

ヒト RFT1 に物理的に相互作用する新規蛋白質のスクリーニング

田中 智恵美^{*1} 桐原 久美子^{*2} 高橋 哲夫^{*3}

Screening of Novel Proteins which Physically Interact with Human RFT1

by

Chiemi TANAKA^{*1}, Kumiko KIRIHARA^{*2} and Tetsuo TAKAHASHI^{*3}

(Received on Sep. 30, 2016 and accepted on Jun. 12, 2017)

Abstract

In eukaryotes, protein *N*-glycosylation is essential for maintenance of both the structure and function of many proteins. *N*-glycans used for protein *N*-glycosylation originate from dolichol-linked oligosaccharides (DLOs), which are assembled via the dolichol pathway localized on the rough endoplasmic reticulum (rER) membrane. In the dolichol pathway, RFT1 protein plays a critical role in flipping of DLOs from the cytoplasmic side to the luminal side of the rER membrane. In this study, we screened for novel proteins which might physically interact with human RFT1 (hRFT1) using the yeast split-ubiquitin system. As a result of screening of 2.1×10^5 cDNA clones derived from human brain, two cDNAs were isolated as candidates for physically interacting with hRFT1, identified and characterized. They were predicted to encode rER resident membrane proteins, which might act as regulatory or accessory subunits for hRFT protein.

Keywords: Dolichol-linked oligosaccharide, *N*-glycosylation, Flipping, Physical interaction, Yeast split-ubiquitin system

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重要な役割を果たしている。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で生合成され、その糖鎖部分は当経路の11種類の糖転移酵素の作用で組み立てられるが、初期の組み立ては rER 膜の細胞質側で、後期の組み立ては rER 膜の内腔側で生じていることから、生合成途中で DLO が rER 膜中で反転 (フリップング) することが判明している。この DLO のフリップングを触媒するフリッパーゼ酵素の実体は未だに解明されていない。Helenius らは、DLO のフリップングに障害を有する酵母変異株を利用して、酵母 *RFT1* 遺伝子が DLO のフリップングに重要な役割を果たしていることを報告した²⁾。この *RFT1* 遺伝子は、ドリコール経路をもつ真核細胞すべてに相同遺伝子が存在していることから、DLO フリッパーゼの有力な候補と考えられたが、後に他の研究グループからそれを否定する報告がなされ^{3),4)}、未だに結論が出ていない。そこで我々は、ヒト *RFT1* (hRFT1) 遺伝子のクローニングを行い、この蛋白質

に rER 膜上で物理的に相互作用する新規蛋白質をコードする遺伝子(cDNA)を、酵母 split-ubiquitin システムを利用して検索することにした。酵母 split-ubiquitin システムは、出芽酵母細胞内でベイトとプレイの2つの膜蛋白質を共発現させ、その物理的相互作用を *in vivo* で検出するために考案された、酵母ツーハイブリッドシステムの一つである⁵⁾。これまでに我々は当システムを用いて、ドリコール経路で働く rER 膜に局在する既知の糖転移酵素間の物理的相互作用を多数検出している⁶⁾。本研究ではクローニングした hRFT1 をベイトとして、これを多種類のヒト cDNA が組換えられたプレイ(cDNA ライブラリー)と共発現することにより、hRFT1 ベイトに相互作用を示す未知の新規遺伝子の発見を試みた。

2. hRFT1 遺伝子のクローニング

hRFT1 蛋白質のコード領域をカバーする全長遺伝子をクローニングするため、Genbank データベースに登録されているクローン NM_052859 の塩基配列を元に、PCR プライマーを設計した (Table 1)。これらのプライマーの 5' 末端側には、4 種類のベクター (pBT-N, pBT-C, pPR-N 及び pPR-C) にクローニングするためにそれぞれ異なる制限酵素認識配列を付加した。そして、それぞれのベクターにクローニングするためのフォワード (fw) プライマーとリバーズ (rv) プライマーを組み合わせて、ヒト脳由来 cDNA プールを鋳型とした PCR を行い、hRFT1 遺伝子全

*1 工学研究科工業化学専攻修士課程

*2 工学部生命化学科学部生

*3 工学部生命化学科准教授

Table 1 PCR primers used in this study.

Primer name	Nucleotide sequence	Purpose
R1BN2fw	5'-catgcatggATGGGCAGCCAGGAGGTGCTGG-3'	PCR cloning of <i>hRFT1</i> into pBT-N
R1BN2rv	5'-tccccgcggTCATGTCATTTTGTCTAGTGCGTCTGGGCAC-3'	PCR cloning of <i>hRFT1</i> into pBT-N
R1BCfw	5'-gctctagacgATGGGCAGCCAGGAGGTGCTGG-3'	PCR cloning of <i>hRFT1</i> into pBT-C
R1BCrv	5'-catgcatggGTCATTTTGTCTAGTGCGTCTGGGCAC-3'	PCR cloning of <i>hRFT1</i> into pBT-C
R1PNCfw	5'-cggaattcgATGGGCAGCCAGGAGGTGCTGG-3'	PCR cloning of <i>hRFT1</i> into pPR-N or pPR-C
R1PNCrv	5'-ccatcgatTGTTCATTTTGTCTAGTGCGTCTGGGCAC-3'	PCR cloning of <i>hRFT1</i> into pPR-N or pPR-C
dslnx_seqfw	5'-GTCGAAAATTCAAGACAAGG-3'	Sequencing of prey constructs
dslnx_seqrv	5'-AAGCGTGACATAACTAATTAC-3'	Sequencing of prey constructs

長を増幅した。増幅した DNA とベクターを同一の制限酵素で処理した後、DNA リガーゼによるライゲーション反応を行い、大腸菌 JM109 を形質転換することで 4 種類のクローン (pBT-N-hRFT1, pBT-C-hRFT1, pPR-N-hRFT1 及び pPR-C-hRFT1) を作製した。このうち、本研究のスクリーニングの過程では、2 種類のベイトコンストラクト (pBT-N-hRFT1 及び pBT-C-hRFT1) を使用した。

3. hRFT1 に相互作用する新規蛋白質をコードする遺伝子のスクリーニング

3.1 スクリーニング用選択培地の決定

2 種類のベイト (pBT-N-hRFT1 及び pBT-C-hRFT1) に対して陽性及び陰性コントロールプレイ (pAI-Alg5 及び pDL2-Alg5) をそれぞれ組み合わせ、酵母 NMY51 株を同時に形質転換し、SD-LW 寒天培地上において、30℃で 3 日間倒置培養した。これらの SD-LW 寒天培地からそれぞれコロニーを取り 500μL の滅菌水に懸濁した後、さらに 10 倍及び 100 倍希釈液を作成した。それらを SD-LWHA+5mM 3-amino-1,2,4-triazol(AT), SD-LWH+5mM AT, SD-LWHA, SD-LWH, SD-LW 寒天培地に 100 倍希釈液・10 倍希釈液・原液の順に 5μL ずつスポットし、30℃で 3 日間培養した。

この選択培地での増殖試験の結果、N 末端に Cub(ユビキチンの C 末端)+VP16/LexA を付加した hRFT1 ベイトを発現する pBT-N-hRFT1 を用いた場合、SD-LWHA, SD-LWH+5mM AT 及び SD-LWHA+5mM AT の選択培地でベイト/ pDL2-Alg5(陰性コントロールプレイ)の共発現株は増殖せず、ベイト/pAI-Alg5(陽性コントロールプレイ)の共発現株だけが増殖した (Fig.1A)。一方、C 末端側に Cub+VP16/LexA を付加した hRFT1 ベイトを発現する pBT-C-hRFT1 を用いた場合、SD-LWHA 選択培地ではベイト/ pDL2-Alg5 の共発現株は増殖せず、ベイト/ pAI-Alg5 の共発現株のみ増殖したが、SD-LWH+5mM AT 及び SD-LWHA+5mM AT の選択培地においては、ベイト/陰性コントロールプレイに加え、ベイト/ 陽性コントロールプレイの共発現株のどちらも増殖が確認できなかった (Fig.1B)。また、SD-LWH 選択培地では、両ベイトの場合

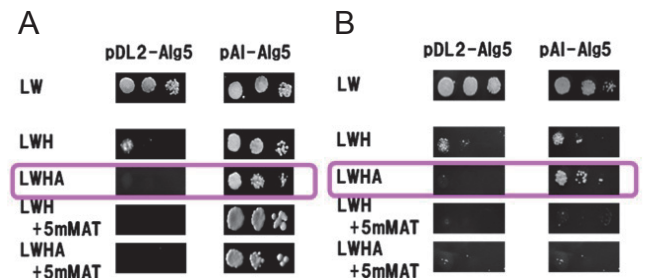


Fig. 1 Preliminary experiments as for background growth of transformants with hRFT1 bait constructs on various selective media. Panel A and B show growth tests of transformants with pBT-N-hRFT1 and pBT-C-hRFT1, respectively.

ともベイト/ pDL2-Alg5 または pAI-Alg5 の共発現株の増殖が確認された (Fig.1)。

以上の結果から、スクリーニングに用いる選択培地は pBT-N-hRFT1 及び pBT-C-hRFT1 の両ベイトの場合とも SD-LWHA 選択培地が最適であると判断し、以下のスクリーニングに用いることにした。

3.2 スクリーニング操作

まず 2 種類のベイト (pBT-N-hRFT1 及び pBT-C-hRFT1) ベイトによる酵母 NMY51 株の形質転換を行い、SD-L 寒天培地でベイト形質転換株をそれぞれ選択した。次にプレイベクターに構築されたヒト脳由来 cDNA ライブラリーの DNA を用いてこれらのベイト形質転換株をさらに形質転換し、ベイト/プレイ二重形質転換株を SD-LWHA 寒天培地にプレイングし、30℃で 4 日間培養した。

3.3 候補遺伝子の回収

3.2 のスクリーニングの培養で SD-LWHA 寒天培地上に増殖したコロニーを液体培養後、菌体から全 DNA を調製した。この DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、アンピシリン含有 LB 寒天培地上でコロニーを選択した。このコロニーを液体培養後、菌体からプラスミドを調製することで、目的とするヒト cDNA が組換えられたプレイコンストラクトを回収した。

4. 候補遺伝子の解析

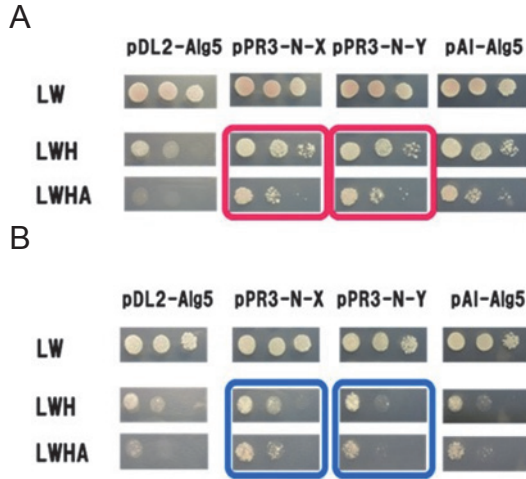


Fig. 2 Reconfirmation of physical interactions of two candidate preys, X and Y, with hRFT1 baits. Panel A and B show growth tests of transformants with pBT-N-hRFT1 and pBT-C-hRFT1, respectively.

pBT-N-hRFT1 ベイトを用いた一次スクリーニングの結果、 1.0×10^5 コロニーから 33 の候補クローンが、また pBT-C-hRFT1 を用いた一次スクリーニングでは、 1.1×10^5 コロニーから 66 の候補クローンが得られた。これらの候補プレイ cDNA の中から、再度 hRFT1 ベイトとの相互作用を確認したところ、pPR-N-X 及び pPR-N-Y の 2 つのプレイ cDNA について両 hRFT1 ベイトとの相互作用が再確認された(Fig.2A 及び Fig.2B)。

この 2 つの cDNA を Table 1 に示したシーケンス用プライマーを用いたシーケンス反応を行い、オートシーケンサー装置 ABI PRIZM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にかけて塩基配列を決定した(Fig.3)。得られた塩基配列をもとに BLAST サーチを用いて GenBank データベースを検索したところ、X はヒト Stress-associated endoplasmic reticulum protein (hSERP1)のコード領域全長 (GenBank accession: AB022427), Y は Chromosome 4 open reading frame 3 (C4orf3)の 4 番目のア

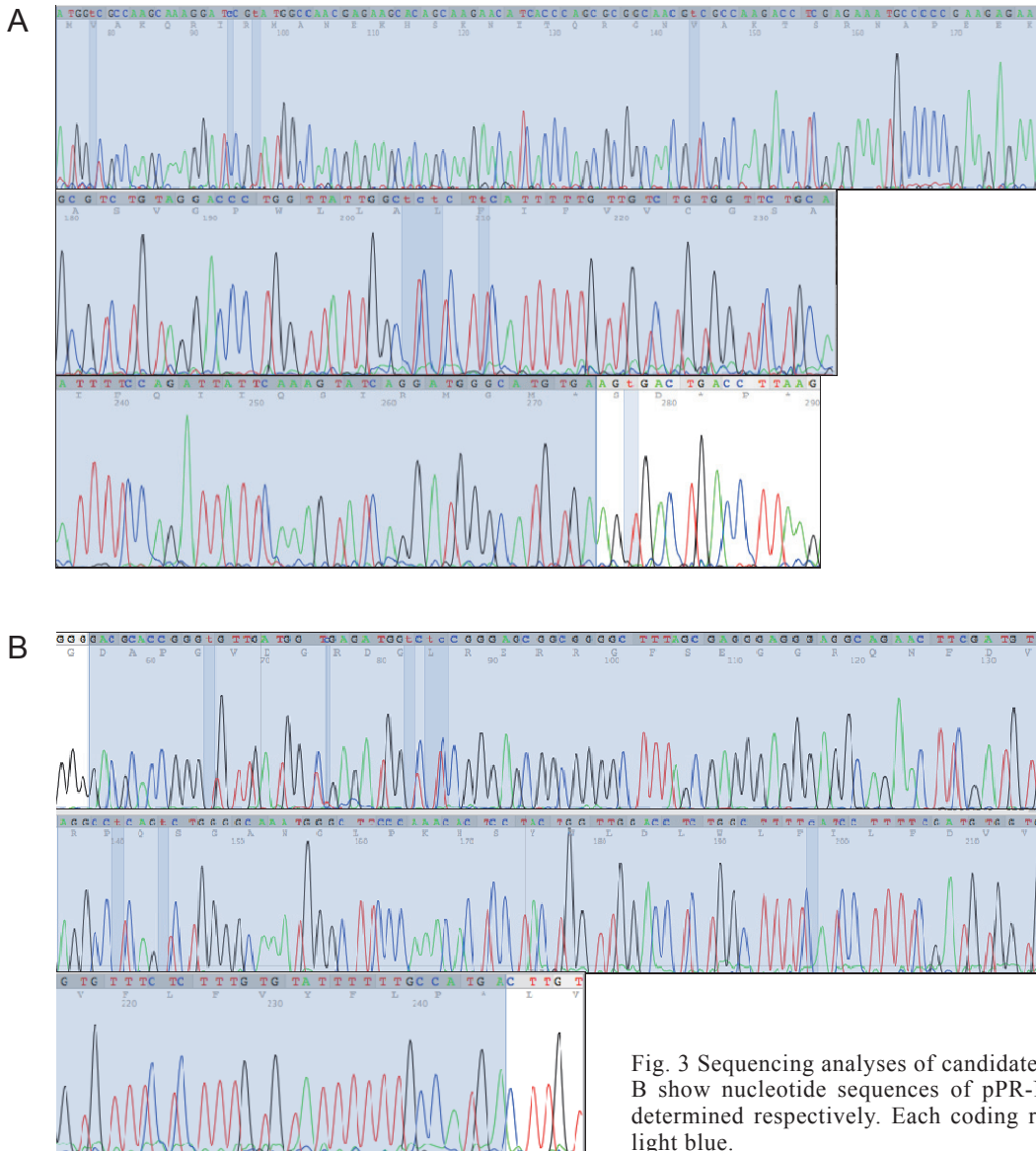


Fig. 3 Sequencing analyses of candidate preys. Panel A and B show nucleotide sequences of pPR-N-X and pPR-N-Y, determined respectively. Each coding region is colored in light blue.

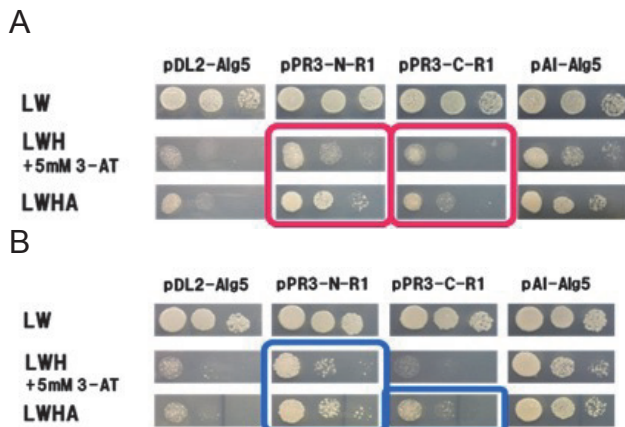


Fig. 4 Swapping analyses of physical interactions between candidate baits and hRFT1 preys. Panel A and B show growth tests of transformants with pBT-N-hSERP1 and pBT-N-C4orf3, respectively.

ミノ酸から終止コドンまでのコード領域 (GenBank accession: NM_001001701)を含む遺伝子であるということが判明した。

続いて、これら2種類のcDNAをpPR3-NベクターからpBT-Nベクターにサブクローニングして、ベイトとプレイを入れ替えても相互作用が生じるかどうかを確認することにした(スワッピング解析)。酵母NMY51株の二重形質転換後に得られたベイト/プレイ共発現株について、選択培地で増殖性を確認したところ、pBT-N-hSERP1ベイトとhRFT1のN末端にCubを付加したpPR-N-hRFT1プレイ又はhRFT1のC末端にCubを付加したpPR-C-hRFT1プレイとの二重形質転換株は、どちらもSD-LWH+5mM 3-AT及びSD-LWHA寒天培地での増殖がそれぞれ確認された(Fig.4A)。これらの結果から、ベイトとプレイを入れ替えてもhSERP1とhRFT1の間で相互作用が起こることが判明した。

一方、pBT-N-C4orf3ベイトとpPR-N-hRFT1プレイとの二重形質転換株は、SD-LWH+5mM 3-AT及びSD-LWHA寒天培地での増殖が観察されたが(Fig.4B)、同ベイトとpPR-C-hRFT1プレイとの二重形質転換株はSD-LWHA寒天培地でのみ増殖が検出され、SD-LWH+5mM 3-AT寒天培地では増殖が観察されなかった(Fig.4B)。これらの結果から、ベイトとプレイを入れ替えてもC4orf3とhRFT1の間で相互作用が起こることが判明したが、増殖性に差が見られたためこの膜タンパク質間の相互作用はhRFT1のN末端側寄りの領域で生じていることが予測される。

5. 考察

本研究では、hRFT1に物理的に相互作用する新規蛋白質を検索することで、hRFT1を含めたヒトDLOフリッパーゼに機能的に関連する蛋白質の一端を解明することを試みた。

今回の解析で同定された2つの蛋白質のうち、SERP1は、低酸素ストレス下でその遺伝子発現が正に調節されるものとしてラットで最初に同定された、1回膜貫通型のrER膜局在蛋白質である⁷⁾。その組織発現性はユビキ

タスであるが、ツニカマイシンによる小胞体ストレス存在下で発現が5倍程度上昇し、ストレス解消後の蛋白質のN-グリコシル化を促進する作用をもつことが実証されている⁷⁾。さらに、SERP1はトランスロコン複合体と免疫学的に共沈降することも報告されており、rERにおける膜蛋白質の品質管理に働いていることが示唆されている⁷⁾。一方で、今回の我々の解析結果は、hSERP1がhRFT1を介して蛋白質N-グリコシル化を調節している可能性を示唆するものである。例えばトランスロコンへhRFT1をターゲティングすることにより、hRFT1の安定性や機能を調節しているケースなどが想定される。そのため、今後まずは免疫共沈などの手法を用いてhRFT1とhSERP1が複合体を形成することを生化学的に実証する必要がある。

同定されたもう1つのC4orf3遺伝子は、ヒト染色体4番長腕q22-q32領域についてのコード領域のスクリーニングにより同定された読み取り枠(ORF3)であり⁸⁾、C型肝炎ウイルスF蛋白質により転写活性化される遺伝子であることが報告されているものの⁹⁾、その蛋白質としての構造や本来の機能の詳細な特徴づけの報告は未だになされていない。そのORF3からは、全長66アミノ酸からなる蛋白質の一次構造とともに、1つの膜貫通ドメインを有することが予測されていたが、その細胞内局在性については今まで実証されていなかった。本研究の中で我々は、C4orf3蛋白質がrER膜に局在するhRFT1蛋白質と物理的に相互作用すること(Fig.2及びFig.4B)、同じくrER膜に局在する陽性コントロールプレイ膜蛋白質(Alg5蛋白質)とも物理的に相互作用すること(Fig.4B)を示した。従って、これらの結果を通じてC4orf3蛋白質は少なくともrER膜に局在していることが、間接的ではあるが最初の実証されたことになる。今後、C4orf4蛋白質に関しても、組換え蛋白質を調製することにより細胞内局在性やhRFT1との複合体形成を生化学的に検証する必要がある。

6. 結論

以上の従来の知見から、hSERP1及びC4orf3は、どちらも未だにその機能に関して確定されていない蛋白質といえる。また、そのアミノ酸配列に関する我々の調査からは、両蛋白質とも1つの膜貫通ドメイン以外に特徴的な保存ドメインまたは保存モチーフは検出されなかった。

以上を総括すると、hSERP1及びC4orf3は、rER膜局在性の膜蛋白質ではあるものの、DLOフリッパーゼ本体ではない可能性が高いと考えられる。しかしながら、両蛋白質は、hRFT1蛋白質とrER膜上で密接に結合していることが酵母split-ubiquitinシステムを適用した本研究によって*in vivo*で証明されたことから、DLOフリッピング装置の補助的あるいは調節的機能を果たす蛋白質である可能性がより強く示唆された。

これらの遺伝子を用いた今後のさらなる解析により、ヒト細胞のrER膜におけるDLOフリッパーゼの蛋白質複合体装置の全容の解明が前進することが期待される。

謝辞

本研究は、平成19年度東海大学工学部研究教育補助金(A)「小胞体でのN-グリカン生合成に働くヒト糖転移酵素間の相互作用の解析」ならびに平成21年度東海大学総合研究機構研究奨励補助金計画「真核細胞の粗面小胞体膜における糖転移酵素ネットワークの解析」の研究援助を頂きました。関係者の方々に深く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) M. Aebi, N-linked protein glycosylation in the ER, *Biochim Biophys Acta* Vol.1833, pp.2430-2437 (2013).
- 2) J. Helenius, D.T. Ng, C.L. Marolda, P. Walter, M.A. Valvano and M. Aebi, Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein, *Nature* Vol.415, pp.447-50 (2002).
- 3) C.G. Frank, S. Sanyal, J.S. Rush, C.J. Waechter and A.K. Menon, Does Rft1 flip an N-glycan lipid precursor?, *Nature* Vol.454, E3-4 (2008).
- 4) J. Jelk, N. Gao, M. Serricchio, A. Signorell, R.S. Schmidt, J.D. Bangs, A. Acosta-Serrano, M.A. Lehrman, P. Bütikofer and A.K. Menon, Glycoprotein biosynthesis in a eukaryote lacking the membrane protein Rft1, *J. Biol. Chem.* Vol.288, No.28, pp.20616-20623 (2013).
- 5) N. Johnsson and A. Varshavsky, Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.91, No.22, pp.10340-10344 (1994).
- 6) T. Takahashi and X.-D. Gao, Physical interactions among human glycosyltransferases involved in dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* Vol.24 No.136, pp.65-77 (2012).
- 7) A. Yamaguchi, O. Hori, D.M. Stern, E. Hartmann, S. Ogawa and M. Tohyama, Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1) / Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation, *J Cell Biol.* Vol.147, No.6, pp.1195-1204 (1999).
- 8) G. Kalsi, P.H. Kuo, F. Aliev, J. Alexander, O. McMichael, D.G. Patterson, D. Walsh, Z. Zhao, M. Schuckit, L. Nurnberger Jr., H. Edenberg, J. Kramer, V. Hesselbrock, J.A. Tischfield, V. Vladimirov, C.A. Prescott, D.M. Dick, K.S. Kendler and B.P. Riley, A systematic gene-based screen of chr4q22-q32 identifies association of a novel susceptibility gene, DKK2, with the quantitative trait of alcohol dependence symptom counts, *Hum. Mol. Genet.* Vol.19, No.12, pp.2497-2506 (2010).
- 9) J. Guo, J. Cheng, D. Ji, L.F. Zhao, X.S. Gao, Y. Liu and S.H. Wu, Screening and cloning target genes transactivated by hepatitis C virus F protein using suppression subtractive hybridization technique, *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* Vol.13, No. 9, pp.660-663 (2005).