

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790033

研究課題名(和文) 光反応基を利用した分子ツールによるシアリルLewis X - セレクチンの認識機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of sialyl LeX-serectin interaction by photoaffinty labelling

研究代表者

大塚 功(Ohtsuka, Isao)

九州保健福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：20389589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖リガンドの合成では、Sia-Gal-GlcNAc及びGal-(Fuc)-GlcNAcからなる二種類について、合成を完了した。しかし、目的となるシアリルLeX由来四糖で構成される糖鎖リガンドの合成には至らなかった。分岐部分であるGal-(Fuc)-GlcNAc部分の合成では、立体障害を生じやすく、当初の予想以上に困難を極めた。目的化合物のリガンド調製については、今後更なる方法論の改良を重ねていきたい。また、今回は期間内に達成することができなかった糖鎖-レクチン認識機構解明について、最終的に合成した三種類の糖鎖リガンドを用いてレクチン-糖鎖の認識現象の解明を目指していきたい。

研究成果の概要(英文)：2 kinds of trisaccharide ligands were synthesized, Sia-Gal-GlcNAc and Gal-(Fuc)-GlcNAc. But tetra saccharide ligand, Sia-Gal-(Fuc)-GlcNAc, was not synthesized. Synthesis of branch part of oligosaccharide were very difficult. Synthesis of their compounds will affect toward to the elucidation of carbohydrate and lectin interactions.

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 有機化学 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

細胞表面の糖鎖とレクチンの親和性(解離定数= K_d)は $10^{-6} \sim 10^{-4} M$ 程度と低く(抗原-抗体反応は $10^{-10} \sim 10^{-9} M$ の低濃度で認識される)、これまで糖鎖の結合を頼りに結合レクチンを見出すことは不可能とされており、研究が遅々としてきた。

糖鎖-レクチンの認識機構解明には、両者の構造活性相関を理解することが重要であり、糖鎖-レクチンを確実に結び付ける方法論の開発が必須だと考える。光アフィニティーラベル法は、光反応基ジアジリンを利用することで、特定分子の同定を極めて高い選択性及び効率性で可能にする汎用性が高い手法である(Nakashima, H., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2006.)。申請者は、本法を利用することで、確実に特定レクチンの認識を可能にする分子ツールを開発してきた(Ohtsuka, I., et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2011.) (図1)。

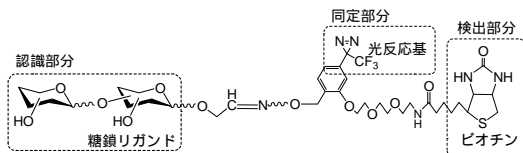


図1 糖鎖リガンドを持った光反応基による新規分子ツール

シアリルルイス X (Lex) (図2) は、炎症時に発現するレクチンであるセレクチンを認識することで、白血球を炎症部位へと導くことが知られている。この際セレクチンが、シアリルLexの非還元末端構造が一部欠損した類似構造体や、他のガングリオシドを認識せず、シアリルLexのみを認識する現象は、糖鎖-レクチンの認識機構を明らかにする上で大変興味深い。シアリルLexを含むこれら糖鎖とセレクチンとの構造活性相関を調べることで、糖鎖-レクチンの認識機構が解明されれば、特異的な阻害剤や標的薬の開発に繋がりと、創薬への途を拓くものと考えられる。

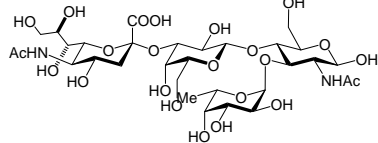


図2 シアリルLex四糖

本申請研究は、これまで開発した分子ツールを実用段階に発展させたものである。これにより、糖鎖-レクチンの認識機構解明に向けた足がかりが構築されるものと期待される。

2. 研究の目的

シアリルLexをリガンドとする分子ツール1及びその類縁体2、3(図3)の化学合成

糖鎖-レクチンの認識機構解明には、目的とする糖鎖及びその類縁構造体との構造活性相関を検証する必要がある。申請者は、これまでに複雑な構造から成る糖鎖を合成してきた経験を基に (Kanie,

O., Ohtsuka, I., et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006.)、これら構造を有する分子ツール1、2、3を合成する。

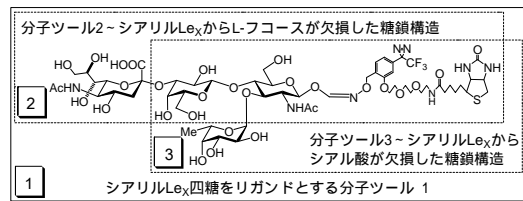


図3 本申請で合成する分子ツール 1、2、3

光アフィニティーラベル法により、糖鎖-セレクチンの認識機構解明

合成した分子ツールを用い、光アフィニティーラベル法により、糖鎖-セレクチンの構造活性相関を調べることで認識機構を解明する。これら成果を糖鎖-レクチンによる炎症発現機構の解明や、創薬開発に役立てる。

3. 研究の方法

計画 シアリルLexをリガンドとする分子ツール1及び類縁体2、3の合成

【研究計画】シアリルLex-セレクチンの認識機構解明には、シアリルLex及びその類縁構造体との構造活性相関に関する知見が重要であり、これらを有する分子ツールを化学合成する必要がある。合成計画を設計する上で、シアル酸によるグリコシド結合形成は困難であり、合成終盤での実施は不向きであることから、早い段階で結合を構築し効率向上を図る。まず、必要となる単糖誘導体4、5、8、10を調製する。次にシアル酸誘導体4と6を縮合させた後、三糖合成の供与体7へと導く。7と受容体8との縮合により、三糖誘導体9を合成する。得られた9を脱保護、オゾン分解により、還元末端に存在するアリル基(AlI)をアルデヒド基に変換し、アフィライト-CHOと反応させることで、2が合成される。また、9、10の縮合により四糖誘導体11が得られ、1へと導かれる。更に5、8、10を用いることで、シアル酸を有しない三糖誘導体13が合成され、3が得られる。

計画 光アフィニティーラベル法によるシアリルLex-セレクチンの認識機構の解明

【研究計画】各分子ツール1、2、3をそれぞれセレクチンに等量添加し、光照射することで認識された糖鎖-セレクチンがクロスリンクされる。検出には、各分子ツールがビオチンを有していることから、ウエスタンブロッティング法により可能となる(図6)。得られた泳動ゲルについて、スポットの濃淡を解析ソフト(NIH-Image)を用いて数値化し、糖鎖-レクチンの構造活性相関が測定することで、シアリルLex-セレクチンにおける認識機構の解明に繋げる。本法は、分子ツールのリガンド部分にあたる糖鎖を付け替えることで、あらゆる糖鎖-レクチンについて網羅的解析が可能となることから、新たな糖鎖機能解明法と

して大変有用な方法論であると言える。

4. 研究成果

計画の糖鎖リガンドの合成では、Sia-Gal-GlcNAc及びGal-(Fuc)-GlcNAcからなる二種類について、合成を完了した。しかし、目的となるシアリルLeX由来四糖で構成される糖鎖リガンドの合成には至らなかった。分岐部分であるGal-(Fuc)-GlcNAc部分の合成では、立体障害を生じやすく、当初の予想以上に困難を極めた。目的化合物のリガンド調製については、今後更なる方法論の改良を重ねていきたい。また、今回は期間内に達成することができなかった計画について、最終的に合成した三種類の糖鎖リガンドを用いてレクチン-糖鎖の認識現象の解明を目指していきたい。

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 3件)

- 1) Establishment of Synthesis Method of Molecular Probe Containing Carbohydrate Ligand and Photoreactive Group for Elucidation of Carbohydrate – Lectin Interactions by Glycosyl Trichloroacetimidate Strategy.
Ohtsuka, Isao*, Sadakane, Yutaka., Atsumi, Toshiyuki., Kakiuchi, Nobuko.
J. KUHW., **14**, 165 - 171 (2013).
- 2) Chemical Synthesis of Sialyl Glycosides for Elucidation of Biological Phenomena.
Ohtsuka, Isao*, Atsumi, Toshiyuki., Kakiuchi, Nobuko.
J. KUHW., **15**, 73 -79 (2014).
- 3) The development of new molecular tools containing a chemically synthesized carbohydrate ligand for the elucidation of

carbohydrate roles via photoaffinity labeling: Carbohydrate-protein interactions are affected by the structures of the glycosidic bonds and the reducing- end sugar.

Ohtsuka, Isao*, Sadakane, Yutaka., Hada, Noriyasu., Higuchi, Mari., Atsumi, Toshiyuki., Kakiuchi, Nobuko.

Bioorg. Med. Chem., submitted, (2014).

[学会発表](計 3件)

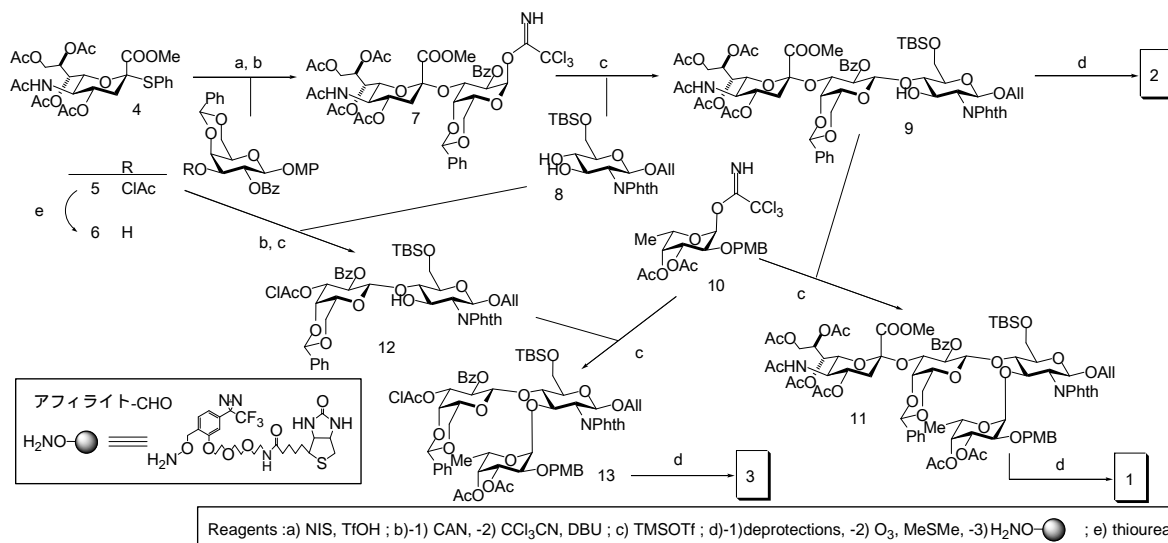
- 1) Synthesis of New Molecular Tools for Elucidation of Carbohydrates Roles by Photoaffinity Labeling ~Carbohydrate – Protein Interactions are Affected by Different of Glycosidic Formations and Conformation of Reducing End Sugar~
○Ohtsuka, Isao., Sadakane, Yutaka., Hada, Noriyasu., Hada, Junko., Kakiuchi, Nobuko.
26th International Carbohydrate Symposium 2012 (ICS 2012), 2012年7月, Madrid, Spain.
- 2) 光アフィニティーラベル法による新規分子ツールの開発 -糖鎖結合様式が認識に及ぼす影響を検証-
○大塚功, 定金豊, 羽田 紀康, 渥美 聡孝, 垣内信子
第30回日本薬学会九州支部大会, 2013年12月, 長崎.
- 3) 光反応性糖鎖ミメティックペプチドの合成とレクチン解析への応用
○定金豊, 松下秀峰, 山路充宏, 大塚功
日本薬学会第133年会, 2014年3月, 熊本.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塚 功 (OHTSUKA, Isao)

九州保健福祉大学・薬学部薬学科・准教授
研究者番号：20389589



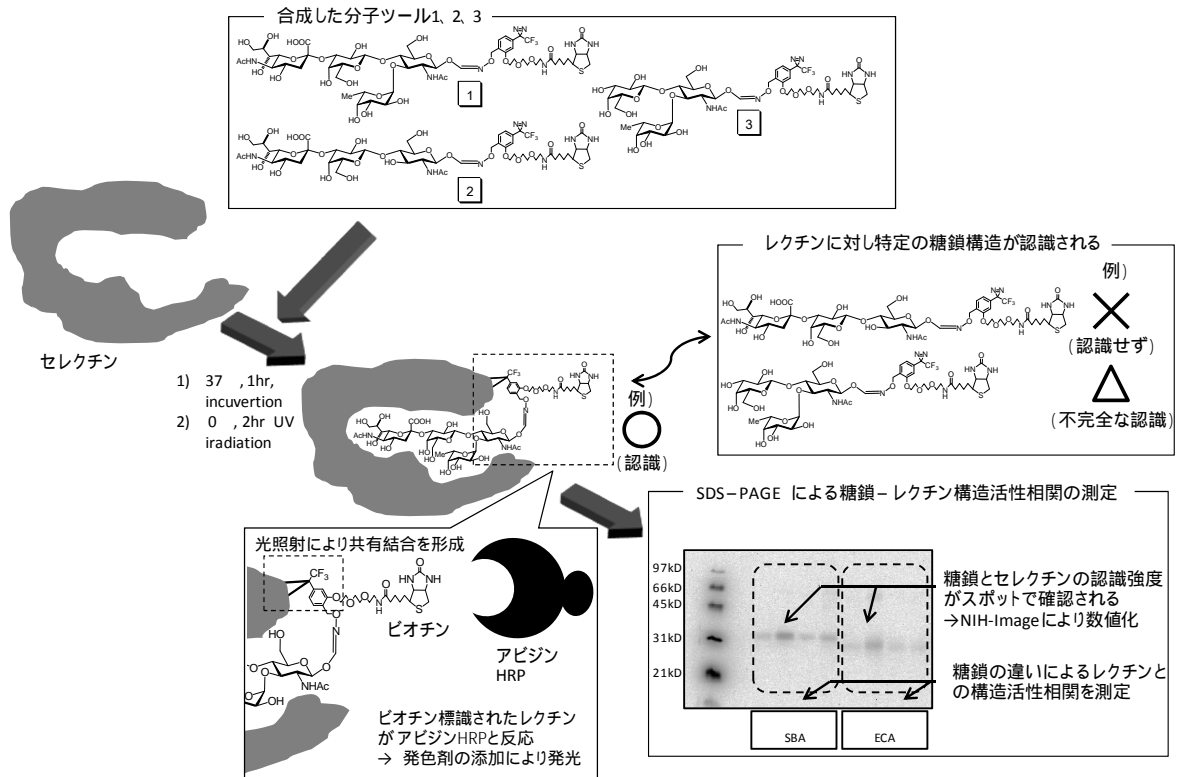


図6 光アフィニティーラベル法により糖鎖に対するセレクチンの構造活性相関と調べる → シアリルLe_x-セレクチンの認識機構が解明される