

学 位 論 文 題 名

Glycoproteins Constructed by Chemoselective Glycosylation with Common Reducing Sugar

(遊離の糖鎖を用いた選択的化学修飾法による糖タンパク質の合成)

学位論文内容の要旨

生体内に存在するタンパク質の多くは様々な翻訳後修飾を受けていることが知られている。そのうちの1つであるタンパク質への糖鎖による修飾は細胞間接着、癌転移、シグナル伝達、細胞内局在、微生物感染、免疫応答等、生命現象にとって非常に重要であることが示されてきた。タンパク質の生理活性には修飾している糖鎖が深く関わっていることが知られてきたが、生理活性に及ぼす糖鎖の影響を詳細に検討するにあたり問題となるのは糖タンパク質の入手方法である。糖タンパク質は生物から直接抽出するか人工的に合成することで得ることが可能であるがそれぞれに大きな問題を抱えている。生物からの抽出においては生体内で起こる糖鎖の修飾が画一的にかつ均一ではないため、得られる糖タンパク質は不均一な混合物となってしまう。遺伝子導入した宿主細胞中での生合成により作製する手法においては、タンパク質の1次配列が遺伝情報の操作のみにより人為的に正確にコントロールできるのに対して糖鎖修飾は遺伝情報の翻訳後に行われるため、その制御は従来の遺伝子工学的な手法のみでは困難な状況にある。タンパク質に内在するアミノ酸に対して人工的に翻訳後修飾を行う手法では糖鎖修飾部位以外の同様のアミノ酸と選択して反応させることは難しい。また、化学合成や酵素反応を活用して構造の均一な糖タンパク質を合成する試みもあるが、複雑な糖鎖工学の操作が必要なことや合成が可能である分子量や糖鎖構造に大きな制約があるために様々な糖タンパク質を得るのは困難を極めている。近年、*in vitro* または *in vivo* におけるタンパク質への非天然アミノ酸導入技術の発達にともない、この手法を応用した糖タンパク質の合成法がいくつか報告されてきてきた。しかし、複雑な糖鎖誘導体の合成が必須であることや糖アミノ酸を直接用いる手法では構造の制限が大きいという問題点があった。

本研究では、*in vitro* におけるタンパク質への非天然アミノ酸導入技術と遊離の糖鎖による選択的な糖鎖付加反応を組み合わせることで、糖鎖の構造および付加する位置が正確に制御された多様な糖タンパク質を作製することに成功した。

第1章では序章として、過去に報告されている糖タンパク質の合成に関する様々なアプローチについて、非天然アミノ酸のタンパク質への導入技術とあわせて概説している。

第2章では、遊離の糖鎖と選択的に反応できる官能基を有する非天然アミノ酸を導入したタンパク質の作成方法について述べている。本研究では、穏和な条件下でアルデヒドやケトンと反応する aminoxy 基を L-homoserine の側鎖に付与した非天然アミノ酸を用いることにした。4 塩基コドン/アンチコドン (CGGG/CCCG) 法を利用した非天然アミノ酸のタンパク質への導入に必要なアミノアシル tRNA_{CCCG} は、化学的アミノアシル化による非天然アミノ酸-pdCpA の合成を経て作製した。生物のタンパク質翻訳系をによる非天然アミノ酸のタンパク質への導入効率は、非天然アミノ酸の構造に大きく依存していることが知られている。本研

究では aminooxy 基を有する L-homoserine 誘導体 [Hser(OH₂)]および N-methyl aminooxy 基を有する L-homoserine 誘導体[Hser(OHMe)]の2種類を作製し、大腸菌抽出液を用いた *in vitro* transcription / translation によるタンパク質への導入を試みた。その結果、作製した2種類の非天然アミノ酸は共に生物のタンパク質翻訳系によりタンパク質へと導入できることが確認された。非天然アミノ酸のタンパク質への導入実験にはストレプトアビジンおよび T4 フェージリゾチームの2種類のタンパク質を用いたが、タンパク質の違いによる2種類の非天然アミノ酸 Hser(OHMe)および Hser(OH₂)の導入効率に大きな差はなく、様々なタンパク質への応用が可能であることが示された。

第3章では、遊離の糖鎖による選択的なタンパク質の化学修飾について述べている。aminooxy 基は、アルデヒドやケトンと反応してオキシムを形成することが知られている。遊離の糖鎖は還元末端側がヘミアセタール環のためアルデヒドが生成され、このアルデヒドは aminooxy 基と反応してオキシムを形成する。また、遊離の糖鎖を N-methyl aminooxy 基と反応させた場合、糖は閉環して環状構造のまま結合する。そこで、N-methyl aminooxy 基を有するストレプトアビジンを用いて、遊離の糖鎖を用いた選択的化学修飾による糖タンパク質の合成を試みた。N-methyl aminooxy 基をもつストレプトアビジンを容易に入手可能な遊離の糖鎖（グルコース、マルトース、マルトトリオース、N-アセチルグルコサミン、ラクトース）と pH 4.0 の酢酸緩衝液中で反応させた後 MALDI TOF MS により分子量を測定した。その結果、反応の前後で混合した糖鎖1分子分だけ分子量の増加が観測された。遊離の糖鎖と非天然アミノ酸を持たないストレプトアビジンとは全く反応が進行しなかったことから、導入した N-methyl aminooxy 基の部位のみに選択的に糖鎖が導入された糖タンパク質が作製されたことが示された。さらに、本手法で導入した糖鎖（ラクトース）に対して α -2.3sialyltransferase を用いた糖転移反応によりシアル酸の付加が確認され、糖転移酵素による糖鎖の伸長が可能であることを明らかにした。本手法では、N-methyl aminooxy 基を有する1種類のストレプトアビジンから糖鎖の構造と修飾位置を制御した計6種類の糖タンパク質を容易に作成し、aminooxy 基を用いた多様な糖タンパク質の合成が可能であることを示した。

第4章は、総括である。本研究では、合成困難とされている糖タンパク質の新しい合成手法を示した。第3章で示したように、本手法による糖タンパク質の合成は1種類の aminooxy 基を導入したタンパク質に異なる遊離の糖鎖を混ぜることで容易に数種類の糖タンパク質を得ることができる。また、タンパク質に導入する aminooxy 基の位置や導入するタンパク質の種類は翻訳に用いる遺伝子を変えることで容易に変更が可能であるため、糖タンパク質のコम्ビナトリアル合成への応用に有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	西村 紳一郎
副査	教授	田中 勲
副査	教授	河野 敬一
副査	特任助教授	福原 法夫
副査	特任助教授	貞許 礼子

学位論文題名

Glycoproteins Constructed by Chemoselective Glycosylation with Common Reducing Sugar

(遊離の糖鎖を用いた選択的化学修飾法による糖タンパク質の合成)

生体内のタンパク質の多くは糖鎖による修飾を受けた糖タンパク質として存在しており、細胞間接着や癌転移、シグナル伝達、細胞内局在、微生物感染、免疫応答等、様々な生命現象に深く関わっていることが知られている。医薬品開発においてもタンパク質の糖鎖修飾の意義が重要視されるようになってきた。しかし、タンパク質の一次配列が遺伝情報の操作のみにより人為的にコントロールできるのに対して、糖鎖修飾は遺伝情報の翻訳後に行われるため従来の遺伝子工学的な手法のみでは制御が困難な状況にある。糖タンパク質は生物からの抽出または遺伝子導入した宿主細胞中での生合成により得られるが、生体内での糖鎖修飾は画一的に進行せずむしろ多様かつ複雑な糖鎖を持った混合物を生成することが一般的である。ペプチドや核酸の自動合成装置に匹敵するスタンダードな糖タンパク質合成技術は依然として確立しておらず、複雑な化合物は常に試行錯誤を伴う多段階の工程により合成されているため、機能と構造の関係を議論する際の大きな障害となっているのが現状である。

本論文では、非天然アミノ酸を組み込んだリコンビナントタンパク質への遊離の糖鎖を用いた位置選択的な化学修飾により、導入する糖鎖の構造と位置が正確にコントロールされた糖タンパク質をハイスループットに得られる新しい糖タンパク質合成法を報告している。

アミノオキシ基はアルデヒド基やケトン基と選択的に反応しオキシムを形成することが知られている。遊離の糖鎖は還元末端側の1位がヘミアセタール構造であるため、同様にアミノオキシ基と反応することができる。そこで、アミノオキシ基を有する非天然アミノ酸をタ

ンパク質に組み込み、遊離の糖鎖による選択的な化学修飾を行った。

タンパク質への非天然アミノ酸の導入に4塩基コドン／アンチコドン(CGGG／CCCG)を拡張コドンとして使用するため、化学的に合成したアミノアシル pdCpA を用いてアミノアシル tRNA_{acccg}を作成した。アミノオキシ基を有する非天然アミノ酸として Hser(ONHMe)および Hser(ONH₂)の2種類の化合物を合成し、ストレプトアビジンおよび T4 フェージリゾチームに導入した。翻訳には大腸菌由来の無細胞タンパク質翻訳系を使用し、タンパク質への非天然アミノ酸の導入をウェスタンブロット解析による完全長タンパク質の生成により確認した。さらに、ストレプトアビジンの83残基目に Hser(ONHMe)を導入したストレプトアビジン 83 Hser(ONHMe)に関して、アフィニティークロマトグラフィーによる精製の後、MALDI TOF MS による解析を行った。

次に、アミノオキシ基を組み込んだタンパク質への遊離の糖鎖による修飾を行った。遊離の糖鎖として容易に入手できる5種類の糖鎖(グルコース、マルトース、マルトトリオース、N-アセチルグルコサミン、ラクトース)を用いた。ストレプトアビジン 83 Hser(ONHMe)を遊離の糖鎖と反応させて MALDI TOF MS により解析したところ、糖鎖1分子だけ分子量の増加したピークが新たに観測された。アミノオキシ基を導入していないタンパク質では全く変化がみられなかったことから、アミノオキシ基と選択的に反応したことを確認している。さらに、導入した糖鎖への糖転移酵素による糖鎖伸長反応が可能であることを明らかにしている。

アミノオキシ基を導入するタンパク質の種類やその位置は翻訳に用いる遺伝子情報を変えることで容易に変更が可能であるため、遊離の糖鎖による修飾と糖転移酵素による糖鎖伸長を組み合わせることで多様な糖タンパク質の作成に活用できることが示唆された。

これを要するに、著者は、新たな糖タンパク質合成法として、遊離の糖鎖を利用したハイスループットな手法を開発し、これまで困難とされてきた糖タンパク質のコンビナトリアル合成に応用できることを示した。

よって、著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認める。