

学 位 論 文 題 名

Studies on Mucin Type Glycopeptides

(ムチン型糖ペプチドの生物有機化学的研究)

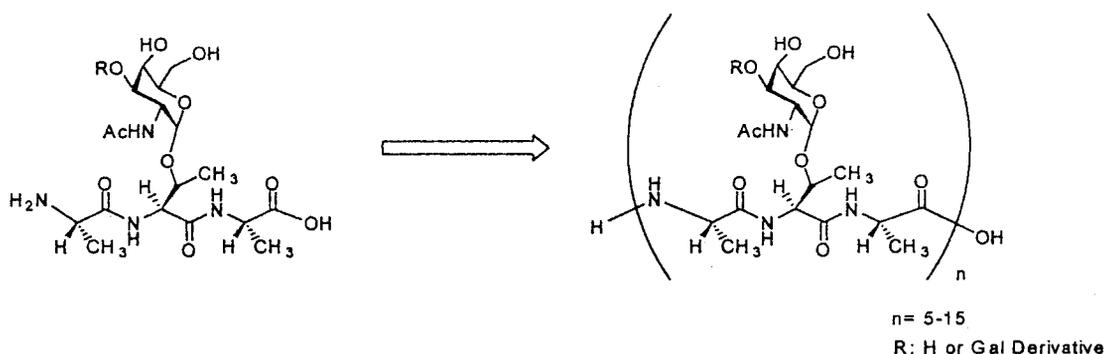
学位論文内容の要旨

ムチン型糖タンパク質の糖鎖は生体内で、細胞接着、細胞間情報の伝達、分化、免疫反応、免疫担当細胞の血管内交通、傷の治癒など、多くの生命現象に関わるリガンド分子であることが最近の研究により明らかになってきた。しかし、糖鎖リガンドとそのレセプター間の結合は非常に特異的である反面、その結合力は極めて弱いことが知られている。生体内ではこの弱い相互作用を増幅させるためにリガンド分子を局所的に高密度で存在させ、より強い結合を誘導しているということが知られている (糖鎖クラスター効果)。一方、ムチン型糖タンパク質の糖鎖構造は多様性に富んでおり、また糖残基が欠損していない天然型の試料を生体内よりを得る事は非常に困難であるため、リガンドの糖鎖構造とその機能に関する研究を行うには限界があった。このような研究をより系統的に行うため、本研究では、規則的な間隔で均一の糖鎖リガンドを持つ糖ペプチドを効率的に化学合成する手法を確立することを第一の目的とした。次に、この糖ペプチドとその糖鎖リガンドを認識するモノクローナル抗体との結合性をペプチド鎖に対する糖鎖リガンドの密集性 (糖鎖クラスター度) に対して評価した。また、この糖ペプチドの基質としての有効性をシアル酸転移酵素に対して調べた。

ムチン型糖タンパク質にはアミノ酸の繰り返し構造を持つタンデムリピート域がある。この領域はセリン (Ser) またはトレオニン (Thr) などのムチン型糖鎖が結合するアミノ酸に富んでおり、この領域には糖鎖がクラスター状に高密度で存在する事が知られている。このような構造のモデルとして、まず、糖鎖リガンドである Tn-抗原を等間隔に持つ規則性糖ペプチドの合成を行った。すなわち Tn-抗原 [N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) - トレオニン (Thr)] をアラニルアラニン (Ala-Ala) のスペーサーを介して等間隔に配した規則性ペプチドを合成した。まず、Ala-Thr-Ala の三残基からなるトリペプチドを液相中で合成した。続いてアノマー位にフッ素原子を持ち、水酸基をベンジルエーテル基で保護した GalNAc 誘導体を前述したトリペプチド誘導体とカップリングした。カップリングは鈴木法を用いて行い、目的とする α グリコシドを高選択的・高収率で得た。続いて GalNAc 誘導体のアジド基を N-アセチル基に変換した後、保護基として用いているベンジルエーテル、ベンジルエステル、ベンジルカルボキシカルボニル基を水素化により同時に脱保護し Ala-Thr-Ala の Thr に GalNAc が導入された糖ペプチドを得た。次に、この糖ペプチドを完全に遊離の (糖鎖水酸基、ペプチドのアミノ末端、カルボキシル末端等が保護されていない)

状態で DPPA 法を用いて重合することにより、Tn 抗原をアミノ酸三残基に一回持つ規則性糖ペプチドを得た。このポリマーはゲルろ過で精製した後、GPC 法を用いて分子量を測定した（繰り返し単位 5~15、アミノ酸残基 15~45）。

同様に極地の魚類の血液中に存在する不凍化糖タンパク質を DPPA 法を用いて合成した。この糖タンパク質は Ala-Thr-Ala を繰り返し単位として持つ規則性糖ペプチドでその全ての Thr 残基に Gal β 1-3GalNAc の二糖残基からなる糖鎖が結合している糖タンパク質である。合成は上述の“Tn-抗原を等間隔に持つ規則性糖ペプチド”に沿って行ったが、特に二糖グリコシドの合成を工夫した。すなわち、この二糖グリコシドの合成はグリコシルフローライドが存在する系でグリコシルイミデートを選択的に活性化することにより効率的に行うことができた。この二糖グリコシド（グリコシルフローライド）はさらに連続的にペプチドとのカップリング反応に用いることができるため、この反応を利用した糖ペプチドの合成手法はより長い糖鎖を有する糖ペプチドを合成する上で大変有効な手法であるといえる。



次いで Tn-抗原を等間隔に持つ規則性糖ペプチドと抗 Tn 抗原モノクローナル抗体との結合を表面プラズモン共鳴法（SPR 法）を用いて測定した。この際、Tn-抗原を一つしか持たない短い糖ペプチド（モノマー）とこのモノマーを重合して得たポリマー（Tn-抗原 10~15 残基、30~45 アミノ酸残基）との 2 種類の糖ペプチドを同じ Tn-抗原濃度下でその結合力の違いを比較した。クラスター化された抗原はそうでない抗原に対して 10 倍程度強い結合力を持つ。これは、両者の解離速度定数はほぼ同じであるにも関わらず、その結合速度定数はポリマーの方が 10 倍程度大きいことによることが確認された。この結果は、ひとたびリガンド-レセプター間に結合が起きるとクラスター化された糖ペプチドではレセプター分子に対する糖鎖リガンドの実効濃度が急激に上昇することから誘導されると考えられる。

また、糖鎖にシアル酸を転移させるヒト N-アセチルガラクトサミン 6 シアル酸転移酵素 I の基質として分子量の異なる 2 種類の Tn-抗原を含む糖ペプチドを用いた。分子量の大きなポリマー（Tn-抗原 10~15 残基、30~45 アミノ酸残基）はシアル酸転移酵素の有効な基質であったが、その一方 Tn-抗原を一つしか持たない短い糖ペプチド（モノマー）は全く基質となり得なかった。この実験結果も糖鎖リガンドを高密度で局在化させることにより糖鎖クラスター効果が誘導される例であるといえる。

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	教授	坂入	信夫
副査	助教授	吉田	孝

学位論文題名

Studies on Mucin Type Glycopeptides

(ムチン型糖ペプチドの生物有機化学的研究)

ムチン型糖タンパク質の糖鎖は生体内で、細胞接着、細胞間情報の伝達、分化、免疫反応、免疫担当細胞の血管内交通、傷の治癒など、多くの生命現象に関わるリガンド分子であることが最近の研究により明らかになってきた。しかし、ムチン型糖タンパク質の糖鎖構造は多様性に富んでおり、また糖残基が欠損していない天然型の試料を生体内より得る事は非常に困難であるため、リガンドの糖鎖構造とその機能に関する研究を行うには限界があった。

この背景にあつて、申請者は糖鎖構造とその生体内での役割についてより詳細な研究を行うために、規則的な間隔で均一の糖鎖リガンドを持つ糖ペプチドを効率的に化学合成する手法を確立した。さらに糖鎖クラスター効果についても局所的な糖鎖密度が高まると抗体に認識されやすくなる、糖転移酵素の基質になり得る等の知見を得た。

ムチン型糖タンパク質にはアミノ酸の繰り返し構造を持つ領域がありここには糖鎖がクラスター状に高密度で存在する事が知られている。この構造のモデル分子として、申請者は Tn-抗原を等間隔に持つ規則性糖ペプチドの合成を行った。ここで糖ペプチドの合成を行う際には保護基としてベンジルエーテル、ベンジルエステル、ベンジルカルボキシカルボニル基を用いることにより水素添加により同時に脱保護が行えた。また、この糖ペプチドを完全に遊離の(糖鎖水酸基、ペプチドのアミノ末端、カルボキシル末端等が保護されていない)状態で DPPA 法を用いて重合することにより目的とする分子を合成することができた。申請者の開発したこの一連の反応を利用することにより従来非常に困難とされている糖ペプチド、その中でも特に規則性糖ペプチドの合成がより簡便に行えるようになったと言えよう。

さらに、申請者はこの一連の反応を利用し極地魚の血液中に存在する不凍化糖タンパク質の合成も行った。ここで、二糖グリコシドの合成に関しては、グリコシルフローライドが存在する系でグリコシルイミデートを選択的に活性化することにより行った。この二糖グリコシド（グリコシルフローライド）はさらに連続的にペプチドとのカップリング反応に用いることができるため、より長い糖鎖を有する糖ペプチドを合成する上で大変有効な手法であるといえよう。

次に、合成したポリ糖ペプチドに糖鎖クラスター効果が見られることを2種類の実験から実証した。第一の例としてこの糖ペプチドとその糖鎖リガンドを認識するモノクローナル抗体との結合性をそのクラスター度に対して表面プラズモン共鳴法（SPR法）を用いて評価した。この結果、クラスター化された糖ペプチドはクラスター化されていないそれと比較して10倍程度強い相互作用が誘導されることがわかった。また、糖鎖にシアル酸を転移させるヒトN-アセチルガラクトサミン6シアル酸転移酵素Iの基質として分子量の異なるTn-抗原を含む糖ペプチドを用いた。結果は分子量の大きなポリマーはシアル酸転移酵素の有効な基質となったが、Tn-抗原を一つしか持たない短い糖ペプチド（モノマー）は全く基質となり得なかった。この実験結果も糖鎖リガンドを高密度で局在化させることにより糖鎖クラスター効果が誘導される例であるといえる。

学位論文の公開発表に際して、西教授より生体内でのクラスター効果の実例およびその重要性について、吉田助教授より重合縮合剤として用いたDPPAの反応機構、山岸教授よりSPR法の理論的背景について、坂入教授より二糖グリコシド生成における反応条件等についての質問がなされた。申請者は自らの経験や過去の論文内容を引用し、豊富な知識に基づいてこれらの質問に明快に回答した。

以上のように申請者は、規則性糖ペプチドを簡便に合成する方法を開発し、この方法によって合成した糖ペプチドのクラスター効果についていくつかの知見を示した。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や学識も併せ申請者が博士（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。