

『ミニマム糖クラスターの動的コンビケムの構築』

長谷川輝明

糖鎖間相互作用とは

オリゴ糖は細胞膜上の糖タンパク質や糖脂質の構成要素として自然界に広く分布しており、それらは様々な糖認識タンパク質に対する特異的リガンドとして働くと考えられてきた。一方で近年、オリゴ糖とオリゴ糖との間の特異的な相互作用が細胞間接着や細胞間情報伝達に関与していると考えられつつあり、この相互作用は「糖鎖間相互作用 (Carbohydrate-Carbohydrate Interactions: CCI)s)」として広く認知され始めてきている。例えば細胞膜上のスフィンゴ糖脂質(GSLs)は様々なシグナル伝達タンパク質と共に水平凝集してGSLマイクロドメインを形成し、その後、隣接する細胞上のGSLマイクロドメイン同士が糖構造依存的に相互作用することにより、細胞間接着や細胞間情報伝達が引き起こされている。CCI'sの実例として、桑実体のコンパクションやメラノーマ細胞の転移が、それぞれLe^x 同士やG_M3とラクトシルセラミド(LacCer)との間のCCI'sによって引き起こされることが挙げられる。しかし、生細胞を用いた研究では細胞膜の不均一性や流動性、さらには複雑性などのために、CCI'sに関する詳細なデータを得ることは非常に困難である。現在のところ、CCI'sを引き起こすオリゴ糖の組み合わせ数種類と、Ca²⁺ の存在がCCI'sの誘起に必須である場合が多いこと以外は、CCI'sに関する詳細なメカニズムはほとんど何も明らかとなっていない。これらの生細胞特有の諸問題を回避し、CCI'sに関するメカニズム解明を行うためには、均一な構造を有する人工モデル系を用いたアプローチが有効である。

人工モデル系を用いた糖鎖間相互作用のメカニズム解明

近年、ミセルやリポソーム、さらには金ナノコロイドや、原子間力顕微鏡 (AFM) のチップ上、さらにはその他の分子骨格上で糖鎖を集積させた人工モデル系を使い、特異的な CCI_sを検出した例が徐々に報告されはじめている。また、オリゴ糖修飾ポリマーとオリゴ糖修飾単分子膜との CCI_sを気液および固液界面にて評価した例や、オリゴ糖修飾 dendrimer を用いた CCI_s研究例も近年別の研究グループによって報告されている。また、糖誘導体の結晶構造または多層膜構造中において、CCI_sと思われる相互作用が確認された事例も報告されている。これらを含めた従来の CCI_s研究は、そのほとんどが分子間相互作用に基づいたアプローチによって行われているが、個々の糖鎖同士の CCI_sは非常に微弱で検出が困難なため、分子間アプローチによる CCI_s研究ではクラスター化した糖鎖が不可欠である。しかし、多数の糖鎖が密集した糖クラスター化合物を利用しているが故に、CCI_sを引き起こした糖鎖ユニット同士の空間パッキングやその結合の強さなどの詳細情報が極めて得にくい。

CCI_sのメカニズム解明に向けたもう一つのアプローチは、分子内相互作用を利用したものであり、この分子内アプローチの利点として CCI_sの検出に必要な糖鎖数が非常に少なく済むことが挙げられる。分子内アプローチとは、分子内で働く CCI_sに基づいた分子のコンホメーション変化を基に、CCI_sの作用機序を明らかにしようとするアプローチであり、このような分子内アプローチによる CCI_sのメカニズム解析を行っている研究室は、全世界を見回しても我々の研究室のみである。今回我々は、この分子内アプローチに動的コンビナトリアルケミストリー (DCC) の概念を導入した人工モデル系を初めてデザインした。DCCとは一般的に生理条件下で開裂および形成が平衡状態となっている特殊な化学結合 (配位結合やジスルフィド結合など) を利用した戦略である。この結合の開裂および形成により、複数の異性体から構成される動的コンビナトリアルライブラリー (DCLs) が自発的に構築されるが、この DCLs 溶液にリガンドを加えると、そのリガンドと安定な複合体を形成する構成分子のみが安定化され、その結果としてその分子の存在比が増幅される。今回我々がデザインした系の特徴は、骨格としてトリスビピリジン鉄錯体を用い、DCLs 内の各構成成分比の増減を紫外可視吸収 (UV-vis) または円偏光二色性分散 (CD) スペクトルによって簡便に検出可能な分

子システムを構築している点にある。ビピリジンは Fe^{2+} と安定なトリス錯体を形成するが、 Fe^{2+} 中心近傍の配位子のねじれにより2種類の立体異性体(Δ -型および Λ -型)が存在し、それらは全て動的平衡条件下にある。ある特定の錯体異性体内部でCCIsが働けばその錯体異性体の解離速度定数は低下し、その結果その錯体異性体の存在比が増大する。各錯体異性体の存在比をUV-visおよびCDスペクトル測定、さらにはHPLC分析などにより追跡することで、どの異性体が安定化されたのか、つまりほどの異性体内部でCCIsが働いたのかをモニタリングできるはずである。

ラクトース修飾ビピリジンの合成

今回我々は、ラクトース(Lac)を5位および5'位に導入したビピリジン(bpy-Lac)を合成し、その後の Fe^{2+} との錯形成に用いることとした。LacはLacCerの糖鎖部分として細胞表面に大量に存在し、 Ca^{2+} 存在下で引き起こされるLacCer-LacCer間またはLacCer-GM3間のCCIsを介して細胞接着を誘導する糖鎖として、すでに多くの報告がなされている。しかし、残念なことにそのイオン選択性やLac部位とイオンとの間の化学量論比など、未だ不明な点が多い。

まず我々は、市販のLacに対してそのヒドロキシ基のアセチル化、アノマー選択的ブロモ化、およびその後のナトリウム-*p*-ニトロフェノキシドを用いた $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応をおこない、*p*-ニトロフェニル- β -ラクトシドを合成したのち、当該化合物に対して還元アミノ化をおこなうことで*p*-アミノフェニル- β -ラクトシド(*p*AP-LacAc)を得た。また、市販の5,5'-ジメチル-2,2'-ビピリジンを過マンガン酸カリウム処理により酸化して2,2'-ビピリジン-5,5'-ジカルボン酸へと変換したのち、塩化チオニル中で加熱環流することで2,2'-ビピリジン-5,5'-ジカルボン酸クロライド(bpy-COCl)を得た。このようにして合成した*p*AP-LacAc およびbpy-COClをテトラヒドロフラン中、トリエチルアミン存在下にて混和することで両者をアミドカップリングさせ、最終的に脱アセチル化を行うことで5位および5'位にLac部位を有するビピリジン(bpy-Lac)を合成した。

ラクトース修飾トリスビピリジン鉄錯体の調製とカチオン応答性

今回合成に成功したbpy-Lacは、 Fe^{2+} との錯化により、2種類のジアステレオメリックな錯体異性体(Δ -型および Λ -型)に加えて、錯化していない遊離のbpy-Lacも含めた計3種類の構成成分からなるDCLsを自発的に形成するはずである。実際にbpy-Lacの水溶液に FeCl_2 を加えたところ、その水溶液の色は即座に赤紫色へと変化した。また、 FeCl_2 添加後の水溶液のUV-visスペクトルには、550nm付近の幅広い特性吸収帯の出現が確認できた。これは水溶液中に存在するbpy-Lacの一部が Fe^{2+} と自発的に錯形成し、6つの糖鎖を有するトリスビピリジン鉄錯体へと変換されたことを明確に示している。興味深いことに、この水溶液に更にNaCl または CaCl_2 を添加(〜1 M)すると、添加量に応じて上記特性吸収帯の強度が更に増大した。これは、 Na^+ もしくは Ca^{2+} の存在により、DCLsを構成する2つの錯体異性体うち、どちらかもしくは両方の安定性が増大し、その結果として錯体全体の存在量が増大(つまりは遊離のbpy-Lacが減少)したことを示している。現在のところ我々はこれらのイオンの存在により、錯体分子内のLac残基間にCCIsが働き、それが付加的な引力となって錯体構造が安定化されたことが、錯体濃度増大の原因であると考えている。

次に、 Δ -型および Λ -型のうちどちらの異性体がこれらのイオンの存在により安定化されたのかを評価するため、円二色性分散(CD)スペクトルの測定を行った。はじめに、 Na^+ および Ca^{2+} を一切含まない錯体水溶液をCDスペクトル測定したところ、550nm付近を境に正から負へと、300nm付近を境に負から正へとシフトするCDシグナルが観測できた。これは Δ -型のトリスビピリジン鉄錯体特有のCDスペクトルであり、このことはイオン非存在下において Δ -型が Λ -型よりも安定で、より過剰に存在していることを示している。興味深いことに、水溶液中に含まれる Na^+ および Ca^{2+} 濃度を0〜0.1M程度の範囲内で徐々に増加させていくと、その濃度に依存してCDスペクトルのシグナル強度が減少した。この事は、水溶液中における Δ -体の過剰率が、この濃度域の Na^+ および Ca^{2+} の存在により低下する(つまりは Δ -型と Λ -型の等量混合物に近づく)ことを示している。一方でより高濃度(0.1〜1.0 M)の Na^+ および Ca^{2+} を含む水溶液中ではこの挙動が反転し、イオン濃度が増加するに従ってCDシグナル強度が増加することも見出した。この濃度域のイオンの存在により、もともと安定であった Δ -型が更に安定化されることを示すデータである。

まとめ

我々は二つのLac部位を有するビピリジン誘導体を有機化学的に合成し、 Fe^{2+} と錯化させることにより6つのLac部位を有するトリスビピリジン鉄錯体を調製した。この錯体は、糖鎖空間配置が異なる2種類の異性体から構成されており、さらに水溶液中では遊離のビピリジンリガンドを加えた計3種類の要素からなるDCLsとして存在している。我々の研究で、これら3種の化合物の存在比が様々なイオン種の添加により劇的に変化し、しかもその変化がUV-visおよびCDスペクトルの測定にて容易に追跡可能であることが明らかとなった。イオンによって誘起された錯体内部のLac-Lac間CCIsにより特定の錯体が安定化されたことが、これらのスペクトル変化の主要因であると考えられる。加えるイオンの濃度範囲によって安定化される異性体が異なるなど、その錯体安定化のメカニズムには未だ不明な点が多いが、今回得られた結果は、微弱なCCIsを高感度に検出するための分子ツールとして、糖修飾ビピリジンが非常に優れていることを明確に示している。今後、Lac以外のオリゴ糖を導入したビピリジンに関しても同様の合成およびアッセイを行い、これらのオリゴ糖のイオン選択性や糖鎖選択性に関する網羅的な知見を得たのち、適切な学術雑誌に論文投稿を行う予定である。

国内学会発表

1. 長谷川輝明・宇留野龍平・堤麻由香・中村もとみ・石川佳明:糖修飾トリスビピリジン鉄錯体を用いた糖鎖間相互作用のメカニズム解析 第94回日本化学会春季年会(平成26年3月27日)
2. 野中祐紀・宇留野龍平・長谷川輝明:6つの糖部位を有するトリスビピリジン鉄錯体による糖鎖間相互作用メカニズムの解析 第33回日本糖質学会(平成26年8月10日)
3. 野中祐紀・宇留野龍平・長谷川輝明:オリゴ糖修飾トリスビピリジン鉄錯体による糖鎖間相互作用メカニズムの解析 第95回日本化学会春季年会(平成27年3月・申込済み)