

成蹊大学

博士（理工学）学位論文

分子ツールを駆使した

糖タンパク質品質管理機構の化学的研究

Chemical study for glycoprotein
quality control using molecular tools

成蹊大学大学院 理工学研究科 理工学専攻

栗原 大輝

目次

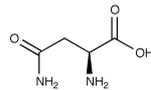
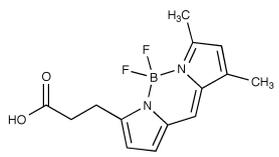
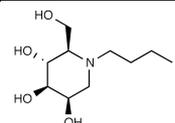
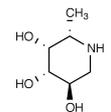
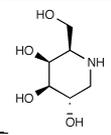
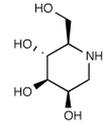
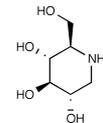
1 緒論	10
1.1 糖タンパク質品質管理機構	10
1.2 糖タンパク質の分泌/分解バランスと細胞恒常性	14
1.3 糖タンパク質品質管理機構に対する研究アプローチ	16
1.4 本論文の目的	19
2 小胞体における分泌/分解糖鎖産生経路の解明	20
2.1 はじめに	20
2.2 本研究の背景	20
2.2.1 産生される糖鎖シグナルについての背景	21
2.2.2 α -1,2-mannosidase 類に対する現状での理解	23
2.3 本研究の目的	24
2.4 本実験の評価系	25
2.4.1 合成蛍光糖鎖基質	25
2.4.2 小胞体画分	27
2.4.3 阻害剤候補化合物	28
2.4.4 実験の解析法	30
2.5 マウス小胞体画分の抽出	33
2.6 α -1,2-mannosidase 類に対する選択的阻害剤の探索	36
2.6.1 α -1,2-mannosidase の触媒メカニズム	36
2.6.2 本実験に用いた阻害剤の特徴	37
2.6.3 Mannosidase 阻害剤における M8 異性体産生の阻害選択性の比較	39
2.6.4 阻害選択性に関する考察	43
2.6.5 まとめ	47
2.7 種々の酵素阻害剤を用いた構造活性相関	47
2.7.1 アルキル鎖や芳香環を導入した誘導体の選択性の比較	48
2.7.2 ManIm 誘導体における阻害選択性	49

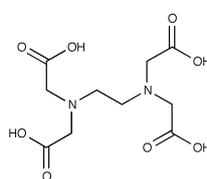
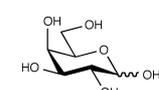
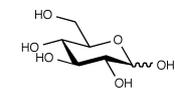
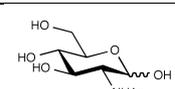
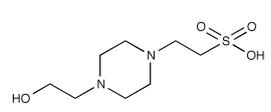
2.7.3	阻害選択性に関する考察	51
2.7.4	まとめ	53
2.7.5	dMJ 誘導体における阻害選択性	53
2.7.6	阻害選択性に関する考察	56
2.7.7	まとめ	56
2.7.8	dMJ 類縁体における阻害選択性の比較	57
2.7.9	阻害選択性に関する考察	59
2.7.10	まとめ	64
2.8	選択的阻害剤の阻害様式決定	65
2.8.1	dMJ と dNJ における阻害様式の決定	67
2.8.2	まとめ	68
2.9	選択的阻害剤下におけるマンノース切断経路解析	69
2.9.1	選択的阻害下におけるマンノース切断反応の解析	69
2.9.2	選択的阻害下におけるマンノース切断反応の解析系の確立	72
2.9.3	選択的阻害下において産生される糖鎖異性体の解析	75
2.9.4	各マンノース切断経路における交差活性の可能性検証	78
2.9.5	各マンノース切断経路を担う候補 α -1,2-mannosidase に対する考察	81
2.9.6	観測された 2 つのマンノース切断経路の生物学的意義における考察	84
2.10	小括	86
3	キトビオースペンタペプチドを用いた PNGase のペプチド特異性解析	88
3.1	はじめに	88
3.2	本研究の背景	89
3.2.1	PNGase 類の分類	90
3.2.2	PNGase 類の生物学的意義	90
3.2.3	PNGase 類の基質特異性	92
3.2.4	本研究の目的	93
3.3	本実験の評価系	93

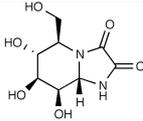
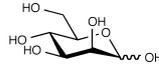
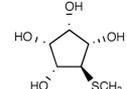
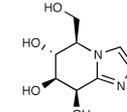
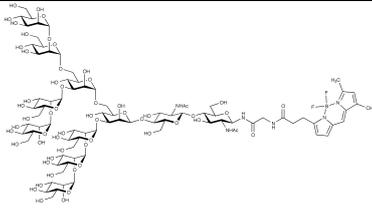
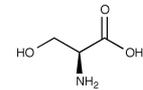
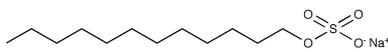
3.3.1	合成糖ペプチド	93
3.3.2	PNGase 類	95
3.3.3	評価系	96
3.4	実験に使用する PNGase の準備または調製	97
3.4.1	PNGase F および PNGase A	97
3.4.2	cytoplasmic PNGase の発現および精製	97
3.5	種々の PNGase を用いたペプチド特異性解析	98
3.5.1	cytoplasmic PNGase のペプチド特異性解析	99
3.5.2	PNGase A のペプチド特異性解析	102
3.5.3	PNGase F のペプチド特異性解析	104
3.6	考察	106
3.6.1	PNGase 類のペプチド特異性に対する考察	106
3.6.2	cytoplasmic PNGase のペプチド特異性についての考察	109
3.7	小括	112
4	総括	113
5	実験編	115
	謝辞	127
	本研究に関する業績	128
	参考文献	133

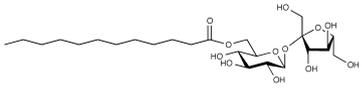
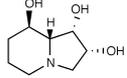
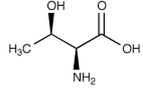
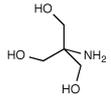
略語表

本論文では、以下の略称を使用した。

略称	名称	構造式・和名
Asn	Asparagine	
BODIPY	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl- 4-bora-3a,4a-diaza- <i>s</i> -indacene- 3-propionic acid	
Butyl-dMJ	<i>N</i> -Butyl 1-deoxymannojirimycin	
CNX	Calnexin	カルネキシン
CRT	Calreticulin	カルレティキュリン
Decyl-dMJ	<i>N</i> -Decyl 1-deoxymannojirimycin	
dFJ	1-Deoxyfuconojirimycin	
dGJ	1-Deoxygalactonojirimycin	
dMJ	1-Deoxymannojirimycin	
dNJ	1-Deoxynojirimycin	

EDEM	ER degradation enhancing β-mannosidase like protein	
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	
ER	Endoplasmic reticulum	小胞体
ERGIC-53	ER-Golgi intermediate compartment protein of 53 kDa	
ERmanI	ER mannosidase I	小胞体マンノシダーゼ I
Gal	D-Galactose	
GH47	Glycoside hydrolase family 47	
Glc	D-Glucose	
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamine	
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-pipera ziny] ethanesulfonic acid	

HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
Kif	Kifunensine	
Man	D-Mannose	
Man A	Mannostatin A	
ManIm	Mannoimidazole	
M9-Gly-BODIPY	Man9GlcNAc2-glycine-BODIPY FL	
OST	Oligosaccharyl transferase	オリゴ糖転移酵素
SAM	Senescence-accelerated mouse	老化促進モデルマウス
Ser	Serine	
SDS	Sodium dodecyl sulfate	

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	SDS ポリアクリルアミド ゲル電気泳動
SML	Sucrose monolaurate	
SW	Swainsonine	
Thr	Threonine	
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	
UGGT	UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase	UDP-グルコース 糖タンパク質 グルコース転移酵素
UPLC	Ultra high performance Liquid chromatography	超高速液体 クロマトグラフィー
VIPL	VIP36-like protein	
VIP36	Vesicular integral membrane protein of 36 kDa	

第 1 章

緒論

1.1

糖タンパク質品質管理機構

タンパク質は生命活動を維持する上で必須の分子であり、多くの場合高次構造を獲得して機能を果たす。タンパク質の約 6 割から 7 割はタンパク質上に糖鎖が付加された糖タンパク質であり、それらの糖鎖はアスパラギン (Asn) 側鎖に結合した *N*-型糖鎖とセリン (Ser) またはトレオニン (Thr) 側鎖に結合した *O*-型糖鎖に大別される¹⁾。糖タンパク質上の糖鎖は、細胞-細胞間相互作用におけるシグナル伝達、ウイルス感染における宿主への取り込み、がんにおける転移先への接着など多くの生命現象に関わっている²⁾。中でも、*N*-型糖鎖は、1994 年ごろから糖タンパク質品質管理機構への関与が示唆され^{3),4)}、小胞体における糖タンパク質の折りたたみ・選別・分泌・分解を制御するタグとしての機能が明らかになった。現在までに当該機構のメカニズムは明らかになりつつあるが^{5),6),7)}、未解明な問題も残されている。以下にその概略を述べる。

リボソームにて翻訳され小胞体内腔に挿入された新生ポリペプチドは、そのアミノ酸配列上に、Asn-X-Ser/Thr (X はプロリン以外) で定義されている *N*-型糖鎖付加のコンセンサス配列を有する場合、Oligosaccharyl transferase (OST) の働きにより Asn 側鎖のアミノ基に対して、ドリコール 2 リン酸に担持されたグルコース 3 残基、マンノース 9 残基、*N*-アセチルグルコサミン 2 残基からなる Glc3Man9GlcNAc2 (G3M9) 14 糖の糖鎖が付加される (Figure 1)。その後、G3M9 糖ポリペプチドは、グルコース加水分解酵素 Glucosidase I により末端グルコース 1 残基が加水分解され、G2M9 糖ポリペプチドとなる。さらに、グルコース加水分解酵素 Glucosidase II により、グルコース 1 残基が加水分解され、G1M9 糖ポリペプチドとなるとその後は、その糖鎖構造をタグとしてレクチン様分子シャペロンである Calnexin (CNX) あるいはその可溶性ホ

モログである Calreticulin (CRT) に認識され、ポリペプチド部の折りたたみが促進される。G1M9 ポリペプチドは折りたたみの促進に伴い、高次構造が形成され G1M9 糖タンパク質となると CNX/CRT との結合が弱まり^{8), 9)}、Glucosidase II によりさらにグルコース残基が加水分解される。その結果として産生される M9 糖タンパク質は、タンパク質の折りたたみセンシングを司る転移酵素 UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) に認識され、正しく折りたたまれているかをチェックされる。UGGT により折りたたみ不十分と判断された場合、M9 糖タンパク質には再度グルコース 1 残基が転移され、再び CNX/CRT によりタンパク質部の折りたたみが促進される。これらの折りたたみ促進、チェックの一連の働きを CNX/CRT サイクルと呼び、タンパク質が正しく折りたたまれる上で欠くことのできない中心機構として理解されている。すなわち、M9 は糖タンパク質のセンシング過程において重要なタグとなる。さらに、M9 はセンシング過程のみでなく、その後の糖タンパク質の分泌および分解を選別するために必要不可欠な糖鎖である。具体的には、M9 糖タンパク質はマンノース加水分解酵素 β -1,2-mannosidase 類によって糖鎖が切断され、分泌糖タンパク質の Golgi 体への輸送に関わる M8B と分解糖タンパク質の細胞質への輸送のタグとなる M8A、M6 および M5 が産生されると考えられている。これらの産生を担う β -1,2-mannosidase には ER mannosidase I (ERManI) や ER degradation-enhancing β -1,2-mannosidase-like protein (EDEM1、EDEM2 および EDEM3) といった 4 種類の加水分解酵素が候補として挙げられているものの、未だにどの β -1,2-mannosidase が分泌あるいは分解を制御する糖鎖構造の産生に関わっているか、統一見解には至っていない。

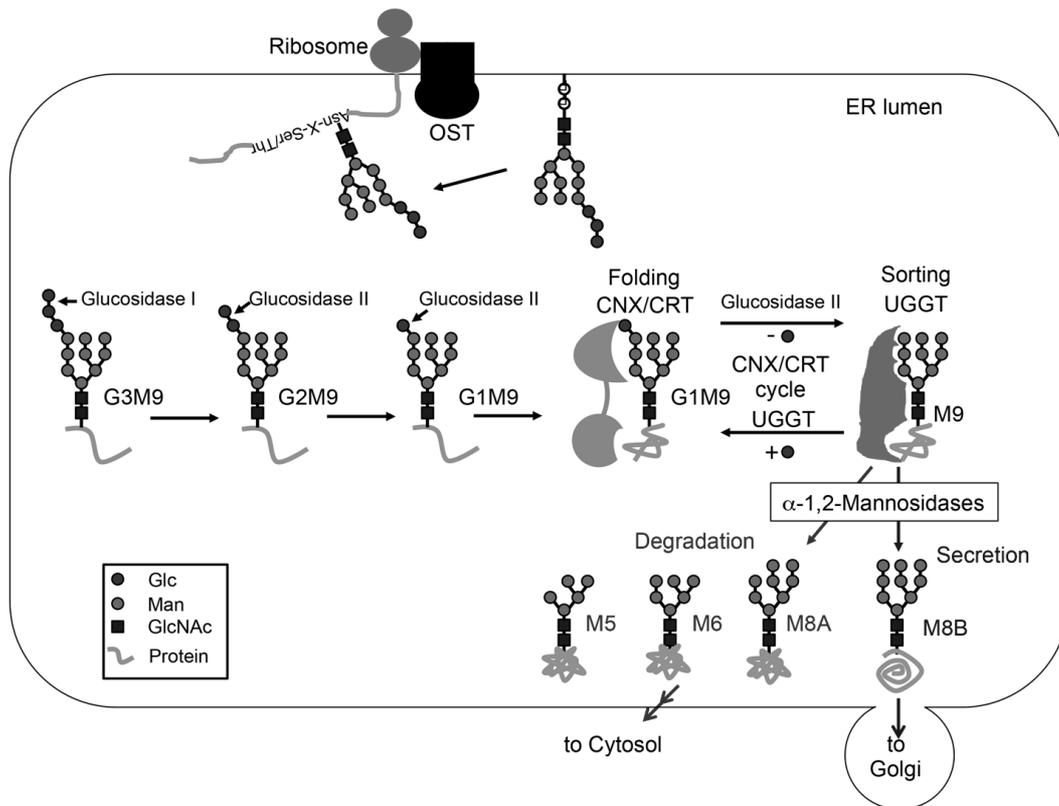


Figure 1. Glycoprotein quality control system in the endoplasmic reticulum.

上記の α -1,2-mannosidase 類の働きで産生された分泌糖タンパク質は Golgi 体へと輸送され、さらなる糖鎖変換を受けたのちに機能する。一方、分解糖タンパク質は、小胞体の様々なレクチン、酵素群あるいはシャペロンの働きによってタンパク質の折りたたみが巻き戻され、糖ポリペプチドとなったのち小胞体から細胞質へと排出され、分解されていく。小胞体内での糖タンパク質の品質管理を上流とすると細胞質での糖タンパク質の分解はその下流に位置する (Figure 2)。この糖タンパク質の分解過程において重要なのは Peptide: N-glycanase (PNGase) による脱糖鎖反応である。糖ポリペプチドはユビキチン化に引き続き、PNGase により脱糖鎖され、最終的には 26S プロテアソームによってタンパク質が分解されていく。しかしながら、プロテアソームはポリペプチド部位に N-型糖鎖が付加されている場合、そのポリペプチドを分解しにくくなると考えられている。すなわち、PNGase による脱糖鎖反応を経て、ポリ

ペプチドは効率よく分解される。一方で、糖鎖部に関しては、PNGase が脱糖鎖した後、endo-beta-N-acetylglucosaminidase (ENGase) により GlcNAc 残基間の結合が切断され、GlcNAc 1 残基を持つ糖鎖が産生される。さらに、細胞質 β -mannosidase (Man2C1) によって順次糖鎖が分解される。細胞質における Man2C1 の脱マンノース反応後、リソソームに運ばれ糖鎖は完全に分解される。

このように、糖タンパク質品質管理では上流において分泌あるいは分解糖タンパク質の選別を経たのち、その下流で脱糖鎖反応が進行し、糖タンパク質が分解されると考えられている。しかしながら、一方で、小胞体にて新生される糖タンパク質の約 3 割が分子シャペロンや関連酵素群が機能しても正しい立体構造を得られず折りたたみ不完全と判断され、分解されると知られている¹⁰⁾。次項においてその分泌/分解バランスの重要性について述べる。

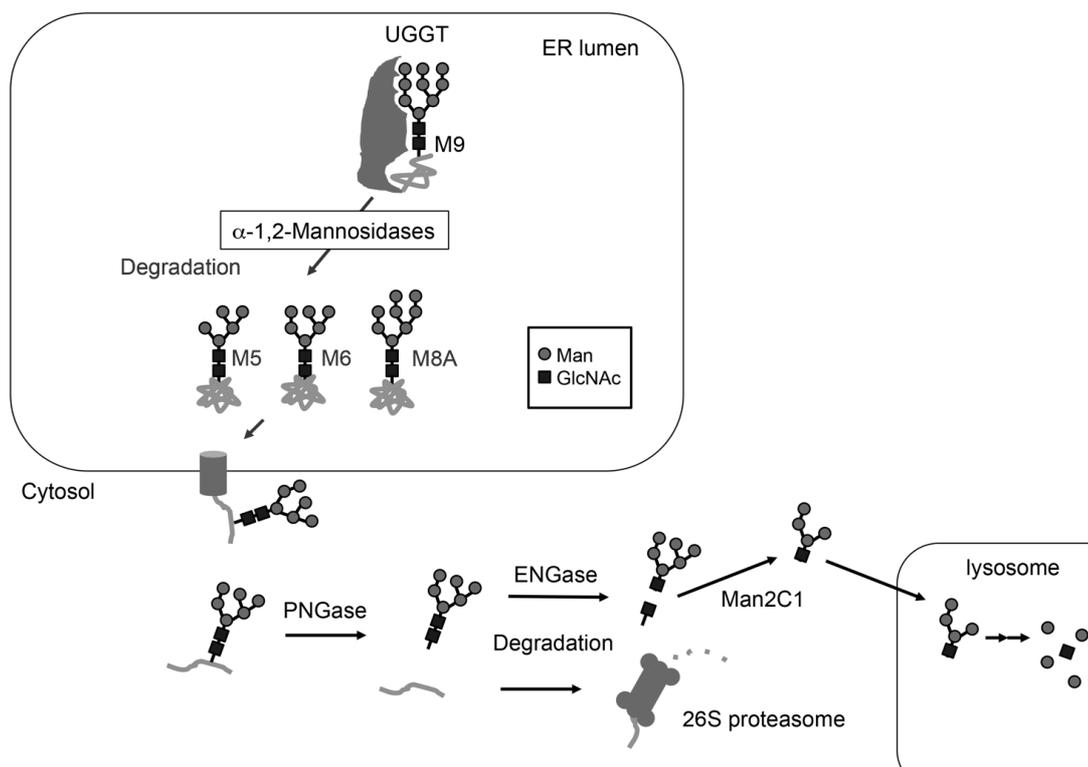


Figure 2. Glycoprotein quality control system in the cytosol and lysosome.

1.2

糖タンパク質の分泌/分解バランスと細胞恒常性

前節の最後に、小胞体における潜在的な折りたたみ不完全糖タンパク質の存在について述べた。本節においては、分解糖タンパク質の適切な分解の意義とそのバランスの破綻が細胞恒常性に与える影響について述べる。

タンパク質は折りたたまれる過程で、アミノ酸配列上の疎水性アミノ酸が内包され、その表面には親水性が露出する。しかしながら、タンパク質が正しい立体構造を獲得できず疎水性がその表面に露出した場合、疎水性相互作用が働きタンパク質どうしが凝集する (Figure 3)。

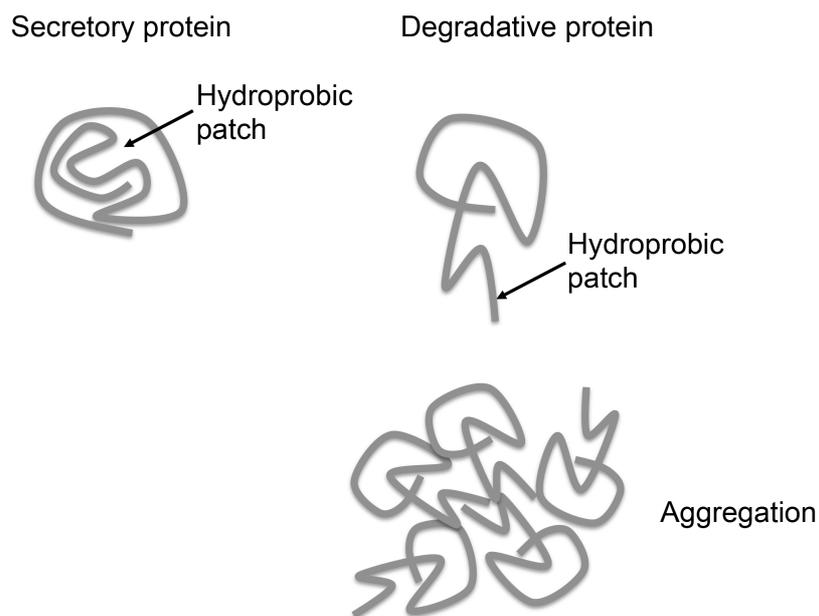


Figure 3. Protein aggregation mechanism.

正常な状態では、小胞体においてタンパク質が凝集しないように、分泌あるいは分解糖タンパク質の選別バランスを維持し、細胞恒常性の破綻を防いでいる。しかしながら、何らかの影響で小胞体に負荷がかかると、この分泌あるいは分解の選別バランスが崩れる。このバランスの破綻により分解されるべきタンパク質が小胞体に蓄積、その後小胞体内で凝集すると小胞体では対処しきれなくなり、細胞はアポトーシスを選択する¹¹⁾。このように、小胞体における分泌/分解糖タンパク質の選別バランスは細胞恒常性を維持する上で、必須である。

一方で、折りたたみの不完全な糖タンパク質がプロテアソームによって分解される機構も細胞においては必須であると近年の研究により明らかとなった。Goldsteinらは、2012年に哺乳動物のPNGaseであるNgly1の欠損が発育不全や運動障害、四肢の筋力低下など全身に重篤な症状を示すと報告し¹²⁾、*NGLY1*欠損症を発見した。さらに、Suzukiらは、*NGLY1*欠損症の原因タンパク質候補を発見し、Ngly1の欠損が、分解すべきポリペプチドに糖鎖の残存を引き起こし、プロテアーゼによる分解を受けられない結果、タンパク質が凝集し病態を発症するというメカニズムを提唱している¹³⁾ (Figure 4)。

これらの知見を加味すると、糖タンパク質品質管理上流における分泌/分解糖タンパク質の選別バランスの制御および下流における分解すべきポリペプチドの適切な分解は細胞恒常性を維持する上で重要であると考えられる。

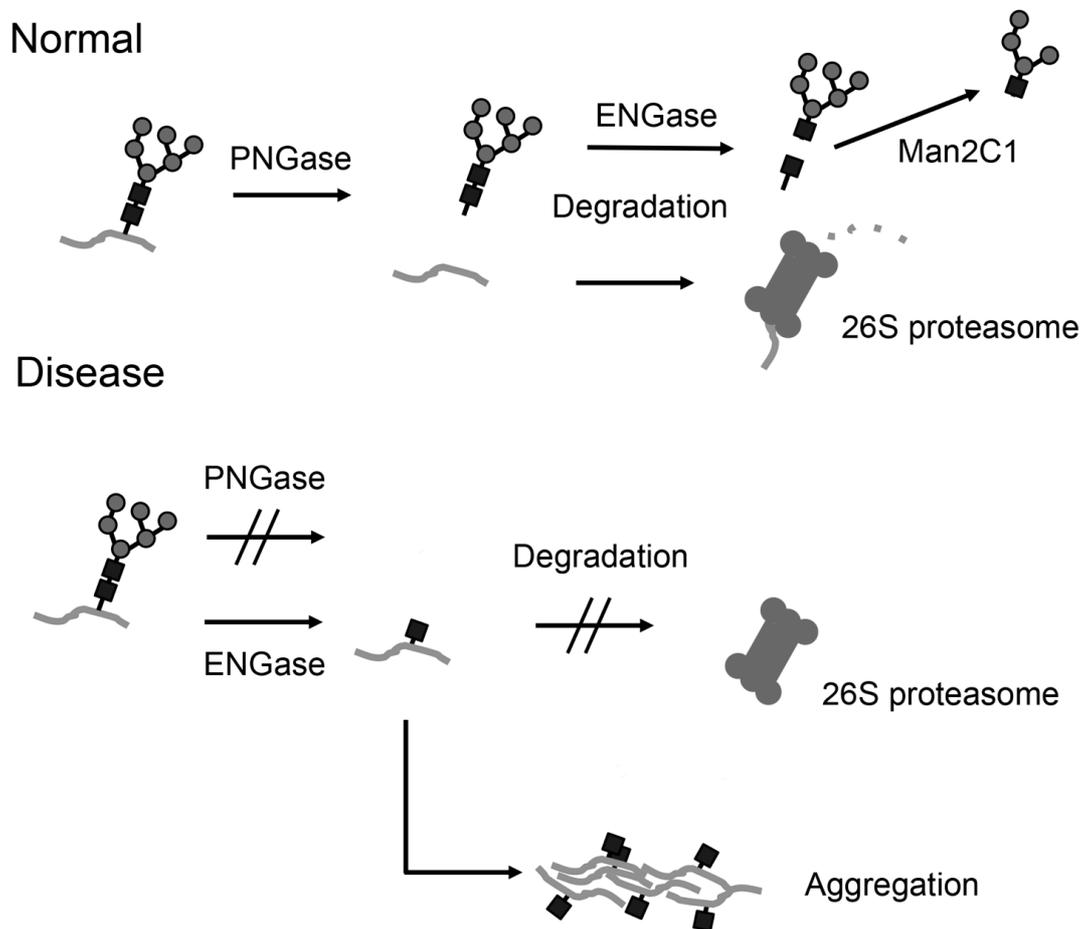


Figure 4. Ngly1 (PNGase)-deficiency mechanism.

1.3

糖タンパク質品質管理機構に対する研究アプローチ

前節では、糖タンパク質品質管理機構の概略とその重要性について述べてきた。本節においては、当該機構に対する研究アプローチの現状と化学的アプローチの必要性について述べる。

糖タンパク質品質管理機構は、その重要性が提唱されて以来、主に遺伝子工学的あるいは生化学的な手法によって解析が進められてきた。2001年から10数年に渡り、多くの酵素や分子シャペロンまたはレクチンが発見され、それらの機能が明らかにされている^{14),15)}。具体的には、遺伝子工学的に標的タンパク質をクローニングし、その機能を明らかにしたものと細胞内での挙動から標的分子の機能を明らかにしたものなどである。

しかし、DNA、タンパク質と並び称される第3の生命分子である糖鎖が関与する糖タンパク質品質管理機構においては、多岐に渡る糖鎖の種類、また糖鎖の不均一性がその解析を妨げる要因となっている。したがって前述したような糖鎖構造がタグとなり機能する糖タンパク質品質管理機構を詳細に理解する上で、構造が均一な糖鎖を用いた解析アプローチの重要性は高い。

近年、有機合成化学を駆使して均一な糖鎖を合成、場合によっては分子プローブ化して、望みの糖鎖関連タンパク質や酵素の機能解析に応用する化学的な手法において有効性が評価されつつある。本手法を用いて、これまで理解されてきた糖タンパク質関連タンパク質の機能がさらに分子レベルで詳細に解明された。例えば、UGGTの糖鎖部以外であるアグリコン部位に対しての認識能の解明^{16),17)}、糖タンパク質品質管理機構におけるGlucosidase IIの糖鎖特異性の訂正ならびにCNX/CRTサイクルにおける基質糖鎖のGlucosidase IIへの受け渡し機構の解明などがある¹⁸⁾。さらに、合成糖鎖を用いた解析から、本来糖転移活性を持たないと報告されていたUGGTのアイソフォームであるUGGT2の糖転移活性が検出された¹⁹⁾。

これらの知見の蓄積から鑑みるに、化学的アプローチを用いた糖タンパク質品質管理機構の研究から、今まで見過ごされてきた酵素活性やタンパク質の性質を再評価でき、有用な研究手法と考えられる。

このような観点から、今後、糖タンパク質品質管理機構に対する化学的なアプローチはますます注目されていくと考える。実際、均一な糖鎖を持つ糖タンパク質の創成とそのタンパク質を用いた糖タンパク質品質管理関連酵素の解析も報告されている²⁰⁾。このような利点を踏まえて、本論文においては、

化学的アプローチによる糖タンパク質品質管理機構の分子レベルでの理解を基盤としている。

1.4

本論文の目的

本論文では、前項までに記載した糖タンパク質品質管理機構における、その上流あるいは下流において細胞恒常性の維持に重要であると考えられる酵素に着目し、化合物を解析ツールとして用いて糖タンパク質の分泌や分解に係る経路について分子レベルでの解明を目的とした。第 2 章においては、糖タンパク質品質管理機構の上流の分泌/分解糖タンパク質の選別経路に着目した。具体的には、*in vitro* における小胞体再構築系を駆使し、 α -1,2-mannosidase 類の糖鎖産生活性を分子ツールによって制御する方法の確立と、そのマンノース切断経路の解析への応用について示した。また第 3 章では、当該機構の下流にあたる PNGase の働きを分子レベルで理解すべく、由来の異なる複数の PNGase を用いて、系統的に親水性/疎水性を制御した合成キトビオースペンタペプチドを基質とした PNGase 類のペプチド特異性解析について述べた。最後に第 4 章として総括を示した。

第 2 章

小胞体における分泌/分解糖鎖産生経路の解明

2.1

はじめに

1.1 にて M9 糖タンパク質のその後の分泌あるいは分解を選別する過程では、 α -1,2-mannosidase 類により産生される分泌あるいは分解糖鎖が重要であると述べた。しかし、小胞体において α -1,2-mannosidase 類によってどのような糖鎖産生経路で分泌/分解糖鎖が産生されているか不明である。そこで、本章においては、化学的アプローチによってマンノース切断経路について解明した。

2.2

本研究の背景

糖タンパク質品質管理機構における M9 の重要性は前述の通りであるが、その後のマンノース切断については現状では完全な理解に至っていない。本節ではその現状と問題点について述べる。

2.2.1

産生される糖鎖シグナルについての背景

M9には α -1,2-mannosidase によって加水分解可能な結合が4ヶ所存在し、A、B または C 鎖の末端マンノース結合は全て α -1,2-マンノシド結合である (Figure 5A)。そのため、小胞体にて見出されている α -1,2-mannosidase 類の働きによって、多様な糖鎖異性体の産生を経て、最終的に M5 が産生されていると考えられている (Figure 5B)。そこで、本項では、現在までに明らかとなっている糖鎖シグナルについての理解を記す。

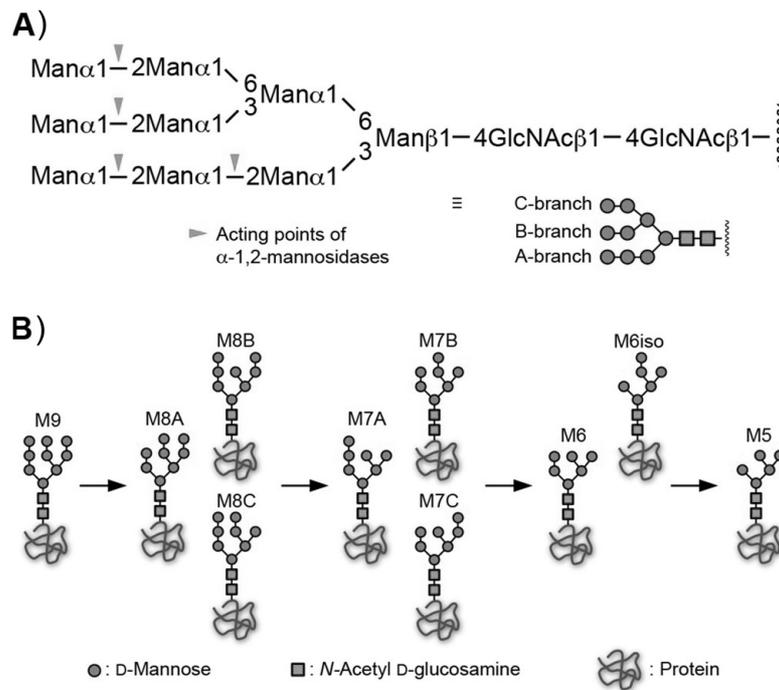


Figure 5. Glycan processing in ER glycoprotein quality control. A) The structure of Man₉GlcNAc₂ and the acting points of α -1,2-mannosidases. B) The glycan processing pathway in the ER.

はじめに M9 から産生される M8 異性体に着目してその糖鎖シグナル機能を考える。M9 の B 鎖末端マンノースが切断された M8B は、2003 年頃まで糖タンパク質の分解シグナルとして理解されてきた²¹⁾。

しかしながら、2010 年頃には M8B の機能についての知見が蓄積され、その糖鎖シグナル機能に新たな考えが提唱された。具体的には、小胞体にて正しい立体構造を獲得した糖タンパク質を Golgi 体へと輸送するカーゴレセプター分子である ERGIC-53、VIPL、VIP36 に対し M8B が強く結合すると報告された²²⁾。一方で、M8B は糖タンパク質を分解経路へと導くレクチン Osteosarcoma-amplified 9 (OS-9) との親和性が低いとも報告された²³⁾。これらの分泌/分解に関連するタンパク質と M8B を含む様々な糖鎖との相互作用解析から、現在 M8B は分泌シグナルとしての機能が提唱されている。

一方で、A または C 鎖末端マンノースが切断された M8A や M8C については、これまでの小胞体局在レクチンや酵素の特異性にに基づき、そのシグナル機能が提唱されはじめている。A 鎖の末端マンノースが切断された糖鎖構造は、UGGT と VIPL の認識されない。すなわち、M8A は、CNX/CRT による折りたたみ促進を受けられず、かつ Golgi 体へも輸送されない糖鎖構造であると考えられる。一方、M8C 型糖鎖は、OS-9 と強く結合する。これらの知見を踏まえると、M8A あるいは M8C は糖タンパク質の分解シグナルとして機能すると考えられる。これらの糖鎖シグナルに加え、さらにマンノース切断が進行した M6 や M5 が小胞体にて検出されており、上述の M8A あるいは M8C は分解シグナル前駆体として機能し、実際の分解シグナルは M6 や M5 だと考えられている。

2.2.2

□-1,2-mannosidase 類に対する現状での理解

本項では、前項の糖鎖シグナル産生に係る □-1,2-mannosidase 類すなわち、ERManI と EDEM1、EDEM2、EDEM3 に対する現在までの理解の変遷について述べる。

1990年代後半にかけて、Moremen らによって M9 型糖鎖のマンノース切断には ERManI が関わり、その産生糖鎖は M8B であると報告された^{24),25)}。その後、長らく ERManI は小胞体に局在するものと考えられてきたが、2010年代にさらなる理解が進み新たな論争が生まれた。具体的には、Sifers らによるこれまで解析されてきた ERManI の局在は過剰発現時に由来するもので、内在性の ERManI は Golgi 体に局在するという報告である²⁶⁾。こちらの局在に関しては、近年局在解析の際に使用する試薬により細胞内で正しく ERManI の局在を解析できていなかった可能性が浮上した²⁷⁾。しかし、Lederkremer らによって ERManI は、小胞体由来の小胞である Quality control vesicle (QCV) に局在し、機能を果たしていると報告され²⁸⁾、再びその局在が小胞体であるのか、それとも QCV であるか議論が続いている。

一方、EDEM は現在までに、数多くの研究者が *in vitro* での EDEM 1/2/3 の酵素活性の検出に挑戦してきたが未だに達成されていないタンパク質である。そこで、発見から現在まで、EDEM 過剰発現下およびノックアウトといった遺伝子工学的な手法から、そのタンパク質機能が解明されてきた。2001年に、ERManI と同じ酵素活性ドメインを有しているが、小胞体においてマンノース切断活性を示さない EDEM が Hosokawa, Nagata らの研究グループによって発見され、当初このタンパク質は M8B と結合し、糖タンパク質の分解を促進すると考えられた²⁹⁾。さらに2005、2006年に相次いで EDEM のホモログタンパク質である EDEM2 と EDEM3 が発見され、EDEM2 は酵素活性を持たないが³⁰⁾、EDEM3 は *in vivo* において酵素活性をもつと報告された³¹⁾。2010年には、再び Hosokawa らによって EDEM = EDEM1 が *in vivo* にて酵素活

性を有していると報告された³²⁾。さらに、ごく近年、Ninagawa, Mori らの研究グループによって、EDEM1/2/3 のシングルノックアウト細胞を用いた細胞内糖鎖異性体の解析から、EDEM1/2/3 は全てマンノース切断活性を有しており、特に、これまで *in vivo* において酵素活性が検出されていなかった EDEM2 が M8B の産生に関わっていると報告された³³⁾。このように、*in vivo* にて EDEM1/2/3 が酵素活性を有するという知見は蓄積してきており、小胞体における複数の α -1,2-mannosidase の並列での機能が想定されている。しかし、以上のような知見が蓄積されている一方で、*in vitro* での詳細な糖鎖特異性解析は達成されておらず、2.2.1 で述べたようなシグナル糖鎖が小胞体でどのようなマンノース切断経路により産生されているかは未だに不明である。

2.3

本研究の目的

そこで本研究では、マンノース切断反応の上流で産生され、分泌あるいは分解糖鎖シグナルとしての機能が想定されている M8 異性体に着目し、それらの異性体産生を選択的に阻害できる化合物の探索を通して、マンノース切断経路の解明を試みた。現在、mannosidase 阻害剤による α -1,2-mannosidase 類の阻害は、細胞に過剰に添加し、マンノース切断を止めるために利用されており、mannosidase 阻害剤の本質的な阻害選択性は議論されていない。すなわち、シグナル糖鎖の産生に着目すると、mannosidase 阻害剤の未だ発見されていない α -1,2-mannosidase 類に対する阻害選択性を見出せる可能性があると考えた。その際、 α -1,2-mannosidase 類の現状での理解を踏まえ、マウスの肝臓から抽出した小胞体画分を小胞体における構成要素が全て含まれる酵素源とし、その環境に有機合成の手法にて獲得した合成蛍光糖鎖基質を添加、さらに阻害剤候補となる化合物を共存させ、マンノース切断反応を解析する化学的な手法を選択した。

2.4

本実験の評価系

化学的な手法によるマンノース切断反応の解析に関し、必要な合成蛍光糖鎖基質、小胞体画分、阻害剤候補化合物および解析系についての詳細を述べる。

2.4.1

合成蛍光糖鎖基質

本実験で用いた合成蛍光糖鎖基質は、以前に合成され、糖タンパク質品質管理機構の解析において多くの実績がある M9-Gly-BODIPY を選択した^{16),34)} (Figure 6)。

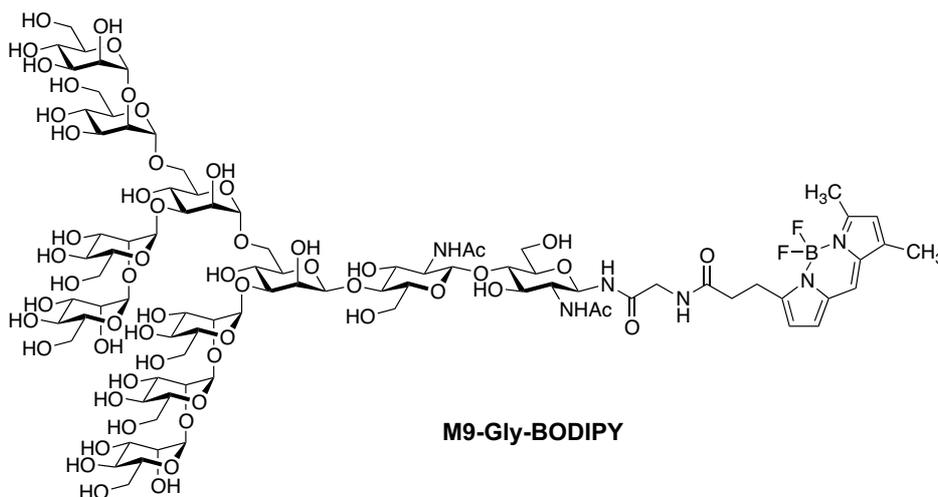


Figure 6. Structure of synthetic fluorescent substrate used in this study.

糖鎖合成に関しては、以前に開発したオリゴ糖セグメントを最終的に M9 へと集約する方法を用いた³⁵⁾。具体的には、はじめにトリマンノシド、ペンタマンノシド、マンノース 1 残基、*N*-アセチルグルコサミン 2 残基からなるコア三糖をそれぞれセグメントとして合成した。その後、コア三糖セグメントとトリマンノシドセグメントのカップリングで A 鎖を構築、ペンタマンノシドとのカ

ップリング反応を経て、B および C 鎖を構築し、M9 へと変換した。その後、M9 の還元末端に、グリシンをリンカーとして蛍光色素 BODIPY を結合させ、M9-Gly-BODIPY の合成が達成されている。本研究で用いた M9-Gly-BODIPY は理化学研究所 伊藤細胞制御化学研究室よりご供与いただいた。

M9-Gly-BODIPY は、励起波長 504 nm、蛍光波長 514 nm の緑色蛍光基質である。そのため解析に使用する際、pM オーダーの低濃度でも検出感度を十分確保できる。また、他の蛍光色素とは異なる小さなストークスシフト、溶媒に依存しない高い蛍光量子収率、エナジートランスファーが観測されないなどの特徴から定量解析に使用可能と考えた。さらに、一般的に使用されている蛍光ラベル化糖鎖であるピリジルアミノ基を結合させた M9-PA とは異なりグリシンをリンカーとしているため、還元末端の糖鎖構造が開環しておらず (Figure 7)、天然に存在する糖鎖構造が再現されている。

また、この化合物は M9 をタグとして働く UGGT の基質となるため¹⁶⁾、糖タンパク質の折りたたみ途中を模倣していると考えられ、折りたたみの完成した分泌糖タンパク質あるいは折りたたみ不完全な分解糖タンパク質の両方の状態を再現できる基質であると想定した。実際に、Senescence-accelerated mouse prone (SAMP6) マウス³⁶⁾由来小胞体画分を用いた糖鎖切断反応に適用した場合、分泌シグナル糖鎖 M8B に加え分解シグナル糖鎖 M8A および M8C が産生することを報告している³⁷⁾。これらの結果から、本実験において、M9-Gly-BODIPY は基質として最適であると考えた。

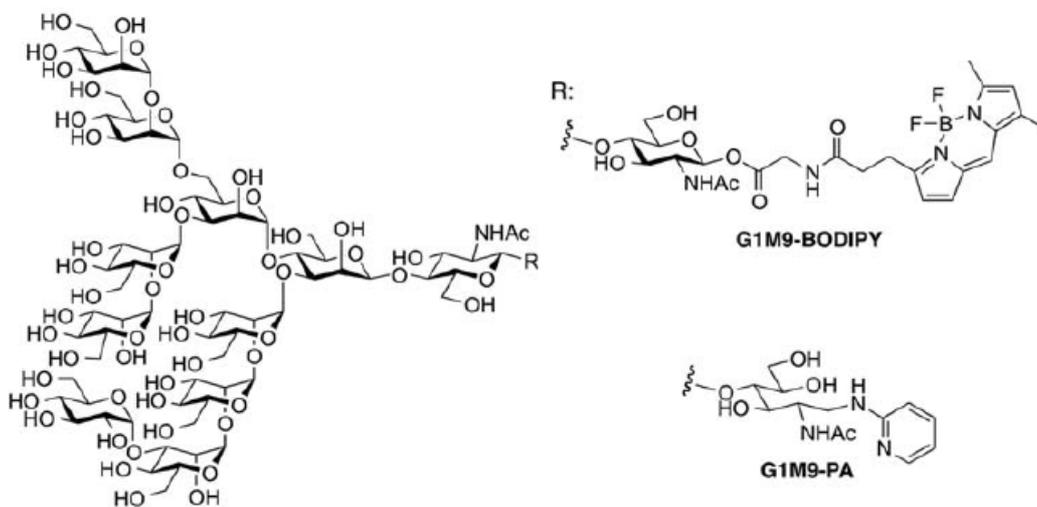


Figure 7. Difference of terminal mannose structure between BODIPY and PA.

出典 Ref (37) より改変

2.4.2

小胞体画分

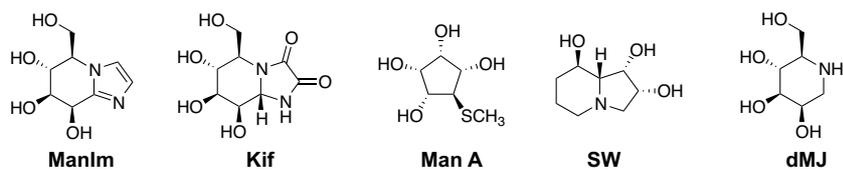
前述のように、以前に、様々な疾患モデルマウス肝臓由来の小胞体画分を用いた糖鎖切断反応の解析から、M8B と M8A および M8C を同時に産生できる系を確立した。その中で、SAMP6 マウス（骨粗鬆症モデルマウス）において、M8 異性体の産生比率（M8B:M8A+M8C）がほぼ 1:1 であると報告している³⁷⁾。本研究では、M8 異性体産生の選択的阻害に焦点を当てているため、その産生比率が大きく異なると正確に阻害選択性を判断できない。これらを踏まえ、本研究では、SAMP6 マウスが小胞体画分を得る最適な試料と考えた。また、臓器として肝臓を選択したのは、肝臓からの小胞体画分の抽出法は既に確立されており、他の臓器と比べ大きな臓器で小胞体含有量が多く、望みの活性を有する酵素、レクチンあるいはシャペロンを多く含有すると考えたためである。

2.4.3

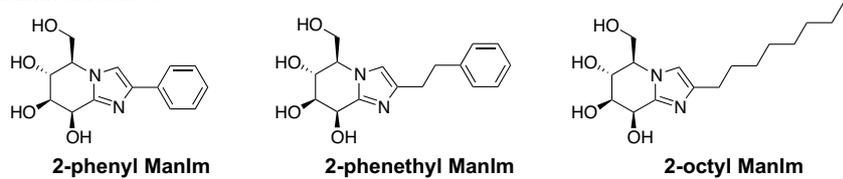
阻害剤候補化合物

本研究において、3つの分類から広く糖加水分解酵素の阻害剤候補化合物 13種類を選定し、それらの M8 異性体産生に対する阻害選択性を比較する化合物を以下に示した (Figure 8)。具体的には、標的とする α -1,2-mannosidase 活性を持つ酵素が属する Glycosyl Hydrolase 47 (GH47) ファミリー^{38,39} に対する阻害能を持つ Mannoimidazole (ManIm) とその誘導体 (2-phenyl ManIm、2-phenethyl ManIm および 2-octyl ManIm)、Golgi mannosidase II の阻害剤として知られる Mannostatin A (Man A) および Swainsonine (SW)、最後に、ERManI の強力な阻害剤として知られる Kifunensine (Kif) と ERManI に対する中程度の阻害剤である 1-Deoxymannojirimycin (dMJ) の誘導体 (*N*-butyl dMJ および *N*-decyl dMJ) とその類縁体 [1-Deoxynojirimycin (dNJ)、1-Deoxygalactonojirimycin (dGJ) および 1-Deoxyfucono^jirimycin (dFJ)] である。それぞれの阻害剤についての詳細は 2.6.2、2.7 に示した。

Mannosidase inhibitors



ManIm derivatives



dMJ analogues and derivatives

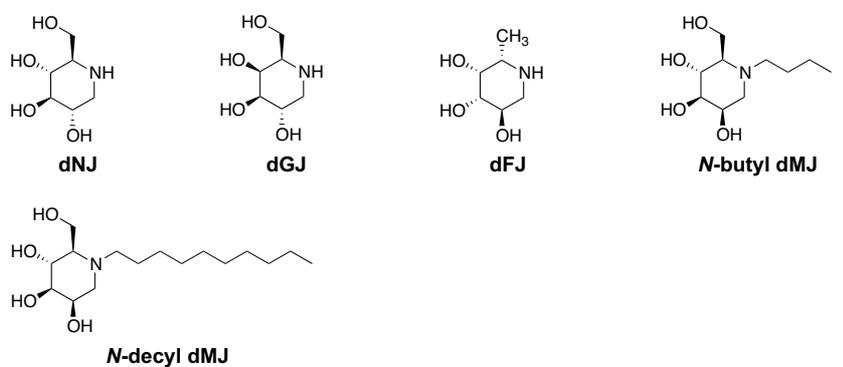


Figure 8. Candidate compounds used in this study.

2.4.4

実験の解析法

これまでに示してきたリソースを組み合わせ、マウス肝臓より抽出した小胞体画分を酵素源として、M9-Gly-BODIPY を添加、さらに阻害剤候補化合物を共存させ、候補化合物ごとに M8 異性体の産生能を測定した。この際、M8 異性体の産生を M9-Gly-BODIPY の BODIPY 部の蛍光に基づき、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて検出、解析する測定法を選択した (Figure 9)。

2.4.1 で述べた BODIPY の特徴から、HPLC 分析において得られたピーク面積をもとに定量的な解析が可能のため、阻害剤候補化合物の選択的阻害能を比較する最適の手法と考えた。また、HPLC における糖鎖分析は汎用されており、その有効性が実証されている^{40,41}。

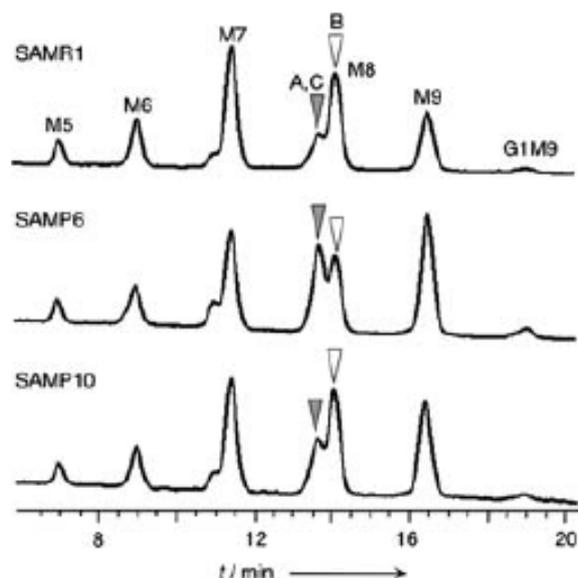


Figure 9. Assay system used in this study.

さらに、HPLC により得られたクロマトグラムをデータ分析・グラフ作成ソフト Origin®2016 にてデコンボリューションし (Figure 10)、それぞれの

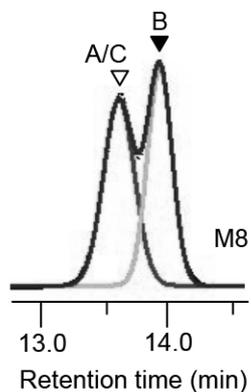


Figure 10. Representative HPLC chromatograms for M8 production analysis using Origin®2016.

ピーク面積を算出して定量性の向上を図った。最後に種々の化合物濃度における M8 異性体に対する選択的阻害率を、阻害剤非存在下における M8 産生率を基準として、算出し、阻害曲線として表した (Figure 11)。本研究では、グラフ作成、解析ソフト KaleidaGraph により阻害曲線を作成した。

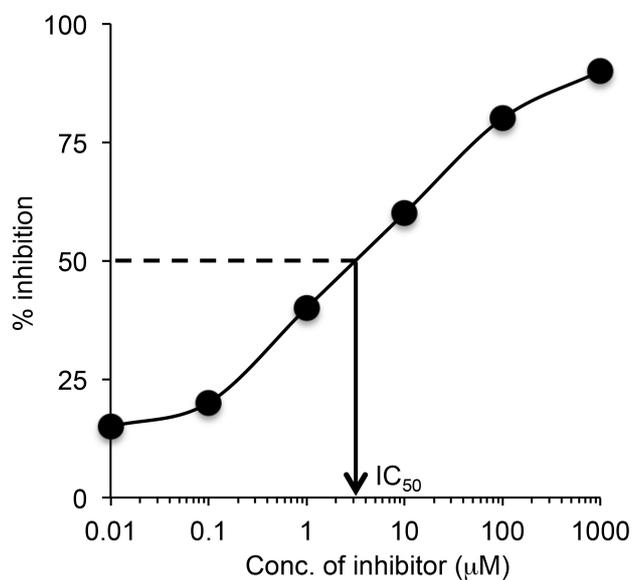


Figure 11. IC_{50} value means the concentration of 50% inhibition.

阻害曲線から、その候補化合物の選択的阻害能を (Half maximal inhibitory concentration) IC_{50} 値を指標として評価した。ここで、 IC_{50} 値とは阻害剤が酵素活性などを 50%阻害する際の濃度を示す。この IC_{50} 値が小さいほど標的の酵素に対して、有効な阻害剤と判断できる。 IC_{50} 値は、阻害曲線同様に KaleidaGraph により算出した。

2.5

マウス小胞体画分の抽出

実験を始めるに際し、小胞体画分を抽出する必要がある。本研究では、2.4.2で述べた理由から、SAMP6 マウスの肝臓から小胞体画分を抽出した。

まず、ポッター型ホモジナイザーに SAMP6 マウス肝臓とプロテアーゼ阻害剤を含むスクロース抽出バッファーを添加し、肝臓を破碎した。続いて、破碎した肝臓から遠心分画法にて段階的に、核/未破碎組織、ミトコンドリア、リソソームを分離した。リソソーム分離後に得られた上清を再度、遠心分離し、沈殿物を小胞体画分として獲得した (Figure 12)。

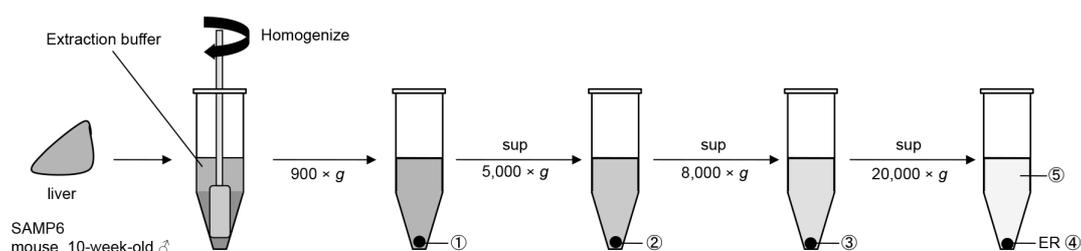


Figure 12. Centrifugal fractionation of ER fraction from SAMP6 liver.①: nucleus and cell debris ②: mitochondria and cell debris ③: lysosome ④: ER ⑤: cytosol

さらに、抽出した小胞体画分中に最も混入が懸念される Golgi 体が含有されていないかを確認すべく、得られた小胞体画分に対して小胞体マーカータンパク質である Glucose-regulated protein78/Binding immunoglobulin protein (Grp78/BiP) と *cis*-Golgi 体マーカータンパク質の Golgi matrix protein GM130 (GM130) を選択し、それぞれの発現を抗 BiP あるいは抗 GM130 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した (Figure 13A)。また、同時に得られた小胞体画分中の mannosidase 類の発現状況も抗 ERMAnI、抗 EDEM1、抗 EDEM2、抗 EDEM3 および抗 Golgi α -1,2-mannosidase IA (Golgi ManIA) 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した (Figure 13B)。

その結果、得られた小胞体画分 (④) では、BiP が検出されたが、GM130 は検出されなかった (Figure 13 A)。さらに、ERManI、EDEM1、EDEM2、EDEM3 および Golgi ManIA は全て検出された (Figure 13B)。Golgi ManIA はその名前の通り、Golgi 体に局在する α -1,2-mannosidase であるが、今回得られた小胞体画分における検出量は、同時に検出した他の α -1,2-mannosidase 類と比べ、非常にわずかであった。さらに、Golgi ManIA は、ごく近年、QCV に局在すると示唆され始めており⁴²⁾、その局在に関して今後、論争が激しくなると予想される。

したがって、本手法にて抽出した小胞体画分は、*cis*-Golgi 体を含むせず、標的の α -1,2-mannosidase 類が全て発現している本研究の目的に適う純度の高い小胞体画分であると考え、その後の実験に用いた。

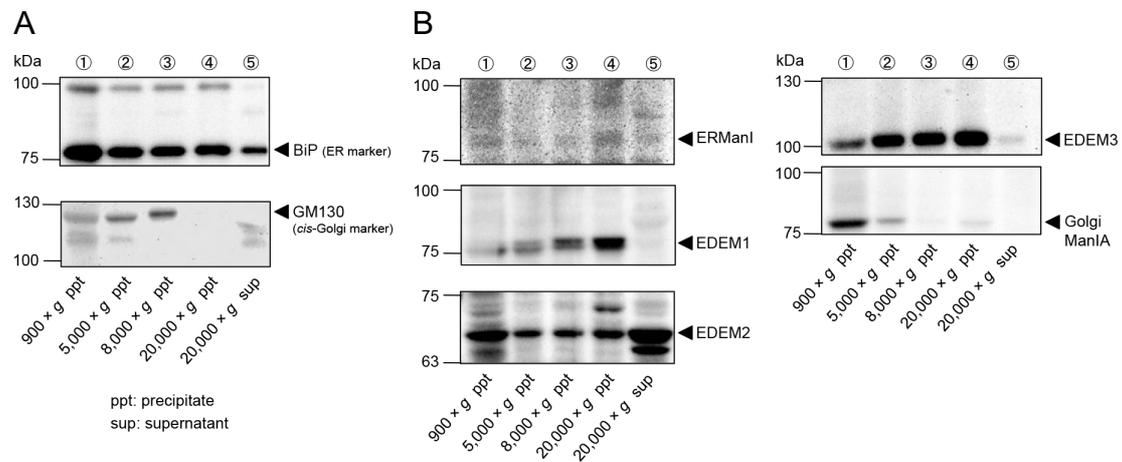


Figure 13. Western blot analysis of ER fraction. A) Western blotting of centrifugal fraction using anti-BiP (ER-marker) and anti-GM130 (*cis*-Golgi-marker) antibodies. The results showed a highly enriched ER fraction was prepared. B) Western blotting of centrifugal fraction using anti-EDEM1, anti-EDEM2, anti-EDEM3, anti-ERManI and anti-GolgiManIA antibodies. The results showed the previously reported ER mannosidases (EDEM1/2/3 and ERManI) were identified in the ER-enriched fraction. Traces of Golgi ManIA were also detected in the ER-enriched fraction, which may arise from contamination during fractionation and/or from retrograde transport from the Golgi apparatus. Based on its low abundance, glycan processing experiments using the ER-enriched fraction should mainly reflect the processing profiles from ER mannosidases.

2.6

□-1,2-mannosidase 類に対する選択的阻害剤の探索

前節にて得られた小胞体画分中、種々の mannosidase 阻害剤を共存させ、シグナル糖鎖 M8B あるいは M8A/C に対する候補化合物の産生阻害能を測定、比較した。本研究では、5種の mannosidase 阻害剤として市販の化合物を含めて選択したが、その理由は 2.3 に記述したように市販の化合物において □-1,2-mannosidase 類が全て含有される環境下の阻害選択性は議論されていないためである。そこで、阻害剤の骨格や標的酵素を限定せず、広範囲に mannosidase への阻害が報告されている化合物 5 種類を候補とした。

以下に、これらの化合物の特徴を示すにあたり、まず必要となる □-1,2-mannosidase の触媒メカニズムについて示した。

2.6.1

□-1,2-mannosidase の触媒メカニズム

□-1,2-mannosidase は、GH47 ファミリーに属し、反転型の酵素メカニズムによってマンノース加水分解を触媒している⁴³⁾ (Figure 14)。具体的には、はじめに、 4C_1 型配座であった還元末端側のマンノースは系内で Ca^{2+} と相互作用し、 1C_4 型配座となる。その後、 ${}^{3,0}B^{3}S_1$ 型配座をとった後、遷移状態として 3H_4 型となる。この遷移状態を経て、□-1,2-マンノシド結合は加水分解され最終的に還元末端側のマンノースは 1C_4 型配座を取る。これら、 ${}^4C_1 \rightarrow {}^3H_4 \rightarrow {}^1C_4$ へと配座が変化するため、□-1,2-mannosidase の阻害には 3 種類のうちどれかの配座を持つ化合物が良いとされ、多くの研究者により様々な遷移状態を模倣した化合物が合成されている。これらのメカニズムを踏まえ、以下には、本実験に使用した候補化合物の特徴を記載した。

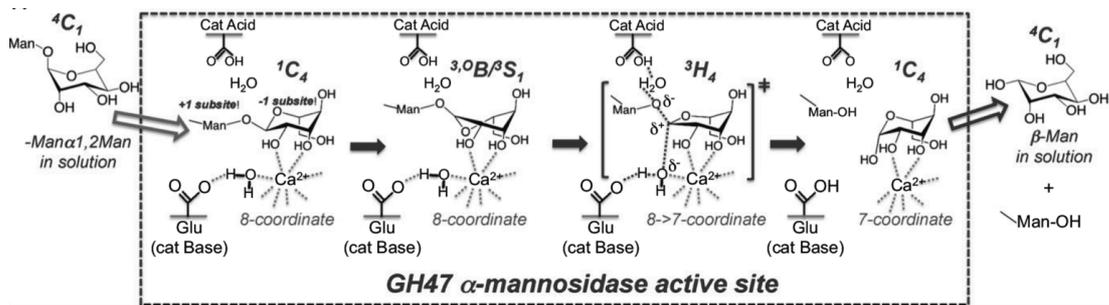


Figure 14. Enzymatic mechanism for GH47 α -mannosidase.

出典: Ref (43) より改変

2.6.2

Mannosidase 阻害剤群の特徴

以下に、シグナル糖鎖 M8B あるいは M8A/C に対する産生阻害能の比較に用いた 5 種の mannosidase 阻害剤の特徴について記載する (Figure 15)。

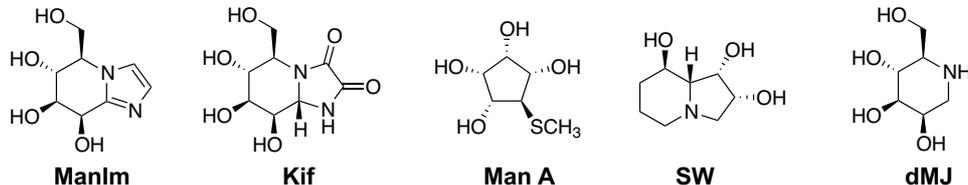


Figure 15. Candidate compounds for selective inhibitors.

ManIm: GH47 ファミリー酵素に対する阻害剤である。その適応範囲はバクテリア⁴⁴⁾から哺乳動物の GH47 mannosidase まで多岐に渡る。その理由は、 α -1,2-mannosidase の触媒メカニズムにおける遷移状態の 3H_4 型配座が固定されており、その配座によって多くの α -1,2-mannosidase の触媒反応中における遷移状態を模倣できるためと考えられる。

Kif: ERMAnI に対する強力な阻害剤であり、その IC_{50} 値は nM のオーダーで

ある⁴⁵⁾。ERManI を阻害する際の配座は、X線共結晶構造解析から¹C₄型であり、競合阻害剤とわかっている。一般的な細胞ベースでの研究にて mannosidase の阻害剤として数多くの使用例がある^{46),47)}。また、ERManI のみならず Golgi ManIA/IB/IC に対しても強力な阻害能を示す^{48),49)}。ただし、ERManI と Golgi ManIA/IB/IC が共存下、あるいは同じ基質に対する阻害能は報告されていないため、両者の阻害選択性は未解明である。

Man A : Golgi mannosidase II の阻害剤である。酵素活性中心にて¹S₃型配座を取る⁵⁰⁾。その阻害様式は競合阻害である。

SW : Golgi mannosidase II の強力な阻害剤である。Golgi mannosidase II の阻害は^{2,5}B型配座に近い配座であると考えられている⁵¹⁾。その阻害様式は競合阻害である。

dMJ : ERManI および α -1,2-mannosidase 類に対する中程度の阻害剤であり、その IC₅₀ 値は μ M のオーダーである⁵²⁾。ERManI を阻害する際の配座は、X線共結晶構造解析から¹C₄型であり、競合阻害剤とわかっている。Kif 同様、細胞ベースでの実験にて、過剰量添加して、全ての mannosidase 活性を阻害するために使われる。また、Kif 同様、ERManI と Golgi ManIA/IB/IC の阻害選択性は明らかとなっていない。

2.6.3

Mannosidase 阻害剤における M8 異性体産生の阻害選択性の比較

本項では、上記で選定した各種 mannosidase 阻害剤におけるシグナル糖鎖 M8B あるいは M8A/C 産生に対する阻害選択性を比較した。2.5 にて、抽出した SAMP6 マウス肝臓由来の小胞体画分 (3 mg protein/mL) と 5 種の mannosidase 阻害剤をそれぞれ別の反応系でプレインキュベートした。その後、基質である M9-Gly-BODIPY (2.5 μ M) を加えた反応液を 37°C、30 分インキュベート後、HPLC 分析のために後処理し、反応溶液中の産生糖鎖を分析した。種々の阻害剤濃度における得られた産生糖鎖の HPLC における面積ピークを 2.4.4 にて記載した方法によって解析し、M8B および M8A/C 産生の阻害率をグラフ作成、解析ソフト KaleidaGraph によってグラフ化した。また、得られたグラフから IC₅₀ 値を算出した。

はじめに、以下に記載されている阻害剤濃度は先行実験にて、大まかに阻害能を評価した後、決定したものであることを付記しておく。

ManIm に関して、その阻害剤濃度を 1-1000 μ M の範囲で設定し、M8B および M8A/C 産生に対する阻害率を阻害曲線として表した (Figure 16A)。実験結果から得られた阻害曲線を評価したところ、ManIm は 1000 μ M において M8B および M8A/C 産生を全て阻害したが、両者間に差はなく阻害選択性は示されなかった。

続いて、Kif に関して、阻害剤濃度を 0.01-1 μ M に設定し、同様に M8B および M8A/C 産生に対する阻害率を阻害曲線として表した (Figure 16B)。Kif は、0.5 μ M において M8B 産生を 90% 近く阻害し、その濃度における M8A/C 産生は、およそ 50% 程度であった。また、1 μ M においては、M8B および M8A/C をそれぞれ、95% 以上、80% 以上阻害した。すなわち、Kif は 0.5 μ M において M8A/C と比べ、M8B をより阻害すると示された。これらの結果から、Kif により M8 異性体産生の選択的阻害が可能であると初めて判明した。

引き続き、Man A について 10-5000 μM に阻害剤濃度を設定し、阻害曲線を表した (Figure 16C)。阻害曲線を評価すると、Man A は M8B および M8A/C を共に阻害し、その阻害率は、1 mM においてそれぞれ、およそ 25%、75%であった。さらに、両阻害曲線から、M8A/C を選択的に阻害していると示された。しかしながら、前述の阻害剤とは異なり、その選択的阻害に mM オーダーでの系内への添加が必要であった。

また、SW に関しては、1-10000 μM に阻害剤濃度を設定し、阻害曲線として表し (Figure 16D)、阻害選択性を評価した。その結果、10 mM において、M8A/C 産生のおよそ 70%を阻害した。一方で、同濃度における M8B 産生阻害はおよそ 25% 程度となった。しかしながら、Man A 同様 mM オーダーでの系内への添加が必要であった。

最後に、dMJ に関して 0.01-100 μM で阻害剤濃度を設定し、その阻害曲線を描いた (Figure 16E)。得られた阻害曲線から、100 μM において M8B および M8A/C 産生を完全に阻害すると示された。しかし、5 μM において、M8A/C 産生をおよそ 90%以上阻害し、一方で M8B 産生に対する阻害は 60%程度であった。すなわち、残存している M8B 産生能は、40% 程度であり、dMJ の M8A/C 産生に対する選択的阻害が示唆された。さらに、選択的阻害は、 μM オーダーでの系内への添加でよく、M8A/C 産生を選択的に阻害する化合物の中で、dMJ が最も阻害能が高いと示唆された。

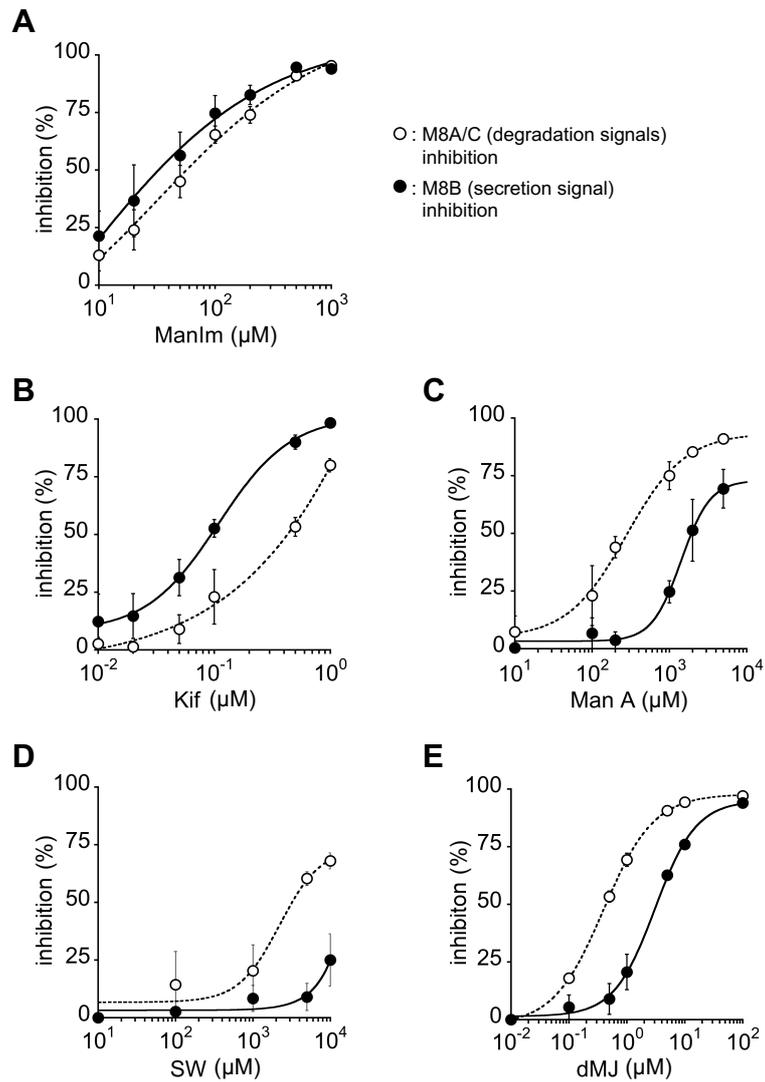


Figure 16. Inhibition selectivities of mannosidase inhibitors for production of the secretion (M8B) and degradation (M8A/C) glycosignals. Inhibition curves for A) ManIm, B) Kif, C) Man A, D) SW, and E) dMJ. Closed circle: M8B inhibition; open circle: M8A/C inhibition. Each data point represents mean values with standard error (n = 3).

これらの結果を踏まえ、それぞれの M8B 産生に対する IC₅₀ として IC₅₀^{M8B}、M8A/C 産生に対する IC₅₀ として IC₅₀^{M8A/C} を算出し、以下に示した (Table 1)。

Table 1. IC₅₀ Values of mannosidase inhibitors for M8B and M8A/C production.

Compounds	IC ₅₀ ^{M8B} [μM] ^[a]	IC ₅₀ ^{M8A/C} [μM] ^[a]
ManIm	37 ± 16	60 ± 13
Kif	0.090 ± 0.013	0.40 ± 0.080
Man A	1.9 × 10 ³ ± 0.66 × 10 ³	0.27 × 10 ³ ± 0.090 × 10 ³
SW	> 1.0 × 10 ⁴	3.3 × 10 ³ ± 0.66 × 10 ³
dMJ	3.0 ± 0.28	0.43 ± 0.039

[a] Mean of IC₅₀ Values with standard error (n = 3)

Table1 から、M8B および M8A/C 産生に対する IC₅₀ 値を踏まえ、その阻害選択性について以下に述べる。

ManIm は、阻害曲線から推定していたように阻害選択性の発現は観測されず、それぞれの IC₅₀ 値が、IC₅₀^{M8B} = 37 ± 16 μM であり、IC₅₀^{M8A/C} = 60 ± 13 μM であった。すなわち、ManIm は阻害選択性を持たないと判明した。Kif に関しては、M8B および M8A/C 産生に対して、選定した化合物中で最も有力な阻害剤であると示された。また、IC₅₀ 値を踏まえても、M8B 産生に対する選択的阻害能を有していると判断した。また、Man A、SW、dMJ に関しては、IC₅₀ 値の比較から、それぞれの化合物の M8A/C 産生に対する選択的阻害を支持する結果が得られ、3 種類の候補化合物のうち、dMJ が最も阻害選択性および阻害能が高いと判明した。

以上の結果を踏まえると、Kif が M8B 産生を選択的に阻害し、一方で dMJ における M8A/C 産生の選択的阻害が示された。すなわち、M8B および M8A/C 産生経路における 2 種類以上の酵素の独立的な作用が示唆された。

2.6.4

阻害選択性に関する考察

本項においては、前項までに明らかになった種々の *mannosidase* 阻害剤における阻害選択性発現の要因について考察した。

はじめに、複数の市販の *mannosidase* 阻害剤において程度の違いはあれ阻害選択性が発現した理由を考える。2.3 でも述べたように、これまでこれらの阻害剤を添加する実験において、その濃度はあまり気にされておらず、全てのマンノース切断を阻害する高濃度で用いられてきた。さらに、細胞ベースでの実験においては、微妙な濃度調節は難しく、これまで阻害剤の持つ真の阻害選択性が見過ごされてきた可能性があるかと推測される。

一方で、 α -1,2-*mannosidase* 類が混在している中で、同じ基質に対する阻害能の差異を評価できたのは、*in vitro* にて M8B および M8A/C 産生をほぼ同等に検出できる測定系が確立されていたためである。以上の 2 つの条件を化学的研究手法によって満たしていたため、今回市販されている *mannosidase* 阻害剤群の再評価ができ、阻害剤機能の再発見につながったものと考えられる。

続いて、阻害選択性の発現について考察した。今回、阻害選択性を発現した Kif および dMJ と全く阻害選択性が発現しなかった ManIm に着目して以下考察を進める。M8B 産生を選択的に阻害する Kif は、 α -1,2-*mannosidase* 類に対して、 1C_4 型配座を取る。さらに、この化合物は 2 環性骨格であるため (Figure 17)、阻害する際の配座は固定され、確実に 1C_4 型配座となる。しかしながら、2 環性骨格を有する SW (Figure 17) においては、阻害選択性が逆転した。これらを踏まえると、2 環性である必要性はなく、それぞれの阻害剤の阻害様式を推定して 2 つの可能性を考える必要がある。

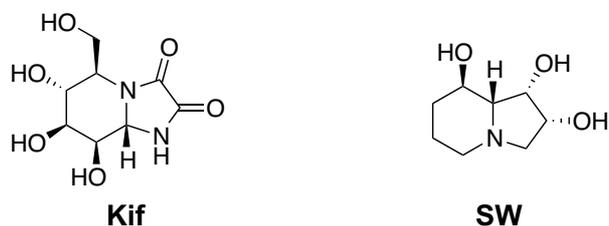


Figure 17. Structural difference between Kif and SW.

まず 1 つ目の可能性として、両阻害剤が共に M8B 産生に関わる α -1,2-mannosidase 活性部位に結合した場合を推測する。この場合、酵素活性中心において、それぞれ阻害剤は Ca^{2+} と相互作用すると考えられる。この Ca^{2+} との相互作用は、Kif の 6 員環骨格中の 2、3 位のヒドロキシ基が重要であると報告されており⁵³⁾、SW で同じように相互作用すると、2 環性の 5 員環部位が該当すると推測される。その際、SW は、Kif に比べ、ヒドロキシ基が少なく、 Ca^{2+} と相互作用すると残りのヒドロキシ基は 1 残基となる。さらに、SW には Kif とは異なりメチレンを介したヒドロキシ基は存在しないため、空間的にも相互作用可能な距離が短くなる。すなわち、必然的に M8B 産生に関わる α -1,2-mannosidase に対する相互作用が弱まり、結合の可能性が極めて低いと推測される。

2 つ目の可能性として、阻害剤の阻害様式が異なり、 α -1,2-mannosidase 類で結合部位が違う場合を推測する。先ほど同様、Kif と SW を例に考えると、Kif は既に α -1,2-mannosidase 類に対して競合阻害であると報告があり、今回の M8B 産生に関わる α -1,2-mannosidase に関しても競合阻害の可能性が高いと考えられる。加えて、既に結晶構造が解かれている ERManI に限らず、全ての α -1,2-mannosidase 類において、酵素活性に重要なアミノ酸残基は全て保存されている⁵⁴⁾。すなわち、どの α -1,2-mannosidase に関してもその取りう

る配座は 1C_4 型となると考えた。一方、SW の β -1,2-mannosidase に対する阻害様式は明らかとなっておらず、前述の競合阻害の場合とは結合部位が異なる可能性が充分考えられる。この場合においても実験結果から考察するに SW と M8B 産生に関わる β -1,2-mannosidase との相互作用は弱いと考えられる。

これらの考察をまとめると、M8B 産生の阻害選択性の発現には、その阻害剤の取りうる配座が 1C_4 型配座である必要性は高く、M8B 産生に関わる β -1,2-mannosidase の活性部位に結合できる阻害剤の方が阻害選択性を発現しやすいと考えられる。

一方で、M8A/C 産生に関する阻害選択性の発現についても以下に考察する。こちらの阻害選択性発現に関しては、M8B 阻害選択性の発現と比べ、化合物の骨格に特に共通点は見出せなかった (Figure 18)。すなわち、5員環骨格、2環



Figure 18. Selective inhibitors for M8A/C production.

性骨格または 6 員環骨格と全く異なる骨格化合物が M8A/C 産生阻害に対して類似の選択性を発現した。これら化合物の共通点は、全て数は違うが、ヒドロキシ基を有している点である。これらの結果から、M8A/C 産生に関わる β -1,2-mannosidase は、ヒドロキシ基を認識し、比較的幅広い範囲で阻害剤を認識すると考えられる。しかしながら、最も阻害選択性および阻害能が高い化合物は dMJ であり、やはり糖骨格を模倣した構造が最適だと考えられる。また、dMJ の阻害選択性は高いものの高濃度下においては、 β -1,2-mannosidase 活性を全て阻害する。これらを複合的に考察するために、Kif と dMJ の骨格中の共通部位である 6 員環に着目し、その配座について考える必要がある。

Kif は前述の通り、2 環性のため 1C_4 型配座に固定されている。一方で、dMJ の取りうる配座を考えると、M8B 産生に関わる ERManI においては、 1C_4 型であると知られている。しかし、水中において糖骨格あるいはそれを模倣した構造を有する化合物は 1C_4 型配座よりエネルギーの低い 4C_1 型配座を取りやすい。Kif の場合、2 環性であるために、配座は固定されるが、dMJ は容易に配座が変換される可能性が高い。

これらを鑑みると、M8A/C 産生に関わる \square -1,2-mannosidase に対して dMJ は 4C_1 型配座で阻害し、高濃度下におけるマイナー配座である 1C_4 型配座によって M8B 産生に関わる \square -1,2-mannosidase を阻害していると考えられる。

最後に、全く阻害選択性を発現しなかった ManIm について考察する。ManIm の取る配座は \square -1,2-mannosidase の触媒反応における遷移状態である 3H_4 型配座である。すなわち、どの \square -1,2-mannosidase 類が活性を示すにも必ず通る必須な配座を模倣しているため、阻害能は高いが、阻害選択性は発現しなかったものと考えられる。

以上をまとめると、 \square -1,2-mannosidase 類の阻害に関しては、阻害剤構造中におけるヒドロキシ基の存在および糖残基の配座が重要であり、M8B 産生に関わる \square -1,2-mannosidase に対しては、 1C_4 型配座が好ましく、M8A/C 産生に関わる \square -1,2-mannosidase に対しては、 4C_1 型配座が阻害剤として有効であると考察した。さらに、遷移状態の 3H_4 型配座を有する化合物には阻害選択性は発現しないと考えられる。

2.6.5

まとめ

これまでの実験結果および考察をまとめると、種々の mannosidase 阻害剤の中から、M8B 産生に対する選択的阻害剤として Kif を M8A/C 産生に対する選択的阻害剤として dMJ を見出した。さらに、阻害選択性の発現には、ヒドロキシ基の存在と配座が重要であるとわかった。

これらを総合すると、種々の mannosidase 阻害剤を使い分けると、M8B および M8A/C の選択的阻害が可能であると証明された。すなわち、本実験の目的に適うどちらか一方のシグナル糖鎖の選択的阻害は Kif および dMJ によって実現できることが判明した。

2.7

種々の酵素阻害剤を用いた構造活性相関

本節では、阻害選択性の要因をより深く理解すべく、構造活性相関について検討した。はじめに、ManIm 骨格にアルキル鎖または芳香環を導入した誘導体について検討し、M8B および M8A/C 産生に対する阻害選択性の発現要因を究明した。さらに、dMJ の母格を有する nojirimycin 系阻害剤における検討から、阻害選択性発現に対する要因の解明を試みた。

2.7.1

アルキル鎖や芳香環を導入した誘導体における阻害選択性の比較

アルキル鎖や芳香環にて誘導体化した阻害剤に対する構造活性相関を考察すべく、誘導体群の阻害選択性を比較した。

アルキル鎖や芳香環の導入を選択した理由として、ある種の α -1,2-mannosidase 類には、疎水性認識部位が存在すると示唆されているためである³⁴⁾。実際に、小胞体における α -1,2-mannosidase 類の酵素活性の検出時においても、糖鎖部位以外のアグリコン部位認識が示唆され、疎水性度の高い基質ほど有意に糖鎖切断されると報告されている³⁴⁾。これらを総合し、 α -1,2-mannosidase 類の活性発現において糖鎖部位と疎水性の認識の 2 つの機能を持つ α -1,2-mannosidase 類が存在すると仮定した。タンパク質の折りたたみが不完全である不良糖タンパク質では、その表面に疎水性が露出しやすく、分泌あるいは分解糖タンパク質の選別に関わる α -1,2-mannosidase 類が疎水性認識をしている可能性は高いと考えた。

この仮定をもとに、活性部位周辺での疎水性認識を志向して、単純なアルキル鎖や芳香環を導入した 2-phenyl ManIm、2-phenethyl ManIm、2-octyl ManIm、*N*-butyl dMJ および *N*-decyl dMJ について検討した (Figure 19)。

最初に、2.6.3 および 2.6.4 にて、阻害選択性が発現しなかった ManIm に対して、阻害選択性の付与を期待し、ManIm 誘導体群の阻害選択性を比較した。

また本研究において、使用した ManIm 誘導体群は、メルボルン大学 Spencer J. Williams 教授らの研究グループからご供与頂いた。

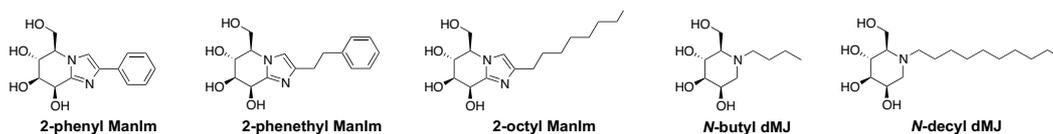


Figure 19. Compounds for Structure-activity relationship analysis.

2.7.2

ManIm 誘導体群における阻害選択性

まず、ManIm のイミダゾール部位の 2 位にフェニル基を導入した 2-Phenyl ManIm について、0.01-1000 μM の阻害濃度範囲において、その阻害率を算出した。しかしながら、2-Phenyl ManIm は、M8B および M8A/C 産生をいずれも阻害しなかった (Figure 20A)。

一方で、2-phenyl ManIm に対してメチレン鎖を導入した 2-phenethyl ManIm に関しては、100-10000 μM の阻害剤濃度においてその阻害率を算出し、阻害曲線として表した (Figure 20B)。さらに、2 mM において M8A/C 産生を 80% 近く阻害し、一方で、M8B 産生はおよそ 60% 程度と阻害選択性の発現が示唆された。

さらに、イミダゾール部位の 2 位に単純なアルキル鎖を伸長した 2-octyl ManIm においてもその阻害選択性を検討した。阻害剤濃度を 10-10000 μM に設定し、その阻害率から阻害曲線を描いた (Figure 20C)。その結果、50 μM において、M8A/C 産生を 50% 以上阻害し、同濃度における M8B 産生は、20% 程度であった。

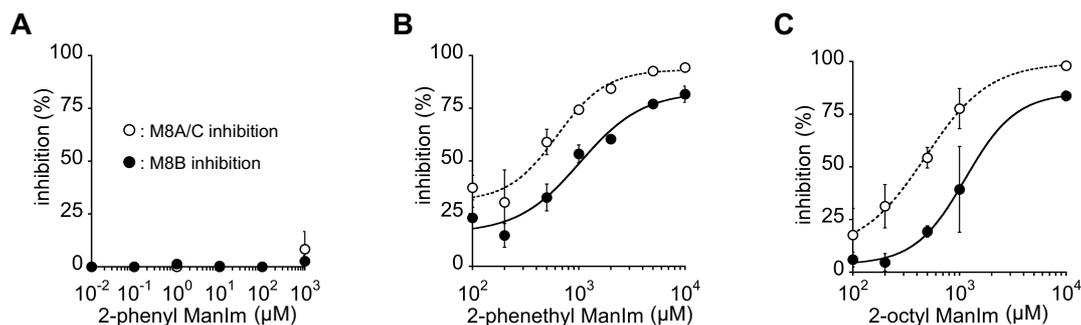


Figure 20. Inhibition selectivities of ManIm for production of the secretion (M8B) and degradation (M8A/C) glycosignals. Inhibition curves for (A) 2-phenyl ManIm, (B) 2-phenethyl ManIm and (C) 2-octyl ManIm, Closed circle: M8B inhibition; open circle: M8A/C inhibition. Each data point represents mean values with standard errors (n=3).

また、これら ManIm 誘導体群に関しても、Table 1 と同様に、IC₅₀ 値を基準として定量的に表した (Table 2)。ManIm を誘導体群に対する基本化合物とし、アルキル鎖および芳香環導入における阻害選択性への影響を解析した。その結果、2-phenyl ManIm および 2-phenethyl ManIm は共に M8B 産生に対して mM オーダーの、M8A/C 産生に対しては μM オーダーの IC₅₀ 値を示した。すなわち M8A/C 産生に対する IC₅₀ 値の方が低く、M8A/C 産生を選択的に阻害していた。

Table 2. IC₅₀ Values of ManIm derivatives for M8B and M8A/C production.

Compounds	IC ₅₀ ^{M8B} [μM] ^[a]	IC ₅₀ ^{M8A/C} [μM] ^[a]
ManIm	37 \pm 16	60 \pm 13
2-phenyl ManIm	ND	ND
2-phenethyl ManIm	1.2 \times 10 ³ \pm 1.3 \times 10 ²	5.0 \times 10 ² \pm 40
2-octyl ManIm	2.6 \times 10 ³ \pm 6.7 \times 10 ²	2.6 \times 10 ² \pm 60

[a] Mean of IC₅₀ Values with standard error (n = 3) ND: Not determined.

これらの結果を総合すると、イミダゾール部位の 2 位に疎水性を有する官能基を伸長すると、M8A/C 産生に関わる α -1,2-mannosidase に対して阻害選択性が発現した。

2.7.3

阻害選択性に関する考察

2.7.2 における阻害選択性の比較から、ManIm 骨格のイミダゾール 2 位に対してアルキル基または芳香環を導入し、化合物に疎水性を付与すると ManIm とは異なり、阻害選択性が発現した。本項においては、以下にその考察を示した。

まず、前提として前項までに述べているように、ManIm は阻害選択性を発現しないが \square -1,2-mannosidase 類に対して阻害効果を示した。一方で、2-phenyl ManIm においては、 \square -1,2-mannosidase 類に対する阻害自体が観測できなかった。この理由をすでに報告されている ManIm とバクテリア由来 \square -1,2-mannosidase の X 線共結晶構造解析の結果⁴⁴⁾を踏まえて考える。

X 線共結晶構造解析の結果を見ると、ManIm のイミダゾール部位の 2 位は、酵素活性部位の外側に位置していると考えられる (Figure 21A)。しかし、直接フェニル基が結合した 2-phenyl ManIm においては、フェニル基自体の嵩高さの影響を解消できないと考えた。すなわち、フェニル基を有しているために、標的 \square -1,2-mannosidase との結合力が弱まり、酵素活性部位に 2-phenyl ManIm が結合できなかったと考えた。

一方、メチレン鎖を介した 2-phenethyl ManIm は、阻害効果を示し、さらに M8A/C 産生に対して阻害選択性が発現した。この原因について M8B 産生に関わる \square -1,2-mannosidase の候補である ERManI と Kif との X 線共結晶構造解析の結果を加味して考える (Figure 21B)。すなわち、2-phenethyl ManIm はメチレン鎖を導入したために、フェニル基の取りうる空間的配置に柔軟性が生まれ、阻害剤が結合する際の酵素活性部位周辺におけるアミノ酸との立体障害を回避すると考えた。具体的には、ERManI は酵素活性部位周辺に基質特異性発現への関与が示唆される 461 番目のアルギニン (R461) を有している⁵⁴⁾ (Figure 21B)。メチレン鎖により柔軟性を獲得した 2-phenethyl ManIm は、比較的立体障害を回避しやすい位置へのフェニル基の存在可能性が考え

られる。しかしながら、R461のアミノ酸と立体障害を起こす位置にフェニル基があるために、阻害剤との結合は弱くなると考えた。対照的に、X線結晶構造の解かれていない他の β -1,2-mannosidase 類の R461 に対応するアミノ酸残基は、グリシン残基である³⁰⁾ (Figure 21C)。このことが、阻害選択性発現の一つの要因と考えた。また、2-octyl ManIm に関しても、主に上記の理由で阻害選択性が発現したものと考えられる。

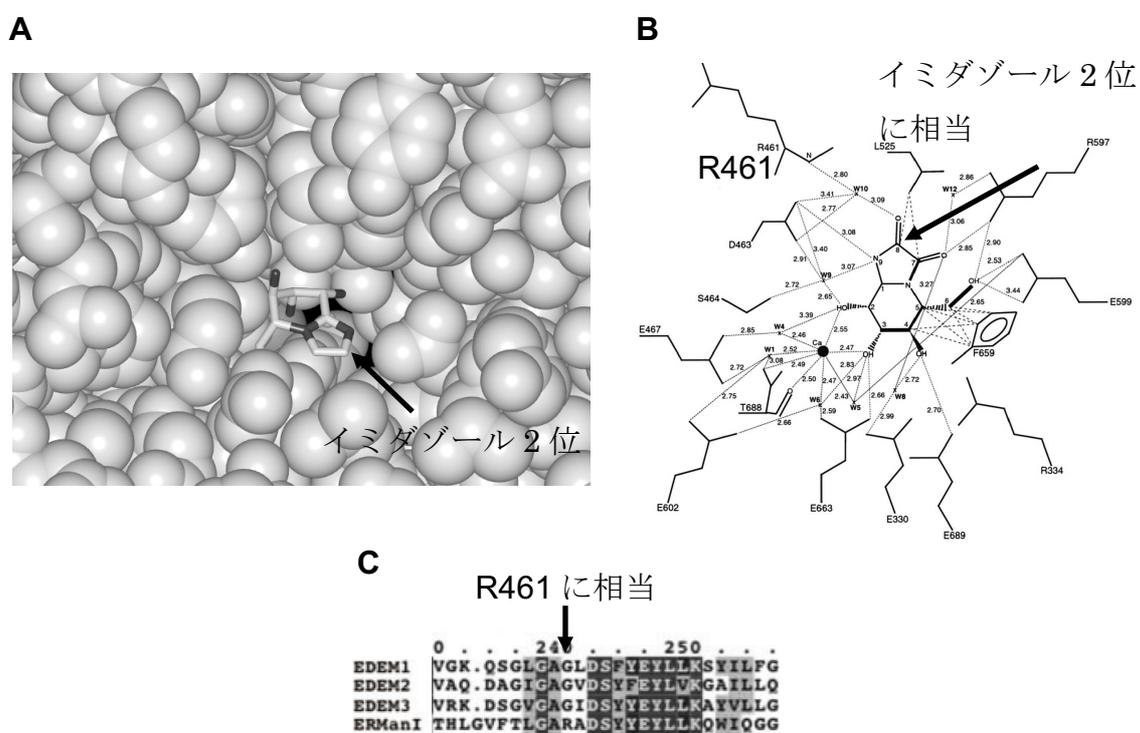


Figure 21. X-ray co-crystal structures of GH47 mannosidase. (A) crystal structure of bacterial GH47 mannosidase and ManIm. (B) crystal structure of human ERManI and Kif. (C) Alignment of human ERManI, EDEM1, EDEM2 and EDEM3 around R461 residue.

出典: Ref(30) (44) (53) より改変

2.7.4

まとめ

以上、ManIm 誘導体群の阻害選択性を比較し、その阻害選択性発現の要因を考察した。まず、ManIm 骨格近傍への嵩高いフェニル基の導入は、 α -1,2-mannosidase に対する阻害効果を消失させた。一方で、2-phenethyl ManIm および 2-octyl ManIm はともに中程度の阻害能と阻害選択性の発現を有していた。

これらを総合すると、酵素活性部位からある程度距離をとった位置における ManIm イミダゾール 2 位へのアルキル鎖または芳香環といった疎水性の付与は、ManIm を母格とした阻害剤に対して阻害選択性を発現させる要因になりうると示唆された。

2.7.5

dMJ 誘導体における阻害選択性

続いて、Kif および dMJ の共通骨格である 6 員環に着目し、前節までの結果を踏まえて dMJ 誘導体を合成、その阻害選択性について比較した。

これまでの研究から、最もよく研究が進んでいる α -1,2-mannosidase 類の ERManI は、dMJ との X 線共結晶構造解析の結果、dMJ の N 原子が酵素活性部位の中心から外側に向かう形で結合している^{51),53)}。すなわち、今回、阻害選択性を議論する ERManI を含む α -1,2-mannosidase 類は、イミノ糖骨格のヒドロキシ基をもとにして相互作用している可能性が高い。

さらに、前項の検討より明らかとなった疎水性部位の付与による阻害選択性の制御を踏まえ、アルキル鎖にて伸長した *N*-butyl dMJ⁵⁶⁾ および *N*-decyl dMJ を合成し、その阻害選択性を検討した (Figure 22)。

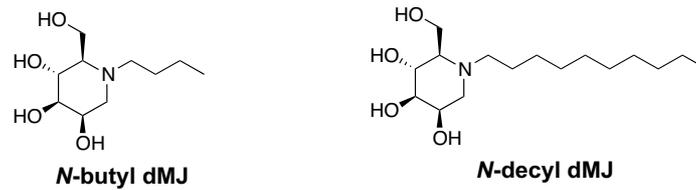


Figure 22. Chemical structures of dMJ derivatives.

まず、*N*-butyl dMJ の阻害剤濃度を 0.1-1000 μM に設定し、各阻害剤濃度における阻害率を算出し、その阻害効果を阻害曲線に表した (Figure 23A)。*N*-butyl dMJ は、阻害剤濃度 20 μM において M8A/C 産生を 75%以上阻害し、M8B 産生に対する阻害は 50%以下であった。すなわち、M8A/C 産生を選択的に阻害していた。また、*N*-decyl dMJ の阻害効果は、阻害剤濃度 20 μM にて、M8A/C 産生を 60%程度阻害し、M8B 産生に対して 40%程度となった (Figure 23B)。

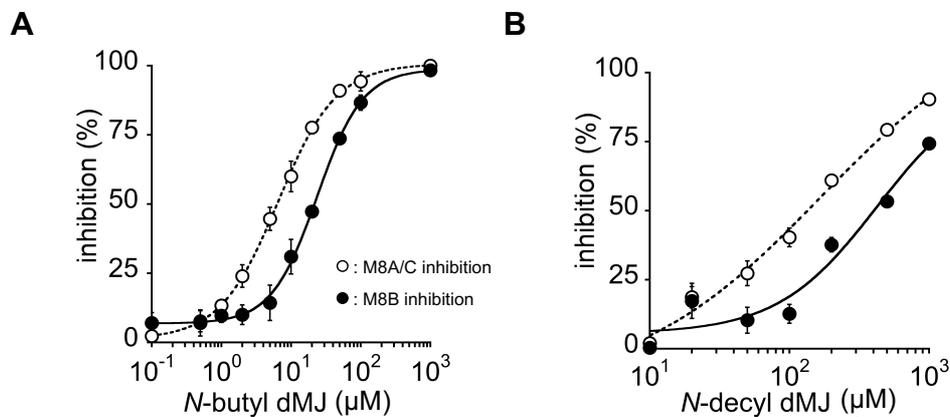


Figure 23. Inhibition selectivities of dMJ derivatives for production of the secretion (M8B) and degradation (M8A/C) glycosignals. Inhibition curves for (A) *N*-butyl dMJ and (B) *N*-decyl dMJ. Closed circle: M8B inhibition; open circle: M8A/C inhibition. Each data point represents mean values with standard errors (n=3).

また、Table 3 を参考に IC₅₀ 値を基準として定量的に結果を解釈した。その結果、*N*-butyl dMJ および *N*-decyl dMJ はそれぞれ M8B 産生に対する IC₅₀ 値に比べ M8A/C 産生に対する IC₅₀ 値の方が低く、M8A/C 産生を選択的に阻害した。また、dMJ を基準として考えた場合、誘導体群の阻害能は伸長するアルキルの長さに関連して低くなった。

これらを総合すると、6 員環骨格中に N 原子にアルキル鎖を導入した場合、阻害能は低下するが、dMJ 誘導体はいずれも M8A/C 産生に対する選択的阻害能を有していた。

Table 3. IC₅₀ Values of dMJ derivatives for M8B and M8A/C production.

Compounds	IC ₅₀ ^{M8B} [μM] ^[a]	IC ₅₀ ^{M8A/C} [μM] ^[a]
dMJ	3.0 ± 0.28	0.43 ± 0.039
<i>N</i> -butyl dMJ	30 ± 4.2	2.7 ± 0.44
<i>N</i> -decyl dMJ	6.1 × 10 ² ± 60	60 ± 50

[a] Mean of IC₅₀ Values with standard error (n = 3)

2.7.6

阻害選択性に関する考察

本項では、dMJ 誘導体における M8B 産生および M8A/C 産生に対する阻害選択性を以下に考察する。誘導体化による阻害選択性を比較する基準の阻害剤として、dMJ を選択した。

異なるアルキル鎖を有する dMJ 誘導体群においても、dMJ 同様の阻害選択性を示した。これらの結果から、dMJ 骨格の N 原子に対してアルキル鎖を導入しても、阻害選択性は変化しないとわかった。しかしながら、アルキル鎖の導入により阻害剤骨格が本来持つ阻害能に関しては低下した。阻害能の低下は、アルキル鎖の長さが長いほど顕著に現れた。この実験結果を踏まえると、アルキル鎖の長さに応じた立体障害がその阻害能に影響を与える可能性があると考えられる。

これらを総合して、アルキル基を用いた dMJ 骨格中の N 原子における修飾では、阻害選択性が保持されると考えられる。

2.7.7

まとめ

以上、dMJ 誘導体群の阻害選択性の比較から、N 原子近傍における構造活性相関を検討した。dMJ を基準としてアルキル鎖導入における阻害選択性への影響を解析したところ、*N*-butyl dMJ、*N*-decyl dMJ 共に阻害能の低下が観測された。この理由は、アルキル鎖を導入した dMJ の立体障害により、標的 α -1,2-mannosidase 類に対する結合力が低下したためだと考えられる。しかしながら、dMJ 誘導体における阻害選択性は、dMJ の持つ阻害選択性が保持されていた。すなわち、dMJ 骨格の N 原子をアルキル鎖にて誘導体化可能であると示された。

2.7.8

dMJ 類縁体における阻害選択性の比較

これまでの検討では、2.6 にて、M8B あるいは M8A/C 産生に対する選択的阻害剤としてそれぞれ Kif あるいは dMJ を発見し、2.7.2 および 2.7.5 において ManIm 骨格あるいは dMJ 骨格に対する構造活性相関を検討した。これらの阻害剤は全て共通点として nojirimycin 骨格を有している。また、 α -1,2-mannosidase 類に対しては主に 6 員環構造におけるヒドロキシ基との結合が軸となり阻害効果があらわれていると想定される。そこで、本節においては、ヒドロキシ基の立体配置に着目し、dMJ 類縁体の阻害選択性を比較した。

実際には、Galactosidase 阻害剤の dGJ、Fucosidase 阻害剤 dFJ さらには Glucosidase 阻害剤 dNJ を選定した (Figure 24)。これらの阻害剤は、 α -1,2-mannosidase 類に対する阻害効果は報告されていないため、本論文ではその特徴は記載しない。

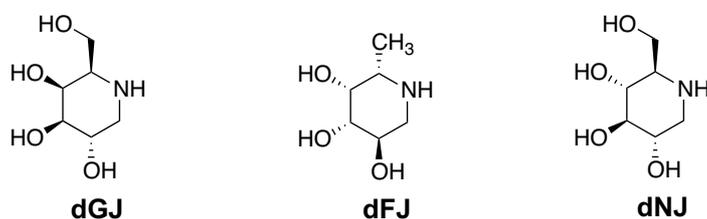


Figure 24. Chemical structures of dMJ analogues.

はじめに、dGJ の阻害剤濃度を 1-1000 μM とし、各阻害剤濃度における阻害率を算出し、阻害曲線とし、 IC_{50} 値を算出した。(Figure 25 and Table 4)。予測通り、dGJ の α -1,2-mannosidase 類に対する阻害効果は観測されなかった。一方で、dFJ の阻害剤濃度を 1-50000 μM に設定し、各濃度における阻害率を算出、阻害曲線を描いたところ、高濃度になるにつれて弱い阻害効果が観測された (Figure 25B)。さらに、dNJ の阻害剤濃度を 1-50000 μM に設定し、各濃度における阻害率から阻害曲線に表したところ、 α -1,2-mannosidase 類に対して阻害効果を示していた (Figure 25C)。特に、dNJ では 50 mM の高濃度の場合に、M8B 産生を 90%以上阻害し、一方で、M8A/C 産生阻害は 10% 以下であった。これらの結果から、dMJ 類縁体の阻害選択性の比較を通して、 α -1,2-mannosidase 類への阻害効果を持つ dNJ を見出した。

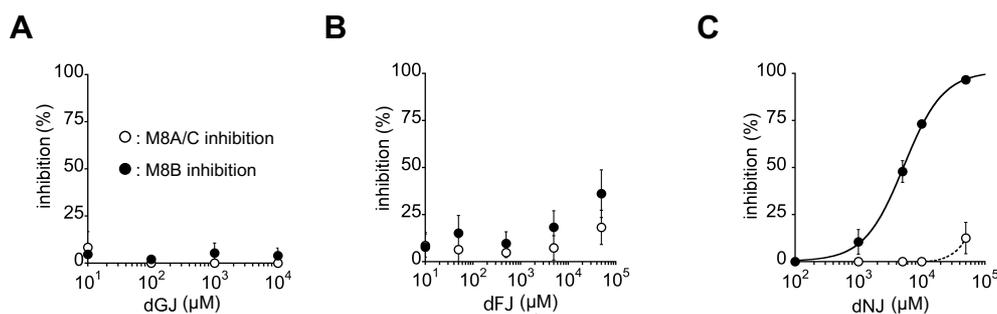


Figure 25. Inhibition selectivities of ManIm and dMJ derivatives for production of the secretion (M8B) and degradation (M8A/C) glycosignals. Inhibition curves for (A) dGJ, (B) dFJ and (C) dNJ. Closed circle: M8B inhibition; open circle: M8A/C inhibition. Each data point represents mean values with standard errors (n=3).

Table 4. IC₅₀ Values of dMJ analogues for M8B and M8A/C production.

Compounds	IC ₅₀ ^{M8B} [μM] ^[a]	IC ₅₀ ^{M8A/C} [μM] ^[a]
dMJ	3.0 ± 0.28	0.43 ± 0.039
dGJ	ND	ND
dFJ	ND	ND
dNJ	5.3 × 10 ³ ± 0.86 × 10 ³	> 5.0 × 10 ⁴

[a] Mean of IC₅₀ Values with standard error (n = 3)

2.7.9

阻害選択性に関する考察

dMJ 類縁体の構造活性相関実験から、全く予期していなかった dNJ の α-1,2-mannosidase 類に対する阻害効果および dNJ の阻害選択性について見出した。そこで、本節においては、その阻害選択性発現の要因を考察した。ここで、考察を進めていく上で、dMJ を基準として、その阻害選択性発現の要因を説明する。

dGJ は、dMJ の C2 および C4 位におけるヒドロキシ基の立体配置が逆転した化合物であり、dNJ は dMJ の C2 位におけるヒドロキシ基の立体配置が逆転している (Figure 26)。

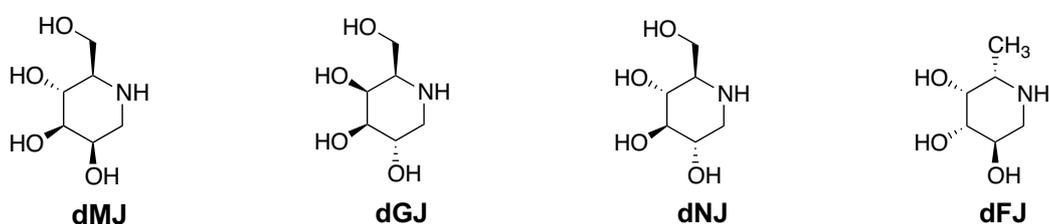


Figure 26. Conformation difference among dMJ analogues.

はじめに、dGJ と dNJ の阻害選択性発現の要因について考察する。dGJ は、M8B および M8A/C 産生に関わる α -1,2-mannosidase 類をいずれも阻害しなかった。一方で、dNJ は、M8B 産生に関わる α -1,2-mannosidase に対して阻害選択性を発現した。これらの結果を踏まえ、C2 および C4 位のヒドロキシ基の立体配置に着目し、阻害選択性の発現要因を考察する。

まず、dMJ および dNJ と dGJ の C4 位のヒドロキシ基に注目すると、dGJ のみその立体配置が逆転している (Figure 26)。すなわち、 α -1,2-mannosidase 類に対しては dMJ および dNJ の C4 位のヒドロキシ基の空間配置が阻害に適していると考えた。実際に、ERManI と Galactose (Gal) 単糖のコンピュータによるドッキングシミュレーションに関する報告から⁵⁷⁾、C4 位のヒドロキシ基の空間的配置を考察する。単糖は溶液中で、配座のエネルギー順位が低い 4C_1 型配座を取る可能性が高い。一方で、 α -1,2-mannosidase 類触媒メカニズムにおける 1C_4 型の経路を考えると、両配座における Gal の空間的配置を考慮する必要がある。しかしながら、基質が 1C_4 型配座を取るのは、主にマンノース骨格の 2、3 位と Ca^{2+} との相互作用の結果であると考えられる。Gal- 1C_4 においては、dMJ の 2、3 位ヒドロキシ基と近い位置に、Gal のヒドロキシ基は配置されていない (Figure 27A)。この結果から、Gal- 1C_4 が、酵素活性部位に結合している可能性は低いと考えた。さらに、ドッキング結果から考えられる各ヒドロキシ基の空間的配置を鑑みても、Gal- 1C_4 が結合する可能性は低いと考えられた。一方、Gal- 4C_1 で α -1,2-mannosidase 類と結合する可能性に関しては、こちらの配座のドッキング結果から 4 位ヒドロキシ基の空間的配置は、dMJ の空間配置とは離れており (Figure 27B)、この空間的な制約により、阻害剤認識が妨げられていると考えられる。

総合して、dGJ は Gal- 4C_1 型で、 α -1,2-mannosidase 類の酵素活性部位への結合が考えられるが、4 位ヒドロキシ基の影響で認識されにくくなっている可能性があり、 α -1,2-mannosidase 類の阻害における C4 位ヒドロキシ基の立体配置の重要性が示唆される。

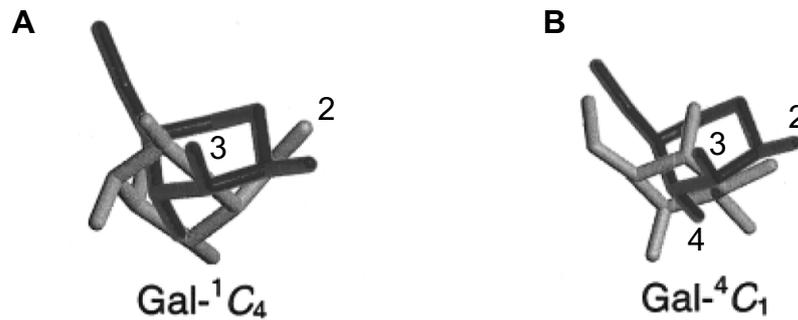


Figure 27. Docking study of Gal chair conformation versus dMJ-¹C₄. (A) Gal-⁴C₁ docking simulation and (B) Gal-⁴C₁ docking simulation. black: dMJ-¹C₄ gray: Gal-chair conformation.

出典: Ref (57) より改変

一方で、C2位におけるヒドロキシ基の立体が、M8B および M8A/C 産生の阻害に与える影響について考察する。dNJ は、dMJ の C2 位ヒドロキシ基が立体反転した構造であるが、M8B 産生を選択的に阻害した。この理由として、C2位ヒドロキシ基の立体配置が重要な要因であると考えられる。先ほどと同様、ERManI と dNJ のドッキング研究と β -1,2-mannosidase 類の触媒メカニズムからその阻害選択性発現の要因を C2 位のヒドロキシ基に着目して考察した。

dNJ においても、水中では、dNJ-⁴C₁ と dNJ-¹C₄ 型の 2 パターンでの酵素活性部位における阻害剤認識が考えられる。しかしながら、dNJ-⁴C₁ 型の場合、触媒メカニズムの最初で重要な C2、3 位ヒドロキシ基における Ca²⁺ との相互作用は、形成できないと考えられる (Figure 28A)。一方で、dNJ-¹C₄ 型の場合、C3、4 位ヒドロキシ基の空間的な位置は、dMJ-¹C₄ 型と比較しても比較的重なる部分が多い (Figure 28B)。このシミュレーションの結果から、M8B 産生に関わる β -1,2-mannosidase において、C3 位ヒドロキシ基における Ca²⁺ との相互作用と C4 位ヒドロキシ基の酵素活性部位における相互作用を軸として、グ

ルコース型の立体配置を持つ dNJ を認識している可能性が示唆される。



Figure 28. Docking study of dNJ chair conformation versus dMJ-¹C₄. (A) dNJ-⁴C₁ docking simulation and (B) dNJ-⁴C₁ docking simulation. black: dMJ-¹C₄ gray: dNJ-chair conformation.

この考察から、 α -1,2-mannosidase 類の阻害選択性発現における、2 位ヒドロキシ基の立体配置の重要性が示唆される。M8B 産生に関わる α -1,2-mannosidase に関しては、dNJ-¹C₄ 型において、dMJ の阻害剤認識よりは弱いものの、C3 位ヒドロキシ基と Ca²⁺ が相互作用できるために高濃度下における阻害が観測されたと推測した。

さらに、dFJ についても β -1,2-mannosidase 類に対する弱い阻害効果が示された。この現象について以下に考察する。Fucose は一般的に L-体であり、それを加味すると、dMJ の C2、4 位ヒドロキシ基と立体配置が同じで、3、5 位ヒドロキシ基の配置配置は異なる。しかしながら、dFJ を 180° 回転すると、そのヒドロキシ基の立体配置は、dMJ と一致する (Figure 29)。すなわち、 β -1,2-mannosidase 類の触媒メカニズムを考慮すると、dFJ は、通常の 1C_4 型から、 4C_1 型となり、Figure 29 に示したようなヒドロキシ基の立体配置となる可能性がある。さらに、C6 位ヒドロキシ基は、 β -1,2-mannosidase 類の阻害に必須でないが、阻害剤認識の安定性を高めていることが知られており⁵³⁾、dFJ の阻害効果を鑑みても、6 位ヒドロキシ基が阻害に必須ではないが、阻害剤認識の安定化に寄与している可能性が高いと考えられる。

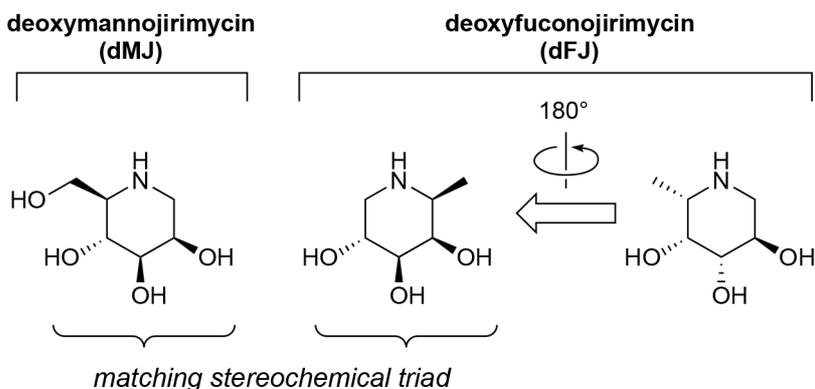


Figure 29. Stereochemical matching of dMJ and dFJ.

2.7.10

まとめ

dMJ 類縁体について、M8B あるいは M8A/C 産生に対する阻害選択性を比較した。その結果、dGJ は α -1,2-mannosidase 類の活性を阻害しなかった。その理由として、C4 位ヒドロキシ基の立体配置が α -1,2-mannosidase 類との結合に関して重要と考察した。一方で、dFJ は、 α -1,2-mannosidase 類に対し弱い阻害効果を示した。すなわち、dFJ の取りうるコンフォメーションによって、dMJ の 2、3、4 位と立体配置が一致し、阻害効果が観測できたと考えている。また、dFJ の阻害効果が dMJ よりも弱いのは、6 位ヒドロキシ基と α -1,2-mannosidase 類との相互作用の消失によるものと示唆された。

さらに、全く予期していなかった現象として、glucosidase 阻害剤 dNJ における α -1,2-mannosidase 類の選択的な阻害が観測された。具体的には、高濃度の dNJ が、M8B 産生を選択的に阻害した。この理由は、C2 位におけるヒドロキシ基と α -1,2-mannosidase 類との Ca^{2+} の相互作用の消失によると示唆された。

これらを踏まえると、nojirimycin 骨格におけるヒドロキシ基の立体配置は、 α -1,2-mannosidase 類の阻害を考えた際に、阻害選択性あるいはその阻害能を調節する要因として寄与しており、これらに着目して誘導体化すれば、阻害選択性あるいは阻害能を向上できる可能性がある。

2.8

選択的阻害剤の阻害様式決定

2.6 および 2.7 を通して、M8B 産生阻害に対して、阻害能は高いが中程度の阻害選択性を有する Kif と、阻害能は低いが高い阻害選択性を有する dNJ を見出した。一方、M8A/C 産生阻害に関しては、阻害能、阻害選択性ともに優れた dMJ を見出した。本実験における最重要要素は、選択性の高い阻害剤の探索による分子ツールの発見であるため、今後の実験には、阻害選択性を考慮して、dNJ と dMJ を用いた。さらに、Kif よりも dNJ の方が、阻害剤骨格の相関が高いため、dNJ および dMJ の組み合わせを選択した。

一方で、両阻害剤は共に同じ骨格を有しているため、阻害剤の作用機序を調査する必要がある。今回の場合、dNJ および dMJ が別々の酵素を阻害する場合と同じ酵素の活性部位と酵素活性部位以外に dNJ および dMJ がそれぞれ結合する場合は想定される。実際に同じ標的酵素に対して阻害剤の D 体、L 体が異なるだけで、阻害様式が変化する例も知られている^{58),59)}。そこで、 α -1,2-mannosidase 類に対する dNJ および dMJ の作用機序を、それらの阻害様式として決定した。

阻害様式は、阻害剤濃度を横軸、阻害剤の反応速度 V_i の逆数を縦軸として得られた直線の交点から視覚的に阻害様式を決定する Dixon plot を選択した⁶⁰⁾。以下に考えられる阻害様式として、競合阻害、非競合阻害、不競合阻害における Dixon plot の例を示す (Figure 30)。

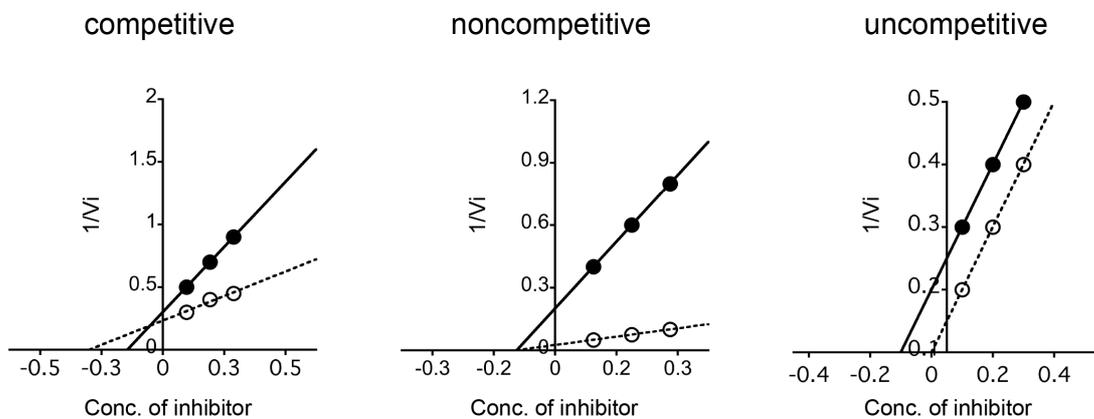


Figure 30. Typical Dixon plot.

競合阻害：阻害剤が酵素活性部位に結合し、基質と拮抗する阻害様式

Dixon plot においては、異なる基質濃度における直線が第 2 象限で交わる

非競合阻害：阻害剤が酵素活性部位とは異なる別の部位に結合し、酵素活性部位の構造を変化させて基質を生成物に変換できなくする阻害様式

Dixon plot においては、異なる基質濃度における直線が - X 軸で交わる

不競合阻害：阻害剤が酵素活性部位に基質が結合した複合体にのみ結合し、生成物に変換させなくする阻害様式

Dixon plot においては、異なる基質濃度における直線が並行となり交わらない

2.8.1

dMJ と dNJ における阻害様式の決定

実際に \square -1,2-mannosidase 類に対する dNJ および dMJ の阻害様式を Dixon plot を用いて決定した。具体的には、SAMP6 マウス小胞体画分に対して、異なる 2 つの M9-Gly-BODIPY の基質濃度 (1.25 または 2.5 μM) に対して、 IC_{50} 値周辺の阻害剤濃度を選択し、dMJ (0.1、0.2、0.5 μM) または dNJ (1000、3000、5000 μM) として、M8B および M8A/C 産生における阻害剤の反応速度を測定し、Dixon plot としてあらわした (Figure 31)。

まず、dMJ に関して、Dixon plot における 2 つの直線が第 2 象限上で交わったため、dMJ の阻害様式は競合阻害である (Figure 31A)。また、その阻害定数 K_i 値は、0.16 μM となった。さらに、dNJ においても、Dixon plot は dMJ と同様に 2 直線が第 2 象限上で交わり、その K_i 値は 3 mM となった (Figure 31B)。

これらを総合して、dMJ および dNJ が \square -1,2-mannosidase 類に対して競合阻害剤であると示された。

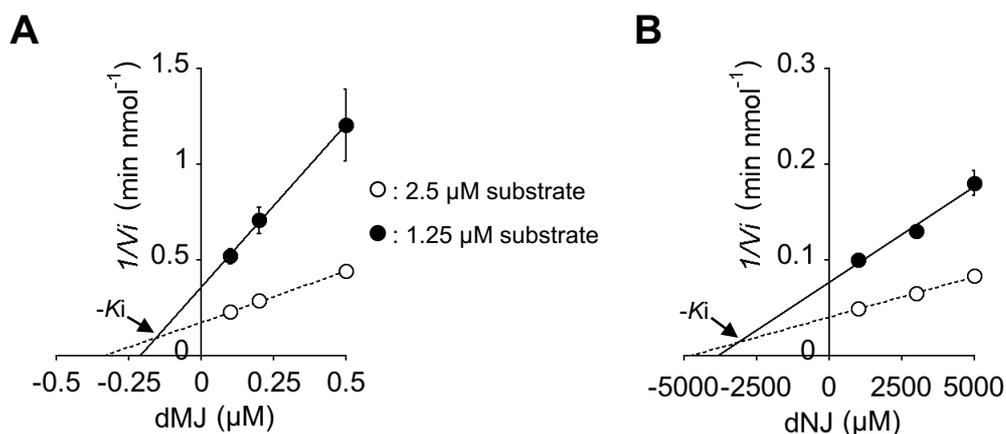


Figure 31. Determination of inhibition mode of the selective inhibitors. A) Dixon plot of dMJ in M8A/C production. B) Dixon plot of dNJ in M8B production. Closed circle: 1.25 μM substrate, open circle: 2.5 μM substrate. Each data point represents the mean values with standard errors (n=3).

2.8.2

まとめ

Dixon plot による阻害様式の決定の結果、両阻害剤は共に競合阻害剤であった。このことから、dMJ あるいは dNJ は、それぞれ別々の α -1,2-mannosidase 類の阻害に関与していると考えられる。また、2.7.9 では、活性部位に阻害剤が結合する競合阻害を想定してその阻害選択性の発現について考察した。本節における結果を踏まえて、 α -1,2-mannosidase 類の阻害における C2 ヒドロキシ基の立体配置の重要性が支持された。

これらを複合的に解釈して、 α -1,2-mannosidase 類の選択的阻害において dMJ および dNJ の組み合わせが適したものであると考えた。具合的には、M8B 産生の選択的阻害には dNJ を用い、M8A/C 産生の選択的阻害には dMJ を用いるのが最適であると判明した。

2.9

選択的阻害下におけるマンノース切断経路解析

前節までの結果を踏まえ、分泌シグナル糖鎖 M8B および分解シグナル糖鎖 M8A/C 産生阻害に dMJ あるいは dNJ が最適であると見出した。

2.2.1 で述べたように、小胞体において M9 は M5 までマンノース切断を受ける。しかし、 β -1,2-mannosidase 類のタンパク質機能の現状での理解を加味すると、M8 以降 M7、M6 または M5 といった糖鎖がどのように産生されているか不明である。本節では、見出した分子ツールを駆使して、小胞体画分内における β -1,2-mannosidase 類の働きを制御し、分泌あるいは分解シグナル糖鎖の産生経路解析へと応用した。

2.9.1

選択的阻害下におけるマンノース切断反応の解析

M8B および M8A/C 産生に関しては、dMJ および dNJ を使い分けて選択的に阻害できるため、別々の β -1,2-mannosidase がそれぞれ独立して糖鎖産生に関与すると考えられる。しかしながら、M8 異性体以降の糖鎖産生に関しても別々の β -1,2-mannosidase が産生に関与しているかそれとも M8 異性体以降は β -1,2-mannosidase 類による役割分担は存在しないのか不明である (Figure 32)。

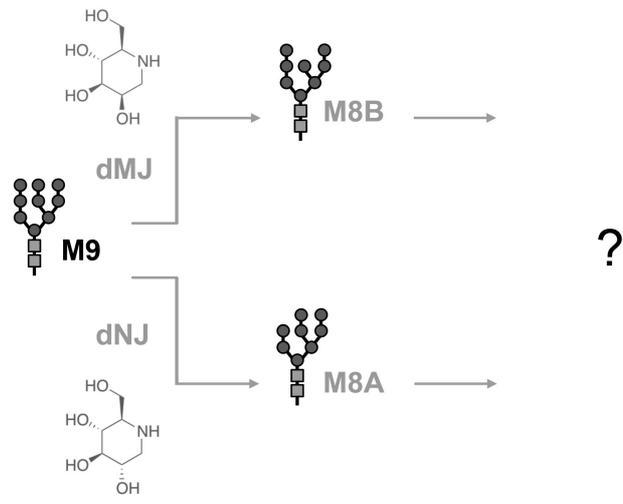


Figure 32. Futher glycan proseeccing pathway from M8 production.

そこで、SAMP6 マウス小胞体画分中、dMJ あるいは dNJ 存在下、M9-Gly-BODIPY を基質として M5 が産生されるまで反応させ、M8 以降の糖鎖産生を解析した。その結果、HPLC のクロマトグラムから、dMJ あるいは dNJ 存在下において、M8 以降も構造の異なる位置異性体が産生された。しかし M7 あるいは M6 異性体の特定には至らなかった (Figure 33)。

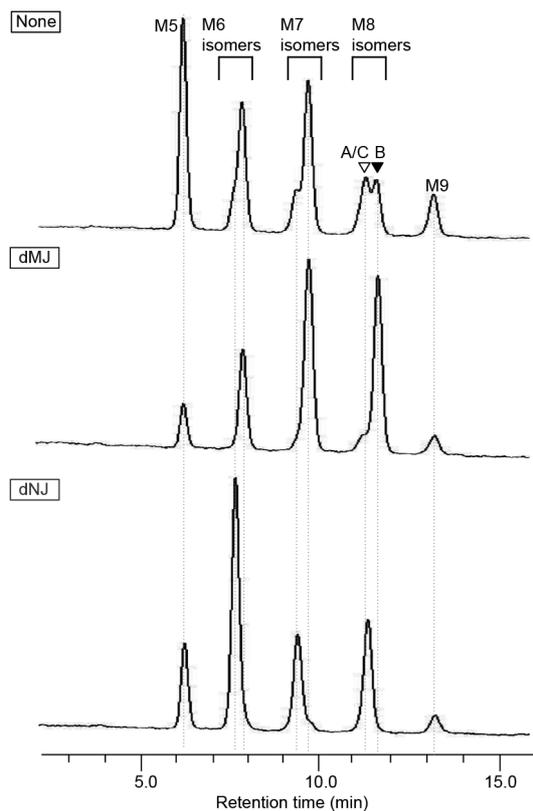


Figure 33. Glycan processing analysis with the complementary selective inhibitors in the ER fraction from SAMP6 liver. HPLC chromatograms showing mannose trimming in the absence of inhibitor, or presence of 5 μ M dMJ or 50 mM dNJ. HPLC conditions: Tosoh TSK-gel Amide-80 column (3 μ m, 4.6 mm \times 15 cm), mobile phase CH₃CN / 100 mM NH₄HCO₂ (pH 4.5), linear gradient from 65:35 to 50:50 over 50 min, flow rate 1.0 mL/min at 40 °C, detection: excitation, 504 nm, emission, 514 nm.

2.9.2

選択的阻害下におけるマンノース切断反応の解析系の確立

前項に示したように、HPLC 分析では M7 あるいは M6 異性体の特定には至らなかった。

そこで、HPLC より分離能の優れた超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) を用いて、M8 異性体のさらなる分離の向上、M7 あるいは M6 異性体の分離を検討した。UPLC による分離条件を検討し、最終的に移動相を $\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{HCO}_2$ (50 mM, pH 4.5) とし、グラジエント比率を 45 min で 73 :27 から 65.5 : 34.5 にした際に M7 あるいは M6 異性体の分離に成功した。そこで、実際に UPLC を用いて、経時的に M9 から M5 までの糖鎖異性体の産生を解析した (Figure 34A)。その結果、UPLC を用いた解析により M8 から M6 異性体を分離できると判明した。この結果を踏まえ、dMJ あるいは dNJ 存在下における経時的な糖鎖異性体の産生を解析した (Figure 34B and C)。

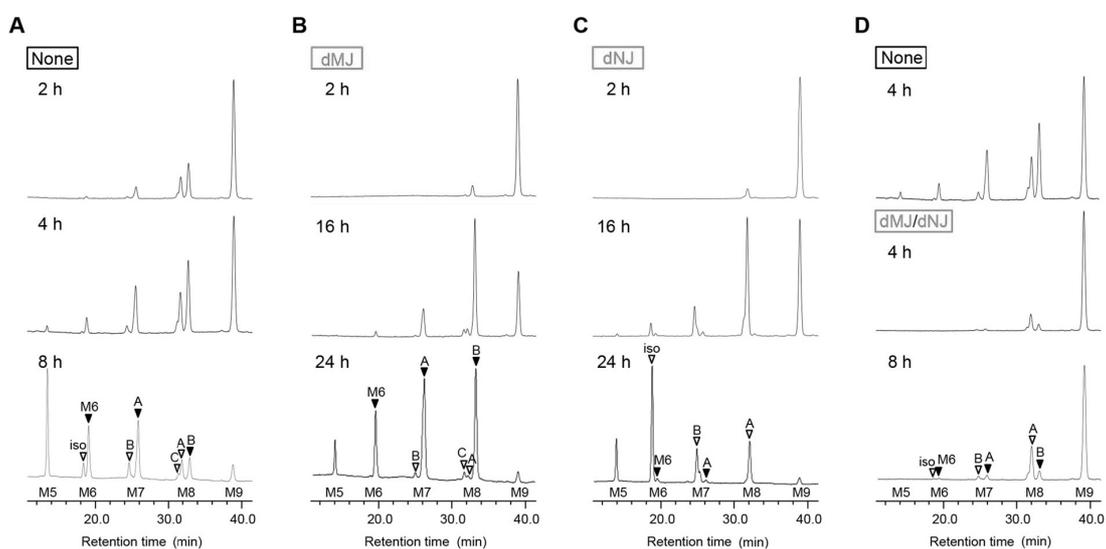


Figure 34. Time course of ER mannosidase-trimming analysis with the complementary selective inhibitors. UPLC chromatograms showing mannose

trimming under the following conditions: A) without inhibitors, B) with 5 mm dMJ, C) with 50 mm dNJ, and D) with both 5 mm dMJ and 50 mm dNJ.

さらに、両阻害剤を反応系に添加したところ、マンノース切断全般が阻害された (Figure 34D)。これらの結果を踏まえて、dNJ および dMJ 存在下でも M5 まで産生される 24 h 後の UPLC クロマトグラムを選択し、それぞれの阻害剤存在下における糖鎖異性体産生の差異を解析した (Figure 35)。阻害剤非存在下では、M8 から M6 まで様々な糖鎖異性体が産生された (Figure 35 upper)。一方、dMJ 存在下においては、M8 から M6 までのそれぞれの右側の異性体ピークが主に産生された (Figure 35 middle)。これとは対比的に dNJ 存在下においては、左側の異性体ピークが主に産生された (Figure 35 bottom)。

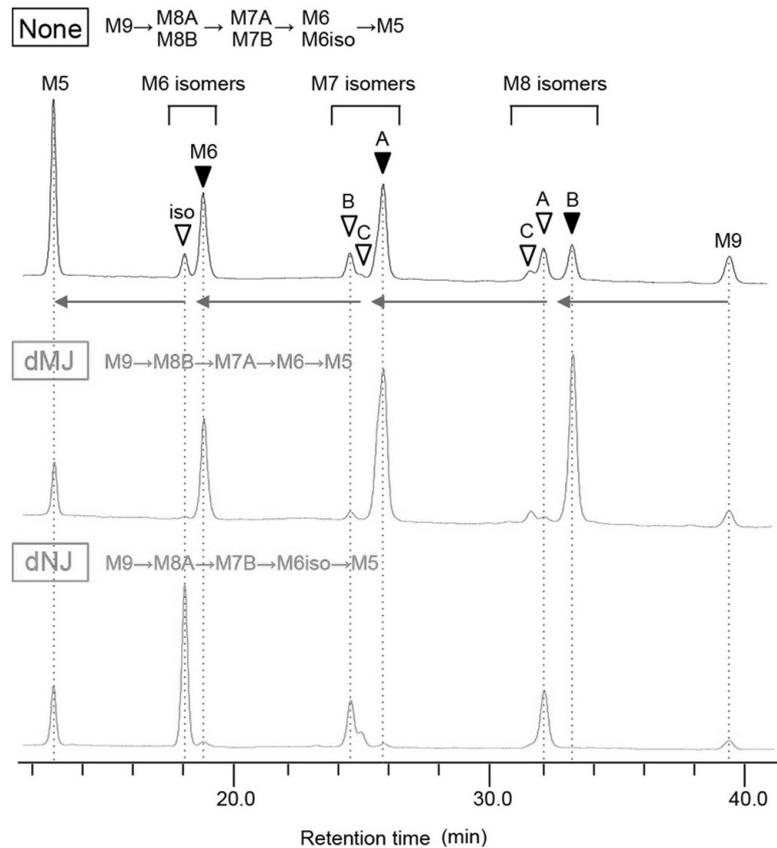


Figure 35. Typical glycan profiles for ER mannosidase-trimming analysis with the complementary selective inhibitors. UPLC chromatograms showing mannoside trimming in the absence or presence of dMJ or dNJ. Reaction times: 8 h for no inhibitor, 24 h for dMJ and dNJ.

2.9.3

選択的阻害剤存在下において産生される糖鎖異性体の解析

24 h 後の dMJ あるいは dNJ 存在下における糖鎖異性体産生を解析し、それぞれの阻害剤存在下において産生される糖鎖異性体についてその構造を特定した。M8 異性体に関しては、以前の研究から、今回用いた分離モードにおける溶出順が明らかとなっている⁶¹⁾。そこで、その溶出順をもとにそれ以降産生された糖鎖の構造について解析した。まず、dMJ 存在下における M8B 以降の糖鎖産生に関しては、M7 異性体の構造として、原理的に M7A か M7C の可能性が高い (Figure 36)。

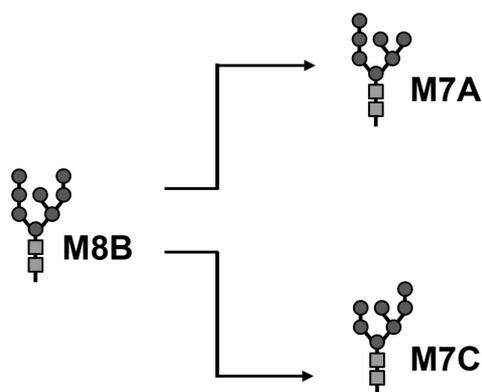


Figure 36. Possible M7 isomer production from M8B.

dNJ 存在下における M7 異性体産生構造としては、M7B あるいは M7C が考えられる。しかし、UPLC 解析では dMJ 存在下で産生される M7 異性体とは、ピークは重ならなかった。したがって、M8B→M7A の産生経路が明らかとなった。一方で dNJ 存在下における M7 異性体産生においては、どちらかのピークが M7B と M7C と考えられる 2 種類のピークが存在した。しかしながら、この段階では M7B あるいは M7C のピークを区別できないため、M6 異性体の

産生について解析した。M8B→M7A の糖鎖産生経路からは、原理的に M6iso は産生されない。すなわち、M8B→M7A→M6→M5 の糖鎖産生経路の存在が明らかとなった。一方で、dNJ 存在下で主に産生される糖鎖異性体が M6iso であると仮定すると、その産生には M7B が関わっていると考えられる。したがって、M8A→M7B→M6iso→M5 の糖鎖産生経路の存在が示唆された。

これらの結果から、dMJ 存在下では dMJ-insensitive mannosidase(s) の働きで、M8B→M7A→M6→M5 の糖鎖産生経路が存在し、dNJ 存在下では、それとは異なる dNJ-insensitive mannosidase(s) の働きによる M8A→M7B→M6iso→M5 の別の糖鎖産生経路の存在が明らかとなった (Figure 37)。

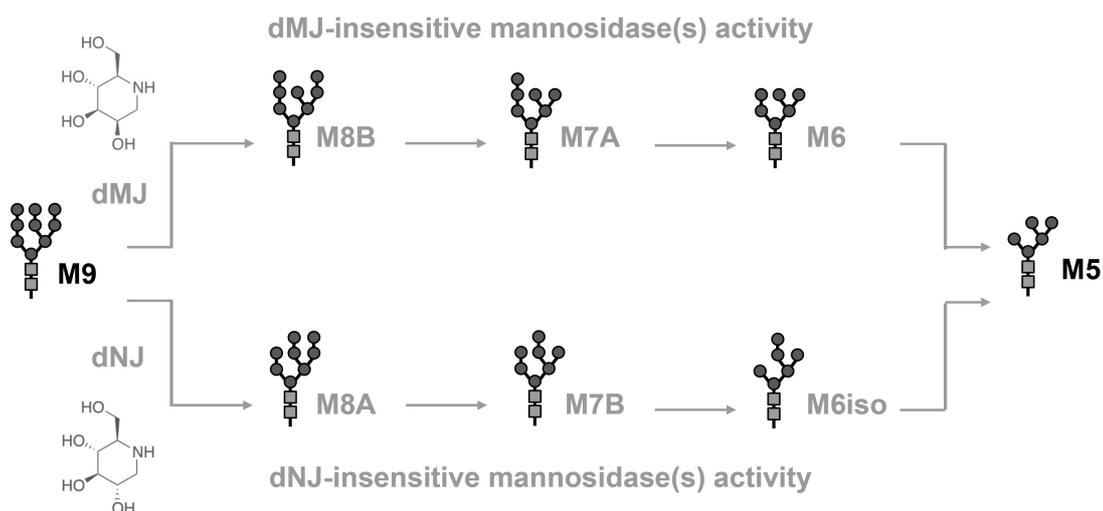


Figure 37. Observed glycan processing pathways in this study.

この実験結果は、小胞体における異なる α -1,2-mannosidase により触媒される 2 つの独立したマンノース切断経路の存在を初めて証明したものである⁶²⁾。

同様のマンノース切断経路は、C57BL/6 マウス肝臓由来小胞体画分を用いた糖鎖産生経路の解析でも存在しており (Figure 38)、マウスにおいて広く保存されているものと考えられる。

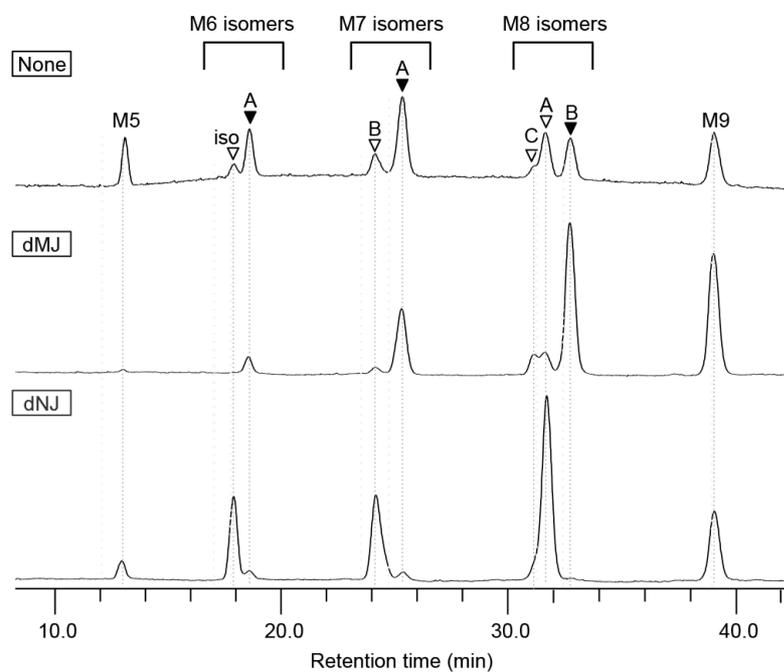


Figure 38. Mannose trimming analysis with the complementary selective inhibitors in the ER fraction from C57BL/6 liver. UPLC chromatograms showing mannose trimming in the absence of inhibitor, or presence of 5 μ M dMJ or 50 mM dNJ. UPLC conditions: Waters ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide column (1.7 μ m, 2.1 mm \times 15 cm), mobile phase CH₃CN / 50 mM NH₄HCO₂ (pH 4.5), linear gradient from 73:27 to 65.5:34.5 over 45 min, flow rate 0.2 mL/min at 60 °C, detection: excitation, 504 nm, emission, 514 nm.

2.9.4

各マンノース切断経路における交差活性の可能性検証

前項では選択的阻害剤存在下、dMJ および dNJ を使い分けて、小胞体における独立した2つのマンノース切断経路の存在を明らかにした。しかしながら、dMJ 存在下にて M8A、M7B、M6iso が存在するときあるいは dNJ 存在下において M8B、M7A、M6 が存在するとき、そのマンノース切断においてそれぞれの糖鎖が基質となり得るか不明であった (Figure 39)。

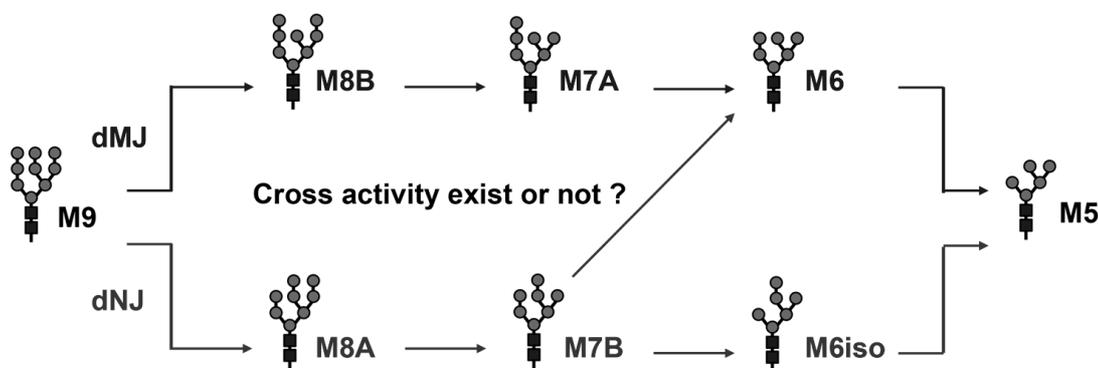


Figure 39. Possibility of cross over activity.

そこで、M9 から M5 の糖鎖異性体が全て存在する系内に対して dMJ あるいは dNJ を添加し、経時変化における各異性体の産生比率を解析した (Figure 40A)。その際に得られたクロマトグラムを Figure 40B および C に示し、その経時変化における M8-M6 異性体の産生比率の変化を示した (Figure 40D および E)。その結果、dMJ-insensitive mannosidase(s) は M9 から M5 の糖鎖異性体が全て存在する系内において系時的に解析したところ、0、3、12 h 後においても、M8A、M7B/C、M6iso の糖鎖産生比率は変動しなかった (Figure 40D)。すなわち、dMJ-insensitive mannosidase(s) におけるもう一方のマンノース切断経路への交差活性は存在しない。

一方で、dNJ-insensitive mannosidase(s) においても同様に交差活性の有無

を解析した。その結果、経時的に M8B が消費され M6 が産生した。しかしながら、本糖鎖産生経路にて産生する M7A の比率は変動しなかった (Figure 40E)。このことは、M8B の中間体糖鎖として M7C が産生され、その後の素早い M6 への変換を示唆している。したがって、dNJ-insensitive mannosidase(s) において M8B から M7C を経由する M6 産生経路の存在が明らかとなった。

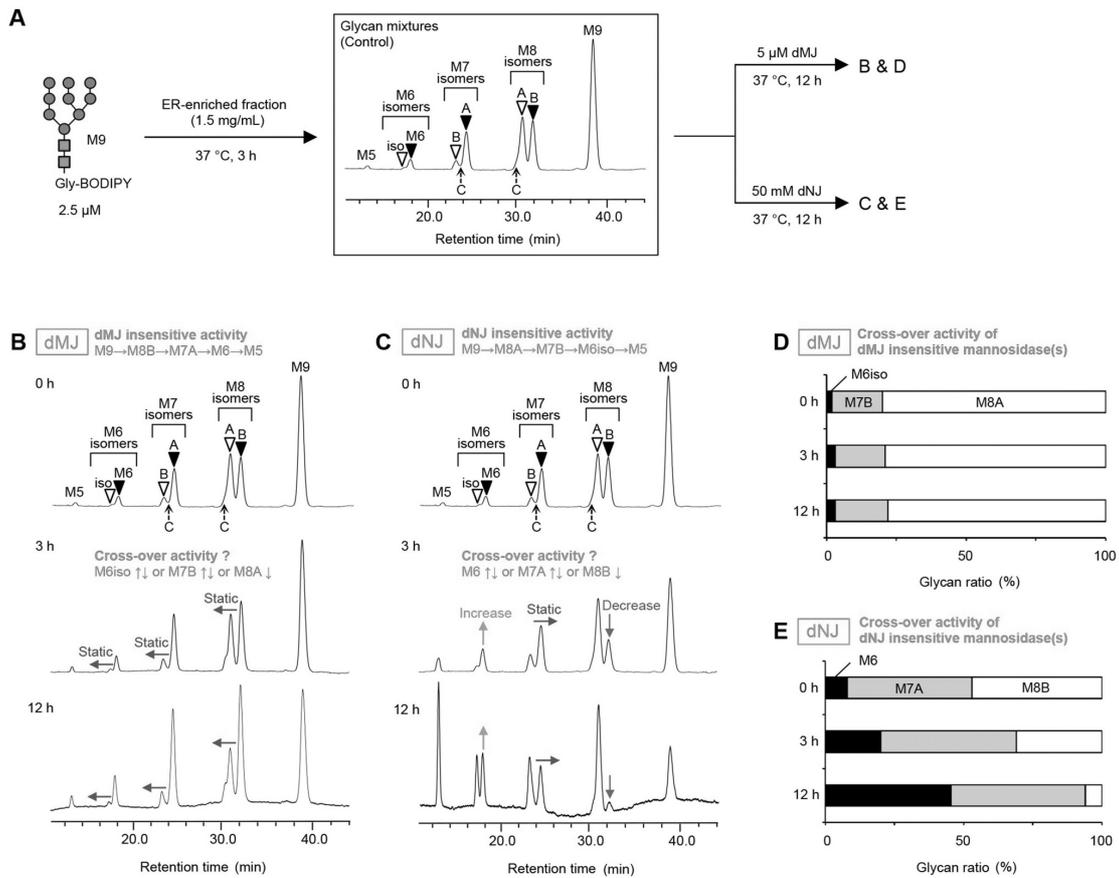


Figure 40. ER mannose-trimming analysis for M9 to M5 mixtures with the complementary selective inhibitors in the ER fraction from SAMP6 liver. A) Schematic of the mannose-trimming analysis starting from glycan mixtures. B) UPLC chromatograms in the presence of 5 μ M dMJ. C) UPLC chromatograms in the presence of 50 mM dNJ. Glycan ratio related to the crossover activity of mannose trimming in the presence of D) dMJ or E) dNJ starting from glycan mixtures.

2.9.5

各マンノース切断経路を担う候補 α -1,2-mannosidase に対する考察

前項までに、小胞体における 2 つの独立したマンノース切断経路とそのバイパス経路の存在を明らかにした。本項では、得られたマンノース切断経路を担う候補 α -1,2-mannosidase に関してそれぞれの経路について考察する。

2.2.2 に述べたように、候補 α -1,2-mannosidase としては、ERManI と EDEM1/2/3 が考えられる。その中で、ERManI のみその糖鎖特異性が明らかであり、M9 から M8B の産生に関わると報告されている。さらに、ERManI の *in vitro* での糖鎖特異性解析から、リコンビナント human ERManI が M8B から M7C を産生すると示唆されている⁶³⁾。しかしながら、観測された dMJ-insensitive mannosidase(s) による糖鎖産生は、M9→M8B→M7A→M6→M5 であった。したがって、リコンビナント ERManI の糖鎖特異性解析から、M8B 産生能を有しているが、その後の糖鎖産生を担う可能性は低く、ERManI が主に dMJ-insensitive mannosidase(s) として働く可能性は低い。さらに、Mori らの研究グループによる EDEM1、EDEM2 あるいは EDEM3 のシングルノックアウト細胞を用いた糖鎖産生の解析結果⁴⁷⁾からも、細胞において ERManI よりむしろ EDEM2 が M9 から M8B を産生する能力が高いと示唆されている。本研究によって得られた結果は、その報告と一致しており、複数の α -1,2-mannosidase が並行して働く場合、EDEM2 が優先的に M8B 産生に関わると想定される。しかしながら、EDEM2 の M8B 以降の糖鎖産生特異性は明らかでない。したがって、M8B 以降の糖鎖産生に EDEM2 が関与するかそれとも他の α -1,2-mannosidase が働くか不明である。そこで、これまでの他の α -1,2-mannosidase 類の糖鎖産生能に関する報告から、どちらの可能性が高いかを考察した。Hosokawa らは、細胞にて過剰発現した EDEM1 が M7A、M6 を産生すると報告している³²⁾。すなわち、M9→M8B は EDEM2 により触媒され、M8B→M7A→M6 は EDEM1 により触媒されている可能性が示唆さ

れる (Figure 41)。

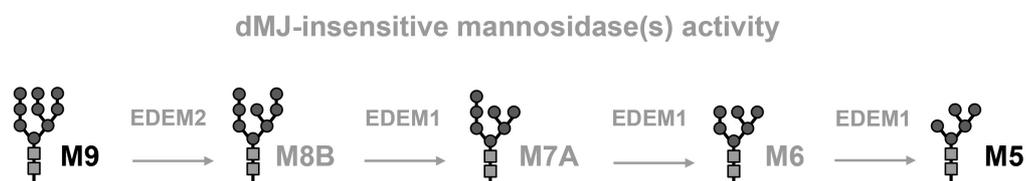


Figure 41. Candidate mannosidase(s) for dMJ-insensitive activities.

続いて、dNJ-insensitive mannosidase(s) の候補 α -1,2-mannosidase(s) について考察する。観測された dNJ-insensitive mannosidase(s) の活性は、M9 \rightarrow M8A \rightarrow M7B \rightarrow M6 \rightarrow M5 および M8B \rightarrow M7C \rightarrow M6 \rightarrow M5 であった。まず、M8A の産生には、EDEM1 が関わる可能性が報告されている^{32),64)}。しかし、一方で EDEM1 は M8B \rightarrow M7A を触媒すると考えられ、本経路の候補 α -1,2-mannosidase である可能性は低いと考えた。一方で、EDEM3 は、 α -1,2-mannosidase 活性を持つと示唆されているが、その糖鎖特異性に関しては、全く議論されていない。したがって、dNJ-insensitive mannosidase として働く可能性が最も高いと考えた (Figure 42)。

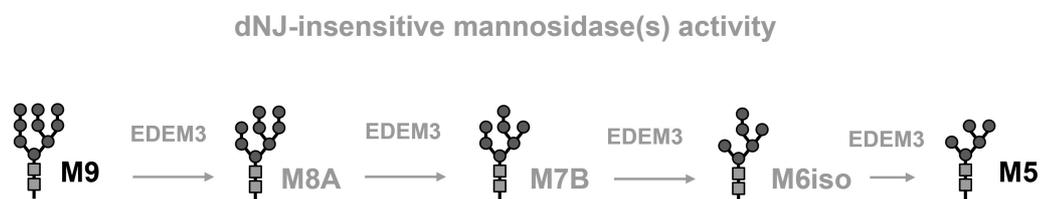


Figure 42. Candidate mannosidase(s) for dNJ-insensitive activities.

本研究にて、見いだされた dNJ-insensitive mannosidase 活性は、Golgi ManIA と類似している。しかしながら、いくつかの相違点がある。Golgi ManIA は M8B→M7C/M7A 産生に関して、M7C と M7A をほぼ 1:1 の割合で産生する⁴⁸⁾。しかし、一方で、dNJ-insensitive mannosidase の活性では、M8B→M7C が主に観測され、M7A の産生はわずかであった (Figure 43)。さらに、ウェスタンブロットによる α -1,2-mannosidase 類の検出においては Golgi ManIA は他の α -1,2-mannosidase 類と比べ、極めて少ない検出量であった。これらを総合して、Golgi ManIA が dNJ-insensitive mannosidase である可能性は低いと考えた。

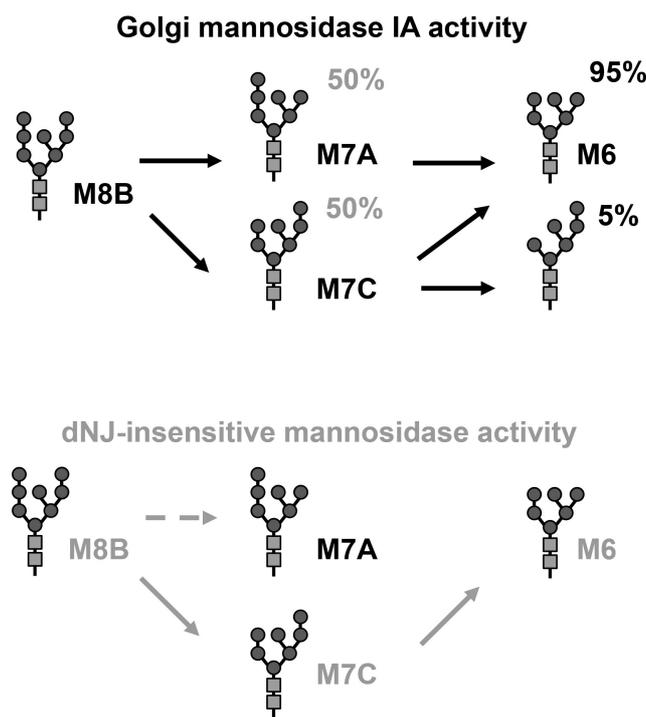


Figure 43. Distinct mannosidase activity toward M8B processing.

2.9.6

観測された2つのマンノース切断経路の生物学的意義における考察

前項まで、観測された2つのマンノース切断経路を担う酵素に関する考察を進めてきたが、一方で、各経路で産生される構造の異なる糖鎖の生物学的意義は不明である。そこで、本項では各経路にて産生された糖鎖構造の意義を糖タンパク質の分泌/分解の観点から考察する。

M9はUGGTに認識される糖鎖構造であり、小胞体に留まる。その後、M8BあるいはM8Aへと変換される別々の経路が存在するが、そのそれぞれの糖鎖の生物学的意義から考察する。M8AはUGGTにより認識されない¹⁷⁾。さらに、その後産生されるM7Bに関しては糖タンパク質の分解に関わると考えられるOS-9と強く結合すると示唆されている²³⁾。すなわち、M9→M8A→M7B→M6iso→M5の糖鎖産生経路は糖タンパク質の分解に関与しているものと考えられる。

一方で、2.2.1でも述べたように、M8Bは糖タンパク質の分泌に関わるERGIC-53・MCFD2の複合体やVIPLに認識される^{22),65)}。さらに、その後産生されるM7Aに関しても、OS-9 ($K_a = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$)よりVIPL ($K_a = 2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$)と強く結合すると報告されており^{22),23)}、これらの結果から、M9→M8B→M7A→M6→M5の糖鎖産生経路は糖タンパク質の分泌に関与していると示唆される。

以上の考察を総合すると、本研究にて見いだされた2つの独立したマンノース切断経路は、それぞれ糖タンパク質の分泌および分解に関わる別々の経路であると示唆される (Figure 44)。

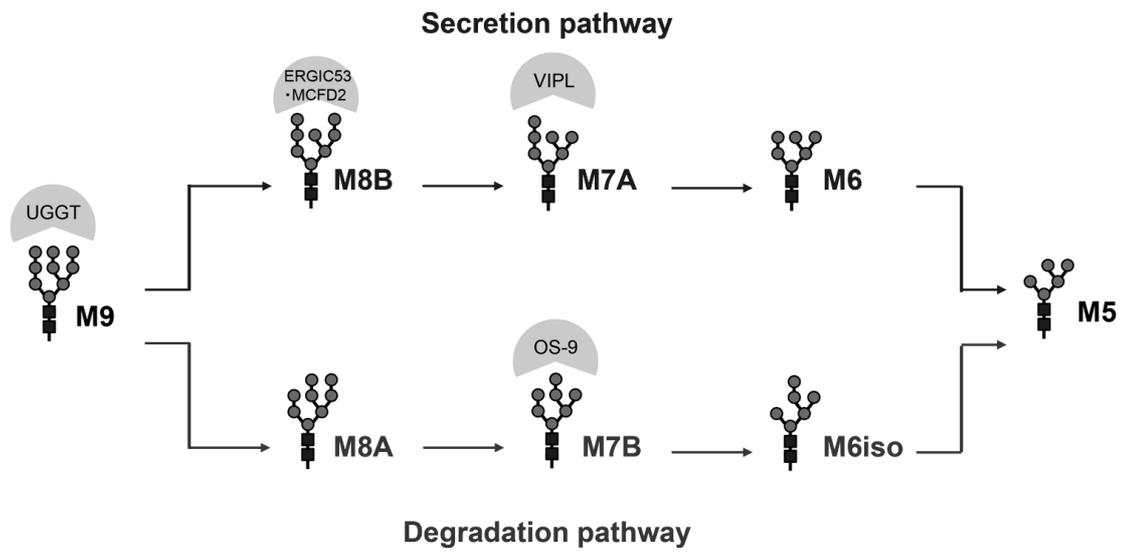


Figure 44. Biological significance found in this study.

2.10

小括

本節では、小胞体 α -1,2-mannosidase 活性を選択的に阻害する化合物の発見を通して、小胞体においてマンノシダーゼ活性を化学的に調節する基盤技術を確立した。

具体的には、構造が明確な合成蛍光糖鎖を用いて、小胞体 α -1,2-mannosidase 類の選択的阻害剤 dMJ および dNJ を見出した。さらに、dMJ と dNJ を使い分けると、M8B あるいは M8A を選択的に産生可能であった。さらに、見出した選択的阻害剤を駆使して、小胞体における 2 つの独立したマンノース切断経路の存在を明らかにした。これら 2 つのマンノース切断経路には、それぞれ別々の α -1,2-mannosidase 類が関与すると示唆された (Figure 45)。

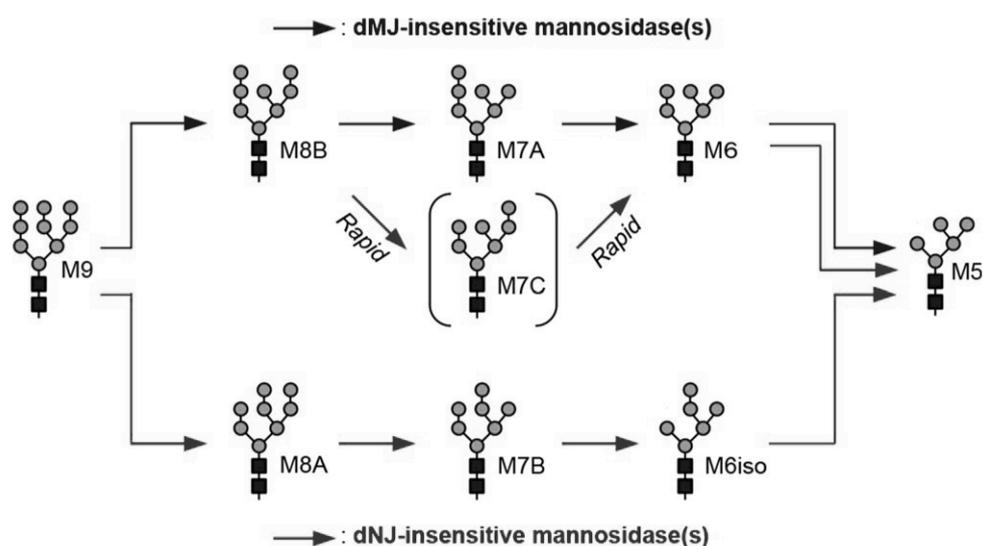


Figure 45. Proposed glycan crossing pathway in this study.

以上の結果は、シグナル糖鎖の選択的産生を分子レベルで示した世界初の結果であり、特定の産生糖鎖が糖タンパク質の分泌あるいは分解を制御するために重要である。さらに最終的に、見出した経路のそれぞれが糖タンパク質の分泌および分解に関わる経路であると考察し、その生物学的意義にも言及した。

タンパク質が正しい立体構造を得られず凝集すると、糖タンパク質品質管理機構が破綻し、ひいてはアルツハイマー病、糖尿病や骨粗鬆症といったフォールディング病になると考えられている⁶⁶⁾。本研究にて見出した選択的阻害剤は糖タンパク質品質管理において主に糖タンパク質の分泌あるいは分解を制御する分子ツールとなり、小胞体において意図的にその分泌あるいは分解バランスを操作する手法になり得ると考えている (Figure 46)。さらに一方で、これらの分子ツールを駆使するとフォールディング病の病態を再現できる可能性もあり、その有用性は今後さらに注目されていくものと期待している。

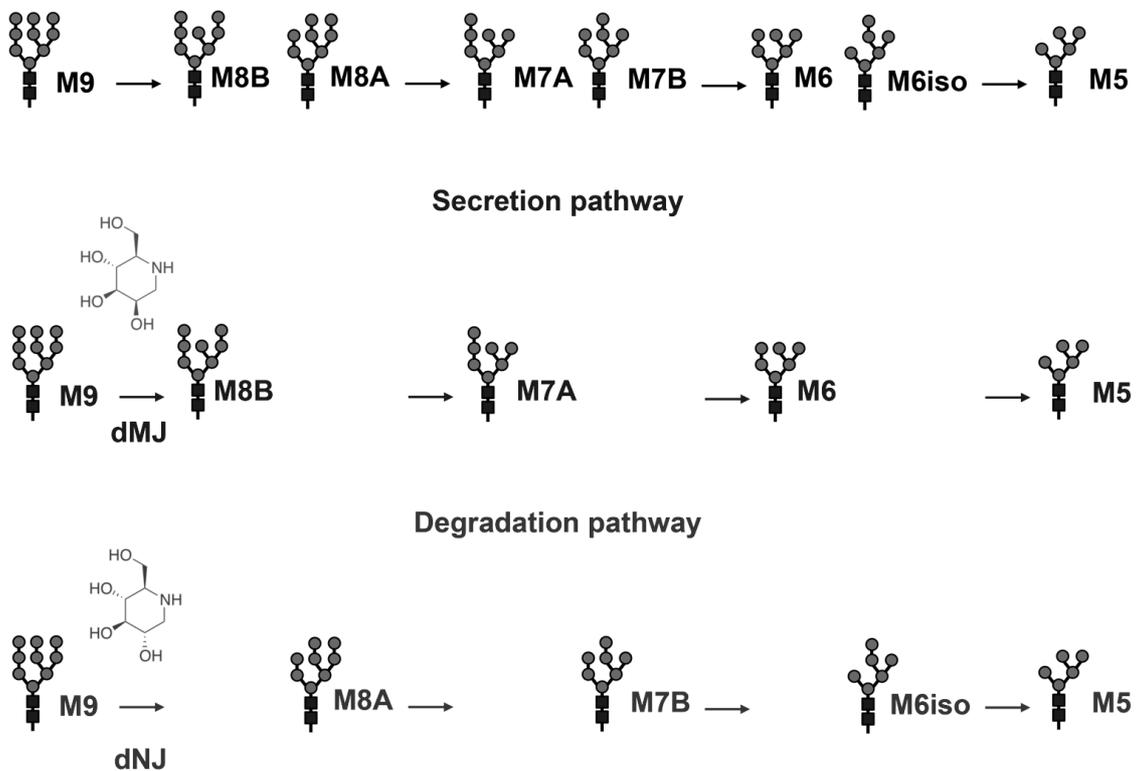


Figure 46. Chemical manipulation of glycoprotein sorting pathways.

第3章

キトビオースペンタペプチドを用いた PNGase のペプチド特異性解析

3.1

はじめに

前節までは、糖タンパク質品質管理機構の上流において細胞の恒常性の維持に重要である糖タンパク質の分泌あるいは分解経路に関して、新規に分子ツールを発見し、その分子ツールを足がかりとして新たなシグナル糖鎖産生経路を発見した。本節では、近年、糖タンパク質品質管理機構の下流にて細胞恒常性の維持を担う重要な分子として考えられている cytoplasmic PNGase に着目した。化学合成にて親水性あるいは疎水性を系統的に制御したキトビオースペンタペプチドを合成し、これを用いて種々の PNGase に対して、ペプチド配列に着目して特異性を解析した。

3.2

本研究の背景

PNGase は、糖タンパク質から N-型糖鎖を切り離す脱糖鎖酵素である。この酵素は、タンパク質の Asn 側鎖と N-型糖鎖の末端 N-acetylglucosamine (GlcNAc) 残基とのアミド結合を加水分解するため、amidase の一種として考えられている (Figure 47)。

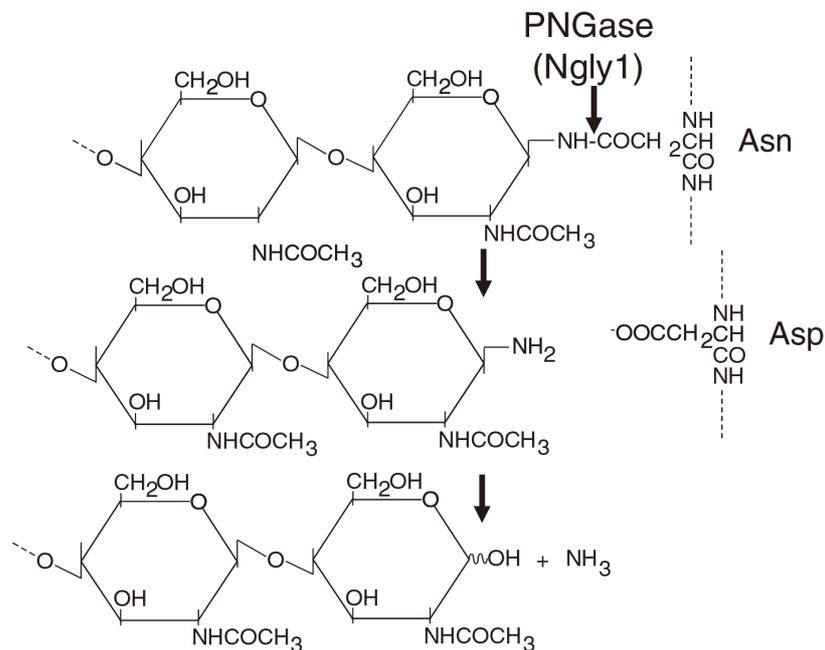


Figure 47. Enzymatic reaction of PNGase.

出典: Ref (69) より転載

PNGase の発見は古く、最初はアーモンドから PNGase A が単離された⁶⁷⁾。さらに、バクテリア *Flavobacterium meningospeticum* から PNGase F が単離された⁶⁸⁾。一方、真核生物においては cytoplasmic PNGase が見出されている。PNGase A と PNGase F は脱糖鎖活性を応用して、糖タンパク質から糖鎖を切り出すためのツールとして汎用されている。一方で、cytoplasmic PNGase は

Suzuki らによって近年その糖タンパク質品質管理機構への関与が示唆されているが⁶⁹⁾、いずれの酵素においても分子レベルでその基質特異性を解析した例は少ない。以下に現在までに明らかとなっている PNGase の特徴について述べる。

3.2.1

PNGase 類の分類

PNGase の特異性を述べるに先立ち、その分類を以下に示す。PNGase は主にバクテリアを由来とするもの、植物に多く存在している酸性 PNGase、そして真核生物で広く保存されている cytoplasmic PNGase の 3 タイプがそのアミノ酸配列情報に基づき分類されている。本研究では、それぞれのタイプの典型的な PNGase として、バクテリア PNGase F、植物 PNGase A あるいは酵母 cytoplasmic PNGase を選定した。主な PNGase 類の特異性についての知見を以下に記した。

3.2.2

PNGase 類の生物学的意義

前項では、PNGase が主に大きく 3 タイプに分類できると示した。本項においては、それぞれの PNGase における生物学的意義の現状理解を記す。

PNGase A は、酸性に至適 pH を持つ酸性 PNGase である。その生物学的な意義に関してはあまり明らかとなっていない。同様に、PNGase F に関しても、その脱糖鎖能が着目され、生物学的意義はあまり議論されていない現状がある。一方で、cytoplasmic PNGase は、Suzuki らによって、1993 年、1994 年に哺乳動物由来の培養細胞からその活性が検出された^{70),71)}。また、これらに見出された PNGase は、細胞質画分にてその活性が検出された。当時、N-型糖タンパク質は細胞質には存在しないと考えられていたため、PNGase の細胞質での存

在理由は不明であった。1995年には、さらに、cytoplasmic PNGase が糖タンパク質の分解に関与する仮説が示され⁷²⁾、その生物学的意義に焦点が当てられてきた。さらに、小胞体で産生された糖タンパク質の分解の際に cytoplasmic PNGase により脱糖鎖反応が起こると示唆され⁷³⁾、この酵素の糖タンパク質分解への関与がますます議論されるようになった。さらに2000年には酵母において cytoplasmic PNGase がクローニングされ、PNG1 と名付けられた⁷⁴⁾。さらに、研究が進み、酵母から哺乳動物まで cytoplasmic PNGase は、その活性発現に重要である core transglutaminase (TGase) ドメインが保存されており⁶⁹⁾、その機能が明らかになってきている。

cytoplasmic PNGase は、糖タンパク質品質管理において分解糖タンパク質の分解に関与する重要な酵素であると理解されてきたが、近年さらに、その理解が進み、病気の発症に関わる可能性が提唱されてきた。具体的には、cytoplasmic PNGase の哺乳類オルソログである NGly1 が欠損すると、NGly1 欠損症という病態を発症すると報告された¹²⁾。NGly1 が欠損した患者では、別の脱糖鎖酵素 ENGase が働き、GlcNAc 残基を一つ残したタンパク質が産生される。この GlcNAc タンパク質はプロテアソームによるタンパク質の分解を受けられず、細胞外で蓄積してしまう。そのタンパク質の蓄積が NGly1 欠損症を引き起こしていると示唆されている¹³⁾。すなわち、正常な状態では NGly1 は様々な糖タンパク質に対して脱糖鎖し、NGly1 欠損症の病態発症を防いでいると考えられる。

このように、PNGase 類はそのツールとしての有用性あるいは生物学的意義から研究ターゲットとして適している。特に cytoplasmic PNGase の生物学的意義は糖タンパク質品質管理機構の下流に位置する経路として今後も研究の発展が望まれている。しかしながら、PNGase F、PNGase A あるいは cytoplasmic PNGase の基質特異性に関しては、詳細に解析した研究は少ない。次項にて、現在までに解析されている基質特異性に関して述べる。

3.2.3

PNGase 類の基質特異性

本項では、PNGase F、PNGase A、cytoplasmic PNGase のそれぞれの機能について述べる。PNGase F と cytoplasmic PNGase に関しては、その X 線共結晶構造が解かれており、それぞれの立体構造が明らかとなっている^{75),76)}。しかしながら、PNGase 類の基質特異性に関しては未解明な部分が多い。中でも生物学的意義が報告されている cytoplasmic PNGase に関してその特異性に対する現状理解を詳しく述べる。

Cytoplasmic PNGase は、正しい立体構造を獲得した分泌糖タンパク質と正しい立体構造を獲得できなかった分解糖タンパク質を見分けて加水分解すると報告された⁷⁷⁾。したがって、cytoplasmic PNGase は、分解糖タンパク質に対して働きやすいと考えられる。一方で、糖鎖部に関する認識に関しては、GlcNAc-GlcNAc 2 糖のキトビオースを認識するとわかっている⁷⁸⁾。さらに、キトビオース構造に 6 つのペプチドが結合したキトビオースヘキサペプチドを基質とするとの報告もある⁷⁸⁾。これらの結果から分解糖タンパク質に対して働きやすい性質またキトビオースヘキサペプチドを基質とする性質は明らかとなっているが、そのペプチド配列の認識特異性に関しては未だに明らかとなっていない。

一方で、PNGase F と PNGase A に関しては、それぞれ、糖鎖特異性が異なると報告されている⁷⁹⁾。一方で、ペプチド配列に関しては、PNGase A が 3-11 アミノ酸残基の小さい糖ペプチドを基質として脱糖鎖すると報告されており⁸⁰⁾、PNGase F に関しては、正しい立体構造を獲得した分泌糖タンパク質より、正しい立体構造を獲得できなかった分解糖タンパク質をより基質として加水分解すると報告されていた⁸¹⁾。しかしながら、これらの結果は均一な構造を持つ糖タンパク質に対する結果ではなく、均一な糖鎖およびタンパク質あるいはペプチド配列を有する基質にて、より細く分子レベルで解析する必要があると考えた。

3.2.4

本研究の目的

このような研究背景を踏まえ、本研究では、構造が明確であり意図的にペプチド配列を制御した複数種の合成糖ペプチドプローブを分子ツールとして PNGase 類のペプチド特異性を解析した。3.2.3 でも述べたように、現在均一な糖鎖構造およびペプチド配列を持った基質に対する PNGase 類の働きは解析されておらず、分子ツールを足がかりとした化学的アプローチによって詳細なペプチド特異性が解析できると期待した。用いる PNGase 類は、市販およびタンパク質発現させたものを使用した。

3.3

本実験の評価系

目的で述べた本実験において必要な基質、酵素、解析系について以下に示す。

3.3.1

合成糖ペプチドプローブ

本項では、実験に用いた基質となる合成糖ペプチドについてその詳細を述べる。本研究では、均一な糖鎖構造および意図的にペプチド配列を制御した化合物を基質として選定した。まず、糖鎖構造に関しては、PNGase 類の基質として最小構造のキトビオース構造を選択した。また、ペプチド配列に関しては、アスパラギン (Asn) 残基にキトビオースが結合した化合物を母核とし、親水性アミノ酸としてセリン (Ser)、疎水性アミノ酸としてロイシン (Leu) を選択した。Asn 残基の N 末端あるいは C 末端に親水性あるいは疎水性を系統的に制御したジペプチドを結合させてキトビオースペンタペプチド 6 種類を合成する方

法にて糖ペプチドプローブを獲得した (Figure 48)。また糖ペプチドプローブ群は N 型糖鎖のコンセンサス配列(Asn-X-Ser/Thr (X はプロリン以外))を持つあるいは持たない C 末端側のアミノ酸配列を選択した。本研究では、以前に合成した糖ペプチドプローブを用いた。

この糖ペプチドプローブを応用して、糖タンパク質品質管理機構に関連する UGGT のペプチド特異性を明らかにしている⁸²⁾。

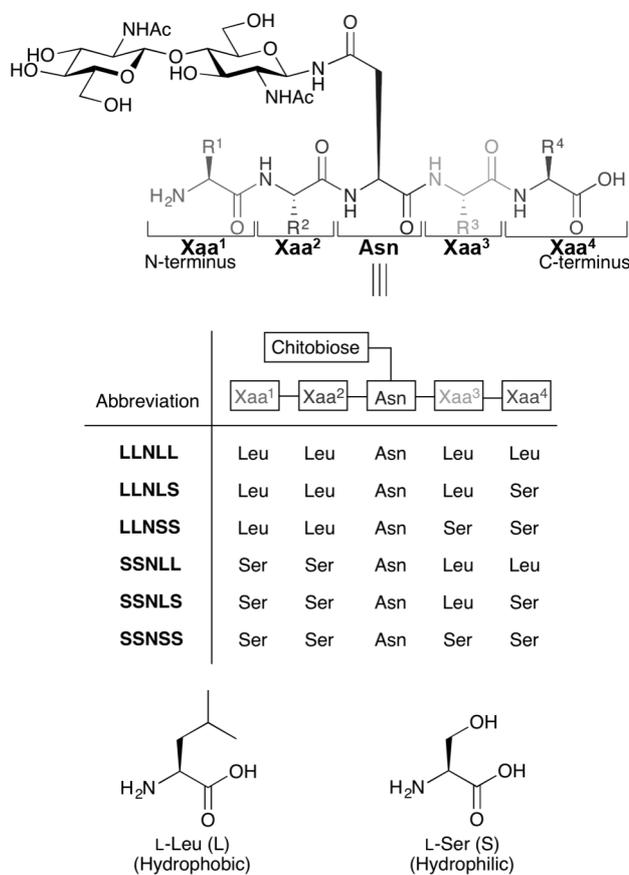


Figure 48. Synthetic substrates used in this study.

3.3.2

PNGase 類

本研究で使用する PNGase は以下のように選定した。3.2.1 に述べたように、PNGase はアミノ酸一次配列情報から、3 タイプに分類される。そこで、それぞれのタイプで一般的である PNGase を使用し、そのペプチド特異性を解析した。バクテリア PNGase F とアーモンド由来の酸性 PNGase A は、市販品を使用した。一方で、cytoplasmic PNGase には、真核生物において広く保存されている TGase ドメインを有し、糖タンパク質品質管理機構の最も単純なモデル生物として考えられる酵母由来の cytoplasmic PNGase を選定した。酵母 cytoplasmic PNGase は、大腸菌を用いたタンパク質発現を経て獲得した。なお、大腸菌発現に使用した PNGase は、pET28b-*PNG1*-(His)₆ で酵母由来 cytoplasmic PNGase 配列にポリヒスチジン (His) をコードする遺伝子配列がタグとして導入されている。本研究で、用いた His は 6 残基分のものを選択した。本ベクターが BL21 (DE3) pLysS cell にトランスフォーメーションされた大腸菌株を使用した⁷⁴⁾。本大腸菌株は、理化学研究所 糖鎖代謝学研究チームよりご供与いただいた。タンパク質発現の詳細は 3.4.2 に示した。

3.3.3

評価系

本研究において使用する糖ペプチドプローブには糖鎖部位とペプチド部位が存在しているがいずれも高感度で吸光あるいは蛍光検出できる官能基を持っていない。このような構造のため、前節で使用した HPLC や UPLC に蛍光または吸光検出器を連結した解析系では検出不可能である。近年、UPLC と Electron spray ionization (ESI) 質量分析が連結された UPLC-MS システムが開発された。そこで、このシステムを活用すると本研究に使用する糖ペプチドプローブを検出し、PNGase 活性を測定できると推定した。すなわち、PNGase により脱糖鎖反応したのちに、切断されたペプチド断片と糖ペプチドプローブを同時に解析し、PNGase 活性の定量解析系を構築した (Figure 49)。

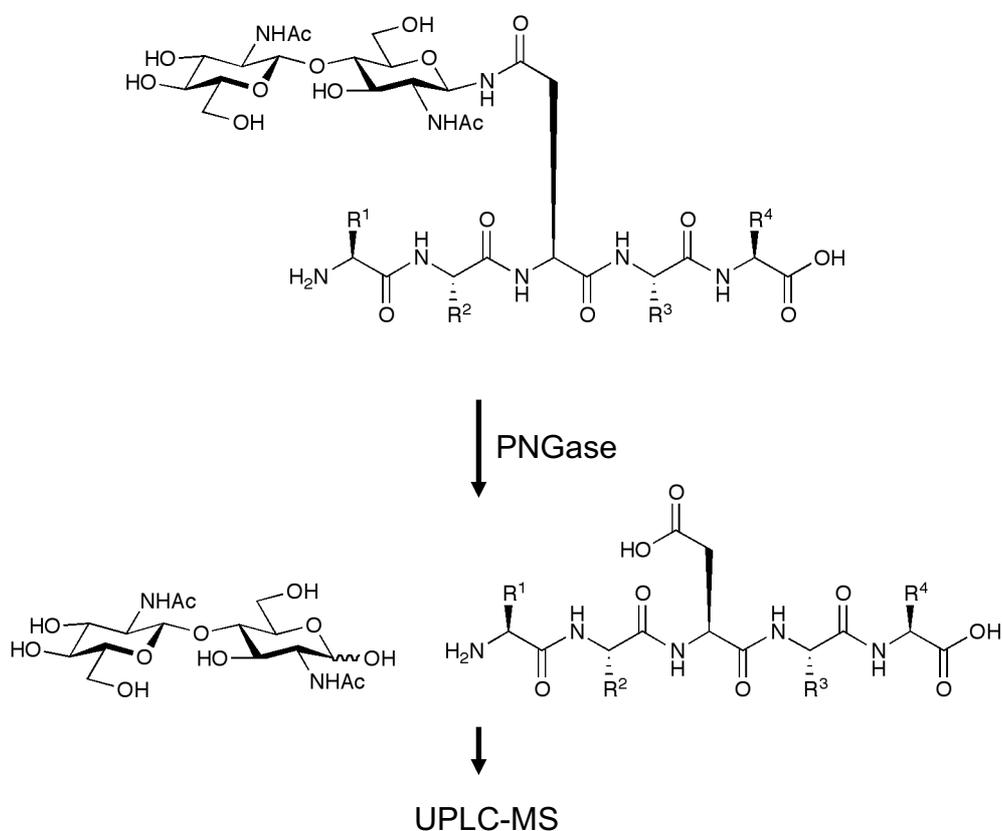


Figure 49. Deglycosylation of synthetic substrate and detection method.

3.4

実験に使用する PNGase の準備または調製

本節では、PNGase F、PNGase A および cytoplasmic PNGase の獲得方法について以下に詳細を述べる。

3.4.1

PNGase F および PNGase A

はじめに PNGase F と PNGase A に関してその由来を含め記載する。PNGase F は、もともと発現しているグラム陰性菌 *Flavobacterium meningesepticum* バクテリアから直接精製されたタンパク質を使用した。一方で、PNGase A に関しては、sweet almond meal から精製されたタンパク質を用いた。

3.4.2

cytoplasmic PNGase の発現および精製

続いて、cytoplasmic PNGase の精製について述べる。本研究で使用したのは pET28b-*PNG1*-(His)₆ ベクターを含有した BL21 (DE3) pLysS cell 発現用大腸菌株である。本大腸菌株を Luria-Bertani (LB) 培地に植菌し、濁度 600 n が 0.8 になるまで培養した。さらに、isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) により発現誘導した。得られた大腸菌をペレットとして回収した。

続いて、大腸菌内で発現させた Png1p-(His)₆ を精製すべく、大腸菌を破碎した。破碎後、His-tag purification resin を用いて、Ni²⁺ とのアフィニティーをもとに Png1p-(His)₆ すなわち、His タグ付き酵母由来 cytoplasmic PNGase を精製した。目的タンパク質が精製できているかは、SDS-PAGE 後のゲルを

CBB によって染色して確認した (Figure 50)。

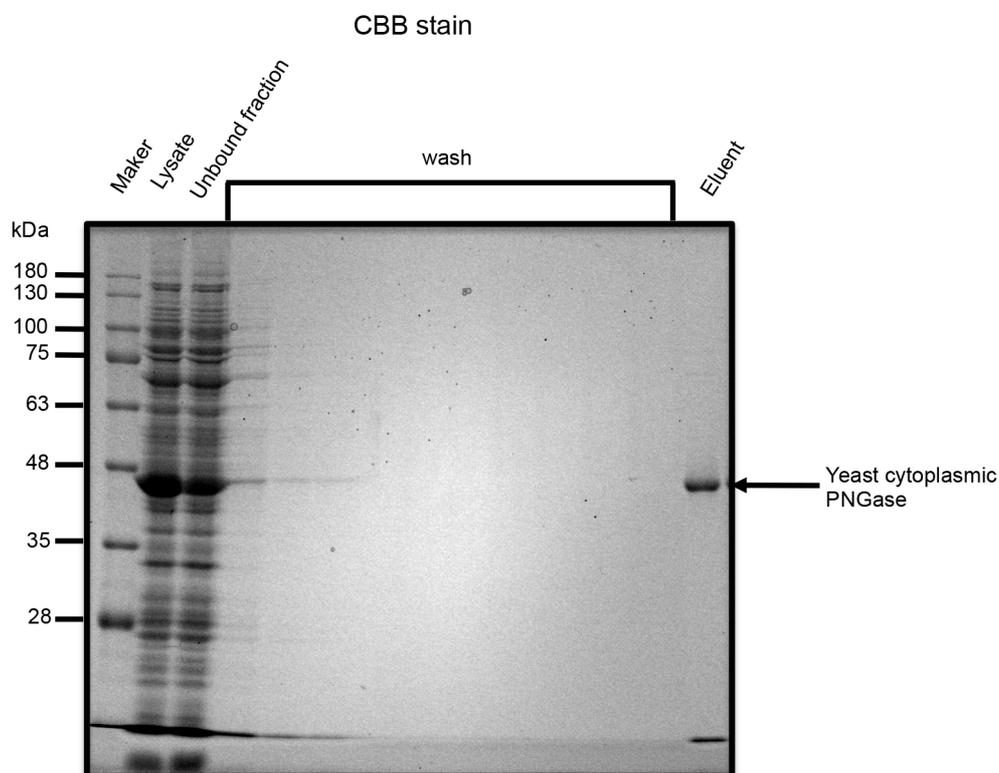


Figure 50. Purification of yeast cytoplasmic PNGase.

3.5

種々の PNGase を用いたペプチド特異性解析

前節までに記述した cytoplasmic PNGase、PNGase F および PNGase A と糖ペプチドプローブを反応させ、各 PNGase におけるペプチド特異性を解析した。反応のモニターには UPLC と質量分析を組み合わせた UPLC-QDa システムを用い、得られたマスキロマトグラムから各糖ペプチドプローブの切断率を定量的に解析した。

3.5.1

cytoplasmic PNGase のペプチド特異性解析

はじめに、真核生物の cytoplasmic PNGase に着目し、そのペプチド特異性を解析した。3.4.2 に記載した酵母由来 cytoplasmic PNGase と 6 種類の糖ペプチドプローブを反応させ、反応液の処理後 UPLC-ESI-MS 用サンプルとして分析した。反応液中に含有されるキトビオースペンタペプチドと反応生成物のペンタペプチドを octadecyl silyl (ODS) カラムにて分離し、同時に ESI MS にて質量分析した。脱糖鎖反応は、トータルイオンクロマトグラムからキトビオースペンタペプチド (基質) とペンタペプチド (生成物) のイオンカウントを抽出し、解析および定量した。

以下に酵母 cytoplasmic PNGase における反応初期段階の UPLC-MS クロマトグラムを示した (Figure 51)。クロマトグラムを解析したところ、6 種類のキトビオースペンタペプチド (LLNLL、LLNLS、LLNSS、SSNLL、SSNLS および SSNSS) と切断されたペンタペプチドの m/z 値は $[M+H]^+$ と一致した。したがって、酵母 cytoplasmic PNGase の場合、6 種類のキトビオースペンタペプチド全てを基質として脱糖鎖すると判明した。

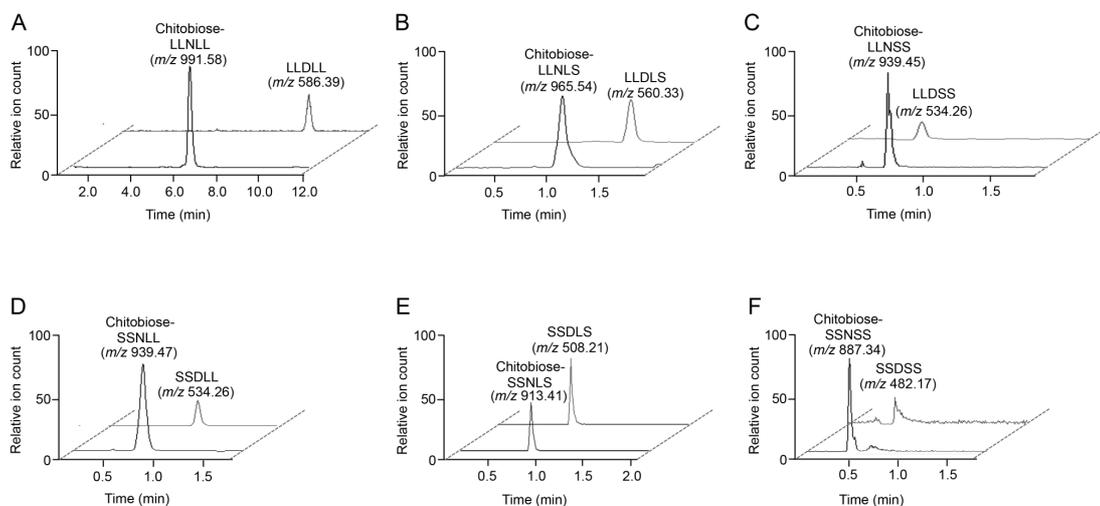


Figure 51. UPLC-MS chromatograms for deglycosylation of chitobiose-pentapeptides mediated by cytoplasmic PNGase. (A) LLNLL, (B) LLNLS, (C) LLNSS, (D) SSNLL, (E) SSNLS, and (F) SSNSS. Each chromatogram indicates the deglycosylation reaction after incubation at 30°C for 10 min.

続いて、酵母 cytoplasmic PNGase のペプチド特異性をさらに理解すべく、経時的に当該酵素の脱糖鎖反応を解析した (Figure 52A)。その結果、反応初期における反応性から算出した脱糖鎖率と最終的に得られた脱糖鎖率は、異なっていた。Cytoplasmic PNGase の場合、10 min 脱糖鎖反応した際の脱糖鎖率が、相対的な酵素活性を反映している (Figure 52B)。当該酵素の場合、反応初期においては、LLNLL や LLNLS といいた折りたたみ不完全な糖タンパク質のタンパク質表面すなわち、疎水性度の高い糖ペプチドに対して脱糖鎖収率 30-35% の高い反応性を示した。一方で、LLNSS や SSNLL または SSNSS のような基質に対しての脱糖鎖収率は 15-20%であった。これらの結果は、酵母 cytoplasmic PNGase の折りたたみ完全な糖タンパク質より疎水性が表面に露出した折りたたみ不完全な糖タンパク質に対して脱糖鎖しやすいという報告を支持している⁸³⁾。しかしながら、酵母 cytoplasmic PNGase は親水性度の高

い **SSNLS** を有する配列を持つ糖ペプチドプローブに対して 60%と最も高い反応性を示した。したがって、親水性度の高い糖ペプチドプローブである **SSNLS** を除いて、cytoplasmic PNGase は、さらに疎水性度の高い糖ペプチドプローブ (**LLNLL** および **LLNLS**) に対して脱糖鎖活性を示した。

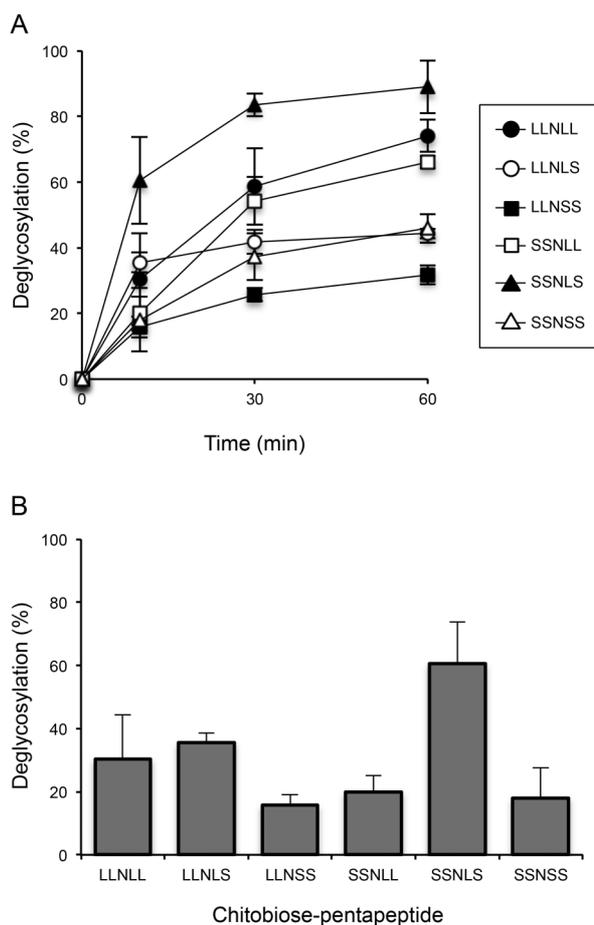


Figure 52. Peptide specificity of yeast cytoplasmic PNGase. (A) Time-course of the deglycosylation of chitobiose-pentapeptides at 30°C. Data are the means and standard deviations of three experiments. (B) Relative deglycosylation activity of chitobiose- pentapeptides after incubation at 30°C for 10 min. Data are the means and standard deviations of three experiments.

3.5.2

PNGase F のペプチド特異性解析

本項では、cytoplasmic PNGase のペプチド特異性における他のタイプの PNGase についての保存性を検討すべく、糖タンパク質の脱糖鎖酵素として最も一般的な PNGase F について検討した。3.4.1 に述べたように、グラム陰性菌 *F. meningosepticum* から抽出された市販の精製 PNGase F を用い、そのペプチド特異性を解析した。PNGase F と 6 種類の糖ペプチドプローブを 0~4 h インキュベートして、各糖ペプチドプローブに対する反応性を比較した。その結果、cytoplasmic PNGase と比べ、PNGase F は、非常に限定的なペプチド特異性を有していると示された (Figure 53A)。さらに、反応初期 (インキュベート 1 h 後)における各糖鎖プローブに対する相対的な反応性から、PNGase F は、他の 5 種類の糖ペプチドプローブと比べ、最も疎水性度の高い LLNLL 配列を有する糖ペプチドプローブに対して 70%と非常に高い脱糖鎖収率を示した (Figure 53B)。最終的に LLNLL は 95%程度脱糖鎖されてプラトーに達したため、PNGase F に対して生成物阻害が起こらないと示された (Figure 53)。また、LLNLS あるいは LLNSS に対して反応性が示され (15-20%)、明らかにその脱糖鎖収率は低下した (Figure 53B)。最終的に 30%程度しか脱糖鎖されなかった結果から、PNGase F は LLNLS あるいは LLNSS に対して、反応性を有していると考えられる。すなわち、LLNLS あるいは LLNSS は PNGase F により脱糖鎖されるが、産生された各ペプチドにより生成物阻害を受けていると考えられた。一方で、PNGase F は SSNLL、SSNLS および SSNSS に対して、ほとんど脱糖鎖しなかった (Figure 53)。

これらを総合すると、PNGase F は、疎水性度の高くかつグリコシル化された Asn 残基の N-末端に Leu-Leu 配列を有する糖ペプチドプローブに対して脱糖鎖能を示した。

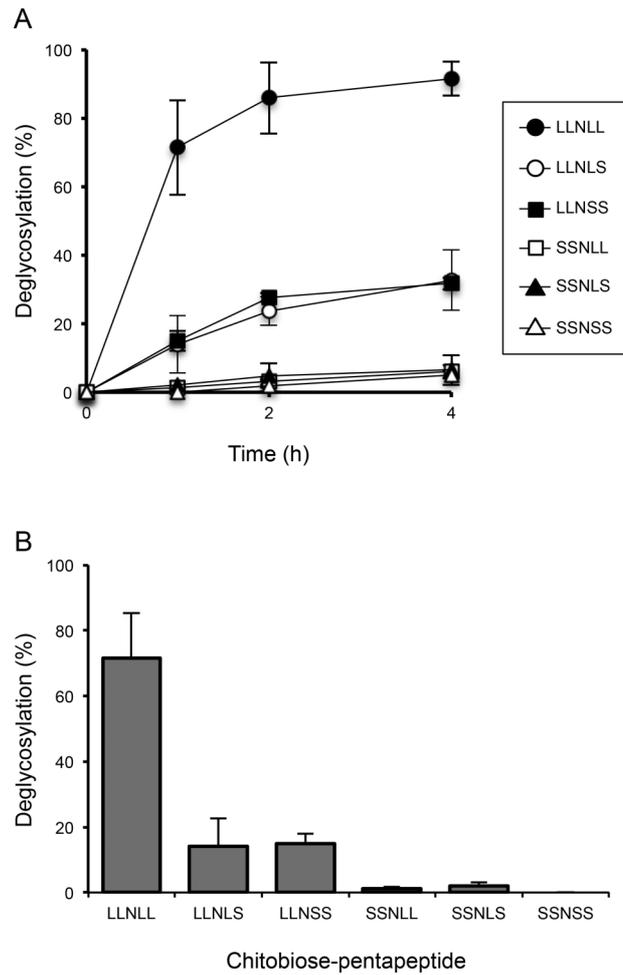


Figure 53. Peptide specificity of bacterial PNGase F. (A) Time- course of the deglycosylation of chitobiose-pentapeptides at 37°C. Data are the means and standard deviations of three experiments. (B) Relative deglycosylation activity of chitobiose-pentapeptides after incubation at 37°C for 1 h. Data are the means and standard deviations of three experiments.

3.5.3

PNGase A のペプチド特異性解析

本項では、PNGase F とは異なる糖鎖特異性が報告されている PNGase A に関して検討した。PNGase A と F の糖鎖特異性は解明されているが、ペプチド特異性の差異は不明である。さらに、PNGase A は糖タンパク質よりむしろ糖ペプチドに対して効果的に脱糖鎖活性を示すと知られている。特に PNGase F とは異なり、変性された糖タンパク質に対して選択的に働くと知られている⁸⁰⁾。そこで、3.4.1 で記載したように、アーモンドから抽出された精製 PNGase A を用い、そのペプチド特異性を解析した。PNGase A と 6 種類の糖ペプチドプローブを反応させ、0~4 h インキュベートし、経時的に脱糖鎖活性をモニタリングした (Figure 54A)。PNGase A と 6 種類の糖ペプチドプローブを 1 h インキュベートすると、その反応性は 6 種類の糖ペプチドプローブ間で LLNLL (ランク 1)、LLNLS/LLNSS/SSNLL/SSNLS (ランク 2) および SSNSS (ランク 3) の 3 つに分割されると判明した (Figure 54B)。したがって、PNGase F とは異なるペプチド特異性を有すると示唆された (Figure 53B および Figure 54B)。

過去の研究によって報告されているように、PNGase A は疎水性度の高い基質 LLNLL を脱糖鎖した。PNGase A は、LLNLL を 1 h で 80%、最終的には 95% 脱糖鎖した。一方で、LLNLS、LLNSS、SSNLL および SSNLS は、1 h のインキュベート後 35-50%と中程度切断された。また、最も親水性度の高い基質 SSNSS は、1 h のインキュベートではほとんど脱糖鎖されなかった。

これらを総合して考えると、PNGase A は LLNLL に対して効率よく脱糖鎖活性を示すが、その他の LLNLS、LLNSS、SSNLL および SSNLS に対して中程度の当該活性を示した。さらに、親水性の高い基質には、脱糖鎖活性を示さなかった。

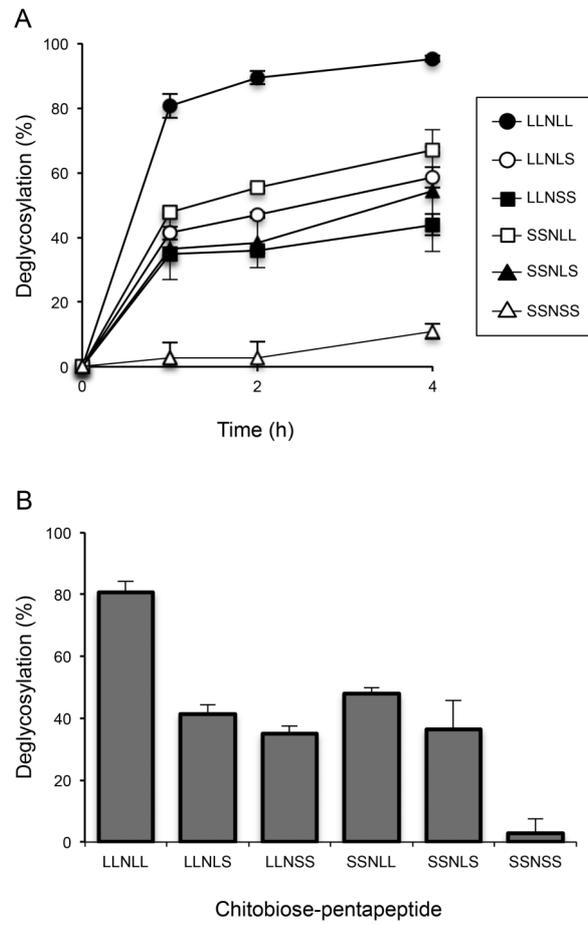


Figure 54. Peptide specificity of plant PNGase A. (A) Time-course of deglycosylation of chitobiose-pentapeptides at 37°C. Data are the means and standard deviations of three experiments. (B) Relative deglycosylation activity of chitobiose-pentapeptides after incubation at 37°C for 1 h. Data are the means and standard deviations of three experiments.

3.6

考察

本節では、前節までの結果を通した PNGase 類のペプチド特異性に関する考察をした。

3.6.1

PNGase 類のペプチド特異性に対する考察

合成糖ペプチドプローブと種々の PNGase を反応させそれぞれのペプチド特異性を解析した。その結果、酵母 cytoplasmic PNGase は、糖ペプチドプローブに対して広範囲な適応範囲を示した。その中でも、比較的疎水性度の高い糖ペプチドに対して若干優先的に反応するという傾向が観測された。しかしながら、cytoplasmic PNGase においては、基質の疎水性度と酵素活性の明確な相関は見られなかった。具体的には、最も疎水性度の高い LLNLL は反応初期において、およそ 30%しか脱糖鎖されなかった。一方で、LLNLL より親水性度の高い SSNLS は、反応初期で 60%以上脱糖鎖された。これらの結果は、cytoplasmic PNGase において Asn 残基の C 末端側の LS 配列が認識部位となる可能性を示している。実際、LLNLS は、反応初期において全糖ペプチドプローブの中で、2 番目に脱糖鎖された。この結果からも、反応初期において Asn 残基の C 末端側 LS 配列が認識部位となる可能性が高いと考えられる。

ここで、最も脱糖鎖活性が高かった親水性基質 SSNLS と最も疎水性度の高い LLNLL の速度論解析から、その反応性について議論する。速度論解析では、種々の基質濃度の逆数と反応速度の逆数の関係を Lineweaver-burk plot として表し、その X 軸接点から基質と酵素の親和性を示す K_m を算出した。また、Y 軸接点から基質に対する反応性を示す V_{max} を算出した。各基質の速度論解析から、SSNLS は親和性については低いが高い反応性を有する V_{max} 依存的な基質であるとわかった (Figure 55, Table 5)。一方で、LLNLL は高い親和性を有するが、

反応性は低い K_m 依存的な基質であるとわかった(Figure 55, Table 5)。これまでに、cytoplasmic PNGase による脱糖鎖反応には、タンパク質の折りたたみ不完全な状態が必要条件となるとも報告されている⁸³⁾。これらの結果を総合すると、基質のいくらかの疎水性度が cytoplasmic PNGase との結合に関与しているが、その他の要因も反応を促進するために関与すると推測される。その例として、本研究にて見出された Asn の C 末端側の LS 配列が考えられる。N 型糖鎖のコンセンサス配列は N-Xaa-S であるので、cytoplasmic PNGase はコンセンサス配列を認識する可能性が推測される。いずれにせよ、cytoplasmic PNGase は脱糖鎖反応の効率を最大化するために複数の駆動力を持つと考えられる。その考察に関しては、3.6.2 に詳細を示す。

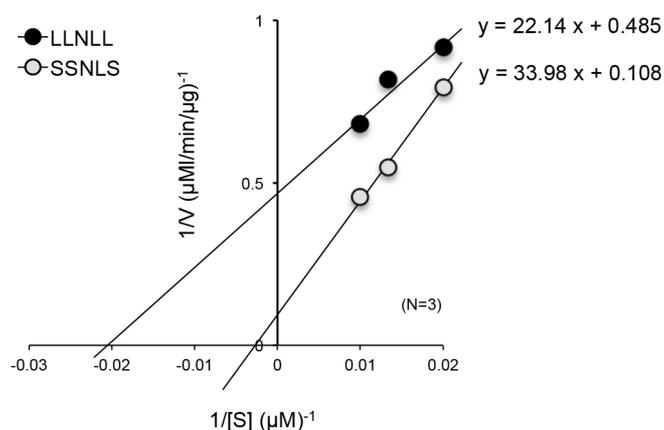


Figure 55. Lineweaver-burk plot of LLNLL and SSNLS by enzymatic reaction of yeast cytoplasmic PNGase. black circle: LLNLL, gray circle: SSNLS. Each data show the means of three independent experiments.

Table 5. K_m and V_{max} of LLNLL and SSNLS.

Substrate	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$)	V_{max} / K_m
LLNLL	45.7	2.07	0.0453
SSNLS	355	12.1	0.0341

さらに、cytoplasmic PNGase のペプチド特異性を理解すべく、見出された PNGase F のペプチド特異性に着目した。Cytoplasmic PNGase とは異なり、PNGase F は、効率的に LLNLL に対して脱糖鎖活性を示した。加えて、低いながらも LLNLS と LLNSS に対して酵素活性を示した。さらに、SSNLL、SSNLS、SSNSS に関してはわずかな脱糖鎖活性しか示さなかった。これらの結果から、PNGase F に関しては、疎水性度の高い糖ペプチドが基質になりやすいと示された。さらに、これらの新たな知見は PNGase F が折りたたみ完全な糖たんぱく質より折りたたみ不完全な糖タンパク質に対して選択的に脱糖鎖活性を示すという報告を支持している⁸¹⁾。さらに、PNGase F は、LLNLL、LLNLS、LLNSS に対してその酵素活性を示した。これらより、Asn 残基の N 末端側の Leu-Leu 配列が PNGase F の認識部位となる可能性がある。

アーモンド由来酸性 PNGase A のペプチド特異性は、PNGase F と類似しているが異なる特異性を示した。すなわち、最も疎水性度の高い LLNLL を効率よく脱糖鎖し、親水性度の高い SSNSS にはほとんどその酵素活性を示さなかった。しかしながら、PNGase F とは異なり、PNGase A は LLNLS、LLNSS、SSNLL および SSNLS に対して中程度の酵素活性を示した。これらの結果は、PNGase A が糖ペプチドの親水性と疎水性を識別する可能性を示している。さらに、PNGase A は糖ペプチドが持つ中程度の疎水性にも適応可能と考えられる。

3.6.2

cytoplasmic PNGase のペプチド特異性についての考察

3.5.1 および 3.6.1 の cytoplasmic PNGase のペプチド特異性解析の結果および考察から、当該酵素の持つ幅広い適応範囲に関してその詳細を考察した。すなわち、cytoplasmic PNGase は、1) 疎水性の高い糖ペプチドに対して若干の選択性を有する。2) 親水性/疎水性度にかかわらず NLS 配列を有する糖ペプチドに高い反応性を示す。以上の 2 つの異なる反応性が観測された。したがって、cytoplasmic PNGase は少なくとも 2 つ以上の基質反応性を有していると考えられる。これらの観測された特異性について以下考察する。まず、前提として、糖ペプチドプローブは、糖鎖付加部位近傍の環境を意図的に親水あるいは疎水的環境にしたものであり、必ずしも天然型の配列を再現した設計ではない。しかし、糖タンパク質品質管理にて糖タンパク質が分解される際、糖タンパク質の折りたたみは解かれ、一本の紐状になる。その状態で、cytoplasmic PNGase が作用して、糖鎖部とタンパク質部に分けられ、それぞれが分解されていく。すなわち、cytoplasmic PNGase が作用する際、糖鎖付加部位近傍のペプチド配列を認識する可能性が高いと考えられる。さらに、酵母からヒトまで真核生物において幅広く存在している cytoplasmic PNGase だが、その酵素活性を示す酵素活性ドメインは、種に関わらず広く保存されている⁶⁹⁾ (Figure 56)。

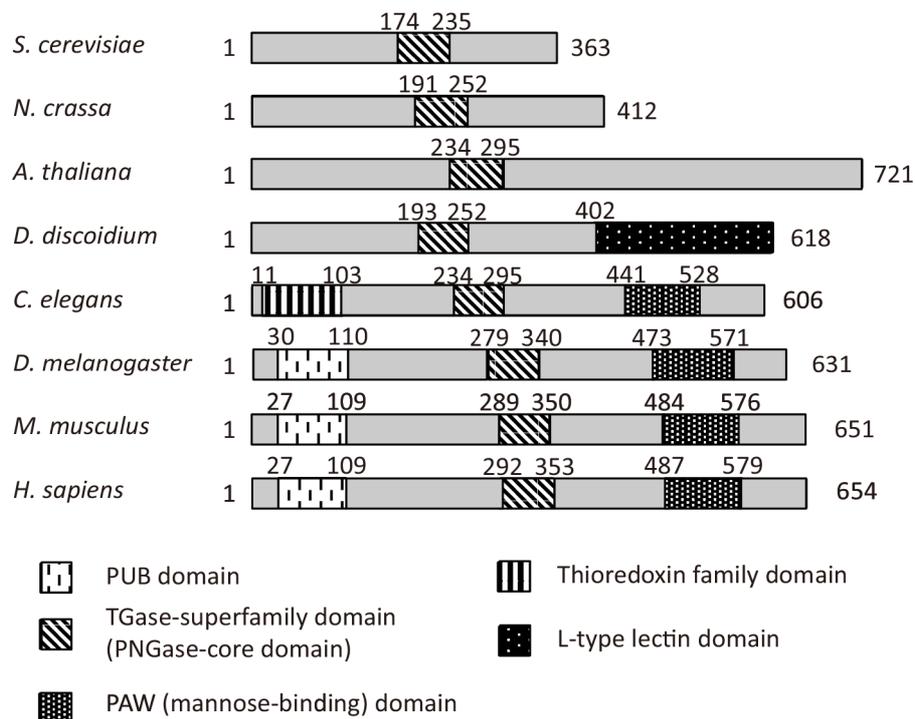


Figure 56. Schematic diagram of primary amino acid sequence of various cytoplasmic PNGase.

出典: Ref (69) より改変

一方で、コア酵素活性ドメインから、N末端側には、進化の過程で、PUBドメインが付与されている。しかしながら、このドメインは直接酵素活性に関わるのではなく、タンパク質-タンパク質相互作用ドメインとして知られている⁸⁴⁾。また、高等生物においては、C末端側にPAW(マンノース結合)ドメインが付与されている。このドメインは主に糖鎖構造を認識しているため⁸⁵⁾、基質としてN-アセチルグルコサミン2残基のキトビオースを糖鎖構造として用いている本研究においては考慮する必要のないドメインと考えた。これらの知見を総合すると、今回検討に用いた酵母 cytoplasmic PNGase は、主にその酵素活性に関わる部位が哺乳動物でも保存されており、得られた特異性を考察するために十分なモデルになると推測される。実際に2パターンの酵素反応性が観測された

が、そのそれぞれについて以下考察を進める。

まずは、1) 疎水性度の高い糖ペプチドに対しての脱糖鎖活性について考察する。まず、cytoplasmic PNGase は、折りたたみ不完全すなわち疎水性が露出した糖タンパク質に対して脱糖鎖活性を示すと報告されている⁸³⁾。したがって、本質的には、疎水性度の高いペプチド配列をより認識する特性を有すると考えられる。さらに、糖ペプチドプローブ LLNLL に対する反応速度論解析から、疎水性度の高い糖ペプチドに対しては親和性が高いと示唆される。すなわち、糖鎖近傍の疎水性度が高い場合、PNGase が強く結合している可能性が考えられる。

一方で、2) NLS 配列を有する糖ペプチドに高い反応性を有する理由を考察する。本研究において、cytoplasmic PNGase が、Asn 残基の C 末端側を認識する可能性が示唆された。実際、酵母 cytoplasmic PNGase の X 線結晶構造⁸⁶⁾を考慮すると C 末端側に認識部位がある可能性は高いと考えられる。また、糖ペプチドプローブに関して、C 末端側においても Asn の次が疎水性度の高い Leu で続いて Ser である配列の有効性が示された。すなわち、コンセンサス配列を有し、C 末端側が疎水的な環境にあるものが適していた。さらに、その中で一番反応性が高い SSNLS は、反応性が非常に高い基質であった。これらを総合すると、コンセンサス配列を有する基質に対しては反応性が高い可能性が示唆される。

以上の 2 点を総合して考えると、糖鎖近傍の疎水性度が高い基質には速やかに結合する可能性が示唆された。一方で、比較的糖鎖近傍が親水環境にあり、コンセンサス配列を有する基質に対しては、素早く反応して、速やかに脱糖鎖していると考えられる。その他の糖ペプチドプローブにおいても全く脱糖鎖活性が示されない基質はなく、他の駆動力によっても cytoplasmic PNGase は、脱糖鎖反応を触媒する可能性が高いと考えられる。

近年、cytoplasmic PNGase の生物学的重要性が明らかになりつつある。すなわち、1.2 や 3.2.2 で述べたように cytoplasmic PNGase の欠損 Ngly1 欠損症は重篤な病態を示すという報告である。本研究により明らかとなった cytoplasmic

PNGase のペプチド配列に対する幅広い適応限界は、いかにして cytoplasmic PNGase が多様なタンパク質に対して働くかを調べるために重要な結果である。

3.7

小括

本章では、種々の PNGase のペプチド特異性解析から、種によって合成糖ペプチドプローブに対する特異性が様々であると判明した⁸⁷⁾。具体的には、PNGase 類は、基本的に疎水性度の高い糖ペプチドに対して脱糖鎖活性を示しやすい (Figure 57)。また cytoplasmic PNGase は、幅広い適応範囲を有しており、PNGase A はランク分けされたペプチド特異性を有していた。さらに、PNGase F は限定的な特異性を有しているを見出した。さらに、cytoplasmic PNGase のペプチド配列に対する幅広い適応限界は、多様な糖ペプチド基質に適応するために獲得したものであると推測される。

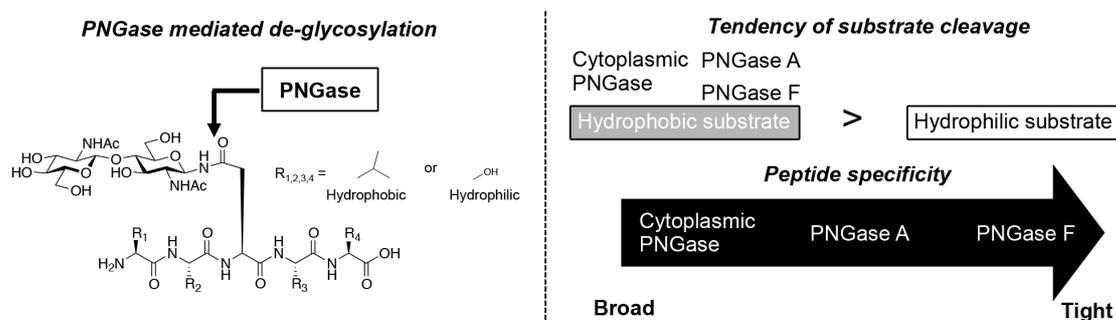


Figure 57. Summary of the peptide specificity of various PNGase.

第 4 章 総括

第 1 章では、糖タンパク質品質管理機構における現状理解と細胞恒常性維持の重要性を示し、当該機構に対する化学的研究アプローチの有効性を示した。

第 2 章では、現在までにブラックボックスとなっていた糖タンパク質品質管理機構における分泌あるいは分解経路に対して、分泌あるいは分解シグナル糖鎖の選択的阻害を基軸にした化学的解析アプローチを確立した。すなわち、分泌あるいは分解シグナル糖鎖に対する選択的な阻害剤をそれぞれ見出した。さらに分子ツールとしてそれら阻害剤を駆使して、これまでに明らかとなっていなかった糖タンパク質の分泌あるいは分解に関与する 2 つの独立した糖鎖切断経路を解明した。

第 3 章では、糖タンパク質品質管理機構の下流で重要な働きをする cytoplasmic PNGase に着目し、糖ペプチドプローブを用いたペプチド特異性を解析した。PNGase 類に関しては、ペプチド特異性を詳細に研究した例はなく、親水性/疎水性を系統的に制御した合成糖ペプチドプローブによりそれらのペプチド特異性が初めて明らかになった。種々の PNGase を検討した結果、PNGase 類は概ね疎水性度の高い糖ペプチドをより基質として認識すると判明した。一方で、PNGase の由来により特異性は様々であった。cytoplasmic PNGase の幅広い適応範囲が示され、PNGase A は糖ペプチドプローブに対して三段階の反応性を有していた。また、PNGase F はペプチド特異性が高いと示された。Cytoplasmic PNGase のペプチド配列に対する幅広い適応限界は、幅広い糖ペプチド基質に対応すべく獲得したものと考えられ、本研究においてその一端を解明した。

以上総合して、化学的研究アプローチにて糖タンパク質品質管理機構を分子レベルで理解した。さらに、その標的酵素活性をもとにした細胞恒常性に係る生命現象の理解から、分子ツールが酵素特性の解明のみでなく、恒常性を意図的に制御するツールへと応用可能なことを示した。第 2 章において見出した選択的阻害剤群は、糖タンパク質の分泌あるいは分解を制御する分子ツールとなりうる。さらに、第 3 章では糖ペプチド型プローブの糖タンパク質品質管理機構下流の分解経路における有用性が示された。一方で、以前の報告から上流にて糖タンパク質の折りたたみをチェックする UGGT の阻害剤としての有用性も示されている。すなわち、親水性/疎水性を系統的に制御した糖ペプチド基質は糖タンパク質品質管理の上流、下流ともに適応可能な分子ツールになりうる。

さらに、分子レベルでの当該機構の理解は細胞恒常性に関わり、ひいては多くの疾患の発症メカニズムに対する根本的な理解につながる。すなわち、糖タンパク質品質管理機構において化合物を自在に操る化学的な研究手法は、生化学、細胞生物学的な理解を超えて、病理学的な理解への新たな方法論の提唱に繋がると期待される。

第 5 章 実験編

第 2 章 小胞体における分泌/分解糖鎖産生経路の解明

使用試薬および機器: SAMP6 マウス肝臓 および C57BL/6 マウス 肝臓は三協ラボサービスから購入した (東京、日本)。Kif、SW、ManA、dMJ および dNJ は Toronto Research Chemicals (トロント、カナダ) から購入した。dGJ、抗-EDEM1 (E8406)、抗-EDEM2 (E1782)、および抗-EDEM3 (E0409) 抗体は Sigma-Aldrich から購入した。dFJ および抗-ERManI 抗体 (sc-104975) は Santa Cruz Biotechnology (カリフォルニア、USA)から購入した。抗-GM130 (610822) 抗体は BD Biosciences (カリフォルニア、USA)から購入した。M9-Gly-BODIPY、¹⁰⁾ManIm、⁸²⁾2-phenethyl ManIm⁸³⁾ および N-butyl dMJ⁵⁰⁾ は参考文献をもとに合成した。N-decyl dMJ、2-phenyl ManIm および 2-octyl ManIm は、Gaetano Speciale および Spencer J. Williams 教授よりご供与いただいた。JASCO LC-2000 (東京、日本) で HPLC 分析し、カラムは TSK-GEL Amide-80 column (3 μm , ϕ 4.6 mm 150 mm) (東京、日本) を使用した。Waters Acquity UPLC H-Class (マサチューセッツ、USA) で UPLC 分析し、カラムは Acquity UPLC Glycan BEH amide column (1.7 μm , ϕ 2.1 mm 150 mm) を使用した。

小胞体画分の抽出: 小胞体画分は、SAMP6 (8 週齢, 雄) or C57BL/6 (8 週齢, 雄) マウス肝臓より遠心分画法にて抽出した⁸⁴⁾。マウス肝臓 (0.3 g) を抽出バッファー [sucrose (0.25 M), EDTA (2 mM), HEPES (10 mM, pH 7.4), EDTA-free protease inhibitor cocktail (1 tablet per 50 mL, Roche)] (1.2 mL) に懸濁させた。この懸濁液をテフロンポッター型ホモジナイザーにて破碎した (20 ストローク, 4°C)。得られた破碎液を遠心した (900 × g, 4°C, 10 min)。遠心後、上清を再び遠心した (5,000 × g, 4°C, 10 min)。続いて、回収した上清を遠心した (8,000 × g, 4°C, 10min)。さらに、回収した上清を遠心し(20,000 × g, 4°C, 120 min)、沈殿を小胞体画分として得た。

小胞体画分の可溶化: 小胞体画分に可溶化バッファー [sucrose (0.25 M), EDTA (2 mM), HEPES (10 mM, pH 7.4), EDTA-free protease inhibitor cocktail (1 tablet per 50 mL, Roche), TritonX-100 (1%)] (100 μL/10 mg の小胞体画分) を添加した。この懸濁液を氷上にてインキュベートしてタンパク質を可溶化した (4°C, 120 min)。得られた小胞体画分のタンパク質濃度は bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo) を用いて決定した。

小胞体画分のウェスタンブロット：抽出過程における各段階の画分 (20 μ L) に 5 \times SDS-PAGE sample buffer [Tris·HCl (250 mM, pH 6.8), DTT (375 mM), SDS (10%), glycerol (50%), Bromophenol Blue (0.1%)] (4 μ L) を添加し、加熱した (100°C, 5 min)。熱処理したタンパク質サンプルを遠心した (15,000 \times g, 3 min)。各サンプルの上清を SDS-PAGE (anti-GM130 抗体に対して3–7.5% グラジエントゲル、他のタンパク質に対して 7.5% ゲルを使用) 後、トランスブロッターにてゲル内のタンパク質を PVDF メンブレンに転写した (45 min, PVDF 膜表面積に対して2 mA)。転写後のメンブレンを Blocking One (ナカライテスク) にて穏やかに震盪した (室温、1 h)。バッファーを除去したメンブレンを一次抗体溶液中(抗-BiP, 抗-GM130 抗-ERManI, 抗-EDEM1, 抗-EDEM2, 抗-EDEM3, および 抗-GolgiManIA 抗体)にて穏やかに震盪した(4°C, 16 h)。TBS-T にてメンブレンを洗浄後 (3 \times 10 min)、一次抗体反応後のメンブレンをHRP標識された二次抗体溶液 [抗-rabbit IgG (goat), 抗-mouse IgG (H+L), or protein G] に浸し、穏やかに震盪した (室温、30 min)。再度、TBS-T (3 \times 10 min)にて洗浄後、化学発光試薬 (Immobilon Western, Millipore) と反応させ、標的タンパク質のバンドを FluoroChemQ image analyzer (ProteinSimple) にて検出した。

小胞体画分中のマンノシダーゼに対する阻害実験：小胞体画分 (60 μg)、Triton X-100 (0.6 %)、 CaCl_2 (10 mM)、HEPES (10 mM, pH 7.4) および 阻害剤 [ManIm (10-10000 μM)、Kif (0.01-1 μM)、Man A (10-5000 μM)、SW (0.01-1000 μM)、dMJ (0.01-100 μM)] を含有する反応液 (20 μL) を調製した。4°C で 30 min プレインキュベーション後、M9-Gly-BODIPY (2.5 μM) を反応液に添加した。さらに、37°C で 30 min インキュベーションした後、 CH_3CN (100 μL) を添加し酵素反応を停止させた。超純水 (80 μL) を加え、遠心後 (20,000 $\times g$, 4°C, 20 min)、上清 (30 μL) を HPLC により分析した。[Tosoh TSK-gel Amide-80 3 μm column (ϕ 4.6 mm 15 cm) ; 移動相: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{HCO}_2$ (100 μM , pH 4.5) ; グラジエント: 50 min で 65 : 35 から 50 : 50; 流量: 1.0 mLmin^{-1} , 40°C; 検出: $\lambda_{\text{ex}}=504$ nm, $\lambda_{\text{em}}=514$ nm]。M8B および M8A/C のピーク面積は Origin 2016 ソフトウェアを用いて算出した。重なり合う部分のピーク面積の算出には Origin 2016 デコンボリューション機能を用いた。

選択的阻害剤の構造活性相関: 小胞体画分 (60 μg)、Triton X-100 (0.6 %)、 CaCl_2 (10 mM)、HEPES (10 mM, pH 7.4) および 阻害剤 [ManIm (10-10000 μM)、2-phenyl ManIm (0.01-1000 μM)、2-phenethyl ManIm (100-10000 μM)、2-octyl ManIm (100-10000 μM)、N-butyl dMJ (0.1-100 μM)、または N-decyl dMJ (10-1000 μM)、dGJ (10-10000 μM)、dFJ (10-50000 μM)、dNJ (100-50000 μM)] を含有する反応液 (20 μL) を調製した。4°Cで30 min プレインキュベーション後、M9-Gly-BODIPY (2.5 μM) を反応液に添加した。さらに、37°Cで30 min インキュベーションした後、 CH_3CN (100 μL) を添加し酵素反応を停止させた。超純水 (80 μL) を加え、遠心後 (20,000 $\times g$, 4°C, 20 min)、上清 (30 μL) を HPLC により分析した。[Tosoh TSK-gel Amide-80 3 μm column (ϕ 4.6 mm 15 cm) ; 移動相: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{HCO}_2$ (100 μM , pH 4.5) ; グラジエント: 50 min で 65 : 35 から 50 : 50; 流量: 1.0 mLmin^{-1} , 40°C; 検出: λ_{ex} =504 nm, λ_{em} =514 nm]。M8B および M8A/C のピーク面積は Origin 2016 ソフトウェアを用いて算出した。重なり合う部分のピーク面積の算出には Origin 2016 デコンボリューション機能を用いた。

選択的阻害剤の阻害様式決定: 小胞体画分 (15 μg)、Triton X-100 (0.6 %)、 CaCl_2 (10 mM)、HEPES (10 mM, pH 7.4) および 阻害剤 [dMJ (0.1, 0.2, 0.5 μM) または dNJ (1000, 3000, 5000 μM)] を含有する反応液 (5 μL) を調製した。4°C で 30 min プレインキュベーション後、M9-Gly-BODIPY (2.5 μM) を反応液に添加した。さらに、37°C で 30 min インキュベーションした後、 CH_3CN (100 μL) を添加し酵素反応を停止させた。超純水 (80 μL) を加え、遠心後 (20,000 $\times g$, 4°C, 20 min)、上清 (30 μL) を HPLC により分析した。[Tosoh TSK-gel Amide-80 3 μm column (ϕ 4.6 mm 15 cm) ; 移動相: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{HCO}_2$ (100 μM , pH 4.5) ; グラジエント: 50 min で 65 : 35 to 50 : 50; 流量: 1.0 mLmin^{-1} , 40°C; 検出: $\lambda_{\text{ex}}=504$ nm, $\lambda_{\text{em}}=514$ nm]。M8B および M8A/C のピーク面積は Origin 2016 ソフトウェアを用いて算出した。重なり合う部分のピーク面積の算出には Origin 2016 デコンボリューション機能を用いた。

選択的阻害下におけるマンノース切断反応の解析:小胞体画分 (60 μg), Triton X-100 (0.6 %), CaCl_2 (10 mM), HEPES (10 mM, pH 7.4), 選択的阻害剤 [dMJ (5 μM) あるいは dNJ (50 mM)] を含有する反応液を調製した (20 μL for SAMP6, 40 μL for C57BL/6)。4°C で 30 min プレインキュベーションした後、M9-Gly-BODIPY (2.5 μM for SAMP6、1.25 μM for C57BL/6) を添加した。37°C でインキュベーションした後 (SAMP6: 8 h 阻害剤非存在下, 24 h for dMJ あるいは dNJ 存在下; C57BL/6: 6 h 阻害剤非存在下、 24 h dMJ あるいは dNJ 存在下)、 CH_3CN (100 μL for SAMP6, 200 μL for C57BL/6) を添加し、酵素反応を停止した。超純水 (80 μL for SAMP6, 160 μL for C57BL/6) を加え、遠心後 (20,000 $\times g$, 4°C, 20 min)、上清 (30 μL for SAMP6, 60 μL for C57BL/6) を乾固させ、超純水 (10 μL) に再溶解させた。各サンプルを UPLC にて分析した。[Waters Acquity UPLC Glycan BEH Amide column (1.7 μm , ϕ 2.1 mm 15 cm); 移動相: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{HCO}_2$ (50 mM, pH 4.5) ; グラジエント: 45 minで 73 : 27 から 65.5 : 34.5; 流量: 0.2 mLmin^{-1} , 60°C; 検出: $\lambda_{\text{ex}}=504 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=514 \text{ nm}$]。

糖鎖異性体混合物を用いた選択的阻害下におけるマンノース切断反応の解析:小胞体画分 (135 μg), Triton X-100 (0.6 %), CaCl_2 (10 mM), HEPES (10 mM, pH 7.4), および M9-Gly-BODIPY (2.5 μM)を含有する反応液を調製した (90 μL)。37°C で 3 h インキュベーションした後、選択的阻害剤 [dMJ (5 μM) あるいは dNJ (50 mM)] を添加した。さらに、37°C で 3 および 12 h インキュベーションした後、 CH_3CN (100 μL) を添加し、酵素反応を停止した。超純水 (80 μL) を加え、遠心後 (20,000 $\times g$, 4°C, 20 min)、上清 (30 μL) を乾固させ、超純水 (10 μL) に再溶解させた。各サンプルを UPLC にて分析した。[Waters Acquity UPLC Glycan BEH Amide column (1.7 μm , ϕ 2.1 mm 15 cm) ; 移動相: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{HCO}_2$ (50 mM, pH 4.5) ; グラジエント: 45 minで 73 :27 から 65.5 : 34.5; 流量: 0.2 mLmin^{-1} , 60°C; 検出: $\lambda_{\text{ex}}=504\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=514\text{ nm}$].

第3章 キトビオースペンタペプチドを用いた PNGase のペプチド特異性解析

使用試薬および機器: キトビオースペンタペプチドは文献をもとに合成した⁷⁶⁾。UPLC-MS 分析には、Waters ACQUITY UPLC I-Class と QDa 検出器 を使用し、カラムは ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (1.7 μm, ø 2.1 mm × 50 mm; Waters, MA, USA) を用いた。PNGase F (*F. meningosepticum* から精製) は New England Biolabs (MA, USA) から購入した。PNGase A (sweet almond meal から精製) は、Roche Life Science (IN, USA) から購入した。pET28b-PNG1-(His)₆ プラスミドは、理化学研究所 糖鎖代謝学研究チームよりご供与いただいた。

Png1-(His)₆ の発現: pET28b-png1-(His)₆ が形質転換された BL21(DE3) pLysS 大腸菌株 (5 μL) をカナマイシン (50 μg/mL) が含有された LB 培地 (15 mL) に添加した。14 h 後、培養液 (15 mL) をカナマイシン (50 μg/mL) が含有された LB 培地に移した (1 L)。その後、OD₆₀₀ = 0.8 になるまで培養し (37°C, 3h)、isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; 1 mM) を加え、さらに培養し、発現誘導させた (37°C, 3 h)。その後、LB 培地 (1 L) を遠心し (15,000 × g, 4°C, 3 min)、発現誘導後の大腸菌を沈殿として回収した。

Png1p-(His)₆ の精製: *Png1p-His₆* を含有する大腸菌をバッファー (Tris-HCl [pH 8.0] (20 mM), phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] (1 mM), NaCl (150 mM); 20 mL) に懸濁させ、リゾチーム (10 mg/mL in Tris-HCl [pH 8.0] (20 mM); 200 μ L) を添加し、インキュベーションした (4°C, 30 min)。懸濁液に 10% Triton X-100 (250 μ L) および 2-mercaptoethanol (7 μ L) を添加し、さらにインキュベーションした (4°C, 20 min)。懸濁液中の大腸菌を超音波処理 (amplitude of 40%, 30 s \times 4) した後、遠心した (12,000 \times g, 4°C, 30 min)。上清を回収して、フィルター濾過した (0.45 μ m)。Complete His-Tag purification Resin (Roche Life Science) (1 mL) にバッファー [リン酸バッファー (pH 8.0) (50 mM), NaCl (300 mM); 20 mL] を加え転倒混和し、遠心した (500 \times g, 4°C, 10 sec)。上清を除去し、同じバッファー (2 mL) にて転倒混和し、平衡化した (4°C, 10 min)。フィルター濾過したタンパク質溶液 (10 mL) を His-Tag resin (1 mL) に添加し、ローテーターで転倒混和し (4°C, 30 min)、*Png1p-(His)₆* を His-Tag resin に結合させた。結合反応後、懸濁したビーズを遠心し (500 \times g, 4°C, 10 sec)、上清を除去し、His-Tag resin (1 mL) を洗浄バッファー (リン酸バッファー [pH 8.0] (50 mM), NaCl (300 mM) : リン酸バッファー [pH 8.0] (50 mM), NaCl (300 mM), imidazole (250 mM) = 98 : 2 ; [5 mL]) で洗浄した。その後、懸濁液を遠心し (500 \times g, 4°C, 10 sec)、上清を除去した。この操作を 10 回繰り返した。最後に、洗浄後の His-Tag resin に溶出バッファー [リン酸バッファー [pH 8.0] (50 mM), NaCl (300 mM), imidazole (250 mM)] を加え、転倒混和し (4°C, 10 min)、*Png1p-(His)₆* を溶出した。

BCA アッセイ: タンパク質サンプルの濃度を bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent Kit (Thermo) を用いて決定した。検量線作成用の標準タンパク質 (BSA) 濃度を 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.025, 0 mg/mL とし、各標準サンプルを調製した。各標準サンプルと 10 倍希釈したタンパク質 (5 μ L) に対して 40 μ L working reagent [試薬 A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid and sodium tartrate in 0.1M sodium hydroxide) : 試薬 B (4% cupric sulfate) = 50 : 1] を加えた。インキュベーションした後 (37°C, 30 min)、各サンプル (30 μ L) の吸光 (562 nm) をマイクロプレートリーダーにて測定した (FlexStation 3, Molecular Devise)。

SDS-PAGE: 各段階のタンパク質に 5 \times SDS-PAGE sample buffer [Tris·HCl (250 mM, pH 6.8), DTT (375 mM), SDS (10%), glycerol (50%), Bromophenol Blue (0.1%)] を加え、加熱した (100°C, 5 min)。サンプルを遠心後 (15,000 \times g, 3 min)、SDS-PAGE (10% gel) にてタンパク質を分離した。分離後のゲルをCBB により染色し、FluoroChemQ image analyzer (ProteinSimple) にて検出した。

PNGase を用いた脱糖鎖反応の解析: 酵素 [(100 U for PNGase F, 5 μ U for PNGaseA, or 0.5 μ g for cytoplasmic PNGase), バッファー (sodium phosphate [pH 7.5] (50 mM) for PNGase F, sodium acetate [pH 5.0] (50 mM) for PNGase A, or MES-NaOH [pH 6.6] (40 mM) for cytoplasmic PNGase), DTT (10 mM) for cytoplasmic PNGase、キトビオースペンタペプチド (100 μ M)] を含有する反応液 (80 μ L for PNGase F and PNGase A, 100 μ L for cytoplasmic PNGase) を調製した。37°C (PNGase F および PNGase A) あるいは 30°C (cytoplasmic PNGase) でインキュベーション後、氷冷したアセトン (50 μ L) を反応液 (10 μ L) に加え、酵素反応を停止した。さらに、インキュベーションし (4°C, 30 min)、タンパク質を沈殿させた。その後遠心し(20,000 \times g, 4°C, 20 min)、上清を乾固させた。1% ギ酸溶液(10 μ L) で再溶解し、測定用サンプルとした。各サンプル (7.5 μ L) を UPLCにより分析した。[Waters AQUITY UPLC BEH C₁₈ column (1.7 μ m, ϕ 2.1 mm \times 50 mm)、 移動相: 0.1% ギ酸/CH₃CN (+0.1% ギ酸)、 分離モード: アイソクラティック (PNGase F: 80:20 [LLNLL], 75:25 [LLNLS, SSNLL, SSNSL および SSNSS], 70:30 [LLNSS]; PNGase A: 80:20 [LLNLL, SSNLL, および SSNLS], 79:21 [LLNSS], 70:30 [LLNLS], 65:35 [SSNSS]; cytoplasmic PNGase: 80:20 [LLNLL, LLNLS, SSNLL, および SSNLS], 75:25 [SSNSS], 70:30 [LLNSS]) 流量: 0.2 mLmin⁻¹, 40°C. 検出: シングル四重極 AQUITY QDa 検出器 (Waters)/ エレクトロスプレーイオン化 (ESI) ESI ポジティブモード、プローブ温度: 600°C, キャピラリー電圧: 1.5 kV, コーン電圧: 15 V).

謝辞

本研究を推進するにあたり、研究に関するご指導はもちろんのこと、研究者としてのいろはを親身になってご教授頂き、これまで導いてくださった戸谷希一郎 准教授に心から感謝いたします。

また、副査をお引き受けくださった細胞分子デバイス研究室 久富寿 教授、天然物応用化学研究室 原節子 教授ならびに群馬大学 糖鎖化学研究室 松尾一郎教授には有益なご助言をいただき、深く御礼申し上げます。

生化学実験に関して基礎からご指導を頂いた 安田女子大学 平野真 講師に心から感謝いたします。

本実験遂行に必要な合成糖鎖プローブを供与いただきました、理化学研究所 伊藤細胞制御化学研究室に深く御礼申し上げます。

Spencer J. Williams 教授には研究進展のための化合物をご供与いただき、深く御礼申し上げます。

Cytoplasmic PNGase の大腸菌株をご供与いただきました理化学研究所糖鎖代謝学研究チームに深く御礼申し上げます。

戸谷研究室に所属した多くの方々と研究生活を送り、共に励ましあいながら研究できました。大変お世話になりました。

最後になりますが、私をここまで支えてくれた両親ならびに姉に大変感謝しております。

2018年3月 栗原 大輝

本研究に関する業績

学術論文

- 1) Taiki Kuribara, Makoto Hirano, Gaetano Speciale, Spencer J. Williams, Yukishige Ito, Kiichiro Totani
Selective manipulation of discrete mannosidase activities in the endoplasmic reticulum by using reciprocally selective inhibitors
ChemBioChem **2017** *18*, 1027-1035.
- 2) Taiki Kuribara, Toshihiro Ishihara, Takaya Kudo, Makoto Hirano, Kiichiro Totani
Peptide specificity analysis of peptide:*N*-glycanases using synthetic chitobiose-pentapeptides,
Protein Pept. Lett. **2017**, *24*, 723-728.

紀要

- 1) 栗原大輝、平野真、戸谷希一郎
小胞体糖鎖プロセッシングに対する選択的阻害
成蹊大学理工学研究報告, **2013**, *50*, 109-112.
- 2) 栗原大輝、戸谷希一郎
小胞体内における 1-デオキシノジリマイシン結合マンノシダーゼの選別
成蹊大学理工学研究報告, **2017**, 掲載予定

招待講演

- 1) 栗原大輝、平野真、Gaetano Speciale、Spencer J. Williams、伊藤幸成、戸谷希一郎
相補的な阻害剤が可能とした小胞体マンノシダーゼ活性の選択的な調節
東日本糖質若手シンポジウム
於：桐生市市民文化会館 スカイホール（群馬）2017. 11. 18 (土)~ 11. 19 (日)

国際会議

- 1) Taiki Kuribara, Makoto Hirano, Kiichiro Totani.
Analysis of glycan processing in the endoplasmic reticulum based on selective inhibitor of mannosidases
Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, at Hilton Hawaiian Village (USA), 2014. 11. 16 (Sun) ~ 11.19 (Wed) Poster presentation
- 2) Taiki Kuribara, Makoto Hirano, Spencer J. Williams, Yukishige Ito, Kiichiro Totani.
Two independent pathways on mannose trimmings in the ER glycoprotein quality control
Glyco23 International symposium on glycoconjugates, at Split, (Croatia), 2015. 9. 15 (Tue) ~ 9. 20 (Sun) Poster presentation
- 3) Taiki Kuribara, Makoto Hirano, Gaetano Speciale, Spencer J. Williams, Yukishige Ito, Kiichiro Totani.
Inhibitor-based manipulation reveals specific glycosignal production through dual mannose-trimming pathways in ER glycoprotein quality control,
International Carbohydrate Symposium (ICS) 2016 at New Orleans, (USA), 2016. 7. 16 (Sat) ~ 7. 21 (Thr) Oral presentation
- 4) Taiki Kuribara, Makoto Hirano, Gaetano Speciale, Spencer J. Williams, Yukishige

Ito, Kiichiro Totani.

Discovery of regioselective mannose-trimming pathways in the endoplasmic reticulum by using selective inhibitors.

EUROCARB2017 at Barcelona, (Spain), 2017. 7. 2 (Sun) ~ 7. 6 (Thr) poster presentation

国内会議

- 1) 栗原大輝, 平野真, 戸谷希一郎
小胞体マンノシダーゼ様タンパク質に対する選択的阻害剤の探索
第93回日本化学会第春季年会
於：立命館大学びわこ・くさつキャンパス（滋賀） 2013. 3. 22 (金)~ 3. 25 (月)
口頭発表
- 2) 栗原大輝, 平野真, 伊藤幸成, 戸谷希一郎
小胞体マンノシダーゼ類に対する選択的阻害剤の探索
GlycoTOKYO2013 シンポジウム
於：成蹊大学4号館ホール（東京） 2013. 10. 19 (土) ポスター発表
- 3) 栗原大輝, 平野真, Spencer J. Williams, 戸谷希一郎
小胞体マンノシダーゼ類に対する選択的阻害剤の探索
第9回日本ケミカルバイオロジー学会年会
於：大阪大学豊中キャンパス（大阪） 2014. 6. 11. (水) ~6. 13. (金) ポスターブリーフィング及びポスター発表
- 4) 栗原大輝, 平野真, Spencer J. Williams, 戸谷希一郎
小胞体マンノシダーゼ類に対する選択的阻害剤の探索
第33回日本糖質学会年会
於：名古屋大学豊田講堂（愛知） 2014. 8. 10 (日)~ 8. 12 (火) ポスター発表
- 5) 栗原大輝, 平野真, スペンサー J. ウィリアムズ, 戸谷希一郎

- 選択的阻害剤が駆使した小胞体マンノシダーゼ EDEM の機能解析
第 87 回日本生化学会大会
於：国立京都国際会館（京都） 2014. 10. 15 (水)～10. 18 (土) ポスター発表
- 6) 栗原大輝, 平野真, スペンサー J. ウィリアムズ, 戸谷希一郎
選択的阻害剤が駆使した小胞体マンノシダーゼ EDEM の機能解析
第 87 回日本生化学会大会
於：国立京都国際会館（京都） 2014. 10. 15 (水)～10. 18 (土) 口頭発表
- 7) 栗原大輝, 平野真, 戸谷希一郎
選択的阻害剤が明かす小胞体でのマンノーストリミング
GlycoTOKYO2014 シンポジウム
於：千葉大学園芸学部キャンパス（千葉） 2014. 11. 8 (土) ポスター発表
- 8) 栗原大輝, 平野真, 伊藤幸成, 戸谷希一郎
マンノシダーゼ類の選択的阻害に基づく小胞体糖鎖プロセッシングの解析
第 95 回日本化学会春季大会
於：日本大学 理工学部船橋キャンパス（千葉） 2015. 3. 26(木)～3. 29(日)
口頭発表
- 9) 栗原大輝, 平野真, 伊藤幸成, 戸谷希一郎
小胞体における 2 つのマンノーストリミング経路
第 34 回日本糖質学会年会
於：東京大学安田講堂（東京） 2015.7.31(金)～8.2(日) ポスター発表
- 10) 栗原大輝, 平野真, Gaetano Speciale, Spencer J. Williams, 伊藤幸成, 戸谷希一郎
シグナル糖鎖産生の選択的阻害を基軸とした糖タンパク質選別経路の解明
第 35 回日本糖質学会年会
於：高知市文化プラザ かるぽーと（高知） 2016.9.1(木)～9.3(土) ポスター発表
- 11) Taiki Kuribara, Makoto Hirano, Gaetano Speciale, Spencer J. Williams, Yukishige Ito, Kiichiro Totani.

Discovery of regioselective mannose-trimming pathways in the endoplasmic reticulum by using selective inhibitors

The 97th CSJ Annual Meeting at Hiyoshi Campus, Keio University (Kanagawa)

2017. 3. 16 (Thu) – 3. 19 (Sun) Oral presentation (English)

- 12) 栗原大輝, 平野真, Gaetano Speciale, Spencer J. Williams, 伊藤幸成, 戸谷希一郎

相補的な阻害剤を用いた小胞体マンノシダーゼ活性の選択的な調節

第36回日本糖質学会年会

於：旭川市民文化会館（北海道）2017.7.19(水)～7.21(金) ポスター発表

- 13) 栗原大輝、平野真、Gaetano Speciale、Spencer J. Williams、伊藤幸成、戸谷希一郎

相補的な阻害剤が可能とした小胞体マンノシダーゼ活性の選択的な調節

東北糖鎖研究会・東京糖鎖研究会合同シンポジウム

於：桐生市市民文化会館（群馬）2017.11.18(土)～11.19(日) ポスター発表

受賞

- 1) 2014年11月 GlycoTOKYO2014 シンポジウム「ポスター賞」

授与機関：東京糖鎖研究会

- 2) 2016年6月 ICS 2016 Travel grant

授与機関: ICS 2010 記念糖質科学基金

- 3) 2017年3月 CSJ Student Presentation Award 2017

授与機関: 日本化学会

- 4) 2017年12月 成蹊大学賞

授与機関: 成蹊大学

参考文献

- 1) Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W.; Etzler, M. E. *Essentials for glycobiology* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- 2) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- 3) Hammond, C.; Braakman, I.; Helenius, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1994**, *91*, 913-917.
- 4) Helenius, A.; Aebi, M. *Science* **2001**, *291*, 2364-2369.
- 5) Caramelo, J. J.; Parodi, A. J. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 3379-3387.
- 6) Słomińska-Wojewódzka, M.; Sandvig, K. *Molecules* **2015**, *20*, 9816-9846.
- 7) Benyair, R.; Ogan-Shetern, N.; Lederkremer, G. Z. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *41*, 99-109.
- 8) Mancino, L.; Rizvi, S. M.; Lapinski, P. E.; Raghavan, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, *99*, 5931-5936.
- 9) Hirano, M.; Adachi, Y.; Ito, Y.; Totani, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *466*, 350-355.
- 10) Schubert, U.; Antón, L. C.; Gibbs, J.; Norbury, C. C.; Yewdell, J. W.; Benink, J. R. *Nature* **2000**, *404*, 770-774.
- 11) Sano, R.; Reed, J. C. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1833*, 3460-3470.
- 12) Need, A. C.; Shashi, V.; Hitomi, Y.; Schoch, K.; Shianna, K. V.; McDonald, M.T.; Meisler, M. H.; Goldstein, D. B. *J. Med. Genet.* **2012**, *49*, 353-361.
- 13) Huang, C.; Harada, Y.; Hosomi, A.; Masahara-Negishi, Y.; Seino, J.; Fujihira, H.; Funakoshi, Y.; Suzuki, T.; Dohmae, N.; Suzuki, T. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. **2015**, *112*, 1398-1403.
- 14) Williams, D. B. *Biochem. Cell Biol.* **1995**, *73*, 123-132.
- 15) Parodi, A. J.; Cazzulo, J. J. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7641-7645.
- 16) Totani, K.; Ihara, Y.; Tsujimoto, T.; Matsuo, I.; Ito, Y. *Biochemistry* **2009**, *48*, 2933-2940.
- 17) Totani, K.; Ihara, Y.; Matsuo, I.; Koshino, H.; Ito, Y. *Angew. Chem. Int.*

- Ed.* **2005**, *44*, 7950-7954.
- 18) Totani, K.; Ihara, Y.; Matsuo, I.; Ito, Y. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 31502-31508.
 - 19) Takeda, Y.; Seko, A.; Hachisu, M.; Daikoku, S.; Izumi, M.; Koizumi, A.; Fujikawa, K.; Kajihara, Y.; Ito, Y. *Glycobiology* **2014**, *24*, 344-350.
 - 20) Izumi, M.; Makimura, Y.; Dedola, S.; Seko, A.; Kanamori, A.; Sakono, M.; Ito, Y.; Kajihara, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7238-7241.
 - 21) Trombetta, E. S.; Parodi, A. *J. Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2003**, *19*, 649-676.
 - 22) Kamiya, Y.; Kamiya, D.; Yamamoto, K.; Nyfeler, B.; Hauri, H-P.; Kato, K. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 1857-1861.
 - 23) Mikami, K.; Yamaguchi, D.; Tateno, H.; Hu, D.; Qin, S-Y.; Kawasaki, N.; Yamada, M.; Matsumoto, N.; Hirabayashi, J.; Ito, Y.; Yamamoto, K. *Glycobiology* **2010**, *20*, 310-321.
 - 24) Tremblay, L. O.; Herscovics, A. *Glycobiology* **1999**, *9*, 1073-1078.
 - 25) Gonzalez, D. S.; Karaveg, K.; Vandersall-Nairn, A. S.; Lal, A.; Moremen, K. W. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21375-21386.
 - 26) Pan, S.; Wang, S.; Utama, B.; Huang, L.; Blok, N.; Estes, M. K.; Moremen, K. W.; Sifers, R. N. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 2810-2822.
 - 27) Benyair, R.; Lederkremer, G. Z. *Microscopy* **2016**, *65*, 517-521.
 - 28) Benyair, R.; Ogen-Shtern, N.; Mazkereth, N.; Shai, B.; Ehrlich, M.; Lederkremer, G. Z. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 172-184.
 - 29) Hosokawa, N.; Wada, I.; Hasegawa, K.; Yorihuzi, T.; Tremblay, L. O.; Herscovics, A.; Nagata, K. *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 415-422.
 - 30) Mast, S. W.; Diekman, K.; Karaveg, K.; Davis, A.; Sifers, R. N. Moremen, K. W. *Glycobiology* **2005**, *15*, 421-436.
 - 31) Hirao, K.; Natsuka, Y.; Tamura, T.; Wada, I.; Morito, D.; Natsuka, S.; Romero, P.; Sleno, B.; Tremblay, L. O.; Herscovics, A.; Nagata, K.; Hosokawa, N. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 9650-9658.
 - 32) Hosokawa, N.; Tremblay, L. O.; Sleno, B.; Kamiya, Y.; Wada, I.; Nagata, K.; Kato, K.; Herscovics, A. *Glycobiology* **2010**, *20*, 567-575.
 - 33) Ninagawa, S.; Okada, T.; Sumitomo, Y.; Kamiya, Y.; Kato, K.; Hiromoto, S.; Ishikawa, T.; Takeda, S.; Sakuma, T.; Yamamoto, T.; Mori, K. *J. Cell*

- Biol.* **2014**, *206*, 347-356.
- 34) Totani, K.; Yamaya, K.; Hirano, M.; Ito, Y. *Carbohydr. Res.* **2017**, *439*, 16-22.
 - 35) Matsuo, I.; Totani, K.; Tatami, A.; Ito, Y. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8262-8277.
 - 36) Takahashi, K.; Tsuboyama, T.; Matsushita, M.; Kasai, R.; Okumura, H.; Yamamuro, Y.; Okamoto, Y.; Toriyama, K.; Kitagawa, K.; Takeda, T. *Bone Miner.* **1994**, *24*, 245-255.
 - 37) Iwamoto, S.; Isoyama, M.; Hirano, M.; Yamaya, K.; Ito, Y.; Matsuo, I.; Totani, K. *Glycobiology* **2013**, *23*, 121-131.
 - 38) Henrissat, B. *Biochem. J.* **1991**, *280*, 309-316.
 - 39) Bourne, Y.; Henrissat, B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 593-600
 - 40) Hase, S.; Ibuki, T.; Ikenaka, T. *J. Biochem.* **1984**, *95*, 197-203.
 - 41) Kaneshiro, K.; Watanabe, M.; Terasawa, K.; Uchimura, H.; Fukuyama, Y.; Iwamoto, S.; Sato, T. A.; Shimizu, K.; Tsujimoto, G.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7146-7151.
 - 42) Ogen-Shtern, N.; Avezov, E.; Shenkman, M.; Benyair, R.; Lederkremer, G. Z. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 3194-3205.
 - 43) Xiang, Y.; Karaveg, K.; Moremen, K. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2016**, *113*, E7890-E7899.
 - 44) Thompson, A. J.; Dabin, J.; Iglesias-fernández, J.; Arèvol, A.; Dinev, Z.; Williams, S. J.; Bande, O.; Siriwardena, A.; Moreland, C.; Hu, T.-C.; Smith, D. K.; Gilbert, H. J.; Rovira, C.; Davies, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10997-11001.
 - 45) Elbein, A. D.; Tropea, E.; Mitchell, M.; Kaushal, G. P. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15599-15605.
 - 46) Tokunaga, F.; Brostrom, C.; Koide, T.; Arvan, P. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40757-40764.
 - 47) Ninagawa, S.; Okada, T.; Sumitomo, Y.; Hiromoto, S.; Sugimoto, T.; Ishikawa, T.; Takeda, S.; Yamamoto, T.; Suzuki, T.; Kamiya, Y.; Kato, K.; Mori, K. *J. Cell Biol.* **2015**, *211*, 775-784.
 - 48) Lal, A.; Pang, P.; Kalelkar, S.; Romero, P. A.; Herscovics, A.; Moremen, K. W. *Glycobiology* **1998**, *8*, 981-995.

- 49) Tremblay, L. O.; Herscovics, A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 31655-31660
- 50) Kawatkar, S. P.; Kuntz, D. A.; Woods, R. J.; Rose, D. R.; Boons, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8310-8319.
- 51) Van den elsen, J. M. H.; Kuntz, D. A.; Rose, D. R. *EMBO J.* **2001**, *20*, 3008-3017.
- 52) Fuhrmann, U.; Bause, E.; Legler, G.; Ploegh, H. *Nature* **1984**, *307*, 755-758.
- 53) Vallée, F.; Karaveg, K.; Herscovics, A.; Moremen, K. W.; Lynne Howell, P. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 41287-41298.
- 54) Lipari, F.; Herscovics, A. *Biochemistry* **1999**, *38*, 1111-1118.
- 55) Romero, P. A.; Vallée, F.; Lynne Howell, P.; Herscovics, A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11071-11074.
- 56) Concia, A. L.; Lozano, C.; Castillo, J. A.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapés, P. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3808-3816.
- 57) Mulakala, C.; Reilly, P. J. *Protein Struct. Funct. Genet.* **2002**, *49*, 125-134.
- 58) Asano, N.; Ikeda, K.; Yu, L.; Kato, A.; Takebayashi, K.; Adachi, I.; Kato, I.; Ouchi, H.; Takahata, H.; Fleet, G. W. *J. Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 223-229.
- 59) Kato, A.; Kato, N.; Kano, E.; Adachi, I.; Ikeda, K.; Yu, L.; Okamoto, T.; Banba, Y.; Ouchi, H.; Takahata, H.; Asano, N. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2036-2044.
- 60) Dixon, M. *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170-171.
- 61) Koizumi, A.; Matsuo, I.; Takatani, A.; Seko, A.; Hachisu, M.; Takeda, Y.; Ito, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7426-7431.
- 62) Kuribara, T.; Hirano, M.; Speciale, G.; Williams, S. J. Ito, Y. Totani, K. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1027-1035.
- 63) Herscovics, A.; Romero, P.; Tremblay, L. O. *Glycobiology* **2002**, *12*, G14-G15.
- 64) Olivari, S.; Cali, T.; Salo, K. E.; Paganetti, P.; Ruddock, L. W.; Molinari, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *349*, 1278-1284.
- 65) Kawasaki, N.; Ichikawa, I.; Matsuo, I.; Totani, K.; Matsumoto, N.; Ito, Y. *Blood* **2008**, *111*, 1972-1979.

- 66) Wang, M.; Kaufman, R. J. *Nature* **2016**, *529*, 326-335.
- 67) Takahashi, N.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *76*, 1194-1201.
- 68) Plummer Jr, T. H.; Tarentino, A. L. *Glycobiology* **1991**, *1*, 257-263.
- 69) Suzuki, T. *J. Biochem.* **2015**, *157*, 23-34.
- 70) Suzuki, T.; Seko, A.; Kitajima, K.; Inoue, Y.; Inoue, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *194*, 1124-1130.
- 71) Suzuki, T.; Seko, A.; Kitajima, K.; Inoue, Y.; Inoue, S. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17611-17618.
- 72) Suzuki, T.; Kitajima, K.; Inoue, S.; Inoue, Y. *Glycoconj. J.* **1995**, *12*, 183-193.
- 73) Wiertz, E. J.; Jones, T. R.; Sun, L.; Bogyo, M.; Geuze, H. J.; Ploegh H. L. *Cell* **1996**, *84*, 769-779.
- 74) Suzuki, T.; Park, H.; Hollingsworth, N. M.; Strenglanz, R.; Lennarz, W. *J. J. Cell. Biol.* **2000**, *149*, 1039-1052.
- 75) Norris, G. E.; Stillman, T. J.; Anderson, B. F.; Baker, E. N. *Structure* **1994**, *2*, 1049-1059.
- 76) Lee, J. H.; Choi, J. M.; Lee, C.; Yi, K. J.; Cho, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005**, *102*, 9144-9149.
- 77) Hirsch, C.; Misaghi, S.; Blom, D.; Pacold, M. E.; Ploegh, H. L. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 201-206.
- 78) Hagihara, S.; Goda, K.; Matsuo, I.; Ito, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *360*, 357-362.
- 79) Tretter, V.; Altmann, F.; Marz, L. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *199*, 647-652.
- 80) Takahashi, N.; Nishibe, H. *J. Biochem.* **1978**, *84*, 1467-1473.
- 81) Tarentino, A. L.; Plummer Jr, T. H. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 10776-10780.
- 82) Kudo, T.; Hirano, M.; Ishihara, T.; Shimura, S.; Totani, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5563-5567.
- 83) Joshi, S.; Katiyar, S.; Lennerz, W. J. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 823-826.
- 84) Suzuki, T.; Park, H.; Till, E. A.; Lennerz, W. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *287*, 1083-1087.
- 85) Zhou, X.; Zhao, G.; Truglio, J. J.; Wang, L.; Li, G.; Lennarz, W. J. Schindelin, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2006**, *103*, 17214-17219.

- 86) Zhao, G.; Li, G.; Zhou, X.; Matsuo, I.; Ito, Y.; Suzuki, T.; Lennarz, W. J.; Schindelin, H. *Glycobiology* **2009**, *19*, 118-125.
- 87) Kuribara, T.; Ishihara, T.; Kudo, T.; Hirano, M.; Totani, K. *Protein Pept. Lett.* **2017**, *24*, 723-728.