

糖鎖の効率合成と機能研究：陽電子断層撮影法を利用した新しい糖鎖機能解析法

Synthetic and functional studies of oligosaccharides and glycoconjugates: new functional analysis by using positron emission tomography

代表研究者 大阪大学 深瀬浩一 Osaka University Koichi Fukase

協同研究者 大阪大学 田中克典 Osaka University Katsunori Tanaka

Solid phase synthesis of N-linked glycan was developed. Our synthesis features (i) microfluidic α -sialylation and β -mannosylation as well as (ii) the efficient glycosylation of the sugar units on the oxybutane-linked polystyrene resin by virtue of the “reagent concentration effects” using fluoruous solvent. A new DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)-labeling probe was designed and synthesized. The high reactivity of the probe enabled the modification of lysine residues in peptides and proteins at very low concentration ($< 10^{-7}$ M) within a short reaction time. The first PET of glycoproteins, [^{68}Ga]DOTA-orosomuroid and asialoorosomuroid successfully visualized the differences in the circulatory residence of glycoproteins, in the presence or absence of the sialic acids.

研究目的

細胞表層の糖鎖は器官形成、老化、感染、炎症、生体防御、癌化、癌転移など様々な生命現象に関与していることが明らかにされてきており、現在その機構の詳細な解明が具体的な研究対象となっている。糖鎖の構造は複雑で多様性と柔軟性に富み、また遺伝子によって厳密には規定されないことから、糖鎖は特異な生物機能を有することが示唆され、糖鎖が関わる未知の生物現象が存在する可能性もある。

糖鎖の機能解析には特定の糖鎖が十分な量必要とされるので、糖鎖合成はきわめて重要である。また診断や治療に有用な糖鎖が見出されたとき、糖鎖誘導体の合成技術は不可欠のものとなる。N結合型糖タンパク質糖鎖は、タンパク質の3次構造の形成と維持やタンパク質の血中の安定性に重要な役割を果たしており、免疫系にも作用することが示唆されている。我々はシアル酸の結合したN結合型糖タンパク質糖鎖の生物機能を明らかにすることを目指し、固相法やマイクロ流路合成などの新手法を利用することで糖鎖の効率合成法について検討した。

さらに生体レベルでの機能解明を目指し、糖関連化合物を中心にした生体分子のイメージング研究を行った。

研究経過

N-結合型糖タンパク質糖鎖の合成研究

高立体選択的 β -マンノシル化法と α -シアリル化法の開発

β -マンノシド結合や α -シアロシド結合は *N*-結合型糖タンパク質糖鎖などの部分構造として普遍的に存在しているが、これらの化学合成は、立体的にも熱力学的にも不利であることから困難であった。そこで本研究ではまずこれらについて検討した。

シアル酸とはノイラミン酸の種々の誘導体の総称であり、通常糖鎖の非還元末端に α グリコシドとして存在する。グリコシド結合部位の横の3位炭素はメチレン構造であり隣接基関与を用いられない、 α -シアロシドは相当する β -シアロシドよりも熱力学的に不安定であるなどにより、 α -シアリル化は困難な課題であった。我々はシアル酸糖供与体の脱離基、および5位アミノ基の保護基の検討を経て糖供与体の反応性を詳細にチューニングし、アミノ基をフタル基で保護することにより、92%の収率、および完全な α -選択性を実現していた。アミノ基をフタル基で保護して環状イミド構造にすると、双極子モーメントの方向が固定されて(fixed dipole moment effect)、カチオン中間体に対するニトリルの配位が促進されると考えられる。しかし、開発した新規なシアル酸供与体 **1a** は非常に高い反応性を有しているため、通常のバッチ式反応では大量スケールでの温度制御が非常に難しく、著しい収率の低下が見られた。そこで厳密な温度制御、効率的な混合、さらにスケールアップが容易に可能なマイクロフローシステムを用いて検討した (Fig. 1)。その結果、TMSOTf を受容体に対して 1.5 当量、シアル酸糖供与体 **1a** を 2.0 当量用いて反応を瞬時に終了させることで、目的の α (2, 6)-シアリルガラクトース **2a** を完全な α -選択性で定量的に得ることに成功した。しかし大量合成においてはフタル基の除去が困難であったため、同様の効果が期待でき、後の官能基変換がより簡単なアジド誘導體 **1b** を供与体を用いて検討した結果、定量的かつ α : β = 20: 1 という高い選択性で2糖体 **2b** を得ることに成功した。

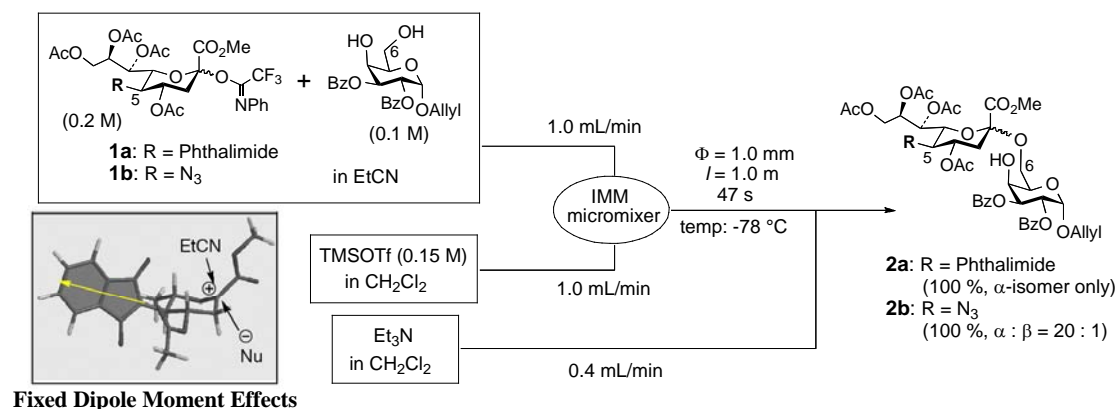


Fig. 1 Microfluidic α -sialylation.

一方、我々はユニークな嵩高い反応活性化試剤である TMSB(C₆F₅)₄ を新たに開発し、収率 93%、 α : β の比が 5:95 という高選択的マンノシル化法を報告していた。しかし、大量合成においては高価な TMSB(C₆F₅)₄ を多量に使用することに障害があるので、より安価で高い選択性 (α : β = 7: 93) を与えた TMSOTf を用いたマンノシル化についてスケールアップを検討した。しかしこの場合もさらにこの場合においてもバッチ式では反応のスケールアップに伴い、収率ならびに選択性が低下したので、種々検討を行った結果、マイクロフローシステムとバッチ式反応を組み合わせた Fig. 2 のような装置を用いることで、 β 選択性は多少

低下するものの、大量スケールの反応においてもその効率を低下させることなく、より一般的な TMSOTf を用いて実用的な連続的フローグリコシル化反応を実現した (92%、 $\alpha:\beta=1:5$) (Fig. 2)。

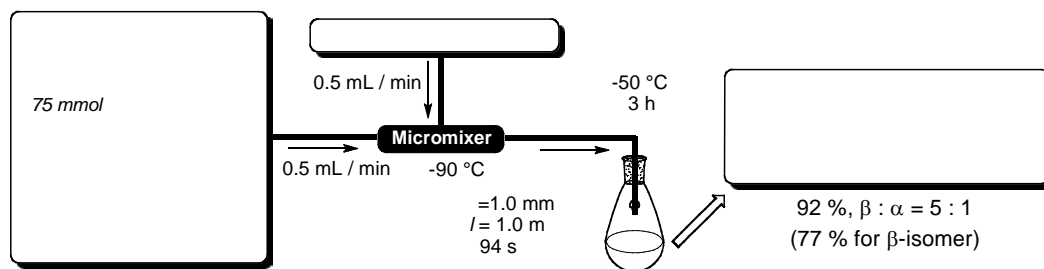


Fig. 2 β -Mannosylation using integrated microfluidic/batch system.

*JandaJel*TM を固相担体とする効率的グリコシル化反応の実現と複合型 N-結合型糖鎖の合成

以上のように、N-結合型糖鎖の合成において鍵となる2つの新規グリコシル化法の開発を経て、Fig. 3に示す N-フェニルトリフルオロアセトイミデートを脱離基とするフラグメント **A-D** を効率良く調製した。次に固相上での効率的なグリコシル化反応を実現すべく、まず固相担体を検討した一般的に良く用いられる

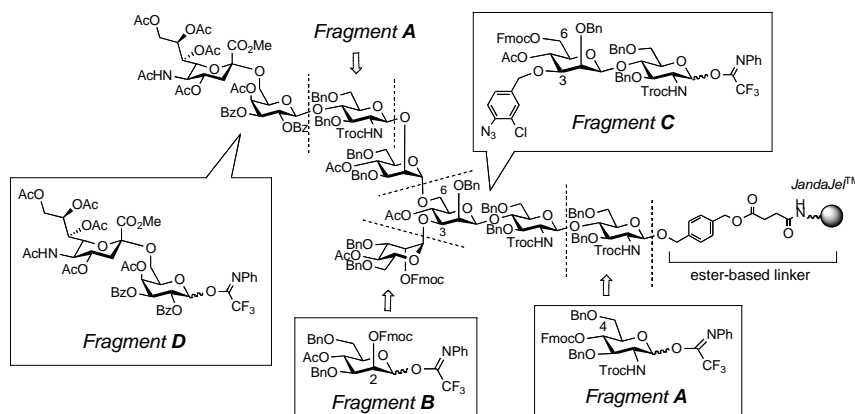


Fig. 3 Four fragments for solid-phase synthesis

ポリスチレン担体では固相上でのグリコシル化反応の効率は低かったので、種々検討した結果、オキシブタン架橋ポリスチレンを基本構造とする *JandaJel*TM を固相担体に用いた場合に、グリコシル化反応が定量的に進行することを見出した。

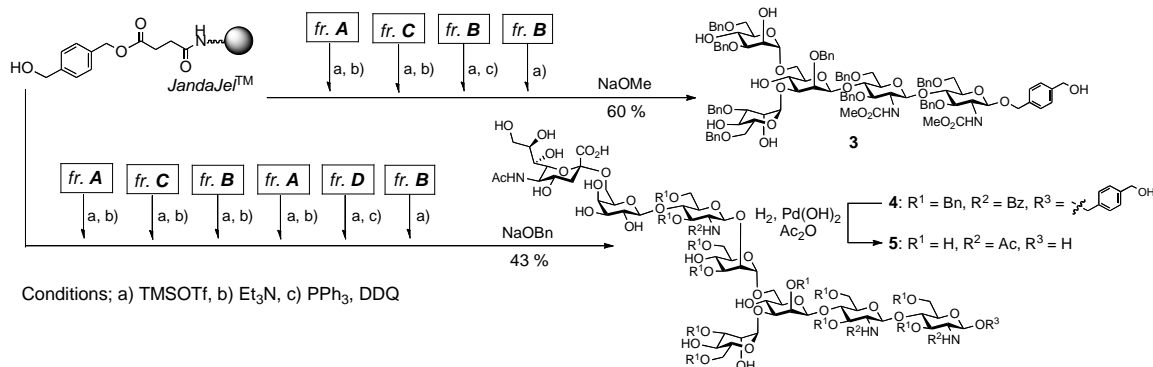


Fig. 4 Solid-phase synthesis of sialylated N-glycan.

そこで、*JandaJel*TM を固相担体に用いてフラグメント **A-D** を順次グリコシル化し、複合型 N-結合型糖鎖の合成を試みた (Fig. 4)。この際、固相上で糖鎖が伸長した際には反応性の低下が見られたが、この問題は我々が新たに見出したフルオラス溶媒の添加による、”試

薬濃縮効果”を利用することにより回避することができた。すなわち、フラグメントを **A-C-B-B** の順に、グリコシル化反応と Fmoc 基やアジドクロロベンジル基の選択的脱保護を繰り返した後、NaOMe を用いて糖鎖のエステルリンカーからの切り出しを行った結果、60% という高収率でコア 5 糖骨格 **3** を得た。同様にして、フラグメント **A-C-B-A-D-B** の順にグリコシル化と脱保護を繰り返した後、NaOBn を作用させて固相からの切り出しと Troc 基のベンジルオキシカルボニル基への変換を行った結果、43% の高収率で還元末端シアル酸を含む 8 糖 **4** を得ることに成功した。最後に、無水酢酸の存在下で水素添加反応を行うことにより、シアル酸を含む 8 糖 **5** の初めての固相合成を達成した。

陽電子断層撮影 (positron emission tomography: PET) を用いた糖鎖機能探索

N-結合型糖タンパク質糖鎖は、細胞内においてタンパク質の品質管理に働いているが、さらにプロセッシングを受け、細胞表層においてあるいは細胞から放出された後には、様々な認識に関与していると考えられる。特にシアル酸含有 N-結合型糖鎖はシグレックとの相互作用を通じて血中でのタンパク質の安定化に寄与している。我々は全身レベルでの N-結合型糖鎖の機能に興味を持ち、その動態を追跡する方法として陽電子断層撮影 (PET) イメージングを用いることとした。

従来は PET 法をペプチド、タンパク質などの生体高分子に適応する場合、活性エステル法で DOTA 配位子をリジン残基に結合させ、続いて ^{68}Ga などの放射性金属を導入していた。しかしながら、活性を保持して標識することが容易ではなく、特に低濃度では導入効率は良くなかった。我々は、独自に開発した“超高速アザ電子環状反応”による迅速修飾法を用いて、水中での生体分子アミノ基選択的な高速放射線標識化法を開発した (Fig. 5)。

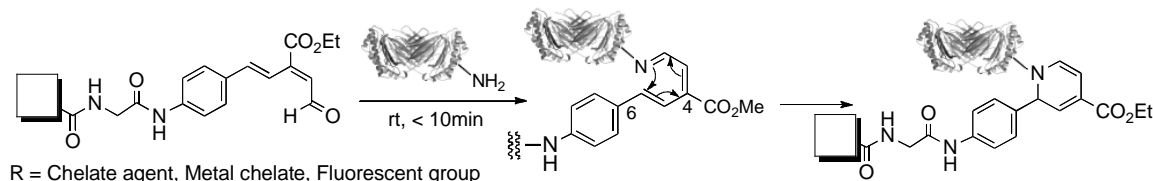


Fig. 5 Rapid labeling via 6 π -azaelectrocyclization.

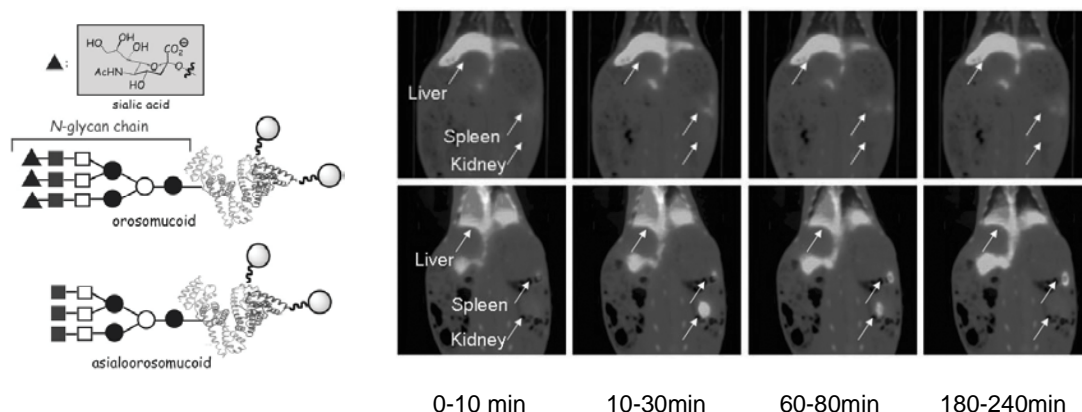


Fig. 6. PET imaging of sialo- and asialo-orosomuroids.

この方法を用いて、様々なペプチド、タンパク質、または細胞に対して、蛍光標識基や PET イメージングのための DOTA (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecanetetraacetic acid) リガンドの導入について検討した。その結果、 10^{-8} M の低濃度でも試料の機能を損なうことな

く、室温・30分以内で高効率的に標識化することに成功した。さらに得られたムチン型糖タンパク質であるオロソムコイドのDOTA標識体に対して陽電子放出金属である ^{68}Ga を導入し、ラビットにおけるPETイメージングを実施した。その結果、シアル酸の有無による糖タンパク質の血流外排出過程の相違を世界で初めて可視化することに成功した(Fig. 6)。シアロ体ならびにアシアロ体ともに肝臓に強い集積が見られる原因はわからないが、シアロ体では脾臓ならびに腎臓にかすかな集積が観測されたのに対して、アシアロ体では時間経過とともにまず腎臓への集積が増し、続いて脾臓への強い集積が観測された。これは糖鎖末端シアル酸が血中タンパク質の安定性や抗原性を制御していることを示している。

糖鎖をクラスター化することによって、糖鎖が相互作用する生体分子との認識能を向上させようとする試みは従来から検討されてきたが、比較的簡単な構造の糖鎖しか導入できなかった。そこで、生体内で利用しうる様々な糖鎖や生体高分子の効率良いクラスターの調製が望まれていた。我々はペプチド鎖にヒスチジン残基を導入するとペプチド末端に導入したアルキンへのメルダーラー-シャープレスクリック反応が効率的に進行することを先に見出していたので、これをN結合型糖鎖のクラスターの合成に応用した。その結果分子量数万にも及ぶ糖鎖クラスターを容易に調製できることを見出した(Fig. 7)。予備的ではあるが、糖鎖構造のわずかな違いによって糖鎖クラスターの臓器集積性や血中安定性が大きく異なることを見出している。現在、癌へ特異的に集積する糖鎖構造を探索している。

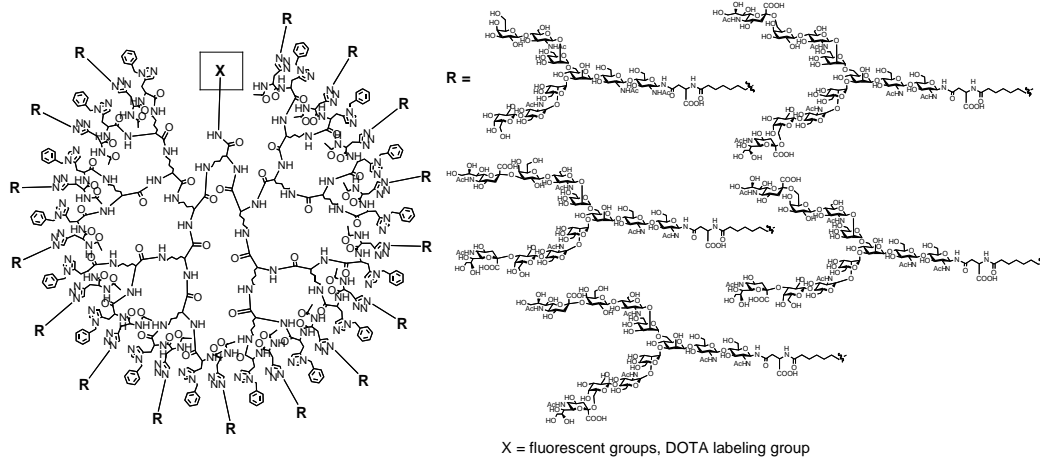


Fig. 7 Structure of glycoclusters.

考察

以上のように我々は、マイクロ系内や固相上での新規グリコシル化反応を開発し、N結合型糖鎖の効率合成を実現した。本法は、単糖または2糖フラグメントを固相上で反応させることにより、簡便に様々なN結合型糖鎖を構築できるので、生物機能解明を意図したライブラリー合成や糖鎖クラスター合成に有用な方法として期待できる。一方我々は世界に先駆けて、糖タンパク質や糖鎖クラスターのPETイメージングに成功した。以上のような生体高分子のPETイメージングはその分子の局在部位を直接的可視化するだけでなく、時間経過における動態や代謝の検討、およびこれを知見とした新たな機能性高分子の開発にも繋がり、例えば生体高分子をベースとする薬剤開発に大きな道を開くものである。また糖鎖構造の微妙な差異により集積臓器が大きく異なることは本研究で新たに見出した知見であり、N結合型糖鎖の新たな役割を見出した。このように本研究は生体レベルでの糖鎖関連分子のイメージングを行うことで糖鎖の機能を解析するという“イメージンググライコミクス”を新たに開拓することができた。

研究成果

1. 深瀬浩一；「自己と非自己の認識に関するケミカルグリコバイオロジー」、日本化学会第 89 春季年会(船橋、2009)
2. K. Fukase; [Synthesis of glycan libraries for elucidation of their biofunctions], International Symposium on Systems Glycobiology-A Bridge between Functional Glycomics and Chemical Biology- (Tokyo, 2008)
3. K. Fukase, K. Tanaka, Y. Fujii, H. Tokimoto, Y. Mori, S. Tanaka, G. Bao, E.R.O. Siwu, A. Nakayabu; [Library-Directed Solid-Phase Synthesis of N-Linked Glycans], The 9th International Symposium on Organic Reactions (Chiayi, Taiwan, 2008)
4. K. Fukase; [Making probes for chemical glycobiology: elucidation of innate immunity and PET imaging of biomolecules], 2008 RIKEN Conference Chemical Biology (Narita, 2008)
5. K. Fukase; [Synthesis of Glycans on Glycoproteins by Using Microreactor and Solid-phase Method], Korea-Japan Joint Symposium on Functional Materials toward Future Catalysts: Chemistry Showcase, KAIST (Daejeon, Korea, 2008)
6. K. Fukase, K. Tanaka, Y. Fujii, H. Tokimoto, Y. Mori, S. Tanaka, G. Bao, E. R. O. Siwu; [Solid-Phase Synthesis of N-Linked Glycans], 18th International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers (FCFP-XVIII) & IUPAC 4th International Symposium on Novel Materials and Synthesis (NMS-IV), (Zhenjiang, China, 2008)
7. 深瀬浩一；「ペプチド・タンパク質、抗体の革新的標識法と PET による動態解析への応用」、医薬品開発支援機構・マイクロドーズ・探索臨床試験研究会第 2 回ミニシンポジウム バイオ医薬品のマイクロドーズ・早期探索臨床試験の意義と課題 (東京、2008)
8. 深瀬浩一；「化学合成で糖鎖の生物機能を解析する」、理研シンポジウム第 3 回有機合成化学のフロンティア (和光、2008)
9. K. Fukase, K. Tanaka, T. Masuyama, Y. Fujii, K. Hasegawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe; [New Labeling Method of Peptide and Protein via Rapid Azaelectrocyclization and Its Application to PET Imaging], The 12th Akabori Conference, (Kyoto, 2008)
10. 深瀬浩一；「マイクロフロー合成ならびに固相合成を利用した糖鎖の効率合成」、第 26 回 Combinatorial Chemistry 研究会(吹田、2008)
11. K. Fukase; [Synthetic Study of Biofunctional Molecules by Using Microfluidic System], IMRET-10: 10th International Conference on Microreaction Technology, (New Orleans, USA, 2008)
12. 深瀬浩一；「生物機能解明のための複合糖質合成」、有機合成のニュートレンド (京都、2008)
13. 深瀬浩一；「新しい反応デバイスを用いた生物活性物質合成」、近畿化学協会合成部会フロー・マイクロ合成研究会第 18 回公開講演会 (東京、2007)

他 22 件

誌上发表

1. K. Tanaka, Y. Fujii, H. Tokimoto, Y. Mori, S. Tanaka, G. Bao, E. R. O. Siwu, A. Nakayabu, K. Fukase, Library-directed Synthesis of N-Glycans: Synthesis of Sialic Acid-containing Complex-type N-Glycan on Solid-supports, *Chem. Asian J.*, in press.
2. K. Tanaka, Y. Mori, K. Fukase, Practical Synthesis of a Man β (1-4)GlcNTroc Fragment via Microfluidic β -Mannosylation, *J. Carbohydr. Chem.*, **2009**, 28, 1-11.
3. K. Tanaka, Y. Fujii, K. Fukase, Site-selective and Nondestructive Protein Labeling Through Azaelectrocyclization-Induced Cascade Reactions, *ChemBioChem*, **2008**, 9, 2392-2397.
4. K. Tanaka, K. Fukase, Recent Advances in Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Biomolecules: from Chemical Labeling to Cancer Diagnostics, *Mini-reviews in Org. Chem.*, **2008**, 5, 153-162.
5. K. Tanaka, K. Fukase, PET (Positron Emission Tomography) Imaging of Biomolecules Using Metal-DOTA Complexes: A New Collaborative Challenge by Chemists, Biologists, and Physicians for Future Diagnostics and Exploration of In Vivo Dynamics, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 815-828.
6. K. Tanaka, T. Masuyama, K. Hasegawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe, K. Fukase, A Submicrogram Scale Protocol for Biomolecule-based PET Imaging by Rapid 6π -azaelectrocyclization: Visualization of Sialic Acid Dependent Circulatory Residence of Glycoproteins, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 102-105.
7. S. Tanaka, T. Goi, K. Tanaka, K. Fukase, Highly Efficient α -Sialylation by Virtue of Fixed Dipole Effects of N-Phthalyl Group: Application to Continuous Flow Synthesis of α (2-3)- and α (2-6)-Neu5Ac-Gal Motifs by Microreactor, *J. Carbohydr. Chem.*, **2007**, 26, 369-394.
8. K. Tanaka, C. Kageyama, K. Fukase, Acceleration of Cu(I)-Mediated Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition by Histidine Derivatives, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 6475-6479.