

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、Ding、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 アンカーなど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。共同研究に向けた mycothiol の大量合成を行い、反応条件の詳細な検討を行った。

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ルートを確立し、今年度も引き続き各種誘導体合成を検討した。アジド及びアミド型合成プローブを用いた酵素反応解析を共同研究にて進めているが、共有結合型酵素阻害剤として期待している。

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。本年は渦鞭毛藻由来のオリゴアラビノフラノシドの構造解析を詳細におこなったところ、非還元末端構造が天然物とよい一致を示した。また、結核菌アラビナンの分解酵素の基質特異性に関する研究遂行のため、種々のオリゴアラビノフラノシド基質および、パラニトロフェニルグリコシド体の合成を行った。

グリコサミノグリカンが生体内に存在する多糖で、その構成糖としてイズロン酸、グルクロン酸を含んでいる。グルクロン酸は安価なグルコースから容易に合成できる一方、イズロン酸はグルクロン酸の5位エピマーであり

ながら、グルクロン酸のエピメリ化では合成困難であることが知られており、グルコースから多段階で合成されている。そこで、キシリレン保護基により立体配座を制限したグルクロン酸誘導体のエピメリ化を行ったところ、イズロン酸誘導体を一段階で合成できることを見出した。

以上に加えて、2-位に新規な保護基を導入した糖供与体を開発し、反応条件を変えることで立体異性体を作り分けられることを見出した。その一般性について検討を継続している。

2. 糖タンパク質細胞内機能の解析 (伊藤、相川、菊間、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。GH47に属するタンパク質のうち、ER degradation-enhancing mannosidase-like protein (EDEM) は、ERにおいて正しく折り畳まれなかった糖タンパク質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唆されている。一方、EDEMポリペプチドでの酵素活性の検出は未だ決着がついていない。昨年度までに、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おいて可溶性画分に生産させる系を開発した。しかし前記系で発現された EDEM では S-S 結合がランダムに形成されていることが示唆された。そこで、今年度は前記系で大腸菌シャペロンとの融合タンパク質として、発現を行った。現在までのところ、得られた融合タンパク質にマンノシダーゼ活性は見出されていない。また大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系以外に、EDEM の活性検出を明瞭にすべくマンノシダーゼ活性が低下する出芽酵母の創出を行った。

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、特にシアル酸生合成経路の基質とされないと考えられる 6 位置置換化合物の合成を行った。

4. 抗体-薬物複合体のリンカー設計 (眞鍋、阿部、松岡、野口、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 の作成法の開発が安全域の拡大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。オリゴ糖鎖に生物直交性反応を行う官能基の化学修飾の検討を行った。さらに、一旦糖鎖切断した糖鎖の抗体への付加反応において改変糖加水分解酵素の検討を行なった。その過程において改変加水分解酵素 endo CC N180H はシアリルグリコペプチドを糖供与体とし、抗体のみならず、低分子糖受容体を基質とすることが明らかになった。抗体への化学修飾糖鎖付加は糖加水分解酵素 endoS D233Q を用いると効率的であった。カテプシン切断型リンカー付き薬物を結合させ、均一 ADC 作製を行った。

5. グルコシル化糖脂質類縁体の合成 (Ding、高橋、伊藤)

理研 BSI の上口、平林らにより、ホスファチジルグルコシド (PtdGlc) から生成するリゾホスファチジルグルコシド (LPG) が神経細胞ガイダンス活性を持つことを見出された。この活性はカンナビノイドレセプターに分類される G-タンパク質共役レセプター (GPCR) GPR55 を介するものであることが明らかになっている。GPR55 は新たな創薬のターゲットとして、そのアゴニストやアンタゴニストの開発が行われているが、活性および特異性の点で十分なものとは言えない。一方、LPG に関してはリン酸ジエステル結合の安定性と極性が障壁になる。そこで、LPG をリード化合物にして、上記の問題点を回避できる類縁体の合成を行った。

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. Development of synthetic methods for glycan chains and glycoproteins (Manabe, Ishiwata, Sakamoto, Ding, 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 mycothiol 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. Following the development of the synthetic route to the probe with the functionality which can covalently bond to the residue in the active site in the enzyme, synthetic study on the various derivatives of the arabinofuranosylated probes including glycosyl amide and azide derivatives has been carried out. As the inhibitor, the synthetic glycosyl amide derivatives would be expected to form the covalent bond with the enzyme which would be carried out by collaborative work for the analysis of enzymatic reaction.

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 oligoarabinofuranoside found in marin toxin isolated from *dinoflagellate* resulted that the NMR spectra of the synthetic glycans showed good agreement in the non-reducing terminal structure with those of natural oligosaccharide. Synthesis of the substrate for the novel mycobacterial arabinan-processing enzyme such as the oligoarabinofuranosides as well as *p*-nitrophenyl oligoarabinofuranoside has been achieved.

Glycosaminoglycans are polysaccharides in animal tissues and contain iduronic acids and glucuronic acids. Glucuronic acid is easily synthesized from an inexpensive glucose. However, iduronic acid, C5-epimer of glucuronic acid, is synthesized from the glucose in several steps, because it is difficult for iduronic acid to be synthesized by epimerization of glucose. We achieved an one-step synthesis of iduronic acid derivative by epimerization of a glucuronic acid derivative, which is conformationally constrained by a xylylene protecting group.

以上に加えて、2-位に新規な保護基を導入した糖供与体を開発し、反応条件を変えることで立体異性体を作り分けられることを見出した。その一般性について検討を継続している。

In addition, effort has been made to develop glycosyl donors carrying novel protecting group at 2-position which enabled construction of both stereoisomers simply switching reaction conditions. Further study is ongoing to examine generality of the concept.

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. In the last fiscal year, we established to produce human EDEM1 and 2 polypeptides in an insoluble fraction by using *in vitro* transcription and translation system where mannosidase activities were not detected. However, random formation of S-S bonds in those polypeptides was suggested. Therefore, fusion forms of *E. coli* chaperons and those polypeptides were prepared by using the system. Those fusion forms have not exhibited mannosidase activities. Moreover, mutant forms of *Saccharomyces cerevisiae* which carried deletion in a couple of mannosidase genes were prepared to use as another platform to express EDEM proteins heterogeneously.

To estimate the degree of the effect of inhibitor against the various processing enzymes in the cell on glycan structure related to glycoprotein, examination of the measuring conditions for glycan analysis based on MALDI-ToF mass were carried out.

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, especially C6-substituted analogues, which would not be precursors of the sialic acid biosynthetic pathway.

4. Improvement of linker in antibody-drug conjugate (Manabe, Abe, Matsuoka, Noguchi, 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 by expanding safety-margin. Conjugation of drugs at glycan site is desirable for preparation of homogeneous ADCs. Optimization of addition of bioorthogonal functional group to oligosaccharide was conducted. Then, glycosidase mutants modified glycan was added by glycosidase mutant endoS D233Q to glycan-runcated antibody. During survey of mutants, it was revealed that endo CC N180H allowed sialylglycopeptide as a glycan donor and transferred to low-molecular acceptor as well as antibody. Then, drug with peptidase cathepsin cleavable linker was conjugated. These reaction sequence exploits homogeneous ADC preparation.

5 Synthesis of novel glycolipid analogues

Recent study by Hirabayashi and Kamiguchi (RIKEN BSI) revealed activity of novel glycolipid lysophosphatidyl glucoside (LPG) that exhibits axon guidance activity. This activity was ascribed to activation of a G-protein coupled receptor GPR55. Whereas significant effort has been made to develop agonists and antagonists of GPR55, they are not sufficient in potency and selectivity. Based on these, our research aims to design and synthesize analogues of LPG that can avoid problems associated with stability and physical properties of phosphodiester linkage.

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 Feiqing Ding
阿部 純平 Junpei Abe
菊間 隆志 Takashi Kikuma
高橋 明美 Akemi Takahashi

Contract Staff

中村 誠司 Seiji Nakamura
松岡 亮次 Ryoji Matsuoka
野口 桂子 Keiko Noguchi

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 Kiichiro Totani
土肥 博史 Hirofumi Dohi
鹿野 秀和 Hidekazu Kano
松尾 一郎 Ichiro Matsuo
中川 優 Yu Nakagawa
塩田 邦男 Shiota Kunio

Students

成田 覚 Satoru Narita