

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05401

研究課題名(和文)糖鎖合成・生化学の融合研究で解明する糖脂質GPI側鎖構造の多様化メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism for diversifying the branched structure of GPI elucidated by interdisciplinary research in glycochemistry and glycobiology

研究代表者

田中 秀則 (Tanaka, Hide-Nori)

岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・助教

研究者番号：20725064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：GPIは真核生物に広く保存された糖脂質である。真核生物間で共通のコア構造を持ち、哺乳動物のGPIは更にGlcNAc、続いてGal、そしてSiaが繋がった側鎖が存在する。また、タンパク質の種類により側鎖構造に多様性があることが知られている。近年、GPI側鎖伸長で働くGal転移酵素がスフィンゴ糖脂質GM1合成酵素B3GALT4であることが明らかになった。そこで本研究では、糖鎖合成化学と糖鎖生化学の融合アプローチによる、GPI側鎖構造の多様化メカニズムの解明を目的とした。B3GALT4の酵素的性質を明らかにするため、酵素基質となるGPI-GalNAcの化学合成を目指し、各ユニットの合成に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖脂質GPIは細胞内で小胞体とゴルジ体中存在する19の酵素群によって生合成されるが、これら生合成酵素の酵素的性質は未だに何一つとして解析されていない。GPI生合成メカニズム解析が進んでいない原因として挙げられるのが、in vitro酵素活性評価系の構築の難しさである。特に酵素活性評価に必要とされる量の高純度GPI分子を天然から入手できないことが大きな障壁となっていた。本研究では、酵素基質であるGPI分子を高純度かつ大量に供給できる合成基盤を確立することでこの難題を解決し、GPI生合成酵素の酵素的性質を世界で明らかにする点で学術的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：GPI is a glycolipid that is widely conserved among eukaryotes. It has a common core structure among eukaryotes, and mammalian GPI has a side chain with GlcNAc, followed by Gal, and Sia. It is also known that the side chain structure varies depending on the type of protein. In recent years, it has been revealed that the Gal transferase that works in GPI side chain elongation is the sphingoglycolipid GM1 synthase B3GALT4. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of diversification of GPI side chain structure by interdisciplinary research in glycochemistry and glycobiology. To clarify the enzymatic properties of B3GALT4, we aimed to chemically synthesize GPI-GalNAc, which serves as the enzyme substrate, and worked on the synthesis of each unit.

研究分野：生物有機化学

キーワード：糖脂質GPI 糖鎖合成 蛍光プローブ 糖転移酵素 B3GALT4 PGAP4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリコシルホスファジリノシトール (GPI) は真核生物に広く保存された糖脂質であり、タンパク質の GPI 付加は生物学的に重要な翻訳後修飾である。翻訳後修飾は小胞体で起こり、GPI 付加タンパク質 (GPI-AP: GPI アンカー型タンパク質) は GPI 構造が成熟されるゴルジ体を経由して、細胞表面へと選択的に輸送される。ヒトでは、酵素、受容体、細胞接着因子、補体制御因子、プリオンを含む 150 以上の GPI-AP が存在し、様々な生命現象における GPI-AP の重要性が確認されている。

GPI は真核生物間で共通のコア構造を有し、タンパク質の C 末端と結合するエタノールアミンリン酸 (EtNP) に続き、トリマンノース (tri-Man)、グルコサミン (GlcN)、ホスファジリノシトール (PtdIns) から成る。哺乳動物の GPI は共通コア構造に加え、tri-Man の還元末端糖 2 位に EtNP、4 位に $\beta(1\rightarrow4)$ 結合で *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、続いてガラクトース (Gal) そしてシアル酸 (Sia) が繋がった側鎖が存在する。タンパク質の種類により、側鎖が asialo (Sia の欠損) 体や agalacto (Sia と Gal の欠損) 体で存在する場合もあり、GPI 側鎖構造は多様である。近年、GPI 側鎖伸長で働く GalNAc 残基に Gal を転移させる酵素がスフィンゴ糖脂質 GM1 合成酵素 B3GALT4 であることが同定された。すなわち、B3GALT4 が GPI-GalNAc (GalNAc 含有 GPI) と GM2 (GM1 生合成前駆体) の構造が異なる二つの基質を同じ活性部位で認識して Gal 転位反応を触媒している可能性が示された。B3GALT4 は哺乳動物細胞で異なる二つの糖脂質生合成を制御していることが考えられるが、その制御メカニズムは不明である。

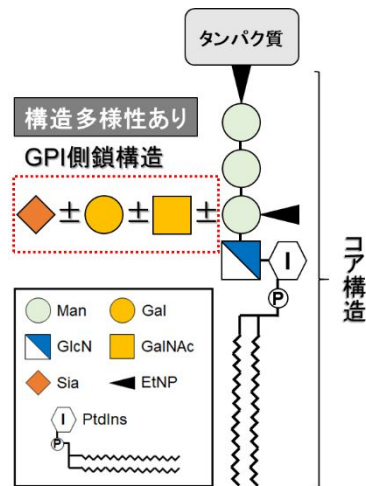


図1. GPI-APの化学構造

2. 研究の目的

本研究では、GPI-GalNAc 分子の化学合成を達成し、合成分子を基質とした B3GALT4 の *in vitro* 反応系を確立することで、これまで細胞レベルでしか議論できなかった GPI 側鎖生成における B3GALT4 の酵素学的特性を分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

【1. GPI-GalNAc と GPI 四糖の化学合成】

B3GALT4 機能解析のため、高感度で酵素活性評価が可能な GPI-GalNAc 蛍光ラベル体 (1) に加え、GlcN と PtdIns を除いた GPI 四糖 (2) の化学合成を達成する。形成が難しい α グリコシド結合を含む擬二糖脂質 (GlcN+PtdIns) との縮合反応で、1 の GPI 骨格を形成する。続く、EtNP 修飾と脱保護で 1 の化学合成を達成する。1 の非還元末端 Man の EtNP には、B3GALT4 による認識に影響が出ないように分子サイズが小さい *N*-メチルアントラニロイル基 (MANT 基: ex = 340 nm, em = 440 nm) を蛍光団として導入する。また、B3GALT4 が GlcN-PtdIns を認識しているかを調べるため、1 の中間体である四糖から誘導し、2 を合成する。

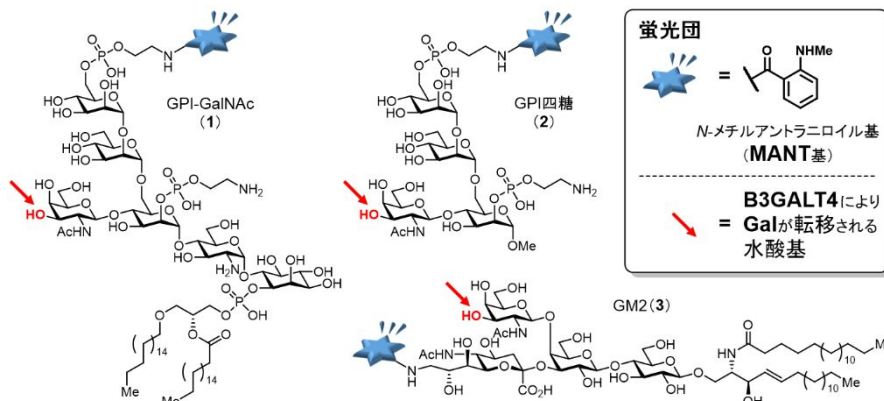


図2. 糖脂質蛍光ラベル体

【2. B3GALT4 活性評価】

ヒスチジンタグを付加した分泌型の B3GALT4 をヒト胎児腎細胞株 (HEK293 細胞) に発現させ、培養上清から Ni セファロースレジンを用いたアフィニティー精製によりリコンビナント B3GALT4 を得る。続いて、化学合成した 1 と 2、別途調製した GM2 蛍光ラベル体 (3) を基質としたリコンビナント B3GALT4 の *in vitro* 反応系を確立し、HPLC 分析による活性評価を行う。それぞれの基質に対する酵素学的パラメーター ($K_m \cdot V_{max} \cdot K_{cat}$) を測定することで、B3GALT4 の基質特異性を明らかにする。また、1 と 3 の両基質が存在する条件下で B3GALT4 の酵素活性

を評価し、単一分子での酵素学的パラメーターを比較することで、生細胞で競合阻害が起こっている可能性を検証する。

4. 研究成果

【1. GPI-GalNAc 及びその類縁体の化学合成】

まず GPI-GalNAc の骨格構築に必要な四糖ビルディングブロック (tri-Man+GalNAc) の合成に取り組んだ。di-Man と Man-GalNAc を縮合する合成経路を立案し、まずは di-Man 骨格を構築した。[1+1]カップリングにおいては、Schmidt グリコシル化反応で α 選択的かつ良好な収率にて di-Man 骨格構築に成功した。続く [2+2]カップリングでは反応条件を検討し、Gin らが報告した脱水型グリコシル化反応において α 選択的かつ定量的に四糖骨格を構築できることを見出した。

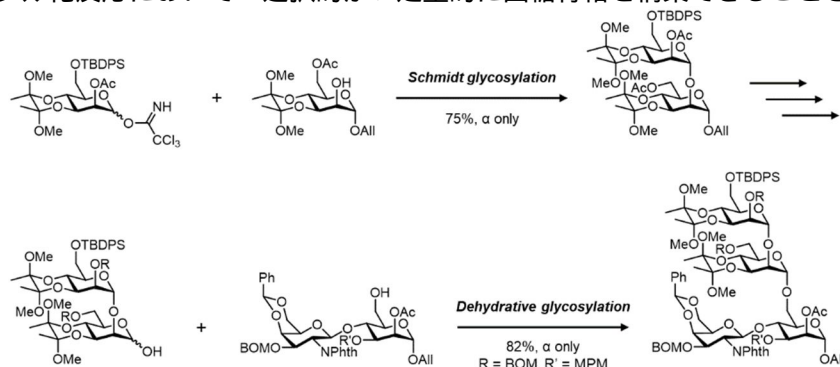


図3. 四糖骨格構築

続いて、擬二糖脂質ビルディングブロックの合成に取り組んだ。調製した GlcN とベンジルメトキメチル (BOM) 保護 Ins ビルディングブロックを用いて、脱水型グリコシル化反応で擬二糖骨格構築を試みた。反応は進行したものの多数の副生成物を与えたため、望む擬二糖の収率は 28% に留まった。また、立体選択性も $\alpha:\beta = 1.6:1$ と低かった。グリコシル化反応における保護基の影響を検証するため、BOM 基から *p*-メチルベンジル (MBn) 基に変更した保護様式の Ins ビルディングブロックを調製し、同条件にて脱水グリコシル化反応に供した。目的物は得られたが、収率は 31% と改善が見られないばかりか、望まない β 選択性 ($\alpha:\beta = 1:3.3$) が発現した。これら結果から、嵩高い BOM 保護 Ins を用いた場合より立体障害が小さい MBn 保護 Ins を用いた場合で β 選択性が増すため、グリコシルトリフレート中間体を経由していることが強く示唆された。収率および立体選択性を向上させるため、現在 Crich らによって報告された 4 位と 6 位水酸基をボロン酸エステルで保護したグリコシル供与体を用いた α 選択的グリコシル化反応を検討している。

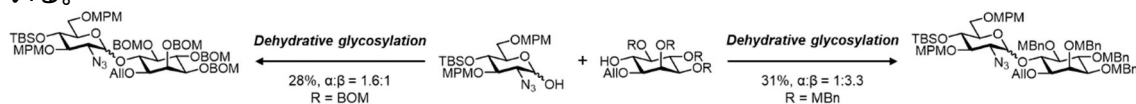


図4. 擬二糖骨格構築

蛍光プローブ合成に向けて、tri-Man をモデル基質として MANT 修飾 EtNP 基の導入に取り組んだ。tri-Man の還元末端 Man の 2 位水酸基を EtNP 化した後、アミダイト法を利用して非還元末端 Man の 6 位水酸基への *N*-Boc 保護 MANT 修飾 EtNP 基の導入を試みた。アミダイト化反応、続く酸化反応ともに良好に進行し、DBU によるシアノエチル基の除去でリン酸ジエステル体に誘導した。イオン交換クロマトグラフィー精製で望む生成物の単離に成功した。最後に、酸性条件下ですべての保護基を除去し、tri-Man モデル蛍光プローブの合成を達成した。確立した合成経路を 1 と 2 の合成に取り組む予定である。

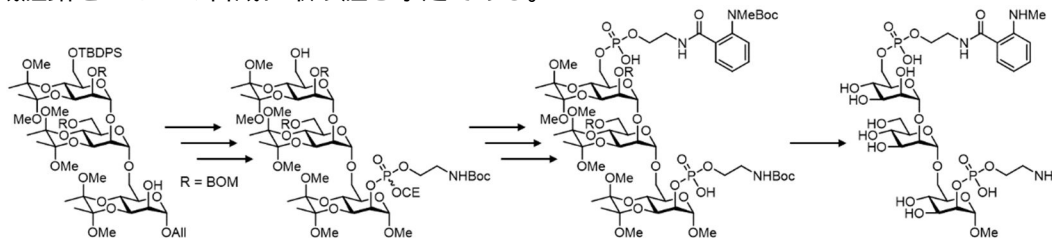


図5. tri-Manモデル蛍光ラベル体の合成

【2. B3GALT4 活性評価】

B3GALT4 の酵素基質となる 1 と 2 の化学合成が達成できなかったため、本研究項目は実施できなかった。研究分担者によりリコンビナント B3GALT4 が発現精製されているため、1 と 2 の化学合成が達成し、目的とする B3GALT4 活性評価を実施すべく研究を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hagino Rui, Mozaki Keita, Komura Naoko, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Ando Hiromune, Tanaka Hide Nori	4. 巻 26
2. 論文標題 Synthetic Approaches to Ribosyl Adenosine 5',5'-Diphosphate Fragment of Poly(ADP-ribose)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 e202300875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.202300875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hagino Rui, Komura Naoko, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Ando Hiromune, Tanaka Hide Nori	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct and Stereoselective Protecting Group Free <i>N</i> -ADP Ribosylation through Traceless Staudinger Ligation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 e202400251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.202400251	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamaya Yu, Komura Naoko, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Ando Hiromune, Tanaka Hide-Nori	4. 巻 67
2. 論文標題 Protecting-group- and microwave-free synthesis of <i>N</i> -glycosyl esters and aryl <i>N</i> -glycosides of <i>N</i> -acetyl- <i>D</i> -glucosamine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116852 ~ 116852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.116852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hagino Rui, Mozaki Keita, Komura Naoko, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Ando Hiromune, Tanaka Hide-Nori	4. 巻 7
2. 論文標題 Straightforward Synthesis of the Poly(ADP-ribose) Branched Core Structure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 32795 ~ 32804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c04732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hide-Nori Tanaka, Yuta Umemura, Naoko Komura, Akihiro Imamura, Hideharu Ishida, Rumana Yesmin HASI, Toshiki Ishikawa, Tamotsu Tanaka, Hiromune Ando
2. 発表標題 Synthetic study on plant glycosphingolipid GIPC
3. 学会等名 The 21st European Carbohydrate Symposium in Paris (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rui Hagino, Naoko Komura, Akihiro Imamura, Hideharu Ishida, Hiromune Ando, Hide-Nori Tanaka
2. 発表標題 Protecting-group-free phosphate cross-coupling enables efficient synthesis of ADP-ribose molecules
3. 学会等名 The 21st European Carbohydrate Symposium in Paris (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅村悠太、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、Rumana Yesmin HASI、石川寿樹、田中保、安藤弘宗、田中秀則
2. 発表標題 植物スフィンゴ糖脂質GIPCの合成研究
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩野瑠衣、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、安藤弘宗、田中秀則
2. 発表標題 無保護リン酸クロスカップリング反応を鍵としたADPリボース関連分子の高効率合成
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中秀則、萩野瑠衣、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、安藤弘宗
2. 発表標題 ADPリボース分子の化学合成法の開発
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅村悠太、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、安藤弘宗、田中秀則
2. 発表標題 糖供与体4,6-0-フェニルボロン酸エステル保護基がグリコシル化反応の立体選択性に与える影響の検証
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小林萌々香、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、安藤弘宗、田中秀則
2. 発表標題 1,5-ラクタム化シアル酸橋頭位ラジカルを利用したC-シアロシド合成法の開発
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 梅村悠太、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、安藤弘宗、田中秀則
2. 発表標題 糖供与体4,6-0-フェニルボロン酸エステル保護基がグリコシル化反応の立体選択性に与える影響の検証
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小林萌々香、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、安藤弘宗、田中秀則
2. 発表標題 1,5-ラクタム化シアル酸橋頭位ラジカルを利用したC-シアロシド合成法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田中秀則、萩野瑠衣、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、安藤弘宗
2. 発表標題 立体選択的N結合型ADP-リボシル化分子の合成法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田中秀則
2. 発表標題 ADP-リボース鎖分子の自在合成のための効率合成法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平塚諒大、田中秀則、濱島将伍、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、安藤弘宗
2. 発表標題 GalNAc側鎖を有する哺乳動物GPIの合成研究
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平塚諒大、濱島将伍、田中秀則、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、安藤弘宗
2. 発表標題 GPI側鎖生合成酵素PGAP4の活性評価に向けた GPIの全合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平塚諒太、田中秀則、濱島将伍、河村奈緒子、今村彰宏、石田秀治、安藤弘宗
2. 発表標題 GalNAc側鎖を有する哺乳動物GPIの全合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脱ADP-リボシル化酵素活性検出用蛍光プローブとして有用な化合物、その塩、又はそれらの溶媒和物	発明者 田中秀則、萩野増衣、海老原章郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2024-27675	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤田 盛久 (Fujita Morihisa) (30532056)	岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・教授 (13701)	
研究分担者	平田 哲也 (Hirata Tetsuya) (90780651)	岐阜大学・高等研究院・特任助教 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------