

Title	新規C型糖修飾必須因子の探索
Sub Title	Identification of novel essential factor of C-mannosylation
Author	森, 研人(Mori, Kento)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2022
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	まず、N型糖転移酵素複合体OSTのサブユニットタンパク質より、C型糖転移酵素との関連が予測される必須因子候補の選定を行った。先行研究において遺伝子ノックアウトの実績があるものから絞り込み、MAGT1とTUSC3を選択した。 MAGT1はシステインの近傍にあるアスパラギンに対して、N型糖鎖修飾を促す働きを有している。また、TUSC3はMAGT1と類似性が高いタンパク質であり、MAGT1が欠損した際に代償機能的に機能することが知られている。 MAGT1およびTUSC3がC型糖鎖修飾の必須因子であるか否かの検証を行うため、それぞれの遺伝子を標的として認識するsgRNAを設計し、CRISPR-Cas9システムによる遺伝子ノックアウトを行うためのプラスミドベクターを作製した。作製したベクターが正しく機能することを確認するため、HEK293T細胞に遺伝子導入を行い、細胞のゲノムDNAに対してT7 endonuclease I assayを行ったところ、MAGT1、TUSC3共に標的部位におけるゲノム編集が確認された。 続いて、これらのベクターを、C型糖修飾検出用タンパク質である、2xTSR-GFPを過剰発現するHT1080細胞にトランスフェクションした。また、遺伝子ノックアウトによるC型糖修飾の阻害を質量分析によっても検証するため、当研究室ですでに樹立済みのRspo1過剰発現HT1080細胞にも同様にトランスフェクションを行った。薬剤による選択ののち、HEK293T細胞と同様にT7 endonuclease I assayによるゲノム編集の確認を行った。その結果、MAGT1に関しては、2xTSR-GFPおよびRspo1過剰発現細胞の両方でゲノム編集が確認できなかった。TUSC3についてはゲノム編集が確認され、ノックアウト細胞を含む細胞集団をえることができた。今後はこの細胞集団からTUSC3ノックアウト細胞を選出し、バンドシフトや質量分析によるC型糖修飾への影響を評価する予定である。また、ノックアウトによる修飾阻害が確認された場合は、TUSC3とC型糖転移酵素の相互作用について、詳細に解析を行う。 First, essential factor candidates predicted to be related to the C-mannosyltransferase were selected from subunit proteins of the N-glycosyltransferase complex OST. We selected MAGT1 and TUSC3 from those that had been subjected to gene knockout in previous studies. MAGT1 stimulates N-glycosylation of asparagine in the vicinity of cysteine. TUSC3 is a protein that is highly similar to MAGT1 and is known to function as a compensatory mechanism when MAGT1 is deficient. In order to verify whether MAGT1 and TUSC3 are essential factors for C-mannosylation, sgRNAs that target MAGT1 and TUSC3 were designed, and plasmid vectors for gene knockout by the CRISPR-Cas9 system were created. In order to confirm that the generated vectors function correctly, they were transfected into HEK293T cells, and T7 endonuclease I assay was performed on the genomic DNA of the cells. Genome editing at the target sites were confirmed for both MAGT1 and TUSC3. Next, These vectors were transfected into HT1080 cells overexpressing 2xTSR-GFP, a protein for C-mannosylation detection. In addition, to verify the inhibition of C-mannosylation by gene knockout by mass spectrometry, Rspo1 overexpressing HT1080 cells established in our laboratory were also transfected in the same manner. After drug selection, T7 endonuclease I assay was performed as in HEK293T cells. As a result, for MAGT1, genome editing was not confirmed in both 2xTSR-GFP and Rspo1-overexpressing cells. On the other hand, genome editing was confirmed for TUSC3, and a cell population containing TUSC3 knockout cells was obtained. In the future, TUSC3 knockout cells will be selected from this cell population, and their effects on C-mannosylation by band shift and mass spectrometry will be evaluated. If inhibition of modification by knockout is confirmed, the interaction between TUSC3 and C-mannosyltransferase will be analyzed in detail.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000003-20210234

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	森 研人	氏名 (英語)	Kento Mori		
研究課題 (日本語)						
新規 C 型糖修飾必須因子の探索						
研究課題 (英訳)						
Identification of novel essential factor of C-mannosylation						
1. 研究成果実績の概要						
まず、N 型糖転移酵素複合体 OST のサブユニットタンパク質より、C 型糖転移酵素との関連が予測される必須因子候補の選定を行った。先行研究において遺伝子ノックアウトの実績があるものから絞り込み、MAGT1 と TUSC3 を選択した。 MAGT1 はシステインの近傍にあるアスパラギンに対して、N 型糖鎖修飾を促す働きを有している。また、TUSC3 は MAGT1 と類似性が高いタンパク質であり、MAGT1 が欠損した際に代償機制的に機能することが知られている。 MAGT1 および TUSC3 が C 型糖鎖修飾の必須因子であるか否かの検証を行うため、それぞれの遺伝子を標的として認識する sgRNA を設計し、CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子ノックアウトを行うためのプラスミドベクターを作製した。作製したベクターが正しく機能することを確認するため、HEK293T 細胞に遺伝子導入を行い、細胞のゲノム DNA に対して T7 endonuclease I assay を行ったところ、MAGT1、TUSC3 共に標的部位におけるゲノム編集が確認された。 続いて、これらのベクターを、C 型糖修飾検出用タンパク質である、2xTSR-GFP を過剰発現する HT 1080細胞にトランスフェクションした。また、遺伝子ノックアウトによる C 型糖修飾の阻害を質量分析によっても検証するため、当研究室ですでに樹立済みの Rspo1 過剰発現 HT 1080細胞にも同様にトランスフェクションを行った。薬剤による選択ののち、HEK 293 T 細胞と同様に T7 endonuclease I assay によるゲノム編集の確認を行った。その結果、MAGT1 に関しては、2xTSR-GFP および Rspo1 過剰発現細胞の両方でゲノム編集が確認できなかった。TUSC3 についてはゲノム編集が確認され、ノックアウト細胞を含む細胞集団をえることができた。今後はこの細胞集団から TUSC3 ノックアウト細胞を選出し、バンドシフトや質量分析による C 型糖修飾への影響を評価する予定である。また、ノックアウトによる修飾阻害が確認された場合は、TUSC3 と C 型糖転移酵素の相互作用について、詳細に解析を行う。						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
First, essential factor candidates predicted to be related to the C-mannosyltransferase were selected from subunit proteins of the N-glycosyltransferase complex OST. We selected MAGT1 and TUSC3 from those that had been subjected to gene knockout in previous studies. MAGT1 stimulates N-glycosylation of asparagine in the vicinity of cysteine. TUSC3 is a protein that is highly similar to MAGT1 and is known to function as a compensatory mechanism when MAGT1 is deficient. In order to verify whether MAGT1 and TUSC3 are essential factors for C-mannosylation, sgRNAs that target MAGT1 and TUSC3 were designed, and plasmid vectors for gene knockout by the CRISPR-Cas9 system were created. In order to confirm that the generated vectors function correctly, they were transfected into HEK293T cells, and T7 endonuclease I assay was performed on the genomic DNA of the cells. Genome editing at the target sites were confirmed for both MAGT1 and TUSC3. Next, These vectors were transfected into HT1080 cells overexpressing 2xTSR-GFP, a protein for C-mannosylation detection. In addition, to verify the inhibition of C-mannosylation by gene knockout by mass spectrometry, Rspo1 overexpressing HT1080 cells established in our laboratory were also transfected in the same manner. After drug selection, T7 endonuclease I assay was performed as in HEK293T cells. As a result, for MAGT1, genome editing was not confirmed in both 2xTSR-GFP and Rspo1-overexpressing cells. On the other hand, genome editing was confirmed for TUSC3, and a cell population containing TUSC3 knockout cells was obtained. In the future, TUSC3 knockout cells will be selected from this cell population, and their effects on C-mannosylation by band shift and mass spectrometry will be evaluated. If inhibition of modification by knockout is confirmed, the interaction between TUSC3 and C-mannosyltransferase will be analyzed in detail.						
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)			