

学位論文題名

Chemical Biology of proteoglycan biosynthetic pathway

(プロテオグリカン生合成機構に関する生物有機化学研究)

学位論文内容の要旨

プロテオグリカン (PG) とは、コアタンパク質と呼ばれるタンパク質に1本以上のグリコサミノグリカン (GAG) 鎖が共有結合している構造をもつ分子の総称である。GAG 鎖はウロン酸とアミノ糖の 2 糖を繰り返し単位とする特徴的な構造を持ち、Xyl-Gal-Gal-GlcA という共通 4 糖を介して、コアタンパク質中の Ser 残基に結合している。また、この共通 4 糖領域に共有結合する GAG 鎖構成糖の違いに基づいて、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) タイプと、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) タイプの二つに大きく分類される。すなわち、共通 4 糖領域に GlcNAc が β 1-4 結合したものは CSPG、GalNAc が α 1-4 結合したものは HSPG に仕分けされる。また、GAG 鎖はそれら基本的糖鎖骨格に加えてエピマー化や硫酸化などの修飾により多様な微細構造をもち、この特異な GAG 鎖の構造がプロテオグリカンの多彩な機能を担うと考えられている。

しかし、これら 2 タイプの PG の生合成分岐点である共通結合 4 糖へのヘキシサミン転移メカニズムは依然不明のままである。これまでに、天然から単離された PG の構造をもとに、GAG 鎖生合成の仕分け制御機構について、以下の二つの仮説が提唱されている。

1) 「HSPG には、GAG に直結するコアペプチド領域は疎水性アミノ酸が多く、またその両側もしくは片側に酸性クラスターペプチド領域が存在する」ことが Esko らによって報告されている。このことは、HSPG タイプへの糖鎖伸長を決定付ける 5 番目の α -GlcNAc 転移酵素がコアペプチドを認識する部位を有していることが示唆される。

2) 一方、「CSPG の共通結合 4 糖領域の Gal が硫酸化されているものは存在するが、その領域が硫酸化された HSPG は見つからない」ことを菅原らが報告している。このことから、共通結合 4 糖上の硫酸基の有無がこの仕分け制御機構に深く関与していると菅原らは推定している。すなわち、この硫酸化が 5 番目の α -GlcNAc 転移に先行しているとすれば、 α -GlcNAc 転移酵素が硫酸基によって阻害され、 β -GalNAc 転移酵素のみがこの共通結合 4 糖に作用すると考えられる。

本研究では、菅原らの生合成仮説を検証するために、コア領域の硫酸化されうる水酸基をフッ素化したコア領域類縁体 (PG イニシエーター) を全種類合成し、CHO-K1 細胞に取り込ませ、細胞が吐き出したイニシエーターの CS/HS の組成比を分析した。

第一章ではプロテオグリカンの生合成機構について現在までに得られている知見を述べる。

第二章では、天然に豊富に存在するラクトースを原料とし、1,6-anhydro- β -lactose を鍵中間体とした新規プロテオグリカン コア 4 糖の合成法について述べた。本研究では、糖鎖合成に

において最も困難であり煩雑なグリコシル化反応と保護基のかけわけを回避するため、天然 2 糖を鍵中間体として合成し、そこからプロテオグリカンコア 4 糖領域の効率的合成法を開発した。これら、合成コア構造は細胞培養においてプロテオグリカンイニシエーターとなることが知られており、2,3,4 糖ペプチドイニシエーターの伸張活性についても検討を行った。その結果、3,4 糖ペプチドより、2 糖ペプチドイニシエーターの伸張活性が最も高く、分子量ではなく糖鎖構造が、細胞膜通過、糖転移酵素作用に影響を与えていることを発見した。

第三章では、プロテオグリカンの生合成仮説を検証するため、フッ素化類縁体をデザインした理由とその合成法を述べる。また、これらフッ素化イニシエーターを用いた細胞培養実験の結果 (CS/HS の生成比) を述べる。

まず、フッ素化類縁体の合成については、電子求引基であるフッ素原子を官能基として有した糖ドナーは低活性であることが予備実験で分かっていたため、第二章で用いたシリレン基をアクセプター保護基として用いることでこの問題を解決した。

また、多段階を有する 5 種類の類縁体を合成するにあたり効率的合成を目指し、Gal(シリレン保護)-Xyl を鍵中間体として設計し、合成効率の向上に成功した。

これら、合成イニシエーターを CHO-K1 細胞で培養し、吐き出されたイニシエーターを分析したところ、2 番目の Gal の 6 位をフッ素化したものが顕著に HS を生じしていることがわかった。フッ素無置換コントロール物質が多く生成していたのとは対照的であり、2 番目 Gal の 6 位硫酸化が CS/HS の仕分けに大きく影響していることが示唆される。

またこの結果は、現在までに合成された人口イニシエーターが HS をせいぜい 50%しか合成できなかったのに対し、初めて HS のみに合成を制御できるイニシエーターを開発できたことになる。

第四章は本研究の総括を、またこれからの展望について述べた。

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 (環境科学院)
副 査 教 授 出 村 誠
副 査 助 教 授 門 出 健 次

学位論文題名

Chemical Biology of proteoglycan biosynthetic pathway

(プロテオグリカン生合成機構に関する生物有機化学研究)

プロテオグリカン (PG)は、共通 4 糖領域に共有結合する GAG 鎖構成糖の違いに基づいて、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG)タイプと、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG) タイプの二つに大きく分類される。これら 2 タイプの PG の生成分岐点である共通結合 4 糖へのヘキサミン転移メカニズムは依然不明のままであり、以下の二つの仮説が提唱されている。

1) HSPG には、GAG に直結するコアペプチド領域は疎水性アミノ酸が多く、またその両側もしくは片側に酸性クラスターペプチド領域が存在する

2) CSPG の共通結合 4 糖領域の Gal が硫酸化されているものは存在するが、その領域が硫酸化された HSPG は見つかっていない

仮説1)は Esko らによって報告されている。このことは、HSPG タイプへの糖鎖伸長を決定付ける 5 番目の α -GlcNAc 転移酵素がコアペプチドを認識する部位を有していることが示唆される。仮説2)は菅原らが報告している。このことから、共通結合 4 糖上の硫酸基の有無がこの仕分け制御機構に深く関与していると菅原らは推定している。

本研究では、菅原らの生合成仮説を検証するため、コア領域の硫酸化される水酸基をフッ素化したコア領域類縁体 (PG イニシエーター) を合成し、CHO-K1 細胞に取り込ませ、細胞が吐き出したイニシエーター由来の CS/HS の組成比を分析することにより、コア領域の硫酸化と GAG 生成分岐点の関係を明快に示すことに成功した。

第一章ではプロテオグリカンの生合成機構について現在までに得られている知見を述べる。

第二章では、天然に豊富に存在するラクトースを原料とし、1,6-anhydro- β -lactose を鍵中間体とした新規プロテオグリカンコア 4 糖の合成法について述べた。これら、合成コア糖ペプチド構造が細胞培養においてプロテオグリカンイニシエーターとなる報告例は無かったが、筆者はこの天然型に近い構造でもイニシエーターとなることを証明した。

第三章では、プロテオグリカンの生合成仮説を検証するため、フッ素化類縁体をデザインした理由とその合成法を述べた。また、これらフッ素化イニシエーターを用いた細胞培養実験の結果 (CS/HS の生成比) を述べた。具体的には、フッ素化類縁体の合成については、電子求引基であるフッ素原子を官能基として有した糖ドナーは低活性であることが予備実験

で分かっていたため、第二章で用いたシリレン基をアクセプター保護基として用いることでこの問題を解決した。また、多段階を有する5種類の類縁体を合成するにあたり効率的合成を目指し、Gal(シリレン保護)-Xyl を鍵中間体として設計し、合成効率の向上に成功した。これら、合成イニシエーターを CHO-K1 細胞で培養し、吐き出されたイニシエーターを分析したところ、2番目の Gal の6位をフッ素化したものが顕著に HS を生成していることがわかった。フッ素無置換コントロール物質が CS を多く生成していたのとは対照的であり、2番目 Gal の6位硫酸化が CS/HS の仕分けに大きく影響していることが示唆される。またこの結果は、現在までに合成された人工イニシエーターが HS をせいぜい 50%しか合成できなかったのに対し、初めて HS のみに合成を制御できるイニシエーターを開発できたことになる。

第四章は本研究の総括を、またこれからの展望について述べた。

すなわち、著者は、プロテオグリカンの生合成機構について共通4糖領域の硫酸化の影響を有機合成化学的に証明することに成功しており、その手法は今後の生体物質の生合成機構研究に大いに貢献するものである。

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。