

平成 30 年度「杉山産業化学研究所研究助成」報告書

研究題目：フロー法を用いた高速糖ペプチド合成法の開発とヒト型インスリンを用いた糖鎖構造の機能評価

大阪大学大学院理学研究科化学専攻 真木勇太

<研究の目的と背景>

本研究では、生体内で広く見られる、アスパラギン残基への糖鎖付加の影響を分子レベルで調べるために、フロー法を用いた高速糖ペプチド合成法の開発、およびヒト型インスリンへの糖鎖導入を実施した。

近年、タンパク質上での糖鎖の機能解明を目的として糖タンパク質の化学合成が盛んに行われているが、未だに糖ペプチドを簡便かつ高純度で手に入れることは容易ではない。酵素法などと比べ、タンパク質化学合成はタンパク質中の任意の場所に自在に糖鎖を導入することができる。しかし、現状では、鍵となる糖ペプチドを固相合成法によって調製することが糖タンパク質合成における律速段階となっている。

そこで本研究では、1 アミノ酸あたり 3 分でペプチド鎖を伸長できる、フローペプチド固相合成法を用いた新規糖ペプチド合成法を検討した。米国のマサチューセッツ工科大学の Pentelute 博士らによって開発されたフローペプチド合成法では、加熱条件下、溶媒や活性化されたアミノ酸をフロー法によって送液することで、1 アミノ酸あたり 3 分のサイクルで Fmoc ペプチド固相合成を実施することができる。本システムを用いることで、従来の糖タンパク質合成の問題点であった糖ペプチド合成を簡便かつ迅速に合成できる方法論の確立を目指した。

<結果>

1) アスパラギン (N) 結合型糖鎖を導入したインスリン B 鎖の合成

Pentelute らによって確立されたフロー法(Simon, et al., Chem. Bio. Chem., 2014, 15, 713.)により、30 アミノ酸からなるヒト型インスリン B 鎖を合成した。インスリンは天然では糖鎖を有さないものの、糖鎖付加による血中寿命の遅延や生理活性の上昇を期待してモデルとした。この際、インスリン受容体との相互作用に影響を及ぼしにくい B 鎖の N 末端に人為的に糖鎖-Asn を導入することとした(図)。使用する複合型糖鎖-Asn は既知の方法(Kajihara, et al., Chem. Eur. J. 2004, 10, 971.)により鶏卵から単離調製した。まずフロー法を用いた Fmoc 固相合成法によって、市販のアミノ PEGA 樹脂上に B 鎖 30 残基を構築した。各アミノ酸あたり 3 分

のサイクルで合成できるため、従来の Fmoc 固相合成法（1 サイクルあたり約 1 時間）と比べて合成に要する時間は格段と短くなった。

続いて、N 末端への糖鎖-Asn の縮合を検討した。まず、水酸基が遊離となったアシアロ糖鎖-Asn(Fmoc) **1** を原料とし、縮合剤として PyBOP、塩基として DIPEA を用いて、フロー法ではなく従来の固相合成チューブ内で反応を行った。反応はきれいに進行し、のぞむアシアロ糖鎖付加インスリン B 鎖 **3** を得ることができた。続いて、無保護の糖鎖-Asn(Fmoc) **1** を使い、フロー法での縮合を検討した。種々の条件を試みたが、無保護糖鎖の有機溶媒に対する溶解性の低さなどが原因となり、フ

ロー法での無保護糖鎖-Asn の縮合反応は難しいことが判明した。そこで、糖鎖の水酸基をアセチル基で保護した糖鎖-Asn(Fmoc) を合成し、これを用いたフロー法での縮合反応を現在検討している。

2) インスリン A 鎖および B 鎖を用いたフォールディング反応

合成したアシアロ糖鎖付きインスリン B 鎖を用い、別途調製した A 鎖 **4** とのフォールディング反応を検討した。この際、21 アミノ酸からなる A 鎖も同様にフロー法によって合成した。インスリンは A 鎖内に 1 つのジスルフィド結合を、また A 鎖と B 鎖の間に 2 つのジスルフィド結合を有している。そこで種々の保護基を用いて段階的に 3 つのジスルフィド結合を位置選択的に構築しながらインスリンのフォールディングを行った(図)。この結果、アシアロ糖鎖付きヒト型インスリンの合成を達成した。

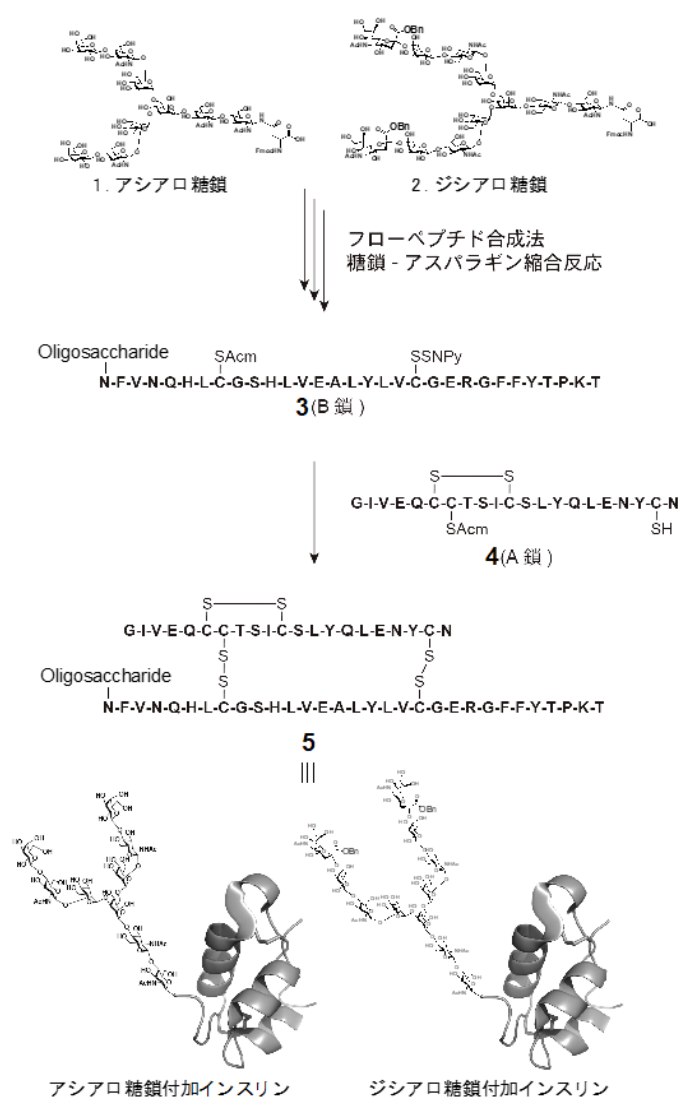


図. フローペプチド合成法を用いた糖鎖付加インスリンの化学合成

さらに、糖鎖構造がインスリンの構造や活性に与える影響を調べるために、糖鎖を持たない天然のインスリン、および、シアル酸を末端に持つジシアロ糖鎖付きインスリンの合成を検討した。ジシアロ糖鎖付きインスリンに関しては、シアル酸のカルボキシ基をベンジルエステルによって保護した状態(図. 2)で B 鎖へと導入し、そのまま A 鎖とのフォールディング反応を行った。現在、フォールディング後の脱保護を検討中である。また、フォールディング効率をそれぞれで比較したところ、糖鎖の有無や構造の影響はあまりないことがわかった。今後、さらに糖鎖の種類を変えたのちにそれぞれの生理活性評価を行い、糖鎖構造が与える影響を分子レベルで解明する予定である。

以上の研究により、N 末端に糖鎖を有する糖ペプチドの高速フロー合成が可能となり、糖鎖構造を変えたヒト型インスリンを用いてその有用性を示すことができた。さらなる糖ペプチド合成の簡便化や任意の位置での糖鎖導入を今後検討していく予定である。

<謝辞>

本研究を遂行するにあたり、平成 30 年度「杉山産業化学研究所研究助成」より助成金を賜りましたことを、厚く御礼申し上げます。