

## 《農芸化学奨励賞》



## 糖タンパク質糖鎖の機能解明に向けた化学的アプローチ

独立行政法人理化学研究所中央研究所伊藤細胞制御化学研究室 前任研究員 松尾 一郎

## はじめに

生体内の糖鎖はさまざまな生命現象に関与していることが知られているにもかかわらず、その機能が分子レベルで明らかにされているものは少ない。その要因として構造が明確で均一構造の糖鎖サンプルを用意することの困難さが挙げられる。もし構造が均一で十分量の糖鎖や糖タンパク質を合成することができれば糖鎖のもつ機能を分子レベルで厳密に調べることが可能になる。このような観点から本研究では、精密有機合成化学を基盤とした実践的糖鎖合成法の開発に取り組み、小胞体関連アスパラギン結合型糖鎖の系統的合成に成功した。そして、糖鎖を介した糖タンパク質品質管理機構を分子レベルで解析すべく、合成糖鎖を利用してレクチン様分子シャペロンや糖質関連酵素の基質特異性解析を試みた。

## 1. 精密有機合成化学を基盤とした小胞体関連高マンノース型糖鎖の系統的合成

小胞体関連アスパラギン結合型糖鎖は、14糖(G3M9)を出発糖鎖として、種々の糖質関連酵素の連携により構造変換される。したがって、還元末端部分の構造は共通であるが、非還元末端部分の構造は多様性に富んでいる(図1)。これらの糖鎖は10糖を超える大きな分子であり、天然物合成化学研究のターゲット化合物としても興味深い。筆者らは目的糖鎖を系統的かつ効率よく合成する方法として収斂的経路による合成法を検討した。すなわち、糖鎖構造の特徴を考慮して四つのオリゴ糖ブロックを合成した後に、還元末端部分に相当する3糖と直鎖型3糖を結合、保護基の変換を行って6糖へと導いた。この6糖受容体を共通中間体として、分岐型5糖を結合することにより11糖を、また分岐型4糖を結合することにより10糖骨格を構築した。このように任意の分岐型オリゴ糖を結合することにより、多様な糖鎖構造を容易に構築することができた。さらに超

高压条件による TBDPS 基の除去反応(HF/pyridine, 1 GPa)を開発することにより、選択的かつ効率的に糖受容体へと変換することが可能となった。そして11糖受容体に対してグルコースブロックを導入することにより小胞体型糖鎖14糖、13糖、および12糖を得た。同様に2種類の10糖受容体および9糖受容体に対してグルコース供与体を結合することにより小胞体関連アスパラギン結合型糖鎖の系統的合成を成し遂げた。現在、上記の方法により数百 mg スケールでの糖鎖合成が可能となっている。

## 2. 糖鎖分子プローブを利用したカルネキシン/カルレティキュリン(CNX/CRT)サイクルの定量的解析

タンパク質上のアスパラギン結合型糖鎖は、タンパク質が機能発現するための高次構造形成や目的器官への輸送、不要糖タンパク質の分解過程といった糖タンパク質の品質管理にかかわっている(図2)。G1M9糖鎖を認識するレクチン様シャペロンCNXやCRT、G1M9糖鎖構造からM9構造へと変換するグルコシダーゼII、M9構造からCNX/CRTの基質となるG1M9構造へと導くグルコース転移酵素の3者が関与するCNX/CRTサイクルは、リガンド糖鎖構造が示されているにもかかわらず、これらのタンパク質との直接的な相互作用解析や、厳密な基質特異性解析は行われていない。そこで合成糖鎖を用いてCNX/CRTサイクルの解析を試みた。

## 2.1 糖鎖分子プローブを用いたカルレティキュリン(CRT)の解析

CRTはG1M9糖鎖と相互作用することにより新生ポリペプチドを小胞体内に係留し、ペプチド部分のフォールディングを助けると考えられている。そこでCRTとG1M9糖鎖との相互作用を<sup>1</sup>H-NMRを用いて解析した。G1M9糖鎖に対してCRTを逐次添加して<sup>1</sup>H-NMRを測定したところ、G1M9糖鎖に相

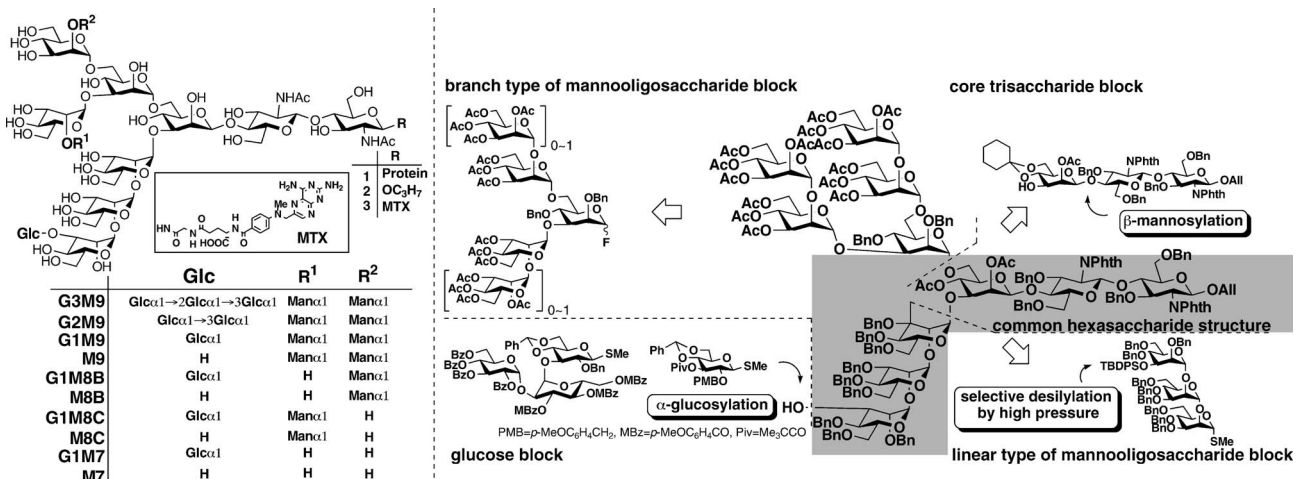


図1 小胞体関連アスパラギン結合型糖鎖の構造と収斂的経路による糖鎖の構築

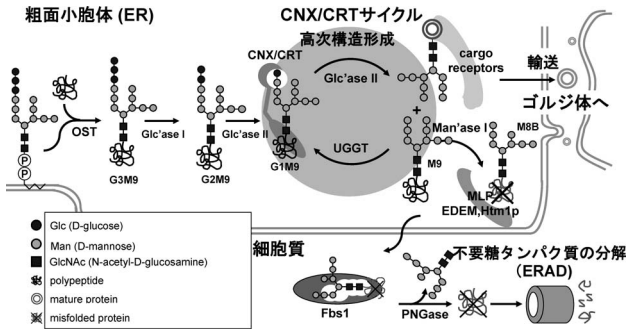


図 2 糖鎖を介した糖タンパク質品質管理機構

小胞体で生成されてくるタンパク質の多くはアスパラギン結合型糖鎖修飾を受ける。小胞体内のシャペロンタンパク質の助けを受けて正しい高次構造をとったタンパク質は、小胞体を出てゴルジ装置へと輸送される。フォールドされていない糖タンパク質は CNX/CRT によって小胞体内にトラップされる。一方どうしても高次構造を獲得できないタンパク質は、細胞質に逆輸送され、細胞質に存在するプロテアソームによって分解される。

当するシグナルが広幅化したことより、G1M9 糖鎖が CRT のリガンドとなることを確認した。さらに、微量熱量測定装置 (Isothermal titration calorimetry: ITC) を用いて解析を行った結果、CRT に対する G1M9 糖鎖の結合定数は  $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  であった。一方、G2M9 および M9 糖鎖との相互作用は、同様の条件下では観測されなかった。また、分岐部分の構造が異なる G1M8B 糖鎖の結合定数は G1M9 糖鎖に比べて 1/3 程度だった。これらの結果より、非還元末端部分のグルコース構造に加えて分岐部分の構造も相互作用に関与していることが明らかとなった。

### 2.2 フォールディングセンサータンパク質 (UGGT) の基質特異性解析

UGGT はフォールディング未完成なタンパク質上の M9 糖鎖を基質とするグルコース糖転移酵素で、M9 糖鎖にグルコースを付加することにより CNX/CRT の認識糖鎖構造へと再変換する。しかし、この特異な基質特異性のために有効な基質がなく、変性糖タンパク質を基質とした解析が行われてきた。そのため糖鎖構造の不均一性に起因する曖昧さを含んでいた。筆者らは糖鎖結合-MTX (メトトレキセート) が UGGT の良い基質になることを見いだした。そして種々の糖鎖結合-MTX を合成することにより、均一な糖鎖構造を有する基質を用いて UGGT のグルコース転移活性の解析に成功した。さらに酵素反応生成物を単離、別途合成した糖鎖と NMR を比較することにより、UGGT による反応生成物が G1M9 構造であることを明らかにした。

### 2.3 グルコシダーゼ II の基質特異性解析

グルコシダーゼ II は G2M9 糖鎖上の二つのグルコース残基を除去する糖加水分解酵素である。グルコシダーゼ II の解析は古くから行われていたが、単一構造の基質を調製することが困

難であるために厳密な基質特異性解析は行われていなかった。そこで、糖鎖結合-MTX を用いて基質特異性解析を行った。その結果、G1M9 および G1M8B 糖鎖は、ほぼ同等の速度で加水分解されて M9 および M8B 糖鎖へと変換されるのに対し、G1M8C 糖鎖は加水分解されにくかった。このようにグルコシダーゼ II は糖鎖の微細構造を認識していることが明らかとなった。また興味深いことに、CRT 存在下、G2M9 糖鎖のグルコース除去を行った場合、グルコースの切断が阻害され、M9 糖鎖まで加水分解されず、G1M9 糖鎖が蓄積することが明らかとなった。

### おわりに

収斂的経路による小胞体関連アスパラギン結合型糖鎖の系統的合成に成功し、得られた糖鎖を利用して CNX/CRT サイクルの定量的解析を行った。以上の研究において、CRT の糖鎖選択性は現在考えられている仮説と良く一致した。また、G1M8B 糖鎖は CRT との結合が弱く、さらにグルコシダーゼ II により速やかに M8B 糖鎖へと変換されるという結果は、M8B 構造が不要タンパク質分解に関与しているという報告との関連からも興味深い。一方 CRT 存在下、G1M9 糖鎖がグルコシダーゼ II によって M9 構造へと変換されなかったことは、G1M9 糖鎖を有するタンパク質は小胞体に係留され続けることを意味する。このような現在の仮説と矛盾する結果は、糖鎖を利用した解析に加えて、糖鎖のおかれている環境も含めた解析の必要性を示していると思われる。今後は、糖鎖のみの解析から糖タンパク質レベルの解析へと研究を展開することにより、糖鎖を介したタンパク質品質管理機構の理解がさらに深まると考えている。

本研究は独立行政法人理化学研究所中央研究所伊藤細胞制御化学研究室にて行われたものであり、本研究を行う機会を与えていただいた当研究室主任研究員の伊藤幸成先生に心より感謝いたします。またご協力いただきました当研究室の皆様にお礼申し上げます。本研究は共同研究者の皆様のご厚意とご支援によって初めて進めることができたものであり、この場をお借りして感謝申し上げます。多くの有力なご助言を賜りました東海大学教授の中原義昭先生、東京大学大学院農学生命科学研究科教授の北本勝ひこ先生、ならびにご支援賜りました諸先生方に感謝いたします。学位論文作成に際して多くのご指導、ご助言をいただきました東京大学名誉教授の北原 武先生、東京大学大学院農学生命科学研究科教授の渡邊秀典先生に感謝いたします。また、学生時代よりこれまで絶え間ないご指導、激励をいただきました横浜市立大学大学院教授の榊原 徹先生、明治乳業株式会社で在職中ご指導いただきました鯉坂勝美先生（現 新潟薬科大学教授）はじめ同僚の皆様にも深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました独立行政法人理化学研究所の小川智也先生に心よりお礼申し上げます。