

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350074

研究課題名(和文) 環状不凍糖ペプチドの迅速合成と不凍化分子機構の解明

研究課題名(英文) Study for rapid synthesis and mechanism elucidation of cyclic antifreeze glycopeptide

研究代表者

比能 洋(HINOU, HIROSHI)

北海道大学・先端生命科学研究所(研究院)・准教授

研究者番号：70333333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：環状不凍糖ペプチドは天然型の直鎖状不凍糖ペプチドが有する活性型配座を取れないことから異なる不凍化機構の存在が予想されていたが、従来の合成法では高純度の標品を得ることが困難であった。本研究ではフッ素化アルコールの水素結合能に着目した新規ペプチド環化法の開発に成功し、この環状不凍糖ペプチドの高純度標品の迅速調整に成功し、さらに従来のペプチド環化に多用されてきた方法ではC-末端アミノ酸のラセミ化が生じることにより生成物の複雑化が生じていることを解明した。さらに、糖鎖不可前後の環状ペプチド骨格の結晶構造および溶液中の構造を解明し、1対の逆並行シート型構造の配列が糖付加により変化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cyclic anti-freeze glycopeptide (AFGP) found by our group has different conformation from linear AFGP found from polar fish. To elucidate the structural feature of the cyclic AFGP, we developed novel cyclization method for peptide and glycopeptide by use of hydrogen-bonding property of fluorinated alcohols. Pure cyclic AFGP was obtained by the new method in high yield from solution of corresponding linear precursor. Interestingly, common cyclization method using DPPA induce C-terminal epimerization. NMR and X-ray crystallographic experiments for cyclic AFGP and corresponding cyclic peptide skeleton revealed anti-parallel beta-sheet structure of the both compound, and glycan modification induce a replacement of amino acid position in the structure.

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：ペプチド環化 水素結合 配座解析 単結晶X線回折 NMR 糖ペプチド 不凍活性 AFGP

1. 研究開始当初の背景

**AFGP** : 極地の魚は不凍糖タンパク質 (Antifreeze glycoprotein: AFGP) を産生することにより体液の凍結から免れていることを DeVries らが 1971 年に報告して以来、不凍(糖)タンパク質の構造活性相関に関する研究が各地で精力的に行われており、魚類からは AFGP に加え、4 種の AFP が見出されている。AFGP は通常のもル凝固点降下に従わない凝固点降下活性を示し、その不凍活性の発現機構は氷晶のプリズム面へ特異的吸着であり、その結果バイピラミッド型氷晶を与えることが知られている。AFGP はトリペプチドに 2 糖が結合した糖ペプチドユニットの繰り返し構造 (MW 2600-33000) を有しており、これまでの申請者らのグループによる合成化学的研究によりその繰り返し数の増大に伴い不凍活性が向上すること、活性に必要な化学構造、活性体は PPII helix と呼ばれるペプチド配座を有することなどが確認された (Tachibana et al. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, 43, 856)。一方、AFGP の氷晶結合部位は未だ複数の異なる説が提案されているのみであり、分子レベルで不凍機構の解明法が求められている。

**環状 AFGP** : 一方、申請者らは AFGP の化学合成においてその環状体が生成していることを見出し、環状 AFGP の混合物が不凍活性を有することを確認した。そこで、その混合物から 6~12 アミノ酸まで 3 サイズの環状体をごく微量 (1 mg 以下) ずつ分離しそれぞれの不凍活性等を調べたところ、天然型に共通の PPII helix 配座をとらないこと、天然体とは逆に最も小さな環状体が特異的に強力な不凍活性を示すことを見出した。 (*Chem. Commun.*, 2009, 1641) この環状 AFGP は分子量 1217.2 の C2 対称分子であり比較的堅い構造を有することが予想されることから、その構造変換と機能解析サイクルの迅速化や、結晶水を含んだ結晶構造の解析や NMR 解析などによる不凍活性の精密分子機構解明が期待される。さらに、電荷を有さない世界初の不凍タンパク質であることから、広い pH 領域および塩濃度で安定して使用可能な生体向け不凍剤となることが期待される。従って、環状 AFGP の量的確保が困難であり、誘導体合成等の調製が容易な効率的合成法の開発が必要である。

2. 研究の目的

環状 AFGP の選択的かつ高収率な固相合成法を構築するとともに、誘導体合成と解析を行うことにより、不凍活性の分子機構解明に挑戦する。

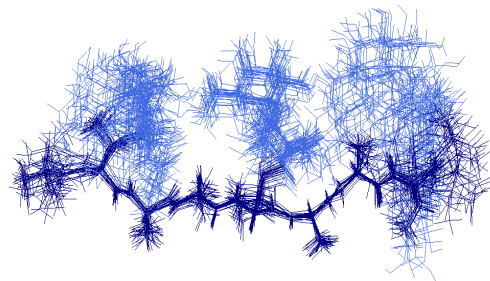
3. 研究の方法

**環状 AFGP (n = 2) のサイズ選択的かつ効率的な合成法の構築**

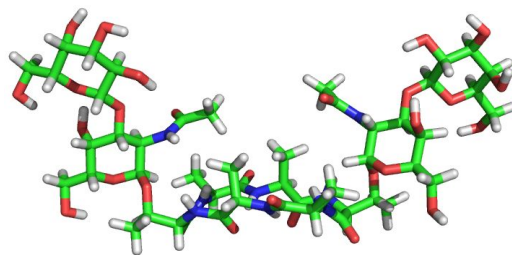
溶媒 - ペプチド間の水素結合ネットワーク

構築の利用により、ペプチドの溶解性と環化効率を高度に両立した液相ペプチド環化法を開発する。

**環状 AFGP の立体配座解析** : NOESY, DQFCOSY, TOCSY, ROESY 法などを用い、水溶液中における配座解析を行う。AMBER9 にて予測した構造より、環状 AFGP も直鎖状の AFGP と同様に親水性部位と疎水性部位が明確に分かれた構造を有していることが予想される。(下図参照) この両親媒性による分子集合体の形成が予想されるが、直鎖状 AFGP においても分子集合体の形成およびその分子間相互作用に関する情報は皆無である。この問題を解明するため、同位体置換体と非置換体を共存させて原子間相互作用を NMR 解析することにより分子間相互作用と分子内相互作用を識別し、水溶液中における環状 AFGP の集合状態の解析に挑戦する。また、その配座の温度応答性、上述の構造活性相関や環境活性相関と連動した配座解析により不凍活性に必要な配座を同定する。さらに、環状 AFGP およびその骨格環状ペプチドの結晶構造解析にも挑戦する。



NMR 法で得た直鎖状 AFGP (n=3) の配座



AMBER9 で予測した環状 AFGP の配座

4. 研究成果

**環状 AFGP (n = 2) のサイズ選択的かつ効率的な合成法の構築**

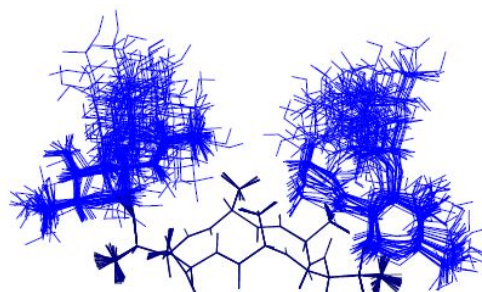
まず、環状 AFGP 合成ルートの最適化について検討した。まず、電磁波照射下、コア 1 型または Tn 型糖鎖を有する AFGP 2 回繰り返し単位 (6 アミノ酸、ATAATA または TAATAA) を固相合成した。この糖ペプチドの環化条件の探索を行い、2,2,2-トリフルオロエタノールとジクロロメタンの混合系 (TFE-DCM) でジイソプロピルカルボジイミドと 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールを組み合わせた縮合系 (DIC-HOAt) を用いることにより従来の DPPA を用いた環化系よりも単純な生

成物ピークパターンが得られた。また、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルも単純な 3 アミノ酸 2 糖型のものが得られた。本研究開始前に DPPA を用いたサンプルから取得したサンプルは単一分子量を示す MALDI スペクトルが得られていたが、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルは非常に複雑であった。そこで、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルが複雑化した理由がエピマーとの混合ピークであったためであると予想し、従来の DPPA を用いた合成法で得られた生成物の分離法を GPC から逆相 HPLC に変更し、新規合成法で取得したサンプルを用いてその分離条件を最適化した。その結果、従来の DPPA を用いた縮合系では C 末端のエピメリ化が生じ、標的となった 2 回繰り返し環状化合物がほぼ 1 対 1 のエピマーとの混合物であったことが判明した。さらに、水素結合で分子間反応を抑制可能な新規法と比較し、DPPA を用いた環化法では環化のサイズ選択性も低いため、多様なサイズの環化体とそのエピマーのセットが生成し、目的環状糖ペプチドの収量および精製効率を著しく低下させていることが判明した。一方、TFE-DCM 中で DIC-HOAt を用いた縮合系は糖ペプチドの 0.1 mM 溶液中では目的糖ペプチドをサイズ選択的に与え、さらに、エピメリ化が検出感度以下に抑制できることが確認された。さらに、事前に C 末端に D-アラニン配置した糖ペプチドを調製し、これを同じ条件で環化させることにより目的環状糖ペプチドのエピマーを選択的に調製することに成功した。DPPA を用いた反応系でエピマーが生じていることはこの合成エピマーと DPPA で合成した副生成物の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを比較することにより実証した。

### 環状 AFGP の立体配座解析

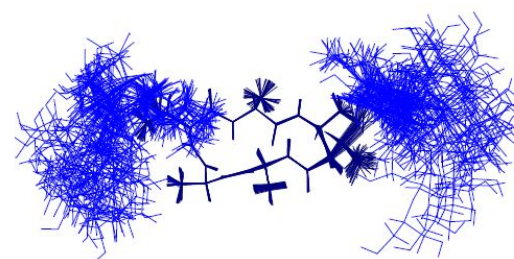
続いて、この環状糖ペプチドの新規合成法を用いて NMR 解析研究に十分な量のサンプルを調製し、各種 NMR 解析を組み合わせることによりその完全帰属を行った。また、環状ペプチド骨格の結晶化に挑戦した結果、質の良い結晶を得ることに成功し、その結晶構造解析を行った。結晶構造解析の結果、環状ペプチドはスレオニンを中心に持つ 3 ペプチド同士の逆並行シート様構造を有していることが示された。一方、糖鎖を持つ環状 AFGP からは結晶構造解析可能な結晶を取得することが困難であった。そこで、NOESY により求められた距離情報と分子動力学計算を用いて環状 AFGP の配座解析を行った。また、環状 AFGP は C2 対称構造を有するため、正確な構造計算には同位体導入などによる NMR 情報の非対称化が必要ではないかと予測していたが、同位体修飾なしで十分に構造計算可能な距離情報を取得することに成功した。この NMR 解析の結果から得られた構造は結晶構造と異なり、アラニンを中間に持つ非常に安定な逆並行シート様構造を有していることが確認された。このペプチド部位の構造は研究開始前に AMBER9 計算で予測した構造と

ほぼ一致していた。しかし、糖鎖のうち特にガラクトース残基の配座が AMBER9 による予測から大きく変化していることが確認された。その結果、アミノ酸側鎖メチル基による疎水性部位と糖残基による申請部位が明確に分離しており、ペプチド残基の配座は異なるものの、直鎖状 AFGP と類似した両親媒性構造を有していることが確認された。



NMR 法で得た環状 AFGP(n=2)の配座

さらに、DPPA による環化の際に生じていた環状 AFGP エピマーについても NMR による完全帰属および配座解析を行った。この化合物は既に C2 対称性が崩れており、全アミノ酸残基を分離して解析可能であった。得られた構造と先に取得した環状 AFGP の構造を比較したところ、エピマー体では環状ペプチド骨格の自由度が増しており、特に糖鎖が結合したスレオニン残基が大きく揺らいでいる。また、逆並行シート様構造の中央のアラニンの片側が D アミノ酸に置換されているため、逆並行シート様構造にねじれが生じていた。また、スレオニン残基の揺らぎに伴い糖残基も大きく揺らいでおり、環状 AFGP では接近していた非還元末端のガラクトース残基が離れ、環状ペプチドの環の外側に突き出したような構造が得られた。すなわち、直鎖状 AFGP で確認されたような明確な親水性部位と疎水性部位の分離が行われていなかった。



環状 AFGP(n=2)エピマーの配座

以上、環状 AFGP の合成において 2,2,2-トリフルオロエタノールとジクロロメタンの混合系 (TFE-DCM) でジソプロピルカルボジイミドと 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールを組み合わせた縮合系 (DIC-HOAt) を用いることにより、DPPA 縮合で 50%程度生じていたエピマー化を HPLC 分析の検出限界以下に抑えると共に、2 量化も痕跡量となる効率的環化法の開発に成功した。本方法は特別なアミノ酸残基や保護基、縮合剤などを必

要としないことから、新しいペプチド環化法として普及することが期待される。得られた環状 AFGP から NMR によりその立体配座解析を行った結果、糖残基による親水性部位とペプチドによる疎水性部位が明確に分かれた配座を有していることが確認された。また、エピマーではペプチド間の自由度が増すことにより糖残基の配座が崩れることが示された。

さらに、フッ素化アルコールを用いた新規ペプチド環化法の一般性について検証した。検証対象として Integrin  $\alpha_3$  アンタゴニストである環状 RGD ペプチド、抗マラリア活性が報告されている mahafacyclin B、腫瘍細胞障害性が報告されている cherimolacyclopeptide E、をそれぞれ選択した。環状ペプチドはいずれも合成例があり、D-アミノ酸を含有する環状 RGD ペプチドは溶解性が高く環化しやすく、一方 mahafacyclin B は難溶性で環化しにくく、cherimolacyclopeptide E はその中間の性質を示した。

不凍環状糖ペプチドの構築において 10 mM という本来環化に適さない高濃度で良好な環化反応が観察されたことからこれらのペプチドも 10 mM で環化を行うこととし、縮合剤にジイソプロピルカルボジイミド、添加剤に HOAt を使用し、DMF 中またはフッ素化アルコールを含む各種アルコールとジクロロメタン (DCM) の等量混合液中での環化特性を評価した。その結果、もともと反応性の高い環状 RGD ペプチドではいずれの溶媒条件でも高収率で環化物が得られた。一方、mahafacyclin B の合成においては環状 AFGP と同様にフッ素化アルコールを用いた系以外では懸濁液となり、環化収率が著しく低下した (3 ~ 15%) が、2,2,2-トリフルオロエタノール (TFE) DCM 溶液中では環化率 94% (HPLC) で生成物を与えた。これまでの報告例では 0.1mM DMF 溶液中で環化率 10% (単離)、0.03mM DMF 中で環化率 30% (HPLC) でありその単離には高沸点の DMF の留去と分液操作が必要であった。一方、申請者が見出した方法では低沸点の 10 mM 溶液中で 94% という環化率を得ることに成功しており、これまで効率が悪かった環状ペプチドの合成効率を飛躍的に改良できることを示すことに成功した。

cherimolacyclopeptide E はこれまで固相上での環化法により総収率 10% (単離) での調製が報告されている。このペプチドの環化を試みたところ、いずれの溶媒系にも溶解し、DMF 中では 23% の環化率であったがフッ素化アルコールおよびアルコール中では 47 ~ 76% といずれも良好な環化効率を示し、TFE-DCM 系が最高収率を示した。また、大変興味深いことに、フッ素化アルコールに限らず、アルコールの pKa が小さくなるに応じて二量体型副生成が少なくなり、エステル型副生成物が増加し、TFE-DCM 系で環化効率が極大化した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 13 件)

Takahiko Matsushita, Wataru Takada, Kota Igarashi, Kentaro Naruchi, Fayna Garcia-Martin, Maho Amano, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura "A straightforward protocol for the preparation of high performance microarray displaying synthetic MUC1 glycopeptides" *BBA-General Subject*, 査読有, **59**, 355-356, 2014. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.11.009

Junya Ishida, Hiroshi Hinou, Kentaro Naruchi, Shin-Ichiro Nishimura "Synthesis of neoglycosphingolipids from methoxyamino-functionalized ceramide" *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, **24**, 1197-1200, 2014. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.12.091

Takayuki Furukawa, Misaki Arai, Fayna G. Martin, Maho Amano, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura "Glycoblotting-based high throughput protocol for the structural characterization of hyaluronan degradation products during enzymatic fragmentation" *Glycoconjugate Journal*, 査読有, **30**, 171-182, 2013. DOI: 10.1007/s10719-012-9395-0

Hirokazu Kai, Hiroshi Hinou, Kentaro Naruchi, Takahiko Matsushita, and Shin-Ichiro Nishimura "Macrocyclic Mechanism-based Inhibitor for Neuraminidases" *Chemistry: A European Journal*, 査読有, **19**, 1364-1372, 2013. DOI: 10.1002/chem.201200859

Takahiko Matsushita, Naoki Ohayabu, Naoki Fujitani, Kentaro Naruchi, Hiroki Shimizu, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura "Site-specific conformational alteration induced by sialylation of MUC1 tandem repeating glycopeptides at an epitope region for anti-KL-6 monoclonal antibody" *Biochemistry*, 査読有, **52**, 402-414, 2013. DOI: 10.1021/bi3013142

Takahiko Matsushita, Seiji Handa, Kentaro Naruchi, Fayna Garcia-Martin, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura "A novel approach for the parallel synthesis of glycopeptides by combining solid-phase peptide synthesis and dendrimer-supported enzymatic modifications" *Polymer Journal*, 査読有, **45**, 854-862, 2013. DOI: 10.1038/pj.2013.14

Ryukou Izumi, Takahiko Matsushita, Naoki Fujitani, Kentaro Naruchi, Hiroki Shimizu, Sakae Tsuda, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura "Microwave-assisted solid-phase synthesis of antifreeze glycopeptides" *Chemistry: A European Journal*, 査読有, **19**,

3913-3920, 2013. DOI: 10.1002/chem.201203731  
Sho Hideshima, Hiroshi Hinou, Daisuke Ebihara, Ryosuke Sato, Shigeki Kuroiwa, Takuya Nakanishi, Shin-Ichiro Nishimura, Tetsuya Osaka “Atomolar-level Detection of Influenza A Virus Hemagglutinin Human H1 and Avian H5 Using Glycan-blotted Field Effect Transistor Biosensor” *Analytical Chemistry*, 査読有, **85**, 5641-5644, 2013. DOI: 10.1021/ac401085c  
H. V. Ravi Kumar, Kentaro Naruchi, Risho Miyoshi, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura “A New Approach for the Synthesis of Hyper-Branched N-Glycan Core Structures from Locust Bean Gum” *Organic Letters*, 査読有, **15**, 6278-6281, 2013. doi: 10.1021/ol403140h  
Fayna Garcia-Martin, Hiroshi Hinou, Takahiko Matsushita, Shun Hayakawa, Shin-Ichiro Nishimura "An efficient protocol for the solid-phase synthesis of glycopeptides under microwave irradiation", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有, **10**, 1612-1617, 2012.  
Hirokazu Kai, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura “Aglycone-focused randomization of 2-difluoromethylphenylsialoside-type suicide substrates for neuraminidases” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有, **20**, 2739-2746, 2012. DOI:10.1016/j.bmc.2012.02.001  
Takayuki Furukawa, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura “Strict stereocontrol by 2,4-O-di-tert-butylsilylene group on  $\beta$ -glucuronylations” *Organic Letters*, 査読有, **14**, 2102-2105, 2012. DOI: 10.1021/ol300634x  
Hiroshi Hinou, Kei Hyugaji, Fayna Garcia-Martin, Shin-Ichiro Nishimura, Fernando Albericio “H-Bonding Promotion of Peptide Solubility and Cyclization by Fluorinated Alcohol” *RSC Advances*, 査読有, **2**, 2729-2731, 2012.; DOI: 10.1039/C2RA01043G

[学会発表](計 10件)

Hiroshi Hinou “Synthesis and Application of Bicyclic Carbohydrates” **International Symposium on Chemical Biology-Drug Discovery**, Mysore University, Mysore, India, Jan. 10th, 2014.  
H. V. Ravi Kumar, Kentaro Naruchi, Risho Miyoshi, Hiroshi Hinou, Risho Miyoshi, Shin-Ichiro Nishimura “Highly Efficient Synthesis of Hyperbranched N-glycans from Locust Bean Gum” 246<sup>th</sup> **American Chemical Society Meeting & Exposition**, Indianapolis (IN), USA, Sep. 8th, 2013.  
Hiroshi Hinou “New Strategy for Peptide

Cyclization H-bonding effect of fluorinated alcohol” **Special Seminar at Chemistry Department of Wayne State University**, Detroit, USA, Sep. 6th, 2013.

Hiroshi Hinou, Hirokazu Kai, Shin-Ichiro Nishimura “Modified Mechanism-based Inhibitor for Neuraminidases” The 11<sup>th</sup> International Symposium for Future Drug Discovery & Medical Care, Sapporo, August 2nd, 2013.

Hiroshi Hinou, Hirokazu Kai, Shin-Ichiro Nishimura “Modified Mechanism-based Inhibitor for Neuraminidases” The 10<sup>th</sup> International Symposium for Future Drug Discovery & Medical Care, Sapporo, October 3rd, 2012.

比能 洋「糖誘導体・糖ペプチドの環化と機能制御」日本化学会生体機能関連化学部会第27回若手フォーラム、札幌、2012年9月5日

Hiroshi Hinou, Yuya Abe, and Shin-Ichiro Nishimura “Solid-Phase Synthesis and Structural Study of Glycopeptide Containing C-Mannosyltryptophan in Human Erythropoietin Receptor” **International Glycomics Symposium -Increasing the Impact of Glycoscience through New Tools and Technologies-**, July 19th, 2012, San Sebastian, Spain.

Hiroshi Hinou, Kei Hyugaji, Fayna Garcia-Martin, Shin-Ichiro Nishimura, Fernando Albericio “H-bonding cyclization of peptide backbone of anti-freeze glycopeptide in fluorinated alcohols” XXVI International Carbohydrate Symposium (**ICS XXVI**), Madrid, Spain, July 22-27th, 2012.

Hiroshi Hinou, Hirokazu Kai, Shin-Ichiro Nishimura “Macrocyclic Mechanism-based Inhibitor for Neuraminidases” XXVI International Carbohydrate Symposium (**ICS XXVI**), Madrid, Spain, July 22-27th, 2012.

Hiroshi Hinou, Yuya Abe, Shin-Ichiro Nishimura “Solid-Phase Synthesis and Structural Study of Glycopeptide Containing C-Mannosyltryptophan in Human Erythropoietin Receptor” International Glycomics Symposium -Increasing the Impact of Glycoscience through New Tools and Technologies-, San Sebastian, Spain, July 19-21th, 2012.

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g4/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

比能 洋 (HINOUE, Hiroshi)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：70333333

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし