

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月1日現在

機関番号：14701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21710230

研究課題名（和文） 医療応用を目指した糖鎖分子プローブの創成

研究課題名（英文） Development of carbohydrate probes toward medicinal applications

研究代表者

山口 真範 (YAMAGUCHI MASANORI)

和歌山大学・教育学部・准教授

研究者番号：20400129

研究成果の概要（和文）：免疫現象に関連するシアロ糖鎖ライブラリーである sialyl α (2-6) gal 6-sulfo LacNAc プローブと2種類の類縁体である de-*N*-acetyl 体、Lactam 体の有機化学合成は達成した。それらを用いて、生体内における新たな免疫調節機構の存在の解明に大きく貢献した。プロテオグリカン糖鎖においては、天然型コンドロイチン硫酸とその由来オリゴ糖をペプチドへ導入することに成功し、医薬品の生体内での安定化剤として応用できることを明らかにした。グリコサミノグリカン糖鎖ライブラリー構築は、革新的ハイブリッド型合成法の確立を達成し目的を果たした。最後にガン関連糖鎖抗原であるシアロ糖鎖ライブラリーについては、鋭意検討の結果、そのハイブリッド型合成法の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Organic synthesis of three type (*N*-acetyl, de-*N*-acetyl and lactamized) sialyl(2-6)gal 6 sulfo LacNAc probes for the biochemical experiments to investigate the mechanism of neo-immunologic function, were achieved. In the proteoglycan carbohydrate chain, developed a new method for the introduction of intact ChS and oligosaccharides into the peptide. Then, clarified the introduction of GAG saccharide would improve the biopharmaceutical properties of drugs.

The construction of GAG oligosaccharides were achieved utilized the developed hybrid type synthetic method which correspond to the glycosaminoglycan oligosaccharides synthesis. The construction of tumor associate carbohydrate antigen were partly achieved utilized the developed hybrid type synthetic method which correspond to the sialo carbohydrate synthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：生理活性分子の設計・合成、糖鎖合成

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸、タンパク質に続く第三の生命鎖として認識され、その多くの生理作用に大きな注目が集まっている。細胞間の認識、情報伝達、分化、増殖、免疫応答など我々が生命を維持していく上で必須の生命現象を司っていることが明らかにされてきた。すなわち、糖鎖が担う役割や経時的な発現を追跡することは、未知の生命現象を明らかにすることができ、炎症や病気の発症メカニズムを解明できる。このような背景のもと糖鎖関連研究は、国内外において非常に重要な研究内容として位置づけられている。

本研究では糖鎖の関わる生命現象を解明するための要となる網羅的解析が可能な糖鎖分子プローブを創出する。次に糖鎖分子プローブを分子イメージングによる診断や糖鎖ワクチン開発に発展させ、実際の医療への応用を目指した。

2. 研究の目的

(1)

新たな糖鎖を介した免疫調節機構の解明とその医療応用を目指したシアロ糖鎖プローブの合成を行う。

主にB細胞に発現されその活性調節に関わっていると推測されている sialyl α (2-6) gal 6-sulfo LacNAc 関連の3種類のプローブを合成する。

(2)

ガン細胞表面に特異的に発現されているガン関連糖鎖抗原の合成を行う。上皮ガン、卵巣ガン、胃ガン部位に発現が認められる糖鎖の効率的合成法の開発を行う。

(3)

プロテオグリカン糖鎖プローブ（天然型、オリゴ糖型）を合成し、その活性中心構造を世界に先駆けて解明する糸口を掴む。

3. 研究の方法

本研究では、有機化学的もしくは酵素化学的手法を活用した目的糖鎖の合成と、それらを適切な分子（タンパク質、脂質、蛍光性化合物）にクリックケミストリー反応などを用いて結合させ、糖鎖の関わる生命現象の網羅的解析を行える糖鎖分子プローブへ導くことにした。

4. 研究成果

(1) sialyl α (2-6) gal 6-sulfo LacNAc 関連の3種類のプローブの合成は達成できた。

3種類の構造はそれぞれ非還元末端に位置するシアル酸部分が異なっている。通常のシアル酸体の化合物とシアル酸部分の5位のアセトアミド基のアセチル基が脱離したデーN-アセチル化された化合物、シアル酸部分が環状構造をとったラクタム化した化合物の計3種類である。

これらの化合物は、適切に保護された糖供与体（ドナー糖）と糖受容体（アクセプター糖）をそれぞれ有機化学的に合成し、それらを化学的に順次結合させていく精密な有機化学合成法にて合成した。またそれぞれ生化学的試験に供し、プローブとしての有効性も確認した。

(2) ガン関連糖鎖抗原の合成においては、当初目指していた効率的合成法の開発「ハイブリット型合成法」が難航したが、本研究期間中に上皮ガン、卵巣ガンに発現されている糖鎖の合成を達成した。シアリル化反応が目標収率を下回り、検討に大きく時間を要した。

最終年度後半になり、その問題点を克服することができた。当初の目標値には到達困難であったが、その中で、「新規シアロ糖鎖の合成法；産業財産権参照」を確立し、今後の効率的合成を可能とした。

(3) プロテオグリカン糖鎖プローブにおいては予定通り天然型、オリゴ糖型の2種類の糖鎖プローブの合成に成功した。それぞれを利用した生化学的試験を行い、糖鎖型医薬品開発における重要かつ有用な知見を得た(雑誌論文4)。またこれら糖鎖プローブ合成においても革新的ハイブリット型合成法の確立に成功した。この方法論に則り、グリコサミノグリカンの有する活性中心構造の解明に有用な働きをする14種類のグリコサミノグリカンオリゴ糖の合成に成功した。またプロテオグリカンそのものを多様な有機化合物に固定化する新たな方法を開発し(産業財産権参照)、その技術を用いてプロテオグリカン新規素材の創出を実現した。

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4件)

[1] Yamaguchi, M.; Utishiba, N. Development of carbohydrate type cancer vaccine: efficient synthesis of TN and T antigen probes. *Bull, fac, edu, wakayama univ, natural science.*, **2012**, 62, 1-6. 査読あり

[2] Yamaguchi, M.; Urano, A.; Kawashima, Y.; Kimura, N.; Kanda, W. Development of carbohydrate probes toward medicinal application: synthesis of sialyllactose derivatives as inhibitor against influenza virus infection. *Bull, fac, edu,*

wakayama univ, natural science., **2011**, 61, 1-5. 査読あり

[3] Yamaguchi, M.; Kakizaki, I.; Endo, M. Novel glycosaminoglycan glycotecnology: method for hybrid synthesis of glycosaminoglycan chains utilizing chemo-enzymatic procedures. *J. Carbohydr. Chem.*, **2010**, 29, 315-331. 査読あり

[4] Yamaguchi, M.; Takagaki, K.; Kojima, K.; Hayashi, N.; Chen, F.; Kakizaki, I.; Kon, A.; Endo, M. Novel proteoglycan glycotecnology: Chemoenzymatic synthesis of chondroitin sulfate-containing molecules and its application. *Glycoconjugate J.*, **2010**, 27, 189-198. 査読あり

[学会発表] (計3件)

[1] 山口真範, 松田麻衣, 川嶋祐典, 浦野文絵, 抜井康人, 藪下侑平「医療応用を目指したシアロ糖鎖の創成における簡便かつ効率的な構築法の開発」第84回日本生化学大会(2011年9月23日, 京都府)

[2] 山口真範, 石田秀治, 安藤弘宗, 宮崎敬子, 神奈木玲児, 木曾真「シアル酸構造修飾プローブを用いた高次生命機能の精査」第83回日本生化学大会(2010年12月9日, 兵庫県)

[3] 山口真範, 高垣啓一, 柿崎育子, 今淳, 遠藤正彦「新規なプロテオグリカン糖鎖工学:コンドロイチン硫酸含有分子の化学-酵素的合成とその応用」第82回日本生化学大会(2009年10月24日, 兵庫県)

〔図書〕（計1件）

[1]Yamaguchi, M. “New Horizons of Glycosaminoglycan Glycotechnology”, Advances in Medicine and Biology, Nova Science Publishers , New York, 2012, 52, 273-288.

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

[1]名称：プロテオグリカン固定化有機材料
発明者：山口真範
権利者：国立大学法人和歌山大学
種類：特許
番号：特願 2012-057111
出願年月日：平成24年3月14日
国内外の別：国内

[2]名称：新規シアロ糖鎖の製造方法
発明者：山口真範
権利者：国立大学法人和歌山大学
種類：特許
番号：特願 2011-204579
出願年月日：平成23年12月28日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 真範 (YAMAGUCHI MASANORI)
和歌山大学・教育学部・准教授
研究者番号：20400129