

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880033

研究課題名（和文）糖鎖機能解明を指向した均一な糖鎖構造を有する糖タンパク質合成法の開発

研究課題名（英文）Development of the synthetic method of glycoproteins with homogenous glycan structure oriented toward functional analysis of glycans

研究代表者

片山 秀和 (KATAYAMA, HIDEKAZU)

東海大学 工学部・講師

研究者番号：30580857

研究成果の概要（和文）：ペプチド固相合成に有用な新規 Cys 残基側鎖保護基の開発を行った。その結果、新規保護基である Pocam 基の有用性を明らかにすることができた。一方、大腸菌発現系を用いたネオ糖タンパク質の合成研究においては、大腸菌による組換えタンパク質発現系によって、側鎖に特殊な官能基を配した Lys 誘導体をタンパク質中に組込むことに成功した。さらに、新規な翻訳後修飾である S-結合型糖鎖を有する糖ペプチドの化学合成を、世界に先駆けて達成した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to develop a novel thiol protecting group which was useful for protecting Cys side chain. As a result, Pocam group could be designed, synthesized and used for solid-phase peptide synthesis and peptide condensation reactions. On the other hand, we tried to synthesize neo-glycoproteins by the combination of bacterial recombinant protein expression system and *in vitro* glycosylation reaction. As a result, we could prepare a recombinant protein containing a specific functional group. A glycopeptide carrying S-linked glycan which was recently found as a novel post-translational modification was chemically synthesized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,080,000	324,000	1,404,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,340,000	702,000	3,042,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：有機化学、ペプチド化学

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする脊椎動物では、その生体内に存在するタンパク質の多くが、タンパク質特異的な翻訳後修飾を受けることが知られている。翻訳後修飾の一つである糖鎖付加は、そのタンパク質の生体内における安定性を高める効果があるなど、多くの機能を担っているが、その糖鎖の詳細な機能が調べられた例はあまり多くない。その原因の一つと

して、糖鎖構造の不均一性の問題がある。

糖タンパク質に付加した糖鎖は、細胞内で様々に切断／伸長の反応が行われるため、通常、均一な構造を有していない。糖鎖の機能を解析する上で、糖鎖構造と機能との関係を調べる、いわゆる構造活性相関研究が不可欠であるが、その不均一性が障壁となり、糖鎖のどのような構造が機能に関与しているのかという点まで、なかなか到達できないのが

現状である。

## 2. 研究の目的

### (1) 大腸菌発現系によるネオ糖タンパク質合成法の開発

均一な構造の化合物を得る方法の一つとして、化学合成がある。糖タンパク質の化学合成は従来より、ペプチド固相合成と固相合成によって得られたペプチド同士の縮合反応との組み合わせにより達成されてきた。しかし、従来の方法論では、十分に効率的とはいえないのが現状である。例えば、糖タンパク質合成に用いる糖鎖部分も化学合成する必要があるが、従来法では、合成した糖鎖をアミノ酸に導入し、その糖アミノ酸を固相合成に用いていた。しかしこの方法では、固相合成によりペプチド鎖を伸長するごとに徐々に収率が低下するため、長いペプチド鎖を合成すると、合成した糖鎖の大部分が無駄になってしまうという大きな問題点を抱えている。一方、合成されたペプチド鎖に何らかの方法で糖鎖を導入することが可能となれば、その問題点を解決することが可能となる。

単純なポリペプチド鎖は、大腸菌を宿主とした組換えタンパク質発現系によって調製することができるが、糖タンパク質を発現することは非常に困難である。最近になって、古細菌の pyrrolysyl-tRNA 合成酵素(PylRS)およびそれに対応する tRNA を利用した、異常アミノ酸の組換えタンパク質への導入方法が報告された。Pyrrolysine は、一部の細菌および古細菌が、ある条件下において翻訳レベルにおいて停止コドン部位に導入することが報告された 22 番目の天然アミノ酸である。この方法を利用すれば、通常のタンパク質には見られない特殊な官能基を組換えタンパク質に導入することが可能になると期待される。そこで本研究では、細菌の一種 *Desulfitobacterium hafniense* の PylRS および tRNA を利用して、大腸菌発現系による組換えタンパク質への特殊官能基の導入を目指すこととした。

### (2) ペプチド固相合成に有用な新規 Cys 残基保護基の開発

固相合成によって得られたペプチドを縮合する反応の改善を行うこととした。ペプチドセグメント縮合法の一つであるチオエステル法は、ペプチドの C 末端に配したチオエステル基を選択的に活性エステルへと導いた後に、もう一方のペプチドの N 末端アミノ基と縮合する方法である。この方法では Lys 残基側鎖および Cys 残基側鎖に保護基を必要とする。従来より Cys 残基側鎖保護基として Acm 基が用いられてきたが、脱保護反応の操作が煩雑であるという問題点があった。そこ

で、Lys 残基側鎖保護基であるアジド基の脱保護条件においてははずすことが可能な、新規 Cys 残基保護基の開発を行うこととした。

### (3) S-結合型糖ペプチド sublancin の化学合成

ペプチド/タンパク質の翻訳後修飾の一つとして、糖鎖の付加がある。糖鎖付加の様式として従来より、Asn 残基側鎖に結合している N-結合型糖鎖、Ser/Thr 残基側鎖に結合している O-結合型糖鎖、Trp 残基側鎖に結合している C-結合型糖鎖が知られていたが、最近になって、Cys 残基側鎖に結合している S-結合型糖鎖が一部のグラム陽性細菌に存在することが報告された。本研究では、枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来の S-結合型糖ペプチド sublancin の化学合成を行うことによって、S-結合型糖鎖を含むペプチドの合成法を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸菌発現系によるネオ糖タンパク質合成法の開発

*D. hafniense* 由来の PylRS をコードする遺伝子、およびそれに対応する tRNA 遺伝子をそれぞれ大腸菌用発現ベクターに挿入した。また、変異を導入することによって塩基配列中に停止コドンが存在する GST 遺伝子の配列を、同様に発現用ベクターに挿入した。これらの発現用プラスミドを用いて、*E. coli* Rosetta2(DE3)株を形質転換した。得られた大腸菌を培養し、種々のアミノ酸誘導体を培地に添加した上で、組換えタンパク質の発現を誘導した。培養後、大腸菌の菌体を超音波によって破碎し、抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、GST タンパク質の発現を確認した。

### (2) ペプチド固相合成に有用な新規 Cys 残基保護基の開発

酸性条件下、亜鉛粉末による還元反応によって脱保護される保護基として、カルボキシル基の保護基である Pac 基が知られている。この構造を模倣して、同還元条件によって脱保護可能なチオール保護基である Pocam 基を開発した。

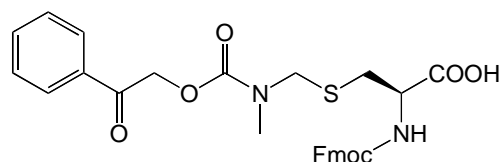


図 1. Fmoc-Cys(Pocam)-OH の化学構造。

この保護基を有する図 1 に示した Cys 誘導体を化学合成し、これを常法によるペプチド固相合成法によってペプチド鎖に導入した。

得られたペプチドを、チオエステル法によるペプチドセグメント縮合反応に供した後に、亜鉛粉末を用いた還元反応による脱保護、酸化による Cys 残基間のジスルフィド結合形成反応を行った。一連の反応を行っていくことによって、昆虫由来の growth blocking peptide (GBP) およびイモガイの毒性分の一種である  $\alpha$ -conotoxin SI の合成を行った。

(3) S-結合型糖ペプチド sublancin の化学合成  
Sublancin には、Glucose が Cys 残基側鎖 S 原子に  $\beta$  結合していることが明らかにされている。そこでまず、Glucose を側鎖に導入した Cys 誘導体を化学合成し、その Cys 誘導体を用いて常法によるペプチド固相合成を行うことによって、sublancin 配列を有する保護ペプチド樹脂を得た。

樹脂からの切り出し後、分子内に存在する 2 対のジスルフィド結合を位置選択的に順次架橋していることによって、天然型の構造を有する sublancin の化学合成を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 大腸菌発現系によるネオ糖タンパク質合成法の開発

*D. hafniense* の PylRS は、酵素学的な *in vitro* の解析によって、種々の Lys 誘導体を基質として認識し、tRNA に導入する活性を示した。この結果は、古細菌の PylRS の酵素学的解析結果と矛盾が無く、PylRS の基質特異性は、細菌と古細菌とは差異が無いことが明らかにされた。

PylRS および tRNA 遺伝子を用いた組換えタンパク質発現系の実験において、*in vitro* で基質として認識されたアミノ酸は、*in vivo* においても基質となり、いくつかの非天然アミノ酸を組換えタンパク質に導入することに成功した。中でも、Lys 残基側鎖にアルキン基を導入した *N*-propargyloxycarbonyl-lysine (図 2) は、その反応性の観点から、糖鎖導入反応によるネオ糖タンパク質化学合成に有用であることが考えられる。現在のところ、異常アミノ酸を含有する組換えタンパク質の発現量が充分ではないが、発現系を改善することによって効率的なネオ糖タンパク質合成系の確立ができるものと期待される。

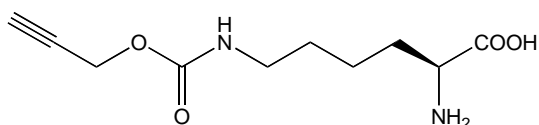


図 2. *N*-propargyloxycarbonyl-lysine の構造。

本研究によって得られた成果は、古細菌を用いた研究結果と類似しているが、比較生物学的な観点から有用性があると考えられると同時に、古細菌の系の代替としての可能性も考えられる。すなわち、古細菌の

PylRS-tRNA を用いた系で困難であったものでも、本研究で用いた細菌のものを利用することによって可能になることも考えられる。今後のさらなる技術革新によって、本成果が有効に利用されることを期待したい。

(2) ペプチド固相合成に有用な新規 Cys 残基保護基の開発

Cys 残基側鎖の保護基として有用な、Pocam 基の開発に成功した。この保護基は、ペプチド固相合成法の各段階における種々の反応条件、およびチオエステル法によるペプチドセグメント縮合反応の条件下においてすぐれた安定性を示した。その一方で、酸性条件下における亜鉛粉末を用いた還元反応によって容易に、かつ副反応を伴うことなく脱保護することが可能であった。この保護基を利用してモデル実験を行い、GBP および  $\alpha$ -conotoxin SI の合成を達成することができた。

この保護基は酸性条件下、亜鉛粉末を用いた還元反応によって脱保護できる一方、チオールやホスフィン、シラン等の還元試薬の存在下においては非常に高い安定性を示した。このような特性を有する Cys 残基側鎖保護基はこれまでに報告が無く、非常に新規性、有用性の高い保護基であると考えられる。一方、酸性条件においてやや不安定であり、酸処理を 50°C で行うと短時間で脱保護されることも見いだされた。

ペプチド/タンパク質の化学合成において、種々の Cys 残基側鎖保護基を用いて、位置選択的なジスルフィド結合形成反応を行うことが重要なステップとなる。本研究で開発された保護基は、上記のように従来には無い特性を有しており、選択的ジスルフィド結合形成においても有用であることが期待される。実際、 $\alpha$ -conotoxin SI の化学合成において、2 対のジスルフィド結合を選択的に架橋することができた。今後、応用例を積み重ねていくことによって、より大きな Cys 残基に富むペプチド/タンパク質の化学合成に展開されることが望まれる。

(3) S-結合型糖ペプチド sublancin の化学合成

Sublancin を、図 3 に示すスキームに従って化学合成した。Cys 残基側鎖に glucose を有する誘導体 Fmoc-Cys(GlcAc<sub>4</sub>)-OH を合成し、それを固相合成法によってペプチド鎖に導入した。脱保護後、順次ジスルフィド結合を形成することによって、高収率で sublancin を得ることができた。これは、S-結合型糖鎖を有する天然型糖ペプチドの世界初の合成例である。

本研究の成果を論文として報告した後、海外の研究グループより sublancin の化学合成が報告されている。本研究で採用した方法は、

その報告よりも合成の工程数が少なく操作が簡便である点において、より優れているものと考えている。また、本研究において、S-結合型糖鎖の種々の化学合成反応条件下における安定性が示されたことによって、今後のさらなる S-結合型糖ペプチドの化学合成研究に展開されることが期待される。

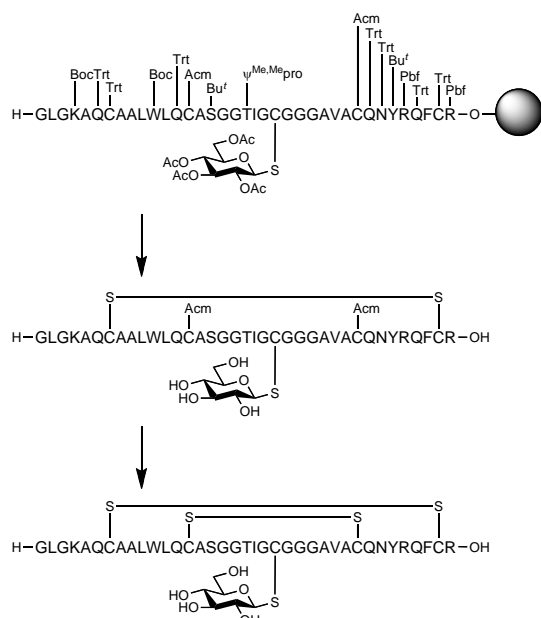


図 3. Sublancin の合成スキーム。

#### 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 6 件)

- (1) Hidekazu Katayama, Kayo Nozawa, Osamu Nureki, Yoshiaki Nakahara, Hironobu Hojo. Pyrrolysine analogues as substrates for the bacterial pyrrolysyl-tRNA synthetase *in vitro* and *in vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2012) **76**, 205-208. 査読有.
- (2) Hidekazu Katayama, Yuya Asahina, Hironobu Hojo. Chemical synthesis of the S-linked glycopeptide, sublancin. *J. Peptide Sci.* (2011) **17**, 818-821. 査読有.
- (3) Hironobu Hojo, Hajime Kobayashi, Risa Ubagai, Yuya Asahina, Yuko Nakahara, Hidekazu Katayama, Yukishige Ito, Yoshiaki Nakahara. Efficient preparation of Fmoc-aminoacyl-N-ethylcysteine unit, a key device for the synthesis of peptide thioesters. *Org. Biomol. Chem.* (2011) **9**, 6807-6813. 査読有.
- (4) Hidekazu Katayama, Yoshiaki Nakahara, Hironobu Hojo. N-Methy-phenacyloxycarbamidomethyl (Pocam) group: a novel thiol protecting group on the

solid-phase peptide synthesis and the peptide condensation reactions. *Org. Biomol. Chem.* (2011) **9**, 4653-4661. 査読有.

- (5) Hironobu Hojo, Hidekazu Katayama, Chiharu Tano, Yuko Nakahara, Azusa Yoneshige, Junko Matsuda, Yohei Sohma, Yoshiaki Kiso, Yoshiaki Nakahara. Synthesis of the sphingolipid activator protein, Saposin C, using an azido-protected O-acyl isopeptide as an aggregation-disrupting element. *Tetrahedron Lett.* (2011) **52**, 635-639. 査読有.
- (6) Hironobu Hojo, Chinatsu Ozawa, Hidekazu Katayama, Akiharu Ueki, Yuko Nakahara, Yoshiaki Nakahara. The mercaptomethyl group facilitates an efficient one-pot ligation at Xaa-Ser/Thr for (glyco)peptide synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2010) **49**, 5318-5321. 査読有.

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 片山秀和、朝比奈雄也、北條裕信. *Bacillus subtilis* 由来 S-結合型糖ペプチド sublancin の化学合成. 日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都女子大学)、2012 年 3 月 23 日
- (2) 片山秀和、朝比奈雄也、北條裕信. S-結合型糖ペプチド sublancin の化学合成. 第 48 回ペプチド討論会 (札幌コンベンションセンター)、2011 年 9 月 27 日
- (3) 片山秀和、北條裕信. 糖ペプチドセグメント縮合反応におけるラセミ化度の検討. 日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都女子大学)、2011 年 3 月 27 日
- (4) Hidekazu Katayama, Yoshiaki Nakahara, Hironobu Hojo. Development of a novel thiol protecting group on the solid phase peptide synthesis and the peptide condensation reaction. 5<sup>th</sup> International Peptide Symposium (京都国際会館)、2010 年 12 月 9 日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 秀和 (KATAYAMA, Hidekazu)

東海大学 工学部・講師

研究者番号：30580857