

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580410

研究課題名（和文）糖ペプチド型分子プローブを用いた細胞内PNGaseのリアルタイム解析

研究課題名（英文）Synthesis of a Versatile Probe for Analysis of Cytoplasmic Peptide-N-Glycanase

研究代表者

松尾 一郎 (MATSUO ICHIRO)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40342852

研究成果の概要（和文）：

細胞内ペプチドN-グリコナーゼ (PNGase) は不要糖タンパク質から N-型糖鎖を遊離させる酵素であり、タンパク質の品質管理機構に関わる分子として注目されている。本研究では PNGase 活性を高感度に検出するために、還元末端にクロロアセタミド基を、非還元末端側の 4 位にプロパルギル基を有するキトビオース誘導体をデザイン、合成した。クリック反応により蛍光性置換基を導入、得られたプローブは PNGase の脱糖鎖活性を μM オーダーで阻害した。

研究成果の概要（英文）：

Functions of Peptide-N-Glycanase (PNGase) in endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) are attracting recent attention. In order to analyze in this process, we developed a potent inhibitor having clickable tag that can allow for a variety of functional groups to be introduced such as detection and purification tags easily using a Cu (I)-catalyzed [3,2] cycloaddition reaction. Our probe inhibited PNGase selectively by microM order and can easily lead to a variety of compounds. These compounds should help in the understanding of the biological functions of cytoplasmic PNGase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：糖鎖工学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：糖鎖、有機合成、糖アミノ酸、PNGase、分子プローブ、N-結合型糖鎖

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、分泌経路を通るタンパク質は粗面小胞体 (ER) で正しい折り畳み構造やサブユニット形成 (高次構造) が厳しくチェックされ “出来損ない” あるいは “不

要” なタンパク質を正しい構造に直したり、取り除いて細胞内に不要なタンパク質が蓄積するのを防いでいる (Helenius A., Aebi M., *Science*, **291**, 2364-2369, 2001)。この際、不必要と判断されたタンパク質は細胞質へ

と逆輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解によって除去されるが (Sifers RN. et al., *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 619-624, **2001**) 近年、プロテアソームによる不要糖タンパク質の効率的な分解において、細胞内 PNGase による脱糖鎖過程が必要であることが明らかとなり (Analysis of ER-associated glycoprotein degradation using synthetic glycopeptide probes” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360**, 357-362, **2007**)、異常糖タンパク質が関連するアルツハイマー病やプリオン病などの疾患との関連からも PNGase の機能は注目されている

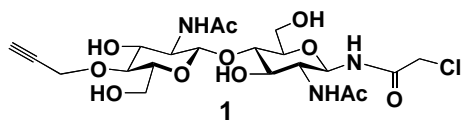
PNGase は糖タンパク質や糖ペプチドから *N*-型糖鎖を遊離させる酵素であり、糖鎖の構造および機能研究の際の有用な試薬として用いられている。一方、真核細胞の細胞質に広く存在する PNGase は、先に述べた通り、異常糖タンパク質の品質管理機構 (ERAD) に関わる分子として注目されている (Suzuki T. et al., *FASEB J.*, **16**, 635-641, **2002**; Suzuki T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 1-5, **2003**)。ところが PNGase 研究のベースとなる簡便な酵素活性測定法がなく、変性 RNase B を基質として用いている方法 (Suzuki T., *Methods* **35**, 360-65, **2005**) が一般的となっている。しかし、この方法では、基質となる変性 RNase B が不安定であることや細胞内での PNGase 活性測定が困難であるなど、PNGase 研究の障害となっていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞内の PNGase 活性を測定することが可能な糖鎖分子プローブの合成を目的とする。その具体的な方法として、活性のある PNGase のみを高感度に検出するプローブや、糖鎖切断と同時に蛍光波長が変化するプローブ、糖鎖切断と同時に蛍光を発する FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) など蛍光検出をベースとした糖鎖分子プローブの開発をめざした。

3. 研究の方法

我々はキトビオース構造を有するハロアミド誘導体が PNGase を阻害剤することを報告している。そこで、この構造をベースに、非還元末端側にプロパルギル基を導入することで、クリック反応を用いて任意の置換基の導入を可能とし、PNGase 研究に必要な分子プローブへと簡便かつ効率的にチューニングできるような化合物 **1** をデザイン、合成することとした。



(1) キトビオース構造の大量合成

還元末端部分にアジド基を、非還元末端部分にプロパルギル基を有するキトビオース誘導体の合成ルートを検証、その後グラムスケールでの大量合成をおこなう。

(2) 蛍光性置換基導入条件の検討

アジド基を有する蛍光性置換基を用いてキトビオース誘導体の非還元末端部分に導入したプロパルギル基とのクリック反応を検証する。その後、タンパク質上でのクリック反応へと展開する。

(3) プローブを用いた PNGase 活性検出

合成プローブを用いて PNGase の活性検出をおこなう。置換基の違いや蛍光性置換基の種類などによる PNGase 阻害活性の差異を明らかにする。

4. 研究成果

(1) キトビオース誘導体の合成

1-1 アシル系保護基を用いたルート

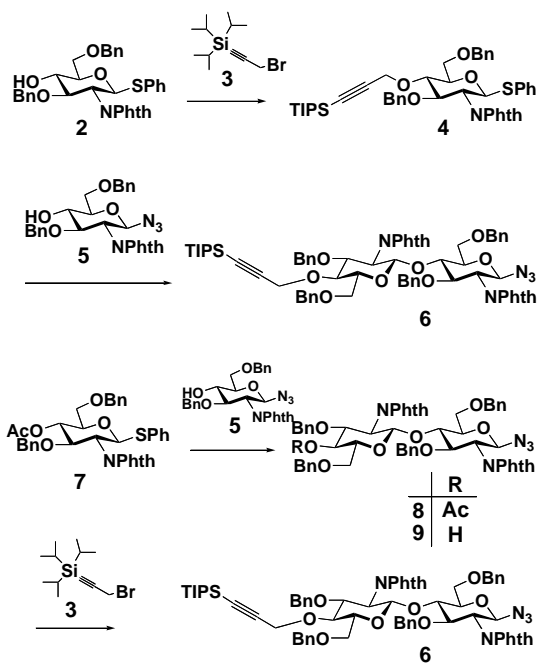
本研究でデザインしたキトビオース誘導体にはアジド基とプロパルギル基が同時に存在する。従って分子間での熱的クリック反応が進行しないように温和な反応条件が必要なことや、水酸基の保護基として脱保護時に水素添加反応は使えないなど合成上の制約がある。そこで、水酸基の保護基としてアシル系の保護基の利用を検討した。しかし、グリコシル化反応によって2糖誘導体は得られず、糖供与体の分解物および糖受容体を回収した。糖受容体にアシル系の保護基を導入したために、4位水酸基の反応性が低下したためと思われる。

1-2 ベンジル系保護基を用いたルート

水酸基の保護基としてベンジル基を用いてキトビオース構造の構築を試みた。具体的には、単糖供与体にプロパルギル基を導入後、アジド基を有する糖受容体と反応させる方法 (ルート1) と先にキトビオース構造を構築した後にプロパルギル基を導入する方法 (ルート2) の2通りを検討した (Scheme 1)。

ルート1: チオフェニル誘導体 **2** にトリイソプロピルシリル基で保護したプロパルギルプロミドを反応させることで単糖供与体 **4** を収率51%で得た。得られた **4** とアジド基を有する単糖受容体 **5** をNIS/AgOTfをプロモーターとして反応することでキトビオース誘導体 **6** を収率83%で得た。

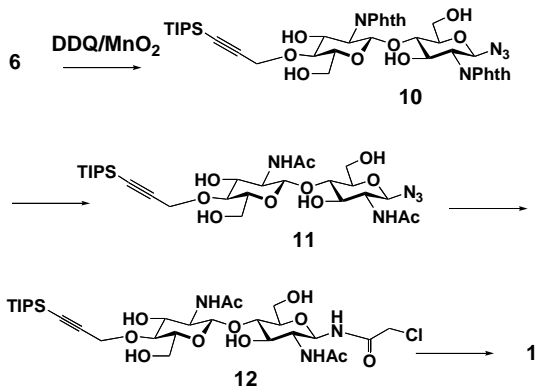
ルート2: 糖供与体 **7** と糖受容体 **5** をカップリング、収率83%でキトビオース誘導体 **8** を得た。得られた **8** のアセチル基を除去、**9** とした後にプロパルギル基を導入、収率76%で化合物 **6** を得た。両ルートともにグラムスケールでの **6** の合成が可能であったが、プロパルギル化の効率を考慮し、ルート2により、キトビオース誘導体 **6** を20グラム合成した。



Scheme 1

1-3 酸化的脱ベンジル化反応

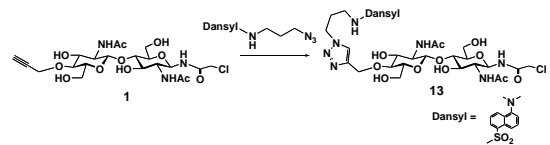
化合物 **6** は還元末端部分にアジド基、非還元末端部分にプロパルギル基を有しているため、ベンジル基の除去に通常よく用いられる接触水素化法は利用できない。そこで、DDQ による酸化的脱ベンジル化を検討した。塩化メチレン中、2.0 当量の DDQ を用いることで、脱ベンジル化反応は速やかに進行し、目的の化合物 **10** を収率よく与えた。DDQ は高価な試薬なので、使用量を減らすために種々条件検討を行った。その結果、ジクロロエタン中、60 °C で反応をおこなうことにより DDQ 量を 1/2 まで押さえることが、さらに反応によって生じるジヒドロキノン、酸化マンガンをもちいることで DDQ へトリサイクル系を検証し、DDQ の使用量を 8 当量まで減らすことができることを明らかにした。



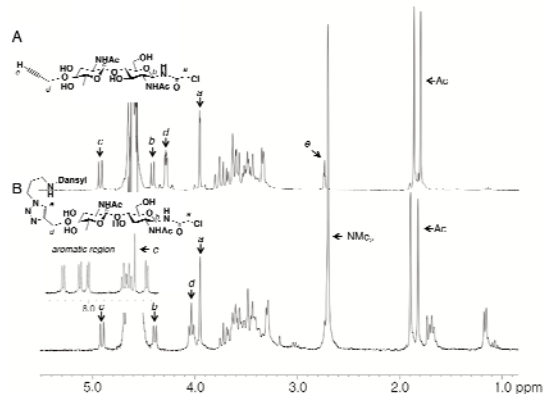
得られた化合物 **10** のフタルイミド基をアセチル基へと変換、還元末端のアジド基をプ

ロパンジチオール/DIPEA にて還元、クロロアセチル化することで化合物 **12** へ、TIPS 基を除去することで、目的としたプローブ **1** の合成に成功した。

1-4 クリック反応によるდანシル化

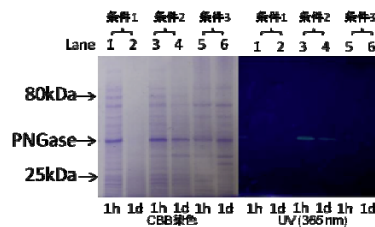


非還元末端部分のプロパルギル基に対して蛍光性置換基の導入を検討した。アミノエタノールに 2 当量のდანシルクロリドを反応させた後にアジ化ナトリウムで処理することでアジド基を有するდანシル誘導体を合成した。得られたアジド体と化合物 **1** を銅触媒存在下、DIPEA、アセトニトリル中で反応することにより収率 78% でდანシル基を導入、化合物 **13** を得た。得られた生成物の ¹H-NMR を図に示した。



1-5 タンパク質上でのクリック反応

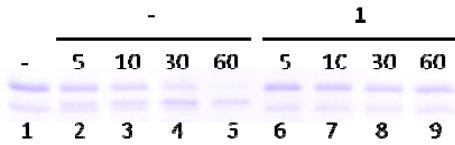
あらかじめ PNGase に対しプローブ **1** を作用させた後に、アジド基を有するდანシル誘導体の導入を検討した。その結果、硫酸銅/アスコルビン酸ナトリウムを用いる系 (条件 2) においてタンパク質上でのクリック反応が進行することが明らかとなった。



条件 1: CuSO₄ (0.13 mM), TCEP(1.3 mM), DIPEA (0.13 mM), **19**(0.13 mM), solvent (H₂O/DMSO=98/2). 条件 2: CuSO₄ (175 mM), ascorbic acid (17.6 mM), EDTA (1 mM), **19** (0.13 mM), solvent (H₂O/DMSO=98/2). 条件 3: CuI (0.039 mM), 2,6-lutidine (3.9 mM), DIPEA (3.9 mM), **19** (0.13 mM), solvent (H₂O/CH₃CN=1/1).

1-6 PNGase の阻害実験

RNaseB を用いて PNGase の脱糖鎖活性を測定した。その結果、60分では糖鎖が切断された。一方、反応液にプローブ **1** を共存させた系では、RNaseB 上の糖鎖は切断されず、PNGase の脱糖鎖活性が **1** によって阻害されることが明らかとなった。

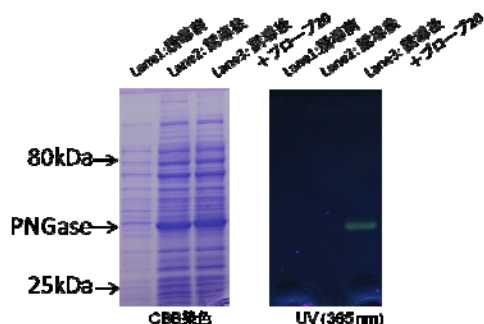


RNase B (1.5 mg/mL) was treated with PNGase (2.5 mg/mL) in 40mM PBS (pH7.0) containing 10 mM DTT in presence of **1**

また、TIPS 体 **12** と Dansyl 体 **13** についても同様の実験をおこなったところ、いずれの化合物も PNGase 活性を阻害することが明らかになった。

1-7 蛍光標識プローブを用いた PNGase 検出

蛍光標識したプローブを用いて PNGase の検出を試みた。PNGase をコードするプラスミドを持った大腸菌の破砕液をプローブ **13** で処理した結果の SDS-PAGE を示す。PNGase 発現誘導前の大腸菌破砕液にはバンドが検出されず、IPTG による PNGase 発現誘導後の破砕液では蛍光が観測されたことから、PNGase を選択的に検出していることが示された。今回の研究で合成したプローブは大腸菌破砕液のタンパク質の混合物中、総タンパク質濃度が 10 マイクロ M 以下でも蛍光のバンドが観測されたことより、活性のある PNGase の



50mL *E. coli* lysate solution was treated with 2mL of **20** (16.5 mM) for 30min at 37 °C after preincubation with 2mL of **1** (16.5mM) for 30 min at 37 °C

みを高感度に検出できることが明らかとなった。

1-8 まとめ

PNGase の簡便な活性検出のために非還元末端部分にプロパルギル基を有する新規糖鎖分子プローブを合成した。今回合成したプローブはクリック反応によりさまざまな置換基の導入が可能であることを Dansyl 基の導入で実証した。得られた Dansyl 体を持ちいることで、タンパク質混合液中の PNGase を高感度に検出することができた。

本課題で合成した糖鎖分子プローブは PNGase 研究において必要に応じて、たとえば探索研究を行う場合はアフィニティータグの導入、細胞膜透過性を向上させる場合には脂溶性分子を、PNGase 上にプローブを導入後、アジド基を有する糖鎖を導入することでネオ糖タンパク質合成を合成するなど、今後の PNGase 研究の発展に貢献するものと思われる。

1-9 謝辞

日本学術振興会科学研究費補助金による本研究へのご援助に対し、厚くお礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、有意義なご助言を頂いた理化学研究所 伊藤幸成主任研究員、鈴木匡先生に感謝致します。

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. M. Masuda, S. Miyazawa, Y. Ito, I. Matsuo "Synthesis of a Versatile Probe for Analysis of Cytoplasmic Peptide-N-Glycanase" *J. Chine. Chem. Soc.*, 59, 269-272, 2012, 査読有り
2. 松尾一郎 "糖タンパク質糖鎖の精密合成と生体機能解析" 横浜市立大学論叢自然科学系列, 61, 161-177, 2010, 査読無し
3. Y. Funakoshi, Y. Negishi, JP. Gergen, J. Seino, K. Ishii, WJ. Lennarz, I. Matsuo, Y. Ito, N. Taniguchi, T. Suzuki "Evidence for an Essential Deglycosylation-Independent Activity of PNGase in *Drosophila melanogaster*" *PLoS One*, 5, e10545, 2010, 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

1. 宮沢進平、真下竜也、松尾一郎 "LacdiNAc構造を有する複合型糖鎖の効率的合成" 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012. 3. 24、京都女子大学(京都).
2. 益田瑞穂、宮沢進平、伊藤幸成、松尾一郎 "細胞内PNGaseの機能解明に向けた糖鎖分子プローブの合成" 日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会、2011. 12. 10、群馬大学工学部(桐生).
3. 宮沢進平、伊藤幸成、松尾一郎 "LacdiNAc構造を有するN-結合型糖鎖

の合成研究” 日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会、2011.12.10、群馬大学工学部(桐生)。

4. 益田瑞穂、鈴木 匡、伊藤 幸成、松尾 一郎、“細胞内PNGase解析のための糖鎖分子プローブの合成” 日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月25-28日、京都女子大学(京都)。
5. M. Masuda, K. Yamada, H. Oku, Y. Ito, I. Matsuo “Synthesis of probes for the analysis of PNGase activity” 2010 環太平洋国際化学会議PACIFICHEM2010、2010年12月16日、ハワイコンベンションセンター(ホノルル)。
6. M. Masuda, T. Suzuki, Y. Ito, I. Matsuo “Fluorescently labeled glyco-molecule probe for analysis activity of PNGase” International Carbohydrate Symposium, 2010.8.2、幕張メッセ(千葉)。
7. 益田瑞穂、鈴木匡、伊藤幸成、松尾一郎 “細胞内Peptide-N-Glycanase解析のための糖鎖分子プローブの合成” 平成22年度日本生化学会関東支部例会、2010.5.29、長岡技術科学大学(長岡)。

[図書](計1件)

松尾一郎(分担) “バイオ医薬品開発における糖鎖技術” シーエムシー出版、監修：早川 暁夫、掛樋一晃、平林 淳、2011。

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 一郎 (MATSUO ICHIRO)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40342852