

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21710233

研究課題名（和文）神経突起伸長作用を持つコンドロイチン硫酸／デルマトン硫酸糖鎖の合成と活性評価

研究課題名（英文）Synthetic and biological studies of chondroitin sulfate and dermatan sulfate partial structure which potentially associate with neurite growth-promoting activity.

研究代表者

若尾 雅広 (WAKAO MASAHIRO)

鹿児島大学・理工学研究科（工学系）・助教

研究者番号：20404535

研究成果の概要（和文）：

硫酸化グリコサミノグリカンに分類されるコンドロイチン硫酸（CS）とデルマトン硫酸（DS）は、様々な組織、細胞に存在し、神経細胞においては、軸索形成や突起伸長作用等の生理活性を有することが報告されている。本研究では、神経細胞の突起伸長作用の発現に重要と考えられている CS-D 部分構造、DS-D 部分構造、ならびにそれらが混在するハイブリッド部分構造に着目し、それらの効率的な化学合成法について検討した。

研究成果の概要（英文）：

Chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS), which are belonging to sulfated glycosaminoglycan, have been reported to exhibit neurite outgrowth activity against nerve cells. In this study, to investigate structure and activity relationships of CS and DS at the molecular level, we examined the synthesis of CS and DS partial structures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度			
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、糖鎖合成、神経突起伸長活性

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸（CS）、デルマトン硫酸（DS）は、生体中で広範囲に分布している硫酸化グリコサミノグリカンの一群である。通常、タンパク質に結合したプロテオグリカンの形で、細胞表層や細胞外マトリックスに存在しており、組織の形態形成をはじめ、細胞の分化・増殖、シグナル伝達、免疫応答、

ウイルス・細菌感染などの様々な生体作用に関与している（1）。これらの糖鎖構造については、CS が、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）とグルクロン酸（GlcA）からなる二糖を基本骨格に持つのに対して、DS では、GalNAc とイズロン酸（IdoA）からなる二糖を基本骨格に持っている（図1）。いずれの糖鎖も生合成過程において、硫酸化酵素の働き

によって不均一に硫酸化されることが知られている。また、DS 鎖は、CS 鎖の形成後、エピ化酵素が働き、グルクロン酸がイズロン酸に変換されることによって形成されるため、これらの糖鎖には、CS 構造と DS 構造が混在しており、多様な糖鎖・硫酸化パターンを形成されると考えられている。近年では、これらの部分構造が、CS・DS の多様な生体機能と密接に関係すると示唆されている。

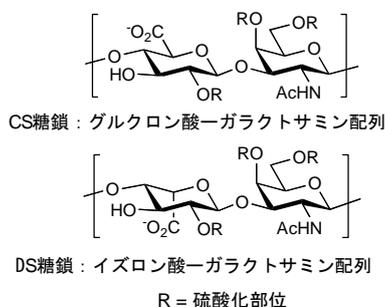


図 1. CS・DS 糖鎖の部分構造

CS・DS 鎖が関与する重要な生体機能の 1 つに神経細胞の突起伸長作用がある。この活性評価においては、CS・DS 鎖は突起伸長促進と阻害の相反する作用を持つという興味深い結果が得られており (2-6)、また近年では、菅原らによって、この神経突起伸長作用には、高硫酸化領域の CS・DS 部分構造に見られる CS-D (D ユニット) と DS-D (iD ユニット) が重要であると報告されている (図 2) (7)。CS・DS 構造に対する機能解析は、進みつつあるが、さらなる研究の進展には、分子レベルかつ構造が明確な CS・DS 構造を用いた機能解析が求められており、CS・DS 部分構造の効率的な合成法が課題となっている。

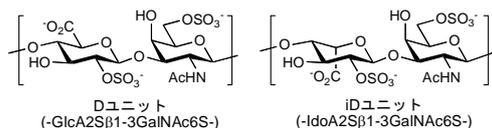


図 2. 神経突起伸長活性を有する CS・DS 糖鎖の部分構造

一方、当研究グループでは、硫酸化グリコサミノグリカンの機能解析の一環として、CS・DS と同様に硫酸化グリコサミノグリカンに分類されるヘパラン硫酸 (HS) /ヘパリン (HP) に含まれる主要二糖部分構造の合成を行い、これまでに特定の二糖構造が、血小板やフォンビルブランド因子 (vWf) との結合に重要であることを明らかにしている (8)。また糖鎖を集合化した糖鎖の結合性を迅速に評価できるキットである“シュガーチップ”と称する糖鎖チップを開発し、それを用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による解析によって、vWf の糖鎖結合領域が A1 ドメイ

ンに存在することを明らかにしている (9)。さらに、新しく作製した HS 部分構造を持つ糖鎖チップを使用することによって、フィブロネクチンや繊維芽細胞増殖因子 (FGF) などの種々のタンパク質の糖鎖に対する結合特性が、糖鎖・硫酸化パターンによって著しく異なることを明らかにしている (10)。最近では、CS の二糖構造に注目した、糖鎖・硫酸化パターンの異なる二糖の糖鎖チップ化や、CS・DS 部分構造の化学合成に向けた検討を行っていた。

【引用文献】

- 1) Conrad, H. E. *Heparin-Binding Proteins*; Academic Press: San Diego, 1998.
- 2) Bandtlow, C. E.; Zimmermann, D. R. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 1267-1290.
- 3) Oohira, A.; Matsui, F.; Tokita, Y.; Yamauchi, S.; Aono, S. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *374*, 24-34.
- 4) Moon, L. D. F.; Asher, R. A.; Rhodes, K. E.; Fawcett, J. W. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 465-466.
- 5) Pizzorusso, T.; Medini, P.; Berardi, N.; Chierzi, S.; Fawcett, J. W.; Maffei, L. *Science* **2002**, *298*, 1248-1251.
- 6) Bradbury, E. J.; Moon, L. D.; Popat, R. J.; King, V. R.; Bennett, G. S.; Patel, P. N.; Fawcett, J. W.; McMahon, S. B. *Nature* **2002**, *416*, 636-640.
- 7) Bao, X.-F.; Muramatsu, T.; Sugahara, K. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 35318-35328.
- 8) Suda, Y.; Bird, K.; Shiyama, T.; Koshida, S.; Marques, D.; Fukase, K.; Sobel, M.; Kusumoto, S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1053-1056.
- 9) Suda, Y.; Arano, A.; Fukui, Y.; Koshida, S.; Wakao, M.; Nishimura, T.; Kusumoto, S.; Sobel, M. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1125-1135.
- 10) Wakao, M., Saito, A.; Ohishi, K.; Kishimoto, Y.; Nishimura, T.; Sobel, M.; Suda, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2499-2504.

2. 研究の目的

本研究では、神経細胞突起伸長活性を持つと予想される D ユニット、iD ユニットに着目し、これらの部分構造を含む糖鎖を化学合成し、合成した糖鎖を用いた活性評価について検討することを目的とした。

CS・DS糖鎖の神経突起伸長活性には、六糖前後の糖鎖成分が必要であると報告されていることから、本研究では、それぞれのユニットを3つ有する六糖体の合成について検討することにした。具体的な糖鎖配列は、以下の通りである(図3)。なお、CS-D(D-D-D)、DS-D(iD-iD-iD)、ならびにそれらがハイブリットで繋がった六糖体(D-iD-DおよびD-iD-iD)の合成はこれまでに達成されていないため、CS・DS糖鎖が関与する、他の生体機能の分子レベルでの解析に利用することができる。

- ① D-D-D
 $\text{GlcA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}\beta(1-4)\text{GlcA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}\beta(1-4)\text{GlcA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}$
 ② D-iD-D
 $\text{GlcA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}\beta(1-4)\text{IdoA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}\beta(1-4)\text{GlcA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}$
 ③ D-iD-iD
 $\text{GlcA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}\beta(1-4)\text{IdoA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}\beta(1-4)\text{IdoA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}$
 ④ iD-iD-iD
 $\text{IdoA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}\beta(1-4)\text{IdoA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}\beta(1-4)\text{IdoA2S}\beta(1-3)\text{GalNAc6S}$
 *D、iDは糖鎖・硫酸化パターンで分類される二糖構造

図3. 標的とする六糖体の構造

3. 研究の方法

CS・DS部分構造を有する六糖体の合成を効率良く行うには、それぞれのユニットに適した二糖ビルディングブロックを設計・合成する必要がある。本研究では、二糖ビルディングブロックとして、二糖体1、2、3、および4を設計した(図4)。これらのビルディングブロックは、硫酸化部位に選択的に除去できる保護基を有しており、必要に応じて位置選択的に硫酸化を行うことができる。

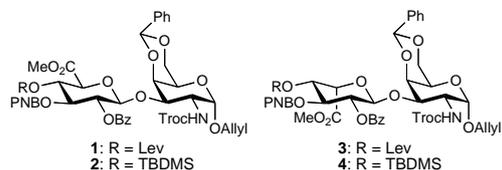
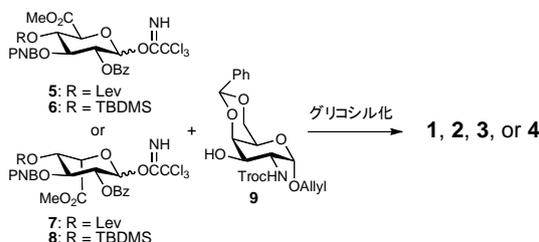


図4. 二糖ビルディングブロックの構造

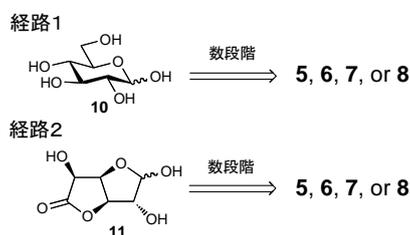
設計した二糖体1-4の調製は、対応する単糖成分であるGalNAc成分9、ウロン酸であるGlcA成分5、6、IdoA成分7、8から合成できると考えられる(スキーム1)。GalNAc成分9については、すでに合成法が確立されているが、ウロン酸成分5-8については確立されておらず、その検討が必要である。そこでウロン酸成分5-8の合成法として、スキーム2に示す2つ経路を立案し、二糖体への誘導を行うこととした。経路1は、既報のグルコース10を出発化合物に用いるウロン酸成分の調製法を参考に、導入する保護基の変更などの改良を行うことで効率良くウロン酸成分を得ることができると考えられる。また経路2は、当研究グループで開発されたグルクロノ-6,3-ラクトン11を出発化合物に用いたウロン酸成分の調製法であり、こちらも導入する保護基を改良することでウロン酸成分を

効率良く合成できると考えられる。また、並行して活性試験に必要な化合物量を確保するための合成経路についても検討することにした。

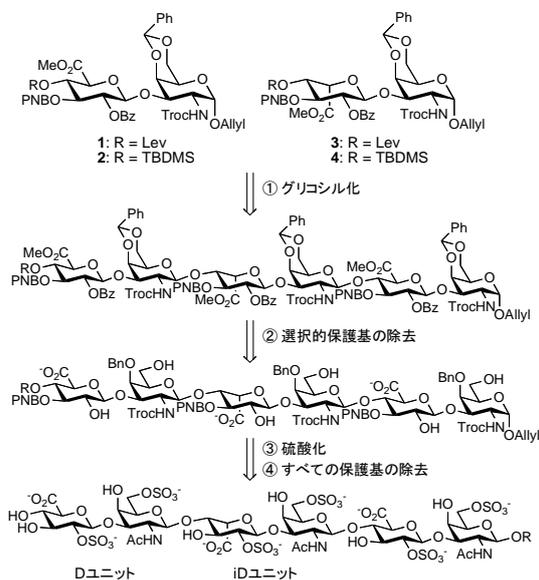
六糖体の合成は、調製した二糖成分を順次グリコシル化を行って糖鎖伸長を行い、その後、選択的な保護基の除去、硫酸化、全ての保護基の除去を行うことによって合成できると予想される(スキーム3)。



スキーム1. 二糖体の合成計画



スキーム2. ウロン酸成分の合成経路



スキーム3. 六糖体の合成計画

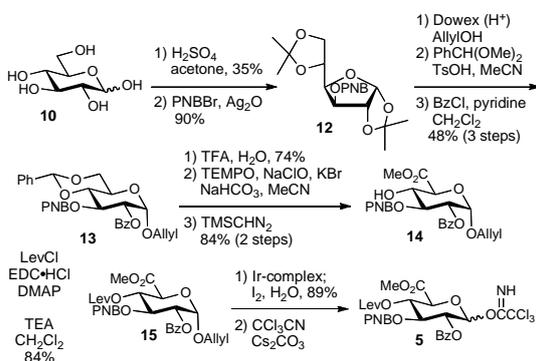
同種のユニットからなる六糖体は、1種類の二糖ビルディングブロックを、異種のユニットからなる六糖体は、2種類の二糖ビルディングブロックを用いれば良いと考えられる。

合成が完了した六糖体については、順次、神経細胞の突起伸長作用の活性の有無について検討し、糖鎖構造によって活性に明確な

差が見られた場合には、分子軌道計算等を用いて分子の活性発現に必要な構造を解析することにした。

4. 研究成果

研究方法に従って、まずウロン酸である GlcA 成分 **5** の合成について検討した (スキーム 4)。グルコースを出発化合物に用いてイソプロピリデン化後、3-O-*p*-ニトロベンジル (PNB) 化を行ってフラノース体 **12** を得た。続いて、イソプロピリデン基の除去、1 位のアリルグリコシド化、4,6-ベンジリデン化、3-O-ベンズイル化を行ってアリルグリコシド **13** を調製した。その後、ベンジリデン基の開裂、6 位選択的酸化、メチルエステル化を経て、4 位にレプリニル (Lev) 基を導入した後、1 位アリル基の除去、イミデート化を行って、GlcA 成分 **5** を合成した。

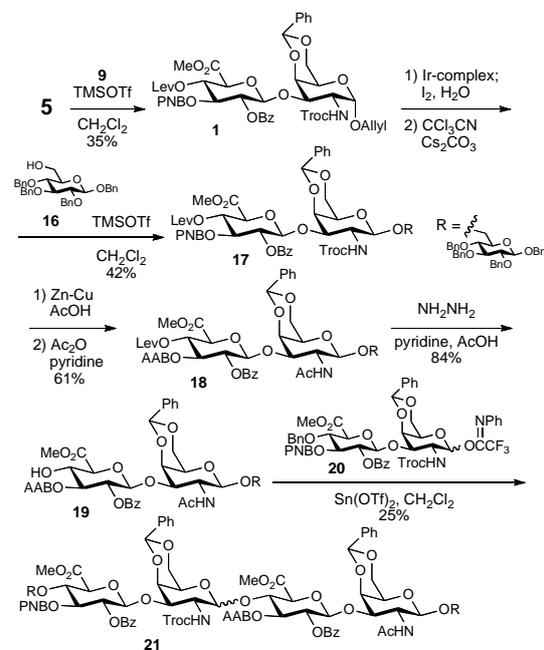


スキーム 4. グルクロン酸成分 **5** の合成

続いて、得られた GlcA 成分 **5** から二糖ビルディングブロックである二糖体 **1** への誘導と二糖体 **1** を用いた糖鎖伸長について検討した (スキーム 5)。二糖体 **1** の合成は、種々の反応条件を検討したところ、酸触媒にトリメチルシリルトリフラート (TMSOTf) を用いるグリコシル化が、低収率ではあるが、目的の二糖体 **1** を与えることが分かった。次に、得られた二糖体 **1** を用いて糖鎖伸長を行った。二糖体 **1** をイミデート体に変換後、単糖であるグルコース成分 **16** とグリコシル化を行ったところ、この場合も低収率ではあったが、目的の三糖体 **17** が得られることが分かった。さらに、得られた三糖体に対して糖鎖伸長が可能か調べた。三糖体 **17** を Zn-Cu と無水酢酸で処理し、PNB 基をアセトアミノベンジル (AAB) 基に、トリクロロエトキシカルボニル (Troc) 基をアセチル (Ac) 基に変換した後、ヒドラジンを用いて Lev 基を除去し、三糖受容体 **19** を調製した。次に、得られた三糖体 **19** と、別途調製した二糖体 **20** を用いてグリコシル化を行ったところ、低収率ではあるが、目的の五糖体 **21** が得られることが分かった。

Lev 基を有する GlcA 成分 **5** から二糖体 **1** を合成でき、また二糖体 **1** から糖鎖伸長を行

うことができたが、いずれのグリコシル化においても収率は低かった。これは、Lev 基の電子吸引性によって糖供与体の反応性が低下するため、また Lev 基の高いイース塩基性によって酸触媒が阻害されるためと考えられる。したがって、Lev 基を有する糖成分では、効率良く六糖体の合成を行うことが困難であると判断し、4 位に *tert*-ブチルジメチルシリル (TBDMS) 基を有するグルクロン酸成分 **6** の合成を検討した。

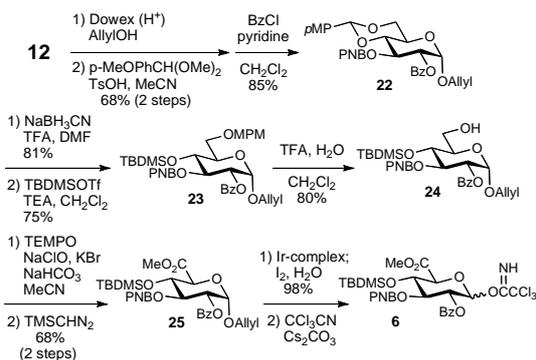


スキーム 5. 二糖中間体 **1** の合成と糖鎖伸長

グルクロン酸成分 **6** の合成に向け、まず、メチルエステル体 **14** を用いて 4 位の TBDMS 化を行った。種々反応条件を検討したが、TBDMS 基の導入は極めて困難であった。また、経路 2 においても、ウロン酸の 4 位に TBDMS 化をする必要があるため、この経路もウロン酸成分の合成に適さないと考えた。そこで、フラノース体 **12** から別経路で合成することにした (スキーム 6)。フラノース体 **12** を酸性条件下、加溶媒分解し、メトキシベンジリデン基を導入した後、3 位のベンズイル化、メトキシベンジリデン基の選択的還元開裂反応を行い、6-O-MPM 体に誘導し、4 位に *tert*-ブチルジメチルシリル (TBDMS) 基を導入して、4-O-TBDMS 体 **23** を調製した。メトキシベンジル (MPM) 基を除去した後、6 位の酸化を行ってメチルエステル体 **25** を得、1 位アリル基の除去、イミデート化を行ってグルクロン酸成分 **6** を合成した。

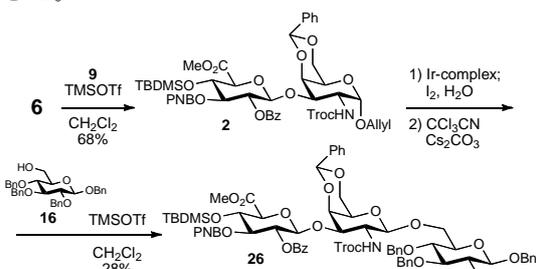
続いて、得られた GlcA 成分 **6** から二糖ビルディングブロックである二糖体 **2** への誘導ならびに二糖体を用いた糖鎖伸長について検討した (スキーム 7)。二糖体 **2** の合成は、さらなる最適化が必要であるが、酸触媒にト

リメチルシリルトリフラート (TMSOTf) を用いることによって、目的の二糖体 **2** が良好な収率で得られることが分かった。



スキーム 6. グルクロン酸成分 **6** の合成

次に、得られた二糖体 **2** を用いて糖鎖伸長を行った。二糖体 **2** を、これまでと同様に、イミデート体に変換後、単糖であるグルコース成分 **16** とグリコシル化を行った。このグリコシル化においてもさらなる最適化が必要であるが、目的の三糖体 **26** を得ることができた。

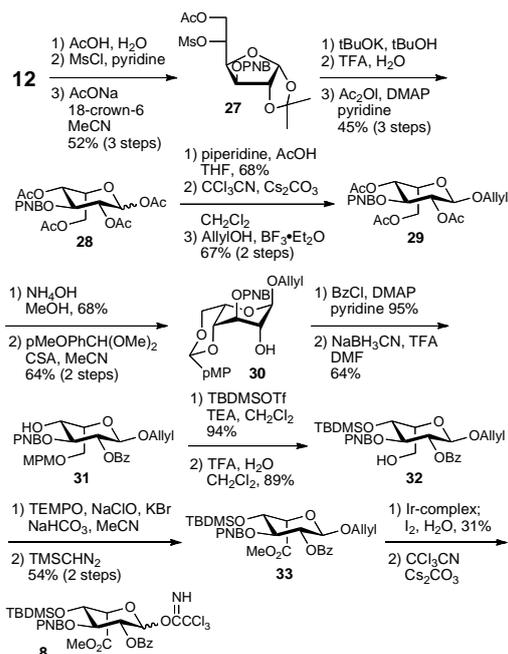


スキーム 7. 二糖中間体 **2** の合成と糖鎖伸長

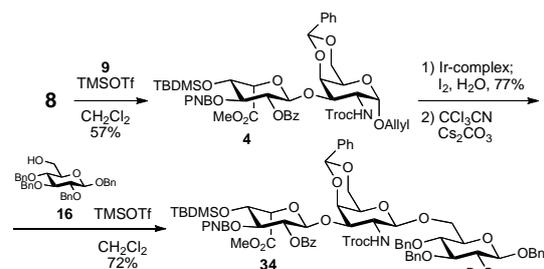
続いて、IdoA 成分の合成について検討した。グルクロン酸の場合と同様に、Lev 基を有する IdoA 成分 **7** は反応性が十分でないことが予想されるため、IdoA 成分 **8** の合成について検討した (スキーム 8)。フラノース体 **12** を出発化合物に用いて、4, 6 位のイソプロピリデン基を選択的に除去し、メシル (Ms) 化後、AcONa で処理することによって、6-O-Ac 体 **27** を調製した。続いて、5 位の反転を行ってイド体に変換し、酸加水分解後、アセチル化を行ってイドピラノース体 **28** に誘導した。次に、ピラノース体 **28** を常法によってアリルグリコシド **29** に変換し、アンモニア水を用いてアセチル基の除去を行い、GlcA 成分 **8** の合成と同様に、4, 6 位にメトキシベンジリデン基を導入した後、選択的還元開裂、4 位へのシリル基の導入、6 位の酸化、メチルエステル化を行ってメチルエステル体 **33** を得た。その後、アリル基の除去、イミデート化を行って IdoA 成分 **8** を合成した。

続いて、得られた IdoA 成分 **8** から二糖ビルディングブロックである二糖体 **4** への誘導

ならびに二糖体を用いた糖鎖伸長について検討した (スキーム 9)。二糖体 **4** の合成は、二糖体 **2** の合成と同様にさらなる最適化が必要であるが、酸触媒にトリメチルシリルトリフラート (TMSOTf) を用いることによって、目的の二糖体 **4** が良好な収率で得られることが分かった。次に、得られた二糖体 **4** を用いて糖鎖伸長を行った。二糖体 **4** をイミデート体に変換後、単糖であるグルコース成分 **16** とグリコシル化を行ったところ、さらなる最適化は必要であるが、目的の三糖体 **34** を収率良く得ることができた。



スキーム 8. イズロン酸成分 **8** の合成



スキーム 9. 二糖中間体 **4** の合成と糖鎖伸長

以上のように本研究では、CS、DS 部分構造の合成について検討し、合成の基盤となる、二糖ビルディングブロックを設計・合成することができた。今後、さらに反応条件を最適化し、糖鎖伸長を行うことによって目標の六糖体を合成する予定である。合成した糖鎖に明確な活性を見出すことができれば、抗血栓剤として知られている HP 五糖のような糖鎖創薬への展開が期待でき、また、CS、DS 糖鎖の合成法が確立できれば、より複雑な糖鎖・硫酸化パターンを持つ糖鎖合成にも応用す

ることができるため、硫酸化グリコサミノグリカンが関与する生体现象の分子レベルでの解明に繋がると考えられる。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ①発表者：杜若祐平、市来幸子、若尾雅広、隅田泰生、発表演題：デルマタン硫酸の二糖部分構造に関する合成研究、学会等名：日本化学会第 91 春季年会 (2011 年 3 月 11 日、日本化学会第 91 春季年会 (2011) 講演予稿集)
- ②発表者：若尾雅広、発表演題：合成化学的アプローチによる複雑多糖の機能解明、学会等名：生体機能関連化学部会第 25 回若手フォーラム (2010 年 9 月 23 日、大阪大学、吹田)
- ③発表者：若尾雅広、小幡瑠美、酒見千穂、杜若祐平、近藤宇男、隅田泰生、発表演題：コンドロイチン硫酸部分構造の合成とタンパク質相互作用解析、学会等名：第 59 高分子討論会 (2010 年 9 月 15 日、北海道大学、札幌)
- ④発表者：若尾雅広、小幡瑠美、酒見千穂、杜若祐平、近藤宇男、満下宣子、隅田泰生、発表演題：コンドロイチン硫酸部分二糖構造ライブラリーの構築とシュガーチップへの応用、学会等名：第 29 回日本糖質学会年会 (2010 年 9 月 9 日、飛騨・世界生活文化センター、高山)
- ⑤発表者：M. Wakao、R. Obata、C. Sakami、Y. Kakitsubata、T. Kondo、N. Mitsushita、Y. Suda、発表演題：Synthesis and Application of Chondroitin Sulfate Partial Disaccharide Library、学会等名：International Carbohydrate Symposium 2010 (ICS-2010) (2010 年 8 月 3 日、幕張メッセ、千葉)
- ⑥発表者：酒見千穂、杜若祐平、若尾雅広、隅田泰生、発表演題：コンドロイチン硫酸四糖部分構造の合成研究シュガーチップへの応用、学会等名：日本化学会第 90 春季年会 (2010 年 3 月 26 日、近畿大学、東大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若尾 雅広 (WAKAO MASAHIRO)

鹿児島大学・理工学研究科 (工学系)・助教

研究者番号：20404535