

令和元年9月3日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01823

研究課題名(和文)筋ジストロフィー治療のためのバイパス糖鎖の合成研究

研究課題名(英文) Synthetic study of bypass-like glycans as therapeutic agent for muscular dystrophy

研究代表者

田村 純一 (TAMURA, Jun-ichi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30221401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は糖鎖異常型筋ジストロフィー治療を目的として、ラミニンとの親和性によってラミニンと効果的に結合できるバイパス糖鎖を合成するため、マトリグリカンを構成するオリゴ糖鎖を化学合成し、天然物の構造が正しいことを有機合成化学的に証明した。一方、マトリグリカンの還元側に位置するキシロシルリビトールリン酸を位置及び立体選択的に化学合成し、天然物の構造決定を検証するとともに、マトリグリカンの酵素的伸長のプライマー候補を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖異常型筋ジストロフィーは、基底膜上のラミニンと細胞膜上のジストログリカンを連結する糖鎖(マトリグリカン:MG)が正常に生合成されないため発症する有効な治療方法のない難病である。本研究ではMGの構成オリゴ糖の化学合成に成功した。一方、MGの還元側に位置するキシロシルリビトールリン酸の合成にも成功し、天然物の構造決定を検証するとともに、MGの酵素的伸長のプライマー候補を得た。MGの化学的再構築によりバイパス化合物の合成に道筋をつけた。この化合物が糖鎖医薬として実証されれば、ポスト遺伝子治療として医学薬学的に大きな波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Matriglycan strongly interacts with laminine to form muscular tissue. In this study, the oligosaccharide which composes matriglycan was chemically synthesized and we clarified the facile structure. In addition, we regio- and stereoselectively synthesized xylosyl ribitolphosphate which locates at the reducing side of matriglycan at the first time. NMR data of the chemically synthesized compound was compatible with those of natural product. The xylosyl ribitolphosphate will be a primer of the enzymatic glycan elongation to form bypass-like glycans as therapeutic agent for muscular dystrophy.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：ジストログリカン バイパス糖鎖 糖鎖合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーの一種である「糖鎖異常型筋ジストロフィー」は、糖タンパクである「ジストログリカン」の生合成異常によって引き起こされ、筋細胞の傷害をはじめ、脳奇形や精神発達遅滞などの中枢神経障害を伴う。最近の研究により「ジストログリカンの糖鎖異常」が、糖鎖異常型筋ジストロフィーの原因であることがわかってきた。図1に示すように、ジストログリカンは膜貫通型タンパクで、細胞外ではその糖鎖部分がラミニンと結合して基底膜につながり、細胞内ではジストロフィンを介して細胞膜と細胞骨格をつなぎとめており、これにより筋細胞膜の物理的強度が保たれている。ジストログリカンに結合している糖鎖のうち、ラミニンと親和性のある糖鎖部分をポストリン酸糖鎖と呼ぶ。ポストリン酸糖鎖は α -キシロースと β -グルクロン酸からなる二糖の繰返し(マトリグリカン)であると提唱されていた(Inamori, K. et al., *Science*, 2012)が、本課題開始当初に詳細構造はまだ明らかでなかった。

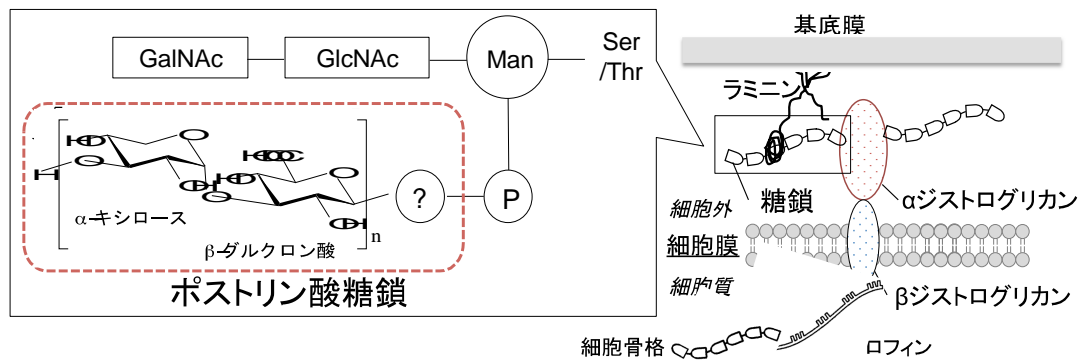


図1

その後、ポストリン酸糖鎖を含む Ser/Thr 以降の全体構造が金川らにより提唱され(Kanagawa, M. et al., *Cell Rep.*, 2016) 図2のようにリピートリン酸を介してマトリグリカンが伸長する *O*-マンノシルグリカンが形成されていると報告された。

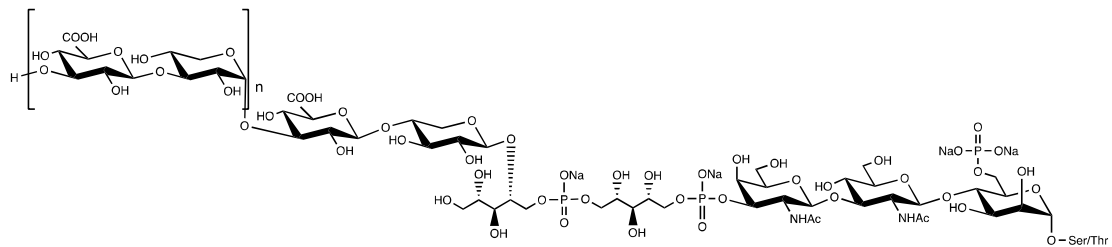


図2

糖鎖異常型筋ジストロフィーは *O*-マンノシルグリカンの生合成異常に起因する。関連する糖鎖生合成酵素を規定する遺伝子の改善が有望視されているが、関与する遺伝子の種類は多く、過剰発現した場合には病状が悪化することも報告されており、遺伝子治療は容易ではない。

筋ジストロフィーは筋細胞膜の糖鎖異常による損傷が引き金となり、筋細胞を取り巻く筋衛星細胞が筋前駆細胞を活性化することで筋細胞の再生を図ろうとする。このようにして起こる筋前駆細胞の枯渇が病状を悪化させる。連携研究者である金川らの先行実験によると、糖鎖合成にかかるフクチン遺伝子の変異型をノックインしたマウスを使用した場合、ジストログリカン上の正常糖鎖が残存していれば、発症に至らなかったことが判明している。つまり、細胞膜と基底膜をつなぐことができれば、筋細胞の損傷に歯止めがかかり、発症を押さえることができると考えた。

2. 研究の目的

今回我々は、ジストログリカン上でラミニンと結合しているマトリグリカンを再構築し、糖鎖とラミニンと結合させる一方、糖鎖の末端でジストログリカンと結合させる「バイパス糖鎖の作成」を考案した。このような糖鎖合成を行った先行例は皆無である。バイパス糖鎖の概念を図3に示す。糖鎖異常型筋ジストロフィーは糖鎖の生合成不全に起因する。ラミニンとジストログリカンをつなぐ「バイパス糖鎖」で基底膜と細胞膜を再びつなぐことを試みる。

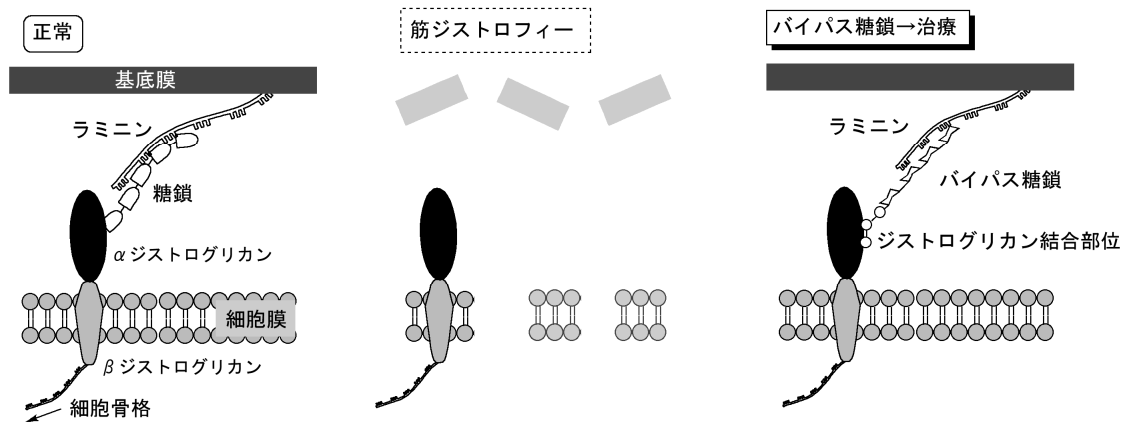


図 3

糖鎖の分解酵素抵抗性、柔軟性、ラミニンへの特異的結合性があることを考慮すると、バイパスに使用する分子の原型はマトリグリカンになる。糖鎖結合ドメインがタンパクであることを考えると、長い糖鎖構造の全てを正確に認識しているとは考えにくい。また、糖鎖と結合するドメインはタンデム型に配置されていると考えられるので、結合には必ずしも長い糖鎖が重要ではなく、短くても糖鎖本数を増やすことで解決できると考えた。

3. 研究の方法

(1) 「ポストリン酸糖鎖 (マトリグリカン) の化学的再構築を行い、バイパス化合物としての機能を検証する」

本研究では、キシロースとグルクロン酸からなる二糖が繰返し縮合した構造をもつマトリグリカンを原型とするバイパス糖鎖の化学的構築を行う。分子型には、糖鎖とラミニンとの結合活性を重視して、直鎖オリゴ糖やクラスター型糖鎖を選択する。ラミニンとの結合活性の測定では、ELISA 等により糖鎖長や集積密度の最適化を検討するため、糖鎖の還元末端には他分子との結合を可能にする自由度の高い官能基を装着させる。

(2) 「ポストリン酸糖鎖 (マトリグリカン) の二糖ユニットの化学的再構築を行う」

バイパス糖鎖中心部は、キシロースとグルクロン酸からなる二糖を繰返し縮合したオリゴ糖である。オリゴ糖合成にあたって、アノマー (糖の 1 位) 炭素の立体制御が問題となる。合成のポイントを下にまとめた。

立体制御が難しい α Xyl 結合は、Xyl 2 位水酸基に隣接基関与能のない保護基を装着し、アノマーの立体を制御する。

GlcA 2 位水酸基に隣接基関与能のある保護基を導入し、選択的な β 結合の形成を可能にする。二糖ユニットの還元末端と非還元末端は、それぞれ *p*-メトキシフェニル基とアリル基等で保護し、オルソゴナルに除去できるようにする。

(3) 「ポストリン酸糖鎖 (マトリグリカン) の二糖ユニットのオリゴマー化を行う」

二糖ユニットが合成できれば、それらの逐次的な縮合によりオリゴマー化を進める。20 糖 (10 回繰返し) までの合成を目標とする。途中の短鎖類縁体もライブラリーとして保存し、鎖長の違いによる結合能の違いの検証に使用する。

4. 研究成果

(1) 二糖を繰返し単位として初めに合成し、その二糖単位間の縮合による糖鎖伸長を行った。

繰返し二糖単位構成糖である Xyl と GlcA を適切な保護基を装着した単糖前駆体として合成した。この二糖を二糖供与体と二糖受容体に誘導し、互いに縮合することで、立体選択的かつ位置選択的に結合した目的四糖を得ることができた。

この四糖は完全に脱保護することができ、当該オリゴ糖の最初の合成に成功した。これによりオリゴマー化の道を拓くことができた。

(2) 一方、マトリグリカンは、その還元側に位置するリビトールリン酸二量体を介してジストログリカンと結合している。本研究ではキシロシルリビトールリン酸を位置及び立体選択的に化学合成し、天然物の構造決定を検証するとともに、マトリグリカンの酵素的伸長のプライマー候補を得ることに成功した (図 4)。

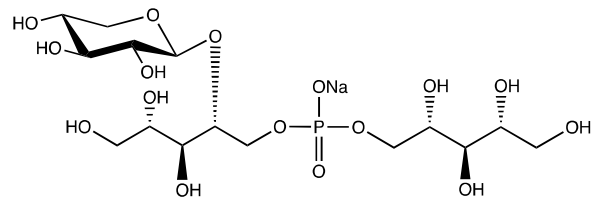


図 4

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Miharu Shida, Tadahisa Mikami, Jun-ichi Tamura, and Hiroshi Kitagawa, Chondroitin sulfate-D promotes neurite outgrowth by acting as an extracellular ligand for neuronal integrin $\alpha V\beta 3$. *Biochimica. Biophysica Acta General Subjects*, 1863 (9), **2019**, 1319-1331. (査読有) DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.06.004

Kazuma Sakamoto, ・ ・ Hiroshi Kitagawa, ・ ・ Jun-ichi Tamura (15 人中 13 番目), Shang-Cheng Hung, and Kenji Kadomatsu, Glycan sulfation patterns define autophagy flux at axon tip through PTPR σ -cortactin axis. *Nature Chemical Biology*, 15 (7), **2019**, 699-709. (査読有) DOI: 10.1038/s41589-019-0274-x

Naoko Takeda-Okuda, ・ ・ Yoshinao Z. Hosaka, Kenji Kadomatsu, Shuhei Yamada, and Jun-ichi Tamura (10 人中 10 番目), Compositional analysis of glycosaminoglycan family in velvet antlers of Sika deer (*Cervus nippon*) at different growing stages. *Glycoconjugate Journal*, 36 (2), **2019**, 127-139. (査読有) DOI: 10.1007/s10719-019-09859-1

Takahiro Tamura and Jun-ichi Tamura, Regio- and stereo-controlled synthesis of β -Xyl(1-4)Rbo-5P1-Rbo, the partial structure of *O*-mannosyl glycan. *Tetrahedron Letters*, 60, **2019**, 465-468. (査読有) <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.12.065>

Jun-ichi Tamura, Facile Synthesis of Biofunctional Oligosaccharides of Chondroitin Sulfate. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 61 (5), **2018**, 239-245. (査読有) DOI: doi.org/10.1627/jpi.61.239

〔学会発表〕(計 13 件)

田村敬裕ほか, *O*-マンノシルグリカンの部分構造, Xyl β 1-4Rbo1-P-5Rbo の合成, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 東京, 2019 年 (口頭発表) .

Takahiro Tamura et al., Synthesis of Xyl β 1-4Rbo5P, partial structure of *O*-mannosylglycan, 日韓合同国際シンポジウム (AFELISA) 2018 年度大会, (春川, 韓国), 2018 (Oral presentation) .

田村敬裕ほか, *O*-マンノシルグリカン部分構造; β Xyl(1-4)Rbo5P の合成, 第 37 回日本糖質学会年会, 仙台, 2018 年 (ポスター発表) .

Jun-ichi Tamura et al., ANALYTICAL STUDY OF CHONDROITIN SULFATE IN DEER ANTLER. *XXth International Carbohydrate Symposium*, Lisbon (Portugal), 2018 (Oral presentation) .

Takahiro Tamura et al., SYNTHESIS OF Xyl β 1-4Rbo, PARTIAL STRUCTURE OF *O*-MANNOSYLYCAN. *XXth International Carbohydrate Symposium*, Lisbon (Portugal), 2018 (Flash communication; oral presentation).

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 田村 敬裕

ローマ字氏名: (TAMURA, takahiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。