

**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：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550194

研究課題名(和文)新規シュガーリングタグの創出とその応用

研究課題名(英文)Preparation of Novel Sugaring Tags and Its Application for Glycoconjugates

研究代表者

稲津 敏行 (Inazu, Toshiyuki)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：70151579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-M)を用いる糖鎖転移反応を工学的に応用できるレベルに到達させる研究の一環として、糖鎖受容体必須構造である1,3-ジオール構造を有する眞分子型新規シュガーリングタグを創出し、ライブラリー化することに成功した。合成はD-リンゴ酸から行い、7種類のタグを合成した。実際に、抗インフルエンザ薬アマンタジンと抗酸化剤であるビタミンEを基質にタグによる修飾反応を行った。これらの糖鎖転移反応は、次のステージとして、現在進行中である。

研究成果の概要(英文)：In order to apply the transglycosylation using endo-β-N-acetylglucosaminidase from *Mucor hiemalis* (Endo-M) to an industrial usage, we have studied several new synthetic methods for the glyco-conjugates. In this study we have prepared 7 kinds of "Sugaring Tags" from D-maleic acid in good yields, such as the corresponding carboxylic acid, amine, azide, thiol, imine, and so on. These "Sugaring Tags" have 1,3-diol moiety, which is an essential structure of glycosyl acceptor for the transglycosylation. We demonstrated the modification reaction of anti-influenza drug; amantadine, and anti-oxidant drug; Vitamin E, using the prepared "Sugaring Tags." The transglycosylation reaction of these compounds are now in progress.

研究分野：有機合成化学、生物有機化学、糖鎖有機化学

キーワード：Endo-M 糖鎖転移反応 糖鎖複合体 工業的応用 シュガーリングタグ

## 1. 研究開始当初の背景

構造が単一な糖タンパク質を調製する方法として、我々が開発した2つの方法が知られている。1つは、天然のN-結合型糖タンパク質をタンパク質分解酵素で徹底分解させ、得られる糖鎖アスパラギンを Fmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)化し、Fmoc-Asn(糖鎖)-OH とし、これを用いて合成する方法である。他方は、*Mucor hiemalis* 由来の $\beta$ -N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ (Endo-M) を用いる糖鎖転移反応(トランスグリコシレーション)の利用である。

前者の方法は、梶原(阪大)らによる、様々な糖タンパク質合成で、その有用性は実証されている。後者の方法は、N-グリカンのキトピオース(GlcNAc-GlcNAc)部分を加水分解する Endo-M が、GlcNAc 1 残基を有するペプチドあるいはタンパク質を糖鎖受容体として共存させると、糖鎖供与体である天然糖鎖誘導体から N-グリカンを糖鎖受容体に再構築する方法で、1990 年代後半に活発に研究が進んだ。しかし、生成する糖鎖誘導体が Endo-M の加水分解基質になるため、収率の向上に難があった。ところが最近になって、Endo-M 関連基礎技術が大きく進展している。

山本、梅川らは、Endo-M の改変により、糖鎖転移活性を有し、加水分解活性が低い酵素の創出に成功している。また、正田らは、この反応の中間体が糖鎖オキサゾリニウムであることを突き止めるとともに、糖鎖オキサゾリンの簡便で実用的な合成法を開発している。この2つのグループの成果を利用すると、加水分解酵素ではなく、合成酵素並みの結果を与えることが報告されている。事実、“Synthase” と命名され市販されている。一方、我々は、Endo-M の糖鎖受容体の必須構造を明らかにして来た。すなわち、Endo-M は、N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の4位と6位に相当する2級と1級の水酸基からなる1, 3-ジオール構造が必須で、本手法の応用範囲を大幅に拡大できることを示した。

一方、GlcNAc のカルボキシメチルグリコシドを用い、タンパク質のアミノ基を修飾し、Endo-M で糖鎖修飾する方法論を発表し、“Sugaring Tag” 法と名付けた。さらに、この方法論を GlcNAc 誘導体から1, 3-ジオール誘導体へ応用した。カルボキシル基を有する1, 3-ジオールを用い、側鎖アミノ基と反応させたりジンを含むペプチドを合成し、糖鎖転移反応を行い、“Sugaring Tag” 法の拡張に成功した。この方法によれば、ペプチドやタンパク質に限らず、医薬など種々の化合物に1, 3-ジオールを導入することができ、天然糖鎖を導入できる新たな工学的な手法になるものと期待される。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、この拡張した

“Sugaring Tag” 法を確立するために、導入試薬となる種々の官能基を有する1, 3-ジオール誘導体(小分子タグ)をライブラリーとして調製することを目的とした。このライブラリーを利用し、市販の酵素と天然糖鎖を用いる Endo-M の糖鎖転移反応を行うことで、この拡張した“Sugaring Tag” 法が、糖鎖科学に造詣のない技術者・研究者でさえも容易に様々な誘導体に糖鎖を導入できる技術になると期待して研究に着手した。

## 3. 研究の方法

種々の官能基を有する1, 3-ジオール誘導体(シュガーリングタグ)の合成を行い、ライブラリー化することを主目的に進めた。また、合成したタグを用い薬物への修飾反応も実施した。実際には、本研究の基礎となる糖鎖受容体の必須構造をさらに明確にすべく、GlcNAc の3位水酸基の影響から検討を開始した。

## 4. 研究成果

### (1) 3-デオキシ GlcNAc の合成とその糖鎖転移反応

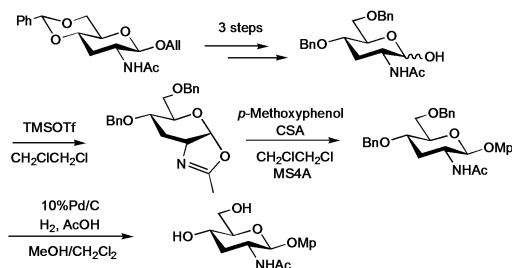
Endo-M を用いる糖鎖転移反応の糖鎖受容体の必須構造が GlcNAc の4位から6位までの1, 3-ジオール構造であることを明らかにしている。その研究の過程で、3位水酸基の影響が少なからずあるように思われた。特にこれまでの結果から、反応が速く、速やかに糖鎖転移生成物を与え、速やかに加水分解される群と、反応が遅く転移生成物はゆっくり精製するものの加水分解もかなり遅い群に分けられる。これらの特徴を比較すると、3位水酸基に相当する水酸基のあるなしに帰着するように見える。すなわち、前者は3位水酸基がある誘導体で、後者はそれが無い化合物群といえる。そこで、本研究では、まずこの課題解決に挑んだ。

3位水酸基の影響を明らかにするには、3-デオキシ GlcNAc 誘導体を合成し、その糖鎖転移活性を見ることで達成できると考え、3-デオキシ GlcNAc 誘導体の合成から開始した。上記の仮説が正しいとすれば、3-デオキシ GlcNAc 誘導体は、遅い反応を示し、加水分解反応も遅い範疇に入るものと予想される。

まず、GlcNAc の3-O-トリフルオロメタンスルホニル体や3-O-トリフルオロメタンスルホニル体を調製し、水素化物イオンとの反応を行った。しかし、予期に反し反応生成物を得ることはできなかった。次に、3-プロモ GlcNAc をラジカル還元で供すルートを検討した。上記のスルホニル体に臭化リチウムを反応させたが、3-プロモは全く得られなかった。種々検討した結果、トリフェニルホスフィンと四臭化炭素を用いることでプロモ体が調製できることを見いだした。すなわち、文献記載の方法で

合成したアリル 2-アセトアミド-4,6-O-ベンジリデン-2-デオキシ-D-グルコピラノシドをピリジン中、トリフェニルホスフィン存在下、四臭化炭素と反応させたところ、対応する3-ブromo GlcNAcが50%の収率で得られた。さらに、トルエン中、AIBN存在下、水素化トリブチルスズと反応させたところ、目的とする3-デオキシ GlcNAcが88%の収率で得られた。

得られた3-デオキシ GlcNAcから3工程で、2-アセトアミド-4,6-O-ベンジリデン-2-デオキシ-D-グルコピラノースを調製し、その後オキサゾリン体の合成、*p*-メトキシフェノールとのグリコシル化反応を行った。さらに、常法により脱ベンジリデン化し、糖鎖受容体となる *p*-メトキシフェニル 2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコピラノシドを調製できた。



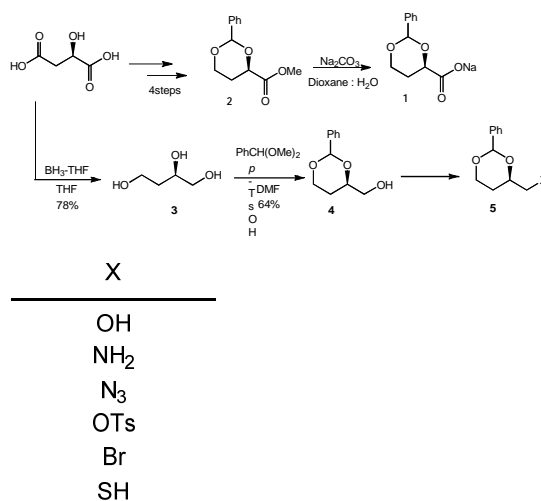
次に得られた *p*-メトキシフェニルグリコシド体を用い、卵黄由来の二本鎖複合型糖鎖を糖鎖供与体に Endo-M を用いる糖鎖転移反応に供した。その結果、予想とは異なり、3位水酸基が存在しない誘導体でも反応が早い群に入る結果となった。予想とは異なる結果となったが、こうした基礎研究結果が必ずや本技術の実用化につながっていくと思われる。

## (2) 1,3-ジオール誘導体の合成

すでに述べたように様々な化合物に1,3-ジオールを導入するためには、種々の官能基を有する誘導体の合成が必須である。そこで本研究では、種々の反応性官能基を有する1,3-ジオール誘導体のライブラリー化を行った。

まず、D-リンゴ酸をボランテトラヒドフラン錯体でハーフエステルへ還元後、1級、2級水酸基をベンジリデン基によって保護した2を得た。得られた2を加水分解し、カルボン酸を有する1,3-ジオール誘導体1を得た。1を用い生理活性ペプチドへの糖鎖修飾について既に報告している。同様にD-リンゴ酸を還元しトリオール体3を得た。得られた3をベンジリデン基で保護し水酸基を有する1,3-ジオール誘導体4を得た。4から種々の官能基を有する1,3-ジオール誘導体をそれぞれ合成し、7種類の“Sugaring Tag”ライブラリーの構築に成功した。図中のXとして、

右のような官能基を選び、合成した。



医薬などの様々な化合物、すなわち、糖鎖受容体中の水酸基やアミノ基と反応するカルボキシル基を有する誘導体は、すでに合成済みであったため、逆に標的分子中のカルボキシル基を想定し、水酸基を有する4を合成した。この4を鍵化合物として三重結合と反応するアジド基、カルボキシル基と反応するアミノ基、種々の求核性官能基との反応を想定したトシラート体やプロモ体を調製し、反応性1,3-ジオール誘導体ライブラリー、すなわち、7種類の“Sugaring Tag”ライブラリーの構築を行うことができた。さらに、チオール型の合成を行っているが、予期せぬ副反応のためか、まだ実現には至っていない。

次に、実際の化合物への1,3-ジオール構造の導入とその糖鎖転移反応について検討を開始した。糖鎖を導入することの効果として期待できるのは、水溶性などの物理的性質の改善、および、糖鎖による体内代謝の変化、すなわち体内動態の変化であろう。そこで、薬物として抗インフルエンザ薬アマンタジンと抗酸化剤ビタミンEを挙げ、その検討に入った。いずれも1,3-ジオール構造を導入することに成功した。しかし、多くの候補化合物群の水溶性が低いことがわかった。Endo-Mによる糖鎖転移反応では、糖鎖受容体の水溶性は極めて重要な要素である。従って、水溶性に難のある誘導体に1,3-ジオール構造を導入しても水溶性に変化がない場合には反応できないことになってしまう。そこで、溶解性を改善する添加剤の効果を検討することにした。言い換えれば、当初の計画通りに“Sugaring Tag”ライブラリーの構築を果たしたが、さらに実用化には解決すべき課題があることが顕在化し、その解決に向けて本研究は次のステージに進んだといえる。予備的には、この課題の解決法も見いだしている。

## (3) おわりに

我々が、約20年前から取り組んできた

Endo-M用いる糖鎖転移反応が、最近再び脚光を浴びている。いわゆる「2010年問題」と呼ばれる世界的な主要医薬の特許切れ問題に端を発し、抗体医薬をはじめとする糖タンパク質製剤などの、「バイオシミラー」「バイオベター」と呼ばれる後発品との品質の同一性の問題が浮上した。この問題は、如何に単一の構造を持つ糖タンパク質を調製し、その構造をどのように確認するかという、ケミカルグライコバイオロジーの課題であろう。酵素の改善、反応機構の解明が進んだという背景にも助けられ、その解決法として、本反応が再び注目されている。2013年11月に経済産業省の「個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発」プロジェクトが次世代バイオ医薬品製造技術研究組合のもとで開始された。細胞培養技術やタンパク質生産技術の革新が期待されているが、本反応もその一翼を担っている。

本研究は、こうした糖タンパク質の合成とは一線を画している。すなわち、低分子医薬などを標的に想定している方法論の開発である。1,3-ジオールという低分子の反応により医薬などの化合物を修飾できれば、市販されている Endo-M 酵素群と天然糖鎖を用いるだけで、糖鎖修飾を可能にする技術である。糖鎖科学を知ることなく、誰でも容易に糖鎖を導入できる技術の開発を目指している。

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。反応性1,3-ジオール誘導体ライブラリー、すなわち、“Sugaring Tag”ライブラリーの構築を行うことができ、今後の本技術の汎用性を高める基盤技術をほぼ確立した。また、併せて、3-デオキシGlcNAcの合成と糖鎖転移反応を通じ、これまで未解明であった糖鎖受容体GlcNAcの3位水酸基の効果に迫った。必須構造の解明につながる新たな情報を与える結果である。

今後明確になった課題をひとつひとつ解決することで、Endo-Mを用いる糖鎖転移反応が、糖鎖工学の実践的技術として醸成され、実用化技術となるものと期待している。また、我々も工学的応用技術として完成するまで、引き続き研究を継続して行く覚悟である。

#### 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 6件)

(1)K. Uray, M. Mizuno, T. Inazu, K. Goto, and F. Hudecz, “The Effect of Glycosylation on the Antibody Recognition of a MUC2 Mucin Epitope,” *Biopolymer (Pept Sci)*, **102**, 390-395(2014). 査読有り

(2)H. Shinohara, R. Kita, N. Shinyashiki, S. Yagihara, K. Kabayama, and T. Inazu, “Temperature Dependent Study of Thermal

Diffusion for Aqueous Solution of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Cyclodextrin,” *AIP Conf. Proc.*, **1518**, 710-713(2013). 査読有り

(3)Y. Hirose, K. Haneda, and T. Inazu, “Development of the a Glycopeptide-synthesizing System Using Immobilized Endo-M and DMC,” *Peptide Science 2013: Proceedings of the 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium & the 50th Japanese Peptide Symposium*,” Ed. by Nishiuchi, Y. and Teshima, T., The Japanese Peptide Society, Osaka(2014), pp.461-462. 査読有り

(4)H. Kobayashi and T. Inazu, “Synthesis of *O*-Glycopeptides Using *N*, *N'*-Isopropylidene Dipeptide Derivatives,” “PEPTIDES 2012: Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium,” Eds. by G. Kotos, V. Constantinou-Kokotou, and J. Matsoukas, European Peptide Society, (2013), pp.632-633.

(5)H. Kobayashi and T. Inazu, “Synthesis of *O*-Glycopeptides Using *N*, *N'*-Isopropylidene Dipeptide Derivatives,” “Peptide Science 2011: Proceedings of the 48th Japanese Peptide Symposium,” Ed. by K. Sakaguchi, The Japanese Peptide Society, Osaka(2012), pp.93-96. 査読有り

(6)Y. Tomabechi and T. Inazu, “Preparation of Pseudo Glycoamino Acid and Its Application to Glycopeptide Synthesis,” *Tetrahedron Lett.*, **52**, 6504-6507(2011). 査読有り

〔学会発表〕(計 19件)

(1)日本化学会第95春季年会 (H.27.3.26~3.29) (日本大学船橋キャンパス、千葉県船橋市) 「マイクロバイオリアクターを活用した複合糖質合成」大石岳史、木村啓志、羽田勝二、稲津敏行

(2)日本農芸化学会 2015年度大会 (H.27.3.26~3.29) (岡山大学、岡山県岡山市) 「“Sugaring Tag”ライブラリーの構築」狐塚哲也、神田由美子、羽田勝二、稲津敏行

(3)日本農芸化学会 2015年度大会 (H.27.3.26~3.29) (岡山大学、岡山県岡山市) 「アルギニン側鎖グアニジノ基に導入したフルオラス Boc 基(「Boc 基」)の脱保護条件の検討」赤司里奈、稲津敏行

(4)第12回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム【依頼講演】(H.26.12.4~12.5) (東京医科歯科大学、東京都文京区) 「Endo-Mを用いる糖鎖付与技術の工学的展開」稲津敏行

(5)2014 Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) (H.26.11.16~11.19) (Hilton Hawaiian Village Waikiki Beach Resort, Honolulu, USA) 「Synthesis of 3-Deoxy-GlcNAc and Its

Application to transglycosylation Using Endo-M」T. Kitsunozuka, Y. Iwayama, K. Haneda, T. Inazu

(6)第51回ペプチド討論会 (H.26.10.24 ~ 10.26) (徳島大学薬学部、徳島県徳島市) 「Studies on Lactam Formation of Arginine Derivatives」R. Akashi, T. Inazu

(7)33rd European Peptide Symposium (H.26.8.31 ~ 9.5) (National Palace of Culture、Sophia、Bulgaria) 「Lactam Formation of Fmoc-Arginine-Dimethylphosphinothioic Mixed Anhydride Derivative」R. Akashi, Y. Iwayama, T. Inazu

(8)第33回日本糖質学会年会 (H.26.8.10 ~ 8.12) (名古屋大学、愛知県名古屋市) 「3-Deoxy-GlcNAc の合成と Endo-M を用いる糖鎖転移反応への応用」狐塚哲也、岩山祐己、羽田勝二、稲津敏行

(9)日本農芸化学会 2014 年度大会 (H.26.3.27 ~ 3.30) (明治大学生田キャンパス、神奈川県川崎市) 「ジメチルチオホスフィン酸混合酸無水物法によるアルギニン含有ペプチドの合成研究」赤司里奈、岩山祐紀、稲津敏行

(10)日本農芸化学会 2014 年度大会 (H.26.3.27 ~ 3.30) (明治大学生田キャンパス、神奈川県川崎市) 「3-deoxyGlcNAc 誘導体の合成研究」狐塚哲也、岩山祐紀、稲津敏行

(11) 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium & 50th Japanese Peptide Symposium (H.24.11.6 ~ 11.8) (ホテル阪急エキスポパーク、大阪府吹田市) 「Development of the a Glycopeptide-synthesizing System Using Immobilized Endo-M and DMC」Y. Hirose, K. Haneda, T. Inazu

(12)GlycoTOKYO2013 シンポジウム (H.25.10.19) (成蹊大学、東京都吉祥寺市) 「固定化 Endo-M と固定化 DMC 誘導体を用いた複合糖質合成システム」廣瀬有也、羽田勝二、稲津敏行

(13)第32回日本糖質学会年会 (H.25.8.5 ~ 8.7) (大阪国際交流センター、大阪府大阪市) 「固定化 Endo-M と固定化 DMC 誘導体を用いた複合糖質合成システムの開発」廣瀬有也、西川雄亮、羽田勝二、稲津敏行

(14)日本化学会第93春季年会 (H25.3.22 ~ 3.25) (立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市) 「DMC 誘導体の固定化に関する研究」廣瀬有也、羽田勝二、稲津敏行

(15)第49回ペプチド討論会 (H.24.11.7 ~ 11.9) (鹿児島県民交流センター、鹿児島県鹿児島市) 「2つのマンノシルセリン残基を持った自己集積型糖ペプチド脂質の合成」笠原翔平、鈴木歩、稲津敏行

(15)第6回多糖の未来フォーラム (H24.11.2) (慶應義塾大学理工学部、神奈川県横浜市) 【依頼講演】「構造の単一な糖タンパク質を合成する」稲津敏行

(16)第31回日本糖質学会年会 (H.24.9.17 ~ 9.20) (鹿児島市民文化ホール、鹿児島県鹿児島市) 「Endo-M を用いる疑似糖ペプチドの合成」伊藤優樹、苔米地祐輔、稲津敏行

(17) The 32nd European Peptide Symposium (H. 24.9.2 ~ 9.7) (The Megaron Conference Center、Athens、Greece) 「Synthesis of O-Glycopeptides Using N, N' -Isopropylidene Dipeptide Derivatives」H. Kobayashi, T. Inazu

(18)The 26th International Carbohydrate Symposium (H.24.7.22 ~ 7.27) (Hotel Melia Castilla、Madrid、Spain) 「Preparation of Fmoc-Asn(Sugar)-OH and Its Coupling Efficiency for Glycopeptide Synthesis」T. Hata, K. Haneda, T. Inazu

(19)The 26th International Carbohydrate Symposium (H.24.7.22 ~ 7.27) (Hotel Melia Castilla、Madrid、Spain) 「Synthesis of Pseudo Glycopeptides Using 1,3-Diol Derivative」Y. Ito, Y. Tomabechi, T. Inazu

〔図書〕(計 2 件)

(1) 稲津敏行、" 概論：ケミカルグライコバイオロジーと糖タンパク質合成、"" バイオ医薬品開発における糖鎖技術、" 早川堯夫、掛樋一晃、平林淳監修、シーエムシー出版、東京(2011)、pp.59-67.

(2) 稲津敏行、" 天然糖鎖とペプチドの複合化、"" 遺伝子医学Mook21号：最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用、" 木曾良明監修、メディカルドゥ、大阪(2012)、pp.99-104.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲津 敏行 (INAZU, Toshiyuki)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：24550194