

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23245037

研究課題名(和文)複合型糖鎖をもつ糖タンパク質の人工精密化学合成を用いる糖鎖機能解明の系統的研究

研究課題名(英文)Chemical Synthesis of glycoproteins having complex type oligosaccharides and elucidation of oligosaccharide functions

研究代表者

梶原 康宏(Kajihara, Yasuhiro)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50275020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,700,000円、(間接経費) 10,110,000円

研究成果の概要(和文)：単一構造のヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質合成を目的とし、3本のシアリル糖鎖を天然型の位置にもつエリスロポエチンの全長構築に成功した。シアル酸結合レクチンシグレック7の化学合成に成功しその基質特異性を調べた。大腸菌で、標的糖タンパク質のペプチドセグメント2つを融合タンパク質として発現し、化学的修飾を施したあと、化学合成した糖鎖ペプチドチオエステルと連結することでインターロイキン13の合成に成功した。鶏卵から単離した2分枝ヒト型糖鎖を化学的に修飾し糖鎖を付加させることで天然型の3分枝型糖鎖の半化学合成に成功した。ヒトIgG1のFcモノマーの全長の合成を検討し成功しFc体の全合成に見通しをつけた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate oligosaccharide functions, chemical synthesis of homogeneous glycoprotein was examined. For the synthesis of target glycoproteins, full-length glycosylpolypeptide chains was designed to divide into several segments and these were prepared by our improved and safe tert-Bo c-SPPS. Glycopeptide-alpha-thioester and peptide-alpha-thioesters thus obtained were successfully coupled by repetitive native chemical ligation. Subsequent folding experiments of chemically synthesized homogeneous glycopeptide yielded correctly folded glycoproteins with native disulfide bond patterns. Using this method, erythropoietin, chemokine and lectin were successfully synthesized.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学

キーワード：糖鎖 糖タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

細胞表面、血液中のほぼ全てのタンパク質は糖鎖を持っている。これら糖鎖は、タンパク質の構造安定性、輸送、細胞間分子認識に必須の分子である。しかし、研究に用いる糖タンパク質は、細胞発現法でのみ得られ、得られる糖タンパク質の糖鎖構造は常に不均一であるために、どのような構造の糖鎖がタンパク質機能発現に必要なか調べるのが困難であった。また、大手製薬会社でも、糖鎖のタンパク質への付加数を増やすなどして薬効を高める研究がなされて来たが、未だ糖鎖機能を解明する学術的な基礎研究は遅れ、創薬事業支援も十分でない。このような問題を解決するために本申請者は、糖鎖構造を制御して糖タンパク質を精密に化学合成することを 2000 年より検討してきた。糖タンパク質の化学合成で鍵となるのは、入手困難なヒト型糖鎖を必要量用意することと、糖ペプチドを連結して標的糖タンパク質の全ペプチド鎖を調製することである。幸い、本申請者は卵黄からグラムスケールで単離できるヒトの完全型糖鎖を利用し、保護基を多用しない糖鎖ペプチドの固相合成法を確立した (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003)。そしてペプチドの連結には、native chemical ligation (NCL; 下図) を利用した。本申請者は、これら方法を組み合わせることで、フォールディングし、かつヒト複合型のシリアル糖鎖をもつ糖タンパク質ケモカインをはじめ化学合成することに成功した (*J. Am. Chem. Soc.* 2008)。また、糖鎖を持つペプチド鎖は化学的に、糖鎖を持たないペプチド鎖は、大腸菌発現を用いてそれぞれ調製後、それらを連結し、ペプチド主鎖の折りたたみをすることで、市販品のエリスロポエチンと同等の細胞増殖活性を *in vitro* で持つエリスロポエ

チン誘導体の合成に成功した (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009)。これにより単一構造の糖タンパク質製剤誘導体の合成に世界ではじめて成功した。これにより、糖タンパク質の合成、ならびに、核磁気共鳴装置による糖タンパク質構造解析をすることで、糖タンパク質を低分子有機合成と同様に、精密有機合成の対象になるよう検討することを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、Boc 法による新規糖ペプチドチオエステル合成法を利用して、ヒト型糖鎖をもつ高純度の糖タンパク質を 20-50mg 調製できる精密な有機化学合成をおこなう。そして 1) 合成糖タンパク質の NMR による構造解析、2) 糖鎖の分岐数など構造を改変した糖タンパク質の合成、3) 合成糖タンパク質の糖鎖構造に依存したマウス体内での動態の追跡、4) 細胞から単離したゴルジ装置に合成糖タンパク質を導入しその挙動を調べるといった系統的なタンパク質の糖鎖機能解明の研究をおこなう。

## 3. 研究の方法

卵黄より調製したヒト型糖鎖と改良 Boc 法を組み合わせる様々な糖タンパク質の合成をおこなう。標的糖タンパク質 (アミノ酸 150 残基程度) を、糖鎖を含む 5 つ程度のペプチドチオエステルセグメントに分けて改良 Boc 法で合成後、native chemical ligation 法で連結して標的糖タンパク質全長の合成 (50 mg 程度) を目指す。そしてフォールディング操作後精製し、3次元構造を形成した単一構造の糖タンパク質を得る。次にこのサンプルを用いて NMR による 3次元構造解析を行い、糖鎖構造がタンパク質の構造に与える効果を調べる。また、得られた糖タン

パク質は、トリプトファン誘導体の蛍光標識体でトリプトファンの位置で標識し、天然の糖タンパク質に近い化学構造の標識体を合成し、体内動態へ与える影響を調べる。そして、ラット肝臓からショ糖の密度勾配を用いる超遠心法により単離するゴルジ装置画分に合成した糖タンパク質を加え、タンパク質毎にどのような糖鎖伸長が起こるか分析し、ゴルジ装置内での糖鎖伸長因子を探る。

#### 4. 研究成果

糖タンパク質を化学合成するために必要な糖ペプチドチオエステルの簡便な合成を検討し、適応困難と思われていた強酸を用いる Boc 法によりシアリル糖ペプチドチオエステルを合成することに成功した。まず、最も特筆すべきことはシアル酸が酸に非常に不安定であるという理由を特定したことである。シアル酸はグリコシル位の隣がデオキシであるために酸に不安定と考えられてきたが、シアル酸のもつカルボキシル基が分子内酸触媒として働くことが原因であることを見出した。その結果、このカルボキシル基を酸に安定なフェナシル基で保護することで強酸条件でも安定なシアリル糖鎖を得ることに成功した。この方法をシアリル糖鎖アスパラギンに応用し、ペプチドチオエステルを最も得られる Boc 法によるシアリル糖鎖ペプチドチオエステルの合成を検討することにした。この方法では、PEGA 樹脂にチオールをもつリンカーを固定化し、通常の Boc 法で、フェナシル基で保護したシアリル糖鎖-アスパラギンも含めペプチドを伸長した。そして、固相上でペプチド側鎖の保護基をトリフルオロメタンスルホン酸で除去し、そして緩衝溶液中でのチオリシスにより従来の HF を

使うことなくシアリル糖鎖ペプチドチオエステルを安全に得る方法を確立した。この方法が成功したことで 83 位にシアリル糖鎖をもつエリスロポエチンの全合成に成功した (Angew Chem. Int. Ed. 2012, 51, 3567)。この手法は更に 3 種類のエリスロポエチン誘導体の合成に応用できたとともに、3 本のヒト型シアリル糖鎖を天然型の位置 3 カ所にもつエリスロポエチンの全長構築に成功した (論文準備中)。どのような方法を用いて、アミノ酸 120 残基からなるシアル酸結合レクチンシグレック 7 の化学合成に成功した。このシグレックは ELISA をつかって基質特異性を調べた結果、本来の基質であるジシアロ糖鎖には結合するがモノシアロ糖鎖には結合しないことが確認できた (投稿準備中)。これにより、糖鎖を認識するレクチンの人工合成にはじめて成功した。大腸菌で、融合タンパク質として発現し、それを化学的に切断、活性化させることで標的糖タンパク質の N 末端のペプチドチオエステルと、C 末端側のペプチドを調製することに成功した。そして化学的に調製した糖鎖ペプチドチオエステルと連結することで簡便にインターロイキン 13 の合成に成功した (投稿中)。鶏卵から単離した 2 分枝ヒト型糖鎖を化学的に修飾することで 24 個の水酸基のうち特異的な位置の水酸基を遊離としそこに糖鎖を付加させることで天然型の 3 分枝型糖鎖の半化学合成に世界ではじめて成功した (投稿準備中)。また、この糖鎖に酵素を用いて、シアル酸を 2 種類の結合様式で連結させることに成功した。ヒト IgG1 の Fc モノマーの全長の合成も検討した。全長 300 残基の N 末端 (ヒンジ部位のシステイン) から # 残基を 3 つのセグメントにわけて Fmoc 法により

合成し、#位からC末端を大腸菌発現により調製し、C末端側から順次NCLにより連結し、Fc全長を得、質量分析、HPLCでその構造を確認した。プロテインジスルフィドイソメラーゼを共存させたフォールディング実験で目的とする2本ジスルフィド結合を形成したFcモノマーを得ることができ、Fc体の全合成に見通しをつけた。しかし、Fmoc法では、各ペプチド、糖ペプチドの量産ができずBoc法による方法での検討の余地がある。また、最後のFcフラグメントのフォールディング、および2量化は今後の課題である。

## 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8件)

- 1) R.Okamoto, M. Kimura, T. Ishimizu, M. Izumi, Y. Kajihara, A semisynthesis of post-translationally modified protein using chemical cleavage and activation of an expressed fusion polypeptide. *Chem. Eur. J.* in press (査読あり)
- 2) M. Izumi, M. Murakami, R. Okamoto, Y. Kajihara, Safe and efficient Boc-SPPS for the synthesis of glycopeptide- $\alpha$ -thioesters. *J. Pept. Sci.* 2014, 20, 98-101. (査読あり)
- 3) M. Izumi, T. Kiuchi, Y. Ito, Y. Kajihara Misfolded glycoproteins as probes for analysis of folding sensor enzyme UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 2013, 25, 1-12. (査読あり)
- 4) C. Unverzagt, Y. Kajihara, Chemical assembly of N-glycoproteins: a refined toolbox to address a ubiquitous posttranslational modification, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 4408-4420. (査読あり)

- 5) M. Murakami, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, Chemical Synthesis of an Erythropoietin Glycoform Containing a Complex-type Disialyloligosaccharide. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 3567-3572. (査読あり)
- 6) R. Okamoto, K. Morooka, Y. Kajihara, A synthetic approach to a peptide  $\alpha$ -thioester from unprotected peptide through cleavage and activation of a specific peptide bond by N-acetylguanidine, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 191-196. (査読あり)
- 7) Y. Kajihara, Y. Tanabe, S. Sasaoka, R. Okamoto, Homogeneous human complex type oligosaccharides in correctly folded intact glycoproteins: evaluation of the oligosaccharide influence on protein-folding, -stability, and -conformational properties. *Chem. Eur. J.* 2012, 18, 5944-5953. (査読あり)
- 8) Y. Kajihara, M. Izumi, K. Hirano, T. Murase, D. Macmillan, R. Okamoto. Elucidating the Function of Complex-Type Oligosaccharides by Use of Chemical Synthesis of Homogeneous Glycoproteins. *Israel Journal of Chemistry*, 2011, 51 917-929. (査読あり)

[学会発表](計17件)

- 1) Kajihara Y., Chemical synthesis of misfolded and correctly folded glycoprotein. 27<sup>th</sup> International Carbohydrate symposium, India, Bangalore, 2014, January 12-17. (招待講演)
- 2) Kajihara Y. Chemical Synthesis of Homogeneous Erythropoietin bearing M9-highmannose type oligosaccharide: A Unique Approach for the Study of Glycoprotein Quality Control, Chemical Protein synthesis meeting, Vienna, Wien, 2013, April3-6 (招待講演)

- 3) Kajihara Y. Homogeneous Glycoproteins: Design, Chemical Synthesis and Biological Evaluation. 26<sup>th</sup> International Carbohydrate symposium, Spain, Madrid, 2012, July 22-27. (招待講演)
- 4) Synthetic Synthesis of Homogeneous Erythropoietin Analogs Bearing a High Mannose-type Oligosaccharide and the Functional Analysis of Folding Sensor Enzyme UGGT、木内達人、岡本亮、和泉雅之、瀬古玲、伊藤幸成、梶原康宏、日本化学会第 94 回春季年会、2014 年 3 月 27-30 日、名古屋大学、名古屋
- 5) 均一な構造のハイマンノース型糖鎖を持つエリスロポエチンの合成、木内達人、岡本亮、和泉雅之、伊藤幸成、梶原康宏、日本化学会第 93 回春季年会、2013 年 3 月 22-25 日、立命館大学、滋賀
- 6) 均一な構造のハイマンノース型糖鎖を持つエリスロポエチンの合成<sup>1)</sup>、木内達人、牧村裕、岡本亮、和泉雅之、瀬古玲、迫野昌文、金森審子、伊藤幸成、梶原康宏、第 32 回日本糖質学会年会、2013 年 8 月 5-7 日、大阪
- 7) 天然由来の二分枝アシアロ糖鎖を利用する三分枝シアリル複合型糖鎖の合成<sup>2)</sup>、真木勇太、岡本亮、和泉雅之、山本岳、梶原康宏、第 32 回日本糖質学会年会、2013 年 8 月 5 日、大阪
- 8) 天然から単離した N 結合型糖鎖を用いる高分岐複合型糖鎖の合成研究<sup>3)</sup>、真木勇太・岡本亮・梶原康宏、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 28 日、神奈川
- 9) 天然から単離した N-結合型糖鎖を用いる高分岐複合型糖鎖の合成研究、真木勇太、岡本亮、和泉雅之、梶原康宏、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 19 日、鹿児島
- 10) Chemical Synthesis of an Erythropoietin Glycoform Containing a Complex-Type Disialyloligosaccharide、村上真淑、岡本亮、和泉雅之、梶原康宏、第 26 回国際糖質学会、2012 年 7 月 25 日、マドリード (スペイン)
- 11) 新規シアリル糖ペプチドチオエステル合成法を基盤としたシアリル糖タンパク質の合成、村上真淑、和泉雅之、岡本亮、梶原康宏、第 92 回日本化学会春季年会、2012 年 3 月 25-28 日、神奈川
- 12) Synthetic Study of Erythropoietin Glycoforms Containing Three Complex-type Disialyloligosaccharides、村上真淑、岡本亮、和泉雅之、梶原康宏、ゴードンリサーチカンファレンス、2012 年 7 月 25 日、バーモント (アメリカ)
- 13) Boc 法を利用する糖タンパク質エリスロポエチン誘導体の合成研究<sup>4)</sup>、木内達人、村上真淑、岡本亮、梶原康宏、第 13 回関西グライコサイエンスフォーラム、2012 年 5 月 19 日、大阪市立大学、大阪
- 14) A SYNTHETIC STUDY ON ERYTHROPOIETIN GLYCOFORM CONTAINING HIGH-MANNOSE TYPE OLIGOSACCHARIDE、木内達人、岡本亮、牧村裕、和泉雅之、伊藤幸成、梶原康宏、26th International Carbohydrate Symposium, 2012 年 7 月 22-27 日、スペイン
- 15) ハイマンノース型糖鎖を有するエリスロポエチンの合成研究<sup>5)</sup>、木内達人、岡本亮、牧村裕、和泉雅之、伊藤幸成、梶原康宏、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 17-20 日、鹿児島

16) Boc 固相合成法を用いたヒト複合型  
シアリル糖鎖を持つ糖ペプチドチオ  
エステルの新規合成法、村上真淑、岡  
本亮、梶原康宏、第 12 回関西グライ  
コサイエンスフォーラム、2011 年 5  
月 14 日、大阪

17) Boc 固相合成法を用いたシアリル糖  
ペプチドチオエステル体の新規調製  
法、村上真淑、岡本亮、梶原康宏、第  
30 回日本糖質学会年会、2011 年 7 月  
11-13 日、新潟

〔図書〕(計 1 件)

The Momentum of Chemical Glycoprotein  
Synthesis

Yasuhiro Kajihara, Masumi Murakami and  
Carlo Unverzagt, 印刷中、Wiley.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

1) 名称：シアリル糖鎖を有する糖ペプ  
チドの製造方法、当該製造方法に使用  
するシアリル糖鎖付加アミノ酸誘  
導体、及び当該糖ペプチド

発明者：梶原康宏、村上真淑、石井  
一之

権利者：糖鎖工学研究所 (株)

種類：日本指定 PCT

番号：2013-503535

出願年月日：2013 年 9 月 6 日

国内外の別： 国外

2) 名称：NCL 法に適した、ポリペプチ  
ド断片の効率的な製造方法

発明者：梶原康宏、岡本亮、  
木村元春、石井一之

権利者：糖鎖工学研究所 (株)

種類：日本指定 PCT

番号：2013-536233

出願年月日：2014 年 3 月 25 日

国内外の別： 国外

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 康宏 (KAJIHARA Yasuhiro)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：50275020

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

( )

該当なし