

PNGase/ENGase 活性の同時検出を志向した糖ペプチドプローブの開発研究

(成蹊大¹⁾) ○鎌田 結子¹・齋藤 直暉¹・廣瀬 光了¹・戸谷 希一郎¹

Simultaneous detection of PNGase/ENGase activity using multifunctionally glycopeptide probe (¹Seikei University) ○Yuiko Kamata,¹ Naoki Saito,¹ Mitsuaki Hirose,¹ Kiichiro Totani¹

In the endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD), deglycan-enzymes such as PNGase and ENGase promote misfolded glycoprotein degradation in cytosol. NGLY1 deficiency, which is related to abnormal ERAD, might be caused by PNGase/ENGase activity balance. However, enzymatic assay system for detection of the balance has not been established. Herein, we target to develop the assay system for revealing the importance of the activity balance. We performed detection of PNGase/ENGase activity balance in a suspension of Wistar rat liver tissue (containing PNGase/ENGase) with the synthetic substrate Man₉GlcNAc₂-Asn(Fmoc)-Leu-Leu. We also examined optimization of the reaction conditions by tuning the peptide moiety of the substrate.

Keywords : Deglycan-enzyme; Endoplasmic reticulum associated degradation; Glycopeptide probe

小胞体関連分解では、糖タンパク質に対する PNGase および引き続く ENGase による脱糖鎖反応が不良糖タンパク質の分解を促す。その脱糖鎖反応の異常によってもたらされる疾患 NGLY1 欠損症では、PNGase/ENGase の活性バランスの変化が疾患を引き起こす要因と考えられている¹⁾。しかし、これらの酵素の活性バランスを定量評価できる解析系は確立されていないため、疾患の発症と酵素活性バランスの相関の詳細は不明なままである。そこで本研究では PNGase/ENGase の活性バランスを評価できる糖ペプチドプローブの開発を目指した(下図)。我々は、Wistar rat の肝臓組織懸濁液(PNGase/ENGase を含む)に独自の合成基質 Man₉GlcNAc₂-Asn(Fmoc)-Leu-Leu を作用させ、アッセイ系やライセート画分の調製法を検討し、PNGase/ENGase の活性検出に成功した。そして、基質のペプチド部位を工夫することで、粗酵素中で安定かつ両酵素の活性検出が可能な糖ペプチドプローブを開発した。



- 1) C. Huang. Y. Harada. A. Hosomi, Y. M-. Negishi. J. Seino.; H. Fujihira. Y. Funakoshi. N. Dohmae. T. Suzuki. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2015**, *112*, 1398–1403.