

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23627

研究課題名（和文）神経系ガングリオシドが持つ生物学的機能の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Study on the molecular basis of biological functions of gangliosides in nervous tissue

研究代表者

河村 奈緒子 (Komura, Naoko)

岐阜大学・高等研究院・特任助教

研究者番号：80849711

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経組織に豊富に存在するガングリオシドと呼ばれる糖脂質が形成する膜分子の集合体（脂質ラフト）に注目した。ガングリオシドの観察や相互作用分子を特定することが可能なガングリオシドプローブを化学合成で開発することにより、脂質ラフトの形成機構や機能を明らかにするために重要なガングリオシドの相互作用を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経疾患と深く関与する重要な生体分子でありながら入手が困難であった糖脂質を簡便に化学合成する方法を本研究で開発した。さらに、これを発展させることであらゆる生命現象を担う細胞膜ドメインと呼ばれる構造体の詳細な解析を可能にした。本研究の成果は、神経疾患の治療・創薬研究へ発展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study focuses on the membrane domains (lipid rafts) formed by glycolipids (gangliosides) in nervous tissue. Ganglioside analogs developed in this study revealed significant interactions of gangliosides to understand the functions of lipid rafts and their formation mechanisms.

研究分野：糖鎖合成化学

キーワード：ガングリオシド 脂質ラフト 細胞膜ドメイン 1分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞表面に存在するシアル酸含有糖脂質（ガングリオシド）は、細胞膜ドメイン（脂質ラフト）を介して多くのシグナル伝達を担うことが知られている。これまでに同定されたガングリオシドの中でも、神経細胞に豊富な神経系ガングリオシドの一群は、神経細胞の分化・増殖のみならず、アルツハイマー病等への関与が示唆されているが、これらの知見は仮説の域を脱しておらず、生物学的機能の分子基盤は未知と言ってよい。

本研究課題では、独自の糖鎖合成化学によって創出する分子プローブと 1 分子イメージング法を駆使して神経系ガングリオシドと脂質ラフトの関係性を明らかにし、その生物学的機能の分子基盤を解明することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、独自のシアル酸含有糖鎖合成法とガングリオシドの 1 分子イメージングを基盤技術として以下の課題に取り組んだ。

- (1) 神経系ガングリオシドの化学合成法の開発
- (2) 神経系ガングリオシドの分子プローブの開発
- (3) ガングリオシドの 1 分子イメージングと親和性タンパク質の同定

3. 研究の方法

(1) 神経系ガングリオシドの化学合成法の開発

先行研究で開発したシアル酸含有糖鎖の効率的合成法 (図 1) を応用して神経系ガングリオシドを合成する。具体的には、グリコシド化反応で完全な α 選択性を示す二環性シアル酸供与体を利用する。

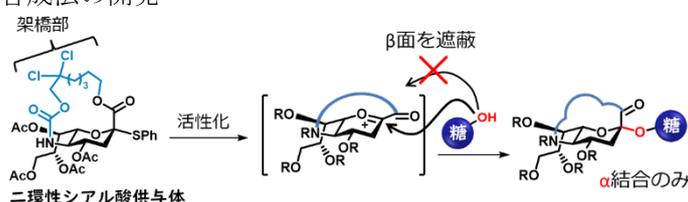


図 1 シアル酸の完全な α 選択的グリコシド化法

(2) 神経系ガングリオシドの分子プローブの開発

ガングリオシドの 1 分子イメージング及び親和性分子の同定を目的に、蛍光プローブ及び分子捕捉用プローブを開発する (図 2)。ガングリオシドのシアル酸 9 位水酸基をアミノ基で置換し、これに対して蛍光ラベル及び光架橋基をアミド化により結合させることで目的の分子プローブを合成する。

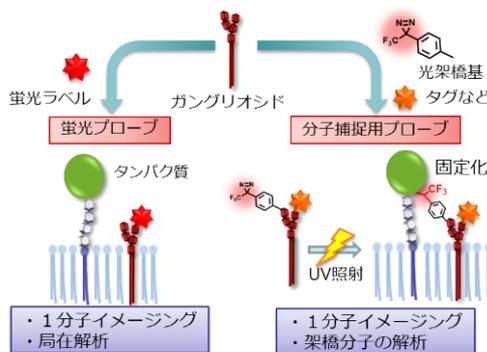


図 2 本研究で開発した分子プローブ

4. 研究成果

(1) 神経系ガングリオシドの化学合成法の開発

神経系ガングリオシドのうち、c 系列と呼ばれる一群は、一様の結合様式

(α (2,8) 結合) で連なったシアル酸三量体を共通構造として有している。従来法ではシアル酸三量体の合成が難しいことから、c 系列ガングリオシドの大量合成は極めて困難であった (図 3)。

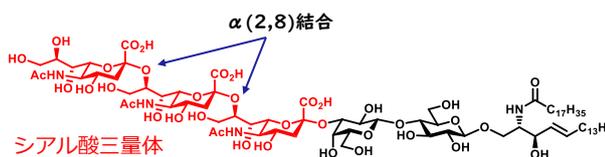


図 3 c 系列ガングリオシドの一例

そこで、先行研究で開発したシアル酸の完全な α 選択的グリコシド化法を応

用して、シアル酸三量体の合成を検討した。まずは α (2,8) 結合合成用の二環性シアル酸受容体の候補を開発した。グリコシル化反応を検証した結果、側鎖の水酸基の保護様式によって受容体の反応性が大きく異なることを明らかにし、優れた反応性を示す二環性シアル酸受容体を選定した。これをグリコシル化反応に三度供することにより、 α (2,8) 結合のシアル酸三量体を良好な収率にて構築することに成功した (図 4)。その後、亜鉛粉末と酢酸を作用させることにより、

三量体が有する 3 つの架橋部を化学選択的に開裂し、保護基の変換により四糖供与体へと誘導した。続くグルコシルセラミドユニットの導入によるガングリオシド骨格の構築は低収率に留まったため、今後最適化が必要である。

一方で、糖脂質構造にシアル酸を直接的に導入する新たなガングリオシド合成法を考案した。まずは *p*-*tert*-butylbenzoyl (TBBz) 基で水酸基を保護した高溶解性のラクトシルセラミド受容体を合成した。ラクトシルセラミド受容体と二環性シアル酸供与体をグリコシル化反応に供した結果、ガングリオシド GM3 骨格を極めて高収率 (87%) にて構築することに成功した (図 5)。その後、マイクロ波照射装置を利用した条件により、二環性シアル酸の架橋部を収率良く開裂し、シアル酸の 5 位のアミノ基を遊離とした。このアミノ基に対して種々の修飾を行った後、それぞれ脱保護反応に供することで、GM3 の天然構造及びシアル酸 5 位修飾型アナログの合成を達成した。さらに、本手法により、蛍光ラベル化したガングリオシドプローブの合成も可能であることを確認した。以上より、ガングリオシド合成におけるシアル酸導入の問題を解消し、簡便な合成法を確立することに成功した。

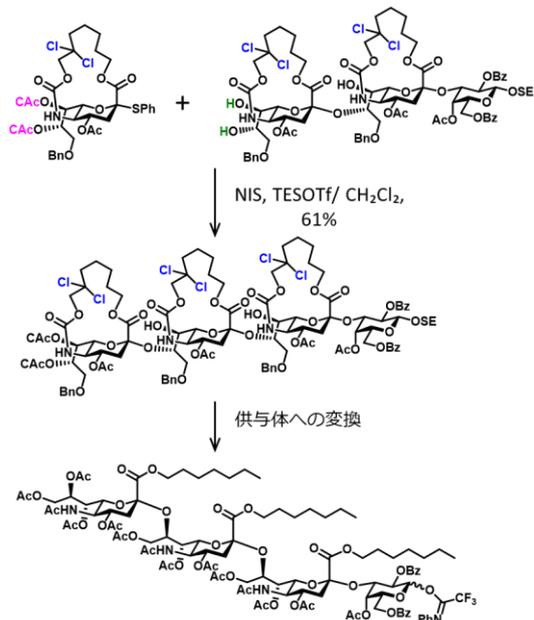


図 4 シアル酸三量体の合成

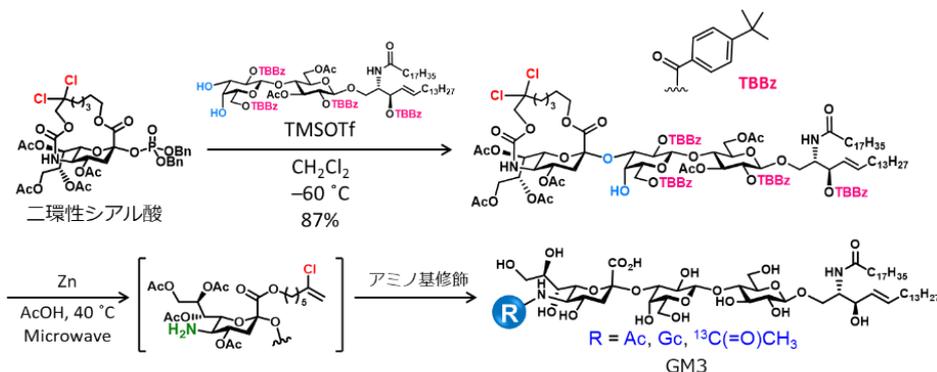


図 5 本研究で開発したガングリオシド合成法

(2) 神経系ガングリオシドの分子プローブの開発

これまでに確立した手法に基づき、糖鎖の末端及び脂質の末端部分に光架橋基を結合させた光反応性ガングリオシドプローブの合成に取り組んだ (図 6)。まず、糖鎖修飾型の GM3 プローブを開発するため、シアル酸 9 位の水酸基をトリフルオロアセトアミド基で置換したガングリオシド中間体を合成した。このトリフルオロアセトアミド基をアルカリ加水分解によりアミノ基へと変換した後、光架橋基である Trifluoromethylphenyl diazirine (TPD) 基をアミド化により収率良く導入した。続いて、ビオチン及び蛍光色素 (ATTO488, ATTO594) を光架橋基に連結させることで、2 種類のプローブの合成を達成した。一方で、同様に脂質の末端にジアジリン基、シアル酸 9 位に ATTO594 (蛍光色素) を導入した脂質修飾型 GM3 プローブの合成も達成した。これらの結果を基に、シアル酸 9 位を TPD 基と検出器 (蛍光色素、ビオチン) で修飾した光反応性 GM1 プローブの合成も達成した。

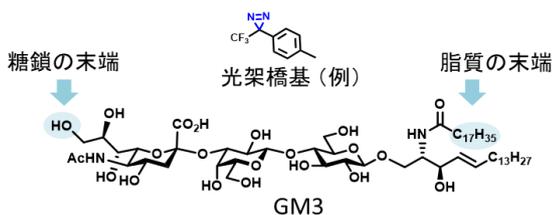


図 6 光反応性ガングリオシド

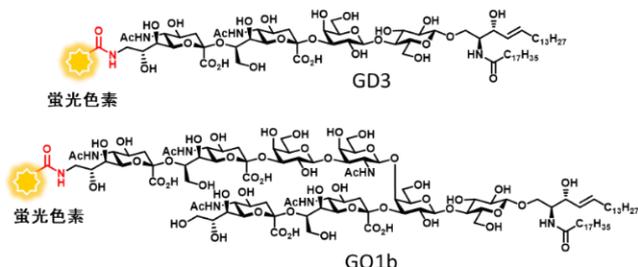


図 7 蛍光ガングリオシド

た。加えて、シアル酸の有無がタンパク質との結合性に与える影響を調べるため、シアル酸を持たないラクトシルセラミドの光反応性プローブも作成した。

一方で、1分子イメージング用の蛍光ガングリオシドプローブとして、シアル酸二量体を共通構造とするb系列ガングリオシド (GD3、GQ1b) の蛍光プローブの合成に取り組んだ (図7)。種々検討した結果、末端のシアル酸の水酸基をトリフルオロアセトアミド基で置換した三糖 (ジシアリルガラクトース) を効率的に合成する手法を確立した。この三糖を共通構造として、ガングリオシドの糖鎖構造を合成した後、グルコシルセラミドの導入により高収率にてガングリオシド骨格を構築した。続いて、全ての保護基を除去してシアル酸9位アミノ体へと誘導し、これに対して蛍光色素 ATT0594 を導入することにより1分子イメージング用の蛍光プローブ (GD3、GQ1b) の合成を達成した。

(3) ガングリオシドの1分子イメージングと親和性タンパク質の同定

研究協力者である鈴木健一博士 (岐阜大学) らとの共同研究により、合成したガングリオシドプローブの生細胞膜上での1分子イメージング及び光架橋実験を行った。b系列ガングリオシドの蛍光プローブ (GD3、GQ1b) の脂質ラフトへの親和性を DRM 分配実験により評価した。その結果、これらは天然の分子と同様のラフト親和性を示したことから、優れたプローブであることを確認した。次に、1分子イメージングにより生細胞膜上でのガングリオシドの振舞いを観察した結果、b系列ガングリオシドが定常状態でホモ二量体を有意に形成することを明らかにし、脂質ラフトの形成機構を解く上で重要な知見を得た。

続いて、光反応性プローブを用いて細胞膜上での光架橋反応を試みた (図8)。光反応性プローブを添加した細胞に対してUV照射による架橋を行った結果、親和性タンパク質の捕捉が可能であることを明らかにした。

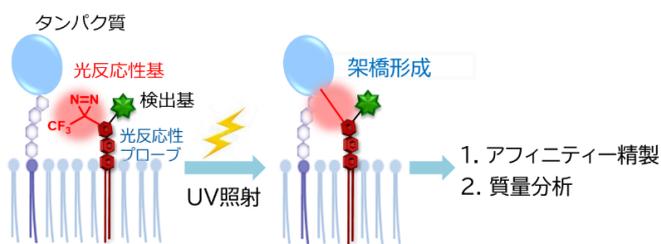


図8 光架橋実験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoko Komura, Keiichi Kato, Taro Udagawa, Sachi Asano, Hide-Nori Tanaka, Akihiro Imamura, Hideharu Ishida, Makoto Kiso, Hiromune Ando	4. 巻 364
2. 論文標題 Constrained sialic acid donors enable selective synthesis of -glycosides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 677 ~ 680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaw4866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maina Takahashi, Junya Shirasaki, Naoko Komura, Katsuaki Sasaki, Hide-Nori Tanaka, Akihiro Imamura, Hideharu Ishida, Shinya Hanashima, Michio Murata, Hiromune Ando	4. 巻 18
2. 論文標題 Efficient diversification of GM3 gangliosides via late-stage sialylation and dynamic glycan structural studies with 19F solid-state NMR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 2902 ~ 2913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D00B00437E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akihiro Kusumi, Takahiro K. Fujiwara, Taka A. Tsunoyama, Rinshi S. Kasai, An An Liu, Koichiro M. Hirose, Masanao Kinoshita, Nobuaki Matsumori, Naoko Komura, Hiromune Ando, Kenichi G. N. Suzuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Defining raft domains in the plasma membrane	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Traffic	6. 最初と最後の頁 106 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tra.12718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 河村 奈緒子、安藤 弘宗	4. 巻 48
2. 論文標題 シアル酸の立体選択的グリコシド化法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファインケミカル	6. 最初と最後の頁 5 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Machi Koikeda, Naoko Komura, Hide-Nori Tanaka, Akihiro Imamura, Hideharu Ishida, Makoto Kiso, Hiromune Ando	4. 巻 38
2. 論文標題 Synthesis of ganglioside analogs containing fluorescently labeled GalNAc for single-molecule imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Carbohydrate Chemistry	6. 最初と最後の頁 509 ~ 527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07328303.2019.1609019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miku Konishi, Naoko Komura, Yuya Hirose, Yuki Suganuma, Hide-Nori Tanaka, Akihiro Imamura, Hideharu Ishida, Kenichi G. N. Suzuki, Hiromune Ando	4. 巻 85
2. 論文標題 Development of Fluorescent Ganglioside GD3 and GQ1b Analogs for Elucidation of Raft-Associated Interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 15998 ~ 16013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c01493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 N. Komura, H.-N. Tanaka, A. Imamura, H. Ishida, H. Ando
2. 発表標題 Stereoselective synthesis of (2,8)-linked oligo-sialic acids using bicyclic sialic acids
3. 学会等名 ACS Fall 2019 National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 N. Komura, K. Kato, T. Udagawa, S. Asano, H. -N. Tanaka, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, H. Ando
2. 発表標題 Fully stereoselective -glycosidation using macrobicyclic sialic acid donors
3. 学会等名 2nd Australasian Glycoscience Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 N. Komura
2. 発表標題 Completely stereoselective α -glycosidation using macrobicyclic sialic acid donors
3. 学会等名 The 11th Asian Communication for Glycobiology and Glycotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 河村 奈緒子、加藤 慶一、宇田川 太郎、浅野 早知、田中 秀則、今村 彰宏、石田 秀治、木曾 真、安藤 弘宗
2. 発表標題 二環性シアル酸を用いた グリコシド化反応の開発
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 河村奈緒子
2. 発表標題 シアル酸含有糖鎖の合成研究および細胞膜ドメイン解析のための糖脂質プローブの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第188回例会 2020年度農芸化学若手女性研究者賞受賞講演 (招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 河村奈緒子
2. 発表標題 シアル酸含有糖鎖の合成研究および細胞膜ドメイン解析のための糖脂質プローブの開発
3. 学会等名 2020年度農芸化学若手女性研究者賞受賞講演 (招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 健一 (Suzuki Kenichi)	岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・教授 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------