

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 6 日現在

機関番号：72690

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860019

研究課題名(和文) GlycoPEGylationによる簡便な糖タンパク質合成手法の開発

研究課題名(英文) Development of simple synthetic method of glycoprotein based on GlycoPEGylation

研究代表者

後藤 浩太郎 (Goto, Kohtarō)

公益財団法人野口研究所・研究部・研究員

研究者番号：30321673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来の「GlycoPEGylation」は糖転移酵素を用いるため、目的のPEG化された糖転移体を大量に調製することは非常に困難である。そこでこの問題点を解決するために、Endo-Mに代表される糖加水分解酵素を用いた「GlycoPEGylation」を開発することとした。

種々検討した結果、マンノース残基の3位と6位水酸基にPEG鎖を導入したマンノシル-(1-4)-N-アセチルグルコサミン誘導体をオキサゾリン化し、これを糖供与体として用いることでEndo-Mによる糖転移反応が進行し、目的の糖転移体を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Conventional "GlycoPEGylation" is a synthetic method of glycoproteins attached PEG using glycosyltransferase. This strategy is very difficult to prepare a large amount of target compounds connected PEG owing to the use of glycosyltransferase. In order to resolve this problem, the development of "GlycoPEGylation" using a glycosylhydrolase represented by Endo-M was attempted.

A result of various studies, disaccharide oxazoline derivative which consists of mannosyl-(1-4)-N-acetyl glucosamine residues connected two PEG chains to 3' and 6' positions of the mannose residue was prepared and used as a glycosyl donor. Furthermore, subsequent enzymatic transglycosylation by using Endo-M was obtained a desired transglycosylated compound.

研究分野：有機化学

キーワード：PEG化 糖転移反応

1. 研究開始当初の背景

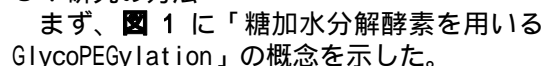
多細胞生物の細胞表面には糖脂質や糖蛋白質の一部として多様な糖鎖が存在することが知られており、それら糖鎖が細胞組織認識や分化など重要な機能に關与していることが次々と明らかにされている。しかし、一般にそれら糖鎖自身は微小不均一性を持つため、天然から単一化合物として糖鎖を得ることは極めて困難である。このような背景から糖鎖の機能解明を分子レベルで行うためには、単一構造糖鎖の合成が必要不可欠であるが、多くの天然物合成がそうであるように、糖鎖の合成も非常に困難であり、それらの合成に膨大な労力と時間を必要とする。このため、それら糖鎖を簡便かつ効率的に合成できる手法が存在しないのが現状である。そこで申請者は、その問題を解決が可能な方法論の創造へのアプローチとして、GlycoPEGylation(DeFrees, S. et al Clausen, *Glycobiology* 2006, 16, 833.)に着目した。

近年、タンパクやペプチド性薬物分子に水溶性高分子ポリエチレングリコール(PEG)を結合させることにより生体内半減期の延長を可能とする PEG 化医薬品の研究が盛んにおこなわれている。体内半減期が伸びれば結果的に投薬量を減らすことができ、結果的に患者の負担を減らすことにつながるため、非常に優れた手法として期待されている。その主な方法としてはタンパク質の側鎖アミノ基への PEG 鎖の導入が用いられているが、タンパク質上に複数力所存在するアミノ基にランダムに導入されるため、PEG 鎖の導入位置や数の異なる種々の PEG 化タンパク質の混合物が生成物として得られる。このような PEG 鎖の導入位置が非選択的な方法ではタンパク質の高次構造の変化や生理活性の低下や喪失が懸念される。この問題点を解決する手法として、糖転移酵素を用いた糖転移反応により位置選択的に PEG 化された糖タンパク質を調製する「GlycoPEGylation」の研究が報告されている。この方法は糖の結合した部分にのみ選択的に PEG 鎖を導入することができるため、従来のランダムに PEG 鎖を導入するよりも高い位置選択性を有する利点を有する。また、この方法で PEG 化された糖タンパク質はこれまで研究が行われているタンパクやペプチド性薬剤と同様に生体内半減期が延長されることが明らかになっている。しかし、糖転移酵素を用いて PEG 化された糖タンパク質を合成する場合は、糖供与体として PEG 化された糖ヌクレオチドが必要不可欠となる。当然そのような糖ヌクレオチドは市販されておらず、また合成する場合にもその安定性などから、大量に調製することは非常に困難であると言わざるを得ない。また反応に用いる糖転移酵素自体も高価である。これらの理由からこの方法は大変優れた手法ではあるが一方で大量調製には向いていないというのが現状である。

2. 研究の目的

この大量合成に対応できない問題点を解決するために糖加水分解酵素を用いることを考えた。一般に糖加水分解酵素は糖転移酵素と比べて格段に安価であり、また近年では糖加水分解酵素にも糖転移活性があるものが多く含まれていることが明らかになっている。そのような糖加水分解酵素の中の1つであるエンド-M-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-M)はエンド型加水分解酵素の1つであり、N-結合型糖タンパク質糖鎖のジアセチルキトビオース部分を切断して糖鎖部位と GlcNAc 1 残基を有するタンパク質を生成するだけでなく、遊離した糖鎖を丸ごと、水酸基を有する化合物に付加するという糖鎖転移活性を有している。さらに高マンノースのみならず複合型糖鎖などすべての糖鎖構造を認識するため、あらゆる N-結合型糖鎖蛋白質を構築できる手法として注目されている。また、この Endo-M を用いる糖転移反応の基質としては GlcNAc オキサゾリン誘導体が有用であることが既に明らかになっている。一般にオキサゾリン誘導体は対応する糖ヌクレオチドと比較して格段に安定であるため、大量調製もより容易である。このため従来法と比較してはるかに簡便に PEG 化された糖タンパク質を大量に合成することが可能になる。さらに本手法では糖供与体として必要な基質は PEG 化された GlcNAc オキサゾリン誘導体のみとなるため、これまでの糖鎖合成にかかっていた時間と労力を一気に解消することができる。つまり糖加水分解酵素を用いた GlycoPEGylation が実現できればこれまでの様々な糖鎖合成の手法より簡便に糖タンパク質を合成できるツールになりうる。そこで本研究ではこの手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

まず、1 に「糖加水分解酵素を用いる GlycoPEGylation」の概念を示した。N-アセチルグルコサミン、グルコサミンあるいは対応する誘導体の任意の位置にポリエチレングリコール(PEG)鎖を導入する。PEG 鎖と各官能基の結合様式については、水酸基へはエーテル結合での導入を試みた。これはこの次のオキサゾリン化が塩基性条件下で行われるため、その条件下でも分解する恐れのない結合様式を選択した(step 1)。次に PEG 鎖の導入された各誘導体をそれぞれオキサゾリン化する(step 2)。オキサゾリン化した各誘導体を糖加水分解酵素(Endo-M など)による糖転移反応を行う(step 3)。この中で特に鍵となるのは step3 の糖転移反応が進行するかという点に尽きる。

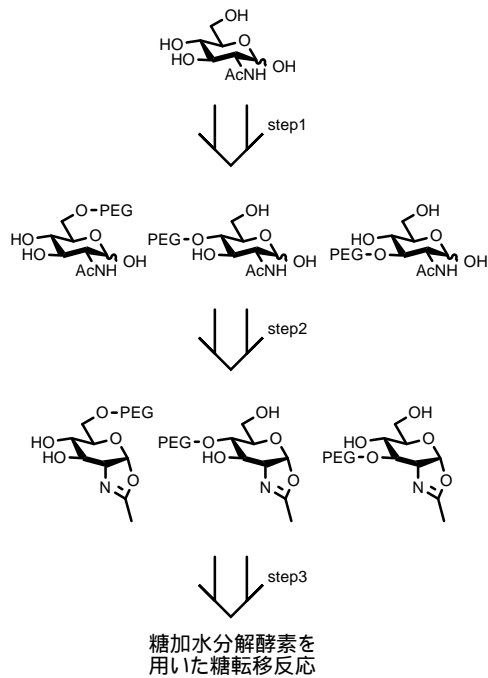


図 1 . 糖加水分解酵素を用いた GlycoPEGylation の概念

しかしながら、糖のどの位置にどのくらいの PEG 鎖を導入すれば Endo-M の基質として認識されるかわかっていない。また、PEG 鎖の導入する糖側についても全く知見はない。すなわち PEG 鎖を導入するのが単糖で良いのか、それともオリゴ糖に導入しないと糖転移反応が進行しないのかということ自体も全くわかっていない。そこでまず、最も単純な単糖での検討を試みることにした。

4 . 研究成果

まず、図 2 に示したような異なる水酸基にそれぞれ重合度が 5 の PEG 鎖を導入したグルコサミンのオキサゾリン体 1~3 を合成した。これらオキサゾリン体 1~3 を糖供与体として糖受容体に GlcNAc-OpNp 体を用いて糖転移反応をそれぞれ試みた。また、糖転移反応に使用する糖加水分解酵素としては Endo-M の改変体である N175Q を使用することとした。しかしながら種々検討したにも関わらず、合成した単糖のオキサゾリン体 1~3 ではいずれも目的の転移体の生成を確認することはできなかった。

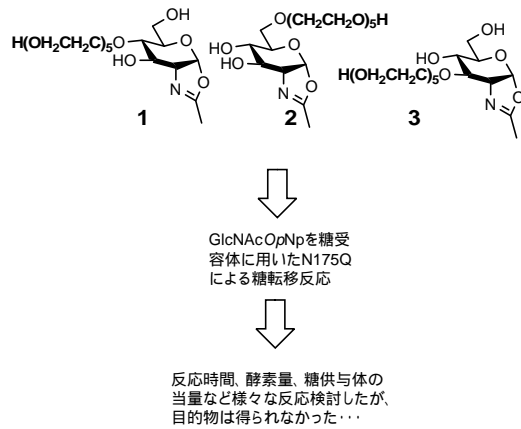


図 2 . 単糖オキサゾリン誘導体の合成および糖転移反応の検討

そこで、単糖ではなく二糖を用いて検討を行うこととした。合成する二糖オキサゾリン体の構造としては、生体内に広く存在する N-結合型糖鎖の構造を参考にして、図 3 に示すような非還元末端のマノース残基の 3 位と 6 位の水酸基にそれぞれ PEG 鎖を有する化合物 6 を選択した。

すなわち、化合物 4 を出発原料にして、7 工程を経てオキサゾリン前駆体 5 を合成した。この化合物 5 のオキサゾリン化の方法としては 2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリドを用いる方法を選択した。すなわち、化合物 5 を水中でトリエチルアミンおよび 2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリドを加え 0 で 1 晩攪拌して収率 96% で二糖オキサゾリン体 6 を合成した。

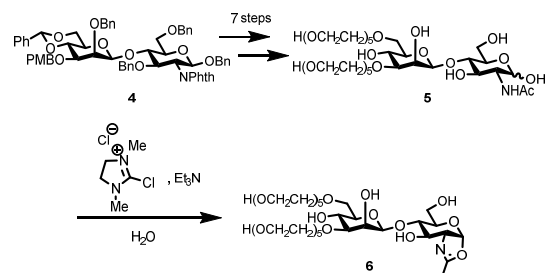


図 3 . 二糖オキサゾリン 6 の合成

この合成した二糖オキサゾリン体 6 に対して Endo-M を用いた糖転移反応を検討した。種々検討した結果、図 4 に示すように目的の糖転移体 7 を収率 41% で得ることに成功した。

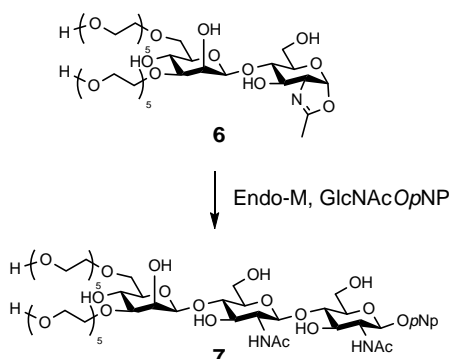


図4 . 二糖オキサゾリン **6** を用いた糖転移反応

以上の結果より、PEG 鎖を導入した糖オキサゾリン誘導体が Endo-M に代表される加水分解酵素の基質になりうることを明らかにすることができた。今回得られた結果をさらに発展させることができれば、これまでの様々な手法より簡便に糖タンパク質を合成できるツールになりうる。さらにこの方法は長大な糖鎖部分を PEG 鎖で置き換えることが可能になるという点も併せ持つため、これまで多大な時間と労力がかかっていた糖鎖合成の煩雑さも一気に解消できる手法になりうるとも考えられる。

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：ポリエチレングリコール鎖が導入された化合物の製造方法

発明者：後藤浩太郎、水野真盛

権利者：公益財団法人野口研究所

種類：特許

番号：特許願 2016 - 158070 号

出願年月日：平成 28 年 8 月 1 0 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

研究代表者

後藤浩太郎 (GOTO Kohtarō)

公益財団法人野口研究所、研究部、研究員

研究者番号：3 0 3 2 1 6 7 3

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()