

学 位 論 文 題 名

Studies on the efficient enzymatic  
synthesis of glycoconjugates.

(酵素法による効率的複合糖質合成に関する基礎的研究)

学位論文内容の要旨

近年、糖鎖が生体内において情報伝達などに関与し、様々な生理活性を示す重要な物質であることが次第に明らかになってきているが、こうした研究をさらに推進するためには構造が明確で純粋な糖鎖化合物試料を十分な量を迅速に供給することが必要不可欠である。

これまでもいくつかの有用な化学的糖鎖合成法が開発されてきたが、糖鎖の構造は複雑でしかも極めて多様性に富んでおり、グリコシド形成反応の位置選択性と立体選択性を同時に満足させることは大変難しい。このためグリコシル化反応を行う際には、位置選択的な保護・脱保護や特異的な活性化の条件などを考慮した非常に綿密な合成計画が要求される。

一方、糖鎖の合成には有機化学的手法に加えて酵素化学的手法も用いられることがある。酵素を用いる有機合成の利点は、各官能基に対する保護基を必要とせず水溶液中、温和な条件下、きわめて高位置・立体選択的に反応を進行させることができる点であり、グリコシル化において酵素のもつ特異的反応性は十分に生かされる。酵素的糖鎖合成においては、現時点で合成の道具として入手可能な酵素（糖加水分解酵素・糖転移酵素等）の種類が少ないことや市販されている酵素やその基質が非常に高価であるという難点もいくつかあげられるが、組み替え大腸菌等を用いた酵素の大量発現や固定化酵素の調製により酵素の複数回の使用を可能にすることで克服されつつある。

また、グリコシル化反応の簡便化を図る有効な試みとして、ペプチドの固相合成と同様、不溶性の樹脂に糖を結合させそれに対して化学的手法もしくは酵素的で糖鎖を伸長していく方法がこれまでに報告されている。固相合成法を用いることは、低分子化合物の化学合成においてしばしば煩雑となる目的物の精製過程を考慮することにより合成の簡便化への適当なアプローチであるといえよう。

本研究では、固相法・液相法・酵素法・化学法それぞれの利点をすべて併せ持つような高分子担体の設計と合成を実現している。ゲルろ過・透析などで簡単に精製することのできるポリマー中に糖鎖伸長のいわばプライマーとなる糖残基を有し、かつ水溶性である事により酵素反応の条件にも適応する、さらに合成された糖鎖のポリマーからの切断も温和な条件下で達成されるという共通の性質を備え、かつ目的とする糖鎖化合物の合成に適するような構造を持つ 3 種類の高性能プライマーポリマーを分子設計・合成し、ポリマー上での様々な糖鎖化合物の合成を行った。

本論文は 6 章からなっており、第 1 章では序論として生体内で糖鎖が果たす様々な役割について例を挙げて説明し糖鎖合成法の開発の必要性を述べるとともに、本研究の背景となる糖鎖の固相合成や酵素的糖鎖合成についても他研究者の研究例をあげながら説明している。

そして直接本研究をはじめのきっかけとなったオリゴ糖合成のためのプライマーポリマーの合成とこのポリマーを用いたオリゴ糖合成について述べている。

第2章は生成物をアミノアルキルグリコシドとして与える新規プライマーポリマーの分子設計とその合成について述べている。 $\alpha$ キモトリプシンによるオリゴ糖の特異的切り出し点としてフェニルアラニン残基をそのスペーサー内にもつプライマーポリマーは $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 ガラクトシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6 シアリルトランスフェラーゼなどの糖転移酵素により極めて定量的にグリコシル化されることが明らかとなった。これは低分子アクセプターを用いた場合と比較すると極めて注目すべき点であった。また糖鎖のリリースには $\alpha$ キモトリプシン認識部位とポリマー主鎖の間に適当な距離と柔軟性が必要であることも明らかになった。

第3章では第2章で述べたプライマーポリマーがもつ糖鎖密度とその分布の様子を調べた。高分子アクセプターを用いた酵素的糖鎖伸長反応においては低分子アクセプターを用いた場合には達成されないほどの高収率（ほぼ定量的）に糖転移反応が起こっていることを確認している。これは糖受容体となるプライマー糖鎖が高分子化していることによる正の糖鎖クラスター効果が発現しているためであると考えられるが、どの程度の糖鎖クラスター度を持つポリマーが最も効率的に糖転移酵素によって認識されるのか、またポリマー上では糖残基がどのように分布しているかを種々の割合で糖モノマーとアクリルアミドを共重合させたポリマーを合成することにより調べ、プライマーポリマーの構造の最適化を行った。これによりプライマーポリマーはランダムコポリマーであり共重合の際の各モノマーの初濃度から生成してくるポリマーの共重合比をコントロールできることが明らかとなった。また酵素によって定量的にグリコシル化されるためには至適な糖鎖間の距離が存在することも明らかとなった。

第4章では糖脂質合成のためのプライマーポリマーの分子設計と合成について述べている。これはセラミドグリカナーゼ感受性の糖脂質型ポリマーであるが、これは本来水不溶性でたいへん扱いにくい物質とされていた糖脂質に重合性基を導入し水易溶性のモノマーと共重合することにより水溶性ポリマーとしたことで、本来糖蛋白質の生合成の際にはたらき、糖脂質はその基質としないといわれているいくつかの糖転移酵素による糖鎖伸長反応に適応させることが可能になるという非常に興味深い結果を得た。この糖脂質型ポリマー上で合成したシアロオリゴ糖をヒル由来のセラミドグリカナーゼ (CGase) の持つトランスグリコシレーション活性を利用して天然の脂質であるセラミドへ転移させることで、生物学的にも非常に重要な役割を果たしているガングリオシド GM3 を容易に合成することが出来た。

第5章ではさらにこの糖脂質型ポリマー上で酵素による非天然型の糖鎖の合成も可能であるということも明らかにされている。一方、CGase を用いて、セラミドの前駆体であるスフィンゴシンに対してトランスグリコシレーションを試みたところセラミドに対するのと同様の収率で糖鎖が転移することが明らかとなった。スフィンゴシンは反応性のアミノ基を持つことからこのアミノ基を化学修飾することで様々な糖脂質の合成が可能である。その一例として本研究ではガングリオシドの機能解明の為の研究の一助にもなると考えられる蛍光性プローブを有する GM3 の合成を行った。

第6章は以上のまとめである。本論文では高汎用性・高反応性を備えた種々のプライマーポリマーの分子設計とこれを用いる新規複合糖質合成法が提唱されているが、これはこれまで極めて複雑であった複合糖質の合成が大幅に簡便化し、高分子担体を用いた自動合成システム「糖鎖自動合成装置」の開発に大きく貢献するものと考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎  
副 査 教 授 長 田 義 仁  
副 査 教 授 山 岸 皓 彦  
副 査 教 授 新 田 勝 利  
副 査 助 教 授 吉 田 孝

学 位 論 文 題 名

### Studies on the efficient enzymatic synthesis of glycoconjugates.

(酵素法による効率的複合糖質合成に関する基礎的研究)

糖鎖は重要な生体分子であるが化学構造が極めて複雑で多様なため構造と機能に関する詳しい研究は遅々として進んでいない。糖鎖は糖タンパク質、糖脂質、さらにプロテオグリカンなどの複合化された分子として機能しており、これらの多様な分子を総称して複合糖質とよんでいる。これらの複合糖質を化学的に構築することは糖鎖生物学の研究を加速するのみならず、医学・薬学領域をはじめ関連する多くの分野への波及効果も大きい。これまで糖鎖は主として有機合成化学的手法を中心に構築されてきた。しかし、糖質化学独特の厄介な問題、すなわち、グリコシド形成反応における「位置選択性」と「立体選択性」を同時にクリアするのは極めて困難で、現段階では普遍的かつ汎用性に富む糖鎖構築に関する方法論は皆無と言わざるを得ない。一方、高度な位置・立体選択性を実現する方法の一つに糖鎖生合成系において機能している糖転移酵素を利用する手法が近年注目されている。現在までに50種類を超える糖転移酵素遺伝子がクローニングされており、なかには大腸菌などを用いて大量に発現されたりコンビナントタイプの糖転移酵素も入手できるようになっているためこれらの酵素を用いる効率的糖鎖構築法の開発が大いに期待されている。

本研究はこのような背景にあって極めてタイムリーなしかも価値ある方法論を確立したものである。本学位論文は全部で7章からなっておりその内容については以下のような構成である。

第1章では糖鎖・複合糖質の生物学的意義及びこれらの化合物の化学的特徴

や合成法に関する歴史と現状、さらに問題点などを詳しく解説している。

第2章では本研究の重要な端緒ともみなせる「キモトリブシン感受性プライマー」のデザインと合成、さらにシアロ糖鎖誘導体合成への応用について論じている。このプライマーは水溶性の高分子担体であり、ポリアクリルアミドの主鎖と反応開始点となる第一の糖質とのリンカー部位にはキモトリブシンによって加水分解される構造が付与されている。糖転移酵素により均一系で定量的に糖鎖の合成が行われており、糖鎖伸長反応が終了した段階で生成物は極めて簡単にしかも定量的に高分子からリリースされている。

第3章ではプライマーポリマーの糖鎖密度とその分布の様子が糖鎖伸長反応にどのような影響を与えるかなどを詳しく考察している。糖受容体となるプライマー糖鎖を高分子化することで正の糖鎖クラスター効果が発現し酵素によって高い親和性で認識されたため定量的にグリコシル化反応が達成されることも明らかとなった。

第4章は糖脂質の合成に有効なプライマーポリマーの分子設計と合成を行っている。この高分子は糖脂質型ポリマーでやはり人工的に水易溶性を付与したことで、いくつかの糖転移酵素による糖鎖伸長反応に適応させることを可能とした。この糖脂質型ポリマー上で合成したシアロオリゴ糖をヒル由来のセラミドグリカナーゼ (CGase) の持つトランスグリコシル化活性を利用セラミドへ転移させて、ガングリオシド GM3 の簡易合成を達成している。

第5章と第6章はこの糖脂質型プライマーの汎用性を証明するために非天然型の2種類の糖脂質の合成とより複雑なシアリルルイス X 含有糖脂質の合成を行っている。また、第7章は本論文の総括である。

以上のように申請者は水溶性プライマーと糖転移酵素を併用する新規な価値ある方法論を確立しており、この手法によりいくつもの重要な糖鎖・糖脂質の簡易合成を実現した。審査員一同はこの優れた研究業績は申請者が博士(理学)の学位を得るに十分なものと評価する。