

## 糖タンパク質の機能解析をめざす複合科学的研究

理化学研究所基幹研究所 主任研究員

科学技術振興機構 ERATO 研究総括 伊藤 幸成

### 1. はじめに

タンパク質の翻訳後・翻訳時修飾の中で、糖鎖付加は最も広範かつ重要なものである。現に真核生物タンパク質の多くは糖鎖が付いた糖タンパク質の形で存在しており、原核生物においてもさまざまな形のタンパク質糖鎖修飾が見いだされている。それらの糖鎖が関与する生命現象は多岐にわたっており、タンパク質の機能を調べるうえでも、糖鎖の関与を考慮に入れることは必要不可欠である。一方、糖タンパク質糖鎖の機能解析において、その構造多様性と不均一性が障壁となっている。これを解決するものとして、合成化学的手法による糖鎖の供給に期待が寄せられてきた。

有機合成化学が生命科学の発展に大きな役割を果たしてきたことは明白である。主要な生体高分子であるタンパク質や遺伝子を構成するペプチドやオリゴヌクレオチドに関しては極めて洗練された合成法が確立されており、自動合成機を用いれば専門家でなくとも比較的容易に合成できる状況にある。現在の分子生物学、細胞生物学の繁栄はまさに合成化学の力によって支えられているとあって差し支えないであろう。しかし、糖鎖はこれらと異なり、グリコシド結合の立体化学や結合位置に起因する多数の異性体が存在しうる。また、遺伝情報の直接の産物ではないため、生物学的手法の適用範囲も自ずと限定される。われわれの研究室では、糖鎖の化学合成における独自の手法を基盤として、糖タンパク質糖鎖が持つ生物機能の解析をめざして研究を行ってきた。本講演では、われわれが行ってきた研究についてこれまでの流れを振り返りつつ、最近の成果を中心に紹介したい。

### 2. 糖タンパク質のプロセッシングと品質管理機構の解析

糖鎖の生物機能に関してわれわれが力を入れて研究を展開してきたものとして、糖タンパク質フォールディング機構への関与がある(図1)。近年、小胞体内におけるタンパク質のフォールディング、細胞内外の輸送、不良タンパク質の分解な

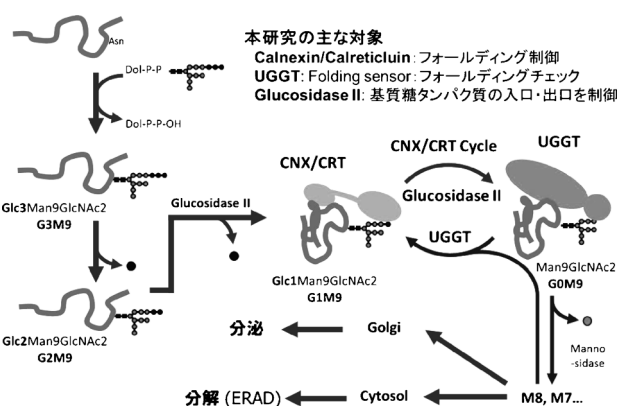


図1 小胞体における糖タンパク質のプロセッシング

どに糖タンパク質糖鎖が関与していることが徐々に明らかにされている。これらは「糖タンパク質品質管理機構」と呼ばれ、糖鎖生物学において極めて注目度の高い課題になっている。

われわれはこの過程において中心的な役割を担う小胞体内に存在する高マンノース型糖鎖を網羅的に合成する手法を確立し、合成糖鎖やそれらのタンパク質複合体を用いて糖タンパク質品質管理機構の精密解析を行ってきた。なかでも小胞体内品質管理機構の中核をなすカルネキシン/カルレティキュリン(CNX/CRT) サイクルを担う「フォールディングセンサー」タンパク質UDP-グルコース:糖タンパク質グルコース転移酵素(UGGT)、小胞体グルコシダーゼII、糖鎖認識性シャペロンカルレティキュリンの定量的解析に成功したことは重要な成果であり、糖鎖科学における合成化学的手法の威力を示したものである。また、小胞体関連分解における鍵酵素であるユビキチンリガーゼFbs1やペプチドN-グリカナーゼの定量的解析においても重要な知見を得ている。これまで糖タンパク質品質管理機構の解明は利用可能な糖鎖のバリエーションおよび量の制限によって妨げられてきた。われわれの研究成果はこれらの問題点を一挙に取り除くものであり、糖鎖生物学の進歩に資するところは極めて大きいと考えられる。また、本研究により合成された糖鎖は、ほかに類を見ないリソースとして注目され、多くの共同研究に発展している。代表的なものとしてFbs1糖鎖結合能の解明、高HIVレクチンactinohivinの構造生物学的研究がある。

### 3. 糖タンパク質糖鎖の新規合成手法の開発と標的志向型合成

上述のように、われわれは真核生物が持つ高マンノース型糖鎖の合成とそれを用いる糖鎖生物学研究の一つの柱として研究を行ってきた。一方、最近になり、さまざまな形のタンパク質グリコシル化が見いだされ、それらの生物機能にも興味を持たれる。その中で特にユニークなものとしてC-マンノシル化トリプトファンが挙げられる。われわれはいち早くこの課題に取りかかり、その化学合成を達成しその生物-医学的研究を展開している。加えて、感染症に関わる複合糖質を対象にした合成研究も展開してきた。主な研究対象として結核菌細胞壁成分アラビナン、食中毒原因菌である*Campylobacter jejuni*の糖タンパク質、寄生虫糖タンパク質糖鎖、が挙げられる。これらの成果は微生物感染機構の解明やオリゴ糖転移酵素による糖タンパク質の微生物生産に関する研究の重要な起点となるものである。

上記の研究において、糖鎖の化学合成における新規な手法が基盤になっている。生物試料に由来する糖鎖は構造が極めて不均一であり、糖鎖の微細構造と機能の関連づけはしばしば困難である。化学合成はこの難点を取り除くことができるという点で優れている。糖鎖の合成においては選択性が常に問題となる

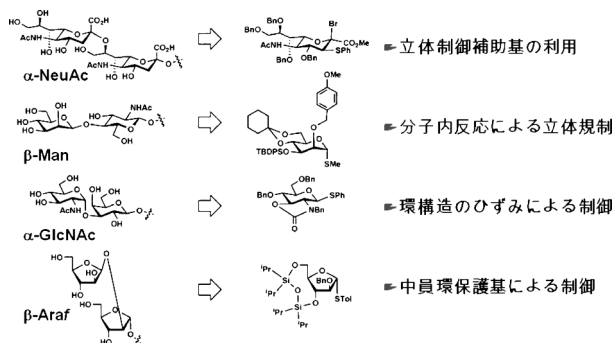


図2 糖タンパク質糖鎖の合成における立体制御

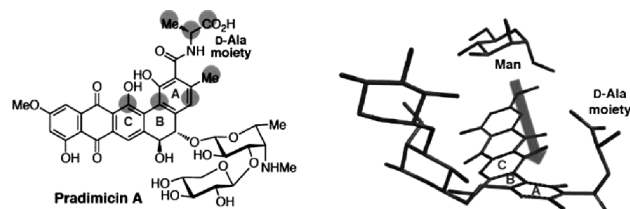
が、特に糖鎖を構成するグリコシド結合の形成における立体化学の制御は重要課題である。グリコシル化反応の立体化学は基質の構造変化や反応条件による影響を受けやすく、実験結果の蓄積による経験則も十分に整っていない。糖鎖の自動合成をうたった研究が行われ始めて久しいが、主として選択性の問題がネックとなり、真の実用性におけるビジョンは開けていない。

グリコシド結合の中にも、選択的な合成が特に困難なものがある。例えば、シアル酸の $\alpha$ -グリコシドやマンノースの $\beta$ -グリコシドは糖タンパク質の共通構造でありながら選択的な合成法が確立されておらず、糖化学における難問であった。われわれはこれらの問題に取り組み、補助基を用いる立体制御や分子内アグリコン転移反応、などの新たな手法を開発してその解決に成功した(図2)。また、電子的効果や構造固定化などさまざまな立体選択的グリコシル化反応を開発し、新しい概念を提供してきた。反応の選択性を迅速に評価する方法や凍結条件下の高効率グリコシド形成反応も開発している。このようにして開発された手法はジシアロガングリオシド、シアル酸含有複合型糖鎖、高マンノース型糖鎖、微生物糖鎖などの初の合成に発展している。

一方、糖鎖の構造多様性を見据えると「多様な構造をいかにして迅速に合成するか」という視点の研究も重要である。そこでさまざまな切り口でこの問題点に取り組み、糖供与体の化学選択性を利用するオルトゴナル合成法、反応をリアルタイムで追跡する方法、反応混合物から望む生成物を特異的に選別する手法、など、糖鎖合成の迅速化に有用な独自の手法を開発し、それらを発展させて複合型糖タンパク質糖鎖の多様性志向型合成を達成した。さらに、腫瘍の悪性化と関連深い*N*-アセチルグルコサミン転移酵素-V (GnT-V) およびそのホモログであるGnT-IXを阻害する物質の開発を達成している。

#### 4. 糖鎖結合性分子の分子認識機構解析

また、生体内の糖鎖認識現象に加え、糖鎖結合能を持つ化合物(CBA)の開発にも興味を持って研究を行っている。CBAは純粋科学的な視点のみならず、医薬開発の視点からも興味深い課題である。特にD-マンノース(Man)を特異的に認識する天然有機化合物であるPradimicin (PRM)に着目し、その分子認識機構解明に向けた研究を行っている。すでに、固体NMRを用いる新規なアプローチにより、PRMのD-アラニン部分お



#### ● 固体NMRによって確認された PRM-Man結合モデル Man相互作用部位

図3 糖鎖結合性天然物 Pradimicin

よびA, B, C環部位が認識に重要であることを見いだしている(図3)。Manを特異的に認識する分子は、抗HIV薬に発展する可能性が示唆されているが、その中でPRMは非糖タンパク質性のCDBとして特異的な位置を占めている。本研究は、天然物化学の視点から糖鎖生物学の新たな方向性を志向するものであり、その成果は新規な糖鎖認識分子のデザインと、医薬候補化合物の探索研究に発展することが期待される。

#### 5. 結 び

思いがけぬきっかけで糖質科学の世界に飛び込んでいつの間にか28年が経ってしまった。その間、糖鎖生物学という学問分野が確立されていく過程を目の当たりにしてきた。国内、国外において第一線の有機合成化学者が糖鎖や糖タンパク質の化学合成に取り組むようになり、糖鎖生物学も構造生物学、細胞生物学、臨床医学、さらには材料科学との接点で大きな発展を遂げている。私自身も、周囲の方々の協力を得て、なかば素人仕事ながら糖鎖生物学との境界に研究を広げるよう努力してきた。その結果、化学合成が糖鎖生物学に寄与する例として、かすかなりとも航跡を残すことができたと思っている。合成糖鎖を駆使した研究自体に新味があるものではなく、類似の研究は数多くの研究者によって行われている。しかし、そのほとんどは何らかの前提に基づいて、天然型糖鎖の部分構造に着目したものである。それに対し、われわれはあえて全体構造の合成にこだわってきたが、それによって初めて見えてきたものもあると感じている。このように愚直な研究が、生物科学領域における有機合成化学の一つのあり方を示すものと感じていただければ幸いである。

謝 辞 研究者人生における転機をお与えいただき、長年にわたりご指導を賜りました小川智也先生に厚く御礼申し上げます。また、伝統ある農芸化学会に入会以来常に暖かい励ましをくださいました松井正直先生、森 謙治先生、北原 武先生、中原義昭先生に心より感謝申し上げます。ここに紹介した研究は、その大部分が理化学研究所細胞制御化学研究室において行われたものです。現在の研究室メンバーに加え、これまでに在籍されたすべてのの方々および共同研究にご協力くださった先生方に感謝いたします。最後に、本成果の礎となった有機合成化学の基本をご指導くださいました、大野雅二先生、正宗 悟先生に深謝を捧げます。