

立教大学学術推進特別重点資金 (立教 S F R)

個人研究

2024 年度研究成果報告書

	所属部局・職名	氏名
研究代表者	理学部・助教 B	丸山 竜人
研究課題	生活習慣病の原因となる GOMED のメカニズムの解析	
研究期間	2024 年度	
研究経費 (1 円単位)	(支出金額) 999,945 円 / (採択金額) 1,000,000 円	
研究の概要 (200~300 字で記入、図・グラフは使用しないこと。)		
当該研究の研究目的を含むこと。 【以下、報告書全体について】他の研究分野の委員が評価することも想定し、わかりやすく記載すること。		
<p>GOMED は、分泌装置のゴルジ体で異常が生じたタンパク質を速やかに分解することで、個体の恒常性を保つ仕組みである。例えば、分泌できず細胞内に過剰に蓄積したインスリンは GOMED によって分解され、正常な量を保つ。しかし、ゴルジ体の主要な役割である糖鎖修飾が異常になった場合にも GOMED が引き起こされるかについては全くわかっていない。よって、GOMED が糖鎖異常のタンパク質を分解するかどうかは重要な問題である。そこで、正しく糖鎖修飾されなかったタンパク質を GOMED は分解しているのか明らかにし、そのメカニズムに迫る。</p>		

キーワード (研究内容をよく表しているものを 3 項目以内で記入。)
[GOMED] [糖鎖修飾] [スクリーニング]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

以下の視点を含めて記載のこと。

- ・当該研究は何をどこまで明らかにできたのか (できなかったのか)。
- ・何をもって研究成果 (経過) を達成できた (できなかった) と考えられるのか
自身が設定した研究目的・目標に照らして、その根拠がわかるよう記載のこと。
- ・どのような点において、当該研究分野の学術研究推進の高度化に寄与できたのか。

- ・当該研究は何をどこまで明らかにできたのか (できなかったのか)。

当該研究において、糖鎖修飾に必要な不可欠な酵素を選定し、それらの遺伝子ノックダウンを行い、オートリソソーム (様) 構造の肥大化度を AI プログラミングにより解析し GOMED の誘導を評価した。その結果、いくつかの酵素の遺伝子ノックダウンによってオートリソソーム (様) 構造の肥大化が確認された。N 型糖鎖はほとんどの分泌または膜タンパク質に付加されているため、非常に多くのタンパク質の正しい修飾に必須の酵素とされる **Man1a**、**Man1a2** に着目した。

遺伝子ノックダウンでは目的の遺伝子を完全に欠損できず、標的以外の遺伝子がノックダウンされたことによって生じるオフターゲット効果の可能性も排除できない。そこで、**Man1a**、**Man1a2** の両方を欠損した細胞を樹立し、遺伝子ノックダウンと同様に GOMED 誘導が見られるかを確認することにした。まず、作製した **Man1a**、**Man1a2** 欠損細胞では N 型糖鎖修飾機能が失われているかを確認するため、**ConA** レクチンを用いた実験を実施した。**ConA** レクチンは糖鎖に含まれるマンノースに強く結合する。**Man1a**、**Man1a2** 欠損細胞では、野生型細胞に比べマンノースの数が多い構造の糖鎖が蓄積すると考えられるため、結合する **ConA** レクチンの量が多くなると考えられる。**Man1a**、**Man1a2** 欠損細胞の **ConA** 結合度をフローサイトメーターで測定したところ、野生型細胞に比べ上昇していた。以上の結果より、作製した **Man1a**、**Man1a2** 欠損細胞では N 型糖鎖修飾機能が失われていることが示唆された。次に、**Man1a**、**Man1a2** 欠損細胞における GOMED の誘導を評価したところ、野生型細胞と比較してオートリソソーム (様) 構造の肥大化度が上昇していた。この結果は遺伝子ノックダウンでみられた結果の再現性を表している。また、**Man1a**、**Man1a2** の酵素活性を阻害する薬剤 **Kifunensine** を野生型細胞に処理した際にもオートリソソーム (様) 構造の肥大化度が上昇していたことも含めて考えると **Man1a**、**Man1a2** 欠損により GOMED が誘導されることが示唆される。

Man1a、**Man1a2** を **Man1a**、**Man1a2** 欠損細胞へレスキューすることにより、GOMED 誘導が抑制されるかを確認する実験を行うために、C 末端に GFP タグを付加した **Man1a**、**Man1a2** を発現するプラスミドを構築した。**ConA** レクチンを用いて **Man1a**、**Man1a2** の発現プラスミドの機能を確認した結果、**Man1a**、**Man1a2** 欠損細胞への **Man1a**、**Man1a2** の過剰発現により **ConA** レクチンとの結合度が低下しており、糖鎖修飾能におけるレスキューが可能であることを示唆した。また、**Man1a**、**Man1a2** 単独のレスキューでも両方をレスキューした場合でも糖鎖修飾能のレスキューの度合いに違いは見られず、どちらか一方の遺伝子がレスキューされれば十分であることが分かった。以上の結果より、まずは **Man1a** に着目し解析を行うこととした。**Man1a**、**Man1a2** 欠損細胞への **Man1a** のレスキューによって GOMED の誘導の抑制が見られるかを検討するため、**Man1a** を過剰発現している細胞 (GFP 陽性細胞) のみをセルソーターにより分取し、その細胞群におけるオートリソソーム (様) 構造の肥大化度を解析する予定である。

研究成果の概要 (つづき)

- ・何をもって研究成果(経過)を達成できた(できなかった)と考えられるのか。

ゴルジ体での糖鎖修飾異常と GOMED の関連を調べるため、本申請課題では、GOMED の誘導に影響を及ぼすゴルジ体に局在する糖鎖修飾関連酵素のスクリーニングを実施した。その結果、N型糖鎖修飾、Glucosaminoglycan 修飾や GPI 修飾に関与する遺伝子のノックダウンによって GOMED が誘導されることを示唆した。このことより糖鎖修飾異常と GOMED が関連している可能性を導くことができた。

スクリーニング結果に基づき、本研究では N型糖鎖修飾酵素 Man1a, Man1a2 に着目した。Man1a, Man1a2 欠損細胞を作製し、GOMED 誘導度を解析した結果、遺伝子ノックダウンと同様にオートリソソーム(様)構造の肥大化度の上昇が見られたため再現性を得ることができた。以上より、Man1a, Man1a2 の欠損と GOMED の誘導が関連している可能性が高まった。

GOMED の実行因子として Wipi3 や Ulk1 が知られているが、Man1a, Man1a2 の欠損による GOMED 誘導はそれらの因子の活性化を介しているのかについて検討できなかった。したがって Man1a, Man1a2 と GOMED 実行因子との関係性については不明のままである。

- ・どのような点において、当該研究分野の学術研究推進の高度化に寄与できたのか。

小胞体におけるタンパク質の品質管理システムの解明が進んでいる。一方、ゴルジ体でのタンパク質の品質管理システムには不明な点が多く、特に糖鎖による翻訳後修飾を介した制御機構は全くわかっていない。Man1a, Man1a2 は N型糖鎖の生合成過程において、ゴルジ体で最も初めに働く酵素である。さらに、N型糖鎖はほとんどの分泌または膜タンパク質に付加されているため、Man1a, Man1a2 は非常に多くのタンパク質の正しい修飾に必須の酵素である。したがって、Man1a, Man1a2 は、非常に多くのタンパク質、そしてそれらが担う多くの生命現象に関与しているため、本研究の成果は当該研究分野の学術研究推進の高度化に寄与できたと考えられる。

※この(様式 2)に記入の、成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差控え期間等を記入した調書(A4 縦型横書き 1 枚・自由様式)を添付すること。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)