

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420844

研究課題名(和文) レクチン様分子シャペロンの活性を可視化する新規糖鎖プローブの開発

研究課題名(英文) Development of novel glycan probe for monitoring molecular chaperone activity.

研究代表者

迫野 昌文 (SAKONO, MASAFUMI)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・准教授

研究者番号：50391959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：スペーサー長の異なる2種類のNileRedを合成した。スペーサー末端のカルボン酸を活性エステルに変換したのち、還元末端アミノ化糖鎖との縮合を行った。その結果、高収率で環境応答性分子をアグリコンに有する糖鎖を合成することに成功した。human CRTのcDNAからのPCRを行い、制限酵素を用いてpColdIプラスミドベクターへインサートをおこなった。大腸菌へ形質転換後、タンパク質発現精製を行った。SDS-PAGEより、目的位置に単一バンドが確認されたことからhCRTの発現を確認した。今後、得られた蛍光基コンジュゲート糖鎖とhCRTを用いて相互作用実験を行っていく。

研究成果の概要(英文)：NileRed derivatives combined with spacer were synthesized. These derivatives were connected to amidated glycan, resulting that glycan which has environmental responsible ability. Recombinant human CRT was produced by E. coli. A cDNA encoding human CRT was cloned into pCold I expression plasmid, which was designed to produce N-terminally (His)6-tagged proteins.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：分子シャペロン レクチン 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾を受けるタンパク質は、小胞体内における糖タンパク質品質管理機構によりフォールディングの補助、検査を受ける。糖タンパク質品質管理機構は、数種類の糖転移酵素、糖切断酵素、さらに分子シャペロンであるカルネキシン(CNX)、カルレチキュリン(CRT)から構成される。これらの酵素のほとんどはレクチン活性を有しており、適した糖鎖構造の基質と反応する。フォールディング状態が完全に成熟していない糖タンパク質には、“フォールディングセンサー”と呼ばれる糖転移酵素が働き、グルコースを糖鎖に1つ付加する。グルコースを付加された未成熟の糖タンパク質は、分子シャペロンCNX/CRTの良基質となりフォールディング補助を受ける。ここで正常にフォールディングしたものは小胞体から輸送され次のステップへ進むことができる。しかし、フォールディングに失敗したものはグルコースを取り外され、分解経路もしくは再びCNX/CRTサイクルへ投げ込まれる。このようなサイクルを経由することで、未成熟な糖タンパク質が細胞内へ行きわたり蓄積しフォールディング疾患に至ることを未然に防いでいる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに糖転移酵素による未成熟糖タンパク質へのグルコース転移に関する検討を実施した。一般に、未成熟糖タンパク質を調製する際、糖鎖の翻訳後修飾のない大腸菌を用いることはできないため、動物細胞もしくは個体からの抽出精製により調製する必要がある。しかし、同じタンパク質でも局在する場所によって糖鎖構造が異なるため、糖鎖構造の揃ったタンパク質を調製することは難しく手間がかかる。そこで申請者は、化学合成手法により単一糖鎖構造を持ち疎水性の蛍光基とリンカーを介して結合した糖鎖プローブ(図1)を合成した。これを糖転移酵素の基質として反応を行い、主に以下の2点の知見を得た。

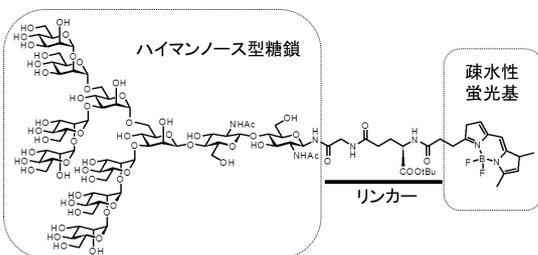


図1 蛍光基付加型糖鎖プローブ

糖転移酵素とプローブの相互作用および転移反応における物理定数は、実際の糖タンパク質を基質としたときと同等であり、糖鎖プローブがアンフォールド状態の糖タンパク質を模倣できている。

合成プローブはCDスペクトルによる二次構造測定に影響しないことから、糖転移酵素の構造解析を詳細に行うことが可能になり、

その結果、糖転移酵素は反応時にダイナミックな2次構造変化を示すことを初めて明らかにした。

したがって、我々の開発した合成糖鎖プローブは糖タンパク質品質管理機構をより詳細に検討するための強力なツールとして機能することが期待できる。

本研究では、レクチン様分子シャペロンの活性を可視化し、解離定数の測定や、より詳細な生物物理定数の導出を可能にする新規糖鎖プローブの開発を行う。これまでに申請者が用いた糖鎖プローブは、図2に示すように糖転移酵素などによりプローブの構造に変化が加えられることで活性を評価してきた。しかし、分子シャペロンは、タンパク質構造の巻き戻りをアシストする性質であるため、糖鎖構造に直接影響を与えず、相互作用した糖鎖プローブには物理的変化が与えられない。形成した分子シャペロン-基質複合体を未反応の基質と分離することで形成割合を測定する方法も考えられる。しかし、通常、分子シャペロンの解離定数は μ Mオーダーと弱い力であるため、未反応基質との分離中における複合体の解離に伴う誤差が無視できない。したがって、より正確に評価するには、シャペロンと複合化した際に、変化を生じるようにプローブに工夫を施すことが必要となる。そこで、分子シャペロンの基質認識の駆動力である疎水性相互作用を利用し、疎水性雰囲気下で蛍光波長が変化する蛍光基をコンジュゲートした糖鎖プローブを新たに合成する。この新規糖鎖プローブを用いて、シャペロンの活性を、未反応基質の分離操作を行うことなく、その場で観察が可能となる活性評価手法の確立を目指す。

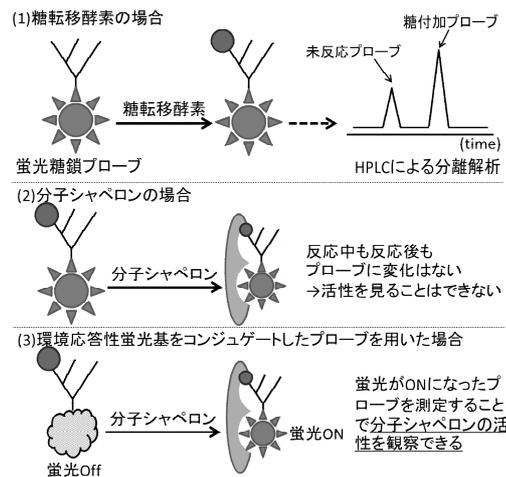


図2 糖鎖プローブを用いた活性評価

本研究の主な特色、独創的な点を以下に列挙する。

1) 単一構造の糖鎖 化学合成により調製した糖鎖プローブを用いることで、生体物からの抽出タンパク質と異なり、単一糖鎖構造の基質を用いた正確な活性評価を行うことができる。また、非天然の糖鎖構造を用いることも可能であり、レクチン活性を詳細に検討す

ることができる。

2) 取り扱いやすい基質 生体からの抽出タンパク質を用いる場合、分子シャペロンの基質とするためにアンフォールディング処理を施す必要性がある。しかし、糖鎖プローブの場合、疎水性蛍光基がアンフォールディング状態のタンパク質を模倣していることから、そのような処理を必要としない。

3) 安価かつ簡便な活性評価 分子シャペロンの研究において活性を直接評価する方法は、主に分子間相互作用を測定するための測定、例えばピアコアや、QCM、ITC などの高価な装置を必要とした。また、変性酵素のリフォールディングによる間接的評価は、解離定数の導出など検体数が増えると極めて煩雑であり時間も要する。本研究では、分子シャペロンと複合化した糖鎖プローブの蛍光強度変化を、汎用的な蛍光分光器で測定することにより、直接活性を測定することが可能になる。したがって、これまでにない安価かつ測定の容易な活性評価を実現する。

4) 基質の繰り返し利用が可能 分子シャペロンと複合化した糖鎖プローブは、解離することで元の状態の糖鎖プローブに戻る。そのため、測定終了後に透析処理などを施すことで、糖鎖プローブと分子シャペロンを分離し、濃縮操作の後、実験に再利用することができる。したがって、糖鎖プローブは実験量に応じて調製する必要がなく、最低限の合成量で実験を行うことができる。

3. 研究の方法

環境応答性蛍光基として疎水性蛍光基 NileRed を用いて、ハイマンノース型糖鎖へのコンジュゲーションを行い、疎水性環境に応答する新規糖鎖プローブを開発する。レクチン活性の詳細を調べるために、糖鎖の B,C-arm をトリミングした構造の糖鎖プローブも合成する。NileRed のコンジュゲーションは、カルボキシル基を付加することにより、リンカーペプチドと縮合することで実現する。レクチン様分子シャペロンとしてカルレティキュリンを調製し、合成した糖鎖プローブ共存下における NileRed の蛍光強度の増加を測定する。糖鎖プローブ濃度一定条件下で、分子シャペロンの濃度を変えて蛍光強度を測定することで、分子シャペロンと基質の解離定数を導出する。また、解離定数に及ぼす糖鎖構造の影響も検討しレクチン活性の定量的比較を行う。さらに、1 分子蛍光観察を用いて詳細な相互作用解析への応用を試みる。

レクチン様分子シャペロンの良基質となる糖鎖は、ハイマンノース型糖鎖(9つのマンノースと2つのNアセチルガラクトサミンから形成される)の A-arm 部位の非還元末端側にグルコースが1つ付加された構造であることが知られている。しかし、含まれる全 12 糖の中でどの糖が分子シャペロンのレクチン活性に大きく寄与するのかまだ不明

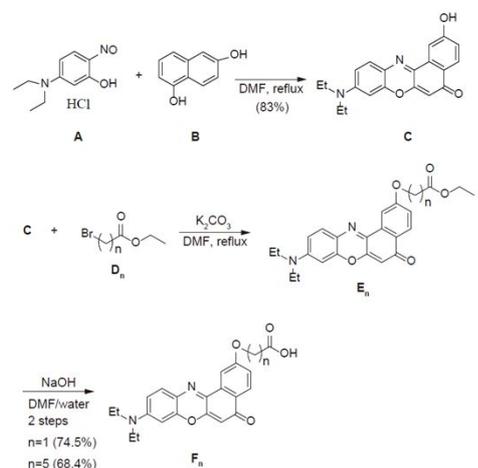
な点が多い。そこで、糖鎖構造の影響を調べるために様々な糖鎖構造のライブラリを構築する。特に、B-, C-arm の影響はほとんどわかっていないことから、それぞれの部位の影響が明らかになるように糖鎖をデザインする。

疎水性環境応答プローブとして、疎水性環境応答性蛍光基である NileRed を用いることとする。NileRed は疎水性でありアンフォールド状態を模倣することが期待される。また、蛍光特性として、水などの極性溶媒中ではほとんど蛍光を発しないが、非極性溶媒や疎水性化合物との結合により 600-640nm に強い蛍光を示すことが知られている。酪酸だけでなく酢酸およびプロピオン酸の導入によるカルボキシル基を有する NileRed を合成し、リンカー部位との縮合を行う。以上の糖鎖、リンカー、蛍光団を縮合することで糖鎖プローブを完成させる。

調製した糖鎖プローブが分子シャペロンの基質として働くことを確認するために、蛍光分光器を用いて、分子シャペロン存在下での糖鎖プローブの蛍光変化を測定する。この時、糖鎖構造は良基質となるグルコース 1 分子付加型ハイマンノースを用いる。蛍光変化が少ない場合には、リンカー長の調整ならびに NileRed の結合位置の調整を行い、もっとも蛍光変化の大きいプローブ構造を探索する。レクチン様分子シャペロンとして、CRT を大腸菌から大量発現し用いることとする。

4. 研究成果

1) カルボン酸を有する NileRed を合成し、ウィリアムソン合成にしたがってカルボン酸部位にスペーサーを結合した。この際、スペーサー長の異なる 2 種類の化合物を合成した。



2) スペーサー末端のカルボン酸を活性エステルに変換したのち、還元末端アミノ化糖鎖との縮合を行った。その結果、高収率で環境応答性分子をアグリコンに有する糖鎖を合成することに成功した。

3) human CRT の cDNA からの PCR を行い、制限酵素を用いて pColdI プラスミドベクターへインサートをおこなった。大腸菌へ形質転換後、タンパク質発現精製を行った。SDS-PAGE より、目的位置に単一バンドが確認されたことから hCRT の発現を確認した。

4) 今後、得られた蛍光基コンジュゲート糖鎖と hCRT を用いて相互作用実験を行っていく。具体的には、共存下における NileRed の蛍光波長変化を測定し、結合定数の導出を試みる。

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6件)

[1] Yoichi Takeda, Akira Seko, Masafumi Sakono, Masakazu Hachisu, Akihiko Koizumi, Kohki Fujikawa, and Yukishige Ito:

Parallel Quantification of Lectin-Glycan Interaction using Ultrafiltration. *Carbohydrate Research*, 375 号(2013) pp. 112-117.

doi: 10.1016/j.carres.2013.04.032.

[2] Karin Margareta Sörgjerd, Tamotsu Zako, Masafumi Sakono, Peter C Stirling, Michel R Leroux, Takashi Saito, Per Nilsson, Misaki Sekimoto, Takaomi C. Saido, and Mizuo Maeda:

Human prefoldin inhibits A fibrillation and contributes to formation of non-toxic Abeta aggregates. *Biochemistry*, 52 号(2013) pp. 3532-3542.

doi: 10.1021/bi301705c.

[3] Masafumi Sakono, Arata Utsumi, Tamotsu Zako, Tetsuya Abe, Masafumi Yohda and Mizuo Maeda:

Formation of non-toxic Abeta fibrils by small heat shock protein under heat-stress conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430 号 (2013) pp. 1259-1264.

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.059.

[4] Masafumi Sakono, Akira Seko, Yoichi Takeda, Yukishige Ito:

PDI family protein ERp29 forms 1:1 complex with lectin chaperone calreticulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452 (2014) 27-31.

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.041.

[5] Masafumi Sakono, Akira Seko, Yoichi Takeda, Jun-ichi Aikawa, Masakazu Hachisu, Akihiko Koizumi, Kohki Fujikawa, Yukishige Ito:

Glycan specificity of a testis-specific

lectin chaperone calmeglin and effects of hydrophobic interactions.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1840 (2014) 2904-2913. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.04.012

[6] Simone Dedola, Masayuki Izumi, Yutaka Makimura, Akira Seko, Akiko Kanamori, Masafumi Sakono, Yukishige Ito, and Yasuhiro Kajihara:

Folding of Synthetic Homogeneous Glycoproteins in the Presence of a Glycoprotein Folding Sensor Enzyme. *Angewandte Chemie International Edition*, 53 (2014) 2883-2887.

doi: 10.1002/anie.201309665

[学会発表](計4件)

[1] 迫野昌文、瀬古玲、武田陽一、八須匡和、小泉晶彦、藤川紘樹、瀬戸秀春、伊藤幸成
カルネキシン/カルレティキュリンサイクルに対する5-チオグルコース置換型基質の反応性, GlycoTokyo2013 (東京), 2013年10月19日

[2] 迫野昌文、瀬古玲、武田陽一、八須匡和、小泉晶彦、藤川紘樹、瀬戸秀春、伊藤幸成
糖タンパク質品質管理機構関連酵素に対する5-チオグルコース置換型基質の反応性, 第32回糖質学会(大阪), 2013年8月5日

[3] 迫野昌文、瀬古玲、武田陽一、八須匡和、小泉晶彦、藤川紘樹、瀬戸秀春、伊藤幸成
糖タンパク質品質管理機構関連酵素に対する5-チオグルコース置換型基質の効果, 農芸化学会2014年大会(東京), 2014年3月27日

[4] Masafumi Sakono, Akira Seko, Yoichi Takeda, Yukishige Ito
Complexation of PDI family protein ERp29 with lectin chaperone calreticulin, PACIFICHEM2015(ハワイ), 2015年12月15日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

迫野昌文 (SAKONO MASAFUMI)

富山大学, 大学院理工学研究部(工学), 准教授

研究者番号: 50391959