

学 位 論 文 題 名

Bio-organic chemistry of protein glycosylation

(タンパク質の糖鎖修飾に関する生物有機化学研究)

学位論文内容の要旨

糖鎖修飾はタンパク質の翻訳後修飾の1つとして知られており、ヒトの全タンパク質の50%程度はN結合型あるいはO結合型糖鎖により修飾を受けていると言われている。糖鎖は細胞間コミュニケーションやタンパク質の品質管理など、生命を維持していく生物学的現象のみならず、ガンの転移やウィルス感染などの疾病への関与も示されるなど、糖鎖生物学に関する研究が精力的に行われてきた。しかしながら、一般的に糖タンパク質上の糖鎖構造は多様かつ不均一であり、遺伝子学的手法を用いた均一な糖鎖構造を有する糖タンパク質の調製が困難であることから、生化学的手法と有機化学的手法の融合が糖鎖生物学研究の推進に必要であると考えられる。そこで本研究ではタンパク質の糖鎖修飾の制御と機能解析に関する生物有機化学研究を行った。

第1章では研究背景として、生物有機化学を用いた糖鎖生物学研究について概説している。

第2章ではシアル酸転移酵素(Sialyltransferase, SiaT)阻害剤の新規ハイスループットスクリーニング法の確立と、 α 2,3-SiaT 選択的阻害剤の獲得について述べる。

具体的には、1,3 双極子付加環化反応(Click 反応)を用いることにより、本来の糖ドナーである CMP-NANA (Cytidine-monophosphate-*N*-acetylneuraminic acid)を基本骨格とした約70種類の阻害剤候補化合物ライブラリを構築した。次に、MSによる定量解析のため、aoWR (aminooxy- tryptophanylarginine)を有する糖受容体を用い、MALDI-TOF MSを基盤とした SiaT 反応の評価法を確立した。この方法で阻害剤候補ライブラリを評価したところ、 α 2,6-SiaT に対しては阻害活性を示さないが、 α 2,3-SiaT に対しては有意な阻害活性を示す酵素選択的な新規阻害剤を得ることができた。本手法は SiaT のみならず、他の糖転移酵素の阻害剤開発にも応用できる極めて有用な手法であると考えられる。また、SiaT が合成を担っているシアリル糖鎖はガンの転移やウィルスの感染などの疾病に関与していることから、本手法で得られた阻害剤は糖鎖の生合成制御剤としてのみならず、医薬への応

用も期待される。

第3章では第2章で副次的に見出された、CMP-NANA より良好な基質となる誘導体の構造情報をもとに、single photon emission computed tomography (SPECT)測定に向けたシアリル化糖タンパク質の新規放射性同位体標識法を確立した。

具体的には、Click 反応により得られたフェノール基を有する CMP-NANA 誘導体に対し、 ^{125}I による芳香族求電子置換反応を行い、続けて SiaT 反応を行うことにより、糖タンパク質の *N*結合型糖鎖に選択的に放射性同位体ラベル化されたシアル酸を導入することができた。シアル酸は糖タンパク質の体内動態や血中滞留性に寄与することから、今後 SPECT などを用いたシアリル化糖タンパク質の体内動態解析に応用されることが期待できる。

第4章では、分化、発生において重要な役割を担っている Notch シグナリングにおける糖鎖の役割を、糖ペプチドの化学合成と NMR による立体構造解析により解明した。

Notch 受容体は種々の細胞の運命決定においてシグナル伝達分子として働くことが知られている膜貫通型糖タンパク質である。Delta や Jagged という2種類のリガンドとの親和性が Notch 受容体の *O*-Fucose 糖鎖修飾により制御され、分化シグナルとなることが報告されているが、分子単位での詳細な制御機構に関しては未だ明らかになっていない。Notch 受容体において、リガンドとの結合に必須である EGF11・EGF12 のうち EGF12 のみが Fucosyl 糖鎖を有していることから、EGF12 における *O*-Fucose 糖鎖修飾がリガンドとの相互作用に極めて重要であると考えられる。よって本研究では様々な糖鎖構造を有する EGF12 糖ペプチドを化学合成により調製し、NMR による立体構造解析と得られた構造の比較を行った。その結果、糖鎖は EGF12 ペプチドの局所的な立体構造の形成に関与することでリガンドとの相互作用を制御している可能性が示唆された。

第5章では各種 EGF12 フラグメントペプチドを固相合成によって調製し、*in vitro* にて Protein-*O*-fucosyltransferase-1 (Pofut1)反応を行うことで、Pofut1 による基質の立体構造認識機構を明らかにしようと試みた。

第6章では第2章、第3章、第4章、第5章を総括し、タンパク質の糖鎖修飾に関して生物有機化学的な研究が有用であることを論じた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 綾 部 時 芳

副 査 教 授 菅 原 一 幸

副 査 教 授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

Bio-organic chemistry of protein glycosylation

(タンパク質の糖鎖修飾に関する生物有機化学研究)

糖鎖修飾はタンパク質の翻訳後修飾の1つとして知られており、ヒトの全タンパク質の50%程度はN結合型あるいはO結合型糖鎖により修飾を受けていると言われている。糖鎖は細胞間コミュニケーションやタンパク質の品質管理など、生命を維持していく生物学的現象のみならず、ガンの転移やウィルス感染などの疾病への関与も示されるなど、糖鎖生物学に関する研究が精力的に行われてきた。しかしながら、一般的に糖タンパク質上の糖鎖構造は多様かつ不均一であり、遺伝子学的手法を用いた均一な糖鎖構造を有する糖タンパク質の調製が困難であることから、生化学的手法と有機化学的手法の融合が糖鎖生物学研究の推進に必要であると考えられる。本論文ではタンパク質の糖鎖修飾の制御と機能解析に関する生物有機化学研究をユニークな方法論により記述している。

第1章では研究の背景として、生物有機化学を主たるアプローチ戦略とした糖鎖生物学研究とその意義について概説している。

第2章ではシアル酸転移酵素(Sialyltransferase, SiaT)阻害剤の新規ハイスルーブットスクリーニング法の確立と、 α 2,3-SiaT 選択的阻害剤の獲得について述べている。

具体的には、1,3 双極子付加環化反応(Click 反応)による阻害剤候補化合物ライブラリの構築と、MALDI-TOF MS を基盤とした SiaT 反応の新しい評価法を確立したことで、 α 2,3-SiaT に対して有意な阻害活性を示す選択的な新規阻害剤を得ることができた。本手法は SiaT のみならず、他の糖転移酵素の阻害剤開発にも応用できる極めて有用な方法論であると考えられる。また、SiaT が生合成を担っているシアリル糖鎖はガンの転移やウィルスの感染などの疾病に関与していることから、本手法で得られた新規阻害剤は糖鎖の生合成機構の解明のためのツールとしてのみならず、医薬品への応用研究等についても大いに期待される。

第3章では第2章で見出された、天然型の CMP-NANA よりも優れた基質となる新規な誘導体の構造情報をもとに、single photon emission computed tomography (SPECT)測定

を目的とするシアリル化糖タンパク質の新規放射性同位体標識法を確立した。

すなわち、Click 反応により得られた芳香族 CMP-NANA 誘導体を ^{125}I により置換反応を行い、これを SiaT 反応に用いることにより、糖タンパク質の *N*結合型糖鎖に選択的に放射性同位体ラベル化されたシアル酸を導入することができた。シアル酸は糖タンパク質の体内動態や血中滞留性に寄与することから、今後 SPECT などを用いたシアリル化糖タンパク質の体内動態解析に応用されることが期待できる。

第4章では、分化、発生において重要な役割を担っている Notch シグナリングにおける糖鎖の役割を、モデルとなる糖ペプチドの化学合成と NMR による立体構造解析により考察した。

Notch 受容体は種々の細胞の運命決定においてシグナル伝達分子として働くことが知られている膜貫通型糖タンパク質である。Delta や Jagged という2種類のリガンドとの親和性が Notch 受容体の *O*-Fucose 糖鎖修飾により制御され、分化シグナルとなることが報告されているが、分子レベルでの詳細な制御機構に関しては未だ明らかになっていない。Notch 受容体において、リガンドとの結合に必須である EGF11・EGF12 のうち EGF12 のみが Fucosyl 糖鎖を有していることから、EGF12 における *O*-Fucose 糖鎖修飾がリガンドとの相互作用に極めて重要であると考えられる。よって本研究では様々な糖鎖構造を有する EGF12 糖ペプチドを系統的化学合成により調製し、NMR による立体構造解析と得られた構造の比較を行った。その結果、糖鎖は EGF12 ペプチドの局所的な立体構造の形成に関与することでリガンドとの相互作用を制御している可能性が示唆された。

第5章では各種 EGF12 フラグメントペプチドを固相合成によって調製し、*in vitro* にて Protein-*O*-fucosyltransferase-1 (Pofut1) 反応を行うことで、Pofut1 による基質の立体構造認識機構をについて推察している。

第6章では第2章、第3章、第4章、第5章を総括し、タンパク質の糖鎖修飾に関して生物有機化学的なアプローチが有効であることを結論している。

以上のように、糖鎖生合成の制御、糖タンパク質の体内動態解析、糖鎖がペプチドの立体構造に及ぼす影響、さらに糖転移酵素の基質特異性の解明に向けた広範な研究成果は糖鎖生物学研究に大きく貢献するものである。よって申請者は北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格があるものと認める。