

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291030

研究課題名(和文) 出芽酵母における糖タンパク質糖鎖代謝の分子機構の全容解明

研究課題名(英文) Clarification of molecular mechanism for the catabolism of glycans on glycoproteins in budding yeast

研究代表者

鈴木 匡 (Tadashi, Suzuki)

国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90345265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母における糖タンパク質糖鎖の代謝機構を明らかにすることを旨として研究を行った。糖タンパク質のN型糖鎖については、細胞質のPNGaseに非依存的な遊離N型糖鎖生成がオリゴ糖転移酵素によって担われることを明らかにした。また代謝に関わる α -グルコシダーゼ、 β -マンノシダーゼ、 β -ヘキソサミニダーゼは存在しなかった。また糖タンパク質の代謝に関わるPNGaseの内在性の基質候補タンパク質、およびモデル糖タンパク質を複数明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at clarifying the catabolic mechanism of glycans on glycoproteins in budding yeast. We found that the cytosolic PNGase-independent formation of free N-glycans were mediated by oligosaccharyltransferase. We also found lack of evidence for the occurrence of catabolic α -glucosidase/ β -mannosidase/ β -hexosaminidase in this yeast. We also identified several endogenous substrate for the cytoplasmic PNGase involved in the catabolism of glycoproteins.

研究分野：糖鎖生化学

キーワード：糖鎖代謝 出芽酵母 N型糖鎖 PNGase オリゴ糖転移酵素

1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾はタンパク質の最も普遍的な翻訳後修飾の一つであり、その修飾はタンパク質の安定性や生理機能に重要な役割を果たす例は枚挙に暇がない。哺乳動物や出芽酵母において、糖タンパク質上の糖鎖がどのように合成されるのか、その分子機構はほぼ解明されたといってもよい。一方で、興味深いことにそれらの糖鎖がどのように分解されるのかに関してはこの“ポストゲノム”と称される現在においても不明な点が多く存在していた。

2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母における糖タンパク質糖鎖の代謝機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

出芽酵母を用いた遺伝学的手法(各変異株の解析)・生化学的手法(糖タンパク質糖鎖、および遊離糖鎖の単離、解析)を駆使して、(1)糖タンパク質 N 型糖鎖の代謝、(2)糖タンパク質 O 型糖鎖の代謝の解明を目指した。また、細胞質 PNGase によって変性糖タンパク質が分解されるプロセスについて解析を行った。

4. 研究成果

糖タンパク質の N 型糖鎖については、(1) PNGase 非依存的な遊離 N 型糖鎖生成がオリゴ糖転移酵素によって担われること(Harada, et al., JBC 2013)、(2)糖鎖の代謝産物、Manbeta1-4GlcNAcbeta1-4GlcNAc の代謝酵素は存在しないこと(Hossain, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2016)(3)N 型糖鎖の生合成中間体に存在する alphaGlc は小胞体のプロセシング酵素以外の代謝酵素が存在しないこと(Hossain, et al., PLoS One, 2016)などを明らかにした。O 型糖鎖の代謝については、新規な代謝機構の存在を示唆するデータが得られているが、その分子機構は現在も不明で鋭意解析中である。また、細胞質 PNGase が小胞体関連分解で汎用されるモデル基質である CPY*という変性タンパク質の糖鎖に作用することを明らかにした(Hosomi and Suzuki, Biochem. Biophys. Acta, 2015)。また PNGase に対する内在性の基質候補タンパク質を細胞質に蓄積する糖タンパク質のプロテオミクス解析によって明らかにした(Hosomi, et al., Biochem. J. 2016)。

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 7件)

1. A. Hosomi, M. Fujita, A. Tomioka, H. Kaji and T. Suzuki (2016) Identification of PNGase-dependent ERAD substrates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **473**, 3001-3012. (査読有)
2. T. J. Hossain, Y. Harada, H. Hirayama, H. Tomotake, A. Seko and T. Suzuki (2016) Structural analysis of free N-glycans in α -glucosidase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Lack of the evidence for the occurrence of catabolic α -glucosidase acting on the N-glycans. *PLoS One* **11**, e0151891. (査読有)
3. T. J. Hossain, H. Hirayama, Y. Harada and T. Suzuki (2016) Lack of the evidence for the enzymatic catabolism of Man1GlcNAc2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 152-157. (査読有)
4. H. Hirayama, A. Hosomi and T. Suzuki (2015) Physiological and molecular function of the cytoplasmic peptide:N-glycanase. *Sem. Cell Dev. Biol.* **41**, 110-120. (査読有)
5. A. Hosomi and T. Suzuki (2015) Cytoplasmic peptide:N-glycanase removes N-glycans on a carboxypeptidase mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 612-619. (査読有)
6. T. Suzuki and Y. Harada (2014) Non-lysosomal degradation pathway for N-linked glycans and dolichol linked oligosaccharides *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 213-219. (査読有)
7. Y. Harada, R. Buser, E. M. Ngwa, H. Hirayama, M. Aebi, and T. Suzuki (2013) Eukaryotic oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* **288**, 32673-32684 (査読有)。

[学会発表](計 30件)

1. Tadashi Suzuki and Hiroto Hirayama Functional analysis of the generation of novel forms of free-glycans. 5th RIKEN-MPG Joint Symposium on Chemical Biology at Berlin, 2016年4月18日
2. Tadashi Suzuki Catabolism of N-glycans in *S. cerevisiae*. Yeast meeting, Seoul National University at Seoul (Korea), 2015年11月25日
3. 細見 昭、飯田 和子、飯田 秀利、鈴木 匡 酵母におけるシグナルペプチド非依存的な小胞体へのタンパク質輸送 BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会) 合同大会 2015年12月2日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

4. 平山 弘人 鈴木 匡 O-結合型糖鎖様構造を持つ遊離糖鎖とその機能について BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会) 合同大会 2015 年 12 月 1 日(口頭発表 2015 年 12 月 1 日)神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
5. Tanim Jabid Hossain, 平山弘人、原田陽一郎、鈴木 匡 出芽酵母における N 型糖鎖代謝機構の解析 第 48 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 2015 年 9 月 2 日 広島大学(広島県東広島市)
6. 細見 昭、飯田和子、飯田秀利、鈴木 匡 シグナルペプチド非依存的な小胞体へのタンパク質輸送 第 48 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 2015 年 8 月 31 日 広島大学(広島県東広島市)
7. 細見 昭、梶 裕之、鈴木 匡 糖ペプチド解析による新規 ERAD 基質糖タンパク質の探索 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 28 日 岡山大学(岡山県岡山市)
8. 細見 昭、鈴木 匡 ERAD で機能するエンドペプチダーゼの解析 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 27 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
9. Tanim Jabid Hossain, Hiroto Hirayama, Yoichiro Harada and Tadashi Suzuki. Analysis of the catabolic pathway of N-glycans in *S. cerevisiae*. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
10. Tanim Jabid Hossain, Hiroto Hirayama, Yoichiro Harada and Tadashi Suzuki. Analysis of the catabolic pathway of N-glycans in *S. cerevisiae*. GlycoTOKYO2014 2014 年 11 月 8 日千葉大学(千葉県柏市)
11. 原田 陽一郎、鈴木 匡 オリゴ糖転移酵素による遊離糖鎖の生成 第 47 回酵母遺伝学フォーラム 2014 年 9 月 1 日 東京大学(東京都文京区)
12. 細見 昭、鈴木 匡 酵母におけるシグナルペプチド非依存的タンパク質輸送経路 第 47 回酵母遺伝学フォーラム 2014 年 9 月 1 日 東京大学(東京都文京区)
13. 平山 弘人、鈴木 匡 遊離糖鎖生成に関わる新規因子の探索 第 47 回酵母遺伝学フォーラム 2014 年 9 月 1 日 東京大学(東京都文京区)
14. Yoichiro Harada and Tadashi Suzuki Role of oligosaccharyltransferase on PNGase-independent release of free oligosaccharides. GlycoT2014, Porto (Portugal), 2014 年 6 月 20 日
15. 鈴木 匡 出芽酵母における糖鎖の代謝機構-我々は何を知っているのか?? -Interdisciplinary Symposium on Advanced Biology and Biotechnology 2013 年 12 月 13 日 産業技術総合研究所(茨城県つくば市)
16. 細見 昭、鈴木 匡 ERAD におけるエンドペプチダーゼ活性の解析 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 5 日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
17. Tadashi Suzuki Non-lysosomal degradation pathway for N-glycans; cases in yeast and mammalian cells. Annual Conference of the Society for Glycobiology at St. Petersburg, FL, 2013 年 11 月 18 日
18. Tadashi Suzuki Exploring the catabolism of glycans in *Saccharomyces cerevisiae*. 2013 International Glycoforum at Wuxi (China), 2013 年 9 月 17 日 (Plenary Lecture)
19. 細見 昭、鈴木 匡 ERAD におけるエンドペプチダーゼの解析 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
20. 平山弘人、鈴木 匡 出芽酵母の生成する遊離糖鎖とその機能について 第 86 回日本生化学会大会(招待講演:平山弘人) 2013 年 9 月 12 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
21. 平山 弘人、鈴木 匡 出芽酵母の遊離糖鎖生成とその調節について 第 46 回酵母遺伝学フォーラム 2013 年 9 月 9 日 東北学院大学(宮城県仙台市)
22. 細見 昭、鈴木 匡 ERAD モデルタンパク質 RTA の液胞による分解 第 46 回酵母遺伝学フォーラム 2013 年 9 月 8 日 東北学院大学(宮城県仙台市)
23. 平山弘人、鈴木 匡 出芽酵母の O-結合型糖鎖様構造を持つ遊離糖鎖とその機能について 第 32 回日本糖質学会年会 2013 年 8 月 7 日 大阪交流国際センター(大阪府大阪市)
24. 細見 昭、梶 裕之、鈴木 匡 糖ペプチド解析による新規 ERAD 基質糖タンパク質の探索 第 32 回日本糖質学会年会 2013 年 8 月 7 日 大阪交流国際センター(大阪府大阪市)
25. Akira Hosomi, and Tadashi Suzuki Analysis of endopeptidase reactions involved in ERAD. The 3rd Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology at Wako, 2013 年 7 月 2 日 理化学研究所(埼玉県和光市)
26. Hiroto Hirayama and Tadashi Suzuki Discovery of the novel type of free glycans in *Saccharomyces cerevisiae*. The 3rd Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology at Wako, 2013 年 7 月 2 日 理化学研究所(埼玉県和光市)

27. Tadashi Suzuki Exploring the “life” of N-glycans on glycoproteins. 22nd International Symposium on Glycoconjugates at Dalian (China) 2013年6月28日(Selected for oral presentation)
28. Akira Hosomi and Tadashi Suzuki Analysis of endopeptidase reactions involved in ERAD. *RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology The Second Symposium* at Wako, 2013年4月16日 理化学研究所(埼玉県和光市)
29. Hiroto Hirayama and Tadashi Suzuki Discovery of the novel type of free glycans in *Saccharomyces cerevisiae*. *RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology The Second Symposium* at Wako, 2013年4月16日 理化学研究所(埼玉県和光市)
30. Yoichiro Harada, and Tadashi Suzuki Yeast oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation. *RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology The Second Symposium* at Wako, 2013年4月16日 理化学研究所(埼玉県和光市)

〔図書〕(計 4件)

1. Nobuko Hosokawa and Tadashi Suzuki (2015) N-glycans and quality control of proteins. Sugar Chains (T. Suzuki, K. Ohtsubo and N. Taniguchi eds.) Springer, pp1-20.
2. Yoichiro Harada and Tadashi Suzuki (2014) OST complex (OST48, Ribophorin I, Ribophorin II, DAD1) In “Handbook of glycosyltransferases and related genes. 2nd Edition” (N. Taniguchi, K. Honke, M. Fukuda, H. Narimatsu, Y. Yamaguchi, T. Angata eds.) Springer, Vol. 3, pp. 1255-1272.
3. Hiroto Hirayama and Tadashi Suzuki (2014) GDP-mannose pyrophosphorylase A, B (GMPPA,B) Handbook of glycosyltransferases and related genes (N. Taniguchi, K. Honke, M. Fukuda, H. Narimatsu, Y. Yamaguchi, T. Angata eds.). Vol. 3, pp. 1599-1606.
4. Tadashi Suzuki (2014) Free oligosaccharides (high mannose type free glycans found in mammals and yeast) Glycoscience: Biology and Medicine. (N. Taniguchi, T. Endo, G. W. Hart, P. Seeberger, C-H. Wong eds.) Vol. 2, pp 907-911

〔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
 鈴木 匡 (SUZUKI Tadashi) 国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90345265

(2)研究分担者
 ()

研究者番号：

(3)連携研究者
 原田 陽一郎 (HARADA Yoichiro) 国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・特別研究員

研究者番号：80464147 (H25-26)

平山 弘人 (HIRAYAMA Hiroto) 国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・協力研究員

研究者番号：50525847 (H25-28)

(4)研究協力者
 ()