

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20350081

研究課題名 (和文) 化学法と発現法を組み合わせたヒト型糖鎖を有する天然糖タンパク質の精密合成

研究課題名 (英文) Precise synthesis of glycoproteins having human oligosaccharides by use of chemical and expression methodologies.

研究代表者

梶原 康宏 (KAJIHARA YASUHIRO)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50275020

研究成果の概要 (和文) : ヒト型糖鎖をもつエリスロポエチン誘導体、共刺激糖タンパク質の合成に成功した。また、ヒト型抗体 IgG の Fc 領域の合成をおこなった。これらの合成では、化学的に調製した糖鎖をもつペプチド鎖と大腸菌発現法により調製した糖鎖を持たないペプチド鎖を連結させるという方法を採用した。この方法により全糖ペプチド鎖を合成後、フォールディング操作を経て目的とする3次元構造を形成した糖タンパク質の合成に成功した。

研究成果の概要 (英文) : Erythropoietin analogue and co-stimulate glycoprotein were synthesized. In addition to these results, glycosylated polypeptide chain of IgG-Fc region was also synthesized. In order to synthesize glycoproteins, glycopeptides-thioesters were prepared by chemical method and polypeptide chain was prepared from E. Coli expression method. Coupling both peptides to prepare whole glycosylated polypeptide and subsequent folding process afforded the folded glycoproteins.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野:複合化学

科研費の分科・細目:複合化学・生体関連化学

キーワード:糖タンパク質、糖鎖、糖ペプチド

1. 研究開始当初の背景

現在、医療等でも利用されている糖タンパク質は、細胞発現法により得られるが、単一構造のものを得るのは困難である。また、これら理由のために、タンパク質上の糖鎖の機能を詳細に調べることが困難であった。そのため、単一構造のヒト型糖鎖をもつタンパク質の調製方法が望まれていた。

2. 研究の目的

糖鎖構造を任意に改変し、そしてタンパク質に糖鎖を結合させるには、化学的な手法によ

り糖タンパク質そのものを化学合成する方法が最も有望であるが、分子量 20000 以上の糖タンパク質を精密に合成する手法は確立されていなかった。本研究では、ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質を化学合成法、および大腸菌発現法を組み合わせ精密に合成することを目指した。

3. 研究の方法

糖タンパク質を合成する場合、標的分子を糖鎖をもつペプチドセグメントと糖鎖を持たないペプチドセグメントに分けて調製し、それらを native chemical ligation をもちいて連結し、そしてタン

パク質部位の折りたたみ操作を経て目的の3次元構造をもつ糖タンパク質を精密に合成するという方法を用いる。糖鎖をもつペプチド鎖はFmoc ペプチド固相合成法を、ペプチド鎖のみは、化学法あるいは大腸菌発現法を用いて調製し、上記方法で糖タンパク質を得る検討をおこなった。

4. 研究成果

1) ヒト複合型シアリル糖鎖を3本もつエリスロポエチン(EPO)誘導体の合成: EPO の1-32番目までのペプチドチオエステルを化学的に調製し、24、28、32位にヒトの複合型シアリル糖鎖をハロアセトアミド法で導入した糖ペプチドチオエステル誘導体を合成した。一方、EPO の33位から166位のペプチドセグメントは大腸菌発現法を用いて調製した。そして32位と33位を native chemical ligation 法で連結してEPO 全長を調製した。そして、3M グアニジンを用いて変性後、透析法でグアニジンを抜く操作をおこなうことで目的とする3次元構造を形成した EPO 誘導体の合成に成功した。この EPO 誘導体を用いた、細胞増殖アッセイでは、天然型の EPO と比べ1%程度の活性であった。これは追加した糖鎖の立体障害によるものと考えているが、糖鎖の数が増えることが糖タンパク質の薬理活性を向上させるのではなく、その付加位置が重要であるという知見を得ることができた。

2) 共刺激糖タンパク質 ICOS の合成: ICOS は T 細胞表層に存在し、24、89、110 位に糖鎖をもつ糖タンパク質で、炎症時に T 細胞を活性化する。科学研究費(特定領域: グライコミックス)の研究課題において、この ICOS が有するヒト型糖鎖の構造決定およびどの位置の糖鎖が ICOS 活性に重要か調べ、89 位に結合した糖鎖が重要であることを明らかにしている。また、本研究で89位の糖鎖を除去した ICOS を Jarkat 細胞で発現しモニターしたところ、この89位の糖鎖が細胞表層への輸送に重要であることが明らかになった。そこで、89位にのみヒト複合型のシアリル糖鎖をもつ ICOS の細胞外ドメイン(アミノ酸: 120 残基)の合成をおこない、89位の糖鎖の機能解明を試みた。120 残基のアミノ酸からなるペプチド鎖を4つのセグメントにわけ、それぞれペプチド固相合成をへて、1-3のセグメントはチオエステルとして合成した。また、糖鎖はシアリル型の複合型糖鎖を89位に導入した形で合成した。これらを順次 native chemical ligation で連結し、全長に相当する糖鎖化ポリペプチド鎖を調製した。次にこのポリペプチド鎖を 3M グアニジンで変性させ、透析法でグアニジンを除去する方法で ICOS のフォールディングを検討した。そして円二色分光法、質量分析、プロテオミクスによるジスルフィド結合位置の確定等を

おこなったところ、適切な3次元構造を形成していることを確認した。また、この ICOS の受容体である B7h との結合実験でも適切な親和力を示したことから必要な3次元構造を形成したことを確認した。また、この糖タンパク質を糖鎖加水分解酵素(glycanase-F)で糖鎖を除去したところ、タンパク質が沈殿する現象を確認した。これは、糖鎖がタンパク質の3次元構造維持に必須であることを確認したはじめての例といえる。

3) 抗体の Fc 部位の合成研究: この研究ではヒト型抗体 IgG₁-Fc フラグメントの全合成を目的とした。ヒト型抗体 IgG₁ の Fc フラグメントの 297 残基目の Asn に結合した複合型糖鎖は、Fc フラグメントのタンパクと相互作用することで抗体の Fc 部位の構造を安定化させたり、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)に関与するなど、重要な役割を担っていると考えられている。しかし、現在のところ、抗体は CHO 細胞や酵母で発現されるのみであり、単一構造の糖鎖をもつ Fc フラグメントを調製するには限界がある。そこで本研究では、単一構造のヒト N 型糖鎖をもつ IgG₁-Fc フラグメントを、大腸菌発現法と糖鎖ペプチドの化学合成とを合わせた方法で合成することにした。IgG₁-Fc フラグメントを Cys229-Thr260-SPh (セグメント A)、Cys261-Arg292-SBn (セグメント B)、Cys293-Lys320-SBn (セグメント C)、Cys321-Ser444 (セグメント D) の4つのペプチドセグメントに分けてそれぞれチオエステルとして合成した。そして、Native Chemical Ligation (NCL) 及び Kinetically Controlled Ligation (KCL) を用いてそれらのセグメントを順次連結させていく検討をおこなった。まず、既存の方法を用いて Cys229-Thr260-SPh (セグメント A)、Cys261-Arg292-SBn (セグメント B)、Cys293-Lys320-SBn (セグメント C) を Fmoc 固相合成法により調製後、それぞれ C 末端をチオエステルとして得た。なお、297 位にはヒト複合型のシアリル糖鎖を導入した。つづいて Cys321-Ser444 (セグメント D) は大腸菌発現法を利用して得ることに成功した。次に、Cys229-Thr260-SPh (セグメント A) と Cys261-Arg292-SBn (セグメント B) を KCL で連結する検討を行った結果、純度よく64残基の目的物、ペプチドセグメント-AB を得ることができた。また、Cys293-Lys320-SBn (セグメント C) と Cys321-Ser444 (セグメント D) を NCL で連結する検討を行った。その結果、糖ペプチドセグメント-CD の生成を確認することができた。そして、得られた64残基のセグメント-AB と糖ペプチドセグメント-CD を、NCL によって連結する検討を行った。その結果、電気泳動で35kDa 付近に目的物だと考えられるセグメント-ABCD の生成を確認することができた。

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 14 件)

- ① K. Hirano, Y. Kajihara, Synthesis of Heavily Glycosylated Peptide α -Thioester. *J. Carbohydr. Chem.*, (2010) 29(2), 84-91, 査読有.
- ② T. Murase, Y. Kajihara, Synthesis of glycosylated polypeptide chain of inducible costimulator on T cell. *Carbohydr. Res.*, (2010) 345(10), 1324-1330, 査読有.
- ③ N. Kamei, R. Fukui, Y. Suzuki, Y. Kajihara, M. Kinoshita, K. Kakehi, H. Hojo, K. Tezuka, T. Tsuji, Definitive evidence that a single N-glycan among three glycans on inducible costimulator is required for proper protein trafficking and ligand binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2010) 391, 557-563, 査読有.
- ④ R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, Expanding the scope of native chemical ligation in glycopeptides synthesis. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, (2010) 16, 191-198, 査読有.
- ⑤ Y. Kajihara, N. Yamamoto, R. Okamoto, K. Hirano, T. Murase, Chemical synthesis of homogeneous glycopeptides and glycoproteins. *Chemical Record*, (2010) 10, 80-100, 査読有.
- ⑥ Y. Kajihara, R. Okamoto, N. Yamamoto, M. Izumi, Synthesis of Glycopeptides. *Methods in Enzymology*, (2010) 478, 503-519 Editor: Minoru Fukuda, Academic Press, 査読有.
- ⑦ K. Hirano, D. Macmillan, K. Tezuka, T. Tsuji, Y. Kajihara Design and Synthesis of Homogeneous Erythropoietin Analogue with Two Human Complex-Type Sialyloligosaccharides: Combined Use of Chemical and Bacterial Protein Expression Methods. *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2009), 48, 9557-9560, 査読有.
- ⑧ N. Nagahara, T. Matsumura, R. Okamoto, Y. Kajihara, Protein cysteine modifications: (2) Reactivity Specificity and Topics of Medical Chemistry and Protein Engineering. *Curr. Med. Chem.*, (2009), 16, 4490-4501, 査読有.
- ⑨ N. Nagahara, T. Matsumura, R. Okamoto, Y. Kajihara, Protein cysteine modifications: (1) Medical chemistry for proteomics. *Curr. Med. Chem.*, (2009) 16:4419-4444, 査読有.
- ⑩ T. Murase, T. Tsuji, Y. Kajihara; Efficient and systematic synthesis of a small glycoconjugate library having human complex type oligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, 344, (2009), 762-770, 査読有.
- ⑪ R. Okamoto, S. Souma, Y. Kajihara; Efficient Substitution Reaction from Cysteine to the Serine Residue of Glycosylated Polypeptide: Repetitive Peptide Segment Ligation Strategy and the Synthesis of Glycosylated Tetracontapeptide Having Acid Labile Sialyl-TN Antigens. *J. Org. Chem.*, (2009), 74, 2494-2501, 査読有.
- ⑫ R. Okamoto, Y. Kajihara; Uncovering latent ligation site for glycopeptide synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2008), 47(29), 5402-5406, 査読有.
- ⑬ R. Okamoto, S. Souma, Y. Kajihara; Efficient Synthesis of MUC4 Sialylglycopeptide through the New Sialylation Using 5-Acetamido-Neuraminamide Donors. *J. Org. Chem.* (2008), 73(9), 3460-3466, 査読有.
- ⑭ N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okamoto, P. E. Dawson, Y. Kajihara; Chemical Synthesis of a Glycoprotein Having an Intact Human Complex-Type Sialyloligosaccharide under the Boc and Fmoc Synthetic Strategies. *J. Am. Chem. Soc.* (2008), 130(2), 501-510, 査読有.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Y.Kajihara, Approaches for elucidation of oligosaccharide functions using the chemically synthesized homogeneous glycoproteins, Schulich Symposium, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa (Israel), 2011年3月13日.
- ② Y.Kajihara, Chemical synthesis of bioactive homogeneous glycoproteins and evaluation of oligosaccharide functions, Glycan forum, Berlin (Germany), 2011年3月12日
- ③ K.Morooka, R.Okamoto, , and Y.Kajihara, Synthetic studies of interleukin-6 by using new efficient synthetic method of glycopeptide- α thioesters. 2010 Pacificchem, Honolulu (USA), 2010年12月17日
- ④ Y.Kajihara, Chemical synthesis of homogeneous glycoproteins and evaluation of oligosaccharide functions, 2010 Pacificchem, Honolulu (USA), 2010年12月17日
- ⑤ Y.Kajihara, Chemical synthesis of homogeneous glycoproteins and evaluation of oligosaccharide functions, 5th International Peptide symposium, 京都国際会館, 2010年12月9日
- ⑥ M.Murakami, and Y.Kajihara, Synthetic study of erythropoietin having complex type disialyloligosaccharides. Asian Communications of Glycobiology and glycotchnology 2nd Conference, Taipei (Taiwan), 2010年10月27日
- ⑦ T.Harada, and Y.Kajihara, Synthetic studies of glycopeptide- α thioester segments of erythropoietin. Asian Communications of Glycobiology and glycotchnology 2nd Conference, Taipei (Taiwan), 2010年10月27日
- ⑧ Y.Kajihara, Synthesis of erythropoietin analogues having human complex type sialyloligosaccharides, Siloglyco2010, Potsdam (Germany), 2010年8月23日
- ⑨ K.Morooka, R.Okamoto, and Y.Kajihara, Synthetic of interleukin-6 segment by using new efficient synthetic method of glycopeptide- α thioester. 第25回国際糖質学会千葉幕張メッセ(千葉県)、2010年8月3日
- ⑩ M. Murakami and Y. Kajihara, Synthetic study of erythropoietin having three complex type disialyloligosaccharides. 第25回国際糖質学会千葉幕張メッセ(千葉県)、2010年8月2日
- ⑪ T.Harada and Y. Kajihara, Synthetic of glycopeptide- α thioester segments of erythropoietin. 第25回国際糖質学会千葉幕張メッセ(千葉県)、2010年8月2日
- ⑫ T.Murase and Y.Kajihara The chemical synthesis of glycosylated co-stimulatory signal accepting protein AILIM/ICOS. 第25回国際糖質学会、千葉幕張メッセ(千葉県)、2010年8月2日
- ⑬ 平野桐子、Derek Macmillan、梶原康宏:化学法と発現法を組み合わせた糖タンパク質誘導体の合成研究. 日本化学会第88回春季年会、立教大学(東京都)、2008年3月28日
- ⑭ 岡本亮、相馬慎吾、梶原康宏:簡便な糖ペプチド合成法の開発. 日本化学会第88春季年会、立教大学(東京都)、2008年3月28日
- ⑮ 梶原康宏:ヒト複合型糖鎖をもつ糖タンパク質の化学合成. 理研シンポジウム、理化学研究所(埼玉県)、2008年1月25日

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

- ①名称:糖鎖付加 AILIM 細胞外ドメインおよびその製造方法
発明者:梶原康宏、辻孝、手塚克成、吉田健太、深江一博
権利者:大塚化学
種類:通常
番号:2009-168099
出願年月日:2009/7/16
国内外の別:国際

②名称:ペプチドチオエステル体の製造方法
発明者:梶原康宏、岡本亮、坂本泉、
石井一之
権利者:大塚化学
種類:通常
番号:2009-151713
出願年月日:2009/6/26
国内外の別:国際

[その他]

ホームページ等

Angewandte. Chem. Int. Ed.2009, 49, 9557-9560
(成果は、この号の in side cover に採用された
<http://www3.interscience.wiley.com/journal/26737/home/cover/index2009.html>) に掲載されたエリスロポエチン誘導体の合成に関する成果が、平成21年10月12日の日本経済新聞の科学面で紹介された。

J. Am. Chem. Soc.,2008, 130, 501-510 に掲載された糖タンパク質の化学合成は、平成20年12月8日の日本経済新聞社会面、12月12日朝日新聞科学面で、また12月8日の NHK「おはよう日本」で紹介された。

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶原 康宏 (KAJIHARA YASUHIRO)
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 :なし

()

研究者番号:

(3)連携研究者:なし

()

研究者番号: