

**Analysis of Glycosaminoglycan Biosynthetic Intermediates and Development of Comparative Quantification Method Using Novel  $\beta$ -Xylosides**

June 2018

Yuya Otsuka

# 主 論 文 要 旨

| 報告番号  | 甲 乙 第 | 号 | 氏 名 | 大塚 祐也 |
|---|-------|---|-----|-------|
| 主 論 文 題 名 :   |       |   |     |       |
| Analysis of Glycosaminoglycan Biosynthetic Intermediates and Development of Comparative Quantification Method Using Novel $\beta$ -Xylosides<br>(新規 $\beta$ -キシロシドを利用したグリコサミノグリカン生合成中間体の解析と糖鎖伸長生成物の比較定量法の開発)  |       |   |     |       |
| (内容の要旨)   |       |   |     |       |
| <p>グリコサミノグリカン (GAG) は、主に細胞外マトリックスに存在する直鎖アニオン性多糖類であり、様々な細胞間相互作用に携っている生体分子である。GAG はその鎖長や修飾基により極めて複雑かつ不均一な構造を有しており、その構造多様性は種々の生理機能と密接に関連している。GAG の構造は生合成機構によって制御されていることから、その構造-機能相関研究の推進には生合成中間体を含む GAG 生合成能を適切に評価する必要がある。<math>\beta</math>-キシロシドを利用した糖鎖プライマー法は、対象細胞の糖鎖生合成機構に従ったオリゴ糖鎖を獲得出来る技術であるが、GAG 生合成中間体の獲得を指向した<math>\beta</math>-キシロシドの探索はなされていない。本研究では GAG 生合成中間体の解析に適した新規<math>\beta</math>-キシロシドを創製し、それを糖鎖プライマー法に利用することで、被検細胞における GAG 生合成中間体の産生能を比較定量する手法を確立することを目的とした。</p> <p>第 1 章では、GAG と<math>\beta</math>-キシロシドの一般的な情報を概説し、GAG の関連する生命科学を進展させるための課題を明らかにした。さらに、当研究の目的及び方針を説明した。</p> <p>第 2 章では、糖鎖プライマーとして <i>O</i>-キシロシルアミノ酸残基を有する<math>\beta</math>-キシロシドを合成すべく、化学酵素的縮合法を利用した合成スキームを確立した。</p> <p>第 3 章では、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を利用して合成した 4 種の<math>\beta</math>-キシロシドの糖鎖伸長能を比較した。試料調製および LC-MS / MS 条件の最適化により、GAG 生合成中間体であるリン酸化糖鎖を定量可能な分析方法を構築し、それによって GAG 中間体オリゴ糖を含む糖鎖伸長能の比較に適した<math>\beta</math>-キシロシドを選定した。</p> <p>第 4 章では、選定した<math>\beta</math>-キシロシドの安定同位体標識体を利用することで、伸長糖鎖の精確な比較定量法を開発した。GAG 生合成阻害剤を用いた細胞アッセイによって、当方法の適格性を検証し、糖鎖伸長生成物の比較定量結果から各阻害剤における作用機序の違いを明らかにした。</p> <p>第 5 章では、外因性硫酸化 GAG が内因性 GAG 産生能に与える影響を、確立した比較定量法によって検証した。その結果、特定の構造を有する硫酸化 GAG が NHDF における GAG 生合成を促進する事を見出した。</p> <p>第 6 章では、結論として本論文を総括し、確立した比較定量法の展望について述べた。</p> <p>本論文では、定量的・定性的に GAG 生合成能を評価するにあたり、創製した<math>\beta</math>-キシロシドを利用した糖鎖プライマー法が有用であることを立証した。確立した比較定量法は、被検細胞の GAG 生合成能の微細な変動を定量的に把握することが可能であった。今後、当方法を利用することで GAG の生合成機構の解明及び構造-機能相関研究がさらに発展し、GAG の生理作用に基づく新たな創薬へと展開することが期待される。</p> |       |   |     |       |

## Thesis Abstract

No. \_\_\_\_\_

|  |   |      |             |
|--|---|------|-------------|
| Registration Number  | <input checked="" type="checkbox"/> "KOU" <input type="checkbox"/> "OTSU"<br>No. _____ *Office use only | Name | Yuya Otsuka |
| <b>Thesis Title</b><br>Analysis of Glycosaminoglycan Biosynthetic Intermediates and Development of Comparative Quantification Method Using Novel $\beta$ -Xylosides  |   |      |             |
| <b>Thesis Summary</b><br><p>Glycosaminoglycans (GAGs) are linear and anionic polysaccharides found in extracellular matrices, and are related to several intracellular biological phenomena. Their structure is highly heterogeneous in terms of their chain length and modification, and this structural diversity is closely related to their biological functions. The structure of GAGs is regulated by the biosynthetic mechanisms; hence, a method for evaluating the GAG production capability including their biosynthetic intermediates is needed for the structure-function relationship studies. <math>\beta</math>-Xylosides have been used artificial acceptors for GAG; however, the structures of <math>\beta</math>-xylosides appropriate for investigation of GAG intermediates are not yet developed. Therefore, it was the aim in this study to discover a <math>\beta</math>-xyloside suitable for in-depth analysis of GAG biosynthetic intermediates in cells and to establish a comparative quantification method. The thesis is composed of six sections.</p> <p>In chapter 1, general information on GAG and the saccharide primer method was summarized, and then issues in GAG related bioscience were clarified. Additionally, the aim of the study was described.</p> <p>In chapter 2, the synthetic scheme for <math>\beta</math>-xylosides that have O-xylosyl amino acid residues was established using chemoenzymatic condensation.</p> <p>In chapter 3, the priming ability of the four <math>\beta</math>-xylosides in normal human dermal fibroblast cells were examined. By optimization of sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry conditions, an analytical method for phosphorylated oligosaccharides was established, and then the saccharide primer appropriate for comparative quantification of GAG intermediate was determined.</p> <p>In chapter 4, a comparative quantification method for elongated oligosaccharides using stable isotope labeled saccharide primer was established. The method was validated using GAG biosynthesis inhibitors. The result indicates that the method could clarify differences in the mode of action of the examined GAG inhibitors.</p> <p>In chapter 5, the effect of exogenous sulfated GAGs on endogenous GAG production was examined by the comparative quantification method. The method revealed that certain sulfated GAGs stimulate NHDF cells to increase endogenous GAG production.</p> <p>In chapter 6, the results and discussion of the thesis were summarized and the perspective of the method established in the thesis was described.</p> <p>In the present thesis, the feasibility of saccharide primer method using <math>\beta</math>-xyloside for quantitative and qualitative studies for the capability of GAG intermediate biosynthesis was demonstrated. The saccharide primer method was applied to evaluate the effect of exogenous GAGs on endogenous GAG production. The established comparative quantification method made it possible to reveal the difference in the biosynthetic abilities of the cells for GAG intermediates. This method will lead to an understanding of both GAG biosynthetic mechanisms and the structure-activity relationship of the GAG, as well as drive GAG-based drug discovery.</p> |   |      |             |