

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成14年度採択研究代表者

伊藤 幸成

(理化学研究所 主任研究員)

## 「糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明」

### 1. 研究実施の概要

#### ◆全体的な概要と代表者の研究実施状況及び展望

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

研究代表者のグループで行なわれてきた糖タンパク質糖鎖の合成研究により、様々なアスパラギン結合型糖鎖（高マンノース型）の精密合成が可能になっている。本研究はそのポテンシャルを最大限に活用し、種々の高マンノース型糖鎖やその部分構造、更にそれらを含む糖タンパク質の有機化学的創成を行ない、品質管理機構における糖鎖の役割を解明する。その手始めとして14年度は小胞体内分子シャペロン（カルネキシン、カルレティキュリン）のリガンド糖鎖12糖（ $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ）の化学合成を達成した。タンパク質品質管理における従来の研究は構造の不明確な糖タンパク質を用いて行なわれてきたものが殆どであることから、詳細については大部分が不明であり様々な見解の不一致も見られる。それに対し合成糖鎖、糖タンパク質を自在に造り出す手法を推進力とする本研究の実施により糖タンパク質品質管理の分子機構について明確な理解が得られることが期待できる。

#### ◆共同研究者の参画状況と今後の展望

##### 長崎大 井原グループ

14年度は小胞体糖鎖プロセッシング阻害剤であるカスタノスペルミンによる、膵β-細胞株（MIN6）のインスリン分泌機構への影響について解析した。また、カスタノスペルミン処理により、糖タンパク質品質管理に関わる小胞体分子シャペロンであるカルレティキュリン、カルネキシンの時間依存性の発現誘導を確認した。15年度以降は、インスリン細胞内含有量の変化の分子を中心に解析する。また、小胞体分子シャペロンであるカルレティキュリン、カルネキシン発現の細胞分泌機構への影響について解析を行う。さらに、伊藤グループにより合成された種々の新規合成糖鎖を用いて、カルレティキュリン、カルネキシン特異的なシャペロン機能阻害糖鎖や小胞体マンノシダーゼの機能阻害糖鎖の細胞機能評価に関する検討を行う。

### 名市大 加藤グループ

14年度は、新生糖タンパク質の立体構造形成を担う分子シャペロン・カルレティキュリン（CRT）、糖タンパク質の小胞輸送を司るカーゴレセプター・VIP-36/ERGIC、および糖タンパク質の分解に関わるユビキチンリガーゼ・Fbx1に着目し、大腸菌によるmgオーダーの大量発現系を山本グループ・田井グループとの共同研究により構築した。これら糖鎖認識分子のNMR解析のための基礎検討を行なった。その後、伊藤グループが糖鎖ブロックを縮合させることにより合成した様々な糖鎖リガンドを用いて相互作用解析を行なっている。

### 東大 鈴木グループ

品質管理機構において高次構造不全のタンパク質から遊離した糖鎖は細胞質において代謝され、最終的にリソソームにとりこまれて分解される。その代謝経路の分子機構は殆ど不明である。本研究では代謝機構に関わる分子の同定と代謝経路の解明を目指し、とくにリソソーム上にあるトランスポーターの同定を目標とする。

ERGIC53やVIP36といった細胞内レクチンはタンパク質の輸送に関わることが示唆されているものの、その詳細な機能については不明である。そこでそれらのタンパク質発現および分泌のプロファイルを解析する。

### 臨床研 田井グループ

脳における糖鎖結合タンパク質を検索し、新規なユビキチンリガーゼSCF<sup>Fbx2</sup>を見いだした。更に詳細に検討した結果、SCF<sup>Fbx2</sup>はN-型糖鎖を認識すること、基質タンパク質の一つはインテグリンβ1であること、糖タンパク質の品質管理に関与することが明らかになった。現在糖鎖を認識するユビキチンリガーゼファミリーの全貌の解明を目的として、Fbx2とそのホモログの詳細な機能解析を行なっている。

### 東大 山本グループ

小胞体内で合成された分泌タンパク質は、正しくフォールディングされた後、ゴルジ体を経て細胞外へ運びだされる。この過程に係わるのがERGIC-53、VIP36とよばれるcargo receptorである。14年度にはVIP36の糖鎖に対する親和性を調べ、酸性になるに従って親和性が上昇することを見出した。

今後はcargo receptorそのものの糖鎖認識部位の改変やCNX、ERGIC-53、VIP36、Fbx2など品質管理に関わる糖鎖認識タンパク質が、どの程度厳密にフォールディング不全のタンパク質を制御しているのかを知るため、糖結合特異性(親和性の相違)を明確にして行く予定である。

## 2. 研究実施体制

### (1) 理研 伊藤グループ

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

(2) 長崎大 井原グループ

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

(3) 名市大 加藤グループ

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

(4) 東大 鈴木グループ

- ① 研究分担グループ長：鈴木 匡（東京大学大学院理学系研究科、科学技術振興特任教員）
- ② 研究項目：細胞内トランスポーターの解析、細胞内レクチンのバイオインフォマテイクス解析

(5) 臨床研 田井グループ

- ① 研究分担グループ長：田井 直（東京都臨床医学総合研究所、部長）
- ② 研究項目：糖鎖を認識するユビキチンリガーゼファミリーの構造と機能解析

(6) 東大 山本グループ

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