

糖鎖の代謝

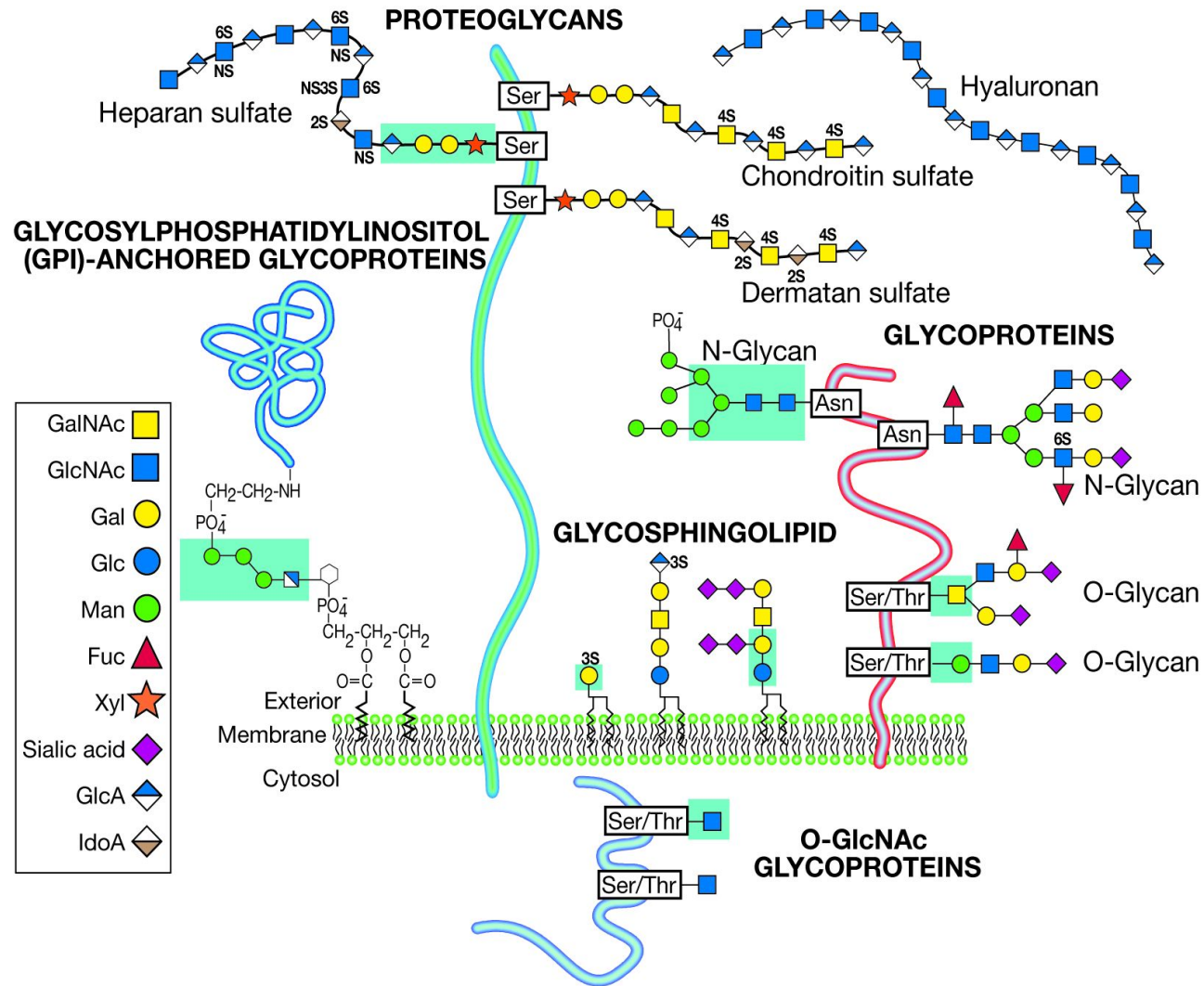
鈴木 匡

理化学研究所 開拓研究本部

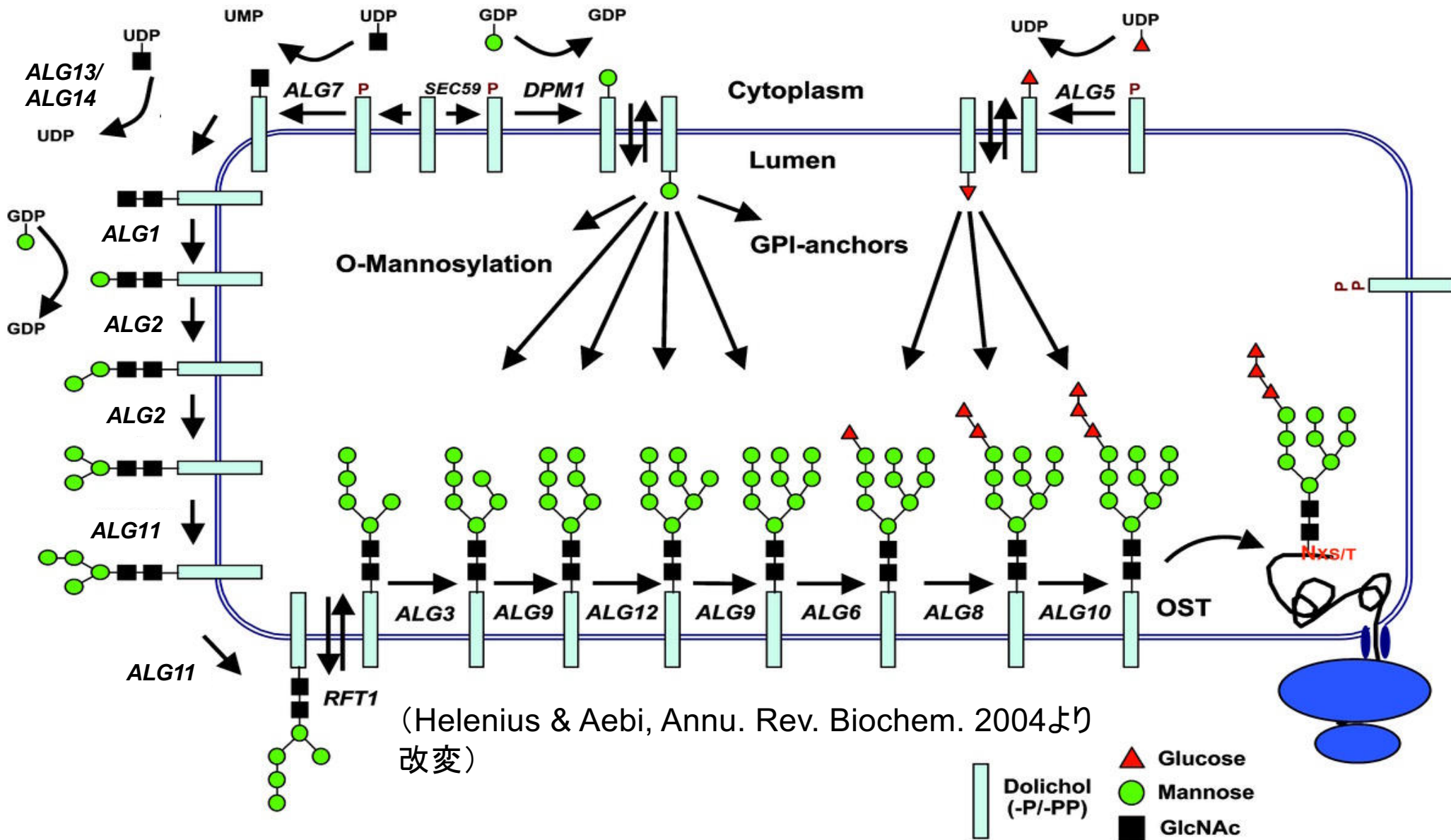
鈴木糖鎖代謝生化学研究室



糖鎖の種類は色々ありますが、、



N型糖鎖の生合成：分子機構は殆ど解明されている。しかし、



糖鎖の分解は、、

*“教科書的”な知識は、

“リソソームで行われる”。以上。

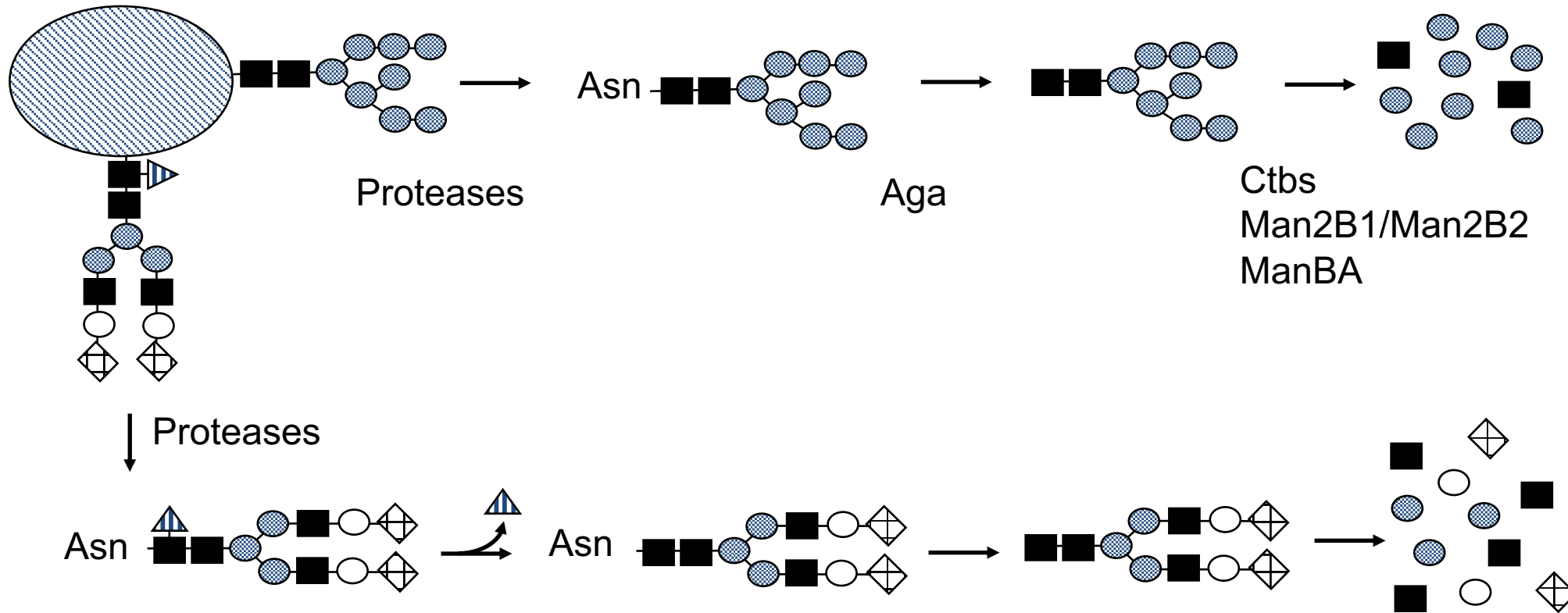
*リソソームにおける分解がおかしくなると、リソソーム蓄積病を起こし、体の様々な部分で異常が生じる

ex. シアリドーシス、ガラクトシアリドーシス

etc

N型糖鎖のリソソーム分解

(Suzuki, T., *Mol. Aspect Med.* 2016)



- GlcNAc
- Man
- Gal
- ◇ Sia
- ▲ Fuc

- *まずタンパク質が分解
- *フコースの除去
- *タンパク質と糖鎖の間の切断
- *還元末端、非還元末端の両方からの逐次分解

Ctbs/Neu1/Glb1
HexA/B
Man2B1/Man2B2
ManBA

リソソーム分解による異常:N型糖タンパク質の分解異常による リソソーム病の例

疾患名

障害酵素

フコシドーシス

α -フコシダーゼ (FucA1)

シアリドーシス

シアリダーゼ (Neu1)

α -マンノシドーシス

α -マンノシダーゼ (Man2B1)

β -マンノシドーシス

β -マンノシダーゼ (ManBA)

GM1ガングリオシドーシス

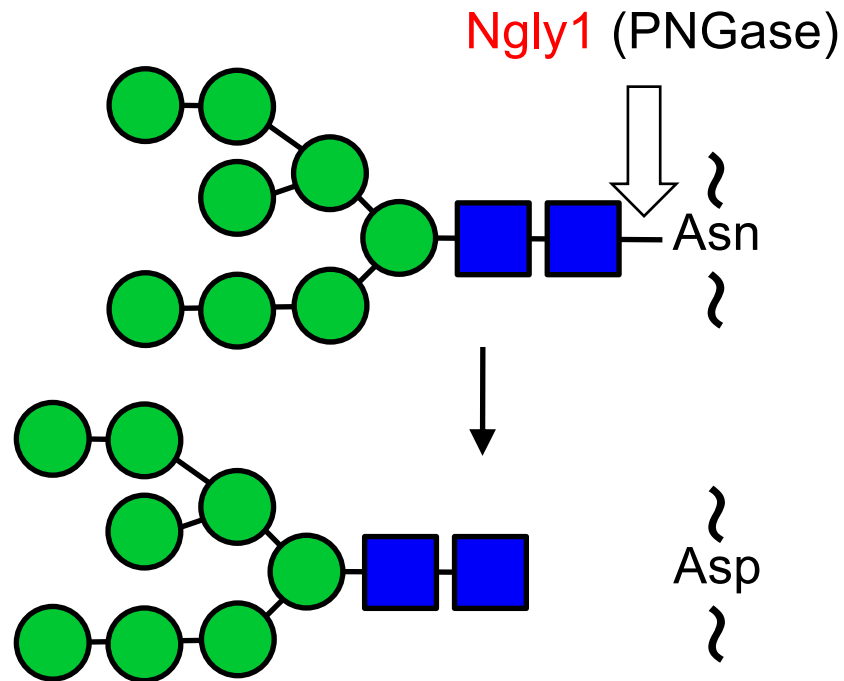
β -ガラクトシダーゼ (Glb1)

Sandhoff病

β -ヘキソサミニダーゼA/B (HexA/B)

アスパラチルグルコサミン尿症 アスパラチルグルコサミニダーゼ

ペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase; Ngly1) ; N型糖鎖の脱離酵素



PNGase : 植物、バクテリア由来の酵素は糖タンパク質糖鎖の構造、機能研究における重要な試薬として広く用いられてきている

● : マンノース (Man)
■ : *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)



井上先生



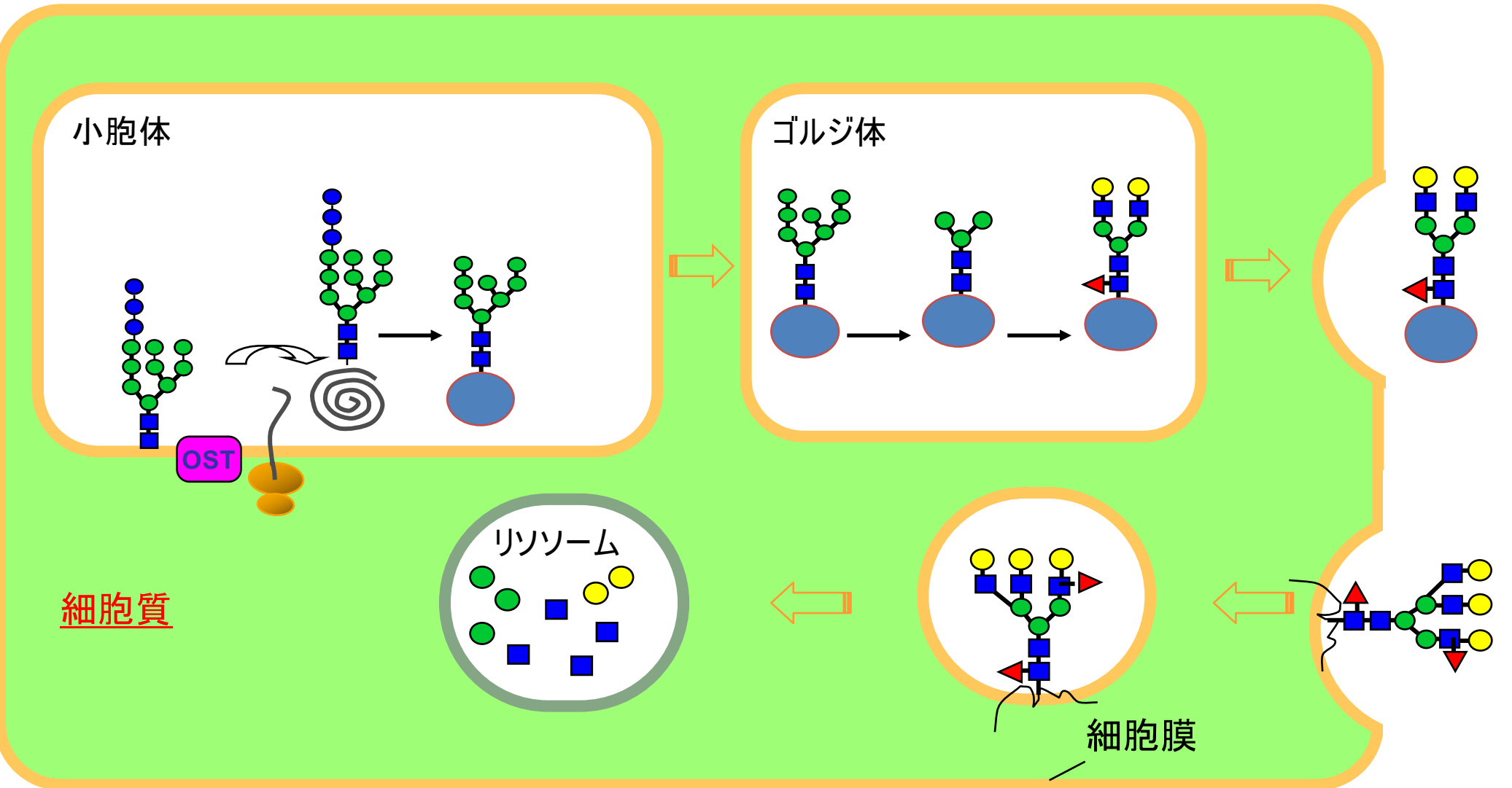
Prof. Lennarz

哺乳動物細胞中の**細胞質** PNGase 活性の発見
(Suzuki, *et al.*, *BBRC* 1993; *JBC* 1994)

出芽酵母における PNGase 遺伝子の発見 (Suzuki, *et al.*, *JCB* 2000)
- **欠損株に顕著な表現型なし**

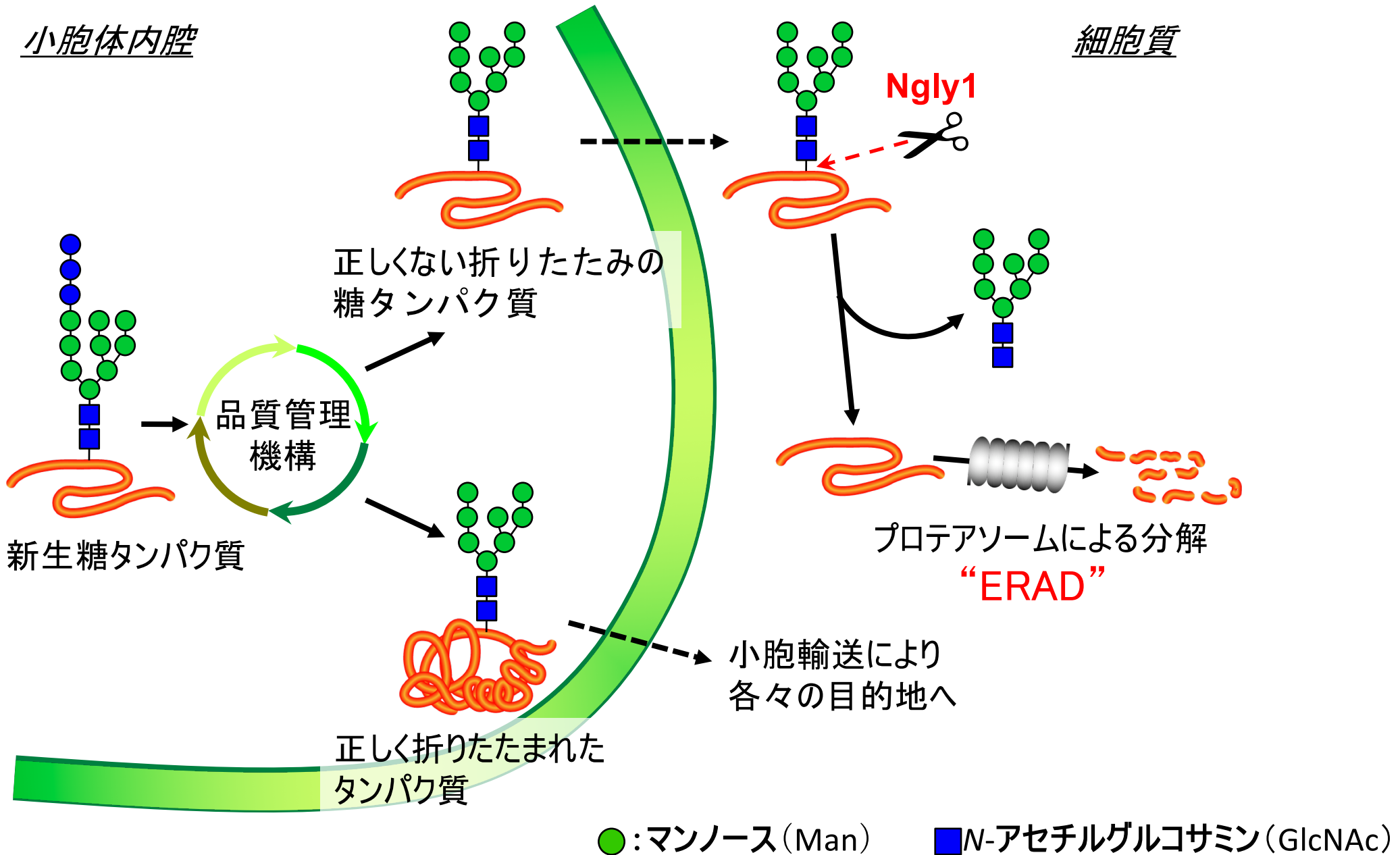
哺乳動物における PNGase 遺伝子オルソログ (**Ngly1**) の命名
(Suzuki, *et al.*, *BBRC* 2003)

糖タンパク質の生合成と分解： 教科書的な知識

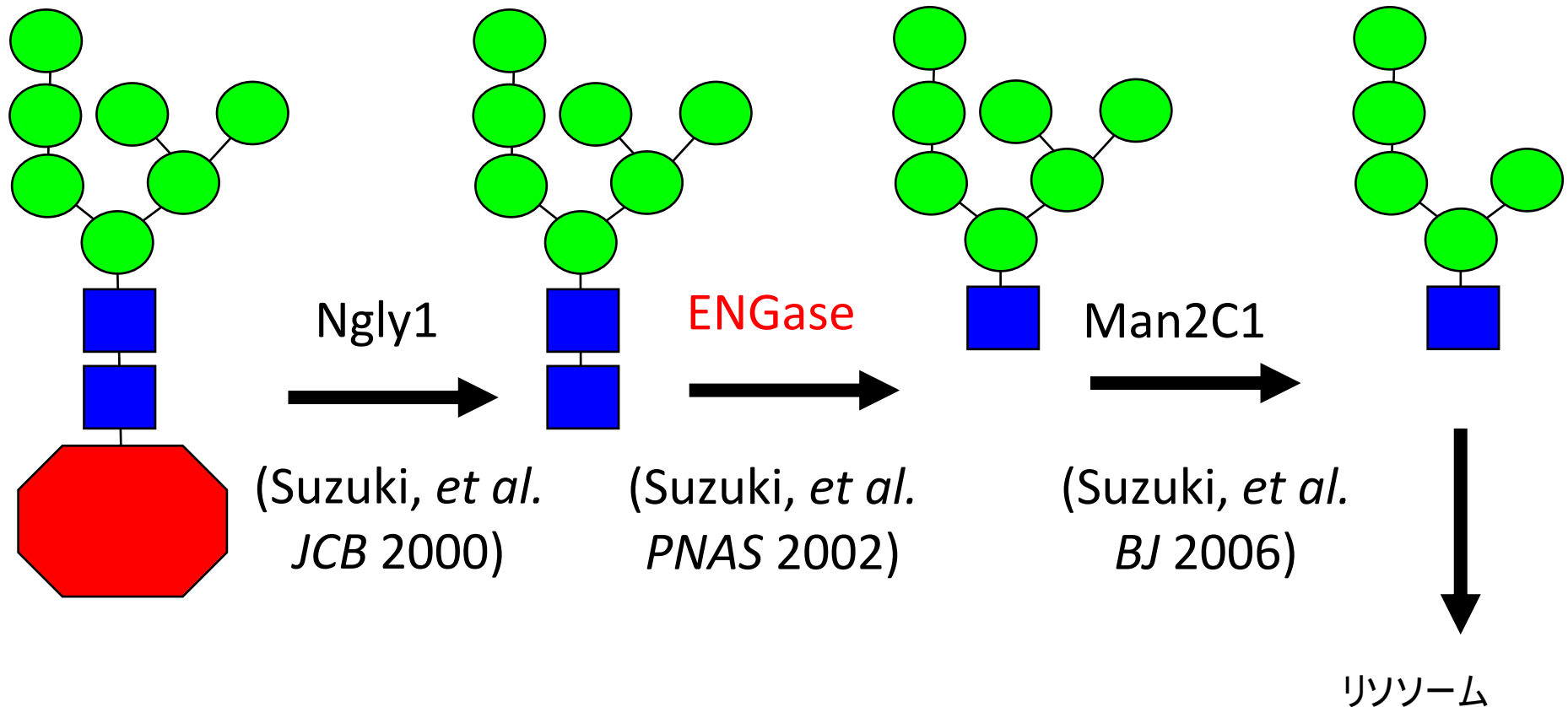


細胞質と糖タンパク質の存在する場所は膜で隔てられている

Ngly1が関与する糖タンパク質の小胞体における品質管理機構



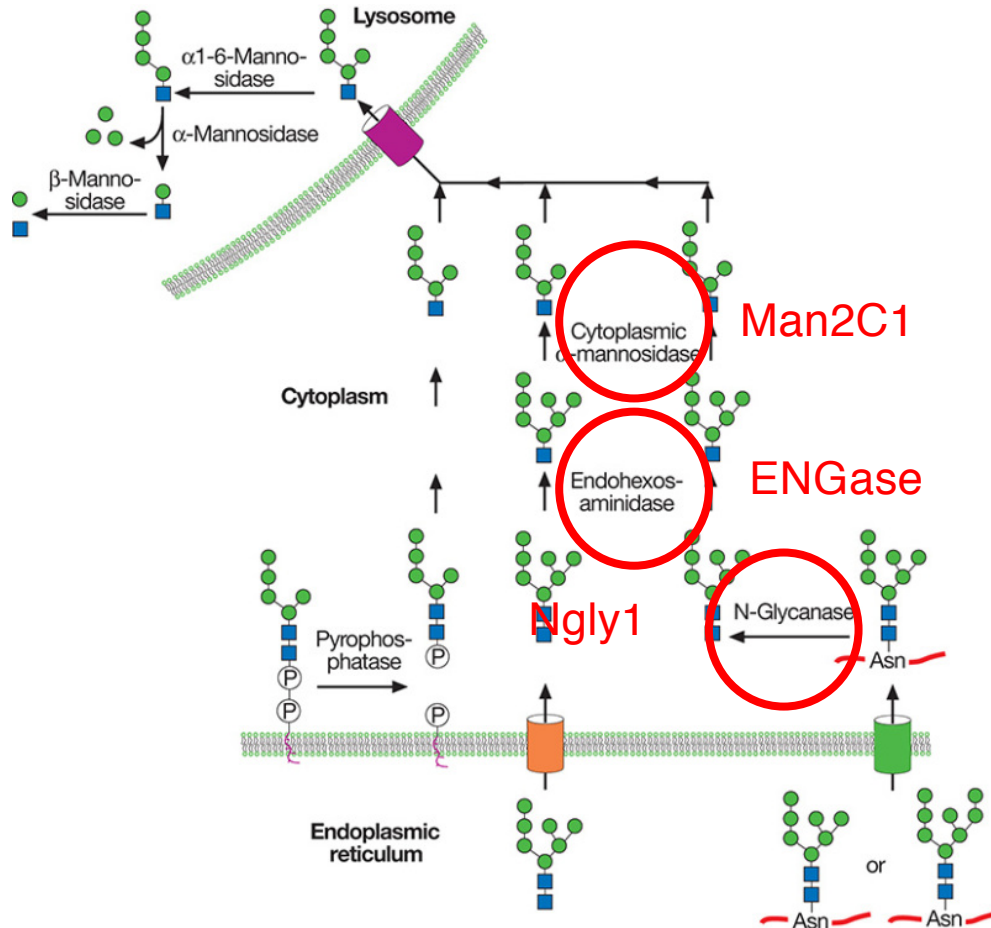
Ngly1によって遊離される糖鎖の新規な代謝メカニズムの解明 細胞質による糖鎖代謝機構(“非リソソーム代謝機構”)



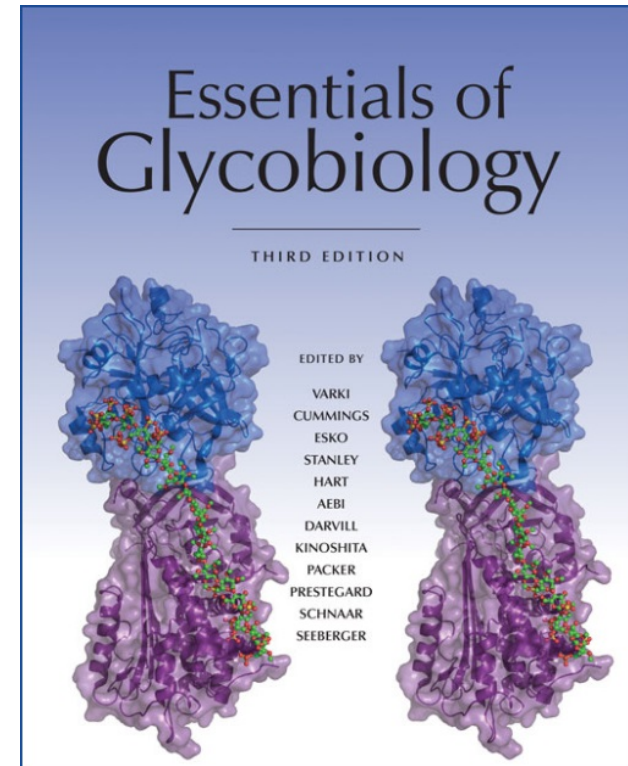
ENGase:エンド- β -Nアセチルグルコサミニダーゼ

-Ngly1の下流で遊離した糖鎖の代謝に関わると考えられてきた

非リソソーム糖鎖代謝機構— ようやく教科書にも記述してもらえました



(Figure 39.3)



2012年 NGLY1欠損症、発見される！

*Ngly1-deficiency:
“Kids who don’t cry”*



(Grace Science Foundation Global
NGLY1 Conference, 2017)

NGLY1欠損症の主な症状:

発育遅延

四肢の筋力低下

不随意運動

てんかん

無涙症

骨の異常(背骨の彎曲など)

脳神経系の異常(脳萎縮など) etc.

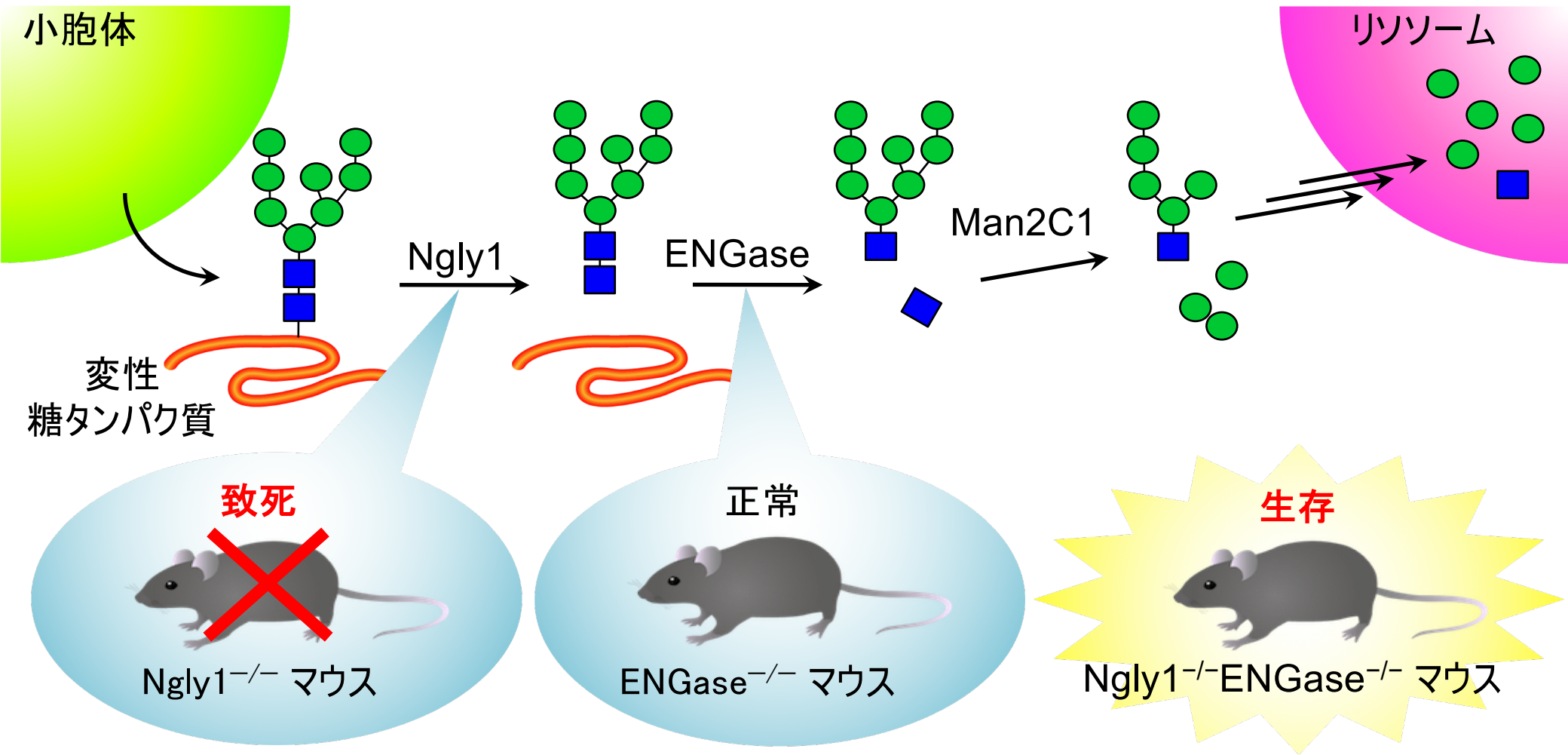


Wilsey Family



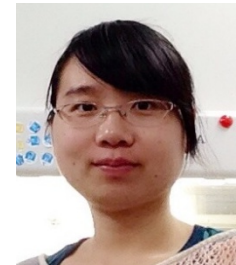
Might Family

我々のノックアウトマウスの解析(予想外の発見): ENGase遺伝子の欠損はNgly1-KOマウスの致死性を回避する



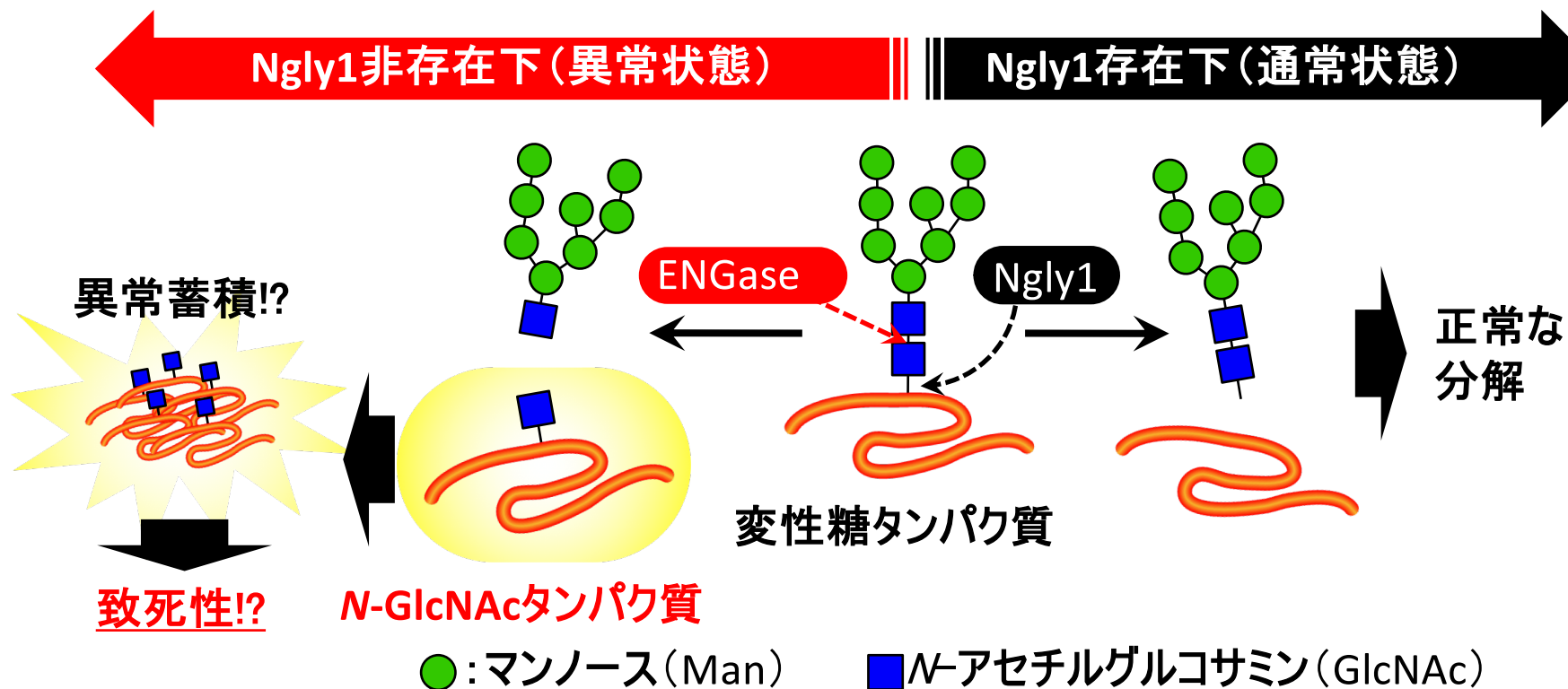
---ENGaseの阻害剤がNGLY1遺伝疾患の治療薬となる可能性がある

いったいなぜそんなことが
起こるのか？
メカニズムは？？



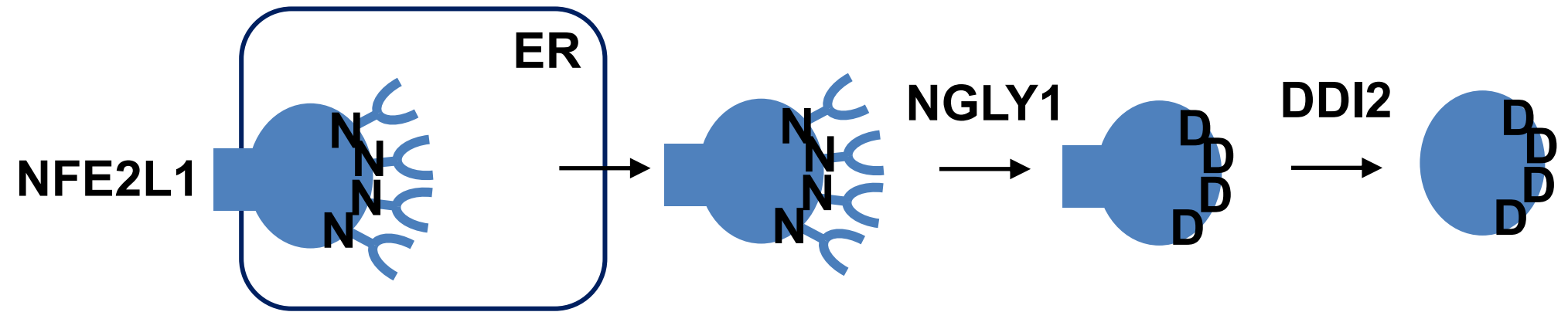
Chengcheng

“**N-GlcNAc仮説**”-Ngly1非存在下でENGaseが変性糖タンパク質に作用し、N-GlcNAcタンパク質を過剰に生産することが細胞に悪影響を及ぼす



Huang, et al., (2015) Endo-beta-N-acetylglucosaminidase forms N-GlcNAc protein aggregates during ER-associated degradation in Ngly1-defective cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, 1398-1403.

Question: Ngly1の機能はごみ処理だけか??



転写因子の活性制御??

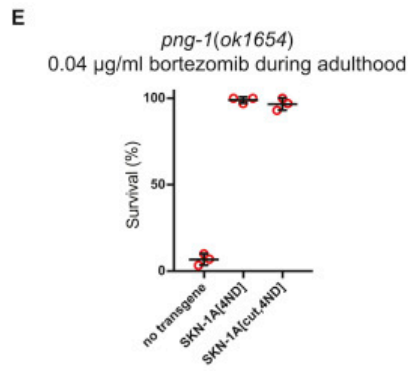
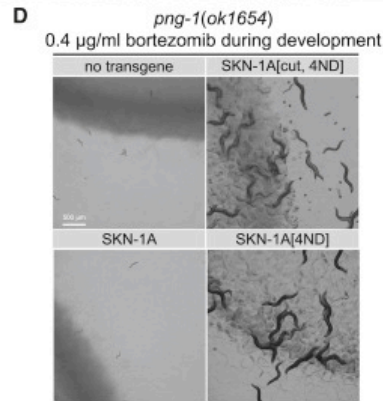
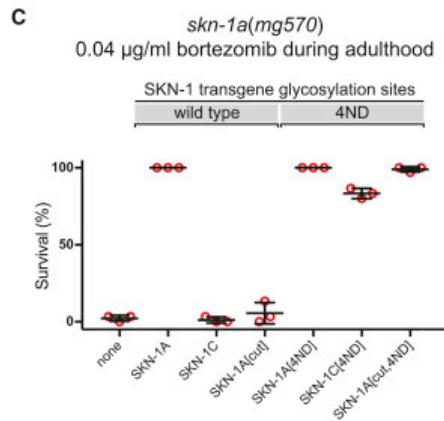
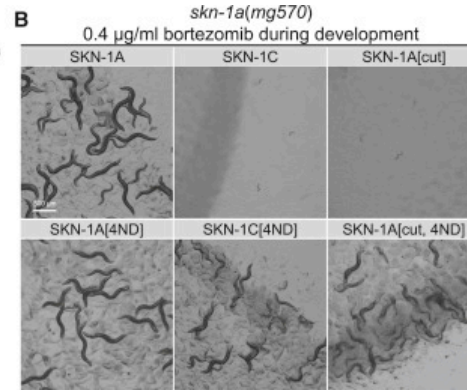
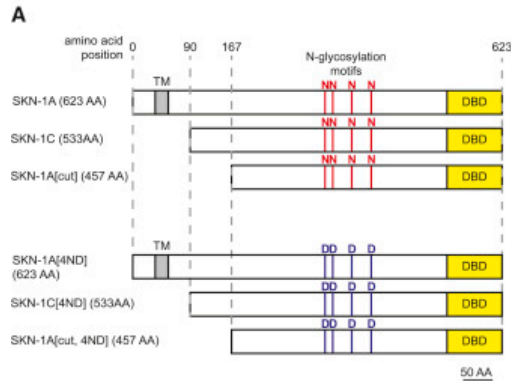
(Lehrbach and Ruvkun, *eLife* 2016;
Tomlin, *et al.* *ACS Cent. Sci.* 2017)

脱N型糖鎖酵素 (PNGase/ENGase)の生理機能の可能性 (Suzuki, et al., Glycoconj. J. 1995)

- (a) 新生糖タンパク質の品質管理
- (b) リセプター-リガンド相互作用の調節
- (c) 生理活性物質の創出
- (d) プロテアーゼによる分解の調節
- (e) 構造多様性の創出

…20年以上経た後で “妄想”が現実！！

NGLY1はタンパク質の”配列エディティング“酵素である!!



Protein Sequence Editing of SKN-1A/Nrf1 by Peptide:N-Glycanase Controls Proteasome Gene Expression
Lehrbach et al. Cell 177, 737 (2019)



Gary Ruvkun
(Harvard Univ.)



Nic Lehrbach
(Mass. Gen. Hospital)

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 1994 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Vol. 269, No. 26, Issue of July 1, pp. 17611-17618, 1994
Printed in U.S.A.

Purification and Enzymatic Properties of Peptide:N-Glycanase from C3H Mouse-derived L-929 Fibroblast Cells

POSSIBLE WIDESPREAD OCCURRENCE OF POST-TRANSLATIONAL REMODIFICATION OF PROTEINS BY N-DEGLYCOSYLATION*

Tadashi Suzuki‡, Akira Seko‡, Ken Kitajima‡, Yasuo Inoue‡§, and Sadako Inoue¶

From the ‡Department of Biophysics and Biochemistry, Faculty of Science, University of Tokyo, Hongo-7, Tokyo 113, Japan and the ¶School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Hatanodai-1, Tokyo 142, Japan

NGLY1欠損症 – その病態発現の原因は多様??



Ngly1^{-/-} Mice

生理活性物質の生成?

ゴミの蓄積?

BMP
シグナル?

(*eLife* 2017)

Nrf1
経路?

(*eLife* 2016)

N-glycoproteins
(ENGase非依存的)

(*PLoS Genet* 2017)

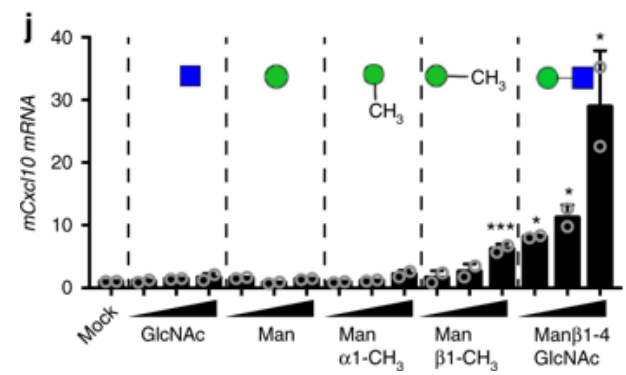
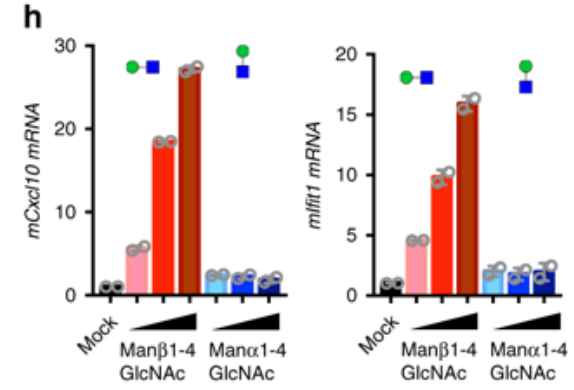
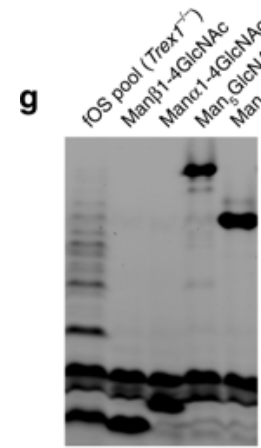
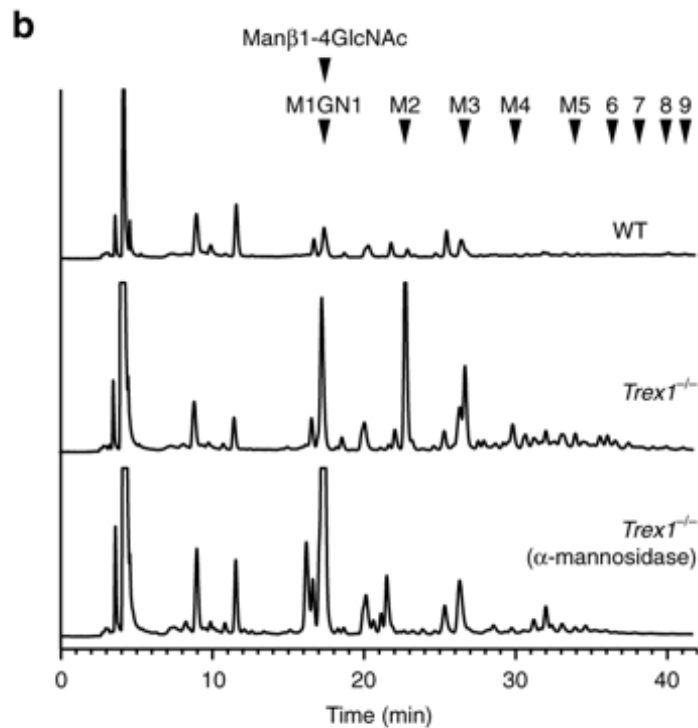
N-GlcNAc proteins
(ENGase依存的)

(*PNAS* 2015)

病態発現

最近のトピックス: 糖鎖の分解中間産物が、免疫反応を引き起こす! (Fermaintt, et al., Nature Communications 2019)

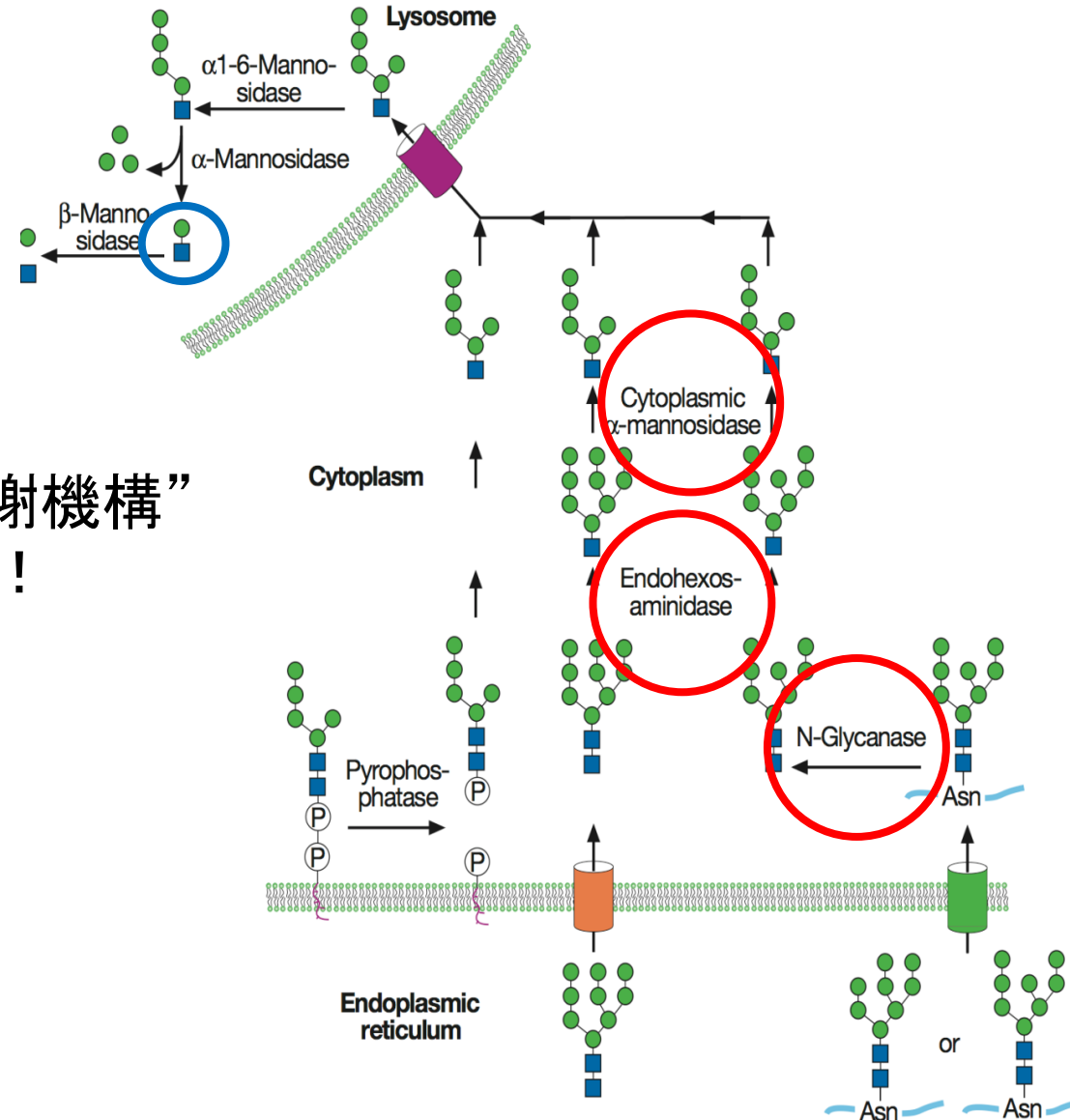
TREX1- DNase として知られているが、変異時にOST (N型糖鎖付加酵素) の機能を調節して遊離の糖鎖を大量に作り、自己免疫疾患を引き起こす



*Manβ1-4GlcNAc disaccharide (MG) is accumulated in *TREX1*^{-/-} cells

*Exogenously-added MG elicited immune response.

細胞内でどのように免疫反応を引き起こす2糖 (Man β 1-4GlcNAc) が作られる??



“非リソソーム代謝機構”
が大事！！

NGLY1の機能：マウスの表現型はバックグ
ラウンドに大きく影響する！
(Fujihira, et al., *PLoS Genet.* 2017)



Yuki

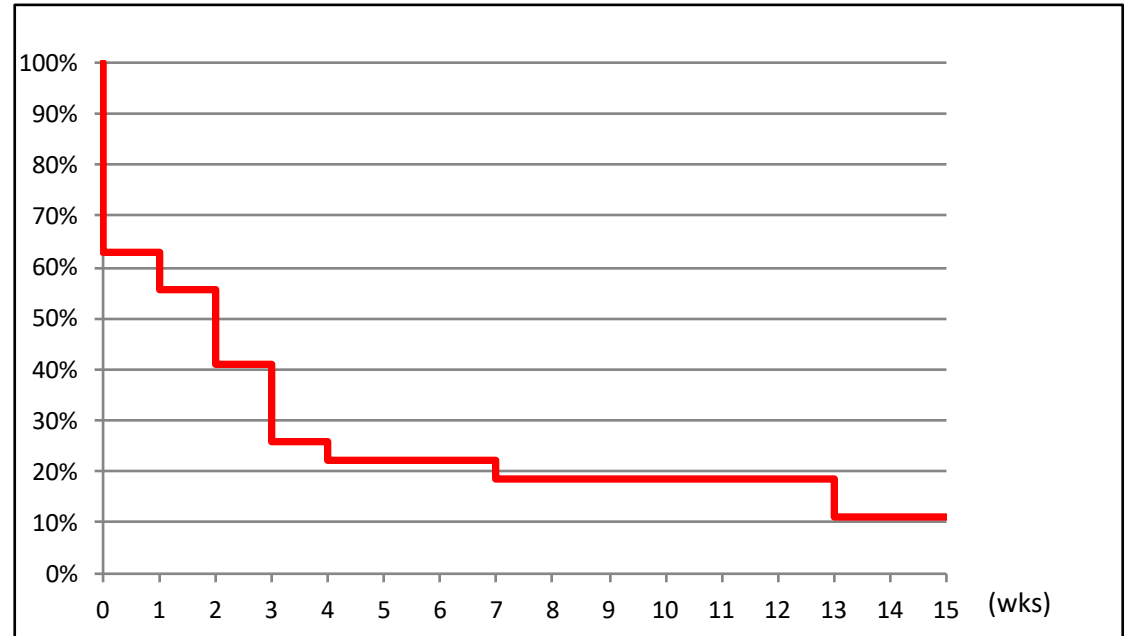
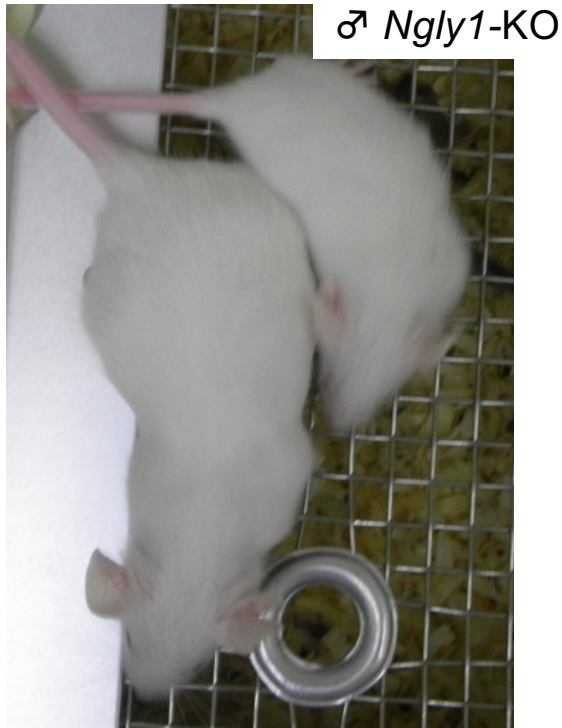


Haruhiko

非近交系のICRマウスとの掛け合わせでは $Ngly1^{-/-}$ マウスは生存可能！

ICR x C57BL/6 ($Ngly1^{-/+}$);
F2 (1ヶ月齢)

C57BL/6とICRの掛け合わせから得られる
 $Ngly1$ -KOマウス(F2)の生存曲線



♂ $Ngly1$ -WT

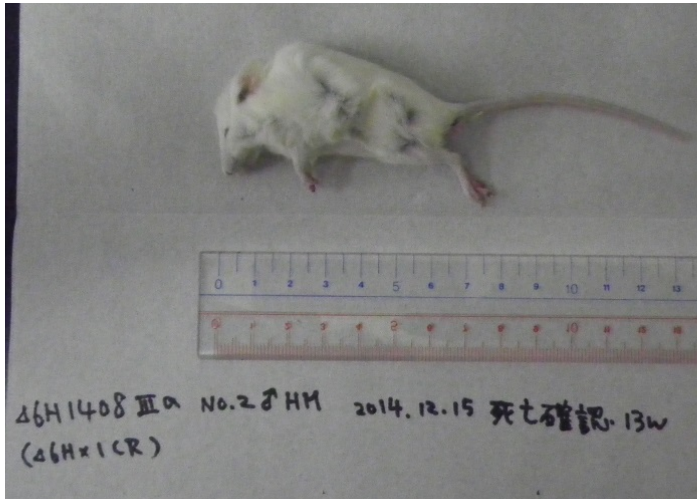
C57BL/6の $Ngly1^{-/-}$ $Engase^{-/-}$ -ダブルKOマウスより強い表現型

ICRとC57BL/6の掛け合わせから得られるNgly1-KOマウス

4週齢時

♂WT 20.70g

♂KO 9.58g



13 wksで死亡
(背骨の湾曲)



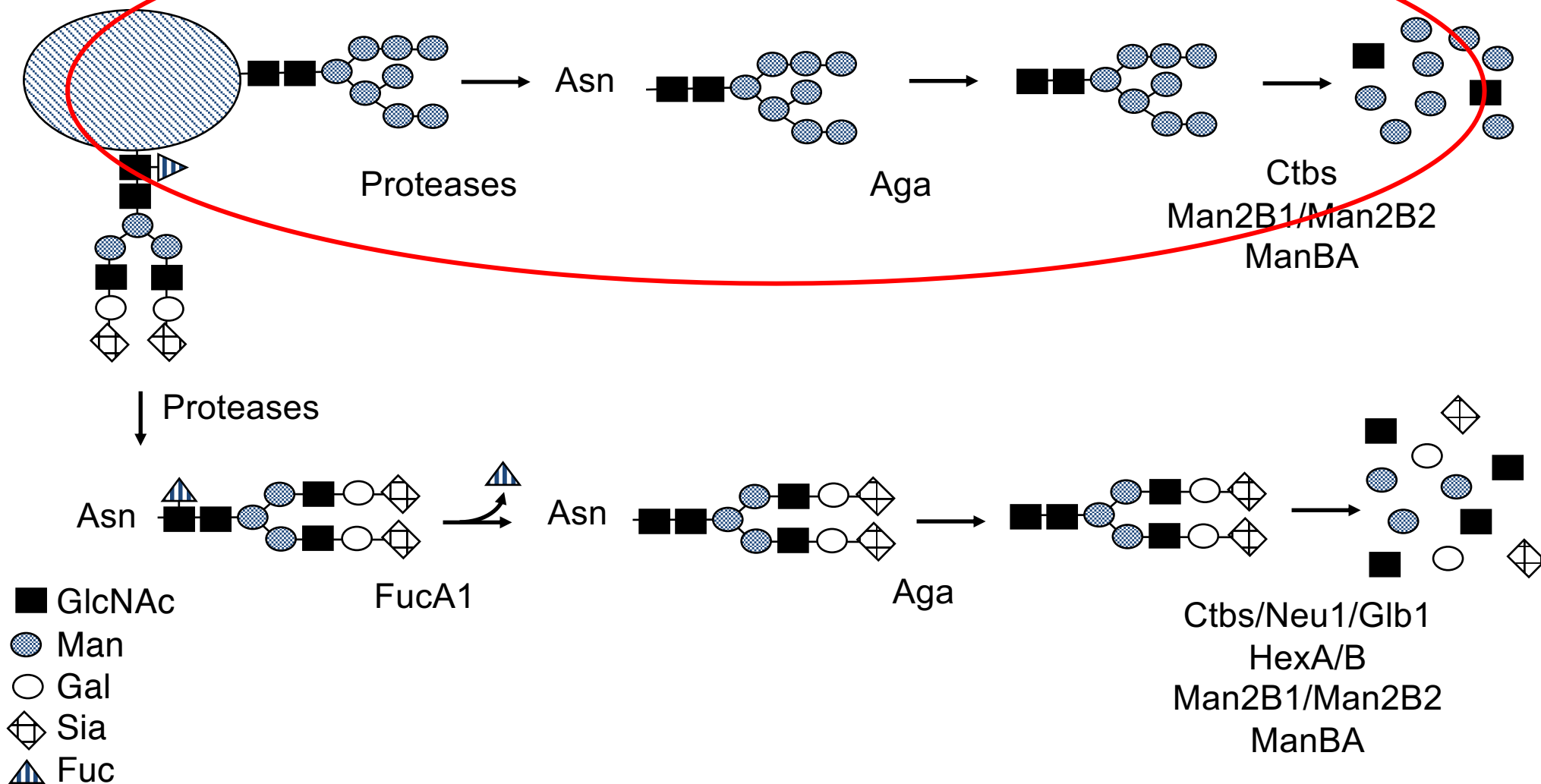
後肢の把持が顕著
(4週齢:KOマウスー右)

*NGLY1*欠損症の創薬の可能性？

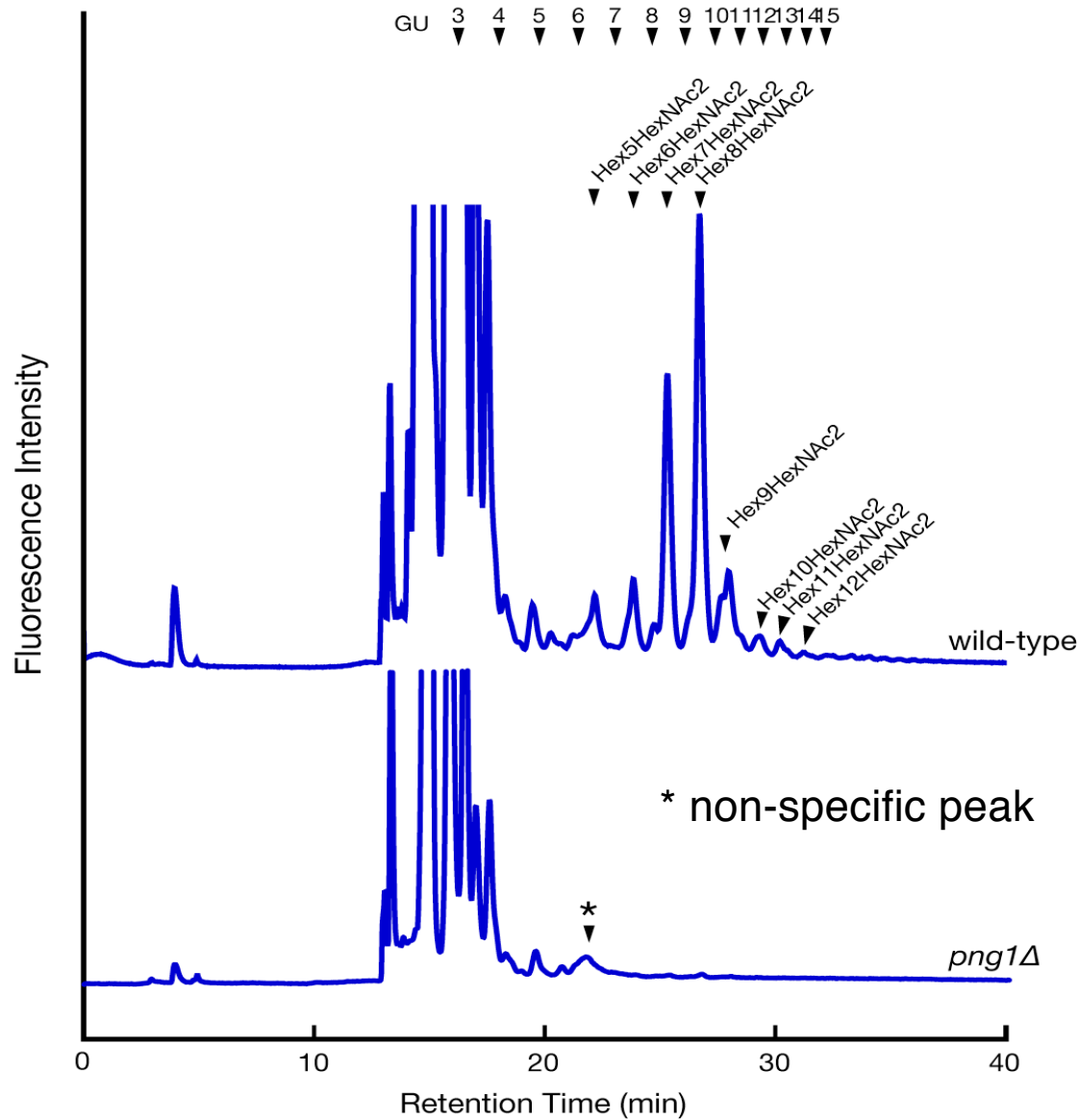
KOマウスの実験結果（遺伝的背景にかなり表現型が左右される）や患者さんの症状（Genotype-Phenotypeの関係が明確でない）ことを考えると、症状を緩和する薬の開発は可能？？

Ex ENGase阻害剤

おまけ: N型糖鎖のリソソーム分解: 出芽酵母ではどうなっている??



出芽酵母では、“遊離糖鎖”の殆どが細胞質PNGaseの作用で作られる (ERADによって、変性糖タンパク質から切り出される)



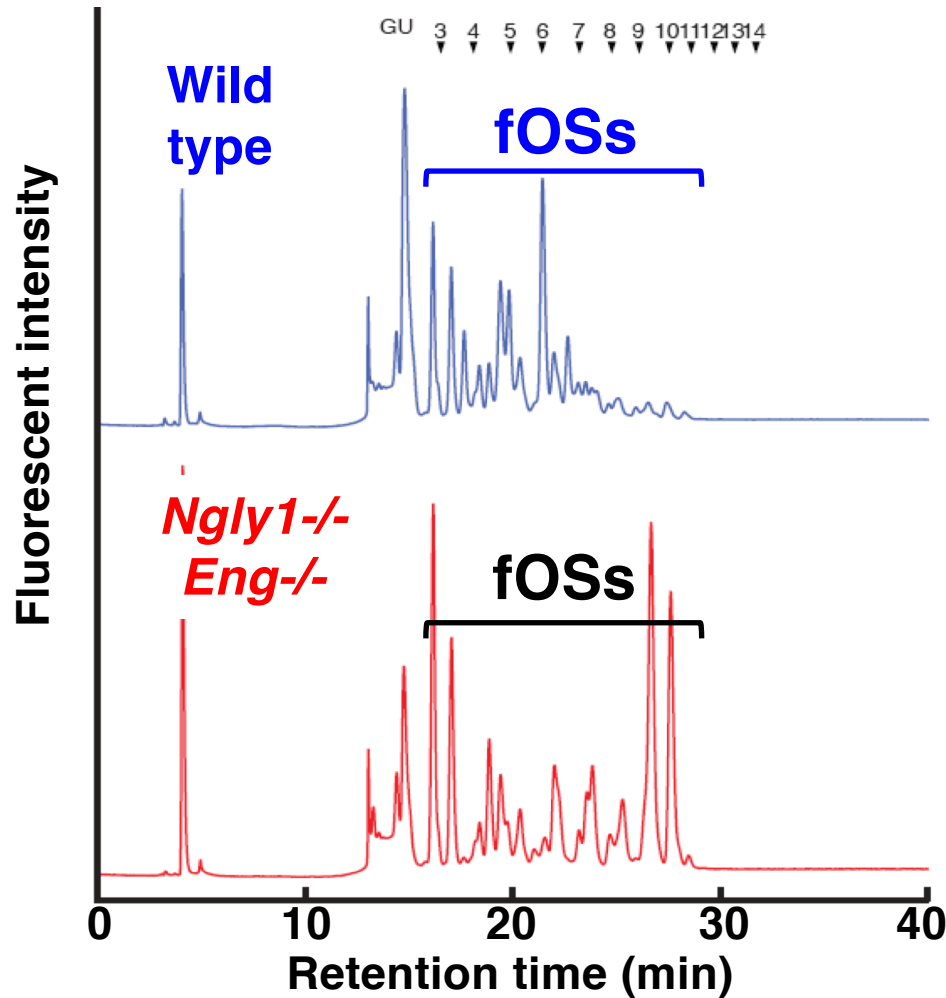
(JBC, 2010)



Hiroto

哺乳動物細胞では、“遊離糖鎖”の殆どが細胞質PNGase・ENGaseの作用以外で作られる(OSTの加水分解)

マウス胚線維芽細胞



驚いたことに、

出芽酵母の液胞(哺乳動物のリソソームにあたる)がN型糖鎖の代謝に大事であることを示すデータは一つもない!

(世の中の常識を疑え!)

糖鎖の代謝は生物種が変われば機構や主要な経路も大きく異なる



Yo

(Glycobiology, 2015)

まとめ

糖鎖の代謝のうち、分解はリソソームで行われる、というのが世の中の常識である(ただし、真核生物で最もよく研究されてる出芽酵母ではこの常識は当てはまらない)。

最近、細胞質や小胞体など、リソソーム以外で行われる糖鎖分解機構(”非リソソーム糖鎖代謝機構“)が存在することがわかってきた。酵母からヒトまで保存されている。

非リソソーム代謝機構の中核を担う細胞質PNGase (NGLY1) は、その欠損によって遺伝病を発症するなど、正常な生育に必要な酵素である(出芽酵母では異なる)。ただし、その病態発現は複数の機構があり、複雑である。

Acknowledgement



RIKEN Team



T-CiRA Team

Funding: Toray Science Foundation, MEXT, Mizutani Fdn Glycosci, Yamada Sci Fdn, Mochida Fdn for Med Pharm Res. Mr. Hiroshi Mikitani



Glycolipidology Initiative
(RIKEN Pioneering Project)

