

糖タンパク質品質管理機構解明に向けた合成化学的アプローチ

戸谷 希一郎*¹

Synthetic Approach Toward Understanding Glycoprotein Quality Control System

Kiichiro TOTANI*¹

ABSTRACT :High-mannose-type oligosaccharides have been revealed to play important roles in protein quality control. A number of intracellular proteins, such as lectins, chaperones and glycan processing enzymes are involved in this process. These include calnexin (CNX) /calreticulin (CRT), UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), glucosidase II, mannosidase I, cargo receptors (VIP36, ERGIC-53), mannosidase-like protein (EDEM, Htm1p) and ubiquitin ligase (Fbs). They are considered to recognize high-mannose-type glycans with subtly different structures, although the precise specificities are yet to be clarified. In order to gain clear understanding of these protein-carbohydrate interactions, comprehensive synthesis of high-mannose-type glycans was conducted. In addition, two approaches to artificial glycoproteins having homogeneous oligosaccharides were investigated. Furthermore, a novel substrate of UGGT was discovered. With these synthetic oligosaccharides, quantitative analysis of CRT, Fbs 1 and UGGT were carried out.

Keywords : glycoprotein quality control, calreticulin, Fbs1, UGGT, synthetic oligosaccharide, high-mannose-type oligosaccharide, artificial glycoprotein

(Received September 25, 2008)

1. はじめに

ゲノムの解読により、ヒト遺伝子は予想より遥かに少ないことが明らかになった。この事実は翻訳後に修飾されるタンパク質が数多く存在し、複雑な分子ネットワークを形成している事を示している。糖鎖修飾は翻訳後修飾の代表例であり、多くの分泌タンパク質や膜タンパク質は糖鎖が付加された糖タンパク質である。これらの糖タンパク質糖鎖は、タンパク質の構造や機能と密接に関連しており、様々な生命現象において重要な役割を担う¹⁾。実際、糖転移酵素や糖加水分解酵素の異常が様々な疾患を引き起こすことが知られており、糖鎖が生命活動の維持に必須であることが窺える。しかし、どの糖鎖がどのような生命現象に必要であるかを定量的に解析した例は未だ少なく、現在も様々なアプローチが行われている。

しかしながらこのような研究を実施するにあたり、糖鎖サンプルの調製がしばしば問題となる。これまで、糖鎖の機能解明には生体試料から得られる糖鎖や糖タンパク質が多く用いられてきたが、生体内に存在する糖鎖は構造の不均一性を含んでいる上、そこから得られる糖鎖サンプルは微量である。これに対し糖鎖の化学合成には、得られるサンプルの量、構造の均一性、非天然型糖鎖を合成できる等、数々の利点が挙げられる。また複雑な分岐型糖鎖は、合成化学研究の標的としても非常に興味深い。我々は糖タンパク質糖鎖が生体内で果たす重要な役割の一つ、タンパク質の品質管理²⁾に注目し、これに関連する高マンノース型糖鎖³⁾やその部分構造⁴⁾の合成、人工糖タンパク質の創製⁵⁾に取り組んで来た。現在、これらの分子プローブを最大限に活用し、糖鎖機能の定量的な解析に取り組んでいる。本論文では、高マンノース型糖鎖及びその類縁体の有機合成をベースとした糖タンパク質の品質管理に関わる糖鎖機能の定量解析⁶⁾について、最近の結果を報告する。

*¹: 成蹊大学理工学部物質生命理工学科専任講師
(Instructor, Dept of Material and Life Science,
e-mail: ktotani@st.seikei.ac.jp)

2. 糖タンパク質品質管理機構

細胞にはタンパク質の高次構造の形成、輸送、不良タンパク質の分解等を監視する品質管理機構が存在している。これらの過程で中心的な役割を果たすのは、細胞質、小胞体、ミトコンドリアなどに存在する分子シャペロンと呼ばれるタンパク質群である。カルネキシン (CNX) 及びその可溶性ホモログ、カルレティキュリン (CRT)は、小胞体内の糖鎖を認識する分子シャペロンであり、新生糖タンパク質の高次構造形成に重要な役割を果たしている。本項ではこれらのレクチン様シャペロンを中心とした、CNX/CRT サイクルと呼ばれる糖タンパク質品質管理の概略を述べる (図1)^{2a)}。

新生タンパク質は小胞体に入ると直ちにN-結合型糖鎖 Glc3Man9GlcNAc2の付加を受ける。この糖鎖は小胞体内に存在するグルコシダーゼI (Glc'aseI) の働きにより、Glc2Man9GlcNAc2へとグルコース (Glc) を一残基切断される^{2b) 7)}。さらに、Glc2Man9GlcNAc2はGlc'ase IIによりGlc1Man9GlcNAc2、Man9GlcNAc2へと順次トリミングされる。この間、糖鎖を認識する分子シャペロンCNX及びCRTは、Glc1Man9GlcNAc2型糖鎖を認識し⁸⁾、ジスルフィドイソメラーゼと共同して糖タンパク質を正常な折り畳みへと導く⁹⁾。折り畳み未完成なMan9GlcNAc2糖タンパク質は、UDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素(UGGT)によりGlcを付加され、再びCNX及びCRTのシャペロン作用を受ける¹⁰⁾。この際UGGTは、折り畳み途上の糖タンパク質のみを基質とする事が知られてお

り、折り畳みセンサーとして機能している。このような Glc の切除と付加の繰り返し (CNX/CRT サイクル) によって最終的に正常な折り畳みを獲得した糖タンパク質のみが、レクチン活性を有するカーゴレプターによってゴルジ体へと運ばれる¹¹⁾。

一方、CNX/CRT サイクルで正常な高次構造を獲得できなかった糖タンパク質は、細胞質に逆輸送され分解を受ける (小胞体関連分解, ERAD)¹²⁾。折り畳み不完全な Man9GlcNAc2 型糖タンパク質は、小胞体内に存在するマンノシダーゼ I (Man'ase I)により Man8(B)GlcNAc2 型へとプロセッシングされ、マンノシダーゼ様タンパク質 (MLPs)¹³⁾によって小胞体から細胞質へと逆輸送される。続く細胞質における糖タンパク質の分解には、ユビキチン-プロテアソームシステムが主な役割を果たすと考えられている¹⁴⁾。近年発見された糖鎖を認識するユビキチン化酵素は¹⁵⁾、この経路を裏付けるものとして脚光を浴びた。アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルト-ヤコブ病等、様々な神経変性疾患の原因は、不用タンパク質の蓄積であると考えられており、ユビキチン化を介した分解機構との関連が注目されている。

新生タンパク質の30%以上は、正常な高次構造に至らず細胞内で分解されている。従って遺伝子の解析のみならず、その翻訳後の過程を理解しなければ、生命現象の解明には至らない。タンパク質の高次構造形成から分解まで、生命活動の根幹を成すタンパク質の品質管理機構の解明は、近年の生命科学における重要なテーマの一つである。

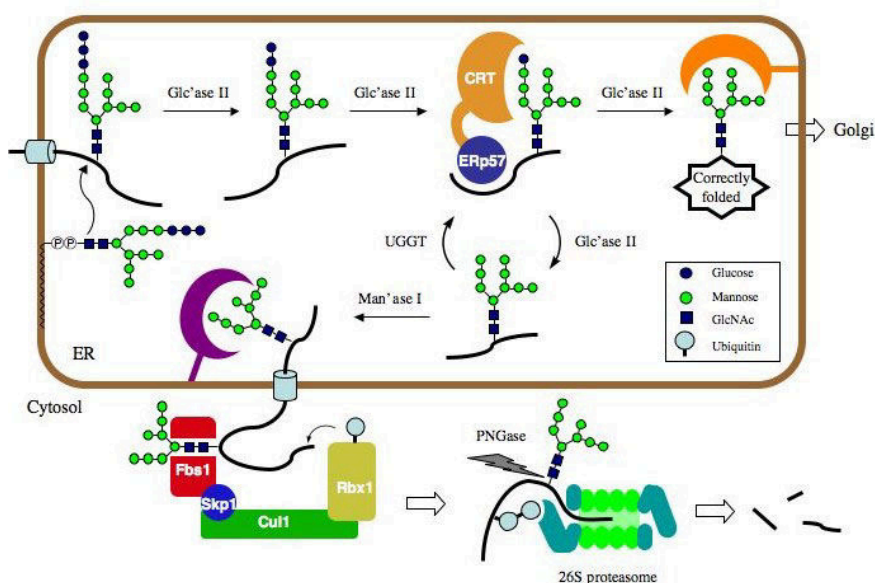


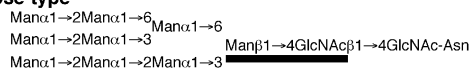
図1 糖タンパク質品質管理機構

3. *N*-結合型糖タンパク質関連分子プローブの合成

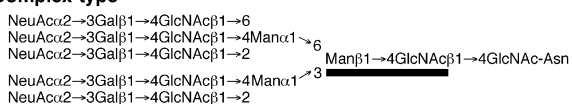
化学合成を用いれば原理的には均一構造のオリゴ糖を大量に供給することができるが、高マンノース型糖鎖のような複雑なオリゴ糖の全合成には、長期間を要し技術的な困難と膨大な工程数が伴う。具体的には綿密にデザインされた単糖フラグメントの調製、各フラグメントのカップリング、脱保護を繰り返しオリゴ糖合成を行っていくことになる。特に我々がターゲットとする *N*-結合型糖鎖の場合、その構造多様性ゆえに個々の糖鎖をひとつひとつ合成していくことは非常に手間のかかる作業である。このような困難を克服するためにパラレル合成や自動合成の実現に向けた研究が盛んに行われているが¹⁶⁾、いまだ黎明期であり、現時点で複雑な糖鎖の合成法として最適な選択肢とはなり得ていない。そこで実際の合成において最大限の効率化を目指す、効果的な共通中間体のデザインと収斂的な合成ルートの構築が非常に重要になってくる。

またオリゴ糖合成において最も留意すべき根本的な問題点は、*O*-グリコシド結合の立体選択的な構築である。なかでも様々な *N*-結合型糖鎖に共通して存在するβ-マンノシド結合(図2下線部)の構築はもっとも困難なもののひとつであり、立体選択的かつ高収率な合成法の開発が強く望まれている¹⁷⁾。我々はこの問題を解決するために分子内アグリコン転移法に注目した。この方法は元々 Barresi と Hindsgaul らによって提案された概念であるが¹⁸⁾、我々はこれに改良を加え、糖供与体の *O*-2 位に *p*-メトキシベンジル基を架橋鎖として導入することで、これまでで最も効率的な分子内アグリコン転移法を開発した(式1)¹⁹⁾。

High-mannose-type



Complex-type



Hybrid-type

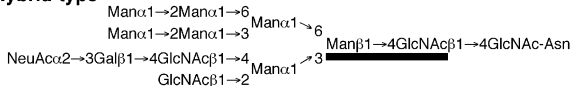
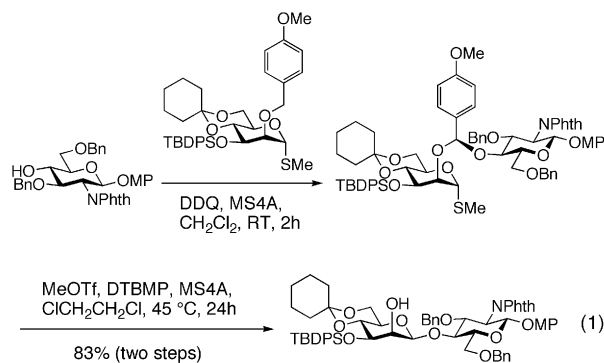
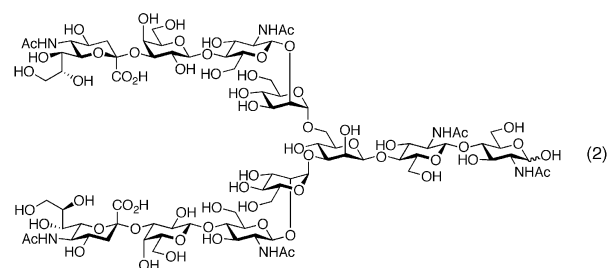


図2 典型的な *N*-結合型糖鎖の構造

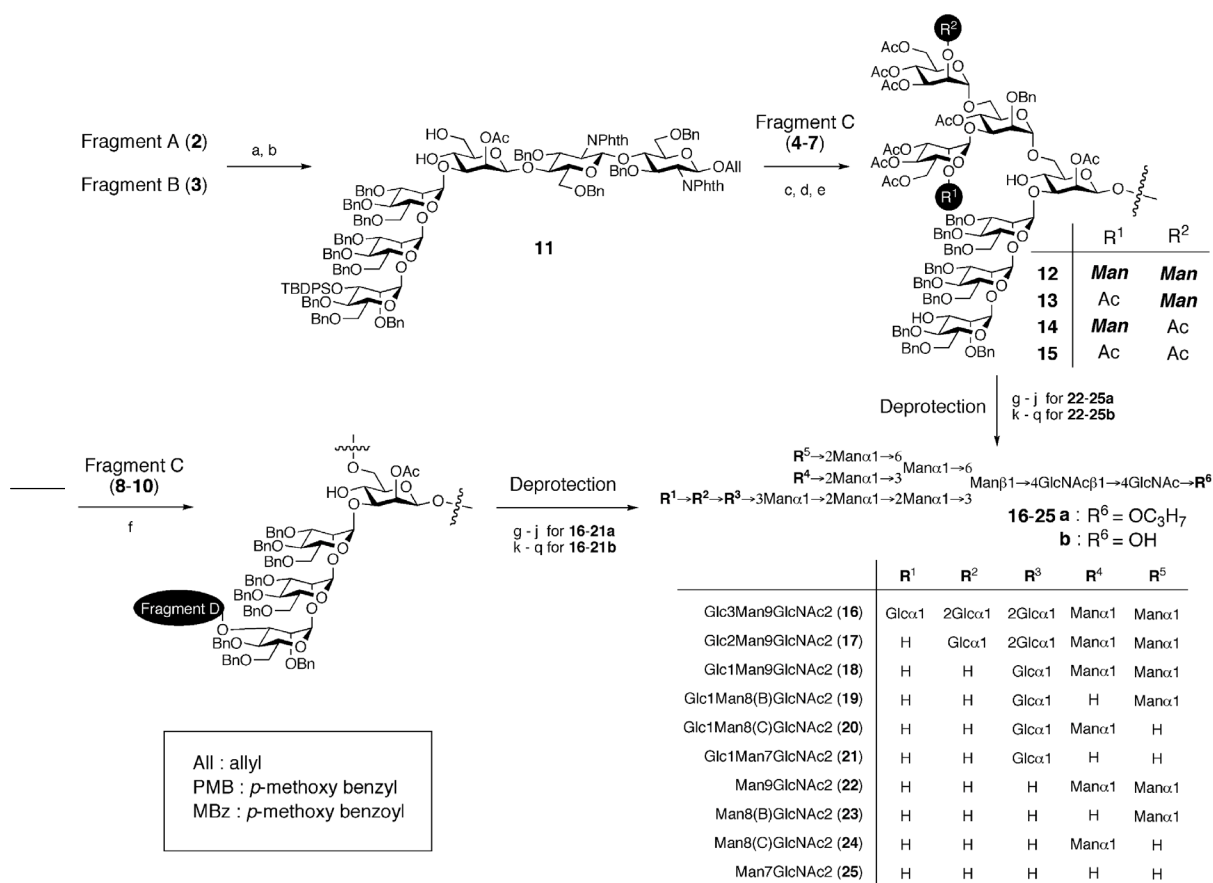
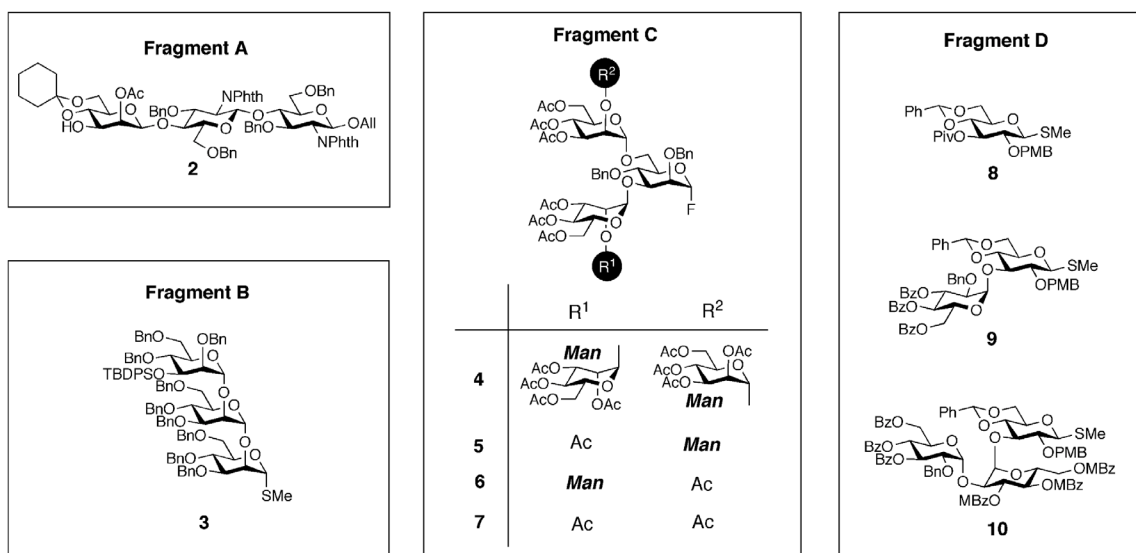


この方法は10g以上のスケールでも $\text{Man}\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc}$ 結合を完璧な立体選択性かつ80%以上の収率で構築できる非常に有用な方法である。実際、本法を鍵反応としてジシアリル化複合型糖鎖(1)(式2)の合成を達成し²⁰⁾、その実用性を証明している。我々はこの独自のIAD法を武器に糖タンパク質品質管理に係る高マンノース型糖鎖の網羅的な合成を行い、さらにそれらを人工糖タンパク質や機能性糖鎖プローブへと展開して、糖鎖生命現象の定量解析への足がかりにすることを目指した。



3.1 高マンノース型糖鎖プローブ³⁾

我々は糖タンパク質品質管理における糖鎖-タンパク質相互作用解析に用いる基本ツールとして、まず小胞体型高マンノース糖鎖の系統的な合成を行った(スキーム1)。小胞体内にはGlc'ase IおよびII, Man'ase IおよびII, UGGTなど様々な糖鎖プロセッシング酵素の働きにより、多様な高マンノース糖鎖構造が存在している。最初のターゲットとしてCNX/CRTのリガンド糖鎖であるモノグルコシル化12糖、すなわちGlc1Man9GlcNAc2(18)を選択した^{3a)}。この分子はフラグメントA(2)、B(3)、C(4)、D(8)を順次カップリングする収斂的なルートで合成した。フラグメントA(2)の合成は前述のIAD法を鍵として行い、フラグメントB、Cとのカップリングを経て11糖とし、超高压条件による脱シリル化²¹⁾を行うことで化合物12を得た。つづく高立体選択的なα-Glc残基の導入は糖供与体として8を用いることで達成し、保護基の脱保護を経て目的物(18)を得た。



スキーム 1 高マンノース型糖鎖の収斂的合成

Reagents and conditions; (a) MeOTf, ClCH₂CH₂Cl, 82 %. (b) *p*-TsOH, CH₃CN, 74%. (c) Cp₂HfCl₂, AgOTf, toluene, ~87%. (d) Ac₂O, pyr., DMAP, ~98%. (e) 10% HF•pyr, DMF, 1GPa, ~95%. (f) MeOTf, DTBMP, ClCH₂CH₂Cl-cyclohexane, ~93%. (g) ethylenediamine, *n*-BuOH, 80°C. (h) Ac₂O, pyr., 0°C. (i) NaOMe, MeOH, 50°C. (j) Pd(OH)₂/C, H₂, 50% AcOH, ~54%, 4 steps. (k) ethylenediamine, *n*-BuOH, 80 °C. (l) Ac₂O, pyr., DMAP, ~94% (2 steps). (m) [Ir(COD)(PMePh₂)₂]PF₆, H₂, THF. (n) I₂, NaHCO₃, H₂O-THF. (o) Ac₂O, pyr., ~97% (3 steps). (p) Pd(OH)₂/C, H₂, 60% AcOH-EtOH. (q) NaOMe, MeOH, ~89% (2 steps).

6糖(11)は汎用性のある鍵中間体であり、この化合物に対して別途合成したフラグメント C (4-7), D(8-10)をカップリングしていくことで、16^{3c)}, 17^{3c)}, 19^{3b)}, 20^{3b)}, 21, 22^{3a)}, 23^{3b)}, 24^{3b)}, 25 もほぼ同様のルートで合成を達成した。これにより主要な小胞体型糖鎖を全て構造が確実な合成品で揃えることができた。

3. 2 人工糖タンパク質プローブ⁵⁾

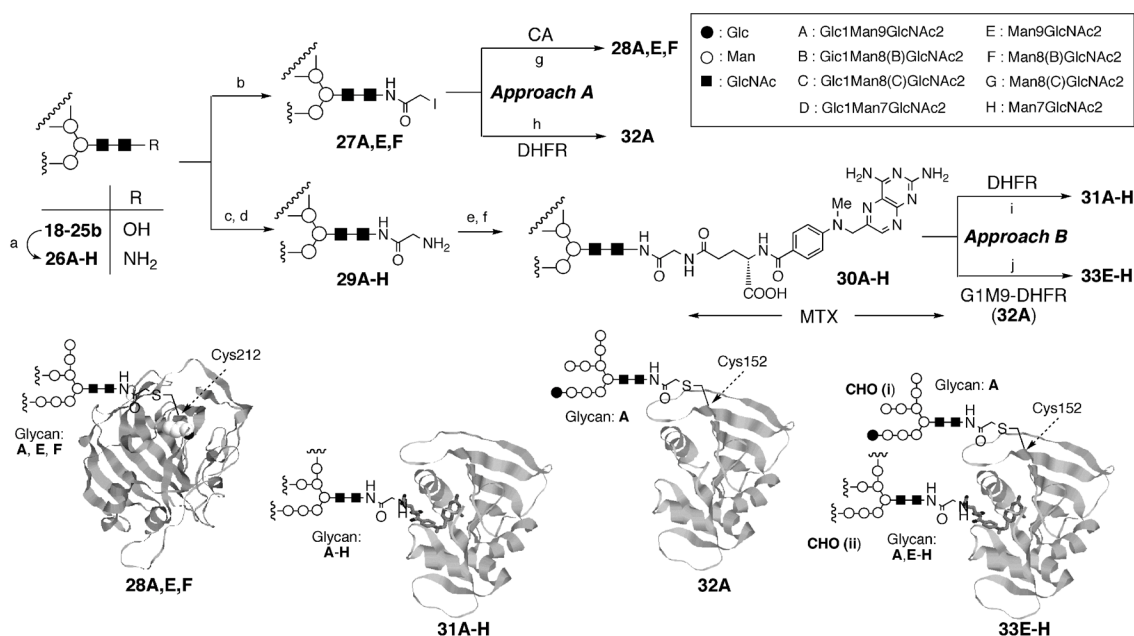
天然の糖タンパク質は通常、様々なグリコフォームの混合物として存在しており²²⁾, タンパク上の個別の糖鎖機能を解析することは困難である。理論的には化学合成によって均一な糖タンパク質を供給することは可能だが、糖タンパク質の全合成は近年の高レベルな精密有機合成の力をもってしても非常に困難な課題である²³⁾。一方、糖鎖を非天然型の結合様式で天然タンパク質上に導入する人工糖タンパク質²⁴⁾は、解析ツールとしての糖タンパク質の供給という観点からは、はるかに現実的である。

最も直接的なアプローチはシステイン残基の特異な反応性を利用したケミカルライゲーション²⁵⁾である(スキーム2, アプローチA)。この方法が複雑なオリゴ糖に適用可能かどうかを実証するために、炭酸脱水素酵素(CA)に対する高マンノース糖鎖の導入を検討した。CA

はシステインを一カ所有する比較的小さな(28kDa)タンパク質である。このタンパク質に対して変性条件下、還元糖(18b, 22b, 23b)からグリコシルアミン(26)を経て調製した一連のヨードアセトアミド(27)を反応させると、速やかに目的の人工糖タンパク質(28)の生成が確認された^{5b)}。

第二のアプローチとして我々はタンパク-リガンド間の強力な相互作用を利用するアプローチを検討した(スキーム2, アプローチB)。この目的にはジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)に対するメトトレキサート(MTX)の結合($K_D < 1nM$)²⁶⁾を活用した。様々なオリゴ糖-MTXコンジュゲート(30)の供給は、グリコシルアミン(26)を出発物質としてグリシンリンカーを介してMTXを導入することで達成した。これらはいずれもDHFRに対する強い親和性を保持しており、人工糖タンパク質(31)を与えた⁵⁾。

さらにアプローチAとBを組み合わせることで、異なるふたつの糖鎖を有する人工糖タンパク質の創製を試みた。152番のアミノ酸に一カ所のシステイン残基を有する*E. coli* DHFRとGlc1Man9GlcNAc2ヨードアセトアミド(27A)を処理するとG1M9-DHFR(32A)を与えた。その後、オリゴ糖-MTXを作用させると、目的とする異なるふたつの糖鎖を有するDHFR(33)の創製に成功した²⁷⁾。



スキーム2 人工糖タンパク質の創製 Reagents and conditions : (a) sat. aq. NH₄HCO₃, 40°C (b) [CH₂(I)CO]₂O, NaHCO₃, DMF, 0°C (74%, 2 steps) (c) FmocGlyCl, NaHCO₃, dioxane-H₂O(1:1), 0°C (d) Piperidine, DMF (~80%, 3 steps) (e) MTX(α-Bu), DMT-MM, MeOH-H₂O (1:1) (f) CF₃COOH (~65%, 2 steps) (g) CA, 5M Guanidine, 4°C, 12h (h) DHFR, 2M Guanidine, 4°C, 4h, (i) DHFR, rt, < 5min (j) 35A, rt, < 5min.

3.3 カルレティキュリンの阻害剤^{4c)}

小胞体糖タンパク質品質管理において、CNXおよびその可溶性ホモログCRTはレクチン活性をもつ分子シャペロンとして多くの糖鎖生物学者の興味を引きつけている。これらはGlc1Man9GlcNAc2糖タンパク質のGlc1Man3糖鎖構造(Aアーム)を特に強く認識している²⁸⁾。我々は前述の高マンノース糖鎖合成を基盤としてER内でCNX/CRTの認識経路を特異的に阻害する化合物の設計および合成を試みた。このためにはCNX/CRTの認識構造を有し、かつ他の糖鎖プロセッシング酵素によって分解さ

れない構造が必要である。そこで我々はコアの3糖構造に2本のGlc1Man3糖鎖を導入した化合物**34**を設計した(図3a)。この化合物は2箇所のCRT認識構造を有することでCRTとの親和性を狙い、かつ非還元末端にマンノース残基を持たないため、ER-Man'aseによる分解を受けない。さらにER-Glc'ase IIの活性に高マンノース糖鎖中のB、Cアーム(分岐型マンノオリゴ糖)構造が必須と言われているため、Glc'ase IIによる分解も受けけないことが期待された。合成したGlc2Man7GlcNAc2(**34**)はCRTに対してGlc1Man9GlcNAc2と同じ結合オーダー($K_B \sim 10^6 M^{-1}$)で認識され(図3a)、かつGlc'ase IIの分解は全く受けけないことが確認された(図3b)^{4c)}。またこの化合物**34**は実際にCRTのシャペロン活性を阻害することも明らかになった。これにより本化合物はCNX/CRT特異的な阻害剤として小胞体糖タンパク質品質管理機構を調節できる可能性が示唆された。

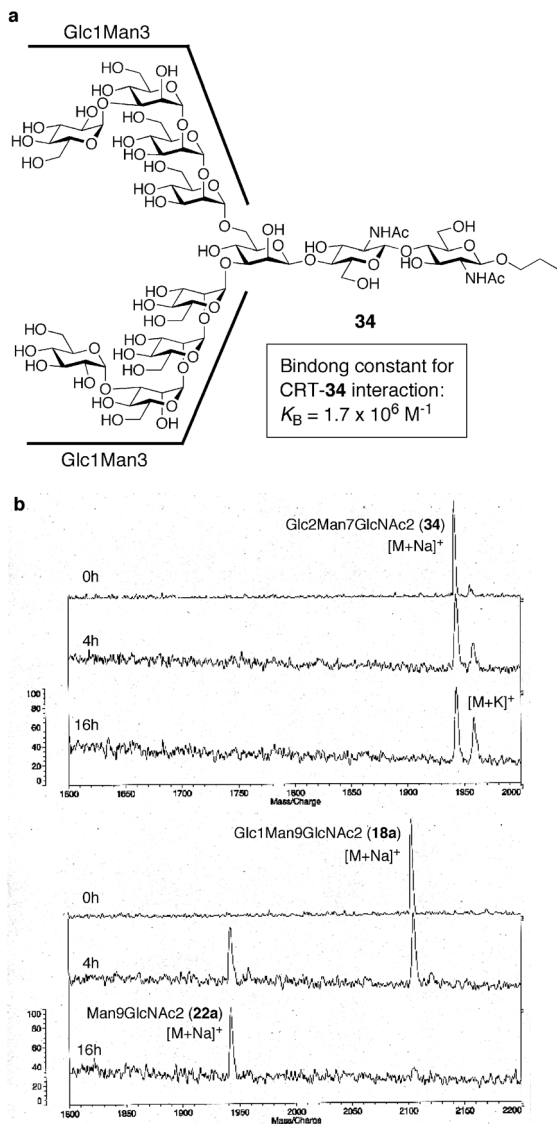


図3 カルレティキュリンの合成阻害剤 (a) The structure of CRT inhibitor **34** and binding constant for CRT-**34** interaction. (b) MALDI-TOF MS spectra for the time course of glucosidase II mediated Glc-trimming reactions to **34** and Glc1Man9GlcNAc2 (**22a**).

3.4 フォールディングセンサー「UGGT」の合成基質^{6b)}

UGGTは小胞体糖タンパク質品質管理の中心であるCNX/CRTサイクルにおいてフォールディングセンサーの役割を果たしている¹¹⁾。本酵素はグルコースを持たない高マンノース糖タンパク質(Man9-7GlcNAc2)のタンパク高次構造を識別し、フォールディング未完成のもののみをグルコシル化してCNX/CRTのリガンド糖鎖(Glc1Man9-7GlcNAc2)を再生することでER内に留めおく機能を持っている。その基質特異性は非常にデリケートで、フォールドした糖タンパク質や完全にミスフォールドしたものは基質として認識されない²⁹⁾。UGGTの機能解析は非常に重要であり、早急な解明が望まれているにもかかわらず、このような特殊な基質特異性のために詳細な検討が進んでいないのが現状である。

最近、我々は前述のMan9GlcNAc2-MTXコンジュゲート(**30E**)がUGGTの良好な基質となることを発見した(図4a)^{5b)}。すなわち、プロピル基をアグリコンとしてもつMan9GlcNAc2(**22a**)はUGGT解析に汎用されているモデル糖タンパク質「変性チログロブリン(dNTg)」に比べて低いGlc転移能に留まっている一方、MTXコンジュゲート(**30E**)はUGGTに対してdNTgと同等以上のGlc転移能を有し、小分子アグリコン型の初の実用的な基質であることが分かった。変性チログロブリンを基質とした解析では、タンパク表面に約8本存在する高マンノース糖鎖が混合物であるため、分子レベルでの解析に支障をきた

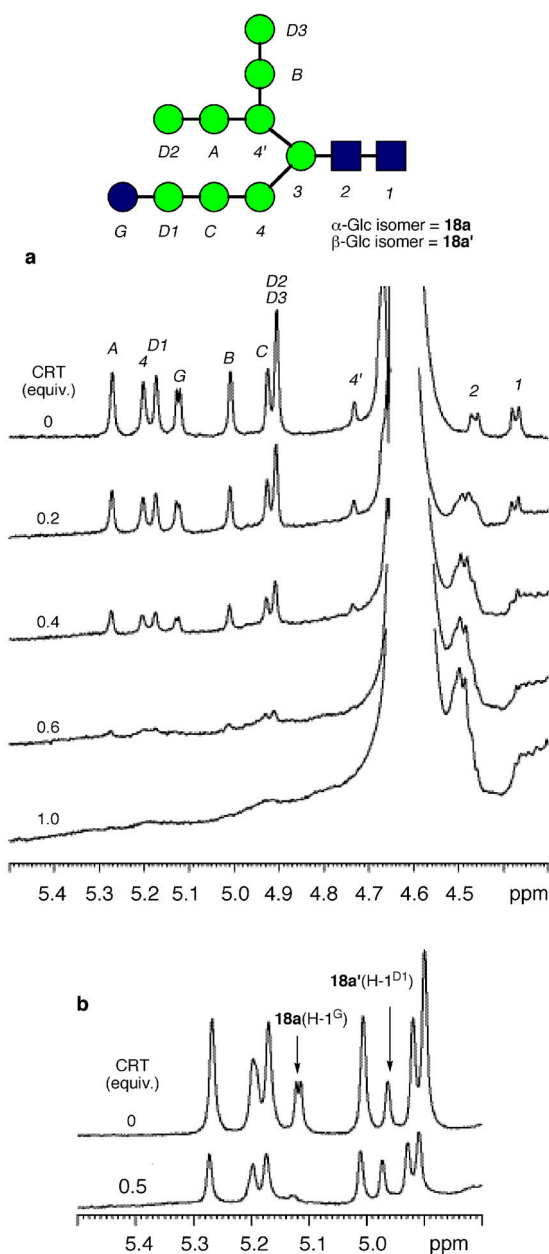


図5 ^1H NMR による CRT と Glc1Man9GlcNAc2 の相互作用解析 (a) Anomeric region of 1D ^1H NMR spectra acquired of Glc1Man9GlcNAc2 (**18a**) in $^2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM Tris-HCl buffer, 10 mM CaCl_2 at pH 7.3. CRT was added to the sample stepwise; the final ratio of **18a** and CRT was 1:1. (B) Anomeric region of 1D ^1H NMR spectra acquired of **18a** + **18a'** (1:1) without and with 0.5 equiv. of CRT.

パク質のみに対してシャペロン作用を行うことが示された。

さらに CRT の糖鎖認識様式について考察すると, CRT は Glc1Man9GlcNAc2 の部分構造である Glc1Man3 (**35**)と強く結合することから, CRT は非還元末端の GlcMan3 構造を主に認識していると考えられる²⁸⁾。また, GlcMan3 構造を2価にした非天然型の **34**^{4c)}や天然型の

$\text{Glc1Man8(B)GlcNAc2}$ (**19a**)は Glc1Man9GlcNAc2 より親和性が低いことから, CRT との結合において GlcMan3 構造に加えて Man5 分岐構造が二次的に関与していることが明らかとなった。

また, Glc'ase II に対する耐性が期待されるフッ素置換型類縁体 **36** は, CRT との結合が観測されたものの, Glc1Man3 構造よりも親和性が低いという結果が得られている^{4b)}。

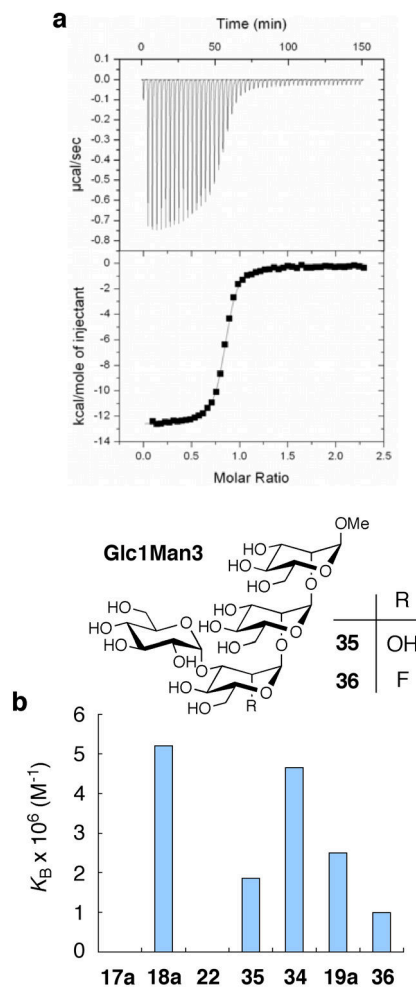


図6 ITC による CRT と合成糖鎖の相互作用解析

(a) Titration was conducted by injecting 6 μl of Glc1Man9GlcNAc2 (300 μM in MOPs buffer) every 3 min into buffer solution (MOPs) containing CRT (28 μM). Molar heat values plotted as a function of the molar ratio ($[\text{Glc1Man9GlcNAc2}]/[\text{CRT}]$). The solid line represents the best-fit binding isotherm. The data were fitted using a single site model. (b) Binding constants of carbohydrate-CRT interactions were summarized.

していた。我々は構造確実な合成糖鎖の特徴を活かし、Man9GlcNAc2-MTX (**30E**) を基質として UGGT 反応を

行い、その糖転移生成物の構造を HPLC, MS, NMR を用いて初めて化学的に決定した (図 4 b, c, d, e)^{5b)}。

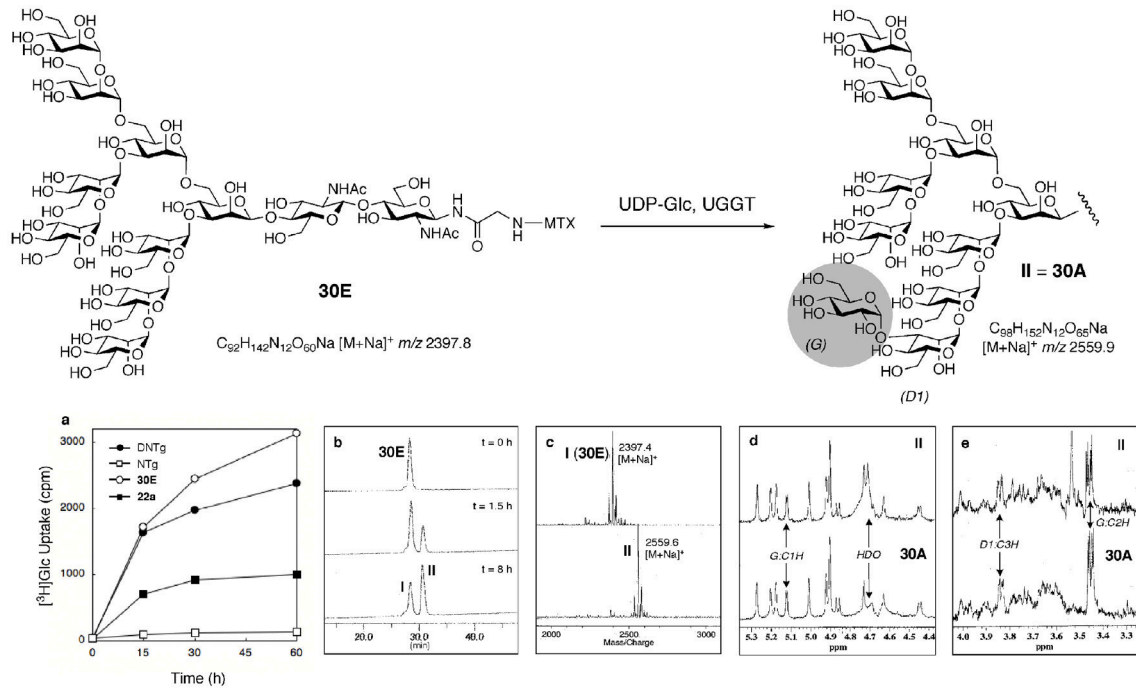


図 4 合成基質に対する UGGT によるグルコシル化反応 (a) Time course of [³H]-Glc uptake in UGGT reactions for **30E**, **22a**, denatured thyroglobulin (DNTg) and native thyroglobulin (NTg) using UDP[³H]-Glc as a donor substrate. (b) HPLC analysis [TSK-GEL Amide-80 column (0.46 φx 25 cm), 1.0 mL/min at 40 °C, solvent (CH₃CN and 3% AcOH-Et₃N, pH 7.3, 65:35 to 50:50) with a linear gradient in 50 min] of the UGGT-glucosylation of **30E**. (c) MALDI-TOF MS spectra of the HPLC peak I (**30E**) and II (corresponds to Glc1Man9GlcNAc-MTX (**30A**)). (d) ¹H NMR spectra of synthetic **30A** and the resulting UGGT product **II** in D₂O. HDO signal was suppressed by DANTE pre-saturation. (e) Differential NOE spectra (trace through the G:C1H resonance) of **30A** and **II**.

4. 合成糖鎖プローブを用いた糖鎖認識タンパク質の定量的な糖鎖特異性解析

我々は、前述のように小胞体糖タンパク質品質管理に関わる様々な糖鎖化合物を系統的に合成した。これまで合成糖鎖を用いた糖タンパク質品質管理機構の網羅的な解析の報告は皆無であり、我々は独自の合成糖鎖基質を分子プローブとしてこの課題に取り組んでいる。現在のところ、分子シャペロン「CRT」、ユビキチンリガーゼ「Fbs1」、フォールディングセンサー「UGGT」の糖鎖特異性解析において顕著な成果を挙げているので、本項ではそれらについて詳細を説明する。

4.1 レクチン様分子シャペロン「カルレティキュリン」の糖鎖特異性^{3a)4b)4c)30)}

CRT は、Glc1Man9GlcNAc2 糖鎖を認識すると考えられている。我々は、まず初めに ¹H NMR を用いて CRT と 12

糖(**18a**)の相互作用解析を行った^{3a)}。図 5 に示したように、CRT の添加によって糖鎖由来のピークが全て CRT 濃度依存的に消失した。これは、糖鎖の見かけ上の分子量が増大した為だと考えられ、CRT と糖鎖が強く結合していることを示している。**18a** とそのβ-Glc 異性体 **18a'** の 1:1 混合物に CRT を加えた際には **18a** のみがブロード化したことから、CRT は Glc1Man9GlcNAc2 糖鎖の Glc 残基を厳密に認識していると考えられる。

次に、合成した高マンノース型糖鎖及びその類縁体と CRT との相互作用を等温滴定カロリーメトリー(ITC)により定量的に解析した³⁰⁾。Glc1Man9GlcNAc2 糖鎖(**18a**)は CRT に強く結合したが($K_B = 5.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)、同じ条件で Glc2Man9GlcNAc2 (**17a**)及び Man9GlcNAc2 型糖鎖 (**22a**)と CRT との相互作用は観測されなかった。この結果は、現在考えられている CRT の機能や糖鎖選択性と良く一致している。すなわち、CRT は高マンノース型糖鎖の Glc 残基のトリミング状態を厳密に見分け、Glc1 型の糖タン

4. 2 ユビキチンリガーゼ「Fbs1」の糖鎖特異性^{6a)}

タンパク質のユビキチン化は分解装置プロテアソームへの移行シグナルであり、ユビキチン化酵素は分解へ向かうタンパク質の取捨選択を行っている。SCF複合体は、Skp1, Cullin1, 及びF-boxタンパク質から成るユビキチン化酵素であり、基質認識を行うユニットF-boxタンパク質の多様性により様々なタンパク質のユビキチン化を行っている。なかでも近年発見されたF-boxタンパク質Fbs1及びFbs2は、高マンノース型糖鎖を認識するというこれまでにない機能を持っている^{15a)}。このことから、SCF^{Fbs}複合体は、糖鎖を認識するユビキチン化酵素として機能し、小胞体で正常なフォールディングに至らなかった糖タンパク質の分解に関与していると考えられている¹⁵⁾。

Fbs1の糖鎖認識機構については、高マンノース型糖鎖の還元末端に存在するキトピオース構造(GlcNAcβ1-4GlcNAc)とFbs1の糖鎖結合領域とのX線及びNMRによる結合構造解析が為され、糖鎖の還元末端側を強く認識することが分かっている³¹⁾。我々は、Fbs1の糖鎖認識機構をより詳細に検討するため、合成した一連の糖鎖を用いて、ITCによる定量的な相互作用解析を行った(図7)。その結果、Fbs1との結合は高マンノース型のコア部分である5糖構造Man3GlcNAc2(37)が最も強く($K_B = 8.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)、本来Fbs1の基質と考えられている高マンノース型の22b($K_B = 3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)や23b($K_B = 3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)よりも強く認識されることが明らかとなった^{6a)}。このことから、Man3GlcNAc2構造が認識に必要な鍵骨格であり、外側のMan残基は立体的に不利に働くと考えられる。さらに、α1-6 Man残基を有する4糖(39)は高マンノース型糖鎖22bや23bと同等にFbs1と結合する($K_B = 3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)が、α1-3 Manの4糖(40)では著しく結合が低下した($K_B = 0.63 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)ことから、α1-6 Man残基がFbs1による糖鎖認識に強く関与していることが示された。また、還元末端側の糖残基が欠如したMan8GlcNAc1糖鎖(38)や、還元末端のキトピオース構造のみでは結合が観測されなかった。これらの結果から、キトピオース構造とα1-6 Man残基が協奏的にFbs1と相互作用していると考えられる。

X線構造解析から得られたキトピオースとFbs1の結合構造に対してMan3残基を加え、構造最適化を行った。得られたMan3GlcNAc2-Fbs1複合体のモデル構造を示す(図7b)。このモデル構造は、α1-6結合したMan残基がAsp216と相互作用しており、我々の実験結果やNMRによる構造解析と良い一致が見られる。さらに、コンプレックス型の11糖(1)の結合が弱くなった($K_B = 0.24 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)のは、α1-6 Man残基の2位に嵩高い3糖構造

(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ)が導入されたためであると説明できる。

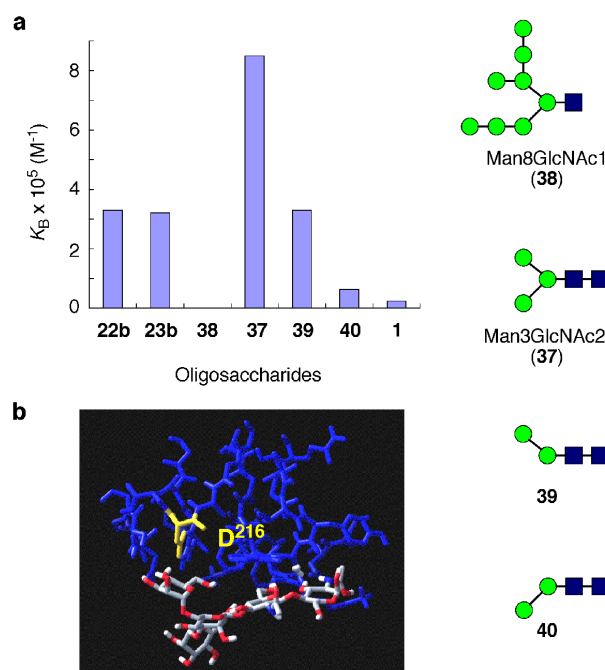


図7 Fbs1と合成糖鎖の相互作用解析 (a) Binding constants for the binding of synthetic oligosaccharides to Fbs1. (b) Proposed structure of Man3GlcNAc2 in complex with Fbs1

4. 3 フォールディングセンサー酵素「UGGT」の糖鎖特異性^{6b)}

我々が開発した初の合成基質である糖-MTXを用いてUGGTの糖転移反応を行い、反応過程をHPLCにて定量的に解析した(図8)^{6b)}。前述の30E-Hおよび別途合成したMan8(B)GlcNAc1-MTX(41)を基質とし、各々に対するUGGT活性を比較したところ、その糖鎖特異性はMan9GlcNAc2>Man8(B)GlcNAc2=Man8(C)GlcNAc2>Man7GlcNAc2>>>Man8(B)GlcNAc1=0となった(図8a)。さらに個々の K_m , V_{max} を求め、UGGTの反応性に関して初めて定量的な解析結果を示すことができた(図8b)。我々の解析によって得られた糖鎖特異性は、以前にMan9-7GlcNAc2糖鎖の混合物である変性チログロブリンを基質とした研究によって提唱された傾向を支持するものであったが、Man8GlcNAc2両異性体(30Fおよび30G)の反応性の違いがはじめて明らかになった。両異性体の経時的なGlc取り込み増加に関しては、今回の反応条件では見かけ上、同等であったが、 K_m , V_{max} には明確な違いがあった。またMan7GlcNAc2-MTX(30H)は

Man9GlcNAc2-MTX (**30E**)と比較して糖転移速度は遅い一方、 K_m はより低く、UGGTに認識されやすいことが分かった。さらに、還元末端のGlcNAcを消失した**41**はGlc転移が全く進行せず、この部位がUGGTの認識に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

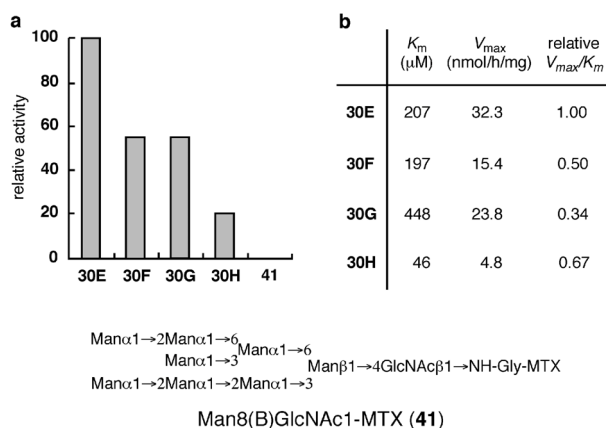


図8 UGGTによるグルコシル化反応の定量解析
 (a) Relative oligosaccharide specificities of UGGT reactions.
 (b) The resulting K_m and V_{max} values of **30E**, **30F**, **30G**, and **30H**.

5. むすび

本論文では、我々のN-結合型高マンノース糖鎖の網羅的合成、およびこれらを分子プローブとした糖タンパク質品質管理機構の定量解析への取り組みについて概説した。糖タンパク質品質管理は様々なシャペロン、レクチン、糖加水分解酵素、糖転移酵素が関与する複雑な機構である。これら鍵物質間の役割分担や互いの関わりは、個々のリガンド構造や基質特異性の理解に伴って明らかになってくるであろう。本稿で述べたように、我々の研究室では既に小胞体関連高マンノース糖鎖、およびそれらのコンジュゲートを系統的に合成し、分子プローブとして自在に供給できる体制を整えている。これらを用いたERや細胞質、ゴルジ体由来のレクチンおよび糖鎖プロセッシング酵素の網羅的な解析に向けて、現在、引き続き研究を進行させており、近い将来、糖鎖の司るタンパク質品質管理機構を分子レベルで理解できるものと確信している。

参考文献

- (a)R. A. Dwek, *Chem Rev.*, **96**, 683 (1996); (b)W. J. Welch, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **15**, 31 (2004)
- (a)A. Helenius, M. Aebi, *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 1019 (2004); (b)R. G. Spiro, *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 1025 (2004); (c)R. Sitia, I. Braakman, *Nature*, **426**, 891 (2003)
- (a)I. Matsuo, M. Wada, S. Manabe, Y. Yamaguchi, K. Otake, K. Kato, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3402 (2003); (b)I. Matsuo, Y. Ito, *Carbohydr. Res.*, **338**, 2168 (2003); (c)I. Matsuo, T. Kashiwagi, K. Totani, Y. Ito, *Tetrahedron Lett.*, **46**, 4197 (2005); (d)I. Matsuo, Y. Ito, *Trends Glycosci. Glycotec.*, **17**, 85 (2005)
- (a)M. Takatani, I. Matsuo, Y. Ito, *Carbohydr. Res.*, **338**, 1073 (2003); (b)Y. Ito, S. Hagihara, M. A. Arai, I. Matsuo, M. Takatani, *Glycoconj. J.*, **21**, 257 (2004); (c)M. A. Arai, I. Matsuo, S. Hagihara, K. Totani, J. Maruyama, K. Kitamoto, Y. Ito, *ChemBioChem*, **6**, 2281 (2005)
- (a)K. Totani, I. Matsuo, Y. Ito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 2285 (2004); (b)K. Totani, I. Matsuo, M. Takatani, M. A. Arai, S. Hagihara, Y. Ito, *Glycoconj. J.*, **21**, 69 (2004); (c)K. Totani, Y. Ito, *Trends Glycosci. Glycotec.*, **17**, 121 (2005)
- (a)S. Hagihara, K. Totani, I. Matsuo, Y. Ito, *J. Med. Chem.*, **48**, 3126 (2005); (b)K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, H. Koshino, Y. Ito, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 7950 (2005)
- E. S. Trombetta, *Glycobiology*, **13**, 77R (2003)
- M-E. Paquet, M. R. Leach, D. B. Williams, *Methods*, **35**, 338 (2005)
- (a)E. M. Frickel, P. Frei, M. Bouvier, W. F. Stafford, A. Helenius, R. Glockshuber, L. Ellgaard, *J. Biol. Chem.*, **279**, 18277 (2004); (b)R. Urabe, H. Okubo, H. Kato, T. Moriyama, Y. Arakaki, *Biochemistry*, **43**, 8858 (2004)
- E. S. Trombetta, A. J. Parodi, *Methods*, **35**, 328 (2005)
- J. D. Schrag, D. O. Procopio, M. Cygler, D. Y. Thomas, J. J. M. Bergeron, *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 49 (2003)
- B. Tsai, Y. Ye, T. A. Papoport, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 246 (2002)
- (a)Y. Oda, N. Hosokawa, I. Wada, K. Nagata, *Science*, **299**, 1394 (2003); (b)M. Molinari, V. Calance, C. Galli, P. Lucca, P. Paganetti, *Science*, **299**, 1397 (2003)
- Z. Kostova, D. H. Wolf, *EMBO J.*, **22**, 2309 (2003)
- (a)Y. Yoshida, T. Chiba, F. Tokunaga, H. Kawasaki, K. Iwai, T. Suzuki, Y. Ito, K. Matsuoka, M. Yoshida, K.

- Tanaka, T. Tai., *Nature*, **418**, 438 (2002); (b)Y. Yoshida, E. Adachi, K. Fukiya, K. Iwai, K. Tanaka, *EMBO Rep.*, **6**, 239 (2005)
- 16) P. H. Seeberger, W-C. Haase, *Chem. Rev.*, **100**, 4349 (2000)
- 17) J. J. Gridley, H. M. I. Osborn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **10**, 1471 (2000)
- 18) F. Barresi, O. Hindsgaul, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9376 (1991)
- 19) Y. Ito, Y. Ohnishi, T. Ogawa, Y. Nakahara, *Synlett*, **1998**, 1102.
- 20) J. Saifert, M. Lergenmüller, Y. Ito, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **39**, 531 (2000)
- 21) I. Matsuo, M. Wada, Y. Ito, *Tetrahedron Lett.*, **43**, 3273 (2002)
- 22) (a) R. S. Rush, P. L. Derby, D. M. Smith, C. Merry G. Rogers, M. F. Rohde, V. Katta, *Anal. Chem.*, **67**, 1442 (1995). (b) G. Opdenakker, P. M. Rudd, M. Wormald, R. Dwek, J. Van Damme, *FASEB J.*, **9**, 453 (1995)
- 23) (a)H. Hojo, E. Haginoya, Y. Matsumoto, Y. Nakahara, K. Nabeshima, B. P. Toole, Y. Watanabe, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 2961 (2003); (b)J. D. Warren, J. S. Miller, S. J. Keding, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6576 (2004)
- 24) B. G. Davis, *Chem. Rev.*, **102**, 579 (2002)
- 25) D. Macmillan, R. M. Bill, K. A. Sage, D. Fern, S. L. Flitsch, *Chem. Biol.*, **8**, 133 (2001)
- 26) J. R. Appleman, E. E. Howell, J. Kraut, M. Kuhl, R. L. Blakley, *J. Biol. Chem.*, **263**, 9187 (1988)
- 27) K. Totani, I. Matsuo, Y. Ihara, Y. Ito, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 5220 (2006)
- 28) M. Kapoor, H. Srinivas, E. Kandiah, E. Gemma, L. Ellgaard, S. Oscarson, A. Helenius, A. Surolia, *J. Biol. Chem.*, **278**, 6194 (2003)
- 29) (a)J. J. Caramelo, O. A. Castro, L. A. Alonso, G. de Prat-Gay, A. J. Parodi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 86 (2003); (b)S. C. Taylor, P. Thibault, D. C. Tessier, J. J. M. Bergeron, D. Y. Thomas, *EMBO Rep.*, **4**, 405 (2003); (c)J. J. Caramelo, O. A. Castro, G. de Prat-Gay, A. J. Parodi, *J. Biol. Chem.*, **279**, 46280 (2004)
- 30) I. Matsuo, Y. Ito, 未発表データ
- 31) T. Mizushima, T. Hirao, Y. Yoshida, S. J. Lee, T. Chiba, K. Iwai, Y. Yamaguchi, K. Kato, T. Tsukihara, K. Tanaka, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 365 (2004)
- 32) M. C. Sousa, M. A. Ferrero-Garcia, A. J. Parodi, *Biochemistry*, **31**, 97 (1992)