

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成14年度採択研究代表者

伊藤 幸成

(独立行政法人理化学研究所中央研究所 主任研究員)

「糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明」

1. 研究実施の概要

糖タンパク質の品質管理機構は、小胞体、ゴルジ体から細胞質でのフォールディング、輸送、分解の課程を包括するものである。この現象は糖鎖の細胞活動の根幹への関与を示唆するものとして、糖鎖生物学に強いインパクトを与えている。

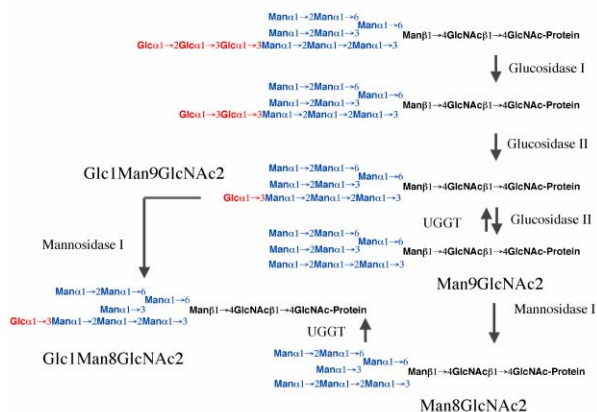
研究代表者のグループで行なわれてきた糖タンパク質糖鎖の合成研究により、様々なアスパラギン結合型糖鎖（高マンノース型）の精密合成が可能になっている。本研究はそのポテンシャルを最大限に活用し、種々の高マンノース型糖鎖やその部分構造、更にそれらを含む糖タンパク質の有機化学的創成を行ない、品質管理機構における糖鎖の役割を解明する。タンパク質品質管理における従来の研究は構造の不明確な糖タンパク質を用いて行なわれてきたものが殆どであることから、詳細については大部分が不明であり様々な見解の不一致も見られる。それに対し合成糖鎖、糖タンパク質を自在に造り出す手法を推進力とする本研究の実施により糖タンパク質品質管理の分子機構について明確な理解が得られることが期待できる。

2. 研究実施内容

伊藤グループ（理研）

本課題の最初の目標として設定した、小胞体内シャペロンCalnexin (CNX)/ Calreticulin (CRT)のリガンドと考えられている12糖 (Glc₁Man₉GlcNAc₂)の合成研究を完了した。本合成は当研究室で独自に開発した手法（立体選択的グリコシル化、超高压条件の脱保護）を有効に利用することにより行ったものである。また、新規な保護基（ペンタフルオロプロピオニル基）を用いてその部分構造

小胞体内での糖タンパク質プロセッシング



(Glc₁Man₃, Man₃)を簡便に合成する手法を開発した。このようにして合成した糖鎖を用

いて、名市大加藤グループとの共同研究によりNMRを用いるCRTとの結合実験を行った。その結果、CRTは高い特異性でGlc₁Man₉GlcNAc₂と結合し、その認識には末端のGlc₁Man₃が重要であることが確認された。現在、他の手法と併せてCRTやその他のタンパク質と合成糖鎖の結合についてより系統的かつ定量的な測定を行っている。

続いて、均一な糖鎖を持つ人工糖タンパク質の創製をめざし、糖鎖-methotrexate (MTX) 複合体の合成を検討した。アスパラギン結合型糖鎖のコア 5 糖 (Man₃GlcNAc₂) と MTXの複合体はDehydrofolate dehydrogenase (DHFR) に強く結合することが分かった。現在、種々の小胞体型糖鎖 (Glc₁Man₉GlcNAc₂, Man₉GlcNAc₂, Glc₁Man₈GlcNAc₂, Man₈GlcNAc₂) をMTX複合体へと導き、これらを含む人工糖タンパク質の創製を検討している。

糖タンパク質の品質管理機構において、ミスフォールドした不良タンパク質の分解は重要な過程である。糖タンパク質の小胞体分解過程 (ERAD) において鍵となるマンノシダーゼ様タンパク質 (MLP) のリガンドは現在のところ同定されていないが、その最も有力な候補mannosidase-1によって生じるMan₈型糖鎖である。そこで、我々はGlc₁Man₈GlcNAc₂ 及びMan₈GlcNAc₂を標的とし、それらの合成を達成した。今後、外部との共同研究によってMLPとの相互作用解析へと展開して行きたい。小胞体内に存在する高マンノース型糖鎖の合成について、Glc₃型、Glc₂型にも対象を広げ、網羅的な合成の完成をめざして今後も継続して進めて行きたい。

以上に加えて、井原グループ、加藤グループ、鈴木グループとの共同研究に供するために種々の糖鎖プローブを合成した、その具体的な内容については以下に記載。

井原グループ (長崎大)

小胞体糖鎖プロセッシング阻害剤であるカスタノスペルミンによる、膵β-細胞株 (MIN6) のインスリン分泌機構への影響について解析した。これまでの結果では、カスタノスペルミン処理後、インスリンの細胞内含量の増加が観察された。この分子機構としてはインスリンの転写レベルや翻訳レベルでの制御は関与せず、細胞内小胞輸送への影響と変化が考えられた。平成16年度は、インスリン細胞内含量の変化の分子機構について、細胞内小胞輸送に関わる分子群への影響について、特にERタンパク質の残留に関わるKDEL受容体やCOP関連分子についての生化学的解析を進める。また、伊藤グループとの共同研究により、新規糖付加修飾として知られるC-マンノシル化トリプトファンに対する抗体を作製した。この糖付加修飾の細胞生理的役割について、種々の分泌タンパクを中心とした免疫化学的解析が進行中である。さらに、ERにおける糖タンパク質の品質管理のセンサーとしての機能が注目される糖タンパク質グルコース再付加反応について、伊藤グループが開発した新規合成糖鎖化合物が利用できることが明らかとなり、種々の合成糖鎖を用いた解析も進行中である。

加藤グループ (名市大)

ユビキチンリガーゼFbs1は、ユビキチンリガーゼ複合体の基質認識ユニットであり、糖

蛋白質に結合している糖鎖と結合する。その糖蛋白質をこれまでに免疫グロブリンを対象として開発してきた糖タンパク質の安定同位体標識技術を応用することによって、ユビキチンリガーゼFbs1のリガンドとなる糖ペプチドの安定同位体の調製に成功した。これにより、Fbs1の糖鎖結合部位を同定するとともに、糖鎖認識様式をNMRにより原子レベルで解析することが可能となった。

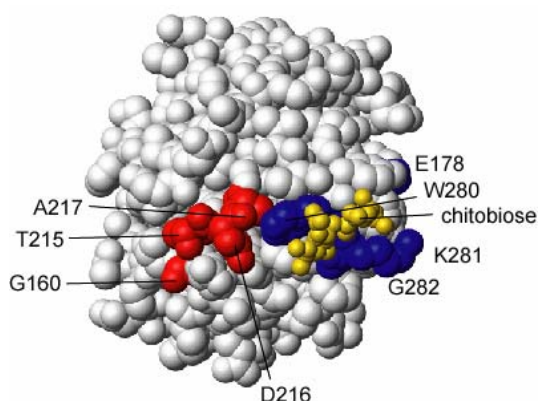


図. Fbs1の糖鎖結合部位

VIP36はFbs1同様細胞内レクチンの1つであり、輸送小胞に存在するカーゴレセプターとしての役割を担っている。NMRを用いてVIP36とリガンド糖鎖との相互作用解析を行った結果、VIP36は高マンノース糖鎖内のMan α 1-2Man α 1-2Man部分を特に認識していることが明らかとなった。さらにこの部分構造に対応するトリマンノースを用いて転移核オーバーハウザー効果(TR-NOE)の解析を行い、VIP36と結合したトリマンノースのコンフォメーションを決定した。

鈴木グループ (東大、阪大)

- (1) 理研伊藤グループより提供されたヨードアセトアミド基を導入した糖鎖を用い、酵母PNGaseをモデルタンパク質として糖鎖認識タンパク質の特異的な結合が出来るかを検討した。In vitroの系で検討を重ねた結果、適当な濃度 (~100 μ M) においては、タンパク質が (Cys残基が豊富なタンパク質であるにも関わらず)、一つの糖鎖を導入することに成功した。更に大腸菌中にPNGaseを発現させた抽出液中を用いてもPNGaseがほぼ特異的にラベルされたことから、このプローブがN型糖鎖を認識するタンパク質の検出に有効である可能性が示唆された。
- (2) 酵母の細胞内レクチンの機能解析をプロテオミクス的解析を行うための準備段階として、タンパク質の発現の際をマスマスペクトロメトリーで検出する機械、Protein chipの利用について検討を行った。その結果Protein chipの検出感度が高い分子量 (500~20,000) においては、大きく差を見い出すことが出来ないことが判明した。今後はより高分子量をターゲットとする2次元電気泳動に焦点を絞り、分泌タンパク質の差異を見れるように検討する。
- (3) 名古屋市立大 加藤グループによって行われるPNGaseの構造解析の一環として、マウスのPNGaseのN端に結合する次の3つのタンパク質について、その結合を調べた。
 - (I) Cdc48タンパク質-このタンパク質の各deletion constructsを作成して、Yeast two-hybridシステムによってN端のタンパク質との結合を調べたところ、全長タンパク質にもっとも高い親和性を示し、またN端の200残基は必ずしも結合に必須ではないことが明らかにされた。
 - (II) S4タンパク質-このタンパク質はプロテアソームの19Sのサブユニットであるが、deletion constructはいずれもPNGaseのN端ドメインに顕著な結

合を示さなかった。また、本タンパク質は大腸菌の発現系において可溶性のタンパク質として発現することが難しく、NMRによる結合の様式の解析には不適であることが予想される。(III)AMFR-AMFRは最近ERADに関わるユビキチンリガーゼとして同定されたが、その最後の膜貫通ドメインを含むC端ドメインがN端タンパク質との相互作用ドメインとして同定されている。今回NMR解析の為にこの膜貫通ドメインを除いたタンパク質とN端ドメインの相互作用を見たところ、その親和性が著しく低下することが観察された。このことから可溶性のタンパク質としてN端タンパク質との相互作用を同定するのは難しいと考えられる。これらの結果から、今後はPNGaseとのNMRによる解析の際は、すでに系が立ち上がっているユビキチンの他Cdc48タンパク質を用いて解析することが望ましいと考えられた。

山本グループ (東大)

小胞体内で合成された分泌蛋白質は、正しくフォールディングされた後、ゴルジ体を経て細胞外へ運びだされる。この際、VIP36は、非極性細胞においては糖鎖プロセシングの不完全なものをトランスゴルジから小胞体へ送り返すことを、また極性細胞においてゴルジ体から細胞表面への輸送を行うと考えられている。VIP36の糖鎖認識ドメインを用いて糖鎖との親和性を調べた解析から、中性からpH6.0に変化することにより構造変化による糖鎖に対する親和性が上昇すること、さらにpH6.0からさらに5.5へ変化するに連れて多量体化を伴うことがわかった。このことから、トランスゴルジ体でリガンドを結合し多量体形成により濃縮を引き起こすこと、また輸送小胞により運ばれたのちにリガンドを解離することが、いずれもpHにより制御されていることが説明できた。一方ERGIC-53は小胞体からゴルジ体への糖タンパク質の輸送に関与しているが、VIP36とは異なり、pH依存的な親和性の大きな変化はないこと、また多量体形成も認められなかった。VIP36とさらに異なる点として、MCFD2という新規の分子がERGIC-53とカルシウム存在下で特異的に強く結合していることも明らかにした。MCFD2は他のカーゴレセプターVIP36、VIPLとは結合しない点、ERGIC-53はstalk部分のジスルフィド結合で2量体または6量体を形成していることも明らかになり、VIP36とは異なる結合・遊離のメカニズムを持つことが示唆された。さらにVIP36に関しては、恒常的に相互作用する分子としてBiPを同定した。この分子はシャペロンとして知られている分子であり、pH変化により構造の崩れたVIP36が中性になるに伴いリガンドを遊離し、それと同時に構造を元に戻す際にBiPが関わっている可能性が示唆され、その意義を今後明らかにしたい。

他に、昨年6月にVIP36と高い相同性を持つVIPLの存在が報告された。VIP36とVIPLの違いを明らかにするためにも、個々を厳密に区別するプローブが必須であるため、VIPL、VIP36、ERGIC-53それぞれを特異的に認識するモノクローナル抗体の作成を行い、それぞれ複数のクローンを取得した。これらを用いて個々の分子の局在性、機能等に関する再評価を今後進める予定である。

3. 研究実施体制

(1) 理研 伊藤グループ

- ① 研究分担グループ長：伊藤 幸成（理化学研究所、主任研究員）
- ② 研究項目：糖タンパク質糖鎖、人工糖タンパク質の創成と糖タンパク質品質管理機能解明への応用

(2) 長崎大 井原グループ

- ① 研究分担グループ長：井原 義人（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科、助教授）
- ② 研究項目：小胞体内分子シャペロンによる品質管理機構の解明

(3) 名市大 加藤グループ

- ① 研究分担グループ長：加藤 晃一（名古屋市立大学薬学部、教授）
- ② 研究項目：糖鎖認識分子の大量発現系の構築、核磁気共鳴（NMR）法による糖鎖-糖鎖認識分子の相互作用解析

(4) 阪大 鈴木グループ

- ① 研究分担グループ長：鈴木 匡（大阪大学大学院医学系研究科、特任助教授）
- ② 研究項目：細胞内トランスポーターの解析、細胞内レクチンのバイオインフォマティックス解析

(5) 東大 山本グループ

- ① 研究分担グループ長：山本 一夫（東京大学大学院新領域創成科学研究科、教授）
- ② 研究項目：細胞内レクチンによるタンパク質輸送機構の解明と新規 cargo receptor 創成による糖鎖利用技術への応用

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Jun Nakano, Tsuyoshi Ichianagi, Hiromichi Ohta and Yukishige Ito: "A novel method for the formation of N-glycosides using hydroxamate", *Tetrahedron Lett.*, **44**, 2853-2856 (2003)
- Ichiro Matsuo, Megumi Wada, Shino Manabe, Yoshiki Yamaguchi, Keisuke Otake, Koichi Kato, and Yukishige Ito: "Synthesis of monoglucosylated high-mannose-type dodecasaccharide, a putative ligand for molecular chaperone, calnexin, and calreticulin", *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3402-3403 (2003)
- Maki Takatani, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito: "Pentafluoropropionyl and trifluoroacetyl groups for temporary hydroxyl group protection in oligomannoside synthesis", *Carbohydr. Res.*, **338**, 1073-1081 (2003)
- Ichiro Matsuo and Yukishige Ito: "Synthesis of an octamannosylated glycan chain, the key oligosaccharide structure in ER-associated degradation", *Carbohydr. Res.*, **338**, 2163-2168 (2003)

- Maki Takatani, Jun Nakano, Midori A. Arai, Akihiro Ishiwata, Hiromichi Ohta, Yukishige Ito: "Accelerated glycosylation under frozen conditions", *Tetrahedron Lett.*, **45**, 3929-3932 (2004)
- Kiichiro Totani, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito: "Tight binding approach to oligosaccharide-grafted protein", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 2285-2289 (2004)
- Mizushima T, Hirao T, Yoshida Y, Lee SJ, Chiba T, Iwai K, Yamaguchi Y, Kato K, Tsukihara T, Tanaka K: "Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase", *Nature Struct. Mol. Biol.*, **11**, 365-370 (2004)
- Noriko Takahashi, Katsuyoshi Masuda, Kenji Hiraki, Kazuo Yoshihara, Hung-Hsiang Huang, Kay-Hooi Khoo and Koichi Kato: "N-Glycan structures of squid rhodopsin: Existence of the α 1-3 and α 1-6 difucosylated innermost GlcNAc residue in a molluscan glycoprotein", *Eur. J. Biochem.* **270**, 2627-2632 (2003)
- K. Tajima, N. Matsumoto, K. Ohmori, H. Wada, K. Suzuki, K. Yamamoto: "Augmentation of NK cell-mediated cytotoxicity to tumor cells by inhibitory NK cell receptor blockers", *Int. Immunol.*, **16**, 385-393 (2004)
- H. Wada, N. Matsumoto, K. Maenaka, K. Suzuki, K. Yamamoto: "The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues", *Eur. J. Immunol.*, **34**, 81-90 (2004)
- M. Mitsuki, N. Matsumoto, K. Yamamoto: "A species-specific determinant on b2-microglobulin required for Ly49A recognition of its MHC class I ligand", *Int. Immunol.*, **16**, 197-204 (2004)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）