

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月3日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590021

研究課題名（和文）生命現象解明のための機能性糖関連物質の創製と創薬への応用

研究課題名（英文）Development of novel sugar-related organic compounds utilized for the elucidation of life phenomenon.

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（和文）：

本研究は、化学的に安定な新しい糖関連機能性分子を化学合成によって創出し、生命現象の解明のためのツールとして用いることを目的とした。エーテル結合糖の合成法を確立し、糖鎖構造の認識機構解明のための新しい分析法を開発した。特に、自己組織単分子膜(SAM: Self-Assembled Monolayers)法を水溶性の糖について応用し、糖類の弱い結合を認識する方法を確立した。また、糖含有生理活性物質であるレベッカマイシン誘導体の合成に成功した。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate life phenomenon, novel sugar-related compounds (e.g., ether-linked sugars, Rebeccamycin derivatives) were efficiently synthesized. A new analytical method, which is utilizing SAM:Self-Assembled Monolayers, was also developed and was used for biological investigation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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、エーテル結合糖、糖尿病、糖鎖、レベッカマイシン、グリコシル化、SAM法、PA化法

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、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。糖

類と標的タンパクとの認識機構解明のためには、精緻な結合様式を分析できる手法の開発が必要と考えられた。そこで、本研究では、糖関連機能性物質をより容易に化学合成する新たな方法論の開発と、それらを用いた生命現象解明を可能とする分析法の開発を課題とした。

2. 研究の目的

(1) 化学的に安定な糖連結体の創製とこれを用いた血糖値降下機構の解明

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。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糖鎖である。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、エーテル結合による糖の連結を化学的に安定な糖鎖の一つの例としてとらえ、化学的安定性をもち、1位以外の様々な位置での連結も可能にする新しい糖連結法を創出することを目的とした。また、エーテル結合糖とグリコシル結合糖を組み合わせたハイブリッド糖の創製もめざした。これらのその作用機序解明を以下の(2)により行った。

(2) 糖鎖構造の認識機構解明のための新しい分析法の開発

糖鎖は非常に複雑な立体構造をもつため、その認識機構解明のためにはより精度が高く効率良い分析法の開発が必須と考えた。そこで、SAM法の糖鎖認識機構解明への応用と新規蛍光分析法としてPA化法の改良を目的とした。

(3) 糖類もたらす三次元的な構造を活かした新しい糖含有生理活性物質の創製

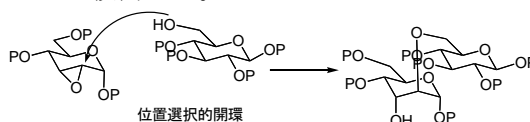
糖類を含有する生理活性物質は数多く存在し、糖部位が作用点との認識機構に関わることが示唆されている。私達は、糖の役割をより大きくとらえ、糖類が組み込まれることで分子全体の三次元的な構造にまで影響が及ぶと考えた。このような発想のもと、生理活性物質の三次元構造を制御する新しい機能性分子として糖類を医薬化学の分野に提供することをめざした。

3. 研究の方法

(1) 化学的に安定な糖連結体の創製とこれを用いた血糖値降下機構の解明

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得る。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) 糖鎖構造の認識機構解明のための新しい分析法の開発

①SAM法の糖鎖認識機構解明への応用: 最近開発された自己組織単分子膜(SAM: Self-Assembled Monolayers)法を水溶性の糖について応用する。糖関連化合物に適したSAMを新しく形成するために適切な長さ疎水性をもったリンカー部位及び吸着部位を設計し、糖関連化合物に導入する。ペプチドの同定にはファージディスプレイ法を利用する。

②新規蛍光分析法の開発: 従来のPA化法では、糖鎖の還元末端に直接2-aminopyridineを還元的アミノ化によって結合させ、蛍光標識を行っている。しかし、この方法では末端の糖鎖の環構造が破壊されるため、特に短い糖鎖の認識機構の解明にはふさわしくない。私達は、還元末端の糖の環状構造を保ったまま蛍光

標識化を行うことを試みた。すなわち、あらかじめ2-aminopyridineに水溶性の高いリンカー部位を組み込み、水溶液中でリンカーを介して還元末端糖鎖に結合させる、新たな蛍光標識導入法の開発をめざした。

(3) 糖類のもたらす三次元的な構造を活かした新しい糖含有生理活性物質の創製
糖類を含有する生理活性物質について、糖部位が認識機構に関わると言われている。私達は、糖部位だけでは不十分で、糖を含有することで分子の立体構造が大きく異なり、認識機構に影響すると考えた。これを実証すべく、インドロカルバズール骨格が糖と連結したRebeccamycinについて様々な類縁体を合成し、特に軸不斉に関わる三次元的な構造の変化を追究した。

4. 研究成果

(1) 化学的に安定な糖連結体の創製とこれを用いた血糖値降下機構の解明

エーテル結合糖の化学合成法に多様性をもたせるべく、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、高い選択性が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。

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) 糖鎖構造の認識機構解明のための新しい

分析法の開発

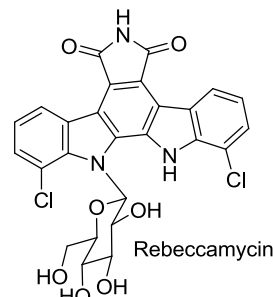
糖関連小分子とタンパク質との相互作用を解明するための新しい方法論の開発に成功した。糖類とタンパク質との非常に弱い相互作用を検出するための新しい方法として、QCM-PD-SAM法を共同研究者とともに見出すことに成功した。これまで、小分子とタンパク質の相互作用を検出するための方法論として、ビオチン-アビジン法が用いられてきた。しかし、糖類のような、タンパク質と大変弱い相互作用をする小分子については、ビオチン-アビジン法は適当ではなく、新しい方法論の開発が求められていた。そこで、単分子膜を形成しやすい金膜とイオウの相互作用に着目し、これを利用した高感度な検出法としてQCM-PD-SAM法を開発し、ト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。また、蛍光標識を利用したPA化法について、グリコシル化を利用して末端の糖を開環させずに蛍光部位を導入することに成功した。

(3) 糖類のもたらす三次元的な構造を活かした新しい糖含有生理活性物質の創製

Rebeccamycinの誘導体を化学合成することに成功した。

特にインドロカルバズール部位と糖部位によって立体構造がどのように構成されるのか、に着目し、ハロゲン置換基を変える

ことによって分子全体の構造が大きく異なることを明らかにした。糖によるコンホメーションが生理活性発現に重要であることを示すことができた。



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 Takeuchi, Tomoharu; Sugiura, Ken-ichi; Nishiyama, Kazusa; Takahashi, Hideyo; Natsugari, Hideaki; Arata, Yoichiro; Kasai, Ken-ichi. Sugar-binding properties of the two lectin domains of LEC-1 with respect to the Galβ1-4Fuc disaccharide unit present in protostomia glycoconjugates. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 査読有 **2011**, *34*,

- 1134-1138.
- ②□Caenorhabditis elegans proteins captured by immobilized Galβ1-4Fuc disaccharide units: assignment of 3 annexins. Takeuchi, Tomoharu; Takahashi, Hideyo; 他 8 名 *Carbohydrate Research* **2011**, *346*, 1837-1841.
- ③□Takeuchi, Tomoharu; Sugiura, Ken-ichi; Nishiyama, Kazusa; Takahashi, Hideyo; Natsugari, Hideaki; Arata, Yoichiro; Natsuka, Shunji; Kasai, Ken-ichi. β-galactosidases from Jack Bean and Streptococcus have different cleaving abilities towards fucose-containing sugars. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 査読有 **2011**, *34*, 567-569.
- ④□Nemoto-sasaki, Yoko; Takai, Shunsuke; Takeuchi, Tomoharu; Arata, Yoichiro; Nishiyama, Kazusa; Takahashi, Hideyo; Natsugari, Hideaki; Kasai, Ken-ichi. The DC2.3 gene in Caenorhabditis elegans encodes galectin that recognizes the galactoseβ1-4Fucose disaccharide unit. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 査読有 **2011**, 1635-1639.
- ⑤□Nishiyama, Kazusa; Yamada, Atsushi; Takeuchi, Tomoharu; Arata, Yoichiro; Kasai, Ken-ichi; Oshitari, Tetsuta; Natsugari, Hideaki; Takahashi, Hideyo. Synthesis of new Galβ1-4Fuc segments useful for biological investigations. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 査読有 **2011**, 1307-1310.
- ⑥□Nishiyama, Kazusa; Yamada, Atsushi; Takahashi, Miki; Takeuchi, Tomoharu; Kasai, Ken-ichi; Kobayashi, Susumu; Natsugari, Hideaki; Takahashi, Hideyo. Synthesis of fluorescence-labeled Galβ1-4Fuc as probes for the endogenous glycol-epitope recognized by galectins in Caenorhabditis elegans. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 査読有 **2010**, *58*, 495-500.
- ⑦□Takeuchi, Tomoharu; Nishiyama, Kazusa; Sugiura, Ken-ichi; Takahashi, Miki; Yamada, Atsushi; Kobayashi, Susumu; Takahashi, Hideyo; Natsugari, Hideaki; Kasai, Ken-ichi. Caenorhabditis elegans galectins LEC-6 and LEC-1 recognize a chemically synthesized Galβ1-4Fuc disaccharide unit which is present in Protostomia glycoconjugates. *Glycobiology* 査読有 **2009**, *19*, 1503-1510.
- ⑧□Nishiyama, 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* 査読有 **2009**, *17*, 195-202.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 西山和沙、山田篤、武内智春、草柳友恵、松本勇記、高草木洋一、菅原二三男、坂口謙吾、小林進、笠井猷一、夏苺英昭、高橋秀依、線虫内在性糖鎖の分子プローブ化及び標的タンパク質の探索、日本薬学会第131年会、2011年3月28日 静岡
- ② 西山和沙、山田篤、武内智春、草柳友恵、松本勇記、高草木洋一、菅原二三男、坂口謙吾、小林進、笠井猷一、夏苺英昭、高橋秀依、線虫ガレクチンLEC-6による糖鎖認識機構解明のための分子プローブの合成及びその評価、第52回天然有機化合物討論会、2010年9月29日 静岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等
 なし

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

なし

(3) 連携研究者

なし