

糖鎖生物学との融合をめざす合成研究

理化学研究所・基幹研究所 伊藤幸成

1. はじめに

有機合成化学が生命科学の発展に大きな役割を果たしてきたことは論を俟たない。主要な生体内高分子であるタンパク質や遺伝子を構成するペプチドやオリゴヌクレオチドに関しては極めて洗練された合成手法が確立されており、自動合成機を用いれば有機合成化学の専門家でなくとも比較的簡単に合成できる状況にある。それらのテクノロジーが生物学の諸領域にもたらした波及効果は計り知れないものがある。現在の分子生物学、細胞生物学の繁栄は、まさに「合成力」によって支えられているとあって差し支えないであろう。これは有機合成化学の波及効果を示す好例である。その反面、パソコンや自動車を使いこなすのに専門科知識が要求されないのと同様に、業者や共同研究者から提供される合成化合物を使うのに化学の知識は必ずしも必要ではない。しかも提供されるサンプルは単なる粉末や溶液であるため、最先端の化学の結果であるということは直感的に理解しづらい。このようなことから、境界領域において有機合成化学はともすれば単なる手段として捉えられる傾向がある。これは有機化学のトレーニングを受けてきた者としては残念なことであるが、プロの合成化学者といえども「ある化合物を作ることが研究の最終ゴールである」、と公言する人は現在では少数派であろう。

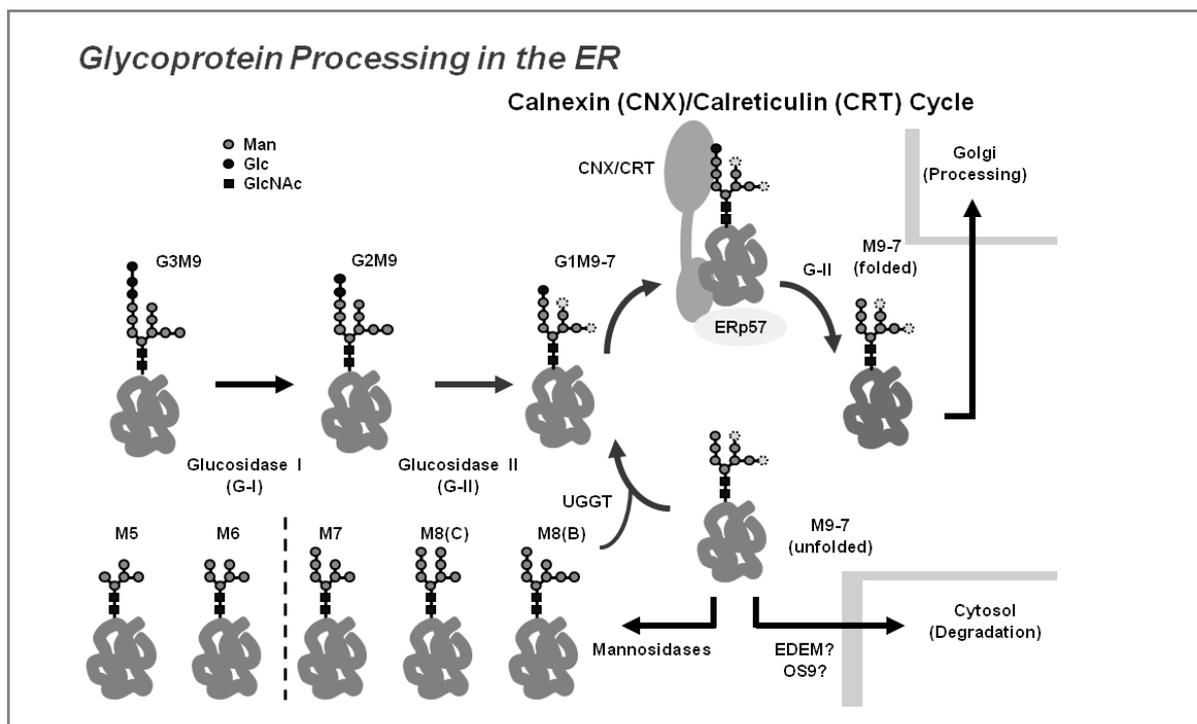
革新的な合成手法の開発により、複雑な化合物についても一昔前では考えられなかったような短段階合成ルートがデザインできるようになった。今後もこのような方向を志向する研究が重要であることは明白である。一方、「それでは何のために合成するのか?」という問いかけがごく当然のようになされるようになり、それに答えることが要求されている。すなわち分野に閉じた論理では評価され難い時代になっている。従って、オリジナルな合成研究を行うこと、適切な課題を見出してターゲット志向の「化合物づくり」に応用すること、学際的な研究の遂行に結びつけること、以上3点をバランスよくこなすことが現在を生きる合成化学者として重要であると考えられる。

我々が今回紹介する研究課題に取り組むことにしたのも、これらの背景を考え併せてのことである。細胞内では種々の構造を持つ糖鎖が様々な局面で活躍している。しかし、技術的な限界からその多くについて構造と機能や活性との相関は明確にされていない。合成化学的には、これらはそう易々と合成できるというものではないが、その一つ一つを作ること自体でエネルギーを使い果たしてしまうほどの「超難問」というわけでもない。すなわち「適度に難しい」のである。糖鎖の合成はペプチドやオリゴヌクレオチドとは異なり原理的な難しさがある。すなわち、糖鎖の構造は単純に配列だけで規定されるものではなく、1残基ごとに3~4種類の位置異性、2種類の立体異性が可能であり、これらを厳密に制御することが要求される。これらを総合すると糖鎖合成の自動化には大きな障壁が立ちはだかっていることは否めない。これまで様々なコンセプトに基づく糖鎖合成の効率化が図られ、自動化を謳った研究も行われている。しかしこれら最高レベルの技術を駆使しても多種多

様な糖鎖を自在に作り分けるという状況には至っていない。見方を変えれば、糖鎖科学はプロによる「手作りの力」が力を発揮しうる領域であると考えられる。

II. 糖タンパク質のプロセッシングと「品質管理」機構

真核生物が作り出すタンパク質の多くは N-X-S(T) のコンセンサス配列上のアスパラギン残基 (N) が N-グリコシル化された糖タンパク質である¹⁾。これらはアスパラギン結合型あるいは N-結合型と呼ばれている。その構造は極めて多彩であるが、全て単一の前駆体である14糖(Glc₃Man₉GlcNAc₂; G3M9)から生合成される²⁾。G3M9は小胞体(ER)内腔で新生タンパク質に転移されるが、その後 ER に存在するグルコシダーゼ I(G-I)およびグルコシダーゼ II(G-II)によるトリミングを受ける。その結果モノグルコシル化糖鎖(Glc₁Man₉GlcNAc₂; G1M9)を持つ糖タンパク質が生成するが、ERにはこのような糖鎖と特異的に結合するレクチン様シャペロンであるカルネキシン(Calnexin; CNX)、カルレティキュリン(Calreticulin; CRT)が存在する。これらはタンパク質ジスルフィド結合異性化酵素ERp57と共同で糖タンパク質のフォールディングを助けている³⁾。



その後、G-II の2段階目の反応によるトリミングが進んでグルコースを含まない糖鎖 (Man₉GlcNAc₂; M9)へと変換されるが、この際タンパク質のフォールディングが未完成であると UGGT が再グルコシル化を行い G1M9 へと導き、再度 CNX/CRT によるフォールディングに供される。すなわち UGGT は糖タンパク質特異的な「フォールディングセンサー」として機能しているという訳である。この過程が CNX/CRT サイクルと呼ばれるものである³⁾。この過程を整理すると、CRT 及び CNX はタンパク質のフォールディングを助ける「アシスタント」として、G-II は糖タンパク質の CRT/CNX サイクルへの出し入れを司る「運びや」として、

UGGT はフォールディングをチェックする「見張り役」として機能している、という役割分担が見えてくる。

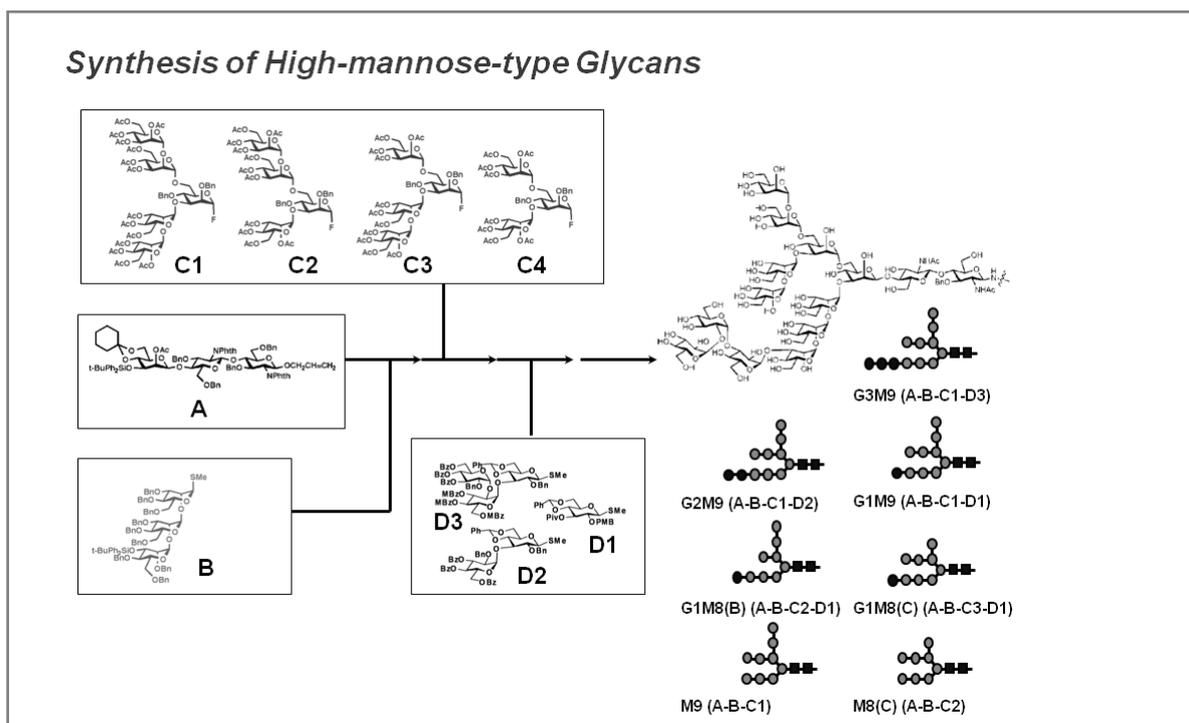
その後、糖タンパク質はゴルジ体へと輸送され更なるプロセッシングを受けて、多くの場合複合型糖鎖へと変換される。一方、最終的に正しいフォールディングに至らなかったタンパク質は細胞質へと運び出され、小胞体関連分解(ER-associated degradation; ERAD)と呼ばれるプロセスによって分解される。

これらの輸送や分解にも Cargo Receptor, EDEM, mannosidase-I, Fbs, peptide: *N*-glycanase (PNGase) といった糖鎖を認識する分子が関与している⁴⁾。この様に、糖タンパク質の誕生、成熟、移動、分解といった広範な過程に糖鎖-タンパク質の共同作業が関わっている。これらを総称して「糖タンパク質品質管理機構」と呼んでいる。

III. 高マンノース型糖鎖の系統的合成

このような研究を行う上で糖鎖の合成を行うことがまず必要になる。図2に示したのが合成経路の概略である^{5),6)}。このように標的となる構造をフラグメント(A, B, C1-4, D1-3)に分割し、それらの組み合わせにより全ての高マンノース型糖鎖を合成する経路を確立した。現在では鍵となる中間体を大量に調製しておき、必要に応じて望みの糖鎖を合成する体制が整っている。また、種々の非天然型糖鎖の合成も行っている。

還元末端に種々のアグリコンを導入することも可能である。一例として、メトトレキサート(MTX)を導入した糖鎖プローブ(G1M9-MTX)の構造を示した⁷⁾。なお、MTXはジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)と強力に結合する阻害剤であるが、その性質を用いると容易に糖鎖-MTX-DHFR 複合体(CHO-MTX-DHFR)に導くことが可能であり、我々はこれを擬似糖タンパク質として種々の実験に用いている。



IV. フォールディングセンサータンパク質 UGGT の解析

先に述べた様に、UGGT はフォールディング未完成の糖タンパク質のみをグルコシル化するという特異な性質を持っている。我々は、運よく M9-MTX が UGGT の極めて良好な基質になることを見出した⁸⁾。正しくフォールディングされていないタンパク質に共通の性質として本来内側に隠れているべき疎水性の領域 (hydrophobic patch) が表面に露出していることが挙げられるが、MTX はその何らかの形でそのような疎水性部位をミミックしていると考えられる。実際、アグリコンを有しない還元糖 (M9-OH) は基質にならないが、短鎖アルキル基をもつ糖鎖 (M9-OPr) は多少の反応性を持つことが確認されている。また、M9-MTX を DHFR に結合させると (M9-MTX-DHFR) 反応性が低下することが判ったが、これは糖鎖がフォールディングしたタンパク質 (DHFR) 上に担持されていることを反映しているものと解釈できる。

より最近の研究により、MTX を他の疎水性置換基に置き換えることも可能であり、Fmoc 基を導入した化合物では反応性が更に向上することも判明している⁹⁾。更に BODIPY のような蛍光性置換基を導入したのも高い反応性を有しており、UGGT の活性検出に有力なプローブになると期待される⁹⁾。

ところで、糖鎖の UGGT に対する相対的な反応性についてはこれまで定量的な解析はなされておらず、曖昧なままで留まっていた。我々は種々の糖鎖構造を有する MTX 誘導体を用いることによりこれを解析した。その結果、マンノース残基の数が減少するにともなってその反応性が低下すること、還元末端に2つの GlcNAc が存在することが必要不可欠であることを明らかにした⁸⁾。

V. グルコシダーゼ II (G-II) の解析

G-II は UGGT と逆方向の反応を触媒し、CNX/CRT サイクルへの基質の出し入れを司るという点で重要な酵素である。ところで、G-II は2つの活性を持っている。すなわち、G2M9 を G1M9 へと変換する (グルコース残基間の結合を切る) 活性 (Cleavage-1) と G1M9 を M9 に変換する (グルコースとマンノースの間の結合を切る) 活性 (Cleavage-2) である¹⁰⁾。その性質を調べるために、まず G2M9-MTX を G-II で処理したところ、Cleavage-1 は-2 に比べて迅速に進行することが明確に示され、Cleavage-2 の速度は CRT の添加によって劇的に低下することが判った¹¹⁾。これらのことは、小胞体内で糖タンパク質は G-II によって G1M9 に変換されると直ちに CRT (及び CNX) によって捕捉されて CNX/CRT サイクルに入ることを示唆している。

一方、小胞体内には複数のマンノシダーゼが存在し、(G1)M9 型の糖鎖は (G1)M8B、(G1)M8(C)、(G1)M7 など、マンノースがトリミングされた構造に導かれる¹²⁾。これらについても、G-II と UGGT による G1 型 ~ G0 型間の相互変換が成立していると考えられる。これらの型の G-II に対する反応性に関して正確な解析はなされていなかったが、G1M9 が他の構造に比べてはるかに高い反応性を有していると信じられて来た¹³⁾。それに対し、我々の合成糖鎖を用いた解析により、これらの相対的な反応性が明らかになった¹¹⁾。中でも G1M8(B) が G1M9 に匹敵する反応性を有することはこれまでの通念を覆すものである。

更にこれらに対応する DHFR 複合体 (CHO-MTX-DHFR) を用いて同様の検討を行ったところ、G1M8(B)は G1M9 よりも高い反応性を持つことがわかった¹¹⁾。このことは、G-II の特異性がアグリコンの性質に依存することを意味する。非常に大雑把な推論ながら、CHO-MTX をフォールディング未完成糖タンパク質のモデル (UGGT の基質となる)、CHO-MTX-DHFR をフォールディング糖タンパク質のモデルと考えると、興味深い結果である。

より最近の研究により、ER 内のマンノシダーゼによるトリミングが糖タンパク質を CNX/CRT サイクルから解き放つシグナルとして機能しているという仮説¹²⁾を支持する結果が得られている¹⁴⁾。

VI. 細胞内擬似環境としてのマクロ分子クラウディング条件

通常の生化学実験はバッファー中希釈された条件で行われる。典型的な濃度は 0.1-1%前後であろう。一方、細胞内にはタンパク質、核酸など様々な生体高分子が高濃度で共存する極めて混み合った環境である。その濃度は 30~40%に達すると言われている。このような環境はマクロ分子クラウディング条件 (macromolecular crowding conditions) と呼ばれる¹⁵⁾。その中ではタンパク質のようなマクロ分子はバッファー中とは大きく異なった振る舞いをする事が予想される。糖タンパク質のプロセッシングについてもそのような因子を考慮に入れつつ解析する必要があると思われる。

我々は、G-II の解析をマクロ分子クラウディング剤として良く用いられるウシ血清アルブミン (BSA) 存在下で行った¹⁶⁾。先に述べたように、G-II は 2 つの反応を触媒するが、BSA の存在下で 2 段階目の反応のみが加速されることがわかった。例えば、40% の BSA を共存させると、 V_{max}/K_m 値は 5 倍以上増大した。一方、同様の条件で UGGT の反応は影響をほとんど受けないこと、マンノシダーゼの反応は逆に遅くなることが判った。

これらの結果がどのような生物学的意義を持つのかについては慎重な議論が必要であろう。しかし少なくとも、擬似細胞内環境とも言えるマクロ分子クラウディング条件が糖タンパク質のプロセッシングにかかわる酵素反応にも大きな影響を及ぼすことは確かである。今後はこのような因子を考慮に入れた解析が必要になって来るであろう。

VII. 結び

我々の研究は有機合成化学と生化学的解析といういわばクラシカルな手法の組み合わせであり、ケミカルバイオロジーと呼べるほど目新しいものではないかも知れない。実際、これまでも合成糖鎖を駆使した研究は多数の研究者によって行われてきたが、それらの多くは何らかの前提をもとに糖鎖の部分構造に着目したものが殆どである。我々は敢えて「全体構造の合成に挑戦する」ということにこだわってきたが、それによって初めて見えて来たものもあると感じている。このような愚直な研究が、糖鎖生物学など生物科学領域における有機合成化学の可能性を示すものと感じていただければ幸いである。

文献

1. Apweiler, R., Hermjakob, H., Sharon, N. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1473, 2-8.
2. Hebert, D. N., Molinari, M. *Physiol. Rev.*, **2007**, 87, 1377-1408.
3. Helenius, A., Aebi, M. *Annu. Rev. Biochem.*, **2004**, 73, 1019-1049.
4. Molinari, M. *Nature Chem. Biol.*, **2007**, 3, 313-320.
5. Matsuo, I., Wada, M., Manabe, S., Yamaguchi, Y., Otake, K., Kato, K., Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 3402-3403.
6. Matsuo, I., Totani, K., Tatami, A., Ito, Y. **2006**, *Tetrahedron*, 62, 8262-8277.
7. Totani, K., Matsuo, I., Ihara, Y., Ito, Y. **2006**, *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 5220-5229.
8. Totani, K., Ihara, Y., Matsuo, I., Ito, Y. **2005**, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 7950-7954.
9. Totani, K., Ihara, Y., Matsuo, I., Tsujimoto, T., Ito, Y.: *Biochemistry*, **2009**, in press.
10. Herscovics, A.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1473, 96-107.
11. Totani, K., Ihara, Y., Matsuo, I., Ito, Y. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 31502-31508.
12. Grinna, L. S., Robbins, P. W. *J. Biol. Chem.*, **1980**, 255, 2255-2258.
13. Avezov, E., Frenkel, Z., Ehrlich, M., Herscovics, A., Gerardo Z. Lederkremer, G. Z. *Mol. Biol. Cell.*, **2008**, 19, 216-225.
14. Bosis, E., Nachliel, E., Cohen, T., Takeda, Y., Ito, Y., Bar-Nun, S., Gutman, M., *Biochemistry*, **2008**, 47, 10970-10980.
15. Ellis, R. J., Minton, A. P. *Nature*, **2003**, 425, 27-28.
16. Totani, K., Ihara, Y., Matsuo, I., Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 2101-2107.