

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560438

研究課題名(和文)希少糖鎖導入による生体分子・細胞機能改変法の開発

研究課題名(英文)Controlling protein/cell biofunction by chemical introduction of glycans

研究代表者

小椋 章弘(Ogura, Akihiro)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・助教

研究者番号：70707843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：人工糖タンパク質の新しい合成法を開発した。本方法はタンパク質の遺伝子操作を必要とせず、試薬を加えて温和な条件下反応させるだけで進行し、また従来法よりも遥かに効率的である。合成した人工糖タンパク質をマウスに注射し生体内での挙動を調べた所、糖鎖の構造によって排出経路や細胞への集積を自在に制御できることがわかった。さらに人工糖タンパク質に金属触媒を結合させておくことで、生物内の狙った臓器上で有機合成反応を行うことに初めて成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed an efficient strategy for synthesis of artificial glycoprotein. This strategy provides the target molecule just by mixing the reagent under mild conditions and does not need prior genetic modification. The glycoproteins thus synthesized were injected to mice and their in vivo kinetics was analyzed. It was revealed that excretion pathway could be controlled and cell selective accumulation was achieved depending on the glycan structure on the protein. Furthermore, first organ-selective metal-catalyzed organic reaction was realized by attaching metal catalyst onto this artificial glycoprotein.

研究分野：生物分子化学

キーワード：糖鎖 糖タンパク質 ターゲティング in vivo蛍光イメージング パターン認識 生体内合成

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年生体高分子の働きに関する多くの知見がもたらされているが、糖タンパク質に関しては天然由来の糖鎖の構造の不均一性とサンプル量の少なさのため、糖鎖の特定の構造が糖タンパク質や細胞の機能において果たす役割の解明は遅れていた。まして、タンパク質や細胞に糖鎖を付与することで積極的に機能を制御する試みは殆ど行われていなかった。

(2) 糖鎖とその生体内受容体であるレクチンとの相互作用は単独では弱いものの、複数の糖鎖-レクチン相互作用が同時に起こるパターン認識によって、全体としての相互作用強度や選択性が上昇することが知られていたものの、その詳細は未解明であった。

2. 研究の目的

(1) 独自の複合化反応により、目的の糖鎖をタンパク質に複合化する方法論を確立する。

(2) 得られた人工糖タンパク質の動態評価を通じて糖鎖の機能を解明する。

(3) タンパク質に糖鎖を導入することで機能を制御し、治療につながる生体内反応を起こす。

3. 研究の方法

(1) 化学合成したリンカーによって、温和な条件下糖鎖とタンパク質を効率的に結合させる条件を検討した。

(2) 蛍光基で標識したタンパク質に対して糖鎖を多数結合させ、マウスに注射することで生体内動態を観察した。

(3) 腫瘍モデルマウスに対して同様に人工糖タンパク質を注射し、腫瘍のイメージングが可能を観察した。

(4) 人工糖タンパク質に金属触媒を担持することで、生きている動物の中の狙った場所での有機合成反応を起こすことを試みた。

4. 研究成果

(1) 機能性分子のモデルとして蛍光基を、生きている細胞の表層に温和な条件下、簡便に導入する方法を開発した。本方法は申請者らが化学合成したリンカーと、容易に入手可能な蛍光物質を混合し、目的の細胞に加えるだけで細胞表層に蛍光を導入できる。本方法は既存の蛍光ラベル化法と比べても導入の効率性に優れており、わずかな量の試薬でも明瞭な蛍光ラベル化が可能である。

(2) 糖鎖をタンパク質の表層に温和な条件下、簡便に導入する方法を確立した。本方法は申請者らが化学合成したリンカーを用い、

容易に入手可能な N-結合型糖鎖と目的のタンパク質を順次加えて混合するだけで、タンパク質表層に糖鎖を導入できる。また、精製も反応終了後に分子量フィルターを用いて洗浄を行うだけであり、誰でも容易に実施することができる。本方法は導入の効率性に優れており、一般的なタンパク質であるヒト血清アルブミンに対して糖鎖を数個程度しか導入することができなかった既存の方法に対し、一度に十個以上の糖鎖を導入することが可能である。

(3) 近赤外蛍光を発する色素で標識したモデルタンパク質に対して(2)と同様に糖鎖を導入し、合成した人工糖タンパク質を生きているヌードマウスに注射した。近赤外蛍光は生体の透過性に優れていることから、生きたままの動物を用いて蛍光イメージングによってタンパク質の動態を追跡することができる。実験の結果、導入した糖鎖の種類によって人工糖タンパク質の動態や排出経路が大きく変化することが判明した。特に、ある酸性糖を先端に有する糖鎖は肝臓に集まった後に膀胱から尿へと排出される一方、別の糖を先端に有するものは肝臓から胆嚢、そして腸管へと排出される。さらにまた別の糖を先端に持つ糖鎖は肝臓に極めて強く蓄積し、蛍光顕微鏡での観察の結果、肝臓の特定の種類の細胞に選択的に取り込まれていることがわかった。糖鎖は単独では受容体との相互作用が弱く、複数の糖鎖が複数の受容体に同時に認識されることで標的細胞への高い親和性を発揮するとされている。今回申請者らの見出したタンパク質への糖鎖導入法によって初めて、高い糖鎖の密度によって親和性を高めることが出来たと考えられる。

(4) 各種糖鎖を表面に有する人工糖タンパク質を腫瘍モデルマウスに注射して(3)と同様の近赤外蛍光イメージング法を用いて評価したところ、末端にシアル酸を特定の結合様式で持つ糖鎖の場合に腫瘍への顕著な集積を確認することが出来た。糖鎖は単独では受容体との相互作用が弱いことが知られているが、集積させることで標的細胞への親和性を著しく高め、腫瘍のターゲティングを可能にしたものと考えられる。

(5) (2)の人工糖タンパク質合成法を、複数種の糖鎖を任意の割合で含む人工糖タンパク質合成法へと拡張した。異なる糖鎖を結合させる試薬を順次作用させる手法と、複数の糖鎖を同一ユニットにまとめた後にタンパク質に導入する手法の2つを開発した。この手法で得られた人工糖タンパク質の動態を生きたままの動物内で追跡したところ、単一の糖鎖をもつ人工糖タンパク質と比較して、糖鎖の導入順序や割合によって腸管からの排出速度が著しく向上することを見出した。生体内での糖鎖の認識にあたっては、糖鎖の

種類だけでなく位置関係も重要な因子であることを示した。

(6) (2)の手法で合成した人工糖タンパク質に金属触媒を担持することで、生きている動物の中の狙った場所での有機合成反応を起こすことを試みた。モデル反応として人工糖タンパク質に担持した金触媒によるプロパルギルエステルのアミド交換反応を行ったところ、細胞表面のタンパク質リジン残基に対して選択的に蛍光基を導入することが出来た。本知見は生体内の狙った場所で遷移金属触媒反応を実践した初めての例であり、ドラッグデリバリーシステムへの応用が期待できる。

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13件)

Tsubokura, K., Vong, K. K. H., Pradipta, A. R., Ogura, A., Urano, S., Tahara, T., Nozaki, S., Onoe, H., Nakao, Y., Sibgatullina, R., Kurbangalieva, A., Watanabe, Y., Tanaka, K. "In vivo gold complex catalysis within live mice", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, Vol.56, 2017, pp.3579-3584
DOI: 10.1002/anie.201610273

Takao, K., Nemoto, R., Mori, K., Namba, A., Yoshida, K., Ogura, A., Total Synthesis and Structural Revision of Clavilactone D, *Chem. Eur. J.*, 査読有, Vol.23, 2017, pp.3828-3831
DOI: 10.1002/chem.201700483

Latypova, L., Sibgatullina, R., Ogura, A., Fujiki, K., Khabibrakhmanova, A., Tahara, T., Nozaki, S., Urano, S., Tsubokura, K., Onoe, H., Watanabe, Y., Kurbangalieva, A., Tanaka, K., "Sequential Double "Clicks" Toward Structurally Well-defined Heterogeneous N-Glycoclusters: The Importance of Cluster Heterogeneity on Pattern Recognition *In Vivo*", *Adv. Sci.*, 査読有, Vol.4, 2017, 16000394
DOI: 10.1002/advs.201600394

Ogura, A., Tahara, T., Nozaki, S., Onoe, H., Kurbangalieva, A., Watanabe, Y., Tanaka, K., Glycan multivalency effects toward albumin enable N-glycan-dependent tumor targeting, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, Vol.26, 2016, pp.2251-2254
DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.03.046

Ogura, A.; Tahara, T.; Nozaki, S.; Morimoto, K.; Kizuka, Y.; Kitazume, S.; Hara, M.; Kojima, S.; Onoe, H.; Kurbangalieva, A.; Taniguchi, N.; Watanabe, Y.; Tanaka, K., Visualizing

Trimming Dependence of Biodistribution and Kinetics with Homo- and Heterogeneous N-Glycoclusters on Fluorescent Albumin, *Sci. Rep.*, 査読有, Vol.6, 2016, 21797
DOI: 10.1038/srep21797

Tsutsui, A., Ogura, A., Tahara, T., Nozaki, S., Urano, S., Kitazume, S., Hara, M., Kojima, S., Kurbangalieva, A., Onoe, H., Watanabe, Y., Taniguchi, N., Tanaka, K., n Vivo Imaging of Advanced Glycation Endo Products (AGEs) of Albumin: First Observation of Significantly Reduced Clearance and Liver Deposition Properties in Mice, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, Vol.14, 2016, pp.5755-5760
DOI: 10.1039/c6ob00098c

Ogura, A., Tanaka, K., Azaelectrocyclization on cell surface: convenient and general approach to chemical biology research, *Tetrahedron*, 査読有, Vol.71, 2015, pp.4518-4521
DOI: 10.1016/j.tet.2015.02.063

小椋 章弘、金属触媒を用いた細胞内有機化学反応、有機合成化学協会誌、査読有、Vol.72、2014、pp.726-727
DOI: 10.5059/yukigoseikyokaiishi.72.726

他5件

[学会発表](計21件)

Akihiro Ogura, Katsunori Tanaka, One-pot glycan conjugation to protein via azaelectrocyclization: Dynamics analysis of neoglycoproteins in live animal, Pacificchem 2015, 2015年12月18日、Honolulu (米国)

Akihiro Ogura, Katsunori Tanaka, General labeling method of cell surface via azaelectrocyclization, Pacificchem 2015, 2015年12月17日、Honolulu (米国)

Akihiro Ogura, Katsunori Tanaka, One-pot Glycan Conjugation to Protein via Azaelectrocyclization: Dynamics Analysis of Neoglycoproteins in Live Animal, 20th International Conference on Organic Synthesis, 2014年7月3日、Budapest (ハンガリー)

他18件

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: アルブミン-糖鎖複合体
発明者: 田中 克典、渡辺 恭良、小椋 章弘、山本 貴博
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2016/069438
出願年月日: 平成28年6月30日
国内外の別: 国際

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.riken.jp/nori-tanaka-lab/lab/publications.html>

<http://www.applc.keio.ac.jp/~takao/lab/publications.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 章弘 (OGURA, Akihiro)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：70707843