

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. 糖鎖を合成する
2. 新しい合成法を開発する
3. 糖タンパク質の機能をしらべる

キーワード：

生体分子、有機合成化学、立体選択性、新規合成手法、糖鎖、糖タンパク質、フォールディング、小胞体、微生物糖鎖、糖鎖認識分子

研究概要

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も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、を中心に研究を行っている。主要研究テーマは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、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、3)合成化学的手法による糖タンパク質細胞内動態の解明、4)糖鎖結合分子の認識機構解析、の4点である。

1. 糖タンパク質細胞内プロセシングの解析 (伊藤、中川、武田、渡邊、菊間、深谷、高橋)

タンパク質の大部分は正しい三次元構造を獲得して初めて機能を発揮する。これを制御する過程はタンパク質の「品質管理機構」と呼ばれる。ヒトをはじめとする真核生物細胞の小胞体においては、さまざまな分子がこの過程に関与している。多彩な糖タンパク質糖鎖機能の中で、小胞体における品質管理機構は、細胞活動の根幹部分への関与を示すものとして強いインパクトを与えている。

我々は糖タンパク質品質管理機構において重要な役割を果たす UDP-グルコース: 糖タンパク質グルコース転移酵素 (UGGT) およびグルコシダーゼ II (G-II) について検討を行った。その結果、UGGT の高感度解析に有用な蛍光性基質の開発に成功し、その基質認識様式の一部を明らかにした。また、従来役割が不明であった G-II の サブユニットが、糖鎖のトリミングに不可欠であることを示す結果を得た。また、最近小胞体内レクチン様タンパク質として見出された malectin の糖鎖認識特異性を調べた。

2. 糖鎖および糖タンパク質合成手法の開発 (眞鍋、石渡、坂本、Lee、土肥、櫻井、伊藤、高橋)

1) 2,3-位に環状保護基を導入してコンフォメーションを制限した糖供与体による立体選択的グルコシル化反応の解析を行った。その過程で、グルコシド結合の異性化が容易に起きる機構について、新奇な知見を得た。また、従来ほとんど知られていなかった endo 型のグリコシド結合の解裂が起きている証拠を得た。

2) 我々は凍結反応条件下でグルコシル化反応が劇的に促進されることを見出している。本年度は、そのメカニズムを解析するために、種々の濃度、添加溶媒、温度などの反応速度および選択性に与える影響を調べた。反応解析は以前に開発した迅速反応最適化系を用いて行なった。その結果、凍結条件の反応促進は、反応場が極めて濃縮された状態にあることによることを示す結果を得た。

3) 微生物の生合成系を糖タンパク質合成に応用することを目指し、種々の糖鎖がウンデカプレニル基にピロリン酸エステル結合でつながった基質を合成した。

3. 糖鎖結合分子の認識機構解析 (中川、伊藤、高橋)

HIV などのウィルスはその表面に高マンノース型糖鎖を高密度で発現している。これらの糖鎖に結合する

分子は抗ウイルス活性を持つことが知られている。その中で pradimicin(PRM)類は小分子でありながらマンノースに特異的に結合する化合物であり、医薬のシーズとして極めて興味深い。本年度は、固体安定同位体ラベル化マンノースを用い、固体 NMR による解析に着手した。その結果、PRM が Ca^{++} 存在下でマンノースと複合体を作ることを確認した。

4. 多糖修飾法の開発と新規機能性高分子の創成 (鹿野、伊藤、高橋)

セルロースは地球上に豊富に存在する生物資源である。本課題ではセルロースの修飾と、機能性高分子の創成に向け研究を行っている。本年度は、環境調和型反応媒体によるセルロースへの置換基導入反応に関して、種々の条件を検討した。その結果、反応条件が分子量低下に与える影響について、今後の指針となる結果を得た。

Key Sentence :

1. Synthesize glycan chains.
2. Develop new synthetic methods.
3. Study functions of glycoproteins.

Key Words : Biomolecules, Organic synthesis, Stereoselectivity, New synthetic methods, Glycans, Glycoproteins, Folding, Endoplasmic reticulum, Microbial glycans, Carbohydrate binding agents

Outline

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, and 4) analysis of carbohydrate binding molecules.

1. Analysis of glycoprotein processing by synthetic substrates (Ito, Nakagawa, Takeda, Watanabe, Kikuma, Fukaya, Takahashi)

Most of proteins are functional only when they are correctly folded. The process that regulates and maximizes protein folding is called "protein quality control". In the endoplasmic reticulum (ER) of eukaryotic cells, many molecules play roles in this process.

High-mannose-type oligosaccharides, which are cotranslationally introduced to nascent polypeptides during N-glycosylation, play critical roles in protein quality control. We have been interested in key enzymes on this process, UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) and glucosidase II (G-II). Our study developed fully synthetic, fluorescent substrate of UGGT and clarified its mode of substrate recognition. In addition, the pivotal role of the β -subunit of G-II in glycan chain trimming was revealed.

2. Development of synthetic methods for glycan chains and glycoproteins (Manabe, Ishiwata, Sakamoto, Lee, Dohi, Sakurai, Ito, Takahashi)

Research done in FY2009 (The diagram and the image, etc. can describe insertion.)

1) Analysis of stereoselective glycosylation using glycosyl donors carrying cyclic protection on 2,3-positions was conducted. This study provided novel findings as for the mechanism of facile isomerization of glycosidic linkages and evidences that endo-type glycoside bond cleavage took place.

- 2) We have discovered dramatic acceleration of glycosylation reactions under frozen conditions. In order to reveal its mechanism, effects of concentrations, co-solvents, temperature on reaction rate and stereoselectivity were studied. Reactions were analyzed by using high-throughput screening method. Our results indicates that highly concentrated environments were created under frozen conditions.
- 3) In order to apply microbial biosynthetic machinery to glycoprotein synthesis, potential donor substrates that carry various glycans linked to undecaprenyl pyrophosphate were prepared.

3. Analysis of molecular mechanism of carbohydrate binding agents (Nakagawa, Ito, Takahashi)

Viruses such as HIV carry high-mannose-type glycans on their surface in a dense manner. Molecules that bind these glycans are known to have antiviral activities. Among them, pradimicin (PRM) are particularly interesting as a drug candidate, because, in spite of its small molecular weight, it has an activity to selectively bind to mannose. We conducted analysis to understand the mode of its mannose-binding capability, using solid state NMR with stable isotope labeled mannose. Our study confirmed that PRM specifically forms complex with mannose in the presence of Ca^{2+} .

4. Modification of polysaccharides for the creation of functional polymers (Kano, Ito, Takahashi)

Cellulose is the living resources which exist abundantly on the earth. In order to expand its utility as raw materials for functional polymers, this subject directs to the creation of cellulose-modified polymers. This year, various conditions for substituent introduction to cellulose in environmentally benign media were examined to provide indicative result as for the influence of reaction condition on decrease of molecular weight was obtained.

Principal Investigator

伊藤 幸成 Yukishige Ito

Research Staff

坂本 康治 Yasuharu Sakamoto

眞鍋 史乃 Shino Manabe

石渡 明弘 Akihiro Ishiwata

中川 優 Yu Nakagawa

高橋 明美 Akemi Takahashi

李 龍柱 Yong Joo Lee

渡邊 泰祐 Taisuke Watanabe

武田 陽一 Yoichi Takeda

土肥 博史 Hirofumi Dohi

菊間 隆志 Takashi Kikuma

Students

櫻井 絢花 Ayaka Sakurai

深谷 将 Sho Fukaya

Visiting Members

鹿野 秀和 Hidekazu Kano