## 梶原康宏

## (大阪大学大学院理学研究科)

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、それらをプローブとして用いて細胞内外で機能を発現する糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖(N型糖鎖)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のアスパ ラギンに、グルコースが3つ結合したハイマンノース型糖鎖(G3M9)が付加し(Figure 1A:1)、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(GQC)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(5)。 この過程では、UDP-glucose: <u>Glycoprotein Glucosyltransferase</u>(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、生成した G1M9 糖鎖をシャペロンであ るカルネキシン/カルレテ ィキュリンが認識し(4)、タ ンパク質部位を正しい構造 (5) 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、ゴルジ体に送ら 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



Figure1A: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。 Figure1B: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。



Figure 2. 糖タンパク質の化学合成. ペプチドチオエステル 15 と糖ペプチド 16 を反応させると中間体 17 を 経由してペプチドが連結できる。全長を合成後フォールディングさせることで糖タンパク質が合成できる。

とで、血中に分泌された後、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。

しかし、生合成される糖タンパク質の糖鎖は、常に糖鎖構造が不均一で、どの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。そこで当研究室では、任意の構造の糖 鎖をもつ糖タンパク質を合成し、その糖鎖機能を調べる研究をおこなってきた。<sup>1-5</sup>

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、ペプチド 15、糖ペプチド 16 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。我々は、ヒト複合型シアリル糖鎖 14 や、マンノース 9 つか らなるハイマンノース型糖鎖 13 を卵黄から単離し、ペプチド固相合成に利用できるよう化学修 飾を施し Figure 2 にしたがって糖タンパク質を合成してきた。

その結果、ハイマンノース型 M9 糖鎖 13 をもつ糖タンパク質を合成し、小胞体内での糖鎖の機能解明の実験をおこなうことが

できた。ここでは、アミノ酸 166 残基からなるエリスロポエチン (EPO) に M9 糖鎖を 1-3本もつ もの、ならびに、そのミスフォー ルド体を合成し、細胞から単離し た小胞体の破砕液に加え、そのリ フォールディング過程を LCMS で APPRLICDSRVLERYLLEAK EAENITTGCAEHCSLNENIT Segment 1 VPDTKVNFYCWKRMEVGQQA VEVWQGLALLSEAVLRGACL 83 LVNSSQPWEPLQLHVDKCVS GLRSLTTLLRALGAQKEAIS Segment 4 PPDAASACPLRTITADTFRK LFRVYSNFLRGKLKLYTGEA CRTGDR N:glycosylation site A: mutation site C: Ala in native sequence Figure 3. エリスロポエチンのアミノ酸配列. 追跡した。その結果、小胞体内の糖タンパク質品質管理機構(GQC, Figure 1A)では、ジスルフィド結合の掛け違い程度のミスフォールド体は、速やかにリフォールドできるが、凝集様式のミスフォールド体はリフォールドすることができないという結果が得られた。また GQC では、G1M9糖鎖の寿命は短く、UGGT によりグルコシル化されると速やかに、カルネキシン類のシャペロンに補足されリフォールディングされていることがわかった(Figure 1A: 4→5)。<sup>6-10</sup>

また、我々は、小胞体で正しくフォールドし、ゴルジ体を通過するシアリル糖鎖をもつ成熟型 の糖タンパク質の糖鎖の機能についても調べてきた。ここでは、同様にエリスロポエチンを用い てその赤血球増殖活性を指標に調べた。

Figure 3 には、EPO の全長を6つのセグメントに分けたアミノ酸配列を示した。これらペプチ



ド、および糖鎖ペプチド は我々が改良した安全 な Boc 固相合成法<sup>5</sup> でペ プチドチオエステルと して調製し、それぞれ NCL で連結した (Figure 4)。そして、グアニジン で変性し、システイン-シスチンのレドックス 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。この合成では、 EP0 が 3 本もつ N 型糖鎖 について、その付加位置、 付加数を変えて5種類 の EPO を合成した。 得 られた EPO は、分解能 50

**Figure 4**. native chemical ligation を利用するエリスロポエチンのセグメン ト連結計画

万の高分解能質量分析装置で解析し、メチオニンが酸化されたものなどほとんど混入していない ことを確認した。<sup>3</sup>

次に、得られた EPO 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。傾向として、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 活性が顕著に低下することが判明した。<sup>3</sup> 市販の EPO と今回合成した N 型糖鎖3本持 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 血中寿命が延び活性を高めていると考えら



Figure 5. エリスロポエチン表面の疎水性領域分布

れる。これまで、EPO は2分枝糖鎖では活性が天然型 EPO の1割程度しかないと考えられていた 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。<sup>3</sup>

糖鎖の付加位置によって赤血球増殖活性が変わる理由については次のように考えている。糖鎖 付加部位である 38、83 位のタンパク質表面は、Figure 5 に示したように高い疎水性で覆われてい る。そのため、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 の水溶性、動態が 変化し、活性が高くなったと考えている。通常 EPO の 24 位周辺は比較的親水性アミノ酸が多い く、24 位には2分枝糖鎖が多い。一方、38、83 位は3 分枝以上のシアリル糖鎖で覆われているこ とがわかっている。このように、タンパク質表面の疎水性と糖鎖の分枝度には相関があることか らも、タンパク質表面に極端な疎水性が出現すると活性に影響を与えることが想像できる。

次に糖鎖分枝の効果を調 べるために、83 位に3分枝の シアリル糖鎖をもつEPOを合 成することにした。しかし、 3分枝のシアリル糖鎖は生 体から単離するのは困難な ので、鶏卵から大量に単離で きる2分枝糖鎖から3分枝 糖鎖を合成することにした。 その結果、2分枝の糖鎖 21



Figure 6. 三分枝糖鎖の半合成

から 10 工程で3分枝糖鎖 22 を得ることに成功した(Figure 6)。<sup>11</sup> ここでは、糖鎖がもつ水酸基 のうち、3分枝目の糖鎖を導入する水酸基のみ遊離とできる選択的保護法を確立し、グリコシル 化反応をおこない合成した。そして、得られた糖鎖アスパラギンのN、C 両末端に EPO のペプチド を連結させ、糖ペプチドを合成後、シアル酸転移酵素で、シアル酸を導入し、3分枝シアリル糖 鎖ペプチド 23 の合成に成功した(Figure 7)。続いて、この糖ペプチドを用いて、Figure 4 の合成 ルートと同様に EPO の合成をおこなった。 Figure 8 には、そのフォールディング後の HPLC, 電気

泳動、そしてマウスに投与した際の赤血 球増殖活性の結果を示した。Figure 8Bの ように透析法を利用したフォールディ ングではこれまでと同様、ミスフォール ド体が混入していた。しかし、最終生成 物の量が極めて少ないこと、またミスフ ォールド体は活性を示さないことがわ かっていたため、フォールド体とミスフ オールド体は分離せず、そのまま精密に 濃度定量をし、動物実験に用いた。投与 したポジティブコントロールである市





販の医療用 EPO と、合成した EPO の濃度比は、Figure 8C の電気泳動に示した。このように、合成 した3分枝糖鎖をもつ EPO は、市販の EPO の3割程度の濃度で同等の赤血球増殖活性を示した。 <sup>12</sup> この結果は、これまで言われた糖鎖が EPO の血中寿命を遅延させるという効果ではなく、糖鎖 がその周辺に発生させる水和殻の影響で活性が向上したものと考えている。実際、合成した別の 小型糖タンパク質を重水に溶かし、タンパク質表面のどの位置が重水素標識されやすいか調べた ところ、糖鎖周辺のタンパク質表面が重水素化されやすいことがわかった。すなわち、糖鎖周辺 の水はダイナミックに流動していることが推定された。現在、糖鎖と水和殻、さらにはタンパク 質活性との関係を調べている。

我々は、現在、糖鎖機能 を明らかにするため、よ り簡便で、精密に糖タン パク質が合成できる方法 の開発をおこなってい る。基本的には、鶏卵から 得られる糖鎖アスパラギ ン以外のペプチド部位 は、固相合成を使わずに できる限り大腸菌で発現 したペプチドを用いて糖 タンパク質を合成するこ とを検討している。この 合成法において、一番重 要で、難しいステップは、 有機溶媒に難溶な長鎖ペ プチドの C 末端をチオエ ステルにすることであ る。

Figure 9 には、我々が確立し た新規ペプチドチオエステル 化法を示した。この方法は、相 本らが見出したシステインの チオールが N 末端側のアミド 結合に攻撃することを利用し ている。ペプチドのC末端に、 故意にシステイン残基を導入 した25を大腸菌で発現した。 そして酸処理によりシステイ ンの分子内転移反応が起こっ ている際(28)に、bis(2sulfanylethyl)amine (SEA 26)を共存させることで、シス テインが脱離するとともに平



Figure 8. 3 分枝糖鎖をもつエリスロポエチンの合成 A) エリスロポエチンの構造. B) フォールディング後の HPLC. C) 市販のエリスロポエチンと 24 の電気泳動. D) マウスを用いた赤血球増殖活性.

C-terminal selective activation using bis(2-sulfanylethyl) amine (SEA)



Figure 9. 新規ペプチドチオエステル化法

衡反応が 29 へと傾き、ペプチドチオエステル等価体 27 が得られた。また、この 27 は、ジスルフ ィド結合を還元することでチオールが2つ生じるため(30)、分子内反応により、29 のチオエステ ル構造へと平衡が傾き、ペプチドチオエステルと同様に NCL に利用することができる。



Figure 10. 新規糖タンパク質の半合成法

また、我々は、更にペプチドチオアシッドを利用する糖タンパク質合成法を確立した(Figure 10)。この方法を利用すると、糖鎖アスパラギンチオアシッド 31 が、2 つのペプチド 32、35 とジ スルフィド結合を介してアミド結合を形成することで、4 工程で糖タンパク質全長 36 を合成する ことができる。現在、この方法を利用して様々な糖タンパク質を合成し、糖鎖機能を調べている。

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言われて いたが、それら実験結果は、常に不均一な構造の糖鎖を含んでおり、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、高純度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開発<sup>13</sup>にも貢献していきたいと考えている。

## References:

- 1. Y. Kajihara, et al. Prompt chemo-enzymatic synthesis of diverse complex-type oligosaccharides and its application to the solid-phase synthesis of a glycopeptide with Asn-linked sialyl-undeca- and asialo-nona-saccharides. *Chem. Eur. J.* 2004, 10, 971-985. doi.org/10.1002/chem.200305115.
- N. Yamamoto, et al. Chemical Synthesis of a Glycoprotein Having an Intact Human Complex-Type Sialyloligosaccharide under the Boc and Fmoc Synthetic Strategies. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 501-510. doi.org/10.1021/ja072543f.
- 3. M. Murakami, et al. Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity. *Sci. Adv.* 2016, 2:e1500678, doi.org/10.1126/sciadv.1500678.
- 4. I.Sakamoto, et al. Chemical Synthesis of homogeneous glycosyl-interferon- $\beta$  that exhibits potent antitumor activity in vivo. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 5428-5431. doi.org/10.1021/ja2109079.
- 5. M. Murakami, et al. Chemical Synthesis of an Erythropoietin Glycoform Containing a Complex-type Disialyloligosaccharide. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 3567-3572. doi.org/10.1002/anie.201109034.
- M. Izumi, et al. Substrate recognition of glycoprotein folding sensor UGGT analyzed by site-specifically <sup>15</sup>N-labeled glycopeptide and small glycopeptide library prepared by parallel native chemical ligation. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 11421-11426. doi.org/10.1021/jacs.7b03277.
- 7. M. Izumi, et al. Synthesis of Glc1Man9-glycoprotein probes by a unique misfolding/enzymatic glucosylation/intentional misfolding approach. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 128, 4036-4039. Doi.org/10.1002/anie.201511491.
- 8. S. Dedola, et al. Folding of Synthetic Homogeneous Glycoproteins in the Presence of a Glycoprotein Folding Sensor Enzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 2883-2887. doi.org/10.1002/anie.201309665.
- 9. M. Izumi, et al. Chemical Synthesis of intentionally Misfolded homogeneous Glycoprotein: a unique approach for the study of glycoprotein quality control. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 7238-7241. doi.org/10.1021/ja3013177.
- 10. T. Kiuchi, et al. Monitoring of glycoprotein quality control system with a series of chemically synthesized homogeneous native and misfolded glycoproteins. J. Am. Chem. Soc. 2018, 140, 17499-17507. doi.org/10.1021/jacs.8b08653
- 11. Y. Maki, et al. Semisynthesis of intact complex-type triantennary oligosaccharides from a biantennary oligosaccharide isolated from a natural source by selective chemical and enzymatic glycosylation. J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3461-3468. doi.org/10.1021/jacs.5b13098.
- 12. Y. Maki, et al. Chemical Synthesis of an Erythropoietin Glycoform Having a Triantennary N-Glycan: Significant Change of Biological Activity of Glycoprotein by Addition of a Small Molecular Weight Trisaccharide. J. Am. Chem. Soc. 2020, 142, 20671–20679. doi.org/10.1021/jacs.0c08719
- M. A. Hossain, et al. Total Chemical Synthesis of a Nonfibrillating Human Glycoinsulin. J. Am. Chem. Soc., 2020, 142, 1164-1169. doi.org/10.1021/jacs.9b11424.