

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15698

研究課題名(和文) ヒト型IgG抗体の半合成とシャペロンを用いたフォールディング研究

研究課題名(英文) Semisynthetic and folding studies on human IgG antibody using chaperons

研究代表者

真木 勇太 (Maki, Yuta)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：00805559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年糖タンパク質の化学合成が進められているが、未だ200アミノ酸残基を超えるタンパク質の合成は容易ではない。本研究では創薬や基礎研究に重要なIgG抗体のFc領域を合成標的とした。固相合成だけでなく、大腸菌発現を用いた長鎖ペプチドの調製を組み合わせることで、簡便にペプチドセグメントを用意し、Native Chemical Ligation反応を用いて全長ポリペプチドを合成した。その結果、糖鎖構造を変えながら219アミノ酸からなる糖ペプチドを合成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体は創薬だけでなく基礎研究に幅広く用いられる重要な生体高分子である。現状、抗体のような大きな糖タンパク質は哺乳動物細胞などを用いた発現法によって調製するのが一般的であり、低分子化合物のように有機化学によって自在に構造変化や部位特異的な修飾を行うことが難しい。抗体の構造の中で、Fc領域は生理活性に重要なアスパラギン結合型糖鎖が付加しており、また抗体の高次構造形成に重要な領域である。このFcを有機化学的に自在に合成することができれば、種々のFab領域とのキメラ抗体の創生や、位置特異的に化学官能基修飾を施した抗体の応用研究へと発展させることができる。

研究成果の概要(英文)：Chemical synthesis of large glycoproteins such as glycoproteins consisting of over 200 amino acids is still big challenge though the many methodologies have been developed. In this work, we targeted Fc region of IgG antibody which is a glycosylated protein and consists of 219 amino acids. We employed not only typical solid-phase peptide synthesis but also E. coli expression to prepare peptides and glycopeptides. Peptide ligation such as Native Chemical Ligation enabled synthesis of full-length Fc polypeptides having different types of glycans.

研究分野：生物有機化学

キーワード：糖鎖 糖タンパク質合成 抗体 ペプチドライゲーション ペプチド固相合成 大腸菌発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体は種々の病気の治療薬として用いられている重要な生体高分子であり、さらにウェスタンブロットティングなどの生物学的基礎研究に欠かすことのできない分子ツールである。糖鎖が付加した糖タンパク質である抗体は、二つの軽鎖と二つの重鎖からなる複雑な分子であり、生合成における高次構造形成機構や糖鎖の機能解明は十分ではなかった。

技術発展により多くの糖タンパク質が合成されているが、抗体のような大型かつ複雑な糖タンパク質を合成することは未踏の領域であった。一般的な糖タンパク質化学合成では、20-30 残基程度のセグメントをいくつか用意し、それらをペプチド連結反応によって伸長することで全長を得る。しかし、200 アミノ酸を超えるような長鎖のポリペプチドとなると、セグメント数の増加や連結反応の効率低下によって合成は非常に困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、抗体が二量化する際に鍵となる Fc 領域糖ペプチドの簡便な半合成法の確立を目指した。抗体の機能発現や抗体全長の合成には重鎖の二量化が鍵である。大腸菌発現と化学合成法を組み合わせることで、219 アミノ酸からなる Fc 糖ペプチドを簡便に得られる合成ルートを検討した。さらに種々のフォールディング条件を試すことで、in vitro での高次構造形成を検討することとした。

3. 研究の方法

219 アミノ酸からなる Fc 領域糖ペプチドを合成するために、化学法によるペプチド合成に加えて、大腸菌発現を用いて簡便に長鎖ペプチドを調製することとした。また、導入する糖については、鶏卵から単離できる二分枝複合型糖鎖 2-アスパラギン (Asn) と、化学合成によって調製する N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)-Asn を用いた。Native Chemical Ligation (NCL) ^{Ref. 1} などのペプチド連結反応を用いてペプチド、糖ペプチドを連結し、全長糖ペプチドを合成した。さらに段階透析を用いた in vitro のフォールディングを検討することで、Fc 領域 1 の合成を目指した。

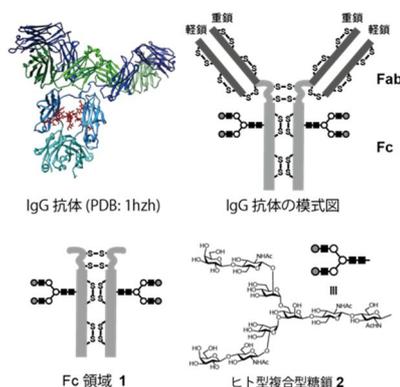


図 1.

4. 研究成果

複合型糖鎖を有する Fc 糖ペプチドの合成

まず、9 糖からなる複合型糖鎖 2 を有する Fc 糖ペプチドの合成を検討した。4 つのセグメントに分割する戦略 (図 2) を考案した。一般的な Boc 固相合成法 ^{Ref. 2} により、セグメント 1 と 2 は C 末端をチオエステル体として調製した。セグメント 3 は糖ペプチドであり、確立された方法 ^{Ref. 3} により鶏卵から単離したヒト型の複合型糖鎖 2-アスパラギン (Asn) を Boc 固相合成に用いる

ことで糖ペプチドヒドラジド CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD

体を得た。また、長鎖ペプチドであるセグメント 4 は大腸菌発現により調製した。望む配列の N 末端側にアフィニティ精製用の His タグとタグ切断用の TEV 配列を導入したプラスミドを設計し、大腸菌発現により調製した。その後 TEV 配列特異的に切断する TEV プロテアーゼを用いて余分なタグ配列を切断し、目的のセグメント 4 を得た。

VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ ANSTYRVVSV
LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE
PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQOGNVFSC
SVLHEALHNH YTQKSLSL

Mutation: Y71A

Chemical synthesis	: Seg1, Seg2, Seg3
<i>E. coli</i> expression	: Seg4

図 2

得られたセグメントを原料とし、NCL 反応によってペプチド連結をおこなった (図 3)。C 末端がチオエステル体であるセグメント 2 と、N 末端に遊離のシステインを有したセグメント 3 をリン酸緩衝液中で混合することで NCL 反応をおこない、天然のアミド結合でセグメント 2 と 3 を連結した。続いて得られたセグメント 23 の C 末端のヒドラジドに対し、酸性リン酸緩衝液中で亜硝酸ナトリウムを作用させることで酸アジドへと変換し、さらにアリールチオールを添加することでチオエステル体としたのちに、セグメント 4 との NCL をおこなった。得られたセグメント 234 の N 末端のシステイン側鎖のアセトアミドメチル (Acm) 基を除去し、セグメント 1 と NCL することで、全長糖ペプチド 3 を得た。

続いて、得られた糖ペプチド **3** を用いてフォールディングを検討した。システイン-シスチンを酸化還元剤として段階透析法を検討した。LC-MS によって反応追跡したところ、分子内での2つのジスルフィド形成に相当する質量変化を確認できたものの、分子間での2量体形成ははっきりと観測されなかった。また電気泳動によってフォールディング反応を追跡したところ、やはり単量体が主生成物であり、二量体に相当するバンドはほとんど観測されなかった。過去の研究では、哺乳動物細胞によって発現した IgG を用いて、ジスルフィドの還元と続くリフォールディングが検討されているが、重鎖の二量体形成効率は低いことが知られている。引き続き、二量体を効率的に得られる *in vitro* のフォールディングを検討しているが、9糖からなる複合型糖鎖が立体障害となって二量体形成の効率が低くなっていると考えている。

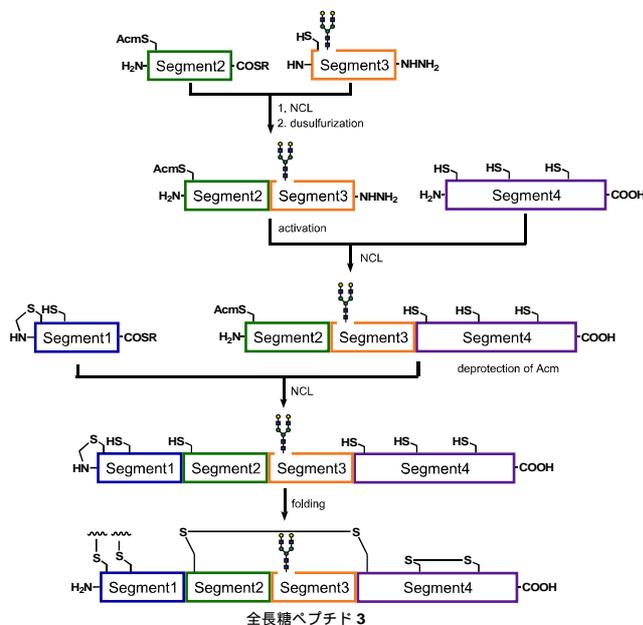


図3

単糖 GlcNAc を有する糖ペプチドの合成

大型糖鎖がFc領域の二量体形成を邪魔していると考え、続いて、立体障害の小さい単糖を有するFc糖ペプチド **6** を合成して *in vitro* のフォールディングを検討することとした。GlcNAc を導入した

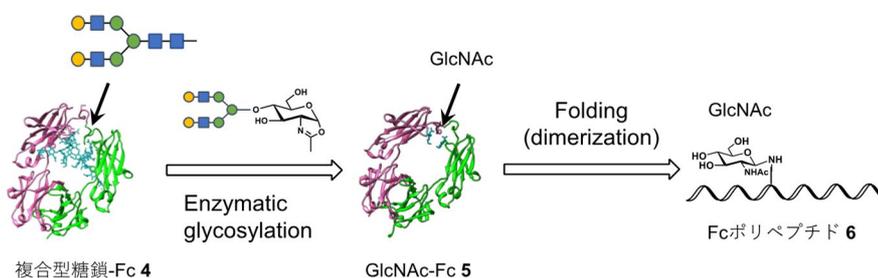


図4

ポリペプチド **6** を用いてフォールディングと二量体形成を行うことで GlcNAc 単糖が付加した Fc **5** を合成し、酵素反応によって残りの糖鎖部分を導入することで複合型糖鎖を有する Fc **4** を得ようと考えた(図4)。この合成戦略が確立できれば Fc 領域に自在に化学修飾を施せるだけでなく、様々な種類の糖鎖を後から導入することができる。

全長ペプチドの合成にあたり、4つのセグメントに分割して合成を進めた(図5)。Fc部位のアミノ酸に変異を加えることがないように新たにデザインした。セグメント1と2は Boc 固相合成法によって調製し、さらにセグメント4は大腸菌発現によって調製した。より発現量を多くするために、セグメント4のN末端側に精製用の His タグと可溶性タグとして SUMO 配列を導入したプラスミドを設計した。1リットルあたり 60mg 程度の発現量で得られるようになった。また SUMO 配列切断用の SUMO プロテアーゼも別途大腸菌発現によって調製できるようにし、簡便に量産できるようになった。

CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
 QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSL

Chemical synthesis : Seg1, Seg2, Seg3
E. coli expression : Seg4

図5

続いて、GlcNAc-Asn **10** を化学合成し、糖ペプチド(セグメント3)を調製した。市販のN-アセチルグルコサミン

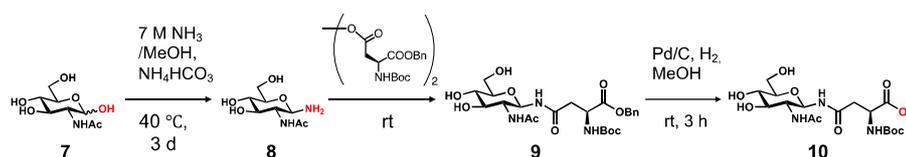


図6

ン (GlcNAc) **7** を出発原料とし、まずアノマー位をアミノ化した。別途調製したアスパラギン酸誘導体の酸無水物との縮合によって GlcNAc-Asn ベンジルエステル **9** を得たのちに、さらに接触

還元によりカルボン酸 10 を合成して Boc 固相合成に用いることで、セグメント 3 を得た。

得られたセグメントを用い、NCL を繰り返すことで全長糖ペプチド 11 を合成した。まずチオエステル体であるセグメント 2 と、N 末端にシステインを有するセグメント 3 を NCL によって連結した。連結後、ラジカル反応条件によって連結に用いたシステインを天然のアラニン残基へと変換した。さらに亜硝酸ナトリウムを用いた活性化によって C 末端のヒドラジドをチオエステルへと変換し、セグメント 4 との NCL を実施した。その後、N 末端のシステイン側鎖の Acm 基を酢酸銀を用いた条件で除去し、セグメント 1 との NCL を行うことで全長ポリペプチド 11 を得た。現在全長の量産を進めながらフォールディング条件を検討している。

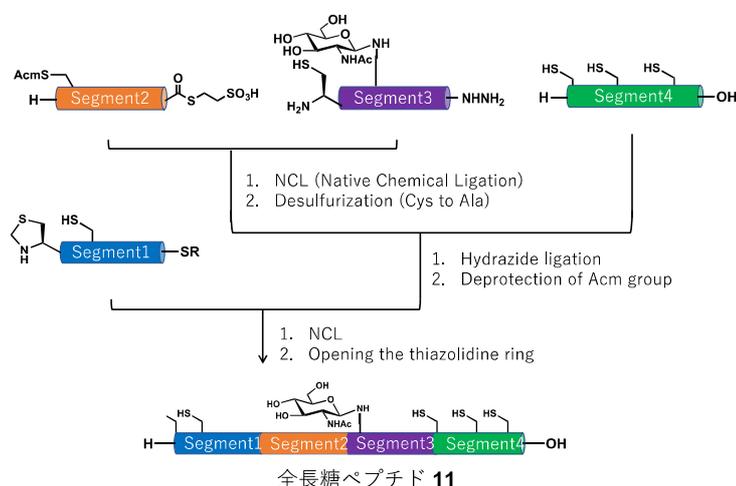


図 7

より効率的に Fc 全長を合成するために、チオ酸を用いた糖ペプチド合成をさらに検討した。図 8 に示すように N 末端側のペプチド 12 をチオ酸として調製し、さらに GlcNAc-Asn もアミノ基を遊離としたチオ酸 13 として調製した。報告例 (Ref. 4) に従い、DMSO 中で diacyl disulfide coupling (DDC) を行うことでペプチドと GlcNAc-Asn を連結した。さらに得られた糖ペプチドチオ酸 14 を用いて、C 末端側のペプチド 15 との連結を検討した。この連結には、thioacid capture ligation (TCL) (Ref. 5) を用いることとした。これはチオ酸と脱離基を有したチオールとでジスルフィドを形成し、続く S N 転移によってアミド結合を形成する反応である。この TCL を実施するため、メルカプトメチル基を有したセリン誘導体を化学合成し (Ref. 6)、この誘導体を N 末端に導入したペプチド 15 を調製した。現在糖ペプチドチオ酸 14 との連結を検討しており、Fc 全長をさらに簡便に進めるための新規合成法の開発を進めている。

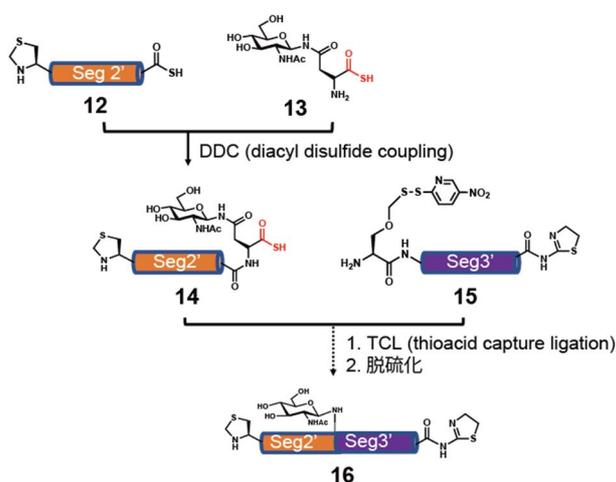


図 8

まとめ

本研究により、ヒト型 IgG の高次構造形成に重要な Fc 領域糖ペプチドを化学的に合成することが可能となった。化学合成による糖ペプチド調製と大腸菌発現を用いたペプチド合成を組み合わせることで、200 アミノ酸を超える Fc ペプチドを糖鎖構造を変えながら調製できるようになった。In vitro のフォールディングを検討した結果、糖鎖が立体障害的に Fc の二量化を妨げていることが示唆されており、現在糖鎖の立体障害を減らしてフォールディングを検討している。今後、二量化と酵素反応による糖鎖導入を検討することで Fc 領域を自在に化学修飾しながら調製できることが期待でき、さらなる応用研究に用いることができると考えている。

引用文献

- (1) Dawson, P. E.; *et al.*, *Science*, **1994**, *266*, 776. (2) Murakami, M.; *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3567. (3) Kajhara, Y.; *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 971. (4) Nomura, K.; *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 10157. (5) Liu, C.-F.; *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 933. (6) Hojo, H.; *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5318.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西川晴美、真木勇太、岡本亮、梶原康宏
2. 発表標題 IgG抗体Fcの4次元構造構築のための糖ペプチド合成研究
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川晴美、真木勇太、岡本亮、梶原康宏
2. 発表標題 糖鎖の機能解明に向けた IgG 抗体 Fc フラグメントの合成研究
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
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
---------	---------