

# 論文の内容の要旨

論文題目「化学酵素法を利用した糖タンパク質の合成研究」

学位申請者 朝比奈 雄也

キーワード：糖タンパク質 糖ペプチド 化学酵素合成法 チオエステル

## ペプチドライゲーション

生体内に存在するタンパク質の約半数は、糖鎖修飾を受けた糖タンパク質として存在している。糖タンパク質糖鎖は様々な生命現象に対する関与が指摘されており、その詳細な機能解明が求められている。しかし、糖鎖合成に関わる糖転移酵素やグリコシダーゼの特異性が低く、生成される糖タンパク質糖鎖は高度に不均一化するため、糖鎖構造と機能との相関関係が未だ明確でない。そこで筆者は、これらの問題にアプローチするため、効率的な糖タンパク質の化学合成法の確立を目指し、研究を行った。

第1章では、糖タンパク質の性質、及び報告されている均一な糖鎖構造を有する糖タンパク質、糖ペプチドの合成法について述べ、その現状と問題点について議論した。

第2章では3つのペプチドセグメントをOne-Potで効率的に縮合する連続的チオエステル法を開発し、単糖を持つTim-3 Ig様ドメインの合成を行った。従来法では、3セグメントの縮合を段階的に行うことで、目的のポリペプチドを得ていた。その結果、縮合ごとに精製工程を要し、目的物の収率や合成の効率を低下させる原因となっていた。そこで、芳香族、及びアルキルチオエステルから得られる反応性の差を利用し、One-Potにて3セグメントを連続的に縮合する連続的チオエステル法を開発することにした。また、従来法ではリシン側鎖アミノ基の保護基としてアジド基を用いていた。しかし、高い疎水性を有するアジド基により保護されたペプチドはしばしば難溶性を示し、逆相HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) による精製を困難にしていた。そこで、高親水性保護基であるイソニコチニルオキシカルボニル (*i*Noc) 基をアミノ基の保護基に用いることで、上記問題を解決できるか検討することにした。その結果、芳香族チオエステルとアルキルチオエステルは $Ag^+$ の有無で化学選択的に活性化をコントロールできることを見出した。この連続的チオエステル法により、3つのセグメントをOne-Potで縮合し、目的のTim-3 Ig様ドメインのポリペプチドを収率よく合成することに成功した。この際、*i*Noc基はセグメントの溶解性を損なうことなく、ペプチド側鎖アミノ基の保護基として用いることができた。得られたポリペプチドを脱保護、フォールディングすることで、GlcNAc付きIg様ドメインの合成を達成した。しかし、Ig様ドメインのフォールディング効率は低く、この量的確保を行うためには、より収率の高い合成方法を模索することが求められた。

第3章では、*O*-アシルイソペプチド法を用いて、均一な複合型糖鎖を有するTim-3 Ig様ドメイ

ンの合成を行った。前章にて行われたIg様ドメインの合成で、問題となったフォールディング効率の低下は、そのポリペプチドの難溶性に原因があると推定された。そこで、ペプチドの溶解性を向上することが知られている*O*-アシルイソペプチド構造をTim-3 Ig様ドメインに導入することで、この問題を解決することにした。その結果、本来のポリペプチドと比べ、イソペプチド構造を持つポリペプチドは高い溶解性を獲得し、効率よくフォールディング体を与えた。最後に得られたGlcNAc付きIg様ドメインに変異型Endo-Mを用いて、糖鎖転移反応することで、目的の均一な複合型糖鎖を有するTim-3 Ig様ドメインの合成に成功した。

第4章では前章で行われた化学酵素合成法における鍵化合物であるGlcNAcを有する糖ペプチドの簡便な調製法を開発した。従来法では、糖水酸基をベンジル基により保護した糖アミノ酸誘導体を用いていたため、固相合成終了後、TFA (Trifluoroacetic acid) カクテルによるペプチド側鎖保護基の脱保護と Low-TfOHによる脱ベンジル化の2回の脱保護工程を行うことで目的の糖ペプチドを調製していた。そこで糖水酸基保護基をベンジル基からTFA感受性保護基に変更することで、より簡便な糖ペプチドの調製法を確立することにした。新規に調製したアジド糖とアスパラギン酸誘導体との改変Staudinger反応により、TFA感受性保護基を有する糖アミノ酸誘導体を合成した。しかし、この誘導体は溶解性に乏しく、続くカルボキシル基の脱保護を行うことができなかった。そこで、難溶性の原因と思われたGlcNAcの2位アミド水素を除去するため、アセトアミド基の窒素に置換基を導入し、溶解性の向上を検討した。その結果、糖アミノ酸の溶解性が改善され、続くカルボキシル基の脱保護を経て、目的のTFA感受性保護基を有する糖アミノ酸誘導体へ導くことができた。次に、得られた糖アミノ酸誘導体を糖セグメントであるエムプリン (35-69) の合成に応用し、その結果、最終脱保護のTFAカクテルでペプチドの脱保護のみならず、糖水酸基の保護基も同時に除去することが可能になり、簡便に目的の糖セグメントを得ることができた。得られた糖セグメントを2章で開発された連続的チオエステル法にて縮合し、脱保護、フォールディング、糖鎖転移反応をすることで均一なアシアロ-及びジシアロ-複合型糖鎖を持つエムプリン第一Igドメインの合成に成功した。

本研究で開発された手法により、GlcNAcを有するペプチドをTFAカクテルによる処理のみで容易に調製することが可能となった。また、ペプチドセグメント縮合においては、One-Potチオエステル法で効率よく長鎖のポリペプチドを縮合することが可能となった。同時に、フォールディングが困難な難溶性ポリペプチドであっても、*O*-アシルイソペプチド法を用いれば効率よく合成ができることが見出された。これらの方法論の開発により、化学酵素合成法による種々の糖タンパク質の合成が可能になるものと期待される。