

学 位 論 文 題 名

Syntheses and Biochemical Evaluation
of Novel Glycoligands

(新しい糖鎖リガンドの合成と生化学的評価)

学位論文内容の要旨

タンパク質、核酸と並び、重要な生体高分子の一つである複合糖質の機能を糖鎖生物有機化学的に分子レベルで詳しく解明するための新しい基礎的手法の確立を第一の目的とした。これまで、糖タンパク質や糖脂質に代表される複合糖質の糖鎖の構造は極めて複雑であったために精密な構造解析・人工構築が極めて困難な課題となっていた。従って、糖鎖の構造と機能を明確に関連付けて説明するための多くの方法論的、技術的問題が包含された領域と言わざるを得なかった。そこで本研究ではまず、複合糖質の単純なモデルとなる新しいタイプのリガンドの合成法の開発と、それらの有用な鍵化合物からさらに付加価値の高い人工複合糖質を誘導する一連の合成法を系統的に検討した。次いで、本研究により新たに合成されたりリガンド・基質の有用性をレクチンとの相互作用・糖脂質分解酵素による分解作用解析などにより評価した。

【第一章】この章では、自然界における様々な複合糖質の構造と機能、役割を概説している。さらに、それら複合糖質の構造・生合成・代謝システム・疾患等との関係などの諸現象は非常に複雑であり、より深く掘り下げた基礎的アプローチの必要性を強調している。今後、糖鎖生物学・糖鎖工学の発展にとって「糖鎖リガンド・基質の系統的合成研究」が必要不可欠であることを説明している。

【第二章】糖鎖の構築を効率的に遂行するために、単純で応用範囲の広い新しいグリコシル化反応を見い出した。すなわち、グリコシド結合を形成させるために有効であることが知られている反応性中間体(アルドース由来のオルトエステル、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)由来のオキサゾリン誘導体など)の調製法を詳細に検討した。これらの反応性に富む鍵中間体は、それら糖質化合物のハロゲン化完全アセチル体より、ベンゼン-ニトロメタン-クロロホルム中、室温で、新規な触媒系

であるシアン化水銀-2,4,6-コリジンを作用させることにより、分子内での閉環反応が速やかに進行し、ほぼ定量的に目的物に誘導できることを見出した。また、得られたオルトエステル誘導体は、ルイス酸触媒下、高収率でその *N*-グリコシド前駆体である有用なアジド誘導体へと導くことにも成功した。また、オキサゾリン誘導体は、酸触媒下、容易に種々のアルコールと反応し、様々なグリコシドへと変換できることから、今後、多くの糖鎖合成に応用可能な新手法の一つとなることが予想された。

【第三章】糖タンパク質モデルの合成とそれらの生化学的評価を、主として糖鎖配列や密度効果（クラスター効果）などとタンパク質の相互作用の関係解明に着目して行った。生物学的に重要な二糖構造として知られる *N*-アセチルラクトサミン

[LacNAc; ガラクトース β (1 $\rightarrow$ 4) *N*-アセチルグルコサミン] および関連する位置異性体等を系統的に効率良く調製し、次いでそれらの糖鎖密度を高めるためにそれぞれの低分子リガンドに重合性の官能基を導入した。これらの重合性糖鎖は、比較的容易に高分子化することができ、高分子鎖上での糖鎖の密度を飛躍的に高めることが可能となった。このようにして得られた種々の高分子糖鎖リガンドと、LacNAc糖鎖結合型レクチン (*Erythrina corallodendron* Lectin) との親和性を、赤血球凝集阻止実験から解析した。その結果、糖鎖配列と結合性の関係は; LacNAc >>

Lac >> Gal β (1 $\rightarrow$ 3) GlcNAc > Gal β (1 $\rightarrow$ 6) GlcNAcであることが確認できた。この実験結果は、対応する低分子リガンドでは実証不可能であり、糖鎖クラスター効果により、結合強度の差が増幅されたことを示唆していると考えられる。

【第四章】この章では、蛍光測定による高感度な酵素反応解析が可能である全く新しいタイプの糖脂質モデル基質を分子設計・合成した。モデル分子は、スフィンゴ糖脂質のコア構造であるラクトース構造を含む *n*-ペンテニルラクトシドより誘導した。すなわち、第二章で既に効率的合成法が見い出されているこのペンテニルグリコシドの非還元末端側の4',6'位に2-ナフトアルデヒド由来のナフチルメチリデン基を導入後、完全ベンゾイル体とした。次いで、位置選択的にナフチルメチリデン基を還元的開裂させ、6'位に2-ナフチルメチル基を移動することに成功した。さらに、脱保護の後、マイケル付加によりシスタミンを導入、ダンシル化することにより、単一分子内に二種類の異なる蛍光プローブを導入した新規な誘導体の調製に成功した。この誘導体は、2-ナフチル基に起因する励起波長 260 nm で励起させると分子内で蛍光エネルギーの移動によるダンシル基に起因する 540 nm 付近の蛍光を示

することが確認された。さらに、糖鎖と脂質の間のグリコシド結合を特異的に加水分解することが知られている酵素（エンドグリコセラミダーゼ）に対するこのラクトシドの基質としての評価を行った。この結果、この基質に対する酵素の K_m 、 V_{max} は、それぞれ $7.7\mu M$ 、 $0.16 nmol/min$ であった。

【第五章】この章は、本論文の総括であり、各章において得られた重要な結果を簡潔にまとめている。

以上のようにこの論文は、糖鎖合成における新しい合成戦略の開発、得られた付加価値の高い糖鎖リガンドや基質を用いた極めて有望な生化学的手法の確立に大きく貢献するものである。特に、蛍光エネルギー移動法を糖鎖関連酵素に対する基質として用いた例は皆無に等しく、今後この方法論に基づく新しい基質合成研究に期待が寄せられるであろう。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	西 村 紳一郎
副 査	教 授	山 岸 皓 彦
副 査	教 授	西 則 雄
副 査	助教授	吉 田 孝

学 位 論 文 題 名

Syntheses and Biochemical Evaluation of Model Glycoligands

(新しい糖鎖リガンドの合成と生化学的評価)

近年、複合糖質と呼ばれる生体高分子の多彩な構造と機能が多くの動・植物の生命維持における方向性の制御という形でクローズアップされている。細胞表層に糖タンパク質や糖脂質などの形態で存在する糖鎖は、受精、発生、分化、成長、老化、癌化などの細胞や個体レベルでの形態変化に加えてウィルス・バクテリア等の異種生物の宿主細胞への感染初期過程にも深く関与する重要な動的分子である。しかし、これら糖鎖レセプターとその相手分子となるタンパク質・酵素との相互作用を分子レベルで詳細に解析する優れた手法は皆無に等しいため、今後の糖鎖生化学および糖鎖生物学の発展には高性能糖鎖リガンドの創製が鍵となっている。

この様な背景にあって申請者は、糖鎖構築の新手法の確立、およびその方法論を糖タンパク質モデルと糖脂質モデルの合成研究に拡張し、それらの全く新しいタイプの様々な糖鎖リガンドの生化学的評価を系統的に行った。本論文は5章からなりその内容は以下のように要約できる。

第1章では本研究の背景、目的、およびその意義を明確に述べている。第2章では、糖鎖合成を進める際に常に問題となっている立体選択的で効率のよいグリコシル化法について述べられている。特に、反応性に富み、汎用性において優れていることが知られるオルトエステル誘導体とオキサゾリン誘導体に焦点を絞り、それらの調製法を詳細に検討した。その結果、シアン化水銀と2,4,6-コリジンからなる新しい

プロモーターを用いると糖分子内での閉環反応は定量的に進行し、また、その適用範囲もガラクトース、*N*-アセチルグルコサミン等の単糖にとどまらず、マルトースやラクトースなどのオリゴ糖にまで応用可能であることを見出している。本手法は第3章・第4章において鍵となる多くの諸反応において用いられている。

第3章では、糖タンパク質とレクチンの相互作用を主として糖鎖配列や、糖鎖密度の効果に着目して新しい糖鎖高分子合成を行っている。細胞分化のマーカーとして知られる *N*-アセチルラクトサミンおよびその構造異性体を系統的に調製し、これに重合性を付与させて効率良く高分子化した。これらの高分子リガンドと *Erythrina corallodendron lectin* との親和性を赤血球凝集反応阻止試験により解析し、従来、低分子リガンドでは不可能であった糖鎖配列と親和性の関連性を見事に説明している。

第4章では、糖脂質分解酵素であるセラミドグリカナーゼの優れた基質となる蛍光性糖脂質モデルの分子設計と合成、さらにその生化学的評価について述べられている。この化合物はスフィンゴ糖脂質の基幹構造の両末端にダンシル基とナフチル基を有する誘導体であり、この異種蛍光プローブ間の蛍光エネルギー移動が酵素による加水分解で消失する現象を利用してこの反応の速度論的解析を可能とし、この基質にするセラミドグリカナーゼの K_m 、 V_{max} の値が各々 $7.7\mu\text{M}$ 、および 0.16 nmol/min であることを明かにした。

第5章では、本論文を総括している。

以上のように申請者は新しい糖鎖合成法の確立とそれを活用した高性能糖鎖リガンドの分子設計・利用の道を開拓した。よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認定した。