

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282209

研究課題名(和文) 合成ジ・オリゴシアル酸プローブを用いる自然免疫システムの解明と制御

研究課題名(英文) Synthesis of chemical probes containing di/oligosialic acids and their biological evaluation related to innate immunity

研究代表者

田中 浩士 (Tanaka, Hiroshi)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：40334544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、まず、7, 8位に遊離水酸基を有するシアル酸糖供与体が非アセトニトリル溶媒中で高い選択的グリコシル化が進行することを明らかにした。さらに、ジシアル酸を有するアレンモノマーのニッケル触媒を用いる重合により、狭い分子量分布を有する糖鎖高分子の合成を達成した。その糖鎖高分子は、Siglec-7とGD3との相互作用を阻害できることを見出した。さらに、デキストランにジシアル酸ユニットを結合させたプローブが、より低濃度でそれら相互作用を阻害できることを明らかにした。今後は、これらのプローブの細胞への影響を精査していく予定である。

研究成果の概要(英文)：In this report, we first investigated that partially unprotected sialyl donors underwent a-selective glycosidation without use of an acetonitrile effect. To demonstrate the utility of the method, a straight forward synthesis of (2,9) disialosides containing N-acetyl and/or N-glycolyl groups was achieved by using the two N-acetyl and N-glycolyl sialyl donors. Next we successfully prepared Glycopolymers possessing disialic acids with a narrow with narrow polydispersities from glycosylated monomers via  $\pi$ -allyl nickel catalyzed coordinating polymerization. A biological evaluation of the glycopolymers and revealed that the synthetic fluorocecent-labelled glycopolymers cause the Siglec-7-GD3 interaction to dissociate in the micromolar concentration range. Finally we prepared the synthesis of dextran derivative possessing disialic acids via polymer reactions. The glycopolymer was able to release Siglec7 from Siglec7-GD3 complex possibly.

研究分野：有機化学

キーワード：糖鎖 シアル酸 免疫 グリコシル化 高分子

## 1. 研究開始当初の背景

Siglec は、シアル酸をリガンドとするレクチンの一類であり、主に免疫系の細胞膜上に存在する。Siglec-7 は、NK 細胞や単球などの免疫担当細胞上に存在し、自身の細胞表面に存在する GD3 などの  $\alpha(2,8)$  ジシアル酸誘導体とシス相互作用することによって抑制性の免疫シグナルを発している。現在のところ、リガンドの結合によって誘発される Siglec-7 のクラスター化がその機能発現に重要であると考えられている。実際に、細胞表面にシアル酸を高発現したガン細胞は、GD3 を取り除いた NK 細胞上の Siglec-7 をクラスター化させることにより、NK 細胞を不活性化することが知られている。このような同一細胞内のリガンドとのシス相互作用によるタンパク質機能制御は、他の Siglec においても見られる現象であり、非常に興味深いシステムである。しかしながら、その機能評価には、酵素処理などによって細胞全体のシアル酸を除去するなど極端な手法が用いられている。そのため、リガンドの結合やクラスター化と、免疫機構活性化との相関等の詳細なメカニズムは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、「合成ジ・オリゴシアル酸プローブを用いる自然免疫システムの解明と制御」と題し、ジ・オリゴシアル酸類縁体の精密有機合成法およびリビング重合を基盤とした糖鎖ユニットの高機能化技術の開発を行なうことにより、合成したケミカルプローブを利用した Siglec-7 を標的とする感染免疫システムにおけるシアリル化糖鎖の役割およびその機能発現メカニズムの解明とその制御技術の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

Siglec-7 の機能やその発現メカニズムの解明を目的とし、新規シアル酸誘導体合成法の開発、ジシアル酸を有する糖鎖高分子の合成とその機能評価を行う。

(1) 新規シアル酸誘導体の合成法の開発では、ニトリル溶媒効果を利用しない *N*-アシル型糖供与体の直接的  $\alpha$  選択的シアリル化反応の開発を行う。その際、シアル酸の保護基のグリコシル化反応に対する影響に着目し、反応性の低い一部の水酸基を保護しない糖供与体の立体選択性について精査する。得られた知見をもとに、*N*-アセチルおよび *N*-グリコリルシアル酸から構成されるシアル酸ダイマーの合成を検討する。

(2) 糖鎖高分子の合成は、糖鎖モノマーの直接重合または、高分子担体に対する高分子反応による合成を検討する。

(2-1) では、アレンモノマーのニッケル触媒を利用したリビング重合法によるジシアル酸含有糖鎖高分子の合成とその Siglec-7 との相互作用について検討する。その際、アジド基を有する開始剤を用いることにより、

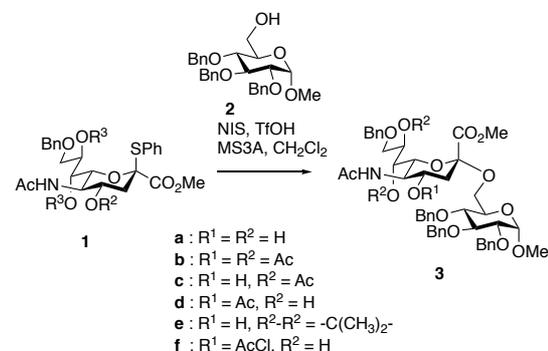
合成した高分子の末端選択的な修飾を検討する。さらに、得られた高分子を用いた Siglec-7 と固相化 GD3 との相互作用に対する阻害効果を検討する。

(2-1) デキストランをテンプレートとして利用したジシアル酸含有プローブの合成とその機能評価では、生物オルトゴナルな反応性を有する官能基を導入したデキストランと、それに対応する官能基を有するジシアル酸との直接的なカップリング反応を検討する。得られたジシアル酸修飾デキストランの Siglec-7 と固相化 GD3 との相互作用に対する阻害効果を精査することにより、母骨格の Siglec-7 への高分子の結合に対する影響について検討する。

## 4. 研究成果

(1) 無保護水酸基を有する糖供与体を用いた塩化メチレン溶媒中におけるシアリル化反応の検討した (表 1)。その結果、7,8 位水酸基が無保護の糖供与体は、塩化メチレン溶媒中で  $\alpha$  選択的にシアリル化反応が進行することを見出した。同様な反応条件下、4,7,8 位水酸基がアセチル基で保護された糖供与体は  $\beta$  選択的にグリコシド **3** を得た。最終的には、4 位水酸基がクロロアセチル基で保護された糖供与体 **1f** が最も高い立体選択性で目的物を与えることを明らかにした。

表 1



Entry	Donor	Temp [°C]	Yield [%]	$\alpha:\beta$ <sup>[a]</sup>
1	<b>1a</b>	-78 to -45	73	92:8
2	<b>1b</b>	-78 to -70	78	30:70
3	<b>1c</b>	-78 to -45	86	84:16
4	<b>1d</b>	-78 to -50	56	86:14
5	<b>1e</b>	-78	68	90:10
6	<b>1f</b>	-78 to -65	70	$\alpha$ only

表 2 には、異なる糖受容体に対するグリコシル化の結果を示した。第 1 級、2 級および 3 級アルコールとも高い  $\alpha$  選択性でシアリル化が進行することを明らかにした。一方、糖誘導体を受容体として用いた場合には、選択性の低下が見られた。糖上の水酸基は分子内水素結合により反応性が低下していることが要因であると考えている。さらに、*N*-グリコリル型のシアル酸糖

供与体を用いて、同様な検討を行った結果、*N*-アセチル型糖供与体と同様な選択性で目的物を得た。

表 2

$\text{HOR}^2$  **3**  
 NIS, TIOH  
 MS3A, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**1f**: R<sup>1</sup> = -COCH<sub>3</sub>  
**2f**: R<sup>1</sup> = -COCH<sub>2</sub>OBn  
**4f**: R<sup>1</sup> = -COCH<sub>3</sub>  
**5f**: R<sup>1</sup> = -COCH<sub>2</sub>OBn

**B**: R<sup>2</sup> =  $\text{O}^n\text{C}_8\text{H}_{17}$   
**C**: R<sup>2</sup> =  $\text{CH}_3$   
**D**: R<sup>2</sup> =  $\text{CH}_3$   
**E**: R<sup>2</sup> = OPMP  
**F**: R<sup>2</sup> = OCH<sub>3</sub>

	Sub.	Accept.	Pro.	Temp [°C]	Yield [%]	$\alpha$ : $\beta$ <sup>[a]</sup>
1	<b>1f</b>	<b>3B</b>	<b>4fB</b>	-35	70	93:7
2	<b>2f</b>	<b>3B</b>	<b>5fB</b>	-78 to -50	74	93:7
3	<b>1f</b>	<b>3C</b>	<b>4fC</b>	-78 to -50	73	93:7
4	<b>2f</b>	<b>3C</b>	<b>5fC</b>	-78 to -50	92	93:7
5	<b>1f</b>	<b>3D</b>	<b>4fD</b>	-78 to -50	79	$\alpha$ only
6	<b>2f</b>	<b>3D</b>	<b>5fD</b>	-78 to -45	76	92:8
7	<b>1f</b>	<b>3E</b>	<b>4fE</b>	-78 to -60	91	84:16
8	<b>2f</b>	<b>3E</b>	<b>5fE</b>	-78 to -55	72	80:20
9	<b>1f</b>	<b>3F</b>	<b>4fF</b>	-78 to -60	40 <sup>[b]</sup>	64:36
10	<b>2f</b>	<b>3F</b>	<b>5fF</b>	-78 to -60	60	69:31

本手法を用いてシアル酸ダイマーである *N*-アセチルおよび *N*-グリコシル型シアル酸を含む $\alpha$ (2,9)ジシアル酸を合成を検討した(図1)。その結果、*N*-アセチルおよび *N*-グリコシル型糖供与体を図1にあるような4種類の $\alpha$ (2,9)ジシアル酸の効率的な合成法の開発に成功した。本手法の大きな利点の一つは、最終段階の脱保護において窒素官能基の保護基の変換が必要ないため、水素添加と加水分解だけで目的の糖鎖が合成できる点である。

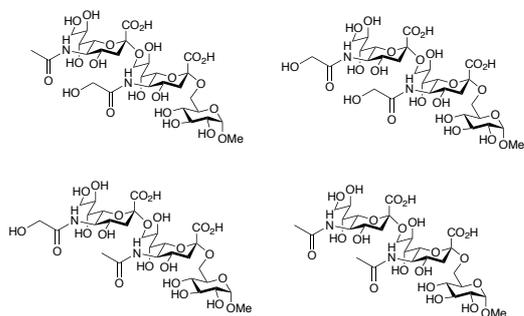


図 1

(2-1) アレンモノマーのニッケル触媒を利用したリビング重合法によるジシアル酸含有糖鎖の合成とその機能評価では、アレンを有する $\alpha$ (2,8)ジシアル酸の直接的な重合による糖鎖高分子の合成を検討した。まず、無保護のジシアル酸を有するアレンモノマーをアジド基を有するニッケル錯体による重

合を検討した。しかしながら、この基質では、望む重合体は得られなかった。一方、2つのカルボン酸を保護したアレンモノマーは、同様な条件下すみやかに重合反応が進行し、目的とする重合体を与えた。分子ふるいカラムを用いた分子量測定の結果、触媒とアレンモノマーの比率が、20および50の場合においても、得られた糖鎖高分子の分子量分布は狭く(ca. 1.1)、本重合がリビング重合様に進行していることが示唆された。

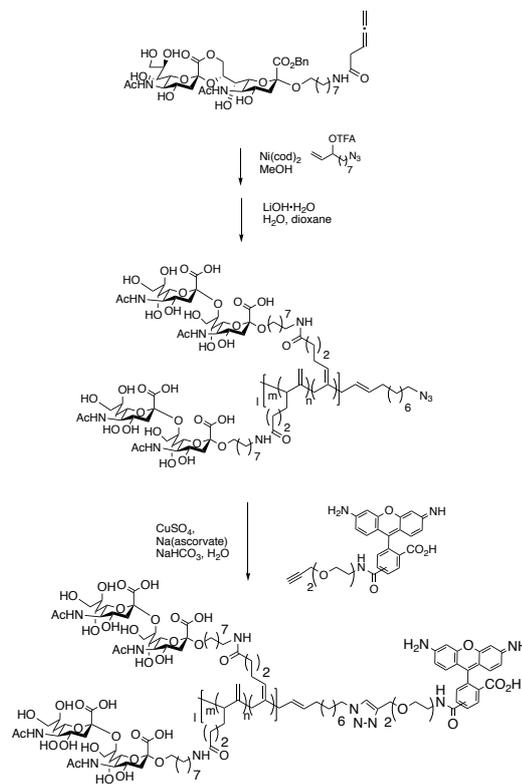


図 2

得られたジシアル酸を有する糖鎖高分子を用いて、固相化した GD3 に対する可溶性の Siglec-7 の糖鎖結合部位との結合の分離実験を行った。その結果、20 量体の高分子を用いた場合に、 $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$  と低濃度で糖鎖—タンパク質の結合を乖離できることが明らかになった。本結果は、本糖鎖高分子が天然においてすでに結合している Siglec-7 とリガンドとの結合を乖離できることを意味しており、本リガンドを細胞上の Siglec-7 の機能制御に利用できることが期待される。

(2-2) デキストランをテンプレートとして利用したジシアル酸含有プローブの合成とその機能評価では、まず、デキストラン多糖にアセチレンおよびアミノ基を導入したテンプレートを合成した。続いて、アミノ基のアシル化により蛍光色素を、アミノ基とアセチレンとのクリック反応により、ジシアル酸をテンプレートに対して

固定することに成功した (図 3)。

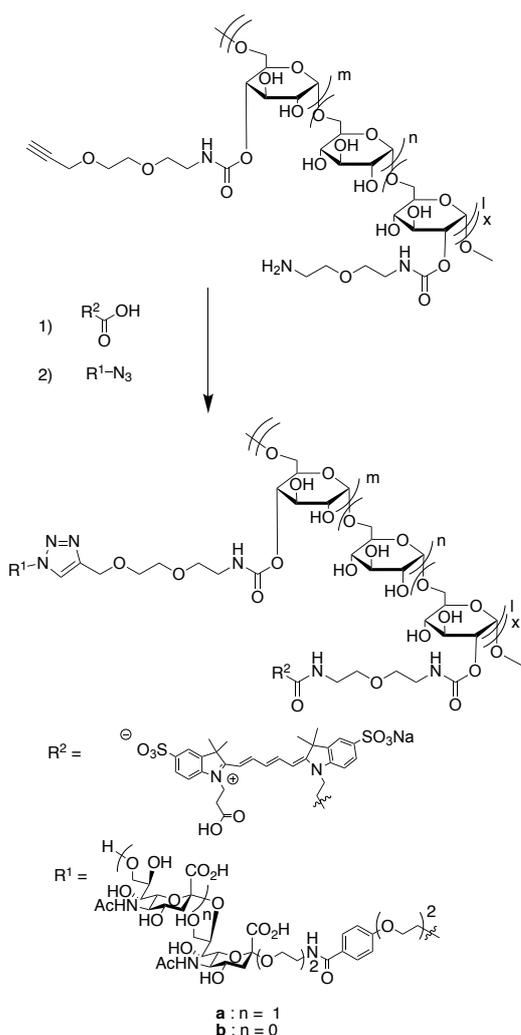


図 3

得られたジシアル酸を有するデキストラン誘導体を用いて、固相化した GD3 に対する可溶性の Siglec-7 の糖鎖結合部位との結合の競合実験を行った。その結果、 $IC_{50} = 125 \text{ nM}$  であった。ジシアル酸結合アレンポリマーの  $IC_{50}$  が  $10 \mu\text{M}$  程度であったことと比較すること、親水性のデキストランポリマーの方がより効率的に多価効果を発揮できるテンプレートであることが明らかになった。どちらの高分子も水への十分な溶解性があったことから、この違いは、主鎖が疎水性か親水性かの違いによることが大きいと考えている。すなわち、主鎖が疎水性の高分子は水溶液中で凝集した構造を取っているのに対し、主鎖が親水性の高分子は十分広がった構造をしていると考えられる。そのため、より効率的に固定化されている糖鎖がタンパク質との相互作用できたと考えられる。今後は、2つの糖鎖の Siglec-7 発現細胞への影響を明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① Chemical synthesis and evaluation of a disialic acid-containing dextran polymer as an inhibitor of sialic acid binding immunoglobulin-like lectin, Siglec 7, Sho Yamaguchi, Atsushi Yoshimura, Yu Yasuda, Airi Mori, Hiroshi Tanaka, Takashi Takahashi, Ken Kitajima and Chihiro Sato, *ChemBioChem*, 2017, DOI: 10.1002/cbic.201600694. (査読有)
- ② Synthesis of End-functionalized Glycopolymers Containing  $\alpha(2,8)$  Disialic Acids by  $\pi$ -Allyl Nickel Catalyzed Coordinating Polymerization and Their Interaction with Siglec-7, Shuichi Ohira, Yu Yasuda, Ikuyoshi Tomita, Ken Kitajima, Takashi Takahashi, Chihiro Sato, and Hiroshi Tanaka, *Chem. Commun.*, 2017, 53, 553-556. (査読有)
- ③ The  $\alpha$ -Glycosidation of partially Unprotected N-Acetyl and N-Glycolyl Sialyl Donors in the Absence of a Nitrile Solvent Effect. Taku Aoyagi, Shuichi Ohira, Shinichiro Fuse, Jun Uzawa, Yoshiki Yamaguchi, and Hiroshi Tanaka *Chem. Eur. J.*, 2016, 22, 6968-6973. (査読有)

〔学会発表〕 (計 12 件)

- ① 側鎖の立体配座を制御した環状カーボネート保護基を有する糖 供与体を用いた  $\alpha(2,8)$ オリゴシアル酸の合成研究、鯉沼僚輔・青柳 拓・田中浩士、2017年3月16日(木) -19日(日) 日本化学会 第97春季年会(2017)、神奈川
- ② シアロ糖鎖  $\alpha, \beta$  結合の判別と セレン含有糖鎖の NMR による解析、鶴澤洵・山口芳樹・田中浩士・鈴木達哉・安藤弘宗・木曾真、平成28年11月16日-18日 第55回 NMR 討論会、広島
- ③ 環状カーボネート保護基を有するシアル酸糖供与体を用いた  $\alpha(2,8)$ オリゴシアル酸の合成研究、鯉沼僚輔・青柳拓・田中浩士、平成28年9月1日-3日 第35回 日本糖質学会年会、高知
- ④ Effects of N- and O-protecting groups of thiosialoside on their reactivity and stereo selectivity towards glycosidation, Hiroshi Tanaka, 2016 Glycoretreat (GlycoForum), 2016年4月11日-13日 New Taipei City (invited lecture)
- ⑤ N-アセチル/グリコリル型シアル酸供与体を用いた  $\alpha(2,9)$ ジシアル酸の合成と機能評価、青柳 拓・五島 亜実・鶴澤 洵・大平 脩一・山口 芳樹・北島 健・佐藤 ちひろ・田中 浩士、平成28年3月24日-27日(日) 日本化学会第96春季年会(2016)、京都
- ⑥ Partially Unprotected N-Acetyl Sialyl

Donors Undergoing  $\alpha$ -Sialylation without the Nitrile Effect, Taku Aoyagi, Syuichi Ohira, Shinichiro Fuse, Hiroshi Tanaka, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), (Honolulu, Hawaii) 2015年12月15日-20日

- ⑦ 免疫細胞における Siglec-7 の新規リガンド結合部位による免疫応答制御、五島 亜実・山川奈緒・安田 優・田中 浩土・宮田真路・北島健・佐藤 ちひろ、平成27年12月1日-4日(金)第38回分子生物学会年会、第88回日本生化学会学会
- ⑧ 平成27年10月24日(土)Glyco TOKYO 2015 慶應義塾大学矢上キャンパス 遊離水酸基を有する N-アセチルシアル酸供与体を用いた  $\alpha$  選択的シアリル化反応  
青柳拓、大平脩一、鶴澤 洵、山口芳樹、田中浩土
- ⑨ 平成27年7月31日-8月2日 第34回日本糖質学会年会 東京大学 東京  
青柳拓、大平脩一、田中浩土。  
(東工大院理工) 遊離水酸基を有する N-アセチルシアル酸供与体を用いる  $\alpha$  選択的シアリル化反応
- ⑩ 平成27年3月26日(木)~29日(日) 日本化学会第95春季年会 日本大学理工学部船橋キャンパス  
遊離水酸基を有する N-アセチルシアル酸供与体を用いた  $\alpha$  選択的シアリル化反応  
青柳拓、大平脩一、布施新一郎、田中浩土
- ⑪ 2014/11/16-18 Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) 2014 Joint Annual Meeting Hawaii.  
 $\alpha$ -Selective glycosidation of using N-acetyl sialyl donors possessing a free hydroxyl group at the C4 position  
Taku Aoyagi, Shuichi Ohira, Hiroshi Tanaka
- ⑫ 2014/11/16-18 Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) 2014 Joint Annual Meeting Hawaii.  
The Synthesis of Sialo-containing Glycopolymers by  $\pi$ -Allyl Nickel Catalyzed Coordination Polymerization.  
Shuichi Ohira, Yu Yasuda, Chihiro Sato, Ken Kitajima, Ikuyoshi Tomita, Takashi Takahashi, Hiroshi Tanaka

[その他]

ホームページ等

<http://www.apc.titech.ac.jp/~htanaka/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田中 浩土 (TANAKA, Hiroshi)  
東京工業大学・物質理工学院・准教授  
研究者番号：40334544

### (2)研究分担者

佐藤 ちひろ (SATO Chihiro)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授  
研究者番号：10343211

### (3)連携研究者

山口 芳樹 (YAMAGUCHI Yoshiki)  
国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム・チームリーダー  
研究者番号：90323451