

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750161

研究課題名(和文) 偽ラセミタンパク質結晶構造解析法による化学合成糖タンパク質の立体構造解析

研究課題名(英文) X-ray crystallography of quasi-racemic glycoprotein synthesized by chemical methods

研究代表者

岡本 亮 (Okamoto, Ryo)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30596870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では偽ラセミタンパク質結晶化法に必要な均一構造の糖タンパク合成のために、本申請者が開発した「ペプチド-グアニジド体」を鍵化合物とした、新規ペプチド-チオエステル合成手法および、位置選択的ペプチド連結反応の確立に成功した。これを用いてN型糖タンパク質CD59と、O結合型の糖であるGalNAc残基を30カ所有した不凍糖タンパク質(AFGP)の合成に成功した。確立した合成手法を利用し、Dアミノ酸と天然型のGalNAcから構成されたAFGPジアステレオマーの合成にも成功し、これと天然型AFGPの1:1で混合した試料を用いた、偽ラセミタンパク質結晶化の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, a new peptide-thioester synthetic method and a regioselective peptide coupling reaction using peptide-guanidide, that was originally found by the author, have been successfully established for the synthesis of homogeneous glycoproteins. Based on these new methodologies, the syntheses of N-glycoprotein: CD59 and O-linked glycoprotein: anti freeze glycoprotein (AFGP) were also achieved. Furthermore, a diastereomeric form of AFGP which has D-amino acids and native GalNAc residues have also successfully synthesized. Quasi-racemic crystallization of AFGP was conducted by using the solution of the 1:1 mixture of the native AFGP and the diastereomeric AFGP.

研究分野：5305

科研費の分科・細目：核酸・蛋白質・糖化学

キーワード：糖タンパク質 結晶構造解析 N-アセチルグアニジン ペプチドグアニジド ペプチドチオエステル 不凍糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ヒト生体内のタンパク質は 50%以上が翻訳後修飾により糖鎖付加を受けた糖タンパク質であるといわれている。糖鎖付加はタンパク質に対して抗原性、血中での分解遅延、三次元構造の安定化等、様々な機能を付与し、タンパク質創薬の観点からも近年大きな注目を浴びている。しかしながら、その特異的な構造の複雑性のため、分子・原子レベルでの構造機能相関研究は容易ではない。このような研究のためには、(1)化学構造が均一な研究試料(糖タンパク質)を得た後、(2)構造解析を行うことで、その詳細な三次元構造を取得する必要がある。(1)については、生物学的手法では必ず糖鎖構造に不均一性が生じる事が知られており、化学合成でのみしか均一な構造の糖タンパク質を得ることができない。本研究開始時まで、いくつかの糖タンパク質の化学合成の報告がなされていたものの、その報告例は限られており、生体内に存在する多種多様な糖タンパク質を合成標的として考えた場合、さらなる基盤技術の発展が望まれた。また、一般に X 線結晶構造解析法は、タンパク質などの複雑な生体分子の構造解析法として有効であるが、糖タンパク質は極めて結晶性が悪く、X 線結晶構造解析を行う事が難しいことが実情であった。

2. 研究の目的

上記のような背景の中、本研究では、(1)多様な糖タンパク質合成を志向した、汎用性の高い新規ペプチド-チオエステル合成法の開発、(2)偽-ラセミタンパク質結晶構造解析を利用した効率的糖タンパク質結晶化法の確立を目的とし研究を実施した。以下この動機を示す。

糖タンパク質化学合成では、いくつかの短いペプチド断片を調製後、これらを連結する事で標的糖タンパク質の全長鎖を合成する。この連結反応を利用する際には、C-末端がチオエステルで活性化されたペプチド誘導体(ペプチド-チオエステル)が鍵物質として広く利用されている。しかし、ペプチド-チオエステルおよびペプチドの化学合成は、常に配列依存的に合成の成否が変わるため、本研究実施時においても、より汎用性の高い方法の模索が世界中で行われていた。そこで本研究では、上記(1)の通り、ペプチド-チオエステル体の新規合成法の開発に視点を置くことで、より汎用性の高い糖タンパク質合成手法の開発を目標とした。

一方本申請者は、天然の糖タンパク質とタンパク質部分の鏡像異性体である D-タンパク質(D-アミノ酸とグリシンから構成されたタンパク質)とを 1:1 で混ぜ合わせた試料を結晶化に用いると、単体では結晶を与えない

ような糖タンパク質でも迅速に糖タンパク質結晶を与えするという、偽-ラセミタンパク質結晶化法を見出していた。これを用いれば様々な糖タンパク質の構造解析が可能になるものと考え、本研究では複雑な構造の糖タンパク質についての結晶化と、構造解析を実施することで、その汎用性の実証と、方法論の確立を目指す事にした。

3. 研究の方法

一般に糖タンパク質は糖鎖の結合部位によって N-および O-結合型に大別される。そこで本研究では標的糖タンパク質として、N-結合型糖タンパク質である CD58 と、O-結合型糖タンパク質である不凍糖タンパク質 (AFGP) を、各々の例として選び各検討を行う事にした。本課題は二年間での研究計画であったため、一年目は合成手法の開発と、標的糖タンパク質の合成法の確立、二年目に同手法による D タンパク質の合成と、結晶化の検討を行う事にした。

CD58 は全長 95 残基で 81 番目の Asn に 1 本の N 型糖鎖をもつ糖タンパク質である。これを効率的に合成するため、C 末端側の短い糖ペプチドを化学合成で、N 末端側の大部分(69 残基)は大腸菌発現法で調製したポリペプチドを原料として利用する、半化学合成法をまずは検討することにした。この戦略では発現ペプチドを、ペプチドチオエステルへと変換する必要がある。これに対して本研究では、本申請者が過去に報告していた、無保護ペプチドの C 末端選択的活性化法を利用する事にした。この手法は化学的手法であるため、大腸菌発現で大量に得る事のできる変性ポリペプチドへも利用可能となり、汎用性の高いチオエステル化法になるものと期待した。まずはこのような半化学合成手法の確立を第一目標とし、これが難しい場合には、N 末端側のペプチド鎖をさらに 30 残基程度のペプチド断片に分け、化学的に調製することにした。そして、これらを連結することにより標的糖タンパク質の全長鎖を得るとい、完全化学的な合成手法の開発も行う事にした(4-(1)参照)。

一方、AFGP は、3 アミノ酸残基を単位とした、繰り返し構造を有した特異な構造の糖タンパク質である(4-(2)参照)。このような分子を効率的に合成するために、近年申請者が開発したペプチド-グアニジド体を鍵化合物とした位置選択的ペプチド連結反応の開発を行う事にした。生体内の O-結合型糖タンパク質では、しばしば一定のペプチド配列の繰り返し構造が見られるため、このような手法の開発は様々な O-結合型糖タンパク質合成法にも利用可能になると期待された(4-(2)参照)。

以上を確立した後、それぞれ対応する D-

タンパク質を合成後、偽-ラセミタンパク質結晶化を検討する事にした。この内、AFGPは複数の糖結合部位を有しており、その複雑な構造的特徴から、極めて結晶化は困難であることが予想されたものの、過去にこのような分子の結晶構造解析報告例はなく、これに成功すれば初めての構造解析例となり、極めて大きなインパクトを与える結果となるだけでなく、本研究における合成手法、結晶化法および構造解析法の有用性の証明となるものと考えた(4-(3)参照)。

4. 研究成果

本研究成果として、主に2つの新規合成手法の開発に成功し、これを用いてCD58と類似した大きさのN型糖タンパク質CD59、およびAFGPの合成に成功した((1)、(2))、AFGPについて結晶化の検討により結晶化のための知見を得ることができた(3)。以下この詳細を示す。

(1) N-アセチルグアニジンを利用した新規ペプチドC末端活性化法の開発

まずはCD58のN末端側ポリペプチドの大腸菌発現を検討した。これについて種々検討を行ったものの、標的ポリペプチド配列の発現効率が極めて悪く、目的物を得ることができなかった。これは標的としたポリペプチド配列が大腸菌発現に適さない配列であるものと判断し、申請時の計画に基づいて、合成戦略を純化学的手法による合成へと転換した。しかし予想外に、これについても既存の手法では原料となるペプチド-チオエステル体を合成することが出来なかった。以上の結果は、目的の項で述べたとおり、ペプチド合成化学特有の配列依存性の問題によるものであると考えられた。

そこでこの基礎的な問題を解決するべく、新規にペプチド-チオエステル合成手法の開発を行った。一般にペプチド固相合成法ではFmoc-ペプチド固相合成法が、自動合成装置も含め広く汎用的に用いられているが、合成過程で塩基を用いるという特性上、塩基条件に不安定なペプチドチオエステルを直接的に合成する事には問題があった。このような背景の中、本研究申請者は独自にC末端にN-アセチルグアニジンを有する新しいペプチド誘導體(ペプチド-グアニジド体)を見出していた。N-アセチルグアニジンは中性緩衝溶液下で容易にアルキルチオールと交換し、ペプチドチオエステルへと変換可能なユニークな官能基であり、ペプチドチオエステルの等価体として利用可能である。従って、Fmoc-ペプチド固相合成法を基盤として、簡便なペプチド-N-アセチルグアニジド体の合成手法を確立できれば、本研究において望むペプチドチオエステル合成法と同等の手法が確立

されるものと考えた。

種々検討した結果、次のような新規手法の確立に至った。本手法では、Cys残基側鎖に導入したチオカルボニル基と、ペプチド主鎖のアミド結合の分子内相互作用によるアミド結合の活性化-開裂反応を利用することで、標的ペプチド配列C末端にN-アセチルグアニジド基の導入を行う。これらはすべて固相上で行う事ができ、側鎖が保護されたペプチド-N-アセチルグアニジド体を固相から遊離させ、得る事ができる。これに対してTFAによる一般的な側鎖保護基の脱保護を経ることで、ペプチド-N-アセチルグアニジド体を得られる。また、種々検討した結果、ペプチド-N-アセチルグアニジド体は、反応条件を最適化する事で、ペプチドチオエステルと同様に、直接的にペプチド連結反応に用いられる事も見出した。本手法を基盤として、CD58と類似した大きさのN型糖タンパク質であるCD59、またN-結合型糖鎖を有する生理活性糖ペプチドGIPの合成に成功した(投稿論文準備中)。

(2) ペプチドグアニジド誘導體を用いた位置選択的ペプチド連結反応の開発と、AFGPの効率的合成法の確立

AFGPはAla-Thr(R)-Ala(R=Gal(1-3)GalNAc or GalNAc)を単位とした繰り返し構造を有している(繰り返し数=4-50)。このような繰り返し構造の分子を効率的に合成すべく、5回繰り返し構造(AF₅)を単位配列として有した、ペプチドチオエステルと、ペプチドグアニジド体を用いる効率的な新規合成法の構築を行った。以下にその詳細を示す。

本手法はグアニジド基とチオエステル基の反応性の差と、グアニジド基がチオエステルへと変換可能である点を利用した合成法である。本研究において、N末端がBoc基で保護された、Boc-AF₅-チオエステルとN末端遊離のH₂N-AF₅-グアニジド体を、銀イオンを利用するチオエステル法により連結させた場合、チオエステル部分のみ活性化され、位置選択的にペプチド鎖が連結されBoc-AF₁₀-グアニジド体を与えることを見出した。得られた生成物の半分を、緩衝溶液中でアルキルチオエステル(Boc-AF₁₀-チオエステル体)へと再変換し、残る半分はBoc基を脱保護する事でH₂N-AF₁₀-グアニジド体へと変換する事で、次の連結反応へと用いることのできるペプチド誘導體を簡便に調製する事ができた。一つの原料(Boc-AF₅-チオエステル)を起点とし、この一連のステップを繰り返す事で、簡便に大型の繰り返し構造を構築する事が可能となる。

原料となるBoc-AF₅-チオエステル体につ

いては糖水酸基無保護のGalNAcを有するThr誘導体である、Boc-Thr(GalNAc)を用い、Boc固相合成法による新規合成法の確立に成功した。この手法により、合成最終段階での脱保護反応が不要となり、効率的にBoc-AFGP₅-チオエステル体を得る事ができるようになった。また、これを原料として、ペプチドグアニジド体を得るために、水溶液中での新規チオエステル-グアニジド交換反応の開発を行った。この結果、200 mM の N-ピバロイルグアニジンを含む pH 8.0 の緩衝溶液を用いると収率よくペプチド-チオエステルをグアニジド体へと変換可能である事を見出した。以上の手法を組み合わせ、Boc-AFGP₅-チオエステル、H₂N-AFGP₅-グアニジド体の簡便な合成法を確立した。

以上のようにして得られた原料ペプチドを、実際に順次連結を行ったところ、20回繰り返し構造(Boc-AFGP₂₀-チオエステル)の合成に成功した。また、Boc-AFGP₂₀-チオエステルとこの合成過程で得られる、H₂N-AFGP₁₀-グアニジドとを連結する事で、30回繰り返し構造の構築にも成功した。したがって、連結するユニットをかえる事で、種々の繰り返し構造の構築に応用可能である事も示された。本手法によって今後様々なAFGP誘導体の合成にも応用可能である(投稿論文準備中)。

(3)AFGPの偽-ラセミタンパク質結晶化の検討

AFGPの偽-ラセミタンパク質結晶化法を行うために、糖が結合せず、D-アミノ酸で構成されたD-AFGP₅の合成を行った。しかし、このような誘導体は溶媒に対する溶解性が著しく悪くなり、その後の連結反応に用いる事ができなかった。そこで、D-AFGP₅に対して天然型構造のGalNAcを結合させる事で、溶解性が改善したAFGPジステレオマーの合成を検討した。このような誘導体は、天然のAFGPの2次構造に近い構造をとることが過去の報告で示唆されていたため、偽-ラセミタンパク質結晶化法へと利用できるのではないかと考えた。原料としてBoc-D-Thr(D-GalNAc)を合成した後、天然型のAFGP(L-AFGP)誘導体と同様に合成を行ったところ、20回繰り返し構造を有するジステレオマー体の合成に成功した(D-AFGP₂₀(D-GalNAc)₅)。

これとL-AFGP₂₀(GalNAc)₅とを1:1で混ぜあわせた偽-ラセミタンパク質溶液を用いて実際に結晶化のスクリーニングを行った。しかしながら、引き続き結晶化条件の検討中ではあるものの、2014年3月時点では良好な結晶を得る事ができなかった。そこでこれら2つの試料を円二色分光により分析を行ったところ、D-AFGP₂₀(D-GalNAc)₅はL-AFGP₂₀(D-GalNAc)₅が示すPPIIタイプのヘリックス構造のシグナルが弱く、構造が若干異なる事が示唆された。このことは過去の報告と一致

するものであり、この構造上の差異のため、偽-ラセミタンパク質特有の対称性により誘起される、迅速な結晶化効果が得られなかったものと考えられる。以上の結果より、AFGPの結晶化のためには、D-アミノ酸とL-GalNAcで構成された完全な立体構造を保持するAFGP鏡像異性体を合成し、ラセミタンパク質結晶化法により結晶化を検討する必要性が示唆された。

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)

[学会発表](計 9件)

折井亮、岡本亮、和泉雅之、梶原康宏、不凍糖タンパク質AFGPの合成研究、日本化学会第94会春季年会、2014年3月28日、名古屋大学

Noriko Sakamoto, Ryo Okamoto, Masayuki Izumi and Yasuhiro Kajihara, Development of an Efficient Synthetic Method of Peptidyl-N-Acylguanidine Derivatives and its Application to Peptide Coupling from N to C-Terminus, *4th Asia-pacific international peptide symposium/50th Japanese peptide symposium*, 6th Nov. 2013, Osaka

Madoka Isoe, Ryo Okamoto, Masayuki Izumi and Yasuhiro Kajihara, Development of a New Selective Activation Method of Peptide C-Terminus Using N-Acetylguanidine Based on Fmoc SPPS, *4th Asia-pacific international peptide symposium/50th Japanese peptide symposium*, 6th Nov. 2013, Osaka

Ryo Okamoto, Madoka Isoe, Noriko Sakamoto, Masayuki Izumi, Yasuhiro Kajihara, Peptidyl-M-acylguanidine: a new peptide derivative for chemical protein synthesis, *4th modern solid phase peptide synthesis and its applications symposium*, 3rd, Nov. 2013, Kobe

岡本 亮、糖タンパク質化学合成のためのsmall chemistryの開発、天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御地区シンポジウム、2013年3月16日、理研(和光)

磯江まどか、岡本 亮、梶原康宏、N-アセチルグアニジンを利用したペプチドC末端の新規選択的活性化法の開発、日本化学会第93会春季年会、2013年3月25日、立命館大学

坂本典子、岡本 亮、梶原康宏、簡便なペプチドグアニジド誘導体合成法の開発、日本化学会第93会春季年会、2013年3

月 25 日、立命館大学
岡本亮、磯江まどか、坂本典子、和泉
雅之、梶原康宏、ペプチドグアニジド
誘導体を利用した新しいペプチドケミ
ストリーの開発、2012 若手ペプチド夏
の勉強会、2012/8/6, 大阪
坂本典子、岡本亮、梶原康宏、簡便な
ペプチドグアニジド誘導体合成法の開
発研究、2012 若手ペプチド夏の勉強会、
2012/8/6, 大阪

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡本 亮 (OKAMOTO, Ryo)
大阪大学・理学研究科・助教
研究者番号：30596870

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし