

「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）

糖タンパク質の品質管理機構には様々なレクチン、シャペロン、カーゴレセプターが関わっている。これらの多くは小胞体内に存在し、高マンノース型糖鎖の微妙な構造の違いを認識すると考えられる。従って、小胞体内での存在が想定される高マンノース型糖鎖を網羅的に合成することは重要である。そこで、本研究では前年度に続き高マンノース型糖鎖の網羅的合成について検討を行った。その結果、高マンノース型糖鎖生合成の過程で、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 ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$)（前年度に合成が完了）の上流に位置する14糖 ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$)、13糖 ($\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$)の合成を完了した。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進めている。

一方、均一な糖鎖を持つ人工糖タンパク質の創製をめざして様々な試みを行っている。そ

の一環として、糖鎖-methotrexate (MTX)複合体の合成とDehydrofolate dehydrogenase (DHFR)への導入を昨年度から検討している。その過程で、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -MTXがUGGT (UDP-Glc: Glycoprotein Glucosyltransferase)の良好な基質になることを見出した。UGGTは小胞体内フォールディングセンサーとして重要な機能を果たしていると言われていたが、ミスフォールドしたタンパク質に結合した $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ のみを基質とするという特異な性質のため解析が進んでいない。我々の結果は、UGGTが小分子を基質として認識した初めての例であり、UGGTの生化学的解析の上できわめて有用なツールを与えるものと期待される。更に、糖鎖結合性を持つE3ユビキチンリガーゼ (Fbs1) の特異性を調べる目的で、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}_2$ をそれぞれ合成した。続いてFbs1に対する結合能を、ITCを用いて比較した。その結果、 $\text{Man}\alpha 1-6\text{GlcNAc}_2$ が最も強い結合を示した。より系統的な解析を天然型の糖鎖との比較の上で行っている。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のカスタノスペルミンは膵 β -細胞株 (β TCとMIN6) のインスリン分泌を抑制する。前年度までの研究から、プロセッシング阻害剤はインスリン合成の転写、翻訳レベルにではなく、分泌小胞輸送系に影響することが明らかとなった。また、カスタノスペルミン処理細胞での解析から、小胞体における糖鎖認識機構の制御がカルレティキュリンの細胞内局在に影響することを見出した。平成17年度は、小胞体糖鎖プロセッシング制御の変化が分子シャペロンの小胞輸送経路における局在をどのように制御しているのか、伊藤グループが合成した Glc1Man3-Biotin などの合成糖鎖基質を用いて分子機構の解析を進めていく。

一方、C-マンノシル化トリプトファンに対するウサギポリクローナル抗体を用いて、細胞株や疾患モデルラットの各種臓器におけるC-マンノシル化トリプトファン発現の細胞生物学的解析を行った。その結果、マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7において、高グルコース濃度(30mM)での培養条件で、C-マンノシル化トリプトファンの発現レベルが増加することを見出した。さらに、高グルコース濃度の影響を個体レベルで調べるため、II型糖尿病モデルとして知られるZucker fatty ratの各種臓器を解析したところ、大血管ではコントロールと比べ、C-マンノシル化トリプトファンの発現レベルが増強していることを確認した。また、実際に大血管でC-マンノシル化を受けると考えられる標的タンパク質としてトロンボスポンジンを同定した。以上の結果より、C-マンノシル化タンパク質は高グルコース濃度で培養した細胞株や糖尿病モデルの血管組織で増加することから、糖尿病などの血管病変における新規病態マーカーとしての可能性が考えられる。また、実際に細胞間の接着やシグナル伝達の制御に関与するトロンボスポンジンがC-マンノシル化の標的タンパク質のひとつであるということは、その病態分子機構における関与も考えられる。平成17年度は、伊藤グループで合成されたC-マンノシル化ペプチドに対する新たなモノクロー

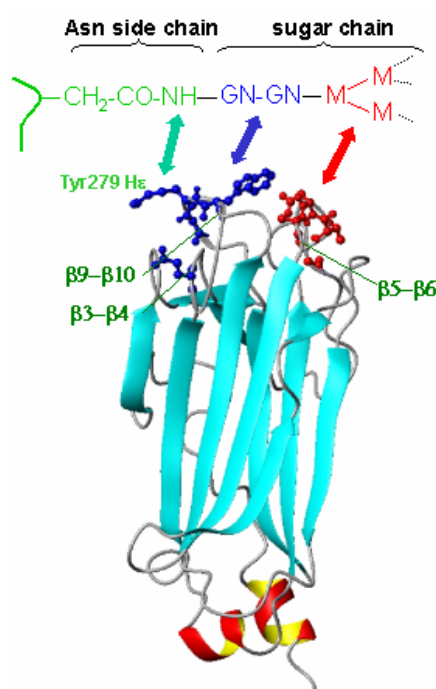
ナル抗体の作製を進める。さらに、マクロファージのシグナル伝達系に対するC-マンノシル化トリプトファン含有ペプチドの生理機能についての細胞生物学的解析を進める予定である。

また、伊藤グループで開発された種々の新規糖鎖基質（高マンノース型糖鎖-MTX複合体）を用いることにより、糖タンパク質の品質管理に重要な糖タンパク質の再グルコース付加反応において、これまで詳細な解析ができなかったUGGTによる糖鎖認識機構の生化学的な解析が可能となった。現在、その詳細な解析が進行中である。

加藤グループ（名市大）

ユビキチンリガーゼであるFbs1は不要となった糖蛋白質の分解に関わる細胞内レクチンである。安定同位体標識糖ペプチドをリガンドとしてNMR解析を行うことにより、Fbs1はリガンドの糖鎖部分だけでなく糖鎖結合部位であるAsn残基ともコンタクトしていることが明らかとなった。従ってFbs1は糖鎖還元末端近傍を認識することで、ユビキチン-プロテアソームシステムにおいて分解標的となるアンフォールド状態の糖タンパク質と特異的に相互作用しユビキチン化を行うことが示唆された。

VIP36はカーゴレセプターとして糖タンパク質の輸送を担っている。18種類のリガンド糖鎖についてフロントアルフィニティクロマトグラフィを用いて相互作用解析を行った結果、VIP36はD1アームにMan α 1-2Man α 1-2Man構造を有する高マンノース型糖鎖に対し高い親和性を示すことが明らかとなった。この結果は、ERグルコシダーゼIIによって非還元末端のグルコース残基が除去された後、*cis*ゴルジマンノシダーゼIが作用するまでの間の生合成過程に現れる糖鎖に対してVIP36は相対的に高い親和性を有することが明らかとなった。さらにNMRの化学シフト摂動実験により、VIP36の β サンドイッチ構造の β シートのくぼみにD1アームのMan α 1-2Man α 1-2Man糖鎖が収納されることが明らかとなった。



Fbs1による糖鎖認識機構

鈴木グループ（阪大）

(1) 昨年同定した出芽酵母PNGaseとヨードアセトアミド基を導入した糖鎖（理研伊藤グループより提供）との結合のキャラクタリゼーションを行った。其の結果、結合位置のCysは分子内の14のCysのうち一つの糖鎖のみを導入すること、その結合は非常に迅速かつ特異的であることが明らかにされた。またこの糖鎖によるラベルは酵素の阻害も引き起こ

し、実際に活性中心のCysをAlaに変えた変異体を用いた実験では糖鎖のラベルが起こらなかった。これらの結果から、本糖鎖プローブは活性の特異的な阻害剤としても利用出来ることが明らかとなった。

(2) 出芽酵母の細胞内レクチンの解析については、細胞内レクチンと予想されるEMP46およびEMP47遺伝子の2重欠損株を用いて、増殖期における遺伝子発現プロファイルの差異を遺伝的に同一の野生株と比較したところ、統計学的に意味のある値として、(産物が)細胞壁に局在する遺伝子群が発現増加し(9.40E-08)、一方でリボソーム関連遺伝子(3.72E-19)、タンパク質の代謝系に関わる遺伝子(2.67E-12)、タンパク質の生合成に関わる遺伝子(6.50E-12)群の発現低下が見られた。このことからこれらの細胞内レクチンの欠損は恐らく様々なタンパク質の輸送異常を引き起こし、その結果細胞質へのタンパク質の供給を増やす動きが起こる一方で、細胞はタンパク質の無駄な生合成、代謝を押さえていることが予想された。しかしながら特定の遺伝子で特に興味深いものは見出せなかった。

(3) 哺乳動物細胞の遊離糖鎖代謝に関わる細胞質マンノシダーゼのキャラクタリゼーションを行った。また、本酵素活性の阻害が細胞に与える影響を調べる上で、遊離糖鎖を細胞質に直接マイクロインジェクションする系、あるいは酵素のsiRNAを用いてRNAiによる発現阻害の系を確立した。本酵素はもともと小胞体の酵素としてとられているものであるが、発現されている酵素の局在性を生化学的、あるいは免疫化学的に調べた結果、その殆どが細胞質に局在することが判明した。また、マンノシダーゼの阻害を行うsiRNAのデザイン、合成を行い、その効果が確かめられた。これにより細胞への糖鎖、siRNAのインジェクションが可能になり、細胞の形態に糖鎖の蓄積が強い影響を及ぼすことが明らかとなった。

(4) (1)と関連して、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 microM)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。

(5) 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が見られるように検討する。

(6) 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)

(1) 細胞内において分泌タンパク質の輸送や選別を行っているレセプターVIP36に関して、細胞内オルガネラのpHに従い会合が起こり糖結合活性が増強すること、またこの反応は可逆的であることを明らかにした。一方、同じファミリーのERGIC-53の糖結合活性に及ぼす影響を調べたところ、その活性調節のメカニズムは大きく異なっていることがわかった。ERGIC-53の糖結合活性を調べたところ、Ca²⁺存在下、且つMCFD2添加により初めて結合が観察された。このことは、ERGIC-53とMCFD2が結合して初めてレクチン活性をあらわすことを示唆しており、ERGIC-53またはMCFD2の遺伝子に欠損のある患者が同じ症状を呈することと良く一致していた。またMCFD2はゲルろ過で二量体を形成しているように思われ、MCFD2ダイマーの結合によりERGIC-53の2,6量体がさらに大きな多量体を形成するものと予想された。しかし、MCFD2の結合によりERGIC-53が不活性型から活性型へ構造変化する可能性も残されており、NMR等を用いた詳細な構造解析(加藤との共同研究)を行う必要がある。

(2) VIP36に恒常的に結合しVIP36と共沈降するタンパク質の探索を行ったところ、分子量80kDa付近にバンドが観察され、LC-MS/MSを用いた同定により、BiPであることが明らかになった。BiPはシャペロン分子として変性したタンパク質と特異的に結合することが知られているが、シャペロンとしてBiPが種々の基質を結合する際には、金属イオンに依存しないことやADP存在下で結合しATP存在下で解離することが知られているのに対して、BiPとVIP36の結合はMg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺依存的事であること、またATP/ADP非依存的であることが明らかになった。このことから、フォールディングが不完全のままゴルジ体へ誤って輸送された糖タンパク質を、VIP36とBiPが共同で小胞体へ送り返す逆行輸送に関わっている可能性が考えられた。

(3) 小胞体内での糖タンパク質品質管理に関わるタンパク質は、しばしば小胞体ストレスに応答して発現誘導されることが報告されている。ヒト精巣癌細胞DU-145を用い、未処理及び5ug/mlツニカマイシン処理14, 24, 42時間後の細胞内レクチンのストレス応答を網羅的解析した。シャペロン、分解系に関わる分子、輸送選別に関わる分子は、いずれも時間経過に伴い5倍から数十倍に発現が増加したのに対して、VIPLは発現の変動が認められず、他の分子とは異なる挙動を示した。また、VIPLと相互作用するタンパク質を検索したところ、VIPLはERGIC-53と特異的に相互作用していること、またこの相互作用は小胞体内で起こっており、ゴルジ体では結合していないことが示唆された。これらの結果から、VIPLは細胞内輸送のcargo receptorそのものではなく、これらの分子の機能を調節している制御分子である可能性が示唆された。

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（原著論文）発表

- K. Totani, I. Matsuo, M. Takatani, M. A. Arai, S. Hagihara, Y. Ito,

- “Synthesis of glycoprotein molecular probes for the analyses of protein quality control system”, *Glycoconjugate J.*, **21** (2004) 67-74
- S. Hanashima, S. Manabe, K. Inamori, N. Taniguchi, Y. Ito, “Synthesis of a bisubstrate-type inhibitor of N-acetylglucosaminyltransferases”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43** (2004) 5674-5677
 - Y. Ito, S. Hagihara, M. A. Arai, I. Matsuo and M. Takatani, “Synthesis of fluorine substituted oligosaccharide analogues of monoglucosylated glycan chain, a proposed ligand of lectin-chaperone calreticulin and calnexin”, *Glycoconj. J.*, **21** (2004) 257-266
 - Y. Ihara, S. Manabe, M. Kanda, H. Kawano, T. Nakayama, I. Sekine, T. Kondo and Y. Ito: Increased expression of protein C-mannosylation in the aortic vessels of diabetic Zucker rats. *Glycobiology*, **15**, 383-392 (2005)
 - Y. Ihara, K. Kageyama and T. Kondo: Overexpression of calreticulin sensitizes SERCA2a to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **329**, 1343-1349 (2005)
 - T. Horibe, H. Matsui, M. Tanaka, H. Nagai, Y. Yamaguchi, K. Kato, M. Kikuchi: “Gentamicin binds to the lectin site of calreticulin and inhibits its chaperone activity.”, *Biochem Biophys Res Commun.* **323**, 281-287 (2004)
 - T. Suzuki (2004) Oligosaccharide chains: Free, *N*-linked, *O*-linked. Encyclopedia of Biological Chemistry 3, 161-164.
 - K. Yamamoto, S. Ito, F. Yasukawa, Y. Konami, N. Matsumoto: “Carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed particle-based flow cytometric assay”, *Anal. Biochem.* **336**, 28-38 (2005)
 - 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)
 - Kusui, H. Sasaki, R. Adachi, S. Matsui, K. Yamamoto, T. Yamaguchi, T. Kasahara, K. Suzuki: “Ribosomal protein S18 identified as a cofilin-

binding protein by using phage display library”, *Mol. Cell. Biochem.* **262**, 187-193 (2004)

- Y. Araki, N. Miyagi, N. Kato, T. Yoshida, S. Wada, M. Nishimura, H. Komano, T. Yamamoto, B. D. Strooper, K. Yamamoto, T. Suzuki: “Coordinated metabolism of Alcadin and amyloid protein precursor regulates FE65-dependent gene transactivation”, *J. Biol. Chem.* **279**, 24343-24354 (2004)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：2件）