

(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) 2023年度成果と今後の研究計画

NFE2L1 (*NRF1*)は、酸化ストレスやプロテオスタシス破綻といった様々なストレスに対応するために重要な役割を果たす転写因子で、これまで*NGLY1*による脱糖鎖によって活性化されることが知られている唯一の分子である。この分子が活性化する際、小胞体内腔におけるN型糖鎖修飾、細胞質への逆輸送、PNGaseによる脱糖鎖、タンパク質の限定分解を経て核へ輸送されることが知られている。そのため、この分子は異なるサイズを持つ様々な分子型 (molecular forms) が存在することが知られており、それぞれの正確な構造は不明な点が多い。*NRF1*の細胞内におけるN型糖鎖状態を調べたところ、*NRF1*がPNGaseによって脱糖鎖を受けた際、SDS-PAGE上での見かけの分子量はほとんど変化しないことが明らかになった。一方、Endo H (*ENGase*) による脱糖鎖では予想される分子量シフトが観察された。このSDS-PAGE上の異常な挙動は、PNGaseの反応による糖鎖付加、すなわちAsnからAspへの変化に伴う負電荷の導入が影響していると考えられた。また、精密な解析の結果、*NRF1*の*NGLY1*による脱糖鎖と*DDI2*を介した限定タンパク質分解は、どちらが先に起こっても良い順不同の反応であることが明らかとなった。これらの解析によって、*NRF1*の正確な分子型の構造とその性質をより深く理解することが可能となった[1]。

*NGLY1*欠損症の研究を日本で加速するために、日本人の患者を見つけることは兼ねてよりの懸案であった。この度九州大学の賀正一教授、酒井康成准教授らのグループによって、最初の日本人*NGLY1*欠損症患者が報告された[2]。*NGLY1*遺伝子の変異が確認されるとともに、血清マーカー、Asn-GlcNAcの値が患者血清中で上昇していることが確認できた。

オリゴ糖転移酵素 (OST) は通常ドリコール結合オリゴ糖 (DLO) からタンパク質に糖鎖を転移するが、加水分解活性により遊離N型糖鎖 (FNG) を生成し、*NGLY1*非依存的なFNG生成機構を担うことが知られている。この反応の機能的な重要性は現在のところ不明である。一方、出芽酵母を用いた解析により、小胞体関連分解 (ERAD) に関わるユビキチンリガーゼ変異体においてOSTの加水分解活性が増強されることが明らかとなった。また、加水分解活性は小胞体におけるタンパク質のフォールディング不全を引き起こす還元剤 (ジチオスレイトール) 処理によっても上昇した。これらの結果から、出芽酵母では、小胞体内でフォールディング不全タンパク質が蓄積するような状況でOSTの加水分解活性が増強されることが明らかとなった。このことから、FNGはタンパク質のフォールディングを助ける生理機能がある可能性が示唆された[3]。

我々は最近血清遊離オリゴ糖の単離方法を確立したが、これらの糖鎖がどのように生成するのか、という詳細な分子機構は解明されていない。そこで、ラットの初代培養肝細胞を用いて、遊離糖鎖が分泌されるかどうかを調べた。その結果、シアリル/中性FNGやシアリルラクトース・LacNAc型糖鎖など、血清遊離オリゴ糖と構造上同じ特徴を持つ多様な遊離オリゴ糖が分泌されていることが明らかとなった。また、阻害剤を用いた実験によって、OSTが血清FNGの分泌に関与していることが示唆された。これらの結果は、肝臓が様々な遊離糖鎖を血清中に分泌していることが示された[4]。



図 血清遊離N型糖鎖の生成と分泌機構のモデル[4]

通常、オリゴ糖転移酵素の作用によって作られた遊離N型糖鎖 (FNG) は小胞体膜上のトランスポーターによって細胞質に放出され、最終的にリソソームで単糖にまで分解される (図下側の経路)。一方肝細胞ではその一部が細胞質に放出される代わりに、小胞輸送によって細胞外に分泌される (図上側の経路)。分泌の過程で、FNGの構造はシアリ酸 (Nアセチルノイラミン酸) を末端にもつ糖鎖に変換される。

鈴木氏の長年のNGLY1および非リソソーム糖鎖分解経路の研究に対して、国際団体である国際複合糖質機構 (International Glycoconjugate Organization; IGO) より **IGO Hakomori Award** が授与された [5]。本賞はIGOによって2年に一度選出され、糖鎖科学の進歩に顕著な貢献をし、また今後も引き続き貢献が期待される研究者に贈られる賞であり、当該分野で最も権威ある国際賞の一つである。日本人の受賞は谷口直之 (大阪大学名誉教授 (2001年))、木下タロウ (大阪大学名誉教授 (2017年)) に引き続き3人目の受賞となった。

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合成、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。

(3) 研究室メンバー

(2023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

(基礎科学特別研究員)

本田晃伸
(特別研究員)
Chengcheng Huang
Shengtao Li
Stuart Emmerson
小山亮祐
(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)
松田次代

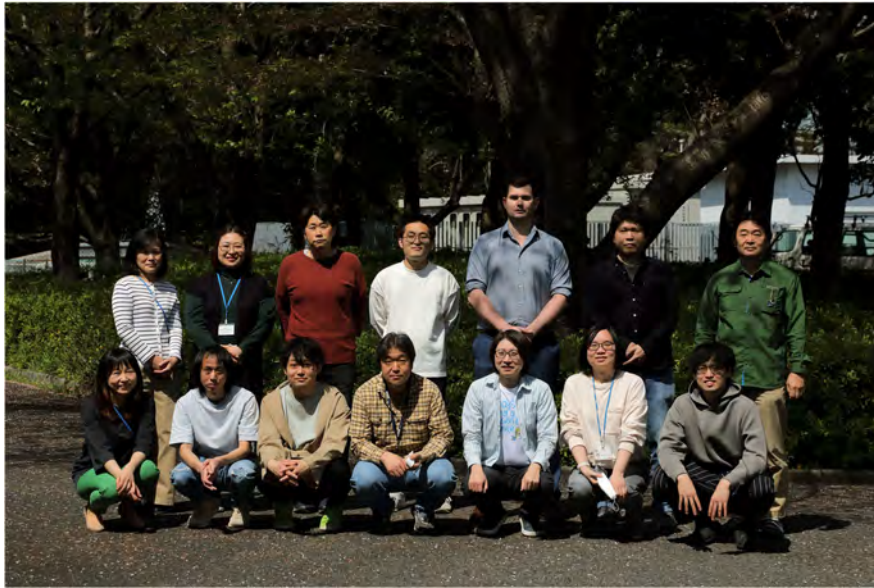
(4) 発表論文等

(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. Y. Tachida#, H. Hirayama# and T. Suzuki* (2023) Amino acid editing of NFE2L1 by PNGase causes abnormal mobility on SDS-PAGE. *Biochim. Biophys. Acta General Subjects* **1867**, 130494. (#= equally contributed) (doi: 10.1016/j.bbagen.2023.130494)
2. Y. Sonoda, A. Fujita, M. Torio, T. Mukaino, A. Sakata, M. Matsukura, K. Yonemoto, K. Hatae, Y. Ichimiya, P. F. Chong, M. Ochiai, Y. Wada, M. Kadoya, N. Okamoto, Y. Murakami, T. Suzuki, N. Isobe, H. Shigeto, N. Matsumoto, Y. Sakai*, and S. Ohga (2024) Progressive myoclonic epilepsy as an expanding phenotype of NGLY1-associated congenital deglycosylation disorder: A case report and review of the literature. *Eur. J. Med. Genet.* **67**, 104895. (doi: 10.1016/j.ejmg.2023.104895)
3. S.-T. Li, H. Hirayama, C. Huang, T. Matsuda, R. Oka, T. Yamasaki, D. Kohda and T. Suzuki* (2024) 1 *The FEBS Journal* **291**, 884-896. (doi: 10.1111/febs.17011)
4. C. Huang, J. Seino, A. Honda, H. Fujihira, D. Wu, K. Okahara, S. Kitazume, S. Nakaya, K. Kitajima, C. Sato, and T. Suzuki* (2024) Rat hepatocytes secrete free oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **300**, 105712. (doi: 10.1016/j.jbc.2024.105712)
5. T. Suzuki NGLY1: the beauty of curiosity-driven science. The 26th International Symposium on Glycoconjugates (Glyco26) at Taipei (Taiwan) 2023 年 8 月 27 日 (**IGO Hakomori Award Lecture**)

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