

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410175

研究課題名(和文) ユビキチン修飾不良品糖タンパク質の系統的精密化学全合成

研究課題名(英文) Total chemical synthesis of ubiquitinated glycoprotein for the study of glycoprotein degradation process

研究代表者

和泉 雅之 (Izumi, Masayuki)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80332641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内には天然型の立体構造を取れずに正しく機能しない不良品糖タンパク質が生成する。それが蓄積すると病気の原因となるため、ユビキチン-プロテアソーム系(UPS)という経路で分解除去される。本研究では、糖タンパク質のUPSによる分解機構を調べるためのプローブとして、ユビキチン化された糖タンパク質を精密化学全合成し、UPSアッセイ系を用いてその分解の様子を分析した。このような巨大で複雑な修飾タンパク質の合成例は世界でもほとんどなく、本研究により世界最先端の合成技術が確立できた。さらに、糖タンパク質の分解経路の研究に合成プローブを用いるという新たな方法論を導入することができた。

研究成果の概要(英文)：Misfolded glycoproteins are toxic to the cell and are thought to be degraded by ubiquitin-proteasome system (UPS), however, the detail of the degradation pathway is not clearly known. In this study, I accomplished the total synthesis of ubiquitinated glycoprotein, and used it as a probe for the study of the degradation of glycoprotein by UPS. This is one of the very few example of the total synthesis of posttranslationally modified complex protein having oligosaccharide and ubiquitin. The degradation assay suggested that the newly developed synthetic ubiquitinated glycoprotein probe can be a valuable tool for the analysis of the degradation of glycoproteins by UPS.

研究分野：生体分子化学

キーワード：糖タンパク質 化学合成 ユビキチン 分解経路

1. 研究開始当初の背景

細胞によって生合成されるタンパク質のうち約3分の1は天然型の立体構造を取れずに正しく機能しない。この不良品タンパク質が細胞内に蓄積すると病気の原因となるため、細胞には不良品を見分けて分解除去する機構がある。この分解機構では、76アミノ酸残基からなる小さなユビキチンとよばれるタンパク質が目印として不良品タンパク質に付加され、それをシグナルとして不良品タンパク質は細胞質にあるプロテアソームで小さなペプチドへと分解される。この経路はユビキチン-プロテアソーム系(UPS)と呼ばれ、2004年のノーベル化学賞に選ばれたことからわかるように非常に重要な研究分野として世界中で研究がおこなわれている。

我々の身体の中のタンパク質のうち約半分は糖鎖による修飾を受けた糖タンパク質である。当然、不良品の糖タンパク質も生成し、UPSにより分解除去されている。しかし、糖タンパク質を分解するためにはタンパク質部分の切断だけではなく糖鎖の切断も必要である。UPSでの糖タンパク質の分解において、ユビキチン化や糖鎖の切断やタンパク質の分解がどのような順序で進むのか、またUPSに関与している様々な酵素群がユビキチン化された糖タンパク質のどのような構造を認識して働いているのかなど、不良品糖タンパク質の分解経路については詳しくわかっていなかった。

私は小胞体における糖タンパク質の品質管理機構に関する研究をおこなってきた。小胞体には天然型の立体構造を取れなかったミスフォールドした糖タンパク質を見つけ、天然型へと直す機構が存在する。小胞体内で天然型に直すことができなかった糖タンパク質がUPSに送られて分解されるので、私は次の段階として不良品糖タンパク質のUPSによる分解を研究ターゲットとすることにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「不良品糖タンパク質の分解経路を解明するための糖タンパク質プローブを創製すること」である。不良品糖タンパク質がUPSに送られてどのように分解されるかを詳しく調べるため、本研究では分解機構へと入る構造と考えられるユビキチンで修飾された分子量2万程度の糖タンパク質を化学合成することとした。これを分解経路を含む無細胞抽出液に添加して分解状況を追跡することで、糖タンパク質の分解機構に迫れるのではないかと考えた。本研究の合成ターゲットは糖鎖とユビキチンという二つの修飾を受けたタンパク質であるが、このように非常に複雑な構造のタンパク質の化学合成例は無く、本研究によりタンパク質の化学合成技術を一歩進めることを目指した。また、糖タンパク質のUPSによる分解

機構の研究は主に分子生物学的アプローチで行われており、この分野に技術発展の著しい化学合成した糖タンパク質プローブを用いるという新たなケミカルバイオロジーの手法を持ち込むことも目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、不良品糖タンパク質のUPSによる分解経路を調べるためのプローブとして、ユビキチン化された糖タンパク質の精密化学合成をおこなった。ユビキチン化糖タンパク質の合成には、ユビキチン鎖と糖ポリペプチド鎖を連結する必要がある。タンパク質のユビキチン化には、イソペプチドケミカルライゲーション(ICL)法というC末端が活性化されたユビキチンと δ -メルカプト-L-リジン残基を含むポリペプチド鎖との連結が報告されている。そこで、本研究ではICL法が糖ポリペプチド鎖とユビキチン鎖との連結にも応用可能かどうかを調べた。

合成したユビキチン修飾糖タンパク質が実際にUPSで分解されるかを調べるためには、市販のUPSアッセイキットに合成プローブを添加し、生成してくる分解物をLC-MSにより構造解析した。

4. 研究成果

ユビキチン修飾糖タンパク質の化学合成には、ユビキチン鎖、糖ポリペプチド鎖、 δ -メルカプト-L-リジンの3つの構成要素が必要であるので、それぞれの合成をおこなった。

ユビキチン鎖はC末端がヒドラジドとして活性化されたものを固相合成した。76残基のポリペプチド鎖を1-27位、28-45位、46-76位の3つのペプチドセグメントに分割し、ペプチド固相合成法によりセグメント1と2はペプチド- α -チオエステルとして、C末端セグメント3はペプチド- α -ヒドラジドとして合成した。そして、3つのセグメントをC末端側からワンポットで順次連結することでユビキチン全長ポリペプチド鎖を合成した。

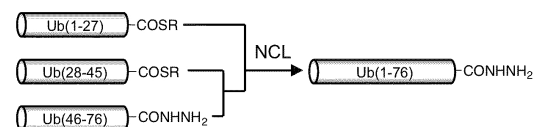


図 ユビキチン- α -ヒドラジドの合成

次に、糖タンパク質とユビキチン鎖をICL法により連結するために必要な δ -メルカプト-L-リジンの新規合成法を開発した。 δ -メルカプト-L-リジンの合成法はいくつか報告されているが、本研究では市販のラセミ体の δ -ヒドロキシ-L-リジンを出発原料とする合成ルートを開発した。N-アセチル- δ -ヒドロキシ-L-リジン誘導体へと変換した後、 δ -ヒドロキシ基をメシル化しチオ酢酸カリウムによる求核置換反応により硫黄原子を導入した。保護基の変換の後に、アミノアシラーゼによる脱N-アセチル化を検討した。L-ア

ミノアシラーゼは L-リジン誘導体のアセチル基のみを加水分解した。D-アミノアシラーゼは D-リジン誘導体のみを加水分解した。加水分解ののちに Fmoc 化をおこない、逆相 HPLC を用いて精製することで固相合成に使用できる N-Fmoc- δ -メルカプト-L-リジン誘導体の合成法を確立した。この合成法では、 δ -メルカプト-D-リジン誘導体も合成できる。この δ -メルカプト-D-リジンの利用法としては、ラセミタンパク質結晶化法への応用が考えられる。ラセミタンパク質結晶化法とは、L-アミノ酸から構成される天然型の L-タンパク質と D-アミノ酸から構成される天然型のタンパク質の鏡像異性体となる D-タンパク質を 1:1 で混合してラセミ体とすると、その対称性により結晶が困難なタンパク質でも X 線結晶構造解析に利用できる結晶が得られやすくなるというものである。 δ -メルカプト-D-リジン誘導体は、ユビキチン化糖タンパク質の X 線結晶構造解析への道を拓くと期待される。

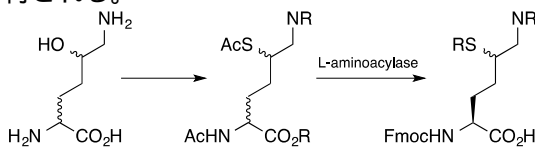


図 δ -メルカプト-L-リジン誘導体の合成

糖タンパク質には CC motif chemokine 1 (CCL1) を選択した。CCL1 は 73 残基からなり 1 本の N 結合型糖鎖と 3 つのジスルフィド結合を有している。糖鎖には、卵黄から単離できる小胞体内の糖鎖構造である $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (M9) 糖鎖を用いた。CCL1 は、1-25 位、26-32 位、33-73 位の 3 つのペプチドセグメントに分割した。セグメント 1 はペプチド- α -チオエステルとして、セグメント 2 は糖ペプチド- α -チオエステルとして、セグメント 3 は 4 2 位に δ -メルカプト-L-リジン残基を導入したペプチドとしてそれぞれ固相合成で合成した。まず、ペプチドセグメント 3 と糖ペプチドセグメント 2 をネイティブケミカルライゲーション(NCL)法により連結した。次いで、ユビキチン- α -ヒドラジドをチオエステルへと変換した後、CCL1(26-73)糖ペプチドと ICL 法により連結した。最後に CCL1 のセグメント 1 を NCL 法により連結して、ユビキチン化された CCL1 全長糖ポリペプチド鎖を得た。

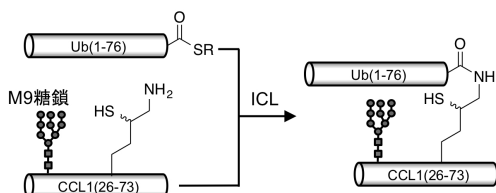


図 糖ペプチドとユビキチン鎖の連結反応

ユビキチン化全長糖ポリペプチド鎖が得

られたので、フォールディング操作をおこなった。フォールディング操作は、還元条件と、酸化還元条件の 2 種類でおこなった。還元条件下でのフォールディングでは、ユビキチン部分のみがフォールディングして CCL1 部分はジスルフィド結合をもたないアンフォールド型のプローブが得られた。一方、酸化還元条件下ではユビキチンと CCL1 の両方がフォールディングしたプローブが得られた。これらの構造は、逆相 HPLC の保持時間の差と質量分析から推定した。

プローブが合成できたので、UPS によるユビキチン化糖タンパク質プローブの分解アッセイをおこなった。アッセイは市販のキット (HeLa 細胞 Fraction II) を用いた。これは、ユビキチン化酵素、脱ユビキチン化酵素、プロテアソームを含んでいるものである。この系に合成したユビキチン化 CCL1 を添加すると、脱ユビキチン化が進行しユビキチンと CCL1 に分解されることが LC-MS を用いた解析で分かった。この結果から、細胞はユビキチン化された糖タンパク質を基質とすることができる脱ユビキチン化酵素を持っていることが明らかとなった。

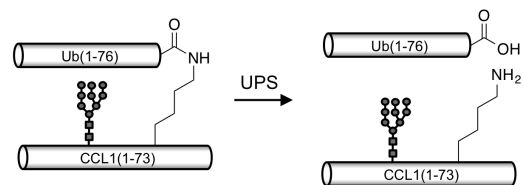


図 UPS による糖タンパク質の脱ユビキチン化

以上のように、本研究では(1) δ -メルカプト-L-リジンの化学-酵素法による新規合成法を確立した。(2)ICL 法に有用なユビキチン- α -ヒドラジドをワンポットで合成する方法を確立した。(3)糖ポリペプチド鎖のユビキチン化が ICL 法によりおこなえることを明らかにし、ユビキチン化糖タンパク質 CCL1 の精密化学合成を達成した。(4)化学合成したユビキチン化糖タンパク質プローブを用いて、細胞がユビキチン化糖タンパク質の脱ユビキチン化をおこなえる酵素活性をもつことを明らかにした。このように、当初の目的としたユビキチン化糖タンパク質の精密化学合成法を確立することができた。本研究の遂行中に、海外のグループから単糖とユビキチン鎖で修飾されたタンパク質の化学合成が報告された。このことから、糖とユビキチンという複雑な修飾を受けたタンパク質の合成が世界で必要とされていることが分かる。この研究で合成したユビキチン化糖タンパク質は、11 糖からなる大きな糖鎖を有しているより複雑で合成・分析技術を要する化合物であり、現在早急に論文の投稿準備をしている。さらに、合成したユビキチン化糖タンパク質プローブが糖タンパク質の分解経路の研究に有用であることも示すことがで

きた。最近、糖タンパク質の分解経路の酵素である Ngly1 の酵素活性の異常が原因となった疾患が発見され、その治療法の開発のためにも糖タンパク質の分解経路のさらなる解明が求められている。本研究の成果により、糖タンパク質分解経路の研究に合成プローブが活用されていくと期待される。また、今回の合成で δ -メルカプト-L-リジンを用いた ICL 法は、工程数が多く煩雑で多種類のプローブの合成には向かないことが分かったため、今後はユビキチン鎖の連結反応の改善も必要であると考えている。

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)

[学会発表](計 4件)

荒木浩行、和泉雅之、富永真美子、岡本亮、梶原康宏、ユビキチン化タンパク質合成のための C-末端活性化ユビキチンの化学合成、日本化学会第 95 春季年会、2015.3.28、日本大学(千葉県・船橋市)
和泉雅之、荒木浩行、富永真美子、岡本亮、梶原康宏、ユビキチン化された高マンノース型糖鎖を有する糖タンパク質 CCL1 の化学合成、第 34 回日本糖質学会年会、2105.7.31、東京大学(文京区・東京都)

Masayuki Izumi, Hiroyuki Araki, Mamiko Tominaga, Ryo Okamoto, Yasuhiro Kajihara, Chemical synthesis of ubiquitinated glycoprotein CCL1 for analysis of glycoprotein degradation, 13th International Kyoto Conference on New Aspect of Organic Chemistry, 2015.11.10, リーガロイヤルホテル京都(京都市・京都府)

Masayuki Izumi, Hiroyuki Araki, Mamiko Tominaga, Ryo Okamoto, Yasuhiro Kajihara, Chemical synthesis of ubiquitinated glycoprotein having different protein conformation, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015.12.17, Honolulu (USA).

6. 研究組織

(1)研究代表者

和泉 雅之 (IZUMI, Masayuki)
大阪大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：80332641

(2)研究分担者

梶原 康宏 (KAJIHARA, Yasuhiro)
大阪大学・大学院理学研究科・教授