

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16556

研究課題名(和文)グリコシル化コラーゲンの系統的化学合成と構造機能解析

研究課題名(英文) Systematic chemical synthesis and structure-function analysis of glycosylated collagens

研究代表者

八須 匡和 (HACHISU, Masakazu)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・助教

研究者番号：60587442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンペプチド鎖にはリシン残基が数多くあり、翻訳後修飾によってコラーゲン特有のヒドロキシリシン残基となる。ヒドロキシリシンは、更に糖鎖修飾を受け、特殊な糖アミノ酸残基(2-O- β -D-glucopyranosyl-0- β -D-galactopyranosylhydroxylysine)となることが報告されている。ペプチド固相合成法により修飾リシン残基を含むコラーゲンモデル糖ペプチドを調製する事を目的として、本研究では固相合成の基本ユニットであるFmoc-ヒドロキシリシン誘導体群の合成経路の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Collagen is the most abundant fibrous protein in animals, constituting dermis, bone and cartilage. The lysine residues in collagen peptide chain are oxidized to collagen-specific hydroxylysine residues by post-translational modification (PTM). Further PTMs of hydroxylysine residues generate the unique glyco-amino acid residues, 2-O- β -D-glucopyranosyl-0- β -D-galactopyranosyl hydroxylysine. The detailed biological functions of the modified lysine residue have not been clearly understood. The purpose of this study is to prepare the glycosylated collagen models. The novel Fmoc-protected glyco-amino acids toward the solid-phase peptide synthesis were designed.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：翻訳後修飾 ヒドロキシリシン グリコシル化 コラーゲン ペプチド固相合成

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは代表的な構造タンパク質である。コラーゲンを構成するアミノ酸はグリシン (Gly) が約 30%、プロリン (Pro) および ヒドロキシプロリン (Hyp) が約 20% を占める。またコラーゲンに特有のアミノ酸としてヒドロキシリジン (Hyl) の存在が確認されている。ヒドロキシプロリンとヒドロキシリジンはそれぞれプロリンとリジンが翻訳後修飾を受けたアミノ酸残基であり、これら水酸基を有した修飾アミノ酸は水素結合によってタンパク鎖同士を結び、コラーゲンの 3 重らせん構造を保つ働きがあるとされている。これまでのコラーゲンの高次構造に関する研究は、(Gly-Pro-Hyp)_n といった規則配列性の合成モデルポリペプチドを用いた報告が主流であり、その安定性とシーケンスの相関、温度に依存した分子会合の様子等が多くのグループによって詳細に説明されてきた。前述したヒドロキシリジンに関する研究報告の例は少なく、組成分析や生物学的知見による機能の予測に関するものしか存在しない。またコラーゲン分子中の多くのヒドロキシリジンが、更なる翻訳後修飾を受け、配糖体として存在している (図 1) という証拠が示されている。しかしながらリジン残基に対するこれらの連続した翻訳後修飾 (ヒドロキシル化およびグリコシル化) が果たす生物学的な理由付けは依然として不明瞭のままである。

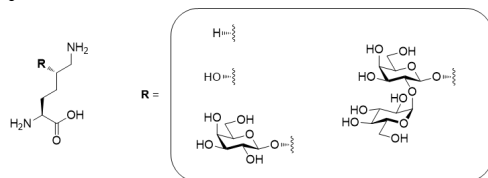


図 1. リジンの翻訳後修飾

タンパク質の糖鎖修飾は一般に生命現象の認識シグナルとして作用するとされている。また付加した糖鎖はタンパク質自身の構造安定性、プロテアーゼ耐性にも深く関係している。そのため、糖鎖修飾はポストゲノム研究の重要な領域として扱われているが、実際の生体内では極めて曖昧な現象・物質として観察される。この曖昧さは、複雑且つ多様な構造を有する (= 関連する酵素群も多い) 分子構造の不均一性に起因する。また同時に、生化学的手法により糖鎖修飾を *in vitro* で再現することが困難である事を意味している。

コラーゲンにおいても、糖鎖修飾が分解物代謝や構造安定性に関係していると予想される。例えば、リウマチ等の関節疾患の多くは、プロテアーゼによるコラーゲン類の過剰な分解を伴い、疾患マーカーとして尿中に糖代謝物を含む事が報告されている。このような事実から類推しても、糖鎖の有無によるコラーゲンの物理的安定性やプロテアーゼ耐性、加水分解物の代謝経路等は十分に検討さ

れるべき課題である。これらを系統的に理解するために、構造が明確なコラーゲン分子を用いて様々な研究モデルを構築する必要がある

2. 研究の目的

コラーゲン分子におけるリジン残基の翻訳後修飾に関して、未だにその生物学的機能は解明されていない。本研究では、修飾されたリジン残基を含む新規のコラーゲンモデル糖ペプチドの系統的な化学合成を行う。グリコシル化を考慮していない従来のコラーゲンモデルと構造・物性を比較することで、これまで議論されてこなかったグリコシル化コラーゲンの特性を調査し、その生体内における役割 (特に抗プロテアーゼ活性) について明らかにする。そのために、翻訳後修飾リジン誘導体を含むペプチドを任意のシーケンスで合成できる基盤技術の開発を指向し、リジン誘導体の効率的な合成ルートを設計・実践する。合成したリジン誘導体を用いてコラーゲンモデルペプチドライブラリーを調製し、糖鎖の有無、シーケンスの違いによる分子物性 (高次構造・熱安定性) の変化を明らかにする。更にプロテアーゼによる酵素加水分解実験を行うことで、生体内における安定性も議論し、化学合成のメリットを生かした応用展開 (人工基質、阻害剤、プローブ) に対応可能な知見を得る。

3. 研究の方法

(1) ヒドロキシリジン誘導体の合成

図 1 に示すようなヒドロキシリジン誘導体群の合成を行う。現在一般的に普及しているペプチド固相合成法である Fmoc 法に対応可能な保護糖アミノ酸 (またはアミノ酸) を調製する [R = H; Fmoc-Lys(Boc)-OH, R = OH; Fmoc-Hyl(ε-Boc, δ-TBDMS)-OH, R = Gal; Fmoc-Hyl(ε-Boc, δ-Gal)-OH, R = Glc-Gal; Fmoc-Hyl(ε-Boc, δ-Glc-Gal)-OH,]。

(2) 糖ペプチド基本ユニットの合成

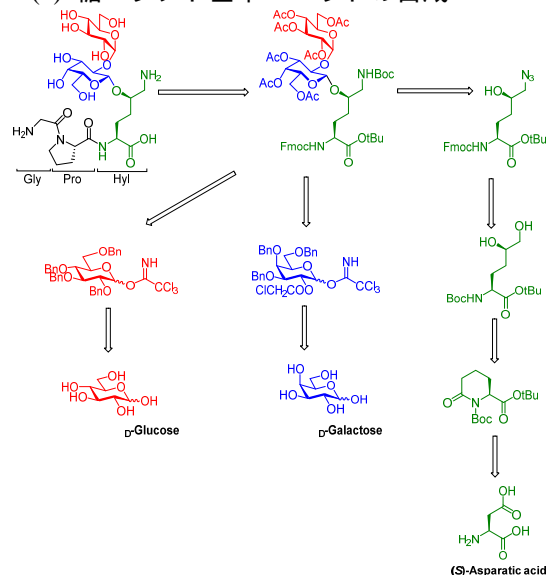


図 2. 糖ペプチドの合成戦略

本研究では図 2 に示すようなトリペプチド (Gly-Pro-Lys) を基本単位とする繰返し配列型のコラーゲンモデルを構築する。

(3) コラーゲンモデルのライブラリ合成
糖ペプチドユニット合成の基本的な技術を確認した後、効率的なライブラリ合成を行う。ペプチドユニットが 4 回繰返された配列 (Gly-Pro-Xaa)₄ を最初の標的化合物とする。4 種のペプチドユニットから 256 種の組み合わせが想定されるが、シーケンシャルホモポリペプチドを最優先して合成し、分析系へと展開する。尚、固相合成の利点として、N 末端側の Fmoc 基を脱保護せずに、固相担体から切出すことで、それまでに合成したペプチドが新たなユニットとして合成に利用可能である。本フラグメントカップリングの手法によれば、必要に応じて合成を中断・再開し、配列と鎖長を自由に組み合わせたモデル分子を構築することが可能である。

(4) 構造分析・物性評価
糖ペプチドライブラリの構造解析を実施する。NMR の NOESY スペクトルから距離情報を得て構造計算を行うほか、CD 測定により三重らせんと一本鎖の転移温度を調べ、高次構造の熱安定性についての測定を行う。リジン残基への糖鎖修飾がコラーゲン分子の溶液中の挙動に対してどのように影響するのかを調べる。

(5) 酵素消化実験
合成した各コラーゲンモデルペプチドの N 末端アミノ基を蛍光ラベルし、種々のメタロプロテアーゼを用いて加水分解処理を行う。HPLC と蛍光検出によって消化断片の定量を行い、MMP に対する分解耐性を糖鎖の有無・種類による相関から評価し、生体内での安定性を明らかにする。

4. 研究成果

糖鎖を有するヒドロキシリジン誘導体の化学合成を行った。現在一般的に普及しているペプチド固相合成法である Fmoc 法に対応可能な保護糖アミノ酸を合成ターゲットとした。具体的にはグルコースとガラクトースそれぞれの糖供与体を合成した後、糖受容体であるヒドロキシリジンユニットの合成を行う。ヒドロキシリジンに対しガラクトース誘導体のグリコシル化反応を行った後、更にグルコースを用いたグリコシル化、数段階の官能基変換を経て目的の糖ペプチドを得る。

(1) 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-D-galactopyranosyl trichloroacetimidate の合成 (図 3)

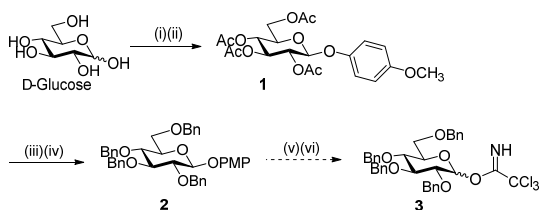


図 3. グルコースユニットの合成

D-グルコースを出発原料とし、アセチル化、アノマーのパラメトキシフェニル化を行った後、保護基をベンジル基に変換し、グルコースドナーとなるトリクロロアセトイミデート体へと誘導した。

(2) 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-chloroacetyl-D-glucopyranosyl trichloroacetimidate (図 4)
D-ガラクトースをアセチル保護した後、ブロモ糖を経由してオルトエステル体とした。保護基をベンジル基に変換し、オルトエステルを加水分解し、2 位ヒドロキシル基をモノクロロアセチル基で保護したトリクロロアセトイミデート体を合成した。

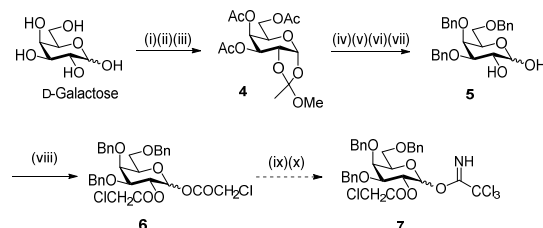


図 4 ガラクトースユニットの合成

(3) *tert*-Butyl (2*S*,5*R*)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5,6-dihydroxyhexanoate の合成 (図 5)
保護アスパラギン酸とメルドラム酸を縮合し、カルボニル基を還元した後、分子内環化によりピペリジノン体へと導いた。エノラートを形成させ、酸化剤により -ヒドロキシ化を行った。還元的条件でピペリジノン体を開環し、1,2-ジオール体を得た。これらの工程では環化によるピペリジノン体の構築と、-ヒドロキシ化の収率が低いため、収率の向上を目指した条件検討を現在も継続している。

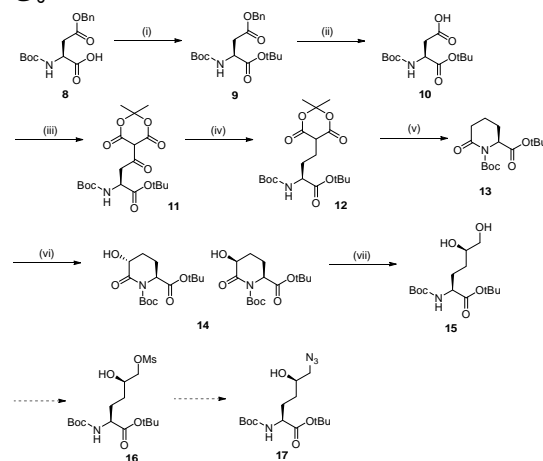


図 5. ヒドロキシリジンユニットの合成

今後は 1 級アルコールをアジド化し、位の保護基を Fmoc 基に変換する。残った 2 級水酸基に対して既に調製してあるガラクトースドナー 7 を縮合し、糖アミノ酸誘導体へと導く。更にガラクトースの 2 位水酸基にグルコース 3 を導入し、ペプチド固相合成に対応した糖アミノ酸の合成を行う

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)

[学会発表](計10件)

山口恭枝、八須匡和、堀戸重臣、*O*-グリコシル化ヒドロキシリシンの合成、日本化学会第97春季年会、2017年3月17日、慶應義塾大学(神奈川県横浜市)

藤永早紀、太田雄介、八須匡和、堀戸重臣、Notch 関連糖鎖の合成研究、日本化学会第97春季年会、2017年3月17日、慶應義塾大学(神奈川県横浜市)

内田万紀、小川範恵、八須匡和、堀戸重臣、新規ジアンヒドロ型保護基を用いた糖鎖合成、第3回 FCCA シンポジウム FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2016、2016年10月22日、・東海大学(神奈川県平塚市)

内山賢人、八須匡和、堀戸重臣、スフィンゴ糖脂質生合成経路解明のための分子デコイ、第3回 FCCA シンポジウム FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2016、2016年10月22日、・東海大学(神奈川県平塚市)

苅部雄貴、八須匡和、堀戸重臣、グリコシル化反応の立体選択性を制御する受容体の分子会合、日本化学会第96春季年会、2016年3月15日、・同志社大学(京都府京田辺市)

藤野貴文、李瀚彬、八須匡和、堀戸重臣、受容体の分子会合を利用したグリコシル化反応において供与体の反応性がアノマー位の立体選択性に与える影響、日本化学会第96春季年会、2016年3月15日、・同志社大学(京都府京田辺市)

河村亮太、前田真一郎、中島康之、八須匡和、堀戸重臣、疎水性の3本の側鎖を持ち蛍光基を有するセラミド類縁体の合成と応用、日本化学会第96春季年会、2016年3月15日、・同志社大学(京都府京田辺市)

中野将徳、木村萌子、八須匡和、堀戸重臣、マンノシル化反応における新規ジアンヒドロ型保護基の β 選択性の調査、第2回 FCCA シンポジウム FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2015、2015年7月30日、・お茶の水女子大学(東京都文京区)

小川範恵、中野将徳、八須匡和、堀戸重臣、新規ジアンヒドロ型保護基を構築したマンノシル供与体の合成、第2回 FCCA シンポジウム FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2015、2015年7月30日、・

お茶の水女子大学(東京都文京区)

井出安奈、水之江沙織、八須匡和、堀戸重臣、5位からの隣接基関与によるシアリル化への影響、第2回 FCCA シンポジウム FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2015、2015年7月30日、・お茶の水女子大学(東京都文京区)

[その他]

東京理科大学基礎工学部生物工学科ホームページ

<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~biost/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

八須 匡和 (HACHISU, Masakazu)

東京理科大学・基礎工学部・生物工学科・助教

研究者番号：60587442