

ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質誘導体の化学合成



研究ノート

梶原 康宏*

Chemical Synthesis of Glycoproteins
having human oligosaccharides.

Key Words : glycoprotein, oligosaccharide

1. はじめに

細胞表層や血液中のタンパク質の多くは、シアル酸、ガラクトース、マンノースなどの単糖が鎖状に連なった**1**のような糖鎖をもつ糖タンパク質である。複合型糖鎖**1**は、糖タンパク質の細胞表層への輸送、抗原性、さらには糖タンパク質の血中寿命に関与している。¹しかし、この複合型糖鎖は常に多様な構造を示し、糖鎖の分岐数は2から4本へ変化するとともに、糖鎖末端の糖の種類は常に不均一である。現在、どのような糖鎖構造がタンパク質の機能発現に必要なかを詳細に調べる研究が活発に展開され、糖鎖構造とタンパク質活性発現の関係が少しずつ明らかになってきている。また、これら糖タンパク質は、薬として利用され、代表的なものでは、貧血治療薬であるエリスロポエチン (EPO) やヒト型抗体があげられ、糖鎖の構造や付加数を変えることで薬理作用が大きく向上することが知られている。²しかし、レセプターとの結合状態のX線結晶構造解析の情報をもとにしても、どの位置に、どのような構造の糖鎖を結合させれば生理活性が向上するか、その予測は未だ困難である。現状は、タンパク質にヒト型糖鎖付加を実施できる動物細胞、²あるいは特別な酵母³を用いて、糖鎖付加位置を遺伝的に可変した変異体を調製し、その中から生理活性の高

い糖タンパク質を選別する方法しかない。しかし、この糖鎖付加変異体の遺伝子を調製しても全ての変異体を発現させることは不可能で、目的とする糖タンパク質の発現量が低下したり、変性などにより全く発現することができないなどの問題が常に存在する。²すなわち、糖タンパク質の細胞をつかった調製は全くのブラックボックス状態で論理的にデザインして生理活性の強い糖タンパク質を得るという方法は全く確立されていない。更に、その糖鎖構造は全く予測できず、不均一なものしか得ることができない。このようななか、我々は、単一構造のヒト複合型糖鎖を有する糖タンパク質を化学的に精密合成する検討および糖鎖の付加位置を自在にかえて糖鎖化とタンパク質の生理活性の関係を調べるための基礎研究を展開している。⁴この際の研究課題は、どのようにしてこの複雑な高分子天然物である糖タンパク質の1次構造を精密に合成するかということと、糖鎖を任意の位置に付加させたあと、本来とるべきタンパク質の2次および3次構造をいかに形成させるかである。また、任意の位置に長鎖の糖鎖を結合させた場合、糖鎖を持たない場合と比べタンパク質のフォールディング過程がどのように変化するか予測することも未だできないので、その過程を理解する実験方法の開発も必要である。現在、我々はEPOをモデルにこの研究を実施している。EPOはアミノ酸166残基からなり複合型糖鎖を3本持っている。EPOの薬理活性発現には、糖鎖末端のシアル酸が不可欠であることが知られている。ここでは、このEPOを例に、最近の結果を紹介する。



*Yasuhiro KAJIHARA

1965年1月生
東京工業大学大学院総合理工学研究科
博士後期課程生命化学専攻修了(1993年)
現在、大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 教授 理学博士 有機化学 生物有機化学 糖質化学
TEL : 06-6850-5380
FAX : 06-6850-5382
E-mail : kajihara@chem.sci.osaka-u.ac.jp

2. 糖タンパク質の合成

糖タンパク質を化学的に合成するには、原料となるヒト型糖鎖が大量に必要である。そこで、我々は、鶏卵からグラムスケールで得られる複合型糖鎖**1**を

用いることにした。そして、この糖鎖を化学修飾後ハロアセトアミド体**4**とし (Fig. 1)、糖鎖付加位置を自在に可変した糖タンパク質誘導体の合成を検討することにした。このハロアセトアミド法は、ペプチド中のシステインと特異的に反応し、糖鎖とペプチドの天然型の結合を模倣した様式で糖鎖をペプチドに導入することができる。生理活性を向上させる糖鎖付加位置が見いだせれば、既に報告した方法で天然型の糖タンパク質を合成したり、糖鎖のタンパク質への影響を調べる実験などが実施できる。ここでは、まず、ハロアセトアミド法を利用したEPO誘導体の合成を紹介する。糖タンパク質全長のペプチド鎖を得るには、幾つかのセグメントに分けて合成後、それらセグメントをNative Chemical Ligation (NCL) を用いて連結するルートが簡便である (Fig. 2)。⁵ NCLではチオエステルをC末端にもつペプチド-AとシステインをN末端に持つペプチド-Bを緩衝溶液に溶かすことで、チオエステル部位と他方のペプチド-Bのシステイン残基が反応して天然型のペプチド結合を形成する。我々は、このNCLを利用したEPO誘導体の簡便な合成方法を検討した。すなわち、化学法により調製した糖ペプチドチオエステル**6**と、大腸菌を用いて発現した糖鎖を持たないペプチド部位**8**をNCLで連結してEPO誘導体の全長糖鎖化ポリペプチドを得る事にした (Fig. 3)。幸いEPOは33位にシステイン残基をもつので、33位でペプチド鎖を2つにわけた。ヒト複合型のシリアル糖鎖は、24、30位にシステイン残基をいれ、ハロアセトアミド法で導入することにした。N末端から32位までのペプチドチオエステル鎖を化学的合成し、33位から166位は大腸菌発現法を用いて調製しこれらをNCLで連結することでEPO全長を合成することにした。既に報告した一般的なFmoc固相合成法によりペプチドチオエステル**5**を調製し、⁶ 続いてハロアセトアミド基をもつヒト型糖鎖を反応させ、糖ペプチドチオエステルセグメント**6**を得た。

次にEPOの33-166位のペプチド鎖を大腸菌発現法により調製した。この場合、Macmillanの方法であるペプチドのN末端にヒスタグ (ヒスチジン10残基) -メチオニン配列が結合したFusionペプチド**7**として発現後、ニッケルカラムが担持したアフィニティーカラムに通すことでニッケルとヒスチ

ジンの特異的な結合を利用して目的とするFusionペプチド**7**を単離した。そしてBrCNを用いてメチオニンとシステイン残基の間を切断することでN末端にシステインをもつペプチド**8**を得ることができた。

次にこれらセグメントをNCLにより連結することを検討した。糖ペプチド**6**および**8**を6Mグアニジン塩酸塩存在下リン酸緩衝溶液中で反応させたところ14時間で目的とするEPOの全長**9**を得た。次に7位と29位に導入していたシステイン残基の保護基 (Acm:アセトアミドメチル基) 酢酸銀を用いて除去して**10**とした後、グアニジン塩酸塩 (GnHCl) で変性させ、システイン-シスチンを共

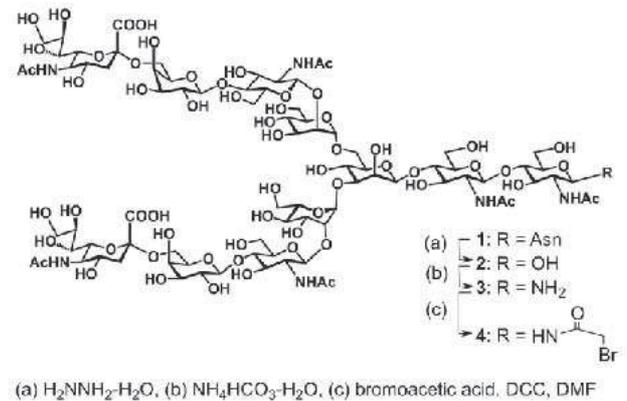


Fig 1. Synthesis of oligosaccharide derivatives.

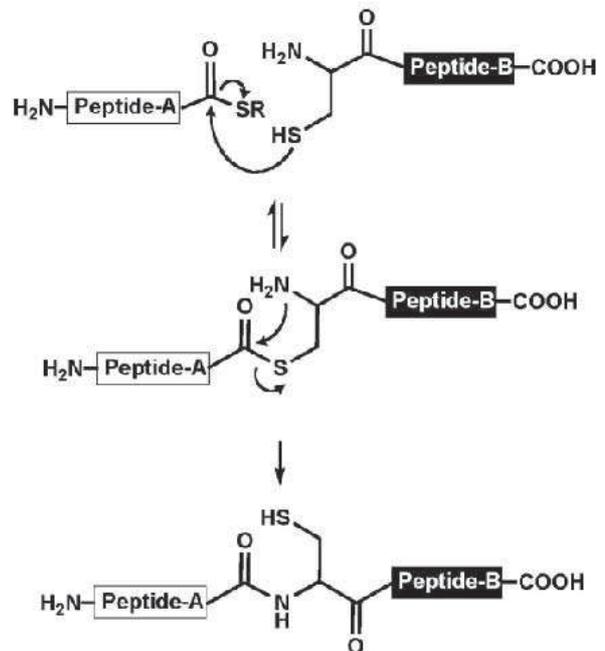


Fig 2. Native chemical ligation

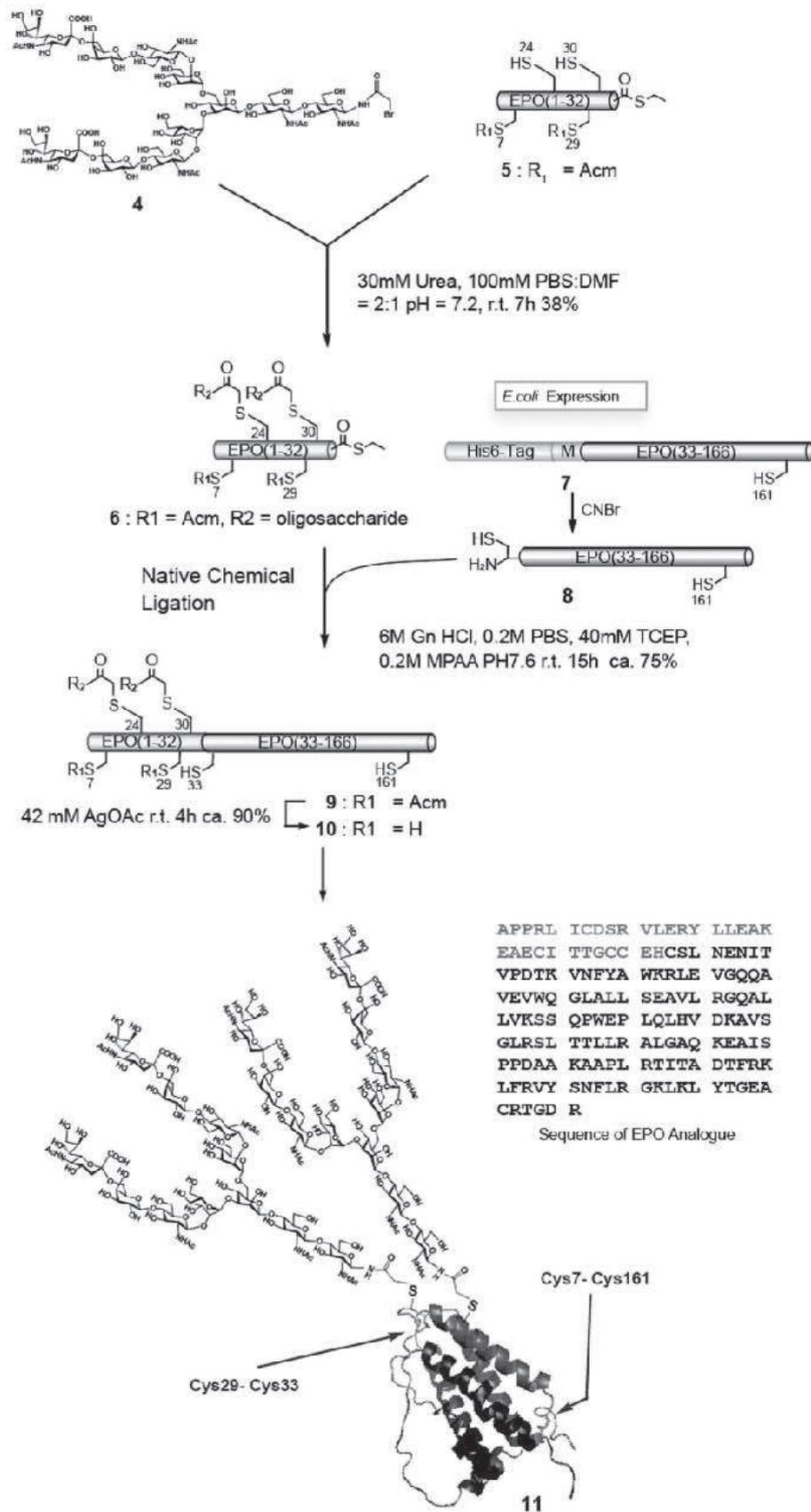


Fig 3. Synthesis of erythropoietin analogue.

存させながら透析法条件下タンパク質中のジスルフィド結合の形成およびフォールディング操作を行った。そして逆相クロマトグラフィーで精製し EPO 誘導体 **11** の単離に成功した。得られた EPO 誘導体は、質量分析、円二色分光法、プロテオリシスによるジスルフィドマップの作成、ELISA アッセイを行ったところ目的とする EPO 誘導体を得られたことが示唆された。そして、合成した EPO および市販されている EPO を用いて *in vitro* での細胞増殖アッセイを行ったところ、共に同等の活性を示した。これらのことから、目的とする 3次元構造を形成した糖鎖化 EPO 誘導体 **11** が得られたことを確認した。⁷ また、同様な方法で、24, 28, 32 位に糖鎖をもつ EPO 誘導体の合成にも成功した。⁸ この誘導体は、糖鎖の立体障害のためか、細胞増殖活性は 1%程度に低下していたが、ジスルフィド結合は天然型と一致しており、精密に非天然型の EPO を合成できていることが確認できた。今後は、この方法を用いて更に多くの EPO 誘導体を合成し、糖鎖の構造、付加位置、生理活性の関係を明確化できるよう研究を展開する。

3. おわりに

以上のように我々はヒト複合型糖鎖を有する糖タンパク質誘導体を合成することに成功した。ここでは述べなかったが、ヒト型糖鎖がペプチドと天然型の様式で結合した天然型糖タンパク質の合成法も確立している。⁶ これらのことから、糖タンパク質は、

生物学的な手法でしか調製できないと考えられていたが、有機合成化学の標的分子として扱うことができるようになったと考えている。今後は、糖鎖の機能について様々な糖タンパク質の例で調べ、学術的な研究および創薬研究へ利用できるよう更に検討をする予定である。

参考文献

- 1 Dwek, R. A. *Science* **1995**, 269, 1234-1235.
- 2 Walsh, G.; Jefferis, R. *Nat Biotech* 2006, 24, 1241-1252.
- 3 Hamilton, S. R.; Bobrowicz, P.; Bobrowicz, B.; Davidson, R. C.; Li, H.; Mitchell, T.; Nett, J. H.; Rausch, S.; Stadlheim, T. A.; Wischnewski, H.; Wildt, S. *Gerngross, T. U. Science* 2003, 301, 1244-1246
- 4 Kajihara, Y.; Yamamoto, N.; Okamoto, R.; Hirano, K.; Murase, T. *Chem. Rec.* **2010**, 10, 80-100.
- 5 Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Lewis, I. C.; Kent, S. B. H. *Science* 1994, 166, 776-779.
- 6 Yamamoto, N.; Tanabe, Y.; Okamoto, R.; Dawson, P. E.; Kajihara, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 501-510.
- 7 Hirano, K.; Macmillan, D.; Tezuka, K.; Tsuji, T.; Kajihara, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9557-9560.
- 8 Hirano, K.; Izumi, M.; Macmillan, D.; Tezuka, K.; Tsuji, T.; Kajihara, Y. *J. Carbohydr. Chem. in press.*

