

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域

(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) 糖脂質の代謝と分子相互作用を解明する分子ツール創製

(英語) Development of molecular tools for the clarification of metabolism and molecular interaction of glycolipids

研究開発担当者 (日本語) 大学院薬学研究院 教授 平井 剛

所属 役職 氏名： (英語) Graduate school of pharmaceutical sciences, Professor Go Hirai

実施期間： 平成28年10月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語)

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究では、糖脂質の機能を探るための2つの新しい分子ツール、糖脂質の結合タンパク質解析の鍵となる“ヘッドグループ修飾型”光親和性プローブ（Head-PAL プローブ）、糖脂質の“基質特異的”な代謝を解析可能な分子プローブの開発を目的としている。以下、28年度の研究成果を纏める。

1. Head-PAL プローブ開発

・光親和性標識法に用いる新しい光反応性基の開発に関して

光親和性標識法は、分子間相互作用を捉える重要な手法である。糖脂質—タンパク質相互作用のようなおそらく一過的で弱い相互作用を解析する試みがこれまでもなされ、一定の成果が報告されているが、より詳細に解析するためには Head-PAL プローブの開発が重要であると、我々は考えている。そのポイントは、糖脂質のヘッドグループにあたる糖鎖に組み込めるコンパクトで非疎水性の光反応性基の開発である。今年度は、その候補官能基である一置換 α -ケトアミドの光反応性に関して検証した。一般的に一置換 α -ケトアミドの光分解は非常に早く、光親和性標識法への利用はほぼ不可能であった。しかしながら、一置換 α -ケトアミドのケト側の置換基をチエニル基とすると、光分解速度がやや遅いことを予備検討段階で見出していた。そこで、様々な一置換 α -ケトアミドの光分解速度を検討した。さらに、 α -ケトアミド構造は求電子性の高いケト基を有することから、リジン残基アミノ基などと非特異的に反応する可能性が懸念された。そこで光分解速度と共に、求電子性を重水中 NMR 解析することで評価した。その結果、検討した中でチエニル基をもつ α -ケトアミド構造のみが、十分に低い求電子性と、他と比べて圧倒的な光安定性を持つことが明らかとなった。このことから、チエニル基をもつ α -ケトアミド構造が有望な光反応性基となることが示唆された。さらに、計算化学的手法を駆使し、チエニル基の効果について検証した。その結果、励起三重項の寄与と励起状態における電子の非局在化に起因することが示唆された。

・代謝耐性型糖脂質アナログの新規合成法開拓

Head-PAL プローブの概念を一般化するには、様々な代謝安定型糖脂質を開発する必要がある。我々は、代謝安定型ガングリオシド GM3 アナログの開発に成功しているが、これを合成する手法では他の代謝耐性型糖脂質は合成できないことが問題であった。また GM3 アナログ合成も多段階を要することから、上記光反応性基の開発に成功しても Head-PAL プローブ合成が難儀となる。より効率的で、汎用性の高い合成手法の開発には、糖構造のアノマー位を活性化し、もう1つの糖ユニットと触媒反応を利用して C-C 結合（C-グリコシド結合）を構築する手法が、理想的であった。本年度はモデル実験を開始し、最近これを実現できる可能性を示す予備的知見を得ることができた。

2. 糖脂質の“基質特異的”な代謝を解析可能な分子プローブ開発

・ $\alpha(2,3)$ -シアリルガラクトース型プローブの合成と機能検証

糖脂質の機能を探る上で、「糖脂質がいつ代謝分解されたかを解析すること」は重要である。今年度は、シアリダーゼによる GM3 の代謝を追跡するために、切断されるシアロシド結合の隣にメチレン基を配置したプローブを設計した。その基盤構造である $\alpha(2,3)$ -シアリルガラクトース型プローブの合成法開拓を進めた。対象構造は新規化合物であり、考える糖脂質の SMM プローブの中で最も合成が困難なものと予想された。種々検討した結果、ビニロガスなグリコシル化反応を新たに開発し、目的物の合成に成功した。また予備検討で、この分子がバクテリア由来のシアリダーゼを阻害することを確認した。

This study focuses on the development of two new molecular tools, photo-affinity probes to identify binding proteins of glycolipids on living cells and molecular probes to analyze the degradation of a specific glycolipid by a specific enzyme, for exploring the precise functions of glycolipids. Here, the results obtained in this fiscal year are summarized.

1. Development of photo-affinity probes

Development of a new photo-reactive group

Photo-affinity labeling is thought to be one of the most powerful and important methodologies for understanding the molecular interactions. Although identification of transient and weak molecular interactions such as glycolipids-proteins interaction has been already investigated based on photo-affinity labeling method, by which some important results were obtained, we believe that development of new type of photo-reactive probes should be necessary for deep understanding of the glycolipids functions in cells. For this purpose, the key task is considered to be the development of compact and less hydrophobic photo-reactive group. This fiscal year, we investigated the photo-reactivity of *N*-mono-substituted α -ketoamides as one of the candidate structures. In general, irradiation of *N*-mono-substituted α -ketoamides induce degradation or intramolecular cyclization, and thereby they have been regarded as unsuitable functional groups as a photo-affinity probe. Furthermore, the other major concern is the existence of relatively higher electrophilic keto group, which would induce non-specific bindings to nucleophilic amino acids such as lysine and cysteine. We prepared several *N*-mono-substituted α -ketoamides and investigated their photo-stability and hydrate forming ability in order to find the suitable keto-substituent for photo-affinity labeling, which shows better photo-stability and possesses less electrophilicity. As a result, we found that a certain *N*-mono-substituted α -ketoamide has lower electrophilicity and unusual photo-stability simultaneously, while other *N*-mono-substituted α -ketoamides were rapidly decomposed by irradiation in water. These results indicated that the specific *N*-mono-substituted α -ketoamide was a good candidate for photo-reactive group. We also performed the DFT calculation to rationalize the effect of the substituent, which proposed the contribution of triplet excited state of the α -ketoamide.

Development of new synthetic method for metabolically stable glycolipids

We have developed the metabolically stable ganglioside analogue, which was synthesized by Ireland-Claisen rearrangement reaction as a key step. In order to synthesize a variety of metabolically stable glycolipids analogues, new synthetic methodologies capable of efficient and versatile C-glycoside formation should be developed. This fiscal year, a catalytic C-glycoside forming reaction was investigated, and several preliminary results were obtained.

2. Development of molecular probes to analyze the degradation of a specific glycolipid

Temporal analysis of glycolipids degradation is thought to be important for the clarification of glycolipids functions. We designed novel molecular probes based on glycolipid structure for identification of the enzyme, which cleaves the specific glycolipid. As a proof-of-concept study, synthesis of the core structure of the designed probe molecule was investigated. As a result, a novel vinylogous glycosylation method to construct the designed key structure was successfully developed, and the synthesis of the designed compound was completed. Furthermore, we found that the synthesized compound showed biological effect as we expected.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 高機能性複合糖質の創製, 口頭, 平井剛, 日本化学会中国四国支部地区化学講演会「有機化学者による生命科学へのアプローチ」, 2016/12/10, 国内.
2. Development of the Disaccharide-Type Activity-Based Probe for Sialidase, 口頭, 深澤亮, 日本化学会第 97 春季年会, 2017/3/17, 国内.
3. 代謝に着目した中分子糖鎖分子の設計と機能, 口頭, 平井剛, 日本薬学会第 137 年会一般シンポジウム「中分子創薬研究のフロンティアー反応集積化が導く中分子戦略: 高次生物機能分子の創製」, 2017/3/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願