

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 2 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590015

研究課題名 (和文) インスリン情報伝達機構解明のための新規糖関連物質の創製

研究課題名 (英文) Development of novel sugar-related organic compounds involved in insulin signaling mechanism

研究代表者

高橋 秀依 (TAKAHASHI HIDEYO)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：10266348

研究成果の概要：本研究は、血糖降下作用を有する希少な糖類及びその関連物質を効率よく化学合成する方法論の確立と、それらを用いたインスリン情報伝達機構の解明を目的としている。血糖降下作用を有する天然物である *Coyolosa* の構造を基本とし、還元的エーテル化反応やオキシランの開環反応によって様々なエーテル結合糖を化学合成することに成功した。また、糖-タンパクの認識機構を解明する新しい方法論の開発も行っている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：有機合成化学・医薬化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：Coyolosa、エーテル結合糖、還元的エーテル化、血糖降下作用、糖鎖、オキシラン、1C-メチル糖、インスリン

1. 研究開始当初の背景

糖類は生体を構成する最も重要な要素の一つである。近年、糖鎖が複雑な生命現象をコントロールする情報素子として働くことが明らかとなり、糖化学への注目が高まっている。このような流れの中で、創薬研究においても今後は一層糖類が重要視されると考え、生物活性を有する糖関連化合物を化学合成し、それらの創薬研究への応用をめざしてきた。特に、天然での存在量は非常に少ないが、興味深い生物活性を有する糖類を効率良く化学合

成し、生命現象の解明のためのツールとして提供することを重視している。これまでに様々な希少な糖関連物質について取り組み、イノシトール類やエーテル結合糖の合成法を開発してきた。本研究課題の開始当初、これらイノシトール類やエーテル結合糖に血糖降下作用が認められ、作用メカニズムの解明が求められ始めていた。そこで、本研究では、これらの糖類について、より容易に大量に、そして多様な構造を化学合成する新たな方法論の開発をめざした。さらに、得られた糖類

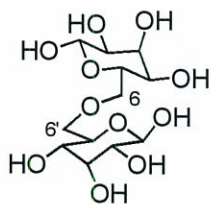
をツールとして、小分子による血糖降下作用の解明に用いることを課題とした。

2. 研究の目的

本研究では、血糖降下作用を有する希少な糖類及びその関連物質を効率良く化学合成する方法論の確立と、それらをツールとして用いたインスリン情報伝達機構の解明を目的とした。

(1) エーテル結合糖の効率良い合成法の開発

Coyolosaは、1997年にメキシコのヤシの木 (*Acrocomia Mexicana*) の根より、血糖降下作用を示す天然物として見いだされた。糖が1位を介するグリコシド結合ではなく、6位同士のエーテル結合によって連結された初めての例である。その作用機序は一般に予想されるグリコシダーゼ阻害作用ではなく、インスリン分泌促進作用であると報告され、生物活性の面からも非常に興味深い。私達は、Coyolosaのようなエーテル結合による糖の連結は非常に安定であり、また、糖の様々な位置での連結を可能にすることに注目し、多様性のある新規なエーテル結合糖類の創出をめざした。合成にあたっては、糖類だけでなく他の基質にも適用可能な効率の良い方法の開発を目標とした。



Coyolosa

(2) 新規縮合糖Petalosa並びに類縁化合物の合成

Petalosaは2005年に *Psacalium peltatum* より単離され、二糖が縮合した非常に稀な構造を有している。

PetalosaもCoyolosaと同様にインスリン分泌促進作用が報告され、非常に興味深い。

そこで、糖類が縮合したこのような全く新しい構造の合成方法の開発をめざした。

(3) イノシトール類の合成とその新規グリコシル化

イノシトール類がインスリン様の血糖降下作用を示すことが明らかになり、特に、希少な *chiro*-inositol において活性が高く、生体内に多く存在する *myo*-inositol を凌ぐことから、これまであまり注目されなかったその他のイノシトール異性体の活性にも注目が集まっている。私達はすでにイノシトール全異性体の合成に成功しており、天然の存在量が少ない *chiro*-inositol を安定供給する方法

論も確立している。そこで、インスリン情報伝達機構の解明のためのツールとして提供すべく、*chiro*-inositol を含むイノシトール全異性体を合成し、それらの位置選択的なリン酸化法やアセチル化法の開発を目的とした。また、イノシトールがピラノースとグリコシド結合で連結した分子が生体内での活性本体と予想されていることから、これらの化合物を効率良く一挙に化学合成する新しいグリコシル化反応の開発もめざした。

(4) 糖類のライブラリーを用いたインスリン情報伝達機構の解明

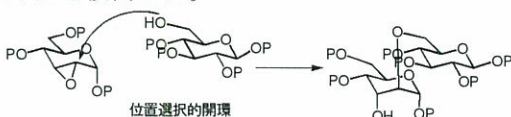
上記の(1)~(3)によって多様な構造を有する低分子糖類のライブラリーを構築することができる。これらの化合物は、インスリンによる血糖値の調節機構のどこかに関わることが予想される。そこで、生物系の研究者との共同実験によって受容体の探索や遺伝子情報を断定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) エーテル結合糖の効率良い合成法の開発及びハイブリッド糖の創製

一般にグリコシル結合(アセタール結合)は、酸や塩基に対して十分な安定性を有していないため、糖鎖も比較的容易に切断される。このような不安定性は糖鎖を扱う上で難点の一つと考えられる。また同時に、グリコシル結合には α 型と β 型の二つの立体化学があり、化学合成する際、いかにして立体選択性高くグリコシル結合を形成するかは大変重要な課題とされている。現在までこのような問題点を解決するために多くの研究が行われているが、糖を連結することを目的とするならば、グリコシル結合ではなく、エーテル結合でも十分と考えた。初めに還元的エーテル化を応用し、糖が様々な位置で結合したより多様なエーテル結合糖の創出を試みた。

さらに上記還元的エーテル化法を補完する別法として、オキシランの開環を利用した方法を検討した。



これは、糖の2、3位にオキシランを形成し、別な糖の水酸基を求核試薬として用いて開環反応を行ない、エーテル結合を形成する方法である。この方法では、求核攻撃の位置や立体化学を制御することによって入手の困難な希少な糖をエーテル結合で連結することができる。また、酸素だけでなくイオウや窒素によるエーテル結合(チオエーテルや

アミノエーテル) 形成も検討した。これらの方法論を駆使し、エーテル結合糖のライブラリー構築を行った。

(2) 新規縮合糖 Petalosa 並びに類縁化合物の合成

Petalosa は二糖が 1、2 位間で縮環した非常に珍しい構造をした新規糖類である。化学合成にあたって、二糖を縮合させる最も簡便な方法としてピナコールカップリングを試みた。

(3) イノシトール類の合成とその新規グリコシル化

すでにイノシトールの全異性体の合成法を確立している。インスリン情報伝達系に作用することが示唆されている *chiro*-inositol を含むイノシトール全異性体について、活性本体と予想されるリン酸化体やアセチル化体及びメチル化体への誘導を試みた。また、グリコシル化されたイノシトールが活性本体とも予想されていることから、イノシトールの立体選択的なグリコシル化も検討した。既存のグリコシル化反応の最大の問題点は、アノマー位の立体化学の制御が完全ではないことである。この点を酵素反応を模倣したモレキュラーインプリンティングを利用することで解決しようとした。

4. 研究成果

(1) エーテル結合糖の効率良い合成法の開発及びハイブリッド糖の創製

血糖効果作用を有するエーテル結合糖である *coyolosa* の構造を基本とし、還元的エーテル化を用いて様々なエーテル結合糖の化学合成を行った。続いて、糖のその他の部位

(2~4位) にエーテル結合を形成すべく、オキシランの開環反応を利用したエーテル結合形成反応を開発した。オキシランの開環にあたっては位置選択性が重要であるが、糖の環上に形成されたオキシランの場合は糖の水酸基の立体化学が影響し、高い選択性をもたらされることを明らかにした。この知見をもとに様々なエーテル結合糖を化学合成することに成功した。本反応はチオエーテルの合成にも応用することが可能で、新規なチオエーテル結合糖を創出することができた。

また、このオキシランの開環反応の反応条件を変えることによって、グリコシル化反応が進行することを新たに見出した。これにより、エーテル結合とグリコシル結合を併せ持つハイブリッド糖の創製が可能になった。興味深いことに、このグリコシル化反応については、糖の 1 位に非常に安定なメトキシ基が存在するにも拘わらず、反応が進行すること

を明らかにした。従来法では、1 位を脱離能の高い置換基に変換する必要があったが、本法では極めて安定な 1 位置換基でもグリコシル化が進行する。したがって、本法は、今後、グリコシル化反応に関わる多くの研究者に大きな影響を与える新しいグリコシル化法である。

これらと並行して、糖の新しい連結法としてカルバメートやウレアによる連結法も新たに開発した。また、糖のグリコシル結合をケトース型で行う 1C-メチル糖のグルコシル化についても検討し、立体選択性についての新しい知見を得た。特に、1C-メチル糖の 1 位同士を連結させることによって物性や生物活性が注目されているトレハロースの類縁体を合成することができた。

エーテル結合糖及びその関連糖類についてはこれまで合成例が全くなく、私達の合成法は新しい方法論の確立と同時に新規な糖関連物質の創製という観点からも高く評価されるものである。

(2) 新規縮合糖 Petalosa 並びに類縁化合物の合成

糖類を用いたピナコールカップリングはこれまで合成例がなく、非常に難しいターゲットである。現在は、この反応を効率よく行うための金属の探索を行っている。

(3) イノシトール類の合成とその新規グリコシル化

イノシトール類やエーテル結合糖の血糖効果作用について、特にインスリン分泌に関して新しい方法論の開発をめざし、研究を遂行した。現在までに、イノシトールのグリコシル化の新しい方法論として、弱い活性化条件におけるドナーの活性化を検討しており、今後成果が得られると思われる。

(4) 糖類のライブラリーを用いたインスリン情報伝達機構の解明

上記 (1) ~ (3) により、糖類のライブラリーが構築されつつある。それらを利用して、インスリン情報伝達機構の解明を試みた。まず、糖関連小分子とタンパク質との相互作用を解明するための新しい方法論の開発に成功した。すなわち、糖類とタンパク質との非常に弱い相互作用を検出するための新しい方法として、QCM-PD-SAM法を共同研究者とともに見出すことに成功した。これまで、小分子とタンパク質の相互作用を検出するための方法論として、ビオチン-アビジン法が用いられてきた。しかし、糖類のような、タンパク質と大変弱い相互作用をする小分子については、ビオチン-アビジン法は適当ではなく、新しい方法論の開発が求められてい

た。そこで、単分子膜を形成しやすい金膜とイオウの相互作用に着目し、これを利用した高感度な検出法としてQCM-PD-SAM法を開発し、トリマンノース構造を認識するタンパク質の探索を行った。本法は従来法に代わる多くの利点を備えており、今後、汎用されるものと考えている。

以上のように、糖類関連物質の新規な合成法の開発だけでなく、それらをツールに用いた生命現象解明のための新しい方法論を開発することができた。これらは国内外から注目される成果である。本研究課題によって糖関連物質のライブラリーも充実しつつあり、今後は、それらの生物活性を新しい方法論を駆使して解明することをめざしたい。特に、インスリン分泌機構における糖関連小分子の役割については、共同研究者の協力を得て、グルコーストランスポーターに注目した新しい展開にも着手しており、大きな成果が期待される。

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7件)

①Nishiyama, Kazusa; Takakusagi, Yoichi; Kusayanagi, Tomoe; Matsumoto, Yuki; Habu, Shiori; Kuramochi, Kouji; Sugawara, Fumio; Sakaguchi, Kengo; Takahashi, Hideyo; Natsugari, Hideaki; Kobayashi, Susumu. Identification of trimannoside-recognizing peptide sequences from a T7 phage display screen using a QCM device. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 巻、195-202 頁、2009 年. 査読有

②Nishiyama, Kazusa; Nakayama, Takahiro; Natsugari, Hideaki; Takahashi, Hideyo. Synthesis of ether-linked sugar by nucleophilic opening of carbohydrate oxiranes. *Synthesis* 3761-3768 頁、2008 年. 査読有

③ Sawada, Daisuke; Sasayama, Shinya; Takahashi, Hideyo; Ikegami, Shiro. Novel synthesis of oligosaccharides linked with carbamate and urea bonds utilizing modified Curtius rearrangement. *Tetrahedron* 64 巻、8780-8788 頁、2008 年. 査読有

④Namme, Rie; Mitsugi, Takashi; Takahashi, Hideyo; Ikegami, Shiro. Development of ketoside-type analogues of trehalose by using \square -stereoselective *O*-glycosidation of ketose. *European Journal of Organic Chemistry* 3758-3764 頁、2007 年. 査読有

⑤ Iijima, Ryosuke; Takahashi, Hideyo; Ikegami, Shiro; Yamazaki, Masatoshi. Characterization of the reaction between sialic acid (*N*-acetylneuraminic acid) and hydrogen peroxide. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30 巻、580-582 頁、2007 年. 査読有

⑥ Sawada, Daisuke; Sasayama, Shinya; Takahashi, Hideyo; Ikegami, Shiro. Novel synthesis of carbamate-linked oligosaccharides based on modified Curtius rearrangement. *European Journal of Organic Chemistry* 1064-1068 頁、2007 年. 査読有

⑦高橋秀依、新規なエーテル結合糖の合成法の開発及び生物活性物質創製への応用、薬学研究の進歩研究成果報告集 23 巻、17-23 頁、2007 年. 査読無

〔学会発表〕(計4件)

①西山和沙、小林 進、草柳友恵、松本 勇記、高草木洋一、倉持幸司、菅原二三男、坂口謙吾、高橋秀依、夏苺英昭、トリマンノース由来の分子プローブの合成と QCM-PD-SAM 法を用いた結合ペプチドの同定、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日 京都

②西山和沙、小林 進、草柳友恵、松本 勇記、高草木洋一、倉持幸司、菅原二三男、坂口謙吾、高橋秀依、夏苺英昭、糖鎖認識機能解明のための分子プローブの合成、第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム、2008 年 11 月 4-5 日 京都

③西山和沙、草柳友恵、高草木洋一、倉持幸司、菅原二三男、坂口謙吾、高橋秀依、夏苺英昭、小林 進、トリマンノース由来の分子プローブの合成と QCM-PD 法による結合ペプチドの探索、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26-28 日 横浜

④高橋秀依、簡単な化学ができること、相模中央化学研究所開所記念講演会、2007 年 10 月 30 日 綾瀬

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 秀依 (TAKAHASHI HIDEYO)

帝京大学薬学部・教授

研究者番号：10266348

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者