

学 位 論 文 題 名

Antifreeze Glycoproteins: Elucidation of the Structural Motifs That Are Essential for Antifreeze Activity

(不凍糖タンパク質の構造と機能)

学位論文内容の要旨

北極や南極周辺などの冷たい海に生息する魚類は、その体液中に不凍タンパク質 (Antifreeze Protein; AFP)、あるいは不凍糖タンパク質 (Antifreeze Glycoprotein; AFGP) と呼ばれる特殊なタンパク質群を有しており、その働きにより、凍結することなく生息できる。これらのタンパク質は、通常の溶質とは異なり、モル凝固点降下則には従わない特殊な抗凍結活性を示す。即ち、氷結晶の表面に特異的に接着し、その成長を阻害することで、分子量から予測されるよりもはるかに大きな凝固点効果を誘導することが知られている。その結果、融点と凝固点の間に差が生じる、サーマルヒステシスと呼ばれる現象を引き起こす。これらのタンパク質群のうち、糖鎖を有する不凍糖タンパク質は、Ala-Thr-Ala からなるトリペプチドの Thr 残基側鎖に、Gal,,1-3GalNAc,, という糖鎖を有する糖ペプチドを基本単位とし、これが何度も繰り返された構造を有する規則配列性の糖タンパク質である ($n=4-50$)。これまで、不凍タンパク質に関しては、X 線や NMR による構造解析、さらには化学合成、遺伝子的手法を利用し、天然型とはことなる構造を有する類縁分子を合成し、活性の比較を行うことで、構造活性相関がかなりわかってきている。ところが、不凍糖タンパク質に関しては、その化学合成が困難であった（糖鎖を有するために遺伝子学的手法では調整できない）ことから、高次構造、および構造と機能に関する系統的な研究はほとんど行えない状況にあった。当研究室では最近、繰り返し単位となる糖ペプチドを合成し、それを DPPA（ジフェニルホスホリルアジド）により連続縮重合反応を行うという、極めて簡便な方法により、不凍糖タンパク質の全合成に初めて成功した。本研究では、確立された合成法を利用し、不凍糖タンパク質、および天然型とは異なる糖鎖やペプチド構造を有する、種々の不凍糖タンパク質類縁体を合成し、その活性評価・構造解析を行うことで、不凍糖タンパク質の活性発現メカニズムを明らかにすることを目的として、研究を行った。

第1章では序論として、不凍（糖）タンパク質に関するこれまでにわかっている知見、および生体内におけるムチン型糖タンパク質の役割について概説した。

第2章では、高分子量、かつ高密度に糖鎖を有するムチン型糖タンパク質ミミックの、効率的な合成法について述べている。不凍糖タンパク質の合成法は既に確立されていたが、天然型とは異なる糖鎖を有する糖タンパク質ミミックの合成も行うことで、不凍糖タンパク質の構造活性相関研究に非常に有用であることを証明した。さらに、合成した糖ペプチドポリマーに対して、糖転移酵素を利用した糖鎖伸長を行うことで、シアリル T 抗原を高密度に有する糖ペプチドや、末端にシアリルルイス X 構造を有するような、コア 2 型ムチンミミックの合成にも成功し、本手法の、ムチン型糖タンパク質ミミック合成における汎用性を示した。

第3章では、従来法（DPPA 法）では不可能であった、塩基に弱い置換基を有する糖ペプチドの効率的な合成法を確立した。不凍糖タンパク質類縁体を合成する中で、糖鎖の 2 位アセ

トアミド基の役割について詳細な検討を行うため、2 位に *O*-Ac 基を有するような類縁体を設計し、第 2 章において確立された方法論に従って合成を行ったところ、最後の重縮合の段階で、アセチル基の転移が観察された。この原因として、反応に用いる塩基（トリエチルアミン）により、アシル転移が促進されていると考えられたので、反応に塩基を必要としない縮合剤の使用を検討した。その結果、IIDQ (1-isobutoxycarbonyl-2-isobutoxy-1,2-dihydroquinoline) を使用したときに、アシル転移は起きず、重合も効率的に進行することが確認された。本手法は、硫酸基を有するような糖ペプチドの合成にも適用され、その有用性を確認している。

第 4 章では、第 2 章、第 3 章で確立した方法論を利用し、天然型の不凍糖タンパク質とは異なる糖鎖やペプチド配列を有する不凍糖タンパク質類縁体を系統的に合成し、その活性測定や CD スペクトルによる 2 次構造の解析を行うことで、不凍糖タンパク質の（高次）構造と、機能との相関について、詳細な検討を行った。その結果、不凍糖タンパク質の活性発現には、1) 糖ペプチドの繰り返し構造（最低 2 回の繰り返しが必要）、2) スレオニンに結合した糖鎖 2 位のアセトアミド基、3) 糖鎖-スレオニン間の α グリコシド、4) スレオニン残基の γ メチル基、といった構造が必須であり、どれかひとつ欠けても活性がなくなることが初めて明らかにした。さらに、CD スペクトルによる高次構造解析を行ったところ、活性を有した類縁体は全て同じスペクトルパターンを示し、ポリプロリンタイプ II ヘリックス様の左巻きの 3_1 ヘリックスを形成していることが示唆された。一方、活性のなかった類縁体については一般に、このヘリックスが崩れたスペクトルパターン（不規則構造）を示した。また、スレオニン残基をセリン残基に置き換えた類縁体の場合には、右巻きの α ヘリックス構造を含有していることを示すスペクトルを示した。これらの結果より、不凍糖タンパク質は、種々の構造的特徴を有することで、水溶液中で左巻きの 3_1 ヘリックスを形成しており、これにより、特異な活性が誘導されていると予測された。

第 5 章では、合成した不凍糖タンパク質の NMR 構造解析を行った。不凍糖タンパク質は、繰り返し構造を有する糖タンパク質であることから、NMR シグナルの帰属が困難であり、これまでその構造決定は達成されていなかった。本研究では、第 4 章において、不凍糖タンパク質の化学合成に成功したのみならず、合成ポリマーの分子量分画を行うことで、活性発現に必要な最低の繰り返し単位の数 は 2 回であることを、既に明らかにしている。繰り返し単位の数 が 2 回、あるいは 3 回の場合には、NMR シグナルの完全な帰属を行うことが可能であり、その立体構造解析に初めて成功した。その結果、CD スペクトルから予測された通り、左巻きの 3_1 ヘリックス構造をとっており、糖鎖が一方の面を、ペプチド側鎖のメチル基が反対側の面を向いた、両親媒性の分子であることが明らかとなった。この両親媒構造こそが、不凍糖タンパク質の氷晶成長阻害活性において、鍵となる構造であろうと考えられる。

第 6 章は、第 2～5 章の総括である。本研究では、これまではその化学合成が困難であったためにほとんどわかっていなかった、不凍糖タンパク質の構造と機能の関係に関して研究を行ってきた。第 4 章では、第 2 章、第 3 章において確立した合成法をもとに、不凍糖タンパク質類縁体を系統的に合成し、その構造活性相関について詳細な検討を行い、第 5 章においては、AFGP の NMR 構造解析に初めて成功した。これらの結果から、不凍糖タンパク質は、これまで考えたよりも厳密な高次構造を有しており、これによって不凍活性が誘導されていることが示された。本研究において得られた知見は、不凍糖タンパク質の活性メカニズムを明らかにする上で必要不可欠なものであり、メカニズム解明に向けた礎となるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 坂 入 信 夫 (大学院地球環境科学研究科)

副 査 教 授 津 田 栄

副 査 助教授 出 村 誠

学 位 論 文 題 名

Antifreeze Glycoproteins: Elucidation of the Structural Motifs That Are Essential for Antifreeze Activity

(不凍糖タンパク質の構造と機能)

北極や南極周辺などの冷たい海に生息する一部の魚類は、その体液中に不凍糖タンパク質 (Antifreeze Glycoprotein; AFGP) と呼ばれる特殊な糖タンパク質を有しており、その働きにより、極寒の海でも凍結することなく生息できる。AFGP は、氷結晶の表面に特異的に接着し、その成長を阻害することで、分子量から予測されるよりもはるかに大きな凝固点効果を誘導することが知られている。AFGP は、Ala-Thr-Ala からなるトリペプチドの Thr 残基側鎖に、Gal,,1-3GalNAc,, という糖鎖を有する糖ペプチドを基本単位とし、これが何度も繰り返された構造を有する規則配列性の糖タンパク質であることがわかっているが、その活性メカニズムに関してはこれまでのところほとんどわかっていない。その大きな原因として、その化学合成法が確立しておらず、機能研究を行うために十分なサンプルを確保できない、という問題があった。一方、当研究室の津田らは、AFGP の初めの全合成を達成し、報告している。

申請者は本論文において、確立された合成法を利用し、AFGP、および天然型とは異なる糖鎖やペプチド構造を有する、種々の AFGP 類縁体を合成し、その活性評価・構造解析を行うことで、これまでほとんどわかっていなかった、AFGP の構造活性相関について、数多くの有用な知見を報告している。

申請者はまず、確立された方法論に従い、若干の改善点も加えつつ、AFGP の全合成を行っている。さらに、合成した AFGP の不凍活性の評価も行い、天然から得られるものと同様の活性を有することを確認している。また、合成 AFGP の分子量分画を行うことで、活性の分子量依存性についても詳細な検討を行っており、繰り返し単位の数が増えるものでも、不凍活性を有することを初めて明らかにした。さらに、合成した糖ペプチドポリマーに対して、糖転移酵素を利用し

た糖鎖伸長を行うことで、シアリルT抗原を高密度に有する糖ペプチドの合成にも成功し、本手法の、ムチン型糖タンパク質ミミック合成における汎用性を示した。

続いて、同様の合成手法により、天然型のAFGPとは異なる糖鎖やペプチド配列を有する、AFGP類縁体を系統的に合成し、その活性測定やCDスペクトルによる2次構造の解析を行うことで、不凍糖タンパク質の（高次）構造と、機能との相関について、詳細な検討を行った。この過程において、従来法（DPPA法）では不可能であった、塩基に弱い置換基を有する糖ペプチドの効率的合成法も確立している。活性評価を行った結果、AFGPの活性発現には、1）糖ペプチドの繰り返し構造（最低2回の繰り返しが必要）、2）スレオニンに結合した糖鎖2位のアセトアミド基、3）糖鎖－スレオニン間の α グリコシド、4）スレオニン残基の γ メチル基、5）両末端アラニン残基の β メチル基、といった構造が必須であり、どれかひとつ欠けても活性がなくなること初めて明らかにした。さらに、CDスペクトルによる高次構造解析を行ったところ、活性を有した類縁体は全て同じスペクトルパターンを示し、ポリプロリンタイプIIヘリックス様の左巻き 3_1 ヘリックスを形成していることが示唆された。一方、活性のなかった類縁体については一般に、このヘリックスが崩れたスペクトルパターン（不規則構造）を示した。また、スレオニン残基をセリン残基に置き換えた類縁体場合には、右巻きの α ヘリックス構造を含有していることを示すスペクトルを示した。これらの結果より、不凍糖タンパク質は、種々の構造的特徴を有することで、水溶液中で左巻きの 3_1 ヘリックスを形成しており、これにより、特異な活性が誘導されていると予測している。

次に、AFGPの氷晶接着メカニズムを分子レベルで解明するため、NMR構造解析を行っている。AFGPは、繰り返し構造を有する糖タンパク質であることから、NMRシグナルの帰属が困難であり、これまでその構造決定は達成されていなかった。一方申請者は、先に述べたように、AFGPの化学合成に成功したのみならず、合成ポリマーの分子量分画を行うことで、活性発現に必要な最低の繰り返し単位の数2であることを、既に明らかにしている。繰り返し単位の数2回、あるいは3回の場合には、NMRシグナルの完全な帰属を行うことが可能であり、その立体構造解析に初めて成功した。その結果、CDスペクトルから予測された通り、左巻きの 3_1 ヘリックス構造をとっており、糖鎖が一方の面を、ペプチド側鎖のメチル基が反対側の面を向いた、両親媒性の分子であることが明らかとなった。この両親媒構造こそが、不凍糖タンパク質の氷晶成長阻害活性において、鍵となる構造であろうと考えられる。

ここまで示したとおり、本研究において得られた知見は、不凍糖タンパク質の活性メカニズムを明らかにする上で必要不可欠なものであり、メカニズム解明に向けた礎となるものである。よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。