

Title	C型糖転移酵素DPY19L3のトポロジー解析と活性点の探索
Sub Title	Topological analysis of human C-mannosyltransferase DPY19L3
Author	丹羽, 祐貴(Niwa, Yuki)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2018
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、C型糖転移酵素であるDPY19L3の小胞体(ER)膜上におけるトポロジーの解析を行った。C型糖修飾はタンパク質の糖鎖修飾の1つで、α-マンノースがトリプトファンのインドール環2位の炭素に対し、炭素-炭素結合を介して結合するユニークな糖修飾である。またこの反応はER内腔において酵素的に起こることが分かっている。以前の研究において我々は、ヒトDPY19L3がR-spondin1のTrp156に対するC型糖転移酵素であることを世界に先駆けて証明した。ヒトDPY19L3はER膜上に存在し、複数回の膜貫通領域を有することが予測されたが、DPY19L3のトポロジーは分かっていなかった。そこで本研究において我々は、in silicoによるDPY19L3トポロジーの解析結果をもとに、分泌型ルシフェラーゼを利用したredox-sensitive luciferase assayを行うことで、DPY19L3のER膜上のトポロジーを確定した。その結果、DPY19L3は11回の膜貫通領域と2個のre-entrantループを有し、そのN末端は細胞質に、C末端はER内腔に配向していることを明らかにした。ヒトDPY19L3は Asn118, Asn319, Asn439, Asn704の4ヶ所でN型糖鎖修飾のコンセンサス配列を有していた。そこでDPY19L3のN型糖鎖修飾部位を特定した結果、Asn118とAsn704の2ヶ所はN型糖鎖修飾され、Asn319とAsn439はN型糖鎖修飾されないことを示した。このことは先の実験で確定したDPY19L3のトポロジー結果と一致し、我々の提示したDPY19L3のトポロジーの確からしさが証明された。ショウジョウバエS2細胞はC型糖修飾活性を有していないが、DPY19L3を導入することで人工的にC型糖修飾を引き起こすことが出来る。この細胞を用いてDPY19L3のN型糖鎖修飾がその活性に重要であるかを評価したが、活性には重要でなかった。一方で、DPY19L3のスプライシングバリエーションであるisoform2は活性を有していなかった。isoform2はDPY19L3のER内腔に配向したC末端領域を欠損している。つまりDPY19L3の活性に重要なC末端領域を同定した。 In this study, we analyzed the ER membrane topology of C-mannosyltransferase DPY19L3. C-mannosylation is a rare type of protein glycosylation in which α-mannose is enzymatically attached to the indole C2 carbon of a tryptophan residue via a C-C linkage in the endoplasmic reticulum (ER) lumen. Previously, we first identified human DPY19L3 as a C-mannosyltransferase for R-spondin1 at Trp156. In the present study, we determined membrane topology of human DPY19L3, which is predicted to be multipass transmembrane protein and localizes to the ER membrane. To identify membrane topology of DPY19L3, we performed redox-sensitive luciferase assay using secretory luciferase based on in silico analysis. As a result, we revealed that DPY19L3 comprises 11 transmembrane regions and 2 re-entrant loops with the N- and C-termini facing the cytoplasm and ER lumen, respectively. Human DPY19L3 has 4 N-glycosylation consensus sites at Asn118, Asn319, Asn439, and Asn704. We identified that DPY19L3 is N-glycosylated at Asn118 and Asn704 but not Asn319 and Asn439, supporting the accuracy of our topological model of DPY19L3 ; however, gain-of-function experiments using Drosophila S2 cells, which lack C-mannosyltransferase activity but are able to induce C-mannosylation by introducing DPY19L3, revealed that N-glycosylations at Asn118 and Asn704 are not required for its C-mannosyltransferase activity of DPY19L3. On the other hand, DPY19L3 has a splice variant, called isoform2, which lacks C-terminal luminal region of DPY19L3. We evaluated the C-mannosyltransferase activity of isoform2 by gain-of-function experiments and suggested that isoform2 has no C-mannosyltransferase activity. These results demonstrated that human DPY19L3 has C-terminal essential region for C-mannosyltransferase.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2017000001-20170266

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	理工学部	職名	助教(有期)	補助額	500 (特B)千円
	氏名	丹羽 祐貴	氏名 (英語)	Yuki Niwa		
研究課題 (日本語)						
C 型糖転移酵素 DPY19L3 のトポロジー解析と活性点の探索						
研究課題 (英訳)						
Topological analysis of human C-mannosyltransferase DPY19L3						
1. 研究成果実績の概要						
本研究では、C 型糖転移酵素である DPY19L3 の小胞体(ER)膜上におけるトポロジーの解析を行った。C 型糖鎖修飾はタンパク質の糖鎖修飾の 1 つで、α-マンノースがトリプトファンのインドール環 2 位の炭素に対し、炭素-炭素結合を介して結合するユニークな糖鎖修飾である。またこの反応は ER 内腔において酵素的に起こることが分かっている。以前の研究において我々は、ヒト DPY19L3 が R-spondin1 の Trp156 に対する C 型糖転移酵素であることを世界に先駆けて証明した。ヒト DPY19L3 は ER 膜上に存在し、複数回の膜貫通領域を有することが予測されたが、DPY19L3 のトポロジーは分かっていなかった。そこで本研究において我々は、in silico による DPY19L3 トポロジーの解析結果をもとに、分泌型ルシフェラーゼを利用した redox-sensitive luciferase assay を行うことで、DPY19L3 の ER 膜上のトポロジーを確定した。その結果、DPY19L3 は 11 回の膜貫通領域と 2 個の re-entrant ループを有し、その N 末端は細胞質に、C 末端は ER 内腔に配向していることを明らかにした。ヒト DPY19L3 は Asn118、Asn319、Asn439、Asn704 の 4 ヶ所で N 型糖鎖修飾のコンセンサス配列を有していた。そこで DPY19L3 の N 型糖鎖修飾部位を特定した結果、Asn118 と Asn704 の 2 ヶ所は N 型糖鎖修飾され、Asn319 と Asn439 は N 型糖鎖修飾されないことを示した。このことは先の実験で確定した DPY19L3 のトポロジー結果と一致し、我々の提示した DPY19L3 のトポロジーの確からしさが証明された。ショウジョウバエ S2 細胞は C 型糖鎖修飾活性を有していないが、DPY19L3 を導入することで人工的に C 型糖鎖修飾を引き起こすことが出来る。この細胞を用いて DPY19L3 の N 型糖鎖修飾がその活性に重要であるかを評価したが、活性には重要でなかった。一方で、DPY19L3 のスプライシングバリエーションである isoform2 は活性を有していなかった。isoform2 は DPY19L3 の ER 内腔に配向した C 末端領域を欠損している。つまり DPY19L3 の活性に重要な C 末端領域を同定した。						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
In this study, we analyzed the ER membrane topology of C-mannosyltransferase DPY19L3. C-mannosylation is a rare type of protein glycosylation in which α-mannose is enzymatically attached to the indole C2 carbon of a tryptophan residue via a C-C linkage in the endoplasmic reticulum (ER) lumen. Previously, we first identified human DPY19L3 as a C-mannosyltransferase for R-spondin1 at Trp156. In the present study, we determined membrane topology of human DPY19L3, which is predicted to be multipass transmembrane protein and localizes to the ER membrane. To identify membrane topology of DPY19L3, we performed redox-sensitive luciferase assay using secretory luciferase based on in silico analysis. As a result, we revealed that DPY19L3 comprises 11 transmembrane regions and 2 re-entrant loops with the N- and C-termini facing the cytoplasm and ER lumen, respectively. Human DPY19L3 has 4 N-glycosylation consensus sites at Asn118, Asn319, Asn439, and Asn704. We identified that DPY19L3 is N-glycosylated at Asn118 and Asn704 but not Asn319 and Asn439, supporting the accuracy of our topological model of DPY19L3; however, gain-of-function experiments using Drosophila S2 cells, which lack C-mannosyltransferase activity but are able to induce C-mannosylation by introducing DPY19L3, revealed that N-glycosylations at Asn118 and Asn704 are not required for its C-mannosyltransferase activity of DPY19L3. On the other hand, DPY19L3 has a splice variant, called isoform2, which lacks C-terminal luminal region of DPY19L3. We evaluated the C-mannosyltransferase activity of isoform2 by gain-of-function experiments and suggested that isoform2 has no C-mannosyltransferase activity. These results demonstrated that human DPY19L3 has C-terminal essential region for C-mannosyltransferase.						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Niwa, Y., Nakano, Y., Suzuki, T., Yamagishi, M., Otani, K., Dohmae, N., Simizu, S.	Topological analysis of DPY19L3, a human C-mannosyltransferase.	FEBS J.	in press			