「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　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、分解の過程を包括するものである。最近になり、これらの過程において糖鎖（特に高マンノース型糖鎖）が重要な役割を果たしていることを示唆する結果が次々と報告されている。研究代表者のグループでは種々の糖タンパク質糖鎖の合成とそれに必要な方法論の開発を行って来た。その結果、種々のアスパラギン結合型糖鎖の系統的合成への道を開くことができた。そこで、本研究室の糖鎖合成化学のポテンシャルを最大限に活用すれば、糖タンパク質品質管理における様々な糖鎖− タンパク質相互作用の詳細解析につなげることができると考えられる。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、本研究では過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。これらを用いて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。昨年度、$Man_9GlcNAc_2$−MTX が UGGT (UDP−Glc: Glycoprotein Glucosyltransferase)の良好な基質になることを見出した。１７年度は Man_8(B)$GlcNAc_2$, Man_8(B)$GlcNAc_2$, Man_8(C)$GlcNAc_2$ の MTX 複合体を合成し、これらを用いて UGGT の糖鎖基質特異性を解析した。その結果 Man9>Man8>Man7 の順に反応性が低下すること、K_m 値はそれぞれ 207 mM (M9)、197 mM (M8B)、448 mM (M8C)、46 mM (M7) であった。このように、我々が開発した合成基質によ

り、UGGT の詳細解析が可能になった。
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-methotrexarte (MTX) 複合体(CHO-MTX)の合成と Dihydrofolate reductase (DHFR) への導入を引き続き検討した。また、システイン残基への共有結合を介した DHFR への糖鎖導入についても初期的な成果を得ている。これにより、MTX との相互作用と併せて２種類の異なる高マンノース型糖鎖が結合した人工糖タンパク質型プローブを調製することが可能になった。

糖鎖の迅速合成法に関しては、以下の研究を行った。まず、これまで当研究室で行われて来たポリエチレングリコールを用いる糖鎖合成系を拡張し、高分子担体を用いない糖鎖迅速合成法を開発した。これを用いて高マンノース型糖鎖の CNX/CRT 結合部位に相当する Glc_1Man_3-Man 及び関連する糖鎖を合成した。現在これらをセンサーチップに固定化し、CRT をはじめとする種々のタンパク質との相互作用解析を試みている。また、糖鎖合成の鍵になるグリコシル化反応をハイスループットに最適化する系を開発した。

以上に加えて、他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）：小胞体糖鎖プロセシング阻害剤カスタノスペルミンを用いカルネキシン/カルレティキュリンサイクルの破綻を引き起こした状況下で、膵β-細胞株 (MIN6) のインスリン分泌が抑制されることから、小胞体糖鎖プロセシングがタンパク質分泌機構の制御に関わるという知見を得た。さらに、小胞体糖鎖プロセシング制御の変化と分子シャペロンの小胞輸送経路における局在の制御についてカルレティキュリンを中心に解析した。その結果、カルレティキュリンの小胞体局在には、Lys-Asp-Glu-Leu 配列のみならず、分子シャペロンである BiP/GrP78 との相互作用が重要であることがわかった。伊藤グループが合成した Glc1Man4-Biotin などの合成糖鎖基質をカルレティキュリンのレクチン機能の不活化を目的として用いることにより解析を進めたところ、カルレティキュリンの糖鎖認識に関わるレクチンサイト近傍が BiP/GrP78 との相互作用に重要であることもわかった。

一方、C-マンノシル化トリプトファンに対する抗体を用いて、マクロファージ系細胞における C-マンノシル化タンパク質の生理的意義について調べた。単球系細胞株 THP-1 細胞は、ホルボールエステルにより分化誘導されると、浮遊細胞から接着細胞へと変化し、CD11b や CD61 などマクロファージ系細胞の分化マーカーを細胞表面に発現する。このような、分化誘導条件で、C-マンノシル化タンパク質の細胞発現を解析したところ、分化誘導に従い細胞内や細胞外に分泌される C-マンノシル化タンパク質が著明に増加することを見出した。

また、ラット肝臓より UGGT を精製し、種々の合成基質 (Man9-MTX, Man8-MTX, Man7-MTX 等) を用いてその糖鎖特異性を調べた。その結果、UGGT の糖鎖特異性について定量的なデータを得ることに成功した。

加藤グループ（名市大）：カーゴレセプターである ERGIC-53 は正しくフォールディングの行われた糖タンパク質を選別し、小胞体からゴルジ体への輸送を担っていると考えられている。MCFD2 は血液凝固因子欠損症の原因遺伝子産物として同定されたタンパク質であり、カーゴレセプターERGIC-53 と複合体を形成することによって小胞体からゴルジ体への糖タンパク質の輸送を担っている。しかしながら MCFD2 と ERGIC-53 の複合体による糖タンパク質輸送機構の詳細は未だ明らかとなっていない。MCFD2 と ERGIC-53 の相互作用は Ca^{2+} に依存することから、MCFD2 と ERGIC-53 の相互作用における Ca^{2+}の役割を高次構造的な観点から明らかにすることを試みた。CD およびＮＭＲスペクトルの解析の結果、Ca^{2+}と結合していない MCFD2 はアンフォールド状態であるが、Ca^{2+}の結合に伴い分子の一部がα-ヘリックス構造へと移行することが明らかとなった。また、安定同位体標識を施した ERGIC-53 を用いたＮＭＲ解析の結果､糖鎖と MCFD-2 は ERGIC-53 分子上の異なる部位に結合していることが判明した。

Peptide:N-glycanase (PNGase)は細胞質において N 結合型糖鎖の結合部位にあたるアスパラギン残基側鎖のアミド結合を加水分解し、糖鎖を遊離させる酵素として機能している。N 末端領域に存在する PUB ドメインは小胞体関連分解（ERAD）に関与するタンパク質（ユビキチン、19S プロテアソームサブユニット S4 など）と相互作用することが報告されており、PUB ドメインの立体構造は、糖タンパク質分解における糖鎖修飾系とユビキチン修飾系の連携の構造基盤を明らかにする上で重要である。NMR 解析の結果、PUB ドメインは、αヘリックスに富むフォールドであることが判明した。またそのユビキチン結合部位を同定することに成功した。

鈴木グループ（阪大）：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）との結合のさらなるキャラクタリゼーションを行った。これまで、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ていたが、今年度は質量分析計を用いた詳細な解析により、糖鎖の結合した Cys が本酵素の活性中心である Cys191 であることを明らかにした。更に分子モデリングの結果によって、その糖鎖の結合部位がペプチドの結合部位とは異なる部位に存在することが示唆された。これらの結果は現在発表準備中である。

Gal4-UAS のシステムを用いた RNAi の異所的な発現系を用いて､ショウジョウバエにおける遊離糖鎖の代謝に関わると予想される酵素群のノックダウン表現型のスクリーニングを行った。その結果新規のマンノシダーゼ CG9466 のノックダウンでは、独立した UAS-RNAi ２系統に共通して *ap*-Gal4 の優性変異表現型と相互作用した。*ap* の表現型はしばしば Wg や N の情報伝達系の因子と相互作用することが知られている。また、CG9466 は小胞体かゴルジ体に局在することが細胞発現系によって解っており、糖鎖のプロセシングに関与する新しいマンノシダーゼであることが推定された。

山本グループ（東大）：(1) 細胞表面糖鎖に対する組換体ERGIC-53の結合をフローサイトメトリーで検討したところ、ERGIC-53はMCFD2と結合することにより構造変化を起こし、不活性型から活性型へ移行し、糖結合活性を獲得することが明らかになった。可溶型組換体を用いた表面プラズモン共鳴による結合実験では、両者の相互作用はpH7.0からpH6.0、かつ0.2-1.0mM Caにおいて概ねKd=6.19x10^{-9}M前後であったのに対し、Ca濃度が0.2mMから0.1mMに変化すると100分の1に親和性が減少し、血友病患者由来MCFD2変異体と類似の値を示した。このことから、小胞体内からゴルジ体への移行により、Ca濃度の変化によりERGIC-53からMCFD2が解離し、リガンドを遊離する可能性が示唆された。

(2)VIP36に恒常的に結合するタンパク質としてシャペロン分子であるBiPを同定し、両者の相互作用はpH非依存的に起こることが示された。両者の細胞内における相互作用を調べる目的で免疫電子顕微鏡による観察を行ったところ、両者の相互作用は小胞体でのみ起こっていることが明らかになった。VIP36は小胞体内では単量体かつ糖結合活性がほとんど持たないと予想されることから、BiPがVIP36のリザーバーとなっており、小胞体ストレス負荷時にBiPが動員されるのと同時に、VIP36が解離し小胞体からゴルジ体へと配備されて行く可能性が考えられた。

(3) 機能未知のVIPLおよびERGIC-53に対するモノクローナル抗体を作成し、内在性VIPLおよびERGIC-53の分布や挙動を明らかにすることを試みた。ERGIC-53とVIPLはともに小胞体に局在していたが、小胞体ストレス負荷によりERGIC-53の発現誘導が起こり、局在が小胞体からゴルジ体へと広がった。この際、VIPLの発現量および局在に変化は認められなかった。VIPLあるいはERGIC-53のノックダウン、また過剰発現を行った結果を考え合わせると、小胞体に常時局在するVIPLがERGIC-53のリザーバーになっており、小胞体ストレス応答により、ERGIC-53を放出しゴルジ体へ避難させ、フォールディング不全タンパク質の輸送を一時停止させている可能性が考えられた。

(4) ERGIC-53/MCFD2、VIP36、VIPLの三種類のL型レクチンドメインをもつカーゴレセプターがどの役割分担を探るアプローチとして、レクチンドメインの糖結合特異性を明らかにした。大腸菌で発現させた組換えタンパク質を四量体化しプローブとし、種々の細胞表面糖鎖に対する結合をフローサイトメトリーによって解析した。VIP36の特異性は、フロンタルアフィニティクロマトグラフィーを用いた神谷らの結果と一致していた。糖結合活性の有無が明らかになっていなかったVIPLにレクチン活性が見出され、その結合特異性はVIP36と同様であった。一方、ERGIC-53は特異性が異なり、幅広い高マンノース型糖鎖に親和性を示した。

３．研究実施体制

「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製と糖タンパク質品質管理機構解明

への応用

「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、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

「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、教授）
②研究項目：NMRを利用した細胞内レクチンの糖鎖認識機構の構造生物学的解析

「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、特任助教授）
②研究項目：細胞質における遊離糖鎖の代謝系の解析と糖鎖とランスポーターの同定およびショウジョウバエにおける遊離糖鎖の代謝機構の解明とその生理機能の解析

「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、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

○ A. Ishiwata, Y. Ito: "High throughput screening of O-glycosylation conditions", *Tetrahedron Lett.*, 46 (2005) 3521-3524

○ S. Hagihara, k, Totani, I. Matsuo, Y. Ito: "Thermodynamic analysis of interactions between N-linked sugar chains and F-box protein Fbs1", *J. Med. Chem.*, 48 (2005) 3126-3129

○ I. Matsuo, T. Kashiwagi, K. Totani, Y. Ito: "First chemical synthesis of triglucosylated tetradecasaccharide (Glc3Man9GlcNAc2), a common precursor of asparagine-linked oligosaccharides", *Tetrahedron Lett.*, 46 (2005) 4197-4200

○ S. Hanashima, S. Manabe, Y. Ito: "Divergent synthesis of sialylated glycan chains: Combined use of polymer support, resin capture-release, and chemoenzymatic strategies", *Angew. Chem.Int. Ed.*, 44 (2005) 4218-4224

○ K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, H. Koshino, Y. Ito: "Synthetic substrates for an endoplasmic reticulum protein-folding sensor, UDP-glucose: Glycoprotein

glucosyltransferase”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 7950-7954 (2005)

○ M. A. Arai, I. Matsuo, S. Hagihara, K. Totani, J.-i. Maruyama, K. Kitamoto, Y. Ito: “Design and synthesis of oligosaccharides that interfere with glycoprotein quality-control systems”, *ChemBioChem.*, 6, 2281-2289 (2005)

○ J. Nakano, H. Ohta, Y. Ito: “Synthesis of complex-type glycans derived from parasitic helminths”, Bioorg. *Med. Chem. Lett.*, 16 (2006) 928-933

○ Kamiya Y, Yamaguchi Y, Takahashi N, Arata Y, Kasai K-I, Ihara Y, Matsuo I, Ito Y, Yamamoto K, and Kato K: Sugar-binding properties of VIP36, an intracellular animal lectin operating as a cargo receptor. J Biol Chem 280: 37178-37182, 2005.

○ Ihara Y, Urata Y, Goto S, and Kondo T: Role of calreticulin in the sensitivity of myocardiac H9c2 cells to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. Am J Physiol Cell Physiol 290: C208-221, 2006.

○ T.Kimura, K.Imaishi, Y.Hagiwara, T.Horibe, T.Hayano, N.Takahashi, R.Urade, K.Kato and M.Kikuchi: “ERp57 binds competitively to protein disulfide isomerase and calreticulin”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 224-230 (2005)

○ Y.Kamiya, Y.Yamaguchi, N.Takahashi, Y.Arata, K.Kasai, Y.Ihara, I.Matsuo, Y.Ito, K.Yamamoto and K.Kato: “Sugar-binding properties of VIP36, an intracellular animal lectin operating as a cargo receptor”, *J. Biol. Chem.* 280, 37178-37182 (2005)

○ T. Suzuki, and Y. Funakoshi (2006) Free oligosaccharides; formation and degradation. *Glycoconjugate J.* in press.

○ I. Kim, J. Ahn, C. Liu, K. Tanabe, J. Apodaca, T. Suzuki, and H. Rao (2006) The Png1-Rad23 complex regulates glycoprotein turnover. *J. Cell Biol.* 172, 211-219.

○ M. Ito, T. Maruyama, N. Saito, S. Koganei, K. Yamamoto, N. Matsumoto.: Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherins to inhibit NK cell cytotoxicity. J. Exp. Med. 203, 289-295 (2006)

○ C.A. Lyeyoung, K. Tajima, K. Kato, N. Matsumoto, K. Yamamoto, T. Nagamune.: Modulating the actions of NK cell-mediated xytotoxicity using lipid-PNG (n) and inhibitory recelptor-specific antagonistic peptide conjugates. Biotechnol. Prog. 21, 1226-1230 (2005)

○ S. Koganei, M. Ito., K. Yamamoto, N. Matsumoto.: B-1a cell origin of the murine B lymphoma line BCL1 characterized by surface markers and bacterial reactivity of its surface IgM. Immunology Lett. 98, 232-233 (2005)

（２）　特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：2 件）