

## 研究課題別評価

1 研究課題名:小胞体タンパク質品質管理機構に関わる PNGase の構造と機能

2 研究者氏名:鈴木 匡

研究員:村部(川村)麻由 (研究期間:H.14.4.1~H.17.3.31)

3 研究の狙い:

細胞質ペプチド: *N*-グリカナーゼ (PNGase) は小胞体における品質管理機構に関連する分子である。すなわち、機能的な構造が取れない糖タンパク質、あるいは正しいサブユニット構造をとれない糖タンパク質を分解、除去する小胞体関連分解 (ERAD) とよばれる過程に関わっていることが示唆されている。私はこれまで本酵素の活性および遺伝子の同定を行ってきており (Suzuki, T., *et al.* (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 1039)、本研究ではその生物学的重要性を特に ERAD との関わりにおいて記述することを目指した。また、PNGase によって遊離される糖鎖がどのように細胞内で分解されるか、その代謝経路の分子基盤の解明とその生理機能にも焦点をあてて実験を行った。

4 研究成果:

(1) 出芽酵母における細胞質 PNGase の複合体の同定と、プロテアソーム分子、ERAD 経路との遺伝学的相互作用

分子の詳細な機能を明らかに手法のひとつとして、その分子と物理的に相互作用する分子を検索、同定することは非常に重要である。我々はこれまでに細胞質 PNGase が Rad23 タンパク質というプロテアソーム結合タンパク質と *in vivo* で複合体を形成することを明らかにした (Suzuki, T., *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 21601)。これを受けて、最近 PNGase と Rad23 に別々のタグを導入し、それらのタグを用いて複合体を高度に精製する手法を確立し、この複合体に含まれると思われる新たな分子群を同定した。また、これまで ERAD の基質となることが知られていた植物の毒素タンパク質であるリシンの無毒化変異体を用いて、酵母の *in vivo* の ERAD / PNGase のアッセイ系を確立した。プロテアソーム阻害剤を用いることが出来る哺乳動物細胞とは異なり、出芽酵母ではこれが PNGase の *in vivo* アッセイ系では唯一の例である。このアッセイ系を確立する過程で、プロテアソームの変異株と PNGase の欠損株をあわせ持つ二重変異株において、リシン変異体を大量発現させると細胞が死に至る表現型を見出した。この表現型は上記の3つの条件(プロテアソームの変異、PNGase の欠損と ERAD 基質の大量発現)がそろって初めて観察され、これらの分子・現象の関連性を改めて明確にした。

(2) PNGase の反応によって生じる遊離 N 型糖鎖の代謝機構の解析

ERAD の過程において、プロテアソームによる構造不良のタンパク質分解の機構は良く研究されているものの、PNGase によって遊離された糖鎖の代謝がどのように起こっているかについては未だ不明な点が多い。例えば哺乳動物においては、永年の生化学的研究によって、出芽酵母の系とは対照的に非常に順序だった、洗練された反応機構によって代謝が起こることが予想されている。即ち、PNGase によって遊離された糖鎖は還元末端にジ-*N*-アセチルキトビオース (GlcNAc

1 4GlcNAc) 構造をもつ (Gn2 糖鎖) が、まずその酵素により還元末端の GlcNAc が外れることによって Gn1 型に変換され、更に非還元末端のマンノースの刈り込みが起こったあとで糖鎖がリソソーム内に取り込まれ、単糖まで分解される、という経路である。これらの分子機構は最近まで全く不明なままであった。我々は最近 Gn2 から Gn1 に変換する酵素の分子クローニングに世界に先駆けて成功し (Suzuki, T., *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9691)、更に細胞質のマンノースの刈り込みを担う細胞質マンノシダーゼの遺伝子も従来 ER マンノシダーゼとして取られていた酵素であることを明らかにした。これらのことから、細胞質における遊離高マンノース型 N 型

糖鎖の細胞質における主要な代謝の分子機構の詳細が明らかとなった。

#### 5 自己評価:

留学から帰国後この3年間で2度の研究室のセットアップを経験し、研究が出来ない期間が短からず存在したという点は、研究の推進という面で非常に残念ではあったが、JST の暖かい援助やメンバーの協力を得ながら、一から研究室の立ち上げを行えたことは、何物にも替え難い良い経験になった。また研究については、当初掲げた“PNGase の構造と機能”という壮大なテーマに比べれば、現状はそのいずれも解明の端緒についたに過ぎないが、複合体の解析や ERAD における PNGase の機能解析を行ったことで、一定の成果を残すことが出来た。特に、酵母の酵素欠損株に顕著な表現型が見られないことからその重要性が周囲から疑問視する声も聞かれる中で、細胞質 PNGase の生物学的重要性を示すデータがはじめて酵母の遺伝学的解析によって得られたことは、本酵素の機能解明において非常に大きいブレイクスルーになったと自負している。

またこの研究で得られた新しい成果として、PNGase によって生じる遊離糖鎖の代謝の分子機構の一端を世界に先駆けて明らかにすることが出来た。これらの研究から、“細胞質は糖鎖の代謝場所として重要である”という新しい概念を提唱するに至った。現在の糖鎖代謝研究はリソソーム病関連の研究以外殆ど世界的に行われていないのが現状であるが、これはちょうどタンパク質分解研究においてその研究の中心がリソソーム分解だった 1980 年代前半の状況を想起させる。その後プロテアソームがキラ星のごとく登場し、細胞質におけるタンパク質分解がありとあらゆる生命現象に深く関わることが判明したのは周知の通りである。糖鎖の細胞質代謝がどれほどの生物学的重要性を持つのか、現段階では知る由もないが、このポストゲノムと称される時代に“N 型糖鎖の代謝”という真核細胞にとって基本的と思える生物学的素過程の分子機構はおろか、その存在すら殆ど知られていないということは驚きでもある。今後は細胞質の糖鎖代謝の全容解明にむけて、その存在の証明と関連分子の同定を目指すと共に、その生理機能を - 重要であるか否か、ということを含めて - 明らかにしていきたい。

#### 6 研究総括の見解:

研究環境が必ずしも好適ではなかったにも拘らず、ブレイクスルーと云ってよい成果をあげたことは注目してよい。特に、課題発見型の研究を可能にする新しいコンセプトを提唱する段階にまでこぎつけたことを評価する。今後どのような方向に研究を集約し、展開するのが注目したい。医学分野との連携を実現することにも前向きに取り組んで欲しい。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. T. Suzuki, H. Park and W. J. Lennarz (2002)  
Cytoplasmic peptide: *N*-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure and potential functions.  
*FASEB J.*, **16**, 635-641.
2. S. Katiyar, T. Suzuki, B. J. Balgobin and W. J. Lennarz (2002)  
Site-directed mutagenesis study of yeast peptide: *N*-glycanase. Insight into the reaction mechanism of deglycosylation.  
*J. Biol. Chem.* **277**, 12953-12959.
3. T. Suzuki, and W. J. Lennarz (2002)  
Glycopeptide export from the endoplasmic reticulum into cytosol is mediated by distinct mechanism from that for export of misfolded glycoprotein.  
*Glycobiology*, **12**, 803-811.
4. T. Suzuki, K. Yano, S. Sugimoto, K. Kitajima, W. J. Lennarz, S. Inoue, Y. Inoue, and Y. Emori

- (2002)  
Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in the processing of free oligosaccharides in the cytosol.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9691-9696.
5. T. Suzuki, and W. J. Lennarz (2003)  
Hypothesis: a glycoprotein-degradation complex formed by protein-protein interaction mediated by the PUB/PUG domain.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 1-5.
6. T. Suzuki, M. A. Kwofie, and W. J. Lennarz (2003)  
Characterization of mouse *Ngly1*, a gene encoding a deglycosylating enzyme implicated in proteasomal degradation; expression, genomic organization and chromosomal mapping.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 326-3332.
7. M. Chavan, T. Suzuki, M. Rekowicz, and W. J. Lennarz. (2003)  
Genetic, biochemical, and morphological evidence for the involvement of *N*-glycosylation in biosynthesis of the cell wall  $\cdot$ 1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **100**, 15381-15386.
8. T. Suzuki (2004)  
Free *N*-linked oligosaccharide chains: formation and degradation.  
In “**Encyclopedia of Biological Chemistry**” (W J. Lennarz and M. D. Lane, eds.) Academic Press/Elsevier Science.
9. T. Suzuki (2004)  
A simple, sensitive *in vitro* assay for cytoplasmic deglycosylation by peptide:*N*-glycanase (PNGase).  
*Methods*, in press.
10. T. Suzuki (2005)  
Free *N*-linked glycan chains: Formation and Degradation.  
*Biochim. Biophys. Acta* (Review; invited for submission).

和文総説(下記のものを含め、計 11 件)

1. 鈴木 匡  
細胞質 PNGase と小胞体品質管理機構  
わかる実験医学シリーズ「ポストゲノムの糖鎖生物学が分かる」実験医学別冊(羊土社)  
pp103-108. (2002)
2. 鈴木 匡  
小胞体における N 型糖鎖のプロセッシングと糖タンパク質品質管理機構 「糖鎖機能:第3の生命鎖」  
蛋白質核酸酵素 2003 年 6 月号増刊(共立出版)pp967-973. (2003)
3. 鈴木 匡  
細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼの構造と機能  
生化学(日本生化学会)pp1405-1413. (2003)
4. 鈴木 匡  
N 型糖鎖のペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase) による脱グリコシル化  
日本農芸化学会誌(日本農芸化学会)pp37-38. (2004)
5. 鈴木 匡  
糖タンパク質の品質管理機構

メディカル・サイエンス・ダイジェスト(北隆館/ニューサイエンス社) pp487-490. (2004)

6. 鈴木 匡

細胞質における遊離糖鎖の生成、代謝とその生理機能

遺伝子医学 MOOK「糖鎖と病気」(メディカル ドゥ)印刷中 (2005)

国際学会講演(下記招待講演 4 件を含め、口頭発表 6 件)

1. T. Suzuki, H. Park, S. Katiyar, and W. J. Lennarz.

Cytoplasmic peptide:*N*-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: its structure and potential functions.

*17th International Symposium on Glycoconjugates* at Bangalore (India), January 13, 2003.

2. T. Suzuki

ENGase and PNGase; two cytoplasmic deglycosylating enzyme act on *N*-linked glycan chain.

*William J. Lennarz Symposium* at San Diego, December 7, 2003

3. M. Kawamura, I. Hara, T. Suzuki

A putative glycoprotein-degradation complex that includes cytoplasmic peptide:*N*-glycanase.

*2004 American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) Annual Meeting* at Boston, June 15, 2004

4. T. Suzuki

Cytosolic free oligosaccharides: formation and cytosolic processing.

*US/Japan Glyco 2004 (Joint meeting of the society for glycobiology and the Japanese society of carbohydrate research)* at Honolulu, November 18, 2004

国内講演 / 発表(下記招待講演 / セミナーを含め、口頭発表 14 件、ポスター発表 2 件)

1. 鈴木 匡

Structure and functions of cytoplasmic peptide:*N*-glycanase.

理化学研究所 2002 年 1 月 24 日

2. 鈴木 匡

Cytoplasmic peptide:*N*-glycanase: proteasomal connection?

東京都臨床医学総合研究所 2002 年 4 月 25 日

3. 鈴木 匡

Cytoplasmic peptide:*N*-glycanase; structure and possible functions.

大阪大学微生物病研究所 2002 年 8 月 27 日

4. 鈴木 匡

プロテアソーム分解系に関わる酵素、PNGase

GlycoTOKYO 2002 シンポジウム(東京)2002 年 11 月 18 日

5. 鈴木 匡

細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼと 26S プロテアソームをつなぐタンパク質、Rad23

第 25 回日本分子生物学会年会(横浜)2002 年 12 月 13 日

6. 鈴木 匡

真核細胞細胞質に存在する N 型糖鎖脱離酵素:PNGase と ENGase

理化学研究所シンポジウム<生体分子の化学>(和光)2003 年 1 月 23 日

7. 鈴木 匡

細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼによる N 型糖鎖の脱離

日本農芸化学会 2003 年度大会、藤沢 2003 年 4 月 3 日

8. 鈴木 匡

細胞質 PNGase: プロテアソーム分解系に関わる脱糖鎖酵素

東京大学 2003 年 5 月 26 日

9. 鈴木 匡

Cytoplasmic 細胞質 PNGase: 構造と機能

日本薬学会東海支部講演会(名古屋)2003 年 9 月 12 日

10. 鈴木 匡

Cytoplasmic deglycosylating enzymes: Why do they exist???

大阪大学 2003 年 11 月 20 日

11. 鈴木 匡

細胞質 PNGase の構造と機能

第 5 回関西グライコサイエンスフォーラム(大阪) 2004 年 5 月 29 日

12. 鈴木 匡

Cytosolic Processing of *N*-glycans: more important than you think?

第 77 回生化学会大会、横浜 2004 年 10 月 15 日