The study of glycopeptide syntheses: exploring concise *O*-linked sialylglycopeptide synthesis and glycopeptide coupling reaction

糖ペプチドの合成研究：
簡便な *O* 型シアリル糖ペプチドの合成と糖ペプチド連結法の探索

Okamoto, Ryo; and Kajihara, Yasuhiro*

International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University,
22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0027, Japan

*Corresponding author: kajihara@yokohama-cu.ac.jp

(Received on August 6, 2008, accepted on August 6, 2008)

Key Words: Sialylation, Sialyl- T_N , MUC4, sialylglycopeptide

Abstract

For the preparation of both *N*-linked and *O*-linked sialylglycopeptides and their glycoprotein form, the critical points in these syntheses are the preparation of an appropriate amount of sialyloligosaccharyl-amino acid and isolation of the sialylglycopeptides. In particular, it has been difficult to isolate *O*-linked sialylglycopeptides in which the sialyl linkage is labile to acid treatment and the *N*-acetyl-galactosaminyl linkage is labile to base-treatment. For the preparation of target glycoproteins by the use of such sialylglycopeptide thus obtained, an efficient coupling method should be essential. In this review, we introduce our new sialyl donors for the synthesis of sialyl- T_N epitope and *O*-linked sialyl- T_N -glycopeptides, and a new concept for a glycopeptide coupling reaction in the synthesis of glycoproteins.

要約

N 型, *O* 型シアリル糖ペプチドおよびその糖タンパク質を調製するために, 最も大事なことは, 必要量のシアリル糖鎖アミノ酸とそれを用いたシアリル糖鎖ペプチドの合成をいかに行うかである. 特に, 酸に弱い, シアリル結合および塩基に弱い *N*-アセチルガラクトサミン結合をもつ *O* 型シアリル糖ペプチドを単離することは注意が必要である. そして, それらシアリル糖ペプチドを用いて, 標的糖タンパク質を調製する場合, ペプチドや糖ペプチドを連結する簡便な方法が必要である. この総説では, シアリル- T_N エピトープを合成するための, 新しいシアリル供与体および, *O* 型シアリル- T_N 糖ペプチドの合成, さらに, 糖タンパク質を合成するための, 糖ペプチド連結法について最近の我々の成果を紹介する.

A. Introduction

Polypeptide chains are modified by co- or post-translational modifications. Of these, glycosylation is the major modification and 50% of all human proteins are thought to be glycosylated (1). Oligosaccharides on glycoprotein are basically divided into two groups, *O*-linked and *N*-linked types (2). In the case of the *O*-linked type, a small oligosaccharide attaches to the alcohol of serine or threonine by an *N*-acetyl- β -D-galactosaminyl linkage. On the other hand, the *N*-linked type is a large branched oligosaccharide, which is further divided into three types: complex, hybrid, and high-mannose types. All *N*-linked oligosaccharides are incorporated on the asparagine side chain, where asparagine is located in the Asn-X-Thr/Ser sequence (X: any amino acid except for proline). However, since the oligosaccharides on proteins exhibit diverse structures, elucidation of oligosaccharide

A. はじめに

ポリペプチド鎖は, 翻訳中あるいは翻訳後修飾を受ける. これらの中で, 糖鎖化は, もっとも主要な修飾で, ヒトタンパク質のうち約 50% が糖鎖化されている可能性がある (1). 糖鎖は, 大きく 2 つのグループに分けることができる. *O* 型, および *N* 型である. *O* 型については, 少数の糖残基が連結した形で, タンパク質中のセリンあるいはトレオニンに *N*-アセチルガラクトサミンを介して結合している (2). 一方, *N* 型は, 大型で分岐構造を形成し, さらに 3 つのタイプ, 複合型, 混成型, 高マンース型に分けられる. 全ての *N* 型糖鎖は, Asn-X-Thr/Ser (X はプロリン以外) のアスパラギン残基の側鎖の窒素原子に結合している. しかし, 糖鎖は, 多様な構造をしているのでどのような構造の糖鎖が機能しているのか解明するのは困難である. 従って, 単一構造の糖鎖をもつ糖タンパク質を調製することが必要である. 近年では, 糖鎖機

Fig. 1. Native chemical ligation and glycoprotein synthesis.

function on proteins has been difficult. Therefore, glycoproteins having homogeneous oligosaccharides need to be prepared. Recently cell expression systems for the study oligosaccharide function have advanced, but as yet it cannot regulate the oligosaccharide patterns precisely. Under these situations, chemical syntheses have been expected which would allow the preparation of homogeneous glycoproteins having complex type and *O*-linked oligosaccharides. In terms of the synthesis of glycoproteins having *O*-linked sugars, the Bertozzi (3) and Nakahara groups (4) have independently succeeded. For the synthesis of glycoproteins having complex type oligosaccharides, we demonstrated the synthesis of monocyte chemotactic protein-3 having a complex type disialyloligosaccharide (5). There are still problems in the synthesis of a number of glycoproteins, however, which remain to be solved.

For preparation of the target glyco-polypeptide chain, peptide and glycopeptide segments should be coupled. The Nakahara and Hojo group used a peptide-thioester activation strategy using AgCl (6), while Bertozzi (3) and our groups (5) employed the native chemical ligation (NCL) method developed by Kent and Dawson (Fig. 1) (7). This NCL method relies on the thiol exchange reaction between a peptide having a α -thioester at the C-terminal and another peptide having a cysteine residue at the N-terminal, and subsequent intramolecular acyl transfer to afford a native amide bond. This method can be performed in the buffer solution without any activated organic reagents except for guanidine-hydrogenchloride and alkyl-thiol. As shown in Figure 1, this NCL absolutely requires a cysteine residue at the N-terminal of the peptide. However, some target glycoproteins don't have cysteine at the appropriate position for the peptide segment coupling reaction. Therefore, in order to couple glycopeptides segments at any position, a new ligation method is also essen-

能を解明するための、細胞を用いた発現法が発展しているが、糖鎖構造を精密に制御することはできない。このような状況下では、単一構造の複合型、あるいは *O* 型糖鎖をもつ糖タンパク質の化学合成が期待されている。*O* 型の単糖をもつ糖タンパク質の合成では、Bertozzi (3) および中原 (4) グループがそれぞれ成功している。複合型シアリル糖鎖をもつ糖タンパク質の合成としては、我々が、monocyte chemotactic protein-3 の合成をおこなっている (5)。しかしながら、今後多くの糖タンパク質を合成していくには、解決しなくてはならない問題が残っている。

標的糖タンパク質の糖ペプチド鎖を調製するには、ペプチドや糖ペプチドセグメントを連結する必要がある。中原、北條グループ (6) は、ペプチドチオエステルをもちい、それを塩化銀で活性化してペプチド鎖を連結している。一方、Bertozzi (3)、我々は (5)、Kent, Dawson らが見出した native chemical ligation (NCL) を利用している (7)。この反応では、C 末端にチオエステル基をもつペプチドとシステイン残基を N 末端にもつペプチド間のチオール交換反応がおこり、そして分子内アシル転移を起こすことで、天然型のアミド結合を与える (図 1)。この反応は、タンパク質変性剤であるグアニジン存在下、緩衝溶液中で活性化剤を用いなくても起こる。図 1 に示したように、NCL は、システイン残基を必要とする。しかし、標的糖タンパク質全長を構築する際、ペプチドを連結していくために必要なシステイン残基を適切な位置にもっていないタンパク質がある。したがって、システイン残基以外の場所でも糖ペプチド、ペプチドを連結できる方法が必要である。

For preparation of *O*-linked sialylglycopeptides and their glycoprotein form, the critical points in these synthetic methods are the preparation of an appropriate amount of sialyloligosaccharyl-amino acid and isolation of the *O*-linked type sialylglycopeptide in which the sialyl linkage is labile for acid treatment and the *N*-acetyl-galactosaminyl linkage is labile for base-treatment. Hence, an annoying problem is the stereoselective construction of the naturally occurring α -sialyl linkage. Because *O*-linked sialylglycopeptide and its protein form have been expected for cancer vaccines (8) and cancer immunotherapy using humanized IgG, efficient *O*-linked sialylglycopeptides have been anticipated.

B. Sialylation

Therefore we started to investigate reactivity and stereoselectivity of amide donors to serve as a new sialyl donor. We selected three amide functional groups, amide (CONH_2), monomethyl amide (CONHCH_3), and dimethyl amide ($\text{CON}(\text{CH}_3)_2$) groups **1–3**, as shown in Fig. 2.

○型のシアリル糖鎖ペプチドおよびその糖タンパク質を合成することについては、合成に必要な、シアリル糖鎖-アミノ酸の調製および酸加水分解されやすいシアリル結合、塩基に弱いガラクトサミン結合を有する○型シアリル糖鎖ペプチドをいかに単離するかが鍵となる。また、さらに問題となるのは、シアリル糖鎖調製のための立体選択的なシアリル化である。○型シアリル糖鎖は、癌ワクチン(8)や、ヒトIgGを用いた抗体治療のための抗原としても期待されているので、より簡便な○型シアリル糖鎖ペプチドの合成法が望まれている。このような状況下で我々は、これら問題点を解決する検討を行ってきた。この総説では、シアリルT_N抗原、およびシアリルT_Nを有するペプチドを合成するのに有用な興味深いシアリル化反応を見出したこと(9)、また糖タンパク質を合成するための新しい糖ペプチドを連結法(10)も開発したことを紹介する。

シアリル化のための有用なシアリル供与体が多数開発されてきたが(11), それらは, 2つのグループに分けることができる。アセトニトリルの溶媒効果を利用したもの(11-13), 隣接基効果を利用したものである(11,14)。さらに最近では, シアル酸の5位を修飾すると α 選択性が向上することが報告されている(11,15-22)。しかし, 全てのシアリル供与体の1位はエステル基であり(図2, 4)(23), 我々は, このエステルをアミド基に置換した効果に興味をもった(図2, 1-3)。そこで, アミドを有する新しいシアリルドナーの反応性, 立体選択性を調べる研究を開始した。我々は, シアル酸の1位にアミド, モノメチルアミド, そしてジメチルアミド基を有する化合物を選び合成した(図2, 1-3)。

1: R = NH₂
 2: R = NHCH₃
 3: R = N(CH₃)₂
 4: R = OCH₃

©2008 FCCA (Forum: Carbohydrates Coming of Age)

Scheme 1. Synthesis of amide donors 1–3.

thesis of the dimethyl amide donor, we used hexaacetyl-NeuAc derivative **10** as the starting substrate (**25**). These amide donors **1–3** were synthesized under conventional conditions, as shown in Scheme 1.

The new sialyl donors **1–3** were examined for the sialylation reaction toward the 6-hydroxyl group of acceptors (**a**)–(**c**). In terms of sialylation of glucoside acceptor (**a**) with amide donor **1**, the reaction afforded sialoside **12** in 84% yield ($\alpha:\beta=7:1$, entry 1). Sialylation using monomethyl amide donor **2** with acceptor (**a**), afforded sialoside **15** in 90% yield ($\alpha:\beta=10:1$, entry 4). Using the galactosyl type acceptors (**b**) and (**c**), this reactions also afforded the desired Neu5Ac- α -(2,6)-Gal and Neu5Ac- α -(2,6)-GalNAc linkages in good yield, respectively ($\alpha:\beta=4.5:1$, entry 2; $\alpha:\beta=4:1$, entry 3). Furthermore, the monomethyl amide donor **2** exhibited better α -selectivity and higher yield (yield=91%, $\alpha:\beta=5:1$, entry 5; $\alpha:\beta=5.4:1$, entry 6). Meanwhile, dimethylamide donor **3** toward acceptor (**b**) and (**c**) afforded an unexpected result. These reactions exhibited β -selectivity rather than α -selectivity ($\alpha:\beta=1:6$, entry 7, and $\alpha:\beta=1:9$, entry 8). In order to evaluate the function of amide group during sialylation, we also examined the normal sialylation reaction using a methyl ester donor **4** in CH₂Cl₂. The stereoselectivity ranged from 4:1 ($\alpha:\beta$) to 1:1 (entry 9–11).

Based on these results, we hypothesized that activation of the amide donor afforded a three membered cyclic intermediate generated by the interaction of the amide-group with the C(2) position to stabilize the oxocarbenium ion intermediate (Fig. 3).

リル供与体 **1–3** を用いて、受容体(a)–(c)の6位水酸基に対してシアリル化を塩化メチレン溶媒中で検討した。グルコース受容体を用いたアミド供与体 **1** のシアリル化については、シアリル糖鎖 **12** を84%の収率で与えた($\alpha:\beta=7:1$, entry 1)。モノメチルアミド供与体 **2** では、シアリル糖鎖 **15** を90%の収率で与えた($\alpha:\beta=10:1$, entry 4)。ガラクトシルタイプの受容体(b)および(c)を用いた場合、Neu5Ac- α -(2,6)-Gal ($\alpha:\beta=4.5:1$, entry 2) および Neu5Ac- α -(2,6)-GalNAc ($\alpha:\beta=4:1$, entry 3) を効率よく与えた。更に、モノメチルアミド供与体 **2** を用いると、さらに高い α 選択性と収率向上が見られた (yield=91%, $\alpha:\beta=5:1$, entry 5; $\alpha:\beta=5.4:1$, entry 6)。しかし、ジメチルアミド供与体 **3** を用いるとその選択性は β 型へと変化した ($\alpha:\beta=1:6$, entry 7, and $\alpha:\beta=1:9$, entry 8)。

アミド基の効果を調べるために、我々は、メチルエステルを有する一般的なシアリル供与体 **4** を塩化メチレン中で反応させた。その結果、立体選択性は、4:1($\alpha:\beta$) から 1:1 (entry 9–11)であった。

これら結果をもとに、我々は、活性化したアミド供与体は、生成する2位のオキソカルベニウムイオンとアミドが相互作用した3員環様の中間体を生成していると考察した (図3)。この過程では、2つの中間体(a)あるいは(b)が存在する可能性がある。実験は、 α 選択性を優位に示すことから、中間体は(b)が優先していると推定している。また、ジメチルア

1; R = NH₂
 2; R = NHCH₃
 3; R = N(CH₃)₂
 4; R = OCH₃

(a)

(b)

(c)

TMSOTf
 CH₂Cl₂
 -78 °C to -40 °C

12-22

*The ratios were determined by ^1H NMR

We also found an interesting stereoselectivity dependent on the reaction temperature, as shown in Table 2.

The diagram illustrates the mechanism of sialylation. It begins with a glycosyl donor in a chair conformation, featuring an X group at C2 and an NRR' group at C1. The reaction proceeds through a resonance-stabilized oxocarbenium ion intermediate. This intermediate is then attacked by a nucleophile HOR'' to form two possible products: (a) a β -sialylated product and (b) an α -sialylated product. The final products are labeled β -Sialylation and α -Sialylation.

ミド供与体では、この中間体形成がジメチル基の立体障害により効率よく起こらないために、 β 選択性を示したのではないかと考えている。

©2008 FCCA (Forum: Carbohydrates Coming of Age)

Table 2. Temperature dependence of sialylation reaction using Neu5Ac-1-monomethylamide 2

Entry	Acceptor	Temperature and $\alpha : \beta$ *		
		-50 °C	-78 °C	-87 °C
1		4.9 : 1 (82%)	8.9 : 1 (92%)	9 : 1 (>90%)
2		3.5 : 1 (83%)	4.9 : 1 (68%)	4.9 : 1 (86%)
3		3 : 1 (84%)	5.7 : 1 (83%)	6.1 : 1 (87%)

*The ratios were determined by ^1H NMR

Table 3. Deamidation of 1-amide-sialosides

Entry	R ₁ (compound)	R ₂	Product : Yield%
1	H (12 α)		23 : 80%
2	CH ₃ (15 α)		23 : 85%
3	H (13 α)		24 : 84%
4	CH ₃ (16 α)		24 : 75%
5	H (14 α)		25 : 89%
6	CH ₃ (17 α)		25 : 92%

configuration, as shown in Fig. 3 (b), may be faster than that of glycosylation. This is because the lower temperature condition decreases the accessibility of acceptor to the sialyl donor through solvent due to an intermolecular reaction. Therefore, alcohol might attack the C(2) carbon from the α -side preferably after the formation of the thermodynamically stable intermediate (b).

Because we found an interesting sialylation reaction by amide donors, we examined deamidation reaction at the 1 position. Hydrolysis by the use of 2 M NaOH solution at 100°C (26) followed by acetamidation with Ac₂O at the 5 position afforded the desired sialoside in good yield. The results of deamidation are shown in Table 3.

ため、中間体(b)を形成する分子内反応の方が早いと考えられ、その結果、受容体のアルコールは中間体形成後、 α 方向から中間体(b)に攻撃し、 α 体を与えるのではないかと考えている。

我々は、アミド供与体を用いた興味深いシアリル化を見出したので、次にアミド基のデアミド化を検討した。2M NaOH 100°Cで処理後(26)、5位のアセトアミド化を行い、目的とするシアリル糖鎖を得ることができた。この結果は、表3に示した。全てのアミド供与体を用いたシアリル化反応の選択性は、このようにデアミド化を行って NMR を用いて決定した。

Scheme 2. Synthesis of sialyl-T_N derivative 31

C. Synthesis of sialyl-T_N serine derivative and sialyl-glycopeptide

Because the sialylation afforded a suitable amount of sialyldisaccharide, we examined synthesis of naturally occurring *O*-linked sialylglycopeptides. We selected MUC4 glycopeptide having the sialyl-T_N epitope (sialyl-T_N-MUC4 peptide), which is found as an antigen of tumor-associated glycoproteins and is potentially an immune response target (27–29). For the synthesis of this *O*-linked sialylglycopeptide, we examined the synthesis of Fmoc-Ser(sialyl-T_N)-OH by using sialyldisaccharide **25** (Scheme 2) (**30**).

After esterification and acetylation of **25**, the trimethylsilylethyl (SE) group at the 1-position of Gal-2-N₃ **26** was removed by TFA. Disaccharide **27** was converted into imidate **28** in order to examine glycosylation with the Boc-N-Serine derivative. This glycosylation afforded sialyl-T_N derivative **29** in moderate yield (**31**). After deprotection steps, we obtained Fmoc-Ser(sialyl-T_N)-OH conjugate **31**, in which the hydroxyl group is free.

For the synthesis of the sialyl-T_N-MUC4 glycopeptide by solid phase peptide synthesis, we used **31**, because we have already demonstrated the synthesis of *N*-linked glycopeptides by the use of an Fmoc-Asn-complex type oligosaccharide having a free sugar hydroxyl group (**32**). We thought that using this oligosaccharyl-amino acid **31** with the free hydroxyl group would avoid the deprotection step of the acetyl group under basic condition, which usually causes β -elimination of amino acids. In addition, we also found that the esterified sialyl-linkage exhibited resistance in the 95% TFA condition, which is the general condition for the cleavage from the resin (scheme 3). Therefore we examined the synthesis of glycopeptides hav-

C. シアリル-T_N-セリン誘導体とシアリルペプチドの合成

我々のシアリル化は、適量のシアリル糖鎖を与えることができるので、天然型に存在する *O* 型シアリルペプチドの合成を検討した。我々は、免疫応答が期待される腫瘍抗原、シアリル-T_N エピトープを有する MUC4 糖ペプチドを選んだ (27–29)。この *O* 型シアリルペプチドの合成については、合成したシアリル糖鎖 **25** を用いて、Fmoc-Ser(sialyl-T_N)-OH を合成することから検討した (Scheme 2) (**30**)。基質 **25** のエステル化とアセチル化後、Gal-2-N₃ **26** の 1 位のトリメチルシリル基を BF₃-Et₂O により脱保護した。そして **27** を Boc-N-Serine をグルコシル化するためイミダート体 **28** へと変換した。**28** と Boc-N-Serine の側鎖水酸基へのグリコシル化の後 (**31**)、脱保護、保護基の導入を経て、水酸基のみ遊離の Fmoc-Ser(sialyl-T_N)-OH **31** を得た。

シアリル-T_N-MUC4 糖ペプチドの固相合成は、既に遊離水酸基をもつ複合型糖鎖が糖ペプチドの合成に利用できたように (**32**)、ここでも水酸基遊離の Fmoc-Ser(sialyl-T_N)-OH **31** を用いる。この水酸基遊離の Fmoc-Ser(sialyl-T_N)-OH **31** は、水酸基の保護基として利用されるアセチル基の塩基処理による脱保護操作を必要としないことから、 β 脱離などの副反応をさけることができると考えた。また、我々は、エステル化したシアロシドは、固相合成の最終工程で行う 95% TFA 処理に耐性を示すことを事前に確認した。そこで、シアリル-T_N 糖ペプチドの合成を検討した (Scheme 3)。

Scheme 3. Solid phase synthesis of sialyl-T_N-MUC4 glycopeptide 32

ing the sialyl-T_N conjugate.

We used poly(ethyleneglycol)-poly(dimethylacrylamide) copolymer (PEGA) resin, which contains the acid-labile linker 4-(4-hydroxymethyl-3-methoxy-phenoxy)-butyric acid (HMPB). This method was used for the synthesis of several glycopeptides having complex type sialyloligosaccharides. The synthesis was pursued as in the previous reaction condition. The first residue, aspartic acid, was introduced by 1-(mesitylenesulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT) and *N*-methylimidazole. The second to eleventh residues were coupled by diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) and hydroxybenzotriazole (HOBt) in DMF. In terms of incorporation of **31**, a conventional condition using DIPCDI and HOBt was used. The following amino acid residues were incorporated by the same reagents, but 40 mM concentration of amino acids was essential to avoid esterification of the sugar-hydroxyl group on sialyl-T_N (**32**). After construction of the glycopeptide, the glycopeptide was released from the resin by treatment with TFA/H₂O (95:5) for 2 h. This condition afforded the desired sialylglycopeptide. Subsequent brief saponification of the methyl ester was performed by 200

この固相合成では, poly(ethyleneglycol)-poly(dimethylacrylamide) copolymer (PEGA) 樹脂に酸加水分解処理に敏感な 4-(4-hydroxymethyl-3-methoxy-phenoxy)-butyric acid (HMPB) リンカーを組み合わせて利用した。この方法で幾つかの複合型糖鎖をもつ糖ペプチドを合成しており, 本合成でもこの条件を用いた。最初のアミノ酸は MSNT を用いて導入し, そして 2 つ目以降のアミノ酸は, カルボジイミドである DIPCDI および HOBt を DMF 中で用いた。糖鎖アミノ酸 **31** の導入も, DIPCDI および HOBt 条件で行った。糖鎖がペプチドに導入されたあとは, 縮合する反応溶液中の各アミノ酸の濃度を, 40 mM になるよう維持し, 糖水酸基へのアミノ酸のエステル化を抑え合成した (**32**)。全てのアミノ酸の導入が終了後, 95% TFA を用いて糖ペプチドを固相から切り出した。そして, 200 mM NaOH もしくは 20 mM NaOH を用いた短時間でのシアリ酸の脱エステル化を行った。HPLC, 質量分析による解析の結果, 少量ながらセリンの側鎖から糖鎖が脱離した生成物を確認したが, 目的とするシアリル糖ペプチドは効率よく得られていた。最後に逆相 HPLC で目的物を生成し, シアリル-T_N-MUC4 ペプチド **32** を収率 61% で得た。

mM NaOH solution for 10 min at 0°C or 20 mM NaOH solution for 1.5 h. Extensive analysis of this reaction with HPLC and mass spectrometry, a tiny amount (5–7% yield) of eliminated product was observed, but this reaction afforded sialyl-T_N-glycopeptide in good yield. Finally, purification of the crude material by a reverse-phase HPLC column afforded pure sialyl-T_N-MUC4 peptide 32 (61% isolated yield). As shown here, we have found an interesting sialylation and efficient synthetic conditions for O-linked sialyl glycopeptides.

D. New concept for native chemical ligation

As mentioned in the introduction, the chemical synthesis of homogeneous glycoproteins is one of the currently available powerful approaches. In terms of this glycoprotein synthesis, native chemical ligation (NCL) is an efficient method in order to link peptide-segments through native amide bond (7). However, all target proteins don't have a cysteine residue at the suitable position for glycopeptide or glycoprotein syntheses. Because of this problem, convenient ligation methods instead of NCL reaction have been anticipated. In order to solve this problem, a reduction method changing from the sulfhydryl group of cysteine to the hydrogen atom after NCL and utilizing an auxiliary group have been developed (34). In particular, a reduction method has been used in order to convert cysteine into alanine, which is frequently found in almost all protein sequences. We have also explored suitable NCL approaches to the synthesis of glycoproteins, and we found a new ligation position at the serine site in the consensus sequence (asparagine-X-serine or -threonine: X is any amino acid except proline), where an asparagine residue is generally incorporated in N-linked oligosaccharide. Our concept is to convert the cysteine residue to a serine residue after conventional NCL, and this means that we can use NCL at the serine site in the protein sequence and at the consensus sequence. The synthetic strategy is shown in Fig. 4. The strategy employs three steps of conversion after NCL (Fig. 4 (a)); the S-methylation of cysteine by methyl 4-nitrobenzene sulfonate (Fig. 4 (b)) and intramolecular rearrangement by CNBr activation (Fig. 4 (c)) (34) followed by an O to N acyl shift (Fig. 4 (d)). Activation by CNBr toward the S-methyl group resulted in intramolecular rearrangement by the action of the neighboring carbonyl oxygen and generates an O-ester peptide intermediate. This intermediate can be converted into the desired peptide through O to N acyl shift under a slightly basic condition (pH 7–8).

In order to confirm proof of concept, we first investigated the reaction process and yield by the use of model tetrapeptides having a cysteine residue corresponding to

ここに示したように、アミド化されたシアル酸を用いる興味深いシアリル化反応を見出すとともに、O型シアリルペプチドの効率的な合成をおこなうことができた。

D. 新しい native chemical ligation 法

冒頭でも述べたように、単一構造の糖タンパク質の化学的合成は有用な方法の1つである。この糖タンパク質の合成については、native chemical ligation (NCL) が天然型のアミド結合でペプチドセグメントを連結できるので有用である(7)。しかし、全ての標的タンパク質がシステイン残基を糖ペプチド合成のための適切な位置にもっているわけではないので、NCL が常に使えるわけではない。この問題のために、NCL に代わるペプチド連結法の開発が期待されている。この問題を解決するために、NCL 後システインのスルフヒドリル基を還元する方法や補助基を使った NCL 法が展開されている(33)。特に、還元法は、システイン残基をタンパク質中しばしば見出されるアラニン残基に変換することができる。我々も、適切な新しい NCL 法の開発を検討し、N型糖鎖が付加するコンセンサス配列のセリン残基が新しい NCL の場所に利用できることを見出した。我々のコンセプトは、NCL 後、システイン残基をセリン残基に変換するもので、これは、コンセンサス配列のセリン部位が常に NCL に利用できることを意味する。合成計画を図4に示した。この方法では、NCL (図4 (a)) 後3工程を経てセリンへと変換する。図4では、システインをS-メチル化(b)し、CNBr 処理(c)により隣接するカルボニル基の反応を介する分子内転移により(34)、O-エステル誘導体を与える。そして、この中間体を弱塩基 (pH 7–8) で処理すると O–N 転移によりセリン残基へと変換される。

このコンセプトを証明するために、我々は、まず、システイン残基をもつモデルのテトラペプチドを用いて、反応機構、収率などを確認する実験をおこなった(表4)。

Fig. 4. Reaction mechanism of the conversion of cysteine to serine

Table 4. Conversion of cysteine to serine using model peptides

Entry	Cys peptide →Ser peptide	Cys-methylation	CNBr conversion	O to N acyl shift
1	<i>Ac</i> -ACGL (33) → <i>Ac</i> -ASGL (34)	quant. (>90%)	75% (62%)	quant. (70%)
2	VDKAVCGL (35) →VDKAVSGL (36)	97% (90%)	85% (63%)	90% (82%)
3	LFRVYCNFLRG (37) →LFRVYSNFLRG (38)	90% (81%)	51% (41%)	quant. (77%)
4	<i>Ac</i> -GCGM(O)A (39) → <i>Ac</i> -GSGMA (40)	quant. (80%)	82% (73%)**	

Yields show conversion yields as estimated by HPLC area intensity, with an isolated yield indicated in the parenthesis (*: one-pot reaction).

the product after NCL (Table 4).

As shown in Table 4, all peptides could be converted to products after the conversion of the cysteine residue to a serine residue. In addition, we confirmed whether L-amino acids in the product cause epimerization or not by comparison with authentic peptides. In the case of tetrapeptide (*Ac*-ACGL-OH: entry 1), we compared this peptide with authentic peptide containing D-amino acids such as *Ac*-^DASGL-OH, *Ac*-A^DSGL-OH, *Ac*-^DA^DSGL-OH and *Ac*-ASGL-OH, by HPLC and NMR analysis. These results proved that the product 34 was identical to *Ac*-ASGL-OH and the conversion method did not cause any epimerization in the peptide. The experiments using

表4に示したように、全てのペプチドの例において、システイン残基からセリン残基に変換することができた。また、我々は、この際、L-アミノ酸がエピメリゼーションを起こしていないか標準サンプルを別途合成し、そして比較し確認した。テトラペプチド (*Ac*-ACGL-OH) の場合、D-アミノ酸を含む、*Ac*-^DASGL-OH, *Ac*-A^DSGL-OH, *Ac*-^DA^DSGL-OH, *Ac*-ASGL-OH を合成し HPLC および NMR で比較した。その結果、生成物2のテトラペプチドは、標準サンプルの *Ac*-ASGL-OH に完全に一致し、反応過程でエピメリゼーションを起こしていないことが確認できた。また、オクタ、ウンデカペプチドでも効率よくこの変換反応をすることに成

Scheme 4. Conversion of cysteine to serine in a pentapeptide containing a methionine residue. Yields show the isolated yield. S-methylation was performed on **39**, which was synthesized by SPPS.

octa and undecapeptides (Table 4, No 2 and 3) also exhibited moderate yield.

One problem in using CNBr was the oxidation of methionine during this process. The reaction using CNBr also cleaves the methionine site. In order to avoid cleavage of the methionine site, we introduced methionine in the sulfoxide form. Because the sulfoxide form of methionine cannot be activated by CNBr reaction (34), we expected an oxidation/reduction protocol (36) would allow the use of this new approach for the synthesis of other peptides having methionine residues. We examined this strategy toward pentapeptide **39** having cysteine and sulfoxide of methionine. This model peptide was synthesized by the use of the sulfoxide of the methionine derivative during simple SPPS. After S-methylation, conversion of S-methyl cysteine to a serine residue and the subsequent reduction of sulfoxide by NH_4I , SMe_2 and TFA (36) was performed as a one-pot reaction. This protocol afforded the desired pentapeptide **40** in good yield (73% isolated yield, scheme 4).

Because we confirmed that this new method could be used for the conversion of a cysteine residue to a serine residue, we examined the synthesis of glycopeptides having complex type oligosaccharides by use of the new method. We selected a fragment of erythropoietin (79 to 98 residues; Scheme 5) as a model glycopeptide. We prepared substrate glycosyl hexapeptide thioester **42** having complex type N-linked asialooligosaccharides, and tetradecapeptide **43** having a cysteine residue, by a reported method (37).

The NCL reaction between the glycopeptide thioester **42** and tetradecapeptide **43** afforded the desired glycosyl icosapeptide **44**. Toward this glycopeptides having free sugar hydroxyl groups, we examined S-selective methylation (Fig. 5 (a)-(c)), followed by activation of the S-methyl cysteine residue by CNBr (Fig. 5 (d)-(g)). However, this product was observed in the form of broad peaks by RP-HPLC (Fig. 5 (e)). Because oligosaccharides on the peptide have many free hydroxyl groups, we concluded that this was random formylation of the sugar

功した。

問題としては、CNBr 処理をする際に起こる、メチオニン残基の酸化反応である。CNBr 反応は、メチオニン残基の部位でペプチド鎖を切断する反応を起こす。この切断反応を避けるために、我々は、スルホキシド型のメチオニンを利用することにした。このようにしておけば、CNBr では反応を起こさないで(35)、最後に、還元して通常のメチオニン残基に戻すことができる(36)。我々は、このスルホキシド型のメチオニン、システイン残基を有するペンタペプチド **39** を固相合成により調製し、その確認実験を行った。ペンタペプチド **39** のスルフヒドリル基をメチル化後、セリン残基へ変換した。そして TFA 存在下、 NH_4I , SMe_2 (36)でワンポットで還元したところ、効率よく目的物であるペンタペプチド **40** がよい収率で得られた (yield=73% 単離収率, scheme 4)。

以上のことから、新しいコンセプトが利用できることが確認できたので、複合型糖鎖をもつ糖ペプチドの合成を検討することにした(scheme 5)。モデルペプチドとして、エリスロポエチンの 79-98 残基を選び検討した。複合型アシアロ糖鎖をもつペプチドチオエステル **42** とテトラデカペプチド **43** は、既に報告した方法で合成した(37)。そして、これらの NCL 反応をおこなったところ、糖鎖化、イコサペプチド **44** を与えた。そして、遊離の糖水酸基をもつこの糖ペプチドに対して、S-メチル化(図 5(a)-(c)), CNBr 処理(図 5(d)-(g))を行った。しかし、この CNBr 処理においては、生成物が幅広い HPLC ピークを示した(図 5(e))。これは、糖水酸基が遊離であるため、蟻酸と CNBr 条件下で、それら水酸基に対する非特異的なホルミルエステル化が起こったからであると考えている。そこで、凍結乾燥後、5% ヒドラジン水溶液あるいは、pH10 程度の塩基性水溶液で 10 分間処理し、O-N 転移と脱ホルミルエステル化をおこなった。図 5(f)に示したように、目的とするセリンを持った糖ペプチド **46** を得ることができた。得られた糖ペプチドの構造と純度は、別途固相合成に

Scheme 5. Synthesis of *N*-linked glycosyl icosapeptide through the new ligation method at the serine site. a) 6 M Guanidine hydrochloride, 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 7.1 containing thiophenol (0.5% v/v), benzylmercaptane (0.5% v/v), 70% isolated yield; b) 6 M Guanidine hydrochloride, 0.25 M Tris·HCl, 3.3 mM EDTA·2Na buffer at pH 8.6, CH₃CN, methyl 4-nitrobenzenesulfonate, 85% conversion yield estimated by HPLC area intensity (67% isolated yield); c) i) CNBr, 80% HCOOH ii) 5% hydrazine hydrate solution, 80% conversion yield estimated by HPLC area intensity (70% isolated yield).

Fig. 5. HPLC profiles for the conversion of cysteine to serine residue in the *N*-linked glycosyl icosapeptide 46. *S*-Methylation reaction: (a) start (1 min > t); (b) 20 min; and (c) after purification. Conversion reaction of *S*-methyl cysteine to a serine residue: (d) start (1 min > t); (e) 38 h; (f) after hydrazine treatment; and (g) after purification. Elution Condition; Intakt column C-18, 3 μ m, 75 mm $\times$ 4.6 mm linear gradient of 18 $\rightarrow$ 45% containing 0.09% TFA in 0.1% TFA aqueous over 15 min at a flow rate of 1.0 ml/min.

Fig. 6. Conversion of cysteine to serine for the synthesis of MUC1 repeat segment.

a) 6 M Guanidine hydrochloride, 0.1 M sodium phosphate, 60 mM 4-mercaptophenyl acetic acid, 20 mM tris(2-carboxylethyl)phosphine buffer at pH 7.2; b) Methyl 4-nitrobenzenesulfonate, 6 M Guanidine hydrochloride, 0.25 M Tris·HCl 3.3 mM EDTA·2Na buffer at pH 8.6, CH₃CN, c) i) CNBr, 80% HCOOH ii) TFA, NH₄I, Me₂S iii) 5% hydrazine hydrate solution.

hydroxyl groups under the formic acid and CNBr conditions. After lyophilization, the residue was dissolved in 5% hydrazine hydrate solution (or a slightly basic solution: < pH 10) for 10 min (Fig. 5 (f)) in order for this peptide to afford the *O* to *N* shift and to remove the formyl group from the sugar hydroxyl groups. As shown in Fig. 5 (f), this treatment successfully afforded the target glycosyl icosapeptide **46** having the serine residue. The structure and purity of this glycopeptide was confirmed by comparison with the authentic sample synthesized by solid phase peptide synthesis.

In addition, we also examined the synthesis of *O*-linked glycopeptide, the MUC1 repeat segment with the variable number tandem repeat region (38) by use of the new ligation concept. This MUC1 segment has proline, threonine and serine residues. After preparation of two *O*-linked glycosyl icosapeptides having mono *N*-acetyl galactosamine segments, we examined the new ligation strategy and this reaction afforded the desired glycosyl tetracontapeptide **49** having the cysteine residue (Fig. 6).

Then cysteine residue at the ligation position in glycopeptide **49** was converted into a serine residue through the same NCL approach. This conversion afforded the desired glycopeptide **51** in moderate yield (overall

より調製しておいた標準サンプルと比較し、この反応が目的どおりに進行したことを確認した。

更に、我々は、MUC1の繰り返し構造をもつO型糖鎖ペプチドの合成にも、この新しいNCL法を応用した。このMUC1は、プロリン、トレオニン、セリンを豊富にもつペプチドである(38)。図6に示したように、*N*-アセチルガラクトサミンをもつ2つのO型糖ペプチドを合成後、新しいNCL法を適応して連結を試みた。このNCLでは、連結された糖ペプチド**49**が効率よく得ることができ、続くセリンへの変換反応により、目的とする糖ペプチド**51**が良好な収率で得られた(HPLCによる全変換収率43%、16%の単離収率)。得られた生成物の構造は、アクチナーゼEというペプチダーゼを用いて連結部位を含む小型ペプチド(SAPDTRPAPGST(GalNAc)APPAHG)に変換後、別途合成した同じ構造の標準糖ペプチ

43% conversion yield estimated by HPLC area intensity, 16% isolated yield,).

In order to confirm the structure of the final glycopeptide, we examined peptide digestion of compound **51** by Actinase E (*Streptomyces griseus*, Kaken pharma, Tokyo) and this non-specific digestion afforded a glycosyl octadeca-peptide with a ligation site (SAPDTRPAPGST (GalNAc)APPAHG). We compared this peptide fragment and with the authentic glycosyl octadeca-peptide synthesized by SPPS and we confirmed that both glycosyl octadeca-peptide fragments were identical. As shown here, a new ligation method has been found which can be used for the synthesis of both *O*-linked and *N*-linked glycopeptides.

E. Conclusion

We have found an interesting sialylation reaction using Neu5Ac-1-amide derivatives, and these reactions exhibited good α -selectivity and yield. Simple modification by an amide group at the C(1) position of sialic acid instead of the ester group forms an interesting intermediate to afford α -selectivity. This method was also developed for the synthesis of glycopeptides having a sialyl-T_N epitope and its *O*-linked type sialylglycopeptide, the MUC4 fragment having sialyl-T_N. In order to couple these *O*-linked glycopeptide and *N*-linked glycopeptides, we also identified a new ligation strategy using a conversion strategy of a cysteine to serine residue. This method was successfully used for the synthesis of both *N*-linked and *O*-linked glycopeptides. Research is currently in progress to utilize this approach for the synthesis of a number of *O*-linked and *N*-linked glycoproteins.

References

1. Wong, C. H. (2005) *J. Org. Chem.* **70**, 4219–4225
2. Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J. (1999) *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor, New York
3. Marcaurelle, L. A., Mizoue, L. S., Wilken, J., Oldham, L., Kent, S. B. H., Handel, T. M., and Bertozzi, C. R. (2001) *Chem. Eur. J.* **7**, 1129–1132
4. Hojo, H., Matsumoto, Y., Nakahara, Y., Ito, E., Suzuki, Y., Suzuki, M., Suzuki, A., and Nakahara, Y. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13720–13725
5. Yamamoto, N., Tanabe, Y., Okamoto, R., Dawson, P. E., and Kajihara, Y. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 501–510
6. Aimoto, S. (2001) *Curr. Org. Chem.* **5**, 45–87
7. Dawson, P. E., Muir, T. W., Lewis, I. C., and Kent, S. B. H. (1994) *Science* **266**, 776–779
8. Danishefsky, S. J., and Allen, J. R. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 836–863
9. Okamoto, R., Souma, S., and Kajihara, Y. (2008) *J. Org. Chem.* **73**, 3460–3466
10. Okamoto, R., and Kajihara, Y. (2008) *Angew. Chem. Int. Ed.* **4**, 5402–5406
11. Boons, G. J., and Demchenko, A. V. (2000) *Chem. Rev.* **100**, 4539–4565
12. Cai, S., and Yu, B. (2003) *Org. Lett.* **5**, 3827–3830
13. DeMeo, C., and Parker, O. (2005) *Tetrahedron Asymmetry* **16**, 303–307
14. Ishiwata, A., and Ito, Y. (2003) *Synlett.* **9**, 1339–1343
15. Lin, C. C., Huang, K. T., and Lin, C. C. (2005) *Org. Lett.* **7**, 4169–4172
16. Tanaka, H., Adachi, M., and Takahashi, T. (2005) *Chem. Eur. J.* **11**, 849–862
17. Ando, H., Koike, Y., Ishida, H., and Kiso, M. (2003) *Tetrahedron Lett.* **44**, 6883–6886
18. Ando, H., Koike, Y., Koizumi, S., Ishida, H., and Kiso, M. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 6759–6763
19. Tanaka, K., Goi, T., and Fukase, K. (2005) *Synlett.* **19**, 2958–2962

ドと比較して、双方が一致することを確認し、本手法が正しく利用できることを確認した。以上示したように、我々は、新しい NCL コンセプトを見出し、N 型および O 型糖ペプチドの合成に利用できることを示した。

E. おわりに

我々は、アミド化された新しいシアル酸供与体を用いる α 選択的な興味深いシアリル化反応を見出した。これは、シアル酸の 1 位に簡単な化学修飾をすることで α 選択性を与える興味深い反応中間体を与えたようである。この方法を用いることで Sialyl-T_N 抗原をもつ O 型糖ペプチドである MUC4 フラグメントの合成に展開することができた。そして、O 型、N 型糖ペプチドを連結していくために、我々は、システイン残基をセリン残基に変換する手法を組み込んだ新しい NCL の方法を見だし、効率よくそれら糖ペプチドを与えることを確認した。研究はさらに発展途上にあり、今後 O 型および N 型糖鎖をもつタンパク質の合成を展開していく予定である。

20. Tanaka, H., Nishiura, Y., and Takahashi, T. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7124–7125
21. Farris, M., and DeMeo, C. (2007) *Tetrahedron Lett.* **48**, 1255–1227
22. Crich, D., and Li, W. (2007) *J. Org. Chem.* **72**, 2387–2391
23. a) Danishefsky, S. J., DeNinno, M. P., and Cheng, S. H. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3929–3940; b) Ye, X. S., Huang, X., and Wong, C. H. (2001) *Chem. Commun.* 974–975
24. Kuhn, R., Lutz P., and Macdonald, D. (1966) *Chem. Ber.* **99**, 611
25. Myers, R. W., Lee, Y. C., Thomas, G. H., Reynolds, L. W., and Uchida, Y. (1980) *Anal. Biochem.* **101**, 166–174
26. Roy, R., and Pon, R. A. (1990) *Glycoconjugate J.* **7**, 3–12
27. Dziadek, S., Brocke, C., and Kunz, H. (2004) *Chem. Eur. J.* **10**, 4150–4162
28. Dekker, J., Rossen, J. W. A., Buller, H. A., and Einerhand, A. W. C. (2002) *Trends. Biochem. Sci.* **27**, 126–131
29. Singh, A. P., Chaturvedi, P., and Batra, S. K. (2007) *Cancer Res.* **67**, 433–436
30. Nakahara, Y. (2007) *Biopolymers* **88**, 308–324
31. Chen, X. T., Sames, D., and Danishefsky, S. J. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7760–7769
32. Yamamoto, N., Takayanagi, A., Yoshino, A., Sakakibara, T., and Kajihara, Y. (2007) *Chem. Eur. J.* **13**, 613–625
33. Christian, H., and Oliver, S. (2008) *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 1553–1556
34. Gross, E., and Morell, J. L. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**, 1145–1150
35. Kaiser, R., and Metzka, L. (1999) *Anal. Biochem.* **266**, 1–8
36. Hackenberger, C. P. R. (2006) *Org. Biomol. Chem.* **4**, 2291–2295
37. Kajihara, Y., Yoshihara, A., Hirano, K., and Yamamoto, N. (2006) *Carbohydr. Res.* **341**, 1333–1340
38. Hanisch, F. G., and Muller, S. (2000) *Glycobiology* **10**, 439–440

Profile of the Authors

Ryo Okamoto received his B. Sc (2004) from faculty of Science, Yokohama City University and also received M. Sc (2006) from international graduate school of arts and sciences, Yokohama City University. He is now graduate student of doctor course in the international graduate school of arts and sciences, Yokohama City University.

Yasuhiro Kajihara received B. Sc (1988) from Faculty of Engineering, Kanagawa University and Ph.D. (1993) from Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology. After spending two years at Japan Tobacco Inc. as postdoctoral research fellow. He was appointed assistant professor at Faculty of Science, Yokohama City University in 1995 and promoted as Associate Professor in 2001. In 2007, he promoted as professor of the international graduate school of arts and sciences, Yokohama City University.