

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590011
 研究課題名（和文）寄生・宿主相互作用解明を指向した糖鎖の化学合成
 研究課題名（英文）Chemical syntheses of oligosaccharides to elucidate host-parasite interactions
 研究代表者
 羽田 紀康（HADA NORIYASU）
 慶應義塾大学・薬学部・准教授
 研究者番号：70296531

研究成果の概要（和文）：

近年、細胞表層に存在する糖タンパク質や糖脂質などの糖鎖が細胞間の認識現象に深く関与する分子種であることが明らかとなり、特に高等動物より見出された糖鎖の化学的、生物学的研究が盛んに行われている。一方、無脊椎動物より見出された糖鎖構造はほ乳類の糖鎖構造とは大きく異なっているが、単離・構造決定にとどまり機能解明にまで至っていない。そこでこれら無脊椎動物由来の糖鎖構造と生物機能に興味を持ち、化学合成を行うことで機能解明を目指している。今回、寄生虫であるエキノコックス、マンソン住血吸虫、ブタ回虫、イヌ回虫及び接合菌より見出された糖鎖の化学合成を行い、20種類以上の目的化合物を得た。

研究成果の概要（英文）：

The oligosaccharide residues of glycoprotein and glycosphingolipids in mammalian tissues have been extensively studied for various biological recognition in recent years. In contrast, much less time has been devoted to structures of oligosaccharides from invertebrates that differ significantly from mammalian glycans. Due to these differences in the glycan structure we have been interested in the relationships between the structure and biological activity of oligosaccharides from invertebrate species, and in our continuing studies to elucidate the mechanism of host-parasite interaction. We carried out the synthesis of oligosaccharides from the helminth, *Echinococcus multilocularis*, *Ascaris suum*, *Schistosoma mansoni* and Zygomycetes species *Mucor hiemalis*, and got target oligosaccharides more than twenty kinds.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：糖鎖合成、宿主・寄生相互作用、糖脂質、糖タンパク質、寄生虫、糸状菌

1. 研究開始当初の背景
 細胞表層の糖鎖は、植物・動物を問わず細胞

の認識伝達に様々な形で関与していることが示唆されている。高等動物、特に人の複合

糖質に関する研究が発展していく中で、我々はそれとは違うユニークな構造を持った無脊椎動物から見出された糖脂質や、薬理活性を持つ植物の多糖体に注目し、それらの生物機能解明のため全合成あるいはモデル合成を行ってきた。無脊椎動物由来の糖脂質を化学合成の立場から研究する機関は国内外見渡しても類を見ず、少なからず注目を受けている。これまでの成果として以下のことがあげられる。1)世界中で重篤な感染症を引き起こし問題となっている寄生虫の1つであるエキノкокスの診断に関する研究は、エキノкокス寄生虫の持つタンパク抗原と血清との相関に関する報告はあるものの、糖鎖抗原を用いた研究はこれまで皆無であった。我々はエキノкокス由来の糖脂質に着目し、その全合成を成し遂げ患者血清との相関を調べたところ健常人と比べ顕著な差が見られ、抗原性を有することを突き止めた。また、ブタ回虫やフトミズなどから見出されたホスホコリンを含有する糖脂質には、IL1や IL-6 などのサイトカイン誘導活性を有している報告があり、合成化合物においては新たにヒスタミン遊離阻害活性や IL-8,12 など別のサイトカイン誘導活性も見出してきた。一方植物由来の多糖体には、Bリンパ球幼若活性や腸管免疫調節活性を持つものがあり、そのモデル化合物を合成しその活性を検定するとともに、これらの活性増強を目指して新しいタイプの糖クラスターの開発を行ってきた。更に、最近、微生物由来の病原体特異的成分が、ヒトの免疫応答機構において重要な役割を果たすことが明らかになってきており、*Acremonium* 属糸状菌及び *Mucor* 属など接合菌類の新規スフィンゴ糖脂質の単離、構造決定を報告してきた。そこでこれらの経験をふまえ、本研究では、以下の研究に着手した。

2. 研究の目的

(1) 接合菌類 *Mucor hiemalis* 由来の糖脂質 : 微生物由来の病原体特異的成分が、ヒトの免疫応答機構において重要な役割を果たすことが明らかになってきており、*Mucor* 属の接合菌類の新規スフィンゴ糖脂質の単離、構造決定を報告してきたので、本研究では、これらを合成し(Fig. 1)、喘息やアレルギーなどの真菌症を誘発する機能の解明を目的とした。真菌症に対する治療薬は様々な副作用を引き起こすほか、高頻度で耐性菌を発生させることが報告されている。そのため、病原性真菌に対する有効な抗真菌薬の選択肢は十分であるとはいえず、より有用性の高い新たな抗真菌薬の開発が望まれている。

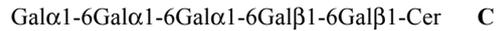
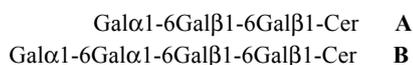


Fig. 1

(2) エキノкокス *Echinococcus multilocularis* 由来の糖タンパク質 : *Echinococcus multilocularis* の血清診断に利用される抗原には Em18、EmA9、Em2 などがあり、このうち Em2 は Gal β (1-3)GalNAc を核として分岐したムチン型の糖鎖を持った糖タンパク質構造をとっていることが判明している。本研究ではアノマー位に 2-(trimethylsilyl) ethyl 基を導入したモデル化合物 **A** から **F** (Fig. 2) の全合成とその効率的な合成方法の構築を目指すと共に、糖鎖部分の抗原性を検討することを目的とした。



Fig. 2

(3) マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* 由来の糖脂質 : これまでは主に回虫や条虫の糖脂質に着目してきたが、新たに吸虫にも視点を当てた。すなわちマンソン住血吸虫よりこれまでの糖脂質とは全く異なった scisto コア構造(GalNAc β 1-4Glc β 1-Cer)を持つ糖鎖構造が報告され、これらを合成することで、その活性の解明と診断薬への応用を検討する。(Fig. 3) また、マンソン住血吸虫のセルカリア幼虫期には、Le^x 抗原構造や擬似 Le^y 抗原構造が存在し、抗原性に富むことがわかっている。そこでこれらの患者血清への抗原性を調べる目的で、比較的短い糖鎖は脂質を含んだ全合成を、又、長い糖鎖は非還元末端の数糖に絞って合成した。

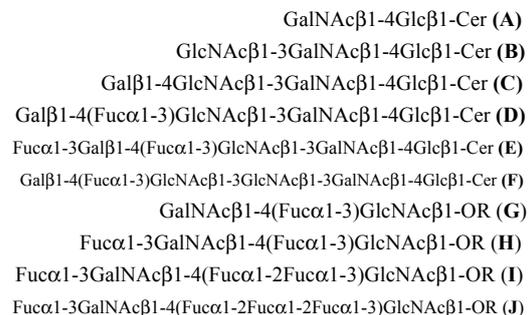


Fig. 3

(4) ブタ回虫 *Ascaris suum* 由来の糖脂質 : これまでにブタ回虫より見出されたホスホコリン含有糖脂質 (PC 糖脂質) のうち PC \rightarrow 6GlcNAc β 1 \rightarrow 3Man β 1 \rightarrow 4Glc β 1-ceramide

の糖鎖合成を行い、各種サイトカインへの影響を調べてきた。一方、ブタ回虫とイヌ回虫の鑑別診断がタンパク抗原では困難とされており、ブタ回虫の糖鎖にその抗原性が期待されることから、今回は、ブタ回虫由来のホスホコリンを含まない非還元末端側のオリゴ糖 (**Fig. 4; A~E**)を合成することで鑑別診断の向上に貢献できることを期待して合成に着手した。

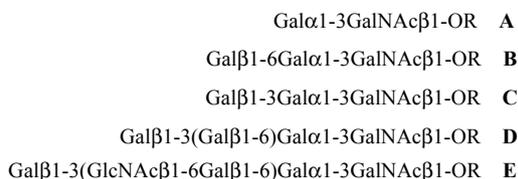


Fig. 4

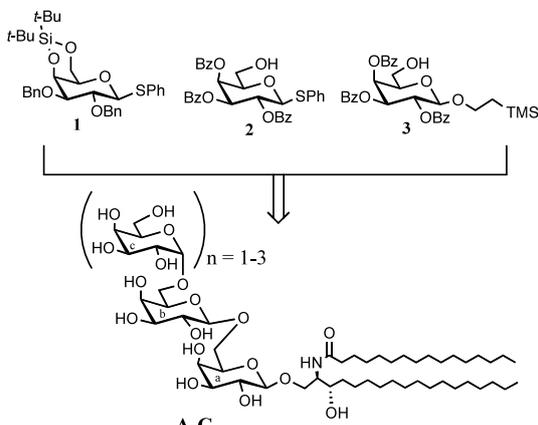
(5) イヌ回虫 *Toxocara canis* 由来の糖タンパク質：イヌ回虫より見出された糖タンパク質糖鎖は、高等動物では見られないメチル糖を含んでおり珍しい構造を有している。(Fig. 5) この糖鎖及びメチル基のない誘導体を合成し、イヌ回虫患者血清に対する抗原性を調べることにした。



Fig. 5

3. 研究の方法

(1) 接合菌類 *Mucor hiemalis* 由来の糖脂質：ガラクトースのみから成る三、四、五糖糖脂質は適切な保護基で保護した単糖誘導体 (**1-3**)を順次縮合することで糖脂質 **A-C** を系統的に合成した。(Scheme 1)



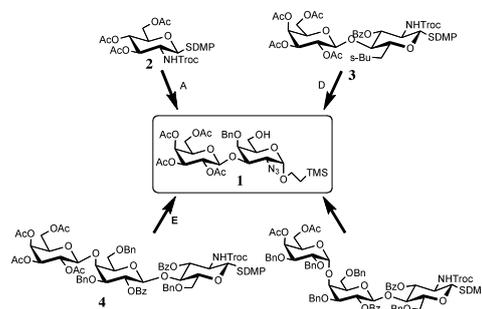
Scheme 1

(2) エキノコックス *Echinococcus multilocularis* 由来の糖タンパク質：

①モデル化合物 **A, D, E, F** の合成

Fig.2 において、モデル化合物 **A, D, E, F** は共通して Gal β 1-3GalNAc からなるコア構造の GalNAc の 6 位に糖鎖が結合した分岐構造をとっている。そこで 6 位を水酸基遊離とした Gal β 1-3GalNAc を共通の糖受容体(**1**)とし、そ

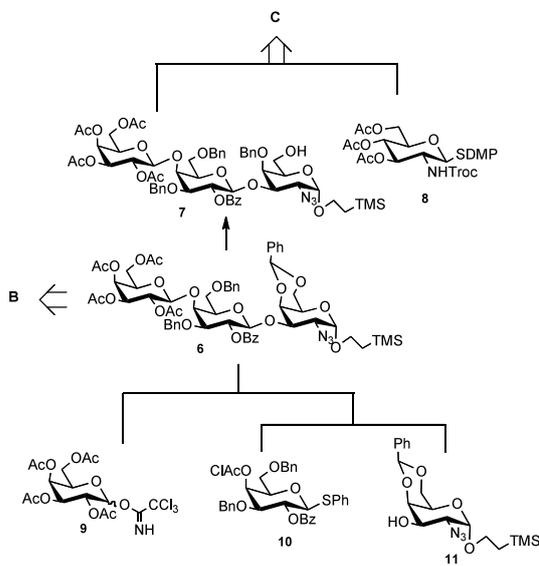
れぞれ適切な単糖、二糖、三糖供与体(**2,3,4,5**)を縮合させるブロック合成によりモデル化合物の合成を目指し、4 種類の糖鎖合成を完了した。(Scheme 2)



Scheme 2

②モデル化合物 **B, C** の合成

モデル化合物 **B** は直鎖状の糖鎖であり、モデル化合物 **C** はモデル化合物 **B** の GalNAc の 6 位に GlcNAc が結合した形をとっている。したがって、GalNAc の 4,6 位をベンジリデン基で保護した単糖受容体 **11** に、**10** 及び **9** を順次縮合させモデル化合物 **B** の誘導体 **6** をステップワイズに合成した後、糖受容体 **7** とし、GlcNAc 供与体 **8** を縮合することでそれぞれのモデル化合物 **B** 及び **C** の合成を完了した。(Scheme 3)

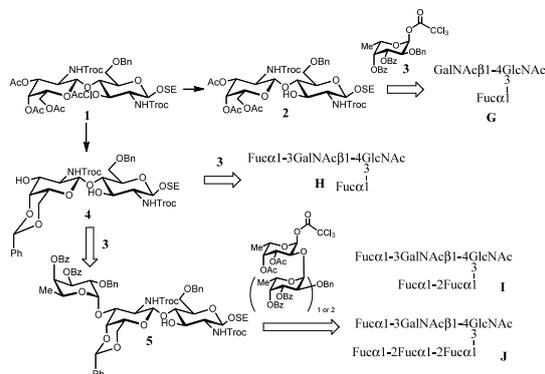


Scheme 3

(3) マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* 由来の糖脂質：

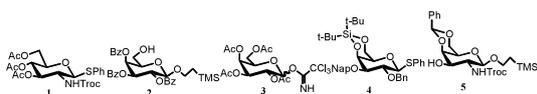
本研究では、住血吸虫症の診断薬の開発と、住血吸虫感染時における宿主の免疫応答の変化を探索する目的で、マンソン住血吸虫より見出された新規な糖脂質を合成した。これまでに Fig.3 の糖脂質 **A~D** の全合成が完了してきた。一方、非還元末端側の糖鎖合成は **Scheme 4** に示すように、コア

となる二糖誘導体 **1** を糖受容体である **2** 及び **4** に変換し、各種フコース誘導体を縮合、脱保護を行うことにより **G, H, I** まで導いた。現在 **5** とトリフコース供与体との縮合を検討している。

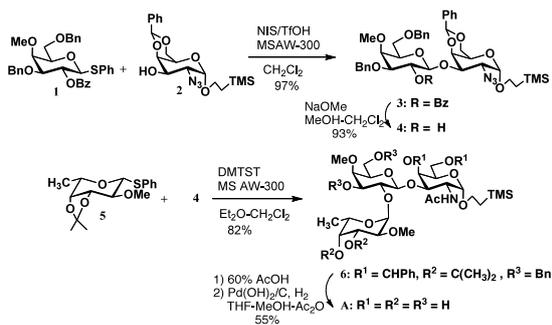


Scheme 4

(4) ブタ回虫 *Ascaris suum* 由来の糖脂質 : Fig.4 に示したオリゴ糖鎖について、**A~D** は下記に示した単糖誘導体を **5**→**2** へ順次ステップワイズな方法で糖鎖伸長させ、**E** については直鎖三糖に、**1** 及び **2** を用いてあらかじめ調製した二糖供与体を縮合するブロック合成により目的化合物に導いた。



(5) イヌ回虫 *Toxocara canis* 由来の糖タンパク質 : Fig.5 に示したオリゴ糖鎖は、単糖誘導体合成の段階でメチル化し、Scheme 5 に示したように順次縮合することで三糖体を構築した。



Scheme 5

さらにこれらのアナログ体として、ガラクトースのメチル基がないもの、フコースのメチル基がないもの、両方のメチル基がないものなどもあわせて合成した。

4. 研究成果

(1) 接合菌類 *Mucor hiemalis* 由来の糖脂質 : これら糖脂質の合成途上のポイントは、非還

元末端側の α -ガラクトシド結合構築である。一般的に 6 位水酸基への α 体構築は困難であり、立体異性体である β 体がかかり生成する。この問題を解決するために糖供与体の 4,6 位保護基に 4,6-*O*-di-*tert*-butylsilylene (DTBS) 基を用い、さらに 2, 3 位水酸基の保護にベンジル基を用いることで、完全な α 選択性を高収率で得ることができた。これらの糖脂質は、ヒトにはその生合成系路が存在せず、これらを合成することは抗真菌薬の選択毒性ターゲットとして期待できる。

(2) エキノкокクス *Echinococcus multilocularis* 由来の糖タンパク質 : *Echinococcus multilocularis* から見出された糖鎖構造はムチン型タイプ II をコアとしているがアノマー位の立体配置は報告されていない。そこで今回は推定構造として合成してきた。合成において、糖供与体の頻用脱離基であるチオフェニル基を持つ糖受容体とトリクロロアセトイミダート基を持つ糖供与体の縮合では、アグリコトランスファーが起こり収率の低下が見られたが、チオフェニル基より脱離能の低い 2, 6-ジメチルチオフェニル基を用いて縮合することで副生成物なしに合成でき、さらにこれまでに行われていない三糖供与体の脱離基としても使用可能であることを見出した。6 種類の合成化合物の患者血清に対する抗原性は、予想に反して顕著な結果を示さず、推定構造の間違い及び、還元末端側の保護基であるトリメチルシリルエチル基の ILISA プレートへの吸着力に問題があると考えた。ごく最近、Em2 抗原の糖鎖構造に関する新たな報告があり、アノマー位の推定構造が報告された。現在、これに基づき再度合成を試みているとともに、還元末端側の保護基をビオチンプローブに置き換えて検討している。

(3) マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* 由来の糖脂質 : *Schistosoma mansoni* から見出された糖鎖構造は、これまでどの生物からも報告されていない新規なコア構造を持つ糖脂質群であり、これらの全合成は生物機能解明のツールに期待できるとともに、構造上の観点からも興味深く、まず、二、三、四糖糖脂質である **A-C** を全合成し、学術雑誌に報告した。また、同時に住血吸虫症患者血清との相関を調べた。しかしこれら比較的糖鎖数の少ないオリゴ糖では抗原性を示さなかった。今後合成が達成される長い糖鎖構造に抗原性の期待がかかる。

(4) ブタ回虫 *Ascaris suum* 由来の糖脂質 : *Ascaris suum* 由来の糖脂質はこれまでに 20 種類以上報告がなされているが、化学的合成が行われたのは我々が行った三、四糖糖脂質の

みである。ブタ回虫及びブイヌ回虫感染における鑑別鑑別を目的とした糖鎖合成において、今回 Fig.4 における 5 種類のブタ回虫非還元末端側糖鎖を目標とし、A~D までをステップワイズな経路で合成に成功した。E においては脱保護時に収率の大幅な低下が見られたため、ストラテジーを変更し、五糖誘導体まで導いた。現在新たに脱保護を検討している。

(5) イヌ回虫 *Toxocara canis* 由来の糖タンパク質 : *Toxocara canis* より見出された糖タンパク質糖鎖は 1 種類であったことから数種の非天然型糖鎖も合成し、構造活性相関を検討することとした。合成途上においてフコース誘導体の縮合時の試薬を 2 種類試したところ NIS-TfOH の系では立体選択性が低下し、副生成物として β 体の生成がみられた。

寄生動物において重要視されることは、宿主との特異的識別の問題である。細菌感染やウイルス感染の分子機構の解析は国内外で精力的に細胞生物学及び細胞社会学的研究がなされ、この種の識別においては糖鎖が重要な役割を演じていることは疑いない。しかし寄生虫に関する宿主との分子レベルの研究は主に獣医学の領域で行われてはいるものの、抗原の多くは混合物であり、診断薬としての均一性を求めることが難しい。それぞれの寄生虫や菌から単離報告された複合糖質は、高等動物はもちろん、他の下等動物の複合糖質とも異なった糖鎖配列をしており、構造的な観点のみならず機能の面においても大変興味深い。特に寄生虫感染に関しては、それぞれの患者血清に対する抗原性として期待できる上に、ワクチン開発への可能性も否めない。しかし、自然界より得られるこれらの糖脂質は、単離、精製が困難な上にごく微量である。化学合成することにより均一かつ大量に供給がなされれば、機能解明が容易になると考え、全合成及び糖鎖合成を行ってきた。糖鎖合成のポイントは如何に立体及び位置選択的に効率よく合成できるかであり、保護基や脱離基ならびに縮合剤の組み合わせを考慮した。今回合成してきた糖鎖は、いずれも宿主との相互作用を分子レベルでの解明に留まらず、ヒトへの免疫機構を追求することで創薬にもつながると期待できる。

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 4 件)

- ① T. Kanaya, S. Yagi, F. Schweizer, T. Takeda, F. Kiuchi and N. Hada. Synthetic Studies on Glycosphingolipids from Protostomia

phyla: Synthesis of Glycosphingolipids from the Parasite *Schistosoma mansoni*. *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有り **58** (6), 2010 pp.811-817.

- ② K. Yamano, A. Goto, F. Nakamura-Uchiyama, Y. Nawa, N. Hada, and T. Takeda. Gal β 1-6Gal, antigenic epitope which accounts for serological cross-reaction in diagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection. *Parasite Immunol.* 査読有り **31**, 2009 pp.481-487.
- ③ A. Koizumi, N. Hada, A. Kaburaki, K. Yamano, F. Schweizer, and T. Takeda. Synthetic studies on the carbohydrate moiety of the antigen from the parasite *Echinococcus multilocularis*, *Carbohydr. Res.*, 査読有り **344**, 2009 pp.856-868.
- ④ N. Hada, J. Oka, K. Hakamata, K. Yamamoto and T. Takeda. Synthesis of neutral glycosphingolipids from *Zygomycetes*. *Carbohydr. Res.*, 査読有り **343**, 2008 pp.2315-2324.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 小泉明彦、羽田紀康、木内文之、*Echinococcus* 属由来糖タンパク質の糖鎖部分に関する合成研究、日本薬学会第 130 年会、2010.3.28. 岡山。
 - ② 金谷貴行、羽田紀康、竹田忠紘、木内文之、無脊椎動物由来糖脂質の合成研究 (46) マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)由来の糖脂質(6) 日本薬学会第 130 年会、2010.3.28. 岡山。
- 他 14 件

[図書] (計 1 件)

- ① 羽田紀康、他、シーエムシー出版 複合糖質の化学と最新応用技術 2009、162-170

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽田 紀康 (HADA NORIYASU)
慶應義塾大学・薬学部・准教授
研究者番号 : 70296531

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし