

学位論文題名

Synthesis and characterization
of photosensitive glycoconjugates

(光応答性複合糖質の合成及び機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

糖鎖の重要性が認識され、その研究が精力的に進められるようになって、すでに20年ほど経過している。その結果、生体内において単なるエネルギー源として扱われてきた糖質が、実は複合糖質として生物情報伝達などかなり高度な生命現象に関わっていることがわかってきたのは大きな進歩といえよう。しかし、現在得られている糖鎖合成とそれらの高次利用等についての知見は、いまだ十分とはいえない。

糖鎖の構造と機能に関する研究が思うように進まない背景には主に以下のような問題点があげられる。

- 1、基本単位の単糖には比較的反応性に富んだ水酸基が多数存在するため、その化学的特性が複雑で特に合成分野での研究を困難にしている。
- 2、生命現象に密接に関わる複合糖質は生体内での発現量が非常に少量のため分離精製が困難である上に、一分子のもてる情報量が極端に多いため、その存在意義を特定するのが非常に難しい。
- 3、糖鎖は遺伝子の二次産物であり真核細胞以上の生物で主に利用されているが、糖鎖の関わる比較的単純な現象でさえもさまざまな生体高分子が複雑に関与しているためメカニズムの解明が難しい。

このように、糖鎖自体が抱える潜在的な困難さのため、これらの問題の解決には合成法や分析技術の向上などが強く望まれる。そこで、本研究では、これまでに例のないタイプの新しい光応答性の糖鎖化合物の合成法を開拓し、これらを用いた機能解明法の確立を目的とした。

糖鎖合成で最も問題とされているのは糖と糖をつなぐ段階、すなわちグリコシル化反応である。そこで、着目したのが光(UV)によってラジカルを発生し、またその化学的特性から、 SN_2 反応などにより蛍光プローブなどを導入しやすい官能基としての「ヨウ素」である。本研究では立体化学制御のできる隣接基としてヨウ素を用いて、簡単に汎用性に富むグリコシル化法を初めて開発した。また、その後、 SN_2 反応、水素化反応などにより様々なグリコシドに変換した。その中には合成が困難とされてきた β -マンノシドや β -デオキシグリコシドも含まれる。またこのグリコシル化法を用いれば、従来まで合成困難であったアスパラギン結合型糖蛋白質糖鎖コア構造の合成が可能であることも示した。

一方、糖鎖は、遺伝子→タンパク質→糖鎖というように遺伝子の情報をもとにして二次的に合成される物質である。このため、タンパク質を研究するときそのタンパク質をコードしている遺伝子を見つけるのが重要なように、糖鎖を合成している酵素を検出し解析

することは最重要項目の一つとされる。

合成酵素である糖転移酵素の反応には基質が複数存在する。従来、こういった酵素の活性測定には、ラジオアイソトープを用いる方法、蛍光ラベル基質を用いる方法が用いられてきた。しかし、放射能はいうまでもなく危険であり、蛍光ラベルを用いる方法は間接的で、生成物を HPLC などで分離しなければならないためいずれも連続的な測定は不可能である。そこで本研究では、FRET (蛍光エネルギー移動法) という手段に着目した。FRET 法は二つの蛍光物質が $\sim 60 \text{ \AA}$ 程度の近距離で放射と励起波長が重なったときに起こる蛍光エネルギー移動を利用する方法である。この方法が糖鎖加水分解酵素に非常に有用であることはすでに当研究室により示されているが、糖転移酵素にはまだ応用できていない。本研究では FRET 法を糖転移酵素に応用し簡便な活性測定と分離精製手段を確立した。

ターゲットにした糖転移酵素はシアリルトランスフェラーゼ (SiaT) とガラクトシルトランスフェラーゼ (GalT) である。まず、ナフチルメチル基 (蛍光ドナー) とダンシル基 (蛍光アクセプター) を導入した両酵素の基質誘導体を効率的に合成した。このような二基質系を用いると目標とした FRET 法を用いて酵素活性を測定できることを初めて示した。この FRET 法を用いての活性測定は、安全、簡単、直接的で非常に有用な方法であることが示された。これにより、FRET 法は合成酵素などの、多分子 \rightarrow 一分子というような一般的な酵素反応の連続的な活性測定や分離精製にも応用可能であることがわかった。

また、アゾ化合物は照射される光の波長によって窒素二重結合部位がシス-トランスの構造変換をすることが知られている。そこで、アゾ化合物を構造中に含む糖鎖をデザインし、光スイッチによる分子認識機能の制御を検討した。すなわち、アゾベンゼン誘導体にガラクトース及び長鎖アルキル基を導入し、これによる単分子膜を形成させて光の波長により膜がどのような物性を示すかを考察した。またこの際の膜とレクチンとの相互作用を詳しく検討した。予想されたとおり、膜の構造及びレクチンとの相互作用は照射する光の波長により大きく変化することが確かめられた。また、アゾベンゼン化合物特有の性質により、この化合物はスモールスケールの糖鎖合成の際に有用な保護基としても十分な有効性を示すことがわかった。今後、新しいバイオセンサー開発研究などに大いに貢献できることが予想される。

以上の研究により、簡便で汎用性に富む新しいいくつかの糖鎖合成法を開発する事に成功した。また、安全、簡単、連続的な糖転移酵素の活性測定および、光の波長を制御することにより分子認識機能を変化させることが可能な光応答性複合糖質などの合成が達成されたことにより、今後の糖鎖研究を支える新しい方法論の確立に大きく貢献した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 田 中 勲
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 characterization of photosensitive glycoconjugates

(光応答性複合糖質の合成及び機能に関する研究)

生物情報伝達の新しい様式として糖鎖シグナルとこれを識別するレセプターの組み合わせがいたるところで発見されている。血液型や免疫・癌などのマーカー物質としての細胞表層糖タンパク質や糖脂質の機能などはその最も具体的な例といえよう。細胞が分化・成長・臓器形成する際などにも複雑な糖鎖構造の消長が観察されているので複合糖質の糖鎖構造の移り変わりや生合成メカニズムなどを詳細に解析する事は生物学的に極めて重要な研究課題となっている。そのためには糖鎖やその関連化合物の迅速かつ簡便な合成法の確立や構造・機能解析技術の向上などが強く望まれている。

申請者は本研究論文においてこれまでに報告例のないいくつかの新しい光応答性糖鎖化合物の設計と合成を行いこれらが糖鎖機能の解明にとって極めて有効なプローブとなることを実験的に証明した。本論文は6つの章で構成されている。1章は序論、2章から5章が本論でその内容を6章で総括している。以下に論文審査の概要について説明する。

第2章は糖鎖合成で最も難解とされている β 型マンノース残基を含む化合物の合成に有効な新しいグリコシル化反応の開発について述べられている。すなわち、アノマー位での立体化学制御を可能とする隣接基として新たにヨウ素原子を採用して簡単かつ汎用性に富む新規グリコシル化法の実現に成功した。このタイプのグリコシドは引き続き2位炭素上での S_N2 反応により合成が困難とされてきた β -マンノシドや β -デオキシグリコシドに容易に変換が可能であった。また、この手法がアスパラギン結合型糖タンパク質に普遍的に存在する糖鎖コア構造の合成に応用できることも実験的に示している。2位炭素への光応答性基の導入に関してもこれを選択的にアクシャル配置で実現できるため今後生化学的な分野での展開が期待できる。

3章と4章ではそれぞれシアル酸転移酵素、ガラクトース転移酵素とよばれる2種類の

糖転移酵素に対する新規な蛍光基質の合成と評価について述べている。従来、このような合成酵素の活性測定には、ラジオアイソトープを用いる方法あるいは蛍光ラベルされた基質を用いる方法が主として用いられてきた。しかし、両者とも生成物をクロマトグラフィーなどにより分離した後定量せざるを得ないため、反応を連続的に追跡する事が不可能である。従って、これらの方法では速度論的パラメーターを決定する事も困難であるうえ、操作が煩雑であったり危険を伴う場合も少なくない。本研究ではこれを解決するために蛍光エネルギー移動法という原理に基づく新規な手法を開発し連続的な糖転移反応の解析に世界ではじめて成功している。この手法は近距離（10–20オングストローム程度）に置かれた一対の蛍光プローブ、例えばナフチルメチル基（蛍光ドナー）とダンシル基（蛍光アクセプター）の間で生じる蛍光エネルギー移動という現象を巧みに利用して酵素反応をモニタリングするもので、蛍光ドナーを280nmで励起すれば蛍光アクセプターから放射される525nmの蛍光を測定するだけで生成物（糖鎖）の定量が可能となる。糖鎖が生成しなければナフチルメチル基の本来の放射光である340nmの蛍光のみが観察されるため極めて特異的で感度の良い手法である事が証明されている。これらの蛍光ラベルされた糖ヌクレオチドや糖鎖の合成に関しても極めて効果的な独自の合成ルートを考案しており、今後このタイプの化合物をデザインする際に有効ないくつかの汎用的な方法論を確立している。この方法により両酵素についての連続的な活性測定に成功しており、速度パラメーターの決定をはじめ酵素量の定量なども実証している。この方法は糖転移酵素に限らず、生体高分子の生合成にかかわる酵素に一般的な多分子→一分子という反応の連続的な活性測定にも応用可能と考えられるためインパクトの大きな成果である。

5章においては光照射によりシス・トランス異性化することが知られているアゾベンゼンを構造中に含む新規な両親媒性ガラクトース誘導体を合成し、光スイッチによる糖鎖の分子認識機能制御を検討している。この光応答性糖脂質モデル化合物は予期した通りの単分子膜形成能を発現し、しかも照射する光の波長により膜の物性が著しく変化する事を確かめている。次いでタンパク質との界面における相互作用を解析した結果、タンパク質は糖鎖の配向性に依存してトランス型の直立した糖脂質単分子膜表面に特異的に吸着していることを証明した。これは糖脂質の機能解明、特に分子集合体形成メカニズムと機能発現の研究にとって新しいブレークスルーとなるアプローチである。

以上のように申請者は簡便で汎用性に富む新しいいくつかの糖鎖化合物の合成法を開発し、これらの全てが複合糖質の機能解明研究に有効な光応答性プローブとなることを証明した。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、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。