

機関番号：12608

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20550149

研究課題名 (和文) β グルカン分岐多糖類の精密有機合成とその機能評価研究課題名 (英文) Synthesis of β -glucan oligosaccharides and their biological evaluation

研究代表者

田中 浩士 (TANAKA HIROSHI)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：40334544

研究成果の概要 (和文)：本研究は、 β グルカン分岐多糖の化学合成法の開発とその機能評価を行なった。まず、 β グルカン多糖の部分構造の効率的な合成法の開発を行った。まう、 β (1, 3) 16糖主鎖とする分岐および直鎖オリゴ糖の合成を行なった。合成糖鎖の機能評価を行ったところ、末端にアミノ基を有する16糖誘導体が Dectin-1 に対する高い親和性と Dectin-1 を介した自然免疫活性化能を有することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：In this report, we describe the synthesis and biological evaluation of β (1,3) oligosaccharides possessing an aminoalkyl group and their biological evaluation. A 2,3 diol glycoside with a 4,6 benziliden protecting group functioned as an effective glycosyl acceptor for the synthesis of β (1,3) linked glycosides. Using a combination of a linear tetrasaccharide and a branched pentasaccharide as glycosyl donors permitted β (1,3) linear octa- to hexadecasaccharides and branched nona- to heptadecasaccharides to be prepared in good total yields. Measurements of the competitive effects of oligosaccharides on the binding of a soluble dectin-1 to a solid-supported Schizophyllan (SPG) revealed that the branched heptadecasaccharide and the linear hexadecasaccharides **2** also have binding activity for to dectin-1. In addition, the two oligosaccharides exhibited agonist activity in a luciferase-assisted NF- κ B assay. This represents the first demonstration of a purely synthetic oligosaccharides stimulating immunity mediated by dectin-1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：有機合成化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：自然免疫、デクチン-1、オリゴ糖、グリコシル化反応

1. 研究開始当初の背景

β (1, 3) グルカン **1** (以後、 β グルカン) は、キノコ類やパン酵母の細胞壁に含まれる β (1, 3) を主鎖とし、 β (1, 6) モノまたは、オリゴグルコシドを側鎖に有す

る多糖類の総称である (図 1)。 β グルカンは、古くより、自然免疫系の活性化を基盤とする抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、抗アレルギー作用等を示すことが知られている。これらの作用には、 β グルカン鎖が形成するらせ

ん高次構造が重要であることが考えられている。そのβグルカンの受容体としては、白血球細胞表面に存在する Dectin-1 が発見されている。しかしながら、このβグルカン多糖の Dectin-1 への結合様式や、結合最小単位、そして、免疫活性化機構などはほとんど明らかにされていない。Dectin-1 とのβグルカンとの相互作用に関する研究として、ごく最近、10糖以上のβグルカン由来多糖において、Dectin-1 結合作用があり、それ以下の小さなオリゴ糖では結合作用が見られないことが報告された。しかし、先の研究では、利用したオリゴ糖は多糖の加水分解によって得られる混合物であり、分岐構造を含めた詳細な構造情報を得るに至っていない。そこで、βグルカンの機能解明のために、βグルカンの部分構造を有する純粋な多糖誘導体が必要とされている。

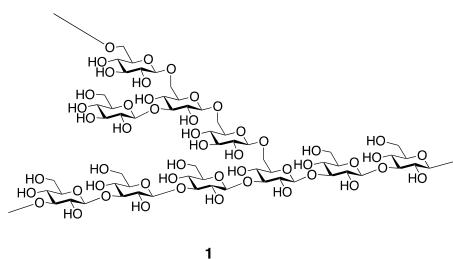


図1 βグルカンの構造

2. 研究の目的

本研究は、高度な化学合成技術を利用して、構造明らかな関連多糖の合成を行なうことによって、従来の生物学的手法では明らかにすることが困難な構造不均一なβグルカン多糖の構造活性相関を明らかにすることを目的とした。得られた知見は、βグルカンの Dectin-1 を経由した自然免疫活性化作用メカニズムの解明、および人工 Dectin-1 作動薬の開発における重要な情報になると期待している。

3. 研究の方法

本研究では、

(1) β(1,3)結合を主鎖とするオリゴの効率合成法の開発

① 2,3および、3,4 ジオール型糖受容体への3位選択的グリコシル化の検討

② βグルカンオリゴ糖の合成

(2) Dectin-1 への結合作用また、それを介する自然免疫系の活性化作用について検討する。

4. 研究成果

比較的大きなβグルカンオリゴ糖の効率的な合成を達成するため、3位選択的グリコシル化を行なうための糖受容体として、2,3 および、3,4 ジオール型糖受容体に体するグリコシル化を検討した。3,4 ジオール型糖受容体を用いた結果を図2に示す。3,4 ジオール型糖受容体2は、4位水酸基は、6位

の立体障害により反応性が低下しているため、3位選択的グリコシル化が進行すると予想した。しかしながら、イミダート糖3を糖供与体として用いたグリコシル化では、4位選択的にグリコシル化反応が進行した2糖4を主生成物として得た。また、3糖5の生成も確認した。これは2位のエステル基が3位水酸基の反応性を強く低下させていることを示している。

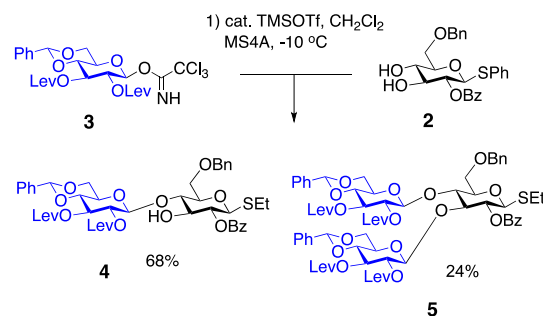


図2 3,4 ジオール糖受容体を用いる検討

次に、2,3 ジオール型等受容体を用いるβ(1,3)オリゴ糖合成の検討結果を図3に示す。2,3 ジオールを有するチオ糖4に対し、先に用いたイミダート糖3をグリコシル化したところ、位置及び立体選択的に3位グリコシル化されたβグリコシド7が得られた。その際、2位にグリコシル化された生成物が10%程度得られた。得られた2糖をそれぞれ、2,3 ジオール型糖受容体11および糖供与体10へと変換した。2糖糖供与体10と2糖糖受容体11とグリコシル化反応は、3位選択的に進行した。その際、2位にグリコシル化された化合物は見られなかった。このことより、2,3 ジオール型糖受容体は、β(1,3)オリゴグルコース合成に適した糖受容体であることを明らかにした。

以上の知見をもとに、2,3 ジオール等受容体を用いるβ(1,3)グルカン17糖17merの合成を行なった(図4)。本合成は、4糖を主鎖とするオリゴ糖ブロック12,13,14のグリコシル化による伸張を基盤とした。比較的大きなオリゴ糖ブロックをグリコシル化することにより、少ない工程数で大きなオリゴ糖が合成できるだけでなく、生成物と原料との分離が容易になる。糖受容の立体障害を低減させた2,3 ジオール型の糖受容体への3位選択的グリコシル化は、大きなオリゴ糖ユニットのグリコシル化も有効であり、分岐17糖の効率的な合成が達成された。本手法を用いて、末端のアミノアルキル基を有する直鎖16糖、12糖、8糖および分岐17糖、13糖、9糖の合成を達成した。16糖についてはアノマー位の誘導体としてα-メチル体も合成した(図5)。得られた糖鎖誘導体の生物作用評価を行った。まず、合成糖鎖における可溶性デクチン-1と固相化βグルカ

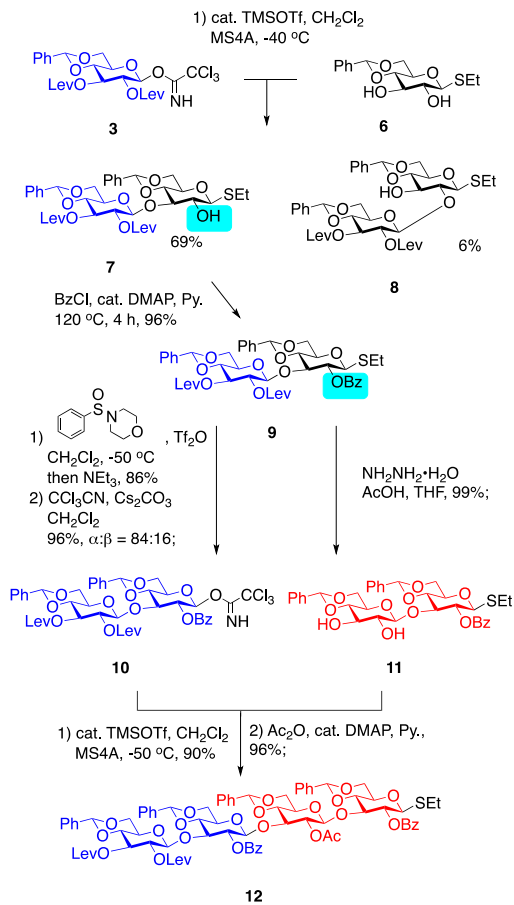


図3 2,3 ジオール糖受容体を用いる検
ンとの結合阻害試験を行った。(図6) その
結果、16糖および17糖が強い結合阻害作
用を有することを明らかにした。その際、分
岐糖の影響はほとんど確認されなかった。ま
た、12糖と16糖との結合阻害作用の差は、
100程度存在し、わずか4糖程度の糖鎖の
長さが結合阻害作用に非常に大きく影響す
ることが明らかとなった。

続いて、デクチン-1とそのシグナル伝達
分子を組込んだ細胞を用いて、免疫活性化作
用を調べた(図7)。その結果、結合能を有
する16糖および17糖において、有意な免
疫活性化作用を示すことを明らかにした。こ
のことは、 β グルカンが、デクチン-1を介
して自然免疫を活性化できる直接的な証拠
として重要な実験事実である。

以上、本研究では、 β グルカン多糖の部分
構造の合成法の開発と β グルカン機能解明
における有用なケミカルツールの開発を行
なった。を目指した。まず、反応性の高い糖
受容体の開発に成功し、それを利用して従来
ほとんど合成例のなかった10糖以上の β
(1,3)グルカン糖鎖の合成に成功した。さら
に、合成した糖鎖の中から、実際にデクチン
-1に結合可能で、かつ、自然免疫活性化能
を有する糖鎖を見出すことができたことは
特筆すべきことである。

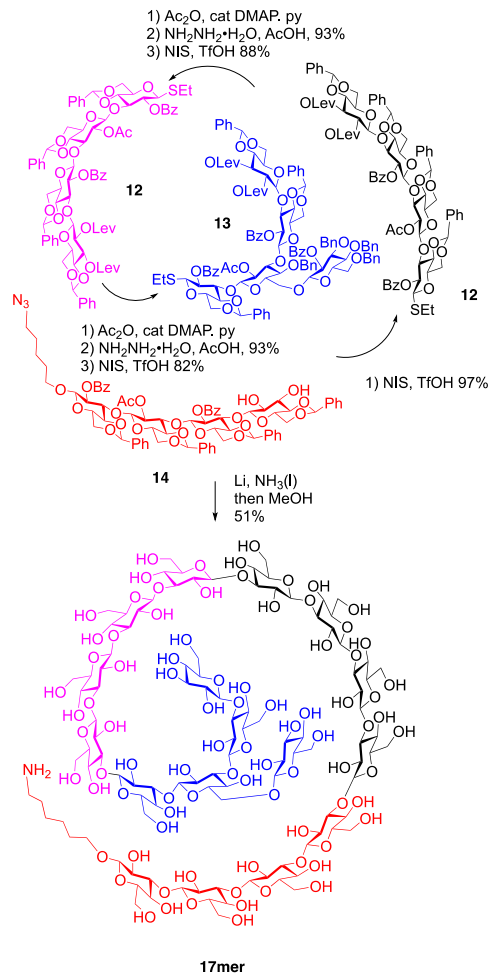


図4 $\beta(1,3)$ グルカン 17糖誘導体の合成

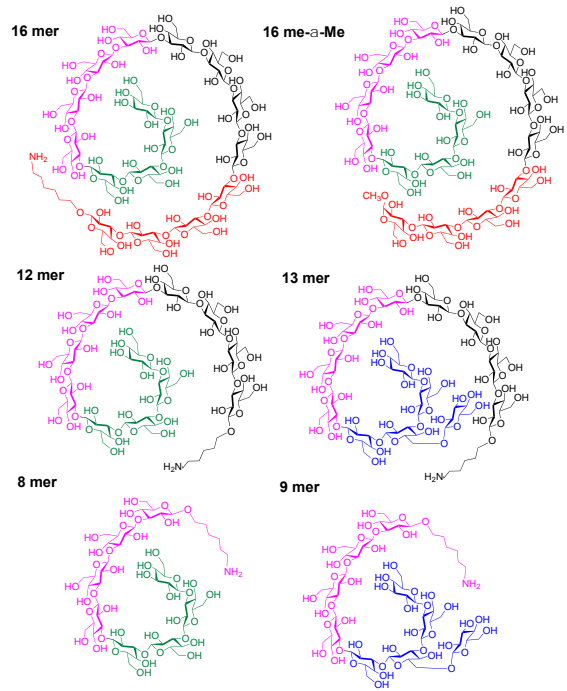


図5 $\beta(1,3)$ グルカンライブラリー

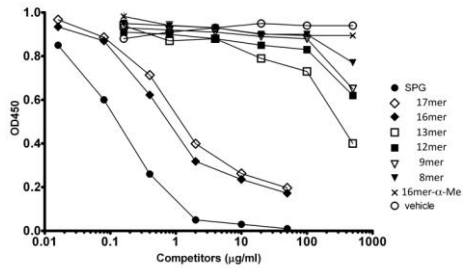


図6 固定化SPGと可溶性Dectin-1との結合に対する競合阻害作用

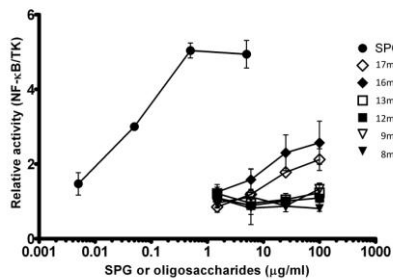


図7 固定化SPGと可溶性Dectin-1との結合に対する競合阻害作用

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1件)

田中浩土、河合徹也、安達禎之、大野尚仁、高橋孝志 β (1,3) Branched Heptadeca- and Linear Hexadeca-saccharides Possessing an Aminoalkyl Group as a Strong Ligand to Dectin-1 *Chem. Commun.*, 2010, 42, 5942-5944 (2010) 査読有り

[学会発表] (計10件)

- ① 田中浩土、河合徹也、安達禎之、大野尚仁、高橋孝志 “Efficient Synthesis of β (1,3) Oligosaccharides Exhibiting Dectin-1 Agonist Activity.” International Chemical Congress of Pacific Basin Society PACIFICHEM 2010 December 15-20, 2010, Honolulu, Hawaii, USA
- ② 河合徹也、田中浩土、安達禎之、大野尚仁、高橋孝志, 「自然免疫活性化作用を有する β グルカン誘導体の合成研究」, 第98回有機合成シンポジウム 2010年11月5日(金)～6日(土) 早稲田大学国際会議場
- ③ 河合徹也、田中浩土、安達禎之、大野尚仁、高橋孝志, 「自然免疫活性化作用を有する β グルカン誘導体の合成研究」, 第

98 回有機合成シンポジウム 2010年11月5日(金)～6日(土) 早稲田大学国際会議場

- ④ Hiroshi Tanaka “Synthesis of biologically important oligosaccharides and their applications to chemical biology research” 2nd ACGG Asian Communications of Glycobiology and Glycochemistry Taipei Oct. 27-29, 2010 (Invited lecture)
 - ⑤ 田中浩土 「生物学上重要な糖鎖の効率的合成法の開発とケミカルバイオロジー研究への展開」第59回高分子討論会 2010年9月15日～17日 北海道大学 (依頼講演)
 - ⑥ 河合徹也、田中浩土、武内良太、安達禎之、大野尚仁、高橋孝志, 「 β (1,3) グルカン多糖類の合成法の開発」第29回日本糖質学会年会、2010年9月9日(水)～9月11日(金) 飛騨、岐阜
 - ⑦ 河合徹也、田中浩土、安達禎之、大野尚仁、高橋孝志, “Synthesis of β Glucan Oligosaccharide Derivatives Activating Innate Immunity”, 第25回国際糖質学会 2010年8月1日(日)～6日(金) (August 1-6, 2010 幕張メッセ国際会議場, 千葉
 - ⑧ 河合徹也、田中浩土、安達禎之、大野尚仁、高橋孝志, 「自然免疫活性化作用を有する β グルカン誘導体の合成研究」第90回日本化学会年会 2010年3月26日(金)～29日(月) 近畿大学、大阪
- [図書] (計2件)
- ① 田中浩土、高橋孝志 「精密有機合成技術とコンビナトリアル化学を基盤とした β グルカン関連糖鎖の合成」大野尚人監修 「 β グルカンの基礎と応用-感染, 抗がん, ならびに機能性食品への β グルカンの関与-」シーエムシー出版 2010年 47-56.
 - ② 田中浩土、高橋孝志 「ラボオートメーション技術を利用する効率的糖鎖合成法の開発研究」正田晋一郎、稲津敏行監修 「複合糖質の化学と最新技術応用」シーエムシー出版 2010年 63-72.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中浩土 (TANAKA HIROSHI)
東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 40334544

(3) 連携研究者

大野 尚人 (Ohno Naohito)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 80152213