

ヒト由来マンノース転移酵素 I を排他的に発現する 出芽酵母システムの構築

高橋 哲夫^{*1} 森 優美子^{*2} 小堀 範人^{*2} 三木 次雄^{*3}

Construction of the Budding Yeast System which Exclusively Expresses Mannosyltransferase I Derived from Human

by

Tetsuo TAKAHASHI^{*1}, Yumiko MORI^{*2}, Norihito KOBORI^{*2} and Tsugio MIKI^{*3}

(Received on Sep. 30, 2016 and accepted on Nov. 10, 2016)

Abstract

In eukaryotes, protein *N*-glycosylation is one of the most important co-translational modifications for the structure and function of many proteins. *N*-glycans used for protein *N*-glycosylation are derived from dolichol-linked oligosaccharides (DLOs), which are assembled by several glycosyltransferases of the dolichol pathway localized on the rough endoplasmic reticulum (rER) membrane. Of them, mannosyltransferase I involved in early assembly of DLO has been demonstrated to be essential for multiple cellular functions. In this study, we constructed an expression system in budding yeast, which exclusively expresses human mannosyltransferase I, by a genetic engineering technique using the human *HMT-1* gene. The system will be a useful tool for analyzing the function of this enzyme.

Keywords: Mannosyltransferase, Dolichol-linked oligosaccharide, *N*-glycosylation, Homologous recombination, Genetic engineering

1. 緒論

真核生物において蛋白質の *N*-グリコシル化は、多くの蛋白質の構造と機能の維持にとって最も重要な翻訳共役の修飾過程の一つである。この *N*-グリコシル化に用いられる *N*-グリカンは、ドリコール中間体 (dolichol-linked oligosaccharide; DLO) に由来する¹⁾。DLO は粗面小胞体 (rough endoplasmic reticulum; rER) 膜に局在するドリコール経路の糖転移酵素により糖鎖部分が組立てられていることから、我々はヒト細胞におけるドリコール経路の調節機構を調べるために、これまでに当経路で働く各種糖転移酵素のヒト遺伝子をクローニングして解析を行っている。

当経路において、特に糖鎖組み立ての初期に働く糖転移酵素群は、細胞の生存にとって必須であることが実証されている^{1,2)}。中でも我々がクローニングしたヒト遺伝子の中で、DLO 生合成の 3 番目の単糖付加に働くマンノース転移酵素 I をコードする *HMT-1* 遺伝子³⁾は、その遺伝的欠陥が神経・筋肉系を中心とした全身性の多様な機能不全を示す先天性グリコシル化異常症 1k 型 (congenital disorder of glycosylation 1k; CDG-1k) を引き起こすことが後に報告されている⁴⁾⁻¹⁰⁾。そこで本研究では、このヒト

マンノース転移酵素 I 中でその機能に影響を与える部位を詳細に調査するためのツールとして、遺伝子工学的手法を用いてヒトマンノース転移酵素を排他的に発現する出芽酵母株を作製し、特定の培養条件でその発現を抑制することが可能な出芽酵母発現システムを構築することにした。

2. 発現系構築用組換えプラスミドの調製

ヒト細胞と同じく、真核細胞である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、蛋白質の *N*-グリコシル化とそれに必要なドリコール経路を rER 膜に有しており、それらの機能は細胞生存に必須である¹¹⁾。したがって、酵母マンノース転移酵素 I をコードする *ALG1* 遺伝子の欠陥は出芽酵母において致死表現型となる¹²⁾。

酵母細胞内でヒト由来マンノース転移酵素 I を排他的かつ安定的に発現させるためには、酵母ゲノム内に存在する内在性の *ALG1* 遺伝子を破壊すると同時に、酵母ゲノム中にヒト *HMT-1* 遺伝子を組み込む必要がある。酵母ゲノムに外来性遺伝子を導入するには、相同組換え (homologous recombination) という現象を利用することが一般的であることから、上記目的が達成されるように酵母細胞内で相同組換えを生じさせるための組換えプラスミド ver.4 を設計した (Fig.1 及び Fig.2)。この組換えプラスミド ver.4 を形質転換操作で酵母細胞内に導入すると相同組換えにより酵母 *ALG1* 遺伝子が破壊され 2 コピー

*1 工学部生命化学科准教授

*2 工学部生命化学科学部生

*3 工学研究科工業化学専攻修士課程

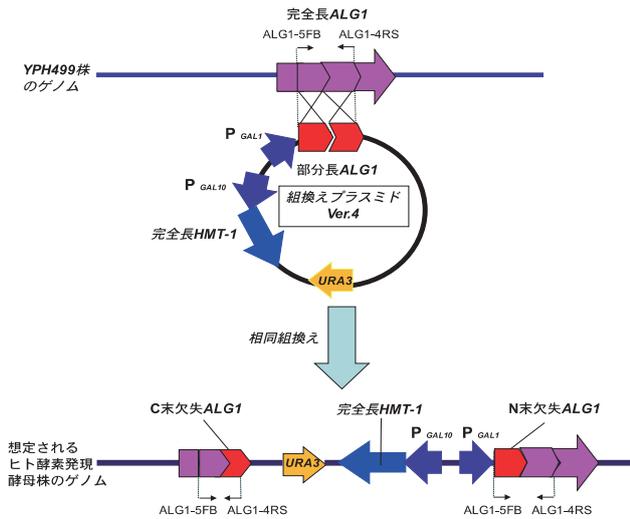


Fig. 1 Schematic presentation of strategy for genomic construction of the yeast expression system using recombinant plasmid ver.4 and homologous recombination.

の不完全な *ALG1* 遺伝子(*alg1*)が生じるとともに、ガラクトース誘導性 *GAL10* プロモーター(*P_{GAL10}*)制御下に置かれた正常なヒト *HMT-1* 遺伝子がゲノム中に安定に組み込まれることが想定される(Fig.1).

そこでまず、この組換えプラスミド ver.4 の遺伝子工学的な作製を行った。ヒトマンノース転移酵素 I のコード領域全長を有する *HMT-1* cDNA をクローニングした組換えプラスミド pESC¹³⁾ を鋳型として A1-10FN フォワードプライマーと A1-14RK リバースプライマーを用いた PCR により 5' 及び 3' 末端にそれぞれ制限酵素 *Not* I 及び *Kpn* I 認識部位を付加した完全長 *HMT-1* 遺伝子を増幅した。この *HMT-1* 遺伝子の DNA を両酵素で消化した後、同じく両酵素で消化した酵母発現用プラスミドベクター pESC-URA のマルチクローニング部位 1 にライゲーション反応 1 で連結し、常法通り大腸菌の形質転換とコロニー選択を経たクローニング操作により、当ベクターのガラクトース誘導性プロモーター配列 *P_{GAL10}* の直下に *HMT-1* をクローン化した組換えプラスミド ver.1 を取得した(Fig.2)。続いて、酵母 YPH499 株のゲノム DNA を鋳型として *ALG1*-5FB フォワードプライマーと *ALG1*-4RS リバースプライマーを用いた PCR により両末端側領域を大きく欠失した、制限酵素 *Bam* HI 及び *Sal* I 認識部位を付加した不完全長 *ALG1* 遺伝子を増幅した。この *ALG1* 遺伝子の DNA を両酵素で消化した後、同じく両酵素で消化した組換えプラスミド ver.1 のマルチクローニング部位 2(MCS2)にライゲーション反応 2 で連結し、常法通り大腸菌の形質転換とコロニー選択を経たクローニング操作により、当ベクターのガラクトース誘導性プロモーター配列 *P_{GAL1}* の直下に部分的な *ALG1* 遺伝子配列を有する組換えプラスミド ver.2 を取得した(Fig.2)。Table 1 には、完全長 *HMT-1* cDNA 及び不完全長 *ALG1* を調製するための PCR に使用したオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列をそれぞれ示す。

この組換えプラスミド ver.2 を制限酵素 *Pvu* II で部分分解し、必要な領域を含む約 3.5kb 長の平滑末端を有する DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により分離・精製した(Fig.3 のレーン 2)。この *Pvu* II 部分消化 DNA 断片

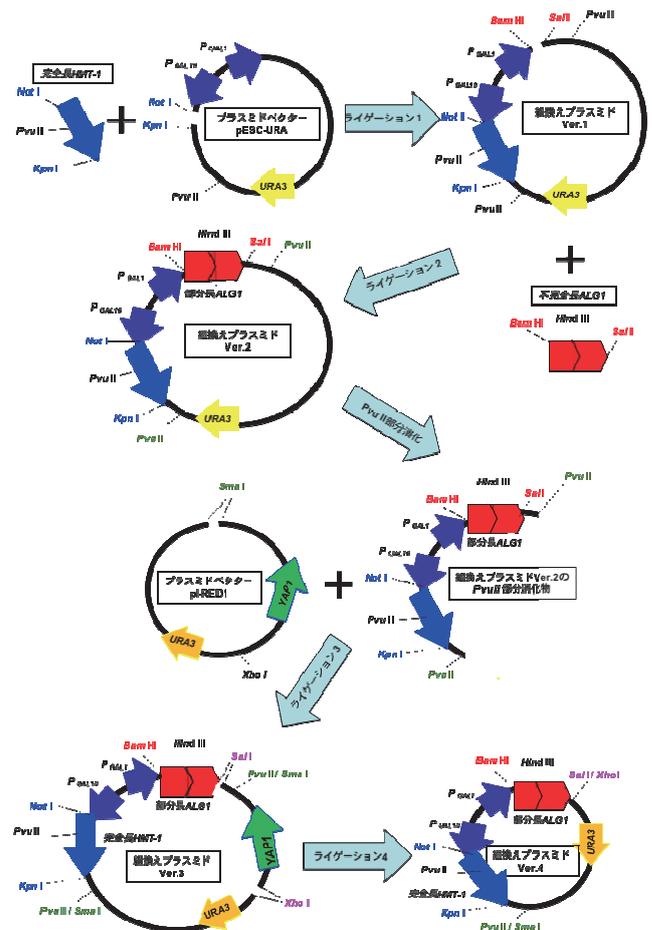


Fig. 2 Schematic presentation of construction of the recombinant plasmid ver.4.

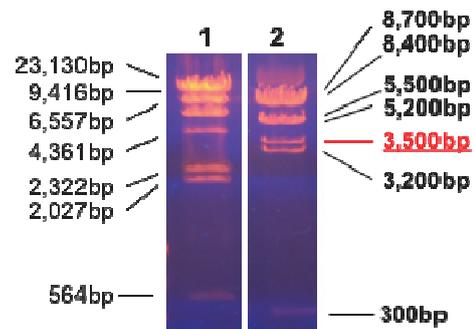


Fig. 3 Separation of 3.5 kb DNA fragment of recombinant plasmid ver.2 by 1.0 % agarose gel electrophoresis. Lane1, λ Hind III DNA size marker; lane2, products of recombinant plasmid ver.2 partially digested with *Pvu* II.

を、制限酵素 *Sma* I を用いて同じく平滑末端化した遺伝子破壊用プラスミドベクター pI-RED1 にライゲーション反応 3 で連結して同様の手順を経てクローニングし、組換えプラスミド ver.3 を取得した(Fig.2)。この組換えプラスミド ver.3 から pI-RED1 由来の不要な *YAP1* 遺伝子を除去するために制限酵素 *Sal* I 及び *Xho* I で完全消化した後、ライゲーション反応 4 で再環状化して同様の手順を経てクローニングし、目的とした組換えプラスミド ver.4 を最終的に取得した(Fig.2)。

Table 1 PCR primers used in this study.

Primer name	Nucleotide sequence	Purpose
A1-10FN	5'-gggcggccgcaaaaATGGCGCCTCATGCTTGG-3'	Cloning of full-length <i>HMT-1</i>
A1-14RK	5'-aaggtaccGTTTTAGCCTCTGGCCCAGGAG-3'	Cloning of full-length <i>HMT-1</i>
ALG1-5FB	5'-aagatccACTTGAAAAGAAAGGGAGGCGG-3'	Cloning of partial <i>ALG1</i>
ALG1-4RS	5'-ctagtgcacGAAGTATGCAGGGAAACTCCG-3'	Cloning of partial <i>ALG1</i>
A1-3F	5'-ATAACAGGCAAAGGGCCTCTGAGGG-3'	Genotyping of KOB12 strain
A1-13R	5'-ATACGGGGGCTGCGGCCACGTCGCCAGC-3'	Genotyping of KOB12 strain
ALG1-1F	5'-AGAGGGTAATTGTAACGGCATTTTAGGGGC-3'	Genotyping of KOB12 strain
ALG1-2R	5'-ACGTCACCACTTCAAAGGTCGTTATCGGG-3'	Genotyping of KOB12 strain
ALG1-4R	5'-CCTGAACCTGAAGTATGCAGGGAAACTCCG-3'	Genotyping of KOB12 strain
ALG1-7R	5'-AAAGGCTTTGGTAGTTAGGGCTTTTGACG-3'	Genotyping of KOB12 strain
UR-1F	5'-ggagaTCTTAACCCAAGTGCACAGAACAAA-3'	Genotyping of KOB12 strain

3. ヒトマンノース転移酵素 I を発現する酵母株の単離

この組換えプラスミド ver.4 を用いて、出芽酵母 YPH499 株 (遺伝子型: *MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*) の形質転換を行い、ウラシルを欠如し糖質源としてガラクトースのみを含む最少栄養合成培地である SG-URA 寒天培地にて 30°C で一週間培養した。当培地上で増殖した形質転換株のコロニーを任意に 1 つずつ選択して滅菌水に懸濁し、吸光度 $OD_{600} = 0.02$ に濃度を調製した。この懸濁液を上記の SG-URA 寒天培地ならびにウラシルを欠如し糖質源としてグルコースのみを含む最少栄養合成培地である SD-URA 寒天培地に一定液量 (5 μ L) 滴下して 30°C で 3 日間培養し増殖性を観察した。その結果を Fig.4 に示す。約 480 コロニーについて SD-URA 寒天培地上で特異的に増殖性が抑制されるクローンのスクリーニングを行った結果、KOB12 株が見出された (Fig.4A)。再確認の増殖性試験の結果、KOB12 株は SG-URA 培地上では正常に増殖するが、SD-URA 培地上では増殖しないことが判明した (Fig.4B)。この観察結果は、親株の YPH499 が内在する酵母 *ALG1* 遺伝子が確実に破壊され、かつ導入したヒト *HMT-1* 遺伝子の発現がグルコース存在下では抑制され、ガラクトース存在下では誘導されていることを強く示唆している。

4. 酵母 KOB12 株のゲノム構成の解析

上記の解析により KOB12 株は、ガラクトース含有培地においてヒトマンノース転移酵素を機能的な酵素として排他的に発現する場合に示す増殖表現型を有していることが実証された (Fig.4)。そこで次に、KOB12 株のゲノム内で、破壊された酵母 *ALG1* と導入されたヒト *HMT-1* が実際に Fig.1 に示した配置になっていることを証明するために、PCR による遺伝子型解析を行った。PCR に使用した *HMT-1* 遺伝子用の 2 種類の内部プライマー (A1-3F

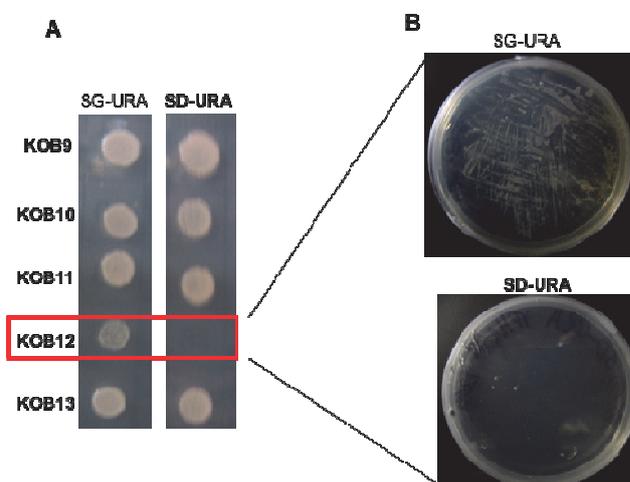


Fig. 4 Growth examination of transformants with recombinant plasmid ver.4. Panel A, spotting test of five transformants (KOB 9-13 strains); panel B, reconfirmation on growth of KOB12 strain.

及び A1-13R), *ALG1* 遺伝子用の上流側プライマー (ALG1-1F), 下流側プライマー (ALG1-2R), 2 種類の内部プライマー (ALG1-4R 及び ALG1-7R), マーカーである *URA3* 遺伝子用の内部プライマー (UR-1F) の各塩基配列を Table 1 に示し、各プライマーがアニールする位置を Fig.5A に示した。KOB 株を SG-URA 液体培地中 30°C で一晩培養した後、ゲノム DNA を抽出し、これを鋳型 DNA として上記プライマーを用いて PCR を行った。対照実験として親株の YPH499 のゲノムを鋳型 DNA とした PCR を行い、1.0% アガロースゲル電気泳動により増幅の有無を検討した。

HMT-1 特異的プライマーと *ALG1* 特異的プライマーを組み合わせた PCR の結果、KOB 株ゲノムからは想定されたサイズの DNA 断片の増幅が検出されたが、YPH499 株ゲノムからは増幅 DNA が検出されなかった (Fig.5B)。*URA3* マーカー遺伝子特異的プライマーと *HMT-1* 特異的プライマーを組み合わせた PCR においても同様の結果が得られた (Fig.5B)。これらの結果は、KOB12 株ゲノム中

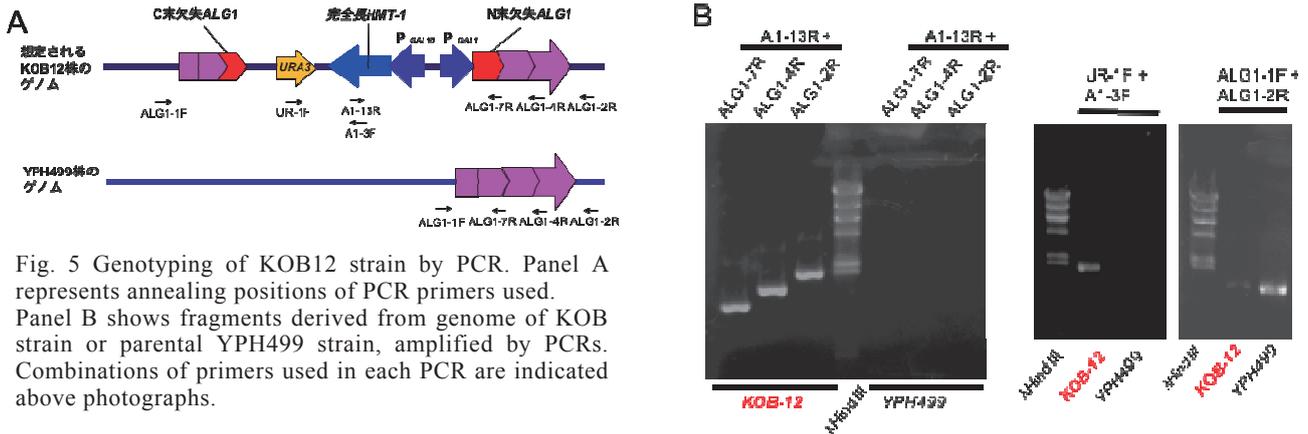


Fig. 5 Genotyping of KOB12 strain by PCR. Panel A represents annealing positions of PCR primers used. Panel B shows fragments derived from genome of KOB strain or parental YPH499 strain, amplified by PCRs. Combinations of primers used in each PCR are indicated above photographs.

の *ALG1* 遺伝子の近傍に *URA3* マーカー遺伝子とヒト *HMT-1* 遺伝子が局在していることを示している。

一方で *ALG1* 遺伝子上流側と下流側のプライマーを組み合わせた PCR では、YPH499 株ゲノムからのみ全長 *ALG1* 遺伝子の増幅が確認され、KOB12 株ゲノムからは増幅産物が検出されなかった (Fig5B)。この結果から KOB12 株のゲノムには *ALG1* 遺伝子が元の形態では残存していないことが判明した。

以上の結果を総合すると、KOB12 株のゲノムでは、想定通り、元の *ALG1* 遺伝子上流側と下流側の間に *URA3* と *HMT-1* が適切な位置関係で挿入されていると考えられる。

5. 結論

本研究の一連の解析の結果、本来の酵母マンノース転移酵素 I を機能的に有効に発現せず、代替としてヒトマンノース転移酵素 I を機能的に発現する酵母 KOB12 株を取得したと考えられる。導入したヒトマンノース転移酵素 I をコードする *HMT-1* 遺伝子はガラクトース存在下で転写を誘導し、グルコース存在下で転写を抑制する酵母細胞由来の *P_{GAL10}* プロモーターに連結してあるため、ガラクトース含有培地に酵母細胞をおいた場合のみ、ヒトマンノース転移酵素 I が発現誘導される。DLO 生合成初期に働くマンノース転移酵素 I は、酵母細胞の生存に必須であることから、ガラクトース含有培地において生育可能な KOB12 株は、機能的なヒトマンノース転移酵素 I を発現していると考えられる。一方で KOB12 株のゲノムには、*P_{GAL10}* プロモーターと同じ性質をもつ *P_{GAL1}* プロモーターに連結した酵母 *ALG1* 遺伝子や、本来のプロモーター直下に存在する *ALG1* 遺伝子も存在しているが、それぞれ当酵素の C 末端側領域または N-末端側領域のコード配列を欠如しているため、どちらも当酵素として機能不能な蛋白質を発現していると推測される。PCR を利用した KOB12 株の遺伝子型解析の結果から、KOB12 株の遺伝子型は *MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 alg1Δ::URA3-P_{GAL10}-HMT-1-P_{GAL1}-alg1Δ* と推定された。

本研究で KOB12 株を取得したことにより、ヒトマンノース転移酵素 I の酵素活性を正確に評価できる酵母発現システムを構築したことになる。この発現システムを

利用すれば、活性を有するヒトマンノース転移酵素 I の酵素学的研究のための酵素標品の調製が、培養細胞に比べて遥かに容易に可能である。さらに、KOB12 細胞はグルコース存在下で *HMT-1* 遺伝子の転写を抑制できるため、変異型 *HMT-1* 遺伝子をエピソーム性プラスミドとして KOB12 細胞に導入した後、培養時の栄養糖質源をガラクトースからグルコースに切り替えることで、プラスミド上の変異型 *HMT-1* が有する変異の有害性の効果を評価することも可能である。このような本発現システムの利用は *HMT-1* 遺伝子の欠陥に起因する CDG-Ik 型⁴⁾⁻¹⁰⁾ の出生前及び出生後の遺伝子診断にも応用が期待される。

参考文献

- 1) M. Aebi, N-linked protein glycosylation in the ER, *Biochim Biophys Acta* Vol.1833, pp.2430-2437 (2013).
- 2) A.D. Elbein, Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides, *CRC Crit.Rev. Biochem.* Vol.16, pp.21-49 (1984).
- 3) T. Takahashi, R. Honda and Y. Nishikawa, Cloning of the human cDNA which can complement the defect of the yeast mannosyltransferase I-deficient mutant *alg1*, *Glycobiology* Vol.10, pp.321-327 (2000).
- 4) C.E. Grubenmann, C.G. Frank, A.J. Hülsmeier, E. Schollen, G. Matthijs, E. Mayatepek, E.G. Berger, M. Aebi and T. Hennet, Deficiency of the first mannosylation step in the N-glycosylation pathway causes congenital disorder of glycosylation type Ik. *Hum. Mol. Genet.* Vol.13, pp.535-542 (2004). □
- 5) C. Kranz, J. Denecke, L. Lehle, K. Sohlbach, S. Jeske, F. Meinhardt, R. Rossi, S. Gudowius and T. Marquardt, Congenital disorder of glycosylation type Ik (CDG-Ik): a defect of mannosyltransferase I, *Am. J. Hum. Genet.* Vol.74, pp.545-551 (2004).
- 6) M. Schwarz, C. Thiel, J. Lübbehusen, B. Dorland, T. de Koning, K. von Figura, L. Lehle and C. Körner, Deficiency of GDP-Man: GlcNAc₂-PP-dolichol mannosyltransferase causes congenital disorder of glycosylation type Ik. *Am. J. Hum. Genet.* Vol.74, pp.472-481 (2004).

- 7) T. Dupré, S. Vuillaumier-Barrot, I. Chantret, H.S. Yayé, C. Le Bizec, A. Afenjar, C. Altuzarra, C. Barnérias, L. Burglen, P. de Lonlay, F. Feillet, S. Napuri, N. Seta and S.E.H. Moore, Guanosine diphosphate-mannose: GlcNAc₂-PP-dolichol mannosyltransferase deficiency (congenital disorders of glycosylation type Ik): five new patients and seven novel mutations, *J. Med. Genet.* Vol.47, pp.729–735 (2010).
- 8) T.M. Snow, C.W. Woods and A.G. Woods, Congenital disorder of glycosylation: a case presentation, *Adv. Neonatal Care* Vol.12, pp.96–100 (2012).
- 9) E. Morava, J. Vodopiutz, D.J. Lefeber, A.R. Janecke, W.M. Schmidt, S. Lechner, C.B. Item, J. Sykut-Cegielska, M. Adamowicz, J. Wierzba, Z.H. Zhang, I. Mihalek, S. Stockler, O.A. Bodamer, L. Lehle and R.A. Wevers, Defining the phenotype in congenital disorder of glycosylation due to *ALG1* mutations, *Pediatrics* Vol.130, e1034–e1039 (2012).
- 10) A.K. Rohlfing, S. Rust, J. Reunert, M. Tirre, I. Du Chesne, S. Wemhoff, F. Meinhardt, H. Hartmann, A.M. Das and T. Marquardt, *ALG1*-CDG: a new case with early fatal outcome, *Gene* Vol.534, pp.345–351(2014).
- 11) M.A. Kukuruzinska, M.L.E. Bergh and B.J. Jackson, Protein glycosylation in yeast, *Ann. Rev. Biochem.* Vol.56, pp.915–944 (1987).
- 12) T.C. Huffaker and P.W. Robbins, Temperature-sensitive yeast mutants deficient in asparagine-linked glycosylation, *J. Biol. Chem.* Vol.257, pp.3203-3210 (1982).
- 13) 三木次雄, リピド中間体生合成に働くヒトマンノース転移酵素Iの変異解析, 平成16年度東海大学大学院修士論文 (2006).