

## 合成 3 糖類が明かす小胞体マンノシダーゼ群のエンド結合識別能

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

Synthetic trisaccharides reveal discriminating ability of *endo*-glycosidic linkages by mannosidases in the endoplasmic reticulum

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

**ABSTRACT** : Glycans on the proteins in the endoplasmic reticulum (ER) act as signals of glycoprotein folding, secretion and degradation. Especially, secretion or degradation signals are produced by the action of ER mannosidases towards each branch of a tri-antennary (A-, B- and C-branch) Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (M9) glycan. Thus, the resulting product after trimming reaction of M9 serves as different signals for determination of glycoprotein fate. Each branch of all terminal glycosidic linkages of M9 are  $\alpha$ -1,2 type, while the adjacent inner glycosidic linkages are different. In this study, we examined whether ER mannosidases showed branch specificity by discriminating between different inner glycosides. For evaluation of the hypothesis, we synthesized four trisaccharides with different glycosidic linkages and applied to mannose trimming assays in the ER fraction derived from mouse liver. Through these assays, we report first experimental demonstration that  $\alpha$ -1,2-mannosidases in the endoplasmic reticulum (ER) can discriminate inner glycosidic linkages of synthetic trisaccharides substrates.

**Keywords** : mannosidases, synthetic trisaccharides, discriminating ability of *endo*-glycosidic linkages

(Received December 16, 2021)

### 1. 研究背景・目的

小胞体で新生される糖タンパク質上の糖鎖は、糖タンパク質の選別、分泌および分解シグナルとして機能する。種々の糖鎖関連タンパク質が糖鎖シグナル産生に関与するが (Figure 1)、その中で小胞体内のエキシ型マンノシダーゼ群 (EDEM1, EDEM2 および EDEM3)<sup>1), 2)</sup> は 3 分岐 (A、B および C 鎖) Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (M9) 型糖鎖の位置選択的な末端マンノース切断を通して、M8A、M8B あるいは M8C を産生する (Figure 1、ER  $\alpha$ -1,2-mannosidases を参照)。これら M8 異性体には、分泌および分解関連タンパク質の *in vitro* 特異性解析から糖タンパク質の分泌シグナルや分解シグナル前駆体としての機能が示唆されている<sup>3)</sup>。しかしながら、小胞体マンノシダーゼ群が M9 型糖鎖に対して分岐鎖特異性を発現するメカニズムは不明

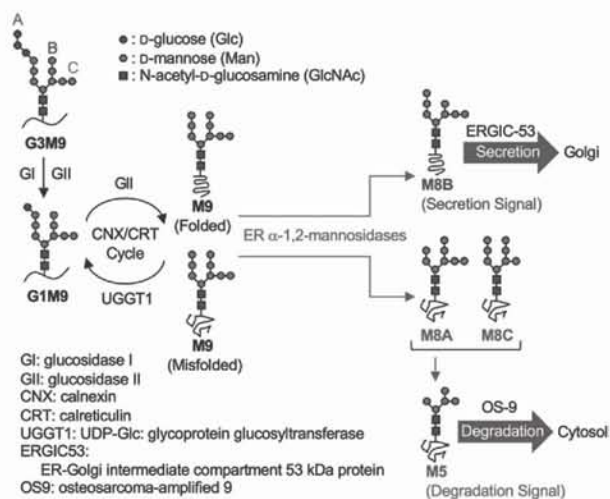


Figure 1. Glycan trimming in ER glycoprotein quality control. This figure is modified from the figure in ref 4.

\*<sup>1</sup> : 物質生命理工学科助教

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

であった。これを解明すべく、我々は M9 型糖鎖の微細な差異に注目した。M9 型糖鎖の末端は全て同じ  $\alpha$ -1,2

マンノシド結合であるが、さらに内側の糖鎖の結合様式はそれぞれ A鎖が  $\alpha$ -1,2 マンノシド結合、B鎖が  $\alpha$ -1,3 マンノシド結合、C 鎖が  $\alpha$ -1,6 マンノシド結合である (Figure 2)。

我々は小胞体のエキソ型マンノシダーゼ群が末端マンノースの一つ内側の結合 (A, B および C鎖のそれぞれ  $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3、および  $\alpha$ -1,6 結合) すなわち、エンド結合を識別し分岐鎖切断に対する特異性を示すのではないかと仮説を立てた。これを実証すべく、はじめにA鎖、B鎖、C鎖に相当する3糖 (A3、B3 および C3) に加え、非天然型の結合様式 (D3) を持つ一連の3糖類を合成した (Figure 2)。合成の詳細は割愛するが、分岐鎖3糖類のグリコシル化を種々検討する中で、我々は反応溶媒をトルエンとジクロロメタンの混合系にすると、グリコシル化生成物を高立体選択的かつ高収率で得られることを見出した。これらの詳細は我々の論文を参照されたい<sup>4)</sup>。本稿では特に、合成3糖類を用いた小胞体マンノシダーゼの特異性解析と競合解析<sup>4)</sup>に焦点を当て、その概要を述べたい。

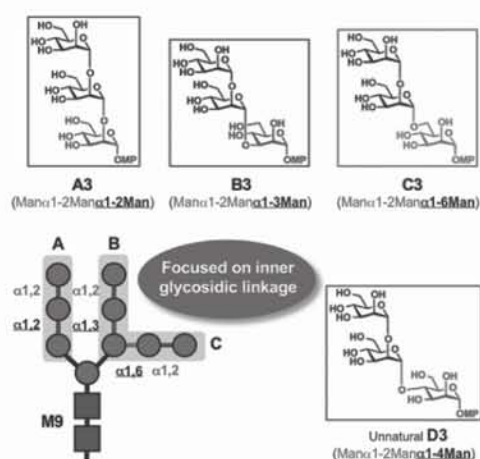


Figure 2. Design of trisaccharide substrates for glycan specificity analysis of ER  $\alpha$ -1,2-mannosidases. Each different *endo*-glycosidic linkage of synthetic trisaccharides is identical to glycosidic linkages of each branch in M9. This figure is modified from the figure in ref 4.

## 2. 実験方法

本研究で使用した senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6) 肝臓は三協ラボサービス (株) から購入した。HPLC分析は東ソー (株) から購入した TSK-GEL Amide-80 カラム (5  $\mu$ m, 4.6 mm I.D.  $\times$  25 cm) を使い、日本分光 (株) 製 JASCO LC-2000 システムにて行った。

### 2. 1 個別の合成3糖類を用いた特異性解析

灌流処理したSAMP6 肝臓から抽出した小胞体画分<sup>5)</sup> (3 mg/mL)、TritonX-100 (0.6%)、CaCl<sub>2</sub> (10 mM)、HEPES (10 mM, pH 7.4) に A3、B3、C3 または D3 (250  $\mu$ M) を添加した反応液 (20  $\mu$ L) を 37  $^{\circ}$ C で 1, 2, 4, 6, 8 h インキュベートした。その後、CH<sub>3</sub>CN (45  $\mu$ L)、ddH<sub>2</sub>O (42  $\mu$ L) を反応液 (3  $\mu$ L) に加え、酵素反応を停止させた。そのサンプルを遠心後 (20,000  $\times$  g, 4 $^{\circ}$ C, 20 分)、回収した上清 (50  $\mu$ L) を HPLC [TSK-GEL Amide-80 カラム 5  $\mu$ m (4.6 mm I.D.  $\times$  25 cm); 移動相: CH<sub>3</sub>CN/ddH<sub>2</sub>O; リニアグラジエント: 10 分間で 98:2 から 90:10、その後 10 分間で 90:10 から 65:35 へ濃度勾配を設定; 流量: 1.0 mL/min; 温度: 40  $^{\circ}$ C; 検出 284 nm]。

### 2. 2 合成3糖類を用いた競合解析

SAMP6 肝臓由来の小胞体画分 (3 mg/mL)、TritonX-100 (0.6%)、CaCl<sub>2</sub> (10 mM)、HEPES (10 mM, pH 7.4) に [A3、B3、C3 (各 250  $\mu$ M) および内部標準物質 (50  $\mu$ M)] あるいは [A3、B3 (各 250  $\mu$ M) および内部標準物質 (50  $\mu$ M)] あるいは [A3、C3 (各 250  $\mu$ M) および内部標準物質 (50  $\mu$ M)] あるいは [B3、C3 (各 250  $\mu$ M) および内部標準物質 (50  $\mu$ M)] を添加した反応液 (25  $\mu$ L) を 37  $^{\circ}$ C で 1, 2, 4, 6, 8 h インキュベートした。その後、CH<sub>3</sub>CN (45  $\mu$ L)、ddH<sub>2</sub>O (42  $\mu$ L) を反応液 (3  $\mu$ L) に加え、酵素反応を停止させた。そのサンプルを遠心後 (20,000  $\times$  g, 4 $^{\circ}$ C, 20 分)、回収した上清 (50  $\mu$ L) を HPLC [TSK-GEL Amide-80 カラム 5  $\mu$ m (4.6 mm I.D.  $\times$  25 cm); 移動相: CH<sub>3</sub>CN/ddH<sub>2</sub>O; リニアグラジエント: 10 分間で 98:2 から 90:10、その後 10 分間で 90:10 から 65:35 へ濃度勾配を設定; 流量: 1.0 mL/min; 温度: 40  $^{\circ}$ C; 検出 284 nm]。

### 2. 3 天然および非天然3糖類を用いた競合解析

SAMP6 肝臓由来の小胞体画分 (3 mg/mL)、TritonX-100 (0.6%)、CaCl<sub>2</sub> (10 mM)、HEPES (10 mM, pH 7.4) に [A3 および D3 (各 250  $\mu$ M)] あるいは [B3 および D3 (各 250  $\mu$ M)] あるいは [C3 および D3 (各 250  $\mu$ M)] を添加した反応液 (20  $\mu$ L) を 37  $^{\circ}$ C で 1, 2, 4, 6, 8 h インキュベートした。その後、CH<sub>3</sub>CN (45  $\mu$ L)、ddH<sub>2</sub>O (42  $\mu$ L) を反応液 (3  $\mu$ L) に加え、酵素反応を停止させた。そのサンプルを遠心後 (20,000  $\times$  g, 4 $^{\circ}$ C, 20 分)、回収した上清 (50  $\mu$ L) を HPLC [TSK-GEL Amide-80 カラム 5  $\mu$ m (4.6 mm I.D.  $\times$  25 cm); 移動相: CH<sub>3</sub>CN/ddH<sub>2</sub>O; リニアグラジエント: 10 分間で 98:2 から 90:10、その後 10 分間で 90:10 から 65:35 へ濃度勾配を設定; 流量: 1.0 mL/min; 温度: 40  $^{\circ}$ C; 検出 284 nm]。

### 3. 各合成 3 糖類を用いたマンノース切断特異性解析

はじめに **A3**、**B3**、**C3** および **D3** を用いて、各合成 3 糖類の切断特異性を解析した。我々が論文発表した当時は、まだ EDEM 類の *in vitro* での活性検出法が確立されていなかった。そのため、我々は senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6) マウスから抽出した小胞体を全ての小胞体タンパク質を含有する酵素源として利用した。この画分には全ての EDEM 類が含有されていることをすでに報告しており<sup>9)</sup>、小胞体マンノシダーゼ群の活性測定が可能である。

小胞体画分と各合成 3 糖類を 37°C でインキュベートし、切断産物 (**A2**、**B2**、**C2** および **D2**) の収率を HPLC により定量的に解析した (Figure 3a)。その結果、**A3**、**B3**、**C3** および **D3** の 8 時間後の加水分解収率はそれぞれ

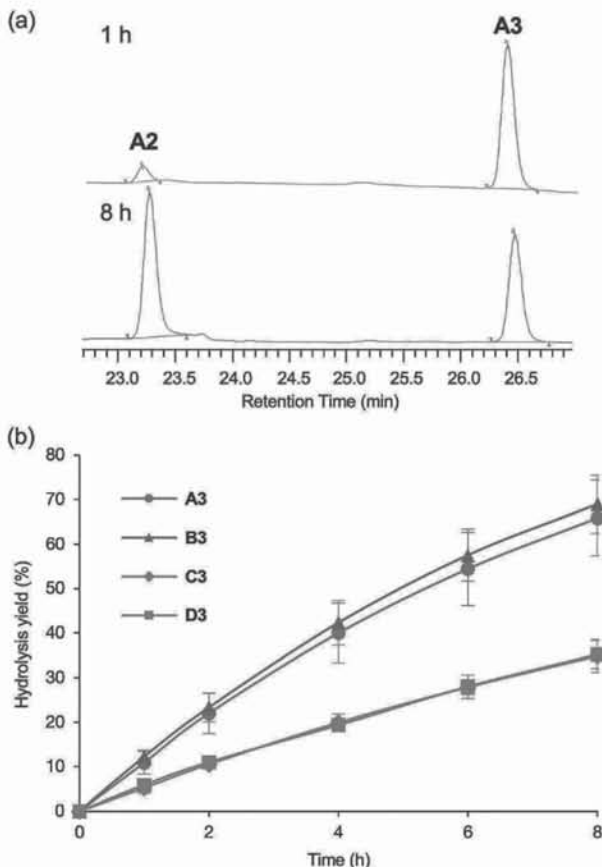


Figure 3. Hydrolysis assay of **A3**, **B3**, **C3** or **D3** in the ER fraction. (a) Typical HPLC profiles of the mannose trimming reaction. (b) Hydrolysis yields of **A3**, **B3**, **C3**, and **D3**. Each data point represents the mean value with the standard deviation (n=9). This figure is modified from the figure in ref 4.

66%、69%、35%、35%であった (Figure 3b)。これをまとめると、小胞体マンノシダーゼ群の各合成 3 糖類に対する特異性は **A3** ≒ **B3** > **C3** ≒ **D3** であった。また、この実験結果は、仮説で挙げたエキソ型小胞体マンノシダーゼ群におけるエンド結合識別能を示唆している。しかしながら、天然型 M9 型糖鎖では全ての分岐鎖が 1 分子中に存在する。したがって、我々は続いて **A3**、**B3** および **C3** を同一系内に共存させた競合実験により小胞体マンノシダーゼ群の詳細な特異性を解析した。

### 4. 合成 3 糖類を用いた競合解析

小胞体画分中に同濃度の **A3**、**B3** および **C3** (250 μM) を共存させ、各 3 糖類の加水分解収率を内部標準物質により規定化して、HPLC にて定量解析した。競合解析では、**B3** と **C3** の加水分解収率が顕著な活性低下を示し、**B3** と比較して **C3** の加水分解収率がより低下していた (Figure 4)。これらの結果から、**A3**、**B3** および **C3** が共存する際の糖鎖特異性は、**A3** > **B3** > **C3** であると判明した。

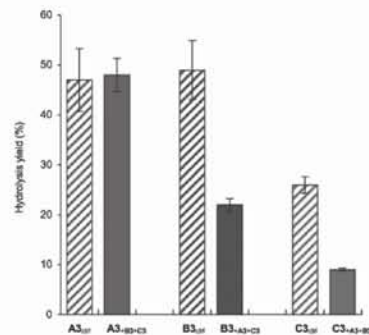


Figure 4. Hydrolysis yields after 6h from competitive assay of **A3**/**B3**/**C3** in the ER fraction. Each data point represents the mean value with the standard deviation (n=3). This figure is modified from the figure in ref 4.

興味深いことに、これまでに我々が報告していた M9 型糖鎖基質に対する特異性<sup>5), 6)</sup> は Figure 3b で示した各 3 糖類の切断特異性に類似していた。これらの結果を鑑みると、天然の M9 型糖鎖の各分岐鎖は互いに相互作用しないことが示唆される。一方合成 3 糖類の場合、各分岐鎖が一分子に集約されていないために、**A3**、**B3** および **C3** の自由拡散により各分岐鎖の加水分解において競合が生じる。この結果として **B3** および **C3** の加水分解収率が低下したものと考察している。この段階までで、合成 3 糖類に対する小胞体マンノシダーゼ群の真の特異性は、**A3** > **B3** > **C3** ≒ **D3** であると判明した。しかしなが

ら、各分岐鎖における競合関係は不明である。そこで、2種類の3糖類 (A3+B3、A3+C3 あるいは B3+C3) による競合実験を行った。

A3 と B3 の競合実験では、B3 の加水分解収率の低下が観測され (Figure 5a)、A3 と C3 の競合においては顕著な C3 の加水分解収率の低下が示された (Figure 5b)。さらに、B3 と C3 の競合においては、C3 の加水分解収率の低下が示された (Figure 5c)。

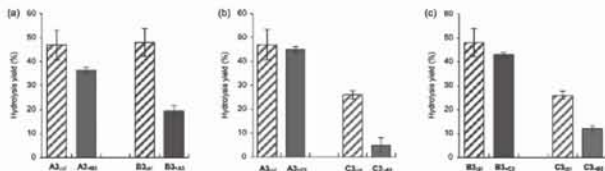


Figure 5. Hydrolysis yields after 6h from competitive assay with two-branch trisaccharides. Results of competitive assays with A3 and B3 (a), A3 and C3 (b), and B3 and C3 (c) in the ER fraction. Each data point represents the mean value with the standard deviation (n=3). This figure is modified from the figure in ref 4.

これらの全ての競合実験の結果を踏まえると、小胞体マンノシダーゼ群の分岐鎖特異性は A3 > B3 > C3 であると判明した。これらの一連のマンノース切断特異性解析および競合解析の結果は、小胞体マンノシダーゼ群が合成3糖類に対してエンド結合識別能を発現して分岐鎖特異性を示す実験的証明となった。

## 5. 非天然型 D3 が示す薬理的シャペロンの可能性

小胞体マンノシダーゼ群のエンド結合識別能が明らかとなったが、非天然型マンノシド結合を有する D3 を A3、B3 あるいは C3 と共存させた際に興味深い活性を示したので、最後にご報告したい。A3+D3 および B3+D3 の競合実験 (Figure 6a and 6b) では、D3 が共存していない時と比べ A3 あるいは B3 の高い加水分解収率が示された。この活性上昇の要因として D3 が薬理的シャペロンとして小胞体マンノシダーゼ群の活性を回復させた可能性が考えられる。薬理的シャペロンとは疾患により酵素が一部折りたたみ不全となりその酵素活性が低下している際に、当該酵素に弱く結合してシャペロン様の機能を果たし、酵素の再折りたたみを促進する化合物の総称である。SAMP6 は疾患モデルマウスであり、何らかの形で小胞体マンノシダーゼ群の活性が低下している

可能性がある。これを踏まえると、A3 や B3 の加水分解に関与する小胞体マンノシダーゼ群は D3 によって活性が回復されており、D3 が小胞体マンノシダーゼ群の薬理的シャペロンのリード化合物になる可能性がある。一方、C3 と D3 の競合結果から (Figure 6c)、両者の加水分解収率に顕著な差異は観測されなかった。

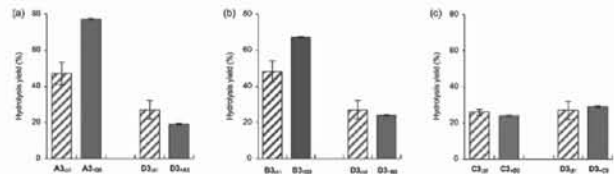


Figure 6. Hydrolysis yields after 6h from competitive assay with natural A3, B3, or C3 branches with the unnatural D3 branch in the ER fraction. Results of competitive assays with A3 and D3 (a), B3 and D3 (b), and C3 and D3 (c) in the ER fraction. Each data point represents the mean value with the standard deviation (n=3). This figure is modified from the figure in ref 4.

これは、C3 と D3 が異なる小胞体マンノシダーゼ群によって加水分解されていることを示唆している。これまでの結果からは C3 と D3 の加水分解収率は Figure 3b でほぼ同等であり、C3 と D3 の加水分解を担うのは同一の責任酵素だと考えられたが、Figure 5c の結果を踏まえるとそれぞれの加水分解に関与する責任酵素が異なること示された。

## 6. 総括

本稿では、合成3糖類 A3、B3、C3 および D3 を用いた切断特異性解析、競合解析について報告した。種々の糖鎖特異性解析を総合すると、小胞体マンノシダーゼ群は合成3糖類に対して、A3 > B3 > C3 ≒ D3 の切断特異性を示すと判明した。これは小胞体マンノシダーゼ群がエンド結合識別能によって分岐鎖特異性を発現していることを初めて実験的に証明した例である。また、我々は D3 による薬理的シャペロン機能に対する初期的な知見を報告した。これらの各分岐鎖切断における責任酵素の同定は残された課題であるが、合成3糖類に対する各 EDEM 類のノックアウト細胞由来小胞体画分の反応性比較および *in vitro* での精製 EDEM 類との反応性比較を通して、今後その責任酵素の同定が達成されるものと期待される。

## 参考文献

- 1) G. George, S. Ninagawa, H. Yagi, T. Saito, T. Ishikawa, T. Sakuma, T. Yamamoto, K. Imami, Y. Ishihama, K. Kato, T. Okada and K. Mori, *eLife*, **2020**, *9*, e53455.
- 2) G. George, S. Ninagawa, H. Yagi, J. Furukawa, N. Hashii, A. Ishii-Watabe, Y. Deng, K. Matsushita, T. Ishikawa, Y.P. Mamahit, Y. Maki, Y. Kajihara, K. Kato, T. Okada, K. Mori, *eLife*, **2021**, *10*, e70357.
- 3) K. Yamamoto, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **2014**, *90*, 67-82.
- 4) K. Nitta, T. Kuribara, K. Totani, *Org. Biomol. Chem.*, **2021**, *19*, 4137-4145.
- 5) S. Iwamoto, M. Isoyama, M. Hirano, K. Yamaya, Y. Ito, I. Matsuo, K. Totani, *Glycobiology*, **2013**, *23*, 121-131.
- 6) T. Kuribara, M. Hirano, G. Speciale, S.J. Williams, Y. Ito, K. Totani, *ChemBioChem*, **2017**, *18*, 1027-1035.