

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710248

研究課題名(和文)糖鎖合成効率の向上を目指した生理活性糖鎖ミミックの創製

研究課題名(英文)Design and Synthesis of Bioactive Sugar Chain Mimics

研究代表者

下山 敦史 (SHIMOYAMA, Atsushi)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：90625055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、天然由来糖鎖に準じた機能を有する糖鎖ミミックを簡便かつ、迅速に得る技術を確立し、生理機能を有した糖鎖ミミックを創製すること最終目標としている。まず、糖鎖の鎖上構造をミミックした分子の創製を目指し、シアル酸含有三糖の内部ガラクトースをジオールで置き換えたミミック分子の骨格構築法を確立した。続いて、生体内では、多くの糖鎖はクラスターを形成することによって糖鎖相互作用の強度ならびに選択性を増強していることから、糖質分子を担体に導入し、多量化することで糖鎖クラスター環境をミミックした分子を調整し、レクチンや細胞との相互作用を解析した。

研究成果の概要(英文)：Synthesis of the desirable sugar chains is very cumbersome process due to very diverse and complex structures of natural sugar chains. In this study, we attempted to construct the sugar chain mimics having a similar biofunction to natural sugar chains by following strategies. (1) To mimic the chain-like structure, we replace the interior sugar unit to the appropriate diol and synthesized sialic acid terminated trisaccharide mimic framework. (2) To mimic the glyco cluster, we constructed the sugar units multimer by introduction of the synthesized sugar units to the carrier (nanoparticle or multi functionalized small molecule).

研究分野：天然物化学、糖化学、有機合成化学

キーワード：糖鎖ミミック 糖鎖 シアル酸 複合糖質

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は様々な生体内における多様な生命現象に関与することが明らかにされつつあるが、糖鎖構造の複雑さと不均一さから、天然からの単離精製、合成化学的手法どちらの手法を用いてもその調達は容易ではなく、そのためその機能解明は十分には進んでいない。糖鎖は(1)レクチンによる糖鎖認識、(2)糖鎖-糖鎖間相互作用、(3)糖鎖が付加されることによる対象分子の相互作用変化などを介して情報伝達を行っている。しかしながら、これらの相互作用の際、巨大で複雑な糖鎖分子のすべての構造情報が必須ではない可能性がある。糖鎖は、細胞表層上を覆うようにびっしりと存在しており、その認識には外側の非還元末端部分の一部の構造とそれが多量体化されているということが重要である場合が多い。例えば、N-結合型糖鎖やガングリオシドの非還元末端に存在する Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal や Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal などの糖鎖構造はインフルエンザウィルスヘマグルチニンのリガンド構造であり、インフルエンザウィルスの宿主細胞への感染に重要である他、シアル酸含有糖鎖を認識するレクチン群、シグレックファミリーのリガンドでもあり、免疫の抑制・活性化にも関与している。しかしながら、その相互作用発現には非還元末端の1~3糖部分のみで十分であり、内部の糖鎖構造は適当なリンカー等に置換可能である。また、末端シアル酸の有無により、糖鎖を付加したタンパク質の体内動態が大きく変化する事例<sup>2)</sup>も報告されており、ここからも非還元末端構造の重要性が示唆されている。

2. 研究の目的

上述のような背景のもと、本研究では、天然由来糖鎖に準じた機能を有する糖鎖ミミックを簡便かつ、迅速に得る技術を確立し、生理機能を有した糖鎖ミミックを創製することを目指した。

まず、糖鎖の鎖上構造をミミックした分子の創製を目指した。3糖以上のオリゴ糖については、内部単糖はレクチン認識において比較的重要性が低く、適度な親水性と結合長を有していれば他の構造で置換しても問題ないと仮定し、内部単糖をエチレングリコールもしくはプロパンジオールで大胆に置き換え、合成効率を向上させるとともに、生理活性を有したオリゴ糖アナログライブラリーの開発に挑んだ。所属グループでは既にエチレングリコールで天然型オリゴマンノースの内部単糖ユニットを模倣したミミックが、天然型オリゴ糖に比べて極めて容易に合成でき、しかもレクチンと強く結合することを見出ししているが<sup>3)</sup>、マンノース以外の糖鎖構造へ適用可能なミミック技術は確立されておらず、多様な構造へと適用可能なミミック技術を目指した。

また、生体内では、多くの糖鎖はクラスタ

ーを形成することによって糖鎖相互作用の強度ならびに選択性を増強していることから、合成した糖質分子を担体に導入し、多量化することで糖鎖クラスター環境をミミックした分子を調製し、その機能解析を目指した。

3. 研究の方法

まず、糖鎖の鎖上構造をミミックするため内部単糖をエチレングリコールもしくはプロパンジオールに置き換えた分子の合成を行った。図1に示されるように、エチレングリコールを導入したミミック分子は、エキソアノメリック効果により $\alpha$ (1-2)、 $\alpha$ (1-4)もしくは $\alpha$ (1-6)グリコシド結合をミミックする配座をとり得ると考えられ、またプロパンジオールを導入した分子については $\alpha$ (1-3)グリコシド結合をミミック可能であり、エチレングリコールもしくはプロパンジオールを使い分けることで多様な立体配座を模倣することが可能となる。

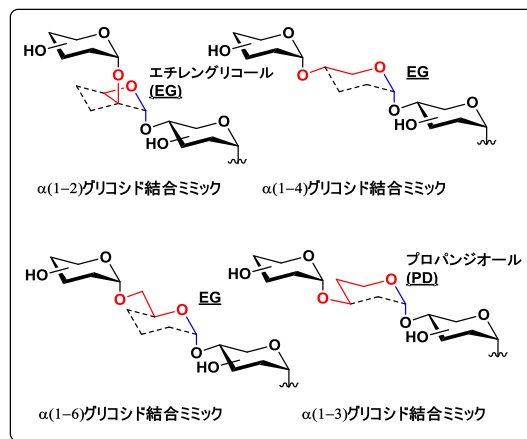


図1. 糖鎖ミミック分子の構造

具体的には、N-結合型糖鎖やガングリオシドのシアル酸を含む非還元末端構造 (Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1- や Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1) の内部ガラクトースをジオールに置き換えた分子を合成した(図2)。まず、シアル酸のアノマー位にエチレングリコール (もしくは、プロパン

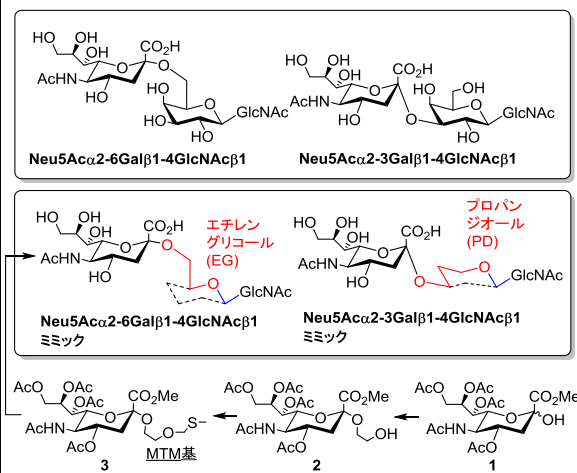


図2. シアル酸含有糖鎖ミミックの合成戦略

ジオール)を導入した後、プメラー転移によりメチルチオメチル基を導入、続いて、メチルチオメチル基をチオグリコシドに見立てたグリコシル化を行うことで、**Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1** ミミック、**Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1** ミミックをそれぞれ合成することとした。

続いて、糖鎖クラスター環境をミミックするため、合成した糖質分子を担体に導入し、多量化し、その機能を評価する系の構築を試みた。具体的には、クエン酸や発光性ナノ粒子を担体として用い、合成した糖質ユニットをリンカーを介して導入した。調製した糖鎖クラスターミミックの機能をレクチンや細胞との相互作用を評価することで解析した。

#### 4. 研究成果

前述の研究方法に従い、シアル酸含有糖鎖ミミックの合成研究を行った。まず、図3に示されるように、*N*-アセチルノイラミン酸を出発原料に糖供与体の合成を行った。既知の条件でメチルエステル化、選択的アセチル化を行い、化合物**1**へと導いた。続いて、*N*-フェニルトリフルオロアセトイミデート体**5**へと導いた後、ジオールとのグリコシル化反応を検討した。種々条件検討の結果、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、アセトニトリル中、**MS3A**存在下において、**TMSOTf**をルイス酸として用い、**20**当量のジオールを反応させることで、良好な収率と選択性で目的の化合物**2**が得られた。**2**をプメラー転位反応により、メチルチオメチル体**3**へと導き、これをミミック骨格構築のための擬チオ糖として用いることとした。

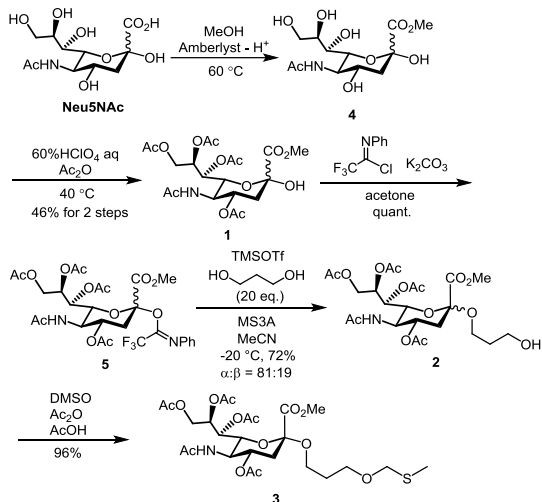


図3. シアル酸誘導体**3**の合成

続いて、担体への導入箇所となるアミノ基を有するリンカーがアノマー位に導入された糖受容体**12**の合成を行った。(図4)*N*-アセチルグルコサミンを出発原料に、既知の手法に従い、アノマー位のアリル化、**4**、**6**位へのベンジリデン化、**3**位のベンジル化の後、アノマー位の脱保護を行い、化合物**9**とした。これをイミデート体**10**とした後、アノマー位へ2-ブロモエタノールを導入した。プロモ

基をアジド基へと変換し、化合物**11**とした後、ベンジリデンの選択的開裂反応により、糖受容体**12**へと導いた。

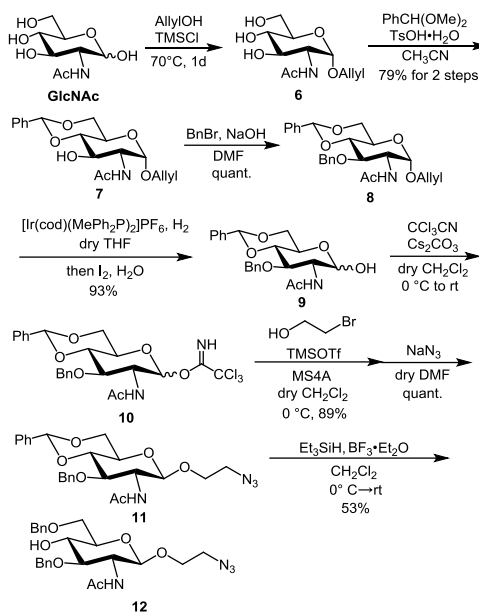


図4. グルコサミン誘導体**12**の合成

合成したシアル酸誘導体**3**のメチルチオメチル基をチオグリコシドに見立てグルコサミン誘導体**12**とのカップリング反応を検討した。しかしながら、種々条件を検討したもののシアル酸誘導体**3**の反応系中での安定性が悪く、反応はうまく進行しなかった。

そこで、グルコサミン誘導体側をチオメチルチオメチル化し、再度、ミミック骨格の構築を試みた(図5)。具体的には、グルコサミン誘導体**12**に対し、プメラー転位反応を行い、**4**位にメチルチオメチル基を導入した化合物**13**とした後、シアル酸誘導体**2**とカップリングさせた。反応は良好に進行し、目的のミミック構造を有する**14**を得ることに成功した。エチレングリコールも同様の経路で合成しており、最終脱保護の後、アミノ基を介して担体へと導入し、シアル酸認識レクチンとの相互作用解析を行う予定である。

一方で、合成糖質分子を担体に導入し、

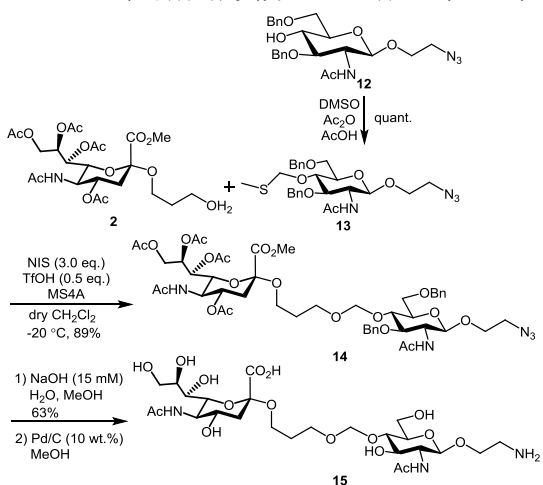


図5. 糖鎖ミミック骨格の構築

多量化することで糖鎖クラスターミミックを構築し、評価する系の確立を行った。

アノマー位にアミノエチルリンカーを導入したマンノース、ガラクトース、フコースを調整し、これらを表面にカルボキシル基やアミノ基を導入したナノ粒子を導入しクラスター化させた。この際、適切なリンカーとして、アゼライン酸を選択することでナノ粒子の発光特性を保持したまま糖ユニットを導入可能であることを見出した。続いて、マンノース認識レクチンであるコンカナバリンAとの相互作用を沈殿形成および発光強度の変化により評価した。結果としては、マンノース付加ナノ粒子を用いることで、レクチンとの特異的な相互作用を検出することに成功している。

また、レクチンだけではなく、特定の標的細胞と高い親和性を有する糖ユニットスクリーニング法の開発も試みた。担体として、クエン酸を選択し、上述の糖ユニットのアミノ基を介して、クエン酸のカルボン酸と縮合させることで、糖ユニット三量体を調整した。糖ユニット三量体と細胞との相互作用を細胞凝集を指標に評価する手法を検討し、ガラクトース三量体によりRAW 264.7細胞の凝集が誘起されることを確認した。

このように、本研究では、天然由来糖鎖に準じた機能を有する糖鎖ミミックを簡便かつ、迅速に得る技術の確立を目指し、シアル酸含有糖鎖の内部ガラクトースをジオールで置き換えたミミック分子の骨格構築法を確立した。続いて、生体内における糖鎖の機能は、クラスター効果によるところが多いことから、糖質分子を担体に導入し、多量化することで糖鎖クラスター環境をミミックした分子を調整し、レクチンや細胞との相互作用を解析し得るモデルを構築した。

<引用文献>

- ① O. Blixt, B.E. Collins, I.M. Nieuwenhof, P.R. Crocker, J.C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 31007-19.
- ② K. Tanaka, T. Masuyama, K. Hasegawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 102-5.
- ③ L.Y. Yang, Y. Kawada, L. Bai, D. Kubota, H. Yuasa, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 6579-86.

#### 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 K. Fukase, A. Shimoyama, Y. Manabe, Effective Synthesis of Oligosaccharide under Microfluidic Conditions, *J. Syn. Org. Chem. JPN.* **2015**, in press. 査読有

- ② A. Shimoyama, Bioorthogonal Reactions for Biomolecular Functionalization and Imaging, *J. Syn. Org. Chem. JPN.* **2014**, 72 (3), 303-304. doi:10.5059/yukigoseikyokaishi.72.303. 査読有
- ③ A. Shimoyama, H. Watase, Y. Liu, S. Ogura, Y. Hagiya, K. Takahashi, K. Inoue, T. Tanaka, Y. Murayama, E. Otsuji, A. Ohkubo, H. Yuasa, Access to a Novel Near-Infrared Photodynamic Therapy by the Combined Use of 5-Aminolevulinic Acid and Lanthanide Nanoparticles, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2013**, 10, 607-614. doi:10.1016/j.pdpdt.2013.07.005. 査読有
- ④ Y. Liu, T. Kobayashi, M. Iizuka, T. Tanaka, I. Sotokawa, A. Shimoyama, Y. Murayama, E. Otsuji, S. Ogura and H. Yuasa, Sugar-attached upconversion lanthanide nanoparticles: a novel tool for highthroughput lectin assay, *Bioorg Med Chem.* **2013**, 21, 2832-2842. doi:10.1016/j.bmc.2013.04.008. 査読有

[学会発表] (計14件)

- ① A. Shimoyama, H. Kobayashi, K. Seio, H. Yuasa, M. Sekine, A. Ohkubo, Efficient Synthesis of 5'-Capped Oligonucleotide using O-N Phosphoryl Migration of Phosphoramidite, XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Chemical Biology of Nucleic Acids (XXI IRT), Poznan (Poland), 2014年8月24日～28日
- ② 下山敦史, 糖質を用いたがん組織のイメージング手法の開発、第17回生理活性をあまり意図しない自由な天然物合成勉強会、阪急大井町ガーデン(東京)、2015年2月28日～3月1日
- ③ 増井誠二、真鍋良幸、下山敦史、福山高英、柳日馨、深瀬浩一、酸性シリカゲルを用いたフロー系でのフィッシュヤグリコシル化、日本化学会第95春季年会、日本大学船橋キャンパス(千葉)、2015年3月26日～29日
- ④ 宮内幸一郎、下山敦史、湯浅英哉、大窪章寛、チオカルボニル基を有する三重鎖形成核酸の合成と性質、日本化学会第95春季年会、日本大学船橋キャンパス(千葉)、2015年3月26日～29日
- ⑤ 田中宏朋、下山敦史、湯浅英哉、大窪章寛、3'-水酸基が保護されたヌクレオシド 5'-トリリン酸誘導体の合成と性質、日本化学会第95春季年会、日本大学船橋キャンパス(千葉)、2015年3月26日～29日
- ⑥ T. Kaewsomboon, A. Shimoyama, H. Yuasa, A. Ohkubo, Synthesis and properties of oligonucleotides containing

isophthalic acid derivatives、日本化学会第95春季年会、日本大学船橋キャンパス(千葉)、2015年3月26日~29日

- ⑦ 下山敦史、小林春輝、清尾康志、湯浅英哉、関根光雄、大窪章寛、O-N ホスホリル転位反応を用いた5'末端キャップ化オリゴヌクレオチドの効率的化学合成、第8回バイオ関連化学シンポジウム、岡山大学津島キャンパス(岡山)、2014年9月11日~13日
- ⑧ 下山敦史、小林春輝、清尾康志、湯浅英哉、関根光雄、大窪章寛、トリメチルグアノシンキャップ化U1snRNAの化学合成とその性質、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014、東京医科歯科大学(東京)、2014年9月8日~9日
- ⑨ 下山敦史、渡瀬寛也、劉渝、飯塚真之、田中翼、外川泉、小倉俊一郎、萩谷祐一郎、高橋究、井上克司、田中徹、大窪章寛、湯浅英哉、アップコンバージョンランタニドナノ粒子と5-アミノレブリン酸の併用による近赤外光線力学治療技術の開発、日本化学会第93春季年会、立命館大学(滋賀)、2013年3月22日~25日
- ⑩ A. Shimoyama, H. Watase, Y. Liu, I. Sotokawa, S-i. Ogura, Y. Hagiya, K. Takahashi, K. Inoue, T. Tanaka, H. Yuasa, Synthesis of Sugar Coated Lanthanide Nanoparticles for 5-Aminolevulinic Acid Mediated Near-infrared Photodynamic Therapy, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), Tokyo Tech (Tokyo), 2012年11月28日~30日
- ⑪ 外川泉、大澤祥、下山敦史、湯浅英哉、レクチンリガンドのスクリーニングを旨とした糖ユニット三量体の合成とその評価、GlycoTokyo2012、慶応大学薬学部(東京)、2012年11月7日
- ⑫ 下山敦史、大澤祥、外川泉、湯浅英哉、標的細胞特異的レクチンリガンド探索を旨とした糖鎖ミミック多量体の合成とその評価、第31回日本糖質学会年会、P-073、鹿児島市民文化ホール(鹿児島)、2012年9月17日~20日
- ⑬ 下山敦史、渡瀬寛也、劉渝、池尻拓馬、小倉俊一郎、萩谷祐一郎、高橋究、井上克司、田中徹、湯浅英哉、ランタニドナノ粒子と5-アミノレブリン酸の併用による近赤外光線力学治療法の開発、第6回バイオ関連化学シンポジウム、1C-04、北海道大学(札幌)、2012年9月6日~8日
- ⑭ A. Shimoyama, H. Watase, T. Ikejiri, S. Osawa, S-i. Ogura, Y. Hagiya, K. Takahashi, K. Inoue, T. Tanaka, H. Yuasa, Synthesis and Function of Sugar Coated Lanthanide Nanoparticles for Near-Infrared Photodynamic Therapy, 26th International

Carbohydrate Symposium (ICS2012), Madrid (Spain), 2012年7月22日~26日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

下山 敦史 (SHIMOYAMA, Atsushi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：90625055