

平成21年 5月25日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19750092
 研究課題名 (和文) 糖鎖高分子とリプレッサーとの相互作用を活用した蛋白質生合成系の構築

研究課題名 (英文) Biosynthesis of Proteins Based on Interaction of Glycopolymers and lac Repressor

研究代表者
 高須 昭則 (TAKASU AKINORI)
 名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：30303697

研究成果の概要：

本研究では、高分子効果によるタンパク質発現量の増加を目指し、*S*-ガラクトシドを高分子に担持させた複合糖質の合成を行い、誘導物質としての可能性を検証した。高分子支持体としては、ポリ(アミドアミン)デンドリマーに加え、ポリ(2-オキサゾリン)およびポリ(スチレン)骨格を有する糖鎖高分子を開環重合法およびリビングラジカル重合法を駆使して合成した。それらを誘導物質として用いてタンパク質の *in vivo* 発現を行った。GFP (Green Fluorescent Protein) を目的タンパク質に用い、その発光により発現の確認と定量化を行った。タンパク質発現は 37°C で 4 時間行った。ポリ(スチレン)骨格は、大腸菌の細胞膜を崩壊させたのに対し、ポリ(アミドアミン)デンドリマーおよびポリ(2-オキサゾリン)骨格を用いた場合は、タンパク質の発現が確認でき、誘導物質としての作用が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	210,000	2,410,000

研究分野：

科研費の分科・細目：複合科学・高分子合成

キーワード：(1) 複合糖質 (2) 糖鎖高分子 (3) デンドリマー (4) lac オペロン (5) 生合成 (6) タンパク質 (7) イソプロピル・*D*-チオガラクトピラノシド (IPTG) (8) リプレッサー

1. 研究開始当初の背景

コドンに関する研究と制限酵素の発達から大腸菌の遺伝子組み換え技術を積極的に応用した多くのタンパク質の生合成が可能になってきた。lac プロモーターによる発現システムではガラクトース残基がリプレッサーと相互作用にすることによって mRNA の

翻訳が開始される。その誘導物質としては、IPTG と呼ばれるイソプロピル・*D*-チオガラクトシドが大きな効果を示すことが知られている (Monod and Jacob, *J. Mol. Biol.* 1961)。ガラクトースでは、発現の途中で細胞内で容易に分解してしまい、ガラクトースの 1 位を誘導体化した IPTG が分解されにく

く大きな効果をもたらしたと考えられる。申請者はこれまでにいくつかの新規糖質高分子の合成とレクチン蛋白質との相互作用に関する研究に携わってきた(Takasu et al., *Biomacromolecules* 2002, 2004, 2005, 2006)。また、2003年から2004年にかけて、カリフォルニア工科大学(David A. Tirrell研究室)で客員研究員として研究生活を送る機会を得た。最近では多くの生命現象に糖鎖とタンパク質の相互作用が重要な働きをしていることが見出され、糖鎖間の距離が非常に大きく影響することもわかってきた。しかし、我々の知る限り lac リプレッサーとガラクトース残基との相互作用について研究した例は少なく(Matthew and Lewis et al, *Science* 1996)、糖鎖高分子を応用活用した系統的な研究は全くない。こうした経緯から、糖質高分子と遺伝子工学の融合に興味を強く抱くに至った。本研究では糖鎖高分子とリプレッサーとの相互作用を利用した蛋白質生合成系の革新に挑戦した。

2. 研究の目的

本研究は、lacオペレーターの誘導物質といえはIPTGに決まりきったこれまでの原理や常識を覆す、従来の延長線上にない新世界を構築し、21世紀の大学に求められているハイインパクト・ハイリターン型の研究に成長させることを目的とした。

バクテリアを発現ホストとして用いる場合、ほとんどがlacプロモーターによりタンパク質の生産が制御されており、ガラクトース残基がリプレッサーと相互作用することによってタンパク質の翻訳がはじまる。本研究では、複合糖質とリプレッサーとの相互作用に関して研究を行った。特に、糖被覆デンドリマーに焦点を置いて研究を進めた。デンドリマーはそれ自体が単分子ミセルとみなすことができる“共有結合により安定に組織化された巨大分子”であり、その糖鎖間距離は世代数を変えることで数ナノから十数ナノの範囲で制御することができ、本研究の目的である糖鎖

間距離とリプレッサーとの相互作用の研究に非常に適している。用いる発現ホストは、フィブロネクチンとエラスチンのシーケンスを組み合わせた細胞外マトリックスタンパク質(aECM)をencodeしたpETシステムとやマウスジヒドロ葉酸還元酵素(mDHFR)をencodeしたpQEシステムで試行する。

期間内に、これらの目標を達成し、学会および論文発表を行う。また、研究室のホームページを用いた情報発信も積極的に行う。

3. 研究の方法

本研究では、まず各種複合糖質を合成した。ガラクトースやラクトースをS-グリコシド結合を介してデンドリマー、ポリオキサゾリン、およびポリスチレンなどの高分子支持体に担持した。それらの各種複合糖質により目的のタンパク質の発現を誘導し、その発現量をIPTGと比較検討する。

5mL程度の培養液を用いてタンパク質の発現を行い、細胞外マトリックスタンパク質はLCST挙動を利用して精製し、mDHFRはNi-アフィニティーカラムにより精製した。タンパク質の発現量は電気泳動およびその産出重量から評価を行った。世代の異なるガラクトースやラクトース被覆デンドリマーを合成し、糖鎖間距離と発現量の相関に迫る。さらに、効率よく発現量を調べるためにグリーンフルオレッセンスプロテイン(GFP)のような蛍光を発するタンパク質をencodeしたプラスミドを調製し、蛍光測定によりその発現量をリアルタイムで測定することも試みた。

4. 研究成果

遺伝子組み換え技術を積極的に活用したタンパク質の生合成は大腸菌をホストに用いており、この発現機構では lac operon の遺伝子調節システムが適応されている(図1)。このシステムでは転写調節分子であるリプレッサーがDNA上に結合して転写を抑制しているが、誘導物質である糖質を添加する

ことにより、リプレッサーは誘導物質と相互作用して DNA に結合できなくなり転写が開始される。

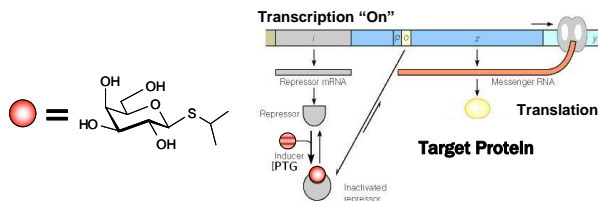
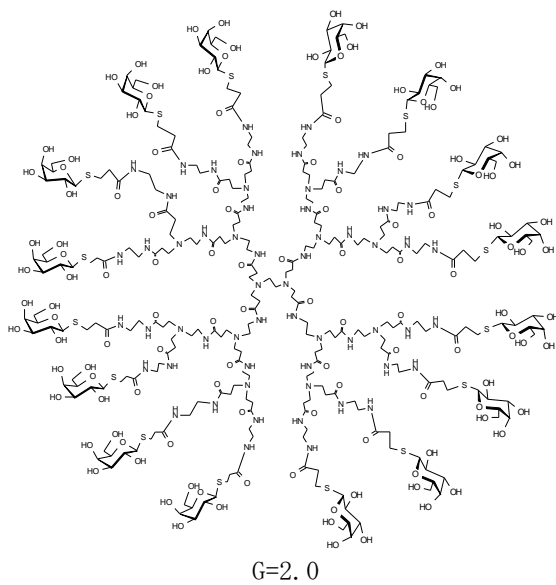


図1. lac オペレーターを用いたタンパク質の生合成システム

Jacob らは誘導物質として Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) が最も効果的であることを報告したが、現在でもその発現量と培養時間は社会的要求を満たしていない。最近、リプレッサーの X 線構造解析が報告され、糖結合部位の構造も明らかになってきた。本研究では高分子効果によるタンパク質発現量の増加を目指し、S-グリコシドを高分子に担持させた新規複合糖質の合成を行い、タンパク質生合成系の誘導物質としての可能性を検証した。



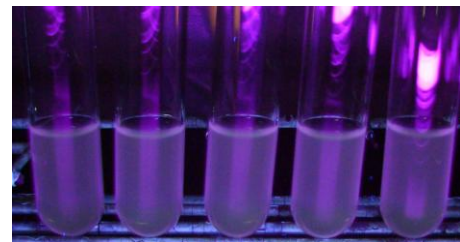
- G=0: ($M_n=2.1 \times 10^3$, $M_w/M_n=1.07$, functionality >99%)
- G=1.0: ($M_n=4.4 \times 10^3$, $M_w/M_n=1.15$, functionality >99%)
- G=2.0: ($M_n=11.1 \times 10^3$, $M_w/M_n=1.20$, functionality=90%)

図2. チオグリコデンドリマー

(1) デンドリマー骨格を有するチオグリコデンドリマーの合成と lac リプレッサーの活性化

まず、高分子支持体としては、分子サイズや官能基数の制御が容易であるデンドリマーを選択した。毒性も考慮に入れポリ(アミノ)デンドリマー (PAMAM) を使い、S-グリコシド化と DCC-HOBt 法により、目的の 0 世代、1.0 世代、および 2.0 世代の S-グリコデンドリマーを合成した (Gal-β-S-PAMAM, G=0, G-1.0, G-2.0、図 2)。得られた Gal-β-S-PAMAM を誘導物質として用いてタンパク質発現を行った。目的タンパク質には GFP (Green Fluorescent Protein) を使い、その発光によりタンパク質発現の確認と定量化を行った。大腸菌を培養し OD_{600} が 0.6 になったところで合成した Gal-β-S-PAMAM を誘導物質として加え、タンパク質発現を 37°C で 4 時間行った。その培養液に UV を照射したところ、目視にてタンパク質の発現が確認でき、誘導物質としての作用が示唆された。しかし IPTG と比べるとその蛍光強度は低かった。今後は、蛍光測定による相対蛍光強度から定量的に解析し、膜融合合法なども含めて検討する。

誘導前



IPTG G0 G1.0 G2.0 Lactose

誘導後



図3. チオグリコデンドリマーによる lac オペレーターの活性化による GFP タンパク質の発現

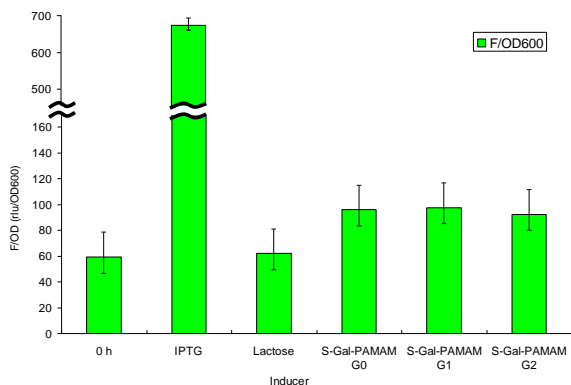


図4. GFP タンパク質の蛍光強度によるチオグリコデンドリマーによる lac オペレーター の活性化の評価

(2) ポリオキサゾリン骨格を有するチオグリコシドの合成と lac リプレッサーの活性化

次に、*S*-グリコオキサゾリン 1 を合成し、その開環重合を検討した。糖構造を有するオキサゾリンの重合は報告がなく、得られたポリ(*S*-グリコオキサゾリン)を“誘導物質”に用いてタンパク質発現を試み、高分子特有の多価効果によって発現量の向上を試みた。

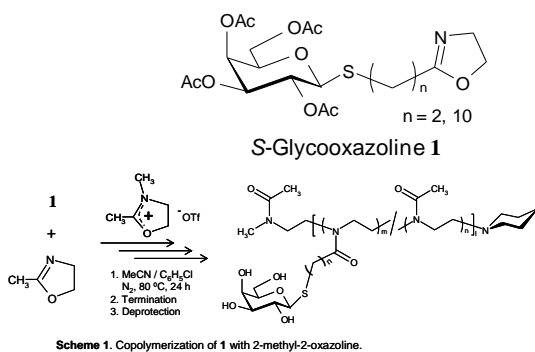
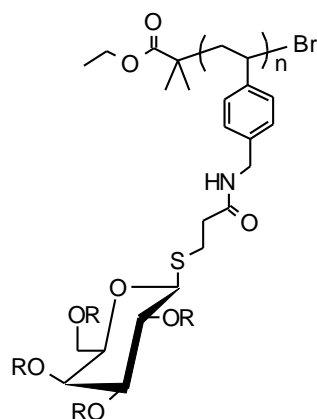


図5. ポリグリコオキサゾリンの合成

S-ガラクトシルカルボン酸とクロロエチルアミンの縮合(収率: 81 %)と環化反応(収率: 91 %)により目的の糖置換オキサゾリンを合成することができた。得られたオキサゾリンは求核性のスルフィドを有することから、メチルトリフラート(MeOTf)と 2-メチル-2-オキサゾリンとの 1:1 付加物を開始剤に用いて開環重合を行うことで比較的分子量分布の狭い重合体($M_n=2500$, PDI : 1.23, 転

化率: 38 %)を得ることができた。重合は進行したものの、糖残基の高さから重合速度は遅く、糖とオキサゾリン間のメチレン鎖を伸ばすことも検討した($M_n=7000$, PDI : 1.20, 転化率: 67 %)。また、2-メチル-2-オキサゾリンとの共重合では、組成比の異なる重合体が合成できた。脱アセチル化して得られた糖鎖高分子を誘導物質に用いて GFP タンパク質の生合成を 37 °C で 4 時間行った(大腸菌宿主)。培養液に UV を照射したところ、目視にて GFP タンパク質の発現が確認できたが、その蛍光強度は汎用誘導物質(IPTG)と比較して優位性は確認できなかった。

(2) ポリスチレン骨格を有するチオグリコシドの合成と lac リプレッサーの活性化



R=Ac: Poly[S-glyco(Ac)₄styrene]
R=H: Poly(*S*-glycostyrene)

図6. ポリスチレン骨格を有するチオグリコシド

原子移動ラジカル重合(ATRP)法が確立されたことでリビングラジカル重合法は成熟期を迎えたと考えられる。本研究でも ATRP を用いて新規糖鎖高分子であるポリ(*S*-グリコスチレン)の合成を行い、タンパク質生合成系である *lac* オペロンの誘導物質として用いた。

S-グリコカルボン酸と *p*-ビニルベンジル

アミンを DCC-HOBt 法を用いて縮合し、糖担持モノマー [*S*-glyco(Ac)₄styrene] を合成した(収率: 72%)。 *S*-glyco(Ac)₄styrene をモノマーに用いて ATRP を 24 時間行ったところ重合は進行したが、6-7 量体までしか得られなかった。これは立体障害の影響と考えられた。そこであらかじめポリ(*p*-ビニルベンジルアミン)を合成し、その後 DCC-HOBt 法でそのアミノ基を *S*-グリコカルボン酸で化学修飾させることで、目的の Poly[*S*-glyco(Ac)₄styrene] を得た(収率: 80%, $M_n=10000$, $M_w/M_n=1.21$, [sugar]/[-NH₂]=74/26)。得られた Poly(*S*-glyco(Ac)₄styrene) をクロロホルム/テトラヒドロフランに溶解させ、ヒドラジンで脱アセチル化し、誘導物質に用いてタンパク質発現を行った。目的タンパク質には GFP(Green Fluorescent Protein) を用い、蛍光を目視にて確認した。その結果、蛍光は確認できたものの誘導後、発現ホストである大腸菌の細胞膜が崩壊した。ポリスチレン骨格によるものであると考えられた。

おわりに

本研究を通じて、lac リプレッサーと糖鎖高分子の相互作用が確認できた。糖鎖間距離や主鎖骨格と相互作用力の相関を明確にすることで、IPTG 代替物質の創製と同時に高分子化学と生化学からなる新たな学術分野の創成につながると期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

高須 昭則 (他 2 名、第 1 著者) Synthesis of New S-Glycodendrimer Toward Activation of Lac Operon Transcription for Protein Biosynthesis, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 47, 310-314, 2009、査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 高須 昭則 (他 1 名、第 1 著者) Synthesis of New S-Glycodendrimer Toward Activation of Lac Operon Transcription for Protein Biosynthesis 236 回アメリカ化学会 国際会議、2008 年 8 月 19 日、アメリカ合衆国 (フィラデルフィア)
- ② 小嶋 寛、高須昭則、*S*-グリコオキサゾリンの合成と開環重合、第 39 回中部科学関連学協会秋季大会、2008 年 11 月 9 日、名古屋大学
- ③ 小嶋 寛、牧野哲也、高須昭則、新規 *S*-グリコオキサゾリンの合成と重合、第 57 回高分子学会年次大会、2008 年 5 月 28 日、横浜
- ④ ④ 中山貴博、牧野哲也、高須昭則、*S*-ガラクトシドを側鎖に有するポリスチレンの合成、第 57 回高分子学会年次大会、2008 年 5 月 28 日、横浜
- ⑤ 高須 昭則、牧野哲也、平林忠道、lac operon の活性化を指向した人口複合糖質の合成、第 56 回高分子学会年次大会、2007 年 5 月 31 日、京都

[その他]

ホームページ

http://polychem.web.nitech.ac.jp/public_html/hiralHirabaya_Re.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高須 昭則 (TAKASU AKINORI)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 30303697

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

牧野 哲也 (MAKINO TETSUYA)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士前期課程

小嶋 寛 (KOJIMA HIROSHI)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士前期課程

中山 貴博 (NAKAYAMA TAKAHIRO)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士前期課程