

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔平成31（2019）年度研究進捗評価用〕

平成28（2016）年度採択分

令和元（2019）年5月17日現在

研究課題名（和文） 小胞体糖修飾の統合的ケミカルバイオロジー

研究課題名（英文） Chemical Biology of ER related glycan modifications

課題番号：16H06290

研究代表者

伊藤 幸成 (YUKISHIGE ITO)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員



研究の概要：小胞体は、タンパク質や脂質に対して様々な形で修飾を行う場である。本課題は、小胞体において生み出され機能する様々な糖質シグナルを対象とし、化学合成を基盤とする研究を行うものである。主な対象として、1) タンパク質 N-グリコシル化、2) C-マンノシル化、3) 脂質のグルコシル化を取り上げ、これらが小胞体において担うシグナリング機能を解明し、統合的な理解をはかる。具体的には1) 小胞体内糖質シグナルの認識機構、2) 糖タンパク質フォールディング状態を反映する構造的基盤の解明、3) 糖鎖プローブによる、フォールディング不全および小胞体ストレス検出系の開発、4) 糖タンパク質プロセシングの化学的制御による選別機構の解明、5) C-マンノシル化とタンパク質品質管理機構への関与、6) 小胞体内脂質合成機構とホメオスタシス維持、小胞体ストレス関連疾患との関連、7) リゾホスファチジルグルコシドをリードとする新規細胞機能調節分子の創製、を目指す。

研究分野：化学

キーワード：糖質関連化学・糖鎖工学、糖タンパク質、糖脂質、小胞体

1. 研究開始当初の背景

(1) 小胞体は翻訳時・翻訳後修飾として特に重要な N-グリコシル化を始めとする様々な糖修飾を司る場である。それらの機能解明は糖鎖生物学における中心課題である。特に興味深いものとして、C-マンノシル化という特異な構造の存在がある。

小胞体において、N-グリコシル化はタンパク質のフォールディングを促進し、その度合いを反映するタグとして働いている。そこにおいて、様々なレクチン、酵素が密接に連携し総合的に働く糖タンパク質「品質管理」機構が存在し、フォールディング中のタンパク質に付加されている多様な構造の「高マンノース型」糖鎖がシグナル分子として機能している。

一方、トリプトファン側鎖 C-マンノシル化の生物機能、特にタンパクにおける役割は謎に包まれていたが、最近になり、自然免疫シグナル制御に加えてタンパク質の品質管理機構への関与が示唆されている。

(2) 小胞体は脂質の合成を司る場でもある。中でも、コレステリルグルコシド、ホスファチジルグルコシド(PtdGlc)など新たなタイプのグルコース含有脂質が脳組織中に見いだされ、その機能に興味を持たれている。最近になり、PtdGlcのリゾ体(LPG)がGタンパク質共役受容体(GPR55)を活性化し、神経

細胞軸索ガイダンスにおけるシグナルとなっていることが明らかにされた。

2. 研究の目的

本課題は、小胞体において生み出され機能する様々な糖修飾(タンパク質 N-グリコシル化、C-マンノシル化、脂質のグルコシル化)を対象に、共通原理を探る。これらが小胞体において担うシグナリング機能を解明すると共に創薬基盤研究に展開させる。研究を遂行する上で独自性の高い手法が確立されており、これらが本研究の基盤となる。

具体的には以下を主な実施項目として研究を行う。

- 小胞体内タンパク質フォールディング制御機構における糖鎖の役割
- 小胞体内グルコシル化の機能解析
- 新規なリゾホスファチジルグルコシド関連分子の創製による細胞機能調節
- C-マンノシル化糖修飾の生物機能とタンパク質品質管理機構との関連

3. 研究の方法

(1) 本組織が有する主たる要素技術である
1) 小胞体型糖鎖の網羅的合成、2) 糖タンパク質の化学的全合成、3) 小胞体タンパク質の発現系、3) 小胞体内糖鎖プロセシング・相互作用の解析系、4) C-結合型マンノース含有ペプチドの合成法、5) 抗 C-マンノシルトリプトファン抗体、6) PtdGlc、リゾ

体 (LPG) 及びそれらの類縁体の合成、7) PtdGlc 特異的抗体を活用し、研究を推進する。

(2) それに加えて新たな合成および解析手法開発の試みを行い、より精密な機能解析にフィードバックさせる。例えば、合成糖タンパク質の擬鏡像体結晶化、新規な糖鎖-タンパク質相互作用検出系等について検討を行う。また、糖鎖の合成については、組織内の連携によって安定的に試料を供給する体制を作る。

4. これまでの成果

(1) 合成した糖タンパク質や糖ペプチドを基質に、小胞体画分を用いてフォールディング過程を精密に解析する系を開発した。続いて、これらと小胞体内タンパク質の相互作用を核磁気共鳴法で追跡し、認識に関わる糖タンパク質ミスフォールド部位の同定やリフォールディング過程の解析に発展させた。また、合成糖鎖を基質とし、阻害剤を使い分ける実験系を構築し、小胞体内で複数のマンノシダーゼが独立して働いていることを示すとともに、小胞体タンパク質 ERp29 や SELENOF (Sep15)の機能に関する知見を得た。

(2) エンドマンノシダーゼが糖タンパク質の分解経路において機能することを示す新しい知見を得た。更に、その活性を鋭敏かつ容易に検出する新規なプローブを開発したことで、より幅広い検討が可能になった。

(3) 小胞体で合成される新規な糖脂質としてホスファチジルグルコシド(PtdGlc)の存在が見いだされ、そのリソ体 (LPGlc) が受容体 (GPR55) を介して特異な生物活性を示すことが分かっていた。そこで、様々な類縁体を合成し、比較することで、活性に重要な部位を特定した。GPR55 は創薬の重要なターゲットであることから、その類縁体をデザインし迅速に合成する手法を開発した。その結果、LPGlc と類似の活性をもつ化合物を見出した。

(4) 小胞体内で C-Man 化糖修飾を受けると考えられる分泌タンパク質をモデルとしてタンパク質品質管理機構との関連について解析を進めた。その結果、C-Man 化はタンパク質の小胞体内合成においてフォールディング特にジスルフィド結合の形成に関与することが示唆された。更に、生体試料内の C-マンノシルトリプトファンを定量する手法を開発した。

5. 今後の計画

合成糖タンパク質や糖鎖基質を用いる研究は順調に成果が出ている。今後は、糖鎖合成に関わる酵素を糖鎖付加型で合成し、小胞体環境下でのフォールディング過程を追跡する。

加えて、これらを構造的に理解するため、合成糖タンパク質の結晶化を試みる。小胞体または体内マンノース切断経路の実体を担う酵素や、エンドマンノシダーゼ活性を持つタンパク質の実体を突き止める試みを行う。

PtdGlc合成酵素については、化学合成した天然型脂質を基質として使い、様々な形で酵素反応産物を解析する方法を取り入れてその活性検出を試みる。

C-マンノシル (C-Man)化の機能については、早急に野生型および非 C-Man 化変異型モデルタンパク質を用い、*in vitro* リフォールディング実験系の解析を行う予定である。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) 研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者(平成29年度(2017年度)まで)は点線を付してください。

- (1) S. Sakurai, Y. Inai, S. Minakata, S. Manabe, Y. Ito, Y. Ihara “A novel assay for detection and quantification of C-mannosyl tryptophan in normal or diabetic mice” *Sci Rep.*, 9, 4675, 2019
- (2) T. Kiuchi, M. Izumi, Y. Mukogawa, A. Shimada, R. Okamoto, A. Seko, M. Sakono, Y. Takeda, Y. Ito, Y. Kajihara “Monitoring of glycoprotein quality control system with a series of chemically synthesized homogeneous native and misfolded glycoproteins” *J. Am. Chem. Soc.* 140,17499-17507, (2018)
- (3) F. Ding, A. T. Guy, P. Greimel, Y. Hirabayashi, H. Kamiguchi, Y. Ito “Squaryl group modified phosphoglycolipid analogs as potential modulators of GPR55” *Chem. Commun.*, 54, 8470-8473 (2018)
- (4) T. Kuribara, M. Hirano, G. Speciale, S. J. Williams, Y. Ito, K. Totani “Selective manipulation of discrete mannosidase activities in the endoplasmic reticulum by using reciprocally selective inhibitors” *ChemBioChem*, 18, 1027-1035 (2017)
- (5) M. Izumi, R. Kuruma, R. Okamoto, A. Seko, Y. Ito, Y. Kajihara “Substrate recognition of glycoprotein folding sensor UGGT analyzed by site-specifically 15N-labeled glycopeptide and small glycopeptide library prepared by parallel native chemical ligation” *J. Am. Chem. Soc.* 139, 11421-11426 (2017)
- (6) 伊藤 幸成 「複合糖質の機能解明をめざす高選択的・高効率合成法の開発」有機合成化学協会賞 2017年

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/chief/synth_cell_chem/