

# 複合型糖鎖をもつ糖タンパク質の化学合成

梶 原 康 宏

(大阪大学大学院理学研究科化学専攻)

岡本亮、山本直毅、田辺康孝、平野桐子、村瀬健文

(横浜市立大学大学院国際総合科学研究科)

## はじめに

メッセンジャーRNAの情報にそって翻訳されたポリペプチド鎖は、様々な修飾を受ける。タンパク質の機能発現には、これらの修飾は必要不可欠なものであり<sup>1</sup>、なかでもグリコシル化は細胞表層や、血中の大半のタンパク質に対して起こる<sup>2</sup>。タンパク質上の糖鎖は、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酸素原子に結合したO型糖鎖に分類される。N型糖鎖は、複合型、混成型、高マンノース型の3つに分けられ、O型糖鎖は、更に8つのグループに分けられる (Figure 1)<sup>2</sup>。

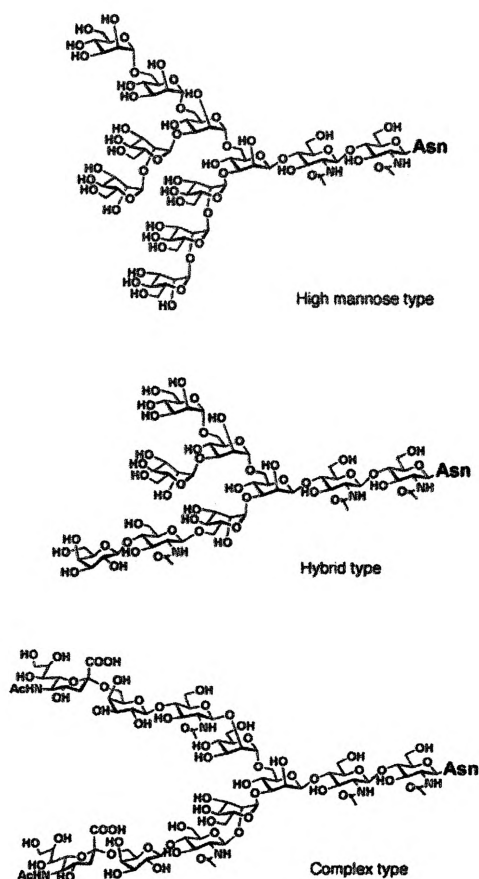


Figure 1. Structure of N-linked oligosacchrides.

近年、糖鎖の機能解明の研究が展開され、高マンノース型糖鎖は、タンパク質の生合成経路に深く関与していることが明らかになった。タンパク質が小胞体内で合成される際、コンセンサス配列(NX(プロリン以外のアミノ酸) S or T)中のアスパラギン残基の側鎖に高マンノース型糖鎖が付加される。ここで付加された高マンノース型糖鎖は、タンパク質が三次元構造を形成する際、折り畳み作業を補助するシャペロン (calnexin/calreticulin) のリガンドとして認識される<sup>3</sup>。フォールディング過程が終了すると、高マンノース型糖鎖の末端に結合したグルコース残基の切断が起き、正しい立体構造を形成した糖タンパク質は小胞体からゴルジ体へと輸送される。一方、折りたたみに失敗したものは、グルコースの再付加によって、再度calnexin/calreticulinによる折りたたみ過程へと戻る<sup>4</sup>。幾度かの折りたたみ過程に失敗した不良タンパク質は細胞内での蓄積を避けるために細胞質へと放出され、ユビキチン化された後にプロテアソームで分解される。この際、小胞体から細胞質への放出、ユビキチン化に関しても高マンノース型糖鎖が関与することが示唆されている<sup>5</sup>。正しい立体構造を形成した糖タンパク質は、その後、小胞体およびゴルジ装置を通過する過程で、高マンノース型から複合型へと変換される。この複合型糖鎖は、2から4分岐などの構造を示すとともに、末端の糖残基の配列が不均一である。そのため多様な糖鎖構造を示し、糖鎖構造と機能の関係を調べる研究が多数展開されている。しかし、糖鎖構造の多様性のため、どのような構造の糖鎖がタンパク質の機能発現に重要か特定することが困難な状態であり、単一構造の糖鎖を有する糖タンパク質を自在に調製する方法が望まれている。そこで単一構造の糖タンパク質を得る為に、化学合成を用いてその合成を試みることにした。糖タンパク質を合成する為に、目的糖タンパク質を複数のペプチドセグメント及び、糖鎖を有する糖ペプチドセグメントとしてそれぞれ合成しKent、Dawsonらが見出したNative Chemical Ligation(NCL)法<sup>6</sup>によってそれぞれのペプチド鎖同士を連結させて糖タンパク質全長鎖を合成する事とした。

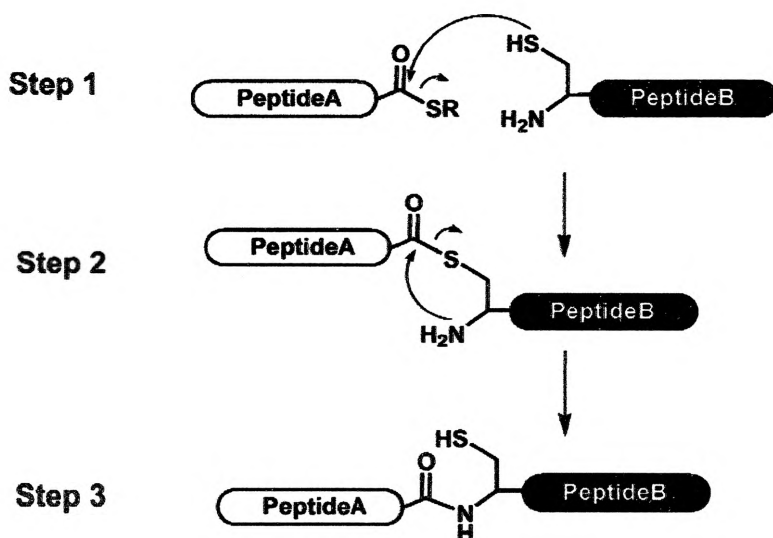


Figure 2. Native Chemical Ligation

このNCL反応では、C末端にチオエステル基を有するペプチドとN末端にシステイン残基を有するペプチド間のチオール交換反応に続く分子内アシル転移を経て、二つのペプチドセグメントを天然型のアミド結合を介して縮合することができる方法である (Figure 2)。

この方法を用いて、まず複合型シアリル糖鎖をもつ糖タンパク質である monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) をモデルにその化学合成を試みた<sup>7</sup>。また一方で、糖タンパク質合成の為により有用なペプチド連結法の開発を目指した。NCL 反応を用いたペプチド連結法では適切な位置にシステイン残基が必要になる。そこで、システイン残基以外の部位において、ペプチド、糖ペプチドを連結させるために、新しい糖ペプチド連結法<sup>8</sup>の開発も試みることにした。

## 結果および考察

### 糖タンパク質の化学合成

糖タンパク質化学合成のターゲットとして、サイトカイン monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) を選択した<sup>7</sup>。MCP-3は76残基のアミノ酸から構成され、二本のジスルフィド結合と、一本のN-結合型糖鎖を有する糖タンパク質である<sup>9</sup>。この糖タンパク

質を化学合成するために1つのシアリル糖鎖ペプチドと、二つのペプチドに全長をわけた。そして、それぞれを化学的に合成後NCLによって連結することで糖タンパク質の全長鎖を構築し、フォールディング操作を行い目的とする糖タンパク質を得ることにした (Figure 3)。この合成戦略では3つのセグメントのうち、セグメント1 (化合物1) 及び、セグメント2 (化合物2) はチオエステル体として調製しなくてはならない。糖鎖の付加していないペプチドチオエステル体 (セグメント2)、そして通常のペプチド鎖 (セグメント3) はBoc法<sup>6</sup>を用いて合成を行った。

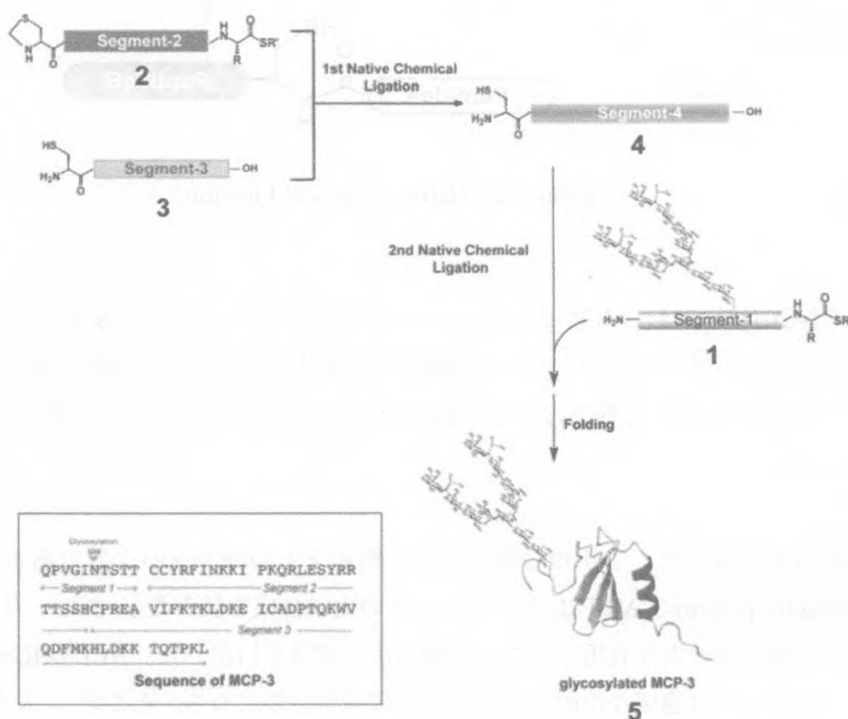
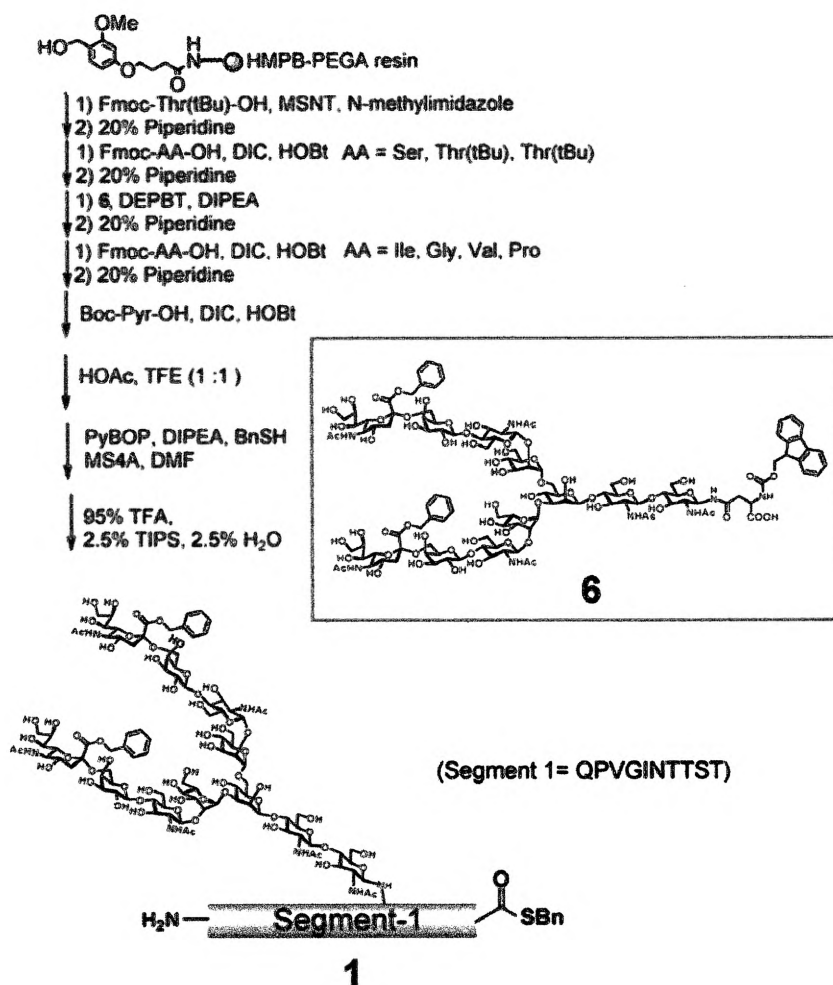


Figure 3. Synthetic strategy of glycosylated MCP-3

一方、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法双方で新規な合成法の開発を行った。ここでは Fmoc 法<sup>10</sup> による合成法について述べる (Scheme 1)。

糖ペプチド合成の原料となる糖鎖は鶏卵中に含まれるヒト型の複合型シアリル2分岐糖鎖を用いた<sup>9</sup>。鶏卵より単離した糖鎖の還元末端には、アスパラギン残基が結合しているため、そのアスパラギン残基をFmoc化し、更にシアリ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によりFmoc-Asn-糖鎖(6)を調製した<sup>11</sup>。続いて、得られたFmoc-Asn-糖鎖(6)のペプチドへの導入について種々検討を行った(Scheme 1)。その結果、ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)、3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one(DEPBT)を用いて行う方法が最良であることを見出した<sup>12</sup>。そこで、この方法を用HMPB-PEGA樹脂上に、糖ペプチド鎖をFmoc法により構築した。そして、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で、糖ペプチド鎖の側鎖が保護された糖ペプチド鎖を得た。次に、このペプチド鎖のC末端の遊離カルボキシル基のチオエステル化反応をおこなった。benzotriazole-1-yl-oxytrispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate(PyBOP)、Diisopropylethylamineを縮合剤として用い、-20℃下でベンジルメルカプタンを縮合することでほぼC末端のアミノ酸のエピメリゼーション抑え目的とするペプチドチオエステルを得ることができた<sup>10</sup>。続いてこれを、95% TFA、2.5% triisopropylsilane、2.5% H<sub>2</sub>O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1を収率43%にて得ることが出来た<sup>7</sup>。



Scheme 1 Synthesis of glycopeptide-thioester by Fmoc strategy.

続いてこれらセグメントのNCLによる連結を検討した(Figure 3)。まずセグメント2とセグメント3を、6M グアニジンを含む100mM リン酸緩衝液 (pH7.6) 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。この結果、反応は効率よく進行し生成物が得られた。これら生成物は未精製のまま、常法に従いN末端のチアゾリン残基をシステイン残基に変換しセグメント4(4)を得た。続いて、得られたセグメント4(4)と糖ペプチドチオエステルセグメント-1(1)の間で2回目のNCL反応を行った。6M グアニジンを含む100mM リン酸緩衝液(pH7.5)にセグメント4(4)と糖

ペプチドチオエステルセグメント-1 (1) を溶解させ、ベンジルチオール及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 (Figure 4 : 7) の構築に成功した。

### 糖タンパク質のフォールディング

以上により、均一な構造の糖鎖を有する MCP-3 の全長糖ペプチド鎖の合成ができたので、次にフォールディングの検討を行った。通常、生合成経路において糖タンパク質のフォールディング過程は複合型糖鎖ではなく高マンノース型糖鎖がシャペロンに認識されながら行われる。従って、シャペロン等が存在しない状態で糖タンパク質が正しい立体構造を形成するかどうか興味深いものであった。そこで、フォールディング操作に一般的に用いられている空気酸化による方法を適用した。変性剤であるグアニジンでポリペプチド鎖を変性させた後に、その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。この反応溶液を 24 時間静置後 HPLC、および質量分析測定を行ったところ、二本のジスルフィド結合を含む標的糖タンパク質が形成されていることが確認できた (Figure 4 : 8)。そして、単離精製後、50mM の NaOH 水溶液によってシアル酸残基のベンジルエステル基を加水分解した (Figure 3 and 4 : 5)。得られた糖タンパク質 5 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複数のペプチドフラグメントの質量を観測できた。また、この分析で 5% 程度、目的ではないジスルフィド結合でつながったペプチドフラグメントも観測されたが、これは、キモトリプシン処理中にジスルフィド結合の再編が生じた可能性が考えられた。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、また ELISA では、MCP-3 に特異的なモノクローナル抗体 2 種類を使って試験を行ったが、両抗体ともに合成した糖タンパク質に反応した。以上のことから、本手法により、95% 程度の純度で目的とする三次元構造を形成した糖タンパク質 5 が得られたことが確認できた<sup>7</sup>。

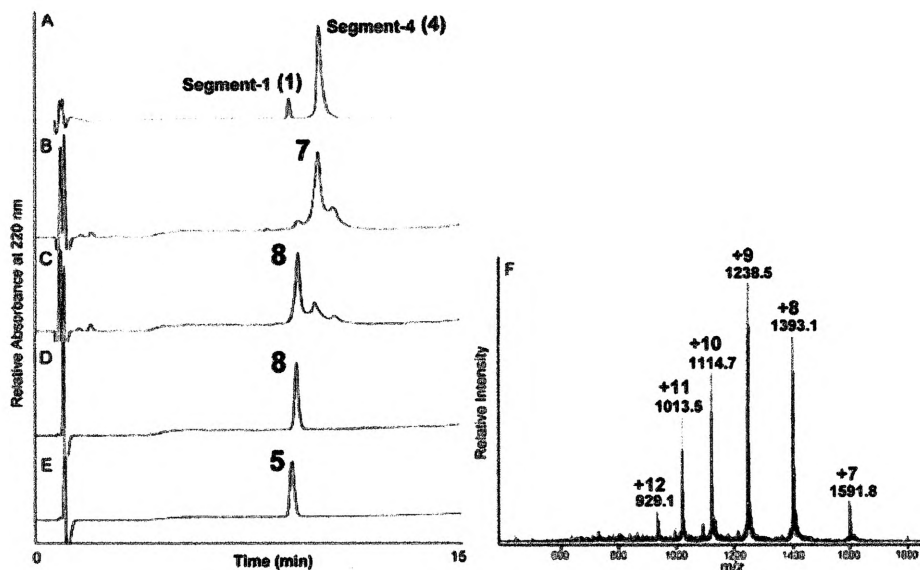


Figure 4. HPLC profile of NCL reaction to obtain glycoprotein 5 and ESI mass data.

### 新しい糖ペプチド連結法の開発

これまで、NCLを利用した糖タンパク質の化学合成について紹介した。NCLは多くの研究者がタンパク質、糖タンパク質合成に利用し、最も有用なペプチド連結法といっても過言ではない。しかし、NCLを行う為にはシステイン残基が必要であるが、全ての標的タンパク質が適切な位置にシステイン残基を有している訳ではない。この問題を解決するために、NCL後システイン残基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<sup>13</sup>。特に、還元法は、システイン残基をアラニン残基に変換することができる。我々も、新しい改良法を検討し、開発を検討し、セリン残基を利用するNCL法が可能であることを見出した。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N型糖鎖が付加する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。その合成計画をFigure 5に示した。



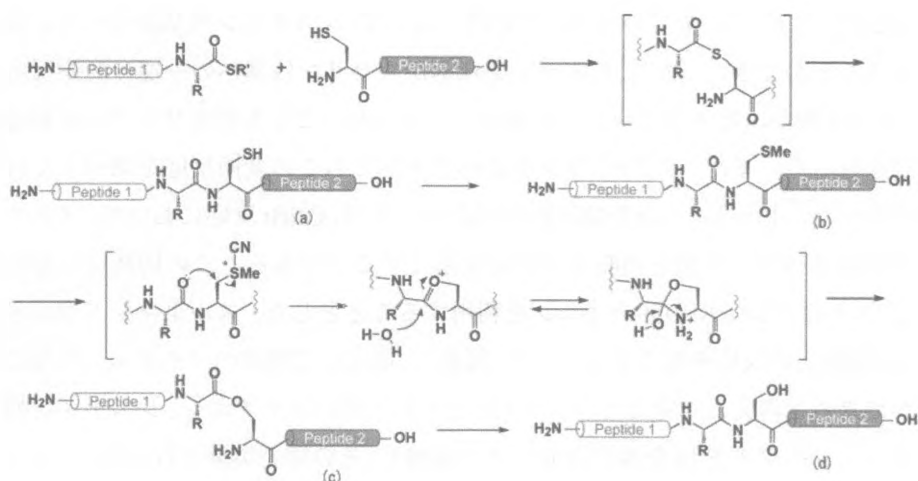


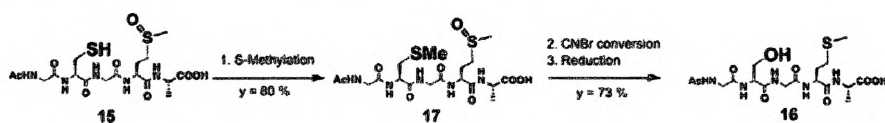
Figure 5. New NCL concept employing conversion reaction of Cys to Ser residue.

この方法ではNCL (Figure 5 (a)) 後、3工程を経てセリン残基へと変換する。この変換反応はシステイン残基を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、O-エステル誘導体を与える。最後に、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有する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行った(表1)。

Table 1 Conversion reaction of Cys to Ser residue

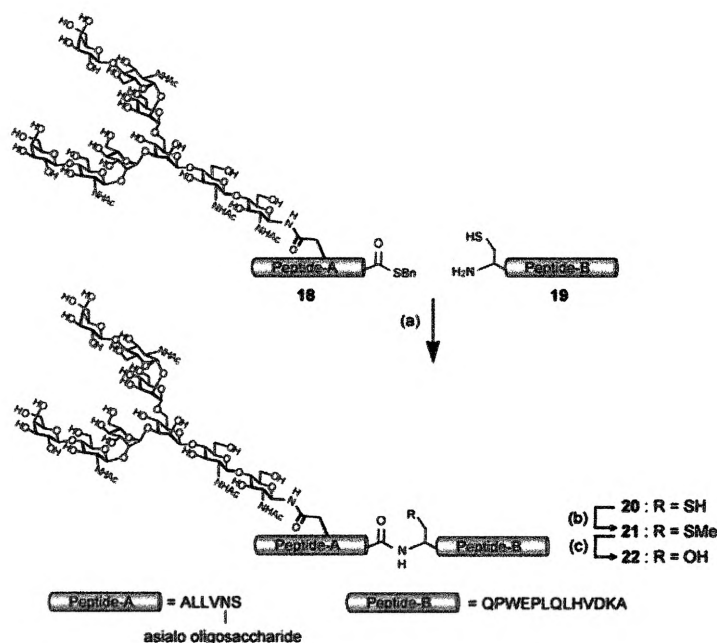
Entry	Cys peptide →Ser peptide	Cys-methylation	CNBr conversion	O to N acyl shift
1	Ac-ACGL ( <b>9</b> ) →Ac-ASGL ( <b>10</b> )	quant. (>90%)	75% (62%)	quant. (70%)
2	VDKAVCGL ( <b>11</b> ) →VDKAVSGL ( <b>12</b> )	97% (90%)	85% (63%)	90% (82%)
3	LFRVYCNFLRG ( <b>13</b> ) →LFRVYSNFLRG ( <b>14</b> )	90% (81%)	51% (41%)	quant. (77%)
4	Ac-GCGM(O)A ( <b>15</b> ) →Ac-GSGMA ( <b>16</b> )	quant. (80%)	82% (73%)**	

表1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、システイン残基からセリン残基への一連の変換反応により、L-アミノ酸がエピメリゼーションを起こしていないことも標準サンプルを別途合成し確認を行った。また、オクタ、ウンデカペプチドでもこの変換反応を効率よく行うことに成功した。しかし、この変換反応の問題としては、CNBr反応において、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とである。この切断反応を避けるために、スルホキシド型のメチオニンを利用することとした。スルホキシド型のメチオニンはCNBrとの反応を起こさないので、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と考えた。そこで、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プチド15を固相合成により調製し、その確認実験を行った。ペプチド15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<sub>4</sub>I, SMe<sub>2</sub> によってワンポットで還元したところ、目的物であるペプチド16を良い収率で得ることができた(73% 単離収率、Scheme 2)。



Scheme 2 Conversion reaction of peptide having sulfoxide group

以上のことから、新しいコンセプトを利用できることが確認できたので、複合型糖鎖を有する糖ペプチドの合成を検討することにした (Scheme 3)。



Scheme 3 Synthesis of glycopeptides using new NCL reaction

モデルペプチドとして、エリスロポエチンの79-98残基を選択した。NCLの原料となる複合型アシアロ糖鎖を有する糖ペプチドチオエステル18とテトラデカペプチド19は、既に報告した方法で合成した<sup>7,10</sup>。これらのNCL反応を行い、糖鎖化イコサペプチド20を得た。遊離の糖水酸基を有するこの糖ペプチド20に対してS-メチル化 (Figure 5 (a)-(b))、CNBr処理 (Figure 5 (b)-(d))を行った。しかし、このCNBr処理において、生成物が幅広いHPLCピークを示した (Figure 6 (e))。これは、糖水酸基が遊離であったため、蟻酸とCNBr条件下で、糖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と考えた。そこで、凍結乾燥後、5%ヒドラジン水溶液もしくは、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同時に行った。その結果、Figure 4 (f)に示したように、シャープなHPLCピークを確認し、糖ペプチド20のシステイン残基をセリン残基へと変換した糖ペプチド22を得ることができた。得られた糖ペプチドの構造及び純度は、別途固相合成により調製した標準サンプルと比較し、この反応が効率よく進行したことを確認した。

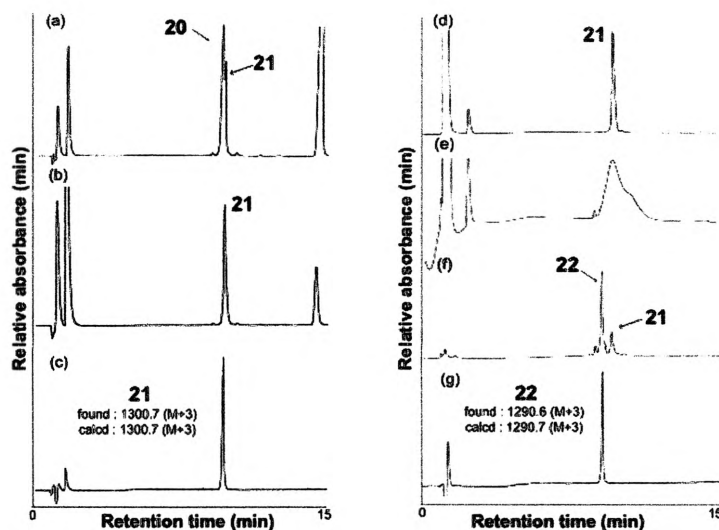


Figure 6. HPLC profiles of the conversion of cysteine to serine residue in the N-linked glycosyl icosapeptide 20. S-Methylation reaction : (a) start (1 min > t), (b) 20 min and (c) after purification. Conversion reaction of the S-methyl cysteine to a serine residue : (d) start (1 min > t), (e) 38 h, (f) after hydrazine treatment and (g) after purification.

以上のように、我々は新しいNCLコンセプトを見出しすとともに、様々な糖ペプチド糖タンパク質の化学合成に成功した。今後、これらの手法を利用しタンパク質上での糖鎖の動的挙動、あるいは糖鎖がタンパク質に与える影響などを調べる予定である。

## 謝辞

本研究は、科学研究費補助金(学術創成研究17GS0420 基盤研究B18550155)および理化学研究所 伊藤幸成博士、横浜市立大学榊原徹教授のご援助を頂いて行いました。本年度御退職される佐藤信裕教授、横山晴彦教授には大変御世話になりました。この場をかりて深謝いたします。

## 参考文献

- 1) G. Walsh, R. Jefferis, Nat. Biotech., 24, 1241 (2006)
- 2) R. A. Dwek, Chem. Rev. 96, 683 (1996)
- 3) S. Hagihara, K. Totani, Y. Ito, Chem. Rec. 6, 290, (2006)

- 4) E. S. Trombetta, A. J. Parodi, *Methods*, 35, 328. (2005)
- 5) a) Y. Oda, N. Hosokawa, I. Wada, K. Nagata, *Science*, 299, 1394, (2003) ; b) 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) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. C. Lewis, S. B. H. Kent, *Science*, 166, 776 (1994)
- 7) N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okamoto, P. E. Dawson, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 501 (2008).
- 8) a) Okamoto, R., Souma, S., and Kajihara, Y. (2008) *J. Org. Chem.* 73, 3460-3466. ; b) Okamoto, R., and Kajihara, Y. (2008) *Angew. Chem. Int. Ed.* 4, 5402-5406.
- 9) (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).
- 10) Y. Kajihara, A. Yoshihara, K. Hirano, N. Yamamoto, *Carbohydr. Res.*, 341, 1333 - 1340 (2006).
- 11) N. Yamamoto, Y. Ohmori, T. Sakakibara, K. Sasaki, L. R. Juneja, Y. Kajihara, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 2537 (2003).
- 12) N. Yamamoto, A. Takayanagi, T. Yoshino, Y. Kajihara, *Chem. Eur. J.*, 13, 613 (2007).
- 13) a) L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 5891-5896 (1996) ; b) D. W. Low, M. G. Hill, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, P. Botti, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6554-6559 (2001) ; c) T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, *Org. Lett.* 3, 1403-1405 (2001) ; d) J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4642-4646 (2002) ; e) D. Macmillan, D. W. Anderson, *Org. Lett.* 6, 4659-4662 (2004) ; f) G. Chen, J. D. Warren, J. Chen, B. Wu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 7460-7462 (2006) ; g) L. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 526-533 (2001) ; h) B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* 9, 687-690 (2007) ; i) A. Brik, S. Ficht, Y. Y. Yang, C. S. Bennett, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 15026-15033 (2006) ; j) D. Crich, A. Benerjee, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 10064-10065 (2007) ; k) P. Botti, S. Tchertchian, WO/2006/133962. ; l) Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 9248-9252 (2007).