

学 位 論 文 題 名

Synthesis and Characterisation of New Type of Cell Adhesive Glycopeptides

（新しい細胞接着性糖ペプチドの合成とその性質）

学位論文内容の要旨

細胞間の相互作用は、細胞の接着や細胞間の情報の伝達、分化、免疫反応、免疫担当細胞の血管内交通、傷の治癒、細胞の浸潤、ガンの転移、ウィルスの感染など、多くの生命現象に重要な役割を果たしている。この相互作用は、細胞表面および細胞外マトリックス内に存在する様々なリガンドとレセプターの特異的な結合により正確に保たれている。

白血球の炎症部位への浸潤には、少なくともセレクトイン、インテグリン、免疫グロブリンスーパーファミリーの 3 種類の細胞接着性リガンドが関与していると考えられている。セレクトインとそのリガンドである糖ペプチドや糖脂質の相互作用は、白血球が血管内皮細胞に接着するための第一段階であるローリングを引き起こす。これにより、血液中の白血球は血管内皮細胞上を転がるようになる。さらに、インテグリンと免疫グロブリンスーパーファミリーの相互作用により、白血球は一時的に血管内皮細胞に固定化される。固定化された白血球は、更なるインテグリンを介した相互作用により炎症部位へと浸潤して行く。

セレクトインは、E-、P-、L-セレクトインの 3 種に分けられ、細胞表層に存在する特定の構造を持つ糖鎖を認識し結合することが知られている。特に、E-セレクトインおよび P-セレクトインはシアリルルイス X と呼ばれる 4 糖構造を認識しているとされている。この糖鎖は、白血球が血管内皮細胞に結合する上で必要な構造であり、さらにガンの転移においても重要な働きをしているとされている。したがって、リュウマチなどの抗免疫病剤やガンの転移の阻害剤として、様々なシアリルルイス X 類似体が合成されている。

一方、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンやビトロネクチン、フィブリノーゲンなどに存在する細胞接着性ペプチド RGDS は、細胞表面に存在するインテグリンと相互作用し、細胞の強固な接着に重要な役目を果たしている事が知られている。このペプチド鎖を含む GRGDS は、マウスメラノーマ細胞のフィブロネクチンへの接着を阻害し、さらにガン細胞の実験的肺転移をも抑制することが示されている。

そこで、私は、RGDS とシアリルルイス X およびシアリルルイス X の特徴であるシアリ酸をそれぞれの特性を生かせるよう適当なスペーサーを介して結合させた非天然型の細胞接着性糖ペプチド 1 および 2（図 1）を設計しその合成を行った。

糖ペプチドの合成は、保護基の選択やそのカップリング条件、脱保護の条件の選択など非常に困難とされている。そこで、今回の合成では、化学的手法と酵素的手法をあわせて

用いることにより高収率で効果的に合成を行うことができた。また、 α -2, 3-シアル酸転移酵素および α -1, 3-フコース転移酵素を用いた糖転移反応において、糖受容体の分子量が低分子であるにもかかわらず、比較的高収率（シアリル化-79.5%, フコシル化-55.6%）で進行していることから、これらの酵素は、糖鎖の構造ばかりでなくその周りの構造も認識していると考えることができる。

この合成した糖ペプチドの E-, P-, L-セレクトリンへの結合力を表面プラズモン共鳴法を用いて評価した。その結果を表 1 にまとめた。この表から、合成した糖ペプチドはシアリルルイス X と比べて P-セレクトリンに対して非常に高い親和性を持つことが明らかとなった。また、E-セレクトリンに対しても結合力の上昇が認められた。しかし、L-セレクトリンに対してはシアリルルイス X と同様ほぼ結合しないことが示された。

また、RGDS の効果について、インテグリン β 1 鎖とそのモノクローナル抗体の結合の阻害力について表面プラズモン共鳴法を用いて評価した。モノクローナル抗体の向きをそろえるため、まず、アミノシランキュベットの表面にプロテイン A を固定化しその上にモノクローナル抗体を固定化した。こうして作成したキュベットを用いて実験を行った結果、インテグリン β 1 (3.2 μ g/ml) が存在する系において化合物 1 は IC₅₀=0.55 mM という結果を示した。これは、同じ系において RGDS が示した IC₅₀=1.16 mM よりもよい結果である。また、化合物 1 は、活性化ヘルパー T 細胞のコラーゲンコートプレートへの接着も強く阻害することが確かめられている。

これらの結果よりこの合成した非天然型糖ペプチドは、RGDS およびシアリルルイス X のそれぞれの特性およびレセプターとの結合活性を失っていないため、新しい細胞接着のモジュレーターとなり得ることが示された。

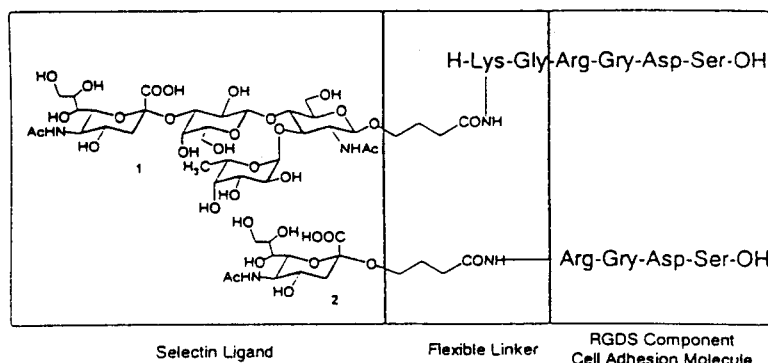


図 1

P-selectin					L-selectin				
	SL ^e -RGDS	SL ^e	LacNAc-RGDS	RGDS		SL ^e -RGDS	SL ^e	LacNAc-RGDS	RGDS
$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	978.1	229.6	114.5	89.1	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	180.1	312.7	29.8	4.1
$k_{off}(s^{-1})$	1.5×10^{-5}	2.6×10^{-4}	4.5×10^{-4}	9.2×10^{-4}	$k_{off}(s^{-1})$	1.9×10^{-1}	3.6×10^{-1}	2.9×10^{-2}	7.7×10^{-1}
$K_A(M^{-1})$	6.6×10^7	8.8×10^5	2.5×10^5	9.7×10^4	$K_A(M^{-1})$	9.5×10^2	8.7×10^2	1.0×10^1	5.4

E-selectin				
	SL ^e -RGDS	SL ^e	LacNAc-RGDS	RGDS
$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	451.2	21.1	9.9	4.0
$k_{off}(s^{-1})$	1.1×10^{-3}	1.7×10^{-3}	1.3×10^{-3}	6.6×10^{-4}
$K_A(M^{-1})$	4.1×10^5	1.2×10^4	7.6×10^3	6.1×10^3

表 1

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 (大学院地球環境科学研究科)

副 査 教 授 坂 入 信 夫 (大学院地球環境科学研究科)

副 査 助 教 授 吉 田 孝

学 位 論 文 題 名

Synthesis and Characterisation of New Type of Cell Adhesive Glycopeptides

(新しい細胞接着性糖ペプチドの合成とその性質)

細胞同士の相互作用は、細胞の接着をはじめ細胞間における情報の伝達、細胞の分化、免疫応答、傷の治癒、ガンの転移、ウィルスの感染などの重要な生命現象に関与している事が知られており、これらの現象は多種類の細胞接着分子の相互作用が複雑に関与する事により精密に制御されていることが知られている。近年、これらの接着分子の阻害剤を合成し細胞接着を制御することによりガンの転移を阻止したりリュウマチ関節炎を軽減する事が可能となると考えられ、セレクチンやインテグリンといった様々な細胞接着分子の阻害剤の合成研究が盛んに行われている。しかし、これらの阻害剤はある一つの分子にターゲットをしぼっているため複雑な相互作用が関与する細胞接着を効果的かつ強力に制御する事は極めて難しく、新しいコンセプトに基づく阻害剤の設計が望まれている。

この背景にあって申請者は、二つの異なる細胞接着分子のリガンドとなる糖鎖およびペプチド鎖を同一分子内に共存させる事により、これまでにないタイプのメカニズムに従う阻害活性を示す糖ペプチドへと誘導する事を企図している。すなわち、ヘテロビファンファンショナルリガンドという新しい概念を提唱した。また、申請者は一般に困難とされている人工糖ペプチドの合成において化学的合成法と酵素的合成法をあわせて用いる事により効率的にその合成を行う事に成功した。本論文は、4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、細胞外マトリックスであるフィブロネクチン由来の細胞接着性テトラペプチド“RGDS”と分子内にカルボキシル基を持つユニークな糖質“シ

アル酸”を適当なスペーサーを介して持つヘテロビファンクショナルリガンドを化学的に合成した。R G D Sは、非常に小さい構造でありながら細胞表面に存在する細胞接着タンパク質“インテグリン”と相互作用する事が知られている。さらにこのペプチドは、ガンの転移を阻害する事も知られており、この合成したヘテロビファンクショナルリガンドも同様の活性を示す事が期待される。

第3章では、糖鎖構造にもはっきりとした役割を持たせるため、糖鎖の構造をより複雑にしたヘテロビファンクショナル糖ペプチドの合成を行っている。糖鎖の構造としては、白血球と血管内皮細胞の相互作用に重要な役割を果たしている細胞接着タンパク質“セレクチン”のリガンドであるシアリルルイスX構造、 $\text{Neu5Ac}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4[\text{Fuc}\alpha(1 \rightarrow 3)]\text{GlcNAc}$ 、を選択した。また、ペプチド鎖にはR G D Sに加え適当なスペーサーとなり得るようリジンおよびグリシンを導入したK G R G D Sを選択した。また、この人工糖ペプチドを合成するにあたりすべての工程を化学的合成法により行う事は、糖鎖とペプチドの化学的性質の大きな違いから非常に困難と考えられる。そこで、申請者は化学合成法と酵素合成法を併用することにより簡便かつ効率的にこの合成を行い高収率で目的物を得ることに成功した。

第4章では、第3章で合成したヘテロビファンクショナルリガンドの生理活性を表面プラズモン共鳴法により評価した。第一に、合成糖ペプチドとセレクチンの相互作用について検討した。その結果、ヘテロビファンクショナルリガンドは、本来のリガンドであるシアリルルイスXよりP-セレクチンには約100倍、E-セレクチンには約20倍強い接着能力を持つことが示された。この事から合成した糖ペプチドは、糖鎖構造によりセレクチンに結合しR G D S構造によりその結合が強められたと考察した。次に、この化合物とインテグリンの相互作用について検討した。インテグリン $\beta 1$ とそのモノクローナル抗体の結合の阻害活性により評価した結果、合成糖ペプチドは、R G D Sの約半分の濃度でも強い活性を示すことを発見している。また、活性化したヘルパーT細胞のインテグリンを介したコラーゲンに対する結合もこの合成糖ペプチドにより強く阻害されることが示されている。これらの結果から、この合成したヘテロビファンクショナル糖ペプチドリガンドが、その糖鎖とペプチド双方の構造によりそれぞれの活性を「協同効果」として増強していることが示された。

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、二つの異なる細胞接着性リガンドを同一分子内に持つ細胞接着性人工糖ペプチドを合成し、ヘテロビファンクショナルリガンドというまったく新しい概念を提唱した。この概念は、独自の仮説に基づき考案されており高く評価できる。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。