

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、 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。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。本年度は、本法の有効性を従来法と比較した。GPI 合成を進めるとともに、共同研究に向けた mycothiol の大量合成を行った。

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。その結果、活性中心残基に共有結合可能な官能基を有するプローブの合成ルートを確立した。

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 β -マンノシドの合成を応用し、植物由来多糖の非還元末端に見られる、種々の結合様式を有する β -アラビノフラノシドを立体選択的に合成した。構造解析を高磁場 NMR を利用するなどして詳細におこなったところ、天然糖鎖非還元末端構造とよい一致を示した。また、結核菌アラビナンフラグメントの種々のオリゴアラビノフラノシドの合成を行った。合成糖鎖基質を用い、種々の分解酵素の基質特異性に関する研究を進めている。

2. 糖タンパク質細胞内機能の解析 (伊藤、相川、石渡、高橋)

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キュリン、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。GH47 **β-D-マンノシダーゼ** (EDEM) は、ER からマンノースを除去し、分解へと導くことが細胞レベルでは示されている。一方、EDEMポリペプチド中の糖は未だ決着がつかない。そこで、ヒト EDEM1 及び 2 をマンノシダーゼ活性のバックグラウンドがない無細胞タンパク質合成系により発現させた。大腸菌シャペロン共存下でも不溶性画分に回収されるが、適切な界面活性化剤を共存させることで、可用性画分に回収された。得られたヒト EDEM1 ポリペプチドは SDS-PAGE において、還元剤存在下では単一分子量を示すものの、次に、ヒト EDEM1 において 1 組の S-S 結合のみを残し、他を Cys に変換した変異型を作成した。還元剤非存在下でも SDS-PAGE 上で単一なバンドを示した。

3. N-アセチルマンノサミン (ManNAc) 誘導体の合成 (坂本、伊藤、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、特にヘキソサミン経路による代謝を受けない化合物を合成し、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. 抗体-薬物複合体のリンカー設計 (眞鍋、阿部、中村、高橋、伊藤)

抗体-薬物複合体 (ADC) は、抗体に低分子を結合させ、薬物を患部に選択的に送達させる手法であり、次世代抗体医薬として期待されている。抗体の細胞表面抗原への高親和性・高選択性と低分子医薬の細胞内への移行性のそれぞれの特性を生かすことができる。リンカーは、薬物と抗体を血清中で安定に結合させ、目的部位で放出させる働きをもつが、均一な ADC の作成法の開発が薬効の向上等の面から望まれている。抗体は普遍的に糖鎖を持ち、糖鎖を介しての薬物結合はリンカーに求められる複数の要件を満たす。改変加水分解酵素 endo CC N180H とシアリルグリコペプチドを用いた抗体への糖鎖付加、糖加水分解酵素 endo S D233Q を用いた抗体への修飾糖鎖付加の検討を行なった。カテプシン切断型リンカーを結合させ、均一 ADC 作製方法論の端緒を拓いた。

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, Sakamoto, Narita, Ito, Takahashi)

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 α -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 this year, comparison between conventional stereoselective glycosylation and our novel methodology was conducted. large-scale synthesis of methylthiol for collaborative work has been completed.

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. So far, we developed the synthetic route to the probe with the functionality which can covalently bond to the residue in the active site in the enzyme.

As the application of our intramolecular aglycon delivery methodology, we have completed the synthesis of the β -arabinofuranosides with various linkages found at the non-reducing terminal end of the plant polysaccharides. The structural analysis of the synthetic glycans with high field NMR resulted that the NMR spectra of the synthetic glycans showed good agreement with those of natural polysaccharide. In addition, we synthesized the oligoarabinofuranosides in mycobacterial arabinan fragment as the substrate for the glycan processing enzyme. By using the synthetic substrates, study of the enzymes on substrate specificity could be possible.

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). ER degradation-enhancing mannosidase-like proteins (EDEMs), which belong to GH47 family protein, could help incorrectly folded glycoproteins to be degraded *in vivo* by de-mannosylation of their *N*-glycans. *In vitro* mannosidase activities in EDEM polypeptides, however, have not yet been clearly identified. Therefore, we have examined to produce human EDEM1 and 2 polypeptides by using *in vitro* transcription and translation system where mannosidase activities were

not detected. Those polypeptides were recovered in an insoluble fraction even in the presence of *E. coli* chaperons. Addition of proper detergent to the reaction mixture resulted in recovery of those polypeptides in a soluble fraction. The hEDEM1 exhibited dispersed patterns on SDS-PAGE gel without DTT, although that yielded a single band in the presence of DTT. This suggested S-S bonds in the polypeptide were randomly formed. Therefore, hEDEM1 having mutations at four cysteine residues, was designed to maintain the single S-S bond. The mutant hEDEM1 showed a single band even in the absence of DTT, suggesting the polypeptide yielded a single species.

3. Synthesis of *N*-acetylmannosamine (ManNAc) derivatives (Sakamoto, Ito, 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. Improvement of linker in antibody-drug conjugate (Manabe, Abe, Nakamura, Takahashi, Ito)

Antibody-drug conjugates (ADCs) consist from antibody and potent drugs are expected to be the next generation of antibody drugs. Antibody has high specificity and affinity to antigen on cell surface, low-molecular drugs have permeability into cell. Linker connects antibody and drugs stable in blood stream, yet releases drugs at desired site. Homogeneous ADCs preparation is highly required from improvement of efficacy of ADCs. Conjugation of drugs at glycan site is desired for preparation of homogeneous ADCs. Glycan addition using glycosidase mutant endo CC N180H and sialylglycopeptide, and endoS D233Q and modified glycan were conducted. Then, drug was conjugated though peptidase cathepsin cleavable linker. These reaction sequence exploits homogeneous ADC preparation.

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
ディンフェイソン Ding Feiqing
阿部 純平 Abe Junpei
高橋 明美 Akemi Takahashi

Contract Staff

中村誠司 Nakamura Seiji

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
戸谷 希一郎 Totani Kiichiro
土肥 博史 Dohi Hirofumi
鹿野 秀和 Kano Hidekazu
松尾 一郎 Matsuo Ichiro
中川 優 Nakagawa Yu

Students

成田 覚 Narita Satoru
飯田岳史 Iida Takeshi