

平成 30 年 4 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18520

研究課題名(和文) Ngly1/ENGase欠損がマウスに招く致死性/致死性回避のメカニズム解明

研究課題名(英文) Revealing the physiological function of de-N-glycosylating enzymes in mice

研究代表者

藤平 陽彦 (Fujihira, Haruhiko)

順天堂大学・医学部・特任研究員

研究者番号：50721057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞質での糖鎖脱離を担う酵素、Ngly1とENGaseの哺乳動物における未知の生理機能の解明に取り組んだ。そのためにNgly1、ENGase遺伝子欠損マウスの解析を行い、ENGaseの欠損は特に異常を示さない一方で、Ngly1の欠損が様々な異常(心臓、造血、筋肉、神経、体重など)を引き起こすことを明らかにした。さらに、それらの異常はENGaseの追加欠損により、回避可能な異常と回避不可能な異常に分かれることも明らかとした。ENGase非依存的なNgly1欠損による異常には、最近報告された内容を元に検証を行った結果、転写因子Nrf1の機能が関与している可能性が高いことが確認された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to reveal an unknown physiological function of de-N-glycosylating enzymes, peptide:N-glycanase (Ngly1) and endo-beta-N-acetylglucosaminidase (ENGase), in mammals. To this end, I performed phenotypic analyses of mice that lack Ngly1/Engase gene (Ngly1-KO, Engase-KO, Ngly1;Engase-KO mice). I found that the deletion of Ngly1 causes many defects (heart, muscle, nervous systems, body weight etc), while Engase deletion does not cause any defects. Interestingly, the defects caused by the loss of Ngly1 are partially rescued by the additional deletion of Engase gene. Therefore, there are two types of pathways that cause the defects by Ngly1-deletion, ENGase-dependent pathway and ENGase-independent pathway. Based on recent reports and my additional experiments suggested that a transcriptional factor Nrf1, which regulates the expression levels of proteasome subunits under low proteasome activity, seems to be involved in the ENGase-independent pathway.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：Ngly1 ENGase ubiquitin-proteasome autophagy

1. 研究開始当初の背景

ペプチド:N-グリコナーゼ (Ngly1) は糖タンパク質から N 結合型糖鎖を切り離す糖鎖脱離酵素で、タンパク質品質管理機構の一つ小胞体関連分解 (ERAD) に寄与する。2012 年、Ngly1 の遺伝子変異に起因する疾患 (NGLY1 欠損症) が発見された。本疾患は全身に重篤な症状 (発育遅延、筋緊張低下、不随意運動、無涙症、肝機能障害、脊椎側彎症など) を呈することから、Ngly1 が哺乳動物において重要な役割 (生理機能) を果たしていることは明らかであったが、Ngly1 および Ngly1 が関与する細胞質での糖鎖分解の生理機能については、特に哺乳動物において、よくわかっていない状態であった。

2. 研究の目的

本研究は、「Ngly1 と ENGase の哺乳動物における未知の生理機能の解明」を目的として取り組んだ。具体的には、研究開始時点における予備的知見として、Ngly1 遺伝子欠損 (Ngly1-KO) マウスが胚性致死となること、Engase の追加欠損がその致死性を回避することなどを見出していたため、「Ngly1 欠損がマウスを致死とする異常・メカニズム」および「Engase 追加欠損によりどの異常を抑制可能なのか」の解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究では、上記の研究目的達成のために、各種遺伝子欠損マウス、それらのマウス由来の組織・細胞を用いて、下記の内容に生化学的・組織学的手法により取り組んだ。

(1) Ngly1 欠損により生じる異常の解析

Ngly1 が ERAD に関与することから、細胞質におけるタンパク質分解系に着目し、異常タンパク質の蓄積や分解系の機能異常について調べた。

(2) N-GlcNAc 仮説の検証

Ngly1 欠損によるマウスの致死性を Engase の追加欠損が抑制するメカニズムとして私たちが提唱している N-GlcNAc 仮説 (詳細は研究成果の部分に記載) について検証に取り組んだ。

(3) Ngly1 欠損で生じる異常の中で Engase 欠損により抑制可能/不可能な異常の同定

(1) の部分で明らかにした異常の中で、Ngly1;Engase 遺伝子二重欠損 (Ngly1;Engase-KO) マウス由来の組織・マウス胚性線維芽 (MEF) 細胞で観察されないものの同定を行った。

4. 研究成果

(1) Ngly1-KO マウスは発生段階において造血・血管発生異常に起因する表現型を示し、Engase 追加欠損により抑制可能/不可能な表現型がある

研究開始時の予備的知見として、Ngly1 欠損による致死性は出産 3 日前 (E16.5) から 2 日前 (E17.5) の間に生じること、一つの致死原

因は心室中隔欠損 (VSD) であることがわかっていった。そこで、VSD 以外にどのような異常があるかを E16.5 の胎仔に着目して解析を行った。その結果、Ngly1 欠損により浮腫 (14.3%) や貧血 (42.9%) といった異常も生じることがわかった (図 1)。興味深いことに、Engase の追加欠損によって、浮腫は抑制されたが貧血は抑制されなかった。以上の結果から、VSD や浮腫に関連する異常には ENGase の機能が関与しており、貧血に関連する異常には ENGase の機能は関与していないことが明らかとなった。

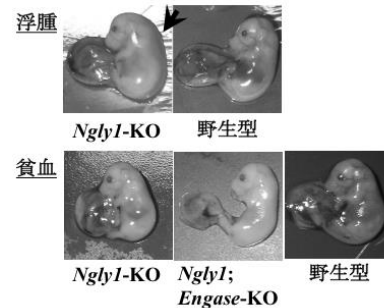


図1 野生型、Ngly1-KO、Ngly1;Engase-KO胎仔において観察された浮腫・貧血

(2) 生体マウスにおいても Engase 追加欠損は Ngly1 欠損に起因する異常を部分的に抑制可能である

過去にマウスの遺伝的背景を変えることで、マウスの致死性が回避されるという報告があった (Fukuda et al, *J. Biol. Chem.*, **286**(21), 2011) のを参考に、Ngly1-KO マウスについてもそのような現象が起こり得るかを検証した。本研究で用いている Ngly1-KO マウスは一般的に実験に用いられる C57BL/6 (B6) 系統のマウスであり、この系統は遺伝的背景が均一であることがわかっている。そこで、B6 系統 Ngly1 へテロ欠損 (Ngly1-HT) マウスと遺伝的背景が多様である ICR 系統のマウスを交配させ、B6-ICR 混成の Ngly1-KO マウスの作出に取り組んだ。

その結果、期待通りに生存する Ngly1-KO マウスを得ることができた。しかしながら、B6-ICR 混成 Ngly1-KO マウスは、生後 3 週間でその約 70%が死亡してしまい、30 週を超えると生存するマウスは存在しなかった (図 2)。さらに、コントロールマウスと比べて体重の低減も観察された (図 3)。同様に、B6-ICR 混成 Ngly1;Engase-KO マウスの作出にも取り組み、生まれた B6-ICR 混成 Ngly1;Engase-KO マウスの表現型を B6-ICR 混成 Ngly1-KO マウスの表現型と比較を行った。その結果、生存率と体重の低減の大幅な改善がみられた (図 2, 3)。つまり、生体マウスにおいても Engase の追加欠損が Ngly1 欠損による異常を抑制可能であることが明らかとなった。

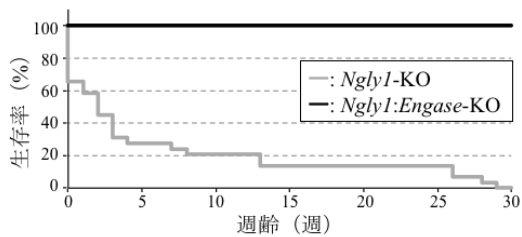


図2 B6-ICR混成Ngly1-KO、Ngly1;Engase-KOマウスの生存率

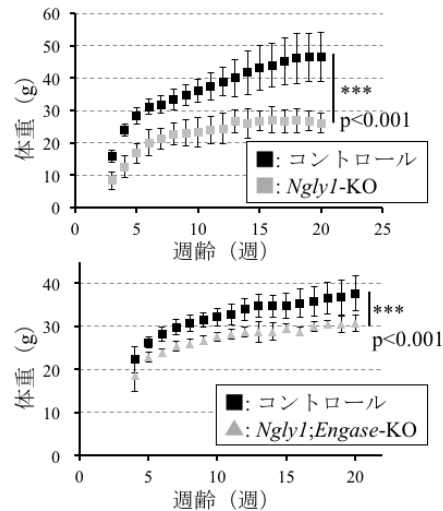


図3 B6-ICR混成Ngly1-KO、Ngly1;Engase-KOマウスの体重変化

(3) N-GlcNAc タンパク質となり得るいくつかの糖タンパク質を同定

Ngly1 欠損による異常を Engase 追加欠損が抑制するメカニズムとして、Ngly1 欠損下においては ENGase が不要な異常糖タンパク質に直接作用し、N-GlcNAc タンパク質を形成し、その N-GlcNAc タンパク質が細胞に有害な作用をもたらしているのではないかと、という N-GlcNAc 仮説を考えている (図4)。この仮説検証のためには、内在性の

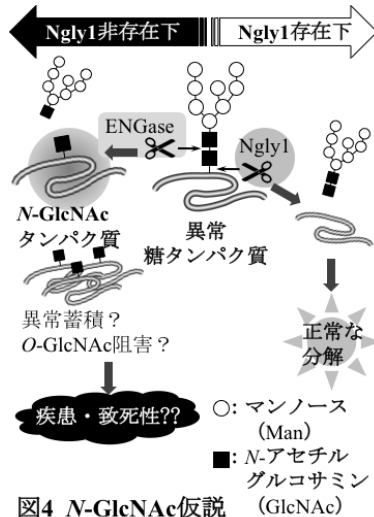


図4 N-GlcNAc仮説

N-GlcNAc タンパク質を同定する必要があるが、技術的に直接 N-GlcNAc タンパク質を検出することが困難だったため、野生型に比べて Ngly1;Engase-KO では N-GlcNAc タンパク質となり得る糖タンパク質が多く蓄積していると考え (図5)、野生型に比べ Ngly1;Engase-KO でより多く細胞質に蓄積している糖タンパク質を MEF 細胞を用いて解析した。その結果、Follistatin-regulated protein1、Hypoxia up-

regulated protein 1、FKBP10 などの糖タンパク質が N-GlcNAc タンパク質となり得ることを明らかにした。

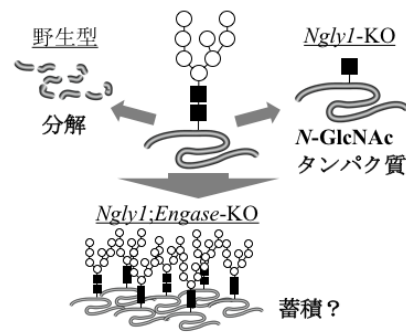


図5 N-GlcNAcタンパク質の候補

(4) Ngly1 欠損は特にユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解系との機能的関連性がある

Ngly1 欠損と細胞質におけるタンパク質分解系との機能的関連性を調べるために、MEF 細胞を用いた解析に取り組んだ。まずは、オートファジーとの関連について調べた。基底状態および飢餓状態において、オートファジーの誘導と発現が相関する LC3-II、p62 の発現を調べた結果、野生型と Ngly1-KO との間で顕著な差は見られなかった (図6)。さらに、Engase を追加欠損した状態でも、顕著な差は見られなかった (図6)。次に、ユビキチン-プロテアソーム系との関連について調べた。2017年、Ngly1 の機能がプロテアソームの機能低下時にプロテアソームのサブユニットの発現を制御する役割を担う転写因子 Nrf1 の活性化に重要だという報告がなされた (Tomlin et al, ACS Cent. Sci., 22;3(11), 2017)。この報告を参考に、プロテアソームの機能阻害時の生存率と Nrf1 の活性化状態を Ngly1-KO、Ngly1;Engase-KO、野生型の間で比較した。その結果、プロテアソームの阻害により、野生型に比べて Ngly1-KO の生存率が著しく低下した。興味深いことに、Ngly1;Engase-KO においても顕著な生存率の低下が見られた (図7)。Nrf1 の活性化に関しては、活性化に伴って生じる Nrf1 のプロセッシングによる分子量の変化をウエスタンブロットにより調べたが、Ngly1-KO でも Ngly1;Engase-KO でもその活性化に異常が生じていることがわかった (図8)。以上のことから、Ngly1 欠損により生じるプロテアソーム阻害時の応答の異常は、Engase の追加欠損により抑制できないものであり、そのメカニズムには Nrf1 が寄与している可能性が高いことが明らかとなった。

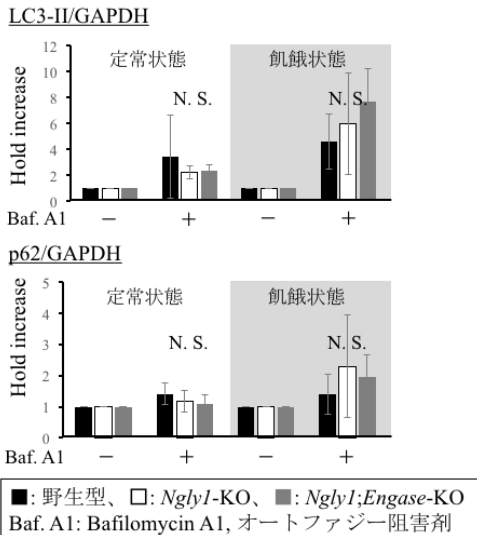


図6 *Ngly1*欠損のオートファジーへの影響

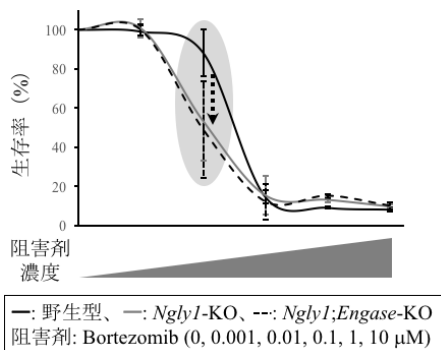


図7 プロテアソームの機能阻害時の各種MEF細胞の生存率

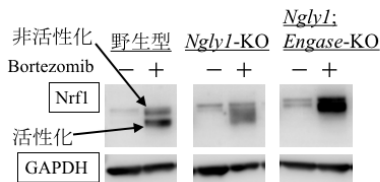


図8 プロテアソームの機能阻害時の各種MEF細胞のNrf1プロセッシング

(5) まとめ

本研究を通して、哺乳動物において *Ngly1* 欠損がもたらすいくつもの異常を明らかにすることができた。その異常を引き起こすメカニズムには、ENGase が関与するものと関与しないものがあり、関与するメカニズムに関しては *N-GlcNAc* タンパク質が、関与しないメカニズムに関しては *Nrf1* が寄与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Haruhiko Fujihira, Katsuaki Usami, Keita Matsuno, Hideyuki Takeuchi, Kaori Denda-Nagai, Jun-ichi Furukawa, Yasuro Shinohara, Ayato Takada, Yoshihiro Kawaoka, Tatsuro

Irimura

A Critical Domain of Ebolavirus Envelope Glycoprotein Determines Glycoform and Infectivity

Scientific reports, 査読: 有, 8(1), 2018, 1-13, DOI: 10.1038/s41598-018-23357-8

2. 藤平 陽彦, 鈴木 匡

NGLY1 欠損症

生化学, 査読: 有, 89(5), 620-625, DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890599

3. Haruhiko Fujihira, Yuki Masahara-Negishi, Masaru Tamura, Chengcheng Huang, Yoichiro Harada, Shigeharu Wakana, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, Gen Kondoh, Tadashi Yamashita, Yoko Funakoshi, Tadashi Suzuki

Lethality of mice bearing a knockout of the *Ngly1*-gene is partially rescued by the additional deletion of the *Engase* gene

PLOS Genetics, 査読: 有, 13(4), 2017, 1-23, DOI: 10.1371/journal.pgen.1006696

[学会発表] (計 5 件)

1. Haruhiko Fujihira et al

The defects caused by the loss of *Ngly1* can be partially rescued by the additional deletion of *Engase*

International Symposium on ER Stress, glycosylation, homeostasis and diseases, 2018

Poster presentation

2. 藤平 陽彦ら

Engase 欠損により回避可能/不可能な *Ngly1* 欠損による異常

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017

口頭発表、ポスター発表

3. Haruhiko Fujihira et al

Summary of phenotypic analyses of *Ngly1*-KO mice and *Ngly1/Engase*-KO mice

International Symposium "Systems Glycobiology and Beyond", 2017

Poster presentation

4. 藤平 陽彦

Engase 欠損により回避可能/不可能な *Ngly1*-KO マウスの表現型

第3回 ENGase 研究会, 2017

口頭発表

5. Haruhiko Fujihira et al

Physiological function of deglycosylating enzymes acting on N-glycans in mice

Frontier 2016 symposium, 2016

Oral presentation and poster presentation

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤平 陽彦 (FUJIHIRA Haruhiko)
順天堂大学・医学（系）研究科（大学院）
研究者番号：50721057

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()