

Structural and Functional Studies on Antifreeze Glycoproteins

(不凍糖タンパク質の構造と機能の解明)

学位論文内容の要旨

一般的に魚類の体液は -0.7°C 付近で凍り付いてしまう。しかし、極地域などの極寒の海域に生息する魚類は -2°C といった極低温下においても、凍結することなく生存する事ができる。これらの魚類はその体液中に不凍タンパク質 (Antifreeze protein; AFP) と呼ばれる物質を発現し、自らの身を守っている。最初に発見された AFP は南極海に生息するノセニア科の魚類のものである (1969 年)。この AFP は後に発見された AFP と区別されるために、不凍糖タンパク (Antifreeze glycoprotein; AFGP) と名付けられた。AFGP は、Ala-Thr-Ala からなるトリペプチドの Thr 側鎖に 2 糖 ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha$) が結合した構造を基本とするムチン型の規則配列糖タンパク質である。

AFP の不凍活性はモル凝固点降下則に従わない特殊な挙動を示す。この現象は氷晶成長の阻害として説明される。水の凍結過程において、AFP が存在する系では特徴的な氷晶の形成を観察することが出来る。これは AFP が氷晶に特異的に接着し、その成長を阻害する事により相転移の遅延を誘導しているからである。しかし、その結晶成長阻害メカニズムの詳細な作用機構は未だ解明されていない。特に AFGP に関しては、ムチン型糖タンパクという特殊な構造が合成や分析の困難さを増大させており、他の AFP に比べて知見が少ない。

本論文ではこれまでに解明されてきた AFGP の構造活性相関を元にして、糖鎖の水酸基およびペプチドの主鎖コンフォメーションと不凍活性の関係に注目した。

第 1 章ではこれまで明らかになっている AFP の生物学的知見、不凍活性機構のモデル、および AFGP の化学合成に関する研究の現状を簡単にまとめ概説した。

第 2 章では、糖のヒドロキシル基に注目し、AFGP のデオキシ誘導体の設計、合成および活性評価について述べた。先述した構造活性相関から不凍活性に必須な最小構造を導きだし、

更にその糖鎖部位のヒドロキシル基をデオキシ化することにより、AFGP が氷もしくは水と相互作用するであろうヒドロキシル基 (4 および 6 位) の重要性を調べた。AFGP のデオキシ誘導体は D-galactose および L-arabinose から化学合成によってそれぞれ調製した。CD スペクトル測定から、デオキシ誘導体が天然の AFGP と同様の polyproline type II helix (PPII helix) 構造をとっていることが判明した。また、デオキシ誘導体はすべて不凍活性 (氷晶成長阻害活性) を有することがわかった。4 位、6 位のヒドロキシル基に関しては有意な差は認められなかったが、糖鎖が構造の安定化と水溶性の向上を担っていることが改めて確認された。

第 3 章では、AFGP の環状型化合物の合成と活性評価について述べた。前章までに明らかにしたように、不凍活性を有する AFGP およびその類縁体は、全て同様の二次構造 (PPII helix) をとることが分かっている。筆者は二次構造を人為的に固定させた AFGP 分子、つまり基本的に活性な化学構造を有し、且つ PPII helix 以外の高次構造を持つ分子を設計した。環状ペプチドは、部分的には活性部位を保存しており、最適であると考えた。種々の環化ペプチド調製法があるが、無保護糖ペプチドに対するワンポッド環化重縮合を行ったところ、目的とする環状 AFGP 分子を効率的に合成することに成功した。得られた環状 AFGP は繰り返し数 2~4 の小分子である。これら環状 AFGP は PPII helix 構造をとらないものの、氷晶成長の阻害活性を有した。繰り返し数 2~4 の直鎖 AFGP と合成した環状 AFGP の詳細な不凍活性評価を行ったところ、直鎖と環状では分子サイズと活性の強さの関係が逆転することを見出した。環状 AFGP は活性型の誘導体としてははじめて PPII helix 構造をとらない分子であると同時に、ペプチド両末端のアミノ基とカルボキシル基が、不凍活性に影響を与えていないことを証明した初めての分子である。

第 4 章は第 1 章から第 3 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	出 村 誠
副 査	教 授	津 田 栄
副 査	准教授	門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

Structural and Functional Studies on Antifreeze Glycoproteins

(不凍糖タンパク質の構造と機能の解明)

本研究では、不凍糖タンパク質の不凍活性機能解明に向け、糖水酸基およびペプチド鎖のコンホメーションの関与を標的とし、デオキシ誘導体および環状ペプチド誘導体それぞれの設計、合成法の確立および不凍活性への影響の調査を行った。

第 1 章では、不凍糖タンパク質の一般的背景および著者が所属している研究室でこれまでに明らかにされた構造活性相関の結果について解説した。

第 2 章では、糖鎖のヒドロキシル基に注目し、不凍糖タンパク質のデオキシ誘導体の設計、合成および活性評価について述べている。ターゲットとしたデオキシ誘導体のデザインは、よく精査された上で選択されており、合成の出発物質も安価かつ大量に入手可能なものが選択されている。一般的に困難とされている糖ペプチドの合成を効率的な合成スキームにより達成した。また、不凍活性の評価から得られた知見として、糖鎖すべてのヒドロキシル基が必ず不凍活性に関して大きな影響を及ぼしていないという結果は、大変重要な研究成果である。

第 3 章では、不凍糖タンパク質の環状型化合物の合成と活性評価について述べている。前章までに明らかにした問題点から、発想を大きく転換し、巨視的な研究を展開している。微細な構造に注目するよりも、二次構造と不凍活性に注目して設計された環状化合物はこれまでの誘導体とは、一線を画しており、研究目的に対する条件を全て満たしている構造である。環状不凍糖タンパク質誘導体はワンポットの環化 n 量化反応で効率的に得られており、その精製・分離工程もよく設計されている。環状不凍糖タンパク質誘導体は特定の二次構造をとらないが、不凍活性を有するはじめての分子であり、氷晶成長阻害メカニズムに対して、新しいモデルの

構築が期待される。熱ヒステリシスの測定から且つ分子サイズと活性強度の関係が逆転もつ注目すべき興味深い結果を得ている。

第4章では第1章から第3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。

本論文は不凍活性発現の鍵となる官能基を構造活性相関より予測し、その官能基を化学的に修飾した新規不凍糖タンパク質類縁体の合成および、活性評価に成功した。また、分子の高分子構造に注目し、新規環状不凍糖ペプチドの設計、合成および活性測定を達成した。これらの研究はユニークな発想から計画され、その実験結果と考察についても高く評価することができる。複合糖質である不凍糖タンパク質の新たな分野の開拓に対して貢献するところ大なるものがある

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があるものと認める。