

## 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、坂本、成田、伊藤、高橋)

Fischer グリコシル化反応以来、アノマー位立体化学は、グリコシド結合を形成するときには制御されて来た。しかし、endo 型のグリコシド結合の開裂を経て、既存のグリコシド結合が開裂・再環化することにより、異性化が容易に起きることを見出していた。本異性化反応は、これまでのグリコシル化反応では困難である 1,2-cis アミノ糖の選択的構築に有効である。以上の背景に基づき、 $\alpha$ -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。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。具体的には、GPI アンカーや細菌表面糖鎖の合成を進めている。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。

加えて、2,4-位を環状保護基で架橋してコンフォメーションを制限した糖供与体によるグルコシル化反応を検討した。その結果、隣接基関与を利用しなくても  $\beta$ -選択的に 2 糖を合成できることを見出した。

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。それらの代謝に関わる酵素の機構解明および構造解析をめざしたプローブの合成を今年度も引き続き検討した。

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  $\beta$ -マンノシドの合成を応用し、これまでの隣接位からの立体制御に加え、遠隔位からのシス-グリコシル化反応について検討した。アラビノフラノシド 5 位の混合アセタールからの転移反応は立体選択的に進行することを見いだした。

#### 2. 糖タンパク質細胞内機能の解析 (伊藤、相川、石渡、高橋)

研究年報

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ティユリン、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(ERManI)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。今回、基質結合に関わる部位をゴルジ酵素型(GolgiManI)に変換した複数の酵素を解析した結果、394番の一アミノ酸置換を持つ変異型酵素では、糖蛋白質中の M9 から M8B への変換が遅延する一方、M7 から M6&5 への分解が加速されるという、GolgiManI 様のプロファイルが示された。既に、ERManI の一塩基多型 (SNP; Single Nucleotide Polymorphism) の一部には遺伝病 (Type II congenital disorder of glycosylation) を誘起することが明らかであった。さらに、394番にも SNP が報告されていることから、missense mutation を誘起する SNP が酵素活性に影響を及ぼす可能性に着目した。その結果、これまで得られた変異型 ERManI の中に、酵素活性を低下させる SNP を一つ同定できた。また、ERManI 及び GolgiManI と同じ GH47 (Glycoside hydrolase family 47) に属する ER degradation-enhancing mannosidase-like (EDEM) の機能部位を探索するため、EDEM と ERManI のキメラ蛋白質の発現を行った。現在までに、キメラ蛋白質の中に糖鎖 M9 を分解する活性は見出されなかった。加えて、UGGT の基質認識機構や糖鎖構造および、ドメインの機能を解析した。また、UGGT が基質の疎水性部分認識に関わる部位を同定した。

### 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、これまでで最も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 (伊藤、高橋)

Pradimicin A (PRM-A) は、放線菌由来の抗生物質であり、 $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  複合体の結晶化に成功し、 $\text{Ca}^{2+}$  複合体の形成において、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ている。

-----  
**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, Sakamoto, Narita, 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, leading us to propose a new paradigm in synthetic carbohydrate chemistry. In order to demonstrate versatility and practicality of this approach, studies toward synthesis of  $\alpha$ -GlcNAc containing glycans, continuous endeavor is in progress to apply the concept to synthesis of bioactive glycosides such as GPI anchor glycans and microbacterial cell surface glycoconjugates. In addition, novel glycosyl donors carrying 2,4- cyclic protection were designed, which indeed exhibited selectivity giving disaccharides having  $\beta$ -glycosidic linkages.

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.

To expand the concept of intramolecular aglycon delivery, possibilities to conduct glycosylation by means of remote aglycon delivery was sought. As a result, stereoselective formation of  $\beta$ -arabinofuranoside was shown to be feasible by this approach.

**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 has been examined. In addition, its variants which have substrate binding sites of Golgi-residing mannosidases were prepared. By using them, several discoveries with respect to properties of ER mannosidase I (ERManI) as well as ER glucosyltransferase (UGGT) were made. Furthermore, implication as for the relationship between diseases

associated with congenital disorder of glycosylation and missense mutation of ERManI was obtained. As for our studies on UGGT, hydrophobicity recognizing region of this enzyme was identified.

### **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 strongest activities to enhance production of orexin.

### **4. Analysis of molecular mechanism of carbohydrate binding agents (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 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  $\text{Ca}^{2+}$ . In combination with binding experiments using various means, we are now able to propose a novel mechanism of molecular recognition of PRM-A. This year, our study was conducted to understand sugar binding specificity of PRMs through analysis of interaction with various monosaccharides.

### ***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  
王 寧 Ning Wang  
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  
藤川 紘樹 Kohki Fujikawa  
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  
額田 恭郎 Nukada Tomoo  
松尾 一郎 Matsuo Ichiro

### ***Students***

成田 覚 Narita Satoru