



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

糖鎖-蛋白質複合体のX線結晶構造解析のためのセレン標識糖鎖プローブの開発

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2015-03-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 達哉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/49111

氏 名 (本国籍)	鈴木 達 哉 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 6 年 3 月 3 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 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	糖鎖-蛋白質複合体の X 線結晶構造解析のためのセレン標識糖鎖プローブの開発
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 石 田 秀 治 副査 岐阜大学 准教授 安 藤 弘 宗 副査 静岡大学 教授 河 合 真 吾 副査 岐阜大学 教授 吉 松 三 博

論 文 の 内 容 の 要 旨

【研究背景】

糖鎖の高次機能発現には糖鎖-蛋白質複合体の形成が重要であり、その認識複合体の立体構造情報の取得は分子レベルでの糖鎖の生物学的意義の解明において不可欠である。蛋白質の立体構造解析ではセレン原子の異常散乱効果を利用する位相決定法 (MAD法) を用いた X 線結晶構造解析が有力であるが、セレン標識蛋白質の調製がしばしば困難化することが一つの課題とされている。そのため、糖鎖-蛋白質複合体の立体構造解析にあたっては、蛋白質をセレン標識するのではなく糖鎖をセレン標識することで簡便に認識複合体の立体構造解析を行うことができると考えられる。そこで、本研究ではセレン標識糖鎖の合成法を確立し、セレン標識糖鎖を用いた MAD 法による糖鎖-蛋白質複合体の X 線結晶構造解析の有効性を検証した。

1. 一級水酸基置換型セレンラクトースの合成と X 線結晶構造解析

セレン標識糖鎖プローブを合成するにあたっては、糖鎖のセレン標識による蛋白質との結合性の変化が懸念された。そこで、本研究では糖鎖認識の様式が報告されているヒト由来ガレクチン-9 NCRD とラクトースとの組み合わせをモデルとして選択し研究を行うこととした。ガレクチン 9 とラクトースの認識にはラクトースの 4' 位、6' 位の水酸基の認識が重要ではあるが、反応性が高くセレン置換時の立体反転反応の影響を受けない一級の 6 位および 6' 位水酸基をセレン置換することとした。また、セレンの置換

基には立体障害が最小のメチル基を選択し、目的化合物をラクトースのグルコース残基の6位またはガラクトース残基の6'位にメチルセレノ基を導入したラクトース誘導体1、2とした (Figure 1)。

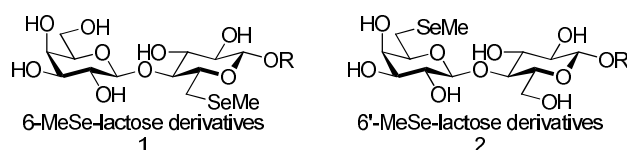


Figure 1

セレン導入については単糖の段階で行うこととし、セレンを有する単糖供与体、単糖受容体を開発することで、今後のより大きなセレノ糖鎖合成への展開を考えた合成戦略を取ることにした。また、鍵となるセレン導入反応は、セレノトルオイル酸無水物を用いて系中でセレノアニオンを発生させる方法を開発し、6位臭素化糖と反応に供することで高収率にて達成した。続く、トルオイル基のメチル基への変換も高収率にて行うことができ、その後のグリコシド結合の形成もイミデート法を用いることで成功し、脱保護反応を経て化合物1、2の合成を達成した。続いてSPR法により親和性測定を行ったところ、6位セレノ体1はガレクチン-9に認識され ($K_d = 300$ mM) 通常のラクトース ($K_d = 400$ mM) と同程度にガレクチン-9に結合することが明らかとなった。一方、6'位セレノ体2はガレクチン-9に対して結合性を示さなかった。続いてヒト由来ガレクチン-9 NCRDとの共結晶化を行ったところ、結合試験の結果と同じく、6位セレノ体1からは共結晶を得ることができたが、6'位セレノ体2からは共結晶は得られなかった。得られた6位セレノ体1の共結晶について放射光ビームラインを用いてX線結晶構造解析を行ったところ、MAD法により構造決定を行うことができ、その立体構造は過去に報告されたヒト由来ガレクチン-9 NCRDの結晶構造解析の結果と同様であった。これらのことから、セレン標識糖鎖がX線結晶構造解析の位相決定分子ツールとして有用であることが示された。

2. アセタール交換反応を利用する新規セレン導入反応の開発

第二部では、より大型の蛋白質の構造解析に向けたセレン標識糖鎖の合成を行った。1つのセレン原子で位相決定ができる分子量は20 kDa (または200 アミノ酸残基)が上限とされているため、大型蛋白質へのMAD法の適用には、セレン多置換糖鎖が必要となってきた。セレン多置換糖鎖の合成にあたっては、既に導入されているセレン原子に影響を与えることなく、簡便に穏和な条件で導入することが求められる。そこで、糖鎖科学の分野でセレンと同族の硫黄においてしばしば観察されるアグリコン転移反応に発想を得て、チオグリコシドを模倣した直鎖型セレノアセタールである BOMSeR (R=Me, Ph, SE)を新たな求核剤として開発した (Figure 2)。

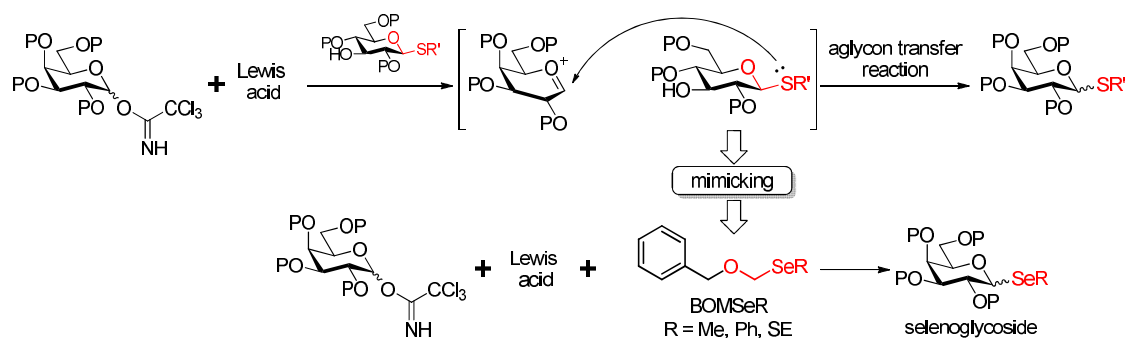


Figure 2

この BOMSeR をグリコシルイミデート体とルイス酸存在下で反応させることで、単糖から四糖までの糖鎖の還元末端に70%以上の収率でアルキルセノ基を立体選択的に導入することに成功した。本手法は、一般的なグリコシル化の反応条件にてセノ化糖鎖を合成できるため、様々な合成糖鎖への応用が可能であり、さらに、合成終盤でもセレンを導入可能な優れた方法であると確認された。また、SE 体を TBAF により活性化し、3-メチルセノプロピルトシレート求電子剤として反応させることで、セレン三置換シアリル a(2-6) ガラクトースの合成に成功した。こちらは今後、分子量 42 kDa のシアリダーゼ Neu2 との共結晶化、構造解析を行い、セレン多置換糖鎖の X 線結晶構造解析における有用性の検証に用いていく。

審査結果の要旨

鈴木達哉は、糖鎖-蛋白質複合体の X 線結晶構造解析に有用なセレン標識糖鎖プローブの開発研究を行い、以下に示す成果を収めた。

糖鎖の高次機能発現には糖鎖-蛋白質複合体の形成が重要であり、その認識複合体の立体構造情報の取得は分子レベルでの糖鎖の生物学的意義の解明において不可欠である。蛋白質の立体構造解析ではセレン原子の異常散乱効果を利用する位相決定法 (MAD 法) を用いた X 線結晶構造解析が有力であり、本研究ではセレン標識糖鎖の合成法を確立し、セレン標識糖鎖を用いた MAD 法による糖鎖-蛋白質複合体の X 線結晶構造解析を行い、その有効性を検証することとした。

まず、糖鎖認識の様式が報告されているヒト由来ガレクチン-9 NCRD とラクトースとの組み合わせをモデルとして選択し、ラクトースの 6 位および 6' 位水酸基をセノメチル基で置換した化合物を設計した。セレン導入については単糖の段階で行うこととし、鍵となるセレン導入は、セノトルオイル酸無水物を用いて系中でセノアニオンを発生させる新たな方法により、高収率にて達成した。

その後、グリコシド結合の形成、脱保護反応を経て化合物の合成を達成した。続いて SPR 法により親和性測定を行ったところ、6 位セノ体は通常のラクトースと同程度に

ガレクチン-9 に結合するのに対し、6' 位セレノ体はガレクチン-9 に対して結合性を示さないことが明らかになった。さらにヒト由来ガレクチン-9 NCRD との共結晶化を行ったところ、6 位セレノ体からは共結晶を得ることができたが、6' 位セレノ体 2 からは共結晶は得られなかった。得られた共結晶について放射光ビームラインを用いて X 線結晶構造解析を行ったところ、MAD 法により構造決定を行うことができ、その立体構造は過去に報告されたヒト由来ガレクチン-9 NCRD の結晶構造解析の結果と同様であった。これらのことから、セレン標識糖鎖が X 線結晶構造解析の位相決定分子ツールとして有用であることが示された。

続いて、より大型の蛋白質の構造解析に対応したセレン標識糖鎖の合成を行った。1 つのセレン原子で位相決定ができる分子量は 20 kDa (または 200 アミノ酸残基) が上限とされているため、大型蛋白質への MAD 法の適用には、セレン多置換糖鎖が必要である。そこで、同族の硫黄においてしばしば観察されるアグリコン転移反応に発想を得て、チオグリコシドを模倣した直鎖型セレノアセタールである BOMSeR (R=Me, Ph, SE) を新たな求核剤として開発した。この BOMSeR とグリコシルイミデート体をルイス酸存在下で反応させることで、単糖から四糖までの糖鎖の還元末端に 70%以上の収率でアルキルセレノ基を立体選択的に導入することができた。本手法は、一般的なグリコシル化の反応条件でのセレノ化糖鎖の合成を達成するものであり、様々な合成糖鎖への応用や、合成終盤でのセレン導入を可能にする優れた方法であることが示された。

以上について、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あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1) A Facile Method for Synthesizing Selenoglycosides Based on Selenium-Transfer to Glycosil Imidate.

Tatsuya Suzuki, Naoko Komura, Akihiro Imamura, Hiromune Ando, Hideharu Ishida, Makoto Kiso, Tetrahedron Lett. 2014, in press.

2) Expanded Potential of Seleno-carbohydrates as a Molecular Tool for X-ray Structural Determination of a Carbohydrate-protein Complex with Single/Multi-wavelength Anomalous Dispersion phasing.

Tatsuya Suzuki, Hisayoshi Makyio, Hiromune Ando, Naoko Komura, Masanori Menjo, Yusuke Yamada, Akihiro Imamura, Hideharu Ishida, Soichi Wakatsuki, Ryuichi Kato, Makoto Kiso, Bioorg. Med. Chem. 2014, in press.