Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Cell endogenous activities of fukutin and FKRP coexist with the ribitol xylosyltransferase,TMEM5

Nishihara, Ryuta

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2018-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7246号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007246

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Cell endogenous activities of fukutin and FKRP coexist with the ribitol xylosyltransferase, TMEM5

リビトールキシロース転移酵素 TMEM5 と共在する fukutin と FKRP の細胞内在性活性

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
分子脳科学
（指導教員：和氣　弘明教授）

西原　竜太

α-ジストログリカノパチーはα-ジストログリカン(α-DG)の糖鎖修飾の異常により生じる疾患である。α-DG は細胞膜貫通蛋白であるβ-DG に接する形で細胞表面に存在するが、細胞内骨格とも親和性を有するβ-DG と細胞と隣接する基底膜との間で結合を保つ働きを持ち、基底膜と細胞骨格との間の機械的張力の担体として機能する。α-DG は表面に O-マンノース糖鎖による糖鎖修飾が行われており。この糖鎖が基底膜のラミニン蛋白と親和性を有する事で、前述のα-DG と基底膜との親和性が生じる。O-マンノース糖鎖の合成には複数の糖転移酵素が関与するが、遺伝子異常などでこれらの糖転移酵素の機能が欠損した時などにはα-DG の糖鎖修飾の異常が生じ、これにより前述の張力が失われ、細胞間の結合が保たれなくなる事により、様々な病態が出現する。α-ジストログリカノパチーはこの糖鎖修飾異常が主な病態であり、例えば O-マンノース糖鎖の合成に関連する糖転移酵素の一つの fukutin の欠損では福山型筋ジストロフィーが、POMT1/POMT2 の欠損では Walker-Warburg 症候群が発症する。 これらのα-ジストログリカノパチーは筋ジストロフィー症状、脳の形成異常、眼症状という共通する３徴が見られる。

近年、当研究室（分子脳科学講座）の研究により、fukutin、FKRP がそれぞれリビトールリン酸を O-マンノース糖鎖に転移する事で糖鎖合成に関与する働きを有し、また、やはり O-マンノース糖鎖の合成に関連する TMEM5 が、fukutin、FKRP の転移させたリビトールリン酸の隣にキシロースを転移させる働きがあるキシロース転移酵素である事が判明した(Figure 1A)。これによりこの３種の糖転移酵素は O-マンノース糖鎖に存在するそれぞれ隣り合う糖の転移を行う事が確認されたが、以前の研究で、POMT1/POMT2 が複合体を形成して糖転移活性を持つ事や、fukutin が POMGnT1(Figure には未掲載)と複合体を形成する事が報告されていた。それらの内容を踏まえ、fukutin、FKRP、TMEM5 の３種の糖転移酵素が複合体を形成している可能性や、複合体形成をして酵素活性を有している可能性を検討する事とした。

まず、fukutin-FLAG、FKRP-V5、TMEM5-Myc の３種を共発現させた HEK293T 細胞より細胞溶解ライセートを回収し共沈実験を行った。それぞれ抗 FLAG、抗 V5,、抗 Myc 抗体が付加した免沈用ビーズで免沈し、ゲル泳動、PVDF 膜に転写した後に抗 FLAG、抗 V5、抗 Myc 抗体でブロットした結果、共発現サンプルでは fukutin で免沈したサンプルが FKRP、TMEM5 と共沈しており、また、FKRP で免沈したサンプルが fukutin、TMEM5 と、TMEM5 と免沈したサンプルが fukutin、FKRP とそれぞれ共沈している事が確認された（figure 1B)。

また、これら３種の蛋白が細胞内で共在している事を確認するため、上記と同様の fukutin-FLAG、FKRP-V5、TMEM5-Myc の３種を共発現させた HEK293T 細胞を抗 FLAG、抗 V5、抗 Myc 抗体の３種の抗体で３重免疫染色した。染色細胞の顕微鏡観察の結果、fukutin、FKRP、TMEM5 の３種の強制発現蛋白が、細胞内で共在する事が確認された（Figure 2A)。

さらに、fukutin、FKRP、TMEM5 はゴルジ局在する事が知られているため、それを確認するた為に上記の３種蛋白を共発現させた HEK293T 細胞の抗ゴルジ抗体による免疫染色を行った。それぞれ抗 FLAG 抗体と抗ゴルジ抗体(GM130)で共染色した細胞、抗 V5 抗体と GM130 で共染色の細胞、抗 Myc 抗体と GM130 で共染色した細胞を顕微鏡観察した所各共発現蛋白はゴルジに局在する事も確認された(Figure 2B)。

これらの結果、各糖転移酵素は共在し、複合体を形成している可能性が示唆された。

次に、我々はこれらの糖転移酵素が共在した状態で各個の糖転移活性を維持しているかどうかを確認した。HEK293 細胞に強制発現させた TMEM5-Myc の細胞ライセート 10 枚分(90mm dish)を抗 Myc 抗体ビーズで免沈する事で、酵素(TMEM5)付加ビーズを回収し、この酵素付加ビーズに fukutin または FKRP の酵素反応に必要な基質(アクセプター、ドナー)を加え酵素活性を確認する実験を行った。

酵素付加ビーズと基質を加えて十分時間経過したサンプルの中に fukutin、FKRP の酵素活性産物が含まれているかどうかを確認した。この時コントロールとしては特に遺伝子導入は行っていない HEK293 細胞の細胞ラ

イセート 10 枚分を Myc 抗体ビーズで免沈した物を用意し、同じ基質(アクセプター、ドナー)を加え反応結果を見る事で比較を行った。

活性産物は HPLC で活性ピークを測定、活性ピークが非常に微細である事が判明したため、基質に放射性同位体(14C)が入っている物を使用し、放射性同位体のカウントによって酵素活性産物が生成されているかどうかを定量した。

その結果、強制発現 TMEM5 付加ビーズで fukutin、FKRP の酵素活性がコントロールと比較して明らかに強い酵素活性で計測された(Figure 3A、B)。活性測定実験用のサンプルでは TMEM5 のみを強制発現させており、fukutin、FKRP は遺伝子導入、強制発現させておらず、この例において fukutin、FKRP 活性が計測される理由は強制発現の TMEM5 に細胞内在性の fukutin、FKRP が付加している為であると考えられた。

これを確認するために上記の強制発現 TMEM5 付加ビーズと同様操作の酵素付加ビーズに SDS サンプルバッファーを加えて、付加酵素蛋白を溶出させた泳動用サンプルを作成し、共沈のウエスタンブロットを行った。コントロールは活性計測時のコントロールと同様に、遺伝子導入を行っていない HEK293T 細胞のライセートを同じビーズで免沈した物を使用した。

これらの結果、TMEM5 強制発現サンプル免沈、fukutin 抗体ブロットの例で細胞内在性の fukutin と思われるバンドが確認された(Figure 3A)。同じ TMEM5 強制発現サンプルを FKRP 抗体でブロットした例では内在性の FKRP は確認されなかった(Figure 3B)。この理由は元々、これらの糖転移酵素は細胞内では発現は非常に微量であると示唆されている事や、FKRP の性能の良いブロット用の抗体が無い事が考えられた。追加的に、強制発現 TMEM5 免沈サンプルでの TMEM5 酵素活性やウエスタンブロットでの発現が見られるかどうかも確認したが、活性、ウエスタンでの発現共、十分に見られた(Figure 3C)。

さらに我々は、これらの内在性酵素活性で産生された産物(部分的な O-マンノース糖鎖とペプチド)が実際に酵素反応後の産物に含まれているかを MS 解析で確認した。

上記の活性実験の fukutin 活性計測用の系で活性実験と同様の手順を行い、内在性 fukutin の活性産物付近のピークを HPLC で計測し(ネガティブコントロールは活性計測実験と同様に非導入細胞を免沈したサンプルで同じ基質を加えて反応を行った物)、分取した(Figure 4A)。分取した活性サンプルを MS、MS/MS 解析し、含有物のピーク(mz)を計測した所、基質(アクセプター)に含まれる α-DG-ペプチドの大きさである 1133(mz)のピークが見られ、それとの差分が 242(mz)となる 1375(mz)のピーク、さらにそこからの差分が 203(mz)となる 1578(mz)、1781(mz)のピークが連続し、その後に差分が 214(mz)となる 1995(mz)のピークがそれぞれ見られた(Figure 4B)。

これらのピークの差分の解釈として、α-DG ペプチドより分離されたと考えられる 242(mz)はマンノース糖とリン酸が付加した物の大きさに等しく、また、その後で連続して出現する 203(mz)は GlcNAc、GalNac の連続した構造が分離した事で計測されたと解釈できる。さらにその後に出現する 214(mz)はリビトールリン酸の分離による物と希釈出来る。この結果によって TMEM5 の強制発現蛋白と共沈した内在性の fukutin の酵素反応後の産物中には fukutin 酵素活性による活性産物 Rbo-P-GalNAcβ1-3GlcNAcβ1-4(phospho-6)Manα1-peptide が含まれており、活性産物分取による MS 解析においてはそれが分解された単糖やリン酸がピークとなって現れていると言える。これにより、強制発現 TMEM5 と内在性 fukutin は共在しており、その際にも内在性の fukutin 活性は保たれている事が明らかになった。

蛋白質が複合体を形成する例は報告されており、ミトコンドリア蛋白や遺伝子発現、調整などの分野では報告も多い。1 つの蛋白質は生成してから分解されるまでに複数の蛋白質と共在、複合体形成をするのではないかという示唆もある。今回の実験の対象である O-マンノース糖鎖の糖鎖形成に関わる糖転移酵素同士は本論文以外の研究でも複合体を形成する事が既にいくつか報告されているが、前記の分野などに比して報告例は少ない。

本論文の対象は酵素蛋白質であるが、酵素蛋白質同士が複合体を形成する利点としては、例えば 2 段階の反応を行う酵素同士が複合体を形成した場合、1 段階目の反応によって生じる反応産物が、近接する 2 段階目反応担当の酵素の酵素活性中心に速やかに移動される事により酵素反応速度が増大する事などが考えられる。細胞内在性酵素の複合体形成と酵素活性に関しては現在でも報告は少なく、本研究が酵素蛋白質複合体の形成機構やその意義の解明に今後関与する可能性も考えられる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2791 号	氏 名	西原 竜太
論文題目 Title of Dissertation	Cell endogenous activities of fukutin and FKRP coexist with the ribitol xylosyltransferase, TMEM5 (リビトールキシロース転移酵素 TMEM5 と共在する fukutin と FKRP の細胞内在性活性)		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 榎本 秀樹 副 査 Vice-examiner 南 康博 副 査 Vice-examiner 丹生健一		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

α-ジストログリカンパチーはα-ジストログリカンの表面に存在する O-mannose 糖鎖の糖鎖修飾に異常が生じた場合に発症する疾患群で、神経遊走障害による脳の形成異常、筋ジストロフィー、眼神経異常を 3 徴とする疾患群である。 O-mannose 糖鎖形成に関与する多くの糖転移酵素の存在が報告されているが、遺伝子変異などでこれらの糖転移酵素の活性が低下した場合などにα-ジストログリカンパチーが発症する事が知られている。

これらの O-mannose 糖鎖の合成に関与する糖転移酵素同士が複合体を作る事も知られており、例えば POMT1 と POMT2 は Thr/Ser に mannose を付加させる活性を持つが、これらは複合体形成している場合の方が、単独で働く場合と比較して高い活性を持つ。他にも fukutin と POMGnT1、LARGE とβ4GAT1 はそれぞれ相互作用しているという報告が既にされている。

近年、fukutin、FKRP、TMEM5 が O-mannose 糖鎖の形成に関与する糖転移酵素であるという報告がなされ、fukutin は Ribitol 5-Phosphate transferase で、CDP- Ribitol を基質として O-mannose 糖鎖にリビトールリン酸を供与する働きがある事、FKRP は fukutin が転移させたリビトールリン酸の後にさらに CDP- Ribitol を基質としてリビトールリン酸を付加させる働きを持つ事、 TMEM5 は Ribitol β1,4-Xylosyltransferase であり UDP-Xylose を基質として FKRP 修飾部の後に Xylose を転移する働きがある事が明らかになっている。

結果的にはこの 3 種の糖転移酵素はそれぞれ隣接する位置にある単糖の付加を行っているという事になるが、この結果を踏まえ、これら 3 種の糖転移酵素が相互作用しているのではないかという示唆に基づいて今回の実験を行う事となった。

まず、 fukutin、FKRP、TMEM5 の 3 種の酵素蛋白が共沈しているか否かをウエスタンブロットにて確認した。HEK293T 細胞にこれら 3 種の蛋白を強制発現した後に溶解し、上清に fukutin、FKRP、TMEM5 免沈用ビーズを加えた後にそれぞれの抗体でブロットした結果、これら 3 種の蛋白は共沈している事が分かった。また。細胞に 3 種導入を行った後に fukutin、FKRP、TMEM5 の各免疫染色用の抗体を用いて 3 重免疫染色を行った結果でもやはりこれらの 3 蛋白は共在している事が分かった。

その次のステップとして、これらの糖転移酵素を強制発現後、共在した状態のままで酵素活性を計測してみる方針とした。例えば fukutin、FKRP、TMEM5 を強制発現させたサンプルを免沈し、それに fukutin、FKRP 反応の基質（CDP- Ribitol）と TMEM5 の基質 UDP-Xylose を全て加え、インキュベートすると 3 段階の修飾が終わった糖鎖構造が得られる可能性を考えて実験モデルを校構成した。しかしながら、強制発現させた酵素蛋白の活性だけではなく発現させていない酵素の活性まで計測された事から、この反応には内在性の fukutin、FKRP、TMEM5 の関与が考えられたため、内在性の活性を計測する方向に方針を改めた。

具体的には TMEM5 のみ単独で強制発現させ、その免沈サンプルを fukutin や FKRP の活性計測アッセイにかける事とした。結果的には TMEM5 のみ強制発現させたサンプルも fukutin や FKRP の活性を持つ事が判明し、これは内在性の fukutin や FKRP が強制発現 TMEM5 と共在し、複合体を形成している事を示唆する物であった。実際に強制発現 TMEM5 が内在性の fukutin や FKRP と共沈しているかを確認するウエスタンブロット共沈も施行したが、内在性 fukutin のバンドは検出されたが、FKRP のバンドは性能の良い抗体が無い事もあり検出できなかった。

最後に、強制発現 TMEM5 と共沈している内在性の fukutin の活性産物の確認を行うために、HPLC/MS による解析を行った。強制発現 TMEM5 に、活性実験同様の基質を加えて反応後に検出できた活性ピーク周囲のサンプルを分取した。この分取サンプルで MS 解析を施行した結果、fukutin 活性によって合成された産物から分離した物と思われる単糖のピークが各々計測され、これによって強制発現 TMEM5 と共沈している内在性の fukutin の活性が保たれている事が明らかになった。以上の結果より、強制発現 TMEM5 と内在性の fukutin、FKRP が各酵素活性を保ったまま複合体形成している可能性が明らかになった。

酵素蛋白質が複合体を形成する利点としては、1 段階目の酵素活性の活性産物が速やかに 2 段階目の酵素の活性中心に移動出来る事などによって酵素活性速度を上昇させるなどの理由が考えられる。
細胞内で蛋白質同士が相互作用する事は広く知られているが、酵素蛋白においてはまだ未知の内容が多い。今回の研究によって糖転移酵素の相互作用の 1 例を示す事ができたが、その意義や利点を証明する事はできなかった。この内容は今後証明されていく課題と考えられる。

本研究は O-mannnose 糖鎖形成に関わる糖転位酵素である fukutin, FKRP, TMEM5 の三量体形成と酵素活性を解析したもので価値ある業績である。よって本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。