

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）要旨

氏名（本籍）	シト ^ト 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合成酵素における細胞内輸送機構の解析

東北医科薬科大学分子生体膜研究所

機能病態分子学 宍戸 史

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り、その分子種は親水性の糖鎖部分と疎水性のセラミド脂質部分両方の構造多様性により特徴付けられている。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GM3、GM2、GD3などのガングリオシドが合成される。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、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。

ガングリオシドはゴルジ体槽板を經由する中でガングリオシド合成酵素群による段階的な糖鎖修飾を次々に受けると前述したが、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り、安定したガングリオシド供給のためにはガングリオシド合成酵素が小胞体から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に一定時間繫留される必要がある。しかしながら、このゴルジ体内での段階的な糖鎖修飾がどのように行われているか、さらに糖転移酵素がどのようにしてそれぞれが局在する槽板に留まっているか、詳細なメカニズムはほとんどわかっていない。本研究ではガングリオシド生合成機構解明の観点から、ガングリオシドGM3合成酵素 (α -2,3-sialyltransferase : ST3GAL5) および GM2合成酵素 (β -1,4 *N*-acetylgalactosaminyltransferase : B4GalNAcT1, B4GALNT1) の種々の変異体を作製し、ガングリオシド合成酵素の転写制御機構や細胞内輸送機構について解析を行った。その結果、ST3GAL5、B4GALNT1の新規mRNAバリエントを同定した。さらに、細胞質領域N末端側に配置された塩基性アミノ酸を基盤としたアミノ酸配列、ST3GAL5ではアルギニン(R)/リジン(K)-based motifが、B4GALNT1ではアルギニン(R)-based motifがそれぞれ酵素のゴルジ体繫留に寄与しているという新知見を得た。

第1章では、GM3合成酵素の新規mRNAバリエント(c-type)が肝臓特異的に発現している事を示した。ST3GAL5のmRNAバリエントはa-type、b-typeが報告されており、ST3GAL5のノックアウトマウスを用いてGM3の生理学的重要性やその機能が精査されてきた。その過程で、肝臓組織で高いGM3合成活性が認められるにも関わらずmRNAバリエント(a-type, b-type)の発現量が低いという事、ノックアウトマウスの肝臓でわずかながらGM2が検出される事などの矛盾が生じていた。マウス肝臓組織のcDNAを用いた5'-RACEなどの詳細な解析を行った結果、ノックアウトマウスの肝臓でのGM3合成活性の由来が

肝臓特異的に発現する新規 mRNA バリエント (c-type) であることを明らかにした⁽¹⁾.

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 M1-B4GALNT1 が翻訳されることを示した。M1-B4GALNT1 は 2 型の膜タンパク質で、既知の M2-B4GALNT1 よりも長い細胞質領域 N 末端を持つ。この N 末端にはゴルジ体から小胞体への逆行輸送シグナル配列である R-based motif が存在し、COPI 被覆小胞の酸性ポケットと結合して逆行輸送されることを見出した。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 が M1-B4GALNT1 と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細胞内での酵素安定性をもつことが示された。興味深いことに、このヘテロダイマーの安定性の向上は小胞体への逆行輸送が要因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⁽²⁾。

第 3 章では、ST3GAL5 および B4GALNT1 の小胞体からゴルジ体への搬出機構の解析を行った。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。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] 配列だけでなく、[R/K](X)[R/K] 配列周辺の塩基性アミノ酸を含む配列 (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、ST3GAL5 の R/K-based motif の部分変異体では、細胞内局在の変化、ST3GAL5 の内腔側領域に付加する N 結合型糖鎖の成熟度の変化、および細胞内での酵素タンパク質安定性の低下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、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⁽³⁾.

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。ゴルジ体内の輸送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糖転移酵素の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小胞体搬出機構やゴルジ体繫留機構の解明に繋がることが期待される。

<参考文献>

主論文（原著論文）

- (1) Identification of a new liver-specific c-type mRNA transcriptional variant for mouse ST3GAL5 (GM3/GM4 synthase).
Shishido, F., Uemura, S., Nitta, T., Inokuchi, J.I. Glycoconjugate journal (2017) 34, 651-659.
- (2) Identification of a new B4GalNAcT1 (GM2/GD2/GA2 synthase) isoform, and regulation of enzyme stability and intracellular transport by arginine-based motif.
Shishido, F., Uemura, S., Kashimura, M., Inokuchi, J.I. Biochimica et biophysica acta (2017) 1859(10), 2001-2011.
- (3) 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.
Uemura, S., Shishido, F., Kashimura, M., Inokuchi, J.I. Glycobiology. (2015) 25(12), 1410-1422.