ヒト複合型糖鎖ライブラリーの 半化学合成と糖ペプチドおよび 糖タンパク質の化学合成

岡本 亮
梶原 康宏*

*Semisynthesis of Human Complex Type Oligosaccharide Library and
Chemical Synthesis of Glycopeptides and Glycoprotein*

Ryo Okamoto and Yasuhiro Kajihara*

This paper describes for the semisynthesis of diverse asparagine-linked oligosaccharides (Asn-oligosaccharides) from asparagine-linked biantennary complex-type-disialylundecasaccharide obtained from egg yolk. This semisynthesis employs chemical modification and branch specific *exo*-glycosidase digestion (β -D-galactosidase, *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase and α -D-mannosidase). Efficient semisynthesis has enabled us to prepare appropriate amount of asparagine linked oligosaccharide and to examine solid phase synthesis for several glycopeptides having homogeneous and intact oligosaccharides. This solid phase glycopeptides synthesis has also been examined to develop for the preparation of glycoprotein. The synthetic target was to be glycoprotein, monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3). This glycoprotein has a complex type disialylundecasaccharide and two disulfide bond. This chemical synthesis employed solid phase synthesis, native chemical ligation and protein folding protocol to obtain desired homogeneous glycoprotein. The disulfide map, CD measurement and enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) supported that glycoprotein exhibited that the desired three dimensional structure.

Key words: oligosaccharide, sialic acid, glycopeptides, glycoprotein, solid phase glycopeptides synthesis

はじめに

タンパク質は、メッセンジャー RNA のコドンにそって翻訳され、ポリペプチド鎖を構築すると特定の3次元構造を形成する。タンパク質は、翻訳中、あるいは翻訳後に様々な修飾を受ける。この修飾は、タンパク質の機能発現に必要不可欠なもので、いくつかの様式に分類することができる。シグナル伝達のためのリン酸化、タンパク質分解のためのユビキチン化、細胞膜内側へのタンパク質の固定化のための脂質化、そして細胞同士の接着、認識あるいはタンパク質輸送のためのグリコシル化である¹⁾。これらの修飾によってタンパク質の物理化学的な性質が調整される²⁾。これら修飾のなかで、頻度の高いものがグリコシル化で、一般にヒト体内のタンパク質の50%近くがグリコシル化されており、これらを糖タンパク質という³⁾。このグリコシル化では、多様な糖鎖構造の付加が起こるために、どのような糖鎖構造がタンパク質の機能発現に必須なのか明らかにすることが困難である。タンパク質に付加する糖鎖は、2つのグルー

ブにわけることができる。タンパク質主鎖のアスパラギン残基の側鎖の窒素原子に結合したN-型糖鎖とセリン/トレオニンの側鎖のアルコールに結合したO-型糖鎖である。このO-型糖鎖は、さらに8つのグループに分類され、N-型糖鎖は、複合型、ハイブリッド型、高マンノース型の3つに分類される⁴⁾。N-型糖鎖は、特に多様な構造を形成し、複合型においては、2-4分岐構造が頻度よく見出される。

また、これら分岐構造の末端の糖残基の種類も不均一で糖鎖構造をより多様化している。糖鎖生物学では、これら糖鎖の機能や多様性の意味を理解するための研究が多数展開されてきた。タンパク質は、小胞体内で合成される際、NX(S/T)という配列(Xは、プロリン以外のアミノ酸)のアスパラギン残基に高マンノース型糖鎖が付加する。そしてcalnexin/calreticulinというシャペロンが、高マンノース糖鎖と相互作用しながら、タンパク質の折りたたみプロセスを監視している⁵⁾。そして正しい、3次元構造を形成したタンパク質は、ゴルジ装置へと輸送されるとともに、高マンノース糖鎖は、複合型糖鎖へと改変される。折りたたみプロセスに失敗した不良品と思われる糖タンパク質は、小胞体から細胞質へと放出され、プロテアソームで分解される。このプロセスにより、ミスフォールディングした糖タンパク質の細胞内

* 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科
(236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2)

* Yokohama City University (22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0027, Japan)

Fig. 1 Structure of N-linked oligosaccharides.

での蓄積を避けている。複合型糖鎖については、興味深い報告がされている⁶⁾。タンパク質が数本 N-型糖鎖をもつ場合、ある位置の糖鎖は、均一な糖鎖構造を示すが、別の位置に結合した糖鎖は、不均一な構造をしている。また、タンパク質製剤に利用されているサイトカインなどでは、ある位置の糖鎖が欠如すると、そのサイトカインは細胞から分泌されなくなる⁷⁾。これは、糖タンパク質の糖鎖が細胞内輸送の荷札として機能していることを想像させる。一方、貧血治療薬である糖タンパク質エリスロポエチン(EPO)は、N-型糖鎖を3本とO-型糖鎖を1本持っている。このEPOは、糖鎖を除去した場合、*in vitro*では、活性を示すが、*in vivo*では、速やかに代謝され活性を示さないことが知られている。糖鎖の存在によりタンパク質の血中寿命が遅延している⁸⁾。複合型の糖鎖は、タンパク質の輸送、安定性、抗原性等に関与しているようである。また、これら糖鎖の生合成による不全は、病気を引き起こすことが多数見出されている⁹⁻¹¹⁾。複合型糖鎖が正常に構築できないことが糖タンパク質の輸送、安定性に影響し、細胞や組織に影響を与え、病気につながっているように見える。

糖タンパク質製剤の分野においてもここ数年、糖鎖構造に関する議論が展開されている。エリスロポエチンのように糖タンパク質製剤が特許切れを迎え、ヨーロッパでは、ジェネリック製剤として利用がはじまっている。しかし、米国では、糖鎖構造が不均一であり、ジェネリック薬としては、まだ許可されていない¹²⁾。この問題

を解決するには、糖鎖とタンパク質の機能の関係を明確化する必要があるが、社会のニーズに糖鎖研究がやや立ち遅れている感がある。糖タンパク質の調製は、一般的には動物細胞を利用するが、この手法を利用する限り、得られる糖タンパク質の糖鎖構造は不均一なものとなる。どのような糖鎖構造がタンパク質の機能発現に必要であるかを調べる必要があるが、現状では、単一構造の糖鎖をもつ糖タンパク質を調製するのは困難である。そこで、我々は糖タンパク質の化学合成法を検討することにした。しかし、必要となる糖鎖試料、タンパク質構築法など、いろいろな問題があった。特に糖鎖の化学合成には、高度な合成技術が要求され、継続的に糖鎖供給をすることは困難である。そこで、我々は、糖鎖を生体試料から大量に得、そして糖ペプチド、糖タンパク質を合成する検討を行ってきた。本論文では、その最近の成果を紹介する。

1. 半化学合成による糖鎖ライブラリーの調製

糖ペプチドや糖タンパク質を化学合成するためには、十分な量の糖鎖を得る必要がある。N-結合型糖鎖を合成する場合、グリコシド結合の立体制御を行いながら糖残基を連結していく必要がある。特に、 β -マンノシル化¹³⁾、 α -シアリル化¹⁴⁾は困難な反応である。このような問題点を解決しつつ、これまでに三分岐¹⁵⁾、四分岐¹⁶⁾、二分岐複合型¹⁷⁾、ハイマンノース型糖鎖¹⁸⁾の化学合成が達成されている。しかしこれらの方法では、糖鎖を糖ペプチド合成のために常に調製し供給し続けることには制限がある。

このような中、筆者らは、天然試料を原料として、半化学合成的に単一構造の二分岐複合型糖鎖の大量調製を検討した¹⁹⁾。鶏卵には、ヒト型の複合型シアリル二分岐糖鎖が、糖ペプチド可溶画分(H-Lys-Val-Ala-Asn (oligosaccharide)-Lys-Thr-OH)として豊富に存在することが報告されていた²⁰⁾。そこで、この二分岐複合型ジシアロ糖鎖を原料として、多様な構造の糖鎖を調製することを計画した。一般に、シアリ酸と他の糖とのグリコシル結合は、酸によって容易に加水分解することができる。従って、二分岐ジシアリル糖鎖の非還元末端のシアリ酸残基を選択的に1残基除去した後、順次適切なエキソグリコシダーゼ処理を行えば様々な構造の二分岐複合型糖鎖を得ることができるのではないかと考えた。しかし、二分岐ジシアリル糖鎖から選択的にシアリ酸1残基を除去することは困難であった。実際、酸加水分解反応を行うと原料であるジシアリル糖鎖、2種類のモノシアロ、アシアロ型の計4種類糖鎖混合物を与えた。

これら糖鎖を分離できれば、当初の合成計画を実施することができるが、糖鎖は高親水性の化合物であるた

Scheme 1 Acid hydrolysis of NeuAc.

め、有機合成のスケール(数百ミリグラム)での分離は極めて困難であった。そこで、我々は得られた糖鎖に疎水性残基である、9-フルオレニルメチル(Fmoc)基をアスパラギンのアミノ基部分に、あるいはベンジル基をシアル酸のカルボキシル基に選択的に導入することができれば、逆相 HPLC により分離することができるのではないかと考えた。そして種々検討した結果、これら疎水性保護基を導入した糖鎖 2-5(スキーム 1)は、逆相のカラムを用いる高速液体クロマトグラフィーによって効率よく分離できるようになった。そこで、これら糖鎖を単離後、シアル酸の結合していない分岐鎖に対し、順次エキソグリコシダーゼを用いて糖残基を除去し簡便に糖鎖構造を改変する検討を行った。用いる酵素は、すべて市販の糖加水分解酵素で、それぞれ、数 10 ミリグラムから百ミリグラムスケールで糖の加水分解反応を実施した。その結果、糖鎖構造の改変を簡便に実施することに成功した(スキーム 2)。また、用いる糖加水分解酵素の順番を代えることで、組み合わせ的に可能な 24 種類の二分岐複合型糖鎖の調製に成功した。得られた糖鎖はすべて NMR 測定を行い、報告されているデータベースと比較し構造を確認した¹⁹⁾。

2. 糖ペプチドの合成

糖鎖を簡便に調製できるようになったので、次では、これら糖鎖を用いた糖ペプチド合成を検討することにした。ペプチドは、通常 *t*-ブトキシカルボニル基(Boc)で保護したアミノ酸を用いる Boc 法、あるいは 9-フルオレニルメチル基(Fmoc)基で保護したアミノ酸を用いる Fmoc 固相合成法によって調製することができる²¹⁾。しかし、固相からペプチド鎖を切り出す際、強酸や HF を必要とする Boc 法の操作では、糖鎖が加水分解される

ので用いることができない。このため過去に報告されている糖ペプチドの合成では、Fmoc 固相合成法が一般に用いられている。また、この際用いられてきた糖鎖-アミノ酸複合体、[Fmoc-Asn(oligosaccharide)]は糖水酸基がアセチル基で保護されていた²²⁾。しかし、N-結合型糖鎖 2 は 40 個以上の水酸基を有している。従って、糖ペプチドの固相合成終了後、これら多数のアセチル基を塩基処理により除去する操作が必要となる。ペプチド分子の塩基処理は、システイン、セリン残基などの側鎖の β -脱離、アミノ酸の α -炭素の異性化を起こす可能性があるため、糖鎖の水酸基やカルボキシル基の保護について再考する必要がある。我々が調製した糖鎖はすべてアスパラギンのアミノ基がすでに Fmoc 基で保護されている(スキーム 2)。そこで、シアル酸のもつカルボキシル基のみ保護すれば、40 個以上存在する糖水酸基は無保護でも、ペプチド固相合成に利用できるのではないかと考え検討することにした。まず、シアル酸のカルボキシル基の保護から検討した。その結果、水溶液中で炭酸セシウムによりカルボン酸塩を調製後、DMF 溶媒中でベンジルブロミドと反応させると、シアル酸の有するカルボキシル基のみを選択的にベンジルエステル化することを見出した(スキーム 3)²³⁾。この構造は、シアル酸分子のプロトンの特異的な化学シフト変化を NMR により観測したこと、および質量分析の ms/ms 実験により確認した。危惧されていたアスパラギン残基のカルボキシル基へのエステル化は、Fmoc 基の立体障害により起こらなかったのではないかと考えている。また、シアル酸をエステル基で保護したことで、ペプチド固相合成で用いる 95%トリフルオロ酢酸処理にも十分耐えることを見出した²³⁾。これは、エステル基の電子的な影響とカルボキシル基の水素原子がなくなったことに起因すると

Scheme 2 Synthesis of diverse asparagine linked oligosaccharides by *exo*-glycosidase digestion.

考えている。通常、糖の1位グリコシル結合は、2位がデオキシ化されると酢酸程度の酸でも加水分解される。

シアル酸は、エステル化されても3位(ピラノースでは2位に相当)がデオキシ化されているので、酸加水分解

を受けやすいと考えられる。我々は、シアル酸のカルボキシル基の水素原子がグリコシル酸素原子に 5 員環構造を形成する形で相互作用することが、シアル酸が酸加水分解を受けやすい理由ではないかと考えている。以上の知見により、Fmoc 固相合成に用いることのできる水酸基遊離の N-結合型複合型糖鎖-Asn 複合体を調製することができた。次に、この糖鎖アスパラギンを用いて固相合成を行った(スキーム 4)²³⁾。モデルとしては、エリスロポエチンの骨格中のペプチド鎖を選んだ。樹脂には、

Scheme 3 Synthesis of Fmoc-Asn-oligosaccharide.

有機溶媒に膨潤性の高い poly(ethylene glycol)-poly(dimethylacrylamide) (PEGA 樹脂)²⁴⁾を、リンカーには、hydroxymethylphenoxyacetic acid (HMPA)を選んだ。アミノ酸の縮合には、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCDI)/ヒドロキシベンズトリアゾール(HOBt)を用いた。また、糖鎖アスパラギンの導入には、2-(1*H*-9-azobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU)/ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)を用いた。そして目的とする配列にそって糖ペプチドを構築し、二分岐複合型ジシアロ糖鎖を有する糖ペプチド 19 の合成に初めて成功した。また、アミノ酸を伸長する際、用いる Fmoc-アミノ酸を低濃度で順次縮合することによって、糖水酸基に対する不要なエステル化反応も抑えることができた。しかしながら、Fmoc-Asn-糖鎖複合体 18 の導入収率は 38% と低収率であった。種々検討した結果、これは Fmoc-Asn-糖鎖複合体 18 を HATU で活性化する際、アスパラチミド 20 を形成することが縮合効率を低下させる原因であることが明らかになった(図 2)²⁵⁾。この間

Scheme 4 Solid-phase synthesis of sialylglycopeptide 19.

題に対し、種々、縮合条件を検討したところ、3-(diethoxy-phosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one(DEPBT)を縮合剤として用いた場合、アスパラチミドの形成が抑えられることがわかった²⁵⁾。そこで、hydroxymethylphenoxyacetic acid(HMPA)リンカーを結合させた poly(ethylene glycol)-poly(dimethylacrylamide)copolymer(PEGA)樹脂を用い、糖ペプチドの合成を再度検討した。糖-アミノ酸の導入は用いた樹脂に対して、2 当量の Fmoc-Asn-糖鎖複合体、DIPEA、3 当

Fig. 2 Aspartimide formation.

量の DEPBT を用いて行ったところ、定量的な糖鎖の導入に成功した。そしてペプチドを伸長した結果、良好な収率で糖ペプチドを得ることに成功した²⁵⁾。この方法を用いることで、図 3 に示したように様々な糖鎖ペプチドが合成できるようになった。

生体内には N-型糖鎖と、もう一種類 O-型糖鎖を有する糖タンパク質が存在する。O-結合型糖を有する糖ペプチドおよび糖タンパク質については、中原、北條らにより 23 KDa のムチン型 MUC 4 糖タンパク質の合成が達成されている²⁶⁾。また、O-結合型糖鎖にはシアリル化されたものも存在する。特に、がん化に伴い、シアリル化された O-型糖鎖シアリル Tn が増加することが知られている。この糖鎖は、がんワクチンに利用できるがん抗原として注目されている²⁷⁾。従って、O-型シアリル糖鎖をもつ糖ペプチドの合成も注目が集まっている。しかし、原料として必要となるシアリル糖鎖の調製にやや問題があった。糖鎖の α -立体選択的シアリル化反応は、通常の方法では困難なために、これまで多数の方法が研究されてきた¹⁴⁾。最近、シアラ酸の 5 位を修飾したものや、4, 5 位間をオキサゾリンで架橋したシアラ酸誘導体が、高い α -選択性を示すがことが報告され、有用性の高いシアラ酸供与体が数多く見出されている²⁸⁾。一

Fig. 3 Synthesized several glycopeptides.

般にシアリル化する場合、シアリ酸の1位カルボキシル基は電子求引性であるため、2位に生じるカチオンを不安定化させると考えられる。従来、開発されてきたこれらシアリル供与体は、その1位がすべてエステル基であった。我々は、この1位の電子求引性あるいは、供与性がシアリル化反応にどのような影響を与えるか興味をもち、今まで、検討されていない1位がアミド化されたシアリ酸誘導体を用いるシアリル化反応を検討することにした²⁹⁾。そこで、常法によりシアリ酸アミド誘導体25-27の合成を検討した。そして得られたこれら誘導体を塩化メチレン溶媒中、低温でシアリル化反応に用いたところ、 α -選択的にシアリル糖鎖を与えることが判明した。また、種々のアミド誘導体を用いたところ、モノメチルアミド誘導体26が最も α -選択性が高く(表1, エントリー4-6)、逆にジメチルアミド誘導体27を用いると β -選択性が優先するという興味深い結果を得た(表1, エントリー7, 8)。同様のシアリル化反応を既知のメチルエステル誘導体28で検討を行ったところ、 α -選択性は得られなかった(表1, エントリー9-11)。

アミド誘導体がこのような α -選択性を与えた理由としては、シアリ酸の2位にカチオンが生じた際、1位のアミド酸素がカチオンに相互作用し、図4のようなスピロ環様中間体を与え、その結果(i)中間体からは、 α -グリコシル体、(ii)からは、 β -誘導体が生じたと考えてい

る。結果から考察すると、 α -体を与えると考えられる中間体(i)の生成が(ii)よりも優先していると考えている。しかし、ジメチルアミド誘導体を用いた例では、予想に反して β -体を優先して与えた。これは、アルキル基の立体障害の影響で、スピロ環様中間体が形成することができず、 α -選択性が低下したのではないかと考えている。これらのことから、本シアリル化反応は、アミド基の電子供与性が2位のカチオン安定性に影響したというよりも、スピロ中間体の形成が重要な役割を果たしたのではないかと考えている。当初の期待した電子的な影響ではなく、隣接基関与を示唆する反応結果が見出されたことで、本研究は興味深いものとなった。そこで、さらに選択性を向上させるために、種々の検討を行った。その結果、 -80°C のような低温でシアリル化反応を行うほうが高い α -選択性を示すことが判明した(表2)。低温環境下では、分子間反応であるアルコールのシアリル化反応の反応速度が低下するが、分子内反応である1位アミド酸素の2位カチオンへの相互作用が優先したため、シアリル化反応が起こる際に、 α -体シアリル体を与えやすい β -型のスピロ環中間体の生成が優先しているのではないかと考えた。これら反応では、シアリル化の副反応であるシアリ酸の2,3位間の脱離反応や、2位への水分子の付加反応はほとんど起こっておらず、目的

Table 1 Sialylation reaction using NeuAc-1-amide derivatives.

Entry	Donor (R)	Acceptor	Product : Yield% ($\alpha : \beta$)
1	25 (NH_2)	(i)	29 : 84% (7 : 1)
2	25 (NH_2)	(ii)	30 : 79% (4.5 : 1)
3	25 (NH_2)	(iii)	31 : 88% (4 : 1)
4	26 (NHCH_3)	(i)	32 : 90% (10 : 1)
5	26 (NHCH_3)	(ii)	33 : 91% (5 : 1)
6	26 (NHCH_3)	(iii)	34 : 92% (5.4 : 1)
7	27 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$)	(ii)	35 : 43% (1 : 6)
8	27 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$)	(iii)	36 : 46% (1 : 9)
9	28 (OCH_3)	(i)	37 : 75% (4 : 1)
10	28 (OCH_3)	(ii)	38 : 80% (1 : 1)
11	28 (OCH_3)	(iii)	39 : 80% (1 : 1)

*The ratios were determined by ^1H NMR

Fig. 4 Presumable mechanism of sialylation reaction using NeuAc-1-amide derivatives.

Table 2 Temperature dependence of sialylation reaction using Neu 5 Ac-1-monomethylamide 26.

Entry	Acceptor	Temperature and $\alpha : \beta$ *		
		-50°C	-78°C	-87°C
1	(i)	4.9 : 1	8.9 : 1	9 : 1
2	(ii)	3 : 1	5.7 : 1	6.1 : 1
3	(iii)	3.5 : 1	4.9 : 1	4.9 : 1

*The ratios were determined by ^1H NMR

物の単離精製も非常に容易であった。

また、シアル酸の1位アミド基は、NaOHにより加水分解し、高収率でシアリル糖鎖へと変換することができた。

次に、このシアリル化反応を利用して、前述のシアリル Tn-セリンの合成を試みた。シアリル化には、最も α -選択性が高いモノメチルアミド誘導体を用い、ガラクトサミン誘導体のシアリル化反応を検討した。その結果、目的とする Fmoc 化されたシアリル- α -2-6-ガラクトサミニルセリン誘導体 40 (スキーム 5) の合成に成功した。次に、このシアリル Tn-セリン誘導体を用いてペプチド合成を検討した (スキーム 5)。一般には、糖水酸基はアセチル基等で保護して、ペプチド固相合成を行うことが常法であるが、前述の N-結合型糖鎖ペプチドの合成と同様に糖水酸基は無保護のまま検討した。これにより、ペプチド合成後に行う、エステル類の脱保護の時間短縮や、塩基性度を抑えて、セリン、システイン等の β -脱離を減少できると考えた。固相には、PEGA 樹脂を用い、N-型糖鎖ペプチドと同様にアミノ酸の伸長を行った。そして、95% TFA による加水分解によりペプチド鎖を固相より切り出した。続いて、シアル酸のメチルエステル基を 20 mM NaOH でけん化した。これらの過程で、酸によるシアル酸の加水分解反応、塩基による

脱離反応は最小限に抑えられていた。その結果、収率よく目的とするシアリル Tn 残基を有する糖ペプチド 41 を得ることに成功した。

以上のように構造は限定されるが、N-型および O-型糖ペプチドの簡便な合成に成功したので、次では糖タンパク質を合成するための検討を開始した³⁰⁾。

3. 糖タンパク質の化学合成

糖鎖を持たない通常のタンパク質の化学合成では Dawson, Kent らによって報告された Native Chemical Ligation (NCL) 法がペプチド鎖連結法として用いられている (図 5)³¹⁾。NCL は一方のペプチド鎖 C 末端に導入されたチオエステル基と、他方のペプチド鎖 N 末端に導入されたシステイン残基側鎖のチオール基が、チオエステル交換反応を起こし、続く分子内アシル転位を介して天然のペプチド結合を形成する方法である。この方法を用いれば、ヒト型糖鎖を持つ糖タンパク質の化学合成が可能ではないかと考えた。

我々は、標的分子として、サイトカイン monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) を選択した³⁰⁾。MCP-3 は 76 残基からなる糖タンパク質で、2 本のジスルフィド結合と、一箇所の N-結合型糖鎖連結部位を有する³²⁾。この合成では Native Chemical Ligation (NCL) を用いて

Scheme 5 Synthesis of MUC 4 sialoglycopeptide.

Fig. 5 Native Chemical Ligation.

1つのシアリル糖鎖ペプチドと、2つのペプチドを連結することにより標的糖タンパクの全長を構築し、続いてフォールディング操作を行うことによって、目的物を合成する戦略を採用した(スキーム6)。本合成においてNCLを利用するには3つのセグメントの内、セグメント-1(化合物45または46)および-2(42)はチオエステル体として調製する必要がある。糖鎖付加のないペプチドチオエステル体(セグメント-2)、通常のペプチド鎖(セグメント3)はBoc法によるペプチド調製法が確立されているので³³⁾、これを用いて合成を行った。次に鍵となる糖ペプチドチオエステル体(セグメント-1)については、Boc法、Fmoc法双方で検討した(スキーム7, 8)。Boc法による合成において問題となるのは、HFによる固相からのペプチド鎖の切断と、アミノ酸側鎖保護基の脱保護を要する点である。幸い、セグメント-1は、アミノ酸側鎖に保護基を必要としないでもペプチド伸長が可能と考えた。また、Boc化された糖鎖アミノ酸誘導体[Boc-Asn(sialyloligosaccharide)-OH, 48]はFmoc基で

保護された18を20% piperidineによってFmoc基を除去した後に、無水Bocを用いることによって調製した³⁰⁾。続いて、セグメント-1をBoc法により構築する検討を行った。まず、ロイシン残基が固定化されているPam[®]樹脂上にリンカーとして、トリチル基で保護された3-メルカプトプロピオン酸を縮合した。次にトリチル基をTFAで酸加水分解後、生成したチオール基に最初のBocアミノ酸を導入した。続いてセグメント-1の配列にそってBocアミノ酸を導入した。糖鎖アスパラギン誘導体46は、前述のDEPBTを用いて行った。セグメント-1の構築後、樹脂からのペプチド鎖の切り出しは、すでに固相上に構築されているチオエステルに対するチオール交換反応を用いることで行った。この結果目的とする糖ペプチドチオエステル体45を収率13%で得ることに成功した³⁰⁾。

一方、Fmoc法ではC末端遊離の保護糖ペプチド鎖を固相合成によって調製した後、縮合反応によってC末端のカルボキシル基をチオエステル化する方法を開発した

Scheme 6 Synthetic strategy of glycosylated MCP-3.

Scheme 7 Synthesis of glycopeptide-thioester by Boc strategy.

(スキーム 8)。まず弱酸によって固相からの切断を行うことのできる HMPB-PEGA 樹脂上に糖ペプチド鎖を Fmoc 法で構築後、酢酸，トリフルオロエタノール 1 : 1 の混合溶液で処理することによりペプチド側鎖の保護基を損なうことなく保護ペプチド鎖 **49** を得た。このペプチド鎖上の遊離になっている C 末端のカルボキシル基のチオエステル化反応は，benzotriazole-1-yl-oxy-trispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphonate (PyBOP)，diisopropylethylamine を用い，アミノ酸の異性化を抑えるため， -20°C 下でベンジルメルカプタンと縮合することによって行った。続いてこれを，95% TFA，2.5% triisopropylsilane，2.5% H_2O を用いることでペプチド鎖の脱保護を行い，目的とする糖ペプチドチオエステル体 **46** を収率 43% にて得ることができた^{30, 34)}。この際の C 末端のアミノ酸の異性化はほとんどないことを NMR 等で詳細に検討し確認した。

このようにして，すべての原料のペプチドセグメントの合成ができたので，続いてこれらセグメントの NCL による連結を行った(スキーム 6)。まずセグメント-2 と

セグメント-3 を 6 M グアニジンを含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.6) に溶解させ，ベンジルチオールおよびチオフェノールを加え室温で 24 時間，NCL 反応を行った。その結果，反応は効率よく進行し生成物を与えた。これを精製作業なしに，N 末端のチアゾリン残基を，メトキシアミン塩酸塩水溶液によって脱保護を行い，システイン残基を含むセグメント-4 を得た。次に，得られたセグメント 4 と糖ペプチドチオエステルセグメント-1 (**46**) の間で 2 回目の NCL 反応を行った。6 M グアニジンを含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解させ，ベンジルチオールおよびチオフェノールを加え pH を 6.5 に調整した。そして，24 時間反応を行ったところ，目的とする糖鎖化 MCP-3 全長鎖(図 6B : **48**) の構築に成功した。次に，この糖鎖化 MCP-3 のフォールディング実験を行った。糖タンパク質が溶けた反応溶液を 0.1 M の Tris 緩衝溶液 (pH 8.0) で 5 倍に希釈し，1 分間空気注入を行った後，24 時間静置した。これを HPLC，および質量分析測定を行ったところ，生成物は 2 本のジスルフィド結合を含む標的糖タンパク質である

Scheme 8 Synthesis of glycopeptide-thioester by Fmoc strategy.

ことを確認した(図 6C : 49)。そして、単離精製後、50 mM の NaOH 水溶液によってシアル酸残基のベンジルエステルを加水分解して標的糖タンパク質 47 の合成に成功した(図 6E : 47)。得られた糖タンパク質の立体構造を確認するために、キモトリプシン消化によるジスルフィド結合の結合様式の決定、CD 測定、および ELISA アッセイを行った。キモトリプシン処理では、HPLC で精製後質量分析を行ったところ、予想したジスルフィド結合でつながったいくつかのペプチドフラグメントの質量を観測できたことから、2 本のジスルフィド結合が構築されていることを確認した。この分析で 5% 程度の目的ではないジスルフィド結合も観測されたが、これは、キモトリプシン処理中にジスルフィド結合が再編された可能性がある。以上のことから、90% 以上の純度で目的とする糖タンパク質が得られたことが確認できた。また、円二色性スペクトル(CD)測定では、目的とする CD パターンが得られた。ELISA では、MCP-3 に特異的なモノクローナル抗体 2 種類を使って行ったが、両抗体ともに合成した糖タンパク質に反応した。これらのことから、合成した 47 は目的とする三次元構造をとっていることが確認された³⁰⁾。

Fig. 6 Synthesis of glycosylated MCP-3.

おわりに

以上のように、我々は糖鎖の半化学合成を利用することで初めて完全な構造のヒト二分岐ジシアロ糖鎖を有する糖タンパク質の合成に成功した。また、O 型糖ペプチドの合成にも成功しているので、今後は、様々な糖タンパク質の合成を検討することが可能である。糖タンパク質は、生物学的な手法でしか調製できないと考えられていたが、今後は、有機合成化学の標的分子として扱うことができるようになったと考えている。世界的にもこの糖タンパク質の化学合成がはじまっており、糖質の機能解明に貢献できる化学的な方法が見出せたと考えている。

謝 辞 本研究を実施するにあたり、多くの合成を行った山本直樹博士、タンパク質合成の共同研究を行ったスクリップス研究所の Philip E. Dawson 博士、大塚化学株式会社の皆様に感謝いたします。また、本研究をご支持いただき支えてくださった理化学研究所 伊藤幸成先

生に感謝いたします。本研究は、科学研究補助金(学術創成, 特定領域, 基盤研究C)の援助を頂き行うことができました。

(2008年5月12日受理)

文 献

- 1) A. Helenius, M. Aebi, *Science*, **291**, 2364 (2001)
- 2) A. J. Petrescu, M. R. Wormald, R. A. Dwek, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 600 (2006)
- 3) C. H. Wong, *J. Org. Chem.*, **70**, 4219 (2005)
- 4) A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, "Essentials of Glycobiology" Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999
- 5) Y. Yoshida, T. Chiba, F. Tokunaga, H. Kawasaki, K. Iwai, T. Suzuki, Y. Ito, K. Matsuoka, M. Yoshida, K. Tanaka, T. Tai, *Nature*, **418**, 438 (2002)
- 6) G. C. White, A. Beebe, B. Nielsen, *Thromb. Haemost.*, **78**, 261 (1997)
- 7) G. Walsh, R. Jefferis, *Nat. Biotech.*, **24**, 1241 (2006)
- 8) C. Macdougall, K. U. Eckardt, *Lancet*, **368**, 947 (2006)
- 9) X. Wang, S. Inoue, J. Gu, E. Miyoshi, K. Noda, W. Li, Y. Mizuno-Horikawa, M. Nakano, M. Asahi, M. Takahashi, N. Uozumi, S. Ihara, S. H. Lee, Y. Ikeda, Y. Yamaguchi, Y. Aze, Y. Tomiyama, J. Fujii, K. Suzuki, A. Kondo, S. D. Shapiro, C. Lopez-Otin, T. Kuwaki, M. Okabe, K. Honke, N. Taniguchi, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **102**, 15791 (2005)
- 10) A. Yoshida, K. Kobayashi, H. Many, K. Taniguchi, H. Kano, M. Mizuno, T. Inazu, H. Mitsuhashi, S. Takahashi, M. Takeuchi, R. Herrmann, V. Straub, B. Talim, T. Voit, H. Topaloglu, T. Toda, T. Endo, *Developmental Cell*, **1**, 717 (2001)
- 11) K. Ohtsubo, S. Takamatsu, M. T. Minowa, A. Yoshida, M. Takeuchi, J. D. Marth, *Cell*, **123**, 1307 (2005)
- 12) H. Ledtord, *Nature*, **449**, 274 (2007)
- 13) (a) F. Barresi, O. Hindsgaul, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9376 (1991); (b) G. Stork, G. Kim, *ibid.*, **114**, 1087 (1992); (c) Y. Ito, T. Ogawa, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **33**, 1765 (1994); (d) D. Crich, S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 435 (1998)
- 14) G. J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.*, **100**, 4539 (2000)
- 15) (a) V. Y. Dudkin, J. S. Miller, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 736 (2004); (b) H. Weiss, C. Unverzagt, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **42**, 4261 (2003); (c) H. Paulsen, M. Heume, Z. Gyorgydeak, R. Lebuhn, *Carbohydr. Res.*, **144**, 57 (1985)
- 16) (a) C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **36**, 1989 (1997); (b) H. Lonn, J. Lonngrén, *Carbohydr. Res.*, **120**, 17 (1983)
- 17) (a) C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **33**, 1102 (1994); (b) T. Ogawa, M. Sugimoto, T. Kitajima, K. K. Sadozai, T. Nukada, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5739 (1986); (c) J. Arnarp, M. Haraldsson, J. Loenngrén, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1985**, 535; (d) H. Paulsen, W. Rauwald, R. Lebuhn, *Carbohydr. Res.*, **138**, 29 (1985); (e) J. Arnarp, J. Loenngrén, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **21**, 1000 (1980)
- 18) (a) X. Geng, V. Y. Dudkin, M. Mandal, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 2562 (2004); (b) I. Matsuo, M. Wada, S. Manabe, Y. Yamaguchi, K. Otake, K. Kato, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3402 (2003); (c) J. R. Merritt, E. Naisang, B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.*, **59**, 4443 (1994); (d) T. Nukada, T. Kitajima, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, **228**, 157 (1992)
- 19) Y. Kajihara, Y. Suzuki, N. Yamamoto, K. Sasaki, T. Sakakibara, L. R. Juneja, *Chem. Eur. J.*, **10**, 971 (2004)
- 20) A. Seko, M. Koketsu, M. Nishizono, Y. Enoki, H. R. Ibrahim, L. R. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta*, **1335**, 23 (1997)
- 21) N. Sewald, H.-D. Jkubke, "Peptides: Chemistry and Biology" Wiley-VCH, Weinheim, 2002
- 22) (a) T. Buskus, S. Ingale, G. T. Boons, *Glycobiology*, **16**, 113 R (2006); (b) O. Seitz, *ChemBioChem*, **1**, 214 (2000); (c) Y. Nakahara, *Biopolymers*, **88**, 308 (2007)
- 23) N. Yamamoto, Y. Ohmori, T. Sakakibara, K. Sasaki, L. R. Juneja, Y. Kajihara, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2537 (2003)
- 24) E. Meinjohanns, M. Meldal, H. Paulsen, R. A. Dwek, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1998**, 549
- 25) N. Yamamoto, A. Takayanagi, T. Yoshino, Y. Kajihara, *Chem. Eur. J.*, **13**, 613 (2007)
- 26) H. Hojo, Y. Matsumoto, Y. Nakahara, E. Ito, Y. Suzuki, M. Suzuki, A. Suzuki, Y. Nakahara, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13720 (2005)
- 27) (a) T. Becker, S. Dziadek, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets*, **6**, 491 (2006); (b) D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **4**, 477 (2005); (c) S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 836 (2000); (d) C. H. Hang, C. R. Bertozzi, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 5021 (2005)
- 28) (a) A. V. Demchenko, G. J. Boons, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 3065 (1998); (b) S. Komba, C. Galustian, H. Ishida, T. Feizi, R. Kannai, M. Kiso, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1131, (1999); (c) C. DeMeo, A. V. Demchenko, G. T. Boons, *J. Org. Chem.*, **66**, 5490 (2001); (d) C. C. Lin, K. T. Huang, C. C. Lin, *Org. Lett.*, **7**, 4169 (2005); (e) C. C. Lin, C. H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2900 (2001); (f) T. Mukaiyama, H. Mandai, H. Jona, *Chem. Lett.*, **31**, 1182 (2002); (g) H. Tanaka, M. Adachi, T. Takahashi, *Chem. Eur. J.*, **11**, 849 (2005); (h) H. Ando, Y. Koike, H. Ishida, M. Kiso, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 6883 (2003); (i) H. Ando, Y. Koike, S. Koizumi, H. Ishida, M. Kiso, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 6759 (2005); (j) K. Tanaka, T. Goi, K. Fukase, *Synlett*, **19**, 2958 (2005); (k) H. Tanaka, Y. Nishiura, T. Takahashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7124 (2006); (l) M. Faris, C. De Meo, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 1255 (2007); (m) D. Crich, W. Li, *J. Org. Chem.*, **72**, 2387 (2007); (n) *idem, ibid.*, **72**, 7794 (2007)
- 29) R. Okamoto, S. Souma, Y. Kajihara, *J. Org. Chem.*, **73**, 3460 (2008)
- 30) N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okamoto, P. E. Dawson, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 501 (2008)
- 31) (a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. C. Lewis, S. B. H. Kent, *Science*, **166**, 776 (1994); (b) T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10068 (1999)
- 32) (a) J. Van Damne, P. Proost, J.-P. Lenearts, G. Opdenakker, *J. Exp. Med.*, **176**, 59 (1992); (b) G. Opdenakker, G. Froyen, P. Fiten, P. Proost, J. Van Damne, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**, 535 (1993)
- 33) M. Schnolzer, P. Alewood, A. Jones, D. Alewood, S. B. Kent, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **13**, 31 (2007)
- 34) Y. Kajihara, A. Yoshihara, K. Hirano, N. Yamamoto, *Carbohydr. Res.*, **341**, 1333 (2006)

PROFILE

梶原康宏 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科・教授

〔経歴〕1988年3月神奈川大学工学部応用化学専攻卒業、1990年3月神奈川大学大学院工学研究科応用化学専攻修了、1993年3月東京工業大学大学院総合理工学研究科博士後期課程生命化学専攻修了、1993年4月-95年5月日本たばこ産業株式会社生命科学研究科博士研究員、1995年6月横浜市立大学理学部助手、2001年4月横浜市立大学大学院総合理工学研究科(理学部兼任)助教授、2007年4月横浜市立大学大学院国際総合科学研究科教授、現在に至る。

岡本 亮 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科

〔経歴〕2004年3月横浜市立大学理学部機能科学専攻卒業、2006年3月横浜市立大学大学院総合理工学研究科システム機能科学専攻博士前期課程修了、2009年3月横浜市立大学大学院国際総合科学研究科ナノ科学専攻博士後期課程修了(予定)

次号予定

巻頭言

二酸化炭素……………井上 祥雄

総説および総論論文

酸・塩基複合塩を鍵とする高機能触媒の設計および高選択的合成法の開拓……………坂倉 彰
面不斉遷移金属錯体を基盤とする軸不斉化合物の立体選択的合成、および動的錯体への展開……………神川 憲
遷移触媒を用いたジカルコゲニド結合の開裂を伴う有機モノカルコゲニド化合物の合成……………谷口 暢一
ニッケル触媒を用いた環化付加反応による効率的な7員環骨格形成法の開発……………斎藤 慎一
対称ジエステルの実用的な選択的モノ加水分解反応—現状と展望—……………庭山 聡美
ステレオイソグラムによるプロキラリティー概念の再検討……………藤田 眞作

Review de Debut

酸化過程を経由するアミド結合形成反応の新展開……………古山 溪行

ケミカルズ覚え書き

高活性アルキル化剤 エチルマグネシウムクロリド(活性化剤：塩化亜鉛)……………竹内真由美

十字路

ハロ環化反応……………坂倉 彰
アレーン錯体……………神川 憲
ジカルコゲニド……………谷口 暢一
アルキリデンシクロプロパン……………斎藤 慎一

新しい合成ほか