

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13742

研究課題名(和文)核磁気共鳴装置による糖タンパク質の構造解析を可能とする精密有機合成

研究課題名(英文)Precise chemical synthesis of glycoproteins for their structural analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy

研究代表者

梶原 康宏 (Kajihara, Yasuhiro)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：50275020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖タンパク質を化学合成するには、糖鎖ペプチドやペプチドを固相合成により調製後 Native chemical ligation(NCL)で連結する。本研究では、位置特異的、濃度可変式<sup>15</sup>N標識を含む糖タンパク質の化学合成を実施した。ハイマンノース型糖鎖、複合型糖鎖、そして糖鎖を持たないケモカインという糖タンパク質を合成し、それぞれの構造をNMRを用いて考察した。その結果、糖鎖付加はタンパク質の3次元構造には大きな変化を与えなかったが、タンパク質の運動性に影響することがわかった。

また、鶏卵から単離したヒト2分枝複合型糖鎖から天然に存在する3分枝型糖鎖2種類を僅か10工程で合成できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Using solid-phase peptide synthesis (SPPS) and native chemical ligation (NCL), thirteen <sup>15</sup>N-labeled amino acids were inserted at specific positions of the protein backbone, while intentionally varying the enrichment of <sup>15</sup>N atoms. This method enabled us to assign <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N signals of synthetic glycoproteins even the same type of amino acid based on the intensities of <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC signals. We synthesized three kinds of glycoproteins bearing an oligosaccharide of either a bi-antennary complex-type or a high-mannose-type and non-glycosylated one. Our NMR experiments showed that glycosylation at the native glycosylation positions did not disturb protein conformation. However, temperature-varied circular dichroism (CD) spectra and T<sub>1</sub> values indicated that oligosaccharides appeared to inhibit protein fluctuation. We also demonstrated novel semisynthesis of tribrached complex type oligosaccharide which can be prepared within 10 conversion steps from the isolated biantennary oligosaccharide.

研究分野：生体関連化学

キーワード：糖質関連化学 糖鎖工学 糖タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

近年、アミノ酸が 200 残基程度で構成されるタンパク質や翻訳後修飾を受けたタンパク質誘導体が化学合成できるようになった (Unverzagt & Kajihara, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, **42**, 4408)。しかし、糖鎖は天然から単離したものに構造が限定され、糖タンパク質の構造は、核磁気共鳴法 (NMR) での解析法が確立されていない。これら一連の研究は、未だ世界で誰も成功していない。

### 2. 研究の目的

本研究では、 $^{15}\text{N}$  標識された安価なアルキル系アミノ酸を化学合成に利用し、ポリペプチドの約 3-4 割のアミノ酸を位置特異的に、かつ  $^{15}\text{N}$  の標識度に勾配をつけて標識した糖タンパク質を迅速に合成する方法を考案した。これにより全標識を施さずにタンパク質部位の構造解析が可能となる。本研究では、ヒトの 3 分枝型糖鎖の新規合成も検討する。

### 3. 研究の方法

a) 多分枝糖鎖の合成は、鶏卵より単離したアスパラギンが結合した 2 分枝糖鎖を位置特異的に部分保護後、分枝構造部位に相当する糖鎖を追加でグリコシル化し 3 分枝、4 分枝糖鎖を合成する。糖タンパク質合成を効率よく合成するには、NCL が必須である。しかし必要となるシステインは常に標的配列に存在するわけではない。そこで、b)  $\beta$  位にチオールをもつ DL-アミノ酸をストレッカー法により、簡便に合成後アミノアシラーゼで光学分割することで調製する。この  $\beta$  位にチオールをもつアミノ酸を利用し、糖鎖アスパラギンのアミノ基、カルボキシル基にペプチドを連結して糖タンパク質合成を実施する。c) 各ペプチドセグメントを固相法で合成する際、用いるアル

キル系のアミノ酸 (アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、グリシン) は、 $^{15}\text{N}$  の標識濃度を可変し (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20% など) 位置特異的に導入する。a) -c) のステップで得た高分枝糖鎖をもつ標識糖ペプチドを利用することで糖タンパク質を合成し、フォールディング後、核磁気共鳴法による全アミノ酸の帰属、最低必

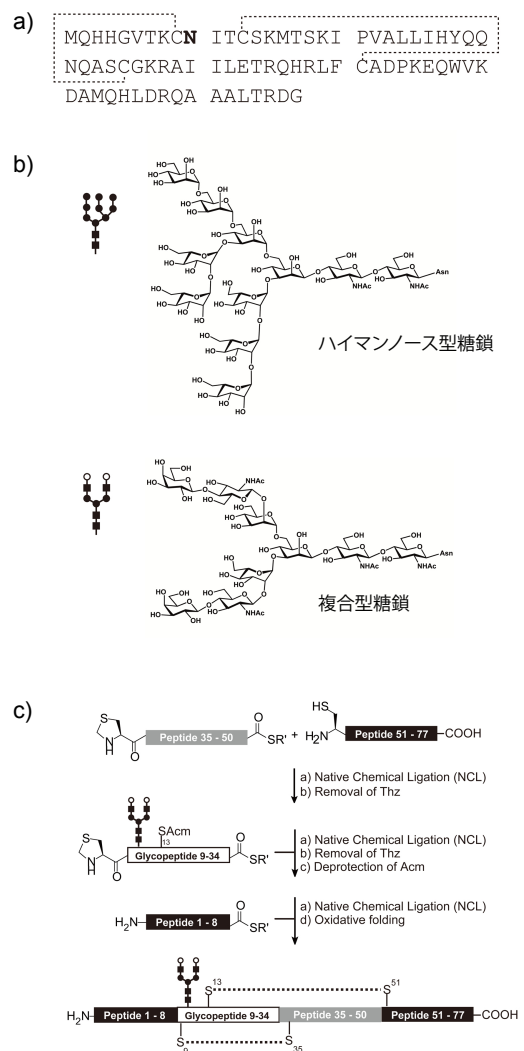


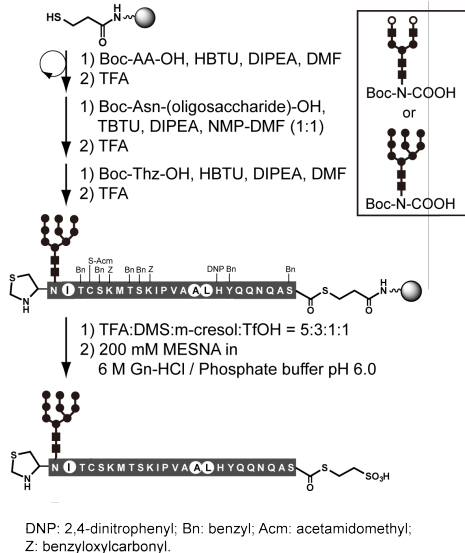
Fig 1.  $^{15}\text{N}$  標識されたアミノ酸を含む糖タンパク質の化学合成

要量の NOE の定量、タンパク質 3 次元構造の決定を実施する。これにより、

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  N-HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  N-HSQC-DIPSI(TOCSY)の  $^{15}\text{N}$  濃度に依存する信号強度から各アミノ酸を容易に帰属できるようになると考えた。

#### 4. 研究成果

本研究では、まず、アミノ酸 76 残基からなるフラクタルカイン (CDF) という糖タンパク質に安定同位体  $^{15}\text{N}$  原子の標識濃度を換えたアミノ酸を導入したものを合成することにした (図 1)。本研究では、市販の  $^{15}\text{N}$  標識アミノ酸を非標識のアミノ酸と混ぜ、 $^{15}\text{N}$  原子の標識度を調節しながら、ペプチド固相合成に利用し、位置特異的に安定同位体が入った糖ペプチド、ペプチドを合成した。

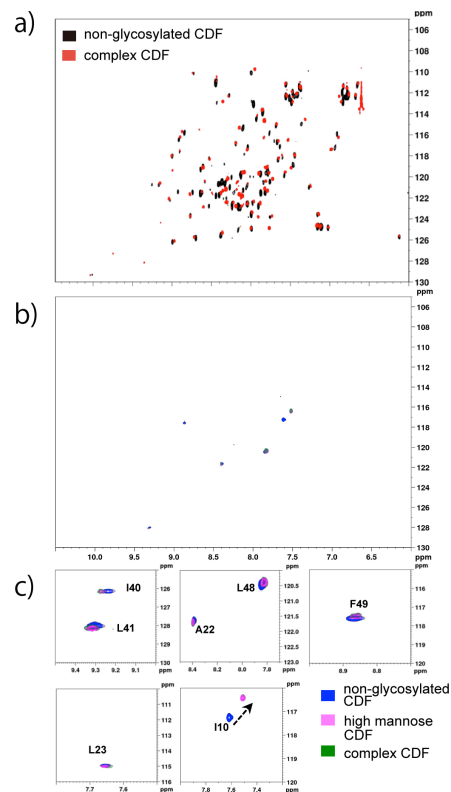


**Fig 2.**  $^{15}\text{N}$  標識されたアミノ酸を含む糖ペプチドの化学合成例. 白円: 標識アミノ酸.

本実験では、10 位のイソロイシン ( $^{15}\text{N}$ :20%)、22 位のアラニン ( $^{15}\text{N}$ :10%)、23 位のロシン ( $^{15}\text{N}$ :2%)、40 位のイソロイシン ( $^{15}\text{N}$ :5%)、48 位のロイシン ( $^{15}\text{N}$ :20%)、49 位のフェニルアラニン ( $^{15}\text{N}$ :10%) にそれぞれ  $^{15}\text{N}$  原子で標識した。また、糖鎖は、鶏卵から単離したハイマンノース型、複合型糖鎖を糖ペプチド固相合成の際導入し糖ペプチドチオエステルとして調製した (図 2)。そして、それらを native chemical ligation (NCL) で連結して糖鎖化ポ

リペプチド全長の合成をおこなった。得られた糖ペプチドをフォールディング処理し、逆相クロマトグラフィーで精製し、NMR による測定をおこなった。

図 3 には、まず、非標識の糖鎖化 CDF (a: 赤シグナル) と糖鎖がない CDF (a: 黒シグナル) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを比較した。その結果、両スペクトル間でシグナルの一致が見られた。これは、タンパク質に糖鎖付加をしても、タンパク質部位の大きな構造変化はなかったことを示唆している。



**Fig 3.**  $^{15}\text{N}$  標識されたアミノ酸を含む糖タンパク質の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC. a) 天然存在比の糖鎖化 CDF (赤: 複合型糖鎖) と非糖鎖化 CDF (黒) b) 10 位のイソロイシン ( $^{15}\text{N}$ :20%)、22 位のアラニン ( $^{15}\text{N}$ :10%)、23 位のロシン ( $^{15}\text{N}$ :2%)、40 位のイソロイシン ( $^{15}\text{N}$ :5%)、48 位のロイシン ( $^{15}\text{N}$ :20%)、49 位のフェニルアラニン ( $^{15}\text{N}$ :10%) にそれぞれ  $^{15}\text{N}$  原子で標識した  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC. c) b) シグナルにおける各信号の拡大. b, c) シグナルは、複合型 (緑)、ハイマンノース (ピンク)、非糖鎖化 (青) シグナルを重ねた  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトル

次に安定同位体標識した複合型糖鎖を

もつCDF, ハイマンノース型糖鎖をもつCDF, 糖鎖がないCDFを別途合成し、それぞれ<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを比較した(図3b, c)。その結果、糖鎖の構造の有無、分枝度の違いは化学シフトに影響しなかった。これらのことからタンパク質への糖鎖付加はタンパク質の3次元構造には必ずしも影響を及ぼすというわけではないことがわかった。

またこの実験とは別に温度を常温から80度程度に昇温後、常温に冷却する過程でのタンパク質部位の2次構造変化を円二色分光測定(CD)で追跡した。その結果、糖鎖がタンパク質上に存在するとタンパク質の運動性が制御された結果が得られた。

次に、タンパク質中のアミノ酸を部位特異的に同様に標識し、タンパク質の3次元構造解析を試みた。用いたタンパク質は、アミノ酸が40残基程度の糖結合レクチンを選んだ。このレクチンは、複合型糖鎖のアスパラギンに結合したグルコサミンの6位のフコースに特異的で、その結合親和力は数百nMであるが、なぜこの小型タンパク質が糖鎖の高い結合親和力を示すことができるのか、また、そのタンパク質構造は明らかになっていない。得られたNOEデータをもとに3次構造を得ることができた。

本成果は、2017年7月の学会ではじめてその構造を発表する。この構造解析においても、安定同位体の位置特異的標識法は有用であった。

本研究では、NCLを用いたペプチド連結時に有用なアミノ酸のβ位にチオールをもつフェニルアラニン、チロシンの合成も検討し成功した。

細胞表面には、3分枝、4分枝型の複合型糖鎖が存在する。これら糖鎖は特に細胞が癌化した際などに増加することが知られている。しかし、これら糖鎖を化学的に合成すると60-70工程を要する。そこで、鶏卵からグラムスケールで得ることができる2分枝複

合型糖鎖の選択的保護、脱保護法を新たに開拓し、化学的に3分枝目の糖鎖を導入することで2分枝糖鎖から僅か10工程で3分枝型糖鎖を得ることに成功した。

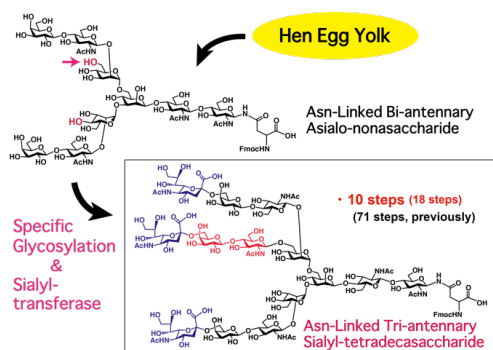


Fig.4: 鶏卵から単離した2分枝複合型糖鎖を化学修飾により3分枝型糖鎖への変換

#### 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Nguyen, M. H.; Izumi, M.; Sato, H.; Okamoto, R.; Kajihara, Y. Chemical synthesis of glycoproteins with the specific installation of gradient enriched <sup>15</sup>N-labeled amino acids for getting insight into glycoprotein behavior, *Chem. Eur. J.*, 2017, 23, 6579-6585, DOI:10.1002/chem.201606049.
2. Maki, Y.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Murase, T.; Kajihara, Y.; Semisynthesis of Intact Complex-Type Triantennary Oligosaccharides from a Biantennary Oligosaccharide Isolated from a Natural Source by Selective Chemical and Enzymatic Glycosylation. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3461-3468, doi:10.1021/jacs.5b13098 (2016).
3. Morishita, Y.; Kaino, T.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y.; Synthesis of D,L-amino acid derivatives bearing a thiol at the β-position and their enzymatic optical resolution. *Tetrahedron Lett.* **56**, 6565-6568, doi:10.1016/j.tetlet.2015.10.015 (2015).

[学会発表] (計 8 件)

1. Maki, Y.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y.; An Efficient Strategy for

- Glycopeptide Synthesis Having a Semisynthesized Triantennary Complex-type Oligosaccharide, The 97th CSJ Annual Meeting, 口頭発表、2017年、3月16-19日、慶応大、神奈川
2. 井上 萌恵、Hien Minh Nguyen、和泉 雅之、岡本 亮、小林 夕香、上野 泰、岡本 裕樹、林 文晶、久富 修、梶原康宏、コアフコース認識レクチンPhoSL の構造解析、日本化学会 第97春季年会、口頭発表、2017年、3月16-19日、慶応大、神奈川
  3. Maki, Y.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Murase, T.; Kajihara, Y.; International Carbohydrate Symposium 2017, Semisynthesis of Intact Complex-type Triantennary Oligosaccharides from a Biantennary Oligosaccharide Isolated from a Natural Source by Selective Chemical and Enzymatic Glycosylation, Oral Presentation, 2016, July, 17-22, New Orleans, USA
  4. Nguyen, Hien Min; Izumi, M.; Okamoto, R.; Kajihara, Y.; Chemical Synthesis of Specific and Gradient <sup>15</sup>N-labeled glycoprotein. 日本化学会、2016年3月24-27日、同志社大、京都
  5. Nguyen, Hien Min; Izumi, M.; Okamoto, R.; Kajihara, Y.; Chemical synthesis of inducible costimulator molecule (AILIM/ICOS) bearing three complex-type oligosaccharides at the native positions, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015年12月15日 - 20日, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA.
  6. Morishita, Y.; Kaino, T.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y.; Synthesis of D,L-amino acid derivatives bearing thiol at the b-position and its enzymatic optical resolution, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015年12月15日 - 20日, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA.
  7. Maki, Y.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y.; A Systematic Synthesis of  $\beta$ 1,6- and 1,4- Branched Human-type Tri-antennary N-glycans by Use of Bi-antennary Glycan Isolated from

Biological Source. Gordon Research Conference: Carbohydrate, 2015年6月14日 - 19日, Mount Snow in West Dover, Vermont, USA

8. 真木勇太、岡本 亮、和泉雅之、梶原康宏、天然から単離した二分枝複合型糖鎖を利用するヒト型三分枝糖鎖の合成研究、33回日本糖質学会年会、2014、8月10-12日、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：平成 年 月 日  
 国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：平成 年 月 日  
 取得年月日：平成 年 月 日  
 国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原康宏 (YASUHIRO KAJIHARA)  
 大阪大学・大学院理学研究科・教授  
 研究者番号：50275020

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：