

糖鎖脱離酵素、PNGase の欠損が引き起こす病態の分子機構解明

Studies on the molecular mechanism of the pathology caused by the defect in deglycosylation enzyme (PNGase)

(個人推薦)

代表研究者	理化学研究所	鈴木 匡	RIKEN	Tadashi SUZUKI
協同研究者	理化学研究所	藤平 陽彦	RIKEN	Haruhiko FUJIHIRA
	理化学研究所	黄 澄澄	RIKEN	Chengcheng HUANG

The cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase/Ngly1) is well conserved throughout eukaryotes, and evidence suggest that it is involved in a quality control system for newly synthesized protein, a process called ER-associated degradation (ERAD). Discovery of a human genetic disorder involving the human orthologue gene (*NGLY1*-deficiency) demonstrates the importance of this protein. In this study, we aim to clarify the molecular mechanism of pathophysiology of *NGLY1*-deficiency, and showed that the ablation of Ngly1 causes dysregulation of the ERAD process. Interestingly, not only delayed degradation but also the deglycosylation of a misfolded glycoprotein was observed in *Ngly1*(-/-) mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. The unconventional deglycosylation reaction was found to be catalyzed by the cytosolic endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase), generating aggregation-prone N-GlcNAc proteins. Surprisingly, the ERAD dysregulation in cells lacking *Ngly1* was found to be restored by the additional knockout of ENGase gene. Thus, our study underscores the functional importance of Ngly1 in the ERAD process and provides a potential mechanism underlying the phenotypic consequences of a newly emerging genetic disorder caused by mutation of the human *NGLY1* gene. Our study also strongly indicate that inhibitor for ENGase could be an attractive drug target for the *NGLY1*-deficiency.

研究目的

細胞質ペプチド:N-グリカナーゼ (PNGase) は真核生物に広く存在し、これまで小胞体におけるタンパク質の品質管理機構に関わることが知られている(1,2)。即ち小胞体で出来た糖タンパク質のうち機能的なフォールディングをとれないようなタンパク質は細胞質に放出されて主にプロテアソームによって分解されるが(小胞体関連分解-ERADと呼ばれる)、その過程で PNGase が変性タンパク質から N 型糖鎖を脱離し、プロテアソームによるタンパク質分解の効率を高めている、と考えられている。本酵素をコードする遺伝子は 2000 年に発芽酵母において初めて同定されたが(3)、その遺伝子欠損株が顕著な表現型を示さなかったこともあり、その生物学的重要性

については最近まで不明であった。

2012 年にヒトにおいてオルソログ遺伝子 (*NGLY1*) の変異による遺伝疾患 (*NGLY1* 欠損症) が報告された(4)。その症状は全身的な生育遅延、四肢の筋力低下、不随意運動や肝機能異常、脳波異常など全身的に重篤な症状を呈するものの、その病体発現のメカニズムは不明である(4-7)。そこで我々は、*NGLY1* 欠損症を引き起こす分子メカニズムの解明に取り組んだ。

研究経過

まず PNGase の ERAD における機能を明らかにするために、発芽酵母によってすでに PNGase 依存的に分解される新しいモデル基質タンパク質 (RTA)

を哺乳動物に発現させることで、小胞体関連分解 (ERAD) の新規なアッセイ法を確立した。このアッセイ法を用いて、Ngly1-KO マウス由来の胚性線維芽細胞 (MEF) においてこのモデルタンパク質の分解過程を調べたところ、野性型マウス由来の MEF よりも分解が遅延することが明らかとなった。興味深いことに、Ngly1-KO 細胞においてもそのモデルタンパク質の N 型糖鎖は脱離されており、その反応は細胞質内の別の脱糖鎖酵素であるエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase; (8)) によって行われることが明らかとなった。細胞質 ENGase はこれまで PNGase によって遊離された糖鎖の代謝に関わると考えられてきたため(9)、この結果は予想外のものであった。

ENGase による糖鎖脱離は、PNGase と異なりタンパク質に N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 一残基を残す (“N-GlcNAc タンパク質” の生成)。興味深いことに、今回用いたモデルタンパク質においては ENGase の反応産物である N-GlcNAc タンパク質が細胞内凝集体として蓄積し、結果分解が遅れることが分かった (図)。一方驚いたことに、ENGase と Ngly1 の両方を欠損した細胞を用いて同様の実験をすると、

モデルタンパク質の分解は正常に行われることが分かった。以上の結果により、ENGase が特に Ngly1 が機能不全の状況で糖タンパク質に直接作用し、N-GlcNAc タンパク質を生成することが明らかとなり、この現象が NGLY1 欠損症の病態発現に関わる可能性が示唆された。

考察

本研究によって Ngly1 タンパク質のタンパク質品質管理機構における重要性が明らかになるとともに、ENGase の存在が Ngly1 欠損の病態につながり得る可能性が示唆された。特に、最近のわれわれのマウス表現型解析からも ENGase の阻害が Ngly1 の病態改善に示す結果が得られつつあることから、ENGase の阻害剤は凝集体を作りやすい N-GlcNAc タンパク質の生成を抑え、NGLY1 欠損症に対する治療薬の有力な候補となり得ると期待できる。また現在様々な組織特異的な KO マウスの詳細な解析にも取り組んでおり、様々な組織における病態の詳細の解明にも今後取り組んでいきたい。

参考文献

1. Suzuki, T. (2015) *J. Biochem.* **157**, 23-34
2. Hirayama, H., Hosomi, A., Suzuki, T. (2015) *Sem. Cell Dev. Biol.* in press. (doi: 10.1016/j.semcdb.2014.11.009)
3. Suzuki, T., Park, H., Sternglanz, R., Hollingsworth, N.M., and Lennarz, W. J. (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 1039-1052.
4. Need, A. C., Shashi, V., Hitomi, Y., Schoch, K., Shianna, K.V., McDonald, M.T., Neuskerm M.H., Goldstein, D.B. (2012) *J. Med. Genet.* **49**, 353-361.
5. Enns, G.M., Shashi, V., Bainbridge, M., Gambello, M.J., Zahir, F.R., Bast, T., Crimian, R., Schoch, K., Platt, J., Cox, R., Bernstein, J.A., Walter, R.S., Bibb, A., Jones, M., Hedge, M., Graham, B.H., Need, A.C., Oviedo, A., Schaaf, C.P., Boyle, S., Butte, A.J., Chen, R., Clark, M.J., Haraksingh, R., FORGE Canada Consortium, Cowan, T.M., He, P., Langlois, S., Zoghbi, H.Y., Snyder, M., Gibbs, R.A., Freeze, H.H., Goldstein, D.B. *Genet. Med.* **16**, 751-758.
6. Caglayan, A.O., Comu, S., Baranoski, J.F., Parman, Y., Kaymakcalan, H., Akgumus, G.T., Caglar, C., Dolen, D., Erson-Omay, E.Z., Harmanci, A.S.,

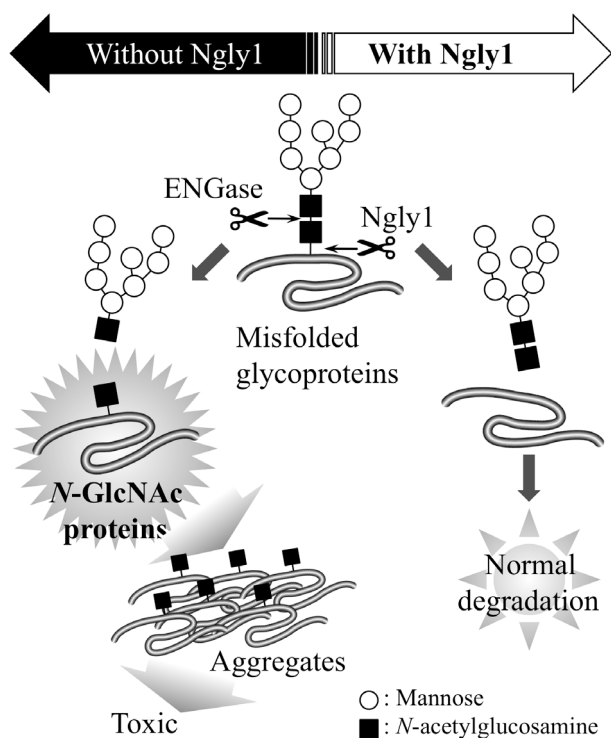


Figure. 1 N-GlcNAc hypothesis

In the absence of Ngly1, ENGase may act directly on the misfolded glycoproteins to produce N-GlcNAc proteins. N-GlcNAc proteins form intracellular aggregates, which can potentially be toxic to cells.

Mishra-Gorur, K., Freeze, H.H., Yasuno, K., Bilguvar, K., Gunel, M. (2015) *Eur. J. Med. Genet.* **58**, 39-43.

7. Heeley, J. Shinawi, M. (2015) *Am. J. Med. Genet. A* **167A**, 816-820.
8. Suzuki, T., Yano, K., Sugimoto, S., Kitajima, K., Lennarz, W.J., Inoue, S., Inoue, Y., Emori, Y. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9691-9696.
9. Suzuki, T. (2007) *Sem. Cell Dev. Biol.* **18**, 762-769.
10. Huang, C., Harada, Y., Hosomi, A., Masahara-Negishi, Y., Seino, J., Fujihira, H., Funakoshi, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., Suzuki, T. (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 1398-1403.

研究の発表

口頭発表

1. T. Suzuki Functional analysis of *NGLY1* in mice. ERAD defects in the cytoplasm. The *NGLY1* story. Rare Disease Day Symposium at La Jolla (CA), USA. 2014年2月28日(招待講演)
2. T. Suzuki Peptide:N-glycanase and non-lysosomal degradation of glycans: basic science meets a human genetic disease. Department Seminar at Molecular, Cellular and Developmental Biology at University of Michigan at Ann Arbor (MI), USA. 2014年3月3日(招待講演)
3. T. Suzuki Story of the cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) – basic science meets genetic disease. RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology 3rd Annual Symposium at Kreuth, Germany. 2014年5月23日(招待講演)
4. T. Suzuki Story of Ngly1: basic science finds a human genetic disorder. Seminars at Institute for Forest Mycology and Plant Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 2014年5月26日(招待講演)
5. T. Suzuki Story of the cytoplasmic peptide:N-glycanase – basic science meets a human genetic disorder. 25th Joint Glycobiology Meeting at Ghent, Belgium. 2014年9月16日(Keynote Lecture)
6. T. Suzuki The cytoplasmic PNGase (Ngly1) – an enigmatic enzyme meets human genetic disorder.

RIKEN Symposium: beauty of glycobiology – novel structures, metabolisms and functions at Wako, Japan. 2014年10月14日(招待講演)

7. The cytoplasmic PNGase (*NGLY1*) – a 20-plus year scientific journey encounters a human genetic disorder. *NGLY1* Special Session at Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research at Honolulu (HI), USA. 2014年11月18日(招待講演)
8. T. Suzuki Analysis of Ngly1-KO mice. Grace Wilsey Foundation's 1st Annual Scientific Conference at Palo Alto (CA), USA. 2015年3月20日(招待講演)
9. Haruhiko Fujihira, Yuki Masahara-Negishi, Masaru Tamura, Shigehar Wakana, Chengcheng Huang, Gen Kondoh, Tadashi Yamashita, Yoko Funakoshi, and Tadashi Suzuki. Physiological functions of deglycosylating enzymes in mice. 2014 *SFG & JSCR Joint Meeting Satellite Symposium II Glycans in Neuroscience* at Honolulu (HI), USA. 2014年11月16日
10. Chengcheng Huang, Yoichiro Harada, Akira Hosomi, Yuki Masahara-Negishi, Junichi Seino, Haruhiko Fujihira, Yoko Funakoshi, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, and Tadashi Suzuki Functional studies of cytosolic deglycosylating enzymes in mammalian cells. 2014 *SFG & JSCR Joint Meeting Satellite Symposium II Glycans in Neuroscience* at Honolulu (HI), USA. 2014年11月16日
11. Chengcheng Huang, Yoichiro Harada, Akira Hosomi, Yuki Masahara-Negishi, Junichi Seino, Haruhiko Fujihira, Yoko Funakoshi, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, and Tadashi Suzuki Functional studies of cytosolic deglycosylating enzymes in mammalian cells. *Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research* at Honolulu (HI), USA. 2014年11月18日
12. Haruhiko Fujihira, Yuki Masahara-Negishi, Masaru Tamura, Shigehar Wakana, Chengcheng Huang, Gen Kondoh, Tadashi Yamashita, Yoko Funakoshi, and Tadashi Suzuki. Physiological functions of deglycosylating enzymes in mice. *Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research* at Honolulu (HI),

USA. 2014年11月19日

13. Chengcheng Huang, Yoichiro Harada, Akira Hosomi, Yuki Masahara-Negishi, Yoko Funakoshi, and Tadashi Suzuki Functional analysis of the cytoplasmic ENGase/PNGase in mammalian cells. GlycoTOKYO2013 シンポジウム 東京 2013年10月19日
14. 藤平 陽彦、正原-根岸 由紀、船越 陽子、原田 陽一郎、黄 澄澄、近藤 玄、山下 匡、鈴木 匡 マウスにおける PNGase の生理機能 第36回日本分子生物学会年会 神戸 2013年12月3日
15. 藤平 陽彦、正原-根岸 由紀、田村 勝、若菜 茂晴、黄 澄澄、近藤 玄、山下 匡、船越 陽子、鈴木 匡 マウスにおける糖鎖脱離酵素群の生理機能 第87回日本生化学会大会 京都 2014年10月16日
16. Chengcheng Huang, Yoichiro Harada, Akira Hosomi, Yuki Masahara-Negishi, Junichi Seino, Haruhiko Fujihira, Yoko Funakoshi, Takehiro Suzuki, Naoshi

Dohmae, and Tadashi Suzuki Functional analysis of the cytoplasmic deglycosylating enzymes in mammalian cells. 第87回日本生化学会大会 京都 2014年10月16日

誌上発表

1. Tadashi Suzuki (2015) The cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) – basic science encounters a human genetic disorder. *J. Biochem.* **157**, 23-34.
2. Chengcheng Huang, Yoichiro Harada, Akira Hosomi, Yuki Masahara-Negishi, Junichi Seino, Haruhiko Fujihira, Yoko Funakoshi, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, and Tadashi Suzuki (2015) Endo- β -N-acetylglucosaminidase forms N-GlcNAc protein aggregates during ER-associated degradation in Ngly1-defective cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 1398-1403.-

-