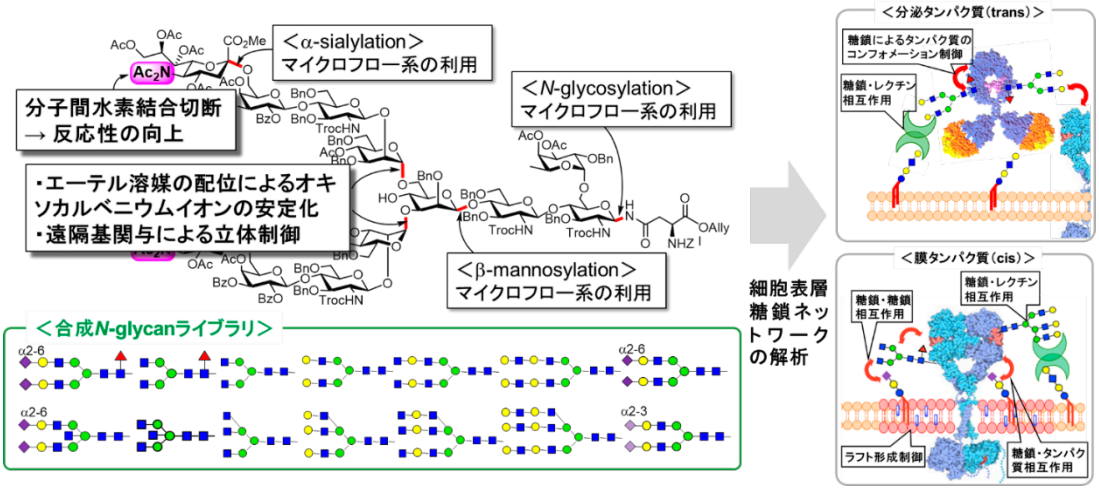
122　合成糖鎖ライブラリを用いた翻訳後修飾糖鎖の機能解明	真鍋　良幸

【目的】糖鎖は細胞表面を被覆するように大量に存在し、糖鎖－糖鎖相互作用や糖鎖－糖鎖認識タンパク質（レクチン）相互作用、ラフト形成などを介して、複雑な生体分子社会を形成する。この糖鎖を介した細胞表層ネットワークは、種々の膜タンパク質の動態・活性に影響を与える。一方で、糖鎖は構造多様性と不均一性に富み、その分子レベルでの解析は困難で、多くの場合、糖鎖の存在を無視して細胞膜上の現象の議論が進められ、糖鎖による膜タンパク質の機能調節の分子基盤はほとんど未解明である。本研究で対象とする *N*-結合型糖鎖（*N*-グリカン）はタンパク質のアスパラギン残基に結合する翻訳後修飾糖鎖で、多様な構造を持ち、その構造に基づき、タンパク質の機能を調節する。中でも、コアフコース、バイセクティンググルコサミン、ポリラクトサミン、末端ガラクトース、末端シアル酸などは、膜タンパク質の活性制御に重要であることが、生合成酵素のノックアウト実験により証明されている。これは、*N*-グリカンが、レクチンをはじめとする種々の分子と相互作用し、膜タンパク質の局在や運動性などの動態を調整して、タンパク質の機能を制御するためであると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。本研究では、化学合成により、*N*-グリカンライブラリを構築し、これを用いて、各々の糖鎖が細胞表面で形成する相互作用ネットワークを解析し、糖鎖による膜タンパク質の機能制御の分子基盤を解明することを目的とする。

【方法】コアフコース、バイセクティンググルコサミン、ポリラクトサミン、末端シアル酸などの構造を含む *N*-グリカンを化学合成した。合成した糖鎖でタンパク質を修飾し、それぞれの糖鎖がレクチンをはじめとするさまざまな生体分子と相互作用して、その動態をイメージングにより調べた。加えて、その動態変化がタンパク質の活性に及ぼす影響に関しても考察した。なお、ここでは、細胞表層における、細胞外の糖鎖修飾タンパク質との相互作用（cis 相互作用）と同一細胞上での相互作用（trans 相互作用）についてそれぞれ調べた。

【結果】*N*-グリカンの効率的合成にあたり、グリコシル化をはじめとした一つ一つの素反応の効率化が必須であると考え、マイクロフロー反応を中心に効率的糖鎖合成の基盤を築いた。その結果、2〜4 糖程度の *N*-グリカンの合成中間体は 10 g 以上のスケールで合成可能となった。これを基盤として、複数の *N*-グリカンの合成を達成した。その際、合成ストラテジーや保護基パターンを精査し、さらには酵素合成も組み合わせることで、世界的に見ても有数の *N*-グリカンライブラリの構築に成功した。さらに合成糖鎖でタンパク質を修飾し、糖鎖－レクチン相互作用が細胞表層におけるタンパク質の動態を制御することを示した。例えば、抗体を、ガラクトースを持つ *N*-グリカンで修飾することで、その内在化を抑えることができた。また、膜タンパク質の動態に糖鎖が及ぼす影響を調べるために、HaloTag を用いて合成糖鎖を再蔵表層に提示するシステムを構築した。本系においても、糖鎖-レクチン相互作用が膜タンパク質の動態に影響を及ぼすことを明確に示した。

N-グリカンの効率合成と合成 *N*-グリカンを用いた細胞表層糖鎖ネットワークの解析



122. 合成糖鎖ライブラリを用いた翻訳後修飾糖鎖の機能解明

真鍋　良幸

大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 天然物有機化学研究室

Key words：糖鎖，化学合成，イメージング，*N*-グリカン，抗体

緒　言

タンパク質の 60%以上は糖鎖修飾を受け、免疫、がんなど様々な生体現象と関与する。一方、生体内で糖鎖は様々な構造の混合物（グライコフォーム）として存在するため、糖鎖の生物機能を分子構造に基づいて解明することは困難であった。*N*-結合型糖鎖（*N*-グリカン）はタンパク質のアスパラギン残基に結合する翻訳後修飾糖鎖で、多様な構造を持ち、それぞれの構造に基づき、タンパク質の機能を調節する。中でも、コアフコース、バイセクティンググルコサミン (GlcNAc)、ポリラクトサミン、末端シアル酸などの構造は、免疫調節やタンパク質の活性制御に重要であることが、その生合成酵素のノックアウト実験により明らかにされている（図 1）。これは、*N*-グリカンが、レクチンをはじめとする種々の分子と相互作用し、タンパク質の局在や運動性などを調整して、その機能を制御するためである。本研究では、*N*-グリカンの機能解明のための合成糖鎖ライブラリ構築を目的とし、種々の構造を持つ *N*-グリカンを合成した。さらに、糖鎖修飾がタンパク質の動態に及ぼす影響を解析するために、合成 *N*-グリカンで修飾したタンパク質を調製し、ライブセルイメージングを行った。

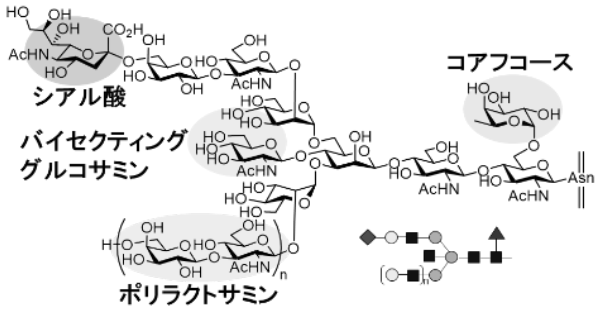


図 1. *N*-グリカンの構造
N-グリカンにそれに含まれる重要な構造（シアル酸，バイセクティンググルコサミン，コアフコース）を示す。

結果および考察

1. *N*-グリカンの合成

1）コアフコース含有 *N*-グリカン 3 の合成

まず、コアフコースとシアル酸を持つ *N*-グリカン 3 を合成した（図 2）。効率的合成を実現するために、還元末端の 4 糖 1 に対して非還元末端の 4 糖 2 を 2 度グリコシル化する収束的ルートを採用した。この際、カギとなるグリコシル化は大きなフラグメント同士のカップリングである。我々はシアル酸中の NHAc がグリコシル化の反応性を大きく低下させること、反応性の低下が分子間での水素結合の形成に起因することを見出し、NHAc を NAc_2 として保護することで、シアル酸から遠隔位のグリコシル化においても反応性と収率を大きく向上させることに成功した［1］。糖供与体

2 と 1 の［4+4］グリコシル化においては溶媒が収率に大きな影響を与え、シクロペンチルメチルエーテル（CPME）を用いた際に高収率で目的の 6 糖を与えた（表 1）。これは、エーテル系溶媒が反応中間体であるオキソカルベニウムイオンを安定化し、分解を防ぐことで、収率向上につながったと考えている。一方で、本グリコシル化の立体選択性は低く、α／β選択性は 3／1 にとどまった。続いて、ベンジリデン基を切断後、［8+4］グリコシル化を検討した。このグリコシル化においても CPME を用いることで、高収率で目的の 12 糖が得られた（87%、α／β＝1／1）。さらに、得られた 12 糖を脱保護し、目的の 3 の合成を達成した［2］。

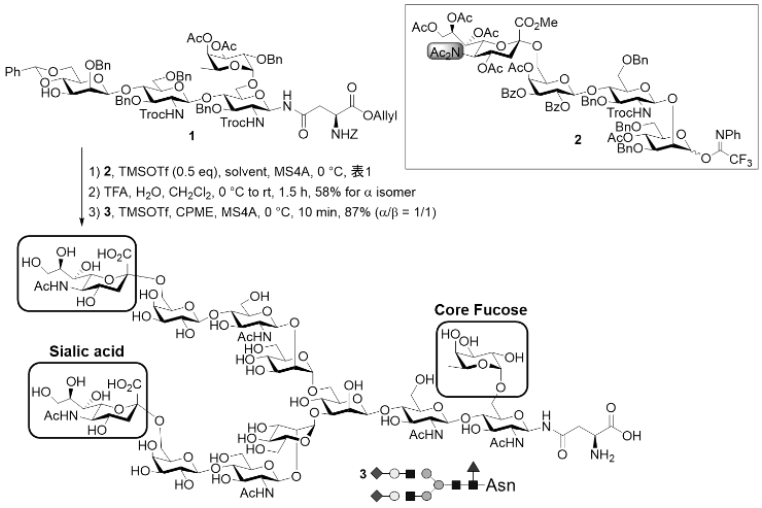


図 2. コアフコース含有 *N*-グリカン **3** の合成
コアフコース含有 N-グリカン **3** 合成を示す。

表 1. 1 と 2 のグリコシル化

entry	slovent	yield	α/β
1	CH_2Cl_2	56%	3/1
2	MeCN	59%	5/3
3	CPME	91%	3/1

化合物 1 と 2 のグリコシル化反応の検討。

2）バイセクティング GlcNAc 含有 *N*-グリカン 7 の合成

次に、バイセクティング GlcNAc 含有糖鎖 7 を合成した（図 3）。この合成においても、上記と同様に収束的な合成ルートを採用し、ここでは、骨格構築の鍵グリコシル化のα選択性を改善するために、非還元末端の 2 糖供与体の保護基パターンを検討した。上記の 3 の合成において、鍵である［4+4］、［8+4］グリコシル化の立体選択性が低い理由として、遠隔基関与を考えた（図 3 下）。Kim らはマンノースを用いたグリコシル化で、3 位や 4 位、6 位のアシル基のオキソカルベニウムイオン中間体に対する遠隔関与が、立体選択性に影響を及ぼすことを報告している［3］。上記のコアフコース含有 *N*-グリカン 3 合成においては、2 の 4 位に導入した Ac 基がα面をブロックしたため、α選択性が低下したと考えた。そこで、バイセクティング GlcNAc 含有糖鎖 7 の合成においては、4 位の Ac 基を Bn 基に変更した糖供与体 5、および 3 位と 6 位にアシル系の保護基を導入し、積極的に遠隔基関与を利用できる糖供与体 6 をそれぞれ設計・合成した。さらに、より効率的な骨格構築を目指し、還元末端の 4 糖 4 のマンノース 3 位と 6 位に対して、同時にグリコシル化を行った（表 2）。まず、5 を用いた場合、活性化剤として TfOH を用いたときに反応は良好に進行し、目的の 8 糖が 62%で得られた。なお、この際もエーテル溶媒を用いてオキソカルベニウムイオン中間体を安定化したことが高収率につながった。しかし、グリコシル化の立体選択性に関しては課題が残り、マンノース 6 位において、α／β＝3／1 にとどまった。一方、6 を用いた場合は、目的の 8 糖が 78%で得られ、完全なα選択性を示した。この

結果は、今回のような大きなフラグメント同士のグリコシル化においても遠隔基関与が利用可能であることを示しており、バイセクティング GlcNAc 含有糖鎖の効率的な骨格構築が可能となった。得られた 8 糖は脱保護を経て目的の 7 へと誘導した［4］。

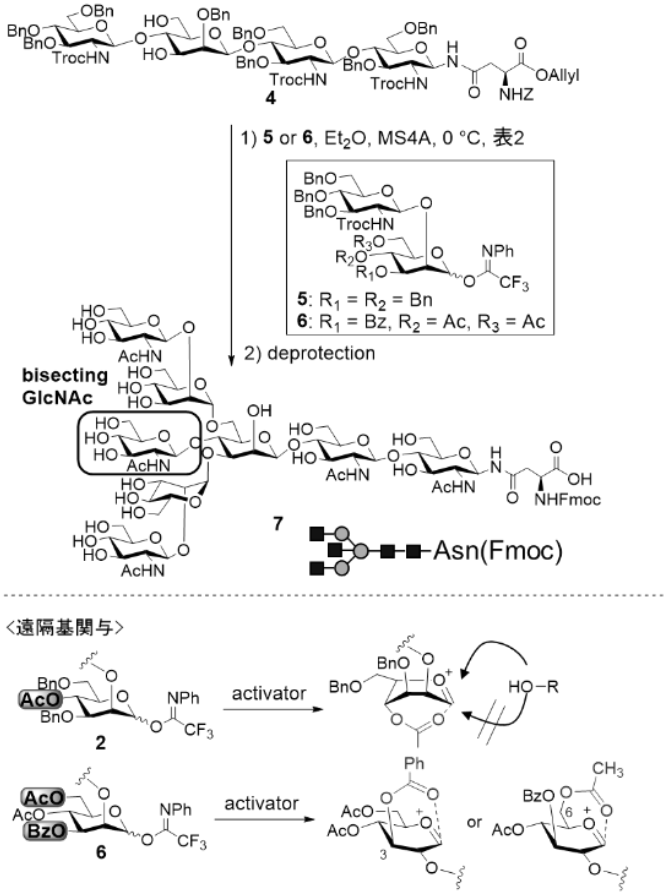


図 3. バイセクティング GlcNAc 含有 *N*-グリカン 7 の合成と遠隔基関与

上）バイセクティング GlcNAc 含有 *N*-グリカン 7 の合成ルートを示す。

下）マンノースの遠隔基関与について示す。

表 2. **4** と **5**（もしくは **6**）のグリコシル化

entry	donor	activator	yield
1	**5**	TfOH	62% (α/β = 3/1)
2	**6**	TMSOTf	78% (α only)[1]

[1]HPLC yield

化合物 **4** と **5**（もしくは **6**）のグリコシル化反応の検討。

3）ポリラクトサミン鎖含有多分枝 *N*-グリカン 16-21 の化学酵素合成

続いて、ポリラクトサミン含有多分枝 *N*-グリカン 16～21 を合成した（図 4）。ここでは、ポリラクトサミン鎖の差長と分枝数の異なる *N*-グリカンの網羅的合成を指向して、2 分枝糖鎖 12、3 分枝糖鎖 13 を化学合成し、これらの糖鎖を足場として酵素合成によりポリラクトサミン鎖を順次伸長した。まず、12、13 を化学合成した。ここでも、収束的なルートを採用し、還元末端の 3 糖 8 に対し、6 をグリコシル化することで 5 糖 9 を得た。その後、3 糖 11 をグリコシル化することで 3 分枝 8 糖 12 に導いた。同様に 2 糖 6 をグリコシル化することで 2 分枝 7 糖 13 を合成した。こ

れらのグリコシル化においても、エーテル溶媒中で遠隔基関与を利用することで、高収率かつ、完全な選択性で反応は進行した。続いて、得られた 12、13 に対して、酵素を用いてポリラクトサミン鎖を伸張した。Lin らの報告に従い [5]、ガラクトース（Gal）転移酵素（NmGalT）と *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）転移酵素（HpGnT）を調製し、これらの酵素を用いて、12、13 の非還元末端に、順次 Gal と GlcNAc を付加した。酵素反応はほぼ定量的に進行し、異なる鎖長のポリラクトサミンユニットを持つ 3 分枝 *N*-グリカン 16～18、2 分枝 *N*-グリカン 19～21 を得た。

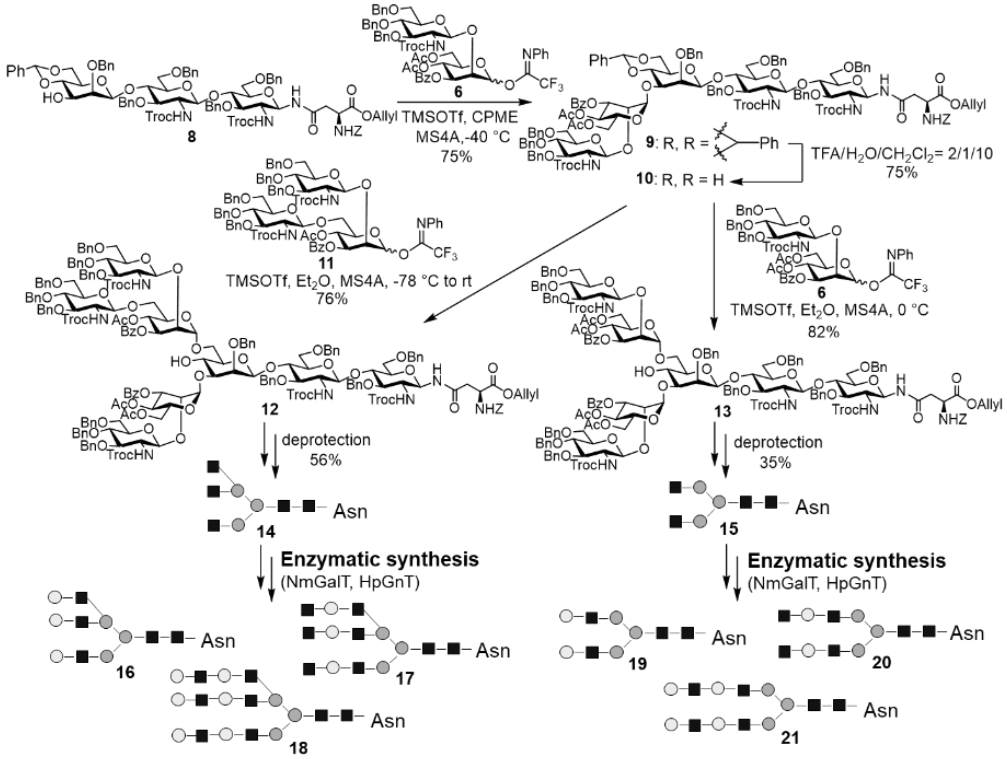


図 4. ポリラクトサミン含有多分枝 *N*-グリカン **16**～**21** の化学酵素合成
ポリラクトサミン含有多分枝 N-グリカン **16**～**21** の合成ルートを示す。

2. 合成 *N*-グリカンで修飾したタンパク質の調製とライブセルイメージング

糖鎖は糖タンパク質や糖脂質として細胞表面を覆っており、糖鎖－レクチン相互作用や糖鎖－糖鎖相互作用、糖鎖－タンパク質相互作用などを介して、複雑な生体分子社会を形成する（図 5）。細胞外複合糖質と細胞表層分子との相互作用は trans 相互作用、細胞表層複合糖質と他の細胞表層分子の相互作用は cis 相互作用と呼ばれる。これらの相互作用は、糖タンパク質の動態を調節し、その機能に影響を与える。しかしながら、糖鎖の多様性、不均一性のため、生細胞上で糖鎖構造に基づいた相互作用解析は困難であった。本研究では、均一構造の *N*-グリカンでタンパク質を標識し、その動態をライブセルイメージングにより可視化することで、*N*-グリカンの機能を解析した。

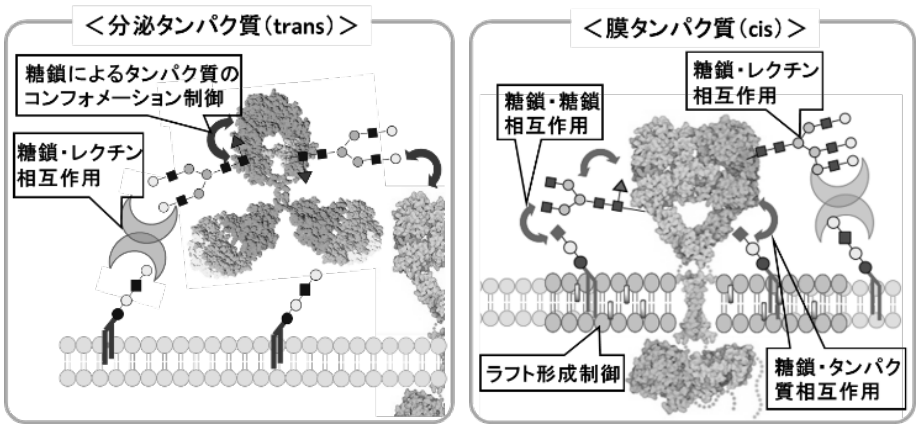


図5. 細胞表面において糖鎖が形成する生体分子社会

細胞表面における trans および cis の相互作用を示す。

1）抗体の動態制御

まず、*N*-グリカンの trans の相互作用を調べるために、抗体を合成糖鎖で標識し、その動態を解析した。抗体はもともと *N*-グリカン修飾を受けており、その構造は抗体の活性に大きく影響する。ここでは、抗体に新たに合成 *N*-グリカンを導入することで、抗体の動態制御を試みた。抗体として、乳がんに対する抗体医薬品である抗 HER2 抗体を用いた。まず、抗体を蛍光標識し、さらに合成 *N*-グリカンを導入した（図 6）。この *N*-グリカン標識蛍光抗体を乳がん細胞に作用させ、ライブセルイメージングを行った（図 7）。この際、導入した *N*-グリカンと相互作用するガレクチン-3 の共存、非共存化で観察を行った。その結果、ガレクチン-3 存在下で、エンドサイトーシスによる抗体の細胞内取り込みが顕著に減少した。この結果は、タンパク質の糖鎖が trans の相互作用を介した動態制御を受けることを明確に示すものである。

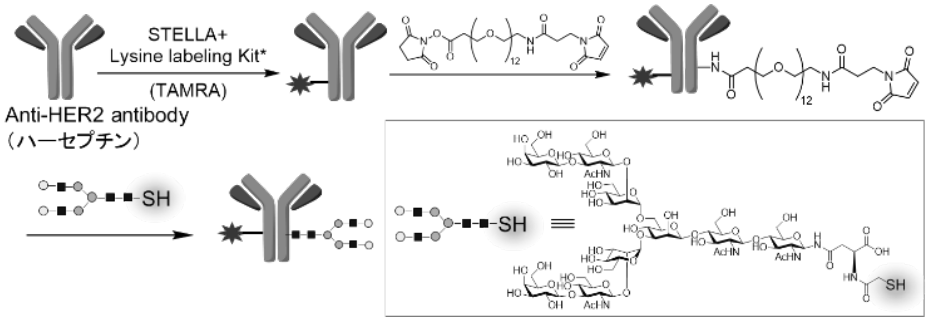


図6. 抗HER2抗体への蛍光基と合成*N*グリカンの導入

蛍光基と *N*グリカンで標識した抗体の合成ルートを示す。

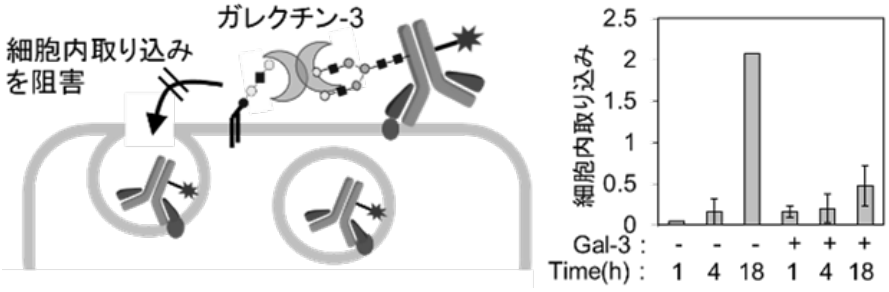


図 7. *N*-グリカン標識による抗体の動態制御

N-グリカン標識抗体の動態解析の結果を示す。

糖鎖とガレクチンの相互作用により抗体の細胞内への取り込みが抑制された。

2）膜タンパク質の動態制御

ほとんどすべての膜タンパク質は糖鎖修飾を受けているが、糖鎖修飾が膜タンパク質の活性を制御する分子基盤はほとんど解明されていない。我々は、膜タンパク質上の *N*-グリカンが形成する cis の相互作用ネットワークの解析を目指して、モデル膜タンパク質に合成糖鎖を導入する手法を開発した（図 8）。HaloTag タンパク質は、ハロゲン化アルキル（HaloTag リガンド）と速やかに反応し、共有結合を形成する。HaloTag 融合膜タンパク質を細胞上に発現させた後、*N*-グリカンと蛍光基を導入した HaloTag リガンドを作用させることで、均一な複合型 *N*-グリカンを導入した蛍光膜タンパク質を生細胞上に調製できる。 複合型 *N*-グリカンをノックアウトした細胞に対して本手法を適用することにより、特定の *N*-グリカンの相互作用解析が可能となった。すでに本手法を用いて、細胞表面に 6 種類の合成 *N*-グリカンを提示することに成功している。

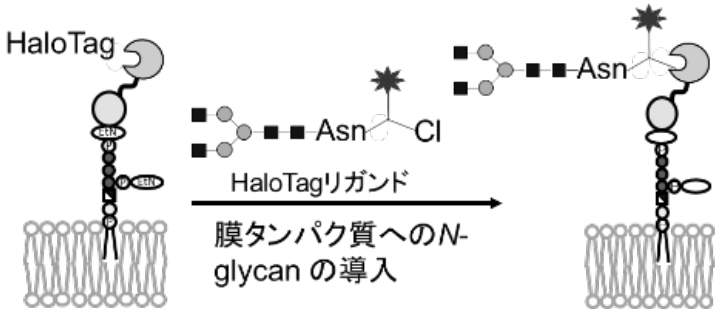


図 8. *N*-グリカン修飾膜タンパク質の調製

HaloTag を用いた合成糖鎖の細胞表面への提示法を示す。

さらに、この方法で提示した *N*-グリカンとレクチンの相互作用を確認した（図 9）。まず、バイセクティング GlcNAc 含有、非含有の *N*-グリカンを提示し、これに FITC 標識 PHA-E4 レクチン（PHA-E4 レクチン：バイセクティング GlcNAc 含有 *N*-グリカンの認識レクチン）を作用させた。その結果、FITC の蛍光はバイセクティング GlcNAc 含有 *N*-グリカンを提示した細胞でのみ観測され、提示した合成 *N*-グリカンがレクチンと相互作用することが確認できた。今後、種々の *N*-グリカンとそれぞれの認識レクチンとの相互作用が膜タンパク質の動態に及ぼす影響を調べることにより、*N*-グリカンの機能の一端を明らかにすることを計画している。

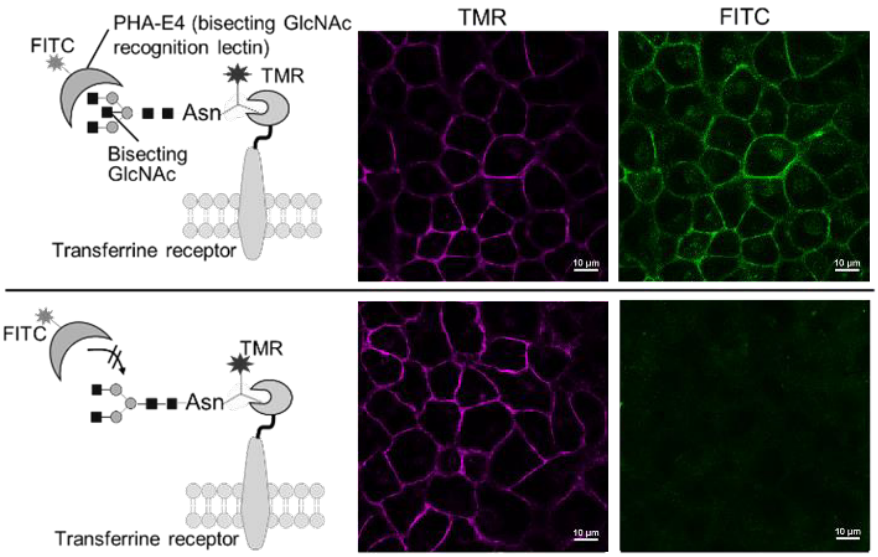


図 9. *N*-グリカン修飾モデル膜タンパク質の調製
HaloTag を用いた方法で提示した糖鎖はレクチン（PHA-E4）により認識された。
スケールバー：10 μm。

共同研究者

本研究の主な共同研究者は、大阪大学大学院理学研究科化学専攻深瀬研究室の深瀬浩一教授、樺山一哉准教授である。

文　献

1) Zhou, J.; Manabe, Y.; Tanaka, K.; Fukase, K. Chem. Asian. J. 2016, 11, 1436. PMID: 26929048 DOI: 10.1002/asia.201600139
2) Nagasaki, M.; Manabe, Y.; Minamoto, N.; Tanaka, K.; Silipo, A.; Molinaro, A.; Fukase, K. J. Org. Chem. 2016, 81, 10600. PMID: 27775350 DOI: 10.1021/acs.joc.6b02106
3) Baek, J. Y.; Lee, B-Y.; Jo, M. G.; Kim, K. S. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 17705. PMID: 19908841 DOI: 10.1021/ja907252u
4) Manabe, Y.; Shomura, H.; Minamoto, N.; Nagasaki, M.; Takakura, Y.; Tanaka, K.; Silipo, A.; Molinaro, A.; Fukase K. Chem. Asian. J. 2018, 13, 1554. MID: 29665315 DOI: 10.1002/asia.201800367
5) Chien, W. T.; Liang, C. F.; Yu, C. C.; Lin, C. H.; Li, S. P.; Primadona, I.; Chen, Y. J.; Mong, K. K. T.; Lin, C. C. Chem. Commun. 2014, 50, 5786. PMID: 24756160 DOI: 10.1039/c4cc01227e