

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成 14 年度採択研究代表者

伊藤 幸成

((独) 理化学研究所中央研究所 主任研究員)

「糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明」

## 1. 研究実施の概要

糖タンパク質の品質管理機構は、小胞体、ゴルジ体から細胞質でのフォールディング、輸送、分解の過程を包括するものである。最近になり、これらの過程において糖鎖(特に高マンノース型糖鎖)が重要な役割を果たしていることを示唆する結果が次々と報告されている。本研究では研究代表者の糖鎖合成化学のポテンシャルを最大限に活用し、上記過程の詳細解析をめざしている。これまでに、小胞体内フォールディングに関わる Calreticulin 及び UGGT、輸送に関わるカーゴレセプター(ERGIC-53, VIP36)、分解に関わる Fbs1 及び PNGase の精密解析に成功している。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を更に進めることにより糖タンパク質品質管理の分子機構について明確な理解が得られることが期待できる。

## 2. 研究実施内容

伊藤グループ(理化学研究所)

糖タンパク質品質管理機構において、小胞体内レクチンシャペロン(Calnexin, Calreticulin)、グルコース転移酵素(UGGT)、グルコシダーゼ(G-II)から構成される Calnexin/Calreticulin(CNX/CRT)サイクルが中心的な役割を担っている。昨年度は CHO-MTX (CHO: Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Man<sub>8</sub>(B)GlcNAc<sub>2</sub>, Man<sub>8</sub>(C)GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>8</sub>(B)GlcNAc<sub>1</sub>) を合成し、UGGT (UDP-Glc: Glycoprotein Glucosyltransferase) の定量的解析を行った。18年度は研究の対象を G-II に移し、種々の CHO-MTX およびそのタンパク質(DHFR)複合体を用いる定量的特異性解析を行った。その結果、G-II の糖鎖特異性は従来信じられて来たものとはかなり異なっており、Glc<sub>1</sub>Man<sub>8</sub>(B)GlcNAc<sub>2</sub> は特に高い反応性を有していることが明らかとなった。さらに、CRT を共存させることにより、G-II が触媒する反応の速度は大きな影響を受けることも分かった。

糖タンパク質の小胞体内分解に関わる Peptide:N-glycanase (PNGase) の解析に有用なプローブの合成を行った。興味深いことに、糖鎖のハロアセタミド体が非常に強く PNGase を阻害することが分かった。共同研究者の鈴木らにより、その阻害様式が解明された。

以上に加えて、他グループとの共同研究に供するために種々の糖鎖プローブを合成した。その

具体的な内容については以下に記載。

井原グループ (長崎大・大学院医歯薬学総合研究科)

糖タンパク質の品質管理に関わるレクチン様分子シャペロンであるカルレティキュリンの小胞体局在化の制御機構について解析を進めた。カルレティキュリンは小胞体のみならず、ゴルジ体や分泌小胞分画にも存在することが明らかとなった。カルレティキュリンの小胞体への滞留、局在には C-末端アミノ酸の Lys-Asp-Glu-Leu 配列が重要であるが、N-末端側球状ドメインもまた重要な役割を果たす知見を得た。その分子機構として、カルレティキュリンの N-ドメインを介した BiP/GRP78 との相互作用による小胞体局在化が示唆された。さらに、Small interference-RNA を用いて細胞内 BiP の発現を抑制すると、カルレティキュリンの小胞体局在が減少し、細胞内の局在パターンが変化することから両者の相互作用の重要性が明らかとなった。

一方、伊藤グループとの共同研究で、 $\alpha$ -Glucosidase II に対する合成糖鎖基質 (Glc2Man9-MTX, Glc2Man7-MTX, Glc1Man9-MTX, Glc1Man8B-MTX, Glc1Man8C-MTX, Glc1Man7-MTX) の基質特異性に関する研究を進めた。その結果、 $\alpha$ -Glucosidase II は、GlcMan8B-MTX に最も高い反応性を示すことが明らかとなり、 $\alpha$ -Glucosidase II の糖鎖認識機構における階層的な糖鎖認識の序列と制御の存在が示唆された。今後、一連の新規合成糖鎖基質を用いることにより、 $\alpha$ -Glucosidase II の糖鎖認識機構の詳細が明らかになれば、カルネキシン/カルレティキュリンサイクルにおける分子シャペロン制御機構の解明に繋がるものと期待できる。

新規糖付加修飾として知られる C-マンノシル化トリプトファンは、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るが、その生理的意義は明らかでない。そこで、C-マンノシル化の TSR ペプチドにおける機能的影響と生理的意義を調べる目的で、マクロファージ細胞株を用いたシグナル伝達系の実験モデルで、合成 C-マンノシル化トリプトファン含有 TSR ペプチドの生理作用について解析した。その結果、C-マンノシル化 TSR ペプチドは、コントロールの TSR ペプチドと比べると、リポポリサッカリド (LPS) による細胞シグナル伝達に影響し、特に c-Jun Kinase 経路の活性化を増強し、細胞障害作用を示すことが明らかとなった。以上の結果は、C-マンノシル化が、タンパク質機能モチーフと考えられる TSR の細胞生理機能に影響を与え、その機能修飾に関わることを強く示唆した。

加藤グループ (名古屋市立大学)

1) VIPL の立体構造と糖鎖認識

VIPL はカーゴレセプターである VIP36 と高い相同性をもっており、糖鎖結合ドメインを有しているが、その糖鎖結合の詳細については明らかとされていない。高マンノース型の糖鎖ライブラリーを用いて VIPL との相互作用を FAC 解析によりおこなった。その結果、VIPL は VIP36 同様に、高マンノース型糖鎖内の主に D1 アームと結合し、D1 アームのグルコース残基の存在は VIPL との親和性を低下させることが判明した。また、VIPL の糖鎖認識ドメインの結晶化に成功し、予備的な解析結果ながら、低分解能の電子密度像を得ることに成功した (高エネ研 若槻壮市教授のグループとの共同研究)。VIPL は、VIP36 と同様に  $\beta$  サンドイッチ構造をしており、糖鎖結合部位や  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位

はよく保存されていることが明らかとなった。

## 2) ERGIC-53とMCFD2の相互作用解析

新生糖タンパク質の小胞輸送にかかわるカーゴレセプター**ERGIC-53**は血液凝固因子欠損症の原因遺伝子産物である。**ERGIC-53**はやはり血液凝固因子欠損症の原因遺伝子産物として同定されたタンパク質である**MCFD2**と複合体を形成することで小胞体からゴルジ体への第V因子、第VIII因子の輸送を制御している。しかしながら**ERGIC-53**と**MCFD2**の複合体による糖タンパク質輸送機構の詳細は未だ明らかとなっていない。そこで**ERGIC-53**の糖鎖および**MCFD2**との相互作用の構造的基盤を明らかにすることを試みた。高マンノース型ライブラリーを用いてFAC解析を行った結果、**ERGIC-53**は糖鎖認識の特異性が低く、マンノース5残基以上からなる高マンノース型糖鎖と幅広く結合し得ることが明らかとなった。またNMR解析の結果、**ERGIC-53**における糖鎖および**MCFD2**の相互作用部位は互いに独立であることが明らかとなった。以上のことから第V因子あるいは第VIII因子の輸送は、**ERGIC-53**による糖鎖認識と**MCFD2**によるタンパク質部分との相互作用を通じて担われていると考えられる。(東京大学 山本一夫教授のグループとの共同研究)

## 3) PNGase の PUBドメインとユビキチン鎖との相互作用解析

**PNGase** は細胞質において糖鎖を遊離させる酵素として機能しており、N末端領域に存在する **PUB** ドメインは小胞体関連分解に関与するタンパク質(ユビキチン、19Sプロテアソームサブユニット **S4** など) と結合することが報告されている。しかしながら、**PUB** ドメインとユビキチン鎖との相互作用様式についての構造的基盤はほとんど明らかとされていない。一連の酵素を用いて様々な鎖長のユビキチン鎖 (**Ub<sub>2</sub>**, **Ub<sub>3</sub>**, **Ub<sub>4</sub>**) を調製して、**PUB** ドメインの相互作用解析を行った。FAC解析の結果、ユビキチン鎖の鎖長の増大に伴って、**PUB** ドメインとの親和性が増大することが明らかとなった。また、ユビキチン鎖の **PUB** ドメイン上の結合部位を同定することに成功した。(大阪大学 鈴木匡助教授のグループとの共同研究)

## 鈴木グループ (阪大)

出芽酵母 **PNGase** とヨードアセトアミド基を導入した糖鎖プローブについて、さらに蛍光基を導入した新規プローブについて酵母への *in vivo* の取り込みや酵素活性の影響などについて解析を行った。その結果酵母によって効率よい取り込みはおこることが明らかとなったが、ERAD を指標にした酵素活性への *in vivo* 活性への影響については検討中である。

ショウジョウバエの **PNGase** 活性に関して、大腸菌および酵母における発現系を作成して活性の検討を行ったが、現在十分な発現系の構築ができない状況である。今後はバキュロウィルスを用いた発現系の検討を予定している。また、発現系が確立している酵母 **PNGase** の活性中心付近の残基をショウジョウバエ型に変えた mutants も各種作成しているが、これらの酵素に酵素活性がないも

のが多数見いだされている。このことから、ショウジョウバエの酵素が実際酵素活性を失っている可能性を考え、その場合重要なアミノ酸置換を各種アミノ酸置換酵素の解析によって明らかにしていく予定である。

#### 山本グループ（東大）

カーゴレセプター (VIP36, VIPL, ERGIC-53/MCFD2 を可溶性 4 量体として発現させ、これらの糖結合特異性を、サイトフローメトリーを用いた糖鎖による阻害実験により解析した。糖鎖は伊藤チームから供与頂いた。VIP36 と VIPL は特異性も類似し、M9 の高マンノース型糖鎖にもっとも強い親和性を示したのに対し、ERGIC-53 は M8B の糖鎖に特異的に結合した。カルネキシンは GM9 特異的であるので、カルネキシンから VIPL、VIPL から ERGIC-53 と積荷の糖蛋白質が受け渡されることが示唆された。一方、糖鎖プロセッシングが不完全なままゴルジに輸送された糖蛋白質は、VIP36 に結合し小胞体へと送り返されるものと予想された。

このVIP36と恒常的に相互作用する蛋白質として分子シャペロンBiPを同定したが、BiPと共沈降するVIP36に付加した糖鎖はendo H耐性であることがわかった。また、免疫電顕による観察においてもBiPとVIP36が相互作用している像が観察されたが、相互作用は小胞体でのみ観察され、ゴルジ体では見られなかった。このことから、BiPと相互作用しているVIP36は、ゴルジ体でフォールディングの不完全な蛋白質を捕まえたのち小胞体に逆輸送されたものであり、フォールディング不全の蛋白質をBiPへ効率良く受け渡すのに寄与していると考えられた。

カーゴレセプターからリガンドが解離するメカニズムは、生物学的意義を知る上でも重要である。MCFD2はERGIC-53と結合して不活性型から活性型に変化させるとともに、解離の鍵となる分子でもある。そこで、MCFD2とERGIC-53との相互作用を、pHやカルシウム濃度の違いによってどのように変化するかについて、表面プラズモン共鳴を用いて精査した。両者の相互作用はpH6-7の範囲で相違はなかった一方、カルシウム濃度により劇的に変化し、特に0.2-0.1mM、あるいはそれ以下の濃度では、親和性が100倍以上低下した。ERGICと呼ばれる細胞内小器官はさまざまな選別輸送に必須の領域といわれ、小胞体とゴルジ体に挟まれた領域であるにもかかわらず、カルシウム濃度は検出限界以下であるという報告がある。この報告に従えば、小胞体で積荷蛋白質を捕まえたERGIC-53は、低カルシウムのERGICに輸送されることにより、MCFD2が解離すると同時に積荷を手放すものと考えられた。

一昨年、マンノース 6 リン酸レセプターと相同のドメインを持つ酵母 Yos9p が、小胞体関連分解 (ERAD)に関わっているとの報告がなされた。そこでヒトオソログである OS-9 遺伝子を単離し、大腸菌で発現させ、可溶性画分に組み換え体蛋白質を回収した。PE 標識 4 量体を用い、糖結合活性を調べたところ、金属イオン非要求性でマンノースに結合すること、デオキシマンノジリマイシンやスライソニン処理で結合が上昇し、endo H 処理で結合が解除されること、また、マンノース 6 リン酸には結合せず、Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> の高マンノース型糖鎖に最も強く結合することが示された。この Yos9p は Hrd3p と複合体を作り細胞質側へフォールディング不全の蛋白質を送り出すと考えられており、哺乳動物細胞における ERAD への関与について、更なる研究を進める予定である。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「理化学研究所 伊藤」グループ

##### ①研究者名

伊藤 幸成((独)理化学研究所・細胞制御化学研究室 主任研究員)

##### ②研究項目

・糖タンパク質糖鎖、人工糖タンパク質の創製と糖タンパク質品質管理機構解明への応用

#### (2)「長崎大学 井原」グループ

##### ①研究者名

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研究者名

加藤 晃一(名古屋市立大学 教授)

##### ②研究項目

・NMRを利用した細胞内レクチンの糖鎖認識機構の構造生物学的解析

#### (4)「阪大 鈴木」グループ

##### ①研究者名

鈴木 匡(大阪大学 特任助教授)

##### ②研究項目

・細胞質における遊離糖鎖の代謝系の解析と糖鎖トランスポーターの同定およびショウジョウバエにおける遊離糖鎖の代謝機構の解明とその生理機能の解析

#### (5)「東大 山本」グループ

##### ①研究者名

山本 一夫(東京大学 教授)

##### ②研究項目

・細胞内レクチンによるタンパク質輸送機構の解明と新規 cargo receptor 創成による糖鎖利用技術への応用

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- Ishiwata A., Ohta S., Ito Y.: A stereoselective 1,2-cis glycosylation toward the synthesis of a novel N-linked glycan from the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *Carbohydr. Res.*, 341, 1557-1573, 2006
- Amin M. N., Ishiwata A., Ito Y.: Synthesis of asparagine-linked bacillosamine. *Carbohydr. Res.*, 341, 1922-1929, 2006
- Hanashima S., Inamori K., Manabe S., Taniguchi N., Ito Y.: Systematic synthesis of bisubstrate-type inhibitors of N-acetylglucosaminyltransferases, *Chem. Eur. J.*, 12, 3449-3462, 2006
- Totani K., Matsuo I., Ihara Y., Ito Y.: High-mannose-type glycan modifications of dihydrofolate reductase using glycan-methotrexate conjugates, *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 5220-5229, 2006
- Matsuo I., Totani K., Tatami A., Ito Y.: Comprehensive synthesis of ER related high-mannose-type sugar chains by convergent strategy, *Tetrahedron*, 62, 8262-8277, 2006
- Suzuki T., Hara I., Nakano M., Zhao G., Lennarz W. J., Schindelin H., Taniguchi N., Totani K., Matsuo I., Ito Y.: Site-specific labeling of cytoplasmic peptide:*N*-glycanase by *N,N*'-diacetylchitobiose-related compounds, *J. Biol. Chem.* 281, 22152-22160, 2006
- Ihara Y., Urata Y., Goto S., and Kondo T.: Role of calreticulin in the sensitivity of myocardial H9c2 cells to oxidative stress caused by hydrogen peroxide, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 290, C208-221, 2006
- Okunaga T., Urata Y., Goto S., Matsuo T., Mizota S., Tsutsumi K., Nagata I., Kondo T., and Ihara Y.: Calreticulin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum, modulates radiosensitivity of human glioblastoma U251MG cells, *Cancer Res.*, 66, 8662-8671, 2006
- Totani K., Ihara, Y., Matsuo I., Ito Y.: Substrate specificity analysis of endoplasmic reticulum glucosidase II using synthetic high mannose-type glycans, *J. Biol. Chem.*, 281, 31502-31508, 2006
- Yamaguchi Y., Nishimura M., Nagano M., Yagi H., Sasakawa H., Uchida K., Shitara K., Kato K.: Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region of human immunoglobulin G1 as revealed by NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta—General Subjects* 1760, 693-700, 2006
- Hayashida Y., Urata Y., Muroi E., Kono T., Miyata Y., Nomata K., Kanetake H., Kondo T., and Ihara Y.: Calreticulin represses E-cadherin gene expression in MDCK cells via slug, *J. Biol. Chem.*, 281, 32469-32484, 2006

- Tanabe K., Lennarz W. J., Suzuki T.: The cytoplasmic peptide:N-glycanase, *Methods Enzymol.*, 415, 46-55, 2006
- Ito M., Maruyama T., Saito N., Koganei S., Yamamoto K., Matsumoto N.: Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherins to inhibit NK cell cytotoxicity, *J. Exp. Med.* 203, 289-95, 2006
- Kajikawa M., Baba T., Tomaru U., Watanabe Y., Koganei S., Tsuji-Kawahara S., Matsumoto N., Yamamoto K., Miyazawa M., Maenaka K., Ishizu A., Kasahara M.: MHC class I-like MILL molecules are beta2-microglobulin-associated, GPI-anchored glycoproteins that do not require TAP for cell surface expression, *J Immunol.* 177, 3108-3115, 2006
- Kawasaki N., Matsuo I., Totani K., Nawa D., Suzuki N., Yamaguchi D., Matsumoto N., Ito Y., Yamamoto K.: Detection of weak sugar binding activity of VIP36 using VIP36-streptavidin complex and membrane-based sugar chains, *J. Biochem.* 141, 221-229, 2007

## (2) 特許出願

平成 18年度特許出願:1 件 (CREST 研究期間累積件数:3 件)