

研究終了報告書

「糖脂質 GPI の糖鎖構造多様化メカニズムの解明」

研究期間：2020 年 11 月～2022 年 3 月

研究者：平田 哲也

1. 研究のねらい

糖鎖修飾は細胞内で最も高頻度にかかるタンパク質の翻訳後修飾の一つであり、糖鎖構造の違いによりタンパク質の構造や機能、局在はダイナミックに制御される。そのため糖鎖修飾機構の異常はタンパク質の細胞内動態を異常化し、がん、糖尿病、認知症などの様々な疾患の原因となる。従って、糖鎖修飾機構を正確に理解することは、各糖タンパク質の生理機能の解明だけでなく、疾患の発症機序の解明や治療法の開発につながり、極めて重要である。糖鎖修飾の大部分は小胞体とゴルジ体で多数の糖転移酵素の連続した反応により行われる。これまでの研究により、糖鎖生合成に関わる酵素群の大部分が同定され、反応順序を記述した詳細な合成経路が描かれている。しかし、細胞内での糖鎖修飾の制御機構や、疾患により糖鎖修飾機構が破綻するメカニズムについては未だ不明な点が多い。特に、糖鎖の大きな特徴である「多様性」を生み出す分子基盤はどの糖鎖についても全く理解が進んでおらず、糖鎖研究で残されている最大の課題の一つである。本研究のねらいは、糖鎖構造の「多様性」を生み出す原理を、研究代表者がこれまでに一貫して研究してきたタンパク質の糖脂質修飾であるグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)を例として解明することである。哺乳動物細胞の GPI の糖鎖部分はグルコサミン、三つのマンノース、二つのエタノールアミンリン酸から成るコア構造と、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、シアル酸の三糖から成る側鎖から構成され、側鎖の有無や伸長具合により GPI の構造多様性がもたらされる。この GPI 側鎖の構造多様性は、GPI アンカー型タンパク質(GPI-APs)である Prion を原因とする、致死性の神経変性疾患であるプリオン病の発症と関係があると報告されている。しかし、GPI 側鎖の構造多様性がどのように生じるかは全く解明されておらず、プリオン病の発症機序の解明や治療法開発の障壁となっている。そこで本研究では、研究代表者および他グループからの知見から着想を得た、GPI 側鎖構造の多様性がタンパク質輸送経路により規定される、という仮説を検証し、GPI 側鎖の構造多様化メカニズムをこれまでにない輸送経路の観点から明らかにすることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、1) GPI 付加配列依存的な GPI-APs の小胞体への取り込み経路の解明、2) GPI 糖鎖多様性の生理的意義の解明、の二つの研究目標を設定した。1)では、GPI 付加シグナル配列(GPI-SS)に依存した GPI-APs の小胞体内腔への取り込み経路の解明を中心に、江南大学の藤田盛久教授と共同で研究を進めた。その結果、GPI-APs のうち、CD59 などの GPI-SS の疎水性が低い分子は SND2 経路を介して小胞体に取り込まれることを見出した。すなわち、C 末端 GPI-SS の配列特性によって GPI-APs の小胞体取り込み経路が決定され



る可能性が示唆された。2)では、GPI 糖鎖多様性の生理的意義の解明のため、北海道大学の小林篤史准教授と共同で、PGAP4 ノックアウトマウスへのプリオン感染実験を行なった結果、GPI 糖鎖多様性がプリオン病の発症抑制に重要であることを見出した。本成果に関する論文が印刷中である。

(2) 詳細

1) GPI 付加配列依存的な GPI-APs の小胞体への取り込み経路および輸送経路の解明
本研究ではまず、GPI-APs の取り込み経路を調べた。その結果、SND2 経路をノックアウト (KO)した HEK293 細胞では CD59 や DAF、CD109 の細胞表面発現が低下することが明らかとなった。次に、取り込み経路が決定されるメカニズムを明らかにするために、これら三つの GPI-APs のアミノ酸配列を比較した。その結果、C 末端に存在する GPI 付加シグナル配列 (GPI-SS)の疎水性度が低いことが明らかとなった。そこで GPI-SS の疎水性度によって GPI-APs の取り込み経路が決定されると仮説を立て、江南大学の藤田盛久教授と共同でこの仮説を検証した。仮説の検証のために、GPI-SS の疎水性度が CD59 よりも高い二つの GPI-APs (Prion、LY6K)の、SND 経路の KO 細胞内での発現を調べた。その結果、CD59 とは異なり、Prion や LY6K は SND 経路の KO 細胞において、野生型細胞と同程度の発現を示した¹。以上の結果から、C 末端 GPI-SS の疎水性度に依存して GPI-APs 前駆体の小胞体への取り込み経路が決定されることが示唆された。この成果は、昨年、FEBS Letters 誌にて論文発表した。

2) GPI 糖鎖多様性の生理的意義の解明

本項目では、GPI 側鎖の構造多様性の生理的意義を解明するために、PGAP4-KO マウスの表現型を解析した。PGAP4-KO マウスは血中アルカリホスファターゼ値とカルシウム濃度値が増加していた。これらの値は骨形成の指標となることから、PGAP4-KO マウスでは骨形成に異常が生じた可能性が示唆され、骨密度、骨格異常の検査を実施した。その結果、予想通り PGAP4-KO マウスでは骨密度の低下、骨格異常などの骨形成異常が認められた。このことから、GPI 側鎖の構造多様性は正常な骨形成に必要であることが明らかとなった。さらに、組織別の PGAP4 の mRNA 発現解析の結果、PGAP4 が脳に高発現することを見出した。この結果は、GPI 側鎖が脳高次機能に必須である可能性を示唆する。そこで、PGAP4-KO マウスの行動解析を行なった。その結果、PGAP4-KO マウスは自発行動の低下、短期記憶の低下などの脳機能の異常を示した。また、北海道大学の小林篤史准教授と共同で PGAP4-KO マウスの病原性 Prion 株に対する感受性を評価したところ、KO マウスは野生型マウスと比べて早期に構造異常化 Prion の蓄積が見られ、早期に死亡することが明らかとなった。このことから、GPI 側鎖は生理的に必要であるだけでなく、プリオン病発症の抑制にも重要であることが明らかとなった²。この成果に関する論文が現在、Journal of Biological Chemistry 誌にて印刷中である。

3. 今後の展開

本研究により、GPI-APs の小胞体への取り込み経路が C 末端 GPI-SS の疎水性度により規定されていることが明らかとなった。今後、取り込み経路の違いにより GPI の糖鎖構造が変化するかどうかやそのメカニズムを詳細に解析することで、GPI を例とした糖鎖構造多様化メカニズム



についての知見を深める予定である。また、タンパク質の取り込み経路による糖鎖構造変化が GPI 以外の糖鎖についても見られるかどうかを調べ、本研究成果の一般化を行う予定である。これら研究に今後 10 年間で取り組むことにより、糖鎖構造の多様性が基質タンパク質の生合成初期の小胞体への取り込みによって決定される、という全く新しい概念を確立したい。この概念は今後の細胞生物学、糖鎖生物学に多大な影響を及ぼすのみならず、タンパク質の運命を操作する新規技術の開発基盤となり、糖鎖異常やタンパク質の輸送異常に起因する疾患の治療法開発に応用展開できる可能性がある。今後 15 年を目処に、タンパク質の取り込み経路の操作技術を用いて、世界初のプリオン病治療薬の開発に取り組みたい。

4. 自己評価

本研究では設定した研究項目の全てについて予定した方針で研究を進めることができ、多くの成果を得ることができた。1)の項目では、本研究での主要な課題である、GPI-APs 前駆体の小胞体への取り込み経路の解明、取り込み経路が決定されるメカニズムの解明について成果を得ることができた。これは本研究の肝である、小胞体取り込み経路の違いによる GPI 糖鎖の多様化、という仮説の証明につながる非常に大きな成果であり、本研究目的の最も重要な部分は達成できたと考えられる。研究代表者個人のみの研究体制でありながら 1 年半という当初予定よりも短い期間でこれら成果を得られたことは特筆に値し、極めて高く評価される。これは共同研究者の協力や研究総括や領域アドバイザーの先生方の指導により、本研究の核心をつく実験を立案でき、効率的に研究を進めることができたためだと考えられる。2)の項目についても順調に成果が得られ、GPI 側鎖構造の生理的意義や疾患との関わりを解明し、論文発表したことは高く評価される。

本研究の一部はすでに論文発表しており、研究者コミュニティへ影響を与え始めている。今後、現在執筆中または投稿中の論文が公開されることで、より広く社会へ影響を与えると期待される。本研究成果は細胞生物学や糖鎖生物学に新しい概念をもたらすだけでなく、プリオン病をはじめとした様々な疾患の治療法開発への応用展開が期待できる。そのため、将来的には医療、畜産などの様々な分野へと波及し、非常に大きな社会・経済効果をもたらすと期待される。本研究を通して、研究代表者独自の研究シーズと、研究者ネットワークを構築することができた。さらに、構築したネットワークを共同研究へと発展させることができ、すでに研究代表者の研究者としての個が確立されつつあると考えている。以上のように、短期間で期待以上の研究成果が得られただけでなく、得られた成果の社会還元への道筋や研究代表者の研究者としての個の確立に向けた基盤が形成されたことから、本研究の評価は非常に高い。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. Jing Yang, **Tetsuya Hirata**, Yi-Shi Liu, Xin-Yu Guo, Xiao-Dong Gao, Taroh Kinoshita, and Morihisa Fujita. 'Human SND2 mediates ER targeting of GPI-anchored proteins with low hydrophobic GPI attachment signals.' *FEBS Lett.* 2021, 595, 1542-1558

哺乳動物細胞における GPI-APs の前駆体細胞の取り込み経路について解析した結果、



CD59、CD55、CD109 は hSND2 依存的に小胞体内腔へ取り込まれることを見出した。これら GPI-APs 前駆体の GPI-SS の疎水性は共通して低く、また疎水性の高い GPI-SS の配列と入れ替えることで hSND2 に依存しなくなったことから、hSND2 への依存性は GPI-SS の疎水性の低さによって決定されることを見出した。

2. **Tetsuya Hirata**, Atsushi Kobayashi, Tamio Furuse, Ikuko Yamada, Masaru Tamura, Hiroyuki Tomita, Yuko Tokoro, Akinori Ninomiya, Yoshitaka Fujihara, Masahito Ikawa, Yusuke Maeda, Yoshiko Murakami, Yasuhiko Kizuka, and Taroh Kinoshita. 'Loss of the *N*-acetylgalactosamine side chain of the GPI-anchor impairs bone formation and brain functions and accelerates the prion disease pathology.' *J. Biol. Chem.* *In press*

GPI 側鎖の構造多様性の生理的意義を解明するために、PGAP4-KO マウスを解析した。PGAP4-KO マウスでは GPI-APs の発現には影響がなかったが、骨形成および脳機能に異常が認められた。また、PGAP4-KO マウスでは病原性 Prion が早期に蓄積し、早期に死亡することが判明した。よって、GPI 側鎖の構造多様性は骨形成、脳機能に必須であるだけでなく、プリオン病の発症抑制に不可欠であることが明らかとなった。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・学会発表

2021 年 11 月 3 日 第 94 回 日本生化学会大会

‘GPI アンカーの GalNAc 側鎖の生理的、病理的な役割’ シンポジウムオーガナイザーを兼任

・招待講演

2021 年 11 月 8 日 SAKIGAKE International Symposium

‘Application of synthetic zwitterions in biochemistry as cryoprotectants for an unstable glycosyltransferase’ 本領域の一期生である黒田浩介准教授らが主催

・総説

Tetsuya Hirata. ‘Biology of Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor Side Chains and Free GPI.’ *Trends in Glycosci. Glycotech.* 2021, 33, E129-E134