

機関番号：3 2 6 4 3

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890258

研究課題名（和文）生体内糖鎖認識機構解明と創薬への応用

研究課題名（英文）Elucidation of carbohydrate chains recognition mechanism and application to medicinal chemistry

研究代表者

西山 和沙 (NISHIYAMA KAZUSA)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：4 0 5 4 5 6 1 2

研究成果の概要（和文）：

糖類は複雑な立体構造を有し生命現象における情報素子として働いている。このような糖鎖の認識機構を解明するためには、新たな解析法の確立が必要である。これに対し、本研究では有機合成化学と生化学及び分子生物学を組み合わせることで、2 種類の新規糖鎖解析法として、自己組織単分子膜を用いたファージディスプレイ法、及び糖の構造を保持した蛍光ラベル化法を確立した。

研究成果の概要（英文）：

The saccharide acts as information element in the life phenomenon having a complicated conformation. The establishment of new analytical method is necessary to elucidate the recognition mechanism of such carbohydrate chains. I established two kinds of new carbohydrate chain analytical methods in this study by putting organic synthetic chemistry and biochemistry and molecular biology together. One is the phage display method using the self-assembled monolayer and the other is the fluorescence label method which maintained structure of the carbohydrate chains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

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：有機化学・糖鎖合成・分子認識・レクチン・エーテル結合糖・QCM・ファージディスプレイ・分子プローブ

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、核酸、タンパク質に続く第3の生命鎖としてポストゲノム時代の一翼を担う研究対象である。近年、高速液体クロマトグラフィーや質量分析法の発展により、糖鎖の構造解析が進みつつあるが、高分子量の糖鎖をマクロな構造としてとらえるアプローチが

多く、糖の持つ水酸基とペプチドのアミノ酸残基との一つ一つの結合を詳細に解析するほどの精度には至っていない。これは、弱く精緻な糖-タンパクの結合特異性を明らかにする精度の高い手法がないことが原因と考えられる。私はこれを打開するために、有機合成化学を活かした新たな糖鎖の合成法

や分析法の開発が必須であると考えた。私は、様々な糖鎖合成研究を行いながら、並行して生化学的な実験手法も学び、生化学の実験法には効率や精度において有機合成化学が貢献できる部分が非常に多いことを知った。本研究課題では、私が身をもって知った生化学的手法の欠点に有機合成化学の力を用いて取り組み、新技術を創出することによって糖-ペプチドの認識機構解明を目指した。得られた知見を医薬化学分野へ応用し、新たな糖関連生物活性物質の分子設計及び合成を行うことにした。生化学的な分析法を有機合成化学に基づいて開発した例は国内外ともに少なく、医薬化学への展開も視野に入れたアプローチはほとんどなされていない。これまで糖関連化合物は創薬化学分野において注目されていなかったが、糖類の認識機構や標的タンパクを明らかにすることによって、糖類を新たな医薬品候補化合物として提示していきたい。

2. 研究の目的

(1) 糖鎖の認識機構を明らかにするための新しい方法論の開発

糖鎖は非常に複雑な立体構造をもつため、その認識機構解明のためにはより精度が高く効率良い方法論の開発が必須と考える。そこで、以下の二つの新規な認識法の開発を検討することにした。

①SAM法を用いた新しい糖鎖認識法の開発

生物活性を示す小分子について酵素などとの作用機構を明らかにするため、これまでにビオチン-アビジン法が汎用されている。しかし、ビオチン-アビジンによる小分子の固定化は一樣ではなく、複雑な立体構造を十分にとらえることは難しい。より効率よく正確に相互作用を明らかにするため、自己組織単分子膜(SAM: Self-Assembled Monolayers)を形成する新しい機能性糖鎖プローブを創製し、糖鎖の認識機構解明にはビオチン-アビジン法よりもSAM法が適することを示すことにした。

②新規蛍光分析法の開発

糖鎖にマーカー分子として蛍光標識を組み込み、アフィニティーカラムなどを用いて糖の認識機構を解明する方法が検討されている。特に 2-aminopyridine を用いた PA: pyridylamino 化法が汎用されているが、糖鎖への 2-aminopyridine の導入は還元末端の糖を開環し、糖鎖構造を壊すだけでなく、非常に効率が悪く操作性も十分ではない。そこで、糖類に対してより汎用性が高い新たな蛍光標識導入法の開発をめざした。

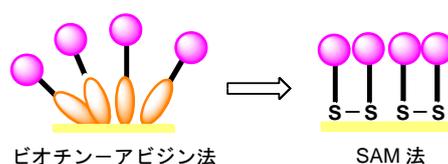
(2) 糖鎖を含有する生物活性物質に関する認

識機構の解明と創薬研究への応用

私はこれまでに、天然物である *Coyolosa* や類似のエーテル結合糖の化学合成及び活性の評価を行ってきた。その結果、エーテル結合糖にはインスリン分泌促進による血糖降下作用があることがわかったが、作用機序については未だに明らかになっていない。そこで、合成したエーテル結合糖を用いて、作用機序解明に取り組むことにした。

3. 研究の方法

(1) ①汎用されているビオチン-アビジン法と比較し、より配向性よく高密度に固定化することができる SAM 法を水溶性の糖について試みた。



糖関連化合物に適した SAM を新しく形成するために適切な長さ疎水性をもったリンカー部位及び吸着部位を設計し、糖関連化合物に導入する。はじめに、コンカナバリン A による認識機構が解明されているハイマンノース (マンノースの三糖連結体) を SAM に組み込んだ新しい機能性分子を創製し、糖鎖の認識機構解明に SAM 法が適用可能であることを示すことにした。解析法としては、ペプチドと糖との弱い結合を感知するために QCM: Quartz-crystal microbalance 法を、ペプチドの同定には PD: Phage-display 法を利用し、これらを組み合わせた新しい手法として QCM-PD-SAM 法を糖類の認識機構解明に役立つ新しい方法として確立する。また、本法によって得られたペプチド配列はフェージディスプレイ法に特化したバイオインフォマティクスツールである RELIC: REceptor Ligand Contacts Database プログラムを用いて解析を行うことにした。本プログラムは、汎用されている BLAST: The Basic Local Alignment Search Tool 解析とは異なり、ペプチド配列群での解析が可能であり、また非特異的結合性ペプチドのバイアスを取り除くことができる点が特徴である。

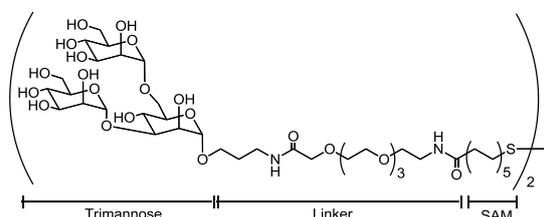
②従来の PA 化法では、糖鎖の還元末端に直接 2-aminopyridine を還元的アミノ化によって結合させ、蛍光標識を行っている。しかし、この方法では末端の糖鎖の環構造が破壊されるため、特に短い糖鎖の認識機構の解明にはふさわしくない。私は、還元末端の糖の環状構造を保ったまま蛍光標識化を行うことをめざすことにした。すなわち、あらかじめ

2-aminopyridine に水溶性の高いリンカー部位を組み込み、リンカーを介して還元末端糖鎖にグリコシル結合させる、新たな蛍光標識導入法の開発を行う。タンパク質との相互作用検出には FAC:Frontal affinity chromatography 法を応用する。まず、線虫内在性のガレクチンである Lec-6 が認識する糖鎖部位として推定されている二糖 (D-Gal-L-Fuc) について、4 位または 3 位でグリコシド結合した二糖を D-マンニトール由来のリンカーを介して 2-aminopyridine と連結させたプローブを合成する。これについては FAC 法により、ガレクチンとの相互作用を検証することにした。もし結合が予想される二糖とガレクチンとの相互作用を確認することができれば、本法の有用性を確かめられる。

(2) エーテル結合糖の血糖降下作用はグルコーストランスポーターの関与が考えられる。このため、数種類のエーテル結合糖を合成し、グルコーストランスポーターでの輸送について解析する。

4. 研究成果

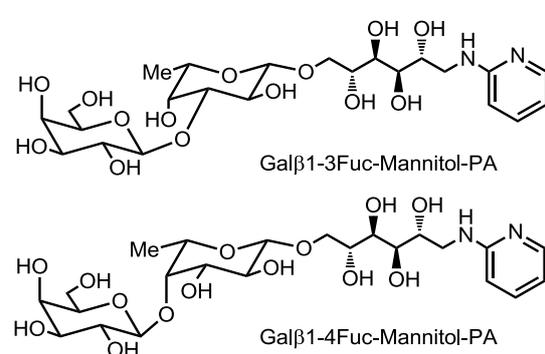
(1) ①はじめに、コンカナバリン A との認識機構が解明されているトリマンノース構造に SAM を導入した新規機能性分子を合成した。



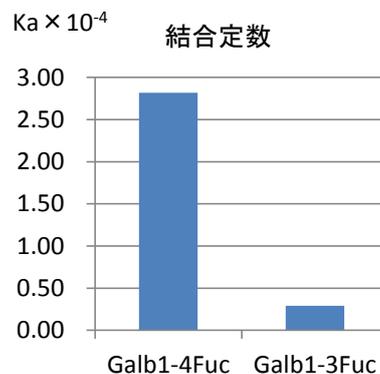
次に、本化合物を用いて、QCM-PD-SAM 法によりランダムファージライブラリーのスクリーニングを行い本化合物と相互作用する合計 7 種類のペプチド配列を同定することに成功した。RELIC プログラムを用いて、これら 7 種類のペプチド配列群とコンカナバリン A のペプチド配列との類似性を検索した結果、2 種類のペプチド配列がコンカナバリン A と類似性を示した。さらに、この 2 種類のペプチド配列は、コンカナバリン A におけるトリマンノース結合部位を含んでいた。続いて、HepG2 細胞由来の cDNA のスクリーニングを行った。その結果、合計 10 種類のペプチド配列を同定することに成功した。このうち、2 種類の結合性ファージ及びコントロールファージによるトリマンノースとの結合試験を行った結果、コントロールファージと比較して、結合性ファージはそれぞれ 1.8 倍、1.9 倍の結合力を示した。また、この 2 種類のファージが提示するペプチド配列を

固層合成しトリマンノースとの結合試験を行った結果、コントロールペプチドと比較して、いずれも 10 倍以上の結合量を示した。以上の結果より、QCM-PD-SAM 法がタンパク質の糖鎖認識機構の解明に有用であることを明らかにした。また、これまでの一般的なファージディスプレイ法では同様の作業量で得られる結合性ペプチド配列は数種類であると想定されることから、QCM-PD-SAM 法の効率性が確認できた。さらに、得られたペプチド配列に対し、RELIC プログラムでの結合部位について解析の結果、既知の結合部位と一致していたことから、本法の高精度性についても確認することができた。今後は本法を利用し、新規糖結合性タンパク質の探索を行う予定である。具体的には、線虫ガレクチンが認識する Galβ1-4Fuc 糖鎖について QCM-PD-SAM 法を用いて、結合するペプチド配列を同定することで、認識機構解明および結合タンパク質の探索を行う予定である。

②線虫ガレクチン LEC-6 が認識する GalFuc 構造の立体構造を解明するために、Galβ1-3Fuc 及び Galβ1-4Fuc に蛍光標識であるピリジルアミノ基 (PA) とマンニトールを結合させたリンカーを導入することで、還元末端の糖の環状構造を保持した蛍光標識化分子プローブの合成に成功した。



本化合物を用いてフロントアルアフィニティークロマトグラフィー (FAC) を行った。



グラフに示す通り、線虫ガレクチン LEC-6 が Gal β 1-3Fuc よりも Gal β 1-4Fuc に親和性を示したことから、線虫生体内において LEC-6 は、Gal β 1-4Fuc を含む糖鎖構造を主に認識していることが推察された。また、この結果から新たな PA 化法が短い糖鎖の解析に有用であることを示した。今後は、Gal β 1-4Fuc を様々な分子プローブへと化学変換することで、この二糖が関わるタンパク質群を同定し、ガレクチンの機能解明に取り組む予定である。

(2)数種類のエーテル結合糖を合成し、グルコーストランスポーターの通過試験を行った。その結果、グルコースの 6 位と結合しているエーテル糖のみが選択的にグルコーストランスポーターを通過することがわかった。この結果は、エーテル結合糖の血糖降下作用への関与を示唆しており、新たな糖尿病治療薬の創製に非常に重要な知見であると考えられる。

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 Kazusa Nishiyama, Atsushi Yamada, Miki Takahashi, Tomoharu Takeuchi, Ken-ichi Kasai, Susumu Kobayashi, Hideaki Natsugari, Hideyo Takahashi, Synthesis of Fluorescence-Labeled Gal β 1-3Fuc and Gal β 1-4Fuc as Probes for the Endogenous Glyco-Epitope Recognized by Galectins in *Caenorhabditis elegans*, *Chemical & pharmaceutical Bulletin*, **2010**, 58(4), 495-500, 査読有

② Takahiro Nakayama, Kazusa Nishiyama, Hideaki Natsugari, Hideyo Takahashi, Novel glycosidation of α -D-altropyranosides, *Synthesis*, **2010**, 1, 43-48, 査読有

③ Tomoharu Takeuchi, Kazusa Nishiyama, Ken-ichi Sugiura, Miki Takahashi, Atsushi Yamada, Susumu Kobayashi, Hideyo Takahashi, Hideaki Natsugari, Ken-ichi Kasai, *Caenorhabditis elegans* galectins LEC-6 and LEC-1 recognize a chemically synthesized Gal β 1-4Fuc disaccharide unit which is present in Protostomia glycoconjugates, *Glycobiology*, **2009**, 19(12), 1503-1510, 査読有

[学会発表] (計 1 2 件)

① 西山和沙, 他、線虫内在性糖鎖の分子プローブ化及び標的タンパク質の探索、第 1 3 1 回日本薬学会年会、2011 年 3 月 28 日～31 日、ツインメッセ静岡

② 西山和沙, 他、線虫ガレクチン LEC-6 による糖鎖認識機構解明のための分子プローブ

の合成及びその評価、第 5 2 回天然有機化合物討論会、2010 年 9 月 29 日～10 月 1 日、グランシップ (静岡県コンベンションアーツセンター)

③ 西山和沙, 他、線虫ガレクチン LEC-6 結合糖鎖の認識機構解明のための分子プローブの合成、第 1 3 0 回日本薬学会年会、2010 年 3 月 28 日～3 月 30 日、岡山大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 和沙 (NISHIYAMA KAZUSA)
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：40545612

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし