

(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やその他の活性によって遊離される*N*型糖鎖(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) 2021年度成果と今後の研究計画

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。これまで我々は武田薬品工業との共同研究(T-CiRAプログラム)において、生育可能でNGLY1欠損症患者と類似の表現型を示す*Ngly1*-KOラットの開発に成功している。本年はそれに引き続き、生育可能なマウスモデルとして、近交系マウスとして頻用されるC57BL/6 (B6) マウス、および日本産の近交系マウスであるJF1マウスを用いて、それぞれの*Ngly1*-KOマウスは胚性致死であるものの、掛け合わせで生じるF1マウス (JF1/B6F1) が生存可能なモデルマウスとして利用できることを見出した[1]。得られた*Ngly1*-KOマウスは成長遅延、運動機能障害など、患者の症状に似た表現型を示した。また、中枢神経系の組織において、ユビキチン化タンパク質の蓄積が観察された。これまでNGLY1欠損症のバイオマーカーとして同定されたAsn-GlcNAcの血漿、および尿中の量を測定したところ、*Ngly1*-KOマウスに特異的な蓄積が見られ、Asn-GlcNAcが*NGLY1*遺伝子欠損のマーカーとして広く利用し得ることが示された。非近交系であった*Ngly1*-KOラットと異なり、今回得られたJF1/B6F1 *Ngly1*-KOマウスは遺伝背景が均一であり、利用価値が高い、新たなモデル動物としてNGLY1欠損症の研究に有用なツールとしての価値が期待される[1]。

昨年度T-CiRAプログラムにおいて開発に成功した*Ngly1*-KOラットを用いて、遺伝子治療の可能性を検討する目的で、その脳室内にAAV9を用いたヒト*NGLY1*遺伝子の導入を行った。その結果、遺伝子の単回投与によって、中枢神経系の器官にヒトNGLY1タンパク質の発現が確認され、ロータロッド解析や足跡解析によって運動機能の劇的な改善が確認できた。この結果により、*Ngly1*-KOラットの少なくとも一部の表現型は治療介入によって症状の改善が可能であり、NGLY1欠損症の治療法の開発に有用なモデルであることを示すと同時に、脳を含めた中枢神経系が治療の有力な標的器官であることが明確に示された[2]。

我々はこれまでB6 *Ngly1*-KOマウスの胚性致死性を回避する因子として、NGLY1と同様細胞質における*N*型糖鎖の代謝に関わる酵素、ENGaseを明らかにしてきた。すなわち、*Ngly1 Engase*のダブルKOマウスは一部胚性致死性を回避し、多くのダブルKOマウスは1年以上生育が可能となる。一方で、これらのダブルKOマウスは加齢に伴い振戦、背骨の湾曲といったNGLY1欠損症患者と共通の症状を示すことから、その表現型抑制の効果は不完全であった。一方、東京都医学総合研究所 吉田雪子主席研究員らとの共同研究の結果、ユビキチンを付加する酵素のうち、糖鎖を認識し、広く組織に発現する*Fbs2*の遺伝子を欠損させると、*Ngly1 Fbs2*のダブルKOマウスはほぼ完全に胚性致死性を回避し、生き残るマウスは運動機能が正常で、*Ngly1*遺伝子が欠損するにも関わらず疾患に類似した表現型を全く示さないことが判った。さらに、細胞レベルで*NGLY1*遺伝子を欠損させたヒト由来培養細胞に*FBS2*を過剰発現させたところ、細胞が増殖できず、詳細な解析の結果、*NGLY1*-KOの細胞で*FBS2*が過剰に働くと、本来分解シグナルであるはずのユビキチンが異常に付加された糖タンパク質が細胞に蓄積し、結果プロテアソームの機能が低下し、細胞死を引き起こすことが明らかとなった(図)。このようにNGLY1欠損症の病態メカニズムの一端を明らかにするとともに、*Fbs2*-KOマウスが正常に発育し表現型を全く示さないことから、*FBS2*の機能阻害剤がNGLY1欠損症の有効な治療薬として機能し得る可能性が示

唆された[3]。

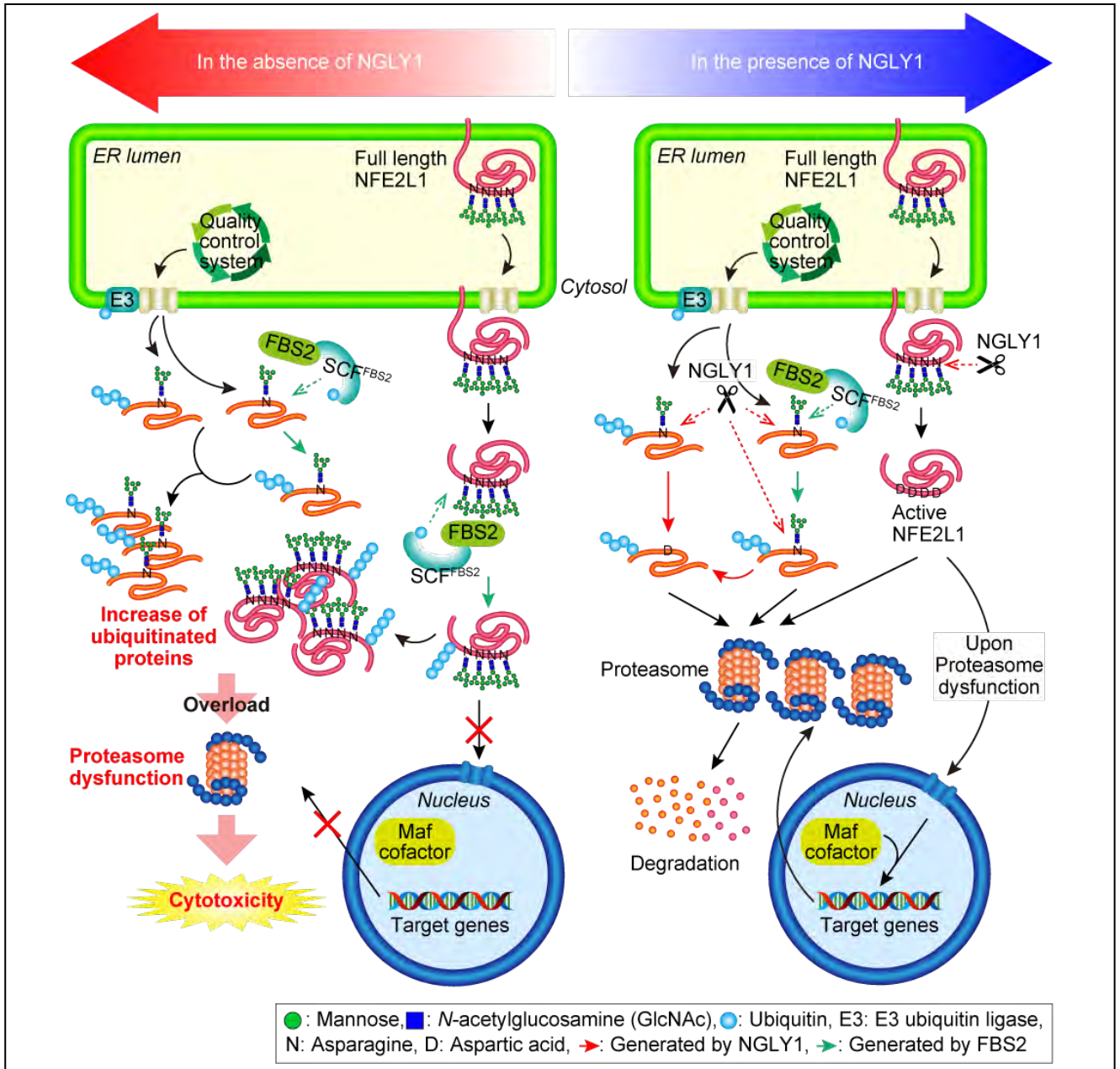


図 NGLY1の機能不全状態において、FBS2が毒性を発揮するメカニズム(仮説) [3]

(右)NGLY1が正常な状態において、ERADにより分解される糖タンパク質(転写因子NFE2L1を含む)は正常にユビキチン化され、プロテアソームによって分解を受ける。一方(左)NGLY1が機能不全な状態においては、FBS2による糖タンパク質の異常なユビキチン化が引き起こされ、蓄積したユビキチン化糖タンパク質はやがてプロテアソームの機能不全をもたらす。そのため、細胞はプロテアソームのサブユニットの発現を制御する転写因子、NFE2L1を活性化しようとするが、NFE2L1自体も糖タンパク質のため、FBS2によってユビキチン化されて細胞内に蓄積し、そのため機能せずにプロテアソームの活性不全の状態が継続し、細胞死を引き起こす。(図はFujihira, et al. (2022) *J. Biochem.* 171, 161-167より引用)

NGLY1欠損症は2012年に病気が発見されて以来、すでに世界中で100例以上の患者が知られており、変異アリルも多数同定されてきているが、それらのアリルに残存活性があるのか、またはその残存活性と症状の重篤性に関連があるか、ということは全く不明である。それは、特に粗酵素抽出液を用いた簡便な酵素活性測定法が存在しないことが原因である。今回我々はNGLY1欠損症患者にこれまで見つかった27の変異アリルを発現、精製して蛍光ラベルをした糖ペプチドを用いた活性測定を行い、3つのアリルにおいて、野生型と比べて30-70%の残存活性があることを明らかにした。また、新たにペプチド部分が環状化した環状糖ペプチド(GCP)を用いたアッセイ法を新たに確立し、粗酵素抽出

液を用いても内在性のプロテアーゼ活性の影響を受けずに酵素活性が測定出来ることが明らかとなった。このGCPを用いた新たな活性測定法は、今後疾患の診断にも活用できることが期待できる [4]。

NGLY1らによって生成するFNGsは、通常細胞内に蓄積している(細胞内FNGs)。一方、最近我々は様々な動物の血清中にシアル酸を非還元末端にもつ細胞外FNGsを同定している。細胞内FNGsは通常還元末端のGlcNAcは1残基である(Gn1型)が、細胞外FNGsは主に還元末端にGlcNAc2残基をもっていた(Gn2型)。今回新たな遊離糖鎖の精製法を確立したことで、これまで見えてこなかったGn1型FNGsやシアル酸を持たない中性FNGs、またミルクオリゴ糖に見られるようなシアリルラクトース/LacNAcといった構造が新たに見つかった。これらの結果から、細胞外の遊離糖鎖の生成機構はこれまで考えられていたよりもずっと多様であり、その生成機構は複雑であ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

(2021年度)

(主任研究員)

Zeynep Sumer Bayraktar

鈴木匡

本田晃伸

(専任研究員)

(研修生)

本賢一

尾上風花

植木雅志

(テクニカルスタッフI)

(研究員)

藤縄玲子

平山弘人

清野淳一

藤平陽彦

佐藤敬子

(技師)

(アシスタント)

立田由里子

鈴木祐子

(特別研究員)

(研究パートタイマーII)

Chengcheng Huang

岡律子

Shengtao Li

松田次代

Stuart Emmerson

小山亮祐

(4) 発表論文等

1. M. Asahina, R. Fujinawa, H. Fujihira, Y. Masahara-Negishi, T. Andou, R. Tozawa, and T. Suzuki*. (2021) JF1/B6F1 *Ngly1*^{-/-} mouse as an isogenic animal model of NGLY1 deficiency. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **97**, 89-102 (doi: 10.2183/pjab.97.005)
2. M. Asahina, R. Fujinawa, H. Hirayama, R. Tozawa, Y. Kajii, and T. Suzuki* (2021) Reversibility of motor dysfunction in the rat model of NGLY1 deficiency. *Mol. Brain* **14**, 91 (doi: 10.1186/s13041-021-00806-6).
3. Y. Yoshida*, M. Asahina, A. Murakami, J. Kawasaki, M. Yoshida, R. Fujinawa, K. Iwai, R. Tozawa, N. Matsuda, K. Tanaka*, and T. Suzuki* (2021) Loss of peptide:N-glycanase causes proteasome dysfunction mediated by a sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **118**, e2102902118 (doi: 10.1073/pnas.2102902118)
4. H. Hirayama, Y. Tachida, J. Seino, and T. Suzuki* (2022) A method for assaying peptide:N-glycanase/N-Glycanase 1 activities in crude extracts using an N-glycosylated cyclopeptide. *Glycobiology* **32**, 110-122 (doi: 10.1093/glycob/cwab115).
5. C. Huang, J. Seino, H. Fujihira, K. Sato, R. Fujinawa, Z. Sumer-Bayraktar, N. Ishii, I. Matsuo, S. Nakaya, and T. Suzuki* (2022) Occurrence of free N-glycans with a single GlcNAc at the reducing termini in animal sera. *Glycobiology* **32**, 314-332 (doi: 10.1093/glycob/cwab124)

*=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