

氏 名	やま さき たがしら みず か 山 崎 (田 頭) 瑞 加
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2495 号
学位授与の日付	平 成 15 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Studies on Three-dimensional Structure and Biological Activity of Glycosylated Calcitonin (糖鎖を付加したカルシトニンの立体構造と生理活性に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 伏 木 亨 教 授 大 東 肇 教 授 熊 谷 英 彦

論 文 内 容 の 要 旨

カルシトニン (CT) は、アミノ酸32残基からなるペプチドで、骨の代謝に関わるホルモンとして知られ、その誘導体は、高カルシウム血症、骨Paget病、骨粗鬆症などの治療薬として使われている。天然のCTには、糖鎖が結合していないので、糖鎖を付加したCT誘導体を合成し解析することにより、糖鎖の効果を調べることができる。そこで本論文の著者は、糖鎖を付加したCTを合成し、円二色性 (CD) 及び核磁気共鳴 (NMR) スペクトルにより立体構造を解析した。さらに、血中カルシウム濃度低下作用や受容体結合能の測定、体内動態解析を行なって生理活性を評価し、糖鎖がペプチドの構造と活性に与える影響について検討した。その内容は以下のように要約できる。

1. N-結合型糖鎖を付加したカルシトニンの立体構造と生理活性

CTの3位AsnにN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を付加したCT3-GlcNAcを固相合成法により調製した。さらにこれに、エンドグリコシダーゼの糖転移反応により、高マンノース型糖鎖を付加し、CT3-M6を調製した。次いで、これをマンノシダーゼで処理して、CT3-M5、CT3-M1を調製した。N-結合型糖鎖付加CTは、疎水的環境で α -ヘリックス構造をとること、また、糖鎖の有無、糖鎖構造の違いはCTの立体構造に大きな影響を与えないことを明らかにした。

血中カルシウム濃度低下作用をラットで測定し、糖鎖付加CTもCTと同様に血中カルシウム濃度低下作用を示し、糖鎖が大きくなるにつれて活性は低下するという傾向、ならびに、GlcNAc単糖の付加によって活性が2倍程度上昇することを明らかにした。そこで、CTの受容体結合能をマウス破骨細胞を用いて測定し、糖鎖付加CTは、受容体結合能を有していること、大きい糖鎖が付加したCTでは若干の結合能の低下があることを明らかにした。一方、GlcNAc付加CTの受容体結合能はCTと同等であった。そこで、CTとCT3-GlcNAcについて、体内動態の比較を行い、CT3-GlcNAcは、肝臓への移行性が抑えられ、それにともない、血液中、骨中で、その分布が増える傾向を確認した。

2. O-結合型糖鎖を付加したカルシトニンの立体構造と生理活性

CTのSer2, Ser5, Thr6, Ser13, Thr21, Thr25, Thr31のそれぞれに、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が付加した7種のO-結合型糖鎖付加CTを固相合成した。これらの糖鎖付加CTも疎水的環境で α -ヘリックス構造をとることを確認したが、CT6-GalNAc及びCT21-GalNAcでは、 α -ヘリックス含量が他の糖鎖付加CTより10%ほど減少していることを見出し、糖鎖付加部位周辺に特異的な立体構造変化を確認した。このCT6-GalNAc及びCT21-GalNAcについてNMRによる詳細な構造解析を行い、糖鎖付加部位周辺で α -ヘリックス構造に緩みが出ていることを明らかにした。

血中カルシウム濃度の低下作用を測定した結果、CT2-GalNAc及びCT21-GalNAcでは活性が保持されるかあるいはやや向上していたが、それ以外のO-結合型糖鎖付加CTでは大幅に低下していた。そこで、受容体結合能を測定したところ、CT2-GalNAc及びCT21-GalNAcで結合能がやや向上し、それ以外のGalNAc付加体では結合能が 10^2 ほどに低下していることを見出した。このことから、血中カルシウム濃度低下作用の変化は、構造解析において確認された立体構造変化とは直接対応せず、主に受容体との結合能の変化によるものであることが明らかになった。さらに、体内動態解析を行ったところ、

CT2-GalNAc及びCT21-GalNAc以外の糖鎖付加CTでは、ほとんどの臓器で分布に差がなかったが、CT2-GalNAc及びCT21-GalNAcは、他の誘導体に比べ血中濃度が低く、骨での濃度が高いことを確認した。

論文審査の結果の要旨

糖ペプチドや糖タンパク質などの複合糖質の糖鎖は、細胞間コミュニケーションや異物認識など、生体内で様々な重要な役割や機能を果たしている。しかし、どのような糖鎖を、ペプチドやタンパク質のどの位置に結合させれば、どのような効果が得られるかなどは明らかになっていない。そこで、本論文の著者は、生理活性ペプチド、カルシトニン（CT）をモデルとして、糖鎖の付加が立体構造や生理活性に及ぼす影響を系統的に解析した。評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. 化学合成及び化学-酵素合成により4種類のN-結合型糖鎖付加CTを調製した。また、化学合成法により、7種類のO-結合型糖鎖付加CTを調製した。
2. これらの糖鎖付加CTの立体構造を解析し、ペプチドへの糖鎖の付加は、糖鎖付加位置周辺に特異的に立体構造を変化させることを示した。さらに、糖鎖の付加によりペプチドの立体構造が変化するの、糖鎖がペプチドと相互作用して局所的な構造変化を誘起するためであることを実証した。
3. これら糖鎖付加CTの血中カルシウム濃度低下作用、受容体結合能、体内動態を測定し、ペプチドへの糖鎖の付加は、糖鎖構造に依存して生理活性を変化させること、糖鎖の付加によりペプチドの生理活性が変化するの、糖鎖が受容体との結合を阻害するか、体内動態を変化させるためであることを解明した。

以上の結果、著者は、糖鎖付加によって新規な高活性ペプチドをデザインするためには、糖鎖の付加位置として受容体結合部位及び立体構造の変化を誘起する部位を避け、目的により糖鎖構造を選択して、糖鎖の付加により効果がある体内動態の改善を図ればよいという方向性を示し得た。これは、生体情報応答学、糖鎖工学、医薬開発の実際に寄与するところが大い。

よって、本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年6月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。