

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. 生物学的機能をしらべる

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、小胞体、微生物糖鎖、糖鎖認識分子、固体 NMR

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いるが、純粋有機合成化学の見地からも興味深い課題である。本研究室では、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機能の解析 (伊藤、相川、坂本、中川、瀬戸、太田、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糖鎖生物学における中心課題となりつつある。

我々は、小胞体内糖鎖を化学的に合成する手法を確立し、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カルレチユリン、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) を主たる対象として検討を行ってきた。本年度は、ヒト小胞体マンノシダーゼ I の糖鎖トリミング活性の解析を行い、その糖鎖特異性を明らかにするとともに、本酵素がミスフォールド型糖タンパク質を優先的にトリミングすることを明らかにした。更に、O-結合型 GlcNAc の細胞質内代謝を調べるプローブとしての有用性が知られている、UDP-GalNAc 2-keto 型アナログの新規な高立体選択的合成法を開発した。

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

- 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 α -選択的グルコシル化反応の解析を行った。前年度までの研究で、グリコシド結合の異性化が容易に起きる機構について endo 型のグリコシド結合の解裂が起きている証拠を得ていた。今年度は更に実験結果を積み重ねるとともに、計算科学的手法を用いてその定量的な解析を行うとともに、メカニズムの理解に向けた検討を行った。
- 上記の糖供与体を用いる C-グリコシル化反応を検討し、O-グリコシル化反応と同様に α -選択的に進行することが分かった。
- グリコシルカチオンに対する及ぼすスルフィド影響について、種々の反応の選択性解析と NMR 解析を併せた実験を行った。その結果、保存可能なグリコシル化活性種が発生できることが見出された。
- 当研究室で開発された分子内アグリコン転移反応による β -マンノシドの合成は、他の手法とことなり、環状保護基を必要としないことが明らかとなった。更に、この手法を応用して、昆虫由来の不凍活性多糖部分構造を合成し、提唱されている構造を強くサポートする結果を得た。

3. 微生物由来複合糖質の合成研究 (石渡、Fulse、伊藤、高橋)

タンパク質への糖鎖付加は真核生物のみならず、種々の微生物にも見られる。これらは細菌の病原性や免疫応答に密接に関与していることが明らかになりつつある。その中で代表的なものとして食中毒の原因として広く知られている *Campylobacter jejuni* や消化器疾患に関連する *Helicobacter pylori* がある。これらの O-結合型糖鎖として存在する Pseudaminic acid は感染や遊走性において重要な役割を果たしているが、合成化学的にも興味深い課題である。その合成は我々によって最近達成されたが、選択性の低さをはじめ多くの問題が残されている。そこで本年度はその改良合成法を検討した。また、前年度に引きつづき、結核菌細胞表層の巨大糖鎖複合体に関する研究を行った。

4. 糖鎖結合分子の認識機構解析 (中川、竹谷、伊藤、高橋)

HIV などのウイ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。昨年度に続き、安定同位体ラベル化した PRM を作成し、マンノースとの結合について固体 NMR による解析を行った。その結果、PRM が Ca^{++} 存在下でマンノースと結合する部位に関する有用な情報を得た。

5. 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。前年度からの継続課題として、環境調和型反応媒体によるセルロースのアセチル基およびプロピオニル基導入に関して、種々の条件を検討した。また、糖質材料の機能化について検討を行った。

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 understand intracellular behaviors of glycoproteins especially in the ER, and 4) analysis of sugar recognition mechanism of carbohydrate binding natural products.

1. Analysis of glycoprotein processing by synthetic substrates (Ito, Aikawa, Sakamoto, Nakagawa, Seto, Ohta, 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. Our particular interest has been directed to key enzymes of this process, UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) and glucosidase II (G-II). This year, analysis of human ER-mannosidase I was conducted, which revealed its glycan specificity and gave an indication that this enzyme strongly favors misfolded glycoprotein, while trimming of folded glycoprotein was sluggish.

O-Linked glycosylation by *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) is a widespread posttranslational modification of cytosolic and nuclear proteins. A 2-keto analogue of UDP-D-galactosamine has been employed as a useful probe to identify O-GlcNAc modified proteins. This year we developed efficient route which provides this compound in an unprecedentedly selective manner.

2. Development of synthetic methods for glycan chains and glycoproteins (Manabe, Ishiwata, Aihara, Ito, Takahashi)

1) Analysis of stereoselective glycosylation using glycosyl donors carrying cyclic protection on 2,3-positions was conducted. Our study in previous years has provided novel findings as for the mechanism of facile isomerization of glycosidic linkages and evidences that endo-type glycoside bond cleavage took place. Further study based on combined experimental and computational approach was conducted, which led us to understand its mechanism.

2) Effects of added sulfide to glycosyl cations were studied based on analysis of stereoselectivity and low-temperature NMR experiments. Our study identified storable glycosyl sulfonium ion which is potentially useful as active species in glycoside bond formation reactions.

3) Intramolecular aglycon delivery, which was established in this laboratory as a highly reliable method to construct b-glycosides of D-mannose was shown not to require any cyclic protection, unlike other procedures reported so far. As an application of this method, insect-derived polysaccharide was chosen our research target and achieved synthesis its partial structure. Our result provided strong support of reported structure of the polysaccharide.

3. Synthesis of glycoprotein glycans of bacterial origin (Ishiwata, Fulse, Takahashi, Ito)

Recent study has discovered various types of protein glycosylation from numerous prokaryotes. They are known to play important roles in bacterial infection and motility. Among them, Pseudaminic acid (Pse), which exists in its O-linked glycosides is particularly interesting from biomedical as well as synthetic point of view. Although synthesis of Pse was reported from this group, a number of problems, particularly in terms of selectivity, have remained unsolved. This year our study has directed to develop refined synthetic route to Pse, which is in progress. In addition, in continuation of preceding years' study, synthesis of gigantic glycan conjugates of *Mycobacterium tuberculosis* was conducted.

4. Analysis of molecular mechanism of carbohydrate binding agents (Nakagawa, Taketani, 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 mannose and PRM both of which were labeled by stable isotope. Our study has confirmed that PRM specifically forms complex with mannose in the presence of Ca^{2+} and obtained important finding as for the mode and sugar binding specificity of PRM. Further study conducted this year successfully obtained information as for interacting sites of PRM and d-mannose.

5. 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. To achieve this goal, various conditions for substituent introduction to cellulose in environmentally benign media were examined continuously. We have been able to clarify factors that caused decrease of molecular weight and propose measures to suppress this unfavorable phenomenon. Study conducted this year gave more detailed insight of this observation and succeeded in identifying conditions that gave acylated cellulose in higher efficiency.

Principal Investigator

伊藤 幸成 Yukishige Ito

Research Staff

相川 順一 Junichi Aikawa
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
Fulse Dinanath Baburo
相原 義之 Yoshiyuki Aihara
瀬戸 秀春 Hideharu Seto

Students

塩入 優紀 Yuki Shioiri
中村 真男 Masao Nakamura
竹谷 隆良 Takara Taketani

Visiting Members

鹿野 秀和 Hidekazu Kano
太田 鋼 Tsuyoshi Ohta
蟹江 治 Osamu Kanie
武田 陽一 Yoichi Takeda
金森 審子 Akiko Kanamori
大竹 敦子 Atsuko Ohtake
鈴木 克彦 Katsuhiko Suzuki
高谷 万紀 Maki Takatani
迫野 昌文 Masafumi Sakono
大黒 周作 Shusaku Daikoku
八須 匡和 Masakazu Hachisu