

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成14年度採択研究代表者

木曾 真

(岐阜大学 応用生物科学部 教授)

「感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究」

1. 研究実施の概要

今世紀の日本は、世界に類例を見ない超高齢化社会が到来すると予測されていますが、いまだにウイルスや細菌感染の脅威から逃れることはできません。またそれらが生産する毒素によって命を落とすこともあります。癌は、現在成人の死因のトップの座にあり、まだまだ増加する傾向にあります。さらに、重篤な神経疾患や自己免疫疾患のように、その原因すら分からず、いまだ治療法が見つからない不治の病もあります。私共は、このような感染症や炎症性疾患、がんの転移、血液の凝固や血栓の形成、脳神経疾患などを対象に、様々な機能性糖鎖分子を設計・合成することによって、構造と機能の関係を分子レベルで明らかにし、創薬へのアプローチをします。すなわち、①多彩な人工ガングリオシドプローブを用いて「機能性（シアロ）糖鎖コドン」とそのコドンを認識する「受容体タンパク質」の相互作用を分子レベルで解析し、その機能を促進または阻害する薬剤の創出、②糖タンパク質ムチンを標的分子として、O-グリコシド型糖鎖の革新的構造解析技術の確立と汎用性の高い合成法の開発を目指しています。

これまでに、1) 新しい免疫制御系を構築するL-セレクトインの糖鎖リガンドの系統的合成、2) 自然免疫系を構築するシグレックとその糖鎖リガンドによる構造生物学的研究、3) ムチン型糖鎖の α -立体選択的グリコシル化法の開発において大きな成果を得ました。今後、これらの研究成果をさらに発展させることにより創薬を目指します。

2. 研究実施内容

研究目的：ウイルスや病原性細菌の感染及び細菌毒素の侵入は、多くの場合、宿主細胞が持つ糖鎖への付着により開始される。また有用な腸内細菌が体内に止まるための足場も糖鎖複合体である。一方、宿主側であるヒトや動物の体内では、免疫系を介して様々な生体内反応が誘発される。本研究では、これら糖鎖を介した相互作用の制御を目的として、糖鎖の構造と機能情報に基づいて、化学合成法と酵素合成法を駆使することにより、天然型や非天然型の様々な生理活性糖鎖複合体の創製を行う。さらに感染症や炎症性疾患、がんの診断・治療、血栓症、免疫疾患、脳神経疾患などを対象に、創薬へのアプローチを展開する。

方法及び結果：有機合成は、分子を自由に作り出せるという特徴を生かし、糖鎖生物学の発展に大きく寄与している。例えば、生体内超微量成分を純粋かつ大量に供給することができ、また天然型構造をモチーフにして種々の類縁体や誘導体を自由に設計・合成することで、医学・生物学用プローブや医薬への応用が期待される新たな生理活性物質を創出することができる。

(1) 方法論の開発

「DTBS基を用いた α -立体選択的ガラクトシル化法の開発」

ガラクトースの4,6位をdi-*tert*-butylsilylene (DTBS)で保護することにより、C-2位にNTrocやOBzのような強い隣接基効果を有する置換基が

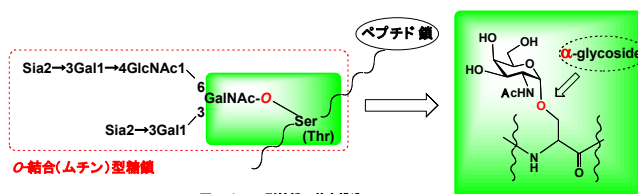
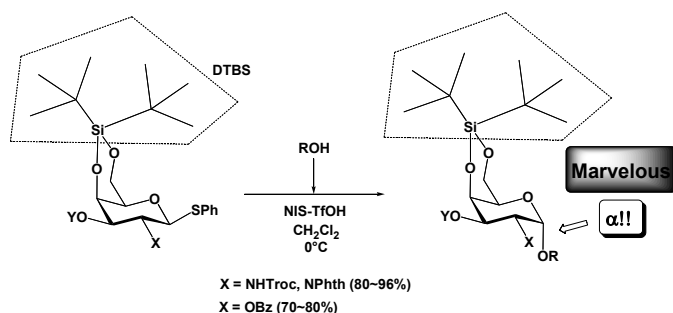


図2. Di-*tert*-butylsilylene (DTBS) 基を用いた α -立体選択的ガラクトシル化法



Imamura, A., Ando, H., Korogi, S., Tanabe, G., Muraoka, O., Ishida, H. and Kiso, M., *Tetrahedron Lett.*, **44**, 6725, 2003.

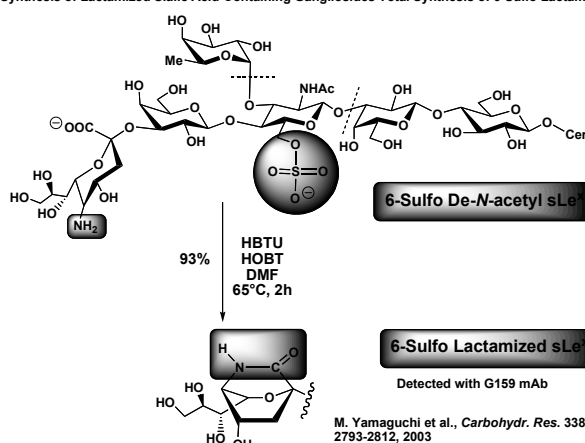
存在するにもかかわらず、他に類をみない高立体選択性、高収率で α -ガラクトシドを構築することに成功した(図1, 2)。この方法は、ムチンに代表されるO-結合型糖鎖の還元末端に位置する α -GalNAcの構築や非還元末端に含まれる α -Galグリコシド構造の構築に有用であり、今後幅広い応用が期待されている。

(2) 複合糖質の全合成

「6-スルホ-ラクタム化シアリルルイスX gangliosideの全合成」

L-セレクチンの内在性リガンドに関する研究の一環として、標記の ganglioside の完全合成に成功した(図3)。本合成の鍵反応であるシアリ酸のラクタム化において、HBTU-HOBTを用いる系を開発し、それを用いて種々のラクタム化シアリ酸含有 ganglioside を系統的に合成した。更に標記 ganglioside を用いて作製したモノクローナル抗体であるG159抗体の認識特異性について明確な知見を得た。

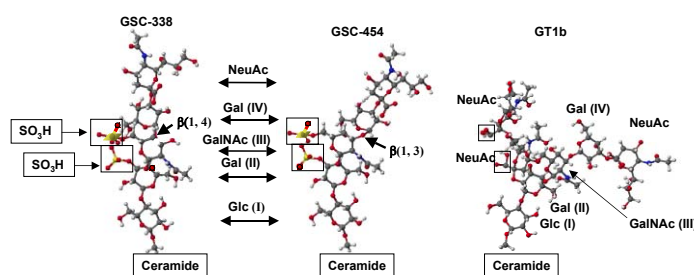
図3. Synthesis of Lactamized Sialic Acid-Containing Gangliosides Total Synthesis of 6-Sulfo Lactamized sLe^x



(3) 有用分子プローブの設計と合成

「新規硫酸化GM1b類縁体の系統的合成と生物機能解析」

神経系Siglecの高親和性リガンドであるChol-1 (α -系列) ガングリオシドをモチーフにして、そのシアル酸を硫酸基で置換した類縁体(硫酸化GM1b類縁体)を、系統的に合成した。得られた化合物のうち、II³III⁶で硫酸化されたiso-GM1b (GSC-338) (図4)が、



M. Hara-Yokoyama et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3441, 2003

図4. Novel Sulfated Gangliosides Inhibit NADase Activity of Leukocyte Cell Surface Antigen CD38

これまで試験した化合物の中で最も強いMAG結合活性を有することを見出した。GSC-338は一方で、白血球表面抗原CD38のNADase活性を強く阻害した。

3. 研究実施体制

(1) 糖鎖構造 研究グループ

- ① 研究分担グループ長：長東俊治 (京都工芸繊維大学、講師)
- ② 研究項目：ムチン型糖鎖の構造解析技術の革新

(2) 細菌毒素 研究グループ

- ① 研究分担グループ長：西河 淳 (東京農工大学農学部、助教授)
- ② 研究項目：細菌毒素と糖鎖の相互作用解析

(3) 糖鎖化学合成 研究グループ

- ① 研究分担グループ長：木曾 真 (岐阜大学農学部、教授)
- ② 研究項目：化学合成による機能性糖鎖分子の創製

(4) 糖鎖酵素合成 研究グループ

- ① 研究分担グループ長：山本憲二 (京都大学大学院生命科学研究科、教授)
- ② 研究項目：酵素法による機能性糖鎖複合体の合成及び腸内細菌と糖鎖の相互作用解析

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- Hara-Yokoyama, M., Ito, H., Ueno-Noto, K., Takano, K., Ishida, H. and Kiso, M.: Novel sulfated gangliosides, high affinity ligands for neural siglecs, inhibit NADase activity of leukocyte cell surface antigen CD38. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3441-3445, 2003.
- Imamura, A., Ando, H., Korogi, S., Tanabe, G., Muraoka, O., Ishida, H. and Kiso, M.: Di-*tert*-butylsilylene (DTBS) group-directed α -selective galactosylation unaffected by C-2 participating functionalities.

Tetrahedron Lett., **44**, 6725-6728, 2003.

- Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R. and Kiso, M. Studies on the endogenous L-selectin ligands: Systematic and highly efficient total synthetic routes to lactamized-sialyl 6-*O*-sulfo Lewis x and other novel gangliosides containing lactamized neuraminic acid. *Carbohydr. Res.* **338**, 2793-2812, 2003.
- Y. Fujinaga, K. Inoue, S. Watarai, Y. Sakaguchi, H. Arimitsu, J-C. Lee, Y. Jin, T. Matsumura, Y. Kabumoto, T. Watanabe, T. Ohyama, A. Nishikawa and K. Oguma. Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes, *Microbiol.* **150**, 1529-1538 2004.
- A. Nishikawa, N. Uotsu, H. Arimitsu, J.-C. Lee, Y. Miura, Y. Fujinaga, H. Nakada, T. Watanabe, T. Ohyama, Y. Sakano and K. Oguma, The receptor and transporter for internalization of Clostridium Botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 327-333 2004.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）