

## 学位論文題名

Functional characterization and synthetic application  
of polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases  
based on synthetic unnatural glycopeptides

(合成非天然型糖ペプチドを基にした

ポリペプチド *N*-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼの  
機能解析および合成的応用)

## 学位論文内容の要旨

GalNAc-Ts (polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases) は、ムチン型糖鎖の基本骨格である GalNAc 残基とペプチド側鎖の結合 (GalNAc  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ O-Ser/Thr) を触媒する重要な糖転移酵素である。ヒトでは 20 種類のアリソフォームが存在し、その各々が異なる基質特異性を有しているが、全ての GalNAc-Ts は共通して触媒ドメイン以外にレクチンドメインをあわせ持つ他の糖転移酵素には類をみない構造的特徴がある。 $\alpha$ -GalNAc 含有糖ペプチドを基質とした過去の報告において、レクチンドメイン変異型 GalNAc-Ts は野生型 GalNAc-Ts とは基質へ異なる  $\alpha$ -GalNAc 転移パターン (転移数の減少、転移サイトの変化等) を示す傾向があるため、レクチンドメインは基質ペプチド上の GalNAc 残基を認識しているものと考えられている。そのレクチンドメインの糖認識能については、GalNAc-Ts 反応の系内に加えた遊離単糖の阻害能をみる初歩的な方法でしか確かめられておらず、本来の認識能を議論しているとは言い難い。そこで本研究では GalNAc-Ts の研究における新たなアプローチとして、ムチン型糖ペプチドに本来転移されるべき  $\alpha$ -GalNAc 残基をその他の単糖または結合様式で置換した「非天然型糖ペプチド」を基質とすることにより、レクチンドメインの糖認識能がもたらす酵素反応への影響 (GalNAc が転移されるアミノ酸残基、数、およびその序列) を詳細に検討した。

まず、ムチン型糖タンパク質の 1 つである MUC5AC のタンデムリピートペプチド (GTT<sub>3</sub>PSPVPTTST<sub>12</sub>T<sub>13</sub>SAP) をモデル基質として、野生型 GalNAc-T3 とレクチンドメイン不活性型 GalNAc-T3 (Lec(-) GalNAc-T3) の糖転移反応を比較、レクチンドメインの反応への関与を確認し、非天然型糖ペプチドの設計に活用することとした。MALDI-TOF MS, RP-HPLC および ETD-MS/MS による反応追跡ならびに生成物同定を行った結果、GalNAc-T3 はモデルペプチド基質に対し GalNAc 残基を段階的に 1 つ (Thr3)、2 つ (Thr3 と Thr12, Thr3 と Thr13)、3 つ (Thr3, Thr12, Thr13) と転移したのに対し、Lec(-) GalNAc-T3 の反応生成物は Thr3 への GalNAc 1 転移体にはほぼ収束した。この結果は、GalNAc 残基の第 2 の転移にはレクチンドメインの関与が必須であることを示している。すなわち、GalNAc-T3 は導入した Thr3 上の  $\alpha$ -GalNAc 残基を自らのレクチンドメインで認識し、それ以降に続く GalNAc 転移反応を促進しているものと考えられる。そこで、この推定モデルを元にレクチンドメインの糖認識能とその反応性への影響について検証すべく、第 1 の転移サイトである Thr3 側鎖を天然型 ( $\alpha$ -GalNAc)、または非天然型単糖 ( $\beta$ -GalNAc,  $\alpha$ -Fucose,  $\beta$ -GlcNAc) で修飾した MUC5AC

糖ペプチドを調製し、これらを GalNAc-T3 および Lec(-) GalNAc-T3 の基質とし生成物を比較した。GalNAc-T3 は天然型基質に対して Thr12 および Thr13 の最大 2 箇所にも GalNAc を転移するが、非天然型基質には Thr13 の 1 箇所のみ GalNAc を転移した。一方、Lec(-) GalNAc-T3 は天然型・非天然型問わず全ての基質において Thr13 にも GalNAc を転移した。これらの結果より、Thr13 への転移はレクチンドメイン非関与であり、Thr12 への転移はレクチンドメインが Thr3 側鎖の  $\alpha$ -GalNAc を認識することによって進行することが証明された。さらに、天然型 ( $\alpha$ -GalNAc) と非天然型 ( $\alpha$ -Fuc) の糖ペプチド基質間の競合実験を行った結果では、GalNAc-T3 のレクチンドメインが  $\alpha$ -GalNAc に対して特異的な親和性を示し、その後の転移反応を促進することが明らかとなった。

$\alpha$ -GalNAc 糖ペプチドとの反応性に違いはみられたものの、GalNAc-Ts は非天然型糖ペプチドに対しても  $\alpha$ -GalNAc 転移活性を示す。そこで、この知見を元に基質上の糖を「保護基」としてとらえた新たなムチン型糖ペプチドの化学酵素的合成法へと発展させることとした。一般的に、Thr/Ser 残基を複数有するペプチド基質に GalNAc-T を作用させると  $\alpha$ -GalNAc が単数～複数転移された糖ペプチド混合物を生成する。酵素合成法の観点から考えると、多様な生成物を作り出す GalNAc-Ts はムチン型糖ペプチド作製のツールとして非常に魅力的である。しかし、GalNAc-Ts 反応はある順序に基づいて連鎖的に進行するため、1つのアイソフォームから調製可能な生成物の GalNAc 転移パターンは限定されてしまい、序列に反する GalNAc-T 転移体は望む事が出来ない。そこで、この序列を人為的に制御することにより GalNAc-T 反応生成物のバリエーションを広げる工夫が、前述した保護基としての「糖」の利用である。この方法は段階的な化学酵素的合成法であり、1) GalNAc 転移が起こるアミノ酸側鎖を予め「保護糖 ( $\alpha$ -Mannose,  $\alpha$ -Fucose または  $\beta$ -Galactose)」で塞いだ糖ペプチドの調製、2) GalNAc-T 反応による  $\alpha$ -GalNAc の導入、そして 3) 糖加水分解酵素 ( $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -fucosidase または  $\beta$ -galactosidase) を用いた保護糖の選択的な除去、の 3 ステップを基本工程とする。本研究では大量発現系が確立されている合成用途に適した GalNAc-T2 を用いて検討した。まず代表的なムチン型糖ペプチド 3 種 (EA2, MUC5AC, MUC1) において、各々の第 1 の GalNAc 転移サイトを前述の「保護糖 (3 種)」にて保護した基質糖ペプチド計 9 種を Fmoc 固相合成法により調製した。それぞれの基質を GalNAc-T2 反応に供して  $\alpha$ -GalNAc を転移させた後、保護糖を各々に対応する糖加水分解酵素処理で除去した。一連の反応過程は MALDI-TOF MS にて追跡し、最終生成物は RP-HPLC 精製後 ECD-MS/MS にて解析した。意図した通り、いずれの場合も  $\alpha$ -GalNAc 以外の糖加水分解酵素で除去可能な「糖」による保護で、GalNAc-T2 従来のグリコシル化パターンとは異なる生成物が得られた。さらに、本法の応用としてシアル酸転移酵素の併用についても試行し、シアリル Tn 抗原 (Neu5Ac  $\alpha$ 2-6GalNAc  $\alpha$ ) と Tn 抗原 (GalNAc  $\alpha$ ) の付加位置が制御された MUC1 糖ペプチドの合成を達成した。今後、本合成法は酵素反応の各種条件 (GalNAc-Ts やその他の糖転移酵素との併用、糖ヌクレオチドドナーの当量、反応時間) や基質の保護パターン (複数の保護糖の利用、保護糖の導入位置) の組み合わせにより、多種類の糖ペプチドライブラリーの効率的な構築を可能にする拡張性の高いムチン型糖ペプチドの合成法への発展が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎  
副 査 教 授 菅 原 一 幸  
副 査 教 授 出 村 誠  
副 査 教 授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

## Functional characterization and synthetic application of polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases based on synthetic unnatural glycopeptides

(合成非天然型糖ペプチドを基にした  
ポリペプチド *N*-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼの  
機能解析および合成的応用)

ムチン型糖鎖はタンパク質の糖鎖修飾の中で主要なもの1つであり、共通骨格として GalNAc $\alpha$ →Ser/Thr 構造 (Tn 抗原) を有する。長年にわたりムチン型糖鎖と様々な生体现象との関与は報告されており、近年では特に細胞の癌化と糖鎖構造の変化は注目されている。このムチン型糖鎖生合成初期において根元の GalNAc 分子を Ser/Thr 側鎖に転移する酵素が polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc-Ts) である。本学位論文は、GalNAc-Ts に対し化学的に合成した非天然型糖ペプチドを基質とすることで、GalNAc-Ts の機能解析および合成酵素としての応用研究を行った。

第二章は、GalNAc-Ts 特有の構造であるレクチンドメインの糖認識能解明を目的とした研究内容であった。レクチンドメインの酵素反応中の働きに関しては未だ不明な点が多く、その機能解明が必要とされている。申請者は、最初にペプチド基質に対する GalNAc-T3 およびレクチンドメイン不活性化 GalNAc-T3 (Lec(-) GalNAc-T3) の活性試験を行い、GalNAc 転移過程における GalNAc-T3 レクチンドメインの関与を精査した。ペプチド基質へのアッセイ結果よりレクチンドメインが認識していると推測された基質上のグリコシル化サイトを  $\alpha$ -GalNAc で修飾した天然型糖ペプチド、およびそれ以外の単糖 ( $\beta$ -GalNAc,  $\beta$ -GlcNAc または  $\alpha$ -Fuc) で修飾した非天然型糖ペプチドを設計、Fmoc 固相合成法により調製し、それら合成糖ペプチド基質計 4 種を GalNAc-T3 および Lec(-) GalNAc-T3 の反応に供した。その結果、GalNAc-T3 レクチンドメインは基質上の糖の種類、アノマー位の立体をも厳密に区別し、特に  $\alpha$ -GalNAc 糖ペプチド基質 (天然型) に対し親和性を有するということを証明した。

第三章は、「糖」を GalNAc-T 反応に対する「保護基」として活用した新規ムチン型糖ペプチドの化学-酵素合成法開発に関する研究であった。ムチン型糖タンパク質の研究

を行うにあたり、糖鎖構造が均一なサンプルは天然から採取するのは困難であるため、これまで化学合成やリコンビナントの糖転移酵素を用いた酵素合成、両者を併用した化学-酵素合成による糖ペプチド（タンパク質）の調製がなされてきた。GalNAc-Tsは合成ツールとして *in vitro* ムチン型糖ペプチドの合成に用いることが可能であるが、グリコシル化のパターンが各々のアイソフォーム毎に限られているという欠点がある。申請者は、この GalNAc-Ts の合成酵素としての欠点を補うため新規化学-酵素合成法を開発した。その手法は、まず GalNAc-T の潜在的なグリコシル化サイトである基質上スレオニン側鎖のヒドロキシ基を予め  $\alpha$ -GalNAc 以外の単糖 ( $\alpha$ -Mannose,  $\alpha$ -Fucose または  $\beta$ -Galactose) で保護した非天然型糖ペプチド基質を化学合成し、続いてその基質に対し GalNAc-T 反応を行い  $\alpha$ -GalNAc 分子を導入後、最後に糖加水分解酵素 ( $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -fucosidase または  $\beta$ -galactosidase) 処理により保護に用いた糖を選択的に除去しムチン型糖ペプチドを合成する、という全3行程から構成されていた。この手法により、従来の GalNAc-T とは異なったグリコシル化パターンの GalNAc 糖ペプチド合成を可能とした。さらに、申請者は応用例としてシアル酸転移酵素 (ST6GalNAc-I) と GalNAc-T を併用し、シアリル Tn (Neu5Ac $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6GalNAc $\alpha$ -) と Tn 抗原、2種類の糖鎖構造を含む MUC1 糖ペプチド合成も行った。この化学-酵素合成法は、基質の保護パターンや酵素反応の条件を変えることにより、効率的な糖ペプチドライブラリー構築法へとさらに発展することが期待される。

審査員からは、非天然型の糖を基質に導入する事で GalNAc-Ts の活性低下は確認されたのかという質問があった。この質問に対し申請者からは、天然型の  $\alpha$ -GalNAc 糖ペプチド基質よりは反応性の低下が見られるものの、酵素反応の条件（糖供与体の等量、酵素量、反応時間）を加味する事で酵素反応を促進する事は可能であるという回答があった。また、本論文でグリコシル化サイト同定に用いた、ETD (Electron Transfer Dissociation-MS/MS) および ECD (Electron Capture Dissociation)-MS/MS の有意性に関する質問が出たが、反応メカニズムと共にそれら MS/MS 法の利点を説明した。

本論文は、合成非天然型の糖ペプチドを用い、GalNAc-Ts のレクチンドメイン機能解析および合成酵素としての汎用性を広げるという、ムチン型糖鎖研究においてはこれまでにない斬新な手法である。今後、GalNAc-Ts アイソフォーム各々の基質特異性の解明、合成ムチン型糖ペプチドライブラリーを用いた癌を中心とした疾患関連エピトープや自己抗体の探索等、創薬研究への応用に繋がる事が期待される。よって審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（生命科学）の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。