

## 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

【研究総括】伊藤 幸成（理化学研究所／主任研究員）

【評価委員】（敬称略、五十音順）

小川 温子（お茶の水女子大学／理事・副学長(国際・研究担当)）

川寄 敏祐（委員長；立命館大学総合科学技術研究機構／上席研究員）

正田 晋一郎（東北大学大学院工学研究科／教授）

瀧 孝雄（株式会社 AGT&T／代表取締役社長）

藤本 ゆかり（慶応義塾大学理工学部／教授）

## 評価の概要

ポストゲノム時代のライフサイエンスにおいて、糖鎖が担う生命情報の解明の重要性が認識されている。しかし一方では、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。本プロジェクトはこの問題に対して正面から取り組むために、天然生物試料とは比較にならないほど大量に、しかも紛れの無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る。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が、リーダーである伊藤研究総括が高マンノース型糖鎖の化学合成で世界の頂点に立つ化学者であると同時に、糖鎖生物学全体に深い関心と理解を有することが背景となり、このように世界でも類を見ない魅力的なプロジェクトが可能になったと考えられる。

本プロジェクトは、伊藤研究総括の理念に沿って、国際的な競争を勝ち抜いてきた、我が国の糖鎖科学研究が誇る研究チームにより構成され、狭い専門領域を超えた研究者集団による新しい研究体制の構築に成功した。糖鎖機能生物化学グループでは、世界的に高い評価を得ている高マンノース型糖鎖化学合成技術にさらなる改良を加え、トップダウン型高マンノース型糖鎖ライブラリーの構築法を完成させた。この実績の上に、高マンノース型糖鎖の関連する糖鎖生物学上の先端的なトピックスの機構解明にいち早く取り組み、力強く、的確に研究を展開したと言える。糖タンパク質合成化学グループでは、伝統的に世界でも高いレベルにある我が国のペプチド合成化学に糖鎖化学を融合させ、これまでにない新しい研究領域を創成した。エリスロポエチンやインターロイキン等のサイトカイン類の糖タンパク質の変性型あるいは活性型を有機化学的に合成することに成功し、小胞体内で糖タンパク質分子のフォールディング（折りたたみ）状態の識別に重要な役割を担う UDP-Glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT)の基質認識に関する研究を大きく進展させた。糖鎖構造情報化学グループでは、蛍光糖脂質を用いてゴルジ体糖鎖生合成過程の可視化手法を開発すると同時に、糖タンパク質の三次元形状を原子間力顕微鏡で解析する探針の化学的デザインに成功した。波及効果の大きい新しい構造解析法として、今後小胞体内での糖鎖の挙動に大きく貢献するものと期待される。

本プロジェクトでは、伊藤研究総括のリーダーシップのもと、有機合成化学を礎とする各研究グループが密に連携し、独創的な糖鎖研究実現の基軸となるオリゴ糖、糖タンパク質、プローブ分子の合成等、各々がその完成に数年は要すると推測される複数の課題を乗り越えながら研究が進められた。その結果、得られた成果はどれも学術的に極めて質が高いだけでなく、大きな波及効果が期待できるものである。特に、糖タンパク質医薬品を低分子医薬品と同じ基準で品質評価して製品提供できる可能性を示した点で社会的貢献は大きい。

以上のように、ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトは、糖鎖科学にとどまらず、生命科学全体における有機合成化学の優位性を実証し、卓越した研究水準を示したと認められ、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する。

## 1. 研究プロジェクトの設定および運営

### 1-1. プロジェクトの全体構想

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、糖鎖の長さや構造は非常に高い多様性を示す。これまで、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巣細胞(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。

本プロジェクトの基本的な構想は、有機合成化学に立脚し、構造が明確な糖鎖を十分量調製することにより、これまで困難であった糖鎖機能の明確化に挑戦することにある。そのために、これまで細胞を用いた生合成に依存してきた糖タンパク質を、有機合成化学的に調製する技術基盤を構築し、さらに、アルツハイマー症候群のようないわゆるフォールディング病など、糖鎖構造異常に起因する種々の疾病の治療や合成糖タンパク質を基盤とする医薬品開発へ貢献しようとした。

このように糖鎖合成化学を基盤として糖鎖生物学の重要課題にチャレンジする構想は、これまでに無い新しい試みであり、高く評価することができる。日本の糖鎖科学研究は、歴史的に見ても、また現在においても、質および量ともに、常に世界をリードし続けてきた。一方、3名のノーベル化学賞受賞者を輩出している我が国の有機合成化学も、世界のトップレベルに位置すると言ってよい。本構想の他には見られない強みは、このような世界に誇る二つのお家芸を融合させた点にあると言える。いわゆる“糖鎖生物学研究に提供される道具としての糖鎖工学”という従来型の視点とは一線を画し、有機合成化学に基づく新たな視座に立った研究を展開することで、糖鎖科学にとどまらず、生命科学領域全体における有機化学的考え方の優位性を実証することを狙いとしており、挑戦的・創造的・融合的な全体構想として非常に優れたものと判断する。

### 1-2. プロジェクトの目標・計画

本プロジェクトでは、糖タンパク質における糖鎖機能の解明を目標に、研究総括を始めとして、各研究グループが蓄積してきた糖鎖の有機化学合成に関する豊富なリソースを駆使し、細胞内における糖鎖が関与するタンパク質のフォールディングの機構解明に取り組む計画である。通常、化学的に全合成した糖タンパク質は変性状態になっているため、バイオ医薬品等への利用を念頭に置いた場合、活性型への変換（リフォールディング）プロセスに関する研究は重要である。計画では、糖鎖生物機能化学グループ、糖タンパク質合成化学グループ、糖鎖構造情報化学グループの3つの研究グループを有機的に連携させることで、プロジェクト全体として糖タンパク質のフォールディングを含む品質管理機構の解明に焦点を当てようとしたものであった。

糖鎖生物機能化学グループでは、糖鎖の生合成に関与する高マンノース型およびこれに関連する糖鎖を、有機化学的手法を駆使して巧妙に合成する技術を開発することが計画された。加えて、このように構造が厳密に定義された糖鎖ならびに関連化合物を用いて、タンパク質の機能発現、フォールディングに関わる未解明の課題に挑戦する戦略が練られた。糖タンパク質合成化学グループでは、エリスロポエチンやインターロイキン等のサイトカイン類を有機化学的に全合成し、これを用いて糖鎖がタンパク質に与える影響を解明することで、糖タンパク質創薬へ向けた知見

の蓄積に役立てることを目指した。糖鎖構造情報科学グループでは、他の2グループが解き明かす、糖鎖の構造と機能の相関を、細胞レベルで可視化解析するために、糖鎖分子の細胞内動態をモニタする分析技術、ならびに糖タンパク質の三次元形状の可視化技術の開発が計画された。

このように本プロジェクトでは、有機合成化学という共通基盤の上に立つ各研究グループが、各々の領域で独創的かつ挑戦的な新規方法論の創出を含む独立した活動を行いながら、互いに連携し、糖鎖機能の明確化という長年の課題に挑戦してきた。伊藤研究総括や梶原グループリーダーらが構築してきた糖鎖合成法、糖タンパク質合成法に立脚した計画は、技術的な優位性を活かした独創性の高いものと評価できる。有機化学合成を駆動力に、構造解析および生体機能解析と合わせ三位一体で研究を進めたことで、糖タンパク質の品質管理機構に関する研究の飛躍的な進展が見込まれると同時に、糖タンパク質の新しい機能の発見など新しい展開も想定され、5年というプロジェクト期間で実施するに相応しい内容だったと言える。

### 1-3. プロジェクトの運営

本プロジェクトでは、糖タンパク質合成化学グループは大阪大学に、糖鎖生物機能化学グループおよび糖鎖構造情報化学グループは理化学研究所（和光）内に、それぞれ研究拠点を有していた。地理的には東西に分かれた拠点構成だが、いずれも我が国を代表する研究組織であり、ERATOのような大型プロジェクトの運営には精通している。互いに高い独立性と専門性を有する各研究グループであるが、相互の密な連携が研究成果の創出に役立ったと認められる。当初の計画に従って、サイト間の研究打ち合わせを毎月一回理化学研究所に集まって実施し、理化学研究所サイト研究者全員と大阪大学サイト数名が参加した。参加者全員が各自一月分の実験データを発表し、問題点や改善策を議論するとともに研究の進展状況を共有できる体制が採られていた。本プロジェクトでは合成（準備）した試料の研究グループ間での有効活用がプロジェクトの成否を大きく左右すると考えられたが、その点では十分な配慮がなされたと言える。その他には、群馬大学（松尾一郎教授）および成蹊大学（戸谷希一郎准教授）でも質の高い共同研究が展開されており、プロジェクト全体に良い作用をもたらしたと言えよう。プロジェクト終了後も、これらの成果を統合していくことにより、糖鎖機能の解明という大きな目標を達成できる十分な体制が構築されており、プロジェクト運営は研究総括のリーダーシップのもと効果的に行われたと認められる。

〔研究プロジェクトの設定および運営〕 a（的確かつ効果的である）

## 2. 研究の達成状況および得られた研究成果

### 2-1. 糖鎖機能生物化学グループ

糖タンパク質における糖鎖構造が生命現象にいかに関与しているかは、未だ完全に解明されていない未知領域と言える。本研究グループにおいては、糖鎖合成におけるオリジナルな基盤技術の開発とそれを用いた糖タンパク質品質管理関連タンパク質の機能解明が、車の両輪のごとく展開されている点の特徴である。糖タンパク質は、小胞体において、まずペプチド鎖に糖鎖が付加されるが、これだけでは機能を発揮せず、ペプチド部分が正確に折りたたまれて初めて機能するようになる。このようなフォールディング過程においては、しばしばミスフォールディング等の望まない現象が起り、生体の恒常性維持に大きな影響を与えることが知られている。しかしながら、これまで均一な糖鎖構造を持った糖タンパク質を調製することは困難であったため、タンパク質のフォールディングと糖鎖構造の関連性を定量的に解析することは出来なかった。本グループは、有機合成化学を駆使することで得られた基盤技術を用いて、糖タンパク質フォールディングの問題について、化学の視点からより深い理解に到達している。

本研究グループでは基盤技術の開発面において具体的に次のような研究成果をあげた。（1）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ーの構築、(2) 限外濾過法によるレクチン-糖鎖結合解析法の開発、(3) ミスフォールド類似糖タンパク質の合成、デコイ型基質の合成、5-チオ-グルコシル化 (5S-Glc) を有する糖鎖の合成等の分子プローブの開発、(4) 糖タンパク質 *in vitro* フォールディングシステムの開発。

化学合成法と酵素法を組み合わせたトップダウン型糖鎖合成法開発では、高マンノース型糖の非還元末端を、グルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンという3種類の異なる単糖で保護し、それらに対応する糖加水分解酵素で選択的に除去するという大変ユニークな合成戦略に沿って、高マンノース型糖鎖のライブラリー構築に成功した。出発原料となる14糖の有機化学的合成には、伊藤研究統括が長年にわたり開発した選択的グリコシル化法が駆使された。これら高マンノース型オリゴ糖が十分量調製できる体制が整ったことは、本プロジェクト全体の推進に大きく貢献したと考えられる。その戦略と成果は卓越しており、世界の最先端をリードする技術と言える。また、本研究を遂行する過程で、ガラクトースの酵素的なトリミングの効率が悪いという予想外の結果に遭遇し、これに対して酵素反応にとらわれることなく、酢酸という温和な酸で脱保護可能なイソピリデン基に保護基を置き換えることにより、この問題を見事に克服するなど、適切な改良もなされた。

さらに、上記の方法により調製した糖鎖ライブラリーに属するオリゴ糖の還元末端を蛍光標識し、各種レクチンとの会合定数を求めることにも成功した。本手法は既存の等温滴定量計による定量結果と一致することから、新しい方法論として高い有用性が期待される。特にここでは、本プロジェクトが高純度の合成糖鎖ライブラリーを保有している点が有利に働き、本法を用いて生体成分の糖鎖認識親和性の研究を今後幅広く展開することができると考えられる。その結果、これまで知られていなかった様々な生体成分について、その糖鎖親和性を明らかにすることが可能になると期待される。

一方、糖タンパク質品質管理機構の解明に関しても、次のような数多くの研究成果をあげている。(1) ミスフォールドした糖タンパク質上の非グルコシル化糖鎖 (Man9) に対してグルコースを1残基転移する酵素である UGGT に関して、デコイ型基質を用いて UGGT の高マンノース型糖鎖認識機構を解析し、UGGT の糖転移活性に及ぼす疎水性置換基の影響を明らかにした。(2) Sep15 (セレノタンパク質) が UGGT の糖転移反応を促進することを示した。(3) これまで機能が不明であった UGGT2 (UGGT1 のアイソフォーム) が糖転移酵素活性を有することを見いだした。

(4) カルネキシン (CNX) のホモログであるカルメギン (CMG) がモノグルコシル化糖鎖を認識することを示した。

このような糖タンパク質品質管理機構の解明に関する一連の研究では、タンパク質表面の任意の位置の疎水性をコントロールすることで、ミスフォールド疑似タンパク質を合成する手法が大きな役割を果たした。その基盤となっているのは、アグリコンにメトトリキセートを持つ高マンノースオリゴ糖を有機化学的に合成し、ジヒドロ葉酸還元酵素との複合体を形成する技術である。疑似タンパク質として調製するミスフォールドした糖タンパク質にグルコースを転移する UGGT が、タンパク質の変性部分と糖鎖構造を同時に認識することを示した点は、品質管理機構において提唱されてきたことを証明する実験的知見を提供するものであり、化学合成を土台とする本プロジェクトならではの成果と言える。特に UGGT の認識がミスフォールディングによる疎水性部分の露出であるという説は、他の多くの基質タンパク質にも一般化できるかどうか極めて重要である。疎水性部分の露出がミスフォールディングの目印であるということを示唆する最新の実験結果も得られており、さらに一般化できれば、UGGT がほとんど全てのタンパク質のミスフォールディングを検出できる理由を解き明かしたことになる。酵素学的には、ミスフォールドしたタンパク質の疎水性部分に UGGT が近づくことによって、三次元的あるいは四次元的変化を誘導し、アロステリックにグルコースを転移することが証明されれば魅力的である。今後、糖タンパク質合成化学グループの成果を活用して、結晶構造解析などで仮説が実証できると一般化への展開が拓けると期待される。

有機合成化学的手法の最大のメリットは、フラスコ内での大量合成が可能なことである。本研究グループで開発された手法でも、前駆体である 14 糖を任意のスケールで調製することができ、また、その後のトリミング反応も、比較的安価に大スケールの処理が可能で糖加水分解酵素を用いている点から、ある特定のオリゴ糖の大量調達が可能になると考えられる。このことは今後、糖鎖生物学的な研究のスケールを格段に広げることになるであろう。糖残基を保護基として使用する例はこれまでも報告例はあるが、本研究によって今後より一般的な手法として普及することを期待したい。研究目標に掲げられた合成の迅速化と完全な選択性の実現については、さらなる研究の進展が期待される。糖鎖合成化学では“完全に選択的でユニバーサルなグリコシル化反応の開発”という究極の目標にどれだけ近づけたかが重要であり、プロジェクト終了後も成果の更なる積み上げを期待したい。

本研究グループの成果は、外部発表を見ても、国際的にインパクトファクターの高い *Angewandte Chemie* 誌に掲載されるなど、国内外で高く評価されていることが分かる。予備評価の段階において投稿準備中であった、分子プローブを用いた研究成果ならびに糖タンパク質品質管理機構の解明に関する研究成果は、いずれも論文発表に至ったことも評価できる。

## 2-2. 糖タンパク質合成化学グループ

糖タンパク質と糖鎖の関連性を精密に解析することは、極めて重要なテーマであり、そのためには、構造が明確な糖タンパク質を大量に調達する必要がある。これまでも、国内外の他の研究者により糖タンパク質合成に関する研究が報告されているが、本研究グループにおいては、オリゴ糖が結合したペプチド断片を用意し、これに他のペプチド断片を順次結合させて、全長型の糖タンパク質へ導く方法論が採用されているのが大きな特色である。高マンノース型糖鎖を効率よく卵黄から調製する基盤技術を確立し、そこから得られたオリゴ糖を用い、固相合成法による糖ペプチド合成と *Native chemical ligation* 法により、全長糖タンパク質を合成した。得られた糖タンパク質を、空気酸化条件下で意図的にミスフォールドさせることにより、UGGT の基質となる不良タンパク質を調製することにも成功した。純粋に化学的な糖タンパク質合成は、有機合成化学における長年の夢であった。その中で、生物活性を示す糖タンパク質の化学合成に世界で初めて成功したことは、基礎科学の観点から特筆に値する。

UGGT はミスフォールドした糖タンパク質を見つけ、M9-マンノース型糖鎖末端にグルコースを一残基転移するセンサー酵素である。このモノグリコシル化が目印となり、レクチン様分子シャペロンであるカルネキシン・カルレティキュリン (CNT/CRT) が介助する再度の折りたたみが行なわれ、効率的にネイティブ構造の糖タンパク質が生産されることが知られている。このきわめて重要な役割をもつ UGGT の作用機構の詳細は不明であったが、本グループでは M9-糖鎖を有するミスフォールド糖タンパク質の合成に成功したことで、UGGT の基質認識機構を解析することが可能となり、以下のような成果を挙げている。(1) ジスルフィド結合の認識：分子内ジスルフィド結合を二本持つ *Interleukin 8 (IL-8)* をモデル糖タンパク質として、ジスルフィド結合で分子間架橋されたミスフォールド型二量体に対して、UGGT は基質として認識することを示した。(2) 一方、*Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)* をモデル糖タンパク質とした場合、UGGT はミスフォールド型だけでなく、ネイティブ型に対しても、弱いグルコース転移が認められた。この結果は MCP-1 ではネイティブ型でもランダムコイル性が高く、比較的柔軟な高次構造を取ることが理由と考えられた。(3) M9-IL8 ペプチド (34-72 番目のアミノ酸残基より成る) の一つのリジン残基を 9 種類の疎水性アミノ酸に変換した糖ペプチドはいずれも、UGGT によって野生型ペプチドより速いグルコース転移を受け、UGGT による基質認識における疎水性残基の重要性が示された。(4)  $^{15}\text{N}$  安定同位元素を導入した糖鎖を付加した IL-8 と UGGT の相互作用を核磁気共鳴法で解析し、特定のアミノ酸残基のケミカルシフトのみが、糖ペプチドと UGGT との混合比変化に対応して変化することを見出した。(5) モデル糖タンパク質として、高次構造研究の進展してい

るタンパク質 Crambin に M9 糖鎖を導入し、UGGT によるフォールディング中間体の認識を調べた実験では、野生型および 6 個含まれるシステイン残基の一つをセリンに置換した変異型の両者を、UGGT は区別することなくグルコース転移することが示された。(6) 本来 M9 糖鎖を三本含むエリスロポエチンに、M9 糖鎖を一本だけ（それぞれ 24, 38, 83 番目のアミノ酸位置に）導入した合成糖タンパク質を作製し、UGGT と糖鎖欠損型の糖タンパク質との相互作用を調べたところ、正常にフォールディングされた三種類全ての糖鎖欠損エリスロポエチンにグルコースの転移が確認された。この結果からエリスロポエチンではポリペプチドの立体構造がネイティブ型でも、親水性を持つ糖鎖が欠損すると疎水性面が露出して、ミスフォールド型と認識されることが示唆された。

このようにミスフォールディングを模した人工糖タンパク質を用いたアプローチは大変エレガントで世界に誇る技術と成果であり、本グループは、本プロジェクトの中でも突出した成果をあげたと言える。その中でも特に、ミスフォールディングによって露出した疎水性ペプチド部分が UGGT 認識のターゲットとなるという成果は、上述の糖鎖機能生物化学グループの成果と互いに支持し合うものである。疎水性露出という一点で、数知れないタンパク質のミスフォールディングを UGGT が認識できることを確かめるためには、今後、結晶構造解析による UGGT の三次元構造解明にアプローチすることが望まれる。なお、本研究では UGGT の基質認識機構、グルコース転移機構の解析に加えて、酵素反応の結果生じた生成物が、反応前の基質と比べて何らかの高次構造変化を起こしているか否か（例えばリフォールディング）について、小胞体画分による蛍光標識 M9-MCP-1 のフォールディング実験系等で検討しておくことは、UGGT-CRT によるリフォールディングシステム全体の分子機構を考える上で興味深いと思われる。さらに、生物的合成に比べて、有機化学合成の優位性を示す上でも、合成される糖鎖の均一性の差違がシャペロン認識において区別され得るのか等についても、今後さらに深く掘り下げた研究を期待したい。

上記の一連の研究は、現在医療応用されている糖タンパク質医薬品を、低分子医薬品と同じ基準で品質評価できる製品提供の実現可能性を示すものであり、実現すればその社会的貢献は極めて大きい。3ヶ所に糖鎖をもったエリスロポエチンが人工的に産生できれば、生物医薬品開発にすばらしい展開が拓けると考えられる。特に日本発の医薬品開発が強く期待されている現状からも、今後なお一層の研究の進展が期待される。さらに有機合成で作成した糖タンパク質であるからこそできる、エリスロポエチンの知られざる機能の提案にも今後期待が膨らむ。

### 2-3. 糖鎖構造情報化学グループ

本研究グループは糖タンパク質、糖脂質の変換過程と構造に注目し、有機化学、分析化学、生化学を融合する研究によって二つの課題、(1) ゴルジ体における糖鎖合成制御機構の可視化と極微量分析技術の開発と (2) 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構造解析に取り組んだ。

一つ目の課題については、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（定量限度フェムトモルオーダー）を開発することにより、これまで不可能と考えられてきた糖脂質が変換されていく過程の詳細を定量的に追跡することに世界に先駆けて成功した。本装置を用いて 6000 個程度の細胞について蛍光性糖脂質の変換過程の時間依存性を定量的に分析したところ、変換速度は予想よりかなり遅いことが明らかとなった。また、シアル酸転移酵素阻害活性を持つフッ化シアル酸と蛍光基を有する CMP-シアル酸類縁体を培養細胞の細胞質に導入したところ、従来ゴルジ体の一部と考えられていた未知の小胞にプローブが取り込まれる興味深い現象を観察した。シアリル化反応を阻害する分子の設計は、以前より知られている知見をもとになされており、蛍光性 CMP-シアル酸アナログの合成自体は、非常に洗練された合成経路を用いている。分子設計および合成アナログを用いた解析手法も的確である。これまで脂質が糖による修飾を受ける様子を動的に捉えた研究はほとんど皆無であるが、本研究では、綿密に分子設計されたプロー

ブを細胞に投入することで、時空間解析を実現している。このように人工的標識を施した糖脂質を用いて生体内の糖脂質の動態をシミュレーションする方法論は新しい構造解析法を世界に提供するものであり、糖質科学の将来の発展に与える影響は極めて大きいので、その有用性を実証する研究の進展が今後待たれる。さらに、この方法論を用いることによって、糖脂質の脂質鎖による分子種多様性は、糖脂質による細胞膜組織形成において、どのような役割と意義があるのかという、最もミステリアスで魅力に富んだ命題に対しても、新たな展開を導くことが今後期待される。

本研究グループでは、この一つ目の課題の中で、当初予定していなかった、質量分析法に基づく光学異性体の解析技術の開発にも成功している。遊離糖のアノメリック情報 ( $\alpha$  体か  $\beta$  体か) は、旋光性以外には、これまで質量分析法を含む多くの方法で識別不可能と考えられてきた。本研究では、質量分析条件下において、ナトリウムの配位の強弱を単糖に関して得ることに成功しており、光学異性体の絶対配置解析に関して全く新しい技術を提供した点で特筆すべきである。

二つ目の課題については、1分子の糖タンパク質の表面構造を明らかにするため、原子間力顕微鏡の探針の先鋭化に取り組んだ。AFMは分子の形状、表面構造を画像化することを得意とするが、電子顕微鏡等に比べて分解能が低いという弱点がある。これを克服するため、探針を先鋭化し解像度を上げたうえで、カンチレバーのシクロデキストリンをコア構造とする dendrimer-1 分子による修飾探針を作成し、糖タンパク質 (RNase B および asialofetuin) 表面の特徴的な構造を観察することに成功した。さらに、この方法を UGGT1 に適用し、高解像度 AFM 像の取得に成功した。これと同時に質量分析により UGGT1 のアミノ酸配列 (1557 残基) を決定し、その 3ヶ所に糖鎖付加部位があることを見出した。更に、そのうちの一カ所について糖鎖構造の解析を行い、比較的短い高マンノース型糖鎖 (Hex5-Hex7) が含まれること、それらの割合は、ラット、ブタ、ウシ、ヒトでは異なること等を示した。この UGGT1 の糖鎖構造解析は大変きれいな成果であり、この成果をもとに、癌化による変化・老化に伴う変化・疾患と UGGT1 の変化等の生物学的アプローチへの将来展開が期待される。AFMによる単一分子の三次元構造解析では、測定の過程で糖タンパクが変性していないか、その生物活性を求めるのは難しいと考えられるが、熱変性や化学変性させたサンプルを比較することで、道が拓けると思われる。このように原子間力顕微鏡の探針の化学修飾による糖タンパク質表面マップ作製の技術開発は、糖タンパク質の高次構造解析において特色ある成果を創出しており、今後一層の発展が見込まれる状況にある。

本グループの細胞内の複合糖質（この場合は糖脂質）や糖タンパク質のフォールディング状態の AFM による可視化の試みなどが成果として現れ、プロジェクト全体へ貢献したと考えられる。質量分析等により糖タンパク質の構造を、配列・立体化学を含めて決定する手法の開発は、極めて挑戦的であるが、まだ検証段階であるので、基本構想にも挙げられた、単一構造の糖鎖を持つ糖タンパク質の構造解析法の確立や、三次元構造を持つ糖タンパク質と変性糖タンパク質の作り分けの実現に向けては、今後、明らかにすべき目標を明確に設定し、重要な課題に集中的に取り組むことが必要と考えられる。信頼性の高い定量的なデータを得るためには、さらに克服すべき課題は多いと感じるが一定の成果は出つつあり、実用化すれば、その社会的利益は極めて高い。

本研究グループの研究成果は国際的にレベルの高い学術雑誌に掲載されており、その中の一部はニュースやハイライトにも取り上げられていることから、客観的に多くの科学者の関心と呼んでいることが分かる。また、物質の構造解析方法に関する特許も取得している点は評価できる。

以上に基づき研究成果を俯瞰すると、研究グループごとに進め方に特徴が見られるが、いずれも力強い進展を示しており、目標に対する達成度は高い。3つのグループがいずれも小胞体における糖タンパク質の品質管理機構、中でも糖タンパク質のフォールディングセンサー酵素として糖タンパク質の品質管理において中心的な役割を持つ UGGT の構造と機能に関する研究に焦点を当て、研究を大きく進展させたことは特筆すべき成果と評価できる。

本プロジェクトは、有機合成化学的な物的・人的資源を利用して準備された厳密に量的ならび

に質的に定義できる糖鎖およびタンパク質を駆使する研究であり、従来からのバイオロジー研究とは一線を画すものである。本プロジェクトで開発された糖タンパク質の化学合成技術は糖鎖研究の分野において世界に誇れるものであり、インターロイキンやエリスロポエチンなど、生物医薬品として巨大市場を形成しているサイトカイン類の化学合成が現実のものとなりつつあることを実感させる。このことは、生物医薬品の製造に関して、パラダイムシフトを起こす可能性のある極めて重要なトピックスであり、今後の展開が大いに期待される。原子間力顕微鏡やゴルジ体糖鎖生成過程の可視化などの分析化学的手法の開発も急速に研究が進んだことから、今後一層の改良により、細胞内での糖鎖の挙動の解明に大きく貢献するものと期待できる。

原著論文、招待講演、国内外の学会発表など ERATO 研究期間に行った外部発表は、数の上では良好な実績である。

特許出願は一件と多いとはいえないが、知財化が有望と思われる成果も認められるので、今後の研究においても積極的な権利確保に努めてほしい。糖鎖機能の解明に該当する成果がまだ十分とは言えないが、化学合成によって得られた糖タンパク質からこれまで知られていなかった糖鎖機能が見出されれば、糖鎖の有機合成法の価値が認知され、さまざまな研究分野への波及効果は計り知れない。

〔研究の達成状況および得られた研究成果〕 a+（十分に高い水準にある）

### 3. 研究成果の科学技術、社会・経済への貢献

#### 3-1. 科学技術への貢献

糖鎖科学研究は、ファジーで未知の部分が多いが、世界中の研究者が、未来のライフサイエンスの中核の一つとして注目していることから、その重要度は極めて高い。しかし、有機合成化学を基軸とする本プロジェクトのような戦略は採られておらず、その意味において、本プロジェクトが国際的に先導的なものであることは疑いの余地がない。特に、タンパク質の正常な機能発現にかかわる根源的な課題と考えられる、糖タンパク質の品質管理機構について、従来の研究の延長では到達し得なかったステージに達しており、本プロジェクトで築かれた土台はライフサイエンスの新しい源流となって展開して行くと考えられる。

本プロジェクト研究の成果は、糖鎖科学にとどまらず、生命科学における有機合成化学の力量を実証した点でも特筆に値する。本プロジェクトのこれまでの成果は、化学の分野で国際的に極めて高い評価が得られるものである。本研究期間内に生み出された具体的な化学技術としては、オリゴ糖鎖の大量合成法の確立、均一な糖タンパク質の調製法の確立、糖鎖と糖タンパク質の相互作用測定法の確立などを挙げることができる。これらの成果は、これまで個々の研究室レベルで行われてきた糖鎖化学研究では成し得ないものであり、本プロジェクトで各研究グループの能力を結集した取り組みによって初めて達成されたものと言える。

異分野への波及効果としては、AFM による糖タンパク質 1 分子表面構造観察技術は新しい科学技術の流れを生み出す可能性があるが、このような新しい技術が革新的な流れに至るかどうかは、これからの展開に負う部分も少なくない。まだ最終結果が出ていない内容については、今後の成果の取り纏めに期待したい。

#### 3-2. 社会・経済への貢献

本プロジェクトで開発された有機化学に基づく糖タンパク質の調製技術は、これまで細胞を用いる調製法に頼っていたバイオベンチャーや製薬会社において、革新的な創薬技術開発の基礎として貢献することができるであろう。サイトカインに属するインターロイキン、エリスロポエチンの化学合成の成功は、生物医薬品の化学合成に一定の道筋をつけたと言え、これまでにない



品質のバイオ医薬品の実用化につながる技術として高く評価できる。

糖タンパク質のフォールディングを含む品質管理機構は、細胞の恒常性維持に必要不可欠であり、このシステムの破綻はさまざまな疾患と関連すると考えられる。このようないわゆるフォールディング病の中には、我が国を含む先進国が先導的に取り組まなくてはならないアルツハイマー症候群など、社会的に極めて重要な疾患が含まれる。本プロジェクトは、これらの疾患に対する直接的な治療法の開発を目指すものではないが、UGGT の機能解析等の成果によって、将来のフォールディング病治療薬の開発へつながる基盤を作ったと言えるであろう。

本プロジェクトでは、糖タンパク質の生合成に関わる品質管理機構の解明を中心とした研究の中で、パラダイムシフトを起こす契機となるような成果も芽生えつつある。これらの成果を伸ばし社会・経済に貢献するためには、これまでに得られた結果を精査し、さらに一段研究を進める必要がある。例えば糖タンパク質医薬品の化学合成への適用を進めるには、高マンノース型糖鎖に限定せず多様な糖鎖を有する糖タンパク質への応用を検討するなどの取り組みが必要であろう。糖鎖合成技術についても、一般の化学研究者が参加できるような簡便で効率の良い技術へと改良する等、なお一段の工夫が期待される。

〔研究成果の科学技術、社会・経済への貢献〕 a+（十分な貢献が期待できる）

#### 4. 総合評価

糖タンパク質が正しく折りたたまれ機能するようになるまでの過程において、糖鎖が極めて重要な役割を担うことが近年の研究により明らかとなってきている。しかし、糖鎖のデザインは遺伝子という設計図に直接従うのではなく、糖鎖合成関連酵素群の協調的な働きにより二次的に生合成されるがゆえに、本質的に不均一性を有する。従って、天然由来の糖タンパク質の解析に依存する従来の研究手法にはこれまで大きな制約があった。糖鎖の機能を定量的かつクリアカットに解析するためには、完全に定義された厳密な構造を有する糖鎖を利用して研究を進めることが不可欠である。糖鎖はバイオテクノロジーなどのタンパク質工学を用いた手法により大量合成することは現状でも、また恐らく近い将来でも不可能である。それゆえ、利用できる極微量の糖鎖に対応できる定量性の高い超高感度の糖鎖解析法が要求される。本プロジェクトはこのような糖鎖研究が抱える諸問題を解決するための突破口となることを目指したものである。そのためには有機化学を基盤とした糖タンパク質の合成・構造解析・生体機能解析を組み合わせた糖鎖研究が必要であり、3つの研究の柱が有機的に連携した本プロジェクトの活動は従来の糖鎖生物学研究とは一線を画す、まさに「グライコトリロジー」と呼ぶに相応しい多くの成果を生み出し、今後の本分野の潮流となったと言える。

本プロジェクトでは、各研究グループが長年にわたって培ってきた有機合成化学領域における糖鎖合成ならびに糖タンパク質合成の技術を基盤に、糖タンパク質ライブラリーを構築し、さらに質量分析や核磁気共鳴などにおける最先端技術を駆使することにより、これまで不明であった糖タンパク質の立体構造形成について、多くの新しい知見を得ることに成功した。各グループの努力が実り、実験材料の調製方法、新規のアッセイ系の確立をもとに、数多くのデータが蓄積されているので、今後の進展も大いに期待される。ここで得られた成果は、タンパク質の立体構造や糖鎖構造の異常に起因する種々の疾病の治療に役立つ基盤となるものである。本プロジェクトでは、既にエリスロポエチンを始めとするサイトカイン類のような比較的分子量の糖タンパク質の全合成に成功し、またそれらのフォールディング制御に関する重要な成果も多く集積しており、その知見は合成糖タンパク質医薬品の開発に将来大きく貢献するものである。

伊藤研究統括のもとでは、若手研究者がそれぞれの持ち味を活かしながら、糖科学における重要な基盤技術の開発に成功しており、既に本プロジェクト終了に合わせて転出し、独立した研究

室を主宰している研究者も多く、本プロジェクトのような環境で研究活動を進めたプロジェクト構成員が次の糖鎖科学のリーダーとなることを、今後期待を持って見守りたい。本プロジェクトの成果が科学技術の流れの中で極めて大きな貢献をしたと位置づけられるようにするためにも、合成糖鎖等の研究資産を普及させ、糖鎖科学研究全般を高めていくことにも、今後努力が注がれていくように期待したい。

以上を総合すると、ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトは、卓越した研究水準を示し、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する。

各評価委員の総合評価は上記評価に良好に収束した。一方、本プロジェクトの最大の成果は、糖鎖生物学分野でこれまで蓄積した実験事実から考えられてきた「糖タンパク質の小胞体内合成過程とその品質管理機構(Quality Control System)」に関する仮説が大筋正しいことが純品糖鎖を用いた分子レベルの実験からも支持されたことであり、糖鎖合成経路や品質管理機構の知見を各段に進展させる、あるいは変革するような画期的な発見が得られているとは言い難いのは残念である、とのコメントもあった。

〔総合評価〕 A+（十分な成果が得られた）

以上