

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710220

研究課題名（和文）疾患・感染症関連糖鎖を認識する人工低分子レセプターの創製と細胞機能制御への応用

研究課題名（英文）Design and synthesis of artificial receptors for disease-related oligosaccharides, and their applications for controlling cell functions

研究代表者

高橋 大介（TAKAHASHI DAISUKE）

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：00509929

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、疾病関連糖鎖を選択的に認識する低分子レセプターと特定波長の光照射下、標的糖鎖を光分解することで細胞機能を制御する新たな人工生体機能分子の創製研究を行い、結核菌糖鎖を選択的に認識し、光分解することで結核菌の増殖を制御する人工生体機能分子の創製を達成した。さらに、ガン転移に関与する糖鎖を認識する低分子レセプターの創製研究を行い、今後の人工生体機能分子の開発に向けた新たな指針を得た。

研究成果の概要（英文）：Small molecules, which selectively bind to and effectively photodegrade target disease-related oligosaccharides under mild conditions, were designed and synthesized. It was found that synthesized anthraquinone (AQ)- or fullerene-boronic acid hybrids selectively bound to and photodegraded β -D-galactofuranoside, which is a sugar component of mycobacterial cell wall. In addition, it was found that photodegradation of the target oligosaccharides on the bacterial cell wall by AQ-boronic acid hybrid took place and induced significant whole-cell destruction. Furthermore, several molecules that bind to sialic acid were designed and synthesized. The results obtained from this study will contribute to the molecular design of photodegrading agents for cancer-related oligosaccharides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：糖鎖、分子デザイン、合成、ボロン酸、分子認識、低分子レセプター、結核、シアル酸

1. 研究開始当初の背景

本研究では、(1) 標的糖鎖を選択的に認識する低分子レセプターの創製と、(2) 標的糖鎖を選択的に光分解する光感受性の人工生体機能分子の創製と細胞機能制御への応用を主目的

としたが、申請時においては、糖鎖を認識する低分子レセプターの創製に関する研究は、複数報告例があり、ボロン酸を分子内に含む低分子レセプターが有力な候補分子であった。しかし、既存の分子では、認識できる糖鎖の

種類が限られていた。一方、光照射をトリガーとして、標的糖鎖を選択的に光分解する光感受性分子の創製に関する研究は、これまで国内外を通じて、所属研究室によって報告された1例のみであった。具体的には、糖鎖を光分解する低分子（アントラキノン）と特定の糖鎖を認識する高分子（レクチン：ピーナツレクチン）とのハイブリッド分子により、標的とする糖鎖（T-抗原糖鎖：Gal(β-1,3)GalNAc）を選択的に分解する光感受性分子の創製に関する研究であり、世界で最初の例であった。このことから、標的糖鎖を、選択的に光分解する生体機能分子の創製は、国内はもとより、世界的にみても極めて新しい研究領域であった。さらに本研究では、糖鎖認識部位に、高分子（レクチン）ではなく、分子の構造変換が容易な低分子を用いるため、様々な糖鎖を認識する低分子レセプターへの応用が期待でき、天然型レクチンとは一線を画したケミカルバイオロジーとしての新たなツールになると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、疾病や感染症に関与する標的糖鎖を選択的に認識する低分子レセプターの創製と、その低分子レセプターに対して、特定波長の光照射下、標的糖鎖を光分解する光感受性分子を連結したハイブリッド型分子を作成し、標的糖鎖のみを選択的に光分解することで機能発現を制御する人工生体機能分子の創製と細胞機能制御への応用を目的とした。具体的には、ガン転移に関与するシアリルルイスA (sLe^a) と結核菌の生存に必須なガラクトフラノシド (GalF) を標的糖鎖とし、これらをそれぞれ選択的に認識・光分解することでガン転移や結核菌の生存を時・空間的に制御する光感受性の人工生体機能分子の創製を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、標的糖鎖を選択的に認識する低分子レセプターの創製と、標的糖鎖を光分解する光感受性生体機能分子の創製と細胞機能制御を指向した応用研究を目的とし、以下に示す方法で研究を行った。

- (1) 疾病関連糖鎖を選択的に認識する低分子レセプターの分子デザインと化学合成
- (2) 標的糖鎖も含めた種々の糖鎖と低分子レセプターとの分子間相互作用解析による結合親和性と選択性の評価
- (3) 光感受性分子の機能発現法の確立
- (4) 低分子レセプターに対して、特定波長の光照射下、糖鎖を光分解する光感受性分子を付与したハイブリッド分子のデザインと化学合成
- (5) *in vitro* における、合成したハイブリッド分子の各種糖鎖に対する光分解効率と選択性

の評価

(6) 細胞内における、合成したハイブリッド分子の機能評価と細胞機能制御

なお、上記(2)における分子間相互作用は、蛍光法および NMR 滴定実験により解析し、結合定数を算出した。光照射下においてハイブリッド分子が産生する活性酸素種の同定と発生量の解析は、ESR を用いて解析した。また、上記(5)における糖鎖の光分解率は、HPLC を用いて定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) 結核菌の細胞壁構成糖鎖を標的とする人工生体機能分子の創製：①アントラキノーンボロン酸ハイブリッド分子の創製

本研究では、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の細胞壁に存在するガラクトフラノシド (GalF) を選択した。GalF は、結核菌の生存に必須の構成成分であり、ヒトの体内には存在しないため、新規ドラッグターゲットとして注目されている。さらに、GalF は 5 員環フラノシドで、かつ側鎖に 1, 2-ジオールを有するという構造上の特徴を有している。そこで、中性条件下、鎖状の 1, 2-ジオールと強く結合する芳香族ボロン酸が GalF に対しても高い親和性を有すると考え、フェニルボロン酸と GalF を含め数種類の単糖との相互作用解析を、蛍光法を用いて行った。その結果、フェニルボロン酸が GalF を選択的に認識することを見出した。次に、芳香族ボロン酸と、人体に害のない長波長紫外光の照射下、糖鎖を光分解することが当研究室で見出されたアントラキノーンとを連結したハイブリッド分子 **1** 及び **2** をデザイン・化学合成し(図 1)、合成したハイブリッド分子と、種々の糖鎖 **3-10** との結合定数を算出した。その結果、

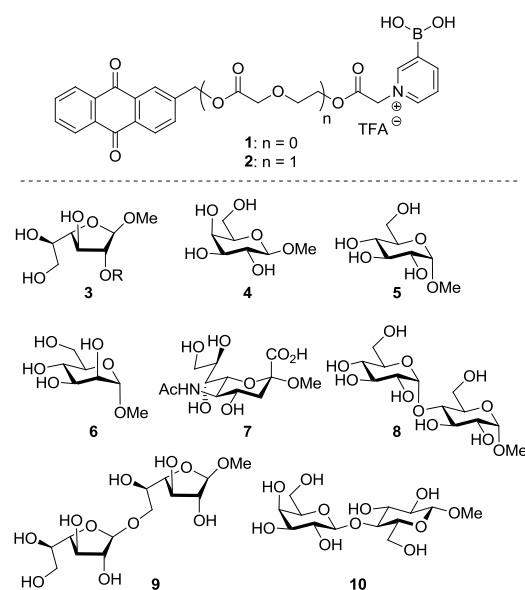


図1 アントラキノーン (AQ) -ボロン酸ハイブリッド分子と各種糖鎖の構造

ハイブリッド分子であっても標的糖鎖 *GalF* 3 及び 9 を選択的に認識することを見出した。次に、ハイブリッド分子 1 及び 2 を用いて、試験管内における各種糖鎖の光分解活性を評価した。すなわち、1 及び 2 と各種糖鎖を混合した水溶液 (pH 7.4) を調整後、サンプルより 10 cm の距離から、365 nm の長波長紫外光を 2 時間照射した。その後、各種糖鎖の光分解率を、光分解後の化合物をアセチル化またはシリル化し、HPLC で分析することにより算出した。その結果、1 及び 2 は、光照射依存性的かつ標的糖鎖選択的に *GalF* 3 及び 9 を光分解することを見出した。以上の結果より、糖鎖光分解の選択性と親和性には、正の相関があることを明らかにした。

続いて、標的糖鎖を有する結核菌 (*M. bovis*: BCG) を用いて、光照射下における抗菌活性について検討した。すなわち、1 及び 2 をそれぞれ結核菌に対して投与した後、菌より 40 cm の距離から、長波長紫外光 (30 W) を 5 分間照射した。抗菌活性は、光照射した後に、培地中で 3 週間培養し、結核菌のコロニー数 (CFU) を測定することにより評価した。その結果、1 及び 2 は、光照射下、結核菌の CFU を濃度依存的に減少させることを見出した。さらに、1 を結核菌に投与し、光照射を行った後の様子を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、結核菌の細胞壁が選択的に分解していることを見出した。次に、標的糖鎖を細胞壁に有さない黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を用いて、同様の抗菌試験を行った。その結果、BCG 菌に対して顕著な抗菌活性を示した 1 及び 2 は、*S. aureus* に対しては抗菌活性を示さないことを見出した。以上の結果から、本研究においてデザイン及び合成したハイブリッド分子が、標的糖鎖を選択的に光分解し、結核菌の増殖を効果的に抑制する人工生体機能分子であることを明らかにした (図 2)。

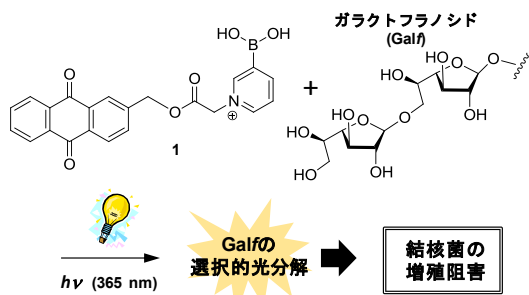


図 2 AQ-ボロン酸ハイブリッド分子を用いた *GalF* の光分解と抗結核菌作用

② フラーレン-ボロン酸ハイブリッド分子の創製

本研究では、これまで光照射で用いてきた長波長紫外光よりも光毒性が低く、かつ、光透過性の高い可視光の照射下、標的糖鎖を選

択的に光分解する人工生体機能分子の創製を目的とし、光感受性分子としてフラーレンに着目した。すでに当研究室では、ある種のフラーレン誘導体が可視光照射下、タンパクを効果的に光分解することを見出しており、糖鎖の光分解も可能ではないかと考えた。そこで、フラーレンに対して包接能を有することで知られる γ -シクロデキストリン (γ -CD)(12)を用いて、長波長紫外光または可視光の照射下における光分解活性を評価した。すなわち、フラーレン誘導体 11 及び γ -CD(12)を混合した水溶液 (pH 7.4) を調整後、サンプルより 10 cm の距離から、365 nm の長波長紫外光または可視光を 2 時間照射した。その後、12 の光分解率を、HPLC 分析により算出した。その結果、フラーレン誘導体 11 が、長波長紫外光のみならず可視光照射下においても、12 を効果的に光分解することを初めて見出した。

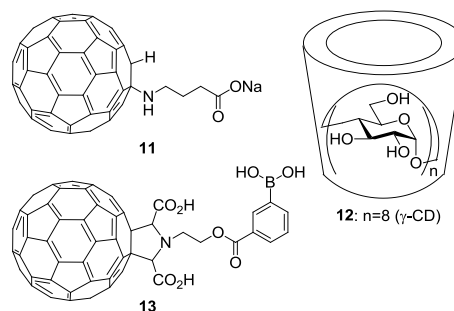


図 3 フラーレン誘導体、フラーレン-ボロン酸ハイブリッド分子及び γ -シクロデキストリンの構造

次に、*GalF* を標的とし、フラーレン-ボロン酸ハイブリッド 13 をデザイン、化学合成した (図 3)。さらに、ハイブリッド 13 と各種糖鎖 3-10 との結合定数を ^{11}B NMR 滴定実験により算出したところ、標的糖鎖 *GalF* に対して選択的に結合することを見出した。また、ハイブリッド 13 の各種糖鎖に対する光分解活性を評価した。すなわち、13 と各種糖鎖を混合した水溶液 (pH 7.4) を調整後、サンプルより 10 cm の距離から、可視光を 2 時間照射した。その後、各種糖鎖の光分解率を、光分解後の化合物をアセチル化し、HPLC で分析することにより算出した。その結果、1 及び 2 は、光照射依存性的かつ標的糖鎖選択的に *GalF* 3 及び 9 を光分解することを見出した。以上の結果より、糖鎖光分解の選択性と親和性には、正の相関があることを明らかにした。結果、可視光照射下、標的糖鎖である *GalF* を選択的に光分解することを見出した (図 4)。

最後に、ハイブリッド分子 13 が光照射によって産生する活性酸素種の同定と発生量を、ESR を用いて解析した。その結果、13

は、活性酸素種の中でも、特にスーパーオキシドを産生することを明らかにした。

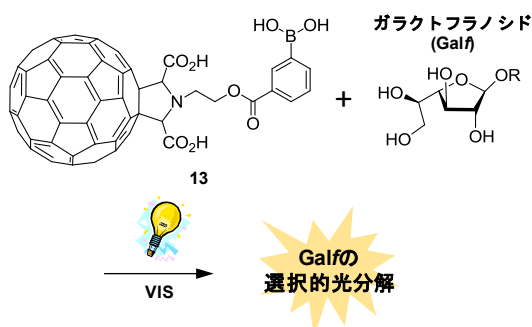


図4 フラーレン-ボロン酸ハイブリッド分子を用いた可視光照射下におけるGalの光分解

(2) がん転移関連糖鎖を認識する人工低分子レセプターの創製

本研究では、ガン細胞に過剰発現し、ガン細胞の転移に深く関与するシアル酸含有糖鎖（ガングリオシド）を標的糖鎖とし、これに選択的に結合する低分子レセプターの開発研究を行った。まず、基礎研究として、ガングリオシドの共通構造であるシアル酸を認識する低分子レセプターの開発に着手した。すなわち、シアル酸のグリセロール側鎖と結合可能な芳香族ボロン酸と、シアル酸のカルボキシル基とイオン結合可能なグアニジノ基とを、長さが異なるスペーサーで連結した低分子レセプター**14-17**をデザイン・合成した（図5）。

次に、合成した**14-17**とシアル酸との結合定数を¹¹B NMR 滴定実験によりそれぞれ算出したところ、化合物**14**および**15**のシアル酸に対する結合定数が、グアニジノ基を有さないフェニルボロン酸(PBA) (**18**)に比べて、2-3倍程度向上することを見出した。以上により、今後のガングリオシドを標的とした人工生体機能分子の開発に向けた新たな指針を得た。

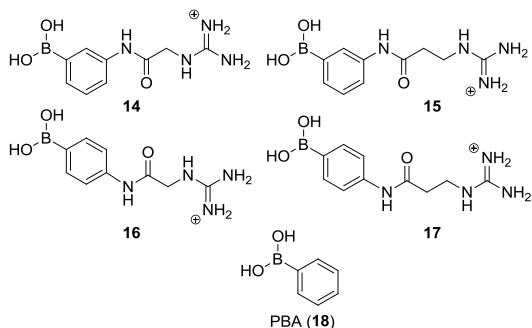


図5 ボロン酸-グアニジンハイブリッド分子の構造

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 D. Takahashi, K. Toshima, Target-selective photodegradation of oligosaccharides by a fullerene-boronic acid hybrid upon visible light irradiation, *Chem. Commun.* **47**, 11712-11714 (2011). (査読有)
- ② D. Takahashi, S. Hirono, K. Toshima, Target-selective photodegradation of oligosaccharides by a fullerene-boronic acid hybrid upon visible light irradiation, *Chem. Commun.* **47**, 11712-11714 (2011). (査読有)
- ③ D. Takahashi, S. Hirono, C. Hayashi, M. Igarashi, Y. Nishimura, K. Toshima, Target-selective photodegradation of oligosaccharides by light-activated small molecules, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 10096-10100 (2010). (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

- ① D. Takahashi, S. Hirono, K. Toshima, Target-selective photodegradation of oligosaccharides by light-activated small molecules, MDF International Workshop: Open-shell Organic Molecules –Synthesis and Electronic Structure Freedom– ; "New Frontier of Materials Science Opened by Molecular Degree of Freedom", October 7, 2011, Osaka.
- ② D. Takahashi, S. Hirono, C. Hayashi, M. Igarashi, Y. Nishimura, K. Toshima, Development of an innovative method for target-selective photodegradation of oligosaccharides by light-activated small molecules. The 31th Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [II], September 14, 2011, Sapporo.
- ③ 廣野 信悟、高橋 大介、戸嶋 一敦、フラーレン-ボロン酸ハイブリッドによる標的糖鎖の選択的光分解、日本化学会第91春季年会、平成23年3月27日、神奈川大学
- ④ 高橋 大介、廣野 信悟、林 千草、五十嵐 雅之、西村 吉雄、戸嶋 一敦、結核菌の構成糖鎖を選択的に光分解する光感受性人工生体機能分子の創製、GlycoTOKYO2010 シンポジウム、平成22年11月27日、東京大学本郷キャンパス
- ⑤ D. Takahashi, S. Hirono, C. Hayashi, M. Igarashi, Y. Nishimura, K. Toshima, Target-selective photodegradation of oligosaccharides by light-activated small molecules. 25th International Carbohydrate Symposium, August 2, 2010, Chiba.
- ⑥ 高橋 大介、廣野 信吾、戸嶋 一敦、標的

糖鎖を選択的に光分解する生体機能分子の有機合成化学的創製 ～アントラキノ
ン-ボロン酸ハイブリッドによる結核菌糖鎖の光分解～、第 97 回有機合成シンポ
ジウム、平成 22 年 6 月 18 日、慶應義塾
大学薬学部芝共立キャンパス

- ⑦ 廣野 信悟、林 千草、五十嵐 雅之、西村
吉雄、高橋 大介、戸嶋 一敦、アントラ
キノン-ボロン酸ハイブリッドによる標
的糖鎖の選択的光分解と抗結核菌作用、
日本ケミカルバイオロジー学会 第 5 回
年会、平成 22 年 5 月 18 日、慶應義塾大
学日吉キャンパス

[その他]

ホームページ等

<http://www.applc.keio.ac.jp/~toshima/takahashi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 大介 (TAKAHASHI DAISUKE)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：00509929

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし