

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20550110

研究課題名(和文) 化学-酵素法による構造明確化硫酸化多糖の合成

研究課題名(英文) Chemo-enzymatic synthesis of sulfated polysaccharides with well-defined structure

研究代表者

大前 仁 (OHMAE MASASHI)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50300801

研究成果の概要(和文): 生体内の硫酸化多糖であるグリコサミノグリカンは生物の分化・発達を制御している重要な多糖類である。本研究ではグリコサミノグリカンのうち、極めて合成困難なヘパラン硫酸と、癌関連糖鎖としても知られる硫酸化ルイス X オリゴマーの合成について重点的に検討した。その結果、ヘパラン硫酸モノマーの合成を達成し、硫酸化ルイス X 関連オリゴ糖の合成も達成した。他に、強力な阻害能を有するヘパラーゼ阻害剤の合成も達成した。

研究成果の概要(英文): Glycosaminoglycans are sulfated polysaccharides having important biological activities, which regulate cellular differentiation and development. In the present study, precision synthesis of heparan sulfate and sulfated-Lewis X oligomers were challenged, which have quite complex structures and are difficult to be prepared chemically. The fluoride monomer for heparan sulfate synthesis was successfully prepared, and sulfated Lewis X-related oligosaccharides were obtained successfully. Further, potent inhibitors for heparanase were also synthesized successfully.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,100,000	630,000	2,730,000
21年度	900,000	270,000	1,170,000
22年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：糖鎖科学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：酵素反応 高分子合成 生体材料 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

第三の生命鎖と言われる糖鎖は遺伝子によって直接コードされていないにも拘わらず、生体のあらゆる組織に様々な形(糖タンパク、糖脂質など)で発現し、生命維持に必須の機能を発揮している。従って、糖鎖の構造・機能解析、および効率的な合成法確立はポストゲノム時代の最重要課題である。硫酸

化多糖として知られるコンドロイチン硫酸(ChS)・ヘパリン(Hep)等のグリコサミノグリカン(GAG; Fig. 1)は組織の形態形成を司るマスターモジュレーターであると考えられており、これらは糖鎖の主鎖構造に加えて一見ランダムに見える硫酸基による修飾パターンが特異な機能発現に必須であることが明らかになってきた。このような状況下、

天然 GAG のミクロ構造と機能との関連解析及び高機能材料合成に向け、硫酸化パターンを制御した GAG 合成が盛んに行われている。ところが、糖鎖有機合成では実用的な自動合成装置は開発されておらず、複雑で手間のかかる液相反応を繰り返し行わなければならない。このため、天然 GAG は分子量が数万～数十万に及ぶ高分子であるのに対し、有機合成 GAG はこれまでのところ最大で 10 糖（分子量約 2,500）にとどまる。

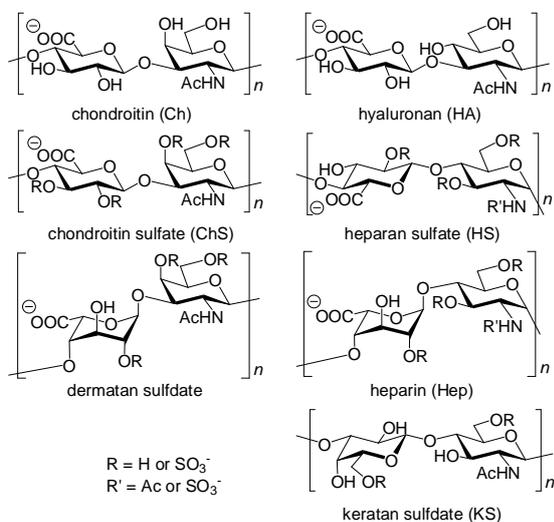


Fig.1 Classification and chemical structures of glycosaminoglycans

一方、申請者は近年、糖鎖合成の中で最も困難とされる GAG 合成を化学 - 酵素法により達成し、糖鎖科学の課題を解決してきた。これらの合成では、本来多糖の分解を触媒する加水分解酵素を逆に多糖生成の触媒として用い、多糖の繰り返し二糖構造からなる活性化基質モノマーを用いることにより、酵素的グリコシル化反応が連続的に引き起こされて（酵素重合）多糖類が一段反応で生成する。これら化学合成多糖はモノマー構造を反映した明確な構造を有し、且つ高純度で得られるため、構造不均一な生体からの抽出物と比較して構造活性相関解明のツールとして極めて有用であるのみならず、高い安全性を有する機能材料として期待される。

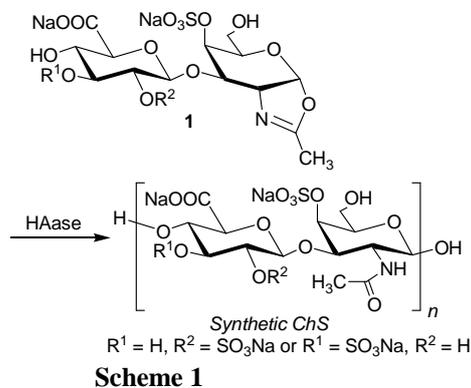
2. 研究の目的

本課題研究では、これまでに達成されたヒアルロン酸 (HA)、コンドロイチン (Ch)、ChS、ケラタン硫酸 (KS) 及びそれらの誘導体合成の結果を踏まえて、合成例のない規則的硫酸化 GAG 合成について検討を行う (1, 2)。また、より効率よく GAG 合成を行うためにモノマーとなる 2 誘導体の酵素合成を

話し、モノマー合成から重合反応を経て GAG 合成までをワンポットで行うシステムの構築を目指す (3)。これら (1) ~ (3) の研究は GAG 分子中のミクロ構造を制御した定序配列合成の基礎となる重要な研究である。さらに、合成される硫酸化多糖について生理活性を利用した材料応用を目指した評価を行う (4)。

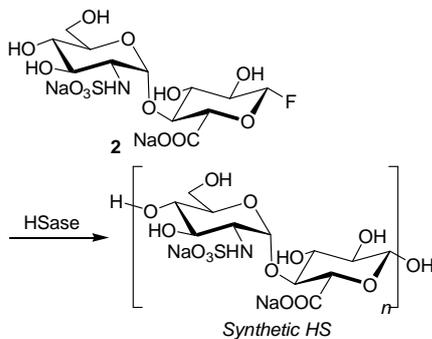
(1) コンドロイチン硫酸合成

これまでにヒアルロニダーゼ (HAase) を触媒として用いる重合反応により、構成ユニットの一つである N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の 4 位、6 位に硫酸基を導入したオキサゾリン型モノマーの合成及び重合反応を検討し、4 位のみに硫酸基を有するモノマーは効率よく重合することを明らかにしている。一方、もう一つの構成ユニットであるグルクロン酸 (GlcA) について硫酸化モノマーの合成・重合反応は未検討である。そこで、GlcA の 2 位、3 位にも硫酸基を導入したモノマーを合成し、重合反応を検討する。これにより、GlcA の特定の位置に硫酸基を有する ChS の合成達成を図る (Scheme 1)。



(2) ヘパラン硫酸合成

既に合成達成された GAG は分子内に β-グリコシド結合のみを有する。ヘパラン硫酸 (HS) は Hep と同様に分子内に β-グリコシド結合と α-グリコシド結合を交互に有し、HA や ChS 等と比較してより複雑な構造を有する。HS は Hep の前駆体でもあり、組織形成、特に骨・軟骨、神経組織の形成に重要な働きをすることが明らかとなっている。そこで、硫酸基の位置が厳密に制御された HS を加水分解酵素であるヘパラナーゼ (HSase) を用いる酵素重合法により合成し、構造明確化 HS 合成法の確立を目指す (Scheme 2)。HSase は β(1-4)-グルクロニド結合を加水分解する保持型酵素である。従って、HS 合成に用いるモノマーは β-フッ化糖型モノマーとする。



Scheme 2

(3) ワンポット合成

酵素重合においてモノマーとして用いる 2 誘導体の効率的合成法について検討する。現在、モノマーは全て有機化学合成によって得られており、2 合成であっても時間と手間が非常に多くかかり、実用化の面においても大きな障壁となっている。そこで、モノマー合成の効率化、及びワンポット合成可能なシステムの構築を目指す。具体的には、酵素的グリコシル化反応による 2 合成を固相担体上で行い、固相担体からの切り出しと同時にアノマー位の活性化を行うことによりモノマーへと誘導する。続いてそのまま酵素重合へ供する。この際、重合触媒用酵素の固相への固定化についても検討する。

(4) 機能評価

構造明確な硫酸化多糖は生理活性を示す材料として非常に有望であり、その可能性について各種生体由来タンパク質との相互作用を測定することにより検証する。具体的には GAG と強く相互作用し、アルツハイマー病やプリオン病の原因となる変異型アミロイド-β-タンパクフラグメントやプリオンタンパクフラグメント、アンチトロンピン等の血液凝固因子、FGF 等の各種成長因子等との相互作用を検証する。これらにより、糖鎖医薬、人工血管や人工透析等に用いる血液チューブの被覆材料、組織再生のためのスキャホールドとしての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 及び (2) で使用するモノマーは有機化学合成によって得る。詳細については割愛するが、(1) の場合で 30 ステップ、(2) の場合で 23 ステップの反応を経て合成する。続いて、合成完了したモノマー 1 及び 2 について、それぞれ HAase 及び HSase に作用させ、重合反応について検討する。

(3) はまず最も単純な N-アセチルグルコサミンのオキサゾリン化について、トシル酸クロリド担持固相担体上での合成を試みる。続いて、より複雑なヒアルロン酸オキサゾリンモノマーの合成等へ展開する。

(4) では (1) 及び (2) で目的とする硫酸

化多糖類が得られた場合、アンチトロンピン等の血液凝固因子、FGF 等の各種成長因子等との相互作用について SPR を用いて検証する。

4. 研究成果

(1) および (2)

当初 (1) から合成開始する予定であったが、合成法確立の観点、およびインパクトの観点からより挑戦的な (2) のヘパラン硫酸合成から行うことにした。

まずモノマーとなる 2 の合成では、α-グリコシドの生成と、アノマー位が β-フッ化体で統一された純粋な化合物の合成が最も困難が予想される。実際、α-グリコシドの生成では対応する不純物である β-グリコシドも 20% 程度生成してしまった。この不純物はカラムクロマトグラフィーと結晶化を繰り返すことにより除去されたが、収率の低下を招いた。一方、アノマー位の β-フッ化体合成では、前段階のアノマー位保護基である 4-メトキシフェニル基の除去の際に副反応が頻発し、同定不可能な不純物が多数生成した。また、不安定な β-フッ化体の分解も頻発し、合成法、反応条件等鋭意検討したが、最終的にはクロマトグラフィーによる生成を繰り返す事により低収率ながら目的とする 2 を合成することができた。本モノマーはヘパラン硫酸の人工合成を可能にする世界初のフッ化物モノマーであり、世界中でしのぎを削るヘパラン硫酸の化学合成を大きくリードする成果となった。

一方、本研究の一部として 2 と同様な 2 糖構造を有する HSase に対する阻害剤も合成検討した (Fig. 2)。比較として単糖阻害剤も合成した。これらの合成は 2 と同様の α-グリコシドの生成が困難であったが、不安定な β-フッ化体ではないため、2 と比較して容易に合成できた。

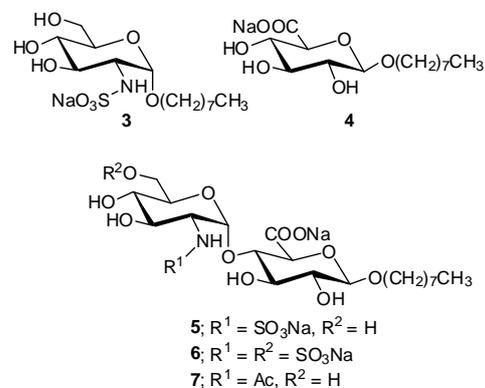


Fig. 2 Chemical structures of HSase inhibitors

合成した 2 について、HSase を用いる酵素重合を予備的に行なったところ、共溶媒としてアセトニトリルを加えた系ではモノマー消費が観察されなかったが、緩衝溶液のみの

反応では有意にモノマー消費が起こっていることが観察された。このことは、設計したモノマー2はHSaseにより触媒作用を受けるが、有機溶媒であるアセトニトリルを加える重合反応系では酵素の失活により反応が起こらなかったことを示している。HSaseは非共有結合的なヘテロダイマーにより構成されており、有機溶媒添加により構造が破壊され失活したものと予想している。今後は酵素の改変により単一ペプチドによる酵素として用いることを検討する必要がある。

一方、阻害剤として合成した3~7についてその阻害能をHSaseおよび類似酵素のexo-β-グルクロニダーゼについて検討した。HSaseに対する阻害能について、4~7は1μMにおいて68%~100%の阻害能を発現し、これまでに報告されている阻害剤の中でも極めて強力な阻害活性を示すことが明らかとなった (Fig. 3)

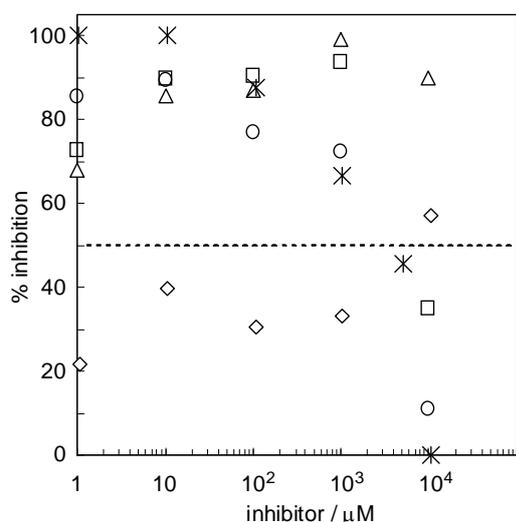


Fig. 3 HSase inhibitory activities of inhibitors 3-7: 3, open diamonds; 4, open squares; 5, open triangles; 6, asterisks; 7, open circles.

また、4~7はHSaseの良い基質とも成り得るため、高濃度では分解されてしまうことも明らかとなった。

exo-β-グルクロニダーゼに対する阻害能はいずれも低く抑えられ、単糖性の3及び4が高濃度で弱い阻害能を示すのみであった (Fig. 4)。

従って、モノマー合成における分子設計により、選択性の高い有効な阻害剤合成も達成でき、世界中で開発競争が行われている抗癌剤のひとつの候補として期待される。

グリコサミノグリカン一種のケラタン硫酸の部分構造である硫酸化ルイス X オリゴマーの合成も検討した (Scheme 3)。本オリゴマーはケラタン硫酸の一部としてのみならず、癌細胞表面に特徴的に発現する癌関連糖鎖抗原の一部構造をなしており、診断薬や

癌ワクチン開発の重要なツールとなり得る。

モノマーとなる硫酸化ルイス X オキサゾリン誘導体 8 の合成について検討を行ったが、期間内に合成完了できなかつた。現在、合成途中である。しかし、8 の合成途中で得られ

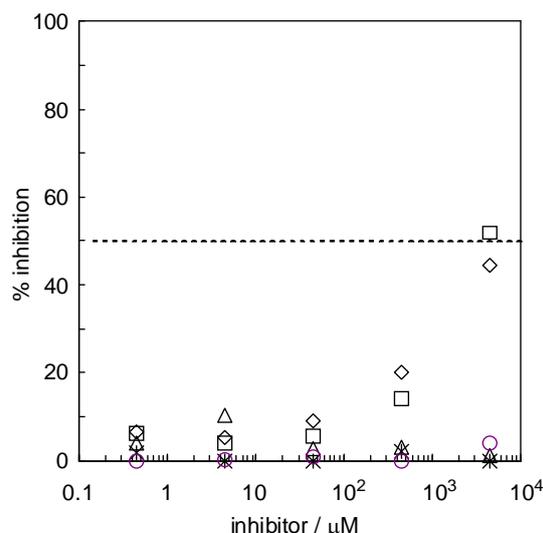
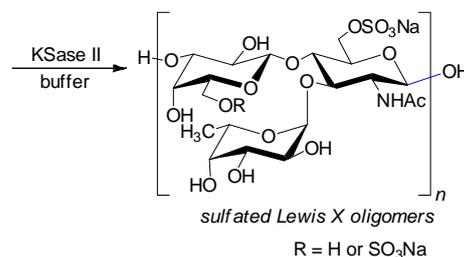
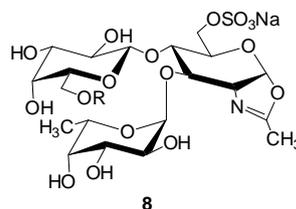


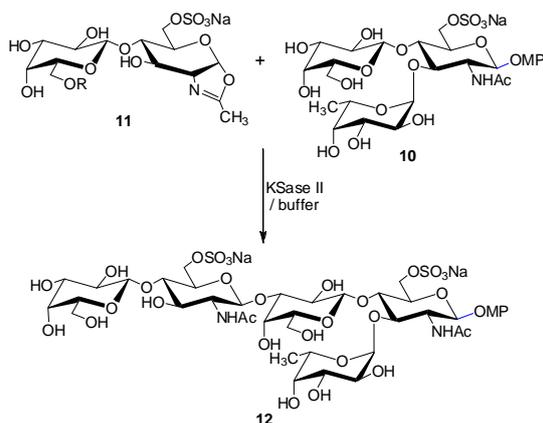
Fig. 4 Exo-β-glucuronidase inhibitory activities of inhibitors 3-7: 3, open diamonds; 4, open squares; 5, open triangles; 6, asterisks; 7, open circles.



Scheme 3

た硫酸化ルイス X 誘導体 10 を受容体として、既存の供与体である 11 とケラターゼ II 触媒によるグリコシル化反応を行ったところ (Scheme 4) 11 の消費が 10 添加系で加速されプライマー効果が現れることが明らかとなった (Fig. 5)。さらに、HPLC による生成物の解析結果及び質量分析結果から目的の 5 糖 12 が生成したことを確認した。これらの結果から、本酵素を用いることにより癌関連糖鎖抗原の簡便な合成が可能となることが世界で初めて示され、今後あらゆるルイス X 型癌関連糖鎖抗原の合成が本手法により合

成可能となると期待される。



Scheme 4

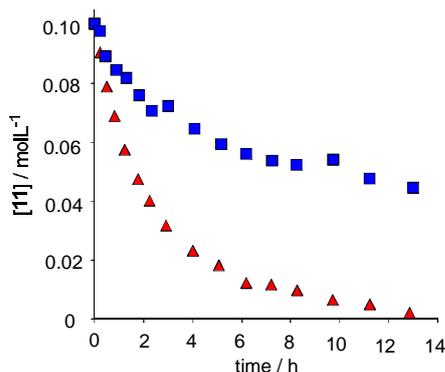


Fig. 5 Reaction time courses of **11** with **10** (red triangles) and without it (blue squares).

1 の ChS モノマー合成は現在進行中であり、**2** 糖誘導体の合成まで完了した。今後はモノマー合成を完了させ、ChS シリーズの合成法確立につなげる

また、(3) 及び (4) については十分に検討する時間がなく、まだ手付かずの段階であるため今後検討していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

M. Ohmae, J. Takada, H. Murakami, S. Kimura, Rapid access to an orthogonally protected Lewis X derivative: an important building block for synthesis of Lewis antigens, Chemistry Letters, 査読有り, 40, 2011, 438-439.

M. Ohmae, K. Kurosaki, A. Makino, S. Kobayashi, Enzymatic polymerization to an alternating N-phthaloyl chitin derivative catalyzed by chitinase, Chemistry Letters, 査読有り, 40, 2011, 194-195.

I. Nakamura, A. Makino, M. Ohmae, S.

Kimura, Immobilization of His-tagged endoglucanase on gold via various Ni-NTA self-assembled monolayers and its hydrolytic activity, Macromolecular Bioscience, 査読有り, 10, 2010, 1256-1272.

[学会発表](計4件)

高田順子・村上博亮・大前仁・木村俊作、ケラターゼII酵素に対する硫酸化ルイスX三糖基質の合成と酵素触媒挙動、第59回高分子討論会、2010年9月17日、北海道大学

小出早苗・藤田勇樹・大前仁・木村俊作、キチナーゼ触媒重合による交互 N-システニルキチン誘導体の合成、第24回キチン・キトサンシンポジウム、2010年7月13日、東京大学弥生講堂

藤田勇樹・大前仁・木村俊作、ヘパラナーゼに対する硫酸化糖阻害剤合成、第59回高分子学会年次大会、2010年5月26日、パシフィコ横浜

藤田勇樹・大前仁・木村俊作、ヘパラナーゼに対する特異的阻害剤の合成、第58回高分子討論会、2009年9月16日、熊本大学黒髪キャンパス

6. 研究組織

(1)研究代表者

大前 仁 (OHMAE MASASHI)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50300801

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：