

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688014

研究課題名(和文) ガングリオシドが持つ神経突起促進活性の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Study on the molecular basis underlying neurite outgrowth promotion by gangliosides

## 研究代表者

安藤 弘宗 (Ando, Hiromune)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20372518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：ガングリオシドと呼ばれる分子が示す神経突起伸展作用の仕組みを解明することを目的として、本研究を実施した。独自に開発した方法を用いて、伸展作用のあるガングリオシドを化学合成することに初めて成功し、合成したガングリオシドを用いて、伸展作用の発現に不可欠な分子構造を初めて明らかにした。また、神経細胞膜でのガングリオシドの振る舞いを観察するために蛍光色素で標識したガングリオシドを合成することができ、この蛍光ガングリオシドを用いて、一分子追跡法という単一の分子の振る舞いを観察する手法によって、生細胞膜での挙動を世界で初めて捉えることができた(連携研究者 鈴木健一准教授・京都大学)。

研究成果の概要(英文)：The goal of this research is to clarify the molecular basis underlying the neurite outgrowth promotion by exogenous gangliosides. We have succeeded in the first total syntheses of neuritogenic gangliosides and their analogues based on the newly developed synthetic method. The synthesized gangliosides were utilized for neurite outgrowth evaluation, by which the structure responsible for the activity was revealed for the first time. Furthermore, we have also developed novel fluorescently labeled ganglioside probes suitable for observing the behavior of ganglioside in living cell membrane. The single molecular observation using the ganglioside probes allowed to observe how ganglioside molecule moves in the cell membrane (done by collaboration with Prof. Kenichi Suzuki of Kyoto University).

研究分野：糖鎖合成化学、生物有機化学

キーワード：ガングリオシド 神経突起伸展 構造活性相関 一分子観察

1. 研究開始当初の背景

ganglioside はシアル酸を糖鎖末端に有する糖脂質の一群である。脳に高発現する ganglioside には、強力な神経突起促進活性があることが 80 年代に報告されており、これを契機として哺乳類脳 ganglioside を用いた神経疾患（パーキンソン病、アルツハイマー病など）または外傷性脳疾患における神経機能の再生修復の試みがアメリカを中心に始まった。しかし、当初は脳 ganglioside の供給源が牛の脳であったため、プリオン汚染の発覚により、あえなく治療研究は大きな減退を余儀なくされた。

一方で、九州大学の樋口らによって、棘皮動物（ナマコ、ウニ、ヒトデ、ウミユリなど）から、神経モデルである PC12 細胞（ラット副腎髄質褐色細胞腫）に対する強力な神経突起促進活性を有する新種の ganglioside が次々と発見されていた。それらは、シアル酸という共通糖残基を有しながらも、哺乳動物 ganglioside とは異なる特殊な構造を有し、その活性は、哺乳動物 ganglioside と同等またはそれ以上であることが報告されている。しかし、ganglioside の脂質部分であるセラミドには類似構造が多数あり、同一の糖鎖構造に対して、種々のセラミドが結合し、いわゆる構造多様化が生じている。そのため、構造が単一でかつ大量の ganglioside を天然資源から得ることは困難であり、この試料調達の困難さが活性発現の機序解明や創薬研究への展開への隘路となっていた。

ganglioside を神経疾患の治療に応用する利点は、その高い生体適合性にある。元来、細胞構成成分であることから毒性、副作用が非常に低く、また、抗原性が低いことも知られており、創薬源としての ganglioside の潜在能力は高いといえる。上述の研究停滞の事例に共通する、純粋な（構造が単一の）ganglioside の安定供給（＝化学合成）という問題さえ解決できれば、糖鎖の生理活性を基盤とする新しい創薬研究が進展することは想像に難くないと言える。

我々の研究室は、ganglioside の機能解明と機能応用を目的として ganglioside の化学合成研究に傾注し、研究開始当初までに、哺乳類脳に特異的に発現する ganglioside の大量合成法の開発、神経突起促進活性を有する棘皮動物 ganglioside の合成において成果を収めていた。また、細胞膜での ganglioside の挙動解析に有用な ganglioside プロープの開発における先行研究で、細胞膜中で天然の ganglioside と同様な挙動を示すプロープの分子設計において新たな指針を得ていた。

ganglioside が示す神経突起伸展活性の機構について、生化学的な研究が進められており、ganglioside が神経成長因子 (NGF) 受容体の一つである TrkA と結合することが示されていた。しかし、それ以上の分子レベ

ルでの機構解明は進んでいなかった。

2. 研究の目的

上述の状況を背景として、本研究では、有機化学的手法により神経突起伸展活性を有する哺乳類脳、棘皮動物 ganglioside およびその類縁体と機能性プロープ合成し、それらを用いて PC12 細胞に対する神経突起伸展作用の機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

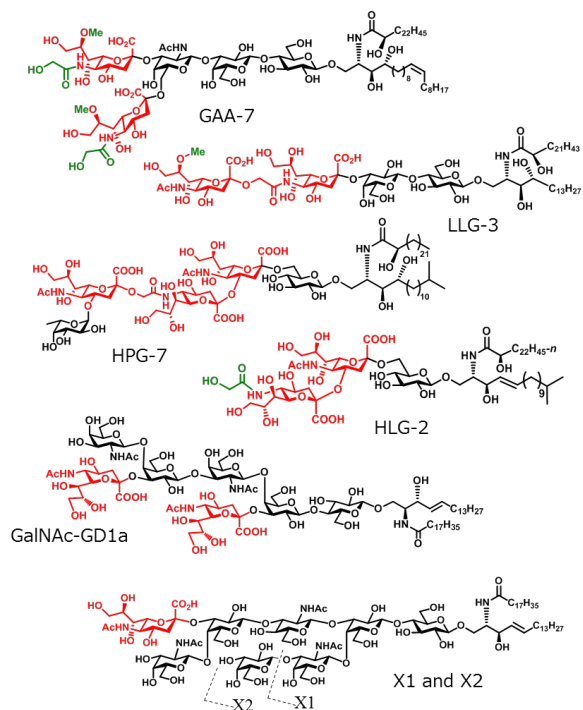
本研究では、分子機構の解明に向けて、以下の研究項目を実施することとした。

- (1) 哺乳類神経系および棘皮動物 ganglioside の化学合成
- (2) 合成 ganglioside を用いた活性評価
- (3) 活性の強力な ganglioside の類縁体合成と類縁体を用いた構造活性相関の解明および最小有効構造の抽出
- (4) TrkA と活性 ganglioside との結合評価
- (5) ganglioside による神経突起伸展に関わるシグナル伝達経路の解析
- (6) 一分子追跡用 ganglioside プロープの合成
- (7) プロープを用いた細胞膜での ganglioside の挙動解析

4. 研究成果

- (1) 哺乳類神経系および棘皮動物 ganglioside の化学合成

本研究において、当研究室で開発した「高反応性シアル酸供与体」「シアル酸部分修飾法」「糖鎖・脂質結合法」を用いて ganglioside 10 種を世界で初めて合成した。（下図：合成した主要な ganglioside）



(2) 合成ガングリオシドを用いた活性評価  
本研究により合成したガングリオシドおよび既に合成済みのガングリオシドを用いて NGF 存在下での PC12 細胞に対する神経突起伸展活性を評価した。

nM レベルの濃度で活性を示した分子  
GQ1b, GT3, GM1, GM3 類縁体, HLG-2, LLG-3, GAA-7, PNG-2A

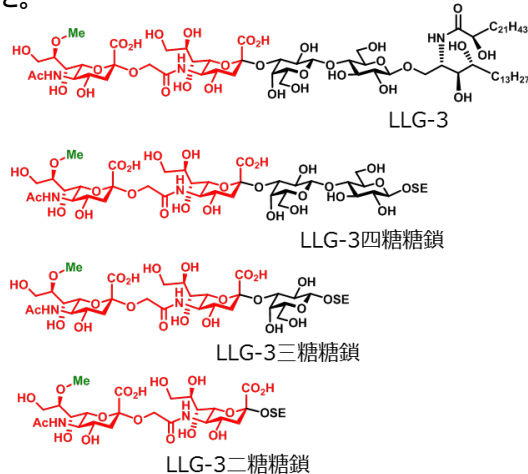
nM レベルの濃度で活性を示さなかった分子

GM3, GD3, HPG-7, HPG-1 糖鎖

上記の活性を示したガングリオシドの中で、哺乳動物の脳に高発現する GQ1b と棘皮動物由来の LLG-3 が強力な活性を示した。GQ1b と LLG-3 の構造上の共通点は、シアル酸の二量体を糖鎖末端に含むことであるが、二量体の構造は同一ではなく、また GQ1b の糖鎖は分岐八糖であり、LLG-3 は直鎖四糖であるという大きな違いがある。本研究では、より単純な構造で同等の活性を示す LLG-3 の効率に着目し、LLG-3 を構造活性相関研究の対象とすることとした。

(3) 活性の強力なガングリオシドの類縁体合成と類縁体を用いた構造活性相関の解明および最小有効構造の抽出

上述の結果より、LLG-3 の構造活性相関研究に向けて、以下の LLG-3 糖鎖類縁体を合成した。



これらの類縁体を活性試験に供したところ、nM レベルの濃度で有意に活性を示したものは、LLG-3 四糖糖鎖、LLG-3 三糖糖鎖であり、LLG-3 二糖糖鎖は有意な活性を示さなかった。このことから、活性発現の最小有効糖鎖は三糖であると結論した。

この結果を受け、8位のメチル基を欠いた LLG-3 三糖類縁体、9位水酸基をメチル化した LLG-3 三糖類縁体を合成し、活性試験に供した。その結果、メチル基を欠いた類縁体では活性が消失し、9位メチル体では8位メチル体と同等の活性を示すことが分かった。これらの活性評価より、LLG-3の活性発現には、末端シアル酸の側鎖水酸基がメチル化修飾を受けることが必須であることが明らかとなった。

(4) TrkA と活性ガングリオシドとの結合評価

活性発現の最小有効構造である LLG-3 三糖を用いて、NGF 受容体である TrkA との結合性を調べることにした。まず結合試験のために LLG-3 三糖の還元末端にアミノ基を有するスパーサーを導入した誘導体を合成した。結合評価にはバイオレイヤー干渉法を用いることとし、センサーチップ末端に LLG-3 三糖誘導体をアミド結合により固定化し、TrkA 細胞外領域含有培養上清を用いて結合評価を行った。その結果、予備的な段階であるが、TrkA と LLG-3 三糖との結合を確認することができた。今後は、種々の類縁体との結合の速度論的解析を進めることにより、LLG-3 と TrkA の結合性を定量評価できるものと考えられる。

(5) ガングリオシドによる神経突起伸展に関わるシグナル伝達経路の解析

本研究では、LLG-3 三糖が別種の神経細胞に対しても神経突起伸展作用を示すことを見出した。この細胞を用いて LLG-3 の添加によって増強されるシグナル伝達経路を解析したところ、ERK-1/2 のリン酸化を促進していることが明らかとなった。

(6) 一分子追跡用ガングリオシドプローブの合成

PC12 細胞の神経突起伸展作用において、以前よりガングリオシドが TrkA と相互作用することが報告されており、細胞膜上で形成されるガングリオシドを含んだ脂質ラフトと TrkA との相互作用に興味を持たれている。本研究では、先行研究によって明らかとなったガングリオシドプローブの設計指針に基づき、TrkA と相互作用するガングリオシドとして知られている GM1 の一分子追跡用ガングリオシドプローブの開発を行った。合成した蛍光標識された GM1 プローブは、種々の生物物理的評価によって、天然の GM1 と等価的なプローブであることが証明され、これまでにない信頼性の高いガングリオシドプローブの開発に成功した。また、この他の主要なガングリオシドのプローブ化にも成功した。

(7) プローブを用いた細胞膜でのガングリオシドの挙動解析

上述したガングリオシドプローブを用いて、先行実験として GPI 型蛋白質受容体である CD59 との相互作用を一分子追跡法により解析した。その結果、CD59 クラスタに対して、ガングリオシドが特異的に共局在（相互作用）する様子を初めて捉えることに成功し、シグナル伝達の足場として重要な脂質ラフトとの形成機構の一端を明らかにすることができた(下図)。今後は、このプローブを用いて、TrkA とガングリオシドの相互作用解析を進めることにより、ガングリオシドによる神経突起伸展促進の動的機構の解明が達成されるものと期待できる。

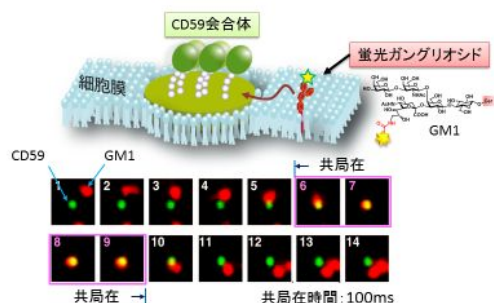


図 1分子イメージングによるタンパク質会合体とガングリオシドの共局在の観察

ガングリオシドが脂質ラフトの核となるタンパク質会合体に特異的にリクルートされる様子を初めて捉えた。

## 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 22 件)

- Expanded potential of seleno-carbohydrates as a molecular tool for X-ray structural determination of a carbohydrate-protein complex with single/multiwavelength anomalous dispersion phasing; (T. Suzuki, H. Makyio, H. Ando, N. Komura, M. Menjo, Y. Yamada, A. Imamura, H. Ishida, S. Wakatsuki, R. Kato, M. Kiso), *Bioorg. Med. Chem.* 22, 2090-2101, **2014**. 査読有 doi:10.1016/j.bmc.2014.02.023
- A Facile Method for Synthesizing Selenoglycosides Based on Selenium-Transfer to Glycosyl Imidate; (T. Suzuki, N. Komura, A. Imamura, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso), *Tetrahedron Lett.* 55, 1920-1923, **2014**. 査読有 doi: 10.1016/j.tetlet.2014.01.151
- Extending the Glucosyl Ceramide Cassette Approach: Application in the Total Synthesis of Ganglioside GalNAc-GM1b; (M. Konishi, A. Imamura, K. Fujikawa, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso), *Molecules* 18, 15153-15181, **2013**. 査読有 doi: 10.3390/molecules181215153
- First synthesis of a pentasaccharide moiety of ganglioside GAA-7 containing unusually modified sialic acids through the use of N-Troc-sialic acid derivative as a key unit; (H. Tamai, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso) *Org. Lett.* 14, 6342-6345, **2012**. 査読有 doi: 10.1021/ol303122w
- Efficiently Synthesizing Lacto-Ganglio Series Gangliosides by Glucosyl Ceramide Cassette Approach: The First Total Synthesis of Ganglioside X2; (S. Nakashima, H. Ando, R. Saito, H. Tamai, H. Ishida, M. Kiso) *Chem. Asia. J.* 7, 1041-1051, **2012**. 査読有 doi: 10.1002/asia.201100928
- Synthesis of the disialic acid-embedded glycan part of ganglioside HPG-1; (H. Shimizu, Y. Iwamaya, A. Imamura, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso) *Biosci. Biochem. Biotech.* 75, 2079-2082, **2011**. 査読有 doi: 10.1080/09168451.2014.990228
- Synthesis of the glycan moiety of ganglioside HPG-7 with an unusual trimer of sialic acid as the inner sugar residue; (Y. Iwayama, H. Ando, H.-N. Tanaka, H. Ishida, \*M. Kiso) *Chem. Commun.* 47, 9726-9728, **2011**. 査読有 doi: 10.1039/c1cc13200h
- The first total synthesis of ganglioside GalNAc-GD1a, a target molecule for autoantibodies in Guillain-Barré syndrome; (K. Fujikawa, S. Nakashima, M. Konishi, T. Fuse, N. Komura, T. Ando, H. Ando, N. Yuki, H. Ishida, M. Kiso) *Chem. Eur. J.* 17, 5641-5651, **2011**. 査読有 doi: 10.1002/chem.201003357
- The total synthesis of neurogenic ganglioside LLG-3 isolated from the starfish *Linckia laevigata*; (H. Tamai, H. Ando, H.-N. Tanaka, H. Ishida, M. Kiso) *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 2330-2333, **2011**. 査読有 doi: 10.1002/anie.201006035
- A first total synthesis of hybrid type ganglioside associated with amyotrophic lateral sclerosis-like disorder; (S. Nakashima, H. Ando, A. Imamura, N. Yuki, H. Ishida, M. Kiso) *Chem. Eur. J.*, 17, 588-597, **2011**. 査読有 doi: 10.1002/chem.201002184

[学会発表](計 51 件)

(1) 招待講演

- Diverse synthesis of gangliosides for exploring functional molecular complexes in the cell membrane; (H. Ando) SFG-JSCR Joint Meeting 2014, Satellite I: Chemical Aspects of Glycobiology, November 16-19, **2014**, Hawaii, USA.
- Ganglioside Synthesis Makes for Raft Science; (H. Ando) Asia-Canada Glycoscience Meeting, May 31-June 1, **2014**, Vancouver, Canada.
- Development of Novel Fluorescent Glycolipid Probe for Single Molecule Imaging of Mesoscale Domain in Living Cell Membrane; (H. Ando) 15th Asian Chemical Congress, August 19-23, **2013**, Sentosa, Singapore.

4. Novel fluorescent ganglioside probe for the single molecule imaging of raft domain; (H. Ando and M. Kiso) The Fourteenth International Membrane Research Forum, March 15-17, **2013**, Kyoto, Japan.
5. ガングリオシドの化学合成で細胞膜メゾ領域に迫る ;(安藤弘宗) 第 10 回日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 平成 24 年 11 月 29-30 日、東京コンファレンスセンター (品川、東京)
6. 糖鎖機能解明のための分子構築 —細胞膜糖脂質の謎に迫る— ;(安藤弘宗) 日本農芸化学会中部支部第 166 回例会若手シンポジウム、平成 24 年 11 月 2 日、福井県民会館 (福井市、福井)
7. 構造が複雑なシアル酸含有糖鎖および糖脂質の合成化学的研究 ;(安藤弘宗) 日本農芸化学会中部支部 第 164 回例会生活習慣病とライフスタイルイノベーション、平成 24 年 6 月 30 日、信州大学農学部 (長野市、長野)
8. Development of novel ganglioside probes for chemical biology of lipid raft; (H. Ando, H. Ishida, and M. Kiso), 3rd ACGG Conference, October 27-29, **2011**, Shanghai, China.

〔図書〕(計 2 件)

1. Synthesis of Sialic Acid-Containing Oligosaccharides and Sialylmimetics; (S. Magesh, H. Ando), *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., pp 404-447, **2013**.
2. Novel Approaches to Complex Glycosphingolipids; (H. Ando, P. Rita, H. Ishida, M. Kiso), *Modern Synthetic Methods in Carbohydrate Chemistry: From Monosaccharides to Complex Glycoconjugates*, Bentham Science Publishers, pp315-337, **2013**.

〔その他〕

(1) 学会賞

安藤弘宗

日本農芸化学会 農芸化学奨励賞(平成 24 年 3 月)

「構造が複雑なシアル酸含有糖鎖および糖脂質の合成化学的研究」

(2) アウトリーチ活動(出前講義 4 件)

講義題目: 「糖の鎖」が導く新しい生命の世界

岐阜県立大垣西高等学校(平成 26 年 6 月 19

日)  
岐阜県立本巣松陽高等学校(平成 26 年 6 月 26 日)  
愛知県立江南高等学校(平成 26 年 10 月 20 日)  
愛知県立東海南高等学校(平成 26 年 11 月 13 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 弘宗 (ANDO, Hiromune)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号: 20372518

(2) 連携研究者

鈴木 健一 (SUZUKI, Kenichi)

京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点・准教授

研究者番号: 50423059