

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02926

研究課題名(和文)細胞質の糖鎖除去不全が生体に異常を引き起こす分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism how deficiency of deglycosylation in the cytosol causes abnormalities in organism.

研究代表者

吉田 雪子(YOSHIDA, Yukiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：90271543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：NGLY1は細胞質で糖タンパク質からN型糖鎖を除去する酵素である。その変異は全身性の重篤な疾患NGLY1欠損症を引き起こし、Ngly1-KOマウスは胚性致死となる。私達は、ユビキチンリガーゼの糖鎖認識サブユニットFbs2を同時に欠損させると、Ngly1-KOマウスの胚性致死性を回避し正常に生育することを見出した。NGLY1-KO細胞においても、Fbs2の発現は細胞死を引き起こした。Fbs2によりユビキチン化された糖タンパク質型転写因子Nrf1は細胞質に蓄積し、プロテアソームの転写誘導活性を失うだけでなく、さらにプロテアソームの機能不全を誘導し、細胞死の原因となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの多細胞生物において、細胞質でN型糖鎖を除去する酵素NGLY1遺伝子の不活化変異は様々な不具合を生じることが、その機序は不明であった。今回の研究成果は、細胞質における2つのN型糖鎖関連タンパク質NGLY1とFbs2の遺伝的相互作用に着目し、細胞質でNGLY1により糖鎖が除去されない場合にどのように個体に異常を引き起こすのか、その分子機構を明確に示した。また、Fbs2がこれまで治療法のなかったヒト希少疾患NGLY1欠損症の有望な治療ターゲットとなり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：Peptide:N-glycanase (NGLY1) is responsible for removing N-glycans from glycoprotein in the cytosol. Mutations in the human NGLY1 gene cause multisystemic symptoms, but the molecular mechanism underlying pathogenesis remains unknown. In mice, Ngly1 knockout (KO) is embryonic lethal. We found that deletion of Fbs2, which encodes a SCF-type ubiquitin ligase subunit that recognizes N-glycans, rescued the lethality and progressive defects in Ngly1-KO mice. In NGLY1-KO cells, Fbs2 expression caused cytotoxicity. Nrf1, an endoplasmic reticulum-associated transcriptional factor for the proteasome, was ubiquitinated by SCFFbs2 in NGLY1-KO cells, resulting in its retention in the cytosol. The cytotoxicity caused by Fbs2 expression was restored by overexpression of glycan-less Nrf1 mutations, or by the deletion of Nrf1 in NGLY1-KO cells. Thus, the proteasome dysfunction caused by accumulation of NRF1 ubiquitinated by SCFFbs2 causes cytotoxicity in NGLY1 deficiency.

研究分野：分子生物学

キーワード：NGLY1 F-boxタンパク質 ユビキチンリガーゼ 糖鎖 タンパク質品質管理 プロテアソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質の多様な糖鎖は、小胞体やゴルジ体における多くの酵素の働きにより形成される。糖タンパク質はその生合成経路から、分泌経路のオルガネラ内腔もしくは細胞外にのみ存在するものと考えられる。しかし、糖鎖の存在しないはずの細胞質にもいくつかの糖鎖結合タンパク質（レクチン）や糖鎖除去酵素が存在する。研究代表者らは、2002年に細胞質に存在するアスパラギン結合型糖鎖（N型糖鎖）を認識するSCF複合体型ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットFbs1（F-box protein recognizing sugar chain 1）を見出して以来、3つの糖鎖認識F-boxタンパク質「Fbs1, Fbs2, Fbs3」に関して研究を進め、「細胞質に現れたN型糖鎖は、除去されるべきタンパク質やオルガネラにおける異常シグナルとして機能する」ことを提唱している（Yoshida & Tanaka, BioEssays 2018）。中でもFbs1とFbs2は小胞体で正しい構造がとれなかった糖タンパク質が細胞質へ逆行輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系により分解される「小胞体関連分解(ERAD)」に関与することを、ERADのモデル基質を用いた解析により明らかとしてきた。Fbs1は神経細胞特異的発現を示すのに対し、Fbs2は組織普遍的に発現するが、これらの遺伝子欠失マウスは顕著な表現型を示さず、生理機能については不明な点が多かった。

一方で、糖タンパク質からN型糖鎖を切り離す酵素NGLY1もまた細胞質に存在する。NGLY1はERADにおいてユビキチン化された基質がプロテアソームにより分解される前に必要な糖鎖除去酵素と考えられている。最近、NGLY1の変異に起因し、筋肉・神経系・目・骨など全身に重篤な症状を呈する稀少疾患「NGLY1欠損症」が報告された(Enns et al, Genet Med 2014)。NGLY1欠損という細胞質における糖鎖除去不全が何故このような病態を引き起こすのかその機構は不明であり、治療法も確立されていない。

NGLY1欠損症の報告以来、研究は大きく進展した。NGLY1はERAD基質全般においてプロテアソーム分解の前に糖鎖除去を行うが、それとは別に、プロテアソームの転写因子Nrf1の活性化に寄与することが報告された(Tomlin et al, ACS Cent Sci 2017; Owings, et al, Hum Mol Genet 2018; Yang et al J Exp Med 2018)。Nrf1は小胞体に局在し、常にERADにより分解を受ける糖タンパク質である。プロテアソームが不活化された場合のみ、分解を受けず核に移行しプロテアソームの転写誘導を行う。その際、NGLY1による糖鎖除去とユビキチン結合型タンパク質DDI2によるプロセッシングがNrf1の転写活性に必須であることが報告されている(Koizumi et al eLife 2016, Lehrbach et al eLife 2016)。また、NGLY1欠損症のモデル動物として*Ngly1*ノックアウトマウスが作出されているが、研究室で汎用されるB6系統のマウスにおいては胚性致死となる(Fujihira et al Plos Genet 2017)。

研究代表者らは、*Fbs2*ノックアウトマウスとの掛け合わせにより、*Ngly1*ノックアウトマウスの胎生致死性が完全に抑制され、成長した*Ngly1;Fbs2*二重ノックアウトマウスは運動機能も正常で異常な表現型は観察されないことを見出した。この表現型から、細胞質における糖鎖除去不全により引き起こされるマウスの致死性、さらにはヒトでの重篤な症状はFbs2により引き起こされる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、細胞質におけるN型糖鎖除去システムの破綻がFbs2依存的にマウスの致死性を引き起こす分子機構を解明することを目的とする。

そのために、*NGLY1* ノックアウト細胞における Fbs2 の標的分子の解析や Fbs2 の発現が *NGLY1* ノックアウト細胞に与える影響などを詳細に解析する。そこから得られた知見を基に *Ngly1* ノックアウトマウスにおいて致死性を与える機構の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 によりいくつかの培養細胞で *NGLY1* ノックアウト (KO) 細胞、*NGLY1:Fbs2*-dKO 細胞を作製する。これらの細胞におけるユビキチン化糖タンパク質の蓄積や、特定の ERAD 基質の解析を行う。

(2) *NGLY1*-KO 細胞において、Fbs2 の発現の有無による細胞増殖速度や細胞の健康度 (ミトコンドリアの形態や ER ストレスの有無) を解析する。

(3) *NGLY1*-KO 細胞においてユビキチン化タンパク質の蓄積が見られた場合、プロテアソーム活性に変化がないか、プロテアソーム活性をモニターする系を作成し検討する。

(4) *Ngly1*-KO マウスは胚性致死のため、*Ngly1*-KO と *Ngly1:Fbs2*-dKO の胎生期マウスによるユビキチン化タンパク質の蓄積の有無を全身において比較する。さらに、培養細胞で同定された Fbs2 の標的糖タンパク質の蓄積の有無についても検討する。

4. 研究成果

(1) 作製した *NGLY1*-KO HeLa 細胞を用いて、Fbs2 と Fbs2 の糖鎖結合ができない変異体 (YW 変異体) を恒常的に発現させた細胞を樹立し、*NGLY1* の基質として報告のある Nrf1 のユビキチン化を解析した。その結果、通常はプロテアソーム阻害剤添加時のみに僅かに見られる Nrf1 のユビキチン化が阻害剤なしでも見られた。また、プロテアソーム活性阻害時に見られる Nrf1 の核移行も Fbs2 の発現により、完全に阻害を受け、ユビキチン化 Nrf1 の細胞質への蓄積が見られた。さらに、*NGLY1*-KO 細胞に Fbs2 を発現させることで、Nrf1 のみならず、糖タンパク質以外にもユビキチン化タンパク質がプロテアソーム阻害剤なしでも蓄積することが判明した。

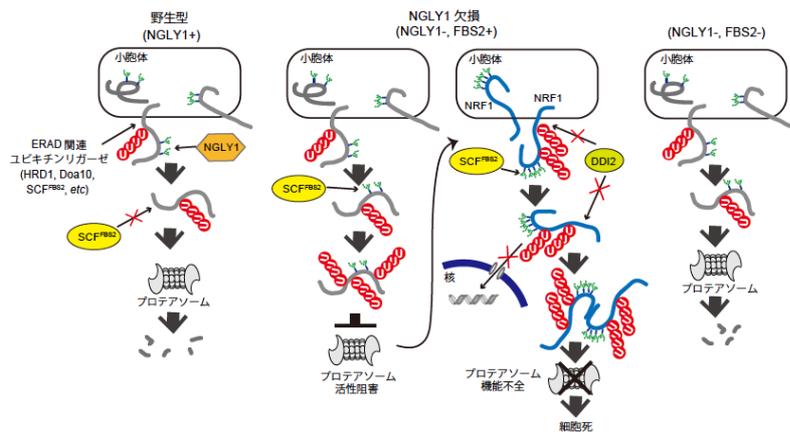
(2) HeLa 細胞では Fbs2 タンパク質の発現が認められないが、HCT116 細胞では発現している。HCT116 細胞においては *NGLY1*-KO 細胞は樹立できず、*NGLY1:Fbs2*-dKO 細胞のみが樹立することができた。また、樹立した Fbs2 発現 *NGLY1*-KO HeLa 細胞はほとんど増殖できないため、維持することができなかった。*NGLY1*-KO 細胞に Fbs2 と糖鎖結合できない YW 変異体、SCF ユビキチンリガーゼ複合体を形成できない LP 変異体をそれぞれ発現させ、コロニー形成能を調べたところ、野生型の Fbs2 を発現させたときのみコロニー形成ができなかった。すなわち、*NGLY1*-KO 細胞における Fbs2 の発現は何らかの糖タンパク質をユビキチン化することで、培養細胞レベルでも細胞に異常を引き起こすことが判明した。

(3) (1) に述べたように、*NGLY1*-KO 細胞に Fbs2 を発現させるとユビキチン化タンパク質が蓄積し、また、多くの短寿命タンパク質が細胞内に蓄積したため、プロテアソーム活性への影響が考えられた。そこでプロテアソームに常に分解される蛍光タンパク質 UbG76V-GFP (Dantuma et al, Nat Biotechnol, 2000) を恒常的に発現する *NGLY1*-KO 細胞を樹立した。この細胞においてはプロテアソーム活性が阻害されたときのみ蛍光が生じる。この細胞に野生型の Fbs2 を発現させると強い蛍光が検出されたことからプロテアソームの阻害が確認された。さらに、細胞抽出液のプロテアソーム活性を測定した場合にも活性の減弱が認められた。

(4) 本研究を行っている最中に、Nrf1 の糖鎖の付いたアスパラギンが *NGLY1* により糖鎖除去と共にアスパラギン酸に変化することが Nrf1 によるプロテアソームの活性化に必要であるとい

う論文が報告された (Lehrbach et al Cell 2019)。そこで、*NGLY1*-KO HeLa 細胞に Fbs2 と共にプロテアソーム活性を誘導すると考えられる Nrf1 の糖鎖付加アスパラギンをすべてアスパラギンに置換した Nrf19N/D 変異体を発現させた細胞でコロニー形成能を調べた。予想通り、プロテアソーム活性が回復して Fbs2 を発現させてもコロニーの形成が完全に回復した。さらに、Nrf1 の糖鎖付加部位を他の残基に置換した Nrf1 を Fbs2 と共に発現させたところ、プロテアソーム転写活性を持たない変異 (9N/A, 9N/Q) などに於いても、予想に反してコロニー形成の回復が認められた。これらの結果は、糖タンパク質 Nrf1 の Fbs2 によるユビキチン化そのものが細胞に毒性を有するのではないかと考えられた。そこで、*Nrf1*;*NGLY1*-dKO 細胞を作製し、そこに Fbs2 を発現させたところ、コロニー形成が部分的に回復した。一方で、Fbs2 と共に Nrf1 を発現させるとコロニーを形成できないことが観察された。これらの結果より、SCF^{Fbs2} によりユビキチン化を受けた Nrf1 の細胞質への蓄積がプロテアソーム活性阻害を引き起こすが、SCF^{Fbs2} によりユビキチン化された Nrf1 は核移行できずにプロテアソーム活性が回復できない。さらに、恒常的なプロテアソーム活性不全が細胞死を誘導すること

が示唆された (右図参照)。



NGLY1 欠損において Fbs2 が細胞や個体にダメージを引き起こす分子機構

(5) 上記の培養細胞レベルの実験により、*NGLY1*-KO 細胞中で Fbs2 によるユビキチン化 Nrf1 の蓄積がプロテアソームの機能不全を引き起こすことが細胞毒性をもたらす可能性が認められたため、*Ngly1*-KO 胎生期マウスにユビキチン化 Nrf1 の蓄積があるかどうかを、タンパク質抽出液を用いたウエスタンブロッティングにより調べた。その結果、死亡が起こる前の胎生期 14 日目と 15 日目の KO マウスの胴体の抽出液に於いてヘテロや野生型マウスには見られないユビキチン化 Nrf1 の存在が確認された。また、この蓄積は同時期の *Ngly1*;*Fbs2*-dKO マウスでは認められなかった。以上の結果は、SCF^{Fbs2} によるユビキチン化 Nrf1 の蓄積が個体においても異常をもたらすことを示唆するものである。

(6) *NGLY1* の存在しない条件で Fbs2 がユビキチン化を起こす糖タンパク質が Nrf1 以外にもあると考え、野生型細胞と *NGLY1*-KO 細胞にそれぞれ Fbs2 を発現させたときの網羅的ユビキチン化タンパク質の解析を行った。予想外のことに、糖タンパク質のみならず、多様なタンパク質のユビキチン化が亢進していることが判明したが、これはプロテアソーム活性が阻害されているためと考えられる。今後は、Fbs2 によるユビキチン化 Nrf1 もしくは Fbs2 の発現そのものがどのようにプロテアソーム活性を阻害するのか、その機構について詳細に解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yukiko Yoshida	4. 巻 2132
2. 論文標題 Lectin-Type Ubiquitin Ligase Subunits: Fbs Proteins and Their Applications for Use	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 215-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0430-4_22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Osamu Nakabayashi, Hirotaka Takahashi, Kenta Moriwaki, Sachiko Komazawa-Sakon, Fumiaki Ohtake, Shin Murai, Yuichi Tsuchiya, Yuki Koyahara, Yasushi Saeki, Yukiko Yoshida, Soh Yamazak, Fuminori Tokunaga, Tatsuya Sawasaki, Hiroyasu Nakano	4. 巻 4
2. 論文標題 MIND bomb 2 prevents RIPK1 kinase activity-dependent and -independent apoptosis through ubiquitylation of cFLIPL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun.Biol.	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01603-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yukiko Yoshida, Tsunehiro Mizushima, Keiji Tanaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Sugar-recognizing ubiquitin ligases: Action mechanisms and physiology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Physiol	6. 最初と最後の頁 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2019.00104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yukiko Yoshida, Yasushi Saeki, Hikaru Tsuchiya, and Keiji Tanaka.	4. 巻 618
2. 論文標題 Detection of ubiquitination activity and identification of ubiquitinated substrates using TR-TUBE	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 135-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2018.12.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masato Higurashi, Tsuyoshi Maruyama, Yusuke Nogami, Fumihiro Ishikawa, Yukiko Yoshiea, Kazuhori Mori, Kenichi Fujita, Motoko Shibanuma.	4. 巻 389
2. 論文標題 High expression of FOXM1 critical for sustaining cell proliferation in mitochondrial DNA-less liver cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp. Cell Res.	6. 最初と最後の頁 11889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.202011889	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yukiko Yoshida, Makoto Asahina, Arisa Murakami, Junko Kawawaki, Meari Yoshida, Reiko Fujinawa, Kazuhiro Iwai, Ryuichi Tozawa, Noriyuki Matsuda, Keiji Tanaka, Tadashi Suzuki	4. 巻 118
2. 論文標題 Loss of peptide:N-glycanase causes proteasome dysfunction mediated by a sugar-recognizing ubiquitin ligase.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 e2102902118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2102902118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tadashi Suzuki, Yukiko Yoshida	4. 巻 171
2. 論文標題 Ever-expanding NGLY1 biology.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 141-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab134	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 吉田雪子
2. 発表標題 Functional genetic interaction between NGLY1 and a glycoprotein-specific F-box protein FBS2.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Yoshida
2. 発表標題 Loss of a lectin-type E3 ligase gene rescues the lethality and defects of NGLY-KO mice.
3. 学会等名 CIFAR Genetic Networks Program Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田雪子
2. 発表標題 Ngly1と糖鎖認識ユビキチンリガーゼSCFFbxo6のマウスにおける遺伝的相互作用
3. 学会等名 第38回日本糖質学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Yoshida
2. 発表標題 Functional genetic interaction between Ngly1 and a lectin-type ubiquitin ligase in mice
3. 学会等名 RIKEN-International Symposim 'Glyco-lipidologue Symposium' (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下大生、吉田雪子、松田憲之、田中啓二
2. 発表標題 プロテアソーム転写誘導因子NRF1の分解機構の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukiko Yoshida
2. 発表標題 SCFFBS2/FBX06 causes proteasome dysfunction in NGLY1 deficiency.
3. 学会等名 8thGlobal NGLY1 Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukiko Yoshida, Arisa Murakami, Junko Kawawaki, Meari Yoshida, Katsumata, Ryu, Masato Hasegawa
2. 発表標題 Ubiquitination of alpha-synuclein is not necessary for fibril formation and transmission in cultured cells.
3. 学会等名 PacifiChem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究内容紹介ページ http://www.igakuken.or.jp/protein/jpn/research/yoshida-team.html</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------