

氏 名 朱 彤

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1817 号

学位授与の日付 平成28年3月24日

学位授与の要件 物理科学研究科 機能分子科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Structural basis of the molecular mechanisms underlying
intracellular quality control of glycoproteins mediated by
their glucosylation

論文審査委員 主 査 教授 青野 重利
教授 加藤 晃一
教授 齊藤 真司
教授 飯野 亮太
准教授 安藤 弘宗 岐阜大学
准教授 山口 拓実
北陸先端科学技術大学院大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

A considerable number of proteins are modified with oligosaccharides that serve as the protein-quality tags. Enzymatic trimming of the oligosaccharides displayed on newly synthesized glycoproteins are coupled with exposure of the protein-fate determinants for interacting with a set of carbohydrate recognition proteins as guides for folding, secretory, and degradation processes. Despite of the biological importance, the physicochemical insights into the quality control system of glycoproteins remain unclear. For this reason, I was motivated to provide the structural basis for understanding the molecular mechanisms of the glycoprotein fate-determination process in my PhD thesis. It contains four chapters, including Chapter 1 “General introduction”, Chapter 2 “Elucidation of the structural basis of the sensing mechanism of the ER folding sensor enzyme UGGT”, Chapter 3 “Exploration of the conformational space occupied by the high-mannose-type oligosaccharide functioning as the folding signal”, and Chapter 4 “Conclusions and perspective”.

The endoplasmic reticulum (ER) in the eukaryotic cells is one of the main compartments for efficient protein folding. In the ER, a high-mannose-type oligosaccharide functions as folding signal for recruiting molecular chaperones to facilitate the folding of newborn glycoproteins. Correctly folded glycoproteins with a transportation tag are moved to the Golgi apparatus, while terminally misfolded ones are marked by extensive processing of the carbohydrate residues and thereby subjected to the degradation process.

The glycoprotein-fate determination system also involves a backup mechanism, by which the intermediates losing the folding signal can be sorted out and their folding signal is regenerated to prolong the process for obtaining the correct three-dimensional (3D) structures. To accomplish this unique mechanism, a molecular “gate keeper” that recognizes the folding intermediates conjugated to a certain type of oligosaccharide and labels them for bringing into additional folding pass plays a key role. An ER-located enzyme, UDP-glucose: glycoproteins glucosyltransferase (UGGT) is considered as the glycoprotein folding sensor. The incompletely folded glycoproteins with a high-mannose-type undecasaccharide are the potential substrates of UGGT which exclusively modifies them by selective glucosylation. The resulting product, a monoglucosylated high-mannose-type oligosaccharide, is responsible for recruiting the ER molecular chaperones to resume the folding maturation.

To elucidate the molecular mechanisms underlying restoring the folding process mediated by glucosylation that involves specific protein-protein and

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

protein-carbohydrate recognitions, it is essential to perform the structural analysis of the key enzyme UGGT itself as well as its substrate and product oligosaccharides. However, no structural information of UGGT had been available so far due to its huge size and instability. Furthermore, detailed conformational analyses of oligosaccharides remain challenging because of the heterogeneous and flexible properties.

In my thesis, I have overcome these obstacles and elucidated the structure of the glycoprotein folding sensor enzyme UGGT based on X-ray crystallographic analyses, as well as the homogeneous high-mannose-type oligosaccharide with terminal glucosylation by using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

To clarify the mechanisms of the recognition towards the incompletely folded glycoproteins, I described the architectural study of UGGT by the combination of bioinformatics analysis and biophysical approaches. To solve the instability problem, UGGT originating from a thermophilic fungus was chosen for operating detailed structural analyses. Encouragingly, the fungal UGGT was successfully obtained in a milligram scale by using *E. coli* system. The bioinformatics analysis of fungal UGGT suggested that the N-terminal region possesses three-tandem thioredoxin (Trx) -like domains (termed Trx1, Trx2 and Trx3 respectively), followed by a domain rich in β sheet and C-terminal catalytic domain. I also performed architectural prediction of UGGT originating from other species and the results showed that the structural domain arrangement is quite conserved among species, indicating the significance of these domain characters for the function of UGGT. To understand the detailed structure at atomic resolution, crystallization of a series of UGGT constructs were performed. Consequently, I successfully resolved the crystal structure of Trx3 domain, which could give the first structural information of UGGT with atomic detail. The crystallographic study of Trx3 domain revealed that Trx3 contains an extensive hydrophobic patch that may serve as putative substrate-binding site. It is plausible that Trx1 and Trx2 also share the similar 3D structure and have the similar function, suggesting that UGGT recognizes the hydrophobic surface of the incompletely folded glycoprotein through the extensive hydrophobic patch harbored in its multiple Trx domains.

The recombinant UGGT thus obtained was also applied for the NMR study of high-mannose-type oligosaccharides by developing a method employing UGGT as catalyst for the terminal glucosylation. Considering the substrate specificity of this enzyme, denatured glycoprotein mixture derived from the genetically engineered yeast cells, which homogeneously expressed a specific high-mannose-type undecasaccharide, were employed as potential substrates. In order to conduct detailed conformational analyses of the oligosaccharides by stable isotope-assisted NMR measurements, UDP-[$^{13}\text{C}_6$]glucose as donor substrate of UGGT was chemically

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

synthesized. By combining these techniques, the *in vitro* chemoenzymatic reaction catalyzed by UGGT successfully provided uniformly and selectively ^{13}C -labeled monoglucosylated high-mannose-type oligosaccharides harboring intracellular glycoprotein folding signal.

Multidimensional NMR measurements of the high-mannose-type oligosaccharides indicated that attachment of one glucose residue induces little conformational changes, whereas the removal of one mannose residue results in significant modification of the dynamic behaviors of the carbohydrate chain. These results suggest that the ^{13}C -labeled oligosaccharides could be a useful probe for NMR analyses of their conformational dynamics in solution and their interactions with the ER chaperones at the atomic level.

These studies would provide the structural basis for understanding the interaction mechanisms between UGGT and structurally imperfect glycoproteins, giving new insights into quality control of glycoproteins in cells.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

糖鎖は、細胞内のタンパク質の品質を提示する標識として機能している。細胞内の小胞体には、適切な立体構造形成に失敗した糖タンパク質を選別し、再生するための品質管理機構が備わっている。しかしながら、このシステムの中核を担う糖転移酵素の詳細な構造および作動機構の理解はほとんど進んでいなかった。本論文はこうした状況に鑑みて、鍵酵素である UDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素 (UGGT)、ならびにその反応基質/生成物である高マンノース型糖鎖の構造学的研究を行ったものである。

提出された論文は、4章から構成されている。第1章では、研究の背景について述べられている。糖タンパク質品質管理機構では、フォールディングが未完成な糖タンパク質の糖鎖末端にグルコース残基を付加し、これを認識する分子シャペロンの標的としている。このシステムにおいて、門番役として機能するのが UGGT である。この酵素は、フォールディングが未完成なタンパク質に対してのみグルコース残基を転移することで、フォールディングセンサーとしての機能を果たしている。しかし、UGGT は分子量が大きく、かつ不安定であることから、その構造生物学研究が阻まれてきた。また、標識として機能する糖鎖に関しても、構造の不均一性と柔軟性により、物理化学研究には困難を伴った。申請者はこれらの問題の解決を図り、糖タンパク質品質管理機構の物理化学基盤を統合的に理解することを目指した。

第2章では、申請者は、UGGT を安定かつ大量に調製する方法を確立し、その基質認識メカニズムの構造的知見を得ることに成功した。すなわち、バイオインフォマティクス解析により、UGGT のフォールディングセンサー領域は主に3つのチオレドキシシン様ドメインから構成されることを見出した。さらに、X線結晶構造解析によって、3番目のチオレドキシシン様ドメインの3次元構造を解明することに成功した。これらの結果により、UGGT が複数ドメインの疎水性領域を用いて基質糖タンパク質をセンシングするメカニズムが推測された。

第3章では、調製した UGGT を活用することで、溶液中での糖鎖の詳細な構造解析を可能とした。酵母変異株を用いた高マンノース型糖鎖の大量調製法と化学・酵素合成法を組み合わせ、均一または選択的に安定同位体標識を施したモノグルコシル化糖鎖の調製法を確立した。得られた安定同位体標識糖鎖を用いて NMR および分子動力学計算による解析を実施し、水中の糖鎖の立体構造情報を得ることに成功した。

第4章では研究成果の総括と、今後の展望が述べられている。本論文の研究成果により、UGGT がフォールディングセンサーとして機能する構造基盤や、グルコース転移反応前後の糖鎖の立体構造変化を明らかにすることができた。今後さらに、細胞内における糖タンパク質の品質管理システムの作動メカニズムの詳細に迫ることが展望としてまとめられている。

以上のように、申請者は主体的に研究に取り組み、糖タンパク質品質管理機構の中核をなす酵素の立体構造情報を明らかにすることに成功している。さらに、標識として

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

機能する糖鎖に対して、従来の研究では困難であった物理化学的アプローチを可能にし、その分子科学研究を進展させる意義も深い。また、本論文の成果は、申請者を筆頭著者とする英文論文として国際学術雑誌 2 報に発表済みである。以上のことから、本論文は、博士（理学）の授与にふさわしいものであると審査委員全員一致で結論した。