

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3776952号
(P3776952)

(45) 発行日 平成18年5月24日(2006.5.24)

(24) 登録日 平成18年3月3日(2006.3.3)

(51) Int. Cl. F I
C 0 7 H 5/06 (2006.01) C O 7 H 5/06
C 1 2 P 19/28 (2006.01) C 1 2 P 19/28
C 1 2 P 21/00 (2006.01) C 1 2 P 21/00

請求項の数 3 (全 8 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平7-203945 (22) 出願日 平成7年7月18日(1995.7.18) (65) 公開番号 特開平9-31095 (43) 公開日 平成9年2月4日(1997.2.4) 審査請求日 平成14年6月19日(2002.6.19)</p>	<p>(73) 特許権者 000173924 財団法人野口研究所 東京都板橋区加賀1-8-1 (72) 発明者 羽田勝二 東京都板橋区中台3-27-1-1311 (72) 発明者 稲津敏行 神奈川県小田原市清水新田284-3 審査官 高堀 栄二</p>
---	---

最終頁に続く

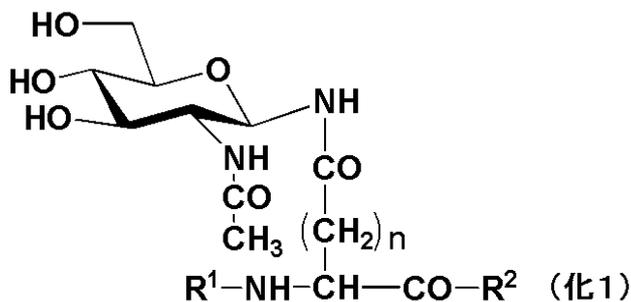
(54) 【発明の名称】 複合糖質の製法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エンド--N-アセチルグルコサミニダーゼ(EC 3 . 2 . 1 . 9 6)の存在下、糖鎖供与体である複合糖質の糖鎖を糖鎖受容体である下記式(化1)で示されるN-アセチルグルコサミン(G l c N A c) 残基を有する合成基質に転移させることにより非天然型の複合糖ペプチドを製造する方法。

【化1】



(式中、 R^1 はH、アミノ保護基、アミノ酸、ペプチドあるいはN末端アミノ酸の アミノ基を保護したペプチドを示す。 R^2 はOH、カルボキシル保護基、アミノ酸、ペプチドあるいはC末端アミノ酸のカルボキシル基を保護したペプチドを示す。 n は2である。)

【請求項2】

N末端アミノ酸の アミノ基の保護基が9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 基、第3ブチルオキシカルボニル (Boc) 基、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル (Npys) 基、ベンジルオキシカルボニル (Z) 基あるいはダンシル (DNS) 基である請求項1に記載の方法。

【請求項3】

C末端アミノ酸のカルボキシル基の保護基が第3ブチル (Bu^t)、ベンジル (Bzl) あるいはメチル (Me) 基である請求項1または2に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ペプチドの合成反応と酵素による糖鎖転移反応を組み合わせた生理活性複合糖ペプチドの製造方法に関する。本発明は医薬分野に応用される。

【0002】

【従来の技術】

糖質および複合糖質は生物の細胞、体液等に存在し、細胞の基質認識や細胞-細胞間の認識等に深く関わっている。また糖質は生体内物質の吸収分解等の代謝の速度に関係している。タンパク質には糖鎖を持つものが知られ、例えばエリスロポエチンやティシューブラスミノゲンアクチベーターがあり、動物細胞を用い遺伝子工学的に作られたこれら糖タンパク質が医薬として利用されている。またペプチドホルモンの中にも糖鎖を持つものが知られ、例えばヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 等がある。これら糖タンパク質あるいは糖ペプチドでは糖鎖がN結合型糖鎖として、ペプチド鎖のAsnにGlcNAcを介して結合している。

【0003】

タンパク質あるいは生理活性ペプチド等に糖鎖を付けたり、あるいは今ある糖鎖を別の糖鎖に換えることにより、生理機能の強化や生理活性の改変に役立つことが期待される。糖鎖を酵素的に改変する方法としては、1) 転移酵素あるいはエキソグリコシダーゼによる方法と、2) エンドグリコシダーゼによる方法が考えられる。

【0004】

1) の方法としては、例えばD. H. ジョジアッセ (D. H. Joziassse) ら [ヨーロピアン ジャーナル オブ バイオケミストリー (Eur. J. Biochem.)、第191巻、第75-83頁 (1990)] の報告があるが、これは糖鎖の非還元末端からの逐次反応である。また、最近、M. シャスター (M. Schuster) ら [ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサエティ (J. Amer. Chem. Soc.)、第116巻、第1135-1136頁 (1994)] は数種のグリコシルトランスフェラーゼを組み合わせた糖鎖の固相合成法を報告している。

【0005】

一方、2) のエンドグリコシダーゼを用いた糖転移反応としては、R. B. トリムブル (R. B. Trimble) ら [ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第261巻、第12000-12005頁 (1986)] のフラボバクテリウム メニンゴセプチカム (Flavobacterium meningosepticum) 由来のエンド- α -N-アセチルグルコサミニダーゼ (エンド-F) に関するもの、R. M. バーデールス (R. M. Bardales) ら [ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第264巻、第19893-19897頁 (1989)] のディプロコッカス ニューモニエ (Diprococcus pneumoniae) 由来のエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼに関するものがあり、前者はグリセロールが受容体に、また後者はグリセロール、p-ニトロフェノール、セリン、スレオニン等が受容体になるという報告である。その後、竹川ら [特開平5-64594号 (1993)] およびK. タケガワ (K. Takegawa) ら [ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第270巻、第3094-3099頁 (1995)] がアルスロバクタープロトホルミエ (Arthrobacter protophormiae) 由来のエンド- α -N-アセチルグルコサミニダーゼ (エンド-A) による糖質への糖鎖転移反応を、

10

20

30

40

50

また、K. ヤマモト (K. Yamamoto) ら [バイオケミカル バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.)、第 203 巻、第 244-252 頁 (1994)] はムコール ヒエマリス (Mucor hiemalis) 由来のエンド-M による糖質への糖鎖転移反応を報告した。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

複合糖質は糖鎖部分と糖鎖が付加する側のタンパク質、ペプチドあるいはセラミド部分等から構成されている。糖質に糖鎖を新たに付与したりあるいは他の糖鎖と入れ換えたりする、いわゆる糖鎖の改変 (リモデリング) により複合糖質の生体内での安定性や生物活性が天然の複合糖質に比べて増強されたり天然にない生物機能が付加されれば医薬品に

10

【0007】

糖質あるいは複合糖質に糖鎖を新たに付加あるいは改変する方法としては、エキソグリコシダーゼまたはグリコシルトランスフェラーゼを用いた糖残基を一つ一つ逐次的に付加する酵素法が考えられる。また、エンド-A やエンド-M 等のエンドグリコシダーゼによる方法は複合糖鎖をブロックとして糖質や複合糖質に転移させる、より効率的な方法を提供する。

【0008】

天然の糖タンパク質あるいは糖ペプチドの糖鎖は、通常 N 結合型糖鎖として、Asn-X-Ser(Thr) [X は任意のアミノ酸、Ser(Thr) はセリンまたはスレオニンを示す] のアミノ酸配列のペプチド鎖の Asn のアミド基に結合した GlcNAc を介して結合している。即ちこのアミノ酸配列の Asn に、末端に GlcNAc 残基を有する糖鎖が付加され更に修飾を受けて N 結合型複合糖鎖は生成される。従って、天然にはこのアミノ酸配列の Asn に結合した糖鎖以外の N 結合型糖鎖は見出されていない。

20

【0009】

上述の酵素による糖鎖の付加あるいは改変には糖鎖受容体であるタンパク質あるいはペプチドに GlcNAc 残基があることが必要であり、糖鎖の付加あるいは改変は、従来、天然の糖タンパク質あるいは糖ペプチドの糖鎖をエンドグリコシダーゼあるいはエキソグリコシダーゼにより GlcNAc 残基を残して切り取った後に別の糖タンパク質から調製した糖鎖を付け換えるものに限られていた。

30

【0010】

タンパク質やペプチドの中には Asn-X-Ser(Thr) の配列があっても糖鎖の付かないものも多く、例えばカルシトニンなどはその一例である。また Asn があってもこの配列が無ければ生成段階での糖鎖の付加はできない。無論、グルタミン(Gln)に糖鎖を生合成的に付加することは遺伝子工学手法をもっても不可能である。

【0011】

Asn 残基に GlcNAc を結合した糖ペプチド (GlcNAc-Asn-ペプチド) を化学的に合成できれば、上述の酵素法により Asn に結合した GlcNAc 残基に糖鎖を付加した新しい複合糖ペプチドを合成できる。この場合、ペプチド側には Asn-X-Ser(Thr) の配列は必ずしも必要とせず Asn のみあればよい。また、Asn に類縁のアミノ酸であるグルタミン (Gln) に GlcNAc 残基を付けた糖ペプチドを合成すれば、同様の複合糖ペプチドの合成が期待できる。

40

【0012】

ペプチドの合成は固相合成法による残基数が数十個のものまでの合成が工業的に実用化されている。

【0013】

本発明は、糖を結合した グルタミン(Gln) を少なくとも 1 個含むペプチド即ち合成基質を化学的に合成し、この足がかりの糖残基へ糖あるいは糖鎖を酵素的に転移させれば新し

50

い複合糖ペプチドが合成できるとの考えに基づき開発されたものである。エンド- -N-アセチルグルコサミニダーゼが、Asnよりも側鎖メチレン鎖に1個長いGlnに結合したGlcNAcにも糖鎖を転移付加させることができるという本発明者らの発見に基づく。

【0014】

【課題を解決するための手段】

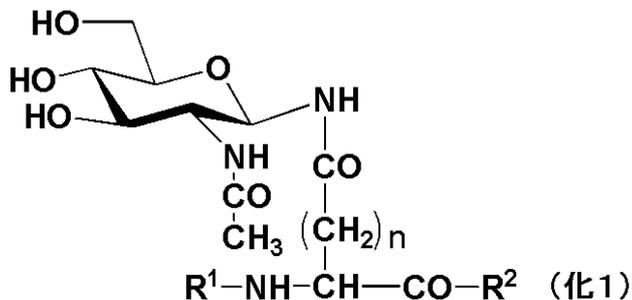
本発明を概説すれば、本発明は1)糖鎖受容体となるGlcNAc残基を有する合成基質の合成と、2)GlcNAc残基を有する合成基質への酵素による糖鎖の転移反応の2つの構成からなる。

【0015】

本発明にいうGlcNAc残基を有する合成基質とは、下記式(化1)

10

【化2】



20

(式中、 R^1 はH、アミノ保護基、アミノ酸、ペプチドあるいはN末端アミノ酸のアミノ基を保護したペプチドを示す。 R^2 はOH、カルボキシル保護基、アミノ酸、ペプチドあるいはC末端アミノ酸のカルボキシル基を保護したペプチドを示す。 n は2である。)で示される化合物である。

【0016】

(化1)に示すGlcNAc残基を有する合成基質の合成は如何なる方法によってもよいが、例えばT. イナヅ(T. Inazu)ら[ペプチドケミストリー 1993 (Peptide Chemistry 1993)、第101-104頁(1994)]の報告した方法に準じて合成される。

【0017】

30

GlcNAcがアミド基に結合したグルタミン(GlcNAc-Gln)をGlnに代えて用いることによりGlcNAcがGlnに結合したペプチド(GlcNAc-Gln-ペプチド)が合成される。(化1)の n が2の化合物がこれに当たる。

【0018】

(化1)の R^1 にある末端アミノ酸のアミノ基の保護基としては、例えば、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基、第3ブチルオキシカルボニル(Boc)基、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル(Npys)基、ベンジルオキシカルボニル(Z)基あるいはダンシル(DNS)基等が用いられる。

【0019】

N末端アミノ酸の保護基は糖鎖転移反応後に常法により外すか、あるいは予め保護基を外した後に糖鎖転移反応に供してもよい。

40

【0020】

(化1)の R^2 にあるカルボキシル基の保護基としては、第3ブチル(Bu^t)基、ベンジル(Bzl)基あるいはメチル(Me)基等であるが、水への溶解性を上げるために保護基を外し、遊離型で用いることが多い。

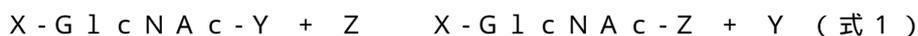
【0021】

本発明の第2の構成は、糖鎖受容体である合成基質への糖鎖供与体からの糖鎖の転移反応による付加である。

【0022】

エンドグリコシダーゼの存在下、下記式(式1)：

50



[式中、Xは複合糖鎖、Yは糖質あるいは複合糖質、Zは(化1)に示した合成基質]で表される転移反応を行うことを特徴とする。

【0023】

本発明に用いるエンドグリコシダーゼとしては、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(EC3.2.1.96)であり、例えば、エンド-Aやエンド-M等が用いられる。該酵素は下記式(式2)：



(式中Rは複合糖鎖を示す)

のアスパラギン(Asn)結合型糖鎖のキトピオース部分(GlcNAc-GlcNAc)の間を加水分解するが、この時に適当な糖鎖受容体があると、受容体に糖鎖(R-GlcNAc)部分が転移する。(式1)の反応はそれを利用したものである。

【0024】

エンドグリコシダーゼによる糖鎖転移反応の糖鎖受容体となるのは、通常、Asn-X-Ser(Thr)配列を含むペプチドのAsnに結合したGlcNAc残基である。

【0025】

驚くべきことに、天然には存在しないグルタミン(Gln)に結合したGlcNAc残基を含むペプチド(GlcNAc-Gln-ペプチド)のGlcNAc残基にもAsnの場合と同様に糖鎖の転移反応が起きることが分かった。

【0026】

(化1)に示すGlcNAc残基を有する合成基質はかかる知見に基づき調製されたものであり、この合成基質への酵素による糖鎖の転移反応を行う本発明を完成させた。

【0027】

酵素の糖鎖供与体の基質特異性については、エンド-Aは高マンノース型糖鎖のみに作用するが、エンド-Mは高マンノース型のみならず複合型糖鎖や混成型糖鎖にも作用する。

【0028】

これらの酵素の本来の機能は加水分解であり、(式1)のZの代わりに水が入り加水分解反応が転移反応とともに副反応として進行する。また、(式1)で生成した転移反応生成物(X-GlcNAc-Z)は加水分解反応の基質となり再分解を受ける。

【0029】

糖鎖転移反応を効率よく行わせるには加水分解反応を抑えて(式1)の反応を優先的に行わせることが必要である。与酵素量を減らし、基質である糖鎖供与体(X-GlcNAc-Y)と糖鎖受容体(Z)の仕込濃度を、そのモル比を1近くにしつつ高濃度にするにより反応の場(酵素の活性中心)における水の影響を排して転移反応を効率よく進行させることができる。

【0030】

反応系で重要な点は、反応を酵素律速条件下で行うことである。即ち糖鎖供与体から受容体への糖鎖転移反応の速度が与酵素量に依存し、その速度を最大にするに必要な最少量の酵素量になるように酵素の添加量を制限して反応する。例えばエンド-Mの場合、糖鎖供与体に対して500ユニット(U)/モル(供与体)以下、望ましくは80-400U/モル(供与体)程度の酵素量を加える。なおここで、酵素の1ユニット(U)は、ヒトトランスフェリン由来のアシアロ複合型糖鎖のダンシル化(DNS)誘導体を加水分解して、37℃、1分間に1マイクロモル(μmol)のN-アセチルグルコサミニル-アスパラギンのDNS誘導体(GlcNAc-Asn-DNS)を生成させるに必要な酵素量である。

【0031】

糖鎖供与体と受容体の仕込濃度を著しく高めることも重要である。与酵素量を制限しつつ両基質を高濃度に仕込むことにより、糖鎖転移反応が促進され副反応が抑えられて反応収率は飛躍的に向上する。その濃度は、糖鎖供与体が10mM以上、望ましくは15-7

10

20

30

40

50

5 mMがよい。また糖鎖受容体は2.5 mM以上、望ましくは7.5 - 35 mM程度がよい。糖鎖受容体の濃度は高い方が望ましいが、合成基質の溶解度が低い場合には2.5 mM程度の濃度でも用いられる。

【0032】

本発明に用いる糖鎖供与体としては、高マンノース型、複合型、混成型いずれの糖鎖も用いられる。高マンノース型糖鎖は例えば卵白アルブミン等から、またシアル酸を含有する複合型糖鎖は例えばヒトトランスフェリンや牛フェツイン等から調製され、シアリダーゼ処理等によりシアル酸を外せばアシアロ複合型糖鎖が調製される。酵素的あるいは化学的に修飾された糖鎖、あるいは化学合成された糖鎖も用いることができる。

【0033】

本発明の反応は、基質の糖鎖供与体、糖鎖受容体および酵素のエンドグリコシダーゼを緩衝溶液中で混合することにより行われる。先述のごとく、糖鎖供与体の濃度を10 mM以上、望ましくは15 - 75 mM、糖鎖受容体の濃度を2.5 mM以上、望ましくは7.5 - 35 mMになるように加える。酵素量は500 U/モル(供与体)以下、望ましくは80 - 400 U/モル(供与体)程度に制限し、例えば、エンド-Mの場合、2 - 10 mU/ml程度の量で用いる。緩衝液としては、pH 5 - 8程度、濃度25 - 200 mM、望ましくは50 - 100 mMの適当な緩衝液が用いられる。エンド-Mの場合、通常pH 5.5 - 6.5、濃度50 - 100 mMの酢酸あるいはリン酸緩衝液中で反応が行われる。基本的な反応液組成の一例は、糖鎖供与体25 mM、糖鎖受容体10 mM、エンド-M 4 mU/mlおよび60 mMリン酸緩衝液(pH 6.25)である。

【0034】

反応温度は通常、室温 - 50 程度、好ましくは30 - 40 で行われ、反応時間は1 - 24時間である。例えば、エンド-M酵素の場合、通常、37 度で3 - 18時間程度反応が行われる。

【0035】

生成した複合糖質は公知の手段に従って反応終了液から容易に分離精製することが出来る。例えば、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー、レクチンカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等により反応終了液から反応生成物の複合糖質を分離し、更に濃縮、脱塩、凍結乾燥等を行えばよい。

【0036】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

高マンノース型糖鎖のGlcNAc-Gln-Fmocへの糖鎖転移反応：

糖鎖受容体のGlcNAc-Gln-Fmoc(分子量572)はAsnの代わりにGln(グルタミン)が入った化合物としてGlcNAc-Asn-Fmocの合成法に準じて合成した。酵素反応にはナトリウム塩にして用いた。糖鎖供与体として、卵白アルブミンをプロナーゼ処理、セファデックスG-25ゲルろ過更にDowex 50イオン交換クロマトにより分離精製して得た高マンノース型糖鎖(Man)₆-(GlcNAc)₂-Asn(分子量1651)を1 μmol(終濃度25 mM)、糖鎖受容体としてGlcNAc-Gln-Fmoc(分子量572)を200 nmol(同5 mM)、エンド-Mを160 μU(同4 mU/ml)加え、60 mMリン酸緩衝液(pH 6.25)40 μl中で37、3時間反応させた。反応停止後、反応液を蒸留水で1 mlに希釈し反応生成物をHPLCで分析した。転移反応生成物が7.5%の収率で得られた。転移反応生成物をHPLC分取し、質量分析したところ、分子量1748に相当するイオンピーク(m/z)が認められ、(Man)₆-(GlcNAc)₂-AsnからGlcNAc-Gln-Fmocへの転移反応生成物、即ち(Man)₆-(GlcNAc)₂-Gln-Fmocであることが確認された。

10

20

30

40

50

【0037】

【実施例2】

ヒトトランスフェリン由来複合型糖鎖のGlcNAc-Gln-Fmocへの転移反応：

糖鎖供与体として、ヒトトランスフェリン(生化学工業)をプロナーゼ処理、セファデックスG-25ゲルろ過を繰り返して得たAsn残基のみを有するシアロ糖ペプチド(TF-SGP、分子量2338)、さらにシアリダーゼ処理してシアル酸を外したアシアロ糖ペプチド(TF-ASGP、分子量1756)を1 μ mol(終濃度25mM)とGlcNAc-Gln-Fmocを200nmol(同5mM)を0.1Mリン酸緩衝液(pH6.25)24 μ lに溶解し、エンド-M 160 μ Uを含む酵素溶液16 μ lを加え、37で3時間反応した。反応停止後反応液を蒸留水で1mlに希釈して、反応生成物をHPLCで分析した。転移反応生成物がTF-SGPの場合5.0%、TF-ASGPの場合13.7%の収率で得られた。転移反応生成物をHPLC分取により単離し、質量分析の結果、TF-SGPの転移反応生成物には分子量2574に相当するイオンピークが、またTF-ASGPの転移反応生成物には分子量1992に相当するイオンピーク(m/z [M-H] 1992)が観測され、各々ジシアロ2本鎖複合型糖鎖がGlcNAc-Gln-Fmocに転移した化合物およびアシアロ2本鎖複合型糖鎖がGlcNAc-Gln-Fmocに転移した化合物であることが確認された。

10

【0038】

【実施例3】

ヒトトランスフェリン由来アシアロ糖鎖のGlcNAc-Gln-DNSへの糖鎖転移反応：

糖鎖受容体としてGlcNAc-Glnのダンシル化(DNS)誘導体(GlcNAc-Gln-DNS)(分子量585)はGlnのアミノ基をDNS基で保護した化合物として合成した。糖鎖供与体としてアシアロ糖ペプチド(TF-ASGP)を用い、糖鎖供与体1 μ mol(終濃度25mM)と糖鎖受容体500nmol(同12.5mM)を0.1Mリン酸緩衝液(pH6.25)24 μ lに溶解し、エンド-M 160 μ Uを含む酵素溶液16 μ lを加え、37で3時間反応させた。反応生成物をHPLC分取し、質量分析したところ、分子量2004に相当するイオンピーク(m/z)観測され、アシアロ2本鎖複合型糖鎖がGlcNAc-Gln-DNSに転移した化合物であることが確認された。

20

30

【0039】

【発明の効果】

本発明により、GlcNAc残基を有する合成基質に酵素的に糖鎖を付加して新規複合糖ペプチドを容易に合成することが可能となった。糖鎖受容体のペプチドはペプチド鎖のアミノ酸配列の中にグルタミン(Gln)があればGlcNAc残基を介してN結合型糖鎖を付加することができ、天然には無い全く新しい複合糖ペプチドを合成できる。付加する糖鎖は高マンノース型、シアル酸を含む複合型糖鎖いずれでもよく、望み通りの複合糖ペプチドを合成できる。

本発明は、医薬への応用とともに複合糖質の糖鎖の果たしている生理的役割を解明するための研究手法を提供する。

40

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平05 - 064594 (JP, A)

特開平07 - 059587 (JP, A)

Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992, vol.184, p.1125-1132

Pharmaceutical Research, 1993, vol.10, p.1268-1273

The Journal of Biological Chemistry, 1995 Feb., vol.270, p.3094-3099

Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, vol.203, p.244-252

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P21/00-21/08

CAPLUS(STN)

JICSTファイル(JOIS)

REGISTRY(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed