

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H02211

研究課題名(和文) セレンの特異的な反応性を利用したユビキチン化糖タンパク質プローブの新規合成法

研究課題名(英文) Development of new synthetic method of ubiquitinated glycoprotein probe using specific reactivity of selenium

研究代表者

和泉 雅之 (Izumi, Masayuki)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・教授

研究者番号：80332641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン化糖タンパク質は、遺伝子の変異やストレスなどで変性した糖タンパク質のユビキチン-プロテアソーム系による分解経路の解明に有用なプローブである。このプローブの合成には糖タンパク質に位置選択的にユビキチンを連結する必要がある。糖タンパク質に含まれるシステイン残基に影響を与えない連結法として、本研究では γ -セレノリシン誘導体の合成法と γ -セレノリシン残基とユビキチン- γ -チオエステルとのワンポット連結-脱セレノ化反応を開発し、K48連結型ジユビキチンペプチドの合成によりその有用性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖タンパク質の分解経路の異常は、細胞の恒常性の維持に影響を与え神経変性疾患などの原因ともなる。現在盛んに開発されているタンパク質のユビキチン化反応に、本研究で開発された γ -セレノリシン残基とユビキチン- γ -チオエステルとの化学選択的連結-脱セレノ化反応が新たに加わることで、ユビキチン化糖タンパク質などより複雑な構造を持ったプローブの合成が効率的になり、ユビキチンバイオロジーの発展がさらに加速される。また、合成したプローブを用いた変性糖タンパク質分解経路の解明を通して基礎生物医学的な応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：The development of ubiquitinated glycoprotein probes is important for the study of the degradation of aberrant glycoproteins by ubiquitin-proteasome system in the cell. Efficient chemical ubiquitination is required to synthesize ubiquitinated glycoprotein probes. We developed a novel γ -selenolysine-mediated ligation reaction with ubiquitin- γ -thioester that does not affect cysteine thiols. Fmoc- γ -seleno-L-lysine and D-lysine derivatives were synthesized from γ -hydroxy-DL-lysine via enzymatic optical resolution. Ubiquitin peptide containing γ -seleno-L-lysine was synthesized by solid-phase peptide synthesis, and one-pot ligation-deselenization was achieved with ubiquitin peptide- γ -thioester to yield K48-linked diubiquitin peptide. This new γ -selenolysine-mediated ligation-deselenization strategy will be useful in the synthesis of ubiquitinated glycoprotein probes.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：精密化学合成 ユビキチン セレン 連結反応

1. 研究開始当初の背景

細胞は変性した(糖)タンパク質を見分けてユビキチンというアミノ酸 76 残基からなるタンパク質を付加し、これを目印としてプロテアソームというタンパク質分解工場が短いペプチドへと分解する。この「ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS)」と呼ばれる分解経路は、細胞に害を与える変性タンパク質を分解して細胞の恒常性を保つ重要な機構である。UPS の異常は細胞の恒常性の維持を破綻させ神経変性疾患などの原因ともなるため、その研究のプローブとなるユビキチン化されたタンパク質の合成が 2009 年以降報告されるようになった。しかし、糖タンパク質の UPS による分解を研究するためのプローブとなるユビキチン化された糖タンパク質は、糖鎖とユビキチンという二つの翻訳後修飾を受けた非常に複雑な分子となるため、研究開始当初はその合成は手付かずであった。また、当時 Ngly1 欠損症という糖タンパク質分解経路の異常が原因となる希少疾患が発見され、現在も創薬ターゲットとしても糖タンパク質分解経路の解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質や糖タンパク質の分解経路の解明のためのプローブとなるユビキチン化タンパク質、ユビキチン化糖タンパク質を合成するための効率的なユビキチン化反応を開発することである。我々は、タンパク質の化学選択的ユビキチン化反応として、 δ -セレノリシン残基とユビキチン- α -チオエステルとの連結反応によるセレノイソペプチドケミカルライゲーション (SeICL) 法を考案した。本反応は、連結反応後の脱セレノ化をシステイン残基のチオール基存在下で行うことができるため、システイン側鎖の保護を必要としない効率的なユビキチン化反応となる。本研究では、モデル反応ではなく実際にジユビキチンやユビキチン化糖タンパク質プローブを合成することでさまざまな問題点を洗い出し SeICL 法を実用的な合成法とすることとした。

3. 研究の方法

タンパク質の化学選択的ユビキチン化反応であるイソペプチドケミカルライゲーション (ICL) 法は、2009 年に Brik らによって開発された。この方法では、ユビキチン化を受けるタンパク質に δ -メルカプトリシン残基を導入し、ユビキチン- α -チオエステルとの連結反応を行い、その後 δ 位のチオール基を脱硫化して天然型のリシンに変換する、という工程を経る。分泌型のタンパク質である糖タンパク質はジスルフィド結合を有することが多いため、脱硫化を利用する ICL 法を利用してユビキチン化糖タンパク質を合成すると、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基の保護が必要となり合成工程が煩雑となる。そこで、我々はシステイン残基を損なうことなくリシンに変換できる δ -セレノリシン残基を介した連結反応である SeICL 法を考案し、実際のユビキチン化タンパク質プローブの合成に利用するために 48 位で連結されたジユビキチンの合成を検討した。また、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される糖タンパク質はハイマンノース型糖鎖を有していると考えられているため、我々がこれまで利用してきた人工糖タンパク質であるハイマンノース (M9) 糖鎖化インターロイキン 8 (M9-IL-8) の SeICL 法によるユビキチン化を検討した。

4. 研究成果

- (1) 固相合成に利用する δ -セレノリシン誘導体の合成：市販の δ -ヒドロキシ-DL-リシンを出発原料とし、ペプチド固相合成に利用するために Fmoc 基で保護された δ -セレノ-L-リシン誘導体の合成を行った。この合成は、 δ 位のヒドロキシ基への求核置換反応によるセレンの導入と酵素アミノアシラーゼによる光学分割を鍵反応とするルートで、15 工程、総収率 3.2%で Fmoc- δ -セレノ-L-リシン誘導体を得た。なお、本合成ルートでは L-アミノアシラーゼを用いると L 体が、D-アミノアシラーゼを用いると D 体がそれぞれ得られるため、D-アミノ酸から構成される天然型のタンパク質の鏡像異性体であるユビキチン化 D-タンパク質の合成にも利用できる。D-タンパク質は L-タンパク質の 1:1 で混合しラセミタンパク質結晶化によるタンパク質立体構造解析に利用されるなど非常に有用なものであり、両鏡像異性体を同時に合成できる本合成法は非常に有用であると言える。

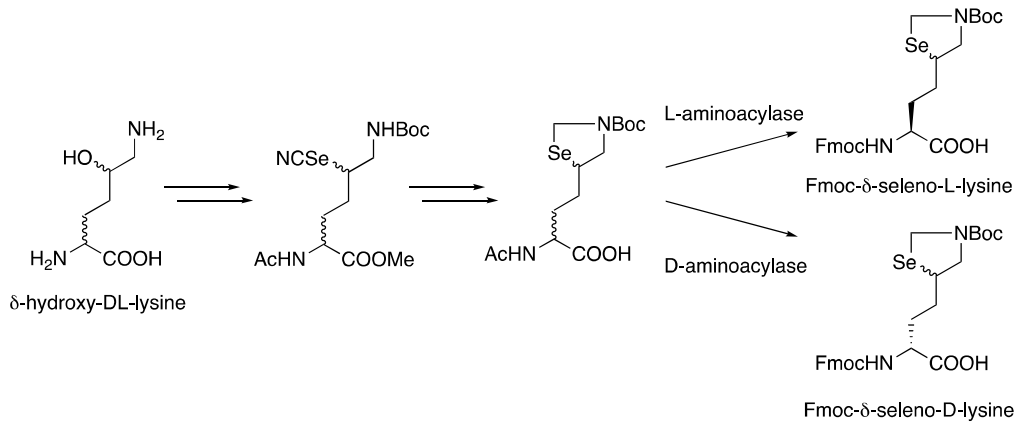


図 Fmoc- δ -セレノ-L-リシンおよび-D-リシン誘導体の合成ルート

- (2) SeICL 法による K48 連結型ジユビキチンの合成: 合成した Fmoc- δ -セレノ-L-リシン誘導体を用いて、K48 連結型ジユビキチンの合成を行った。ユビキチンは 76 残基からなるタンパク質であり、1-45 残基目と 46-76 残基目の 2 つのペプチドに分割してそれぞれ固相合成し、native chemical ligation により連結する戦略で合成する。そのため、まず 48 位に δ -セレノリシン残基を有するペプチドを固相合成した。固相合成に用いる樹脂、N 末端システインの保護基、樹脂からの切り出し条件を種々検討し、48 位に δ -セレノリシン残基を有するユビキチン(C46-76)-ヒドラジドを純度よく得ることができた。そして、K48 連結型ジユビキチンの合成のために、48 位に δ -セレノリシン残基を有するユビキチン(C46-76)-ヒドラジドとユビキチン(C46-76)-チオエステルの SeICL 反応を検討した。種々反応条件を検討することで、 δ -セレノリシン残基側鎖セレナゾリジン環の脱保護、連結反応、脱セレノ化、の 3 ステップをワンポットで行う条件を確立できた。本研究の最新の成果は、国際学会 Pacificchem2021 で発表した。



図 K48 連結型ジユビキチンの合成

- (3) ハイマンノース型糖鎖を有する IL-8 のユビキチン化: ユビキチン-プロテアソーム系での糖タンパク質の分解経路を調べるためのプローブとして、ユビキチン化糖タンパク質プローブの合成を検討した。研究代表者の開発したハイマンノース(M9)型糖鎖を有する IL-8 (M9-IL-8)を糖タンパク質部分とし、Fmoc- δ -セレノ-L-リシン誘導体を用いて δ -セレノ-L-リシン含有 M9-IL-8 の合成を検討したが、固相合成による M9-IL-8 ペプチド配列への δ -セレノ-L-リシンの導入が低収率であった。そのため、 δ -メルカプト-L-リシンの導入を検討したところ、こちらは反応が収率よく進行し δ -メルカプト-L-リシン含有 M9-IL-8 を得ることができた。そこで、ICL 法によるユビキチン- α -チオエステルとの連結反応を検討したが、目的とするユビキチン化 M9-IL-8 を得ることができなかった。本合成研究は、非常に小スケールで検討したため十分な条件検討が行えておらず、引き続き δ -セレノリシン残基を介した SeICL 法によるユビキチン化糖タンパク質プローブの合成検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Izumi Masayuki, Araki Hiroyuki, Tominaga Mamiko, Okamoto Ryo, Kajihara Yasuhiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Chemical Synthesis of Ubiquitinated High-Mannose-Type <i>N</i> -Glycoprotein CCL1 in Different Folding States	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 16024 ~ 16034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.joc.0c01766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 秋山龍成、和泉雅之
2. 発表標題 Fmoc- α -セレノリジン誘導体の合成法の改良
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ジョンソンエマリー、和泉雅之
2. 発表標題 ユビキチン化糖鎖化インターロイキン8の合成研究
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Izumi, M., Tanaka, Y., Araki, H., Maki, Y., Okamoto, R., Kajihara, Y.
2. 発表標題 Selenoisopeptide Chemical Ligation toward Chemical Synthesis of Homogeneous Ubiquitinated Glycoprotein Containing Disulfide Bond
3. 学会等名 29th International Carbohydrate Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山 龍成、田中 勇祐、岡本 亮、梶原 康宏、和泉 雅之
2. 発表標題 ペプチド固相合成に利用できる 位に置換基を有する D リジン誘 導体の合成
3. 学会等名 日本化学会第 9 9 春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中勇祐、真木勇太、岡本亮、梶原康宏、和泉雅之
2. 発表標題 -セレノリジン誘導体を用いたユビキチン化糖タンパク質の合成研究
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiyama, T., Tanaka, Y., Okamoto, R., Kajihara, Y., Izumi, M.
2. 発表標題 Chemical synthesis of diqbiquitin using delta-selenolysine-mediated ligation
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------