OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Rab11-mediated post-Golgi transport of the sialyltransferase ST3GAL4 suggests a new mechanism for regulating glycosylation
Author(s)	北野, 真郷
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87942
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　北野　真郷　）	
論文題名	Rab11-mediated post-Golgi transport of the sialyltransferase ST3GAL4 suggests a new mechanism for regulating glycosylation. （Rab11によるシアル酸転移酵素ST3GAL4の輸送を介した新規糖鎖修飾制御機構の解明）

Rab11は、約60種類以上存在するRab GTPasesのうちの1つであり、Rab11a、Rab11bから構成され、リサイクリングエンドソーム（RE）を中心とした細胞内小胞輸送を制御します。先行研究で、このRab11aの腸上皮特異的KOマウスにおいて、小胞体・ゴルジ体で起こるN型糖鎖修飾の異常が生じていることが示唆されましたが、REはゴルジ体以降の小胞であることから、その輸送を制御するRab11と糖鎖修飾との関連は何も知られておりませんでした。

そこで私は、Rab11が糖鎖修飾を制御する詳細なメカニズムを明らかにするために、Rab11a、bをダブルでノックダウンしたHeLa細胞（DKD細胞）を作製し、解析を行いました。

DKD細胞の糖タンパク質を酵素処理やレクチンブロッティング法により解析した結果、N型糖鎖修飾に異常が起きていることがわかりました。また、LC-MSを用いて糖鎖構造分析を行ったところ、DKD細胞においてα2,3-シアル酸が選択的に増加していることがわかりました。そこで私は、N型糖鎖のα2,3-シアル酸転移酵素として最もメジャーなST3GAL4に着目し、蛍光免疫染色によりその局在を解析しました。従来、 ST3GAL4はTGNに局在し酵素反応を行うと考えられてきましたが、コントロール細胞にてREに局在するドット上の構造物が確認されたため、その数を定量するとDKD細胞で有意な減少が見られ、定常状態においてRab11がST3GAL4をREへと輸送していることがわかりました。このことからRab11はTGNからST3GAL4をREへと運ぶことで、α2,3-シアリル化を負に制御していることが示唆されました。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　北野真郷　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主査　教授	三善英知
	副査　教授	戸邉享
	副査　教授	辻川元一

論文審査の結果の要旨

本研究は、リサイクリングエンドソームを中心とした細胞内小胞輸送に関与するRab11が、α2,3-シアル酸転移酵素であるST3GAL4をゴルジ体から輸送し、α2,3-シアリル化を負に制御していることを明らかにした研究である。論文の概要は以下の通りである。

N型糖鎖修飾は高度に保存された翻訳後修飾であり、主に小胞体・ゴルジ体で糖タンパク質のアスパラギン残基に段階的に糖が付加していくことで行われ、タンパク質のフォールディングや活性などに重要な役割を担っている。この反応の中心となるのが小胞体、ゴルジ体に局在する一群の糖転移酵素であり、これらの糖転移酵素が正しい局在をすることが糖鎖の付加に重要である。主に糖転移酵素が小胞体からゴルジ体へ輸送されるためのメカニズムなどがよく研究され、糖転移酵素を小胞体に留めると適切な糖鎖付加が起こらないことが知られている。これらの輸送は小胞体―ゴルジ体間の細胞内小胞輸送によって制御されており、Rabファミリー分子やゴルジ体の足場タンパク質であるgolgin、繋留タンパク質であるSNAREなどが関与することが分かっている。一方で、エンドソームやリソソーム、細胞膜など、ゴルジ体を通過した後の分泌経路のオルガネラにおいては、糖転移酵素がそこに存在するかどうか、またその存在意義についてほとんど未解明であった。本研究ではこのゴルジ体以降の輸送経路における糖転移酵素の輸送と、N型糖鎖修飾、特にα2,3-シアル酸修飾の関連について検討している。

Ⅰ．小腸特異的Rab11aノックアウトマウスの小腸由来の糖タンパク質で確認されたN型糖鎖修飾異常をより一般的に解析するために、shRNAを用いてヒト子宮頸がん細胞株HeLa細胞でRab11a、Rab11bのダブルノックダウンを行ったところ、同様にN型糖鎖修飾異常を確認した。

Ⅱ．N型糖鎖のどのような構造に異常が生じているのかをレクチンブロットにより解析したところ、シアル酸修飾の増加が確認された。また、シアル酸加水分解酵素処理やclick chemistryなどの解析からもシアル酸修飾の増加が確認され、LC-MSを用いてより詳細に解析を行ったところ、α2,3-シアル酸修飾の異常な亢進が確認された。

Ⅲ．α2,3-シアル酸修飾異常の原因としてα2,3-シアル酸転移酵素であるST3GAL4のゴルジ体からの輸送異常を同定した。

近年、いくつかの糖転移酵素が、従来提唱されてきた小胞体-ゴルジ体への局在ではなく、細胞膜へと局在することが明らかとなってきたが、それらがどのような経路で輸送され、どのような役割を果たしているのかはほとんど分かっていない。本研究では、従来トランスゴルジ網に局在すると考えられていたST3GAL4が、Rab11依存的な小胞によってゴルジ体以降の細胞内小器官に局在することを明らかにしている。また、この経路がST3GAL4に特異的であることは考えにくく、その他の糖転移酵素も同様に輸送されていると考えられ、本研究は、「特定の糖転移酵素がどのようにして選択的に細胞膜へ輸送され、どのような役割を担うのか」という謎を紐解く革新的な足がかりとなることが期待される。以上のように本研究の科学的価値は高く、学位授与に値する内容であると認める。