

小胞体内エンド- α -マンノシダーゼ活性を検出する発蛍光性基質の合成研究

(成蹊大理工) ○西脇 みどり・高橋 翔・栗原 大輝・戸谷 希一郎

Synthetic Study of Fluorogenic Substrate for Detecting Endo- α -mannosidase Activity in the Endoplasmic Reticulum (*Faculty of Science and Technology, Seikei University*) ○Midori Nishiwaki, Sho Takahashi, Taiki Kuribara, Kiichiro Totani

The endoplasmic reticulum glycoprotein quality control (ERQC) regulates the folding, secretion, and degradation of glycoproteins. We have found endoplasmic reticulum endo mannosidase (ER-EM) activity, which plays an important role in the degradation pathway in ERQC. ER-EM is a multipoint recognition enzyme that recognizes the hydrophobic site, which is a misfolding glycoprotein, together with the A arm of glycosylated highly mannose-type glycoprotein, and has the characteristic of cleavage Glc α 1-3Man at the non-reducing end. However, the responsible enzyme and intracellular localization of ER-EM have not yet been clarified. Here, we carried out synthetic study of fluorogenic substrate for ER-EM based on the FRET theory. We examined synthesis of Glc α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man as a recognized glycan motif and introduction of 5-FAM as a fluorescent group at the reducing end and Dabsyl group as a quenching group for FRET pair at the non-reducing end.

Keywords : glycohydrolase, endoplasmic reticulum, synthetic substrate, FRET

小胞体糖タンパク質品質管理機構 (ERQC) は糖タンパク質の折りたたみ、分泌、分解を制御している。当研究室では、ERQC において分解経路を担う小胞体エンドマンノシダーゼ (ER-EM) 活性を見出している。ER-EM は、グルコシル化高マンノース型糖タンパク質の A アームと、不良糖タンパク質部である疎水性部位を多点認識する酵素であり、還元末端の Glc α 1-3Man を一挙に切断する特徴を持つ。しかしながら、ER-EM の活性本体や細胞内局在は未だ明らかとなっていない。

ここでは本酵素活性をリアルタイムで検出するために、FRET 現象を利用して、酵素による切断に伴い蛍光を発するプローブの合成を行う。我々は認識糖鎖部位として、Glc α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man を合成し、その還元末端に蛍光基としての 5-FAM、および非還元末端に FRET ペアとなる消光基としての Dabsyl 基の導入を検討している。

