

機関番号：32644
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20380069
 研究課題名（和文）疎水性糖タンパク質の効率的な化学合成法の確立とサポシン合成への応用
 研究課題名（英文）Development of a synthetic method for hydrophobic glycoprotein and its application to saposin synthesis
 研究代表者 北條 裕信 (HOJO HIRONOBU)
 東海大学・工学部・教授
 研究者番号：00209214

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質受容体、脂質結合性タンパク質など、生体内には多くの疎水性糖タンパク質が存在している。これらの糖タンパク質は、ペプチド合成、また精製時に高度に難溶性になるために、セグメント縮合法等の効率的なタンパク質合成法を用いても調製困難である。本研究では、脂質結合性タンパク質サポシン C を例として、ペプチド合成、精製、セグメント縮合時に溶解性を向上させる手法を開発し、疎水性糖タンパク質の化学合成をより効率化する方法を検討した。

研究成果の概要(英文)：The synthesis of highly hydrophobic glycoproteins, such as membrane proteins and lipid-binding proteins, is extremely difficult even with the use of efficient segment coupling methods. The main difficulty is that the segments usually retain low solubility during peptide synthesis, purification and ligation steps. To overcome this problem, a method to enhance the solubility of segments during peptide synthesis and purification was developed and applied to the synthesis of lipid-binding protein, saposin C.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	6,800,000	2,040,000	8,840,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：疎水性糖タンパク質、セグメント縮合、O-アシルイソペプチド

1. 研究開始当初の背景

生体内に存在する糖タンパク質の中には、細胞膜受容体、脂質結合タンパク質など、高度に疎水性であるものが存在する。このような糖タンパク質は、Native chemical ligation (NCL)法や

チオエステル法等、効率的なタンパク質合成法を利用しても合成することが困難である。その主な原因は、これらの方法に用いるペプチドセグメントが、その高度な疎水性により固相合成、精製、ライゲーション、いずれの段階においても

難溶性になってしまうことにある。

固相合成中にペプチドの溶解性を改善する方法は、多くのグループにより開発されている。その中の一つとして *O*-アシルイソペプチド法が知られている(図1)。この方法では、native ペプチド中の一部の Ser、Thr 残基においてペプチド鎖を側鎖水酸基に結合し、通常のアミド結合の代わりにエステル結合を形成する方法である(構造 A)。そのため、分子間での規則的なβ-シート構造形成が抑制され、ペプチドの溶解性が著しく向上する。この方法の大きな長は、酸性条件下でイソペプチド構造が維持されている限り、HPLC による精製段階でもペプチドは高い溶解性を保っている点である。また、ペプチドを中性条件下に置くと速やかに *O*-*N* アシルシフトが起こり、アミド結合を持つ native なペプチド構造(構造 B)を再生することができるという利点も持つ。

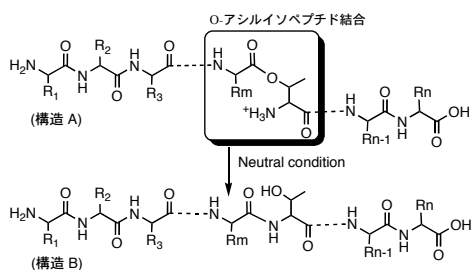


図1. *O*-アシルイソペプチド法。

もし *O*-アシルイソペプチド法を NCL 法に適用できるならば、疎水性タンパク質合成の簡便化に大きく貢献することであろう。しかし、イソペプチド構造は NCL 条件下(ほとんど中性の条件下で行われる)において速やかな *O*-*N* アシルシフトにより消失するため、この方法をそのまま NCL 法に適用することは困難である。現在、*O*-アシルイソペプチド法は、固相合成後も高い溶解性を保つことができる唯一の方法であるため、この方法の NCL 法への適用は、疎水性タンパク質の化学合成達成の点から強く望まれる。

2. 研究の目的

本課題では、イソペプチド部位をアジド基によって保護することにより、*O*-アシルイソペプチド法を NCL 法と組み合わせた新規な疎水性タンパク質合成法の開発をめざして研究を進めた。合成例として、スフィンゴ脂質活性化タンパク質、サポシン C を用いた。

3. 研究の方法

サポシン C はスフィンゴ糖脂質の代謝に関わる糖タンパク質であり、約80残基のアミノ酸からなる(図2)。サポシン C の機能解明を進めるため、我々は、以前からその化学合成研究を進めてきた。常法に従い、まず、ペプチド鎖を Ala³⁵-Cys³⁶ の間で分割してN末端側のペ

プチドチオエステルとC末端側のペプチドを固相法により合成し、NCL 法により縮合するという計画をたてた。しかし、N末端側のセグメントは、多くの疎水性アミノ酸よりなっており、非常に難溶性であった。従って、常套手段である逆相のHPLCによる精製、C 末端セグメントとの縮合ができない状況であった。

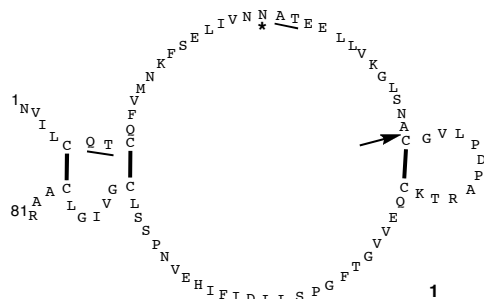


図2. サポシン C の構造. 矢印は、NCL を行った部位、星印は、天然サポシン C における糖鎖結合部位、また、下線を引いたジペプチドは、Boc 法による固相合成の際アシルイソペプチド構造を形成させた位置を示す。

そこで、本研究では *O*-アシルイソペプチド法を NCL 法と組み合わせた方法を開発することとした(図3)。すなわち、溶解性の低い N 末端ペプチドの一部にイソペプチド結合を導入して溶解性を向上させ、HPLC による精製、NCL 法によるペプチド鎖同士の縮合を行う。その後 *O*-*N* 転位により native なペプチド結合へと変換し、ジスルフィド結合形成後サポシン C を得ることとした。ペプチド鎖伸長、精製、NCL 時に *O*-*N* 転位によるイソペプチド構造の消失を避けるため、イソペプチド部位のアミノ基をアジド基で保護することとした。

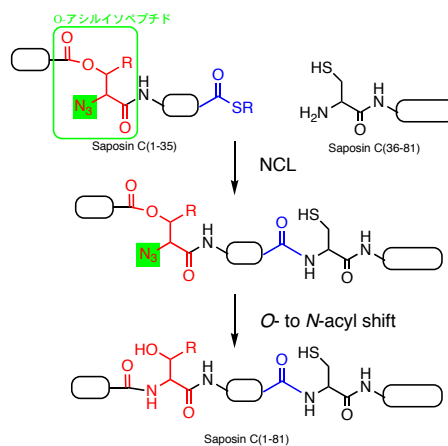


図3. NCL 法と *O*-アシルイソペプチド法を組み合わせた新規なサポシン C 合成法。

4. 研究成果

イソペプチド結合を形成する部位は、Gln⁶-Thr⁷、Ala²³-Thr²⁴ の2カ所とした。まず、通

常の 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)固相法によりペプチド鎖を伸張した後 Thr²⁴ で N₃-Thr-OH を導入した。続いて導入された Thr 残基の側鎖水酸基に Fmoc-Ala-OH をエステル結合させた。樹脂の一部を切り出して分析したところ、望み通りアシルイソペプチド結合が形成されたことを確認できた。そこで Fmoc 法によりさらにペプチド鎖を伸長したところ、予想に反してイソペプチド結合の分解が示唆された。従来の報告では、イソペプチド結合は脱 Fmoc 試薬であるピペリジンに安定であるとされているが、配列によってはピペリジンによる分解を受けるのではないかと推定される。

そこで Fmoc 法によるペプチド鎖の伸長を断念し、ピペリジンを用いない Boc (*t*-butoxycarbonyl) 法によるペプチド鎖伸長を試みることにした(図 4)。まずチオール基を導入したアミド樹脂上で C 末端アミノ酸 Ala とのチオエステル結合を形成させた後、Boc 法によりペプチド鎖を伸張した。Ala²³-Thr²⁴ において先ほどと同様にアシルイソペプチド結合を形成し、樹脂の一部を分析して反応の完了を確認した。Boc 法によりペプチド鎖をさらに伸長した後、Gln⁶-Thr⁷ において再度アシルイソペプチド結合を形成させた。すべてのアミノ酸を導入後、得られた保護ペプチド樹脂をアニソール存在下 HF により処理し、粗ペプチドを得た。HPLC により分析したところ、図 4 b に示すように、目的とするペプチドチオエステル 2 をまずまずの純度で得ることに成功した。HPLC による精製時における溶解度も問題なく、3%の収率で高純度のペプチドチオエステル 2 を得ることができた。

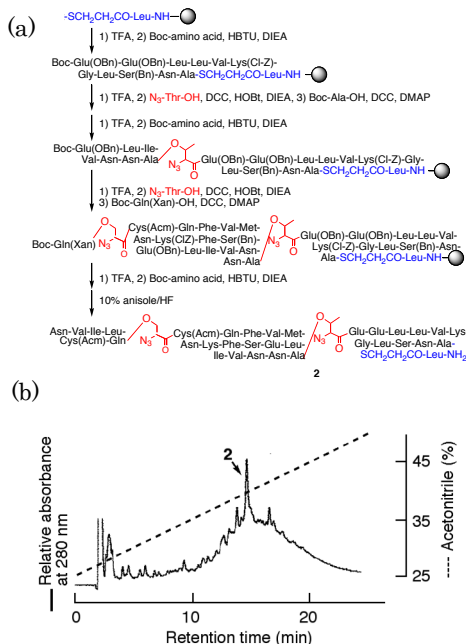


図 4. (a) N-末端チオエステル 2 の合成ルートと (b) その粗ペプチドの HPLC. (3) NCL 法によるセグメント同士の縮合

C 末端側のペプチド 3 は、通常の Fmoc 法により合成した。HPLC による精製時の溶解性に問題はなく、収率 15%で得ることができた。

そこで、ペプチド 2, 3 を NCL 法により縮合した。図 5 の方法 A, B に示す2つの方法を試みることにした。方法 A では、O-アシルイソペプチド構造を残しつつライゲーションを行い、終了後にアジド基を還元して O-N 転位を経てアミド結合へと導くことにした。1夜放置したところ、ライゲーション反応は完結しなかったものの、中間体 4 の生成が確認された。そこで反応液に TCEP [tris(2-carboxyethyl)phosphine]を加えて一晩アジド基の還元を行い目的物 5 を得ることに成功した。収率は 11%であった。一方、方法 B では、ライゲーションと同時にアジド基を還元し、アミド結合への変換を行うことにした。その結果、7時間程度で反応は完結し収率 23%で目的物 5 を得ることができた。以上のことからサポシンの合成には方法 B の方がより効率的であることが明らかとなった。

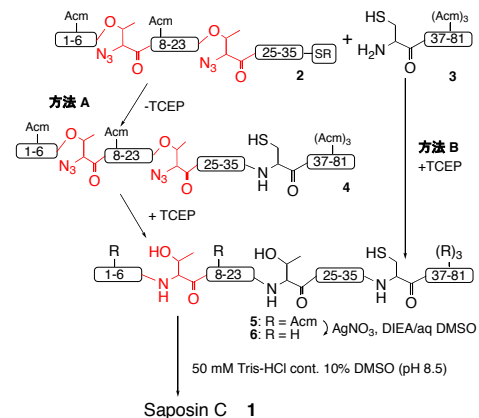


図5. サポシン C の合成ルート.

そこで、次に銀イオンによるチオール保護基 Acm (acetamidomethyl) 基の除去を行い、還元状態のサポシン C 6 を得た。最後にトリス緩衝液中で DMSO (dimethylsulfoxide)による酸化反応を利用してジスルフィド結合の形成を行い、最終目的物 1 を得ることに成功した。

同様にして、図 4 の方法を用いて Asn²² に単糖 GlcNAc を持つ N 末端チオエステルを合成し、これを C 末端ペプチド 3 と図 5 の方法 B により縮合した。Acm 基の除去、DMSO 酸化を行い、単糖を持つサポシン C の合成に成功した。

以上のように当初目的とした疎水性の糖タンパク質合成を達成するため、O-アシルイソペプチド法と NCL 法を組み合わせた新規な合成法を開発し、脂質結合性を持つ疎水性糖タンパク質サポシン C の合成に成功した。この方法は、同様の疎水性糖タンパク質の合成に広く用いることができる方法であると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- 1) H. Hojo, H. Katayama, C. Tano, 他 6 名, Synthesis of the sphingolipid activator protein, saposin C, using an azido-protected *O*-acyl isopeptide as an aggregation-disrupting element, *Tetrahedron Lett.* (査読あり), **52**, 635–639 (2011).
- 2) S. Yoshida, F. Kumakura, I. Komatsu, K. Arai, Y. Onuma, H. Hojo, B.G. Singh, I. Priyadarsini, M. Iwaoka, Antioxidative Glutathione Peroxidase Activity of Selenogluthathione, *Angew. Chem. Int. Ed.* (査読あり), **50**, 2125–2128 (2011).
- 3) Y. Nakahara, I. Matsuo, Y. Ito, R. Ubagai, H. Hojo, Y. Nakahara, High-pressure-promoted Fmoc-aminoacylation of N-ethylcysteine: preparation of key devices for the solid-phase synthesis of peptide thioesters, *Tetrahedron Lett.* (査読あり), **51**, 407–410 (2010).
- 4) N. Kamei, R. Fukui, Y. Suzuki, Y. Kajihara, M. Kinoshita, K. Kakchi, H. Hojo, K. Tezuka, T. Tsuji, Definitive evidence that a single N-glycan among three glycans on inducible costimulator is required for proper protein trafficking and ligand binding, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読あり), **391**, 557–563 (2010).
- 5) H. Katayama, H. Hojo, T. Ohira, 他 7 名, Correct disulfide pairing is required for the biological activity of crustacean androgenic gland hormone (AGH): Synthetic studies of AGH, *Biochemistry* (査読あり), **49**, 1798–1807 (2010).
- 6) A. Ueki, Y. Takano, A. Kobayashi, Y. Nakahara, H. Hojo, Y. Nakahara, Solid-phase synthesis of glycopeptide carrying a tetra-N-acetyl-lactosamine-containing core 2 deca-saccharide, *Tetrahedron* (査読あり), **66**, 1742–1759 (2010).
- 7) A. Wada, M. Hasegawa, P.-F. Wong, E. Shirai, L.-J. Tan, R. Llanes, H. Hojo, E. Yamasaki, A. Ichinose, Y. Ichinose, M. Senba, Direct binding of gangliosides to *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) neutralizes its toxin activity, *Glycobiology* (査読あり), **20**, 668–678 (2010).
- 8) H. Katayama, H. Hojo, I. Shimizu, Y. Nakahara and Y. Nakahara, Chemical synthesis of mouse pro-opiomelanocortin (1-74) by azido-protected glycopeptide ligation via the thioester method, *Org. Biomol. Chem.* (査読あり), **8**, 1966–1972 (2010).
- 9) H. Hojo, C. Ozawa, H. Katayama, A. Ueki, Y. Nakahara, and Y. Nakahara, The Mercaptomethyl Group Facilitates an Efficient One-Pot Ligation at Xaa-Ser/Thr for (Glyco)peptide Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* (査読あり), **49**, 5318–5321 (2010).
- 10) H. Hojo, H. Katayama, Y. Nakahara, Progress in the ligation chemistry for glycoprotein synthesis, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* (査読あり), **22**, 269–279 (2010).
- 11) H. Katayama, T. Utsumi, C. Ozawa, Y. Nakahara, H. Hojo, Y. Nakahara, Pyruvoyl, a novel amino protecting group on the solid phase peptide synthesis and the peptide condensation reaction, *Tetrahedron Lett.* (査読あり), **50**, 818–821 (2009).
- 12) K. Kawahira, H. Tanaka, A. Ueki, Y. Nakahara, H. Hojo, Y. Nakahara, Solid-phase synthesis of *O*-sulfated glycopeptide by the benzyl-protected glycan strategy, *Tetrahedron* (査読あり), **65**, 8143–8153 (2009).
- 13) A. Ueki, M. Hirota, Y. Kobayashi, 他 6 名 5 番目, Stereoselective synthesis of benzyl-protected β -galactosides by propionitrile-mediated glycosylation, *Tetrahedron* (査読あり), **64**, 2611–2618 (2008).
- 14) H. Hojo, Y. Murasawa, H. Katayama, T. Ohira, Y. Nakahara, Y. Nakahara, Application of a novel thioesterification reaction to the synthesis of chemokine CCL27 by the modified thioester method, *Org. Bioorg. Chem.* (査読あり), **6**, 1808–1813 (2008).
- 15) H. Katayama, H. Hojo, T. Ohira, Y. Nakahara, An efficient peptide ligation using azido-protected peptides via the thioester method, *Tetrahedron Lett.* (査読あり), **49**, 5492–5494 (2008).
- 16) C. Ozawa, H. Katayama, H. Hojo, Y. Nakahara, Y. Nakahara, Efficient sequential segment coupling using N-alkylcysteine-assisted thioesterification for glycopeptides dendrimer synthesis. *Org. Lett.* (査読あり), **10**, 3531–3533 (2008).

[学会発表] (計 32 件)

- 1) 中原義昭, 姥貝吏紗、小林甫、中原悠子、北條裕信、松尾一郎、伊藤幸成、糖ペプチドチオエステル合成の鍵素子 Fmoc-AA-NAC の開発、日本農芸化学会 2010 年度大会、東京 2010 年 3 月。
- 2) 北條裕信、片山秀和、小沼侑子、米重あずさ、松田純子、中原悠子、中原義昭、疎水性糖タンパク質の化学合成研究、日本農芸化学会 2010 年度大会、東京 2010 年 3 月。
- 3) 植木章晴、森和弘、中原悠子、北條裕信、中原義昭、集積化 Galb(1-3)GlcNAc の合成研究、日本農芸化学会 2010 年度大会、東京 2010 年 3 月。
- 4) 朝比奈雄也、田中洋成、柿沢宏紀、植木章晴、中原悠子、北條裕信、中原義昭、新規ルートによる N-結合型糖鎖の合成研究、日本農芸化学会 2010 年度大会、東京 2010 年 3 月。
- 5) 田中洋成、萩原匡、柿沢宏紀、植木章晴、中原悠子、北條裕信、中原義昭、複合型 N-グリカン収斂的合成をめざす 4 糖、8 糖中間体の合成研究、日本農芸化学会 2010 年度大会、東京 2010 年 3 月。
- 6) 萩原匡、土肥瑞季、植木章晴、中原悠子、北條裕信、中原義昭、糖ペプチド固相合成のための複合型糖アミノ酸の合成研究、日本農芸化学会 2010 年度大会、東京 2010 年 3 月。
- 7) 片山秀和、北條裕信、野澤佳世、濡木理、相本三郎、中原義昭、PyIRS および tRNA^{Pyl} を用いた Lys 誘導体の組換えタンパク質への導入、日本農芸化学会 2010 年度大会、東京 2010 年 3 月。
- 8) Hojo, H., Katayama, H., Takenouchi, T., Shimizu, I., Ueki, A., Nakahara, Y., Nakahara, Y. Synthesis of

- glycoprotein by the segment condensation method, 25th International carbohydrate symposium, 東京, 2010年8月。
- 9) Hojo, H., Katayama, H., Ueki, A., Nakahara, Y., Nakahara, Y. The synthesis of (glyco)protein by the ligation methods, 31st European Peptide Symposium, Copenhagen, 2010年9月。
 - 10) 北條裕信, 糖タンパク質合成を指向したペプチド科学の進展, 第8回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 東京, 2010年11月。
 - 11) Hojo, H., Katayama, H., Ueki, A., Nakahara, Y., Nakahara, Y. Synthesis of glycoprotein by the segment condensation method, 5th International peptide symposium, 京都, 2010年12月。
 - 12) Katayama, H., Nakahara, Y., Hojo, H. Development of a novel thiol protecting group on the solid phase peptide synthesis and the peptide condensation reactions, 5th International peptide symposium, 京都, 2010年12月。
 - 13) Hojo, H. Chemical synthesis of glycoprotein by a segment condensation method, 大阪大学タンパク質研究所セミナー, 大阪, 2010年12月。
 - 14) 植木章晴, 高野穰, 中原悠子, 北條裕信, 中原義昭, ベンジル保護法を用いる(LacNAc)₄構造を含む糖ペプチドの合成, 日本農芸化学会2009年度大会, 福岡2009年3月。
 - 15) 中原悠子, 北條裕信, 中原義昭, 松尾一郎, 伊藤幸成, 糖ペプチドチオエステル化のためのアミノアシルNAC素子の高圧下合成, 日本農芸化学会2009年度大会, 福岡2009年3月。
 - 16) 川平恵太, 中原義昭, 中原悠子, 植木章晴, 北條裕信, 硫酸化糖ペプチドの合成研究, 日本農芸化学会2009年度大会, 福岡2009年3月。
 - 17) 片山秀和, 北條裕信, 中原悠子, 中原義昭, アジド基含有糖ペプチドチオエステルの調製とペプチド縮合反応への展開, 日本農芸化学会2009年度大会, 福岡2009年3月。
 - 18) 小澤千那津, 片山秀和, 植木章晴, 北條裕信, 中原悠子, 中原義昭, Xaa-Ser/Thr部位での新規ライゲーション法による糖ペプチドの合成, 日本農芸化学会2009年度大会, 福岡2009年3月。
 - 19) Katayama, H.; Hojo, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. Efficient peptide ligation using azido- and pyruvoyl-protected peptides via the Ag⁺-free thioester method. 21st American Peptide Symposium, Bloomington, 2009年6月。
 - 20) 朝比奈雄也, 田中洋成, 柿沢宏紀, 植木章晴, 中原悠子, 北條裕信, 中原義昭, 新規収斂的ルートによるN-結合型糖アミノ酸の合成研究, 第29回糖質学会年会, 高山2009年9月。
 - 21) 萩原匡, 土肥瑞季, 植木章晴, 中原悠子, 北條裕信, 中原義昭, 糖ペプチド固相合成のための複合型糖アミノ酸ビルディングブロックの合成研究, 第29回糖質学会年会, 高山2009年9月。
 - 22) Hojo, H.; Katayama, H.; Onuma, Y.; Nakahara, Y.; Yonshige, A.; Matsuda, J.; Nakahara, Y. Synthetic Study of sphingolipid activator glycoprotein, Saposin C. 46th JPS, 北九州, 2009年11月。
 - 23) Onuma, Y.; Hojo, H.; Katayama, H.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. Chemical synthesis of a chemokine-binding protein, Evasin-1, 46th JPS, 北九州, 2009年11月。
 - 24) Katayama, H.; Hojo, H.; Shimizu, I.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. Chemical synthesis of the glycosylated mouse pro-opiomelanocortin (1-74) by the thioester method. 46th JPS, 北九州, 2009年11月。
 - 25) Hojo, H. Glycoprotein synthesis using efficient ligation of azido-protected peptide by Ag⁺-free thioester method. 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium, Jeju Island, 韓国, 2009年11月。
 - 26) Hojo, H.; Nakahara, Y. Chemical synthesis of glycoprotein and its folding. 12th Akabori Conference, 京都2008年5月。7) 植木章晴, 高野穰, 中原悠子, 北條裕信, 中原義昭, ベンジル保護型β-ガラクトシドの収斂的合成法の開発と複雑な糖鎖合成への展開, 第28回日本糖質学会年会, つくば, 2008年8月。
 - 27) 川平恵太, 植木章晴, 田中洋成, 中原悠子, 北條裕信, 中原義昭, 選択的修飾を可能とするLacNAc含有糖タンパク質糖鎖の合成研究, 第28回日本糖質学会年会, つくば, 2008年8月。
 - 28) Hojo, H.; Ozawa, C.; Katayama, H.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. The application of *N*-alkylcysteine (NAC)-assisted thioesterification to the synthesis of polypeptides by the thioester method. 30th European peptide symposium, Helsinki, 2008年8-9月。
 - 29) Katayama, H.; Hojo, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y. Azide as a protecting group for lysine side chains on the solid phase peptide synthesis oriented toward the peptide condensation by the thioester method. 30th European peptide symposium, Helsinki, 2008年8-9月。
 - 30) Ozawa, C.; Katayama, H.; Ueki, A.; Hojo, H.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. Study on a novel ligation method at Xaa-Ser/Thr site. 45th JPS, 東京, 2008年10月。
 - 31) Katayama, H.; Utsumi, T.; Hojo, H.; Nakahara, Y. Development of a novel amino protecting group efficient for the peptide condensation reaction by the thioester method. 45th JPS, 東京, 2008年10月。
 - 32) Takenouchi, T.; Hojo, H.; Katayama, H.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. Synthetic studies on human glycodelins. 45th JPS, 東京, 2008年10月。
- [図書] (計2件)
- 1) 北條裕信, 中原義昭: 複合糖質の化学と最新応用技術 (稲津敏行, 正田晋一郎監修), 第2編第2章糖ペプチド, 糖タンパク質の化学合成法 p129-136, シーエムシー出版, 2009年。
 - 2) 北條裕信, 中原義昭, 臨床糖鎖バイオマーカーの開発 5) 糖タンパク質合成法の開発 p115-119, メディカルドゥ, 2008年。

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称:ペプチドの製造方法

発明者:北條裕信、中原義昭

権利者:学校法人東海大学

種類:国際特許

番号:PCT/JP2009/005180

出願年月日:2009年10月6日

国内外の別:国際出願

6. 研究組織

(1)研究代表者

北條 裕信(HOJO HIRONOBU)

東海大学・工学部・教授

研究者番号: 00209214

(2)連携研究者

中原 義昭(NAKAHARA YOSHIAKI)

東海大学・工学部・教授

研究者番号: 50087574