

# 小胞体糖タンパク質品質管理における多機能性タンパク質

栗原 大輝<sup>\*1</sup>, 戸谷 希一郎<sup>\*2</sup>

## Bifunctional proteins in the endoplasmic reticulum

Taiki KURIBARA<sup>\*1</sup>, Kiichiro TOTANI<sup>\*2</sup>

### 1. はじめに

小胞体にて生合成される新生タンパク質の多くは、糖鎖が結合し糖タンパク質となる。糖タンパク質上の糖鎖は、新生糖タンパク質が折りたたまれる上で様々なシグナルとして機能することが明らかとなっている<sup>1</sup>。具体的には糖鎖構造の違いにより糖タンパク質の「折りたたみ促進」、「選別」、「分泌」および「分解」を担うシグナルとして機能する。換言すると、シグナル糖鎖はタンパク質部位の折りたたみ状態を示すシグナルとして機能していると考えられる。これらのシグナル糖鎖は、小胞体における種々の糖鎖認識タンパク質や糖鎖プロセッシング酵素の働きを経て産生される。このような糖鎖を基にした糖タンパク質の折りたたみ機構を、糖タンパク質品質管理機構と呼ぶ。本機構で生じるシグナル糖鎖は、タンパク質の折りたたみ状態を反映するはずであるため、小胞体の糖鎖認識タンパク質や糖鎖プロセッシング酵素は、糖鎖部位に加えタンパク質部位の折りたたみ状態に応じて結合力や反応性が変化するものと考えられる。実際、UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase 1 (UGGT1) においては、Man9GlcNAc2 (M9) 型糖タンパク質のタンパク質部位の折りたたみ状態に応じた UGGT1 活性の変化が知られている。このような知見を踏まえると、本機構において、UGGT1 の他にも糖鎖変換とタンパク質の折りたたみ状態を識別する多機能性のタンパク質群が存在している可能性がある。本稿では、小胞体糖鎖関連タンパク質の多機能性について、我々が近年見出したいくつかの結果を紹介したい。

### 2. Calreticulin の多機能性

Calreticulin (CRT) は糖タンパク質品質管理機構において、Glc1Man9GlcNAc2 (G1M9) 型糖タンパク質を認識し、タンパク質部位の折りたたみを促進するレクチン様分子シャペロンである。糖タンパク質は CRT に認識されると、本シャペロンと種々の酸化還元酵素との連携により、そのタンパク質部位が正しく折りたたまれる。この過程において、CRT が糖鎖のみを認識しているのか、それともタンパク質部位も併せて認識するのかは議論的となっていた。我々は独自に開発してきた糖鎖プローブを用いた解析により CRT が糖鎖部位に加えてタンパク質部位を認識する多機能性を明らかにした<sup>2</sup>。すなわち化学合成した G1M9 型糖鎖のアグリコン部位に様々な疎水性度を有する置換基を導入し、系統的に疎水性度の異なる G1M9 型糖鎖プローブを調製した。これらを用いて CRT との結合を評価し、糖鎖近傍の疎水性度が高まるほど CRT との結合が強くなることを証明した。この結果から、CRT は、少なくとも糖鎖付加部位近傍の疎水性度を識別する多機能性を有する可能性を見出した。

### 3. $\alpha$ 1,2-mannosidase 類の多機能性

糖タンパク質品質管理機構において、折りたたみ工程と共に重要なのは、分泌および分解糖タンパク質の選別である。小胞体で生合成される糖タンパク質の約3割は、本質的に折りたたみ不可能で分解されることが知られている。分解糖タンパク質が小胞体に蓄積すると小胞体ストレス状態となり、アルツハイマー病、パーキンソン病、糖尿病などに代表される折りたたみ不全病発症の原因となると考えられている。そこで、細胞恒常性を維持すべく小胞体では、 $\alpha$ 1,2-mannosidase 類 (ERMan1、EDEM1、EDEM2 および EDEM3) が糖鎖をプロセッシングし、分泌シグナル糖鎖や分解シグナル糖鎖を産生することで、分

\*1: 物質生命理工学科助教

\*2: 物質生命理工学科教授 (ktotani@st.seikei.ac.jp)

泌および分解糖タンパク質を選別していると考えられている。しかしながら、シグナル機能が示唆されている糖鎖が小胞体内でどのように産生されているかは明らかとなっていなかった。我々は、この本質的な問題を、マウス肝臓由来の小胞体画分と均一構造を有する合成糖鎖基質を用いた糖鎖プロセッシング解析によって解明した<sup>3)</sup>。具体的には分泌あるいは分解シグナル機能が想定されている糖鎖産生を標的として、それぞれのシグナル糖鎖産生阻害剤を見出し、小胞体での  $\alpha 1,2$ -mannosidase 活性の選択的な調節に成功した。この手法を用い、小胞体での糖鎖産生を解析したところ、ふたつの独立した糖鎖産生経路が存在することを世界で初めて明らかにした。さらに、それぞれの経路に対応する糖鎖のシグナル機能を加味して、糖タンパク質の分泌および分解経路に関わるシグナル糖鎖産生経路を解明した。分泌糖タンパク質の表面は親水性アミノ酸で覆われていて、分解糖タンパク質の表面には疎水性部位が露出していることを考慮すると、これらのマンノース切断活性には、タンパク質部位の表面疎水性度が関連するかもしれない。実際に  $\alpha 1,2$ -mannosidase 類のうちいくつかの酵素は、タンパク質表面に疎水性部位が露出するにしたがって、その酵素活性が向上すると報告されている<sup>4)</sup>。これらを総合すると、 $\alpha 1,2$ -mannosidase 類にも多機能性を有する酵素の存在が推測される。

#### 4. 小胞体糖鎖プロセッシングと多機能性

上記のように、合成糖鎖基質や阻害剤を用いた化学的手法により CRT あるいは  $\alpha 1,2$ -mannosidase 類が、糖鎖のみならずタンパク質部位の疎水性度を識別する多機能性を有する候補として挙がってきた。これらの結果のさらなる裏付けとして、糖鎖近傍の疎水性部位の距離を様々なリンカーで調節した G1M9 および M9 型合成基質を用いた小胞体糖鎖プロセッシングの網羅的解析の結果を紹介する<sup>5)</sup>。マウス肝臓由来の小胞体画分とアグリコン部位の疎水性位置を系統的に変化させた糖鎖プローブを用いた糖鎖プロセッシング解析によって、CRT と  $\alpha 1,2$ -mannosidase 類に対して以下のことが判明した。CRT は小胞体内環境において、糖鎖近傍の疎水性度が高い基質ほど結合力が高くなり、ある距離以上糖鎖部位と疎水性部位が離れると結合しなくなる。これらの知見は、CRT が疎水性部位に対してランダムに結合するのではなく、特定の距離もしくは位置の疎水性部位を識別して多機能性を発揮する可能性を示唆している。また、 $\alpha 1,2$ -mannosidase 類の活性においては、糖鎖近傍から疎水性

部位が離れるにつれて糖鎖プロセッシング活性が低下した。さらに、同じ基質群に対しての UGGT1 の糖転移能を解析したところ、同様の傾向が観測された。これらを踏まえると、特定あるいは複数の  $\alpha 1,2$ -mannosidase が、糖鎖近傍の疎水性度を識別する多機能性を有しており、この性質が分泌あるいは分解糖タンパク質の選別に寄与する可能性がある。しかしながら、糖タンパク質の分泌および分解経路を担うどの  $\alpha 1,2$ -mannosidase が多機能性を有するのかを証明する実験結果は得られていない。現在は、この疑問を解決すべく、分泌および分解経路を担う  $\alpha 1,2$ -mannosidase の同定を進めている。

#### 5. 総括

本稿では、小胞体における糖タンパク質品質管理に関連するタンパク質群の多機能性について言及した。具体的には CRT および  $\alpha 1,2$ -mannosidase 類に多機能性の可能性を見出した (図 1)。小胞体では、糖タンパク質の折りたたみ状態と糖鎖構造が密接にリンクしている。これらを踏まえると、多機能性という概念は、糖タンパク質の糖鎖変換における糖鎖部位とタンパク質部位の関係性をさらに分子レベルで理解するための一助となると考えている。さらに、我々は、細胞質における糖タンパク質の分解過程においても、糖鎖近傍の疎水性やアミノ酸の配列がその分解に影響を与える可能性を示している<sup>6)</sup>。これらを総合し、我々はすでに糖タンパク質関連タンパク質における多機能性を総説として発表している<sup>7)</sup>。今後、さらにこの概念をもとに糖タンパク質関連酵素の分子レベルでの活性メカニズムが明らかにされることを期待している。

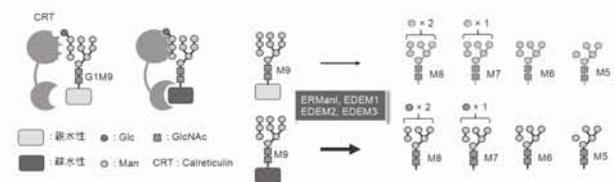


図 1. CRT と  $\alpha 1,2$ -mannosidase 類の多機能性の可能性

#### 参考文献

- 1) J. J. Carmelo, A. J. Parodi. *FEBS Lett.* **2015**, 589, 3379-3387.
- 2) M. Hirano, Y. Adachi, Y. Ito, K. Totani. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, 466, 350-355.

- 3) T. Kuribara, M. Hirano, G. Speciale, S.J. Williams, Y. Ito, K. Totani. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1027-1035.
- 4) M. Shenkman, E. Ron, R. Yehuda, R. Benyair, I. Khalaila, G. Lederkremer. *Commun. Biol.* **2018**, *1*, 172.
- 5) K. Totani, K. Yamaya, M. Hirano, Y. Ito. *Carbohydr. Res.* **2017**, *439*, 16-22.
- 6) T. Kuribara, T. Ishihara, T. Kudo, M. Hirano, K. Totani. *Protein Pept. Lett.* **2017**, *24*, 723-728.
- 7) T. Kuribara, K. Totani. *Med. Res. Arch.* **2018**, *6*, 1852.