

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18694

研究課題名(和文) ガングリオシド修飾による高次機能化細胞培養基材の開発

研究課題名(英文) Development of highly functionalized cell culture substratum with ganglioside glycans

研究代表者

今村 彰宏 (IMAMURA, Akihiro)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：30610951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：有用なバイオマテリアルとして知られる繊維状タンパク質シルクフィブロインに対して、高次機能性を有するガングリオシド糖鎖を化学修飾する手法を開発した。修飾する糖鎖は、強力な神経突起伸展活性をもつ棘皮動物由来ガングリオシドLLG-3の糖鎖部分とし、これを化学合成により調製した。LLG-3糖鎖には、アグリコンとして、末端に芳香族アミンを有するリンカーを配し、これをフィブロインのポリペプチド鎖に含まれるチロシン残基に対して、ジアゾカップリング反応で結合させた。その結果、高度な生理活性を有する糖鎖をフィブロインに導入することに成功し、ガングリオシド糖鎖修飾シルクフィブロインを世界で初めて創出した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a chemical modification method for introducing highly bioactive gangliosides to silk fibroin protein, which has been used as a matrix material in the field of tissue engineering. As a glycan to modify silk fibroin, the glycan part of echinodermatous ganglioside LLG-3 was chosen due to a high degree of the neurogenic activity and chemically synthesized. The synthetic LLG-3 glycan with a linker bearing an aromatic amine at the terminal was coupled with tyrosine residues in silk fibroin via diazonium coupling reaction, leading to the generation of ganglioside-modified silk fibroin for the first time.

研究分野：応用糖質化学

キーワード：フィブロイン ガングリオシド 糖鎖修飾 バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

ガングリオシドはシアル酸を糖鎖末端に有する細胞膜糖脂質の一群であり、そのうち、脳に高発現するガングリオシドには、強力な神経突起伸展活性があることが知られている。また、ガングリオシドの化学合成技術は近年目覚しく進歩し、構造均一かつ夾雑物のない純粋なガングリオシドが入手可能になってきた。一方、糖鎖の機能解明を進めるに当たり、これまでガングリオシドなどの糖鎖刺激による細胞応答は、生細胞に対して糖鎖を二次元的に“振りかける”ことで評価されてきた。しかし、自然界における細胞応答は、糖鎖を含む細胞外因子からの刺激を細胞の全周囲から三次元的に受けることで促進されるため、これまでの研究手法では糖鎖の機能を厳密な意味で評価できていなかった。

2. 研究の目的

ガングリオシドがもつ生理機能（神経突起伸展活性）に着目し、ガングリオシド糖鎖で修飾した細胞培養基材を開発することを目的とする。具体的には、化学合成したガングリオシド糖鎖で繊維状タンパク質（シルクフィブロイン）を修飾して三次元足場基材を作製し、高次機能性を有する細胞培養基材を創出する。作製した培養基材で神経細胞等を培養し、糖鎖修飾による細胞分化への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

まず、ガングリオシド糖鎖として、その糖鎖部分のみで強力な神経突起伸展活性を有する棘皮動物由来ガングリオシド LLG-3 の四糖部分を化学合成する。次に、これをシルクフィブロインに含まれるチロシン残基に対して、ジアゾカップリング反応により導入する。得られた糖鎖修飾シルクフィブロインを細胞培養基材へと誘導し、各種細胞を培養して糖鎖修飾による細胞分化応答を評価する。

4. 研究成果

(1) ガングリオシド LLG-3 糖鎖の合成

LLG-3 糖鎖は、シアル酸 $\alpha(2,11)$ シアル酸 $\alpha(2,3)$ ガラクトース $\beta(1,4)$ グルコースで構成された四糖である。本研究では、LLG-3 糖鎖をシルクフィブロインへ導入する際に、クリック反応の一種であるヒュスゲン環化付加反応を利用することを想定し、糖鎖側に官能基として予めアルキンを配した分子設計とした (図1)。当該糖鎖の合成経路は、図1に示したように、まず、非還元末端のシアル酸誘導体 **4** と内部シアルルガラクトース二糖誘導体 **5** をアミド結合で繋ぎ、これを三糖供与体 **3** へと導いた後、予めアグリコンとしてアルキン部位を導入しておいたグルコース受容体 **2** とグリコシル化することで、目的とする LLG-3 四糖糖鎖 **1** へ導くスキームとした。まず、非還元末端側三糖供与体 **3** は、当研究室

の既報論文(*Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2330–2333)を参考にして合成した (図2)。次に、アグリコンとしてプロパギル基を有する還元末端グルコース誘導体 **2** は、グルコースペンタアセテートを出発物質として、6段階を経て合成した (図3)。最後に、合成ユニット **2** および **3** をグリコシル化反応に供することで、目的とする LLG-3 四糖糖鎖 **1** の合成を達成した (図4)。

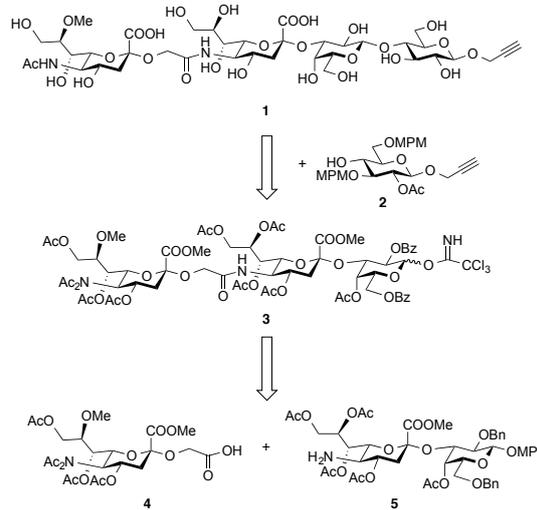


図1. LLG-3 糖鎖の合成戦略概要

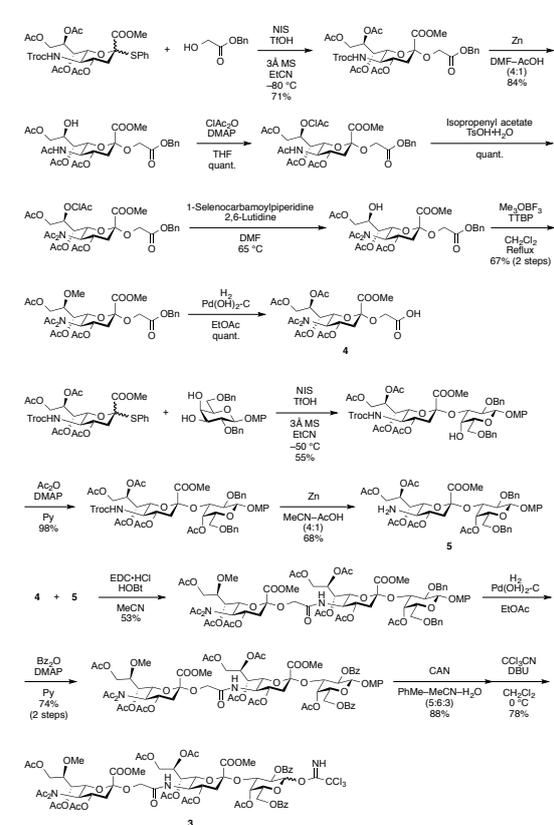


図2. 非還元末端側三糖供与体 **3** の合成

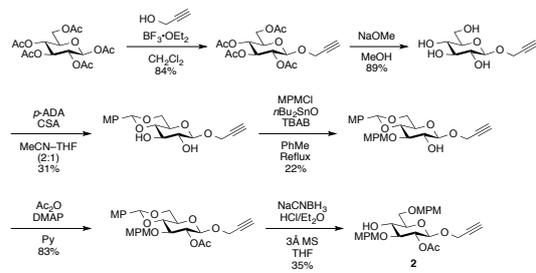


図 3. 還元末端グルコース受容体 **2** の合成

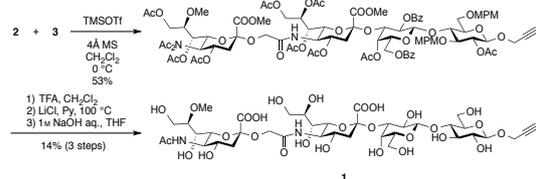


図 4. LIG-3 四糖糖鎖 **1** の合成

(2) リンカー部の設計および合成

研究計画段階では、糖鎖とフィブロインの結合は、糖鎖の還元末端に直接アグリコンとして導入した芳香族アミンとフィブロイン中に約 5% 存在するチロシン残基間でのジアゾカップリングを想定していた。しかしながら、予備実験において、糖鎖アグリコンの芳香族アミンから生成するジアゾニウム塩の安定性の低さが問題となり、ジアゾカップリング反応が円滑に進行しないという知見を得た。そこで、戦略を見直し、糖鎖とフィブロインの間にリンカーを配した設計とし、リンカーの末端には、それぞれ、アジド基と芳香族アミンを導入することとした。すなわち、新戦略では、まずフィブロインに対してリンカーをジアゾカップリングで導入し、その後、糖鎖をクリック反応で導入する経路とした。

設計したリンカーの構造と合成経路を図 5 に示す。リンカー**6** はトリエチレングリコールを出発物質として、5 段階で合成した。

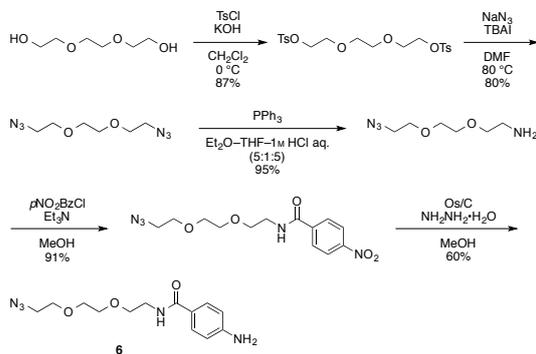


図 5. リンカー**6** の合成

(3) フィブロインへのリンカー導入

新規研究計画に基づいて、フィブロインへのリンカー導入を試みた。まず、モデル実験として、リンカーと *p*-Cresol (チロシンのモデル) との間でジアゾカップリング反応を検討した。反応条件は、既報論文 (Murphy, A. R.

et al. Biomaterial **2008**, *29*, 2829–2838) を参考にして、一段階目でジアゾニウム塩を形成させた後、ホウ酸緩衝液を加えた。続いて、少量の炭酸水素ナトリウムを加えて pH を 8 に調整後、*p*-Cresol を加えた。この際、反応液は、アゾ基生成に由来する濃い赤褐色を呈した。収率は反応時間が長い方が高い傾向にあり、21 時間後の収率は 98% であった (図 6)。

次に、チロシンを用いたモデル実験を実施した。*p*-Cresol で最適化した条件下において、リンカーと *N*-Boc-Tyrosine を反応させた。その結果、76% の収率で目的とするアゾ化合物を得た (図 7)。

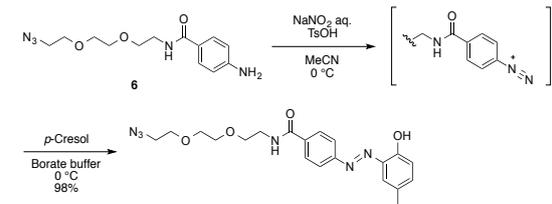


図 6. ジアゾカップリング反応の検討 I

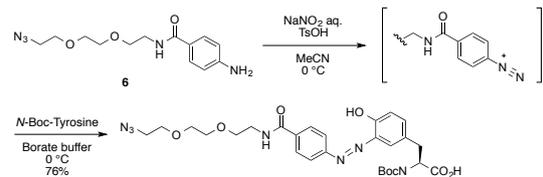


図 7. ジアゾカップリング反応の検討 II

次に、研究ターゲットであるフィブロインへのリンカー導入を試みた。まず、フィブロイン中に含まれるチロシン残基の量を算出した。Zhou らの論文 (Zhou, C. Z. *et al. Proteins* **2001**, *44*, 119–112) を参考にして、フィブロインの分子量を 391 kDa、そのポリペプチド鎖中の 5.3% がチロシンであると仮定すると、フィブロイン 200 mg 中には約 63 μ mol のチロシンが含まれていることになる。この計算結果を基にして、リンカーとフィブロインのジアゾカップリング反応を遂行した。なお、当該反応では、蚕繭から精練・調製した 3% フィブロイン水溶液を用いた。反応液は、フィブロイン水溶液添加直後に赤褐色へと変化し、アゾ化合物の生成が示唆された。フィブロインへのリンカー導入の確認は UV-Vis 測定にて行った。ジアゾカップリング反応後、透析処理を施したサンプルを凍結乾燥し、それを再び超純水に溶解したものを測定サンプルとした。測定サンプルは、反応に用いたリンカーの当量別に 0.25、0.5、0.75、1.0 equiv の 4 種類用意し、対照用として、フィブロイン水溶液のみのサンプルを用意した。また、サンプル濃度はそれぞれ 0.15 wt% で調製した。図 8 に測定結果を示す。

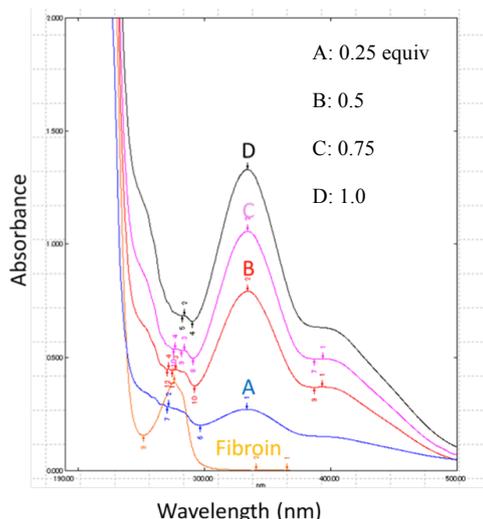


図 8. フィブリンに対するリンカー導入時の UV-Vis スペクトル

図 8 において、各サンプルの UV-Vis スペクトルは、極大吸収波長が 280 nm から 330 nm 付近へシフトした。これは、ジアゾカップリングにより、フィブリン中のチロシンがアゾベンゼン構造に変化したことを示しており、これによりジアゾカップリング反応の進行を確認した。また、ジアゾカップリング反応に用いたリンカーの当量が多いほど 330 nm 付近の吸光度が高くなったことから、反応に用いるリンカーの当量を変化させることで、修飾度合いを制御できる可能性が示された。

(4) フィブリンへの糖鎖導入 (モデル実験)

フィブリンへのリンカー導入に続き、クリック反応を利用した糖鎖の導入を試みることにした。しかしながら、フィブリンは高分子量であることに加え、糖鎖導入部位となるチロシンの残基数が少ないことから、NMR による糖鎖導入の確認は困難であると考えられた。そこで、まず、クリック反応による糖鎖の導入に向けて、緑色色素 (FastGreenFCF) を導入したグルコース誘導体をモデル糖として、フィブリンへの導入を検討した。図 9 に示した FastGreenFCF-グルコースを別途調製し、先に調製したリンカー修飾フィブリンとのヒュスゲン環化付加反応を試みた。この際、凍結乾燥して保存していたリンカー修飾フィブリンを超純水に溶解し、水溶液に戻そうとしたところ、非常に難溶であった。また、反応に用いたモデル糖の当量はアジド基に対して同当量とした。反応試薬として、硫酸化銅、アスコルビン酸ナトリウムを用い、室温にて 12 時間反応させた。反応終了後、生成物を透析で精製し、凍結乾燥後、緑色化合物を得た (図 9)。得られた化合物の UV-Vis スペクトルから FastGreen 由来の吸収 (630 nm 付近) を観測したことから、フィブリンへの糖鎖導入を

確認した。しかし、この反応で得られた化合物の収率は著しく低かった。これは、リンカー修飾フィブリンの水に対する低い溶解性と、容易にゲル化する特性に起因すると考えられる。

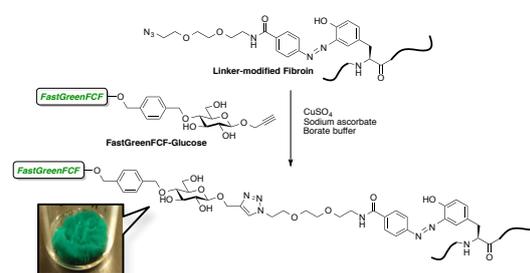


図 9. モデル糖を用いたフィブリンの糖鎖修飾

(5) フィブリンへの糖鎖導入 (改良法)

上記(4)のモデル実験で得られた知見より、フィブリンへリンカーを導入した後に糖鎖で修飾する戦略は効率が悪く、現実的ではないと判断し、糖鎖導入方法を根本から見直すこととした。すなわち、改良法では、糖鎖は予めリンカーと結合させ、糖鎖付加リンカーを合成した後、フィブリンに導入する戦略とした。

まず、モデルとして、グルコース単糖で改良法を検討した。リンカー6 に対して、プロパルギルグルコースをクリック反応で導入し、得られたグルコース付加リンカーを、ジアゾカップリングにてフィブリンに導入した (図 10)。その結果、アゾ基の生成を示唆する橙色に呈色した化合物が得られた。これを $^1\text{H NMR}$ にて構造解析した結果、トリアゾール環由来のプロトンシグナルおよびリンカー由来芳香族プロトンシグナルの低磁場シフトが認められた。これらの情報より、フィブリンへのグルコース導入を確認した。また、当該グルコース修飾フィブリンは、糖を導入したことにより水溶性が向上し、ゲル化することなく 4 °C 条件下、液体状態で長期間安定に存在することを確認した。

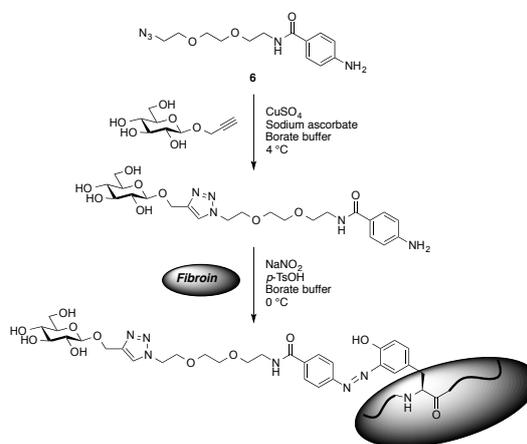


図 10. 改良法によるフィブリンの糖修飾

次に、本研究の目的化合物である LLG-3 修飾フィブロインを合成した。上記(1)で合成した LLG-3 四糖糖鎖 **1** とリンカー **6** をヒュスゲン環化付加反応で結合させ、LLG-3 糖鎖リンカーを合成後、これをジアゾカップリング反応に供し、フィブロインと反応させた。反応後、透析による精製を経て得られたサンプルを ^1H NMR にて構造解析した。その結果、グルコースを用いたモデル実験の結果と同様、トリアゾール環由来のプロトンシグナルおよびリンカー由来芳香族プロトンシグナルの低磁場シフトが認められた。さらに、LLG-3 に含まれるシアル酸由来のプロトンシグナル (H-3ax, 3eq) が観測されたことから、フィブロインへの LLG-3 糖鎖の導入を確認した。この結果、生体適合性に優れ、機能性材料として広く認知されているシルクフィブロインに対して、ガングリオシドのような高次機能性を有する糖鎖の導入を世界で初めて達成し、LLG-3 糖鎖修飾フィブロインを創出した (図 11)。

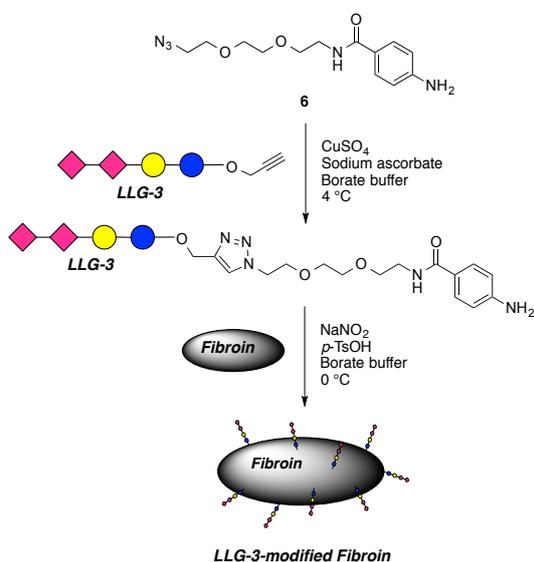


図 11. LLG-3 修飾フィブロインの創出

また、フィブロインへの LLG-3 糖鎖の導入は、フィブロインに対して LLG-3 糖鎖が(0.2 equiv, 0.5 equiv)の二通りについて実施した。橙色の呈色は、用いた糖鎖の当量に比例して 0.5 equivの方が濃くなった。また、グルコース修飾フィブロインと比較した場合、水(重水)への溶解性や外見上の差異は確認できなかったが、粘性については LLG-3 糖鎖で修飾したものの方が高かった。得られた液状の LLG-3 修飾フィブロインは、フィルム状へと形状誘導することが可能であり、現在、細胞培養基材への誘導化を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yagami, N.; Imamura, A.* Stereodirecting effect of cyclic silyl protecting groups in chemical glycosylation. *Rev. Agric. Sci.*

2018, 6, 1–20. 査読あり DOI: 10.7831/ras.6.1

- ② Tanase, M.; Imamura, A.*; Ando, H.; Kiso, M.; Ishida, H. Linear synthesis of the Chol-1 ganglioside core tetrasaccharide and disialyl T antigen glycan using a 5-ureido-sialyl donor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2017**, 81, 2268–2278. 査読あり DOI: 10.1080/09168451.2017.1395682
- ③ Imamura, A.*; Matsuzawa, N.; Sakai, S.; Udagawa, T.; Nakashima, S.; Ando, H.; Ishida, H.; Kiso, M. The origin of high stereoselectivity in di-*tert*-butylsilylene-directed α -galactosylation. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 9086–9104. 査読あり DOI: 10.1021/acs.joc.6b01685

[学会発表] (計 1 件)

- ① 武藤達朗、今村彰宏、石田秀治 シルクフィブロインの糖鎖修飾に向けた方法論の開発、糖鎖科学中部拠点 第 14 回「若手の力」フォーラム、2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 彰宏 (IMAMURA, Akihiro)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号： 30610951

(2) 研究協力者

武藤 達朗 (MUTO, Tatsuro)