

糖鎖機能の解明を指向した糖タンパク質合成法の開発

北條 裕信

1. はじめに

グリコシル化は、生体内タンパク質の約半分に及ぶ一般的な翻訳後修飾である。これらの糖鎖には、細胞の増殖や分化、がん化など種々の生命現象への関与が指摘されている。したがって、糖鎖機能が詳細に解明されれば、糖鎖機能に基づく新薬の開発も期待される。タミフルやリレンザはその好例といえる。

しかし、これらの例は別として、糖タンパク質糖鎖の機能を詳細に明らかにすることは容易ではない。種々の糖転移酵素により構築される糖鎖には多様性があるため、糖タンパク質は異なった糖鎖構造を持つ混合物として存在しており、個々の糖鎖の持つ機能の特定は困難なのが現状である。このことが糖タンパク質糖鎖研究の進展を妨げる原因の一つとなっている。

最近の化学合成法の進歩によって、均一な糖鎖を持つタンパク質の合成が可能となってきた。そして化学合成糖タンパク質を用いた糖鎖機能解析が実現されつつある。ここでは、筆者らの成果を含め、糖タンパク質合成の現状を概説する。

2. セグメント縮合法とチオエステル合成法

現在、40残基程度のペプチドの合成にはもっぱら固相法が用いられており、抗原用ペプチドの合成等、生化学分野でも必須の技術となっている。ペプチドが樹脂に結合しているため、固相法では機械的に試薬添加とろ過を繰り返すだけでペプチドを合成することができる。反面、各アミノ酸導入時に生じる欠陥ペプチドが樹脂上に蓄積するため、合成終了後に樹脂から切り出すと、目的物のほかに多くの欠陥ペプチドが共存することとなる。短いペプチドならばHPLCにより目的物を精製できるが、50残基を超え

るようなペプチドでは、副生成物の除去は往々にして困難である。このため、タンパク質の合成には、固相合成した比較的短いペプチドどうしを結合させるセグメント縮合法の適用が必須となる。

セグメント縮合を利用した糖タンパク質の合成ルートを図1Aに示す。いずれの方法もC末端にチオエステル基を持つ糖ペプチドが鍵物質である。ルート1では、固相合成の際、糖鎖を持つアミノ酸を導入して糖ペプチドチオエステルを合成し、縮合、フォールディングを経て糖タンパク質を得る。一方、ルート2では、ペプチドに一番近い還元末端糖のみを持つアミノ酸を導入し、単糖を持つタンパク質を得た後、残りの糖鎖を酵素的に導入する。両方法とも一長一短があるが、ルート1では、目的の糖鎖を持ったタンパク質が直接得られる、ルート2では単糖を持つタンパク質を、糖転移酵素を用いて種々の糖鎖を持つタンパク質に簡単に誘導できる等のメリットがある。

単糖どうしをつなぐグリコシド結合が強酸に不安定であることから、糖ペプチドチオエステルの合成は、強酸を用いない9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 法が有効である。図1Bに概略を示す^{1,2)}。この方法では、種々のアシル基転位素子を樹脂上に導入し、Fmoc法によりペプチド鎖を伸長する。樹脂から切断後、適切なチオール(図ではR₃-SH)で置き換えて目的物を得る。チオエステル結合は、Fmoc基除去に用いるピペリジンで分解するため、固相合成後にチオエステル結合を形成させる巧みな方法である。我々は転位素子としてN-アルキルシステイン(NAC)を用いるNAC法を開発している³⁾。

3. native chemical ligation (NCL) 法によるインターフェロン-βの合成

インターフェロン-β (IFN-β) は抗がん活性、抗ウイルス活性を持つサイトカインである。二つのサブタイプのうち、1aには糖鎖があるが、1bにはない。1aの方が活性が高く、また非還元末端にシアル酸があると血中安定性が高い。

均一な糖鎖を持つIFN-βの医薬応用を目指してIFN-β-1aの化学合成が報告されている³⁾。この合成では図1Aルート1の方法が用いられた。また、セグメント縮合は、図2

大阪大学蛋白質研究所蛋白質有機化学研究室 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2)

Synthetic method of glycoproteins for their functional studies

Hironobu Hojo (3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

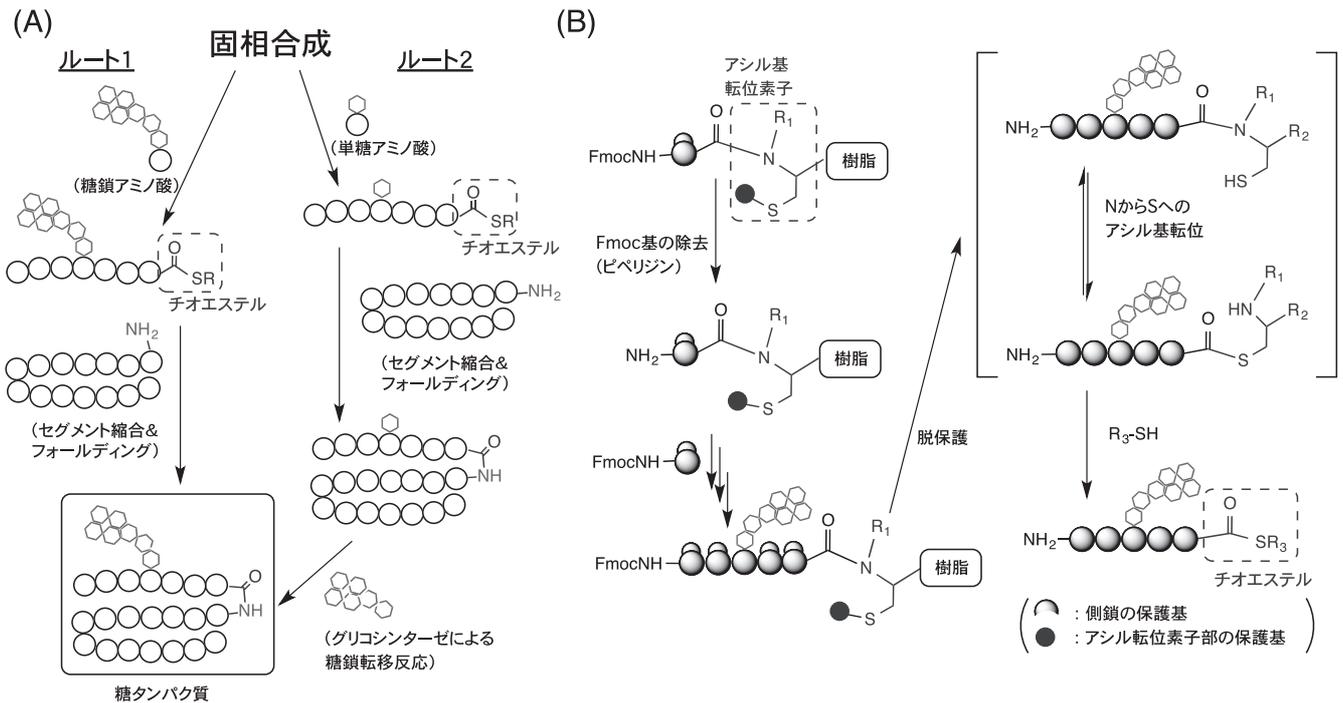


図1 糖タンパク質とFmoc法による糖ペプチドチオエステルの合成ルート

(A) 糖タンパク質の合成ルート。(B) 糖タンパク質合成の鍵化合物ペプチドチオエステルの合成ルート。R₁~R₃は適切なアルキル基を表す。チオエステル結合は、Fmoc固相法の段階で用いられるピペリジンにより分解してしまう。このため、固相合成時はアシル基転位素子によりアミド結合でペプチドを保持し、合成終了後N-S転位によりチオエステルへと変換する。

AのNCL法⁴⁾により達成された。NCL法は、ペプチドチオエステルとCys残基をN末端に持つペプチドとのチオエステル交換、アシル転位を経て目的物を得る方法である。保護基不要の縮合法であり、タンパク質合成のスタンダードとして用いられている。

IFNの合成ルートを図2Bに示す。適切な位置にCys残基がないため、配列中のAlaをCysに変更してNCLを行った後Alaに変換するDawsonらの方法が用いられている^{5,6)}。NCL, Cys→Ala変換後、脱保護、フォールディングを経て目的物へと誘導された。得られたIFNは、 α ヘリックスに富むCDスペクトルを示し、また、シアル酸を持つIFNは、アシアロ体よりも強い抗腫瘍活性、血中安定性を持っていた。

4. NCL法によるサポシンCの合成

ペプチド鎖の構築時に大きな問題がなければ、20 kDa程度の糖タンパク質の合成は可能である^{3,7)}。一方脂質結合タンパク質等、疎水性の高いタンパク質は、分子量によらず化学合成が難しい。その主な原因は、固相合成、精製、縮合いずれの段階でもペプチドが難溶性になることにある。

サポシンCは、リソソーム内において、セラミド部分

に結合してスフィンゴ糖脂質の可溶化を促し、そのグリコシダーゼによる分解を補助する。サポシンCが欠損すると、グルコシルセラミドが細胞内に蓄積し重篤な神経疾患に至るため、その病態解明と治療法の開発が待たれている。そこで、筆者らは機能解析を目指して、均一な糖鎖を持つサポシンCの合成を行った⁸⁾。

ペプチド鎖を二つに分割してNCLの適用を試みたが、予備実験の結果、N末端側のチオエステルはきわめて溶解性が悪く、HPLCによる精製が困難であった。そこで、ペプチドの溶解性を向上させるアシルイソペプチド法⁹⁾の適用を試みた。この方法では、固相合成時、適切なSer/Thr残基においてペプチド鎖を側鎖水酸基に結合し、エステル結合を形成する。この構造が維持される酸性条件では、分子間での β シート構造形成が抑制されて溶解性が向上する。一方、イソペプチド結合は中性条件では速やかに通常のペプチド結合へと変換される。

サポシンCの合成ルートを図2Cに示す。NCL後にグリコシターゼ¹⁰⁾による糖鎖伸長を行うため、Asn²¹には還元末端糖であるGlcNAcを導入した。通常の合成によりN末端側34残基のチオエステルを合成したところ、前述のように難溶性のために精製できなかった。そこでAla²²-Thr²³にイソペプチド結合を導入してチオエステルを再合成したところ、溶解性は飛躍的に向上し、収率はイソペ

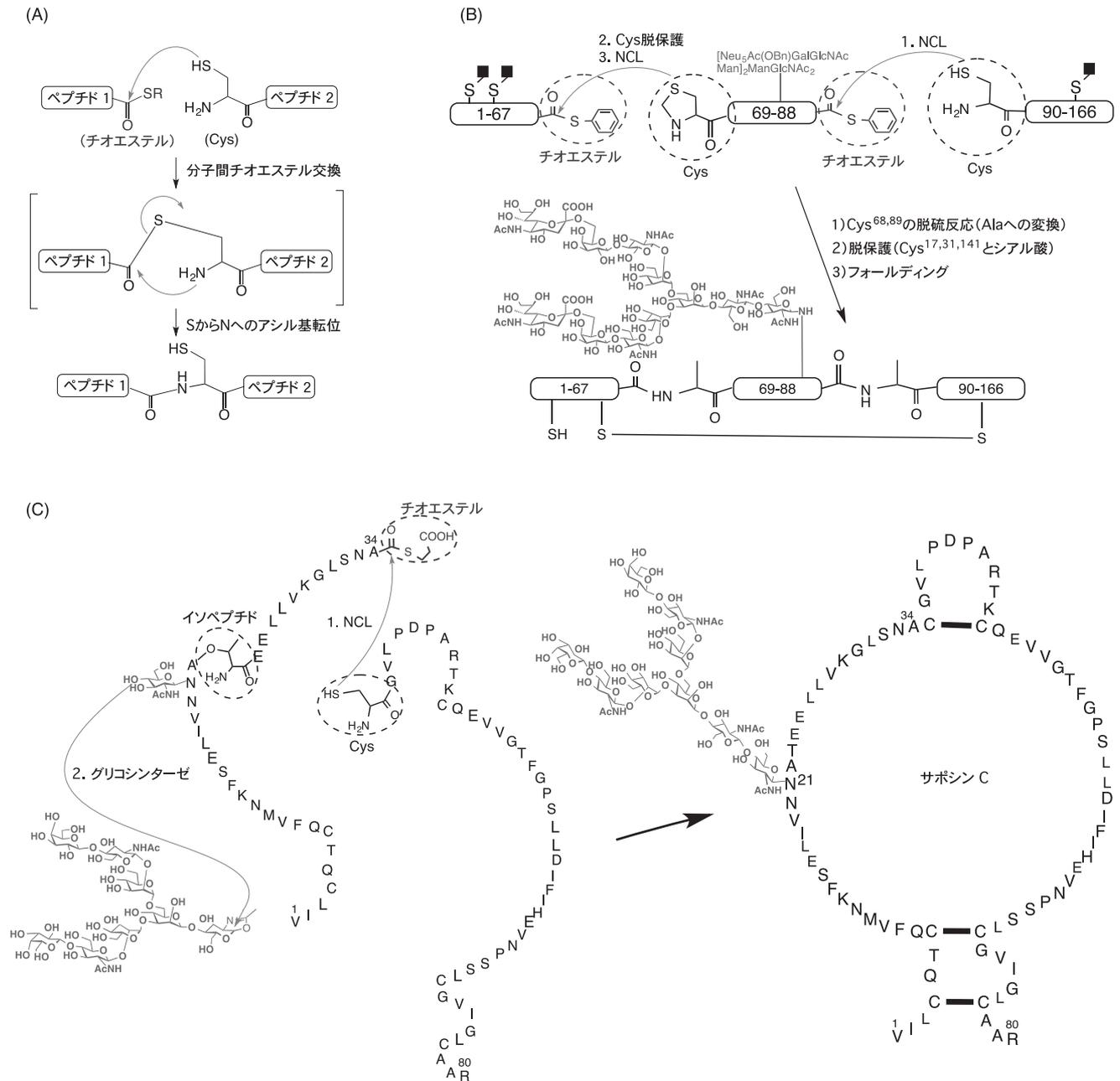


図2 native chemical ligation (NCL) 法による糖タンパク質の合成
 (A) NCL 法の概略. (B) IFN-β の合成ルート. (C) サポシン C の合成ルート.

チド結合導入前の 10 倍に達した. C 末端ペプチドとの NCL を行ったところ, イソペプチド結合がペプチド結合に変換されるとともに, 効率よく縮合反応が進行した. 保護基の除去とジスルフィド結合形成後, GlcNAc を持つサポシン C を得た. 次に別途化学合成した 8 糖を酵素により転移させ, 9 糖を持つサポシン C に誘導した.

9 糖付き, GlcNAc 付きサポシン C, コントロールとして合成した糖鎖を持たないサポシン C, いずれも α へリックスに富む CD スペクトルを示し, グルコシルセラミ

ダーゼによる基質の加水分解反応を 30 倍程度促進した. この活性は天然物の 2 倍以上にあたる. ただし糖鎖の有無による活性変化はみられなかった. 今後 *in vivo* での活性測定を行い, 糖鎖機能をさらに調べる予定である. 糖鎖を持つサポシン C は, 溶解と凍結乾燥を繰り返しても溶解性にあまり変化はなかったが, 糖鎖を持たないものは一度溶解して凍結乾燥すると, 以後ほとんど溶けなくなることから, 糖鎖が溶解性の向上に寄与していることは確かである.

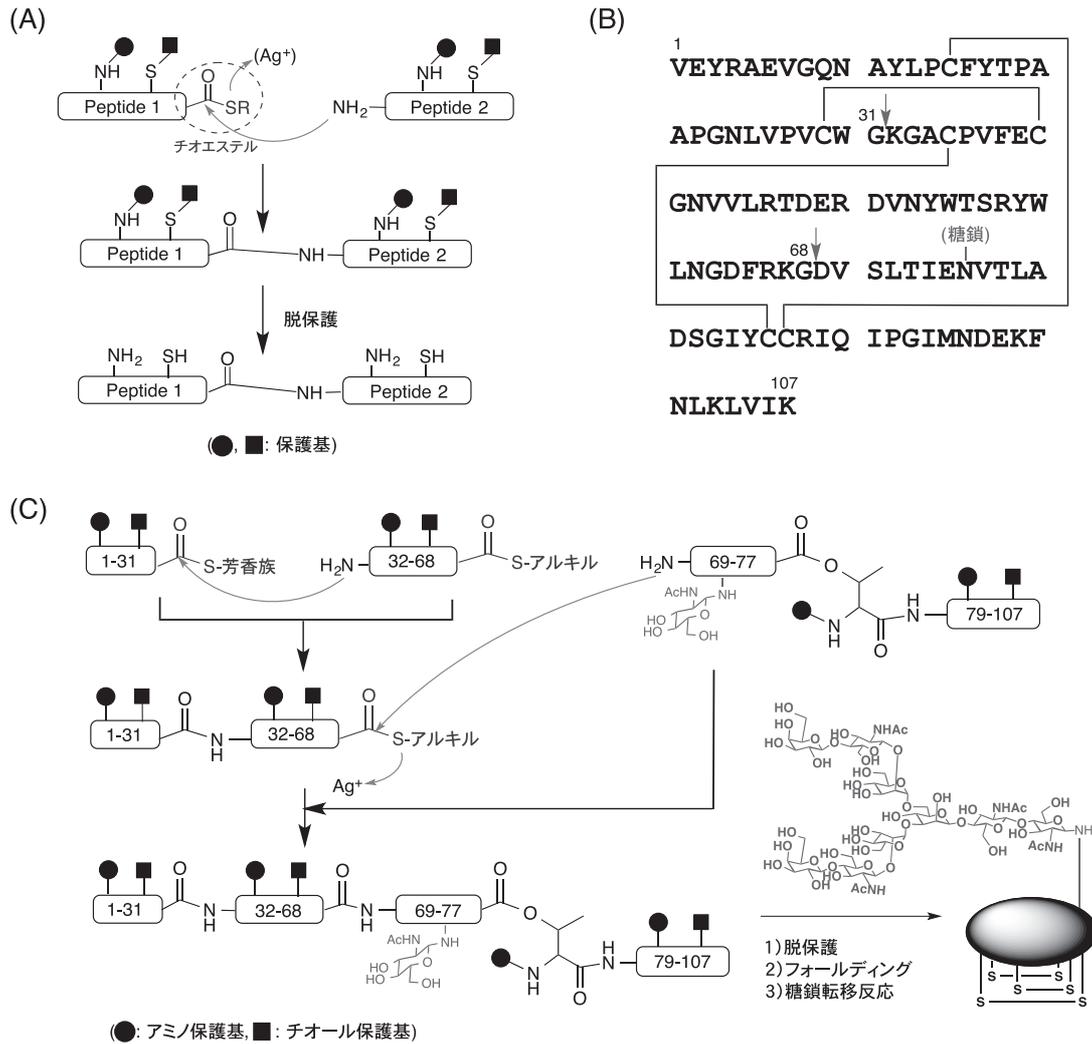


図 3 チオエステル法による TIM-3 Ig ドメインの合成

(A) チオエステル法の概略。 (B) Ig ドメインの構造。 ↓ はペプチドの分割位置を示す。 (C) Ig ドメインの合成ルート。

5. TIM-3 Ig ドメインの化学-酵素合成

T 細胞表面に存在する T cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3) の Ig ドメイン（ポリペプチド鎖：12 kDa, 図 3B）には 1 か所の N 結合型糖鎖が存在する。この糖鎖にガレクチン 9 が結合すると、その T 細胞の細胞死が誘導される。そこで、Ig ドメインとガレクチン 9 との複合体を解析し、細胞死のメカニズム解明に貢献するため、糖鎖を持つ Ig ドメインを合成した¹¹⁾。

この Ig ドメインには、適切な位置に Cys 残基がないため、チオエステル法（図 3A）¹²⁾ により縮合した。この方法では側鎖アミノ基とチオール基を保護したペプチドのチオエステル基を活性化し、他方のペプチドの末端アミノ基と反応させる。保護基の導入により、理論上でのアミノ酸残

基でも縮合できる方法である。

チオエステル法では、 Ag^+ によりアルキルチオエステルを活性化する。一方、芳香族チオエステルを用いると Ag^+ 非存在下で縮合可能である。そこで Ag^+ の有無による連続縮合法を開発し、Ig ドメインの合成に用いた（図 3C）。まず、図 3B の矢印でペプチド鎖を分割し、NAC 法²⁾ により N 末端（1-31）の芳香族チオエステルと、中央（32-68）のアルキルチオエステルを合成した。さらに、C 末端セグメント（69-107）には溶解性向上のため Thr⁷⁸ の位置にイソペプチド構造を導入した。N 末端と中間セグメントを Ag^+ 非存在下で縮合後、C 末端セグメントと Ag^+ を加えて続けて縮合したところ、効率よく Ig ドメインの全長ペプチドが得られた。脱保護、フォールディング、糖鎖転移を経て目的とする Ig ドメインを得た。

合成した Ig ドメインは β シート構造に富む CD スペク

トルを与え、Ig フォールドの形成が示された。また、ジスルフィド結合様式も図 3B のとおりであった。今後、ガレクチン 9 との複合体の結晶化を行い、その立体構造を解析する予定である。

6. おわりに

化学合成法の進展により、複雑な糖鎖を持った糖タンパク質が比較的短期間に合成可能になってきた。これらの均一な糖鎖を持つタンパク質は、糖鎖機能の解明に貢献するばかりでなく、医薬品開発も加速させるものと期待される。4 節で疎水性糖タンパク質の合成にふれたが、膜タンパク質等水系溶媒に難溶性のタンパク質の化学合成については、さらに検討が必要である。膜上には GPCR 等創薬ターゲットとなるタンパク質が多く存在している。その多くは糖タンパク質であり、これらの機能解明に貢献できるように、化学合成法のさらなる進展が期待される。

- 1) Mende, F. & Seitz, O. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 1232-1240.
- 2) Hojo, H., Onuma, Y., Akimoto, Y., Nakahara, Y., & Naka-

- hara, Y. (2007) *Tetrahedron Lett.*, 48, 25-28.
- 3) Sakamoto, I., Tezuka, K., Fukae, K., Ishii, K., Taduru, K., Maeda, M., Ouchi, M., Yoshida, K., Nambu, Y., Igarashi, J., Hayashi, N., Tsuji, T., & Kajihara, Y. (2012) *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 5428-5431.
- 4) Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I., & Kent, S.B.H. (1994) *Science*, 266, 776-779.
- 5) Yan, L.Z. & Dawson, P.E. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 526-533.
- 6) Wan, Q. & Danishefsky, S.J. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 9248-9252.
- 7) Hojo, H., Matsumoto, Y., Nakahara, Y., Ito, E., Suzuki, Y., Suzuki, M., Suzuki, A., & Nakahara, Y. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 13720-13725.
- 8) Hojo, H., Tanaka, H., Hagiwara, M., Asahina, Y., Ueki, A., Katayama, H., Nakahara, Y., Yoneshige, A., Matsuda, J., Ito, Y., & Nakahara, Y. (2012) *J. Org. Chem.*, 77, 9437-9446.
- 9) Sohma, Y., Sasaki, M., Hayashi, Y., Kimura, T., & Kiso, Y. (2004) *Chem. Commun.*, 124-125.
- 10) Umekawa, M., Higashiyama, T., Tanaka, T., Noguchi, M., Kobayashi, A., Shoda, S., Huang, W., Wang, L.X., Ashida, H., & Yamamoto, K. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, 1800, 1203-1209.
- 11) Asahina, Y., Kamitori, S., Takao, T., Nishi, N., & Hojo, H. (2013) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 9733-9737.
- 12) Hojo, H. & Aimoto, S. (1991) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 64, 111-117.

著者寸描

●北條裕信 (ほうじょう ひろのぶ)



大阪大学蛋白質研究所教授。博士 (理学)。
 ■略歴 1963 年長野県に生る。85 年大阪大学理学部卒業。87 年同大学院理学研究科博士課程前期課程修了。88 年大阪大学蛋白質研究所助手。94 年大阪市立大学工学部講師。98 年東海大学工学部助教授。2007 年同教授。13 年より現職。

■研究テーマと抱負 (糖)タンパク質の化学合成研究。有機合成の特長を生かして、生化学的な手法では困難な機能性タンパク質を合成し、有機化学的にタンパク質、修飾タンパク質の機能を解明したいと考えています。

■ウェブサイト <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/index.html>