

学位論文の要旨	
氏名	齊藤 彰寛
学位論文題目	へパラン硫酸部分構造の系統的合成に関する研究
<p>本論文は、へパラン硫酸 (HS) 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、HS の多様な構造に誘導できる二糖中間体の効率的合成法の開発、二糖中間体からの HS 部分構造を有する硫酸化糖鎖の合成、ならびに調製した HS 部分二糖構造の相互作用解析について述べられている。</p> <p>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。</p> <p>HS 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 HS プロテオグリカン (HSPG) として細胞外マトリックスや細胞表面に存在している。HS 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、HS 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、HS 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、HS 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、HS 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 HS 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。</p> <p>一方、HS 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、HS 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、HS の二糖構造であるグルコサミン-ウロン酸配列において考えられる 48 種類の糖鎖・硫酸化パターンを系統的に合成できる 2 種類の二糖中間体を設計した。設計した二糖中間体の高効率的合成を達成するためには、ウロン酸成分の合成法が鍵であり、ウロン酸成分の新規合成法を開発することによって、2 種類の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 HS 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 HS 部分二糖構造を用いてシュガーチップを作製し、HS 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。</p> <p>第二章では、効率的なウロン酸成分の合成について述べる。</p> <p>HS の構成成分であるウロン酸は、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。HS 部分構造を効率よく調製するには、このウロン酸成分の合成が重要であるため、本研究では、グルクロノ-6,3-ラク톤を原料に用いた合成法について検討した。その結果、これまでの合成法に比べ短段階で目的のウロン酸成分であるグルクロン酸、ならびにイズロン酸成分を調製することができた。</p>	

第三章では、HS 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。

HS 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二糖中間体はほとんど知られていない。本研究では、グルコサミン成分上の保護基の最適化を行った後、先に合成したウロン酸成分とグリコシル化を行い、HS 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2種類の二糖中間体を合成した。

第四章では、HS 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2種類の $\text{GlcNS}\alpha\text{1-4GlcA}$ 構造および $\text{GlcNAc}\alpha\text{1-4GlcA}$ 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、HS 結合性タンパク質であるフィブロネクチンとフォンビルブランド因子 (vWF) 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、*N*-硫酸化と6位の硫酸化を受けたグルコサミン (GlcNS6S) 成分が重要であると示唆されている。今回合成した硫酸基のない *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造では、特異的な相互作用がほとんど見られなかったことから、フィブロネクチンとの相互作用には、硫酸基も重要であると考えられる。一方 vWF では、本研究で合成した硫酸基のない $\text{GlcNAc}\alpha\text{1-4GlcA}$ 構造においても相互作用が見られ、カルボン酸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、HS 部分構造の合成素子として重要なウロン酸成分の合成についてまず取り組んだ。その結果、2種類のウロン酸、グルクロン酸成分とイズロン酸成分の短段階合成ルートを確認することができた。また、調製したウロン酸成分と、保護基の最適化を行ったグルコサミン成分とのグリコシル化を行って、2種類の二糖中間体を調製することができた。調製した二糖中間体は、HS 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、 $\text{GlcNS}\alpha\text{1-4GlcA}$ 構造および $\text{GlcNAc}\alpha\text{1-4GlcA}$ 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 HS 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、HS 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 HS と HS 結合性タンパク質やウイルスなどの HS 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。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第338号	氏名	齊藤 彰寛
審査委員	主査	隅田 泰生	
	副査	門川 淳一	橋本 雅仁
<p>学位論文題目 へパラン硫酸部分構造の系統的合成に関する研究 (Study on the Systematic Synthesis of Heparan Sulfate Partial Structures)</p> <p>審査要旨</p> <p>提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、へパラン硫酸 (HS) 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、HS の多様な構造に誘導できる二糖中間体の効率的合成法の開発、二糖中間体からの HS 部分構造を有する硫酸化糖鎖の合成、ならびに調製した HS 部分二糖構造の相互作用解析について述べたもので、全文7章より構成されている。</p> <p>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ている。</p> <p>第二章では、効率的なウロン酸成分の合成について述べている。</p> <p>グルクロノ-6,3-ラク톤を原料に用いた合成法について検討した。その結果、短段階で目的のウロン酸成分であるグルクロン酸、ならびにイズロン酸成分を調製することができた。</p> <p>第三章では、HS 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ている。</p> <p>本研究では、グルコサミン-ウロン酸配列を有する2種類の二糖中間体を合成した。これらは、HS 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。</p> <p>第四章では、HS 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ている。</p> <p>調製した二糖中間体を用いて、糖鎖のチップ化ならびに糖鎖リガンド複合体への誘導を行った。</p> <p>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ている。</p> <p>第六章では、本研究の総括を述べている。</p> <p>第七章では、実験方法について述べている。</p> <p>本研究では、ウロン酸成分の新規合成法について取り組み、これらを用いてグルコサミン-ウロン酸配列の二糖中間体を調製することができた。この二糖中間体は、HS 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。またシュガーチップ化についても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 HS 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、解析ツールとしての応用が期待できる。</p> <p>今後、合成した二糖中間体から、HS 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 HS と HS 結合性タンパク質やウイルスなどの HS 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。</p> <p>以上本論文は、新規ウロン酸の合成法及び多分岐能を有する二糖中間体の合成に関する研究で、その後、硫酸化、シュガーチップ化について検討し、SPRセンサーチップとして使用することが可能であることを明らかにした。これは、構造活性相関解析や創薬候補化合物のスクリーニングに大きく寄与する。よって、審査委員会は博士 (工学) の学位論文として合格と判定する。</p>			

最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第338号	氏名	齊藤 彰寛
審査委員	主査	隅田 泰生	
	副査	門川 淳一	橋本 雅仁
<p>平成 22 年 7 月 30 日 17:00 から行われた学位論文発表会において、審査委員を含む 18 名の前で学位論文の内容が説明され、その後、以下に示すような質疑応答が行われ、いずれについても満足すべき回答を得ることが出来た。</p> <p>〔質問1〕フラノース中間体を合成する際に、グルコースから合成する方法とラクトンから合成する方法は、どちらが効率がよいか？〔回答1〕グルコースでは6ステップ、ラクトンからでは5ステップと1段階減らすことができる。また、トータル収率もラクトンからの方が良い。</p> <p>〔質問2〕IdoAのTPDS化では、なぜβ体と決定したのか？〔回答2〕NMRでは完全にβ体とは言えない。しかし、IdoAのコンフォメーションを考えた結果、¹C₄に近いと考えるならば、糖骨格との立体障害が少く、7員環を形成し易いであろうβ体ではないかと考えた。</p> <p>〔質問3〕PABではなぜグリコシル化が進行しないのか？本当に立体障害なのか？〔回答3〕現時点では立体障害と考えている。これを証明するための実験は行っていない。</p> <p>〔質問4〕なぜ、<i>μ</i>-ブチルチオフェニル基を用いたのか？チオメチルやチオフェニルではいけないのか？〔回答4〕試薬の匂いの問題。炭素鎖が長くなるほど匂いは減少していくため。</p> <p>〔質問5〕GlcAとIdoAでは、アクセプターとして用いる場合どのような差があるか？〔回答5〕GlcAの方が反応性は高い。おそらくコンフォメーションの違いによるものだと思う。IdoAは¹C₄に近いコンフォメーションと考えると水酸基がアキシシャルに向くため、糖骨格との立体障害によって反応性が低下していると考えている。</p> <p>〔質問6〕UroA2位Ac体でも、低温(-78℃)で反応させればオルトエステル体の形成を防げたのではないかと？〔回答6〕可能であったかもしれない。しかしNMRの解析を考えるならば、アノマー位が固定された2位Bz体の方が今後使用し易いと思う。</p> <p>〔質問7〕MPMのハロゲン化は一般的なのか？〔回答7〕糖以外の合成でも稀にハロゲン化されている。</p> <p>〔質問8〕なぜMPMのオルト位がハロゲン化されているのか？〔回答8〕メトキシ基が電子供与性であるため、オルト・パラ配向性であること。また、パラ位はすでにうまっているため、オルト位が置換されていると考えた。¹³Cでも確認した。</p> <p>〔質問9〕なぜ非還元末端がメチル基なのか？メチル基は必要なのか？〔回答9〕メチル基をつけることで、ポリマーの末端を表しているわけではないことを主張している。今までに合成してきたものとの比較のためにも、末端のメチル基は統一させた方がよいと考えてメチル基とした。</p> <p>〔質問10〕糖鎖を伸ばしていった場合、同じ硫酸化パターンを持つものしか作れないのか？〔回答10〕糖鎖伸長し違うパターンを組み込みたいのであれば、二糖の段階（またはスパーサーと縮合した三糖）で保護基の変換を行わなくては行けない。二糖ビルディングブロックは、HS二糖部分構造を合成するためのものであり、糖鎖伸長後も万能というわけではない。</p> <p>〔質問11〕vWf A-1ドメインとの相互作用では、糖鎖である必要はあるのか？適当な化合物に、カルボン酸や硫酸基をつけてマイナスチャージを持たせればいいのか？〔回答11〕マイナスチャージの他に「糖鎖」という構造を認識していると考えているため、「糖鎖」を使用する意味はあると思う。糖鎖のコンフォメーションが重要な要因の一つだと思う。</p> <p>〔質問12〕グリコシド結合が生じる場合と、オルトエステルが生じる場合のエネルギー図を示せ。〔回答12〕βグリコシド結合ができる場合、中間体はアノマー位の求電子性が高いものの方がアシル基上炭素の求電子性が高いものより安定である。オルトエステルが生じる場合、中間体の安定性は、βグリコシド結合ができる場合と逆になる。それぞれ、より安定な中間体を經由するため、生じるものが違ってくる。</p> <p>〔質問13〕IdoAのコンフォメーションはわからないのか？保護基がついた状態ではある程度固定化されないのか？〔回答13〕NMRの結果では、全てのピークがほぼシングレットであり、そのため様々なコンフォメーションの平均が結果として観測されていると思う。X線などは測定したことがないため詳しくはわからない。合成した全てのIdoAのピークはほぼシングレットであった。そのため、保護されていてもされていなくても、あまりコンフォメーションの固定は起こっていないように思う。（論文では、1,2イソプロピリデン化されたIdoAは¹C₄に固定される、といった報告はある。）</p> <p>以上から審査委員会では、申請者が博士課程の修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士（工学）の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。</p>			