第37回糖質科学懇話会

Detection of *N*-linked Oligosaccharide Processing Enzyme Activity at Cellular Level

ヒト細胞における糖鎖プロセッシング酵素活性の可視化にむけて

日本大学生物資源科学部生命化学科 准教授

袴田 航 (はかまた わたる)

Associate Professor, Department of Chemistry and Life Science, College of Bioresource Sciences, Nihon University

Wataru Hakamata

1. はじめに

20世紀後半から、糖質は核酸・タンパク質に続く「第三の生命情報物質」として注目を集めはじめた。今ではその機能の重要性は広く認識され、高校の教科書に紹介されるまでになっている。このような糖質は、比較的短い糖鎖としてタンパク質や脂質に結合し、発生、分化、癌、感染、炎症、老化、生殖、再生などの多くの生物現象に広く関わっている。この「第三の生命情報物質：糖鎖」には、タンパク質に結合する糖鎖と脂質に結合する糖鎖があり、タンパク質結合糖鎖は*N*結合型と*O*結合型がある。本稿では、*N*結合型糖鎖のプロセッシングについて簡単に述べさせていただく。

2. *N*結合型糖鎖プロセッシング酵素と酵素活性可視化の意義

真核生物では、非常に多くのタンパク質が糖鎖修飾を受けている。特に単膜系オルガネラに輸送されるタンパク質において、その修飾割合は8割とも9割ともいわれている。このように修飾を受けるタンパク質は小胞体上のリソソームで合成され、同時に小胞体内腔に輸送される。そこで小胞体膜に結合したオリゴ糖転移酵素によってコンセンサス配列上のアスパラギン残基の側鎖のアミノ基に14糖からなるオリゴ糖が付加される。付加された14糖は小胞体内の2種類のグルコシダーゼIおよびIIによって、末端のグルコース残基が取り除かれる。このプロセスは、小胞体におけるタンパク質の*N*結合型糖鎖プロセッシングの最初のステップである。その後、正常に糖鎖がプロセッシングされたタンパク質はゴルジ体へと輸送される。輸送された糖タンパク質は、そこでさらにゴルジ体マンノシダーゼによってプロセッシングを受け、複雑な糖鎖構造を獲得し目的の場所へ輸送され、それぞれの機能を果たすこととなる。そして機能を果たし寿命を迎えた糖タンパク質の多くはリソソームで分解される。

このような糖鎖プロセッシングシステムを解明するにあたり、培養細胞レベルでそれら酵素の活性を可視化することができれば、それら酵素の機能解明に寄与できると考えて

いる。しかしながら、これら酵素活性を培養細胞レベルで可視化することは十分に達成されていない。そこで、糖鎖プロセッシングシステム解明の一助となればと思い、糖鎖プロセッシングに関与する小胞体グルコシダーゼ・ゴルジ体マンノシダーゼ・リソソーム フコシダーゼ活性を細胞内で特異的に高感度に検出可能な蛍光基質の開発を試みている。更に、得られた蛍光基質はこれら酵素の細胞レベルで作用する阻害剤の探索を可能とする。阻害剤を探索する過程で頻繁に直面する問題として、*in vitro*で強力な酵素阻害活性を示す化合物であっても、培養細胞を用いたアッセイ系ではほとんど阻害活性を示さないケースが多くある。この阻害活性の不一致の問題は、培養細胞における化合物の膜透過性および代謝変換の問題を含み、阻害剤スクリーニングの効率を大きく低下させていた¹⁾。本問題を解決するためにも、蛍光基質は重要であり得られる阻害剤は多くのウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことが期待される¹⁻³⁾。

3. 細胞内で機能する蛍光基質の分子設計

一般に糖鎖プロセッシング酵素は特異的な糖鎖構造を認識して加水分解を行う。そのために、酵素の活性部位には糖残基を認識するサブサイトが存在する。故にサブサイトは単糖を認識する程度の空間的大きさしか持っていない場合が多い。一方、蛍光基質に必須な蛍光団は平面性が高く分子サイズが単糖よりも大きいので、酵素のサブサイトは立体的に蛍光団を受け入れがたいことが容易に予想された。本予想は、基質となる糖残基に蛍光団を直接グリコシル化する分子設計が適切でないことを意味する。そこで、蛍光団を酵素の外側へ配置させるために糖残基と蛍光団の間にキノンメチド開裂(1,6-脱離反応)部位を設けたプローブの基本設計を行った(図1)。有機化学的には、キノンメチド開裂が進行することに疑いの余地はないが、細胞中でオルガネラ特異的に、しかも効率よく反応が進行するかは確証が持てなかった。そこで、小胞体に局在するカルボキシエステラーゼを標的酵素として、本コンセプトの実証実験を行った。その結果、プローブは酵素の局在する小胞体のみを特異的に蛍光染色したことから、本プローブが細胞中

図1. 加水分解反応後のキノンメチド開裂 (1,6-脱離反応) に伴った蛍光団遊離機構

で望んだ機能を発揮することが示された⁴⁾。

3.1 小胞体グルコシダーゼの蛍光基質開発

小胞体にはグルコシダーゼIとIIが存在する。それぞれの基質特異性の解析を行った結果、小胞体グルコシダーゼIは糖鎖のみを基質とし、小胞体グルコシダーゼIIは糖鎖と単糖誘導体の両方を基質とし、2-デオキシグルコシダーゼ活性も有することが認められた⁵⁾。そこで、糖部分を2-デオキシグルコースとし、赤・青・緑の蛍光団結合させた3色のプローブを設計し合成を行った(図2, 化合物1)。これらのプローブは、酵素の局在する小胞体のみを特異的に蛍光染色することができた⁶⁾。

3.2 ゴルジ体マンノシダーゼの蛍光基質開発

細胞内においてマンノシダーゼは小胞体・ゴルジ体・リソソームに局在し、それぞれ異なる基質特異性と機能を有していることが知られている。また、それぞれを別々に蛍光染色可能なプローブについても報告されていない。そこで、小胞体グルコシダーゼと同様に、基質を分子設計し合成を行った(図2, 化合物2)。これらのプローブは、酵素の局在するゴルジ体のみを特異的に蛍光染色することができた。そこで、ゴルジ体分散作用が知られているプレフェルジンAを用いてゴルジ体を分散させると同時に本プローブによりゴルジ体を染色した結果、染色部位が分散されたことから、染色部位がゴルジ体であることを確認した⁷⁾。

3.3 リソソーム フコシダーゼの蛍光基質開発

細胞内においてフコシダーゼはリソソームに局在し、様々な糖タンパク質の分解を担っている。そこで、小胞体グルコシダーゼと同様に、基質を分子設計し合成を行った(図2, 化合物3)。これらのプローブは、酵素の局在するリソソームのみを特異的に蛍光染色することができた。リソソーム肥大作用の知られているクロロキンを作用させ、

図2. 糖鎖プロセッシング酵素特異的の赤色蛍光基質の構造

化合物1は小胞体グルコシダーゼII基質, 化合物2はゴルジ体マンノシダーゼ基質, 化合物3はリソソームフコシダーゼ基質。

クロロキンの作用により本プローブの染色部位が肥大するか確認した結果、染色部位の肥大が確認されたことから、染色部位がリソソームであることを確認した⁸⁾。

4. おわりに

本研究の最終目的の1つは、標的酵素特異的な阻害剤を見出し医薬品候補化合物とすることである。これら阻害剤をスクリーニングするために、本蛍光基質は有用であると確信している。現在、理化学研究所天然化合物バンク(RIKEN NPDepo, MTA 締結済)を活用させていただき、阻害剤の探索を開始した。雑駁な内容となってしまったが、新規なN結合型糖鎖阻害剤を得るため、試行錯誤を重ねながら研究を行っている。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの先生に多大なるご助力を賜りましたので、ここに感謝の意を表します。

文献

- 1) W. Hakamata, M. Kurihara, H. Okuda, T. Nishio and T. Oku: Design and screening strategies for α -glucosidase inhibitor based on enzymological information. *Curr. Top. Med. Chem.*, **9**, 3-12 (2009).
- 2) G. Horne, F.X. Wilson, J. Tinsley, D.H. Williams and R. Storer: Iminosugars past, present and future: medicines for tomorrow. *Drug Discov. Today*, **16**, 107-118 (2011).
- 3) 袴田 航: グリコシダーゼの基質特性解析と阻害剤開発に関する研究. 応用糖質科学, **1**, 51-57 (2011).
- 4) W. Hakamata, A. Machida, T. Oku and T. Nishio: Design and synthesis of an ER-specific fluorescent probe based on carboxylesterase activity with quinone methide cleavage process. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 3206-3209 (2011).
- 5) W. Hakamata, M. Muroi, T. Nishio, A.T. Oku and A. Takatsuki: Recognition properties of processing α -glucosidase I and α -glucosidase II. *J. Carbohydr. Chem.*, **23**, 27-39 (2004).
- 6) 田村沙緒里, 袴田 航, 平野貴子, 西尾俊幸: 培養細胞における小胞体グルコシダーゼIIのマルチカラーイメージング. 応用糖質科学, **2 Suppl.**, 34 (2012).
- 7) 鈴木敦子, 袴田 航, 平野貴子, 西尾俊幸: ヒト培養細胞におけるゴルジ体 α -マンノシダーゼ選択的蛍光イメージングプローブの開発. 応用糖質科学, **2 Suppl.**, 34 (2012).
- 8) 塚越 匠, 袴田 航, 平野貴子, 西尾俊幸: キノンメチド開裂を基盤とした細胞内フコシダーゼのマルチカラー蛍光イメージング. 応用糖質科学, **1 Suppl.**, 60 (2011).