



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

セレノ化糖を用いた蛋白質結晶構造解析に関する基盤研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-08-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 島袋, 隼平 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56218

氏 名 (本 国 籍)	島袋 隼平 (沖縄県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 7 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 9 年 3 月 1 3 日
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	セレン化糖を用いた蛋白質結晶構造解析に関する基盤研究
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 海老原 章 郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

細胞表面における糖鎖-蛋白質複合体の形成は、細胞表面における細胞と外界因子との相互作用において基幹的な分子反応であり、複合体形成の分子構造を基盤とした特異性の理解は、生体界面での生物現象の本質を解明する上で不可欠である。また、この課題は創薬開発という観点からも重要性、緊急性が高い。筆者は、この課題に対する有効な手法として、X線結晶構造解析に注目し、糖鎖-蛋白質複合体のX線結晶構造解析の最大の課題である位相決定を簡便迅速化するための方法開発に取り組んだ。本研究では、X線結晶構造解析の位相決定法の一つである多波長異常分散法に着眼した。同法は、主にセレン原子の電磁波照射に対する特殊な応答性を利用し、結晶中に取り込まれたセレン原子の特殊応答を足掛かりとして、最終的に空間内の電子密度分布を求め、原子配置を決定するものである。この手法は、従来では、遺伝子工学的にセレン原子を結合させたセレン標識蛋白質の調製を必須とし、蛋白質調製の効率、費用、標識蛋白質の脆弱性、変性等の問題が指摘されている。本研究では、蛋白質が認識する糖鎖リガンドにセレン原子を導入したセレン化糖鎖を位相決定の分子ツールとして用いる方法を提案している。

第一部では、セレン化フコース誘導体群の合成およびその応用を検討した。まず、天然の糖鎖を構成する単糖の一つである、フコースの四つの水酸基それぞれをメチルセレン基で置換したセレン化フコース誘導体の合成を行った。メチルセレン基置換フコース誘導体五種の合成では、置換基導入位の炭素の化学的特性および周辺の立体化学的環境に則したメチルセレン基導入経路を幅広く検討し、目的のセレン化フコース誘導体群を首尾よく合成する経路を確立した。続いて、それらをリガンドミミックおよび位相決定分子として用いた、構造未知のフコース結合性蛋白質 AOL の X線結晶

構造解析に取り組んだ。その結果、セレノ化フコース-AOL 複合体の構造解析に成功し、セレノ化フコースの天然リガンドを模倣した位相決定分子としての有用性を証明した。また、この構造解析により AOL 中に存在する異なる六つの糖結合部位における結合様式を原子レベルで明らかにした。さらに、表面プラズモン共鳴法による AOL とセレノ化フコースとの親和性の定量解析を行い、セレノ化フコース-AOL 複合体結晶化の成否と親和性強度の関連性を見出した。

第二部では、糖蛋白質の X 線結晶構造解析の迅速化を指向したセレノ化糖の開発を行い、セレノ化糖による位相決定を利用した蛋白質 X 結晶構造解析の応用範囲を拡張するための基礎的研究に取り組んだ。蛋白質の約 50% は糖鎖修飾を受けた糖蛋白質であることから、蛋白質上の糖鎖をセレノ化糖鎖に置換することで、糖鎖非結合性蛋白質の X 線構造解析においてもセレン原子による位相決定が利用可能となると発想し、糖鎖置換法の基礎研究を行った。まず、糖転移酵素 EndoM の基質として設計したセレノ化糖鎖オキサゾリン誘導体の合成を検討し、糖残基間のグリコシド結合の酸素原子をセレン原子に置換したセレノ化二糖オキサゾリンの合成に成功した。続いて、セレノ化二糖オキサゾリンを基質とする EndoM による蛋白質(リボヌクレアーゼ B)への糖鎖転移反応を検討し、セレノ化糖鎖による蛋白質修飾に初めて成功した。

審査結果の要旨

本論文は、糖鎖-蛋白質複合体の立体構造解析に有用な分子ツールの開発とその応用に関する研究成果を纏めたものである。

細胞表面における糖鎖-蛋白質複合体の形成は、細胞表面における細胞と外界因子との相互作用において基幹的な分子反応であり、複合体形成の分子構造を基盤とした特異性の理解は、生体界面での生物現象の本質を解明する上で不可欠である。また、この課題は創薬開発という観点からも重要性、緊急性が高い。筆者は、この課題に対する有効な手法として、X 線結晶構造解析に注目し、本論文では、糖鎖-蛋白質複合体の X 線結晶構造解析の最大の課題である位相決定を簡便迅速化するための方法開発に取り組んだ。

筆者は、X 線結晶構造解析の位相決定法の一つである多波長異常分散法に着眼した。多波長異常分散法は、主にセレン原子の電磁波照射に対する特殊な応答性を利用し、結晶中に取り込まれたセレン原子の特殊応答を足掛かりとして、最終的に空間内の電子密度分布を求め、原子配置を決定するものである。この手法は、従来では、遺伝子工学的にセレン原子を結合させたセレン標識蛋白質の調製を必須とし、蛋白質調製の効率、費用、標識蛋白質の脆弱性、変性等の問題が指摘されている。本論文では、蛋白質が認識する糖鎖リガンドにセレン原子を導入したセレノ化糖鎖を位相決定の分子ツールとして用いる方法が提案されている。

第一部では、「セレノ化フコース誘導体群の合成およびその応用」として、天然の糖鎖を構成する単糖の一つである、フコースの四つの水酸基それぞれをメチルセレノ基で置換したセレノ化フコース誘導体の合成、また、それらをリガンドミミックおよび位相決定分子として用いた、構造未知のフコース結合性蛋白質 AOL の X 線結晶構

造解析について述べられている。第一章では、メチルセレン基置換フコース誘導体五種の合成検討の詳細が述べられており、置換基導入位の炭素の化学的特性および周辺の立体化学的環境に則したメチルセレン基導入経路が幅広く検討され、目的のセレン化フコース誘導体群を首尾よく合成する経路が確立されている。第二章では、合成したセレン化フコースを用いたフコース結合性蛋白質 AOL の X 線結晶構造解析の有用性が検証されており、結果として、セレン化フコース-AOL 複合体の構造解析に成功し、セレン化フコースの天然リガンドを模倣した位相決定分子としての有用性が証明された。また、この構造解析により AOL 中に存在する異なる六つの糖結合部位における結合様式が原子レベルで明らかとなった。さらに、表面プラズモン共鳴法による AOL とセレン化フコースとの親和性の定量解析が行われ、セレン化フコース-AOL 複合体結晶化の成否と親和性強度の関連性が見出された。

第二部では、「糖蛋白質の X 線結晶構造解析の迅速化を指向したセレン化糖の開発」として、セレン化糖による位相決定を利用した蛋白質 X 結晶構造解析の応用範囲を拡張するための基礎的研究について述べられている。蛋白質の約 50% は糖鎖修飾を受けた糖蛋白質であることから、蛋白質上の糖鎖をセレン化糖鎖に置換することで、糖鎖非結合性蛋白質の X 線構造解析においてもセレン原子による位相決定が利用可能となると発想し、糖鎖置換法の基礎研究が行われた。第一章、第二章では、研究背景と新しい手法の基本概念について論述され、第三章では、糖転移酵素 EndoM の基質として設計したセレン化糖鎖オキサゾリン誘導体の合成について述べられており、糖残基間のグリコシド結合の酸素原子をセレン原子に置換したセレン化二糖オキサゾリンの合成に初めて成功している。第四章では、セレン化二糖オキサゾリンを基質とする EndoM による蛋白質（リボヌクレアーゼ B）への糖鎖転移反応を検討し、セレン化糖鎖による蛋白質修飾に初めて成功した。

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. Makyio, H.,[†] Shimabukuro, J.,[†] Suzuki, T., Imamura, A., Ishida, H., Kiso, M., Ando, H. and Kato, R. Six independent fucose-binding sites in the crystal structure of *Aspergillus oryzae* lectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, 477, 477-482. († 共同筆頭著者)
2. Shimabukuro, J., Makyio, H., Suzuki, T., Nishikawa, Y., Kawasaki, M., Imamura, A., Ishida, H., Ando, H., Kato, R. and Kiso, M. Synthesis of seleno-fucose compounds and their application to the X-ray structural determination of carbohydrate-lectin complexes using single/multi-wavelength anomalous dispersion phasing. *Bioorg. Med. Chem.* **2016** in press.