

1. 研究課題名

「大分子糖蛋白質の極微細構造制御：20kDa分子の精密合成をめざして」

研究代表者：中原義昭

2. 研究実施の概要

蛋白質は大部分が糖鎖をもつ糖蛋白質として存在するが大分子であるために、その分子レベルでの糖およびペプチド部分の機能解明は困難である。本研究の目的は構造的に純粋な糖蛋白質およびプロテオグリカン標品を化学合成的な手段によって得る方法論を確立することにある。理化学研究所、東海大学工学部、鳥取大学教育学部でその課題を担当する。鳥取大グループは「プロテオグリカン分子の設計と合成」を担当し、他は理研グループ、東海大グループが行っている。それぞれ相補的な連繋のもと研究連絡、合成技術情報の交換を緊密にしプロジェクトの推進にあたっている。

3. 研究実施内容

(1) 糖鎖ユニット合成の効率化と糖蛋白質合成戦略の確立

1. 1. 新規マンノシルトリプトファンを含む複合糖質の合成

ヒトRNaseおよびCHO細胞用いてつくられたRecombinant IL12から新規に見いだされたC-結合型マンノシルトリプトファン残基を含む糖ペプチドの合成研究を行い、立体選択的なC-結合型マンノシドの合成法開発に成功した。さらに特異的な近傍のペプチド配列を有する糖ペプチドの合成を行った。

1. 2. アスパラギン結合型糖鎖5糖ユニットと糖タンパク部分構造の合成

アスパラギン結合型糖鎖を有する糖ペプチドの固相合成において本研究グループでは、従来よりベンジル基を水酸基の保護に用いる方法を基盤として進めてきた。アスパラギン結合型糖鎖5糖ユニットの量的確保を行い、HIVのgp120糖タンパク質に含まれるV3ループをターゲットとして下記の新規に開発したアリルリンカーを利用して固相合成を展開中である

1. 3. O-結合型糖鎖をもつ糖ペプチドBuilding Blockの合成

O-結合型糖鎖をもつ糖ペプチドBuilding Block合成について、昨年度はO-結合型コアクラス2に分類されるジシアリル6糖の合成に成功した。同化合物を大量に合成し糖ペプチドオリゴマー分子の固相合成に用いることは現段階では困難なので、本年度はそのモデルあるいは前駆物質として有用なコアクラス2の4糖性糖ペプチドBuilding Blockの効率的な合成を行った。シアル酸を含む6糖への変換は後に酵素的な手法で行うことも可能であると考えている。4糖性Building Blockの量的な確保の上で、活性型T細胞膜の糖タンパク質ロイコシアリンのムチン領域繰り返し構造の合成に用いる。

1.4. 固相合成用新規リンカーの開発

当研究チームでは新規なアリルエステル型リンカーおよびシリルエーテル型リンカーを新たに設計し、その有用性を追究している。このうちパラジウム触媒によって選択的な切断が可能なアリルリンカーは、弱酸で切断されるSieber Amide樹脂と組み合わせプロテオグリカン基本骨格をモデルとする糖ペプチド合成を行った。

一方、やはり当研究チームで新たに開発したシリルエーテル型リンカーはフルオリドリシスによって選択的な酸素-ケイ素結合が切断可能であり糖鎖やセリン、スレオニンなどアミノ酸の側鎖水酸基とエーテル結合をすることによってペプチド側鎖を樹脂に固定し、後に保護基を残したままペプチドを切り出すことができる。昨年度はO-結合型糖鎖が集積した糖タンパク質グリコホリンAの断片の合成に応用しこの新しい方法論が保護糖ペプチドの合成に大変に有効であることを報告した。本年度はその固相合成反応過程を詳しく検討する目的でヒトIL2のN末端糖ペプチドをモデルとしてN, C両方向へのカップリング効率を研究した。

1.5. 2量糖複合体の合成

膜結合型糖蛋白質であるグリコホリンAはその膜貫通部位に2量モチーフを有する。その2量の生物学的な役割解明と、そのような性質をもった比較的簡単な化合物の機能物質としての開発を目的として合成研究を行った。昨年度はグリコホリンA糖ペプチド断片の合成に必要なスレオニンおよびセリンと結合した3糖ユニットの合成を行ったが、本年度はモデル化合物も含め糖クラスター部の固相合成に適した樹脂、縮合剤などの反応条件を検討し、3糖鎖が3連続するグリコホリンAのN末端ペプチドの固相合成に成功した。一方膜貫通部22アミノ酸からなるペプチドを固相合成したが大変に難溶性でありクロマトグラフィーでの精製をさらに検討中である。

1.6. アミノ酸フルオリドを用いる糖ペプチドの合成

N-結合型糖ペプチド合成においてアスパラギンと糖鎖との結合に際しては、現在最もよく用いられる方法として1-アジドを還元してアミノグリコシドとして活性化したアスパラギン酸と縮合させる方法である。この時アミノ基のエピメリ化を防ぐため活性化アスパラギン酸共存下でのアジド基の接触還元を実行することが有効である。本研究はアミノ酸フルオリドが新規かつ効率的な活性化アスパラギン酸であることを明かにした。

(2) プロテオグリカン分子の設計と合成

プロテオグリカン分子は一本のペプチド鎖のセリン残基から多くの直鎖状糖鎖（グリコサミノグリカン鎖：GAG）が枝状に配置された構造をしている。本研究の標的化合物は、コアペプチドに直鎖九糖が10本程度結合した20kDa

大分子である。本研究では、六糖繰り返し糖鎖部分を別途合成し、還元末端部分（三糖セリルグリシン）に結合させ、オリゴマー化する合成戦略を採用している。平成11年度はGAG還元末端部分を量的に確保しつつ合成した。また、還元末端三糖の合成途上、リン酸・硫酸基を位置特異的に有するオリゴ糖セリンの合成も行った。これら酸性基はGAG糖鎖伸長機構に影響を与えると考えられており、酵素的糖鎖伸長実験に用いられた。

また、コンドロイチン硫酸の機能性の抽出と長鎖化を指向した、新規直鎖型コンドロイチン硫酸クラスター糖鎖の合成を並行して行った。これはGAG繰り返し二糖リガンド間をC8炭化水素で連結した疑似糖鎖である。平成11年度は、疑似六糖および疑似十糖クラスターの合成を完了した。また、これら非天然型疑似糖鎖が糖転移酵素の受容体として認識されることが、酵素的糖鎖伸長実験（共同研究）により確認された。

(4) 生物活性糖蛋白質の全合成

15 KDa糖タンパク質であるヒトIL2およびEmmprinのうちのイムノグロブリンドメインを標的として合成を開始した。前者は4つのブロックに分けそれぞれをBoc法によって合成した。N-末端側のブロックにはO-結合型糖鎖が存在するが、2糖性ユニットを用いて合成を行った。C-末端側の2つのブロックについてはカップリングを行ったが、溶解性に問題があり収率の向上には更に検討を要する。一方後者は2つのブロックに分け、糖鎖の無いものについては合成を完了した。N-結合型2糖鎖を導入してその活性を比較検討する予定で研究を進めている。

(5) 非天然型糖鎖および改変糖ペプチドの合成

非天然型糖鎖複合体の合成研究

アスパラギン結合型糖鎖の共通コア構造部分の構造の必然性あるいは特異性を探るためのサンプル調製を目的としてキトビオース部分のグリコシド結合異性体を合成した。マンノースとの結合では非選択的に α 、 β 両異性体を得られるので、組み合わせて4種の異性体を合成した。今後は立体配座解析を行って天然型糖鎖の構造の必然性など追究する。

4. 今後の課題

3年を経過しペプチド固相合成に実践的な知識を得、新規なリンカー類を開発、これを駆使して糖ペプチドの固相合成に成果が得られた。現在、大分子の糖タンパク合成に用いる糖アミノ酸ユニットの合成に全力をあげて取り組んでおり、15-20 KDaの分子の全合成方法論の確立にむけて研究を推進する。糖タンパク糖鎖合成の効率化研究とプロテオグリカン鎖の大分子化についての課題も連動しつつ進める。