

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651248

研究課題名(和文) タンパク質ドメインの鏡像体を利用したマンノースレセプター設計の新戦略

研究課題名(英文) A new strategy for designing mannose receptors based on enantiomers of protein domains.

研究代表者

中川 優 (Nakagawa, Yu)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：90452284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、L-ラムノースが6-デオキシ-D-マンノースの鏡像体であることに着目し、全く新しいマンノースレセプターとしてナマズ卵由来ラムノース結合性レクチン(SAL)の糖結合ドメインの鏡像体の合成を試みた。さらに、タンパク質を鏡像体とすることで全く別の機能を発現するという、機能性人工タンパク質の新しい設計戦略を提示することを目指して、新規ガラクトースレセプターの候補としてスギタケ由来フコース結合レクチン(PhoSL)の鏡像体を合成し、等温滴定カロリーメトリー(ITC)によるD-ガラクトース結合試験を行なった。

研究成果の概要(英文)：On the basis of the fact that L-rhamnose is equivalent to 6-deoxy-L-mannose, this study tried to synthesize an enantiomer of rhamnose-binding domains of catfish lectin SAL as a novel mannose receptor. In parallel, attempts were also made to develop a galactose receptor based on an enantiomer of PhoSL, a mushroom lectin for L-fucose, which is equivalent to 6-deoxy-L-galactose. This study aimed to propose a strategy for designing enantiomers of proteins as bioactive molecules having functions different from those of parent proteins.

研究分野：農学

キーワード：生理活性 蛋白質 糖 有機合成

1. 研究開始当初の背景

マンノース受容体とは、D-マンノースを特異的に認識する分子の総称である。近年、マンノース受容体は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 表面に存在する高マンノース型糖鎖に結合し、HIV の標的細胞への侵入を阻害すると同時に、宿主免疫機構を利用して HIV を排除することが明らかにされた [Balzarini, J. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 583]。この2段階抗 HIV 作用は既存の薬には認められず、マンノース受容体はまったく新しい作用機序を有する抗 HIV 薬のリードとして期待されている。しかしながら、代表的なマンノース受容体であるタンパク質性のレクチンは多量体としてのみ活性を示し、さらに強い副作用を有することから、レクチンそのものを抗 HIV 薬とすることは難しい。一方、非ペプチド性の低分子マンノース受容体に関しては、未だに開発の初期段階である。このような背景から、既存のマンノース受容体を用いた抗 HIV 薬の創薬研究は停滞しており、新しいタイプのマンノース受容体の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は、ラムノース結合性レクチン (RBL) の「鏡像体」に基づいてマンノース受容体を開発することを目的としている。L-ラムノースは 6-デオキシ-L-マンノースと等価であり (Fig. 1)、RBL は L-マンノースとも結合することが確認されている [Hosono, H. *et al. Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16*, 1]。さらに、RBL のラムノース結合ドメインは、4 本のジスルフィド結合でその三次元構造が規定されており、ドメイン単独でもラムノース結合活性を示すことが明らかにされた [Vakonakis, I. *et al. Structure* **2008**, *16*, 944]。これらの知見を考慮に入れ、本研究では、RBL のラムノース結合ドメインの「鏡像体」を化学合成することにより、全く新しいタイプの人工マンノース受容体を開発することを目標とした。

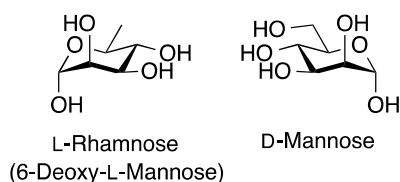


Fig. 1 L-ラムノースと D-マンノースの構造

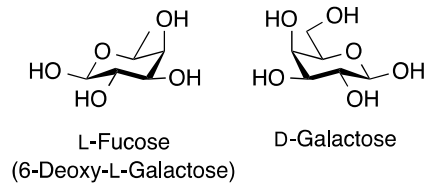


Fig. 2 L-フコースと D-ガラクトースの構造

さらに、L-フコース結合性タンパク質の「鏡像体」の開発も目標の一つとして設定した。L-フコースは、6-デオキシ-L-ガラクトースと等価であることから (Fig. 2) L-フコース結合性タンパク質の「鏡像体」は D-ガラクトース受容体となることが期待される。このように、マンノース受容体の開発だけに留まらず、タンパク質を「鏡像体」とすることで全く別の機能を発現するという、機能性人工タンパク質の新しい設計戦略を提案することが本研究の最終目標である。

3. 研究の方法

ラムノース結合性レクチン (RBL) は、魚卵から多く見いだされており、アミノ酸約 95 残基からなるラムノース結合ドメインが 2 個あるいは 3 個タンデムに並んだ構造を有する。本研究では、これまでに報告されている RBL の中で、ナマズ (*Silurus asotus*) の卵由来の SAL に着目した [Hosono, M. *et al. Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16*, 1; Hosono, M. *et al. Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1472*, 668]。SAL は 3 個のラムノース結合ドメインを有し (SAL-D1, D2, D3)、そのすべての一次配列が決定されている上 (Fig. 3) L-マンノースと顕著に結合することが確認されている。そこで、新規人工マンノース受容体の候補として、SAL のラムノース結合ドメインの鏡像体をターゲットとして設定した。

一方、人工ガラクトース受容体の候補としては、フコース結合性レクチン・PhoSL [Kobayashi, Y. *et al. J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33973] の鏡像体を選定した。PhoSL はスギタケ (*Pholiota squarrosa*) 由来のアミノ酸 40 残基からなるレクチンであり (Fig. 3)、化学的安定性に優れていることから、合成のターゲットとしては最適である。

これらの鏡像体を化学合成し、等温滴定カロリメトリー (ITC) を用いて各種糖鎖との結合活性を評価する計画を立てた。

SAL-D1	ANMITCYGDVQKLHCETGLIIVKSSLYGRDSTTCSTNRPPAQVAVTTCSLPITIGDRCNGLPDC ELKTDLLGNTDPCQGTYYKYNTSFCING
SAL-D2	NYAVICEHGYSTLDCGNDAILIVNANYGRASSQICSNGLPNGLTQNTNCYAANTLTTVAGLCNGK KSC TVEALNTIFSDPCSGTVKYLTVTYICT
SAL-D3	KEMVVCEGGSASINCGAQTIKTIWANYGRDSTVCS TGRPGSLLNTNCYTSDTLNKVAAGCD HLSTC TIPANNNFSGDPCPN TYKYLRIVYACV
PhoSL	APVPVTKLVCDGDTYKCTAYLDFGDGRWVAQWDTNVFHTG

Fig. 3 SALのラムノース結合ドメイン (SAL-D1, D2, D3) と PhoSL のアミノ酸配列

4. 研究成果

(1) SALのラムノース結合ドメインの合成

SALの3つのラムノース結合ドメイン (SAL-D1, D2, D3) の中から「鏡像体」合成の候補ドメインを選定するため、各ドメインが化学的に合成可能かどうかを確認した。まず、SAL-D3の合成をFmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) 固相合成によるステップワイズ法で行なったところ、様々な長さのペプチドの混合物を与え、目的の95残基のペプチドを得ることはできなかった。そこで、native chemical ligationによるフラグメントカップリング法を試みるために、N末端47残基のペプチドの合成を試みた。その結果、16残基で伸長が止まったペプチドがメインに生成することが判明した。この原因として、近傍に存在するプロリン2残基によってペプチドが折れ曲がった二次構造をとっている可能性が考えられた。

そこで、アミノ酸配列上プロリン残基が近傍に存在しないSAL-D2にターゲットを換え、5つのペプチドフラグメントのカップリングでSAL-D2に導く計画を立てた。さらに、ペプチド合成は、pseudoproline dipeptideを用いてペプチド伸長に有利な二次構造を取りやすくした状態で行なうこととした。まず、C末端47残基のペプチドの固相合成を行なったところ、高純度で目的のペプチドを得ることができた。一方、N末端48残基は、6, 8, 20, 14残基からなる4つのペプチドチオエステルを合成して連結させることを試みたが、チオエステルへの変換反応およびカップリングともに収率が低く、N末端48残基のフラグメントペプチドを十分量確保することができなかった。そこで、N末端48残基についてもフラグメントに分けることなく、一挙に合成し、C末端47残基のペプチドとのカップリングのみでSAL-D2へ導く計画に変更した。しかしながら、N末端48残基のペプチド合

成収率が低く、カップリングを試すには至らなかった。N末端48残基については、2つのフラグメントに分けて合成するなど、合成経路の更なる検討が必要である。合成経路が確立できれば、鏡像体の合成が可能となり、下記に示す高マンノース型糖鎖ライブラリーとの結合試験によって、RBLのラムノース結合ドメインの「鏡像体」が人工マンノース受容体となりうるか検証できると考えられる。

(2) 高マンノース型糖鎖ライブラリーの有機化学的構築

HIV表面に存在する高マンノース型糖鎖は、還元末端のN-acetyl-D-glucosamine 2糖構造 (GlcNAc₂) に最大9個のManで構成されるマンノオリゴ糖が結合した構造を有する (Fig. 4)。そこで本研究では、レクチンの鏡像体に基づく人工マンノース受容体を合成した際に様々な構造の糖鎖との結合試験を実施することを想定し、高マンノース型糖鎖ライブラリーの構築を行なった。

チオ糖およびフッ化糖を用いたグリコシル化により、高マンノース型糖鎖の部分構造である2~5糖ユニットを合成した (Fig. 5)。これらのユニットを連結させることにより、様々な構造の高マンノース型糖鎖を適宜調製することが可能である。

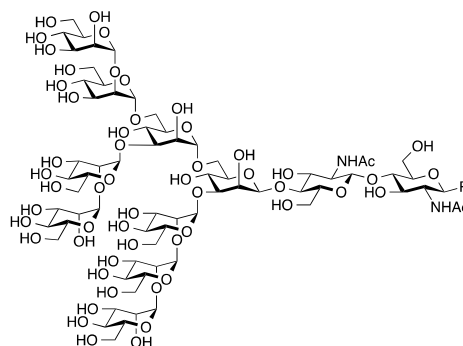


Fig. 4 高マンノース型糖鎖の一例

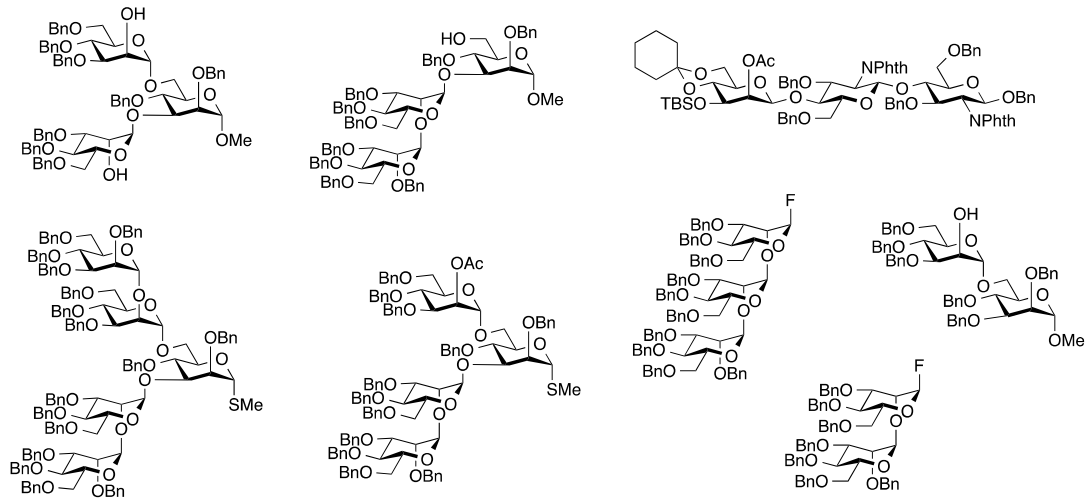


Fig. 5 高マンノース型糖鎖の部分構造ユニット

(3) PhoSL の鏡像体の合成と糖結合活性

PhoSL はアミノ酸 40 残基からなる比較的小型のレクチンであることから、ステップワイズ法によるペプチド固相合成法で合成可能であると考えられた。そこで、側鎖を保護した一般的な Fmoc アミノ酸を用いて合成を行なったところ、13~14 残基のペプチドがメインに得られ、目的のペプチドは全く得られなかった。この原因として、C 末端側 6~10 番目のアミノ酸の保護基を含めた側鎖 (Q: trityl, W: Boc, D: *t*-butyl, T: *t*-butyl, N: trityl) が嵩高く、立体障害によってペプチド伸長が阻害されている可能性が考えられた。そこで、側鎖無保護でも副反応が起きにくいと考えられるアスパラギンおよびグルタミンについては、側鎖無保護の Fmoc アミノ酸を用いて再度合成を試みたところ、目的のペプチドを得ることができた。

PhoSL が合成可能であることが確認できたので、対応する D-アミノ酸を用いて PhoSL の鏡像体 (D-PhoSL) を同様に合成し、D-ガラクトースとの結合を等温滴定熱量メトリー (ITC) で解析した。50 mM PBS (pH 7.4) 中 50 μ M D-PhoSL に 10 mM D-ガラクトースを滴下した結果、熱量変化はほとんど認められなかった (Fig. 6)。本結果は、D-PhoSL は D-ガラクトースと結合しない、あるいは結合活性は極めて低いことを示唆するものである。PhoSL は単糖の L-フコースには結合せず、6 糖以上の糖鎖中の L-フコース残基に結合することが知られていることから [Kobayashi, Y. *et al. J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 33973], D-PhoSL は糖鎖中の D-ガラクトース残基に結合する可能性が残されている。D-PhoSL と糖鎖との結合解析は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 優 (NAKAGAWA, Yu)
名古屋大学大学院・生命農学研究科・准教授
研究者番号: 90452284

(2) 連携研究者

入江 一浩 (IRIE, Kazuhiro)
京都大学大学院・農学研究科・教授
研究者番号: 00168535

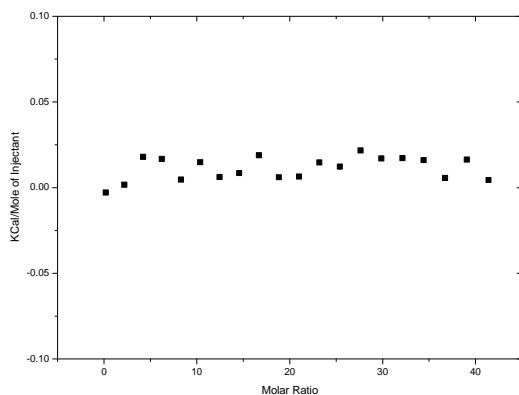


Fig. 6 D-PhoSL と D-ガラクトースとの滴定試験における ITC プロファイル