

東海大学工学部 教授

中原 義昭

「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」

1. 研究実施の概要

天然物全合成研究は従来は比較的低分子についてその骨格形成法や立体化学の制御法などを課題として有機化学の発展に寄与してきた。そしてそれは新規な反応試薬の開発や、微量物質の構造解析法発展をもたらした。一方、新しい医薬リード開拓をめざす興味は海産毒など複雑な構造を持ち取り扱いの難しい天然物をも対象として探索することとなりそれらの全合成研究はさらなる新技術開発を要求するところとなった。本研究課題でとりあげる糖蛋白質はやはりその構造の複雑さのゆえ化学合成分野においては未開拓の研究対象である。蛋白質は大部分が糖鎖をもつ糖蛋白質として存在し、糖鎖には蛋白質の構造維持のみならず認識シグナルとしての機能が付与されている。糖蛋白質はホルモン、免疫グロブリン、サイトカイン、レクチンなど生命現象の重要な場面に登場するが大きな分子であるために、化学的手段による精密合成はいまだ達成されていない。糖鎖を含めて機能がようやく理解されようという今、化学構造的に純粋な糖蛋白質サンプルは生物現象の追究とその制御法確立のため必須である。この研究の目的は、従来別々に発展してきた蛋白質化学と糖鎖化学の技術を融合調和し糖蛋白質や類縁のプロテオグリカン精密合成する方法を確立することにある。目的達成には有機化学に酵素化学など可能な知識と技術を結集することが必要であり、新発想の技術開発も望まれる。近年のバイオテクノロジーの発展は多くの蛋白質が遺伝子操作技術によって生物工学的手法で合成できることを証明してきた。しかしながら、翻訳後修飾によって導かれる糖蛋白質は現在の生物学的技術では容易には得られない。本研究チームでは従来より糖蛋白質や糖脂質など複合糖質の糖鎖の生物学的機能に着目しその全合成研究で実績をあげてきた。それは、多くの水酸基を有し本来親水性であった糖残基を有機溶媒中で取り扱えるよう疎水性保護基を導入し、位置および立体選択的にグリコシド結合を形成して糖鎖を組み立てるという技術を高度化、先鋭化したものであって、新規な保護基やグリコシル化試薬の開発を重要課題とする。一方、合成した糖鎖を実際に分子レベルの研究に用いるためには糖鎖のみでなくフルサイズの複合糖質分子として提供可能とする必要もある。糖脂質の中心をなすスフィンゴ糖脂質は分子量1000-2000程度の比較的低分子であってそれらの化学合成法がほぼ確立しつつあるのに対し、糖蛋白質は小さなものでも分子量がその10倍以上あり精密な有機化学的手法による全合成はほとんどなされていなかった。実際に糖蛋白質の精密合成が可能となればその機能を制御したり任意の構造を人工的に導入することもできる。このような背景と展開の目標をもって本研究チームでは表記のタイトルのもとに研究計画を作成し、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) 生物活性糖蛋白質の全合成、4) 非天然型糖鎖および改変糖ペプチドの合成、をテーマとして研究を行った。テーマはそれぞれに連携しているが、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は全体の中心となるものであって糖蛋白質糖鎖合成および糖ペプチドの固相合成の新しい方法論の開発研究を行った。糖鎖合成については、① 従来より合成が困難であるとされていた β -マンノシドを含むアスパラギン結合型糖鎖誘導

体を当研究チームで開発した新規分子内アグリコン転移反応を利用して立体選択的に合成することを可能とした。これにより複合型糖鎖構造の典型であるシアル酸含有 11 糖の合成およびアスパラギン結合型糖鎖コア構造に新規に見つげだされた GlcNAc- β 1 $\rightarrow$ 2Man 結合を持つ 7 糖鎖の合成に初めて成功した。さらに分子内アグリコン転移反応を効率化するための必須な構造の研究にも成果を得た。② T リンパ球の活性化や免疫不全疾患に伴って T 細胞表層蛋白質ロイコシアリン糖鎖の構造変化として現れるコア 2 型シアル酸含有 O-結合型 6 糖をもつセリンユニットの合成に初めて成功した。③ ヒト RNase や recombinant IL12 より発見されたマンノシルトリプトファンは蛋白質上のトリプトファン残基がマンノースにより C-グリコシド化されたユニークな構造のものでありその立体選択的な化学合成ルートを開発した。④ 固相上で合成される糖ペプチドブロックを温和な条件で切断することを目的としてパラジウム触媒で切断可能な新規アリルエステル型リンカーを開発した。プロテオグリカンの幹の構造をなすキシロースが結合したセリグリシンをモデルとして合成に用いその有用性を示した。⑤ 糖ペプチド側鎖の水酸基を固相に固定するため新しいシリルエーテル型リンカーを開発した。これを用いることで同じ樹脂上でペプチド鎖を N-および C-末端方向へ伸長可能とするものである。グリコホリン A とヒトインターロイキン 2N-末端糖ペプチドの合成を示した。さらに C-末端の固相上での修飾が可能であることを利用してセグメント縮合の重要な中間体となる糖ペプチドチオエステルに良好な収率で変換することができた。⑥ 糖鎖の迅速合成のためポリエチレングリコールに固定して糖鎖伸長を図る手法を開発してきたが、合成した糖鎖を効率的に担体から切断するためのニトロベンジル型リンカーを開発した。⑦ ポリエチレングリコール担体上でのオリゴ糖合成を簡便にモニタリングするためクロロアセチル基とパラニトロベンジルピリジンによる発色反応と MALDI-TOF MS を用いる新しい方法を開発した。⑧ アミノ酸フルオリドを用いる糖ペプチドの新規な方法を開発した。

2) プロテオグリカン分子の設計と合成 プロテオグリカン巨大分子は、1 本のペプチド鎖のセリン残基から枝のように多くのグリコサミノグリカン糖鎖が配置している。これらを合成する際には、構成する糖とアミノ酸の各残基の縮合の順序が種々の保護基の選択や収率に影響を及ぼす。効率的な合成のためには、糖間の縮合に比べてペプチド鎖の伸長の方が比較的高い収率を期待できることから、糖鎖が結合した小断片ペプチドを合成単位とし、ペプチド間の縮合により大分子とする経路を選択した。① 3 糖糖鎖を 4 本有するヘキサデカペプチドの合成に成功した。② 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行った。③ 生合成を制御する還元末端オリゴ糖ペプチドの合成研究を行い、硫酸基とリン酸基を共にもつオリゴ糖の合成に成功した。④ ヘパリン系プロテオグリカンの生合成中間体であるベータグリカン 4 糖ヘキサペプチドの合成を行った。

3) 生物活性糖蛋白質の全合成 最終的に 20 kDa サイズの分子を全合成することを目的として研究を行ったが、先ず① ベンジル保護を用いる糖ペプチド固相合成によって N-結合型糖鎖をもつ CD52 を合成した。最後にベンジル基は接触還元によって除去した。② ヒト α 2HS 糖蛋白質の B 鎖を Fmoc 法によるペプチ

ド自動合成プログラムを用いて合成した。ここではシアル酸残基をふくむ O-結合型糖鎖の保護基としてベンジル基が使えること、システインを含むペプチド鎖のため接触還元ではなくベンジル基は強酸とソフト求核試薬の組み合わせで除去可能なことを見いだした。さらに③ グリコホリン A の N-末端シアル酸含有ペンタペプチドを固相合成し脱保護してこの方法論が有効であることを確認した。④ ガン細胞由来の EMMPRIN は matrix metalloproteinases 産生促進因子でありそのイムノグロブリン様ドメイン I には N-結合型糖鎖が含まれる。チオエステル法によるセグメント縮合によってキトビオースを含む 61 アミノ酸からなる糖ペプチドを合成した。合成したペプチドのみのサンプルは活性を示さないのに対し糖鎖が結合したものは顕著な活性を示し、糖鎖の重要性を分子レベルで研究するための格好の実験系を構築することができた。⑤ HIV 外被糖蛋白質 GP120 の V3 ループ構造をアリルリンカー上で固相合成した N-結合型 5 糖を含むセグメントを用いてセグメント縮合により合成した。糖鎖の切断なしに保護基のベンジル基の除去が可能な酸性条件の検討が重要課題である。⑥ O-結合型 3 糖を結合したヒトインターロイキン 2 (15kDa) の全合成を行った。4 つのセグメントに分割してそれぞれを固相合成した。難溶性の C-末端セグメント合成には backbone amide-protection 法を利用し、糖鎖を含む N-末端セグメントはアリルリンカーとシリルリンカーの組み合わせでチオエステルとした。⑦ ヒト絨毛性腺刺激ホルモン β サブユニット ($_{\text{hCG}}$: 24 kDa) を標的として合成研究を行った。これまでの方法とは異なって糖鎖無保護のままで固相合成、さらにセグメント縮合を試みた。

4) 非天然型糖鎖および改変糖ペプチドの合成 天然には見いだされていない配列を持った糖鎖サンプルは糖鎖の生物機能を探るための有効なプローブとなるものと考えられる。また難分解性の糖ペプチド誘導体合成にも発展可能である。N-結合型 5 糖をモデルとして Man-GlcNAc および GlcNAc-GlcNAc 部のグリコシド結合に関する立体異性体を合成した。天然型を含めて 4 種の 5 糖性化合物を得た。

2. 研究構想

真核細胞において蛋白質はその大部分が糖鎖の修飾をうけた糖蛋白質として存在する。糖鎖は蛋白質の維持と機能発現に構造的な寄与をしているものと考えられているが、さらに重要な点は糖鎖自身、あるいは糖鎖を含む蛋白質の構造の一部が情報分子となって生体の恒常性の制御や発生、分化など生命活動の主要なメカニズムに組み込まれていることである。しかしながら多種類の糖残基の組み合わせで構築されている糖鎖は構造の多様性ととも生体内では僅かに糖鎖構造の異なる類縁体の混合物として存在する。これは糖鎖のミクロ不均一性と呼ばれる。したがって生体から得られるサンプルを単一の構造のものにするためには高度な精製が要求され、また精製しても得られる量は極めて僅かであることから均一なサンプルを確保することは容易ではなく糖鎖の生物機能を分子レベルで解明する研究のさまたげとなっている。これまでに本研究チームはこのような状況にある糖蛋白質や糖脂質など複合糖質の多様な糖鎖構造に着目し、均一糖鎖分子を再構築しサンプルの

量的供給も期待できる有機合成化学的手法を確立すべく研究を行ってきた。一方、糖蛋白質ホルモンやサイトカインなどの生物機能は蛋白質自身の構造に依存し、糖鎖の結合は蛋白質の立体構造変化や輸送のためのシグナルであることも指摘されている。したがって糖鎖の重要性を議論するには蛋白質部分をも含めたサンプルを再構築して研究に供することが大切である。このような観点から糖鎖の合成法開発と呼応して、糖蛋白質フラグメントである糖ペプチドの化学合成が 1980 年代前半に独の Paulsen や Kunz らのグループを中心に活発化してきた。さらに糖ペプチドの効率的な合成を達成するためにペプチド合成では常套手段となった固相合成法を積極的に取り入れることが必要となり、1980 年代後半から現在にいたるまで糖ペプチドについても固相合成が主流となっている。糖蛋白質糖鎖はアスパラギンのアミド側鎖に N-グリコシド結合したアスパラギン結合型糖鎖とセリンやスレオニン側鎖の水酸基と O-グリコシド結合した O-結合型 (ムチン型) 糖鎖に大別される。前者の糖鎖は N-アセチル- β -D-グルコサミン残基、後者は N-アセチル- α -D-ガラクトサミン残基がアミノ酸部と結合しており、それぞれはさらに N-アセチル-D-グルコサミン、D-マンノース、D-ガラクトース、N-アセチル-D-ノイラミン酸 (シアル酸)、L-フコースなどの複数の糖残基と O-グリコシド結合して伸長し複雑な糖鎖を構成している。糖ペプチド合成では糖鎖をあらかじめアスパラギンやセリンに結合し適当な保護基を持つ糖アミノ酸ビルディングブロックとして調製し他の N-保護アミノ酸と同様に固相合成に組み込む方法が一般的かつ効率的である。しかし複雑な糖鎖はその合成に調製に手間がかかることからアスパラギン結合型と O-結合型糖鎖いずれの場合でも単糖か 2、3 糖サイズの糖鎖のものが合成法のデモンストレーションに用いられている。糖鎖機能の研究のためには生体内の糖鎖と同程度のサイズの糖鎖を結合できる技術として開発することが必要である。したがって糖鎖そのものを合成する方法にもさらなる効率化が要求される。さらにペプチド固相合成においては縮合の収率を高めるために過剰量の N-保護アミノ酸を用いる粉とが行われている。特に自動合成機では 4 当量以上を用いるプログラムが採用されている。多工程を要して合成される糖アミノ酸ビルディングブロックを成るべく無駄にしないことも検討課題のひとつとなる。ところで固相合成が有効なペプチドのサイズは 30 から 40 アミノ酸で構成されるものであってそれ以上の大きな糖蛋白質を合成対象とする場合は固相合成で作った糖ペプチドセグメント同士を溶液中でセグメント縮合して大きな分子に導くことが必要となる。ペプチド化学の分野ではチオエステル法が有効な方法として 100 アミノ酸残基以上からなる蛋白質の化学合成のために開発されてきた。糖蛋白質の合成にも同様の戦略が可能であると思われるが、本研究をスタートした時点ではそのような研究の報告例はなかった。

このような背景と糖蛋白質の糖鎖工学的展開の重要性に着目して表記タイトルのもとにこの未開拓分野の研究を計画した。糖蛋白質化学合成を可能とするためには糖鎖に適した化学とペプチド化学を併用した技術が必要であるが、そのそれぞれは別箇に独自の効率性を求めて発展してきた経緯から互いに共用できない化学反応条件なども採用されている。

以下に本研究課題で取りあげ解決を目指している問題について述べる。

① 固相法によるペプチドオリゴマーの合成では合成したオリゴマーは一般的に強い酸性条件のもと支持担体より解放され、かつ殆どの側鎖保護基は同じ条件で切断可能となるよう設計されている。大変簡便な手法であるが酸性条件に弱いグリコシド結合を含む糖鎖が共存した場合、どの程度の酸条件まで糖鎖結合が耐えうるかについては明らかでない。特にセグメント縮合のために開発されたペプチドチオエステルは N-脱保護のため繰り返しトリフルオロ酢酸処理を用い樹脂からの切断にはフッ化水素を必要とする Boc 法でその合成法が開発されている。糖ペプチド合成には N-脱保護に弱塩基を用い樹脂からの切断にはトリフルオロ酢酸を使う Fmoc 法が有利であり専ら使われている。

② 糖鎖には多くの水酸基が含まれるが固相合成を展開する際には O-アシル化を避けるため水酸基は保護しておく方が良いと思われる。他の殆どの研究グループは、糖水酸基の保護基としてアセチル基を採用し合成の最終段階で脱アセチル化を行っている。その場合ナトリウムメトキシド、ヒドラジンなどの塩基でこれを実行しているが、強い塩基性条件下ではペプチド中で立体中心のエピメリ化やセリン、スレオニン残基側鎖の β 脱離などが懸念される。糖蛋白質ではアスパラギン結合型と O-結合型糖鎖いずれの糖鎖もその非還元末端にシアル酸残基を持つものが多く、その残基を含んだオリゴ糖部分構造たとえば SLeX などがシグナルとしての重要な役割を果たしている事実が知られている。しかしながらシアル酸にはカルボキシル基が存在しペプチド縮合反応時には副反応を避けるためエステルなどの誘導体としてこれを保護しておく必要がある。その脱保護には等量以上の塩基の存在が要求される可能性がある。最近、樹脂からの切断に用いるトリフルオロ酢酸の酸性で同時に切断可能なトリアルキルシリル基、*p*-メトキシベンジル基、イソプロピリデン基などの利用も報告されているが、これら比較的不安定な保護基を導入して糖鎖および糖アミノ酸ビルディングブロックを調製することにはかなりの制約が伴う。本研究チームでは糖鎖の合成に反応性の高いベンジル保護された糖を多く活用してきた。特にシアル酸グリコシドを合成するために開発した高度な α 立体選択的グリコシル化法はベンジル基による保護を基盤としている。通常ベンジル基は触媒を用いた水素化分解によって中性条件で脱離することができるがシステインやメチオニンなどのアミノ酸残基をふくむ糖ペプチドでは脱硫反応を招くおそれがある。

従って、糖蛋白質合成に使える既存の糖鎖保護基としてはアセチル基のようなアシル型保護基とベンジル基いずれも一長一短ありというところである。

一方、固相合成で用いる縮合剤の選択如何では N-選択的アシル化が期待され、糖鎖およびアミノ酸側鎖の水酸基の保護を無くして行うことも検討する必要がある。保護基の多いペプチドは脂溶性が増すためクロマト溶媒への溶解性に問題が生じることがある。保護基を少なくして中間体の糖ペプチドセグメントの精製を容易にすることが合成の効率上も重要である。

③ 糖ペプチドのセグメント縮合を目的とする場合、保護されたセグメントを固相合成して樹脂より切り出し、溶液中でそのカップリングを行うことになるが、樹脂上で効率的に保護糖ペプチドを合成し、また切断するためには樹脂の選択とともに適切なリンカーが必要である。最近のコンビナトリアルケミストリーの発展によって数多くのリンカーが工夫されているが、既知のリンカーは必ずしも糖ペプチド合成に適していないので新しくリンカーの開発を考慮する必要がある。

④ 自動化されたペプチドの固相合成では市販の N-保護アミノ酸を大過剰（～4 当量）に使用することで短時間に高収率の縮合を達成できるようプログラムされている。しかしながら合成した貴重な糖アミノ酸ビルディングブロックを同じように大過剰使用することはできない。反応に使われなかったビルディングブロックは再生可能であると思われるが複雑な混合物である反応液中から回収することは非能率的である。したがってなるべく少過剰量を用いての効率的な縮合が求められる。

⑤ 糖ペプチドをセグメント縮合によって完全なサイズの糖蛋白質分子に導くという合成はほとんどなされておらず、本研究の目標とするところであるが、セグメントが大きくなるにしたがい縮合の効率低下は予想に難くない。ペプチドのみでは成功しているペプチドチオエステル法あるいはシステインの特異的な反応性を基盤とした **native chemical ligation** 法を有効に取り入れることが重要であろう。ウナギカルシトニン（32 アミノ酸）への糖鎖導入や昆虫が産生する抗バクテリア物質ディプテリシン誘導体（82 アミノ酸）分子についてごく最近他のグループによってチオエステル法と **native chemical ligation** 法でそれぞれ合成の報告がなされた。カルシトニンではさらにエンド型糖加水分解酵素の逆反応を利用して天然由来のオリゴ糖を付加するという興味深い展開が示されている。また発現蛋白質にインティンを組み込んでプロテインスプライシングでチオエステルとし **native chemical ligation** 法に利用する遺伝子工学蛋白質工学併用の試みが最近報告されている。それを利用した蛋白質 C-末端への小さな糖ペプチドの導入が試みられている。いまのところシステイン残基の存在が必須であるが、大きな糖蛋白質合成へ利用の期待は大きい。

⑥ 糖鎖合成においては収斂的な戦略をとることでかなりの大きさの（例えば 25 糖）オリゴ糖も合成可能になった。しかしながら未だ完全には克服されていない合成上の問題がある。アスパラギン結合型にふくまれる β マンノシド結合は立体電子的に不利な結合であり、従来の糖供与体と糖受容体をグリコシル化反応では β 結合を優先的に得ることが困難であった。本研究チームで最近開発した分子内アグリコン転移反応を用いると高い立体選択性で β マンノシドが生成する。その収率向上、実用例の展開と以前にチャレンジして果たせなかった複合型 11 糖の全合成完成を目指す。

⑦ 線形のポリマーであるポリペプチドや DNA オリゴマーと異なり糖鎖は分岐構造をとること、糖残基同士をつなぐグリコシド結合に α β の立体異性が存在すること、さらにペプチド縮合やリン酸エステル縮合に比べてグリコシル化反応の収率が低いいため自動合成化ははるかに後れを取っている。ポリマーサポート上での糖鎖合成は 1990 年代半ば頃からカ

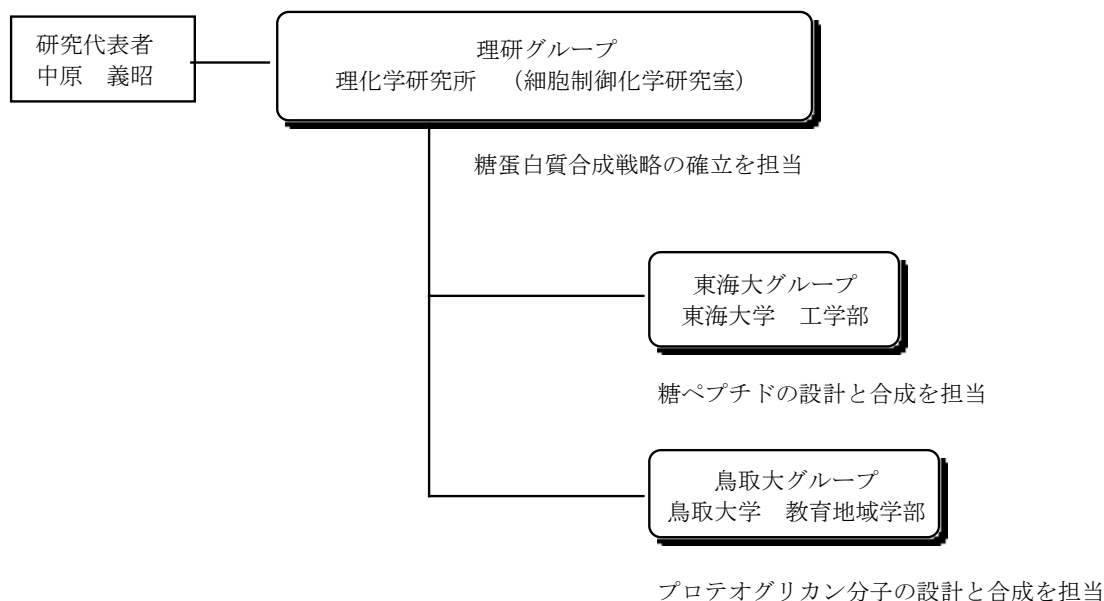
ナダ、アメリカ、ヨーロッパの研究者達そして本研究チームによって糖鎖の迅速合成をめざして研究が続けられている。グリコシド結合の立体化学が制御しやすい基質を用いての研究でその有用性が示されてきたが、多様な糖鎖構造構築を目的とするコンビナトリアルなライブラリー合成に有効であると期待されている。そのための技術開発はこれからの課題であり、糖鎖機能の解明という目的に沿う研究として取りあげる。

⑧ プロテオグリカンはその構造上の特徴から通常の糖蛋白質とは区別して取り扱われるがタンパク鎖上に無数の長大な酸性多糖鎖が展開する広義の糖蛋白質の一員である。その構造の大きさから全合成は現段階では不可能と考えられるが、細胞増殖や細胞接着の制御、血液凝固系への関与など基本的な生命現象との関わりが興味深い巨大分子群である。糖鎖部分の構造も複雑でようやく5～6糖断片程度の合成が可能となった状況である。ヘパリンのようにある特定の断片が生理活性を示すことが知られる例もあるが、巨大分子を構成する必然性あるいは構造上の制約など不明な事柄は多く、糖蛋白質の延長上にあるターゲットとして合成化学的アプローチを展開してする。

⑨ 糖蛋白質糖鎖は蛋白質ポリペプチド鎖を構成するアスパラギンおよびセリン／スレオニンと結合して多様な構造を表わしているが、単糖残基の種類やグリコシド結合の位置および立体化学は比較的限られたものから構成されている。それは糖鎖の生合成の過程において糖転移酵素の基質特異性が厳密に守られて進化してきたことによるものと考えられる。従って自然界では利用されていない結合の組み合わせや糖残基の修飾形態は無限に考えられる。糖鎖の機能については未だ不明な事柄が多いが、糖蛋白質の構造維持のための働きや部分糖鎖がシグナルとして認識されるのであれば本来とは異なる非天然型構造の糖鎖をもつサンプルを調製することで糖鎖機能を探る手段を提供できる。一方、糖分解酵素も非天然型糖鎖に対しては作用しづらいと考えられるので難分解性の糖蛋白質を創製することにつながる。

以上のような研究構想のもと研究計画を作成した。

3. 研究の実施体制



4. ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名 称	場 所	参加人数	概要
平成 9 年 11 月 14 日	理研シンポジウム 「生体分子の化学」	理化学研究所 大河内記念ホール	77 名	演者：伊藤幸成、山本憲二、佐々木 誠、林崎良英、相本三郎
平成 10 年 11 月 26 日	理研シンポジウム 第 2 回「生体分子の化学」	理化学研究所 大河内記念ホール	95 名	演者：中原義昭、三原久和、秋吉一 成、蟹江 治、関根光雄
平成 11 年 11 月 11 日	理研シンポジウム 第 3 回「生体分子の化学」	理化学研究所 大河内記念ホール	60 名	演者：安東純江、赤路健一、加藤晃 一、眞鍋史乃、北川裕之、田 村純一
平成 12 年 11 月 30 日	理研シンポジウム 第 4 回「生体分子の化学」	理化学研究所 統合支援施設大会議場	91 名	演者：中原義昭、梶原康宏、遠藤玉 夫、穴戸昌彦、二木史朗、北 條裕信
平成 13 年 11 月 2 日	理研シンポジウム 第 5 回「生体分子の化学」	理化学研究所 大河内記念ホール	96 名	演者：伊藤幸成、山子 茂、鍋島一 樹、比能 洋、湯浅英哉、杉 本直己

5. 主な研究成果

(1) 論文発表 (41 件)

- Z.-W. Guo, Y. Nakahara, Y. Nakahara, and T. Ogawa, "Fragment of the IL-8 Receptor Containing Two Vicinal Oligosaccharide Chains." *Carbohydr. Res.* 308 (1997) 373-377.
- Z.-W. Guo, Y. Nakahara, Y. Nakahara, and T. Ogawa, "Solid-phase Synthesis of CD52 Glycopeptide and an Efficient Route to Asn-Core Pentasaccharide Conjugate." *Bioorg. Med. Chem.*, 5 (1997) 1917-1924.
- Y. Nakahara, Y. Nakahara, Y. Ito, and T. Ogawa, "Total Synthesis of B-Chain of Human α 2HS Glycoprotein." *Tetrahedron Lett.*, 38 (1997) 7211-7214.
- Z.-W. Guo, Y. Ito, Y. Nakahara, and T. Ogawa, "Synthetic study on a novel Asn-linked core structure: synthesis of a pentasaccharide, α -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)-[α -D-Man-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-Man-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-GlcNAc $\rightarrow$ OMP." *Carbohydr. Res.* 306 (1998) 539-544.
- S. Ando, J. Aikawa, Y. Nakahara, and T. Ogawa, "Synthesis and properties of neoglycoconjugates carrying a dimerization motif of glycophorin A transmembrane domain." *J. Carbohydr. Chem.*, 17 (1998) 633-645.
- A. Dan, M. Lergenmüller, M. Amano, Y. Nakahara, T. Ogawa, and Y. Ito, "p-Methoxybenzylidene-tethered β -Mannosylation for Stereoselective Synthesis of Asparagine-Linked Glycan Chains." *Chemistry-A Euro. J.*, 4 (1998) 2182-2190.
- Y. Nakahara, Y. Nakahara, Y. Ito, and T. Ogawa, "Solid-phase synthesis of B-chain of human α 2HS glycoprotein." *Carbohydr. Res.*, 309 (1998) 287-296.
- H. Kitagawa, K. Tsutsumi, M. Ujikawa, F. Goto, J. Tamura, K. W. Neumann, T. Ogawa and K. Sugahara, "Regulation of Chondroitin Sulfate Biosynthesis by Specific Sulfation: Acceptor Specificity of Serum β -GalNAc Transferase Revealed by Structurally-defined Oligosaccharides." *Glycobiology*, 7 (1997) 531-537.
- H. Kitagawa, M. Ujikawa, K. Tsutsumi, J. Tamura, K.W. Neumann, T. Ogawa and K. Sugahara, "Characterization of Serum β -Glucuronyltransferase Involved in Chondroitin Sulfate Biosynthesis." *Glycobiology*, 7 (1997) 905-911.
- J. Tamura, K.W. Neumann, S. Kurono and T. Ogawa, "Synthetic Approach towards Sulfated Chondroitin Di-, Tri-and Tetrasaccharides Corresponding to the Repeating Unit." *Carbohydr. Res.*, 305 (1998) 43-63.
- H. Kitagawa, Y. Tone, J. Tamura, K.W. Neumann, T. Ogawa, S. Oka, T. Kawasaki and K. Sugahara, "Molecular Cloning and Expression of Glucuronyltransferase I Involved in the

- Biosynthesis of the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans.” *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 6615-6618.
- J. Tamura, Y. Miura and H.H. Freeze, “Complex Form Synthesis of β -GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal and α -GalNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal as Biotinylated 2-Aminoethyl Glycosides and the Streptavidin ation.” *J. Carbohydr. Chem.*, 18 (1999) 1-14.
- Y. Ito, Y. Ohnishi, T. Ogawa, and Y. Nakahara, “Highly Optimized b-Mannosylation via *p*-Methoxybenzyl Assisted Intramolecular Aglycon Delivery.” *Synlett*, (1998) 1102-1104.
- K. Nakamura, N. Hanai, M. Kanno, A. Kobayashi, Y. Ohnishi, Y. Ito, and Y. Nakahara, “Design and Synthesis of Silyl Ether-Based Linker for Solid-Phase Synthesis of Glycopeptides.” *Tetrahedron Lett.*, 40 (1999) 515-518.
- L. Singh, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara, “The First Total Synthesis of the Core Class II Disialylated Hexasaccharide as a Building Block for Glycopeptide Synthesis.” *Tetrahedron Lett.*, 40 (1999) 3769-3772.
- S. Nakanaka, H. Kitagawa, F. Goto, J. Tamura, K. Neumann, T. Ogawa, and K. Sugahara, “Involvement of the Core Protein in the First β -*N*-Acethylgalactosamine Transfer to the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region Tetrasaccharide and in the Subsequent Polymerization. The Critical Determining Step for Chondroitin Sulfate Biosynthesis.” *Biochem. J.*, 340 (1999) 353-357.
- J. Tamura and J. Nishihara, “Stereoselective Syntheses of Phosphorylated and Sulfated Glycosyl Serines in Glycosaminoglycan for Biological Probes.” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9 (1999) 1911-1914.
- K. Nakamura, A. Ishii, Y. Ito, and Y. Nakahara, “A Novel Silyl Linker: Motif for Side Chain Tethered Approach to Solid-Phase Glycopeptide Synthesis.” *Tetrahedron*, 55 (1999) 11253-11266.
- H. Tsuda, S. Yamada, H. Miyazono, K. Morikawa, K. Yoshida, F. Goto, J. Tamura, K.W. Neumann, T. Ogawa and K. Sugahara, “Substrate specificity studies of *Flavobacterium chondroitinase C* and *heparitinase* towards the glycosaminoglycan-protein linkage region-use of a sensitive analytical method developed by chromophore-labeling of linkage glycoserines using dimethylaminoazobenzenesulfonyl chloride.” *Eur. J. Biochem.*, 262 (1999)127-133.
- S. Manabe and Y. Ito, “Total Synthesis of Glyco-amino Acid Structure Motif: C2- α -L-C-Mannosylpyranosyl-L-tryptophan.” *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (1999) 9754-9755.

- Y. Ito, M. Gerz, and Y. Nakahara, "Amino Acid Fluoride For Glycopeptide Synthesis." *Tetrahedron Lett.*, 41 (2000) 1039-1042.
- L. Singh, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara, "An Efficient Access to Protected Disialylated Glycohexaosyl Threonine Present on the Leukosialin of Activated T-Lymphocytes." *Carbohydr. Res.* 325 (2000) 132-142.
- J. Seifert, M. Lergenmüller, and Y. Ito, "Synthesis of an α -(2,3)-Sialylated, Complex-Type Undecasaccharide." *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 531-534.
- H. Hojo and Y. Nakahara, "Recent progress in the solid-phase Synthesis of Glycopeptide." *Curr. Protein and Peptide Sci.* 1 (2000) 43-68.
- A. Ishii, H. Hojo, A. Kobayashi, K. Nakamura, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara, "A Facile Silyl Linker Strategy for the Solid-phase Synthesis of Protected Glycopeptide: Synthesis of an N-Terminal Fragment of IL-2 (1-10)." *Tetrahedron*, 56 (2000) 6235-6243.
- Y. Nakahara, S. Ando, M. Itakura, N. Kumabe, H. Hojo, Y. Ito, and Y. Nakahara, "Solid-phase synthesis of serglycin glycopeptide on a new allyl ester linker." *Tetrahedron Letters*, 41 (2000) 6489-6493.
- S. Manabe, Y. Nakahara, and Y. Ito, "Novel Nitro Wang Type Linker for Polymer Support Oligosaccharide Synthesis; Polymer Supported Acceptor." *Synlett*, 1241-1244 (2000).
- Y. Ohnishi, H. Ando, T. Kawai, Y. Nakahara, and Y. Ito, "Synthesis of a novel asparagine-linked heptasaccharide structure via *p*-methoxybenzyl-assisted β -mannosylation." *Carbohydr. Res.*, 328 (2000) 263-276.
- S. Ando, Y. Nakahara, Y. Ito, T. Ogawa, and Y. Nakahara, "Solid-phase synthesis of the glycopeptide of human glycophorin AM, bearing the consecutive sialyl-T antigen." *Carbohydr. Res.*, 329 (2000) 773-780.
- M. Takatani, T. Nakama, S. Manabe, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara, "Synthesis of N-Linked Pentasaccharides with Isomeric Glycosidic Linkage." *Glycoconj. J.*, 17 (2000) 361-375.
- Y. Nakahara, S. Ando, Y. Ito, H. Hojo, and Y. Nakahara, "New Allyl Ester Linker and Solid-phase Synthesis of Serglycin Core Region." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (2001) 1358-1368.
- H. Hojo, J. Watabe, Y. Nakahara, Y. Nakahara, Y. Ito, K. Nabeshima, and B.P. Toole, "Synthesis of the Extracellular Ig Domain I of Emmprin carrying a Chitobiose Unit." *Tetrahedron Lett.*, 42 (2001) 3001-3004.

- Y. Ito, H. Ando, M. Wada, T. Kawai, Y. Ohnishi, and Y. Nakahara, "On the Mechanism of *p*-Methoxybenzylidene Assisted Intramolecular Aglycon Delivery." *Tetrahedron*, 57 (2001) 4123-4132.
- H. Ando, S. Manabe, Y. Nakahara, and Y. Ito, "Tag-Reporter Strategy for Facile Oligosaccharide Synthesis on Polymer Support." *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 3848-3849.
- J. Tamura and J. Nishihara, "Synthesis of phosphorylated and sulfated glycosyl serines in the linkage region of the glycosaminoglycans." *J. Org. Chem.*, 66 (2001) 3074-3083.
- J. Tamura, H. Urashima, K. Tsuchida, H. Kitagawa, and K. Sugahara, "Synthesis of linear-type chondroitin clusters having a C8 spacer between disaccharide moieties and enzymatic transfer of D-glucuronic acid to the artificial glycans." *Carbohydr. Res.*, 332 (2001) 41-51.
- H. Kitagawa, N. Egusa, J. Tamura, M. Kusche-Gullberg, U. Lindahl and K. Sugahara, "*rib-2*, a *Caenorhabditis elegans* Homolog of the Human Tumor Suppressor *EXT* Genes Encodes a Novel α 1,4-*N*-Acetylglucosaminyltransferase Involved in the Biosynthetic Initiation and Elongation of Heparan Sulfate." *J. Biol. Chem.*, 276, 4834-4838 (2001).
- B.-T. Kim, H. Kitagawa, J. Tamura, T. Saito, M. Kusche-Gullberg, U. Lindahl, and K. Sugahara, "The Human Tumor Suppressor *EXT* Gene Family Members *EXTL1* and *EXTL3* Encode α 1,4-*N*-Acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in Heparan Sulfate/Heparin Biosynthesis." *Proc. Natr. Acad. Sci.*, 98, 7176-7181 (2001).
- H. Ando, S. Manabe, Y. Nakahara, and Y. Ito "Solid-Phase Capture-Release Strategy Applied to Oligosaccharide Synthesis on a Soluble polymer Support." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40 (2001) 4729-4731.
- K. Sakamoto, Y. Nakahara, and Y. Ito "Combination of Silyl Carbamate and Amino acid Fluoride for Solid Phase Peptide Synthesis." *Tetrahedron Lett.*, 43 (2002) 1515-1518.
- A. Ishii, H. Hojo, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara "A Silyl Linker-based Approach to The Solid-phase Synthesis of Fmoc Glycopeptide Thioesters." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (2002) 225-232.

(2) 特許出願（4件）

発明者：中原義昭、中村和彦、伊藤幸成

「新規シリルリンカーおよびそれを用いる糖ペプチドの固相合成法」

特願平 11-103231 号

出願日：平成 11 年 4 月 9 日

発明者：田村純一

「硫酸化・リン酸化三糖セリンの製造に有用な脱離基としてトリクロロアセトイミデートを持つ糖供与体、その製法およびその中間体」

特願平 11-342839 号

特開 2001-158797

平成 13 年 6 月 12 日公開

発明者：田村純一

「リン酸化三糖セリン、硫酸化・リン酸化三糖セリンおよびそれらの合成方法」

特願平 11-344285

特開 2001-158795

平成 13 年 6 月 12 日公開

発明者：田村純一、加和 学

「糖質を結合してなるホスフィンオキシド類」

特願 2001-142594

平成 13 年 5 月 14 日出願

受賞等

北條裕信（東海大）

日本ペプチド学会奨励賞（第 37 回ペプチド討論会、平成 12 年 10 月、名古屋）

田村純一（鳥取大）

2001 年度有機合成化学協会「帝人研究企画賞」：磁性ナノ粒子を用いる新しい有機固相合成法の開発