

Title	C-結合型糖修飾が疾病関連タンパク質機能に与える影響の解析
Sub Title	Effect of C-mannosylation on disease-related protein functions
Author	三浦, 一輝(Miura, Kazuki)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2021
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>前年度までに申請者は、数種類のC-結合型糖修飾が起きる疾病関連タンパク質を見出している。本年度は中でも変形性関節症の原因タンパク質である ADAMTS4 について研究を行なった。まず、ADAMTS4 のC-結合型糖修飾部位を明らかとするため ADAMTS4 過剰発現ヒト培養細胞より、リコンビナント ADAMTS4 を単離・精製後、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、404番目、523番目、526番目、および529番目の Tryptophan においてC-結合型糖修飾が起きていることが明らかとなった。</p> <p>続いて、これらC-結合型糖修飾が ADAMTS4 にどのような影響を与えるか明らかとするため、C-結合型糖修飾が起きる Tryptophan を Phenylalanine に変異させた、C-結合型糖修飾されない変異型 ADAMTS4 を発現するヒト培養細胞株を樹立し、野生型 ADAMTS4 発現細胞および変異型 ADAMTS4 発現細胞を用いて比較実験を行った。その結果、変異型 ADAMTS4 は野生型 ADAMTS4 と比較して、正常なプロセッシングを受ける割合が減少し、かつ酵素活性が低下した。また、ADAMTS4 は小胞体からゴルジ体を経て細胞外に分泌されるが、変異型 ADAMTS4 ではゴルジ体への細胞内輸送が抑制され、細胞外に分泌される ADAMTS4 量が低下した。これらの結果は、ADAMTS4 のC-結合型糖修飾はタンパク質の安定性および細胞内局在に重要な役割を与えることを示唆している。</p> <p>We discovered several C-mannosylated disease-related proteins so far. In this year, we focused on a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS4) protein, which is a causative protein of osteoarthritis. First, to identify C-mannosylated tryptophan residues in ADAMTS4, we established ADAMTS4 over-expressing human cell line and purified recombinant ADAMTS4 from the conditioned medium of the cell line. LC-MS/MS analysis of recombinant ADAMTS4 showed that ADAMTS4 was C-mannosylated on Trp404, Trp523, Trp526, and Trp529. Next, to examine the effects of these C-mannosylations on ADAMTS4 functions, we established C-mannosylation-defective mutation (replaced from tryptophan to phenylalanine) ADAMTS4 over-expressing cell lines and performed several comparative experiments using wild-type ADAMTS4 and mutant ADAMTS4. These experiments showed that the C-mannosylation of ADAMTS4 regulates proper processing, enzyme activity, intracellular trafficking, and secretion. Taken together, these results demonstrated that C-mannosylation plays important roles for the proper folding and stability of ADAMTS4 protein.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000008-20200175

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	200 (B) 千円
	氏名	三浦 一輝	氏名 (英語)	Kazuki Miura		
研究課題 (日本語)						
C-結合型糖修飾が疾病関連タンパク質機能に与える影響の解析						
研究課題 (英訳)						
Effect of C-mannosylation on disease-related protein functions						
1. 研究成果実績の概要						
<p>前年度までに申請者は、数種類の C-結合型糖修飾が起きる疾病関連タンパク質を見出している。本年度は其中でも変形性関節症の原因タンパク質である ADAMTS4 について研究を行った。まず、ADAMTS4 の C-結合型糖修飾部位を明らかとするため ADAMTS4 過剰発現ヒト培養細胞より、リコンビナント ADAMTS4 を単離・精製後、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、404 番目、523 番目、526 番目、および 529 番目の Tryptophan において C-結合型糖修飾が起きていることが明らかとなった。</p> <p>続いて、これら C-結合型糖修飾が ADAMTS4 にどのような影響を与えるか明らかとするため、C-結合型糖修飾が起きる Tryptophan を Phenylalanine に変異させた、C-結合型糖修飾されない変異型 ADAMTS4 を発現するヒト培養細胞株を樹立し、野生型 ADAMTS4 発現細胞および変異型 ADAMTS4 発現細胞を用いて比較実験を行った。その結果、変異型 ADAMTS4 は野生型 ADAMTS4 と比較して、正常なプロセッシングを受ける割合が減少し、かつ酵素活性が低下した。また、ADAMTS4 は小胞体からゴルジ体を経て細胞外に分泌されるが、変異型 ADAMTS4 ではゴルジ体への細胞内輸送が抑制され、細胞外に分泌される ADAMTS4 量が低下した。これらの結果は、ADAMTS4 の C-結合型糖修飾はタンパク質の安定性および細胞内局在に重要な役割を与えることを示唆している。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>We discovered several C-mannosylated disease-related proteins so far. In this year, we focused on a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS4) protein, which is a causative protein of osteoarthritis. First, to identify C-mannosylated tryptophan residues in ADAMTS4, we established ADAMTS4 over-expressing human cell line and purified recombinant ADAMTS4 from the conditioned medium of the cell line. LC-MS/MS analysis of recombinant ADAMTS4 showed that ADAMTS4 was C-mannosylated on Trp404, Trp523, Trp526, and Trp529.</p> <p>Next, to examine the effects of these C-mannosylations on ADAMTS4 functions, we established C-mannosylation-defective mutation (replaced from tryptophan to phenylalanine) ADAMTS4 over-expressing cell lines and performed several comparative experiments using wild-type ADAMTS4 and mutant ADAMTS4. These experiments showed that the C-mannosylation of ADAMTS4 regulates proper processing, enzyme activity, intracellular trafficking, and secretion. Taken together, these results demonstrated that C-mannosylation plays important roles for the proper folding and stability of ADAMTS4 protein.</p>						
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)			
三浦 一輝、鈴木 健裕、堂前直、清水 史郎	C-mannosylation が ADAMTS4 機能に与える影響の解析	日本農芸化学会 関東支部 2020 年度大会	2020 年 11 月 28 日			
Miura, K., Suzuki, T., Sun, H., Takada, H., Ishizawa, Y., Mizuta, H., Dohmae, N. & Simizu, S.	Requirement for C-mannosylation to be secreted and activated a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS4)	Biochim. Biophys. Acta (Gen. Subj.)	March, 2021			