

## ハイブリッドプローブによる小胞体エンドマンノシダーゼ活性複合体の機能解析

(成蹊大理工<sup>1</sup>・大阪国際がんセンター<sup>2</sup>) ○平 啓人<sup>1</sup>・栗原 大輝<sup>2</sup>・廣瀬 光了<sup>1</sup>・戸谷 希一郎<sup>1</sup>

Functional analysis of ER endomannosidase-active complex using hybrid probes.

(<sup>1</sup>Department of Science and Technology, Seikei University, <sup>2</sup>Osaka International Cancer Institute) ○Akito Taira,<sup>1</sup> Taiki Kuribara,<sup>2</sup> Mitsuaki Hirose,<sup>1</sup> Kiichiro Totani<sup>1</sup>

We discovered endoplasmic reticulum endomannosidase (ER-EM) activity which removes Glc $\alpha$ 1-3Man from Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (G1M9) misfolded glycoproteins for promoting them into the degradation pathway in the ER glycoprotein quality control system. And we found the involvement of carboxylesterase 1d (Ces1d) as a component of ER-EM active complex. As a substrate recognition specificity, ER-EM is a multi-point-recognition enzyme, which recognizes the glycans and the hydrophobic aglycone. Therefore, we developed an ER-EM targeting hybrid probe having a Ces1d inhibitor JW972 and G1M9 glycan. The evaluation of ER-EM active complex using the probe showed that Ces1d is involved in hydrophobic aglycon recognition. However, the catalytic site involved in glycohydrolysis is still unclear.

Accordingly, as a second-generation probe, we had the idea of developing a photocross-linkable hybrid probe that introduced a photocross-linker into the ER-EM target glycan moiety. The photo-crosslinkable probe was examined to be synthesized by a chemoenzymatic synthesis method using UGGT1, which is a glycosyltransferase that converts M9-type glycoprotein to G1M9-type glycoprotein.

This presentation reports on the functional analysis of the ER-EM active complex using first- and second-generation hybrid probes.

**Keywords :** ER-endomannosidase, Ces1d, Chemoenzymatic synthesis

我々は、小胞体糖タンパク質品質管理機構において Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (G1M9)型不良糖タンパク質から Glc $\alpha$ 1-3Man を加水分解し分解経路へと促す小胞体エンドマンノシダーゼ (ER-EM)活性を発見した。また、ER-EM 活性複合体へのカルボキシルエステラーゼ 1d(Ces1d)の関与を見出した。さらに、その基質認識特性として、糖鎖と疎水性アグリコンの二点を認識する多点認識型酵素であることが判明した。

そこで、我々は ER-EM 活性の標的糖鎖である G1M9 型糖鎖と Ces1d 阻害剤 JW972 を構成要素としたハイブリッドプローブを開発した。そして、本プローブによる ER-EM 活性評価の結果、Ces1d は疎水性アグリコンの認識に関与することを見出した。しかし、糖加水分解に関与する触媒サイトは不明である。そこで、第二世代プローブとして、ER-EM 標的糖鎖部位に光架橋剤を導入した光架橋型ハイブリッドプローブの開発に至った。光架橋型プローブは UGGT1 という M9 型糖鎖を G1M9 型糖鎖に変換する糖転移酵素を利用し化学酵素的合成法を利用した合成を検討した。

本発表では、第1世代および第2世代ハイブリッドプローブを用いた ER-EM 活性複合体の機能解析について報告する。