

小胞体糖鎖プロセッシングに対する選択的阻害

栗原 大輝*¹, 平野 真*², 戸谷 希一郎*³

Selective Inhibition of Oligosaccharide Processing in the Endoplasmic Reticulum

Taiki KURIBARA*¹, Makoto HIRANO*², Kiichiro TOTANI*³

(Received September 20, 2013)

1. はじめに

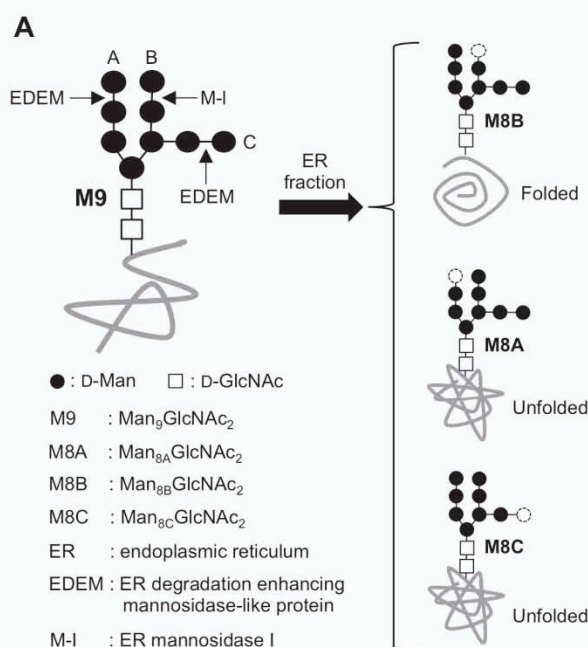
小胞体 (ER) 内の糖タンパク質糖鎖はタンパク質品質管理の制御タグとして働くことが知られている¹⁾。とくに $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (M9) 型 11 糖に対して, mannosidase I (M-I)²⁾ および ER degradation enhancing mannosidase-like protein (EDEM)³⁾ によって $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を生成する過程は, 重要な意味をもつ (図 1A)。 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 型糖タンパク質には 3 種の構造異性体が存在するが, $\text{Man}_{8B}\text{GlcNAc}_2$ (M8B) は当該糖タンパク質を分泌工程へと導くシグナルとして機能し, $\text{Man}_{8A}\text{GlcNAc}_2$ (M8A) および $\text{Man}_{8C}\text{GlcNAc}_2$ (M8C) は糖タンパク質を分解工程へと誘導するシグナルとして機能する。このように $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖の生成は糖タンパク質の運命を司る選別工程として重要である。

本研究では, 前述の選別工程に対する様々なマンノシダーゼ阻害剤の効果を検証し, 各阻害剤の $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 異性体生成に関する選択性を評価した。

2. 実験方法

本研究で阻害剤として使用した Swainsonine (SW), Kifunensin (Kif), deoxymannojirimycin (DMJ), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) および Mannostatin A (Man A) は SIGMA 社から購入した。Mannoimidazole (ManIm)⁴⁾ はメルボルン大学の Spencer J. Williams 博士よりご供与いただいた。マウス肝臓は SAM マウス研究協議会から分与される SAMP6⁵⁾ を日本 SLC 社経由で凍結肝臓として入手した。基質として用いた M9-

Gly-BODIPY (図 1B) は以前に化学合成したもの⁶⁾ を用いた。



B

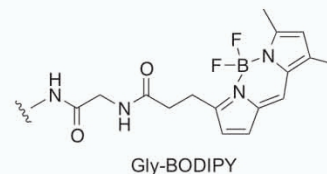
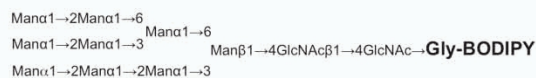


図 1 本研究の背景 : A. 糖鎖プロセッシングと糖タンパク質の選別 B. 合成糖鎖基質の構造

*¹ : 理工学研究科理工学専攻 博士前期課程

*² : 物質生命理工学科 助教

*³ : 物質生命理工学科 准教授 (ktotani@st.seikei.ac.jp)

2. 1 小胞体画分の抽出

灌流処理をした SAMP6 マウス肝臓 (0.5 g) に緩衝液 [0.25 M sucrose, 2 mM EDTA, 10mM HEPES (pH 7.2), 5 mM

2-mercaptoethanol and protease inhibitor cocktail] (5 mL) を加えポッター型テフロンホモジェナイザーを用いて破碎した (3 ストローク, 4 °C)。得られた懸濁液を 4°C で 900 g (10 min), 5,000 g (10 min), 8,000 g (10 min), 20,000 g (120 min) と段階的に遠心し, 最終的に得られたペレットを 400 μL の可溶性緩衝液 [0.25 M sucrose, 2 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, Protease inhibitor cocktail 1 tab./50 mL (Roche), 0.6% Triton X-100, 10 mM HEPES (pH 7.4)] に溶解し, 小胞体画分とした。

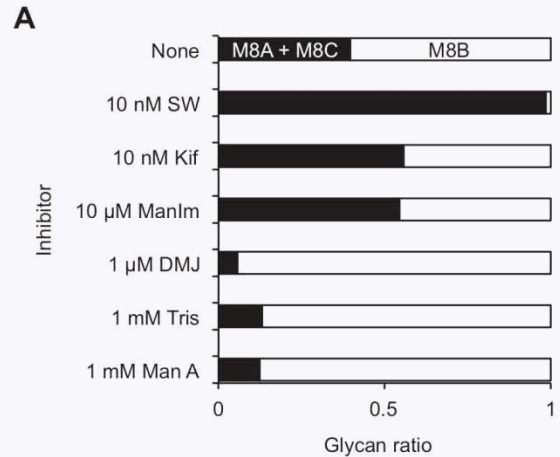
2. 2 糖鎖プロセッシングアッセイ

全量 15 μL の反応液を以下のように調製した。小胞体画分 (45 μg) および阻害剤を緩衝液 [10 mM CaCl₂, 0.6% Triton X-100, 10 mM HEPES (pH 7.4)] に溶解し, 37°C で 30 分間プレインキュベートした。この溶液に基質として M9-Gly-BODIPY (37.5 pmol) を加え, 反応液とした。反応液を 37°C で 30 分間インキュベート後, アセトニトリル (100 μL) を加えて反応を停止した。反応液の全量を 200 μL まで水で希釈し, 反応の進行度合いを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量分析した。得られた生成物量から反応の阻害率と 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。

3. 実験結果と考察

小胞体画分を酵素源としたM9-Gly-BODIPY に対する糖鎖プロセッシング反応は, 反応 30 分後において 20% 程度のM8 糖鎖を生成し, さらに反応が進行したM7-5 糖鎖の生成は観測されなかった。また反応液をHPLCで分離するとM8A+M8CとM8Bが異なるピークとして検出された。そこで, この反応系に種々のマンノシダーゼ阻害剤を共存させ, 糖鎖プロセッシング反応を行ったところ, M8 異性体の生成比率が阻害剤に依存して変化することが分かった (図 2A)。この結果から, とくにSWはM8Bの生成を選択的に阻害し, DMJ, Tris, Man AはM8A+M8Cの生成阻害に選択性を有することが明らかとなった。現状のHPLC分離条件ではM8AとM8Cの分離は達成できないため, これらの異性体に対する阻害剤の選択性は不明である。しかしながら小胞体内でM8AおよびM8Cは, いずれもEDEMによって生成するため, M8A+M8Cの生成阻害に効果を示したDMJ, Tris, Man Aは, EDEMに対する選択的阻害剤と捉えることができる。一方, M8BはM-Iによって生成するため, その生成を抑制したSWは, M-Iに対する選択的阻害剤となりうる。

そこで次に各阻害効果の濃度依存性を検討し, 得られ



B

	IC ₅₀ for M-I (μM)	IC ₅₀ for EDEM (μM)
SW	<0.01	1100
Kif	0.018	0.032
ManIm	55	110
DMJ	4.7	0.087
Tris	>10000	270
Man A	3400	240

図 2 阻害剤の選択性: A. M8 異性体の生成比 B. M-I およびEDEMに対する阻害剤のIC₅₀

たデータからM-IによるM8B生成とEDEMによるM8A+M8C生成に対するIC₅₀を算出し, 各阻害剤の性質を検証した (図 2B)。その結果, SWとDMJは低濃度でそれぞれM-IないしEDEMを選択的に阻害することが分かった。一方, TrisとMan AはEDEMを選択的に阻害するものの, その阻害能はDMJの 1/2500 以下であった。KifとManImと両酵素に対して阻害効果を示したが, とくにKifは高い阻害能を有することが分かった。総合するとSW, DMJ, Kifを使い分けることによって, M-Iのみ, EDEMのみ, M-IとEDEMの双方を用途によって阻害し分けることが可能であると判明した。

この阻害選択性の一因として, M-Iが遷移状態において末端Man 残基を ¹C₄ 型配座で認識していることが挙げられる。通常, 糖鎖末端のMan残基は ⁴C₁ 型配座であり, 多くのマンノシダーゼ類はこの配座の基質を認識する。EDEMの基質認識様式はいまだに不明であるが, それが一般のマンノシダーゼのようにM-Iと異なるなら, 阻害選択性を説明する要因となる。

本研究で見出した選択的阻害剤候補は, 完全な選択性を備えている訳ではない。これらの阻害剤を高濃度で添加した場合, 全てのマンノシダーゼ活性が一律に阻害されてしまう。しかしながらこれらの候補物質を見出した

点は意義があり、今後、それぞれの構造を基に、選択性を高めた阻害剤の合成に繋げて行きたい。

参考文献

- 1) R. Benyair, E. Ron, G.Z. Ledekremer, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **2011**, *292*, 197-280.
- 2) D.S. Gonzalez, K. Karaveg, A.S. Vandersall-Nairn, A. Lai, K.W. Moremen, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21375-86.
- 3) N. Hosokawa, L.O. Tremblay, B. Sleno, Y. Kamiya, I. Wada, K. Nagata, K. Kato, A. Herscovics, *Glycobiology* **2010**, *20*, 567-75.
- 4) D. A. Kuntz, C.A. Tarling, S.G. Withers, D.R. Rose, *Biochemistry* **2008**, *47*, 10058-68.
- 5) T. Takeda, *Neurobiol. Aging* **1999**, *20*, 105-10.
- 6) K. Totani, Y. Ihara, T. Tsujimoto, I. Matsuo, Y. Ito, *Biochemistry* **2009**, *48*, 2933-40.
- 7) F. Vallee, K. Karaveg, A. Herscovics, K.W. Moremen, P.L. Howell, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 41287-98.