博士（理　学）　松　下　隆　彦

学位論文題名

Studies on chemoenzymatic syntheses of highly *O*-glycosylated mucin-type glycopeptides assisted by microwave irradiation

（マイクロ波を利用した高度 *O*－グリコシル化ムチン型糖ペプチドの酵素・化学的合成に関する研究）

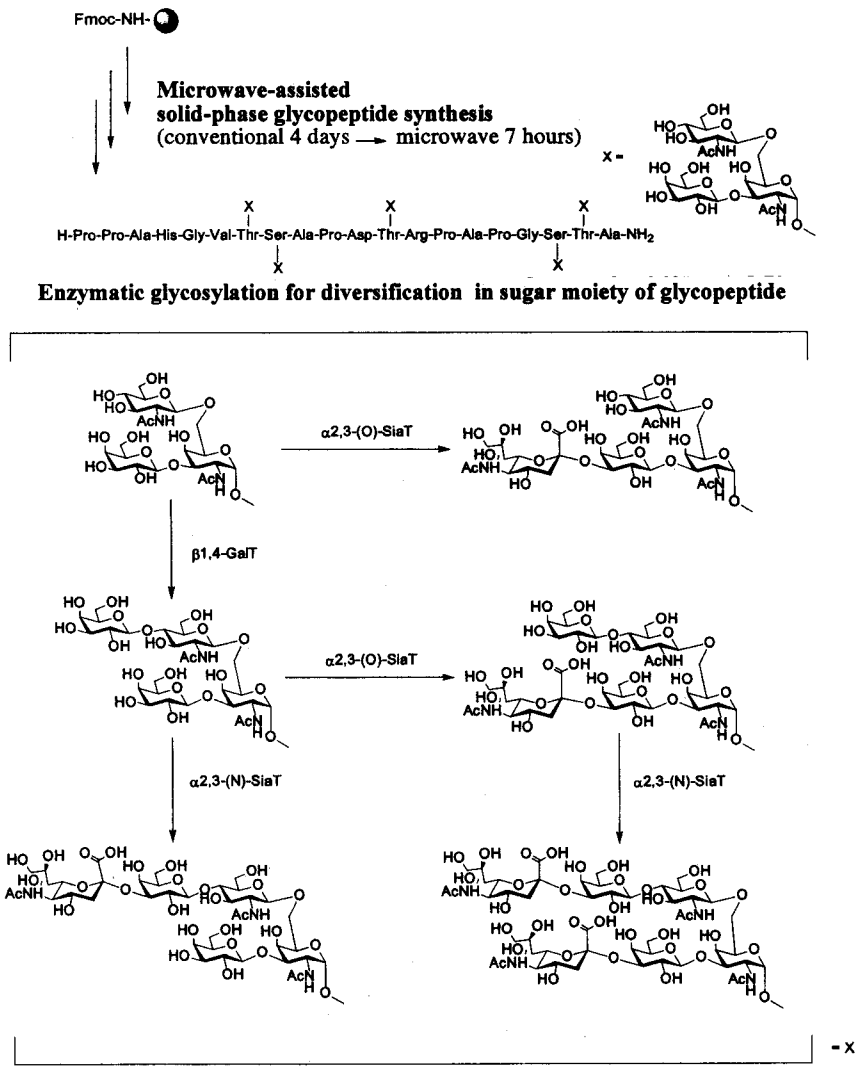
学位論文内容の要旨

生体内において糖鎖はその大半がタンパク質や脂質などと結合した複合糖質として存在しており、生体内の情報伝達やタンパク質の品質管理、構造安定化やタンパク質輸送のための標識など、多種多様な高次機能と密接に関わっていることが明らかになってきた。しかし、糖鎖は生体内において微細構造が不均一な一群の化合物として存在しているために単一な試料を得ることが大変難しく、また微量にしか存在しないことから複合糖質の研究には困難がつきまとってきた。今後、複合糖質の機能と構造の関係を詳細に研究し、医薬品等の応用分野へと活用していくためには、糖タンパク質の部分構造である糖ペプチドを化学合成によって均一かつ純粋な試料として十分量調達する必要がある。糖ペプチド分子は糖鎖とペプチドの双方が複雑かつ多様性に富んでいるためにそれらの合成は非常に難しいものであり、従来の合成法では多大な労力と時間を強いられる。このようなことから糖ペプチド試料の迅速かつ効率的な合成法の開発が期待されている。

糖ペプチドの一般的な合成法としては、糖アミノ酸を原料として用いる固相合成法が挙げられる。糖アミノ酸の化学合成は多段階の工程数を経るために量的確保が難しいこともあり小過剰での使用が望まれる。しかし、糖ペプチド固相合成は糖アミノ酸の立体障害による反応率および反応速度低下を防ぐ目的で大過剰の糖アミノ酸を使用しなければならず、また反応時間も延長して行われるが、反応時間の延長はラセミ化などの副反応も導いてしまうことから、新たな反応促進の手段が求められていた。そこで本研究では近年種々の化学反応促進の手段として盛んに利用されてきているマイクロ波合成を利用することで従来の固相合成の問題点を解決する新規糖ペプチド合成法の開発を目指し、その手法を用いて有用糖ペプチド化合物群を迅速かつ効率的に調製することを目的とした。

まずモデル実験として、コア 2 構造と呼ばれる分岐型 3 糖を有する Fmoc-糖アミノ酸を選択し、その固相上縮合反応を通常条件下とマイクロ波照射下にて比較した。その結果、マイクロ波照射下では立体障害の大きさにも関わらず反応が 20 分で定量的に進行することを見出した。さらに実際の糖ペプチド固相合成へのマイクロ波照射の効果を検討するため、ムチン型糖タンパク質 MUC 1 に含まれる反復配列単位である 20 アミノ酸残基からなる糖ペプチ

ドを目的分子としてマイクロ波固相合成を試みた。このMUC1糖タンパク質は主に上皮細胞の膜結合タンパク質として存在しており、O－結合型糖鎖を多数含む反復配列を有している。それらは細胞間認識や細菌、ウイルス、毒、タンパク質分解からの保護といった重要な役目を担っている。コア２分岐型糖鎖の形成は正常型ムチンのO-結合型糖鎖伸長の鍵となるステップであり、コア２分岐が形成されることによりポリラクトサミン鎖のような複雑な糖鎖が付加され、成熟したムチンへと導かれることが知られている。一方コア２分岐が形成されないときはコア１糖鎖構造を経て抗原性をもつ糖鎖が優位に発現され、それらは細胞間の接着を阻害し、炎症や癌の転移などに関わっていると推定されている。そこでMUC1糖タンパク質の機能変化の分岐点となり、これらの発現機構や機能解明のツールとして有用性の高いコア２糖鎖を配列内５箇所に有した難易度の高い分子を目的化合物としてデザインした。構造の複雑さから合成困難が予想されたが、マイクロ波照射下では糖ペプチド固相合成は効率よく進行し、非照射下による実験と比較して明らかな固相合成反応効率の向上が確認された。特に反応速度に関しては大幅な向上がみられ、合成所要時間は従来法と比較して約４日から７時間へと大幅に短縮されることが明らかになった。以上のようにマイクロ波照射下において迅速かつ効率的に合成されたMUC１糖ペプチドに対し、続いて種々の糖転移酵素およびそれぞれに対応した糖ヌクレオチドを用いて逐次的に糖鎖伸長反応を行った。これらの酵素反応により、糖鎖構造の異なる計６種類のMUC１糖ペプチド群の効率的な調製を達成した。



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
副　査　　教　授　　河　野　敬　一
副　査　　助教授　　門　出　健　次

学位論文題名

Studies on chemoenzymatic syntheses of highly *O*-glycosylated mucin-type glycopeptides assisted by microwave irradiation

（マイクロ波を利用した高度 *O*－グリコシル化ムチン型糖ペプチドの酵素・化学的合成に関する研究）

本研究において著者は、現状の糖ペプチド合成において課題となっている反応速度および反応率の向上と合成の簡便化を目的とした糖ペプチド合成法に関する研究を行った。その中で、マイクロ波を利用した化学合成法と糖転移酵素を利用した酵素合成法の組み合わせによる新規糖ペプチド合成法を確立し、難合成糖ペプチド分子の迅速合成およびその効率的ライブラリ化を達成することで本合成法の有用性を示している。学位論文審査を行った結果、著者は学位を授与される資格があるものと評価できるものであった。

第１章では、研究背景として糖ペプチド合成研究の意義、合成法の発展経緯および現状の合成法における問題点について述べている。この分野において広範な知識を身につけており、現状の問題点を把握して研究の動機付けを明確に行なっていることが評価できる。

第２章では、マイクロ波を利用した糖ペプチドの化学合成について述べている。近年種々の化学反応促進の手段として盛んに利用されてきているマイクロ波技術に着目し、マイクロ波の糖ペプチド固相合成への適用およびその効果の検討を行っている。まず、マイクロ波の照射によって立体障害の大きい糖アミノ酸の固相上縮合反応が促進され、反応速度、

反応率ともに向上することを見出している。また、実際の糖ペプチド固相合成においても同様にマイクロ波照射が有効であり、従来法と比べて約10分の1の反応時間で難合成糖ペプチド分子の構築を達成している。さらに、反応条件の改善を行うことにより高純度でこのモデル分子を合成することに成功している。問題解決に向けたアプローチを持っており、それらを適切な実験系を設計して検討を行い、的確な分析と考察を施すことで解決へと導いていることが評価できる。

第3章では、糖転移酵素を利用した酵素合成による糖ペプチドのライブラリ化について述べている。第2章にて合成したモデル糖ペプチドに対して3種類の糖転移酵素を組み合わせて連続的に反応させることにより、温和な条件下における簡便な糖ペプチドのライブラリ化を達成している。予備実験において、酵素反応に用いた3種類の糖転移酵素のうち1種類において反応が進行せず、反応条件を再設定することで酵素反応を進行させることに成功しており、独自で問題を解決する能力を身に付けたものと評価できる。

第4章は、第1章から第3章までの総括およびこれからの展望について述べている。

今後、本研究成果は糖ペプチドおよび糖タンパク質の生物学的機能解明を促進するだけではなく、機能性糖ペプチド分子の迅速探索、種々の疾患に対する診断、治療薬、ワクチン等への応用に発展する可能性もあることから、科学・技術的な面のみならず社会的な面での波及効果も十分に期待できる。

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。