

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292215

研究課題名(和文)非天然分岐型糖鎖含有デタージェントライブラリの構築と膜蛋白質の可溶化

研究課題名(英文)Synthesis of a novel glyco-detergent for analysis of membrane protein

研究代表者

松尾 一郎 (Matsuo, Ichiro)

群馬大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40342852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質可溶化に従来利用されているデタージェントの性質を凌ぐ糖結合デタージェントの開発を目的として、親水基の配向が異なる単糖を有するオクチルグリコシドとグルコース残基の水酸基に対して系統的にフッ素原子を導入したフルオログルコースを有するオクチルグリコシド誘導体、立体的にかさ高い親水性置換基として分岐型構造を有するマンノトリオース結合デタージェントを合成した。これらのアルキルグリコシド誘導体の臨界ミセル濃度を蛍光試薬と等温滴定型カロリメータにより決定した。得られた臨界ミセル濃度を基準としてマイクロソーム画分の可溶化を試みた結果、デタージェント特異的にタンパク質が可溶化されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Detergents are used to lyse cells, solubilize proteins, and prevent nonspecific binding in purification steps. They are essential in particular, for purification and characterization of integral membrane proteins. However, many of them affect the native structure of protein and result to lose the protein function. For that reason, increasing efforts for developing a new type of detergent which gentler solubilizing agents without interfering with membrane protein structure and activity. In order to develop of new detergents, we synthesized alkyl glycoside derivatives having monosaccharide structure (glucose, mannose, galactose, and allose residue), fluorinated glucose derivatives and branched trimannoside derivative. Using these alkyl glycoside derivatives, we characterized their physico-chemical properties such as critical micelle concentration by fluorescent dye method and isothermal titration calorimetry, and solubilization behavior of proteins from membranous fraction of ER.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：界面活性剤 糖 膜タンパク質 糖鎖合成 フッ素 臨界ミセル濃度 等温滴定型熱量計

1. 研究開始当初の背景

細胞が生きていくためには、細胞膜を介した物質の輸送やエネルギー交換、情報伝達が必要である。これらの生命現象は細胞膜に存在する膜タンパク質を介して行われるため、膜タンパク質の機能解析や構造解析研究の進展は、基礎生物学に限らず創薬研究などの応用研究においても重要である。しかし、膜タンパク質の解析は、可溶性のタンパク質研究と比較して実験的な研究が進展しているものは限られている。その要因として、膜タンパク質を膜から取り出す際に膜タンパク質の疎水面同士が会合することで不溶化してしまい、膜タンパク質を安定的に本来の機能を損ねることなく膜から取り出すことができないことにある。

このような目的を達成するために多くのデタージェントが開発されてきた。特に中性分子の糖を極性頭部にもつアルキルグリコシド誘導体はマイルドなデタージェントとして多用され、極性頭部に相当する糖として、グルコースやマルトースを有するデタージェントは市販されている。しかし、デタージェントによる膜タンパク質の可溶化の成否に理論はなく、糖の種類、糖残基の数、糖部分の分岐構造、アルキル基の長さなど、新規の糖結合デタージェントの開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、膜タンパク質可溶化に従来利用されているデタージェントの性質を凌ぐ糖結合デタージェントの開発をめざす。その方法として、1) 糖分子の性質(分岐型糖鎖による親水基の配向・糖分子内極性・糖分子内親水性・疎水性)が異なるデタージェントを系統的に構築する。2) 得られた化合物群の物性値(臨界ミセル濃度・ミセルサイズ・ITCによる熱量など)を測定、物理化学的性質を明らかにする。3) その後、小胞体画分やモデル膜タンパク質を用いて糖分子の構造のちがいによるタンパク質の可溶化能の差異を明らかにする。

3. 研究の方法

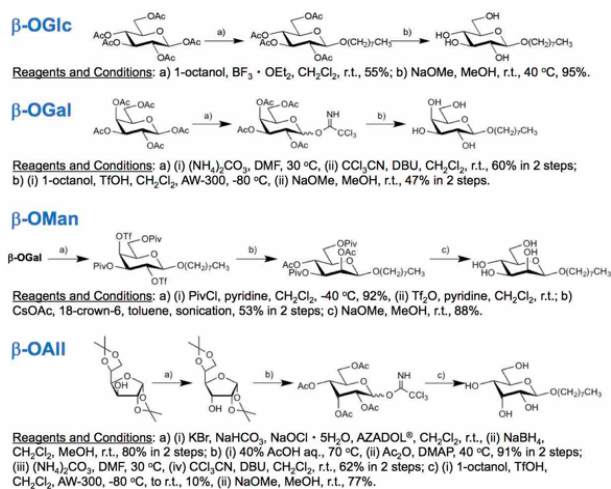
合成化学的手法により単糖およびオリゴ糖誘導体を合成後、長鎖アルコールとカップリングすることで糖結合デタージェントへと導く。オクチルグルコシドの構造をもとにして糖水酸基の配向が異なる β -マンノシド、 β -ガラクトシド、 β -アロシドを合成後、それぞれ臨界ミセル濃度を測定し、糖水酸基の配向の違いによる差異を明らかにする。次に水酸基の影響を調べるためにオクチルグルコシドの2位、3位、4位、および6位水酸基をフッ素原子に置換したフッ素原子含有オクチルグルコシド誘導体を合成する。グルコース部分の水酸基がフッ素原子へと置換されたことによる性質の変化を臨界ミセル濃度により評価する。一方、オクチルグルコシドとフッ素含有オクチルグルコシドの結果をもとに、アルキル基

の炭素鎖の長さを系統的に変えた誘導体を合成し、アルキル鎖の長さや臨界ミセル濃度との関係を確認する。また極性頭部に相当する糖部分の構造を分岐構造にしたデタージェントを合成する。単糖が結合したデタージェントとの差異を臨界ミセル濃度により確認する。得られたオクチルグルコシド誘導体を用いて小胞体画分の可溶化を行う。小胞体画分を回収後、種々のデタージェントにより処理、可溶性画分のタンパク質の濃度、可溶化されるタンパク質を比較することで、デタージェントとしての機能を評価する。

4. 研究成果

糖水酸基の配向が異なるオクチルグリコシドの合成:

単糖の水に対する溶解度は糖の種類によって大きく異なる。この溶解度の差はピラノース環上の水酸基の配向と周囲の水分子との相互作用に依存する。したがって、糖水酸基の配向が異なるデタージェントは、周囲の水分子との水和状態が異なる性質を持つと期待される。このような観点から、糖残基として一般的に利用されるグルコースの構造を元に2位の水酸基の配向が異なる β -マンノシド、3位の水酸基の配向が異なる β -アロシド、4位の水酸基の配向が異なる β -ガラクトシドをそれぞれ合成した。



Scheme 1. オクチルグリコシド誘導体の合成

β -オクチルグルコシド (β -OG)、 β -オクチルガラクトシド (β -OGal) および β -オクチルアロシド (β -OA11) は、対応する単糖のアセチル体の1位アセチル基を選択的に除去、トリクロロアセトイミデート体へと導いた後にオクチルアルコールとカップリング、脱アセチル化することで得た。一方、オクチルマンノシド (β -OMan) の合成は、ベータ結合でオクチル基を導入することが困難であったため、オクチルガラクトシドを合成後、2位および4位水酸基の立体を反転することで合成した (Scheme 1)。

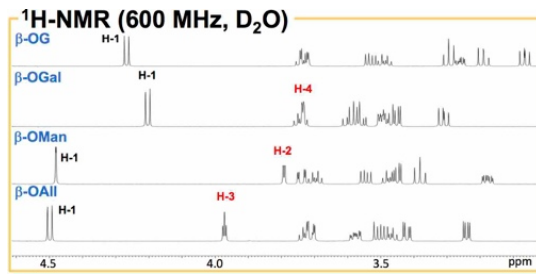
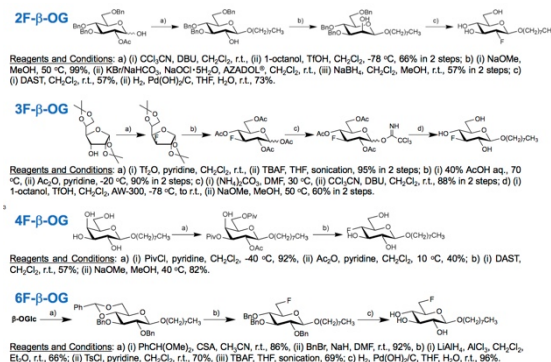


Figure 1. オクチルグリコシド誘導体の NMR スペクトル

フッ素原子含有オクチルグリコシド誘導体の合成：

オクチルグリコシドの糖水酸基を系統的にフッ素原子に置換したフッ素含有オクチルグリコシドを合成した。フッ素原子は高い極性を持つことからグルコース分子内の分極をもたらすこと、親水性および疎水性基とも相互作用しない性質から、膜タンパク質を可溶化する際にこれまでのデタージェントにない環境を提供すると期待した。

2位フルオロ (F) オクチルグリコシド (2F-β-OG) の合成は、2位に遊離の水酸基を有するオクチルグリコシドを合成後、2位水酸基の立体を反転、オクチルマンノシドとした後に、ジエチルアミノサルファートリフルオリド (DAST) によりフッ素原子を導入、脱保護することで合成した。3F オクチルグリコシド (3F-β-OG) の合成は、ジアセトンアロースの3位にフッ素原子を導入、3F グルコースとした後に還元末端部分にオクチル基を導入することで合成した。4F オクチルグリコシド (4F-β-OG) の合成は、オクチルガラクトシドの2, 3, 6位水酸基をアシル基で保護した後に、遊離の4位水酸基を DAST にてフッ素化することで合成した。6F オクチルグリコシド (6F-β-OG) の合成は、オクチルグリコシドをベンジリデン化、2位および3位水酸基をベンジル基で保護、ついでベンジリデン基の還元開裂反応により6位に遊離の水酸基を有するオクチルグリコシドへ、6位水酸基へ脱離基を導入後、TBAF によりフッ素原子を導入することで合成した (Scheme 2)



Scheme 2. フッ素原子を有するオクチルグリコシド誘導体の合成

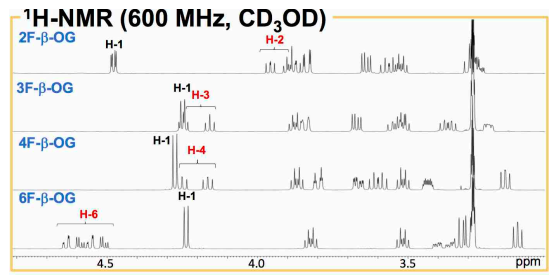


Figure 2. フッ素原子を有するオクチルグリコシド誘導体の NMR スペクトル

図1および図2にオクチルグリコシド誘導体の¹H-NMRスペクトルを示した。フッ素原子が導入された部分のプロトンが低磁場シフトしていること、フッ素とのカップリングが観測されたことより、それぞれ構造を確認した。

オクチルグリコシド誘導体の臨界ミセル濃度の測定：

合成したオクチルグリコシドのデタージェントとしての性質を評価するために臨界ミセル濃度を測定した。臨界ミセル濃度測定法としては一般的な蛍光法に加え、等温滴定熱量計 (ITC) による臨界ミセル濃度の決定を行った。等温滴定熱量計 (ITC) による臨界ミセル濃度の決定は、高濃度のデタージェント溶液を水に対して滴定することで、ミセルが崩壊する際の熱量とセル内のデタージェント濃度が臨界ミセル濃度を超え、ミセルの崩壊による発熱がなくなった点の希釈熱から算出した。オクチルグリコシド (β-OG) と3Fオクチルグリコシド (3F-β-OG) のITCの結果を図1に示した。

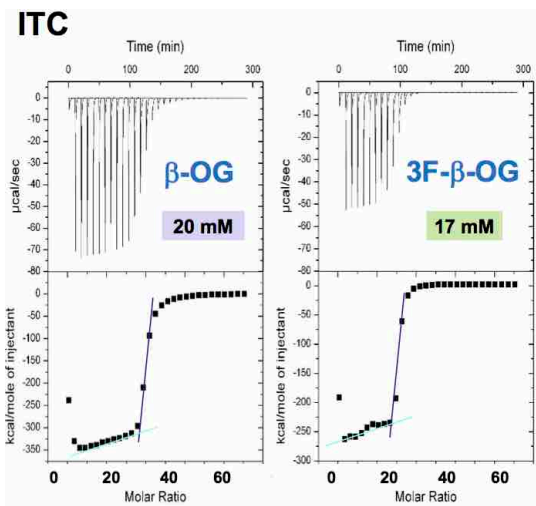


Figure 3. 等温滴定熱量計 (ITC) による臨界ミセル濃度測定

ITCにより得られた臨界ミセル濃度の結果は蛍光法で得られた値とほぼ同じであり、ITCにより臨界ミセル濃度が決定できることを確認した (Table 1)。

	CMC (蛍光光度法)	CMC (ITC)	粒子径***
β -OG*	20 mM	21 mM	2.1 nm (40 mM)
β -OG	20 mM	21 mM	2.4 nm (40 mM)
β -OMan	17 mM	17 mM	3.2 nm (40 mM)
β -OAll	23 mM	21 mM	2.7 nm (40 mM)
β -OGal	23 mM	- **	2.5 nm (40 mM) ****
2F- β -OG	5 mM	- **	23 nm (20 mM)
3F- β -OG	15 mM	17 mM	5.2 nm (40 mM)
4F- β -OG	4 mM	- **	23 nm (10 mM)
6F- β -OG	6 mM	- **	24 nm (20 mM)

Table 1. オクチルグルコシド誘導体の臨界ミセル濃度
*市販品；**水に難溶；***動的な光散乱法を用いた粒子形
サイズ；****溶解度が低く 40 度での測定結果

アルキル基の炭素鎖の長さを系統的に変えた
オクチルグルコシドおよび6F- β -OGの合成:
フッ素原子を導入したオクチルグルコシド誘
導体の水に対する溶解度は 3F 誘導体を除き
低かった (図 4)。

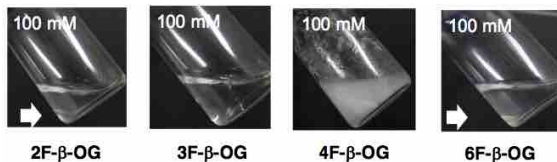


Figure 4. フッ素原子含有オクチルグリコシド誘導体の
水に対する溶解度

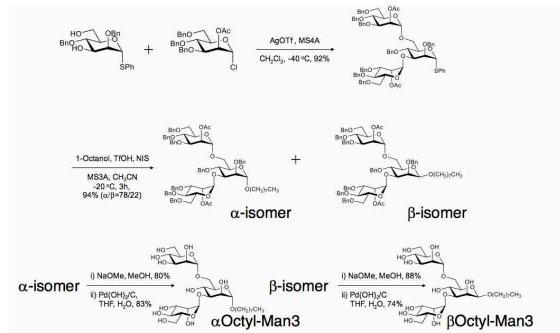
そこでアルキル鎖の長さを短くしたアルキル
グルコシド誘導体を合成し、溶解度の改善お
よびアルキル鎖の長さが臨界ミセル濃度に与
える影響を調べた。アルキル基としてはペン
チル基 (炭素 5 個)、ヘキシル基 (炭素 6 個)
およびヘプチル基 (炭素 7 個) を導入した。そ
の結果、炭素が一つ短くなるごとに臨界ミセル
濃度が上昇し、6F ヘプチルグルコシドはオク
チルグルコシドと同等の臨界ミセル濃度を示
すことが明らかとなった (表 2)

Glucose	CMC (蛍光光度法)	6-F-Glucose	CMC (蛍光光度法)
β -Pentyl-Glc	--mM*	6F β -Pentyl-Glc	220 mM
β -Hexyl-Glc	190 mM	6F β -Hexyl-Glc	60 mM
β -Heptyl-Glc	50 mM	6F β -Heptyl-Glc	27 mM
β -OG	23 mM	6F β -OG	6 mM

Table 2. アルキル鎖の長さの異なるアルキルグルコシド
および6-F グルコシドの臨界ミセル濃度 (*溶解度が高
く CMC が測定できなかった)

分岐構造を有する糖鎖デタージェント合成:
糖部分の分岐構造としてアスパラギン結合
型糖タンパク質糖鎖の高マンノース型糖鎖部
分構造に相当するマンオトリオースを有する
デタージェントの合成を検討した。高マンノ

ース型糖鎖は粗面小胞体で新生ポリペプチド
上に導入され、タンパク質の品質管理機構に
関与していることも明らかとなっている。ま
た、高マンノース型糖鎖のシャペロン活性に
関する報告もありタンパク質との相互作用が
期待される。



Scheme 3. 分岐型マンノース 3 糖構造を有するオクチル
グリコシドの合成

マンノース 3 残基からなる分岐 3 糖は、3 位
と 6 位に遊離の水酸基を有するマンノース受
容体に対してマンノース供与体を 2 箇所同時
に反応させることで合成した。得られた 3 糖
誘導体の還元末端部分にオクチル基を導入、
 α 体と β 体の混合物を得た。得られたオク
チル体を精製後、それぞれ脱保護することで目
的とした分岐構造を有するデタージェントを
合成した (Scheme 3)。得られた分岐構造を有
する 3 糖オクチル体の構造は NMR により確認
した。

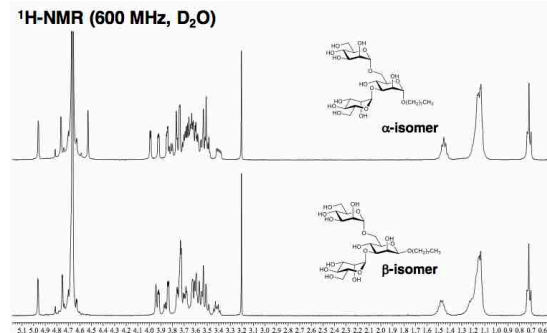


Figure 5. 分岐型マンノース 3 糖構造を有するオクチル
グリコシドの NMR スペクトル

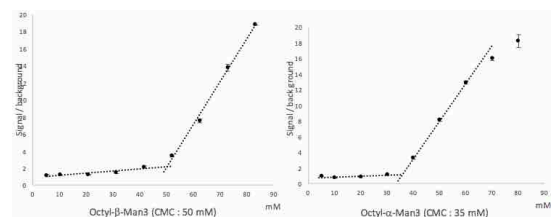


Figure 6. 蛍光試薬による分岐型マンノース 3 糖構造を
有するオクチルグリコシドの臨界ミセル濃度の決定

得られた3糖誘導体の臨界ミセル濃度を蛍光試薬により決定した(図6)。その結果、 β 体は50mM、 α 体は35mMでオクチルグルコシドとほぼ同じであった。また、 α 体のほうが β 体よりも臨界ミセル濃度が低い事が明らかとなった。

小胞体画分を用いた可溶性実験:

今回合成したデタージェントを用いて粗面小胞体の画分の可溶性実験を行なった。ラット肝臓由来のミクロソーム画分に対して臨界ミセル濃度および2倍の臨界ミセル濃度のデタージェントで処理、12時間氷冷で放置後、

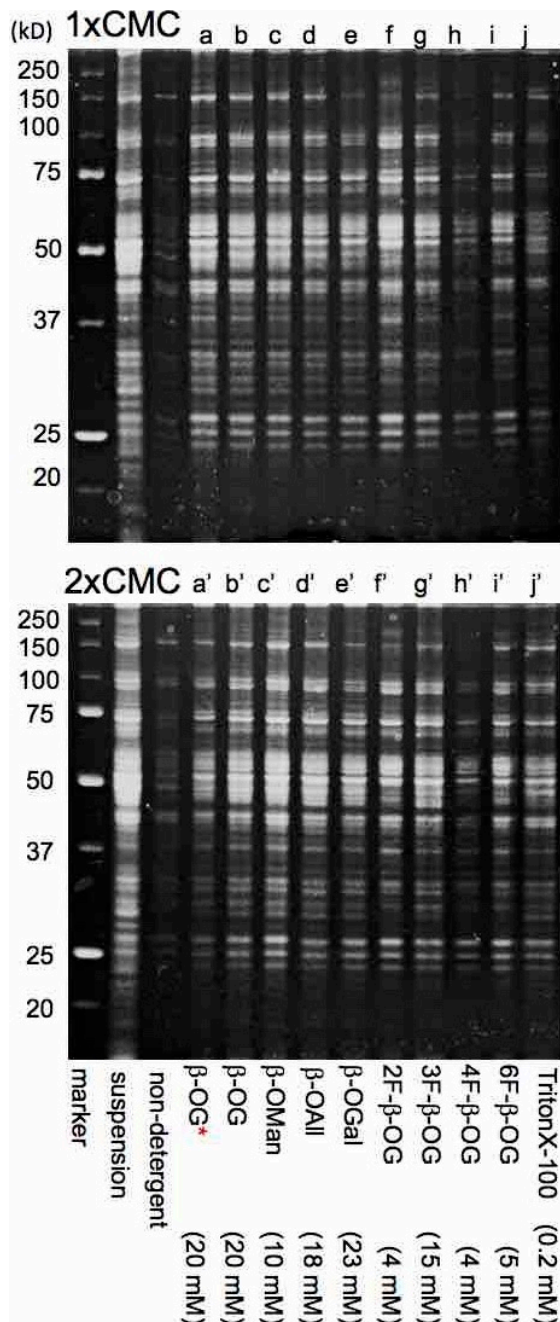


Figure 7. ラット肝臓由来のミクロソーム画分の可溶性実験

105,000gにて1時間遠心した。遠心後、上澄み画分に可溶化されたタンパク質をSDS-PAGEにて解析した(図7)。その結果、オクチルグルコシドとフッ素原子が導入されたデタージェントでは、オクチルグルコシドの方が効率良くタンパク質を可溶化する事が示された。しかし、糖の構造による特徴的な溶出パターンは観察されなかった。一方、フッ素原子を導入したデタージェントは、オクチルグルコシドに比べてタンパク質の可溶化効率が低かった。特に4位にフッ素原子を導入した4F- β -OGのタンパク質の溶出能は低かった。

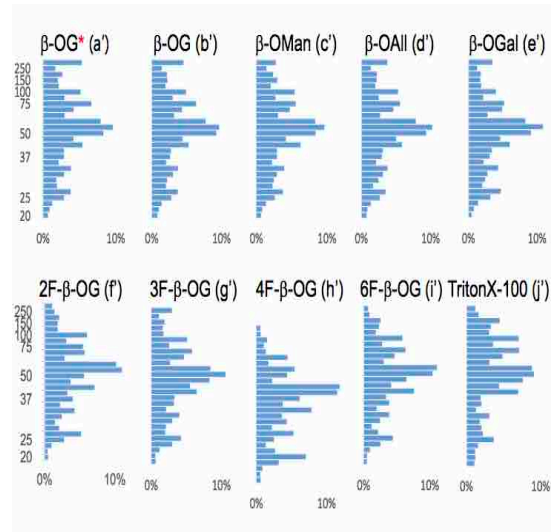


Figure 8. 各デタージェントによるラット肝臓由来のミクロソーム画分の可溶性パターン

各デタージェントによるタンパク質の溶出量を分子量ごとに定量化し、グラフにあらわした(図8)。その結果、4F- β -OGはタンパク質の可溶化量は少ないが、低分子量側のタンパク質を選択的に溶出している事が明らかとなった。コントロール実験として用いたTriton-Xは高分子量側の可溶化率が高いのに対し、オクチルグルコシドは75-100Daのタンパク質を選択的に可溶化する事が示された。

本研究では、糖部分の構造が異なるデタージェントやフッ素原子を導入したデタージェント、分岐構造を有するデタージェントの合成を行なった。得られたデタージェントを用いて小胞体膜画分の可溶性実験を行った結果、いずれの化合物もデタージェントとして機能することを確認した。膜タンパク質の可溶性実験におけるデタージェントの選択は入手可能なデタージェントを使って行われており、理論的な裏付けはない。本研究で合成されたデタージェントはこれまでにない新規な構造を有しているものもある。今後、タンパク質の可溶性実験に用い、これまで可溶性が困難なタンパク質が得られることを期待する。

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0件)

〔学会発表〕(計12件)

1. 石川愛実、齋藤隆行、吉村弥生、松尾一郎、6位にフッ素を導入した糖誘導体の合成研究、日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会、高崎(2016)
2. 齋藤隆行、石川愛実、長谷見早紀、栗原大輝、平野真、戸谷希一郎、吉村弥生、松尾一郎、親水部にフッ素を有するグライコデタージェントの合成と界面活性剤としての機能評価、日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会、高崎(2016)
3. Takayuki Saito, Saki Hasemi, Manami Ishikawa, Yayoi Yoshimura, Ichiro Matsuo, Synthesis and evaluation of octyl glycosides for membrane protein analysis, International Carbohydrate Symposium, New Orleans (2016)
4. 齋藤隆行、石川愛実、長谷見早紀、吉村弥生、松尾一郎、フッ素を導入したオクチルグルコシド誘導体の合成とその物性評価、第35回日本糖質学会、高知(2016)
5. 齋藤隆行、長谷見早紀、吉村弥生、松尾一郎、フッ素を有する新規グライコデタージェントの合成、日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会、高崎(2015)(ポスター賞受賞)
6. 佐野加苗、荻原健、石井希実、宇津井隆志、吉村弥生、松尾一郎、Si系保護基を用いたN-型糖鎖の合成研究(1)、東北糖鎖研究会、仙台(2015)
7. 荻原健、佐野加苗、石井希実、宇津井隆志、吉村弥生、松尾一郎、Si系保護基を用いたN-型糖鎖の合成研究(2)、東北糖鎖研究会、仙台(2015)
8. 長谷見早紀、齋藤隆行、長谷川知洋、吉村弥生、松尾一郎、等温滴定型カロリメーターを用いたオクチルグルコシドの評価、第34回日本糖質学会、東京(2015)
9. 長谷見早紀、吉村弥生、松尾一郎、オクチルグルコシドの合成と評価、日本農芸化学会、岡山(2015)
10. 荻原健、石井希実、松尾一郎、Si系保護基を有するマンノース供与体を用いた4糖合成、東北糖鎖研究会、岩手(2014)
11. 長谷見早紀、高橋 惇、松尾一郎、オクチルグルコシドベースとした中性でタージェントの合成、関東支部群馬地区地域懇談、桐生(2014)
12. 高橋 惇、松尾一郎、オクチル3-および6-モノフルオログルコシドの合成、日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会、高崎(2013)

〔図書〕(計1件)

1. 等温滴定型熱量系を用いたレクチン-糖分子の相互作用解析、松尾一郎、武田陽一、p261-264、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック、NTS、(2015)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 一郎 (MATSUO Ichiro)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号：40342852

(2) 研究分担者

清水 弘樹 (SHIMIZU Hiroki)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス部門・研究員
研究者番号：30344716

園山 正史 (SONOYAMA Masashi)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号：40242242

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし