

北海道特産ラクトースを原料として用いるヘパラン硫酸PGの創生

嶋脇 健 [北海道大学先端生命科学研究院/博士研究員]

背景・目的

近年、生体中における糖鎖の重要性が認識されており、本研究の対象であるプロテオグリカン(PG)は、それら複合糖質中の糖タンパク質の一種である。PGは構成糖の違いにより、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CS)とヘパラン硫酸プロテオグリカン(HS)の二つに大きく分類される。しかしCSがAタイプ、Bタイプなど、ある特定の立体構造を示すのに対し、HSは多様な立体構造を形成しており、生体分子と相互作用する部位の構造はほとんど解明されていない。これは、生物が生産するHSの生成量がCSに比べ少ないことにも起因しており、純粋かつ大量のHS入手法が確立されていないためである。これらの状況から、北海道の特産物である安価なラクトースを原料として用い、有用生理活性物質であるHSの創生を目指し研究を行った。

内容・方法

北海道大学の菅原らは、CSのみ共通の4糖領域が硫酸化されていることを発見し、この修飾がCS/HSの仕分けを制御しているのではないかとこの生合成仮説を提唱している。

そこで私は、細胞内におけるこの硫酸化を積極的に阻害するPGイニシエーターの構築を計画した。すなわち、硫酸化修飾されうる水酸基をフッ素置換することにより、この部位の化学修飾を制御できると考えた(図1)。フッ素原子を選択した理由は、電気陰性度や水素結合能が酸素原子に最も近く、また原子半径が小さいことからPG合成酵素に対する立体的な影響が少ないと考えたからである。

現在までに私は、ラクトースを出発原料として用い、PG共通4糖領域(Xyl-Gal, Xyl-Gal-Gal, Xyl-Gal-Gal-

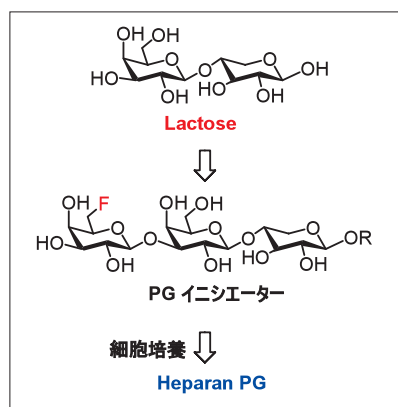


図1

GlcA)の効率的な合成法を確立している(K.Shimawaki et al., *Angrew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 3074-3079)。これらの化合物は細胞と共培養することによりPGイニシエーターとなることから、この合成経路を応用しフッ素置換型PGイニシエーターへと導く計画である。

結果・成果

まずラクトースからフッ素置換体への変換の検討を行ったが、効率的にフッ素を導入することは困難であった。そこでフッ素置換した単糖を別途合成し、これを順次連結することでPGイニシエーターを構築することとした。

電子求引性のため反応性が悪いことが予想されるフッ素置換ドナーを各種合成したところ、アノマー活性化基がSPh, SMe, Fの場合は全く活性化が起こらず、トリクロロアセトイミデート体のみ活性化できることがわかった。またアクセプターに関しては一般的に用いられる保護基を用いたものは全く反応せず、4,6-シリレン-Gal、2,3-イソプロピリデン-XyIなど、立体障害を低減したアクセプターのみ反応が進行した。

これらの初期検討をふまえ、鍵中間体として(a)を設定し、フッ素置換型PGイニシエーター4種類(2, 3, 4, 5)と対称化合物(1)の効率的な合成法を確立した(図2)。

得られたフッ素置換PGイニシエーターの伸長アッセイをCHO-K1細胞で行った。CHO-K1細胞に、合成したフッ素化イニシエーターを加え、37℃で48時間培養後、培養上清を精製し、ゲルろ過HPLC(TSK-GEL Super SW3000)により分析した。

その結果、(5)の伸長活性が弱いものの、全てのイニシエーターが伸長活性を示した(>50kDa)。こ

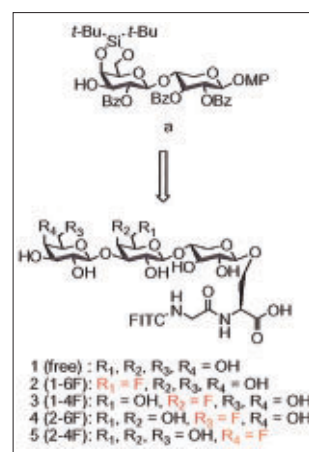


図2

れらを分取した後、Chondroitinase ABC 消化することにより、HS/CSの組成比を求めた(図3)。

対称化合物であるフッ素無置換体(1)は、HSの割合が若干生成しているもののCSの割合が多い。(2)、(3)、(5)は(1)に比べCSの割合が減りHSの割合が若干ながら増加している。(4)はChondroitinase ABCで全く消化されないことからほぼHSのみが伸長していると考えられる。

これらの結果から、明らかに3糖目のGalの6位水酸基の硫酸化がPG生合性の仕分けに関与していることが示唆される。これは、CS合成酵素が6位硫酸化アクセプターに対する親和性が高いか、もしくはHS合成酵素がアクセプター6位硫酸化によって阻害を受けているためだと考えられる。

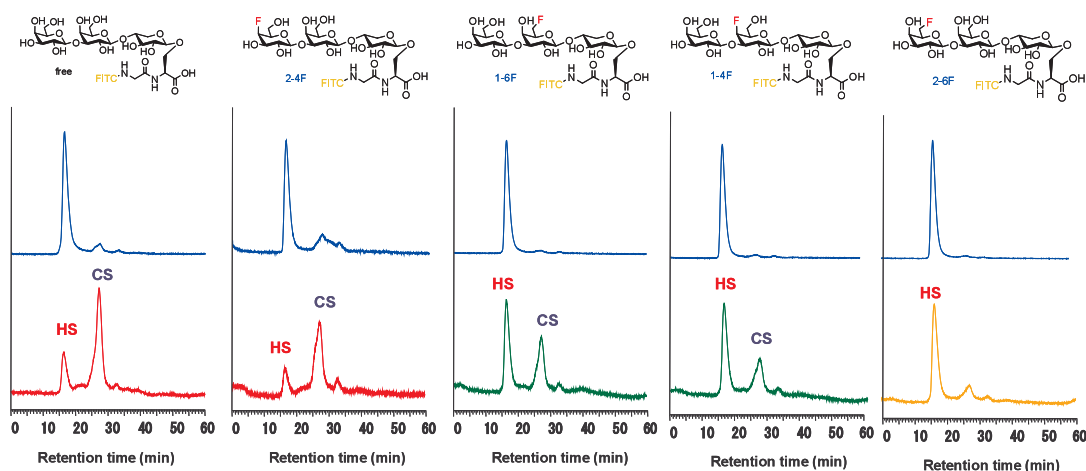


図3

この結果は、人口 PG イニシエーターとして初めて HS のみへ制御できるものであり、この伸長生成物をバイオプローブとして用いることにより、様々な研究や創薬への応用が期待できる。

また電子求引性で不活性であるフッ素置換グリコシルドナーのグリコシル化条件の検討は、今後の不活性型糖鎖合成に大きな知見を与える結果である。

今後の展望

まず本研究で得られた PG 生合成機構に関する知見が、実際の酵素の構造と矛盾しない結果であるか、ドッキングシミュレーションなどを用いることにより解明する予定である。また得られたバイオプローブを用い、いまだに発見されていない HS 相互作用タンパク質の抽出、同定を行うことにより、新たな生理現象の発見ができるのではないかと期待している。さらに HS はその複雑な構造のため、生理活性を示す部位の微細な構造が解明されていないものが多いため、NMR を用いた構造解析を行いたいと考えている。