

戦略的創造研究推進事業
ERATO
追跡評価用資料

「伊藤グライコトリロジー」プロジェクト
(2009.10～2016.3)

研究総括：伊藤 幸成

2022 年 3 月

目次

要旨	1
まとめ図	3
第 1 章 プロジェクトの概要.....	4
1.1 研究期間.....	4
1.2 プロジェクト発足に至る科学技術や社会の背景.....	4
1.2.1 科学技術の背景.....	4
1.2.2 社会の背景.....	6
1.3 プロジェクトのねらい.....	6
1.4 研究体制.....	8
1.5 プロジェクト終了時点での研究成果やその意義.....	9
1.5.1 糖鎖生物機能化学グループ.....	9
1.5.2 糖タンパク質合成化学グループ.....	18
1.5.3 糖鎖構造情報化学グループ.....	23
第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況.....	29
2.1 プロジェクトの終了後の状況に関する基礎データ	29
2.1.1 調査方法	29
2.1.2 競争的研究資金の獲得状況.....	31
2.1.3 論文の発表状況.....	32
2.1.4 特許の出願・公開・登録状況.....	36
2.1.5 招待講演	37
2.1.6 受賞状況	37
2.1.7 ベンチャー企業の設立状況.....	37
2.1.8 報道関係	38
2.2 プロジェクトの進捗状況.....	39
2.2.1 タンパク質 N-グリコシル化シグナル機構	39
2.2.2 脂質グルコシル化のシグナリング機構.....	51
2.2.3 C-マンノシル化のシグナリング機構.....	54
2.2.4 糖鎖合成研究の進展.....	56
2.2.5 糖タンパク質化学合成技術の進展.....	59
2.2.6 細胞分化における糖脂質変換過程の解析.....	62
2.2.7 Pradimicins 研究の進展	63
2.2.8 その他の研究成果.....	64
2.3 プロジェクト参加研究者の活動状況.....	66
2.4 第 2 章まとめ.....	68

第 3 章 プロジェクト成果の波及と展望.....	69
3.1 科学技術への波及と展望.....	69
3.1.1 新たな糖鎖科学研究の潮流の形成.....	69
3.1.2 糖鎖化学研究者の育成.....	71
3.1.3 科学技術への波及のまとめと展望.....	72
3.2 社会経済への波及と展望.....	72
3.2.1 医薬・創薬分野への展開.....	72
3.2.2 他の関連技術との比較.....	73
3.2.3 社会経済への波及のまとめと展望.....	75
【引用文献】	76

要旨

本資料は、戦略的創造研究推進事業のERATO「伊藤グライコトリロジー」プロジェクト(2009年10月～2016年3月)において、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)事業およびその事業運営の改善等に資するために、追跡調査を実施した結果をまとめたものである。

ヒトを始めとする高等生物においては、糖タンパク質の糖鎖の構造多様性が多彩な生命機能に反映されている。本プロジェクトは、有機合成により均一な糖鎖および糖タンパク質を合成し、糖タンパク質の細胞内外における作用、特に小胞体でのタンパク質立体構造形成に果たす役割を系統的に解析し、その機能を理解することを目的とした。その特徴は有機合成を駆動力に据えて、構造解析および生体機能解析を合わせた三位一体の推進力として糖鎖研究に取り組むことであり、プロジェクト名を「グライコトリロジー」とした。

第1章では本プロジェクトの概要と期間中の成果を記載した。伊藤幸成研究総括らは、化学合成と酵素法を組み合わせた「トップダウン型」糖鎖合成法を開発し、高マンノース型糖鎖の網羅的ライブラリを構築した。また、均一な構造の高マンノース型糖鎖をもつミスフォールド、ネイティブ型、それぞれの糖タンパク質を精密に化学合成し、小胞体内の糖タンパク質品質管理機構でどのようなプロセスがなされているかを解析することに成功した。さらに、細胞内糖鎖合成制御機構の可視化を図るため、フェムトモルレベルでの定量が可能な蛍光検出ナノ LC-MS/MS システムを開発した。

第2章では本プロジェクト終了後から追跡調査時点までの研究成果について記載した。伊藤は科研費特別推進研究に採択され、タンパク質 N-グリコシル化以外的小胞体における他の糖修飾(脂質グルコシル化、C-マンノシル化)も対象に取り上げ、これらが小胞体において担うシグナリング機構全般について、統合的に理解するための研究を実施した。その結果、N-グリコシル化に関しては、合成した糖タンパク質を基質として小胞体画分を用いた精密なフォールディング過程解析系を開発するとともに、小胞体内タンパク質の相互作用を核磁気共鳴法で追跡し、糖タンパク質ミスフォールド状態の認識に関わる部位を同定することにも成功した。脂質グルコシル化については、神経細胞軸索ガイダンスのシグナル活性をもつフォスファチジルグルコシドのリゾ体の類縁体合成に成功した。また、生体試料内の C-マンノシルトリプトファンを定量する手法を開発した。

グループリーダーを務めた梶原らは、糖タンパク質化学合成の高効率化に成功するとともに、エリスロポエチンやインスリンの生物活性に及ぼす糖鎖の機能について新規な知見を得た。

第3章では本プロジェクト成果が科学技術および社会経済に及ぼす影響について記述した。文部科学省は糖鎖機能を統合的に理解し、医療に役立てることを目的に、「ヒューマングライコームプロジェクト」を推進することを2020年に決定した。糖鎖化学と糖鎖生物学

との学際的研究である伊藤らの本プロジェクトは、この大型国家プロジェクトの基本構想に繋がるものであり、大きな糖鎖科学の潮流を生み出したものといえる。

また、本プロジェクトで開発された均一構造の糖鎖や糖タンパク質を精密に化学合成する技術は、医療や創薬分野の発展に貢献することが期待される。

本プロジェクトに係わった研究員のうち、9 名が公的研究機関で研究を継続し、そのうちの 5 名が教授に就任しており、本プロジェクトが糖鎖科学研究者の育成にも貢献したことが窺える。

まとめ図

戦略目標、達成目標/プロジェクトの目標（ねらい）	インプット	アクティビティ/アウトプット	アウトカム（short/mid-term）		アウトカム（long-term）/インパクト																																						
			～追跡調査時点	今後予想される展開	今後想定される波及効果																																						
戦略目標： 「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」 プロジェクトの目標 糖鎖及び糖タンパク質を精密に有機化学合成し、これらの細胞内における機能、特に小胞体内タンパク質管理機構（ERQC）における機能を解析する 1.糖鎖の合成化学 ・高マンノース型糖鎖のライブラリ化と大量合成 2.糖鎖生物機能の解析 ・ERQCにおける糖鎖-タンパク質相互作用機序の解析 3.糖タンパク質の合成 ・種々の糖タンパク質の全合成 ・糖タンパク質フォールディング過程の精密解析 4.糖鎖構造の情報化学 ・糖タンパク質/糖脂質の構造解析手法の開発	研究総括 伊藤 幸成(理化学研究所・主任研究員) 研究体制 1.糖鎖生物機能化学グループ(武田 陽一) 2.糖タンパク質合成化学グループ(梶原 康宏) 3.糖鎖構造情報化学グループ(蟹江 治) (特別重点期間) 1.糖鎖生物機能化学グループ(伊藤 幸成/迫野 昌文/武田 陽一) 2.糖鎖構造情報化学グループ(鈴木 克彦)	論文 <table><tr><td>成果論文数</td><td>97</td></tr><tr><td>発展論文数</td><td>38</td></tr></table> 特許出願・登録 <table><tr><td></td><td></td><td>期間中</td><td>終了後</td></tr><tr><td rowspan="2">出願</td><td>国内</td><td>1</td><td>0</td></tr><tr><td>海外</td><td>1</td><td>0</td></tr><tr><td rowspan="2">登録</td><td>海外</td><td>1</td><td>0</td></tr><tr><td>海外</td><td>1</td><td>0</td></tr></table> 国内外会議での招待講演 <table><tr><td></td><td>国内</td><td>国際</td><td>全体</td></tr><tr><td>期間中</td><td>19</td><td>25</td><td>44</td></tr><tr><td>終了後</td><td>15</td><td>21</td><td>36</td></tr><tr><td>合計</td><td>34</td><td>46</td><td>80</td></tr></table>	成果論文数	97	発展論文数	38			期間中	終了後	出願	国内	1	0	海外	1	0	登録	海外	1	0	海外	1	0		国内	国際	全体	期間中	19	25	44	終了後	15	21	36	合計	34	46	80	糖鎖生物機能化学グループ ・トップダウン型高マンノース型糖鎖ライブラリを構築 ・デコイ型基質および疑似ミスフォールド糖タンパク質を用いてUGGT UGGT(UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase)の基質認識機構を解明 ・糖タンパク質 <i>in vitro</i> フォールディングシステムの開発 糖タンパク質合成化学グループ ・ミスフォールド型糖タンパク質の化学合成に成功 ・糖タンパク質のネイティブ型、ミスフォールド型、およびフォールディング中間体に対するUGGT基質認識機構を精査 ・鶏卵卵黄からの高マンノース型糖鎖調製法を確立 糖鎖構造情報化学グループ ・微量の糖脂質を定量できる蛍光検出ナノLC-MS/MSシステムを開発し、糖脂質の細胞内動態観察に成功 ・質量分析法に基づく光学異性体解析手法を開発	小胞体(ER)糖修飾の統合的ケミカルバイオロジー 1.タンパク質N-グリコシル化のシグナリング機構 ・合成糖タンパク質を基質に、小胞体画分を用いたフォールディング過程精密解析系を開発 ・UGGTのミスフォールド体疎水性部位認識を確認 ・ミスフォールドG1M9糖タンパク質合成法を開発 ・UGGT1、UGGT2の活性部位を特定 ・阻害剤を活用したマンノシダーゼ解析系を開発 ・ERp29とcalnexin(CNX)との相互作用を明確化 2.脂質グルコシル化のシグナリング機構 ・フォスファチジルグルコシドのリソ体と類似の生物活性をもつ類縁体を合成 3.C-マンノシル化のシグナリング機構 ・生体試料中のC-マンノシル化Trp定量法を開発 糖タンパク質化学合成技術の進展 ・エリスロポエチンの活性と糖鎖との関連明確化 ・インスリン安定性と糖鎖との関連明確化	ヒューマングライコームプロジェクト 糖鎖の網羅的情報解析(グライコミクス)で、生体の全糖鎖構造(グライコーム)を理解 ↓ ゲノミクス・プロテオミクス・グライコミクスによる統合的生命科学の進展 医療・食品における技術革新 ・病態の解明 ・診断・病態予測のためのマーカー開発 ・新規治療法の開発 ・抗菌・抗ウイルス剤の開発 ・アンチエイジング研究 学術研究への技術的貢献 ・構造が規定された糖鎖・糖タンパク質の安定供給 ・糖鎖構造解析技術 ・糖鎖機能制御化合物の合成
成果論文数	97																																										
発展論文数	38																																										
		期間中	終了後																																								
出願	国内	1	0																																								
	海外	1	0																																								
登録	海外	1	0																																								
	海外	1	0																																								
	国内	国際	全体																																								
期間中	19	25	44																																								
終了後	15	21	36																																								
合計	34	46	80																																								

第 1 章 プロジェクトの概要

本調査の対象である ERATO「伊藤グライコトリロジー」プロジェクト(以後、本プロジェクトと記載)の概要を下記に示す。

1.1 研究期間

研究期間は 2009 年 10 月～2016 年 3 月。但し、最後の 1 年(2015 年 4 月～2016 年 3 月)は特別重点期間として、プロジェクト自体のスリム化を図り、糖鎖生物機能化学グループと糖鎖構造情報化学グループに限定して継続された。

1.2 プロジェクト発足に至る科学技術や社会の背景

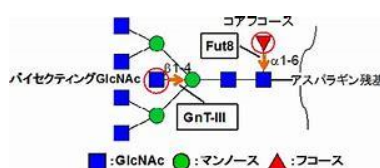
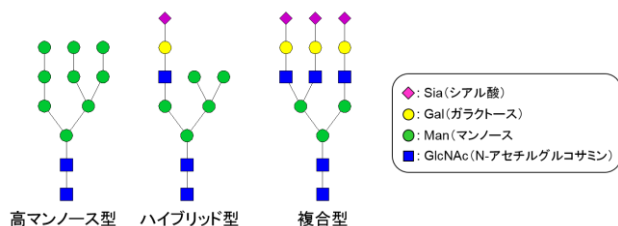
1.2.1 科学技術の背景

ヒトを始めとする真核生物の細胞内には糖タンパク質が多種多様な形で存在し、糖タンパク質糖鎖がタンパク質の安定性や構造に影響を与えることや、細胞間認識、細胞分化、がん化、シグナル伝達、免疫応答、微生物感染などの様々な生体現象に深く関与していることが知られている¹。糖タンパク質糖鎖は通常アスパラギン結合型(*N*-結合型)²、セリン/スレオニン結合型(*O*-結合型)およびその他の比較的マイナーなグループに分類される。*N*-結合型および *O*-結合型糖鎖はそれぞれ“glycoform”とよばれる極めて多様な構造を含んでおり、構成する糖の数、組成、配列、枝分かれ、結合の立体化学などにより生み出される構造多様性により、糖鎖は大量の生命情報を担うことができると考えられている。

N-結合型糖鎖はタンパク質中の Asn-X-Ser/Thr という「コンセンサス配列」に導入される。この反応は小胞体(ER)内腔(lumen)において RNA からタンパク質への翻訳と同時に起きる「翻訳時修飾」であり、オリゴ糖転移酵素(OST) という巨大複合体酵素によって触媒される。大多数の真核生物においては、その際転移される糖鎖は 3 分子のグルコース(Glc)、9 分子のマンノース(Man)、2 分子の *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)からなる 14 糖(Glc3Man9GlcNAc2;G3M9)である。この糖鎖が共通の前駆体となり、ER およびゴルジ体(Golgi apparatus)における修飾を経て多様な構造へと変換され、分泌型や細胞表層あるいはオル

¹ Rudd PM, et al., *Science*, 291, 2370-2376, 2001

² タンパク質のアスパラギン側鎖に *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β 結合した糖鎖で、高マンノース型、ハイブリッド型、複合型があり、共通の母核構造として枝分かれの 5 糖構造(トリマンノシルコア)を有する。トリマンノシルコアにフコースが付加したコアフコース糖鎖や、中央のマンノースに GlcNAc が付加したバイセクト糖鎖も知られている。



ガネラに局在する糖タンパク質になる(図 1-1)。糖タンパク質プロセッシングの過程で、当初タンパク質に導入された G3M9 はグルコシダーゼ I (G-I) およびグルコシダーゼ II (G-II) のはたらきによりモノグルコシル化糖鎖 Glc1Man9GlcNAc2 (G1M9) へと変換される。膜結合型のシャペロン calnexin (CNX) とその可溶性ホモログである calreticulin (CRT) はこの構造と特異的に結合することにより糖タンパク質のフォールディングを助けていると考えられており、G-II および UDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素 (UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase:UGGT) と共同で CNX/CRT サイクルとよばれるシステムを構築している。このシステムは糖鎖構造と共にタンパク質のフォールディング状態をモニターしていると考えられる。ここで最も興味深いのは UGGT の基質認識である。この酵素は、タンパク質のいわゆる“Molten globule”型構造を認識していると言われているが、そのメカニズムについては曖昧な理解しか得られていない。

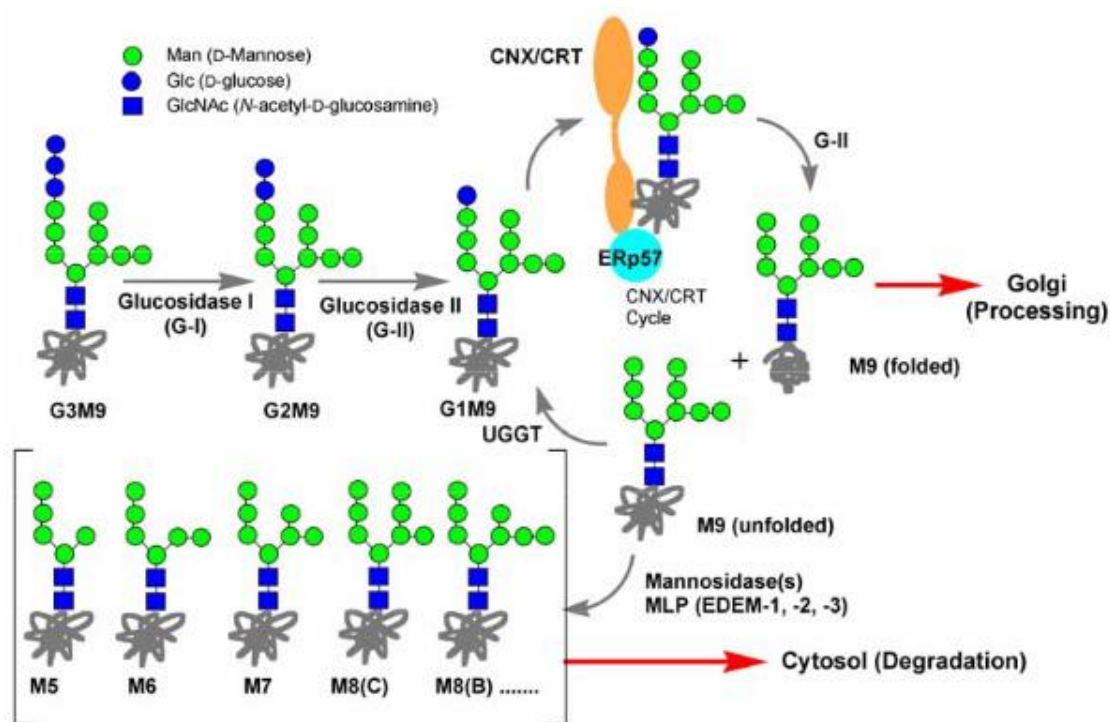


図 1-1 小胞体内糖タンパク質プロセッシングと品質管理機構 (ERQC)³

ポストゲノム時代のライフサイエンスにおいて、小胞体糖タンパク質品質管理機構 (ERQC) のように糖鎖が担う生命現象の解明が重要であることが認識されているが、糖鎖構造の多様性と複雑さゆえに、その情報分子としての理解は、核酸やタンパク質などの他の生体成分に比べ大きく遅れをとっていた。糖鎖生物学では、天然から単離された糖タンパク質を材料として用いる研究が主であるが、糖鎖構造が不均一であるため、各糖鎖の正確な機能

³ CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」研究領域の研究課題「糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明」研究終了報告書

を理解することは困難であった。一方、有機化学による均一構造糖鎖の合成は、立体異性や位置異性を厳密に制御する必要があり、多くの場合枝分かれ構造を構築する必要があることから原理的な難しさを含んでいた。

本プロジェクトの伊藤幸成研究総括(以下、伊藤)は、分子内アグリコン転移反応(Intramolecular aglycon delivery: IAD)によるマンノース β -選択的グリコシド化やオルトゴナルグリコシル化法などを開発し、世界に先駆けて糖タンパク質糖鎖の高効率合成に成功していた⁴。また、CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」研究領域の研究課題「糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明」(2002年度～2007年度)、および科研費学術創成研究「生物機能解明をめざす糖タンパク質の統合的合成研究」(2005年度～2009年度)において、糖鎖の生物機能解明研究を開始し、糖タンパク質品質管理に関わる小胞体内の全高マンノース型糖鎖の合成⁵、化学合成人工糖鎖基質による小胞体内グルコース転移酵素(UGGT)⁶や小胞体内グルコシダーゼ II (G II) 活性の測定⁷、マクロ分子クラウド環境における G II 活性測定⁸に成功していた。さらに、当該学術創成研究の共同研究者である梶原康宏(以下、梶原)は、糖タンパク質ケモカイン⁹や生理活性糖タンパク質エリスロポエチン誘導体の化学合成¹⁰に成功していた。

伊藤は、有機合成により糖鎖および糖タンパク質を精密に合成し、これを用いて糖タンパク質の細胞内における作用を系統的に解析し、その機能を理解することを目指して本プロジェクトを立ち上げた。

1.2.2 社会の背景

文部科学省は平成 17 年度の戦略目標に「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」を掲げ、細胞内の代謝変化の網羅的解析を行うことにより、細胞の恒常性維持メカニズムを解明して、細胞機能向上や細胞制御のための基盤技術を創製することを目指した。

本プロジェクトは糖タンパク質関連分子の人工合成を中心に、糖タンパク質の細胞内における作用と機能の理解を深めると共に、合成糖タンパク質医薬開発のための基盤構築を目指したものであり、本戦略目標に合致していた。

1.3 プロジェクトのねらい

DNA を設計図として正確に築き上げられるタンパク質の構造は、分子量のそろった単分散高分子であるのに対し、付加される糖鎖の長さや構造は非常に高い多様性を示す。これまで、

⁴ 伊藤幸成 有機合成化学協会誌、74, 206-213, 2016

⁵ Matsuo I, et al., *Tetrahedron*, 62, 8262-8277, 2006

⁶ Totani K, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 7950-7954, 2005

⁷ Totani K, et al., *J. Biol. Chem.*, 281, 31502-31508, 2006

⁸ Totani K, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 2101-2107, 2008

⁹ Yamamoto N, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 501-510, 2008

¹⁰ Hirano K, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 9557-9560, 2009

バイオ医薬品としての糖タンパク質は、チャイニーズハムスター卵巢細胞(CHO 細胞)を用いることにより合成されてきたが、細胞を用いた生合成では、タンパク質上に特定の糖鎖を均一に発現させるのは難しく、通常はさまざまな長さの糖鎖を持つ糖タンパク質の混合物しか調製できないというのが糖科学の常識であった。従って、糖タンパク質の機能と糖鎖構造の関連性を精密に解析することは、生命科学で残された最も重要な課題の一つとなっており、そのためには、構造が明確な糖タンパク質を大量に調製する必要があった。最近になり、糖鎖がタンパク質立体構造形成過程に重要な関与を行っていることが明らかになり、糖鎖生物学における重要課題として注目されているが、この過程を詳細に調べる上で、糖タンパク質を天然物から単離して利用する従来の生化学的アプローチには限界がある。

本プロジェクトは、有機合成により糖鎖および糖タンパク質を精密に人工合成し、これを用いて糖タンパク質の細胞内における作用を系統的に解析し、その機能を理解することを目的とした。その特徴は有機合成を駆動力に据えて、構造解析および生体機能解析と合わせた三位一体の推進力として糖鎖研究に取り組むことであり、プロジェクト名を「グライコトリロジー」とすることで、新たな糖鎖研究の創成を目指した(図 1-2)。同時に、本プロジェクトの成果は、タンパク質の立体構造や糖鎖構造異常に起因する種々の疾病(アルツハイマー病、プリオン病、糖鎖不全症など)の新しい治療法開発、合成糖タンパク質医薬開発、新規な抗感染症薬開発に貢献することが期待された。

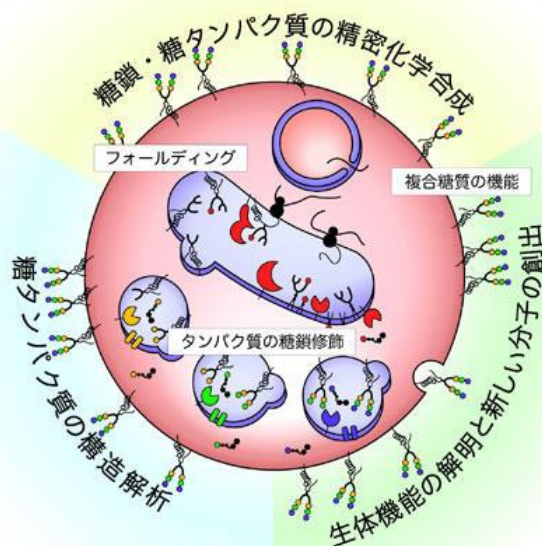


図 1-2 伊藤グライコトリロジープロジェクトの概要¹¹

¹¹ 本プロジェクトホームページ https://www.jst.go.jp/erato/research_area/completed/igk_PJ.html

1.4 研究体制

本プロジェクトの目標は、有機化学のポテンシャルを活かして糖鎖機能の明確化を探索するものであり、特に糖タンパク質のフォールディング過程に関わるレクチン、シャペロン、プロセシングおよびフォールディングセンサー酵素の解析をターゲットとした。そのために3つの研究グループを設置し、(1)糖鎖生物機能化学グループは、小胞体でのタンパク質品質管理機構を解析する上で重要な高マンノース型糖鎖のライブラリ化と大量合成、ならびに糖鎖-タンパク質相互作用機序の解析を担当した。(2)糖タンパク質合成化学グループは、様々な標的糖タンパク質の合成を通して、糖鎖がタンパク質に与える影響を化学の視点で考察し、糖鎖の機能解明および糖タンパク質創薬への知見を蓄積することを目標とし、糖タンパク質の化学合成において世界を先導する成果を挙げている梶原がグループリーダーを務めた。また、(3)糖鎖構造情報化学グループは糖タンパク質や糖脂質の構造に注目し、有機化学、分析化学、生化学を融合する研究を担当した。さらに、群馬大学工学部松尾一郎および成蹊大学理工学部戸谷希一郎と、それぞれ、「化学-酵素法による糖鎖合成法確立に向けた糖鎖構造最適化と酵素探索」および「再構成糖鎖プロファイリングと小胞体ストレス関連疾患の評価」を目的に共同研究を実施した。

伊藤は、理化学研究所で毎月1回研究打合せ会を開催し、各グループ間の情報共有に努めるとともに、合成した糖鎖試料の共有化に尽力した。

表 1-1 研究グループと人員および実施場所(2015 年 3 月時点)

グループ名	糖鎖生物機能化学	糖タンパク質合成化学	糖鎖構造情報化学	事務所
実施場所	理化学研究所 研究本館	大阪大学大学院 理学研究科	理化学研究所 研究本館	理化学研究所 研究本館
リーダー	武田 陽一	梶原 康宏	蟹江 治	技術参事 1 名 事務参事 1 名 事務員 1 名
研究員	7 名	4 名	4 名	
技術員	0 名	0 名	0 名	
研究補助員	1 名	0 名	0 名	
計	8 名	4 名	4 名	3 名
総計	19 名			

[2016 年 3 月時点]

グループ名	糖鎖生物機能化学			糖鎖構造情報化学
実施場所	理化学研究所	富山大学	立命館大学	青森大学
リーダー	伊藤 幸成	迫野 昌文	武田 陽一	鈴木 克彦
研究員	2 名	1 名	1 名	1 名
技術員	0 名	0 名	0 名	0 名
研究補助員	0 名	0 名	0 名	0 名
計	2 名	1 名	1 名	1 名
総計	5 名			

本プロジェクトは、埼玉県和光市の理化学研究所・研究本館と大阪大学豊中キャンパス G 棟で実施された。本プロジェクトで購入設置された主要機器は、ナノフロー液体クロマトグ

ラフシステム、イオントラップ型質量分析装置、マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置(理化学研究所)や、高性能構造解析質量分析装置イオントラップ型(大阪大学)などである。

1.5 プロジェクト終了時点での研究成果やその意義

伊藤は、本プロジェクト研究終了報告書(非公開)にて、本プロジェクトの特筆すべき成果として、化学-酵素法によるトップダウン型高マンノース型糖鎖ライブラリの合成、均一な部分変性糖タンパク質の化学合成および生化学的性質の解明、蛍光標識糖脂質を用いた糖脂質生合成機構の統合的解析を挙げている。本プロジェクト事後評価(最終評価)報告書では、これらの研究成果が戦略目標「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」に資する十分な成果が得られたと評価された¹²。

以下に本プロジェクト研究終了報告書(非公開)に記載された研究成果について詳述する。

1.5.1 糖鎖生物機能化学グループ

本グループは、化学的に合成した糖鎖を用いて糖タンパク質糖鎖の細胞内機構を解明することを目指し、特に重要な *N*-結合型糖鎖のタンパク質フォールディングにおける役割に焦点を当て、有機化学的な手法を用いながら、小胞体内で行われる糖タンパク質の品質管理について解析を行った。

(1) 基盤技術の開発

①高マンノース型糖鎖の合成

(i) 化学-酵素法によるトップダウン型高マンノース型糖鎖ライブラリの合成

小胞体において糖タンパク質生合成や品質管理機構に関与している高マンノース型糖鎖は、数十種類存在するが、それらの生理機能を解析する研究や、糖タンパク質化学合成などの応用研究を行う上で糖鎖ライブラリを簡易に作成する技術は重要である。伊藤らは化学合成法と酵素法を組み合わせた酵素・化学的トップダウン型による効率的な糖鎖合成法を新たに開発した。高マンノース型糖鎖(Man9型)の非還元末端に、保護基として異なる糖残基を導入した14糖前駆体を5つのブロックに分けて合成し(図1-3)、この14糖前駆体に対して、まず保護糖残基を加水分解するグリコシダーゼを作用させた後にマンノシダーゼを逐次作用させることによって、30種類以上の糖鎖を合成することに成功した^[1]。本法の特長は、必要とする特定の高マンノース型糖鎖を14糖前駆体から酵素消化のみで選択的かつ簡便に合成し得る点にある。

¹² ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクト事後評価(最終評価)報告書
https://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/E_ito_houkoku.pdf

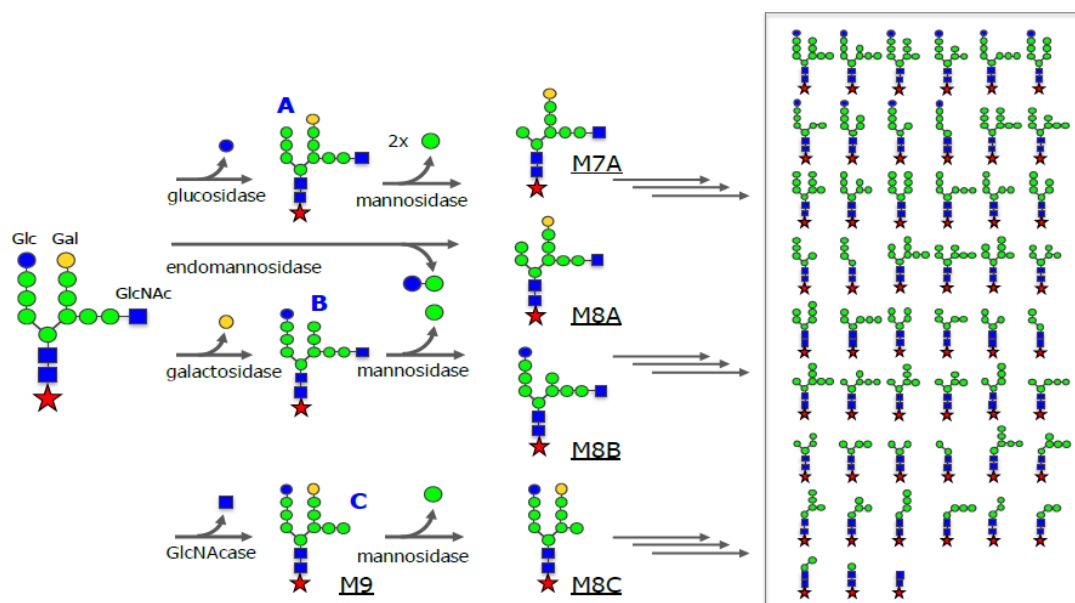


図1-3 トップダウン型酵素-化学法による高マンノース型糖鎖ライブラリの構築¹³
1種類の共通前駆体から糖加水分解酵素によって様々な糖鎖構造へと導く。各分岐鎖(A、B、C-アーム)の非還元末端に導入される異なる糖残基は「保護基」として働く。

本法では、B-アームの非還元末端に存在するガラクトース保護基を酵素によってトリミングする反応の効率が悪いことが欠点であった。そこで、B-アームの非還元末端マンノース残基をイソプロピリデン基で保護することとし、基質の全合成を行った。イソプロピリデン基は酢酸によって脱保護が可能で、他の酵素反応条件下で安定であることから、ライブラリ構築がより簡便に行えることが分かり、第2世代基質として50種類以上の糖鎖を合成することに成功した^{[2], [3]}。

(ii) 連続した1,2-cis グルコシド結合を有する高マンノース型糖鎖合成(群馬大学・松尾との共同研究)

N-結合型糖鎖のプロセッシングに関与するとされているエンド α -マンノシダーゼの実体を解析するために、活性測定に必要な蛍光標識オリゴ糖誘導体を合成した。小胞体高マンノース型糖鎖A-アーム部分に含まれる1,2-cisグルコシド結合の構築は、 α -マンノース残基の2位水酸基を酸化-還元法により立体を反転、 α -グルコース残基へと変換する方法を採用し、連続した1,2-cisグルコシド結合を有する小胞体高マンノース型糖鎖6糖および5糖、4糖の計3種類の蛍光標識糖鎖を合成した(図1-4)^[4]。

¹³ 本プロジェクト研究終了報告書

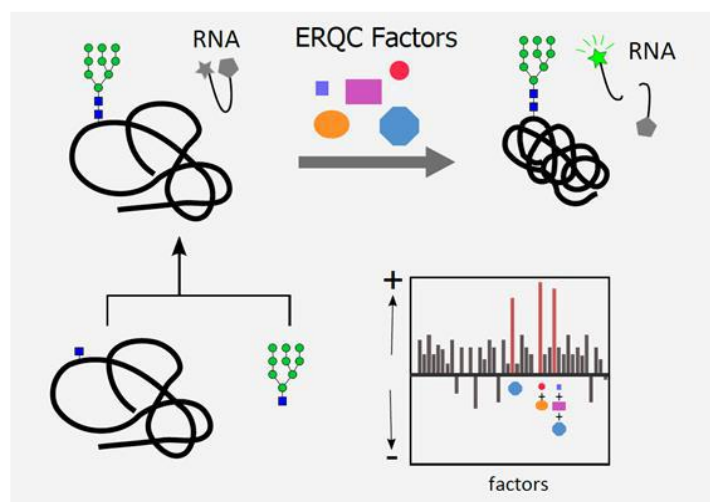


図 1-5 RNase B を利用したフォールディングモニタリングシステムの模式図¹⁵
 フォールディング促進因子 (ERQC Factors) の添加によって RNase がフォールディングすると RNase 活性が回復し、基質である RNA を切断する。基質 RNA は切断されることで FRET によって消光していた蛍光が回復するためリアルタイムで RNase のフォールディングがモニターできる。

まずは、タンパク質のフォールディングに関与するレクチンシャペロン CNX/CRT に着目し、リフォールディング促進効果を検討した。CNX/CRT に認識されるためには糖鎖がモノグルコシル化されている必要があるため、モノグルコシル化糖鎖の調製法を検討し、鶏卵卵黄から抽出したイムノグロブリン (IgY) から効率よくアスパラギンに結合した望みの糖鎖を得る手法を確立した^[6]。得られた糖鎖を酵素的に RNase B に導入して G1M9GN2-RNase モデルタンパク質を調製し、フォールディング促進因子の候補となる約 100 種類の組換えタンパク質の中から、*Aspergillus oryzae* 由来の CNX (AoCNX) と各種タンパク質の組み合わせを選び、フォールディング促進効果を検討した。その結果、小胞体内でタンパク質の S-S 結合の形成に働くプロテインジスルフィドイソメラーゼ (Protein disulfide isomerase: PDI) ホモログタンパク質 TigA と AoCNX は複合体を形成すること、この複合体は TigA 単独よりも G1M9GN2-RNase のリフォールディング促進効果が高いことを明らかにした^[7]。

(2) 糖タンパク質品質管理機構の解明

① UGGT の解析

(i) 認識機構

UGGT は、正しくフォールディングした糖タンパク質とミスフォールド糖タンパク質を見分けて後者のみにグルコースを転移するが、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。伊藤らは、すでに開発していた人工基質 (アグリコンにメトトレキセート (MTX) や蛍光性分子を導入した高マンノース型糖鎖) を用いて、UGGT の基質認識機構を解析した。その結果、

¹⁵ 本プロジェクト研究終了報告書

疎水性蛍光指示薬 1-Anilinonaphthalene-8-Sulfonic Acid (ANS)¹⁶ との相互作用から UGGT は表面に疎水性パッチを有すること、また、CD スペクトルの測定から UGGT は糖鎖と疎水性アグリコンを同時に認識した際にのみ 2 次構造の変化を引き起こすことがわかった^[8]。

UGGT は 170kDa の巨大なタンパク質であり、活性中心も推定されているが、糖鎖やアグリコンの認識部位に関する知見は乏しい。そこで、人工基質にタンパク質と共有結合を形成する反応性分子であるスクアリン酸エチルエステルと、蛍光分子(BODIPY-FL)を新たに導入したデコイ型基質を作製し、UGGT の基質認識部位について検討した(図 1-6)。この基質は UGGT とインキュベートしただけでは弱い結合能しか示さないが、UDP を添加することによって効率的に UGGT と反応することが明らかになった。これは UDP の結合によって糖鎖 UGGT の認識能が増強されることを示唆している。一方、グルコース転移の供与体である UDP-Glc の添加ではほとんど標識されなかった。このことは UGGT によって速やかにグルコシル化された基質糖鎖は UGGT と親和性を失うことを示している。更に、共有結合を形成したアミノ酸(Lys1424)を特定し、UGGT の機能に疎水性アミノ酸クラスター部位が関与することを示した^[9]。

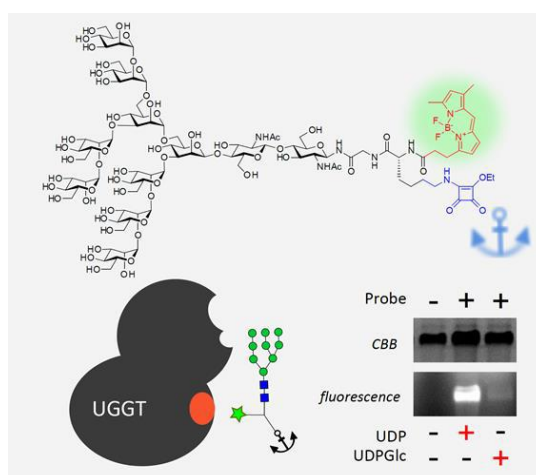


図 1-6 デコイ型基質による UGGT の基質認識部位の同定¹⁷

アグリコンに導入した疎水性蛍光分子(BODIPY-FL)は UGGT による認識を増強させる。反応性分子(スクアリン酸エステル)はタンパク質上のアミノ基と共有結合を形成するため、UGGT 基質認識部位のラベル化が可能になる。

次に、UGGT がタンパク質のどのような特徴を捉えてミスフォールドであると認識するかを検討した。システイン残基すべてを他のアミノ酸に置換したうえで、任意の位置に 1 残基のシステインを導入した大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素(ecDHFR)変異を 20 種類作製し、それぞれに疎水性分子である pyrene をシステイン残基を介して導入した。システイン残基に疎水性分子を導入することで、タンパク表面の任意の位置の疎水性を高めることができる。これらとアグリコンに MTX を導入した高マンノース糖鎖との複合体を調製することで、ミス

¹⁶ タンパク質の疎水性表面(疎水性パッチ)に親和性を持つ蛍光物質で、疎水性パッチとの相互作用で蛍光強度が増す。

¹⁷ 本プロジェクト研究終了報告書

フォールド疑似糖タンパク質ライブラリを作製した(図 1-7)。これら疑似糖タンパク質に対する UGGT の糖転移活性を比較した結果、いずれの pyrene 導入体も、導入していない疑似糖タンパク質よりも高い効率で、グルコース転移を受けることがわかった。それぞれの pyrene 導入体の中でも活性の違いが見られたことから、ミスフォールド疑似糖タンパク質を用いることで、糖鎖とミスフォールド部位との距離やミスフォールドタンパク質として認識されるために必要な表面疎水性度など、UGGT が認識しているミスフォールド糖タンパク質に共通する性質を明らかにすることが可能であると考えられた^[10]。

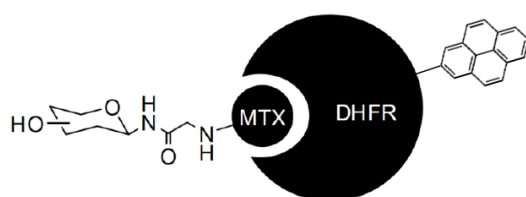


図 1-7 ミスフォールド疑似糖タンパク質¹⁸

MTX が DHFR に結合した複合体は疑似糖タンパク質として利用できる。任意の位置に疎水性低分子を導入可能な ecDHFR 変異体を持ちいることで、ミスフォールド疑似糖タンパク質を作製した。

(ii) UGGT2

UGGT の 2 つのアイソフォームのうち、ヒト UGGT2 は UGGT1 と 50%以上のアミノ酸の相同性があり、活性部位が存在しているにもかかわらずグルコース転移活性が確認されていなかった。合成糖鎖プローブを用いた独自のアッセイ系を用いることで、UGGT2 の酵素活性について再検討した結果、UGGT1 よりは弱いものの UGGT2 にも糖転移活性が存在すること、基質特異性は UGGT1 とほぼ同じであることを見いだした。また、Sep15¹⁹(システイン型変異体)は UGGT と複合体を形成すること、さらにこの複合体は UGGT 単独よりもグルコース転移活性が高いことを併せて見いだした^[11]。

また、UGGT の活性を司っているドメインを探索するために、UGGT1 および UGGT2 の組み換えトランケートタンパク質の調製および糖転移活性を調べ、活性中心を含む C 末端側 20%の領域からなるトランケート体が効率的に糖転移活性を有することなどを発見した。この成果は、本プロジェクト終了後に発表された(2.2.1(2)①参照)。

②CNX/CMG の解析

CNX のホモログである Calmegin(CMG)が、CNX よりはやや劣るが、熱凝集したタンパク質のリフォールディングを促進することを明らかにした。さらに、CMG もモノグルコシル糖鎖を認識するがその認識様式に差があることや、CMG は CNX に比べて糖鎖に対する親和性は低

¹⁸ 本プロジェクト研究終了報告書

¹⁹ 15kDa のセレノタンパク質で、Cys-Gly-Sec(セレノシステイン)配列を有することから酸化還元酵素として機能していると推定される。

いが疎水性アグリコン部位に対する親和性が高いことがわかった。両者ともに精巢に発現していることから、異なるタンパク質もしくはフォールディング状態を対象基質にしていると考えられた^[12]。

③5-チオ-グルコシル化(5S-Glc)糖鎖による ERQC の解析

通常 CNX/CRT サイクルを経ても正しいフォールディングに導くことができなかった糖タンパク質は、小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation:ERAD)と呼ばれる分解経路に入ることになる。小胞体のグルコシダーゼ II (G-II)は、G2M9 および G1M9 糖鎖からそれぞれ Glc を加水分解する活性を有しており、この ERAD に重要な役割を果たしている(図 1-1)。そこで、小胞体のプロセッシング過程において、G-II に抵抗性を示すモノグルコシル化糖鎖を生成できれば、CNX/CRT サイクルに長く留まることが可能になり、通常の経路でのゴルジ体への輸送や ERAD への経路を断たれた場合の生体の応答をモニタリングするツールとなるだけでなく、ERQC システムを利用した *in vitro* フォールディングシステムへの利用も期待できる。そのようなツールを開発するために、5-チオ-グルコース残基(5SGlc)を有する糖鎖が ERQC 関連タンパク質に対してどのような反応性を示すか検討した。その結果、UDP-5SGlc は UGGT によるグルコース転移反応の供与体になることが明らかになった。この成果は本プロジェクト終了後に発表された(2.2.1(4)参照)。

④ERp29 の機能解析(富山大学・迫野との共同研究)

ERQC において、分子シャペロン CNX/CRT が小胞体内でタンパク質の S-S 結合の形成に働く PDI 様タンパク質である ERp57 と相互作用することは一般によく知られている(図 1-1)。近年、ERp57 以外の PDI 様タンパク質が、ER 内に多く存在していることが分かっており、また、ERp57 以外に相互作用する PDI 様タンパク質が存在する可能性が考えられた。そこで、SPR 型タンパク質-タンパク質相互作用解析法(BIACORE)²⁰を用いて、CRT と相互作用する PDI 用ファミリーの探索を行った。その結果、ERp29 が ERp57 と同程度に CRT と相互作用することを見いだした^[13]。

⑤再構成糖鎖プロファイルによる小胞体ストレス関連疾患の評価(成蹊大学・戸谷との共同研究)

ERQC での制御にはタンパク質表面の糖鎖プロセッシングが関与している。たとえば Glc1Man9GlcNAc2(G1M9)は「折り畳み促進」、M9 は「折り畳みチェック」、M8B は「分泌」そして M8A、M8C およびさらに切断の進んだ M7-5 は「分解」のシグナルとして機能することが知られている(図 1-1)。ERQC が何らかの原因で破綻すると、その組織に特有の疾患を発症(フォールディング病)する。アルツハイマー病に代表される神経変性疾患は脳細胞のフォ

²⁰ 表面プラズモン共鳴(SPR)を利用して、生体分子間の相互作用をリアルタイムでモニターするタンパク質-タンパク質相互作用解析法。

ールディング病であり、2 型糖尿病はインスリンを産生する膵臓β細胞や代謝に関わる肝細胞のフォールディング病である。また、最近では骨粗しょう症と肝細胞の小胞体ストレスの関係も指摘されている。そこで、2 型糖尿病モデルラットおよび骨粗しょう症モデルマウスの細胞状態を、それぞれの糖タンパク質品質管理の稼働状況にまつわる糖鎖プロファイルを再構成して評価した。

G1M9-BODIPY を基質とし、Wistar ラット肝臓由来の小胞体画分内で G1M9 から M5 に至る再構成糖鎖プロファイルを取得した。これを非肥満型 2 型糖尿病モデルラット (Goto-Kakizaki rat) 肝臓由来のそれと比較したところ、糖尿病モデルでは M8、M7、M6、M5 といった小胞体からの排出(分泌・分解)シグナルが有意に増加することが分かった(図 1-8 A)。また、Goto-Kakizaki rat 肝臓では、GⅡの活性および発現の低下、UGGT の活性低下に伴い糖タンパク質の小胞体内保持機能が低下する一方、マンノシダーゼ I の活性および発現の上昇と、生成する M8B に結合する ERGIC53²¹の発現上昇に伴う分泌経路の活性化によって、糖タンパク質の小胞体からの排出機能が高まっていることが分かった。

次いで、骨粗しょう症モデルマウス (SAMP6) と認知症モデルマウス (SAMP10) 肝臓に由来する再構成糖鎖プロファイルを正常老化モデルマウス (SAMR1) 肝臓由来のそれと比較した(図 1-8 B)。その結果、正常老化および認知症モデルマウスでは M8B(分泌シグナル)が優先的に生成したが、骨粗しょう症モデルマウスでは選択性が逆転し M8A/C(分解シグナル)が主生成物となることが分かった。また、SAMP6 肝臓では、GⅡの活性および発現の低下、UGGT の活性低下に伴い糖タンパク質の小胞体内保持機能が低下する一方、EDEMI²²の活性上昇と生成する M8C に結合する OS9²³の発現上昇に伴って分解経路を活性化し、小胞体関連分解に関する機能を高めていることが分かった^[14]。

²¹ 小胞体とゴルジ体の中間に位置するオルガネラ (ER-Golgi intermediate compartment) に局在する 53kDa のタンパク質で、小胞体からゴルジ体へ糖タンパク質を輸送するカーゴレセプター。

²² ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein 1 小胞体関連分解に関与。

²³ Osteosarcoma amplified 9 Degradation-enhancing protein 小胞体関連分解に関与するレクチン。

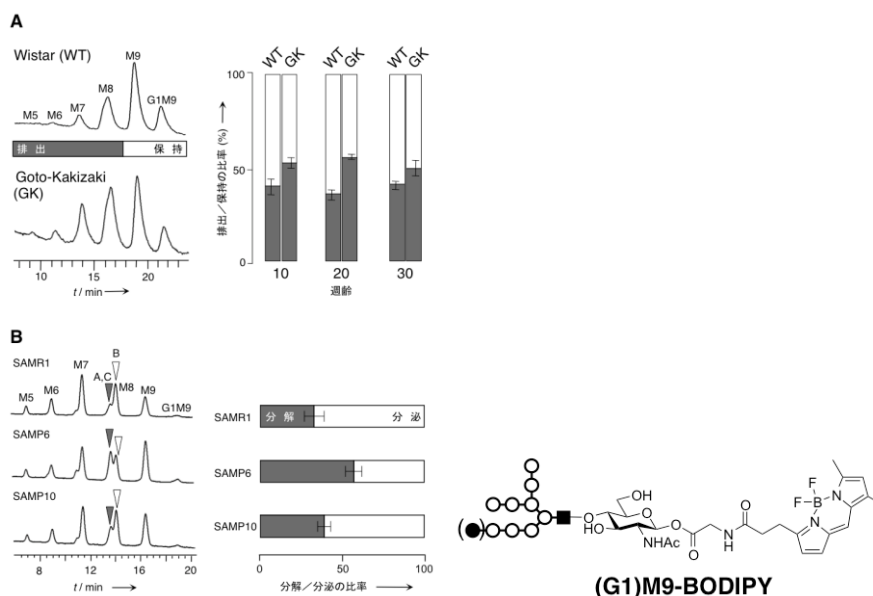


図 1-8 再構成糖鎖プロファイル法による糖タンパク質品質管理の稼働状況解析²⁴
A: 非肥満型 2 型糖尿病モデルラットの評価 B: 老化関連疾患モデルマウスの評価
右下: (G1)M9-BODIPY の構造式

⑥糖タンパク質品質管理に関連する糖鎖プロセッシングに対する分子クラウディング効果 (成蹊大学・戸谷との共同研究)

細胞内は一般的な *in vitro* 環境と比べて様々な生体分子によって非常に混んだ環境である。そこで、ウシ血清アルブミンを高濃度 (200mg/ml) で添加して、細胞内分子濃度を模したマクロ分子クラウディング条件が、前項で述べた再構成糖鎖プロファイルに与える影響を精査した。その結果、分子クラウディング環境下において糖鎖プロセッシングの前半、すなわちグルコース切断過程の速度は加速される一方、糖鎖プロセッシングの後半、すなわちマンノース切断過程のそれは減速されることが明らかとなった。さらに同様の分子クラウディング環境下において、レクチン様分子シャペロン CRT が糖鎖プロセッシング中間体とより強固に結合することも明らかになった^[15]。

⑦CRT の糖鎖付加近傍に対する識別機構 (成蹊大学・戸谷との共同研究)

ERQCにおいて、CRTはUGGTと共同して新生糖タンパク質上のG1M9型糖鎖を認識し、タンパク質部分のフォールディングを促進しているが、CRTがG1M9型糖タンパク質の糖鎖部分とタンパク質部分 (アグリコン) の両方を認識するのか、あるいは、糖鎖部分のみを認識するのかは不明確である。そこでアグリコン構造の異なる合成糖鎖リガンドおよびフォールディング状態を様々な制御した糖タンパク質を用いて、サーマルシフト²⁵によるCRTとの相互作用

²⁴ 本プロジェクト研究終了報告書

²⁵ 一定の勾配で温度を変化させる機能と蛍光強度を測定できる機能を兼ね備えた装置を用いて、タンパク質の変性解析を行う方法で、疎水性部分の露出を検出する。

解析を行い、そのアグリコン特異性を検証した。その結果、合成リガンドを用いた相互作用解析では、CRTとリガンドの相互作用はアグリコンの疎水性度が高くなるにつれ、強くなることが示された(図1-9)。また、様々な温度で熱変成させたIgYとの相互作用では、CRTはIgYのタンパク質の変性度が上昇するにつれて、高い親和性を示すことがわかった^[16]。

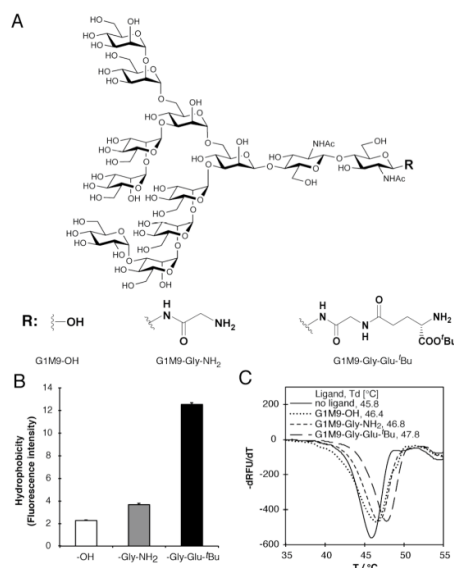


図1-9 CRTと合成糖鎖リガンドの相互作用解析²⁶

(A) 合成リガンドの構造 (B) 合成リガンドの疎水性 (C) サーマルシフトアッセイ相互作用解析

1.5.2 糖タンパク質合成化学グループ

本グループは、均一な構造の高マンノース型糖鎖をもつミスフォールド、ネイティブ型の糖タンパク質を精密に化学合成し、小胞体内酵素基質認識様式や糖タンパク質品質管理機構のプロセスについて解析した。

(1) ジスルフィドのかけ違いによるミスフォールド糖タンパク質に対する UGGT の認識

天然にはジスルフィド結合を持つ糖タンパク質が数多く存在しており、ジスルフィド結合のかけ違いは生体内で実際に存在するミスフォールドの形式のひとつである。ジスルフィド結合を持つ糖タンパク質をモデルとして、ジスルフィド結合のかけ違いを起こさせることによって安定で構造が規定されたミスフォールド体を合成し、UGGT の認識機構を解析した。まず、UGGT の基質となる高マンノース型糖鎖(特に Man9GlcNAc₂:M9) の生物材料からの単離を検討し、鶏卵卵黄から M9-アスパラギン誘導体を必要量得る方法を確立した^[17]。次に、これを原料として固相合成法による糖タンパク質の合成を行った。モデルタンパク質として 72 アミノ酸残基からなるジスルフィド結合を 2 本持つインターロイキン(Interleukin 8: IL-8)を用いた。IL-8 は本来糖鎖を持たないため、報告されている立体構造を精査し、糖

²⁶ 本プロジェクト研究終了報告書

鎖導入によるネイティブ構造への影響が少ないと考えられるループ上の Asn36 を糖鎖導入部位として選択した(図 1-10)。N 末側 33 残基のペプチドチオエステル 1 と C 末側 39 残基の糖ペプチド 2 に分割してそれぞれ固相合成法で調製し、Native chemical ligation 法(NCL 法)²⁷により連結して全長糖ペプチド 3 を得た。続いて空気酸化条件下で意図的にミスフォールディングを行い、ネイティブ構造 4、ジスルフィド結合の掛け違った 2 種類のミスフォールド体 5、6 および二量体 7 を得た(図 1-10)。また、フォールディング反応を途中で止めることにより、ジスルフィド結合が無いものや結合が 1 本の誘導体も得た。これらの M9 糖鎖を有する IL-8(M9-IL-8) 誘導体が UGGT の基質となるかどうかを LC-MS を用いて調べたところ、ネイティブ型 4 にはほとんどグルコース転移が見られないが、ミスフォールド体 5、6 はどれも基質となること、なかでも二量体 7 は非常に良い基質となることがわかった。すなわち、UGGT はミスフォールド体および二量体をリフォールディングが必要な基質として認識する能力があることが確認できた。二量体 7 はタンパク質表面の疎水性パッチを評価する試薬である 8-anilino-naphthalene 1-sulfonate(ANS) との結合が強く見られた。これは、ネイティブ構造ではタンパク質の内側に入っている疎水性アミノ酸がミスフォールド体では表面に露出し、そこを UGGT が認識していると解釈でき、これまで考えられてきた認識機構を強く裏付ける証拠が得られた^[18]。

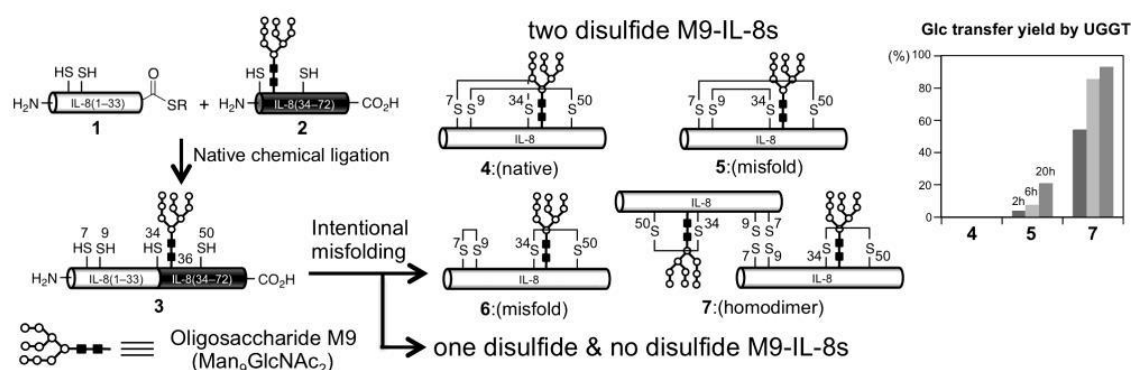


図 1-10 M9-IL-8 誘導体の合成と UGGT によるグルコース転移活性²⁸

グラフ縦軸はグルコース転移収率、横軸はアッセイに用いた基質。各基質は、2、6、20 時間反応を追跡した転移量を表示した。

(2) G1M9 糖タンパク質のタンパク質部位に対するグルコシダーゼ II、CNX/CRT の認識

これまで、単一構造の G1M9 糖タンパク質のミスフォールド型、ネイティブ型を調製する方法がなかったために、グルコシダーゼ II や CRT がタンパク質部位を認識しているかどうか明らかになっていなかった。そこで、単一構造の G1M9 糖タンパク質のミスフォールド型、ネイティブ型の精密化学合成を検討した。

²⁷ Dawson PE, et al., *Science*, 266, 776-779, 1994

²⁸ 本プロジェクト研究終了報告書

しかし、G1M9 糖鎖を調製し糖タンパク質を合成するのは困難であり、また UGGT という糖転移を利用したとしても UGGT はミスフォールド糖タンパク質のみにしかグルコース転移をしない。そこで、まずミスフォールド糖タンパク質を積極的に合成し、そして UGGT によりグルコースを転移させて G1M9 糖タンパク質とし、リフォールディングさせることで G1M9 糖タンパク質のミスフォールド型、ネイティブ型の精密化学合成を検討した (図 1-11)。

前項で化学合成した M9-IL-8 の二量体を UGGT と UDP-Glc で処理して G1M9-IL-8 を調製し、次いでネイティブ型、ミスフォールド型および二量体ミスフォールド型を調製することに成功し、それぞれの G1M9 糖タンパク質に対するグルコシダーゼ II 活性と CRT 認識能を検討した。本研究成果は本プロジェクト終了後に発表された (2.2.1(1)①参照)。

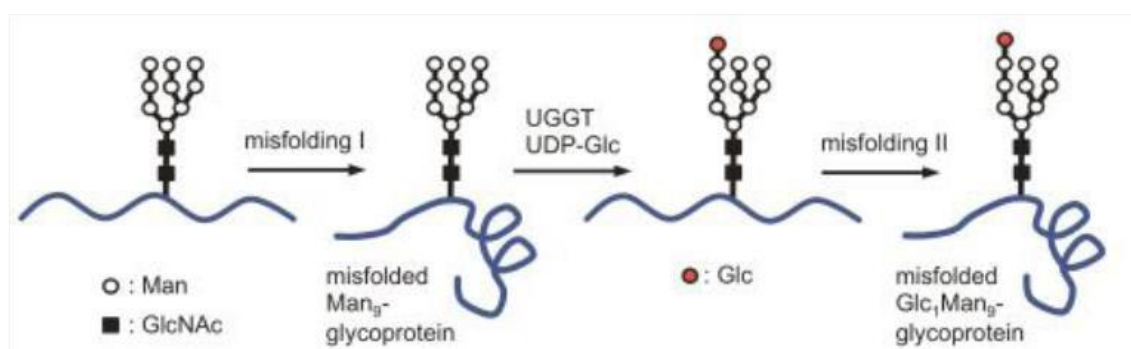


図 1-11 G1M9 糖鎖を持つ糖タンパク質 (ネイティブ型、ミスフォールド型) の酵素化学合成²⁹
化学合成した M9 糖ペプチドを故意にミスフォールドさせた後、UGGT によりミスフォールド型 G1M9 糖タンパク質を合成、そして再度リフォールディングすることで、G1M9 糖鎖をもつ糖タンパク質 (ネイティブ型、ミスフォールド型) を合成。

(3) UGGT によるフォールディング中間体の認識

ミスフォールドした糖タンパク質が UGGT の基質となることは明確に確認されたが、さらに糖ポリペプチド鎖がネイティブ型やミスフォールド体に行き着く途中の中間体が、UGGT の基質となるかどうかを検討した。UGGT にネイティブ型またはミスフォールド体へと向かうフォールディング中間体が識別できるかどうかは興味深い課題であった。まず、アミノ酸 46 残基からなる小型タンパク質クランビンの配列に M9 糖鎖を導入した糖ポリペプチド鎖が UGGT の共存下でネイティブ型のみにフォールディングすること、およびクランビンのもつ 6 残基の Cys 残基のうち 2 残基を Ser に置換した変異体が、同条件下で 3 種類のミスフォールド体を生成することを見いだした (図 1-12)。

²⁹ 本プロジェクト研究終了報告書

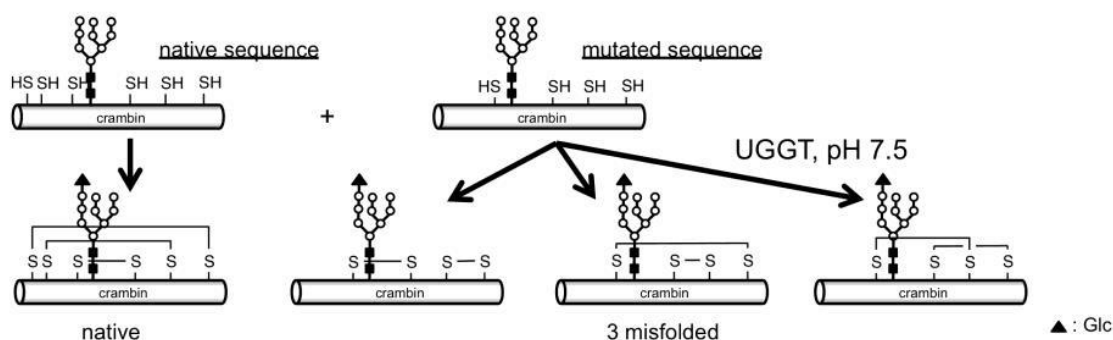


図 1-12 フォールディング中間体に対する UGGT の酵素活性測定³⁰

そこで、小胞体内でのフォールディング環境を模倣するため、天然の配列と Ser 変異体の 2 種類の糖ポリペプチド鎖を共存させ、UGGT 存在下でフォールディング実験を行い中間体に対するグルコース転移の時間経過を LC-MS を用いて調べた。その結果、すべての中間体にグルコース転移が同程度観測され、UGGT はネイティブ型またはミスフォールド体へと向かうそれぞれの中間体を識別することはできないことを見いだした^[19]。

(4) 糖鎖構造のタンパク質フォールディングに与える影響

糖タンパク質の生合成において、小胞体では糖タンパク質をフォールディングさせるために高マンノース型糖鎖を付加し、ゴルジ体では酸性の複合型糖鎖へと構造を改変するが、糖鎖の構造変化がタンパク質のフォールディング、安定性にどの程度影響を与えるか調べた例はない。そこで、小型タンパク質であるクランビンに 2 分枝アシアロ複合型または高マンノース型糖鎖を付加した糖ペプチドをそれぞれ化学合成し、そのフォールディング過程およびフォールディング後のタンパク質の 3 次構造を比較した。

図 1-13 には、合成した高マンノース型糖鎖あるいは複合型糖鎖をもつポリペプチドがフォールディングする過程を逆相クロマトグラフィーで追跡した結果を示した。その結果、各時間毎のクロマトグラフィーを比較したところ、同じピークパターンでフォールディングすることが確認できた(図 1-13 B)。また、得られた高マンノース型、複合型糖鎖をもつクランビンの ¹H-¹⁵N-HSQC を比較したところほぼ全てのシグナルが完全に重なり、それら 2 つのタンパク質部位の 3 次構造が一致しているということが確認できた。

糖タンパク質生合成経路では高マンノース型のように 3 分枝でやや疎水性面をもつ糖鎖、ならびに親水性が増した 2 分枝複合型糖鎖が付加してもタンパク質のフォールディング過程、3 次構造には影響がないことが判明し、小胞体内の糖タンパク質品質管理機構はタンパク質構造には直接影響を与えない糖鎖をタグとして利用することで、タンパク質のフォールディングを効率よく認識、制御しているということが推定できた^[20]。

³⁰ 本プロジェクト研究終了報告書

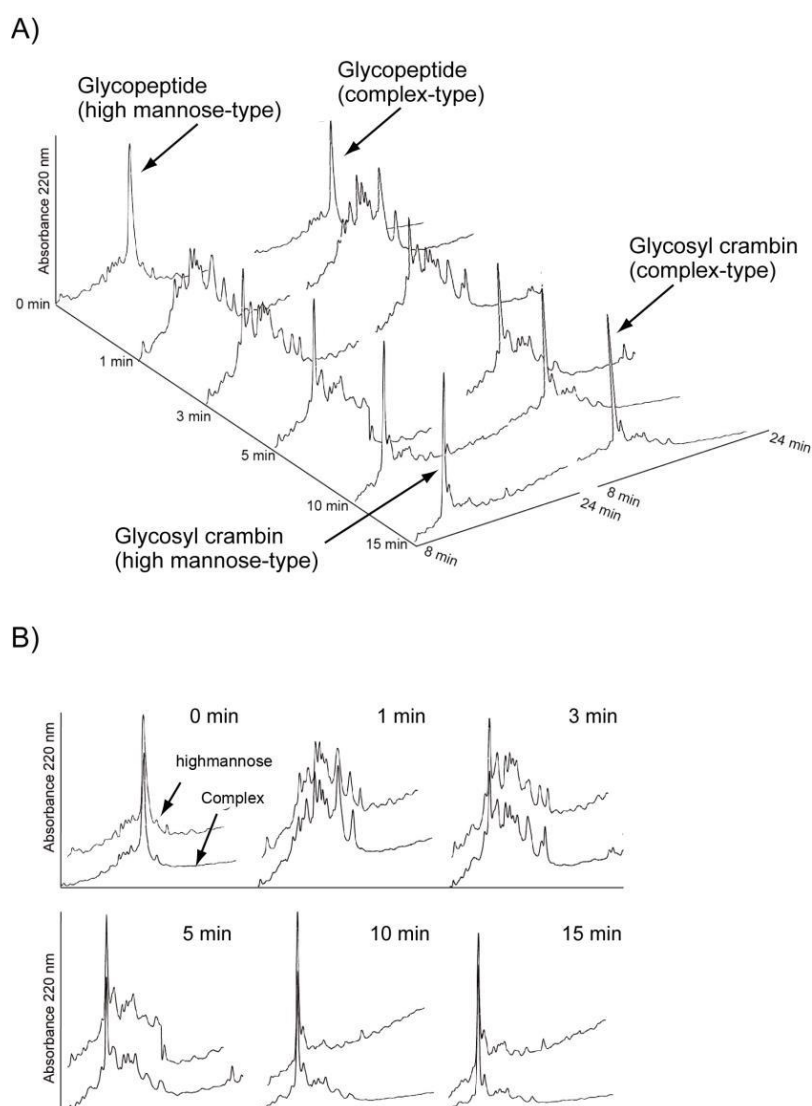


図 1-13 高マンノース型、複合型糖鎖をもつポリペプチドのフォールディング過程³¹
 A) 化学合成した高マンノース型糖鎖、ならびに複合型糖鎖をもつクランビンのフォールディング。
 B) 各時間における高マンノース型糖鎖、ならびに複合型糖鎖をもつクランビンのフォールディング過程の HPLC プロファイルを重ねたもの。

(5) 疎水性を示す糖タンパク質に対する UGGT の認識

生体には、タンパク質表面に数本の糖鎖をもつ糖タンパク質が多く存在するが、N 型糖鎖を 3 本もつエリスロポエチン (EP0) に、1 本だけ M9 糖鎖を導入したネイティブ型の立体構造を持つ糖鎖一部欠損型、および 3 カ所全てに糖鎖をもつ天然型を合成し、それぞれ UGGT がどのように認識するか調べた。EP0 は 166 アミノ酸からなり、24、38、83 位に複合型のシアル糖鎖をもつが、小胞体で生合成される際は高マンノース型の M9 糖鎖をもっている。しかし、動物細胞を用いて EP0 を調製すると糖鎖は複合型となり、高マンノース型を得ることができない。そこで、EP0 の 166 残基のアミノ酸を 6 つのセグメントに分けてそれぞれ

³¹ 本プロジェクト研究終了報告書

プチド固相合成により調製し、Native chemical ligation 法(NCL 法)にて連結して、24、38、83 位にそれぞれ 1 本の M9 糖鎖をもつ EP0(M9-EP0)、ならびに 24、38、83 位に計 3 本の M9 糖鎖をもつ M9-EP0 を化学合成した(図 1-14)。

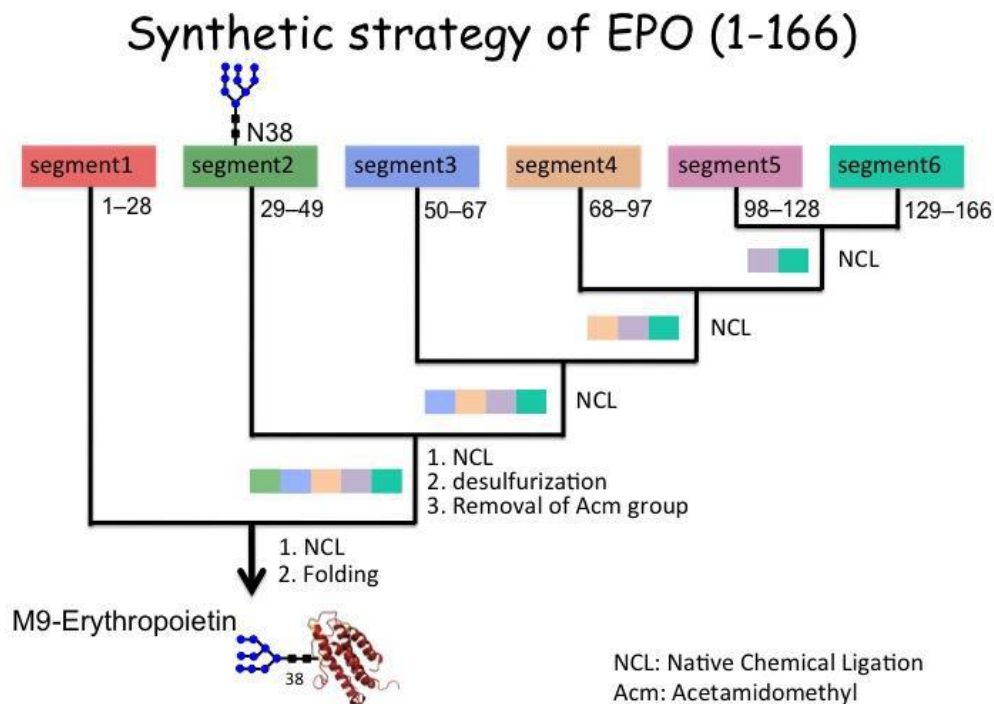


図 1-14 38 位に M9 糖鎖を持つ EP0 の化学合成³²

6 つのペプチド、糖ペプチドを NCL 法で連結し、そしてフォールディングさせることで全合成した。同じ合成法で、24、83 位にそれぞれ糖鎖をもつ EP0、ならびに 24、38、83 位に糖鎖をもつ EP0 を合成した。

得られた M9-EP0 を変性剤であるグアニジン存在下段階透析法でフォールディングし、ネイティブ型 EP0 と 3 量化したミスフォールド体を取得し、UGGT の反応性を調べた。その結果、UGGT はこれまでとは違い、正しくフォールドした全ての EP0 に Glc を転移することがわかった。この原因について伊藤らは EP0 タンパク質表面の疎水性残基が作る広範な疎水性面を UGGT がミスフォールド特有の疎水性面と認識したためであると考察し、さらに詳細に検討した結果を本プロジェクト終了後に報告した(2.2.1(1)④参照)。

1.5.3 糖鎖構造情報化学グループ

本グループは、糖タンパク質および糖脂質の構造に注目し、糖によるそれらの修飾過程を明らかにするために、極微量分析技術による細胞内糖鎖合成制御機構の可視化、および原子間力顕微鏡による糖タンパク質の可視化を検討した。

³² 本プロジェクト研究終了報告書

(1) ゴルジ体における糖鎖合成制御機構の可視化・理解と極微量分析技術開発

細胞内におけるタンパク質やスフィンゴ脂質の糖鎖による修飾過程は、生合成に関与する酵素群以外ほとんど未解明である。そこで、スフィンゴ糖脂質の合成過程について蛍光性の合成プローブ分子を導入した培養細胞を用い、様々な糖による修飾過程について「いつ」「どこで」「なにが」「どれだけ」を明らかにすることを目的とした。

①新規機能性シアル酸誘導体の合成

シアル酸は多くの複合糖質糖鎖の非還元末端に存在しており、細胞間の認識や、ウイルスや細菌による接着現象にも深く関与している。そこでシアル酸転移反応の場であるゴルジ層板を選択的に可視化するとともに、シアリル化反応を阻害する分子を設計・合成した(図 1-15 a)。このフッ化シアル酸を持ち蛍光基を有する CMP シアル酸類縁体は、ラット由来のシアル酸転移酵素を阻害すること(図 1-15 b)、ならびにゴルジ体マーカー分子で染色されるゴルジ体領域の一部と考えられる未知の領域に取り込まれることがわかった(図 1-15 c)^[21]。

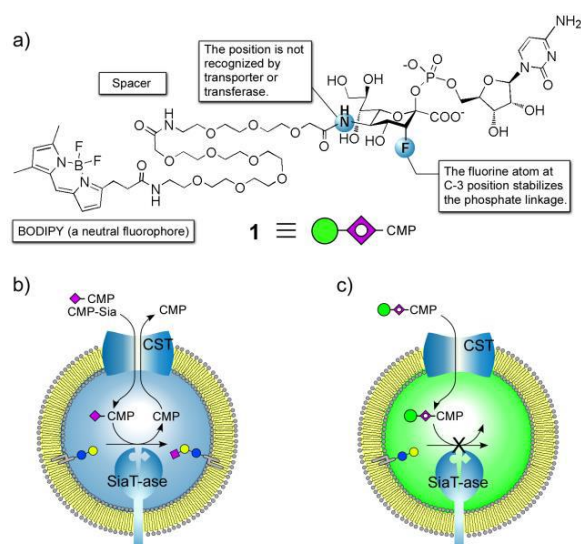


図 1-15 新規機能性シアル酸誘導体³³

a) 化学構造、b) シアル酸転移酵素阻害、c) ゴルジ体領域への取込み

②蛍光標識糖脂質を用いた糖脂質生合成機構の統合的解析

蛍光標識したラクトシルセラミドアナログを化学合成し、動物培養細胞 PC12D を用いて、投与した標識糖脂質の細胞内における動態を共焦点顕微鏡で追跡し、一方で nanoLC-MS を用いてフェムトモルオーダーで定量的かつ定性的に代謝過程を追跡する技術(ナノ液体クロマトグラフィー-LED 励起蛍光検出-質量分析装置: 蛍光検出ナノ LC-MS/MS システム)を開発した^[22]。蛍光標識ラクトシルセラミドアナログは経時的に細胞内へ取り込まれ、ゴルジ体へ集積した。それに伴い糖鎖付加が起こり、新たに合成された種々のガングリオシドを検

³³ 本プロジェクト研究終了報告書

出することに成功した(図 1-16)^[23]。さらに、実験条件の異なる細胞間における糖鎖付加の誤差の問題を解決するため、安定同位体による標識化を組み込んだ 2 官能基性の蛍光標識分子を有する糖脂質を化学合成し、内部標準とした(図 1-17)。これにより合成された糖脂質の定量解析が可能となった^[24]。

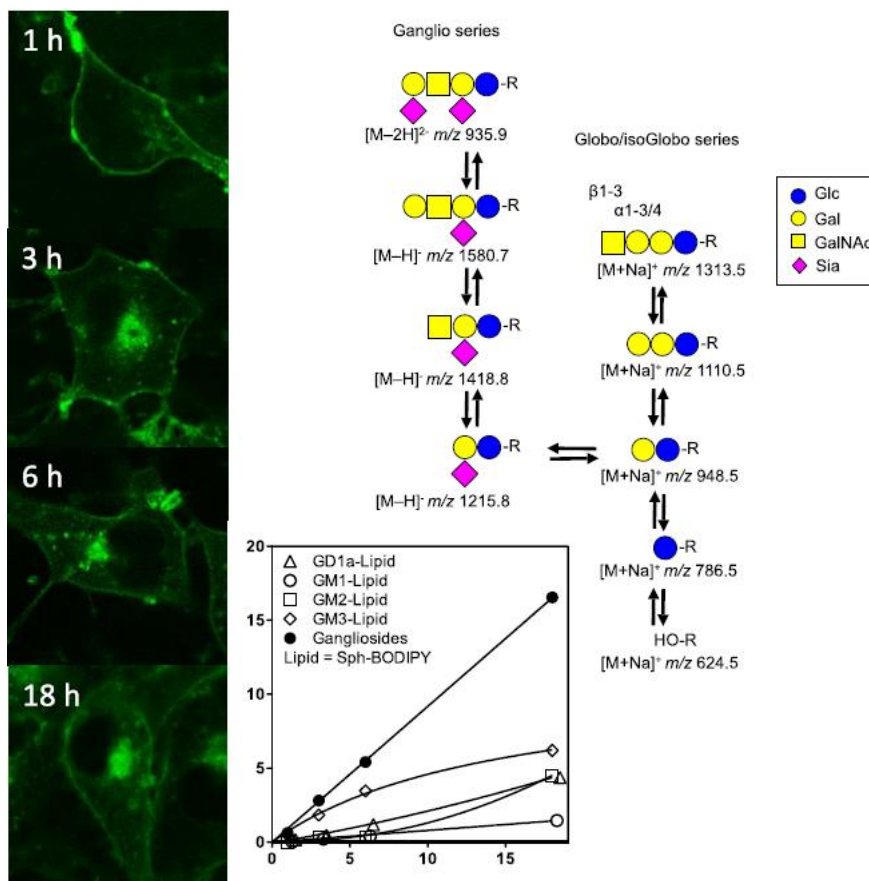


図 1-16 細胞内脂質代謝過程の可視化³⁴

左図：共焦点レーザー顕微鏡画像。蛍光標識が経時的にゴルジ体へ集積している。

挿入図：蛍光標識ラクトシルセラミドアナログ導入後 1h、3h、6h、18h のそれぞれ約 6000 細胞から糖脂質を抽出し、nanoLC-MS で分析し、種々のガングリオシドを定量した。

右図：蛍光標識ラクトシルセラミドアナログ (●●●●●●●●) から糖付加により生成するガングリオシド模式図。

³⁴ 本プロジェクト研究終了報告書

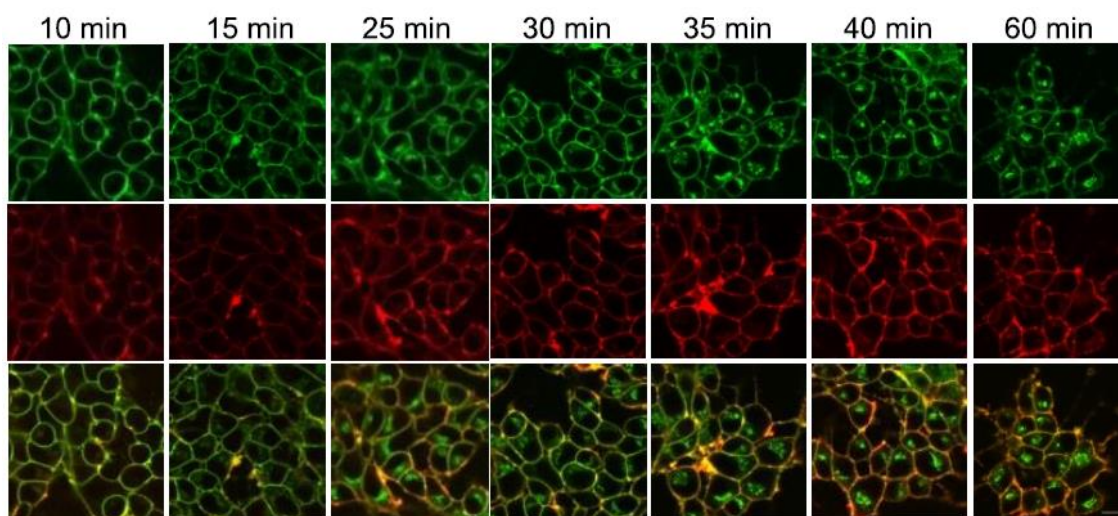


図 1-17 標識糖脂質の細胞内動態³⁵

上段：蛍光標識したラクトシルセラミド、中段：細胞表面マーカー、下段：マージ。ラベル化糖脂質が経時的にゴルジ体へ移動することがわかる。

(2) 質量分析法による新規解析技術開発

質量分析法は極めて微量における構造の解析に有効であるが、他の多くの方法同様キラルブラインドである。一方、糖はキラル中心が連続するジアステレオ構造を有しており判別が可能である。しかし、遊離糖においては、アノマー化のため各々の立体を有する単糖の単離、精製は事実上不可能である。そこで、適切な前駆体から質量分析条件下、気相で各々のアノマーを得る方法を開発した。この結果、ナトリウムの配位の強弱を一連の単糖について得ることができた^[25]。

この方法をさらに展開し、質量分析法に基づく光学異性体の解析技術について新手法を開発することに成功した。すなわち、一方のエナンチオマー(例えばR-体)について対をなすキラル補助団(R-体/S-体)により誘導化することでジアステレオ対とする。ジアステレオ対(R-R-体/R-S-体)は化学的性質が異なるため質量分析法においても判別が可能である。ここで、エナンチオマーであるR-S-体とS-R-体の判別は不可能である。換言すると、質量分析法によりR-R-体とS-R-体の質量分析データを取得することが可能である。従って、ジアステレオ対判別の原理を知ることができれば、光学中心の絶対配置を知り得る。この考えに従って光学活性中心を一つ有する種々の分子について検討した結果、立体化学の一義的な帰属につながる法則を得ることは出来なかった。しかし、質量分析データの差異が分析条件における活性化エネルギーを反映することは明らかとなった。計算科学的手法により特にナトリウムと分子の結合エネルギーを精査した結果、質量分析データが計算科学の結果と一致した。すなわち、これら両者の検討を行うと絶対配置の決定が可能であることが判明した^[26](図1-18)。

³⁵ 本プロジェクト研究終了報告書

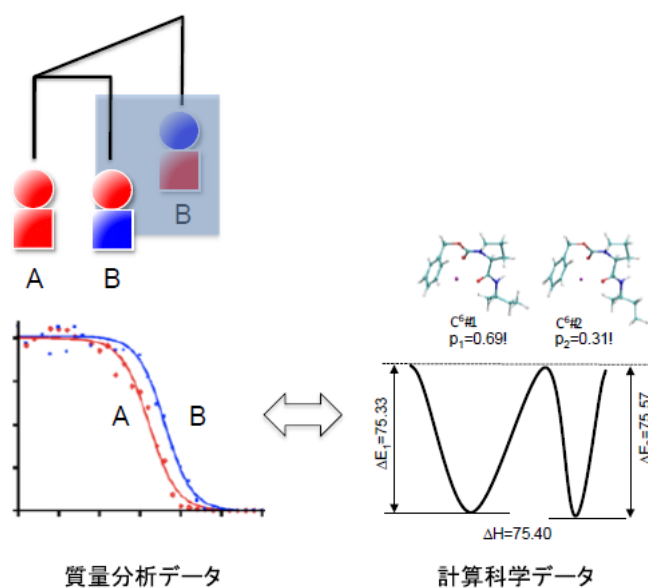


図 1-18 質量分析法による絶対配置決定法を開発³⁶

(3) 小胞体への分子ターゲティング法の開発

化合物などを小胞体などの特定の細胞器官に輸送するための人工タンパク質を開発した。逆行輸送により細胞内小器官に輸送されることが示されているガレクチン-1³⁷の N-末端と、ハロゲン化アルカンを持つ任意の分子と化学結合を形成する HaloTag タンパク質³⁸との融合分子を構築し、さらに配列内にゴルジ体内に存在するプロテアーゼの切断部位と、C-末端に小胞体滞在シグナル(KDEL)³⁹を配置した。これにより従来法では不可能であった水溶性、分子量共に高い物質を小胞体へと送達できることを示した。具体的には小胞体において UGGT ならびにマンノシダーゼの基質となる M9Gn2 糖鎖を小胞体に送達することに成功した^[27]。

(4) 原子間力顕微鏡 (AFM) の高分解能化とこれによる糖タンパク質の可視化と構造解析

分泌タンパク質の半数は糖鎖により複雑な修飾を受けているが、多様性の問題から分子としての糖タンパク質の立体構造に関する研究がなされていない。そこで、有機合成により探針の化学修飾をおこなって、物質の形状および表面構造を計測する AFM の空間解像度を上げることににより、糖タンパク質の表面マップを作成することを目指した。質量分析法により取得される糖タンパク質の配列情報と組み合わせることで、糖タンパク質の新規な構造解析技術となることが期待できる。

シクロデキストリン (CD) をコアとする dendritic 分子を合成して、AFM カンチレバーの dendritic 分子による修飾に成功した。さらに、青森大学・鈴木との共同研究で、CD に

³⁶ 本プロジェクト研究終了報告書

³⁷ ガレクチン: ガラクトース (β -ガラクトシド構造) を認識し、結合あるいは糖鎖同士を架橋するタンパク質の総称

³⁸ 低分子リガンドと特異的な共有結合を形成する 33kDa のタグタンパク質を利用したタンパク質機能解析ツール。

³⁹ Lys (K)-Asp (D)-Glu (E)-Leu (L) の 4 つのアミノ酸からなる小胞体移行シグナル

親和性の高いアダマンタン骨格と光反応性のジアジリンを側鎖に有する化合物を用いて CD 結合探針とすることで、AFM の解像度を向上させた(未発表)。また、質量分析法により UGGT1 の糖鎖付加位置および糖鎖の配列を決定することに成功した^{[28][29]}。

第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況

2.1 プロジェクトの終了後の状況に関する基礎データ

2.1.1 調査方法

調査は、文献調査(プロジェクト報告書、解説、原著論文など)、インターネットによる調査、各種データベースによる業績(論文・特許・受賞他)の調査からなる基礎データ調査と、プロジェクト関係者や外部有識者へのインタビュー調査を行った。これに基づき、本プロジェクト期間中の成果の調査時点での発展状況および波及効果等についてまとめた。

(1) 基礎データ調査の方法

基礎データ調査については、基本的にプロジェクトメンバー⁴⁰を対象として、プロジェクトの研究に関連した成果の発展状況について、文献による成果の把握と、論文や研究助成金の獲得状況等のデータ調査を行った。各項目について利用したデータベースと調査範囲等を下記に記す。

①競争的研究資金の獲得状況

プロジェクトメンバーを対象として、本プロジェクトの研究内容に関連している研究課題について調べた。表 2-1 はその中で、競争的研究資金の総額が 1 千万円以上のものを抽出して示した。

データベースとしては、調査対象者の所属する研究室や本人の WEB サイトおよび KAKEN 科学研究費助成事業データベース等の競争的研究資金に関する検索サイトと、補助的に Google 等の検索サイトを利用した。

②論文

本プロジェクト期間中の論文は、2009 年～2016 年に発表された論文およびプロジェクトの終了報告書に成果論文としてリストアップされている論文とした。成果論文リストの中で *in press*、*to be submitted* 等と表記があり、その後発表されたものについても基本的には期間中の論文とした。以下、これらの論文を「成果論文」と定義する。

本プロジェクト終了後の論文は、2017 年 1 月以降に発表され、かつ本プロジェクトメンバーが著者になっている論文を収集した(ただし、本プロジェクト期間中の論文に含むものは除く)。収集した論文の中で、本プロジェクトとの関連を Abstract、引用関係等で確認し、関連のあるものを関連論文としてリストアップした。以下、これらの論文を「発展論文」と定義する。

⁴⁰ 研究総括、グループリーダー、研究員

データベースは、主としてエルゼビア社の Scopus を利用し、補完的にクラリベイトアナリティクス社の Web of Science を利用した。

各論文についての評価の一つである FWCI(Field Weighted Citation Impact)⁴¹、および Journal の指標となる CiteScore⁴²についても収集した。

③特許の出願・登録状況

本プロジェクト期間中の特許は、プロジェクト終了報告書の成果リスト記載の特許とした。本プロジェクト終了後の特許は 2016 年 4 月以降に出願され、かつプロジェクトメンバーが発明者の特許とし、データベースは、主に PatentSquare (パナソニック社) を利用し、補助的に特許情報プラットフォームと Espacenet を利用した。

④招待講演

研究総括およびグループリーダーの本プロジェクト終了後の招待講演を調査対象者の所属する研究室や本人の WEB サイトの調査、Google 等の検索サイト、①で記述した文献データベースの会議録等を併せて収集し、かつインタビューの際に主な招待講演について確認した。

⑤受賞

プロジェクトメンバーの本プロジェクト終了後の受賞を調査対象者の所属する研究室や本人の WEB サイトの調査、Google 等の検索サイトで収集後、研究総括およびグループリーダーに確認した。

⑥ベンチャー

インターネット検索やベンチャー情報の記載のあるデータベースを用いて検索した。

⑦報道

日経テレコンおよび、プロジェクト関係者の WEB サイトの情報を収集した。

⑧参加研究者の動静

終了報告書を元にプロジェクト参加研究者⁴³を特定し、プロジェクト参加時の職位および、終了時の職位、現在の職位を検索した。

⁴¹ FWCI(Field-Weighted Citation Impact) : 1 文献あたりの被引用数を世界平均(年別・分野別・文献タイプ別に算出)で割った数値。

⁴² ジャーナル評価指標(Web of Science の Impact Factor と同様の指標)。その論文が出版された年の CiteScore を収集と、現在の最新(CiteScore2019)を収集。

⁴³ プロジェクトメンバーに加えて、終了報告書に記載のある技術員、研究補助員等も含めている。

(2) インタビュー調査の方法

インタビュー調査は研究総括および、本プロジェクトの主なメンバー数名と、プロジェクトの成果およびその後の伊藤や、他の研究者について良く把握している(外部有識者とする)1 名について、実施した。プロジェクト関係者には、基礎調査で知り得た情報の本プロジェクトとの関連や、その後の展開等についての情報を収集した。

2.1.2 競争的研究資金の獲得状況

本プロジェクト期間中から現在までのプロジェクトメンバーも含めた競争的研究資金の獲得状況を表 2-1 に示す。伊藤は科研費特別推進研究「小胞体糖修飾の統合的ケミカルバイオロジー」(2016 年度～2020 年度)(以後、科研費特別推進)で、本プロジェクトの研究を継続発展させた。

表 2-1 競争的研究資金の獲得状況

表 2-1 研究種目別研究資金の獲得状況																		
				JST				科研費				AMED						
研究 期間 (年 度)	研究種目	研究課題	研究代表者	2 0 0 9	2 0 0 0	2 0 0 1	2 0 0 2	2 0 0 3	2 0 0 4	2 0 0 5	2 0 0 6	2 0 0 7	2 0 0 8	2 0 0 9	2 0 1 0	2 0 1 1	金額 (億円)	
2009 ～ 2015	ERATO	伊藤グライコトリロジー	伊藤 幸成														14. 17	
2014 ～ 2016	科研費 基盤研究 (A)	大型生理活性糖タンパク 質の精密半化学合成	梶原 康宏														0. 28	
2016 ～ 2020	科研費 特別推進 研究	小胞体糖修飾の統合的ケ ミカルバイオロジー	伊藤 幸成 (研究分担者： 武田 陽一、 松尾 一郎、 梶原 康宏、 迫野 昌文、 井原 義人、 戸谷 希一 郎、平林 義 雄、 山口 芳樹)														4. 15	
2016 ～ 2020	AMED 創 薬戦略部 (医薬品 研究課) 次世代治 療・診断 実現のた めの創薬 基盤技術 開発 糖 鎖利用に よる革新	糖鎖構造の可変を可能に する糖タンパク質の精密 半化学合成とその品質分 析技術の開発	梶原 康宏														1. 50	

研究 期間 (年 度)	研究種目	研究課題	研究代表者	2 0 0 9	2 0 0 1	2 0 0 2	2 0 0 3	2 0 0 4	2 0 0 5	2 0 0 6	2 0 0 7	2 0 0 8	2 0 0 9	2 0 1 0	2 0 1 1	2 0 1 2	金額 (億円)
	的創薬技 術開発事 業 技術 開発提案 A																
2017 ～ 2019	科研費 基盤研究 (A)	精密合成した糖タンパク 質プローブを用いるゴル ジ装置内糖鎖構造管理機 構の解明	梶原 康宏														0.30
2017 ～ 2020	科研費 基盤研究 (B)	セレンの特異的な反応性 を利用したユビキチン化 糖タンパク質プローブの 新規合成法	和泉 雅之														0.17

検索日 2020年11月16日

2.1.3 論文の発表状況

成果論文および発展論文の全論文の Field-Weighted Outputs in Top Citation Percentiles⁴⁴の論文数を表 2-2 に示す。

成果論文数は 97 報であり、Top1%は米国 Scripps Research Institute との共同研究で Science 誌に発表された、HIV(ヒト免疫不全ウイルス)の外皮糖タンパク質 glycan shield に関する論文である(表 2-3 1 位)。また、グリコシルスルホニウムイオンの構造、安定性、および反応性を明らかにした論文⁴⁵が Top10%となっている。

発展論文数は 38 報で、Top10%の 2 報は複合型シアリル糖鎖タンパク質の化学合成に関する論文である(2.2.5(1)参照)。

表 2-2 プロジェクトの論文投稿状況一覧

	論文数	平均 FWCI 値	FWCI Top %				
			10% 圏外	10% 以内	1% 以内	0.1% 以内	0.01% 以内
成果論文	97	0.70	95	2	1	0	0
発展論文	38	0.64	36	2	0	0	0

検索日：2020年10月14日

(1) 本プロジェクト成果に直接関わる論文

研究終了報告書に挙げられている論文を中心に、本プロジェクトと直接かかわると判断できる論文数をその被引用数の推移と共に図 2-1 に示す。プロジェクト期間中の論文が、プ

⁴⁴ 1 論文あたりの被引用数を世界平均(出版年・分野・文献タイプ別に算出)で割った数値。0.01%は、0.01%以内に含まれる論文の数を示し、0.1%は、0.01%より大きく、0.1%以内のものを示す。

⁴⁵ Nokami T, et al., *Org. Lett.*, 13, 1544-1547, 2011

プロジェクト終了後も安定して引用されており、1 報、1 年あたりの平均被引用件数は 2.45 件/年・報である。

また、被引用数上位 5 報を表 2-3 に示した。1 位は HIV(ヒト免疫不全ウイルス)の外皮糖タンパク質 glycan shield に関する論文である。2 位はマンノースの立体選択的な β -グリコシド結合を可能にした、分子内アグリコン転移反応(Intramolecular aglycon delivery: IAD)の効率化について、3 位は結核菌表層のアラビノガラクトタン糖鎖の合成について、それぞれ発表したものである。

4 位は理研糖鎖代謝生化学研究室・鈴木匡との共同研究で、特定の糖鎖構造を持つタンパク質の可視化に関する論文である。

5 位はミスフォールド糖タンパク質の分解機構に関与する OS-9 の機能について報告したものである。

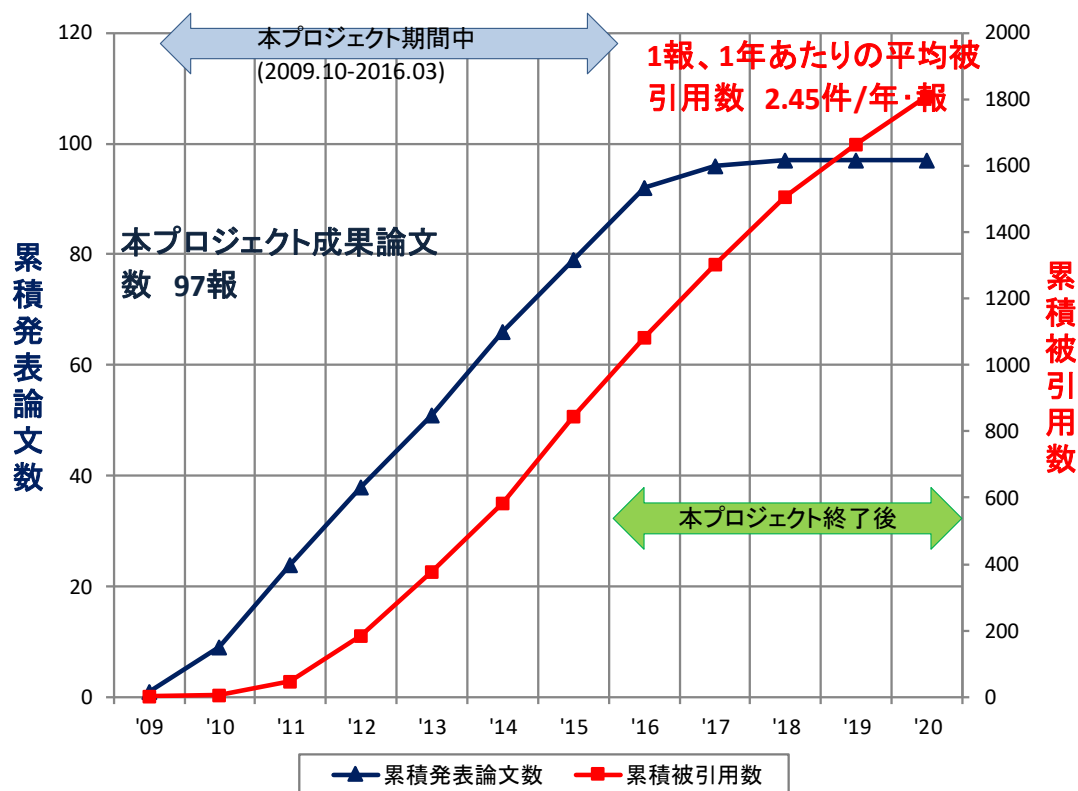


図 2-1 プロジェクトの成果論文の発表論文数と被引用数の推移
(検索 DB : Scopus 検索日 2020 年 10 月 8 日)

表 2-3 プロジェクトの成果論文の内、被引用上位 5 報の論文

N o	著者名	タイトル	出版 年	出版物名	巻	号	論文番 号/ペ ージ	被 引 用 数	DOI	文献タ イプ	FWCI	CiteSc ore*
1	Pejchal R., Doores K. J., Walker L. M., Khayat R., Huang P.-S., Wang S.-K., Stanfield R. L., Julien J.-P., Ramos A., Crispin M., Depetris R., Katpally U., Marozsan A., Cupo A., Maloveste S., Liu Y., McBride R., Ito Y., Sanders R. W., Ogohara C., Paulson J. C., Feizi T., Scanlan C. N., Wong C.-H., Moore J. P., Olson W. C., Ward A. B., Poignard P., Schief W. R., Burton D. R., Wilson I. A.	A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield	2011	Science	334	6059	1097- 1103	499	10.1126 /scienc e.12132 56	Article	12.07	44.7 (45.3)
2	Ishiwata A., Lee Y. J., Ito Y.	Recent advances in stereoselective glycosylation through intramolecular aglycon delivery	2010	Organic and Biomolecular Chemistry	8	16	3596- 3608	104	10.1039 /c00428 1a	Article	2.42	- (6.1)
3	Ishiwata A., Ito Y.	Synthesis of docosasaccharide arabinan motif of mycobacterial cell wall	2011	Journal of the American Chemical Society	133	7	2275- 2291	67	10.1021 /ja1099 32t	Article	1.80	16.1 (24.8)
4	Haga Y., Ishii K., Hibino K., Sako Y., Ito Y., Taniguchi N., Suzuki T.	Visualizing specific protein glycoforms by transmembrane fluorescence resonance energy transfer	2012	Nature Communications	3		907	57	10.1038 /ncomms 1906	Article	1.42	6.5 (18.1)
5	Mikami K., Yamaguchi D., Tateno H., Hu D., Qin S.-Y., Kawasaki N., Yamada M., Matsumoto N., Hirabayashi J., Ito Y., Yamamoto K.	The sugar-binding ability of human OS-9 and its involvement in ER-associated degradation	2009	Glycobiology	20	3	cwp175 (310- 321)	50	10.1093 /glycob /cwp175	Article	2.01	- (6.1)

(検索 DB : Scopus 検索日 2020 年 10 月 8 日 FWCI、CiteScore10 月 14 日時点)
 ※CiteScore は出版年の値。()内は 2019 年の値。

(2) 本プロジェクトの成果の発展、または本プロジェクトから波及した研究内容の文献

本プロジェクトの成果の発展および波及に関する論文は計 38 報である。プロジェクト終了以降の発展論文の発表数と被引用数の推移を図 2-2 に示す。また、発展論文のうち、被引用数 5 位までの論文を表 2-4 に示した。1 位は精密化学合成により調製した糖タンパク質 EPO の糖鎖機能に関する論文で、4 位は糖タンパク質化学合成についての総説である。2 位、3 位、5 位はそれぞれ、がん転移に関与する N-アセチルグルコサミン転移酵素 V、酵素 UGGT の立体構造、および単一のマンノシルドナーから両方のアノマーを取得するための新しい糖鎖合成手法に関する論文である (2.2 参照)。

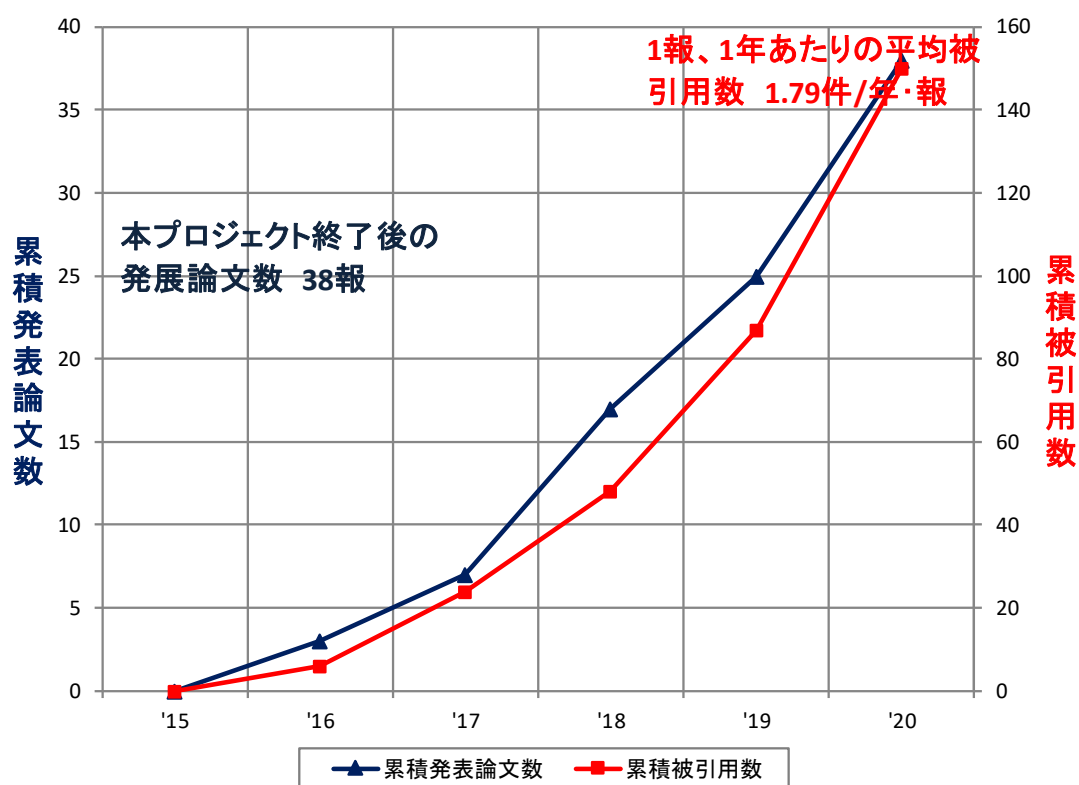


図 2-2 プロジェクト終了以降の発展論文の発表数と被引用数の推移
(検索 DB : Scopus 検索日 2020 年 10 月 8 日)

表 2-4 プロジェクトの成果の発展論文の内、被引用上位 5 報の論文

N o	著者名	タイトル	出版 年	出版物名	巻	号	論文番 号/ペー ジ	被 引 用 数	DOI	文献タ イプ	FWCI	CiteSc ore*
1	Murakami M., Kiuchi T., Nishihara M., Tezuka K., Okamoto R., Izumi M., Kajihara Y.	Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity	2016	Science Advances	2	1	e1500678	52	10.1126/ sciadv. 1500678	Article	2.56	4.8 (25.2)

N o	著者名	タイトル	出版 年	出版物名	巻	号	論文番 号/ペー ジ	被 引 用 数	DOI	文献タ イプ	FWCI	CiteSc ore*
2	Nagae M., Kizuka Y., Mihara E., Kitago Y., Hanashima S., Ito Y., Takagi J., Taniguchi N., Yamaguchi Y.	Structure and mechanism of cancer-associated N- acetylglucosaminy ltransferase-V	2018	Nature Communications	9	1	3380	15	10.1038 /s41467 -018- 05931-w	Article	1.84	18.1 (18.1)
3	Calles-Garcia D., Yang M., Soya N., Melero R., Ménade M., Ito Y., Vargas J., Lukacs G.L., Kollman J.M., Kozlov G., Gehring K.	Single-particle electron microscopy structure of UDP- glucose:glycoprot ein glucosyltransfera se suggests a selectivity mechanism for misfolded proteins	2017	Journal of Biological Chemistry	292	27	11499- 11507	13	10.1074 /jbc.M1 17.7894 95	Article	1.08	8.2 (7.4)
4	Unverzagt C., Kajihara Y.	Recent advances in the chemical synthesis of N- linked glycoproteins	2018	Current Opinion in Chemical Biology	46		130-137	10	10.1016 /j.cbpa .2018.0 7.004	Review	0.62	13.3 (13.1)
5	Ding F., Ishiwata A., Ito Y.	Bimodal Glycosyl Donors Protected by 2- O-(ortho- Tosylamido)benzyl Group	2018	Organic Letters	20	14	4384- 4388	8	10.1021 /acs.or glett.8 b01922	Article	1.20	10.9 (10.4)

(検索 DB : Scopus 検索日 2020 年 10 月 8 日 FWCI、CiteScore10 月 14 日時点)
※CiteScore は出版年の値。()内は 2019 年の値。

2.1.4 特許の出願・公開・登録状況

本プロジェクトの期間中と終了後の調査時点に至るまでの特許出願状況を表 2-5 に示す。
期間中に出願が 1 件で、特許第 5441064 号「物質の構造解析方法」および US8575543 として
国内および米国で登録された。本プロジェクト終了後の特許出願はない。

表 2-5 プロジェクトの特許出願状況一覧

	出願件数		登録件数	
	国内	海外 ⁴⁶	国内	海外
プロジェクト期間中	1	1	1	1
プロジェクト終了後	0	0	0	0
合計	1	1	1	1

検索日 : 2020 年 10 月 13 日

⁴⁶ 海外は国内出願に優先権主張をかけて、海外に出願した特許を示す。

2.1.5 招待講演

伊藤と3名のグループリーダーは本プロジェクトの成果について、それぞれ、国内外で招待講演を行った(2016年4月以降に、伊藤が国際8件・国内9件、武田が国内1件、梶原が国際12件・国内5件、および蟹江が国際1件)。

伊藤は、合成化学を主体とした糖質科学研究について小胞体糖タンパク質管理機構を中心に、RIKEN-Max Planck Joint Research Center Fifth Annual Symposium(2016年)、ACS National Meeting(2018年および2019年)、日本農芸化学会(2019年)や糖質科学コンソーシアムシンポジウム(2019年)などで講演した。また、武田はUGGTの機能解析について理研シンポジウム「小胞体糖修飾の統合的ケミカルバイオロジー」(2017年)で講演した。

梶原は糖タンパク質化学合成研究の進展について、Gordon Research Conference(2017年)、American Chemical Society National Meeting(2019年)、Emil Fischer Memorial Symposium(2019年)、日本生化学会(2018年)、日本農芸化学会(2018年)や日本生物学会(2018年)などで講演した。蟹江はInternational Carbohydrate Symposium(2016年)で化学合成と精密分析法を駆使したグリカンプロセシングの時空間解析について講演した。

2.1.6 受賞状況

伊藤は「複合糖質の機能解明をめざす高選択的・高効率合成法の開発」が評価されて、2016年度有機合成化学協会賞(学術的)を受賞した。また、American Chemical Society(USA)の2021年度のThe Claude S. Hudson Awardに内定した⁴⁷。本賞は1945年に設立され、糖質化学の分野において卓越した業績を挙げた研究者に与えられるもので、伊藤は日本人として3人目の受賞となる。

梶原は「ヒト型糖鎖の大量化学合成を利用する糖タンパク質精密化学合成法の開発ならびに、それを用いた糖鎖機能解明」が評価され、2020年度のRoy L. Whistler AwardをInternational Carbohydrate Organizationから授与された。日本人としては、2008年度の伊藤に次ぐ受賞となる。

糖鎖生物機能化学グループの八須匡和は、「UGGTの基質認識に関する化学的アプローチ」研究で2016年度の東京糖鎖研究会奨励賞を受賞した。また、藤川紘樹は、「大腸菌膜タンパク質の膜挿入機構解明を目指した糖脂質MPIase部分構造の合成」で2017年度の新規素材探索研究会奨励賞、および「大腸菌膜タンパク質膜挿入に關与する糖脂質MPIase部分構造の合成と活性」で日本糖質学会第21回日本糖質学会ポスター賞(2019年度)をそれぞれ受賞した。

2.1.7 ベンチャー企業の設立状況

ベンチャー企業の設立はないが、梶原は株式会社糖鎖工学研究所⁴⁸の技術顧問を務めている。

⁴⁷ <http://www.jcgg.jp/news/20200818.html>

⁴⁸ <https://www.glytech.jp/>

る。糖鎖工学研究所は、ヒト型糖鎖製造および糖鎖修飾技術を基盤技術とし、低価格・高品質のバイオ医薬品および革新的なバイオ医薬品の開発を目指しており、プレスリリースで、永信薬品工業株式会社(本社：台湾)とヒト型糖鎖を付加させた新規ソマトスタチン⁴⁹誘導体の共同臨床開発を日本において2020年度に開始したことを公表している⁵⁰。

2.1.8 報道関係

複合型シアリル糖鎖数とEPO生理活性との関係を明確にした研究について(2.2.5(1)①参照)、日経バイオテック(2016年2月15日)は、「糖タンパク質製剤を高純度糖鎖を用いて化学的に自在に合成する技術は、より高い活性を持つ次世代型バイオ医薬の開発に役立ちそうだ」と報じた。また、高温でも安定なグリコインスリンの合成に成功したことについて(2.2.5(1)②参照)、QLifePro医療ニュース(2020年1月24日)は「新規製剤の開発に期待」と報じた。

京都新聞朝刊(2019年9月25日)および日経産業新聞(2019年8月28日)は糖鎖工学研究所を取り上げ、梶原との共同研究で糖鎖を活用した医薬品開発を進めていることを報じた。

質量分析法に基づく光学異性体の解析技術(1.5.3(2)参照)について、科学新聞(2016年4月15日)および日刊工業新聞(2016年4月12日)は、「質量分析法を使うことでNMRに比べ、使う試料の量が10万分の1程度で済むため、創薬にかかる期間やコストの削減につながる可能性がある」と報じた。

⁴⁹ 成長ホルモン等の分泌を抑制するペプチドホルモンの1種で、生物製剤として市販されている。

⁵⁰ https://www.glytech.jp/_pdf/NewsRelease20200129_JP.pdf

2.2 プロジェクトの進捗状況

本プロジェクト期間中の研究は、科研費特別推進「小胞体糖修飾の統合的ケミカルバイオロジー」(2016年度～2020年度)で継続された。伊藤は、本プロジェクト研究対象のN-グリコシル化を拡張発展させ、小胞体において生み出され機能する様々な糖質シグナル(タンパク質N-グリコシル化、C-マンノシル化、および脂質のグルコシル化)を取り上げ、これらが小胞体において担うシグナリング機能を解明し、統合的な理解を図ることを目的に科研費特別推進を立ち上げた⁵¹。

また、糖鎖合成や糖脂質、および Pradimicins(プラディミシン; マンノースに結合する唯一の放線菌由来天然低分子化合物)に関する研究も継続した。

梶原は、糖タンパク質化学合成の効率化を達成し、生理活性を増強した糖タンパク質の創出にも成功した。

なお、伊藤らは本プロジェクトの成果をベースにして、小胞体糖タンパク質管理機構を考察した総説を発表した⁵²。

2.2.1 タンパク質N-グリコシル化シグナル機構

(1) 化学合成糖タンパク質を用いた解析

①G1M9-糖タンパク質のタンパク質部位に対するグルコシダーゼⅡ、CNX/CRTの認識

期間中に酵素化学法で調製したG1M9-IL-8のネイティブ型(図2-3 10)、ミスフォールド型(図2-3 12)および2量体ミスフォールド型(図2-3 13)を用いて、グルコシダーゼⅡ(GⅡ)活性およびCRT認識能を検討した(1.5.2(2)参照)。その結果、GⅡはミスフォールド型、ネイティブ型に関係なくG1M9からGlcを分解することが示された。このことからGⅡはER内に存在するG1M9-糖タンパク質と遭遇すると、機械的にGlcを除去すると推定された。

次に、CRTがG1M9-IL-8に結合することによりGⅡ活性が阻害されることを指標に、CRTのG1M9-糖タンパク質認識能を調べた。その際に、糖鎖との結合能を消失したCRT変異体(K111H)についても同時にGⅡ阻害活性を測定した。その結果、10と12は共にCRTによりGⅡ活性が阻害されたが、CRTK111Hによる阻害をあまり受けなかった。このことからCRTはG1M9糖鎖を介して10と12に結合していることが示された。一方で、13はCRTK111HによってもGⅡ活性が顕著に阻害された。2量体ミスフォールディング型の13は10や12よりもタンパク質表面の疎水性が高いこと^[18]、およびCRTが糖鎖を持たないタンパク質の疎水性パッチに結合してタンパク質凝固を抑制することが報告されていることから⁵³、13はCRTの糖鎖認識部位のみならずタンパク質認識部位をも介して結合していると推定された。以上の結果から、UGGTほど厳密ではないが、CRTがG1M9-糖タンパク質の疎水性ミスフォールド型を認識することが示された^[30]。

⁵¹ https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-16H06290/16H06290_saitaku_gaiyo_ja.pdf

⁵² Ito Y., et al., *Chem. Eur. J.*, 15461-15470, 2020

⁵³ Pocanschi CL, et al., *J. Biol. Chem.*, 286, 27266-27277, 2011

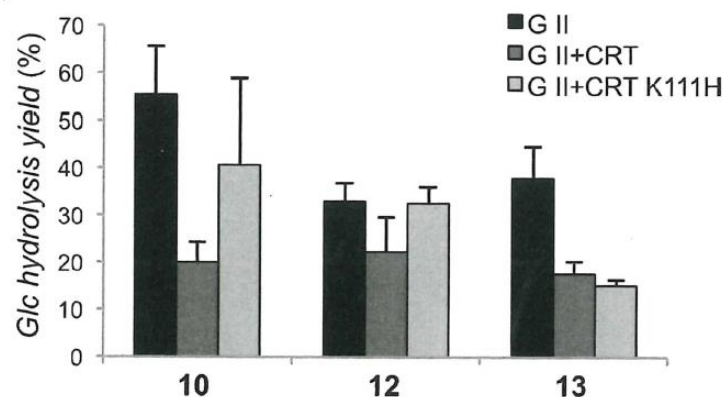


図 2-3 G1M9-糖タンパク質に対する G II と CRT の認識^[30]

G1M9-IL-8 のネイティブ型：10、ミスフォールド型：12、2 量体ミスフォールド型：13。
G II：グルコシダーゼによる Glc 加水分解量、G II + CRT：CRT 存在下での加水分解量、G II + CRTK111H：糖鎖結合能を持たない CRTK111H 存在下での加水分解量。

②2 量体ミスフォールド型 M9-糖タンパク質の新規合成法

2 量体ミスフォールド型 M9-IL-8 は UGGT の良好な基質であるが(1.5.2(1)参照)、UGGT による Glc 転移反応を継続中にネイティブ型に移行する傾向が見られた。そこで、より安定で良好な 2 量体ミスフォールド型の化学合成法を開発した。IL-8 の N 末端残基(1-33)のペプチド- α -チオエステルをビスマレイミド(Bismaleimide)リンカーで結合した 2 量体を作製し、これと M9 糖鎖を持つ C 末端ペプチド(34-72)、および糖鎖を持たない C 末端ペプチドを同時に反応させる二重 NCL 法を試みた。その結果、M9 糖鎖を 2 つ持つホモ 2 量体、M9 糖鎖を 1 つ持つヘテロ 2 量体、および糖鎖を持たないホモ 2 量体を効率よく得ることができた(図 2-4)。これらを用いて UGGT による Glc 転移反応を調べたところ、M9 糖鎖を持つホモ 2 量体とヘテロ 2 量体はともに UGGT の優れた基質であることがわかった^[31]。

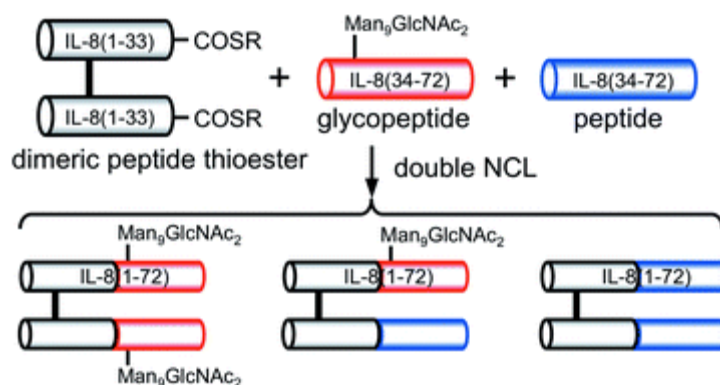


図 2-4 二重 NCL 法による 2 量体ミスフォールド型 M9-IL-8 の合成^[31]

下図左：(M9)₂-ホモ 2 量体、中央：M9-ヘテロ 2 量体、右：ホモ 2 量体

③¹⁵N 安定同位体原子を導入した糖ペプチド型基質と UGGT の相互作用解析

期間中の研究で、M9-IL-8 の C 末端側 39 残基(34-72)の糖ペプチドでも UGGT のミスフォールド型基質として利用できることがわかっていた。そこで、39 残基の糖ペプチドを部分

的に ^{15}N 標識したものを合成し、UGGT の基質認識サイトとミスフォールド型糖タンパク質のポリペプチド部位との相互作用を、NMR を用いた化学シフト摂動法(NMR 滴定法)⁵⁴を用いて検討した。

まず、化学合成法により 9 個の疎水性アミノ酸残基(Ala35、Val41、Leu43、Gly46、Leu49、Val58、Val62、Phe65、Ala69)を部分的に ^{15}N 標識した M9-IL-8(34-72)を合成し、標識糖ペプチドと UGGT との混合比を変化させながら ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。その結果、糖ペプチドの Phe65 が UGGT と特異的に相互作用することが示唆された。そこで、この相互作用を分析するために、Phe65 を他の 10 の天然アミノ酸(Glu(E)、Lys(K)、Gln(Q)、Ser(S)、Tyr(Y)、Gly(G)、Ala(A)、Pro(P)、Leu(L)、Val(V))で置換した糖ペプチドライブラリを新たに構築した(図 2-5)。得られた糖ペプチドライブラリに対する UGGT 基質特異性を調べたところ、UGGT は疎水性の低い糖ペプチドを基質として使用できる可能性はあるものの、疎水性糖ペプチド(Val、Phe(F)、Leu)をより良好な基質として認識することが明らかになった(図 2-6)^[32]。

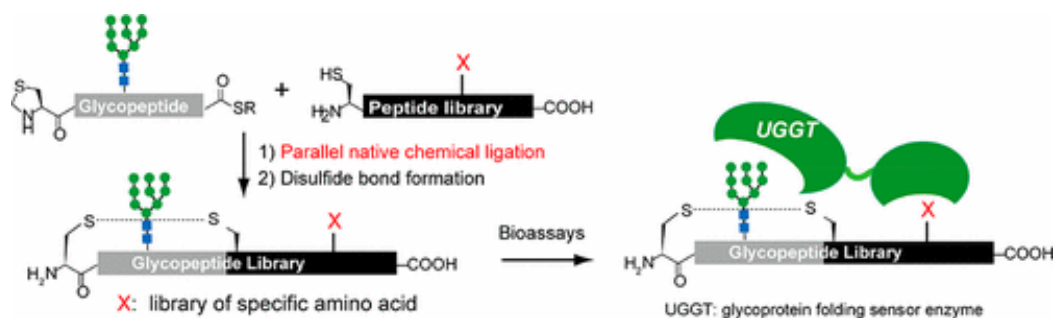


図 2-5 Phe65 を他のアミノ酸に置換した M9-IL-8(34-72) ペプチドライブラリの構築^[32]
N 末端 16 残基の M9 糖ペプチドチオエステル、および Phe65(X) を 10 種のアミノ酸に置換した C 末端側ペプチド(50-72)を固相合成法で合成し(Phe を含め計 11 種)、両者を一度に NCL 法で連結してペプチドライブラリを合成し、さらに空気酸化で S-S 結合を形成させることで M9 ミスフォールド型ライブラリを構築した。

⁵⁴ タンパク質とリガンドの相互作用における結合部位や解離定数を求めるための手法。 ^{15}N でラベルしたタンパク質の 2 次元 ^1H - ^{15}N HSQC(Heteronuclear Single Quantum Correlation: 高分解能 2 次元 NMR 測定法) スペクトルをリガンド存在下と非存在下で測定し、タンパク質中の主鎖アミド基に由来する相関ピークの位置・強度がリガンド結合に伴って摂動を受けることを利用し、リガンドが直接結合する部位を明らかにすることができる。

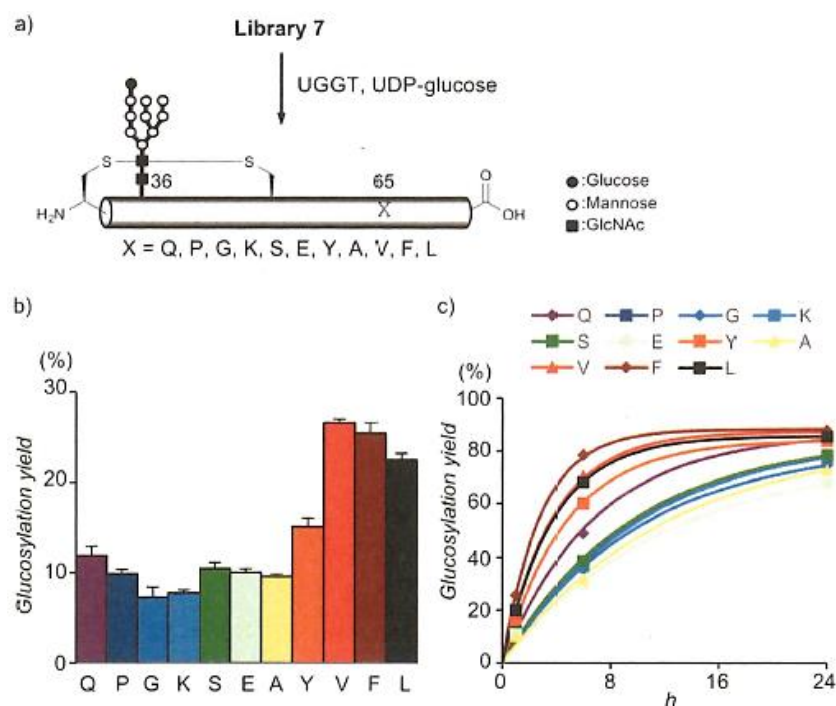


図 2-6 UGGT の基質特異性^[32]

a) ヒト UGGT の M9-IL-8(34-72) ペプチドライブラリに対する Glc 転移活性測定

b) LC-MS で検出された Glc 転移収率 (c) Glc 転移収率経時変化

④疎水性糖タンパク質 EPO に対する UGGT 認識機構

期間中に、UGGT がネイティブ型の M9-EPO をも認識し Glc を転移することを見出していたが(1.5.2(5))、その認識機構について検討した。

他の糖タンパク質の多くが β シート構造をもつものに対し、EPO はヘリックス構造のみである。そこで、同じくヘリックス構造のみのインターフェロン β の M9 付加型(M9-IFN- β)を化学合成し、UGGT の認識を調べたところ、ネイティブ型 M9-IFN- β には Glc を転移しなかった。そこで、EPO と IFN- β の表面モデルを精査した結果(図 2-7)、EPO は正しいネイティブ構造をとっていても疎水性面が表面に飛びだしているという特徴をもつために、ミスフォールド型として UGGT に認識されると推定された^[33]。

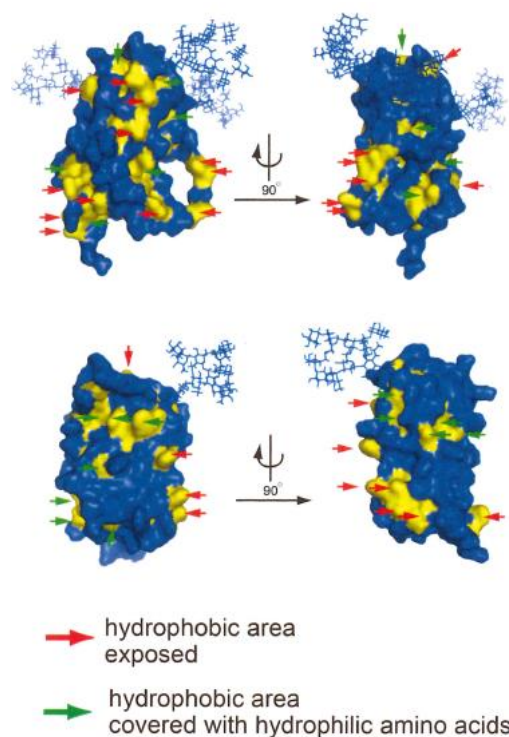


図 2-7 EPO(上段)と IFN- β (下段)の表面モデル^[33]

黄色は疎水性アミノ酸、青色は親水性アミノ酸を示す。赤い矢印はタンパク質から飛び出している疎水性面、緑の矢印は親水性アミノ酸で覆われた疎水面を示す。

次に、ラット肝臓の小胞体を分離破碎し得られた小胞体溶液を用いて、UGGT の M9-EPO 認識能を調べたところ、in vitro の UGGT アッセイとは逆に Glc 転移は観測されなかった。これは、Glc 化された後すぐにグルコシダーゼ II (G II) による Glc 除去が起こっているものと考えられた。実際、G II 阻害剤である 1-deoxynojirimycin(DNJ)を共存させると Glc 転移活性が検出された。これらの結果から、小胞体の中では Glc 化と脱 Glc 化が非常に速く起こっており、その間にシャペロン群がミスフォールド構造を修正し、正しいネイティブ型を蓄積していくと推定された(図 2-8) ^[33]。

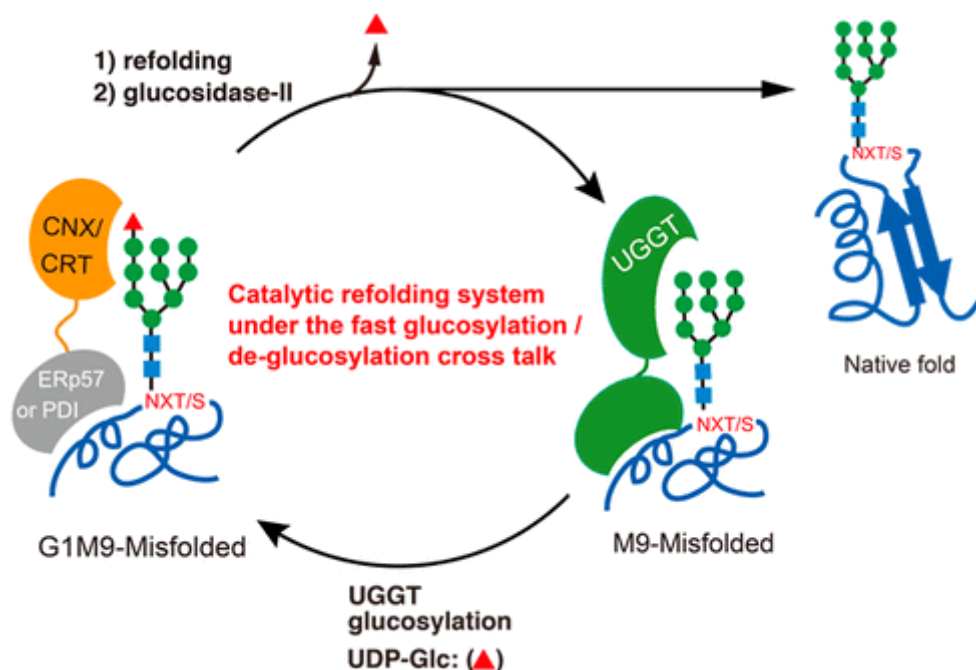


図 2-8 小胞体内の迅速な Glc 化/脱 Glc 化による糖タンパク質フォールディング^[33]

また、ミスフォールド型 G1M9-IL8 を小胞体溶液に入れてそのリフォールディングを追跡したところ、Glc の除去とともにネイティブ型が定量的に形成されることを観測した。さらに、どの程度のミスフォールド体のリフォールディングできるかを、凝集性の M9-EP0 と小胞体溶液を用いて検討し、ある程度の凝集まで進んだものはリフォールディングできない可能性があることを示した^[33]。

⑤ゴルジ体エンド- α -マンノシダーゼとタンパク質品質管理機構

ゴルジ体のエンド- α -マンノシダーゼは、G1M9 糖鎖の非還元末端 (A-arm) の Glc- α -1-3-Man を加水分解する酵素活性を持つが(図 2-9)、その生理機能は不明である。伊藤らは、本酵素がミスフォールディング型の G1M9 糖タンパク質を特異的に認識することで、ERQC の補完的役割を担っているかどうかを調べた。期間中に M9 糖鎖を導入したクランビン(Chaperonin)を化学合成し、UGGT がネイティブ型およびミスフォールディング型のどちらの中間体も認識することを報告したが(1.5.2(2)参照)、この Glc 転移反応により、ネイティブ型とミスフォールディング型それぞれの M9 糖鎖の約 30%が G1M9 糖鎖となることも見出していた。そこで、この反応液を基質としてエンド- α -マンノシダーゼを添加し、G1M9 糖鎖の分解と M8 糖鎖の生成を分析した。その結果、本酵素はネイティブ型およびミスフォールディング型クランビンのどちらの G1M9 糖鎖も同等に加水分解して M8 糖鎖を生成した。このことから本酵素は ERQC の補完的役割をもたないことがわかった^[34]。

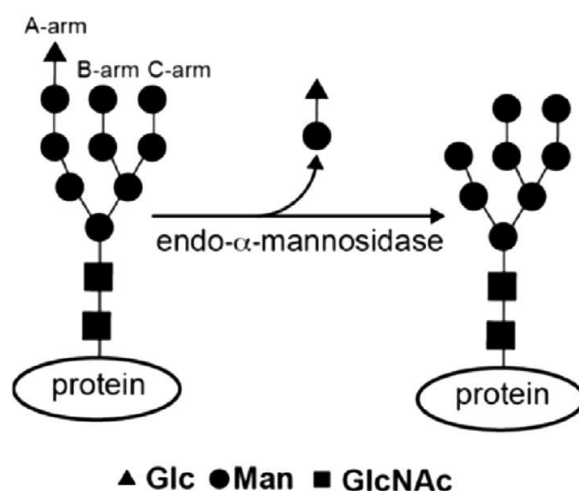


図 2-9 ゴルジ体エンド- α -マンノシダーゼによる加水分解反応^[34]
高マンノース型糖鎖 A-arm の非還元末端の Glc-Man を分解。

(2) UGGT の機能解析

①ドメイン機能

ヒト由来の UGGT1 (HUGT1) と UGGT2 (HUGT2) の触媒領域の特定、および触媒領域に隣接するドメインが Glc 転移活性に及ぼす影響を調べるために、それぞれから 6 種類のトランケートタンパク質を調製した(図 2-10)。グリシンリンカーを介して蛍光色素 BODIPY と結合した M9 糖鎖(M9-Gly-BODIPY)を人工基質として、Glc 転移活性を測定したところ、いずれのトランケート体にも活性が認められた(図 2-10)。特に HUGT1 および HUGT2 の活性中心を含む C 末端側 20%の領域からなるトランケート体(U1F、U2F)が、効率的に糖転移することを明らかにした。さらに、U1F は全長 HUGT1 と同様の基質特異性を示すこと、ならびに、M9-IL-8 のミスフォールド体を認識できることがわかった。また、HUGT1 と HUGT2 とのキメラタンパク質の解析から E ドメイン(図 2-10)が触媒活性に影響することを見いだした^[35]。

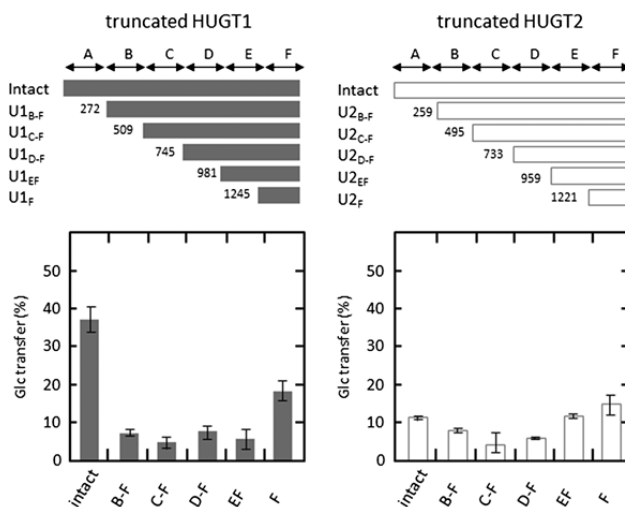


図 2-10 HUGT1 と HUGT2 の各トランケート体の Glc 転移活性^[35]

②立体構造解析

カナダ・McGill 大学との共同研究で、電子顕微鏡単粒子解析法⁵⁵により UGGT の立体構造を解析し、ミスフォールド糖タンパク質の選択的認識機構を考察した。ヒト UGGT との相同性がそれぞれ、44%と 34%を示すショウジョウバエ UGGT と真菌 *Penicillium chrysogenum* UGGT を X 線小角散乱法⁵⁶およびネガティブ染色(負染色) 電子顕微鏡法⁵⁷で分析し、18Å の解像度で UGGT 立体構造を解析した。その結果、UGGT は大きな中央空洞を備えたケージのような構造を有し、中央の空洞が触媒部位を含み、疎水性表面で裏打ちされていることが示唆された。これにより、露出した疎水性残基を持つミスフォールド型の糖タンパク質との結合が強化され、親水性表面を持つネイティブ型は除外されると推定された(図 2-11) ^[36]。

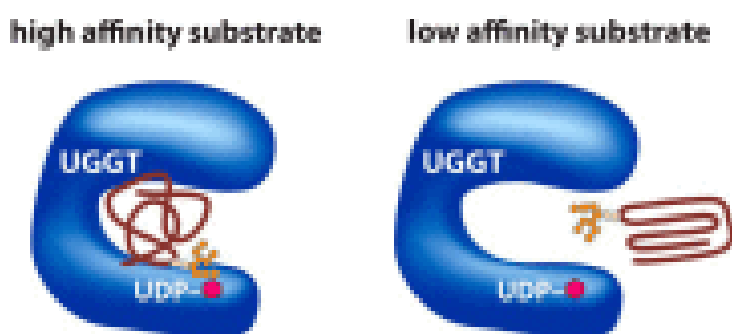


図 2-11 UGGT の構造と糖タンパク質認識機構模式図^[36]

UGGT は、中央空洞部の疎水性表面構造により疎水性のミスフォールド型糖タンパク質と結合し、糖鎖に Glc を転移する(左図)。表面が親水性のネイティブ型糖タンパク質は UGGT と結合せず、Glc 転移を受けない(右図)。

③シャペロン機能

UGGT はミスフォールド型タンパク質を検知するセンサーとして機能する ERQC の重要な因子であるが、UGGT そのものが糖タンパク質のフォールディングに関与するかは知られていない。伊藤らは、エンドグリカナーゼと GlcNAc-oxazoline による化学酵素法で、RNase B から M9-RNase を調製し、ヒト UGGT1(HUGT1)にフォールディングを促進するシャペロン機能があるかどうかを調べた。シャペロン機能の有無は、リフォールディングによって回復する RNase 活性(1.5.1(1)③参照)を指標とした。

その結果、HUGT1 は M9-RNase および糖鎖を持たない RNase のフォールディングをわずかに促進することがわかった。さらに、UDP-Glc の存在下で M9-RNase のフォールディングを顕著に促進すること、および UDP や UDP-Gal にはその効果が無いこともわかった。また、Glc 転移活性が失活した HUGT1 変異体には、このシャペロン機能がみられなかった。これら

⁵⁵ 単粒子解析法(single particle analysis) は、3 次元電子顕微鏡法の一つで、透過型電子顕微鏡下で多数の均一な粒子を観察、撮影し、画像処理によって粒子の詳細な構造を得る手法。

⁵⁶ X 線小角散乱法(small angle X-ray scattering) は、X 線を物質に照射し、散乱角が小さく散乱された X 線を測定することにより物質の構造情報を得る手法。

⁵⁷ ネガティブ染色(負染色) 電子顕微鏡法は、精製したタンパク質あるいは複合体を高分解能で観察できる簡便な方法である。単粒子解析などの画像処理法と組み合わせると数 nm の分解能で立体像を予測できる。

のことから、HUGT1 は糖鎖を介したタンパク質との相互作用により、タンパク質のリフォールディングを促進していると考察された(図 2-12)^[37]。

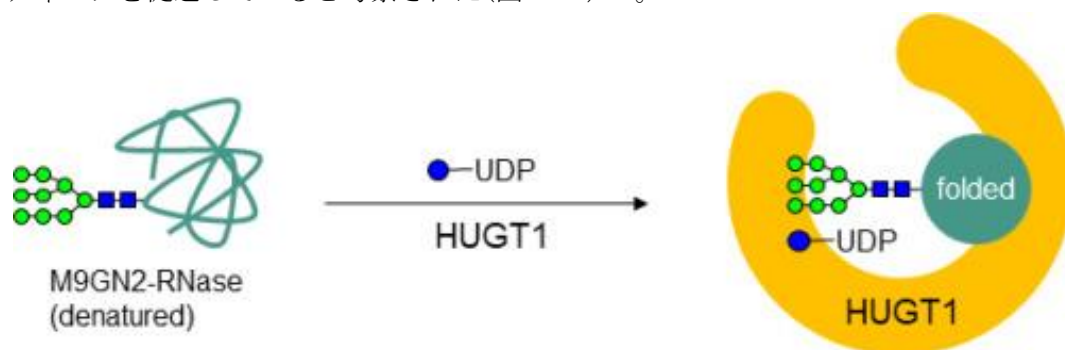


図 2-12 HUGT1 のシャペロン機能^[37]

(3) 小胞体における N-グリカンプロセッシング反応に及ぼすアグリコン構造の影響

糖タンパク質の N-グリカン構造はフォールディングの状態を反映するので、N-グリカンのプロセッシングはアグリコンの性状による影響を受ける可能性がある。本研究では、合成基質を用いて N-グリカンプロセッシングに与えるアグリコン構造の影響を調べた。リンカー分子としてエチレングリコール(EG)を用い、その鎖長を変えることで一連の異なるリンカー長さを有し、かつ末端に疎水性 BODIPY 蛍光色素を結合した複数の合成基質 (Glc₁)Man₉GlcNAc₂-G-EG_(n)-BODIPY を調製した。これらを用いて、マウス肝臓由来の小胞体画分におけるグルコース転移、グルコースおよびマンノースのトリミング反応について検討した。結果は N-グリカンと疎水性パッチの間が短いリンカーを持つ基質は、グルコース転移とマンノーストリミング反応の両方に対し高い活性を持ち、一方でグルコーストリミング反応は低い活性を示した(図 2-13 上段)。対照的に、長いリンカーを持つ基質は、グルコーストリミング反応に高い活性を示し、グルコース転移反応性とマンノーストリミング反応性が低いことがわかった(図 2-13 下段)。これらのことから、小胞体における糖タンパク質の N-グリカンプロセッシングのための反応性は、アグリコン構造によって調整できることが示された^[38]。

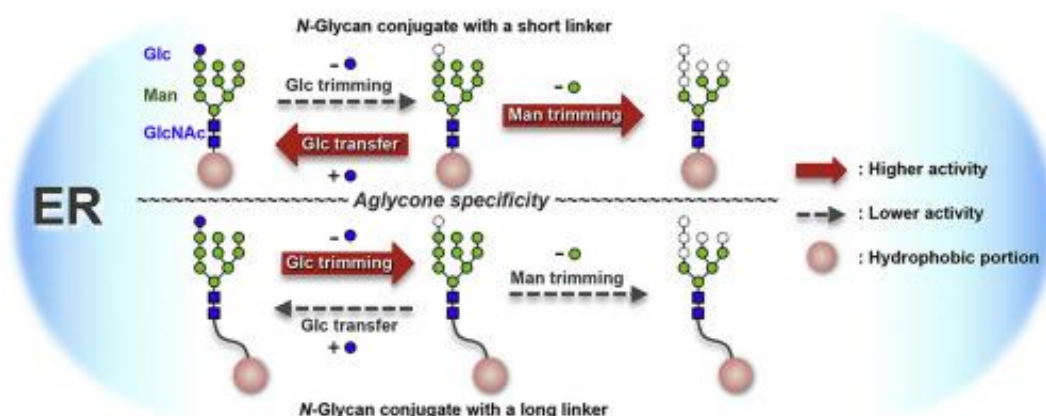


図 2-13 小胞体における N-グリカンプロセッシング^[38]

(4) 5S-Glc 糖鎖による ERQC の解析

期間中に UDP-5SGlc が UGGT によるグルコース転移反応の供与体になることを明らかにしていたが(1.5.1(2)③参照)、新たに、5SGlc 化された高マンノース糖鎖(5S-G1M9)は CRT とは相互作用し複合体を形成するが、CNX とは相互作用しないことを見いだした。また、CRT 変異体を用いた解析の結果、この複合体形成に CRT の Asn154 残基が関与することを示した。さらに、5S-G1M9 はグルコシダーゼ II による Glc 加水分解を受けないことを明確にした(図 2-14)^[39]。

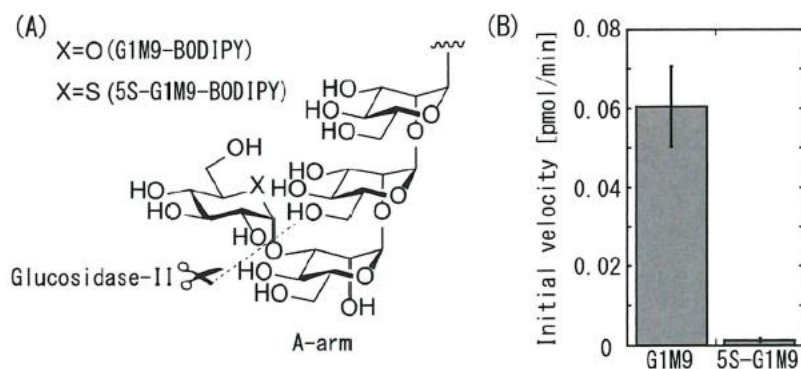


図 2-14 グルコシダーゼ II による加水分解反応^[39]

(A) 蛍光標識された G1M9-BODIPY および 5S-G1M9-BODIPY の構造。

(B) グルコシダーゼ II による加水分解初速度。

(5) 小胞体内マンノシダーゼ類のマンノーストリミング機構

小胞体内では、未成熟な糖タンパク質は、複数の α -1,2-マンノシダーゼの組み合わせ作用による Man9GlcNAc2 から Man5GlcNAc2 へのマンノース残基の逐次トリミングを通じて、分泌経路と分解経路のどちらに行くかが分類される(図 1-1 および 1.5.1(2)⑤参照)。個々のグリコフォームが分泌と分解のためのシグナルをコードしていると推測されているが、特定のシグナルグリコフォームがマンノシダーゼ類のランダム作用によって生成されるのか、または特定の α -1,2-マンノシダーゼによって制御された方法で位置選択的に生成されるのかはわかっていない。伊藤らは、複数のマンノシダーゼ阻害剤を用いて、小胞体におけるシグナルグリコフォーム生成の生化学的な解析を実施した。骨粗しょう症モデルマウス(SAMP6)肝臓からの小胞体抽出物を酵素源とし、M9-Gly-BODIPY を人工蛍光基質として、1-deoxymannojirimycin(dMJ)や 1-deoxynojirimycin(dNJ)などの阻害剤存在下で生成する糖鎖を分析した。その結果、dMJ 非感受性マンノシダーゼ類により M9→M8B→M7A→M6→M5(図 2-15 青色矢印)、dNJ 非感受性マンノシダーゼ類により M9→M8A→M7B→M6iso→M5(図 2-15 赤色矢印)の経路で、それぞれ、位置選択的にマンノーストリミングが進行することがわかった^[40]。本研究成果は *ChemBioChem* 誌の Very Important Paper に選定された⁵⁸。

⁵⁸ 戸谷研究室ホームページ研究業績

http://www.ml.seikei.ac.jp/totanolab/Totani_Lab/Publications.html の No. 65 (2020/12/9 時点)

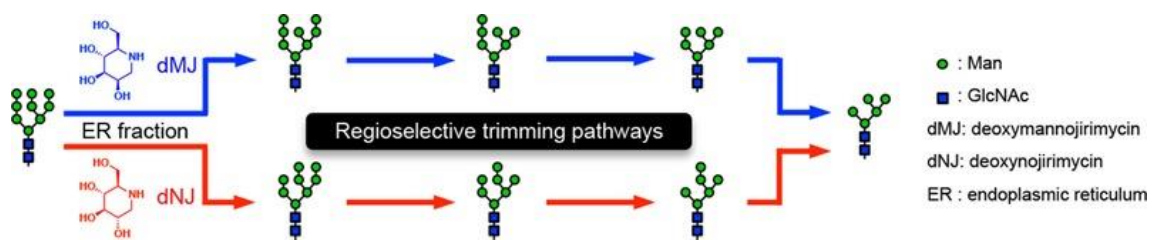


図 2-15 小胞体内マンノシダーゼのマンノーストリミング機構^[40]

上段青色矢印: dMJ 非感受性マンノシダーゼ(類)によるトリミング。

下段赤色矢印: dNJ 非感受性マンノシダーゼ(類)によるトリミング。

(6) フォールディング病と糖タンパク質品質管理機構との相関解析

フォールディング病の 1 種であるメタボリックシンドロームが、グルコシル化および脱グルコシル化に関連するグルコシダーゼ II (G II) と UGGT に及ぼす影響について、健常/肥満/糖尿病の各モデルラットにおける mRNA 発現量/タンパク質発現量/酵素活性を比較した。その結果、肥満モデルラット (ZF) では健常ラットと比べ、G II と UGGT1 とともに mRNA 発現量とタンパク質発現量が低下し、それに伴って両酵素活性の低下が見られた。一方で、肥満 2 型糖尿病モデルラット (ZDF) では ZF に比べて、mRNA/タンパク質発現量はともに多くなり、G II 活性もわずかに増加した。しかし、UGGT1 活性は発現量の増加に反して減少することがわかった (図 2-16)。これらのことから、メタボリックシンドロームは、疾患の重症度に応じて脱グルコシル化/再グルコシル化酵素活性に影響を与えることが示唆された^[41]。

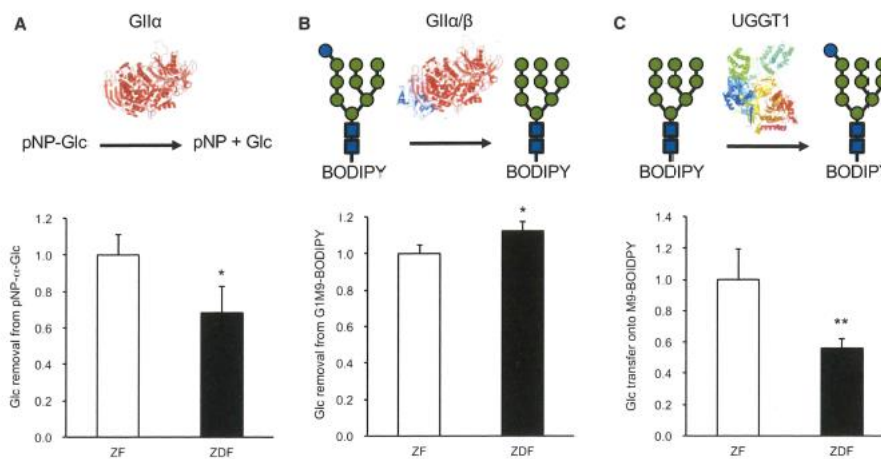


図 2-16 肥満/肥満 2 型糖尿病モデルラットの G II/UGGT1 活性^[41]

A: G II α-サブユニットのグルコシダーゼ活性。

B: G II α/βヘテロダイマーのグルコシダーゼ活性(G IIはヘテロダイマーの形で G1M9 糖タンパク質に作用する)。

C: UGGT1 のグルコース転移活性。

(7) ERp29 と CNX との相互作用

本プロジェクト期間中に ERp29 が CRT と相互作用することを見出していたが(1.5.1(2)④参照)、新たに ERp29 と CNX との相互作用を検討した。Halotag 化⁵⁹した CNX を担体に固定化し、種々の PDI タンパク質(ERp18、ERp27、ERp29、ERp44、PDIp)が CNX と複合体を形成できるかを調べた(図 2-17)。その結果、ERp29 だけが ERp57 と同様に CNX と相互作用を持つことがわかった。また、CNX 変異体を用いた解析で、ERp29 は CNX の P-ドメイン⁶⁰を認識していることも明らかになった^[42]。

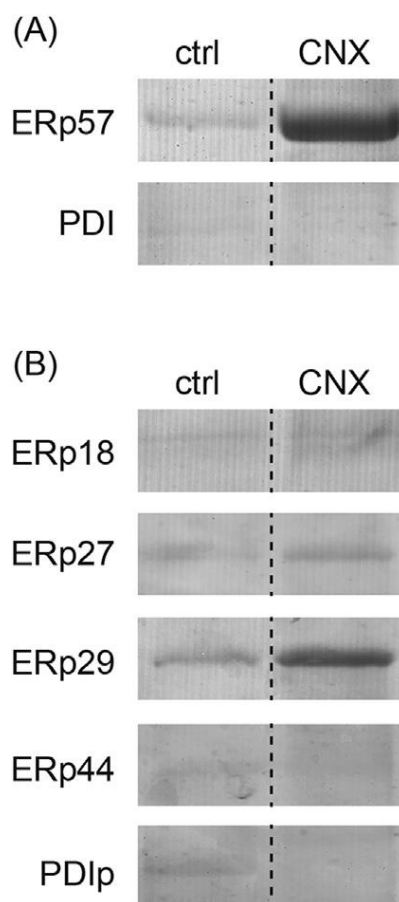


図 2-17 CNX と PDI との相互作用^[42]

(A) ERp57 (ポジティブコントロール)および PDI (ネガティブコントロール)と CNX との相互作用。ctrl は Halotag だけを固定化したもの。

(B) 種々の PDI タンパク質と CNX との相互作用。

なお、伊藤らは ERp29 が二量体を形成することで、CNX も二量体化することを新たに見いだした⁶¹。

⁵⁹ 低分子リガンドと特異的な共有結合を形成する 33kDa のタグタンパク質で、タンパク質-タンパク質相互作用などのタンパク質機能解析に用いられる。

⁶⁰ Proline-rich hairpin-like domain

⁶¹ Nakano H., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 536, 52-58, 2021

(8) CRT の新規シャペロン機能

小胞体(ER)におけるプロインスリンの酸化的折りたたみは、膵臓β細胞からのインスリンの適切な分泌に重要な役割を果たしている。伊藤らは、マウスインスリノーマ⁶²由来 MIN6 細胞を用いて、小胞体の CRT が、正常な酸化的フォールディングを受けなかったプロインスリンのシャペロンとして機能することを発見した^[43]。また、大腸菌でのマウス CRT の調製法および CRT のシャペロン機能解析法の詳細を報告した^[44]。

2.2.2 脂質グルコシル化のシグナリング機構

伊藤は本プロジェクト期間中に、理研・脳科学総合研究センターの平林義雄・上口裕之と協力し、小胞体で合成される糖脂質の1種である Phosphatidyl-β-D-glucoside (PtdGlc) のリゾ体⁶³(lyso-Phosphatidyl-β-D-glucoside: LPGlc) (図 2-18) が、G タンパク質共役受容体⁶⁴である GPR55⁶⁵を活性化し、神経細胞軸索ガイダンス⁶⁶におけるシグナルとなっていることを明らかにしていた⁶⁷。科研費特別推進では、新規な LPGlc の創製による細胞機能調節機構の解明をめざした⁶⁸。

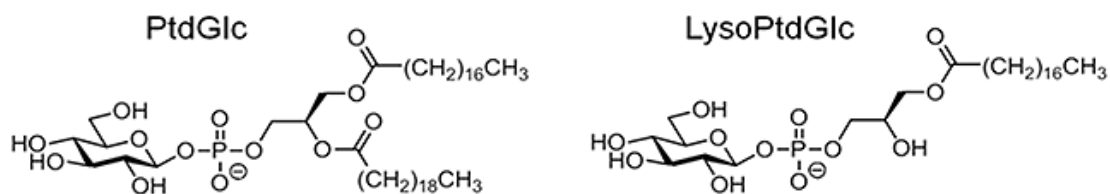


図 2-18 PtdGlc と LPGlc の構造式⁶⁹

(1) スクアリル基修飾リン糖脂質類似体

LPGlc のホスホジエステル構造の代替としてスクアリルジアミドを特徴とする新規の類縁体を化学合成した(図 2-19 a)。それぞれの LPGlc 類縁体の軸索伸長反発活性を測定したところ、類縁体 1A が顕著な反発活性を示した。また、1A の反発活性は GPR55 の特異的阻害剤である ML193⁷⁰により失活することから、1A は LPGlc と同様に GPR55 に作用することが示

⁶² 血糖値にかかわらずインスリンを分泌する能力を有する、膵臓に発生する腫瘍。

⁶³ 脂質部分の sn-1 位または sn-2 位の脂肪酸のいずれか一方が外れた一本鎖のリン脂質。

⁶⁴ 細胞膜を貫通するタンパク質で、ホルモンや神経伝達物質など様々な細胞外因子を受容して、細胞内へシグナルを伝える。すべてのタンパク質の中で最大のファミリーを形成し、多くの疾患に関与しているため、創薬の重要な標的となる。

⁶⁵ 7 回貫通型の G タンパク質共役受容体で、発生や多くの疾患(神経障害性疼痛、がん、炎症)に関与している。内因性アゴニストとして Lysophosphatidyl inositol が知られている。

⁶⁶ 正確な神経回路ネットワークの形成には、発生期に軸索が標的のニューロンにむかって正しく伸長しシナプス結合を形成する必要がある、これを軸索ガイダンスと呼ぶ。

⁶⁷ Guy AT, et al., *Science*, 349, 974-977, 2015

⁶⁸ https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-16H06290/16H06290_saitaku_gaiyo_ja.pdf

⁶⁹ 理研・プレスリリース「神経回路構築を制御する脂質を発見」2015 年 8 月 28 日
https://www.riken.jp/press/2015/20150828_2/

⁷⁰ N-[4-[[[3,4-dimethyl-5-isoxazolyl]amino]sulfonyl]phenyl]-6,8-dimethyl-2-(2-pyridinyl)-4-quinolinecarboxamide

された(図 2-19 b~d)。また、各類縁体の構造活性相関から、GPR55 のリガンド認識には C-6 および C-2' の水酸基の立体選択性を含めた構造が重要であることがわかった^[45]。また、伊藤らは別種の類縁体も合成し、LPG1c の作用機序を考察した⁷¹。

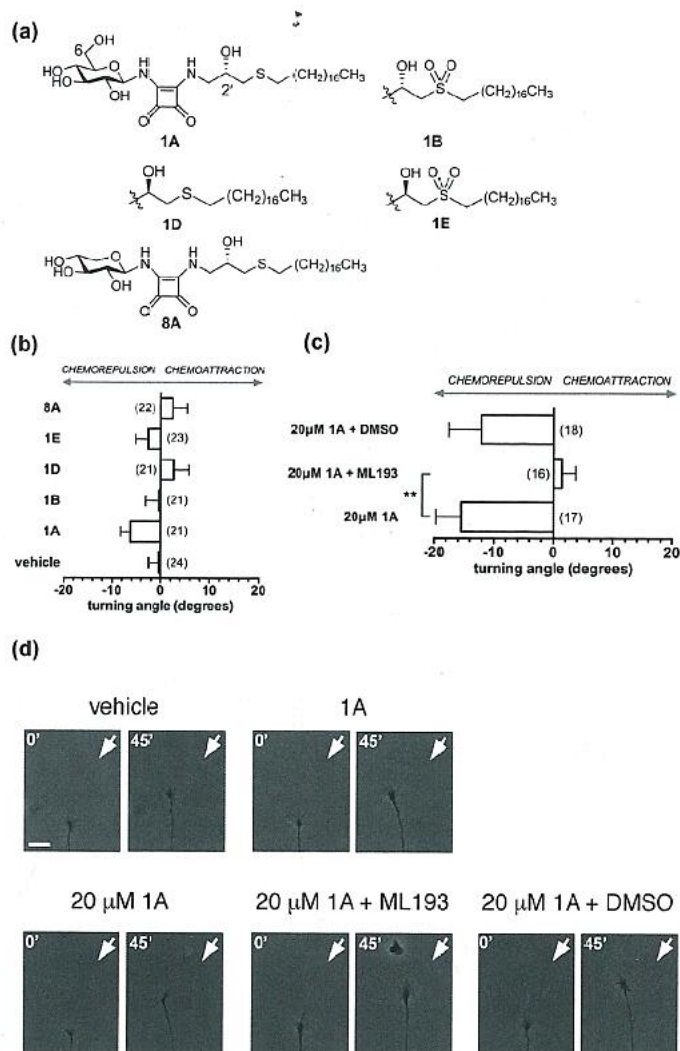


図 2-19 LPG1c 類縁体の構造と軸索伸長反発活性^[45]

(a) LPG1c 類縁体の構造式。 (b) 各々の類縁体(10μm)の軸索伸長反発活性。
(c) 類縁体 1A(20μm)の反発活性。GPR55 の特異的阻害剤 ML193 の存在下で反発活性が失われる。
(d) 軸索伸長の画像(バーは 10μm)。矢印の方向から類縁体 1A を投与すると 40 分後に軸索の伸長は反発されて左方向に旋回した。

(2) GPR55 活性化における構造活性相関

LPG1c による GPR55 活性化の構造活性相関を調べるために、その糖構造と *sn*-1 のエステル領域に着目して、4 種のリゾリン脂質類縁体と LPG1c を化学合成した(図 2-20)。これらの類縁体について軸索伸長反発活性を測定したところ(図 2-21)、ether-LysoPtdGlc(4)は LPG1c(1)と同等の反発活性を示し、かつ GPR55 の阻害剤 ML193 によりその活性が損なわれ

⁷¹ Abe J., et al., *Org. Biomol. Chem.*, 18, 8467-8473, 2020

ることがわかった。LysoPtdGal (2) および amide-LysoPtdGlc (5) はともに反発活性を示さず、これらは GPR55 のリガンドとはならないことが示された。一方で、LysoPtdIns (3) は軸索伸長反発活性を示したが、その活性は ML193 の影響を受けないことから、GPR55 非依存性であると推定された。さらに、既知の GPR55 の分子構造を基に分子動力学シミュレーション⁷²を実施し、リゾリン脂質のグルコース構造がイノシトールやガラクトース構造よりも GPR55 のリガンド結合部位にフィットすることを見いだした^[46]。

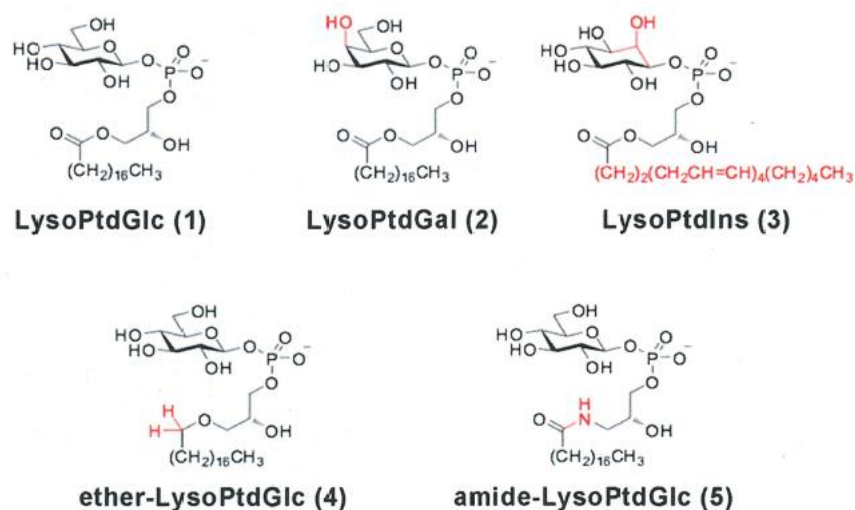


図 2-20 化学合成したリゾリン脂質の構造^[46]

LysoPtdGlc (1): lyso-phosphatidyl- β -D-glucoside、LysoPtdGal (2): lyso-phosphatidyl- β -D-galactoside、LysoPtdIns (3): lyso-phosphatidylinositol

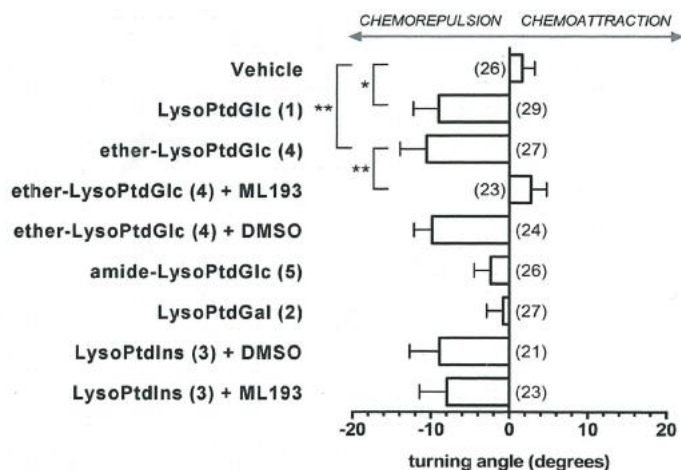


図 2-21 リゾリン脂質類縁体の軸索伸長反発活性^[46]

反発活性は図 2-19 d と同様の方法で調べた。

⁷² 分子動力学シミュレーションはコンピューター上で仮想的に原子や分子を配置し、その運動を調べる手法。

また、伊藤らは脂質鎖長の異なる LysoPtdGlc 類縁体を調製し、脂質鎖長と G タンパク質共役受容体活性化との関連について考察した⁷³。

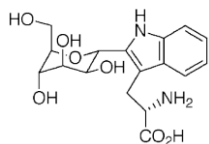
2.2.3 C-マンノシル化のシグナリング機構

C-マンノシル化トリプトファン(CMW)⁷⁴は、サイトカイン受容体などに含まれるタンパク質機能モチーフ・トロンボスポンジン-タイプ I-リピート(TSR)に含まれることが知られており、タンパク質のトリプトファン残基と Man との間に C-C 結合を有する特異な糖タンパク質構造である。CMW の化学合成⁷⁵に成功した伊藤らは、N-グリコシル化と同じく小胞体で起こる C-マンノシル化の生理機能について検討していた⁷⁶。科研費特別推進でもそのシグナリング機構について検討を継続するとともに、遊離 CMW の新規定量法や、CMW 資化性微生物について報告した⁷⁷。

(1) 遊離 CMW の新規定量法の開発

遊離の CMW はヒトの尿などに存在することが知られており、腎機能のバイオマーカーとしての興味を持たれているが、その生理的意義は良くわかっていない。伊藤らは、親水性相相互作用液体クロマトグラフィー(hydrophilic interaction liquid chromatography:HILIC)⁷⁸による分離と、蛍光発色および MS による検出を組み合わせた CMW の新規定量分析法を開発し、マウス組織中の CMW を定量した(図 2-22)。このシステムを使用して、マウスの異なる組織における遊離の単量体 CMW 量を体系的に評価した結果、CMW は骨格筋には少なく、脳、脾臓、肺、膀胱、精巣などの臓器、特に卵巣と子宮に多く存在することがわかった。また、KK-Ay 糖尿病マウスでは、尿中の CMW 排泄レベルが増加すること、ならびに組織レベルでは肝臓で減少し、腎臓で増加することを明らかにし、遊離 CMW が腎機能のバイオマーカーとして有効であることを示した^[47]。

⁷³ Guy AT, et al., *ACS Chem. Biol.*, 11, 3635-3645, 2020



⁷⁴ CMW の構造式

⁷⁵ Manabe S, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 9754-9755, 1999

⁷⁶ Ihara Y, et al., *Glycobiology*, 15, 383-392, 2005; Muroi E, et al., *Glycobiology*, 17, 1015-1028, 2007

⁷⁷ https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-16H06290/16H06290_saitaku_gaiyo_ja.pdf

⁷⁸ 高極性のシリカゲル基本とした固定相をポリスクシンイミドなどで誘導化し、水やアセトニトリルなどの極性溶媒を移動相とした、高極性物質の分離手法。

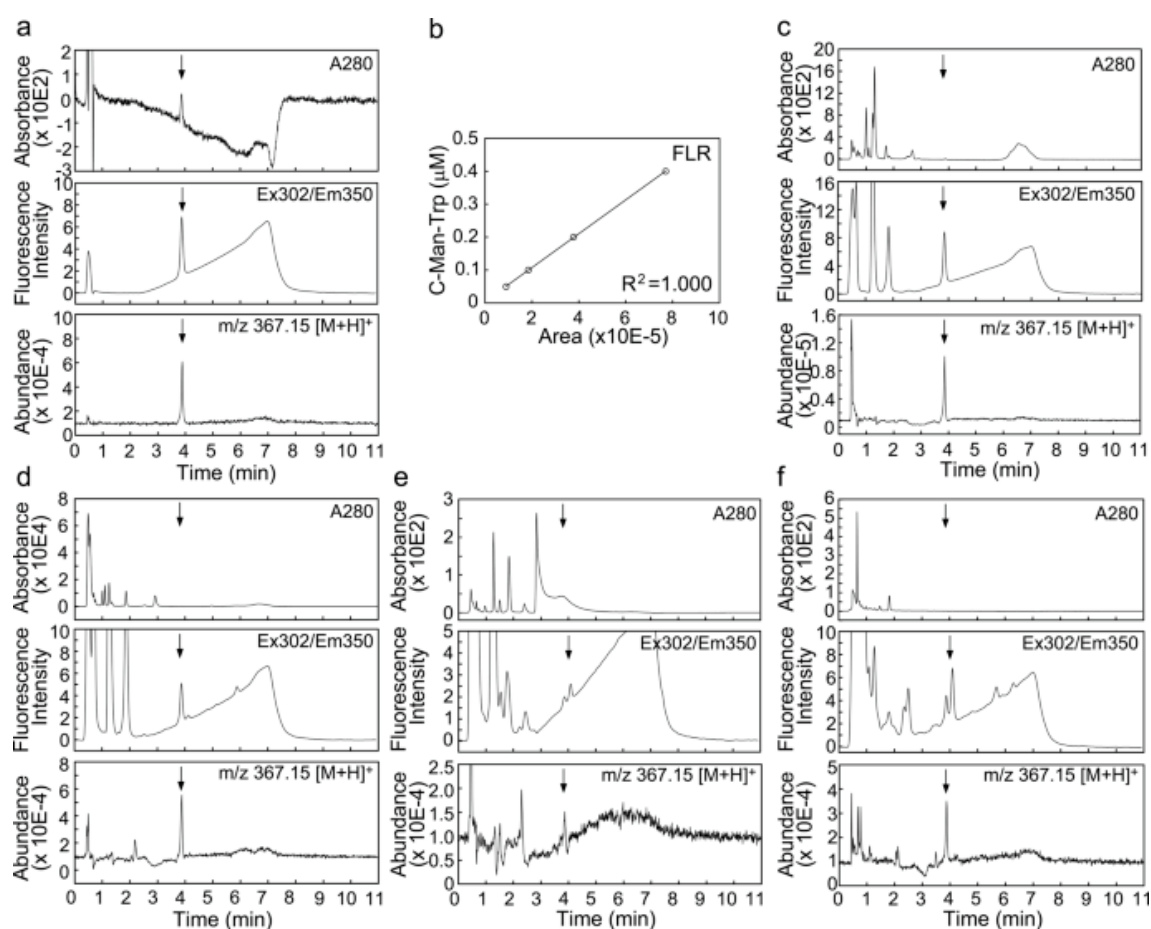


図 2-22 マウス組織中の CMW 定量分析^[47]

- (a) 合成 CMW の定量分析。上段: HILIC のピーク検出 (A280 吸光)、中段: 蛍光検出 (励起 302nm/ 蛍光 350nm)、下段: MS 検出 (m/z 367.15 $[M+H]^+$)。
 (b) 蛍光強度による CMW 検量線。
 (c) ~ (f) マウスの脳、肝臓、血漿、および尿中の CMW 分析。

次に、遊離 CMW が卵巣がんのバイオマーカーになるかを検討した。卵巣がんには特異的なバイオマーカーが知られておらず、早期発見が困難なため、治癒率の低いがんである。伊藤らは、悪性、境界悪性、良性の卵巣がん患者 (計 49 人) の血漿中の CMW を定量分析し、健常人 (7 人) のそれと比較した。その結果、卵巣がん患者の血漿中 CMW 量は健常人のものより高いこと、さらに、悪性患者のそれは境界悪性や良性患者のものより有意に高いことを見いだした^[48]。

(2) CMW 資化性微生物の同定

CMW は人間の尿から検出されたため、一般的に CMW は体内で異化されず、尿から排泄されると考えられている。伊藤らは、自然界で CMW がどのように代謝されるかを調べるために、土壌からの集積培養で CMW を資化できる微生物の単離を試みた。CMW を単一炭素源として生育する細菌コロニーが得られたが、16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、単一の細菌種ではなく、複数の種からなる細菌コンソーシアムであることがわかった。次に、どの細菌が CMW の

資化の原因であるかを決定するために、次世代シーケンシング (next generation sequencing: NGS) 分析⁷⁹を行ったところ、培地中の CMW の減少と同時にスフィンゴモナス科の種が増加することがわかり、この種が CMW の分解に積極的に関与している可能性が高いことが示された^[49]。

(3) 遊離 CMW 生成機構

哺乳類のタンパク質 C-マンノシル化は、小胞体内で DPY19L1 および DPY1L3 遺伝子にコードされた C-mannosyltransferase により起こることが知られているが⁸⁰、遊離の CMW がどのような機構で産生するかは知られていない。伊藤らは開発した CMW 分析法を用いて、各種培養細胞中の CMW 量を計測した。その結果、CMW 量はオートファジー⁸¹誘導因子やリソソーム阻害剤の影響を受けることを見出し、細胞内 CMW 産生にオートファジー経路が寄与する可能性を示した^[50]。

2.2.4 糖鎖合成研究の進展

(1) 化学合成

伊藤らは本プロジェクト終了後も糖鎖化学合成研究を継続した。まず、C2-*O*-(*ortho*-Tosylamido)benzyl ether (2-*O*-TAB) を有する単一のマンノシルドナーから両方のアノマーを取得するために、ZnI₂ の存在下で亜リン酸マンノシルを使用するという新しい手法を開発し、高い選択性で様々な β -マンノシドを生成できることを示した (図 2-23)^{[51], [52]}。

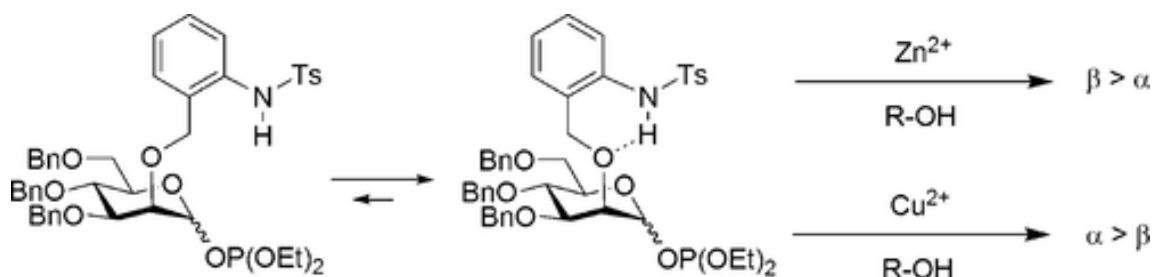


図 2-23 選択的 β -マンノシドの生成^[51]

また、グリコシドの 2 位アミノ基と 3 位水酸基をカーバメート基で保護することで、アノマー炭素と環内酸素の間の結合が切断されるエンド開裂反応 (endocyclic cleavage reaction) を開発し、 β -グリコシドの α -グリコシドへのアノマー化を容易にした。本反応

⁷⁹ ランダムに切断された数千万～数億の DNA 断片の塩基配列を同時並行的に決定する実験手法。断片化した 1 本鎖の DNA に対して、断片の相補鎖を合成しながら決定する手法 (Sequence-by-Synthesis 法) によって、塩基配列を決定する。

⁸⁰ Niwa Y, et al., *Mol. Biol. Cell*, 27, 744-756, 2016

⁸¹ 細胞が、自身のタンパク質を小胞化して、多様な加水分解酵素を含む細胞小器官であるリソソームと融合させて分解する現象。

を用いて、結核治療のための潜在的な創薬ターゲットである mycothiol⁸²を効率的に合成することに成功した^[53]。

(2) エンド α -マンノシダーゼの糖転移活性を利用した高マンノース糖鎖の合成

伊藤らは、高マンノース糖鎖合成の効率化を図るために、ヒト・ゴルジ体のエンド α -マンノシダーゼ (G-EM) の糖転移活性を利用した化学酵素法による調製法を検討した。Glc α 1-3Man のフッ素体(1)を糖供与体、糖受容体として Man α 1-2Man のダンシル体(2)を用いて反応させ、目的の4糖化合物(3)を得た(図 2-24)。次に、加水分解活性が低く糖転移活性が高い G-EM 変異体(E407D)を取得し、高マンノース型糖鎖 Man₉GlcNAc₂を Glc₁Man₉GlcNAc₂に変換することに成功した。また、糖受容体として Man α 1-2Man 構造が必須であることがわかった^[54]。

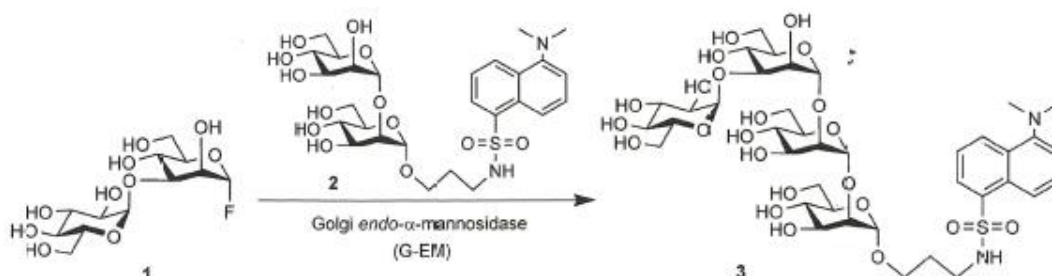
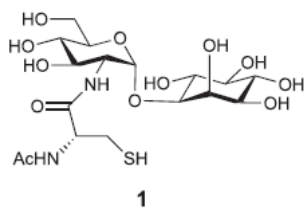


図 2-24 G-EM による糖転移反応^[54]

(3) α -マンノシド化合物の系統解析

天然に存在する一連の α -マンノシド化合物の結合様式を網羅する2糖および3糖(図 2-25)を調製し、衝突誘起解離(collision-induced dissociation:CID)、エネルギー分解質量分析(energy-resolved mass spectrometry:ERMS)、および¹H核磁気共鳴分光法を使用して分析し、各マンノシル結合の安定性を系統的に解析した。これにより長鎖の新規天然マンノシドの構造解析に有用な基礎データの取得に成功した^[55]。



⁸² mycothiol の構造式

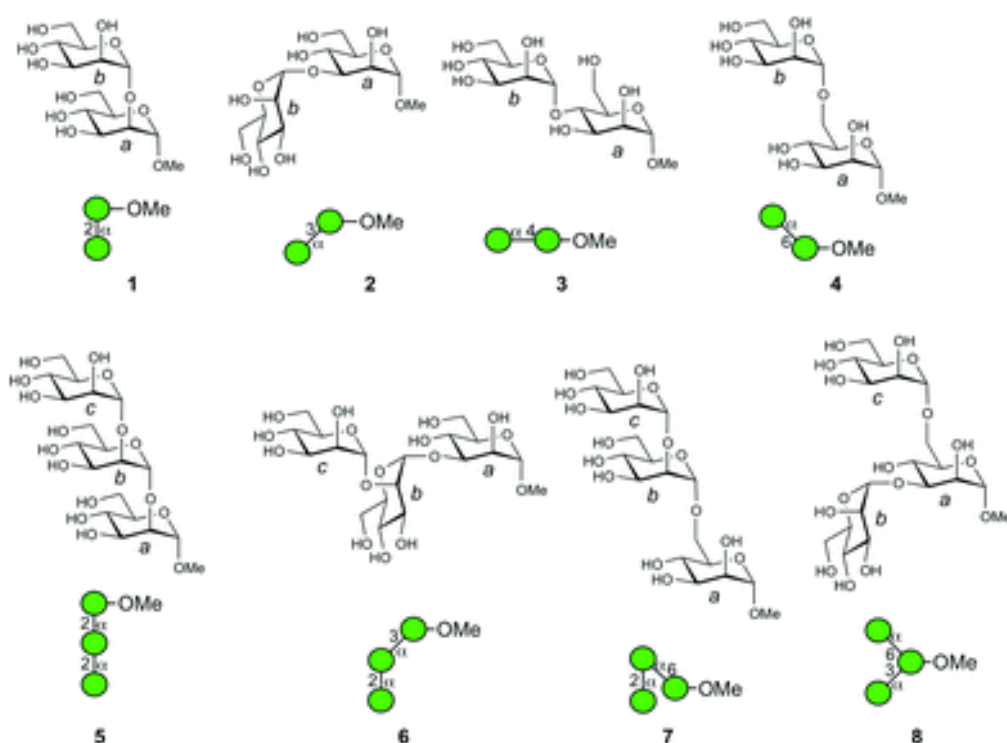


図 2-25 各種の結合様式を持つ α -マンノシド化合物ライブラリ^[55]

α Man- (1 $\rightarrow$ 2) - α Man-OMe (1)、 α Man- (1 $\rightarrow$ 3) - α Man-OMe (2)、 α Man- (1 $\rightarrow$ 4) - α Man-OMe (3)、 α Man- (1 $\rightarrow$ 6) - α Man-OMe (4)、 α Man- (1 $\rightarrow$ 2) - α Man- (1 $\rightarrow$ 2) - α Man-OMe (5)、 α Man- (1 $\rightarrow$ 2) - α Man- (1 $\rightarrow$ 3) - α Man-OMe (6)、 α Man- (1 $\rightarrow$ 2) - α Man- (1 $\rightarrow$ 6) - α Man-OMe (7)、および α Man- (1 $\rightarrow$ 3) - [α Man- (1 $\rightarrow$ 6) -] α Man-OMe (8)

(4) 2-デオキシ糖の合成

2-デオキシ糖は糖転移酵素の阻害剤として有用な化合物である。伊藤らは、uridine-5' - diphosphate (UDP)-2-deoxy glucose と UDP-2-deoxy galactose (図 2-26) を合成し、これらの 2-デオキシ糖が pH4 緩衝液中で通常の UDP 糖よりも速い速度で加水分解され、不安定であることを示した^[56]。

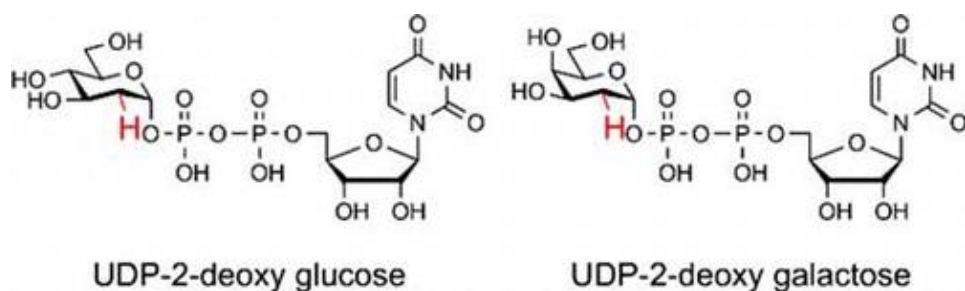


図 2-26 2-デオキシ糖の構造式^[56]

2.2.5 糖タンパク質化学合成技術の進展

(1) 複合型シアリル糖鎖タンパク質の化学合成

小胞体内で正しくフォールディングされた糖タンパク質は、ゴルジ体内でさらなる修飾を受け、非還元末端にシアル酸を含む複合型糖鎖などに変換されて、それらが機能する場である細胞膜や細胞外へ移送される。梶原は高マンノース型糖タンパク質のみならず、複合型シアリル糖タンパク質の化学合成にも取り組んだ。

①糖タンパク質 EP0 の糖鎖機能の解明

EP0 は、24、38、83 位に *N*-結合型の多分枝複合型糖鎖および 126 位に *O*-結合型糖鎖を有しており、その製剤は哺乳類細胞を用いて生産されている。しかし、動物細胞を用いた生産では、糖鎖末端の糖残基の欠如などの構造的不均一性が生じ、多様な糖鎖が付加した形で得られる。そのため、どの糖鎖構造が糖タンパク質の生理活性に重要かを特定するのは困難であった。そこで、梶原らは EP0 を 6 つのセグメントの固相合成と NCL 法での連結により (1.5.2(5)参照)、複合型 2 分枝シアリル糖鎖を有する 5 種の EP0 (EP0^{24, 38, 83}、EP0⁸³、EP0^{24, 38}、EP0^{38, 83}、EP0^{24, 83} : 上つき数字はシアリル糖鎖の結合部位) を合成し、糖鎖と EP0 生理活性との関係を調べた (図 2-27)。なお、各セグメントの固相合成で問題となるシアリル結合の加水分解を防ぐために、シアル酸のカルボキシル基をフェナシルエステルで保護する新規な合成法を開発していた⁸³。

それぞれの EP0 をグアニジン存在下段階透析法でフォールディングしたところ、38 位にシアリル糖鎖を持たないものはフォールディング収率が低下しており、38 位の糖鎖が 3 次元構造形成に重要であることが分かった。

次にマウスに投与して EP0 の赤血球増殖活性を調べた。その結果、3 本の糖鎖を持つ EP0^{24, 38, 83} の活性が最も高いこと、ならびに活性低下の大きな要因は 38 位の糖鎖欠如であることが判明した。EP0^{24, 38, 83} の活性は市販の 3~4 分枝糖鎖を持つ EP0 生物製剤の 8 割程度であった。従来は EP0 活性発現には多分枝糖鎖が必須とされていたが、本研究により初めて 2 分枝糖鎖であっても活性が発現することが示された。さらに、5 種の EP0 の均等混合液の赤血球増殖活性は EP0 総量が同一であっても大幅に低下することを明らかにし、EP0 生物製剤における糖鎖構造の不均一性が品質管理上の大きな問題となり得ることを証明した^[57]。

⁸³ Murakami M, et al., *Angew. Chem. Int. ed.*, 51, 3567-3572, 2012

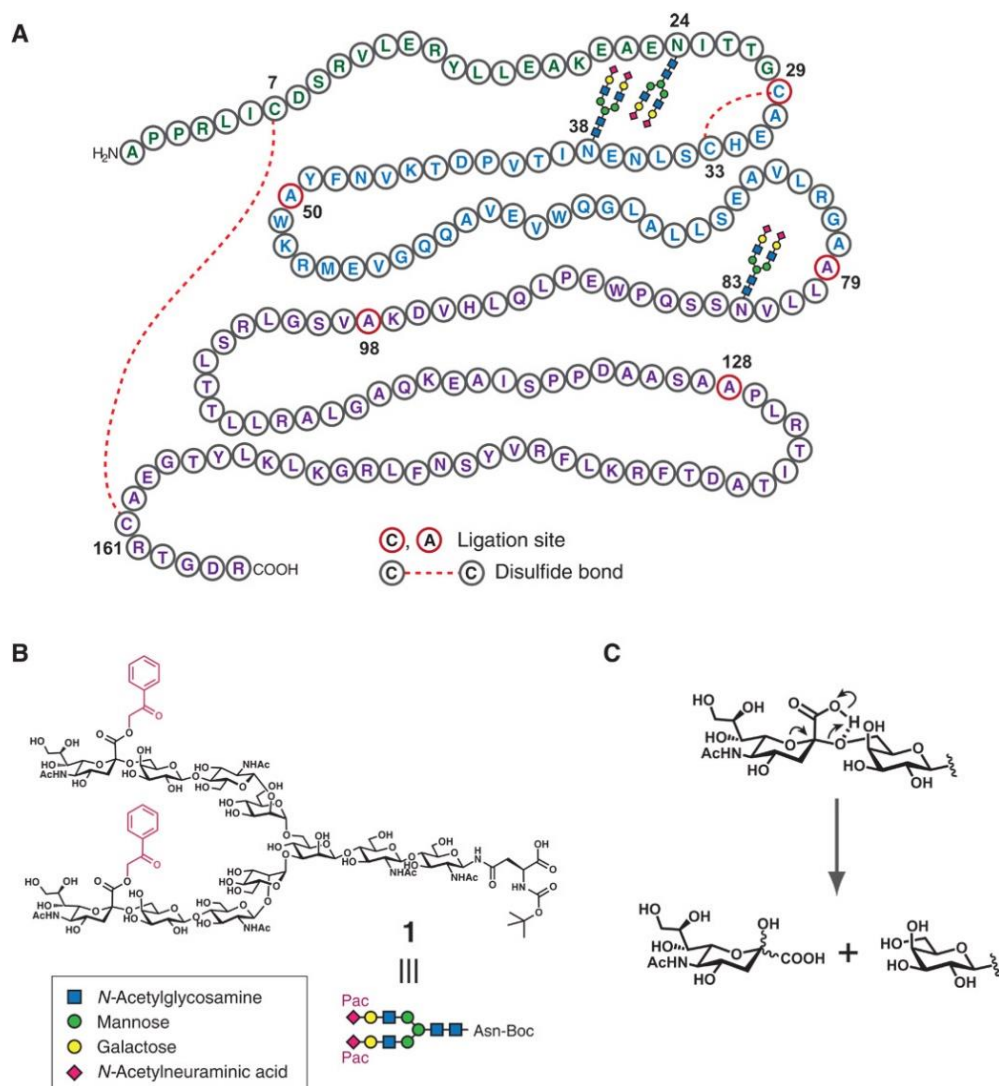


図 2-27 2 分枝複合型シアリル糖鎖 EPO の合成^[57]

A: EPO アミノ酸配列と糖鎖付加部位。

B: 2 分枝シアリル糖鎖。シアリ酸のカルボキシル基をフェナシルエステルで保護。

C: ペプチド固相合成で問題となるシアリル結合の分子内触媒反応による酸加水分解反応。

なお、梶原らは 3 分枝複合型シアリル糖鎖の化学酵素法による合成に成功しており⁸⁴、3 分枝シアリル糖鎖を持つ EPO の合成とその生理活性についても検討している⁸⁵。

②糖鎖を利用した安定なインスリンの合成

糖尿病患者に必要な不可欠なインスリンは、線維化という現象によって薬効を失うためにその保存可能期間が短いことが問題となっている。梶原はメルボルン大学と共同で、新たに 2 分枝複合型シアリル糖鎖を付加したグリコインスリンを化学合成し、インスリンの線維化を防ぐことに成功した。

⁸⁴ Maki Y, et al., *J. Ame. Chem. Soc.*, 138, 3461-3468, 2016

⁸⁵ 梶原のコメントによる。

合成されたグリコインスリンは高温のような過酷条件でも線維化せず、マウスを用いたインスリン負荷試験においてインスリンとほぼ同等の機能を持つことが分かった(図 2-28)^[58]。

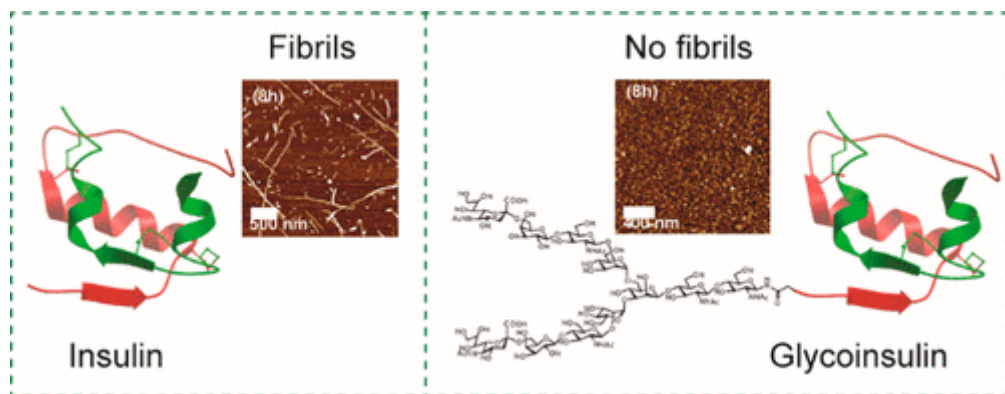


図 2-28 インスリンとグリコインスリン^[58]

写真は高濃度・高温条件下での原子間力顕微鏡図

(2) 新規ペプチド結合法の開発

梶原らは、酸化された鉄試薬である塩化鉄(FeCl_3)を用いて、 α -アミノチオアジドを酸性水溶液中で酸化させることにより、アミノ酸がペプチド結合を自発的に形成し、アミノ酸のポリマーすなわちポリペプチドが迅速に得られることを発見した。得られたポリペプチドを分析すると、 α 位にあるアミノ基と別のアミノ酸のカルボキシ基がペプチド結合を形成していることがわかり、本反応には位置選択的ペプチド結合を形成するメカニズムがあると考えられた。様々な検証実験の結果から、その反応中間体には、ジアミノアシルジスルフィド体が作られ、選択的なペプチド結合を与えたと考えられる(図 2-29)。これにより、無保護アミノ酸を、有機化学的な試薬なしで連続的に、かつ水のなかでポリペプチドを高収率で化学合成することに成功した^[59]。

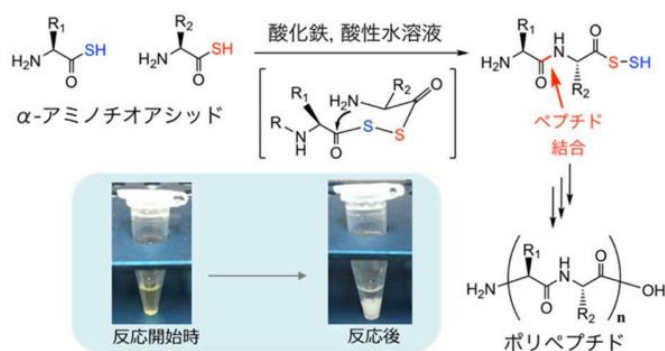


図 2-29 α -アミノチオアジドを利用した新規ペプチド合成⁸⁶

塩化鉄を含む酸性溶液にフェニルアラニン(Phe)の α -アミノチオアジドを溶かして静置すると Phe ポリペプチドが生成し、沈殿物が得られた。

⁸⁶ 大阪大学プレスリリース「生命の起源-地球上にポリペプチドが出現したルートの解明にもつながる成果」2019 年 5 月 17 日 https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2019/20190517_2

また、鉄鉱石共存下で α -アミノチオアシッドを酸性溶液中に溶かし静置したところ、リジン、フェニルアラニンからなるポリペプチドが生じることも確認した^[59]。この結果は生物が出現する前の前生物的環境において、ペプチドが α -アミノチオアシッドの酸化により生じうることを示すものとして注目され、本研究成果のイメージが *Biochemistry* 誌のカバー画像として採用された^[87]。

なお、梶原は *N*-結合型糖タンパク質精密化学合成研究における進展について総説を発表した^[60]。

(3) 酵素法による糖タンパク質合成における副反応

均一な構造の糖タンパク質合成法として、エンドグリカナーゼとグリコシルオキサゾリンを使用した化学酵素法が多用されているが^[88]、一方で、副産物が非酵素的に発生することも報告されている。モデル基質として L-Asn 残基を含まないペプチド (Ac-L-Ala-L-Lys-L-Ala-NH₂) を使用し、GlcNAc-oxazoline との非酵素的反応 (pH8.0) で生成する副産物を特定することを試みた。生成物の分析により、オキサゾリン環が L-Lys (K) のアミノ基に攻撃され、二置換アセトアミジンが形成されることを明らかにした (図 2-30)^[61]。

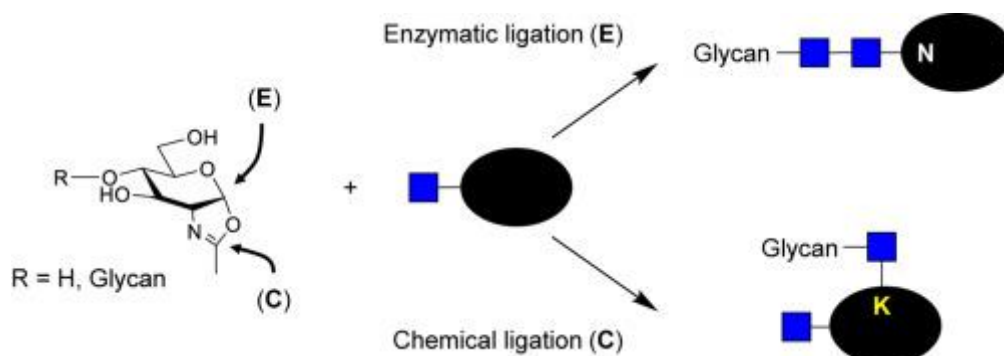


図 2-30 化学酵素法における副産物生成^[61]

エンドグリカナーゼは基質タンパク質の L-Asn (N) を認識し糖鎖を転移するが (Enzymatic ligation)、L-Lys (K) が存在すると、その末端 NH₂ との化学反応で非酵素的に副産物が生成する (Chemical ligation)。

2.2.6 細胞分化における糖脂質変換過程の解析

蟹江と伊藤らは、蛍光標識ラクトシルセラミドアナログ (LacCerBODIPY) と蛍光検出ナノ LC-MS/MS システム (1.5.3(1) 参照) を活用して、新たに細胞分化における糖脂質変換過程について検討した。神経成長因子 (NGF) により神経細胞様に分化するラット褐色細胞腫 PC12D 細胞を用い、非分化細胞および NGF 処理により調製した分化細胞と分化途中細胞に、それぞれ LacCerBODIPY を投与して糖脂質変換過程を経時的に追跡した (図 2-31)。その結果、細胞の分化状態により原形質膜のグリコシルセラミド組成が異なることが分かった。さらに、LacCerBODIPY は他のグリコシルセラミドに変換されるまで約 10 分間は原形質膜に留まる

⁸⁷ <https://pubs.acs.org/toc/bichaw/58/12>

⁸⁸ Umekawa M, et al., *J. Biol. Chem.*, 285, 511-521, 2010

ことを利用して、fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)⁸⁹法で、より迅速に細胞分化の状態を識別する手法を開発した^[62]。

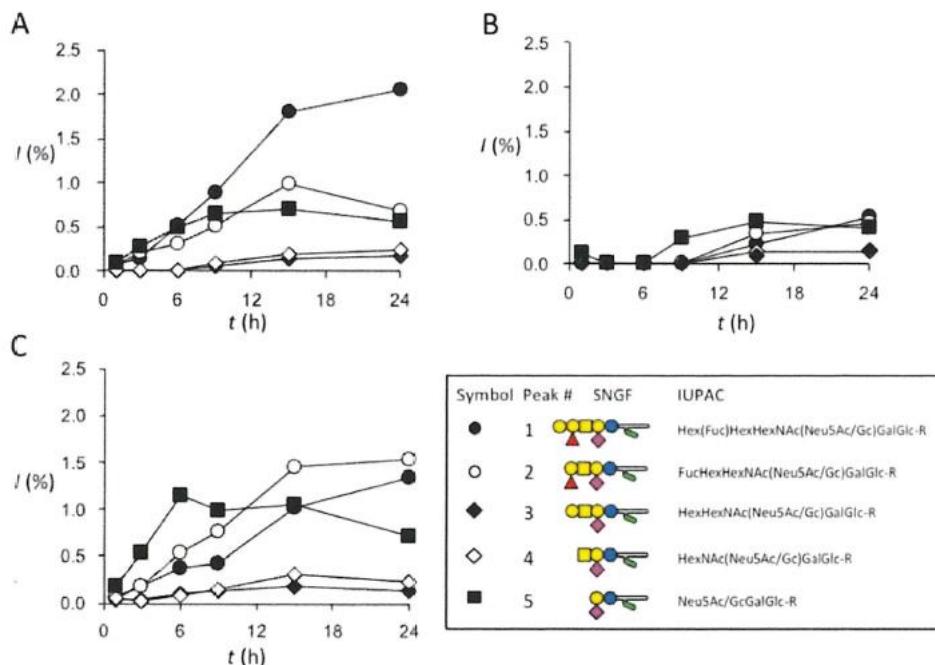


図 2-31 細胞分化における糖脂質変換解析^[62]

(A) 非分化 PC12D 細胞、(B) 分化細胞、(C) 分化途中細胞

2.2.7 Pradimicins 研究の進展

放線菌由来の抗生物質である Pradimicin A (PRM-A: 図 2-32) は、 Ca^{2+} の存在下でマンノース (Man) や Man を含む糖鎖に結合することが出来る数少ない低分子化合物であり、創薬のリードあるいは糖鎖の役割を解析するツール分子として興味を持たれている。中川 (現: 名古屋大学)、伊藤らは本プロジェクト期間中に引き続き⁹⁰、終了後も PRM-A と Man との結合様式の解析を継続した。

PRM-A と Man との結合を解析する際の問題点は、PRM-A の高い凝集性と、 Ca^{2+} イオンおよび Man との複数の複合体の形成にある。これらの問題に対処するために固体 ^{113}Cd -NMR と 2 次元双極子支援回転共鳴 (2D-DARR⁹¹) 実験の組み合わせによる分析法を開発し、PRM-A の Ca^{2+}

⁸⁹ FRAP (光褪色後蛍光回復法): 分子の動態を見る手法で、細胞の中のある一部分にレーザーを集光し、その部分を褪色させた後、その部分の蛍光の回復を観察する。褪色した周りの分子が動かなければ、褪色した部分はそのままとなるが、褪色した周りの分子が動きまわっていると、褪色した部分に周りの分子が入ってくるので蛍光が回復してくる。この回復するスピードを見ると、周りの分子の動きが分かる。分子の動きが早いほど蛍光の回復が早い。

⁹⁰ Nakagawa Y, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 17485-17493, 2011; Nakagawa Y, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 1040-1043, 2012

⁹¹ Dipolar Assisted Rotational Resonance:6 オングストローム以内の距離にある ^{13}C 間の双極子相互作用をクロスピークとして検出する 2 次元固体 NMR 法。

を媒介とした Man 結合形状、ならびに PRM-A がグリカンの非還元末端以外の Man 残基と結合することを明らかにした^[63]。

また、X線結晶解析と固相NMR分光法を用いて、2分子のPRM-AとCa²⁺との複合体(PRMe₂/Ca²⁺)の結合様式を明確にし、この複合体と2分子のManとの結合体(PRMe₂/Ca²⁺/Man₂)のより精密な結合様式を提示した。同時にPRM-Azide化合物を合成し、*Candida rugosa*の細胞壁マンナンを蛍光標識することに成功した(図2-32)^[64]。さらに、Methyl 5-thio- α -D-mannopyranosideとMethyl α -D-mannopyranosideとの結合能を比較評価し、PRM-AのMan認識にはManの分子内酸素原子が必要なことを見いだした^[65]。

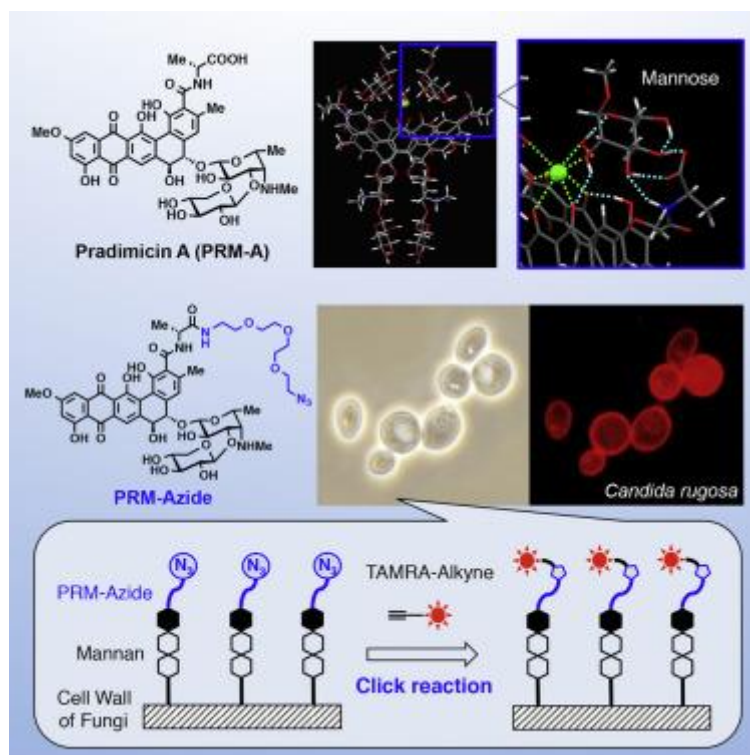


図2-32 PRM-AとManの結合様式解析^[64]

上段：PRMe₂/Ca²⁺複合体の結合様式(中央)と当該複合体によるMan認識。

下段：PRM-Azideによる細胞壁マンナンの蛍光標識。

なお、伊藤らは細胞壁マンナン構造を模した合成オリゴマンノースを用いて、PRM類が直鎖よりも分岐したオリゴマンノースと結合しやすいことを見いだし発表した⁹²。

2.2.8 その他の研究成果

伊藤は本プロジェクトでの主テーマであったERQCにおける糖鎖機能の解明以外に、抗体糖鎖などの研究で成果を発表した。

(1) 均一な構造の抗体-薬物複合体

⁹² Nakagawa Y., et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 10.1246/bcsj.20200305, 2020

次世代抗体医薬として注目されている「抗体-薬物複合体(antibody-drug conjugate: ADC)」は、がん細胞に高発現している抗原に対して高い親和性を持つ抗体に、殺細胞効果のある低分子薬物を結合させたものであり、この抗原に対する高い親和性によりがん組織へ運ばれた ADC の薬物は、がん組織に到達した後、徐々に放出されるように化学修飾されている。現在使用されている ADC の製造法では、結合薬物の数と位置が異なる多種類の ADC が生成されるという問題点がある。眞鍋（現：星薬大学）、伊藤らは糖加水分解酵素とその改変体を組み合わせることにより、均一な構造の ADC を作製できる手法を開発し(図 2-33)、合成した ADC が抗原依存的に殺細胞効果を示すことを明らかにした^[66]。

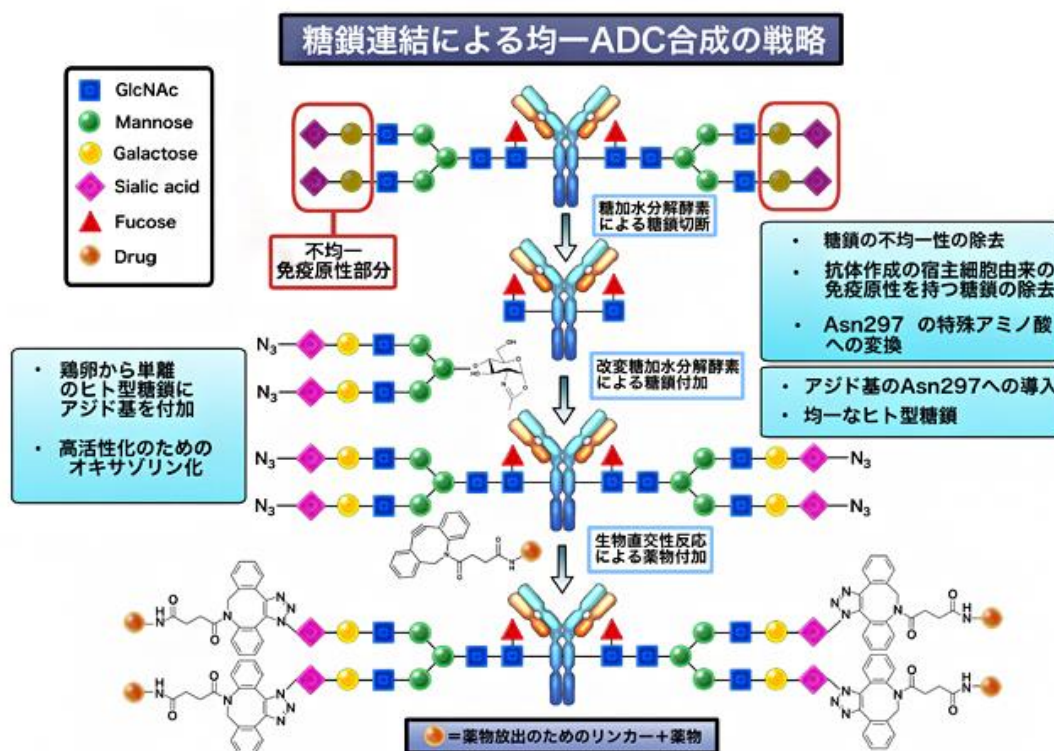


図 2-33 糖鎖連結による均一 ADC 合成の戦略⁹³

1. 抗体のFc領域に結合型糖鎖の構造を糖加水分解酵素(ENGase)により、還元末端のGlcNAcのみを残して、糖鎖の不均一部分を切断する。
2. 鶏卵から単離したヒト型糖鎖にアジド基(N₃-)を付加する。
3. 抗体に改変ENGaseを用いて糖鎖を結合させる。
4. 強い細胞毒性を持つ薬物の Monomethyl auristatin を化学修飾した後、生体直交反応により糖鎖部分に結合させる。

東京大学大学院薬学研究科の長江雅倫らは、ヒトのがんの悪性化を促進する糖鎖合成酵素であるN-acetylglucosaminyltransferase-V(GnT-V)⁹⁴のX線結晶構造解析に成功し、その立体構造を世界で初めて明らかにした。GnT-Vは中心に深い窪みを持つクローバー形をして

⁹³ 理研プレスリリース「均一な構造の抗体-薬物複合体」2019年4月16日
https://www.riken.jp/press/2019/20190416_2/index.html

⁹⁴ GlcNAc をタンパク質上の糖鎖に転移し、β 1-6 分枝と呼ばれる糖鎖の枝分かれを触媒する。

おり、基質となる糖鎖はその窪みに嵌まり込むことがわかった(図2-34)。GnT-V の立体構造を利用することで特異性の高い阻害剤のデザインが可能となり、糖鎖を標的としたがん治療薬開発へつながることが期待される。伊藤は共同研究者として阻害剤となる糖鎖化合物の合成研究を担当した^[67]。

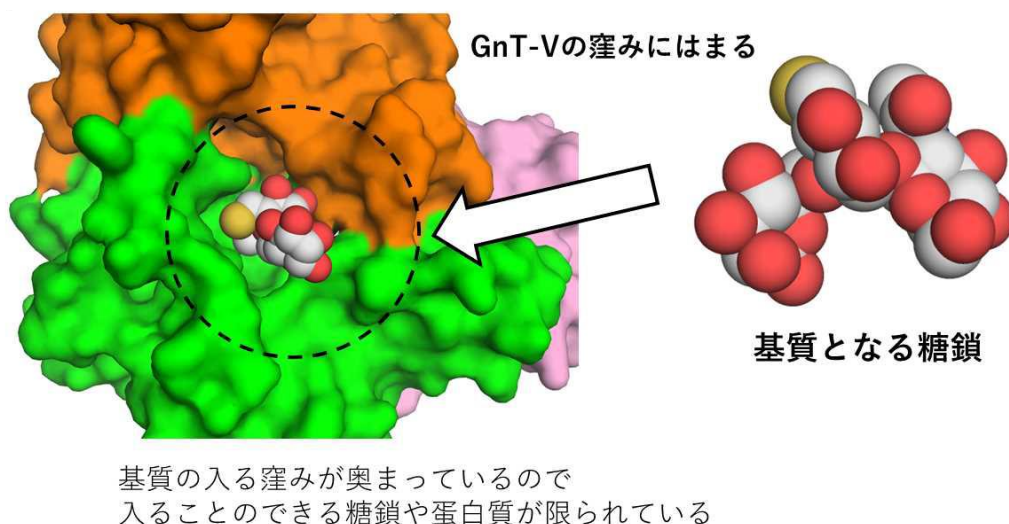


図 2-34 GnT-V の基質ポケット付近の構造⁹⁵

早稲田大学理工学術院・塩田邦郎らは、ヒト iPS 細胞からのオレキシニューロン⁹⁶の再生が高血糖条件下では阻害を受けるが、その阻害が *N*-acetyl-D-mannosamine (ManNAc) 添加により解除されることを発見した。伊藤は共同研究者として ManNAc およびその誘導体を化学合成した^[68]。

2.3 プロジェクト参加研究者の活動状況

本プロジェクト終了後もグループリーダーを含む多数の研究者が公的機関で研究を継続している。

伊藤幸成研究統括は、2020 年 3 月に理化学研究所を退任し名誉研究員になると共に、4 月に大阪大学大学院理学研究科・基礎理学プロジェクト研究センターの特任教授・招聘教授に就任した。また、ACS Chem. Biol. 編集委員、International Carbohydrate Organization 日本代表委員、日本薬学会代議員、AMED 課題評価委員、NEDO 技術評価委員を歴任し、現在、日本糖質学会評議員、日本糖質科学コンソーシアム常任委員、日本農芸化学会フェロー、および日本ケミカルバイオロジー学会世話人を務めている。

武田陽一は、立命館大学生命科学部生物工学科准教授を経て、2020 年 4 月に教授に昇格した。科研費特別推進研究「小胞体糖修飾の統合的ケミカルバイオロジー」(2016 年度～2020

⁹⁵ 東京大学・岐阜大学プレスリリース「がん悪性化に関与する糖鎖合成酵素 GnT-V の構造を解明」
<https://www.gifu-u.ac.jp/about/publication/press/20180821.pdf>

⁹⁶ 神経ペプチドの 1 種であるオレキシンを産生するニューロン。オレキシンは睡眠、摂食、感情、および代謝を制御するための重要な脳活動を調節している。

年度)の研究分担者として、小胞体糖タンパク質品質管理機構の研究を継続した。また、科研費基盤研究(C)「 α -1,3-グルカン含有生分解性複合樹脂ならびにその再資源化に資する酵素の開発」(2019年度～2021年度)の研究分担者として、グルカンの資源化を研究している。

梶原康宏は、大阪大学大学院理学研究科化学専攻教授として、科研費挑戦的萌芽研究「核磁気共鳴装置による糖タンパク質の構造解析を可能とする精密有機合成」(2015年度～2016年度)、科研費基礎研究(A)「大型生理活性糖タンパク質の精密半化学合成」(2014年度～2016年度)、および科研費基礎研究(A)「精密合成した糖タンパク質プローブを用いるゴルジ装置内糖鎖構造管理機構の解明」(2017年度～2019年度)の研究代表者を務めた。また、科研費特別推進研究「小胞体糖修飾の統合的ケミカルバイオロジー」(2016年度～2020年度)の研究分担者として、糖タンパク質化学合成研究を継続した。さらに、AMED「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発」の研究開発課題「糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業」の分担研究「糖鎖構造の可変を可能にする糖タンパク質の精密半化学合成とその品質分析技術の開発」(2016年度～2020年度)で研究開発担当者を務め、化学合成糖タンパク質の実用化研究を進めている。

蟹江治は、東海大学工学部生命科学科教授に就任し、科研費挑戦的萌芽研究「糖加水分解酵素阻害剤による免疫回復療法開発に関する研究」(2015年度～2016年度)の研究代表者、および科研費基礎研究(B)「バイオマスの限定的分解-分離-再結合反応を基盤とした高付加価値医療材料の開発」(2015年度～2018年度)の研究分担者として、糖鎖や糖質に関する研究を継続した。

糖鎖生物機能化学グループの鈴木克彦は、青森大学薬学部薬学科准教授を経て教授に昇格した。同じく、金森審子は東海大学工学部生命科学科教授に就任した。また、王寧は中国江南大学副教授に就任した。

同グループの八須匡和は東京理科大学基礎工学部生物工学科助教を経て、講師に就任し、科研費若手研究(B)「グリコシル化コラーゲンの系統的化学合成と構造機能解析」(2015年度～2016年度)の研究代表者として、コラーゲン糖ペプチド合成研究に従事した。小泉晶彦は城西大学助教に就任し、2020年4月に民間に転出した。また、藤川紘樹はサントリー生命科学財団生物有機科学研究所研究員となり、科研費研究活動スタート支援「新規酵素様糖脂質 MPIase の合成と膜タンパク質膜挿入活性の作用機構解明」(2015年度～2016年度)、科研費若手研究(B)「糖脂質 MPIase ライブラリを用いた膜タンパク質膜挿入活性機構の解明」(2017年度～2019年度)、および科研費基盤研究(C)「シャペロン様糖脂質 MPIase の膜上挙動観察と膜タンパク質膜挿入促進剤の開発」(2020年度～2022年度)の代表研究者として、糖脂質研究を継続している。

糖タンパク質合成化学グループの和泉雅之は、高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門教授に就任し、科研費基礎研究(B)「セレンの特異的な反応性を利用したユビキチン化糖タンパク質プローブの新規合成法」(2017年度～2020年度)の代表研究者として、糖タンパク質合成研究を継続した。また、牧村裕は京都大学生存圏研究所バイオマス変換分野博士研究員に転出した。

糖鎖構造情報化学グループの迫野昌文は富山大学准教授に就任し、科研費特別推進研究「小胞体糖修飾の統合的ケミカルバイオロジー」(2016年度～2020年度)の研究分担者として、小胞体糖タンパク質品質管理機構の研究を継続した。また、科研費基盤研究(C)「TALEの高いDNA配列認識特性を利用した遺伝子変異検査法の開発」(2018年度～2020年度)の代表研究者、および科研費基盤研究(B)「機能性タンパク質ナノブロック複合体創製の基盤的プロセス技術開発と応用展開」(2019年度～2021年度)の研究分担者を務めている。

同グループの孫尚紘は韓国高麗大学研究助教授に就任した。

2.4 第2章まとめ

伊藤は科研費特別推進を獲得して、タンパク質 N-グリコシル化以外の小胞体における他の糖修飾(脂質グルコシル化、C-マンノシル化)も対象に取り上げ、これらが小胞体において担うシグナリング機構全般について統合的に理解するための研究を実施した。また、梶原はAMED-CREST や科研費基盤研究(A)などの大型助成金を得て、糖タンパク質精密化学合成研究を進展させた。

その結果、期間中のものも含め、成果論文は97報、発展論文は38報となった。

終了後の N-グリコシル化に関する主な成果は、合成した糖タンパク質を基質にして、小胞体画分を用いたフォールディング過程精密解析系を開発したこと、ならびに小胞体内タンパク質の相互作用を核磁気共鳴法で追跡し、認識に関わる糖タンパク質ミスフォールド部位の同定に成功したことである。また、UGGTの機能解析を進展させるとともに、ERp29に機能に関する新規な知見を得た。さらに、合成糖質を基質として、阻害剤を使い分ける実験系を構築し、小胞体内で複数のマンノシダーゼが独立して働いていることを見いだした。

GPR55受容体を介して特異な生物活性を示すLPG1cを対象に、新たに様々な類縁体を合成して活性に重要な部位を特定するとともに、LPG1cと同等の活性を示す類縁体の取得に成功した。

C-マンノシル化の機能について検討し、生体試料内の C-マンノシルトリプトファンを定量する手法を開発した。

また、梶原は糖タンパク質化学合成の高効率化に成功するとともに、EPOやインスリンの生物活性に及ぼす糖鎖の機能について新規な知見を得た。

特許出願件数は期間中の1件である。

伊藤と梶原以外に本プロジェクトに係わった研究員のうち、9名が公的研究機関で研究を継続している。特に武田と鈴木はそれぞれ教授に昇格し、蟹江、金森と和泉は転出して教授に就任した。

第 3 章 プロジェクト成果の波及と展望

3.1 科学技術への波及と展望

3.1.1 新たな糖鎖科学研究の潮流の形成

本プロジェクト事後評価(最終評価)報告書では、「糖鎖が担う生命情報の解明の重要性が認識されているが、糖鎖構造の多様性、複雑さゆえに、その情報分子としての理解は、核酸やタンパク質など他の生体成分に比べ大きく遅れをとっている」とし、「本プロジェクトはこの問題に正面から取り組むために、天然物試料とは比較にならないほど大量に、しかも紛れのない正確な構造を持つ均一な糖鎖を化学合成により調製する方法を確立し、これを用いて糖鎖情報の解明を目指したものであり」、「合成化学を基盤として糖鎖生物学の最先端課題に挑戦する構想はこれまでに無い試みである」と評価された⁹⁷。

伊藤は、自身の研究が「生命機能解析を見据えた糖鎖効率的合成における手法の開発を基軸とした研究」であるとし、糖鎖化学と糖鎖生物学との学際的研究の重要性を強調している⁹⁸。さらに、有機合成化学協会誌に寄稿したラウンジ「我が国の研究が拓く糖鎖化学の未来」で、梶原らの糖タンパク質化学合成研究以外に、岐阜大学・安藤弘宗らがガングリオシド全合成技術を蛍光ガングリオシドプローブに展開し、脂質ラフトにおけるガングリオシドの動的挙動を観察した研究などを紹介し、糖鎖化学を基軸とした生物機能解明研究の進展を述べている⁹⁹。

上述のような糖鎖化学と糖鎖生物学・糖鎖医学との学際的研究を組織的に進める動きが開始されている。東海国立大学機構¹⁰⁰は、2020 年 4 月に「糖鎖生命コア研究拠点: Institute for Glyco-core Research (iGCORE)」を立ち上げた¹⁰¹。iGCORE は、(a) 合成化学・1 分子イメージング、計算科学により個々の糖鎖の動態原理を明らかにし、(b) ケミカルバイオロジー・インフォマティクスにより細胞レベルでの糖鎖の集合原理を明らかにして、それを化学的・遺伝子的に制御する手法を開発し、さらに、(c) 各糖鎖分子や糖鎖集合体が振る舞う原理や糖鎖の網羅的情報解析(グライコミクス)を応用し、生体が見せる発生・老化などの生命現象や、疾患における糖鎖の機能を解明することを目的としている(図 3-1)。iGCORE の拠点長には前述の岐阜大学・安藤弘宗が就任した。

ERATO プロジェクトでトップダウン型の糖鎖ライブラリが構築された背景には、伊藤幸成研究総括の「個々の糖鎖の働きから、集合としての糖鎖の働きが見えてくる」という視点があり、この視点は iGCORE の「個々の糖鎖に着目した生体機能解析を脱して、糖鎖がどのよ

⁹⁷ ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクト事後評価(最終評価)報告書
https://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/E_ito_houkoku.pdf

⁹⁸ 伊藤幸成 有機合成化学協会誌、74, 206-218, 2016

⁹⁹ 伊藤幸成 有機合成化学協会誌、76, 59-65, 2018

¹⁰⁰ 東海国立大学機構: 名古屋大学と岐阜大学が連携して設立された国立大学法人
<https://www.thers.ac.jp/index.html>

¹⁰¹ 糖鎖生命コア研究拠点 (iGCORE) <https://www.thers.ac.jp/research/chain/post.html>

うに集合し、その集合体がどのように働くのかを解明する」という基本理念と共通するものといえる¹⁰²。

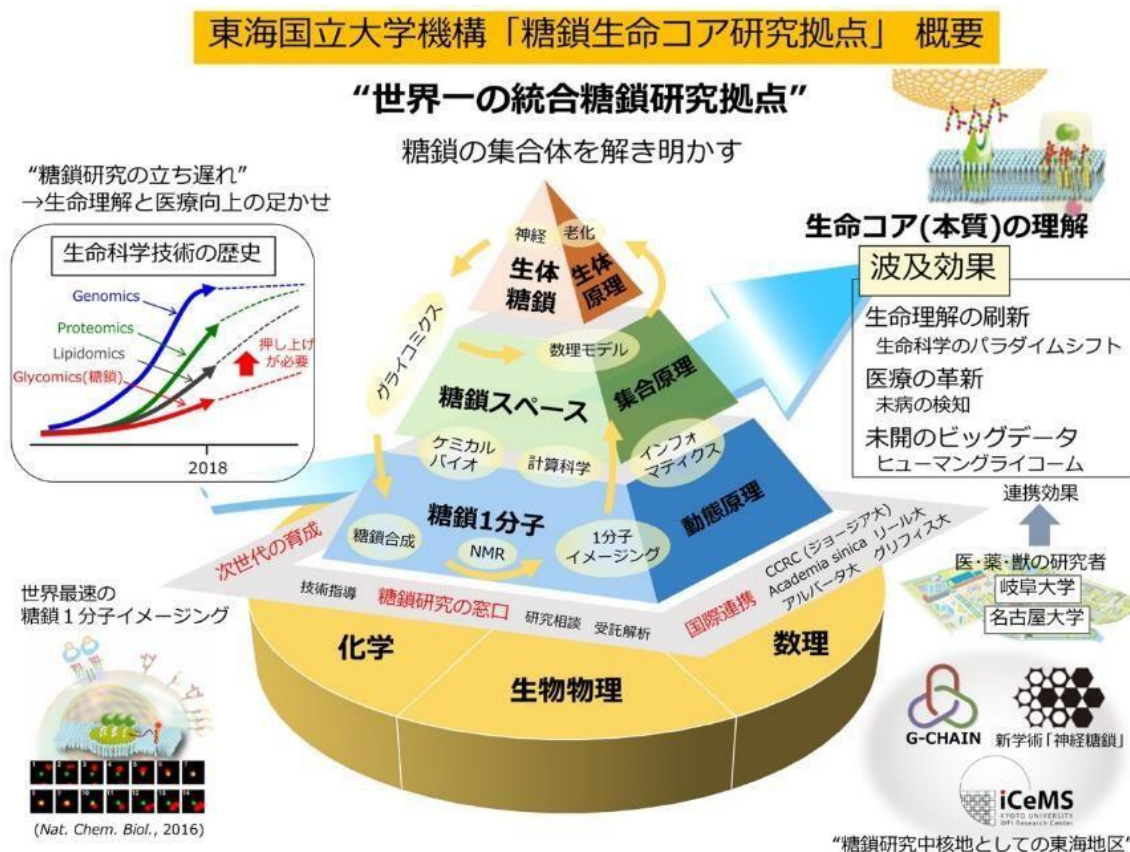


図 3-1 東海国立大学機構「糖鎖生命コア研究拠点」概要¹⁰³

文部科学省は、2020年9月24日に「学術研究の大型プロジェクトの推進に関する基本構想ロードマップの策定 -ロードマップ2020-」を策定し、基礎医学・大規模研究計画として「ヒューマングライコームプロジェクト:HGP」の推進を決定した¹⁰⁴。HGPはヒトゲノムプロジェクトに匹敵するもので、グライコミクスを通して、生体の全糖鎖構造(グライコーム)を理解することにより、ゲノミクス(核酸)、プロテオミクス(タンパク質)および糖鎖を含む統合的生命科学を進展させ、認知症やがんの克服などの医療革新を図ることを目標としており(図3-2)、その実施主体中核機関として東海国立大学機構が指定されている。

¹⁰² 外部有識者のコメントによる。

¹⁰³ 糖鎖生命コア研究拠点 (iGCORE) <https://www.thers.ac.jp/research/chain/post.html>

104 文部科学省 ロードマップ 2020
https://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu4/021/1412963_00001.htm

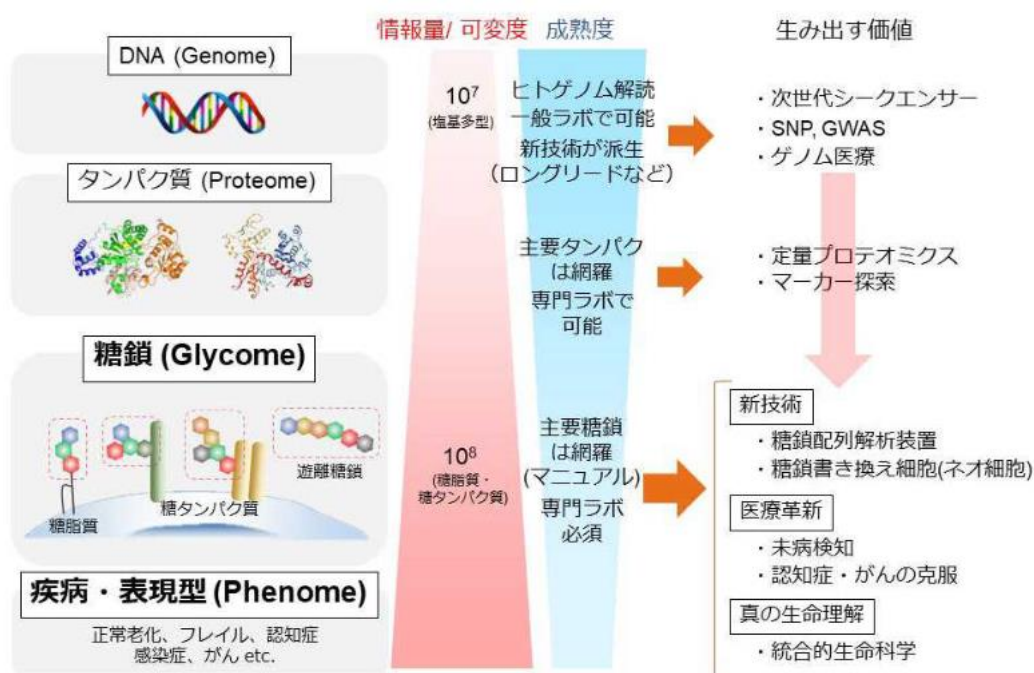


図 3-2 ヒューマングライコムプロジェクト概念図¹⁰⁵

科学技術・学術審議会 学術分科会 研究環境部会 学術研究の大型プロジェクトに関する作業部会「学術研究の大型プロジェクトの推進に関する基本構想ロードマップの策定-ロードマップ 2020-」(案)に掲載されたヒューマングライコムプロジェクトの概要(HGP マスタープラン)。

東海国立大学機構の iGCORE が HGP の中核研究拠点となったことを考慮すると、糖鎖化学と糖鎖生物学の学際的研究に初めて本格的に取り組んだ本 ERATO プロジェクトは、大型国家プロジェクトである HGP 構想の基盤の 1 つであったことが窺える。

3.1.2 糖鎖化学研究者の育成

本プロジェクトからは次世代の研究リーダーも育っており、グループリーダーの武田(立命館大学生命科学部生物工学科教授)や蟹江(東海大学工学部生命科学科教授)、当時研究員であった鈴木(青森大学薬学部薬学科教授)、金森(東海大学工学部生命科学科教授)、和泉(高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門教授)、迫野(富山大学准教授)、八須(東京理科大学基礎工学部生物工学科講師)らを輩出している。

日本の糖鎖化学は世界的に高い水準にあるが¹⁰⁶、一方で、糖鎖化学合成に取り組む研究者の数が減少していることが指摘されており¹⁰⁷、本プロジェクトが糖鎖化学研究者の育成の面においても有意義であったことが窺える。なお、本プロジェクトとは直接関係しないが、上述の安藤は CREST 研究員として伊藤の研究室に 2 年間在籍したことがあり、このことも JST の事業が糖鎖科学の振興に大きな寄与をもたらしたことを示している。

¹⁰⁵ HGP マスタープラン : https://www.thers.ac.jp/news/upload/20200909_gaiyo.pdf

¹⁰⁶ 伊藤幸成 有機合成化学協会誌、76、59-65、2018

¹⁰⁷ 外部有識者のコメントによる。

3.1.3 科学技術への波及のまとめと展望

文部科学省は「学術研究の大型プロジェクトの推進に関する基本構想ロードマップの策定 -ロードマップ 2020-」を策定し、ゲノムプロジェクトに匹敵する大型国家プロジェクトとして「ヒューマングライコームプロジェクト:HGP」の推進を決定した。糖鎖化学を基盤として糖鎖生物学の最先端課題に初めて本格的に挑戦した本プロジェクトは、HGP 構想を構築する基盤の1つであったことが窺える。

本プロジェクトは教授に就任した5人を含め、多数の糖鎖化学研究者を輩出し、日本の糖鎖化学の優位性を継続発展させることに貢献した。

3.2 社会経済への波及と展望

3.2.1 医薬・創薬分野への展開

糖鎖が担う生物機能は多岐にわたっており、糖鎖構造の異常は、がん、プリオン病、筋ジストロフィー、糖鎖不全症など様々な疾病と関連している。また、抗 HIV 活性分子や中和抗体は、アスパラギン結合型糖鎖を認識することも示されており¹⁰⁸、医療分野の発展には個々の糖鎖が持つ生物機能の明確化が必須である。上述の HGP マスタープランは、HGP が「医療、食品に深遠な革新をもたらす」とし、その社会的価値として、「病態の解明、診断・病態予測のためのマーカーの開発、治療法の開発へと繋がる」ことを挙げており、「iPS 細胞等の細胞治療、抗体等のバイオ医薬品では、糖鎖が適切な規格化に決定的役割を担い、さらにバイオ医薬品の活性化に糖鎖は重要となる」と述べている。すでに、糖鎖末端に存在するシアル酸が加齢とともに構造が変化を起こすことを示すアンチエイジング研究¹⁰⁹や、ウイルス表面の糖タンパク質フォールディングに関与する α -グルコシダーゼの阻害剤を抗 COVID-19(新型コロナウイルス)薬として開発する¹¹⁰などの動きが始まっている。

伊藤らは本プロジェクトで均一な構造の糖鎖や糖タンパク質を化学合成し、小胞体糖タンパク質品質管理機構の詳細を明確にするとともに、フォールディング病とされる2型糖尿病や骨粗しょう症の糖鎖プロファイルを構築することに成功した。また、梶原らは糖鎖が EPO やインスリンの生物活性や安定性に及ぼす役割を明確にした。これらは、HGP マスタープランの構想を先取りする成果である。

本プロジェクトでその有用性が実証された糖鎖化学は、今後も構造が規定された糖鎖を円滑に供給することで個々の糖鎖機能の統合的な理解を深め、解明された糖鎖機能を制御できる新規化合物の合成をとおして、創薬開発に貢献することが期待される¹¹¹。

¹⁰⁸ 伊藤幸成 有機合成化学協会誌, 74, 206-218, 2016

¹⁰⁹ Kinoshita M, et al., *ACS Omega*, 5, 18608-18618, 2020

¹¹⁰ Williams SJ & Goddard-Borger ED, *Biochem. Soc. Trans.*, 48, 1287-1295, 2020

¹¹¹ 外部有識者のコメントによる。

3.2.2 他の関連技術との比較

天然から単離した糖タンパク質を用いる研究では、その構造不均一性が故に糖鎖機能の役割を正確に理解することが困難であった。この問題を根本的に解決することを目的に、伊藤は本プロジェクトで、有機化学を基盤として均一な構造の糖タンパク質糖鎖および糖タンパク質を合成する技術を開発した。また、糖鎖構造を解析する手法として、質量分析法を基本とする分析法の開発にも成功した。これらの技術開発の成果について、他の関連技術との対比を表 3-1 に示した。

表 3-1 本プロジェクトで開発された技術と関連・類似技術との対比

	本プロジェクト開発技術	関連・類似技術
糖タンパク質糖鎖合成	分子内アグリコン転移反応によるマンノース β -選択的グリコシド化の開発 Ishiwata A., et al., <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 8, 3596 (2010)	アセタール型環状保護基修飾報によるマンノース β -選択的グリコシド化 Crich D, <i>Acc. Chem. Res.</i> , 43, 1144 (2010)
	トップダウン型高マンノース型糖鎖ライブラリ構築 (1.5.1(1))	コアフコース・バイセクティング GlcNAc 含有 N-グリカン化学合成 真鍋良幸 有機合成化学協会誌, 76, 502 (2018)
	鶏卵卵黄からの高マンノース型糖鎖大量調製法の開発 (1.5.2(1))	鶏卵卵黄からの 2 分枝複合型シアリル糖鎖の調製 Seko A, et al, <i>Biochem. Biophys. Acta, Gen. Subj.</i> , 23, 1335 (1997)
		橋かけ法によるシアリル酸 α -選択的グリコシド化 Komura N, et al., <i>Science</i> , 364, 677 (2019)
糖タンパク質合成	Boc-ペプチド固相合成法を用いた糖ペプチドチオエステル調製法の開発 (Murakami M, et al., <i>Angew. Chem. Int. ed.</i> , 51, 3567 (2012)), および高マンノース型糖タンパク質・複合型シアリル糖鎖タンパク質の合成 (1.5.2、2.2.1)	チオエステル法によるペプチド縮合 Hojo H, & Aimoto S, <i>Bull. Chem. Soc. Jpn.</i> , 64, 111 (1991)
		Native chemical ligation 法の開発 Dawson PE., <i>Science</i> , 266, 776 (1994)
	α -アミノチオアシッドによる新規ペプチド結合法の開発 (2.2.5(2))	エンド M 酵素を用いた糖タンパク質調製法 Yamamoto K, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 92, 493 (2001)、Shoda S, <i>Proc. Jpn. Acad. Ser. B</i> , 93, 125 (2017)
		理研クリック反応による不均一な糖タンパク質の合成 Ogura A, et al., <i>Sci. Rep.</i> , 6, 21797 (2016)
糖鎖分析技術	蛍光検出ナノ LC-MS/MS システムを開発 (1.5.3(1)②)	キャピラリー電気泳動-レーザー励起蛍光 (CE-LIF) 分析法の高感度化を実現 Kawai T, et al., <i>J. Chromatogr.</i> , 31, 138 (2018)
	質量分析法による絶対配置決定法の開発 (1.5.3(2))	

高マンノース型糖鎖化学合成について技術的に最も大きな問題点は、マンノースの β -選択的なグリコシド化反応であるとされていたが、伊藤らは p-メトキシベンジル(PMB)基を足掛かりとする分子内アグリコン転移反応を開発してこの問題点を解決していた。さらに、本プロジェクト期間中に PMB 基に代わって 2-ナフチルメチル(NAP)基を用いる改良法を発表するとともに、有機合成技術を持たない研究者もオンデマンドに目的の糖鎖を入手できることを目的に、トップダウン型高マンノース糖鎖ライブラリを開発した。

マンノースの β -選択的なグリコシド化については、Crich Dらがマンノース供与体の4,6-位をアセタール型環状保護基で修飾する方法を提案している。また、大阪大学大学院理学系研究科真鍋良幸は、水素結合の形成阻害や遠隔基関与を利用した糖鎖合成法を開発し、コアフコース糖鎖やバイセクト糖鎖を合成している。

なお、マンノース β -グリコシド化と同様に選択的なグリコシド結合が難しいとされているシアル酸の α -グリコシド化に関しては、岐阜大学安藤らが、シアル酸のカルボキシル基とアミド基の間に橋かけ構造を構築することで、 α 結合のみのシアル酸合成法を開発した。

糖タンパク質の化学合成の大きな契機となったのは、大阪大学蛋白質研究所北条裕信らのチオエステル法の発展形として開発された Native chemical ligation 法であるとされており、糖鎖が付いたペプチドを化学的に合成し、それ以外の部分と無保護の状態でカップリングする方法として本プロジェクトでも用いられた。

糖鎖が付いたペプチドの化学合成に関しては、梶原らが Boc(tert-Butyl-Oxy Carbonyl)-ペプチド固相合成法を用いた効率的な手法を開発した。一般的なペプチド合成に用いられる Fmoc(Fluorenyl-Methoxy-Carbonyl)-固相合成法では塩基性条件を多用するため、ペプチドチオエステルが分解しやすい。一方で、塩基処理を用いない Boc-固相合成では酸処理の工程が必要なため、容易に酸加水分解を受けるシアル結合を有する複合型糖タンパク質の化学合成は難しいとされていた。梶原らは、シアル酸のカルボキシル基が分子内触媒として作用することを見出し、これを Penacyl 基で保護することで、高効率な糖ペプチドチオエステル Boc-固相合成法を開発した。この手法は高マンノース糖鎖型糖タンパク質合成にも適用された。

さらに、梶原らは酸化された鉄試薬である塩化鉄の存在下で、 α -アミノチオアシッドを酸性水溶液中で酸化させることにより、アミノ酸がペプチド結合を自発的に形成し、ポリペプチドが迅速に得られることを発見した。これにより、C末端をチオアシッドに変換した糖ペプチドを無保護のポリペプチドと縮合させることが可能となった。

なお、還元末端に GlcNAc を持つ無保護の糖鎖を水溶液中でオキサゾリンに変換し、エンド-M 酵素¹¹²によってタンパク質に糖鎖を導入する手法は、構造が均一な糖タンパク質を化学酵素的に合成する手法として汎用されている。

¹¹² エンド-M 酵素：糸状菌 *Mucor hiemalis* が産生するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼで、アスパラギン結合糖鎖のジアセチルキトビオース結合を加水分解し、タンパク質側に GlcNAc 1 残基を残して糖鎖を遊離させる。その際、適当な受容体が存在すると遊離した糖鎖がその受容体に転移する。

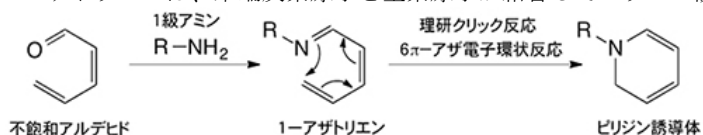
一方で、生体に存在する糖鎖は不均一であることを踏まえ、理化学研究所田中克典らは、独自に開発した 6 π -アザ電子環状反応(理研クリック反応)¹¹³によってアミノ基を高速で糖鎖修飾する手法を開発し、血清アルブミンのリジン残基に不均一な糖鎖を導入することに成功した。

本プロジェクトでは極微量成分の分析に有効な質量分析法を活用し、フェムトモルレベルでの糖鎖解析を可能とする蛍光検出ナノ LC-MS/MS システムを開発し、これまで不可能と考えられていた糖脂質が変換されていく過程を定量的に追跡することに成功した。また、計算科学的手法との併用で、質量分析法に基づく光学異性体の新しい解析技術を開発した。なお、従来から糖鎖分析に汎用されているキャピラリー電気泳動レーザー励起蛍光分析法について、糖鎖の新しい濃縮法が開発され、その分析感度がフェムトモルレベルに達したことが報告された。

3.2.3 社会経済への波及のまとめと展望

本プロジェクトでは、天然からの取得が難しい均一構造の糖鎖や糖タンパク質を調製する技術、および極微量の糖鎖を分析できる技術が開発され、小胞体糖タンパク質管理機構や、バイオ医薬品における糖鎖機能の精密解析に成功した。糖鎖機能の統合的理解を目指す HGP は、その社会的価値として、「病態の解明、診断・病態予測のためのマーカーの開発、治療法の開発へと繋がる」ことを挙げており、本プロジェクトの成果は医療や創薬分野の発展に寄与するものである。

¹¹³ 不飽和アルデヒドとリジン残基のような 1 級アミンが反応すると、1-アザトリエンが生成する。1-アザトリエンは、末端炭素原子と窒素原子が結合してピリジン誘導体を与える (アザ電子環状反応)。



【引用文献】

- [1] Koizumi A., Matsuo I., Takatani M., Seko A., Hachisu M., Takeda Y., Ito Y., “ Top-down chemoenzymatic approach to a high-mannose-type glycan library: Synthesis of a common precursor and its enzymatic trimming” , *Angewandte Chemie – International Edition*, 52, 7426 (2013).
- [2] Fujikawa K., Koizumi A., Hachisu M., Seko A., Takeda Y., Ito Y., “ Construction of a high-mannose-type glycan library by a renewed top-down chemo-enzymatic approach” , *Chemistry – A European Journal*, 21, 3224 (2015).
- [3] Fujikawa K., Seko A., Takeda Y., Ito Y., “ Approaches toward High-Mannose-Type Glycan Libraries” , *Chemical Record*, 16, 35 (2016).
- [4] Iwamoto S., Kasahara Y., Kamei K.-I., Seko A., Takeda Y., Ito Y., Matsuo I., “ Measurement of endo- α -mannosidase activity using a fluorescently labeled oligosaccharide derivative” , *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 78, 927 (2014).
- [5] Takeda Y., Seko A., Sakono M., Hachisu M., Koizumi A., Fujikawa K., Ito Y., “ Parallel quantification of lectin-glycan interaction using ultrafiltration” , *Carbohydrate Research*, 375, 112 (2013).
- [6] Wang N., Seko A., Takeda Y., Ito Y., “ Preparation of asparagine-linked monoglucosylated high-mannose-type oligosaccharide from egg yolk” , *Carbohydrate Research*, 411, 37 (2015).
- [7] Wang N., Seko A., Takeda Y., Kikuma T., Ito Y., “ Cooperative role of calnexin and TigA in *Aspergillus oryzae* glycoprotein folding” , *Glycobiology*, 25, 1090 (2015).
- [8] Sakono M., Seko A., Takeda Y., Hachisu M., Ito Y., “ Biophysical properties of UDP-glucose: Glycoprotein glucosyltransferase, a folding sensor enzyme in the ER, delineated by synthetic probes” , *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426, 504 (2012).
- [9] Ohara K., Takeda Y., Daikoku S., Hachisu M., Seko A., Ito Y., “ Profiling Aglycon-Recognizing Sites of UDP-glucose:glycoprotein Glucosyltransferase by Means of Squarate-Mediated Labeling” , *Biochemistry*, 54, 4909 (2015).
- [10] Hachisu M., Seko A., Daikoku S., Takeda Y., Sakono M., Ito Y., “ Hydrophobic Tagged Dihydrofolate Reductase for Creating Misfolded Glycoprotein Mimetics” , *ChemBioChem*, 17, 300 (2016).
- [11] Takeda Y., Seko A., Hachisu M., Daikoku S., Izumi M., Koizumi A., Fujikawa K., Kajihara Y., Ito Y., “ Both isoforms of human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase are enzymatically active” , *Glycobiology*, 24, 344 (2014).
- [12] Sakono M., Seko A., Takeda Y., Aikawa J.-I., Hachisu M., Koizumi A., Fujikawa K., Ito Y., “ Glycan specificity of a testis-specific lectin chaperone calmeglin and effects of hydrophobic interactions” , *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, 1840, 2904 (2014).
- [13] Sakono M., Seko A., Takeda Y., Ito Y., “ PDI family protein ERp29 forms 1:1 complex with lectin chaperone calreticulin” , *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452, 27 (2014).
- [14] Iwamoto S., Isoyama M., Hirano M., Yamaya K., Ito Y., Matsuo I., Totani K., “ Reconstructed glycan profile for evaluation of operating status of the endoplasmic reticulum glycoprotein quality control” , *Glycobiology*, 23, 121

	(2013).
[15]	Matsushima H., Hirano M., Ito Y., Totani K., “ Diverse Effects of Macromolecular Crowding on the Sequential Glycan-Processing Pathway Involved in Glycoprotein Quality Control” , <i>ChemBioChem</i> , 14, 753 (2013).
[16]	Hirano M., Adachi Y., Ito Y., Totani K., “ Calreticulin discriminates the proximal region at the N-glycosylation site of Glc1Man9GlcNAc2 ligand” , <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 466, 350 (2015).
[17]	Makimura Y., Kiuchi T., Izumi M., Dedola S., Ito Y., Kajihara Y., “ Efficient synthesis of glycopeptide- α -thioesters with a high-mannose type oligosaccharide by means of tert-Boc-solid phase peptide synthesis” , <i>Carbohydrate Research</i> , 364, 41 (2012).
[18]	Izumi M., Makimura Y., Dedola S., Seko A., Kanamori A., Sakono M., Ito Y., Kajihara Y., “ Chemical synthesis of intentionally misfolded homogeneous glycoprotein: A unique approach for the study of glycoprotein quality control” , <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 134, 7238 (2012).
[19]	Dedola S., Izumi M., Makimura Y., Seko A., Kanamori A., Sakono M., Ito Y., Kajihara Y., “ Folding of synthetic homogeneous glycoproteins in the presence of a glycoprotein folding sensor enzyme” , <i>Angewandte Chemie – International Edition</i> , 53, 2883 (2014).
[20]	Dedola S., Izumi M., Makimura Y., Ito Y., Kajihara Y., “ Evaluation of the effect of post-translational modification toward protein structure: Chemical synthesis of glycosyl crambins having either a high mannose-type or a complex-type oligosaccharide” , <i>Biopolymers</i> , 106, 446 (2016).
[21]	Suzuki K., Ohtake A., Ito Y., Kanie O., “ Synthesis of a fluorescently tagged sialic acid analogue useful for live-cell imaging” , <i>Chemical Communications</i> , 48, 9744 (2012).
[22]	Daikoku S., Ono Y., Ohtake A., Hasegawa Y., Fukusaki E., Suzuki K., Ito Y., Goto S., Kanie O., “ Fluorescence-monitored zero dead-volume nanoLC-microESI-QIT-TOF MS for analysis of fluorescently tagged glycosphingolipids” , <i>Analyst</i> , 136, 1046 (2011).
[23]	Ohtake A., Daikoku S., Suzuki K., Ito Y., Kanie O., “ Analysis of the Cellular Dynamics of Fluorescently Tagged Glycosphingolipids by Using a Nanoliquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Platform” , <i>Analytical Chemistry</i> , 85, 8475 (2013)
[24]	Son S.-H., Daikoku S., Ohtake A., Suzuki K., Kabayama K., Ito Y., Kanie O., “ Syntheses of lactosyl ceramide analogues carrying novel bifunctional BODIPY dyes directed towards the differential analysis of multiplexed glycosphingolipids by MS/MS using iTRAQ” , <i>Chemical Communications</i> , 50, 3010 (2014).
[25]	Shioiri Y., Suzuki K., Daikoku S., Kurimoto A., Ito Y., Kanie O., “ Stereospecific generation and analysis of α - And β -hemiacetals of monosaccharides in gas phase” , <i>Carbohydrate Research</i> , 382, 43 (2013).
[26]	Kanie O., Shioiri Y., Ogata K., Uchida W., Daikoku S., Suzuki K., Nakamura S., Ito Y., “ Diastereomeric resolution directed towards chirality determination focussing on gas-phase energetics of coordinated sodium dissociation” , <i>Scientific Reports</i> , 6, 24005 (2016).
[27]	Son S.-H., Seko A., Daikoku S., Fujikawa K., Suzuki K., Ito Y., Kanie O.,

	“ Endoplasmic Reticulum (ER)-Targeted, Galectin-Mediated Retrograde Transport by Using a HaloTag Carrier Protein” , <i>ChemBioChem</i> , 17, 630 (2016).
[28]	Daikoku S., Seko A., Ito Y., Kanie O., “ Glycan structure and site of glycosylation in the ER-resident glycoprotein, uridine 5' -diphosphate-glucose: Glycoprotein glucosyltransferases 1 from rat, porcine, bovine, and human” , <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 451, 356 (2014).
[29]	Daikoku S., Seko A., Son S.-H., Suzuki K., Ito Y., Kanie O., “ The relationship between glycan structures and expression levels of an endoplasmic reticulum-resident glycoprotein, UDP-glucose: Glycoprotein” , <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 462, 58 (2015).
[30]	Izumi M., Oka Y., Okamoto R., Seko A., Takeda Y., Ito Y., Kajihara Y., “ Synthesis of Glc1Man9-Glycoprotein Probes by a Misfolding/Enzymatic Glucosylation/Misfolding Sequence” , <i>Angewandte Chemie - International Edition</i> , 55, 3968 (2016).
[31]	Izumi M., Komaki S., Okamoto R., Seko A., Takeda Y., Ito Y., Kajihara Y., “ Synthesis of misfolded glycoprotein dimers through native chemical ligation of a dimeric peptide thioester” , <i>Organic and Biomolecular Chemistry</i> , 14, 6088 (2016).
[32]	Izumi M., Kuruma R., Okamoto R., Seko A., Ito Y., Kajihara Y., “ Substrate Recognition of Glycoprotein Folding Sensor UGGT Analyzed by Site-Specifically ¹⁵ N-Labeled Glycopeptide and Small Glycopeptide Library Prepared by Parallel Native Chemical Ligation” , <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 139, 11421 (2017).
[33]	Kiuchi T., Izumi M., Mukogawa Y., Shimada A., Okamoto R., Seko A., Sakono M., Takeda Y., Ito Y., Kajihara Y., “ Monitoring of Glycoprotein Quality Control System with a Series of Chemically Synthesized Homogeneous Native and Misfolded Glycoproteins” , <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 140, 17499 (2018).
[34]	Dedola S., Izumi M., Makimura Y., Seko A., Kanamori A., Takeda Y., Ito Y., Kajihara Y., “ Direct assay for endo- α -mannosidase substrate preference on correctly folded and misfolded model glycoproteins” , <i>Carbohydrate Research</i> , 434, 94 (2016).
[35]	Takeda Y., Seko A., Fujikawa K., Izumi M., Kajihara Y., Ito Y., “ Effects of domain composition on catalytic activity of human UDP-glucose: Glycoprotein glucosyltransferases” , <i>Glycobiology</i> , 26, 999 (2016).
[36]	Calles-Garcia D., Yang M., Soya N., Melero R., Ménade M., Ito Y., Vargas J., Lukacs G.L., Kollman J.M., Kozlov G., Gehring K., “ Single-particle electron microscopy structure of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase suggests a selectivity mechanism for misfolded proteins” , <i>Journal of Biological Chemistry</i> , 292, 11499 (2017).
[37]	Wang N., Seko A., Takeda Y., Ito Y., “ Glycan dependent refolding activity of ER glucosyltransferase (UGGT)” , <i>Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects</i> , 1864, 129709 (2020).
[38]	Totani K., Yamaya K., Hirano M., Ito Y., “ Influence of aglycone structures on N-glycan processing reactions in the endoplasmic reticulum” , <i>Carbohydrate Research</i> , 439, 16 (2017).

[39]	Sakono M., Seko A., Takeda Y., Hachisu M., Koizumi A., Fujikawa K., Seto H., Ito Y., “ Influence of high-mannose glycan whose glucose moiety is substituted with 5-thiogluco- se on calnexin/calreticulin cycle”, <i>RSC Advances</i> , 6, 76879 (2016).
[40]	Kuribara T., Hirano M., Speciale G., Williams S.J., Ito Y., Totani K., “ Selective Manipulation of Discrete Mannosidase Activities in the Endoplasmic Reticulum by Using Reciprocally Selective Inhibitors”, <i>ChemBioChem</i> , 18, 1027 (2017).
[41]	Kuribara T., Imagawa A., Hirano M., Ito Y., Totani K., “ Metabolic syndrome perturbs deglucosylation and reglucosylation in the glycoprotein folding cycle”, <i>FEBS Letters</i> , 594, 1759 (2020).
[42]	Nakao H., Seko A., Ito Y., Sakono M., “ PDI family protein ERp29 recognizes P-domain of molecular chaperone calnexin”, <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 487, 763 (2017).
[43]	Ikezaki M., Minakata S., Nishitsuji K., Tabata S., Lee Matsui I.-S., Takatani M., Usukura J., Ito Y., Ihara Y., “ Calreticulin protects insulin against reductive stress in vitro and in MIN6 cells”, <i>Biochimie</i> , 171-172, 1 (2020).
[44]	Ihara Y., Ikezaki M., Takatani M., Ito Y., “ Calnexin/calreticulin and assays related to N-Glycoprotein folding in vitro”, <i>Methods in Molecular Biology</i> , 2132, 295 (2020)
[45]	Ding F., Guy A.T., Greimel P., Hirabayashi Y., Kamiguchi H., Ito Y., “ Squaryl group modified phosphoglycolipid analogs as potential modulators of GPR55”, <i>Chemical Communications</i> , 54, 8470 (2018).
[46]	Guy A.T., Kano K., Ohyama J., Kamiguchi H., Hirabayashi Y., Ito Y., Matsuo I., Greimel P., “ Preference for Glucose over Inositol Headgroup during Lysolipid Activation of G Protein-Coupled Receptor 55”, <i>ACS Chemical Neuroscience</i> , 10, 716 (2019).
[47]	Sakurai S., Inai Y., Minakata S., Manabe S., Ito Y., Ihara Y., “ A novel assay for detection and quantification of C-mannosyl tryptophan in normal or diabetic mice”, <i>Scientific Reports</i> , 9, 4675 (2019).
[48]	Iwahashi N., Inai Y., Minakata S., Sakurai S., Manabe S., Ito Y., Ino K., Ihara Y., “ C-Mannosyl tryptophan increases in the plasma of patients with ovarian cancer”, <i>Oncology Letters</i> , 19, 908 (2020).
[49]	Hossain T.J., Manabe S., Ito Y., Iida T., Kosono S., Ueda K., Hosomi A., Inoue D., Suzuki T., “ Enrichment and characterization of a bacterial mixture capable of utilizing C-mannosyl tryptophan as a carbon source”, <i>Glycoconjugate Journal</i> , 35, 165 (2018).
[50]	Minakata S., Inai Y., Manabe S., Nishitsuji K., Ito Y., Ihara Y., “ Monomeric C-mannosyl tryptophan is a degradation product of autophagy in cultured cells”, <i>Glycoconjugate Journal</i> , 10.1007/s10719-020-09938-8 (2020).
[51]	Ding F., Ishiwata A., Ito Y., “ Stereodivergent Mannosylation Using 2- O-(ortho-Tosylamido)benzyl Group”, <i>Organic Letters</i> , 20, 4833 (2018).
[52]	Ding F., Ishiwata A., Ito Y., “ Bimodal Glycosyl Donors Protected by 2- O-(ortho-Tosylamido)benzyl Group”, <i>Organic Letters</i> , 20, 4384 (2018).
[53]	Manabe S., Ito Y., “ Comparing of endocyclic and exocyclic cleavage reactions using mycothiol synthesis as an example”, <i>Tetrahedron</i> , 74, 2446 (2018).

[54]	Iwamoto S., Kasahara Y., Yoshimura Y., Seko A., Takeda Y., Ito Y., Totani K., Matsuo I., “Endo- α -Mannosidase-Catalyzed Transglycosylation”, <i>ChemBioChem</i> , 18, 1376 (2017).
[55]	Ding F., Guy A.T., Greimel P., Hirabayashi Y., Kamiguchi H., Ito Y., “Squaryl group modified phosphoglycolipid analogs as potential modulators of GPR55”, <i>Chemical Communications</i> , 54, 8470 (2018).
[56]	Miyagawa A., Takeuchi S., Itoda S., Toyama S., Kurimoto K., Yamamura H., Ito Y., “Chemical synthesis and isolation of UDP-2-deoxy glucose and galactose”, <i>Synthetic Communications</i> , 46, 1790 (2016).
[57]	Murakami M., Kiuchi T., Nishihara M., Tezuka K., Okamoto R., Izumi M., Kajihara Y., “Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity”, <i>Science Advances</i> , 2, e1500678 (2016).
[58]	Hossain M.A., Okamoto R., Karas J.A., Praveen P., Liu M., Forbes B.E., Wade J.D., Kajihara Y., “Total Chemical Synthesis of a Nonfibrillating Human Glycoinsulin”, <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 142, 1164 (2020).
[59]	Okamoto R., Haraguchi T., Nomura K., Maki Y., Izumi M., Kajihara Y., “Regioselective α -Peptide Bond Formation Through the Oxidation of Amino Thioacids”, <i>Biochemistry</i> , 58, 1672 (2019).
[60]	Unverzagt C., Kajihara Y., “Recent advances in the chemical synthesis of N-linked glycoproteins”, <i>Current Opinion in Chemical Biology</i> , 46, 130 (2018).
[61]	Wang N., Seko A., Daikoku S., Kanie O., Takeda Y., Ito Y., “Non-enzymatic reaction of glycosyl oxazoline with peptides”, <i>Carbohydrate Research</i> , 436, 31 (2016).
[62]	Arai K., Ohtake A., Daikoku S., Suzuki K., Ito Y., Kabayama K., Fukase K., Kanie Y., Kanie O., “Discrimination of cellular developmental states focusing on glycan transformation and membrane dynamics by using BODIPY-tagged lactosyl ceramides”, <i>Organic and Biomolecular Chemistry</i> , 18, 3724 (2020).
[63]	Nakagawa Y., Ito Y., “Solid-State NMR Analysis of Mannose Recognition by Pradimicin A”, <i>New Developments in NMR</i> , 2017-January, 269 (2017).
[64]	Nakagawa Y., Doi T., Takegoshi K., Sugahara T., Akase D., Aida M., Tsuzuki K., Watanabe Y., Tomura T., Ojika M., Igarashi Y., Hashizume D., Ito Y., “Molecular Basis of Mannose Recognition by Pradimicins and their Application to Microbial Cell Surface Imaging”, <i>Cell Chemical Biology</i> , 26, 950 (2019).
[65]	Watanabe Y., Yamaji F., Ojika M., Sugawara T., Akase D., Aida M., Igarashi Y., Ito Y., Nakagawa Y., “The endocyclic oxygen atom of D-mannopyranose is involved in its binding to pradimicins”, <i>Tetrahedron Letters</i> , 61, 151530 (2020).
[66]	Manabe S., Yamaguchi Y., Matsumoto K., Fuchigami H., Kawase T., Hirose K., Mitani A., Sumiyoshi W., Kinoshita T., Abe J., Yasunaga M., Matsumura Y., Ito Y., “Characterization of antibody products obtained through enzymatic and nonenzymatic glycosylation reactions with a glycan oxazoline and preparation of a homogeneous antibody-drug conjugate via Fc N-Glycan”, <i>Bioconjugate Chemistry</i> , 30, 1343 (2019).
[67]	Nagae M., Kizuka Y., Mihara E., Kitago Y., Hanashima S., Ito Y., Takagi J.,

	Taniguchi N., Yamaguchi Y., “ Structure and mechanism of cancer-associated N-acetylglucosaminyltransferase-V” , <i>Nature Communications</i> , 9, 3380 (2018).
[68]	Hayakawa K., Sakamoto Y., Kanie O., Ohtake A., Daikoku S., Ito Y., Shiota K., “ Reactivation of hyperglycemia-induced hypocretin (HCRT) gene silencing by N-acetyl-d-mannosamine in the orexin neurons derived from human iPS cells” , <i>Epigenetics</i> , 12, 764 (2017).