

氏 名	黄 澄澄
博士の専攻分野の名称	博士 (学術)
学位記号番号	博理工甲第 970 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Studies on non-conventional degradation pathway for <i>N</i> -glycoproteins in mammalian cells (哺乳動物における <i>N</i> 型糖タンパク質の新規分解経路の研究)
論文審査委員	委員長 連携教授 鈴木 匡 委員 教授 円谷 陽一 委員 教授 森安 裕二 委員 連携准教授 堂前 直

論文の内容の要旨

In eukaryotes, a large portion of the secretory and membrane proteins that synthesized in the ER are modified with asparagine-linked glycans (*N*-glycans). The covalent attachment of glycans on proteins results in changes in their physicochemical properties, as well as physiological properties.

The molecular details of the biosynthetic pathway of *N*-glycans in mammals have been well-clarified. Dolichol-linked precursors for *N*-glycans are assembled at the ER membrane and transferred to Asn residues of the consensus sequence (Asn-Xaa-Ser/Thr, Xaa≠Pro) in nascent polypeptides. The *N*-glycosylated proteins, or *N*-glycoproteins that acquired the correct folding state with the aid of various ER luminal chaperones, are transported to their respective destinations via vesicular trafficking. Within the secretory pathway, the *N*-glycans are extensively remodeled from high mannose-type glycans to complex-type glycans that often play central roles in regulating bioactivity or stability of glycoproteins.

In contrast to the *N*-glycan biosynthesis, molecular mechanism for *N*-glycan degradation has not yet been fully understood even in mammalian cells. For instance, it has long been believed that lysosomes are the predominant organelle to break down all kinds of macromolecules including *N*-glycoproteins. However, recent studies revealed a novel non-lysosomal glycan degradation pathway occurring in the cytosol, whilst the quality control machinery in the ER was being clarified. The ER lumen possesses quality control system that ensures only correctly folded proteins to exit the ER to their destinations, while those misfolded ones would be retrotranslocated to the cytosol for proteasomal degradation. The latter process was often called as ER-associated degradation (ERAD). During the ERAD process, a cytosolic peptide:*N*-glycanase (PNGase), which cleaves glycans from glycoproteins, initiates the non-lysosomal degradation of *N*-glycans by releasing free oligosaccharide (fOSs) in the cytosol. The released fOSs are then further processed by the action of cytosolic endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) that removes a single GlcNAc residue from the reducing end on the fOSs, as well as the cytosolic α -mannosidase Man2C1 before the remaining fOSs could be transported to the lysosomes for their degradation into monomeric sugars. In addition to this cytosolic glycan degradation, recent study in our lab indicated unknown functions of basal autophagy in the catabolism of complex type

free glycans. These findings have shed light on the importance of non-lysosomal compartments in glycan degradation. However, detailed mechanisms underlying the non-conventional glycan degradation pathways remains largely elusive.

The purpose of my study is to elucidate the biological importance and molecular mechanisms of these glycan/glycoprotein degradation pathways. In the first chapter, I aim to clarify the physiological role of the cytosolic PNGase which works in the initial step of the non-lysosomal degradation pathway. This study is extremely important because growing number of patients showing multiple symptoms have been identified harboring mutations in *NGLY1* (a gene encoding an orthologue of human cytosolic PNGase), while the development of therapeutic treatments is hindered due to the limited knowledge on the underlying mechanisms of the phenotypes caused by the mutation of *NGLY1* gene. Gene-knockout mice studies in our lab have revealed that the abrogation of *Ngly1* (mouse PNGase) causes embryonic/perinatal lethality. Surprisingly, this lethality was rescued by an extra knockout of a gene encoding the cytosolic ENGase, clearly indicating that the presence of ENGase in *Ngly1*^{-/-} mouse causes the lethal phenotype. To provide the mechanistic insight into the ENGase-caused lethality in *Ngly1*^{-/-} mice, I utilized mouse embryonic fibroblast (MEF) cells derived from various knockout mice, and tried to analyze the activity of ENGase on glycoproteins in the *Ngly1*^{-/-} MEF cells. Using a plant-derived glycoprotein for ERAD substrate, dysregulation of ERAD was shown in *Ngly1*^{-/-} MEF cells while normal ERAD was observed in wild type, *Engase*^{-/-}, and *Engase*^{-/-}*Ngly1*^{-/-} MEF cells. Moreover, a deglycosylating activity of ENGase toward a model ERAD substrate was confirmed in the absence of *Ngly1*, and the ENGase-generated *N*-GlcNAc containing proteins formed stable aggregates in *Ngly1*^{-/-} MEF cells. Collectively, this study underscores the functional importance of *Ngly1* in the ERAD process and provides a potential mechanism underlying the phenotypic consequences of a newly-emerging genetic disorder caused by mutation of human *NGLY1* gene.

In the second chapter, I aim to clarify how basal autophagy regulates the degradation of complex type free oligosaccharides. Recent observations in our lab showed that sialyloligosaccharides, which are normally generated and degraded in the lysosomes, considerably accumulated in the cytosol of cells lacking Atg5, a molecule essential for autophagosome formation. Sialin, a sialic acid transporter in the lysosome membrane, was suggested to be somehow involved in the accumulation of sialic acid containing fOSs in *Atg5*^{-/-} MEF cells. To better understand the underlying mechanisms, I examined the level of sialin molecule upon inhibition of autophagy, and the results clearly showed the increase of sialin proteins upon the inactivation of autophagy process, indicating the specific regulation of sialin by the autophagy. While the detailed mechanisms still remain to be clarified, my results clearly showed the relationship between autophagic process and stability of sialin protein.

The observations in my thesis study underscore the biological importance of the novel non-lysosomal compartment in glycan degradation, and expanded our current knowledge of the non-conventional glycoprotein degradation pathways.

論文の審査結果の要旨

黄澄澄の博士後期課程論文発表会は2015年1月20日（火）に埼玉大学で実施された。“Studies on non-conventional pathway for *N*-glycoproteins in mammalian cells”（邦題：哺乳動物における*N*型糖タンパク質の新規分解経路の研究）という題で発表が行われ、黄氏がこれまで行ってきた2つの研究、Functional studies of the cytosolic deglycosylating enzymes in mammalian cells、および Novel mechanism in lysosomal degradation of *N*-glycans について英語で口頭発表が行われた。

第1章 Functional studies of the cytosolic deglycosylating enzymes in mammalian cells

本研究の第1章ではまず哺乳動物の細胞質における糖鎖脱離酵素群の機能解析を、様々なノックアウトマウス由来の胚性繊維芽細胞を用いて行った。*N*型糖鎖脱離酵素、ペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase) およびエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) は真核細胞の細胞質に広く存在し、タンパク質の品質管理に関わることが知られている。最近、ヒトにおいて PNGase 遺伝子 (*NGLY1*) の変異による重篤な遺伝子疾患 (*NGLY1* 欠損症) が発見されたが、病態にいたる分子メカニズムの詳細はまだ不明である。黄氏は、新しいモデルタンパク質を用いて、細胞内の小胞体で作られたタンパク質の品質管理に関わる“小胞体関連分解”の仕組みを分析・評価する手法を確立し、様々な細胞を用いて解析を行ったところ、*NGLY1* 遺伝子を欠損させた細胞で、モデルタンパク質の分解が遅れることを発見した。また、PNGase 非存在下でもモデルタンパク質の糖鎖脱離が観察され、その反応が ENGase によって行われることが明らかになった。ENGase は通常、細胞内で PNGase によって切り取られた糖鎖の代謝に関わることが知られている。驚いたことに、ENGase と PNGase の両方を欠損させた細胞でモデルタンパク質の分解を調べたところ、正常な分解を示した。これらの結果から、ENGase は PNGase の働かない状況下で、糖の一種である *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が1つだけ残った「*N*-GlcNAc タンパク質」を生成し、それが細胞内で凝集体として蓄積することが考えられ、実際質量分析による解析で *N*-GlcNAc タンパク質の存在を証明した。これらの結果から PNGase 遺伝子の欠損が小胞体関連分解の異常をもたらし、その原因の一端は ENGase の反応によって *N*-GlcNAc タンパク質を生成するためであると考えられる。これらの現象は *NGLY1* 欠損症の病態発現に関わる可能性があるため、ENGase の阻害剤が *NGLY1* 欠損症の薬剤開発の有力な候補となることが期待される。

第2章 Novel mechanism in lysosomal degradation of *N*-glycans

本研究の第2章では一転してオートファジー欠損下でシアリルオリゴ糖の代謝が異常になる分子メカニズムを解析した。細胞質に存在する不要なタンパク質や脂質、損傷を受けた細胞小器官などを分解するための仕組みの1つとしてオートファジーと呼ばれる機構が知られている。通常、オートファジーは細胞が飢餓状態のときに起こるが、正常時のオートファジー（基底オートファジー）は細胞内のタンパク質の品質を保つのに重要と考えられている。真核生物の細胞質には、タンパク質や脂質などと結合しない“遊離”状態の糖鎖（遊離糖鎖）が存在することが古くから知られており、その一部は PNGase による変性タンパク質からの糖鎖の脱離で生成するが、PNGase に依存しない生成経路も知られている。これらの細胞質遊離糖鎖が生成、分解される分子メカニズムの詳細については未だ不明な点が数多く残されている。黄氏を含めた研究グループは、これまで基底オートファジー機能が欠損した細胞で、その細胞質にシアル酸を持つ複合型糖鎖由来の遊離糖鎖（シアリルオリゴ糖）が顕著に蓄積していることを見出した。通常シアリルオリゴ糖はリソソームで分解されるため、細胞質に蓄積することは稀である。さらに解析を進めると、リソソーム膜上においてシアル酸を細胞質へ輸送する

膜タンパク質「シアリン」の発現を抑制すると、規定オートファジー欠損下でシアリルオリゴ糖の蓄積が抑制されることが明らかとなった。即ち、シアリンの機能がシアリルオリゴ糖の蓄積に重要な役割を果たすことが示されたが、そのメカニズムは不明であった。黄氏はオートファジーの欠損をコントロール出来る細胞を用いてオートファジー欠損下でシアリン分子にどのような変化がもたらされるかを解析したところ、シアリンの発現量がオートファジー欠損に伴い増大することが分かった。興味深いことに他のリソソームタンパク質ではそのような発現量の増加は見られず、この効果はシアリンに特異的であることが示された。これらの結果から、リソソーム膜上でのシアリン分子の増加がシアリルオリゴ糖の細胞質への漏出をもたらしている可能性が考えられた。

第1章の研究は黄氏が第一著者として *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 誌に受理されており、第2章の研究は黄氏が第一著者として *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 誌に受理されている。さらに第2章に関連するオートファジー欠損におけるシアリルオリゴ糖の細胞質における蓄積に関する研究は黄氏が共著者（7人中4番目）として *J. Biol. Chem.* 誌に2013年に発表されている。

結論として黄氏の研究では、長年その生理機能が不明だった細胞質の脱糖鎖酵素群の生物学的重要性、特に哺乳動物における Ngly1 の ERAD における機能が明らかとなり、最近発見されたヒトの遺伝疾患（*NGLY1* 欠損症）の発症メカニズムに迫った。またオートファジー欠損下でシアリルオリゴ糖が細胞質に蓄積する分子メカニズムの一端を明らかにした。即ち本研究は未だ不明な点の多い哺乳動物における N 型糖タンパク質の新規分解経路の解明に大きく寄与するものと考えられ、学位論文として「合格」と判定した。