

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。特に、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 点を主要テーマとして研究を行っている。

1. 糖鎖および糖タンパク質合成手法の開発（眞鍋、石渡、木村、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ことが明らかになっており、計算科学的手法を用いてその定量的な解析と、メカニズムの理解に向けた検討が行われてきた。以上の背景に基づき、 α -グリコシドを構成成分として持つ生物活性糖鎖の合成研究を行った。特に、放線菌が産生するレドックス分子であり、結核菌に対する薬剤標的と目される Mycothiol の高選択的合成を達成した。環状保護基を導入した糖供与体の立体化学と反応性および立体選択性に関して、継続的な研究を進めている。これにより、糖鎖合成における新たなパラダイムの創成を目指している。

タンパク質への糖鎖付加は種々の微生物や植物にも見られる。これらは、動物細胞が主として 6 員環構造のヘキソピラノシドから構成される糖鎖を持つのに対し、5 員環構造のペントフラノシドから成り、細菌の病原性や免疫応答および植物の分化や細胞壁構造維持に密接に関与していることが明らかになりつつある。これまでに、植物の細胞壁成分糖ペプチド性ホルモンを構成する、オリゴアラビノフラノシドを選択的に合成する手法を確立し、CLV3 と呼ばれる糖ペプチドや植物細胞壁成分のエクステンシンの糖ペプチド繰り返し構造の合成を達成した。今年度はそれらの代謝に関わる酵素の機構解明をめざしたプローブの合成を検討した。

2. 糖タンパク質細胞内機能の解析（伊藤、相川、石渡、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。一方、小胞体マンノシダーゼ I は、ミスフォールド糖タンパク質の分解過程において鍵を握る酵素として興味を持たれている。これまで、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、1) フォールディング過程に関わると想定されるモノグルコシル化糖鎖に対してもトリミング活性を持つこと、2) ミスフォールド状態の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ている。今年度は、糖鎖枝分かれ部分に対する特異性を調べた。また、基質結合に関わる部位をゴルジ酵素型に変換した酵素を作成した。現在その詳細解析を進めている。加えて、UGGT の基質認識機構や糖鎖構造の解析を行うと共に、そのドメイン解析を行った。

一方、細菌の糖タンパク質生合成は、生物進化や抗感染症開発といった視点から興味を持たれる。合成したオリゴ糖供与体を用い、糖鎖導入反応過程の試験管内再現を行い、特異性に関して新たな知見を得た。

3. N-アセチルマンノサミン (ManNAc) 誘導体の合成 (伊藤、坂本、瀬戸、高橋)

N-アセチルマンノサミン (ManNAc) はヘキソサミン経路と呼ばれる細胞内糖鎖生合成の鍵化合物である。我々は、その生理活性に着目した研究を行っている。これまで共同研究者により、動物実験において ManNAc が行動や認知機能を改善する活性を持つことが報告されている。また、細胞レベルの実験で、脳機能に関係するホルモンであるオレキシン産生を強く亢進する活性を持つことが示されている。そこで、過年度に引き続き ManNAc の各種類縁体を合成し、その構造活性相関を調べた。その結果、格段に高い活性を持つ新たな ManNAc 誘導体を見出すことができた。

4. 糖鎖結合分子の認識機構解析 (中川、伊藤、高橋)

Pradimicin A (PRM-A) は、放線菌由来の抗生物質であり、 Ca^{2+} 存在下で D-マンノース (Man) を認識する。現在のところ、PRM-A とその誘導体は、「Man 認識能を有する唯一の低分子化合物群」であることから、PRM-A 類による Man 認識機構の解明は学術的に極めて重要な研究課題である。我々は、固体 NMR を利用するアプローチで、その相互作用機構解析を行ってきた。より最近になり、PRM-A の水溶性を高めたアナログと Ca^{2+} 複合体の結晶化に成功した。その情報をもとに、様々な解析を行い、 Ca^{2+} 複合体の形成において、従来考えられてきたカルボキシル基部分ではなく、アントラキノン部分が重要であることを示唆する結果を得た。

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

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

Analysis of stereoselective glycosylation using glycosyl donors carrying cyclic protection on 2,3-positions has been 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 studies based on combined experimental and computational approach was conducted, which have led us to understand its mechanism. In order to demonstrate versatility and practicality of this approach, studies toward synthesis of α -GlcNAc containing glycans was conducted. For example, Mycothiol, a microbial redox molecule that is attracting attention as drug target of anti-mycobacterial agents, was achieved in a highly stereoselective manner. Continuous endeavor is in progress to discover novel findings concerning relationship between stereochemistry and reactivity as well as selectivity of glycosyl donors having cyclic carbamate or carbonate groups, which aims to establish a new paradigm in synthetic carbohydrate chemistry. .

Modification by glycan chains is often found in various prokaryotes, whose functions in microbial infection and pathogenicity are of recent interest. In contrast to glycan chains derived from animals, many of them are composed of 5-membered ring pentofuranosides. Our recent study successfully established a methodology to construct arabinofuranoside containing glycans and achieved the synthesis of glycopeptide repeating unit of extensins. In continuation of the project, we have conducted studies to create molecular probes that will be helpful in understanding mechanism of enzymes responsible for metabolism of these glycans.

2. Analysis of glycoprotein processing by synthetic substrates (Ito, Aikawa, Ishiwata, 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). In continuation of our study on ER-mannosidase I, which is known to play critical roles in degradation of misfolded glycoproteins, its property to preferentially act on misfolded glycoproteins was conducted. Previously, we found that 1) this enzyme is able to conduct trimming of monoglucosylated glycans involved in glycoprotein folding cycle, and 2) the trimming was accelerated when glycoproteins were denatured. To further deepen our understanding of this enzyme, its activity toward several branches of target glycans was examined. In addition, its variants which have substrate binding sites of Golgi-residing mannosidases were prepared. Analysis of their properties is in progress. Studies on UGGT, in terms of its substrate recognition, glycan composition, and domain analysis were also conducted.

On the other hand, glycoprotein producing systems of bacterial origin are interesting subjects in light of their connection with evolution and therapeutic potentials. Using chemically synthesized oligosaccharide donor and its derivatives, we conducted studies to reconstitute bacterial protein glycosylation system, which revealed its specificity.

3. **Synthesis of N-acetylmannosamine (ManNAc) derivatives** (Ito, Sakamoto, Seto, Takahashi)

Previous studies have suggested that N-acetylmannosamine (ManNAc), a biosynthetic precursor of sialic acid containing glycoconjugate, exhibits effects to improve brain functions such as recognition. In addition, more recent studies discovered its ability to enhance production of orexin. Given these promising observations, we synthesized various analogues and derivatives of ManNAc to conduct structure-activity relationship studies. We successfully identified novel ManNAc derivatives that exhibited strong activities to enhance production of orexin.

4. **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, prandimicin A (PRM-A) is 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-A. Recently, we have successfully obtained crystallographic data of a complex comprised of water soluble PRM-A analog and Ca^{2+} . In combination with binding experiments using various means, we are now able to propose a novel mechanism of molecular recognition of PRM-A, particularly toward Ca^{2+} .

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
瀬戸 秀春 Hideharu Seto

Visiting Members

蟹江 治 Osamu Kanie
武田 陽一 Yoichi Takeda
金森 審子 Akiko Kanamori
鈴木 克彦 Katsuhiko Suzuki
迫野 昌文 Masafumi Sakono
大黒 周作 Shusaku Daikoku
八須 匡和 Masakazu Hachisu
孫 尚鉉 Sang-Hyun Son
王 寧 Ning Wang
藤川 紘樹 Kohki Fujikawa
大原 啓一郎 Keiichiro Ohara
戸谷 希一郎 Totani Kiichiro
菊間 隆志 Kikuma Takashi
土肥 博史 Dohi Hirofumi
鹿野 秀和 Kano Hidekazu
丸山 潤一 Maruyama Junichi
額田 恭郎 Nukada Tomoo
松尾 一郎 Matsuo Ichiro
佐藤 寛子 Satoh Hiroko

Students

木村 謙太 Kimura Kenta