

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710244

研究課題名(和文) β-グルカンの三重らせん高次構造と免疫賦活活性の相関における化学生物学

研究課題名(英文) Studies on the Relationship between the Triple Helical Structure and Immunostimulatory Activity of beta-glucan

研究代表者

谷口 透 (Taniguchi, Tohru)

北海道大学・先端生命科学研究所(研究院)・助教

研究者番号：00587123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：β-グルカンのような糖鎖・多糖の二次構造や高次構造は生理活性との関連が示唆されているものの、これを調べる方法は知られていなかった。本研究ではVCD(赤外円二色性)に着目し、「VCD励起子キラリティ法」と命名した新規手法を開発した。本法を用いてβ-グルカンの三重らせん高次構造変化を検出することに成功した。β-グルカンが三重らせん構造をとりうる最小単位の同定を指向し、鎖長の短いβ-グルカンの新規合成法を開発した。

研究成果の概要(英文)：The secondary and higher-order structure of oligo- and polysaccharides has been suggested to be important in exhibiting their biological activity; however, few methods have been available to study their relationship. In this study, through basic studies on vibrational circular dichroism (VCD), we developed a "VCD exciton chirality method", which allowed us to study stereostructures of complex molecules. By using this method, we successfully detected the conformational changes of beta glucan triple helix. Aiming at identifying the minimum structure of beta glucan to form triple helix, we also developed a new method to synthesize short beta glucan.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：糖 赤外円二色性 有機合成 糖スルホキシド 高分子構造

1. 研究開始当初の背景

糖鎖・多糖の二次構造・高次構造はその生理活性との関わりが示唆されているものも少なくない。例えば、国内で抗がん剤として臨床利用されているレンチナンなどのベータグルカン多糖は水中で三重らせん構造、DMSO などの有機溶媒中で一本鎖ランダムコイル状構造をとるとされており、その高次構造と免疫賦活活性の相関が指摘されている。しかしながら、二次構造-生理活性相関が広く研究されているタンパク質や核酸と異なり、糖鎖はその高次構造解析の困難さも相まって、その高次構造-活性相関については未だに未解明な点が多い。タンパク質や核酸は紫外吸収を示すため、CD (円二色性) によってその二次構造を簡便に解析する方法論が確立している。しかし、糖は紫外吸収を示さないため、新たな簡便な構造解析法の開発が求められる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、近年普及が進んできた赤外円二色性 (VCD) を用いて、多糖の新規高次構造解析法を確立することを第一の目的とした。VCD は赤外領域において、キラルな分子による左円偏光と右円偏光の吸収の差を観測する手法であり、従来の紫外領域の CD の赤外版である。全てのキラル有機化合物が赤外吸収を示すことから、あらゆるキラル分子の研究に有用なツールと言える。糖はキラル中心の集合体ともみなすことができ、VCD を用いることによって NMR など既存の手法とは異なった視点から糖の構造を「見る」ことができるようになると考えられる。具体的な研究対象として、ベータグルカンなどの VCD を検討することとした。

また、鎖長の短いベータグルカン (ベータグルカンフラグメント) が三重らせんを形成しうるかを確認するために、ベータグルカンフラグメントの効率的合成法を開発することを第二の目的とした。得られたフラグメントが三重らせんを形成する場合には免疫賦活活性を調査することを考えた。

3. 研究の方法

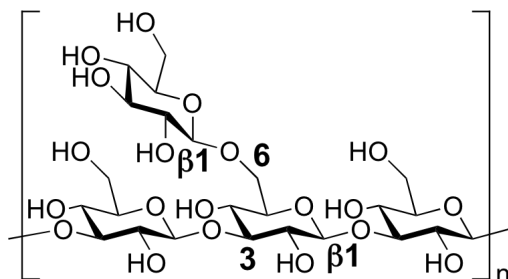


図 1. ベータグルカンの一般的構造。分岐の度合いはベータグルカンの種類によって異なる。

VCD のスペクトルの解釈は従来、理論計算によって行われてきた。すなわち、理論計

算が適用できないほど複雑な分子に対しては VCD による構造解析がこれまで困難だった。ベータグルカン (図 1) はグルコースが  $\beta$ 1-3 結合で連なった多糖であり、 $\beta$ 1-6 結合による分岐も有するなど、VCD 理論計算の範疇を越えた複雑な分子である。そこで本研究では、各種の天然物・合成化合物の VCD をつぶさに検証するところから研究を開始した。

また、ベータグルカンフラグメントの合成に当たり、グルコース同士を  $\beta$ 1-3 結合で効率的に連結させる方法が必要となる。本研究では主に、糖スルホキシド (図 2) を糖供与体として用いる、スルホキシドグリコシル化 (いわゆる Kahne グリコシル化) を用いて新規方法論を開発することとした。とりわけ、スルホキシド部分に存在する硫黄原子の不斉中心がグリコシル化反応に及ぼす影響を調べることにより、硫黄の立体化学によって制御する新たなグリコシル化法を開発できるものと考えた。糖スルホキシドの硫黄立体化学に着目した研究はこれまでほとんど例がないために新規性が高い。一方、本研究遂行に必要な技術として、硫黄部分に関するジアステレオマー (図 2) を効率的に分離する方法、ならびに分離した糖スルホキシドの硫黄部分の立体化学の決定法の確立が求められる。

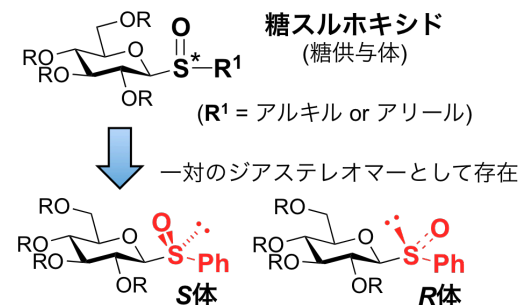


図 2. 糖スルホキシドのジアステレオマー

4. 研究成果

各種天然物の VCD を測定した結果、吸収波長の近い二つの赤外発色団が近接に存在するとき、その二つの発色団の位置関係を反映した高強度の分裂型 VCD ピークが観察されることを発見した。すなわち、二つの発色団が手前から奥に向かって時計回りに存在するとき (正の二面角)、低波数側から正-負の分裂型ピークを示し、反時計回りのとき (負の二面角) は負-正のピークを示す (図 3)。すなわち、このような分裂型ピークを観察するだけで、分子の立体構造を決定できる。

本手法は理論計算を用いる必要がないので、これまで VCD 理論計算では解析不可能だった複雑な分子の解析も可能となる。本手法を「VCD 励起子キラリティー法」と命名し、本成果をアメリカ化学会誌に報告した。なお、本結果はアメリカ化学会誌による注目論文

(Spotlights on Recent JACS Publications; 毎号から 3~4 報のみ選ばれる) に選ばれた。本 Spotlights に掲載されたのは、理研、阪大産業科学研究所に続き国内では 3 例目となった。

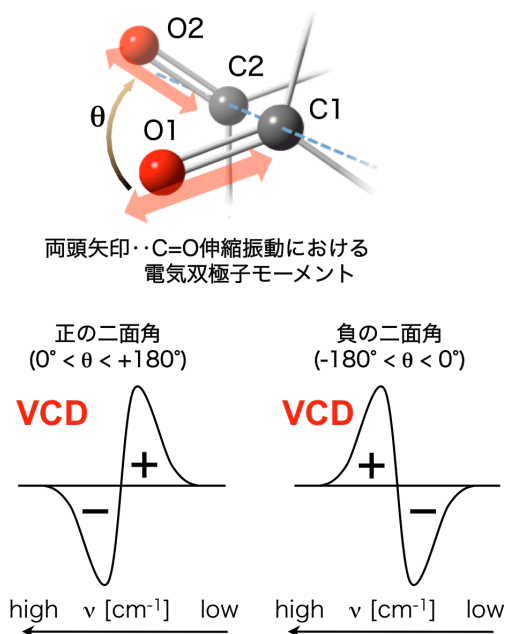


図 3. VCD 励起キラルリティー法を用いると、分裂型 VCD シグナルの形状から、分子の構造解析ができる。

本成果を基に、さっそく各種のベータグルカン多糖 (市販および提供いただいた 3 種) を DMSO 中および水中で VCD を測定した。その結果、予想通り三重らせんを形成する水中において、高強度かつ分裂型の VCD シグナルをいくつか観測することに成功した。VCD を用いて、多糖の構造変化を検出した最初の例となる。今後、他の多糖の構造変化研究にも、VCD が利用されるようになると期待される。

鎖長の短いベータグルカンでも三重らせん構造を形成するかどうかを確認するために、ベータグルカンフラグメントの合成法の開発に取り組んだ。とりわけ、スルホキシドグリコシル化を用いた新規方法論開発に向け、各種の糖スルホキシドのジアステレオマー対を入手し、グリコシル化における挙動の違いを見ることとした。それぞれの糖スルホキシドは対応する対応するスルフィドの酸化によってジアステレオマーの混合物として得た。ジアステレオマーの分割にあたり、キラル固定相を有する HPLC カラム、あるいは中圧クロマトグラフィー用カラムを用いると極めて効率的に両ジアステレオマーを得られることを見出した。本分離法の一般性は、各種の糖スルホキシド誘導体で確認した。なお、中圧クロマトグラフィー用のキラルカラムを用いた場合は 300 mg 以上のジアステレオマー混合物を 20 分以内で分離できた。

得られたジアステレオマーの硫黄部分の

立体化学の決定について、各々 VCD を測定した。スペクトルの解釈について、ジアステレオマー間の高い構造類似性を鑑み、励起キラルリティー法ではなく、理論計算を行うこととした。その結果、VCD の理論計算により、硫黄部分の立体化学を簡便に帰属できることを明らかにした。さらに驚くべき結果として、硫黄部分の立体化学の違いが糖の立体配座に影響を与えるということ初めて見出した (図 4)。

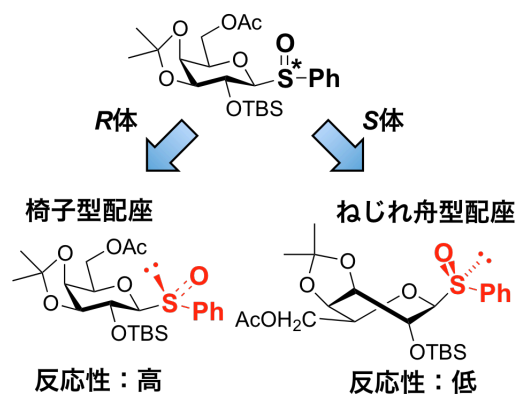


図 4. 糖スルホキシドの硫黄立体化学が異なる二つのジアステレオマーは糖部分の立体配座が異なることがある。また、Kahne グリコシル化の反応性にも影響を及ぼす。なお、図中にはグルコースではなくガラクトース誘導体の例を示した。

このような糖の立体配座の違いがグリコシル化反応に与える影響を調べるべく、各ジアステレオマーについて Kahne グリコシル化における収率や生成物について解析した。その結果、ジアステレオマーは反応性が異なるのみならず、生成物の  $\alpha:\beta$  比やオルトエステルの生成率が異なることが明らかとなった。

本結果を基に、ジアステレオマーの反応性の違いを利用したベータグルカン合成の新規方法論の構築を検討した。グルコース同士を  $\beta 1-3$  結合で連結させることは可能だったが、収率が 50%程度と中程度であった。既存の手法よりも効率的な手法として確立させるためには、今後の研究にて最適化が求められる。

スルホキシドグリコシル化によって構築したベータグルカン直鎖 6 糖について、DMSO 中および水中で VCD を測定した。なお、ベータグルカン多糖の結晶構造解析より、6 糖がらせん一巻きに対応していることが明らかとなっている。ベータグルカン両スペクトルはほとんど同じ形状を示したことから、三重らせんは形成されていないことが示唆された。今後、より重合度の大きいベータグルカンフラグメントについて検討を進めていく必要がある。

以上、本研究では VCD 励起キラルリティー

一法の開発に成功し、本法を用いてベータグルカンの高次構造変化を解析することに成功した。また、ベータグルカンの新規合成法の開発において、糖スルホキシドの硫黄立体化学におけるジアステレオマーの反応性を研究するための諸技術を確立し、その反応性が異なることも明らかにした。ベータグルカン三重らせん構造の形成に必要な最小単位は6糖より長いいずれかの鎖長であることを明らかにした。

谷口 透 (TANIGUCHI, Tohru)  
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教  
研究者番号：00587123

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1 谷口 透 「簡単に溶液状態の分子の立体構造を解析：赤外円二色性キラル分光法」現代化学、査読無、Vol. 518、2014、pp. 47-51.
- 2 谷口 透 「赤外円二色性によるキラル分子の構造解析」化学と工業、査読無、Vol. 66、2013、pp. 825-826.
- 3 谷口 透、門出健次 「Optical Rotation, Electronic Circular Dichroism and Vibrational Circular Dichroism of Carbohydrates and Glycoconjugates」Comprehensive Chiroptical Spectroscopy、査読有、Vol. 2、2012、pp. 795-818.
- 4 谷口 透、門出健次 「Exciton Chirality Method in Vibrational Circular Dichroism」、J. Am. Chem. Soc. 査読有、Vol. 134、2012、pp. 3695-3698.

[学会発表] (計 6 件)

- 1 谷口 透 他、「糖スルホキシドの硫黄立体化学：Kahne グリコシル化反応性と VCD 構造解析」日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 29 日、名古屋大学 (愛知)
- 2 谷口 透 他、「Exciton Chirality Method in VCD」第 14 回国際キラル分光法会議、2013 年 6 月 13 日、Vanderbilt 大学 (米国)
- 3 谷口 透 「赤外円二色性による天然物をはじめとする各種キラル分子の立体化学簡便解析」日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 22 日、立命館大学 (滋賀)
- 4 谷口 透 「VCD (赤外円二色性) による立体化学・立体配座決定の最先端」理研シンポジウム 第 13 回分析・解析技術と化学の最先端、2012 年 12 月 12 日、理化学研究所 (埼玉)
- 5 谷口 透 他 「The VCD Exciton Chirality Method: A Novel Nonempirical Method for Determination of Absolute Configuration」第 54 回天然有機化合物討論会、2012 年 9 月 18 日、東京農業大学 (東京)
- 6 谷口 透 「赤外円二色性における励起子キラリティー法」第 47 回天然物化学談話会、2012 年 7 月 5 日、阿蘇プラザホテル (熊本)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者