

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12760

研究課題名(和文)糖鎖の生体内代謝を追跡する革新的分子プローブの開発

研究課題名(英文)Development of a novel type of carbohydrate probes

研究代表者

平井 剛(Hirai, Go)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：50359551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖質(複合糖質)は、それぞれ重要な機能を持っている。糖鎖の分解は、その機能をオフにする役割を担っており、非常に重要であるが、細胞内で特定の複合糖質が、いつ、どの酵素に分解されているかを追跡することは不可能である。そこでこれを可能にする、新しい分子ツールの開発を目指した。興味対象の複合糖質構造に対して、その構造をあまり変化させずに仕掛けを施し、その基質が分解されたときに、分解した酵素と共有結合を形成できるようにすれば、追跡が可能となる。今回、独自のアイデアでこれを実現できる分子ツールを開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrates (glycoconjugates) have important functions. Degradation of carbohydrates that play a role of "turning off" functions of original carbohydrates, is also important process in cells. However, it is not possible to monitor when or which enzymes degradate a specific glycoconjugate in cells. This time, a new molecular tool that can do this was successfully developed with our own idea.

研究分野：ケミカルバイオロジー 有機合成化学

キーワード：複合糖質 シアリダーゼ 酵素反応 分子プローブ

1. 研究開始当初の背景

シアル酸は、糖タンパク質、糖脂質( ganglioside )、多糖に存在し、多様な糖鎖構造に連結している。シアル酸を末端にもつ ganglioside などの複合糖質は、シアリダーゼにより分解され、これが代謝分解の最初の段階となる。シアリダーゼはノイラミダーゼとも呼ばれ、ウイルスやバクテリアではその感染・増殖に深く関与していることから、これらに対する阻害剤が多数開発されてきた。しかしながら、阻害剤だけでは生物現象とシアリダーゼ機能を分子レベルで議論することは困難である。シアリダーゼは哺乳類では4種あり、基質選択性が厳密ではないので、酵素-基質の組み合わせは無数の可能性がある。そのため、“細胞レベルである特定の糖脂質の分解をどのシアリダーゼが実行したか”を解析することはできない。この基質特異的な代謝追跡 ( Substrate-Specific Metabolism Monitoring ( SMM )) を可能にする分子プローブ ( SMM プローブ ) は、糖加水分解酵素とその基質の機能解析に貢献できると考え、本研究ではこれを実現するべく、研究に取り組んだ。

本研究では、ganglioside GM3 のシアリダーゼによる分解追跡を可能にできる SMM プローブ開発の概念実証を目指した。SMM プローブの要件は、1) 興味対象のシアロ糖鎖とほとんど同じ構造を有し、2) シアリダーゼによって基質として認識され、3) 分解される際にシアリダーゼと共有結合を形成する、ことである。これによって、“GM3”が“どのシアリダーゼ”に分解されたかを、解析できるようになる ( 図1 )。

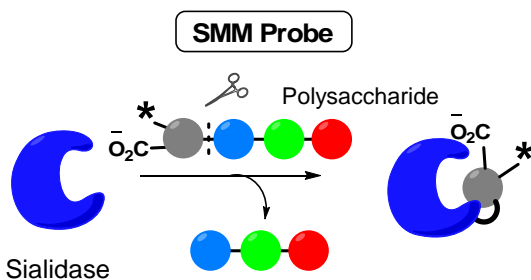


図1 . SMM プローブの概略図

これを実現できるプローブの候補は、3位にF原子を持つシアル酸誘導体1であった。1はシアリダーゼの基質となり、2位置換基Xが切断されカチオン性中間体2となる( 図2 )。F原子によって2は不安定化され、すぐに触媒サイトに存在するチロシンと共有結合を形成し、シアリダーゼとプローブが結合した複合体3を与える。仕掛けのF原子は複合体2の安定化と同時に1の安定化と2の不安定化に寄与する。このことから、Xには適切な脱離基 ( 通常はF原子 ) が必須となる。すなわち上記の1)の性質を持たせることができなかった。

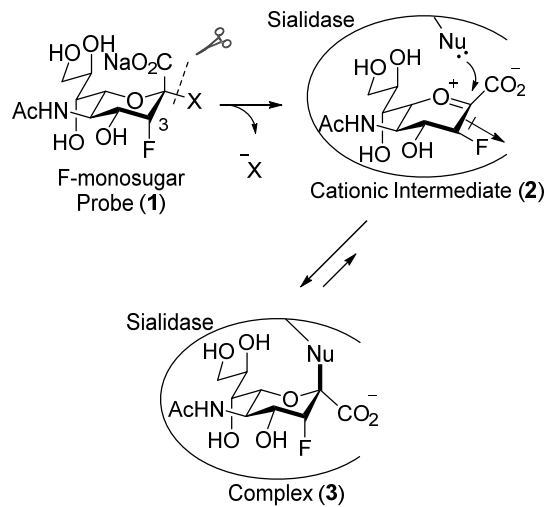


図2 . 3位F型プローブ1

2. 研究の目的

そこで本研究では、GM3の構造を基盤として、上記3つの要件を満たすプローブ開発を考え、最終的に3位にメチレン基を導入したシアロ糖鎖誘導体4を設計した ( 図3 )。4は3位に電子求引基を持たず、またシアル酸のコンホメーションに大きな影響を与えないことが計算化学的に示唆されている。このことから、シアリダーゼに対する親和性と基質としての反応性を低下させず、Rに糖鎖構造を導入可能と期待した。さらに4がシアリダーゼと基質になると5を生成する。5は活性化されたMichael受容体と見ることができ、近傍の求核性アミノ酸と反応して、シアリダーゼと共有結合を形成でき、安定な複合体6を生成すると考えた。GM3構造に適用する前段階として、本研究では2糖型の4を合成し、本設計コンセプトの概念実証をすることにフォーカスした。

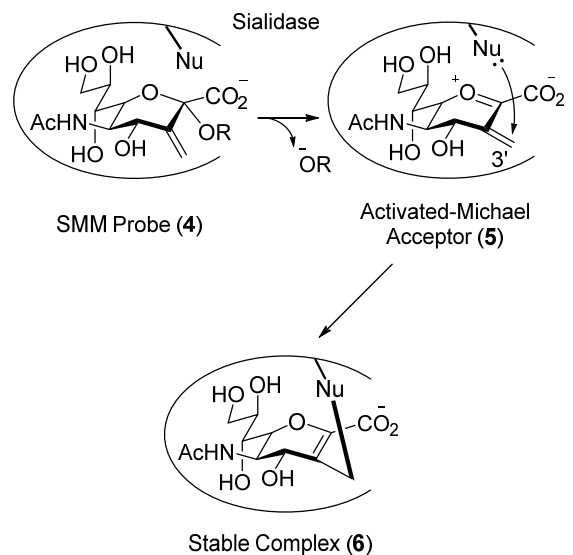


図3 . 新規 SMM プローブ 4 の設計

### 3. 研究の方法

化合物 4 は新規構造であり、本構造を本当に合成できるのかが、最初の課題であった。当初、3 位エキソメチレン基は対応する 3-ケト体から構築しようとして検討していた。しかし、3-ケト体の合成は困難であり、前駆体の 3-アルコール体を酸化条件に付すと、基質が分解した。構造決定には至っていないが、1 位メトシカルボニル基の影響でレトロクライゼン縮合が進行し、シアル酸が開環していると推定された。

そこで、2 位へのアクセプター糖の導入と 3 位エキソメチレン基を同時に構築する新たな合成法を立案した (図 4)。2,3-デヒドロ体の 3 位に脱離基 (LG) をもつ 1 炭素ユニットを導入した 7 を活性化することで、オキソニウム種 8 を発生させる。アクセプター糖が、3' 位ではなく、2 位と反応すれば、3 位エキソメチレン基を構築しながら望むシアロシド結合を形成でき、9 を合成できると考えた (ピニロガス活性化によるシアリル化反応)。より不安定と推測される 9 を再活性化せず、7 を選択的に活性化するため、適切な脱離基 LG と活性化法の選択が重要である。

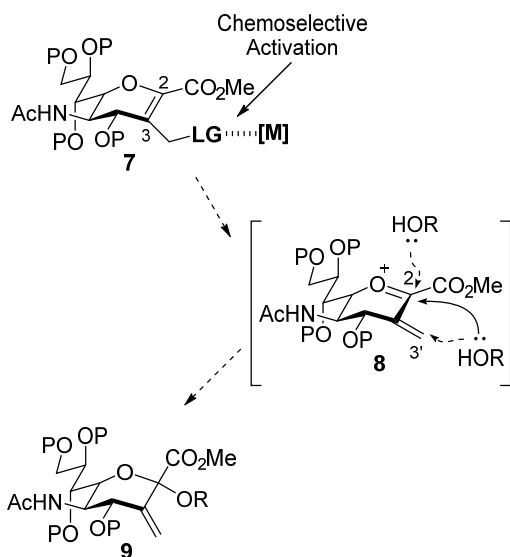


図 4. 合成計画

### 4. 研究成果

脱離基 LG として *o*-アルキニルベンゾエートを導入したドナーを用い、金錯体による活性化法を利用することを計画した (図 5)。この際、反応の位置及び立体選択性を獲得するため、7 位に配向基として Pico 基を導入したドナー 10 を用いて、グリコシル化反応を実施した。調製したドナー 10 と 1 級アルコール 11a とのグリコシル化を試みたところ、12a を 52% で選択的に得ることに成功した。同様にガラクトースアクセプター 11b とのグリコシル化を試みたところ、32% で 12b を立体選択的に与えた。さらに、ガラクトース 3 位とのグリコシル化を検討した。様々なアクセプタ

ーを合成して検討したが、最終的に 6 位を Tr 基で保護し、さらに他の水酸基を保護していない 11c を用いた時に、12% で目的物 12c を単離することに成功した (図 5)。

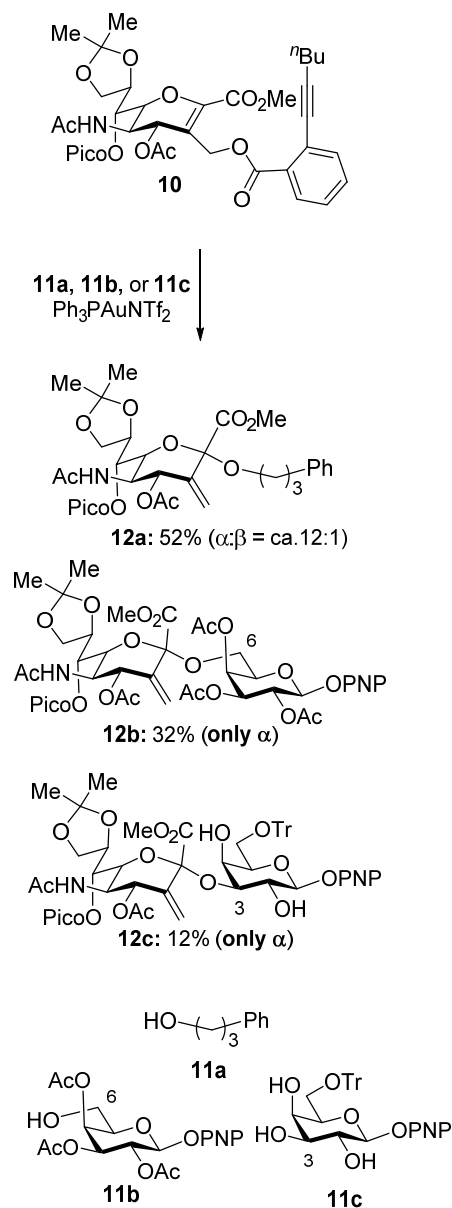


図 5. ドナー 10 を用いるシアリル化反応

12a-12c の保護基を除去し、3 種の化合物 4 の誘導体を得た。これらのウェルシュ菌シアリダーゼに対する阻害効果を評価したところ、単糖型はほとんど阻害活性を示さなかったが、2 糖型の 2 種は、顕著な阻害活性を示し、さらに意外なことに、これらは典型的なシアリダーゼ阻害剤 DANA よりも低濃度でシアリダーゼ活性を阻害した。また、シアリダーゼとの共有結合形成も確認でき、SMM プローブの概念実証に成功した。

### 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13件)すべて査読あり

- (1) Thienyl-Substituted  $\alpha$ -Ketoamide: A Less Hydrophobic Reactive Group for Photo-Affinity Labeling  
Eisuke Ota, Kazuteru Usui, Kana Oonuma, Hiroyuki Koshino, Shigeru Nishiyama, Go Hirai,\* and Mikiko Sodeoka\*  
ACS Chemical Biology, 13, 876-880 (2018).
- (2) Water-Proton Relaxivities of Radical Nanoparticles Self-Assembled via Hydration or Dehydration Processes  
Kosuke Morishita, Yuna Okamoto, Shuhei Murayama, Kazuteru Usui, Eriko Ohashi, Go Hirai, Ichio Aoki, Satoru Karasawa\*  
Langmuir 33, 7810-7817 (2017).
- (3) Synthesis of polyunsaturated fatty acid-containing glucuronosyl-diacylglycerol through direct glycosylation  
Qianqian Wang, Yuta Kuramoto, Yozo Okazaki, Eisuke Ota, Masaki Morita, Go Hirai,\* Kazuki Saito, Mikiko Sodeoka\*  
Tetrahedron Lett. 58, 2915-2918 (2017).
- (4) 7-Hydroxy 3-methyleneisindolin-1-one as a new ES IPT-fluorescent probe to monitor aqueous environments  
Yusuke Kimuro, Kazuteru Usui, Satoru Karasawa, Go Hirai, and Mariko Aso\*  
Chem. Pharm. Bull. 65, 796-800 (2017).
- (5) Synthesis of the Right-Side Structure of Type B Physalins  
Masaki Morita, Shuntaro Kojima, Megumi Ohkubo, Hiroyuki Koshino, Daisuke Hashizume, Go Hirai,\* Keiji Maruoka, and Mikiko Sodeoka\*  
Isr. J. Chem. 57, 309-318 (2017).
- (6) Total synthesis of natural derivatives and artificial analogs of 13-oxyingenol and their biological evaluation  
Takayuki Ohyoshi, Yuki Tamura, Ichiro Hayakawa,\* Go Hirai,\* Yamato Miyazawa, Shota Funakubo, Mikiko Sodeoka,\* and Hideo Kigoshi\*  
Org. Biomol. Chem. 14, 11426-11437 (2016).
- (7) Rational Design and Synthesis of [5]Helicene-Derived Phosphine Ligands and Their Application in Pd-Catalyzed Asymmetric Reactions  
Kosuke Yamamoto, Takashi Shimizu, Kazunobu Igawa, Katsuhiko Tomooka, Go Hirai, Hiroshi Suemune,\* and Kazuteru Usui\*  
Sci. Rep. 6, 36211 (2016).
- (8) Comparative Characterization of the Leaf Tissue of Physalis alkekengi and Physalis peruviana Using RNA-seq and Metabolite Profiling  
Atsushi Fukushima,\* Michimi Nakamura, Hideyuki Suzuki, Mami Yamazaki, Eva Knoch, Tetsuya Mori, Naoyuki Umemoto, Masaki Morita, Go Hirai, Mikiko Sodeoka, and Kazuki Saito\*

- Frontiers in Plant Science 7, 1883 (2016).
- (9) A new carbamidemethyl-linked lanthanoid chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells  
Yuya Hikone, Go Hirai, Masaki Mishima, Kohsuke Inomata, Teppei Ikeya, Souichiro Arai, Masahiro Shirakawa, Mikiko Sodeoka, Yutaka Ito\*  
Journal of Biomolecular NMR 66, 99-110 (2016).
- (10) Photochemical and Additive-free Coupling Reaction of  $\alpha$ -Cumyl  $\alpha$ -Ketoesters via Intermolecular C-H Bond Activation  
Eisuke Ota, Yu Mikame, Go Hirai,\* Shigeru Nishiyama, Mikiko Sodeoka\*  
Synlett 27, 1128-1132 (2016).
- (11) Identification of novel secreted fatty acids that regulate nitrogen catabolite repression in fission yeast  
Xiaoying Sun, Go Hirai, Masashi Ueki, Hiroshi Hirota, Qianqian Wang, Yayoi Hongo, Takemichi Nakamura, Yuki Hitora, Hidekazu Takahashi, Mikiko Sodeoka, Hiroyuki Osada, Makiko Hamamoto, Minoru Yoshida,\* Yoko Yashiroda\*  
Sci. Rep. 6, 20856 (2016).  
DOI:10.1038/srep20856
- (12) Photo-induced formation of cyclopropanols from  $\alpha$ -ketoamides via  $\gamma$ -C-H bond activation  
Eisuke Ota, Yu Mikame, Go Hirai,\* Hiroyuki Koshino, Shigeru Nishiyama, Mikiko Sodeoka\*  
Tetrahedron Lett. 56, 5991-5994 (2015).
- (13) Reactions of Carbonyl Compounds with Phosphorus Ylide Generated from Tribromofluoromethane and Tris(dimethylamino)phosphine  
Go Hirai,\* Eri Nishizawa, Daiki Kakumoto, Masaki Morita, Mitsuki Okada, Daisuke Hashizume, Sayoko Nagashima, Mikiko Sodeoka\*  
Chem. Lett. 44, 1389-1391 (2015).
- 〔学会発表〕(計14件)  
(招待講演)
- (1) 平井剛、How to create glycolipid analogues with superior biological activity、2nd CSRS- ITbM Joint Workshop、2016.1.7、和光
- (2) 平井剛、ケミカルバイオロジーに役立つものづくりを目指して、特別企画:有機合成化学を起点とするものづくり戦略(日本化学会第96回春季年会)、2016.3.24、同志社大学
- (3) 平井剛、生物活性分子創製研究と有機合成研究の融合、熊本大学理学部化学特別講義C講演会、2016.05.24、熊本大学
- (4) 平井剛、高機能性複合糖質の創製、日本化学会中国四国支部地区化学講演会「有機化学者による生命科学へのアプローチ」、2016.12.10、岡山大学
- (5) 平井剛、代謝に着目した中分子糖鎖分子の設計と機能、日本薬学会第137年会一

般シンポジウム「中分子創薬研究のフロンティア - 反応集積化が導く中分子戦略: 高次生物機能分子の創製 -、2017.3.27、仙台国際センター

(6) 平井剛、有機化学を起点とするケミカルバイオロジー研究、徳島大学大学院「創薬先端合成化学特論」講演会、2017.5.24、徳島大学

(7) 平井剛、有機合成化学を起点とするケミカルバイオロジー研究、平成 29 年度有機合成化学講演会 - 合成有機化学のフロンティア -、2017.6.2、九州大学

(8) 平井剛、人工糖鎖を備えて未来の疾患と戦う、第 7 回 CSJ 化学フェスタ 2017「10 年後にはどんな分子ができる? 有機合成化学者の「革命分子」への挑戦」(2017.10.18)、2017.10.18、タワーホール船堀

(9) 平井剛、非天然型複合糖質を創る、糸状菌分子生物学研究会 第 5 回若手の会 WS in SAGA、2017.11.16、佐賀・川上峡温泉ホテル龍登園

(10) 平井剛、天然物を高機能化する有機合成、日本化学会第 98 春季年会(2018): 天然有機化合物の全合成: 効率的分子構築のための新しい反応と戦略 (CSJ カレントレビュー企画)、2018.3.23、日本大学理工学部船橋キャンパス

(一般発表)

(11) Go Hirai, Marie Kato, Kana Oonuma, Eri Nishizawa, Hiroyuki Koshino, Mikiko Sodeoka, Fluorine containing C-linked gangliosides GM3 analogs: Synthesis, conformational analysis, and biological activities, Molecular Function of Natural Products: Advances towards Chemical Biology, PacifiChem 2015、口頭、2015.12.15-20、Honolulu

(12) 深澤亮、平井剛、加藤麻理依、大沼可奈、越野広雪、袖岡幹子、シアリダーゼの機能解析を志向した 3 位修飾型シアリ酸誘導体の合成と活性評価、第 58 回天然有機化合物討論会、口頭、2016.9.14-16、仙台、日本

(13) 深澤亮、大沼可奈、加藤麻理依、平井剛、袖岡幹子、Development of the Disaccharide-Type Activity-Based Probe for Sialidase、日本化学会第 97 春季年会、口頭、2017.3.16-19、横浜、日本

(14) 平井剛、深澤亮、大沼可奈、森田昌樹、加藤麻理依、袖岡幹子、シアリダーゼに対する新規 activity-based probe の開発、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム、口頭、2017.10.25、名古屋大学、日本

〔図書〕(計 1 件)

「日本化学会 編: 天然有機化合物の全合成 (CS カレントレビュー 27): 独創的なものづくりの反応と戦略」(第 4 章(著者: 平井剛)と第 14 章(著者: 平井剛、袖岡幹子)を執筆) 2018 年 3 月 20 日発刊、化学同人

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: シアル酸誘導体  
発明者: 平井剛・深澤亮・袖岡幹子  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特許願 2016-147705  
出願年月日: 平成 28 年 7 月 27 日願  
国内外の別: 国内

○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  
<http://sekkei.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平井 剛 (Hirai, Go)  
九州大学大学院薬学研究院・教授  
研究者番号: 50359551

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )