

シャペロンタンパク質カルネティキュリンと結合可能な光機 能性糖鎖リガンドの開発

成蹊大学 理工学部理工学科応用化学専攻

廣瀬 光了

1. はじめに

がんは日本人の2人に1人が一生のうちに罹患すると推定されており、わが国における最も深刻な健康課題の一つである。がんの発症には、喫煙や食生活、運動不足、飲酒などの生活習慣に加え、加齢や遺伝的要因、環境因子が複合的に関与している。そのため、予防医療の推進や早期発見の体制整備が進められているものの、がんの発症そのものを完全に防ぐことは現実的に困難であり、依然として多くの患者が治療を必要としているのが現状である。

特に、がんが進行した高ステージの症例では、根治を目指した治療法として「切除手術」が選択されることが多い。外科的切除は大きく部分切除（温存手術）と全摘切除の二つに分類される。部分切除は、がん病変を取り除きつつ可能な限り正常組織を残すことができるため、臓器の機能や形態を維持できるという大きな利点がある。しかしながら、微小転移や取り残しが生じた場合には再発のリスクが高く、再手術や追加治療が必要となる可能性がある。一方、全摘切除はがんの再発率を大きく低減できるものの、臓器の喪失に伴う機能障害や合併症が避けられず、患者の日常生活や社会復帰に深刻な影響を及ぼすことが少なくない。

さらに、手術に加えて広く用いられている治療法として抗がん剤治療が挙げられるが、これにも多くの課題が存在する。抗がん剤はがん細胞の増殖を抑制する一方で、正常細胞にも影響を及ぼすため、脱毛、悪心・嘔吐、免疫低下、倦怠感などの副作用が避けられない。また、多くの場合、十分な治療効果を得るためには長期間にわたる反復投与が必要であり、患者の身体的・精神的負担が大きいだけでなく、医療費の増大という社会的問題も引き起こしている。

このように、現行のがん治療は一定の成果を上げているものの、治療効果、再発リスク、副作用、生活の質（QOL）、医療コストのいずれの観点においても依然として改善の余地が大きい。したがって、より少ない治療回数で高い治療効果を達成でき、かつ正常組織への影響を最小限に抑えられる新たながん治療戦略の開発が強く求められている。

2. がん治療法の糸口となるタンパク質（カルレティキュリン）

ここでは、本研究の中心標的分子であるカルレティキュリン（Calreticulin; CRT）について紹介する。CRTは小胞体（endoplasmic reticulum, ER）に局在する多機能タンパク質であり、細胞の恒常性維持において極めて重要な役割を担っている¹⁻⁴。特に、CRTは新生糖タンパク質の品質管理に関与し、タンパク質が正しい立体構造へと折りたたまれる過程（フォールディング）を補助する分子シャペロンとして機能する^{1,5}。具体的には、CRTはモノグルコシル化された高マンノース型糖鎖（Glc₁Man₉GlcNAc₂型）を認識し（図1）、タ

する「二点認識型(ハイブリッド型)結合様式」により親和性が增強されることを示している。

この知見に基づき、芳香族 Fmoc 基を他の機能性芳香族分子に置換することで、CRT 標的性を維持したまま、新たな機能を付与できると考えた。そこで本研究では、光線力学療法 (photodynamic therapy, PDT)

で広く用いられるクロロフィル

(Chl) 誘導体に着目した。クロロフィルは可視光照射により一重項酸素 (1O_2) を発生し、がん細胞を選択的に傷害できる光増感剤として知られている¹⁵⁾。特に亜鉛クロロフィル-*a* 誘導体 (ZnChl) は、金属なしの Chl 誘導体と比較的して水溶性が高い点が有望である。

本研究では、三糖 G1M2 骨格に EG リンカーを介して ZnChl 誘導体を結合した **G1M2-EG8-ZnChl** を設計・合成した (図 2)。この分子設計は、三糖部位が CRT の *N* ドメインを認識し、ZnChl 部位が *P* ドメインの疎水領域と相互作用すると同時に、光照射により活性酸素を発生する二重機能を有する分子として機能することを目指す。すなわち、本分子は「CRT 認識能」と「光細胞傷害能」を兼ね備えた多機能性糖鎖プローブとして位置づけられる。

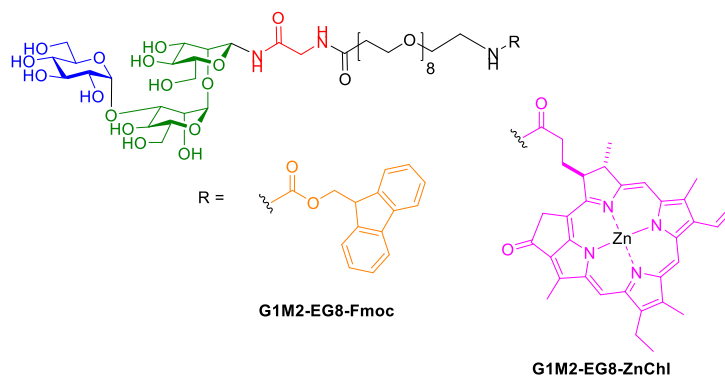


図 2. **G1M2-EG8-R** (R = Fmoc or ZnChl) の化学構造

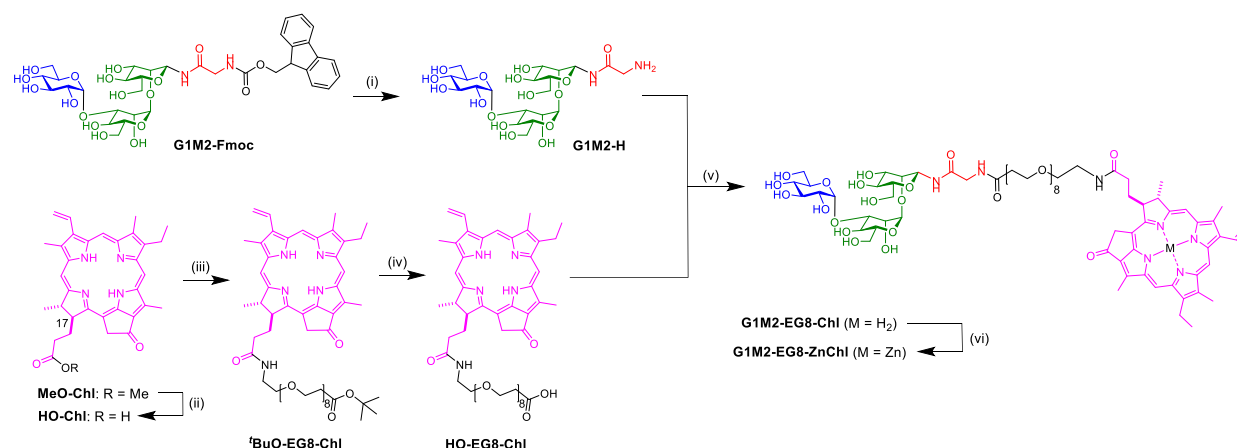
4. 光機能性糖鎖リガンド **G1M2-EG8-ZnChl** の合成

本研究では、CRT 標的三糖リガンドと光増感性クロリン誘導体を柔軟に組み合わせるため、モジュール型合成戦略を採用した (Scheme 1)。すなわち、三糖部位とクロリン光増感部位をそれぞれ独立に合成し、最終段階でカップリングする方法を選択した。この戦略により、いずれかの構成要素を改変する際にも、他方の構造に影響を与えることなく設計変更が可能となる。まず、二つの主要構成要素として、三糖ユニット **G1M2-H** およびクロリン側鎖 **HO-EG8-Chl** を調製した。**G1M2-H** は、既報の **G1M2-Fmoc** から Fmoc 基を除去する一段階反応により¹⁴⁾、定量的に得られた [Scheme 1 (i)]。

一方、**HO-EG8-Chl** は三段階反応により合成した。まず、既報に従って調製した **MeO-Chl**¹⁶⁻¹⁸⁾ の C17 位プロピオン酸メチルエステルを酸性条件下で加水分解し、対応するカルボン酸 **HO-Chl** を 97% 収率で得た [(ii)]^{19,20)}。C17 位を修飾部位として選択した理由は、この位置での官能基導入がクロリン骨格の光物性にほとんど影響を与えないことが知られているためである。続いて、**HO-Chl** の C17 位カルボキシ基と、末端アミノ基を有する **tBuO-EG8-H** とを、水溶性縮合剤 EDC および縮合助剤 HOBt 存在下でアミド化し、**tBuO-EG8-Chl** を 91% 収率で得た [(iii)]。ここで導入したオクタエチレングリコール (EG8) リンカーは、既報の有効な CRT リガンドである G1M9 型糖鎖および **G1M2-EG8-Fmoc** とほぼ同程度の分子長となるよう設計した。その後、*t*Bu 保護基をトリフルオロ酢酸処理により脱保護し、目的の **HO-EG8-Chl** を 97% 収率で得た [(iv)]。得られた **HO-EG8-Chl** と

G1M2-H を、縮合剤 COMU 存在下でカップリングすることでアミド結合を形成し、**G1M2-EG8-Chl** を 26% 収率で合成した [(v)]。

さらに、本研究では水溶性の向上を目的としてクロリン部位の金属化を検討した。クロリン骨格への金属導入は一般に溶解性を改善することが報告されているため²¹⁾、酢酸亜鉛存在下で中心金属として亜鉛を導入し、最終目的化合物 **G1M2-EG8-ZnChl** を収率 96% で得た [(vi)]。得られた化合物の構造は、¹H NMR 分光法、および質量分析 (found: $m/z = 1584.6101$, calcd. $[M + Na]^+ m/z = 1584.6086$) により同定した。



Scheme 1. **G1M2-EG8-ZnChl** の合成経路.

5. 光機能性糖鎖リガンドの光学特性と CRT 親和性評価

本研究で開発した CRT 標的型光機能性糖鎖リガンド **G1M2-EG8-ZnChl** の光学特性およびカルレティキュリン (CRT) に対する親和性を評価した。まず、**G1M2-EG8-ZnChl** の光学特性を理解するため、紫外可視分光測定を行った。エタノール中における本リガンドの吸収スペクトルは、430 nm (Soret 帯) および 659 nm (Qy 帯) に強い吸収帯を示した (図 3 赤線)。このスペクトルは、糖鎖を持たない ZnChl 単体である zinc methyl pyropheophorbide-*a* のスペクトルと一致 (Soret: 430 nm, Qy: 659 nm) しており、エタノール中で、本リガンドは凝集体を形成していないことが確認された。一方、水性 MOPS 緩衝液中では、主吸収帯が 434 nm および 666 nm に観測され、赤色光領域に特徴的な吸収を保持していた (図 3 青線)。また、蛍光測定では水系での発光が著しく減衰し、エタノール中の約 20% まで低下したことから、部分的な凝集による消光が示唆された。本リガンドは水系中でも、ある程度の分散性を保ちつつ、光学活性を維持していると結論づけられた。

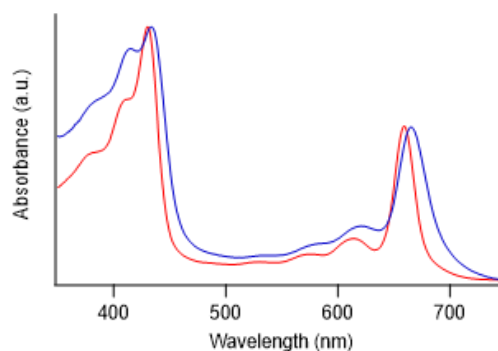


図 3. エタノール中(赤線)、および MOPS 緩衝水溶液中 (青線) での **G1M2-EG8-ZnChl** の紫外可視吸収スペクトル.

次に、光照射による一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の生成能を、DPBF を用いた化学トラッピング法で評価した。660 nm の光照射により DPBF の吸収が時間依存的に減少し、**G1M2-EG8-ZnChl** が $^1\text{O}_2$ を生成することが確認された ($k_{\text{G1M2-EG8-ZnChl}} = 17.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)。本リガンドは、比較物質であるクロリン e_6 トリメチルエステル (**Ce6**) よりも、反応速度 ($k_{\text{Ce6}} = 30.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) が遅かったものの、その一重項酸素量子収率は、 $\Phi_{\Delta} = 0.27$ と算出され、光増感剤として十分な活性を有することが示された。さらに、80 秒間の照射後も ZnChl 由来の吸収ピークに顕著な減衰は見られず、本リガンドは短時間の光照射条件下で、高い光安定性を有することが明らかとなった。

続いて、**G1M2-EG8-ZnChl** と CRT との相互作用を生体外で評価した。熱安定性シフトアッセイでは、本リガンドの存在下において、CRT の変性温度が 1.4°C 上昇し、三糖のみの **G1M2** (0.6°C) よりも、高い熱安定化が観測された。一方、既報の **G1M2-EG8-Fmoc**¹⁴⁾ (2.5°C) よりも低い熱安定性を示した。これは、ZnChl 部分の嵩高さが、CRT との結合様式に影響し、結合能が低下している可能性が示唆された。さらに、等温滴定熱量測定により結合熱力学を解析した結果、**G1M2-EG8-ZnChl** は CRT に対して $K_b = 1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ の結合定数を示した。負のエンタルピー変化 ($\Delta H = -3.48 \text{ kcal/mol}$) は、水素結合や π - π 相互作用などの特異的相互作用の形成を示唆し、同時に正のエントロピー寄与 ($-T\Delta S = -4.83 \text{ kcal/mol}$) は、脱溶媒和に伴う系の無秩序化を反映していると考えられた。これらの結果から、本リガンドは三糖部分が *N* ドメインの糖認識部位と相互作用し、ZnChl 部分が疎水的あるいは芳香族相互作用を介してアグリコン認識領域に寄与する「二点認識型 (ハイブリッド型) 結合様式」リガンドとして機能すると推察された。ただし、ZnChl の大きな芳香族骨格は、結合ポケットへの最適な入り込みの許容量を超え、**G1M2-EG8-Fmoc** ($K_b = 5.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)¹⁴⁾ よりも親和性が低下した可能性がある。また、大きな芳香族アグリコンは、糖鎖構造に基づく精密な分子認識よりも、疎水相互作用主体の結合を誘導する可能性も示唆された。

6. まとめ

本研究では、カルレティキュリン (CRT) を標的とした新規光機能性糖鎖リガンド **G1M2-EG8-ZnChl** を設計・合成し、その光物性および CRT 親和性を体系的に評価した。紫外可視分光および蛍光測定により、本リガンドは水系条件下でも赤色光領域に特徴的な吸収を保持し、部分的な凝集は見られるものの実用上、十分な分散性と光学活性を維持することが明らかとなった。また、DPBF を用いた評価から、本リガンドが光照射により一重項酸素を効率的に生成し、かつ短時間の照射に対して高い光安定性を示すことを確認した。これらの結果は、**G1M2-EG8-ZnChl** が光増感剤として生理条件に適合し得ることを強く支持している。さらに、熱安定性シフトアッセイおよび等温滴定熱量測定による解析により、本リガンドが CRT に対して高い親和性を有し、その結合が三糖部分と ZnChl アグリコンの双方に依存する二重認識型相互作用であることを示した。一方で、ZnChl の嵩高

さが、結合最適化を制限する可能性も見出され、今後の分子設計における重要な指針が得られた。

以上より、**G1M2-EG8-ZnChI** は「CRT 親和性」と「光増感機能」を両立した新たな糖鎖基盤型光機能性リガンドであり、CRT 標的型 PDT 材料の創出に向けた有望な分子設計プラットフォームを提供するものと結論づけられる。

また、本研究は CRT が主に免疫原性細胞死 (ICD) に伴って細胞表面に提示されるといふ生物学的特性を踏まえ、ICD 関連状態を標的とし得る光増感剤の分子設計基盤を確立した点に意義がある。現段階では分子設計および生物物理学的評価に焦点を当てたが、今後は細胞内挙動、ER 局在性、ならびに実際の光線力学療法 (PDT) 効果の検証へと展開していく必要がある。

謝辞

本研究は (公益財団法人) 天野工業技術研究所、2025 年度 (前期募集) 研究助成金を受けて実施されました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) M. Michalak, R. E. Milner, K. Burns, M. Opas, Calreticulin. *Biochem. J.* **1992**, *285*, 681–692.
- 2) M. G. Coppelino, S. Dedhar, Calreticulin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, *30*, 553–558.
- 3) K. H. Krause, M. Michalak, Calreticulin. *Cell* **1997**, *88*, 439–443.
- 4) M. Michalak, E. F. Milner, N. Masaeli, K. Nakamura, M. Opas, Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 281–292.
- 5) F. R. Ware, A. Vassilakos, P. A. Peterson, M. R. Jackson, M. A. Lehrman, D. B. Williams, The molecular chaperone calnexin binds Glc₁Man₉GlcNAc₂ oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 4697–4704.
- 6) E-M. Frickel, P. Frei, M. Bouvier, W. F. Stafford, A. Helenius, R. Glockshuber, L. Ellgaard, ERp57 is a multifunctional thiol-disulfide oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18277–18287.
- 7) M. Michalak, J. Groenendyk, E. Szabo, L. I. Gold, M. Opas, Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 651–666.
- 8) M. Feng, K. D. Marjon, F. Zhu, R. Weissman-Tsukamoto, A. Levett, K. Sullivan, K. S. Kao, M. Markovic, P. A. Bump, H. M. Jackson, T. S. Choi, J. Chen, A. M. Banuelos, J. Liu, P. Gip, L. Cheng, D. Wang, I. L. Weissman, Programmed cell removal by calreticulin in tissue homeostasis and cancer. *Nat. Comm.* **2018**, *9*, 3194.
- 9) D. Y. Kim, A. Pyo, M. Yun, R. Thangam, S.-H. You, Y. Zhang, Y.-r. Jung, D.-H. Nguyen, A. Venu, H. S. Kim, M. S. Yoon, Y. Hong, J.-J. Min, Imaging calreticulin for early detection of immunogenic cell death during anticancer treatment. *J. Nuc. Med.* **2021**, *62*, 956–960.
- 10) Y. Zhang, R. Thangam, S.-H. You, R. D. Sultonova, A. Venu, J.-J. Min, Y. Hong, Engineering calreticulin-targeting monoclonal antibodies to detect immunogenic cell death in cancer chemotherapy. *Cancers*, **2021**, *13*, 2801.

- 11) Y. Liu, Y. Wang, Y. Yang, L. Weng, Q. Wu, J. Zhang, P. Zhao, L. Fang, Y. Shi, P. Wang, Near infrared fluorescence probe for dynamic and reversible monitoring of redox homeostasis fluctuations of hemangioma. *Signal Trans. Targ. Ther.* **2023**, *8*, 104.
- 12) I. Matsuo, M. Wada, S. Manabe, Y. Yamaguchi, K. Otake, K. Kato, Y. Ito, Synthesis of monoglucosylated high-mannose-type dodecasaccharide, a putative ligand for molecular chaperone, calnexin, and calreticulin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3402–3403.
- 13) Y. Ito, S. Hagihara, I. Matsuo, K. Totani, Structural approaches to the study of oligosaccharides in glycoprotein quality control. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 481–489.
- 14) T. Kuribara, T. Kojima, Y. Kobayashi, M. Hirose, K. Shibayama, Y. Takeda, K. Totani, Development of a calreticulin-targeting glycan ligand based on a hybrid binding concept. *Glycobiology* **2025**, *35*, cwaf015.
- 15) S. Yano, S. Hirohara, M. Obata, Y. Hagiya, S. Ogura, A. Ikeda, H. Kataoka, M. Tanaka, T. Joh, Current states and future views in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2011**, *12*, 46–67.
- 16) K. M. Smith, D. A. Goff, D. J. Simpson, *Meso* substitution of chlorophyll derivatives: Direct route for transformation of bacteriopheophorbides *d* into bacteriopheophorbides *c*. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4946–4954.
- 17) L. Ma, D. Dolphin, Nucleophilic reaction of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene and 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene with methyl pheophorbide *a*. Unexpected products. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 849–860.
- 18) H. Tamiaki, S. Takeuchi, S. Tsudzuki, T. Miyatake, R. Tanikaga, Self-aggregation of synthetic zinc chlorins with a chiral 1-hydroxyethyl group as a model for *in vivo* epimeric bacteriochlorophyll-*c* and *d* aggregates. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 6699–6718.
- 19) M. Hirose, M. Teramura, J. Harada, H. Tamiaki, BciC-catalyzed C13²-demethoxycarbonylation of metal pheophorbide *a* alkyl esters. *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1473–1480.
- 20) M. Hirose, J. Harada, Y. Kashiya, H. Tamiaki, Predicted structure of the BciC enzyme catalyzing the removal of the C13²-methoxycarbonyl group for biosynthesis of chlorosomal chlorophylls: A mechanism for dual catalytic functions of hydrolysis and decarboxylation inside its active site. *Biochemistry* **2023**, *62*, 1443–1451.
- 21) M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi, P. K. Pandey, The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 340–362.

シャペロンタンパク質カルネティキュリンと結合可能な光機能性糖鎖リガンドの開発

所属・研究者名 成蹊大学 理工学部理工学科応用化学専攻 助教 廣瀬光了

[目的] 免疫原性細胞死 (ICD) に関与する分子であるカルレティキュリン (CRT) を標的とした新規光機能性糖鎖リガンドを開発することを目的とした。

[内容] CRT 親和性を有する三糖 (G1M2) を基盤とし、光増感機能をもつ亜鉛クロロフィル (ZnChl) を連結した複合体 **G1M2-EG8-ZnChl** は、糖鎖部分と光増感部分を独立に合成後、後期段階で連結して合成した。得られた化合物について、光物性および CRT 親和性を評価した。

[成果] ① **G1M2-EG8-ZnChl** の合成に成功。② 水系条件でも赤色光領域 (665 nm) に吸収を示し、実用的な光学活性を保持。③ 光照射により一重項酸素の発生。④ CRT に対して有意な親和性。

