

糖鎖の構造科学と生物機能

特集 プロジェクト研究

楠 本 正 一*

Glycobiology – Structure and Function

Key Words : glycan chain, glycoconjugate, structural analysis, synthesis, biofunction

はじめに

日本学術振興会の未来開拓学術研究推進事業の第2期目の課題の1つとして、平成9年度に発足した「糖鎖の構造生物学と機能」という私たちのプロジェクトが採択された。この研究は大阪大学大学院理学研究科・化学専攻の長谷純宏、楠本正一両研究室と、当時の北海道大学医学部癌研究施設(昨年4月から国立がんセンター・ウイルス部)の斎藤政樹グループが共同で行うことになっている。

糖分子が互いにグリコシド結合でつながると、大きさの面だけを見ても二糖、三糖などのオリゴ糖から、高分子量の多糖までさまざまな種類の分子が生じる。それらの構造は構成糖の種類とそれらの結合位置の違いなどによって、まさに千差万別である。さらに自然界には、糖だけでなく糖が蛋白質や脂質などに結合してできた糖蛋白質や糖脂質のような複合糖質が存在するので、その多様性はさらに広がる。複合糖質の一部を構成している場合を含めて、糖分子が連なることによって何らかの特定の生物学的な役割を果たすようになったもの、言い換えれば生体内である情報を担っているものを最近「糖鎖」と呼んでいる。血液型を決めているのが赤血球の表面にある糖鎖の構造であることは比較的良好に知られているが、このほかにも癌化した細胞に多く出現し、

癌の診断に利用されている糖鎖や、細胞の相互認識にかかわる糖鎖なども見出されている。本研究ではさまざまな生物機能を有する糖鎖や複合糖質を対象にして、それらの機能を構造や分子認識の観点から理解しようとするものである。そのために微量の生物活性糖鎖の単離と構造研究、構造の確認と類縁体調製のための効率的な合成、3次元的な分子構造の解析、糖鎖と蛋白質の相互作用解析、遺伝子の制御による糖鎖機能の解明まで含めた幅広い計画を立てている。以下にこのプロジェクトの概要について紹介する。

糖鎖の探索と機能研究

細胞の表面、細胞質内などには多種類の糖鎖が広く分布している。しかしほとんどの場合、それぞれの糖鎖の存在量は決して多くない。その上に特別の発色団をもたない糖鎖は検出感度が低いために、分離や精製が容易でなく、このことが微量糖鎖化合物の取り扱いを難しくしている。この問題を解決するために長谷らが考案したピリジルアミノ(PA)化法は糖鎖の還元末端の性質を利用して、還元アミノ化という手法でその位置に特異的に蛍光性のピリジルアミノ基を導入するもので、これによって微量の糖鎖を高感度で検出し、精製することが可能になった。このPA化法は現在では糖鎖の検出、生成の標準的手法の1つとして世界的にも広く認知されている。長谷らは糖蛋白質や糖脂質から切り出した糖鎖を対象にして、PA化法を駆使してそれらの構造を明らかにする研究を展開してきたが、本研究では細胞膜の成分にこだわらず、特にこれまではほとんど研究されなかったために、その役割もよくわかっていない細胞質内の遊離糖鎖に焦点を当て、未知の新しい糖鎖の探索と構造決定、さらにその生物学的役



*Shoichi KUSUMOTO
1940年11月30日生
1963年大阪大学理学部化学科卒業
現在、大阪大学大学院・理学研究科・
化学専攻、教授、理学博士、天然物有機化学
TEL 06-6850-5388
FAX 06-6850-5419
E-Mail skus@chem.sci.osaka-u.ac.jp

割の解明にも取り組む。糖鎖の構造決定には、これまでに開発してきた蛍光標識糖鎖の部分加水分解と2次元糖鎖マップ法が非常に役立っている。また標識糖鎖を基質に用いることによって、それらの糖鎖の代謝にあずかる酵素を探索し、その役割の解明を行う。すでに研究を行っているニワトリ輸卵管の α -マンノシダーゼについては、基質特異性と部分アミノ酸配列の解明が進んでいる。

糖鎖の合成研究

糖鎖の構造と役割を明らかにするには、合成による構造確認と関連化合物の供給が不可欠である。本研究では糖鎖の合成にも重点をおいて複数のアプローチを行っている。多様な構造の糖鎖を化学的に自在に構築するためには、多数の水酸基の選択的な保護と脱保護、立体選択的かつ効率的なグリコシド結合形成反応の確立、の2つが重要な課題である。楠本研究室では最近のいわゆる糖鎖研究ブームの始まる以前からこれらの問題に取り組んできたが、すでに互いに独立かつ選択的に導入—除去することが容易にできる多様な水酸基保護法を考案して複雑な糖質の合成に大きな貢献を果たした(図1)。一連のp-

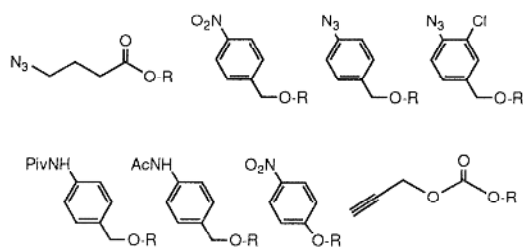


図1 新しい水酸基の保護基

位窒素置換ベンジル基は、電極酸化やDDQ酸化などの穏和な酸化条件によって切断することのできる有用なもので、酸化条件の選択による段階的な除去が可能である。このうちp-ニトロベンジル基、4-アジド-3-クロロベンジル基は、そのままではこれらの酸化に対して安定であるが、前者は還元してアミノベンジル基またはアシルアミノベンジル基に変換することによって、後者はアジド基にトリフェニルホスフィンを作用させることによって、それぞれ活性化すると、同じ酸化剤によって非常にスムーズに切断できるようになる。簡便な操作で同じ反応剤に対する感受性を高めるこの活性化は、いわば「留

め金(safety catch)をはずす」操作に相当するもので、この考えの導入によって複数の保護基を自在に使いこなして、極めてフレキシブルな合成計画を立てることが可能になった。それらの有用性は後述べるリポタイコ酸の化学合成において実証されている。最後にあげたプロパルギルオキシカルボニル基も同様の考えに基づくもので、そのままのかたちでは酸に対して安定であるが、コバルト錯体に変換することによって酸性条件で容易に切断できるようになる。

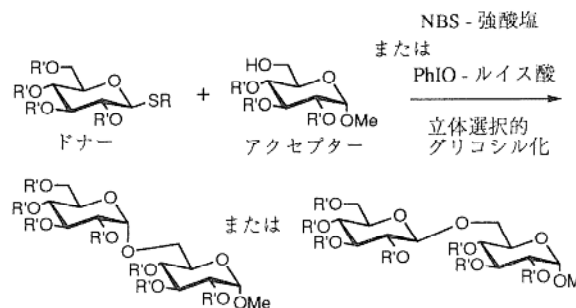


図2 チオグリコシドをドナーとする立体選択的グリコシル化

グリコシド結合形成についても、チオグリコシドを用いる温和で立体選択的な反応条件を数多く見出してすでに報告しているが、さらに引き続き検討を行っている(図2)。化学的なグリコシル化反応(グリコシド結合形成反応)はドナー成分(この場合はチオグリコシド)を活性化して、アクセプターと呼ばれる他方の糖成分と結合させて行う。この時に例えば系内に少しでも水分が存在すると、活性化されたドナーの加水分解が起こってしまうために目的物の収率が低下する。したがって実際の合成ではこのような技術上の基本的問題を全て解決した上で、選択性を追求する必要がある。チオグリコシドにNBSと強酸の塩を作用させる活性化法は、吸湿性のない固体状の反応剤だけを用いることができるので、湿気の混入を避けやすい。また用いる塩の種類を選び、既知の溶媒効果を利用すれば、極めて高い立体選択性を達成できるようになった。同じドナーとアクセプターを用いた反応でも α -または β -グリコシドを選択的に作り分けることさえ可能である。ドナーの2位水酸基の保護基がグリコシル化反応の立体化学に大きな影響を与えることは以前からよく知られていたが、6位の保護基の選択によって α -グリコシド生成を優先させる効果が得られることもわかって

きた。これらの知見を総合的に活かし、目的に応じた反応条件を選ぶことによって効率のよい立体選択的なグリコシル化が達成できるようになっている。この液相法による化学合成は実際に硫酸化多糖ヘパリンの部分構造の合成などにすでに多くの成果を挙げているが、本研究では糖鎖を迅速かつ簡便に合成するために、実用的な固相合成の実現も視野に入れて研究を展開している。上記の液相法で得られた基本的な知見はいずれも固相合成にも有用であるが、固相反応に固有の問題である担体の選択、固相と糖鎖を連結する優れたリンカーの開発などの研究を現在行っている(図3)。

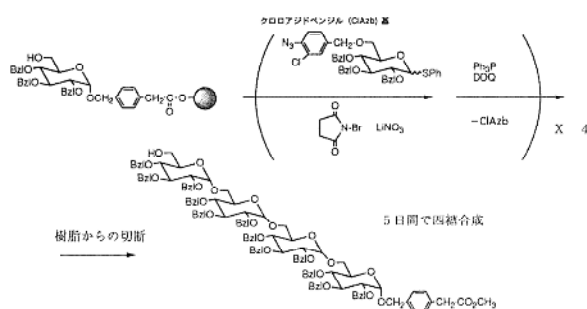


図3 糖鎖の固相合成

また、多数の保護基を駆使して厳密な無水反応条件下で行う上記のような化学合成とは全く逆に、酵素を利用する水溶液中での糖鎖合成についても検討しており、すでに成果が出はじめている。酵素合成にはすでに多くの研究グループが取り組んでいるが、ここでは加水分解酵素のトランスグリコシダーション活性を利用して、p-ニトロフェニルグリコシドをドナーに用いる手法を選び、最少の保護基を導入することによって特定の構造のオリゴ糖や蛍光標識体を非常に簡便に合成することに成功している。さらに酵素法に化学的グリコシル化を組みあわせる経路を見出して、酵素で合成したオリゴ糖鎖とアミノ酸の縮合体を得ることに成功した(図4)。今後は

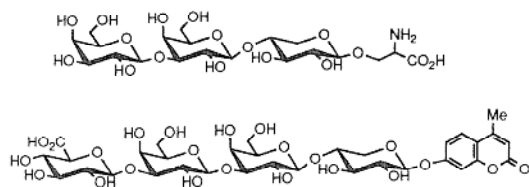


図4 酵素、酵素-化学的方法によって合成された糖鎖誘導体

さらに種々の新しいドナーや酵素の組合せを検討して、より一般性の高い糖鎖合成法へと発展させる計画である。

複雑な糖鎖、複合糖質の機能研究

精製の難しさや、量的な問題のゆえに入手が容易でない糖鎖化合物の機能を明らかにしていくには、合成的な手法が不可欠であることは既に述べた通りであるが、合成はそのほかにも、天然には存在しないような類縁化合物、種々の目的に用いる標識化合物を得るための貴重な手段でもある。本研究では以下に代表的な例を挙げるような様々な糖鎖や複合糖質の機能解明を目指して、総合的なアプローチを行っている。

硫酸化多糖ヘパリンは、生体内での機能が最近注目されているグリコサミノグリカンと総称される酸性多糖の1つである。このヘパリンは抗血液凝固作用を示すことから古くから臨床的にも用いられてきたが、血液中の血小板とも相互作用して副作用を引き起こすことが明らかになってきた。隅田らはきわめて不均一な天然ヘパリン中に存在する特定の硫酸化二糖構造が血小板との相互作用に関わっていることを推定し、これを合成的に証明した。本プロジェクトではさらに各種の関連糖鎖構造やその集合体を合成し、血小板や新たに血管平滑筋細胞との相互作用、またその際の結合の相手となる蛋白因子の分離、同定を目指して研究を行っている。ヘパリンの血液凝固阻害作用については、すでに活性本体として硫酸化五糖構造が証明されているが、本研究によってヘパリンのそれ以外のさまざま生物機能についても活性構造とその分子レベルでのはたらきについて順次明らかにしていきたい。

楠本研究室ではこれまで永年にわたって細菌細胞表面の複合糖質が高等動物に対して示す顕著な免疫増強活性をテーマに、その活性本体の決定と作用機作について研究してきた。本研究でもこれを発展させて、グラム陰性菌由来のリポ多糖の活性部位リピドA、グラム陽性の連鎖球菌から得られる新規免疫増強活性複合糖質などについて研究を行っている。

リピドAは図5に示す構造を有する糖脂質で、これがリポ多糖の多彩な活性の本体であることは私たちのこれまでの研究で明らかになっている。リポ多糖は種々のサイトカインを誘導するきわめて強い作用を有して白血球やリンパ球を活性化するが、その

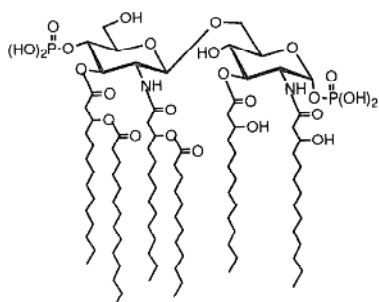


図5 大腸菌リピドAの化学構造

作用の過剰な発現がヒトをはじめとする動物に対して強い毒性として現れる。このためにリポ多糖は強力な細菌毒素エンドトキシンとしておそれられてきた。リピドAはこのエンドトキシンの本体として、毒性から抗腫瘍作用に至るリポ多糖の全ての活性を有することが合成化合物を用いた実験によって確認された。すでにこれまでにこのリピドA構造の効果的な合成法を確立しており、それによってアシル基の数や分布の異なるものをはじめとする種々の誘導体を合成した。そしてそれらの生物活性の比較からさまざまな興味ある知見が得られている。例えば図5の大腸菌リピドAよりもアシル基の数が少ないその生合成前駆体は、リピドAやリポ多糖の活性を抑えるアンタゴニストとして働くことがわかっている。このような結果から、アシル基の集合が分子のかたちを通じて活性に影響を与えていることが示唆されたので、構造変化と分子のコンホメーション、さらには活性の関係を明らかにすることを計画した。そしてこれまでに位置特異的に ^{13}C 標識したリピドA誘導体の化学合成とそのMNRスペクトルの解析から、溶液中のリピドA誘導体のコンホメーションを明らかにするとともに、その特徴的な会合状態を明らかにすることも成功している。今後は活性とコンホメーションの関係、リセプターを始めとする結合蛋白との相互作用による構造変化へと順次研究を進めていきたいと考えている。既に特異的な結合蛋白質の探索のために必要な放射性標識リピドA誘

導体の合成も終えている。

グラム陰性細菌のリポ多糖ほどに顕著な活性ではないが、グラム陽性細菌も同様の作用を持つ複合糖質を含んでいることが指摘され、その本体はこの種の菌に特徴的な表層成分であるリポタイコ酸であろうと推定されてきた。しかし連鎖球菌のリポタイコ酸の推定構造を改めて確認し、それを合成した結果からリポタイコ酸そのものは活性の本体ではないこと、別に微量成分ではあるが強い活性を示す新しい複合糖質が存在することが分かった。現在その構造解明を目指して努力を続けている。グラム陰性菌のリポ多糖に起因するショック症状は、抗生物質の進歩もあって臨床的にはかなり解決されつつあるのに、最近では従来とは逆にグラム陽性菌によるショックが大きな問題になりつつあるという。新たに分離された活性複合糖質が、リポ多糖あるちはリピドAと同様に働くものかはまだ明確でないが、その構造と作用の解析から、リポ多糖の場合と同様に感染に伴うショックの原因物質を明らかにすることも夢ではないかも知れない。

おわりに

未来開拓学術研究推進プロジェクトの課題として私たちのグループで進めている計画のうち、大阪大学で行う部分について以上に紹介した。共同研究者の斎藤は、遺伝子の側から糖鎖の機能を解析する研究を分担する。既に細胞表層の糖脂質生合成の重要な鍵物質であるガングリオシドGM3合成酵素を標的に選んで、その遺伝子クローニングに世界で初めて成功した。今後はこの遺伝子の制御による細胞表層における糖鎖の役割、細胞外マトリックスと糖鎖の相互作用の解明へと研究を発展させる予定である。

糖鎖の高感度分析、選択的な合成と機能研究、そして遺伝子からのアプローチの有機的協力によって、糖鎖を含むさまざまな分子が生命現象に果たしている役割を明らかにできることを願っている。