博 士 学 位 論 文 審 査 要 旨

学位申請者氏名	碓井　瑠智雄
論　文　題　目	合成化学的手法を基盤とした高マンノース型糖鎖の構造多様性に関する研究
審査委員（職名・氏名・印）	
主　　査	教　授　　戸谷　希一郎
審査委員	教　授　　久富　寿
	教　授　　横山　明弘
	教　授　　松尾　一郎（群馬大学 理工学部）
論文審査結果（合　否）	合　格

論文審査の要旨

本論文は、タンパク質上で生命機能を制御する高マンノース型糖鎖の分岐鎖多様性と配座多様性に焦点を当て、[1] 合成化学的に構築が困難な多様な分岐糖鎖構造の簡便な構築法の開発、[2] 合成した多様な分岐糖鎖サンプルのレクチン特異性解析への応用、[3] 糖鎖の多様な配座の一種である折り畳み配座の安定化に寄与する要因の解明、に関する研究成果をまとめたものである。本論文は６章で構成され、第１章に緒論、第２章～第４章に研究成果、第５章に総括、第６章に実験編を記載している。

高マンノース型糖鎖はがん細胞表面に高発現し、また免疫応答の標的としても機能する。さらにウイルス表面にも高発現し、その感染機構に関与するため、高マンノース型糖鎖を標的とした治療戦略にも注目が集まっている。一方、細胞内ではタンパク質に対する代表的な翻訳後修飾として高マンノース型糖鎖の付加が知られており、本糖鎖は新生糖タンパク質のフォールディング／分泌／分解を制御するシグナルとして糖タンパク質品質管理機構を担っている。このように高マンノース型糖鎖は、糖タンパク質の機能獲得の根幹を担うばかりでなく、多様な疾患の診断や治療の標的にもなりうるため、その機能研究は学術的意義に加え、疾患診断／治療薬の開発など工学的成果にも繋がる重要課題である。しかしながら、高マンノース型糖鎖は分岐構造の多様性と、コア構造周辺における配座的多様性の双方が複雑に組合わさることで、体系的な解析と機能の理解が困難である。さらに多様かつ複雑な分岐構造を有する高マンノース型糖鎖群には、研究対象となる糖鎖サンプルの入手にも困難が伴う。糖鎖生合成はセントラルドグマに含まれないため、糖鎖サンプルは分子生物学的な調製が不可能である。そこで一般的に糖鎖サンプルは「生物試料からの抽出法」、「化学酵素的合成法」および「化学合成法」によって供給されている。しかしながら各方法は、供給糖鎖種の限定、合成スケールの限定、合成工程の煩雑さ、という問題点を抱えている。本論文は合成化学的な手法に立脚して、多様な高マンノース型分岐糖鎖の簡便な合成手法を確立し、本手法で調製した多様な分岐糖鎖をレクチン特異性解析に応用してその実用性を実証し、さらに高マンノース型糖鎖が有する配座多様性の要因についても検証することにより、高マンノース型糖鎖の研究基盤と機能理解を大きく進展させるものである。以下に本論文の構成と各章の詳細な内容を記す。

論文審査の要旨（続）

第１章「緒論」

まず、高マンノース型糖鎖の構造的特徴について概説し、とくに本糖鎖が分岐鎖構造に多様性を有する点と、分岐鎖が伸長した配座と折り畳まれた配座の両方を取りうる配座多様性を有する点について強調して説明している。続いて高マンノース型糖鎖を研究サンプルとして入手する一般的な方法として、「生物試料からの抽出法」、「化学酵素的合成法」および「化学合成法」について紹介し、高マンノース型糖鎖研究を加速する上で、いずれの方法にも一長一短があり簡便かつ十分量の糖鎖サンプル供給に適う理想的な方法が未開発である現状の課題を提起している。さらに高マンノース型糖鎖の生物学的機能を概説し、とくにがん細胞、免疫応答、ウイルス感染および糖タンパク質品質管理との関わりについて説明することで、本糖鎖が生命科学分野において重要な研究対象である点を強調している。最後に本研究の目的が 高マンノース型糖鎖の構造多様性の意義の解明であることを述べ、とくに本論文が [1] 高マンノース型糖鎖の研究基盤となる多様な分岐糖鎖を簡便に調製する化学合成手法の開発、[2] 合成した高マンノース型分岐糖鎖を用いたレクチン認識における分岐特異性解析、および [3] 高マンノース型糖鎖の配座多様性に寄与する折りたたみ配座の安定化要因の解明、に関する成果をまとめたものである点を説明している。

第２章「高マンノース型糖鎖の化学合成における部分的グリコシル化法の開発」

本章では、高マンノース型糖鎖の多様な分岐構造群を簡便に入手する手法として、共通の糖受容体に対するワンポット部分的グリコシル化法を開発した。種々の条件検討の結果、本手法は反応に用いる糖供与体の当量数を調節することにより、部分的糖鎖伸長反応を再現性よく達成できることを見出した。これにより、ひとつの反応容器内に４種類の分岐糖鎖を同時に生成できる簡便な合成手法の開発に成功した。また反応系内に混合物として生ずる４種類の分岐糖鎖の精製においては、２本のカラムを連結した中圧分取液体クロマトグラフィー法により、一段階での精製を達成した。また、得られた分岐異性体の構造決定には、2D-HMBC NMR 測定の活用が有効であることを明らかにした。以上により従来の各分岐糖鎖を個別に化学合成する手法と比較して、工程数の大幅な削減に成功した。本合成手法は、高マンノース型糖鎖の多様な分岐構造の迅速な供給を可能にし、分岐異性体レベルでの詳細な機能解析への貢献が期待される。

第３章「抗ウイルス性レクチンに対する高マンノース型糖鎖の分岐鎖特異性解析」

本章では、前章で合成した一連の高マンノース型分岐鎖を活用し、抗ウイルス性植物レクチン GNL の複数の結合ポケットに対する分岐糖鎖の結合特異性解析を行った。その結果、分岐異性体 **Pre-M8B** および **Pre-M8C** に対する GNL の顕著な結合能の違いが観察された。従来、GNL に対する糖鎖特異性には、糖鎖の構成糖残基数が深く関与すると報告されていたが、本研究によって、GNL は多様な高マンノース型糖鎖構造に対して、糖残基数の違いよりも分岐パターンの違いを優先して認識する分岐鎖特異性を有することを初めて見出した。本研究により、多様な分岐構造を有する化学合成糖鎖群の研究サンプルとして活用が、高マンノース型糖鎖の機能解明に有用であることが実証された。

第４章「高マンノース型糖鎖分岐鎖の折り畳み配座に関する安定化要因の解析」

本章では、高マンノース型糖鎖のコア構造における *N*-Ac 基の、折り畳み配座安定化への役割を

論文審査の要旨（続）

解明すべく、**$Man_3GlcNAc_2$** とその模倣体 **Man_3Glc_2** を化学合成し、NMR 解析および分子動力学 (MD) シミュレーションによる統合的な立体配座解析を実施した。NMR 解析の結果、**$Man_3GlcNAc_2$** では α(1→6)Man 分岐鎖が深く折り畳まれた配座をとるのに対し、*N*-Ac 基を OH 基に変換した **Man_3Glc_2** は開放的で緩やかに折り畳まれた配座を示すことが初めて実験的に証明された。また MD 計算により、*N*-Ac 基に由来する局所的な剛直性と双極子相互作用がコア糖鎖配座を緻密に制御し、糖鎖全体の深い折り畳みを誘起・安定化させていることが理論的に裏付けられた。以上の結果から、*N*-Ac 基は糖鎖全体の配座を支配する不可欠な構造的決定因子であると結論づけられた。*N*-Ac 基の存在によって安定化される折り畳み配座は、レクチンが糖鎖と結合する際の分岐鎖の初期認識プロセスを制御する可能性を有するため、レクチン相互作用のメカニズム解析に新しい洞察を与えるものである。本研究で合成した **Man_3Glc_2** は、折り畳み配座が不安定化した極めて有用なモデル糖鎖であり、今後は実験および計算の両面から、レクチン親和性解析等への応用が期待される。

第５章「総括」

ここでは第２章、第３章および第４章で得られた成果をまとめ、多様な高マンノース型糖鎖分岐鎖のワンポット合成法の確立、合成した多様な分岐糖鎖を活用した GNL レクチンにおける分岐鎖特異性の解明と、高マンノース型糖鎖における折り畳み配座の安定化要因の特定に成功したと結論している。

第６章「実験編」

ここでは本研究に関わる糖鎖化学合成、レクチン特異性解析、NMR による糖鎖配座解析、MD シミュレーションによる糖鎖配座解析などの実験手法について紹介している。

以上を要約すると、本論文は疾患発症や免疫応答、糖タンパク質品質管理などに寄与する高マンノース型糖鎖の構造多様性に関して、合成化学的な手法を基盤として研究した成果をまとめたものである。その結果、これまで未達成であった多様な糖鎖分岐鎖の簡便なワンポット合成法の開発を通して、高マンノース型糖鎖研究基盤の確立に成功している。また開発した手法によって合成した分岐糖鎖群を活用して、抗ウイルス性の GNL レクチンが有する高マンノース型糖鎖の分岐パターンの違いを識別する分岐鎖特異性を初めて明らかにし、分岐糖鎖サンプル群の有用性を実証している。さらに高マンノース型糖鎖が有する多様な立体配座の一種である特有の折り畳み配座が、コア糖鎖構造中の *N*-Ac 基によって安定化されることを、合成化学的に調製した糖鎖サンプルを用いた NMR 解析と MD シミュレーションを組み合わせて証明している。これらの成果はタンパク質上の主要な糖鎖修飾の一種である高マンノース型糖鎖が有する構造多様性に対するあらたな研究基盤と学理の創出に加え、本糖鎖が関与するがんやウイルス感染、アルツハイマー病やパーキンソン病に代表されるタンパク質フォールディング病の診断や治療に有用な糖鎖関連医薬の開発基盤を提供するものであり、その理工学的意義は極めて大きい。よって、本審査委員会は本論文を博士（理工学）の学位に値するものと認める。なお、これらの成果は申請者が筆頭著者となる２編の学術論文としてまとめられ、いずれも国際学術雑誌に掲載されている。とくに、そのうち１編は、論文審査委員に高く評価され「Supplementary Cover」に選出されたことを付記する。

（以　上）