

学位論文の要旨

氏名

杜若 祐平

学位論文題目

デルマタン硫酸部分構造の系統的合成に関する研究

本論文は、デルマタン硫酸（DS）に含まれる多様な二糖部分構造の系統的合成法を確立するため、鍵となる単糖成分であるウロン酸の新規合成法の開発、DSの多様な構造に誘導できる三糖中間体の効率的合成法の開発、三糖中間体からのDS部分構造を有する硫酸化糖鎖の合成、ならびに調製したDS部分二糖構造の相互作用解析について述べられている。

第一章では、序論として本研究の意義と合成経路の概略について述べる。

DSはグリコサミノグリカン（GAG）の代表的な糖鎖であり、タンパク質に結合したプロテオグリカン（DS-PG）として細胞外マトリックスや細胞表面に存在している。DS糖鎖は、成長因子等の様々な高生理活性タンパク質と相互作用し、それらの機能を調節していると考えられており、DS構造と機能に関する研究が非常に注目されている。しかしながら、DS糖鎖は生合成過程において基本骨格高分子多糖が形成された後に、エピ化、硫酸化等の酵素修飾を不均一に受けるため、多様な糖鎖・硫酸化パターンを有しており、DSの構造活性相関を明らかにすることは非常に困難である。そこで本研究では、DSの構造活性相関解析を行うことを目指し、構造が均一で、かつ明確な糖鎖構造を、合成化学的手法により調製し、調製した糖鎖を用いてDS結合性タンパク質との相互作用解析について検討することにした。

一方、DSの部分構造を有するオリゴ糖鎖の合成研究は、これまでも精力的に行われているが、DSの二糖構造を系統的かつ効率よく合成する手法はほとんど知られていない。そこで本研究では、DSの二糖構造であるイズロン酸-ガラクトサミン配列において考えられる16種類の糖鎖・硫酸化パターンを系統的に合成できる三糖中間体を設計した。設計した三糖中間体の高効率的合成を達成するためには、イズロン酸成分の合成法が鍵であり、新規合成法を開発することによって、二糖中間体の効率的合成を達成した。次に、調製した二糖中間体を用いて、糖鎖リガンド複合体の合成について検討し、糖鎖・硫酸化パターンの異なるDS二糖部分構造が合成できることが分かった。また、調製したDS部分二糖構造を用いてシュガーチップを作製し、DS結合性タンパク質との相互作用を、表面プラズモン共鳴（SPR）センサーによって解析した。

第二章では、効率的なイズロン酸成分の合成について述べる。

DSの構成成分であるイズロン酸は、酸性糖であるため中性糖に比べて反応の制約を受けるため、使用できる保護基が制限される。DS部分構造を効率よく調製するには、このイズロン酸成分の合成が重要であるため、本研究では、これまでの合成法に比べ様々な保護基を用いる事によってイズロン酸成分を調製することができた。

第三章では、DS の二糖部分構造において想定されるすべての硫酸化パターンを構築できる、多分岐能を有する二糖中間体の合成について述べる。

DS のオリゴ糖合成において、糖鎖・硫酸化パターンを系統的に合成できる中間体はほとんど知られていない。本研究では、ガラクトサミン成分上の保護基の最適化を行った後、先に合成したイズロン酸成分とグリコシル化を行い、DS 二糖部分構造において想定されるすべての硫酸化パターンが構築できる、多分岐能を有する三糖中間体を合成した。

第四章では、DS 二糖部分構造を有する糖鎖リガンド複合体の合成について述べる。

調製した二糖中間体を用いて、糖鎖のチップ化ならびに相互作用解析が容易に行える糖鎖リガンド複合体への誘導を行った。まず二糖中間体上の保護基の除去および硫酸化について検討したところ、導入した保護基の選択的除去が可能であることが分かった。そして様々な構造を含む糖鎖リガンド複合体の合成を行うことができた。

第五章では、調製した糖鎖リガンド複合体のシュガーチップ化および SPR センサーを用いた糖鎖-タンパク質相互作用解析について述べる。

まず調製した糖鎖リガンド複合体のシュガーチップ化を行った。シュガーチップの作製は、既報の方法に従って行った。すなわち糖鎖水溶液に金チップを浸漬し、リガンド複合体の固定化を行った。その後、金チップを糖鎖水溶液から取り出し、洗浄、乾燥させることによって調製した。タンパク質との相互作用解析には、DS 結合性タンパク質であるフィブロネクチンとを用いた。フィブロネクチンにおいては、これまでの研究から、硫酸化度の高い構造において相互作用が見られ、カルボン酸や硫酸基のようなアニオン成分による静電的相互作用が重要であると考えられた。

第六章では、本研究の総括を述べる。

本研究では、DS 部分構造の合成素子として重要なイズロン酸成分の合成についてまず取り組んだ。その結果、イズロン酸成分の短段階合成ルートを確立することができた。また、調製したイズロン酸成分と、保護基の最適化を行ったガラクトサミン成分とのグリコシル化を行って、三糖中間体へ誘導することができた。調製した三糖中間体は、DS の二糖部分構造において予想されるすべてのパターンを構築できる多分岐能を有する。実際、調製した二糖中間体を用いて、9 種類の構造を含む三糖体の合成を行ったところ、選択的な保護基の除去および硫酸化を行うことができた。また、最終の脱保護においても硫酸基等を損なうことなく硫酸化三糖に誘導することができた。またシュガーチップ化についても検討したところ、これまで通りチップ化を行うことができた。

作製したシュガーチップを用いた SPR センサーによる GAG 結合性のタンパク質との相互作用解析では、フィブロネクチンとの相互作用には糖鎖・硫酸化パターンや硫酸化度が相互作用に非常に重要であることが示唆され、今後、解析ツールとしての応用が期待できる。

今後、合成した二糖中間体から、DS 鎖上に存在するすべての糖鎖・硫酸化パターンを構築することによって DS と DS 結合性タンパク質やウイルスなどの DS 結合性分子との詳細な構造活性相関解析が行えるものと考えている。また創薬候補になる化合物が見出されることも期待できる。

第七章では、実験方法について述べる。

合成したすべての化合物の合成法と構造解析について記載した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Study on the Systematic Synthesis of Dermatan Sulfate Partial Structures

Name: KAKITSUBATA Yuhei

DS is a highly sulfated polysaccharide belonging to glycosaminoglycan, and commonly found in cell surface and extracellular matrix components. DS is known to regulate biological functions thorough the interaction with various biomolecules, such as growth factors, cell surface receptors, extracellular proteins, and so on. Although DS is basically composed of iduronic acid (IdoA)-*N*-acetyl galactosamin (GalNAc) disaccharide repeating unit, the structure of DS is very heterogeneous because of suffering random enzymatic modification. Recently, the specific structure in DS is considered to be responsible for the specific interaction with target proteins, and the elucidation of structure-activity relationship of DS becomes an important issue. However, since structurally defined DS oligosaccharides are difficult to obtain from the natural source, the supply by organic synthesis is strongly desired. In this study, novel synthesis of DS trisaccharide intermediate diverging for sulfation patterns, and interaction analysis between synthesized DS disaccharide structures and DS-binding protein or viruses were examined.

IdoA moiety was efficiently prepared from glucose. DS trisaccharide intermediate was obtained by glycosylation of IdoA moiety, GalNAc moiety, and glucose moiety. Obtained DS trisaccharide intermediate was transformed to appropriate ligand conjugates by means of orthogonal deprotection and sulfation strategy. Interaction analysis was performed by surface plasmon resonance (SPR), and the binding interaction of DS binding protein, such as fibronectin, with synthetic DS disaccharide structures was evaluated.

In Chapter 1, background and overview on this thesis are described.

In Chapter 2, novel synthesis of iduronic acid moiety is described.

In Chapter 3, efficient synthesis of DS disaccharide building blocks is described.

In Chapter 4, synthesis of DS disaccharide-ligand conjugates is described.

In Chapter 5, interaction analysis of DS disaccharide with DS-binding proteins or viruses is described.

In Chapter 6, the results of this study are summarized.

In Chapter 7, general information and synthetic procedures are described.