

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22550105

研究課題名(和文) アミノ酸配列特異的糖鎖導入と酵素法による糖蛋白質の精密ハイブリッド合成

研究課題名(英文) Precise hybrid synthesis of glycoprotein through amino acid sequence-specific introduction of oligosaccharide followed by enzymatic transglycosylation reaction

研究代表者

小林 厚志 (Kobayashi, Atsushi)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90361138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：糖タンパク質は様々な生理活性を示すことが明らかになっているが、均一なものの調製は現時点では困難である。これまでに正しい折りたたみがなされているタンパク質を得ることは、大腸菌等の原核細胞を用いれば容易であり、これに対して正確に糖鎖負荷する技術を開発すれば、所望の糖蛋白質を得ることが可能である。近年、配列特異的に糖とタンパク質の間でアマドリ転位反応が起こりうる可能性を示唆する報告があり、これに基づき、アマドリ転位反応の解析およびその反応促進について検討した。アマドリ転位反応は緩衝液の種類によってその反応速度が影響を受け、リン酸やホウ酸塩が促進効果が認められたが配列特異性については未解明である。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to obtain homogeneous glycoproteins, although it is increasing our knowledge concerning physiological functions of glycoproteins. Nowadays, it is very easy to obtain bare proteins that fold appropriately by using prokaryote cells like Escherichia coli, and it is possible to obtain desired glycoproteins by conjugating with oligosaccharide and proteins precisely. Recently, it was reported that the Amadori rearrangement occurred between oligosaccharides and proteins in a sequence specific manner. Based on this report, I have investigated the effect of additives on the Amadori rearrangement reaction and acceleration of its reaction rate. The most striking result was that the effects of borate ion were depended upon chemical structure of sugars. For example, very large reaction rate using D-fructose was observed in phosphate buffer, although almost no reaction was observed in borate buffer. Investigation of sequence specificity of the Amadori rearrangement is under way.

研究分野：高分子化学

科研費の分科・細目：生体高分子

キーワード：糖タンパク質合成 酵素化学合成 アマドリ転移反応 配列特異的反応 高分子反応

## 1. 研究開始当初の背景

核酸、タンパク質、糖鎖等の生体高分子は、生命科学の発展と共にその重要性が次々に示されている。とりわけ、糖とタンパク質や糖と脂質のように、異種の生体分子間が結合してできた生体高分子の生命における存在意義や機能性分子としての可能性が注目されている。それは、これら生体高分子が複数の機能性分子の結合体であることから、複数の機能を示す分子として振る舞うことが期待できるからである。そのため、このような複合生体高分子の合成法の確立が急がれている。

しかしこういった異種生体分子同士を共有結合にて結合させることは容易ではない。それは、両者の分子量が大きいにもかかわらず、たった一点で結合させることが要求されるからである。通常、これら生体分子には、同じ官能基が大量にあることから、特定の部位で選択的に結合させることはきわめて困難である。

そのような困難な課題ではあるものの、化学選択的に結合を生じさせる官能基の組み合わせが少なからずある。それは、糖の還元末端にあるアルデヒド基と蛋白質上にあるアミノ基の組み合わせである。アルデヒド基はアミノ基と自発的に反応し、シッフ塩基を形成することはよく知られた事実である。糖の還元末端に存在するアルデヒド基は、どんな大きな分子量であっても一カ所しか存在しないことから、蛋白質のアミノ基を活用した糖蛋白質の合成反応はよく利用されている。しかしシッフ塩基は水溶液中で不安定であるために、還元アミノ化等でより安定な結合に変換することが行われる。しかしこの反応は、還元剤による蛋白質の化学修飾や変性などの問題があるので、蛋白質の機能を保持したい場合には不適である。従って、より簡便で、かつ、穏和な条件での蛋白質への糖鎖導入法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

前述の通り、糖蛋白質の合成法として、二糖類などの低分子オリゴ糖をアマドリ転位反応により導入し、その糖化蛋白質に対して酵素的配糖化をすることにより新規糖蛋白質を得る戦略は有効であることを示した。オリゴ糖をアマドリ転位反応にて、一段階で蛋白質へ導入する方法も考えられるが、オリゴ糖の分子量が大きくなるにつれて、還元末端のアルデヒド基は反応性が低下することから、アマドリ転位反応によるオリゴ糖鎖の直接導入は非効率となる。とりわけ、糖蛋白質に導入すべきオリゴ糖鎖は合成が限りなく困難であり、天然物からの抽出に頼っている現状を鑑みると、この2段階を経る方法は貴重な糖鎖のロスが少なく、効率的である。しかしながら当該方法の素反応であるアマドリ転位反応 酵素触媒高分子反応のい

れも収率が低い。当該方法で得られた新規糖蛋白質を材料として提供するためには、各段階いずれも収率を80%とする必要がある。また、導入位置や導入糖鎖数の制御も要求される。

これら問題点を改善する戦略として、本研究申請においては、

(1) アマドリ転位反応をより優先的に促進するアミノ酸配列を蛋白質の導入する事による糖化効率の向上

(2) 無保護の高分子量のオリゴ糖鎖の一段階活性及び酵素触媒高分子反応によるオリゴ糖鎖の利用効率の向上

の2点を達成することにより、糖蛋白質の精密ハイブリッド合成法を確立する

## 3. 研究の方法

### (1) アマドリ転位反応特異的アミノ酸配列の探索

アマドリ転位反応による糖化するアミノ酸としては第1級アミノ基を有するリジンがもっとも適している。その反応速度は隣接アミノ酸の影響を受けると考えられることから、その前後のアミノ酸を変えたトリペプチドをモデル系として、アマドリ転位反応の反応速度を比較し、特異配列を見いだす。

### (2) 糖活性化技術を活用したアマドリ化した各種蛋白質への糖鎖導入条件の検討

これまでに数々の活性化糖の合成を達成してきたが、酵素との相性についての検討は不十分である。適応可能な分子に関しての基礎データを得るために、5糖以上、もしくは、分岐を有するオリゴ糖の活性化条件を検討することと、活性化糖を用いた酵素反応の詳細を調べ、糖化蛋白質への配糖化のための基礎データを得る。

### (3) 新規糖蛋白質の機能評価

酵素などの球状タンパク質をはじめとして、コラーゲンのような繊維蛋白質まで本手法が適応可能か検討する。また、得られた糖蛋白質が、糖と蛋白質のおおのの機能をきちんと発揮できるかどうか、酵素活性の測定はゲル可能な評価を行うことによって検証する。

## 4. 研究成果

(1) 配列特異性解明のためのペプチドマッピング、(2) 糖化位置異性体の効率的な分離法の開発、(3) 糖化反応に対する緩衝液の影響、(4) 糖化物に対する酵素的配糖化反応の検討を行った。

(1) 配列特異性解明のためのペプチドマッピング。タンパク質上の糖化位置の配列特異性を解明するために、ペプチドマッピングを行った。MALDI-TOF MS 解析によりいくつかの断片の同定はできたが、糖化が最も進行すると予想されるペプチド断片のMS解析による検出ができず、配列特異性の解明には至らな

かった。

(2) 糖化位置異性体の効率的な分離法の開発。糖化位置異性体を分離するために、ホウ酸溶液を用いる陽イオン交換クロマトグラフィーを利用したところ、いくつかの異性体の分離が可能になった。しかし、上述のように位置異性体の構造は未解明である。

(3) 糖化反応に対する緩衝液の影響。ホウ酸緩衝液を用いて糖化反応を行ったところ、糖化反応がほとんどしない糖と向上する糖があることが明らかになった。これは、条件次第で糖化反応の制御が可能であることを意味する。

(4) 糖化物に対する酵素的配糖化反応。分離した糖化タンパク質の一つに酵素的糖化反応を行ったところ、所望の糖タンパク質を得ることができなかった。このことにより、酵素的配糖化反応においては、糖化された部位によっては糖受容体化を達成することは困難であると推定できる。また、非特異的な糖化反応も起きていたことから、糖化されやすい部位においては、活性化糖が非酵素的にタンパク質表面で共有結合形成が起こりうる可能性が示唆された。

以上、当初の計画通りにはならなかったものの、糖化反応に関する新しい知見が得られたことから、今後はこれら知見を元に複合糖質合成条件の最適化を図る。

## 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12件)

1. Direct introduction of detachable fluorescent tag at reducing end of oligosaccharides. Naoki Yoshida, Tsukasa Fujieda, Atsushi Kobayashi, Masaki Ishihara, Masato Noguchi, and Shin-ichiro Shoda. *Chemistry Letters*, 42, 1038-1039 (2013). DOI: 10.1246/cl.130379 査読あり

2. 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl  $\beta$ -D-glycosaminides: Novel Substrates for Transglycosylation Reaction Catalyzed by Exo- $\beta$ -D-glucosaminidase from *Amycolatopsis orientalis*. Tomonari Tanaka, Tomonori Wada, Masato Noguchi, Masaki Ishihara, Atsushi Kobayashi, Takayuki Ohnuma, Tamo Fukamizo, Ryszard Brzezinski, Shin-ichiro Shoda. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 31, 634-646 (2012) DOI:10.1080/07328303.2012.698437 査読あり

3. One-pot chemo-enzymatic route to chitoheptaose via specific transglycosylation of chitopentaose-oxazoline on chitinase-template. Naoki Yoshida, Tomonari Tanaka, Masato Noguchi,

Atsushi Kobayashi, Kumiko Ishikura, Tatsuya Ikenuma, Hiromu Seno, Takeshi Watanabe, Michinari Kohri, and Shin-ichiro Shoda. *Chemistry Letters*, 41, 689-690 (2012) DOI: 10.1246/cl.2012.689 査読あり

4. A Practical One-step Synthesis of 1,2-Oxazoline Derivatives from Unprotected Sugars and Its Application to Chemo-enzymatic

$\beta$ -N-Acetylglucosaminidation of Disialo-oligosaccharide. Masato Noguchi, Tsukasa Fujieda, Wei-Chun Huang, Masaki Ishihara, Atsushi Kobayashi, and Shin-ichiro Shoda. *Helvetica Chimica Acta*, 95, 1928-1936 (2012) DOI:10.1002/hlca.201200414 査読あり

5. A dimethoxytriazine type glycosyl donor enables facile chemo-enzymatic route toward  $\alpha$ -linked N-acetylglucosaminyl-galactose

disaccharide unit from gastric mucin. Masato Noguchi, Miwa Nakamura, Ayaka Ohno, Tomonari Tanaka, Atsushi Kobayashi, Masaki Ishihara, Masaya Fujita, Akiko Tsuchida, Mamoru Mizuno, and Shin-ichiro Shoda. *Chemical Communications*, 48, 5560-5562 (2012) DOI:10.1039/C2CC30946G 査読あり

6. Crystal structures of glycoside hydrolase family 51

$\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga maritima*. Do-Hyun. Im, Kei-ichi Kimura, Fumitaka Hayasaka, Tomonari Tanaka, Masato Noguchi, Atsushi Kobayashi, Shin-ichiro Shoda, Kentaro Miyazaki, Takayoshi Wakagi, and Shinya Fushinobu. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76, 423-428 (2012) DOI:10.1271/bbb.110902 査読あり

7. p-Nitrophenyl  $\beta$ -glycosides of  $\beta$ -1,4-gluco/xylo-disaccharides for the characterization of subsites in endo-xylanases.

Mamoru Nishimoto, Atsushi Kobayashi, Yuji Honda, Motomitsu Kitaoka, and Kiyoshi Hayashi. *Journal of Applied Glycoscience*, 58, 115-118 (2011) DOI:10.5458/jag.jag.JAG-2010\_024 査読あり

8. Direct dehydrative pyridylthio-glycosidation of unprotected sugars in aqueous media using 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride as a condensing agent.

Naoki Yoshida, Naoya Aida, Masato Noguchi, Tomonari Tanaka, Takeshi Matsumoto, Masaki Ishihara, Atsushi Kobayashi, and Shin-ichiro Shoda. *Chemistry An Asian Journal*, 6, 1876-1885 (2011) DOI:10.1002/asia.201000896 査読あり

9. Synthesis of non-natural xyloglucans by polycondensation of 4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl oligosaccharide monomers catalyzed by endo- $\beta$ -1,4-glucanase. Tomonari Tanaka, Masato Noguchi, Masaki Ishihara, Atsushi Kobayashi, and Shin-ichiro Shoda. *Macromolecular Symposia*, 297, 200-209 (2010). DOI:10.1002/masy.200900083 査読あり

10. Novel dialkoxytriazine-type glycosyl donors for cellulase-catalyzed lactosylation. Tomonari Tanaka, Masato Noguchi, Kei-ichi Watanabe, Takuya Misawa, Masaki Ishihara, Atsushi Kobayashi, and Shin-ichiro Shoda. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8, 5126-5132 (2010) DOI:10.1039/C0OB00190B 査読あり

11. Efficient transfer of sialo-oligosaccharide onto proteins by combined use of a glycosynthase-like mutant of *Mucor hiemalis* endoglycosidase and synthetic sialo-complex-type sugar oxazoline. Midori Umekawa, T. Higashiyama, Y. Koga, T. Tanaka, M. Noguchi, Atsushi Kobayashi, S. Shoda, Wei Huang, Li-Xi Wang, Hisashi. Ashida, and Kenji Yamamoto. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects*, 1800, 1203-1209 (2010). DOI:10.1016/j.bbagen.2010.07.003 査読あり

12. 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazine oligoxyloglucans: Novel one-step preparable substrates for studying action of endo- $\beta$ -1,4-glucanase III from *Trichoderma reesei*. Atsushi Kobayashi, Tomonari Tanaka, K. Watanabe, Masaki Ishihara, Masato Noguchi, H. Okada, Yasushi Morikawa, and Shin-ichiro Shoda. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20, 3588-3591 (2010). DOI:10.1016/j.bmcl.2010.04.122 査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

1. タンパク質と各種還元糖のアミノカルボニル反応に対するホウ酸塩の影響、小林厚志、酒井健介、吉田尚生、正田晋一郎、日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、平成 26 年 3 月 27 日
2. Engineering on Glycoconjugates through Chemo-enzymatic Process, 小林厚志、岩手大学 拠点形成・重点研究、岩手大学工学部、平成 26 年 2 月 20 日 (招待)
3. Enzymatic Introduction of Oligosaccharide into Protein via the Amadori Rearrangement, Atsushi Kobayashi, International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku

Branch of the Chemical Society of Japan, 東北大学片平キャンパス、平成 25 年 9 月 29 日(依頼講演)

4. EFFECTIVE CHEMO-ENZYMATIC SYNTHESIS OF GLYCOPROTEIN FROM HEN EGG LYSOZYME VIA THE AMADORI REARRANGEMENT, Naoki Yoshida, Kensuke Sakai, Atsushi Kobayashi, Shin-ichiro Shoda 17th European Carbohydrate Symposium, 2013 年 7 月 7 日~7 月 11 日、テルアビブ、イスラエル
5. アマドリ転位反応を經由する化学 酵素法により生成した人工糖タンパク質の解析、吉田尚生、酒井謙介、小林厚志、正田晋一郎、日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学、平成 25 年 3 月 26 日
6. 分子量制御を可能にする化学-酵素法による人工糖タンパク質合成プロセス、小林厚志、平成 24 年度東北地区先端高分子セミナー、秋田県仙北市、平成 25 年 3 月 3 日(招待)
7. アマドリ転位反応を經由するタンパク質への化学酵素的糖鎖導入プロセス、小林厚志、吉田尚生、酒井謙介、相沢健太、正田晋一郎、応用糖質科学会 2012 年度大会、東京農工大学、平成 24 年 9 月 19 日
8. タンパク質への酵素的糖鎖導入のための足場分子 3 デオキシオリゴ糖の合成、小林厚志、熊谷雄志、正田晋一郎、日本化学会年会、慶応義塾大学、平成 24 年 3 月 26 日
9. 糖タンパク質合成を指向するアマドリ転位反応高効率化戦略、小林厚志、熊谷雄志、相沢健太、正田晋一郎、第 60 回高分子討論会、岡山大学、平成 23 年 9 月 30 日
10. 高選択的なアマドリ転位反応制御を可能にする還元糖の合成、熊谷雄志、小林厚志、正田晋一郎、化学系学協会東北大会、東北大学、平成 23 年 9 月 17 日
11. 糖タンパク質合成のためのアマドリ転位反応高効率化戦略、小林厚志、熊谷雄志、正田晋一郎、第 91 日本化学会春期年会、神奈川大学、平成 23 年 3 月 27 日
12. 水溶性脱水縮合剤を活用する高分子量オリゴ糖のラベル化、小林厚志・永井光・田中知成・石原正規・野口真人・正田晋一郎、第 59 回高分子討論会、北海道大学、平成 22 年 9 月 15 日(依頼)

〔図書〕(計 4 件)

1. 分子量のそろった糖タンパク質をつくる。[有機合成化学協会誌, 71(12),

(2013), 1252-1258]正田晋一郎、小林厚志、野口真人

2. 酵素利用技術大系～基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで～. 第5編 酵素を操る、第1章 酵素を使った物質合成、第3節 糖鎖分解酵素を用いた糖鎖合成、 [NTS, (2010) 408-413]正田晋一郎、小林厚志、野口真人
3. 食べ物の化学から発展していく糖鎖工学. [化学同人 化学, 65(6), (2010), 29-32]小林厚志・正田晋一郎
4. 糖の特性を活用する酵素触媒配糖化反応. [化学工業社 化学工業, (2010) 1-8]小林厚志

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

特記すべき項目はなし

## 5. 研究組織

### (1)研究代表者

小林 厚志 (Atsushi Kobayashi)  
東北大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：90361138