

## 糖タンパク質合成への挑戦

梅川 碧里

近年における遺伝子工学の発展は目覚ましい。遺伝子組換え技術を用いることによって、特定のアミノ酸を置換したり、異種生物由来の遺伝子をつなぎ合わせて「キメラタンパク質」なるものを自在に作り出したりできるようになった。今や遺伝子組換え技術は、食品や医療分野など至る所で応用されている。

ところで、このように驚異的な遺伝子組換え技術をもってしても、いまだに人工的に合成することが困難なものの一つに「糖タンパク質」がある。タンパク質は生体を構築し、生体内のあらゆる機能調節を担っているが、実にその7割近くは「糖鎖」の付加した糖タンパク質として存在しており、その糖鎖構造の違いがタンパク質そのものの機能に大きな影響を与えることが知られている。糖タンパク質のセリン・スレオニン (O) 結合型糖鎖は少数糖からなる比較的単純な構造をしているが、アスパラギン (N) 結合型糖鎖は多糖からなる複雑な構造をしており、そのバリエーションは多い。遺伝子組換え技術を応用したもの一つに「バイオ医薬品」があるが、それらはヒトのサイトカインや抗体など薬となるタンパク質の遺伝子をおもにチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に組み込むことによって生産されている。しかし、CHO細胞を用いて糖タンパク質を生産した場合、その糖鎖構造は不均一でかつヒト由来のそれとは微妙に異なるため、ヒト体内においてしばしば抗原性を有し、十分な薬理効果を示さない。とりわけ、ヒトのN結合型糖鎖末端のシアル酸は多くのサイトカインの生理活性に重要で、造血因子エリスロポエチンは3本のN結合型糖鎖の末端のシアル酸が欠如すると血中半減期が減少し、ほとんど生理活性を示さない。このようなことから、特定の糖鎖を有する均一な糖タンパク質を効率的に合成する技術が必要となっている。

これに対するアプローチの一つに、糖タンパク質生産の宿主として用いる異種細胞の糖鎖合成関連遺伝子を改変することによって、「ヒト型」の糖タンパク質を生産するという試みがある<sup>1)</sup>。この試みは、哺乳類細胞と比較して、培養やタンパク質精製にかかるコストが安価で、かつ遺伝子改変の容易な酵母や植物細胞などについてなされており、既にそれらの遺伝子組換え宿主細胞を用いていくつかの「ヒト型」サイトカインが生産できるようになった。

しかしながら、細胞を用いた場合、糖鎖構造が完全に均一な糖タンパク質を生産することはやはり難しい。バイオ医薬品のみならず、種々の糖タンパク質糖鎖の機能評価を行う際には、ターゲットタンパク質におおのの構造の糖鎖をより厳密に付加する手段が必要となる。そ

こで考案されたアプローチの一つが、有機合成技術を用いた手法である。梶原らは、 $\alpha$ チオニルエステルと末端システインのエステル交換による「ネイティブケミカルライゲーション」を利用して、糖鎖構造の完全に均一な糖タンパク質を合成することに成功している<sup>2)</sup>。それは、タンパク質のN末端側の任意の場所にヒト型糖鎖を導入した短い部分ペプチドを化学合成し、 $\alpha$ チオニルエステル付加を行う一方で、末端がシステイン残基となるように残りのC末端側のペプチドを組換え大腸菌で発現させ、両ペプチド鎖をネイティブケミカルライゲーションで連結するというものである。

もうひとつは山本らにより開発された酵素法で、いくつかのエンド型グリコシダーゼが有する「糖転移付加活性」を利用して酵素的に糖鎖付加を行うものである。本法では、N-アセチルグルコサミン1残基を有するペプチドやタンパク質に種々のN結合型糖鎖のオリゴ糖を一度に付加できる。問題は、グリコシダーゼは本来の糖加水分解活性が強く、糖転移付加活性によって生成した糖鎖付加生成物の糖鎖がグリコシダーゼの基質となって再び切断されるため、糖鎖付加生成物が高収率で得られないことであった。しかし最近、ヒト型糖鎖に対する転移付加活性をもつ糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来のエンドMを基にして、高収率で糖鎖付加産物を生成できる変異体酵素が創製された<sup>3,4)</sup>。これは、エンドMの反応中間体形成の鍵残基を破壊した点変異体酵素が、以下の機能を有することを利用している。1) 本酵素は、反応中間体と考えられるオキサゾリン構造を還元末端に持つ糖鎖に対し糖転移付加活性を有する。しかし、2) 「グリコシターゼ」様に、生成した糖鎖付加生成物の糖鎖は切断しない。正田らにより開発された、保護・脱保護の必要なくシアロ糖鎖をオキサゾリン誘導体化する化学法と、その変異体酵素を用いる方法を組み合わせることにより、いくつかの「ヒト型」糖ペプチド・タンパク質の効率的合成が実現している<sup>5,6)</sup>。

このように、従来は困難であった糖タンパク質の合成技術はこの数年で大きな進歩を遂げてきた。これらの技術がさらに発展し、実用化され、種々の糖タンパク質が自在に作られるようになるまではそう遠くないかもしれない。

- 1) 三崎 亮: 生物学, **89**, 30 (2011).
- 2) Hirano, K. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 9557 (2009).
- 3) Umekawa, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **283**, 4469 (2008).
- 4) Umekawa, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **285**, 511 (2010).
- 5) Noguchi, M. *et al.*: *J. Org. Chem.*, **74**, 2210 (2009).
- 6) Umekawa, M. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **1800**, 1203 (2010).