

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 糖鎖の超高感度検出を目的とした新規糖アナログの開発
(英語) Development of new sugar analogs for super-sensitive detection of glycans

研究開発実施期間: 平成 28 年 9 月 9 日～令和 3 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 木塚 康彦
(英語) Yasuhiko Kizuka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人東海国立大学機構 岐阜大学 高等研究院 生命の鎖統合研究センター・准教授
(英語) Tokai National Higher Education and Research System・Gifu University, Center for Highly Advanced Integration of Nano and Life Science・Associate Professor

II 研究開発の概要

糖鎖の発現制御は疾患により破綻し、結果がんやアルツハイマー病など様々な疾患を引き起こす。このことから、糖鎖の病的変化はこれらの疾患の治療標的・マーカーになると考えられる。糖鎖変化の医療応用のためには、特定の糖鎖を高感度に検出する方法・ツールが不可欠である。ところが現在の糖鎖生物学では、糖鎖の微細な変化を感度よくまた特異的に検出する技術が不足している。汎用されるレクチンや抗体は、非特異的なシグナルの高さや親和性の弱さといった問題点があり、糖鎖を検出する新たな技術開発が望まれている。

本課題では、有機合成によって新たな糖アナログをデザイン・合成し、*in vitro* の糖転移酵素アッセイと、クリックケミストリーを利用した細胞糖鎖のラベル化・検出により、感度・毒性・特性を評価することを目的とする。これにより高感度かつ高選択性を持った、新たなケミカルプローブの開発を目指す。さらに、得られた糖アナログによる糖鎖合成阻害効果を合わせて検証し、阻害剤となりうる糖アナログも同時に探索する。またすでに従来品よりも高感度化に成功したフコースのアナログ(Kizuka et al., *Cell Chem. Biol.*, 2016, 23, 782-792)を用い、肺がん細胞から特異的に分泌されるフコシル化糖タンパク質を単離、同定する。得られた標的糖タンパク質のマーカー創薬標的としての有用性を評価する。

本課題では、新たな糖鎖プローブとなる糖アナログの開発を目指した。糖アナログを用いた糖鎖検出の最大の問題点は、使える糖の種類が少ないことである。これまでに、GalNAc、GlcNAc、シアル酸、フコースという 4 種の糖の誘導体のプローブが開発されているが、動物細胞の糖鎖を構成する糖は約 10 種存在し、本手法では全て

の糖鎖をカバーできない。この問題を解決するため、植物の代謝酵素遺伝子を組み込んだ動物細胞を作成し、これまで使えなかった糖鎖プローブが可能な細胞を作出した。この細胞に、有機化学により新たに合成した糖アナログを添加したところ、確かに効率的に糖鎖ラベルが行われることがわかった。さらに、新たに合成したアナログは細胞増殖抑制作用や、グリコサミノグリカン合成抑制作用などの生理活性を持つことがわかった。以上より、新たなプローブ、阻害剤候補となる化合物およびそれを利用した糖鎖検出法が開発できた。

また、これまで糖鎖プローブとして使われていた 6-アルキニルフコースというフコースのアナログ（試薬として販売）が、強力なフコシル化阻害剤であることを見出した。この化合物を添加すると、細胞の内在性のフコシル化糖鎖が激減し、さらにこの阻害の程度（IC50～5 μM 以下）は、既存のフコシル化阻害剤である 2-フルオロフコースよりもはるかに強力であった。その阻害メカニズムは、GDP-フコース合成酵素の一つである FX の特異的な阻害であることを発見した。FX の特異的な阻害剤はこれまで報告がなく、世界で初めての発見である。さらに、6-アルキニルフコースによるフコシル化の阻害によって肝がん細胞の浸潤能を抑えられることも見出した。以上の成果は論文として受理された(Kizuka et al., *Cell Chem. Biol.*, 2017, 24, 1467-1478)。また、糖転移酵素の中で疾患と関連が深い N 型糖鎖の分岐酵素について、その阻害剤となる糖アナログの開発を試みた。立体構造から阻害作用を有する可能性のある候補物質を 11 種合成し、酵素アッセイに供したところ、いくつかの物質に阻害作用が見出された。

また、すでに高感度プローブとして開発した 7-アルキニルフコースおよび類縁のフコースアナログを用い、クリックケミストリーにより糖鎖がラベルされたタンパク質の同定を行った。それに先立ち、7-アルキニルフコースと、6-アルキニルフコースについて、ラベルされる標的ターゲットについての詳細な解析を行った。その結果、特に 7-アルキニルフコースは、細胞中の糖タンパク質はよくラベルされるものの、培地中の糖タンパク質のラベル化効率が低いことや、細胞分化や血管内皮の機能に重要な Notch 上の O-フコース型糖鎖のラベルには 6-アルキニルフコースの方が適していることなどが明らかになった。その理由を明らかにするために、これらのアナログの GDP 体を用いてほぼ全てのフコース転移酵素の活性を *in vitro* で測定したところ、O-フコースを転移する POFUT1, POFUT2 は、他のフコース転移酵素と比べて構造指向性が低く、様々なアナログを許容できることがわかった。この構造生物学的基盤として、POFUT1 や POFUT2 の触媒ポケットの中で、フコースの 6 位の周辺に空間が広がっており、O-フコース転移酵素はこれらのアナログを広く許容できるポケット構造を持っていることがわかった。以上の成果を論文として発表した (Ma et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2020)。

次に、肺がんのマーカ―や治療標的となりうるフコシル化糖鎖のキャリアタンパク質の同定を試みた。培地中の糖タンパク質のラベル化効率が良いことがわかった 6-アルキニルフコースを用い、肺がん細胞株 A549 に添加して培地中の糖タンパク質糖鎖をラベルした。ラベル化された糖タンパク質をクリックケミストリーによってビオチン化し、アビジンビーズで生化学的に精製したのち、プロテオミクスにより同定した。その結果、30 種以上の糖タンパク質の同定に成功した。今後これらの糖タンパク質の中から、肺がんのマーカ―あるいは治療標的となるタンパク質を絞っていく予定である。

Dysregulation of glycan expression often causes various diseases, including cancer and Alzheimer's disease. This suggests that disease-related glycan alterations are biomarkers and/or therapeutic targets of these diseases. Therefore, methods and tools are required for detection of a certain glycan with high specificity. However, in the glycobiology field, techniques are insufficient to detect the slight changes in glycans with high sensitivity and specificity, and development of new techniques are desired.

Here, we design and chemically synthesize novel sugar analogs and assess their sensitivity, toxicity and usefulness by applying these compounds to *in vitro* glycosyltransferase assay and click chemistry-based labeling and detection of cellular glycans. Using this strategy, we try to develop new chemical probes of glycans with high sensitivity and selectivity. In addition, we examine their inhibition potency against glycosylation and try to develop new inhibitors. Meanwhile, using these

techniques, we aim at identifying fucosylated glycoproteins specifically secreted from lung cancer cells. We also assess usefulness of the identified glycoproteins as disease markers and drug targets.

In this project, we tried to develop new sugar analogs as novel glycan probes. A prominent shortcoming of sugar analog for glycan detection is the limited number of available sugar residues. Analogs of 4 sugars, GalNAc, GlcNAc, sialic acid and fucose, have so far been developed as glycan probes. In animal cells, roughly 10 kinds of sugars constitute glycans, and therefore this technique cannot cover all glycans at this moment. To overcome this issue, we established animal cells expressing plant metabolic enzymes which allow for utilization of many sugars. Treatment of these cells with newly synthesized sugar analogs resulted in efficient glycan labeling. Furthermore, the newly synthesized analogs were found to inhibit cell growth and biosynthesis of glycosaminoglycans. These findings showed that we developed new probes and inhibitor candidates.

We also discovered that a fucose analog, 6-alkynyl-fucose, that had been used as a glycan probe, is a potent inhibitor of fucosylation. Addition of this compound resulted in a sharp drop of fucosylated glycan endogenously expressed in cells. In addition, inhibition potency was much higher than the existing fucosylation inhibitor, 2-fluorofucose. Moreover, we revealed that the inhibition mechanism in which this compound specifically inhibits a GDP-fucose synthase FX. As no specific inhibitor of FX has been reported, that was the first case in the world. Furthermore, we found that inhibition of fucosylation by 6-alkynyl-fucose suppresses invasion of liver cancer cells. These findings were published in a paper (Kizuka et al., *Cell Chem. Biol.*, 2017, 24, 1467-1478). In addition, we tried to develop sugar analogs as inhibitors for an N-glycan branching enzyme that is highly involved in diseases. 11 candidate compounds were designed based on the enzyme structure and synthesized. Enzyme assay in vitro revealed that some of these compounds indeed had inhibition activity of the enzyme.

We also identified fucosylated proteins which were labeled with highly sensitive clickable probe 7-alkynyl-fucose and related fucose analogs. Prior to these experiments, we examined the proteins labeled with 7-alkynyl-fucose and 6-alkynyl-fucose. As a result, 7-alkynyl-fucose was found to efficiently label cellular proteins but not secreted proteins. We also found that 6-alkynyl-fucose is suitable for labeling O-fucose on Notch which is essential for cell differentiation. To understand the mechanism, we carried out systematic fucosyltransferases assays using GDP-fucose analogs and revealed that O-fucosylation enzymes, POFUT1 and POFUT2, can effectively use fucose analogs as donor substrates compared with other enzymes. As to the structural basis, the catalytic pockets of POFUT1 and POFUT2 have a space around 6 position of fucose and therefore are tolerant for various fucose analogs. These results were published as a paper (Ma et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2020).

We finally tried to identify fucosylated glycoproteins from lung cancer cells using these fucose analogs. 6-Alkynyl-fucose was added to A549 cells, and the proteins in the media were modified with these analogs into the glycans. The labeled proteins were further biotinylated by click chemistry, purified with avidin-beads and identified by proteomics. We succeeded in identification of over 30 glycoproteins. We plan to further investigate whether some of these identified proteins are biomarkers or therapeutic targets of lung cancer.