

学位論文題名

Chemical Biology for the Characterization and Regulation of Human and *Helicobacter pylori* Fucosyltransferases

(ヒトおよび *Helicobacter pylori* 由来フコース転移酵素の機能解明と
制御に関する生物有機化学研究)

学位論文内容の要旨

フコース転移酵素は GDP-L-フコースをドナーとして主に糖タンパク質および糖脂質中のガラクトース又は *N*-アセチルグルコサミン残基に L-フコースを転移する酵素である。この酵素は他の糖転移酵素とは異なり、分枝構造の構築や糖鎖合成の最終段階を担うことから、生物学的にも重要な役割を果たしていると考えられている。

この酵素により合成されるフコース含有糖鎖の例として、血液型決定抗原が挙げられる。これらはガラクトース-*N*-アセチルグルコサミン2糖のガラクトース残基に α 1,2型でフコースが結合したオリゴ糖を基幹領域としている。また *N*-アセチルラクトサミンの *N*-アセチルグルコサミン残基に α 1,3型でフコースが結合した LewisX、そこに更に *N*-アセチルノイラミン酸が結合した SialylLewisX と呼ばれる構造が或る種の癌細胞において異常増加することや、IgG 中 N 結合型糖鎖の還元末端側 *N*-アセチルグルコサミン残基に α 1,6型で結合しているフコースを除去すると抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性が 100 倍以上に上昇することなどが知られている。これらのことからフコース転移酵素は様々な生体现象のコントロールの一端を担っていると考えられ、触媒メカニズムの解明や活性制御などの研究が広く行われている。

その手法の一つとして、筆者は GDP-フコース骨格を有する鍵化合物である 6-アジド-GDP-フコースを有機化学的に合成し、その誘導体の使用によるフコース転移酵素の活性評価法並びに阻害剤探索法を提案した。

第一章ではこれまでのフコース転移酵素ならびにフコース含有糖鎖研究の現状を簡単にまとめ概説した。

第二章では鍵化合物であるアジド基を有する GDP-L-フコース類似体のデザインおよび合成について述べた。低コストで大量に合成することを目指し、安価な D-ガラクトースを出発物質として L-ガラクトース誘導体を合成するスキームを構築した。また、ガラクトース中、5ヶ所に存在する水酸基の内、修飾しても酵素認識に影響を及ぼさないことが既に報告されている 6 位水酸基に活性官能基の一種であるアジド基を導入することとした。これらの情報を基に鍵化合物の合成を行い、さらにこの鍵化合物がフコース転移酵素によって転移が行われることを確認した。

第三章では蛍光エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET) による新規

フコース転移酵素反応モニタリング法の開発について述べた。第二章において合成した鍵化合物にアミド結合を介してナフタレンを導入したものをドナーとして用い、ダンシル化したアクセプターに対し転移反応を行った。その際にナフタレンの励起光を照射しながら反応を行うことで FRET 現象が発生しナフタレン由来蛍光の減少およびダンシル由来蛍光の増加が観測された。筆者はこの変化を基に経時変化の連続的モニタリングおよび、ドナーに対するミカエリス定数の算出が可能であることを示した。また、1,3 双極子環化付加反応（クリックケミストリー）によりナフタレンを導入した化合物は基質ではなく阻害剤となることを明らかにし、その阻害活性評価を同様の手法により行った。

第四章では、フコース転移酵素の活性制御を目的とし、第三章で得られた情報を基にクリック反応によって鍵化合物を誘導化した阻害剤候補化合物ライブラリーの構築を行い、MALDI-TOF MS を用いた新規スクリーニング法により阻害剤の探索を行った。ライブラリー構築において、ほとんどの反応は効率的に進行した。さらに安定同位体ラベル化内部標準を使用した MALDI-TOF MS アッセイ法によるライブラリーのハイスループットスクリーニングの結果、クリック反応を行った化合物全てに阻害活性が認められた。また、原料である 6-アジド-GDP-フコースは *H. pylori* 由来フコース転移酵素のみに作用する阻害剤であることも示した。さらに、強く酵素活性を阻害した化合物については、同様の手法により阻害定数の算出を行った。

第五章においては第一章から第四章までの総括を、またこれからの展望についても短く述べた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 教 授 出 村 誠
副 査 准教授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

Chemical Biology for the Characterization and Regulation of Human and *Helicobacter pylori* Fucosyltransferases

(ヒトおよび *Helicobacter pylori* 由来フコース転移酵素の機能解明と
制御に関する生物有機化学研究)

本研究において、筆者は1種類の鍵化合物から誘導される様々な基質類縁体を使用することによりフコース転移酵素の機能解明及び活性制御に関する研究を行っている。

第1章では、これまでの糖鎖及び糖転移酵素全般の研究とその中におけるフコース転移酵素の位置付け、ならびにそれらの構造情報及び反応メカニズム解明に向けた研究の現状についてまとめている。著者が何に注目し、何を解明したいのかを常に念頭に置いた論旨で大変わかりやすくまとめられており、この分野に対する知識を幅広く身に付けたと評価できる。

第2章では、鍵化合物となる GDP-フコース誘導体のデザインおよび合成について述べている。デザインに際して修飾しても酵素反応に影響を及ぼさない水酸基がよく精査された上で選択されており、導入する活性官能基についても、容易な誘導化によるライブラリ構築などへの発展性を踏まえたうえで最適なものが選択されている。さらに合成においても、ただ単に研究レベルでの収量を求めるのではなく、工業的に使用可能なスケールでの合成への応用も考慮に入れた安価な材料による新規合成法によって達成している。また、それらの分析方法も適当であると評価できる。

第3章では、蛍光エネルギー移動法によるフコース転移酵素の反応モニタリングについて述べている。この手法においては基質類似体に導入する蛍光プローブの選択が鍵となるが、過去の知見を基に本人のアイデアも加えて最適な組み合わせを選択し合成を行っている。反応モニタリングに際しては、様々な文献を参考に至適条件をそれら探索することで α 1,3-Fuc-T VI および α 1,6-Fuc-T VIII の反応モニタリングを行い、それを基に速度論解析が可能であることも示している。さらに両酵素

の活性の違いから酵素の基質結合部位周辺の環境の差異についても言及している。

第4章では、ヒト及び *H. pylori* 由来フコース転移酵素の阻害剤探索について述べている。著者はクリック反応を利用して鍵化合物を誘導化した場合は阻害剤となりうることを第3章で発見し、その知見を基にクリック反応による化合物ライブラリの構築を行っているが、その際、トライアンドエラーを繰り返しながら最適な条件を探索している。また、それらの化合物の評価法として新たに安定同位体を有する化合物を使用した MALDI-TOF MS による定量法を考案している。この一連の探索法は、簡単な手法で行えること、酵素反応物を精製することなく直接定量すること等を様々な角度から十分に考慮して開発されており、新規なハイスループットスクリーニング法として期待される成果であると考えられる。また、阻害剤探索の結果から構造活性相関についても報告されている結晶構造と照らし合わせながら考察を加えている。

第5章では第1章から第4章までの総括を、またこれからの展望について述べている。

これらを要するに、本論文は1つの鍵化合物を使用して基質や阻害剤を簡便な手法により合成し、それらを蛍光エネルギー移動法や MALDI-TOF MS 法によって評価することにより、基質や阻害剤の探索を行うだけでなく、その活性メカニズムや酵素構造に関する考察も可能であることを示したものであり、これからの酵素機能解明に向けた研究にとって大きな貢献となる可能性を持っている、将来性の高い研究であると評価できる。

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があるものと認める。