

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5月8日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21603007

研究課題名（和文）リガンドからのアプローチによる動物レクチン機能の解析と応用

研究課題名（英文）Elucidation of functions of animal lectins by employing synthetic ligands

研究代表者

石田 秀治（ISHIDA HIDEHARU）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20203002

研究成果の概要（和文）：

B細胞の活性化制御に関わるシグレック-2と、自然免疫の防御因子であるマンナン結合タンパク質（MBP）に着目し、合成リガンドを用いてそれらの機能を解明した。特にシグレック2の研究では、当該レクチンを強く阻害する物質を見出し、B細胞活性化の抑制を解除することに成功した。本物質はマウスのインフルエンザ感染を有意に抑制し、医学・薬学的応用の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Functions of siglec-2 expressed on B cell and mannan-binding protein (MBP) concerned with innate immunity were studied by employing their synthetic ligands as well as inhibitors. A novel, potent inhibitor of siglec-2 was developed based on the structure-activity relationship of a series of sialosides as siglec-2 ligands, and which was found to be significantly effective to protect mice from the infection with influenza virus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：糖鎖リガンド

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンの形で、生体内のすべての組織、細胞に含まれている。従来、生体エネルギー源として糖の機能が研究されてきたが、今日、糖鎖の研究は生体情報分子としての機能に注目が集まっている。ポストゲノム研究の重要性が認識される現在、糖鎖科学はその中心的役

割を担っていると言っても過言ではない。糖鎖の多彩な生物機能を考えるうえで、糖鎖情報の解読分子としての内在性糖鎖認識タンパク質（動物レクチン）の生物学的意義の解明が重要性を増している。動物レクチンは、血液・体液中に分泌され、あるいは血球・血管細胞表面に発現され、免疫・炎症など様々な生体防御反応の調製に役割を果たしてい

ることが明らかになってきた。

一方、糖鎖の有機合成技術は、我が国が世界をリードする分野であり、なかでも糖脂質の一種であるガングリオシドの系統的合成や糖タンパク質糖鎖の精密合成は国際的に高く評価されている。また、近年、合成化学の優れた技術、知識を基盤として生物現象の解明に取り組む **Chemical Biology** という新しい学問分野の重要性が認識され、糖鎖科学研究においても、このコンセプトを積極的に活用していくことが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、動物レクチンとして先天性免疫因子である血清レクチン MBP (マンナン結合タンパク質) と、B 細胞の抗体産生の制御に関わっているシグレック 2 (CD22 とも呼ばれる) に着目し、そのリガンド分子の化学合成を中心とした **Chemical Biology** により、それらの生体機能の解明を目的とする。以下、詳述する。

(1) シグレック-2の研究

シグレックは免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、シアル酸を含む糖鎖を認識するタンパク質の総称である。その一種であるシグレック 2 (CD22) は、 α 2-6 シアル酸を特異的に認識し、抗体産生細胞の前駆細胞である B リンパ球に発現する。まず、シグレック 2 とリガンド糖鎖の親和性を解析するための分子プローブの開発を目的として研究を行った。

(2) MBP リガンドの研究

一方、MBP はマンノース結合型タンパク質あるいはマンノース (マンナン) 結合レクチンとも呼ばれる C 型動物レクチンである。MBP はある種のガン細胞に対して細胞障害作用を持つことが示されており、リガンド糖鎖としてルイス a エピトープの繰り返し構造が提案されている。本研究では、MBP のリガンド構造要求性の解明を目的として、繰り返し単位 1-5 までのルイス a タンデム構造の構築を目指している。

3. 研究の方法

(1) シグレック-2の研究

シグレック-2に関するこれまでの研究において、シグレック-2に対する高親和性リガンドを見出すとともに、リガンド認識機構の構造生物学的解析に成功している。本研究ではその研究で得られた高親和性リガンド (シアル酸の 9 位にビフェニル基を有する誘導体) をモチーフにして、還元末端からスペーサーを介してビオチンを結合させ、表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析用のプローブを開発

する。

続いて、シグレック高親和性リガンドとハプテンであるニトロフェニル基を多価で結合させた複合体を設計・合成する。その合成にはアジドとアルキンによるクリックケミストリーを用いることとし、糖鎖リガンドの還元末端ガラクトースにはアジドアルキル基を導入し、一方で、アルキンを末端に有するスペーサーを調製した後、最終段階で縮合する。

本分子は、初回感染時の迅速・大量抗体産生の可能性を検証するモデル分子であり、その結果ポジティブな結果が得られれば、ハプテンとして細菌由来抗原を組み込み、実際の感染に対する有効性を検証していく。

(2) MBP リガンドの研究

MBP のリガンドとして、ルイス a エピトープがタンデム型に結合した構造 (n=1-6) の系統的合成を行った。設計した分子は、還元末端にリンカーとして遊離のグルコースを有しており、そのアルデヒド基を利用して標識化、プレートへの固定化など種々の修飾が可能である。また系統的な合成を可能にするため、ビルディングブロックとなるルイス a 3 糖は、糖供与体として糖鎖伸長反応に供した後、一段階で糖受容体に変換できるような保護基を選択した。

まず、ルイス a 3 糖ビルディングブロックの効率的構築法を開発し、それを用いて糖供与体を十分量調製する。一方で、ルイス a 3 糖と還元末端グルコースを縮合し、初発の糖受容体を合成する。またこの 4 糖の脱保護を行いルイス a 単量体 (n=1) に導くことで、脱保護の条件を確立する。

続いて、合成した還元末端 4 糖受容体に 3 糖供与体を縮合し、7 糖に導いた後、一方は脱保護ルイス a 2 量体 (n=2) に導く。他方は選択的脱保護を行って糖受容体に変換した後に、更なる糖鎖伸長に供する。この過程を繰り返すことにより n=1-6 の系統的合成を達成する。合成品は MBP との結合能を評価し、MBP の最小リガンド構造を明らかにする。

4. 研究成果

(1) シグレック-2の研究

これまでの研究でシグレック-2に一定の親和性を有することが知られている 9-biphenyl-NeuGc α 2-6Gal をモチーフにし、還元末端にアルキンを導入後、末端にビオチンを有するアジド体をクリックケミストリーによって縮合させ、目的とする分子プローブ

を合成することに成功した。本プローブを用いることでELISA法でのスクリーニングが可能になり、本プローブを用いて系統的な類縁体の設計・合成とシグレック2に対する親和性の評価を進めた。その結果、シアル酸の2位及び9位に芳香族置換基を導入することで、nMのレベルでCD22の機能をブロックする分子の創製に成功した。

さらに当該分子の個体レベルの生物活性を評価することとし、CD22欠損マウスを対象群としてインフルエンザ感染に対する抵抗性を調べた。その結果、CD22欠損マウスと同様に感染後の体重減少を抑制し、臨床スコアを用いても同様の評価が得られた。当該化合物は免疫反応を早期化させる機能を有し、ユニバーサルな感染防御剤としての応用が期待される。最後に医学薬学的応用を視野に入れて、本化合物の大量合成法の確立を達成した。また当該化合物を合成展開し、より強い活性を示す化合物を見出した。この化合物はPET標識への応用が可能であり、非常に有用である。

(2)MBPリガンドの研究

まず、繰り返し単位1〜3のLe^aタンデム構造を構築したが、得られた糖鎖はMBPと有意な親和性を示さなかった。

続いてルイスAエピトープの4〜5回の繰り返し構造を有する糖鎖の合成を目指した。鍵中間体となるルイスA3糖の構築に成功し、適切な保護基に変換することで、グルコシル化反応供与体(ドナー)とグルコシル化反応受容体(アクセプター)に導いた。またネオラクトサミンを用いて合成ブロックの縮合反応を検討し、最適条件を確立した。今後、上述のルイスa3糖ドナーとアクセプターを確立した条件で縮合することで、目的とするルイスaオリゴマーの構築が達成されると期待される。

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5件) (全て査読有り)

1. Abdu-Allah, H.H.M., Watanabe, K., Daikoku, S., Kanie, O., Tsubata, T., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Design and synthesis of a multivalent heterobifunctional CD22 ligand as a potential immunomodulator, *Synthesis*, 18, 2968-2974, 2011.

2. Abdu-Allah, H.H.M., Watanabe, K., Completo, G.C., Magesh, S., Hayashizaki, K., Takaku, C., Tamanaka, T., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Paulson, J.C., Tsubata, T., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: CD22-Antagonists with nanomolar potency: The synergistic effect of hydrophobic groups at C-2 and C-9 of sialic acid scaffold. *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 1966-1971, 2011.
3. Kawasaki, N., Lin, C.-W., Inoue, R., Khoo, K.-H., Kawasaki, N., Ma, B.Y., Oka, S., Ishiguro, M., Sawada, T., Ishida, H., Hashimoto, T. and Kawasaki, T.: Highly fucosylated N-glycan ligands for mannan-binding protein expressed specifically on CD26 (DPPVI) isolated from a human colorectal carcinoma cell line, SW1116. *Glycobiology*, 19, 437-450, 2009.
4. Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Hayashizaki, K., Takaku, C., Tamanaka, T., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M.: Potent small molecule mouse CD22-inhibitors: Exploring the interaction of the residue at C-2 of sialic acid scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 5573-5575, 2009.
5. Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Hayashizaki, K., Iwayama, Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M.: Synthesis of biotinylated sialoside to probe CD22-ligand interactions. *Tetrahedron Lett.*, 50, 4488-4491, 2009.

[学会発表] (計6件)

1. 菅沼勇輝, 岩山祐己, 植木章晴, 今村彰宏, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真 : Siglec-2 阻害剤の効率的合成法の開発, 2012 年度大会日本農芸化学会、京都、平成 24 年 3 月 22 日-26 日 (Oral).
 2. Ishida, H.: Design, synthesis and biological evaluation of novel sialosides as potent and selective inhibitors for siglecs. Freie Universität Berlin, Germany, August 27, 2010 (Lecture).
 3. Abdu-Allah, H. H. M., Ishida, H., Watanabe, K., Tsubata, T., Completo, G., Paulson, J. C., Ando, H. and Kiso, M.: Design, synthesis and biological evaluation of novel sialosides as potent and selective inhibitors for siglecs. 13th International Conference on Biology and Chemistry of Sialic Acids – SialoGlyco 2010, Potsdam, Germany, August 21-26, 2010 (Poster).
 4. Ishida, H.: Design and Synthesis of Novel Sialosides as CD-22 Inhibitors. Toward Systems Glycobiology 3 -Let's talk about sialic acids in Nagoya!-. (October 20, 2009, 生物機能開発利用研究センター (名古屋))
 5. Abdu-Allah, H.H.M., Tamanaka, T., Takaku, C., Yu, J., Lu, Z., Magesh, S., Adachi, T., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M.: CD22 ligands: Design synthesis and applications. The Fifth iCeMS International Symposium “Biomaterials at the interface of chemistry, physics, and biology” (July 27-28, 2009, Clock Tower Cenntennial Hall, Kyoto University). (poster)
 6. Abdu-Allah, H.H.M., T. Tamanaka, C. Takaku, Yu, J., Lu, Z., Magesh, S., T. Adachi, Tsubata, T., Ishida, H., and Kiso, M.: Exploring structure-affinity relationships of CD22-inhibitors. 22, JST 戦略的創造研究推進事業「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」CREST 国際シンポジウム「獲得免疫と糖鎖生物学」, 木更津市 (千葉), 2009 年 3 月 23 日~24 日. (poster)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 1 件)
1. 出願番号 特願 2009-177776
 発明者 鏑田武志、木曾真、石田秀治、アブドゥ・アラ、ハジャジハッサンモハメッド
 発明の名称 CD22 分子に対する高親和性を有し B 細胞の増殖を増強する化合物
 出願人：東京医科歯科大学、岐阜大学
 出願日 平成 21 年 7 月 30 日
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]
- ホームページ等
<http://www1.gifu-u.ac.jp/~kasseil/>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
 石田 秀治 (ISHIDA HIDEHARU)
 岐阜大学・応用生物科学部・教授
 研究者番号：20203002
 - (2) 研究分担者
 ()
 研究者番号：
 - (3) 連携研究者
 川崎 敏祐 (KAWASAKI TOSHISUKE)
 立命館大学・糖鎖工学研究センター・教授
 研究者番号：50025706
- 連携研究者
 鏑田 武志 (TSUBATA TAKESHI)
 東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学部・教授
 研究者番号：80197756