ペプチドライゲーション法による糖タンパク質の化学酵素合成

朝比奈 雄也

大阪大学蛋白質研究所

FAX: +81-6-6879-8603, E-mail: asahina@protein.osaka-u.ac.jp

(受付日: 2015年1月8日, 受理日: 2015年2月5日)

キーワード: 糖ペプチド, 糖タンパク質, チオエステル法, 化学酵素法, Endo-M

要 約

グライコシンターゼ (Endo-M 変異体) を用いた化学酵素法は、均一な糖タンパク質サンプルを円滑に得ることのできる強力な手法の1つである。この戦略では、糖鎖転移基質となる *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 付きタンパク質の効率的な調製が鍵となる。そこで我々は、鍵化合物の効率的合成を行うべく、One-Pot ペプチドライゲーション法と簡便な GlcNAc 付きペプチドセグメント調製法を開発した。これら手法によって効率的に GlcNAc 付きタンパク質を調製し、最後に、グライコシンターゼを用いた糖鎖転移反応で目的とする均一な *N*-結合型複合型糖鎖を有する Tim-3 Ig ドメインと emmprin の合成に成功した。

A. はじめに

糖タンパク質糖鎖は細胞の増殖、分化、がん化など、多くの重要な生命現象と関わっていることが知られており、精力的な研究が行われてきた。しかし、糖タンパク質のミクロ不均一性により、天然から均一な糖鎖構造を有するサンプルを単離し、系統的な機能解析を行うことは困難とされる。そこで我々は、化学合成を基礎としたタンパク質合成法を確立し、単一な糖鎖構造を有する糖タンパク質の供給を目指して研究を行っている。その合成法の1つとして、稲津、山本らが報告した endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) (1) の糖鎖転移活性を利用した、化学酵素法がある (2)。この当初の報告では、競合する糖加水分解反応による収率の低下が問題であった。しかし、さらなる検討によって、糖供与体にオキサゾリンを用いる方法 (3)、Endo-M 変異体 (グライコシンターゼ) (4) が見出され、現在では高収率で目的の糖鎖転移体を得ることが実現されている。化学酵素法は、1つの GlcNAc 付きタンパク質を調製さえすれば、糖鎖転移反応によって望むグライコフォームを持った糖タンパク質を種々合成することが可能であり、多様な糖鎖構造を持つ天然の糖タンパク質に対応した合成法であると考えられる (5)。現在、

優れた糖供与体の供給法 (6) やこのオキサゾリン化法 (7) が開発され、加えて、グライコシンターゼの市販化により酵素の入手が容易になった。その一方、糖鎖受容体の化学合成にはいくつかの問題点が存在する。すなわち、化学酵素法によって効率よく糖タンパク質を調製するためには、その糖鎖転移基質となる GlcNAc 付きタンパク質をいかに合成するかが鍵となる (Fig. 1)。この GlcNAc 付きタンパク質の合成を行うにあたって、大きく分けて2つの重要な工程がある。それは、ペプチドセグメント同士を縮合し、ポリペプチド鎖へと導くライゲーション工程と、この原料となる GlcNAc 付きペプチドセグメントの調製工程である。前者の工程にて複数回の縮合を行う際には、中間体の精製が必須であり、これに伴って収率の低下が生じていた。また、後者の工程では、2工程の最終脱保護処理が求められており、煩雑性が高かった。そこで本研究では、これら両工程が抱える問題を新規法により解決し、化学酵素法の鍵化合物である GlcNAc 付きタンパク質の効率的合成法を開発することにした。

B. Ag^+ -promoted, Ag^+ -free チオエステル法

ペプチド固相合成 (SPPS) 法は、迅速かつ簡便にペプ

Fig. 1. 化学酵素法を用いた糖タンパク質合成。

チドを調製することが可能であり、糖ペプチド合成においても広く用いられている。しかし、長鎖のポリペプチドの調製となると、伸長効率の低下に由来した副生成物との分離が困難となる。よって、50残基を超える糖タンパク質の合成にはペプチドライゲーション法が用いられる。そのライゲーション法の一種のチオエステル法(8a)をFig. 2に示す。まず、アルキルチオエステルを有するN末端セグメントを固相法により調製する。次に、チオエステルを Ag^+ により活性化し、末端に遊離のアミノ基を持つC末端ペプチドセグメントと縮合することで、目的のポリペプチドが得られる。この際、セグメントの側鎖アミノ基とチオール基を保護する必要があるものの、原理上、どのアミノ酸残基間でも縮合することができる。この利点は縮合部位の制限が大きくかかるネイティブケミカルライゲーション法(9)など、他のライゲーション法に比べ、柔軟な合成設計が可能であると言える。加えて、従来用いられてきたアルキルチオエステルを脱離能の高い芳香族チオエステルに変更することで、銀イオンによる活性化を要しない Ag^+ -freeチオエステル法が開発されている(8b)。これら方法を用いて3つのセグメントを縮合する際には、C末端セグメントからN末端セグメント方向へ順次縮合を行うことで、目的のポリペプチド鎖を得ていた。しかし、縮合後の脱Fmoc処理に用いられた過剰のピペリジンを除くため、得られた中間セグメントを精製しなければならず、その結果、各セグメント縮合は段階的に行われていた。ポリペ

プチド合成において収率を低下させる主な原因は精製工程にある。特に、疎水性の高いペプチドである場合、クロマトグラフィー中に不可逆な吸着が生じ、回収率の大幅な低下が見込まれる。セグメント精製工程を1つでも回避することができれば、収率と効率ともに向上したポリペプチド鎖の調製が可能になる。そこで、アルキルチオエステルと芳香族チオエステルの反応性の違いを利用した、One-Pot連続的チオエステル法を開発することにした。

C. One-pot連続的チオエステル法によるTim-3 Igドメインの合成

糖タンパク質Tim-3はTh-1細胞表層上に存在し、その細胞外IgドメインにN-結合型糖鎖が付加されている。この糖鎖が動物レクチンのガレクチン-9により認識され、アポトーシスシグナルの誘導がなされると示唆されている(10)。このIgドメインを前項で述べた連続的チオエステル法により全長のポリペプチド鎖を得ることにした。Tim-3 Igドメインの合成経路をFig. 3に示す。全長107残基を3つのセグメントに分け、それぞれを固相合成にて調製した。この際、セグメント1は芳香族チオエステル、また、セグメント2はアルキルチオエステルとして調製した。一方、C末端セグメント3は極めて難溶性であったため、Thr⁷⁸に相馬らが開発したイソペプチド構造(11)を導入し、可溶化を図った。各セグメントの調製後、One-pot連続縮合を検討した。まず、セグメン

Fig. 2. Ag^+ -promoted、および Ag^+ -freeチオエステル法によるC末端からN末端への段階的ペプチドセグメント縮合。

Fig. 3. ワンポットチオエステル法による糖タンパク質Tim-3 Igドメインの合成。

Fig. 4. *N*-アセチルグルコサミン付きペプチドの調製法 (左)。TFA感受性保護基を持つGlcNAc-Asn誘導体9の合成ルート (右)。Reaction conditions: (a) MPM-Cl, NaH, TBAI, THF, 0°C and then reflux, 1 h, 71%; (b) (1) $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, *n*-BuOH, 90°C, 3 h, (2) Ac_2O , CH_2Cl_2 , r.t., 30 min, 88% in 2 steps; (c) HOObt , *n*-Bu₃P, H_2O , THF, r.t., 3 h, 6: 82%, 9: 78%; (d) Zn, AcOH, HFIP, r.t. 1 d; (e) (1) $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, *n*-BuOH, 90°C, 3 h; (2) 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde, NaBH_3CN , AcOH, MeOH, r.t., 15 min; (3) Ac_2O , pyridine, DMAP, r.t., 1 h, 65% in 3 steps; (f) Zn, AcOH, CH_2Cl_2 , r.t., 2 h, 85%.

ト1と2の縮合を Ag^+ -free条件下で行った。その結果、芳香族チオエステルのみが選択的に活性化され、望むアルキルチオエステルが保持された中間体セグメント4を得ることができた。次に、セグメント3と共に AgCl を加えることで第二縮合を行った。この Ag^+ -promoted条件は中間体アルキルチオエステル4を活性化し、続く縮合を副反応なく進行させた。その結果、目的とするIgドメインの全長配列5を、一度の縮合効率と遜色ない収率で得ることに成功した。得られたポリペプチド鎖5の脱保護を行った後、酸化還元系緩衝液中でイソペプチド構造を天然のアミド構造に変換すると同時にジスルフィド形成を行い、GlcNAc付きタンパク質6を効率よく調製することに成功した。一方、糖供与体は以前の研究(6b)より合成して得られた8糖ヘミアセタールをDMC法(7a)により、糖オキサゾリンへ誘導することで得た。最後に、グライコシターゼにより合成オキサゾリンを糖鎖転移し、目的の均一な9糖構造を有するTim-3 Igドメイン7の合成に成功した(12)。得られた糖タンパク質は円二色性スペクトルによる2次構造解析からIgドメイン特有の β -シート構造を持つこと、また、酵素消化により天然と同様のジスルフィド架橋を形成していることが証明された。得られたIgドメインはガレクチン-9との相互作用解析とX線結晶構造解析に用いる予定である。

D. TFA感受性保護基を有するGlcNAc-Asn誘導体の開発

前項ではOne-pot縮合法を開発しGlcNAc付きタンパク質を効率的に得る方法を確立した。そこで次は、鍵化合物の原料であるGlcNAc付きペプチドセグメントの効率的調製法を検討することにした。我々は、高い堅牢性を持ち、なおかつ、ペプチドやチオエステルに損傷を与えることなく除去できるベンジル (Bn) 基により保護された糖アミノ酸誘導体8を糖ペプチド合成に用いてきた(6b, 13)。しかし、Bn基の堅牢性により、固相法後の最終脱保護では2度の処理を行

う必要があった (Fig. 4、左図)。それは、1) TFAカクテルによるペプチド保護基の脱保護、2) Low-TfOH試薬(14)による糖水酸基Bn基の除去である。この煩雑性の高い2度の脱保護処理を回避すべく、我々はTFA感受性保護基を有する糖アミノ酸誘導体9を設計し、糖タンパク質emmprin1st Igドメイン (22–104) の合成に応用することにした。目的のGlcNAc-Asn 9の合成経路をFig. 4 (右図) に示す。まず、アジド糖10の3位水酸基を

-methoxybenzyl

化し、化合物11を得た。次に、2位フタルイミド基を脱保護し、生じたアミノ基をアセチル化することでアセトアミド12を得た。得られたアジド糖12とFmoc-Asp (OPfp)-OPac 13を含水THF中で HOObt 共存下、*n*-Bu₃Pを用いた改変Staudinger反応(15)により還元、続く縮合を行ったところ、収率83%で目的とするGlcNAc-Asn誘導体14を得ることに成功した。しかし、14の溶解性が極めて乏しく、続くカルボキシル基の脱保護を行うことは困難であった。この難溶性は1,2位のアミド基が分子間水素結合による凝集によって引き起こされていることが推測された。そこで、比較的導入が容易な2位アミド基の窒素に2,4,6-trimethoxybenzyl (TMB) 基を導入することで、水素結合を阻害し、溶解性を向上させることにした。化合物11から3工程でTMB化グルコサミン誘導体16を調製し、先と同様のカップリング条件でアミノ酸13と縮合した。得られたGlcNAc-Asn誘導体17の溶解性は14と比べて劇的に改善された。そこで、フェナシル基の脱保護を CH_2Cl_2 -AcOH中でのZn還元を行うことで、目的のTFA感受性保護基を有する9の合成に成功した。

E. 新規GlcNAc-Asn誘導体9を用いたEmmprin (22–104) の合成

次に糖タンパク質emmprin (22–104) の合成に応用することにした。Emmprinはガンの転移、浸潤に関連することが示唆されている糖タンパク質で、Asn⁴⁴にN-結合型糖鎖が

Fig. 5. Emmpirin第一Igドメインの合成ルート。Asn⁴⁴が糖鎖付加部位である。

Fig. 6. 新規GlcNAc-Asn 9を用いた糖ペプチドセグメント19の合成。

Fig. 7. 糖鎖転移反応による糖タンパク質22, 23の合成とそのHPLCによる解析。(a) 反応開始直後。(b) アシアロタイプオキサゾリンとの糖鎖転移反応。(c) ジシアロタイプオキサゾリンとの糖鎖転移反応。

付加している(16)。Emmpirinの合成経路をFig. 5に示す。全長83残基のポリペプチド鎖を3つのセグメント18, 19, 20に分け、それぞれを固相法により調製することにした。これら3セグメントは先に開発した連続的のチオエステル法によるOne-Pot縮合で全長のポリペプチドへと導くことにした。次に、ペプチド側鎖保護基の脱保護、フォールディングを行い、

最後にグライコシターゼを用いた糖鎖転移反応により、目的のジシアロ、アシアロ型糖鎖を有するemmpirin 22および23の合成を行うことにした。GlcNAc付きペプチドチオエステル19の合成経路をFig. 6に示す。まず、チオエステル化素子であるN-alkylcysteine (NAC) (17) が導入された樹脂からペプチド鎖の伸長を行い、Asn⁴⁴には先に合成したGlcNAc-

Asn **9**をHOBt-DIC法によって手動で導入した。ペプチド伸長終了後、常法と同じTFAカクテルにて2時間、室温で処理した。その結果、一度の処理でペプチド保護基と同時に糖水酸基保護基も除去された目的のペプチド**19a**が得られた。続いて、3-メルカプトプロピオン酸とチオエステル交換反応を行うことにより、目的のGlcNAc付きペプチドチオエステル**19**を効率よく得ることに成功した。次に得られたセグメント**18**, **19**, **20**を連続的チオエステル法によりOne-Pot縮合(12)でポリペプチド鎖へと導くことにした (Fig. 5)。まず、芳香族チオエステル**18**とアルキルチオエステル**19**をAg⁺-freeチオエステル法により縮合し、続けてセグメント**20**とAgClを添加し、第二の縮合を行うことで、目的とするemmprinのポリペプチド鎖が効率よく得られた。次に、ペプチド鎖側鎖の脱保護とフォールディングを行い、GlcNAc付きemmprin**21**の調製に成功した。最後に、CDCMI(7b)により誘導したアジアロ型8糖、ジシアロ型10糖オキサゾリンを糖鎖転移することで、目的の均一な9糖、および11糖を有するemmprin**22**, **23**の合成を完遂した (Fig. 7)(18)。得られたemmprinは結晶解析による糖鎖を含めた立体構造の解析、また、MMP活性の検討に用いる予定である。

F. おわりに

本研究では、化学酵素法を用いた糖タンパク質合成における鍵化合物であるGlcNAc付きタンパク質の効率的合成法を開発した。連続的チオエステル法によるOne-pot縮合が実現した結果、セグメント縮合効率は大幅に上昇し、各糖タンパク質を数mgスケールで調製することが可能になった。また、TFA受性保護基を有するGlcNAc-Asn誘導体の開発により、以前より迅速、かつ容易にGlcNAc付きペプチドセグメントを調製することが実現された。今後はこれら方法によって種々の糖タンパク質の合成を行い、糖鎖機能の解明を目指した検討を行っていきたい。最後に謝辞として、本研究を通じてご指導、ご鞭撻だけでなく、研究者思想を育ててくださった大阪大学蛋白質研究所、北條裕信教授に深く御礼申し上げます。また、糖鎖化学を通じて、科学思想を与えてくださった元東海大学工学部生命化学科、中原義昭教授に感謝いたします。さらに、鈴木明身所長をはじめとする東海大学糖鎖科学研究所の先生達には、研究を進めるにあたって多大な激励とご援助を頂きましたことを心より感謝いたします。

参考文献

1. Yamamoto, K. (2001) *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 493–501.
2. Mizuno, M., Haneda, K., Iguchi, R., Muramoto, I., Kawakami, T., Aimoto, S., Yamamoto, K., and Inazu, T. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 284–290.
3. Li, B., Zeng, Y., Hauser, S., Song, H., and Wang, L. X. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9692–9693.
4. Umekawa, M., Huang, W., Li, B., Fujita, K., Ashida, H., Wang, L. X., and Yamamoto, K. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 4469–4479.
5. Wang, L. X., and Amin, M. N. (2014) *Chem. Biol.* **21**, 21–66.
6. a) Inazu, T., Mizuno, M., Yamazaki, T., and Haneda, K. (1999) in *Peptide Science 1998* (Kondo, M. ed.), pp. 153–156, Protein Research Foundation, Osaka. b) Hojo, H., Tanaka, H., Hagiwara, M., Asahina, Y., Ueki, A., Katayama, H., Nakahara, Y., Yoneshige, A., Matsuda, J., Ito, Y., and Nakahara, Y. (2012) *J. Org. Chem.* **77**, 9437–9446.
7. a) Tanaka, T., Nagai, H., Noguchi, M., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2009) *Chem. Commun. (Camb.)*, 3378–3379. b) Noguchi, M., Fujieda, T., Huang, C. H., Ishihara, M., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2012) *Helv. Chim. Acta* **95**, 1928–1936.
8. a) Hojo, H., and Aimoto, S. (1991) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **64**, 111–117. b) Hojo, H., Murasawa, Y., Katayama, H., Ohira, T., Nakahara, Y., and Nakahara, Y. (2008) *Org. Biomol. Chem.* **8**, 1966–1972.
9. Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., and Kent, S. B. H. (1994) *Science* **266**, 776–779.
10. Cao, E., Zang, X., Ramagopal, U. A., Mukhopadhyaya, A., Fedorov, A., Fedorov, E., Zenchek, W. D., Lary, J. W., Cole, J. L., Deng, H., Xiao, H., DiLorenzo, T. P., Allison, J. P., Nathenson, S. G., and Almo, S. C. (2007) *Immunity* **26**, 311–321.
11. Sohma, Y., Sasaki, M., Hayashi, Y., Kimura, T., and Kiso, Y. (2004) *Chem. Commun. (Camb.)*, 124–125.
12. Asahina, Y., Kamitori, S., Takao, T., Nishi, N., and Hojo, H. (2013) *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 9733–9737.
13. a) Nakahara, Y. (2003) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **15**, 257–273. b) Hojo, H., and Nakahara, Y. (2007) *Biopolymers Peptide Science* **88**, 308–324.
14. Tam, J. P., Heath, W. F., and Merrifield, R. B. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5242–5251.
15. Hagiwara, M., Dohi, M., Nakahara, Y., Komatsu, K., Asahina, Y., Ueki, A., Hojo, H., Nakahara, Y., and Ito, Y. (2011) *J. Org. Chem.* **76**, 5229–5239.
16. Nabeshima, K., Iwasaki, H., Koga, K., Hojo, H., Suzumiya, J., and Kikuchi, M. (2006) *Pathol. Int.* **56**, 359–367.
17. Hojo, H., Onuma, Y., Akimoto, Y., Nakahara, Y., and Nakahara, Y. (2007) *Tetrahedron Lett.* **48**, 25–28.
18. Asahina, Y., Kanda, M., Suzuki, A., Katayama, H., Nakahara, Y., and Hojo, H. (2013) *Org. Biomol. Chem.* **11**, 7199–7207.

著者情報

朝比奈雄也：〈来歴〉2009年東海大学生命化学科卒業／2011年同大学大学院工業化学専攻修了／2014年同大学大学院総合理工学専攻博士課程修了（博士（理学）取得）／同年より大阪大学蛋白質研究所助教、現在に至る。〈研究テーマ〉糖鎖、糖ペプチド、糖タンパク質の合成研究。