MINIREVIEW (TIGG-07/02/90-MR-1)

**De-N-Glycosylation of Glycoproteins in Animal Cells:
Evidence for Occurrence and Significance**

Sadako INOUE

School of Pharmaceutical Sciences, Showa University,
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

In eukaryotic cells, the biosynthetic mechanism of protein N-glycosylation has been well established (1-3). However, the necessity for removing specific N-glycan chain(s), if any, from certain glycoproteins, as possibly a prerequisite for intracellular transport and other unknown requirements, has yet to be demonstrated in any system.

During our structural and functional studies on glycoproteins found by the authors and considered essential to the embryogenesis of fish, the de-N-glycosylation of two types of glycoproteins differing completely in localization and function was found to definitely occur. The functional roles of glycan chains of glycoproteins are generally unclear even for biologically significant molecules such as those in fish eggs. Although the present findings are limited, the de-N-glycosylation of glycoproteins may be more widespread than presently considered and important for understanding the functional roles of N-glycan chains, at least in some glycoproteins.

1. Intracellular accumulation of N-linked glycoprotein-derived free sialooligosaccharides in fish eggs.

That glycoproteins undergo de-N-glycosylation was first evident from a recent discovery of free sialooligosaccharides (MW 2000) in mature unfertilized eggs of the fresh water trout, Plecoglossus altivelis (4). All the

free sialooligosaccharides were composed of galactose, mannose, N-acetylglucosamine, and N-acetylneuraminic acid. Structural analysis indicated them to be typical complex-type of bi-, tri-, and tetraantennary chains. The most important feature noted was that each oligosaccharide chain retains the di-N-acetylchitobiose structure GlcNAc β 1-4GlcNAc at the reducing terminus, indicating them to have originally been protein-linked components which became detached during oogenesis by the action of a putative peptide N4-(N-acetyl- β -glucosaminyl) asparagine amidase or peptide: N-glycosidase (PNGase) on a progenitor glycoprotein (see Scheme 1).

To our knowledge, there is no report on PNGase from an animal source, though PNGase activity has been detected in the extracts of various plant seeds and bacteria (5-11). The occurrence of endo- β -N-acetylglucosaminidase in animals has been reported (12). However, the products formed by this enzyme do not retain the di-N-acetylchitobiose structure. More recently, the intracellular accumulation of a novel class of disialobiantennary free oligosaccharides was observed in the unfertilized mature eggs of Tribolodon hakonensis, a dace (13), thus indicating the accumulation of free oligosaccharides to possibly be a general phenomenon in fish eggs. In normal animal tissues or cells, no accumulation of glycoprotein-derived free oligosaccharides was detected,

動物細胞におけるアスパラギン結合型糖鎖の遊離・De-N-Glycosylation 現象の発見とその意義

井上貞子

生物細胞で、糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖が形成する機構は既に解明されている⁽¹⁻³⁾。しかし、動物細胞において、機能上の目的から、アスパラギン結合型糖鎖が、タンパク質との結合部位からそっくり切断される(de-N-glycosylation)という現象は、これまでに報告されていないようである。筆者らは、最近、魚卵を材料とする糖タンパク質の構造と機能の研究の過程で、局在性と機能を異にする二種の糖タンパク質から、アスパラギン結合型糖鎖が遊離する現象を見いだした。

魚卵糖タンパク質についてもそうであるが、糖タンパク質が顕著な機能をもっている場合でも、糖鎖が何の為に結合しているのか、その機能は何かをはっきりしている例は少ない。糖タンパク質を研究する者にとって最大のジレンマであるこの問題を解明する上で、糖タンパク質のde-N-glycosylation現象の発見は、発想法の転換をもたらすものである。本稿では、筆者らが見いだした事実を紹介し、含蓄される問題点を提起したい。

1. 魚卵における遊離アスパラギン結合型糖鎖の蓄積現象の発見と糖鎖構造の決定。

まずアユ(*Plecoglossus altivelis*)の成熟未受精卵細胞質に、二千前後の分子量をもつ三種の糖鎖が遊離状態で存在することが見いだされた⁽⁴⁾。これらは、ガラクトース、マンノース、N-アセチルグルコサミン、およびN-アセチルノイラミン酸から成ることから、糖タンパク質由来であることが推定されたが、構造解析の結果、ジー、トリ-およびテトラアンテナ型の典型的なアスパラギン結合型糖鎖であることが明らかにされた。最も注目すべき点は、これらの糖鎖がいずれも還元末端にジー-N-アセチルキトビオース構造-GlcNac β 1 $\rightarrow$ 4GlcNacを保持していることである。すなわち、これらの遊離糖鎖はある糖タンパク質から、酵素ペプチド-N⁴-(N-アセチル- β -グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼ(PNGase)の作用を受けて切断されたものである。糖タンパク質から、アスパラギン結合型糖鎖を付け根から切り離す酵素(PNGase)は、植物の種子や細菌に存在することが知られているが、動物細胞に存在する例は報告されていない⁽⁵⁻¹¹⁾。一方、動物細胞に存在するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼによる切断では、還元末端のN-アセチルキトビオース構造が保持

possibly meaning that such glycan chains are immediately transported to lysosomes where they undergo further cleavage by glycohydrolases to constituent monosaccharides (12). The accumulation of oligosaccharides in tissues causes metabolic diseases.

In the following identification will first be made of progenitor glycoproteins for free oligosaccharides and the enzyme responsible for de-N-glycosylation. The mechanism (when and where) and significance of de-N-glycosylation in the oocytes will then be discussed and finally, whether de-N-glycosylation is universal mechanism for animals will be considered.

2. Identification of progenitor glycoproteins for free oligosaccharides in fish eggs.

At the time the accumulation of free oligosaccharides was noted in fish eggs, vitellogenin was considered the source. This compound is a lipophosphoglycoprotein (MW 250-600K, reported for fish egg) synthesized in the liver of nonmammalian vertebrates, and taken from the bloodstream by growing oocytes which then process it into yolk proteins, lipovitellin (MW 20-200K) and phosvitin (MW 2-30K). These yolk proteins are the major proteinaceous components of eggs (80-90% total protein in amphibian and fish eggs) (14-16). Vitellogenin has a carbohydrate component, and the glycosylation of vitellogenin in the liver of Xenopus has been reported (17). No report, however, clearly states whether this carbohydrate is attached to lipovitellin (lipoprotein) or phosvitin (phosphoprotein), or both. Major phosvitin molecules from salmonid fish were previously shown to be linked hybrid-type N-glycan chains (18). Hen egg phosvitin is a glycophosphoprotein

although the carbohydrate structure given for it is hardly acceptable in the light of present knowledge (19,20).

Glycophosphopeptides were shown present among the molecular species of the phosvitins of Plecoglossus and Tribolodon eggs and their carbohydrate structures were determined. In each fish species, the structures of oligosaccharide chains linked to the phosphopeptides are identical to those of free oligosaccharides accumulated in the eggs of respective species (21). Free oligosaccharides having structures identical to those of phosvitins were also found in Oryzias latipes eggs (22). These results support our first supposition that free oligosaccharides accumulated in fish eggs derived from vitellogenin during processing (vitellogenesis). What appears most probable is that the glycan chains of vitellogenin molecules are recognized by the receptor on the egg surface and participate in binding. Vitellogenin incorporation is a typical receptor-mediated endocytosis (23,24) and to recycle the receptor incorporated into the cell dissociation of the ligand (vitellogenin) is prerequisite. The de-N-glycosylation of carbohydrate chain by PNGase would appear necessary for dissociation. One other reasoning is that de-N-glycosylation is necessary for proteolysis of vitellogenin to occur. Alternatively, glycan chains must be attached to limit the site of proteolysis and subsequent de-N-glycosylation occurs following the proteolysis for unknown reason. The identification of the enzyme involved in de-N-glycosylation and examination of the specificity and compartmentation of the enzyme activity should provide some clarification of these matters.

3. Release of glycan chains from L-hyosphorin during embryogenesis.

されることがあり得ない⁽¹²⁾。

アユ卵に見いだされた遊離アスパラギン結合型糖鎖糖タンパク質糖鎖の蓄積現象は、その後ウグイ (*Tribolodon hakonensis*) 成熟未受精卵でも見いだされ糖鎖構造が解析された⁽¹³⁾。ウグイ卵の場合にも、遊離糖鎖の還元末端にN-アセチルキトビオース構造を保持するものが存在することから、アユ卵の場合と同じく、PNGaseの作用による糖タンパク質の糖鎖の切断が行われていることが推定された。このように、糖タンパク質由来遊離糖鎖の蓄積現象は、魚卵に一般的な現象のようであるが、これ迄他の動物細胞に見いだされた例がないのは、糖鎖がたとえ遊離したとしても直ちにリソソームに送り込まれ、単糖レベルまで分解されてしまうからであろう。

魚卵におけるこれら遊離糖タンパク質糖鎖の蓄積現象について、まず第一に解明されなければならない問題点は、これらの糖鎖が由来する糖タンパク質と、関与する酵素

(PNGase?)の同定であろう。次の段階は、卵細胞における糖鎖遊離機構(いつ、どこで起こるか)とその生物学的意義の解明である。更に、最終的には、このような糖タンパク質のde-N-glycosylation機構が広く動物細胞に存在することを証明し、その意義付けをすることが、筆者らの目指すところである。

2. アユおよびウグイ未受精卵に蓄積されている遊離糖鎖が由来する糖タンパク質の同定。

魚卵における遊離糖タンパク質糖鎖の蓄積

現象をはじめて見いだした段階において既に、その量が多いことから、これらの糖鎖がビテロジェニンに由来するのではないかという推測がなされた⁽⁴⁾。ビテロジェニンは肝臓で合成されるリン酸化リボ糖タンパク質(魚卵のものは分子量25-60万)で、卵細胞表面にあるレセプターと結合して細胞内に取り込まれると、直ちに特異的なプロテオリシスを受けて、リポビテリン(分子量2-20万)とホスビチン(分子量数千-数万)に分解され卵黄粒に送り込まれる。このプロテオリシスによるプロセッシングが行われないと、卵黄(yolk)は形成されない。リポビテリンとホスビチンは卵黄タンパク質の主たるものであり、同時に卵全体のタンパク質の80-90%を占める⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。ビテロジェニンが糖を成分として持つことは古くから知られており、*Xenopus*の肝臓でビテロジェニンの糖鎖形成が起こることを示した報告もあるが⁽¹⁷⁾、その糖鎖がリポビテリン(リボタンパク質)の部分に結合しているのかホスビチン(リンタンパク質)の部分に結合しているのかについては確定的な報告がない。筆者等は先にサケ科魚卵のホスビチンがハイブリッド型のアスパラギン結合型の糖鎖を持つことを組成分析の結果から示唆した⁽¹⁸⁾。また鶏卵のホスビチンが糖タンパク質であることは報告されているが⁽¹⁹⁾、そこで示された糖鎖構造は現在の知識からは受け入れ難いものである⁽²⁰⁾。

最近、筆者等はアユやウグイ卵のホスビチンに糖鎖をもつ分子種があることを見だし、それらの糖鎖構造の解析を行った。その結果、

Hyosophorin is a family of glycoproteins found in fish eggs and identified as a component of cortical alveolus (25-28). Its unique feature is that high molecular weight form (H-hyosophorin, MW 100-200K) in unfertilized eggs undergoes specific proteolysis to produce the smallest repeating unit, L-hyosophorin (MW 7-9K) at the time of fertilization (25,28). No degradation of glycan chains occurs in this depolymerization.

Seko et al. noted hyosophorin-derived free glycan chains to be present in early embryos of the flounder, Paralichthys olivaceus (29). The free glycans have unusual pentaantennary structures typical of glycan chains of hyosophorin and retain the di-N-acetylchitobiose structure at their reducing termini. They also found hyosophorin-derived free glycan chains in embryos of the Medaka, Oryzias latipes. These hyosophorin-derived glycan chains have never been found in unfertilized eggs or eggs following fertilization.

4. Evidence for the de-N-glycosylation of a plant-seed glycoprotein.

Ricin, a toxic lectin of Ricinus communis seeds, is a heterodimer whose subunits, A and B chains, are joined by a disulfide bond (30). The amino acid sequence of both subunits have been determined by Funatsu and coworkers (31). The most significant difference between the polypeptide structure deduced from the nucleotide sequence of cloned cDNA and the amino acid sequences determined directly for the A and B chains is that, at position 236 in the A chain, the nucleotide sequence predicts asparagine (-Asn-Gly-Ser-) (32), whereas the amino acid sequence, an aspartate (-Asp-Gly-Ser-). Other

partially sequenced cDNA clones also predict this Asn. Sequence analysis of cDNAs showed the precursor protein to contain four potential sites (Asn-Xaa-Thr/Ser) for N-linked glycosylation at Asn-10 and -236 in the A chain and at Asn-374 and -414 in the B chain. A 'heavy' or 'variant' form of the ricin A chain has been shown to actually contain two N-linked oligosaccharide chains at Asn-10 and -236 (33). The structure of the N-linked oligosaccharide chain at Asn-236 of the 'heavy' form of the ricin A chain has recently been reported (34). Considering these results together, a 'light' form of the ricin A chain is most likely formed from the 'heavy' form by site-specific de-N-glycosylation which converts the asparaginyl-glycosylamine bond at position 236 to aspartic acid. Asn->Asp transformation by similar de-N-glycosylation may possibly be found on examining published amino acid sequences of proteins, Asp-Xaa-Thr/Ser sequences and the corresponding nucleotide sequences.

5. The function of de-N-glycosylation

Cotranslational N-glycosylation of secretory proteins appears essential particularly for the early steps of the secretory pathway to prevent the nonspecific aggregation of partially folded proteins following their synthesis for the acquisition of functional conformation(s) (35-39). But, once the proper functional conformation has been attained, the requirement for such glycan chains to be present in certain N-linked glycoproteins may be less critical or even impede later events. Moreover, de-N-glycosylation, which may convert Asn residues to Asp (CHO-Asn to Asp) thus introducing negatively charged residues and altering the macromolecular nature, may be one means

アユ卵とウグイ卵のいずれにおいても、ホスビチンの糖鎖構造は、先に決定されたそれぞれの魚卵に蓄積されている遊離糖鎖の構造と一致した⁽²¹⁾。また最近、メダカ未受精卵にもホスビチンの糖鎖と同一構造の糖鎖が遊離状態で存在することを見いだした⁽²²⁾。これらの場合、各魚卵に特徴的な糖鎖構造が同定の際の決め手となった。この結果は、初めの推測通り、魚卵に蓄積されている遊離糖鎖がビテロジェニン由来であり、ビテロジェニンが卵にとりこまれ、分解のプロセッシングを受けて卵黄が形成される過程で、糖鎖遊離が

起こると言う考えを支持するものである。ここで最も単純で好都合な考えは、肝臓で合成され、血流によって運ばれたビテロジェニンが卵細胞表面のレセプターに認識される際に糖鎖が関与するというものである。卵細胞によるビテロジェニンの取り込みは、レセプターの関与する典型的なエンドサイトーシスであり^(23,24)、ビテロジェニンと結合して卵細胞内に取り込まれたレセプターを再生して元の卵表面にもどす為には、リガンド(ビテロジェニン)を解離させる必要がある。この目的の為にPNGaseが働いて糖鎖が切断されると

Scheme 1. A typical non-lysosomal degradation of asparagine-linked glycoproteins leading to the formation of bi-, tri-, and tetraantennary "free" sialooligosaccharides found (4) in *Plecoglossus altivelis* eggs. A-1: $R_a = R_c = H$, $R_b = R_d = \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-$; A-2A: $R_a = H$, $R_b = R_c = R_d = \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-$; A-2B: $R_c = H$, $R_a = R_b = R_d = \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-$; A-3: $R_a = R_b = R_c = R_d = \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-$.

for regulating the ligand-receptor interactions of certain secretory proteins at least in some cases. By this modification, the structural and functional properties of glycoproteins can be modulated. At the present, the authors are in no position to make any definite conclusions as to the functions of de-N-glycosylation or the free glycans liberated. Nevertheless, our finding of de-N-glycosylation as a possible basic biologic process may provide a new approach to the study of glycobiology. Too, it should be noted that, from a recent study on the metabolism of cell-associated proteoglycans, the glycosaminoglycan chains of cell-surface proteoglycans appear to be separated from protein cores in a nonlysosomal compartment prior to their transport to lysosomes for degradation (40-43).

References

1. Hanover, J.A., and Lennarz, W.J. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 244, 1-19
2. Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631-664
3. Lennarz, W.J. (1987) *Biochemistry* 23, 7205-7210
4. Ishii, K., Iwasaki, M., Inoue, S., Kenny, P.T.M., Komura, H., and Inoue, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 1623-1630
5. Takahashi, N. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 1194-1201
6. Plummer, T.H., Jr., Elder, J.H., Alexander, S., Phelan, A.W., and Tarentino, A.L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 10700-10704
7. Tarentino, A.L., Gomez, C.M., and Plummer, T.H., Jr. (1985) *Biochemistry* 24, 4665-4671
8. Tarentino, A.L., and Plummer, T.H., Jr. (1987) *Methods Enz.* 138, 770-778
9. Plummer, T.H., Jr., Phelan, A.W., and Tarentino, A.L., (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 167-173
10. Hirani, S., Bernasconi, R.J., and Rasmussen, J.R. (1987) *anal. Biochem.* 162, 485-492
11. Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Plummer Jr., T.H. (1989) *Anal. Biochem.* 180, 195-204
12. Brassart, D., Baussant, T., Wieruszkeski, J.-M., Strecker, G., Montreuil, J., and Michalski, J.-C. (1987) *Eur. J. Biochem.* 169, 131-136
13. Inoue, S., Iwasaki, M., Ishii, K., Kitajima, K., and Inoue, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 18520-18526
14. Wallace, R.A. (1985) in *Developmental Biology* (Browder, L.W. ed.), vol. 1, pp 127-177, Plenum Press, New York
15. Ng, T.B., and Idler, D.R. (1983) in *Fish Physiology*, vol. IXA, pp 373-404, Academic Press, New York
16. Mommsen, T.P., and Walsh, P.J. (1988) in *Fish Physiology*, vol. XIA, pp 347-406, Academic Press, New York
17. Gottlieb, T.A., and Wallace, R.A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 95-103
18. Tazawa, I., Inoue, Y., Iwasaki, M., Inoue, S., Okumoto, N., and Hayashi, F. (1988) *Comp. Biochem. Physiol.* 89B, 475-482
19. Shainkin, R., and Pearlmann, G.E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 2278-2284
20. Shainkin, R., and Pearlmann, G.E. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 693-700
21. Iwasaki, M., and Inoue, S. (1989) *Seikagaku* 61, 1150 (in Japanese)
22. Kitajima, K., personal communica-

いう考えは魅力的である。一方、ピテロジェニンがプロテオリシスによるプロセッシングを受けるに先だって糖鎖が除去される必要があると考えることもできる。また逆に、糖鎖の存在がプロテオリシスを受ける部位を限定していることも考えられ、糖鎖の切断は特異的なプロテオリシスの後、別の理由で起こると言う考えも否定できない。いずれにせよ、糖鎖の切断に働く酵素を同定し、その細胞内局在部位 (compartmentation) や特異性を調べる研究によって解明すべき問題である。

3. 魚卵初期発生におけるL-hyosophorinからの糖鎖の遊離。

hyosophorinは筆者等が魚卵に見だし、表層胞局在を明らかにした一群の糖タンパク質である⁽²⁵⁻²⁸⁾。hyosophorinの最も著しい特徴は、未受精卵に存在する分子量10-20万の高分子型(H-hyosophorin)が、受精または卵活性化に伴って特異的なプロテオリシスを受け、

H-hyosophorinの最小反復単位である分子量7-9千の低分子型(L-hyosophorin)に低分子化する現象である^(25,28)。このとき、糖鎖の切断は全く起こっていない。ところが最近、瀬古等は、ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)初期胚にhyosophorin由来の糖鎖が遊離状態で存在することを見いだした⁽²⁹⁾。hyosophorinの糖鎖は他の糖タンパク質に見られない特徴的なペンタアンテナ型構造を持つため、ここで見いだされた遊離糖鎖がhyosophorin由来であることは疑いなかった。更に最近、瀬古等は、メダカの初期胚にも、hyosophorin由来の糖鎖が遊離状態で存在することを見いだした。

hyosophorin由来の糖鎖は、未受精卵や受精直後の卵には決して存在しない。胚発生のある特定の時期に糖鎖の遊離が起こるのである。

これらの事実が、初期発生におけるhyosophorinの機能を解く鍵を握っているものと思われ、研究が進められている。

Some like it hot

- tion
23. Opreko, L., Wiley, H.S., and Wallace, R.A. (1980) *Cell* 22, 47-57
24. Busson-Mabillot, S. (1984) *Biol. Cell* 51, 53-66
25. Inoue, S., and Inoue, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 5256-5261
26. Kitajima, K., Inoue, Y., and Inoue, S. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 5262-5269
27. Kitajima, K., Inoue, S., and Inoue, Y. (1989) *Dev. Biol.* 132, 544-553
28. Seko, A., Kitajima, K., Iwasaki, M., Inoue, S., and Inoue, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 15922-15929
29. Olsnes, S., and Phihl, A. in *Molecular Action of Toxins and Viruses* (1982) pp 51, (Cohen, P., and Van Heyningen, S., eds.) Elsevier Biomedical, Press Amsterdam
30. Yoshitake, S., Funatsu, G., and Funatsu, M. (1978) *Agric. Biol. Chem.* 42, 1267-1274
31. Funatsu, G., Kimura, M., and Funatsu, M. (1979) *Agric. Biol. Chem.* 43, 2221-2224
32. Lamb, F.I., Roberts, L.M., and Lord, J.M. (1985) *Eur. J. Biochem.* 148, 265-270
33. Quoted in ref. 32 as personal communication from Foxwell, B.
34. Kimura, Y., Kusuoku, H., Tada, M., Takagi, S., and Funatsu, G. (1989) *Seikagaku* 61, 1020 (in Japanese)
35. Freedman, R.B. (1989) *Biochem. Soc. Trans.* 17, 331-335
36. Slieker, L.J., Martensen, T.M., and Lane, M.D. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 15233-15241
37. Olson, T.S., and Lane, M.D. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 6816-6822
38. Olson, T.S., Bamberger, M.J., and Lane, M.D. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 7342-7351
39. Schulke, N., and Schmid, F.X. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 8832-8837
40. Lark, M.W., and Culp, L.A. (1983) *Biochemistry* 22, 2289-2296
41. Brauker, J.H., and Wang, J.L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 13093-13101
42. Dean, R.T., Jessup, W., and Roberts, C.R. (1984) *Biochem. J.* 217, 27-40
43. Piepkorn, M., Hovingh, P., and Linker, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 8662-8669

4. 魚卵以外の系においても糖タンパク質の de-N-glycosylation 起きていることを示す事実。

リシンはヒマ (*Ricinus communis*) の種子に存在するレクチンで、AとBのサブユニットからなる⁽³⁰⁾。AとB鎖のアミノ酸配列は船津等により決定された⁽³¹⁾。ここで、A鎖の236番目のアミノ酸はアミノ酸配列分析からはAspであるが、cDNAからはAsnと決められた⁽³²⁾。リシンをコードしているいくつかのcDNAクローンを得、それらの塩基配列を決定した結果は、いずれもAsnであることを示している。また、cDNAの解析によるとA鎖のAsn-10と-236、B鎖のAsn-374と-414が糖鎖結合可能なサイト (Asn-Xaa-Thr/Ser) である。ところで最近、リシンA鎖のheavy型 (バリエント) が分離され、れにはAsn-10に加えてAsn-236にも糖鎖が結合していることが報告された⁽³³⁾。リシンA鎖heavy型のAsn-236に結合した糖鎖の構造は最近決定された⁽³⁴⁾。

そこで考えられるのは、heavy型のAsn-236に結合した糖鎖のde-N-glycosylationによって通常のlight型が形成したのではないかということである。この考えに従えば、アミノ酸配列分析からAspとされたA鎖の236番目のアミノ酸に対するヌクレオチドのコードがAsnとなっていることが、よく説明できる。既に報告されているタンパク質のアミノ酸配列の中から、糖鎖結合の可能な配列に対応するAsp-Xaa-Thr/Serなる配列を拾い上げ、それらのAspに対するヌクレオチドコードを調べる作業

を行うことによって、このような例が更に見つかる可能性があると思われる。

5. de-N-glycosylationの機能は何か?

分泌性タンパク質においてアスパラギン結合型糖鎖は、特に分泌の初期過程でタンパク質が非特異的な構造変化を起こすのを防止し、機能に必要なコンホメーションをとるために不可欠とされている⁽³⁵⁻³⁹⁾。しかし、一旦必要なコンホメーションが固定されてしまえば、アスパラギン結合型糖鎖の存在は不要かむしろ有害である場合もあるのではないか。また、de-N-glycosylationによって糖鎖と結合していたAsnがAspに変換されれば、その部位に負電荷が導入される。この変換によって分泌性タンパク質とレセプターとの相互作用など、細胞内の特定の部位で糖タンパク質の構造が変化し、機能調節が行われるという機構も考えられる。de-N-glycosylationとそれによって遊離される糖鎖の機能に関して確かな結論を下す為には、更に多くの知見が必要である。de-N-glycosylationという現象の発見は、糖タンパク質糖鎖の機能に関して新しい着想を産み、glycobiologyの分野に新しい研究課題を提供するものであろう。

尚最近、プロテオグリカンの代謝の研究で、細胞表面のプロテオグリカンのグリコサミノグリカン鎖がコアタンパク質から切断される反応が、リソソームに運ばれて分解される前にリソソームとは別の部位で行われるという報告がある⁽⁴⁰⁻⁴³⁾。