

糖ペプチドの精密化学合成

梶原 康宏

(横浜市立大学大学院国際総合科学研究科)

はじめに

生体内のタンパク質の多くは糖鎖が結合した糖タンパク質である。糖鎖はタンパク質に結合しその分子を覆うことで、タンパク質の抗原性、輸送、タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）への耐性そして、タンパク質の3次元構造の維持など、タンパク質の機能発現に寄与している。また、細胞表層に存在する糖鎖は細胞間相互作用、ウイルス感染などに関与している。タンパク質は、糖鎖付加を受けながら（co-translational modification）遺伝情報によって粗面小胞体で生合成された後、ゴルジ装置へ輸送される。そして、そこに存在する糖関連酵素によって翻訳後修飾と呼ばれる糖鎖の再修飾がおこなわれ、最終的にシアル酸という重要な機能を有する糖残基が付加されて糖鎖の生合成が完了する（図1）。

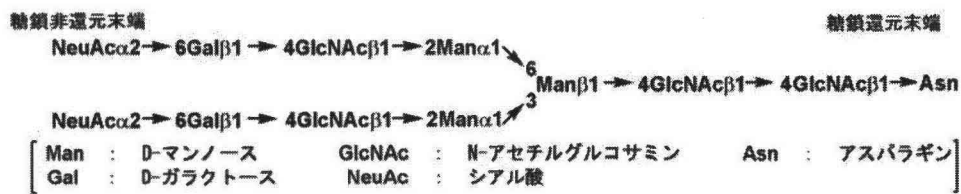


図1. アスパラギン結合型糖鎖の代表的な構造

しかし、糖タンパク質は、構成するアミノ酸配列が同様であっても、糖鎖構造が不均一なことに起因する構造異性体の混合物として生合成されている。そのため、タンパク質修飾の代表的な分子である糖鎖の機能を調べるためにはシアル酸まで結合した構造の明確な糖鎖を有するペプチドおよびタンパク質を調製することが不可欠であり、さまざまな糖タンパク質・糖鎖ペプチドの合成研究が現在世界中で盛んに展開されている¹⁾。また、糖タンパク質・糖鎖ペプチドを医薬分野に応用しようとする研究も多数展開されている。現在、糖タンパク質の合成はChinese hamster ovary (CHO) cellを利用した発現系が主流であるが、発現系で得られる糖タンパク質の糖鎖構造はいずれも不均一である。近年、有機合成化学の手法を用いて様々な糖鎖を合成する例が報告されているがタンパク質に結合している図1のような代表的なアスパラギン結合型シ

アシル糖鎖は、構造が複雑でかつ高分子であることから容易に化学合成することができない。そのため、十分な量の糖鎖が入手できず糖ペプチド、糖タンパク質の合成研究の進展が遅れている。この点において近年、当研究室では鶏卵から得られるシアリルグリコペプチドから大量にアスパラギン結合型糖鎖（図1）を得る方法を確認することに成功している²⁾。そこで、この糖鎖を原料にした糖鎖ペプチドの簡便な合成方法を確立することができれば、これまで合成困難であったアスパラギン結合型シアリル糖鎖ペプチドを短期間で大量に得ることが可能となり世界的に未だ達成されていない純粋な構造の大型糖鎖を有するペプチド・タンパク質の合成に一步近づくことになる。

現在、ペプチド、タンパク質の合成方法として固相合成法が確立している。そこで、この固相合成法をシアリル糖鎖ペプチドの合成に応用することが最も簡便な方法であると考えられる。しかし、このアスパラギン結合型シアリル糖鎖（図1）を利用するためには有機化学的にも難しい次の3つの問題点を解決しなければならなかった（図2）。

1. 糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸残基は酸による加水分解を起こしやすく糖鎖ペプチド合成の操作中に容易に糖鎖から欠如する。
2. アスパラギンのカルボキシル基 (A) にペプチド鎖のアミノ基を縮合させる際、シアル酸残基に存在するカルボキシル基 (B) とアミノ基の縮合が競合する（図2）。
3. ペプチド鎖をアミノ基Cに伸長させる際、副反応としてアミノ酸が糖水酸基にエステル化する可能性がある。

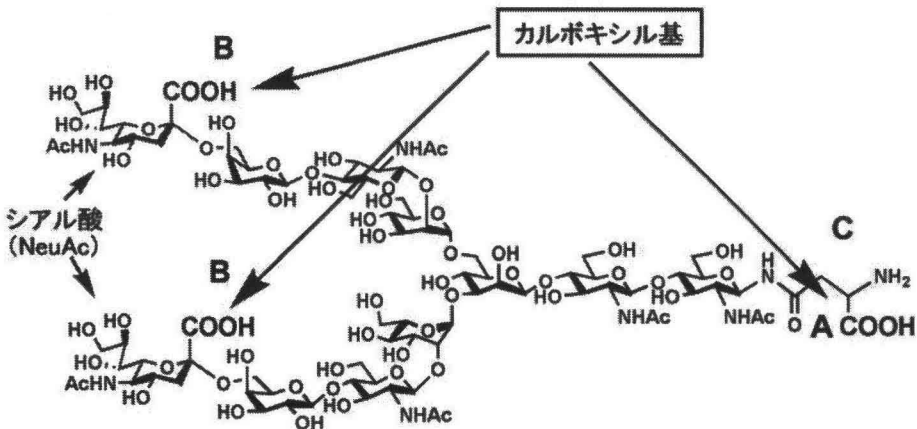


図2. 本研究に利用するアスパラギン結合型シアリル糖鎖の化学構造

そこで本研究ではこれらの問題点を解決し、さまざまなシアリル糖鎖ペプチドの化学合成を行うことを目的とした。また、その合成分子としては、生理活性糖タンパク質エリスロポエチンや抗原抗体反応に関連する糖タンパク質 Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein-4 (CTLA-4) を選び、その重要フラグメントの合成を行った。

結果および考察

アスパラギン結合型シアリル糖鎖の利用

シアリル糖鎖ペプチドの合成はペプチド合成の一般的な手法である固相合成法を利用することが簡便であると考えた (図4)。そこで、Fmoc法による固相合成に利用するために、卵より得たアスパラギン結合型シアリル糖鎖 2) に 9-fluorenylmethyl-oxy-carbonate (Fmoc) 基を導入した後、シアル酸のカルボキシル基のみを選択的に保護する検討を行った (図3)。アスパラギン部分のアミノ基を Fmoc 基で保護した後、カルボキシル基をセシウム塩とした。そして、ベンジルブロミドを DMF 溶媒中反応させたところ、アスパラギンのカルボキシル基は未反応でシアル酸のカルボキシル基のみ選択的にベンジルエステル化し糖鎖 1 を得ることに成功した (図3)。このように構造の複雑な糖鎖に対し選択的に有機反応を行った例は今回がはじめてである。

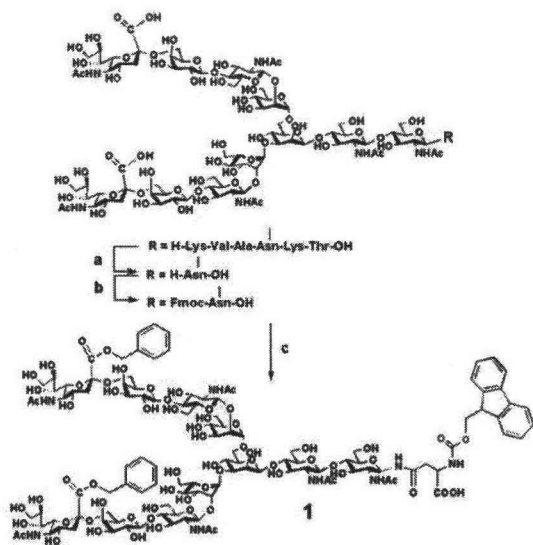


図3. シアル酸残基の有するカルボキシル基への選択的保護基の導入

Reagents: a) Actinase-E, Tris-HCl buffer, NaN_3 , pH 7.5 (86%); b) 9-fluorenylmethyl N-succinimidyl carbonate (Fmoc-OSu), NaHCO_3 , Acetone, H_2O (68%); c) Cs_2CO_3 , H_2O then BnBr, DMF (85%)

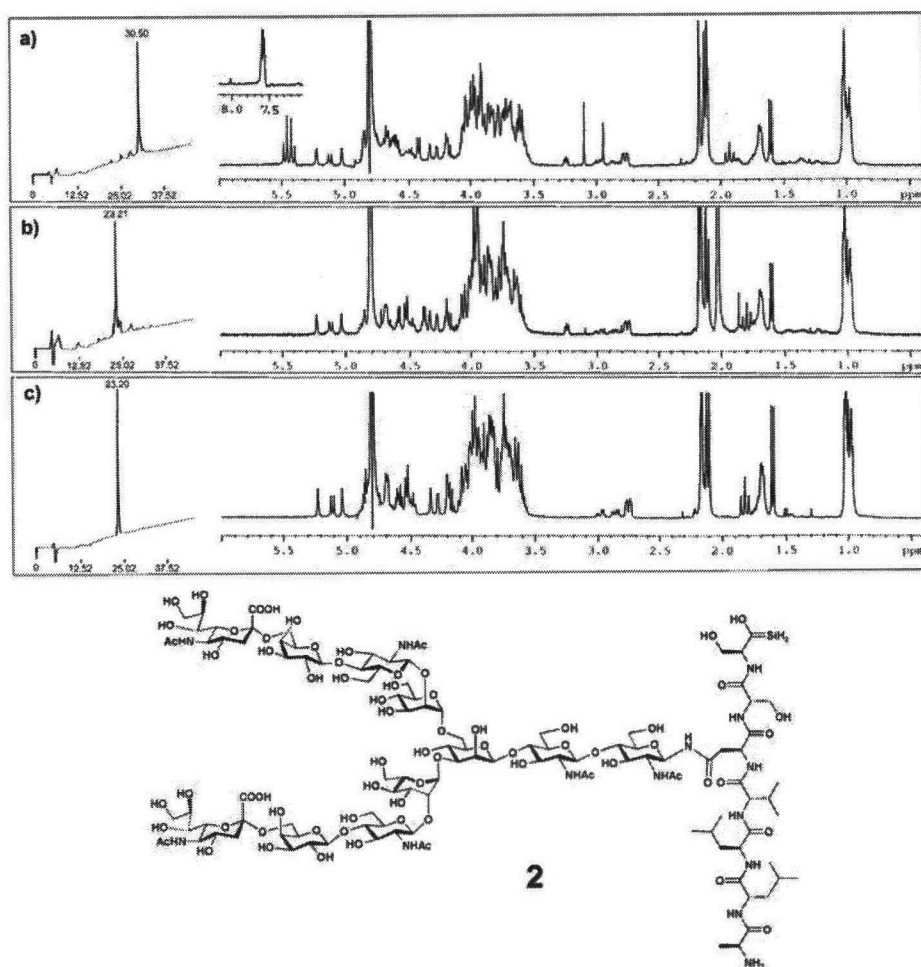


図 5. 逆相 HPLC 溶出パターンと ^1H -NMR スペクトル a) 固相から切り出した後、b) ベンジルエステルを脱保護した後、c) 精製後に測定した結果。およびシアリル糖鎖ペプチド 2 の構造。

シアリル糖鎖ペプチド固相合成における問題点の解決

前述のようにシアリル糖鎖ペプチドの合成に成功したが、いくつか改善する必要がある点が残った。特に糖鎖アスパラギン 1 の固相への導入率は 38% と低いものであった。そこで、定量的な固相上ペプチドへの導入を目的として 1 の縮合収率を向上させる検討を行った。その結果、糖鎖アスパラギン 1 を縮合剤により活性化した際、副生成物としてアスパルチミド誘導体 3 が生成することで 1 が不活性化していることを確認し⁴⁾(図 6)、これが固相への縮合率低下に結びついていることを明らかにした。そして、この問題を踏まえ糖鎖アスパラギンの縮合条件を最適化することにより糖鎖アスパラギン

1を固相上のペプチドに90%以上の収率で導入し最終目的物の糖鎖ペプチドの合成収率が5%程度であったものを30%以上に向上させることが出来た。

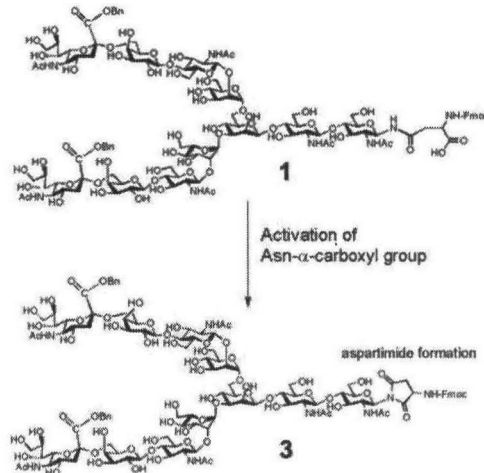


図6. アスパルチミド誘導体3の形成

長鎖ペプチドを有するシアリル糖鎖ペプチド固相合成

今まで述べたシアリル糖鎖ペプチド固相合成法において最も特徴的なものは、多数存在する糖水酸基を無保護のまま固相合成に利用している点である。無保護で用いると糖鎖ペプチドを構築後、保護基を除去する操作を大幅に削減できるため本手法は簡便な合成法として有効である。しかし、アミノ酸を伸長させる際、副反応として活性化したアミノ酸が40以上も存在する糖水酸基のどこかにエステル化することが危惧される(図7)。そこで、このエステル化の問題についても糖鎖ペプチド合成の収率向上のために詳細に調べることにした。その結果、アミノ酸伸長の際、反応溶液量を調節し試薬の濃度等を希釈すると糖水酸基へのエステル化がほとんど起こらずにペプチド鎖のみ選択的に伸長できることを見出した。

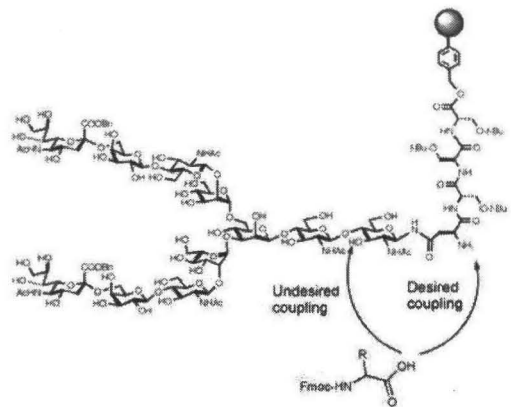


図7. アミノ酸縮合時に起こりうる反応の模式図

9kDaのシアリル糖鎖ペプチドの合成

これまで確立した合成条件がさまざまなシアリル糖鎖ペプチドの合成に対し有用であるかを調べるために、抗炎症剤として実用化が検討されている CTLA-4 の 113–150 フラグメント **6** を目的化合物として合成を検討した。このフラグメントはシアリル糖鎖を2本有するシアリル糖鎖ペプチドで合成戦略を図8に示した。

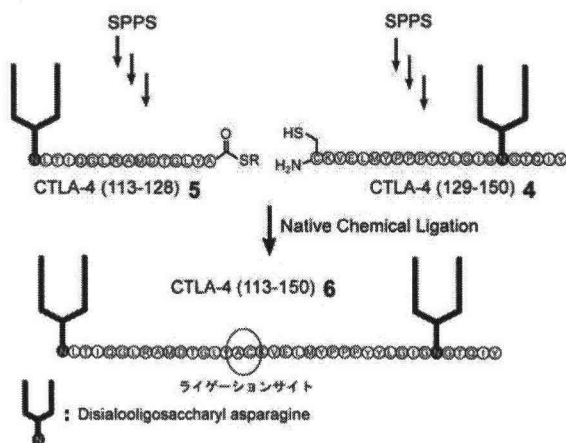
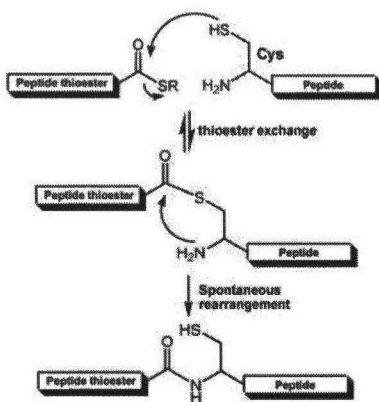
図 8. CTLA4(113-150) **6** の合成戦略

図 9. Native Chemical Ligationの反応機構

この方法ではタンパク質や高分子量ペプチドの合成に利用される Native Chemical Ligation（NCL）（図9）を用いて2つのシアリル糖鎖ペプチドをつなげることにより目的物を合成するルートを採用している。

NCLはチオエステルをC末端にもつペプチドフラグメントとシステインをN末端に

持つペプチドフラグメントを用いる。図9に示すように、システインのチオール基がチオエステル交換することにより、5員環構造を形成できる位置にあるシステインのアミノ基が選択的にチオエステルに攻撃することでペプチド結合を形成する反応である。

図8に示したように、本来のアミノ酸配列ではライゲーションサイトのアミノ酸がイソロイシンとシステインであるが、ライゲーション効率を上げるためにイソロイシン（一文字表記：I）を側鎖が立体的に小さいアラニン（一文字表記：A）に置換して合成を検討することにした。まず、N末端にシステインを有するCTLA-4フラグメント(129-150) **4**の合成を検討した。このアミノ酸の配列はCKVELMYPPPYLIGINGTQIY（Nに糖鎖が結合）である。これまでに確立した条件を用いFmoc法によるシアリル糖鎖ペプチドの固相合成を行った。その結果、目的とする22残基からなるシアリル糖鎖ペプチド **4**の合成を純度よく行うことに成功した。固相から切り出した後のサンプル、精製した後のサンプルを逆相HPLCで分析した結果および合成したシアリル糖鎖ペプチドの構造を図10に示した。化合物はNMR測定および質量分析により目的物であることを決定した。

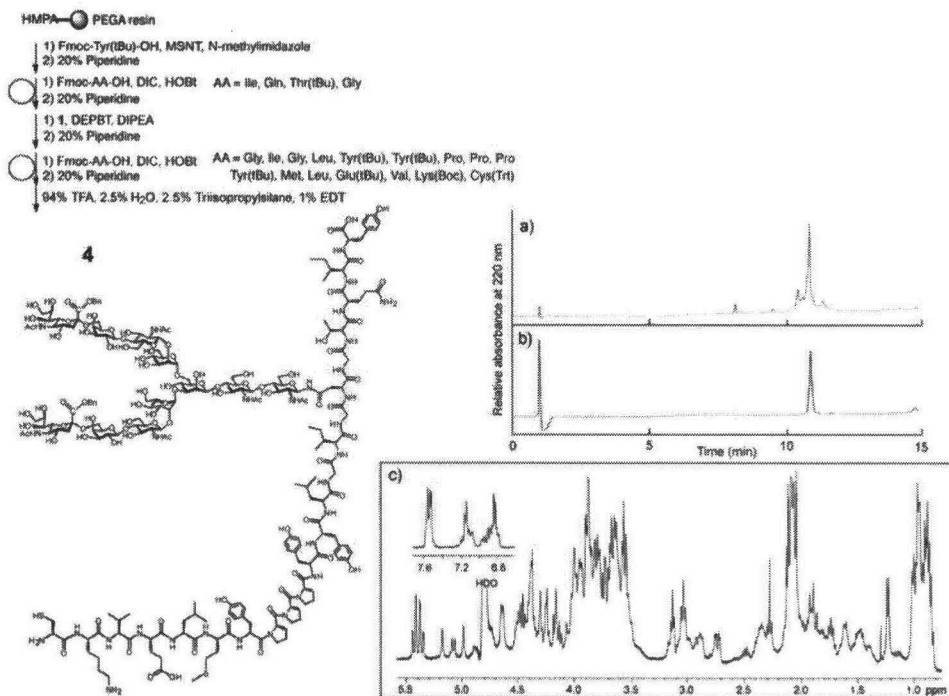


図10. CTLA-4フラグメント(129-150) **4**の合成結果 a):固相から切り出した後の逆相HPLCの溶出パターン b):精製後の逆相HPLC溶出パターンおよび c) ¹H-NMRスペクトル。

NCLを利用するにはC末端にチオエステルを有するペプチドフラグメントが必要である。そこで、Fmoc法によりチオエステルを有するシアリル糖鎖ペプチドを合成するために、Fmoc 基の脱保護条件を通常の 20%Piperidine/DMF から 2% Hexamethyleneimine, 25% 1-methyl-pyrrolidine, 2%HOBTの混合溶液 (DMSO: NMP = 1 : 1) に変えてもう一つのフラグメントである CTLA-4 (113-128) **5**の合成を検討した。その結果、目的とするシアリル糖鎖ペプチドチオエステルを低収率ながら高純度で得ることに初めて成功した。合成した化合物の構造と精製後の逆相 HPLC 分析、¹H-NMR 測定の結果を図11に示した。化合物は NMR 測定および質量分析により目的物であることを決定した。

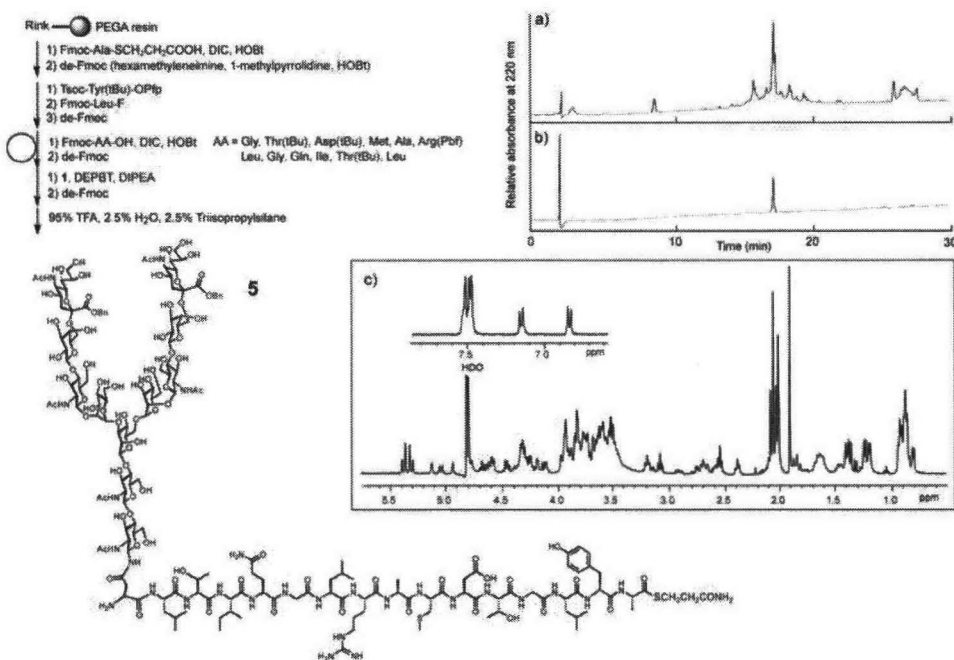


図11. CTLA-4フラグメント(113-128) **5**の合成 a):固相から切り出した後の逆相HPLCの溶出パターン b):精製後の逆相HPLC溶出パターンおよび c) ¹H-NMRスペクトル。

このように、NCLに必要なフラグメントの合成が完了したので次に、NCLを用いて CTLA-4 (113-150) **6**の合成を行った。フラグメント **4**, **5**を6M グアニジンを含む 100mM リン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解させベンジルチオール及びチオフェノールを加え室温で24時間NCL反応を行った。反応は逆相HPLCを用いて追跡した (図12)。その結果、反応が進行しライゲーション生成物を与え、シアリル糖残基のベンジルエステルを加水分解することで目的とする CTLA-4 (113-150) **6**の合成に成功した。これ

らの化合物は質量分析により目的物であることを確認している。このように、本手法を用いることで初めて大型の糖ペプチドの合成に成功した⁵⁾。

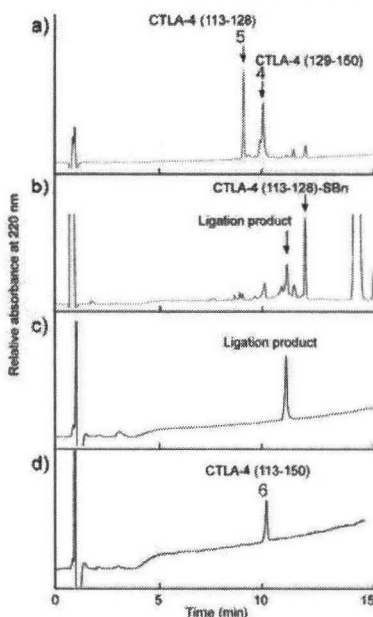


図 12. NCL 反応を追跡した逆相 HPLC チャート。a) 反応 0 時間、b) 24 時間後、c) 精製後のライゲーション生成物、d) 脱ベンジルエステル体の精製後の目的化合物 CTLA-4 (113-150) 6

考察

本研究では鶏卵から大量に得ることが出来るアスパラギン結合型シアリル糖鎖を利用し、シアリル糖鎖ペプチドの固相合成法の確立に世界で初めて成功した。シアル酸のカルボキシル基のみにベンジル基を導入できたのは、アスパラギン部分のカルボキシル基の構造が大きな Fmoc 基の立体障害の影響でセシウム塩にならなかった、もしくはベンジル基を導入するための試薬が近づきにくかったためであると考えられる。また、シアル酸のトリフルオロ酢酸に対する安定化は、シアル酸のカルボキシル基をベンジルエステル化することによってカルボキシル基の電子吸引性が増大され、シアル酸 2 位の電子密度が低下した結果、2 位のカチオン安定性が低下し酸加水分解されにくくなったものと考えている。この発見が、いままで誰も成し得なかったシアリル糖鎖ペプチドの固相合成を初めて可能にした。そして、糖鎖アスパルチミドの副成、糖水酸基へのエステル化という問題を解決することで目的とするシアリル糖鎖ペプチドを高収率で得る方法確立することが出来た。

これらの成果は、大型のアスパラギン結合型シアリル糖鎖ペプチドの合成を世界で

初めて達成できたことにつながった。また、この合成方法の特徴として、糖水酸基は、無保護のまま固相合成に用いている。大型の糖鎖には糖水酸基が多数あり、これらの水酸基を無保護で固相合成に利用できることは最終過程で必要とする保護基を除去するための行程を大幅に簡略化することができ非常に有効である。

さらに、大型の糖鎖ペプチドを合成していくうえで、NCL法を利用したシアリル糖鎖ペプチドの合成に成功したことも非常に有用な結果である。糖鎖の機能解明には生体内に存在するような天然型構造の糖鎖を有するタンパク質が必要である。そのため、NCL法に必要なチオエステルを有するシアリル糖鎖ペプチドの合成が必要不可欠であったが、収率は低いものの、その合成も初めて成功した。これらの技術を用いることで今後さまざまなシアリル糖タンパク質の合成に挑戦できるようになると期待される。

引用文献

- 1) Kajihara, Yasuhiro; Yamamoto, Naoki; Miyazaki, Tatsuo; Sato, Hajime. Synthesis of diverse asparagine linked oligosaccharides and synthesis of sialylglycopeptide on solid phase. *Curr. Med. Chem.* (2005), 12(5), 527-550.
- 2) Yasuhiro Kajihara, Yasuhiro Suzuki, Naoki Yamamoto, Ken Sasaki, Lekh Raj Juneja. Prompt Chemoenzymatic Synthesis of Diverse Complex Type Oligosaccharides and its Application to the Solid Phase Synthesis of a Glycopeptide Having Asn-linked Sialyl-undeca and Asialo-nonasaccharides. *Chemistry A European J.* 10, 971-985, 2004.
- 3) Naoki Yamamoto, Yoshiko Ohmori, Tohru Sakakibara, Ken Sasaki, Lekh Raj Juneja, Yasuhiro Kajihara. Solid-phase synthesis of sialylglycopeptides through selective esterification of the sialic acid residues of an Asn-linked complex-type sialyloligosaccharide. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 2537-2540. 2003.
- 4) Yamamoto, Naoki; Takayanagi, Ayumi; Sakakibara, Tohru; Dawson, Philip E.; Kajihara, Yasuhiro. Highly efficient synthesis of sialylglycopeptides overcoming unexpected aspartimide formation during activation of Fmoc-Asn(undecadisialyloligosaccharide)-OH. *Tetrahedron Lett.* (2006), 47(8), 1341-1346.
- 5) Naoki Yamamoto, Ayumi Takayanagi, Ayako Yoshino, Tohru Sakakibara, and Yasuhiro Kajihara An Approach for A Synthesis of Asparagine Linked Sialylglycopeptides Having Homogeneous Complex Type Undecadisialyloligosaccharides. *Chemistry A Euro. J.* (2007), 13, 613-625.