

伊藤細胞制御化学研究室 Synthetic Cellular Chemistry Laboratory

主任研究員 伊藤 幸成
ITO, Yukishige

糖タンパク質, 糖脂質, プロテオグリカン等の複合糖質は構成成分として糖が連なった糖鎖と呼ばれる部分を有している。糖鎖は細胞間の認識, 分化やがん化等の細胞レベルでの生命現象と密接に関連していることが知られている。また, タンパク質の活性制御, 安定化, フォールディング, 輸送, 分解過程においても重要な役割を担っていることも明確になりつつある。複雑で多様に富んだ糖鎖の構築は有機合成化学の見地から興味深い課題であるのみならず生物学との境界領域の研究対象としても注目されている。これらの背景をもとに複合糖質特に糖タンパク質関連分子の精密合成, それに関連する分子プローブの創製に有効な新規反応や合成戦略, を主要テーマとして研究を行っている。

1. 新たな合成手法の開発と複合糖質関連分子プローブの創製 (伊藤, 眞鍋, 石渡, 高橋, 森^{*1}, 高野^{*1})

糖鎖の分子機能を解明する上で種々の分子プローブを創製することは極めて有用である。当研究室では多種多様な糖鎖を自在に合成するための手法の開発を目指して多面的な研究を行っている。また, それらの手法を活用し, 糖鎖の生物機能解明に有用な分子プローブの創製を試みている。今年度は以下の検討を行った。

糖鎖の合成においては糖残基を結ぶグリコシド結合形成反応 (グリコシル化反応) が鍵となる。グルコシル化反応には多種多様な反応条件 (溶媒, 温度, 試薬等) の選択肢がある。その中から高い選択性と収率の両方を満たす最適なものを見出すのは多大な労力と時間を要する作業である。この問題点を解決する手法として, 我々は重水素置換した保護基を持つ基質を用いることにより, 多数の反応を小スケールでパラレルに行ない, 迅速に結果を評価する系の開発を行っている。具体的には重水素ラベルしたベンジル基で保護した糖供与体と糖受容体を用いてグリコシル化を行った。これにより立体異性体の比率が NMRを用いて容易に算出できるのみならず, ノンラベル体との混合物のMALDI-TOF MSを測定することによって収率, 原料の回収を定量することができる。本手法はミクロスケールの反応やパラレル反応に応用可能である。本年度はこの手法を活用して, クロロホルムとエーテル系の混合溶媒中で1,2-シス選択性が向上することを見いだした。さらに, 高マンノース型糖鎖に存在する3連続の1,2-シスグリコシドを高い選択性で構築することによりこの手法の有用性を証明した。また, 我々が独自に開発した分子内アグリコン転移反応が広い範囲の1,2-シスグリコシド結合に適用できることを示した。

2. 複合糖質の生物機能解明と新規生物活性物質の創製をめざす合成研究 (伊藤, 石渡, 眞鍋, 高橋, 辻本^{*4}, 久保田^{*1}, Greimel^{*1}, Amin^{*1}, Lee^{*1})

ユニークな糖タンパク質構造として興味を持たれるC-マンノシルトリプトファン (C-Man-Trp, CMW) は, 機能未知のタンパク質翻訳後修飾である。我々は既に本構造の初の立体選択的全合成とこれを含む糖ペプチドの合成を達成している。それに引き続き今年度はCMWを含むタンパク質の部分構造を種々合成した。更に外部との共同研究により, その生物活性や疾病との関連を明らかにすべく検討を行なっている。

タンパク質への糖鎖付加は真核生物に限定された現象と考えられて来たが, 近年の研究によりある種のグラム陰性菌 (*C. jejuni*) がアスパラギン結合型糖鎖を持つことが見出され, 感染や糖タンパク質生合成系の進化の両面で興味を集めている。その構造は, bacillosamine (Bac)をタンパク質結合部位に有し, N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) のくり返し構造とグルコースによる枝分かれから構成されている (Glc₁GalNAc₅Bac₁)。また, *C. jejuni* の糖転移酵素を用いたタンパク質への糖鎖付加は新しいタイプの糖タンパク質発現系として期待されている。昨年度までにその基本骨格を立体選択的に構築する手法を確立したが, 今年度はGlc₁GalNAc₅Bac₁全構造の合成を達成した。これと平行して, バクテリア由来のO-結合型糖タンパク質構造である pseudaminic acid (Pse)の合成研究を行っている。昨年度その合成を完了したが選択性に問題が残されている。今後の展開をふまえてより効率の良い合成経路をデザインし, その検討を行った。

昨年度, 2,3-位を環状オキサゾリジノン基で保護したアミノ糖供与体を用いる, 選択的グリコシル化反応を開発した。本手法は, 2-アジド糖を用いる従来法に較べて, 種々の点で優位性を持つ事が証明されている。本年度は, 本反応を鍵として, 胃粘膜に存在し抗ピロリ菌活性を持つと考えられている特殊な構造をもつムチン型糖鎖の合成を達成した。本化合物は消化器官潰瘍や腫瘍の予防に有効な医薬のリードとして注目される。

平林らによって見出された新奇なリン酸化糖脂質 (PtdGlc) の合成を行なった。この糖脂質は細胞膜ラフトへの局在が提唱され, 中枢神経系の分化への関与が示唆されている。これまでにPtdGlcの合成を完成させ, 平林らによって報告された構造の標準サンプルを提供している。昨年度に引き続き種々の誘導体を合成しその活性について脳科学研究センターと共同で研究を行っている。

NKT細胞活性化能を持ち, 免疫制御物質として医薬への応用が期待されている β -ガラクトシルセラミド (β -GalCer) アナログの合成研究を行った。昨年度までに, 容易に入手可能なD-ガラクトースと酒石酸 (又はD-グルコース) から共通中間体を合成し, これを多様な化合物へと変換する基本的なルートを確立した。これにもとづき種々の β -GalCerアナログを合成し, それらによるTh1型およびTh2型免疫応答活性化を横浜研究所と共同で系統的に調べて来た。それに加え, 天然物由来の β -GalCer関連糖脂質の合成研究を行い, Longiside, Damicosideの合成を達成した。現在細部の改良を行っている。

3. 合成化学的手法による糖タンパク質プロセッシングと品質管理機構の解明 (伊藤, 松尾, 高橋, 戸谷^{*2}, 渡邊^{*2}, 高谷^{*2}, 宮川^{*1}, 武田^{*1}, 宮崎^{*3})

タンパク質は高次構造の獲得や翻訳後（時）修飾を伴って初めて正しい機能を発現する。種々の翻訳後（時）修飾の中で糖鎖の付加はタンパク質の構造に大きな影響を与えるものとして特に重要である。実際、真核生物の生体内反応を司る酵素、ホルモン、サイトカイン等のタンパク質の多くは糖鎖を含む糖タンパク質である。それらの輸送、活性調節、立体構造の制御において糖鎖が重要な役割を果たしていることが知られている。従って、タンパク質の生物機能を解明する上で糖鎖の関与を理解することは極めて重要である。しかし、これらの現象を解明する上で、分子生物学的手法に依存する研究手法には限界がある。糖タンパク質の役割について明確な理解を得るためには、糖鎖の構造と機能を関連づける必要がある。そのためには構造の決まった糖鎖が必要となるが、生物試料から得られる糖タンパク質はミクロ不均一性に起因する構造の曖昧さを含んでいる。また、タンパク質、核酸は多くの場合遺伝子工学的的手法により比較的容易に得られるのに対し、糖鎖は遺伝情報の直接の産物ではないためそのような手法の適用外にある。それに対し化学合成の手法を用いると任意の構造を持つ糖鎖、あるいは糖タンパク質部分構造（機能性ドメイン）を作り出すことが可能になる。糖タンパク質の多様な機能の中で我々が近年着目しているものに、タンパク質品質管理機構（Quality Control）への関与がある。この過程には細胞内の様々な糖鎖認識タンパク質が係わっていることが近年の研究により明らかにされている。

タンパク質が小胞体（ER）内で修飾を受ける過程で付加される糖鎖は、末端に3個のグルコース残基を持つ高マンノース型14糖（ $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, G3M9）としてタンパク質のアスパラギン側鎖に導入される。その後グルコシダーゼ I 及び II によって12糖（ $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, G1M9）及び11糖（ $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, M9）へと変換される。その中間に生じるモノグルコシル化糖鎖G1M9は、小胞体内に存在する糖鎖認識分子シャペロンであるカルネキシン（CNX）やカルレティキュリン（CRT）のリガンドとしてこれらに結合すると考えられている。CNXやCRTはフォールディングセンサとして働くグルコース転移酵素（UGGT）およびグルコシダーゼ II とともに「カルネキシンサイクル」とよばれるサイクルを形成し、これが糖タンパク質品質管理機構の重要部分である。更に1）不良タンパク質を分解過程へと導くマンノシダーゼ様レクチン（MLP）が存在すること、2）糖鎖を認識するカーゴレセプターとよばれるタンパク質（VIP36, ERGIC-53）が小胞体-ゴルジ体間の輸送に係わっていること、3）細胞質におけるプロテアソームでのタンパク質の分解における重要なステップのユビキチン化を触媒するユビキチンリガーゼの中でアスパラギン結合型糖鎖を認識するもの（Fbs1）が存在している、等の興味ある現象が報告されている。

これは、真核生物の細胞活動において極めて重要な部分を担うものであり、活発な研究が展開されている。我々はこれまで培って来た糖鎖合成化学の研究を活用しその解明に取り組んでいる。これまでに分子シャペロンCNX, CRTのリガンド糖鎖と想定される G1M9 やその部分構造の合成とNMR及び等温滴定型力熱量計（ITC）によるCRTとの相互作用解析を行ってきた。また、G1M9の小胞体内トリミングによって生ずる一連の糖鎖 [$\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (M9), $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (M8), $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (G1M8)] の合成を完成させた。更に小胞体型糖鎖の種々の誘導体を合成し、CRT および前述のユビキチンリガーゼ(Fbs1)と糖鎖の相互作用の詳細解析を行った。更に、小胞体内糖鎖のなかで最も複雑な14糖（G3M9）の合成を完了している。

合成糖鎖を組み込んだ人工糖タンパク質を創製するために種々の試みも併せて行なっている。その一つとしてジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）とそのリガンド（MTX）の強力な結合を利用して合成糖鎖をDHFRに導入する手法を開発している。ところで、前述のUGGTはミスフォールドしたタンパク質に結合した糖鎖（M9, M8等）のみを基質としグルコースを付加するというユニークな特異性を持っている。我々は、M9-MTXがUGGTの良好な基質になることを見出した。これは糖タンパク質に由来しない小分子が基質として認識された初の例である。更に種々の糖鎖-MTX 複合体を合成し、それらを用いる反応生成物の構造確認、UGGTの特異性解析を行った。これにより、UGGTの糖鎖特異性を定量的に見積もることが初めて可能になった。また、カルネキシンサイクルを構成する重要な酵素であるグルコシダーゼ II の定量的解析にも成功している。

今年度は、種々の高マンノース型糖鎖やその部分構造・類縁体を用い、CRTの糖鎖認識について解析を行った。フッ素置換誘導体などを用いる相互作用解析やSTD-NMRによる解析の結果、CRTが認識する部位を同定することができた。また、糖タンパク質の小胞体関連分解に係るPNGaseの糖鎖特異性を解明した。更に、細胞内環境を模倣したMacromolecular Crowding環境下で、グルコシダーゼ II の2段階目の反応が劇的に加速されることを見いだした。

*1協力研究員, *2訪問研究員, *3研修生, *4横浜研究所研究員

This laboratory is working on the interface of synthetic chemistry and glycobiology. Glycoconjugates are involved in a variety of biological events such as cell-cell recognition, malignant transformation, cell differentiation, and signal transduction. In fact, a majority of proteins produced in eukaryotic cells are glycoproteins. Although syntheses of these classes of molecules are significant challenge, they are expected to provide useful molecular probes to clarify the biological functions of glycoconjugates. Our current research activities are directed to 1) development of novel synthetic methodologies and their application to glycoconjugate related molecular probes, 2) synthesis studies toward delineating biological functions of glycoconjugates and discovery of novel bioactive compounds, and 3) synthetic approaches to glycoprotein processing and protein quality control.

1. Development of novel synthetic methods

Investigations toward the development of efficient methodologies in oligosaccharide synthesis were conducted in terms of various contexts.

In multistep oligosaccharide synthesis, optimization of reaction conditions is particularly cumbersome. We developed a novel system for rapid screening of glycosylation reactions, which provide desired stereoisomer in highest yield and selectivity. As an application of this methodology, synthesis of tetrasaccharide that consists of four consecutive 1,2-cis glycosidic linkages was conducted. In addition, an improved version of intramolecular aglycon delivery was developed, which was proven versatile to provide various types of 1,2-cis glycosides.

2. Synthesis of glycoconjugate structural motifs with biological interests

C-Mannosyl tryptophan (CMW) is a highly unique type of protein glycosylation. However its biological role is yet to be clarified. We have established a synthetic route to CMW and peptides containing this structure. In collaboration with Dr. Ihara (Wakayama Medical University), research toward clarifying its biological functions is actively conducted.

In contrary to previous belief, presence of glycoproteins from prokaryotic cells has been revealed. Of particular interest is Asn-linked glycan discovered from *C. jejuni*. It consists of bacillosamine (Bac), repeating α -GalNAc and β -Glc. We established a strategy to construct α -GalNAc repeat by using 4-*O*-pentafluoropropionyl (PFP)-protected GalN₃ derivative as a donor. This year, we completed the synthesis of its full structure. In addition, synthesis of pseudaminic acid (Pse), a component of *O*-linked glycoprotein of *C. jejuni* was studied.

As a continuous effort to reveal its activities, the synthesis of phosphatidyl glucoside (PtdGlc) and its lyso derivative, as well as functionalized analogues, was conducted, various analogues and probed derivatives of PtdGlc were synthesized to clarify its biological functions.

α -Galactosyl ceramide (α -GalCer) is known to activate NKT cells to stimulate Th1 and Th2-type immune responses. As extension of the last year's achievements, systematic synthesis of α -GalCer derivatives was conducted. In addition, synthesis of natural products having α -GalCer-like structures was conducted.

A novel method for α -stereoselective glycosylation of 2-amino sugars was developed in this group was applied to the synthesis of mucin-type glycan, which has been proposed to have an anti *Helicobacter pylori* activity, was achieved. It employs 2,3-oxazolidinone masked glycosyl donors.

3. Glycoprotein processing and quality control

Glycosylation is the most widespread and prominent among various types of post- or co-translational protein modifications. In fact, a majority of eukaryotic proteins are glycosylated. Therefore, precise analysis of the functions of glycan chains is essential for understanding the biological properties of proteins. In recent years, functional roles of asparagine (Asn)-linked glycan chains in glycoprotein quality control are attracting attention. In particular, high-mannose type glycan chains are proposed to play major roles in this process, being recognized by a variety of intracellular proteins. For instance, endoplasmic reticulum (ER) residing molecular chaperons calnexin (CNX) and calreticulin (CRT) are suggested to recognize mainly the oligosaccharide portion (Glc₁Man₉GlcNAc₂) of glycoproteins and assist their folding in collaboration with protein disulfide isomerase ERp53. Subsequently, terminal glucose (Glc) is removed by glucosidase II and glycoproteins carrying undecasaccharide (Man₉GlcNAc₂) are transported to Golgi for further processing. Other major players in glycoprotein quality control are glucosyl transferase (UGGT), mannosidase-like lectin (EDEM) and cargo receptors (VIP36, ERGIC-53) and ubiquitin ligase (Fbs1). All of these proteins likely recognize precisely different oligosaccharide structures, although molecular basis of these phenomena is unclear.

Our research has been directed to systematic synthesis of high-mannose-type glycans, involved in the above process. This year, we completed the first chemical synthesis of triglycosylated tetradecasaccharide (Glc₁Man₉GlcNAc₂), the most complex among this class of glycans. We also conducted quantitative analysis of the interaction between various glycans and Fbs1, revealing that this protein mainly recognizes the core pentasaccharide of Asn-linked glycans.

This year, we clarified glycan binding specificity and binding mode of CRT using synthetic oligosaccharides. In addition, analysis of PNGase, which plays important roles if glycoprotein degradation was conducted using modified oligosaccharides and glycopeptides.

Furthermore, analysis of glycan processing enzymes under macromolecular conditions that mimic intracellular environment was conducted. This study revealed that the second cleavage of glucosidase II was specifically accelerated, implying the importance of conducting biochemical assays in pseudocellular environments, instead of dilute buffer conditions.

Staff

Head

Dr. Yukishige ITO

Members

Dr. Shino MANABE

Dr. Akihiro ISHIWATA

Dr. Ichiro MATSUO

Dr. Akemi KUBOTA *¹

Dr. Tomonori MORI *¹

Dr. Peter GREIMEL *¹

Dr. Yong Joo LEE *¹

Dr. Atsushi MIYAGAWA *¹

Dr. Yoichi TAKEDA *¹

Dr. Yutaka TAKANO *¹

Dr. Mohammed Nurul AMIN *¹

*¹ Contract Researcher

Visiting Members

Dr. Kiichiro TOTANI (Jpn. Sci. Tech. Agency)

Ms. Maki TAKATANI (Jpn. Sci. Tech. Agency)

Dr. Taisuke WATANABE (Jpn. Sci. Tech. Agency)

Dr. Takashi TSUJIMOTO (Yokohama Inst.)

Trainees

Ms. Ayako MIYAZAKI (Fac. Sci. & Eng., Saitama Univ.)