

平成23年 5月 31日現在

機関番号： 82401
研究種目： 若手研究(B)
研究期間： 2008～2010
課題番号： 20710171
研究課題名(和文)
特異な構造を持つガングリオシドAG類の化学合成と神経突起伸長活性の評価
研究課題名(英文) Chemical synthesis of unique AG-gangliosides and evaluations of nerve cell stimulation activities
研究代表者
花島 慎弥 (HANASHIMA SHINYA)
独立行政法人理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム・基幹研究所研究員
研究者番号： 50373353

研究成果の概要(和文)：

ヒトデから単離されたガングリオシド類は特異な糖鎖構造を持ち、神経突起伸長効果が報告された。このヒトデ糖鎖の糖鎖構造に着目しその化学合成を新規シアリル化の手法を開発して達成した。さらに哺乳動物の細胞上に存在してその機能調節を担うSiglecとヒトデ糖鎖との結合をNMRにより解析し、シアリ酸を中心にした3糖が結合エピトープであることを明らかにした。本研究はシアリ酸が内部にある糖鎖もヒトのタンパク質に認識される可能性を示し、Siglec阻害剤の新たな可能性を拓いた。

研究成果の概要(英文)：

Gangliosides isolated from starfish have unique glycan sequences and nerve cell stimulating activities. We focused on their unique glycan sequences and synthesized the glycan parts by developing novel sialylation strategies. Further, we analyzed the binding between a starfish glycan and a protein Siglec, expressing on mammalian cell surfaces and modulating their functions. We elucidated the binding epitope as the trisaccharide unit including the sialic acid residue. Our finding revealed the potential that inner sialic acid could be also recognized by Siglec, which would develop useful potential for inhibitors of Siglec.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

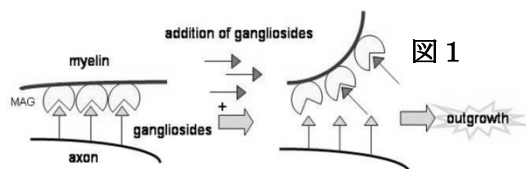
研究分野：複合新領域

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：ガングリオシド 合成 シアリ酸 NMR

1. 研究開始当初の背景

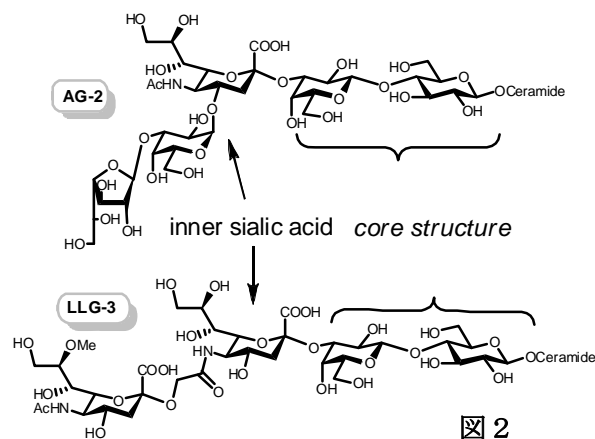
近年、シアル酸を持つ糖脂質であるガングリオシド類が有する様々な生理活性が注目されている。事故や疾患により失われた神経軸索の再生は、部分的に失われた身体機能を再生するために不可欠である。神経軸索の伸長や伸長抑制にはラミニン、フィブロネクチンや Nogo、などある種のタンパク質やプロテオグリカンが深い関わりを持つ事が知られている。これらのタンパク質の中で哺乳動物のシアル酸認識タンパク質である Siglec-4 は神経系においてミエリン鞘の維持、成熟したニューロンの神経突起出芽の阻害に参与している。近年、この Siglec-4 にある種のガングリオシド糖鎖が結合することで、神経突起の出芽、伸長を強く促進することが明らかとなった。



一方、免疫細胞に発現する Siglec-2 も同様に内在性のシアリル化糖鎖と結合することで、免疫細胞の活性を制御していることが明らかとなった。そこで、内在する哺乳動物型ではないガングリオシドならびに類縁体を外部から投与することで、これら Siglec 類の関与する生命現象を望む方向に制御できる可能性を考えている。その結果、神経突起の伸長やネットワークの再生が可能になるのではないかと考えられる。また、ヒトをはじめとした哺乳動物の免疫細胞に発現する Siglec-2 を介して同様に免疫系を活性化して外来の病原性微生物やウイルスに対抗できるのではないかと考えられる。

現在まで、哺乳動物型ガングリオシドは系統的に合成が進んでおり、それらの神経突起伸長を含む生理活性は明らかになりつつある。しかしながら近年、哺乳動物とは進化的に遠いヒトデやナマコなどから単離された海洋生物由来のガングリオシド AG 類及び LLG 類が、NGF を介して高い神経突起伸長作用を示すことが明らかとなった。これらの構造は哺乳動物にはないユニークな特徴を持つ(図 2)。両者は、糖鎖の内部にシアル酸をもつ。哺乳動物の糖鎖では一般にシアル酸は非還元末端に存在することに比べ特徴的である。また、シアル酸-ガラクトース-グルコース 3 糖部分を共通構造として有する。AG 類ではシアル酸の 4 位から更にガラクトースを含む糖鎖が伸びている。そして非還元末端がガラクト (フコ) フラノースでキャップされている。一方、LLG-3 四糖は、シアル酸の 5 位グリコール酸アミドに更にシアル酸が付加したジシアリル構造を持つ。さらに非還元末端シアル酸は 8 位にメチル基を有する、

哺乳動物には無い特徴的な構造を持つ。天然物を用いた神経突起伸長試験の結果は、AG2 の活性はヒト型ガングリオシドと同程度かより高く、一方 LLG-3 に関しては非常に強い神経突起伸長活性が報告された。このようにヒト型ではない特異な構造を持つ糖鎖がヒトのシアル酸認識タンパク質に認識される分子認識メカニズムに着目した。



2. 研究の目的

本研究では哺乳動物にはない特異なシアリル化糖鎖構造を持つヒト由来ガングリオシド AG2 ならびに LLG-3 の新規化学合成を行ない、簡便で効率的な化学合成経路を開拓する。また、合成を達成する過程で新規シアリル化の手法を開発する。特異なシアリル化糖鎖構造に限らない一般的で効率的なシアリル化の手法の開発を目指した。さらに合成したシアリル化糖鎖とシアル酸結合タンパク質である Siglec との結合能の評価を行なう。シアル酸を糖鎖内部にもつ AG2 や LLG-3 が Siglec 類と結合すればこれらをリードとして Siglec 類を介した神経細胞や免疫細胞の制御を調節できる化合物の開発に繋がり、したがって医薬品へ応用展開が可能なポテンシャルを秘めていると考えている。

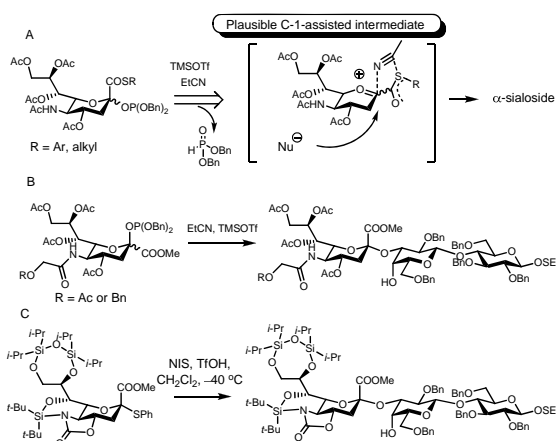
3. 研究の方法

有機化学的手法により、糖鎖構造を化学的に合成する。LLG-3 四糖の合成は、タンデムに繋がった 8-O-Me-Neu5Ac α -(2-11)-Neu5Gc 部分で分割して、8-O-Me-Neu5Ac 供与体と Neu5Gc を含む三糖受容体をあらかじめ別途合成し、最終段階でシアル酸の 5 位でアミド縮合により連結して、最後に脱保護することで目的とした、LLG-3 四糖が得られる。

一方 AG2 五糖の化学合成は、中央部分のシアル酸を含む三糖とガラクトピラノシルガラクトース二糖を別途合成して、グリコシル化反応により両者を (2+3) 縮合し、最後に脱保護することで目的の AG2 五糖構造へと導く。さらに合成糖鎖と Siglec との相互作用解析に関しては NMR を中心的に用いて行う。滴定実験によるシグナル変化の追跡に加え、相互作用解析の手法として TR-NOESY, STD-NMR を用いて詳細に解析することで、原子レベルで結合エピトープを同定する。

4. 研究成果

1位にあらかじめ導入した補助基からの隣接基関与効果を基盤とした新規シアリル化の手法を開発した[A]。本手法では1位にあらかじめチオエステルを導入したシアリル供与体を準備する。クロロ酢酸エチルを用いた混合酸無水物を經由することで、容易に1位カルボキシル基へのチオエステルの導入が可能であった。さらに、反応性の高いホスファイト基を2位脱離基として採用した。種々のチオエステルを合成してシアリル化反応における立体選択性を調べたところ、無置換のフェニルチオエステルで保護したシアリル供与体を用いた場合、安定性と立体選択性に関して優れた結果を与えた。そこで本供与体を用いて種々の受容体に対してグリコシル



化反応を行ったところ種々の基質、ガラクトース受容体に対して高い収率と立体選択性を与えた。

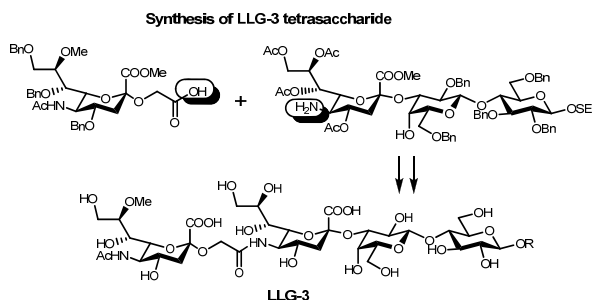
5位にN-グリコシル基をもつ Neu5Gc は Neu5Ac とともに広く一般的なシアリル分子種であるが、ヒトに含まれないという理由などからその機能解明に関する研究が遅れている。そこで、機能解明研究に供するために化学合成法の検討を行うことにした。まず一般的に用いられるチオ糖の Neu5Gc を合成し反応性の高い1級水酸基とのシアリル化反応を試みたが、その反応性は Neu5Ac と異なり低い事がわかり、目的のグリコシドを効率よく得るのは困難であった。そこで、より反応性の高いホスファイトを脱離基として用いることで、高収率で目的のシアリル化反応が進行することを報告した[B]。

近年 4,5位をオキサゾリジノン基で固定したシアリル供与体がシアリル化反応において高い反応性を示すことが報告された。そこで、われわれはシアリル化のピラノース環の固定効果と、供与体の反応性ならびに立体選択性に関する事を予想して、5,7位を di-tert-butylsilylene(DTBS)基でさらに二重架橋した供与体を開発した[C]。本供与体を用いたシアリル化反応において多様な受容体を許容して高い立体選択性を示した。供与体のデザインとしてさらに 8,9位の保護基に関しても検討を行い、特にかさ高い

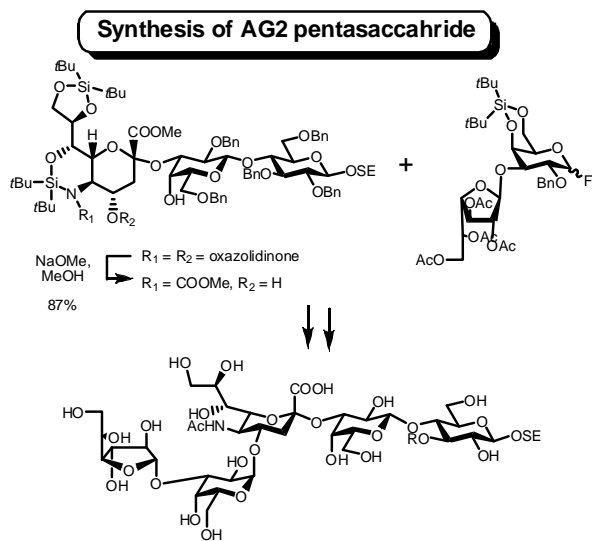
diisopropylsilyldisiloxanylidene (DIPDS)基を導入した供与体が多く受容体に対して高い α -選択性を示した。これら開発した手法は一般性が高く、多くのシアリル化糖鎖合成に適用可能である。

このように高収率かつ高立体選択性を示すシアリル化の新規手法を開発したので、本手法を用いてヒト由来の特徴的糖鎖構造の合成を行った。

LLG-3の合成はまず非還元末端となるシアリルの8位にメチル基を導入した。適切に Bn 基で保護



したシアリル供与体を合成して、Me 化条件を検討した結果、水酸化バリウムを塩基とした条件で MeI を用いた場合、シアリルのメチルエステル、アミドプロトン保持した状態で導入が可能であった。得られたメチルエーテル体とグリコール酸部位をグリコシル化反応にてカップリングした後、別途合成したシアリルラクトース 3 糖とアミド化して 4 糖とした。最後に脱保護することで、目的の LLG-3 四糖の合成を達成した。



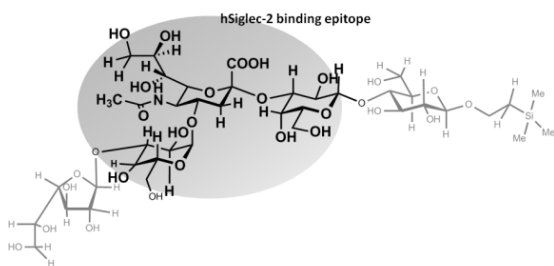
われわれはヒト糖鎖のユニークな糖鎖構造に着目し AG2 五糖の化学合成を達成した。AG 類はシアリルの5位からさらに糖鎖を伸ばした新規の構造をもつためこれまでに類似化合物も含めて合成例は無く、新たな合成手法の開発に取り組んだ。その結果、シアリルの糖鎖導入に関して新規の立体選択手法を開発した。また、立体選択的にシアリルが導入でき、かつ5位の水酸基を容易に遊離できるシアリル供与体を新たに開発して AG2 の合成を達成した。

合成は 5,7位ならびに 8,9位に DTBS 基をもつシアリル供与体とラクトースとをシアリル化反応に

よりカップリングすることで3糖が得られる。この3糖をNaOMeで処理してオキサゾリジノン基を開環することで、シアル酸4位水酸基を選択的に脱保護することが可能であり、3糖受容体を得た。

続いて別途合成したガラクトフラノシルガラクトースフルオリド供与体を Cp_2HfCl_2 , AgOTf で活性化して本受容体とのグリコシル化反応を行い、5糖ユニット保護体を得た。最後に全ての保護基を除去して目的としたAG2五糖を得た。

AG2のようなシアル酸が中央部分にある糖鎖はシアリダーゼによる酵素消化を受けにくいと考えられるため、血清中での安定性が高く、また動態も通常のシアリル化糖鎖とは異なる可能性がある。そこで合成したAG2五糖はシアル酸が中央部分にあるにもかかわらずヒトのシアル酸認識タンパク質に認識されるか興味深い。そこで免疫細胞上に存在してその調節を担う Siglec-2 と AG2 との結合を NMR により解析した。神経細胞上にも Siglec 類が存在することが知られている。その結果ヒト Siglec-2 とは K_d 5 mM 程度の結合定数で結合が観測できたが、マウス Siglec-2 との結合は観測できなかった。次に飽和移動-NMR を用いてヒト Siglec-2 と AG2 との相互作用を詳細に解析した。その結果、ヒト Siglec-2 はシアル酸が糖鎖内部にあるにもかかわらず、シアル酸を中心に3糖構造を中心に認識することを明らかにした。本研究により、AG2 のようなシアル酸が内部にあるシアリル化糖鎖に関してもヒトのタンパク質に認識される可能性を示し、Siglec-2 に関して新たな結合サイトの存在を示唆することができた。



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 8 件)

1. Shinya Hanashima “Recent strategies for stereoselective sialylation reaction and their applications” *Trend in Glycosci. GlycoTech.* in press.
2. Shinya Hanashima, Ken-ichi Sato, Yuko Naito, Hiromu Takematsu, Yasunori Kozutsumi, Yukishige Ito, Yoshiki Yamaguchi “Synthesis and binding analysis

of unique AG2 pentasaccharide to human Siglec-2 using NMR techniques”, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3720-3725.

3. Shinya Hanashima, “Homogeneous glycoprotein synthesis using bacterial oligosaccharyltransferase” *Trend in Glycosci. GlycoTech.* **2009**, *2*, 302-304.
4. Shinya Hanashima, Yoshiki Yamaguchi, Yukishige Ito, Ken-ichi Sato, “Synthesis of the starfish ganglioside AG-2 pentasaccharide” *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6150-6153.
5. Shinya Hanashima, Ken-ichi Sato, Yukishige Ito, Yoshiki Yamaguchi, “Silylene/oxazolidinone double-locked sialic acid building blocks for the efficient sialylation reaction in dichloromethane” *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4215-4220.
6. Shinya Hanashima, Taku Tomiya, Shoji Akai, Ken-ichi Sato, “Sialylation Reactions Using N-Glycolylneuraminic Acid Phosphite Donor” *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 959-965.
7. Shinya Hanashima, Daichi Ishikawa, Shoji Akai, Ken-ichi Sato, “Synthesis of the starfish ganglioside LLG-3 tetrasaccharide” *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 747-752.
8. Shinya Hanashima, Shoji Akai, Ken-ichi Sato, “Thioester-assisted α -sialylation reaction” *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5111-5114.

[学会発表] (計 7 件)

1. 花島慎弥 Binding Analysis of Human Siglec-2 and Synthetic AG2 Pentasaccharide Using NMR Technique 理研ケミカルバイオロジー—国際シンポジウム 2010.10.26 理化学研究所
2. Shinya Hanashima Synthesis of the unique starfish ganglioside AG2 pentasaccharide using silylene/oxazolidinone double-locked building blocks 20th Joint Glycobiology Meeting 2009.11.10 Cologne, Germany
3. 花島慎弥 三環性シアル酸供与体を用いた効率的シアリル化の検討 日本糖質学会年会 2009.9.11 高山
4. Shinya Hanashima Synthesis of the unique starfish ganglioside AG2 pentasaccharide using silylene/oxazolidinone double-locked building blocks, Japanese-Giessen-GlycoWorkshop 2009.11.7 Giessen, Germany
5. Shinya Hanashima Synthesis and biological function of the unique starfish ganglioside AG2 pentasaccharide Austria/Japan seminar on Comparative Glycobiology and Development Biology 2009.9.21 葉山
6. 花島慎弥 新規シアル酸供与体を用いた ganglioside AG2 糖鎖の合成 有機合成化学協会 関東支部会新潟シンポジウム 2008.11.30 新潟
7. 花島慎弥 シアル酸を糖鎖中央部にもつ ganglioside AG-2 五糖の合成研究 第 28 回日本糖質学会年会

2008.8.19 筑波

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花島 慎弥 (HANASHIMA SHINYA)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖構造生物学

研究チーム・基幹研究所研究員

50373353