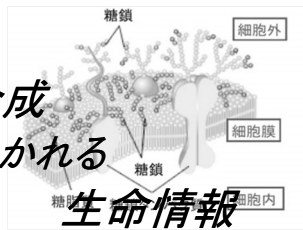


複雑な糖鎖の合成からひもとかれる



生命情報

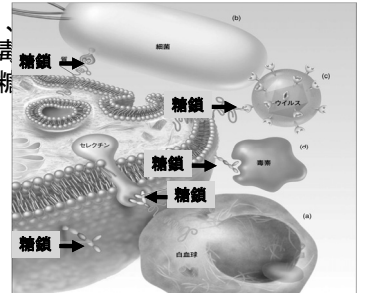
糖

群馬大学大学院工学研究科
応用化学・生物化学専攻
松尾一郎



糖鎖は様々な生命現象に関与する生体分子

糖鎖機能: 細胞間の識別、細菌・ウイルス感染、毒素の認識と糖鎖、癌と糖鎖・糖鎖と免疫・・・etc.



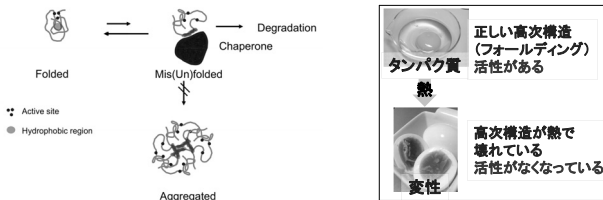
マンギー生化学より

タンパク質の品質管理

最近明らかになった糖タンパク質糖鎖の機能

タンパク質の品質管理機構に糖鎖が関与?

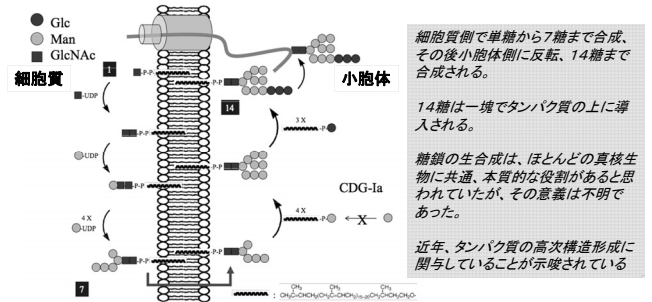
正しいフォールディングを受けたタンパク質のみが機能を持つ



- 細胞内にはタンパク質のフォールディングを助けるタンパク質(シャペロン)が存在する
- その中には糖タンパク質糖鎖を認識するものがある (Calnexin/Calreticulinサイクルでタンパク質の高次構造をつくる)
- アスパラギン結合型糖鎖(高マンノース型糖鎖)がこの過程に関わっている (小胞体でタンパク質に導入される糖鎖の役割は明らかになっていない)

アスパラギン結合型糖鎖の生合成経路は真核生物に共通、しかしその生物学的意義は不明

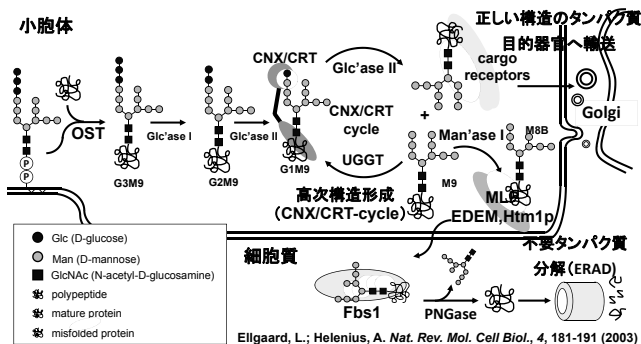
小胞体ではアスパラギン結合型(高マンノース型)糖鎖が導入される



糖鎖生合成の不良が原因の疾患が知られている: CDG (congenital Disorders of Glycosylation)

糖鎖がタンパク質の高次構造形成に関与?

—タンパク質が機能発現するために糖鎖は必要 = 生命現象の根幹—



糖鎖構造を認識するタンパク質の複雑な連携によってなされる糖鎖-タンパク質の定量的な基質特異性解析や相互作用解析は行われていない

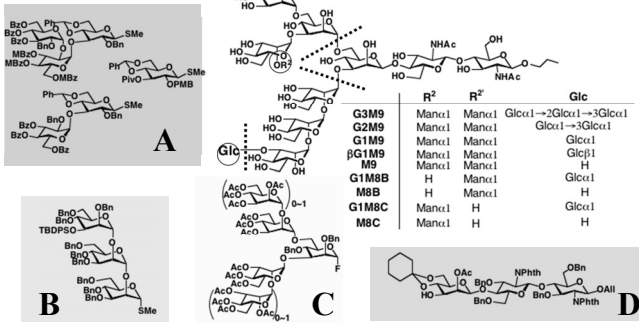
複雑な糖鎖の合成からひもとかれる生命情報

どのようにして生命情報をひもとくのか?

- 高マンノース型糖鎖はタンパク質の高次構造形成に関与
 - タンパク質の取捨選択、運命を決めている?
- 高マンノース型糖鎖の品質管理機構への関わりを分子レベルで調べる
 - 糖鎖サンプルを用意して調べればわかる(はず)
 - 糖鎖を化学合成する
 - 合成糖鎖を利用して糖鎖と関連のタンパク質との相互作用を機器分析装置で解析する
 - 定量的データから糖鎖の役割を考える

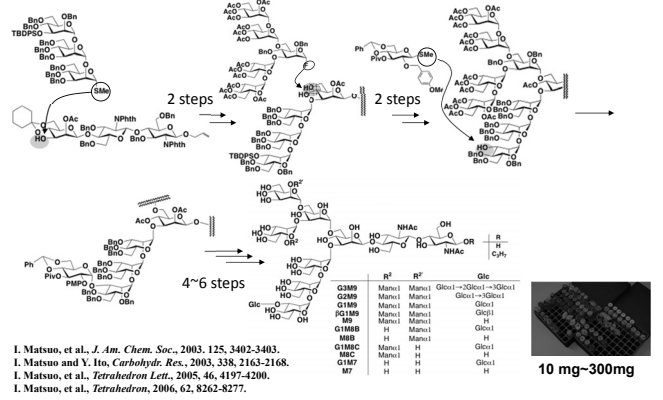
合成化学的アプローチだからこそわかることがある!!

糖鎖構造を認識するタンパク質を解析するために
 — 収斂的経路を利用して小胞体型糖鎖を系統的に合成する —



ある程度のブロックに分けて合成後、繋ぎあわせるので効率的

収斂的経路によるアスパラギン結合型糖鎖の合成



10 mg-300mg

糖タンパク質の高次構造形成に関与する
 タンパク質の分子レベルでの解析

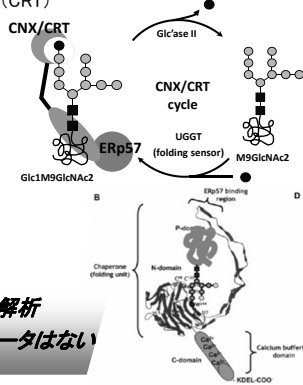
レクチン様分子シャペロン:カルレチキユリ(CRT)

MW:46000
 Lectin like chaperone (ERp57と協調)
 Ca²⁺ binding protein
 Cell adhesion
 Control of gene expression

糖鎖認識に関する研究

- G1M9糖鎖を認識および分岐部分の構造(B,C-arm)の構造が結合に影響を与える
 - * A. Vassiliakos et al. *J. Biochemistry* 1998, 37, 3480.
 - * R.G. Spiro et al. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 11588.
 - (CRT 固定化カラムを用いた pull down assay)
- G1M3オリゴ糖の結合定数(K_a)は10⁶M⁻¹である
 - * M. Kapoor et al. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 6194.
 - (糖鎖部分構造を用いたITCによる解析)

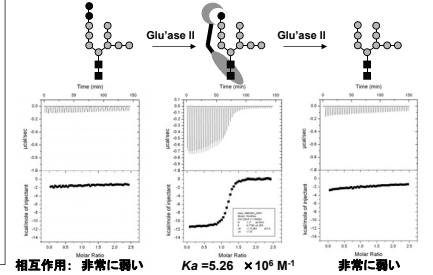
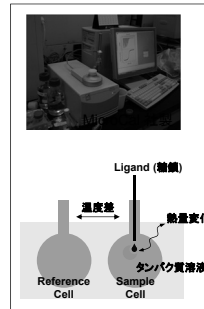
糖鎖の全体構造を用いた定量的解析
 糖鎖の認識部位に関する実験データはない



等温滴定型熱量計 (Isothermal titration calorimetry: ITC) を用いた小胞体関連糖鎖とCRTとの相互作用解析

Isothermal titration calorimetry 法

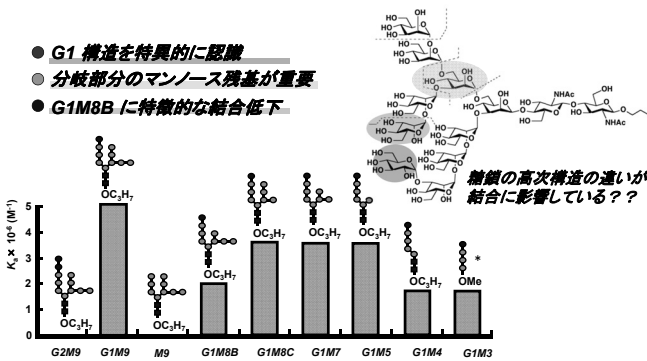
- ラベル、固定化する必要が無い!
- × 糖鎖およびタンパク質がmgオーダーで必要



Conditions: 30 μM protein (10 mM MOPS, 5 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, pH 7.4) in a sample cell (volume 1.4181 mL), 300 μM oligosaccharide solution at 293K. The oligosaccharide solution was added as 50 injections of 6 μM into the sample cell

等温滴定型熱量計(ITC)によるCRTの特異性解析
 — 糖鎖微細構造の違いにより認識能が異なる —

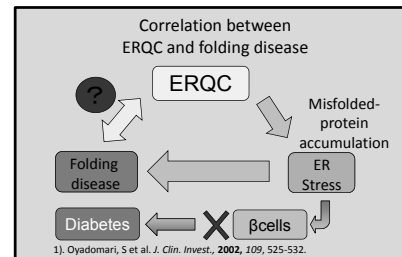
- G1 構造を特異的に認識
- 分岐部分のマノース残基が重要
- G1M8B に特徴的な結合低下



* Kapoor, M., Srinivas, H., Kandiah, E., Gemma, E., Ellgaard, L., Oscarson, S., Helenius, A., Suroli, A., *J. Biol. Chem.* 278, 6194, 2003. "Interactions of Substrate with Calreticulin, an Endoplasmic Reticulum Chaperone"

糖鎖の微細な構造の違いが
 タンパク質品質管理機構を制御している?

仮説: 品質管理機構に関連するタンパク質の活性の差により小胞体の糖鎖構造の違いが生じるのでは?

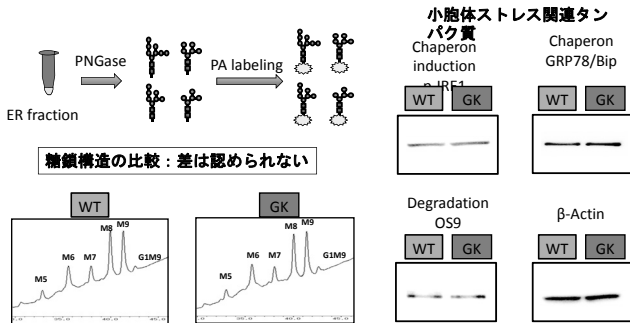


フォールディング病に糖鎖を介した品質管理機構の痕跡があるか?

糖鎖分子プローブを用いた小胞体関連酵素活性プロファイリング (糖鎖プロファイリング)

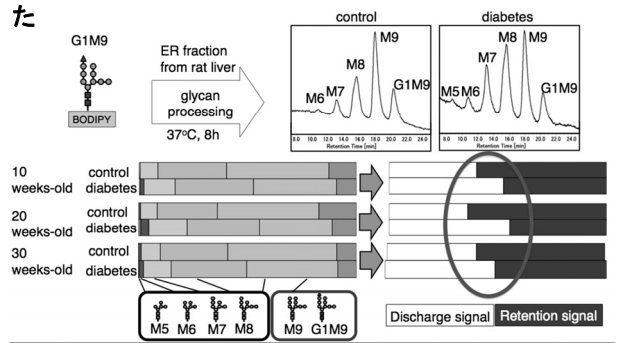
糖鎖分子プローブを用いた小胞体関連酵素活性プロファイリング (糖鎖プロファイリング)

糖尿病マウスをモデルとしてラット肝臓小胞体画分の糖タンパク質糖鎖の構造を解析、糖鎖構造の差異はない

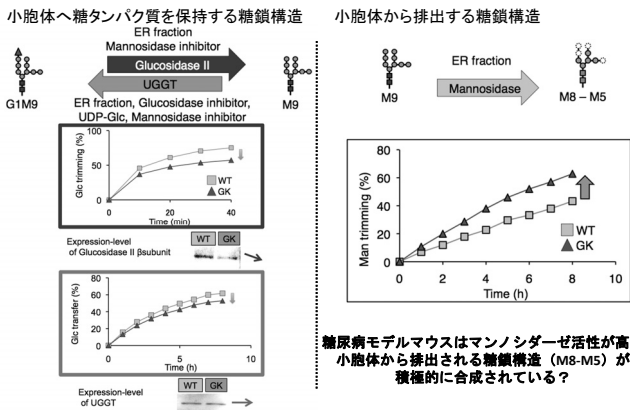


糖鎖分子プローブを用いた小胞体関連酵素活性プロファイリング

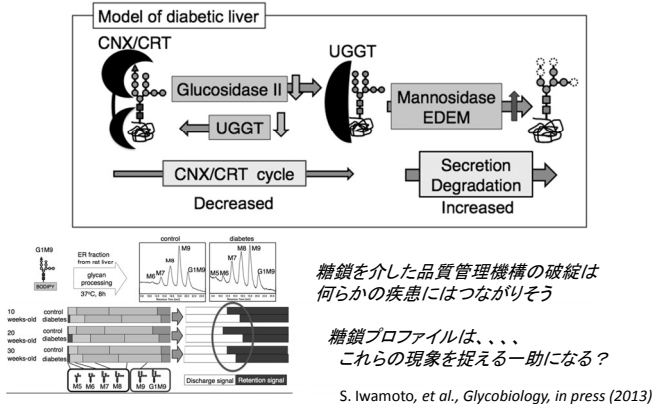
糖鎖分子プローブをラット肝臓小胞体画分で処理 → 異なる糖鎖プロファイルを示した



小胞体関連酵素活性の違いにより糖鎖構造プロファイルに差異



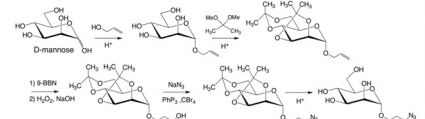
糖鎖分子プローブを用いた小胞体関連酵素活性プロファイリング (糖鎖プロファイリング) で疾患に迫れるか?



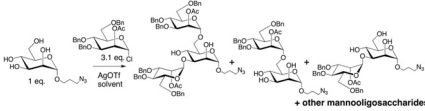
研究成果最適展開支援プログラム A STEP (H23年度)

病原体を除去する分岐型マンノース結合高機能性綿球の開発

マンノース受容体の合成



選択的マンノシル化反応による分岐型オリゴ糖の合成



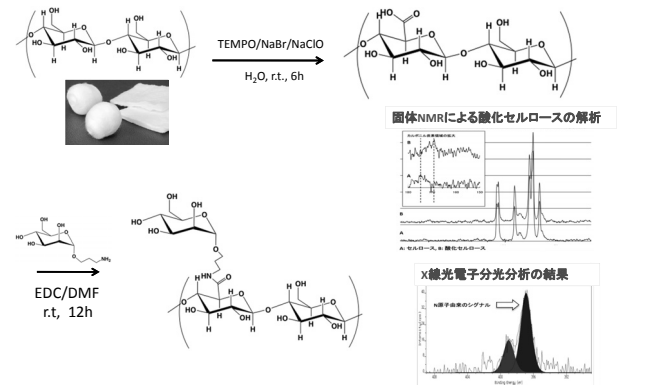
病原性細菌・ウイルスを糖鎖により吸着除去、衛生状態を改善

糖鎖高分子材料は有効
コンセプト：OK 実証済み
実用化：NG 糖鎖大量調製がボトルネック

分岐型マンノオリゴ糖の簡便合成技術
100グラムスケール
効率的大量合成
化学修飾による
汎用性向上
市販の綿球の
高機能化、定量技術
糖鎖大量精製技術

糖鎖の大量供給を實現化

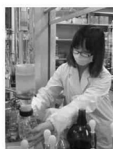
酸化セルロースの調製とマンノース誘導体の導入



群馬大学大学院工学研究科 応用化学・生物化学専攻

糖鎖化学研究室(松尾研究室)

MATSUO
Labo



糖鎖をたくさんつくる

糖鎖合成化学を基盤として、糖鎖プローブを創り出し、生化学的な解析を通して糖鎖の機能を理解する。そして糖鎖の機能を生かした機能性材料の開発へと展開する。

謝辞:本研究の一部は、理化学研究所、ERATO-JST主任研究員 伊藤幸成先生
成蹊大学大学院工学研究科 准教授 戸谷希一郎先生のご協力、ご助言を頂きました。