

糖鎖化コレラトキシン B-サブユニットの合成と生細胞への導入

真木勇太、川田一希、岡本亮、梶原康宏

大阪大学 理学研究科 理研・理学研究科連携プロジェクト拠点

タンパク質の糖鎖付加は重要な翻訳後修飾であり、糖鎖はタンパク質の生理活性の制御や安定性の向上に重要である。これまでの研究により、糖鎖は小胞体における糖タンパク質品質管理機構に関与しており、種々のシャペロンと相互作用しながら糖タンパク質のフォールディングに貢献することが明らかとなっている。しかし、小胞体 (ER) からゴルジ体に運ばれた後に、糖タンパク質の輸送や成熟過程に糖鎖がどのように影響しているのか未だ明らかではない。我々は、合成した均一な構造の糖タンパク質を ER やゴルジ体へと導入することで、タンパク質上の糖鎖の構造変化や機能を調べることができると考えた。

本研究では、生細胞の特定のオルガネラへと糖タンパク質を導入するために、人工的に複合型糖鎖を付加したコレラトキシン B サブユニット (CTB) を合成した。コレラトキシン (CT) は *V. Cholerae* から産生されるタンパク質毒素であり、毒性を有する A サブユニットと、細胞への侵入に重要な 5 量体構造の B サブユニットから構成されている。CT は細胞膜表層のガングリオシド GM1 と相互作用することで、エンドサイトーシスによって細胞内へと侵入し、その後ゴルジ体や ER へと輸送される。この CT の活性を利用し、糖鎖を付加した CTB を合成することで ER やゴルジ体を選択的に輸送しようと考えた。糖鎖の導入位置については、X 線結晶構造解析の結果を参考に、五量体形成や GM1 との結合を阻害しにくい N 末端側を選んだ。導入する糖鎖については、研究室で確立された方法によって鶏卵から調製し、7 糖からなる複合型糖鎖を導入した。120 アミノ酸残基ほどからなる全長を 5 つのセグメントに分割し、それぞれを Boc 固相合成法によって調製した。そしてセグメント同士を一般的な Native Chemical Ligation 反応によって連結することで全長糖ペプチドを得た。さらに段階透析を用いた条件で CTB のフォールディングを検討したところ、単量体として糖鎖化 CTB を得た。

得られた糖鎖化 CTB を使って細胞への導入実験を検討した。合成した CTB の C 末端には、細胞内での挙動を追跡するための HiBiT タグ (発光タグ) と ER への輸送効率を高める ER 輸送シグナルを導入しておいた。細胞への取り込みを観察したところ、時間経過とともに細胞膜上からゴルジ体や ER へと輸送されることを確認した。これにより、合成した糖タンパク質を選択的に細胞のオルガネラへと導入することに初めて成功した。また糖鎖のない CTB や ER 輸送シグナルのない CTB も用いてゴルジ体や ER へ輸送された割合を定量した。その結果、糖鎖や輸送シグナルの有無で輸送効率が変わることが明らかとなった。本研究により、糖鎖化 CTB は単量体でも ER やゴルジ体へと輸送されることが明らかとなり、導入する糖鎖構造を変えることで生合成経路における糖鎖機能を今後さらに調べていくことができる。

研究業績リスト

I 査読論文

(1) Glycoproteins semisynthesis by chemical insertion of glycosyl asparagine using a bifunctional thioacid-mediated strategy.

Kota Nomura, Yuta Maki, Ryo Okamoto, Ayano Satoh, Yasuhiro Kajihara. *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*, 10157–10167.

(2) Studies in glycopeptide synthesis.

Yasuhiro Kajihara, Rie Nishikawa, Yuta Maki, Ryo Okamoto, *Arkivoc*, **2021**, *4*, 230–40.

(3) Purified EDEM3 or EDEM1 alone produces determinant oligosaccharide structures from M8B in mammalian glycoprotein ERAD.

Ginto George[†], Satoshi Ninagawa[†], Hirokazu Yagi, Jun-ichi Furukawa, Noritaka Hashii, Akiko Ishii-Watabe, Ying Deng, Kazutoshi Matsushita, Tokiro Ishikawa, Yugoviandi P Mamahit, Yuta Maki, Yasuhiro Kajihara, Koichi Kato, Tetsuya Okada*, Kazutoshi Mori*, *eLife* **2021**, *10*, e70357.

(4) Semisynthesis of a Homogeneous Glycoprotein Using Chemical Transformation of Peptides to Thioester Surrogates

Ryo Okamoto, Kento Iritani, Yoko Amazaki, Donglin Zhao, Chaitra Chandrashekar, Yuta Maki, Yurie Kanemitsu, Tomoka Kaino, Yasuhiro Kajihara, *J. Org. Chem.* **2021**, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c02031>.

II 国際会議等における発表

(1) Semisynthesis of a complex-type oligosaccharide to understand the function of triantennary structure of glycoproteins,

Yuta Maki, ACS Carbohydrate Division Young Investigator Symposium, online, 1月16日, oral presentation.

(2) Thioacid-Based Strategy for the Semisynthesis of Glycoproteins

Kota Nomura, Ryo Okamoto, Yuta Maki, Yasuhiro Kajihara, Pacificchem 2021, online,

12/19, oral presentation.

(3) Uncovering the Latent Function of Hydration of Carbohydrates Tuning the Thermal Hysteresis Activity of Antifreeze Glycoprotein

Hiroyuki Shibata, Ryo Orii, Yuta Maki, Daichi Fukami, Sakae Tsuda, Yasuhiro Kajihara, Ryo Okamoto, Pacificchem 2021, online, 12/21, poster presentation.

(4) Semisynthesis of Glycoproteins for the Elucidation of Glycan Functions

Yanbo Liu, Yasuhiro Kajihara, Pacificchem 2021, online, 12/21, poster presentation.

(5) Chemical synthesis of an erythropoietin glycoform having a semisynthesized triantennary oligosaccharide and its biological evaluation

Yuta Maki, Ryo Okamoto, Masayuki Izumi, Yasuhiro Kajihara, Pacificchem 2021, online, 12/21, poster presentation.

Ⅲ 国内会議等における発表

(1) ミスフォールド型糖タンパク質 IL-8 の半合成研究

ママヒット・ユゴヴィアンディ・プリマンダ, 真木勇太, 岡本亮, 梶原康宏

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月29日、ポスター発表

(2) スレオニン部位を利用した新規糖タンパク質半合成法の開発研究

山田大貴, 真木勇太, 岡本亮, 梶原康宏

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月29日、ポスター発表

(3) 糖鎖の機能解明に向けた IgG 抗体 Fc フラグメントの合成研究

西川晴美, 真木勇太, 岡本亮, 梶原康宏

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月29日、ポスター発表

(4) 複合型糖鎖を有する Cholera Toxin B-Subunit の化学合成と生細胞への導入

真木勇太, 佐藤あやの, 川田一希, 岡本亮, 梶原康宏

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月28日、口頭発表

(5) 糖鎖アナログをもつエリスロポエチンの合成研究

森口 達也, 中村大地, 真木 勇太, 岡本 亮, 梶原 康宏

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月27日、ポスター発表

(6) 糖タンパク質 Interleukin-6 (IL-6) の半合成研究

劉晏博, 真木勇太, 岡本亮, 梶原康宏

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月27日、ポスター発表

(7) 糖タンパク質 MCP-1 の半合成研究

奥田 暁, 岡本 亮, 真木 勇太, 梶原 康宏

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月27日、ポスター発表

(8) β メルカプトチロシン誘導体を利用した糖タンパク質 IL17F 半合成法の開発研究

矢部 勇人, 岡本 亮, 真木 勇太, 梶原 康宏

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月27日、ポスター発表

(9) タンパク質糖鎖水和殻による水の動的挙動

岡本 亮, 真木 勇太, 芝田 大之, 佐藤 あやの, 梶原康宏

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月27日、口頭発表

(10) 化学的糖鎖挿入による糖タンパク質精密合成

野村 幸汰, 真木 勇太, 岡本 亮, 佐藤 あやの, 梶原 康宏

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月27日、口頭発表

(11) 新規ワンポット法による糖タンパクの化学合成と糖鎖の特異的水和の機能解明研究

芝田大之, 田中裕也, Donglin Zhao, 真木勇太, 梶原康宏, 岡本亮

第40回日本糖質学会年会

鹿児島、10月29日、ポスター発表

(12) Semisynthetic Study of Interleukin-6 (IL6)

Yanbo Liu, Ryo Okamoto, Yuta Maki, Yasuhiro Kajihara, CSJ 101th Annual Meeting, 2021/3/22, online, 口頭発表.

(13) Thioacid-Based Strategy for the Semisynthesis of Glycoproteins

Kota Nomura, Yuta Maki, Ryo Okamoto, Yasuhiro Kajihara, CSJ 101th Annual Meeting, 2021/3/19, online, 口頭発表

(14) 新規 One-Pot 法による糖タンパク質の化学合成と糖鎖の特異的水和の解明研究

芝田 大之、田中 裕也、Donglin Zao、真木 勇太、梶原 康宏、岡本 亮、日本化学会第101回春季年会、2021/3/22、オンライン、口頭発表

(15) フォールディングセンサー酵素の阻害剤を用いる糖タンパク質品質管理機構の追跡

齋藤 泉、大谷 結子、向川 友紀、山内 美紀、和泉 雅之、真木 勇太、岡本 亮、伊藤 幸成、梶原 康宏、日本化学会第101回春季年会、2021/3/22、オンライン、口頭発表

(16) 糖鎖機能解明に向けた糖ペプチドプローブの合成研究

石原 薫、真木 勇太、岡本 亮、伊藤 幸成、梶原 康宏、日本化学会第101回春季年会、2021/3/19、オンライン、口頭発表

(17) ペプチドC末端の新規活性化法を利用した糖タンパク質 ICOS の半合成

入谷 健斗、岡本 亮、天崎 瑤子、真木 勇太、梶原 康宏、日本化学会第101回春季年会、2021/3/19、オンライン、口頭発表

(18) 分子内酸触媒による加水分解を鍵としたコンドロイチン硫酸誘導体およびライブラリーの合成

松井 翔太郎、古場 温美、満保 章泰、真木 勇太、岡本 亮、梶原 康宏、日本化学会第101回春季年会、2021/3/22、オンライン、口頭発表

(19) ラクタム構造を有する複合型シアリル糖鎖の合成研究

森口 達也、松野 剛、真木 勇太、岡本 亮、和泉 雅之、梶原 康宏、日本化学会第101回春季年会、2021/3/22、オンライン、口頭発表

(20) 新規 β -メルカプトフェニルアラニン合成法の開発

奥田 暁、岡本 亮、真木 勇太、梶原 康宏, 日本化学会第101回春季年会、2021/3/22、オンライン、口頭発表

(21) 糖タンパク質の効率合成を志向した β メルカプトロイシンの新規合成法の開発研究

小坂田 翼、岡本 亮、真木 勇太、梶原 康宏、日本化学会第101回春季年会、2021/3/22、オンライン、ポスター発表

(22) フォールディングにおける糖鎖の機能解明に向けた IgG 抗体の Fc フラグメントの合成研究

西川 晴美、上田 南、真木 勇太、岡本 亮、和泉 雅之、梶原 康宏, 日本化学会第101回春季年会、2021/3/19、オンライン、口頭発表

(23) 糖タンパク質の新規半合成法の開発に向けた β メルカプトチロシン誘導体の合成研究

矢部 勇人、岡本 亮、真木 勇太、梶原 康宏、日本化学会第101回春季年会、2021/3/22、オンライン、口頭発表

(24) メルカプトメチル基を有するセリン/トレオニンを用いた新規ペプチド連結反応の開発研究

山田 大貴、真木 勇太、岡本 亮、梶原 康宏、日本化学会第101回春季年会、2021/3/22、オンライン、口頭発表

IV 著書

該当なし

V 受賞と知的財産

該当なし

VI その他研究業績、発表文献

該当なし