

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 6 日現在

機関番号：72690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510318

研究課題名(和文)糖鎖シルセスキオキサン型プローブを用いる抗糖鎖抗体スクリーニングシステムの開発

研究課題名(英文) Development of anti-saccharide antibody screening system using glycosylated silsesquioxane probe.

研究代表者

水野 真盛 (Mizuno, Mamoru)

公益財団法人野口研究所・その他部局等・その他

研究者番号：40271506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、糖鎖シルセスキオキサン型プローブを用いるハイスループットな抗糖鎖抗体スクリーニングシステムの構築である。

まず、糖鎖シルセスキオキサン型プローブの合成としてシルセスキオキサン(以下POSS)部位へのチオール・エン反応による糖鎖の導入について種々検討したが、副反応が優先して進行してしまい、目的物質を十分な量合成することが非常に困難であることが明らかとなった。そこで、アミド結合による導入を検討するためのPOSS誘導体の合成を検討した結果、1か所のアミノ基のみを保護したPOSS誘導体の合成に成功した。今後、得られたPOSSプローブを利用して目的の遂行を目指す。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the development of a high-throughput anti-saccharide antibody screening system using a glycosylated silsesquioxane probe .

First, various investigations on the introduction of the oligosaccharide by thiol - ene reaction to the silsesquioxane (POSS) derivative were carried out to prepare a glycosylated silsesquioxane probe. But side-reaction proceeded preferentially, and it was found that the synthesis of sufficient amounts of desired product is very difficult.

Next, in order to introduce oligosaccharide moiety to POSS by amide bond, synthesis of protected POSS derivative only one place amino group was investigated, and preparation of the desired compound was succeeded.

研究分野：有機化学

キーワード：糖鎖抗体 シルセスキオキサン フルオラス

1. 研究開始当初の背景

DNA、タンパク質に次ぐ第3の生体高分子として糖鎖がある。糖鎖は生体内で細胞間の認識や接着、ウイルスや毒素の感染など、分子や細胞の認識機能に密接に関与している。このように生命現象において非常に重要な役割を担っている糖鎖は、その生合成が遺伝子による直接支配を受けないため、糖鎖研究はポストゲノムにおける重要な研究分野であるといっても過言ではない。更に近年疾病に伴い細胞表層上の糖鎖構造が大きく変化することが明らかにされ、糖鎖はバイオマーカーとしても注目されている。いくつかの代表的なマーカー糖鎖については既に抗糖鎖抗体が市販され、診断にも応用されているが、天然に存在する大部分の糖鎖構造に対しては、選択性の高い抗糖鎖抗体は得られていないのが現状である。抗糖鎖抗体は疾病マーカーとしてのみならず、糖鎖特異的デリバリーや抗体医薬への応用が期待されている。また網羅的糖鎖機能解析システムを開発するうえでも欠かせないツールである。

2. 研究の目的

本研究では、非特異的吸着を抑制し高い糖鎖選択性を有するフルオラスタグ含有糖鎖シルセスキオキサン型プローブの合成と構造の最適化を目的とする。また、得られたプローブを用いた抗糖鎖抗体のハイスループットなスクリーニングシステムを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

1分子内にフルオラス基を1つと糖鎖を7つ有する、抗糖鎖抗体スクリーニング用シルセスキオキサンプローブ(フルオラスタグ含有糖鎖シルセスキオキサン)を合成する。シルセスキオキサンコアブロックはまず、糖鎖導入部位を有する不完全縮合体を合成した後、フルオラスタグの導入を行い完全縮合体とする。糖鎖部位の導入はHuisgen反応で行い、糖鎖をクラスター化させる。得られたプローブはフルオラス相互作用でPTFEウエルに固定化し、抗体スクリーニング用デバイスを調製する。得られたデバイスにM13ファージを用いたファージディスプレイ法を行い糖鎖特異的抗糖鎖抗体のハイスループットなスクリーニングシステムの構築を行う。

4. 研究成果

まずPOSS部位である「フルオラスタグ含有POSSコアブロック」の合成を行った。当初の計画では、アミノシラン誘導体を有機溶媒中で1価のアルカリ金属水酸化物と反応させることにより、不完全縮合型POSSを得たのち、フルオラス基を有するシラン誘導体を縮合させることでフルオラス基を1個所だけ有するPOSS誘導体を合成する。次に7

か所のアミノ基にプロピオール酸を縮合させることでアルキン部位を導入することで「フルオラスタグ含有POSSコアブロック」を合成する計画を立てた(図1)。

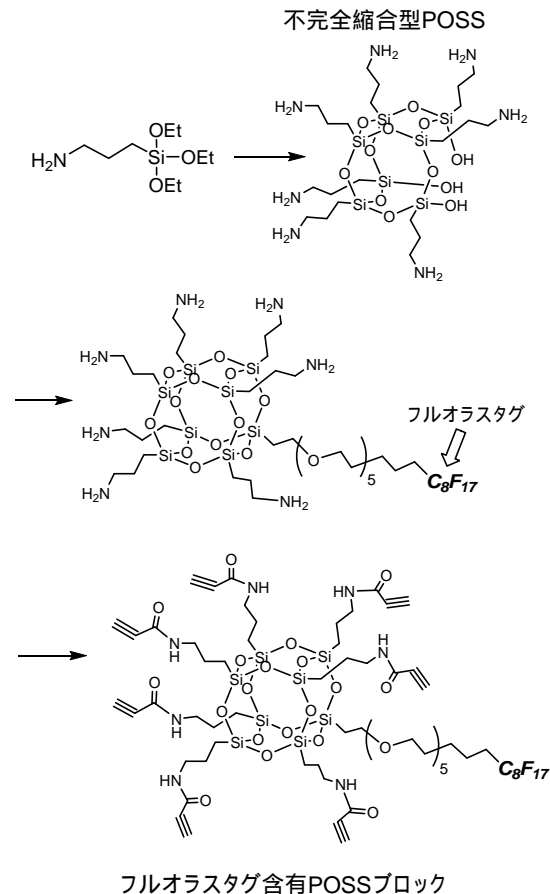


図1. フルオラスタグ含有POSSコアブロックの合成計画

まず、不完全縮合型POSSの合成について種々検討を行った結果、当初計画の構造である不完全縮合型POSSの合成は非常に困難であることが明らかとなった(図2)。

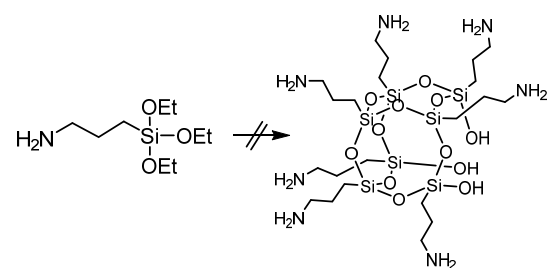


図2. 不完全縮合型POSSの合成検討

次に、アミノ基を8つ有するoctaamino-POSSの一か所のみフルオラス基をアミド結合で導入することを試みた。しかし縮合剤等、反応条件に付いて種々検討を行ったが、目的物は得られなかった(図3)。そこでシルセスキオキサンコアブロックの設計を初めから見直し、まず8個所ある官能基のうち、一か所みを修飾できる手法につい

て検討を行った。その結果、octavinyl-POSS をトリフルオロメタンスルホン酸と反応させると 8 個所のビニル基のうち 1 か所のみをヒドロキシエチル基へと変換させることに成功した。次に水酸基をアジド基に変換し、monoazide-heptavinyl-POSS (1) を合成した (図 4)。

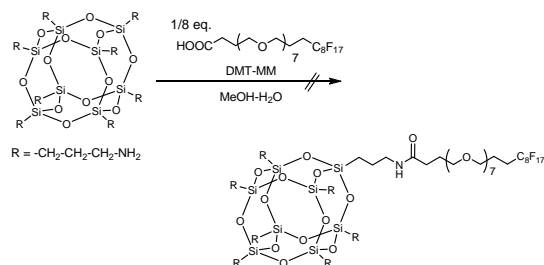


図 3 . Octaamino-POSS の 1 点修飾の検討

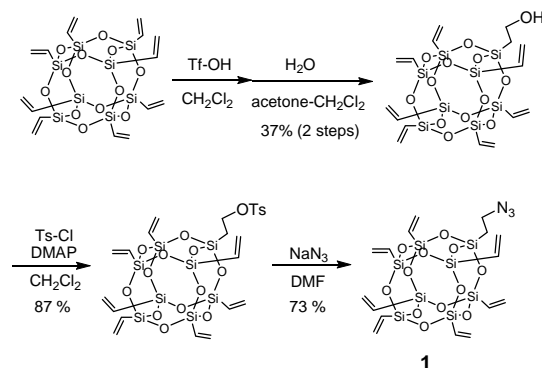


図 4 . Monoazide-heptavinyl-POSS の合成

次に、Huisgen 反応による化合物 1 のアジド基へのフルオラスタグの導入を検討した。まず PEG スパースを有するフルオラスタグ 2 の導入について種々検討を行ったが、導入がほとんど進行しないことが明らかとなった。そこでスパース部分を PEG 鎖からアルキル鎖へと変えたフルオラスタグ 3 を合成し、POSS ブロックへの導入を行ったところ、収率 61% で目的とするフルオラスタグ含有 POSS ユニット 4 を得ることに成功した。

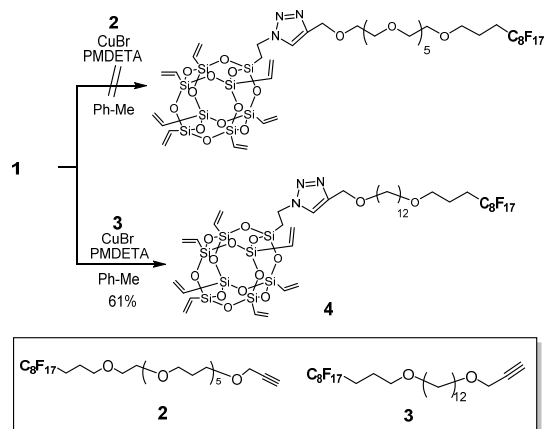


図 5 . POSS 誘導体へのフルオラスタグの導入

次に、チオール・エン反応による化合物 4 への糖鎖の導入について検討を行った。当初は GM3 型糖鎖をモデル化合物として用いる計画であったが、POSS ユニット合成の進捗が遅れたため、合成が容易なラクトース誘導体 5 に変更した。

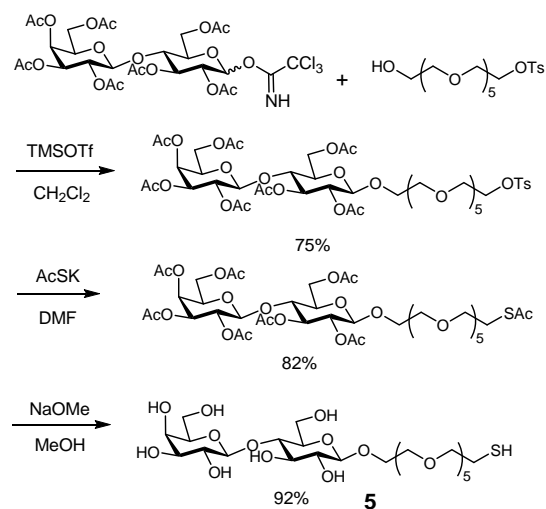


図 6 . ラクトース誘導体 5 の合成

得られた PEG 化ラクトース誘導体 5 のフルオラスタグ含有 POSS ユニット 4 への導入の検討を行った。その結果、POSS ブロック上の 7 か所の反応点に対する糖鎖の導入効率は平均 3 ~ 4 ヶ所であり、7 ヶ所すべてに導入できた完全導入体を得ることはできなかった。反応性の低下の原因として、POSS ユニット 4 の有機溶媒に対する溶解性が低いことが考えられた。そこで POSS ユニットの有機溶媒への溶解性を向上させるため、フルオラスタグの導入を最後にする計画に変え、POSS ユニットとして化合物 6 を用いることにした。

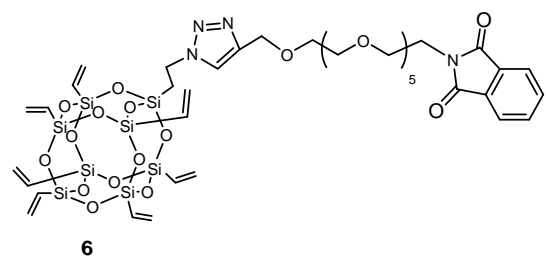


図 7 . POSS 化合物 6

まず、予試験としてドデカンチオールを用いたチオール・エン反応の検討を行った結果、POSS ユニット 6 の 7 か所の反応点にドデカンチオールが導入された化合物が収率 84% で得られることが明らかとなった (図 8)。そこで、PEG 化ラクトース誘導体 5 の POSS ユニット 6 への導入について種々検討を行った。反応の追跡を TLC で行ったところ、原料の POSS ユニット 6 の消失が確認された。反応後、ゲルろ過精製を行い、POSS を含むフラクションを ¹H-NMR 測定を行ったところ、7 つのオレフィン反応点に対して複数個所にラクト

ース誘導体 **5** が導入されたと推定される誘導体の存在が確認できた。

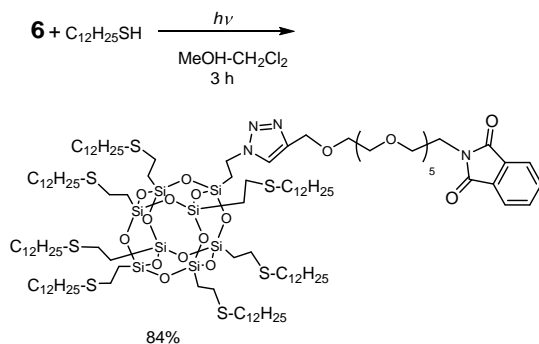


図 8 . 予試験 : POSS ユニット **6** へのチオール・エン反応によるドデカンチオール導入

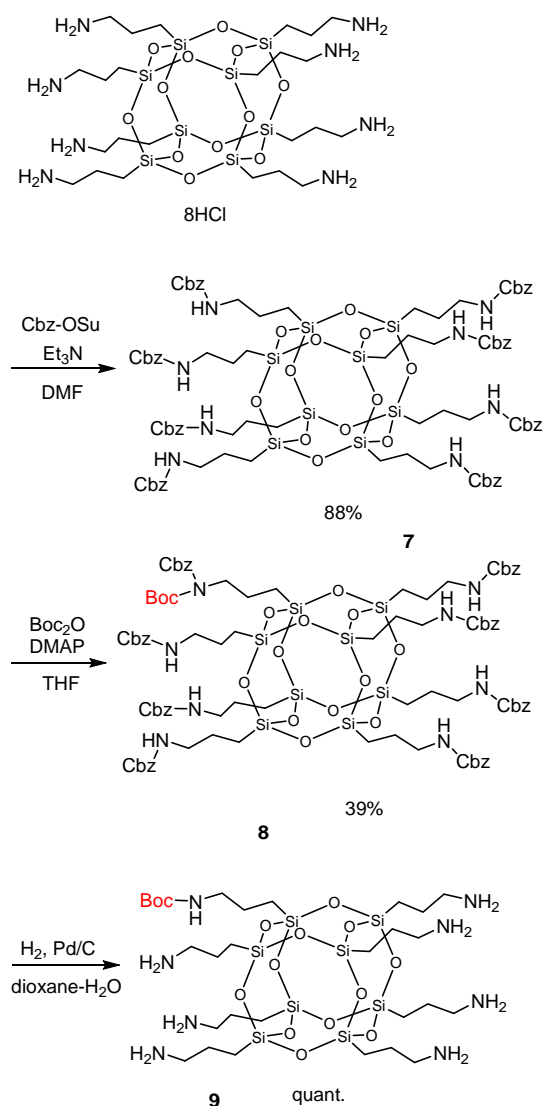


図 9 . 1 か所のアミノ基のみを保護した octaamino-POSS 誘導体 **9** の合成

しかし生成物の単離精製が非常に困難で

あり、収量も非常に低い結果であった。そこで、化合物 **5** と **6** を用いて糖鎖の導入収率の向上を目指し、種々検討を行ったが、収率の向上は得られず、また副反応である化合物 **5** のジスルフィド化が優先して進行してしまい、目的物が得られない場合もあった。このように、チオ・ル・エン反応による糖鎖導入は再現性も低い結果となった。ドデカンチオールを使用した場合は収率良く進行していたので、これらの結果から PEG スペースを有する糖鎖誘導体がチオ・ル・エン反応には不適当な基質である可能性が示唆された。そこで POSS への糖鎖の導入をアミド結合で行う計画に変更し、そのための POSS 誘導体の合成を行った。POSS 誘導体としては octaamino-POSS の 1 か所のアミノ基のみを保護した化合物の合成を計画した。中間体の条件としては NMR による化合物同定が容易であり (修飾箇所と個数が容易に把握できること)、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる単離精製が容易であることが挙げられる。これらの条件を考慮し種々検討を行った結果、octaamino-POSS の 8 か所すべてのアミノ基に Cbz 基を導入した化合物 **7** を中間体とすることで、目的とする octaamino-POSS の 1 か所のアミノ基のみを保護した化合物 **9** が得られることが明らかとなった。すなわち、DMF 中トリエチルアミン存在下で Cbz-OSu を反応させることで化合物 **7** が収率 88% で得られた。次に THF 溶媒中で DMAP 存在下、室温で Boc₂O を 5.5 当量反応させることで 1 か所のみ Boc 基が導入された化合物 **8** を収率 39% で得ることができた。最後にパラジウムカーボン触媒による接触水素化還元により Cbz 基を除去することで目的とする mono-Boc-heptaamino-POSS **9** が定量的に得られた。

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 4 件)

G. P. Subedi, T. Satoh, S. Hanashima, A. Ikeda, H. Nakada, R. Sato, M. Mizuno, N. Yuasa, Y. F.-Yamaguchi, Y. Yamaguchi, Overproduction of anti-Tn antibody MLS128 single-chain Fv fragment in Escherichia coli cytoplasm using a novel pCold-PDI vector, *Protein Expression and Purification*, 査読有、Vol. 82、2012、pp.197-204、doi:10.1016/j.pep.2011.12.010

M. Noguchi, M. Nakamura, A. Ohno, T. Tanaka, A. Kobayashi, M. Ishihara, M. Fujita, A. Tsuchida, M. Mizuno and S.-i. Shoda, A dimethoxytriazine type glycosyl donor enables a facile chemo-enzymatic route toward α -linked

N-acetylglucosaminyl-galactose disaccharide unit from gastric mucin, *Chem. Commun.*、査読有、Vol. 48、2012、pp.5560-5562、doi: 10.1039/c2cc30946g

M. Tojino, Y. Hirose and **M. Mizuno**, Convenient Synthesis of Glycosyl Bromide from 1-O-acetyl Sugars by Photo-irradiative Phase-Vanishing Reaction of Molecular Bromine, *Tetrahedron Lett.*、査読有、Vol. 54、2013、pp.7124-7126 doi: 10.1016/j.tetlet.2013.10.088

K. Goto, **M. Mizuno**, Application of Fluorous Chemistry for Oligosaccharide Synthesis, *Trend. Glycosci. Glycotech.*、査読有、Vol. 25、2013、pp.203-213 doi: 10.4052/tigg.25.203

〔学会発表〕(計 8 件)

M. Mizuno, K. Koichi, M. C. Kasuya, K. Hatanaka, "CARBOHYDRATE SYNTHESIS USING FLUOROUS CHEMISTRY", 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid (Spain), July 22-26, 2012

M. Mizuno, K. Goto, H. Kawakami, M. Tojino, "SYNTHESIS OF HYBRID GLYCOPEPTIDE", 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid (Spain), July 22-26, 2012

大隅賢二、近藤純平、藤田雅也、菅原州一、**水野真盛**、鶏卵由来シアリル糖ペプチドの糖鎖タンパク質間相互作用解析への利用、第 31 回日本糖質学会年会(鹿児島市) 2012 年 9 月 17~20 日

後藤浩太郎、弘瀬友理子、**水野真盛**、フルオラス one-pot グリコシル化法の開発、フルオラス科学研究会第 5 回シンポジウム(仙台) 2012 年 11 月 29 日

K. Fukuda, M. Tojino, K. Goto, H. Dohi, Y. Nishida, **M. Mizuno**, "ACID-STABLE HEAVY FLUOROUS TAG WITH THREE FLUOROUS CHAINS FOR A CARBOHYDRATE SYNTHESIS", International Symposium on Fluorous Technologies 2013 (ISoFT13), Budapest(Hungary), June 2-5, 2013

土田明子、**水野真盛**、伊藤明宏、木曾真、古川圭子、古川鋼一、腎癌細胞における GalNAc-Disialyl Lc4 糖鎖抗原の役割、第 32 回日本糖質学会年会(大阪) 2013 年 8 月 8~7 日

福田和男、戸治野真美、後藤浩太郎、土肥博史、**水野真盛**、西田芳弘、糖鎖合成に向けた耐酸性ヘビーフルオラスタグの開発、第 32 回日本糖質学会年会(大阪) 2013 年 8 月 8~7 日

福田和男、戸治野真美、後藤浩太郎、土肥博史、西田芳弘、**水野真盛**、耐酸性ヘビーフルオラスタグを用いた糖鎖合成、フルオラス科学研究会第 6 回シンポジウム(岡山) 2013 年 11 月 1 日

〔図書〕(計 1 件)
水野真盛、S & T 出版株式会社、新しい溶媒を用いた有機合成、2013

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者
水野 真盛 (MIZUNO, Mamoru)
公益財団法人野口研究所・研究部・研究員
研究者番号：40271506

(2) 研究分担者
藤田 雅也 (FUJITA, Masaya)
公益財団法人野口研究所・研究部・研究員
研究者番号：20321672
(平成 26 年 2 月 1 日まで)

川上 宏子 (KAWAKAMI, Hi-roko)
公益財団法人野口研究所・研究部・研究員
研究者番号：40320254
(平成 27 年 9 月 30 日まで)

大隅 賢二 (OSUMI, Kenji)
公益財団法人野口研究所・研究部・研究員
研究者番号： 90203778
(平成27年10月1日より)

(4)研究協力者
()