

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550134

研究課題名(和文) 癌および疾患特異的糖鎖の高効率合成法の開拓

研究課題名(英文) Development of highly effective synthesis methods for tumor and disease specific carbohydrates

研究代表者

大前 仁 (Ohmae, Masashi)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50300801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：種々の疾患に関連する糖鎖における詳細な構造活性相関解明のために、それら糖鎖の合成法開拓について検討した。特に、細胞が癌化すると出現してくる多様な癌関連糖鎖抗原のうち、1グループをなす硫酸化II型糖鎖抗原の合成法確立を目指した反応の開拓を主要命題として検討した。L-フコース分枝を多く有する硫酸化II型糖鎖抗原の合成のため、まず分枝構造単位となる硫酸化ルイスXの効率的合成法を確立した。続いて硫酸化ルイスX単位を丸ごと正確に転移させることができるケラタナーゼII酵素を発見し、これまで未達成であった硫酸化II型糖鎖抗原の合成を可能にする基本反応をはじめて開拓することができた。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out to construct effective synthesis methods for disease-related carbohydrates, leading to investigation of their structure-activity relationships. Particularly, tumor-associated type II sulfated carbohydrate antigens were the major synthesis targets in this study. This type of antigen has L-fucose branches, consisting of complex sulfated Lewis X units in a molecular chain. We first established a facile and rapid synthesis method for a sulfated Lewis X unit. We further found the novel methodology to obtain sulfated type II carbohydrate antigens containing L-fucose branches by the catalysis of keratanase II, which can transfer the sulfated Lewis X oxazoline derivative to the other type II sulfated chain. These important findings opened up the way to the synthesis of complex type II sulfated carbohydrate antigens for the first time.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：癌関連糖鎖抗原 糖鎖有機合成 糖加水分解酵素 硫酸化糖鎖 酵素触媒重合

1. 研究開始当初の背景

タンパク質・核酸に続き第三の生命鎖と言われる糖鎖は、細胞表面や細胞外マトリクスなどあらゆる組織に存在し、細胞の分化・増殖、恒常性維持など生命維持に重要な役割を担っている。この様に重要な機能を有する糖鎖は、細胞が癌化することにより構造変化を起こすことが知られ、さらに毒素、ウイルス、細菌、寄生虫が宿主細胞へ感染する際の宿主側リガンドとして機能する。従って、糖鎖は癌の診断・治療、感染症の予防・治療のための標的分子として利用が期待されている。しかし、糖鎖構造は遺伝子により直接コードされておらず、遺伝子工学的的手法により設計・合成することは不可能である。従って、生理活性分子として糖鎖を利用するには目的とする糖鎖を一つ一つ化学合成する以外に方法がない。

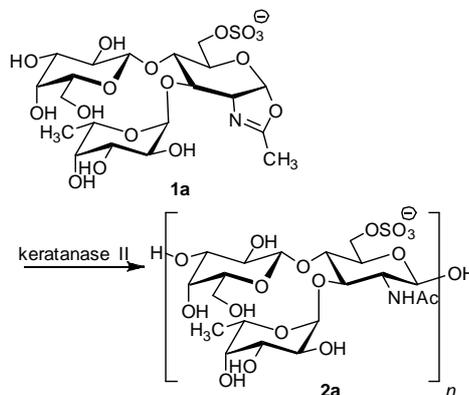
申請者は糖鎖合成法の一つである「酵素触媒重合法」により、糖オキサゾリン誘導体を遷移状態アナログ基質 (TSAS) モノマーとして用い、これまで化学合成不可能であったヒアルロン酸、コンドロイチン、そして4位のみ全て硫酸基を有するコンドロイチン4硫酸の合成に成功した。これらは天然では得ることができない極めて構造が均一な多糖類として、糖鎖科学研究に役立つ基本材料として注目されている。また、申請者が初めて重合酵素として発見したヒアルロナーゼは上記ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン4硫酸を生成する全ての重合反応の触媒として利用可能であるため、対応するTSASモノマーの共重合を行うことにより一分子中にヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン4硫酸の構造を有するハイブリッド多糖の合成も可能にした。一方、糖タンパク質および糖脂質の両者で見られる基本構造のポリラクトサミンに硫酸基を導入した硫酸化ポリラクトサミンの合成を、ケラターゼII酵素を触媒として用いる酵素触媒重合により達成した。このケラターゼII酵素はこれまで専ら分解酵素としてのみ用いられ、その基質特異性の高さから構造解析のための酵素として利用されるのみであったが、申請者は初めて本酵素が糖転移能を有し、合成用酵素として有用であることを示した。

2. 研究の目的

以上の研究背景を踏まえ、申請者は本課題研究によってより高機能な糖鎖材料の合成を目指すことを考えた。即ち、

[1] 重合反応による、より複雑な構造を有する糖鎖の合成

[2] 逐次伸長による配列制御糖鎖の合成について本課題研究で検討することを目的とした。これらにより、疾患に特異的な構造明確な糖鎖が得られ、これを用いた抗体作製などによりワクチンやDDS開発に繋がると期待される。

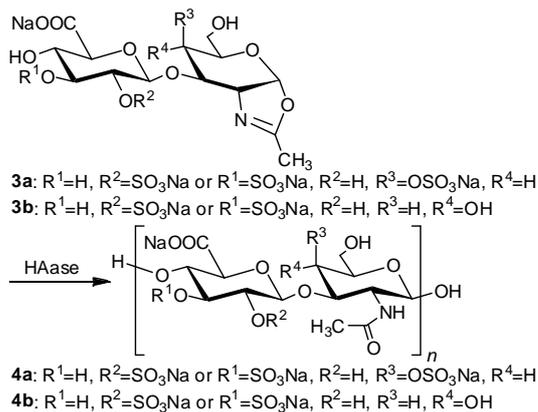


Scheme 1

[1]-1. 硫酸化ルイス X オリゴマーの合成

ケラターゼII酵素により合成される硫酸化ポリラクトサミンは N-アセチラクトサミン (Galβ(1→4)GlcNAc; LacNAc) が β(1→3) 結合で繋がった二糖繰り返し構造を有する。本構造はルイス式抗原のII型糖鎖の基幹構造であり、癌性変化によりI型糖鎖 ([4Galβ(1→3)GlcNAcβ(1→)]) に代わって発現量が亢進する。さらに L-フコース (Fuc) の修飾を受けやすくなり、いわゆるルイス X 抗原 {Galβ(1→4)[Fucα(1→3)]GlcNAc; Le^x} が非還元末端のみならず分子鎖中に連続して発現するようになる。この Le^xオリゴマー構造は癌細胞に特異的に見られる糖鎖抗原であることから、特異性の高い腫瘍マーカーとなり得る。ケラターゼII酵素は Le^x構造も認識可能であると予想されており、硫酸化 Le^xオキサゾリン 1a を TSAS モノマーとして用いることにより、硫酸化 Le^xオリゴマー 2a が合成可能であると予想される (Scheme 1)。2a は硫酸基と Fuc 分枝を有する複雑な糖鎖であり、これまで有機合成法での報告例はなく、酵素触媒重合法によっても未達成の挑戦的な研究である。

[1]-2. 高硫酸化コンドロイチンの合成と非天然型ヒアルロン酸硫酸の合成



Scheme 2

二糖繰り返し構造中に2つ以上の硫酸基を有するコンドロイチンは高硫酸化コンドロイチンと呼ばれ、細胞の分化・増殖過程において高濃度で発現することから、組織の形態形成を制御するシグナル分子として注目されている。これまでに酵素触媒重合により化学合成された構造均一な硫酸化 GAG はコンドロイチン 4 硫酸のみである $([4]GlcA\beta(1\rightarrow3)GalNAc(4-SO_3^-)\beta(1\rightarrow)n)$ 。そこで本課題研究ではグルクロン酸 (GlcA) 残基に硫酸基を導入した TSAS モノマー **3a** を合成し、ヒアルロニダーゼ重合を行うことにより高機能な高硫酸化コンドロイチン硫酸 **4a** の合成達成を目指す。(Scheme 2) また、GlcA 残基はヒアルロン酸の構成分子でもあることから、GlcA 残基に硫酸基を導入した TSAS モノマー **3b** を重合させて非天然型ヒアルロン酸硫酸 **4b** の合成も検討する。

[2] 癌関連 II 型糖鎖の合成

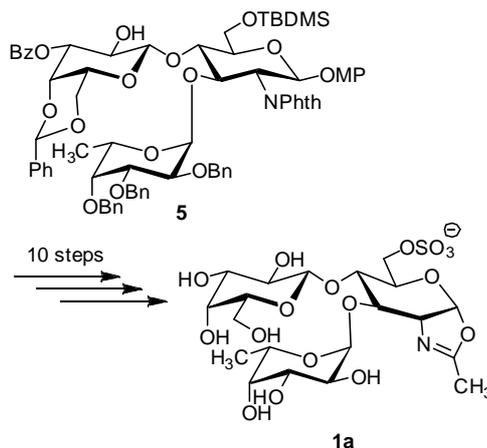
上記[1]-1 で用いるケラタナーゼ II 酵素は Le^x 、LacNAc 等の硫酸化オキサゾリン誘導体を TSAS モノマーとして認識して糖転移反応を引き起こすと予想される。従って、癌細胞表面で見られる Le^x オリゴマーを含む複雑な II 型糖鎖を構造特異的に精確に合成するため、上記オキサゾリンモノマーを配列順に添加して逐次的に糖鎖伸長を行い、目的とする II 型糖鎖へと誘導する手法を確立する。

3. 研究の方法

[1]-1. 硫酸化 Le^x オキサゾリン誘導体の合成

まず TSAS モノマーである硫酸化 Le^x オキサゾリン誘導体の合成法を確立させる。 Le^x 誘導体の合成法に関しては多数の報告があるが、硫酸基の導入および還元末端オキサゾリン化による活性化を考慮した場合、既存の方法では合成困難である。申請者は既にオルソゴナルに除去可能な数種の保護基を導入

した Le^x 誘導体 **5** の合成法を確立しており、本研究では当該手法による硫酸化 Le^x オキサゾリン誘導体の合成を進める (Scheme 3)。



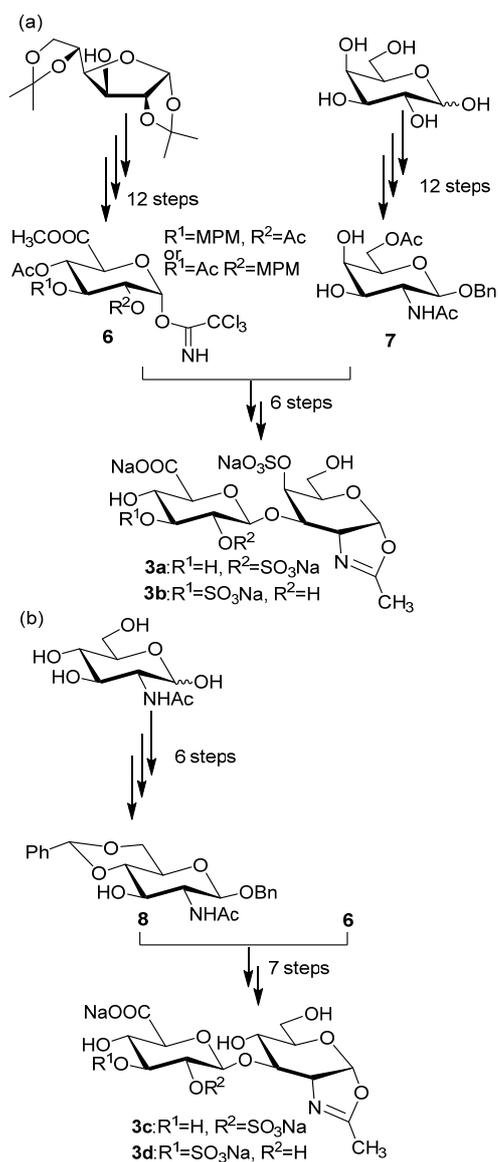
Scheme 3

[1]-2. 硫酸化 Le^x オキサゾリンモノマーのケラタナーゼ II 酵素による重合反応

硫酸化 Le^x オキサゾリンモノマー **1a** をケラタナーゼ II 触媒重合に供し、硫酸化 Le^x オリゴマー **2a** の合成を行う (Scheme 1)。以前に行ったケラタナーゼ II 酵素による重合反応では $30^\circ C$ 、 $pH 8.5$ のリン酸緩衝液中で最も効率よく重合反応が進行した。従って、本研究ではまず同条件で反応を行い、 pH および温度における至適条件を決定する。同時に、単離精製後、NMR および質量分析による構造決定も行う。

[1]-3. 硫酸化コンドロイチンおよびヒアルロン酸硫酸合成用オキサゾリンモノマーの合成

GAG 合成用モノマーの GlcA 部は2位あるいは3位に硫酸基を導入する必要があるため、位置選択的保護基の導入の容易さを考えてグルコース (Glc) を出発物質とし、6位を酸化することにより Le^x 誘導体 **6** とする。二糖繰り返し構造のもう一方の糖である N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) はガラクトースから誘導して **7** とする。**6** および **7** をグリコシル化により結合させ、続いて保護基の除去、硫酸化、オキサゾリン化を経てモノマー **3a** とする (Scheme 4a)。同様に GlcA の2位に硫酸基を導入したモノマーも合成する。ヒアルロン酸硫酸モノマーの合成は Le^x 誘導体 **8** と **6** をグリコシル化により結合させ、硫酸基の導入、オキサゾリン化を経てモノマー **3b** とする (Scheme 4b)。これらモノマー合成では特に問題となる点は予想していないが、万一問題が発生した場合は保護基の種類を変更するなど適宜対応する。



Scheme 4

[1]-4. ヒアルロニダーゼ触媒重合による高硫酸化コンドロイチンおよびヒアルロン酸硫酸の合成

モノマー**3a**および**3b**をヒアルロニダーゼ触媒重合に供し、高硫酸化コンドロイチン**4a**および非天然型のヒアルロン酸硫酸**4b**を合成する (Scheme 2)。ヒアルロニダーゼ触媒重合では、30 °C、pH 7.5 のリン酸緩衝液中での重合反応が最も効率よく進行することが明らかとなっている。従って、本研究でも同条件で重合反応を行い**4a**および**4b**の合成を行う。さらに、pH および温度条件を検討し、至適条件の決定を行う。また、**4a** および **4b** の構造決定も上記 1 と同様に行う。

[2]-1. 癌関連 II 型糖鎖の合成

本研究で合成されるモノマー**1a**と、合成既知の硫酸化 LacNAc オキサゾリンモノマー**9**を糖供与体、それらの合成中間体より得られる

Gal β (1 \rightarrow 4)[Fuc α (1 \rightarrow 3)]GlcNAc(6-SO₃Na) β -O-R (**10**) および

Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc(6-SO₃Na) β -O-R (**11**)を糖受容体として適宜組み合わせ用い (R:アルキル基等)、逐次的に糖鎖伸長反応を行って癌関連 II 型糖鎖のライブラリー合成を行う。その他、硫酸化 II 型糖鎖やシアリル化糖鎖の合成も検討する。

[2]-2. 特異構造を有する硫酸化コンドロイチンの合成

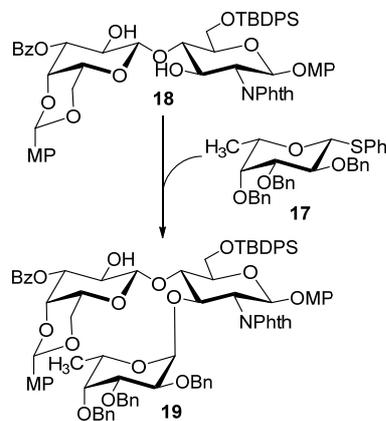
本研究で合成されるモノマー**3a**と、合成既知の 4 硫酸モノマー (GlcA β (1 \rightarrow 3)GalNAc(4-SO₃Na)オキサゾリン: **12**) および非硫酸化モノマー (GlcA β (1 \rightarrow 3)GalNAc オキサゾリン: **13**)を糖供与体とし、これらの合成中間体から誘導される

(3-SO₃Na)GlcA β (1 \rightarrow 3)GalNAc(4-SO₃Na) β -O-R (**14**)、GlcA β (1 \rightarrow 3)GalNAc(4-SO₃Na) β -O-R (**15**)、GlcA β (1 \rightarrow 3)GalNAc β -O-R (**16**)等を糖受容体として用い、糖鎖伸長反応を行う。まずマラリア原虫の VAR2CSA レセプターに対する高アフィニティリガンドを探索することを初期の目標として上記 **3a**、**12**~**16** を組み合わせ糖鎖伸長反応を行い、候補ライブラリーを作成する。これまでに 12 糖以上で強い結合力を発現することが示されていることから、本研究においても 12 糖に絞って合成を行う。

4. 研究成果

[1]-1. 硫酸化 Le^x オキサゾリン誘導体の合成

既に合成法を確立していた Le^x 誘導体 **5** について、モノマー**1a**への誘導法を種々検討したが、TBDMS 基および 4',6'-ベンジリデン基をそれぞれ TBDPS 基および 4',6'-メトキシベンジリデン基へと変換することにより、**1a**を合成することができた。本合成において、フコース誘導体ドナー (**17**) と LacNPhth 誘導体アクセプター (**18**) とのグリコシル化反応で (Scheme 5)、保護基の変更を行ったにも関わらず、水酸基の求核性に影響を与えず、以前の報告と同様に Le^x 誘導体 (**19**) が有意に生成した。これにより、有機化学的に Le^x を合成する際の簡便で迅速な合成法を確立できた。



Scheme 5

[1]-2. 硫酸化 Le^x オキサゾリンモノマーのケラタナーゼ II 酵素による重合反応

合成完了した **1a** に対し、触媒となるケラタナーゼ II を作用させ、重合反応が起こるかどうかが検討した。その結果、pH 6.5~8.1、30 °C において **1a** は有意に認識され、**2a** (主として $n=2$) が高効率で得られた (Table 1)。

Table 1. Results of the polymerization of **1a**.

pH	yield of 2a /%	time /h
6.5	82	5
7.0	80	10
7.8	73	7
8.1	67	15

一方、**2a** の詳細な構造解析は 1H (Figure 1) 及び ^{13}C NMR (Figure 2) 測定により行った。なお、スペクトルを単純化するために還元末端を還元した状態 (**2a'**) で測定した。

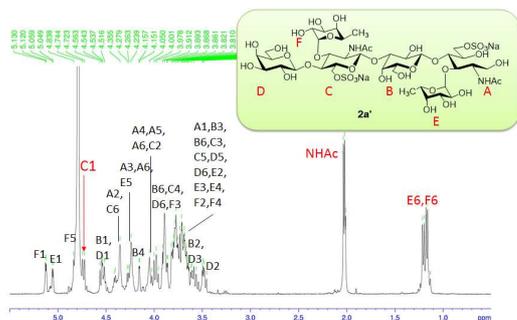


Figure 1. 1H NMR spectrum of **2a'**.

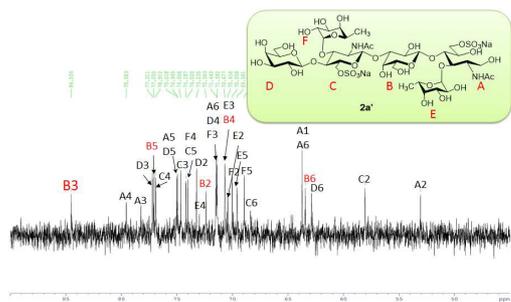


Figure 2. ^{13}C NMR spectrum of **2a'**.

Figure 1 から生成したグリコシド結合が β 結合であることが、Figure 2 からその位置が (1 \rightarrow 3) であることが明らかとなり、本反応により硫酸化 Le^x が β (1 \rightarrow 3) 結合で繋がった硫酸化 Le^x オリゴマーが合成できることが明らかとなった。

以上の結果から、硫酸化 Le^x を丸ごと転移させて II 型糖鎖を生成させる反応を創出できたことが明らかとなり、癌関連糖鎖抗原を迅速に合成する道を拓いた。

[1]-3 および [1]-4.

硫酸化コンドロイチンおよびヒアルロン

酸硫酸合成については、各モノマーの合成を開始し、合成完了のめどが付いた。

[2]-1 および [2]-2.

これらの研究については現在 [1] の研究のめどが付いた状態であり、今後取り組んで行くべき課題となっている。

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 4 件)

① J. Horinaka, Y. Urabayashi, T. Takigawa, M. Ohmae, Entanglement Network of Chitin and Chitosan in Ionic Liquid Solutions, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2013**, *130*, 2439-2443.

DOI: 10.1002/APP.39459

② M. Ohmae, Y. Fujita, J. Takada, S. Kimura, Development of Novel Inhibitors Specific for Human Heparanase-1, *Chem. Lett.*, **2013**, *42*, 797-798.

DOI: 10.1246/cl.130231

③ M. Ohmae, Y. Fujita, J. Takada, S. Kimura, Synthesis of a Heparan Sulfate Disaccharide Fluoride for Detection of Heparanase Activity, *Chem. Lett.*, **2013**, *42*, 1168-1169.

DOI: 10.1246/cl.130437

④ M. Ohmae, S. Koiode, Y. Fujita, S. Kimura, Enzymatic polymerization to an alternating N-L-cysteinyl chitin derivative: a novel class of multivalent glycopeptidomimetics, *Carbohydr. Res.*, **2013**, *377*, 28-34.

DOI: 10.1016/j.carres.2013.05.009

[学会発表] (計 6 件)

① 山崎悠司、勢造恭平、高田順子、大前仁、木村俊作、ケラタナーゼ II を触媒として用いる癌関連硫酸化 II 型糖鎖抗原の合成、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 36 日~29 日、日本大学理工学部

② 山崎悠司、勢造恭平、高田順子、大前仁、木村俊作、ケラタナーゼ II を触媒として用いる癌関連硫酸化 II 型糖鎖抗原の合成、第 33 回日本糖質学会年会、2014 年 8 月 10 日~12 日、名古屋大学

③ 大前仁、勢造恭平、高田順子、木村俊作、化学-酵素法による癌関連硫酸化ルイス X オリゴマーの合成、第 32 回日本糖質学会年会、2013 年 8 月 5 日~7 日、大阪国際交流センター

④ 大前仁、小出早苗、藤田勇樹、木村俊作、キチナーゼ触媒重合による交互 N-システイニルキチン誘導体の合成、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 17 日~20 日、鹿児島市民ホール

⑤ 大前仁、高田順子、勢造恭平、木村俊作、ケラタナーゼ II 触媒を用いるトランスグリコシル化反応による腫瘍関連糖鎖抗原の合成、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 17 日~20 日、鹿児島市民ホール

⑥勢造恭平、高田順子、大前仁、木村俊作、
ケラタナーゼ II 触媒を用いるグリコシル化
反応による腫瘍関連糖鎖抗原の合成、第 61
回高分子学会年次大会、2012 年 5 月 29 日
～31 日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大前 仁 (OHMAE MASASHI)

京都大学大学院工学研究科材料化学専
攻・助教

研究者番号：50300801