

「単一分子・原子レベルの反応制御」  
平成8年度採択研究代表者

中原 義昭  
(東海大学工学部 教授)

## 「大分子糖蛋白質の極微細構造制御」

### 1. 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、鳥取大学教育地域科学部でその課題を担当する。

### 2. 研究実施内容

平成10年度は(1)–(3)および(6)について研究を実施した。

- (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
- (2) プロテオグリカン分子の設計と合成
- (3) 計算化学的手法による合成デザイン
- (4) 酵素化学的手法の活用
- (5) 生物活性糖蛋白質の全合成
- (6) 非天然型糖鎖および改変糖ペプチドの合成

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。

(1) について、

#### 1.1 新規アスパラギン結合型糖鎖の合成

理研グループではアスパラギン結合型糖鎖の共通コア構造に含まれ、従来その合成が困難であるとされてきた $\beta$ -マンノシドを独自に開発した分子内アグリコン転移反応を用いて高立体選択的に得ることに成功しているが、さらに複雑な基質での適用と効率化を求め研究を行った。最近その構造が明らかになった新規アスパラギン結合型糖鎖母核7糖構造を標的としてその全合成に成功した。

#### 1.2 水酸基無保護のアスパラギン結合型糖鎖5糖ユニットの合成

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。最終脱保護の過程は接触水素化によって行った。しかしながらこの工程は完全脱ベンジルに至るまでかなりの反応時間を要することも確認された。糖鎖が複数存在するときなどその反応終点の見極めには困難が予測される。そこで水酸基無保護のまま固相合成を展開する目的でアスパラギン結合型糖鎖5糖ユニットを合成した。このことにより脱保護工程を簡略化出来るものと期待される。さらに無保護ユニットの取り扱いの難易を調べるのが肝心である。アスパラギン残基のアミノ基のみをFmoc基で保護した誘導体を合成した。この化合物を用い、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、特にシアル酸をもつものは長い合成ステップが必要である。昨年に引き続き O-結合型コアクラス2に分類されるジシアリル6糖の合成を行い、官能基が全て保護された誘導体の合成に成功した。この化合物はさらに大きな糖ペプチドオリゴマー分子の液相あるいは固相でのいずれの合成にも有用な糖ペプチド Building Block となるものである。

### 1.4 固相合成用新規リンカーの開発

糖ペプチドのブロック縮合による高分子化を行うには、そのブロックとなるペプチドおよび糖ペプチド中間体合成の効率化がのぞまれる。中間体となる糖ペプチドオリゴマーを保護したままで切り出すためには温和な切り出し条件の確立、あるいは従来ペプチド化学で確立してきた方法論とは異なる化学の導入が必要と思われる。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、その有用性を確かめた。このうちアリルリンカーはパラジウム触媒によって選択的なエステル結合の切断を意図したもので、温和な条件で切り出し可能な市販のクロロトリチル型リンカーと組み合わせることにより樹脂からの切り出しポイントを二箇所導入することができる。固相合成した糖ペプチドをブロック合成の際のカルボキシル成分およびアミノ成分いずれにも振り分けられるよう工夫した。このアリルリンカーはクロロトリチル型リンカーとの組み合わせばかりでなく、他のアミノ型樹脂とも結合可能でありさまざまな展開が期待できる。昨年度はアリルリンカー部分および各種アミノ酸へのアリルエステル化、そして短鎖のペプチドオリゴマーをモデル化合物とする合成研究を行いアリルエステル型リンカーが期待通りの性能を有していることを確認したが、本年度は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に着手した。

一方、シリルエーテル型リンカーは糖鎖やセリン、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、ペプチド鎖を固相合成した後にフルオリドリシスによって保護基を残したままペプチドを

切り出すことができるよう設計したものである。さらにペプチド鎖は N,C 端いずれの方向へも伸長可能である。昨年度はこの新しいリンカーの合成とそれを用いた N 末端方向への鎖伸長を基盤とする糖ペプチドフラグメントの合成に成功した。本年度は固相に結合したアミノ酸アシルエステルをパラジウム触媒で切断してカルボン酸としそれとペプチドアミンあるいは 2 糖セリン複合体アミンとを反応させて同様の効率で固相合成が可能であることを確認した。さらに糖水酸基をシリルエーテルとして固定した場合の固相合成として 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れに成功した。

#### 1.5 2 量化糖複合体の合成

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 量化モチーフを有する。その 2 量化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。昨年度は単純化した 2 量化モチーフに糖鎖を結合したネオ糖ペプチドを固相合成法によって合成し、その電気泳動で 2 量化を観測したので、本年度はより天然のグリコホリン A に近い糖ペプチド断片の合成に着手した。シアル酸を含む 3 糖をクラスターとして含有する N-末端側の糖ペプチドと難溶性の膜貫通部オリゴペプチドをいかにブロック合成で結合させるかが課題である。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い、合成工程の再検討とともにサンプルの量的確保を得た。引き続き膜貫通部ペプチドの固相合成を行っている。

(2) について、

##### 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。平成 10 年度は 9 年度に行った繰り返し糖鎖部分の合成に引き続き、大分子合成の基礎的検討事項として GAG 還元末端部分の合成を検討した。

還元末端 GAG の一本鎖としては九糖程度が現時点の技術で伸長可能な長さであり、これらの十数本をペプチド鎖に結合させた約 20 KDa 分子が標的化合物である。本研究では、合成戦略として六糖以上の繰り返し糖鎖部分を別途合成し、還元末端三糖に結合する方法を採用している。平成 10 年度は、主に還元末端三糖セリンの合成を行った。従来の GAG の糖-ペプチド間の縮合は、糖鎖骨格完成後にこれを供与体としてセリン水酸基と縮合しているが、縮合反応における貴重な糖供与体のロスは無視できない。そこで、還元側であるキシロシルセリンへの逐次合成戦略を選択することとした。この経路では供与体が単糖であるため、同じ縮合収率であってもオリゴ糖供与体まで誘導するロスは回避できる。このようにして三糖セリン受容体を効率的に合成することができた。一方、GAG 糖鎖仕分け機構には共通

四糖上のリン酸、硫酸基が影響を与えられている。還元末端三糖セリンの合成途上、これら酸性基を位置特異的に有する単糖及び二糖セリンの合成も行った。

還元末端 3 番目と 4 番目の糖残基間の縮合は九糖合成上のポイントである。この反応条件の検討と、還元末端 5 番目の糖転移酵素検索に用いるモノクロナル抗体の作成のため、2-アミノエチルガラクトシドとグルクロン酸供与体の縮合を行った。反応は立体選択的に進行し、今後の縮合の問題点が解決できた。また、完成糖鎖をビオチン化、続いてストレプトアビジン複合体に誘導した。これを用いてモノクロナル抗体を作成中である。

さらに、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ている。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。これまでに最小クラスター単位（四糖）の合成を完了した。非天然型ではあるが、大分子合成を指向した場合その合成は比較的容易であり、疑似糖鎖の伸長の検討を進めている。このようなクラスター分子に、天然物に匹敵するかそれ以上の生理活性を期待している。(3) について、

#### 計算化学的手法による合成デザイン

大分子を対象として合成中間体のデザインに使用可能な分子模型を計算機上で再現することを目的とし、原子を剛体球として取り扱う近似法プログラムの開発をおこなった。化学結合長を変化させず回転のみを許容した 2 面角系のモデルを採用した。作成されたプログラムは分子一般の 2 面角系剛体球モデルの計算、分子力学、分子動力学に適用可能なデータ構造を出力する。前年度までに完了したデータ構造作成部分の汎用性を高めるため PC (パーソナルコンピュータ) への移植を検討し、部分的には成功を納めた。WS (ワークステーション) のコンパイラと比べ PC 用のコンパイラは融通性に難があるため、実行を実現するためにはさらなる検討が必要である。本研究は巨大分子を指向しているので、計算速度に関しては可能なかぎり上げておくことが望ましい。この観点に立って、計算部分に関してはスーパーコンピュータへの移植を試みた結果、WS に比べ 50 倍ほどの計算速度の獲得した。さらにスーパーコンピュータのハードの性格を考慮した書き換え (ベクトル化) をおこなった結果、WS の 500 倍の計算速度を実現できた。

(6) について

#### 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  $\alpha$ 、 $\beta$  両異性体を得る方法が知られているので、組み合わせて 4 種の異性体を合成する予定である。さらにこれらの糖鎖

は生合成研究のプロープとして活用することを考えている。本年度は2-アジドグルコース誘導体を用いてグリコシル化をすることでキトビオース部分 $\alpha$ 異性体を選択的に得ることに成功した。一方、マンノース $\alpha$ -グリコシド異性体のものは5糖コア構造異性体、さらにアスパラギンとの結合に成功した。

### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Z.-W. Guo, Y. Ito, Y. Nakahara, and T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* 306 (1998) 539-544.
- S. Ando, J. Aikawa, Y. Nakahara, and T. Ogawa, *J. Carbohydr. Chem.*, 17 (1998) 633-645.
- A. Dan, M. Lergenmüller, M. Amano, Y. Nakahara, T. Ogawa, and Y. Ito, *Chemistry-A Euro. J.*, 4 (1998) 2182-2190.
- Y. Nakahara, Y. Nakahara, Y. Ito, and T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, 309 (1998) 287-296.
- Y. Ito, Y. Ohnishi, T. Ogawa, and Y. Nakahara, *SYNLETT*, (1998) 1102-1104.
- K. Nakamura, N. Hanai, M. Kanno, A. Kobayashi, Y. Ohnishi, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.*, 40 (1999) 515-518.
- L. Singh, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.*, 40 (1999) 3769-3772.

他1件