



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

セレクチンファミリーが認識する Sialyl-Le^x
エピトープの最小有効構造の解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉田, 雅宏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2413

氏 名 (本籍)	吉 田 雅 宏 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第72号
学 位 授 与 年 月 日	平成8年3月14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	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	セレクトインファミリーが認識するSialyl-Le ^x エピトープの最小有効構造の解析
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 長谷川 明 副査 岐 阜 大 学 教 授 木 曾 眞 副査 信 州 大 学 教 授 茅 原 紘 副査 岐 阜 大 学 教 授 原 徹 夫 副査 静 岡 大 学 教 授 碓 氷 泰 市 副査 岐 阜 大 学 助 教 授 石 田 秀 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

細胞表層には糖タンパク質や糖脂質 (ガングリオシド) が、糖鎖部分を細胞外に配向させるように存在している。これらの分子種は、外界の情報の認識や自己の存在を顯示し、ウイルス、バクテリア、ホルモン、細胞毒素、その他のレセプター機能をはじめ、細胞間認識や細胞の分化・増殖、ガン化、受精、免疫などの基本的な生命現象に深く関与しており、その生物学的役割の多彩さから最近特に注目を集めている。その中で、特異な構造を有する炭素9原子から成る糖酸、いわゆるシアル酸を構成成分とするオリゴ糖鎖及びそのセラミド誘導體 (ガングリオシド) は、多彩な生物学的役割を有しているにも係わらず、生体内には極微量しか存在しておらず、分子の多様性も手伝って、天然界から純粋な単一化合物として得ることは非常に困難である。この多彩な生物活性を担う分子種の生物学的機能の解明を分子のレベルで行うためには、合成化学的手法による単一化合物及びその類縁体の合成が必要不可欠である。

本研究では特に白血球やガン細胞上に見出され、最近セレクトインファミリーのリガンド分子として注目されている Sialyl-Le^x [sLe^x; Neu5Acα(2→3)-Galβ(1→4)-[Fucα(1→3)]-GlcNAc] エピトープの最小有効構造及び認識部位の解析を目的としている。このセレクトインファミリーは、炎症の初期の段階などにおいて、サイトカインの刺激により血管内皮

細胞表面、血小板及び白血球表面に一時的に出現する接着タンパク質で、sLe^x糖鎖を認識することにより、白血球の炎症部位への遊走、ガン細胞の血行性転移、血栓形成などに関与している分子である。

本研究において、sLe^x エピトープの最小有効構造及び認識部位を解析するために、下記に示す9種類のsLe^x 類縁体を後述のようにして合成した。あらかじめ側鎖ジオールの開

ガングリオシド類縁体

X(-3)Galβ(1-4)[Fucα(1-3)]GlcNAcβ(1-3)Galβ(1-1)lipophilic part

X; C7- (I), C8- (II), and 8-epi-Neu5Ac (III)

carboxymethyl (IV), sulfate (V), and phosphate (VI)

エピトープ類縁体

(VII) Neu5Acα(2-3)Galβ(1-3)[Fucα(1-2)]1-deoxy-Glc

(VIII) Neu5Acα(2-3)Galβ(1-2)[Fucα(1-3)]1-deoxy-Glc

(IX) Neu5Acα(2-3)Galβ(1-6)[Fucα(1-4)]1-deoxy-Glc

裂、エピメリ化などを施したシアル酸のチオグリコシド体を糖供与体、適切に保護したガラクトースの SE [2-(trimethylsilyl)ethyl] グリコシド体を糖受容体として、アセトニトリル溶媒中 NIS (*N*-iodosuccinimide) – TfOH (trifluoromethanesulfonic acid) をグリコシル化剤として縮合反応を行い、熱力学的に不安定であるシアル酸の α-グリコシド体を位置及び立体選択的に得ることができた。この二糖誘導体は、ガラクトースの遊離の水酸基のベンゾイル化、SE グリコシド体をメチルチオグリコシド体へと変換し、シアリルガラクトース二糖供与体へと導いた。このようにして導いたシアル酸の側鎖部分を修飾したシアリルガラクトース二糖供与体、C-3 位にカルボキシルメチル基もしくはレプリノイル基を導入したガラクトース糖供与体と、あらかじめ調製した還元末端側三糖受容体とを、塩化メチレン溶媒中 DMTST [dimethyl(methylthio)sulfonium triflate] を縮合剤として反応を行い、目的とする sLe^x 五糖もしくは四糖誘導体を合成した。この後、ベンジル基のアセチル基への変換、SE 基の除去、トリクロロアセトニトリルを作用させて α-イミデート体へと好収率にて導いた。さらにイミデート法による脂質部分の導入、保護基の除去などを行い、sLe^x ガングリオシド類縁体 I ~ VI を合成した。また、適切に保護した 1-デオキシグルコースを糖受容体として、シアリルガラクトース及びフコースを、DMTST をグリコシル化剤として位置及び立体選択的に順次縮合反応を行い、sLe^x 四糖誘導体を合成した。続いて、ベンジル基、アシル基の脱保護を行い、目的とする sLe^x エピトープ類縁体 VII ~ IX を合成した。

このように合成した種々の sLe^x 類縁体は、ELISA 法を用いたセレクトインファミリーとの接着阻害活性を測定し、リガンド糖鎖とセレクトインファミリーとの構造活性相関を検討した。この結果をまとめると、次の3項目を挙げることができる。①シアル酸の側鎖水酸基は、セレクトインファミリーとの接着にはほとんど関与していない。②シアル酸の代わり

に、酸性基であるカルボキシル基や硫酸基を有する類縁体でも強い阻害活性を示すことから、シアル酸はセレクトインファミリーとの接着に必ずしも必要ではない可能性がある。③グルコース骨格に結合するフコースとシアリルガラクトースは、C-3位とC-4位の間以外での結合位置の変換は不可能である。このことは元来問われていなかったグルコース骨格の重要性を示唆している。

以上、本研究により明らかにしたセレクトインファミリーのリガンドとしてのsLe^x エピトープの最小有効構造の解析は、広くシアロ複合糖質の分子レベルにおける生物学的機能解析研究の可能性を示し、今後の研究に大いに貢献するものと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

シアロ複合糖質であるガングリオシドは動物細胞表層に存在し、糖鎖部分を細胞外に配向させ、外界の情報や自己の存在を顕示し、ウイルス、バクテリア、ホルモン、細胞毒素、その他のレセプター機能をはじめ、細胞間認識や細胞の分化・増殖、ガン化、受精、免疫などの基本的な生命現象に深く関与する分子種である。その化学構造は特異な構造を有する炭素9原子から成る糖酸、すなわちシアル酸と各種のオリゴ糖鎖及び糖質部分であるスフィンゴシンと脂肪酸から構成されているセラミドから構築されている。このガングリオシドは生体内に極微量しか存在せず、オリゴ糖鎖構造の多様性に加えて、シアル酸及び脂質部分にも多様性があり、天然から純粋な単一化合物として得ることは困難である。この多彩な生物活性を担うガングリオシドの生物学的機能の解明を分子レベルで行うためには、有機合成化学的手法による単一天然化合物及びその類縁体の合成が必要不可欠な課題である。

本研究では、ガングリオシドのうち、白血球やガン細胞上に見出され、最近セレクトインファミリーのリガンド糖鎖として注目されている Sialyl-Le^x (sLe^x) エピトープの最小有効構造及び認識部位の解析を、有機合成化学的手法を用いて行うことを目的とした。このセレクトインファミリーは、炎症の初期の段階などにおいて、サイトカインの刺激により血管内皮細胞表面、血小板及び白血球表面に一時的に出現する接着タンパク質で、sLe^x 糖鎖を認識することにより、白血球の炎症部位への遊走、ガン細胞の血行性転移、血栓形成などに関与している。

本研究では、有機合成化学的手法によってのみ可能となる下記に示す非天然型 sLe^x 類縁体の合成に成功し、ELISA を用いてセレクトインファミリーとの接着阻害活性を測定し、レセプターとリガンドの間の構造活性相関を明らかにした。この結果をまとめると、次の3項目を挙げることができる。①シアル酸の側鎖水酸基は、セレクトインファミリーとの接着にはほとんど関与していない。②シアル酸の代わりに、酸性基であるカルボキシル基や硫酸基を有する類縁体でも強い阻害活性を示すことから、シアル酸はセレクトインファミリーとの接着に必ずしも必要では

ない可能性がある。③グルコース骨格に結合するフコースとシアリルガラクトースは、C-3位とC-4位の間以外での結合位置の変換は不可能である。このことは元来問われていなかったグルコース骨格の重要性を示唆している。

以上、本研究で明らかにした sLe^x 糖鎖とセレクトインファミリーの間の構造活性相関は、他のガングリオシドとレセプターの間の構造活性相関にも応用可能であると共に、糖鎖工学に新たな方法論を提供するものである。よって本論文は博士（農学）学位論文として十分な価値があるものと認める。

ガングリオシド類縁体

X(-3)Gal β (1-4)[Fuc α (1-3)]GlcNAc β (1-3)Gal β (1-1)lipophilic part
X; C7- (I), C8- (II), and 8-epi-Neu5Ac (III)
carboxymethyl (IV), sulfate (V), and phosphate (VI)

エピトープ類縁体

(VII) Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-3)[Fuc α (1-2)]1-deoxy-Glc
(VIII) Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-2)[Fuc α (1-3)]1-deoxy-Glc
(IX) Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-6)[Fuc α (1-4)]1-deoxy-Glc