

遊離 N 型糖鎖の生成と分解-N 型糖鎖の分解の場としての細胞質 —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—



鈴木 匡

大阪大学大学院医学系研究科 21 世紀 COE プログラム 特任助教授

1. 私が知りたかったこと

私の研究は学部生のころ、PNGase という糖鎖脱離酵素活性を細胞質に発見したことに端を発している。それは当時全く予想外の発見であり、以来私は、その酵素が真に存在するのか、するならばその生物学的な意味は何かを一貫して問うてきた。このさきがけ研究では、先に遺伝子が同定され、その存在が確立された細胞質 PNGase が、細胞内でどのような複合体を形成するのか、また新生糖タンパク質の品質管理と異常タンパク質の分解機構にとってどれ程の重要性を持つのかを明らかにするべく研究を行った。

2. 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（図1）(1)。

私は本酵素の活性および遺伝子の同定を行ってきており(2)、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。

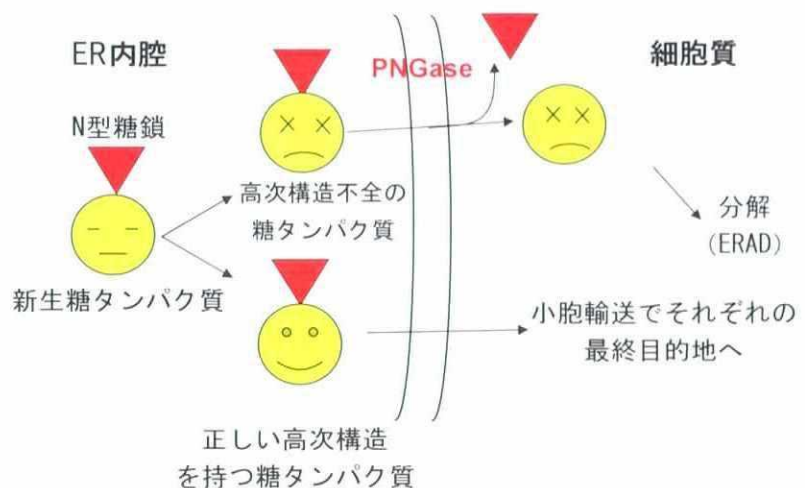


図1 小胞体における糖タンパク質の品質管理機構

3. 結果／考察

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ていた(3)。これを受けて、我々は最近 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* での 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(4) (図2)。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 β 1 \rightarrow 4GlcNAc) 構造をもつ (Gn2 糖鎖) が、まずその酵素が還元末端の 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(5)、更に細胞質のマ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。

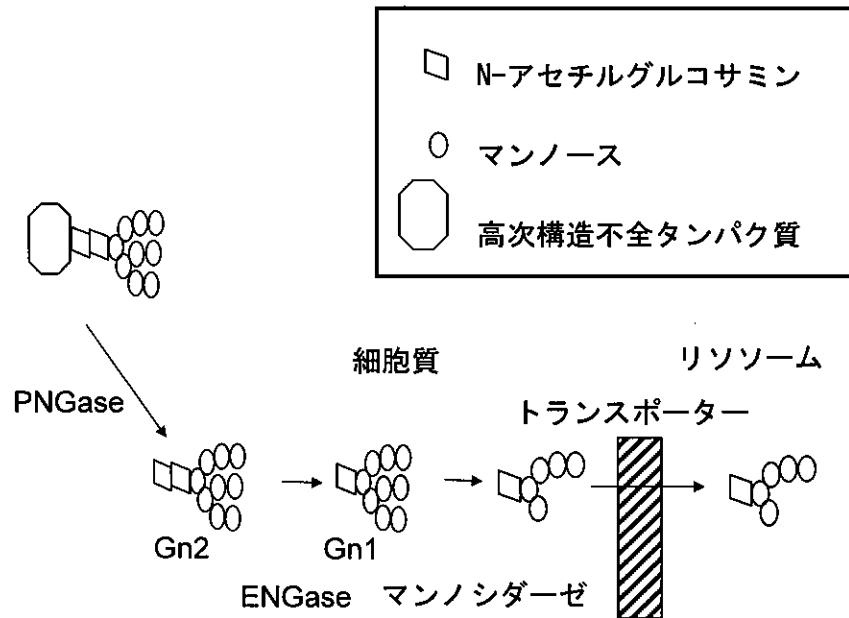


図2 哺乳動物細胞の細胞質における遊離N型糖鎖のプロセッシング

これらの結果により、今まで不明であった細胞質 PNGase の生物学的重要性を示すデータを初めて遺伝学的解析によって得られたと共に、PNGase によって生じる遊離糖鎖の代謝の分子機構を明らかにすることが出来た。今後は遊離糖鎖の代謝機構の普遍性とその生理機能について解析を行っていく予定である。

参考文献

1. Suzuki, T., Park, H., and Lennarz, W. J. (2002) *FASEB J.* **16**, 635-641.
2. Suzuki, T., *et al.* (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 1039-1051.
3. Suzuki, T., *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 21601-21607.
4. Suzuki, T. (2004) In *Encyclopedia in Biological Chemistry*, Academic Press/Elsevier Science, in press.
5. Suzuki, T., *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9691-9696.