

令和 2 年 9 月 25 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08347

研究課題名(和文) 創薬を目指した無脊椎動物由来複合糖質糖鎖の合成と機能探索

研究課題名(英文) Synthesis and function search of glycoconjugate found from invertebrate animal species for drug discovery

研究代表者

羽田 紀康 (Hada, Noriyasu)

東京理科大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：70296531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表層に存在する糖タンパク質や糖脂質など複合糖質の糖鎖が細胞間の認識現象に深く関与する分子種であることが明らかとなり、特に高等動物より見出された糖鎖の化学的、生物学的研究が盛んに行われている。一方、無脊椎動物より見出された糖鎖構造はほ乳類の糖鎖構造とは大きく異なっているが、機能解明には至っていない。そこでこれら無脊椎動物由来の糖鎖構造と生物機能に興味を持ち、化学合成を行うことで機能解明及び創薬を目指している。今回、寄生虫であるエキノコックス(*Echinococcus granulosus*)及び海綿より見出された糖鎖の化学合成を行い、数種類の目的化合物を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖は栄養の観点からのみ有用な物質ではなく、細胞の分化、増殖、がん化、など、基本的な生命現象に深く関わっている分子種であり、その機能を解明することは創薬に深く関わっている。抗インフルエンザ薬であるタミフルは、我々が細胞表層に持つシアル酸という一連の糖鎖の役割を追求し、これを元に開発してきた身近な例である。我々はこのような糖を素材として創薬研究を行っており、その素材を二等動物に求めてきた。特に寄生虫感染に関わる創薬は、新興国では非常に大きな問題であり、新薬の早期開発が望まれる。また、海綿由来の糖脂質も新規性の観点から魅力ある化合物であり、合成目標として語る。

研究成果の概要(英文)：The oligosaccharide residues of glycoconjugates such as glycoproteins and glycosphingolipids in mammalian tissues have been extensively studied for various biological recognition in recent years. In contrast, although the sugar chain structure found in invertebrates differs greatly from that of mammals, its function has not been elucidated. Therefore, we are interested in carbohydrate structures and biological function derived from these invertebrates, and aim to elucidate the function and drug discovery by chemical synthesis. We carried out the synthesis of oligosaccharides from the helminth, *Echinococcus granulosus* and some genus Sponge and got target some oligosaccharides.

研究分野：糖化学、天然物化学

キーワード：糖鎖合成 宿主・寄生相互作用 糖脂質 糖タンパク質 寄生虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞表層の糖鎖は、植物・動物を問わず細胞の認識伝達に様々な形で関与していることが示唆されている。高等動物、特に人の複合糖質に関する研究が発展していく中で、我々はそれとは違うユニークな構造を持った無脊椎動物から見出された糖脂質、糖タンパク質に注目し、それらの生物機能解明のため全合成あるいはモデル合成を行ってきた。無脊椎動物由来の糖脂質を化学合成の立場から研究する機関は国内外見渡しても類を見ず、少なからず注目を受けている。これまでの成果として以下のことがあげられる。(1)世界中で重篤な感染症を引き起こし問題となっている寄生虫の1つであるエキノコックスの診断に関する研究は、エキノコックス寄生虫の持つタンパク抗原と血清との相関に関する報告はあるものの、糖鎖抗原を用いた研究はこれまで皆無であった。我々はエキノコックス (*Echinococcus multilocularis*)由来の糖脂質に着目し、その全合成を成し遂げ患者血清との相関を調べたところ健常人と比べ顕著な差が見られ、抗原性を有することを突き止めた。また、同寄生虫より見出された糖タンパク質糖鎖にも注目しその合成を行ってきた。(2) キシャヤステから見出された三糖糖脂質を合成し、マウスメラノーマ B16F10 に対する増殖を抑制することを見出した。(3) 海綿の一種より見出された D-フコースを含有する糖脂質とその関連化合物を合成し、NO 産生抑制活性に対する構造活性相関を検討した。(4) ブタ回虫やフトミズなどから見出されたホスホコリンを含有する糖脂質には、IL1 や IL-6 などのサイトカイン誘導活性を有している報告があり、合成化合物においては新たにヒスタミン遊離阻害活性や IL-8,12 など別のサイトカイン誘導活性も見出した。(5) マンソン住血吸虫より見出された新奇なコア構造を持つ糖脂質群を合成した。

### 2. 研究の目的

(1)-a エキノコックス多包条虫 (*E. multilocularis*) 由来糖脂質のビオチン化糖鎖：これまでに *E. multilocularis* から見出された糖脂質 4 種及び糖タンパク質糖鎖 5 種を合成し、それぞれ患者血清に対する抗原性を調べてきた。ここでは合成した 4 種の糖脂質と 5 種の糖タンパク質糖鎖のうち、それぞれ一番抗原性の高い物を選び、糖脂質の脂質部分をビオチン化することにより(Fig. 1)、還元末端の条件をそろえどちらの糖鎖の抗原性が高いかを比較した。

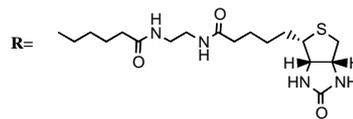


Fig. 1

(1)-b エキノコックス単包条虫 (*E. granulosus*) 由来糖タンパク質糖鎖：単包条虫から見出されたの四糖 ( $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1\text{-R}$ ) 及び五糖 ( $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1\text{-R}$ ) ( $\text{R}=\text{ビオチンプロープ}$ ) の系統合成を目指した(Fig. 2)。これまでの合成法は四糖及び五糖のいずれも還元末端側から糖鎖伸張を目指したステップワイズの合成法を試みてきたが、保護、脱保護及び、縮合のステップ数が多く、収率低下の原因となった。また、五糖に関しては、中間位のガラクトース導入に対してすべてエステルで保護された糖供与体の反応性が低下しており、糖鎖伸張がかなわず、保護基を工夫して五糖までの糖鎖伸張を完了してきた。本研究においては、四糖及び五糖の非還元末端二糖受容体をあらかじめ調製し、四糖は還元末端二糖受容体、五糖は還元末端三糖受容体を調製しそれぞれ 2+2、2+3 の縮合により糖鎖伸張し効率的な合成法を見出す。得られた目的糖鎖はこれまでに合成が完了している単包条虫由来の 3 種類の糖鎖とともに、単包虫症感染患者の血清に対して抗原性を調べるとともに、多包虫症感染患者の血清に対する交叉反応を調べることで単包虫症感染患者への特異性を検討した。

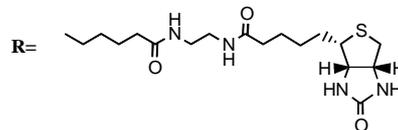
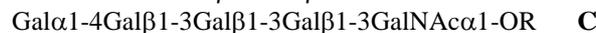
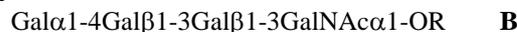


Fig. 2

(2) 海綿 *Agelas* 属由来糖脂質：海綿の一種 *Agelas dispar* より見出された 5 種類の糖脂質の全合成を目指す。これまでに 4 種類の二糖糖脂質の全合成は完了しているが、収率改善を目指し、新規な方法を開発するとともに、まだ未完成である  $\text{GalNAc}\beta 1-6\text{Gal}\alpha 1-2\text{Gal}\alpha 1\text{-Cer}$  の合成を目標とする(Fig. 3)。特に中間位のガラクトース受容体は保護基の観点から 4,6 位水酸基遊離となり、6 位に選択的にガラクトサミン供与体を導入するところが鍵反応となる。

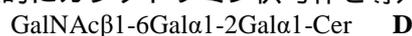


Fig. 3

(3) 海綿 *Terpio* 属由来糖脂質： *Terpio* 属より見出された糖脂質はこれまでに動物から見出されていないフコフラノースを含んだ  $\text{Fuc}\alpha 1-3\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$  という構造をしており、構造的にも生物活性適にも興味深く、非天然型である  $\text{Fuc}\beta 1-3\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$  も併せて合成目標とする (Fig. 4)。本合成の鍵反応は市販のフコピラノースから直接フコフラノース誘導体への変換であり、収率よく得られる条件を検討する。また、還元末端側のグルコースには、あらかじめアジドスフィンゴシン (またはセラミド) を導入し、保護、脱保護、脱離基の変換、縮合の回数を減らし、効率的な合成法を開発する。

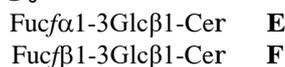


Fig. 4

(4) 堀田裂頭条虫由来 *Diphyllobothrium hottai* の糖脂質： 本寄生虫から見出された糖脂質は  $\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{Glc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-\text{Cer}$  及び、 $\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{Glc}\beta 1-3(\text{Gal}\beta 1-6)\text{Gal}\beta 1-\text{Cer}$  という四糖、五糖糖脂質であり、ガラクトース、グルコース、フコースという 3 種類の糖鎖を含んでいる (Fig. 5)。しかし、ガラクトースは 3 種類の誘導体が必要であり、本年度はまず、5 種類の単糖誘導体を合成目標とする。糖脂質の合成は一般的に糖鎖伸張した後、セラミド部の導入を試みているが、五糖誘導体へのセラミドの導入はかなり収率の低下が予想される。そこで、あらかじめ還元末端側ガラクトースにアジドスフィンゴシンを導入し、これを単糖受容体として糖鎖伸張できないかを検討する。

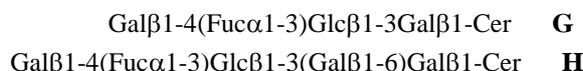
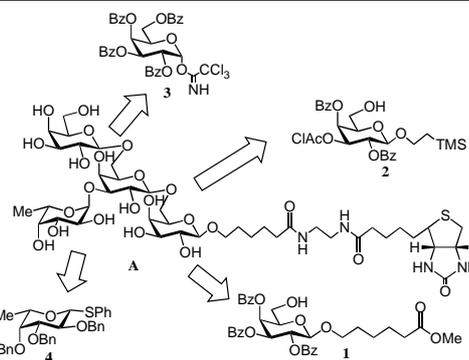


Fig. 5

### 3. 研究の方法

#### (1)-a エキノコックス多包条虫 (*E. multilocularis*) 由来糖脂質のビオチン化糖鎖の合成：

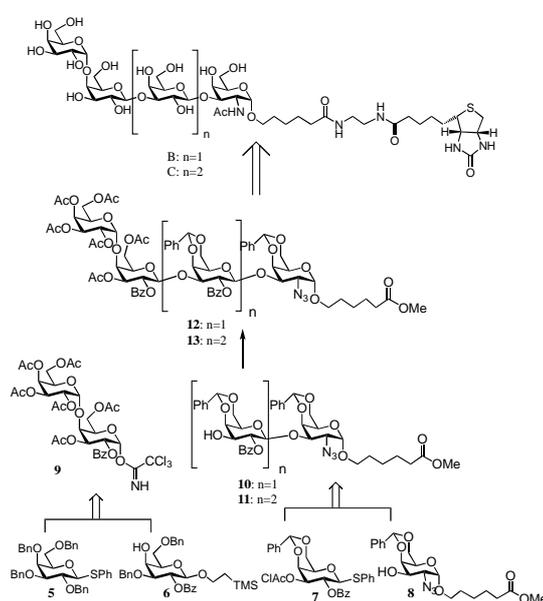
これまでに合成した 4 種類の糖脂質の中で、最も抗原性の高かった四糖糖脂質の脂質部分をビオチン誘導化したモデル化合物 **A** (Fig.1) を合成目標とした。化合物 **A** はそれぞれ適切に保護した単糖誘導体 **1-4** を順次縮合させ、四糖誘導体に導いた後、すべての水酸基の保護基を脱保護し、還元末端をビオチン化することにより得られた。(Scheme 1)



Scheme 1

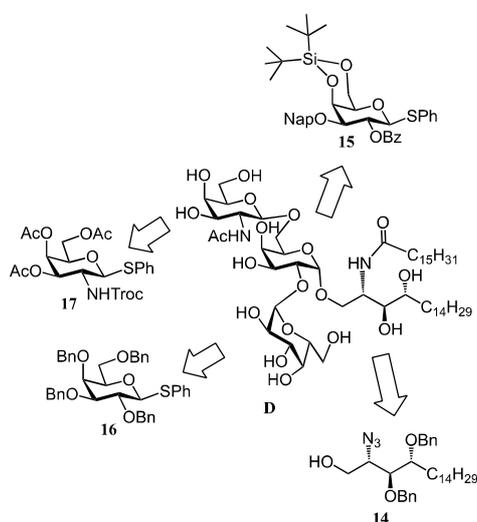
#### (1)-b エキノコックス単包条虫 (*E. granulosus*) 由来糖タンパク質糖鎖の合成：

これまでの結果より、四糖合成においては還元末端よりステップワイズに糖鎖伸長し、目的ビオチン化糖鎖 **B** を得ているが、五糖はステップワイズな伸長方では得ることが出来なかった。そこで Scheme 2 に示すように単糖誘導体 **5-8** を調製し、**5** と **6** を縮合することにより四糖及び五糖の非還元末端二糖供与体 **9** をあらかじめ調製し、一方、単糖誘導体 **7** 及び **8** から四糖のための還元末端二糖受容体 **10**、五糖のための還元末端三糖受容体 **11** を合成した。その後それぞれ 2+2、2+3 の縮合により糖鎖伸張するという効率的な合成法を見出し目的糖鎖 **B** 及び **C** に導いた。得られた糖鎖はこれまでに合成が完了している単包条虫由来の 3 種類の糖鎖とともに、単包虫症感染患者の血清に対して抗原性を調べるとともに、多包虫症感染患者の血清に対する交叉反応を調べることで単包虫症感染患者への特異性を検討した。しかし、単包虫症患者に特異的な単包虫由来の糖鎖を見出すことは出来なかった。



Scheme 2

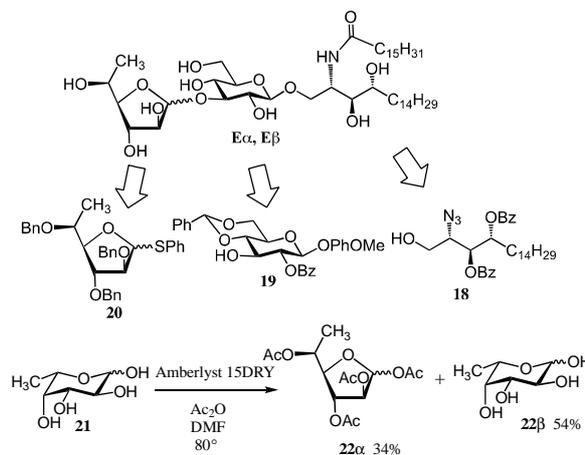
(2) 海綿 *Agelas* 属由来糖脂質の合成：「*Agelas dispar*」より見出された三糖糖脂質 GalNAc $\beta$ 1-6Gal $\alpha$ 1-2Gal $\alpha$ 1-Cer **D** の全合成は、鍵化合物となるガラクトース受容体 **15** とアジドスフィンゴシン受容体 **14** を縮合した後、順次、**16**, **17** を縮合させて糖鎖伸長し、三糖糖脂質誘導体まで導いた。(Scheme 3)



Scheme 3

(3) 海綿 *Terpio* 属由来糖脂質の合成：

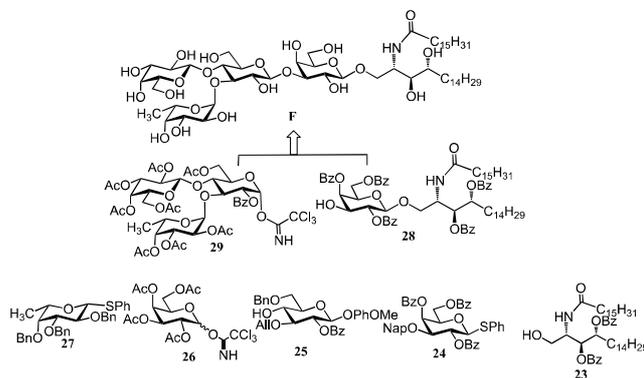
*Terpio* 属より見出された二糖糖脂質 Fuc $\alpha$ 1-3Glc $\beta$ 1-Cer (**E $\alpha$** )及びその異性体である Fuc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-Cer (**E $\beta$** )の全合成をめざした。鍵反応は出発のフコピラノースからフコフラノース型への変換で、酸性のイオン交換樹脂により、まずまずの収率でフラノース体 **22 $\alpha$** に変換でき、その後、フコフラノース供与体 **20** に導いた。一方、グルコース受容体は **19** をデザインし、**20** と縮合した後、二糖供与体に変換後、アジドスフィンゴシン受容体 **18** と縮合、長鎖脂肪酸との縮合を経てすべての保護基を脱保護して、**E $\alpha$** , **E $\beta$** に導いた。は、鍵化合物となるガラクトース受容体 **15** とアジドスフィンゴシン受容体 **14** を縮合した後、順次、**16**, **17** を縮合させて糖鎖伸長し、三糖糖脂質誘導体まで導いた。(Scheme 4) また、得られた化合物はヒトすい臓がん MIA PaCa-2 細胞を用いて、ERK-Akt 増殖シグナルの抑制効果を検証した。



Scheme 4

(4) 堀田裂頭条虫由来 *Diphyllobothrium hottai* の糖脂質合成：

本研究では、裂頭条虫症の診断薬の開発と、裂頭条虫感染時における宿主の免疫応答の変化を探索する目的で、堀田裂頭条虫より見出された新規な糖脂質の中で、Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)Glc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-Cer 及び、Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)Glc $\beta$ 1-3(Gal $\beta$ 1-6)Gal $\beta$ 1-Cer という四糖、五糖糖脂質の合成を目指した。(Scheme 5)



Scheme 5

#### 4. 研究成果

(1)-a エキノコックス多包条虫 (*E. multilocularis*) 由来糖脂質のビオチン化糖鎖：合成に関しては、元の糖脂質の合成においては 4 種類を系統的に合成するための経路を考案して合成に

着手したが、今回は四糖のみのため、その化合物に特化した保護基と合成ルートにより遂行してきたために、効率及び収率の改善が見られた。得られた化合物 A と、すでに合成及び抗原性を調べている糖タンパク質糖鎖 Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-OR I (R=ビオチンプロープ) を同じプレート上による同じ患者血清(60 名分)を用いて比較した。その結果、若干ではあるが、糖タンパク質糖鎖の抗原性が高いことが明らかとなった。また、個々の患者血清に対する糖脂質ビオチン化糖鎖 A と糖タンパク質ビオチン化糖鎖 I の抗原性を比較検討したところ、化合物 A に強く反応を示す血清は I には弱く、化合物 I に強く反応する血清は A には弱い傾向を示すことが明らかとなった。

(1)-b エキノコックス単包条虫 (*E. granulosus*) 由来糖タンパク質糖：目的五糖ビオチン体 C の合成に際して、還元末端側三糖目の単糖供与体をエステル保護からエーテル保護に変換することで、三糖目の縮合が成功するとともに、2+3 のブロック合成にすることで糖鎖伸長における収率が大幅に改善でき、C の全合成に成功した。これら 2 つのビオチン化糖鎖及び、すでに合成が完了していた単包条虫由来の 3 種類の糖鎖の合計 5 種類を単包条虫感染患者の血清に対する抗原性を調べたが、いずれも強い抗原性を示さず、単包条虫に特異的な糖鎖構造を見出すことは出来なかった。

(2) 海綿 *Agelas* 属由来糖脂質：これまで糖脂質の合成は一般的に糖鎖伸長後にセラミド又はアジドスフィンゴシン誘導体を縮合させることで得ていた。しかし、本糖脂質はセラミドに結合しているガラクトースの 2 位に糖が結合しており、オリゴ糖の状態、セラミドを結合させることは立体選択性の観点から困難であると考え、当初単糖セラミド受容体にガラクトースを縮合させる経路を取った。しかし、次のステップである二糖目の縮合時に生成した $\alpha\beta$ 混合物の分離が困難であった。そこで本研究では二糖目を縮合する際の単糖セラミド受容体を単糖アジドスフィンゴシン受容体とすることで、二糖目の縮合後の $\alpha\beta$ 混合物の分離を可能とした。現在は、三糖アジドスフィンゴシン誘導体まで導き、現在セラミドへの変換を行っている。

(3) 海綿 *Terpio* 属由来糖脂質：

*Terpio* 属より見出されたに二糖糖脂質 Fuc $\alpha$ 1-3Glc $\beta$ 1-Cer (E $\alpha$ )及びその異性体である Fuc $\beta$ 1-3Glc $\beta$ 1-Cer (E $\beta$ )の全合成は完了し、ヒトすい臓がん MIA PaCa-2 細胞を用いた ERK-Akt 増殖シグナルの抑制効果を調べ、いずれも抑制が認められたが、非天然型のフコフラノースの b 体の方が、若干ではあるが活性が高いことが明らかとなった。

(4) 堀田裂頭条虫由来 *Diphyllobothrium hottai* の糖脂質合成：

寄生虫感染において重要視されることは、宿主との特異的識別の問題である。細菌感染やウイルス感染の分子機構の解析は国内外で精力的に細胞生物学及び細胞社会学的研究がなされ、この種の識別においては糖鎖が重要な役割を演じていることは疑いない。しかし寄生虫に関する宿主との分子レベルの研究は主に獣医学の領域で行われてはいるものの、抗原の多くは混合物であり、診断薬としての均一性を求めることが難しい。それぞれの寄生虫から単離報告された複合糖質は、高等動物はもちろん、他の下等動物の複合糖質とも異なった糖鎖配列をしており、構造的な観点のみならず機能の面においても大変興味深い。特に寄生虫感染に関しては、それぞれの患者血清に対する抗原性として期待できる上に、ワクチン開発への可能性も否めない。しかし、自然界より得られるこれらの糖脂質は、単離、精製が困難な上にごく微量である。化学合成することにより均一かつ大量に供給がなされれば、機能解明が容易になると考え、全合成及び糖鎖合成を行ってきた。糖鎖合成のポイントは如何に立体及び位置選択的に効率よく合成できるかであり、保護基や脱離基ならびに縮合剤の組み合わせを考慮した。今回合成してきた糖鎖は、いずれも宿主との相互作用を分子レベルでの解明に留まらず、ヒトへの免疫機構を追求することで創薬にもつながると期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 N. Hada, Y. Umeda, H. Kumada, Y. Shimazaki, K. Yamano, F. Schweizer, M. Oshima, T. Takeda and F. Kiuchi.	4. 巻 67(2)
2. 論文標題 Synthesis of the non reducing end oligosaccharides of a glycosphingolipid from <i>Ascaris suum</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 143-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Naohiro Oshima, Tomofumi Shimizu, Yuji Narukawa, Noriyasu Hada, and Fumiyuki Kiuchi	4. 巻 72(3)
2. 論文標題 Quantitative analysis of anti-inflammatory activity of orengedokuto : Berberine is responsible for inhibition of NO production	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 706-714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-018-1209-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomofumi Shimizu, Nobuhiko Shibuya, Yuji Narukawa, Naohiro Oshima, Noriyasu Hada, and Fumiyuki Kiuchi	4. 巻 72(1)
2. 論文標題 Synergistic effect of baicalein, wogonin and oroxylin A mixture: Multistep inhibition of the NF- $\kappa$ B signalling pathway contributes to an anti-inflammatory effect of <i>Scutellaria</i> root flavonoids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 73-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-017-1111-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Shimizu, N. Shibuya, Y. Narukawa, N. Oshima, N. Hada and F. Kiuchi.	4. 巻 72
2. 論文標題 Synergistic effect of baicalein, wogonin and oroxylin A mixture; multistep inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway contributes to an anti-inflammatory effect of <i>Scutellaria</i> root flavonoids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nat. Med.	6. 最初と最後の頁 181-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-017-1129-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 T. Kanaya, R. Mashio, T. Watanabe, F. Schweizer, and N. Hada.	4. 巻 73
2. 論文標題 Synthesis of glycosphingolipids from the fungus <i>Hirsutella rhossiliensis</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 6847-6855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2017.10.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金谷貴行, 関里紗, 渡辺敏子, 栗原正明, 羽田紀康
2. 発表標題 マボヤ及びアカボヤ由来糖脂質の合成研究(2)
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金谷貴行, 羽田紀康.
2. 発表標題 マボヤ及びアカボヤ 由来新規糖脂質の合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚功, 羽田紀康, 渥美聡孝
2. 発表標題 海綿 <i>Axinella corrugate</i> 由来の糖脂質の合成
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 羽田紀康, 山野公明
2. 発表標題 エキノコックス属由来糖鎖の合成とヒト血清に対する抗原性
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 向井理, 大嶋 直浩, 羽田 紀康
2. 発表標題 海綿 Terpios sp. 由来化合物の合成
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	金谷 貴行  (Kanaya Takayuki)		