

医療応用を目指した α -ガラクトシルセラミド類縁体の合成Synthesis of α -galactosyl ceramide analog toward medical treatment applications

川 室 裕太郎 山 口 真 範
Yutaro KAWAMURO Masanori YAMAGUCHI*
(和歌山大学教育学部化学教室)

2014年10月5日受理

Abstract

An effective synthesis method of the α -galactosyl ceramide analog by lipid-coated glycoside hydrolase. This lipid-coated glycoside hydrolase could act as an efficient catalyst for transglycosylation in the two water-organic phases.

はじめに

生体には、多種多様な糖鎖が存在しこれらは構成や結合様式・分岐構造の違いにより、細胞間認識において重要な役割を果たしている^{1)~4)}。

その一つの例として免疫があげられる。ヒトをはじめとする高等動物、植物、菌類には病原体から体を守るために免疫という仕組みが備わっている。免疫系には、病原体が感染するとただちに病原体を攻撃するようなしくみである自然免疫系と、時間はかかるが特異性をもつ抗体を産出し個々の病原体に対して反応する獲得免疫系があるが、いずれも「自己」と「非自己」を糖鎖などの認識によって行っている。最近、自然免疫系と獲得免疫系をつなぎそれらの機能を増幅するナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)が注目をあびている。

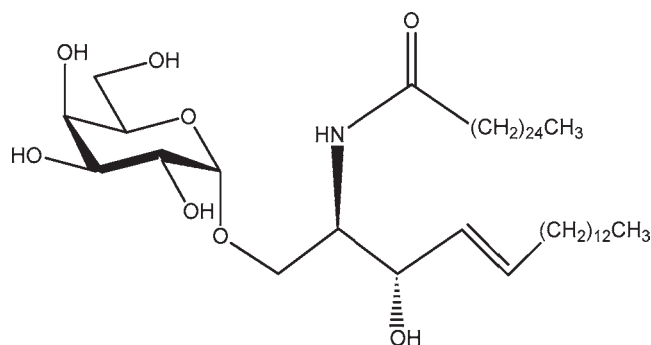
NKT細胞は、NKマーカーを有するT細胞であり、T細胞の受容体とは異なり、 α 鎖は多様性のない1種類のT細胞の抗原受容体(V α 14)しか発現していない特徴を持つ。そのため、T細胞の受容体は主としてタンパク質を認識するのに対して、NKT細胞抗原受容体は、タンパク質ではなく糖脂質である α -ガラクトシ

ルセラミドを認識する⁵⁾(図1)。そして、認識することで免疫系を活性化し高い抗腫瘍効果をもたらす⁶⁾(図2)。そのため、 α -ガラクトシル化された糖鎖は、多様な研究用途に用いられ、未知の生命現象の解明に重要な役割を果たしている。本研究ではNKT細胞の活性化に関わる α -ガラクトシルセラミドを模した α -ガラクトシルセラミドアナログを脂質修飾酵素によって効率的に合成し、医療へ応用することを目的とした。

脂質修飾酵素

現在までに糖鎖を α -ガラクトシル化する方法として有機化学的手法、酵素的な手法、酵素化学的手法などの合成例があるが、合成するまでに水酸基の保護、脱保護などの複雑な過程があり、多くのステップや高度な技術や有害な試薬を必要とする。そこで、グリコシダーゼによる加水分解の逆反応である糖転移反応を用いて1ステップの合成で脂質への α -ガラクトシル化を試みた。

しかしながら、本酵素反応による脂質へのグリコシル化は、困難を供なっていた。グリコシダーゼは、水中で活性を発揮するものであり、水中へ溶解しない脂

図1. α -ガラクトシルセラミド

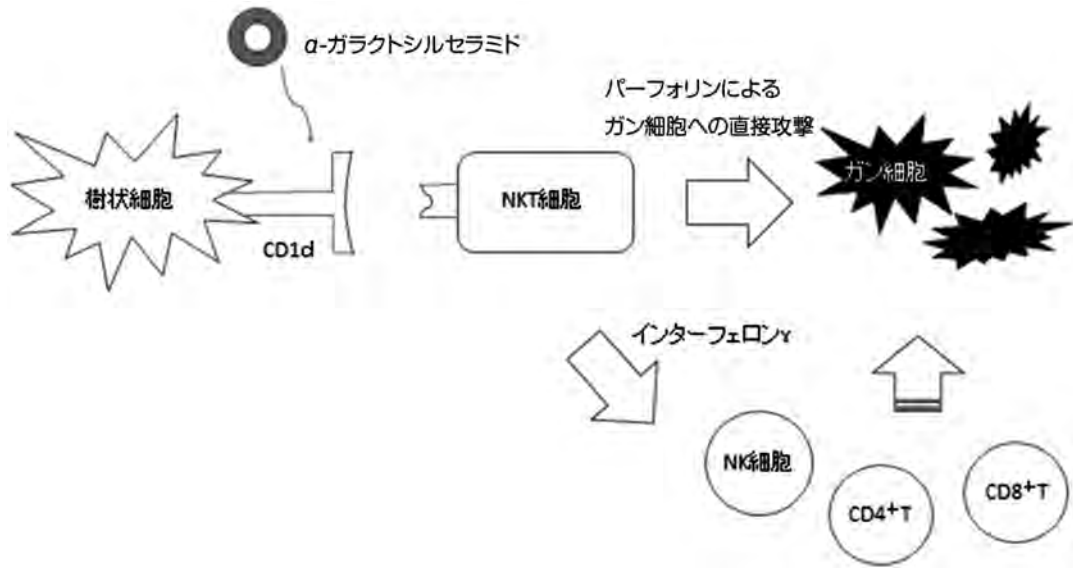


図2. NKT細胞による抗腫瘍メカニズム

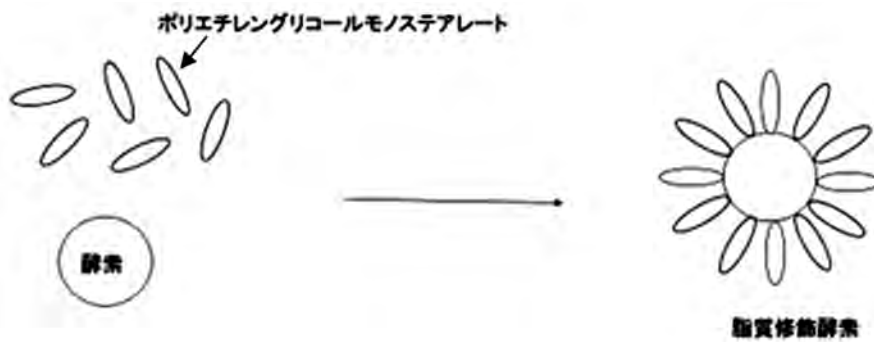


図3. 脂質修飾酵素のイメージ

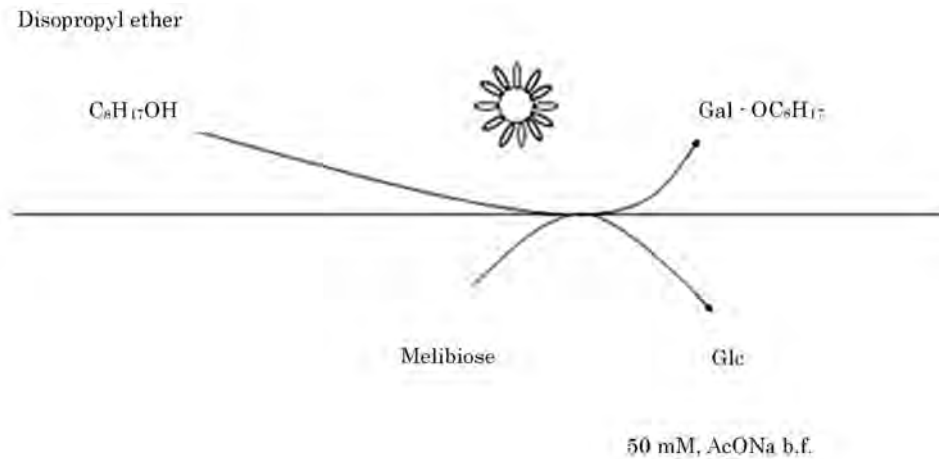


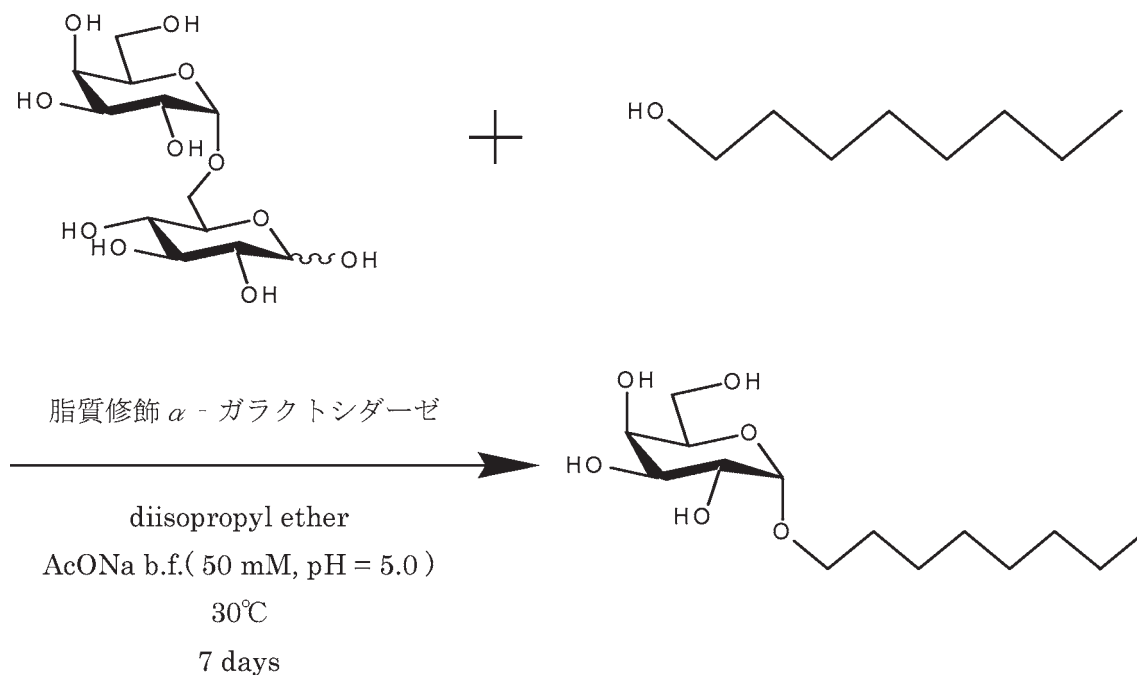
図4. 脂質修飾酵素による有機溶媒中でのグリコシル反応

質への糖転移は不可能、もしくは極めて低収率であった。我々の前段階の検討実験においても目的物は一切得られなかった。

そこで、水、有機溶媒の二層系を試すことにした。

酵素は表面が親水基で覆われているので水溶性であり、有機溶媒中では、変性し失活してしまうため、いくつかの例外を除いて有機溶媒中では、ほとんど機能

しない。そこで、本研究では酵素の表面を脂質で覆った脂質修飾酵素を作成し有機溶媒中に均一に溶解させる方法を用いた(図3)。脂質修飾酵素は、酵素表面の親水基と脂質の親水基が水素結合で結合し、二本の長いアルキル基を外側に向けた構造であり、均一有機溶媒中や水-有機溶媒二層系で効率良くグリコシル化反応を進行することができる⁷⁾⁻⁹⁾(図4)。



Scheme

脂質修飾酵素の調製

ポリエチレングリコールモノステアレート (50 mg) を酢酸ナトリウムバッファー (pH = 5.0, 20 mL) に加え 50°C にて、分散させた。続いて、常温に戻した後、 α -ガラクトシダーゼ (スミチーム AGS; 新日本化学工業株式会社) 40 mg (1500 U) を加え、30°C にて 24 時間インキュベートした。反応終了後、12000 r. p. m., 10°C にて 5 分間遠心分離を 3 回行い、脂質修飾酵素スミチーム AGS を得た。

α -ガラクトシルセラミドアナログの合成

酢酸ナトリウムバッファーにメリビオースを溶解し、それを糖供与体として用い、有機層にジイソプロピルエーテルを用い、糖受容体として 1-オクタノール、糖転移触媒として脂質修飾した α -ガラクトシダーゼを添加した。その後、緩やかに攪拌しながらインキュベートし、グリコシル化反応を行い、目的とした α -ガラクトシルセラミドアナログを得た。(Scheme)

まとめ

本研究では、脂質修飾した *Aspergillus niger* 由来の α -ガラクトシダーゼを用いた糖転移反応により、 α -ガラクトシルセラミドアナログの酵素的合成を達成した。得られた化合物は NK T 細胞活性などが見込まれ、免疫療法などへの応用が期待できる。

また本研究において開発した α ガラクトシル化の方法は、ガン、肺炎などに関わる α ガラクトシル化した糖鎖合成にも応用することができ、効率的な α -ガラクトシル化の糖鎖合成手法の一つと成り得る。

実験の部

一般操作

メリビオースは東京化成株式会社製、有機合成試薬、反応溶媒、カラム溶媒は和光純薬工業株式会社製のものを使用した。

^1H NMR は日本電子 400 Hz を用いて測定し、TLC は silica gel 60 F₂₅₄ を用い、検出は発色試薬 (10 % $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{EtOH}$) による。

α -ガラクトシルセラミドアナログの合成

メリビオース (200 mg, 0.58 mmol) を酢酸ナトリウムバッファー (50 mM, pH = 5.0, 1.6 mL) に溶解し 10 wt % の濃度に調製した。続いて、ジイソプロピルエーテル (1 mL)、脂質修飾した α ガラクトシダーゼ (50 μL) 加え、30°C にて 7 日間インキュベートした。反応終了後、逆層カートリッジカラム (Alltech HP Reversed-Phase Column) に供し、 $\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 8 : 2$ (2 mL), $\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 1 : 1$ (2 mL), $\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 2 : 8$ (4 mL), MeOH (2 mL) の順で溶出し、溶出液 ($\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 2 : 8$) 画分にて目的化合物を得た。

^1H NMR (CD_3OD) :

δ 0.88 (t, 3 H), 1.29 (m), 1.61 (m), 3.61-3.73 (m), 3.78 (t), 3.85 (br-d), 4.77 (d).

謝辞

本研究は基盤研究 (C) No. 24510297 の助成を受けて行った。

参考文献

1. A, Varki. (1993) *Glycobiology*, **3**, 97-130.
2. Suzuki, Y.; Nakao, T.; Ito, T.; Watanabe, N.; Toda, Y.; Xu, G.; Suzuki, T.; Kobayashi, T.; Kimura, Y.; Yamada, A.; Sugawara, K.; Nishimura, H.; Kitame, F.; Nakamura, K.; Deya, E.; Kiso, M.; Hasegawa, A. (1992) *Virology*, **189**, 121-131.
3. Cuatrecasas, P. (1973) *Biochemistry*, **12**, 3547-3558.
4. Muramatsu, T. (1988) *J. Cell. Biochem.*, **36**, 1-14.
5. Kawano, T.; Cui, J.; Koezuka, Y.; Toura, I.; Kaneko, Y.; Motoki, K.; Ueno, H.; Nakagawa, R.; Sato, H.; Kondo, E.; Koseki, H.; Taniguchi, M. (1997) CD1 d-restricted and TCR-mediated activation of Valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*, **278**, (5343), 1626-1629.
6. Motohashi, S.; Nakayama, T. (2008). Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer. Sci.*, **99**, 638-645.
7. Mori, T.; Okahata, Y. (1997). A Facile Transglycosylation Catalyzed by Lipid-coated Glycoside Hydrolases. *J. Appl. Glycosci.*, **44**, 337-342.
8. 森 俊明、岡畑 恵雄、(1997) 生物と化学, **35**, pp 662-666.
9. Mori, T.; Fujita, S.; Okahata, Y. (1997). A Facile Transglycosylation Catalyzed by a Lipid-coated β -D-Galactosidase in the Water-Organic Two Phases. *Chemistry. Letters.*, **26**, 77-74.