

メラニン生成関連タンパク質における新規糖修飾の解析と 応用への展開

慶應義塾大学理工学部応用化学科

清水 史郎

Premelanosome protein (PMEL) is a functional protein as a scaffold for melanin synthesis and pigmentation in melanosome. PMEL forms non-toxic amyloid fibrils through aggregation of its fragments. In the previous studies, PMEL has several *N*-glycosylation and *O*-glycosylation sites and those are significant for membrane trafficking or fibril formation. *C*-mannosylation is a unique type of protein glycosylation, which the α -D-mannopyranose is attached to the first tryptophan residue in the consensus sequence, Trp-Xaa-Xaa-Trp/Cys (Xaa represents any amino acid). PMEL has one predicted *C*-mannosylation consensus sequence, Trp 153-Lys-Thr-Trp, in the N-terminal region (NTR) and Trp 153 is probably *C*-mannosylated; however, the presence of *C*-mannosylation in PMEL has not been reported. In this study, we first demonstrated by mass spectrometry that PMEL is *C*-mannosylated at predicted Trp 153, and also *C*-mannosylated at Trp 104 and Trp 156, which belong to Trp 104-Val-Asn-Asn and Trp 156-Gly-Gln-Tyr, respectively. In addition, we identified that *C*-mannosylation at Trp 104 can occur near *N*-glycosylation at Asn 106. Furthermore, we evaluated the role of *C*-mannosylation in PMEL on its function of fibril formation, using *C*-mannosylation-defective mutant (W104F, W153F/W156F) PMEL transiently overexpressed HeLa cells. Compared with control and W104F, W153F/W156F especially diminished fibrils. Taken together, PMEL is *C*-mannosylated at Trp 104, Trp 153 and Trp 156, and we suggest that the *C*-mannosylation of PMEL regulates amyloid fibril formation and/or pigmentation in melanosome.

1. 緒 言

ヒトゲノムプロジェクトの成果をもとに、ゲノムだけでなく転写産物やタンパク質の情報も網羅的に理解することができるようになってきた。これらの情報は時に様々な疾病との関連を明らかにし、治療法ならびに診断法の新規開発と改良が進められてきた。そして、今後も生命分野の情報はAIなどとの結びつきでさらに発展することが期待されている。

また、生命現象の解明に貢献したのはゲノム情報だけではなく、質量分析機器の技術革新によるところが少なくない。例えば、これまでは解析に膨大な時間を要した生体内の代謝産物をスピーディーに解析し病態を理解することができるようになったり、報告例がない生体内の有機物（核酸やタンパク質の翻訳後修飾など）の発見につながったりと、その恩恵は計り知れない。

タンパク質翻訳後修飾の1つである *C*-mannosylation は1994年にヒト尿中のRNase2より見出された¹⁾。これまでに基質タンパク質は約30知られており、分泌、細胞内局在、フォールディングに関与していることが分かっている。基質の多くはトロンボスポンジタイプIリピー

る²⁾。実際に約30の例のうち、半分以上がTSR領域で *C*-mannosylation されている。そして、TSR領域内での *C*-mannosylation 責任酵素として線虫ではdpy-19が³⁾、哺乳類ではDPY19L1やDPY19L3などが報告されている^{4,5)}。一方、TSR領域以外での *C*-mannosylation の報告も我々の研究成果を含めて数例知られている。現在までにTSR領域以外で起こる *C*-mannosylation の責任酵素がDPY19ファミリーによるものであるか否かは不明であるが、より多くの基質例を提示することで *C*-mannosylation に対する新たな知見が提示できるものと思われる。

メラノソーム内においてメラニン色素沈着の足場として重要な役割を担うPMELタンパク質は、糖鎖修飾を受ける糖タンパク質である。PMELはメラノサイトやメラノーマ特異的に発現しており、その組織特異性からメラノーマ検出のための腫瘍抗原でもある。また、PMELはプロテアーゼによる切断を経てアミロイド繊維を形成し、それが色素沈着の足場として機能する。そのため、PMELの繊維形成機構を解明することは、メラニン産生とアミロイド形成の両方の点で重要である。PMELはN末端に疎水性アミノ酸を多く含むシグナルペプチドを持つ分泌型タンパク質である。PMELはメラノソームに輸送されたのち、数回の切断を経てメラニン色素沈着のための繊維が形成される。PMELにおける糖鎖修飾は、*N*型糖鎖修飾 (*N*-glycosylation)、*O*型糖鎖修飾 (*O*-glycosylation) とともに存在し、それぞれの役割も解析されているが、*C*-mannosylationの有無や役割は未解明のままである。



Novel glycosylation of melanin-related protein and its application

Siro Simizu

Department of Applied Chemistry,
Faculty of Science and Technology,
Keio University

2. 方 法

2. 1. PMEL 過剰発現細胞の樹立とリコンビナントタンパク質の精製および質量分析法による C-mannosylation の確認

全長のヒト PMEL タンパク質は膜貫通領域があり、過剰発現させた際に精製するのが困難であると考えられたので、C-mannosylation される可能性が高い PMEL の N-terminal region (PMEL-NTR) をクローニングし、その N 末端に検出用の Myc 配列と精製用の His6 配列を導入した発現ベクターを作製した。発現ベクターを CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、選択培地で培養することで、PMEL-NTR を安定的に過剰発現する細胞株を取得した。樹立した細胞からアフィニティー精製によりリコンビナントの PMEL-NTR を大量に得ることに成功したため、得られた PMEL-NTR が C-mannosylation されているか否かを質量分析法で確認した。

2. 2. PMEL における C-mannosylation がその機能に及ぼす影響

ヒト子宮頸がん細胞の HeLa 細胞は PMEL を発現していないが、PMEL を発現させると本来の機能発現に必要な切断を受けることが知られている。そこで野生型および C-mannosylation されるトリプトファンをフェニルアラニンに置換した変異型 PMEL を HeLa 細胞に遺伝子導入し、野生型が切断を受ける条件で変異型が切断されるか否かを評価した。また、ヒトメラノーマ細胞の SK-MEL-28 細胞は PMEL を発現しているが、メラノソーム成熟過程のステージ II からステージ III への移行ができないことが知られている。よって、SK-MEL-28 細胞の内在性 PMEL をノックアウトし、その後、野生型または変異型の PMEL を再発現させることでメラノソームの成熟に PMEL の C-mannosylation が関与しているか否かを評価した。

2. 3. PMEL における C-mannosylation 責任酵素の探索

C-mannosylation 責任酵素が存在しないことが報告されていたハエ由来の S2 細胞に PMEL-NTR を発現させ、同

時に C-mannosylation 責任酵素の可能性のある遺伝子も導入することで酵素の同定を試みた。C-mannosylation の有無は上述と同様に質量分析法で評価した。

3. 結 果

3. 1. PMEL タンパク質における C-mannosylation

図 1 にヒト PMEL タンパク質の概略を示す。PMEL は N 末端側からシグナルペプチド (SP)、N-terminal region (NTR)、Polycystic kidney disease domain (PKD)、リピート領域 (RPT)、kringle-like domain (KLD)、そして膜貫通領域 (TM) があり、細胞が分化する過程で RPT と KLD の間でプロテアーゼによる切断を受ける。切断された断片はそれぞれ N 末端側が M α 、C 末端側が M β と呼ばれる。M α は細胞外領域に存在し、その中に 153 番目のトリプトファンを含んだ C-mannosylation を受ける可能性があるコンセンサス配列がある。

図 1 の 210 番目のアミノ酸までをクローニングし、さらに検出用の Myc タグと精製用の His6 タグ配列を導入したベクターを作製した。配列が正しいことを確認後、ハムスター由来である CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、G418 によるセレクションを経て安定的に過剰発現している細胞株 (CHO-K1-HM-PMEL-NTR) を樹立した。また並行して、全長の PMEL をクローニングし、発現用ベクターを作製した。

PMEL の 153 番目のトリプトファンが C-mannosylation されているかを確認するため、CHO-K1-HM-PMEL-NTR 細胞よりリコンビナント PMEL-NTR を粗精製した。そして得られたタンパク質の質量分析を行うことで C-mannosylation を検出した。その結果、予想されていた 153 番目のトリプトファンだけでなく、104 番目および 156 番目のトリプトファンも C-mannosylation されていることが示唆された。

3. 2. PMEL タンパク質における C-mannosylation の役割

3.1. の結果を受けて、PMEL タンパク質における C-mannosylation の役割を解析するために、2 つの実験を行った。1 つは HeLa 細胞に野生型または変異型の PMEL

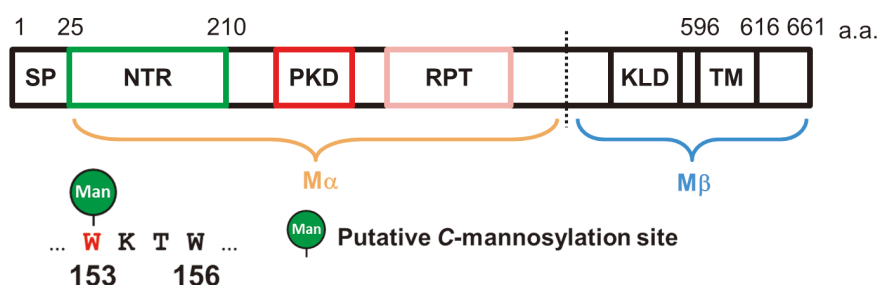


図1 ヒト PMEL タンパク質の概略

を発現させてその差を比較する実験であり、もう1つはメラノーマ細胞のPMELをノックアウトし、野生型または変異型を再発現させる実験である。3.2.の実験は全て全長のPMELを使用した。

HeLa細胞を用いた実験結果を図2に示す。前述したようにHeLa細胞にはPMELは発現していないため、空ベクターを導入したneoのレーンにはPMELは検出できない。また野生型(wt)を発現させた場合は、全長を検出できるE-7抗体で100kDa付近にバンドが確認でき、さらにHMB45抗体でM α および細かく切断されたPMELを認識することができた。同条件で104番目のトリプトファンをフェニルアラニンに置換したWFを遺伝子導入した際はwtを導入した時との差があまりなかった。一方、153番目と156番目

のトリプトファンを2か所ともフェニルアラニンに置換した2WFを遺伝子導入すると、断片化されたPMELの量が減少していた。このことからPMELタンパク質における特に153番目および156番目のC-mannosylationが、PMELが切断されるのに重要である可能性が示唆された。

2つ目の実験である、メラノーマ由来SK-MEL-28細胞におけるPMELのノックアウト実験は、現在までにノックアウト細胞を樹立し、その後wt、WF、または2WFを再導入した細胞を樹立中である。なお、ノックアウト細胞における電子顕微鏡像から、これまでの報告通り、II型のメラノソームが検出できなくなっていることは確認した(図3)。

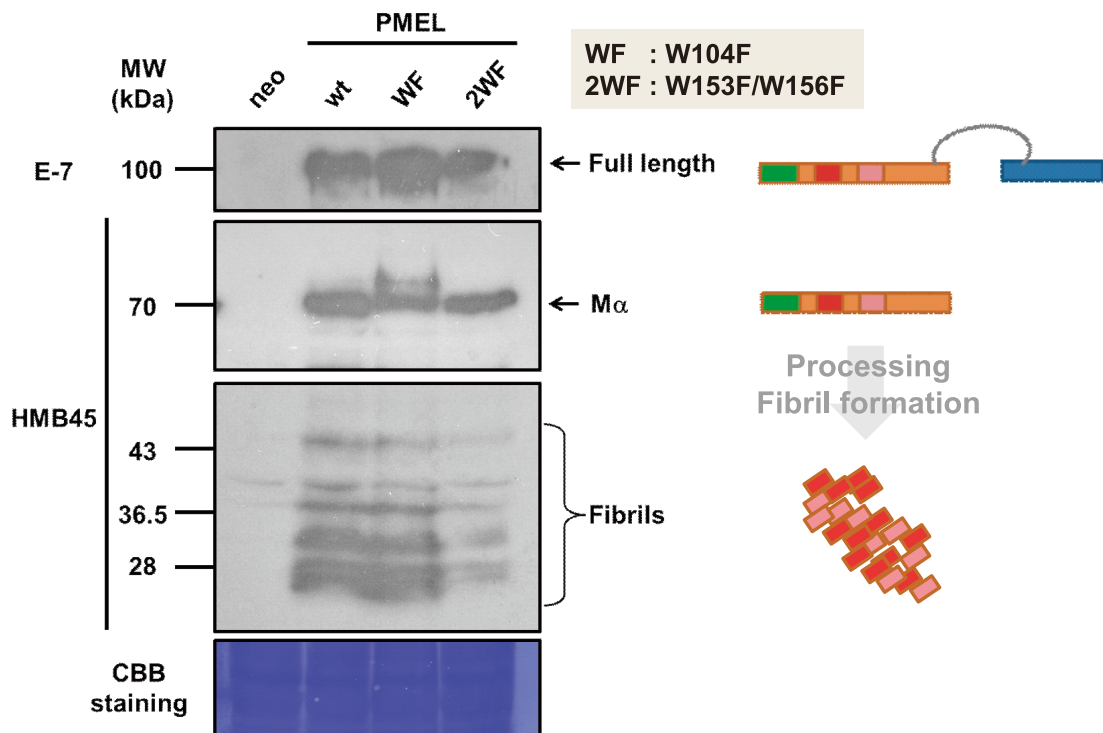


図2 HeLa細胞を用いたPMELタンパク質におけるC-mannosylationの役割の解析



図3 SK-MEL-28細胞におけるステージIIのメラノソーム電子顕微鏡像の例

3. 3. PMELにおけるC-mannosylation責任酵素の探索

これまでに我々は新たなC-mannosylation責任酵素としてDPY19L3を報告しているが、その際にハエ由来のS2細胞を使用したノックイン実験を行っている。つまり、S2細胞にはC-mannosylation責任酵素が欠損しており、基質とともに酵素を導入すると、基質タンパク質がC-mannosylationされていた。そのことを利用し、PMELのC-mannosylation責任酵素も同様に探索することとした。具体的には、S2細胞にPMELだけ、または同時に責任酵素の候補であるDPY19L1～L4のそれぞれを導入し、PMELにおけるC-mannosylationの有無を質量分析により確認した。その結果、予想に反しPMELだけを導入したS2細胞由来のリコンビナントPMELがC-mannosylationされていた。また、DPY19ファミリーを共発現してもそのC-mannosylationの程度が変化しなかった。このことから、PMELにおけるC-mannosylation責任酵素は、これまでに知られているDPY19ファミリータンパク質ではない、新規なものである可能性が示唆された。

4. 考 察

本研究では、メラニン生成関連タンパク質であるPMELにおけるC-mannosylationの役割を解析した。その結果、大変興味深い研究成果を得ることに成功した。

- I) PMELはC-mannosylationされることを世界で初めて明らかにすることができた。また、予想された153番目だけではなく、104番目と156番目のトリプトファンもC-mannosylationされていた。さらに、104番目と156番目のC-mannosylationは、我々のこれまでの研究からも提唱されているコンセンサス配列以外で起こったことから、C-mannosylationのコンセンサス配列に関する有益な情報を提供することができた。
- II) PMELのC-mannosylationは繊維形成の前段階であるプロテアーゼによる切断に関与している可能性が示唆された。以前の報告で、アラニン・スキャンによりPMEL中の重要なトリプトファンをスクリーニングしている報告があり、153番目と156番目のトリプトファンを他のアミノ酸に置換するとPMELとしての機能が著しく低下することは分かっていた。しかし、本研究成果により、その原因がC-mannosylationである可能性を示唆することができた。詳細はPMELノックアウト細胞に様々な変異型PMELを再発現させることで明らかになると考えられる。
- III) PMELのC-mannosylation責任酵素はこれまでに同定

されていないものである可能性が高いことが分かった。すなわち、C-mannosylation責任酵素が欠損していることが知られているS2細胞にPMELを遺伝子導入するだけで、(DPY19ファミリータンパク質を導入しなくても)C-mannosylationされた。本研究で、責任酵素の同定までには至らなかったが、新規C-mannosylation責任酵素の存在が示唆された。

謝 辞

質量分析は理化学研究所・環境資源科学研究センター・生命分子解析ユニットの堂前直先生、鈴木健裕先生との共同研究によるものです。また、電子顕微鏡像は東京医科歯科大学・難治疾患研究所の清水重臣先生、荒川聡子先生との共同研究の成果です。

本研究成果により、日本糖質学会より第20回日本糖質学会ポスター賞(第36回日本糖質学会)を研究室に所属していた大学院生である小松 良亮が「メラノソーム関連タンパク質PMELにおけるC-mannosylationの解析」と題し受賞している。

また、本研究を遂行するにあたり公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団よりご助成いただきましたことに感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Hofsteenge J, Müller DR, de Beer T, Löffler A, Richter WJ, Vliegenthart JF. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase U. *Biochemistry* **33**, 13524-30 (1994).
- 2) Niwa Y, Simizu S. C-mannosylation; previous studies and future research perspectives. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **30**, E231-8 (2018).
- 3) Buettner FF, Ashikov A, Tiemann B, Lehle L, Bakker H. C. *elegans* DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol. Cell* **50**, 295-302 (2013).
- 4) Niwa Y, Suzuki T, Dohmae N, Simizu S. Identification of DPY19L3 as the C-mannosyltransferase of R-spondin1 in human cells. *Mol. Biol. Cell* **27**, 744-56 (2016).
- 5) Shcherbakova A, Tiemann B, Buettner FF, Bakker H. Distinct C-mannosylation of netrin receptor thrombospondin type 1 repeats by mammalian DPY19L1 and DPY19L3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 2574-9 (2017).