

「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)

「大分子糖蛋白質の超微細構造制御」

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高分子であるために、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。

2. 研究実施内容

2.1 糖鎖合成の効率化研究

2.1.1 高分子担体上での糖鎖合成のためのリンカー開発

固相合成法は核酸およびペプチド化学の分野では既に確立された効率的なオリゴマー合成手段であるが、糖鎖の合成にはいくつかの未解決な問題が存在する。固相合成した化合物を担体から効率的に切断するためにペプチド化学ではいくつかのリンカーが開発されているが糖鎖の合成の条件すなわちグリコシル化反応の酸性的な条件下で安定に使える、かつ合成した糖鎖を損なうことなく担体から切断できるものは殆ど知られていない。この要請に適合する新たなリンカーの開発を行った。Wangタイプのリンカーにニトロ基を導入することでグリコシル化反応で用いるルイス酸に対して安定化を図り、ポリエチレングリコール(平均分子量5,000)やMerrifield樹脂を高分子担体とする糖鎖合成を展開し、有効なリンカーであることを確立した。

2.1.2 高分子担体上での糖鎖合成反応追跡法の開発

高分子担体上での糖鎖合成はオリゴ糖合成の迅速化に有効であるが、各段階の反応追跡は困難である。その一つの解決手段として低分子量ポリエチレングリコール(平均分子量500程度)上に糖受容体を担持し、クロロアセチル基を水酸基の保護基として含む糖供与体を用いるグリコシル化反応を設計した。縮合反応の進行はMALDI-TOF MSで観測される。担体を構成するエチレングリコールユニットの特異な正規分布に着目してそのマス値の推移から判断が可能であることを見いだした。一方この合成では糖鎖伸長のためその前段階としてクロロアセチルで保護された水酸基の選択的保護が設計されているがクロロアセチル基をp-ニト

ロベンジルピリジンによる呈色反応によってモニターすることに成功した。

2.1.3 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として、我々はすでにO-結合型コアクラス2に分類されるジシアリル6糖の合成に成功しているが、その大量確保と糖ペプチド固相合成に展開することが現段階では困難なので、昨年度に引き続きその前駆物質である4糖性糖ペプチドBuilding Blockの合成を行って、二つのルートでの合成に成功した。これらは活性型白血球膜糖タンパク質ロイコシアリンをモデルとする糖ペプチドの固相合成に利用する。

2.1.4 N-結合型糖たんぱく質7糖鎖ユニットの合成

N-結合型糖鎖を含む糖ペプチドを固相合成するために必要となるBuilding Blockとしてアスパラギンに7糖鎖が結合したユニットを合成した。これまでの研究成果を考慮すると糖鎖水酸基の保護を無くして固相合成することで効率化を図ることが可能であると思われる。そこで従来法にしたがって合成したN-結合型糖鎖を変換して水酸基の保護を無くしたユニットとして合成した。この化合物はヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを標的とする合成研究に用いる。

2.2 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から、セリン残基にO-グリコシド結合した多数の直鎖状糖鎖(グリコサミノグリカン: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GAG9糖が10本程度結合した20kDa大分子である。標的化合物の合成戦略としては、非還元側くり返し糖鎖(6糖)を別途合成し、これを還元末端3等に結合し、得られる9糖セリルグリシンをペプチド部分でオリゴマー化する経路を採用した。本年度はGAGの一種であるコンドロイチン9糖の合成を行った。標的化合物を効率的に合成するためには、現段階では糖間の縮合が隘路となる。この問題点を解決するため、今後は2糖単位での還元側への逐次縮合や保護基の選択を行い、縮合収率の向上を目指す。

2.3 生物活性糖蛋白質の全合成研究

2.3.1 hCGの合成研究

ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)は代表的な糖タンパク質であり妊娠の維持に関係していることから良く研究されてきた。糖鎖を除いたβ-hCGは受容体との結合性は失わないもののアデニル酸シクラーゼの活性化ができなくなることが知られている。hCGにはα、βサブユニットがあり合わせて4本のN-結合型糖鎖と4本のO-結合型を有する。詳細な糖鎖の生物学的機能については不明であるが合成化学の対象として興味深い。本研究はその全合成を目指しているが、本年度はβサブユニットのN-結合型糖鎖を含む23-36番目と、O-結合型糖鎖を有する128-145番目のセグメントの固相合成を行った。いずれの糖鎖についても2糖鎖性の

ユニットを導入することとし、基本的に糖鎖水酸基は無保護で行う方法を開拓することとした。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

印刷中であったもの

A. Ishii, H. Hojo, A. Kobayashi, K.Nakamura, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Tetrahedron*, 56(2000)6235-6243.

Y. Nakahara, S. Ando, M. Itakura, N. Kumabe, H. Hojo, Y. Ito, and Y. Nakahata, *Tetrahedron Letters*, 41(2000)6489-6493.

本年度提出リスト

S. Manabe, Y. Nakahara, and Y. Ito, *Synlett*, 1241-1244(2000)

Y.Ohnishi, H. Ando, T. Kawai, Y, Nakahara, and Y. Ito, *Carbohydr. Res.*, 328 (2000)263-276.

S. Ando, Y, Nakahara, Y. Ito, T. Ogawa, and Y, Nakahara, *Carbohydr. Res.*, 329 (2000)773-780.

M. Takatani, T. Nakama, S. Manabe, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y, Nakahara, *Glycoconj. J.*, 17(2000)361-375

Y, Nakahara, S. Ando, Y. Ito, H. Hojo, and Y, Nakahara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(2000)1358-1368

H. Hojo, J. Watabe, Y. Nakahara, Y. Ito, K. Nabeshima, and B. P. Toole, *Tetrahedron Lett.*, 42(2001)3001-3004

Y. Ito, H. Ando, M. Wada, T. Kawai, Y. Ohnishi, and Y, Nakahara, *Tetrahedron*, 57(2001)4123-4132

H. Ando, S. Manabe, Y. Nakahara, and Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.*, 123(2001)3848-3849.

J. Tamura and J. Nishihara, *J. Org. Chem.*, 66(2001)3074-3083.

J. Tamura H. Urashima, K. Tsuchida, H. Kitagawa, and K. Sugahara, *Carbohydr. Res.*, 332(2001)41-51.