

### 1) 研究の背景

真核生物のタンパク質は細胞表層や細胞内器官に存在するものや細胞外に分泌されるホルモンあるいはサイトカイン等を含めてその多く(50%以上)は糖鎖と呼ばれるオリゴ糖を有する糖タンパク質である。糖鎖は、タンパク質の生体内安定化、細胞内及び細胞間の特異的輸送等に関与する他、立体構造を決定する因子として機能の発現や制御に関わっていることが知られている。また、糖鎖の構造が細胞の癌化、個体レベルでの分化、老化、受精、シグナル伝達等の重要な生物現象と関わっていることも次々と明らかになっている。これらの機能を分子レベルで解明することは現在の生体関連科学の中で重要なトピックスの一つである。糖鎖の構造と機能の関連づけを行なう上で大きな障壁となっているのは、生体試料から得られる糖タンパク質の構造不均一性である。ある細胞から単一の糖タンパク質を採ることができたとしても糖鎖構造に着目すると多くの場合様々な構造(glycoforms)の混合物である。この状況は培養細胞を用いたとしても同様である。従って糖鎖の機能を分子構造と関連づけるためには生化学的、分子生物学的手法のみでは不十分であり、有機合成による糖鎖関連化合物の創製に大きな期待が寄せられている。糖鎖の生合成過程には様々な要素が複雑に絡み合っているが、その解明においても種々の糖鎖構造を作り出すことにより有用な手段を提供することが可能になると考えられる。

### 2) 糖タンパク質の品質管理に関する糖鎖の合成と機能解析

糖タンパク質糖鎖の機能は多岐にわたっておりそれぞれに重要であるが、その中で細胞活動の根幹に関わっていることから特に注目されているものにタンパク質の品質管(quality control)への関与がある。タンパク質の品質管理とは、小胞体内新生タンパク質のフォールディング、輸送、不良タンパク質の分解を含んでいるが、その過程で糖鎖と細胞内レクチン/分子シャペロンとの多様な相互作用が重要な役割を果たしている(1)。この概略を図1にまとめた。

アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖は、小胞体膜上での14糖ブロック( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ )の転移によって導入されるが、その後のトリミングの過程で生ずる様々な糖鎖構造が分子シャペロンやレクチンとの結合に係わっている。例えばグルコシダーによるグルコース( $\text{Glc}$ )2残基のトリミングによってできる12糖( $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ )は小胞体内のシャペロンであるカルネキシン(CNX)及びカルレチキュリン(CRT)によって認識される。一方、ここから更に1残基の $\text{Glc}$ が除去されてできる11糖( $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ )はグルコース転移酵素による再グルコシル化を受けるが、その際正常なフォールディングを受けていないタンパクのみがその基質となる。すなわちCNX/CRTは糖鎖認識を鍵としてタンパク質のフォールディングを助け、UGGTはフォールディングの具合を感知するセンサーとして機能している。

なお、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ は更にマンノシダーゼ-1によって $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ へと変換されるが、この構造はある時間内に正しいフォールディングに到らなかったタンパクのproteasomeでの分解におけるシグナルとして機能していると言われている。また、最近になって、小胞体の中にはマンノシダーゼ-レクチン様タンパク質が存在し、misfoldタンパク質の細胞質への輸送/分解過程に関わっていることが日本及び欧州の3つのグループから相次いで報告された(2)。しかし、それらのレクチン活性について直接的な証拠はなく、実際にどのような糖鎖をリガンドとしているかは議論が分かれている(3)。

更にproteasomeでの分解におけるユビキチン化に関わるE3ユビキチンリガーゼの中に、具体的な構造は同定されていないが高マンノース型糖鎖を認識するものが存在することが明らかにされた(4)。このように、糖タンパク質糖鎖の品質管理機構において、その誕生から成熟、そして分解に至る過程で糖鎖の微細な構造変化が関与していることが強く示唆されている(図2)。

図1 糖鎖が関与する糖タンパク質品質管理機構

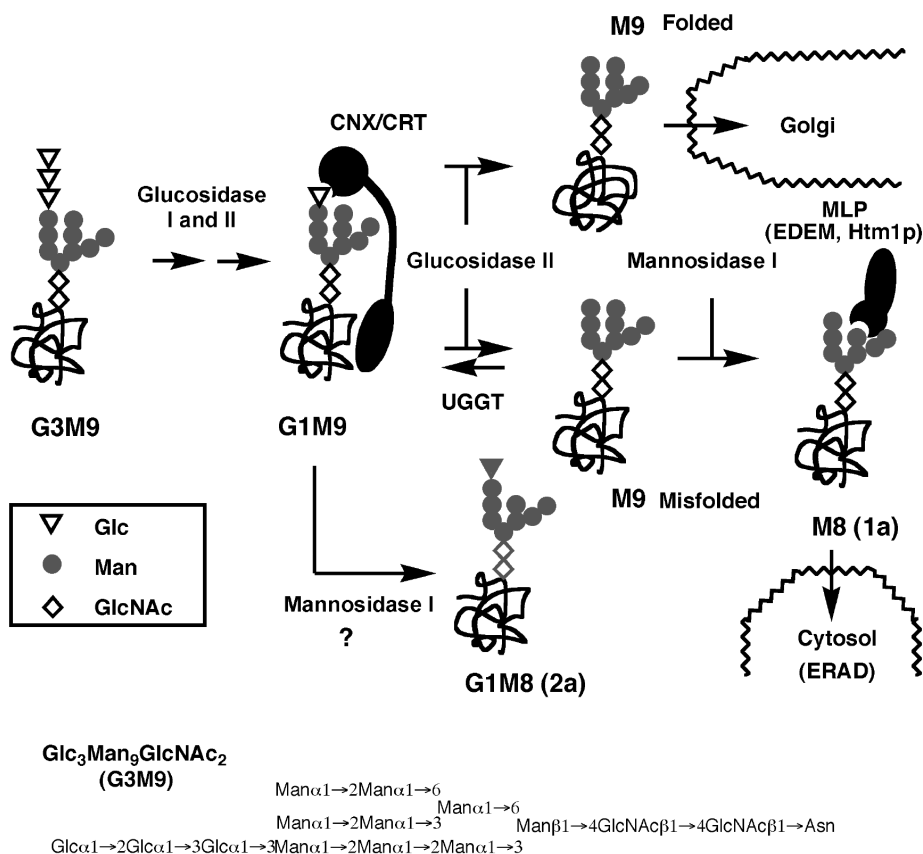


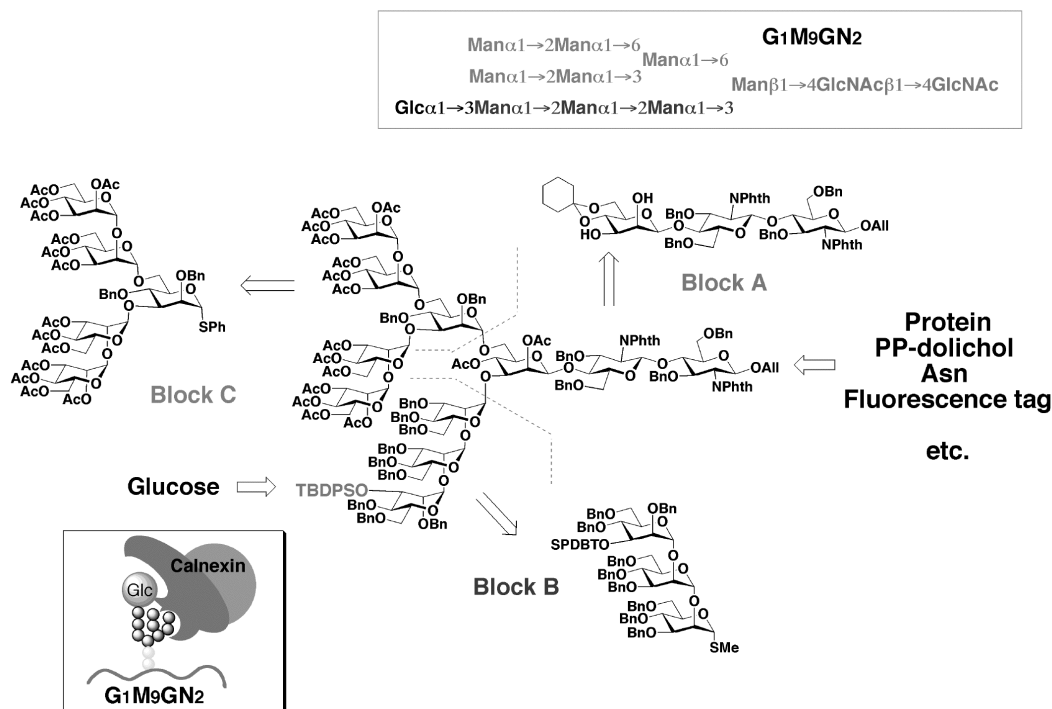
図2 小胞体内品質管理に関わる糖鎖リガンド

Protein	Ligand(?)
Calnexin (CNX)/Calteticulin (CRT)	Glc <sub>1</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
Glucosyl Transferase (Glc-T)	Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
Mannosidase-Like Protein (MLP)	Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
Ubiquitin Ligase (Fbs)	High Mannose-type
Cargo Receptors (VIP 36, ERGIC 53)	High Mannose-type

**Glc<sub>1</sub>Man<sub>9(8)</sub>GlcNAc<sub>2</sub>**

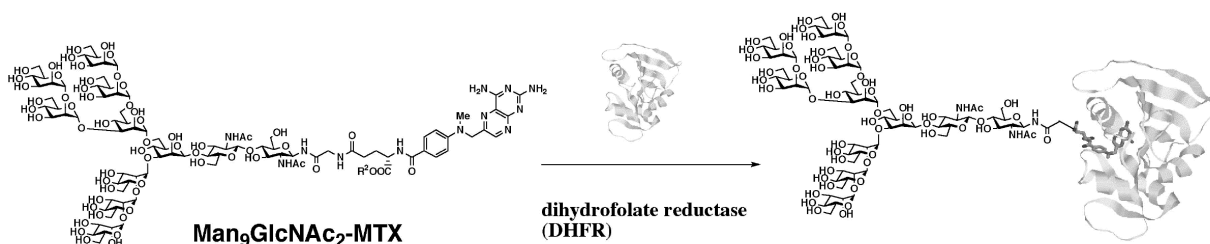
我々は糖タンパク質糖鎖の合成における独自の的方法論を開発してきた。特に、アスパラギン結合型糖鎖の合成において大きな障壁であった -マンノグリコシド [ Man(1-4)GlcNAc]の構築について、p-メトキシベンジル基の特性を利用した分子内アグリコン転移反応を開発することによってこれを解決した (5)。本構造は全てのアスパラギン結合型糖鎖の共通構造であり、その効率的で信頼度の高い合成法の確立が待たれていた。この手法の有効性はすでに複合型1-2糖の合成において実証されている(6)。この手法をフルに活用して、糖タンパク質品質管理機構の分子レベルでの解明をめざして研究を行なっている。その一端として、CNX/CRT のリガンドと考えられている1-2糖の合成 (図3) と CRT との相互作用を中心に成果を紹介する (6,7)。

図3 タンパク質品質管理に關する12糖の合成



一方、実際に細胞内で起きている現象を再現しその分子の基盤を明らかにするためには、構造の規定された糖鎖を持つ糖タンパク質が必要となる。そこで、我々は合成糖鎖をタンパク質に導入した人工糖タンパク質の創製を試みている。現在のところ、タンパク質のシステイン残基の反応性を利用する手法、小分子リガンドとタンパク質の結合を利用する手法の2点について初期的な成果を得ている(文献)。それらの現状についても紹介したい。

図4 人工糖タンパク質の創製



### 3) 効率化と迅速化を指向する糖鎖合成手法の開発

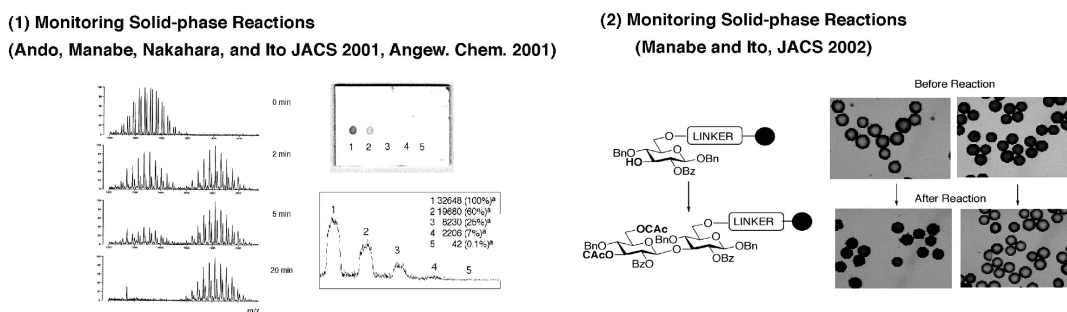
糖鎖の著しい構造多様性を考えると、合成手段の精密化の追及とともに迅速化に向けた取り組みの重要性が認識される。そのための方向性として固相合成法が考えられる(8)。固相合成はペプチドや核酸の領域では高度な最適化が達成され、自動合成機の使用がルーチン化するまでに至っている。従って糖鎖の分野においても同様の手法が確立されれば Glycobiology におけ大きなブレイクスルーになると期待されるが(9)、大きな障壁が立ちはだかっていることも確かである。

我々の研究室では高分子担体を用いた糖鎖の実践的迅速合成を柱の一つとして様々な検討を行なっている。固相合成においてはリンカーのデザインが極めて重要である。市販の樹脂は主としてペプチド合成を基盤に開発されて来たため、酸性条件での安定性に問題があり、必ずしも糖鎖固相合成には適していない。そこで

ニトロ基を導入して安定性を賦与した新しいタイプのリンカーを検討した (10)。

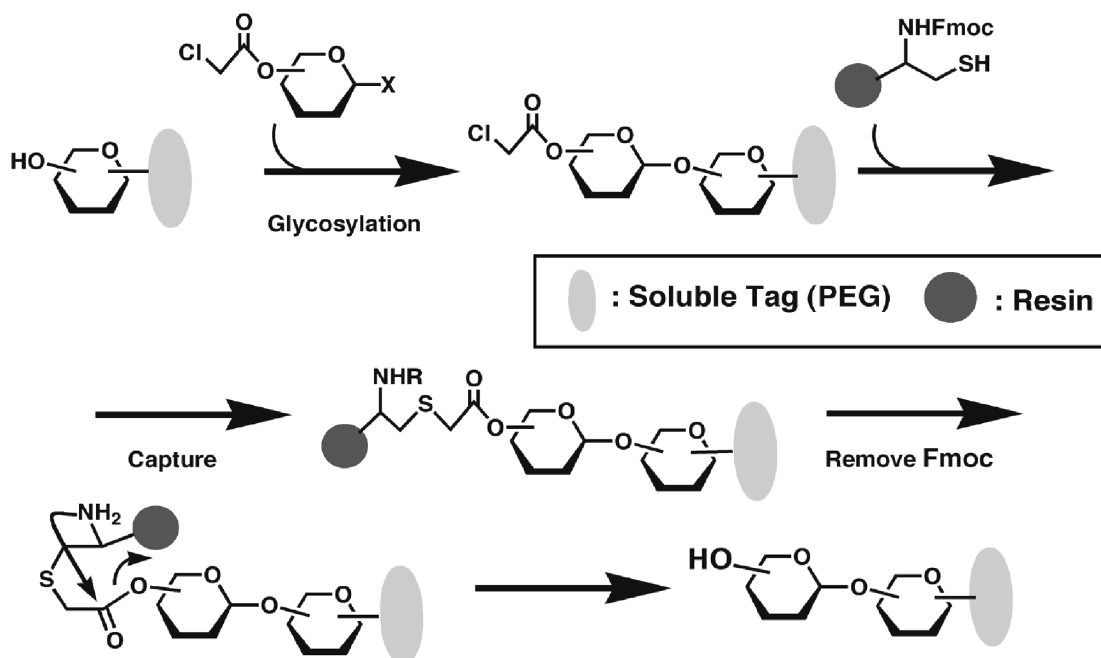
糖鎖固相合成においては特に反応のモニターが大きな問題点となる。これは反応条件の最適化が進み、ニヒドリン反応による定量的モニター法が確立されているペプチド合成とは大きく異なる点である。そこで、糖鎖固相合成における反応の半定量的モニターを行なうための新たな手法を検討した (図 5) (11)。更に、樹脂上での糖鎖固相合成を呈色反応によりリアルタイムでモニターする手法を開発した (12)。一方、モニターができたとしても固相上での糖鎖伸長反応を 100% 近い収率で進行させることは一般的には困難である。この問題点を踏まえて、望む糖鎖のみを釣りに上げる新規な手法を開発した (図 6) (13)。

図 5 新しい反応モニター法



以上の研究において新たに開発したリンカー及びリアルタイムモニタリング法に更なる最適化を行なってより実践的な糖鎖迅速合成法へと展開して行きたいと考えている。

図 6 Capture-release 法による糖鎖の釣り上げ

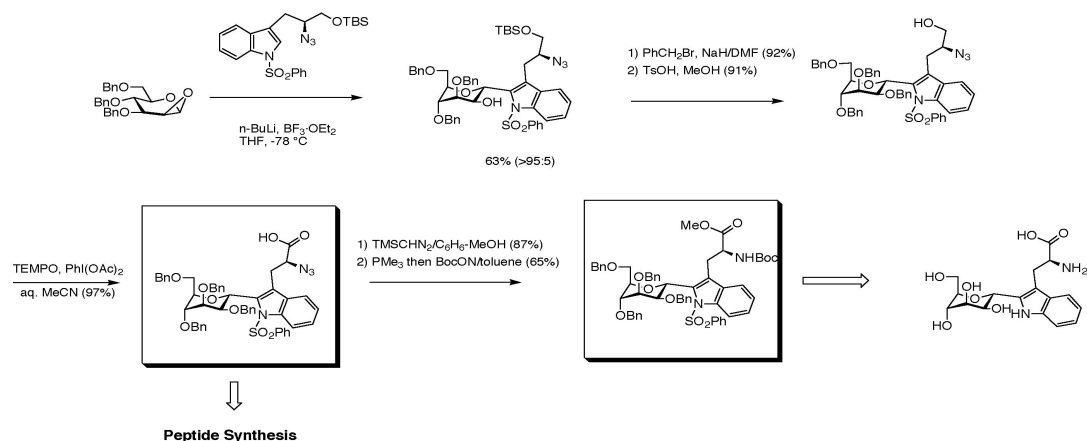


これらの糖鎖固相合成をめざした研究に加えて、アスパラギン結合型糖鎖、糖ペプチドの合成に有効な新規方法論の開発についても研究を行なっている (5, 14-17)。更に、2 基質型糖転移酵素阻害剤の合成 (18)、新規な糖タンパク質構造としてその生体機能に興味もたれる C-mannosyl tryptophan (C-Man-Trp) の合成研究 (19) についても概略を紹介したい (図 7)。

図 7 C-マンノシルトリプトファン合成

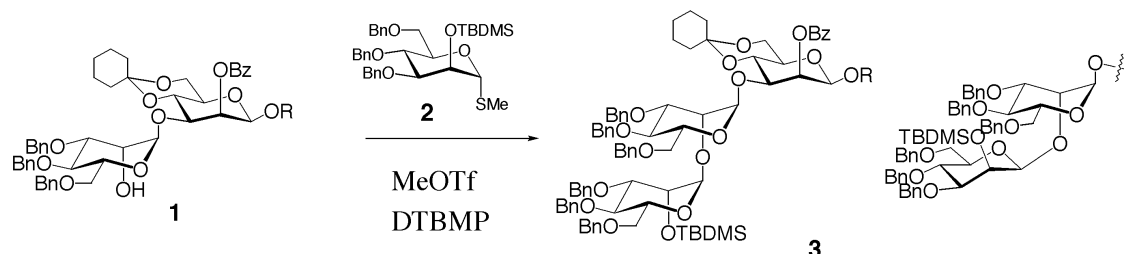
### Synthesis of C-Mannosyl Tryptophan

(Manabe et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**; *Chem. Eur. J.* **2003**)



また、より最近の成果として 1) 凍結溶液中での反応加速現象 (20) (図 8)、2) グリコシル化反応条件の迅速最適化手法の開発 (21) の 2 点について初期的な結果を報告したい。

図 8 凍結溶液中でのグリコシル化反応



entry	2 (equiv.)	MeOTf/DTBMP (equiv.)	solvent	temp., time	3 (yield)	$\alpha:\beta$
1	2	4.5/4.5	$(\text{ClCH}_2)_2$	r.t., 19 h 50 °C, 10 h	65% <sup>a</sup>	15:1
2	1.5	2.7/1.6	toluene	50 °C, 22 h	50% <sup>b</sup>	~50:1
3	1.5	2.7/1.6	<i>p</i> -xylene	0 °C, 18 h	77%	18:1

<sup>a</sup>18% recovery of acceptor. <sup>b</sup>43% recovery of acceptor.

1. Helenius and Aebi, *Science* **291**, 2364 (2000)
2. Nagata et al. *EMBO Reports*, **2**, 415 (2001); Aebi et al. *EMBO Reports*, **2**, 423 (2001); Endo et al. *J. Biol. Chem.* **276**, 8635 (2001).
3. Frenkel et al. *J. Biol. Chem.* **278**, 34119 (2003)
4. Yoshida et al. *Nature*, **418**, 438 (2002)
5. Ito et al., *Synlett*, **1998**, 1102-1104; *Tetrahedron* **57**, 4123 (2001).
6. J. Seifert et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**, 531 (2000).
7. Matsuo et al., *Tetrahedron Lett.* **43**, 3273 (2002); Matsuo et al. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, *es.* **338**, 1073 (2003).
8. Totani et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* in press.
9. Ito and Manabe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 701 (1998); Plante, et al. *Science*, **291**, 1523 (2001).
10. Manabe et al., *Synlett* **2000**, 1241.
11. Ando et al. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3848 (2001).
12. Manabe and Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12638 (2002).
13. Ando et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 4725 (2001); Hanashima et al. *Synlett* **2003**, 979; Ito and Manabe, *Chem. Eur. J.* **8**, 3077 (2002).
14. Ishiwata et al. *Synlett*, **2002**, 634.
15. Nakano et al. *Tetrahedron Lett* **44**, 2853 (2003).
16. Ishiwata et al. *Tetrahedron Lett.* **44**, 3187 (2003).
17. Ishiwata et al. *Synlett*, **2003**, 1339.
18. Hinou et al. *J. Org. Chem.* **68**, 5602 (2003).
19. Manabe et al. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9754 (1999); *Chem. Eur. J.* **2003**, 1435.
20. Takatani et al. *Tetrahedron Lett.* **2004**, in press.
21. Ishiwata et al. unpublished.