

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2013～2016  
 課題番号：25810105  
 研究課題名(和文) 動的コンビネームによるミニマム糖クラスターの構築と糖鎖間相互作用の解明への応用  
  
 研究課題名(英文) Dynamic combinatorial library to prepare minimum glycoclusters for probing carbohydrate-carbohydrate interactions  
  
 研究代表者  
 長谷川 輝明 (Hasegawa, Teruaki)  
  
 東洋大学・生命科学部・教授  
  
 研究者番号：90423566  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ糖脂質は細胞膜上にて水平凝集し、糖鎖の密集した「糖マイクロドメイン」を形成する。また、隣接細胞の糖マイクロドメイン同士の糖鎖-糖鎖間相互作用(CCLs)により、細胞接着が誘起される。しかしCCLsのメカニズムは未だ明らかとなっていない。先行研究例にてCCLsにある種のイオンが必須であるとの結果が示されているが、その理由も未解明である。本研究課題では、糖クラスターに対し、糖クラスター内部の当空間配置を鋭敏に検知するための分子プローブとしての錯体を導入した「糖修飾トリスビピリジン鉄錯体」を調製し、錯体由来のCDスペクトルの変化を元に、糖クラスター内部の糖鎖空間配置の変化を評価した。

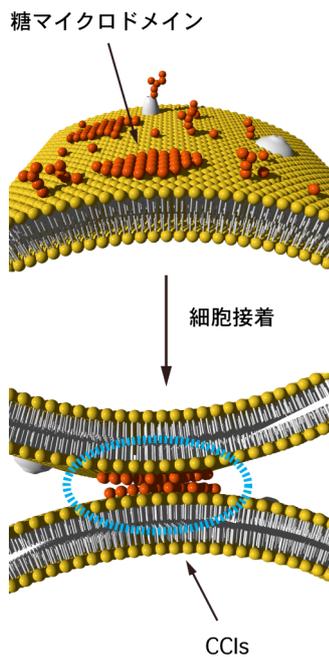
研究成果の概要(英文)：In glycosphingolipid chemistry, an increasing interest has been placed on carbohydrate-carbohydrate interactions (CCLs) and it is now recognized that CCLs act as main driving forces to induce various cellular recognition events. In spite of importance of CCLs, not only fluidic nature but also fluctuations of glycosphingolipid levels on the cell surfaces make it quite difficult to investigate CCLs in a detailed manner. Simple and well-designed model systems are, therefore, highly required in this research field. In this project, we synthesized glycosylated 1,10-bipyridines and then, used them for complexation with ferrous ion to construct the corresponding tris-bipyridine ferrous complexes having multivalent glycosylated clusters. The resultant glycoclusters showed circular dichroism (CD) spectra characteristic for  $\pi$ -isomers. Their CD spectral changes on additions of various alkaline/alkaline-earth metal ions were monitored through CD spectral analyses.

研究分野：糖鎖科学

キーワード：糖鎖間相互作用 動的コンビナトリアルケミストリー 動的コンビナトリアルライブラリー

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、細胞膜上にて、スフィンゴ糖脂質が、スフィンゴミエリンやコレステロールなどの主要な細胞膜成分と共に水平凝集し、その結果として細胞表面に糖鎖が密集した「糖マイクロドメイン」を形成していることがわかってきた。隣接する細胞膜上に存在する糖マイクロドメイン同士が、糖と糖の選択的な相互作用（糖鎖-糖鎖間相互作用：Carbohydrate-Carbohydrate Interactions: CCI）によってお互いに相互作用することで、細胞同士の接着や細胞間のシグナル伝達が誘起されることも明らかになりつつある。CCIs が誘導する細胞接着の例として、ニジマス精子の卵細胞認識や、受精卵のコンパクション、ガン細胞と血管内皮細胞の接着（ガン転移）や各種炎症など、様々なものが知られるようになってきた。つまり、CCIs のメカニズムの詳細を理解することは、多細胞生物である我々人間を理解するために重要であると共に、ガン転移防止薬など、「望まない細胞接着」をトリガーとして始まる各種疾患の予防治療薬の開発のためにも極めて重要である。しかし、CCIs のメカニズム（糖構造依存性やイオン要求性、糖とイオンの化学量論比、CCIs が引き起こされた際の糖鎖同士の空間配置など）は未だ一切不明である。



(2) CCIs のメカニズム解析を妨げる要因は非常に多い。例えば第一に、CCIs が非常に微弱な相互作用であることがあげられる。また、細胞膜表面に存在するスフィンゴ糖脂質の糖鎖部分が非常に構造多様性に富んでおり、同一の糖構造を有するスフィンゴ糖脂質の存在量は非常に少ない事も要因の1つである。また、細胞膜は動的な分子集合体であり、細胞膜内の各スフィンゴ糖脂質は絶えず流動しており、糖マイクロドメインも離合集散を繰り返している事も CCIs の解析を困難にし

ている。更に、そもそもスフィンゴ糖脂質の細胞表面における存在量ですら時間的に変動していることが本質的な問題である。つまり、この様に極めて複雑かつ動的な細胞膜の構造そのものが、その部分構造である糖マイクロドメイン間に働く CCIs のメカニズム解析を決定的に困難にしている主要因である。

(3) 前述の諸問題を回避し、CCIs のメカニズム解析を定量的に行うためには、天然の細胞膜を模倣しつつ、天然細胞膜の持つ各種問題点を回避する事が可能な「人工モデル」を用いて研究を行うことが有効である。例えば人工モデルを用いたこれまでの先行研究では、表面をスフィンゴ糖脂質由来の糖鎖で被覆した金ナノコロイド（糖修飾金ナノコロイド）を調製し、その糖修飾金ナノコロイドが分散した水溶液中に各種塩化物塩（NaCl や KCl、CaCl<sub>2</sub> など）を加えることにより、添加するカチオン種の違いやナノコロイド上の糖構造の違いによって、糖修飾金ナノコロイドの凝集性に違いが生じるかを評価した例などが知られている。このような先行研究を経て、CCIs が誘導されるのは特定の糖構造の間だけであることや、Ca<sup>2+</sup>の存在が CCIs の誘導に重要であることなどが知られるようになってきた。しかし、CCIs を引き起こす糖構造としてこれまでに発見された糖鎖の組み合わせは極めて少数であり、Ca<sup>2+</sup>がなぜ CCIs の誘導に重要なのか、その詳細は全くわかっていない。

(4) CCIs のメカニズム解明に向けた我々独自のアプローチは、分子内相互作用を利用したものである。この分子内アプローチの利点として CCIs の検出に必要な糖鎖数が非常に少なく済み、結果として CCIs が引き起こされた際の糖鎖の空間配置を明らかにできることが挙げられる。例えばこれまで我々は、糖修飾フェロセンを用い、各種イオンの添加によって分子内に誘起された CCIs に基づく糖修飾フェロセンのコンホメーション変化を元に、CCIs を評価してきた。このように我々は分子内アプローチに基づく CCIs 研究を一貫して行ってきたが、このような分子内アプローチによる糖鎖間相互作用のメカニズム解析を行っている研究室は全世界を見回しても我々の研究室のみである。我々の手法の特徴および利点は、分子内 CCIs によるコンホメーション変化を円偏光二色性 (CD) または UV-vis スペクトルによって簡便に検出可能な分子システムを構築している点にある。

2. 研究の目的

(1) 本課題において我々は、新たな分子内アプローチの手法として、動的コンビナトリアルケミストリー（以下、動的コンビケム）の手法を用い、CCIs のメカニズム解析手法を確立させることとした。動的コンビケムとは

常温にて結合と開裂が平衡状態にある化学結合（ジスルフィド結合や配位結合など）を用いて複数の構成成分を連結し、様々な形状のホストライブラリーを構築する手法である。その結果得られたライブラリーの溶液に対し、ある特定のゲスト分子を添加すると、そのゲスト分子と強く相互作用するライブラリーメンバーのみが結合した結果安定化され、その存在比が増大する。この増大したライブラリーメンバーの構造を解析することで、ゲストと効率的に結合するホスト構造の探索を可能とする手法である。

(2) 構築した動的コンビケムライブラリーに対してイオンを添加することにより、どのようなイオン種が CCI<sub>s</sub> を誘起するのか、さらには CCI<sub>s</sub> の誘起により糖クラスター内の糖鎖の空間配置がどのように変化するのかを評価する。

### 3. 研究の方法

(1) CCI<sub>s</sub> に関するこれまでの先行研究では、細胞膜を模倣した人工モデル系を作成し、分子間の凝集（例：糖修飾金ナノコロイド）や接着（例：糖脂質水面単分子膜と糖鎖高分子）を観察または測定することにより、CCI<sub>s</sub> を評価している例が多数であった。これらは CCI<sub>s</sub> による細胞間接着を再現したモデル系と言える。これらの先行研究例では、いずれも CCI<sub>s</sub> の発現にある種のイオン（ほとんどの場合は Ca<sup>2+</sup>）が必須であるとの結果が示されている。しかしなぜ特定のイオンの存在が CCI<sub>s</sub> の誘起に必須なのか、そのメカニズムは未だ不明である。

(2) 本研究課題では、糖を導入したトリスビピリジン鉄錯体を合成し、イオンを添加することによる錯体のコンホメーション変化を元に、錯体内部で働く CCI<sub>s</sub> を評価することとした。例えば本申請課題では導入する糖鎖としてラクトース (Lac)、マルトース (Mal)、もしくはイソマルトース (Ima) を選択し、これらの二糖を 5 位および 5' 位に有するビピリジンを有機化学的に導入する。さらには、得られた糖修飾ビピリジン水溶液中にて Fe<sup>2+</sup> と混和することにより、トリスビピリジン鉄錯体を調製する。ビピリジンは各種金属イオンに対する良好な配位子であり、特に Fe<sup>2+</sup> との錯化では、極めて安定なトリス錯体のみを形成する。糖修飾トリスビピリジン鉄錯体には、錯体中心の配位子のねじれ方向が異なる 2 つの異性体 (Δ/Λ) が存在し、この両者では糖空間配置も異なっている。これらの異性体の存在比 (Δ-Λ比) は円二色性分散 (CD) スペクトル測定にて容易に解析することができる。

(3) 本錯体は錯体中心部分の不斉構造 (Δ/Λ) に加え、糖鎖にも不斉炭素が存在する。この点において、糖修飾トリスビピリジン鉄

錯体の Δ 体および Λ 体はお互いにジアステレオマー (エピマー) であり、異なる立体構造、異なる糖鎖空間配置、異なる化学ポテンシャルを有する。この 2 種類の錯体が動的平衡状態にある水溶液に、様々なアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩を添加して CD スペクトルの測定を行う。もし、どちらかの錯体の統空間配置が CCI<sub>s</sub> に適したものである場合、塩の添加によってその錯体内部で CCI<sub>s</sub> が (対応するジアステレオマー内部より) 強く働き、その結果その異性体の存在比が増大する。本研究課題ではどのようなイオン種が上記の糖空間配置の変化を引き起こすのかについて、多様なイオン種 (アニオンを含む) を用いた詳細かつ網羅的な解析を行った。

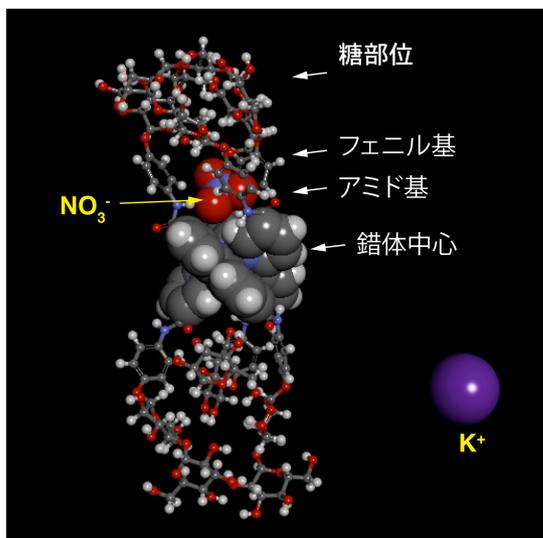
### 4. 研究成果

(1) 本課題ではまず、市販の Lac、Mal、または Ima に対し、そのヒドロキシ基をピリジン/無水酢酸系でアセチル化した。得られたアセチル化糖を臭化水素酢酸溶液を用いてプロモ化し、その後、ナトリウム-*p*-ニトロフェノキッドで SN<sub>2</sub> 置換を行う事で、これらの二糖の *p*-ニトロフェニル配糖体へと変換した。得られた各種配糖体を 2,2'-ビピリジン-5,5'-ジカルボン酸クロライドと脱水縮合させたのち、塩基性条件下で脱アセチル化することで各種の糖修飾ビピリジン (bpyLac、bpyMal、および bpyIma) を合成した。更に、これらの糖修飾ビピリジン水溶液中にて、Fe<sup>2+</sup> と混和させることで糖修飾トリスビピリジン鉄錯体 ([Fe(bpyLac)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>、[Fe(bpyMal)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>、および [Fe(bpyIma)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>) へ変換することに成功した。

(2) 得られた糖修飾トリスビピリジン鉄錯体は塩非存在下において、弱いながらも Δ 型錯体特有の CD スペクトルを示した。一方で硝酸塩を加えた場合、[Fe(bpyMal)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> の CD スペクトルは強い Λ 型のスペクトルに変化した。このことは塩非存在下では Δ-Λ 比がほぼ 1 : 1 に等しかったのに対し、塩の添加により Λ 型錯体が大幅に増加したことを示している。一方 [Fe(bpyLac)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> ではこのような変化は観測されなかった。また、硫酸塩を糖修飾トリスビピリジン鉄錯体に添加した場合では、両錯体の Λ 型錯体の濃度が共に大きく増大したが、[Fe(bpyLac)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> のみが 0.1 M 以上の硫酸塩濃度で崩壊してしまった。これらの結果は、錯体が有する糖構造の違いによって塩に対する応答性が異なることを示している。

(3) 次に我々は、これらのイオン種 (カチオンおよびアニオン) が、錯体のどの部分と相互作用しているのかを明らかにするため、分子動力学法 (MD) を用いたコンピューターシミュレーションを行った。我々が今回用いたシステムは、当該研究分野において世界的に幅広く用いられている Discovery Studio 4.5 (DASSO BIOVIA) であり、力場としても

糖関連の分子構造解析に幅広く用いられている CHARMM を用いた。錯体として  $\Delta$ -[Fe(bpyMal)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> を用い、K<sup>+</sup> および NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を共存させて MD 計算を行ったところ、その際安定構造では NO<sub>3</sub><sup>-</sup> が錯体のアミド基部分と相互作用しており、一方 K<sup>+</sup> は錯体との相互作用が見られなかった。これは CD スペクトルによる結果 (CD 変化はアニオン種依存的に起こり、カチオン種の違いにより影響を受けない) とよく一致している。



(4) 前述のような様々な実験の結果、①各種イオンの添加により、糖クラスター内の糖鎖パッキングが劇的な影響を受けること、②そのパッキングの変化は、一般的に糖鎖近傍のアミド基とアニオン種の相互作用によるものであること、③ラクトースに関してはカチオン種によってもパッキングが変化を受けること、などが明らかとなった。

#### 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 1 件)

Yuki Nonaka, Ryuhei Uruno, Fumiko Dai, Ryoji Matsuoka, Masaki Nakamura, Maho Iwamura, Haruo Iwabuchi, Takahiro Okada, Naoto Chigira, Yoshitsugu Amano, and Teruaki Hasegawa "Hexavalent glycoclusters having tris-bipyridine ferrous complex cores as minimum combinatorial libraries for probing carbohydrate-carbohydrate interactions" *Tetrahedron* 2016, 72, 5456-5464.

[学会発表] (計 13 件)

① Naoto Chigira, Fumiko Dai, Masahito Hagio, and Teruaki Hasegawa "Preparation of organometallic compounds having multiple carbohydrates and their ion-responses to induce dynamic changes in their carbohydrate packings" 日本化学会第97春季年会、2017年3月17日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県横浜

市)

② 代芙美子・長谷川輝明 「糖修飾トリスフェナントロリン鉄錯体の合成とコンフォメーション変化」第10回バイオ関連化学シンポジウム、2016年9月7日、石川県立音楽堂およびもてなしドーム地下イベント広場 (石川県金沢市)

③ 野中祐紀・宇留野龍平・代芙美子・松岡亮次・岩村真帆・中村真基・天野善継・千明脩人・長谷川輝明 「糖鎖間相互作用のメカニズム解析：糖修飾トリスビピリジン鉄錯体を用いた動的コンビネーム的アプローチ」第35回日本糖質学会、2016年9月3日、高知市文化プラザかるぽーと (高知県高知市)

④ 代芙美子・長谷川輝明 「糖修飾トリスフェナントロリン鉄錯体の合成とコンフォメーション解析」第35回日本糖質学会 2016年9月2日、高知市文化プラザかるぽーと (高知県高知市)

⑤ Yuki Nonaka, Ryuhei Uruno and Teruaki Hasegawa "Glycosylated tris-bipyridine ferrous complexes offer dynamic combinatorial libraries for probing carbohydrate-carbohydrate interactions", Canadian Glycomics Symposium, 2016年5月19日、アルバータ州バンフ市 (カナダ)

⑥ Yuki Nonaka and Teruaki Hasegawa "Hexavalent glycoclusters having tris-bipyridine ferrous complex cores for probing intramolecular carbohydrate-carbohydrate interactions" The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2015), 2015年12月17日、ハワイ州ホノルル市 (アメリカ合衆国)

⑦ 野中祐紀・宇留野龍平・長谷川輝明 「オリゴ糖修飾トリスビピリジン鉄錯体による分子内糖鎖間相互作用メカニズムの解析」第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015年9月10日、熊本大学黒髪キャンパス (熊本県熊本市)

⑧ 代芙美子・長谷川輝明 「糖修飾トリスフェナントロリン鉄錯体の合成と機能解析」第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015年9月10日、熊本大学黒髪キャンパス (熊本県熊本市)

⑨ 代芙美子・長谷川輝明 「糖修飾トリスフェナントロリン鉄錯体の合成と機能評価」第34回日本糖質学会、2015年08月01日、東京大学安田講堂など (東京都文京区)

⑩ 野中祐紀・宇留野龍平・長谷川輝明 「6つの糖部位を有するトリスビピリジン鉄錯体による分子内糖鎖間相互作用メカニズムの解析」第34回日本糖質学会、2015年08月01日、東京大学安田講堂など (東京都文京区)

⑪ 野中祐紀・宇留野龍平・長谷川輝明 「オリゴ糖修飾トリスビピリジン鉄錯体による糖鎖間相互作用メカニズムの解析」日本化学会第95春季年会、2015年03月27日、日本大学船橋キャンパス (千葉県船橋市)

⑫ 野中祐紀・宇留野龍平・長谷川輝明 「6つの糖部位を有するトリスビピリジン鉄錯体

による糖鎖間相互作用メカニズムの解析」第33回日本糖質学会、2014年8月10日、名古屋大学豊田講堂（愛知県名古屋市千種区）

⑬ 長谷川輝明・宇留野龍平・堤麻由香・中村もとみ・石川佳明「糖修飾トリスビピリジン鉄錯体を用いた糖鎖間相互作用のメカニズム解析」第94回日本化学会春季年会、2014年3月27日、名古屋大学東山キャンパス（愛知県名古屋市千種区）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.toyo.ac.jp/~t-hasegawa/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

長谷川 輝明 (HASEGAWA, Teruaki)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：90423566