

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21124

研究課題名(和文)新規可溶化法を用いたO-結合型糖タンパク質の合成研究

研究課題名(英文)Synthetic study of the O-glycoprotein using the solubilizing method

研究代表者

朝比奈 雄也(Asahina, Yuya)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：10737232

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)：本研究では、新規可溶化保護基である4-ピコリル(Pic)基を利用して、難溶性領域を持つ糖タンパク質、インターロイキン-2(IL-2)の化学合成を行った。先行研究でIL-2のC末端領域は、高い難溶性を示し、合成することが困難であった。そこで、PicをC末端領域中に含まれるグルタミン酸側鎖に導入することで、溶解性の改善することができた。得られたC末端領域を、他のペプチドセグメントとチオエステル法により縮合することで、全長配列を構築し、続いて、脱保護とフォールディングをすることで、目的とした均一な糖鎖構造を持つIL-2の合成を達成した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we successfully established a novel solubilizing method using 4-picolyl (Pic) group, which realized the synthesis of the glycoprotein, human interleukin-2 (IL-2), containing C-terminal poor solubility regions. Pic ester was introduced to the carboxy group of Glu residues of the C-terminal region, effectively solubilizing the poor solubility peptide. In the next step, the peptide ligation using the one-pot thioester method was performed to obtain the entire polypeptide. After the polypeptide was lead to the final product via deprotection and folding, the synthetic one was investigated by CD analysis and T-cell proliferation assay, which indicated the success of the chemical synthesis of IL-2 having homogeneous sugar chain.

研究分野：糖タンパク質有機化学

キーワード：糖ペプチド 糖タンパク質 極性反転 可溶化 ペプチドライゼーション 4-ピコリル基(Pic)

1. 研究開始当初の背景

一般的な(糖)タンパク質合成では、まず最初に、目的化合物をいくつかの部分配列(ペプチドセグメント)に分割し、それぞれを固相合成により調製する。次に、得られたペプチドセグメントを液相中にて縮合することで全長のポリペプチド鎖へと導いていく。しかし、我々は、タンパク質の合成途上でペプチドの難溶性という問題によく遭遇してきた。目的タンパク質が可溶性タンパク質であっても、そのペプチドセグメントは難溶性を示すことが頻繁にある。この様なペプチドを精製や誘導することは困難であり、結果、そのタンパク質合成が不可能になってしまう。特に、我々が長年に渡り合成に挑戦してきたインターロイキン-2 (IL-2) の C-末端領域ペプチド (66-133) は、高い疎水性を示し、既存の可溶化法であっても対処が不可能であった。IL-2 の合成を達成するためには、既存の方法に代わる汎用性の高い、効果的な可溶化法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

新規なペプチド可溶化保護基を開発し、今まで高い難溶性により調製できなかった IL-2 の C 末端領域 (66-133) の合成に応用する。次に、得られたセグメントをペプチドライゲーション法により、糖タンパク質へと導いてゆく。この IL-2 の合成を通して、開発した可溶化保護基の有用性を明らかにする目的で行った。

3. 研究の方法

ペプチド可溶化保護基として、4-ピコリル (Pic) 基を利用することにした (図 1)。今まで遭遇した難溶性ペプチドの特徴を考察した結果、疎水性領域が含まれていることに加えて、等電点 (pI) の低い酸性ペプチドであることが分かってきた。この推測を裏付けるように、今まで遭遇した難溶性セグメントの pI 値を計算すると、サポシン C (4.6)、Tim-3 (4.9)、IL-2 (3.9) などと低い値を示している。これら酸性ペプチドは、HPLC に用いられる酸性アセトニトリル水溶液中 (pH 2-3) で電荷を失い、疎水性相互作用で分子間凝集を引き起こし、その結果、難溶性を示していると予想される。これら考察から、ペプチドの極性を高

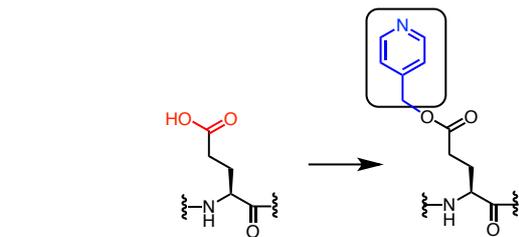


図 1. ピコリル (Pic) 基の構造とペプチド側鎖グルタミン酸への導入。

めると共に、酸性水溶液中で電荷を獲得させる、すなわちペプチドの等電点(塩基性)を上昇させることで、効果的に親水性を高めることができると考えた。そこで、高い極性と塩基性を持つ Pic 基を難溶性ペプチドの側鎖に導入することで、溶解性を向上させる方法を立案した。Pic 基はペプチドの精製に用いられる酸性アセトニトリル水溶液中でイオン化し、高い親水性を示すと考えられたためである。また、Pic 基を導入するアミノ酸側鎖官能基を、グルタミン酸の側鎖カルボン酸にした。グルタミン酸を Pic エステルとして保護すると、酸性アミノ酸が見かけ上、塩基性アミノ酸へ極性が反転し、ペプチドの等電点が塩基性へ大幅に上昇する。結果、Pic 基の正電荷を帯びたペプチド鎖は、高い親水性を獲得し、少ない補助基の導入で効果的に可溶化することを期待した。この方法によって、先行研究で合成が困難だった IL-2 の C 末端の部分配列を可溶化し、この糖タンパク質合成を完遂することにした。

4. 研究成果

・難溶性ペプチドセグメントの調製

上記で述べた Pic 基を IL-2 のセグメント中で一番難溶性であった 99-133 の配列に導入し、可溶化を試みた (図 2)。先行研究でこのセグメントは、既存の可溶化法であるイソペプチドを 2 箇所導入しても、可溶化が困難なペプチドであった。そこで、セグメント中の Glu<sup>100, 114, 110, 116</sup> に、Pic 基で保護されたグルタミン酸誘導体を固相合成法によりペプチド鎖へと組み込み、Pic 保護ペプチドを合成した。その結果、得られた粗生成 Pic 保護ペプチドは、大幅に溶解性が向上した。この粗生成物を逆相 HPLC により精製することで、目的とする C 末端ペプチドを高純度で得ることに成功した。しかし、固相合成中に、Pic 保護グルタミン酸が、一部ピログルタミン化することが分かった。今後はこの副反応を抑えるため、立体障害を高めた 2-pyridyl-2-propyl (PyP) 基を利用することを検討してゆ

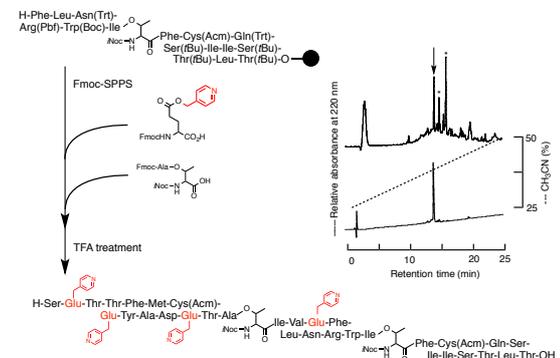


図 2. Pic 基を利用した IL-2 (99-133) の合成。矢印で示されたピークが目的物。アスタリスクでマークされたピークは、ピログルタミン化。

きたいと考えている。

・他のペプチドセグメントの調製

Pic 基による難溶性ペプチドの可溶化に成功したため、次に、その他の IL-2 のセグメントの調製を行った。糖ペプチドセグメント (1-27) を、以前に報告した 4-メチルベンジル保護戦略を利用し、目的のアリールチオエステルを得た。次に、常法では合成が難しい C-末端にプロリンを持つペプチドチオエステル (28-65) を、末端遊離のカルボン酸を持つ N-アルキルシステインを用いて、効率良く調製することに成功した。最後に、セグメント (66-98) の合成では、先に述べたセグメント (99-133) と同様に溶解性が悪かったが、Pic 基を 2 つ導入だけで可溶化することができ、結果、目的のペプチドチオエステルを得ることに成功した。

・ライゲーションによる全長ペプチドの構築

上記方法により、IL-2 の合成に必要な 4 つのセグメントが得られたため、次に、ペプチドライゲーション法によるセグメント間縮合を行うことにした (図 3)。まずは、C 末端半分 (66-133) の合成を行うべく、Ag<sup>+</sup>-free チオエステル法により、66-98 と 99-133 のセグメントを縮合した。次に、得られた C 末端半分セグメント (66-133) と糖ペプチドセグメント (1-27)、及びプロリルチオエステル (28-65) を One-pot チオエステル法によって縮合し、一挙に全長配列を構築した。その結果、収率 56% で目的の IL-2 全長ペプチド (1-133) の合成を行うことができた。

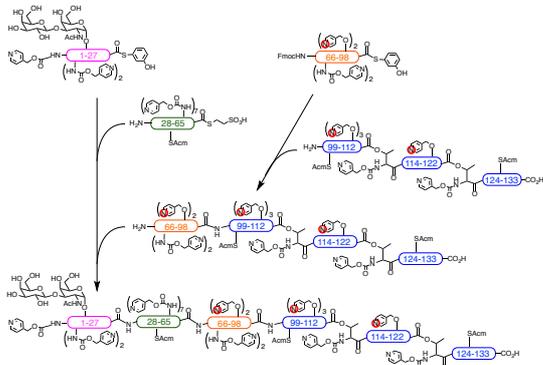


図 3. IL-2 のライゲーションの経路図。

・全長ペプチドの脱保護とフォールディング

得られた全長ペプチドを脱保護し、フォールディングを行うことにした (図 4)。まず、酢酸銀で処理することで、システイン側鎖 Acm 基の脱保護を行った。そのまま精製を行わず、次に亜鉛還元を行い、側鎖 iNoc 基、Pic 基の脱保護を One-pot で行い、目的の完全脱保護体を得た。この完全脱保護体は、イソペプチド構造を保っているため、溶解性の低下なく、効率良く精製することができた。次に、得られたペプチドを 6M グアニジン塩酸塩中性バッファー中に溶解し、イソペプチド結合を

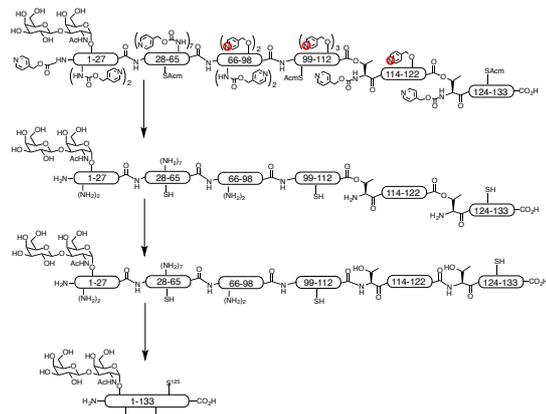


図 4. IL-2 の脱保護とフォールディング。

本来のアミド結合へ変換した。続いて、この溶液を酸化還元系の緩衝溶液中に大希釈し、フォールディングを行った。その結果、目的とする糖付き IL-2 を得ることに成功した。

・合成 IL-2 の 2 次構造解析、及び生理活性の検証

得られた合成 IL-2 の評価を行うべく、まずは、円偏光二色性 (CD) スペクトル解析を行い、正しい構造でフォールディングされているのかどうか、検証した。その結果、天然物と同様に  $\alpha$ -ヘリックスに富む構造を持つことが見出された。続いて、T 細胞増殖活性、及びインターフェロン  $\gamma$  産生活性を行った。その結果、合成品は、リコンビナント IL-2 と同定の活性を示すことが分かった。これらの検証により、得られた IL-2 が正しい立体と完全な生理活性を持つことが支持された。以上の研究により、均一な糖鎖構造を有する IL-2 の化学合成に成功した。

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 Y. Asahina, S. Komiya, A. Ohagi, R. Fujimoto, H. Tamagaki, K. Nakagawa, T. Sato, S. Akira, T. Takao, A. Ishii, Y. Nakahara, H. Hojo. Chemical synthesis of O-glycosylated human interleukin-2 by the reverse polarity protection strategy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 8226-8230 (2015).

<http://doi.org/10.1002/anie.201501847> (査読有り)。

② Y. Asahina. Chemoenzymatic Synthesis of Glycoprotein Using the Peptide Ligation Chemistry. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **27**, E15 or J15 (2015).

<http://doi.org/10.4052/tigg.1414.4E> (英語版), <http://doi.org/10.4052/tigg.1414.4J>

(日本語版) (査読有り)。

③ A. Ohagi, Y. Asahina, H. Hojo. Study on a preparation of prolyl thioester by the N-alkylcysteine method. *Peptide Science 2015: H. Hojo, T. Inazu, H. Katayama (Eds.)*, 135-136 (2016) (プロシーディング、査読有り)。

④ R. Fujimoto, Y. Asahina, S. Komiya, A. Ohagi, H. Tamagaki, K. Nakagawa, T. Sato, S. Akira, T. Takao, A. Ishii, Y. Nakahara, H. Hojo. Total synthesis of interleukin-2 having core 1 type disaccharide by the reverse polarity protection strategy. *Peptide Science 2015: H. Hojo, T. Inazu, H. Katayama (Eds.)*, 119-122 (2016) (プロシーディング、査読有り)。

⑤ N. Takeda, Y. Asahina, R. Fujimoto, A. Suzuki, H. Hojo. Synthesis of O-linked glycopeptide thioester by the 4-methylbenzyl protection strategy. *Peptide Science 2015: H. Hojo, T. Inazu, H. Katayama (Eds.)*, 123-124 (2016) (プロシーディング、査読有り)。

⑥ Y. Asahina, T. Kawakami, H. Hojo. Development of the One-pot ligation by using two orthogonal thioester devices. *Peptide Science 2016*, 77-78 (2017). (プロシーディング、査読有り)。

⑦ Y. Asahina, T. Kawakami, H. Hojo. One-pot native chemical ligation by combination of two orthogonal thioester precursors. *Chem. Commun.*, 53, 2114-2117 (2017).  
<http://doi.org/10.1039/c6cc10243c> (査読有り)。

[学会発表] (計 11 件)

① 朝比奈雄也、小宮忍、大萩亜美、藤本梨菜、玉垣裕子、中川勝博、佐藤荘、審良静男、石井彰、中原義昭、北條裕信、O-結合型糖鎖を有するインターロイキン-2 の化学合成、第 34 回日本糖質学会年会、2015 年 7 月 31-8 月 2 日、東京大学安田講堂 (東京都文京区)。

② A. Ohagi, Y. Asahina, H. Hojo. Study on a preparation of prolyl thioester by the N-alkylcysteine method. 第 52 回日本ペプチド討論会、2015 年 11 月 16-18 日、平塚公民館 (神奈川県平塚市)。

③ R. Fujimoto, Y. Asahina, S. Komiya, A. Ohagi, H. Tamagaki, K. Nakagawa, T. Sato, S. Akira, T. Takao, A. Ishii, Y. Nakahara, H. Hojo. Total synthesis of interleukin-

2 having core 1 type disaccharide by the reverse polarity protection strategy. 第 52 回日本ペプチド討論会、2015 年 11 月 16-18 日、平塚公民館 (神奈川県平塚市)。

④ N. Takeda, Y. Asahina, R. Fujimoto, A. Suzuki, H. Hojo. Synthesis of O-linked glycopeptide thioester by the 4-methylbenzyl protection strategy. 第 52 回日本ペプチド討論会、2015 年 11 月 16-18 日、平塚公民館 (神奈川県平塚市)。

⑤ 山本直幸、朝比奈雄也、北條裕信、マンノース-6-リン酸を有する糖ペプチドの合成、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27-30 日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)。

⑥ 竹田直樹、武居俊樹、朝比奈雄也、北條裕信、4-メチルベンジル基を用いた alpha-シアリル糖ペプチドの合成研究、第 35 回日本糖質学会、2016 年 9 月 1-3 日、高知市文化プラザかるぼーと (高知県、高知市)。

⑦ Y. Asahina, S. Komiya, A. Ohagi, R. Fujimoto, H. Tamagaki, K. Nakagawa, T. Sato, S. Akira, T. Takao, A. Ishii, Y. Nakahara, H. Hojo. Total synthesis of human interleukin-2 having core 1 disaccharide by the reverse polarity protection strategy. 8<sup>th</sup> International Peptide Symposium、2016 年 9 月 4-9 日、ライプツィヒ大学、(ドイツ、ライプツィヒ)。

⑧ Y. Asahina, T. Kawakami, H. Hojo. Study for development of the one-pot ligation by using two orthogonal thioesterification devices. 第 53 回日本ペプチド討論会、2016 年 10 月 26-28 日、京都テルサ (京都府、京都市)。

⑨ 朝比奈雄也、川上徹、北條裕信、直交型チオエステル化素子を利用したヒトヒストン H4 の化学合成、日本農芸化学会 2017 年大会、2017 年 3 月 17-20 日、京都女子大学 (京都府京都市)。

⑩ 藤本梨菜、武居俊樹、朝比奈雄也、佐藤毅、北條裕信、カベオリン-1 の化学合成研究及び、細胞膜内ドメインの構造解析。日本農芸化学会 2017 年大会、2017 年 3 月 17-20 日、京都女子大学 (京都府京都市)。

⑪ 竹田直樹、武居俊樹、朝比奈雄也、北條裕信、TFA 感受性保護基を用いたシアリル糖ペプチドの合成研究、日本農芸化学会 2017 年大会、2017 年 3 月 17-20 日、京都女子大学 (京都府京都市)。

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学蛋白質研究所蛋白質有機化学研究室

HP: <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/index.html>

雑誌論文①の日本語解説:

[http://www.protein.osaka-](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/res_desc/index.html#il-2)

[u.ac.jp/organic/res\\_desc/index.html#il-2](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/res_desc/index.html#il-2)

雑誌論文⑦の日本語解説:

[http://www.protein.osaka-](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/res_desc/index.html#cpenac)

[u.ac.jp/organic/res\\_desc/index.html#cpen](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/res_desc/index.html#cpenac)

[ac](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/res_desc/index.html#cpenac)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

朝比奈 雄也 (Asahina, Yuya)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号: 10737232