

小胞体内における 1-デオキシノジリマイシン結合マンノシダーゼの選別

栗原 大輝*¹, 戸谷 希一郎*²

Screening of 1-deoxynojirimycin binding mannosidase in the endoplasmic reticulum

Taiki KURIBARA*¹, Kiichiro TOTANI*²

(Received Nov xx, 2017)

1. 研究背景・目的

小胞体で新生された糖タンパク質上の糖鎖は、糖タンパク質の分泌あるいは分解を制御するシグナルとして機能することが、提唱されている¹⁾。特に小胞体に局在する α -1,2-マンノシダーゼ類である ERmannosidase I (ERManI)、ER-degradation-enhancing mannosidase-like protein 1 (EDEM1)、EDEM2 および EDEM3 が、Man9GlcNAc2 (M9) 型糖鎖を順次、切断することで産生される糖鎖群は、糖タンパク質の選別に重要な役割を果たす (Fig. 1)。すなわち M8B 型糖鎖は糖タンパク質の分泌シグナル、M8A 型糖鎖あるいはさらにマンノースが切断された M6 や M5 型糖鎖は糖タンパク質の分解シグナルとして機能することが想定されている。しかしながら、それらのシグナル糖鎖の産生経路は、明らかとなっていない。

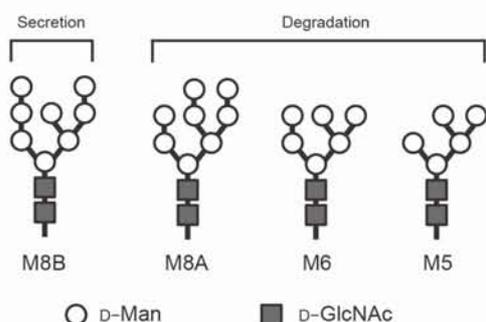


Figure 1. Sorting signals of glycoprotein.

我々は最近、小胞体の構成要素が全て含有される小胞体画分中、適切に酵素阻害剤を使い分け、小胞体内において M8B あるいは M8A 型糖鎖の産生を基軸として、糖

タンパク質の分泌あるいは分解に関与する独立した 2 つの糖鎖産生経路が存在することを報告した²⁾。しかしながら、依然として、2 つの独立した糖鎖産生経路にどの α -1,2-マンノシダーゼが関与しているか不明である。本研究では、M8B を経由する分泌シグナル糖鎖産生経路を高選択的に阻害する、1-デオキシノジリマイシン (dNJ) に対する標的酵素の絞り込みを Cellular Thermal Shift Assay (CETSA) にて検討した。

2. 実験方法

本研究で使用した dNJ は Toronto research chemicals 社から購入した。抗 ERManI 抗体は GeneTex 社、抗 EDEM1/2/3 抗体は SIGMA 社から購入した。

2. 1 小胞体画分の抽出

灌流処理した SAMP6³⁾ マウス肝臓 (0.5 g) に緩衝液 [0.25 M sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM HEPES (pH7.4) and EDTA-free protease inhibitor cocktail 1 tab./50 mL (Roche)] (4 mL) を加え、ポッタ型ホモジナイザーにて破碎した (20 ストローク, 4°C)。得られた破碎液を 4°C で遠心操作によって段階的に分画した [900 × g (10 min), 5,000 × g (10 min), 8,000 × g (10 min), 20,000 × g (120 min)]。最終的に得たペレット 10 mg を 100 μ L の可溶性緩衝液 [0.25 M sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM HEPES (pH7.4), EDTA-free protease inhibitor cocktail 1 tab./50 mL, 1% triton-X100] で再溶解した。さらに、懸濁液を 20,000 × g (20 min) で遠心し、上清を小胞体画分とした。

2. 2 Cellular Thermal Shift Assay (CETSA)

小胞体画分 (3 mg/mL) を、4°C で 30 分間インキュベーション後、50 μ L ずつマイクロチューブに分注し、それぞれサーマルサイクラーにて 3°C 刻みで 3 分間加熱処理

*¹: 理工学研究科理工学専攻博士後期課程

*²: 物質生命理工学科准教授 (ktotani@st.seikei.ac.jp)

し、氷上で 3 分間冷却した。各サンプルを 4°C、20,000 × g (20 min) で遠心し、上清 35 μL を可溶性サンプルとした。可溶性サンプルに 5 × SDS sample buffer [(Tris/HCl (250 mM, pH6.8), DTT (375 mM), SDS (10%), glycerol (50%), Bromophenol Blue (0.1%)) 8.75 μL を加え、SDS-PAGE用サンプルとした。各サンプルをSDS-PAGE (7.5% ポリアクリルアミドゲル) 後、抗ERManI および抗EDEM1/2/3 抗体を用いたウェスタンブロットにより、加熱処理後の標的タンパク質の残存量をイメージアナライザーで解析し、融解曲線を描いた。

2. 3 Isothermal dose-response fingerprint (ITDRF)

小胞体画分 (3 mg/mL) にdNJ (0.001-10 mM) を添加した反応液 (50 μL) を、4°C で 30 分間 インキュベーションした。その後、各サンプルを融解曲線をもとに決定した温度 (40 °C : Fig.3A, 46 °C : Fig. 3B, 54 °C : Fig. 3C, 66 °C : Fig. 3D) で 3 分間加熱処理し、3 分間氷上にて冷却した。各サンプルを 4°C、20,000 × g (20 min) で遠心し、上清 35 μL を可溶性サンプルとした。可溶性サンプル中の α-1,2-マンノシダーゼ類の残存量を 2.2 と同様にウェスタンブロットにより評価した。

3. 実験結果と考察

CETSA は、ITDRFと組み合わせることで組織あるいはライセート中で化合物と標的タンパク質との結合を評価する手法として報告された⁴⁾。CETSA (ITDRF) では、タンパク質とリガンド化合物との結合による熱安定化効果を利用し、標的タンパク質を同定している。具体的には、CETSAにて測定した融解曲線をもとに標的タンパク質がほとんど変性される温度下において、ITDRFによりリガンド濃度依存的な標的タンパク質の安定化を比較し、結合の有無を評価する。

この原理に従い、本研究ではまず、標的酵素群 (ERManI, EDEM1, EDEM2 および EDEM3) を様々な温度で熱処理し、融解曲線を得た (Fig. 2)。この結果から、EDEM3 は標的酵素群の中で熱安定性がもっとも低いことが分かった (Fig. 2A)。これに対し、ERManI および EDEM1 は中程度の安定性を示した (Fig. 2B and C)。一方で、EDEM2 は標的酵素群の中でもっとも熱安定性が高いことが分かった (Fig. 2D)。

続いて、融解曲線に基づいて各標的酵素に対し、ITDRF に最適な熱処理温度を設定し、dNJ濃度依存的なタンパク質熱安定化効果の有無を評価した (Fig. 3)。その結果、EDEM3 がdNJ 濃度依存的に安定化され、dNJ がEDEM3

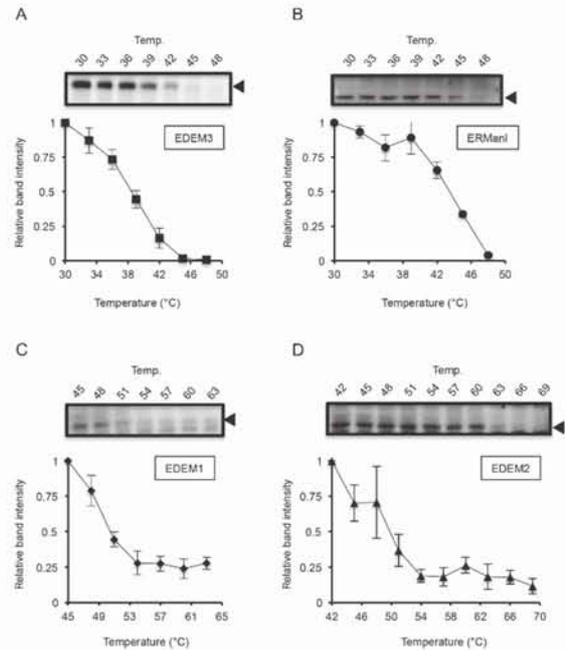


Figure 2. Thermostability of mannosidases in the ER.

と結合することが示唆された (Fig. 3A)。一方、ERManI、EDEM1 およびEDEM2 に関しては、dNJ による熱安定化効果は観測されなかった (Fig. 3B, C and D)。

一連のCETSA (ITDRF) 実験の結果は、dNJの標的結合タンパク質がEDEM3であることを示唆している。これまでにEDEM3 は、M8B型糖鎖産生に関わるとの報告はないが、その後産生されるM7やM6型糖鎖の産生に関わるマンノシダーゼと解釈されてきた⁵⁾。これらの結果を総

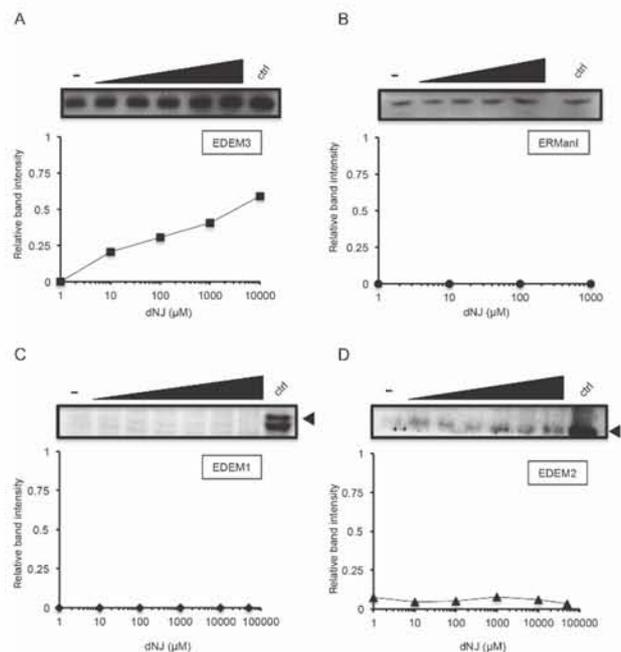


Figure 3. Stability effect of dNJ for mannosidases in the ER.

合すると、EDEM3はM8B型糖鎖産生に引き続くM7やM6型糖鎖産生に関与する酵素候補と考えられる。しかしながら、M9型糖鎖からのM8B型糖鎖産生に関わるマンノシダーゼの候補は未だに不明である。これまでの研究から、ERManIとEDEM2がその候補として考えられるが、本研究では、いずれのタンパク質もdNJの添加により安定化されなかった。しかしながら、本研究により、dNJが抑制する分泌シグナル糖鎖産生経路の、M8B以降の糖鎖産生に関与するマンノシダーゼの絞り込みができた点は意義がある。CETSAでは、標的タンパク質固有の熱への安定性が異なるため、dNJに対する結合タンパク質の候補が複数存在する場合、評価するのは難しい。今後は標的タンパク質群に対して、dNJの結合を均一な条件で評価できる手法を併用し、小胞体内糖鎖プロセッシングの全容解明に取り組んでいきたい。

参考文献

- 1) J.J. Caramelo, A.J. Parodi, *FEBS Lett.* **2015**, 589, 3379-3387.
- 2) T. Kuribara, M. Hirano, G. Speciale, S. J. Williams, Y. Ito, K. Totani, *ChemBioChem* **2017**, 18, 1027-1035.
- 3) K. Takahashi, T. Tsuboyama, M. Matsushita, R. Kasai, H. Okumura, T. Yamamuro, Y. Okamoto, K. Toriyama, K. Kitagawa, T. Takeda, *Bone Miner.* **1994**, 24, 245-255.
- 4) D. M. Molina, R. Jafari, M. Ignatushchenko, T. Seki, E. A. Larsson, C. Dan, L. Sreekumar, Y. Cao, P. Nordlund. *Science*, **2013**, 341, 84-87.
- 5) S. Ninagawa, T. Okada, Y. Sumitomo, K. Kamiya, K. Kato, S. Hiromoto, T. Ishikawa, S. Takeda, T. Sakuma, T. Yamamoto, K. Mori. *J. Cell Biol.* **2014**, 206, 347-356.