

審査の結果の要旨

氏名 芳賀(室塚) 淑美

細胞表面に存在する糖脂質は、細胞間認識、分裂増殖、分化誘導、接着、癌化、受精、ホルモンやウイルス・毒素の受容体など、様々な生理的、病的現象に深く関与している。これらの機能に着目し、近年糖鎖を含有する機能性分子が報告され、医療への応用が期待されている。本論文は、マテリアルとしての用途拡大を可能にするための糖脂質大量合成系の確立、および、得られた糖脂質類似体を用いた生体機能分子の構築とその生理作用についての研究を報告したものであり、全八章により構成されている。

第一章は序論であり、糖脂質の生体内における多様な役割を述べ、それらの役割における糖鎖構造と機能との分子レベルでの詳細な関係を解明するために純度・量の両方の側面からの安定した供給が必要であることを述べている。また、既存の糖脂質合成法の問題点を明示するとともに、本研究のバックグラウンドとなるユニークな糖鎖合成法の成り立ちについて紹介している。

第二章では、動物細胞を糖鎖生産工場と見立てて糖脂質の類似体を合成するバイオコンビナトリアル合成法を用いた糖脂質GM3(NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer)類似体の生産における最適条件を詳細に検討している。糖鎖プライマーは糖脂質生合成過程の中間体に似た糖誘導體で、細胞の糖転移酵素の基質として働く。本研究では脂質部位にアジド基を導入した糖鎖プライマーが二種類、コントロールとしてアジド基を持たない糖鎖プライマーが一種類合成され、それぞれ細胞により糖鎖伸長されることが示された。アルキル鎖の根元にアジド基を導入した糖鎖プライマー(2-azidododecyl β -lactoside: primer II)は他のプライマーと比べて約2倍糖鎖伸長を受けやすいことが明らかとなったが、三種類の糖鎖プライマーの界面活性能を測定することによりこの理由も明らかにした。また、播種細胞数依存性、プライマー濃度依存性、培養時間依存性についても明確な依存性を確認し、最適条件を決定した。さらに、検討した最適条件を用いてのGM3類似体の大量合成と、生成物の分離精製方法も検討している。本研究は、これまで微量分析レベルでしか生成物を得ることのできなかつたこの手法を向上させ、大量合成への可能性を提示した。

第三章では、GM3とepidermal growth factor receptor (EGFR)の相互作用や細胞における外因性/内在性GM3について検証している。糖脂質が種々の増殖因子受容体に影響を及ぼすことは知られているが、実際の作用機構は明らかにされていなかった。本章では、GM3とEGFRの相互作用の機序を、共焦点レーザー顕微鏡による画像解析など様々な手法により明らかにした。

第四章では、糖脂質のクラスター効果の説明と、GM3の代謝中間体であるlyso-GM3のオリゴマー化、合成された化合物のキナーゼ活性への阻害効果や細胞毒性を評価している。EGFRを高発現しているA431細胞に各化合物を様々な濃度で添加したところ、lyso-GM3 dimerに高いチロシンキナーゼ活性阻害能が見出されている。

第五章では、第二章で大量合成の可能性が示されたGM3類似体(lyso-GM3 mimetic)を応用して同様な機能性糖鎖含有分子の合成を行い、それらがEGFRの関係する生理現象に及ぼす作用を検証している。A431細胞にこれらの各々の化合物を投与し、糖鎖伸長したプライマーを応用した新規化合物であるmimetic dimerに天然型であるlyso-GM3 dimerと同様のEGFRのチロシンリン酸化阻害能があることを示した。さらに、EGFRシグナリングの下流にあたるAktや細胞増殖も抑制することを明らかにした。

第六章では、一般的なガン細胞におけるこれらの化合物の阻害能が検証されており、ここまで用いられてきたA431細胞だけでなく、同様にEGFRを発現していることが知られているKB細胞においてもEGFRのリン酸化を阻害できることが示されている。また、EGFRの悪性の高い変異体として知られるEGFRvIIIを発現した細胞においてもlyso-GM3 dimer およびmimetic dimer はチロシンキナーゼ活性阻害能を示すことを発見し、これらのオリゴ糖を含む機能性分子がEGFによって誘導される細胞増殖、その中でも特に癌に対して有効な阻害剤となり得る可能性を示した。

第七章では、EGFRとGM3の直接的相互作用を、SPR法を用いて詳細に解析している。結合定数やkinetics parameterの解析により、EGFRと糖脂質の相互作用が特異的であることを発見した。

第八章では、本論文の総括と将来への展望を述べている。

以上のように、本論文では、有機合成と生化学という異なる分野を融合させたユニークな糖鎖生産法を用い、その手法の向上と、その結果得られる糖脂質類似体の応用を検討している。まず、培養条件や糖鎖プライマーの物理的性質を徹底的に検討することにより、収率を大幅に上昇させ、大量合成への可能性を提示した。さらに糖脂質類似体の応用として新規な機能性糖鎖含有分子を合成し、その優れた生理活性を実証した。また、従来の生物学的な研究では解明しきれなかったEGFRとGM3の相互作用をも明らかにした。これらの成果は、生化学および糖鎖生命工学の発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。