

成果報告書

研究題目：O-結合型糖鎖の機能解明を目指した不凍糖タンパク質 AFGP の立体構造解析
(研究背景と目的)

本研究では、真核生物広範にみられる、タンパク質の O-グリコシル化が、タンパク質の立体構造および活性に与える影響を分子レベルで明らかにする事を目指し研究を実施した。

不凍糖タンパク質 (antifreeze glycoprotein: AFGP) は $[\text{Ala-Thr-Ala}]_n$ ($n=4-50$) という繰り返しアミノ酸配列をタンパク質本体として、各 Thr 側鎖の水酸基に、ガラクトース β (1-3)N-アセチルガラクトサミン (Gal-GalNAc) という二糖が結合した化学構造を有している。AFGP は氷の結晶成長を阻害する機能を持ち、過去の研究より、糖部分の除去は凍結阻害活性を消失させる事が分かっている。また、短い AFGP においては、弱いながらも、GalNAc のみで活性を示す事が示唆されている。GalNAc は真核生物広範に見られる共通の O-グリコシル化の基幹糖構造であり、その機能や役割は未だ明確になっていない。そこで本研究では、GalNAc という単糖修飾が果たす普遍的な役割を見出すために、化学合成によって GalNAc のみをもつ AFGP ($=[\text{Ala-Thr}(\text{GalNAc})-\text{Ala}]_n$; 以下 AFGP (GalNAc) $_n$ とする) の化学合成法の開発および、その凍結阻害活性の測定を行った。またその機能と構造との相関関係を調べるために、近年申請者が見出した擬ラセミ糖タンパク質結晶化法を利用した AFGP の結晶構造解析を実施した。

(結果)

1) AFGP (GalNAc) の化学全合成：本合成研究では、N-ピバロイルグアニジン (N-PivGu) を利用した効率的な繰り返しペプチド連結法を確立する事で、効率的に種々の長さの AFGP (GalNAc) の化学全合成を達成した。

まずペプチド固相合成法によって、15 残基からなる短い N 末端が Boc 保護された AFGP (GalNAc) $_{15}$ -チオエステル体 (1) を構築した。これを原料として新規に確立した、N-ピバロイルグアニジン (PivGu) を利用した交換反応を利用し、C 末端に N-PivGu をもつペプチド-グアニジン誘導体 (AFGP (GalNAc) $_{15}$ -PivGu (2)) を効率的に得ることができた。これらを銀イオンを利用した、既知のペプチド連結反応に浴したところ、PivGu 部分を損なう事無く、30 残基からなる Boc-AFGP (GalNAc) $_{30}$ -PivGu (3) を効率的に得る事ができた。さらにこの生成物 (3) の PivGu 部分は緩衝溶液中チオールと反応させることで容易にチオエステルへと変換し、一方で、同じ生成物 (3) の Boc 基を直接除去する事で、N 末端が遊離の AFGP (GalNAc) $_{30}$ -PivGu (4) も得る事ができた。これらを新たにペプチド連結反応の原料とすることで、さらに倍の大きさの AFGP (GalNAc) 誘導体の合成が可能となった。以上を繰り返した後、最後にペプチド C 末端の加水分解を行う事で、計 4 種類 (15, 30, 60, 120

残基)のAFGP(GalNAc)の合成に成功した。

これらを用い、不凍活性の指標である、熱ヒステシスの評価を行った。この結果、すべてのAFGP(GalNAc)について明確な活性が認められた。以上より新しい糖タンパク質合成法を確立するとともに、AFGPの活性最小構造はO-GalNAc化された構造であり、O-GalNAcという単糖修飾が普遍的にAFGPの骨格を成すポリペプチド鎖に、明確な凍結阻害機能を付与することを明らかにした。以上の結果については現在投稿論文の作成中である。

2) AFGP(GalNAc)の立体構造解析：本研究では、化学合成糖タンパク質と、そのタンパク質部分の光学異性体であるD-タンパク質(D-アミノ酸およびグリシンで構成されたタンパク質、糖鎖は結合していない)を1:1で混合した擬ラセミ糖タンパク質を用いた迅速な糖タンパク質結晶化法を利用し、AFGP(GalNAc)の結晶構造解析をこころみた。しかし、D-Ala(aとする)とD-Thr(tとする)からなるGalNAc残基をもたないAFGP(=[ata]_n)は極めて水への溶解性がわるくその取り扱いが困難である事がわかった。そこで、tの側鎖に天然型のD-GalNAcを結合した誘導体を用い、AFGPのジアステレオマー([at(D-GalNAc)a]_n)を合成することでその溶解性の改善を行った。この結果その溶解性は改善されたものの、天然型の立体をもつAFGP(GalNAc)との1:1で混合した擬ラセミAFGP(GalNAc)では結晶は得られなかった。

そこで、本研究では擬ラセミ糖タンパク質ではなく、完全なラセミ糖タンパク質を新たに合成し、結晶構造解析を検討した。ラセミタンパク質結晶化法は、擬ラセミ糖タンパク質結晶化法のプロトタイプ of 結晶化法であり、極めて迅速に非修飾のタンパク質結晶を与える事が分かっていた。本研究においては、鍵となるD-GalNAcの鏡像異性体である、L-GalNAcを大量に必要とするため、その原料となるL-Galの簡便な大量合成法を新規に確立した(J. Carbohydr. Chem. 2015)。これを原料とし、i)で確立した合成手法に乗っ取り、AFGP(GalNAc)の鏡像異性体([at(L-GalNAc)a]_n)の合成法についても確立し、世界で初めてのラセミ糖タンパク質の合成に成功した。現在この結果得られたラセミAFGP(GalNAc)を用い、一般的な結晶化スクリーニングによりその結晶化を検討中である。

(発表論文)

R. Orii, M. Izumi, Y. Kajihara, R. Okamoto, *J. Carbohydr. Chem.* **2015**, 34, 560-566.

(謝辞)

今回このような研究の機会を賜りました、一般財団法人杉山産業化学研究所に深く御礼申し上げます。