

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 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590014

研究課題名（和文）寄生虫感染診断薬を目指した糖鎖抗原の化学合成

研究課題名（英文）Chemical syntheses of oligosaccharides to elucidate in diagnosis of parasite infection

研究代表者

羽田 紀康 (HADA NORIYASU)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：70296531

研究成果の概要（和文）：

近年、細胞表層に存在する糖タンパク質や糖脂質など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、単離・構造決定にとどまり機能解明にまで至っていない。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を目指している。今回、寄生虫であるエキノコックス、イヌ回虫、マンソン住血吸虫及びブタ回虫より見出された糖鎖の化学合成を行い、20種類以上の目的化合物を得た。

研究成果の概要（英文）：

The oligosaccharide residues of glycoprotein and glycosphingolipids in mammalian tissues have been extensively studied for various biological recognition in recent years. In contrast, much less time has been devoted to structures of oligosaccharides from invertebrates that differ significantly from mammalian glycans. Due to these differences in the glycan structure we have been interested in the relationships between the structure and biological activity of oligosaccharides from invertebrate species, and in our continuing studies to elucidate the mechanism of host-parasite interaction. We carried out the synthesis of oligosaccharides from the helminth, *Echinococcus multilocularis*, *E. granulosis*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Ascaris suum*, and got target oligosaccharides of more than twenty kinds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

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

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つ

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) キンチャズデ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) エキノコックス *Echinococcus multilocularis* 及び *E. granulosus* 由来の糖タンパク質: 多包虫症の原因虫である *Echinococcus multilocularis* の血清診断に利用される抗原のなかで、Em2 は Gal β 1-3GalNAc を核として分岐したムチン型の糖鎖を持った糖タンパク質構造をとっており、これまでに還元末端を 2-(trimethylsilyl) ethyl (TMSEt) 基で保護した 6 種類のモデル化合物の合成を終え、感染患者血清に対するこれら糖鎖の抗原性を検討してきた。しかし、すべての化合物において顕著な抗原性は見られなかった。この原因を TMSEt 基の ELSA プレートへの吸着力に問題があると考え、本研究では TMSEt 基をビオチンプローブに置き換えた 5 種類の糖鎖の合成を目標とした。(Fig.1) ビオチンプローブに置き換えることによりストレプトアビジンコーティングプレートを用いて感度よく検出できることが期待できる。一方、近年単包虫症の原因虫である *E. granulosus* から *E. multilocularis* 由来の糖鎖とは異なった構

造を持つ糖タンパク質が報告され、多包虫症と単包虫症に対する糖鎖抗原の交差反応にも興味を持ち、後者由来のビオチン化糖鎖 (F,G: Fig.2) の合成も目標とした。

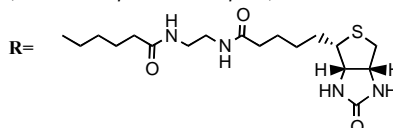
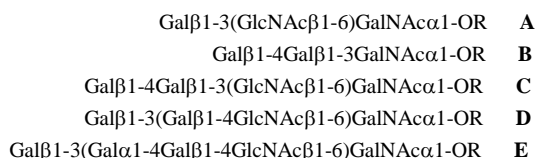


Fig. 1

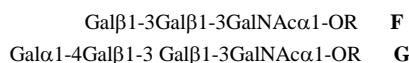


Fig. 2

(2) イヌ回虫 *Toxocara canis* 由来の糖タンパク質: イヌ回虫より見出された糖タンパク質糖鎖は、高等動物では見られないメチル糖を含んでおり珍しい構造を有している。この糖鎖及びメチル基のない誘導体を合成し、イヌ回虫患者血清に対する抗原性を調べることにした。本糖鎖もエキノコックス糖鎖同様ビオチンプローブを導入した H~L を合成目標とした。(Fig. 3)

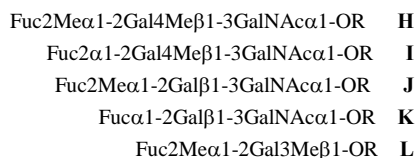


Fig. 3

(3) マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* 由来の糖脂質: マンソン住血吸虫より見出された糖脂質は、これまでの糖脂質とは全く異なった scisto コア構造 (GalNAc β 1-4Glc β 1-Cer) を持つ糖鎖構造であり、これまでに二~六糖糖脂質の全合成を行ってきた。また、マンソン住血吸虫のセルカリア幼虫期には、Le^x 抗原構造や擬似 Le^y 抗原構造が存在し、抗原性に富むことがわかっている。そこでこれらの患者血清への抗原性及び免疫調節物質としての効果を調べる目的で、フコース残基の数の違いに注目した非還元末端の数糖に絞り合成をめざした。(Fig. 4)

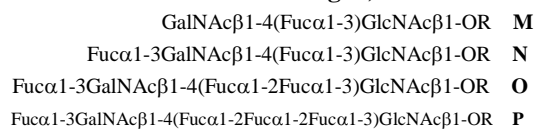


Fig. 4

(4) ブタ回虫 *Ascaris suum* 由来の糖脂質: ブタ回虫とイヌ回虫の鑑別診断がタンパク抗原では困難とされており、ブタ回虫に特有な非還元末端側のオリゴ糖を含んだビオチン化糖 **Q~U** (**Fig. 5**) を合成することで鑑別診断の向上に貢献できることを期待して合成目標とした。

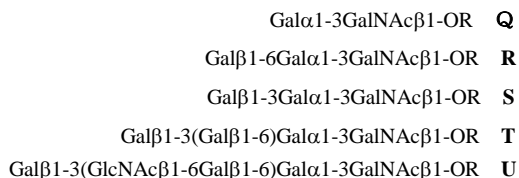


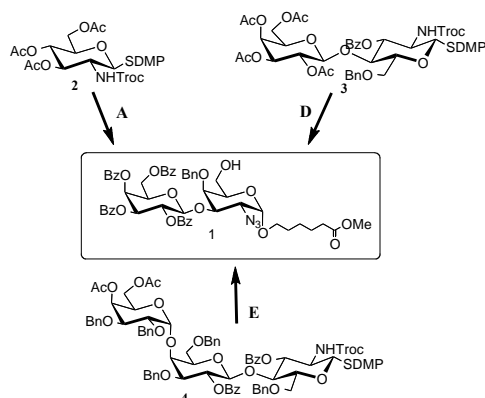
Fig. 5

3. 研究の方法

(1) エキノコックス属由来糖タンパク質糖鎖の合成:

①モデル化合物 **A, D, E** の合成

Fig.1 において、モデル化合物 **A, D, E** は共通して Gal β 1-3GalNAc からなるコア構造の GalNAc の 6 位に糖鎖が結合した分岐構造をとっている。そこで 6 位を水酸基遊離とした Gal β 1-3GalNAc 誘導体を共通の糖受容体 (**1**) とし、それぞれ適切な単糖、二糖、三糖供与体 (**2,3,4**) を縮合させるブロック合成により 3 種類の糖鎖誘導体に導いた。 (**Scheme 1**)



Scheme 1

その後、それぞれの水酸基を脱保護した後、ビオチンプローブを導入し、目的化合物 **A, D, E** に導いた。

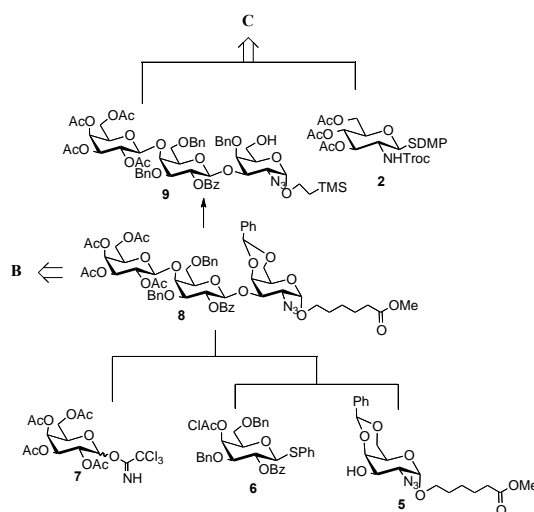
②モデル化合物 **B, C** の合成

モデル化合物 **B** は直鎖状の糖鎖であり、モデル化合物 **C** はモデル化合物 **B** の GalNAc の 6 位に GlcNAc が結合した形をとっている。したがって、GalNAc の 4,6 位をベンジリデン基で保護した単糖受容体 **5** に、**6** 及び **7** を順次縮合させモデル化合物 **B** の誘導体 **8** をステップワイズに合成した後、糖受容体 **9** とし、GlcNAc 供与体 **2** を縮合後、脱保護及びビオチン化により **B** 及び **C** に導いた。 (**Scheme 2**)

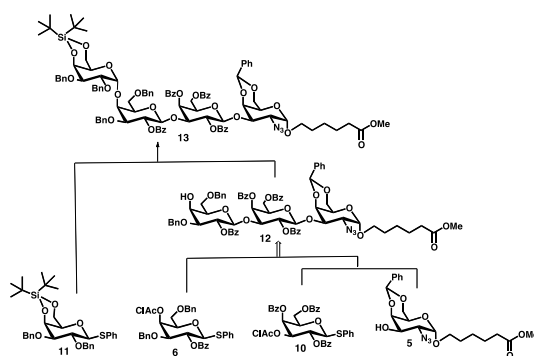
③ *E. granulosus* 由来の糖タンパク質糖鎖

の合成

Scheme 3 に示すように還元末端側より順次ステップワイズに糖鎖伸張させ、**12,13** を得た後、脱保護及びビオチン化して目的化合物 **F** 及び **G** に導いた。



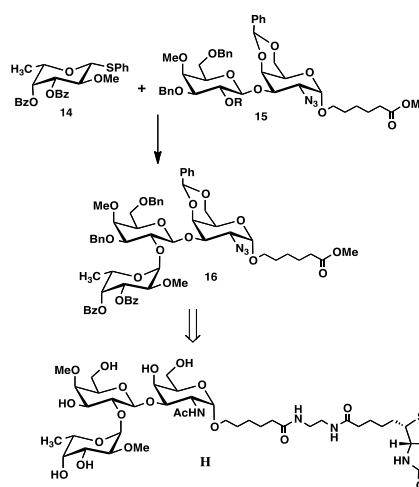
Scheme 2



Scheme 3

(2) イヌ回虫 *Toxocara canis* 由来糖タンパク質糖鎖の合成:

本糖鎖も当初 TMSEt 基を使用していたが、

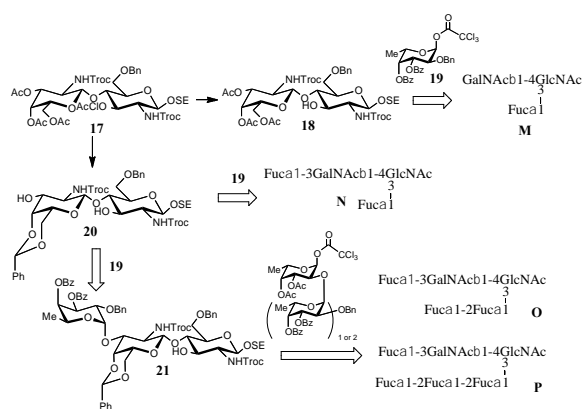


Scheme 4

エキノコックス属糖鎖同様ビオチンプローブ

ブ導入を目指し、メトキシカルボニルペンチル基で誘導した。また、*T. canis* より報告された糖鎖は1種類であるが、構造活性相関を調べる目的でメチル基を部分的に持たない非天然型糖鎖も併せて合成した。**Scheme 4** に天然型糖鎖である **H** の合成概要を示した。

(3) マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* 由来の糖脂質：本研究では、住血吸虫症の診断薬の開発と、住血吸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、マンソン住血吸虫より見出された新規な糖脂質の中で、非還元末端側の糖鎖に注目し合成した。コアとなる二糖誘導体 **17** を糖受容体である **18** 及び **20** に変換し、各種フコース誘導体を縮合、脱保護を行うことにより **M**~**P** の糖鎖を得た。(Scheme 5)



Scheme 5

(4) ブタ回虫 *Ascaris suum* 由来の糖脂質：これまでにアミノ基の保護をトリクロロエトキシカルボニル(Troc)基を用いてきたが、脱保護時に収率の低下が見られ、目的物を得ることができなかった。そこで本研究ではフタルイミド基(Phth)に変換して再度合成している。

4. 研究成果

(1) エキノコックス属由来の糖タンパク質：*Echinococcus multilocularis* これらはELESAにより多包虫症感染患者の血清と相関を調べたところ、**B, C, E** に抗原性が見られ特に **B** が強く抗原性を示した。また、抗原決定基を精査する目的で **B** の非還元末端二糖部と、**B** の α -ガラクトシド結合を β に置き換えた三糖を合成し、相関を調べたところいずれも抗原性を示さなかったことから多包虫症感染患者血清に対する抗原決定基は **B** の配列が重要であることが示唆された。また、*E. granulosus* 由来のビオチン化糖鎖についても三糖、四糖誘導体の合成に成功した。

(2) イヌ回虫 *Toxocara canis* 由来の糖タンパク質：*Toxocara canis* より見出された糖タン

パク質糖鎖は1種類であったことから数種の非天然型糖鎖も合成し、構造活性相関を検討した結果、メチル基が抗原性に重要な官能基であることを見出した。

(3) マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* 由来の糖脂質：*S. mansoni* から見出された糖鎖構造は、これまでどの生物からも報告されていない新規なコア構造を持つ糖脂質群であり、特に、今回合成目標とした部分は高等動物の持つ LewisX によく似た糖鎖配列を有しており、感染患者血清との相関及び免疫調節物質の両方の観点からも興味深い。これらの合成が完了したことは今後の機能解析に興味を持たれる。

(4) ブタ回虫 *Ascaris suum* 由来の糖脂質：*Ascaris suum* 由来の糖脂質はこれまでに20種類以上報告がなされているが、化学的合成が行われたのは我々が行った三、四糖糖脂質のみである。ブタ回虫及びイヌ回虫感染における鑑別鑑別を目的とした糖鎖合成において、今回 Fig.4 における5種類のブタ回虫非還元末端側糖鎖を目標とし、ストラテジーを変更して **Q**~**U** までの五糖誘導体まで導いた。現在脱保護を検討している。

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
(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 T. Kanaya, F. Schweizer, T. Takeda, F. Kiuchi, N. Hada. Synthetic studies on glycosphingolipids from protostomia phyla: synthesis of glycosphingolipids and related carbohydrate moieties from the parasite *Schistosoma mansoni*, *Carbohydr. Res.*, 査読有り **361**, 55-72 (2012).
- ② A. Koizumi, K. Yamano, T. Tsuchiya, F. Schweizer, F. Kiuchi, N. Hada. Synthesis, antigenicity against human sera and structure-activities relationships of carbohydrate moieties from toxocara larvae and their analogues, *molecules*, 査読有り **17**, 9023-9042 (2012).
- ③ K. Yamano, A. Koizumi, T. Takeda, F. Kiuchi, N. Hada. Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc is the dominant epitope of Em2 antigen, the mucin-type glycoprotein from *Echinococcus multilocularis*, *Parasitol. Res.*, 査読有り **111**, 795-805 (2012)
- ④ A. Koizumi, K. Yamano, F. Schweizer, T. Takeda, F. Kiuchi, N. Hada. Synthesis of the carbohydrate moiety from the parasite *Echinococcus multilocularis* and their antigenicity against human sera, *Eur. J. Med. Chem.*, 査読有り **46**, 1768-1778 (2011).

[学会発表] (計 5 件)

- ① 塚本達也、梅田悠奈、羽田紀康、木内文之、無脊椎動物由来糖脂質の合成研究(51) ブタ回虫 *Ascaris suum* 由来非還元末端糖鎖の合成(7)、日本薬学会第 133 年会、2013.3.29. 横浜。
- ② 大鐘真実、羽田紀康、土屋貴志、中根洋美、小泉明彦、木内文之、山野公明、*Echinococcus granulosus* 由来糖タンパク質の糖鎖部分に関する合成研究日本薬学会第 132 年会、2010.3.30. 札幌。

他 3 件

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽田 紀康 (HADA NORIYASU)
慶應義塾大学・薬学部・准教授
研究者番号 : 70296531

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし