



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Chemoenzymatic Synthesis of Multivalent Glycomolecules and Their Biological Functions( 内容・審査結果の要旨(Summary) )
Author(s)	戸谷, 一英
Report No.(Doctoral Degree)	博士(農学) 甲第273号
Issue Date	2002-03-13
Type	博士論文
Version	
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2614">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2614</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名(本国籍)	戸谷一英 (大阪府)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第273号
学位授与年月日	平成14年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	Chemoenzymatic Synthesis of Multivalent Glycomolecules and Their Biological Functions (多価糖鎖分子の酵素化学合成および生物学的機能に関する研究)
審査委員会	主査 静岡大学 教授 碓氷 泰市 副査 静岡大学 教授 河岸 洋和 副査 岐阜大学 教授 加藤 宏治 副査 信州大学 教授 細野 明義

### 論文の内容の要旨

細胞表面に存在する糖蛋白質や糖脂質の糖鎖は、分化や接着など細胞間相互作用において重要な役割を演じている。我々の目的は、糖蛋白質や糖脂質をミミック(模倣)する分子認識素子の合成にある。今回、以下に示す4つのサブテーマで検討を行った。

#### 1. *Trichoderma reesei* セルラーゼによるスフィンゴ糖脂質ミミックとしてのアルキルラクトシドの合成 (*Arch. Biochem. Biophys.* 385, 70-77, 2001)

ラクトース(Lac)及び *N*-アセチルラクトサミン(LacNAc)は糖脂質・糖蛋白質糖鎖の基本単位であり、特に長鎖(C<sub>12</sub>)アルキルラクトシドは細胞による糖鎖合成のプライマーとして知られている。今回、*T. reesei*の産生するセルラーゼ粗酵素中に見出されたLac及びLacNAc転移活性を用いて、ラクトシルセラミドのミミックとなるアルキルラクトシドや、LacNAcオリゴ糖の酵素合成を行った。酵素源として市販セルラーゼ粗酵素、供与体基質として *p*-ニトロフェニルβ-ラクトシド(Lacβ-*p*NP)及びβ-*N*-アセチルラクトサミニド(LacNAcβ-*p*NP)、受容体基質として1-アルカノール(C<sub>2</sub> ~ C<sub>12</sub>)及び各種単糖を用いて転移反応を行い、TLC、HPAEC-PADにて分析した。転移生成物はシリカゲルあるいは活性炭カラムで単離しNMR等で構造決定した。本糖転移反応により、アルキルラクトシドや *N*-型糖鎖側鎖単位の一段

階合成が可能であった。アルカノールを受容体とした場合、Lac 及び LacNAc の転移が認められたが、受容体のアルキル鎖が長くなるにつれて転移効率が著しく低下した。この点は反応系への界面活性剤(コール酸 Na)添加によって改善され、オクチル及びドデシル $\beta$ -ラクトシドが、それぞれ収率 13%及び 5% (供与体ベース)で合成可能となった。単糖を受容体とした場合、グルコースやマンノースの 4 位の OH への転移が認められ、LacNAc $\beta$ -pNP を供与体としたマンノースへの転移生成物は N-型糖鎖のアンテナリー構造に存在する Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4Man であった(収率 13%)。また、転移活性の本体を明らかにするために Lac 転移活性を DEAE-セファロースにて 3 分画し、このうち 1 画分から各種クロマトにて Lac $\beta$ -及び LacNAc $\beta$ -pNP 水解活性を併せ持つ均一な画分を得た。分子量、等電点、基質特異性、基質競合阻害試験の結果から本酵素はエンド型セルラーゼの一種と推測した。

## 2. 糖転移酵素による Le<sup>x</sup> オリゴ糖及び配糖体の実践的合成法の開発 (Biosci. Biotechnol. Biochem., in press)

血液型糖鎖抗原の一種として知られ細胞の分化や接着に関与する Le<sup>x</sup> 関連抗原の合成を行った。市販の組み換え $\alpha$ 1,3-フコシルトランスフェラーゼを使用して、糖供与体として GDP-フコース、添加剤として BSA、Triton X-100 を加えることにより、受容体基質 LacNAc、LacNAc $\beta$ -pNP、LNnT (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc)へのフコシル転移反応は位置選択的かつ定量的に進行し、全て転移生成物 Le<sup>x</sup>、Le<sup>x</sup> $\beta$ -pNP、LNFP III [Gal $\beta$ 1-4 (Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc]に変換した。さらに、安価な酵素源を求めて動物血清より $\alpha$ 1,3-フコシルトランスフェラーゼをスクリーニングしたところ、ニワトリ血清中に最も高い $\alpha$ 1,3-フコシルトランスフェラーゼ活性を認めた。しかしながら、血清中に共存する加水分解酵素により転移生成物の生成が阻害されたので、これらをフェニル-セファロースにより除去したところ、目的酵素の比活性が上昇し本部分精製酵素による Le<sup>x</sup> オリゴ糖の合成が可能であった。

## 3. 多価性 Le<sup>x</sup> 単位含有人工糖鎖ペプチドの酵素・化学合成とレクチン相互作用における糖クラスター効果

様々な糖鎖置換度(DS)および分子量(MW)で LacNAc を多価性に含有するポリ $\alpha$ -L-グルタミン酸骨格の人工糖鎖ペプチドを酵素・化学的に合成し、 $\alpha$ 1,3-フコシルトランスフェラーゼにより多価性 Le<sup>x</sup> 含有人工糖鎖ペプチドに変換した。これら糖鎖ペプチドとレクチン(ヒマヤマ RCA120 およびヒイロチャワンタケ AAL)の相互作用における親和性増幅作用について表面プラズモン共鳴法により検討した。LacNAc 糖鎖ペプチドと RCA120 の親和性は糖鎖ペプチドの DS (5 ~ 60%)および MW (28 ~ 159 kDa)の増加につれてゆっくり増大し(K<sub>D</sub> ~ 10<sup>-7</sup>)、LacNAc モノマー化合物のそれ(K<sub>D</sub> 10<sup>-4</sup> ~ 10<sup>-3</sup>)と比較すると約 1000 倍の増幅であった。対照的に、AAL と Le<sup>x</sup> 糖鎖ペプチドの間には DS や MW によらず強い親和性(K<sub>D</sub> ~ 10<sup>-8</sup>)が観察され、Le<sup>x</sup> モノマー化合物(K<sub>D</sub> ~ 10<sup>-3</sup>)から約 100,000 倍の増幅であった。この様に、糖クラスター効果に対する感受性はレクチン間で異なり、それ故、最大の親和性で糖結合

蛋白質と相互作用するような多価性糖鎖プローブを設計することが重要と結論した。

#### 4. 多価性シアリルオリゴ糖鎖を有する人工糖鎖ペプチドの酵素・化学合成と糖鎖構造特異的インフルエンザウイルス感染阻害

インフルエンザウイルス(A及びB型)はウイルス膜上のヘマグルチニン(HA)が宿主細胞膜上のシアロ糖鎖を受容体として結合し感染する。我々はムチン様シアロ糖蛋白質がインフルエンザウイルスを阻害することに着目し、ムチンをミミックする人工糖鎖ペプチド(neoglycopeptides)の構築を試みた。酵素的に合成した *p*-ニトロフェニル二糖配糖体をポリ $\alpha$ -L-グルタミン酸(DP, 95 ~ 475; MW, 14 ~ 72 kDa)に導入後、シアリルトランスフェラーゼによりシアリル化し、糖蛋白質糖鎖の非還元末端シアリル 3 糖構造 [Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -, Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -, および Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -]をそれぞれ多価性に含有する各種人工糖鎖ペプチド(MW 30 ~ 310 kDa, 糖鎖置換度 DS 22~62%)を合成した。次に、これら人工糖鎖ペプチドを用いてインフルエンザウイルス阻害試験を行い、糖鎖ペプチドが有する SA 結合様式・糖鎖構造・糖鎖置換度(SA 含有量)・分子量と、ウイルス阻害力の関係を検討した。固相化したフェツインへのウイルス結合阻害試験(ELISA 法)および MDCK 細胞へのウイルス感染中和試験(LDH 法)において、人工糖鎖ペプチドは各ウイルス亜型の SA 結合特性に従ったウイルス阻害パターンを示した[A/PR/8/34 (H1N1),  $\alpha$ 2,3 $\gg$  $\alpha$ 2,6; A/Memphis/1/71 (H3N2),  $\alpha$ 2,6 $\gg$  $\alpha$ 2,3; B/Lee/40,  $\alpha$ 2,6 $\gg$  $\alpha$ 2,3; B/Gifu/2/73,  $\alpha$ 2,6 $\approx$  $\alpha$ 2,3]。MDCK 細胞への感染における糖鎖ペプチドの IC<sub>50</sub>は、溶液中のシアロ酸濃度に換算しておよそ 10<sup>-6</sup> M であった。また、各ウイルスは SA 結合様式だけでなくコアの糖鎖構造に対する特異性が異なることが明らかになった。全体的にウイルス中和活性は人工糖鎖ペプチドの分子量(MW)と糖鎖置換度(DS)の増加とともに著しく増大した。対照として合成したポリアクリルアミド型糖鎖ポリマーはウイルスの SA 結合特異性をより厳密に反映しており、PGA ベースの上記人工糖鎖ペプチドとは異なるウイルス感染阻止パターンを示した。

### 審査結果の要旨

本論文は、複合糖質のオリゴ糖鎖を分子認識素子と見なし脂質やポリペプチドに組み込むための結合技術の新技术を開拓し、人工糖脂質や人工糖タンパク質を分子設計している。これら分子は細胞の顔となっている複合糖質の機能性糖鎖の形態をミミック(模倣)したものであり、生物機能性材料(バイオミメティックマテリアル)としてその有用性を実証した成果をまとめている。その内容は次のように要約される。

緒論に続き第一章では、微生物起源である *Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼを触媒素子として、スフィンゴ糖脂質をミミックした一連のアルキルラクトシドの酵素

合成法を確立している。本法はセルラーゼがラクトースや *N*-アセチルラクトサミン二糖単位を 1-アルカノール ( $n=2\sim 12$ ) 受容体の短鎖から長鎖まで糖転移させる画期的な結合手法を開拓したものである。本酵素はまた *N*-アセチルラクトサミン単位をマンノースへ高位置選択的に糖転移させる活性も有しており、その結果糖タンパク質に存在する 4-*O*- $\beta$ -*N*-アセチルラクトサミニル-マンノース三糖の合成も可能にした。このように本来ラクトースや *N*-アセチルラクトサミン二糖単位は糖脂質や糖タンパク質糖鎖のコア単位であるので、本法が開発されたことにより、より天然に近い人工複合糖質の分子設計が可能となっている。

第二章では目的とする人工複合糖質を構築するうえで重要なオリゴ糖鎖として知られる  $Le^x$  オリゴ糖鎖単位 [Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ -] の実践的酵素合成法を確立している。本糖鎖単位は細胞の分化や接着に関与し生化学的にも極めて重要な単位となっている。そこで市販の組み換え体 $\alpha$ 1,3-フコシルトランスフェラーゼを活用し、*N*-アセチルラクトサミンの OH-3 位に位置選択的にフコースを転移させる合成法を確立した。さらに酵素起源としてより安価に入手可能なニワトリ血清中に $\alpha$ 1,3-フコシルトランスフェラーゼ活性の存在を見出し、本活性を利用しても  $Le^x$  オリゴ糖鎖の合成が可能であることを実証している。

第三章では前章で合成した  $Le^x$  オリゴ糖鎖を分子認識素子としてポリグルタミン酸主鎖に側鎖として組み込んだ人工糖鎖ポリペプチドの実に汎用性の高い結合手法を開発している。その結果、糖鎖置換度や分子量は自在に制御可能であり、目的とする  $Le^x$  単位を多価性に含有する人工糖鎖ポリペプチドの合成に成功した。その多価性糖鎖ポリペプチドとレクチンとの相互作用を表面プラズモン共鳴法で解析すると、親和性は糖鎖置換度と分子量の増大に大きく依存していることを実証した。この成果は、天然の糖タンパク質を超える糖鎖プローブの設計に大いに役立つものである。

第四章では、ムチン様シアロ糖タンパク質がインフルエンザウイルスを阻害することに着目し、ムチンをミミックするシアリル三糖構造を多価性に含有するシアリルオリゴ糖鎖置換型人工糖鎖ポリペプチドを前章と同様な結合手法により酵素・化学的手法に基づいて合成した。本糖鎖ペプチドは各種インフルエンザウイルス株のシアリル酸結合特性に従った結合能(阻害力、中和力)を示しその活性は糖鎖置換度と分子量の増加に従い著しく増大した。以上の結果、ポリペプチド上に多価性のシアリル糖鎖を結合させることは本ウイルス捕捉剤を分子設計する上で必須条件となることを明らかにした。

このように本論分は糖鎖を脂質やポリペプチドと直接結合させる汎用性に富む結合手法を開拓することで、人工糖脂質や人工糖ポリペプチドといった複合糖質のミミ

ックとも言える糖鎖分子集合体の構築法に成功している。特に糖鎖ポリペプチドは糖鎖プローブとなるばかりかインフルエンザ捕捉剤としての生物機能性材料として極めて有用であることが実証され、応用面への展開も含めその内容は高く評価できる。

以上本論文審査会は提出論文並びに基本となる学術論文等について慎重に審議し、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと判断した。

[基礎となる学術論文]

1. Enzymatic Synthesis of Aliphatic  $\beta$ -Lactosides as Mimic Units of Glycosphingolipids by Use of *Trichoderma reesei* Cellulase.  
Totani K., Yasutake N., Ohi H., Murata T., and Usui T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **385** (1), 70 – 77 (2001)
2. Enzymatic Synthesis of Oligosaccharide Containing Le<sup>x</sup> Unit by Using Partially Purified Chicken Serum.  
Totani K., Shimizu K., Harada Y., Murata T., and Usui T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66** (3) (2002), in press.

[参考資料]

1. 微生物感染に一役買う $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖  
戸谷一英, 化学と生物, 37 (10), 674-675 (1999)