



## N-糖蛋白去糖基化酶 (PNGase) 的研究进展\*

陈妍雯<sup>1)</sup> 袁舒颖<sup>1)</sup> 刘瑞杰<sup>1)</sup> 张绍兴<sup>1)</sup> 邹琳<sup>2)</sup> 芦鑫荣<sup>2)</sup>孔维淦<sup>2)</sup> 陈力<sup>2)\*\*</sup> 孙桂芹<sup>1)\*\*</sup><sup>(1)</sup> 浙江中医药大学医学技术与信息工程学院, 杭州 310053;<sup>(2)</sup> 复旦大学基础医学院病原生物学系, 医学分子病毒学教育部/卫生健康委员会重点实验室, 上海 200032)

**摘要** N-糖蛋白去糖基化酶 (PNGase) 是一种广泛存在于真菌、植物、哺乳动物中的去糖基化酶, 可以水解 N-糖蛋白或 N-糖肽上天冬酰胺与寡糖链连接的化学键, 并释放出完整的 N-寡糖。PNGase 在生物体内参与蛋白质降解、器官发育、个体生长等过程。人 PNGase 基因功能缺陷会导致先天性去糖基化障碍, 小鼠 PNGase 缺陷会导致胚胎致死性, 线虫 PNGase 缺陷使其寿命下降。本文对 PNGase 在不同物种的分布、蛋白质结构、酶学功能及生物学功能进行阐述, 为 PNGase 的生理病理功能及致病机制的基础研究提供思路, 为 PNGase 作为糖生物学工具酶或药物开发的创新应用研究奠定基础。

**关键词** N-糖蛋白去糖基化酶, 分布, 蛋白质结构, 酶学功能, 生物学功能

**中图分类号** Q55

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0349

N-糖蛋白去糖基化酶 (peptide : N-glycanase, 简称为 PNGase), 又称为 N-糖肽酶、N-糖酰胺酶、肽-N-糖苷酶, 广泛分布于原核和真核生物中, 可以水解多肽上天冬酰胺 (Asn) 连接的寡糖, 并释放出完整寡糖链<sup>[1]</sup>。不同物种来源的 PNGase, 基因长度及氨基酸序列不同, 生物学功能上也有一定差异性。PNGase 参与秀丽线虫的生殖, 并与果蝇生长、小鼠胚胎发育有关<sup>[2-3]</sup>。人体内的 PNGase NGLY1 (N-glycanase 1) 缺陷, 会引起罕见遗传性疾病先天性去糖基化障碍, 患者出现发育迟缓、运动障碍等症状<sup>[4]</sup>; 对出现运动障碍的 Ngly1 缺陷小鼠模型补充其表达, 模型小鼠的运动功能得到一定恢复<sup>[5]</sup>。NGLY1 在人黑色素瘤细胞中高表达, 下调黑色素瘤细胞 NGLY1, 肿瘤细胞生长受到抑制<sup>[6]</sup>。上述研究结果提示, PNGase 可能在生物生长发育过程中有重要意义。本文阐述了 PNGase 在不同物种中的分布、酶的结构、生物学功能, 为 PNGase 的基础及应用研究提供依据。

## 1 PNGase 的分布

PNGase 在真核生物 (真菌、线虫、哺乳动物等) 和原核生物 (细菌) 中均有分布, 本文对已报

道的不同物种来源 PNGase 进行统计 (表 1)。

### 1.1 真核生物的 PNGase

PNGase 在真核生物广泛存在, 包括真菌、植物、线虫、哺乳动物等<sup>[7-10]</sup>。1977 年, Takahashi 等<sup>[9]</sup> 在杏仁 (Almond) 中首次发现 PNGase, 命名为糖胺酶 A, 即 PNGase A。之后陆续在大豆<sup>[11]</sup>、水稻<sup>[12]</sup>、拟南芥<sup>[13]</sup> 和番茄<sup>[14]</sup> 等植物中发现 PNGase。1997 年, 真菌塔宾曲霉 (*Aspergillus tubingensis*) 中发现 PNGase, 命名为 PNGase At<sup>[7]</sup>。Suzuki 等<sup>[15]</sup> 在酿酒酵母中发现第二个真菌 PNGase YPNG1。裂殖酵母中也发现有 SpPNGase<sup>[16]</sup>。

无脊椎动物秀丽隐杆线虫和黑腹果蝇 (线虫和果蝇的寿命短、繁殖速度快) 中发现的 PNGase<sup>[17-18]</sup>, 多用于 PNGase 体内功能研究。1991

\* 浙江省自然科学基金 (LY20C050002)、浙江省教育厅高等学校国内访问学者教师专业发展项目 (FX2020021)、浙江中医药大学校级科研基金 (2020ZG25) 资助。

\*\* 通讯联系人。

孙桂芹 Tel: 13868116801, E-mail: sunguiqin2001@163.com

陈力 Tel: 15821138980, E-mail: lichen\_bk@fudan.edu.cn

收稿日期: 2021-11-17, 接受日期: 2022-01-12

年Seko等<sup>[19]</sup>在脊椎动物青鳉鱼 (Medaka fish) 的卵中发现PNGase。1993年, 小鼠体内发现Ngly1、人体内发现NGLY1 (N-glycanase 1, 又称为N-glycanase, PNGase)<sup>[10]</sup>; 后续研究发现人NGLY1的缺陷会导致遗传性疾病NGLY1型先天性去糖基化障碍 (NGLY1-related congenital disorder of deglycosylation, NGLY1-CDDG)<sup>[4]</sup>。

1.2 原核生物的PNGase

目前, 原核生物的PNGase仅在脑膜炎败血伊丽莎白菌 (*Elizabethkingia meningoseptica*, 缩写为EM; 又称为脑膜炎脓毒黄杆菌, *Flavobacterium*

*meningosepticum*) 中发现, 共两种PNGase, 分别命名为PNGase F和PNGase F-II。

1984年, Plummer等<sup>[20]</sup>在EM中发现了第一个细菌来源的PNGase并命名为PNGase F, PNGase F能完整水解并释放糖蛋白上的N-糖链, 但不能作用于含有 $\alpha$ -1,3核心岩藻糖基化的N-糖蛋白。2015年, 孙桂芹等<sup>[3]</sup>在EM中发现了第二个细菌来源的PNGase F-II, PNGase F-II在具有PNGase F功能的同时, 还可水解并释放植物和昆虫来源的含有 $\alpha$ -1,3核心岩藻糖基化N-糖蛋白的完整糖链。

Table 1 Basic information statistics table of N-glycosidase from different species  
表1 不同物种PNGase的基本信息统计表

| 物种分类 | 来源 | 酶的名称                                               | 氨基酸数量       | 基因长度 | 参考文献          |      |
|------|----|----------------------------------------------------|-------------|------|---------------|------|
| 原核生物 | 细菌 | <i>Flavobacterium meningosepticum</i> *（脑膜炎脓毒黄杆菌）  | PNGase F    | 354  | 1 260 bp      | [20] |
|      |    | <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> （脑膜炎败血伊丽莎白菌） | PNGase F-II | 567  | 1 704 bp      | [3]  |
| 真核生物 | 真菌 | <i>Aspergillus tubingensis</i> （塔宾曲霉）              | PNGase At   | 537  | 1 732 nt      | [7]  |
|      |    | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> （酿酒酵母）             | YPNG1       | 363  | 1 092 nt      | [15] |
|      |    | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> （粟酒裂殖酵母）          | SpPNGase    | 333  | 1 675 nt      | [16] |
|      | 植物 | <i>Prunus amygdalus</i> （扁桃）                       | PNGase A    | 571  | NA            | [9]  |
|      |    | <i>Glycine max</i> （大豆）                            | PNGase GM   | 604  | 28 688 nt     | [11] |
|      |    | <i>Oryza sativa</i> （水稻）                           | PNGase Os   | 447  | CDS: 1 344 nt | [12] |
|      |    | <i>Arabidopsis thaliana</i> （拟南芥）                  | AtPNG1      | 721  | 4 411 nt      | [13] |
|      | 动物 | <i>Solanum lycopersicum</i> （番茄）                   | PNGase      | 588  | 1 806 nt      | [14] |
|      |    | <i>Caenorhabditis elegans</i> （秀丽隐杆线虫）             | PNG-1       | 542  | 8 521 nt      | [17] |
|      |    | <i>Drosophila melanogaster</i> （黑腹果蝇）              | PNGase L    | 631  | 2 957 nt      | [18] |
|      |    | <i>Oryzias latipes</i> （青鳉鱼）                       | PNGase M    | 639  | 11 343 nt     | [19] |
|      |    | <i>Danio rerio</i> （斑马鱼）                           | PNGase      | 644  | 1 521 nt      | [21] |
|      |    | <i>Gallus gallus</i> （鸡）                           | PNGase      | 651  | 19 417 nt     | [22] |
|      |    | <i>Mus musculus</i> （小鼠）                           | Ngly1       | 651  | 62 613 nt     | [10] |
|      |    | <i>Pan troglodytes</i> （黑猩猩）                       | NGLY1       | 654  | 64 535 nt     | [23] |
|      |    | <i>Homo sapiens</i> （人）                            | NGLY1       | 654  | 71 096 nt     | [10] |

\**Flavobacterium meningosepticum*于2005年更名为*Elizabethkingia meningoseptica*。

2 PNGase的结构

不同物种PNGase是均具有去糖基化功能的同工酶, 其基因序列、酶结构等各有特点。

2.1 不同物种PNGase的同源性

PNGase在不同物种内虽然具有相似功能, 但其氨基酸长度和序列有较大差异。根据GeneBank数据库中已发表的PNGase相关氨基酸序列, 进行序列比对, 本文绘制了部分PNGase的进化树

(图1)。由图可知, 原核、真核生物PNGase有较大的遗传距离, 但在真核生物中有一定的保守性, 人与黑猩猩的PNGase同源性最近。

2.2 PNGase的结构

2.2.1 真核来源的PNGase

目前, 真菌、植物和动物来源的PNGase分子结构仅有部分得到解析。人NGLY1蛋白含有PUB、PNG Core、PAW 3个保守结构域<sup>[24]</sup> (图2a), 其中PUB区域的结构已被解析, 该结构域由5个 $\alpha$ 螺旋

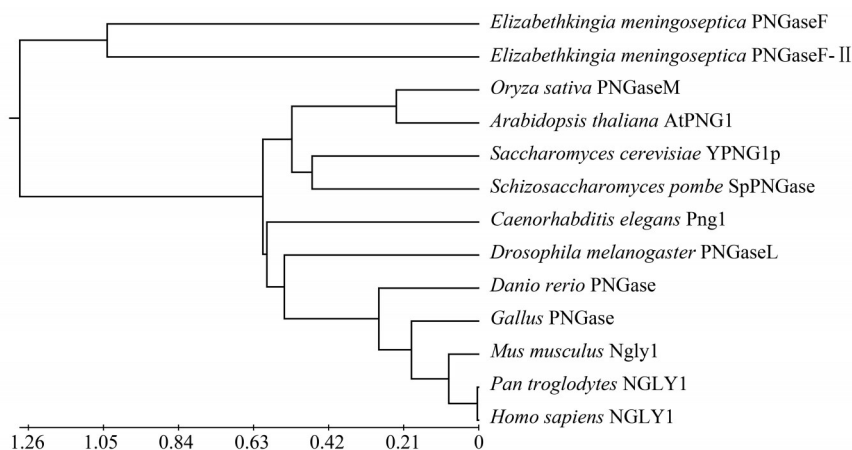


Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of PNGase

图1 部分PNGase的进化树分析

和3个反平行的 $\beta$ 折叠构成。PUB是蛋白质与蛋白质相互作用的区域；PNG Core是NGLY1催化N-糖蛋白去糖基化的区域；PAW参与NGLY1与寡糖结合<sup>[25]</sup>。通过AlphaFold2模拟了NGLY1蛋白的三级

结构（图2b），根据模拟结果，PUB结构域有一长臂状结构，可能与帮助蛋白质结合相关。酿酒酵母YPNG1分子结构已得到解析，分为两个结构域；小鼠Ngly1仅有PUB结构域得到解析。

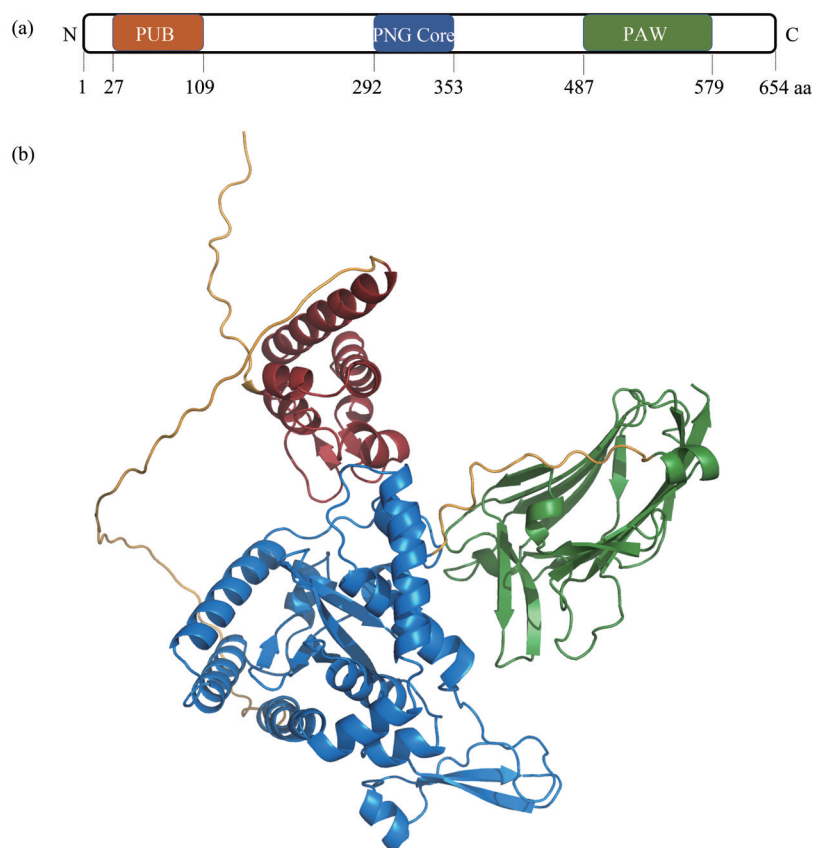


Fig. 2 Structure of human PNGase

图2 人PNGase的结构

(a) NGLY1的保守结构；(b) AlphaFold2预测的人NGLY1模拟三维结构图，红色代表PUB、蓝色代表PNG Core、绿色代表PAW。

### 2.2.2 原核来源的PNGase

PNGase F 的保守结构域包括 PNG-N 与 PNG-C (图3)。PNGase F 的活性中心, 是两个8字反向 $\beta$ 折叠形成的结构域, 底物在活性中心内与3个酸性氨基酸结合, 结合位点分别为 Asp60、Glu118 和 Glu206。Kuhn 等<sup>[26]</sup>认为 Asp60 位点起催化作用, Glu118 位点主要参与底物的识别与结合, Glu206 位点主要稳定底物分子与酶的结合。

PNGase F-II 的 N 端为 GLPGLi 结构、C 端为 PNG-N 和 PNG-C 结构域 (图3), 后两个结构域之间由 10 个氨基酸组成的  $\alpha$  螺旋连接。GLPGLi 结构域由 10 个  $\beta$  折叠和两个  $\alpha$  螺旋组成, 与 Glu82 和 Asp189 结合, 带正电荷。PNGase F-II 靠近 C 端的 PNG-N 和 PNG-C 与 PNGase F 的相似, 但 PNGase F-II 没有 Glu118 位点, 比 PNGase F 多了 3 个与底物识别相关的 loop 环<sup>[3]</sup>。

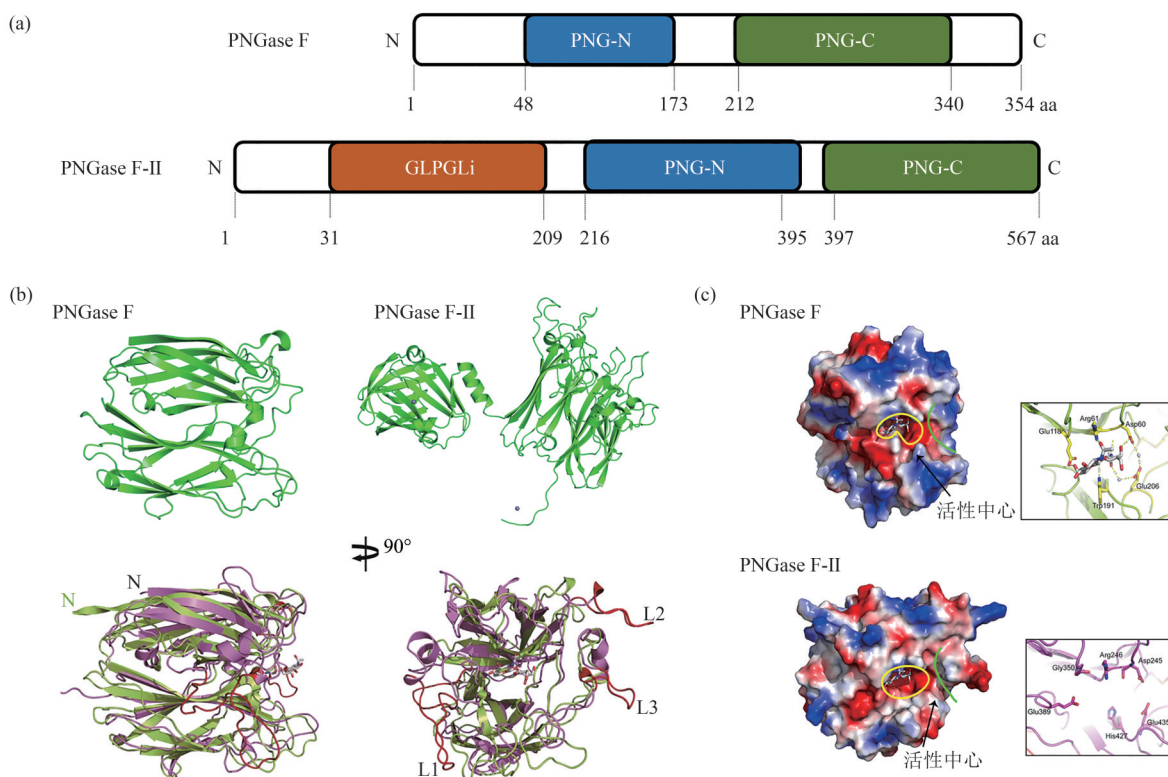


Fig. 3 Structure of prokaryotic PNGase<sup>[3]</sup>

图3 原核生物PNGase的结构<sup>[3]</sup>

(a) PNGase F 及 PNGase F-II 结构域; (b) PNGase F 及 PNGase F-II 的晶体结构 (上图)、C 端结构对比 (下图, 绿色 F, 紫色 F-II); (c) PNGase F 及 PNGase F-II 的电荷分布及活性中心。

## 3 PNGase 的功能研究

### 3.1 PNGase 的酶学功能研究

PNGase 能够裂解 N-连接糖肽或糖蛋白上天冬酰胺残基与 N-乙酰葡萄糖胺之间的酰胺键, 使天冬酰胺转化为天冬氨酸, 生成含有天冬氨酸的多肽并释放完整的 N-糖链<sup>[27-28]</sup>。根据糖蛋白糖链外层链结构的不同, 糖蛋白可分为高甘露糖型 (high-mannose, 含有多个  $\alpha$ -连接的甘露糖残基)、复杂型 (hybrid, 含有以岩藻糖、半乳糖和唾液糖

为组分的糖链残基) 与杂合型 (complex, 兼有高甘露糖型、复杂型特点)。PNGase 对复合型、杂合型、高甘露糖型糖链均可切除; 能水解的 N-糖蛋白或 N-糖肽的氨基酸序列为 Ser/Thr-X-Asn (Ser: 丝氨酸, Thr: 苏氨酸, X: 除脯氨酸以外的任何氨基酸)<sup>[1]</sup>。PNGase 的酶切位点示意图见图 4。

Suzuki 等<sup>[24]</sup>报道, 人 NGLY1 的主要作用底物为高甘露糖型 N-糖蛋白。原核来源的 PNGase F 具有广泛的底物特异性, 可以酶切 RNase B、Ova、IgG 等底物, 但不能切除带有  $\alpha$ -1,3-核心岩藻糖



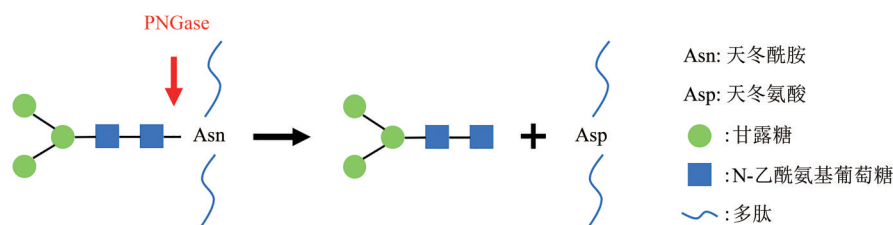


Fig. 4 Schematic diagram of the restriction site of PNGase

图4 PNGase的酶切位点示意图

N-糖蛋白上的寡糖链，例如辣根过氧化物酶 (HRP, 植物来源蛋白)<sup>[2]</sup>；而同为原核来源的 PNGase F-II，除了具有 PNGase F 的功能，可水解释放含有  $\alpha$ -1,3 核心岩藻糖 N-糖蛋白的完整糖链<sup>[3]</sup>。其余物种来源的 PNGase 具有相似的酶学功能。

### 3.2 PNGase的生物学功能研究

已有研究显示，PNGase 在真核生物中发挥一定的生物学功能，如器官发育、个体生长等<sup>[4, 29-30]</sup>。当人 NGLY1 缺陷时，会导致先天性去糖基化障碍<sup>[4, 6]</sup>。PNGase 在原核生物中的生物学功能尚未明确，本课题组前期实验发现，PNGase F 在炎症机体中可能促进细胞因子风暴，从而加重 EM 感染宿主的炎症反应<sup>[31]</sup>。

#### 3.2.1 PNGase与人类疾病

人体内蛋白质糖基化修饰作用缺陷，会导致疾病发生，如糖基化障碍 (congenital disorder of glycosylation, CDG)。N-糖基化缺陷是 CDG 糖基化缺陷类型之一，与 PNGase 缺陷相关<sup>[32]</sup>。由 NGLY1 缺陷引起的 NGLY1-CDDG，患者出现发育迟缓、智力缺陷、运动功能障碍等临床症状<sup>[4]</sup>。本课题组于 2020 年报道了 6 例中国 NGLY1-CDDG 患者，并对 NGLY1-CDDG 的临床及基础研究进行了综述<sup>[33-34]</sup>。

另外，Zolekar 等<sup>[6]</sup> 对人皮肤黑色素瘤细胞进行研究，发现黑色素瘤细胞相比正常黑色素细胞 NGLY1 高表达；体外敲除黑色素瘤细胞 NGLY1 基因，黑色素瘤细胞的生长受到抑制、死亡，提示 NGLY1 与黑色素瘤的高度相关性，抑制 NGLY1 可能作为新的黑色素瘤治疗策略。

#### 3.2.2 PNGase与鼠模型疾病

Fujihira 等<sup>[30]</sup> 敲除 C57BL/6 品系小鼠的 *Ngly1* 基因，观察发现 C57BL/6 *Ngly1*<sup>+/+</sup> 缺陷的雌雄小鼠配交后，*Ngly1*<sup>-/-</sup> 后代在胚胎发育过程出现心室间

隔缺损，个体在出生前胚胎全部死亡，但 C57BL/6 品系小鼠与 ICR 品系小鼠杂交，*Ngly1*<sup>-/-</sup> 小鼠胚胎部分死亡，*Ngly1*<sup>-/-</sup> 小鼠的致死表型可以通过敲除内切 N-糖苷酶基因 (Engase) 得到纠正。

Kong 等<sup>[35]</sup> 敲除小鼠胚胎成纤维细胞 MEFs 的 *Ngly1*，发现 *Ngly1*<sup>-/-</sup> MEFs 线粒体膜电位降低 50%，线粒体活性氧负荷上升 40%，线粒体呼吸链功能缺陷；回补 *Ngly1* 后，线粒体功能恢复正常。Asahina 等<sup>[5]</sup> 报道，*Ngly1* 缺陷鼠模型出现运动功能障碍，使用腺相关病毒 (AAV-9) 与人 NGLY1 cDNA 重组载体对小鼠进行单次脑室内注射，恢复大脑 (神经元) 和脊髓中的 NGLY1 表达，大脑神经元中 NGLY1 的酶活性增加，模型鼠的运动功能得到一定恢复。上述结果提示，小鼠体内 PNGase 缺陷可导致部分品系小鼠胚胎致死；PNGase 可能与维持线粒体功能和机体运动功能有关；补充 NGLY1 表达，可能对相关疾病有治疗意义。

#### 3.2.3 PNGase与酵母

PNGase 缺陷的酵母突变株，与野生型相比，突变株中错误折叠的突变糖蛋白的降解速率变慢，但 *png1* 基因的缺失未影响酵母细胞的生存和生长，与酵母生存无明显关联<sup>[17]</sup>。Hirsch 等<sup>[36]</sup> 报道，酵母 YPNG1 在体外也可以区分正确与非正确的糖蛋白。上述结果提示，YPNG1 可能与酵母细胞内糖蛋白质量控制有关。

#### 3.2.4 PNGase与线虫

秀丽隐杆线虫体内的 PNGase PNG-1 由 *png-1* 基因编码<sup>[17]</sup>。Habibi-Babadi 等<sup>[29]</sup> 研究发现，*png-1* 能够限制神经元和上皮细胞轴突分支，*png-1* 缺陷后其产卵器官发育过程中轴突分支增加，导致其产卵行为下降。Kong 等<sup>[35]</sup> 敲除秀丽线虫的 *png-1* 基因，发现 *png-1* 敲除个体寿命降低为野生型的 53%。上述结果提示，PNGase 可能参与维持线虫的生殖功能，并延长线虫个体寿命。

### 3.2.5 PNGase与果蝇

Galeone 等<sup>[37]</sup> 研究果蝇 PNGase 相关基因 *Pngl*, 发现其与果蝇骨骼形态生成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 信号通路有关, BMP 参与果蝇胚胎期消化道形成; 当 *Pngl* 缺陷, 果蝇发育迟缓且幼虫消化道畸形。Owings 等<sup>[38]</sup> 干扰果蝇 *Pngl* 表达, 发现 PNGase 缺陷个体生长发育迟缓, 在部分个体中有致死性; 热休克基因表达增加, 热冲击作用可延长缺陷个体的寿命, 对治疗有一定的参考意义。结果提示 PNGase 缺陷可能导致果蝇生长发育延迟、器官畸形。

## 4 展 望

糖组学是继基因组学、蛋白质组学之后的研究热点。糖基化和去糖基化是影响蛋白质结构功能的重要修饰, 研究此类修饰需要具有相关酶学功能的工具酶。PNGase 酶学功能的研究可以通过质谱、核磁共振波谱等技术开展。PNGase F 是目前应用最多的糖生物学分析工具酶, N-糖蛋白经 PNGase F 水解, 获得的寡糖链可通过质谱、毛细管电泳等技术分析鉴定糖链结构及丰度, 已在肿瘤、感染性疾病、自身免疫性疾病与糖基化研究中得到应用<sup>[39-41]</sup>。

PNGase 的酶学及生物学功能已有一定的研究, 但生物体内的生理病理机制还未明确。研究表明, 人 NGLY1 缺陷可引起罕见遗传性疾病 NGLY1-CDDG, 临床表现为发育迟缓、智力缺陷、运动障碍等<sup>[4]</sup>, 该疾病目前无有效的治疗方法。AAV9-NGLY1 cDNA 重组载体, 能补充 Ngly1 缺陷小鼠神经元细胞的 NGLY1, 使模型小鼠的运动功能障碍恢复<sup>[5]</sup>, 结果提示 NGLY1 可能为 NGLY1-CDDG 患者治疗的潜在药物靶点, 提高 NGLY1 蛋白表达水平或其酶活性, 可能有助于减轻患者症状, 针对 NGLY1 筛选酶激活剂是该类疾病药物的研发目标。NGLY1 在黑色素瘤细胞中高表达, 降低 NGLY1 表达水平能抑制黑色素瘤细胞生长<sup>[6]</sup>, 为 NGLY1 酶抑制剂相关药物的研发提供新的思路。另外, NGLY1-CDDG 患者成纤维细胞存在线粒体功能损伤, 影响能量产生, 回补 NGLY1 表达恢复线粒体功能, NGLY1 或能应用于线粒体相关药物的研发。

孙桂芹等<sup>[3]</sup> 发现的 PNGase F-II 能水解植物、昆虫来源带有  $\alpha$ -1,3 核心岩藻糖的蛋白质寡糖, 而植物<sup>[42]</sup>、昆虫<sup>[43]</sup> 来源的  $\alpha$ -1,3 核心岩藻糖结构参与人 IgE 识别花粉、蜂毒等过敏原。李天胜等<sup>[44]</sup>

用核心岩藻糖苷酶 (cFase I) 处理过敏原, 发现过敏病人的血清对处理后过敏原的反应下降。因此, 糖苷酶在过敏原的基础与应用研究与中药糖生物学研究等领域有潜在的应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Gosain A, Srivastava A, Saran S. Peptide:N-glycanase is expressed in prestalk cells and plays a role in the differentiation of prespore cells during development of dictyostelium discoideum. *Indian J Exp Biol*, 2014, **52**(3): 197-206
- [2] Tretter V, Altmann F, Marz L. Peptide-n4-(n-acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1-3 to the asparagine-linked n-acetylglucosamine residue. *Eur J Biochem*, 1991, **199**(3): 647-652
- [3] Sun G, Yu X, Bao C, et al. Identification and characterization of a novel prokaryotic peptide: N-glycosidase from *Elizabethkingia meningoseptica*. *J Biol Chem*, 2015, **290**(12): 7452-7462
- [4] Lam C, Wolfe L, Need A, et al. Ngly1-related congenital disorder of deglycosylation//Adam M P, Mirzaa G M, Pagon R A, et al. *GeneReviews*®[Internet]. Seattle (WA):University of Washington, Seattle, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK4815541>
- [5] Asahina M, Fujinawa R, Hirayama H, et al. Reversibility of motor dysfunction in the rat model of Ngly1 deficiency. *Mol Brain*, 2021, **14**(1): 91
- [6] Zolekar A, Lin V J T, Mishra N M, et al. Stress and interferon signalling-mediated apoptosis contributes to pleiotropic anticancer responses induced by targeting ngly1. *Br J Cancer*, 2018, **119**(12): 1538-1551
- [7] Ftouhi-Paquin N, Hauer C R, Stack R F, et al. Molecular cloning, primary structure, and properties of a new glycoamidase from the fungus *aspergillus tubigenensis*. *J Biol Chem*, 1997, **272**(36): 22960-22965
- [8] Kato T, Kitamura K, Maeda M, et al. Free oligosaccharides in the cytosol of *caenorhabditis elegans* are generated through endoplasmic reticulum-golgi trafficking. *J Biol Chem*, 2007, **282**(30): 22080-22088
- [9] Takahashi N. Demonstration of a new amidase acting on glycopeptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, **76**(4): 1194-1201
- [10] Suzuki T, Seko A, Kitajima K, et al. Identification of peptide: N-glycanase activity in mammalian-derived cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **194**(3): 1124-1130
- [11] Kimura Y, Ohno A. A new peptide-n4-(acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase from soybean (*Glycine max*) seeds: purification and substrate specificity. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, **62**(2): 412-418
- [12] Chang T, Kuo M C, Khoo K H, et al. Developmentally regulated expression of a peptide: N-glycanase during germination of rice seeds (*Oryza sativa*) and its purification and characterization. *J Biol Chem*, 2000, **275**(1): 129-134
- [13] Diepold A, Li G, Lennarz W J, et al. The arabidopsis atpng1 gene encodes a peptide: N-glycanase. *Plant J*, 2007, **52**(1): 94-104
- [14] Hossain M A, Nakano R, Nakamura K, et al. Molecular

- identification and characterization of an acidic peptide: N-glycanase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. J Biochem, 2010, **147**(2): 157-165
- [15] Suzuki T, Park H, Kitajima K, *et al.* Peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide: N-glycanase activity. J Biol Chem, 1998, **273**(34): 21526-21530
- [16] Xin F, Wang S, Song L, *et al.* Molecular identification and characterization of peptide: N-glycanase from schizosaccharomyces pombe. Biochem Biophys Res Commun, 2008, **368**(4): 907-912
- [17] Suzuki T, Park H, Hollingsworth N M, *et al.* Png1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide: N-glycanase. J Cell Biol, 2000, **149**(5): 1039-1052
- [18] Funakoshi Y, Negishi Y, Gergen J P, *et al.* Evidence for an essential deglycosylation-independent activity of pngase in *Drosophila melanogaster*. PLoS One, 2010, **5**(5): e10545
- [19] Seko A, Kitajima K, Inoue Y, *et al.* Peptide: n-glycosidase activity found in the early embryos of *Oryzias latipes* (medaka fish). The first demonstration of the occurrence of peptide: N-glycosidase in animal cells and its implication for the presence of a de-N-glycosylation system in living organisms. J Biol Chem, 1991, **266**(33): 22110-22114
- [20] Plummer T H, Jr., Elder J H, Alexander S, *et al.* Demonstration of peptide: N-glycosidase f activity in endo-beta-N-acetylglucosaminidase F preparations. J Biol Chem, 1984, **259**(17): 10700-10704
- [21] Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H, *et al.* Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99**(26): 16899-16903
- [22] Caldwell R B, Kierzek A M, Arakawa H, *et al.* Full-length cdnas from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis. Genome Biol, 2005, **6**(1): R6
- [23] Maudhoo M D, Madison J D, Norgren R B Jr. *De novo* assembly of the chimpanzee transcriptome from nextgen mRNA sequences. Gigascience, 2015, **4**: 18
- [24] Suzuki T, Huang C C, Fujihira H. The cytoplasmic peptide: N-glycanase (NGLY1) - structure, expression and cellular functions. Gene, 2016, **577**(1): 1-7
- [25] Suzuki T. The cytoplasmic peptide: N-glycanase (NGLY1)-basic science encounters a human genetic disorder. J Biochem, 2015, **157**(1): 23-34
- [26] Kuhn P, Guan C, Cui T, *et al.* Active site and oligosaccharide recognition residues of peptide-n4-(n-acetyl-beta-d-glucosaminyl)asparagine amidase F. J Biol Chem, 1995, **270**(49): 29493-29497
- [27] Hirayama H, Hosomi A, Suzuki T. Physiological and molecular functions of the cytosolic peptide: N-glycanase. Semin Cell Dev Biol, 2015, **41**: 110-120
- [28] Suzuki T. A simple, sensitive *in vitro* assay for cytoplasmic deglycosylation by peptide: N-glycanase. Methods, 2005, **35**(4): 360-365
- [29] Habibi-Babadi N, Su A, de Carvalho C E, *et al.* The N-glycanase png-1 acts to limit axon branching during organ formation in *Caenorhabditis elegans*. J Neurosci, 2010, **30**(5): 1766-1776
- [30] Fujihira H, Masahara N Y, Tamura M, *et al.* Lethality of mice bearing a knockout of the *Ngly1*-gene is partially rescued by the additional deletion of the engase gene. PLoS Genet, 2017, **13**(4): e1006696
- [31] 孙桂芹. 脑膜炎败血伊丽莎白金菌全基因组测序及其N-糖苷酶基因的功能学研究[D]. 上海:复旦大学基础医学院, 2014
- Sun G Q. Whole Genome Sequencing and Function Analysis of N-glycanase Genes of *Elizabethkingia meningoseptica*[D]. Shanghai: School of Basic Medical Sciences, Fudan University, 2014
- [32] Francisco R, Marques-Da-Silva D, Brasil S, *et al.* The challenge of cdg diagnosis. Mol Genet Metab, 2019, **126**(1): 1-5
- [33] Abuduxikuer K, Zou L, Wang L, *et al.* Novel NGLY 1 gene variants in Chinese children with global developmental delay, microcephaly, hypotonia, hypertransaminasemia, alacrimia, and feeding difficulty. J Hum Genet, 2020, **65**(4): 387-396
- [34] 袁舒颖, 邹琳, 库尔班江·阿布都西库尔, 等. 罕见病 NGLY 1 型先天性去糖基化障碍 CDDG 的临床和基础研究进展. 浙江临床医学, 2020, **22**(12): 1845-1848
- Yuan S Y, Zou L, Abuduxikuer K, *et al.* Zhejiang Clinical Medical Journal, 2020, **22**(12): 1845-1848
- [35] Kong J, Peng M, Ostrovsky J, *et al.* Mitochondrial function requires NGLY 1. Mitochondrion, 2018, **38**: 6-16
- [36] Hirsch C, Misaghi S, Blom D, *et al.* Yeast n-glycanase distinguishes between native and non-native glycoproteins. EMBO Rep, 2004, **5**(2): 201-206
- [37] Galeone A, Han S Y, Huang C, *et al.* Tissue-specific regulation of bmp signaling by drosophila N-glycanase 1. Elife, 2017, **6**: e27612
- [38] Owings K G, Lowry J B, Bi Y, *et al.* Transcriptome and functional analysis in a drosophila model of ngly1 deficiency provides insight into therapeutic approaches. Hum Mol Genet, 2018, **27**(6): 1055-1066
- [39] Gu Y, Han J, Liu X, *et al.* Dynamic alterations in serum IgG n-glycan profiles in the development of colitis-associated colon cancer in mouse model. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2020, **1864**(10): 129668
- [40] Schwedler C, Blanchard V. Measurement of neutral and sialylated IgG N-glycome at Asn-297 by CE-LIF to assess hypogalactosylation in rheumatoid arthritis. Methods Mol Biol, 2019, **1972**: 77-93
- [41] Connelly M A, Gruppen E G, Wolak-Dinsmore J, *et al.* Glyca, a marker of acute phase glycoproteins, and the risk of incident type 2 diabetes mellitus: prevend study. Clin Chim Acta, 2016, **452**: 10-17
- [42] van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, *et al.* Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in ige binding to plant glycoallergens. J Biol Chem, 2000, **275**(15): 11451-11458
- [43] Seismann H, Blank S, Braren I, *et al.* Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. Mol Immunol, 2010, **47**(4): 799-808
- [44] Li T, DiLillo D J, Bournazos S, *et al.* Modulating IgG effector function by fc glycan engineering. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, **114**(13): 3485-3490

## Research Progress of The Peptide : N-Glycanase (PNGase)\*

CHEN Yan-Wen<sup>1)</sup>, YUAN Shu-Ying<sup>1)</sup>, LIU Rui-Jie<sup>1)</sup>, ZHANG Shao-Xing<sup>1)</sup>, ZOU Lin<sup>2)</sup>,  
LU Xin-Rong<sup>2)</sup>, KONG Wei-Li<sup>2)</sup>, CHEN Li<sup>2)\*\*</sup>, SUN Gui-Qin<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>*School of Medical Technology and Information Engineering, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;*

<sup>2)</sup>*Department of Medical Microbiology and Parasitology, Key Laboratory of Medical Molecular Virology of Ministry of Education and National Health Committee, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)*

**Abstract** Peptide : N-glycanase (PNGase) is a deglycosylation enzyme widely presented in fungi, plants, mammals and other eukaryotics. Only two bacterial PNGase have being isolated (PNGase F and PNGase F-II) thusfar, and both are used widely as research tools in glycomics. PNGase catalyzed the hydrolysis of the amide bond between N-acetylglucosamine and an Asn residue on an N-glycoprotein, generating a de-N-glycosylated protein and a complete N-oligosaccharide. After the reaction, the N-glycosylated Asn residue was converted to Asp. Although it is known that PNGase participates in protein degradation, organ development, individual growth and other key biological processes in organisms, its impacts on health was illustrated only recently. Human PNGase (NGLY1) deficiency could lead to a genetic disease named congenital disorder of deglycosylation-NGLY1. A nematode PNGase deficiency could reduce its life span. Its defects in mice could be embryonic lethal. This article describes the distribution, protein structure, and biological function of PNGase in different species. It can serve as an important information resource to support basic research for PNGase mechanism and innovative study for PNGase applications.

**Key words** peptide:N-glycanase, distribution, protein structure, enzymatic function, biological function

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0349

---

\* This work was supported by grants from Natural Science Foundation of Zhejiang Province(LY20C050002), Professional Development Project of Visiting Scholars in Universities of Zhejiang Education Department(FX2020021), and Zhejiang Chinese Medical University Science Foundation (2020ZG25).

\*\* Corresponding author.

SUN Gui-Qin. Tel: 86-13868118601, E-mail: sunguiqin2001@163.com

CHEN Li. Tel: 86-15821138980, E-mail: lichen\_bk@fudan.edu.cn

Received: November 17, 2021 Accepted: January 12, 2022