

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008－2009

課題番号：20710159

研究課題名 (和文) O-結合型糖鎖を用いた de novo タンパク質設計に関する研究

研究課題名 (英文) De novo protein design using O-linked glycans

研究代表者

藤谷 直樹 (Fujitani Naoki)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任助教

研究者番号：10374191

研究成果の概要 (和文)：ヒト由来ムチンやヒト由来IgA1ヒンジ領域の糖ペプチド PSTPPTPSPSTPPTSPS をマイクロ波照射雰囲気化で合成し、立体構造解析を行った。下線で示した残基にN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)および、core1構造(Gal-GalNAc)を有する糖ペプチドを合成した。その結果、糖を有しないペプチドでは9つのプロリンがcis-transの異性体を形成し、ペプチド全体として複数のコンフォーマーを形成していたが、糖鎖修飾 (特に2糖core1構造) を付加することによって、cis-transの異性化反応が大きく抑制され、トランス体がメインに存在していることが明らかとなった。糖鎖修飾されたセリンまたはスレオニンは、そのC末端側に存在するプロリンの異性化反応を大きく抑制することが明らかとなった。一般的なペプチド固相合成はC末端側から合成するが、その際、最初の残基がプロリンであるとき、次のアミノ酸をカップリング後の脱保護反応において環状ジペプチド構造 (ジケトピペラジン構造) を形成してしまい、アミノ酸伸長が止まって収率が大きく低下することが知られている。これは、プロリンがシス体を形成するためであるが、本研究で得られた知見をもとに、2番目のアミノ酸を糖アミノ酸に置換したところ、プロリンはトランス体に固定され、ジケトピペラジン構造の形成を抑制し、アミノ酸伸長が起きた。本研究の結果として、糖鎖がC末端側の隣に存在するプロリンをトランス体として維持する効果があること (cis-trans 異性化反応の速度を落とす)、C末端にプロリンが有する場合における Fmoc 固相ペプチド合成法に関して PCT 出願を行った。

研究成果の概要 (英文)：Glycopeptide mucins and IgA1 hinge region PSTPPTPSPSTPPTSPS found in human were synthesized under microwave irradiation atmosphere and the three-dimensional structure analysis was performed.

In the case of IgA1 hinge, the glycopeptides with N-acetylgalactosamine (GalNAc) and core1 structure (Gal - GalNAc) were synthesized in the residue indicated by underlines.

As a result, 9 of proline formed an isomer of cis - trans out of a peptide without sugar, but a isomerization of cis - trans was drastically restrained to add a sugar chain modification (in particular, in the case of core1 structure), and that a structure with trans conformation exists mainly became clear. It was revealed that glycans on serine or threonine restrains an isomerization reaction of the proline which exists in the C-terminal side.

General solid phase synthesis of peptide is initiated from the C-terminal, but it is widely known that the yield decrease in the case of the first amino acid is proline because the peptide structure constructs a ring structure (diketopiperazine structure) in a deprotection reaction after the coupling. This is because proline forms a cis conformer, the knowledge obtained by IgA1 research, when I substitute for the 2nd amino acid in a sugar amino acid, proline is fixed on a trans conformer, and amino acid extension has occurred. A PCT application was performed about the case that a sugar chain has the effect which maintains the proline which exists next to the C-terminal as a trans conformer (cis-trans isomerization

reaction slowed down.) and a Fmoc solid phase peptide synthesis method in the case of proline possesses in the C-terminal as a result of this research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生命化学、翻訳後修飾、立体構造デザイン、核磁気共鳴

1. 研究開始当初の背景

(1) 全く新規のアミノ酸配列から構成されるタンパク質の立体構造設計、いわゆる「*de novo* タンパク質設計」は、新たな機能を有するタンパク質を生成することを目的に、世界各国が取り組んでおり、我国も、理化学研究所のグループが近年、 λ ファージ由来の DNA 結合タンパク質と同様の立体構造を有するタンパク質のデザインに成功している(*J. Mol. Biol.*, **354**, 801-814 他)。しかし、PDB をはじめとする立体構造データの蓄積が進んでいるにも関わらず、*de novo* タンパク質設計の報告例は多くないのが現状である。これはデータベース解析の他、時間を要する経験的ポテンシャル関数等の構築が不可欠であるためである。

(2) 申請者は近年、糖ペプチドや糖鎖認識タンパク質の研究(研究業績欄の論文)を通して、糖鎖が一定の規則でタンパク質の立体構造を制御していることを発見した(*Carbohydr. Res.*, 2007; *J. Org. Chem.*, 2006; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004; 下図)。糖鎖付加は代表的な翻訳後修飾の1つであり、翻訳後修飾がタンパク質の立体構造変化を誘引した結果、機能発揮に結びつくことは広く議論されている。我が国のタンパク質 3000 プロジェクトなどにより、多くの糖タンパク質の立体構造が明らかになった一方で、その構造変化のメカニズムを詳細に議論している報告例は米国メモリアル・スロー・ケタリング癌センターや米国ミネソタ大学のグループ(*J. Am. Chem. Soc.*, 2002 他)、などの一部に留まっている。

(3) 申請者らの研究により見出された規

則を用いて「糖鎖を道具として用いた、タンパク質の立体構造設計」を考えた。糖鎖の利用が *de novo* タンパク質の設計を迅速化できるものとする。さらに、糖鎖付加によってインシュリンの機能を向上させることにも成功しており(*J. Am. Chem. Soc.*, 2004)、*de novo* タンパク質設計の大きな意味である「新規機能の付加」も期待できるものとする。

2. 研究の目的

- (1) 主に以下の2点を主な目的とした。
- 糖ペプチドのライブラリー化と糖鎖による構造安定化要因の一般化。
 - 一般化された構造安定化要因を用いて、新規なアミノ酸配列を有する糖ペプチドの立体構造をデザインする。

(2) 疾患関連タンパク質に注目し、その構造解析と機能解明を行うこととした。具体的にはヒト由来ムチンと IgA1 ヒンジ領域に着目した。

3. 研究の方法

(1) 糖ペプチドの合成---ヒト由来 MUC4 および MUC5AC、さらに IgA1 ヒンジペプチドを合成した。一般的なペプチド固相合成法では糖アミノ酸のカップリング効率が悪く時間を要するため、申請者が所属する研究室で開発された、電磁波(マイクロウェーブ)を用いたペプチド合成方法を用いて効率的な合成を行なった(1アミノ酸伸長に要する時間=3~5分、*J. Org. Chem.*, 2006; *Org. Lett.*, 2005)。

(2) 立体構造解析と構造情報の抽出---合成した全ての糖ペプチドに対する立体構造解

析実験を行った。NMR 装置は極低温型高感度プローブを装着しており、通常の立体構造解析のために要する測定時間の 16 分の 1 から 32 分の 1 程度で完了した。また、スペクトルの帰属も申請者らが開発したアルゴリズムを用いて、構造算出までの時間を大幅に短縮できた。

(3) 構造情報の抽出---蓄積された立体構造情報から構造安定化要因を抽出した。得られた構造と in silicoシミュレーションの結果をポテンシャルエネルギーレベルで比較した。

4. 研究成果

(1) 合成した糖ペプチドをマイクロアレイ化し、特定の疾患をターゲットとした自己抗体探索を進めた (出願準備中)。

(2) IgA1 ヒンジ領域の立体構造を決定した。現在まで、IgA1 ヒンジ領域の糖鎖構造解析はマスペクトルにより、その数や種類の推定に留まっていた。本研究により、単糖修飾もしくは修飾なしの状態 (IgA 腎症患者に多い) ランダム構造であったのに対し、2 糖 core1 以上構造で修飾された糖ペプチドは一定の立体構造を形成していることが明らかとなった。



上図はその一部分を示す

(20 個の再安定構造の重ね合わせ。青はペプチド鎖、その他は糖鎖構造を示す。特定の位置に修飾された糖鎖がペプチドの構造を安定化していることを明らかにした。

(3) 2 糖構造以上で IgA1 ヒンジ領域が安定化されることは、プロリンのシス-トランスの異性化を糖鎖が制御していることに起因していることが明らかになった。

(4) しばしば、ペプチド固相合成法ではプロリンのシス体が原因となって環状化反応が起こり、収率が下がるという問題がある。

そこで、本研究では SP, TP の両ペプチドを合成し、S と T における糖鎖修飾の有無による収率の差を調査した結果、糖鎖修飾があったほうが収率が上昇することを発見し、有効な合成方法として出願した。

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 3 件)

① Matsushita T., Sadamoto R., Ohyabu N., Nakata H., Fumoto M., Fujitani N., Takegawa Y., Sakamoto T., Kuroguchi M., Hinou H., Shimizu H., Ito T., Naruchi K., Togame H., Takemoto H., Kondo H., and Nishimura S.-I., “Functional Neoglycopeptides: Synthesis and Characterization of New Class MUC1 Glycoprotein Models Having Core 2-based O-Glycan and Complex-type N-Glycan Chains”, *Biochemistry*. 査読有, **48**, 11117-11133(2009)

② Kouno T., Fujitani N., Mizuguchi M., Osaki T., Nishimura S.-I., Kawabata S.-i., Aizawa T., Demura M., Nitta K., and Kawano K., “A Novel β -defensin Structure: a Strategy of Big Defensin for a Resistance by Gram-positive Bacteria”, *Biochemistry*, 査読有 **47**, 10611-10619 (2008)

③ Nakagawa H., Ohira M., Hayashi S., Abe S., Saito S., Nagahori N., Monde K., Shinohara Y., Fujitani N., Kondo H., Akiyama S.-I., Nakagawara A., Nishimura S.-I., “Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system”, *Cancer Lett* 査読有 **270**, 295-301 (2008)

[学会発表] (計 3 件)

① Kensaku Hosoguchi, Kazumi Shimizu, Naoki Fujitani, Hiroshi Hinou, Shin-Ichiro Nishimura, “Structural Insights into Glycosylated EGF12 on Mouse Notch-1 Receptor”, 7th Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR, Sapporo, 27th July in 2009

② Kensaku Hosoguchi, Kazumi Shimizu, Naoki Fujitani, Shin-Ichiro Nishimura, “Synthesis, Folding and Structural Insights into Glycosylated EGF12 on Mouse Notch-1 Receptor”, The 1st Hokkaido Univ.-Academia Sinica Joint Symposium, Sapporo, 7th October in 2009

③ Kensaku Hosoguchi, Kazumi Shimizu, Naoki Fujitani, Shin-Ichiro Nishimura,

“Synthesis, Folding and Structural Insights into Glycosylated EGF12 on Mouse Notch-1 Receptor”, Glycobiology, San Diego, 12th-15th November in 2009

〔図書〕（計 1 件）

①基礎から学ぶ構造生物学 第 4 章 NMR
藤谷直樹、河野隆英
共立出版（2008）総項数 203

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：糖ペプチドの製造方法
発明者：西村紳一郎、藤谷直樹
権利者：国立大学法人北海道大学
種類：特許
番号：特願 2008-312507
出願年月日：平成 20 年 12 月 8 日
国内外の別：国内

名称：糖ペプチドの製造方法
発明者：西村紳一郎、藤谷直樹
権利者：国立大学法人北海道大学
種類：特許
番号：特許 PCT/JP2009/006641
出願年月日：2009 年 12 月 4 日
国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤谷 直樹 (Fujitani Naoki)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
特任助教
研究者番号：10374191

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし