

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23241074

研究課題名(和文)糖鎖合成と生体イメージングを基盤とする糖鎖の生物機能解析

研究課題名(英文)Studies on biological function of glycoconjugates using synthetic probes and in vivo imaging

研究代表者

深瀬 浩一 (FUKASE, Koichi)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80192722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要：複雑な構造を有する複合糖質の効率的合成法を確立し、それらの合成を達成するとともに、合成化合物群を用いて生物活性構造の同定と活性発現機構を解明した。自然免疫受容体に認識される細菌複合糖質の単離、合成と機能研究を行い、その構造が活性に及ぼす影響について明らかにした。これにより、自然免疫受容体リガンドを用いた免疫制御への道が開かれ、アジュバント等への実用化が期待できる。また複雑構造を有するN-グリカンを化学合成するとともに、そのイメージングにより、N-グリカンの構造が生体内動態に与える影響を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have developed novel synthetic methods for the effective synthesis of glycoconjugates and achieved the synthesis and biological assay of various types of glycans and glycoconjugates. Some immunomodulating glycoconjugates were revealed as a prospective candidate for an immune adjuvant. We also synthesize N-glycans which have core fucose and bisecting GlcNAc to investigate its function. In vivo imaging of various kinds of N-glycans clearly showed that the structure of N-glycans have influence on their dynamics.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：自然免疫リガンド リピドA ペプチドグリカン N-グリカン イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は器官形成、老化、感染、炎症、生体防御、癌など生体の防御や恒常性維持に関わる様々な生命現象において極めて重要な働きをしている。しかし、化学構造に基づいた糖鎖機能の解析はまだ十分にはされていない。そこで本研究では、合成糖鎖を用いて、糖鎖の生物機能を解明し、さらには糖鎖シグナルによって生体反応を制御することを目的としている。

本研究の主題の一つである自然免疫は、広く多細胞生物に存在し微生物に特有の分子構造を認識して免疫系を活性化するシステムである。1996年に Hoffman らにより自然免疫受容体として Toll が発見されて以来次々に新しい受容体が見つかり、獲得免疫への作用や免疫疾患との相関などを含めその機構が急速に解明されている (Akira S. et al., *Cell* **2006**, *124*, 783)。

申請者は、細胞壁ペプチドグリカン(PGN)やグラム陰性菌リポ多糖などの細菌由来自然免疫刺激糖鎖の合成研究により、免疫を活性化する鍵構造や受容体を明らかにしてきた(*Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2010**, *86*, 322)。リポ多糖部分構造とその活性中心であるリポド A や種々の類縁体を合成して、リガンドの微妙な構造の違いでリポ多糖受容体 (Toll 様受容体 4: TLR4) のシグナルが制御されることを見出した(*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2008**, *81*, 796)。また PGN の種々のフラグメント合成を行い (*Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 232) 細胞内タンパク因子 Nod1, Nod2 が PGN の受容体であり、それぞれ g-D-グルタミルジアミノピメリン酸(iE-DAP)ならびにムラミルジペプチド(MDP)を最小構造として認識することをミシガン大の猪原らと共に示した (*Nature Immunol.* **2003**, *4*, 702, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5509)。Nod1 の遺伝子変異が喘息等のアレルギー疾患に相関があり、環境からの Nod1 刺激がアレルギーの制御に繋がること示唆されたことから、細菌が環境中に放出する Nod1 リガンドを同定するなど多くの成果を挙げた (*J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23607)。

また、ヒトの生体内のタンパク質の多くは糖鎖による翻訳後修飾を受けている。N-結合型糖鎖 (N-グリカン) はタンパク質のアミノ酸残基に結合する糖鎖で、多様な構造を持ち、その構造の違いがタンパク質の活性を制御する。一方で、N-グリカンは天然では多様な構造の混合物として存在するため、その構造に基づいた機能の解析は進んでいない。そこで、申請者はこの機能解明の解明を目指して、糖鎖野党タンパク質の PET イメージングを実施してきて、糖鎖が生体内動態に与える影響を明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、リポ多糖、赤痢アメーバ由来糖脂質、ペプチドグリカン(PGN)、のフラグメント構造を始めとする微生物由来免疫刺

激糖鎖の合成を行い、それらの免疫応答を調べる。また、自然免疫受容体リガンドの標識プローブを合成し、細胞レベルでの免疫活性化機構の解析を目指す。さらには、様々なリガンドを用いた受容体活性化によりサイトカインシグナルや免疫細胞の制御が可能であることから(*PLoS One* **2010**, *5*, e12550)、単一あるいは複数のリガンドを併用することで、抗癌、抗アレルギー、抗炎症といった免疫系の制御を行うことを目的とする。

また、N-グリカンの合成も行い、その機能解明を目指す。単離した糖鎖からの酵素合成が報告されている糖鎖に関しては、細胞やタンパク質に標識し、イメージングを行う。また、調製法が確立していない糖鎖に関しては化学合成により調整する。特に、疾病とさまざまな関連があることが示されているコアフコース含有 N-グリカンとバイセクティング含有 N-グリカンの合成に注力し、その機能解明を目指す。

## 3. 研究の方法

ヘリコバクターピロリ菌や歯周病菌等の寄生菌と、アテローム性動脈硬化などの慢性炎症との相関が報告されている。我々は、ピロリ菌リポド A は、急性炎症を惹起しないが、慢性炎症やアテローム性動脈硬化との相関が示されている IL-18 を強力に誘導することを最近見出した。そこでこれらのリポド A や関連構造について一層の合成研究を進め、慢性炎症シグナルとの相関を調べる。

特徴的な細胞傷害性 T 細胞(NKT)活性化作用を持つ赤痢アメーバ由来糖脂質についても、新規化学合成法の確立、生物活性の解析、また活性化機構の解析を行う。TLR2 リガンド、Nod1 リガンドがそれぞれナチュラルキラー細胞 (NK) 活性化、NKT 活性化能を有することから、他の種々の合成リガンドならびに複合体についても NK、NKT 活性化を指標として抗腫瘍活性を示す化合物を探索する。

Nod1 を介したアレルギーの抑制については、バチルス属などの土壌細菌の関与が示唆される。安全なバチルス属細菌として、納豆菌を選びその培養上層から Nod1 リガンドを探索する。さらに Nod1 リガンドと他の自然免疫受容体リガンドとのシナジーについて検討する。

さらには、異なる受容体のリガンド分子を結合させた複合体を合成し、それらを用いた高度な免疫制御について検討する。

申請者が開発した電子環状反応を用いて糖鎖でタンパク質や細胞を標識し、順次 PET イメージングを行う。並行して N-グリカンの化学合成を行う。合成した糖鎖は生体内安定性を高めてイメージングを行うために、糖鎖クラスターへと誘導する。

## 4. 研究成果

(1) 寄生性細菌由来リポ多糖部分構造の合成と機能解析

胃、十二指腸潰瘍の起炎菌ヘリコバクター・ピロリや歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリスなどの寄生性細菌の LPS は特徴的な数種のリポド A 構造を有する。これらの LPS は、大腸菌等の他の腸内細菌の LPS に比べ免疫刺激活性は弱い、寄生性、慢性炎症、癌化、あるいはアテローム性動脈硬化との関連が示唆されている。本研究ではリポド A とそれに Kdo の結合した分子について、構造と免疫調節作用との関連を明らかにするために合成研究を実施した。これらの寄生性細菌のリポド A は合成や生物活性の解析が包括的に行われたことはない。本研究では、図 1 に示される 10 種類の寄生性細菌由来リポ多糖部分構造 (1~7) を集積的な手法を用いて網羅的に合成し、選択的な免疫調節作用を見いだした。

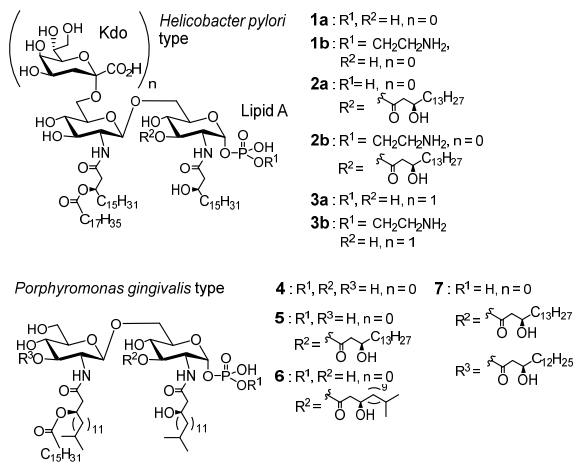


図 1. 合成した寄生性細菌由来リポ多糖部分構造

具体的には二糖共通鍵中間体の構築後にアシル基、リン酸基の導入を行うことにより、数種の構造パターンを網羅的に合成可能な経路を確立した。また、リポド A 骨格と Kdo 残基との  $\alpha$ -選択的グリコシル化についても化学量論以上のルイス酸を必要としたこれまでのフッ化糖を用いた方法に対し、脱離基として *N*-フェニルトリフルオロイミデートを用いることで、触媒量のルイス酸で活性化が可能な反応へと改良を行い、保護基の選択肢を広げた。また、同反応をマイクロリアクターを用いたフロー系反応へと展開させることで、高選択的かつ効率的に目的の三糖体を得る方法を見出した。

得られた寄生性細菌由来 LPS 部分構造 (1~7) の生物活性試験を行った結果、炎症性サイトカイン IL-6 については 1b, 2b, 7 が微弱ではあるが誘導活性を示すのに対し、1a, 2a, 3~5 は阻害活性を示し、リン酸基の修飾、アシル基構造の違い、Kdo の有無による活性のスイッチングが見られた。一方でこれらは、慢性炎症との相関が注目されている IL-12 や IL-18 を誘導した。特に IL-6 誘導を阻害した 1a, 3, 5 は IL-12, IL-18 の選択的な誘導作用を示した<sup>2)</sup>。以上のことから寄生性細菌のリポド A が、微妙な構造上の差異によって、TLR4

受容体に認識された後、異なる複数の細胞内シグナル伝達経路を選択的に阻害、活性化していることを初めて明らかにし、寄生性細菌の病原性、寄生性の要因の一つを示すとともに、選択的サイトカイン誘導制御の可能性を示した。

## (2) 赤痢アメーバ *E. histolytica* trophozoites の NK 細胞刺激活性を持つイノシトールリン脂質の合成と機能解析

赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* のイノシトールリン脂質 EhPIb は、特異な免疫応答を誘導する。その機能解明のために全合成研

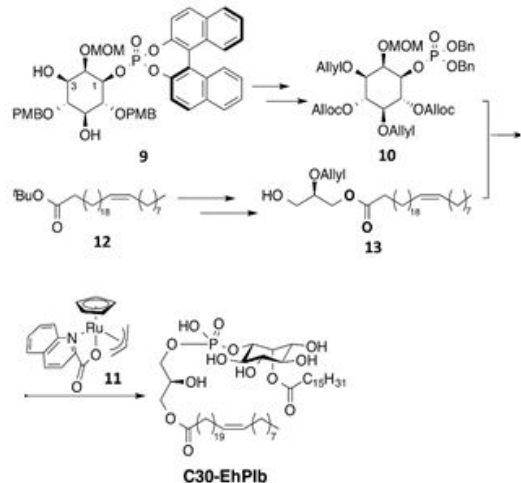
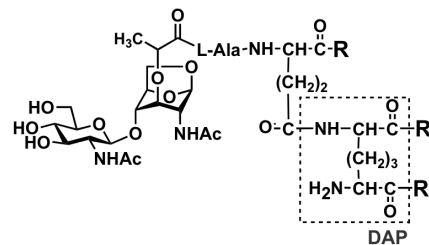


図 2. イノシトールリン脂質 EhPIb の合成

究を行った。まず Ni 触媒存在下 Grignard 試薬を用いた sp<sup>3</sup>-sp<sup>3</sup> クロスカップリング反応により、長鎖脂肪酸 12 を合成した。水酸基の永続的な保護基としてアリル系保護基を用い、北村らの Ru 触媒を用いて、最終工程において全てのアリル系保護基を切断するという新たなアリルストラテジーを確立した。これらの手法を用い、最終的脱保護を経て C30-EhPIb の全合成を達成した (図 2)。

## (3) バチルス属、アシネトバクター属細菌培養上清からの天然 Nod1 リガンドの同定



Natural human Nod1 ligand found in *E. coli* and also in *B. subtilis* (R = -OH); PGN fragment found in *B. subtilis* (R = -NH<sub>2</sub>).

図 3. 納豆菌由来 PGN 部分構造

バチルス属、アシネトバクター属細菌培養上清からの天然 Nod1 リガンドの分離精製を進め、MS-MS 分析により、天然 Nod1 リガンドを図 3 に示した PGN 部分構造であると決定した。バチルス属の代表例として、納豆菌

型、および比較として大腸菌型の構造を図3に示した。

#### (4) 自然免疫リガンドの標識体および複合体の合成

自然免疫受容体 Nod1、2 ならびに TLR2 の機能研究について、それらのリガンドである様々なペプチドグリカンフラグメントやリポペプチドの蛍光標識体や光親和性標識体の合成に成功した。また、TLR2 および Nod2 のリガンドを化学的に結合させた複合型分子(図4)を創製し、異なる受容体の同時刺激による相乗的な免疫増強活性を見出した。

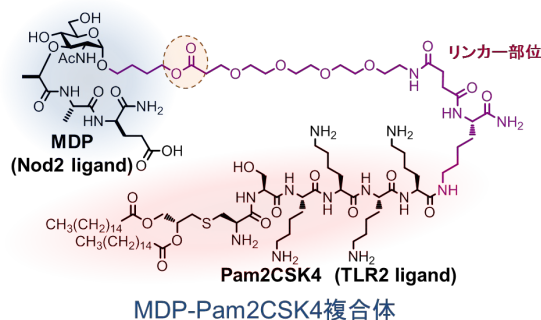


図4. TLR2、Nod2 リガンドの複合体

#### (5) N-グリカンの化学合成と生物有機化学

N-グリカンの化学合成を行った。コアフコース含有 12 糖およびバイセクティング含有 12 糖の全骨格構築に成功した。本合成は、4 糖に対して 4 糖を 2 度グリコシル化することにより 12 糖を構築する収束的な合成ルートである。一方、糖鎖工学研究所から供与を受けた N-グリカンを用いた蛍光イメージング、PET イメージングを行い、糖鎖構造による臓器集積やがん集積の違いを見出した。

他にも、糖転移酵素(フコシルトランスフェラーゼ 8)や糖加水分解酵素(ノイラミニダーゼ 3)の阻害剤の探索も行い、多方面から N-グリカンの生理的意義に迫った。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 25 件)

- Hsu Y.; Ma HH.; Lico LS.; Jan JT.; Fukase K.; Uchinashi Y.; Zulueta MM.; Hung SC. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2014**, *53*(9), 2413-2416
- Tanaka, K.; Kitadani, M.; Tsutsui, A.; Pradipta, AR.; Imamaki, R.; Kitazume, S.; Taniguchi, N.; Fukase, K. *Org Biomol Chem.* **2014**, *12*(9), 1412-1418.
- Tanaka, K.; Nakamoto, Y.; Siwu, ER.; Pradipta, AR.; Morimoto, K.; Fujiwara, T.; Yoshida, S.; Hosoya, T.; Tamura, Y.; Hirai, G.; Sodeoka, M.; Fukase, K.\* *Org Biomol Chem.* **2013**, *11*(42), 7326-7333.
- Tanaka, K.; Moriwaki, K.; Yokoi, S.; Koyama, K.; Miyoshi, E.; Fukase, K.\* *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1074-1077.

- Wang, N.; Huang, C.-y.; Hasegawa, M.; Inohara, N.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.\* *ChemBioChem* **2013**, *14*, 482-488.
- Iwasaki, T.; Higashikawa, K.; Reddy, V. P.; Ho, W. W. S.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.\*; Terao, J.; Kuniyasu, H.; Kambe, N. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2956-2960.
- Tanaka, K.; Siwu, R. O. E.; Hirotsaki, S.; Iwata, T.; Matsumoto, R.; Kitagawa, Y.; Pradipta, A. R.; Okumura, M.; Fukase, K.\* *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5899-5902.
- Tanaka, K.; Yokoi, S.; Morimoto, K.; Iwata, T.; Nakamoto, Y.; Nakayama, K.; Koyama, K.; Fujiwara, T.; Fukase, K.\* *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1865-1868
- Fujimoto, Y.; Shimoyama, A.; Suda, Y.; Fukase, K.\* *Carbohydrate Research* **2012**, *356*, 37-43.
- Fujimoto, Y.; Shimoyama, A.; Suda, Y.; Fukase, K.\* *Carbohydrate Research* **2012**, *356*, 37-43.
- Tanaka, K.; Mazumder, K.; Siwu, E. R. O.; Nozaki, S.; Watanabe, Y.; Fukase, K.\* *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1756-1759.
- Shimoyama, A.; Saeki, A.; Tanimura, N.; Tsutsui, H.; Miyake, K.; Suda, Y.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.\* *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (51), 14464-14474.
- Uchinashi, Y.; Nagasaki, M.; Zhou, J.; Tanaka, K.; Fukase, K.\* *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7243-7248.
- Shimoyama, A.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.\* *Synlett* **2011**, *16*, 2359-2362.
- Tanaka, K.; Fukase, K.\*; Katsumura, S. *Synlett* **2011**, *15*, 2115-2139.

[学会発表](計 56 件)

- “Imaging and Sensing Biomolecular Function and Assembly” Synthesis and Bio-imaging study of glycans. Koichi Fukase, Osaka university-University of Bordeaux International Symposium, Institut Européen de Chimie et Biologie, University of Bordeaux, Pessac, France, 2014.3.14-15 (Invited)
- Synthetic Study of Microbial and Animal Glycans. Koichi Fukase, 27th International Carbohydrate Symposium (ICS27), Bangalore, India, 2014.1.12-17 (Invited)
- マイクロフロー合成を基軸とした集積合成法の開発と生体制御分子創製への展開. 深瀬浩一、第3回慶應義塾大学戦略的研究基盤形成支援事業シンポジウム-グリーンイノベーションとライフイノベーションの架け橋、慶應義塾大学、横浜、2013.12.21 (招待講演)
- Synthesis and Bio-imaging study of glycans towards immunoregulation. Koichi Fukase, Yukari Fujimoto, Yoshiyuki Manabe, and Katsunori Tanaka, First Osaka university-EPFL International Symposium, Osaka Univ., 2013.12.2-4 (Invited)

5. Synthetic Study of Microbial and Animal Glycans. Koichi Fukase, Yukari Fujimoto, Katsunori Tanaka, and Yoshiyuki Manabe, The 11th International Symposium on Organic Reaction (ISOR-11), Taipei, Taiwan, 2013.11.19-22 (Invited)

6. 化学プロセスインテグレーションと化合物インテグレーション：生体反応の制御を目指した化学システムの創成. 深瀬浩一、第3回CSJ化学フェスタ2013、タワーホール船堀、東京、2013.10.21-23 (招待講演)

7. Synthesis and Bio-functional Studies of Animal and Bacterial Glycans. Koichi Fukase, 17<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Tel-Aviv, Israel, 2013.7.7-11 (Invited)

8. 生物機能分子と生体分子機能の探索を目指した新しいアッセイシステム：シグナル遮断分子とグライコバイオイメージング. 深瀬浩一、理研シンポジウム：第8回有機合成化学のフロンティア/JST-ERATO シンポジウム生細胞分子化学、鈴木梅太郎記念ホール、和光、2013.7.5 (招待講演)

9. マイクロリアクターを利用した反応制御と糖鎖合成. 深瀬浩一、岡山マイクロリアクターネット例会、岡山大学工学部、2013.6.7 (招待講演)

10. 有機合成と生体イメージングを基盤とすると糖鎖化学生物学. 深瀬浩一、理研シンポジウム-未来に繋ぐ天然物合成化学-、大阪大学会館、2013.5.31 (招待講演)

11. Synthetic Studies of Glycans and Glycoconjugates for Chemical Glycobiology. Koichi Fukase, 5th Gratama Workshop, Tokyo Institute of Technology, 2013.5.29-6.1. (Plenary)

12. マイクロリアクターを利用した反応制御と糖鎖合成 (特別企画講演) 深瀬浩一、日本化学会第93春季年会(2013)、滋賀県草津立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2013.3.22.-25 (招待講演)

13. Synthesis of regulatory molecules and probes for innate immunity and glyco-imaging. Koichi Fukase, The 7th Glycan Forum Berlin 2013, nhow Hotel, Berlin, Germany, 2013.3.20-23 (Invited)

14. Comprehensive Approaches for New Antitumor Agents and Immunoregulatory Molecules, Regulation of Innate Immune Responses and Signal Transductions. Koichi Fukase, First International Symposium on Pharmaceutical Sciences: A Global Approach, Department of Pharmacy, University of Science & Technology, Chittagong, Bangladesh, 2013.2.26 (Plenary)

15. 有機合成を基盤とする生物活性分子の機能解析と創製. 深瀬浩一、ヘテロ原子部会平成24年度第2回懇話会、京都大学・宇治おうばくプラザ、2012.12.14 (招待講演)

16. Immunoactivation and immunomodulation using synthetic PRR ligands. Koichi Fukase, The

1st International Symposium on Chemical Biology of Natural Products Target ID and Regulation of Bioactivity, Kyoto, Kyoto Century Hotel, 2012.10.31-11.1 (Invited)

18. Immunoactivation and immunomodulation using synthetic PRR ligands. Koichi Fukase, International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 (IEIIS2012), National Institute of Informatics, Tokyo, Japan, 2012.10.23-26 (Invited)

19. 有機合成とイメージングを基盤とする生物活性分子の機能解析と創製：新しい抗腫瘍療法を目指して. 深瀬浩一、大塚有機合成シンポジウム、大塚製薬 能力開発研究所 (徳島)、2012.10.15-16 (招待講演)

20. Synthesis of bacterial glycoconjugates for regulation of immune system. Koichi Fukase, 5th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Suzdal, Russia, 2012.9.2-6 (Invited)

21. 化学合成で糖鎖の生物機能に迫る. 深瀬浩一、第15回機能性分子シンポジウム、筑波大学総合研究棟、2012.1.28. (招待講演)

22. Integrated Synthesis of Bioactive Glycans and Heterocycles. K. Fukase, 10th International Symposium on Organic Reactions (ISOR10). Faculty of Science and Technology, Keio University, Yokohama, Japan, 2011.11. 21-24 (Invited)

23. Glyco-imaging for glycan dynamics study. K. Fukase, The 71st Okazaki Conference "New perspectives on molecular science of glycoconjugates", Osakazaki Conference Center, NINS, Japan, 2011.10.12-14 (Invited)

24. Structures and functions of bacterial lipopolysaccharides. K. Fukase, Bilateral Joint Seminar: Glycobiology Japan-Netherlands Joint Seminar 2011. Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan, 2011.10.8-11 (Invited)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

深瀬浩一 (FUKASE, Koichi)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：80192722

### (2) 研究分担者

田中克典 (TANAKA, Katsunori)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：00403098

真鍋良幸 (MANABE, Yoshiyuki)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：00632093