

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650040

研究課題名(和文)小胞体内腔で生成する遊離糖鎖の代謝機構の解明

研究課題名(英文)Studies on metabolic pathway of free oligosaccharides generated in the ER lumen

## 研究代表者

原田 陽一郎(Harada, Yoichiro)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任准教授

研究者番号：80464147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母には、小胞体内腔でオリゴ糖転移酵素がドリコールオリゴ糖を分解して遊離糖鎖を生成する経路が存在する。小胞体内腔で生成した遊離糖鎖は何らかの機構によって細胞質に輸送され、細胞質/液胞マンノシダーゼの作用によって代謝されることがわかっていたが、遊離糖鎖の代謝に関する分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では遊離糖鎖の代謝に関与する遺伝子を同定するため、出芽酵母の非必須遺伝子破壊株コレクションを用い、遊離糖鎖の代謝異常を示す遺伝子を探索したところ、HRD1欠損株で遊離糖鎖の量が2倍に増加することが明らかとなった。この結果はHRD1が遊離糖鎖の代謝に関与することを強く示唆している。

研究成果の概要(英文)：In budding yeast, oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides (fOSs) by degrading dolichol-linked oligosaccharides in the lumen of the endoplasmic reticulum. Although it has been known that fOSs are transported into the cytosol and catabolized by the cytosol/vacuolar mannosidase, the molecular mechanism underlying the fOS catabolism remains largely elusive. Here we used non-essential gene knockout collection of budding yeast to screen genes involved in fOS catabolism and found that the knockout of HRD1 results in the two-fold increase in the amounts of fOSs. This result strongly indicate that HRD1 is involved in the catabolism of fOSs.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：小胞体 アスパラギン結合型糖鎖 遊離糖鎖 代謝 輸送

1. 研究開始当初の背景

アスパラギン (N) 結合型糖鎖修飾は、小胞体内腔で合成されて細胞外へ分泌されるタンパク質の最も主要な翻訳後修飾の1つで、タンパク質の立体構造の形成、分解および細胞内輸送など、様々な細胞機能を制御する。これまでに私は、N型糖鎖修飾を触媒する酵素であるオリゴ糖転移酵素 (OST) (原田ら、(2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) およびドリコールオリゴ糖の代謝 (原田ら、(2013a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 原田ら、(2013b) *J. Biol. Chem.*) に関する研究を行ってきた。最近、私は、出芽酵母を用いた研究から、OST が N 型糖鎖の前駆体であるドリコールオリゴ糖を加水分解し、小胞体内腔で遊離型の糖鎖 (遊離糖鎖) を生成することを見いだした (原田ら、(2013b) *J. Biol. Chem.*)。この研究の過程において、私は、小胞体内腔で生成した遊離糖鎖が細胞内で代謝されることを発見した。興味深いことに、小胞体内腔で生成した遊離糖鎖は細胞質へと輸送され、Ams1 ( $\alpha$ -マンノシダーゼ) と呼ばれる糖加水分解酵素によって分解されることが分かった。しかし、遊離糖鎖がどのように小胞体内腔から細胞質へ輸送されるのか、その分子機構は全く分かっていない。1995 年にフランスのグループによって、哺乳動物細胞の小胞体膜に遊離糖鎖を輸送する機構が存在することが報告されている [1] が、この輸送経路に関わる分子も未同定のままである。

2. 研究の目的

本研究では、小胞体内腔で生成する遊離糖鎖の代謝に関わる因子を同定し、その分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

小胞体内腔で生成した遊離糖鎖の代謝に関わる分子機構を解明するためには、遊離糖鎖の小胞体-細胞質間輸送に関わる因子の同定が必須である。本提案では、出芽酵母の遺伝学および生化学的手法を駆使し、遊離糖鎖の輸送に関わる因子を同定する。

(1) **出芽酵母遺伝子データベース (SGD) から小胞体に関連する遺伝子の抽出**：小胞体に関連した遺伝子を SGD から抽出した。具体的には、Saccharomyces cerevisiae genome database

(<http://www.yeastgenome.org>) からシグナルペプチドまたは膜貫通領域を持つと予想される遺伝子をバイオインフォマティクスの手法により抽出した。

(2) **小胞体関連遺伝子の欠損変異株の作製**：PCR を利用した簡便な遺伝子破壊法を用いて、小胞体関連遺伝子の欠損変異株を作製した。具体的には、我々の研究室で保有する出芽酵

母の非必須遺伝子破壊株のコレクション (Open Biosystems から購入) から (1) で抽出した遺伝子の破壊株をピックアップした。これらの変異株に対し、OST とは別の、遊離糖鎖を生成する酵素 (Png1) を Code する遺伝子 PNG1 をノックアウトし、二重破壊株を作製した (詳細な方法は <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9717241> の論文を参照)。

(3) **遊離糖鎖および表現型の解析**：高速液体クロマトグラフィーを用いて、遊離糖鎖の量と構造に影響を及ぼす遺伝子欠損変異株を同定し、その表現型を解析した。(2) で作製した二重破壊株を培養後、菌体を 70% エタノールで抽出し、その上清から遊離糖鎖を、グラファイトカーボンカラムを用いて精製した。精製した遊離糖鎖を 2-アミノピリジンで蛍光標識後 (詳細な方法は <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150426> の論文を参照)、サイズ分画 HPLC で遊離糖鎖を分離、定量した。

4. 研究成果

(1) **出芽酵母遺伝子データベース (SGD) から小胞体に関連する遺伝子の抽出**

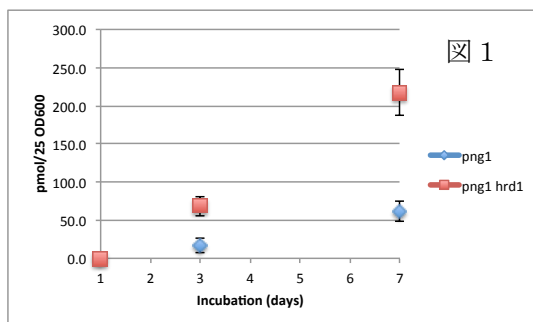
SGD に登録されている遺伝子情報から、「小胞体」というキーワードを用いて、約 330 個の機能未知の非必須遺伝子をピックアップした。

(2) **小胞体関連遺伝子の欠損変異株の作製**

我々の研究室が保有する出芽酵母の非必須遺伝子破壊コレクションを用い、上でピックアップした候補遺伝子のうち、約 300 株について、OST 非依存的な遊離糖鎖の生成酵素 (PNG1) との二重破壊株を作成した。

(3) **遊離糖鎖および表現型の解析**：

上で作成した二重破壊株から遊離糖鎖を精製後、蛍光標識し、順相 HPLC で定量した。まず親株である png1 破壊株では、Man1GlcNAc2 のスタンダードと溶出位置が一致するピークが検出された。二重破壊株の遊離糖鎖の解析の結果、すべての破壊株において Man1GlcNAc2 が主要な遊離糖鎖とし



て検出された。興味深いことに、HRD1 と PNG1 の二重破壊株において、Man1GlcNAc2の量が2倍に増加した(図1)。このことは、HRD1が小胞体内腔で精製した遊離糖鎖の代謝に関与することを強く示唆している。

Hrd1は小胞体関連分解の鍵となるタンパク質で、小胞体内腔で生成した異常な糖タンパク質を細胞質に輸送するレトロトランスロコンの候補分子である。糖タンパク質が小胞体膜を隔てて輸送される際、糖鎖は巨大であるため、レトロトランスロコンのポアは非常に大きいと考えられる。今回、Hrd1が遊離糖鎖の代謝に関与することが明らかとなったことから、今後、Hrd1が媒介する糖タンパク質の輸送のメカニズムの解明の一助になるかもしれない。

#### 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 8 件、全て査読あり)

- (1) Harada, Y., Huang, C., Yamaki, S., Dohmae, N., and Suzuki, T. (2016) Non-lysosomal degradation of singly phosphorylated oligosaccharides initiated by the action of a cytosolic endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. *J. Biol. Chem.* in press. doi:10.1074/jbc.M115.685313
- (2) Harada, Y. (2016) "Biosynthesis and Degradation of Dolichol-Linked Oligosaccharides" *Trends in Glycosci. Glycotechnol.* DOI:10.4052/tigg.1512.1.
- (3) Hossain, T.J., Harada, Y., Hirayama, H., Tomotake, H., Seko, A., Suzuki, T. (2016) "Structural Analysis of Free N-Glycans in  $\alpha$ -Glucosidase Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: Lack of the Evidence for the Occurrence of Catabolic  $\alpha$ -Glucosidase Acting on the N-Glycans." *PLoS One* 11:e0151891
- (4) Harada, Y., Hirayama, H., and Suzuki, T. (2015) "Generation and degradation of free asparagine-linked glycans." *Cell. Mol. Life Sci.* 72:2509-2533.
- (5) Harada, Y., Masahara-Negishi, Y., and Suzuki, T. (2015) Cytosolic free oligosaccharides are predominantly generated by the degradation of dolichol-linked oligosaccharides in mammalian cells. *Glycobiology* 25:1196-1205.
- (6) Chengcheng, H., Harada, Y., Hosomi, A., Masahara-Negishi, Y., Seino J., Fujihira,

H., Funakoshi, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., and Suzuki, T. "Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase forms N-GlcNAc protein aggregates during ER-associated degradation in Ngly1-defective cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:1398-1403, (2015).

- (7) Harada, Y., Sato, C., and Kitajima, K. "Sulfatide-hsp70 interaction promotes hsp70 clustering and stabilizes binding to unfolded protein." *Biomolecules* 5:958-973, (2015).
- (8) Hossain, T. J., Hirayama, H., Harada, Y., and Suzuki, T. "Lack of the evidence for the enzymatic catabolism of Man1GlcNAc2 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80:152-157, (2015).

[学会発表] (計 7 件)

1. 原田 陽一郎、丸山 征郎 "エクソソーム表面糖鎖の機能の解明を目指した基礎的研究" 第34回日本糖質学会、東京大学、東京都文京区、2015年8月2日。ポスター発表
2. 原田 陽一郎、鈴木健裕、堂前直、丸山征郎 "がんエクソソームの骨髄輸送における糖鎖の機能解明に向けた基礎的研究" 第87回日本生化学会大会、京都国際会館、京都府京都市、2015年12月1日。口頭発表
3. 原田 陽一郎、鈴木 匡 "グルコース飢餓によって誘導されるドリコールオリゴ糖の未成熟分解の発見とその分子機構の解明に向けて" 第33回日本糖質学会、名古屋大学、愛知県名古屋市、2014年8月11日。ポスター発表
4. Harada, Y., Masahara-Negishi, Y. and Suzuki, T. "PNGase-independent formation of free oligosaccharides is predominant in mammalian cells" 2014

**SFG & JSCR Joint Meeting, Satellite Symposium II, Glycans in Neuroscience,** Hawaii, USA, 2014年11月16日 ポスター発表

5. **Harada, Y.,** Nakajima, K., Masahara-Negishi, Y., Freeze, H. H., Angata, T., Taniguchi, N. and Suzuki, T. “Metabolically programmed quality control system for dolichol-linked oligosaccharides” **2014 SFG & JSCR Joint Meeting,** Hawaii, USA, 2014年11月16日 ポスター発表
6. **Harada, Y.,** Nakajima, K., Masahara-Negishi, Y., Freeze, H. H., Angata, T., Taniguchi, N. and Suzuki, T. “Metabolically programmed quality control system for dolichol-linked oligosaccharides” **2014 SFG & JSCR Joint Meeting, Satellite Symposium IV, New Vistas in Glycoscience; Challenges for Junior Scientists,** Hawaii, USA, 2014年11月16日 **(Invited talk)**
7. **Harada, Y.** and Suzuki, T. “Degradation of aberrant dolichol-linked oligosaccharides by a putative pyrophosphatase” Symposium (Glycobiology in the endoplasmic reticulum - Do we know it all yet?) **The 87<sup>th</sup> Annual Meeting for the Japanese Biochemical Society,** Kyoto international conference center, Kyoto-city, Kyoto-fu, Japan, 2014年10月15日. **(Invited talk)**

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 陽一郎 (Yoichiro Harada)

鹿児島大学 医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：80464147