

東海大学大学院平成25年度博士論文

化学酵素法を利用した糖タンパク質の
合成研究

指導 北條 裕信 教授

小島 直也 教授

東海大学大学院総合理工学研究科

総合理工学専攻

朝比奈 雄也

略字

Ac	acetyl
Acm	acetamidomethyl
Ar	aryl
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
BrZ	2-bromobenzyloxycarbonyl
Bu ^t	<i>tert</i> -butyl
CD	circular dichroism
CDMBI	2-chloro-1,3-dimethyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-3-ium chloride
cHex	cyclohexyl
DCE	1,2-dichloroethane
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropylethylamine
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)pyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EGF	epidermal growth factor
Endo-M	Endo- β - <i>N</i> -glucosaminidase from <i>Mucor hiemalis</i>
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
Fuc	fucose
Gal	galactose
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalactosamine
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglucosamine
Glu	glucose
Gu	guanidine
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HOObt	hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine
Hoc	cyclohexyloxycarbonyl
<i>i</i> Noc	isonicotinyloxycarbonyl
MPA	3-mercaptopropionic acid

MPM	4-methoxybenzyl
Man	mannose
Mpt-MA	dimethylphosphinothionic mixed anhydride
NAC	<i>N</i> -alkylcysteine
NCL	native chemical ligation
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidine-2-one
NeuNAc	<i>N</i> -acetylneuraminic acid
Pac	phenacyl
Pfp	pentafluorophenyl
Ph	phenyl
RPHPLC	reversed-phase high performance liquid chromatography
SPPS	solid-phase peptide synthesis
TFA	trifluoroacetic acid
TIM	T-cell immunoglobulin mucin
TMB	trimethoxybenzyl
Tf	triflic
Tos	<i>p</i> -toluenesulfonyl
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trt	trityl

目次

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

第1章 序論

1-1	糖タンパク質の機能とその機能解明へのアプローチ	1
1-2	糖鎖とペプチドの化学的性質	6
1-3	固相法による糖ペプチド合成法	7
1-4	糖ペプチドの合成例	9
1-5	セグメント縮合法を用いた糖タンパク質の合成法	13
1-6	複数のセグメント縮合による長鎖のペプチドの合成	18
1-7	化学酵素合成法による糖タンパク質の合成	21
1-8	結論	23
1-9	参考文献	24

第2章 連続的チオエステル法による Tim-3 Ig 様ドメイン (1-107) の合成

2-1	緒言	27
2-2	糖タンパク質 Tim-3 Ig (immunoglobulin) 様ドメイン	30
2-3	合成戦略	30
2-4	ペプチドセグメントの合成	32
2-5	連続的チオエステル法による3セグメントの縮合	34
2-6	Ig ドメインの脱保護、及びフォールディング	35
2-7	結論	37
2-8	実験の部	37
2-9	参考文献	40

第3章 イソペプチド法を用いた Tim-3 Ig 様ドメイン (1-107) の合成

3-1	緒言	42
3-2	イソペプチド法を用いた Ig ドメインの合成戦略	44
3-3	イソペプチド構造を有する C 末端セグメント 4i の合成	45
3-4	イソペプチドの構築、脱保護とフォールディング	46
3-5	GlcNAc 付き Ig ドメインとオキサゾリンの糖鎖転移反応	48

3-6	CD スペクトルによる二次構造の解析	50
3-7	酵素消化を用いたジスルフィド架橋位置の決定	50
3-8	結論	52
3-9	実験の部	53
3-10	参考文献	57
第4章 TFA で脱保護可能な保護基を有する GlcNAc-Asn の開発		
4-1	緒言	58
4-2	TFA 感受性保護基を有する糖アミノ酸の合成	59
4-3	エムプリン第一 Ig ドメインの合成戦略	60
4-4	糖アミノ酸誘導体 2 を用いた糖セグメント 14 の合成	61
4-5	連続的チオエステル法による縮合とフォールディング	63
4-6	糖鎖転移反応による GlcNAc 付き Ig ドメインの糖鎖伸長	64
4-7	CD スペクトル解析による 2 次構造の解析	66
4-8	結論	66
4-9	実験の部	67
4-10	参考文献	76
第5章 総括		
		78

第1章 序論

1-1. 糖タンパク質の機能とその機能解明へのアプローチ

生体中のタンパク質の約半数は、様々な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、タンパク質との結合様式により、アスパラギン残基の側鎖アミド基に N-グリコシド結合している N-結合型糖鎖、またセリン、スレオニン側鎖水酸基に O-グリコシド結合している O-結合型糖鎖に大別される⁽¹⁾ (Figure 1-1)。これらの糖鎖は Figure 1-2 に示すように、さらにいくつかの種類に分けられている。N-結合型糖鎖は、還元末端 5 糖 (Man₃-GlcNAc₂) を母核構造とし、複合型、高マンノース型、混成型糖鎖と 3 つに大別される。複合型糖鎖は Gal-β-(1-4)-GlcNAc (LacNAc) を有した 2 分岐構造を有しており、真核生物の糖タンパク質に多く見出されている。高マンノース型はマンノースが多数分岐して構築されており、翻訳後修飾の初期に多く見出されている。混成型は複合型と高マンノース型糖鎖が組み合わされた糖鎖構造を有している。

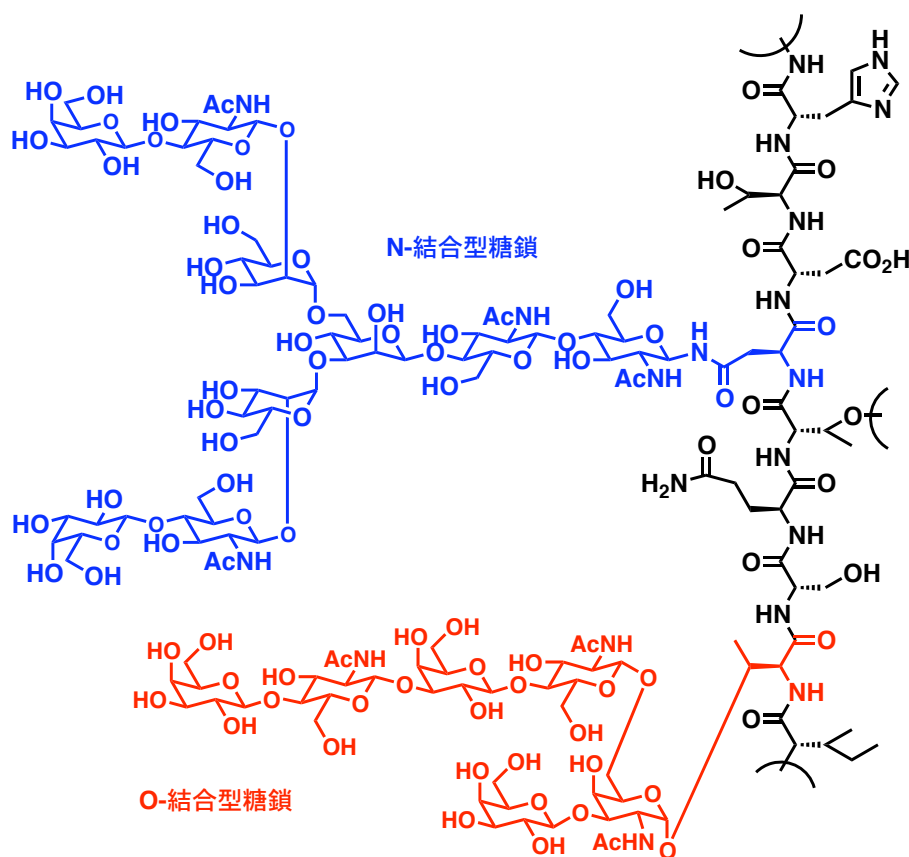
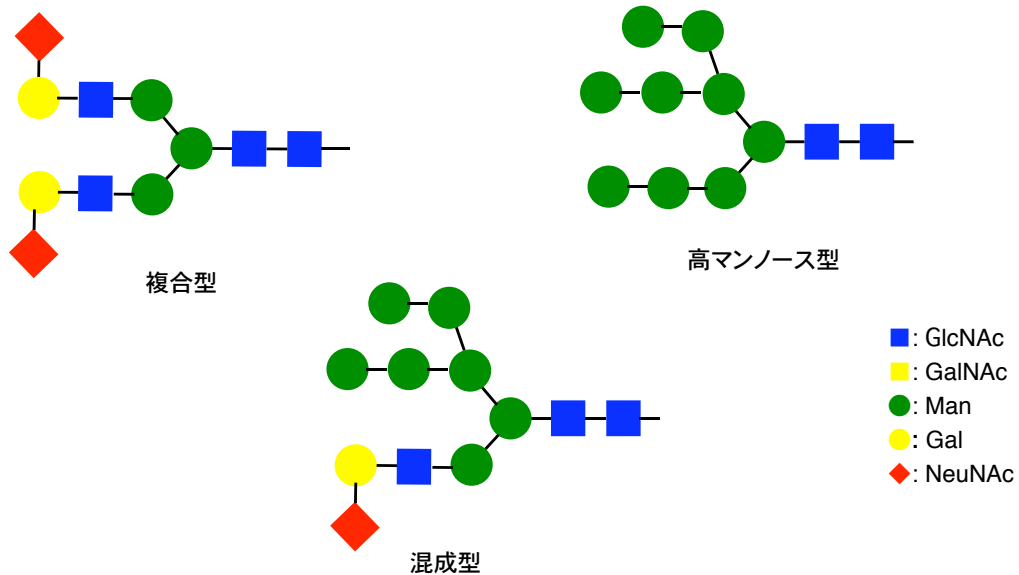


Figure 1-1 N-、及び O-結合型糖鎖の構造の一例。

N-結合型糖鎖



O-結合型糖鎖

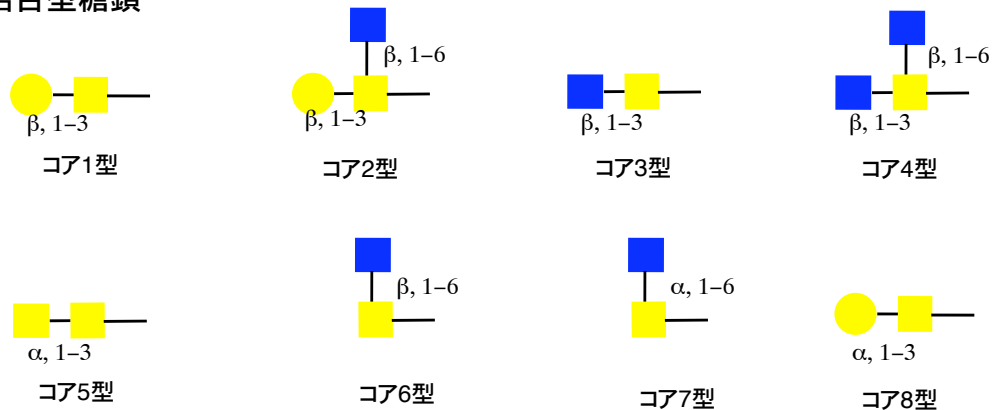


Figure 1-2 O-及びN-結合型糖鎖の分類。

O-結合型糖鎖では、還元末端の GalNAc を元に結合位置と立体、及び分岐構造によりコア 1 から 8 まで大別されている。

これらの糖タンパク質糖鎖は、タンパク質の翻訳中に構築される。N-結合型糖鎖の場合、粗面小胞体内腔で、ドリコール 2 リン酸に結合した $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ からなる 14 糖が、オリゴ糖転移酵素により、Asn-Xaa-Ser/Thr の配列中の Asn 側鎖アミド基に転移されることで形成される (Figure 1-3)。

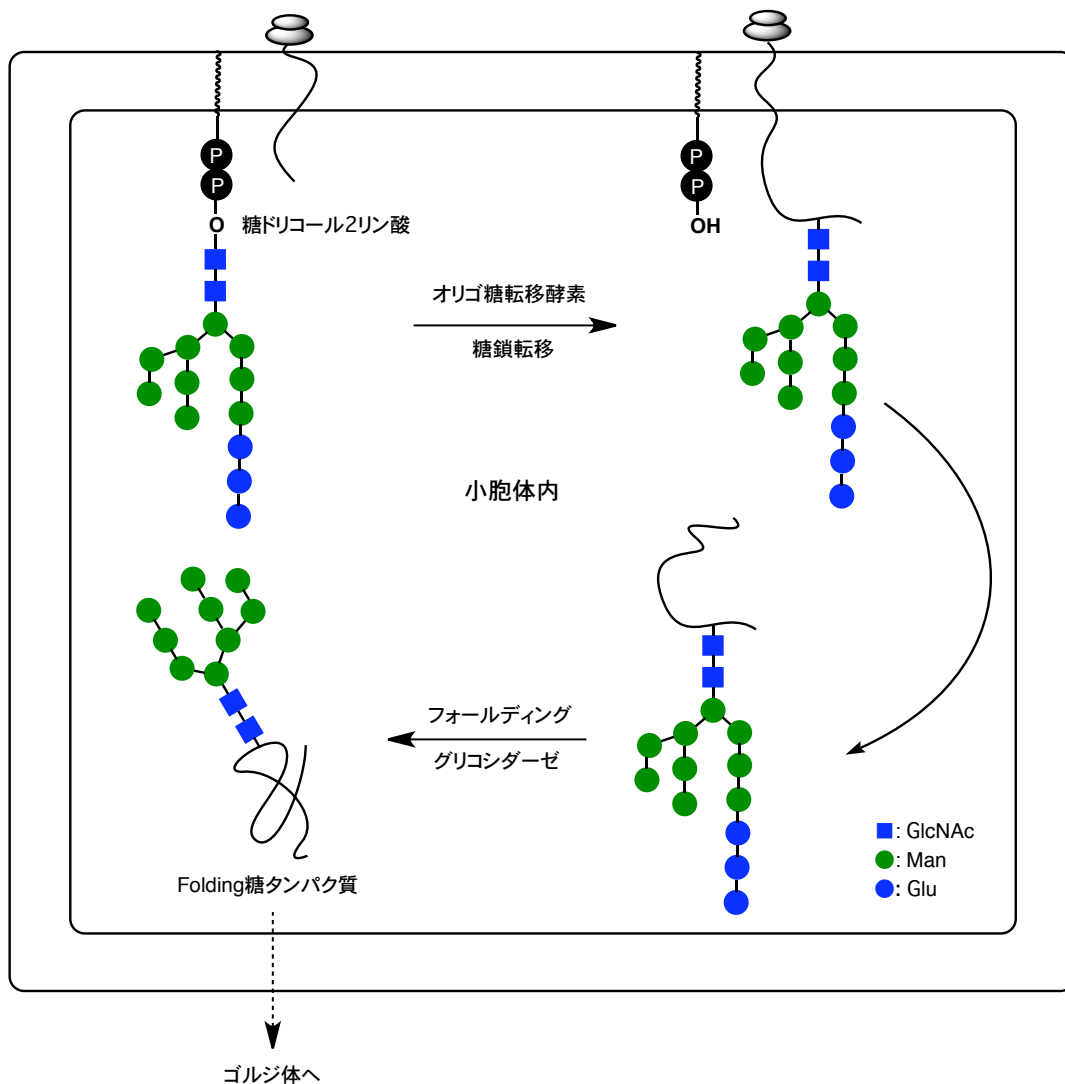


Figure 1-3 小胞体内での *N*-結合型糖鎖の生合成模式図。

小胞体内でフォールディングされた後、糖タンパク質はゴルジ体へ輸送され、さらに修飾を受ける (Figure 1-4)。*N*-結合型糖鎖においては、元の 14 糖構造から種々のグリコシダーゼによる糖鎖の加水分解、及びトランスフェラーゼによる糖鎖付加を受けることで、多様な糖鎖構造が構築される。これに並行してセリン、スレオニン残基の側鎖水酸基に単糖が逐次付加することで *O*-結合型糖鎖も構築される。これらの過程は競合し合いながら複雑に進行するため、結果、同じタンパク質にもかかわらず、糖鎖構造は高度に不均一化した状態で生成してしまう。このことを糖タンパク質糖鎖のマイクロ不均一性と呼ぶ。

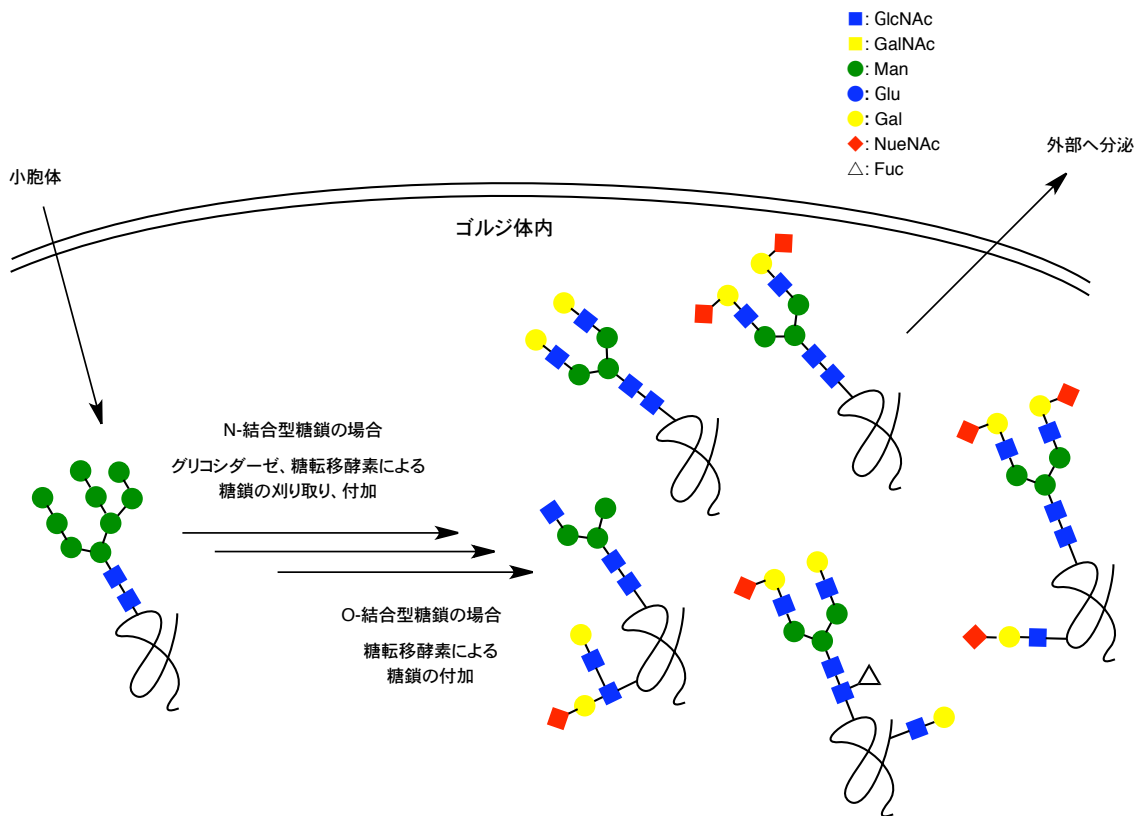


Figure 1-4 ゴルジ体内での糖タンパク質糖鎖の生合成。

これら糖タンパク質糖鎖は、細胞接着、受精、ガン化、ガン細胞の転移など数多くの生命現象に関わっていることが示唆されている。一例としてグライコデリン (glycodelin, Gd) の糖鎖機能について述べる⁽²⁾ (Figure 1-5)。Gdは生殖に関わる糖タンパク質であり、いくつかのグライコフォームが知られている。そのうち、子宮内で分泌されているグライコデリン-A (GdA) はAsn²⁸とAsn⁶³にGalNAc-β-(1-4)-GlcNAc (LacdiNAc) 構造を含むN-結合型複合型糖鎖を持っている。このGdAは精子の頭部に結合することで、精子-卵子間の相互作用を阻害することが知られている。一方、精液中に分泌されているグライコデリン-S (GdS) はAsn²⁸に高マンノース型糖鎖、及びAsn⁶³にLewis^x [Fuc-α-(1-3)-{Gal-β-(1-4)}-GlcNAc]が含まれた複合型糖鎖を有する。GdSは精子の頭部を保護することで、GdAと頭部間の結合を防ぐ役割を有する。以上のように、グライコデリンはその機能が糖鎖構造により制御されている一つの例といえる。

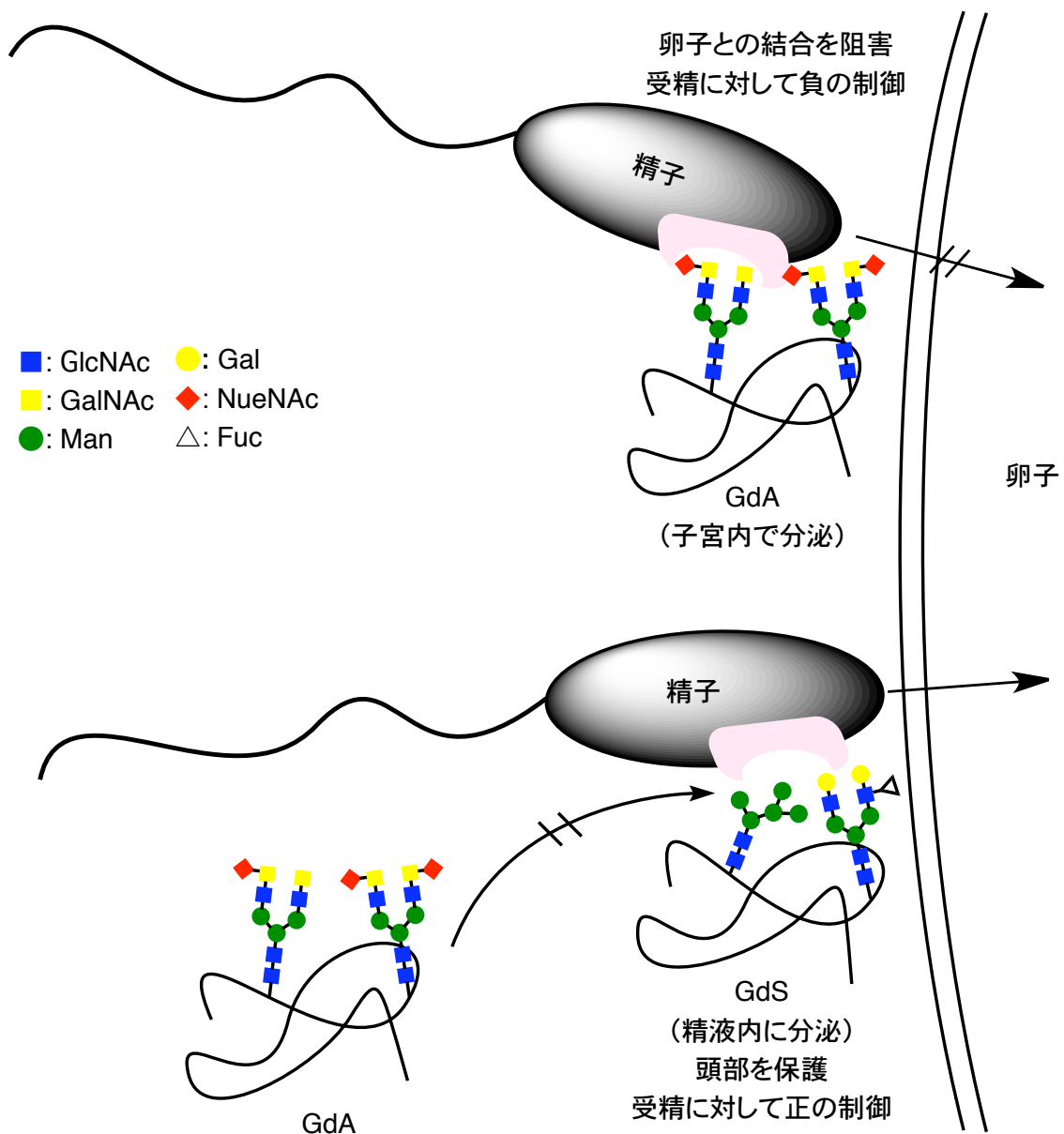


Figure 1-5 Glycodelin の糖鎖と活性の相関。

糖タンパク質糖鎖の重要性にもかかわらず、その機能の詳細は未だ不明瞭であることが多い。なぜなら、機能解析に必要となる均一な糖鎖を持つ糖タンパク質を得ることが困難なためである。そこで、有機化学的手法により、糖タンパク質を合成することが、糖鎖機能の解明を行う一つの手法になると期待される。このような観点から、糖タンパク質や糖ペプチドの化学合成研究が多くの化学者により行われている。

1-2. 糖鎖とペプチドの化学的性質

ペプチドは20種類のアミノ酸がアミド結合を介し、直線状の分子構造を形成している (Figure 1-6)。その効率的な化学合成を実現するため、これまで保護基やアミド結合形成法、また脱保護法等について数多くの研究がなされてきた。その結果、1-3 に述べる固相合成法が開発され、短いペプチドに関しては簡便で、迅速な合成が可能となっている。ペプチドの合成においては、強塩基性条件下で α 位がラセミ化する懸念があるため、一般に弱塩基性から酸性条件が用いられる。

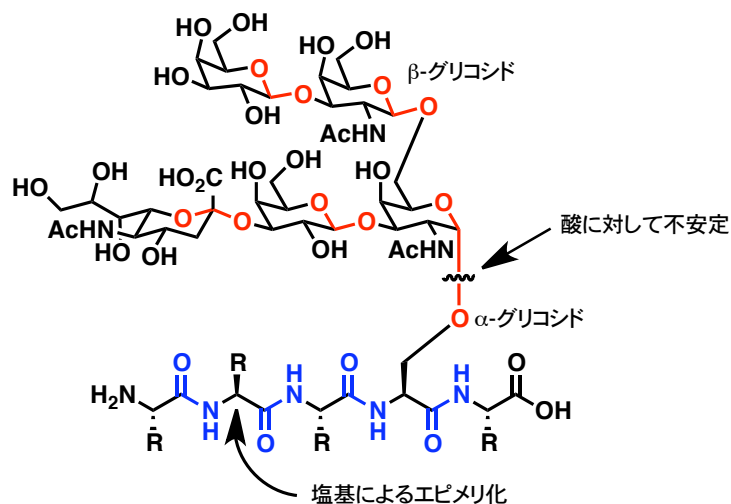


Figure 1-6 糖鎖とペプチド鎖の構造。

一方、糖鎖はグリコシド同士が酸素原子を介したアセタール結合で構築されている。糖鎖はそれを構成する単糖が有する水酸基に、いくつかの糖がグリコシド結合することにより、分岐していることが多い。これに加えて α,β -グリコシド結合による立体異性が存在することにより、糖鎖はペプチド鎖に比較して複雑な分子構造を持っている。これらの複雑な糖鎖構造の効率的な化学合成を目指して、保護基、グリコシル化法等などの膨大な研究がなされてきた。しかし、現在のところ、完全に立体制御されたグリコシル化法はなく、ペプチドのような固相合成法は完成されていない。このため、化合物に応じた液相中での糖鎖合成を種々行っているのが現状である。糖鎖合成では、アセタール結合が強酸性条件下で容易に加水分解されることを考慮し、弱酸から塩基性条件での反応

が用いられる。このような化学的性質、及び構造の違いにより、ペプチド化学と糖鎖化学はそれぞれ独立して発展してきた。このためペプチドと糖鎖の複合体である糖タンパク質の場合には、双方の化学的性質を考慮した合成化学を確立する必要がある。

1-3. 固相法による糖ペプチド合成法

糖ペプチドを調製する際、ペプチド固相合成法（Solid-Phase Peptide Synthesis, SPPS）を用いる方法が有用である。固相合成法の概要を Figure 1-7 に示す。まず α -アミノ基を保護したアミノ酸を樹脂に導入することで、C末端アミノ酸を固相担体に固定化する。次に α -アミノ基の保護基を除去し、樹脂上に新たなアミノ基を生成する。上記工程を繰り返すことでペプチド鎖の伸長を行うことができる。この際、予め適切に保護した糖アミノ酸誘導体を調製し、他のアミノ酸と同様に固相担体へ導入することで糖ペプチド樹脂へと導くことができる。伸長終了後、酸処理により、側鎖保護基の除去と脱樹脂を行うことにより、糖ペプチドを得る。

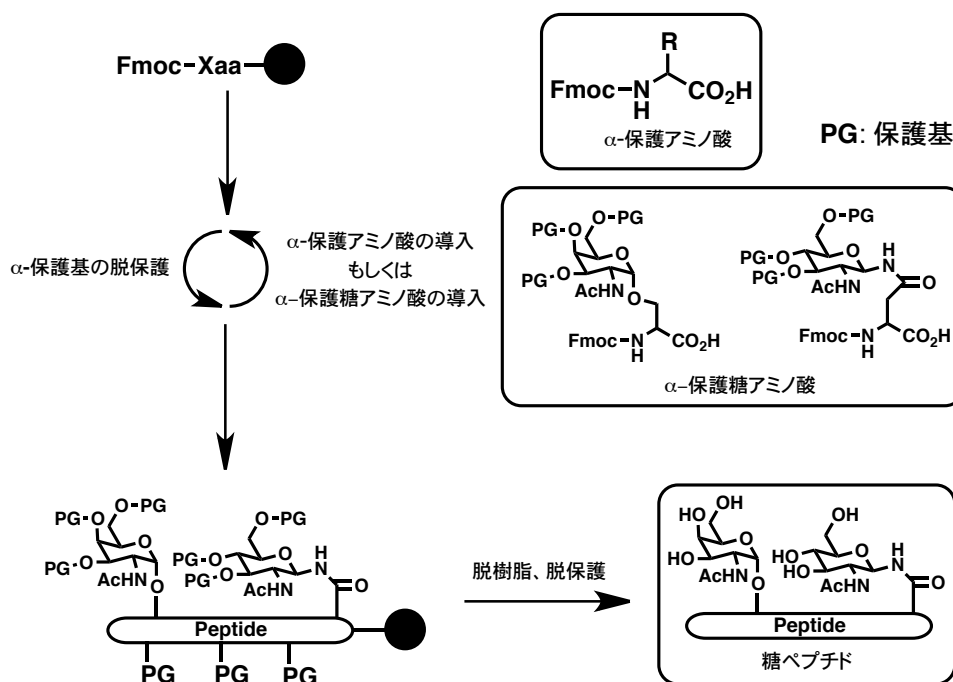
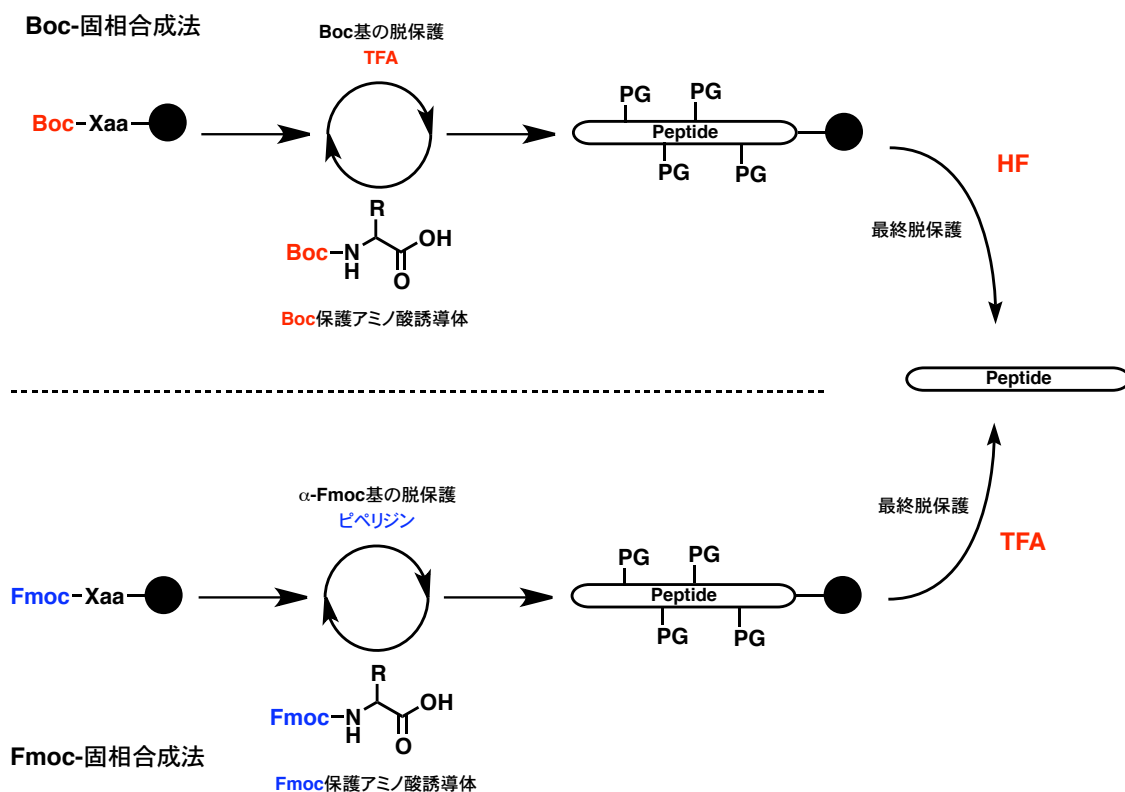


Figure 1-7 ペプチド固相合成法による糖ペプチドの調製。

Figure 1-8 に示すように、固相合成法は大きく分けて α -アミノ基の保護基として *tert*-butoxycarbonyl (Boc) 基を用いた Boc 法、及び 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) 基を用いた Fmoc 法がある。Boc 法では α -アミノ基の脱保護を TFA 処理により、最終脱保護は強酸である無水 HF によって達成される。一方、Fmoc 法においては、 α -アミノ基の脱保護を弱塩基であるピペリジン処理で、最終脱保護を弱酸である TFA 処理により行われる。温和かつ一度の酸処理のみでペプチドを得ることができるため、Fmoc 法は糖鎖、及びペプチドの化学的性質に調和した方法であると言える。そのため、多くの糖ペプチドは Fmoc 法により調製されている。



Scheme 1-8 Boc 及び Fmoc 法によるペプチド固相合成。

1-4. 糖ペプチドの合成例

次に、固相合成法を用いた糖ペプチドの合成例をいくつか述べる。いずれの報告も別途調製した保護糖アミノ酸ユニットを用いることは共通であるが、糖水酸基の保護方式が異なっている。

糖水酸基にアシル系保護基を用いた合成例

Otvos らは糖水酸基を Ac 基で保護した α -Fmoc 糖アミノ酸 Pfp エステルを調製し、これを固相担体に導入することで、糖ペプチド樹脂を合成した⁽³⁾ (Figure 1-9)。得られた糖ペプチド樹脂を TFA で脱保護し、遊離した Ac 保護糖ペプチドをけん化することで、N-結合型糖ペプチドを得ている。NaOH による強塩基性条件にて Ac 基の除去を行なっているため、Ac 基の転位、 β -脱離によるデヒドロアラニン化、アミノ酸のラセミ化等の副反応が懸念される。実際、Otvos らの合成では、アルカリけん化中に Ac 基が N 末端アミノ基に転位する副反応が観測されている。Meldal らも同様に Ac 保護糖アミノ酸を用いて、Fmoc 固相合成法により糖ペプチドの調製を行なっている⁽⁴⁾。この際、Ac 基の脱保護は MeOH 中 NaOMe

処理にて行われており、GlcNAc 付き glucoamylase の部分配列の合成に成功している。この脱保護条件下では、 β -脱離によるデヒドロ化やラセミ化などの副反応を起こすことなく脱保護ができると報告されている (Figure 1-10)。

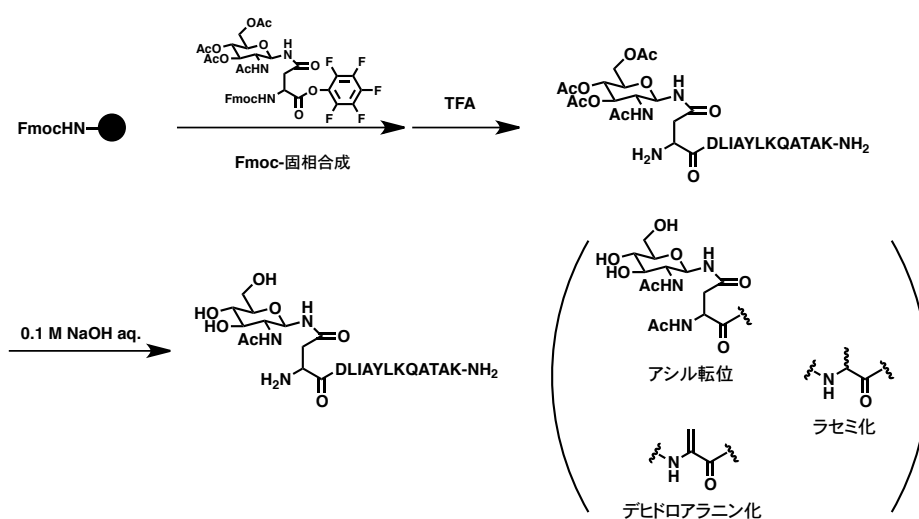


Figure 1-9 Ac 保護戦略における糖ペプチド合成。

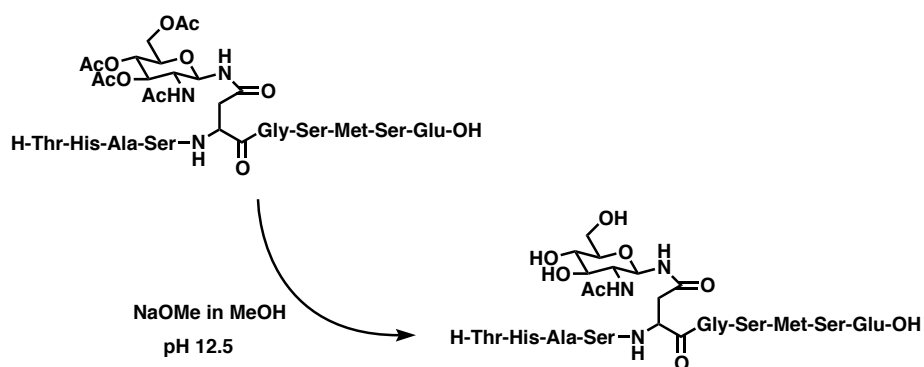


Figure 1-10 NaOMe 処理による glucoamylase 部分配列の合成。

また Kihlberg らは、NaOMe を用いた脱保護反応を NMR により詳細に解析した⁽⁵⁾。この報告によると、MeOH 中の NaOMe による脱 Ac 化処理では、アミノ酸残基のラセミ化は確認されず、またβ-脱離によるデヒドロ化も 5%以下に抑えられることが見出されている (Figure 1-11)。

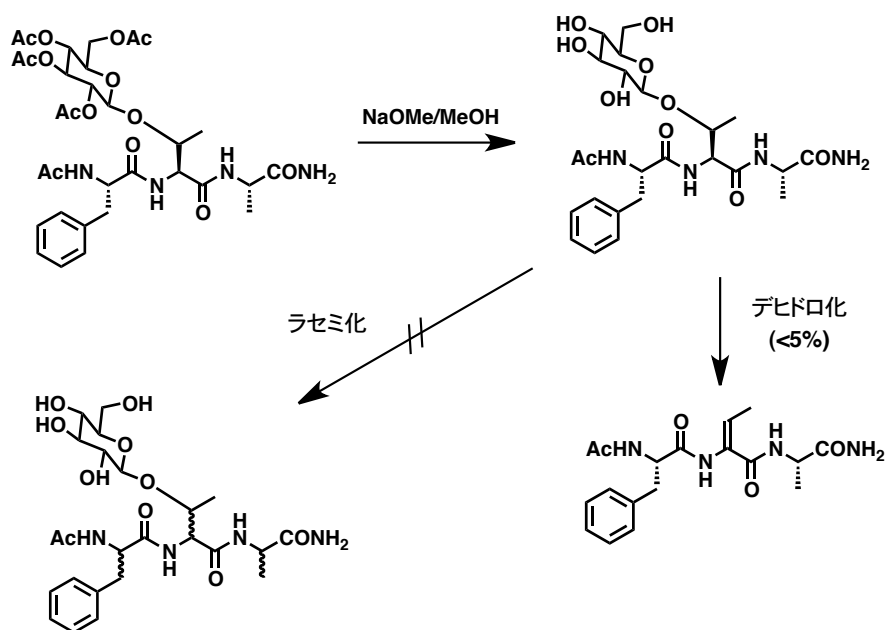


Figure 1-11 NaOMe による脱保護時の副反応の検証。

アシル系保護基を用いた糖アミノ酸合成は、その糖鎖構造が単純な場合には容易であるため、これまで多数の糖ペプチド合成がアシル系保護基を用いて行われている。しかし、ポリペプチド鎖が長くなるにつれて、アミノ酸側鎖の官能基が増加するため、脱アシル化条件下での副反応の増加が懸念される。また、後に述べるセグメント縮合法において重要な鍵中間体であるペプチドチオエステルには、この塩基処理を行うことができない。

糖水酸基が無保護の糖アミノ酸を用いた合成例

Otvosらは水酸基が無保護のGlcNAc及びGlcNAc₂-AsnのPfpエステルを用いた糖ペプチドの合成を行なっている⁽⁶⁾。またMeldalらも同様に水酸基無保護の3糖アミノ酸誘導体を固相法で導入し、EGF様ドメイン(51-56)の合成を行なっている⁽⁷⁾(Figure 1-12)。保護糖アミノ酸を用いる戦略に比べ、この方法ではペプチド鎖と糖鎖の2段階の脱保護処理を行うことなく、糖ペプチドを得られることが利点である。また、梶原らは無保護の11糖アミノ酸を利用して、エリスロポエチン(79-85)の合成を行なっている⁽⁸⁾。しかし、無保護糖アミノ酸を用いる方法では、これを導入した後のペプチド鎖伸長で、糖鎖水酸基のO-アシル化が引き起こされることが懸念される。そのため、糖アミノ酸を導入してからのペプチド鎖伸長は比較的短いものが多い。稲津らは温和なアシルドナーであるジメチルチオホスフィン酸混合無水物(Mpt-MA)を用いて糖ペプチド伸長を行うことで、O-アシル化を抑えつつ、カルシトニン(1-10)の合成を達成している⁽⁹⁾。

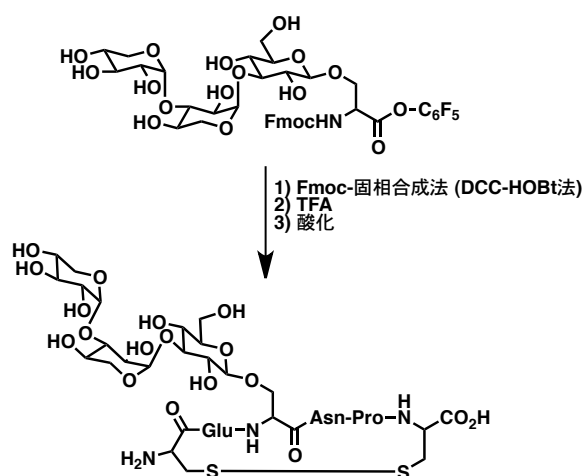


Figure 1-12 無保護糖アミノ酸を用いた EGF 様ドメインの部分配列の合成。

糖水酸基保護基がベンジル基で保護された糖アミノ酸を用いた合成例

最後に糖水酸基を Bn 基にて保護した糖アミノ酸誘導体を用いた糖ペプチド合成について述べる。Bn 基は酸性条件で除去することが可能であり、アシル基保護で問題となった β -脱離、 α -エピメリ化、また *O*-アシル化などの問題を回避できる利点がある。糖鎖合成の原料となる Bn 保護された単糖誘導体の調製は Ac 保護糖に比べると工程数が多い。しかし、Bn 基で保護した糖鎖は高い反応性を有するため、複雑な糖鎖構造を構築する際には有効である。中原らは Bn 基を保護基として 3 糖アミノ酸誘導体の合成を行い、固相合成法に応用した⁽¹⁰⁾ (Figure 1-13)。通常の脱樹脂条件の TFA 処理後、TMSOTf/TFA/thioanisole⁽¹¹⁾ 処理により脱 Bn 化を行うことで、B-chain α 2HS 糖ペプチドの合成に成功している。また、Bn 保護戦略によりコア 2 型 4 糖アミノ酸誘導体の合成を行った後、低濃度 TfOH⁽¹²⁾ 処理を経て、Leukosialin (215-224) の合成に成功している⁽¹³⁾。この他にも、いくつかの大きな糖鎖構造を持つアミノ酸や、そのペプチドが合成されており、コア 2 型 10 糖を持つペプチドの合成にまで展開された⁽¹⁴⁾ (Figure 1-14)。しかし、糖鎖構造が巨大になると、糖鎖に全く損傷を与えることなく Bn 基を除去することが困難であることが明らかとなった。

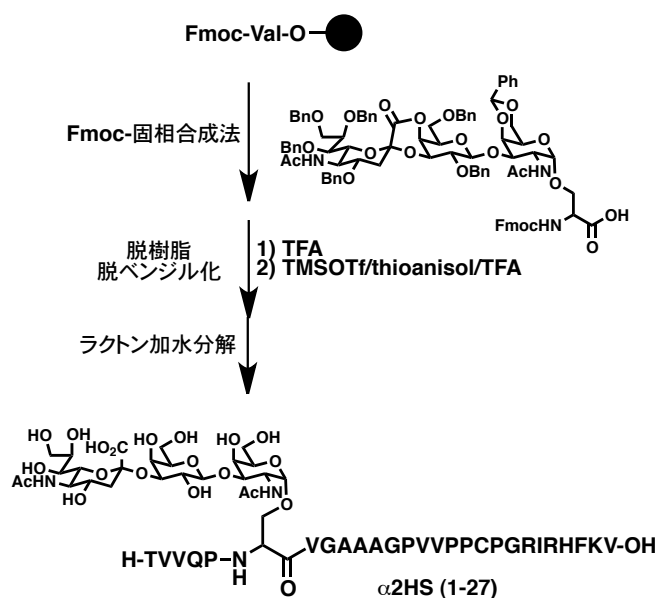


Figure 1-13 Bn 保護戦略を用いた糖ペプチド (α 2HS 部分配列) の合成。

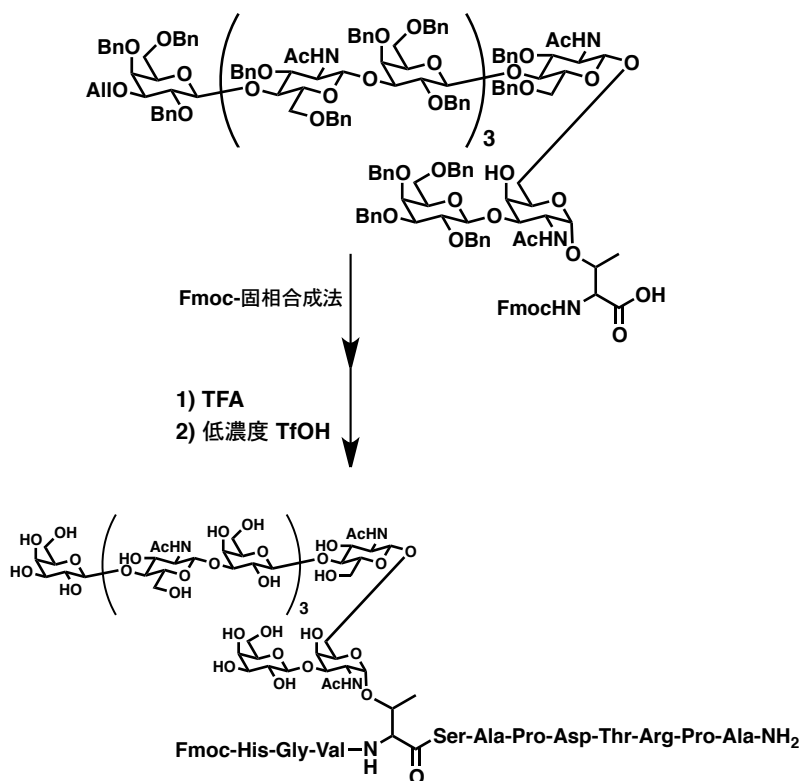


Figure 1-14 Bn 保護戦略によるコア 2 型 10 糖ペプチド合成。

1-5. セグメント縮合法を用いた糖タンパク質の合成法

先に述べたように糖ペプチド調製において固相合成法は汎用されている。しかし、長鎖の糖ペプチドを調製する際、アミノ酸の導入を繰り返すたびに、ペプチド伸長の効率が低下し、目的物と副生成物との分離が困難になる。そのため、一般的には 30~50 残基程度が固相合成法の限界とされている。これ以上のポリペプチド鎖を合成するには、固相法により合成したペプチドセグメント同士を縮合する、セグメント縮合法を用いるのが一般的である。現在、タンパク質を合成する際、主に用いられているのはネイティブケミカルライゲーション法 (NCL) 法とチオエステル法の 2 種類である。両方法ともチオエステルが縮合の要として用いられている。

NCL法を用いた糖タンパク質の合成

NCL法はKentらに開発された手法であり、概要をFigure 1-15に示す⁽¹⁵⁾。まず、C末端にチオエステル結合を有するペプチドセグメント、及びN末端に遊離のシステインを有するセグメントを固相法により調製する。両セグメントを中性緩衝液中で混合すると、チオエステルとシステイン残基間でチオエステル交換反応した中間体が生成する。その後、自発的なS-to-Nアシル転位により、速やかにアミド結合を形成することで縮合が完結する。本手法の利点は、チオエステル交換反応が分子間で特異的に進行するため、ペプチドのC末端をチオエステルとする以外、すべての官能基が無保護のまま、セグメント縮合が可能である。BertozziらはGalNAcを有する糖ペプチドセグメント(1-24)と(25-82)を固相合成法にて調製し、これらをNCL法にて縮合することでdiptericinの合成を行なっている⁽¹⁶⁾。

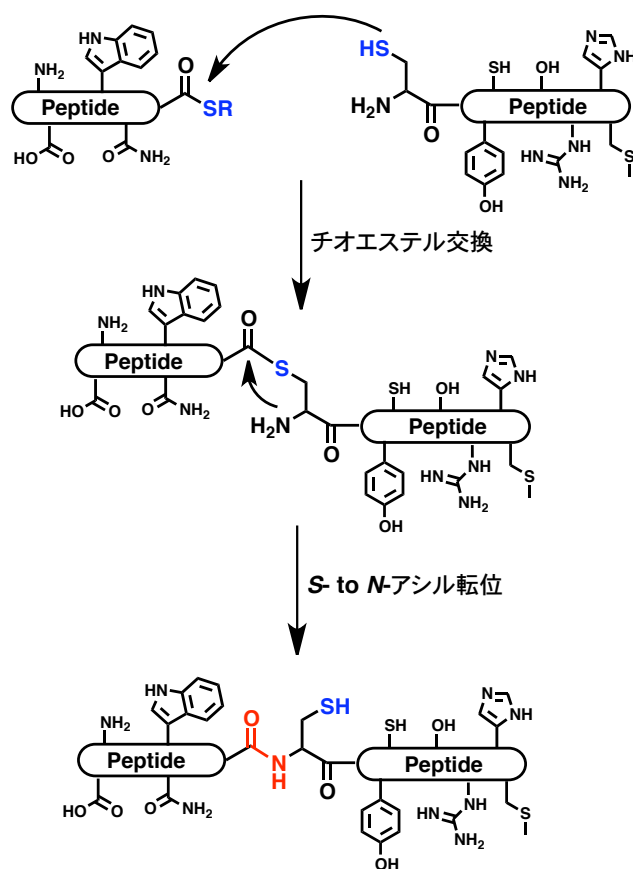


Figure 1-15 NCL法によるセグメント縮合。

しかし、NCL 法はその反応機構上、縮合位置に必ずシステイン残基を必要とする。システイン残基がタンパク質中で占める比率は低く、必ずしもシステイン残基が縮合に適する位置に存在するとは限らない。この問題を解決すべく、Dawson らは NCL による縮合後、そのシステインのチオール基を Raney ニッケルによって脱硫することで、アラニンに変換する方法を開発した⁽¹⁷⁾。ついで、Danishefsky らはホスフィンを用いた温和な脱硫条件を見出すことに成功した⁽¹⁸⁾ (Figure 1-16)。本手法によりアラニンもライゲーション位置として選択することが可能となり、梶原ら、Danishefsky らはシステインの含有率が少ないエリスロポエチン (1-166) の合成に成功している^(19,20)。しかし、この脱硫反応を用いる際には、本来タンパク質中に存在するシステイン残基を選択的に保護する必要がある、なおかつ、そのシステインは縮合部位として利用することができなくなってしまう。そのため、縮合部位の制限という問題が完全に解決されたとは言えず、未だタンパク質の一次配列に左右されているのが現状である。

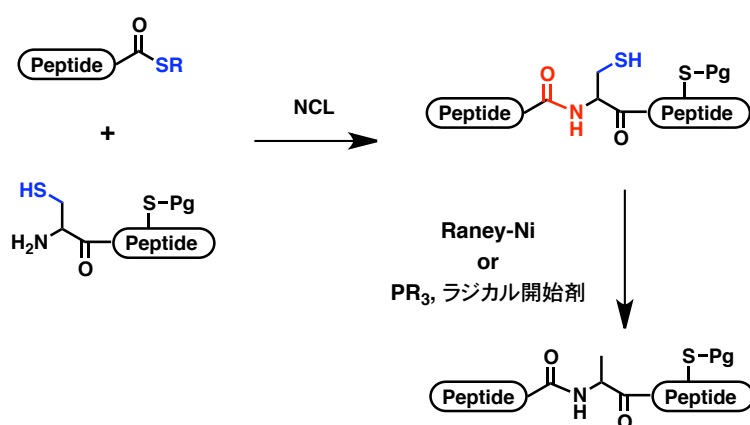


Figure 1-16 脱硫反応を用いた Ala 部位での NCL 法。

チオエステル法を用いた糖タンパク質の合成

次にチオエステル法の概要を Figure 1-17 に示す⁽²¹⁾。本手法はまず、ペプチド側鎖チオール、及びアミノ基を保護した C 末端にアルキルチオエステルを有するセグメントと、末端アミノ基のみ遊離となった C 末端セグメントを調製する。次に両セグメント共存下、Ag⁺を添加することでアルキルチオエステルを活性化し、HOObt との活性エステルへ導く。ここで、C 末端セグメントのアミノ基がアシル化することで、望む縮合体が得られる。この反応機構上、チオエステル

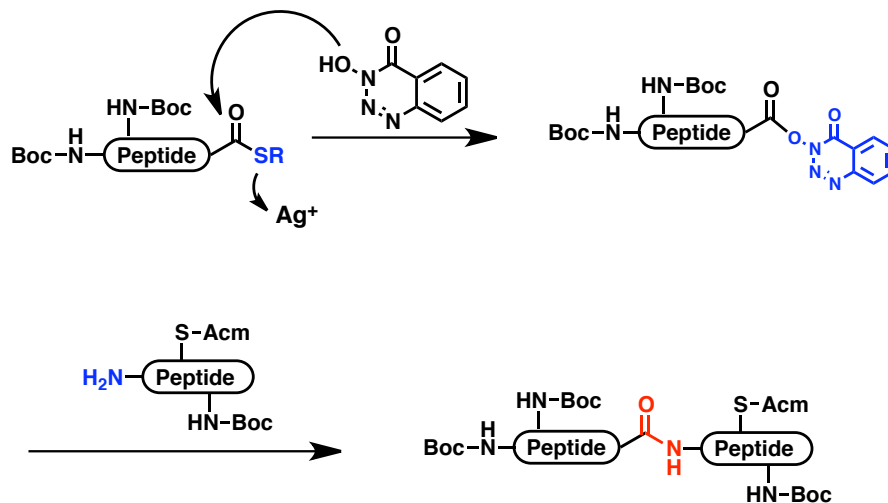


Figure 1-17 チオエステル法によるセグメント縮合。

法ではセグメントの分割はどのアミノ酸間でも可能である。但し、縮合反応中のラセミ化の懸念を無くすためには、 α -エピメリ化が生じない Gly-/Pro-Xaa 配列間で縮合を行うことが有効である。天然に存在するタンパク質中には Gly、Pro 残基が数多く存在するため、ほとんどの場合はこれら配列を縮合部位として、選択することが可能である。

稲津らは前項で述べた Mpt-MA 法と無保護糖アミノ酸を用いることで糖ペプチドチオエステルセグメントを調製し、C 末端セグメントとチオエステル法により縮合することで、目的とする GlcNAc 付きカルシトニン (1-32) の合成に成功している⁽⁹⁾ (Figure 1-18)。また北條らは Bn 保護戦略によって構築した 5 糖

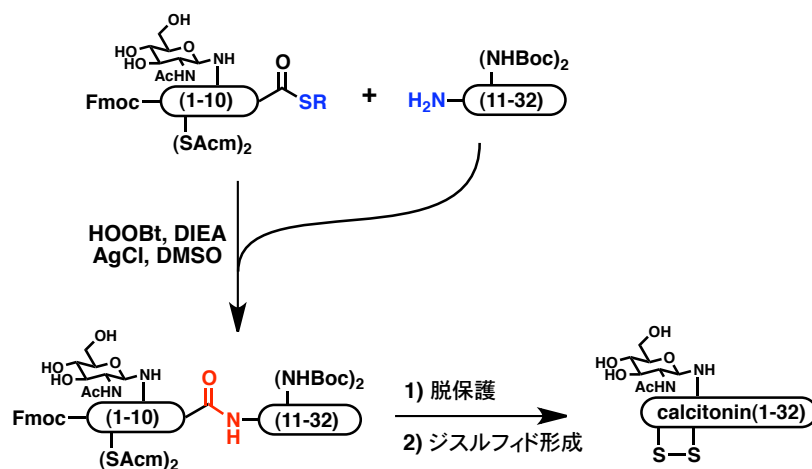


Figure 1-18 チオエステル法によるカルシトニンの合成。

アミノ酸誘導体を用いることで糖ペプチドチオエステルを合成し、チオエステル法により 5 糖付きエムプリン (34-94) の合成に成功している⁽²²⁾。

チオエステル法では縮合時に重金属である Ag^+ を用いるため、遮光下での反応が必須であり、また、反応中に生成する不溶性の銀-硫黄化合物を分離する操作に若干の注意が必要であった。北條らは、従来用いていたアルキルチオエステルを芳香族チオエステルに変更することで、 Ag^+ を添加することなく縮合反応が進む Ag^+ -Free チオエステル法を見出した⁽²³⁾ (Figure 1-19)。この方法により、2つのセグメントを混合する簡便な操作のみで縮合を行うことが可能となった。

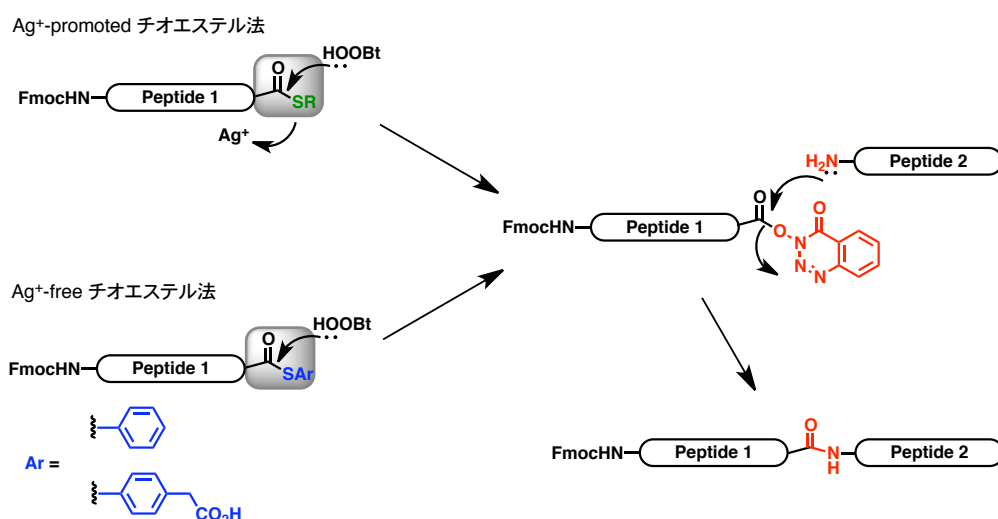


Figure 1-19 Ag^+ -promoted チオエステル法と Ag^+ -free チオエステル法。

また、チオエステル法で選択的に縮合を行うためには、リシン残基の側鎖アミノ基とシステイン残基の側鎖チオール基を保護したセグメントを調製する必要がある。従来法では、固相合成時に側鎖アミノ基を Boc 基で保護したリシン誘導体を用いていたため、最終脱保護後に遊離したアミノ基を持つセグメントが得られていた (Figure 1-20)。そのため、再度 Boc 基で保護、精製する工程を要していた。片山らは脱樹脂条件と直行したアジド基に変換したリシン誘導体を導入することで、脱保護後に直接保護セグメントを得る手法を確立した^(24, 25)。これにより、セグメント精製後に Boc 基による再保護を行う工程が不要になり、より簡便な合成が可能となった。

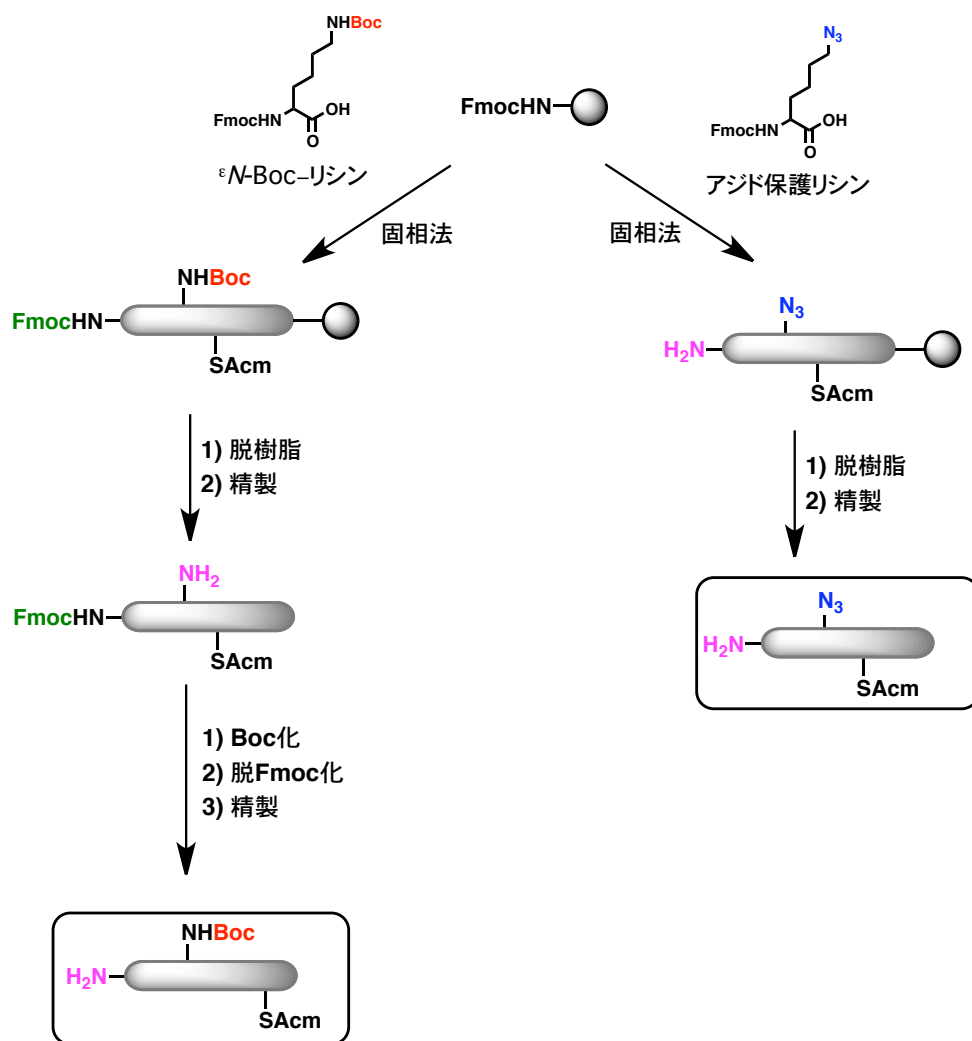


Figure 1-20 ϵ -N-Boc リシンを用いた従来のセグメント調製法。

1-6. 複数のセグメント縮合による長鎖のペプチドの合成。

より長いポリペプチドを合成するためには、末端アミノ酸残基が保護された複数のペプチドセグメントを調製し、前項で述べたような縮合法を繰り返し行うことで達成される。梶原らはNCL法により、3つのセグメントをC-N末端方向へ段階的に縮合を行い、MCP-3 (1-76) の合成に成功している⁽²⁶⁾。Figure 1-21に示した様に、まず、末端システインがホルムアセタール保護された中央セグメント (11-34) とC末端セグメント (36-76) とのNCL法による縮合を行う。次にホルムアセタールを脱保護し、精製することで、新たに末端システインが

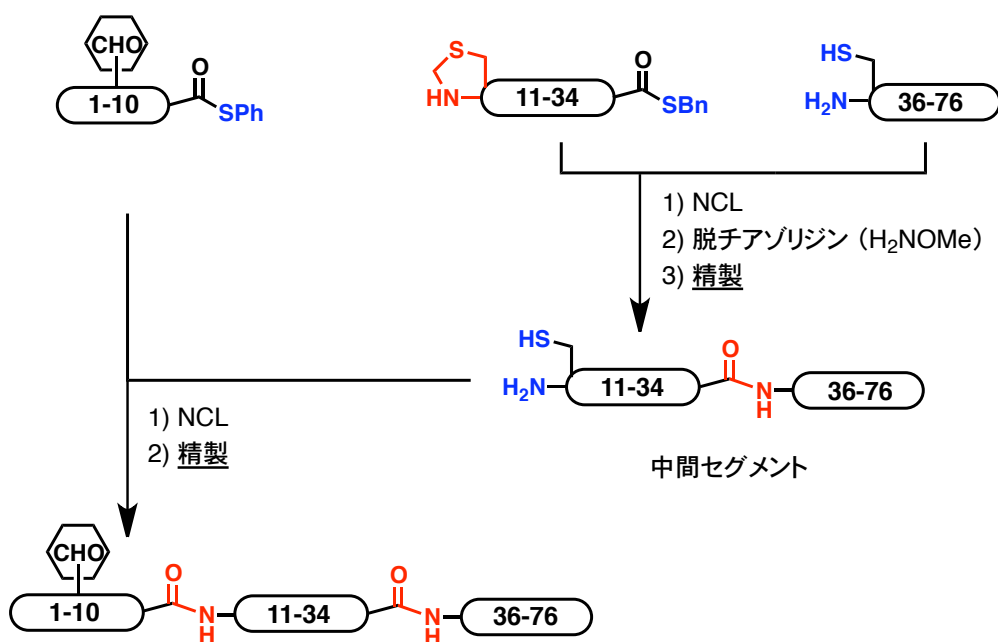


Figure 1-21 段階的な NCL 法による MCP-3 の合成

遊離した中間セグメントを得る。続いて N 末端セグメント (1-10) との縮合を行い、目的の MCP-3 ポリペプチドを得ている。本手法は中間セグメントの脱保護、精製工程を伴うため、縮合反応は段階的に行う必要がある。

これに対して、上記方法とは逆方向の N-C 方向へ、連続的にセグメント縮合を行う手法が開発された。Kent らは芳香族チオエステルとアルキルチオエステルの反応性の差を利用する KCL (Kinetically Controlled Ligation) 法を開発し、クラウンの合成に応用している⁽²⁷⁾ (Figure 1-22)。KCL 法では、両チオエステルセグメントの速度論支配による選択的な縮合により、One-Pot で 3 セグメントの縮合体を効率よく得ることが可能である。しかし、NCL 法の律速段階である分子間チオエステル交換反応の速度は、チオエステルのアミノ酸残基に大きく依存していることが知られている⁽²⁸⁾。すなわち、第一縮合時の両チオエステル間に優位な反応速度の差が得られなければ、選択的に縮合することができないため、その結果、合成に応用可能なタンパク質はかなり限定される。比較的短いセグメントでの KCL 法による縮合例は、いくつか報告されているものの、巨大なタンパク質の合成に応用するためには、より詳細な研究が必要であると考えられる⁽²⁹⁾。

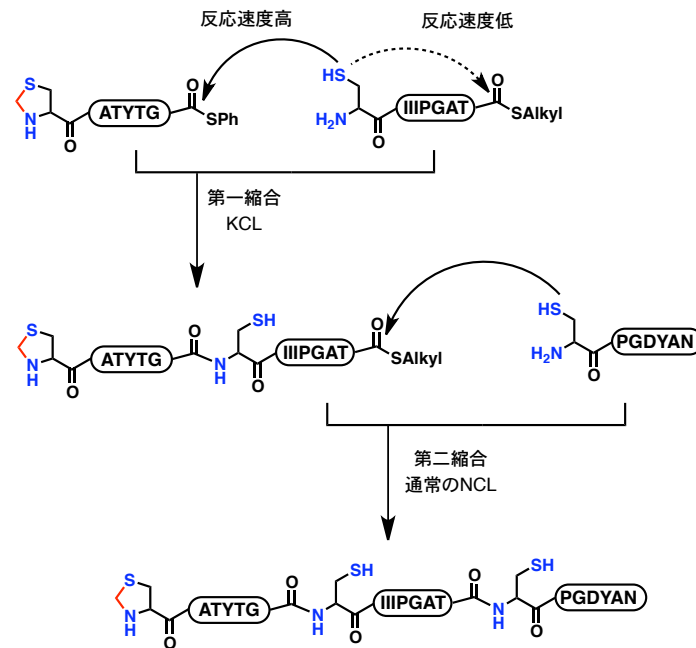


Figure 1-22 KCL 法を用いたクランビン部分配列の One-Pot 縮合。

チオエステル法でも複数のセグメントを繰り返し縮合することで、より長いポリペプチド鎖を合成することができる。北條らは、6つのチオエステルセグメントを段階的に縮合することで、MUC2の繰り返し配列の合成を行っている⁽³⁰⁾ (Figure 1-23)。この例では、末端アミノ基をFmoc基で保護した糖チオエステ

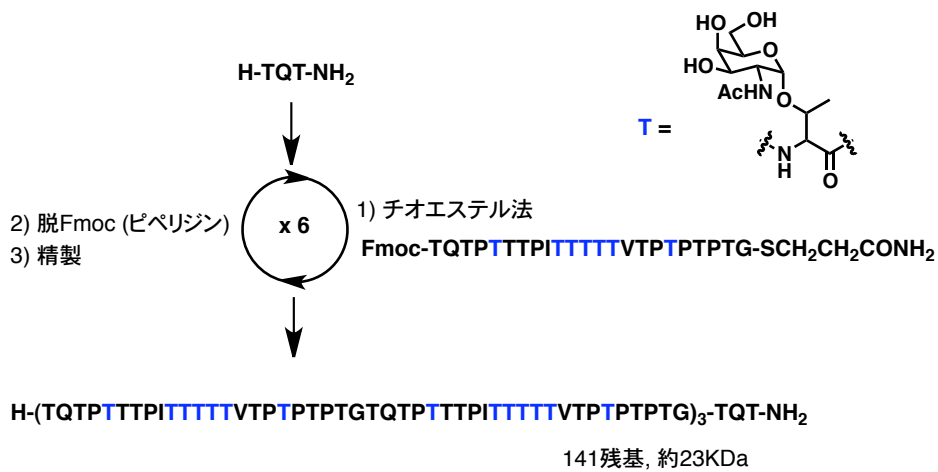


Figure 1-23 MUC2 繰り返し配列の合成。

ルセグメントの縮合、脱 Fmoc 化、及び精製工程を順次繰り返すことで 23KDa の巨大なポリペプチド合成を行っている。しかし、チオエステル法でも NCL 法と同様に末端アミノ酸残基の保護基の除去を伴うことから、各反応で精製を要する。その結果、セグメント縮合は段階的に行われていた。

1-7.化学酵素合成法による糖タンパク質の合成

1-4 で述べたように、糖ペプチドを合成するには、液相法にて糖鎖を予め構築した Fmoc-糖アミノ酸誘導体を用いられる。しかし、固相法で糖アミノ酸を導入する際には、樹脂に対して過剰の誘導体を用いる必要があり、得られる糖ペプチドの収率は多くても 10%前後であることが一般的である。このため、多工程に渡って合成された貴重な糖アミノ酸誘導体の大半が無駄になってしまう。一方、比較的合成が容易な単糖アミノ酸を固相法に用いて、単糖ペプチドを調製した後に、糖鎖転移酵素を用いてオリゴ糖を構築する、化学酵素合成法がある。

Endo- β -glucosaminidase (Endo-M) はもともと N-結合型糖鎖のキトビオース間の結合を加水分解する酵素である。山本らは Endo-M の加水分解反応の逆反応により、加水分解基質（糖供与体）の糖鎖が、そのまま系中に加えた GlcNAc 残基（糖受容体）を持つペプチドに転移することを見出した⁽³¹⁾。また稲津らは、あらかじめ卵白から均一な糖アミノ酸を調製した後⁽³²⁾、この糖鎖を化学合成した GlcNAc 含有ペプチドに対して糖鎖転移反応を行うことで、均一なジシアロ型 11 糖を有するカルシトニンの合成を行った⁽³³⁾ (Figure 1-24)。この化学酵素合成法は GlcNAc を有したタンパク質さえ調製することができれば、使用する糖供与体に対応した糖鎖構造を得ることができる。すなわち、糖鎖の構築を最終段階で行う収束的合成と、糖鎖の多様性に対応できる多分岐的合成が同時に実現することが可能である。

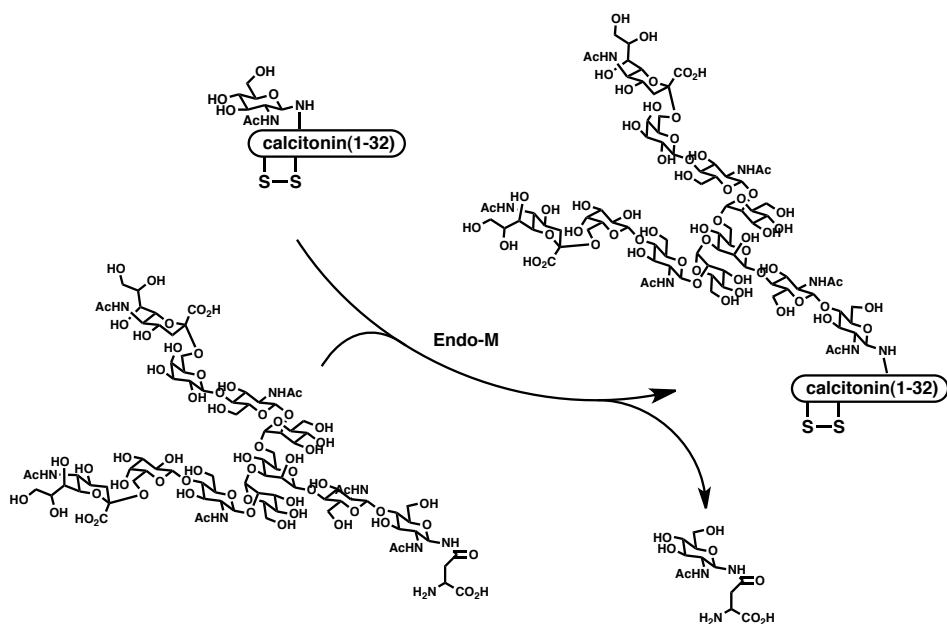


Figure 1-24 Endo-M を用いた化学酵素合成法。

しかし、Endo-M が本来から有する加水分解能と糖鎖転移能が競合するため、得られる糖ペプチドの収率が低いことに大きな問題があった。そこで、Wang らは糖供与体の還元末端をオキサゾリン化した糖鎖を用いると、糖鎖転移反応が速度論的に加水分解反応に対して加速され、収率よく目的化合物が得られることを見出した⁽³⁴⁾。さらに山本らは、構造活性相関の詳細な検討により、生成した目的物を加水分解する活性を無くした変異体 Endo-M を見出し、糖鎖の導入効率が飛躍的に高まることを報告した⁽³⁵⁾。北條らは、これら改良された方法により、化学的に調製した GlcNAc を持つタンパク質に糖鎖オキサゾリンと変異型 Endo-M を用いて糖鎖転移反応することで、9 糖付きサポシン C (1-80) の合成を達成している⁽³⁶⁾ (Figure1-26)。

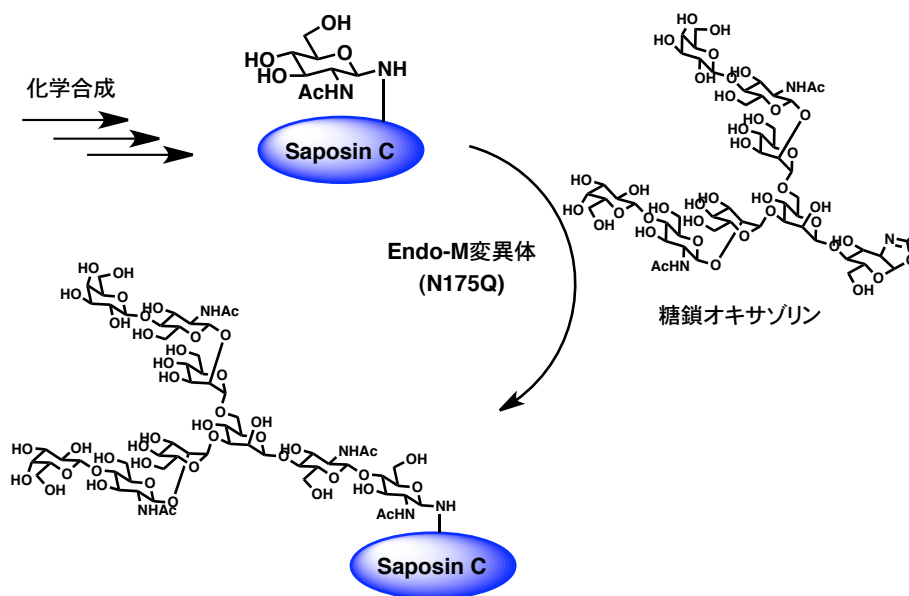


Figure 1-26 糖鎖オキサゾリンと変異 Endo-M を用いた化学酵素合成法。

1-8. 結論

本章では既存の糖ペプチド、及び糖タンパク質の合成方法論を議論した。糖鎖とペプチドとの化学的性質が大きく異なるため、それら複合体である糖タンパク質は双方の性質を考慮した方法により調製することが必要である。その結果、あらかじめ液相法で調製した糖アミノ酸誘導体を用いて、温和な酸性条件で脱保護できる Fmoc 固相法により糖ペプチドを調製する方法が一般的にとられてきた。糖アミノ酸誘導体の保護戦略にはいくつかの種類があるが、いずれも一長一短である。しかし、30-50 残基程度の糖ペプチド、もしくはチオエステルセグメントを調製する際には、我々が用いてきた、酸性条件にて脱保護可能な Bn 基を用いることが有効であるように思われる。しかし、固相法では糖アミノ酸を過剰量用いることが一般であり、得られる糖ペプチドの収率は低いため、多大な労力をかけて調製した糖アミノ酸の大半が無駄になる。これに対して、変異型 Endo-M と糖オキサゾリンを用いた化学酵素合成法は GlcNAc を 1 つ有する糖ペプチド、もしくはタンパク質を調製さえすれば、対応した糖供与体を糖鎖転移反応により、合成の最終段階で糖鎖を効率よく導入することが可能である。また、糖供与体を種々変更することで、多様なグリコフォームの糖タン

パク質を得ることも可能である。以上の議論を踏まえ、現在のところ、糖タンパク質のグリコフォームに対応できる調製法は化学酵素合成法ではないかと考えられる。

我々はすでに化学酵素合成法でサポシン C の合成に成功している⁽³²⁾。この合成においては Bn 保護基を有する GlcNAc-Asn 誘導体を固相合成により導入することで、化学酵素合成法において鍵化合物である GlcNAc 付き糖ペプチドを調製していた。このため、脱保護の際、通常の TFA 処理と低濃度 TfOH 処理の 2 度の脱保護を要し、調製に煩雑性がある。

また、長鎖のポリペプチドを合成するためには、1-5 で述べたように、固相合成したセグメント同士をセグメント縮合法により連結する工程を行う。この際、用いられているのは NCL 法とチオエステル法であり、双方には異なった長所がある。縮合部位の選択において両方法を比較すると、チオエステル法の方がタンパク質の一次構造に依存せず、柔軟なセグメント分割を計画することができるため、有利であると言える。しかし、100 残基を超える様な大きな糖タンパク質をセグメント縮合で合成するには、より効率の高い手法の開発が望まれる。

本研究で著者は、化学酵素合成法による糖タンパク質の合成において鍵となる GlcNAc 付きタンパク質を効率的に合成するため、連続的チオエステル法の開発と、その原料である糖ペプチドの簡便な調製法を確立することにした。

1-9. 参考文献

1. Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*, Wiley, 1996.
2. Seppala, M.; Koistinen, H.; Chiu, P. C. N.; Yeung, W. S. B. *Hum. Reprod.*, **2007**, *13*, 275-287.
3. Otovos, L. Jr.; Wroblewski, K.; Kollat, E.; Perczel, A.; Hollosi, M.; Fasman, G. D.; Ertl, H. C. J.; Thurin, J. *Peptide Res.*, **1989**, *2*, 362-366.
4. Meldal, M.; Bock, K. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 6987-6990.
5. Sjolín, P.; Elofsson, M.; Kihlberg, J. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 560-565.
6. Otvos, L. Jr.; Urgeb, L.; Hollosib, M.; Wroblewskic, K.; Graczykc, G.; Fasmand, G. D.; Thurina, J. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 5889-5892.
7. Reimer, K. B.; Meldal, M.; Kusumoto, S.; Fukase, K.; Bock, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1993**, 925-932.

8. Yamamoto, N.; Ohmori, Y.; Sakakibara, T.; Sasaki, Ken.; Juneja, L. R.; Kajihara, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 2537-2540.
9. Mizuno, M.; Muramoto, I.; Kawakami, T.; Seike, M.; Aimoto, S.; Haneda, K.; Inazu, T. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 55-58.
10. Nakahara, Y.; Nakahara, Y.; Ito, Y.; Ogawa, T. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 7211-7214.
11. Fuji, N.; Otaka, A.; Ikemura, O.; Akaji, K.; Funakoshi, S.; Hayashi, Y.; Kuroda, Y.; Yajima, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 274-275.
12. Tam, J. P.; Heath, W. F.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 5242-5251.
13. Singh, L.; Nakahara, Y.; Ito, Y.; Nakahara, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *325*, 132-142.
14. Ueki, A.; Takano, Y.; Kobayashi, A.; Nakahara, Y.; Hojo, H.; Nakahara, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *66*, 1742-1759.
15. Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. *Science*, **1994**, *226*, 776-779.
16. Shin, Y.; Winans, K. A.; Backes, B. J.; Kent, S. B. H.; Ellman, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *121*, 11684-11689.
17. Yan, L. Z.; Dawson, P. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 526-533.
18. Wan, Q.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 9248-9252.
19. Murakami, M.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 3567-3572.
20. Wang, P.; Dong, S.; Brailsford, J. A.; Iyer, K.; Townsend, S. D.; Zhang, Q.; Hendrickson, R. C.; Shieh, J. H.; Moore, M. A. S.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 11576-11584.
21. Hojo, H.; Aimoto, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, *64*, 111-117.
22. Mizuno, M.; Muramoto, I.; Kawakami, T.; Seike, M.; Aimoto, S.; Haneda, K.; Inazu, T. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 55-58.
23. Hojo, H.; Haginoya, E.; Matsumoto, Y.; Nakahara, Y.; Nabeshima, K.; Toole, B. P.; Watanabe, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 2961-2964.
24. Hojo, H.; Murasawa, Y.; Katayama, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 1808-13.
25. Katayama, H.; Hojo, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*,

- 5492-5494.
26. Yamamoto, N.; Tanabe, Y.; Okamoto, R.; Dawson, P. E.; Kajihara, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 501-510.
 27. Bang, D.; Pentelute, B. L.; Kent, S. B. H. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006** *45*, 3985–3988.
 28. Hackeng, T. M.; Griffin, J. H.; Dawson, P. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 10068-10073.
 29. Raibaut, L.; Ollivier, N.; Melbyk. O. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 7001-7015.
 30. Hojo, H.; Matsumoto, Y.; Nakahara, Y.; Ito, E.; Suzuki, Y.; Suzuki, M.; Suzuki, A.; Nakahara, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 13720–13725.
 31. Yamamoto, K.; Kadowaki, S.; Fujisaki, M.; Kumagai, H.; Tochikura, T. *Biosci. Biothec. Biochem.* **1994**, *58*, 72-77; Yamamoto, K.; Kadowaki S.; Watanabe, J.; Kumagai, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *203*, 244-252.
 32. Inazu, T.; Mizuno, M.; Yamazaki, T.; and Haneda, K. *Peptide Science*, **1999** (Kondo, M. ed.), 153–156.
 33. Mizuno, M.; Haneda, K.; Iguchi, R.; Muramoto, I.; Kawakami, T.; Aimoto, S.; Yamamoto, K.; Inazu, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 284–290.
 34. Li, B.; Zeng, Y.; Hauser, S.; Song, H.; Wang, L. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *47*, 1-6.
 35. Umekawa, M.; Huang, W.; Li, B.; Fujita, K.; Ashida, H.; Wang, L. X.; Yamamoto, K. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 4469–4479.
 36. Hojo, H.; Tanaka, H.; Hagiwara, M.; Asahina, Y.; Ueki, A.; Katayama, H.; Nakahara, Y.; Yoneshige, A.; Matsuda, J.; Ito, Y.; Nakahara, Y. *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 9437–9446.

第2章 連続的チオエステル法による Tim-3 Ig 様ドメイン (1-107)の合成

2-1. 緒言

最初に報告されたチオエステル法は Ag^+ によるチオエステルの活性化を利用して2つのセグメントを縮合する方法であった⁽¹⁾。次いで、芳香族チオエステルを用いた Ag^+ -Free チオエステル法が開発され、 Ag^+ を用いること無く縮合を行うことが可能となった⁽²⁾。 Ag^+ -Free チオエステル法により合成された CCL27 (1-95)の合成経路を Figure 2-1 に示す。CCL27 (1-95) の3つのセグメント A、B、C をそれぞれ固相合成法で調製し、セグメント A、B を芳香族チオエステルへ誘導した。次に、C 末端セグメント C から N 末端セグメント方向へ順次セグメント縮合を行うことで、目的の CCL27 のポリペプチドを合成している。しかし、本手法では縮合後の脱 Fmoc 処理に用いられた過剰のピペリジンを除くため、得られた中間セグメントを精製することが必須であった。その結果、各セグメント縮合は段階的に行われていた。もし、3セグメントの縮合を One-Pot で連続的に行うことができれば、従来法より収率と効率ともに向上したポリペプチド鎖の調製をすることができると考えられる。

そこで従来法のチオエステル法と Ag^+ -Free チオエステル法の活性化条件に着目した。アルキルチオエステルと芳香族チオエステルの反応性には明確な差が

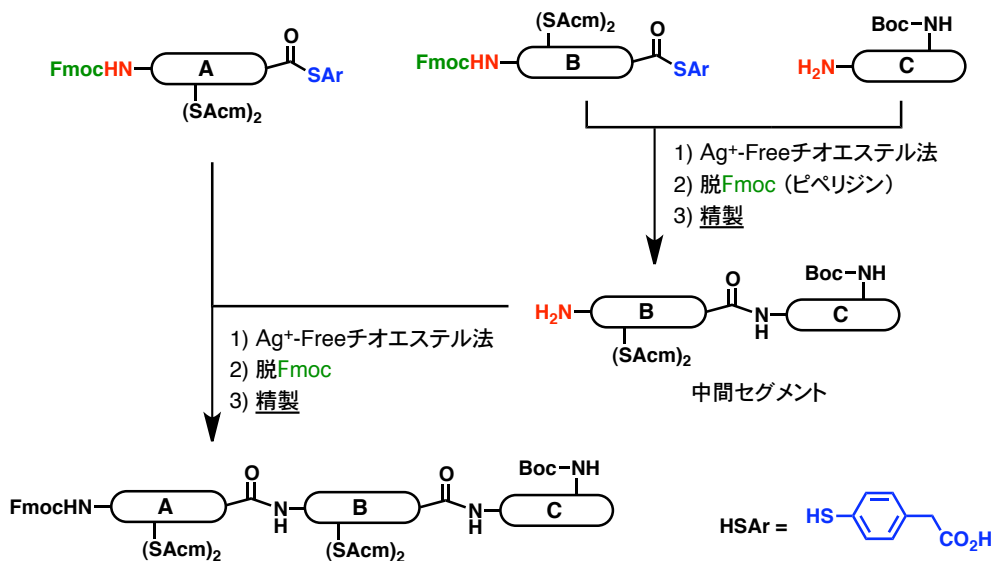


Figure 2-1 Ag^+ -Free チオエステル法による CCL27 の合成。

あり、原理的には、 Ag^+ イオンの有無により、それらの選択的活性化を行うことが可能であると推測される。これら推測を踏まえ、3セグメントを **One-Pot** にて縮合する連続的チオエステル法が可能であると考えた (Figure 2-2)。すなわち、N 末端セグメントを芳香族チオエステル、また、中央セグメントをアルキルチオエステルとして調製する。第一段階の縮合を Ag^+ -Free チオエステル法条件下で行うと、芳香族チオエステルが選択的に活性化され、中央セグメントとの縮合体である中間体セグメントを得ることができる。続いて、C 末端セグメントと Ag^+ を反応混合液に加え、中間体セグメント中のアルキルチオエステルを活性化することで、第二の縮合を行う。その結果、望む 3 セグメントの縮合体を **One-Pot** で得ることが可能であると考えた。この様に従来とは逆の N-C 末端方向への縮合を行うことにより、途中段階での脱保護、精製を回避し、長鎖のポリペプチドが効率よく得られることが期待できる。

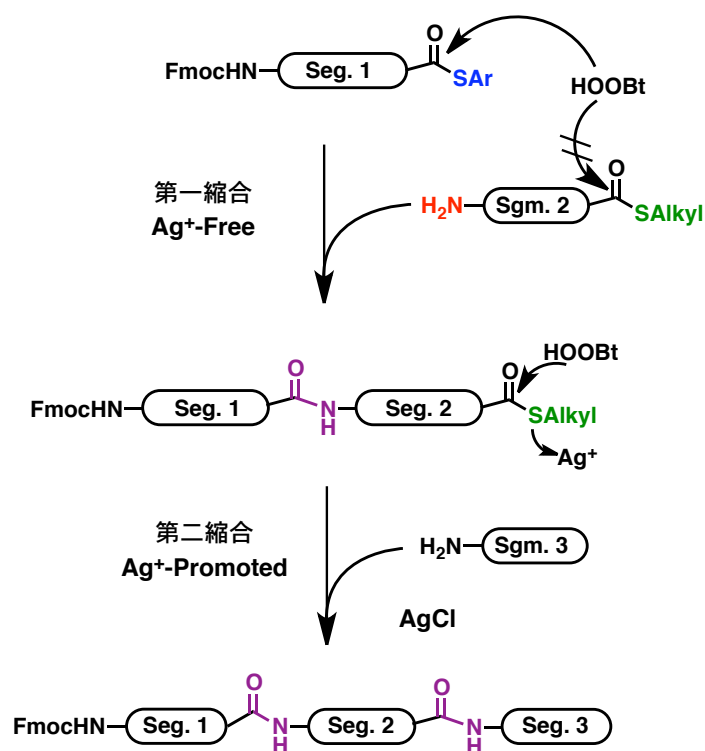


Figure 2-2 連続的チオエステル法による one-pot 縮合反応。

また、序論 1-5 で述べたように、ペプチド側鎖アミノ基の保護基を、従来用いていた Boc 基からアジド基へ変換したアミノ酸誘導体を用いることで、セグメントの再保護工程を回避することができる⁽³⁾。しかし、元のアミノ基に比べアジド基は高い疎水性を示すため、アジド保護ペプチドは無保護のペプチドに比べ、CH₃CN 水溶液に対して溶解性が低い (Figure 2-3)。その結果、セグメントはしばしば難溶となり、RPHPLC による精製が行えないことが問題となっていた。高い極性を持ち、なおかつペプチドの脱保護条件と直交した保護基を用いることが、この問題の解決策となることが考えられる。Veber らはアミノ基の保護基として isonicotinylloxycarbonyl (*i*Noc) 基を開発した⁽⁴⁾。*i*Noc 基は酸に対して高い安定性を示し、なおかつアジド基と同様に Zn 還元により容易に脱保護することが可能である。また *i*Noc 基に含まれるピリジン環の高い極性により、CH₃CN 水溶液に対して高い溶解性があると期待できる。この *i*Noc 基を上記のチオエステル法に応用し、保護基として有用性があるかどうかを確かめることにした。本研究では親水性保護基 *i*Noc 基の利用と芳香族チオエステル、及びアルキルチオエステルの反応性を利用した、ペプチドセグメントの One-Pot 連続的縮合法を開発することにした。

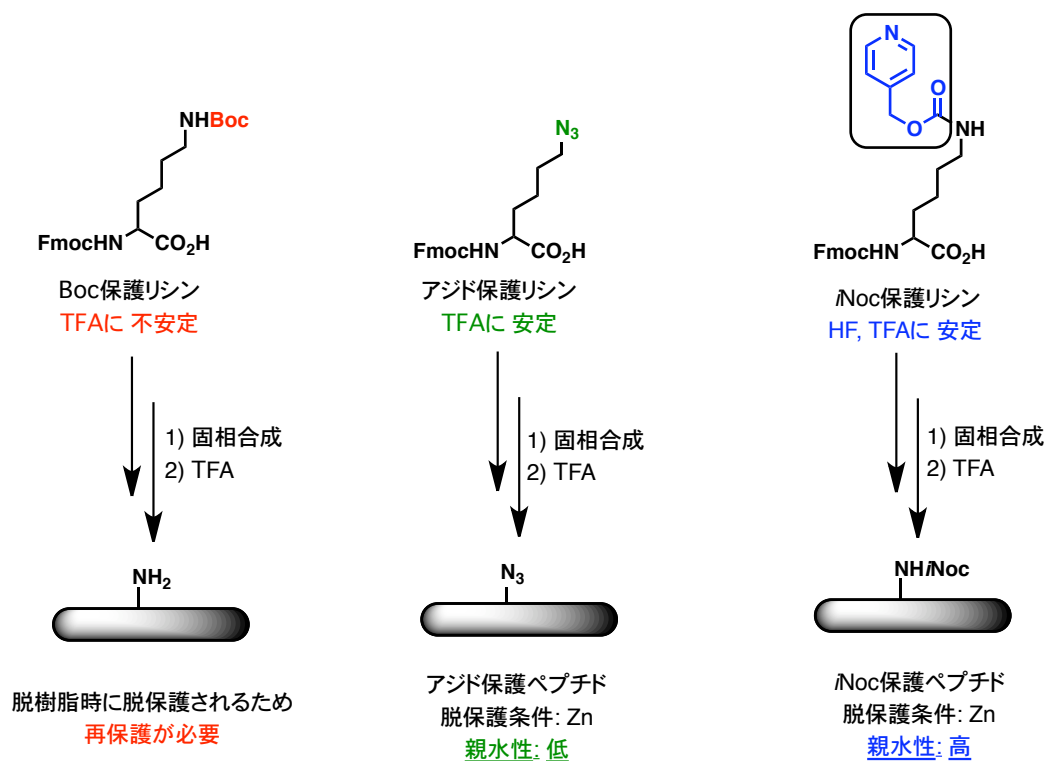


Figure 2-3 *i*Noc 基の構造及び特性。

2-2. 糖タンパク質 Tim-3 Ig (immunoglobulin)様ドメイン

本手法の有用性を検討するため、糖タンパク質 Tim-3 (T-cell immunoglobulin mucin 3) Ig 様ドメインの合成を行った。Tim-3 は Th-1 細胞、樹状細胞、マクロファージの表層上に存在する膜タンパク質であり、種々の免疫応答、制御に関わっていることが知られている。Tim-3 は細胞外ドメインである Ig 様ドメインに N-結合型複合型糖鎖を有しており、この糖鎖を動物レクチンの一種であるガレクチン-9 が認識することで、細胞内にシグナルが伝達され、その Th-1 細胞の細胞死を誘導することが示唆されている。Almo らによって、糖鎖の無い Ig 様ドメインはすでに大腸菌発現系で調製され、X 線解析により立体構造は解析されている⁽⁵⁾。しかし、ガレクチンとの相互作用解析を進めるには、均一な糖鎖を有する Ig ドメインを調製することが必須である。

2-3. 合成戦略

標的化合物の Tim-3 Ig 様ドメイン (1-107)を Figure 2-4 に示す。3つのジスルフィド結合を形成し、Asn⁷⁶に N-結合型糖鎖を有している。Ig ドメインの合成経路を Figure 2-5 に示す。全長配列を3つのセグメント(1-31)**2**、(32-68)**3**、(69-107)**4**に分け、それぞれ固相合成法にて調製することにした。N末端セグメント**2**は、固相合成時に N-alkylcysteine (NAC) 素子を導入することでペプチドチオエステルへ導くことにした⁽⁶⁾。中央セグメント**3**は Boc 法にてチオエステルリンカー⁽¹⁾を用いてアルキルチオエステルとして調製することとした。またリシン残基は、

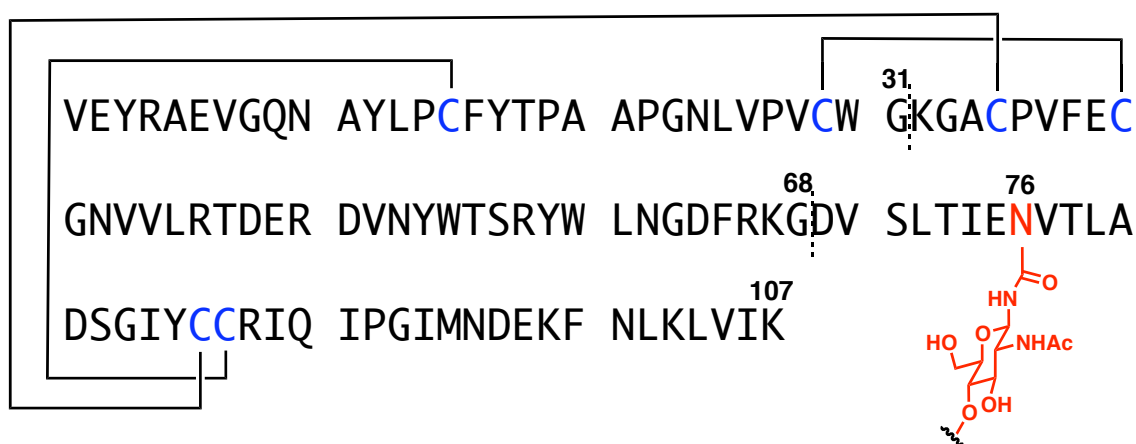


Figure 2-4 Tim-3 Ig 様ドメインの構造。

側鎖アミノ基を *i*Noc 基で保護した誘導体を用いて導入することにした。C 末端セグメント 4 は同様に Boc 法にて固相合成を行い、また糖鎖付加部位である Asn⁷⁶ では、GlcNAc-Asn 誘導体を導入することとした。各々のセグメントの調製後、連続的チオエステル法により One-Pot で Ig ドメインのポリペプチド鎖 6 の合成を行い、その後、脱保護、フォールディング、Endo-M 変異体と糖鎖オキサゾリンを用いた糖鎖転移反応⁽⁷⁾を行うことで目的とする N-結合型複合型糖鎖を有する Tim-3 Ig 様ドメイン 1 の合成を達成することにした。

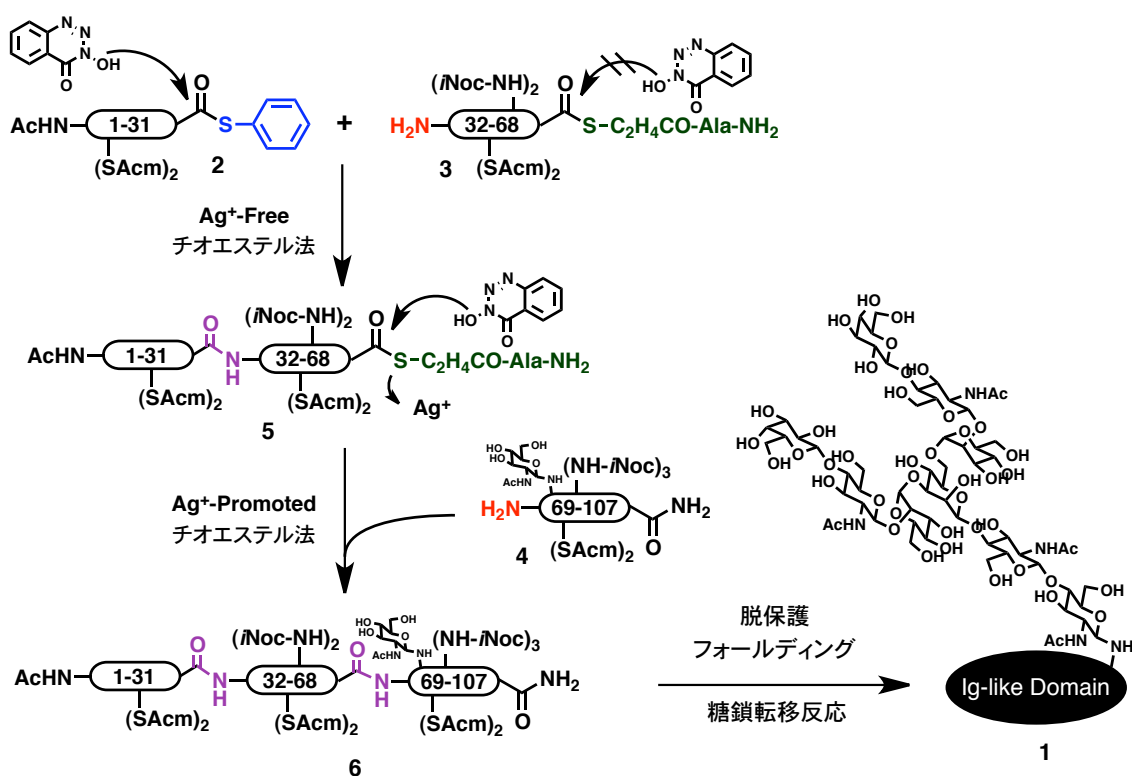


Figure 2-5 Ig 様ドメインの合成経路。

2-4. ペプチドセグメントの合成

まず、芳香族チオエステル **2** を NAC 法⁽⁶⁾により調製した。NAC 法は北條らが開発した、Fmoc 法でペプチドチオエステルを合成する手法である。概要を Figure 2-6 に示す。まず、*N*-アルキルシステイン誘導体が C 末端に導入されたペプチド樹脂を固相法により調製する。次に最終脱保護を行った後、弱酸性条件下で生じた *N*-アルキルシステインの *N*-*S* アシル転位平衡体と、過剰に加えられた外部チオールとのチオエステル交換反応により、目的のペプチドチオエステルを調製する方法である。この方法では、従来の Fmoc 法をそのまま適用でき、なおかつ、ほとんど副反応無くチオエステルを与える。

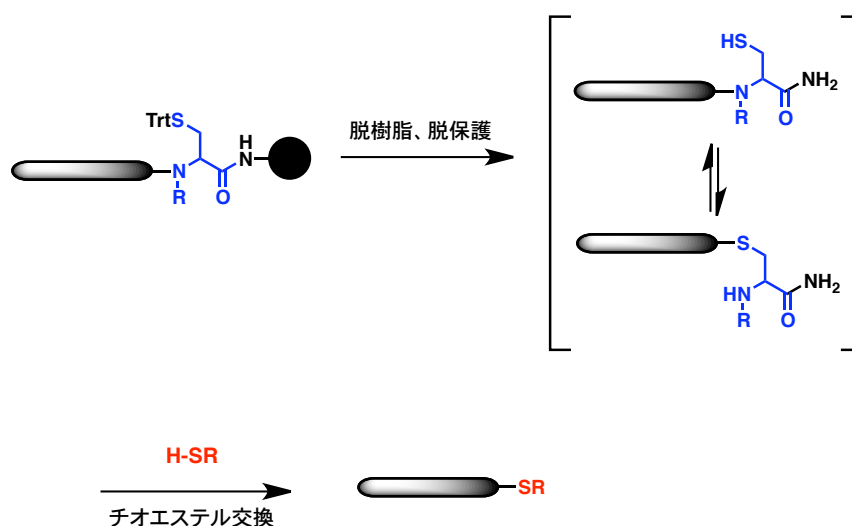


Figure 2-6 NAC 法によるチオエステル化。

NAC 法により合成されたペプチド **2** の合成経路を Figure 2-4-2 に示す。親水性リンカーとしてアルギニンを 2 残基カップリングした後、Fmoc-Gly-(Et)Cys(Trt)-OH⁽⁸⁾を CH₂Cl₂ 中で DIC-HOBt 法により樹脂に導入した。続いてマイクロウェーブ自動合成機によりペプチド鎖の伸長を行った。ペプチド伸長終了後、TFA カクテルで最終脱保護をすることで、粗ペプチドを得た。続いて、得られた粗ペプチドを尿素と AcOH を含むアセトニトリル水溶液に溶解し、PhSH とのチオエステル交換反応を行った。1 日後、チオエステル交換反応はほぼ完了し、目的とするチオフェニルエステル **2** を得ることに成功した(Figure 2-7)。

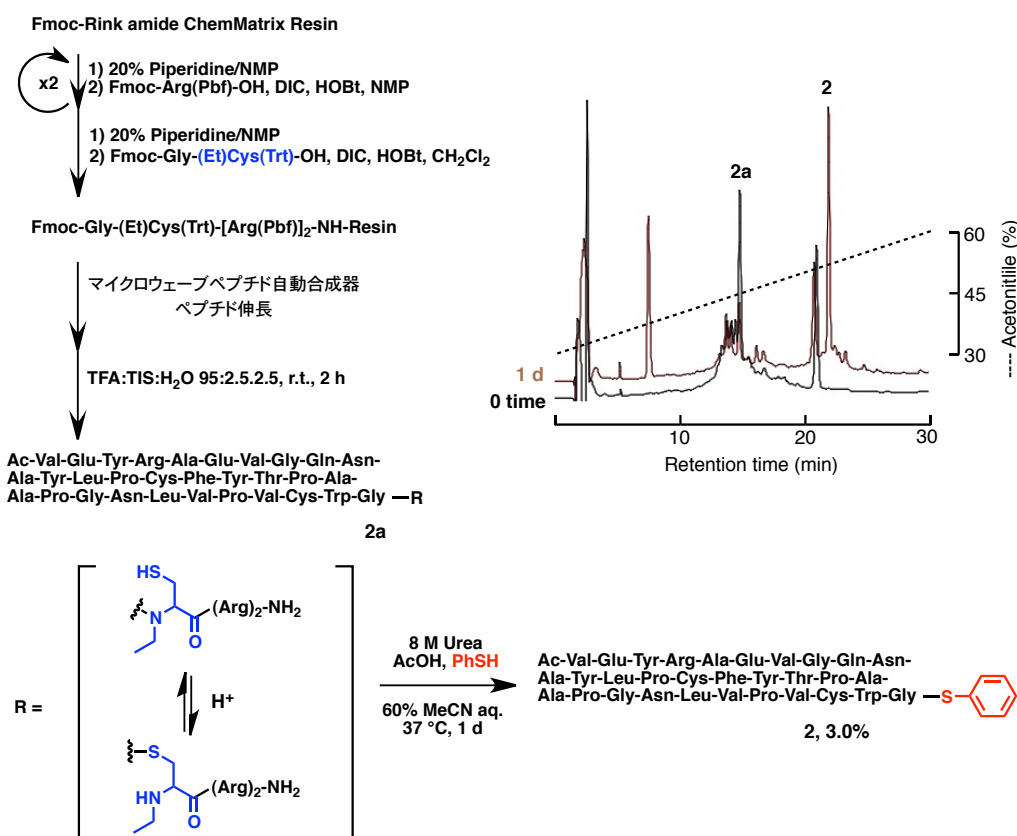


Figure 2-7 ペプチド **2** の合成。溶出条件: カラム、Mightysil RP-18 GP2 150-4.6 ; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1 % TFA を含む)。

次に *i*Noc 保護された糖セグメント **4** の合成を行った (Figure 2-8)。MBHA 樹脂から、Boc 法にてペプチド鎖の伸長を行い、リシン残基部位は Boc-Lys(*i*Noc)-OH を DIC-HOBt 法にて導入した。Asn⁷⁶ には水酸基をベンジル保護した糖アスパラギン誘導体を導入した。ペプチド鎖伸長後、10% anisole/HF で脱樹脂処理することで、粗生成ペプチドを得た。粗生成ペプチドは CH₃CN 水溶液にグアニジン塩酸塩を添加することで、溶解することが可能であることが分かった。RPHPLC で精製することでセグメント **4** を収率 3.4% で得ることに成功した。対照実験としてアジド保護されたセグメント **4** と同様のセグメントを調製したところ、CH₃CN 水溶液を含めた多くの溶媒に対して難溶解性を示し、RPHPLC により分析しても、目的化合物の溶出は確認されなかった。以上の結果から、アジド基に比べると、*i*Noc 基はペプチドの溶解性を損なわないことが

確認された。一方、中央セグメント **3** は Boc 固相合成法によりチオエステルリンカーを用いたペプチド伸長を行うことで調製された。

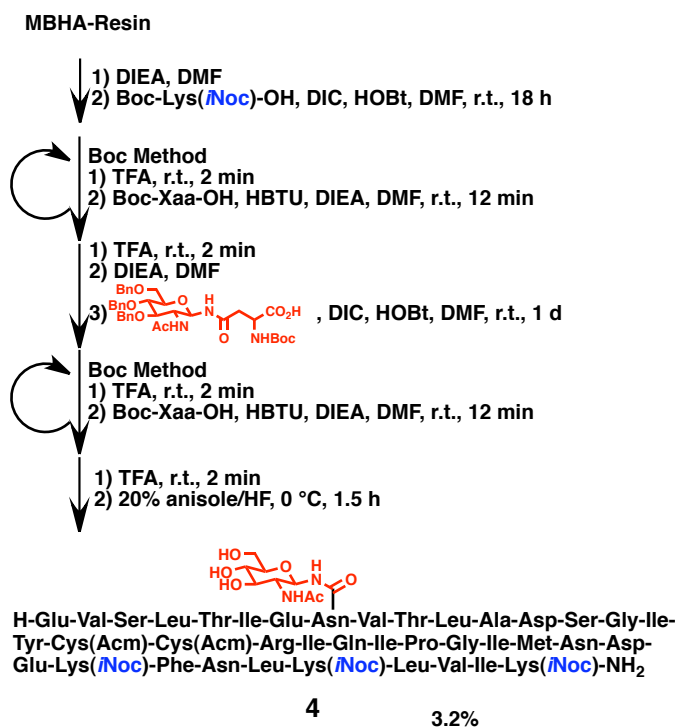


Figure 2-8 糖セグメント **4** の調製。

2-5. 連続的チオエステル法による 3 セグメントの縮合

次に、3 セグメントを連続的チオエステル法により One-Pot 縮合することにした。(Figure 2-9)。まず N 末端芳香族チオエステル **2** と中央アルキルチオエステル **3** を HOObt、DIEA を含む DMSO に溶解し、Ag⁺-Free チオエステル法条件下に処した。すると化学選択的に芳香族チオエステル **2** のみが選択的に活性化され、中央セグメント **3** との縮合反応が進行した。12 時間で反応はほぼ完了し、中間体セグメント **5** を目立った副反応なしに得ることができた。次に DMSO に溶解した C 末端セグメント **4** と AgCl を反応混合液に加え、第二の縮合を行った。Ag⁺イオンの添加によりアルキルチオエステル結合が活性化され、C 末端セグメント **4** との縮合反応が進行した。6 時間後、目的とするポリペプチド **6** が主生成物として得られたことが RPHPLC 分析で確認された。エーテルでペプチドを沈殿処理した後、得られた粗生成物をゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) によ

り精製し、Ig ドメイン (1-107) **6** を収率 34%で得た。以上のように、芳香族チオエステルとアルキルチオエステルの反応性の違いを利用した **One-Pot** 縮合法の開発に成功した。

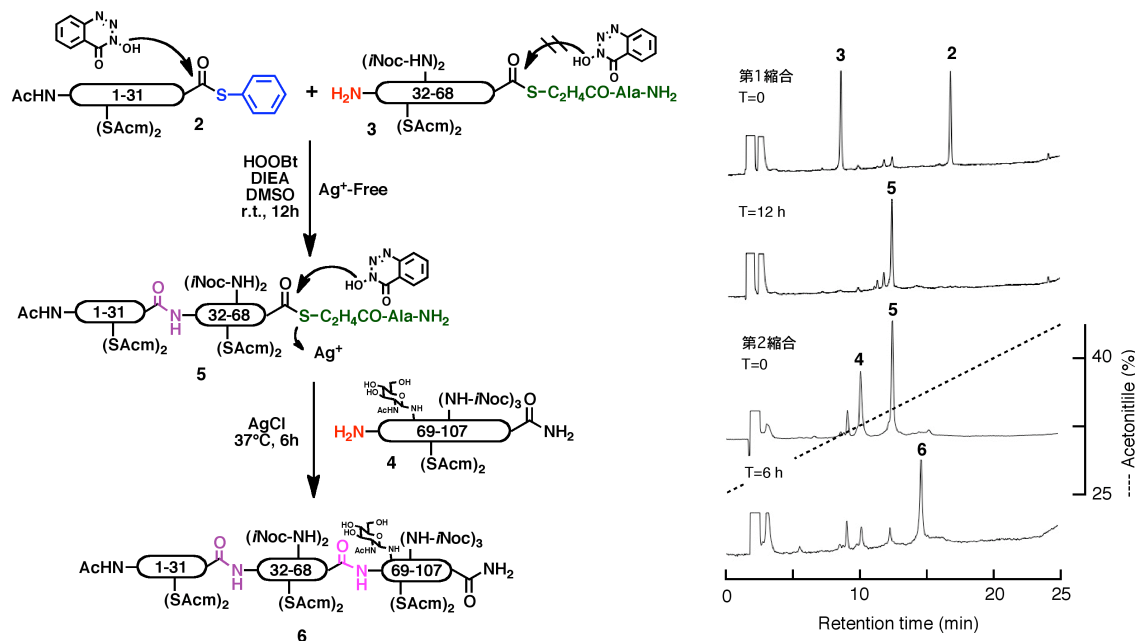


Figure 2-9 連続的チオエステル法による one-pot 縮合。溶出条件: カラム、Mightysil RP-18 GP2 150 mm-4.6 mm; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1% TFA を含む)。

2-6. Ig ドメインの脱保護、及びフォールディング

次に得られたポリペプチド鎖 **6** を脱保護した後、ジスルフィド結合を形成することでフォールディングした Ig ドメインへと導くことにした (Figure 2-10)。まず、ポリペプチド **6** を既知の Zn/AcOH aq. 条件で処理した。しかし、反応の速度が非常に遅く、なおかつ時間経過につれて HPLC 分析中に溶出されるペプチドが減少し、回収率の著しい低下が見られた。この原因は系内で生成する Zn²⁺ により、ペプチドが何らかの副反応を起こしているものと予想された。そこで、添加する酸を AcOH から 3-メルカプトプロピオン酸 (MPA) に変更し、生成する Zn²⁺ をキレーションにより捕捉することで、この副反応を抑制することを検討した。6 M グアニジン塩酸塩水溶液中に 15% MPA を含んだ溶液を反応溶媒として用い、Zn による還元を行ったところ、効率よく反応が進行し、6 時間では

ば反応は終了した。RPHPLCにて精製したところ、収率76%で、脱*i*Noc体7を得ることに成功した (Figure 2-6-1, chart b)。次に、DMSO水溶液中にて、AgNO₃を用いてAcm基の除去を行い、目的の無保護ポリペプチド8を得た (Figure 2-6-1, chart c)。最後に既報⁽⁵⁾に従い、システイン-システアミンによる酸化還元緩衝溶液中でジスルフィド結合の形成を行った。まず得られたポリペプチド8を6 M尿素水溶液で溶解、変性させた。続いて酸化還元緩衝溶液中に滴下し、4 °Cにて一晩静置した。その結果、chart dで示されているように、副生成物が多く、

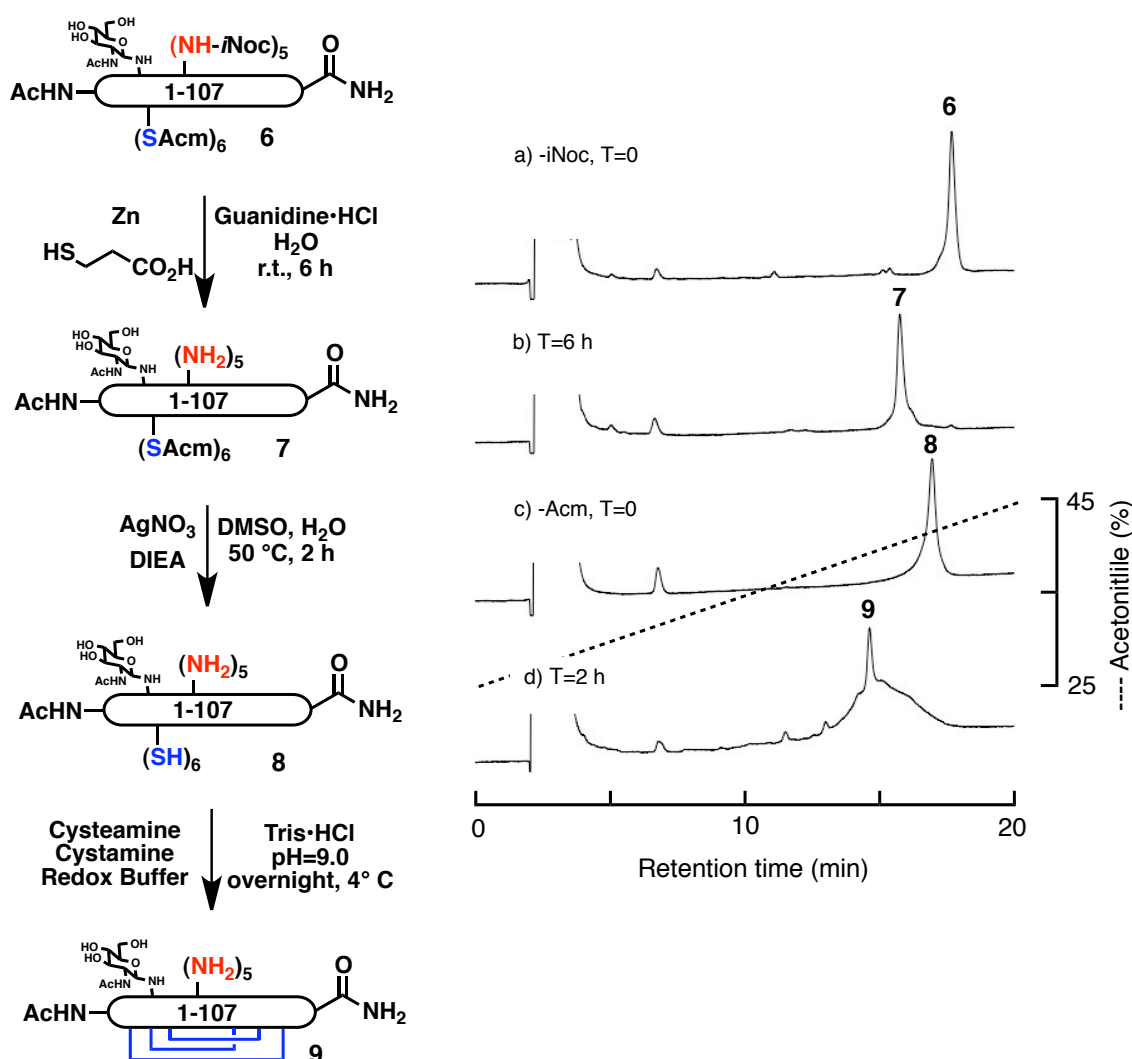


Figure 2-10 ポリペプチド6の脱保護、フォールディング。溶出条件: カラム、YMC Protein-RP 150 mm-4.6 mm ; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1% TFA を含む)。

目的化合物の収率は 12%であったものの、目的の GlcNAc を有する Ig ドメイン 9 を得ることに成功した。変性条件と希釈緩衝液を検討したものの、フォールディング体の生成効率の向上は見られなかった。

2-7. 結論

芳香族チオエステルとアルキルチオエステルの反応性を利用した、One-Pot で 3 セグメントを縮合する、連続的チオエステル法の開発に成功した。側鎖アミノ基の保護基に用いられた *i*Noc 基は、セグメントの溶解性を損なうことなく、保護ペプチドの調製を可能にした。得られたペプチドセグメントは Ag⁺の有無で選択的に活性化され、3つのセグメントを One-Pot で縮合することができた。得られたポリペプチド鎖を脱保護後、フォールディングすることで GlcNAc を有する Tim-3 Ig 様ドメイン(1-107)の合成に成功した。しかし、無保護ペプチド 8 の溶解性が乏しいことから、フォールディングの効率は低下した。糖鎖転移を経て 9 糖付き Ig ドメインの量的確保を行うためには、フォールディング効率を改善し、収率よく GlcNAc を持つ Ig ドメインを得る手法を再度検討する必要があることが明らかになった。

2-8. 実験の部

Ac-[Cys(Acm)^{15, 29}]-TIM-3 IgV (1-31)-SC₆H₅ (2).

Fmoc-Rink amide ChemMatrix resin (170 mg, 0.10 mmol) を 20% piperidine/ NMP で 5 分間と 15 分間処理し、脱 Fmoc 化した。Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0.40 mmol) を 1 M DIC/NMP 溶液 (0.60 ml) と 1 M HOBt/NMP 溶液 (0.60 ml) で 30 分間室温にて活性化した溶液を樹脂に加え、50 °C にて 1 時間振盪した。同様の工程を繰り返し、Fmoc-[Afg(Pbf)]₂-NH-resin を得た。脱 Fmoc 化、及び CH₂Cl₂ 洗浄後、Fmoc-Gly-(Et)Cys(Trt)-OH (130 mg, 0.20 mmol) と DIC (31 μl, 0.30 mmol)、HOBt (38 mg, 0.30 mmol) を CH₂Cl₂ (1.0 ml) に溶解し、溶液を樹脂に加え、室温で一晩振盪した。樹脂を NMP で洗浄した後、10% Ac₂O, 5% DIEA を含む NMP 溶液で 5 分間室温にて処理した。次に樹脂をマイクロウェーブペプチド自動合成器にてペプチド伸長を行うことで Ac-Val-Glu(OBu^t)-Tyr(Bu^t)-Arg(Pbf)-Ala-Glu(OBu^t)-

Val-Gly-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Ala-Tyr(Bu^t)-Leu-Pro-Cys(Acm)-Phe-Tyr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Pro-Ala-Ala-Pro-Gly-Asn(Trt)-Leu-Val-Pro-Pro-Val-Cys(Acm)-Trp(Boc)-Gly-(Et)Cys(Trt)-[Arg(Pbf)]₂-NH-Resin (600 mg)を得た。一部の樹脂 (240 mg) をTFAカクテル (TFA:TIS:H₂O 95:2.5:2.5, 4.0 ml) で2時間室温にて処理した。反応液をろ過し、窒素を吹きこむことでTFAを留去した。エーテルを加え、ペプチドを沈殿し、再度エーテルで沈殿を洗浄 (x2) した。残渣を減圧下にて乾燥した後、残渣を6 M urea、5% AcOHを含む、60% CH₃CN aq. (10 ml) に溶解した。PhSH (0.20 ml) を加え、37 °Cで1日間振盪した。反応液をエーテルで3度洗浄した後、RPHPLCで精製することでpeptide 2 (1.2 μmol, 3.0%) を得た。MALDI-TOF mass, found: m/z 3660.0, calcd for (M+H)⁺: 3660.7. Amino acid analysis: Asp_{2.03}Thr_{1.03}Glu_{2.98}Pro_{3.86}Gly_{3.02}Ala_{3.94}Val_{3.84}Leu_{1.96}Tyr_{2.94}Phe₁Arg_{1.00}.

H-[Cys(Acm)^{35, 40}, Lys(*i*Noc)^{32, 67}]-TIM-3 IgV (32-68)-SCH₂CH₂CO-Ala-OH (3).

Boc-Ala-OH (150 mg, 0.80 mmol) をCH₂Cl₂で溶解し、DIC (35 μl, 0.40 mmol) とDMAPを加えた。反応液をHO-CH₂-Pam-Core Shell resin (400 mg) に加え、室温で一晩振盪した。Ac₂O:pyridine 1:1溶液でアセチルキャッピングした後、樹脂をTFAで2分間 (x2) 処理した。樹脂をDMFで洗浄し、5% DIEA/DMF溶液で2分間 (x2) 処理した。Boc-Gly-S-CH₂CH₂COOH (77 mg, 0.20 mmol) を1M DIC/NMP (0.30 ml) と1M HOBt/NMP (0.30 ml) で30分間室温にて活性化した溶液を樹脂に加え、一晩室温で振盪した。アセチルキャッピングを行った後、樹脂をMeOH、エーテルで順次洗浄し、真空下で乾燥することでBoc-Gly-SCH₂CH₂CO-Ala-OCH₂-resin (500 mg)を得た。樹脂の一部を酸加水分解し、アミノ酸分析を行うことでアミノ酸導入量を定量した。得られた樹脂 (500 mg, 0.16 mmol) をTFAで2分間 (x2) 処理し、続いて5% DIEA/NMP溶液で2分間 (x2) 処理した。Boc-Lys(*i*Noc)-OH (130 mg, 0.34 mmol)を1M DIC/NMP (0.50 ml)と1M HOBt/NMP (0.50 ml)で30分間室温にて活性化した溶液を樹脂に加え、30分間室温にて振盪した。得られたペプチド樹脂はBoc固相合成法の系内中和法を用いて、ペプチド鎖を延伸した。得られたペプチド樹脂、H-Lys(*i*Noc)-Gly-Ala-Cys(Acm)-Pro-Val-Phe-Glu(OBn)-Cys(Acm)-Gly-Asn-Val-Val-Leu-Arg(Tos)-Thr(Bn)-Asp(OcHex)-Glu(OBn)-Arg(Tos)-Asp(OcHex)-Val-Asn-Tyr(Br-Z)-Trp(Hoc)-Thr(Bn)-Ser(Bn)-Arg(Tos)-Tyr(Br-Z)-Trp(Hoc)-Leu-Asn-Gly-Asp(OcHex)-Phe-Arg(Tos)-Lys(*i*Noc)-Gly-SCH₂CH₂CO-Ala-OCH₂-resin (1.60 g)の一部(200 mg)を10% anisole/HF(5.0 ml)

で1.5時間0 °Cで脱保護した。HFを減圧除去し、残渣をエーテルで沈殿した。沈殿を3回エーテルで洗浄し、残渣を50% CH₃CN aq.で溶解し、凍結乾燥した。RPHPLCにて精製することでペプチド**3** (190 nmol, 1.0%) を得た。MALDI-TOF mass, found m/z 4655.3 (average) calcd for (M+3H-2*i*Noc)⁺: 4655.2 (average). amino acid analysis: Asp_{6.27}Thr_{1.93}Ser_{0.92}Glu_{2.18}Pro_{1.36}Gly_{4.23}Ala_{2.27}Val_{3.71}Leu_{2.01}Tyr_{2.05}Phe₂Lys_{2.13}Arg_{4.16}.

H-[Asn(GlcNAc)⁷⁶, Cys(Acm)^{86,87}, Lys(*i*Noc)^{99, 103,107}]-TIM-3 IgV (69-107)-NH₂ (4).

MBHA-Resin•HCl (240 mg, 0.16 mmol)を5% DIEA/DMFで2分間(x2)処理した。Boc-Lys(*i*Noc)-OH (38 mg, 0.10 mmol)を1 M DIC/NMP (0.20 ml)と1M HOBt/NMP (0.20 ml)で30分間室温にて活性化した溶液を樹脂に加え、一晚室温にて振盪した。アセチルキャッピングを行った後、得られた樹脂をBoc固相合成法の系内中和法[12]によりペプチド鎖の伸長を行った。Lys^{103,99}は上記に記したDIC/HOBt法にてBoc-Lys(*i*Noc)-OHを導入した。得られたペプチド樹脂H-Asp(OcHex)-Val-Ser(Bn)-Leu-Thr(Bn)-Ile-Glu(OBn)-Asn[GlcNAc(Bn)₃]-Val-Thr(Bn)-Leu-Ala-Asp(OcHex)-Ser(Bn)-Gly-Ile-Tyr(Br-Z)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Arg(Tos)-Ile-Gln-Ile-Pro-Gly-Ile-Met-Asn-Asp(OcHex)-Glu(OBn)-Lys(*i*Noc)-Phe-Asn-Leu-Lys(*i*Noc)-Leu-Val-Ile-Lys(*i*Noc)-NH-Resin (0.70 g)の一部 (110 mg) を10% anisole/HF (5.0 ml)で90分間0 °Cにて処理した。HFを減圧除去した後、エーテルでペプチドを沈殿した。沈殿をエーテルで3回洗浄し、50% CH₃CN aq.で溶解した。ペプチド溶液をろ過し、凍結乾燥を行った。得られた残渣をRPHPLCで精製することでペプチド**4** (530 nmol, 3.2%) を得た。MALDI-TOF mass, found: m/z 4713.6, calcd for (M+4H-3*i*Noc)⁺: 4713.5. Amino acid analysis: Asp_{5.81}Thr_{1.69}Ser_{1.77}Glu_{3.09}Pro_{1.23}Gly_{2.15}Ala₁Val_{2.88}Met_{0.64}Ile_{5.20}Leu_{3.98}Tyr_{0.83}Phe_{1.11}Lys_{3.97}Arg_{0.96}.

Ac-[Cys(Acm)^{15,29,35,40,86,87}, Asn(GlcNAc)⁷⁶, Lys(*i*Noc)^{32,67,99,103,107}]-TIM-3 IgV (1-107)-NH₂ (6).

ペプチド **2** (340 nmol)と**3** (310 nmol)をHOObt (1.5 mg, 9.2 μmol)、DIEA (1.0 μl, 6.0 μmol) を含むDMSO(30 μl)に溶解した。反応液を12時間室温にて振盪した。ペプチド**4** (540 nmol)をHOObt (1.3 mg, 8.0 μmol)、DIEA (0.90 μl, 5.3 μmol) を含むDMSO (25 μl) に溶解し、その溶液を反応液に加えた。一欠片のAgClを加え、

遮光した状態で6時間37 °Cで振盪した。反応液にエーテルを加えペプチドを沈殿させ、EtOAcで三度洗浄し、引き続きエーテルで洗浄した。減圧乾燥後、残渣を6 M グアニジン塩酸塩を含む50% CH₃CN aq.に溶解し、DTTを加えた。溶液をゲルろ過クロマトグラフィーにより精製することで化合物**6** (110 nmol, 35% from peptide **3**) を得た。Amino acid analysis: Asp_{14.10}Thr_{4.56}Ser_{2.44}Glu_{7.75}Pro_{5.82}Gly_{9.38}Ala_{6.26}Val_{10.19}Met_{0.91}Ile_{5.46}Leu_{7.99}Phe₄Lys_{5.13}Arg_{6.13}.

Ac-[Cys(Acm)^{15,29,35,40,86,87}, Asn(GlcNAc)⁷⁶]-TIM-3 IgV (1-107)-NH₂ (**7**).

糖タンパク質 **7** (300 nmol) を6 M グアニジン塩酸塩、15% MPA を含む水溶液に溶解した。Zn(200 mg, 予め1 M HCl aq. で2度洗浄し、水で3度洗浄した。) を溶液に加え、6時間室温にて激しく攪拌した。ろ過後、溶液に10% クエン酸水溶液を加え、RPHPLCにて精製することで化合物 **7** (230 nmol, 76%) を得た。Amino acid analysis: Asp_{14.36}Thr_{4.76}Ser_{2.83}Glu_{8.70}Pro_{6.10}Gly_{9.26}Ala_{6.07} Val_{10.31}Met_{0.96} Ile_{5.46}Leu_{8.19}Phe₄Lys_{5.15}Arg_{6.06}.

Ac-[Asn(GlcNAc)⁷⁶]-TIM-3 IgV (1-107)-NH₂ (**9**)

ペプチド **7** (200 nmol)を80% DMSO aq.に溶解し、AgNO₃ (4.0 mg, 24 μmol) と DIEA (0.35 μl, 2.0 μmol) を加えた。反応液を遮光した状態で4時間50 °Cで振盪した。DTTを反応液に加え、6 M グアニジン塩酸塩を含む50% CH₃CN aq.で希釈した。生じた沈殿を遠心分離し、上清をゲルろ過クロマトグラフィーにて生成することでポリペプチド **8** (180 nmol, 89%) を得た。peptide **8** (100 nmol) を6 M urea 水溶液に溶解し、希釈溶液 (0.2 M Tris•HCl, 0.4 M arginine, 5 mM cysteamine, 0.5 mM cystamine, pH 9.0, 20 ml) に加えた。反応溶液を一晩4 °Cで静置した後、RPHPLCにて精製することで糖タンパク質 **9** (13 nmol, 12%) を得た。MALDI-TOF mass, found: m/z 12301 (average), calcd for (M+H)⁺ (average): 12310. Amino acid analysis: Asp_{13.76}Thr_{4.56}Ser_{2.78}Glu_{7.90}Gly_{9.57}Ala_{6.36}Val_{9.33}Met_{0.52}Ile_{5.34}Leu_{7.93} Tyr_{6.00}Phe₄ Arg_{6.25}.

2-9. 参考文献

1. Hojo, H.; Aimoto, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, *64*, 111-117.

2. Hojo, H.; Murasawa, Y.; Katayama, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 1808–13.
3. Katayama, H.; Hojo, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 5492-5494; Katayama, H.; Hojo, H.; Shimizu, I.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 1966-1972.
4. Veber, D. F.; Paleveda, W. J.; Lee, Y. C.; Hirschmann, R. *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 3286-3288.
5. Cao, E.; Zang, X.; Ramagopal, U. A.; Mukhopadhyaya, A.; Fedorov, A.; Fedorov, E.; Zenchek, W. D.; Lary, J. W.; Cole, J. L.; Deng, H.; Xiao, H.; DiLorenzo, T. P.; Allison, J. P.; Nathenson, S. G.; Almo, S. C. *Immunity*, **2007**, *26*, 311-321.
6. Hojo, H.; Onuma, Y.; Akimoto, Y.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 25–28.
7. Umekawa, M.; Huang, W.; Li, B.; Fujita, K.; Ashida, H.; Wang, L. X.; Yamamoto, K. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 4469–4479.
8. Hojo, H.; Kobayashi, H.; Ubagai, R.; Asahina, Y.; Nakahara, Y.; Katayama, H.; Ito, Y.; Nakahara, Y. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 6807–6813.

第3章 イソペプチド法を用いた Tim-3 Ig 様ドメイン(1-107)の合成

3-1. 緒言

前章では連続的チオエステル法を開発し、Tim-3 Ig 様ドメインの合成に成功した。しかし、そのフォールディング効率が低く、低収率であったことから、Ig 様ドメインの量的確保を行うにはこの問題を解決する必要がある。その問題となったフォールディングは無保護ペプチド **8** の溶解性に起因していると考えられる。すなわち、フォールディングの際に、あらかじめ行われる変性条件で無保護ポリペプチド **8** が十分に変性していないため、後の希釈緩衝液中のジスルフィド形成が効率よく進行しなかったと推測される。そこで、ポリペプチド鎖自体の溶解性を向上させることが、この問題の解決方法になると期待できる。

ペプチドが難溶性を示す原因は、多くの場合、分子間の β -シート形成によるペプチド鎖同士の凝集である (Figure 3-1)。ペプチド **8** も同様の機構による溶解性の低下が疑われるため、この凝集を抑制することがフォールディング効率の改善策になることが期待される。そこで、ペプチドの溶解性を飛躍的に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ポリペプチド鎖に導入することで、上記問題を解決することにした。*O*-アシルイソペプチド法は木曾らによって開発された、難溶性を示すペプチドを効果的に合成する手法である⁽¹⁾

(Figure 3-2)。セリン、及びスレオニンの側鎖水酸基にエステル結合したイソペプチドは、ペプチド主鎖の平面性を崩すことで、分子間の β -シート構造を形成

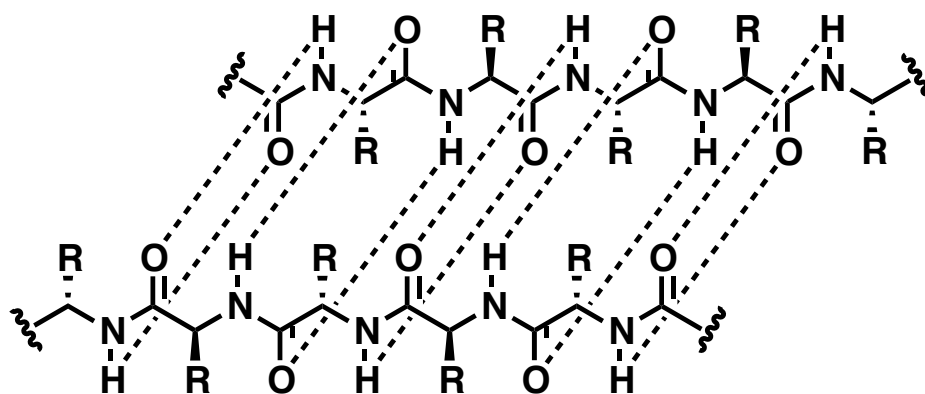


Figure 3-1 ペプチド鎖の β -シート構造。

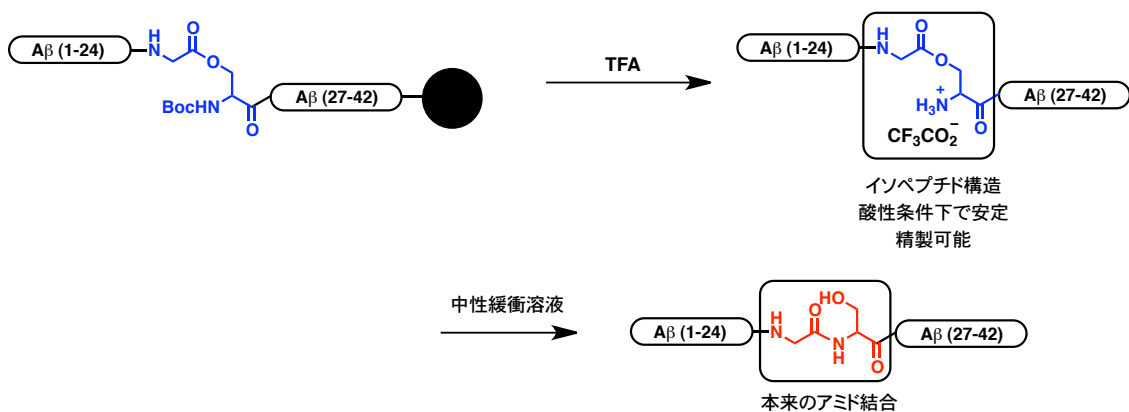


Figure 3-2 イソペプチド法を用いた A β の合成。

できず、飛躍的に溶解性が向上する。このイソペプチド構造は、 α -アミノ基がプロトン化する酸性条件下では安定に存在することができ、なおかつ中性緩衝液中に溶解すると、自発的 *O*- to *N*-アシル転位反応を起こし、本来のアミド結合を復元することが可能である。木曾らは、本手法を用いることで、凝集性の高いアミロイド β (1-42) を効率的に合成している⁽²⁾。また、北條らは NCL 法とイソペプチド法を組み合わせ、高疎水性タンパク質サポシン C の合成に成功している⁽³⁾ (Figure 3-3)。

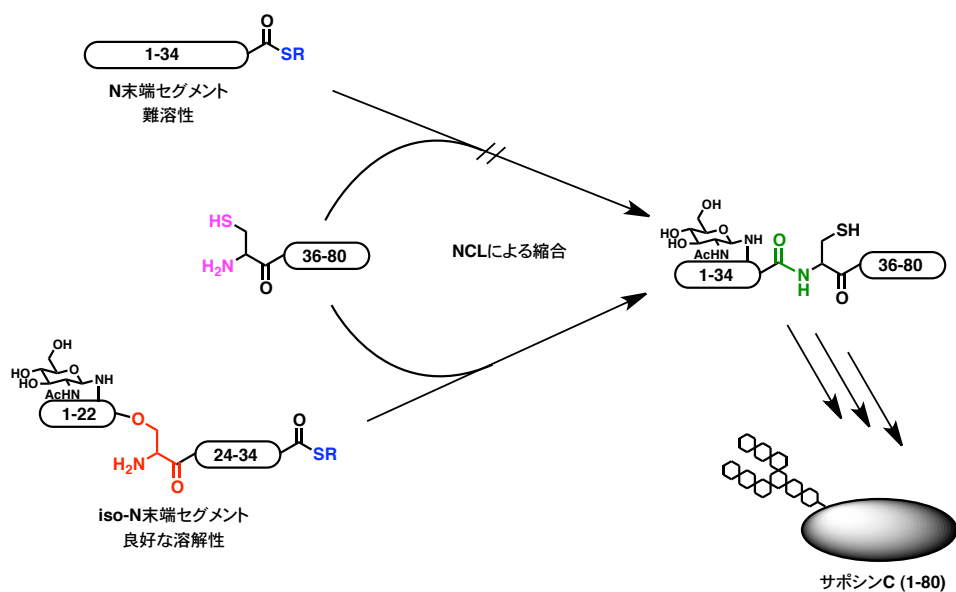


Figure 3-3 イソペプチド法と NCL 法を用いたサポシン C の合成。

3-2. イソペプチド法を用いた Ig ドメインの合成戦略

イソペプチド法を用いた Ig 様ドメインの合成戦略を Figure 3-4 に示した。3 セグメントのうち、もっとも溶解性の乏しかった C 末端セグメント **4** 中の Val⁷⁷-Thr⁷⁸ 間にイソペプチド構造を導入することにした。また、このイソペプチド結合はフォールディング条件を行う直前まで保持することが重要である。そこで、側鎖アミノ基と同様に *i*Noc 基で Thr⁷⁸ の α -アミノ基を保護することにした。調製したイソペプチドセグメント **4i** を前章と同様に連続的チオエステル法で縮合し、イソペプチド構造を持つ **6i** を得ることにした。その後、脱 Acm 化と脱 *i*Noc 化を酸性条件で行うことで、異性化構造を保持したイソペプチド **8i** を得る。その後、フォールディング条件下でアミド結合を再生しつつ、ジスルフィド架橋の形成を行うことで目的の Ig 様ドメイン **9** を得ることにした。

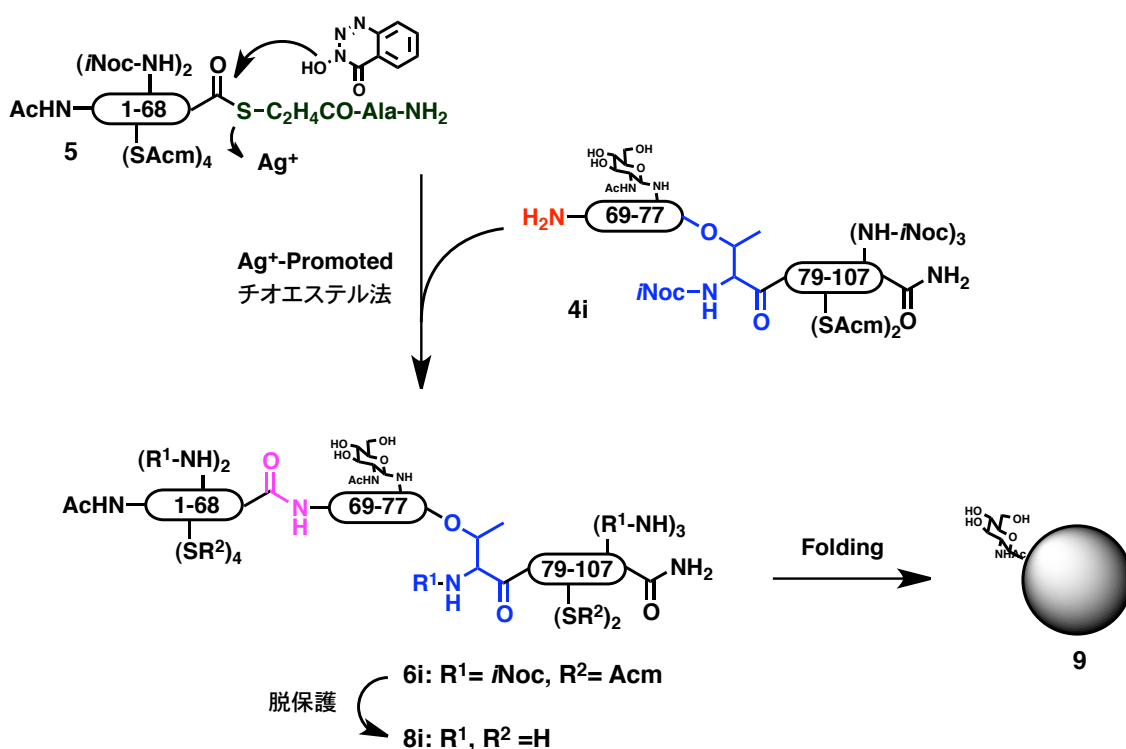


Figure 3-4 イソペプチド法を用いた Ig 様ドメインの合成経路。

3-3. イソペプチド構造を有する C 末端セグメント 4i の調製

C 末端セグメント **4i** の調製は Figure 3-5 に示すように行った。Fmoc-Rink amide 樹脂を出発樹脂とし、マイクロウェーブペプチド自動合成機でペプチド鎖の伸長を行った。得られた途中配列(79-107)に、別途調製したイソジペプチド *i*Noc-Thr(Fmoc-Val)-OH **13** を 1,2-ジクロロエタン中 DIC-HOBt 法で導入した。次に糖アミノ酸誘導体を導入した後、ペプチド鎖を手動で伸長した。ペプチド鎖伸長終了後、TFA カクテルによるペプチドの最終脱保護、及び Low-TfOH⁽⁴⁾ による糖水酸基の脱保護を行うことでイソペプチドセグメント **4i** を収率 14% で得ることに成功した。溶解性はイソペプチド構造のない **4** と比べて上昇し、収率も約 4 倍上昇した。

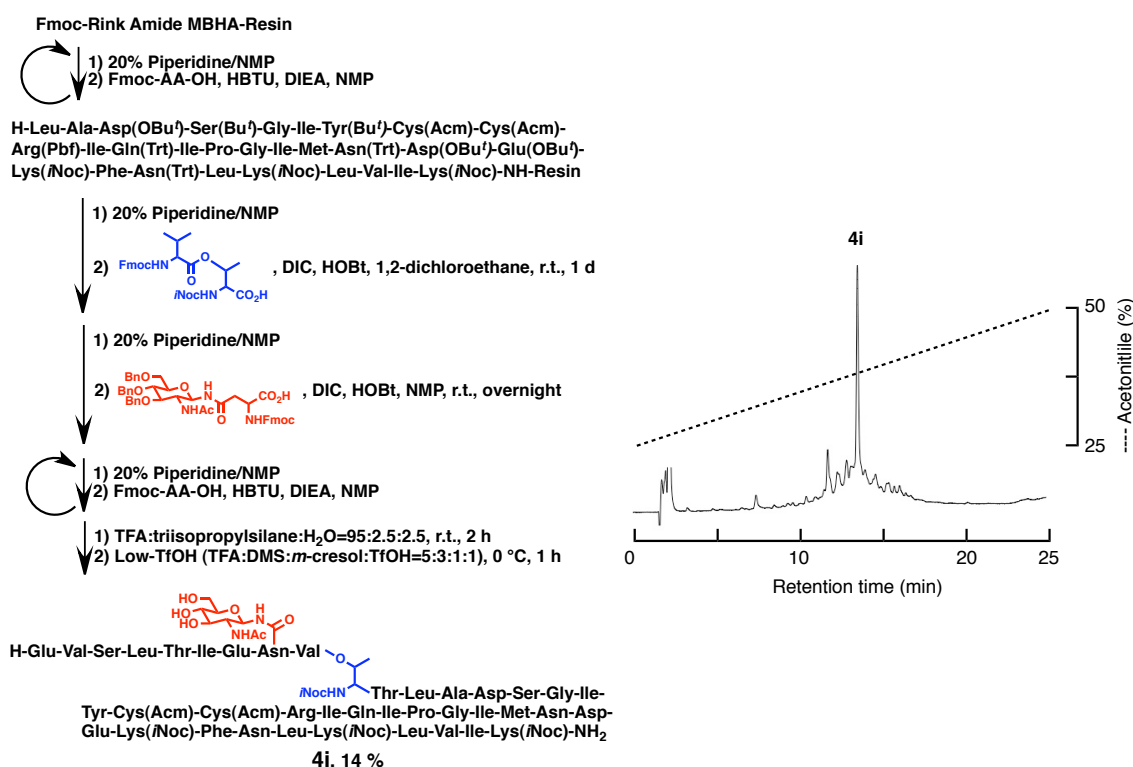


Figure 3-5 イソペプチド **4i** の合成。溶出条件: カラム、Mightysil RP-18 GP2 150 mm-4.6 mm; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1% TFA を含む)。

3-4. イソポリペプチドの構築、及び脱保護とフォールディング

Figure 3-6 のように、得られたイソペプチド **4i** を連続的縮合にてイソポリペプチドへ導いた。まずは前章と同様の手順で縮合を行い、中間セグメント **5** を得た。その反応溶液に調製したイソペプチド **4i** と AgCl を加え、第二の縮合を開始した。反応は効率よく進行し、目的のイソペプチド **6i** の合成に成功した。GFC により精製したところ、**6** の約 2 倍の 63% の収率で **6i** が得られた。これは、イソペプチド構造によりポリペプチドの溶解性が上昇したため、反応効率、及び精製時の回収率が向上したためと予想される。

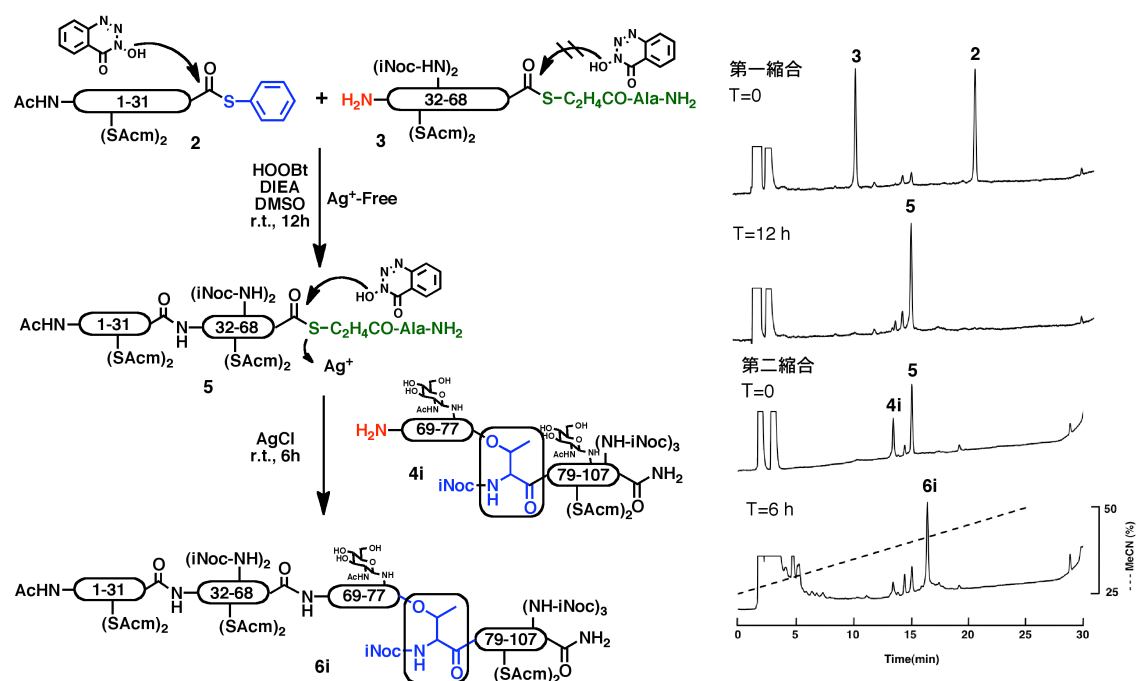


Figure 3-6 イソポリペプチド **6i** の合成。溶出条件: カラム、Mightysil RP-18 GP2 150 mm-4.6 mm; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1% TFA を含む)。

次に得られたイソペプチド **6i** を AgOAc で処理することで AcM 基の脱保護を行い、続けて 15% MPA Gu•HCl 水溶液で希釈し、Zn 還元を行った (Figure 3-7)。各々の反応は目立った副反応なく進行し、目的とする無保護のイソペプチド **8i** を得た (Figure 3-4-2, chart b, c)。次にフォールディング条件で、Val⁷⁷-Thr⁷⁸ のイ

ソペプチド構造がどの程度の速度で *O-N* アシル転位するのか調べた (Figure 3-8)。フォールディング条件である pH 9.0 の緩衝溶液にペプチドを溶解し、RPHPLCにて *O-N* 転位反応の解析を行った。その結果、1 時間程度で疎水性側に保持時間のずれたペプチド **8** が観測された。これにより、**8i** はフォールディング条件下ですみやかにアミド結合を再生することがわかった。そこで、**8i** を変性操作後に希釈緩衝液に加え、4 °C で一晩静置することでフォールディング体 **9** へ誘導した。得られた粗生成物の RPHPLC チャートを Figure 3-7、 chart d に示す。**8i** は **8** と比べると、効率よくフォールディング体 **9** を与え、収率も 26%と約 2 倍の上昇を示した。これにより、フォールディング前にポリペプチドを完全に溶解させることが、収率よくフォールディングさせるために重要であることがわかった。

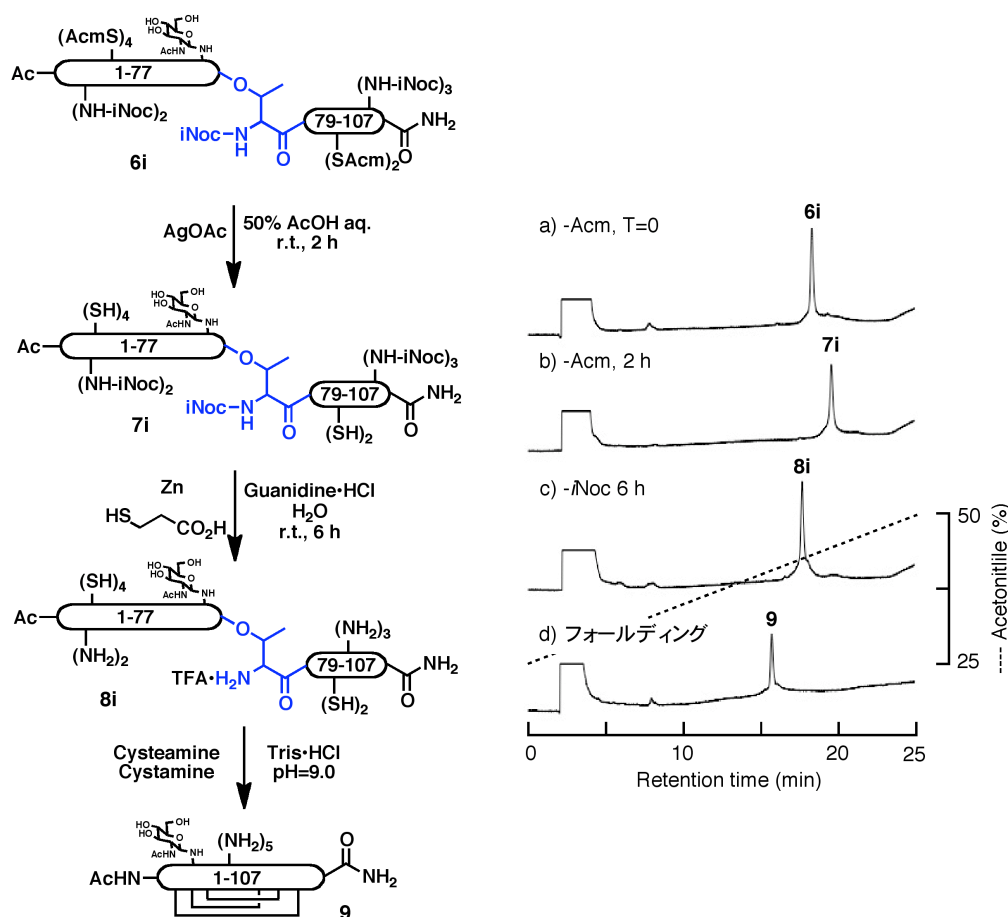


Figure 3-7 イソポリペプチドの脱保護、フォールディング。溶出条件: カラム、Protein RP 150 mm-4.6 mm; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1% TFA を含む)。

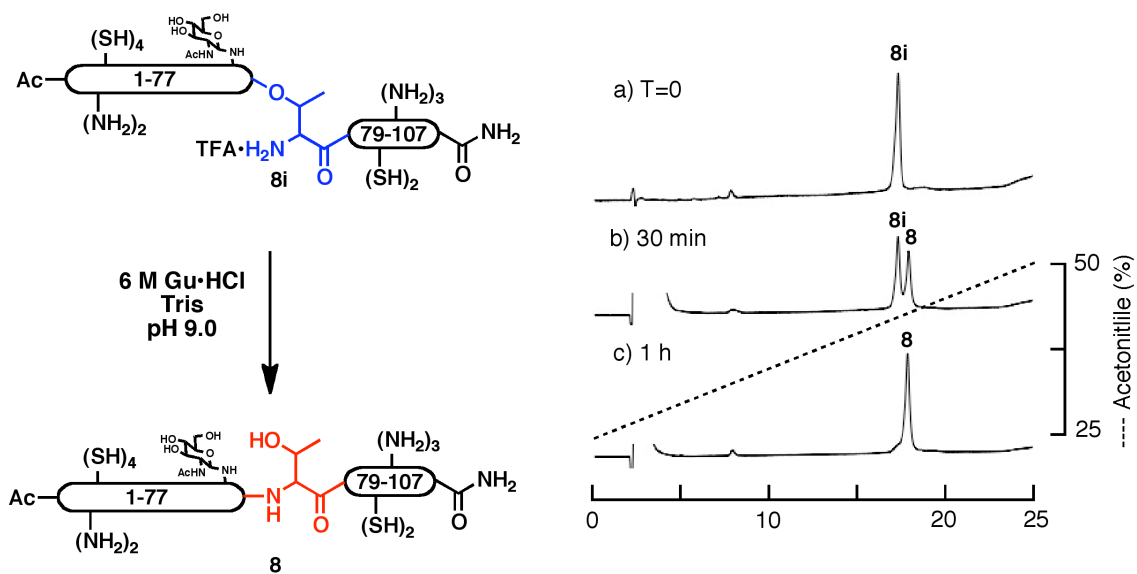


Figure 3-8 *O*- to *N*-アシル転位反応の追跡。溶出条件: カラム、Protein RP 150 mm-4.6 mm; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1% TFA を含む)。

3-5. GlcNAc 付き Ig ドメインとオキサゾリンの糖鎖転移反応

イソペプチドの導入により収率よく GlcNAc 付き Ig 様ドメイン **9** を得ることが可能になったため、酵素反応により糖鎖を構築し、均一な複合型糖鎖を持つ Ig 様ドメインを合成することにした (Figure 3-9)。Ig 様ドメイン **9** と化学合成した複合型糖鎖オキサゾリン⁽³⁾と変異型 Endo-M (グライコシターゼ)⁽⁵⁾を中性緩衝液中で混合し、室温にて反応を行った。しかし、溶解性が乏しい Ig 様ドメイン **9** が反応中に沈殿してしまい、糖鎖転移反応の進行は確認できなかった。そこで、6 M 尿素を含む中性緩衝液にあらかじめ **9** を溶解し、続いて尿素の終濃度が 2 M になるまで希釈し、糖鎖転移反応を行った。その結果、Figure 3-10, chart b に示すように、親水性側に保持時間が移動したピークが現れ、これを分取、精製した。得られた化合物を MALDI-TOF mass により解析したところ、目的物の理論質量数に一致したことから、複合型 **9** 糖を有する Ig ドメイン **1** の合成が確認された。

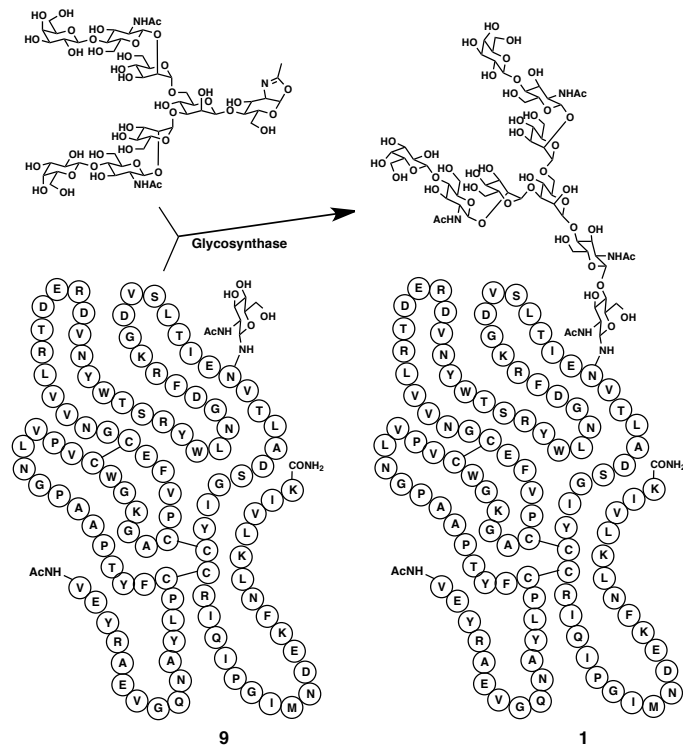


Figure 3-9 糖鎖転移反応による9糖骨格の構築。

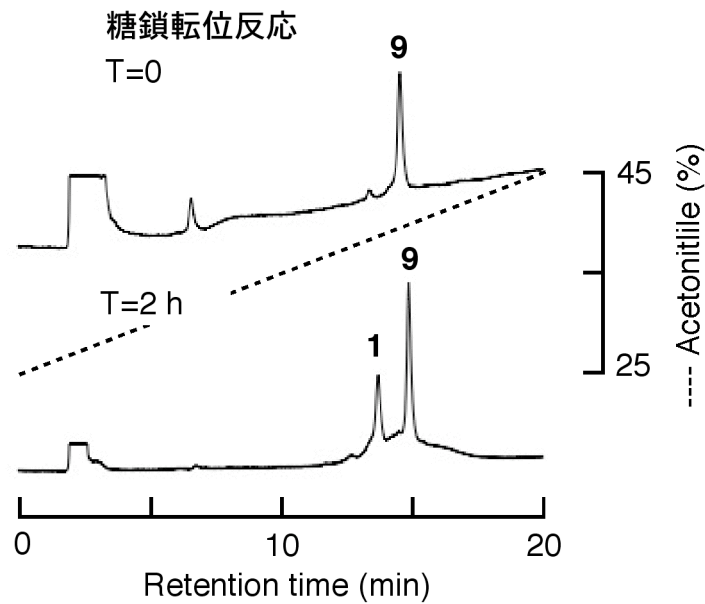


Figure 3-10 糖鎖転移反応の RP HPLC 解析。溶出条件: カラム、Protein RP 150 mm-4.6 mm; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1% TFA を含む)。

3-6. CD スペクトルによる二次構造の解析

得られた単糖付き Ig 様ドメイン **9**、及び9糖付き Ig ドメイン **1** を CD スペクトルにより、二次構造を解析することにした。Figure 3-11 に示すように、これら Ig 様ドメインの CD スペクトルは典型的な β -シート構造パターンを示していた。この結果から、合成された Ig 様ドメインは正しい立体構造を形成していることが見出された。

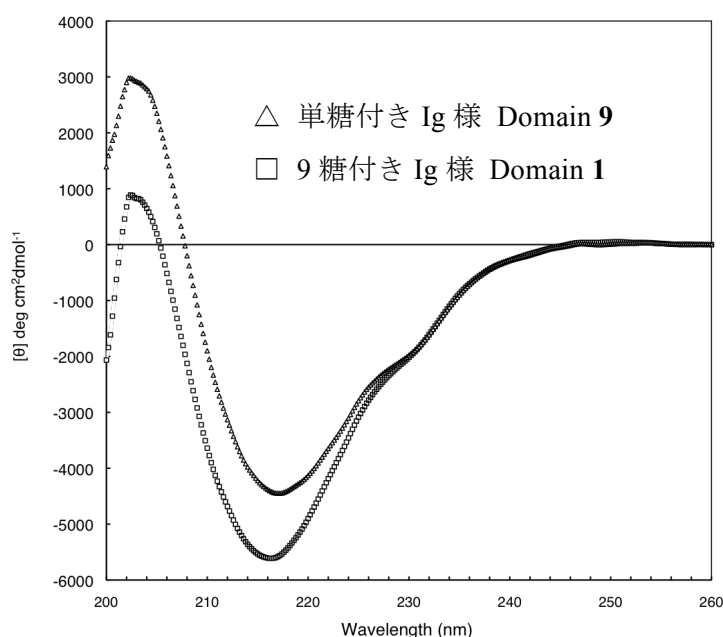


Figure 3-11 **9** 及び **1** の CD スペクトル解析。

3-7. 酵素消化を用いたジスルフィド架橋位置の決定

Ig 様ドメインのジスルフィド架橋位置を酵素消化法により決定することにした (Figure 3-12)。まず、Ig ドメイン **9** にリシルエンドペプチダーゼとトリプシンによる酵素消化を連続して行うことで、フラグメント **A** を得た。次にフラグメント **A** を Glu-C、Asp-N で消化、精製することでフラグメント **B** へ導いた。次にキモトリプシンで消化を行い、フラグメント **C** とフラグメント **D** を得た。得られたフラグメント **D** は MALDI-TOF mass、及びアミノ酸分析で同定されたことから、Cys²⁹-Cys⁴⁰ 間の架橋構造を立証する結果を与えた。

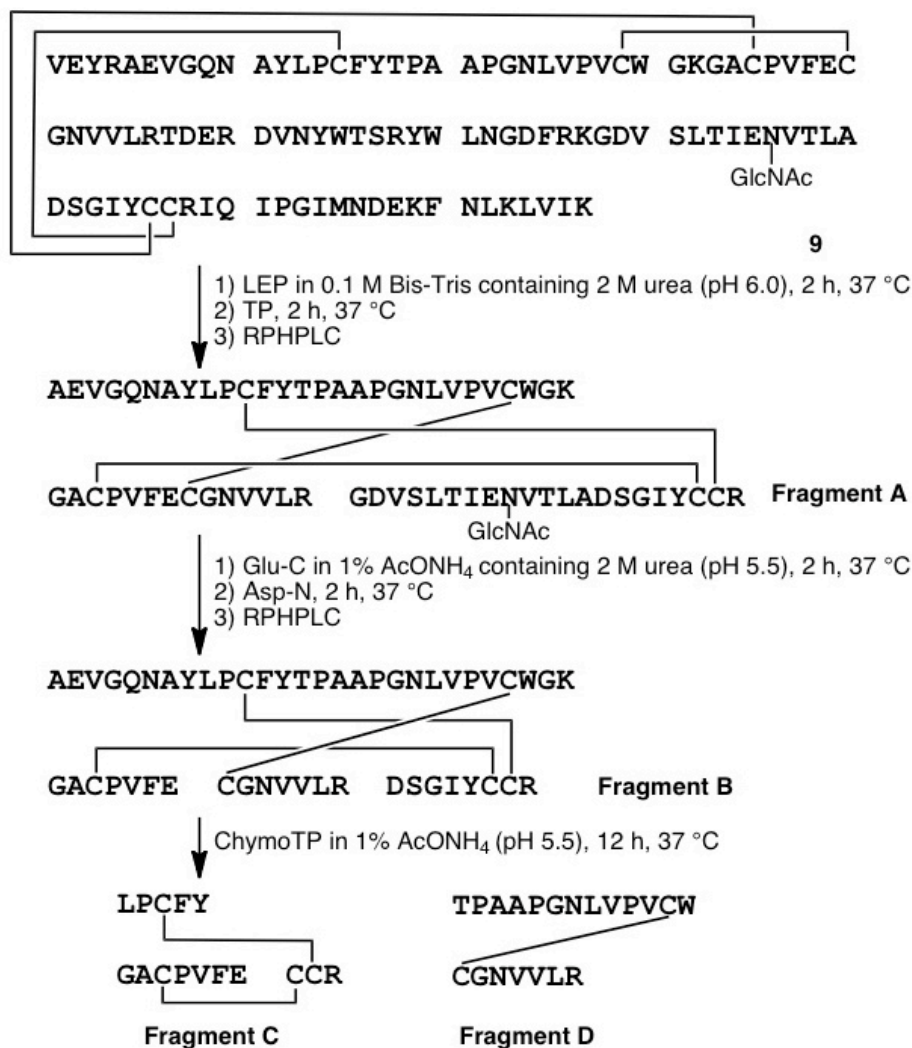


Figure 3-12 酵素消化を用いたジスルフィド架橋位置の決定。

一方、システイン残基が連続した配列を持つフラグメント C には 2 種類の異性体の生成が考えられ、質量分析、及びアミノ酸分析のみでは決定できない。そこで、別途異性体 2 種を標準サンプルとして調製し、RPHPLC の保持時間で比較、決定することにした。酵素消化して得られたフラグメント C と合成された 2 種類の標準サンプルの RPHPLC による分析チャートを Figure 3-13 に示す。各々の保持時間を比較すると、フラグメント C は標準サンプル A とほぼおなじ保持時間に溶出されることが確認された。これにより、ジスルフィド架橋位置は Cys¹⁵-Cys⁸⁷、Cys³⁵-Cys⁸⁶ であると決定された。

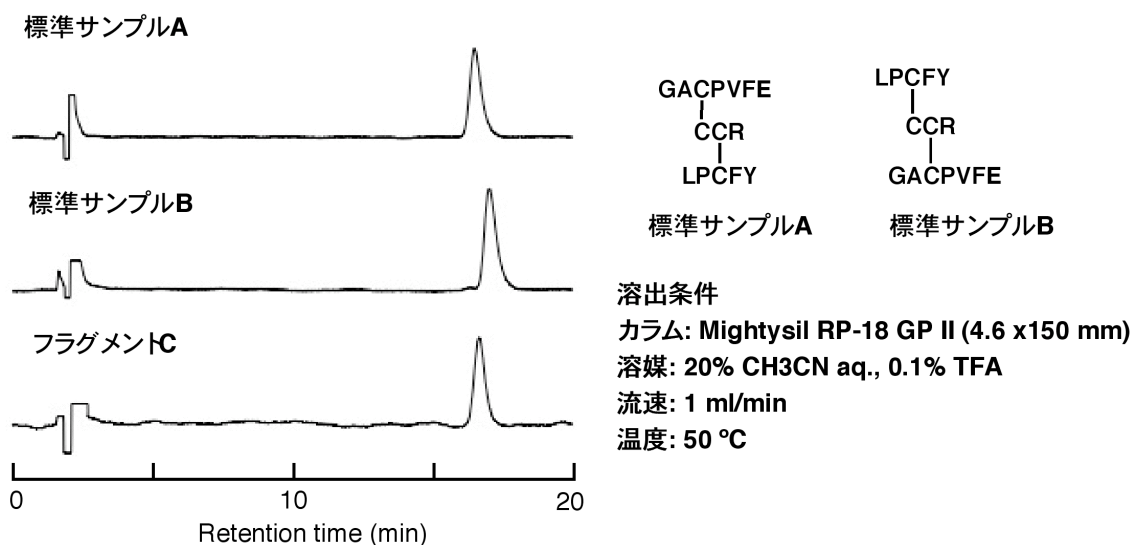


Figure 2-13 フラグメント C と合成された標準サンプルとの比較。

3-8. 結論

イソペプチド法を用いた連続的チオエステル法により Tim-3 Ig 様ドメインの効率的合成に成功した。イソペプチド構造を導入された C 末端セグメント **4i** は **4** と比べ溶解性と収率が飛躍的に向上した。**4i** は前章で開発された連続的チオエステル法で同様に縮合され、イソポリペプチド **6i** へ収率よく導かれた。得られたポリペプチドは酸性条件下で脱保護することで、そのイソペプチド構造を保持しつつ、無保護ポリペプチド **8i** へ誘導することができた。イソペプチド構造により溶解性が上昇した **8i** は、**8** と比べ 2 倍の効率で目的とするフォールディング体 **9** を与えた。最後に、GlcNAc 付きタンパク質に対して、変異型 Endo-M と糖鎖オキサゾリンを用いた糖鎖転移反応を行うことで目的の均一な複合型 **9** 糖を有する Tim-3 Ig 様ドメインの合成に成功した。今後、得られた Ig 様ドメインは X 線結晶解析による立体構造の検討に用いる予定である。

3-9. 実験の部

***N*²-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*⁶-4-pyridylmethoxycarbonyl-L-lysine (10).**

CH₂Cl₂ (30 ml) に懸濁した *N*²-9-fluorenylmethoxycarbonyl-L-lysine hydrochloride (2.4 g, 7.8 mmol) に 4-nitrophenyl-4-pyridylmethyl carbonate (2.4 g, 8.6 mmol) と DIEA (2.7 ml, 16 mmol) を加え、3時間室温にて攪拌した。AcOHを反応液に加え酸性にした後、生じた沈殿をろ過した。残渣をMeOH、CH₂Cl₂で洗浄し、真空減圧下にて乾燥した。また、ろ液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH 14:1 AcOH 1%) にて精製した。精製した化合物を dioxane に溶解し、凍結乾燥した。ろ物と合わせて化合物**10** (2.8 g 72%) を得た。R_f 0.40 (CHCl₃:MeOH=9:1 1% AcOH). Mp 179-182 °C. [α]_D +6.2 (CHCl₃:MeOH=1:1, c 1.0). Anal. calcd for C₂₈H₂₉N₃O₆: C, 66.79; H, 5.80; N, 8.34, Found: C, 66.80; H, 5.72; N, 8.37. ¹H NMR (DMSO): δ 8.54 (d, *J*=5.8 Hz, 2H, Ar*H*), 7.89 (d, *J*=7.3 Hz, 2H, Ar*H*), 7.72 (d, *J*=7.8 Hz, 2H, Ar*H*), 7.62 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, -NH), 7.43-7.29 (m, 6H, Ar*H*), 5.05 (s, 2H, PyrCH₂-), 4.29-4.20 (m, 3H, Ar₂CH-CH₂-), 3.94-3.88 (m, 1H, α*H*), 3.00 (brd, *J*=6.3 Hz, 2H, ε*H*₂), 1.71-1.32 (m, 6H, -CH₂-).

***N*-4-Pyridylmethoxycarbonyl-L-threonine *tert*-butyl ester (11).**

L-Threonine *tert*-butyl ester hydrochloride (490 mg, 2.3 mmol) と 4-nitrophenyl-4-pyridylmethyl carbonate (760 mg, 2.8 mmol) を DMF (10 ml) に溶解した。トリエチルアミン (0.35 ml, 2.5 mmol) を加え、50 °Cにて1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をEtOAcに溶解した。水、飽和食塩水にて洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。ろ過後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH 19:1 AcOH 1%) で精製した。得られた化合物をEtOAcに溶かし、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、Na₂SO₄で乾燥した。ろ過後、減圧濃縮することで化合物**11** (600 mg, 84%) を得た。R_f 0.36 (CHCl₃:MeOH=19:1 1% AcOH). [α]_D -7.7 (CHCl₃, c 1.0). Anal. calcd for C₁₅H₂₂N₂O₅: C, 58.05; H, 7.15; N, 9.03. Found: C, 58.02; H, 7.18; N, 8.93. ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.54 (d, *J*=1.4 Hz, 2H, Ar*H*), 7.25 (d, *J*=5.3 Hz, 2H, Ar*H*), 5.90 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, -NH), 5.14 (s, 2H, PyrCH₂-), 4.33-4.32 (m, 1H, β*H*), 4.20 (dd, *J*=2.4, 8.7 Hz, 1H, α*H*), 3.42 (brs, 1H, -OH), 1.47 (s, 9H, *t*-Bu), 1.26 (d, *J*=6.3 Hz, 1H, -CH₃).

***O*-(*N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-valyl)-*N*-4-pyridylmethoxycarbonyl-L-threonine tert-butyl ester (**12**).**

N-9-fluorenylmethoxycarbonyl-L-valine (120 mg, 0.36 mmol) と **11** (94 mg, 0.30 mmol) を窒素雰囲気下にてCH₂Cl₂ (3 ml) に溶解した。反応液を0 °Cに冷却した後、WSCD•HCl (87 mg, 0.45 mmol) を加えた。DMAP (3.7 mg, 0.03 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応溶液をEtOAcで希釈して、水、飽和重曹水にて洗浄した。Na₂SO₄で乾燥した後、ろ過、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (toluene:EtOAc 1:1 AcOH 1%) にて精製した。得られた化合物をEtOAcに溶解し、飽和重曹水、飽和食塩水にて洗浄した。Na₂SO₄で乾燥した後、ろ過、減圧濃縮することで化合物**12** (180 mg, 94%) を得た。 *R*_f 0.33 (Toluene:EtOAc=1:1 1%AcOH). [α]_D +23.3 (CHCl₃, c 0.5). Anal. calcd for C₃₅H₄₁N₃O₈: C, 66.54; H, 6.54; N, 6.65, Found: C, 66.61; H, 6.51; N, 6.65. ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.57 (d, *J*=5.8 Hz, 2H, Ar*H*), 7.75 (d, *J*=7.3 Hz, 2H, Ar*H*), 7.58 (d, *J*=7.3 Hz, 2H, Ar*H*), 7.14-7.16 (m, 8H, Ar*H*), 5.63 (d, *J*=9.3 Hz, 1H, Thr-NH), 5.51-5.49 (m, 1H, Thr-β*H*), 5.32 (d, *J*=9.2 Hz, Val-NH), 5.13 (s, 2H, PyrCH₂-), 4.42-4.37 (m, 3H, Ar₂CH-CH₂-, Thr-α*H*), 4.27-4.20 (m, 2H, Ar₂CH-, Val-α*H*), 2.17-2.13 (m, 1H, Val-β*H*), 1.40 (s, 9H, *t*-Bu), 1.31 (d, *J*=6.3 Hz, 3H, Thr-CH₃), 0.96 (d, *J*=6.8 Hz, 3H, Val-CH₃), 0.90 (d, *J*=6.8 Hz, 3H, Val-CH₃).

***O*-(*N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-valyl)-*N*-4-pyridylmethoxycarbonyl-L-threonine (**13**).**

化合物 **12** (83 mg, 0.13 mmol)を TFA (2 ml) に溶解し、室温にて 2 時間攪拌した。減圧濃縮した後、残渣を EtOAc で溶解し、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。Na₂SO₄で乾燥し、ろ過後、減圧濃縮を行うことで化合物 **13** (76 mg, quant.) を得た。 *R*_f 0.14 (CHCl₃:MeOH=14:1 1% AcOH). [α]_D +7.6 (CHCl₃, c 0.5). Anal. calcd for C₃₁H₃₃N₃O₈: C, 64.68; H, 5.78; N, 7.30; O, 22.24, Found: C, 64.67; H, 5.65; O, 7.38. ¹H NMR (CD₃OD): δ 8.46 (d, *J*=4.4 Hz, 2H, Ar*H*), 7.76 (d, *J*=7.3 Hz, 2H, Ar*H*), 7.66-7.62 (m, 2H, Ar*H*), 7.42-7.26 (m, 6H, Ar*H*), 5.51-5.46 (m, 1H, Thr-β*H*), 5.21 (d, *J*=14.1 Hz, 2H, PyrCH₂-), 4.43 (d, *J*=3.41 Hz, 1H, Thr-α*H*), 4.38 (brd, *J*=6.8 Hz, 2H, Ar₂CH-CH₂-), 4.22-4.19 (m, 1H, Ar₂CH-), 4.06-4.02 (m, 1H, Val-α*H*), 2.09-1.99 (m, 1H, Val-β*H*), 1.28 (d, *J*=6.3 Hz, 3H, Thr-CH₃), 0.92-0.89 (m, 6H, Val-CH₃).

Val⁷⁷-Thr⁷⁸ にイソペプチド構造を有する H-[Asn(GlcNAc)⁷⁶, Cys(Acm)^{86, 87}, Lys(*i*Noc)^{99, 103, 107}]-TIM-3 IgV (69-107)-NH₂ (4i).

Fmoc-Rink amide MBHA resin (735 mg, 0.25 mmol)を Fmoc 固相合成法にてペプチド鎖の伸長を手動で行った。Lys 残基を除いたアミノ酸は Fmoc-amino acid (1.25 mmol)、0.5 M HBTU/DMF (1.2 mmol)、DIEA (2.5 mmol) を用いて導入した。Lys 残基は上記に記した通り、DIC/HOBt 法にて導入した。得られたペプチド樹脂 H-Lys(*i*Noc)-Phe-Asn(Trt)-Leu-Lys(*i*Noc)-Leu-Val-Ile-Lys(*i*Noc)-NH-Resin をマイクロウェーブペプチド自動合成機にて合成した。得られた樹脂 H-Leu-Ala-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Gly-Ile-Tyr(Bu^t)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Arg(Pbf)-Ile-Gln(Trt)-Ile-Pro-Gly-Ile-Met-Asn(Trt)-Asp(OBu^t)-Glu(OBn)-Lys(*i*Noc)-Phe-Asn(Trt)-Leu-Lys(*i*Noc)-Leu-Val-Ile-Lys(*i*Noc)-NH-Resin の一部 (0.15 mmol) を 1,2-dichloroethane で 3 度洗浄した。*i*Noc-Thr(Fmoc-Val)-OH を 1,2-dichloroethane (2.0 ml)に溶解し、DIC (70 μ l, 0.45 mmol)と HOBt (60 mg, 0.45 mmol)を加え、この反応溶液をペプチド樹脂に加え、一晩室温にて攪拌した。アセチルキャッピング、及び脱 Fmoc 処理を行った後、Fmoc-Asn(GlcNAcBn₃)-OH を 1M DIC/NMP (0.60 ml) と 1M HOBt/NMP (0.60 ml)で 30 分間活性化した溶液をペプチド樹脂に加え、3 時間 50 °C で振盪した。アセチルキャッピング後、HBTU/DIEA を活性化試薬として用いた Fmoc 固相合成法にて再度ペプチド鎖の延伸を行い *i*Noc-Thr[H-Asp(OBu^t)-Val-Ser(Bu^t)-Leu-Thr(Bu^t)-Ile-Glu(OBu^t)-Asn(GlcNAcBn₃)-Val]-Leu-Ala-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Gly-Ile-Tyr(Bu^t)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Arg(Pbf)-Ile-Gln(Trt)-Ile-Pro-Gly-Ile-Met-Asn(Trt)-Asp(OBu^t)-Glu(OBn)-Lys(*i*Noc)-Phe-Asn(Trt)-Leu-Lys(*i*Noc)-Leu-Val-Ile-Lys(*i*Noc)-NH-Resin (1.3 g)を得た。一部の樹脂 (76 mg) を TFA カクテル (TFA:TIS:H₂O 95:2.5:2.5, 1.0 ml) にて処理した。反応液に窒素を吹き込み、TFA を除去し、エーテルでペプチド鎖を沈殿した。生じた沈殿をエーテルで 3 度洗浄し、残渣を減圧下にて乾燥した。乾燥した残渣をアルゴン雰囲気下、Low-TfOH⁽⁴⁾カクテル (TFA:dimethyl sulfide:*m*-cresol:TfOH=4:3:1:1, 1.0 ml) で 1 時間 0 °C にて処理した。反応液に-80 °C で冷却したエーテルを加え、ペプチド鎖を沈殿し、生じた沈殿をエーテルで 3 度洗浄した。残渣を RPHPLC で精製することで *i*Noc-Thr[H-Asp-Val-Ser-Leu-Thr-Ile-Glu-Asn(GlcNAc)-Val]-Leu-Ala-Asp-Ser-Gly-Ile-Tyr-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Arg-Ile-Gln-Ile-Pro-Gly-Ile-Met-Asn-Asp-Glu-Lys(*i*Noc)-Phe-Asn-Leu-Lys(*i*Noc)-Leu-Val-Ile-Lys(*i*Noc)-NH₂ 4i (1.0

μmol , 13%)を得た。MALDI-TOF mass, found: m/z 4710.5, calcd. $(M+5H-4i\text{Noc})^+$: 4710.5. Amino acid analysis: Asp_{5.57}Thr_{1.54}Ser_{1.63}Glu_{3.04}Pro_{2.09}Gly_{1.96}Ala_{0.98}Val_{2.66}Met_{0.72}Ile_{4.89}Leu_{3.64}Tyr_{0.77}Phe₁Lys_{2.94}Arg_{0.87}.

Val⁷⁷-Thr⁷⁸ にイソペプチド構造を有する **Ac-[Cys(Acm)^{15, 29, 35, 40, 86, 87}, Asn(GlcNAc)⁷⁶, Lys(*i*Noc)^{32, 67, 99, 103, 107}]-TIM-3 IgV (1-107)-NH₂ (6i).**

ペプチド **2** (230 nmol) とペプチド **3** (220 nmol)を HOOBt (1.0 mg, 6.7 μmol)と DIEA (0.6 μl , 3.4 μmol)を含む DMSO (20 μl) に溶解し、反応溶液を 12 時間室温にて振盪した。イソペプチド **4i** (300 nmol)を HOOBt (0.73 mg, 4.5 μmol) and DIEA (0.40 μl , 2.3 μmol)を含む DMSO (20 μl) に溶解し、反応溶液へ加えた。一片の AgCl を加え、遮光した状態で 6 時間室温にて振盪した。反応液に ether:EtOAc 4:1 を加え、生成物を沈殿し、残渣を 3 度エーテルで洗浄した。減圧乾燥後、残渣をゲルろ過クロマトグラフィーにて精製することでペプチド **6i** (140 nmol, 63%) を得た。Amino acid analysis: Asp_{13.74}Thr_{4.55}Ser_{2.78}Glu_{8.40}Gly_{9.05}Ala₆Val_{9.92}Met_{0.97}Ile_{4.95}Leu_{7.77}Tyr_{5.56}Phe_{3.81}Lys_{4.94}Arg_{5.38}.

Ac-[Asn(GlcNAc)⁷⁶]-TIM-3 IgV (1-107)-NH₂ (9)

ペプチド **6i** (150 nmol) を 50% AcOH aq. (0.30 ml) で溶解し、AgOAc (1.5 mg, 9.0 μmol)を加えた。反応液を遮光し、2 時間室温にて振盪した。反応液に 6 M グアニジン塩酸塩、15% MPA を含む水溶液 (0.5 ml) 加えた。生じた沈殿を遠心分離し、上清と分離した。沈殿を再度同様の手順で 5 回洗浄し、合わせた上清 (ca. 3 ml) に Zn (ca. 200 mg) 加え、室温で 1 時間激しく振盪した。ろ過後、反応液を RPHPLC で精製することでペプチド **8i** (85 nmol, 57%) を得た。得られた **8i** (85 nmol) を 6 M 尿素 aq. (0.66 ml) で溶解し、ゆっくりと攪拌した希釈溶液 (0.2 M Tris \cdot HCl, 0.4 M arginine, 5 mM cysteamine, 0.5 mM cystamine, pH 9.0, 40 ml) に 4 $^{\circ}\text{C}$ にて加えた。反応溶液を一晩 4 $^{\circ}\text{C}$ にて静置し、RPHPLC で精製することで糖タンパク質 **9** (22 nmol, 26%) を得た。MALDI-TOF mass, found: m/z 12310 (average), calcd for $(M+H)^+$ (average): 12310, Amino acid analysis: Asp_{14.22}Thr_{4.77}Ser_{2.86}Glu_{8.57}Gly_{9.12}Ala_{6.02}Val_{10.00}Met_{0.64}Ile_{4.90}Leu_{7.99}Tyr_{5.90}Phe₄Lys_{5.04}Arg_{6.46}.

Ac-{Asn[(Gal-GlcNAc-Man)₂Man-GlcNAc]₇₆}-TIM-3 Ig domain (1-107)-NH₂ (1).

GlcNAc 付き Ig 様ドメイン **9** (3.0 nmol) を 6 M 尿素を含む 50 mM リン酸バッファ (pH 7.0, 4.0 μ l) に溶解した。糖オキサゾリン (150 nmol) を 50 mM リン酸バッファ (pH 7.0, 4.0 μ l) に溶解し、ペプチド溶液に加えた。Glycosynthase (1 mU/ μ l, 5.0 μ l) を続けて加え、反応溶液を室温で 6 時間振盪した。反応溶液を RPHPLC で精製することで糖タンパク質 **1** (1.0 nmol, 33%) を得た。MALDI-TOF mass, found: m/z 13731 (average), calcd for (M+H)⁺: 13730 (average). Amino acid analysis:

Asp_{14.17}Thr_{4.73}Ser_{2.91}Glu_{8.76}Gly_{9.30}Ala_{6.72}Val_{10.58}Met_{0.53}Ile_{5.16}Leu_{8.01}Tyr_{5.99}Phe₄Lys_{4.70}Arg_{5.81}.

参考文献

1. Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Chem. Commun.*, **2004**, 124–125.
2. Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 5965–5968.
3. Hojo, H.; Tanaka, H.; Hagiwara, M.; Asahina, Y.; Ueki, A.; Katayama, H.; Nakahara, Y.; Yoneshige, A.; Matsuda, J.; Ito, Y.; Nakahara, Y. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9437–9446.
4. Tam, J. P.; Heath, W. F.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 5242–5251.
5. Umekawa, M.; Huang, W.; Li, B.; Fujita, K.; Ashida, H.; Wang, L. X.; Yamamoto, K. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 4469–4479.

第4章 TFAで脱保護可能な保護基を有する GlcNAc-Asn の開発

4-1. 緒言

前章で述べたように GlcNAc を有するタンパク質は化学酵素法を用いた糖タンパク質合成において、鍵化合物である^(1,2)。この GlcNAc 付きタンパク質を合成するためには、固相合成法によって GlcNAc 付きペプチドを調製する必要がある。1-4 で述べたようないくつかの方法のうち、筆者らのグループでは、ペプチド鎖伸長中に *O*-アシル化の危険性がなく、また、酸性条件下で脱保護できる Bn 保護戦略による糖ペプチド合成を行ってきた。その Bn 保護戦略に則った従来の GlcNAc 付きペプチドの合成ルートを Figure 4-1 に示す。まず、Bn 保護糖アミノ酸誘導体 **1** を固相法により導入した後、TFA カクテルによるペプチドの脱保護、続いて低濃度 TfOH⁽³⁾ による糖水酸基の Bn 基の除去の 2 つの脱保護工程を経ることで、GlcNAc 付きペプチドが調製されていた。もし、従来の Bn 基から TFA 感受性保護基に変更した糖アミノ酸誘導体 **2** を固相合成に用いることができれば、1 度の TFA 処理でペプチドの脱保護と共に、糖の保護基の除去も可能となり、糖ペプチドの調製がより効率的に行えることになる (Figure 4-1-1)。そこで、本章では TFA 感受性糖アミノ酸誘導体の開発を行い、糖タンパク質エムプリン第一 Ig ドメイン⁽⁴⁾ (22-104) の合成に応用することにした。

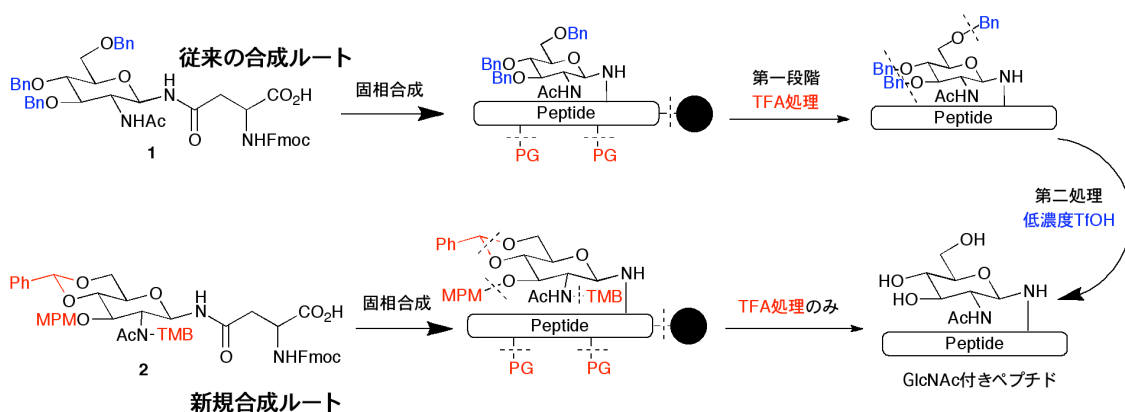


Figure 4-1 従来法と新規法による GlcNAc を有する糖ペプチド合成経路。

4-2. TFA 感受性保護基を有する糖アミノ酸の合成

糖アミノ酸 **2** の合成経路を Figure 4-2 に示す。既知のアジド糖 **3**⁽⁵⁾ の 3 位水酸基を MPM 化することで化合物 **4** へ誘導した。次に、フタロイル基をエチレンジアミンにより除去し、生成したアミノ基をアセチル化することで、アジド糖 **5** を収率 88% で得た。一方、Fmoc-Asp(OPfp)-OPac **11** を市販の誘導体 Fmoc-Asp(OBu^t)-OH より、3 段階で調製した (実験項参照)。そこで、アジド糖 **5** とアスパラギン酸誘導体 **11** との縮合反応を改変 Staudinger 反応により行った⁽⁶⁾。HOObt を添加した含水 THF 中で *n*-Bu₃P を加えることで、還元と同時にアシル化を行い、糖アミノ酸 **6** を収率 82% で得ることに成功した。しかし、得られた **6** は溶解性に乏しく、続く Zn 還元条件に用いる CH₂Cl₂/AcOH 混合溶媒に溶解させることが困難であった。辛うじて溶解させることが可能であったヘキサフルオロイソプロパノールを用いて Zn 還元を行ったものの、望む脱保護体 **7** は得られず、ベンジリデンが除去されたジオール体が得られたのみであった。この化

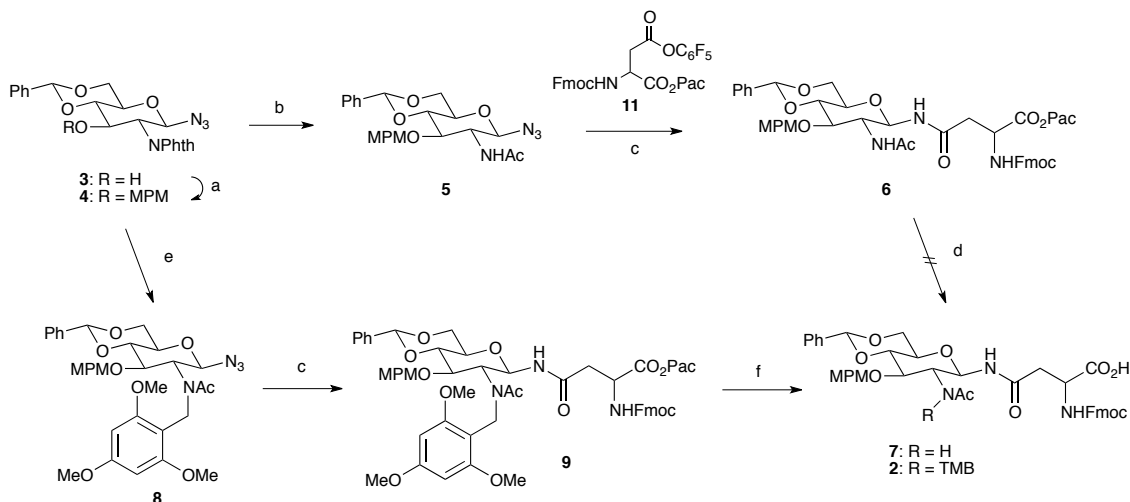


Figure 4-2 TFA 感受性保護基を有する糖アミノ酸誘導体の合成。反応条件: (a) MPM-Cl, NaH, TBAI, THF, 0 °C and then reflux, 30 min, 71%; (b) (1) H₂NCH₂CH₂NH₂, *n*-BuOH, 90 °C, 3 h, (2) Ac₂O, CH₂Cl₂, r.t., 30 min, 88% in 2 steps; (c) HOObt, *n*-Bu₃P, H₂O, THF, r.t., 3 h, **6**: 82%, **9**: 78%; (d) Zn, AcOH, HFIP, r.t. 1 d; (e) (1) H₂NCH₂CH₂NH₂, *n*-BuOH, 90 °C, 3 h; (2) 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, MeOH, r.t., 15 min; (3) Ac₂O, pyridine, DMAP, r.t., 1 h, 65% in 3 steps; (f) Zn, AcOH, CH₂Cl₂, r.t., 2 h, 85%.

化合物 **8** の難溶性は GlcNAc の 1 位と 2 位炭素に存在するアミド結合が、両方、もしくは単独で分子間の水素結合形成に関わり、分子同士が凝集するためではないかと推測された。そこで、修飾が容易な 2 位アミド基の窒素に置換基を導入し、水素結合に関与すると思われるアミド水素を取り除くことで、溶解性が向上するか検討することにした。まず、アジド糖 **4** から脱 Phth 化、還元アミノ化、アセチル化を経て、他の保護基と同様に TFA で脱保護可能な 2,4,6-トリメトキシベンジル (TMB) 基が 2 位窒素上に導入された化合物 **8** を誘導した。続いて同様に Pfp エステル **11** とカップリングすることで、糖アミノ酸 **9** を得た。得られた *N*-TMB 化 GlcNAc は **6** と比べ飛躍的に溶解性が改善された。そこで、CH₂Cl₂/AcOH 溶媒中で Zn による脱 Pac 化反応を行うことで、TFA 感受性保護基を有する糖アミノ酸誘導体 **2** を得ることに成功した。

4-3. エムプリン第一 Ig ドメイン (22-104) の合成戦略

得られた糖アミノ酸誘導体を用いて、エンプリン⁽⁴⁾ 第一 Ig ドメイン (22-104) の合成を行うことにした。エンプリン (emmprin; extracellular matrix metalloproteinase inducer) はガン細胞上に過剰発現され、がん細胞の転移に深く関わっているタンパク質である。また Asn⁴⁴ に結合している糖鎖が、活性に関連していることが知られている。

Ig ドメインの構造を Figure 4-3 に、また合成経路を Figure 4-4 に示す。22-104 の計 83 残基を 3 つのセグメント (22-34) **12**、(35-69) **13**、(70-104) **14** に分け、それぞれを Fmoc 固相合成法で調製することにした。得られたセグメントを前章にて開発した連続的チオエステル法により縮合すべく、セグメント **12**、**13** はそ

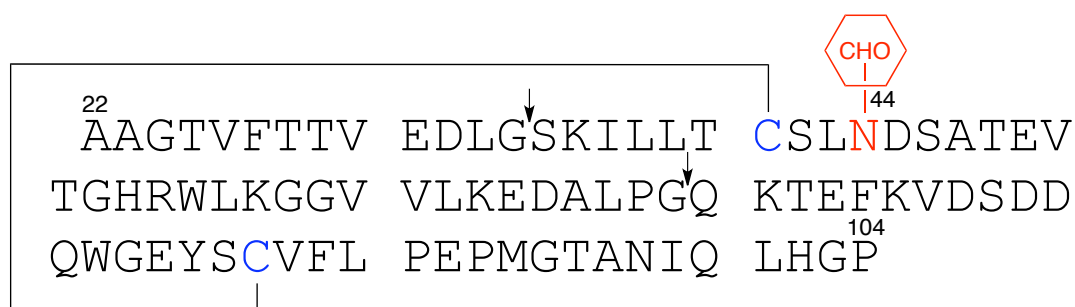


Figure 4-3 エムプリン第一 Ig ドメイン (22-104) の一次構造。

それぞれ芳香族チオエステルとアルキルチオエステルとして調製した。それらチオエステルは前章で述べたように、*N*-アルキルシステイン (NAC) 法によって調製することとした⁽⁷⁾。また、糖ペプチドセグメント **13** 合成にあたって、前節で合成した TFA 感受性保護基を有する糖アミノ酸 **2** の導入を行い、その固相合成における有用性を検証した。セグメント縮合と脱保護、フォールディング後にグライコシターゼ^(2c)の糖鎖転移反応で糖鎖伸長を行い、アシアロ、及びジシアロ複合型糖鎖を持つ Ig 様ドメインを合成することにした。

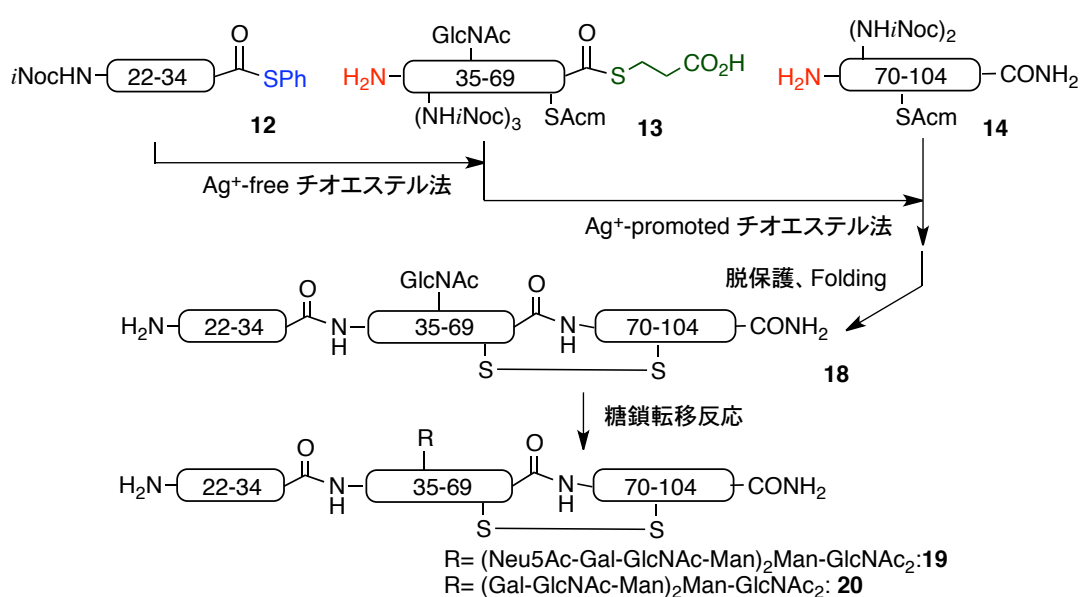


Figure 4-4 エムプリン (22-104) の合成経路。

4-4. 糖アミノ酸誘導体 **2** を用いた糖セグメント **13** の合成

糖セグメント **13** の合成経路を Figure 4-5 に示す。Fmoc-Rink amide 樹脂を出発物質とし、リシンを親水性リンカーとして 2 残基導入した。NAC 法によるチオエステル化を行うため、DCE 中で DIC-HOBt 法により、Fmoc-Gly-(Et)Cys(Trt)-OH⁽⁸⁾を樹脂へ導入した。次にマイクロウェーブペプチド自動合成機を用いて、ペプチド鎖の伸長を行った。また、Fmoc-Lys(*i*Noc)-OH は DIC-HOBt 法により、手動で導入した。糖鎖付加部位、Asn⁴⁴ では糖アミノ酸誘導体 **2** を DIC-HOBt 法で導入した。固相合成終了後、通常の TFA カクテルで 2 時間室温にて処理した。その粗生成ペプチドの RPHPLC チャートを Figure 4-5、

チャート a に示す。MASS スペクトルの結果から 2 つのメインピークが糖水酸基も含めて脱保護された **13a**, **13b** であることが明らかとなった。続いて、MPA とのチオエステル交換反応を行い、目的の糖ペプチドチオエステル **13** を得た。これにより、TFA 感受性糖アミノ酸誘導体 **2** を用いることで 1 段階の脱保護処理で GlcNAc を持つペプチドを得ることに成功した。一方、N 末端セグメント **12** は NAC 法を用いて芳香族チオエステルへ誘導された。また、C 末端セグメント **14** は通常の Fmoc 固相合成法にて調製された。

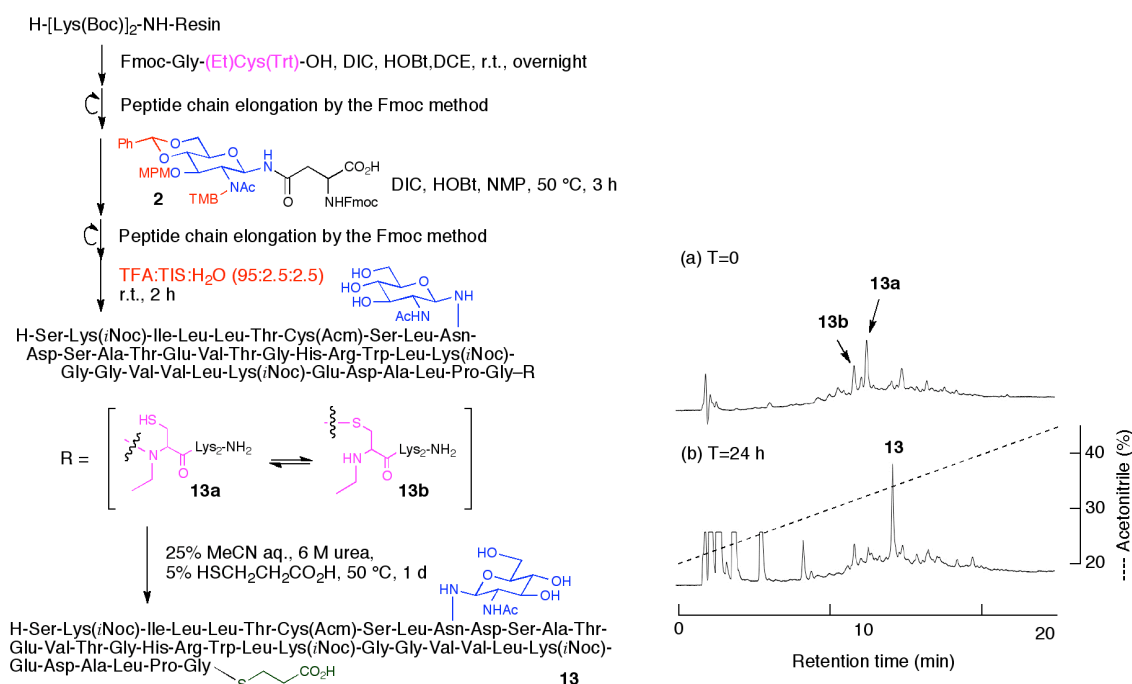


Figure 4-5 糖アミノ酸誘導体 **2** を用いた糖セグメント **13** の調製。溶出条件: カラム、Mightysil RP-18 GP2 150 mm-4.6 mm; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1% TFA を含む)。

4-5. 連続的チオエステル法による縮合、及びフォールディング

調製したセグメント同士を前章で開発した連続的チオエステル法による縮合を行い、エムプリンのポリペプチド鎖の合成を行うことにした。Figure 4-6 に示すように、まず、芳香族チオエステル **12** とアルキルチオエステル **13** を Ag^+ -Free の条件下にて縮合を行った。反応は効率よく進行し、12 時間で目的の中間体セグメント **15** を与えた。ついで、反応溶液に C 末端セグメント **14** と AgCl を加え、第二の縮合を行った。18 時間後にほぼ反応は終了し、目的の Ig ドメインのポリペプチド鎖 **16** を得ることに成功した。GFC 精製後に得られたポリペプチド **16** の収率は 48% であった。

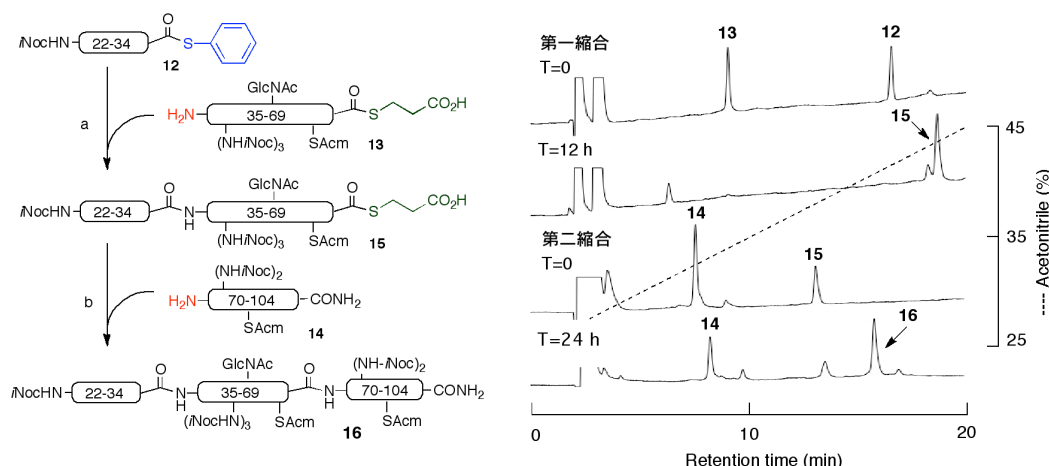


Figure 4-6 エムプリンポリペプチド **16** の合成。反応条件: (a) HOObt, DIEA, DMSO, r.t., 12 h; (b) AgCl , r.t., 1 d, 48% in 2 steps. 溶出条件: カラム、Mightysil RP-18 GP2 150 mm-4.6 mm; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、 H_2O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1% TFA を含む)。

次に AgOAc 処理による脱 Acm、続く Zn/MPA を用いた脱 *i*Noc 化反応を行い、RPHPLC にて精製することで目的の無保護ポリペプチド **17** を得た (Figure 4-7)。最後に、システアミン-シスタミン酸化還元緩衝液中にて一晩静置することでジスルフィドの形成を行い、望むフォールディングされた GlcNAc を有する Ig ドメイン **18** を得ることに成功した。

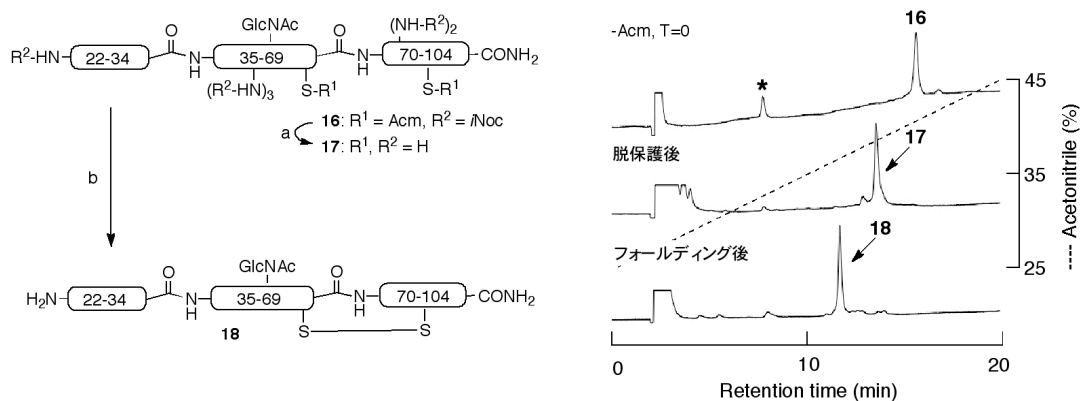


Figure 4-7 ポリペプチド **16** の脱保護とフォールディング。反応条件: (a) (1) AgOAc, 50% AcOH aq., 35 °C, 18 h; (2) Zn, 6 M Gu•HCl, 15% MPA aq., r.t., 30 min, 60% in 2 steps; (b) 0.1 M Tris•HCl, 10% glycerol, 10 mM cysteamine, 1 mM cystamine, pH 8.0, 4 °C, overnight, 57%. 溶出条件: カラム、Protein RP 150 mm-4.6 mm; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1 % TFA を含む)。

4-6. 糖鎖転移反応を用いた GlcNAc 付き Ig ドメインの糖鎖伸長

糖鎖転移反応を行うため、糖オキサゾリンの合成を行った (実験項参照)。アジアロ複合型糖鎖 **8** 糖 **21**、及びジシアロ糖鎖 **10** 糖 **22** は対応するヘミアセタールから、正田らが開発したオキサゾリン化試薬 CDMBI を用いて調製した⁽⁹⁾。

得られた GlcNAc 付き Ig ドメイン **18** と 2 種類の糖オキサゾリン **21**、**22** との糖鎖転移反応^(3c)を行った (Figure 4-8)。両反応とも効率よく進行し、目的とするアジアロ複合型糖鎖 **9** 糖、及びジシアロ複合型糖鎖 **11** 糖付きエムプリン Ig ドメイン **19**、**20** を与えた。**19** と **20** の糖転移効率はそれぞれ 38%と 50%であった。

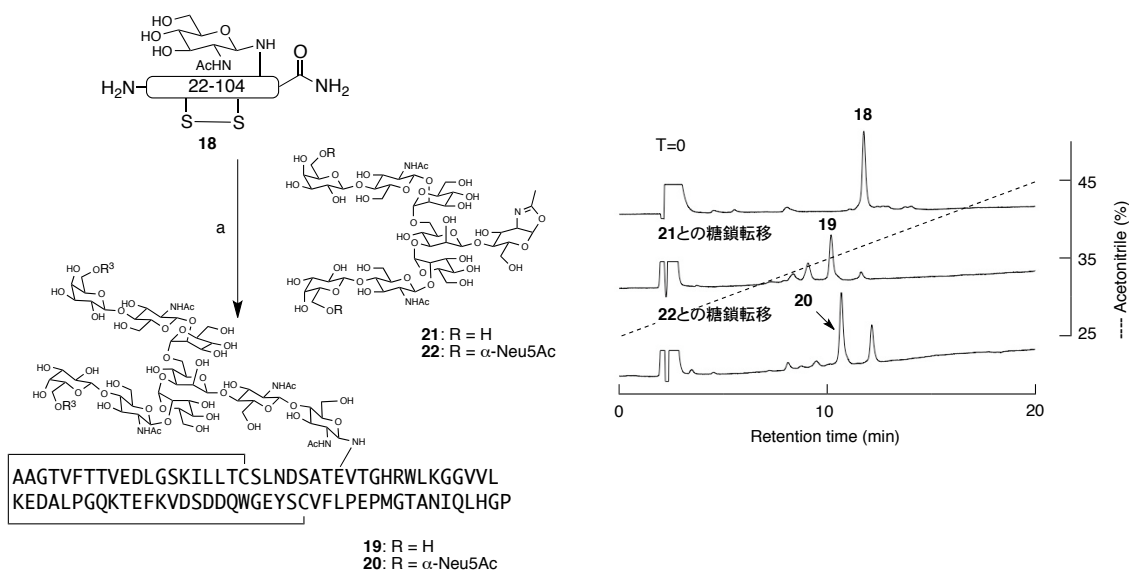


Figure 4-8 GlcNAc 付きエムプリン **18** の糖鎖転移反応。反応条件: (a) **21** or **22**, glycosynthase, 20% DMSO, 25 mM phosphate buffer pH 7.0, r.t., 4 h. 溶出条件: カラム, Mightysil RP-18 GP2 150 mm-4.6 mm; 流速 1 ml/min; 溶出液 A、H₂O (0.1% TFA を含む)、溶出液 B、アセトニトリル (0.1 % TFA を含む)。

4-7. CD スペクトル解析による 2 次構造の解析

先の合成で得られた糖鎖構造の異なった Ig ドメイン **18**、**19**、**20** の CD スペクトルを測定し、2 次構造を解析した。Figure 4-9 に示すように、3 種類の糖タンパク質は β -シート構造に富むスペクトルを示し、Ig ドメインの立体構造が正しく形成されていることが見出された。

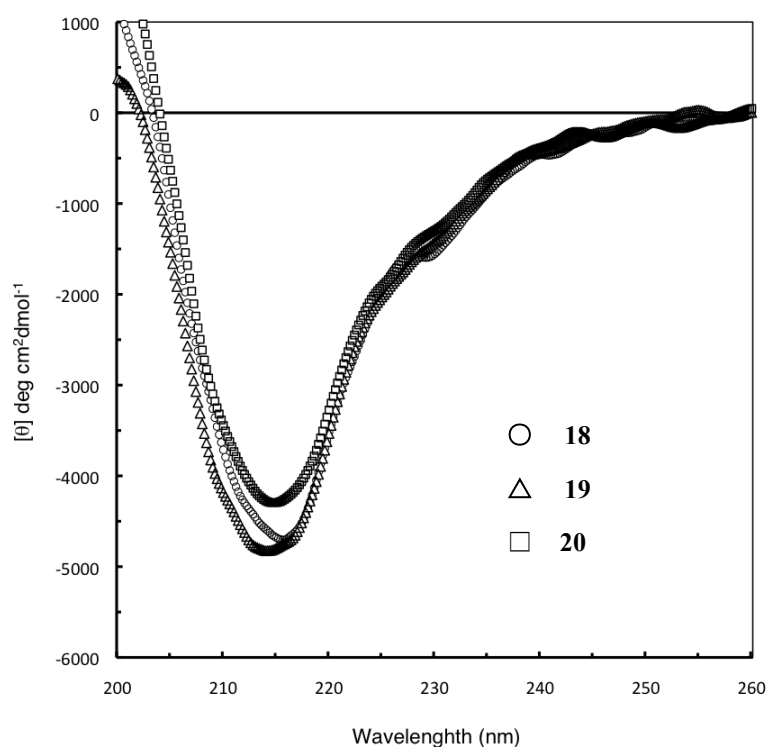


Figure 3-9 3 種類のグリコフォームを有するエムプリンの CD スペクトル。

4-8. 結論

TFA 感受性保護基を有する糖アミノ酸誘導体を開発し、固相合成に応用することで、エムプリン第一 Ig ドメイン (22-107) の合成を行った。新規に合成された糖アミノ酸誘導体は糖ペプチドチオエステルの調製に用いられ、TFA による一段階の処理で、望む脱保護体を簡便に得ることを実現した。得られた糖セグメントを他のセグメントと連続的チオエステル法により One-Pot で縮合し、望む Ig ドメインのポリペプチド鎖を得た。脱保護、及びフォールディングを行っ

た Ig ドメインを、2 種類の糖オキサゾリンとの糖鎖転移反応により、対応する 2 種類の複合型糖鎖を有する Ig ドメインの合成に成功した。得られたエムプリンは立体構造解析の検討に用いる予定である。

4-9. 実験の部

4,6-*O*-Benzylidene-2-deoxy-3-*O*-(4-methoxybenzyl)-2-phthalimide- β -D-glucopyranosyl azide (4).

4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimide- β -D-glucosaminyl azide **3** (200 mg, 0.48 mmol) を THF (2.4 ml) に Ar 雰囲気下で溶解した。溶液を 0 °C に冷却し、60% NaH in oil (58 mg, 1.5 mmol) と *n*-tetrabutylammonium iodide (36 mg, 0.15 mmol) と 4-methoxybenzyl chloride (0.13 ml, 0.96 mmol) を加えた。反応溶液を昇温し、1 時間加熱還流した。再度、反応溶液を 0 °C に冷却し、AcOH (83 μ l, 1.5 mmol) を加え、反応を停止した。水で反応溶液を希釈し、3 回 EtOAc/hexane (1:1) 溶液で水層を抽出した。合わせた有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。減圧濃縮後、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (toluene/EtOAc 9:1) で精製し、化合物 **4** (185 mg, 71%) を得た。R_f 0.24 (toluene/EtOAc 7:1). Mp 145-148 °C. [α]_D +47.1 (c 1.0, CHCl₃). Anal. calcd for C₂₉H₂₆N₄O₇: C, 64.20; H, 4.83; N, 10.33, Found: C, 64.28; H, 4.98; N, 10.21. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.84-7.65 (m, 4H, ArH) 7.54-7.52 (m, 2H, ArH), 7.44-7.38 (m, 3H, ArH), 6.71 (d, 2H, *J*=8.7 Hz, ArH), 6.37 (d, 2H, *J*=8.2 Hz, ArH), 5.64 (s, 1H, PhCH<), 5.43 (d, 1H, *J*=9.3 Hz, H-1), 4.71 (d, 1H, *J*=12.2 Hz, ArCH₂-), 4.48-4.43 (m, 2H, H-3, H-4), 4.42 (d, 1H, *J*=12.2 Hz, ArCH₂-), 4.12-4.07 (m, 1H, H-2), 3.90-3.80 (m, 2H, H-6), 3.77-3.74 (m, 1H, H-5), 3.62 (s, 3H, -OMe).

2-Acetamido-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-3-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-glucopyranosyl azide (5).

n-BuOH (3.7 ml) に懸濁した **4** (200 mg, 0.37 mmol) にエチレンジアミン (0.49 ml, 7.4 mmol) を加えた。反応溶液を窒素雰囲気下で 3 時間 90 °C で攪拌した。濃縮後、粗生成物を CH₂Cl₂ に溶解し、水、飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。

濃縮後、残渣を CH_2Cl_2 (3.7 ml) に溶解し Ac_2O (80 μl , 0.89 mmol) を加え、30 分間室温で攪拌した。生じた結晶をろ過で集め、 EtOAc で洗浄後、減圧下で乾燥することで、化合物 **5** (140 mg, 88%) を得た。 R_f 0.30 ($\text{CHCl}_3/2,2,2\text{-trifluoroethanol}$ 19:1). Mp 200 °C (decomp.). $[\alpha]_D$ -66.0 (c 0.26, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1). Anal. calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6$: C, 60.78; H, 5.77; N, 12.33, Found: C, 60.79; H, 5.59; N, 12.37. $^1\text{H NMR}$ (DMSO) δ : 8.12 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, -NH), 7.42-7.39 (m, 5H, ArH), 7.18 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, ArH), 6.85 (d, 2H, $J=8.3$ Hz, ArH) 5.72 (s, 1H, PhCH<), 4.71 (d, 1H, $J=9.3$ Hz, H-1), 4.65 (d, 1H, $J=11.2$ Hz, ArCH₂-), 4.53 (d, 1H, $J=11.2$ Hz, ArCH₂-), 4.29-4.25 (m, 1H, H-5), 3.84-3.68 (m, 7H, H-2, 3, 4, 6, -OMe), 3.62-3.57 (m, 1H, H-6), 1.86 (s, 3H, Ac).

***N*²-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*⁴-[2-acetamido-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-3-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-glucopyranosyl]-L-aspragine phenacyl ester (**6**).**

化合物 **5** (94 mg, 0.21 mmol) と **11** (120 mg, 0.25 mmol) と HOObt (40 mg, 0.25 mmol) を THF (1.1 ml、2% H_2O を含む) に溶解した。 $n\text{-Bu}_3\text{P}$ (62 μl , 0.25 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。 反応溶液を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 溶液で希釈し、有機層を飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄し MgSO_4 で乾燥した。 残渣をトルエンで懸濁し、ろ過した。 固形物をトルエンで 3 度洗浄し、減圧下で乾燥することで化合物 **6** (150 mg, 82%) を得た。 R_f 0.38 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1). Mp 220 °C (decomp.). $[\alpha]_D$ -4.5 (c 0.19, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1). Anal. calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{12}$: C, 67.94; H, 5.59; N, 4.75, Found: C, 67.94; H, 5.59; N, 4.74. $^1\text{H NMR}$ (DMSO) δ : 8.60 (d, 1H, $J=9.3$ Hz, -NH), 8.01-7.96 (m, 3H, -NH, ArH), 7.89 (d, 2H, $J=7.3$ Hz, ArH), 7.74-7.68 (m, 3H, ArH), 7.59-7.55 (m, 2H, ArH), 7.43-7.31 (m, 9H, ArH), 7.19 (d, 2H, $J=8.2$ Hz, ArH), 6.85 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, ArH), 5.71 (s, 1H, PhCH<), 5.56 (d, 1H, $J=17.1$ Hz, PhCOCH₂-), 5.49 (d, 1H, $J=17.1$ Hz, PhCOCH₂-), 5.12 (brdd, 1H, $J=9.3, 9.8$ Hz, H-1), 4.71-4.64 (m, 1H, Asn- α H), 4.65 (d, 1H, $J=11.2$ Hz, ArCH₂-), 4.53 (d, 1H, $J=11.2$ Hz, ArCH₂-), 4.35-4.28 (m, 2H, Ar₂CHCH₂-), 4.24-4.20 (m, 2H, Ar₂CH-, H-5), 3.89-3.77 (m, 1H, H-2), 3.44-3.38 (m, 6H, -OMe, H-6, H-3), 2.83 (dd, 1H, $J=4.9, 16.1$ Hz, Asn- β H), 2.63 (dd, 1H, $J=8.3, 16.1$ Hz, Asn- β H), 1.80 (s, 3H, Ac).

4,6-*O*-Benzylidene-2-deoxy-3-*O*-(4-methoxybenzyl)-2-[*N*-(2,4,6-trimethoxybenzyl)-

acetamido]- β -D-glucopyranosyl azide (8).

n-BuOH (46 ml)に **4** (2.5 g, 4.6 mmol)を懸濁し、エチレンジアミンを(6.2 ml, 93 mmol)窒素雰囲気下で加えた。反応溶液を 3 時間 90 °C で攪拌し、濃縮した。残渣を CH₂Cl₂ に溶解し、水、飽和食塩水で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。残渣を MeOH (22 ml)に懸濁し、AcOH (0.53 ml, 9.3 mmol)と 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde (1.1 g, 5.6 mmol)と NaBH₃CN (217 mg, 3.5 mmol)を加えた。反応溶液を 15 分間室温で攪拌し、減圧濃縮した。残渣 EtOAc に溶解し、を水、飽和食塩水で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。濃縮後、残渣をピリジン(20 ml)と Ac₂O (10 ml)で溶解し、4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine (56 mg, 0.46 mmol)を加えた。反応溶液を室温で 1 時間攪拌した後濃縮した。残渣を EtOAc で溶解した後、5%クエン酸水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。濃縮後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (toluene/EtOAc 4:1)で精製し、化合物 **8** (1.8 g, 65%)を得た。 *R*_f 0.35 (toluene/EtOAc 4:1). [α]_D +7.9 (C 1.0, CHCl₃). Anal. calcd for C₃₃H₃₈N₄O₉: C, 62.45; H, 6.03; N, 8.83, Found: C, 62.30; H, 6.08; N, 8.62. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.41-7.34 (m, 5H, ArH), 7.18 (d, 2H, *J*=8.3 Hz, ArH), 6.82 (d, 2H, *J*=8.3 Hz, ArH), 6.61 (s, 2H, ArH), 5.71 (d, 1H, *J*=8.8 Hz, H-1), 5.49 (s, 1H, PhCH<), 4.74 (brdd, 1H, *J*=8.9, 9.2 Hz, H-3), 4.67 (d, 1H, *J*=11.7 Hz, ArCH₂-), 4.59 (d, 1H, *J*=14.2 Hz, ArCH₂-), 4.49 (d, 1H, *J*=11.7 Hz, ArCH₂-), 4.44 (d, 1H, *J*=14.2 Hz, ArCH₂-), 4.30 (dd, 1, *J*=4.4, 10.2 Hz, H-6), 3.80-3.77 (m, 12H, -OMe), 3.73-3.66 (m, 1H, H-6), 3.63-3.57 (m, 1H, H-5), 3.46 (brt, 1H, *J*=9.3 Hz, H-2), 2.25 (s, 3H, Ac).

***N*²-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*⁴-{4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-3-*O*-(4-methoxybenzyl)-2-[*N*-(2,4,6-trimethoxybenzyl)-acetamido]- β -D-glucopyranosyl}-L-aspragine phenacyl ester (9).**

化合物 **8** (78 mg, 0.13 mmol)と **11** (100 mg, 1.6 mmol)と HOOBt (26 mg, 0.16 mmol)を THF (1.3 ml, H₂O を 2%含む)に溶解し、*n*-Bu₃P (39 μ l, 0.16 mmol)を加えた。反応溶液を室温で 3 時間攪拌した。EtOAc で反応溶液を希釈した後、有機層を飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄し Na₂SO₄ で乾燥した。濃縮後、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し (toluene/EtOAc 1:1) 化合物 **9** (100 mg, 78%)を得た。 *R*_f 0.33 (toluene/EtOAc 1:1). [α]_D +22.6 (c 1.0, CHCl₃). Anal. calcd for C₆₀H₆₁N₃O₁₅: C, 67.72; H, 5.78; N, 3.95, Found: C, 67.75; H, 5.75; N, 4.23. ¹H-NMR

(CDCl₃/CD₃OD 19:1) δ : 7.93 (d, 2H, $J=7.3$ Hz, ArH), 7.74 (d, 2H, $J=7.3$ Hz, ArH), 7.62-7.58 (m, 3H, ArH), 7.51-7.22 (m, 13H, ArH), 6.86-6.83 (m, 2 H, ArH), 6.24-6.06 (m, 2H, ArH), 6.00 (d, 0.5H, $J=9.3$ Hz, H-1 of conformer A), 5.54-5.33 (m, 3H, PhCH<, PhCOCH₂-), 4.91 (d, 0.5H, $J=11.2$ Hz, ArCH₂- of conformer A or B), 4.80-4.69 (m, 3H, Ar₂CH-, Asn- α H, H-3), 4.57-4.50 (m, 2H, Ar₂CHCH₂-, ArCH₂-), 4.46-4.19 (m, 6H, Ar₂CHCH₂-, ArCH₂-, H-6), 3.82-3.77 (m, 12H, CH₃O-), 3.72-3.58 (m, 2H, H-5 of conformer A, H-6), 3.47 (brdd, 0.5H, $J=8.8, 9.2$ Hz, H-4 of conformer A or B), 3.18-3.08 (m, 1H, H-2 of conformer A or B, H-5 of conformer A), 2.88 (dd, 0.5H, $J=4.9, 16.6$ Hz, Asn- β H of conformer A), 2.77 (dd, 0.5H, $J=4.9, 16.1$ Hz, Asn- β H of conformer A), 2.63 (dd, 0.5H, $J=5.7, 16.1$ Hz, Asn- β H of conformer B), 2.42-2.39 (m, 2H, Asn- β H of conformer B, Ac of conformer A), 2.12 (s, 1.5H, Ac of conformer B).

***N*²-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*⁴-{4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-3-*O*-(4-methoxybenzyl)-2-[*N*-(2,4,6-trimethoxybenzyl)-acetamido]- β -D-glucopyranosyl}-L-aspragine (2).**

化合物 **9** (110 mg, 0.10 mmol)を CH₂Cl₂ (2.0 ml)に溶解した後、AcOH (1.5 ml)と Zn 粉末(400 mg, 6.2 mmol)を加えた。反応液を室温で 2 時間激しく攪拌した。セライトろ過後、ろ液を濃縮した。残渣を EtOAc に溶解した後、5%クエン酸水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。濃縮後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl₃/MeOH 19:1 1% AcOH)で精製することで化合物 **2** (80 mg, 85%)で得た。R_f0.30 (CHCl₃/MeOH 19:1 1% AcOH). [α]_D +65.0 (c 1.0, CHCl₃). Anal. calcd for C₅₂H₅₅N₃O₁₄: C, 66.02; H, 5.86; N, 4.44, Found: C, 65.94; H, 5.60; N, 4.28. ¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 19:1) δ : 7.74 (d, 2H, $J=7.3$ Hz, ArH), 7.60-7.56 (m, 2H, ArH), 7.49-7.46 (m, 2H, ArH), 7.40-7.21 (m, 9H, ArH), 6.86-6.83 (m, 2H, ArH), 6.21 (s, 1H, ArH), 6.13 (s, 1H, ArH), 5.98 (d, 0.5H, $J=9.3$ Hz, H-1 of conformer A), 5.54 (s, 0.5H, PhCH< of conformer A), 5.53 (s, 0.5H, PhCH< of conformer B), 4.92 (d, 0.5H, $J=11.7$ Hz, ArCH₂- of conformer A), 4.80-4.70 (m, 1.5H, ArCH₂-, H-4 of conformer A), 3.85-3.77 (m, 12H, CH₃O-), 3.17-3.11 (m, 1.5H, H-4, 5 of conformer A or B), 2.86 (dd, 0.5H, $J=4.4, 17.0$ Hz, Asn- β H of conformer A), 2.65 (dd, 0.5H, $J=5.4, 16.6$ Hz, Asn- β H of conformer A), 2.54 (dd, 0.5H, $J=4.4, 16.6$ Hz, Asn- β H of conformer B), 2.39-2.31 (m, 2H, Ac, Asn- β H of conformer B), 2.13 (s, 1.5H, Ac of conformer A).

***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*O*⁴-*t*-butyl-L-aspartic acid phenacyl ester (10).**

N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-*O*⁴-*t*-butyl-L-aspartic acid (5.0 g, 12 mmol)を75% MeOH aq. (120 ml)に溶解し、Cs₂CO₃ (2.0 g, 6.1 mmol)を加えた。反応溶液を15分間攪拌した後、濃縮した。残渣をAr雰囲気下にてDMF (120 ml)で溶解した。反応液を0 °Cに冷却し、2-bromoacetophenone (2.6 g, 13 mmol)を加えた。反応液を0 °Cで2時間攪拌した。反応液を水で希釈した後、EtOAc/hexane (1:1)で水層を3度洗浄した。合わせた有機層を水、飽和食塩水で洗浄した後、Na₂SO₄で乾燥した。濃縮後、残渣を再結晶 (Hexane/EtOAc)で精製し、化合物 **10** (5.0 g, 78%)を得た。R_f 0.35 (toluene/EtOAc 7:1). Mp. 99-102 °C. [α]_D -2.0 (CHCl₃, c 1.0). Anal. calcd for C₃₁H₃₁NO₇: C, 70.31; H, 5.90; N, 2.64, Found: C, 70.32; H, 5.71; N, 2.63. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.90 (d, 2H, *J*=7.3 Hz, Ar*H*), 7.76 (d, 2H, *J*=7.3 Hz, Ar*H*), 7.62-7.59(m, 3H, Ar*H*), 7.51-7.47(m, 2H, Ar*H*), 7.41-7.37 (m, 2H, Ar*H*), 7.32-7.29 (m, 2H, Ar*H*), 5.91 (d, 1H, *J*=8.8 Hz, -NH), 5.45 (d, 1H, *J*=16.1 Hz, PhCOCH₂-), 5.39 (d, 1H, *J*=16.5 Hz, PhCOCH₂-), 4.86-4.81 (m, 1H, α*H*), 4.45-4.40(m, 1H, Ar₂CHCH₂-), 4.37-4.33(m, 1H, Ar₂CHCH₂-), 4.27-4.23(m, 1H, Ar₂CH-), 3.04 (dd, 1H, *J*=5.4 Hz, 17.1 Hz, β*H*), 2.92 (dd, 1H, *J*=4.9 Hz, 17.1 Hz, β*H*), 1.48 (s, 9H, *t*-Bu).

***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*O*⁴-pentafluorophenyl-L-aspartic acid phenacyl ester (11).**

化合物 **10** (5.0 g, 9.5 mmol)を50% TFA/CH₂Cl₂ (95 ml)に溶解した。室温で1時間攪拌した後、濃縮した。残渣を窒素雰囲気下にてCH₂Cl₂ (47 ml)で溶解した後、混合液を0 °Cに冷却し、pentafluorophenol (2.7 g, 14 mmol)と1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.9 g, 10 mmol)を加えた。反応溶液を室温で1時間攪拌した後、濃縮した。残渣をEtOAcで溶解した後、有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。粗生成物を再結晶で精製し (Hexane:EtOAc)化合物 **11** (5.7g, 93%)を得た。R_f 0.54 (toluene/EtOAc 4:1). Mp. 97-100. [α]_D= +4.6 (CHCl₃, c 1.0). Anal. calcd for C₃₃H₂₂F₅NO₇: C, 61.98; H, 3.47; N, 2.19, Found: C, 62.11; H, 3.46; N, 2.37. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.90 (d, 2H, *J*=7.3 Hz, Ar*H*), 7.76 (d, 2H, *J*=7.3 Hz, Ar*H*), 7.65-7.59 (m, 3H, Ar*H*), 7.52-7.48 (m, 2H, Ar*H*-), 7.42-7.38 (m, 2H, Ar*H*), 7.33-7.29 (m, 2H, Ar*H*), 5.86 (d, 1H, *J*=7.8 Hz, NH), 5.49 (d, 1H, *J*=16.6, PhCOCH₂-), 5.44 (d, 1H, *J*=16.6, PhCOCH₂-), 5.06-5.01 (m,

1H, α H), 4.47-4.40 (m, 2H, Ar₂CHCH₂-), 4.27-4.23 (m, 1H, Ar₂CH-), 3.46-3.44 (m, 2H, β H).

***i*Noc-emmprin (22-34)-SPh (12).**

Fmoc-Rink amide MBHA 樹脂 (150 mg, 50 μ mol)を 20% ピペリジン/NMP 溶液で 1 分間処理した。再度、樹脂を同様の溶液で 5 分間処理し、NMP で洗浄した。Fmoc-Lys(Boc)-OH (94 mg, 0.20 mmol)を 0.5 M HBTU/DMF (0.38 ml, 0.19 mmol)と DIEA (70 μ l, 0.4 mmol) で溶解した後、樹脂へ加えて室温で 12 分間振盪した。引き続き、Lys 残基を上記と同様の手順で再度導入し、Fmoc-[Lys(Boc)]₂-NH-resin を得た。脱 Fmoc 化後、DCE (0.5 ml)に溶解した Fmoc-Gly-(Et)Cys(Trt)-OH (65 mg, 0.10 mmol)と DIC (15 μ l, 0.15 mmol)と HOBt (19 mg, 0.15 mmol)を樹脂に加え、室温で一晩振盪した。10% Ac₂O と 5% DIEA を含む NMP 溶液で 5 分間アセチルキAPPINGした後、得られた Fmoc-Gly-(Et)Cys(Trt)-[Lys(Boc)]₂-NH-resin を 433A ペプチド自動合成器の FastMoc 法でペプチド鎖の伸長をすることで H-Ala-Ala-Gly-Thr(Bu^t)-Val-Phe-Thr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Val-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-(Et)Cys(Trt)-[Lys(Boc)]₂-resin を得た。*i*Noc-ONp (27 mg, 0.10 mmol)を NMP (1.0 ml)に溶解した後、樹脂に加え室温で 1 時間振盪した。樹脂を NMP、CH₂Cl₂、MeOH、エーテルで 3 回ずつ洗浄し、減圧乾燥することで *i*Noc-Ala-Ala-Gly-Thr(Bu^t)-Val-Phe-Thr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Val-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-(Et)Cys(Trt)-[Lys(Boc)]₂-resin (260 mg)を得た。得られた樹脂(50 mg)を TFA カクテル (TFA:triisopropylsilane:H₂O=95:2.5:2.5, 1.0 ml)で 2 時間室温にて処理した。反応溶液をろ過した後、窒素気流で TFA を除去し、エーテルで沈殿させた。沈殿をエーテルで 2 回洗浄し、減圧下で乾燥した。残渣を 6 M 尿素と 5% AcOH を含む 60% CH₃CN aq. (2.0 ml)に溶解し、PhSH (40 μ l) を加えた。反応溶液を 37 °C で 1 日間振盪した後、過剰の PhSH をエーテル抽出で除去した。混合溶液を RPHPLC で精製することでペプチド **12** (740 nmol, 7.6%)を得た。MALDI-TOF mass, found: m/z 1507.7, calcd for (M+H)⁺: 1507.7. Amino acid analysis: Asp_{1.01}Thr_{2.69}Glu_{1.04}Gly_{2.06}Ala_{1.95}Val_{1.95}Leu_{1.06}Phe₁.

H-[Cys(Acm)⁴¹,Asn(GlcNAc)⁴⁴,Lys(*i*Noc)^{36,57,63}]-emmprin(35-69)-SC₂H₄CO₂H (13).

Fmoc-Gly-(Et)Cys(Trt)-[Lys(Boc)]₂-NH-resin (0.10 mmol)をマイクロウェーブペ

プチド自動合成器によりリシン残基を除いてペプチド伸長した。リシン残基は
 予め Fmoc-Lys(*i*Noc)-OH を 1M DIC/NMP (0.40 ml) と 1M HOBt/NMP (0.40 ml) で
 30 分間活性化した溶液を樹脂に加え、室温で 30 分振盪することで導入した。そ
 の後、得られた H-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Val-Thr(Bu^t)-Gly-
 His(Trt)-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Leu-Lys(*i*Noc)-Gly-Gly-Val-Val-Leu-Lys(*i*Noc)-
 Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Ala-Leu-Pro-Gly-(Et)Cys(Trt)-[Lys(Boc)]₂-resin に、予め **2**
 (190 mg, 0.20 mmol) を 1 M DIC/NMP (0.40 ml) と 1 M HOBt/NMP (0.40 ml) で 30 分
 間活性化した溶液を樹脂に加えた。反応溶液を 50 °C で 3 時間浸透し、アセチル
 キャッピング処理を行った。再度、ペプチド自動合成器でペプチド鎖を伸長し、
 H-Ser(Bu^t)-Lys(*i*Noc)-Ile-Leu-Leu-Thr(Bu^t)-Cys(Acm)-Ser(Bu^t)-Leu-Asn(GlcNAc)-
 Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Val-Thr(Bu^t)-Gly-His(Trt)-Arg(Pbf)-
 Trp(Boc)-Leu-Lys(*i*Noc)-Gly-Gly-Val-Val-Leu-Lys(*i*Noc)-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Ala-
 Leu-Pro-Gly-(Et)Cys(Trt)-[Lys(Boc)]₂-resin (640 mg) を得た。得られた樹脂の一部
 (220 mg) を TFA カクテル (TFA:triisopropylsilane:H₂O=95:2.5:2.5, 4.0 ml) で 2 時
 間室温にて処理した。反応溶液をろ過した後、ろ液を窒素気流で除去し、エー
 テルで沈殿させた。沈殿をエーテルで 2 回洗浄し、減圧下で乾燥した。残渣を 6
 M 尿素を含む 25% CH₃CN aq. (5.0 ml) に溶解し、MPA (0.25 ml) を加えた。反
 応液を 50 °C で 1 日間浸透した後、過剰の MPA をエーテルで抽出、除去した。
 混合溶液を RPHPLC で精製することでペプチド **13** (1.3 μmol, 3.7%) を得た。
 MALDI-TOF mass, found: m/z 4072.3, calcd for [M+4H-3*i*Noc]⁺: 4072.6 (average).
 Amino acid analysis: Asp_{2.63}Thr_{2.04}Ser_{2.30}Glu_{1.62}Gly_{4.07}Ala₂Val_{2.12}Ile_{0.74}Leu_{5.07}
 Lys_{2.90}His_{0.90}Arg_{0.88}.

H-[Cys(Acm)⁸⁷, Lys(*i*Noc)^{71,75}]-emmprin (70-104)-NH₂ (14).

Fmoc-Rink amide MBHA resin (300 mg, 0.10 mmol) をペプチド **13** と同様にマイク
 ロウェーブ自動合成機によりペプチド伸長することで、
 H-Gln(Trt)-Lys(*i*Noc)-Thr(Bu^t)-Glu(Bu^t)-Phe-Lys(*i*Noc)-Val-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-
 Asp(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Gly-Glu(Bu^t)-Tyr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Acm)-
 Val-Phe-Leu-Pro-Glu(OBu^t)-Pro-Met-Gly-Thr(Bu^t)-Ala-Asn(Trt)-Ile-Gln(Trt)-Leu-
 His(Trt)-Gly-Pro-NH-resin (700 mg) を得た。得られた樹脂の一部 (200 mg) を TFA
 カクテル (TFA:triisopropylsilane:H₂O=95:2.5:2.5, 4.0 ml) で 2 時間室温にて処理し
 た。反応溶液をろ過した後、ろ液を窒素気流で除去し、エーテルで沈殿させた。

沈殿をエーテルで2回洗浄し、減圧下で乾燥した。残渣を RPHPLC で精製することでペプチド **14** (1.5 μmol , 5.5%)を得た。MALDI-TOF mass, found: m/z 4039.5, calcd for $[\text{M}+3\text{H}-2i\text{Noc}]^+$: 4039.4 (average). Amino acid analysis: Asp_{4.11}Thr_{1.71}Ser_{1.34}Glu_{5.70}Gly_{3.36}Ala_{1.14}Val_{2.06}Met_{0.72}Ile_{1.03}Leu_{2.13}Tyr_{1.10}Phe₂Lys_{1.95}His_{1.07}.

***i*Noc-[Cys(Acm)^{41,87}, Asn(GlcNAc)⁴⁴, Lys(*i*Noc)^{36,57,63,71,75}]-emmprin (22-107)-NH₂ (16).**

ペプチド **12** (470 nmol)とペプチド **13** (310 nmol)と HOOBt (1.9 mg, 12 μmol)を DMSO (31 μl)に溶解した後、DIEA (1.0 μl , 5.8 μmol)を加え、反応溶液を室温で12時間振盪した。ペプチド **14** (370 nmol)を HOOBt (0.91 mg, 5.6 μmol)と DIEA (0.49 ml, 2.8 μmol)を含む DMSO (31 μl)に溶解し、反応液に加えた。一欠片の AgCl を反応液に加え、遮光条件下24時間室温で激しく振盪した。反応溶液にエーテル/EtOAc (1:1)を加えた後、生じた沈殿をエーテルで2度洗浄した。減圧乾燥後、残渣を50% CH₃CN水溶液に溶解し、GFCにより精製することでペプチド **16** (150 nmol, 48 % from **13**)を得た。MALDI-TOF mass, found: 9267.2, calcd for $[\text{M}+6\text{H}-5i\text{Noc}]^+$: 9267.3 (average). Amino acid analysis: Asp_{7.65}Thr_{6.93}Ser_{3.18}Glu_{7.99}Gly_{9.10}Ala_{5.68}Val_{7.00}Met_{0.77}Ile_{1.78}Leu_{9.64}Tyr_{0.26}Phe₃Lys_{5.06}His_{1.83}Arg_{0.97}.

H-[Cys(SH)^{41,87}, Asn(GlcNAc)⁴⁴]-emmprin (22-107)-NH₂ (17).

ペプチド **16** (350 nmol)を50% AcOH aq. (0.30 ml)に溶解した後、AgOAc (2.3 mg, 14.0 μmol)を加えた。反応溶液を遮光し、35 °Cで18時間振盪した。15% MPAを含む6 M グアニジン塩酸塩水溶液(0.40 ml)を反応溶液に加え、遠心することで上清と沈殿を分けた。生じた沈殿を繰り返し15% MPAを含む6 M グアニジン塩酸塩水溶液(0.40 ml)で再度洗浄し、遠心することで上清と分けた。合わせた上清(約6 ml)にZn粉末(約150 mg)を加え、室温で30分間激しく攪拌した。反応液をろ過した後、RPHPLCで精製することで**17** (210 nmol, 60%)を得た。MALDI-TOF mass, found: 9126.4, calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$: 9125.1 (average). Amino acid analysis: Asp_{7.64}Thr_{7.45}Ser_{3.99}Glu_{8.01}Pro_{4.09}Gly_{9.04}Ala_{5.56}Val_{6.33}Met_{0.63}Ile_{1.73}Leu_{9.47}Tyr_{0.28}Phe₃Lys_{4.94}His_{1.83}Arg_{0.92}.

H-[Asn(GlcNAc)⁴⁴]-emmprin (22-107)-NH₂ (18).

ペプチド **17** (210 nmol)を 6 M グアニジン塩酸塩水溶液 (0.75 ml)に溶解し、15 分間室温で振盪した。溶液を 4 °C に冷却した希釈バッファー (0.1 M Tris•HCl, 10 % グリセロール, 10 mM システアミン, 1 mM シスタミン, pH 8.0, 45 ml) に ゆっくりと加え、4 °C で一晩静置した。溶液を TFA で中和し、RPHPLC で精製 することで Ig ドメイン **18** (120 nmol, 57 %)を得た。MALDI-TOF mass, found: 9122.2, calcd for [M+H]⁺: 9123.1 (average). Amino acid analysis: Asp_{8.24}Thr_{7.25}Ser_{4.41}Glu_{8.80}Pro_{4.09}Gly_{9.14}Ala_{5.34}Val_{6.69}Met_{0.91}Ile_{2.01}Leu_{10.13}Tyr_{0.33}Phe₃Lys_{5.24}His_{2.07}Arg_{1.04}.

β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-2-deoxy-2-acet-amido-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-deoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose-2,1-D-oxazoline (21).

β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-2-deoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-deoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose **23** (ca. 1 mg, 0.70 μmol)を K₃PO₄ (2.2 mg, 11 μmol)を含む H₂O (0.1 ml)に溶解し、0 °C に冷却した。CDMBI (0.76 mg, 3.5 μmol)を溶液に加え、0 °C で 2 時間静置した。溶液を RPHPLC で精製し、凍結乾燥することで糖鎖オキサゾリン **21** を得た。

5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-a-D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid-(2→6)-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-deoxy-2-acet-amido-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-a-D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid -(2→6)-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-deoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose-2,1-D-oxazoline (22).

5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-a-D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid-(2→6)-

β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-acet-amido- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid-(2 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose **24** (ca. 1 mg, 0.50 μ mol) を K₃PO₄ (2.2 mg, 11 μ mol)を含む H₂O (0.1 ml)に溶解し、0 °C に冷却した。CDMBI (0.76 mg, 3.5 μ mol)を溶液に加え、0 °C で 2 時間静置した。溶液を RPHPLC で精製し、凍結乾燥することで糖鎖オキサゾリン **22** を得た。

糖鎖転移反応

GlcNAc 付きタンパク質 **18** (20 nmol)と **21** もしくは **22** (約 50 eq.)を 50 mM リン酸緩衝液(20% DMSO, pH 7.0, 20 μ l)に溶解した。Glycosynthase (5 mU, 5 ml)を溶液に加え、室温で 4 時間ゆっくりと振盪した。溶液を酢酸で中和し、RPHPLC で精製することで糖タンパク質 **19** 及び **20** を得た。

H-[Asn(LacNAc₂Man₃GlcNAc₂)⁴⁴]-emmprin (22-107)-NH₂ (**19**).

収率: 7.6 nmol, 38%. MALDI-TOF mass, found: 10542, calcd for [M+H]⁺: 10543 (average). Amino acid analysis: Asp_{8.05}Thr_{7.04}Ser_{4.27}Glu_{8.74}Pro_{5.20}Gly_{9.10}Ala_{4.93}Val_{6.79}Met_{0.13}Ile_{1.91}Leu_{10.3}Tyr_{0.37}Phe₃Lys_{5.09}His_{2.02}Arg_{0.93}.

H-[Asn(5-NueNAc₂LacNAc₂Man₃GlcNAc₂)⁴⁴]-emmprin (22-107)-NH₂ (**20**).

収率: 10 nmol, 50%. ESI-TOF mass, found: 11121, calcd for [M+H]⁺: 11119 (monoisotopic) Amino acid analysis: Asp_{8.38}Thr_{7.36}Ser_{4.50}Glu_{9.05}Pro_{4.66}Gly_{9.40}Ala_{5.06}Val_{7.23}Met_{0.36}Ile_{2.02}Leu_{10.1}Tyr_{0.38}Phe₃Lys_{5.30}His_{2.16}Arg_{1.00}.

4-10. 参考文献

1. a) Yamamoto, K.; Kadowaki, S.; Fujisaki, M.; Kumagai, H.; Tochikura, T. *Biosci. Biothec. Biochem.* **1994**, *58*, 72-77; b) Yamamoto, K.; Kadowaki S.; Watanabe, J.; Kumagai, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *203*, 244-252.
2. a) Mizuno, M.; Haneda, K.; Iguchi, R.; Muramoto, I.; Kawakami, T.; Aimoto, S.; Yamamoto, K.; Inazu, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 284-290; b) Li, B.; Zeng, Y.; Hauser, S.; Song, H.; Wang, L. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *47*, 1-6; c) Umekawa, M.; Huang, W.; Li, B.; Fujita, K.; Ashida, H.; Wang, L. X.; Yamamoto, K. *J. Biol.*

- Chem.*, **2008**, *283*, 4469–4479; d) Umekawa, M.; Higashiyama, T.; Tanaka, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S.; Huang, W.; Wang, L.-X.; Ashida H.; Yamamoto, K. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2010**, *1800*, 1203-1209; e) Umekawa, M.; Li, C.; Higashiyama, T.; Huang, W.; Ashida, H.; Yamamoto, K.; Wang, L.-X. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 511-521; f) Hojo, H.; Tanaka, H.; Hagiwara, M.; Asahina, Y.; Ueki, A.; Katayama, H.; Nakahara, Y.; Yoneshige, A.; Matsuda, J.; Ito, Y.; Nakahara, Y. *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 9437–9446; g) Amin, M. N.; McLellan, J. S.; Huang, W.; Orwenyo, J.; Burton, D. R.; Koff, W. C.; Kwong, P. D.; Wang, L.-X. *Nat. Chem. Biol.*, **2013**, *9*, 521-526.
3. Tam, J. P.; Heath, W. F.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 5242-5251.
 4. Nabeshima, K.; Iwasaki, H.; Koga, K.; Hojo, H.; Suzumiya, J.; Kikuchi, M. *Pathol. Int.*, **2006**, *56*, 359-367.
 5. Dan, A.; Lergenmüller, M.; Amano, M.; Nakahara, Y.; Ogawa, T.; Ito, Y. *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4*, 2182–2190.
 6. Hagiwara, M.; Dohi, M.; Nakahara, Y.; Komatsu, K.; Asahina, Y.; Ueki, A.; Hojo, H.; Nakahara, Y.; Ito, Y. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5229–5239.
 7. Hojo, H.; Onuma, Y.; Akimoto, Y.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 25–28.
 8. Hojo, H.; Kobayashi, H.; Ubagai, R.; Asahina, Y.; Nakahara, Y.; Katayama, H.; Ito, Y.; Nakahara, Y. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 6807–6813.
 9. Noguchi, M.; Fujieda, T.; Huang, W. C.; Ishihara, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. *Helv. Chim. Acta.*, **2012**, *95*, 1928-1936.

第5章 総括

糖タンパク質糖鎖は多くの生命現象に関わっていることが示唆されており、その機能解明が求められている。しかし、糖タンパク質糖鎖のマイクロ不均一性により、糖鎖構造と機能との相関関係が未だ明確になっていない。そこで筆者は、これらの問題にアプローチするための強力な手法になりうる化学的な糖タンパク質合成法の研究を行った。

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。数ある合成戦略の中、化学合成した GlcNAc を有する糖タンパク質に対して、Endo-M 酵素の糖鎖転移反応により糖鎖骨格を構築する化学酵素的な手法は、効率のよい収束的合成と糖タンパク質糖鎖のマイクロ均一性に対応した多岐的合成を兼ね備えた手法である。そこで、本研究では化学酵素合成法において鍵化合物である GlcNAc 付きタンパク質の効率的な調製法について研究を行うことにした (Figure 5-1)。

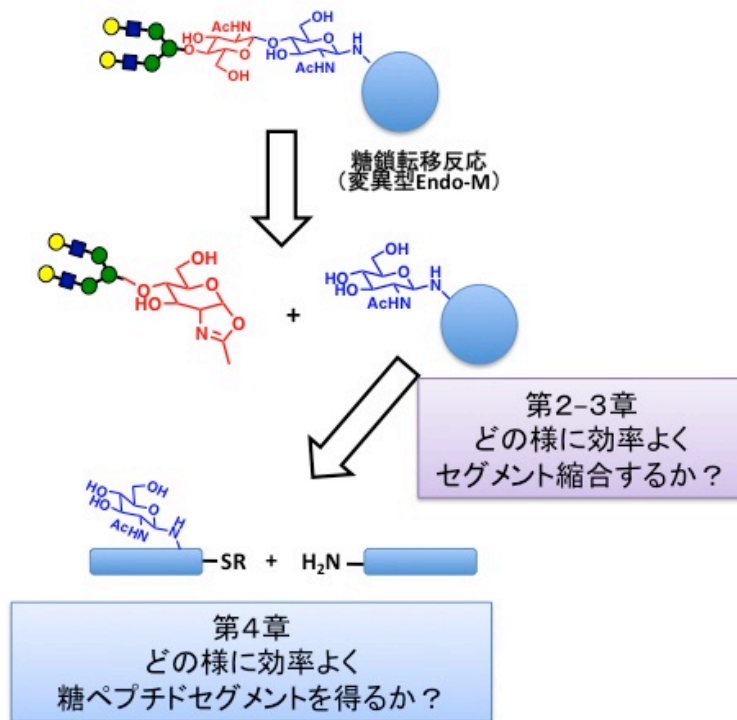


Figure 5-1 化学酵素合成法による糖タンパク質の合成。

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つのセグメントの縮合を C 末端セグメントから順次縮合することで目的のポリペプチド鎖を構築していた。しかし、中間セグメントの末端アミノ基の脱保護に用いられる過剰のピペリジンを除去するため、セグメント縮合毎に精製工程を要し、その結果、各縮合は段階的に行われていた。一般的にタンパク質はクロマトグラフィーによる精製中に不可逆な吸着を引き起こすことで、一定の損失を生じ、加えて、疎水性の高いタンパク質においては顕著な収率の低下を引き起こす。より巨大な糖タンパク質を構築するには、精製工程を回避し、効率よく縮合を行うことが求められている。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 (Figure 5-2)。

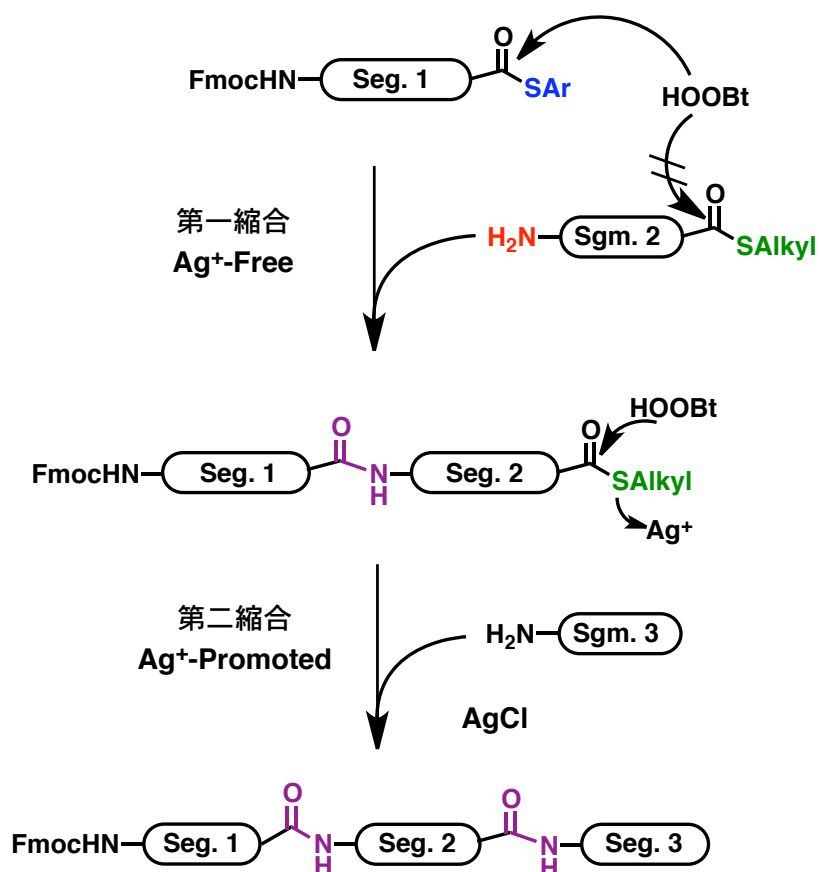


Figure 5-2 連続的チオエステル法

また、固相合成時に側鎖アミノ基をアジド基に変更したリシン誘導体を用いることで、簡便に半保護セグメントを得る手法が確立されている。しかし、疎水性の高いアジド基により、得られる半保護セグメントは難溶性を示し、しばしば精製が困難であった。そこで、親水性保護基であるイソニコチニルオキシカルボニル (*iNoc*) 基をアジド基の代わりに用いることで、セグメント調製に有用であるかどうか検証することにした。

検討の結果、芳香族チオエステルとアルキルチオエステルを Ag^+ の有無で化学選択的に活性化できることを見出し、3つのセグメントを **One-Pot** で縮合することを実現した。この際、*iNoc* 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。これら新規縮合法により、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。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、先に述べたフォールディング効率の問題を改善すべく、*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。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 (Figure 5-3)。3つのセグメントの内、最も溶解性が乏しい C 末端セグメントにイソペプチド構造を導入した糖ペプチドを調製し、先に開発した連続的チオエステル法にて縮合を行った。その結果、本来のポリペプチドと比べ、イソ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 9 糖を有する Tim-3 Ig 様ドメインの合成に成功した。

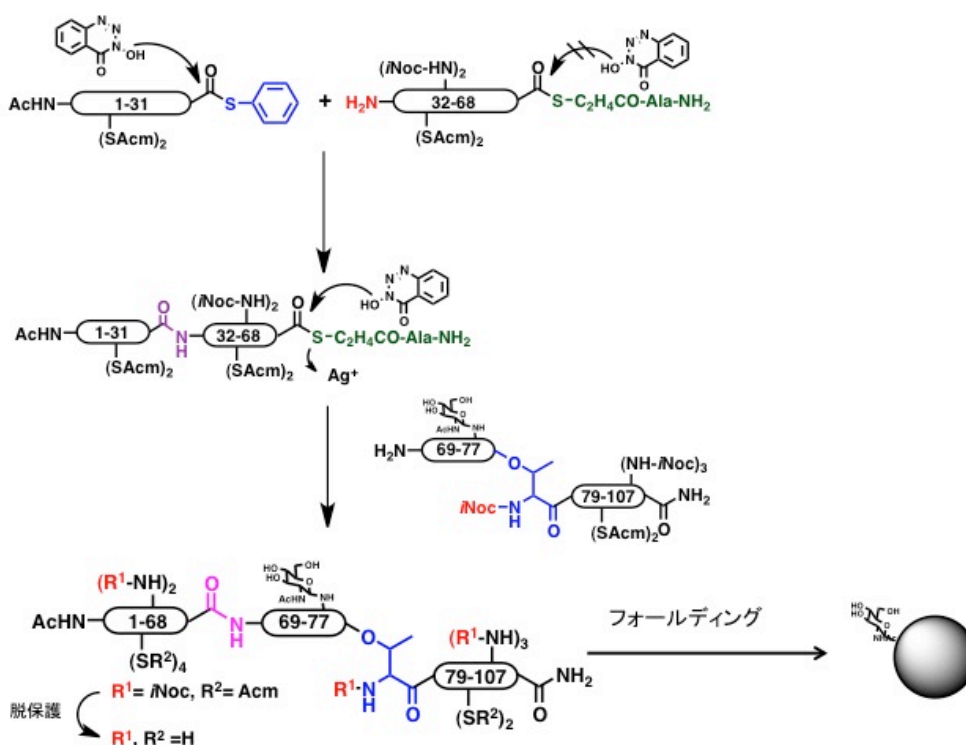


Figure 5-3 O-アシルイソペプチド法を用いた Ig 様ドメインの合成。

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。GlcNAc 付きタンパク質は化学酵素合成法における鍵化合物である。この鍵化合物を調製するにあたって、当グループが押し進めてきた Bn 保護戦略に則り、糖水酸基を Bn 基で保護した GlcNAc-Asn 誘導体を用いて GlcNAc 付きペプチドを調製していた。しかし、この GlcNAc ペプチドを得るために固相合成後に 1) TFA カクテルによるペプチド保護基、及びリンカーの切断、2) Low-TfOH による脱ベンジル化を行うことを要していた。そこで、従来用いられてきた Bn 基から TFA 感受性保護基に変更した GlcNAc-Asn 誘導体を合成することで、2 段階の脱保護を回避し、簡便な GlcNAc 付きタンパク質の調製法を開発することとした (Figure 5-4)。

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反応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

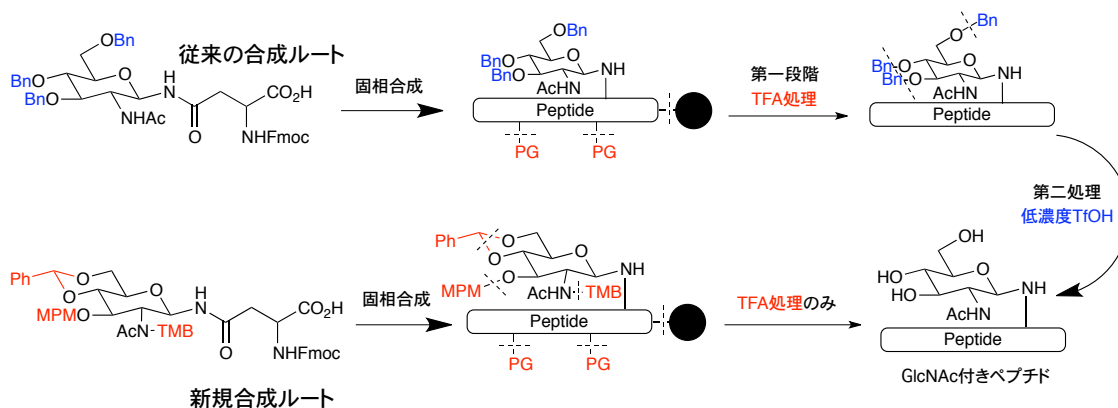


Figure 5-4 TFA 感受性保護基を用いた糖ペプチド合成。

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大幅に改善され、続くカルボキシル基の脱保護反応を経て、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) の合成に応用した。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 *asialo*-及び *disialo*-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容易に調製することが可能となり、また、**One-Pot** チオエステル法で効率よく長鎖のポリペプチドを調製することが可能となった。これらの方法論の開発により、化学酵素合成法の鍵化合物である GlcNAc 付きタンパク質の調製を高い効率で行うことが実現され、種々の糖タンパク質の合成に応用されることが期待される。

業績一覽

學術論文

1. Hagiwara, M., Dohi, M., Nakahara, Y., Komatsu, K., Asahina, Y., Ueki, A., Hojo, H., Nakahara, Y., Ito, Y., Synthesis of Biantennary Complex-type Nonasaccharyl Asn Building Blocks for Solid-phase Glycopeptide Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry*, **2011**, 76(13), 5229–39.
2. Hojo, H., Kobayashi, H., Ubagai, R., Asahina, Y., Nakahara, Y., Katayama, H., Ito, Y., Nakahara, Y. Efficient Preparation of Fmoc-aminoacyl-*N*-ethylcysteine Unit, a Key Device for the Synthesis of Peptide Thioesters. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2011**, 9(19), 6807–13.
3. Katayama, H., Asahina, Y., Hojo, H. Chemical Synthesis of the *S*-Linked Glycopeptide, Sublancin. *Journal of Peptide Science*, **2011**, 17, 818-821.
4. Hojo, H., Tanaka, H., Hagiwara, M., Asahina, Y., Ueki, A., Katayama, H., Nakahara, Y., Yoneshige, A., Matsuda, J., Ito, Y., Nakahara, Y. Chemoenzymatic Synthesis of Hydrophobic Glycoprotein: Synthesis of Saposin C Carrying Complex-type Carbohydrate. *The Journal of Organic Chemistry*, **2012**, 77(21), 9437–46.
5. Asahina, Y., Kamitori, S., Takao, T., Nishi, N., Hojo, H. Chemoenzymatic Synthesis of the Immunoglobulin Domain of Tim-3 Carrying a Complex-Type *N*-Glycan by Using a One-pot Ligation. *Angewandte Chemie International edition.*, **2013**, 52, 9733–9737.
6. Asahina, Y., Kanda, M., Suzuki, A., Katayama, H., Nakahara, Y., Hojo, H. Fast Preparation of an *N*-Acetylglucosaminylated Peptide Segment for the Chemoenzymatic Synthesis of a Glycoprotein. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2013**, 11, 7199–7207.
7. T. Takei, Y. Urabe, Y. Asahina, H. Hojo, T. Nomura, Takeshi, K. Dedachi, K. Arai, M. Iwaoka. Model Study Using Designed Selenopeptides on the Importance of the Catalytic Triad for the Antioxidative Functions of Glutathione Peroxidase. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2014**, 118, 492-500.

プロシーディング

1. Asahina, Y., Katayama, H., Kamitori, S., Hojo, H. Synthetic Study of Glycosylated IgV Domain of Tim-3 Using Segment Condensation Method. *Peptide Science Sakaguchi Edition.*, **2011** 141-142.
2. Asahina, Y., Kobayashi, H., Ubagai, R., Katayama, H., Nakahara, Y., Ito, Y., Nakahara, Y., Hojo, H. Efficient Synthesis of Fmoc-aminoacyl-N-ethylcysteine, a Key Device for Peptide Thioester Preparation. *Peptide Science Sakaguchi Edition.*, **2011**, 143-146.
3. Asahina, Y., Kamitori, S., Hojo, H. Chemoenzymatic Synthesis of Tim-3 Ig Domain Carrying Complex-type N-Glycan Using the Sequential One-Pot Condensation by the Thioester Method. *Peptide Science Sugimura Edition.*, **2012**, 15-16.

書籍

1. 朝比奈雄也、北條裕信、TIM-3 Ig ドメインの酵素-化学合成、東海大学糖鎖科学研究所紀要、2012年。

学会発表

1. 朝比奈雄也、田中洋匡、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、日本糖質学会年会 高山大会、P-054、2009年8月、ポスター発表。
2. 朝比奈雄也、田中洋匡、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、日本農芸化学会年会 東京大会、3XAp15、2010年3月、口頭発表。
3. 朝比奈雄也、田中洋匡、片山秀和、神鳥成弘、北條裕信、セグメント縮合を用いた糖タンパク質の化学合成、日本糖質学会年会 長岡大会、P-100、2011年6月、ポスター発表。
4. 朝比奈雄也、片山秀和、神鳥成弘、北條裕信、セグメント縮合法を用いた Tim-3 IgV Domain の合成研究、日本ペプチド学会 札幌大会、P-020、2011年9月、ポスター発表。
5. 朝比奈雄也、小林 甫、姥貝吏紗、片山秀和、中原悠子、伊藤幸成、中原義昭、北條裕信、Fmoc-アミノアシル-N-エチルシステインの効率的合成法、日本ペプチド学会 札幌大会、P-021、2011年9月、ポスター発表。

6. Yuya Asahina, Hidekazu Katayama, Shigehiro Kamitori, Hironobu Hojo, Synthetic Study of Glycosylated IgV Domain of Tim-3 Using the Thioester Method, 15th Korean Peptide-Protein Symposium, PS-04, Ochang Center 韓国, 2011 年 12 月, ポスター発表。
7. 朝比奈雄也、片山秀和、神鳥成弘、北條裕信、セグメント縮合法を用いた Tim-3 IgV Domain の合成研究、日本農芸化学会 京都大会、2A32p09、2012 年 3 月、口頭発表。
8. Yuya Asahina, Hiromasa Tanaka, Masashi Hagiwara, Akiharu Ueki, Hidekazu Katayama, Yuko Nakahara, Azusa Yoneshige, Junko Matsuda, Yoshiaki Nakahara, Hironobu Hojo, Chemoenzymatic Synthesis of Saposin C Carrying Complex-type Carbohydrate, International Carbohydrate Symposium, スペイン マドリード, 2012 年 7 月, ポスター発表。
9. 朝比奈雄也、神鳥成弘、北條裕信、N-結合型複合型糖鎖を持つ TIM-3 Immunoglobulin 様ドメインの酵素化学合成、日本糖質学会 鹿児島大会、b4-02、2012 年 10 月、口頭発表。
10. 朝比奈雄也、神鳥成弘、北條裕信、Synthesis of TIM-3 Ig Domain Carrying Complex-type N-glycan Using the Sequential One-Pot Condensation by the Thioester Method、日本ペプチド学会 鹿児島大会、Y-05、2012 年 11 月、口頭発表。
11. 朝比奈雄也、神田美華、北條裕信、糖受容体ペプチドの簡便な合成法の開発、日本農芸化学会 仙台大会、3B20a04、2013 年 3 月、口頭発表
12. Yuya Ashaina, Kanada Mika, Hironobu Hojo, Prompt Preparation of N-Acetylglucosaminylated Peptide for the Chemoenzymatic Synthesis of Glycoprotein, 23th American Peptide Symposium in Hawaii, YI-P298, 2013 年 6 月、ポスター発表。
13. 朝比奈雄也、神田美華、北條裕信、酸感受性保護基を有する GlcNAc-Asn 誘導体の合成と糖タンパク質調製への応用、第 32 回日本糖質学会年会、大阪、b1-03、2013 年 8 月。
14. Y. Asahina, K. Nabeshima, H. Hojo, Study of the Substituent effect on the N-alkylcysteine-assisted thioesterification, 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, Osaka, 2013 年 11 月。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々のご指導、ご協力をいただきましたので、ここに感謝の意を述べたいと思います。

本学工学部生命化学科の北條裕信教授には、指導教官として膨大な指導を頂きました。研究者に最も重要である、研究に対する思想を育てて頂いたことを深く感謝いたします。

また、本学工学部生命化学科の中原義昭、元教授には、学部生時代、多大なご指導、ご鞭撻を賜りましたことを深く感謝いたします。

本論文を作成するにあたって、本学工学部生命化学科、小島直也教授、本学工学部応用化学科、稲津敏行教授、長瀬裕教授、本学理学部化学科、岩岡道夫教授にはお忙しい中で、多大なご助言とご指導を賜りました。大変感謝しております。

研究生生活を支援してくれた本学糖鎖科学研究所に深く感謝いたします。また鈴木明身所長を始めとする先生方には、大変暖かいご指導と激励を頂きましたことを感謝いたします。

また、研究室間セミナー、発表会等で議論を重ねてくださった、本学工学部生命化学科の片山秀和講師には感謝申し上げます。

最後に、私の研究室生活を支えてくれた研究室の緒先輩、同輩、後輩や友人、家族に感謝の意を述べたいと思います。ありがとうございました。

東海大学大学院総合理工学研究科
朝比奈雄也