

糖タンパク質の精密化学合成を利用する糖鎖機能の解明

大阪大学大学院理学研究科
梶原康宏

糖鎖が結合した糖タンパク質は、サイトカインをはじめとする生理活性物質として体内の恒常性を維持するために必要不可欠なものである。また、糖タンパク質は、それら糖鎖の機能は完全に理解されないまま、抗体、酵素、サイトカインが糖タンパク質製剤として広範に利用されている。

本発表では、糖タンパク質を精密に化学合成し、それらプローブを用いて、糖タンパク質の生合成経路、細胞内外で機能を発現する糖タンパク質の糖鎖の役割を包括的に調べた試みについて述べる。

糖タンパク質の生合成は、小胞体で開始される。リボソームから生産されるペプチドにグルコースが3つ結合したハイマンノース型糖鎖 (G3M9) が付加 (Figure 1A:1) し、そしてこの糖鎖が多数の酵素、シャペロンにより構成される糖タンパク質品質管理機構のタグ (Figure 1A:3, 4) として利用されることで、タンパク質部分が正しくフォールディングする¹ (5)。この過程では、UDP-glucose : Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) は、ミスフォールド糖タンパク質 2 を認識し、ミスフォールドと

いうタグであるグルコースを1残基付加する(3)。そしてこの G1M9 糖鎖をシャペロンであるカルネキシン/カルレチキュリンが認識し、タンパク質部位を正しい構造へとリフォールディングする。

この過程で、正しくフォールディングした糖タンパク質 5 は、ゴルジ体へ送られ、ハイマンノース型糖鎖 (Figure 1B:8) のプロセッシングおよびシアリル糖鎖 (Figure 1B 10, 11) への再構築を経て完成品 7 となり、細胞膜や細胞外へと分泌されていく。特に、糖タンパク質が、酸性のシアリル糖鎖 (Figure 1B 10, 11) を持つことで、血中に

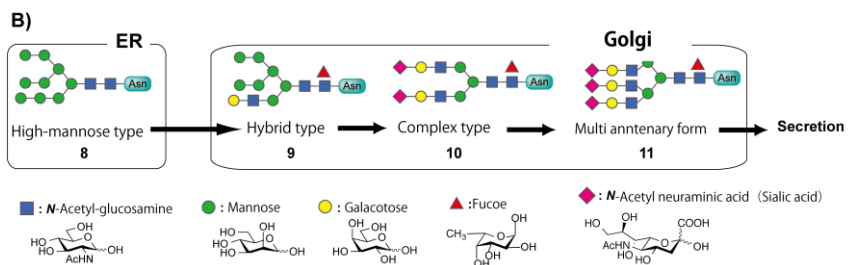
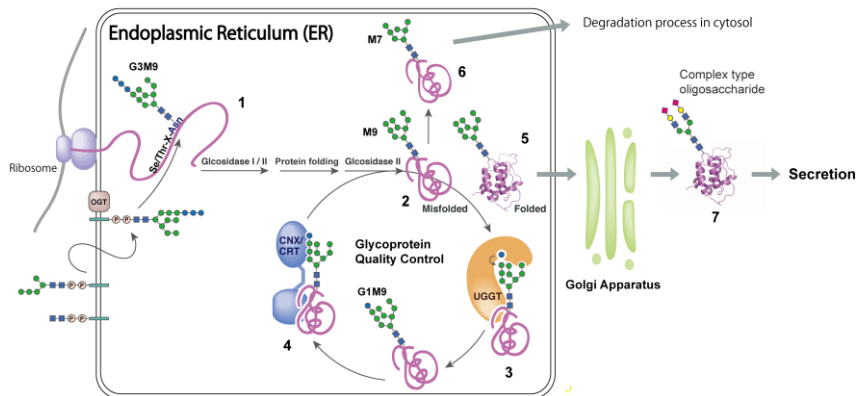


Figure 1A: 糖タンパク質の生合成経路. リボソームから生成したペプチドに G3M9 ハイマンノース型糖鎖が付加し 1、続いてタンパク質部位のフォールディングが実施される。この間でフォールディングセンサー酵素 UGGT がタンパク質の構造を調べ 3、ミスフォールドであればシャペロン CNX/CRT がタンパク質部位の構造を整える 4。完成した糖タンパク質 5 は、ゴルジ装置へ運ばれ、シアリル糖鎖へと変換され (7) 細胞外へ分泌される。

Figure 1B: 小胞体内からゴルジを経由する糖タンパク質の糖鎖構造の変化。

分泌された後、その水溶性の向上や、糖タンパク質の凝集の防止、血中寿命、抗原性が制御される²。

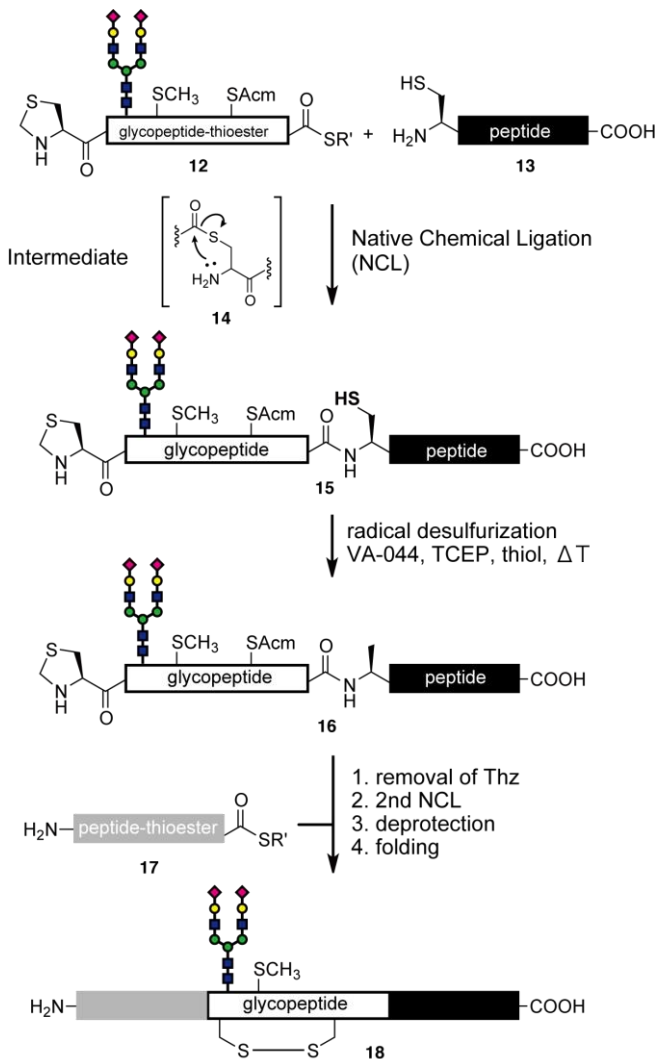


Figure 2. 糖タンパク質合成法. 糖ペプチドチオエステルとN末端にシステインをもつペプチドを緩衝溶液中で反応させることでチオエステル交換、分子内転移をへてペプチド結合が形成される。この反応を順次繰り返すことで糖タンパク質全長を構築し、最後にジスルフィド結合を形成させる。

しかし、糖タンパク質の糖鎖は、常に糖鎖構造が不均一で、どのような構造の糖鎖がタンパク質機能を制御しているのか明らかになっていない³。

均一な構造の糖タンパク質を調製するには、Figure 2 に示した native chemical ligation (NCL) を使い、糖ペプチド 12、ペプチド 13, 17 を連結し、標的糖タンパク質のポリペプチド鎖を構築後フォールディングする方法が有効である⁴。この合成で必要となる化学的構築法は、いかに均一なヒト型のハイマンノース型糖鎖、ならびに複合型シアリル糖鎖を調製し、糖ペプチドに組み込むと同時にその糖ペプチドのC末端をチオエステル化することである (Figure 2; 12)。特にペプチドの固相合成が糖ペプチド合成にも広範に利用できるが、その最終工程で酸による糖ペプチドの固相からの切り出し工程が問題となる。シアリル糖鎖は、酸に不安定で、酢酸程度の酸でそのシアリル結合が加水分解される。

我々は、この不安定性は、シアリル糖鎖の1位のカルボキシ基による分子内酸触媒が原因ではないかと考え、卵黄から単離したヒト複合型糖鎖のシアリル糖鎖のカルボキシ基を酸に安定なフェナシル基で保護した糖鎖を合成し、酸処理をしたところ加水分解が抑えられることを見出した⁵。そこで、

この糖鎖を利用し、ペプチドチオエステルを容易に与えるが酸処理の工程を多用する Boc-ペプチド固相合成に利用した⁵。その結果、Figure 4 のルートで酸に不安定なシアリル糖鎖をもつペプチドチオエステルを得ることに成功した。この方法では、得られたシアリル糖ペプチドのペプチド側鎖の保護基を固相上で酸処理により脱保護後、

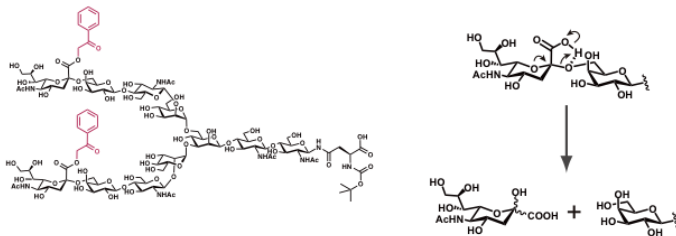


Figure 3. 左図: 卵黄より単離し構造決定したヒト二分岐複合型糖鎖のシアリル糖鎖をフェナシル基で保護. 右図: シアリル結合加水分解反応の推定反応機構。

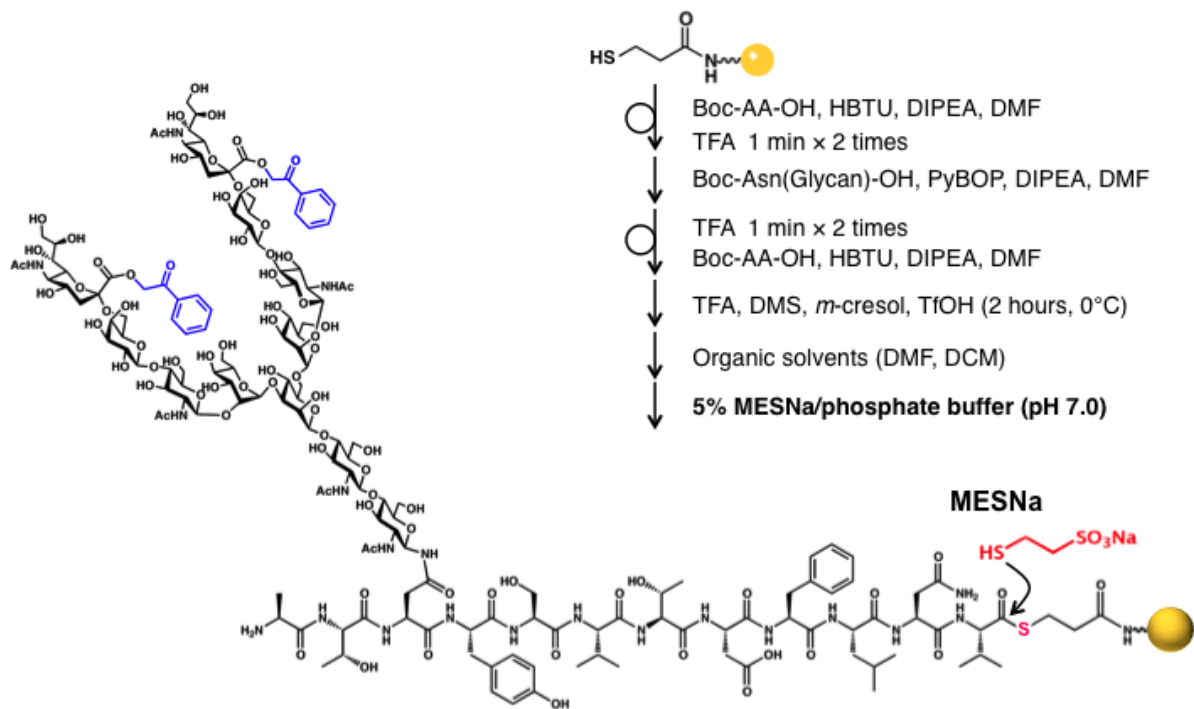


Figure 4. シアリル糖鎖ペプチドの固相合成。固相上のチオールに順次 Boc 法（ペプチド側鎖はベンジル基）でアミノ酸を伸長し、糖鎖アスパラギン、更にペプチドを伸長後、固相上でペプチド側鎖のベンジル基を Trifluoromethane sulfonic acid (TfOH) で脱保護後、樹脂を洗浄、そしてチオリシスによりシアリル糖鎖ペプチドを合成する。

チオリシスにより固相から切り出す方法を採用した。その結果、TFA などの酸を濃縮するなどの手間が必要なく、安全に合成できるようになった。また、この固相合成法を利用してハイマンノース型糖鎖をもつ糖ペプチドチオエステルも簡便に合成することに成功した⁶。

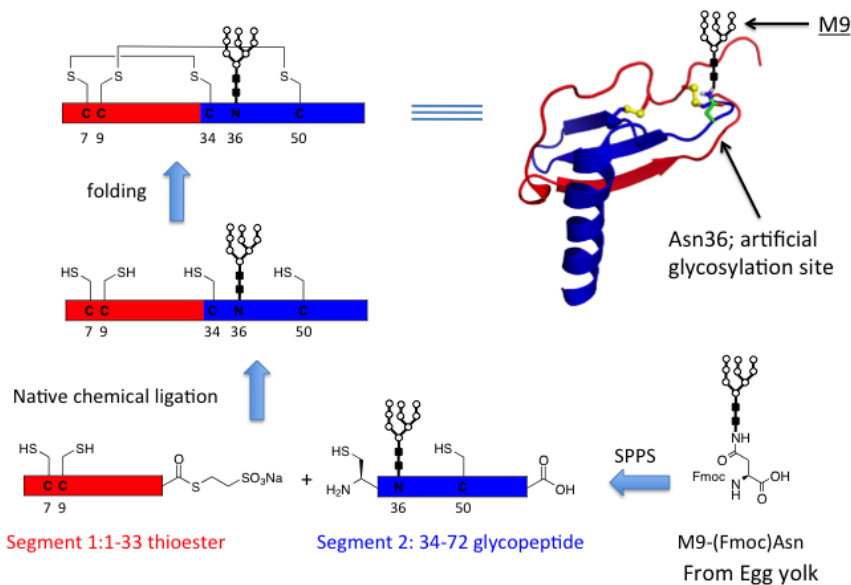


Figure 5. ハイマンノース型糖鎖をもつインターロイキン-8 の化学合成
ハイマンノース糖鎖が結合したアスパラギンは卵黄より単離、ペプチダーゼ処理後、Fmoc により保護することで調製した。

次に、我々は、Boc 固相合成法を用いる糖ペプチドチオエステル合成法、NCL 法、糖タンパク質フォールディングを利用して、ハイマンノース型糖鎖をもつ糖タンパク質を合成し、小胞体内の糖タンパク質品質管理機構における糖鎖の役割を調べることにした (Figure 1)。特に、UGGT がどのようにしてミスフォールド糖タンパク質を正しい構造の糖タンパク質と区別しミスフォールド糖タンパク質

にのみ、リフォールディングを促進させるためのタグであるグルコースを1つ付加させるのか調べることにした。

この実験では、アミノ酸 72 残基からなるサイトカイン、インターロイキン-8 (IL-8) の 2 次構造を形成していない位置に故意に糖鎖を付加したものを 2 セグメント縮合により合成し、ジスルフィド結合の組み合わせを換えることで天然型、ミスフォールド型を合成することにした⁷。Figure 5 には、N 末端側から 32 位までのペプチドチオエステルと 34 位から 72 までのペプチドを NCL で連結し IL-8 を作る合成計画を示した。糖鎖は、この図では 36 位に導入することにした。そして、この計画に沿って、ハイマンノース糖鎖をもつ IL-8 のポリペプチド鎖を調製した。ハイマンノース型糖鎖も卵黄から単離精製し構造決定後複合型糖鎖と同様に利用した。

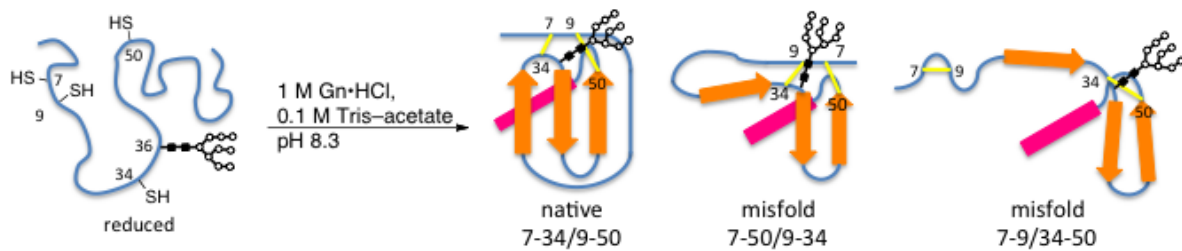


Figure 6. 故意なジスルフィド結合のかけかえによるミスフォールド糖タンパク質の合成. 速度論的なジスルフィド結合形成により様々なジスルフィド結合の組み合わせが生じる。これらを単離し、UGGT アッセイに利用. 天然型のジスルフィド結合は、7 位と 34 位、および 9 位と 50 位間でジスルフィド結合を形成したもの. ジスルフィド結合は、ペプチダーゼ処理後質量分析により決定した。

得られた糖鎖化 IL-8 全長は、次にレドックス（熱力学的制御）条件は用いず、速度論的にジスルフィド結合を形成させるフォールディング条件を採用すると、期待通り、様々なジスルフィド結合形成様式フォールディング体を得た。この実験では生成した化合物を HPLC で単離後、ジスルフィド結合の位置の分析により天然型の IL-8 に加え、2 種類のミスフォールド体ならびに、ミスフォールド体が 2 量化したもの計 4 種類が得られたことを確認した (Figure 6)。

次に、得られた 4 種類のフォールド体について、ヒト由来の UGGT を用いてアッセイしたところ、UGGT は天然型の糖鎖化 IL-8 にはグルコースを転移せず、ミスフォールド体にものみ転移することがわかった。天然型については、UGGT の酵素量を増やしても転移することはなかった。これにより、UGGT は天然型とミスフォールド型の構造を識別し、ミスフォールド体にものみグルコースを転移するということが、均一な構造をもつ糖タンパク質誘導体を用いることで確認できた⁷。

次に得られたミスフォールド体と UGGT によるグルコース転移量の関係について調べた。UGGT の転移量は、ジスルフィド結合が掛け違った IL-8 単量体よりも 2 量体の方が顕著にグルコース転移を示した。また、円二色分光法によりそれぞれの 2 次構造について分析するとミスフォールド単量体では、 α ヘリックス、 β シート構造が天然型よりも減少し、ややランダムコイル様の構造を形成していることが判明した。また、2 量体については、 β シート構造のみが顕著に減少していることが判明した。

これまで UGGT はミスフォールドによりタンパク質内部に配向されるべき疎水性アミノ酸が表面に露出することを鍵として認識すると考えられていた。そこで、タンパク質表面の疎水性を評価する分光学的分析を実施したところ、ミスフォールド 2 量体がかつとも疎水性面を露出していることが判明した。これと UGGT の活性を合わせて考察すると、疎水性のアミノ酸が多く位置して

いたβシート構造がミスフォールドにより消失し、その結果、疎水性アミノ酸がタンパク表面に露出したことを UGGT が認識しグルコースを転移したものと考察できた。本発表ではこの成果に加え他の糖タンパク質の例も合わせて更に考察した結果について述べる。

また、本研究ではゴルジ装置に輸送され成熟型糖鎖である複合型シアリル糖鎖をもつ糖タンパク質になったモデルとしてエリスロポエチンの化学合成もおこない、その糖鎖機能について考察した⁸。エリスロポエチン (EPO) はアミノ酸 166 残基からなり、N 型糖鎖を 3 本、24, 38, 83 位に、O 型糖鎖を 126 位に持つ赤血球の増殖を促進するヒトに必要不可欠な生理活性糖タンパク質である。N 型糖鎖は、この生理活性発現に必要不可欠であるが、O 型は関与していないことが知られている。

EPO を合成するために、Figure 7 のように6つのセグメントに分けてそれぞれ、Boc-、Fmoc-固相合成を利用して合成後、順次 NCL により連結し糖鎖の付加位置を可変した5種類の EPO のポリペプチドを調製した。3本の N 型糖鎖付加位置を可変することで、どの糖鎖が重要か調べることができると判断し、(24, 38)、(38, 83)、(24, 83) に2本 N 型糖鎖をもつもの、ならびに N 型糖鎖を 83 位に1本もつものも合わせて合成した。糖鎖数が少ない EPO の合成では、糖鎖が結合していないペプチドチオエステルを別途用意しておき、合成する誘導体に合わせて、順次導入し合成した。

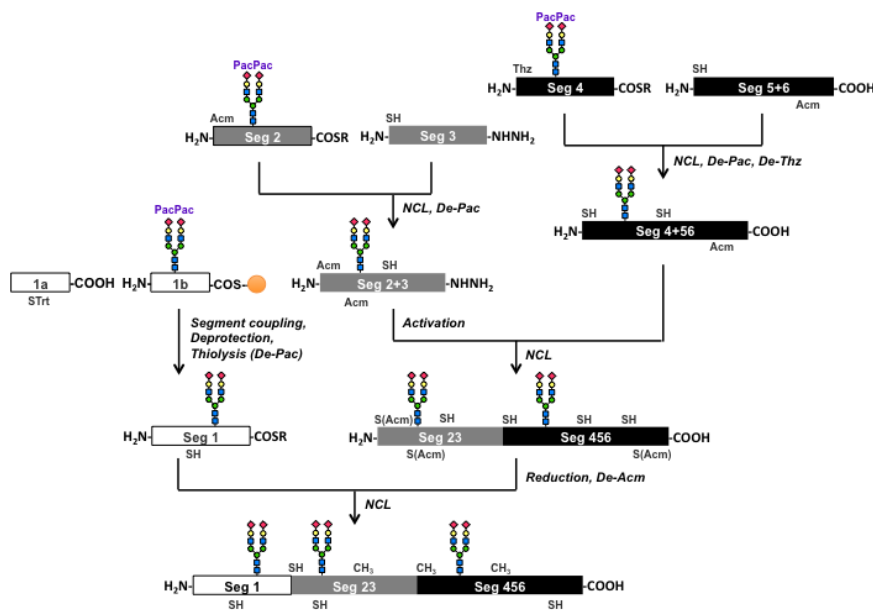
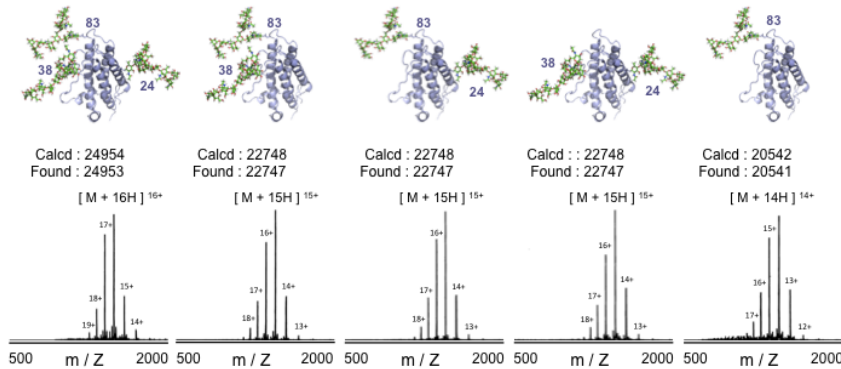


Figure 7. N 型二分岐シアリル糖鎖を三本もつエリスロポエチンの合成計画

得られた5種類の EPO の糖鎖化ポリペプチドは、グアニジンで変性し、システイン-システインのレドックス条件下、グアニジンを透析で順次抜いていくことでフォールディングさせた。Figure 8 には、フォールディング後 HPLC により精製した EPO の質量分析、ならびにフォールディング収率について示した。全ての EPO 誘導体が ESI-MS により非常に綺麗なパターンを示した。また、円二色分光法により2次構造についても評価し全ての EPO がヘリックス構造を形成していることが確認できた。フォールディングについては、タンパク質-タンパク質相互作用により、2 量化する副反応が観測されたので、EPO の濃度を希釈し実施することで最大 90%の収率を出すことに成功した。

次に、得られた EPO (1.4 μM) を用いてマウスでの赤血球増殖活性を評価した。その結果、糖鎖を3本もつものが市販品の EPO に近い活性を示した。糖鎖が2本の場合は、38, 83 位に糖鎖がある場合高い活性を示したが、そのどちらか一方が無くなると活性が顕著に低下した。市販の EPO

と今回合成した N 型糖鎖 3 本もつものの活性の違いは、N 型糖鎖の分枝度の違いが原因と考えている。市販の EPO は動物細胞で培養され調製されているが、38, 83 位の糖鎖は 4 分枝が主である。この分枝度が増えることでシアル酸の結合数が増え血中寿命が伸び活性を高めていると考えられる。これまで、EPO は 2 分枝糖鎖では活性が 9 割以上低下すると考えられていたが、均一な 2 分枝シアリル糖鎖を天然型の位置にもてば十分な活性が得られることが判明した。



Results of oxidative folding

Concentrations	Yields from HPLC peaks (%)				
	● EPO ^{24, 38, 83}	● EPO ^{38, 83}	● EPO ^{24, 83}	● EPO ^{24, 38}	● EPO ⁸³
0.1 mg/mL	67.1 (± 0.9)	57.6 (± 4.6)	42.3 (± 2.5)	48.8 (± 4.8)	37.0 (± 3.2)
0.01 mg/mL	86.0 (± 5.4)	89.9 (± 5.7)	65.9 (± 1.6)	76.4 (± 11.2)	62.5 (± 2.4)

Figure 8. 合成した 5 種類のエリスロポエチン（糖鎖付加位置は、24/38/83; 24/38; 38/83; 24/83; 83 位の 5 組）とその質量分析 (ESI) ならびにフォールディング収率

データは報告されていなかった。そこで、我々は、5 種類の EPO を 1/5 の濃度で故意に混ぜた溶液（EPO タンパク質の濃度は 1.4 μM）を作り、3 本シアリル糖鎖をもつ EPO との活性比較をおこなった。その結果、活性本体であるタンパク質濃度が同じであっても糖鎖の付加位置、数が違う誘導体の混合物となると活性が低下することを明らかにした。

以上、糖鎖は、糖タンパク質の生合成経路、糖タンパク質の活性発現に重要であるといわれていたが、それら実験結果に利用する糖タンパク質は常に不均一な構造の糖鎖を含んでおり、どの糖鎖構造が重要か分子レベルでの正確な評価ができていなかった。我々の精密化学合成により、糖タンパク質が得られるようになり、糖鎖機能の評価に貢献できるようになったと考えている。

今後も様々な糖タンパク質を合成し、糖鎖機能解明の基礎研究のみならず糖タンパク質製剤の開発にも貢献していきたいと考えている。

References:

- ¹ Helenius, A.; Aebi, M., *Science*, 2001, 291, 2364.
- ² Bertozzi, C. R.; Kiessling, L, *Science*, 2001, 291, 2357.
- ³ Ledford, H. *Nature* 2007, 449, 274
- ⁴ Unverzagt, C; Kajihara, Y. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 4408. Kajihara Y. et al. *Chem.Rec.*, 2010, 10, 80.
- ⁵ Murakami, M. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 3567.
- ⁶ Makimura, Y. et al. *Carbohydr. Res.*, 2012, 364, 41.
- ⁷ Izumi, M., et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 7238.
- ⁸ Murakami, M., et al. *Science Advances*, 2016, 2, e1500678

なぜ、糖鎖の付加位置によって赤血球増殖活性が変わるかについては、38, 83 位のタンパク質表面が高い疎水性で覆われているため、EPO の溶解度に影響し、それを分枝度の高い高親水性のシアリル糖鎖で覆うことで EPO の体内動態が向上し、活性が高くなったと考えている。

また、市販の EPO は糖鎖構造が不均一で、培養条件により糖鎖構造が変わり、その結果、活性が変動すると考えられているが、これまで明確なデ