

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460131

研究課題名(和文) 海洋天然物由来糖脂質の合成と機能探索

研究課題名(英文) Synthesis and functional research of glycosphingolipids from marine natural products

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

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、数種類の海綿とホヤより見出された糖鎖の化学合成及び機能探索を行った。

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 some Marine sponge and Sea squirts, and got target oligosaccharides and elucidated a biological activities.

研究分野：糖化学 天然物化学

キーワード：糖脂質 海綿 化学合成 生物活性 ホヤ

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っ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) 寄生虫感染に対する診断薬開発を目指し、エキノコックス(多包条虫)、イヌ回虫、ブタ回虫、マンソン住血吸虫から見出された糖脂質または糖タンパク質糖鎖を合成し、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、イヌ回虫に関しては、非天然型糖鎖も併せて合成し、構造活性相関を調べ、天然型の抗原性が一番強いことが判明した。2) キンヤヤスデから見出された β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)[α -L-Fucp-(1 \rightarrow 3)]- β -D-Glcp(1 \leftrightarrow 1)-Cer 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 β -D-GalNAcp-(1 \rightarrow 4)[α -D-Fucp-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcNAcp(1 \leftrightarrow 1)Cer 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。

2. 研究の目的

(1) 海綿 *Sphaciospongia vesparia* 由来の糖脂質: イタリアの Mangoni らは *S. vesparia* から無脊椎動物由来では非常に珍しいガラクトフラノース及びアラビノースを持つ糖脂質を見出した。(A 及び C) これらの生物活性は全く見出されておらず、機能探索を目的として合成目標とした。その際、非天然型糖鎖である B も併せて合成することとした。(Fig. 1)

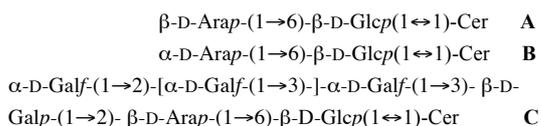


Fig. 1

(2) 海綿 *Agelas disper* 由来の糖脂質: *A. disper* からは α Gal-Cer をコアとする 5 種類の糖脂質が報告され、リンパ球の増殖能に関する生物活性が報告されている。一方で、 α Gal-Cer

コア構造は NKT-cell に作用して抗腫瘍活性を示すと報告されていることから創薬への応用の点からも興味深く、この糖脂質が糖鎖伸張された D~H を合成目標とした。(Fig. 2)

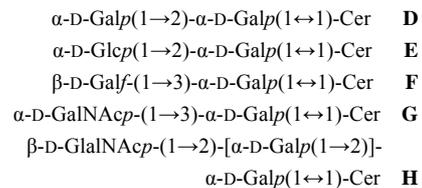


Fig. 2

(3) 海綿 *Amphimedon compressa* 由来の糖脂質: *A. compressa* からは I~L の糖脂質が見出されており、合成目標とした。(Fig. 3)

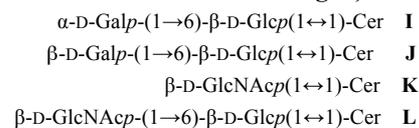


Fig. 3

(4) 海綿 *Aplysinella rhax* 由来の糖脂質: *A. rhax* から見出された糖脂質 M (Fig5) はこれまでに誘導體とともに合成し、NO 産生抑制活性を測定し、天然体の活性が最も強いことを明らかにしている。今回ヒト乳癌由来細胞株(MCF7)を用いた機能探索を目指した。

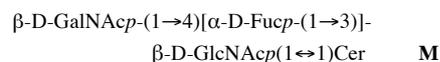


Fig 4

(5) ホヤ *Microcosmus sulcatus* 由来の糖脂質: ホヤの一種 *M. sulcatus* はラクトシルセラミドに D-フコースが結合した三糖糖脂質 N (Fig. 4) を有し、この糖脂質を合成目標とした。本糖脂質の合成においては従来法であるフコースをラクトース部分に縮合する方法ではなく、グルコース受容体にフコース供与体を縮合した後、グルコースの 4,6-ベンジリデン基を還元解裂させて 4 位水酸基遊離とし、ガラクトース供与体を縮合するまでを one-pot で行うという画期的な方法を模索した。

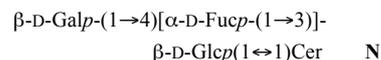


Fig. 5

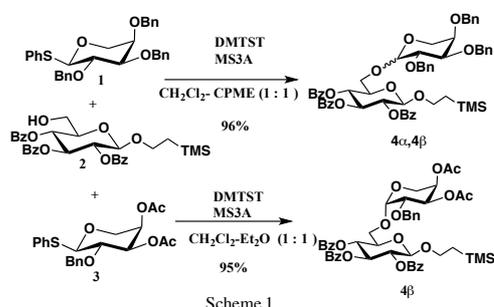
3. 研究の方法

(1) 海綿 *Sphaciospongia vesparia* 由来の糖脂質:

①糖脂質 A,B の合成

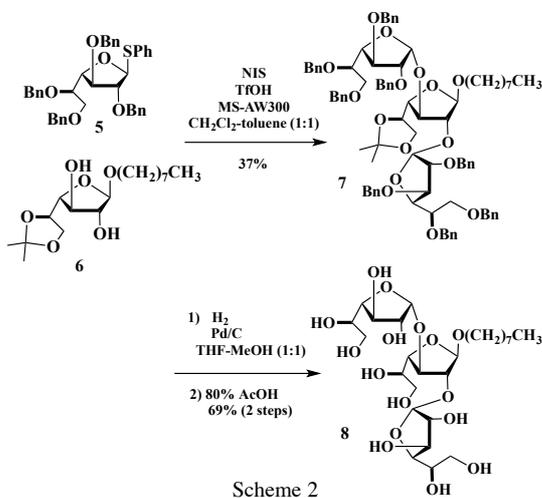
Fig.1 において、天然型糖脂質 A はアラビノースがグルコースの 6 位に β 結合した構造をとっている。そこで 6 位を水酸基遊離としたグルコース誘導體を糖受容体(1)として合成し、phenyl 2,3,4-tri-O-benzyl-1-thio- β -D-arabinopyranoside (2) と縮合条件を検討した

が、 β 選択的に得ることはできず 4α と 4β の混合物を与えた。一方、アラビノースの 3,4, 位をアセチル基で保護した糖供与体 **3** を合成し、**1** と縮合したところ、 β 選択的に **4** を得ることができた(Scheme1)。そこで、 $4\alpha, 4\beta$ それぞれを適切な糖供与体へと変換し、セラミド部を導入することで糖脂質 **A** 及びその非天然型糖脂質である **B** へと導いた。



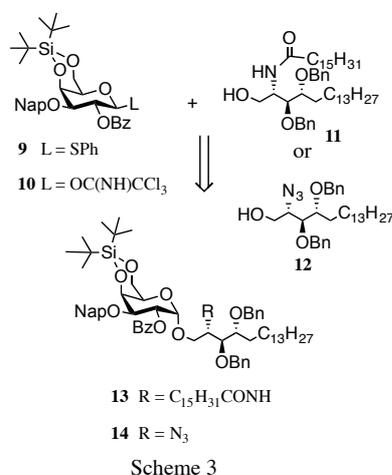
②糖脂質 **C** の合成

糖脂質 **C** は 2 分子のガラクトフラノースが β ガラクトフラノシドの 2,3 位に α 結合した六糖構造をしており全合成には大変困難を要する。今回はまず、天然からは見出されていない還元末端側四糖糖脂質を合成した。その後、Scheme2 にしますようにガラクトフラノース受容体 **6** の 2,3 位水酸基にガラクトフラノース供与体 **5** を過剰に加えることで立体選択的に三糖誘導体 **7** を得た。**7** は脱保護し、**8** へと導いた。(Scheme2).

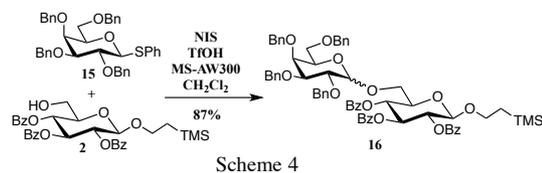


(2) 海綿 *Agelas disper* 由来の糖脂質：糖脂質の合成は通常、糖鎖伸張後にセラミド誘導体と縮合しているが、本糖脂質は還元末端ガラクトースが α 結合でセラミドと結合しており、立体選択性の問題が起きる可能性が高いことが予想される。そこで、単糖誘導体と脂質部を先に縮合し、後から糖鎖伸張させる計画を練った。まずは、単糖供与体 **9** または **10** とセラミド受容体 **10** でどちらが収率よく単糖セラミド誘導体 **13** が得られるか比較したところ、**9** との縮合では、目的糖脂質誘導体

13 はほとんど得られず、イミデート体 **10** との縮合では 70%の収率で **13** が得られた (Scheme3)。しかし、続いてガラクトース 2 位のベンゾイル基を脱保護した後、次のガラクトースとの縮合では a,b の混合物を与え、カラムクロマトグラフィーによる分離は不可能であった。そこで、糖アジドスフィンゴシンによる糖鎖伸張を試みる目的で、**9** と **12** を縮合したところ、62%の収率で **14** が得られた。一方で、イミデート体 **10** と **12** の縮合は 21%と低収率であった。得られた **14** はベンゾイル基の脱保護をした後、ガラクトース及び、グルコースを糖鎖伸張し、目的の糖脂質 **D** 及び **E** へと導いた。また、**14** は Nap 基を脱保護することにより 3 位水酸基遊離とし、ガラクトフラノース誘導体を縮合及び脱保護することで、糖脂質 **F** を合成した。

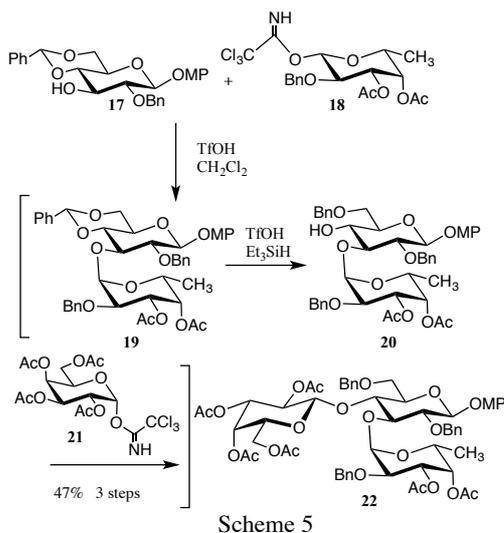


(3) 海綿 *Amphimedon compressa* 由来の糖脂質：本研究において糖脂質 **I** 及び **J** はガラクトースがグルコースの 6 位に α と β で結合しているため、その縮合には立体選択性を持たせない系を考え、1 : 1 でかつ収率よくとれる条件を検討した (Scheme 4)。目的の二糖誘導体である **16** は効率よく得られたが、分離が困難であり、2 ステップ先のベンジル基をアセチル基に置き換えたところで分離が可能となった。その後セラミドを導入し目的糖脂質に導いた。



(4) 海綿 *Aplysinella rhax* 由来の糖脂質：24well のプレートに培地調製した MCF7 細胞を播種し、17b-エストラジオールを含んだサンプルを加えさらに培養し、570nm における吸光度を測定した。

(5) ホヤ *Microcosmus sulcatus* 由来の糖脂質：本糖脂質の鍵反応は、グルコースと D-フコースを縮合するところからガラクトースを縮合するところまで 3 ステップを一工程で行うところにある。17 と 18 を CH₂Cl₂ 存在下、TfOH を加えて縮合させ 19 を得た後、Et₃SiH を加えてベンジリデン基の還元解列を行って 20 とし、そこにガラクトース供与体 21 を加えることにより、一気に 22 に導いた。得られた 22 は定法に従って、セラミドと結合させ三糖糖脂質 M を合成した。



4. 研究成果

(1) 海綿 *Sphaciospongia vesparia* 由来の糖脂質：S. vesparia より見出された糖脂質 A 及び、その立体異性体である B、及び、ガラクトフラノースを含んだ糖脂質 C の還元末端四糖糖脂質及び、非還元末端三糖の合成に成功した。

(2) 海綿 *Agelas disper* 由来の糖脂質：本糖脂質の合成においては、糖誘導体とセラミド誘導体、またはアジドスフィンゴシン誘導体の縮合において、収率及び、選択性の観点から最善の方法を見出す検討がなされた。これまでに、糖脂質 D, E 及び F の合成が完了しており、G 及び H の合成に応用している。

(3) 海綿 *Amphimedon compressa* 由来の糖脂質：ガラクトース供与体の立体選択性を持たせない方法で、糖脂質 I 及び、J を合成し、K についても効率よく得られた。

(4) 海綿 *Aplysinella rhax* 由来の糖脂質：糖脂質 M の新たな生物機能として、エストロゲン誘導ヒト乳癌由来細胞株(MSF7)の増殖抑制を見出した。

(5) ホヤ *Microcosmus sulcatus* 由来の糖脂質：1 pot 3step 反応を選択することで、効率

よく糖脂質 M の全合成に成功した。M は無脊椎動物では珍しい、D フコースを含有する糖脂質であり、その機能に興味を持たれる。

今回合成目標とした海洋生物由来の糖脂質はいずれも新規な構造を有する糖脂質であり、新たな機能を探索するターゲットとして大変興味深い糖脂質である。これらを網羅的に合成し、in vitro におけるスクリーニングに掛け、何らかの生物活性が見られたなら、そこから創薬への応用が期待できる。

糖鎖の合成は、タンパク質や核酸等に比べて、自動化が遅れており、未だ化学合成の領域を超えることができない化合物群である。しかし、糖鎖の新規な機能が次々と明らかになり生命現象解明、あるいは創薬への期待が高まる中、新規性の高い海洋生物由来の糖脂質を合成することは、魅力ある化合物群であることは間違いない。

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 4 件)

- ① I. Ohtsuka, N. Hada, M. Kanemaru, T. Fujii, T. Atsumi and N. Kakiuchi. Synthesis of a new glycosphingolipid, neurosporaside, from *Neurospora crassa*. *Carbohydr. Res.*, **404**, 9-16 (2015). 査読有り
- ② N. Hada, R. Shimura, K. Hakamata, H. Kiyohara, H. Yamada, T. Takeda, F. Kiuchi. Synthesis of Model compounds related to linear β-D-(1→6)-galactosyl side-chains of polysaccharides from *Astragalus mongholicus* Bunde. *Heterocycles*, **90**, 563-578 (2015). 査読有り
- ③ I. Ohtsuka, Y. Sadatake, N. Hada, M. Higuchi, T. Atsumi, N. Kakiuchi. 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. *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 3829-3837 (2014). 査読有り
- ④ N. Hada, A. Miyamura, I. Ohtsuka, F. Kiuchi. Synthetic studies on glycosphingolipids from protostomia phyla: Synthesis of glycosphingolipid from the marine sponge *Sphaciospongia vesparia* and its analogue. *Heterocycles*, **88**, 689-704 (2014). 査読有り

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① 古沢小波, 羽田紀康, 木内文之.
無脊椎動物由来糖脂質の合成研究
(56) 海綿 *Agelas dispar* 由来の糖脂質.
日本薬学会第 136 年会.
2016. 3. 28. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ② 古沢小波, 羽田紀康, 木内文之.
海綿 *Agelas dispar* 由来の糖脂質の合成研究.
GlycoTOKYO2015 シンポジウム,
2015. 10. 19. 慶應義塾大学理工学部
(神奈川県横浜市)

他 5 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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