

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

主任研究員 伊藤幸成 (薬博)  
ITO Yukishige (Dr. Pharm.)



キーセンテンス：

1. 複合糖質合成手法を開発する
2. 棟タンパク質の生物機能を解析する
3. 新規生物活性物質を創製する

キーワード：

複合糖質、グリコシル化反応、選択的合成、糖タンパク質、小胞体、プロセッシング、品質管理機構

研究目的

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。複雑で多様性に富んだ糖鎖の構築は生物学との境界領域の研究対象としても注目されており、有機合成化学の見地から興味深い課題である。これらの背景をもとに複合糖質特に糖タンパク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, 中川, 高橋, Lee, 櫻井, Liu)

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。我々が本年度は我々が独自に開発した分子内アグリコン転移反応の更なる改良を行った。その結果、本手法をきわめて一般性の高いものにすることに成功した。特にもっとも構築が困難なラムノースの  $\alpha$ -グリコシドに適用できることを見出したことは他に類を見ない成果である。

昨年度までに 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、 $\alpha$ -選択的グリコシル化反応を開発し、本反応を鍵とした抗ピロリ菌活性ムチン型糖鎖の合成を達成した。今年度その立体選択性発現の機構解明をめざし、電解条件下で活性種を検出する実験を行った。また、2,3-オキサゾリジノン化した糖が容易にエピメリ化を行うことを発見した。

我々は凍結条件下でグリコシル化反応が加速されることを見出している。その一般性を検証する実験を行っているが、本年度は種々の補助溶媒の効果をしらべた。

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, 中川, 高橋, 辻本, Greimel, Amin, Lee)

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 ( $\text{Glc}_1\text{GalNAc}_5\text{Bac}_1$ )。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。昨年度までの研究によりその糖鎖全構造の合成を達成した。今年度は *C. jejuni* 糖転移酵素を用いた糖タンパク質生産の可能性を探るため、オリゴ糖供与体基質の合成研究を行った。

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。今年度も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た。安定性に優れたカルバ糖誘導体の合成に新たに取り組み、初期的な成功をおさめた。

### 3. 合成化学的手法による糖タンパク質プロセッシングの解明 (伊藤, 高橋, 渡邊, 宮川, 武田)

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 (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, 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 (Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, G1M9) 及び11糖 (Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, 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) やカルレチキュリン (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。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。

本年度はその過程で重要な役割を果たすグルコース転移酵素 (UGGT) およびグルコシダーゼII (G-II) に焦点を当てた実験を行った。その結果、UGGTの高感度基質となる蛍光ラベル化糖鎖を開発し、本酵素の基質認識機構に新たな視点を与える結果を得た。また、G-IIが最終生成物によって阻害されること、特にMan<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (M7) が強い阻害活性をもつことを見出した。本酵素は および サブユニットからなるヘテロ2量体であるが、麹菌の遺伝子破壊株を用いた実験により、サブユニットが糖タンパク質のプロセッシングに必須であることを証明した。

-----  
**Key Sentence :**

1. Develop methodologies to synthesize glycoconjugates.
2. Analyze functions of glycoproteins.
3. Create novel bioactive molecules.

**Key Words :** glycoconjugates, selective reactions, glycoproteins, the endoplasmic reticulum, processing, quality control

#### **Purpose of Research**

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** ( Ito, Manabe, Isiwata, Nakagawa, Lee, Takahashi, Sakurai, Liu )

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

Our research explored the generality of intramolecular aglycon delivery toward synthesis of various 1,2-cis glycosides. This method was optimized to proven to be suitable for the synthesis of  $\beta$ -rhamnoside, most difficult glycosidic linkage to construct selectively.

Previous investigation conducted in this group revealed that 2,3-Oxazolidinone delivatized glycosyl donors are suitable for 1,2-cis glycosides of 2-amino sugars. To clarify the origin of this selectivity, our research adopted several approaches including electrochemical generation of active species and monitoring interconversion of stereoisomers.

We also investigated the rate accelerating effect of frozen conditions, putting particular focus on the effects of various additives.

## 2 . Synthesis of glycoconjugate derivatives to explore their biological activities ( Ito, Ishiwata, Manabe, Nakagawa, Takahashi, Greimel, Amin, Lee )

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  $\alpha$ -GalNAc and  $\beta$ -Glc. We established a strategy to construct  $\alpha$ -GalNAc repeat by using 4-*O*-pentafluoropropionyl (PFP)- protected GalN<sub>3</sub> derivative as a donor. Our previous research completed the synthesis of its full structure. In order to explore the use of *C. jejuni*. Oligosaccharide transferase for the production of glycoproteins, we conducted synthetic studies toward oligosaccharide donor substrates of this enzyme.

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. As a stabilized analogue of PtdGlc, we started synthesis of its carbasugar derivatives.

## 3 . Synthesis of glycoconjugate derivatives to explore their biological activities Analysis of glycoprotein processing and quality control ( Ito, Nakagawa, Takahashi, Watanabe, Miyagawa, Takeda )

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 (Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) of glycoproteins and assist their folding in collaboration with protein disulfide isomerase ERp53. Subsequently, terminal glucose (Glc) is removed by glucosidase II (G-II) and glycoproteins carrying undecasaccharide (Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) are transported to Golgi for further processing. In this process, ER glucosyl transferase (UGGT) plays an important role as a “folding sensor”. This year, our efforts have been extended to analyze ER glucosyltransferase (UGGT) and G-II. We successfully discovered novel substrates of UGGT, which are fluorescently labeled and suitable for small scale assay of this enzyme. We also discovered that the end products of G-II, especially Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> inhibit its activity.

G-II is a heterodimeric enzyme, consisting of an  $\alpha$ - and a  $\beta$ -subunit. Our analysis using gene disruptants of *A. oryzae* revealed that both of them are indispensable for glycoprotein processing.

***Head***

伊藤 幸成      Yukishige Ito

***Members***

石渡 明弘      Akihiro Ishiwata  
李 龍柱      Yong Joo Lee  
眞鍋 史乃      Shino Manabe  
宮川 淳      Atsushi Miyagawa  
中川 優      Yu Nakagawa  
小野 文靖      Fumiyasu Ono  
高橋 明美      Akemi Takahashi  
武田 陽一      Yoichi Takeda  
渡邊 泰祐      Taisuke Watanabe

***Visiting Members***

荒井 緑      Midori Arai  
蟹江 治      Osamu Kanie  
松尾 剛      Goh Matsuo  
松尾 一郎      Ichiro Matsuo  
中原 悠子      Yuko Nakahara  
仲野 隆久      Takahisa Nakano  
額田 恭郎      Tomoo Nukada  
佐藤 寛子      Hiroko Satoh  
戸谷 希一郎      Kiichiro Totani  
辻本 恭      Takashi Tsujimoto  
藪田 五郎      Goro Yabuta

***Trainees***

劉 渝      Yu Liu  
櫻井 絢花      Ayaka Sakurai