

令和 6 年 9 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05077

研究課題名（和文）膜動態を「あやつる」ための膜タンパク質の化学的糖鎖修飾法

研究課題名（英文）Chemical glycan modification of membrane proteins for "manipulating" membrane dynamics

研究代表者

生長 幸之助 (Kounosuke, Oisaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・研究チーム長

研究者番号：00583999

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 21,000,000円

研究成果の概要（和文）：糖鎖はタンパク質や脂質に付加して機能を発揮するが、特に膜タンパク質における糖鎖修飾がエンドサイトーシスや細胞間移行など、生命現象における重要な役割を果たしている。しかし、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、新規膜タンパク糖鎖修飾技術の開発を通じた精密な糖鎖-膜タンパク質複合体の創製と、その膜動態を「あやつる」人為的制御技術の開発を目標とした。研究の結果、独創的反応化学を用いる、アミノ酸残基選択的修飾反応や抗体修飾反応を開発し、細胞膜上での糖鎖修飾の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、糖タンパク質膜ダイナミクスの精密な理解と人工的な制御を進め、生体適合性の高い化学反応（速度論的的化学摂動）を利用した、新規薬物送達系の開発や、革新的生命操作法につながる技術基盤に成ることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Glycans add to proteins and lipids to exert their functions, and glycosylation, particularly onto membrane proteins, plays an important role in biological phenomena such as endocytosis and cell-to-cell transfer. However, the detailed mechanisms have remained unclear. This study aimed to create precise glycan-installation onto membrane proteins through the development of novel bioconjugation techniques, and to develop artificial methodologies to manipulate the membrane dynamics. As a result of the research, amino acid residue-selective modification reactions and antibody modification reactions using original reaction chemistry were developed, showing the possibility of glycan installations.

研究分野：生体関連化学

キーワード：生体適合化学 膜タンパク質 糖鎖 生体共役反応 膜動態 エクソソーム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸・タンパク質に続く第3の生命鎖として認識されているが、糖鎖機能の解析は生合成酵素のロックアウトを中心に進められてきたため、その分子基盤解明は立ち遅れている。糖鎖はそれ自体単独で効果を発揮しているわけでは無く、タンパク質や脂質に付加することによって初めて機能する。特に、膜タンパク質に目を向けると、修飾糖鎖がエンドサイトーシスの制御やエクソソームの細胞間移行の制御に深く関わるなどの報告例が相次いでおり、「糖鎖修飾」はタンパク質の膜動態において中心的な役割を果たしている。しかし糖鎖(構造・修飾様式・周辺分子との相互作用)と膜動態(細胞内動態・細胞外分泌・細胞間移行およびレシピエント細胞における膜動態)の関係性については今なお不明な点が多い。糖鎖構造/修飾様式を変更することでタンパク質の膜動態を変化できるか否かについては、世界的にも知見が存在しなかった。

2. 研究の目的

糖鎖構造/修飾様式とタンパク質膜動態の関係性理解およびその人為的制御、さらには生命科学研究への応用を見据えた生体適合反応化学の学術基盤を構築することを目的とした。糖鎖と膜タンパク質を個別調製し、生体適合型の化学反応を用いて、両者を結合させる手法を開発できれば、様々な構造の糖鎖を用意し、様々な修飾様式で簡便な糖タンパク質供給法となる。さらに、生体膜上で実施可能なタンパク質の修飾反応を確立することで、タンパク質膜動態や糖鎖機能の人為的制御(「あやつる」)に有効な化学ツールとなると考えた。

3. 研究の方法

これまでの糖鎖生命科学研究において、主流であった酵素を活用する手法ではなく、独自の反応化学を活用した化学修飾を基盤とした方法論を開発することとした。これにより、生合成系・酵素系では実現し得ない修飾様式にもアプローチできる方法論ができると考えた。班構成員の生長はタンパク質修飾反応を、上田は糖修飾反応をそれぞれ開発することで、それぞれ得意とする変換対象から機能制御を可能にすることを目指した。

4. 研究成果

これまで、独自のラジカル種の設計によるアミノ酸残基選択的修飾反応の開発に取り組み、トリプトファン選択的修飾反応の開発を行ってきた。タンパク質に応じて好みの修飾を行うために、他のアミノ酸残基選択的修飾反応の開発を行うことで、化学変換ツールの拡充を目指した。イミノキシルラジカルの反応性を詳細に検討することで、チロシン選択的な修飾反応が進行することを見出した(*J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 19844-19855)。イミノキシルラジカル近傍の置換基の高さによって、付加体の安定性を調整することができ、環境に応じて逆反応が進行する系へと展開することもできた。本反応はタンパク質機能をオンデマンドで制御可能なツールへと展開が可能である。

また、アミノ基を足がかりとした修飾反応の開発にも取り組んだ。光触媒、アミン触媒及びゲルマニウム触媒の三成分共存下、光照射するとアミノ基の α 位C-H結合が選択的にC-C結合へと変換可能な方法論を開発した(*Org. Lett.* **2022**, *24*, 3325-3330)。さらに、ペプチドチオアシッドを修飾反応剤として活用することで、カルボン酸存在下でアミノ基選択的なアミド形成反応が進行することも見出した(*Commun. Chem.* **2023**, *6*, 231)。本反応は、アミノ基選択的な修飾反応としてだけでなく、保護基の利用を最小限に抑えることのできるペプチド形成反応へと展開が可能であった。

開発したアミノ酸選択的修飾反応を活用した、膜タンパク質の糖鎖修飾に先立ち、糖タンパク質の代表例と言える抗体の修飾反応を行った。これまでトリプトファン修飾反応では、活性種であるオキシアンモニウムイオンの前駆体として、N-オキシラジカルを利用していたが、代わりにヒドロキシルアミンを前駆体として活用することで、抗体のような酸感受性タンパク質への修飾反応がうまく進行することがわかった(*Bioconjugate Chem.*, **2023**, *34*, 781-788)。これによって、抗体-金クラスターコンジュゲートの創成が可能となり、cryo-EMによってコンジュゲート構造の確認ができた。そこで、細胞膜上タンパク質のトリプトファン残基選択的な糖鎖修飾に取り組み、標的タンパク質の抗体に酸化酵素(HRP)をコンジュゲートさせた抗体-触媒複合体を用いることで、オキシアンモニウムイオンの前駆体を触媒近傍でのみ発生させることが可能であり、フローサイトメトリーによって細胞膜上の糖鎖修飾が進行することが確認できた。今後は糖鎖修飾の有無によって、膜動態解析及び制御を検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tatsumi Toshifumi, Sasamoto Koki, Matsumoto Takuya, Hirano Ryo, Oikawa Kazuki, Nakano Masato, Yoshida Masaru, Oisaki Kounosuke, Kanai Motomu	4. 巻 6
2. 論文標題 Practical N-to-C peptide synthesis with minimal protecting groups	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 231-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-023-01030-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Malawska Katarzyna Joanna, Takano Shinjiro, Oisaki Kounosuke, Yanagisawa Haruaki, Kikkawa Masahide, Tsukuda Tatsuya, Kanai Motomu	4. 巻 34
2. 論文標題 Bioconjugation of Au₂₅ Nanocluster to Monoclonal Antibody at Tryptophan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 781-788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.3c00069	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 該当する
1. 著者名 Sakai Kentaro, Oisaki Kounosuke, Kanai Motomu	4. 巻 24
2. 論文標題 A Germanium Catalyst Accelerates the Photoredox $\text{-C}(\text{sp}^3)\text{H}$ Alkylation of Primary Amines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 3325 ~ 3330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.2c00871	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 -
1. 著者名 Maruyama Katsuya, Ishiyama Takashi, Seki Yohei, Sakai Kentaro, Togo Takaya, Oisaki Kounosuke, Kanai Motomu	4. 巻 143
2. 論文標題 Protein Modification at Tyrosine with Iminoxyl Radicals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 19844 ~ 19855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c09066	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44件（うち招待講演 27件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 生長幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長幸之助, カタジナ ヨアンナ マラフスカ, 高野 慎二郎, 柳澤 春明, 吉川 雅英, 佃 達哉, 金井 求
2. 発表標題 抗体トリプトファンに対する金25核ナノクラスター修飾反応
3. 学会等名 第40回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 巽俊文, 笹本晃生, 及川和輝, 平野遼, 松本拓也, 中野真人, 吉田勝, 生長 幸之助, 金井求
2. 発表標題 ペプチドチオ酸カップリング伸長反応
3. 学会等名 第49回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kounosuke Oisaki
2. 発表標題 Chemical Upgrading of Peptides and Proteins
3. 学会等名 Open T-LSI Seminar（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長幸之助
2. 発表標題 「タンパク質の化学アップグレード法」に至るまでの合成化学者奮闘記
3. 学会等名 東京農工大学 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kounosuke Oisaki
2. 発表標題 Chemical Upgrading of Proteins
3. 学会等名 University of Melbourne (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kounosuke Oisaki
2. 発表標題 Chemical Upgrading of Proteins
3. 学会等名 University of Queensland (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toshifumi Tatsumi, Koki Sasamoto, Kazuki Oikawa, Ryo Hirano, Takuya Matsumoto, Masato Nakano, Masaru Yoshida, Kounosuke Oisaki, Motomu Kanai
2. 発表標題 Protecting Group-Minimized Peptide Synthesis Using Peptide Thioacid
3. 学会等名 13th International Peptide Symposium/15th Australian Peptide Conference (IPS2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Katarzyna Joanna Malawska, Shinjiro Takano, Kounosuke Oisaki, Haruaki Yanagisawa, Masahide Kikkawa, Tatsuya Tsukuda, Motomu Kanai
2. 発表標題 Bioconjugation of Au25 Nanocluster to Monoclonal Antibody at Tryptophan
3. 学会等名 XI Konwersatorium Chemii Medycznej (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 鳥取大学工学部 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 蛋白質科学会ワークショップ「反応化学の目からタンパク質を理解し、制御する」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 第53回天然物化学談話会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 名古屋大学 創薬科学研究科 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 京都薬科大学 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 カタジナ ヨアンナ マラフスカ, 高野 慎二郎, 生長 幸之助, 柳澤 春明, 吉川 雅英, 佃 達哉, 金井 求
2. 発表標題 抗体トリプトファンに対する金25核ナノクラスター修飾反応
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第17回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 第6回食・触コンソーシアムシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 電気化学的なトリプトファン選択的タンパク質化学修飾法
3. 学会等名 電気化学会第90回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 野口遵研究助成金講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 徳島大学薬学部（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長幸之助, 丸山勝矢, 石山隆史, 関陽平, 坂井健太郎, 藤後貴也, 金井求
2. 発表標題 イミノキシルラジカルを用いるチロシン選択的タンパク質修飾法
3. 学会等名 第39回メディシナルケミストリーシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 神戸大学理学部 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 東北大学薬学部 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 第16回食・触コンソーシアムワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 触媒化学融合研究センター 研究交流講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 巽 俊文, 及川 和輝, 笹本 晃生, 平野 遼, 松本 拓也, 生長 幸之助, 金井 求
2. 発表標題 保護基使用を最小限に抑えたペプチドチオ酸カップリング反応の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂井健太郎, 生長幸之助, 金井求
2. 発表標題 ゲルマニウム型新規結合弱触媒を用いた1級アミン 位C(sp ³)-Hアルキル化
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 イミノキシルラジカルを用いるチロシン選択的タンパク質生体共役反応
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会 (名古屋) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katarzyna Joanna Malawska, Kounosuke Oisaki, Motomu Kanai
2. 発表標題 Tryptophan-Selective Bioconjugation Revisited - Plural-Step Protein Modifications
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂井健太郎, 生長幸之助, 金井求
2. 発表標題 Site-selective $\text{-C(sp}^3\text{)-H}$ Alkylation of Alcohols and Primary Amines Promoted by Photoredox, HAT, and Bond-Weakening Hybrid Catalysis
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 名古屋工業大学 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 岐阜薬科大学・岐阜大学 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 膜動態を「あやつる」ための膜タンパク質の化学的糖鎖修飾法
3. 学会等名 超異分野学会 東京大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長 幸之助, 堀雄一郎, 浅野圭祐, 上田善弘, 真鍋良幸
2. 発表標題 糖鎖ケミカルロックインが拓く膜動態制御
3. 学会等名 超異分野学会 東京大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 静岡県立大学薬学部 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshifumi Tatsumi, Kazuki, Oikawa, Koki Sasamoto, Ryo Hirano, Takuya Matsumoto, Kounosuke Oisaki, Motomu Kanai
2. 発表標題 Protecting Group-Minimized Peptide Synthesis Using Peptide Thioacid
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katsuya Maruyama, Takashi Ishiyama, Yohei Seki, Kounosuke Oisaki, Motomu Kanai
2. 発表標題 Tunable traceless reversibility in a tyrosine-selective iminoxyl bioconjugation
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kentaro Sakai, Kounosuke Oisaki, Motomu Kanai
2. 発表標題 Identification of Bond-Weakening Spirosilane Catalyst for Photoredox α -C-H Alkylation of Alcohols
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 金井研 x 塩野義製薬Web講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katsuya Maruyama, Takashi Ishiyama, Yohei Seki, Kentaro Sakai, Takaya Togo, Kounosuke Oisaki, Motomu Kanai
2. 発表標題 Tyr-Selective Protein Modification with Iminoxy Radicals
3. 学会等名 13th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 タンパク質の化学アップグレード法
3. 学会等名 京都大学 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生長 幸之助
2. 発表標題 主鎖無保護アミノ酸を用いるペプチド合成法
3. 学会等名 第53回若手ペプチド夏の勉強会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生長幸之助, 丸山勝矢, 石山隆史, 関陽平, 金井求
2. 発表標題 イミノキシルラジカルを用いるチロシン選択的タンパク質生体共役反応
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki, Oikawa, Toshifumi Tatsumi, Koki Sasamoto, Ryo Hirano, Takuya Matsumoto, Kounosuke Oisaki, Motomu Kanai
2. 発表標題 Protecting Group-Minimized Peptide Synthesis Using Peptide Thioacid
3. 学会等名 2021 CSPS/CC-CRS Annual Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kounosuke Oisaki, Katsuya Maruyama, Takashi Ishiyama, Yohei Seki, Motomu Kanai
2. 発表標題 Tyrosine-Selective Bioconjugation Using IminoxyI Radicals
3. 学会等名 ACS Meeting Spring 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

学術変革領域B「糖化学ノックイン」成果と実績
<https://glycan-chemical-knockin.com/articles>
Researchmap
<https://researchmap.jp/oisaki/>

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
研究分担者	川島 茂裕 (Kawashima Shigehiro) (40508115)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	金井 求 (Kanai Motomu) (20243264)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授 (12601)	削除：2022年7月15日

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
---------	---------