直接結合し、可溶性タンパク質は膜貫通型の積荷受容体との相互作用を介して結合する. Sec23/24 複合体を Sec13-Sec31 複合体 (Sec13/31) が架橋することで COP II 小胞の形成と積荷タンパク質の取り込みが進行する. Sec23 は Sar1-GTP に対する GTPase 活性化タンパク質 (GTPase-activating protein : GAP) であるため、出芽前駆複合体を形成すると Sar1-GTP は Sec23 によって加水分解され解離してしまう. 出芽前駆複合体は Sar1 が解離してもごく短時間保持されることと、解離した Sar1-GDP はすぐに Sec12 によって再活性化され、再び小胞形成に参加すること、これが繰り返されることで積荷タンパク質を小胞内に保持すると考えられる [67]. Sar1 が解離した出芽前駆複合体は小胞体膜上への結合が不安定なため、積み込みに不適切な積荷タンパク質が含まれた場合は Sar1-GTP の再構

築前に Sec23/24 複合体が膜から解離する。これらのことから、Sar1 における GTP/GDP サイクルは、適切な積荷タンパク質 (Sec24 に結合するシグナル配列をもつ、積荷受容体と相互作用するなど) の選択システムとして機能しているといえる。ST3GAL5 の R/K-based motif が Sar1 とのみ相互作用する場合、Sar1-GTP が Sar1-GDP に変換され解離することで、ST3GAL5 は出芽前駆複合体から解離してしまう。そのため、ST3GAL5 が出芽前駆複合体に濃縮するためには Sar1 以外の相互作用するパートナー (積荷受容体) が必要である。すなわち、ST3GAL5 の R/K-based motif は Sar1 と相互作用することによって出芽前駆複合体へガイドされ、出芽前駆複合体の別の積荷タンパク質、または積荷受容体に受け渡されることで COP II 小胞に効率的に取り込まれるのではないだろうか。

糖転移酵素の内腔側に特徴的な構造として、触媒領域が挙げられる。ST3GAL5 は内腔側に比較的大きな触媒領域をもつ。しかし、この触媒領域が小胞体搬出やゴルジ体繫留時に他タンパク質と相互作用をすることは考え難い。なぜなら、触媒領域は糖転移酵素の基質特異性に関わるため、その構造は多様であり、ゴルジ体に局在する約 170 種類の糖転移酵素の一つ一つに特異的に対応する相互作用分子が用意されることは難しいと予想されるからである。ある程度糖転移酵素間に共通した構造を認識すると仮定すると、その候補として糖鎖修飾が挙げられる。糖転移酵素の多くは内腔側に N 結合型糖鎖をもつ糖タンパク質である。この糖鎖が積荷受容体と相互作用することで小胞体に組込まれるならば、少ない積荷受容体の種類で機能するのではないだろうか。実際、M3-ST3GAL5 の N 結合糖鎖付加部位 (<sup>180</sup>N, <sup>224</sup>N, <sup>334</sup>N) をグルタミン (Q) に置換した変異体において、M3-ST3GAL5-N224Q, -N334Q がゴルジ体に局在するのに対し M3-ST3GAL5-N180Q は小胞体とゴルジ体の両方に局在する (Fig. 50)。しかしながら、M3-ST3GAL5 がもつ 3 カ所の糖鎖は全て酵素活性に必須であり、糖鎖が無くては立体構造が維持されず GM3 合成活性が著しく低下する[34]。そのため、N180Q 変異体において小胞体からの搬出が抑制された原因が、純粋に糖鎖の有無による影響のみを反映しているとは言えない。一方、*in vitro* で酵素活性が維持される、糖鎖機能を代替するアミノ酸配列置換が存在することが報告されている[34]。代替アミノ酸配列に置換した H177D/N180S 変異体において、酵素活性の改善が見

られ、局在もゴルジ体と細胞質領域のドットにシフトした。細胞質領域のドットは、COP II 小胞の形成の場である ERES マーカータンパク質 Sec31-GFP と共局在しない (Fig. 50)。この局在がどのオルガネラであるかは更なる検討が必要であるが、培地中への分泌量が野生型 M3-ST3GAL5 と比較して M3-ST3GAL5-N180Q で 20%だったのに対し、M3-ST3GAL5-H177D/N180S は 50%と増加していることから [34]、M3-ST3GAL5 内腔側の構造が小胞体からの搬出に関わることを示している。

ゴルジ体に輸送された M3-ST3GAL5-R2A/R3A 変異体はゴルジ体に繫留されずエンドソームに局在するものが増加し、分解が亢進した。また K9A/K13A 変異体においても同様の結果を示した。M3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A、K9A/K13A 変異体はエンドソームの局在は見られず、M3-ST3GAL5(N)-GFP と類似した局在を示した。このことから、R/K-based motif のゴルジ体繫留機能は全長 M3-ST3GAL5 に限定される、すなわち、R/K-based motif は内腔側と協調して ST3GAL5 をゴルジ体に繫留していることがわかる。また、M2-ST3GAL5 や M1-ST3GAL5-R11S/R12S 変異体（小胞体局在のためのゴルジ体から小胞体への逆行輸送シグナルに変異を導入した変異体）が速やかにライソソームで分解される [35] ことから、全長 M3-ST3GAL5 のみで安定したゴルジ体繫留が行われていると考えられる。ゴルジ体におけるタンパク質の輸送機構は未だ不明な点が多いが、ゴルジ体の構造 (cis, medial, trans) はゴルジ体の酵素によって特徴付けられ、特定のゴルジ体常在タンパク質の獲得と消失を繰り返す動的構造であると説明されている。この槽成熟モデルによれば、小胞体から供給された小胞によって新しい cis 槽が絶え間なく形成され、徐々に成熟して medial 槽に、次いで trans 槽に成熟する。ゴルジ体酵素の特徴的な分布は COP I 被覆小胞によるゴルジ体間の逆行輸送によるとされる。すなわち、積荷タンパク質は動的な同一槽に留まり、修飾を受け持つ常在タンパク質が輸送されることで積荷タンパクの成熟が進む。哺乳動物におけるゴルジ体間逆行輸送がどのような機構によって行われているかはいまだ詳細はわかっていないが、ゴルジ体常在酵素が COP I 被覆小胞のゴルジ体間逆行輸送されることにより働く場に繫留される可能性は高い。近年、出芽酵母の糖転移酵素におけるゴルジ体局在を制御する新たなタンパク質として Vps74 が報告されており、糖転

移酵素の細胞質側の N 末端に存在する[F/L][L/I/W]XX[R/K]配列と Vps74 の結合が糖転移酵素の COP I 小胞への積み込みに関与することが示唆されている[68,69].

M3-ST3GAL5 と M3-ST3GAL5-R/K-based motif 変異体において、ゴルジ体繫留による酵素安定性に比例して糖鎖成熟度が変化することも注目になる (Fig. 46, Fig. 48). この結果は ST3GAL5 の逆行輸送が N 結合型糖鎖の成熟に関わると示唆している. つまり, 1 回のゴルジ体通過では糖転移酵素による糖鎖修飾は時間・空間的に不十分で, 複数回ゴルジ体を通過する必要がある. 糖転移酵素のゴルジ体繫留時間が N 結合型糖鎖の成熟度に影響を与えることはこれまでに報告がない. このメカニズムは ST3GAL5 のみではなく, 糖タンパク質全体にも適用される可能性から, 糖鎖修飾の根本に関わる重要な課題である. 今後, M3-ST3GAL5 と M3-ST3GAL5-R/K-based motif 変異体の糖鎖構造をより詳細に解析することで, 糖タンパク質のゴルジ体繫留機構解明の手がかりとなるだろう.

本章では ST3GAL5 における小胞体搬出機構, ゴルジ体繫留機構の両方で R/K-based motif は重要な機能をもつことを示すとともに, 輸送における内腔側領域の重要性も示唆した. 内腔側のどの領域部分が重要であるか, 小胞体搬出やゴルジ体繫留に関わる他の分子とどのような相互作用が行われているか, その一連の制御機構の解明は今後の課題である.



#### 第4節 材料と方法

##### 実験試薬・実験材料

Lipofectamine 2000 Regent : Invitrogen

Ham's F-12 : Wako

poly-L-lysine : SIGMA

DMEM (4.5g/l Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid : Nacalai Tesque

Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (HAM/D-MEM) :  
SIGMA

Penicillin-streptomycin mixed Solution Stabilized : Nacalai Tesque

Fetal Bovine Serum (FBS) : Biosera

CELLBANKER 1 : 日本全薬工業

Forskolin : SIGMA

cOmplete, EDTA-free protease inhibitor cocktail : Roche Diagnostics

Peptide: N-glycosidase F (PNGase F) : New England Biolabs

Endoglycosidase H (Endo H) : New England Biolabs

Pierce BCA protein assay kit : Thermo Fisher Scientific

pGEM-T Easy Vector : Promega

pENTR/D-TOPO vector : Life Technologies

CSII-CMV-RfA : Life Technologies

Gateway LR Clonase enzyme mix II : Invitrogen

Prestained XL-Ladder : APRO

PVDF 膜 : MILLIPORE

Amersham™ ECL Select Western Blotting detection Reagents : GE Healthcare

Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 : TOYOBO

Image it Fx signal enhancer : Invitrogen

MagExtractor-PCR&Gel Clean up kit : TOYOBO

cycloheximide : SIGMA

ProLong Gold antifade reagent : Thermo Fisher

CellLight Early Endosomes-GFP BacMan2.0 reagent : Thermo Fisher Scientific

## 抗体

・ ウェスタンブロッティング用一次抗体

抗 ST3GAL5 抗体(C-term)

抗 $\beta$ -actin 抗体 : SIGMA

・ ウェスタンブロッティング用二次抗体

抗 rabbit IgG HRP 抗体 : GE Healthcare

抗 mouse IgG HRP 抗体 : GE Healthcare

・ 間接蛍光抗体法用一次抗体

抗 ST3GAL5 抗体(9129)

抗 B4GALNT1 抗体(9535\_Ex\_ProteinA)

抗 GFP 抗体 : Aves Labs

抗 KDEL 抗体 : StressGen Bioreagents

抗 GM130 抗体 : BD Bioscience

抗 Rab7 抗体(Rab7-117) : SIGMA

・ 間接蛍光抗体法用二次抗体

抗 mouse IgG Alexa 594 抗体(Alexa Fluor 594) : Invitrogen

抗 rabbit IgG Alexa 488 抗体(Alexa Fluor 488) : Invitrogen

抗 chicken IgY Alexa 488 抗体 (Alexa Fluor 488) : Jackson ImmunoResearch

Laboratories

## Plasmids

本章で使用了したプラスミド一覧

Plasmid name	Inserted ORF	Vector
pSU157	M3-ST3GAL5(N)-GFP	pEGFP-N1
pKM81	M3-ST3GAL5(N)-GFP R2A/R3A	pEGFP-N1
pKM9	B4GALNT1(N)-GFP	pEGFP-N1
pKM123	B4GALNT1(N)-GFP R5A/R6A	pEGFP-N1
pKM184	B4GALNT1(N)-GFP R2A	pEGFP-N1
pKM137	B4GALNT1(N)-GFP R2A/R5A/R6A	pEGFP-N1
pKM150	M3-ST3GAL5(N)-GFP	CSII-CMV-RfA
pKM129	M3-ST3GAL5(N)-GFP R2A/R3A	CSII-CMV-RfA
pFS415	M3-ST3GAL5(N)-GFP R2A/R3A/P4A/S5A	CSII-CMV-RfA
pFS416	M3-ST3GAL5(N)-GFP R2A/R3A/L6A/L7A	CSII-CMV-RfA
pFS417	M3-ST3GAL5(N)-GFP R2A/R3A/I8A/K9A	CSII-CMV-RfA
pFS418	M3-ST3GAL5(N)-GFP R2A/R3A/D10A/I11A	CSII-CMV-RfA
pFS419	M3-ST3GAL5(N)-GFP R2A/R3A/C12A/K13A	CSII-CMV-RfA
pFS440	M3-ST3GAL5(N)-GFP R2A/R3A/K9A	CSII-CMV-RfA
pFS441	M3-ST3GAL5(N)-GFP R2A/R3A/K13A	CSII-CMV-RfA
pFS442	M3-ST3GAL5(N)-GFP R2A/R3A/K9A/K13A	CSII-CMV-RfA
pFS487	M3-ST3GAL5(N)-GFP K9A/K13A	CSII-CMV-RfA
pKM155	B4GALNT1(N)-GFP	CSII-CMV-RfA
pKM149	B4GALNT1(N)-GFP R2A/R5A/R6A	CSII-CMV-RfA
pFS311	M3-ST3GAL5	CSII-CMV-RfA
pFS520	M3-ST3GAL5 R2A/R3A/K9A	CSII-CMV-RfA
pFS521	M3-ST3GAL5 R2A/R3A/K13A	CSII-CMV-RfA
pKM121	M3-ST3GAL5 R2A/R3A	CSII-CMV-RfA
pFS495	M3-ST3GAL5 R2K/R3K	CSII-CMV-RfA
pFS522	M3-ST3GAL5 R2A	CSII-CMV-RfA
pFS523	M3-ST3GAL5 R3A	CSII-CMV-RfA
pFS519	M3-ST3GAL5 K9A/K13A	CSII-CMV-RfA
pKM91	B4GALNT1	CSII-CMV-RfA
pKM148	B4GALNT1 R2A/R5A/R6A	CSII-CMV-RfA
pFS486	B4GALNT1 C80S/C82S	CSII-CMV-RfA

上記一覧のプラスミドの作製手順を以下に示す。クローニング操作はそれぞれ標準的なプロトコルに準じて行った。

- ・ pGEM-T Easy vector へのクローニング (pcDNA3 vector への組み込み用)

M3-ST3GAL5/pcDNA3.1zeo(+)を鋳型とし、2段階 PCR 法で R/K-based motif に変異を導入した。まず、primary PCR として primer-F1/R1, primerF2/R2 でそれぞれ増幅した。精製した PCR 産物を混合して鋳型とし、primerF1/R2 で secondary PCR を行った。上述の方法で pGEM-T Easy vector に組込んだ。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pKA 17	M3-ST3GAL5/pcDNA3.1zeo(+)	mM3-ST3GAL5-R2/3A	F1 : 5'- CCCCTATTGACGTCAATGACGG -3' R1 : 5'- GCCGCCACCATGGCAGCACCCAGCTTGTTA -3' F2 : 5'- TAACAAGCTGGGTGCTGCCATGGTGGCGGC 3' R2 : 5'- CAGCGGCGGCATCCACTGAGGATCC 3'

- ・ pcDNA3 vector へのクローニング

pKA17 を制限酵素 BamHI で処理し、得られたフラグメントを同様に BamHI で処理した pcDNA3.1zeo(+) vector に組み込み pKA18 とした。

Plasmid	鋳型	ORF
pKA 18	pKA 17	mM3-ST3GAL5-R2/3A
pKM 23	pKM 3	mM2-B4GALNT1

mM2-B4GALNT1-GFP 変異導入プラスミドは、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いて作製した。ターゲット領域を導入したプラスミドを鋳型とし、PCR で点変異を導入した。得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pKM 137	pKM 23	mM2-B4GALNT1-R5/6A	5'- AGACGCTGCTGCCCTCTATGCGCTAGTC -3' 5'- AGGGCAGCAGCGTCTAGCCGCATGGTGGC -3'

- ・ pGEM-T Easy vector へのクローニング (pEGFP-N1 vector への組み込み用)

M3-ST3GAL5/pcDNA3.1zeo(+), pKA18 を鋳型とし, 内腔側配列を含まない配列を増幅するプライマーを用いて PCR を行い, 第 1 章第 4 節「pGEM-T Easy vector へのクローニング」と同様の方法で pGEM-T Easy vector に組み込み, pSU151 とした.

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pSU 151	M3-ST3GAL5/pcDNA3.1 Zeo(+)	mM3-ST3GAL5(N)	5'- CCCCTATTGACGTCAATGACGG -3' 5'- CCCGGGCAGGGTCCACATAGTGCATTC -3'
pKM 78	pKA 18	mM3-ST3GAL5(N)-R2/3A	5'- CCCCTATTGACGTCAATGACGG -3' 5'- CCCGGGCAGGGTCCACATAGTGCATTC -3'

・ pEGFP-N1 vector へのクローニング

mM3-ST3GAL5(N)-GFP, mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2/3A は, pSU151 を制限酵素 EcoRI, SmaI で処理して得られた各フラグメントを, 同様に EcoRI, SmaI で処理した pEGFP-N1 vector に組み込み作製した. mM2-B4GALNT1(N)-GFP は第 2 章第 4 節「Plasmids」の pKM9 を用いた.

Plasmid	鋳型	ORF
pSU 157	pSU 151	mM3-ST3GAL5(N)-GFP
pKM 81	pKM 78	mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2/3A
pKM 9	pKM 7	mM2-B4GALNT1(N)-GFP

その他の mM3-ST3GAL5(N)-GFP と mM2-B4GALNT1(N)-GFP 変異導入プラスミドは, PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いて作製した. ターゲット領域を導入したプラスミドを鋳型とし, PCR で点変異を導入した. 得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した.

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 393	pKM 81	mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/P4A/S5A	5'- AGCAGCCGCATTGTTAATAAAAAGACATC -3' 5'- AACAATGCGGCTGCTGCCATGGTGGCGGC -3'
pFS 394	pKM 81	mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/L6A/L7A	5'- CAGCGCAGCCATAAAAAGACATCTGCAAG-3' 5'- TTTATGGCTGCGCTGGGTGCTGCCATGGT-3'

pFS 395	pKM 81	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/I8A/K9A	5'- TGTTAGCCGCAGACATCTGCAAGTGCACG-3' 5'- TGTCTGCGGCTAACAAGCTGGGTGCTGC-3'
pFS 396	pKM 81	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/D10A/I11A	5'- AAAAGCAGCCTGCAAGTGCACGTTGGT-3' 5'- TTGCAGGCTGCTTTTATTAACAAGCTGG-3'
pFS 397	pKM 81	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/C12A/K13A	5'- ACATCGCAGCCTGCACGTTGGTTGCATTT-3' 5'- TGCAGGCTGCGATGTCTTTTATTAACAA-3'
pKM 184	pKM 9	mM2-B4GALNT1(N) -GFP-R2A	5'- ACCATGGCTCTAGACCGCCGGGCCCTC -3' 5'- GTCTAGAGCCATGGTGGCGGATC -3'
pKM 123	pKM 9	mM2-B4GALNT1(N) -GFP-R5/6A	5'- AGACGCTGCTGCCCTCTATGCGCTAGTC -3' 5'- AGGGCAGCAGCGTCTAGCCGCATGGTGGC -3'
pKM 137	pKM 123	mM2-B4GALNT1(N) -GFP-R2/5/6A	5'- ACCATGGCTCTAGACGCTGCTGCCCTC -3' 5'- GTCTAGAGCCATGGTGGCGGATCCGAG -3'

・ pENTR-D TOPO vector へのクローニング

pGEM-T easy vector, または pcDNA3 vector にクローニングしたプラスミドを鋳型とし, PCR で目的配列を増幅した. アガロースゲル電気泳動で分離・精製後, pENTR-D TOPO vector に topo cloning で組込んだ. 得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した.

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pKM 144	pSU 157	mM3-ST3GAL5(N)- GFP	5'- CACCATGAGAAGACCCAGCTTGTTAATAAAAA GA -3' 5'- GGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGC -3'
pKM 107	pKM 81	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A	5'- CACCATGGCAGCACCCAGCTTGTTAATAAAAA G -3' 5'- GGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGC -3'
pFS 406	pFS 393	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/P4A/S5A	5'- CACCATGGCAGCAGCCGCATTG -3' 5'- GGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGC -3'
pFS 407	pFS 394	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/L6A/L7A	5'- CACCATGGCAGCACCCAGCGC -3' 5'- GGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGC -3'
pFS 408	pFS 395	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/I8A/K9A	5'- CACCATGGCAGCACCCAGCTTG -3' 5'- GGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGC -3'

pFS 409	pFS 396	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/D10A/I11A	5'- CACCATGGCAGCACCCAGCTTG -3' 5'- GGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGC -3'
pFS 410	pFS 397	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/C12A/K13A	5'- CACCATGGCAGCACCCAGCTTG -3' 5'- GGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGC -3'
pKM 152	pKM 9	mM2-B4GALNT1(N)- GFP	5'- CACCATGCGGCTAGACCGCCGGG -3' 5'- GGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGC -3'
pKM 143	pKM 137	mM2-B4GALNT1(N)- GFP -R2A/R5A/R6A	5'- CACCATGGCTCTAGACGCTGCTGCCC -3' 5'- GGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGC -3'
pSU 212	M3- ST3GAL 5/ pcDNA3. 1zeo(+)	mM3-ST3GAL5	5'- CACCATGAGAAGACCCAGCTTGTTAATAAAAA GA -3' 5'- GGATCCTCAGTGGATGCCGCCGCTG -3'
pKM 106	pKA 18	mM3-ST3GAL5 - R2A/R3A	5'- CACCATGGCAGCACCCAGCTTGTTAATAAAAA G -3' 5'- GGATCCTCAGTGGATGCCGCCGCTG -3'
pKM 89	pKM 1	mM2-B4GALNT1	5'- CACCATGCGGCTAGACCGCCGGG -3' 5'- GGATCCTCACTCGGCGGTCATGCACTG -3'
pKM 142	pKM 136	mM2-B4GALNT1 - R2A/R5A/R6A	5'- CACCATGGCTCTAGACGCTGCTGCCC -3' 5'- GGATCCTCACTCGGCGGTCATGCACTG -3'
pFS 588	pSZ 8 [34]	mM3-ST3GAL5 - N180Q	5'- CACCATGAGAAGACCCAGCTTGTTAATAAAAA GA -3' 5'- TTCAGTGGATGCCGCCGCTGAGGTCCTC -3'
pFS 589	pSZ 9 [34]	mM3-ST3GAL5 - N224Q	5'- CACCATGAGAAGACCCAGCTTGTTAATAAAAA GA -3' 5'- TTCAGTGGATGCCGCCGCTGAGGTCCTC -3'
pFS 590	pSZ 10 [34]	mM3-ST3GAL5 - N334Q	5'- CACCATGAGAAGACCCAGCTTGTTAATAAAAA GA -3' 5'- TTCAGTGGATGCCGCCGCTGAGGTCCTC -3'
pFS 593	pSU 114 [34]	mM3-ST3GAL5 - H177D/N180S	5'- CACCATGAGAAGACCCAGCTTGTTAATAAAAA GA -3' 5'- TTCAGTGGATGCCGCCGCTGAGGTCCTC -3'

変異導入プラスミドの作成は、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いた。ターゲット領域を導入したプラスミドを鋳型とし、PCR で点変異を導入した。得られたクローンは DNA シーケンサと ORF 内に設定したプライマーを用いて配列を確認した。

Plasmid	鋳型	ORF	Primers
pFS 433	pKM 107	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/K9A	5'- GTTAATAGCAGACATCTGCAAGTGCAC -3' 5'- ATGTCTGCTATTAACAAGCTGGGTGC -3'
pFS 434	pKM 107	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/K13A	5'- ATCTGCGCCTGCACGTTGGTTGCATTT -3' 5'- CGTGCAGGCGCAGATGTCTTTTATTAA -3'
pFS 435	pKM 107	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -R2A/R3A/K9A/K13A	5'- GCAGACATCTGCGCCTGCACGTTGGTTGCATTT - 3' 5'- GGCGCAGATGTCTGCTATTAACAAGCTGGGTGC - 3'
pFS 481	pKM 144	mM3-ST3GAL5(N)- GFP -K9A/K13A	5'- GCAGACATCTGCGCCTGCACGTTGGTTGCATTT - 3' 5'- GGCGCAGATGTCTGCTATTAACAAGCTGGGTCT - 3'
pFS 494	pKM 106	mM3-ST3GAL5 -R2K/R3K	5'- CATGAAGAAACCCAGCTTGTTAATAAAA -3' 5'- TGGGTTTCTTCATGGTGAAGGGGGCGGC -3'
pFS 513	pKM 106	mM3-ST3GAL5 - R2A/R3A/K9A	5'- GTTAATAGCAGACATCTGCAAGTGCAC -3' 5'- ATGTCTGCTATTAACAAGCTGGGTGC -3'
pFS 514	pKM 106	mM3-ST3GAL5 - R2A/R3A/K13A	5'- ATCTGCGCCTGCACGTTGGTTGCATTT -3' 5'- CGTGCAGGCGCAGATGTCTTTTATTAA -3'
pFS 515	pSU 212	mM3-ST3GAL5 -R2A	5'- CACCATGGCAAGACCCAGCTTGTTAAT -3' 5'- GGTCTTGCCATGGTGAAGGGTGGGCG -3'
pFS 516	pSU 212	mM3-ST3GAL5 -R3A	5'- ATGAGAGCACCCAGCTTGTTAATAAA -3' 5'- GCTGGGTGCTCTCATGGTGAAGGGTGG -3'
pFS 512	pSU 212	mM3-ST3GAL5 - K9A/K13A	5'- GCAGACATCTGCGCCTGCACGTTGGTTGCATTT - 3' 5'- GGCGCAGATGTCTGCTATTAACAAGCTGGGTCT - 3'
pFS 480	pKM 89	mM2-B4GALNT1 - C80S/C82S	5'- AACAGCAGTTCTGAATCCAAGGGAGGAAG -3' 5'- TTCAGAACTGCTGTTGTTCTGAGCCAGCAG -3'

・ CSII-CMV-RfA vector へのクローニング

pENTR-D TOPO vector にクローニングしたプラスミドと CSII-CMV-RfA vector を混合し、LR clonase enzyme mix II を添加して LR 反応による組換えを行った。得られたクローンは制限酵素処理を行い、アガロースゲル電気泳動でバンドサイズを確認した。



ORF	pENTR-D TOPO	CSII-CMV-RfA
mM3-ST3GAL5(N)-GFP	pKM 144	pKM 150
mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A	pKM 107	pKM 129
mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/P4A/S5A	pFS 406	pFS 415
mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/L6A/L7A	pFS 407	pFS 416
mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/I8A/K9A	pFS 408	pFS 417
mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/D10A/I11A	pFS 409	pFS 418
mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/C12A/K13A	pFS 410	pFS 419
mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/K9A	pFS 433	pFS 440
mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/K13A	pFS 434	pFS 441
mM3-ST3GAL5(N)-GFP-R2A/R3A/K9A/K13A	pFS 435	pFS 442
mM3-ST3GAL5(N)-GFP-K9A/K13A	pFS 481	pFS 487
mM2-B4GALNT1(N)-GFP	pKM 152	pKM 155
mM2-B4GALNT1(N)-GFP-R2A/R5A/R6A	pKM 143	pKM 149
mM3-ST3GAL5	pSU 212	pFS 311
mM3-ST3GAL5 -R2A/R3A	pKM 106	pKM 121
mM3-ST3GAL5 -R2K/R3K	pFS 494	pFS 495
mM3-ST3GAL5 -R2A/R3A/K9A	pFS 513	pFS 520
mM3-ST3GAL5 -R2A/R3A/K13A	pFS 514	pFS 521
mM3-ST3GAL5 -R2A	pFS 515	pFS 522
mM3-ST3GAL5 -R3A	pFS 516	pFS 523
mM3-ST3GAL5 -K9A/K13A	pFS 512	pFS 519
mM2-B4GALNT1	pKM 89	pKM 91
mM2-B4GALNT1- R2A/R5A/R6A	pKM 142	pKM 148
mM2-B4GALNT1- C80S/C82S	pFS 480	pFS 486
mM3-ST3GAL5 -N180Q	pFS 588	pFS 594
mM3-ST3GAL5 -N224Q	pFS 589	pFS 595
mM3-ST3GAL5 -N334Q	pFS 590	pFS 596
mM3-ST3GAL5 -H177D/N180S	pFS 593	pFS 599
Sec31-GFP	pFS 556	pFS 562

## 細胞培養法

CHO-K1 細胞 : Ham's F-12

293T 細胞 : high-glucose DMEM

上記の培地に最終濃度 10% (v/v) FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/ mL streptomycin

で添加し基本培地とした。5% CO<sub>2</sub>, 37°C条件下において基本培地で培養した。

#### Lipofectamine 2000 による遺伝子導入（一過性発現株の作製）

第2章第4節の「Lipofectamine 2000 による遺伝子導入（一過性発現株の作製）」と同様に行った。

#### レンチウイルス調整法

第1章第4節の「レンチウイルス調整法」と同様に行った。

#### 間接蛍光抗体法による細胞内局在の観察

第1章第4節の「間接蛍光抗体法による細胞内局在の観察」と同様に行った。

初期エンドソームマーカータンパク質 Rab5-GFP は CellLight Early Endosomes-GFP BacMan2.0 reagent を用いて発現させ、抗 GFP 抗体で検出した。

#### SDS-PAGE 用膜画分試料の調整法

第1章第4節の「SDS-PAGE 用膜画分試料の調整法」と同様に行った。

糖鎖切断処理は Endo H または PNGase F を用いて 37°C で 60 分間インキュベートした。

#### SDS-PAGE

第1章第4節の「SDS-PAGE」と同様に行った。

#### ウエスタンブロッティング

第1章第4節の「ウエスタンブロッティング」と同様に行った。

#### Cycloheximide chase

CHO-K1 安定発現株 (ST3GAL5 WT, R2A/R3A, R2K/R3K, K9A/K13A) を Ham's F-12 基本培地に 50 µg/mL で cycloheximide を添加し、37°C で 3 時間処理を行った。コントロールとして cycloheximide 無添加も行った。前述に従い、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングを行った。

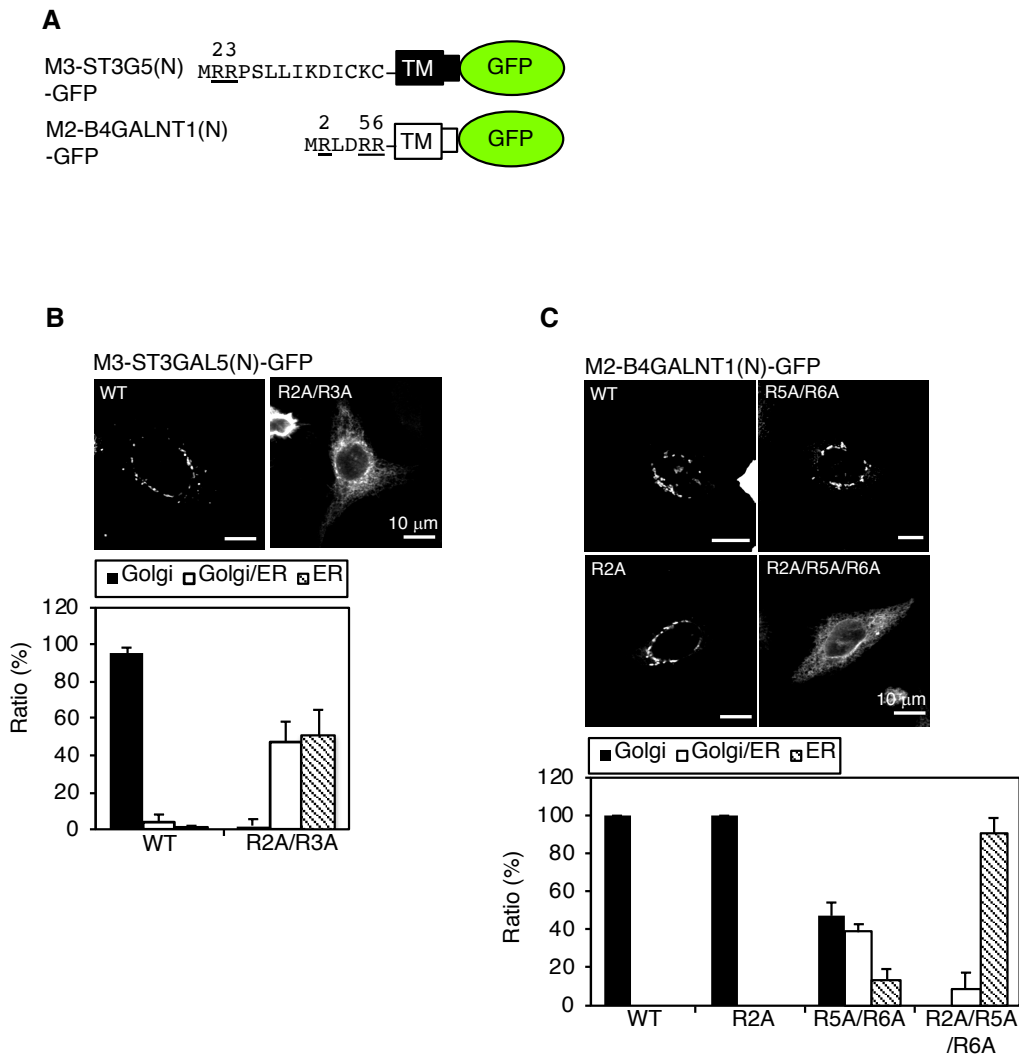


Figure 34. M3-ST3GAL5(N)-GFPとM2-B4GALNT1(N)-GFPの小胞体間搬出シグナルの解析(一過性発現)

(A) 小胞体搬出シグナルの解析に用いたGFP融合タンパク質作成用プラスミドの模式図。TM:膜貫通領域, R: [r/k](X)[R/K]配列

(B, C) CHO-K1細胞に一過性に発現させ、抗GFP抗体でmM3-ST3GAL5(N)-GFP (WT, 変異体), mM2-B4GALNT1(N)-GFP (WT, 変異体)の細胞内局在をそれぞれ定量した。局在パターンは3回以上の定量を行った。Bar: 10 μm.

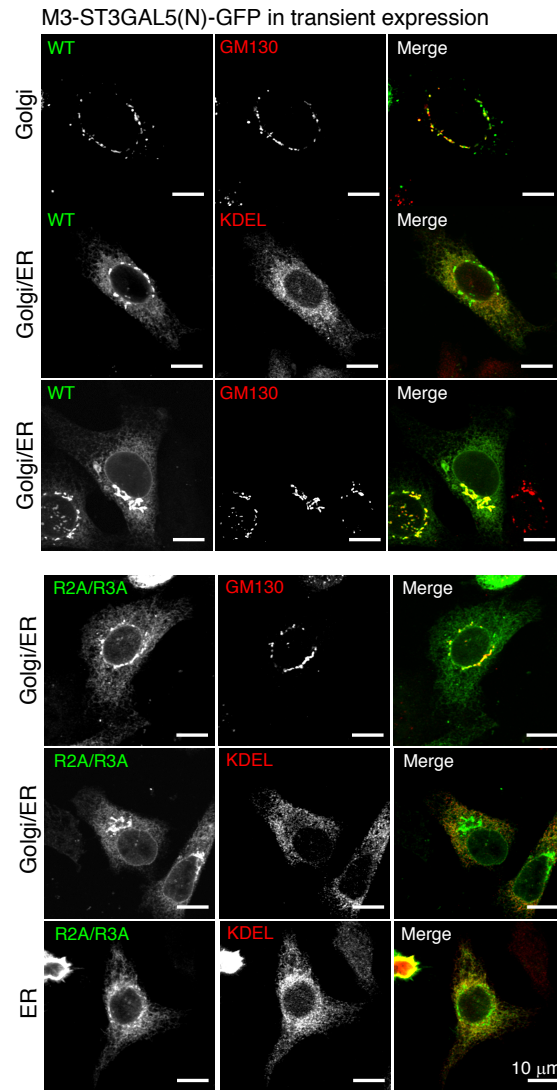


Figure 35. M3-ST3GAL5(N)-GFPの小胞体間搬出シグナルの解析

CHO-K1細胞に一過性に発現させ、抗GFP抗体でmM3-ST3GAL5(N)-GFP(WT, 変異体)の細胞内局在をそれぞれ観察した。Bar: 10 μm.

M2-B4GALNT1(N)-GFP in transient expression

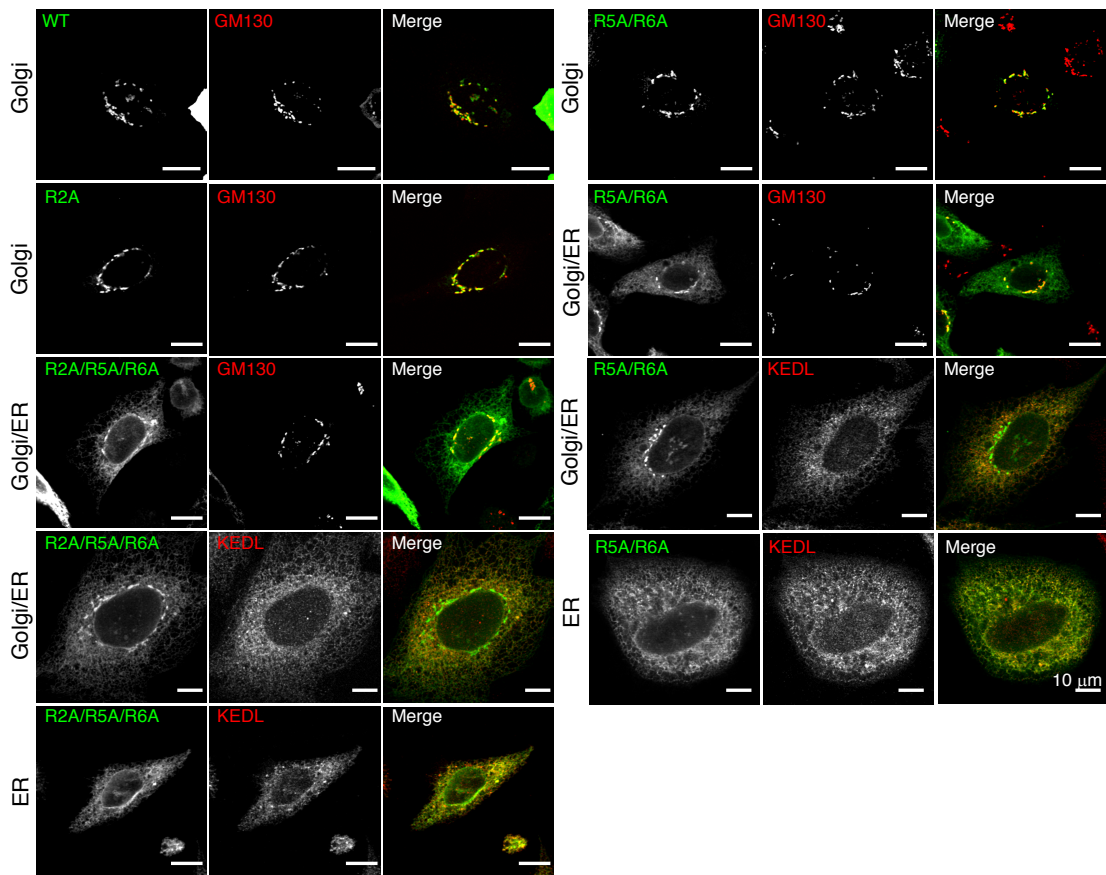


Figure 36. M2-B4GALNT1(N)-GFPの小胞体間搬出シグナルの解析

CHO-K1細胞に一過性に発現させ、抗GFP抗体でmM2-B4GALNT1(N)-GFP(WT, 変異体)の細胞内局在をそれぞれ観察した。Bar: 10 μm.

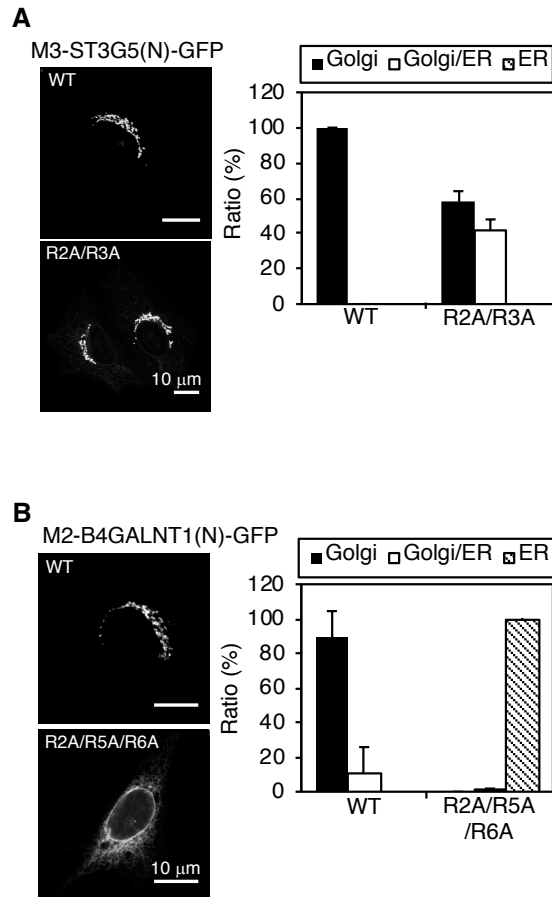


Figure 37 M3-ST3GAL5(N)-GFPとM2-B4GALNT1(N)-GFPの小胞体間搬出シグナルの解析(安定発現)

(A, B) CHO-K1細胞に安定発現させ, 抗GFP抗体でmM3-ST3GAL5(N)-GFP(WT, 変異体), mM2-B4GALNT1(N)-GFP(WT, 変異体)の細胞内局在をそれぞれ定量した. 局在パターンは3回以上の定量を行った. Bar: 10  $\mu$ m.

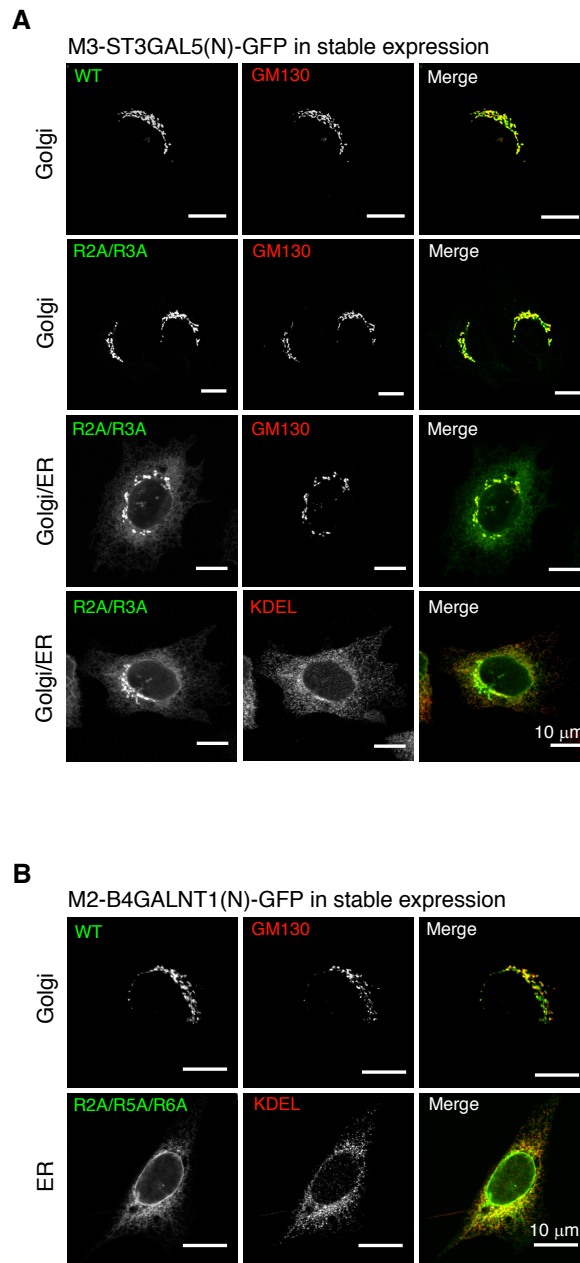


Figure 38. M3-ST3GAL5(N)-GFPとM2-B4GALNT1(N)-GFPの小胞体間搬出シグナルの解析(安定発現)

(A, B) CHO-K1細胞に安定発現させ、抗GFP抗体でmM3-ST3GAL5(N)-GFP(WT, 変異体), mM2-B4GALNT1(N)-GFP(WT, 変異体)の細胞内局在をそれぞれ観察した。Bar: 10  $\mu$ m.

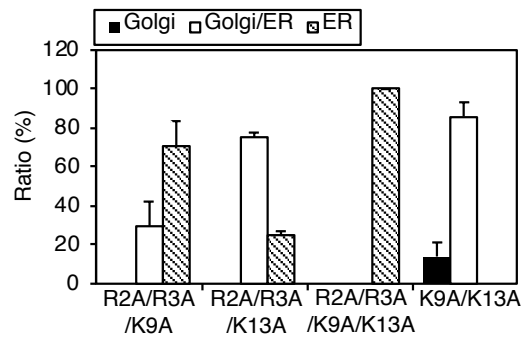
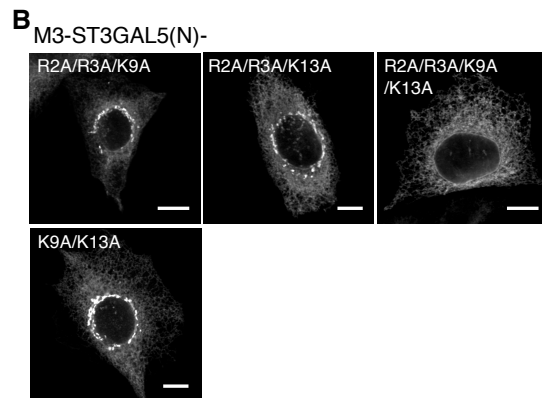
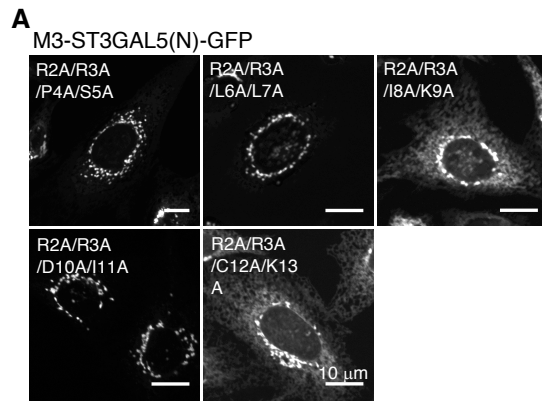


Figure 39. M3-ST3GAL5(N)-GFPの小胞体間搬出シグナルの解析 (安定発現)

(A, B) CHO-K1細胞に安定発現させ、抗GFP抗体でmM3-ST3GAL5(N)-GFP (WT, 変異体)の細胞内局在をそれぞれ観察した。局在パターンは3回以上の定量を行った。Bar: 10  $\mu$ m.



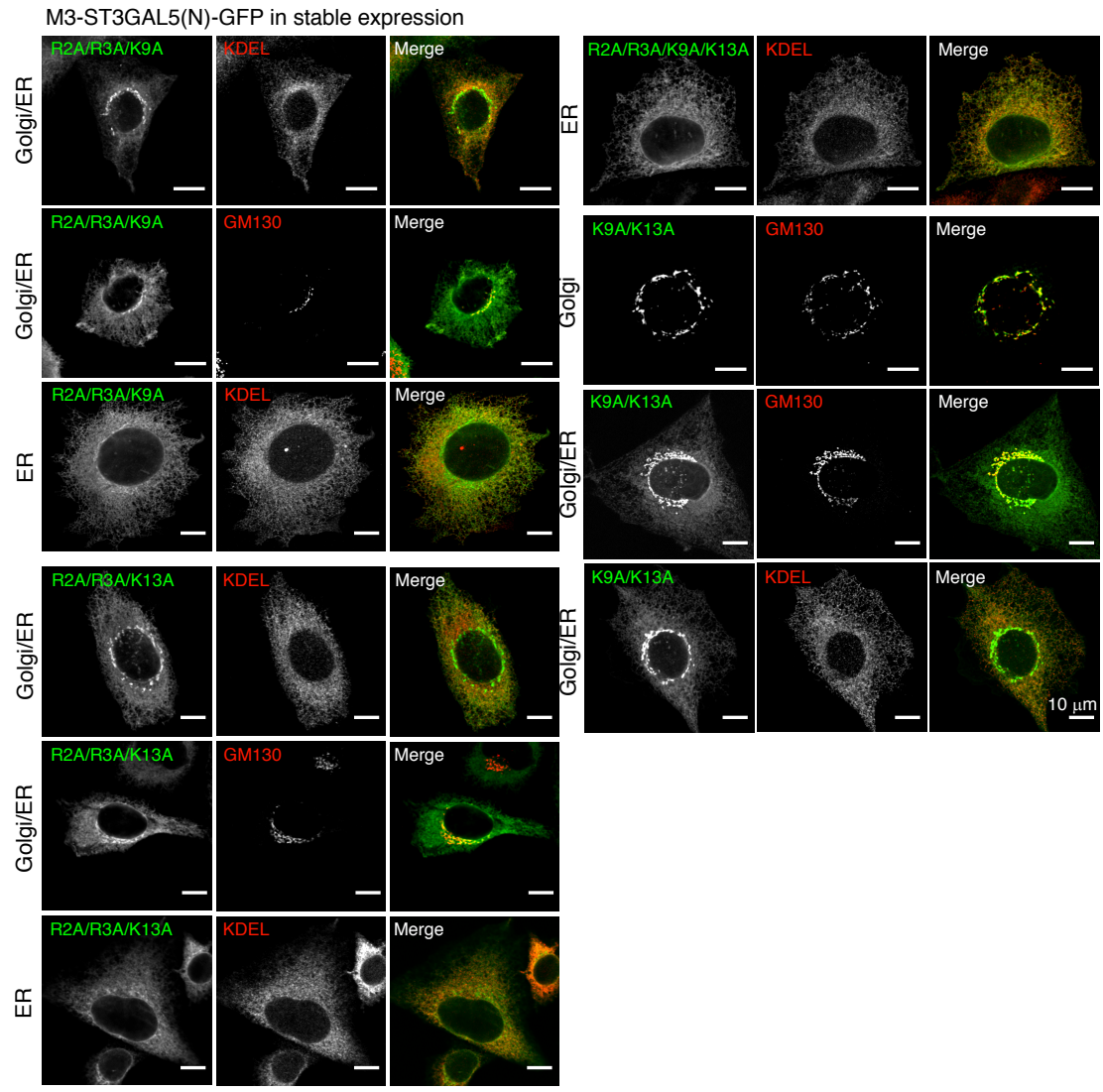


Figure 40. M3-ST3GAL5(N)-GFPの小胞体間搬出シグナルの解析 (安定発現)

CHO-K1細胞に安定発現させ、抗GFP抗体でmM3-ST3GAL5(N)-GFP (WT, 変異体)の細胞内局在をそれぞれ観察した。Bar: 10 μm.

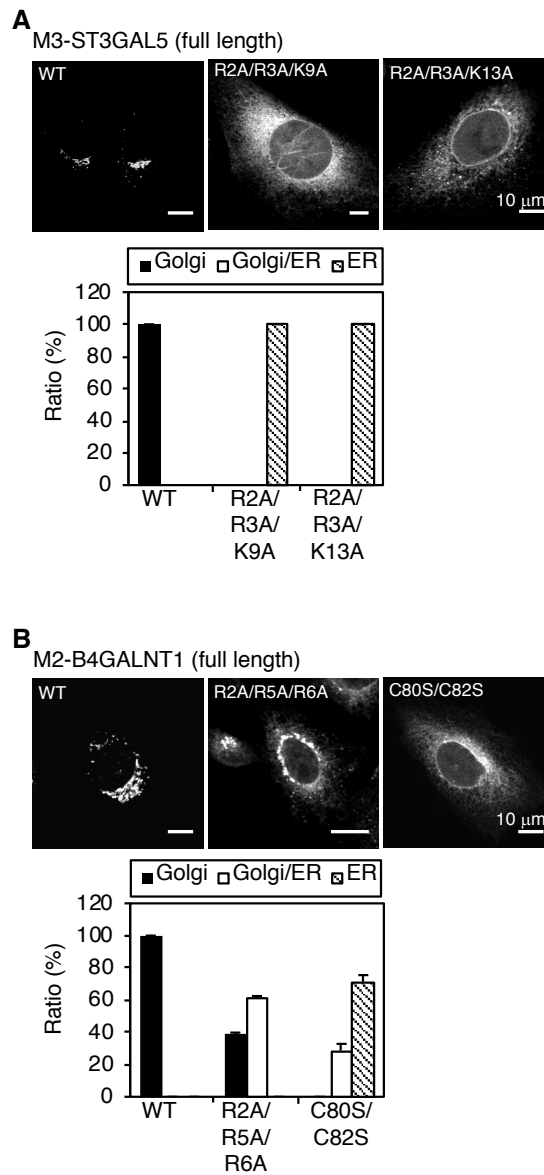


Figure 41. R/K-based motifによる全長M3-ST3GAL5, 全長M2-B4GALNT1の小胞体搬出シグナルの解析(1)

(A, B)CHO-K1細胞に安定発現させ, 抗ST3GAL5抗体又は抗B4GALNT1抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在をそれぞれ定量した. 局在パターンは3回以上の定量を行った. Bar: 10  $\mu$ m.

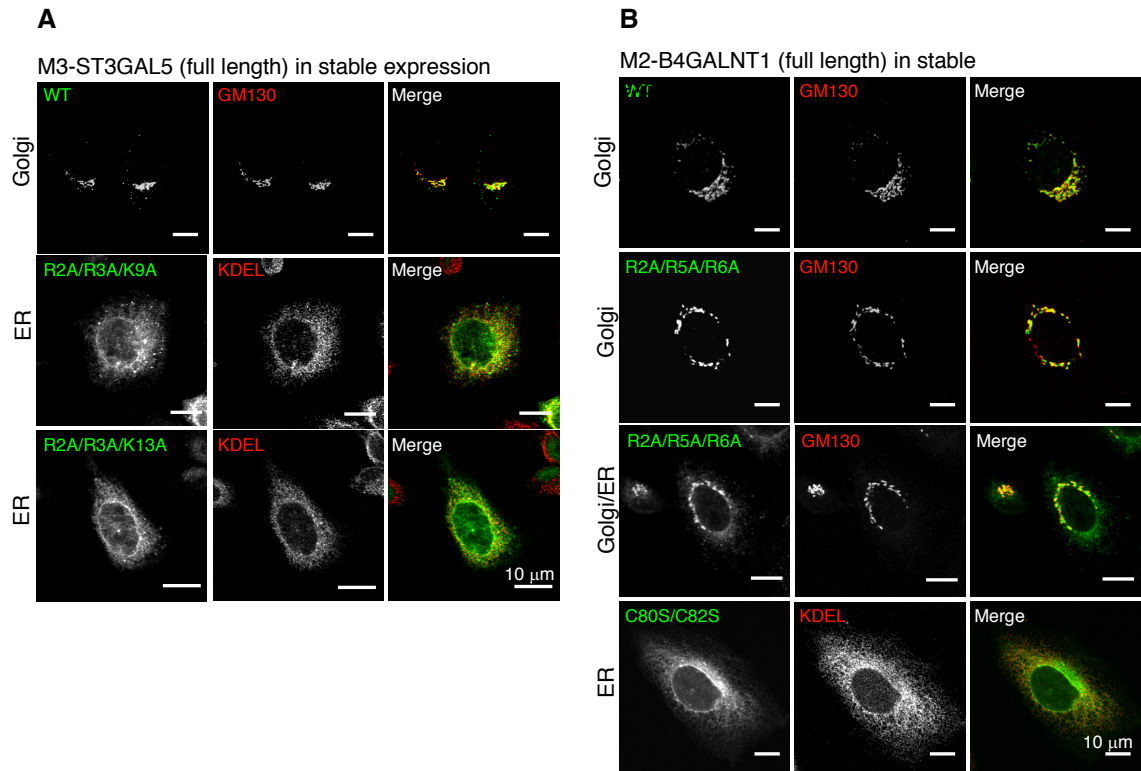


Figure 42. R/K-based motifによる全長M3-ST3GAL5, 全長M2-B4GALNT1の小胞体搬出シグナルの解析(2)

(A, B)CHO-K1細胞に安定発現させ、抗ST3GAL5抗体又は抗B4GALNT1抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在をそれぞれ観察した。Bar: 10 μm.

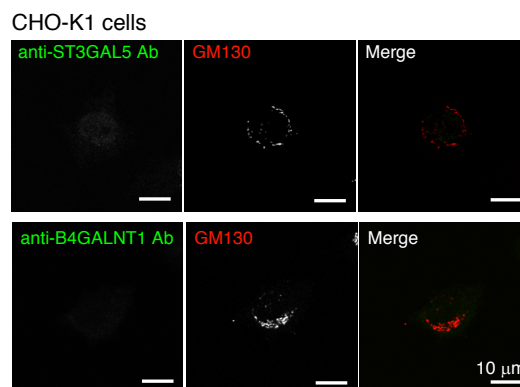


Figure 43. 内在性ST3GAL5およびB4GALNT1の観察

CHO-K1細胞の内在性ST3GAL5, およびB4GALNT1の観察のため, 抗ST3GAL5抗体又は抗B4GALNT1抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在をそれぞれ観察した. Bar: 10 μm.

**A**  
M3-ST3GAL5 (full length)

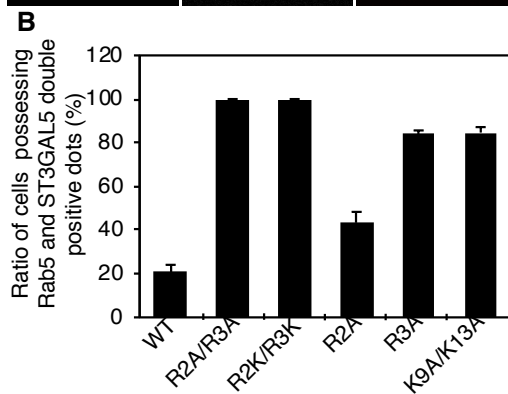
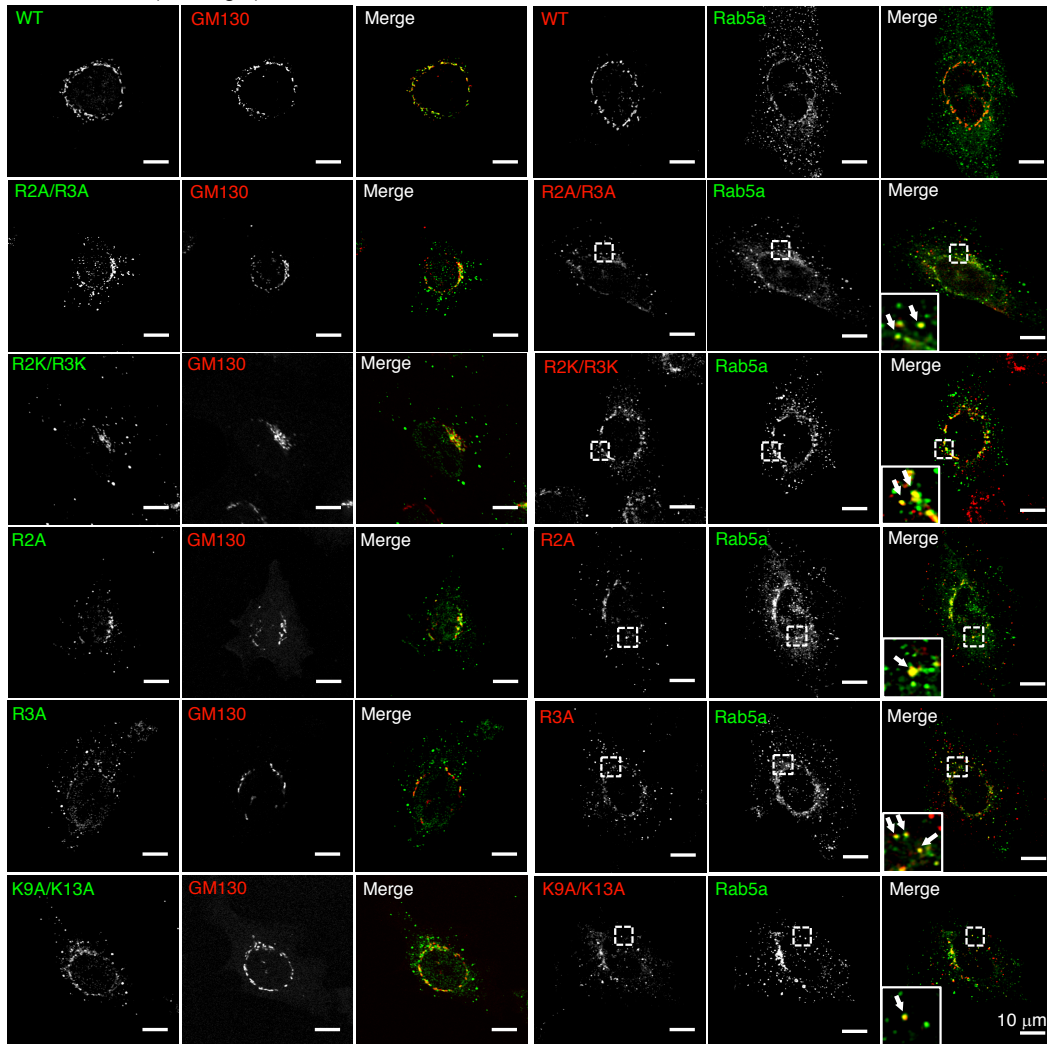


Figure 44. R/K-based motifが全長M3-ST3G5のゴルジ体繫留に与える影響(1)

(A) CHO-K1細胞に安定発現させ、抗ST3GAL5抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在をそれぞれ観察した。Bar: 10 μm.

(B) ST3GAL5の局在が観察された細胞のうち、初期エンドソームの共局在が観察された細胞の割合を示した。

M3-ST3GAL5 (full length) in stable expression

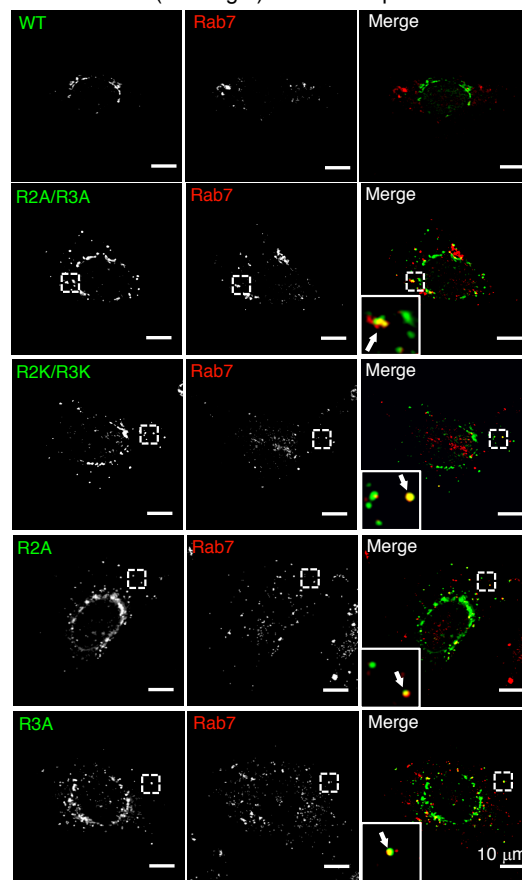


Figure 45. R/K-based motifが全長M3-ST3GAL5のゴルジ体繫留に与える影響(2)

CHO-K1細胞に安定発現させ、抗ST3GAL5抗体と後期エンドソームマーカー抗Rab7抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在をそれぞれ観察した。Bar: 10 μm.

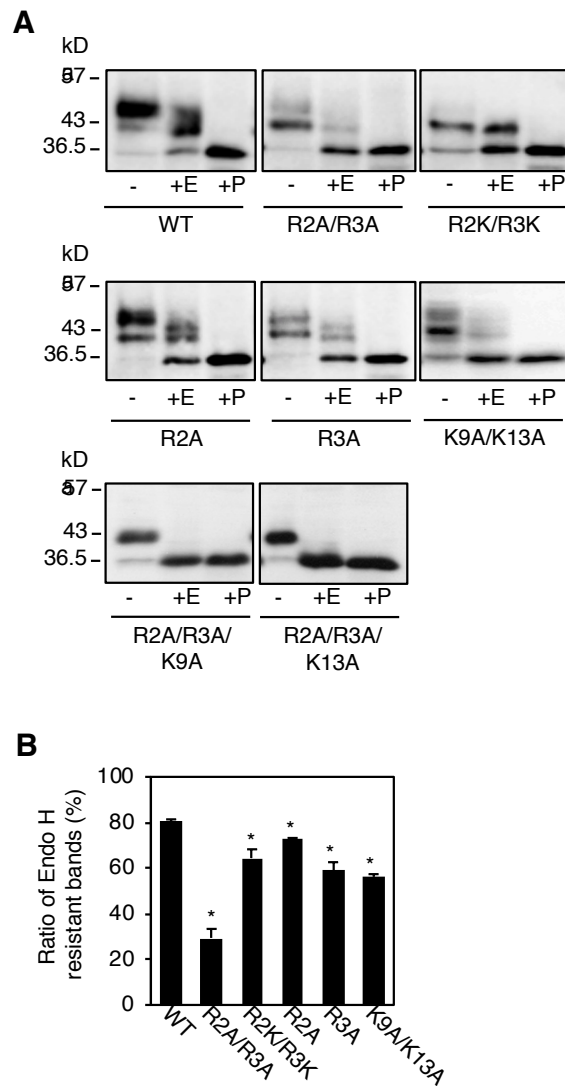


Figure 46. M3-ST3GAL5 (WT, 変異体) のN結合型糖鎖構造の比較(1)

CHO-K1細胞に安定発現させ、膜画分を回収した。SBで処理を行い、糖鎖切断未処理(-), Endo H処理(+E), PNGase F処理(+F)後に抗ST3G5抗体でウエスタンブロットングを行った。

(A) 各ウエスタンブロットング結果を示した。

(B) 糖鎖切断未処理のタンパク質量に対するEndo H耐性タンパク質量の比率を示した。

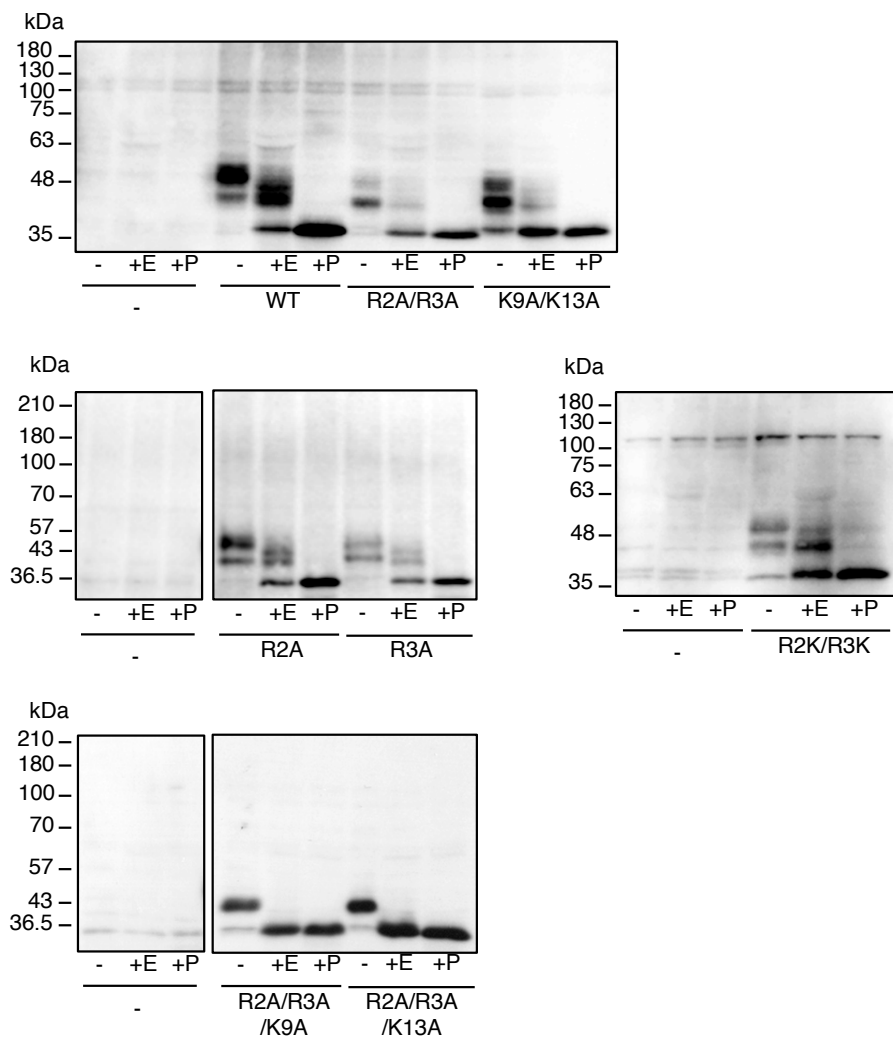


Figure 47. M3-ST3GAL5 (WT, 変異体)のN結合型糖鎖構造の比較(2)

CHO-K1細胞に安定発現させ、膜画分を回収した。SBで処理を行い、糖鎖切断未処理(-), Endo H処理(+E), PNGase F処理(+P)後に抗ST3GAL5抗体でウエスタンブロットングを行った。PVDF膜全体像を示した。



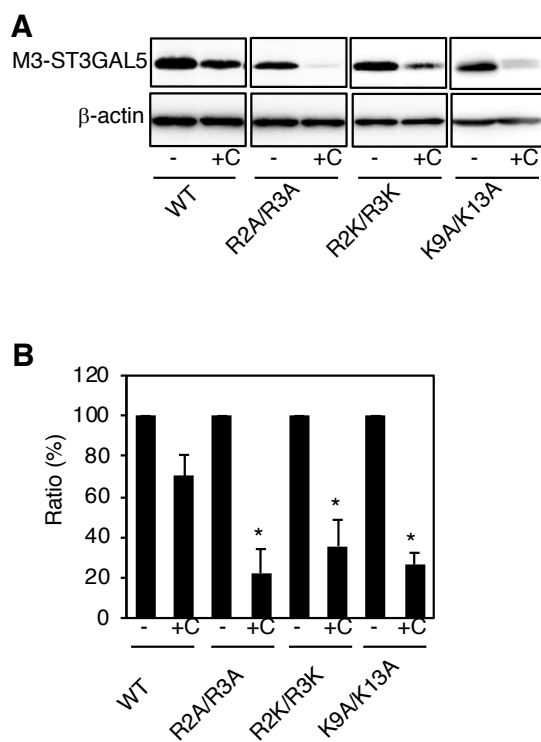


Figure 48. M3-ST3GAL5 (WT, 変異体)の安定性の解析

M3-ST3G5 (WT, 変異体)を50 μg/mL cycloheximide (CHX)添加有り(+C), 無し(-)で37°Cで3 h処理し, ウエスタンブロッティングを行いタンパク質量をそれぞれ定量した. 同様に3回以上の定量を行った.

(A) 膜画分を回収しSBで処理を行い, PNGase Fで糖鎖切断処理後抗ST3GAL5抗体でウエスタンブロッティングを行った.

(B) CHX未処理のタンパク質量を100%とした時のCHX処理のタンパク質量を示した. \* $P < 0.01$

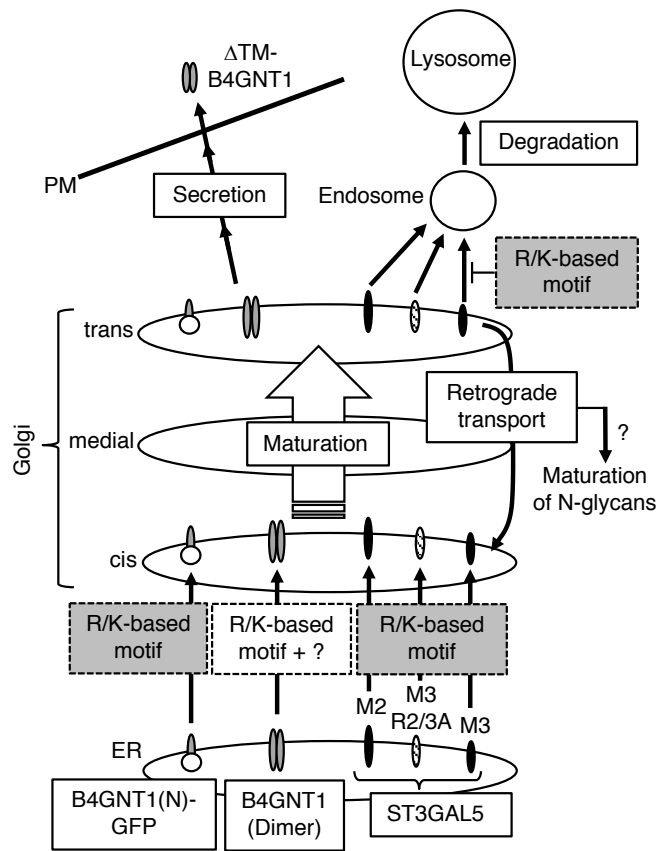


Figure 49. ST3GAL5とB4GALNT1の細胞内動態のまとめ

R/K-based motifは、ST3GAL5において小胞体搬出シグナルとして機能するとともに、M3-ST3GAL5のゴルジ体滞留シグナルとして機能することが示唆された。M2-ST3GAL5は速やかにゴルジ体からライソソームへ輸送されることから、R/K-based motifはN末端のアミノ酸配列に影響を受けると考えられる。さらに、R/K-based motifの部分変異体が野生型と比較して糖鎖構造の成熟が抑制されることから、M3-ST3GAL5はゴルジ体内で繰り返し逆行輸送され糖鎖成熟が進むと示唆された。B4GALNT1はR/K-based motifよりも内腔側ジスルフィド結合によるダイマー形成が小胞体搬出により重要であると考えられるが、その搬出機構は不明であり、更なる解析が必要である。

M3-ST3GAL5 (full length) in stable expression

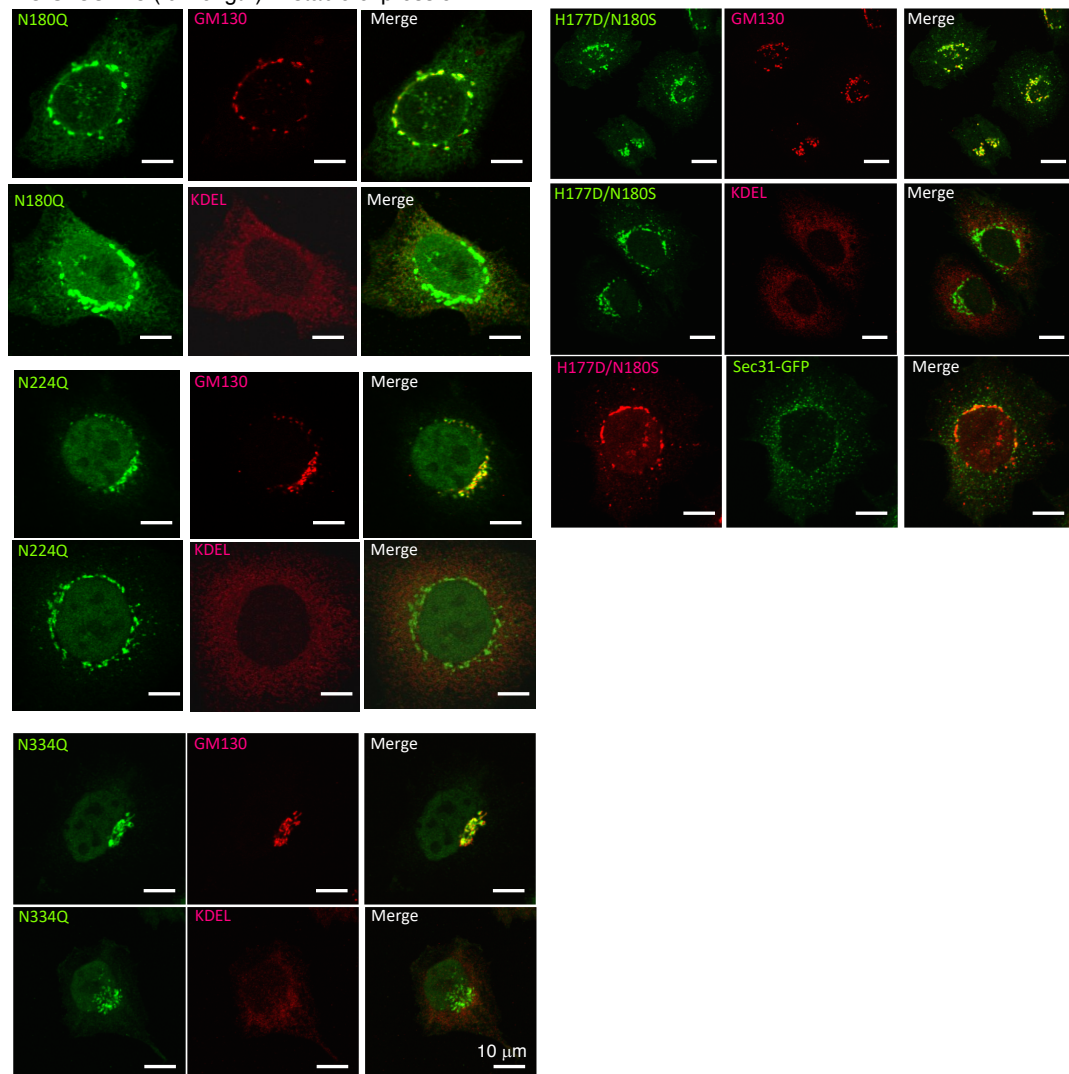


Figure 50. N結合型糖鎖付加部位に変異を導入したM3-ST3GAL5変異体の細胞内局在(安定発現)

CHO-K1細胞に安定発現させ、抗ST3GAL5抗体で間接蛍光免疫法を行い細胞内局在をそれぞれ観察した。  
Bar: 10  $\mu$ m.

## 総括ならびに結論

本研究では、GM3 合成酵素 (ST3GAL5) と GM2 合成酵素 (B4GALNT1) の安定したゴルジ体局在化に関わる機構を解明することを目的として細胞内輸送機構の解析を行い、以下の結果が得られた。

第 1 章では、マウス *ST3GAL5* の肝臓特異的 mRNA variant (c1-type) を同定し、既知の mRNA variant (a-, b-type) と異なる転写制御機構をもつことを示唆した。また、c1-type が胎生期に発現せず、生後時間経過と共に発現量が著しく上昇することから、組織特異的に mRNA variant の制御機構が変化する可能性を示した[37]。

第 2 章では、M1-ST3GAL5 で見られるような R-based motif をもつ糖転移酵素として、新たにヒトおよびマウス *B4GALNT1* の新規 mRNA variant (variant 2) を同定した。variant 2 からは既知の mRNA variant (variant 1) から翻訳される M2-B4GALNT1 と比較して細胞質領域の長いアイソフォーム M1-B4GALNT1 が合成され、M1-B4GALNT1 の細胞質領域に存在する R-based motif により一部が逆行輸送されることを示した。また、M1-ST3GAL5 と比較して M1-B4GALNT1 の逆行輸送効率は低く、その原因が内腔側分子量の大きさによることを示した。さらに、R-based motif をもつ M1-B4GALNT1 は M2-B4GALNT1 とヘテロダイマーを形成することで、M2-B4GALNT1 の安定性を向上させることを示した。M1/M2-B4GALNT1 ヘテロダイマーは小胞体への逆行輸送は行われなことから、この安定性の向上はゴルジ体繫留の延長によるものと示唆された[38]。

第 3 章では、ST3GAL5, および B4GALNT1 の小胞体からゴルジ体への搬出シグナルとされる [R/K](X)[R/K]配列の解析を行った。細胞質領域の膜貫通領域近傍に位置する [R/K](X)[R/K]配列は、小胞体からゴルジ体への搬出シグナルとして機能すると報告されていたが[39]、この配列が全長 M3-ST3GAL5, および全長 M2-B4GALNT1 に及ぼす影響を精査した結果、[R/K](X)[R/K]配列よりもブロードなアミノ酸配列 (R/K-based motif) が ST3GAL5 と B4GALNT1 の小胞体搬出に関与することを明らかにした。さらに、M3-ST3GAL5 の R/K-based motif の部分変異体では、細胞内局在の変化、内腔側領域の N 結

合型糖鎖の成熟度の変化，および酵素の安定性の減少が生じることを見出した．これらの結果から，細胞質領域の R/K-based motif は小胞体搬出のみならず，M3-ST3GAL5 の安定したゴルジ体繫留機構にも重要な役割をもつことが示唆された[40]．

以上のことから，B4GALNT1 では逆行輸送シグナルとして機能する R-based motif が，ST3GAL5 では小胞体搬出シグナルとして機能する R/K-based motif が，それぞれゴルジ体繫留機構にも寄与しているという新知見が得られた．しかしながら，現時点ではこの R-based motif がどのようにゴルジ体繫留に関わっているかについて，推測の域を出ていない．おそらく，このシグナル配列が COP I 被覆小胞を介したゴルジ体間の逆行輸送を誘導するのだろうが，小胞への積み込みに関わる分子などは今後明らかにしていく必要がある．また，本研究で明らかになった最も興味深い知見は ST3GAL5 に付加する N 結合型糖鎖の成熟にそのタンパク質自身の逆行輸送が必要かもしれないということだ．N 結合型糖鎖もまた，ガングリオシドと同様にゴルジ体間を通過する過程で糖鎖合成酵素群による多段階の修飾を受ける．糖鎖成熟，つまり，より複雑な糖鎖合成のためにはゴルジ体を一回通過しただけでは不十分であり，糖タンパク質の複数回のゴルジ体通過が必要であることを示唆している．この原理はガングリオシド合成にもそのまま当てはまり，GM3 や GM2 以降のより複雑な糖鎖構造をもつガングリオシド合成のために基質である脂質自身の逆行輸送が必要なかもしれない．今後はこのような糖鎖合成の根本に関わるタンパク質および脂質のゴルジ体間の逆行輸送メカニズムを解明することがとても重要である．

本論文は以下の原著論文を基に作成した。

Shishido, F., Uemura, S., Nitta, T., Inokuchi, J.I.: Identification of a new liver-specific c-type mRNA transcriptional variant for mouse ST3GAL5 (GM3/GM4 synthase). *Glycoconjugate journal* (2017). doi:10.1007/s10719-017-9788-1

Shishido, F., Uemura, S., Kashimura, M., Inokuchi, J.I.: Identification of a new B4GalNAcT1 (GM2/GD2/GA2 synthase) isoform, and regulation of enzyme stability and intracellular transport by arginine-based motif. *Biochimica et biophysica acta* 1859(10), 2001-2011 (2017). doi:10.1016/j.bbamem.2017.07.006

Uemura, S., Shishido, F., Kashimura, M., Inokuchi, J.: The regulation of ER export and Golgi retention of ST3Gal5 (GM3/GM4 synthase) and B4GalNAcT1 (GM2/GD2/GA2 synthase) by arginine/lysine-based motif adjacent to the transmembrane domain. *Glycobiology*. 25(12), 1410-1422 (2015). doi:10.1093/glycob/cwv071

## 謝辞

本研究の遂行に多大なるご支援をいただきました東北医科薬科大学理事長・学長 高柳元明先生に深く感謝申し上げます

本論文を終えるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東北医科薬科大学薬学部機能病態分子学教室 井ノ口仁一教授、並びに同医学部医化学教室 上村聡志講師に深く感謝を申し上げます。

本論文を作成するにあたり、ご高閲、ご助言を賜りました東北医科薬科大学薬学部細胞制御学教室 顧建国教授、並びに薬品物理化学教室 山口芳樹教授に深く感謝を申し上げます。

本研究を行うにあたり多大なご助言とご協力を賜りました東北医科薬科大学薬学部機能病態分子学教室 鈴木明身教授、稲森啓一郎准教授、永福正和講師、狩野裕考助教、公私共に多大なご助言とご協力を賜りました東北医科薬科大学薬学部機能病態分子学教室 樫村まどか修士、豊島かおる博士、新田昂大博士、豊澤祐美女史、土屋香織女史並びに臨時職員の皆様、配属生の皆様に深く感謝を申し上げます。

学位を取得するにあたり、終始見守り、精神的支援を賜りました家族・友人に心から感謝を申し上げます。

最後に、本研究のために尊い生命をいただきましたマウスに深く感謝いたします。

2020年3月

宍戸 史

## 参考文献

1. Simons, K., Toomre, D.: Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology* **1**(1), 31-39 (2000). doi:10.1038/35036052
2. Losev, E., Reinke, C.A., Jellen, J., Strongin, D.E., Bevis, B.J., Glick, B.S.: Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* **441**(7096), 1002-1006 (2006). doi:10.1038/nature04717
3. Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K., Nakano, A.: Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* **441**(7096), 1007-1010 (2006). doi:10.1038/nature04737
4. Hakomori, S.: Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer research* **45**(6), 2405-2414 (1985).
5. Hakomori, S., Handa, K.: Glycosphingolipid-dependent cross-talk between glycosynapses interfacing tumor cells with their host cells: essential basis to define tumor malignancy. *FEBS letters* **531**(1), 88-92 (2002).
6. Aksoy, N., Akinci, O.F.: Mucin macromolecules in normal, adenomatous, and carcinomatous colon: evidence for the neotransformation. *Macromolecular bioscience* **4**(5), 483-496 (2004). doi:10.1002/mabi.200300099
7. Brockhausen, I.: Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* **1473**(1), 67-95 (1999).
8. Dall'Olio, F., Malagolini, N., Trinchera, M., Chiricolo, M.: Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **17**, 670-699 (2012).
9. Nojiri, H., Kitagawa, S., Nakamura, M., Kirito, K., Enomoto, Y., Saito, M.: Neolactoseries gangliosides induce granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *The Journal of biological chemistry* **263**(16), 7443-7446 (1988).
10. Bremer, E.G., Hakomori, S.: GM3 ganglioside induces hamster fibroblast growth inhibition in chemically-defined medium: ganglioside may regulate growth factor receptor function. *Biochemical and biophysical research communications* **106**(3), 711-718 (1982).
11. Simons, K., Ikonen, E.: Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**(6633), 569-572 (1997). doi:10.1038/42408
12. Varma, R., Mayor, S.: GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**(6695), 798-801 (1998). doi:10.1038/29563
13. Cheng, Z.J., Singh, R.D., Marks, D.L., Pagano, R.E.: Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids. *Molecular membrane biology* **23**(1), 101-110 (2006). doi:10.1080/09687860500460041
14. Hakomori, S.I.: Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochimica et biophysica acta* **1780**(3), 325-346 (2008). doi:10.1016/j.bbagen.2007.08.015
15. Tagami, S., Inokuchi, J., Kabayama, K., Yoshimura, H., Kitamura, F., Uemura, S., Ogawa, C., Ishii, A., Saito, M., Ohtsuka, Y., Sakaue, S., Igarashi, Y.: Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* **277**(5), 3085-3092 (2002). doi:10.1074/jbc.M103705200
16. Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J.L., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K., Proia, R.L.: Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**(6), 3445-3449 (2003). doi:10.1073/pnas.0635898100
17. Aerts, J.M., Ottenhoff, R., Powlson, A.S., Grefhorst, A., van Eijk, M., Dubbelhuis, P.F., Aten, J., Kuipers, F., Serlie, M.J., Wennekes, T., Sethi, J.K., O'Rahilly, S., Overkleeft,



- H.S.: Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity. *Diabetes* **56**(5), 1341-1349 (2007). doi:10.2337/db06-1619
18. Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I.H., Zhang, J., Siegel, C., Komarnitsky, S., Yew, N.S., Cheng, S.H.: Inhibiting glycosphingolipid synthesis improves glycemic control and insulin sensitivity in animal models of type 2 diabetes. *Diabetes* **56**(5), 1210-1218 (2007). doi:10.2337/db06-0719
  19. Kabayama, K., Sato, T., Kitamura, F., Uemura, S., Kang, B.W., Igarashi, Y., Inokuchi, J.: TNF $\alpha$ -induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology* **15**(1), 21-29 (2005). doi:10.1093/glycob/cwh135
  20. Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y., Inokuchi, J.: Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(34), 13678-13683 (2007). doi:10.1073/pnas.0703650104
  21. Yoshikawa, M., Go, S., Suzuki, S., Suzuki, A., Katori, Y., Morlet, T., Gottlieb, S.M., Fujiwara, M., Iwasaki, K., Strauss, K.A., Inokuchi, J.: Ganglioside GM3 is essential for the structural integrity and function of cochlear hair cells. *Human molecular genetics* **24**(10), 2796-2807 (2015). doi:10.1093/hmg/ddv041
  22. Yoshikawa, M., Go, S., Takasaki, K., Kakazu, Y., Ohashi, M., Nagafuku, M., Kabayama, K., Sekimoto, J., Suzuki, S., Takaiwa, K., Kimitsuki, T., Matsumoto, N., Komune, S., Kamei, D., Saito, M., Fujiwara, M., Iwasaki, K., Inokuchi, J.: Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**(23), 9483-9488 (2009). doi:10.1073/pnas.0903279106
  23. Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Furukawa, K., Aizawa, S.: Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(20), 10662-10667 (1996).
  24. Sheikh, K.A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T.O., Proia, R.L., Griffin, J.W., Schnaar, R.L.: Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(13), 7532-7537 (1999).
  25. Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R.J., Schnaar, R.L.: A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Experimental neurology* **166**(2), 227-234 (2000). doi:10.1006/exnr.2000.7504
  26. Yamashita, T., Wu, Y.P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J.M., Dupree, J.L., Geyer, R., Sandhoff, K., Proia, R.L.: Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(8), 2725-2730 (2005). doi:10.1073/pnas.0407785102
  27. Boccuto, L., Aoki, K., Flanagan-Steet, H., Chen, C.F., Fan, X., Bartel, F., Petukh, M., Pittman, A., Saul, R., Chaubey, A., Alexov, E., Tiemeyer, M., Steet, R., Schwartz, C.E.: A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation. *Human molecular genetics* **23**(2), 418-433 (2014). doi:10.1093/hmg/ddt434
  28. Fragaki, K., Ait-El-Mkadem, S., Chausse, A., Gire, C., Mengual, R., Bonesso, L., Beneteau, M., Ricci, J.E., Desquirit-Dumas, V., Procaccio, V., Rotig, A., Paquis-Flucklinger, V.: Refractory epilepsy and mitochondrial dysfunction due to GM3

- synthase deficiency. *European journal of human genetics : EJHG* **21**(5), 528-534 (2013). doi:10.1038/ejhg.2012.202
29. Simpson, M.A., Cross, H., Proukakis, C., Priestman, D.A., Neville, D.C., Reinkensmeier, G., Wang, H., Wiznitzer, M., Gurtz, K., Verganelaki, A., Pryde, A., Patton, M.A., Dwek, R.A., Butters, T.D., Platt, F.M., Crosby, A.H.: Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nature genetics* **36**(11), 1225-1229 (2004). doi:10.1038/ng1460
  30. Wang, H., Wang, A., Wang, D., Bright, A., Sency, V., Zhou, A., Xin, B.: Early growth and development impairments in patients with ganglioside GM3 synthase deficiency. *Clinical genetics* **89**(5), 625-629 (2016). doi:10.1111/cge.12703
  31. Boukhris, A., Schule, R., Loureiro, J.L., Lourenco, C.M., Mundwiler, E., Gonzalez, M.A., Charles, P., Gauthier, J., Rekik, I., Acosta Lebrigio, R.F., Gaussen, M., Speziani, F., Ferbert, A., Feki, I., Caballero-Oteyza, A., Dionne-Laporte, A., Amri, M., Noreau, A., Forlani, S., Cruz, V.T., Mochel, F., Coutinho, P., Dion, P., Mhiri, C., Schols, L., Pouget, J., Darios, F., Rouleau, G.A., Marques, W., Jr., Brice, A., Durr, A., Zuchner, S., Stevanin, G.: Alteration of ganglioside biosynthesis responsible for complex hereditary spastic paraplegia. *American journal of human genetics* **93**(1), 118-123 (2013). doi:10.1016/j.ajhg.2013.05.006
  32. Harlalka, G.V., Lehman, A., Chioza, B., Baple, E.L., Maroofian, R., Cross, H., Sreekantan-Nair, A., Priestman, D.A., Al-Turki, S., McEntagart, M.E., Proukakis, C., Royle, L., Kozak, R.P., Bastaki, L., Patton, M., Wagner, K., Coblentz, R., Price, J., Mezei, M., Schlade-Bartusiak, K., Platt, F.M., Hurles, M.E., Crosby, A.H.: Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis. *Brain : a journal of neurology* **136**(Pt 12), 3618-3624 (2013). doi:10.1093/brain/awt270
  33. Wakil, S.M., Monies, D.M., Ramzan, K., Hagos, S., Bastaki, L., Meyer, B.F., Bohlega, S.: Novel B4GALNT1 mutations in a complicated form of hereditary spastic paraplegia. *Clinical genetics* **86**(5), 500-501 (2014). doi:10.1111/cge.12312
  34. Uemura, S., Kurose, T., Suzuki, T., Yoshida, S., Ito, M., Saito, M., Horiuchi, M., Inagaki, F., Igarashi, Y., Inokuchi, J.: Substitution of the N-glycan function in glycosyltransferases by specific amino acids: ST3Gal-V as a model enzyme. *Glycobiology* **16**(3), 258-270 (2006). doi:10.1093/glycob/cwj060
  35. Uemura, S., Yoshida, S., Shishido, F., Inokuchi, J.: The cytoplasmic tail of GM3 synthase defines its subcellular localization, stability, and in vivo activity. *Mol. Biol. Cell* **20**(13), 3088-3100 (2009). doi:10.1091/mbc.E08-12-1219
  36. Michelsen, K., Schmid, V., Metz, J., Heusser, K., Liebel, U., Schwede, T., Spang, A., Schwappach, B.: Novel cargo-binding site in the beta and delta subunits of coatamer. *The Journal of cell biology* **179**(2), 209-217 (2007). doi:10.1083/jcb.200704142
  37. Shishido, F., Uemura, S., Nitta, T., Inokuchi, J.-i.: Identification of a new liver-specific c-type mRNA transcriptional variant for mouse ST3GAL5 (GM3/GM4 synthase). *Glycoconjugate journal* (2017). doi:10.1007/s10719-017-9788-1
  38. Shishido, F., Uemura, S., Kashimura, M., Inokuchi, J.I.: Identification of a new B4GalNAcT1 (GM2/GD2/GA2 synthase) isoform, and regulation of enzyme stability and intracellular transport by arginine-based motif. *Biochimica et biophysica acta* **1859**(10), 2001-2011 (2017). doi:10.1016/j.bbamem.2017.07.006
  39. Giraud, C.G., Maccioni, H.J.: Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. *Molecular biology of the cell* **14**(9), 3753-3766 (2003). doi:10.1091/mbc.E03-02-0101
  40. Uemura, S., Shishido, F., Kashimura, M., Inokuchi, J.: The regulation of ER export and Golgi retention of ST3Gal5 (GM3/GM4 synthase) and B4GalNAcT1 (GM2/GD2/GA2 synthase) by arginine/lysine-based motif adjacent to the transmembrane domain. *Glycobiology* **25**(12), 1410-1422 (2015). doi:10.1093/glycob/cwv071
  41. Tsukamoto, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Takeuchi, K., Ihara, H., Saito, M., Kozaki,

- S.: Binding of Clostridium botulinum type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* **280**(42), 35164-35171 (2005). doi:10.1074/jbc.M507596200
42. Nagafuku, M., Okuyama, K., Onimaru, Y., Suzuki, A., Odagiri, Y., Yamashita, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Takayanagi, M., Ohno, I., Inokuchi, J.: CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**(6), E336-342 (2012). doi:10.1073/pnas.1114965109
  43. Kono, M., Takashima, S., Liu, H., Inoue, M., Kojima, N., Lee, Y.C., Hamamoto, T., Tsuji, S.: Molecular cloning and functional expression of a fifth-type alpha 2,3-sialyltransferase (mST3Gal V: GM3 synthase). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**(1), 170-175 (1998).
  44. Kapitonov, D., Bieberich, E., Yu, R.K.: Combinatorial PCR approach to homology-based cloning: cloning and expression of mouse and human GM3-synthase. *Glycoconj. J.* **16**(7), 337-350 (1999).
  45. Kouzarides, T.: Chromatin modifications and their function. *Cell.* **128**(4), 693-705 (2007). doi:10.1016/j.cell.2007.02.005
  46. Chen, Z., Wang, L., Wang, Q., Li, W.: Histone modifications and chromatin organization in prostate cancer. *Epigenomics.* **2**(4), 551-560 (2010). doi:10.2217/epi.10.31
  47. Tsunoda, T., Takagi, T.: Estimating transcription factor bindability on DNA. *Bioinformatics (Oxford, England)* **15**(7-8), 622-630 (1999).
  48. Lekstrom-Himes, J., Xanthopoulos, K.G.: Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *The Journal of biological chemistry* **273**(44), 28545-28548 (1998).
  49. Shen, C.N., Slack, J.M., Tosh, D.: Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* **2**(12), 879-887 (2000). doi:10.1038/35046522
  50. Westmacott, A., Burke, Z.D., Oliver, G., Slack, J.M., Tosh, D.: C/EBPalpha and C/EBPbeta are markers of early liver development. *The International journal of developmental biology* **50**(7), 653-657 (2006). doi:10.1387/ijdb.062146aw
  51. Greenbaum, L.E., Li, W., Cressman, D.E., Peng, Y., Ciliberto, G., Poli, V., Taub, R.: CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *The Journal of clinical investigation* **102**(5), 996-1007 (1998). doi:10.1172/jci3135
  52. Uemura, S., Kabayama, K., Noguchi, M., Igarashi, Y., Inokuchi, J.: Sialylation and sulfation of lactosylceramide distinctly regulate anchorage-independent growth, apoptosis, and gene expression in 3LL Lewis lung carcinoma cells. *Glycobiology* **13**(3), 207-216 (2003). doi:10.1093/glycob/cwg022
  53. Kozak, M.: Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**(1-2), 1-34 (2002).
  54. Furukawa, K., Soejima, H., Niikawa, N., Shiku, H.: Genomic organization and chromosomal assignment of the human beta1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase gene. Identification of multiple transcription units. *The Journal of biological chemistry* **271**(34), 20836-20844 (1996).
  55. Nagata, Y., Yamashiro, S., Yodoi, J., Lloyd, K.O., Shiku, H., Furukawa, K.: Expression cloning of beta 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase cDNAs that determine the expression of GM2 and GD2 gangliosides. *The Journal of biological chemistry* **267**(17), 12082-12089 (1992).
  56. Sango, K., Johnson, O.N., Kozak, C.A., Proia, R.L.: beta-1,4-N-Acetylgalactosaminyltransferase involved in ganglioside synthesis: cDNA sequence, expression, and chromosome mapping of the mouse gene. *Genomics* **27**(2), 362-365 (1995). doi:10.1006/geno.1995.1058
  57. Shikano, S., Li, M.: Membrane receptor trafficking: evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(10), 5783-5788 (2003). doi:10.1073/pnas.1031748100
58. Li, J., Yen, T.Y., Allende, M.L., Joshi, R.K., Cai, J., Pierce, W.M., Jaskiewicz, E., Darling, D.S., Macher, B.A., Young, W.W., Jr.: Disulfide bonds of GM2 synthase homodimers. Antiparallel orientation of the catalytic domains. *The Journal of biological chemistry* **275**(52), 41476-41486 (2000). doi:10.1074/jbc.M007480200
  59. Okajima, T., Xu, A., Lei, L., Irvine, K.D.: Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science (New York, N.Y.)* **307**(5715), 1599-1603 (2005). doi:10.1126/science.1108995
  60. Jackson, L.P.: Structure and mechanism of COPI vesicle biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **29**, 67-73 (2014). doi:10.1016/j.ceb.2014.04.009
  61. Ma, W., Goldberg, J.: Rules for the recognition of dilysine retrieval motifs by coatomer. *The EMBO journal* **32**(7), 926-937 (2013). doi:10.1038/emboj.2013.41
  62. Jackson, L.P., Lewis, M., Kent, H.M., Edeling, M.A., Evans, P.R., Duden, R., Owen, D.J.: Molecular basis for recognition of dilysine trafficking motifs by COPI. *Developmental cell* **23**(6), 1255-1262 (2012). doi:10.1016/j.devcel.2012.10.017
  63. Yip, C.K., Walz, T.: Molecular structure and flexibility of the yeast coatomer as revealed by electron microscopy. *Journal of molecular biology* **408**(5), 825-831 (2011). doi:10.1016/j.jmb.2011.03.029
  64. Nikonov, A.V., Snapp, E., Lippincott-Schwartz, J., Kreibich, G.: Active translocon complexes labeled with GFP-Dad1 diffuse slowly as large polysome arrays in the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **158**(3), 497-506 (2002). doi:10.1083/jcb.200201116
  65. Snapp, E.L., Hegde, R.S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N., Lippincott-Schwartz, J.: Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *The Journal of cell biology* **163**(2), 257-269 (2003). doi:10.1083/jcb.200306020
  66. Kamada, A., Nagaya, H., Tamura, T., Kinjo, M., Jin, H.Y., Yamashita, T., Jimbow, K., Kanoh, H., Wada, I.: Regulation of immature protein dynamics in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **279**(20), 21533-21542 (2004). doi:10.1074/jbc.M401403200
  67. Sato, K., Nakano, A.: Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis. *Nature structural & molecular biology* **12**(2), 167-174 (2005). doi:10.1038/nsmb893
  68. Schmitz, K.R., Liu, J., Li, S., Setty, T.G., Wood, C.S., Burd, C.G., Ferguson, K.M.: Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer. *Developmental cell* **14**(4), 523-534 (2008). doi:10.1016/j.devcel.2008.02.016
  69. Tu, L., Tai, W.C., Chen, L., Banfield, D.K.: Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi. *Science (New York, N.Y.)* **321**(5887), 404-407 (2008). doi:10.1126/science.1159411