

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570148

研究課題名（和文） シアル酸を持つ遊離N型糖鎖の代謝におけるオートファジーの役割の解明

研究課題名（英文） Studies on a role of autophagy on the catabolism of sialylated oligosaccharides

研究代表者

鈴木 匡 (SUZUKI TADASHI)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖代謝学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90345265

## 研究成果の概要（和文）：

我々は正常なオートファジー欠損の *Atg5<sup>-/-</sup>* 細胞を用いて細胞内糖鎖を解析したところ、シアル酸を持つ遊離糖鎖が特異的に蓄積するのを見出した。そこでこの糖鎖がどのように生成し、オートファジーがこれらの糖鎖の代謝にどのように関与しているかを解析した。その結果、このオートファジー欠損による影響は基底オートファジーに依り、正常なオートファジーはこれらの蓄積を防ぐ役割を果たすことを明らかにした。また、リソソーム上のシアル酸トランスポーターであるシアリンがこの現象に関与していることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Previously, we showed that in *Atg5<sup>-/-</sup>* cells, sialyl oligosaccharides specifically accumulated in the cytosol. Accumulation of these glycans was observed under non-starved conditions, suggesting that non-induced, basal autophagy is essential for their catabolism. Interestingly, once accumulated in the cytosol, sialyl glycans cannot be efficiently catabolized by resumption of the autophagic process, suggesting that functional autophagy is important for preventing sialyl oligosaccharides from accumulating in the cytosol. Moreover, knockdown of sialin, a lysosomal transporter of sialic acids, resulted in a significant reduction of sialyl oligosaccharides, implying that autophagy affects the substrate specificity of this transporter. This study thus provides a surprising link between basal autophagy and catabolism of *N*-linked glycans.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：遊離糖鎖、オートファジー、シアル酸、糖鎖代謝、細胞質、リソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞質成分のタンパク質分解機構としてよく知られている。我々は細胞質に蓄積することが知られている遊離 N 型糖鎖の代謝にオートファジーが関わっているかどうかを調べるために、オートファジー欠損株に蓄積する遊離糖鎖の構造解析を行ったところ、驚いたことにシアル酸を持つ遊離糖鎖（シアリル遊離糖鎖）が特異的に蓄積することを見出した。

## 2. 研究の目的

これらの予備的データをもとに、本研究では、特にシアリル遊離糖鎖の(1)生成機構と(2)シアリル遊離糖鎖の細胞内輸送機構について、オートファジーの役割の詳細を解析することを目指した。

## 3. 研究の方法

細胞としてオートファゴソーム形成に必須な *Atg5* 遺伝子を欠損した細胞 (*Atg5*<sup>-/-</sup>)、および *Atg5*<sup>-/-</sup>細胞に Tet-off promoter 存在下で *Atg5* 遺伝子を組み込んだ m5-7 細胞を用いて遊離糖鎖の解析を行った。様々な薬剤処理、あるいは遺伝子の過剰発現、あるいはノックダウンの条件で、シアリル糖鎖およびコントロールとして遊離の中性糖鎖（高マンノース糖鎖）の量がどのように変動するかを調べるために、細胞質から蛍光標識した遊離糖鎖を HPLC 解析することによって定量した。

## 4. 研究成果

*Atg5*<sup>-/-</sup>細胞を用いて、シアリル化遊離糖鎖が特異的にこの細胞で蓄積していることを明らかにした。また、m5-7 細胞を用いて、シアリル糖鎖の蓄積が明らかに *Atg5* 遺伝子の発現によって抑えられることを確かめた。また様々な薬剤処理、またオートファジー経路の別の遺伝子に欠損を持つ細胞を用いた解析によって、オートファジー欠損とシアリル糖鎖の蓄積がリンクしていることを明らかにした。興味深いことに、飢餓によって誘導されるオートファジーではシアリル遊離糖鎖と高マンノース遊離糖鎖の代謝が同様に亢進されることが明らかになった。このことは飢餓誘導オートファジーによっておこる細胞質の遊離糖鎖代謝は非選択的であるのに対し、通常状態で起こっている基底オートファジー (basal autophagy) がシアリル糖鎖の代謝に特異的に関わっていることが示された。また、一旦オートファジー欠損株においてシアリル糖鎖が細胞質に蓄積すると、その後遺伝子発現を回復させてオートファジー経路を正常に戻しても細胞質のシアリル糖鎖の代謝は亢進されなかったことから、基底オートファジーは糖鎖の代謝に積極的

に関わるのではなく、細胞質におけるシアリル糖鎖の蓄積を防いでいる、ということが示唆された。構造解析および細胞分画の結果からこれらの遊離糖鎖はリソソーム起源であることが示唆されたことから、基底オートファジーは正常なリソソームの機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。最後に、リソソーム膜上のシアル酸輸送体であるシアリンをノックダウンすることで、オートファジー欠損下でのシアリル糖鎖の細胞質への蓄積を遅延させることが出来たことから、基底オートファジーはシアリンが正常な機能を果たすためになんらかの役割を果たしていることが考えられた。

## 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 4 件)

1. Tadashi Suzuki (2013) free oligosaccharides: formation and degradation (free oligosaccharides related to N-linked glycans).

*Encycl. Biol. Chem.* (2<sup>nd</sup> ed.) **2**, 329-331.  
(査読無)

2. Atsushi Kato, Li Wang, Kumiko Ishii, Junichi Seino, Naoki Asano and Tadashi Suzuki (2011) Calystegine B3 as a specific inhibitor for cytoplasmic alpha-mannosidase, Man2C1.

*J. Biochem.* **149**, 415-422.  
(査読有)

3. Hiroto Hirayama and Tadashi Suzuki (2011) Metabolism of free oligosaccharides is facilitated in the *och1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.

*Glycobiology* **21**, 1341-1348.  
(査読有)

4. Yoshimi Haga, Kumiko Ishii and Tadashi Suzuki (2011) N-glycan is essential for stability and intracellular trafficking of glucose transporter, GLUT4.

*J. Biol. Chem.* **286**, 31320-31327.  
(査読有)

[学会発表] (計 11 件)

① 鈴木 匡

N 型糖鎖代謝とオートファジーの不思議な関係

第 85 回日本生化学会大会 福岡

2012年12月15日(国内学会講演)

② 鈴木 匡

糖鎖の一生を探る  
第10回日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 東京  
2012年11月30日(国内学会講演)

③ 鈴木 匡

The cytoplasmic peptide: N-glycanase (PNGase) and non-lysosomal catabolic pathway for N-glycans. (英語発表)  
第34回日本分子生物学会大会 横浜  
2011年12月16日(国内学会講演)

④ 清野 淳一、王 麗、石井 久美子、水島 昇、鈴木 匡

N型遊離糖鎖の代謝におけるオートファジーの役割について  
GlycoTOKYO 2011 シンポジウム 和光  
2011年12月9日(国内学会発表)

⑤ Tadashi Suzuki

Role of autophagy in the catabolism of sialylated oligosaccharides in mammalian cells.  
31<sup>st</sup> Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [III], Sapporo (Japan)  
2011年9月14日(国際学会講演)

⑥ Tadashi Suzuki

A novel metabolic pathway for N-linked glycans (Keynote Lecture)  
21<sup>st</sup> International Symposium on Glycoconjugates, Vienna (Austria)  
2011年8月25日(国際学会講演)

⑦ Junichi Seino, Li Wang, Kumiko Ishii, Noboru Mizushima, and Tadashi Suzuki

Autophagy regulates catabolism of N-linked oligosaccharides.  
Glycobiology Gordon Research Conference, Barga (Italy)  
2011年5月9日(国際学会講演)

⑧ 鈴木 匡

Free oligosaccharides in the cytosol: formation and degradation. (英語発表)  
第33回日本分子生物学会大会/第83回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) 神戸  
2010年12月10日(国内学会講演)

⑨ Junichi Seino, Li Wang, Kumiko Ishii, Noboru Mizushima, and Tadashi Suzuki

Role of autophagy in the catabolism of sialylated N-glycans. Sialoglyco2010, Potsdam (Germany)  
2010年8月22日(国際学会講演)

⑩ Tadashi Suzuki

Free oligosaccharides in the cytosol: formation and degradation.  
International Symposium on Organelle Network: Interface among Infection-Immunity, Cell Biology and Glycobiology, Toyonaka (Japan)  
2010年4月13日(国際学会講演)

⑪ Tadashi Suzuki

Free oligosaccharides: recent topics.  
2<sup>nd</sup> Japan/China Joint Symposium on Glycobiology, Wako (Japan)  
2010年4月7日(国際学会講演)

[図書](計1件)

Tadashi Suzuki and Katsunori Yamaguchi (2013) Chapter 6, mammalian sialidases (pp 188-208) In "Sialobiology; structure, biosynthesis and function of sialic acid glycoconjugates in health and disease (J. Tiralongo and I. Martinez-Duncker, eds.) Bentham Science Publisher Ltd.

[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

[http://www.riken.go.jp/research/labs/grc/riken\\_max\\_planck/sys\\_glycobiol/glycome\\_tabolome/](http://www.riken.go.jp/research/labs/grc/riken_max_planck/sys_glycobiol/glycome_tabolome/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 匡 (SUZUKI TADASHI)

独立行政法人理化学研究所・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 なし  
(3)連携研究者 なし