

〈一般研究課題〉 糖蛋白質を構築する酵素の反応機構を解明する

C結合型糖ヌクレオチドの開発

助成研究者 名古屋工業大学 宮川 淳



糖蛋白質を構築する酵素の反応機構を解明する C結合型糖ヌクレオチドの開発

宮川 淳
(名古屋工業大学)

Development of C-linked Sugar Nucleotides to Elucidate the Reaction Mechanisms of Enzymes involved in Glycoprotein Biosynthesis

Atsuh Miyagawa
(Nagoya Institute of Technology)

Abstract :

The biosynthesis of glycoproteins in the endoplasmic reticulum involves a cascade of enzymatic processes, including glycan transfer, protein folding, trafficking, and degradation. It has been elucidated that the structural maturation and transport of glycoproteins are regulated by the progressive remodeling of *N*-glycan structures. However, the molecular mechanism of the initial glycan transfer, mediated by glycosyltransferase, remains unclear due to the lack of stable, non-hydrolysable analogs suitable for mechanism studies. To address this challenge, we have developed a synthetic strategy for the preparation of C-linked sugar nucleotides, in which the O-glycosidic linkage between the sugar moiety and the phosphate group is replaced by a robust C-P bond. The key step involves a photochemically radical reaction between an *exo*-glucal derivative and *O,O*-diethyl-*Se*-phenyl phosphoroselenoate, yielding β -stereoselective C-phosphonates in a good yield under mild conditions. Subsequent deprotection and condensation with uridine monophosphate morpholidate afforded the desired C-linked UDP-sugar analog. The structure of the product was confirmed by NMR spectroscopy and high-resolution mass spectrometry. This method enables the stereoselective synthesis of stable sugar nucleotide mimics and provides a promising platform for mechanistic investigations of glycosyltransferases involved in *N*-glycan biosynthesis, as well as for the design of potent enzyme inhibitors targeting aberrant glycosylation pathways implicated in cancer and immune disorders.

1. はじめに

小胞体内における糖タンパク質が生合成される過程について研究が進み、糖タンパク質の糖転移、フォールディング、輸送、分解などにおける多くの発見が報告されている[1,2]。その糖タンパク質の生合成過程において、付与された糖鎖構造が、次第に変化することでタンパク質の高次構造化と輸送を制御していることが明らかになった。その最初の重要な工程である糖鎖を翻訳されたポリペプチドに転移する酵素は複合体を形成して分子量が大きく、反応機構の詳細は明らかになっていない[3,4]。しかし、酵素の反応機構を詳細に解析するためには、認識タンパク質と、反応基質による共結晶を作成して、X線結晶構造解析が必要となるが、天然基質の場合は作成中に反応してしまうため、分解しない基質が必要である。

そこで近年では、酵素反応の際に切断されるO-グリコシド結合をC-グリコシド結合に置換することで、糖脂質や糖鎖間結合に切断耐性をもたせる研究が行われてる[5-7]。そこで、糖リン酸結合の間の酸素を、炭素に置き換えることができれば、切断耐性をもった糖タンパク質の生合成過程の基質である糖ヌクレオチドを合成することを計画した。この合成方法を確立することで、N型糖鎖転移酵素やガンや免疫などに関わる糖転移酵素についても解析可能になる。また天然基質に対する類似性も高く安定な分子であるため、阻害剤としても高い活性が期待できる。

2. 実験方法

2.1 実験装置

光反応装置として、マグネチックスターラー付アルミブロック低温槽(東京理化器械；PSL-2500B)と光反应用LED光源+LEDヘッド+LED光源用同行ロッドループ(朝日分光；CL-1501, CL-H1-365-9-1-B, L150)を用いて光反応を行った(図1)。また合成した化合物の分析には、超伝導高分解能核磁気共鳴装置(Bruker；AV400N)と高分解能質量分析装置(Waters；Synapt G2 HDMS)を用いた。



図1. 光反応装置

2.2 実験方法

各試薬を混合した後、デガスした溶媒に溶解させ、アルゴン雰囲気下でLED照射を行い、攪拌した。反応終了後、分液洗浄を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行った。その後、核磁気共鳴分光計と高分解能質量分析計を用いて化合物の構造を同定した。

3. 実験結果

3.1 前駆体合成

メチル α -D-グルコースを用いて、ベンジル化を行い、メチル α -D-ベンジルグルコースを、77%の収率で得た。このメチル α -D-ベンジルグルコースの1位を、酸加水分解を行うために、酢酸溶液中で、硫酸水溶液を加えて、80度で加熱して、4時間攪拌した後、精製を行い、目的物を収

率55%で得た。この1位水酸基をもつ化合物を、Albright-Goldman酸化によって、ラクトンを形成した。このラクトンを、Tebb試薬を用いて処理することで二重結合を糖のピラノース環外に作り、*exo*-Glucalを89%の収率で得た。

3.2 光反応試薬の調整

O,O-Diethyl-*Se*-phenyl phosphoroselenoateを用いて、光反応による炭素ーリン酸結合を形成することを目指した。そのために*O,O*-Diethyl-*Se*-phenyl phosphoroselenoateを、*N*-(Phenylseleno)phthalimideと垂リン酸ジエチルを用いて、合成を行った[8]。*N*-(Phenylseleno)phthalimideと垂リン酸ジエチルを溶解させ、攪拌を行った後、分液洗浄を行い、精製を行った結果、収率89%で*O,O*-Diethyl-*Se*-phenyl phosphoroselenoateを得た。これを用いて、先に合成した二重結合をもつグルコースと光反応を行い、条件検討を行った。

3.3 光反応による炭素ーリン結合の形成

合成した*exo*-Glucalと*O,O*-Diethyl-*Se*-phenyl phosphoroselenoateの光反応の種々の反応条件検討を行った(表1)。光反応を行う前に、比較のため、加熱によるラジカル反応を試験した。AIBNを用いてベンゼン中、70度に加熱して反応を行ったところ、 β 結合した目的物を得ることができた。続いて、光反応による検討を行った(図2)。青色LED(450 nm)を使用して、AIBNとトリメチルシシルシランを用いて室温で反応を行ったところ、29%の収率で β 体のみを得ることができた。さらに紫色LED(365 nm)を使用して、AIBNとトリメチルシシルシランを用いて室温で反応を行ったところ、30%の収率で同様に β 体のみを得ることができた。さらに0度で反応を行い、開始剤としてAIBNとベンゾフェノンを一緒に用いたところ、トリメチルシシルシランを用いた場合は38%、トリブチルスタナンを用いた場合は60%の収率で、 β 体のみを得ることができた。



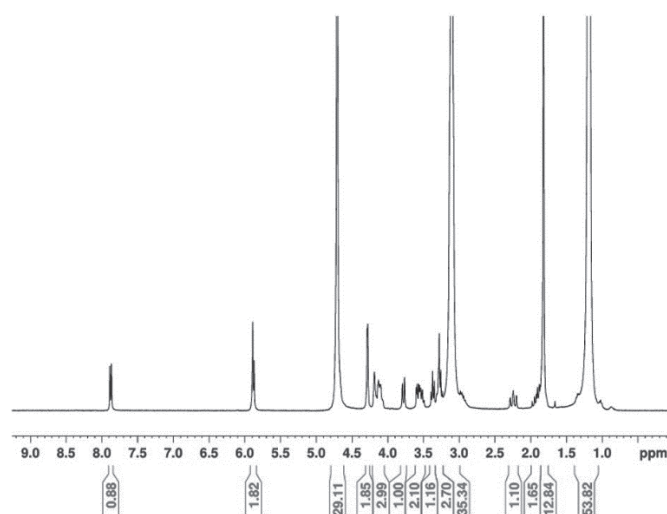
図2. 光反応の様子

表1. ラジカル反応によるC-P結合の形成

Run	Solvent	Reagents	LED irradiation (nm)	Temperature (°C)	Yield (%)	Anomeric Configuration
1	Toluene	AIBN, (TMS) ₃ SiH	-	70	-	-
2	Benzene	AIBN, (TMS) ₃ SiH	-	70	40	only β
3	Benzene	(TMS) ₃ SiH	450	25	29	only β
4	DCM	(TMS) ₃ SiH	450	25	-	-
5	Toluene	(TMS) ₃ SiH	450	25	-	-
6	Benzene	Bu ₃ SnH	450	25	-	-
7	Benzene	AIBN, (TMS) ₃ SiH	365	25	30	only β
8	Benzene	Benzophenone, (TMS) ₃ SiH	365	0	38	only β
9	Benzene	AIBN, Benzophenone, Bu ₃ SnH	365	0	60	only β
10	Toluene	AIBN, Benzophenone, Bu ₃ SnH	365	0	33	only β

3.4 C結合型糖ヌクレオチドの合成

合成した糖ーリン酸を用いて、糖ヌクレオチドの合成検討を進めた。まず、リン酸エステルの脱保護の検討を行い、トリメチルシリルブロミドを用いて室温で24時間攪拌を行った結果、薄層クロマトグラフィーにより脱保護が観察された。続いて、糖の水酸基の保護基であるベンジル基の脱保護を、パラジウム炭素を用いて、水素雰囲気下、5時間攪拌したところ、定量的にすべてが脱保護された糖ーリン酸を得ることができた。その後、この糖ーリン酸と、ウリジナーリン酸モルホリデートのカップリング反応を行い、4日間攪拌を続けた後、逆相シリカゲルクロマトグラフィーにより精製を行った結果、28%の収率で目的とするC結合型糖ヌクレオチドの合成をした(図4)[9]。またNMRスペクトルおよびMSスペクトルを測定し、化合物の構造を確認した。

図3. C結合型UDP-Glcの¹H NMRスペクトル

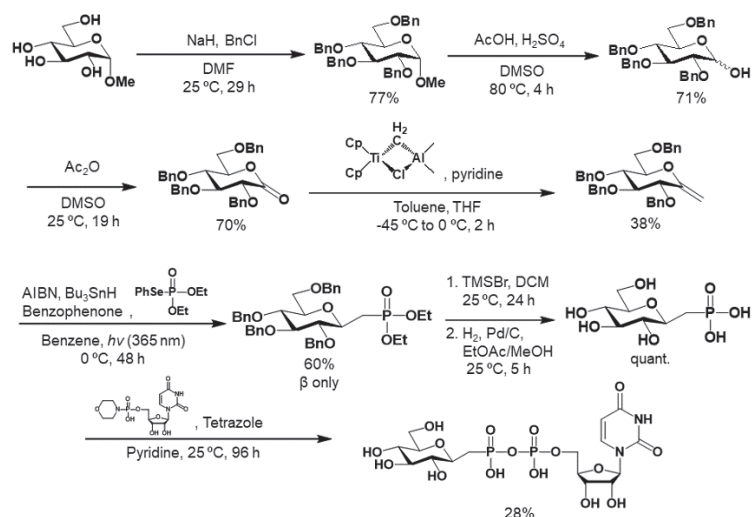


図4. C結合型UDP-Glcの合成経路

4. まとめ

本研究成果により、立体選択的なC結合型糖ヌクレオチドの合成を達成した。本研究の目的であるラジカル反応による炭素ーリン酸結合の生成については、加熱によるラジカル反応と、光によるラジカル反応を比較した結果、低温下、光照射によるラジカル反応によって収率よく目的化合物が形成されることがわかった。また、この反応はβ体立体選択的に進行し、α体の生成は確認されなかった。得られた化合物を用いて、ウリジンーリン酸と縮合反応を行い、C結合型糖ヌクレオチドの形成と構造決定を行った。今後は、逆の立体であるα体選択的な反応の開発を行い、C結合型の糖ーリン酸の立体異性体の選択的な合成を確立していく。そして、C結合型糖ヌクレオチドの網羅的な合成を可能にし、糖転移酵素の反応機構解析を行っていく。その結果、糖タンパク質の合成過程の解明や疾患による異常な糖転移反応の解明につなげる。

参考文献

- [1] Toustou, C., Walet - Balieu, M. L., Kiefer - Meyer, M. C., Houdou, M., Lerouge, P., Foulquier, F., & Bardor, M. (2022). Towards understanding the extensive diversity of protein N - glycan structures in eukaryotes. *Biological Reviews*, 97(2), 732-748.
- [2] Shivatare, S. S., Shivatare, V. S., & Wong, C. H. (2022). Glycoconjugates: synthesis, functional studies, and therapeutic developments. *Chemical reviews*, 122(20), 15603-15671.
- [3] Mohanty, S., P Chaudhary, B., & Zoetewey, D. (2020). Structural insight into the mechanism of N-linked glycosylation by oligosaccharyltransferase. *Biomolecules*, 10(4), 624.
- [4] Bai, L., & Li, H. (2019). Cryo - EM is uncovering the mechanism of eukaryotic protein N - glycosylation. *The FEBS Journal*, 286(9), 1638-1644.
- [5] Ghosh, T., & Nokami, T. (2022). Recent development of stereoselective C-glycosylation via generation of glycosyl radical. *Carbohydrate Research*, 522, 108677.
- [6] Shang, W., Shi, R., & Niu, D. (2023). C - Glycoside Synthesis Enabled by Nickel Catalysis. *Chinese Journal of Chemistry*, 41(17), 2217-2236.
- [7] Hirai, G., Kato, M., Koshino, H., Nishizawa, E., Oonuma, K., Ota, E., Watanabe, T.,

- Hashizume, D., Tamura, Y., Okada, M., Miyagi, T. & Sodeoka, M. (2020). Ganglioside GM3 analogues containing monofluoromethylene-linked sialoside: synthesis, stereochemical effects, conformational behavior, and biological activities. *JACS Au*, 1(2), 137-146.
- [8] Yang, B., Zhang, X. Y., Yue, H. Q., Li, W. Z., Li, M., Lu, L., Wu, Z. Q., Li, J. Sun, K. & Yang, S. D. (2022). A Promoter - free Protocol for the Synthesis of Selenophosphates and Thiophosphates via a Spontaneous Process at Room Temperature. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 364(20), 3528-3538.
- [9] Miyagawa, A., Takeuchi, S., Itoda, S., Toyama, S., Kurimoto, K., Yamamura, H., & Ito, Y. (2016). Chemical synthesis and isolation of UDP-2-deoxy glucose and galactose. *Synthetic Communications*, 46(22), 1790-1795.