

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

伊藤 幸成((独)理化学研究所中央研究所 主任研究員)

主たる共同研究者

井原 義人 (和歌山県立医科大学医学部 教授)

加藤 晃一 (名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授)

鈴木 匡 ((独)理化学研究所フロンティア研究システム チームリーダー)

山本 一夫 (東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授)

田井 直 (東京都臨床医学総合研究所 部長) (~ 平成15年9月)

3. 研究内容及び成果

(1) 研究課題全体の研究内容及び成果

タンパク質の品質管理機構における糖鎖の役割は急速に注目度が高まっているトピックである。世界各国の研究室から次々とインパクトの高い成果が報告されているが、何れにおいても構造が均一で規定された糖鎖、糖タンパク質の供給に重大な限界があることが足かせとなり、必ずしもクリアカットな結論に至っていない。我々は研究開始にあたって、合成化学的に様々な糖鎖を供給できるという強みを最大限に活かすことによりこの難点を取り除くことができ、ブレークスルーとなる成果が得られると考えた。一方、合成化学の視点からは、常にオリジナルな手法の開発に努めるという姿勢を保つことを念頭においた。一方、糖鎖の合成研究においては多様な方法論指向型の研究が世界的に展開されているが、実際に、複雑な標的分子の合成につなげ、それを生命現象解明のための分子プローブとして用いている例は少ない。我々は、1)オリジナルな手法の開発、2)それを、複雑な糖鎖の実践的な高選択、高効率合成に応用する、という2点をバランスよく両立させることに重点をおいた。

また研究組織の中に、シャペロン(井原)、ERAD(鈴木)、レクチン(山本)といった各分野で先端的な研究を行っている生物・医学グループと NMR を基盤とする強力な構造生物学グループ(加藤)を擁することにより、他ではまねのできない統合的な研究が展開できると期待した。

その後5年間にわたり、各グループ間の共同研究が活発に行われた。代表的なものは以下の通りである。

- ・Calreticulin(CRT)(レクチン・シャペロン) 伊藤 G, 加藤 G, 井原 G
- ・UGGT(フォールディングセンサー) 伊藤 G, 井原 G
- ・Glucosidase II(小胞体内プロセッシング) 伊藤 G, 井原 G
- ・Fbs1(小胞体関連分解・ユビキチンリガーゼ) 伊藤 G, 加藤 G
- ・PNGase(小胞体関連分解・糖鎖除去) 鈴木 G, 伊藤 G, 加藤 G
- ・ERGIC-53, VIP36, VIPL(カーゴレセプター) 山本 G, 伊藤 G・加藤 G

これにより、糖タンパク質のフォールディング、輸送、分解など細胞内品質管理機構において重要な、様々な糖鎖・タンパク質相互作用を定量的に解析することに成功した。

(2) サブグループ毎の研究内容及び成果

理研 伊藤グループ

1) CRT/CNX が認識するモノグルコシル化糖鎖、その部分構造および類縁体を合成し、CRT の糖鎖

特異性を明らかにした。

- 2) 小胞体に存在する全ての高マンノース型糖鎖を合成するルートを確立した。
- 3) UGGT の非タンパク質型基質の合成に初めて成功し、その定量的解析に応用した。
- 4) 合成基質を用いて、Glucosidase II の基質特異性を明らかにした。
- 5) Fbs1 の糖鎖結合能の定量的解析を行った。
- 6) 糖鎖ハロアセタミド体が PNGase を強力に阻害することを見だし、細胞透過能をもつ蛍光性阻害物質の開発を行った。
- 7) 効率的脱保護反応や、凍結反応系中でのグリコシル化反応の著しい加速効果を見出し糖鎖合成において鍵となるグリコシル化反応を迅速に最適化する系を開発した。
- 8) C-マンノシル化トリプトファン (CMW) およびこれを含むペプチドを合成し共同研究者(井原)の協力のもとに様々な活性を調べた。

長崎大[現 和歌山県立医大]井原グループ

- 1) 糖タンパク質の品質管理機構の破綻とタンパク分泌への影響を明らかにした。
- 2) CRT の細胞内局在制御の分子機構について解析し、C-末端ドメインに加え、N-末端ドメインも重要であることを見出した。
- 3) UGGT および Glucosidase II の糖鎖特異性について、伊藤グループと共同研究を行った。
- 4) CMW の細胞生理機能の解析を行い、本構造の発現が病態やシグナル伝達と関連することを示唆する結果を得た。

名古屋市立大学 加藤グループ

糖鎖-タンパク質相互作用の多面的な解析を目指し、フロントアルフィニティークロマトグラフィー (FAC) および NMR の手法を用いた研究を行った。主たる成果は以下の通り。

- 1) 小胞体シャペロン CRT/CNX の糖鎖認識特異性を明らかにし、CRT に結合した糖鎖の構造を解明した。
- 2) カーゴレセプター (ERGIC-53, VIP36, VIPL) の特異性を解明し、糖鎖認識の分子基盤を明らかにした。
- 3) ERAD にかかわるレクチンや PNGase の基質認識を解析した。

阪大[現 理研]鈴木グループ

- 1) 伊藤グループと共同で PNGase の特異的な阻害物質を見出した。
- 2) 質量分析と結晶解析の結果から PNGase の基質認識および反応の機構を解明した。
- 3) ショウジョウバエ PNGase 変異体の解析を行った。

東大 山本グループ

細胞内レクチンによるタンパク質輸送機構と新規カーゴレセプター創成を検討した。その結果以下の成果を得た。

- 1) VIP36 および ERGIC-53 による基質の結合 / 解離が Ca センサーおよび pH センサーによって制御されていることを示した。
- 2) ERGIC-53 の機能を調節する分子として MCSD2 存在を明らかにした。
- 3) VIP36 が Bip と結合していることを見出した。
- 4) 細胞内における VIPL と ERGIC-53 などの分子間相互作用を検証した。
- 5) マンノースレセプタードメインをもつ OS-9, XTP-3B, Glucosidase II サブユニットの糖鎖結合特異性と性状を明らかにした。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

高マンノース型糖鎖の系統的化学合成ルートの確立、酵素 化学的「トップダウン型」コンビナトリアル合成による糖鎖合成など、非常に顕著な成果が得られている。またこれらの先駆的な合成法から得られた糖鎖を用いて、Calreticulin / Calnexin、VIP36、VIPL、ERGIC-53など、糖タンパク質の品質管理で主要なタンパク質について糖鎖選択性や輸送機構について重要な知見を得ている。またUGGTの優れた人工基質を見出し、UGGTの基質特異性を解明している。グリコシダーゼ の基質特異性に関する研究を進め、細胞内環境を模倣したマクロ分子クラウディング条件で興味深い性質を示すことを見出した。これらの成果はレベルの高いJournalに発表されている。研究内容から、特許性は低く出願件数は少ない。

論文発表(国内 2件、国際 57件) 招待講演(国内 28件、国際 17件)

口頭発表(国内 99件、国際 29件) 特許出願(国内 3件、海外 2件)

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

系統的な高マンノース型糖鎖の化学合成法の確立は世界に例を見ない素晴らしい成果であり、これらの糖鎖を利用してタンパク質の品質管理における糖鎖機能を分子論的に解明した功績は大きい。

代表者らが数年前に精密化学合成に成功したC-マンノシル化トリプトファン(C-Man-Trp)に関連したC-Man化タンパク質はCD14 / TLR4系のシグナル伝達において活性化に働くことが示唆され、C-Man化されるタンパク質の同定、C-Man-WSPWの受容体の同定等ができれば、新しい分野が開ける可能性がある。またC-Man化の酵素の同定やクローニングにより、医薬品への応用が期待される。

4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

各種N-グリカンを精密に化学合成できる世界でも例がない研究代表者の研究室から、合成されたN-グリカンが生物学の研究室に供給され、考えられる最も適切な組み合わせを持つ共同研究体制で研究が推進された。

研究代表者の伊藤幸成は2008年度の Whistler International Award in Carbohydrate Chemistry を受賞したが、CRESTの研究がこのような形で結実したことは大変喜ばしいことである。共同研究者の井原義人が長崎大助教授から和歌山県立医大の教授に、鈴木匡が阪大の助教授から理研フロンティアチームリーダーに昇進した。また、若手研究者も種々の奨励賞を受賞した等、キャリアアップも多く、本チームは理想的なCREST体制であった。