

(0) 研究分野

分科会: 生物

キーワード: 糖タンパク質、アスパラギン結合型糖鎖、代謝(分解)

ペプチド: *N*-グリカナーゼ、NGLY1

(1) 研究背景と研究目標

ペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase) は糖タンパク質あるいは糖ペプチドからアスパラギン結合型 (N型) 糖鎖を遊離する酵素です。真核細胞の細胞質に広く存在するPNGase (ヒト遺伝子名: *NGLY1*) は、現在小胞体 (Endoplasmic reticulum; ER) において新たに合成された異常糖タンパク質の品質管理機構の一つである小胞体関連分解 (ER-associated degradation; ERAD) に関わる分子であることが広く認知されるに至っています。一方で、哺乳動物や出芽酵母においてN型糖鎖の生合成経路は現在そのほとんどが解明されたと言ってもいいのに対し、*NGLY1*やその他の活性によって生じる、N型糖鎖と共通の構造を持つ遊離糖鎖 (遊離N型糖鎖:FNG) の代謝機構はほとんど不明のままです。この非リソソーム型の糖鎖の代謝はおそらく真核生物において最も基本的な、教科書にも記述されるべき生物学的素過程であるにも関わらず、未同定な酵素、トランスポーターが数多く存在することが明らかです。我々はこのまだ未解明な代謝機構の解明を進めるとともに、その代謝機構の生理機能について様々な角度から研究を進めています。

(2) 2022年度成果と今後の研究計画

*NGLY1*は1993年に鈴木がその活性を同定し、2000年に遺伝子を同定した分子である。その生理機能や生物学的重要性は長らく不明なままであったが、*NGLY1*遺伝子の欠損によって生じるヒト遺伝疾患である*NGLY1*欠損症が2012年に発見されて以来、患者団体の精力的な活動のおかげもあり、*NGLY1*研究が世界的に急速な広がりを見せている。本年度は日本生化学会からの依頼により、東京都医学総合研究所の吉田雪子主席研究員と共同で*NGLY1*および*NGLY1*欠損症のための特集号を*J Biochem*誌に編集し[1]、その特集号においてマウスやラットのモデル動物を用いた研究の進展、および*NGLY1*研究において重要な活性測定法、および*NGLY1*欠損症のバイオマーカーについて、これまでの知見をまとめた総説を寄稿した[2, 3]。

*NGLY1*欠損症研究において患者由来細胞に残存する*NGLY1*活性を正確に見積もることは非常に重要であるが、現在よく用いられる活性測定法は蛍光などでラベルした糖ペプチド基質を用いてHPLCによってプロダクトを同定する方法である。この方法は非専門家にとって敷居が高く、臨床の研究室でも汎用性のある活性測定法の開発は急務の課題であった。そこで群馬大学の高橋剛准教授らが中心となり、自己触媒的にタンパク質のスプライシングを起こすインテン、と呼ばれるシステムを用いて酵素活性を同定する方法を開発した。この方法においては、*NGLY1*によって糖鎖が脱離されるとペプチドのスプライシングが起こるように設計されており、その結果生じるNanoLucルシフェラーゼの活性を測定することで間接的に*NGLY1*の活性を定量化できる。この方法により精製酵素については0.2 nMの酵素活性 (出芽酵母由来PNGase) を正確に検出することができた。またこの方法によりHela細胞に*NGLY1*を過剰発現させた場合、その粗抽出液から*NGLY1*酵素活性を検出することも可能であった。更に基質の糖ペプチドに細胞透過性のノナルギニン (Arg9) ペプチドを融合することによって、細胞内の*NGLY1*活性の検出を試みたところ、*NGLY1*過剰発現株によって活性の検出が可能であった (図)。この新規プローブはHPLCを介さずにPNGase活性を検出する新しい方法として有用であると期待される[4]。

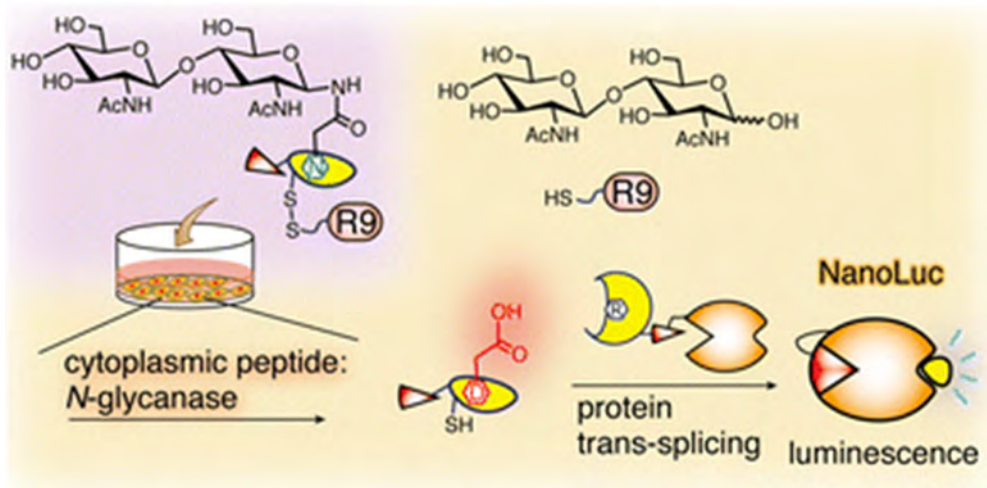


図 インテインシステムを介した細胞質 PNGase のアッセイ法の概略 [4]

インテインは、タンパク質のスプライシング反応を触媒するタンパク質で、インテインの中には2つのドメインに分かれた分割インテインがあり、それぞれが会合することでエクステイン同士を繋ぎ合わせる事ができる（上図の場合は NanoLuc ルシフェラーゼがエクステインであり、2つの断片に分割されている）。この反応は PTS (protein transsplicing) と呼ばれており、本アッセイでは、N 末端インテインに GlcNAc2 残基が導入されることで、C 末端インテインとの相互作用を阻害し、PTS の反応が著しく抑制されるデザインとなっている。一方 N 末端インテインに PNGase が作用すると、PTS 反応が促進され、結果生成されるルシフェラーゼによる強い発光が検出されるため、ルシフェラーゼ活性によって間接的に NGLY1 活性を測定することになる。細胞を用いたアッセイでは、N 末端インテインにノナルギニン (Arg9) を融合させることで、この N 末端インテインの細胞内への膜透過を促進し、細胞内での PTS 反応を引き起こしている。

N型糖鎖は小胞体でタンパク質に付加されたのち、その構造は小胞体-ゴルジ体で様々なプロセッシングを受け、そのプロセッシングがタンパク質の細胞内・細胞外における輸送、局在や生理機能に重要な役割を果たすことが知られている。ゴルジ体は細胞分裂の際に断片化され、その間タンパク質の分泌経路は阻害されることが知られている。この状態において、細胞のグリコシル化がどのように制御されているのかは全く不明であった。ミシガン大学のYanzhang Wang教授らとの共同研究によって、ゴルジ体に到達した糖タンパク質が最初に遭遇する糖鎖プロセス酵素、 α 1,2-マンノシダーゼ (Man1A1) が有糸分裂期において、CDK1によってSer12がリン酸化され、その結果Man1A1活性を減弱させることを明らかにした。この結果、糖鎖のプロセッシング経路に変化をもたらし、また、同時にMan1A1ののちに作用する糖転移酵素、MGAT1との相互作用を低下させた。これらの結果は、糖鎖付加反応が細胞周期に呼応して厳密に制御されていることを初めて明らかにした[5]。

今後は引き続き遊離N型糖鎖およびその前駆体（ドリコール結合糖鎖）、および出芽酵母における遊離O型糖鎖生成機構の分子機構を行うとともに、様々な生物種の新規糖鎖生成、分解機構を明らかにし、比較糖鎖生物学の見地から糖鎖の重要性に迫る。また、NGLY1のマウスにおける機能を詳細に解析し、NGLY1欠損症の病態発現メカニズムの解明を目指すとともに、T-CIRAプログラムにおける治療法開発の解明に貢献する。

(3) 研究室メンバー

(2022年度)

(主任研究員)
鈴木匡
(専任研究員)
本賢一
植木雅志
鎌田勝彦
(研究員)

平山弘人
藤平陽彦
(技師)
立田由里子
(特別研究員)
Chengcheng Huang
Shengtao Li

Stuart Emmerson
小山亮祐
本田晃伸
(研修生)
尾上風花
(テクニカルスタッフ)
藤縄玲子

清野淳一
佐藤敬子
(アシスタント)
鈴木祐子
(研究パートタイマーII)
岡律子
松田次代

(4) 発表論文等

(研究室メンバー: 2重下線; T-CiRAメンバー/AMED-CRESTメンバー: 1重下線)

1. T. Suzuki* and Y. Yoshida (2022) Ever-expanding NGLY1 biology. *J. Biochem.* **171**, 141-143 (doi: 10.1093/jb/mvab134)
2. H. Fujihira*, M. Asahina, and T. Suzuki (2022) Physiological importance of NGLY1, as revealed by rodent model analyses. *J. Biochem.* **171**, 161-167 (doi: 10.1093/jb/mvab101)
3. H. Hirayama* and T. Suzuki (2022) Assay for peptide:N-glycanase/NGLY1 and disease-specific biomarkers for diagnoses of NGLY1 deficiency. *J. Biochem.* **171**, 169-176 (doi: 10.1093/jb/mvab127)
4. T. Takahashi*, T. Uchibayashi, N. Ishii, I. Matsuo, Y. Yoshida and T. Suzuki (2022) Luminescence detection of peptide:N-glycanase activity using engineered split inteins. *Chem. Commun.* **58**, 13282-13285 (doi: 10.1039/D2CC04865E)
5. S. Huang#, Y. Haga#, J Li#, J. Zhang, H. K. Kweon, J. Seino, H. Hirayama, M. Fujita, K. W. Moremen, P. Andrews, T. Suzuki, and Y. Wang* (2022) Mitotic phosphorylation inactivates the Golgi mannosidase MAN1A1. *Cell Rep.* **41**, 111679 (doi: 10.1016/j.celrep.2022.111679) (#: equally contributed)

参考図

Group photo of RIKEN Glycometabolic Biochemistry Laboratory



Group photo of T-CiRA Ngly1 project Team



Laboratory Homepage

https://www.riken.jp/research/labs/chief/glycometab_biochem/index.html