

## 糖鎖分解の基質特異性解析：グルコシダーゼに対する概念実証

木室, 佑亮

<https://hdl.handle.net/2324/4475064>

---

出版情報 : Kyushu University, 2020, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏名	木室 佑亮
論文名	糖鎖分解の基質特異性解析：グルコシダーゼに対する概念実証
論文調査委員	主査 九州大学大学院薬学府 教授 平井 剛 副査 九州大学大学院薬学府 教授 王子田彰夫 副査 九州大学大学院薬学府 准教授 麻生真理子 副査 九州大学大学院薬学府 准教授 谷口陽祐

### 論文審査の結果の要旨

本論文では、独自に設計した、グルコースの2'位にエキソメチレン基を持つ基質アナログが、“基質特異的代謝追跡 (SMM) プローブ”として機能するかを焦点にあてて、論じている。本検証には基質特異性が知られている $\alpha$ -グルコシダーゼを用いて実証している。

第2章では2糖型基質アナログの合成法構築法を立案し、すべて立案どおり $\alpha$ 選択的に所望の2'位エキソメチレン置換型マルトース、およびイソマルトース誘導体の合成を達成している。

第3章では、第2章で得た2'-エキソメチレン型2糖アナログが、 $\alpha$ -グルコシダーゼに対し、提案したSMMプローブとして機能するかを検証している。「 $\alpha$ -グルコシダーゼの基質となり切断される」か、さらに「 $\alpha$ -グルコシダーゼを不可逆的に阻害する」か、にフォーカスを絞って検討している。その結果、酵母由来のマルターゼにおいて、基質特異性に応じて基質として認識され不可逆阻害することを明らかにした。

他の $\alpha$ -グルコシダーゼへの適用範囲拡大を狙い、さらに検討した経緯も議論された。具体的には、ポンペ病治療薬である Myozyme<sup>®</sup>、ラット小腸抽出物由来の MGAM、SI 混合物に対し、基質アナログの阻害活性が評価されたが、これら酵素群に対しては、明確な不可逆的阻害が認められないことを明らかにした。Myozyme<sup>®</sup>に対しては、アナログの  $k_{cat}/K_m$  が低下しており、2位エキソメチレン基の導入によって、基質として機能が大きく低下していることが原因として考察された。この結果から、限定された酵素群にのみ、合成されたアナログは基質として機能することを推察している。一方、MGAM と SI 混合物に関しては、一部マルターゼと同じ挙動を観測されたことから、混合物に含まれる何らかの $\alpha$ -グルコシダーゼに対して基質となり、不可逆的に阻害している可能性も議論された。以上のことから、今回開発したアナログは、適用範囲が限定的ではあるものの、SMMプローブとしての要件を満たす化合物であることが示された。

第4章では、 $\alpha$ -グルコシダーゼと基質アナログは共有結合を形成しているか、論じている。基質構造をできる限り維持するために、前例のない6位炭素に検出用の蛍光タグを導入したプローブを設計・合成された。酵母由来のマルターゼに対し、蛍光ラベル化実験が実施され、マルターゼが時間依存的に蛍光ラベル化されること、さらに可逆的阻害剤との競合阻害実験によってプローブが酵素活性中心と共有結合を形成していることを示す結果が示された。しかしながら、精製酵素を混合した疑似的夾雑系において、マルターゼ以外の BSA や Myozyme<sup>®</sup> に対する非特異的な蛍光ラベル化が確認されたこと、さらに蛍光タグ自体が阻害活性を示すことなどから、理想的な結果ではないとの結論に至っている。

この問題は、6位にアルキンを導入したアルキンプローブの設計・合成によって解決された。マルターゼとアルキンプローブの間で共有結合を形成した後に、Huisgen 反応を利用して蛍光タグを

導入する戦略が採用された。反応効率の最適化、さらには蛍光タグの酵素への非特異的なラベル化の抑制に成功し、最終的に夾雑系への適応も検討された。その結果、Myozyme<sup>®</sup>への非特異的なラベル化が、解決できないことが判明した。結晶構造解析やこれまでの研究例を参考に、この非特異的なラベル化がグルコース構造に起因するラベル化と考察している。実際、グルコースを高濃度共存させることで、Myozyme<sup>®</sup>のラベル化が抑制され、マルターゼ特異的な蛍光ラベル化が実現された。さらに HeLa 細胞ライセートにマルターゼを共存させても、マルターゼをラベル化することに成功している。

第 5 章では他の糖加水分解酵素への適用を志向し、2'-エキソメチレン型  $\beta$ -グルコシド体の合成が示されている。6 位にピコロイル基を導入した新たなドナーを設計し、これまで  $\alpha$ -選択的だったグリコシル化を  $\beta$ -選択的に逆転させることに成功している。本合成法を基盤とし、2 種の 2'位エキソメチレン置換型  $\beta$ -グルコシドとその立体異性体の合成を達成した。エルゴステリルグルコシドアナログが EGCp2 の mechanism-based inhibitor になっているかを確認するため、インビトロでの阻害活性評価が実施された。しかし、糖脂質骨格自体の界面活性効果によって、正確な機能評価に至らなかった。この点については、技術的に改善の余地があることが示されている。

以上、本論文は、切断されるグリコシド結合の隣の水酸基をエキソメチレン基に変換した分子は、限定的な酵素に対してではあるが、糖加水分解酵素の SMM プローブとして機能することが示され、分子設計概念を実証する結果を得ることに成功している。以上のように、本研究は既存の分子設計概念ではなし得ない“基質特異的代謝追跡法”を可能にする、プローブ開発の可能性を開いたものであり、博士（創薬科学）の学位に値すると認める。