

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310150

研究課題名(和文) 共生および感染免疫に関わる糖質を基盤としたケミカルプローブの合成とその評価

研究課題名(英文) The synthesis of biologically active oligosaccharides in symbiosis and immunity

研究代表者

田中 浩士 (TANAKA, Hiroshi)

東京工業大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：40334544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円、(間接経費) 3,780,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、合成ケミカルプローブを利用する生物化学、計算化学および分析化学の融合技術に基づいた共生と免疫に関わる糖鎖の機能とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、共生と免疫にかかわる3種類の糖鎖(サンゴと褐虫藻の共生を仲介するフォルスマン抗原5糖、ヒト自然免疫活性を有するグルカン多糖およびリボマンナンリン酸糖脂質)の新規効率的合成法および、その構造活性相関に関する有益な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The synthesis of biologically active oligosaccharides in symbiosis and immunity and their applications to chemical biological research are described. Forssmann pentasaccharide identified as a ligand of the lectin SLL-2 isolated from an octocoral *Sinularia lochmodes*, β -D-glucan oligosaccharide stimulating innate immunity and lipomannan glycoconjugates isolated from BCG were selected as target natural glycoconjugates. We prepared by these complex oligosaccharides and related derivatives and elucidation of the structure activity relationships using the synthetic glucans.

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：自然免疫 真菌 グリコシル化 サンゴ ケミカルバイオロジー 複合糖質 立体選択的 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

異種生物の相互作用には、正の作用としての共生および負の作用としての感染の関係がある。感染として見なされた場合には、免疫防御システムにより侵入生物を排除する。このような生物間の認識や識別において、しばしば、糖鎖が必要な役割を果たしている。そのため、これらの糖鎖を介した異種細胞間相互作用の詳細なメカニズムを明らかにすることは、生物学的見地だけでなく創薬開発において非常に重要である。しかしながら、生体試料から構造が明らかで純粋な糖鎖を生物機能表を行なうに十分量、分離精製することは容易なことではない。そこで、これらの糖鎖の機能を明らかにするためには、有機合成によって供給された構造が明らかで純粋な糖鎖およびその誘導体が必要である。

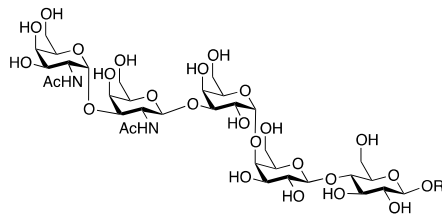
2. 研究の目的

本研究は、「共生および感染免疫に関わる糖質を基盤としたケミカルプローブの合成とその評価」と題し、ケミカルプローブを利用する生物化学、計算化学および分析化学の融合技術に基づいた共生と免疫に関わる糖質の機能とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的には、共生と免疫にかかわる3種類の糖鎖(サンゴと褐虫藻の共生を仲介するフォスマン抗原5糖、ヒト自然免疫活性を有するグルカン多糖およびリポマンナンリン酸糖脂質)の構造活性相関とそれが誘起する生物現象メカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

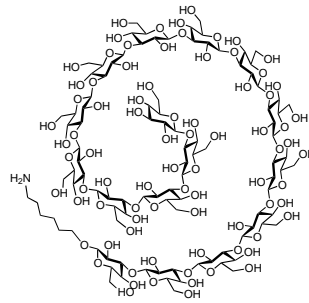
本研究では、合成ケミカルプローブを利用する生物化学、計算化学および分析化学の融合技術に基づいた共生と免疫に関わる糖鎖の機能とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的には、共生と免疫にかかわる3種類の糖鎖(サンゴと褐虫藻の共生を仲介するフォスマン抗原5糖、ヒト自然免疫活性を有するグルカン多糖およびリポマンナンリン酸糖脂質)の構造活性相関とそれが誘起する生物現象メカニズムを明らかにする。

(1) フォスマン5糖の合成とその機能評価では、ワンポットグリコシル化反応を用いるフォスマン5糖の合成法の開発とそれを基盤とした周辺糖鎖の合成を行なう。さらに、これらの糖鎖の標的タンパク質 SLL-2 との結合試験および、サンゴと褐虫藻の共生阻害試験を行い、本共生関係における SLL-2 の役割を明らかにする。

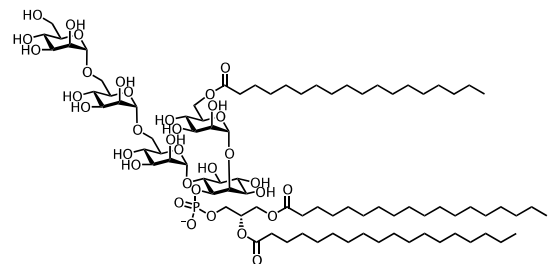


(2) グルカンオリゴ糖のその機能評価では、NMR法を用いる合成グルカン16糖

の構造解析とクリックケミストリーを用いる逐次型伸長法によるグルカン糖鎖ミニミックの合成とその機能評価を行なう。



(3) リポマンナンリン酸糖脂質の合成とその機能評価では、リードとした誘導体合成と糖鎖変換型誘導体の合成を目的とした収束的合成戦略の開発を目指す。



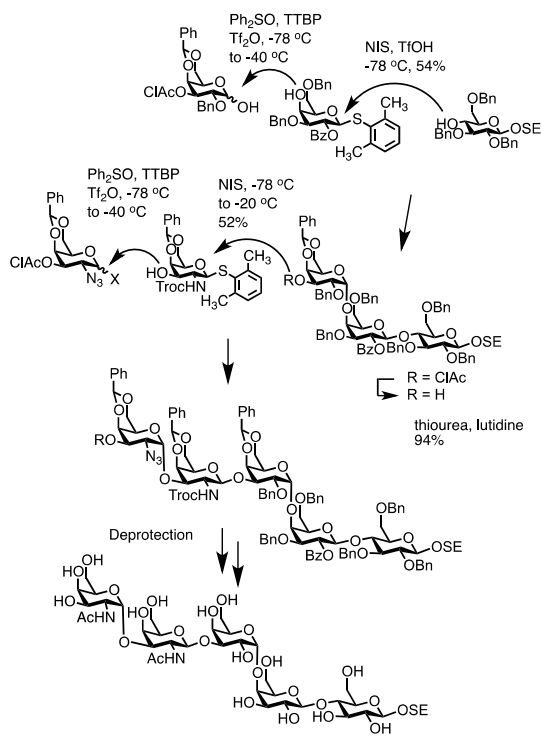
4. 研究成果

(1-1) OPG 反応を用いる5糖類縁体の合成
OPG 反応を用いるフォスマン5糖の合成を検討した。まず、還元末端3糖の合成を検討した。ガラクトースを糖供与体とチオガラクトシドを糖受容体として用いることにより、化学選択的かつ選択的かつ選択的に2糖を合成した。さらに、連続的にチオ糖を活性化することにより、還元末端側の3糖をワンポットで得ることに成功した。続いて、5糖の合成を検討した。まず、2位にアジド基を有するガラクトース糖供与体に対して、チオガラクトシド糖を糖受容体として用いることにより、化学選択的かつ選択的かつ選択的に2糖を合成した。さらに、連続的にチオ糖を活性化し、先に合成した3糖を糖受容体として用いることにより、5糖をワンポットで得ることに成功した。得られた保護5糖を脱保護することにより、目的とする5糖を得た。さらに、本手法を用いて、糖鎖の長さや、構成単糖の異なる誘導体の合成を達成した。

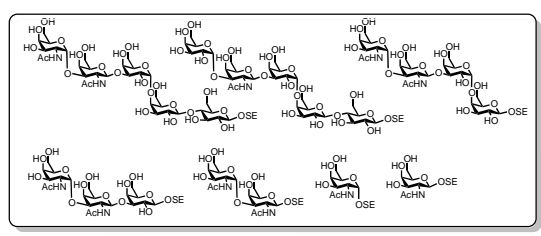
(1-2) 生物機能評価

合成した糖鎖を用いた生物活性試験を行った。まず、偏光蛍光解消法による SLL-2 との結合試験を行った。その結果、ガラクトサミンをガラクトシドへと変換した5糖の SLL-2 の糖鎖認識能は低下した。さらに、糖鎖長が短くなると同様に結合能が低下した。本結果から、非還元末端側のアミノ糖だけでなく、5糖全体が SLL-2 の認識において重要であることが明らかとなった。次に、褐虫藻遊泳細胞の形態変化における糖鎖の影響を

調べた。その結果、SLL-2 に対する結合能に対応して、SLL-2 の褐虫藻細胞形態変化に対する機能を阻害することを明らかにした。本研究結果より、5 糖がサンゴと褐虫藻の共生の鍵化合物として働くことを明確にした。

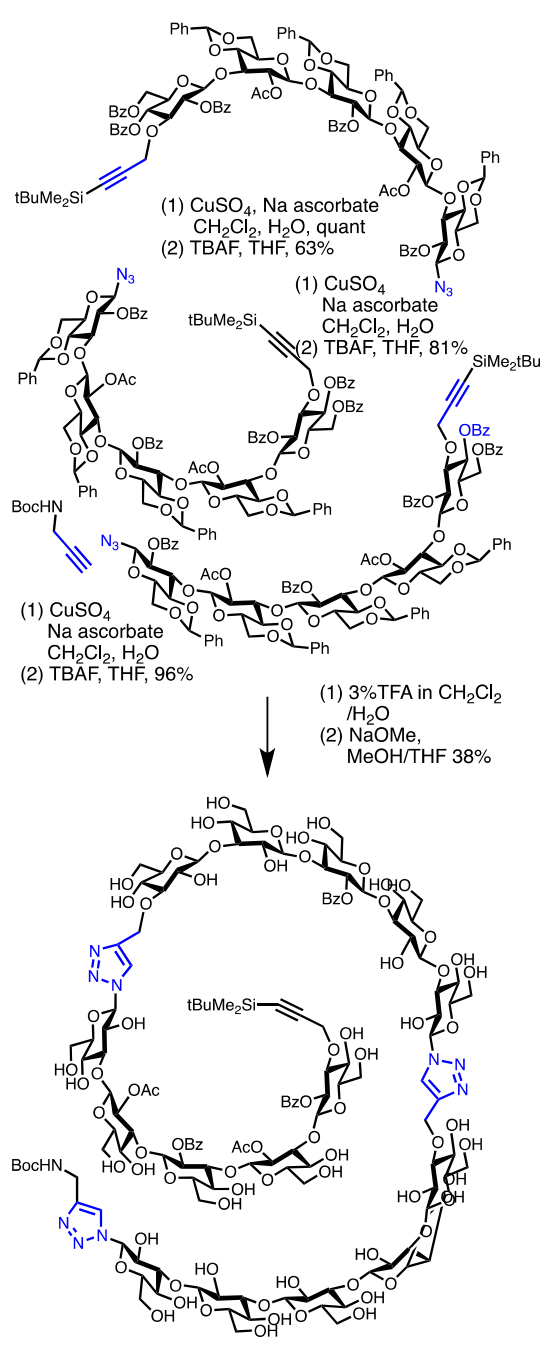


5糖類縁体



(2-1) クリック反応を用いる直鎖型多糖ミミックの合成

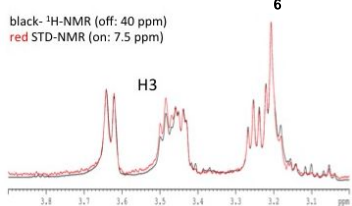
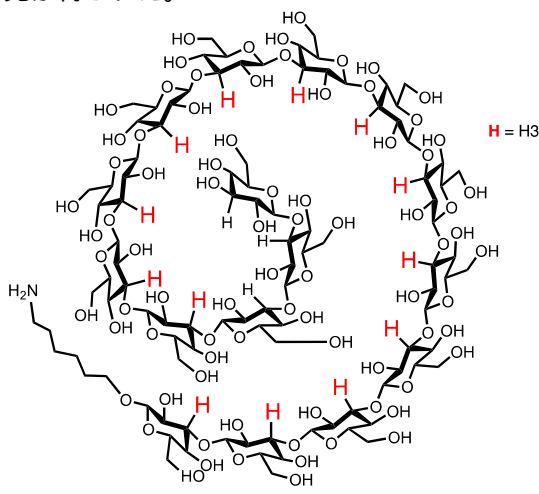
糖鎖ユニットをスパーサーを介して直線状に結合する直鎖型多糖モデルの合成を検討した。まず、グルカンユニットをトリアゾールスパーサーを介して直列に結合させた直鎖型βグルカン誘導体の液相合成を行なった。その結果、両末端にアセチレンとアジドを有する4糖ユニットを合成し、順次[3+2]環化付加反応により伸長し4糖を4ユニット含む16糖の合成に成功した。得られた16糖誘導体についてDectin-1に対する結合作用を確認したが、このグルカンミミックには、結合作用は確認できなかった。このことより、(1、3)グルコシド結合が連続することにより糖鎖の立体配座がDectin-1への結合に重要であることが示唆された。さらに、本手法を固相合成への適応を検討した。その結果、3糖ユニットを三度固相上で結合させた9糖ミミックの合成を確認した。



(2-2) STD-NMR 法を用いる Dectin-1 と合成糖鎖の相互作用解析

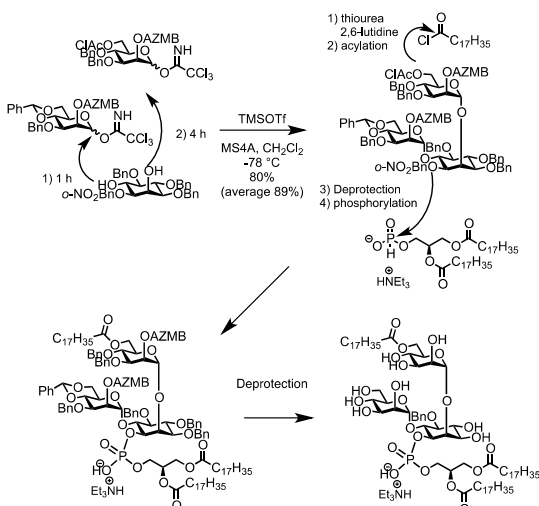
16糖からなるグルカン誘導体とレセプタ蛋白質Dectin-1との相互作用についてSTD-NMRを用いた解析を行なった。STD-NMRは、受容体に隣接するリガンド部位の特定に有用な手法である。Dectin-1の結合部位の可溶性タンパク質と16糖の複合体形成について分析した。その結果、アミノアルキル基のDectin-1への有意な相互作用はみられず、糖鎖部を介してDectin-1に結合していることが示唆された。さらに、詳細に得られたスペクトルの解析を行なったところ、グルコースの3位の水素(赤色)に相対的に強い相互作用が観測された。このことより、Dectin-1とグルカンとの相互作用様式における新しい知

見が得られた。



(3) 多様性指向型合成戦略に基づくリポマンナン糖脂質の合成

リン脂質部変換体の合成法の検討を行なった。合成の最終段階で糖鎖部の導入が可能なる合成戦略の開発を検討した。まず、イノシトールを糖受容体とした位置選択的グリコシル化を鍵反応とするワンポットグリコシル化を検討した。その結果、イノシトールのエカトリアル配向とアキシアル配向の水酸基に有意な反応性の差があり、エカトリアルおよびアキシアルの順番で選択的にマンノースを導入するワンポットグリコシル化反応を開発した。得られたジマンノシルイノシトールに脂肪酸およびジアシルホスファチジル基を導入することにより、目的とする糖脂質を得た。

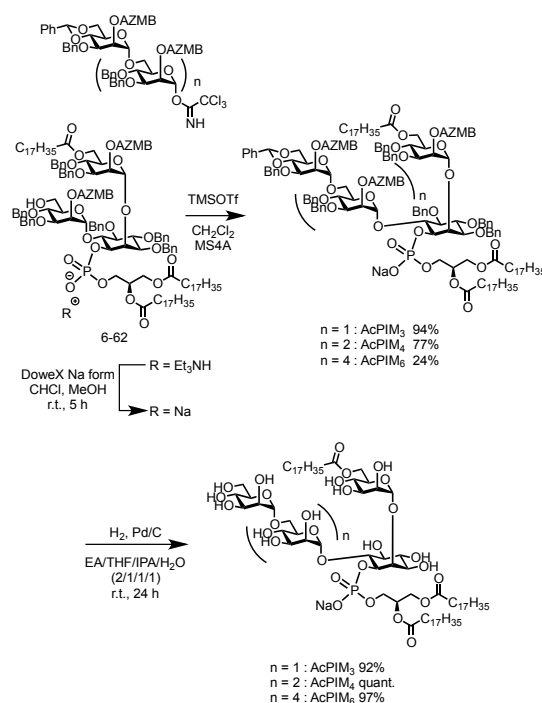


続いて、リン脂質部を有する糖受容体に対するグリコシル化により糖鎖変換型リポマンナンの合成を検討した。まず、リン酸ジエステル共存下でのマンノースのグリコシル

化を検討した。その結果、イミダート糖に対し、量論量の TMSOTf を作用させた場合に、良好な収率で目的であるグリコシドを得ることを明らかにした。



続いて、リン酸ジエステルを有するリポマンナン糖受容体に対するグリコシル化を検討した。その結果、6位水酸基のみを遊離な糖受容体を用いた場合に、目的グリコシル化良好な収率で目的となるグリコシル化対を与えた。本手法を用いて側鎖部の糖鎖の長さが異なるリポマンナン類縁体 4 種を合成した。



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)

Synthesis of a phosphatidylinositol dimannosyl donor, Shuichi Ohira, Yoshiki Yamaguchi, Takashi Takahashi, Hiroshi Tanaka, *Heterocyclcs*, **2014**, 89, 763-774 (査読有り)

Synthesis and Biological Evaluation of the Forssman antigen Pentasaccharide and Derivatives by a One-Pot Glycosylation procedure.

Hiroshi Tanaka, Ryota Takeuchi, Nami Kuniya, Mitsuru Jimbo and Takashi Takahashi

Chem. Eur. J., **2013**, 9, 3177-3187 (査読有り)

©Synthesis of a β -glucan polysaccharide analogue by an iterative copper-catalyzed azide-acetylene coupling reaction.

Hiroshi Tanaka, Hiroaki Tago, Yoshiyuki Adachi,

Naohito Ohno and Takashi Takahashi *Tetrahedron Lett.*, **2012**, 53, 4104-4107 (査読有り)

©Synthesis of $\beta(1,3)$ oligoglucans exhibiting a Dectin-1 binding affinity and their biological evaluation.

Hiroshi Tanaka, Tetsuya Kawai, Yoshiyuki Adachi, Shinya Hanashima, Yoshiki Yamaguchi, Naohito Ohno and Takashi Takahashi *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 3898-3914 (査読有り)

〔学会発表〕(計 16 件)

花島慎弥、池田明美、田中浩土、安達禎之、大野尚仁、高橋孝志、山口芳樹、「NMRを用いた短鎖 1,3-glucan の構造と Dectin-1 との相互作用解析」第 32 回日本糖質学会年会 平成 25 年 8 月 5 日～8 月 7 日、大阪国際交流センター、大阪喜田昭子、神保 充、森本幸生、武内良太、田中浩土、高橋孝志、三木邦夫「軟サング由来レクチンと直鎖多糖の複合体の結晶構造」日本蛋白質科学会年会、平成 25 年 6 月 12 日～14 日、とりぎん文化会館、鳥取県

田中浩土、細野貴裕、砂川洵、高橋孝志「固相法を用いる両親媒性リン酸ジエステルライブラリーの合成研究」日本化学会第 93 春季年会(2013) 2013 年 3 月 22 日(金)～25 日(月)立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀

神保 充・武内良太・田中浩土・高橋孝志・村本光二・渡部終五、「サングレクチン SLL-2 の自己会合」平成 25 年度日本水産学会春季大会、平成 25 年 3 月 26 日(火)～30 日(土)、東京海洋大学品川キャンパス、東京

田中浩土、武内良太、神保充、高橋孝志「サングレクチン結合性フォルスマン抗原 5 糖類縁体の迅速合成とその機能評価」第 31 回日本糖質学会年会、平成 24 年 9 月 17～20 日 鹿児島市民文化ホール、鹿児島

神保 充、國谷奈美、武内良太、田中浩土・高橋孝志、小池一彦、酒井隆一、神谷久男、「褐虫藻表面に存在するサングレクチンリガンドの探索」平成 24 年度日本水産学会秋季年会、平成 24 年 9 月 14～17 日、独立行政法人日本水産大学校

武内良太、田中浩土、神保 充、高橋孝、「ワンポットグリコシル化反応と固相脱保護法を基盤としたサングレクチン結合性糖鎖の合成と機能評価」日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会平成 24 年 6 月 7～9 日 京都大学 百周年時計台記念館百周年ホール、京都

大平脩一、田中浩土、砂川洵、小濱秀康、高橋孝志、「ホスファチジルイノシトールジマンノシド誘導体の合成とその機能評価」第 30 回日本糖質学会年会、新潟、平成 23 年 7 月 11～13 日(口頭)

田中浩土「糖質関連化合物の精密有機合成とケミカルバイオロジー研究への応用」有機合成化学協会関東支部ミニシンポジウム、2011 年 7 月 2 日(土) 早稲田大学、西早稲田キャンパス、東京

田中浩土、「ケミカルバイオケミストリー～化学に戻ってくるために～」GlycTokyo2013、2013 年 10 月 19 日、成蹊大学 4 号館ホール、東京

田中浩土、「糖受容体から見た糖鎖合成-大きなオリゴ糖を合成するために-」第 32 回日本糖質学会、2013 年 8 月 5-7 日大阪国際交流センター

田中浩土、「グルカンオリゴ糖の合成とその機能評価」第 10 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、2012 年 11 月 29-30 日、東京コンファレンスセンター、東京

Hiroshi Tanaka, "Combinatorial Solid-Phase Synthesis of Heteroaromatic Derivatives Based on the Structure of Natural Products" The Southern Highlands Conference on Heterocyclic Chemistry Peppers Manor House, 2012 年 8 月 16-28 日, Moss Vale, Australia

田中浩土、「固相合成技術を用いる機能性化合物ライブラリーおよび PET プロープ合成法の開発」第三回レドックスライフイノベーションシンポジウム、2012 年 3 月 9 日、東京大学医学部教育研究棟、東京

田中浩土、「生体機能性糖鎖の効率的合成法の開発 - 糖受容体からみるグリコシル化反応 - 」JST ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクト シンポジウム「生命化学の最先端」2011 年 7 月 27 日、理化学研究所、埼玉

田中浩土、「糖質関連化合物の精密有機合成とケミカルバイオロジー研究への応用」有機合成化学協会関東支部ミニシンポジウム、2011 年 7 月 2 日、早稲田大学西早稲田キャンパス、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.apc.titech.ac.jp/~htanaka/index.html>

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

神保 充 (JINMO Mitsuru)

北里大学・海洋生命学部・准教授

研究者番号：10291650

山口 芳樹 (YAMAGUCHI Yoshiki)

理化学研究所・システム糖鎖生物学研究グループ・チームリーダー

研究者番号：90323451

川内 進 (KAWAUCHI Susumu)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：80204676

安達 禎之 (ADACHI Yoshiyuki)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60222634