

鈴木糖鎖代謝生化学研究室

主任研究員 鈴木 匡 (D.Sci.)



(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、
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)糖鎖を遊離させる酵素です。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、*N*型糖鎖の生合成の経路は現在そのほとんどが解明されたといってもいいのに対し、NGLY1によって遊離される糖鎖の代謝機構はほとんど不明のままです。この非リソソーム系の糖鎖の代謝は恐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) 2020年度成果と今後の研究計画

糖タンパク質はその合成の場である小胞体において、様々な品質管理を受ける。出来損ないのタンパク質は、いわゆるシャペロンシステムを利用してフォールディング(タンパク質の折りたたみ)状態の改善を図るが、どうしても正しい立体構造を取れない出来損ないのタンパク質は品質管理に引っかかり、プロテアソームと呼ばれる細胞質のプロテアーゼ複合体によって分解、除去される。この機構をERADと呼ぶが、この過程で、小胞体によってアスパラギン結合型(*N*型)糖鎖の修飾を受けたタンパク質は、細胞質に逆輸送された後に脱*N*型糖鎖酵素、PNGase(NGLY1)によって糖鎖の脱離を受ける。その結果、ERADを受けるタンパク質はプロテアソーム阻害剤の存在下で“糖鎖を持たない”フォームとして細胞内で蓄積することが知られており、しばしばNGLY1による糖鎖脱離の証拠として捉えられることが多い。一方、我々のERADのモデルタンパク質を用いた解析では、NGLY1や、他の*N*型糖鎖脱離酵素であるENGaseを欠損した細胞においても、この“糖鎖を持たない”フォームがプロテアソーム阻害剤存在下で蓄積することを見出した。解析の結果、この“糖鎖を持たないフォーム”は、通常状態でも存在するが、プロテアソームによって速やかに分解するために見ることができず、プロテアソームの活性を阻害して初めて見えてくる、ということがわかった。これらの結果から、プロテアソーム阻害剤存在下での“糖鎖を持たない”フォームの蓄積は、必ずしもNGLY1による脱糖鎖を示唆するものではない、ということが明らかとなり、今後実験結果の解釈には注意が必要であることを実験的に明確に示すことができた[1]。

NGLY1欠損症は*NGLY1*遺伝子の変異によって引き起こされる稀少疾患で、成長遅延や様々な運動機能障害、てんかん、無涙症など様々な重篤な症状を呈する。これまで作成された*Ngly1*-KOマウスは胚性致死性を示し、患者の症状を模するような表現型を示すモデル動物が存在しないことから、NGLY1欠損症の病態発現メカニズム解明の研究や治療法の開発はこれまで進んでこなかった。今回我々は武田薬品工業との共同研究(T-GIRAプログラム)において、生育可能な*Ngly1*-KOラットの開発に成功した。このラットは成長遅延や運動機能障害、痛覚や聴覚反射の異常、背骨の彎曲など、患者の症状に似た表現型を示した。NGLY1はこれまでERADにおける機能が報告されているが、*Ngly1*-KOラットでは細胞質にユビキチン化タンパク質の蓄積が認められた。組織切片の解析により、特定の脳領域に凝集体の蓄積や炎症反応を思わせる様々な異常所見が見られ、また患者同様に坐骨神経の軸索変性も観察された。今回開発された生存可能な*Ngly1*-KOラットは、NGLY1欠損症の病態解析および治療介入の前臨床研究における有用なモデル動物となることが期待される[2]。

C57BL/6系統において、*Ngly1*-KOは胚性致死であるが、別の*N*型糖鎖脱離酵素であるENGase遺伝子(*Engase*)とのダブルKOにおいて致死性が部分的に回避されることが知られている(藤平ら、*PLoS Genet* (2017))。これまで我々は、NGLY1欠損症のように*Ngly1*の活性が落ちると、代わりにENGaseによる糖鎖

脱離反応が促進され、過剰な *N*-GlcNAcタンパク質の合成が促進され、そのことがマウスにとって不都合な結果をもたらす、という仮説を立てており、(*N*-GlcNAc仮説: 図) 実際ERADのモデル基質を用いて *N*-GlcNAcタンパク質の生成を実証した(黄ら、*PNAS* 2015)。一方で、内在性のタンパク質で実際に *Ngly1*-KO細胞で *N*-GlcNAcタンパク質が生成するかどうかは確かめられてこなかった。そこで、内在性 *N*-GlcNAcタンパク質の同定を目指して野生型、*Ngly1*-KO、*Engase*-KO、そして *Ngly1 Engase* double-KOのマウス胚由来繊維芽細胞の細胞質から *N*-GlcNAc、および *O*-GlcNAcタンパク質の網羅的同定を試みた(UCSFの Prof. Alma Burlingame/Dr. Jason C. Maynardらとの共同研究)。その結果、*O*-GlcNAcについては特に大きな変化は検出できなかったが、*Ngly1*-KO細胞のみで、特にプロテアソーム阻害剤下で *N*-GlcNAcタンパク質の顕著な増加が認められた。一方 *Engase*-KO細胞あるいは *Ngly1 Engase* double-KO細胞では *N*-GlcNAcタンパク質はほとんど検出されなかった。これらの結果から仮説通り *N*-GlcNAcタンパク質の生成には細胞質 *ENGase* が関与していることが明らかとなった。*N*-GlcNAcタンパク質の過剰な生成は、*NGLY1* 欠損症の病態に関与することが期待される[3]。

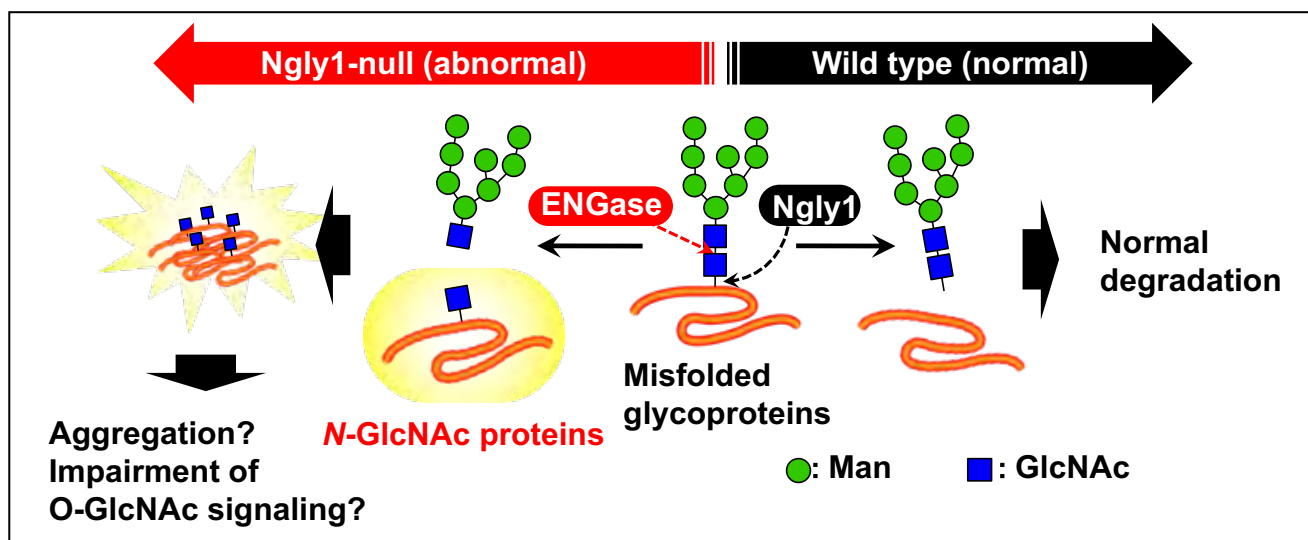


図 *N*-GlcNAc仮説: 正常時は、異常タンパク質の糖鎖脱離は主に *Ngly1* によって担われ、正常にタンパク質は分解される。一方、*Ngly1* の活性が阻害された状態では *ENGase* が異常糖タンパク質に直接作用し、*N*-GlcNAcタンパク質が生成する。*N*-GlcNAcが過剰に生産すると、タンパク質凝集の形成や、*O*-GlcNAcを介したシグナル伝達を阻害することで、細胞毒性が発揮され、このことが *NGLY1* 欠損症の病態の一端をなす、という仮説。

以前 *NGLY1* がショウジョウバエにおいて組織特異的に *BMP* のシグナルを制御することを報告している(Galeoneら、*eLife* 2017) (Prof. Hamed Jafar-Nejad, Baylor College of Medicineとの共同研究)。今回、Prof. Hamed Jafar-Nejad (Baylor College of Medicine, USA), Dr. Antonio Galeone (Univ. of Milan, Italy), Prof. Markus Affolter (Univ. of Basel, Switzerland), Dr. Cathleen M Lutz (The Jackson Laboratory, USA)らとの共同研究により、ショウジョウバエの *Dpp*、そして哺乳動物のオルソログである *BMP4* が *NGLY1* の内在性の基質であり、驚いたことに *NGLY1* による脱糖鎖はその細胞質への逆輸送に必須であることが明らかになった。*BMP4* の小胞体での蓄積は小胞体ストレスを引き起こし、*NGLY1* の小胞体膜への局在を増加させた。小胞体膜上の *NGLY1* は変性した *BMP4* から糖鎖を脱離し、逆輸送を促進するとともにプロテアソームによる分解を促進し、正常な高次構造を獲得した *BMP4* の分泌を促進することがわかった。これらの結果は *NGLY1* の ERAD における新しい機能を示しており、*BMP4* シグナルの異常が *NGLY1* 欠損症の病態発現の一端を担う可能性が示唆された (*T-CiRA* プロジェクトの共同研究) [4]。

可溶性タンパク質の小胞体への輸送は、輸送されるタンパク質自身も持つ小胞体シグナルペプチドによって規定されており、シグナルペプチドを持たないタンパク質は小胞体内へ輸送されないと考えられてきた。一方で、シグナルペプチドを持たないにもかかわらず、小胞体内へ輸送される可溶性タンパク質が一部報告されてきた。しかし、このシグナルペプチドに依存しないタンパク質輸送の詳細は分かっていなかった。信州大学の細見昭助教、東京都医学総合研究所 飯田和子協力研究員、東京学芸大学 飯田秀利名誉教授らとの共同研究において、出芽酵母のシグナルペプチドに依存しない小胞体へのタンパク質輸送の抑制因子として *Ste24* タンパク質を同定した。また、*Ste24* タンパク質を欠損した変異株を用いて、シグナルペプチドを持たない核タンパク質 *Rme1* が小胞体へ輸送されることを発見した [5]。

今後は遊離N型糖鎖およびその前駆体(ドリコール結合糖鎖),および新たに見出した遊離O型糖鎖の新規代謝の分子機構の解明を行うとともに、様々な生物種の糖鎖生合成、代謝機構を明らかにし、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欠損症の病態発現の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

(2020年度)

(主任研究員)

鈴木匡

(専任研究員)

本賢一

(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

Zeynep Sumer Bayraktar

(研修生)

尾上風花

(テクニカルスタッフI)

藤縄玲子

清野淳一

(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

1. C. Huang and T. Suzuki* (2020) The occurrence of nonglycosylated forms of *N*-glycoprotein upon proteasome inhibition does not confirm cytosolic deglycosylation. *FEBS Lett.* **594**, 1433-1442 (doi: 10.1002/1873-3468.13734.).
2. M. Asahina, R. Fujinawa, S. Nakamura, K. Yokoyama, R. Tozawa, and T. Suzuki* (2020) *Ngly1*^{-/-} rats develop neurodegenerative phenotypes and pathological abnormalities in their peripheral and central nervous systems. *Hum. Mol. Genet.* **29**, 1635-1647 (doi: 10.1093/hmg/ddaa059.).
3. J. C. Maynard, H. Fujihira, G. E. Dolgonos, T. Suzuki* and A. L. Burlingame (2020) Cytosolic *N*-GlcNAc proteins are formed by the action of endo- β -*N*-acetylglucosaminidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **530**, 719-724 (doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.127.).
4. A. Galeone, J. M. Adams, S. Matsuda, M. F. Presa, A. Pandey, S. Y. Han, Y. Tachida, H. Hirayama, T. Vaccari, T. Suzuki, C. Lutz, M. Affolter, A. Zuberi, and H. Jafar-Nejad* (2020) Regulation of BMP4/Dpp retrotranslocation and signaling by deglycosylation. *eLife* **9**, e55596 (doi: 10.7554/eLife.55596.).
5. A. Hosomi*, K. Iida, T. Cho, H. Iida, M. Kaneko, and T. Suzuki* (2020) The ER-associated protease Ste24 prevents N-terminal signal peptide-independent protein translocation into the ER in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **295**, 10406-10419 (doi: 10.1074/jbc.RA120.012575.).

*=corresponding author

Supplementary



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