

平成17年度採択分

平成19年 3月31日現在

研究課題名(和文) 生物機能解明をめざす糖タンパク質の統合的合成研究

研究課題名(英文) Comprehensive Studies toward Synthesis of Glycoproteins

研究代表者

氏名: 伊藤幸成 (ITO Yukishige)

所属研究機関・ 部局・ 職: 理化学研究所・ 細胞制御化学研究室・ 主任研究員



推薦の観点: 国際的に対応を強く要請される研究

研究の概要: 糖鎖の導入は発生、分化、老化、免疫、癌化等の多様な生体現象に深く関与しているのみならず、新規な機能をもった糖タンパク質製剤など医薬開発や糖鎖チップなどの材料開発などの観点からも注目されている。本研究では糖鎖の網羅的合成、複合型糖鎖の化学的および酵素的合成と糖ペプチドの構築、ムチン型糖鎖の合成、微生物等に由来する新規な糖タンパク質糖鎖の合成、糖鎖の迅速合成法の開発を目的とする。また、糖タンパク質の化学的全合成は構造的に均一な糖タンパク質が供給できるのみならず有機合成化学における未踏の挑戦である。これに向けた検討を多面的に行い、世界初の生物活性糖タンパク質の全合成を目指す。

研究分野/ 科研費の分科・ 細目/ キーワード: 生体関連物質、核酸・ タンパク質・ 糖化学、合成化学・ 糖鎖生物学

1. 研究開始当初の背景: タンパク質の翻訳後修飾はタンパク質の活性化、機能制御、高次構造の獲得、輸送、分解等にとって極めて重要かつ必須の生物学的プロセスであることが認識されつつある。糖鎖の付加(グリコシル化)は最も重要なタンパク質の翻訳後修飾であり、発生、分化、老化、免疫、癌化等の多様な生体現象に深く関与している。

本研究を組織する3名はそれぞれ独自の切り口で糖タンパク糖鎖の化学合成に取り組んで来た実績があり、当該分野におけるトップランナーと自負している。これらの力を集結し、新しいブレークスルーへと結び付けるべく本研究を開始した。

2. 研究の目的: ヒトを始めとする高等動物から微生物や植物、寄生虫まで、広く存在する糖タンパク質の多様な糖鎖を合成する。更に、純粋化学的に糖タンパク質の全合成を達成する。化学的に構築した糖タンパク質の生物機能を解析する。

3. 研究の方法:

以下の分担に従って研究を行っている。

- 伊藤幸成(理研): アスパラギン結合型(高マンノース型)糖鎖の合成、微生物由来あるいはその感染に関連する新規な糖タンパク質糖鎖の合成、人工糖タンパク質の創製、糖鎖生物学に有用な合成プローブの開発。
- 中原義昭(東海大): O-結合型糖鎖を

持つ糖タンパク質の全合成、そのためのブロック縮合法の開発。

- 梶原康宏(横浜市大): アスパラギン結合型(複合型)糖鎖及びそれを含む糖タンパク質の合成。そのための合成手法の開発、合成糖タンパク質の生物活性評価。

4. これまでの成果

#### 糖タンパク質糖鎖の合成

糖タンパク質の正常な機能発現の上で重要な役割を果たしている「高マンノース型」糖鎖を系統的に合成するルートを確立した。

これら一連の糖鎖により糖タンパク質のフォールディング、輸送、分解が調節されている。しかし、これらの多様な糖鎖を個別に合成することは多大な時間と労力を要する。本研究では、「トップダウン型コンビナトリアル合成」を提唱し、その解決を図った。すなわち、化学的に合成した14糖を共通前駆体としその酵素消化によって目的糖鎖を全て合成する、というものである。実際、糖タンパク質の生合成においては、Glc3Man9GlcNAc2という前駆体から多様な構造が生み出されている。本法は、そのような生合成過程に習っていると看做す点で「バイオミメティック」なものであると同時に、合成の効率、酵素のアベイラビリティを考慮した実践的なものである。「これまでに共通前駆体14糖合成法を確立し、酵素反応によ

て高マンノース型糖鎖の代表的な  
〔4. これまでの成果 ( 続き )〕

ものに導くことに成功している。近年、高マンノース型糖鎖の多彩な生物機能が注目されており、これに関連したプローブの必要性が増大している。従って、本法は糖鎖生物学に大きな学術的インパクトを与えるものである。

その他、微生物 (*C. jejuni*) や寄生虫に由来する新規な糖タンパク質糖鎖の合成を行った。特に *C. jejuni* の糖タンパク質合成系は生物進化との関連で注目されているのみならず、糖タンパク質の *in vivo* あるいは *in vitro* 合成の点からも高いポテンシャルを有している。我々の成果は、その基質特異性の解明、さらに合成糖鎖のタンパク質への導入への道を拓くものである。

### 糖タンパク質の全合成

糖タンパク質は、分子量の大きさとその構造の複雑さから、「究極の合成ターゲット」として有機合成化学者の注目を集めている。

本研究では、化学的に合成した O-結合型糖鎖や、鶏卵から採取した複合型糖鎖を含む糖タンパク質の全合成に成功した。

これまでに、23kDa のムチン型糖タンパク質 (MUC2 Basal motif)、T-細胞表層の共刺激糖タンパク質 (CTLA4)、白血球遊走活性因子ケモカイン (MCP-3)、クランピン、オボムコイドの合成に成功している。また、それらのフォールディングを検討中である。一方、合成した糖鎖を化学選択的ライゲーションおよびリガンドとの相互作用によってタンパク質に組み込む手法を検討している。それらによって得られる、均一な糖鎖を持つ「人工糖タンパク質」はタンパク質プロセッシング機構の解明に利用している。この様にして、化学的に糖鎖を合成し、それを組み込んだ糖タンパク質を合成したことは、代表的な糖鎖構造を持つ糖タンパク質が実際に化学合成できることを示したものである。有機合成化学としてのインパクトに加え、糖タンパク質の糖鎖構造とタンパク質機能を関連づける上で、重要な成果である。

- 「トップダウン合成法」を完成させる。
- この手法を用いて種々の糖鎖を系統的に合成し、機能の解明を行う。
- *C. jejuni* 糖タンパク質合成系を用いる試験管内糖タンパク質合成を検討する。
- タンパク質化学合成において鍵となる「チオエステル法」を改良し、糖タンパク質の全合成に応用する。
- 合成した糖タンパク質のフォールディング実験や生物活性の検討を行う。

### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) (研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- I. Matsuo, K. Totani, A. Tatami, **Y. Ito**: “Comprehensive synthesis of ER related high-mannose-type sugar chains by convergent strategy”, *Tetrahedron*, 62, 8262-8277 (2006).
- K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, H. Koshino, **Y. Ito**: “Synthetic substrates for an endoplasmic reticulum protein-folding sensor, UDP-glucose: Glycoprotein glucosyltransferase”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 7950-7954 (2005).
- Hojo, H.; Onuma, Y.; Akimoto, Y.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. N-Alkyl cystein-assisted thioesterification of peptides. *Tetrahedron Lett.*, 48, 25-28 (2007).
- Hojo, H.; Matsumoto, Y.; Nakahara, Y.; Ito, E.; Suzuki, Y.; Suzuki, M.; Suzuki, A.; Nakahara, Y. Chemical Synthesis of 23 kDa Glycoprotein by Repetitive Segment Condensation: A Synthesis of MUC2 Basal Motif Carrying Multiple O-GalNAc Moieties. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 13720-13725 (2005).
- Yamamoto, N.; Takayanagi, A.; Yoshino, A.; Sakakibara, T.; Kajihara, Y. An approach for a synthesis of asparagine-linked sialylglycopeptides having intact and homogeneous complex-type undecadisialyloligosaccharides. *Chem. Eur. J.* 13(2), 613-625, (2007).

ホームページ等

<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/wako/synthetic/index.html>

### 5. 今後の計画