

(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) 2024年度成果と今後の研究計画

細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼの遺伝子、*NGLY1*の変異によって引き起こされる*NGLY1*欠損症について、我々はこれまでヒト*NGLY1*を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを脳室内投与することで、若い*Ngly1*^{-/-}ラットの運動機能が劇的に回復することを明らかにしてきた (Asahina, *et al.*, *Mol Brain* 2021)。すなわち、*NGLY1*欠損症を早期に診断し、速やかに治療介入することによって中枢神経系機能不全に起因する症状を改善する可能性がある。従って生体サンプル中の*NGLY1*活性を測定するアッセイ法の確立は急務の課題である。本年はそのようなアッセイ法に貢献し得る新規アッセイ法の開発を行った。

まずは、FRETベースで“*NGLY1*が反応すると光る”プローブを用いた新規アッセイ系を開発した [1]。更に、別のアッセイ法として、*NGLY1*のアミノ酸編集機能 (糖鎖を持つAsn→Aspへの変換) を利用して、*NGLY1*による脱糖鎖反応によって新たにエピトープタグが生成するような基質をデザインし、抗タグ抗体にて*NGLY1*活性を検出する簡便で高感度なシステムを開発した [2]。いずれの方法においても、蛍光の検出やELISAといった臨床検査に適応可能な方法で*NGLY1*活性を検出する新たな方法が確立された。

*NGLY1*欠損症において、てんかん発作は患者にしばしば見られる重篤な症状である。我々がこれまで確立した*Ngly1*^{-/-}マウスにおいて、特段の刺激を必要とせずてんかん様症状を引き起こすことがわかった。てんかんに関係する様な脳の部位の遺伝子発現解析の結果、オキシトシンの遺伝子発現が有意に低下していることが判明した。興味深いことに、てんかん様症状はオキシトシンの鼻腔内投与によって、容量依存的に抑制された。これらの結果、オキシトシンが*NGLY1*欠損症のてんかん様症状に有効な治療薬として有用である可能性が示唆された [3]。

Nrf1はさまざまなストレスに応答して活性化する転写因子である。例えば、プロテアソーム活性が低下した際に、核に輸送されプロテアソーム遺伝子の発現を誘導し、新たなプロテアソームが作り出される。これまで*NGLY1*による糖鎖脱離がNrf1の活性化に必要であるということが知られていた。また、我々はこれまで*NGLY1*欠損状態で、ユビキチン化Nrf1が細胞の中に蓄積することを見出していた。本研究では、そのユビキチン化が、糖鎖がつく近傍のセリンやスレオニンのアミノ酸とENGaseの働きにより生じるGlcNAcの水酸基に結合する、いわゆる非典型的ユビキチン化であることを見出した。また、この反応には糖鎖認識ユビキチンリガーゼFBS2と共にもうひとつのユビキチンリガーゼARIH1が必要であることや、形成されるユビキチン鎖がこれまで例を見ないような複雑に分岐した形態をとることも明らかとなった。興味深いことに、これらの結果はマ

ウスの表現型をよく説明できる (図)。このことからNGLY1欠損症の病態は、NGLY1の機能不全による直接の効果というより、“異常なユビキチン化糖タンパク質”の蓄積によって引き起こされることが強く示唆された[4]。

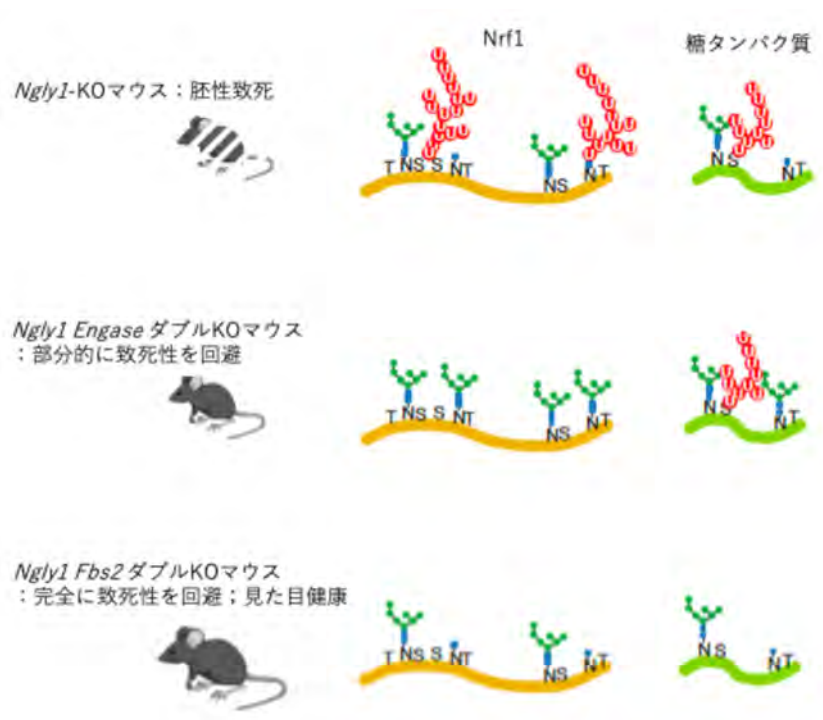


図 Ngly1-KOマウスにおける異常ユビキチン化タンパク質の蓄積[4]

(上) *Ngly1*-KOマウスにおいて、NFE2L1のN型糖鎖は部分的にENGaseの作用を受けてN-GlcNAc残基を作る。SCF^{FBS2}は残っているN型糖鎖を利用してNFE2L1を含む基質を認識し、SCF^{FBS2}-ARIH1は主にENGaseの作用によって出来たN-GlcNAc残基、およびSer/Thr残基をアクセプターとして、異常なユビキチン化反応を引き起こす。結果、マウスは胚性致死となる。(中) *Ngly1*^{-/-}*Engase*^{-/-}ダブルKOマウスでは、主要なアクセプターであるN-GlcNAcが作られず、その結果NFE2L1のユビキチン化はほとんど起こらない。一方、Ser/Thrのヒドロキシ基を介したユビキチン化は起こり得るので、異常なユビキチン化タンパク質の蓄積は完全には消失せず、ダブルKOマウスも加齢に伴う様々な表現型を示す。(下) *Ngly1*^{-/-}*Fbs2*^{-/-}ダブルKOマウスでは、そもそもSCF^{FBS2}-ARIH1による異常なユビキチン化が起こらず、マウスの運動機能も野生型と遜色ない。

遊離N型糖鎖 (FNGs) は自然界に広く存在し、細胞内に存在するFNGsについてはその生成や分解機構について多くのことがわかってきているが、細胞外に存在するFNGsを含む遊離糖鎖については、まだ多くのことが未解明である。特に最近我々が見出した血清中の細胞外FNG (Seino, et al., *Glycobiology* 2016) については、動物種における分布も不明な点が多い。今回サケの血清を用いてFNGsをふくむ様々な遊離糖鎖が、哺乳動物と同様広く見られることを明らかにした。このことから血清遊離糖鎖は脊椎動物に広く分布していることが示唆された[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

(2024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

(基礎科学特別研究員)

本田晃伸

(特別研究員)

Shengtao Li

Stuart Emmerson

小山亮祐

(テクニカルスタッフI)

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

鈴木あけみ

(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. H. Hirayama, Y. Tachida, R. Fujinawa, Y. Matsuda, T. Murase, Y. Nishiuchi, and T. Suzuki* (2024) Development of a fluorescence and quencher-based FRET assay for detection of endogenous peptide:N-glycanase/NGLY1 activity. *J. Biol. Chem.* **300**, 107121. (doi: 10.1016/j.jbc.2024.107121)
2. H. Fujihira, K. Sato, Y. Nishiuchi, T. Murase, Y. Matsuda, Y. Yoshida, T. Kamei and T. Suzuki* (2024) ELISA-based highly sensitive assay system for the detection of endogenous NGLY1 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **710**, 149826 (doi: 10.1016/j.bbrc.2024.149826)
3. Y. Makita, M. Asahina, R. Fujinawa, H. Yukitake, and T. Suzuki* (2024) Intranasal oxytocin suppresses seizure-like behaviors in a mouse model of NGLY1 deficiency. *Commun. Biol.* **7**, 460 (doi: 10.1038/s42003-024-06131-7)
4. Y. Yoshida*, T. Takahashi, N. Ishii, I. Matsuo, S. Takahashi, H. Inoue, A. Endo, H. Tsuchiya, M. Okada, C. Ando, T. Suzuki, N. Dohmae, Y. Saeki, K. Tanaka*, and T. Suzuki* (2024) Sugar-mediated non-canonical ubiquitination impairs Nrf1/NFE2L1 activation. *Mol Cell* **84**, 3115-3127 (doi: 10/1016/j.molcel.2024.07.013).
5. A. Honda, J. Seino, C. Huang, M. Nakano and T. Suzuki* (2025) Occurrence of free glycans in salmonid serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **742**, 151096 (doi:10.1016/j.bbrc.2024.151096)

Supplementary

Group photo of RIKEN Glycometabolic Biochemistry Laboratory



Laboratory Homepage

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