



研究課題名 糖タンパク質の革新的合成法の確立と翻訳後修飾の機能解明に向けた統合的アプローチ

大阪大学・大学院理学研究科・教授

かじはら やすひろ
梶原 康宏

研究課題番号： 21H05028

研究者番号： 50275020

研究期間： 令和3年度～令和7年度 研究経費（期間全体の直接経費）： 145,900千円

キーワード： 糖鎖、糖タンパク質、水和殻

【研究の背景・目的】

タンパク質上には、アスパラギンのアミド側鎖、セリン・スレオニンの水酸基に糖鎖が結合したN型ならびにO型糖鎖が存在する。しかし、糖鎖が、タンパク質の生合成過程でなぜ特異的に付加し、そして、多様な分枝構造でどのような機能を果たしているのか未だ詳細には理解できていない。本研究では、大腸菌で発現した長鎖ペプチドと糖鎖アミノ酸を水溶液中で連結し、数工程で糖タンパク質を合成するという革新的方法の確立を目指す。そして、糖鎖がタンパク質上で砂糖シロップのような特異的な水和殻を構築し、糖タンパク質とそのレセプタータンパク質の相互作用を促進するなどの機能をもつことの実証を検討する。また、合成した糖タンパク質を細胞の内外に導入し、糖鎖の機能を調べる。さらには、合成した糖タンパク質と受容体の複合体の構造解析を目指す。

【研究の方法】

アスパラギンの α カルボン酸をチオアシッドに変換した糖鎖アスパラギンチオアシッドを合成し、その α アミノ基及び α チオアシッドに大腸菌で発現したペプチドをそれぞれ連結させ、標的糖鎖ポリペプチドを合成する新規法を検討する。この方法でより短工程の糖タンパク質合成を検討する。まず、大腸菌で発現したペプチドのC末端をチオエステルへと活性化後、糖鎖アスパラギンチオアシッドと連結させ、糖鎖ペプチドチオアシッドを合成する。そして、このチオアシッド部位と、 β -メルカプトアミノ酸をN末端にもつペプチドを連結することで、糖鎖ポリペプチドを合成する。そして、 β -メルカプト基の脱硫化、フォールディング操作で糖タンパク質を合成する。これに必要な様々な β -メルカプトアミノ酸の合成もおこなう。また、糖鎖はアスパラギン結合型、セリン結合型など検討する。

糖鎖の水和殻が、タンパク質同士の相互作用を向上しているという機能を実証するために、糖タンパク質の糖鎖周辺の水の集積度を水素重水素交換質量分析法で解析する。また、それら糖タンパク質の生物活性や親和力の変化をピアコア等で調べ、糖鎖の有無の影響と水和殻の関係を評価する。

膜一回貫通型の糖タンパク質を生細胞上に合成する方法の開発をおこなう。膜貫通型糖タンパク質の細胞内と膜貫通部分のペプチドを、インテイン(IntC)というセルフスプライシングペプチドと融合させた形で細胞表層に発現する。そして、別途、インテイン(IntN)を末端にもつ糖タンパク質を合成後、細胞表

層のIntCと糖タンパク質のIntNを連結させ、セルフスプライシングを経て、膜上での天然型膜貫通型糖タンパク質の合成を目指す。

様々な糖鎖をもつ合成糖タンパク質を細胞内のゴルジ体に導入し、生合成経路に乗せて糖鎖伸長をさせた後、回収し、糖鎖構造を解析するシステムの開発を目指す。本研究では、まず、毒性のないコレラトキシンBユニットに糖鎖を結合させたものを合成後、細胞に加え、エンドサイトーシスでゴルジ体に輸送されるシステムをより効率的なものにする検討から始める。

フォールディングセンサー酵素(UGGT)とミスフォールド型糖タンパク質の複合体の構造をCryoEMで明らかにし、UGGTがミスフォールド体のどのような特徴を認識しているか解明する。

【期待される成果と意義】

糖鎖の構造と機能を、生物学的現象毎に特定できない理由は、タンパク質上の糖鎖を自在に変えて、生物科学的実験をする方法がなかったこと、更には、特定の糖鎖をもつタンパク質を細胞表層や、細胞内のオルガネラに挿入し、その糖タンパク質活性を追跡する方法がなかったためである。その結果、糖鎖機能解明は足踏み状態であった。本研究では、糖鎖構造を自在に変えた様々な糖タンパク質を短時間で合成し、生細胞上の膜糖タンパク質の合成などに応用すれば、多くの問題が世界に先駆けて研究できると考えた。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Y. Maki, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, Chemical Synthesis of an Erythropoietin Glycoform Having a Triantennary N-Glycan: Significant Change of Biological Activity of Glycoprotein by Addition of a Small Molecular Weight Trisaccharide. *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 20671. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c08719>
- ・ Murakami, 他5名 Y. Kajihara*, Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity, *Science Advances*, 2016, 2:e1500678, DOI: 10.1126/sciadv.1500678.

【ホームページ等】

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/kajihara/index.html>