

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750387

研究課題名(和文) 標的糖質を選択的にラベル化する人工機能性レクチンの創製と細胞表面エンジニアリング

研究課題名(英文) Creation of artificial functional lectins for target-selective labeling of carbohydrates and their application to cell surface engineering

研究代表者

高橋 大介 (Takahashi, Daisuke)

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：00509929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、標的糖質を選択的にラベル化する新たな人工機能性レクチンの創製と応用を目的とした基盤研究を行った。

まず、人工機能性レクチンを合成するための基盤技術の開発に取り組み、標的レクチンを選択的に単離・ラベル化する固相アフィニティラベル化法(第一世代)の開発に成功した。また、本手法が薬剤の標的タンパク同定法としても有望であることを明らかにした。さらに、より温和な条件下でレクチンのラベル化が行える光切断型の固相アフィニティラベル化法(第二世代)の開発を検討し、目的とする人工機能性レクチンを創製する上で重要な指針を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Toward the creation of novel artificial functional lectins, a solid-phase affinity labeling method (1st generation) using a designed and synthesized chemical tool was developed. It was found that the solid-phase affinity labeling reaction of target-lectin (Con A or PNA) selectively and effectively proceeded even in the presence of other proteins. In addition, it was successfully demonstrated that target-selective isolation and modification of the native protein, hCA II, was feasible, even from human cell lysate. With these results, it is expected that this method will be applicable for target-selective isolation and modification of unknown target receptor proteins of biologically active small molecules. Furthermore, a novel solid-phase affinity labeling method (2nd generation) using a designed and synthesized photo-cleavable chemical tool to improve the efficiency of the cleavage reaction. These results will contribute to the creation of the purposed artificial functional lectins.

研究分野：有機合成化学、糖質化学、化学生物学

キーワード：糖鎖認識 レクチン ラベル化 人工機能性タンパク 固相反応 光反応

1. 研究開始当初の背景

細胞表層上の糖鎖は、「細胞の顔」とも呼ばれ、細胞の種類や状態に応じて、その構造ならびに発現量を変化させることで、恒常的な生命現象や疾病に深く関与している。そのため、細胞表層糖鎖の機能解析を可能にする機能性プローブで、標的糖質（糖鎖、糖タンパク、および糖脂質）を選択的にラベル化する新技術の開発は、極めて重要である。これまでに、国内外を通じて、生細胞表層糖鎖を、共有結合を介して直接ラベル化する唯一の手法として、糖鎖の生合成経路を利用した代謝標識法が挙げられる。代謝標識法とは、培養液に入れたアジド基を有する非天然型単糖（マンノサミン誘導体）が、哺乳動物細胞に取り込まれ、アジド基を有するシアル酸誘導体へと変換された後、この単糖を含む糖鎖が細胞表層上に提示されることを利用した手法であり、提示されたアジド基と機能性プローブとの Staudinger 反応、またはクリック反応を行うことで、生細胞表層上のシアロ糖鎖（シアル酸含有糖鎖）のライブイメージングに成功している (Bertozzi C. R. et al. *Science*, **2000**, *287*, 2007; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 16793.)。しかし、上記手法では、原理的に、全てのシアロ糖鎖がラベル化されてしまうため、詳細な糖鎖の機能解析は困難である。さらに、非天然型単糖の細胞への取り込み効率や代謝効率など改善すべき複数の課題が残されている。このような背景の中、申請者は、細胞表層上の標的糖質の選択的なイメージングや定量的な糖鎖プロファイリングを実現し、糖鎖機能の統合的理解を深めるには、これまでにないブレークスルーが不可欠であると考えた。そこで、糖鎖の種類、結合異性、および位置異性体を識別可能なレクチンを化学的に修飾した新たな人工機能性レクチンを創製し、生細胞表層上の標的糖質を選択的かつ直接的にラベル化する新技術を開発したいという経緯に至った。

2. 研究の目的

以上の背景より、本研究では、標的糖質を選択的かつ直接的にラベル化する人工機能性レクチンの創製と細胞表層エンジニアリングへの応用を指向した基盤技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、以下に示した方法で検討した。
 (1) 「リガンド交換型（第一世代）固相ケミカルツール」を用いた人工機能性レクチンの創製
 生体適合性ポリマー(PEGA レジン)上に、a) リガンド部位としてガラクトースまたはマンノース、b) タンパクの固定化部位にプロモアセチル基、及び c) 切り出し部位にヒドラゾン部位を有する固相ケミカルツール 1 または 2 のデザイン・化学合成
 固相ケミカルツール 1 を用いた、標的レク

チン PNA の固定化反応およびヒドラゾン-オキシム交換反応を用いた切り出し法の検討
 固相ケミカルツール 2 を用いた、標的レクチン Con A のラベル化反応への応用
 標的レクチンと数種類のタンパク質共存下でのラベル化反応の検討とタンパク選択性の検証
 糖以外のリガンドとそのレセプタータンパク質の組合せを用いた本手法の一般性の検証

(2) 「光切断型（第二世代）固相ケミカルツール」を用いた人工機能性レクチンの創製
 PEGA レジン上に、a) リガンド部位としてマンノース、b) 固定化部位にプロモアセチル基、及び c) 切り出し部位に、人体に害のない長波長紫外光の照射下、温和な中性条件で切断可能な *o*-ニトロベンジル基を併せ持つ固相ケミカルツールのデザイン・化学合成
 合成した光切断型固相ケミカルツールを用いた、標的レクチン Con A の固定化反応の検討
 固相上に固定化した Con A の、長波長紫外光 (365 nm, 15-100 W) の光照射下における切り出し反応の検討
 なお、上記(1)、(2)いずれの場合も、各反応の進行は、SDS-PAGE 及び MALDI-TOF MS 解析により確認・評価した。

4. 研究成果

(1) リガンド交換型（第一世代）固相ケミカルツールを用いた人工機能性レクチンの創製
 まず、デザインした固相ケミカルツール 1 及び 2 (図 1) を化学合成後、1 を用いた PNA の固定化反応を検討した。その結果、反応は、HEPES バッファー (pH 8.0, 50 mM) 中、室温、24 時間で速やかに進行し、70% の収率で固相上に PNA が担持された 4 が得られることを見出した。次に、アミノオキシ酢酸 5 を用いた切り出し反応 (ヒドラゾン-オキシム交換反応) を検討した結果、酢酸バッファー (pH 5.5, 50 mM) 中、37 °C、72 時間反応を行うことにより、望むラベル化 PNA 6 が 52% の収率で得られることを見出した (スキーム 1)。なお、各段階の反応の進行は、MALDI-TOF MS 及び UV-Vis スペクトル解析により確認し、反応収率は、Bradford 法により算出した。

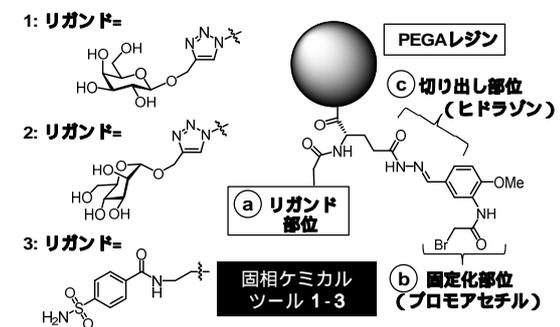
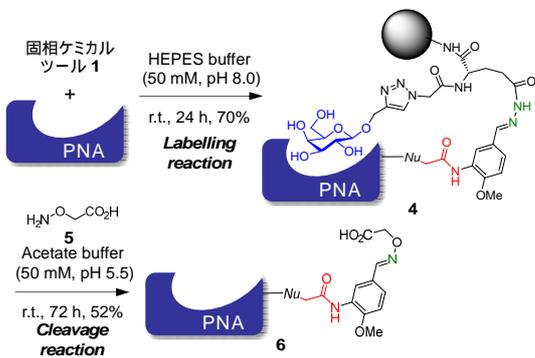
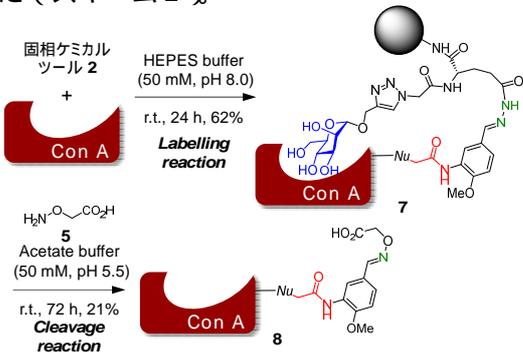


図 1 固相ケミカルツールの化学構造



スキーム 1 固相ケミカルツール 1 を用いたラベル化 PNA 6 の合成

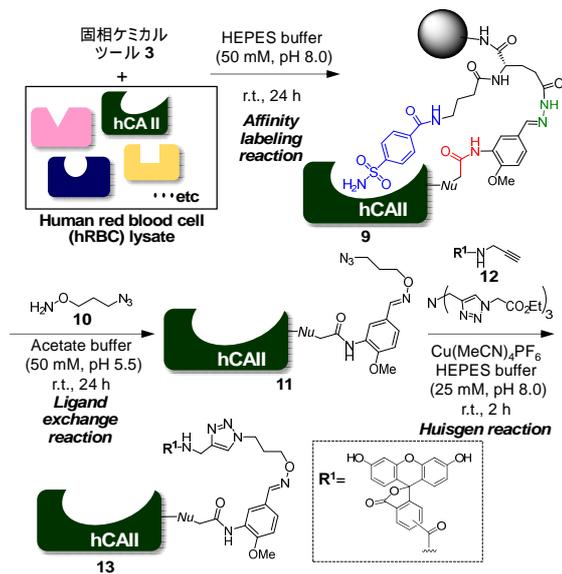
次に、固相ケミカルツール 2 を用いた Con A のラベル化への応用を検討した。その結果、同条件下においていずれの反応も進行し、望むラベル化 Con A 8 が得られることを見出した (スキーム 2)。



スキーム 2 固相ケミカルツール 2 を用いたラベル化 Con A 8 の合成

次に、本手法のタンパク選択性を検証するため、1 を用いた PNA のラベル化を、ガラクトースに対して親和性を有さない 3 種類 (BSA, fetuin, 及び RNase A) のタンパク共存下で検討した。その結果、ラベル化 PNA 4 が、混合タンパク中からでも、選択的に得られることを明らかにした。さらに、2 を用いた Con A のラベル化反応を複雑なタチナタマメのタンパク抽出液を用いて検討した場合においても、本反応が標的選択的に進行することを見出した。なお、以上の反応におけるタンパク選択性は、MALDI-TOF MS 及び SDS-PAGE 解析を行うことで確認している。以上の結果より、本手法が、標的レクチンを選択的に機能化する新手法として有効であることを示すことができた。そこで、本手法が薬剤の標的タンパク同定法として応用できるのではないかと考え、以下に示した実験を検討した。すなわち、薬剤様分子としてベンゼンスルホンアミドを選択し、これをリガンド部位として有する固相ケミカルツール 3 をデザイン・合成した。次に、得られた 3 を用いて、赤血球細胞ライセートから、ベンゼンスルホンアミドの標的タンパクであるヒト炭酸脱水酵素 II (hCAII) の単離・機能化を検討した。具体的には、赤血球細胞ライセートに 3 を作用させ、固相上へのタンパクの固定

化反応後、未反応タンパクを洗浄操作により除去した。次に、アジド基を有するアルコキシアミン 10 を用いた切り出し反応、続くアセチレン部位を有するフルオレセイン 12 との Huisgen 環化反応を検討した。その結果、セルライセート中から、蛍光ラベル化された標的タンパク hCAII 13 を選択的に単離することに成功した (スキーム 3)。以上の結果より、本手法が、セルライセート中からでも標的タンパクを選択的に単離出来るだけでなく、機能化も可能にする効率的な手法であることを明らかにし、薬剤の標的タンパク同定法としても有望であることを見出した。



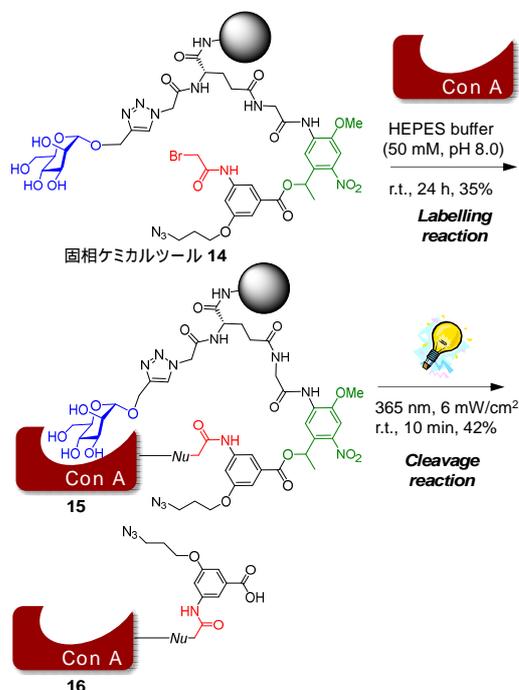
スキーム 3 固相ケミカルツール 3 を用いた hCAII の選択的単離・機能化

しかし、本手法において切り出し反応に用いたヒドラゾン オキシム交換反応は、アルコキシアミンと固相上のヒドラゾン部位とが反応する二基質型の反応であるため、タンパク質の種類によっては、立体障害が大きく、反応時間に 72 時間を要するなど、反応効率が低いことが課題として明らかになった。また、本切り出し反応条件に付した後の Con A のマンノースに対する結合定数が、ネイティブの Con A と比較して明らかに低下することを、等温滴定熱量計 (ITC) を用いた検証実験により確認された。以上の結果を受け、温和な条件下、タンパクの変性を伴うことなく速やかに進行すると期待した光切断反応を切り出し反応とする新手法の開発を行った。

(2) 「光切断型 (第二世代) 固相ケミカルツール」を用いた人工機能性レクチンの創製

まず、a) リガンド部位としてマンノース、b) タンパクの固定化部位にプロモアセチル基、及び c) 切り出し部位に、人体に無害な長波長紫外光の照射下、速やかに切断可能な *o*-ニトロベンジル基を選択し、これを PEGA レジン上に併せ持つケミカルツール 14 をデザイン・合成した。次に、14 を用いて、光切断

反応の効率を LC-MS を用いて定量的に評価した。その結果、50% MeCN/酢酸バッファー (pH 5.5, 50 mM) 中、室温、365 nm (6 mW/cm²) の光照射下、効率的に光切断反応が進行し、10 分間の光照射により、ほぼ定量的に反応が進行することを見出した。次に、**14** を用いた固相アフィニティラベル化反応を検討した。その結果、HEPES バッファー (pH 8.0, 50 mM) 中、室温で 24 時間反応させることで、固相に Con A が担持された **15** が 35% の収率で得られることを見出した。さらに、得られた **15** を用い、酢酸バッファー (pH 5.5, 50 mM) 中、室温、10 分間の光照射を行うことで、ラベル化タンパク **16** が 41% の収率で得られることを見出した。最後に、本手法の応用として、**14** とタチナタマメ抽出液を用いた固相アフィニティラベル化を検討した。その結果、夾雑物の多いタンパク粗抽出液からでも、Con A を選択的に単離・ラベル化できることを明らかにした。以上の結果より、本手法は、ヒドラゾン オキシム交換反応を用いた従来法に比べ、切り出し反応が簡便かつ迅速に行える効率的な手法であることを見出した (スキーム 4)。



スキーム 4 固相ケミカルツール **14** を用いた Con A 選択的単離・機能化

しかし、本手法の A) 固相ラベル化収率が低い点、及び予想外の結果として、B) 光切断反応の再現性が低いことが研究を進めていく中で明らかとなった。そこで、上記課題の克服を目的とし、新規光切断型ケミカルツールのデザイン・合成、及び機能評価を行った。分子デザインに際し、課題 A) の原因は、**14** が Con A と相互作用した後の固定化部位近傍に、求核性アミノ酸残基が存在しないためだと考えた。そこで、**14** のリガンド部位から固定化部位までの分子長を短くした新規

ケミカルツール **17** をデザイン、合成した (図 2)。次に、**17** を用いた液相中における Con A のラベル化を検討した結果、**17** のラベル化収率が、62% まで顕著に向上することを見出し、課題 A) の克服に成功した。次に、課題 B) の原因は、固相上の分子が固相内部に入り込み、光が十分到達しなかったためと考えた。そこで、分子 **17** を直接固相上に担持するのではなく、固相内部に入り込みにくいアビジンを固相表層に担持後、アビジン-ビオチン相互作用を介して、分子を担持した固相ケミカルツール **18** を合成後 (図 2)、光切断反応を検討した。その結果、良好な収率で光切断反応が進行することを見出し、目的とする人工機能性レクチンを創製する上で重要な指針を得ることできた。

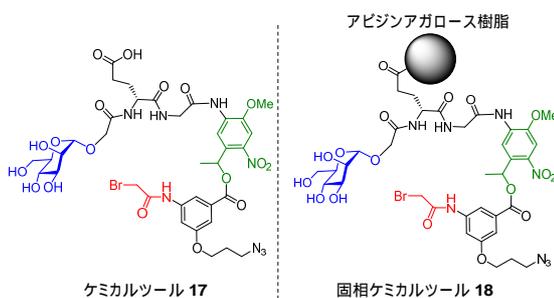


図 2 ケミカルツール **17** 及び **18** の化学構造

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 1 件)

Kuwahara, D.; Hasumi, T.; Kaneko, H.; *Takahashi, D.; *Toshima, K., A Solid-Phase Affinity Labeling Method for Target-Selective Isolation and Modification of Proteins, *Chem. Commun.*, 査読有, **2014**, 50, 15601-15604.

〔学会発表〕(計 6 件)

【招待講演】Takahashi, D., SUNBOR symposium 「Chemistry of Natural Products -Power of the Molecules」, Chemical Methods for Target-selective Photodegradation of Oligosaccharides & for Target-selective Isolation and Modification of Proteins, November 17, 2014, Suntory Foundation for Life Sciences (Osaka-fu・Mishima-gun)

【招待講演】高橋 大介, 2 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム固相ケミカルツールを用いた標的タンパクの選択的単離・機能化法の開発, 2014 年 9 月 10 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

Kuwahara, D.; Takahashi, D.; Kazunobu T, A Solid-phase Chemical Labeling Method for Isolation and Modification of Target Proteins,

2nd National Tsing Hua University / Keio University Bilateral Symposium of Advanced Chemistry, July 10, 2014, Keio University Yagami Campus (Kanagawa-ken · Yokohama-shi)

桑原 大知、高橋 大介、戸嶋 一敦、固相アフィニティラベル化法を用いた薬剤標的の同定法の開発、日本ケミカルバイオロジー学会 第9回年会、2014年6月11日、大阪大学豊中キャンパス（大阪府・豊中市）

蓮見 貴大、金子 新、高橋 大介、戸嶋 一敦、標的タンパクを選択的に単離・標識化する固相ラベル化法の開発、日本化学会第94春季年会、2014年3月28日、名古屋大学東山キャンパス（愛知県・名古屋市）

【招待講演】 Takahashi, D., Chemistry Based Approaches for Target-Selective Photodegradation of Oligosaccharides and for Target-selective Modification of Proteins, Carlsberg Laboratory Seminar, September 27, 2013, Carlsberg Laboratory, Copenhagen (Denmark)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.applc.keio.ac.jp/~toshima/takahashi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 大介 (TAKAHASHI DAISUKE)

慶應義塾大学・理工学部・専任講師

研究者番号：00509929

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし