

学 位 論 文 題 名

Molecular Design of Mechanism-Based Glycosyltransferase Inhibitors:
Dynamic Inhibitors for Human β 1,4-Galactosyltransferase

(作用メカニズムに基づいた新規糖転移酵素阻害剤の分子設計：
ヒト β 1,4-ガラクトース転移酵素の動的阻害剤)

学位論文内容の要旨

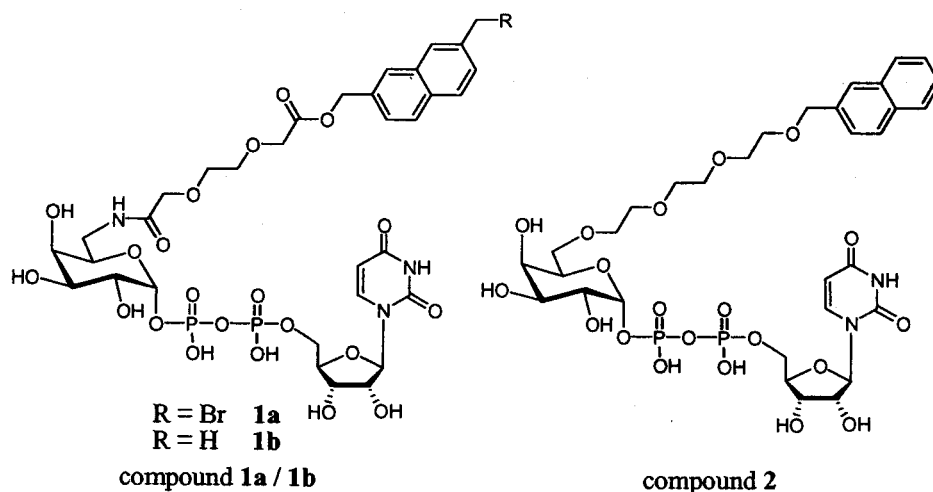
近年、様々な疾患と糖鎖との関連が報告されるようになり、糖鎖関連医薬の開発が注目されている。例えば、癌細胞上に見られるシアル酸含有糖鎖の増加が、転移能、浸潤能に大きく関わっていることが報告されている。またインフルエンザウイルスを初め、様々なウイルス、細菌が糖鎖を足がかりに感染する等の知見も得られるに至り、糖鎖生合成酵素阻害薬等により糖鎖構造制御が可能になれば、癌、炎症、感染症といった疾患の効果的な治療法となることが期待される。

糖転移酵素は、ゴルジ装置内において、糖鎖生合成の中心を担っている酵素である。糖転移酵素の一つである β 1,4-ガラクトース転移酵素(以下 β GalT)は、UDP-ガラクトースを糖ドナーとし、糖アクセプターである *N*-アセチルグルコサミンにガラクトースを一つ転移する反応を触媒する。その調達しやすさから、糖転移酵素の基質認識機構、及び阻害薬合成研究のモデルとしてよく研究されてきた。近年になり、Bourne ら、Qasba らのグループによって、相次いでウシ由来 β GalT の結晶構造が報告された。Qasba らの報告によると、この酵素は UDP-ガラクトースの結合によって、大小二つのループが構造変化を起こし、それによって糖アクセプター結合部位が形成されるというものであった。中でも、小ループに存在する Trp314 は、直接 UDP-ガラクトースと結合し、大ループの構造変化を促すために重要であると考えられ、実際に alanine や glycine に変異をかけたミュータントでは活性が著しく減少することが確認されている。

申請者はこの Trp314 の動きに着目し、この Trp と相互作用する分子を近傍に配置することでその動きを止めることが出来れば、酵素は構造変化することが出来なくなり、活性が阻害されるのではないかと考えた。そこでまず、UDP-ガラクトースをベース構造とし適切な長さを持つリンカーによって、Trp, Cys, Met と選択的に反応する性質を持つプロモメチルナフタレンを Trp 近傍に配置出来るように設計したアフィニティーラベル化合物 **1a** を、有機化学的手法により合成した。次に合成した化合物 **1a** を、ヒト由来 β GalT(ウシ由来酵素 Trp314 はヒト由来酵素では Trp310 に相当)をターゲットとして反応させて、ESI-MS 法によって実際にラベリングが可能であるか確認した所、化合物 **1a** の添加量依存的な Trp310 のラベル化が確認された。次に、ラベル化した β GalT をトリプシン消化し、MALDI TOF MS 法によって解析

した所、化合物 **1a** 添加なしのコントロールと比較して、新しいピーク (m/z 3273.149) の出現を確認した。さらにこのピークについて MALDI TOF/TOF MS 解析を行った所、目的とする Trp310 に化合物 **1a** 由来のナフタレンが共有結合していることが確認された。この結果によって、適切な距離、位置にナフタレンを配置すれば、Trp310 残基とナフタレンを特異的に相互作用させることが可能であることが確認された。また化合物 **1a** の安定型類縁体 **1b** が比較的強い阻害活性を示したことから、次に、Trp310 の動きを妨害する同様のコンセプトによる種々の動的拮抗阻害剤の分子設計に着手した。

UDP-ガラクトースをベースとしナフタレンを含有する 6 種の化合物を合成して、阻害活性を検討した結果、化合物 **2** が最も強い阻害活性を示すことが確認された。この化合物 **2** について、タンパク質-リガンド間の相互作用を温和な環境で検出することが可能な Cold Spray Ionization MS (CSI-MS) 法を用いて解析したところ、化合物 **2** の結合により β GalT は、もはや糖アクセプター結合能を保持しないことが示された。さらに、UDP-ガラクトース、及び化合物 **2** の結合による β GalT の構造変化の推移を円二色性スペクトルによって観察した。その結果、化合物 **2** は通常の構造変化で見られるものとは大きく異なるスペクトルを与えることが確認された。CSI-MS の実験結果とあわせると、化合物 **2** は末端ナフタレンが Trp310 と相互作用することにより、動的な触媒反応メカニズムを阻害しているものと結論した。



A model of bovine β GalT complexed with compound **2**

Yellow: Trp314 Green: Large loop

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 河 野 敬 一

副 査 助教授 出 村 誠

副 査 助教授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

Molecular Design of Mechanism-Based Glycosyltransferase Inhibitors: Dynamic Inhibitors for Human β 1,4-Galactosyltransferase

(作用メカニズムに基づいた新規糖転移酵素阻害剤の分子設計：
ヒト β 1,4-ガラクトース転移酵素の動的阻害剤)

生体の糖鎖合成における中心的酵素である糖転移酵素の阻害剤は、癌、炎症、ウイルス感染といった様々な疾病に対する薬剤として期待され、研究が盛んに行われている。本研究において申請者は、動的な立体構造情報を基にした糖転移酵素阻害剤の設計と合成、及び阻害剤としての作用メカニズムの解明を行った。その中で特に糖転移反応に必須である基質結合による酵素の構造変化に着目し、その構造変化そのものを阻害するという極めてユニークな前例のないコンセプトに基づく阻害剤設計に成功している。ヒト β 1,4-ガラクトース転移酵素(β Gal-T)は、小ループ上のトリプトファン(Trp)310の基質へのアクセスを契機とする大きな構造変化が酵素反応のために必要であるが、この Trp310 の基質へのアクセスを抑える不可逆的、及び可逆的阻害剤を設計し、最終的に現在最も強力な阻害作用を有する化合物を発見するに至った。加えてそれらが Trp310 と直接相互作用することで酵素の構造変化を制御していることを種々の最新型質量分析法を用いて証明した。

第1章では研究背景として、糖転移酵素と様々な疾患との関係、糖転移酵素阻害剤研究開発の現状、及び糖転移酵素の構造レベルでの特徴を概説している。

第2章では、Trp310 に対するアフィニティーラベル試薬(不可逆結合型阻害剤)の設計と合成、及び β Gal-T へのラベル化部位の解析を行っている。Trp の求核性を利用するラベル化剤としてブロモメチルナフタレンを用いているが、本研究はこのようなハロメチルアリアル基を Trp に対する選択的アフィニティーラベル試薬として用いた初の試みである。立体構造情報を基に、適切な

距離を有するリンカーを介してプロモメチルナフタレンを Trp310 に対して提示した試薬を設計、合成し、それが設計通りに Trp310 と直接結合することを MALDI-TOF MS 及び MS/MS 解析を用いて証明している。

第3章では、第2章で得られた基本骨格分子を基にその周辺化合物を種々合成し、さらに強力な阻害作用を示す化合物を発見している。より柔軟性の高い分子がより強い阻害作用を示すという極めて興味深い結果が得られている。また近年開発された Cold-Spray-Ionization MS (CSI-MS) 及び円二色性スペクトル分析を用いることで、得られた阻害剤が β Gal-T の活性発現に必須の構造変化を阻害する機能を有することを証明している。

第4章では、第1章から第3章までの研究を総括している。

動的な立体構造情報を基に設計した複雑な構造を持つ特異的阻害剤を有機化学的手法によって合成し、さらにその阻害剤の性質と作用機序を考察するために様々なアプローチにより論理的検証を行っており、研究を進める上で基盤となる有機合成技術、分析技術等を幅広く修得している。

以上のように、高谷氏は初めて動的な立体構造情報を基に糖転移酵素阻害剤を構築し、さらに β Gal-T と同様に一般的に構造変化を必要とする糖転移酵素に対して広く適用し得る新規阻害剤設計コンセプトを提案した。この研究成果は糖転移酵素阻害剤のみならず、広く生理活性物質の分子設計に波及効果を与え、医薬品の開発等にも貢献するものである。よって申請者は北海道大学博士（理学）の学位を授与されるに充分の資格があるものと認める。