

アミノ酸置換型 **GlcNAc-1-phosphotransferase $\alpha\beta$** を
用いた昆虫細胞における
マンノース **6-リン酸型糖鎖修飾**の技術構築

2024

桐山慧

目次

本論文で用いた省略形	3
第一章 緒論	5
第二章 実験材料と実験方法	9
第三章 結果	17
3-1. 哺乳類細胞と昆虫細胞における NAGPA の発現比較解析	17
3-2. 昆虫細胞における NAGPA の細胞内局在解析	19
3-3. 哺乳類細胞と昆虫細胞における GNPTG の発現比較解析	21
3-4. 哺乳類細胞と昆虫細胞における GNTTAB の発現比較解析	23
3-5. 昆虫細胞における GNTTAB の細胞内局在解析	25
3-6. S1P の発現による GNPTAB の評価	26
3-7. Sf9 細胞における S1P の局在解析	28
3-8. クローニングリング法による細胞集団の獲得および発現解析	30
3-9. 獲得した細胞集団の IDUA 酵素活性測定	31
3-10. アミノ酸置換型 GNTTAB の作成	32
3-11. 昆虫細胞におけるアミノ酸置換型 GNPTAB の発現解析	34
3-12. 昆虫細胞におけるアミノ酸置換型 GNPTAB の細胞内局在解析	35
3-13. Phostag-agarose を用いた M6P 付加の評価	37
3-14. N 型糖鎖切断の有無による Phostag-agarose 分離の比較評価	39
第四章 考察	40
参考文献	43
謝辞	47

本論文で用いた省略形

4-MU	4-Methylumbelliferone
4-MUIdoA	4-Methylumbelliferyl α -L-Idopyranosiduronic acid
	2-Sulfate Disodium
BSA	Bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン
cDNA	Complementary DNA
CHO	Chinese hamster ovary, チャイニーズハムスター卵巣
CI-M6PR	Cation-independent M6P receptor, カチオン非依存性 M6P 受容体
CMV	Cytomegalovirus promoter
dCalnexin	<i>Drosophila</i> calnexin (ER marker)
dGM130	<i>Drosophila</i> 130-kDa <i>cis</i> -Golgi matrix protein (Golgi/ <i>cis</i> -Golgi marker)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphates
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ER	Endoplasmic reticulum, 小胞体
F258	Fibroblast, 健常者由来皮膚線維芽細胞
FBS	Fetal bovine serum, ウシ胎仔血清
GFP	Green Fluorescent Protein, 緑色蛍光タンパク質
GlcNAc	N-Acetylglucosamine
GNPT	N-Acetylglucosamine (GlcNAc)-1-phosphotransferase
GNPTAB	N-Acetylglucosamine (GlcNAc)-1-phosphotransferase subunits alpha/beta
GNPTG	N-Acetylglucosamine (GlcNAc)-1-phosphotransferase subunit gamma
HRP	Horseradish peroxidase, 西洋ワサビペルオキシダーゼ
<i>Hygro^r</i>	Hygromycin-resistance gene
IDUA	α -L-Iduronidase
IgG	Immunoglobulin G, 免疫グロブリン G
LERP	Lysosomal enzyme receptor protein
LYSET	Lysosomal enzyme trafficking factor
M6P	Mannose 6-phosphate, マンノース 6-リン酸

mEGFP	mono Enhanced Green Fluorescent Protein
MPR	M6P receptor(s)
MQ	Milli-Q water
NAGPA	N-acetylglucosamine-1-phosphodiester α -N-acetylglucosaminidase
<i>Neo^r</i>	Neomycin-resistance gene
n.s.	Not significant
P2A	P2A self-cleaving peptides
PBS	Phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水
PBST	0.1% (v/v) Tween 20/PBS
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PNGase F	Peptide-N-glycanase F, N型糖鎖切断酵素
POST1	Partner of site-1 protease
<i>Puro^r</i>	Puromycin-resistance gene
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RRID	Research Resource Identifiers
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
S1P	Site-1 protease
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> ovary-derived, ツマジロクサヨトウ卵巣由来
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris-buffered saline
TPB	Tryptose phosphate broth
UDP	Uridine diphosphate
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate N-acetylglucosamine
v/v	Volume/volume
w/v	Weight/volume

第一章 緒論

リソソーム酵素とマンノース 6-リン酸 (M6P)

N 型糖鎖の末端マンノース残基の 6 位にリン酸基が付加されるマンノース 6-リン酸 (M6P) 修飾は、多くのヒトリソソーム酵素がゴルジ体からリソソームへと輸送するために必要不可欠な糖鎖修飾である。哺乳類細胞での、リソソーム酵素に対する N 型糖鎖末端マンノース 6-リン酸 (M6P) 修飾は、二段階のプロセスによって行われる (Fig. 1-1)。まずシスゴルジにて GlcNAc-1-phosphotransferase (GNPT)により、N 型糖鎖の末端マンノースへ GlcNAc-1-リン酸が転移される [1]。その後トランスゴルジにて加水分解酵素である N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetyl-glucosaminidase (NAGPA)により末端 GlcNAc が切断される [2]。以上のプロセスにより露出した M6P 残基とその M6P 受容体 (MPRs)との特異的結合を介して、多くのヒトリソソーム酵素はリソソームへと輸送される [3]。

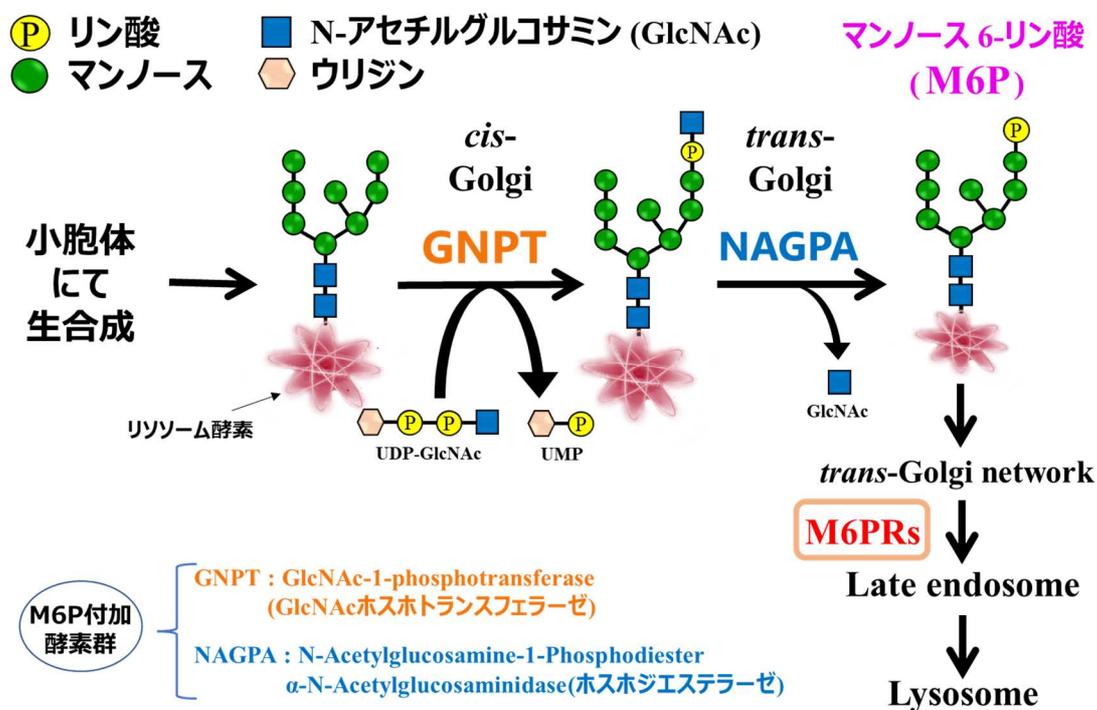


Fig. 1-1. 細胞内におけるヒトリソソーム酵素の生合成および M6P 修飾機構

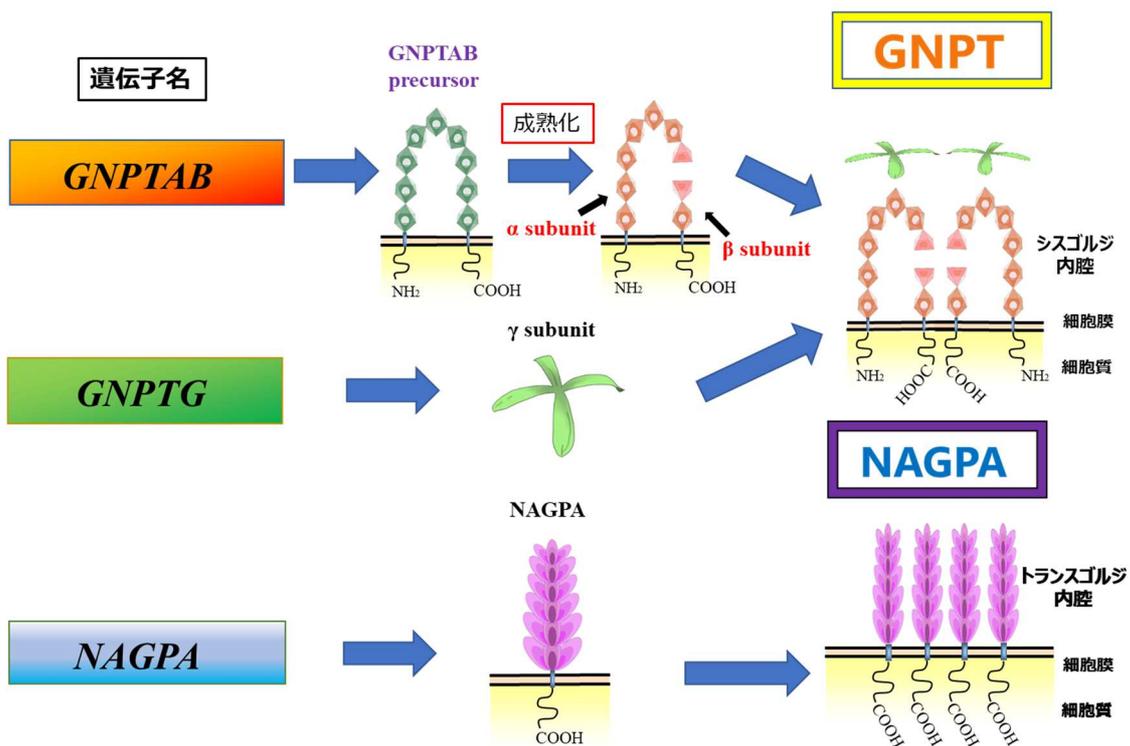


Fig. 1-2. GNPT および NAGPA の生合成および構造

GlcNAc-リン酸転移酵素 (GNPT)および GlcNAc 切断酵素 (NAGPA)

GNPT はサブユニット α 、 β 、および γ サブユニットによって形成される複合タンパク質である (Fig. 1-2) [4]。GNPTAB (MIM607840)には GNPTAB ($\alpha\beta$ 前駆体サブユニット)がコードされており、GNPTG (MIM607838)には GNPTG (γ サブユニット)がコードされている [5-7]。GNPT は $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ の状態でシスゴルジに存在し機能する。 $\alpha\beta$ サブユニットは初め前駆体の状態で合成され、K928-D929 間が切断されることで成熟化し活性化する [6]。 α サブユニットはII型の膜貫通タンパク質であり、 β サブユニットはI型の膜貫通タンパク質である。 γ サブユニットは可溶性タンパク質であり、 α サブユニットと結合し複合体を形成する [8]。NAGPA は NAGPA (MIM607985)にコードされるI型の膜貫通タンパク質であり、ホモテトラマーを形成してトランスゴルジに存在し機能する [2]。

Site-1 protease (S1P)

Site-1 protease (S1P)は *MBTPS1* (MIM 603355)にコードされるタンパク質であり、GNPTAB を含む複数のタンパク質の成熟化に関わる酵素である [9]。S1P は GNPTAB の K928-D929 間を切断するセリンプロテアーゼである (Fig. 1-3)。GNPTAB は成熟化することで転移酵素活性を有する。S1P はI型の膜貫通タンパク質であり、GNPTAB と同様シスゴルジ局在性の膜タンパク質である。S1P もまた生合成時には前駆体タンパク質として存在し、プロドメインと呼ばれるN末側のポリペプチドが切断されることで成熟化し機能する [10-12]。また S1P の活性中心は S414 であるが、その他 D218 や H249 もまたプロテアーゼ活性にかかわる重要なアミノ酸であり、190-472 aa がプロテアーゼ機能を有する領域とされている [13]。

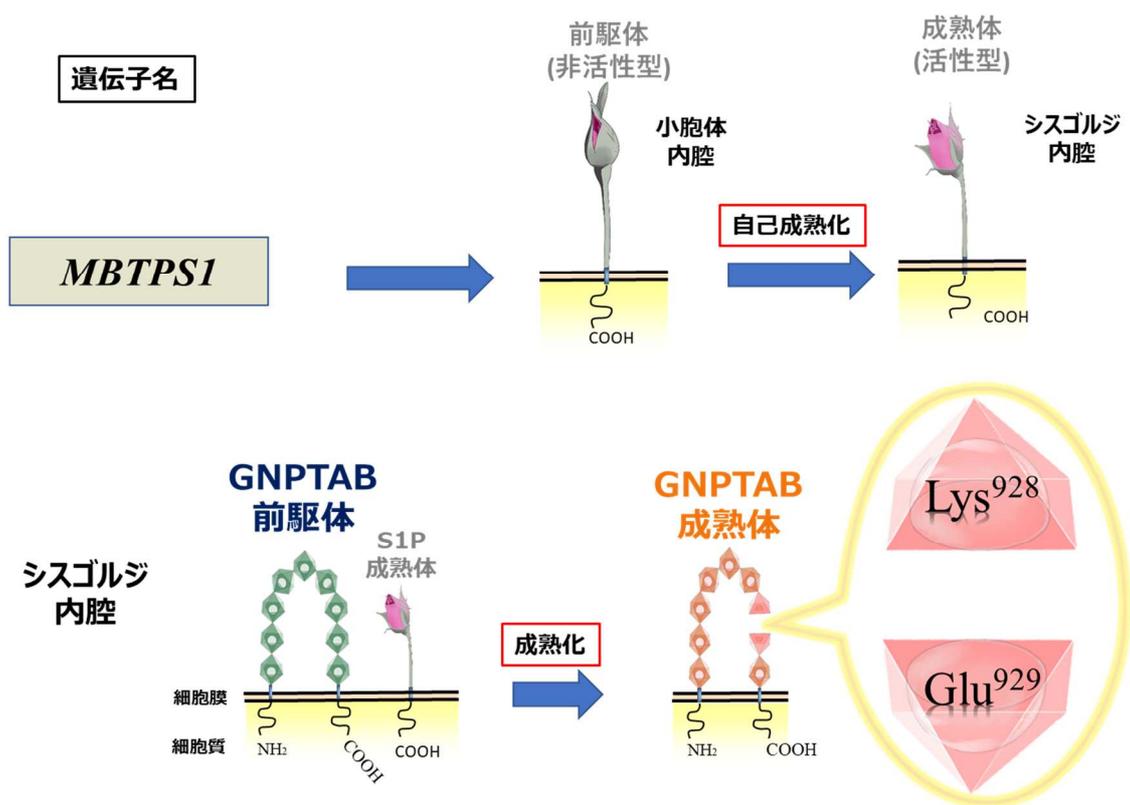


Fig. 1-3. S1P の生合成・構造および GNPTAB の成熟化メカニズム

Alpha-L-Iduronidase

Alpha-L-Iduronidase (IDUA)は *IDUA* (MIM 252800)にコードされるタンパク質であり、その N 型糖鎖に M6P 修飾を受けることでリソソームへと輸送されるリソソーム酵素である [14]。N 型糖鎖付加部位を 6 か所 (N110、N190、N336、N372、N415、N451)有し、N336 および N451 に付加される N 型糖鎖に M6P が修飾される。また N372 に付加される糖鎖は IDUA の酵素触媒能に必須であることが報告されている [15]。

哺乳類細胞では M6P 依存的なリソソーム酵素の輸送を担う受容体として MPRs が機能していることを先述した。昆虫細胞ではリソソーム酵素をリソソームに運ぶ受容体として lysosomal enzyme receptor proteins (LEBP)が存在している [16]。LERP は M6P に対する認識能は無く、リソソーム酵素の立体構造を認識し結合すると考えられている。したがって IDUA が昆虫細胞において M6P 付加された場合でも、そのほとんどは細胞上清に分泌されると考えられる。また本研究で用いた IDUA 酵素の活性評価系では、昆虫細胞で発現させたヒト IDUA 活性を検出することができる一方で昆虫細胞内在性の iduronidase 活性をほとんど検出しない。そのため本研究では M6P 修飾を受けるヒトリソソーム酵素として、回収および評価が容易である IDUA を用いることとした。

研究目的

一般に昆虫細胞は小胞体におけるタンパク質および糖鎖の生合成機構はヒトと同様であり、生合成されたタンパク質のうち特定のアスパラギン残基に、ドリコールリン酸に結合した糖鎖前駆体が転移され糖鎖修飾が進行する [17]。しかし、ゴルジ体以降の糖鎖修飾はヒトと異なることが報告されている [18]。ゴルジ体で生じる M6P 修飾は、無脊椎生物である昆虫では機能していない。そのため昆虫細胞やカイコガなどの生体を用いてヒトリソソーム酵素を大量発現させても、その N 型糖鎖に M6P は付加されない [19]。植物であるシロイヌナズナを用いて M6P 修飾を人為的に達成しようとする研究もなされているが、未だ実現はしていない [20]。そこで本研究では、無脊椎生物である昆虫細胞においてヒト M6P 修飾酵素群およびヒトリソソーム酵素を発現させその発現解析を行なうとともに、人為的な M6P 修飾の達成に関する技術構築を検討することとした。

第二章 実験材料と実験方法

抗体

本研究では以下の抗体を用いた: mouse anti-FLAG antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. RRID:AB_262044), mouse anti-HA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. RRID:AB_262051), rabbit anti-GNPTG antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), rabbit anti- β Tubulin antibody (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA. RRID:AB_823664), mouse anti-myc (MBL Life Science, Tokyo, Japan. RRID:AB_11160947), rabbit anti-*Drosophila* Calnexin (dCalnexin, Abcam, Cambridge, UK. RRID:AB_1310022), rabbit anti-Calnexin (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY. RRID: AB_11178981), rabbit anti-*Drosophila* GM130 (dGM130, Abcam, Cambridge, UK. RRID:AB_732675).

細胞

本研究では、遺伝子のクローニング用にヒト繊維芽 (F258)細胞を、各タンパク質の評価用として哺乳類細胞であるチャイニーズハムスター卵巣由来 (CHO)細胞、昆虫細胞である *Spodoptera frugiperda* (Sf9)細胞を使用した。哺乳類細胞である F258 および CHO 細胞は 10% (v/v) Fetal bovine saline (FBS, Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 、100 μ g/mL Streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、70 μ g /mL Penicillin G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)含有培地 Nutrient Mixture F-10 Ham (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)中、37°C、CO₂ 濃度 5%条件下で培養した。昆虫細胞である Sf9 細胞は 10% (v/v) Tryptose phosphate broth (TPB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、2.5% (v/v) FBS、100 μ g/mL Streptomycin、70 μ g /mL Penicillin G 含有培地 IPL-41 insect medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)中、26°Cで培養した。

各遺伝子のクローニングおよびベクターの作成

下記のプラスミドを文献に準拠し作成した [21]: pCMV-GNPTAB-3 \times FLAG, pCMV-NAGPA-3 \times FLAG, pcDNA3.1-GNPTG-HA, pIB- GNPTAB-3 \times FLAG, pIB-GNPTAB-3 \times FLAG-*Puro*^r, pIB-GNPTG-3 \times FLAG, pIB-NAGPA-3 \times FLAG, pIB-NAGPA-myc-P2A-*Hygro*^r, pIB-*Drosophila syntaxin16-mEGFP*, and pIB-MBTPS1 (*S1P*)-HA.

Neo^r をコードする遺伝子 1 ng を鋳型に P2A (P2A ペプチド配列)-*Neo*^r をコー

ドする DNA 断片を primer sets (Fw: 5' - TTTTCTAGAGGAAGCGGAGCTACTAAC TTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATG ATTGAACAAGATGGATTGC, Rev: 5' - TTTTACCGGTTTCAGAAGAAGCTCGTCAA GAAGG)を用いて増幅した。得られた DNA 断片を *pIB/V5-His vector* のマルチクローニングサイトに挿入した *pIB/P2A-Neo^r-V5-His vector* をサブクローニングし、さらに *GNPTG* を挿入した *GNPTG-P2A-Neo^r/pIB-V5-His vector* を作製した。

IDUA 遺伝子を鋳型に 1 ng 用い、*IDUA* (MIM:252800)をコードする DNA 断片を primer sets (Fw: 5' - TTTTCTCGAGCACCATGCGTC, Rev: 5' - TTTTACGCGTTGG ATTGCCCGGGGATG)を用いて増幅した。増幅した DNA 断片を *pIZ/V5-His vector* に挿入し、*IDUA-His/pIZ vector* を作製した。

各種インサート DNA の配列に関しては、徳島大学大学院医歯薬学研究部総合研究支援センター先端医療研究部門でシークエンシングを行ない、塩基配列を確認した。また組換え遺伝子を用いた実験は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会の承認を得て行なった。

アミノ酸置換型 GNPTAB (GNPTAB^{Q36L/E39L})のクローニング

プライマーセット(Fw: 5'-phosphate-GGACTGGTGGTTCTGGAATGGAGC, Rev: 5'-phosphate-GAACAGGAAGGCGGAGACGATGG) を用いて *pIB-GNPTAB-3×FLAG-Puro^r* から DNA 断片 *GNPTAB^{Q36L/E39L}* を含む鎖状の *pIB-GNPTAB^{Q36L/E39L}-3×FLAG-Puro^r* を増幅した。その後 ligation mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いてセルフライゲーションによりプラスミド *pIB-GNPTAB^{Q36L/E39L}-3×FLAG-Puro^r* を獲得した。

ヒトタンパク質恒常発現 CHO 細胞の作製

未導入 CHO 細胞を 35 mm culture dish (Falcon) に 3×10^5 cell となるよう播種し、10% (v/v) FBS, Nutrient Mixture F-10 Ham 2 mL 中、37°C、CO₂ 濃度 5%条件下で培養した。その後 Lipofectamine3000 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いたリポフェクション法により、製造者のプロトコルに従って CHO 細胞に各ベクターを導入した。Neomycin または Hygromycin 耐性遺伝子を組み込んだプラスミドを導入した細胞に関して。500 µg /mL G418 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)または 500 µg /mL Hygromycin B を加えた培地に 3-4 日おきに交換し、ヒトタンパク質安定発現 CHO 細胞 (mixture)を作製した。

昆虫細胞へのタンパク質発現ベクターの導入

未導入 Sf9 細胞を 25 cm² 細胞培養用フラスコ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)に 3×10⁵ cell となるよう播種し、10% (v/v) TPB、2.5% (v/v) FBS 含有培地 IPL-41 insect medium 5 mL 中、26°C条件下で培養した。Lipofectamine3000 を用いたリポフェクション法により、製造者のプロトコルに従って Sf9 細胞に各ベクターを導入した。なお一過性発現細胞は、特に記載がないものに関してはトランスフェクション後 72 h 後に細胞を回収したものとする。

ヒトタンパク質恒常発現 Sf9 細胞の作製

Blasticidin, Neomycin, Hygromycin, Puromycin, または Zeocin 耐性遺伝子を組み込んだプラスミドを導入した細胞に関して。25 µg /mL Blasticidin S (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Tokyo, Japan), 1,000 µg /mL G418, 300 µg /mL Hygromycin B, 5 µg /mL Puromycin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Tokyo, Japan), または 250 µg/mL Zeocin (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を加えた培地に 3-4 日おきに交換し、ヒトタンパク質安定発現 Sf9 細胞 (mixture)を作製した。

また 2 つ以上のヒトタンパク質を共安定発現した Sf9 細胞に関しては、上記の操作を順番に複数回行うことで作製した。

クローニングリングを用いた細胞集団の獲得

クローニングリングおよびシリコングリース (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)をオートクレーブ処理し、55°Cにて乾燥後室温まで冷ました。S1P-HA, IDUA-6×His, NAGPA-myc, および GNPTG を安定共発現している細胞集団を上記の薬剤セレクションにより作成した。この細胞集団を 100 mm カルチャーディッシュ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)に 1×10⁴ cells 播き、26°C、3 週間培養した (**Fig. 2-1**)。培地を除きシリコングリースを薄く塗ったクローニングリングをディッシュに接着させた。100 µL の培地を加えてリング内のコロニーを剥がし、24-well plate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)に回収した。さらに 100 µL の培地を加え洗い、24-well plate に回収した。得られた各コロニーを培養し、最終的に 75 cm² Flask までスケールアップした。

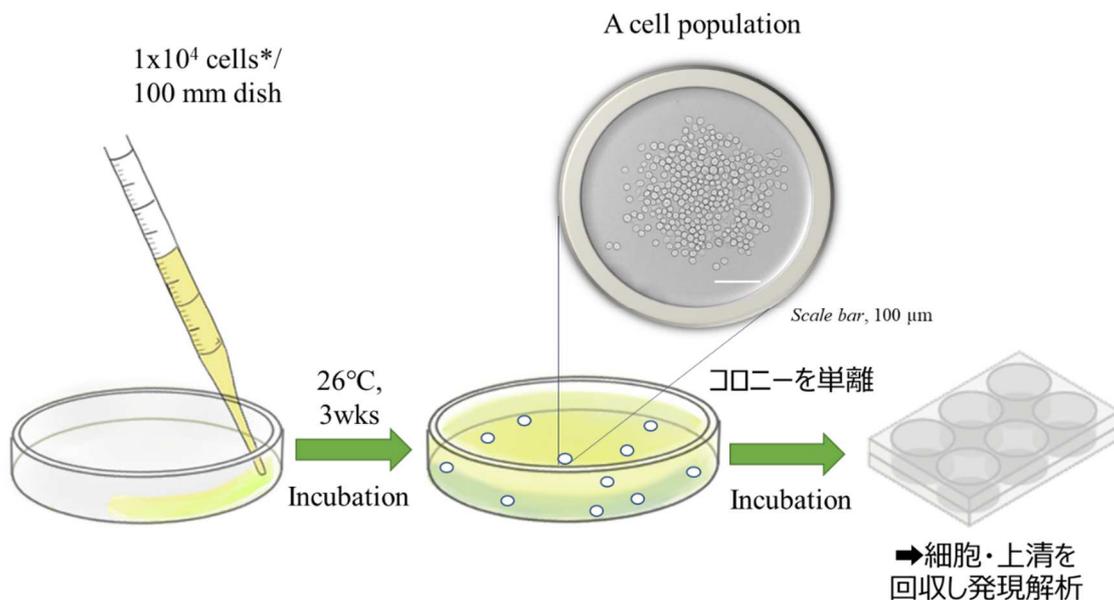


Fig. 2-1. クローニングリング法による細胞集団の獲得

細胞抽出液の作製

細胞を剥がし回収した上清を $300 \times g$, $4^\circ C$, 10 min の条件で遠心することで細胞をペレットダウンした。細胞抽出液として Ripa 抽出液 (50 mM Tris-HCl buffer (pH7.6), 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet[®] P40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.5% (v/v) Sodium Deoxycholate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.1% (v/v) SDS, 20 μM Leupeptin, 1 μM Pepstatin A, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF) を用いた。Ripa 抽出液を加えペレットを再懸濁後、氷水を入れた MUS-10 Ultrasonic Cleaner (Sonicator ; EYELA) にてソニケーションを行ない、ピペッティングを 30 回行うことで細胞を破碎した。

タンパク定量

タンパク質濃度は DCTM protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) を使い、Protein standard (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を標準物質として、製造者のプロトコルに従い行なった。

Immunoblotting

各サンプルを 10% (v/v) ポリアクリルアミドゲルにアプライし電気泳動を行なった (15 mA/plate)。SDS-PAGE 後のゲルを Immobilon®-P PVDF Membrane (PVDF 膜 ; Nippon Millipore, Tokyo, Japan) に転写した。50% (v/v) Blocking one-TBS により室温で 1 h ブロッキング処理を行なった後、各 1 次抗体を 50% (v/v) Blocking one-TBS で適宜希釈し、4°C で一晩処理した。PBS-0.1% (v/v) Tween 20 (PBST) で洗浄した後、各 2 次抗体 (HRP-conjugated antibodies (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA. RRID:AB_2099233, RRID:AB_330924)) を 50% (v/v) Blocking one-TBS で適宜希釈して室温で 1hr 処理した。抗体処理後の PVDF 膜を PBST および PBS で洗浄した後、Western Lightning Chemiluminescence Reagent Ultra (Perkin Elmer, Waltham, MA) を用いて、画像解析装置 ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, RRID:SCR_019690) image analyzer で検出した。分子量は Prestained SDS-PAGE Standards, broad range (Prestained Markers, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) より算出した。

1 次抗体処理で用いた抗体は以下の希釈度で用いた: 1:200 for rabbit anti-GNPTG, 1:1000 for rabbit anti-HA, rabbit anti- β Tubulin, and 1:2000 for mouse anti-FLAG antibody, and 1:10000 for mouse anti-myc antibody.

PVDF 膜の Stripping

PBS-0.05% (v/v) Tween 20 で PVDF 膜を洗浄後、Stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% (v/v) SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol (Wako)) に浸し 50°C, 30 min, 処理した。その後 PBS-0.05% (v/v) Tween 20 で洗浄し、Western Lightning Chemiluminescence Reagent Ultra を用いた検出により抗体の除去を確認した。

Immunofluorescence

未導入及び各ヒトタンパク質発現 Sf9 細胞を 8-well Lab-Tek chamber slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) に 5×10^4 cell/well となるよう播種し 26°C 条件下で培養し細胞を接着させた。4% (w/v) PFA/PBS で室温、1 h 固定後、PBS で洗浄し 5% (v/v) Goat serum (Cedarlane Laboratories Ltd, Burlington, Ontario, Canada) / 1% (w/v) BSA/PBS で室温、1 h ブロッキングした。一次抗体溶液を 150 μ L 加え、4°C、一晩反応させた。PBST で洗浄後、二次抗体溶液を 150 μ L 加え、室温で遮光し、1 h 反応させた。また同時に Hoechst33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を 5 μ g/mL で処理した。

PBST で洗浄後、50% (v/v) Glycerol /PBS で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM-700 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany, RRID:SCR_017377)を用いて観察した。

間接蛍光染色に用いた抗体は以下の希釈倍率で用いた: 1:100 for rabbit anti-dCalnexin, rabbit anti-Calnexin and rabbit anti-dGM130, 1:200 for rabbit anti-HA and mouse anti-HA, 1:500 for mouse anti-FLAG antibody, and 1:2000 for mouse anti-myc.

2 次抗体は以下の抗体を利用した: Alexa Fluor 488-coupled antibody (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA. RRID:AB_10694704, RRID:AB_1904025) and Alexa Fluor 555-coupled antibody (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA. RRID:AB_1904022, RRID:AB_10694110).

共局在度合いを示すピアソン係数は、Fiji ソフトを用いて算出した [22,23]。得られた値に対して適切な統計処理を行ないグラフ化した。

上清の回収

Sf9 細胞に関して、75 cm² 細胞培養用フラスコにてコンフルエンスにした状態で、10% (v/v) TPB、100 µg/mL Streptomycin、70µg/mL Penicillin G 含有培地 IPL-41 insect medium 中、26°C条件下で7日間培養した。上清を Millex[®]-HV 0,45 µm フィルター(Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Germany)を通して回収し、Amicon Ultra-30 kDa (Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Germany)を用いて濃縮した。

IDUA 酵素活性測定

α-L-イズロニダーゼ (IDUA)の人工蛍光基質として 4-MUIdoA (2mM 4-Methylumbelliferyl α-L-Idopyranosiduronic acid 2-Sulfate Disodium (Biosynth Ltd., St. Gallen, Switzerland)、500 mM NaCl、0.1 M 酢酸 Na 緩衝液、pH 4.5)を用い、37°C でインキュベーションし 0.2 M Glycine-NaOH (pH10.7)で反応を停止させ、励起波長: 355nm 蛍光波長: 460nm で蛍光強度を測定した。なお標準物質として 100 µM 4-Methylumbelliferone (4-MU; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用いた。

Phostag-agarose を用いたリン酸化タンパク質分離

Phostag は二価金属イオン存在下でリン酸基と特異的に結合する特性を有する低分子化合物である [24]。この Phostag に agarose を結合した Phostag-agarose 懸濁液(50% (v/v) , (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Tokyo, Japan)をカラムにゲル量で 100 μg 堆積させ、Binding/Washing buffer を 2 mL \times 3 回アプライした (Fig. 2-2)。続いて Balancing buffer を 2 mL \times 2 回アプライし、Phostag と Zn^{2+} で錯体を形成させた。再度 Binding/Washing buffer を 4 mL \times 3 回アプライし、Binding/Washing buffer で 10 mL としたサンプル溶液を全量アプライした。この時得られた溶液を素通り画分として回収した。次に Binding/Washing buffer を 10 mL \times 2 回アプライし、その画分を洗い画分として回収した。最後に Elution buffer を 20 mL \times 2 回アプライし、その画分を溶出画分として回収した。各画分の溶液を Amicon ultra を用いて適切な量に濃縮したのち、総タンパク質定量および IDUA 酵素活性測定を行なった。

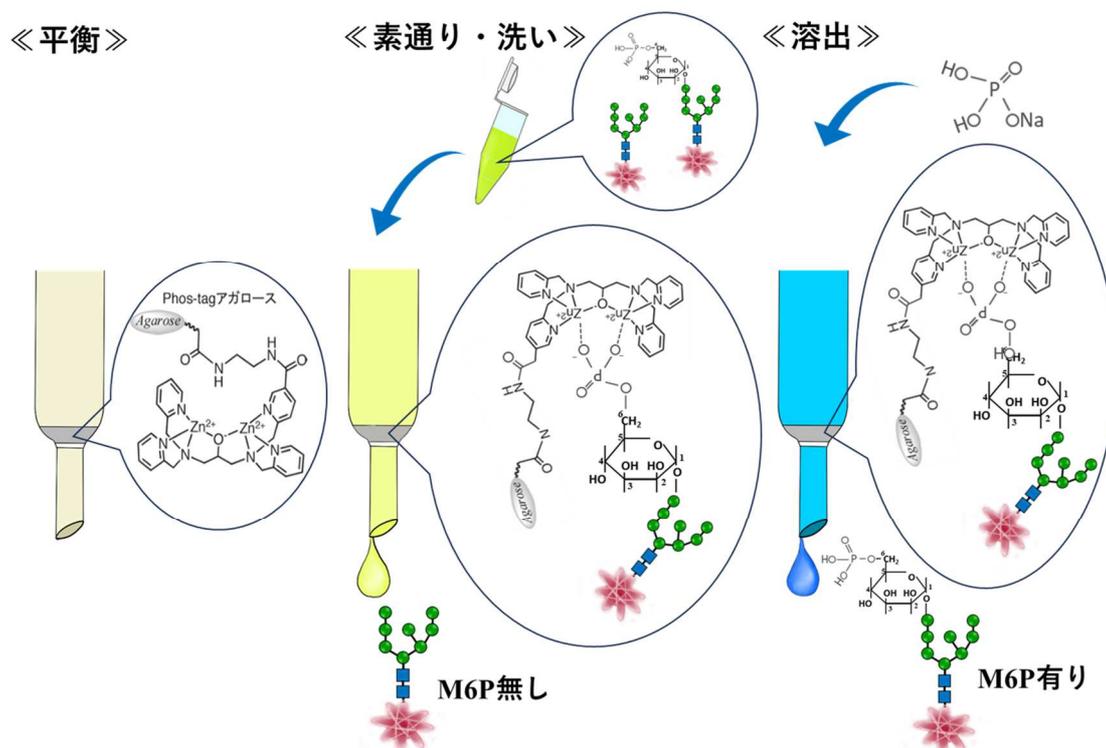


Fig. 2-2. Phostag-agarose によるリン酸化タンパク質の分離メカニズム

PNGaseF 処理

サンプル溶液に 1×G7 Reaction buffer (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA), 1% NP-40 (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA), 500 U PNGaseF (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA)を加え MQ で total 20 μ L とした。37°C, 1 h の条件で反応させた (Fig. 2-3)。未処理のサンプルでは PNGaseF 酵素を加えず MQ 1 μ L を加えた。反応後の溶液を Amicon ultra を用いて 1,000 倍希釈した。このサンプルを用いて以下 Phostag-agarose によるリン酸化タンパク質分離を行ない、タンパク質定量および IDUA 酵素活性測定を行なった。

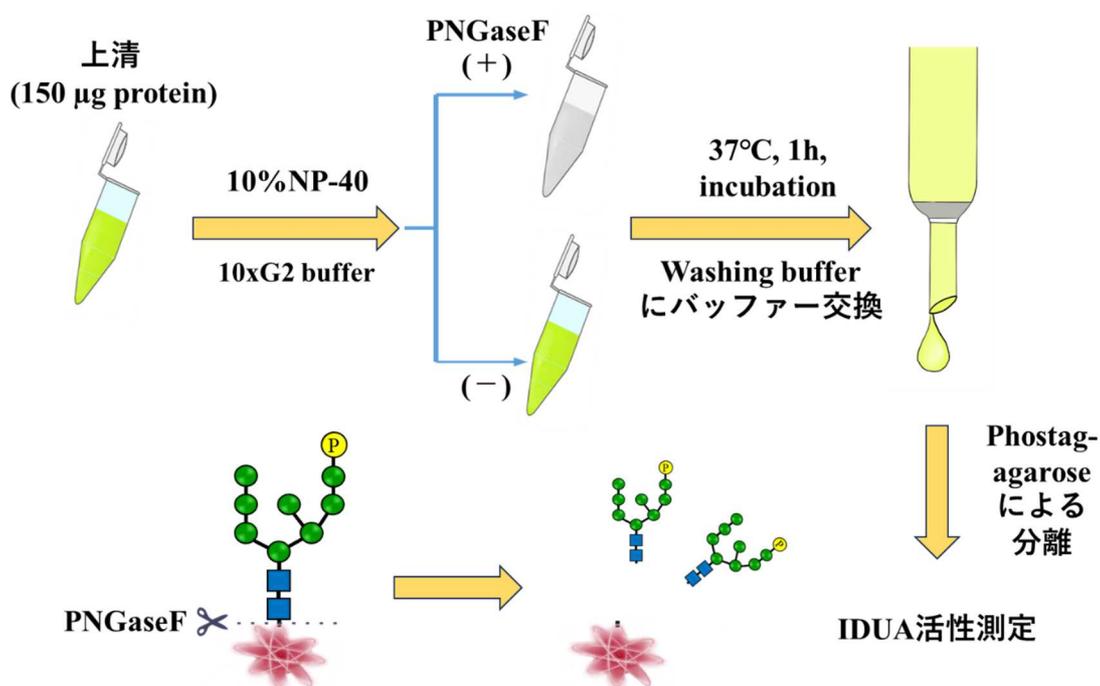


Fig. 2-3. PNGaseF 処理の有無による Phostag-agarose 分離操作

第三章 結果

3-1. 哺乳類細胞と昆虫細胞における NAGPA の発現比較解析

NAGPA はトランスゴルジに局在する分子量約 56,000 の膜貫通タンパク質であり、N 型糖鎖付加部位を 6 か所有する。ウエスタンブロット法によるタンパク質の検出を行なったところ、いずれの細胞でも NAGPA-3×FLAG 発現細胞で特異的に単一バンドが検出された (**Fig. 3-1**)。CHO 細胞では N 型糖鎖非切断では 87.9×10^3 , N 型糖鎖切断では 60.9×10^3 の分子量の位置にバンドが検出された。一方で Sf9 細胞では N 型糖鎖非切断で 66.3×10^3 , N 型糖鎖切断で 61.6×10^3 の分子量の位置にバンドが検出された。すなわち哺乳類細胞および昆虫細胞いずれの細胞においてもヒト NAGPA は正常に発現していると判断した。また PNGase F 処理時にバンドが低分子シフトしていることから、小胞体で生合成され N 型糖鎖修飾を受けていることが示された。PNGaseF 処理後の分子量はどちらの細胞で発現させた場合も変わらないが、N 型糖鎖非切断時には Sf9 細胞に比べ CHO 細胞で発現させた方が分子量は大きい。この原因として、哺乳類細胞と昆虫細胞でのゴルジ体における糖鎖修飾の違いが挙げられる。CHO 細胞では高マンノース型や複合型など多種多様な糖鎖構造に修飾されるのに対し、昆虫細胞ではパウチマンノース型という、マンノースがトリミングされた糖鎖構造に修飾されることが多い。この糖鎖修飾の違いにより、PNGaseF 未処理時の細胞間での分子量の差が生じていると考察する。

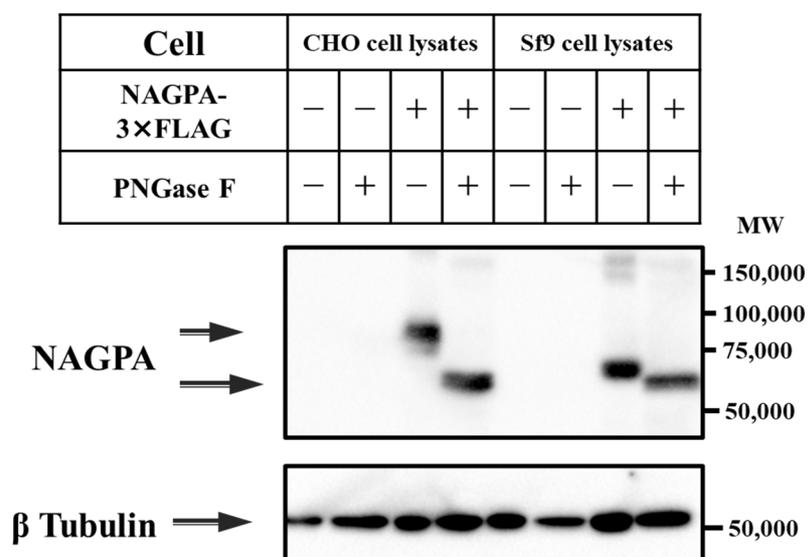


Fig. 3-1. 哺乳類細胞と昆虫細胞における NAGPA の発現解析 哺乳類細胞である CHO 細胞および昆虫細胞である Sf9 細胞において NAGPA を安定発現させた細胞集団 (mixture) を作成し、その細胞を回収した。各細胞抽出液を 10 μ g ずつアプライし、Western blotting による発現解析を行なった。コントロールとして β Tubulin の検出を行なった。各タンパク質は以下の抗体を用いて検出した; Anti-FLAG (SIGMA), anti- β Tubulin (CST) Ab.

3-2. 昆虫細胞における NAGPA の細胞内局在解析

NAGPA はトランスゴルジに局在し機能する加水分解酵素である。NAGPA-myc を発現させ局在解析を行なったところ、小胞体マーカーである dCalnexin とはわずかに共局在を示し、シスゴルジマーカーである dGM130 とは隣接するような局在パターンが認められた (**Fig. 3-2A**)。共局在率に関して Pearson 係数を測定したところ、小胞体とシスゴルジにはほぼ同程度の局在率を示していることが明らかとなった (**Fig. 3-2B**)。続いてショウジョウバエ Syntaxin16 (dSyntaxin16) 融合 mEGFP タンパク質を一過性に発現させ、dSyntaxin16 と各種小胞体マーカータンパク質との共局在を確認した。Calnexin または GM130 との共局在は、Sf9 細胞において部分的な局在パターンを示した (**Fig. 3-2C**)。dSyntaxin16 と各種小胞体マーカータンパク質とのピアソン係数値は、NAGPA と各種小胞体マーカータンパク質との値と同程度の値を示していた (**Fig. 3-2D**)。一方で dSyntaxin16 と NAGPA との共発現は、Sf9 細胞において他のオルガネラマーカーよりも有意な共局在化パターンを示した。これらのデータから、NAGPA は哺乳動物細胞と同様に昆虫細胞である Sf9 細胞においてもトランスゴルジ局在を示していることが示された。

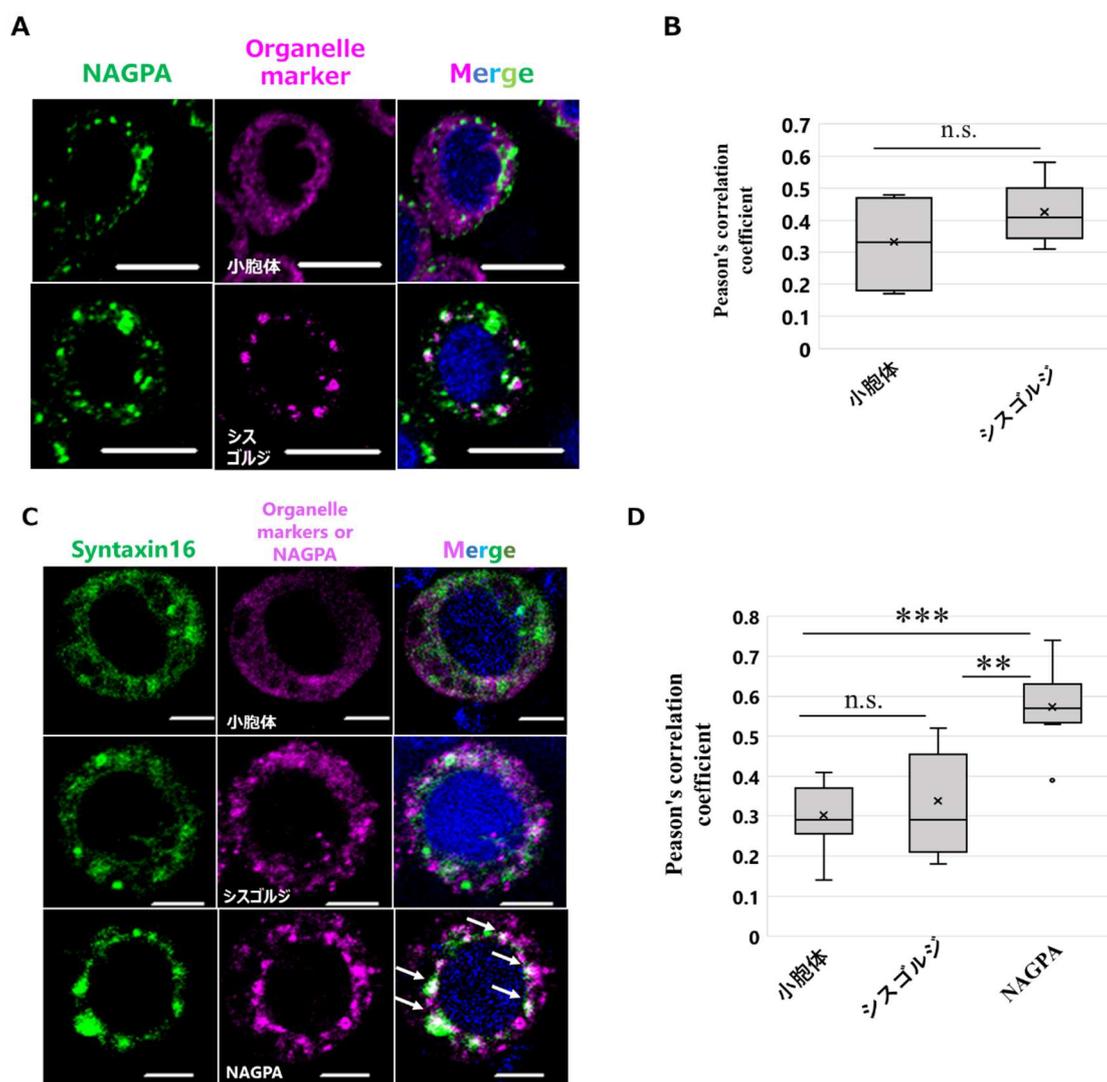


Fig. 3-2. 昆虫細胞における NAGPA の細胞内局在解析 昆虫細胞である Sf9 細胞にて NAGPA-myc を安定発現させた。(A) NAGPA を anti-myc (green) Ab で、小胞体マーカーである Calnexin およびシスゴルジマーカーである GM130 をそれぞれ anti-dCalnexin および anti-dGM130 (magenta) Ab で共染色した。核は Hosechst 33258 (blue) で染色した。Scale bar, 10 μ m. (B) NAGPA と小胞体マーカータンパク質 (n=7) またはシスゴルジマーカータンパク質 (n=9) における共局在度を定量化するため Fiji software を用いて Pearson's Correlation Coefficients を計算しグラフ化した。Error bars represent mean \pm SD. Student's *t*-test. (C) *Drosophila* syntaxin16-mEGFP (+Syntaxin16) を未導入細胞または NAGPA 安定発現細胞に一過性導入し、72 時間後に固定化した。*Drosophila* syntaxin16-mEGFP (green) と、小胞体マーカー、シスゴルジマーカー、NAGPA をそれぞれ anti-dCalnexin, anti-dGM130, anti-myc (magenta) Ab で共染色し観察した。Scale bar, 5 μ m. (D) *Drosophila* syntaxin16-mEGFP と小胞体マーカータンパク質 (n=9)、シスゴルジマーカータンパク質 (n=9)、および NAGPA (n=8) との共局在度を定量化しグラフ化した。Error bars represent mean \pm SD. ***p*<0.01 ****p*<0.001 by One-way ANOVA with Tukey test.

3-3. 哺乳類細胞と昆虫細胞における GNPTG の発現比較解析

GNPTG は分子量約 34,000 の可溶性のタンパク質であり、N型糖鎖付加部位を 2 か所有する。GNPTG の発現解析では、細胞溶解液と上清にそれぞれ特異的なバンドが検出された(**Fig. 3-3**)。GNPTG を哺乳類細胞で発現させた場合、抽出液画分にはかなりのバンドが検出されたが、上清画分にはほとんど検出されなかった。逆に昆虫細胞では、GNPTG のバンドは細胞上清中に検出されたが、細胞内にはほとんど検出されなかった。この原因は内在性 GNPTAB が存在するか否かの違いにより生じていると推測した。CHO 細胞では GNPTG は内在性 GNPTAB と複合体を形成することで細胞内に留まっている。一方 *Drosophila melanogaster* では、内因性 GNPTAB の分子量はヒト GNPTAB と比べ小さく、かつ構造的に大きく異なることが報告されている [25]。したがって、GNPTG は昆虫細胞内在性の GNPTAB と複合体を形成することができないため、細胞外に分泌されたのではないかと考察した。

タンパク質の検出を行なったところ GNPTG の分子量に相当するバンドが特異的に検出されていることから、GNPTG タンパク質自体はいずれの細胞でも正常に発現していることが認められた。PNGase F 処理時にバンドが低分子シフトしていることから、小胞体で生合成され N 型糖鎖修飾を受けていることが示された。

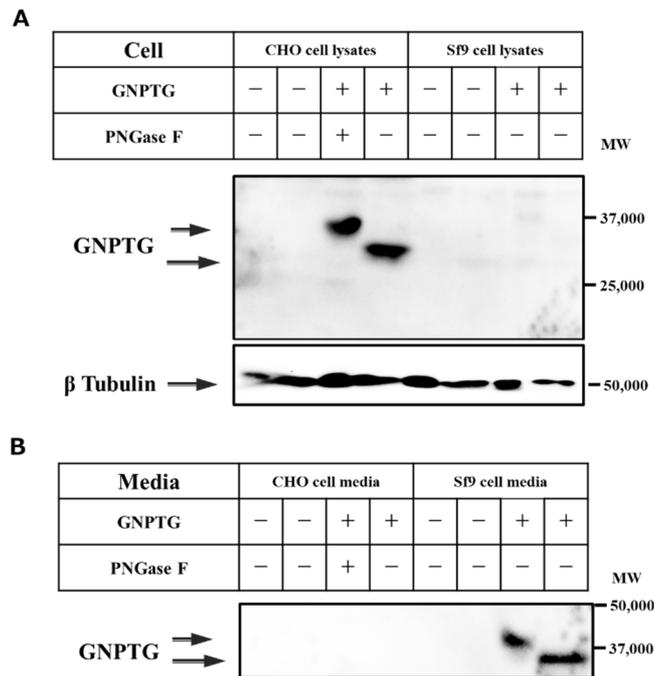


Fig. 3-3. 哺乳類細胞と昆虫細胞における GNPTG の発現解析 哺乳類細胞である CHO 細胞および昆虫細胞である Sf9 細胞において GNPTG を安定発現させた細胞集団 (mixture) を作成し、その細胞を回収した。(A) 各細胞抽出液を 10 μ g ずつアプライし、Western blotting による発現解析を行なった。コントロールとして β Tubulin の検出を行なった。(B) 無血清培地で 1 週間培養した細胞上清を回収した。各サンプルを 10 μ g ずつアプライし、Western blotting による発現解析を行なった。各タンパク質は以下の抗体を用いて検出した; Anti-FLAG (SIGMA), anti- β Tubulin (CST) Ab.

3-4. 哺乳類細胞と昆虫細胞における GNPTAB の発現比較解析

GNPTAB はシスゴルジに局在し機能する膜貫通タンパク質であり、前駆体が 144,000 (N 型糖鎖付加部位; 20 か所)の分子量の 2 回膜貫通タンパク質、成熟体である α サブユニットが 104,000 (N 型糖鎖付加部位; 17 か所)の分子量の II 型膜貫通タンパク質、 β サブユニットが 40,000 (N 型糖鎖付加部位; 3 か所)の分子量の 1 型膜貫通タンパク質である。Sf9 細胞における GNPTAB-3 \times FLAG の発現を解析した結果、無処理では分子量 180×10^3 、PNGase F 処理では分子量 140×10^3 のバンドが検出された (Fig. 3-4A)。検出されたバンドは、哺乳類 CHO 細胞で発現させた GNPTAB-3 \times FLAG のバンドと同じ分子量であった。一方、GNPTAB の成熟型の一つである β サブユニットのバンドは、CHO 細胞では分子量 40×10^3 付近に明瞭に検出されたが、Sf9 細胞では 40×10^3 付近にほとんどバンドは見られなかった。一方で CHO 細胞では 40×10^3 の分子量の位置に成熟体に相当する β -subunit のバンドが検出されているが、Sf9 細胞では該当する位置にバンドはほとんど認められない。これらのバンド強度を Image Lab software を用いて定量化し、GNPTAB の成熟化率を算出した (Fig. 3-4B)。CHO 細胞では 53.8% の成熟化が生じているのに対し、Sf9 細胞ではわずか 3.5% 程度と、成熟化率が有意に減少していることを明らかとした。本結果から昆虫細胞では GNPTAB の成熟化がほとんど生じないことが示された。

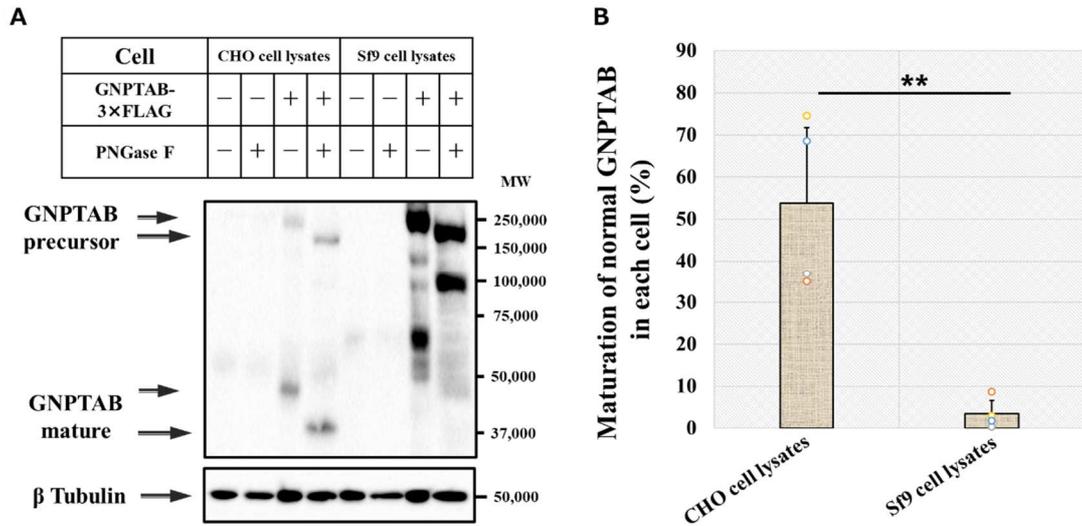


Fig. 3-4. 哺乳類細胞と昆虫細胞における正常型 GNPTAB の発現解析 哺乳類細胞である CHO 細胞および昆虫細胞である Sf9 細胞において GNPTAB を安定発現させた細胞集団 (mixture) を作成し、その細胞を回収した。(A) 各細胞抽出液を 10 μ g ずつアプライし、Western blotting による発現解析を行なった。コントロールとして β Tubulin の検出を行なった。各タンパク質は以下の抗体を用いて検出した; Anti-FLAG (SIGMA), anti- β Tubulin (CST) Ab. (B) 各細胞における GNPTAB の成熟化率に関して数値化しグラフ化した。Error bars represent mean \pm SD (n=3). ** p <0.01 by Student's t -test.

3-5. 昆虫細胞における GNPTAB の細胞内局在解析

前述した通り、GNPTAB はシスゴルジに局在し機能する膜タンパク質である。局在解析を行なったところ、小胞体マーカと強いシグナルを示し、シスゴルジマーカとは弱いシグナルを示した (Fig. 3-5A)。ヒト GNPTAB と小胞体マーカタンパク質 (n=14) またはシスゴルジマーカタンパク質 (n=14) における共局在度を定量化するため Fiji software を用いて Pearson's Correlation Coefficients を計算しグラフ化した (Fig. 3-5B)。統計処理を行なったところ、シスゴルジマーカとの共局在度に比べ小胞体マーカとの共局在度が有意に高いことが示された。すなわち昆虫細胞では哺乳類細胞と異なり、発現したヒト GNPTAB の多くがシスゴルジではなく小胞体に局在していることが示唆された。

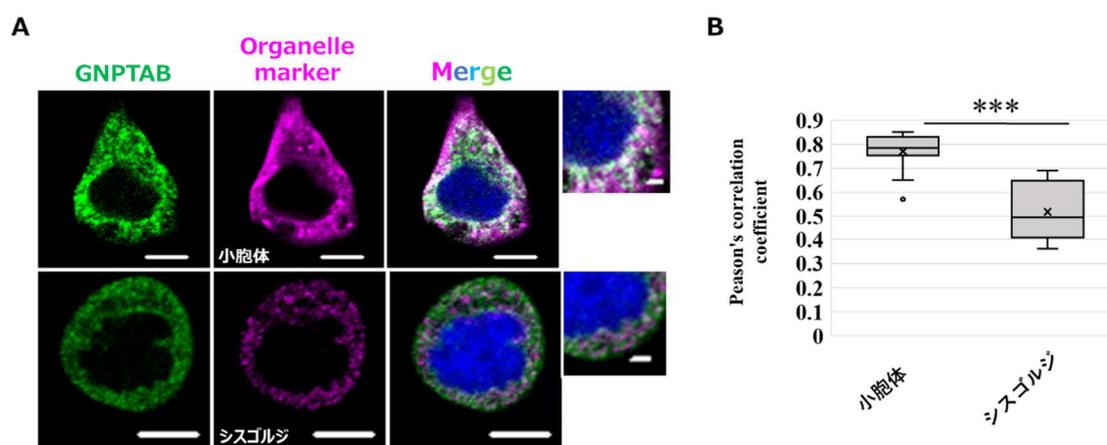


Fig. 3-5. 昆虫細胞における GNPTAB の局在解析 GNPTAB-3×FLAG を昆虫細胞で一過性発現させ、その 96 時間後に細胞を固定した。(A) GNPTAB を anti-FLAG (green) Ab で、小胞体マーカである Calnexin およびシスゴルジマーカである GM130 をそれぞれ anti-Calnexin および anti-dGM130 (magenta) Ab で共染色した。核は Hosechst 33258 (blue) で染色した。Scale bar, 5 μ m or 1 μ m. (B) GNPTAB と小胞体マーカタンパク質 (n=14) またはシスゴルジマーカタンパク質 (n=14) における Pearson's Correlation Coefficients を計算しグラフ化した。Error bars represent mean \pm SD. *** p <0.001 by Student's t -test.

3-6. S1P の発現による GNPTAB の評価

項目 3-4 の結果から、昆虫細胞でヒト GNPTAB を単独で発現させても成熟化がほとんど生じないことが示された。そこで GNPTAB の成熟化酵素である S1P を発現させ解析を行なった。S1P は前駆体が約 117,000 (N 型糖鎖付加部位; 5 か所)、成熟体が約 96,000 (N 型糖鎖付加部位; 5 か所)の分子量の 1 型膜貫通タンパク質である。各細胞由来抽出液 10 μg に対し PNGaseF 処理したサンプルを用いてウエスタンブロッティング解析を行なった (Fig. 3-6A)。Anti-HA 抗体で S1P-HA の検出を行なったところ 115.4×10^3 、 92.1×10^3 のダブルバンドを検出した。これらのバンドは、それぞれ S1P の前駆体と成熟体の分子量に相当することから、S1P が Sf9 細胞で正常に発現していると判断した。さらに、抗 FLAG 抗体による GNPTAB-3 \times FLAG 前駆体の検出では、GNPTAB-3 \times FLAG 発現細胞において 150.0×10^3 に特異的なバンドが検出された。また、GNPTAB-3 \times FLAG の成熟型である β -subunit-3 \times FLAG を anti-FLAG で解析したところ、S1P-HA を共発現している細胞では 37.0×10^3 に特異的なバンドが検出された。これらのバンド強度を Image Lab software を用いて定量化し、GNPTAB の成熟化率を算出した ((Fig. 3-6B)。結果をみると、単独発現時にはほとんど起こらない GNPTAB の成熟化が、S1P の共発現によって顕著に生じていることが示された。したがって昆虫細胞にて通常生じない GNPTAB の成熟化が S1P の発現により生じたことが明らかとなった。すなわちヒト S1P は昆虫細胞において正常に発現および機能していると評価した。

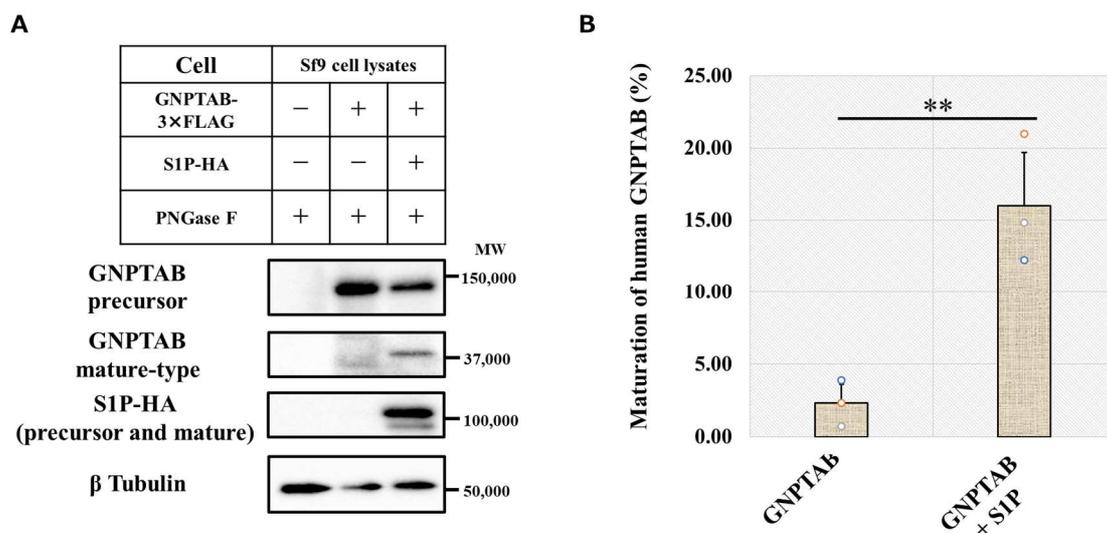


Fig. 3-6. 昆虫細胞における GNPTAB と S1P の共発現解析 昆虫細胞である Sf9 細胞において GNPTAB を単独、または S1P と共発現した安定発現細胞集団 (mixture) を作成し、その細胞を回収した。(A) 各細胞抽出液を 10 μ g ずつアプライし、Western blotting による発現解析を行なった。コントロールとして β Tubulin の検出を行なった。各タンパク質は以下の抗体を用いて検出した; Anti-FLAG (SIGMA), anti-HA (SIGMA), anti- β Tubulin (CST) Ab. (B) 単独発現時および S1P との共発現時における GNPTAB の成熟化率をそれぞれ計算しグラフ化した。Error bars represent mean \pm SD (n=3). ** p <0.01 by Student's t -test.

3-7. Sf9 細胞における S1P の局在解析

S1P はシスゴルジに局在し機能するプロテアーゼである。S1P-HA を単独あるいは共発現させた Sf9 細胞を用いて間接蛍光免疫染色法による局在解析を行った。S1P は小胞体マーカーである Calnexin と一部共局在を示し、顆粒状蛍光の一部はシスゴルジマーカーである GM130 と共局在を示した (Fig. 3-7A)。共局在に関して定量分析を行ったところ、小胞体に比べシスゴルジに有意に局在していることが明らかとなった (Fig. 3-7B)。続いて NAGPA との局在を確認したところ、顆粒状蛍光の一部分が共染色している様子が認められた (Fig. 3-7C)。また GNPTAB との局在を確認したところ、多くの顆粒状蛍光で強いシグナルを確認できた。共局在に関して定量化し統計処理を行ったところ、S1P は NAGPA よりも GNPTAB と有意に共局在していることが示された (Fig. 3-7D)。

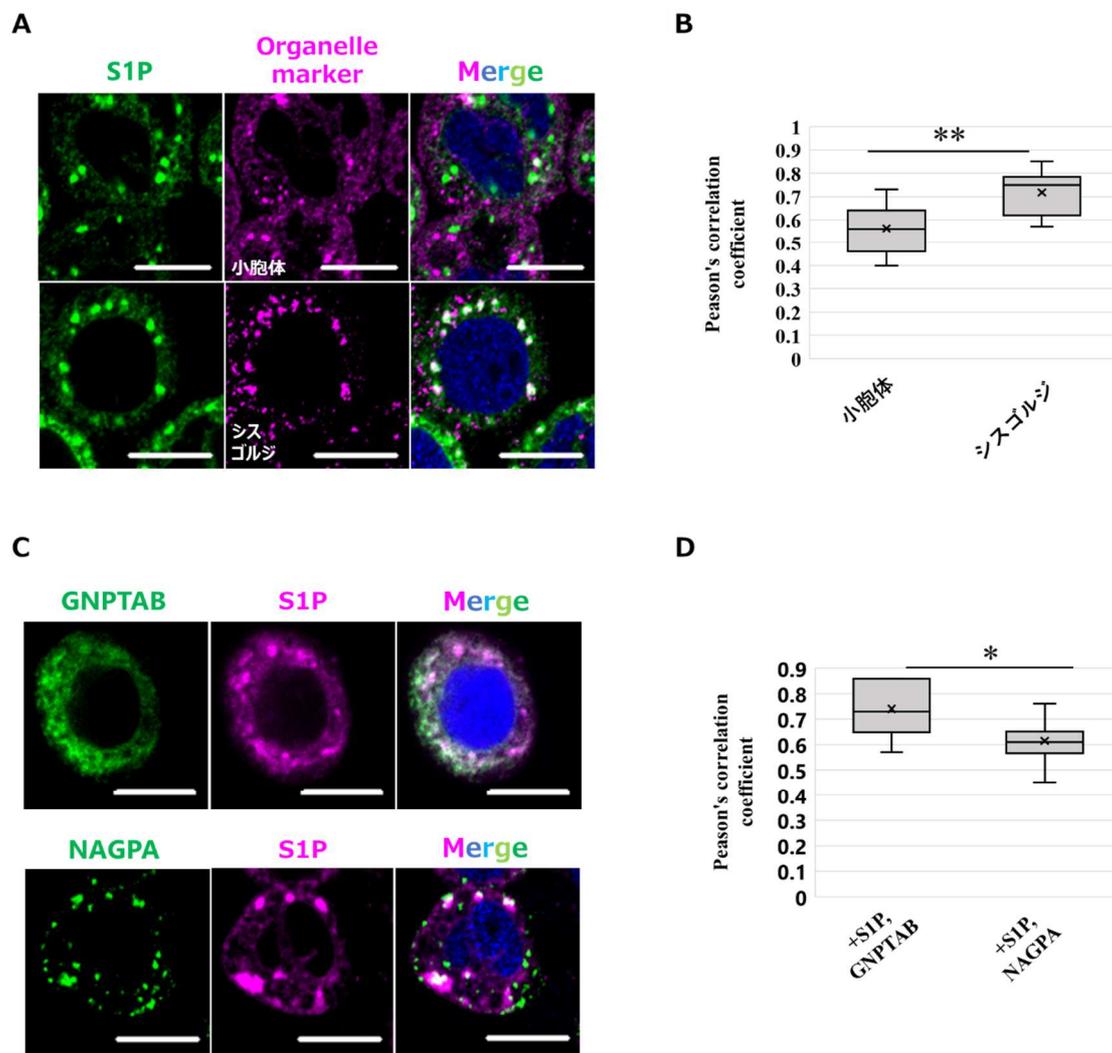


Fig. 3-7. 昆虫細胞における S1P の細胞内局在解析 (A, B) 昆虫細胞である Sf9 細胞にて S1P-HA を安定発現させた。(A) NAGPA を anti-HA (green) Ab で、小胞体マーカーである Calnexin およびシスゴルジマーカーである GM130 をそれぞれ anti-dCalnexin および anti-dGM130 (magenta) Ab で共染色した。核は Hosechst 33258 (blue)で染色した。Scale bar, 10 μ m. (B) S1P と Calnexin (n=12)または GM130 (n=9)における共局在度を定量化しグラフ化した。Error bars represent mean \pm SD. ****** p <0.01 by Student's *t*-test. (C, D) S1P-HA と GNPTAB-3 \times FLAG または NAGPA-myc とそれぞれ安定共発現している細胞を固定化した。(C) GNPTAB または NAGPA を anti-FLAG または anti-myc (green)で、S1P を anti-HA (magenta)で共染色した。核は Hosechst 33258 (blue)で染色した。Scale bar, 10 μ m. (D) S1P と GNPTAB (n=7)または NAGPA (n=17)における共局在度を定量化しグラフ化した。Error bars represent mean \pm SD. ***** p <0.05 by Student's *t*-test.

3-8. クローニングリング法による細胞集団の獲得および発現解析

昆虫細胞にて人為的な M6P 修飾を達成するためには i) M6P 付加に関わるタンパク質を同一細胞内で共発現させたいうえで、ii) すべてのタンパク質が正常に機能していること、この 2 項目をクリアすることが必要条件であると考えられる。

M6P 修飾達成に必要な条件 i) に関して。M6P 修飾反応は哺乳類細胞において、GNPTAB, GNPTG, NAGPA, S1P, および M6P 修飾を受けるヒトリソソーム酵素 (IDUA) の、計 5 種類のタンパク質が存在して達成される反応である。これら計 5 種類のタンパク質を昆虫細胞で発現させることが最低限の必要条件である。そこで別々の薬剤耐性遺伝子を搭載した発現ベクターに各遺伝子を挿入したプラスミドを作成し、各種薬剤を用いてセレクションを行なった。その後 Sf9 細胞に対し、S1P-HA, NAGPA-myc, GNPTG, および IDUA-6×His を安定共発現する細胞集団 (mixture) を薬剤セレクション法により作成した。この細胞集団をカルチャーディッシュに低密度で播き 3 週間培養することで複数のコロニーを形成させた (Fig. 2-1)。クローニングリングを用いて独立したコロニーを採取し、最終的に計 6 種類のコロニーの培養およびスケールアップに成功した。得られた細胞集団の細胞抽出液または細胞上清を回収し、WB によるタンパク質の発現解析を行なった (Fig. 3-8)。

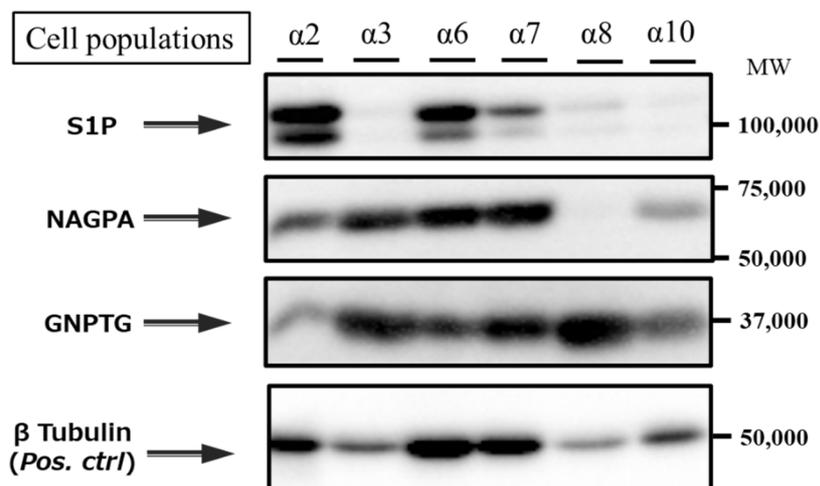


Fig. 3-8. 各細胞集団におけるタンパク質発現解析 α2, α3, α6, α7, α8, α10 の細胞抽出液をそれぞれ 10μg ずつアプライし、anti-HA (SIGMA), anti-myc (MBL Life Science), anti-β Tubulin (CST) Ab を用いて検出を行なった。また細胞上清を 20 μL ずつアプライし、anti-GNPTG (SIGMA) Ab を用いて検出を行なった。

3-9. 獲得した細胞集団の IDUA 酵素活性測定

得られた細胞集団のうち $\alpha 2$, $\alpha 6$, および $\alpha 7$ において S1P-HA, NAGPA-myc, および GNPTG の発現を確認したため、これらの細胞上清を用いて IDUA の活性測定を行なった (Fig. 3-9)。コントロールとして未導入の Sf9 細胞上清を用いて同様に IDUA 活性測定を行ない、総活性値をグラフ化した。未導入ではほとんど IDUA 酵素活性は認められなかったのに対し、 $\alpha 2$, $\alpha 6$, および $\alpha 7$ ではいずれも IDUA 酵素活性値が認められた。中でも $\alpha 7$ 細胞集団において他の細胞集団に比べ有意に高い IDUA 酵素活性値を認めた。他のタンパク質の発現量と併せて、 $\alpha 7$ 細胞集団では S1P-HA, NAGPA-myc, GNPTG, および IDUA-6×His が高発現している。すなわち GNPTAB を除く計 4 種類の細胞を安定共発現する細胞集団の獲得に成功したと判断した。

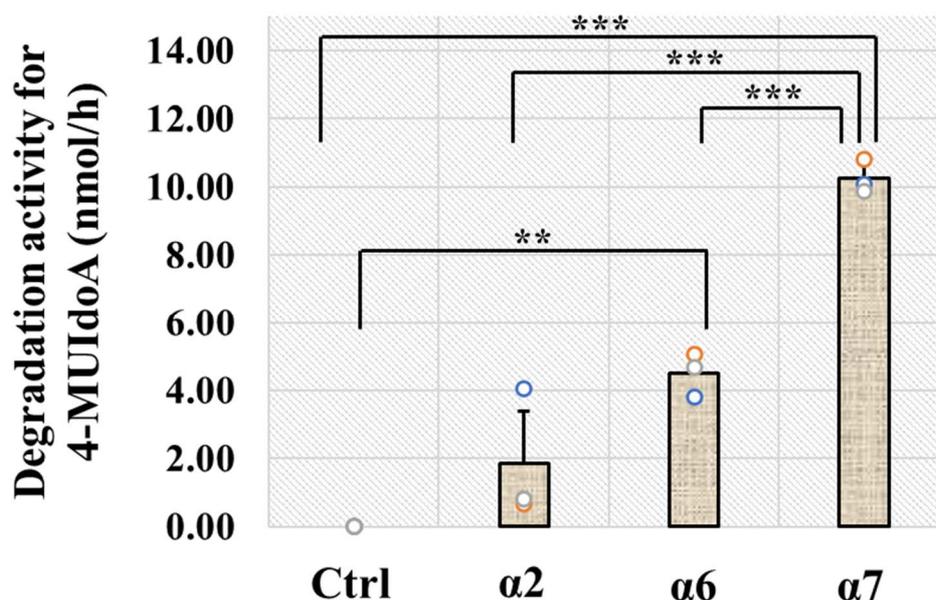


Fig. 3-9. 各種細胞集団上清中の IDUA 酵素活性測定 未導入 Sf9 細胞または各種細胞集団を 2×10^5 cells ずつ播種し、無血清培地 10 mL を加え 1 week 培養した。上清を PBS にバッファ交換したのち、最終容量を 50 μ L となるよう濃縮した。このうち 15 μ L を用いて 4-MUIdoA 分解活性測定を行ない、その総活性値 (nmol/h) を測定した。Error bars represent mean \pm SD (n=3). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by One-way ANOVA with Tukey test.

3-10. アミノ酸置換型 GNTPAB の作成

M6P 修飾達成に必要な条件ii)に関して。M6P 修飾が生じるためには M6P 修飾の最初の GlcNAc-1-リン酸転移反応が極めて重要である。この反応は $\alpha\beta$ サブユニットからなる GNPTAB による影響が大きく、GNPTAB の遺伝子変異による活性低下により M6P 付加が生じないことが臨床や *in vitro* など様々な研究系で示されている [26-30]。すなわち M6P 修飾が生じるためには M6P 修飾の最初の GlcNAc-1-リン酸転移反応を担う GNPTAB の機能が極めて重要である、と言い換えることができる。GNPTAB は哺乳類細胞では *cis*-Golgi に局在し、S1P によって成熟化することで活性化し転移酵素として機能する [9]。

GNPTAB は通常シスゴルジに局在し、S1P と会合し Lys928-Asp929 間が切断されることで α -subunit および β -subunit に開裂し転移活性を有する。一方で昆虫細胞ではヒト GNPTAB はシスゴルジ局在性が低く、かつ成熟化がほとんど生じないことを項目 3-4、および 3-5 で示した。また GNPTAB と S1P を昆虫細胞で共発現することで成熟化に関して増大することを項目 3-6 で確認した。しかし成熟化に関しては哺乳類細胞では 54%程度生じるのに対し、昆虫細胞では S1P との共発現時でも 16%程度と低い。

M6P 修飾を人為的に達成するためには GNPTAB の活性化、すなわち成熟化が必須である。そこで本研究では昆虫細胞における局在をシスゴルジ局在性へと変更した改変型 GNPTAB を作成することで活性型である成熟体 GNPTAB の発現量を増加させることを狙い操作を行なった。

ゴルジ体への局在シグナルはほとんど報告されていないが、細胞質ドメインや細胞膜アミノ酸配列がゴルジ体局在に関係していることは報告されている [31, 32]。また脊椎動物など M6P 修飾が生じる生物種由来の GNPTAB ホモログと昆虫を含めた M6P 修飾が生じない非脊椎動物種由来の GNPTAB ホモログの膜貫通ドメイン内におけるアミノ酸配列を比較した研究が報告されている [33]。この研究では 36 番目および 39 番目のアミノ酸において、各生物種間で異なるアミノ酸が保存されていることが述べられている。すなわち脊椎動物群では 36 番目と 39 番目が親水性アミノ酸で構成されているのに対し、非脊椎動物群では疎水性アミノ酸で構成されている。そこで本研究では、膜貫通ドメイン内の 36 番目のグルタミン (Q)および 39 番目のグルタミン酸 (E)を疎水性アミノ酸であるロイシン (L)に置換したアミノ酸置換型 GNPTAB (GNPTAB^{Q36L/E39L})を作成し昆虫細胞において発現することで、目的を達成することが可能か解析を行うこととした (Fig. 3-10)。

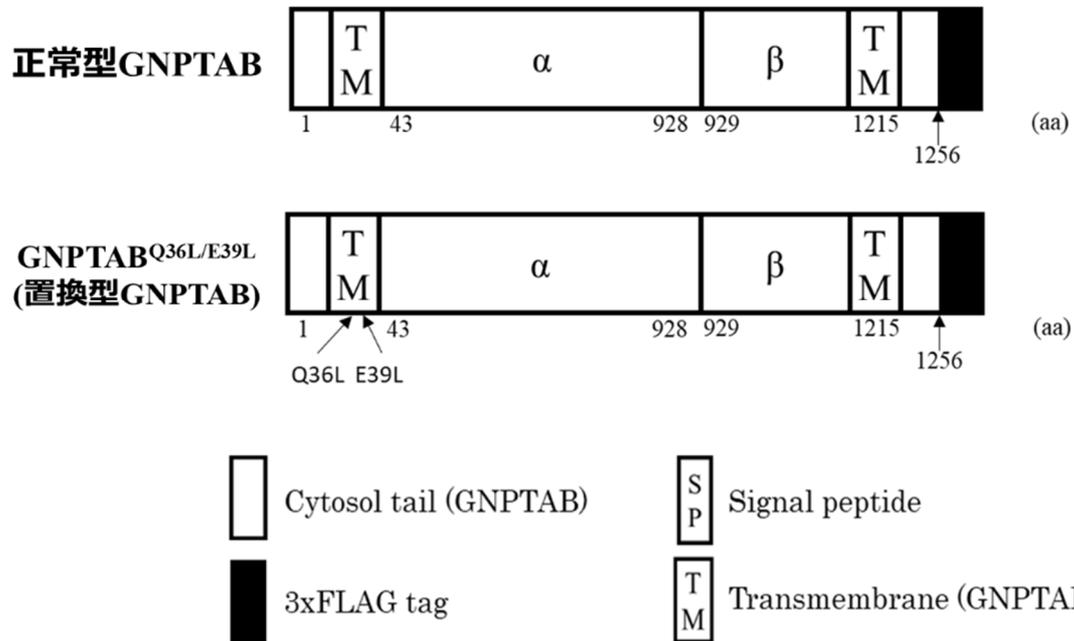


Fig. 3-10. 正常型 GNPTAB と GNPTAB^{Q36L/E39L} の 1 次構造. M6P 修飾反応における重要なサブユニットである GNPTAB は、成熟化することで活性化する 2 回膜貫通型タンパク質である。局在に関連する膜貫通領域 (TM)のうち、親水性アミノ酸である 36 番目のグルタミン (Q)および 39 番目のグルタミン酸 (E)を疎水性アミノ酸であるロイシン (L)に置換したアミノ酸置換型 GNPTAB (GNPTAB^{Q36L/E39L})を作成した。

3-11. 昆虫細胞におけるアミノ酸置換型 GNPTAB の発現解析

アミノ酸置換型である GNPTAB^{Q36L/E39L} の発現解析を行うため、 $\alpha 7$ 細胞集団に対し一過性発現操作を行なった。なお比較のため空ベクターおよび正常型 GNPTAB をそれぞれ一過性発現した細胞も用意した。Western blot 法による発現解析を行なったところ、正常型 GNPTAB および GNPTAB^{Q36L/E39L} を発現した細胞抽出液において、 180×10^3 の分子量の位置に単一バンドがそれぞれ検出された (Fig. 3-10A)。一方で GNPTAB^{Q36L/E39L} を発現したサンプルでは 45×10^3 の分子量の位置に成熟体に相当する β -subunit のバンドが検出されているが、正常型 GNPTAB では該当する位置にバンドはわずかに認められるのみである。これらのバンド強度を Image Lab software を用いて定量化し、GNPTAB の成熟化率を算出した (Fig. 3-10B)。正常型 GNPTAB ではわずか 17.2% 程度であるのに対し、GNPTAB^{Q36L/E39L} を発現したサンプルでは 60.5% と、成熟化率が有意に増加していることを明らかとした。なお GNPTAB^{Q36L/E39L} の成熟化率は、CHO 細胞で正常型 GNPTAB を発現した際の成熟化率と同程度である。

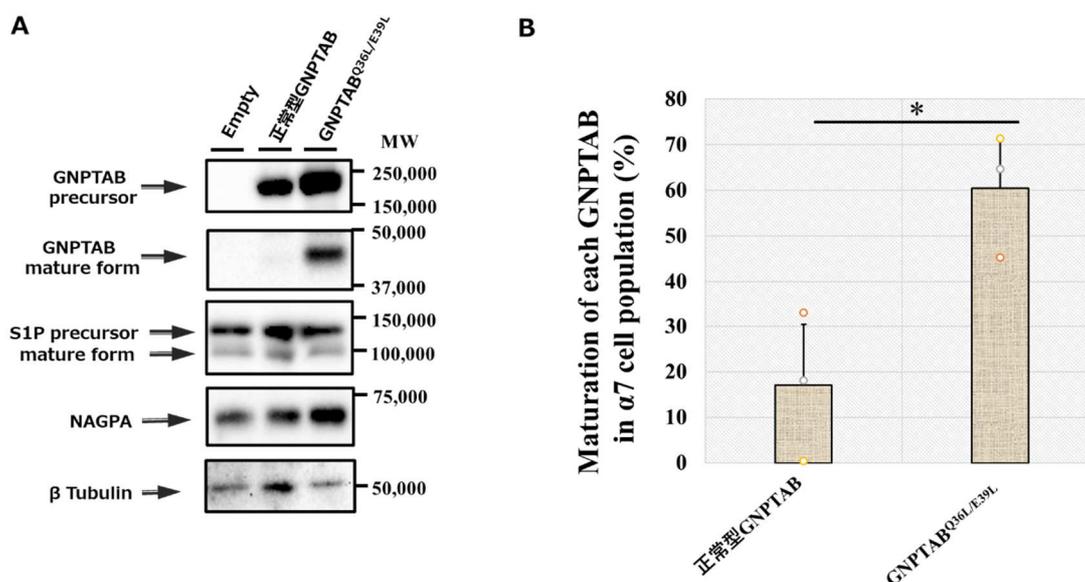


Fig. 3-11. $\alpha 7$ 細胞集団における置換型 GNPTAB の発現解析 (A) $\alpha 7$ 細胞集団において空ベクター、正常型 GNPTAB、または GNPTAB^{Q36L/E39L} をそれぞれ一過性発現させ、72 時間後に細胞を回収し細胞抽出液を作成した。各細胞抽出液を $10 \mu\text{g}$ ずつアプライし、Western blotting による発現解析を行なった。コントロールとして β Tubulin の検出を行なった。各タンパク質は以下の抗体を用いて検出した; Anti-FLAG (SIGMA), anti-HA (SIGMA), anti-myc (MBL Life Science), anti- β Tubulin (CST) Ab. (B) 正常型またはアミノ酸置換型 GNPTAB を $\alpha 7$ 細胞集団に一過性発現させた際の各 GNPTABs の成熟化率をそれぞれ計算しグラフ化した。Error bars represent mean \pm SD (n=3). * $p < 0.05$ by Student's *t*-test.

3-12. 昆虫細胞におけるアミノ酸置換型 GNPTAB の細胞内局在解析

アミノ酸置換型である GNPTAB^{Q36L/E39L} の細胞内局在解析を行うため、未導入 Sf9 細胞に対し一過性発現を行なった。局在解析を行なったところ、小胞体マーカーおよびシスゴルジマーカーとそれぞれ強いシグナルを示した (Fig. 3-12A)。GNPTAB^{Q36L/E39L} と小胞体マーカータンパク質 (n=13) またはシスゴルジマーカータンパク質 (n=14) での Pearson's Correlation Coefficients を計算しグラフ化した (Fig. 3-12B)。統計処理を行なったところ、小胞体マーカータンパク質との共局在度とシスゴルジマーカータンパク質との共局在度との間に有意差は認められなかった。すなわち正常型 GNPTAB とは異なり GNPTAB^{Q36L/E39L} は小胞体だけではなくシスゴルジへも同程度局在していることが示唆された。

正常型 GNPTAB と GNPTAB^{Q36L/E39L} における局在の変異について比較解析を行なった (Fig. 3-12C, D)。得られた Pearson 係数をもとに小胞体マーカータンパク質またはシスゴルジマーカータンパク質との共局在度の比較を行なったところ、正常型 GNPTAB に比べ GNPTAB^{Q36L/E39L} は小胞体局在性が有意に減少し、代わりにシスゴルジ局在性が有意に増大していることが判明した。すなわち局在に関して、哺乳類細胞での局在パターンと同様 GNPTAB^{Q36L/E39L} は昆虫細胞において小胞体およびシスゴルジへの局在性を示していると判断した。これら発現解析・局在解析の結果から、作成した GNPTAB^{Q36L/E39L} は狙い通りシスゴルジ局在性へと変更することで成熟化率を向上させることに成功したと評価する。

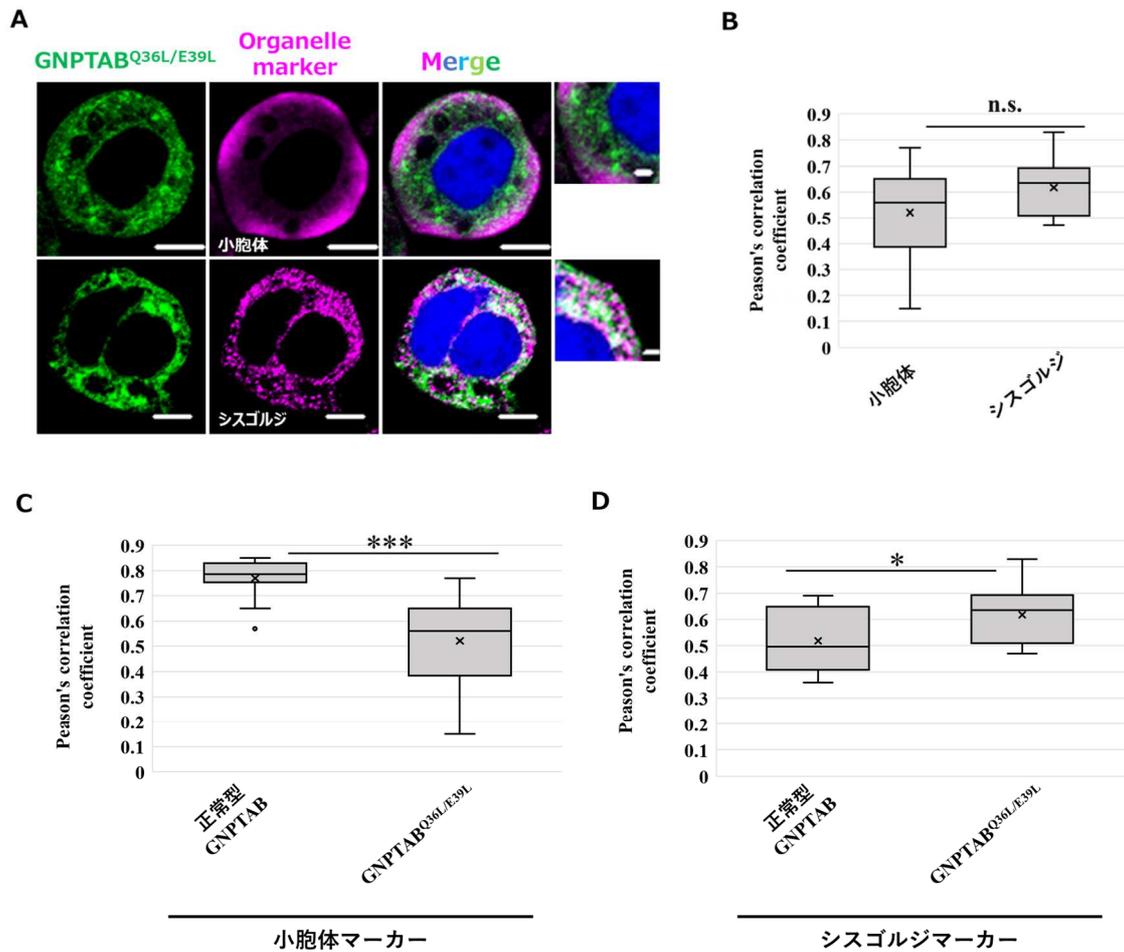


Fig. 3-12. Sf9 細胞におけるアミノ酸置換型 GNPTAB の局在解析 GNPTAB^{Q36L/E39L} を未導入 Sf9 細胞で一過性発現させ、その 96 時間後に細胞を固定した。(A) GNPTAB を anti-FLAG (green) Ab で、小胞体マーカーである Calnexin およびシスゴルジマーカーである GM130 をそれぞれ anti-Calnexin および anti-dGM130 (magenta) Ab で共染色した。核は Hoeschst 33258 (blue) で染色した。Scale bar, 5 μ m or 1 μ m. (B) GNPTAB^{Q36L/E39L} と小胞体マーカータンパク質 (n=13) またはシスゴルジマーカータンパク質 (n=14) における Pearson 係数を測定しグラフ化した。Error bars represent mean \pm SD. Not significant (n.s.) was showed by Student's *t*-test. (C, D) 正常型 GNPTAB または GNPTAB^{Q36L/E39L} と小胞体マーカータンパク質 またはシスゴルジマーカータンパク質における Pearson 係数に関して統計処理を行ないグラフ化した。小胞体マーカー+正常型 GNPTAB (n=14) or GNPTAB^{Q36L/E39L} (n=13)、ゴルジ体マーカー+正常型 GNPTAB (n=14) or GNPTAB^{Q36L/E39L} (n=14). Error bars represent mean \pm SD. **p*<0.05, ****p*<0.001 by Student's *t*-test.

3-13. Phostag-agarose を用いた M6P 付加の評価

前項までの操作にて、S1P-HA, NAGPA-myc, GNPTG, および IDUA-6×His を安定共発現する細胞集団として $\alpha 7$ 細胞集団の獲得に成功した。また昆虫細胞において哺乳類細胞と同様に成熟化およびシスゴルジ局在性を示すアミノ酸置換型 GlcNAc-1-phosphotransferase $\alpha\beta$ -subunits として GNPTAB^{Q36L/E39L} の作成に成功している。そこで実際に $\alpha 7$ 細胞集団において GNPTAB^{Q36L/E39L} を共発現させることで M6P 修飾が達成可能か評価を行なう必要があると考えた。M6P 残基を同定する方法は複数存在するが、小スケールでも評価可能な実験系として、本操作では低分子化合物である Phostag-agarose を用いた分離操作による評価を行うこととした。Phostag は二価金属イオン存在下でリン酸基と特異的に結合する特性を有する。この Phostag に agarose を結合した Phostag-agarose を用いることで、オープンカラムにてリン酸化タンパク質を分離することが可能である (Fig. 2-2)。M6P 残基は N 型糖鎖の末端マンノースにリン酸基が付加した形である。M6P 残基を有していない場合、Phostag-agarose にトラップされず素通り画分・洗い画分にリソソーム酵素である IDUA が回収される。一方で M6P 修飾が生じていた場合、Phostag-agarose にトラップされ溶出画分に回収される。したがって溶出画分における IDUA の存在量を測定することで、定性的に M6P 修飾が生じているか評価することが可能であると考え、Phostag-agarose を用いた分離操作を行うこととした。なおコントロールとして $\alpha 7$ 細胞集団に空ベクターまたは正常型 GNPTAB をそれぞれ一過性発現した細胞も用意し操作を行なった。

結果を見ると、空ベクターおよび正常型 GNPTAB を一過性発現させた細胞上清由来サンプルでは、溶出画分における IDUA 総活性値 (nmol/h) に関して有意差は認められなかった (Fig. 3-13)。ところが GNPTAB^{Q36L/E39L} を一過性発現させた細胞上清由来サンプルは、空ベクターや正常型 GNPTAB に比べ有意に IDUA 総活性値が上昇していた。本結果は GNPTAB^{Q36L/E39L} の発現により上清中の IDUA に何かしらのリン酸化が生じていることを意味している。

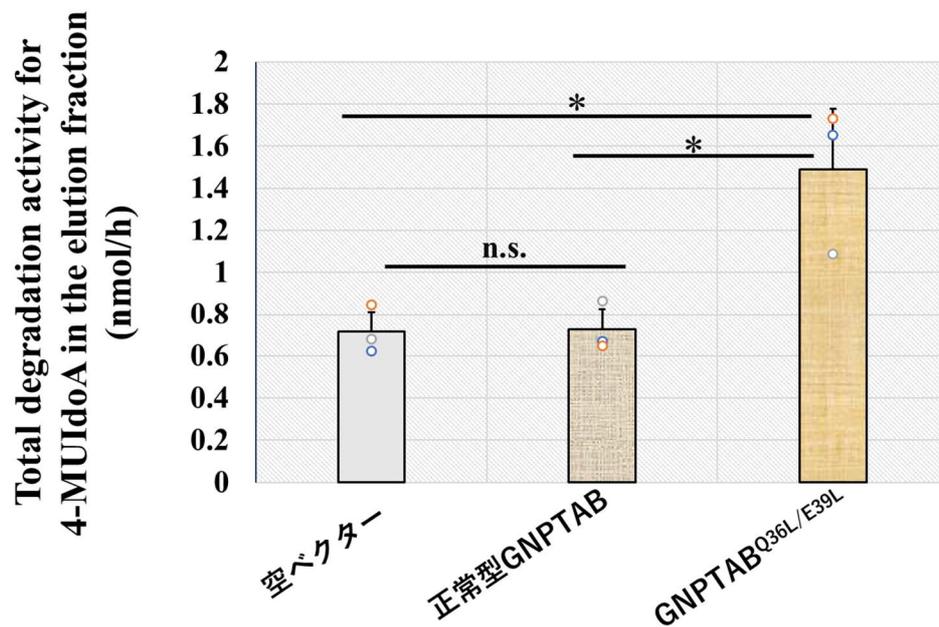


Fig. 3-13. Sf9 細胞内および上清中の IDUA 酵素活性測定 $\alpha 7$ 細胞集団において空ベクター、正常型 GNPTAB、または GNPTAB^{Q36L/E39L} をそれぞれ一過性導入した。無血清培地にて 1 週間培養した培地を回収し、限外ろ過にて洗いバッファーに交換した。得られたサンプルのうち 150 μg を用いて Phostag-agarose 分離を行ない、各画分をそれぞれ回収した。溶出画分を濃縮したのち、人工蛍光基質である 4-MUIdoA を用いて IDUA 活性測定を行ない、その総活性値 (nmol/h) を測定した。Error bars represent mean \pm SD (n=3). * p <0.05 by One-way ANOVA with Tukey test.

3-14. N 型糖鎖切断の有無による Phostag-agarose 分離の比較評価

前項の結果ではこのリン酸化が N 型糖鎖、特に M6P 残基由来なのか、もしくはタンパク質本体のいずれかのアミノ酸がリン酸化されたことによる影響なのか、判別ができない。そこで GNPTAB^{Q36L/E39L}を一過性発現させた細胞上清由来サンプルに関してあらかじめ PNGaseF 処理を行ない、N 型糖鎖切断処理を行なうこととした (Fig. 2-3)。その後 Phostag-agarose による分離を行ない溶出画分中の IDUA 活性を測定することで、Phostag が認識しているリン酸基が N 型糖鎖由来か否か評価を行なうこととした。

結果をみると、PNGaseF 処理を行なったサンプルでは PNGaseF 酵素を加えていないサンプルに加え溶出画分中の IDUA 総活性値が有意に減少していた (Fig. 3-14)。すなわち Phostag が認識しているリン酸基は N 型糖鎖に依存していることが示唆された。これらの結果から、 $\alpha 7$ 細胞集団において GNPTAB^{Q36L/E39L}を一過性発現させることで、これまで昆虫細胞を含めた非脊椎動物群において達成報告のない M6P 修飾反応を達成した可能性が定性評価にて示された。

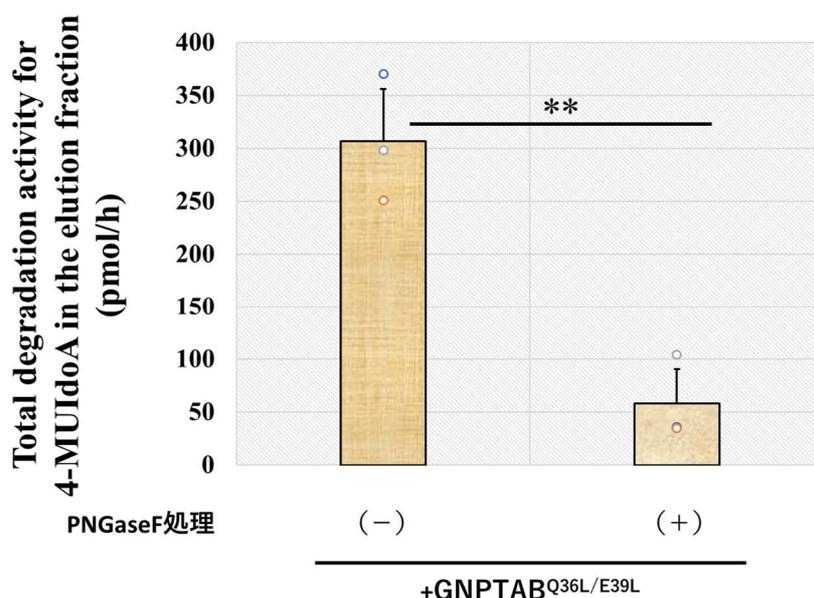


Fig. 3-14. Sf9 細胞における S1P の局在解析 $\alpha 7$ 細胞集団において GNPTAB^{Q36L/E39L}を一過性導入した上清のうち 150 μ g に対して 10 \times G2 buffer および 10% NP-40 を加えた。PNGaseF を加えたサンプル (PNGaseF 処理 (+)) および加えないサンプル (PNGaseF 処理 (-)) をそれぞれ用意し 37 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベーションした。限外ろ過にて洗いバッファーに交換したのち、Phostag-agarose 分離を行なった。溶出画分において IDUA 活性測定を行ない、その総活性値 (pmol/h) を測定した。Error bars represent mean \pm SD (n=3). ** $p < 0.01$ by Student's t -test.

第四章 考察

M6P 付加は多くの脊椎動物で観察される修飾であるが、昆虫や植物などの無脊椎生物では観察されない [6, 19]。植物細胞におけるヒト M6P 修飾酵素の発現を解析した研究は報告されている [20]。一方で昆虫細胞では M6P 修飾にかかわる解析実験は報告されていない。そこで本稿では昆虫細胞における M6P 修飾酵素群の発現解析、およびこれまで達成報告のない昆虫細胞における M6P 修飾反応の技術構築を目指し研究を行なった。結果、昆虫細胞では GNPT のサブユニットの一つである GNPTAB の非成熟化および小胞体局在性を確認した、併せて正常型 GNPTAB では M6P 修飾がほとんど生じないことも確認した。

GlcNAc-1-リン酸転移反応は M6P 修飾の第一の反応であり、機能低下に伴い M6P 修飾率も低下することが報告されている。また GNPT の変異に伴う遺伝子疾患として以下の疾患が知られている。GNPTAB の遺伝子変異は mucopolysaccharidosis type II (I-cell disease) または mucopolysaccharidosis type III $\alpha\beta$ (Pseudo-Hurler polydystrophy) を引き起こす [26-28]。GNPTG の遺伝子変異は mucopolysaccharidosis type III γ を引き起こす [29, 30]。どちらの疾患も多くの M6P 依存性リソソーム酵素が M6P 修飾されずに細胞外に分泌されることで、リソソーム内に基質が蓄積し症状を呈する。ただし症状の程度は疾患で異なり、一般に GNPTAB の遺伝子変異により生じる疾患の方が GNPTG の遺伝子変異により生じる疾患より重度の症状を呈することが報告されている [34, 35]。すなわち GNPT の機能として、GNPTAB の方がより重要な機能を担っていることが分かる。昆虫細胞ではこの GNPTAB において、非成熟化と小胞体局在性を確認した。すなわち昆虫細胞において M6P 修飾を達成するためには GNPTAB の発現異常を改善する必要があると考えた。成熟に関しては、GNPTAB の切断酵素である S1P の共発現により、GNPTAB の成熟が有意に促進された。すなわち昆虫細胞内在性の S1P とヒト GNPTAB がゴルジ装置内で会合・認識できないため成熟化が生じないと考察した。またヒト S1P を共発現させた場合 GNPTAB の成熟化率は上昇したものの、哺乳類細胞で発現した場合と比べ約 3 割程度と低い。そこでシスゴルジ局在性を示すアミノ酸置換型 GNPTAB (GNPTAB^{Q36L/E39L}) を用いることで、哺乳類細胞と同程度の 60% の成熟化率を示すことを確認した。GNPTAB^{Q36L/E39L} を含む計 5 種類のタンパク質を共発現する細胞を作成し、M6P 修飾の付加に関して定性評価において確認した。

ところで、GNPTAB が昆虫細胞において本来の局在とは違う局在性を強く示したという結果は非常に興味深いものであった。ほかの膜タンパク質である NAGPA や S1P は哺乳類細胞と同様の局在性や機能を示していた。なぜ GNPTAB

のみが哺乳類細胞と異なる細胞内局在性を示していたのか。その理由としてパートナータンパク質の発現にあると考察する。例えば S1P は GNPTAB の他コレステロール生合成にかかわる転写因子など複数のタンパク質の成熟化に寄与するプロテアーゼである [9-12, 36]。また昆虫であるカイコガ (silkworm ; *Bombyx mori*) においてもホモログ体として membrane-bound transcription factor site-1 protease (LOC114246930) の発現が認められている。S1P は単独で成熟化しシスゴルジへ移行すると考えられてきたが、近年パートナータンパク質として partner of site-1 protease (POST1/C12ORF49) の存在が報告された [37]。POST1 が S1P と相互作用することでシスゴルジ局在性を示すようになることから、局在・活性にかかわるパートナータンパク質として命名されている。また昆虫細胞でも UPF0454 protein C12orf49 homolog (LOC108040533) の存在が報告されている。従って今回 Sf9 細胞にて発現させた S1P は、昆虫細胞内在性の POST1 ホモログ体と結合することでシスゴルジ局在性を示していた可能性が考えられる。同様に GNPTAB にもパートナータンパク質が存在しており、パートナータンパク質の存在により局在や安定化が生じると予想できる。実際、このパートナータンパク質の候補として Lysosomal enzyme trafficking 393 factor (LYSET) の存在が最近になって報告された [28]。このパートナータンパク質である LYSET を KO した哺乳類細胞では小胞体局在性が認められている。LYSET のホモログ体にあたるタンパク質は脊椎動物や脊索動物では認められるものの、昆虫など無脊椎動物では存在していない。すなわち昆虫細胞ではそのホモログが存在していないためシスゴルジ局在性および成熟化をほとんど示さなかったのではないかと考察することができる。本稿では GNPTAB^{Q36L/E39L} を用いることで局在と成熟化の問題を解決したが、正常型 GNPTAB を含む M6P 付加酵素群に加え LYSET を共発現することでも問題を解決できる可能性は高いと考察する。

昆虫細胞における M6P 糖鎖修飾の鍵は GNPTAB にあると考えている。今回 GNPTAB の 36 番目と 39 番目のアミノ酸をロイシンに変更することで、正常型 GNPTAB ではほとんど生じない M6P 修飾をわずかではあるが生じさせることができたであろうと考察する。M6P 糖鎖修飾率を高めるためには、前述のアミノ酸置換に加え活性本体である内腔側のアミノ酸を改変することで達成できると考える。実際、細胞性粘菌である *Dictyostelium discoideum* 由来 GNPTAB ホモログ体 (LNR domain-containing protein; XP_638036) の α サブユニットのアミノ酸配列をモチーフにして作成した改変型 GNPTAB は、正常型に比べ約 17 倍の GlcNAc-1-リン酸転移活性を有していることが報告されている [8, 38-40]。今回アミノ酸置換操作を行なった 36 番目と 39 番目のアミノ酸に加え、いくつかのアミノ酸を改変した改変型 GNPTAB を作成することで、哺乳類細胞と同様、あるいはそれ以上の収量の M6P 付加リソソーム酵素を昆虫細胞でも獲得すること

が可能になると推測する。

本結果から、アミノ酸置換型 GNPTAB を用いることで、昆虫細胞における局在性と成熟化に関して改善できたと判断した。また $\alpha 7$ 細胞集団に対しアミノ酸置換型 GNPTAB を共発現させることで人為的な M6P 糖鎖修飾に係る重要な技術を構築できたと判断した。本技術は、これまで昆虫細胞を含めた無脊椎生物で達成報告のない、M6P 修飾の人為的な達成につながる”しるべ”になると総括する。

参考文献

1. Braulke, T., Raas-Rothschild, A., and Kornfeld, S. (2001) I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: Disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Valle D, Beaudet A, Vogelstein B, Kinzler K, Antonarakis S, Ballabio A, Scriver C, Sly W, Childs B, Bunz F, et al (eds). New York City, NY: McGraw Hill
2. Kornfeld, R., Bao, M., Brewer, K., Noll, C., and Canfield, W. (1999) Molecular cloning and functional expression of two splice forms of human N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase. *J Biol Chem* 274 , 32778-32785
3. Storch, S., and Braulke, T. (2005) Transport of lysosomal enzymes. In: Saftig P, editor. *Lysosomes*. New York: Springer Science+Business Media; Landes Bioscience 17–26
4. Bao, M., Booth, J.L., Elmendorf, B.J., and Canfield, W.M. (1996) Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. I. Purification and subunit structure. *J Biol Chem* 271 , 31437-31445
5. Kudo, M., Bao, M., D'Souza, A., Ying, F., Pan, H., Roe, B.A., and Canfield, W.M. (2005) The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA. *J Biol Chem* 280 , 36141-36149
6. Tiede, S., Storch, S., Lubke, T., Henrissat, B., Bargal, R., Raas-Rothschild, A., and Braulke, T. (2005) Mucopolidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat Med* 11 , 1109-1112
7. Raas-Rothschild, A., Cormier-Daire, V., Bao, M., Genin, E., Salomon, R., Brewer, K., Zeigler, M., Mandel, H., Toth, S., Roe, B., Munnich, A., and Canfield, W.M. (2000) Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy (mucopolidosis IIIC). *J Clin Invest* 105 , 673-681
8. van Meel, E., Lee, W.S., Liu, L., Qian, Y., Doray, B., and Kornfeld, S. (2016) Multiple Domains of GlcNAc-1-phosphotransferase Mediate Recognition of Lysosomal Enzymes. *J Biol Chem* 291 , 8295-8307
9. Marschner, K., Kollmann, K., Schweizer, M., Braulke, T., and Pohl, S. (2011) A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism. *Science* 333 , 87-90
10. Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.C., Lazure, C.,

- Murphy, R.A., Chretien, M., and Marcinkiewicz, M. (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 , 1321-1326
11. Okada, T., Haze, K., Nadanaka, S., Yoshida, H., Seidah, N.G., Hirano, Y., Sato, R., Negishi, M., and Mori, K. (2003) A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J Biol Chem* 278 , 31024-31032
 12. Stirling, J., Hellewell, J., Blakey, A., and Deakin, W. (2006) Thought disorder in schizophrenia is associated with both executive dysfunction and circumscribed impairments in semantic function. *Psychol Med* 36 , 475-484
 13. Seidah, N.G., and Prat, A. (2012) The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov* 11 , 367-383
 14. Zhao, K.W., Faull, K.F., Kakkis, E.D., and Neufeld, E.F. (1997) Carbohydrate structures of recombinant human α -L-iduronidase secreted by Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem* 272 , 22758–22565.
 15. Maita, N., Tsukimura, T., Taniguchi, T., Saito, S., Ohno, K., Taniguchi, H., and Sakuraba, H. (2013) Human α -L-iduronidase uses its own N-glycan as a substrate-binding and catalytic module. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 , 14628-14633.
 16. Dennes, A., Cromme, C., Suresh, K., Kumar, N.S., Eble, J.A., Hahnenkamp, A., and Pohlmann, R. (2005) The novel *Drosophila* lysosomal enzyme receptor protein mediates lysosomal sorting in mammalian cells and binds mammalian and *Drosophila* GGA adaptors. *J Biol Chem* 280 , 12849-12857
 17. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54 , 631-664
 18. Tomiya, N. (2009) Humanization of recombinant glycoproteins expressed in insect cells. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 21 , 71-86
 19. Aeed, A.P., and Elhammer, P.A. (1994) Glycosylation of Recombinant Prorenin in Insect Cells: The Insect Cell Line Sf9 Does Not Express the Mannose 6-Phosphate Recognition Signal. *Biochemistry* 33 , 8793–8797
 20. Pierce, O.M., McNair, G.R., He, X., Kajiura, H., Fujiyama, K., and Kermode, A.R. (2017) N-glycan structures and downstream mannose-phosphorylation of plant recombinant human alpha-L-iduronidase: toward development of enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I. *Plant Mol Biol* 95 , 593-606
 21. Kiriya, K., Fujioka, K., Kawai, K., Mizuno, T., Shinohara, Y., and Itoh, K. (2023) Novel synthetic biological study on intracellular distribution of human GlcNAc-1-

- phosphotransferase expressed in insect cells. *J Biochem* (in press doi: 10.1093/jb/mvad090)
22. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9 , 676–682
 23. Royle, J.S. (2020) The digital cell: cell biology as a data science. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* ISBN: 9781621822783 (hc); 9781621822806 (eb)
 24. Kinoshita, E., Yamada, A., Takeda, H., Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. (2005) Novel immobilized zinc(II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins. *J Sep Sci* 28 , 155-162
 25. Du, S., Wang, G., Zhang, Z., Ma, C., Gao, N., and Xiao, J. (2022) Structural insights into how GlcNAc-1-phosphotransferase directs lysosomal protein transport. *J Biol Chem* 298 , 101702
 26. DeMars, R.I., and Leroy, J.G. (1966) The remarkable cells cultured from a human with Hurler's syndrome: An approach to visual selection for *in vitro* generic studies. *In Vitro* 2 , 107-118
 27. Leroy, J.G., and DeMars, R.I. (1967) Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblast. *SCIENCE* 157 , 804-806
 28. Hickman, S., and Neufeld, N.F. (1972) A hypothesis for I-cell disease: Defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 49 , 922-929
 29. Zarghooni, M., and Dittakavi, S.S.R. (2009) Molecular analysis of cell lines from patients with mucopolidosis II and mucopolidosis III. *Am J Med Genet A* 149 , 2753-2761
 30. Kudo, M., Brem, M.S., and Canfield, W.M. (2006) Mucopolidosis II (I-cell disease) and mucopolidosis IIIA (classical pseudo-hurler polydystrophy) are caused by mutations in the GlcNAc-phosphotransferase α/β -subunits precursor gene. *Am J Hum Genet* 78, 451-463
 31. Teasdale, R.D., D'Agostaro, G., and Gleeson, P.A. (1992) The signal for Golgi retention of bovine beta 1,4-galactosyltransferase is in the transmembrane domain. *J Biol Chem* 267 , 4084-4096
 32. Welch, L.G., .and Munro, S. (2019) A tale of short tails, through thick and thin: investigating the sorting mechanisms of Golgi enzymes. *FEBS Lett* 593 , 2452-2465
 33. Pechincha, C., Groessl, S., Kalis, R., de Almeida, M., Zanotti, A., Wittmann, M., Schneider, M., de Campos, R.P., Rieser, S., Brandstetter, M., Schleiffer, A., Muller-Decker, K., Helm, D., Jabs, S., Haselbach, D., Lemberg, M.K., Zuber, J., and Palm,

- W. (2022) Lysosomal enzyme trafficking factor LYSET enables nutritional usage of extracellular proteins. *Science* 378 , eabn5637
34. Cathey, S.S., Kudo, M., Tiede, S., Raas-Rothschild, A., Braulke, T., Beck, M., Taylor, H.A., Canfield, W.M., Leroy, J.G., Neufeld, E.F., and McKusick, V.A. (2008) Molecular order in mucopolidosis II and III nomenclature. *Am J Med Genet A* 146 , 512-513
35. Dierks, T., Schlotawa, L., Frese, M.A., Radhakrishnan, K., von Figura, K., and Schmidt, B. (2009) Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease—lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793 , 710-725
36. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 , 11041-11048
37. Xiao, J., Xiong, Y., Yang, L.T., Wang, J.Q., Zhou, Z.M., Dong, L.W., Shi, X.J., Zhao, X., Luo, J., and Song, B.L. (2021) POST1/C12ORF49 regulates the SREBP pathway by promoting site-1 protease maturation. *Protein Cell* 12 , 279-296
38. Qian, Y., West, C.M., and Kornfeld, S. (2010) UDP-GlcNAc:Glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase mediates the initial step in the formation of the methylphosphomannosyl residues on the high mannose oligosaccharides of *Dictyostelium discoideum* glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 393 , 678-681
39. Liu, L., Lee, W.S., Doray, B., and Kornfeld, S. (2017) Role of spacer-1 in the maturation and function of GlcNAc-1-phosphotransferase. *FEBS Lett* 591 , 47-55
40. Liu, L., Lee, W.S., Doray, B., and Kornfeld, S. (2017) Engineering of GlcNAc-1-Phosphotransferase for production of highly phosphorylated lysosomal enzymes for enzyme replacement therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 5 , 59-65

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧にご指導、ご鞭撻下さいました
徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬科学教育部附属医薬創製教育研究センター
旧創薬生命工学分野 伊藤 孝司 先生、
並びに徳島大学先端酵素学研究所 蛋白質発現分野 篠原 康雄 先生に、
心より感謝致します。

本研究は JST 科学技術イノベーション創出に向けた大学フェローシップ創設事業 JPMJFS2130 の支援を受けたものです。また、本事業の支援を受けるにあたり助力して下さいました皆様に深く感謝申し上げます。

DNA シーケンス解析に協力していただいた、
徳島大学大学院医歯薬学研究部 総合研究支援センター先端医療研究部門の皆様
に
御礼申し上げます。

本研究は、徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬科学教育部附属医薬創製教育研究センター 旧創薬生命工学分野および徳島大学先端酵素学研究所 蛋白質発現分野にて行なわれたものであり、研究に際して御協力くださいました研究室諸氏
に御礼申し上げます。

最後に、精神的・経済的支えとなり、終始暖かく見守って下さいました家族に
心より感謝致します。

2024 年 1 月
桐山 慧