

サーマルシフトアッセイによるカルレティキュリン-糖鎖相互作用解析

平野 真*¹, 戸谷 希一郎*²

Interaction analysis of calreticulin and glycans using thermal shift assay

Makoto HIRANO*¹, Kiichiro TOTANI*²

ABSTRACT : Calreticulin (CRT) has been described as a lectin-like chaperone that recognizes Glc1Man9GlcNAc2 (G1M9)-glycoproteins in the endoplasmic reticulum (ER). However whether CRT directly recognizes aglycone (protein portion) of glycoprotein remains controversial. Our previous study demonstrated that CRT competitively inhibited glucosidase II activity against a hydrophobic substrate not but that against a hydrophilic substrate, implying that CRT recognizes not only glycan structure but also aglycone hydrophobicity. Here to investigate the possibility we prepared ligands for CRT: G1M9-derivatives with different hydrophobicity on the aglycone and gradually denatured immunoglobulin Y (IgY), which harbors G1M9 glycan, and analyzed the interaction of a recombinant CRT with the ligands using thermal shift assay. These results demonstrate that CRT strongly binds to more hydrophobic G1M9-derivative and more denatured IgY, clarifying that CRT more strongly binds misfolded glycoprotein, and reversely releases folded glycoprotein by distinguishing the folding status of glycoprotein in the ER glycoprotein quality control system.

Keywords : calreticulin, lectin, glycoprotein, aglycone, thermal shift assay

(Received September 30, 2015)

1. はじめに

タンパク質の生合成過程において、小胞体糖タンパク質品質管理機構は必要不可欠である。特に、Calnexin/Calreticulin (CNX/CRT) サイクルは、その中心機構として、タンパク質の正常な折り畳みに寄与している(1)。CRTは、このサイクルにおいて、折り畳みセンサー酵素UGGT (UDP-Glucose: glycoprotein glucosyltransferase) と共同し、新生糖タンパク質上のGlc1Man9GlcNAc2 (G1M9) 型糖鎖を認識し、タンパク質部分の折り畳みを促進する機能が知られている(2-5)。CRTは、1つの糖鎖認識ドメインを有し、そこから長いヘアピンを伸張し、プロリンリッチなドメインを形成する。X線結晶構造解析から、G1M9型糖鎖上のグルコース (Glc) 残基が糖鎖認識ドメインと糖鎖との相互作用に必須であることが示

されている(6)。しかしながら、CRTがG1M9型糖タンパク質の糖鎖部分とタンパク質部分(アグリコン)の両方を認識するか、あるいは、糖鎖部分のみを認識するのかが不明確である(7-12)。

以前の我々の研究において、過剰量のCRT存在下、アグリコン構造に活性が左右されないglucosidase II (13) が疎水性のアグリコンを有するG1M9型基質よりも親水性のアグリコンを有するG1M9型基質からGlc残基を切断しやすいことを示している(14)。これは、CRTが疎水性の基質を捕捉し、glucosidase IIの基質へのアクセスを阻害していること、すなわち、CRTは糖鎖だけでなく、アグリコンの疎水性度をも認識していることを示唆している。折り畳み過程で、タンパク質は成熟するに従い、疎水性のアミノ酸配列が内包され、その疎水性度が低下する。したがって、これらのことから、CRTは、未成熟で疎水性度の高い糖タンパク質と強く相互作用し、逆に、成熟し親水性度の高い糖タンパク質との相互作用は弱くなると推測された。

*¹ : 成蹊大学 理工学部 物質生命理工学科 助教

*² : 成蹊大学 理工学部 物質生命理工学科 准教授 (ktotani@st.seikei.ac.jp)

本稿では、この仮説の立証を題材に、糖鎖-レクチン相互作用解析におけるサーマルシフトアッセイ (15) の有用性について議論する。

2. サーマルシフトアッセイ

サーマルシフトアッセイは、SYPRO Orangeという蛍光物質とリアルタイムPCRの装置を用いて、ターゲットタンパク質の変性温度を測定し、その相対的な安定性を評価することができる手法である。すなわち、タンパク質の熱変性の過程で、天然ではタンパク質の立体構造中に内包されている疎水性領域が露出する。このとき、SYPRO Orangeは、露出した疎水性領域に特異的に結合し、蛍光を発する。この蛍光強度の変化をモニタリングすることでタンパク質の変性温度を測定することが可能となる。ここで、タンパク質とそのリガンド分子が共存すると、タンパク質-リガンド複合体が形成され、タンパク質が安定化されるため、リガンドとの相互作用の親和性に依存してタンパク質の変性温度は上昇する。この変性温度の変化 (ΔT_d) を指標として、タンパク質-リガンド相互作用を評価することが可能となる。これまで、サーマルシフトアッセイは、創薬研究において、比較的親和性の強いタンパク質-リガンド相互作用のスクリーニングに用いられてきたが、本研究では、比較的親和性の弱いレクチン-糖鎖の相互作用に適用可能か検証する。また、生体分子の相互作用解析には、等温滴定熱量測定 (ITC) や表面プラズモン共鳴法 (SPR) などが用いられてきた。サーマルシフトアッセイでは、ミリグラムオーダーのタンパク質が必要なITC (16) と比較し、マイクログラムオーダーのタンパク質で相互作用を解析できる。また、SPRでは、たとえ生体内では可溶性のタンパク質として存在しているタンパク質でも固定化が必須である (17) が、サーマルシフトアッセイでは、固定化の必要はなく、溶液状態で相互作用を解析することができるというメリットがある。そこで、本研究では、これらの利点を活かし、生体内では可溶性タンパク質として存在するCRTと、様々なアグリコン構造をもつ合成G1M9 リガンド、もしくは、変性G1M9 型糖タンパク質との相互作用をサーマルシフトアッセイにて評価し、その有用性を検証した。

3. CRTと合成リガンドとの相互作用

CRTとリガンドとの相互作用を評価するため、はじめに、CRT単体での変性温度をサーマルシフトアッセイにて導き出した。ここでは、リコンビナントのヒトCRT(4,

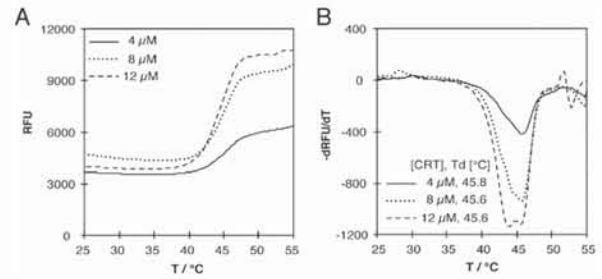


Figure 1. Determination of denaturation temperature (T_d) of calreticulin (CRT). The CRT solution (20 μ L) in the presence of SYPRO® Orange dye was gradually heated from 25°C to 55°C in a real-time PCR device, and the fluorescence intensity was monitored to obtain melt curves (A). The melt peaks (B) revealed that the T_d for CRT ranged from 45.6°C to 45.8°C. Temperature at the local minimums represents T_d .

8, 12 μ M) と 60 x濃度のSYPRO Orange (Original: 5000 x) をTris-buffered saline (pH 7.4)/10 mM CaCl₂ (TBSCa) 中で総溶液量 20 μ Lで混和し、リアルタイムPCR装置 (CFX96, Bio-Rad) にて、0.2°C/10 secで段階的に温度を上昇させながら、励起光 470 nmを照射し、570 nmの蛍光強度をモニタリングした。これにより得られた曲線をMelt curveといい、この変曲点に変性温度を示している (Fig. 1A)。さらに、変曲点を明確にするため、蛍光強度を温度で微分した曲線Melt peakを描くと、その極小値を変性温度として求められる (Fig. 1B)。よって、これらの結果から、CRTの変性温度は、45.6–45.8°Cであることが明らかとなり、4 μ MのCRTで変性温度を評価できることが示唆された。

そこで、続いて、疎水性度の異なるアグリコン構造をもつG1M9 型糖鎖リガンド (G1M9-OH, -Gly-NH₂, -Gly-Glu-Bu; Structures, see Fig. 2A; Hydrophobicities, see Fig. 2B) を合成し、CRTとの相互作用をサーマルシフトアッセイにて評価した。ここでは、CRT (4 μ M) と各G1M9 糖鎖リガンド (12 μ M) をTBSCa中で混和し、4°Cで1時間ブレインキュベーションした後、SYPRO Orangeを 60 x濃度で添加し、サーマルシフトアッセイに供した。得られたMelt peakから、それぞれのリガンド共存下でのCRTの変性温度を算出した (Fig. 2C)。その結果、リガンド非存在下に比べ、G1M9-OH, -Gly-NH₂, -Gly-Glu-Buの変性温度はそれぞれ、0.6, 1.0, 2.0°C上昇した。これらの結果から、CRTとリガンドとの相互作用はアグリコンの疎水性度に従って強くなることが示された。また、比較的親和性の弱いレクチン-糖鎖相互作用にも、サーマルシフトアッセイを適用することが可能であることが示唆された。

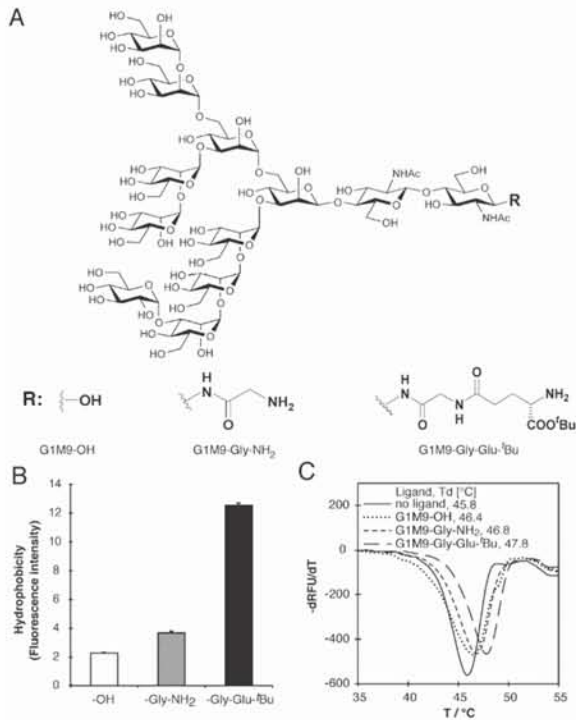


Figure 2. Interaction of CRT with G1M9-derivatives. (A) Aglycone structures of the synthesized G1M9-derivatives. (B) The aglycone hydrophobicities of G1M9-derivatives. The hydrophobicity was evaluated by measuring the fluorescence intensity of the derivatives in the presence of SYPRO® Orange. Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 3$). (C) Interaction of CRT with G1M9-derivatives. After an hour preincubation, the mixtures of CRT (4 μ M) and G1M9-derivatives (12 μ M) were subjected to TSA (35°C to 55°C). Curves represent typical melt peaks.

4. 変性G1M9型糖タンパク質の作製

次に、実際の糖タンパク質とCRTとの相互作用をサーマルシフトアッセイにて検証するため、変性状態の異なるG1M9型糖タンパク質の調製を試みた。モデルとなるG1M9型糖タンパク質には、ニワトリ由来のImmunoglobulin Y (IgY) を用いた。本研究で用いたIgY上にG1M9型糖鎖が存在することは、Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) システム (18) を用いて確認した (Fig. 3A)。また、IgYを種々の濃度でサーマルシフトアッセイに供し、IgYの変性温度が71.0–71.4°Cの範囲にあることが示された (Fig. 3B)。この結果から、IgYとCRTの変性温度は大きく異なっており、サーマルシフトアッセイにて、これらのタンパク質が共存していてもCRTの変性温度の変化を測定可能であることが示唆された。さらに、IgYの変性度が65°C付近から大きく上昇していることから、IgYを70、もしくは、75°Cで2分間

熱処理し、変性度の異なるIgYの調製を試みた。変性度はSYPRO Orangeの蛍光強度により測定した (Fig. 3C)。この結果から、IgYは70°Cで中程度、サーマルシフトアッセイで算出した変性温度を超えた75°Cで完全に変性したものを調製できることが示された。したがって次項のCRTとIgYの相互作用解析では、未処理のIgYを天然型、70°C、75°Cで熱処理したIgYをそれぞれ部分変性型、完全変性型として評価することとした。

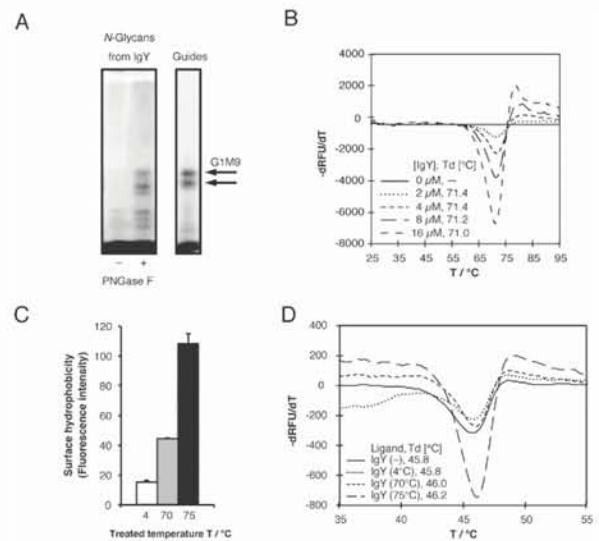


Figure 3. Interaction of CRT with a G1M9-glycoprotein, immunoglobulin Y (IgY). (A) Analysis of *N*-glycans on IgY. *N*-Glycan content of IgY was analyzed using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. The *N*-glycans released from IgY were labeled with ANDS through a reductive amination and SDS-PAGEd. Bands were analyzed using an image analyzer. The guides, G1M9 and M9 glycans. (B) Determination of Td of IgY. To monitor the changes in the folding status of IgY during heat denaturation, IgY was subjected to TSA (25°C to 95°C). The curves represent typical melt peaks of IgY. (C) Heat regulation of the denaturation state of IgY. To prepare different folding forms of IgY, IgY (4 μ M) was heated at the indicated temperatures for 2 min. SYPRO® Orange was added to the solution and the surface hydrophobicity was evaluated by measuring the fluorescence intensity. Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 3$). For subsequent analyses of the interaction of CRT with IgY, IgYs unheated and heated to 70°C and 75°C were used as native, partially denatured, and completely denatured forms, respectively. (D) Interaction of CRT with IgY. After a 12-h preincubation of CRT (4 μ M) and IgY (8 μ M) with or without heat denaturation, the mixture was subjected to TSA (35°C to 80°C). Curves represent typical melt peaks ranging from 35°C to 55°C.

5. CRTと変性IgYとの相互作用

最後に、CRTとG1M9型糖タンパク質モデルとして、天然型、部分変性型、完全変性型IgYとの相互作用をサーマルシフトアッセイにて解析した。ここでは、CRT (4 μ M) とそれぞれのIgY (8 μ M) をTBSCa中にて混和し、12時間ブレインキュベーションした後、SYPRO Orangeを添加し、サーマルシフトアッセイに供した (Fig. 3D)。その結果、天然型IgY共存下では、CRTの変性温度に変化が認められなかったことから、CRTは天然型IgYとはほとんど相互作用しないことが示された。一方で、部分変性型では0.2°C上昇し、完全変性型では0.4°Cの上昇が認められた。よって、タンパク質部分の変性度が上昇するに従って、CRTとIgYとの親和性が高まることが示された。また、タンパク質同士の相互作用についても、各々の変性温度が異なれば、サーマルシフトアッセイにて評価することが可能であることが示唆された。

しかしながら、CRTと合成リガンドとのサーマルシフトアッセイに比べて、変性温度の変化は小さかった。これには、IgYの濃度、G1M9型糖鎖の含有量、またそれらのバランスの問題が挙げられる。すなわち、本研究で用いたIgYにはG1M9型糖鎖は12%程度しか含まれていない。そのため、CRTのリガンドとなり得るG1M9型IgYの含有量が極めて低いという問題点がある。これを解決するため、サーマルシフトアッセイにおいて、IgYのモル数を増加したが、CRTのMelt peakがIgYのMelt peakに埋没してしまい、CRTの変性温度を測定することができなかった (data not shown)。そのため、より明確にCRTのリガンド認識について、天然型と変性型G1M9型糖タンパク質との差を検証するためには、よりG1M9型糖鎖を有するタンパク質の含有量を高める必要があると考えられる。

6. 結論

以上のことから、タンパク質をリガンドとする際には、ターゲットとなる糖鎖をもつタンパク質の含有量などを考慮する必要はあるが、比較的親和性の弱いレクチン-糖鎖相互作用の解析にサーマルシフトアッセイを適用することが可能であり、本研究を通じて、CRTはG1M9型糖タンパク質との相互作用において、糖鎖部分だけではなく、アグリコン部分の疎水性度を識別することが示された。

本研究により、CRTとG1M9型糖タンパク質との相互作用におけるアグリコン認識について新たな知見を加えることができた。

参考文献

1. D. N. Hebert, M. Molinari, In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 1377–1408.
2. A. J. Parodi, Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation, *Biochem. J.* 348 (2000) 1–13.
3. D. N. Hebert, B. Foellmer, A. Helenius, Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes, *EMBO J.* 15 (1996) 2961–2968.
4. L. A. Rutkevich, D. B. Williams, Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum, *Curr. Opin Cell Biol.* 23 (2011) 157–166.
5. K. Totani, Y. Ihara, T. Tsujimoto, I. Matsuo, Y. Ito, The recognition motif of the glycoprotein-folding sensor enzyme UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase, *Biochemistry* 48 (2009) 2933–2940.
6. G. Kozlov, C. L. Pocianschi, A. Rosenauer, S. Bastos-Aristizabal, A. Gorelik, D. B. Williams, K. Gehring, Structural basis of carbohydrate recognition by calreticulin, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 38612–38620.
7. A. R. Rodan, J. F. Simons, E. S. Trombetta, A. Helenius, N-linked oligosaccharides are necessary and sufficient for association of glycosylated forms of bovine RNase with calnexin and calreticulin, *EMBO J.* 15 (1996) 6921–6930.
8. S. Allen, N. J. Bulleid, Calnexin and calreticulin bind to enzymically active tissue-type plasminogen activator during biosynthesis and are not required for folding to the native conformation, *Biochem. J.* 328 (1997) 113–119.
9. A. Zapun, S. M. Petrescu, P. M. Rudd, R. A. Dwek, D. Y. Thomas, J. J. Bergeron, Calnexin and calreticulin bind to enzymically active tissue-type plasminogen activator during biosynthesis and are not required for folding to the native conformation, *Cell* 88 (1997) 29–38.
10. B. Di Jeso, L. Ulianich, F. Pacifico, A. Leonardi, P. Vito, E. Consiglio, S. Formisano, P. Arvan, Folding of thyroglobulin in the calnexin/calreticulin pathway and its alteration by loss of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum, *Biochem. J.* 370 (2003) 449–458.
11. L. Mancino, S. M. Rizvi, P. E. Lapinski, M. Raghavan, Calreticulin recognizes misfolded HLA-A2 heavy chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 5931–5936.

12. Y. Saito, Y. Ihara, M. R. Leach, M. F. Cohen-Doyle, D. B. Williams, Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins, *EMBO J.* 18 (1999) 6718–6729.
13. M. F. Pelletier, A. Marcil, G. Sevigny, C. A. Jakob, D. C. Tessier, E. Chevet, R. Menard, J. J. Bergeron, D. Y. Thomas, The heterodimeric structure of glucosidase II is required for its activity, solubility, and localization in vivo, *Glycobiology* 10 (2000) 815–827.
14. K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, Y. Ito, Substrate specificity analysis of endoplasmic reticulum glucosidase II using synthetic high mannose-type glycans, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 31502–31508.
15. U. B. Ericsson, B. M. Hallberg, G. T. Detitta, N. Dekker, P. Nordlund, Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies, *Anal. Biochem.* 357 (2006) 289–298.
16. Y. Liang, Application of isothermal titration calorimetry in protein science, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40 (2008) 565–576.
17. P. L. Kastiris, A. M. J. J. Bonvin, On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact, *J. R. Soc. Interface* 10 (2013) 20120835.
18. N. Gao, M. A. Lehrman, Alternative and sources of reagents and supplies of fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE), *Glycobiology* 13 (2003) 1G–3G.