

出芽酵母が持つ新規エンド O-マンノシダーゼの同定とその機能解析

平山 弘人

理化学研究所 糖鎖代謝学研究チーム

(現所属：京都大学 iPS 研究所 湘南分室)

研究の目的

タンパク質への糖鎖修飾は真核生物に共通して見られる翻訳後修飾の一つであり、タンパク質自体の安定性を向上させるだけでなく、様々な生体内プロセス（細胞間相互作用、シグナル伝達、細胞分化、がん細胞の転移など）に深く関わっていることが知られている。我々は細胞質における糖鎖の分解・代謝の生物学的意義を解明するために、出芽酵母を用いて研究を行っている^(1,2)。その過程で、炭素源マンノースへと変化させた細胞培養条件では、新規 O-マンノシダーゼ(EOM)の活性が細胞内で上昇すること、その結果、タンパク質上の O-結合型糖鎖が切り出され、大量の遊離 O 型糖鎖(fOGs)が生成されることを偶然にも見出した。そこで、出芽酵母が有する新規 EOM 遺伝子の同定を行うことを目標とし、EOM 依存的な O-結合型糖鎖切り出しの生物学的意義の解明を目指す。

結果

(I) *CYC8* 遺伝子の doxycycline 依存的なシャットダウン株の作製。

cyc8Δ 株はマンノースを炭素源とした培養条件で、EOM の活性化に起因する過剰な脱マンノシル反応により生育阻害を示すという知見を得ている(図 1 A)。そこで、*cyc8Δ* 株上で *CYC8* 以外の遺伝子を破壊した約 4000 種類の二重変異株を掛け合わせにより作成し、*cyc8* 変異株の示す生育阻害を抑圧するような二重変異株の取得を試みることにした(図 1 B)。つまり、*cyc8Δ* 株の生育阻害を抑圧した遺伝子は EOM 自身もしくは、EOM の発現・調整に関わる因子をコードしている可能性が高い筈なので、一連の遺伝子を同定することが目的である。通常、このような 2 つの細胞種の掛け合わせで二重破壊株を作る際には、減数分裂/胞子形成という過程を経て作成される(図 1 B)。しかし残念ながら、*cyc8Δ* 株は減数分裂のプロセスに異常が見られるので、掛け合わせによる二重破壊株の作製は不可能である。そこで我々は、ドキシサイクリン(Dox)依存的に *CYC8* の発現をシャットダウンすることが出来る *TetOff* 株を作成し掛け合わせを行うことにした。具体的には、Dox 依存的発現抑制に関わる転写因子 tTA をプラスミドにより発現させた株を作り、その株における *CYC8* 遺伝子のプロモーター部分を *TetOff* プロモーターへ置き換えた。その後、Dox によるシャットダウン条件下での *CYC8* の発現を可能な限り抑える為(Dox 存在下で *CYC8* の僅かな発現を抑えるため)、C 末端には、細胞内での Cyc8 の安定性を低下させる CL-1 デグロン配列を付加し⁽³⁾、その下流には転写レベルでの発現を

減少させるための DAmP 変異⁽⁴⁾を導入した株を作成した(*TetOff-cyc8-degron-DAmP*) (図 1C)。

その結果, Dox 存在下で *TetOff-cyc8-degron-DAmP* 株の生育阻害が確認され, Dox 非存在下では良好な生育を確認することが出来た (図 1D)。また, Dox 非存在下において正常な孢子形成/減数分裂を確認することが出来た。今後はこの株を用いて 4000 種の遺伝子破壊株と掛け合わせを行ない, *cyc8* 変異株の示す生育阻害を抑圧する株のスクリーニングを行う予定である。

(II)EOM による過剰なタンパク質の脱マンノシル化は MAPK シグナル伝達経路を攪乱する *cyc8Δ* 株がマンノースを炭素源とした培養条件中で, 細胞壁合成不全に起因する生育阻害を示すことが我々の行った過去の研究から明らかとなっている。しかし, その詳細なメカニズムは不明であった。今回我々は, *cyc8Δ* における細胞壁の恒常性維持に関わるシグナル伝達経路(MAPK 経路)の異常を疑い, 解析を進めた(図 2A)。具体的には, Calcofluor white (CFW)とよばれる細胞壁合成阻害剤の非添加/添加条件下での MAPK 経路の活性化を抗-リン酸化 Mpk1 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した(図 2B)。野生株はグルコース, マンノースどちらの炭素源でも, CFW 依存的に MAPK 経路の活性化が起きている。一方, *cyc8Δ* 株を YPMan 培地で培養すると, CFW の刺激が無くても, 恒常的な MAPK 経路の活性化が見られたが, CFW による刺激を与えても, それ以上の MAPK 経路の活性化は見られなかった(図 2B)。次に脱糖鎖反応とシグナル伝達異常の関係性を探るために, MAPK 経路の因子の中で唯一 O-マンノシル化を受ける, 細胞表面上のセンサータンパク質, Wsc1 の糖鎖付加状態をウエスタンブロットにより解析した。炭素源交換後, 経時的に Wsc1 の発現を解析したところ, *cyc8Δ* 株はマンノースを炭素源として培養した時のみ, 通常見られる Wsc1 のバンドとは異なる分子量の小さいバンドが確認された(図 2 上段, Low Mw Wsc1-HA)。この分子量の低下は *cyc8Δ* 株で見られる過剰な EOM の活性化による脱マンノシル化に起因する可能性が高い。以上のことから, *cyc8Δ* 株では, 図 3 のモデル図に示されているように, 過剰な脱マンノシル化が起きることにより, Wsc1 の細胞表面での不安定化および立体構造の変化が起き, MAPK 経路が十分に機能しなくなることが示唆される。その結果, 細胞壁の恒常性の維持が出来なくなることが高いと考えられる。

結論

上述のように, 我々は *CYC8* 遺伝子の欠損株の解析を通じて, EOM の発現調節機構および, EOM の機能の生物学的意義の一端を明らかにすることに成功した。しかしながら, EOM 依存的な遊離 O 型糖鎖の生成・代謝について, 詳細な分子メカニズムや生理的意義は未だ不明な点が多い。現在我々が行っているグローバルスクリーニング—*TetOff-cyc8-degron-DAmP* 株を約 4000 種類変異株と掛け合わせて二重変異株の作成し, *cyc8Δ* の表現型を抑圧するような遺伝子をスクリーニングすること—

により、遊離 O 型糖鎖の生成・代謝および、その調節機構の全貌が明らかになる可能性が高いと考えている。

文献

- (1) Harada Y, Hirayama H, Suzuki T,(2015) Generation and degradation of free asparagine-linked glycans. *Cell Mol Life Sci.* 72(13):2509-33
- (2) Hirayama H, Hosomi A, Suzuki T, (2014) Physiological and molecular functions of the cytosolic peptide:N-glycanase..*Semin Cell Dev Biol.* 41:110-20,
- (3) Gilon T, Chomsky O, Kulka RG. (1998) Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 15;17(10):2759-66.
- (4) Schuldiner M *et al.*, (2005) Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell.*, 4;123(3):507-19.

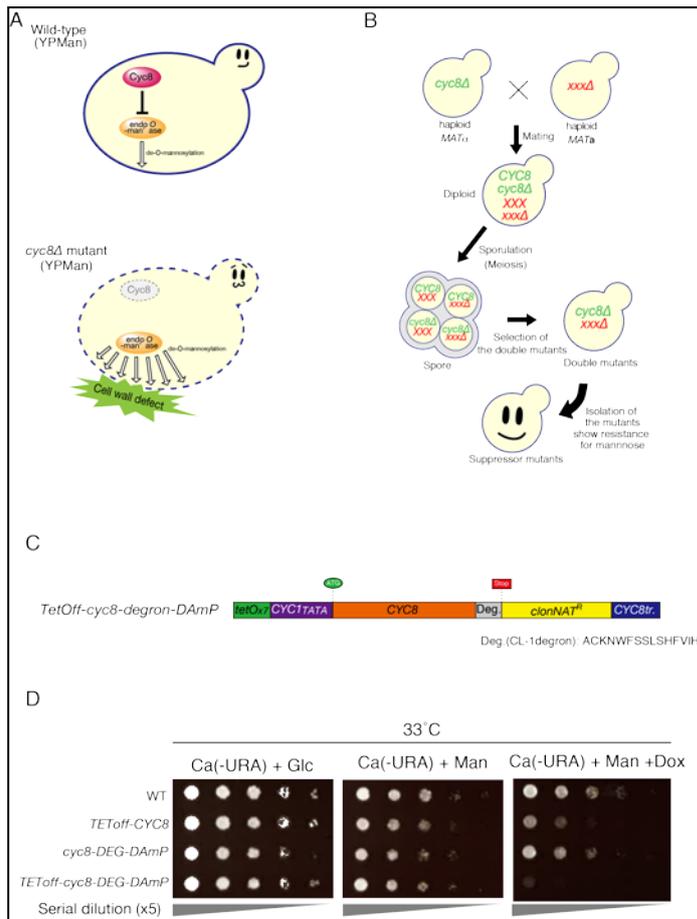


図 1 *TetOff-cyc8-degtron-DAmP* による Dox 依存的シャットダウン株の作製

(A) *cyc8Δ*株はマンノースを炭素源とした培養条件下で細胞壁の形成異常を起こす

出芽酵母における EOM の発現、活性は通常 Cyc8 によって厳密に調整されている。Cyc8 が欠損すると、EOM 活性の著しい上昇により、細胞壁に存在する糖タンパク質上の O-結合型糖鎖が切り出される。その結果、細胞壁の機能異常が起き、生育が阻害される。(B) 掛け合わせによる、*cyc8Δ*とそれ以外の遺伝子の二重破壊株の作製方法

(C) *TetOff-cyc8-degtron-DAmP* のコンストラクション図。

ゲノム上の *CYC8* プロモーター

を *tetOx7-CYC1TATA*へ置き換えることで、Dox 依存的な *CYC8* 発現のシャットダウンを行うことができる。更に Dox 存在下での *CYC8* の微弱な発現を回避するために、*CYC8* の C 末端に CL-1 デグロン配列を付加されるように設計した。また、転写された mRNA の翻訳量を低下させるために STOP コドンの直後に *clonNAT* マーカーを導入する *DAmP* 変異を導入した。

(D) 33°C における *TetOff-cyc8-degtron-DAmP* 株の生育をスポット試験にて検討

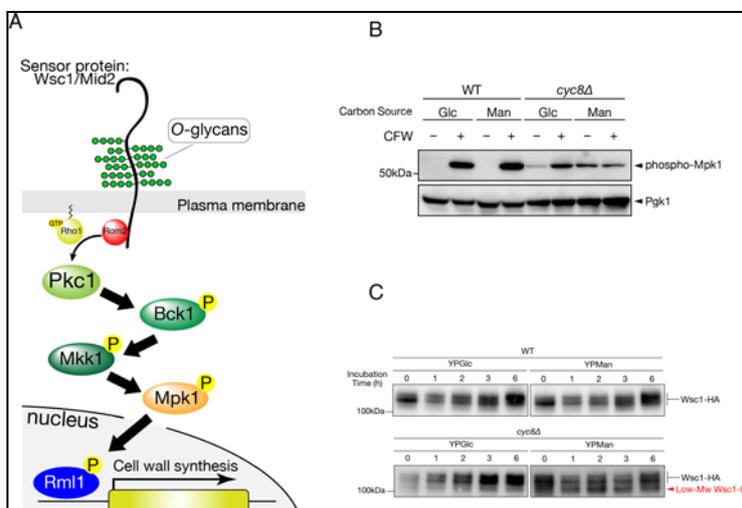


図 2 EOM の活性化による Wsc1 の脱糖鎖反応は MAPK 経路を欠損させる

(A) MAPK 経路による Cell wall integrity pathway

(B) WT と *cyc8Δ*株における MPK1 のリン酸化についての解析

(C) 炭素源交換後の Wsc1 の分子量変化

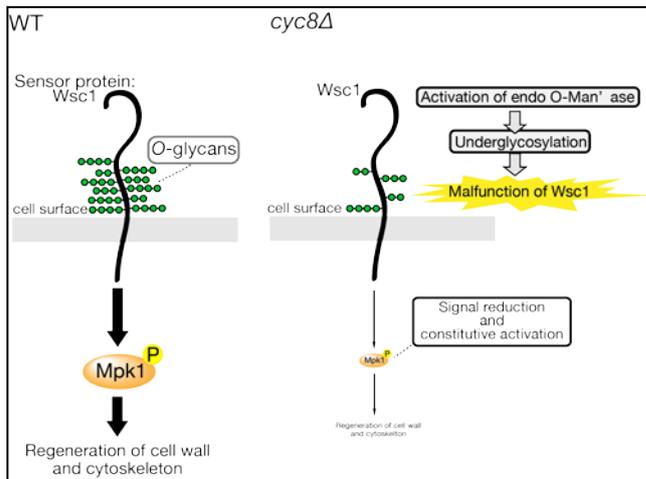


図3 *cyc8Δ*株における MAPK 経路欠損についてのモデル図