

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05276

研究課題名（和文）糖改変型複合糖質の迅速な系統合成法の開発と水を介した糖の複合糖質活性調節能の解明

研究課題名（英文）Development of efficient synthesis of glycoconjugates and elucidation of water-mediated regulation of glycoconjugate activity

研究代表者

岡本 亮（Okamoto, Ryo）

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：30596870

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）：本研究ではまず糖鎖構造が異なる糖タンパク質の系統合成を可能にする効率的な新規合成法の確立に成功した。これによって得られた糖タンパク質を利用し、糖タンパク質上の糖鎖が水を介してタンパク質間相互作用に影響しうることを見出した。そこでこの知見を踏まえ、天然では糖鎖を持たないタンパク質に糖鎖を導入し、受容体との結合能を調べたところ、糖鎖が有意に結合能を向上させられることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖タンパク質などの複合糖質は、生物製剤として利用されている一方、糖修飾による機能変化の原理原則は明らかになっていない。本研究はタンパク質に結合した糖鎖は、水を介してタンパク質部分の受容体との結合親和性に影響する、という新しい知見を明らかにした。これは、未だタンパク質翻訳後修飾として機能が不明瞭であったタンパク質上の糖鎖機能に対して、明確な機能の定義を与えるという視点から、学術的進歩をもたらすものであるといえる。また、アミノ酸配列変化に寄らないタンパク質部機能改変を可能にするものであり、今後新しいタンパク質製剤のデザインなどへの応用が強く期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we have succeeded in the development of efficient synthesis of glycoforms of glycoproteins. By using the resultant synthetic glycoproteins, we uncovered glycans on proteins may regulate the binding of protein moieties with receptor proteins. Upon this finding, we investigated the effect of glycosylation of a protein that does not have glycans in nature. As a result, the glycosylation resulted in enhancing the binding affinity of the protein with its receptor proteins.

研究分野：生物有機化学

キーワード：糖タンパク質 糖鎖 水和 タンパク質間相互作用 棟ペプチド タンパク質 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質や糖ペプチドなどの複合糖質は、多様な構造の糖修飾によって機能が変化する。生物製剤として利用されている IgG 抗体では、糖鎖の有無や構造の違いで、異物を除去する免疫活性が大きく変化する(*Ann. Rev. Immunol.* **2007**, 25, 21)。糖による活性変化は、バンコマイシン等の糖ペプチド系抗生物質でも知られており、1-2 糖による小さな修飾でも、糖の構造が変わると抗菌活性が変化する (*Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 3798)。一般に複合糖質上の糖付加部位は、受容体との結合に関わる分子認識部分とは離れた部位に位置している。つまり糖による複合糖質の活性変化の要因には、直接的な受容体との相互作用以外で、分子認識の様式を変化させている事が想定されるが、その理解は進んでいなかった。これは、生体試料から得られる複合糖質の糖鎖部分が不均一であり、厳密な糖鎖機能解析が困難である事が、研究終了時現在でも致命的な要因となっている。この様な中、本申請者は化学合成糖タンパク質を用いた独自の糖鎖機能解析研究を通して、糖が水を介して複合糖質の活性を調節するという特異な機能の端緒を見出していた。この結果から、糖タンパク質上の糖は特異な水和殻によってタンパク質表面の水和状態を変化させ、糖タンパク質活性の分子認識や活性を調節しているのではないかという仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究ではこの様な「水を介した糖の複合糖質活性調節能」を実証することを目指し研究を実施した。このために、まずプローブとして必須な糖構造の異なる糖タンパク質、糖ペプチドの迅速な系統合成法を新規に確立することを目指した。そしてこれで得られた分子を利用し、重水中での水素重水素交換実験を通して、タンパク質上での糖鎖と水の相互作用を実測し、これが特に受容体との結合能にもたらす影響を考察することとした。

3. 研究の方法

上記目的の達成のために、まず異なる糖をもつ糖タンパク質および糖ペプチドの系統合成法の検討を行った(以下)。そしてこれらの合成基質上のペプチド結合や糖鎖のもつアミド水素が、重水中で重水素と交換速度を実測した()。またこの結果を得た上での応用研究として、糖鎖をもたないタンパク質に対して、糖鎖を導入した人工糖タンパク質を合成し、糖鎖がタンパク質相互作用に与える影響を調べた。

糖鎖構造の異なる糖タンパク質ケモカイン CCL1 グリコフォームの系統合成

CCL1 は白血球の遊走活性をもち、炎症形成に関わる糖タンパク質である。これまでに本申請者はこの全合成と、X 戦結晶構造解析を達成し、糖鎖がタンパク質構造を変えずに、タンパク質活性を変化させる事を見出していた。本研究では、この理由が、CCL1 の受容体との結合に必要な分子認識部位周辺の水和状態変化に由来するという仮説の元、糖鎖構造を変えて体系的な糖の機能解析を行うこととした。まずこの基盤として、ワンポットで複数のペプチドを連結することができる独自の手法を鍵として、異なる糖鎖をもつ CCL1 グリコフォームの効率的な合成法の検討をおこなった。

単糖修飾型 RGD ペプチドの系統合成

環状 RGD ペプチドは、アルギニン(R)-グリシン(G)-アスパラギン酸(D)の配列をインテグリンとの結合部位として、細胞接着を阻害する小型環状ペプチドである(*J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461)。単糖修飾した環状 RGD 糖ペプチドは、構成するアミノ酸、糖の数、環状構造など、糖ペプチド系抗生物質の構造的特徴(*Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2096)とよく一致している。その一方で、糖を変えた系統合成が容易であり、活性に関わる分子認識部位が明確なため、目的とする糖の水和と活性の関係を分子レベルで簡便に解析する事ができると考えた。そこで、まずは C 末端が活性化された RGD 糖ペプチドを合成し、N 末端と C 末端を縮合することで環状構造の構築を行うこととした。

水素重水素交換実験による複合糖質上の水和状態の評価

合成した基質を用い、重水中での水素重水素交換(HDX)実験を行う。重水中ではペプチド結合や、糖鎖がもつアセトアミド部分のアミド水素が重水素に置換される。この交換速度と領域は質量分析や NMR によって定量可能である。申請者は、先行研究から水和能の異なる単糖で修飾された糖タンパク質間で、タンパク質部分の構造は変わらずに周辺の HDX 速度のみが変化するという事をすでに見出していた。これは、糖の水和殻が、バルクの水と異なる水素結合ネットワークを有し、水分子の動きに影響するためと考えられた。この知見を元に本研究では、糖の構造に応じた合成基質の HDX 速度と領域を実測し、糖がどのように水と相互作用しているのかを明らかにすることとした。

小型人工タンパク質の新規合成と、受容体タンパク質との結合親和性相関関係の解明

糖鎖の水和層は、母体のタンパク質部分の分子認識に影響を与えるのではないかという新しい仮説のもと、糖鎖を持たない小型のタンパク質に、糖鎖を導入した人工糖タンパク質の合成をおこなった。さらに等温カロリメトリを利用して、受容体タンパク質との結合親和性を実測した。

4 . 研究成果

アミノチアゾリジンを利用した新規ワンポットペプチド連結法の開発と CCL1 グリコフォームの系統合成

糖タンパク質の化学合成では、固相合成で調製した短いペプチド、または糖ペプチドビルディングブロックを、ペプチド連結反応によって全長ポリペプチド鎖を合成する。一般にこの連結反応は複数回実施する必要がある、効率的な合成戦略が求められる。これに対して本研究では、本申請者が開発したペプチド-アミノチアゾリジン体を鍵としたワンポットペプチド連結法を確立した。ペプチド-アミノチアゾリジンは、ペプチド C 末端の反応性を制御し、ペプチドの位置選択的連結を可能にする。これを鍵化合物として、さらにワンポットで、3 つのペプチドセグメントを連結するとともに、続く *in vitro* でのフォールディング反応にも成功した。以上より、新規にワンポットペプチド連結-フォールディング法を確立するに至った。この方法を基盤として、糖鎖の構造のことなる 4 種類の CCL1 グリコフォームと、糖鎖のない CCL1 の全合成を達成した。以上の結果は、学術論文として発表済みである(*Chem. Comm.* **2023**, *59*, 13510)。本合成法は CCL1 だけでなく、今後他の化学修飾タンパク質の化学合成への適用が期待される。

チオエステル法を鍵とした環状 RGD 糖ペプチドの系統合成

本研究では、水和能が異なることが知られている単糖のガラクトース(Gal)とグルコース(Glc)を修飾糖として利用し、環状 RGD 糖ペプチドの合成を行なった。

まず鍵物質となる糖-アミノ酸誘導体の合成を行った。原料として既知の単糖チオグリコシド体とスレオニン(Thr)誘導体を用いたグリコシル化と糖保護基の除去を通して水酸基無保護の糖スレオニン誘導体を新規に合成した。次に Dawson linker をアミド結合した樹脂上で、Fmoc ペプチド固相合成法による糖ペプチドの構築と保護基の除去を行ったのちアルキルを含む緩衝溶液で処理して目的とする糖ペプチドチオエステルを得ることに成功した。本手法は、Fmoc ペプチド固相合成法で一般的に保護基の除去に利用される TFA などの強酸性試薬を濾過するだけで除去することができる。この手法は、上述の糖タンパク質合成にも適用されており、広範に利用可能であることも実証した(Chem. Comm. 2023, 59, 13510)。つづいて、得られた糖ペプチド-チオエステルを、銀イオンで活性化する縮合法であるチオエステル法により分子内環化をおこなったところ、目的とする環状構造の構築に成功した。以上の合成戦略により、Glc, Gal, GalNAc をもつ環状 RGD 糖ペプチド合成が可能であることを実証した。この一部を利用し SPR 実験によるインテグリンタンパク質との相互作用解析を開始するに至った。これについては研究期間終了時までには適切な解析条件を確立するに至らなかった。これは主にインテグリンタンパク質の安定性、ならびにセンサーチップへの固定化の問題であることが示唆されたことから、条件の最適化、または他の分析手法による相互作用解析の検討が必要と思われる。今後本手法で得ることができる環状糖ペプチド誘導体を利用し、活性評価などを通して、糖の微細な構造の違いと糖ペプチドの機能間での厳密な活性相関研究が可能である。

CCL1 を利用した水素重水素交換実験による複合糖質上の分子認識部位の水和状態評価

合成した種々の糖鎖構造をもつ CCL1 グリコフォームと、糖鎖をもたない CCL1 を基質として、HDX-MS 実験によるタンパク質上での糖鎖と水の相互作用の評価をおこなった。

HDX-MS では、重水素化位置を調べるために分析対象のタンパク質を十分に消化する必要がある。その際、重水素化標識を失わないように、低温かつ酸性条件下で迅速に行う必要がある。そこでまず合成 CCL1 を基質として最適条件の検討を行なった結果、pH 2.3, 0 の条件下で十分な糖タンパク質消化が可能な条件を確立できた。続いて、各種 CCL1 グリコフォームを用いて実際に HDX-MS 実験を行なった。この結果、糖鎖付加部位周辺をみると、糖鎖をもつ CCL1 は、糖のない CCL1 に比べて重水素化率が增加することを見出した。すなわち、糖鎖が結合することでその周辺領域の重水素化に変化が生じることが明らかとなった。また結合している糖鎖が大きい方が、より高い重水素化数を有することが明らかとなった。さらにこのような重水素置換について、糖鎖とペプチド鎖のどちらで起きているのかを調べるために、重水素化反応後に糖鎖の切断を行なったのち、LCMS による分析を行なった。この結果、重水中での重水素交換反応は、糖鎖部分で顕著に生じたことが明らかになった。この結果は、糖鎖がタンパク質上で自由に周辺の水分子と相互作用していることを初めて実験的に観測したものである。このような性質はタンパク質上で糖鎖が周辺の水の動的挙動に影響を及ぼしていることが示唆される。

小型人工タンパク質の新規合成と糖鎖による受容体との結合親和性相関関係の解明

CCL1 を利用した HDX-MS 実験の結果、糖鎖は構成糖残基の数に応じて水分子との相互作用能が上昇し、タンパク質上に特異な水和層を形成していることが示唆された。これを踏まえ、糖鎖の水和層は、母体のタンパク質部分の分子認識に影響を与えるのではないかという新しい仮

説に至った。そこで CCL1 とは別の小型のタンパク質を利用し、これに新たに糖鎖を導入した人工糖タンパク質の合成を応用研究として実施した。本項目は当初の計画になかったものの、最も困難が予想された糖タンパク質の新規合成法の開発、並びに HDX 実験が滞りなく進んだことから実施を行った応用研究である。これによって得られた人工小型糖タンパク質と、受容体タンパク質との結合親和性を調べたところ、糖鎖は母体のタンパク質部分の結合親和性を有意に変化させるということを明らかにした。この結果は、今後アミノ酸配列に寄らないタンパク質部分の機能改変という新しい原理の確立を示唆する画期的な結果であると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 R. Okamoto, H. Shibata, T. Yatsuzuka, T. Hanao, Y. Maki, K. Kabayama, A. Miura, K. Fukase, Y. Kajihara,	4. 巻 59
2. 論文標題 Convergent synthesis of proteins using peptide-aminothiazoline	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 13510-13513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D3CC04387H	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13件（うち招待講演 2件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 山崎久生、真木勇太、梶原康宏、岡本亮
2. 発表標題 ペプチド型複合糖質に於ける糖の機能解明を志向した環状RGD糖ペプチド合成研究
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎久生、真木勇太、梶原康宏、岡本亮
2. 発表標題 糖ペプチド型複合糖質に於ける糖の機能解明を志向した環状RGD糖ペプチドの合成研究
3. 学会等名 日本化学会 第103回春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西川 晴美、真木 勇太、梶原 康宏、岡本 亮
2. 発表標題 小型人工糖タンパク質を利用した糖鎖とタンパク質間相互作用相関関係の解明研究
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西川 晴美、岡本 亮、真木 勇太、梶原 康宏
2. 発表標題 小型人工糖タンパク質の合成研究
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023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
---------	---------