

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05028
研究課題名：糖タンパク質の革新的合成法の確立と翻訳後修飾の機能解明に向けた統合的アプローチ
研究代表者氏名（ローマ字）：梶原 康宏（KAJIHARA Yasuhiro）
所属研究機関・部局・職：大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：50275020

研究の概要：本研究では新規合成法により調製したメルカプトアミノ酸類と、チオアシッドを利用するペプチドの連結法を活用し、糖鎖アスパラギン誘導体から5 - 6工程で糖タンパク質を合成する新規法の確立を目指す。また、糖鎖と水の相互作用を介する糖鎖機能の解析ならびに細胞表層への糖タンパク質の導入、さらには、化学合成した糖タンパク質の構造解析を検討する。
研究分野：生体分子化学およびその関連分野（生体関連化学、生物分子化学関連、ケミカルバイオロジー関連）キーワード：糖鎖、糖タンパク質、水和水、膜結合型糖タンパク質、チオアシッド、メルカプトアミノ酸

1．研究開始当初の背景

糖鎖が結合したタンパク質、および翻訳後修飾されたタンパク質類の化学合成は、ここ10年間で多くの研究者が参画し修飾基の機能解明が試みられている。しかし、合成に必要な工程数が多いこと、量産できないこと、そして、近年、さらなる応用研究が求められることから合成法の高効率化が求められている。理想的には一つの修飾タンパク質が1月以内で合成でき、かつ、細胞培養で調製するものよりも、高純度かつ自在に修飾基を可変できるものが求められる。これが解決すると天然型に近い構造でタンパク質への機能付加が可能となり、細胞培養法を凌駕する方法となる。そして、この分野の基礎研究、応用研究を推進することができる。したがって、短時間で糖タンパク質など翻訳後修飾されたタンパク質を合成し、その修飾基の機能解明が求められている。

2．研究の目的

本研究では糖タンパク質を迅速に合成し、糖鎖機能の解明を推進することを目的としている。本研究の課題は、以下の6点である。1）ペプチドを連結するためのチオアシッドを利用する糖タンパク質の新規合成法の確立、2）糖タンパク質合成で活用するアミノ酸類（SHアミノ酸）の合成、3）大腸菌を利用するペプチドチオエステル、ペプチドヒドラジン、ペプチドチオアシッドの合成、4）糖鎖と水の相互作用を介するタンパク質-タンパク質親和力の向上に関する研究、5）生細胞上への均一な糖鎖をもつ膜貫通型糖タンパク質の導入、6）クライオ電顕(CryoEM)を用いたフォールディングセンサー酵素の解析

3．研究の方法

まず、糖鎖アスパラギン誘導体から10工程以内で様々な糖タンパク質が合成できる以下の新規合成法を確立する。糖鎖(Glycan)がアスパラギンに結合したものを鶏卵から単離し、そのアスパラギンのカルボン酸をチオアシッドにしたもの($H_2N-Asn(Glycan)-COSH$)を合成する。そして、糖タンパク質: Peptide-X-Asn(Glycan)-Y-Peptide (糖鎖1本結合したものをモデルとしている: X, Yはそれぞれアミノ酸に相当する)の糖鎖が結合したところからN末端側のペプチドを Peptide-X-COSHとして固相合成、あるいは大腸菌発現を利用して調製する方法を確立する。そして、 $H_2N-Asn(Glycan)-COSH$ と Peptide-X-COSHをジスルフィド結合を介して連結後SN転移を利用し、Peptide-X-Asn(Glycan)-COSHを合成する(Diacylidysulfide coupling: DDC)。そして、糖鎖のC末端側のペプチドの末端にジスルフィド結合で活性化したRS-S-Cys-Peptide (この場合CysがYに相当)を反応させ、ジスルフィド結合を介し、2つのペプチドを連結後、SN転移でアミド結合を構築することで標的糖タンパク質のポリペプチド(Peptide-X-Asn(Glycan)-Y-peptide)を合成する(Thioacid Capture ligation: TCL)。そして、使っていた保護基の脱保護、脱硫化、フォールディングにより糖タンパク質を合成する。また、Yに相当するアミノ酸として位にチオールをもつアミノ酸を種々合成して、様々な標的糖タンパク質を合成できるようにする。本研究では、タンパク質-タンパク質相互作用時に、その界面に存在する糖鎖が水を吸収し、タンパク質間相互作用の親和力を向上するという仮説をたてている。そこで、この実験について合成した糖タンパク質と該当するレセプターとの親和力が糖鎖によりどの程度変化するか調べる。また、糖鎖と水の相互作用を水素重水素交換質量分析法、核磁気共鳴法で追跡する。そして、それに必要な新規測定法を開発する。細胞表層に化学合成した糖タンパク質を膜貫通型で導入する検討をする。ここでは、インテインというセルフスプライシング法を用いて、細胞膜貫通部分を発現法で、細胞外ドメインを化学合成した糖タンパク質をもちいて検討する。また、合成した糖タンパク質をCryoEMにより構造解析が可能か検討する。

4．これまでの成果

位にチオールをもつSHアミノ酸として8種類合成することに成功した。いずれも、過去の報告例では10工程程度必要とされていたが、いずれも、5-6工程で合成するルートを確立した。そして、大腸菌で発現したペプチドのN末端がセリン、トレオニンいずれかのアミノ酸である部位に、合成したSHアミノ酸

を Ser/Thr-Ligation 法で導入することに成功した。そして、DDC, TCL 法で糖タンパク質 2 種類を合成することに成功した。次に合成した糖タンパク質をもちいて、水素重水素交換質量分析実験をおこなったところ、糖鎖周辺がタンパク質表面よりも顕著に重水素交換が起こっていることを確認した。また、その糖タンパク質の特異的な受容体との親和力を調べたところ糖鎖が結合することで向上することを確認した。さらには、核磁気共鳴法をもちいて、水と糖鎖が相互作用する部位を追跡することにも成功した。これらの成果から糖タンパク質が複合体を形成する際、糖鎖周辺で自由水が発生し、タンパク質相互作用が向上していることが示唆された。実際、不凍糖タンパク質の糖鎖構造を換えると凝固点降下が観測され、その糖鎖周辺では水分子が動き続けていることが核磁気共鳴法で追跡できた(水素重水素交換速度より観測)。細胞表層に合成した糖タンパク質を導入するため、スプリットインテインを用いて検討し、膜貫通部位に相当するペプチドの膜内への発現に成功した。コレラトキシンにヒト型糖鎖を結合させたものを合成し、生細胞内のゴルジ体、小胞体に輸送させることに成功した。この手法は糖鎖生合成の追跡を可能にする。

5. 今後の計画

- 1) 糖鎖アスパラギンチオアシッド、SH アミノ酸と大腸菌発現を組み合わせた糖タンパク質の合成例としてインターロイキンのシリーズを実施し増やす。可能であれば糖タンパク質あるいは糖ペプチドと水の相互作用を核磁気共鳴法で追跡できないか検討する。
- 2) 受容体タンパク質に結合する小型タンパク質をモデルに、任意に糖鎖をつけて、それら複合体の結合親和力を ITC 等で評価し、タンパク質-タンパク質相互作用に糖鎖付加がどのように影響するか、さらに例を増やし調べる。
- 3) 糖鎖の水和水の挙動を、核磁気共鳴法を用いて理解する実験を検討する。
- 4) Intein を活用し、細胞表層に合成した糖タンパク質を導入することを引き続き検討する。
- 5) CryoEM を使って合成した糖タンパク質の構造が解析できないか検討する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

Regulating Antifreeze Activity through Water: Latent Functions of the Sugars of Antifreeze Glycoprotein Revealed by Total Chemical Synthesis. R. Okamoto, R. Orii, H. Shibata, Y. Maki, S. Tsuda, Y. Kajihara, *Chem. Eur. J.*, 査読有, e202300690 (2023). DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.202300690>

Isolation and characterization of high-mannose type glycans containing five or six mannose residues from hen egg yolk, Y. Maki, Y. Otani, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, *Carbohydr. Res.*, 査読有, 521, 108680 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108680>

Design and Synthesis of Glycosylated Cholera Toxin B-Subunit as a Tracer of Glycoprotein Trafficking in Organelles of Living Cells. Y. Maki, K. Kawata, Y. Liu, K-Y. Goo, Ryo Okamoto, Y. Kajihara, A. Satoh, *Chem. Eur. J.*, 査読有, 28, e202201253 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.202201253>

Optimization of Semisynthetic Approach for Glycosyl Interferon- β -polypeptide by Utilizing Bacterial Protein Expression and Chemical Modification. Y-K. Chong, C. Chandrashekar, D. Zhao, Y. Maki, R. Okamoto, Y. Kajihara, *Org. Biol. Chem.*, 査読有, 20, 1907-1915 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1039/D1OB02391H>

Semisynthesis of a homogeneous glycoprotein using chemical transformation of peptides to thioester surrogates. R. Okamoto, K. Iritani, Y. Amazaki, D. Zhao, C. Chandrashekar, Y. Maki, Y. Kanemitsu, T. Kaino, Y. Kajihara *J. Org. Chem.*, 査読有, 87, 114-124 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c02031>

Glycoproteins semisynthesis by chemical insertion of glycosyl asparagine using a bifunctional thioacid-mediated strategy. K. Nomura, Y. Maki, R. Okamoto, A. Satoh, Y. Kajihara. *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, 143, 10157-10167 (2021, June 30). <https://doi.org/10.1021/jacs.1c02601>

総説: Recent advances on the synthesis of N-linked glycoprotein for the elucidation of glycan functions, Y. Liu, K. Nomura, J. Abe, Y. Kajihara, *Current opinion in chemical biology*, 査読有, 73, 102263-102263 (2023), DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102263>

受賞講演: N-Glycans on Proteins, Y. Kajihara, Roy L Whistler Award lecture (International Carbohydrate organization), 30th International Carbohydrate Symposium, 2022年7月10日 - 2022年7月15日 (online で開催, 2022年6月28日、リスボンで対面により受賞講演を収録)

7. ホームページ等

<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/chem.202300690>; https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id978.html; <https://www.eurekalert.org/news-releases/959718>; https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2021/20210727_2