



シアル酸含有糖鎖の合成研究および細胞膜ドメイン解析のための糖脂質プローブの開発

岐阜大学研究推進・社会連携機構生命の鎖統合研究センター (G-CHAIN) 河村 奈緒子

はじめに

生物の細胞表面に存在するシアル酸含有糖鎖(シアロ糖鎖)は、細胞内外のコミュニケーションに深く関与する重要な生体分子である。また一方で、これらはウイルス・毒素の認識部位でもあることから、創薬研究の対象としても注目が高い。近年、シアロ糖鎖のなかでも糖脂質(ガングリオシド)は、タンパク質やコレステロールが集積した細胞膜ドメイン(脂質ラフト)を形成することによって、細胞間・細胞膜内外の重要かつ多彩なシグナル伝達を担うと考えられている。従って、これらの機構解明には脂質ラフトの理解が必要であるが、これまではその存在状態が不明であるばかりか、存否論争が長らく続いてきた。我々は、脂質ラフトの形成機構及び構造の解明を目的に、独自の合成化学を基盤とした細胞膜のケミカルバイオロジー研究を推進してきた。そのツールであるガングリオシドプローブを開発するためには、糖鎖合成化学における50年来の課題、すなわちシアル酸のグリコシド化における課題の解決が必要であった。我々は、この難題を解消する新たなアプローチを発想し、ガングリオシドのみならず、全てのシアロ糖鎖の合成を迅速化する強力な合成化学の開発に注力してきた。そして、構築した手法を基に、生細胞上でのガングリオシドの1分子イメージングを可能とする蛍光プローブ、さらに、分子捕捉用プローブを開発し、ガングリオシドに関わる細胞膜ドメインのケミカルバイオロジーの開拓に取り組んできた。

1. シアル酸の立体選択的グリコシド化法の開発

天然に存在するシアル酸の殆どは、 α グリコシド結合により糖鎖に結合している。しかしながら、化学合成においては、これまで、シアル酸の α 結合と β 結合の完全な作り分けが不可能であった。そこで、我々は、グリコシド化の反応点となるアノマー炭素を橋頭位とすることで、 S_N1 反応のグリコシド化において一方の結合様式のみ合成が可能と発想した。 α 結合のシアル酸は、1位カルボキシル基と5位アミノ基が β 側に配向し、1,4-cis配置の関係にある。そのため、これを架橋することができれば、グリコシド化の際に橋頭位オキソカルベニウムイオンの β 側が架橋部により完全に遮蔽されるため、結果として生成物は α グリコシドに限定されると考えた(図1)。そこで、橋頭

位アノマー炭素のカチオン生成はBredt則により不利であると考えられたため、anti-Bredtなカチオンの生成を許容する架橋部の鎖長を検討した。その結果、鎖長によってグリコシド化の収率は大きく異なり、16員環を与える架橋部を有するシアル酸供与体が α 結合のみを極めて高収率にて与えることを見出した。さらに、5位側の架橋部末端を2,2-dichloroethoxycarbonylとすることによって、二環性シアル酸供与体の大幅な反応性向上に成功した。加えて、カーバメート部分は亜鉛と酢酸による温和な条件下で、遊離のアミノ基へ変換できるため、天然にみられる多様な5位アミノ修飾体への展開を可能にした。我々は、立体選択性が完全な本手法を用いれば、天然に存在する全てのシアロ糖鎖の合成が可能であることを証明し、従前は最難関であったガングリオシド、シアル酸多量体の効率的合成も達成した。さらに、天然型のO-グリコシドのみならず、創薬開発の応用も期待できるC-グリコシド合成も可能とした。このように、ガングリオシドをはじめとしたシアロ糖鎖の化学合成に必要な実用的で応用範囲の広い基礎技術を確立した¹⁾。

2. 脂質ラフトの観察を可能とする蛍光ガングリオシドプローブの開発

脂質ラフトの観察を目的に、蛍光ラベル化したガングリオシドの化学合成と生細胞上での1分子イメージングに取り組んだ。ガングリオシドの糖鎖には、タンパク質との相互作用に重要な官能基(カルボキシル基やアミド基)が存在する。そこで、これらの官能基の機能を妨げないようにするため、標的水酸基のみをアミノ基で置換した後、蛍光色素をアミド化により結合させる方法確立した。これにより、天然と同様に振舞う優れた蛍光ガングリオシドプローブ17種類の開発に初めて成功した²⁻⁴⁾。続いて、沖縄科学技術大学院大学の楠見明弘先生、岐阜大学・G-CHAINの鈴木健一先生らとの共同研究のもと、生細胞上での1分子イメージングを行った。その結果、ガングリオシドとタンパク質会合体が頻繁に会合する様子を捉えることに成功した(図2)。これによって脂質ラフトの可視化・存在証明に初めて成功し、20年にわたる脂質ラフト存否論争を終結させた²⁻⁶⁾。

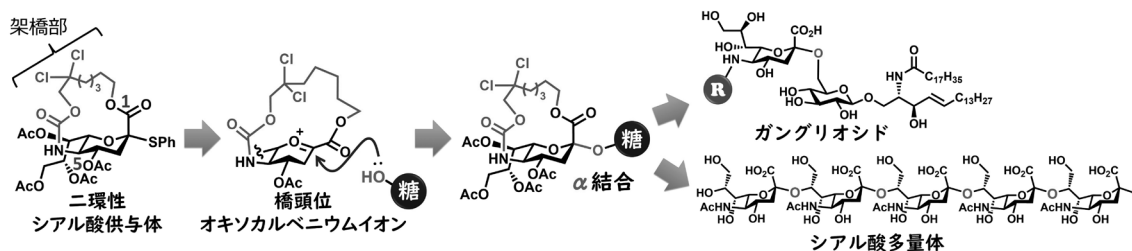


図1. 本研究で開発したシアル酸の完全な立体選択的グリコシド化法

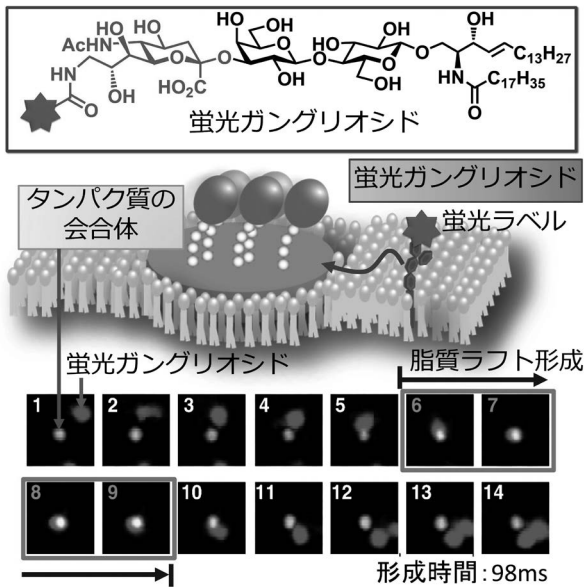


図2. 脂質ラフト形成の1分子イメージング

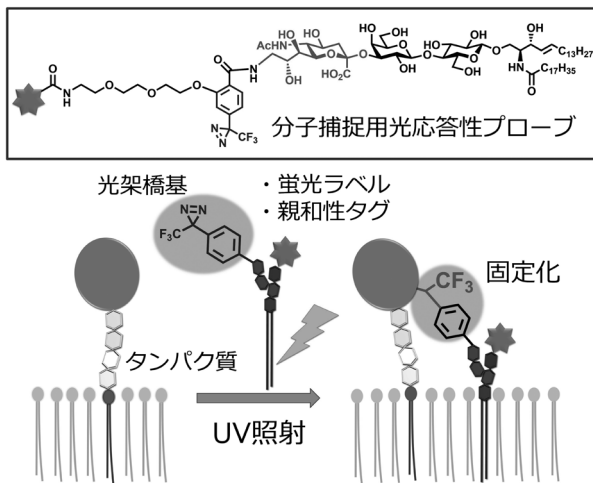


図3. 光架橋反応による親和性分子の捕捉

3. 脂質ラフトの構造解析のための分子捕捉用光応答性ガングリオシドプローブの開発

脂質ラフトの機能を明らかにするためにはその構造解析が必要である。1分子イメージングにより、脂質ラフトは極めて動的で不安定な性質を有することが明らかとなったが、このようなドメインの構造解析法は確立されていない。そこで、我々は、細胞膜上で近接分子の捕捉が可能な新たなガングリオシドプローブを発想した。すなわち、光照射により近接分子との架橋形成が可能な光架橋基（ジアジリン基）と検出基（蛍光ラベル、親和性タグ）を有した分子捕捉用光応答性ガングリオシドプローブを考案した（図3）。これにより、1) 安定なガングリオシドタンパク質会合体の1分子イメージング、2) 脂質ラフト構成分子の抽出・同定、が可能と考えた。我々は、糖鎖のシアル酸9位水酸基に光架橋基と検出基の両方を結合させる方法を確立することで、二官能性のガングリオシドプローブの化学合成に初めて成功した。このような糖鎖末端で分子捕捉が可能な分子プローブに加え、脂肪酸C17位に光架橋基を有するガングリオシドプローブも開発し、脂質間で相互作用する膜分子の捕捉も可能とした。我々は、ガングリオシドGM3及びGM1

を対象に、分子捕捉用光応答性プローブ5種類を化学合成することに成功した⁷⁾。

おわりに

シアロ糖鎖の機能はこれまでも大きな関心が寄せられてきた。しかしながら、その機能研究さらには応用研究の推進には、シアロ糖鎖の強力な化学合成技術が望まれてきた。我々が確立した合成化学は、シアロ糖鎖合成の簡便化・迅速化を実現するものであるため、これらの研究の進展に貢献できると考えている。一方で、本研究で開発したガングリオシドプローブは、これまで不明であった脂質ラフトの性状の一端を明らかにした。しかしながら、ドメインの形成と機能にはまだ多くの謎が残されている。今後も化学と生物学の異分野融合研究によって、シアロ糖鎖の機能の理解を基に、細胞膜ドメインの理解を深めていきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) N. Komura *et al.* Constrained sialic acid donors enable selective synthesis of α -glycosides; *Science*, 364, 677–680 (2019).
- 2) N. Komura *et al.* Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor; *Nat. Chem. Biol.*, 12, 402–410 (2016).
- 3) N. Komura *et al.* Syntheses of fluorescent gangliosides for the studies of raft domains; *Methods in Enzymology*, 597, 239–263 (2017).
- 4) M. Koikeda, N. Komura*, H.-N. Tanaka, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, H. Ando*, Synthesis of ganglioside analogues containing fluorescently labeled GalNAc for single-molecule imaging; *J. Carbohydr. Chem.*, 38, 509–527 (2019).
- 5) K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, T. K. Fujiwara, M. Kiso, A. Kusumi, Development of new ganglioside probes and unraveling of raft domain structure by single-molecule imaging; *Biochim. Biophys. Acta*, 1861, 2494–2506 (2017).
- 6) K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, M. Konishi, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, Revealing the raft domain organization in the plasma membrane by single-molecule imaging of fluorescent ganglioside analogs; *Methods in Enzymology*, 598, 267–282 (2018).
- 7) N. Komura, *et al.* Syntheses of bifunctional photoaffinity ganglioside probes for studying raft-associated interactions; *Trends Carbohydr. Res.*, 9, 1–26 (2017).

謝辞 本研究は、岐阜大学応用生物科学部生理活性物質学研究室、京都大学物質—細胞統合システム拠点 (iCeMS) サテライトおよび岐阜大学生命の鎖統合研究センター (G-CHAIN) 糖鎖コアグループで行われたものです。糖鎖の化学合成に携わる機会と恵まれた研究環境をお与え下さいました木曾真先生、石田秀治先生に深く感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、多大なご指導とご支援をいただくとともに、本賞にご推薦くださいました安藤弘宗先生に心より感謝申し上げます。日頃よりご助言とご指導をいただきました、今村彰宏先生、田中秀則先生に深く御礼申し上げます。二環性シアル酸の立体配座解析にご協力いただきました岐阜大学工学部の宇田川太郎先生、ラフトプローブ開発で多大なお力添えを頂きました沖縄科学技術大学院大学の楠見明弘先生（前京都大学 iCeMS 及び再生医科学研究所）、岐阜大学・G-CHAIN の鈴木健一先生（前京都大学 iCeMS）に心より御礼申し上げます。最後に、昼夜実験に励み、本研究に貢献していただいた生理活性物質学研究室の研究員、学生の方々にこの場を借りて深謝いたします。