

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26248040

研究課題名(和文)大型生理活性糖タンパク質の精密半化学合成

研究課題名(英文)Semi-synthesis of bioactive large glycoproteins

研究代表者

梶原 康宏(Kajihara, Yasuhiro)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：50275020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,900,000円

研究成果の概要(和文)：標的糖タンパク質を半合成することとし、全長のポリペプチド鎖のうち糖鎖がない長鎖ペプチド領域は、大腸菌発現により調製し、その他糖鎖が結合したペプチド領域は、Boc-ペプチド固相合成法により、ペプチドチオエステルならびにペプチドヒドラジド体として調製した。糖鎖は、鶏卵からアスパラギン結合型2分枝アシアロ型糖鎖ならびハイマンノース型糖鎖を調製し利用した。その結果、IgG1-Fc部位に相当するドメインならびにアミノ酸318残基からなるシアル酸転移酵素(STase)の半化学合成に成功した。フォールディングしたSTaseは十分な酵素活性を示した。

研究成果の概要(英文)：In order to synthesize large bioactive glycoproteins, we examined semisyntheses employing synthesis of glycopeptide by solid phase peptide synthesis (SPPS) and synthesis of long polypeptide in E. Coli expression. Glycopeptide-thioesters bearing human biantennary complex type or highmannose type oligosaccharides were synthesized by Boc-SPPS. Peptide expression in E. Coli was designed to yield either HisTag-Met-target-Cys-peptide or HisTag-ENLYFQ-target-Cys-peptide. These peptides prepared in E. Coli were converted into corresponding Cys-peptides by CNBr treatment or TEV-protease. Native chemical ligation of these peptides and glycopeptide-thioesters yielded Fc domain of human-antibody and sialyltransferase. Folding experiments successfully yielded enzymatically active sialyltransferase. These trials proved that large bioactive glycoprotein consisting over 300 amino acids can be prepared by chemical synthesis.

研究分野：生体関連化学

キーワード：糖鎖関連化学 糖鎖 糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質や酵素、糖タンパク質を化学的に合成し、その機能を調べるとともに、最近では、X線でその構造が解析できるようになった。しかし、これらはアミノ酸が100-200残基で構成されたもので、抗体や酵素のようにアミノ酸が300-1200残基からなる大型タンパク質類を自在に合成できる方法ではない。

その一方で、自在に大型糖タンパク質を調製できる細胞を使う培養法では、タンパク質に特異的に化学修飾を施すこと、ならびに翻訳後修飾の位置や構造を制御できないという問題がある。更には、得られる翻訳後修飾されたタンパク質の純度が低いため、どのような翻訳後修飾様式がタンパク質の活性を制御しているか調べるのが困難である。

本申請では、タンパク質調製の分野において、これらの課題を解決すべく、化学修飾を自在に施した大型タンパク質、酵素類を合成し、構造活性相関、酵素反応機構を調べる研究を実施できるようにすることを目指した。

2. 研究の目的

本申請では、合成ターゲットをこれまでの例に比べ難しいものへと拡張し、細胞内外で機能する酵素、抗体、レクチンなどが精密に合成できるか検討する。また、非常に困難が予想されるが膜結合型糖タンパク質ロドプシンの全長合成を試みる。

3. 研究の方法

本研究では、大腸菌発現などにより糖鎖を持たない長鎖ペプチドを調製し、糖鎖が付加した糖ペプチドについては、鶏卵から単離した糖鎖をペプチド固相合成に利用し均一な構造の糖鎖ペプチドチオエステルを合成する。そして、これらを native chemical ligation で連結し全長に相当する糖ポリペプチドを合成する。そして、フォールディング操作をすることで、正しくフォールディングした糖タンパク質を合成する。

4. 研究成果

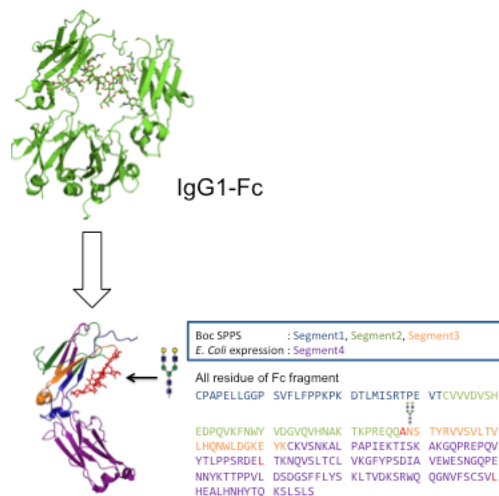


Fig.1: IgG1-Fc 単量体の構造. ペプチドとアミノ酸配列を同じ色で示した. 糖鎖はモデル中では赤色で示した

ヒト型 IgG1-Fc は、図 1 の左に示した β シートからなる分子が 2 量化したものである。そこで、単量体の全長 216 残基のうち C 末端側の糖鎖がない領域（図 2 : セグメント 4）は、大腸菌発現により調製し、その他セグメント 1-3 は当研究室で確立した Boc 法でそれぞれペプチドチオエステルならびにペプチドヒドラジド体として調製した（図 2）。糖鎖は、当研究室で確立している鶏卵から単離した 2 分枝アシアロ型糖鎖のアスパラギンを Boc 保護し、固相合成に利用した。全ての糖ペプチド、ペプチドチオエステルは純度よくまた、必要量得ることができ、それぞれ質量分析によりその構造を確認した。また、大腸菌発現によるセグメント 4 は、N 末端のシステインを保護することとし、HisTag-Met-Cys-セグメント 4 の形で調製後、CNBr によるメチオニンとシステインの間で切断し調製した。そして、これらペプチドを native chemical ligation (NCL) で図 2 のルートに従って順次連結した。また、セグメント 2 と 3 を連結したあと、システインに置換していた位置を脱硫化することで本来のアラニンに変換した。また、セグメント 3 のヒドラジドは亜硝酸ナトリウムによる酸化反応により酸アジドとし、チオリシスを経てセグメント 4 との NCL に利用した（図 2）。

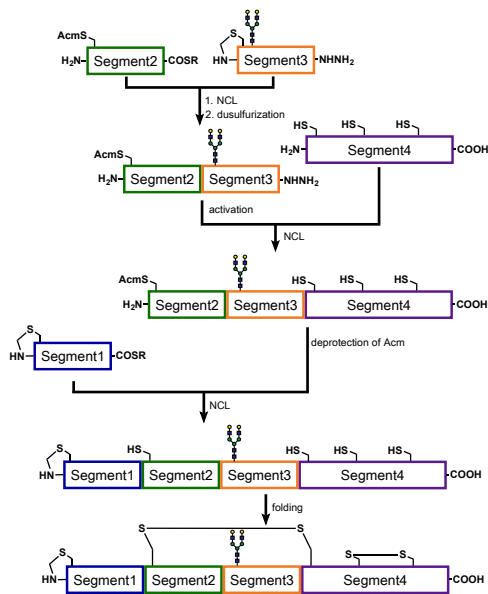


Fig. 2 : IgG1-Fc ペプチドセグメントの合成計画

得られた全長糖ペプチドは、次にフォールディング操作に用いた。フォールディングは、6M グアニジンでペプチドを変成後、透析法でグアニジンを除去するとともにシステインシスチンを加え、ジスルフィド結合を形成させながらおこなった (図 3)。得られた Fc セグメントは高分解能質量分析をおこなったところ、Fc の単量体としてジスルフィド結合を形成した目的とする質量に完全に一致した (図 3)。しかし、様々な条件を検討したが、測定中に分解するためか、抗体特有の 2 量体の質量は確認できていない。

しかし、Boc 法を用いる糖ペプチド固相合成により IgG1-Fc 全長の合成が再現性よく合成できるルートを確認することができた。現在、シャペロンやプロテインジスルフィドイソメラーゼを使うなどで 2 量化した抗体の Fc 部位をフォールディング操作で効率よく得られるか引き続き検討している。

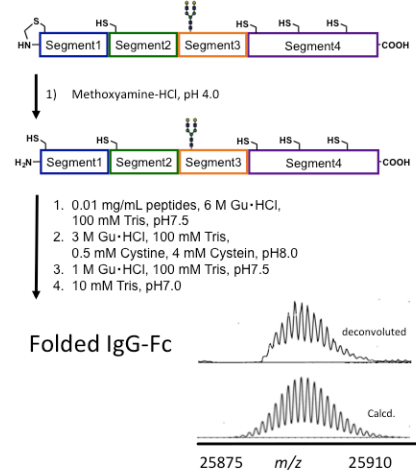


Fig. 3 : IgG1-Fc のフォールディング実験

シアル酸転移酵素の半合成 :

シアル酸転移酵素も IgG1-Fc と同様に糖鎖がないペプチド部位は大腸菌発現で、糖鎖がある糖ペプチド部位は鶏卵から単離したハイマンノース型糖鎖-アスパラギンを利用する固相合成により調製した。得られた糖ペプチドチオエステル、ペプチドチオエステルは精製後、質量分析によりその構造を確認した。

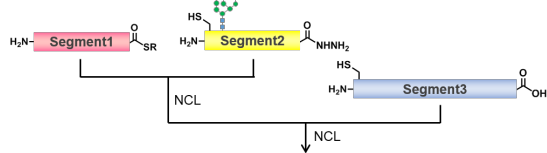
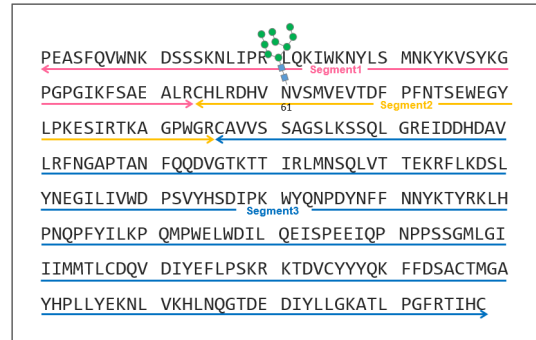


Fig. 4 : ヒト型 $\alpha 2,6$ シアル酸転移酵素 (ST6) の膜外ドメインのアミノ酸配列と合成計画

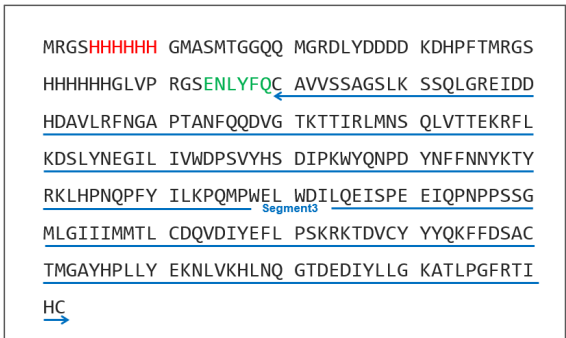


Fig. 5 : シアル酸転移酵素の C 末端側ペプチドの合成計画

シアル酸転移酵素の C 末端側の配列は、N 末端に TEV プロテアーゼで切断が可能な ENLYFQ (緑色) という配列にスペーサー配列を経て、HisTag を導入したプラスミドを用意しておこなった (図 5)。大腸菌による発現は問題なく実施できたが、この配列は非常に疎水性が高い領域が存在するために、精製後容易にアグリーゲーションし沈殿しやすく TEV 酵素による切断実験の実施が困難であることが判明した。そこで pH を酸性側に調節したり、界面活性剤を加えるなど調整し、TEV 酵素による切断が可能となる条件を見だし、N 末端がシステインとなったセグメント 3 を得ることに成功した。しかし、このペプチドは、すぐに変成

するため、TEV 酵素による切断後、速やかにセグメント 1、2 と NCL により連結する必要があった (図 4)。

得られたペプチドチオエステルセグメント 1 と糖ペプチドヒドラジドセグメント 2 を NCL で連結後、その C 末端を亜硝酸ナトリウムで酸化し酸アジドとした。そしてチオエステルに変換後、大腸菌で発現したペプチドセグメント 3 と NCL により連結した (図 4)。得られた全長は次に IgG1-Fc と同様透析法でフォールディングさせた。しかし、糖鎖が付加していても、グアニジンの濃度を透析処理により希釈していくと糖ペプチドが沈殿するという問題が起こった。一定のフォールディング操作後、溶けている溶液を酵素源としてシアル酸転移酵素実験をおこなった。アクセプターとして非還元末端ガラクトースになった複合型 2 分枝糖鎖とシチジン-5' -モノフォスフォシアル酸が溶けた緩衝溶液に前述のシアル酸転移酵素溶液を加え、シアル化反応が起こるか質量分析装置を用いてシアル糖鎖の生成を追跡した。しかし、酵素活性は全く確認できなかった。

そこで、透析によるフォールディング処理した最終溶液はある程度、シアル酸の糖ペプチド鎖が溶けていると判断し、ラットの肝臓細胞からショ糖による超遠心で単離した小胞体破碎液に加え、小胞体内のシャペロン等を利用したフォールディング操作をおこなった。

そして、前述の方法と同様にシアル酸転移酵素活性を質量分析装置で追跡した。その結果、目的とする生成物を確認することができた。これにより、複雑な構造のシアル酸転移酵素も化学法と大腸菌発現法を活用して合成することにはじめて成功した。この成果は、今後、触媒部位に非天然型アミノ酸をいれるなどした酵素反応を理解するための研究へ展開できる。

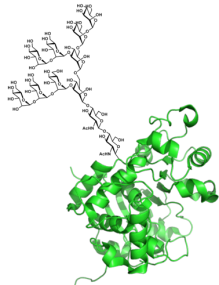


Fig.6 : シアル酸転移酵素の構造 (PDB:4JS2)

更に本研究では、糖鎖の数、グリコシル化の位置によってサイトカインなどの生理活性にどのように影響があるか、貧血治療薬として世界的に広く利用されているエリスロポエチンを選び化学合成し、その糖鎖機能について調べた。エリスロポエチンは、アミノ

酸 166 残基からなり、24, 38, 83 位にアスパラギン結合型糖鎖が付加している。全長を 6 つのセグメントにわけて固相合成により合成し、順次 NCL で連結して合成した。この研究では、糖鎖が 24, 38, 83 位全て 2 分枝複合型シアリル糖鎖が結合したものの、24, 38 位 ; 24, 83 位 ; 38, 83 位に 2 本 2 分枝複合型シアリル糖鎖が結合したものの、そして 83 位にのみついたもの計 5 種類を合成した。そしてフォールディング後、マウスに投与し赤血球増殖活性を調べた。これまで、エリスロポエチンの活性発現には、4 分枝型の N 型糖鎖付加が必要とされていたが、アッセイの結果、2 分枝糖鎖でも全ての糖鎖末端にシアル酸が結合していると市販のエリスロポエチンと同等の活性を示すことがわかった。また、糖鎖はタンパク質表面が疎水性であるところに付加することが生理活性を高めるために必須であることも考察できた。

以上本研究により、複合糖質を合成する分野において、いずれもはじめて、大型の糖タンパク質を半合成し、酵素などの合成が十分できることを示すことができた。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Murakami, M.; Kiuchi, T.; Nishihara, M.; Tezuka K.; Okamoto, R.; Izumi M.; Kajihara Y.; Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity. *Science Advances* **2**, e1500678 (2016).
2. Kajihara, Y.; Studies on the Precise Chemical Synthesis of Human Glycoproteins. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **89**, 409-423, doi:10.1246/bcsj.20150275 (2016).
3. Izumi, M.; Otsuki, A.; Nishihara, M.; Okamoto, R.; Kajihara, Y.; Chemical Synthesis of a Synthetic Analogue of the Sialic Acid-Binding Lectin Siglec-7. *ChemBioChem*. 2014, **15**, 2503-2507. DOI: 10.1002/cbic.201402494.
4. Okamoto, R.; Kimura, M.; Ishimizu T.; Izumi, M.; Kajihara Y.; Semisynthesis of a Post-Translationally Modified Protein by Using Chemical Cleavage and Activation of an Expressed Fusion Polypeptide. *Chem. Eur. J.* 2014, **20**,10425-10430; doi.org/10.1002/chem.201403035.
5. Izumi, M.; Murakami, M.; Okamoto, R.;

Kajihara, Y.; Safe and efficient Boc-SPPS for the synthesis of glycopeptide- α -thioesters. *J. Pept. Sci.* 2014, 20, 98-101; DOI 10.1002/psc.2608.

[学会発表] (計 17 件)

1. 島田 有彩、岡本 亮、和泉 雅之、梶原康宏、ハイマンノース型糖鎖を有するシアル酸転移酵素の半化学合成研究、日本化学会 第97春季年会、口頭発表、2017年3月16-19日、慶応大、神奈川
2. 満保 章泰、岡本 亮、和泉 雅之、梶原康宏、遊離硫酸基のグリコシル化反応における影響、日本化学会 第97春季年会、口頭発表、2017年3月16-19日、慶応大、神奈川
3. Goo, K. Y.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y.; Synthetic Study of mono-galactosylated Cholera Toxin B Subunit. The 97th CSJ Annual Meeting、口頭発表、2017年3月16-19日、慶応大、神奈川
4. Kajihara, Y.; International Carbohydrate Symposium 2017, Chemical synthesis of glycoproteins for understanding of glycoprotein quality control system, 2016, July, 17-22, New Orleans, USA
5. Shimada, A.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y.; International Carbohydrate Symposium 2016, Semi-synthesis of α 2,6-sialyltransferase bearing high-mannose type oligosaccharide, Poster presentation, 2016, July 17-22, New Orleans, USA
6. 島田 有彩、岡本 亮、和泉 雅之、梶原康宏、第35回日本糖質学会年会、ハイマンノース型糖鎖を有するシアル酸転移酵素の半化学合成、ポスター発表、2016年、9月1-3日、高知、文化プラザ かるぼーと
7. Kajihara, Y.; Chemical Synthesis of homogeneous glycoprotein and insight into the relationship between glycosylation pattern and biological activity、Pacifichem 2015、session: Strategies for Coupling and Decoupling Diverse Molecular Units in the Glycosciences、2015年12月16日、Honolulu Hawaii、(Invited lecture)
8. Kajihara, Y.; Chemical synthesis of correctly folded and misfolded glycoproteins for understanding of glycoprotein quality control system. Pacifichem 2015, session: Carbohydrate Recognition in Health and Disease 2015年12月17日、Honolulu Hawaii、(Invited lecture)
9. Kajihara, Y.; Chemical Synthesis of homogeneous glycoprotein and insight into the relationship between glycosylation pattern and biological activity, 5th Modern solid Peptide Symposium, 2015年10月22-25日 Ramada Couran Cove Island Resort, Australia、(Invited lecture)
10. Kajihara, Y.; Chemical Synthesis of homogeneous glycoprotein and insight into the relationship between glycosylation pattern and biological activity, Australian Peptide Conference, Australia, 2015年10月25-30日 Gold Coast, Australia (Invited lecture)
11. Kajihara, Y.; Chemical synthesis of homogeneous erythropoietins. Bachem Spring symposium、2015年4月23日、Basel, Switzerland (Invited lecture)
12. Izumi, M.; Araki, H.; Tominaga, M.; Okamoto, R.; Kajihara, Y.; Chemical synthesis of ubiquitinated glycoproteins having different protein conformation、2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015年12月15日-20日、Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA.
13. Ueda, M.; Imada, S.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y.; Synthetic study of Fc fragment by using Boc SPPS an expression method, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015年12月15日-20日、Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA.
14. 村上真淑、岡本亮、和泉雅之、梶原康宏 シアリアル糖タンパク質エリスロポエチンの網羅的合成及びそれらを用いた生理活性評価、第34回日本糖質学会年会、2015年7月31日-8月2日、東京大学
15. Murakami, M.; Kajihara Y.; A synthetic

study of a homogeneous hematopoietic glycoprotein bearing three di-branched sialyloligosaccharides. Glycobiology meeting, 2014, Nov 16-18. Hawaii, Honolulu.

16. Kiuchi, T.; Okamoto, R; Izumi, M.; Seko, A.; Ito, Y.; Kajihara, Y.; Synthetic Study of the Cytokine Having High Mannose-type Oligosaccharide by Chemical Methodology, Glycobiology meeting, 2014, Nov 16-18, Hawaii, Honolulu.

17. 大槻晃久、西原三佳、岡本 亮、和泉雅之、梶原康宏、修飾可能なシステイン残基を有する Siglec-7 の化学合成とその糖鎖結合活性, 33 回日本糖質学会年会、2014、8月10-12日、名古屋

〔図書〕(計 3 件)

1. 和泉雅之、伊藤幸成、梶原康宏「糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック」第4編第2章第4節「糖タンパク質合成」株式会社エヌティーエス、2015年8月発行、356-358.
2. 和泉雅之、伊藤幸成、梶原康宏「糖タンパク質の品質管理の仕組み」東京化学同人 現代化学、2015年10月発行、535号、48-53.
3. Kajihara, Y.; Murakami, M.; Unverzagt, C.; Chemical Glycoprotein synthesis, Glycochemical synthesis, editors : Shang-Cheng Hung, Medel Manuel L. Zulueta, 2016, 263-292.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：平成 年 月 日
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：平成 年 月 日

取得年月日：平成 年 月 日
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原康宏 (YASUHIRO KAJIHARA)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：50275020

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：