

氏名	イワン サスキアワン Iwan Saskiawan
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	生博第9号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究科統合生命科学専攻
学位論文題目	Studies on Syntheses of Glycosylated Bioactive Peptides Using Mold Endoglycosidase and Analyses of Their Bioactivities (糸状菌のエンドグリコシダーゼを利用した生理活性糖ペプチドの合成とその生理活性の解析に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 山本憲二 教授 泉井 桂 教授 竹安邦夫

論文内容の要旨

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の α -接合因子は一倍体の α -接合型酵母によって分泌されるフェロモンで、13のアミノ酸からなるペプチドである。この接合因子は a-接合型酵母によって分泌されるプロテアーゼによって分解を受ける。すなわち、酵母細胞の接合準備段階にフェロモンによって誘導される細胞周期の停止から細胞を復帰させるためにこのプロテアーゼが関与していると考えられている。

一般にペプチドは分解酵素による作用を受けやすいが、糖鎖が結合した糖ペプチドは分解酵素に対する抵抗性が強くなる。そこで、生理活性ペプチドである酵母の α -接合因子について、糖鎖を付加した場合の生理活性の影響を調べた。糖鎖を付加した α -接合因子は化学-酵素合成法によって調製した。まず、Fmoc を保護基としたアミノ酸を材料として固相合成法を展開し、グルタミン残基に *N*-アセチルグルコサミンを結合した α -接合因子 (Trp-His-Trp-Leu-Gln(GlcNAc)-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr) を合成した。次いで、これを受容体として、土壌より単離同定した *Mucor hiemalis* の Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) の糖転移活性を用いて、ニワトリ卵黄より調製した糖ペプチドより、シアロ複合型糖鎖をグルタミン残基に転移付加した。得られたグルタミン結合型糖鎖を有する α -接合因子について、a-接合型酵母の生育阻止実験により生理活性を調べた結果、この糖ペプチドは native の α -接合因子に比べて、生理活性が減少することを見出した。しかし、糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸を除くと生理活性は回復した。一方、糖鎖を付加した α -接合因子は native な α -接合因子に比べて、分解酵素に対して著しい抵抗性を示すことが明らかになった。また、*N*-アセチルグルコサミンを結合した α -接合因子は native な α -接合因子に比べて顕著に高い生理活性を有することを見出した。そこで、これらの α -接合因子について円偏光二色性を調べたところ、native な α -接合因子と *N*-アセチルグルコサミンを結合した α -接合因子はわずかな立体構造の差異しか見られず、その差異が生理活性に影響を与えることが示唆された。

糖鎖を転移付加することができる Endo-M は *N*-アセチルグルコサミン残基のみならず、グルコース残基をも受容体として糖鎖を付加することができる。そこで、グルコースをグルタミン残基に結合した α -接合因子を合成し、Endo-M の糖転移活性を利用して、シアロ複合型糖鎖を転移付加して糖ペプチドを化学-酵素合成した。a-接合型酵母の生育阻止実験によって生理活性を調べたところ、native な α -接合因子の生理活性に比べて低下していた。一方、グルコースを結合した α -接合因子について生理活性を調べたところ、*N*-アセチルグルコサミンを結合した α -接合因子の生理活性よりも低く、*N*-アセチルアミノ基がその生理活性に何らかの役割を果たしていることが示唆された。また、これらの α -接合因子誘導体について、a-接合型酵母に対する結合能を調べたところ、native の α -接合因子の結合能とほとんど変わらなかった。すなわち、*N*-アセチルグルコサミンやグルコースを付加した α -接合因子は a-接合型酵母への結合能は変わらないにもかかわらず、生理活性は高められることが明らかになった。円偏光二色性を調べたところ、いずれの α -接合因子も大きな構造の相違は見られず、典型的なランダム構造を有していた。

論文審査の結果の要旨

高等生物の多くのタンパク質は遺伝子の翻訳後に糖鎖による修飾を受けて機能の改変などが行われる。タンパク質のみならず、生理活性ペプチドにも糖鎖を有するものがあり、生理活性の調節や安定化などに寄与している。一方、天然に存在する糖鎖を改変して目的の機能を持つ糖鎖を創り出したり、生体物質に人工的に糖鎖を付加してそれに新しい機能を付与することは糖鎖工学における重要な課題である。従来より、このような試みは還元的アミノ化などいくつかの方法を用いて行われて来たが、せいぜい、わずかな糖を付けることができる程度であった。本論文の著者はペプチドの化学合成法と微生物のエンドグリコシダーゼの糖転移活性を利用した酵素法を組み合わせた化学-酵素合成法によって生理活性糖ペプチドの合成に成功し、得られた糖ペプチドの生理活性を解析して糖鎖の付加がペプチドの生理活性に及ぼす影響を解析した。著者はこのような試みのモデルとして、13のアミノ酸残基からなるペプチドフェロモンである酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の α -接合因子を選び、この生理活性ペプチドに種々の糖鎖の付加を試みた。さらに、得られた糖鎖を有するペプチドフェロモンが誘導する細胞周期の停止について調べた。評価すべき主な点は以下の通りである。

1. Fmocを保護基としたアミノ酸を材料としてグルタミン残基に *N*-アセチルグルコサミンを結合した α -接合因子を合成し、これを受容体として、糸状菌 *Mucor hiemalis* の Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) の糖転移活性により、シアロ複合型糖鎖をグルタミン残基に転移付加し、グルタミン結合型糖鎖を有する糖ペプチドを合成することに成功した。このようなグルタミン結合型糖鎖を持つ糖ペプチドは自然界には存在せず、この化学-酵素合成法によって初めて得ることができた。
2. α -接合因子の生理活性は糖鎖を付加することによって著しく低下したが、糖鎖の末端に存在するシアル酸を除くと活性が回復することを見出し、シアル酸が生理活性に大きな影響を及ぼすことを指摘した。一方、プロテアーゼやペプチダーゼなどの分解酵素に対しては native の α -接合因子に比べて、これらの糖鎖付加ペプチドが著しく高い抵抗性を有することを明らかにした。
3. *N*-末端より5番目のグルタミン残基に *N*-アセチルグルコサミンを導入した α -接合因子は生理活性を著しく促進することを見出した。円偏光二色性分析による結果より、わずかな立体構造の差異がその生理活性に大きな影響を与えることを示した。
4. グルコースを結合した生理活性ペプチドを化学-酵素合成法によって初めて合成し、native の α -接合因子の生理活性よりも高い活性を有することを見出した。しかし、その活性は *N*-アセチルグルコサミンを結合した α -接合因子の生理活性よりも低く、*N*-アセチルアミノ基が生理活性の促進に何らかの役割を果たしていることを示した。

以上のように、本論文は糖鎖生物学の分野に新たな知見を加えたものであり、さらに微生物学、細胞生物学、タンパク質工学などに寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成16年1月26日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。