

学位論文 博士（理学）

分泌型タンパク質における
糖鎖修飾の解析とその機能評価

2015 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

丹 羽 祐 貴

主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	丹羽 祐貴
主 論 文 題 目： 分泌型タンパク質における糖鎖修飾の解析とその機能評価				
(内容の要旨) 糖鎖修飾は、タンパク質の翻訳後修飾の一種であり、主にタンパク質の安定性、フォールディング、分泌などに関与している。多くのタンパク質は、正しく糖鎖修飾を受けることでその機能を発揮することから、糖鎖修飾の状態を解析し、その機能を理解することは糖タンパク質を理解する上で非常に重要である。本論文では、三種類の分泌タンパク質に関して、糖鎖修飾の解析とその機能評価を行った。				
(1) Cathepsin V の N-glycosylation とその役割の解析 ヒト Cathepsin V (CTSV) の N-glycosylation について解析を行った。N-glycosylation 阻害剤であるツニカマイシンを用いた実験や、MALDI-TOF MS による解析の結果から、CTSV が Asn ²²¹ と Asn ²⁹² の 2ヶ所で N-glycosylation されていることを初めて明らかにした。さらに、CTSV の N-glycosylation が CTSV の細胞内輸送、細胞外への分泌、酵素活性に重要であることを示し、CTSV の N-glycosylation の重要性を明らかにした。				
(2) CCN1 の O-fucosylation とその役割の解析 ヒト CCN1 の O-fucosylation について解析を行った。CCN1 過剰発現細胞より精製したリコンビナント CCN1 の MALDI-TOF MS による解析から、分泌された CCN1 は Thr ²⁴² で O-fucosylation されていることを初めて明らかにした。さらに、CCN1 の O-fucosylation が CCN1 のヘパラン硫酸を介した細胞膜への結合、細胞外への分泌に重要であることを明らかにした。また、CCN1 の O-fucosylation を触媒すると予想された Pofut2 をノックダウンすると、CCN1 の分泌量は顕著に減少した。従って、CCN1 の O-fucosylation は Pofut2 により触媒され、Thr ²⁴² における O-fucosylation が CCN1 の分泌を制御していることを明らかにした。				
(3) R-spondin1 の C-mannosylation の役割と責任酵素の解析 ヒト R-spondin1 (Rspo1) の C-mannosylation について解析を行った。Rspo1 過剰発現細胞より精製したリコンビナント Rspo1 の LC-MS による解析から、分泌された Rspo1 は、Trp ¹⁵³ と Trp ¹⁵⁶ の 2ヶ所で C-mannosylation されることを初めて明らかにした。また、Rspo1 の C-mannosylation が、Rspo1 の細胞内輸送、細胞外への分泌、Wnt シグナルの増強活性に重要であることを明らかにした。さらに、Rspo1 の Trp ¹⁵³ 及び Trp ¹⁵⁶ の C-mannose 転移酵素の検討を行った結果、ヒト Rspo1 の Trp ¹⁵⁶ に対する C-mannose 転移酵素として DPY19L3 を同定した。DPY19L3 をノックダウンした際の Rspo1 の分泌量を評価した結果、Rspo1 の分泌は顕著に減少した。従って、Rspo1 の Trp ¹⁵⁶ の C-mannosylation は DPY19L3 により触媒され、C-mannosylation が Rspo1 の分泌を制御していることを明らかにした。				
本研究により、分泌タンパク質における糖鎖修飾の重要性が明らかとなり、今後の糖鎖生物学の研究発展につながることが期待される。				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name NIWA, Yuki
Title Analysis of protein glycosylation on the secreted proteins and its functional evaluation.		
Abstract <p>Glycosylation is one of the post-translational modifications and relates to protein stability, folding, secretion, and so on. Since glycosylation is necessary for many proteins to function, analysis of protein glycosylation is important to understand the functions of glycoproteins. In this study, the author analyzed glycosylation of three secreted proteins and evaluated its functions.</p> <p>(1) Analysis of <i>N</i>-glycosylation of cathepsin V and its functional effects The author analyzed <i>N</i>-glycosylation of human cathepsin V (CTSV). The results of the treatment with tunicamycin, an <i>N</i>-glycosylation inhibitor, and MALDI-TOF MS analyses demonstrated that CTSV is <i>N</i>-glycosylated at Asn²²¹ and Asn²⁹². Furthermore, <i>N</i>-glycosylation of CTSV was required for its intracellular trafficking, secretion, and the activity. These results demonstrated that functions of CTSV are regulated by <i>N</i>-glycosylation.</p> <p>(2) Analysis of <i>O</i>-fucosylation of CCN1 and its functional effects The author analyzed <i>O</i>-fucosylation of human CCN1. MALDI-TOF MS analysis demonstrated that secreted CCN1 is <i>O</i>-fucosylated at Thr²⁴². Furthermore, <i>O</i>-fucosylation of CCN1 was required for secretion and binding to cell surface via heparan sulfate proteoglycan. Moreover, knockdown of Pofut2, possible enzyme that catalyzes <i>O</i>-fucosylation of CCN1, decreased the secretion of CCN1; therefore, these results demonstrated that <i>O</i>-fucosylation of CCN1 at Thr²⁴² by Pofut2 is important for its secretion.</p> <p>(3) Analysis of <i>C</i>-mannosylation of R-spondin1 and its functional effects, and identification of responsible <i>C</i>-mannosyltransferase for R-spondin1 The author analyzed <i>C</i>-mannosylation of human R-spondin1 (Rspo1). LC-MS analysis revealed that secreted Rspo1 is <i>C</i>-mannosylated at Trp¹⁵³ and Trp¹⁵⁶. Furthermore, <i>C</i>-mannosylation of Rspo1 was important for its intracellular trafficking, secretion, and its agonistic activity for Wnt signaling. Moreover, the author first demonstrated that <i>C</i>-mannosylation of Rspo1 at Trp¹⁵⁶ was catalyzed by DPY19L3. Knockdown of DPY19L3 decreased the secretion level of Rspo1. These results suggested that <i>C</i>-mannosylation of Rspo1 at Trp¹⁵⁶ by DPY19L3 regulates its secretion.</p> <p>From this study, the author demonstrated the importance of glycosylation on the secreted proteins, and these results are expected for the development of the study about glycobiology.</p>		