JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	溶液NMR法を用いた糖鎖の構造と水和との連関の解明
Author(s)	龍岡，博亮
Citation	
Issue Date	2023-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/18435
Rights	
Description	Supervisor:山口 拓実，先端科学技術研究科，博士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

博士論文

溶液 NMR 法を用いた糖鎖の構造と水和との連関の解明

龍岡　博亮

主指導教員　山口拓実

北陸先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科(マテリアルサイエンス)

令和 5 年 3 月

Abstract

Biological functions of carbohydrates are exerted mainly through their interactions with lectins. The hydration as well as the structure of carbohydrates are considered to be important factors for the selectivity and affinity of carbohydrate recognitions. In this study, I elucidated the relationship between hydration and structural characteristics of carbohydrates.

To characterize unique solvation environments according to the geometric characteristics of carbohydrates, I attempted to investigate behaviors both of carbohydrates and waters. By solution NMR analyses and molecular dynamics simulations, in conjunction with chemical synthesis of carbohydrates, it was revealed that carbohydrates modulate their interactions with surrounding water molecules and hydration sphere based on the chemical structure and sequence of carbohydrates. On the other hand, I also found that the hydrophobic interaction between sugar residues is important to regulate the conformation of carbohydrates in solution.

The $^{1}H/^{2}H$ isotope shifts in NMR were applied to study the proton exchanges between carbohydrate and water and between water molecules. To focus on the differences in sequence and linking type, three compounds, GLC1-3MAN, MAN'1-3MAN, and MAN'1-2MAN, were synthesized and analyzed by NMR using H_2O/D_2O mixed solvents. NMR measurements to focus on the carbohydrate hydroxy groups revealed that the carbohydrate–water proton exchange in GLC1-3MAN solution proceeded slower than in the others. Meanwhile, the frequent proton exchange between waters in GLC1-3MAN solution was shown by NMR observations of water signals. The results suggested that GLC1-3MAN promotes water structuring more efficiently than the others. Furthermore, bridging water molecules between the hydroxy groups were identified prominently in GLC1-3MAN by molecular simulations. These results indicate that the presence of water molecules strongly bound to carbohydrates by cross-linking their hydroxy groups is a key factor for the expansion of water networks.

To examine the effect of water on carbohydrates in solution, I also observed the conformational changes of Lewis X (Gal1-4(Fuc1-3)GlcNAc) in water and methanol, as a model carbohydrate. The NMR analyses of synthetic Lewis X carbohydrates revealed that a conformation of Lewis X is stabilized by water and the conformation changes in methanol with increase of the GlcNAc ring puckering. It was suggested that hydrophobic interactions between the Gal and Fuc residues are important for the conformational control of Lewis X.

Based on solution NMR spectroscopy, I established a methodology that approaches the carbohydrate hydrations from both the carbohydrate and water aspects. I succeeded to reveal both the effects of carbohydrate structure on water and the effects of water on carbohydrate structures. This study will promote the understanding of the functioning mechanisms of carbohydrates in aqueous solution. It is also expected that the findings contribute to the development of applicable carbohydrate materials including new drugs and biomarkers.

Keyword: NMR, Carbohydrate, Hydration, Structure, H/D isotope shifts

目次

第 1 章 序論 1

1-1. 糖鎖の生命機能 2

1-2. 糖鎖の相互作用メカニズム 2

1-3. 水和の物理化学解析 4

1-4. 研究の目的 5

第 2 章 H/D 同位体シフトを利用した水和解析 7

2-1. 緒言 8

2-2. 試料調製 9

2-3. NOESY および緩和解析 9

2-4. ^{13}C-OH/OD の同位体シフト解析 14

2-5. HOH/HOD の同位体シフト解析 18

2-6. 結言 22

2-7. 実験項 23

第 3 章 配列や結合様式と水和の連関の解明 26

3-1. 緒言 27

3-2. 末端構造の化学合成 28

3-3. H/D の同位体シフト解析 30

3-4. 分子動力学計算による配位水の解析 35

3-5. 結言 39

3-6. 実験項 40

第 4 章 水による糖鎖の立体構造制御 51

4-1. 緒言 52

4-2. ルイス X 糖鎖の緩和解析 52

4-3. 水中でのコンフォメーションの比較 56

4-4. コンフォメーションに対する溶媒効果 61

4-5. 結言 63

4-6. 実験項 64

第 5 章 総括 79

参考文献 83

謝辞 87

業績 88

第 1 章 序論

1-1.　糖鎖の生命機能

生体分子である糖鎖はタンパク質、核酸に並ぶ第 3 の生命鎖として、細胞内や細胞表面で起こる様々な生命現象に関与している。その範囲は広く、ウイルス感染やシグナル伝達、細胞接着など、非常に多岐にわたる(図 1-1)[1-3]。

糖鎖は生体内では単体で存在することに加え、糖タンパク質や糖脂質、プロテオグリカンのような複合糖質として機能する。こうした複合糖質における糖鎖は、修飾した生体分子の溶解性や安定性を向上させるだけでなく、糖鎖自身が分子認識の標的分子としての役割を果たしている[4-6]。例えば小胞体では、糖タンパク質上の高マンノース型糖鎖がタンパク質のフォールディングをサポートするためのタグとして働き、糖鎖とレクチンとの特異的相互作用を通して、タンパク質の品質管理が行われる[7,8]。こうした糖鎖の分子間相互作用のメカニズムを理解することは、生命現象の解明に通じるとともに、糖鎖を応用した医薬品や材料開発などへの応用にも重要だと言える[9]。

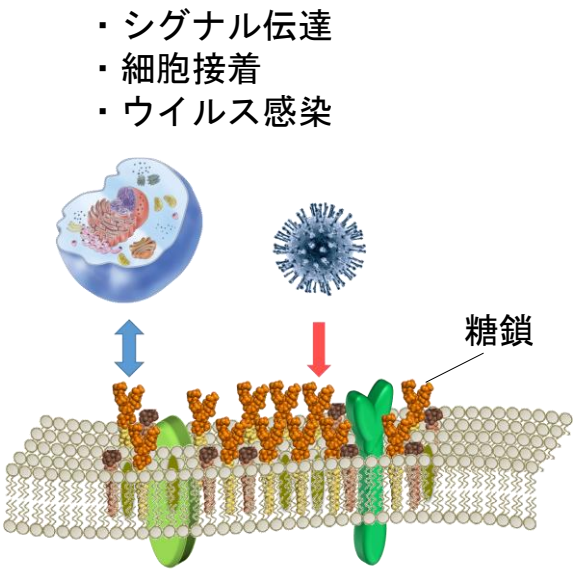


図 1-1.　糖鎖が関与する生命現象

1-2. 糖鎖の相互作用メカニズム

糖鎖の分子認識メカニズムを正しく理解するためには、レクチンとの結合状態のみならず、遊離状態の糖鎖についての物理化学的な解析も不可欠だと考えられる。また、糖鎖の分子認識における親和性や選択性には、糖鎖の化学構造に加え、立体構造や水和構造も密接に関連していると考えられる（図 1-2）[10-13]。

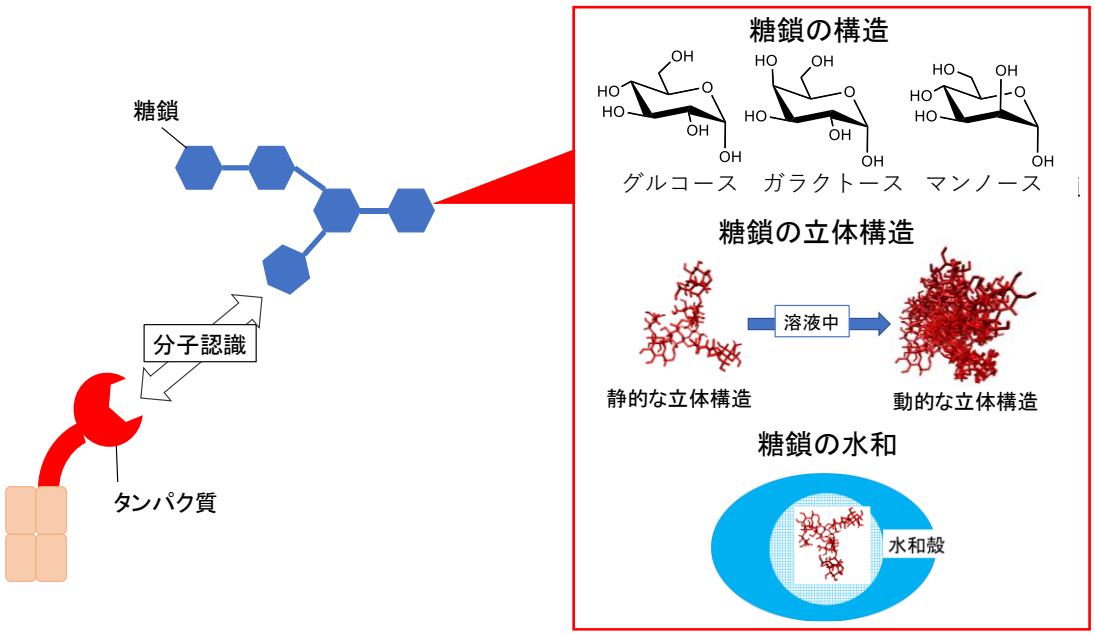


図 1-2. 糖鎖の分子認識に関与する物理化学的な要因

Gimeno らは、血液型抗原を含む糖鎖の構造解析を通して、ヒトガレクチン 3 との相互作用機構を調査している。報告によると、レクチンとの結合には直接関係していないフコース残基によって糖鎖のコンフォメーションが制限され、遊離状態でも糖鎖の立体構造が結合状態のコンフォメーションに近い状態に変化することで親和性を向上させることが明らかにされている[14]。このように、遊離状態の立体構造は、糖鎖の相互作用の重要な要素であることが見出されている。また、Bermejo らにより、 Tn 抗原（*N*−アセチルガラクトサミン-O-Thr/Ser） は、セリンとトレオニンの違いにより立体構造が異なることが報告されている[15]。セリンとトレオニンのメチル基の有無により、分子全体の溶媒和の最適化のためにグリコシド結合の回転が起こり、相互作用に違いが生じることが明らかにされた[15]。

糖鎖の認識には、水分子も深く関わっている。例えば小胞体レクチンであるカルレティキュリンと糖鎖の複合体の結晶構造解析から、水分子を介した水素結合も糖鎖の配列認識に重要であることが明らかにされている[16]。さらに、Nurisso らは、ガラクトース認識レクチン PA-IL に関する分子動力学（MD）シミュレーションに基づく自由エネルギー計算から、糖鎖とタンパク質を架橋する水分子の重要性を報告している。PA-IL と、連結様式の異なる３種の糖鎖 Gal1–2Gal、Gal1–3Gal、Gal1–4Gal との結合におけるエナジェティクスの理論値を、実験値と比較したところ、水分子を考慮することで結合親和性の違いが適切に求まった[17]。こうした研究例からも、糖鎖の分子間相互作用のメカニズムを理解するためには、糖鎖の化学構造や立体構造のみならず、水和構造を複合的に解析する必要があることがわかる(図 1-3)。しかし、とりわけ溶液中の糖鎖の水和に関する知見は限られている。

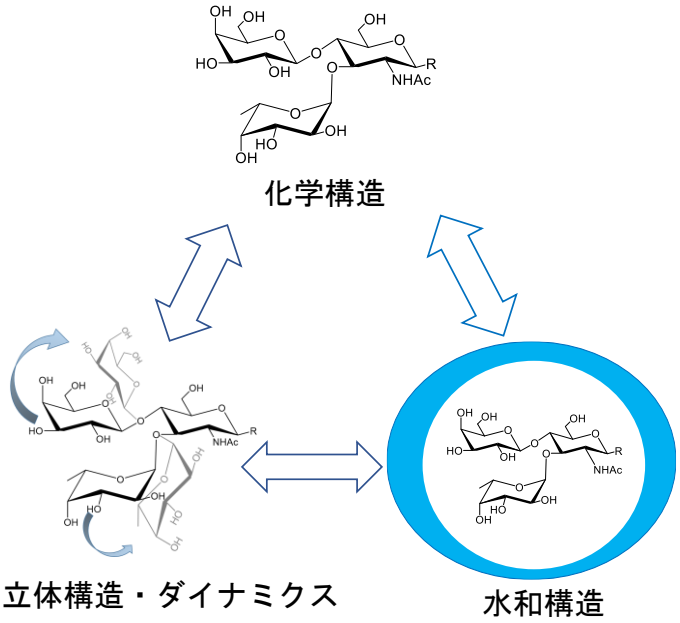


図 1-3. 糖鎖の化学構造、立体構造及び水和構造は互いに影響し合っている

1-3. 水和の物理化学解析

糖鎖によって生じる水の特異な挙動を明らかにすることは、物理化学的にも注目を集めている。核磁気共鳴（NMR）分光法[18,19]、ラマン分光法[20]、中性子散乱法[21,22]、テラヘルツ分光法[23,24]、蛍光分光法[25]、誘電・超音波緩和法[26]、MD シミュレーション[27,28]など様々な手法を用いて、糖鎖水溶液中の水の挙動について研究されてきた。例えば、Heyden らはテラヘルツ吸収測定により、トレハロース、ラクトース、グルコースが第一溶媒和圏を超える広い範囲にまで水の水素結合ネットワークに影響を与えることを明らかにした[24]。また Groot と Bakke は、フェムト秒赤外分光法を用いて水分子の配向のダイナミクスを解析し、トレハロースやグルコースの水溶液では水の再配向が遅くなることを明らかにした[29]。Winther らは、^{17}O を用いた NMR の緩和解析により、トレハロース周辺の水のダイナミクスが変化することを報告している [18]。

しかし、これらの研究は溶液中のバルクの水の振る舞いに注目したものであり、糖鎖の構造の違いが、どのようにして特異な水の挙動を引き起こすのかはまだよく分かっていない。さらに、糖鎖の立体構造に対する水和の影響も、明らかではない。糖鎖は、水との相互作用によって水分子同士のネットワークを変化させ、糖鎖の構造に応じた様々な水和環境を有するのではないかと考えられる。そこで、本研究では、糖鎖の化学構造や立体構造と、水和との連関を解明しようと考えた。

糖鎖の構造と水和の関係を知るためには、糖鎖が水に与える影響と、水が糖鎖に与える影響をそれぞれ詳細に調査することが必要であると考えた。このような解析の要件を満たすために、本研究では、溶液 NMR 法に着目した。NMR は原子レベルの分解能を持つため、対象分子の精密測定に適しており、糖鎖の構造解析や相互作用解析にも広く用いられている[30-33]。また、溶液 NMR 法を用いることで、溶質とは別に、溶媒である水を観察することもできる。以上のような利点から、NMR を用いることで、糖鎖の化学構造と立体構造、水和挙動の複合的な解析ができると考えた。さらに、有機合成による糖鎖の結合様式や配列などの作り分けや、MD シミュレーションによる解析を組み合わせることで、糖鎖の構造と水和について系統的に観測・比較することを考えた。

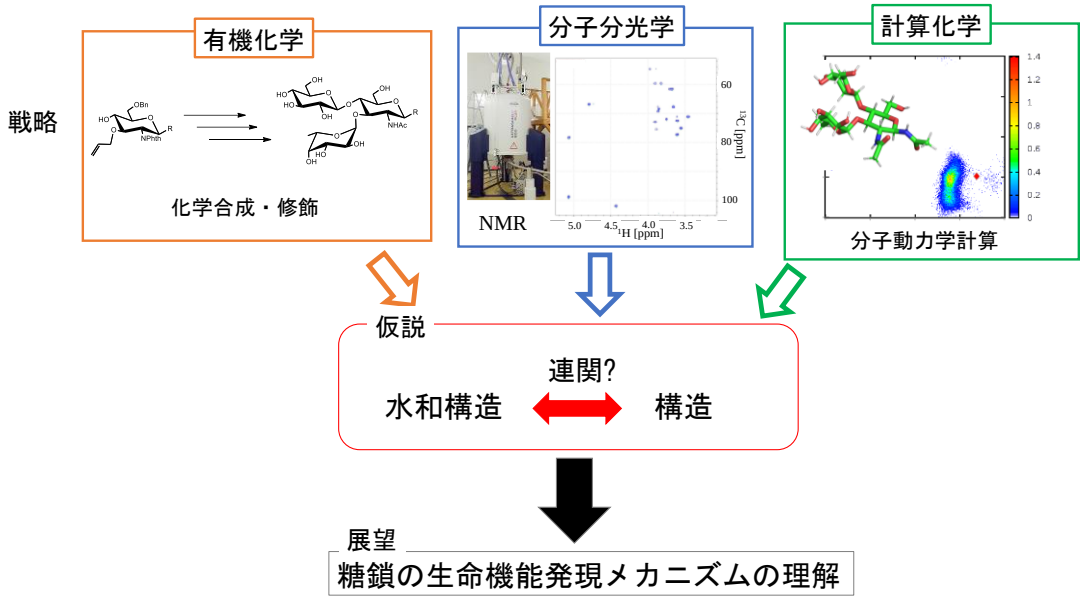


図 1-4. 複合的なアプローチにより、糖鎖の物理化学的課題を解決する

1-4. 研究の目的

糖鎖認識における選択性や親和性には、糖鎖の化学構造や立体構造に加え、水和構造も重要な要素として関与すると考えられる。本研究では、糖鎖の機能を制御する要因として水和に注目し、糖鎖の構造−水和挙動の連関を解明することを目的とする。その実現を目指し、溶液 NMR 法を基軸に、糖鎖の構造と水和の複合的な解析を行った。

第 2 章では、糖の水和を解析するための基盤の確立を目指した。糖鎖が水に与える影響を調査するために、本研究では、溶質と溶媒の両方に注目した解析を行う。そのために ^{1}H と ^{2}H のアイソトープシフトを利用して糖と水、及び水同士の相互作用の観測を行い、溶質を加えた際の水素結合ネットワークの変化を調べることを考え、その解析法の確立に取り組ん

だ。

続く第 3 章では、糖鎖の配列や結合様式が水和にどのような影響を与えるかを考察した。高マンノース型糖鎖の非還元末端に見られる 2 糖構造 Manα1-2Manα、Glcα1-3Manα、及び Manα1-3Manα を合成し、NMR 計測と分子シミュレーションを通して水和挙動の違いを解析した。

さらに第 4 章では、糖鎖が溶液中で水から受ける効果を考察した。細胞表面に見られる分岐型三糖であるルイス X 糖鎖をモデルとして、水からの糖鎖への影響を調査した。糖鎖の立体構造や運動性は、疎水性相互作用や水素結合などの残基間相互作用により制御を受けていると考えられる。そこで、溶媒の違いでおこる糖鎖の立体構造ダイナミクスの変化を NMR 法によって観測し、糖鎖のコンフォメーションに対する水の役割を明らかにした。

第 2 章 H/D 同位体シフトを利用した水和解析

2-1. 緒言

本研究では、構造と水和の関連を解明するために、NMR を用いて糖と水、および水分子間のプロトン交換の観察を試みた。そのため、本章では、水酸基に注目した水和の解析法の確立に挑戦した。水酸基の配向が一部異なるグルコース、ガラクトース、マンノースの基本的な単糖をモデルとして、その水和挙動の比較を試みた。その結果、グルコース、ガラクトース、マンノースの水に対する影響の違いが分かり、幾何学的特性に影響された糖の水和挙動を明らかにした。

水や糖の水酸基は、プロトン交換速度が速く、D_2O や H_2O での測定では詳細な情報を得ることはできないため、アセトン、メタノール、ジメチルスルホキシド（DMSO）等の有機溶媒を用いて行われている[34-36]。また、重水素による ^{13}C 同位体シフトを利用した間接的なアプローチにより、糖鎖の水酸基の情報を得ることも可能である[37,38]。以上のことから、本研究では H_2O/D_2O と DMSO-d_6 混合溶媒を用いて、プロトン交換速度を調整し、メチル α−グルコシド(GLCa)、メチル α-ガラクトシド(GAL)、メチル α-マンノシド(MAN)及びメチル−β−グルコシド(GLCb)の一連の単糖の水和挙動の変化を解析した（図 2-1）。

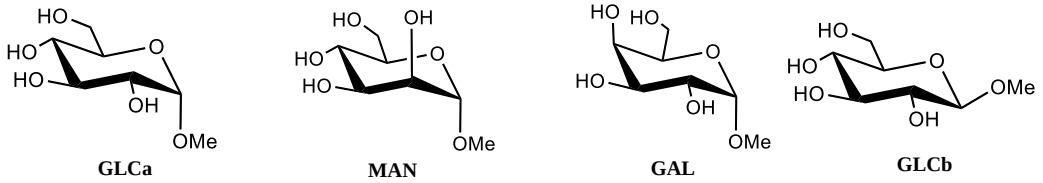


図 2-1. メチル α-グルコシド、メチル α−ガラクトシド、メチル α-マンノシド、メチル β-グルコシドの化学構造

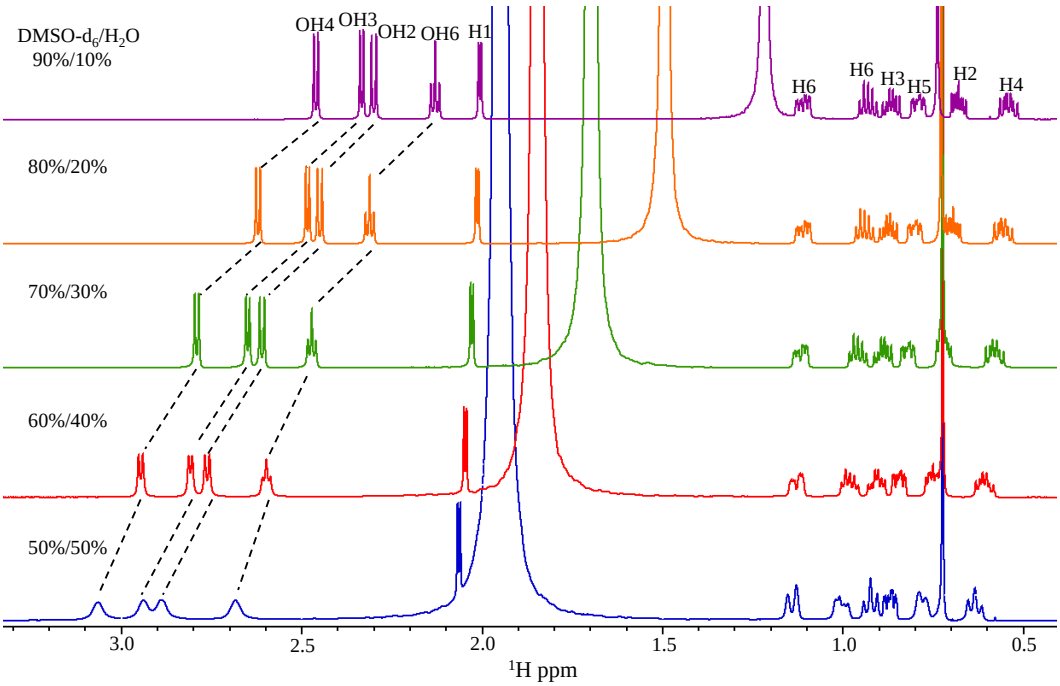


図 2-2. 2.5 ppm の DMSO シグナルを基準とした H_2O と DMSO-d_6 の混合比における GLC の ^{1}H NMR スペクトルの変化

2-2. 試料調製

GLCa を対象に、H_2O と DMSO-d_6 を異なる比率で混合して ^{1}H NMR スペクトルを測定した。図 2-2 から、H_2O の比率を上げていくと水酸基のシグナルは低磁場シフトし、40%を越えると線幅の広がりが見られた。H_2O と DMSO-d_6 を一定割合（30：70）で混ぜた混合溶媒が水酸基の解析には最適と考え、今後の解析はこの混合溶媒を用いることとした。

また、不純物による影響を抑制するために、すべての単糖は、使用前に共通の方法で再結晶した。超純水を用いて 75℃で飽和溶液を調製し、-3℃で静置して再結晶させた。その後、冷却したメタノールとアセトンで洗浄し、解析試料とした。

2-3. NOESY および緩和解析

糖と水との相互作用を調べるために、NOESY スペクトル計測と水の ^{1}H NMR の緩和による解析を行った[39,40]。測定では、H_2O と DMSO-d_6 を一定割合（30：70）で混ぜた混合溶媒を使用し、試料濃度 200 mM の溶液を調製し、解析を行った(図 2-3)。

GLCa、GAL および MAN の各溶液について NOESY および ROESY スペクトルを測定したところ、糖の水酸基と水の信号間にクロスピークが現れた(図 2-4)。観測されたクロスピー

クの符号は NOESY スペクトル、ROESY スペクトルともに対角ピークと同位相であり、化学交換がシグナルの支配的な要因であることを示した。このことから、混合溶媒中でも糖と水との間でプロトン交換が効果的に起こることがわかった。そこで、ミキシングタイム（τ_m）を変化させて NOESY スペクトルを計測し、信号強度のプロットから交換速度を解析した[41]。表 2-1 は、それぞれの糖の各水酸基について、見積もられたプロトン交換速度をまとめたものである。しかしながら、得られた結果は単糖間での有意差を見出すことには至らなかった。NOESY の定量的解析では、化学交換のみならず、糖と近接する水分子との双極子相互作用がクロスピークのシグナル強度に影響する可能性があり、表 2-1 の解析結果においてもその影響は無視できないと考えられる。

糖－水間のプロトン交換によって系中の水分子にも影響が出ると考え、CPMG 法による緩和解析を実施した[42]。図 2-5 は水の ^{1}H NMR 信号の横緩和速度（R_2）の解析結果である。溶質を含まない場合は R_2= 082±0.01 であるのに対し、GLCa、GAL、MAN の溶液ではそれぞれで R_2=0.94±0.01、086±0.01、0.95±0.02 であった。この結果から、GLC および MAN は、GAL と比べて水への影響が大きい可能性が考えられる。しかし NMR 緩和は、化学交換や運動性の変化など様々な要因を内包するため、対象の差はあるものの 3 種類の単糖間での水和挙動の違いを議論することは難しいと言える。以上から、NOESY や緩和での解析のみから、糖の水和挙動の詳細を調べるには適切ではないと考えた。

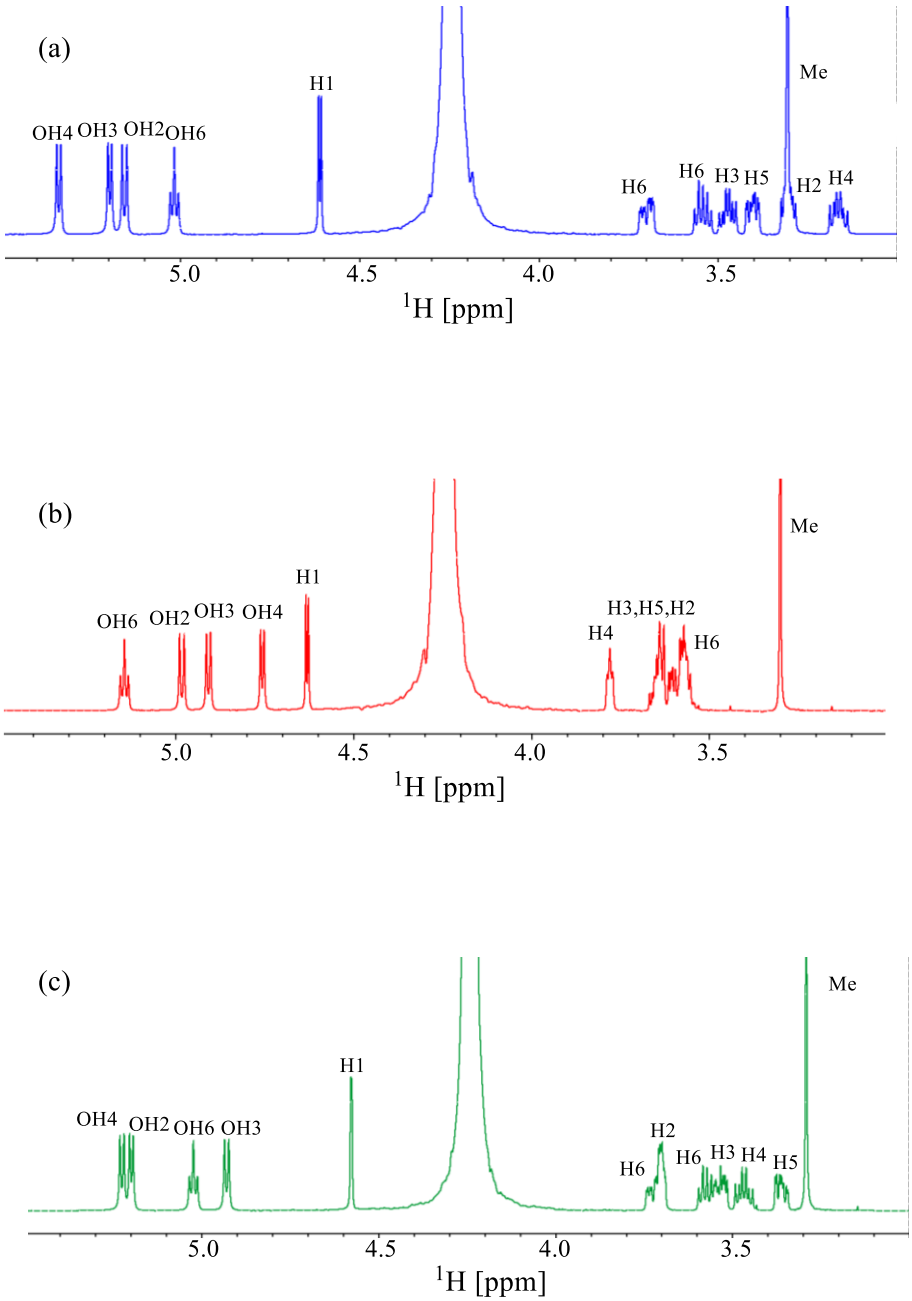
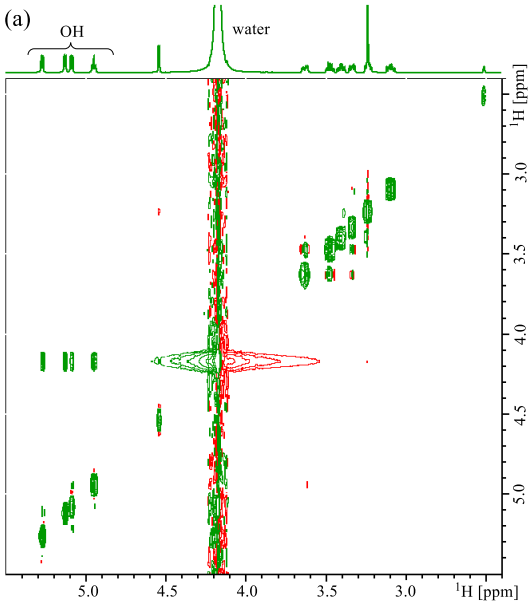
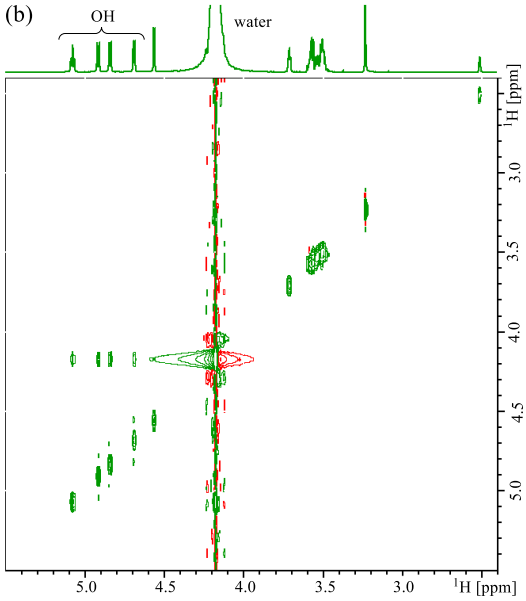
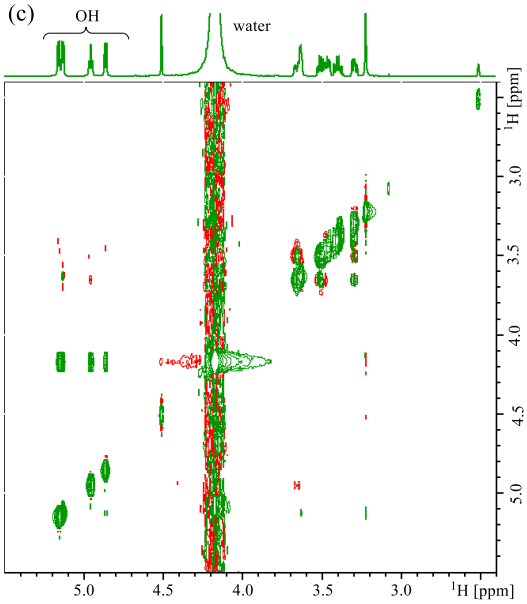


図 2-3. (a) GLCa, (b) GAL および (c) MAN の混合溶媒 (H_2O:DMSO-d_6=30:70) 中の ^{1}H NMR スペクトル。化学シフトは TMS を基準とした


(a)
OH
water
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
^{1}H [ppm]


(b)
OH
water
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
^{1}H [ppm]


(c)
OH
water
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
^{1}H [ppm]

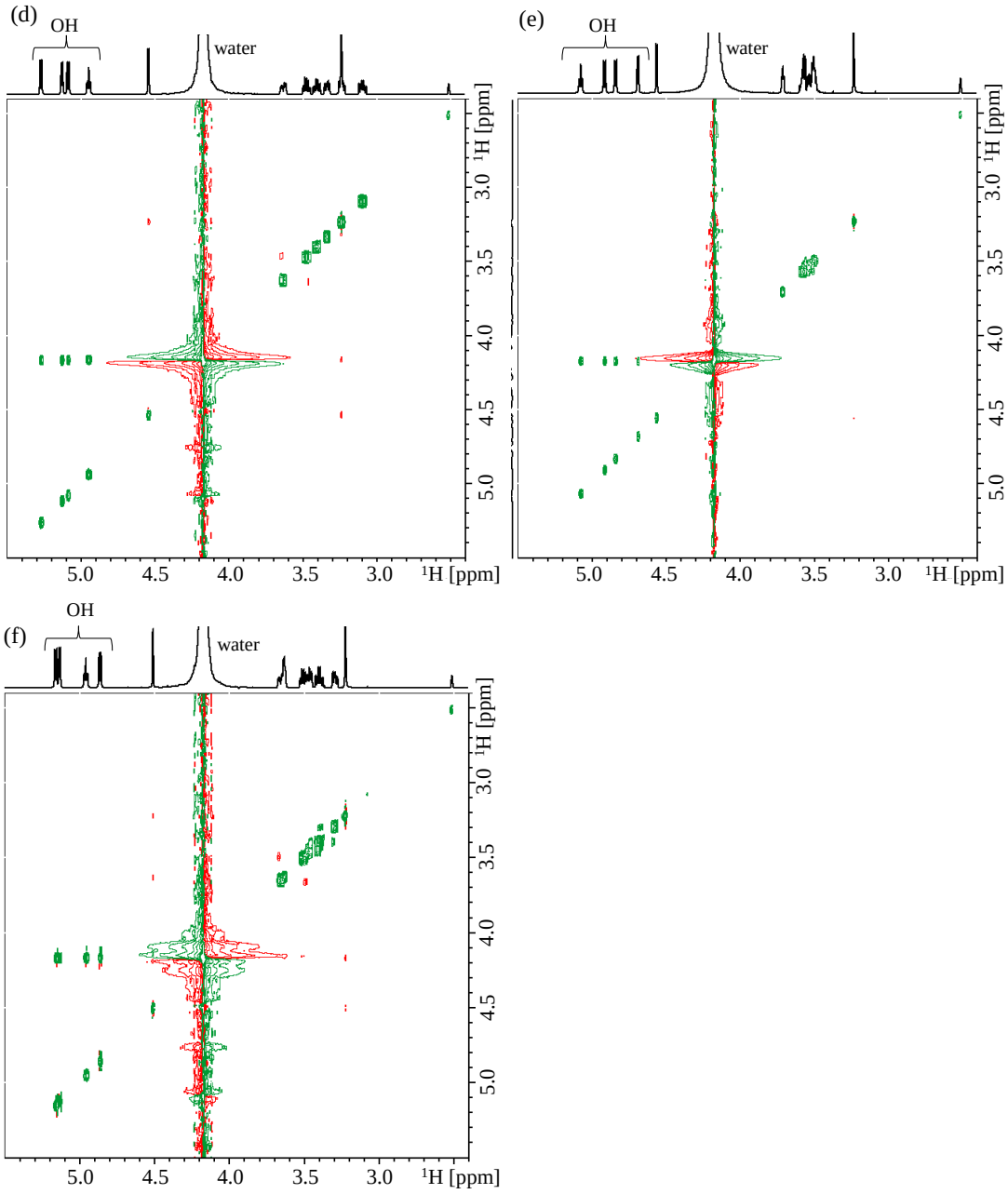


図 2-4. (a, b, c) 30%H_2O および 70%DMSO-d_6 溶液中の(a, d) GLCa, (b, e) GAL, (c, f) MAN の NOESY および ROESY スペクトル（ミキシングタイムは NOESY で 0.06 s、ROESY で 0.2 s）。なお、正のピークは緑、負のピークは赤で示す

表 2-1. NOESY の解析により得られた糖鎖と水とのプロトン交換速度

excahnge rates [s^{-1}]			
	GLCa	GAL	MAN
OH2	3.0±0.1	3.3±0.1	2.7±0.1
OH3	2.9±0.1	2.9±0.3	3.2±0.2
OH4	2.5±0.1	1.9±0.3	2.3±0.3
OH6	3.5±0.1	4.0±0.1	3.9±0.2

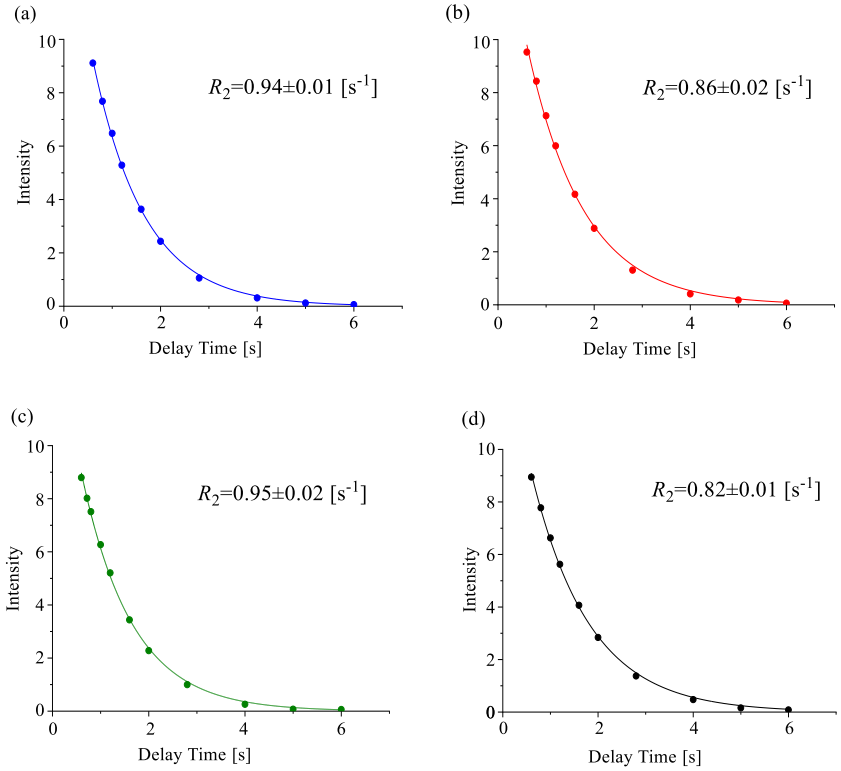


図 2-5. 水のスペクトルに対する緩和解析 (H_2O:DMSO-d_6=30:70) 。それぞれ(a) GLCa, (b) GAL , (c) MAN 及び(d)ブランクを示す

2-4. ^{13}C-OH/OD の同位体シフト解析

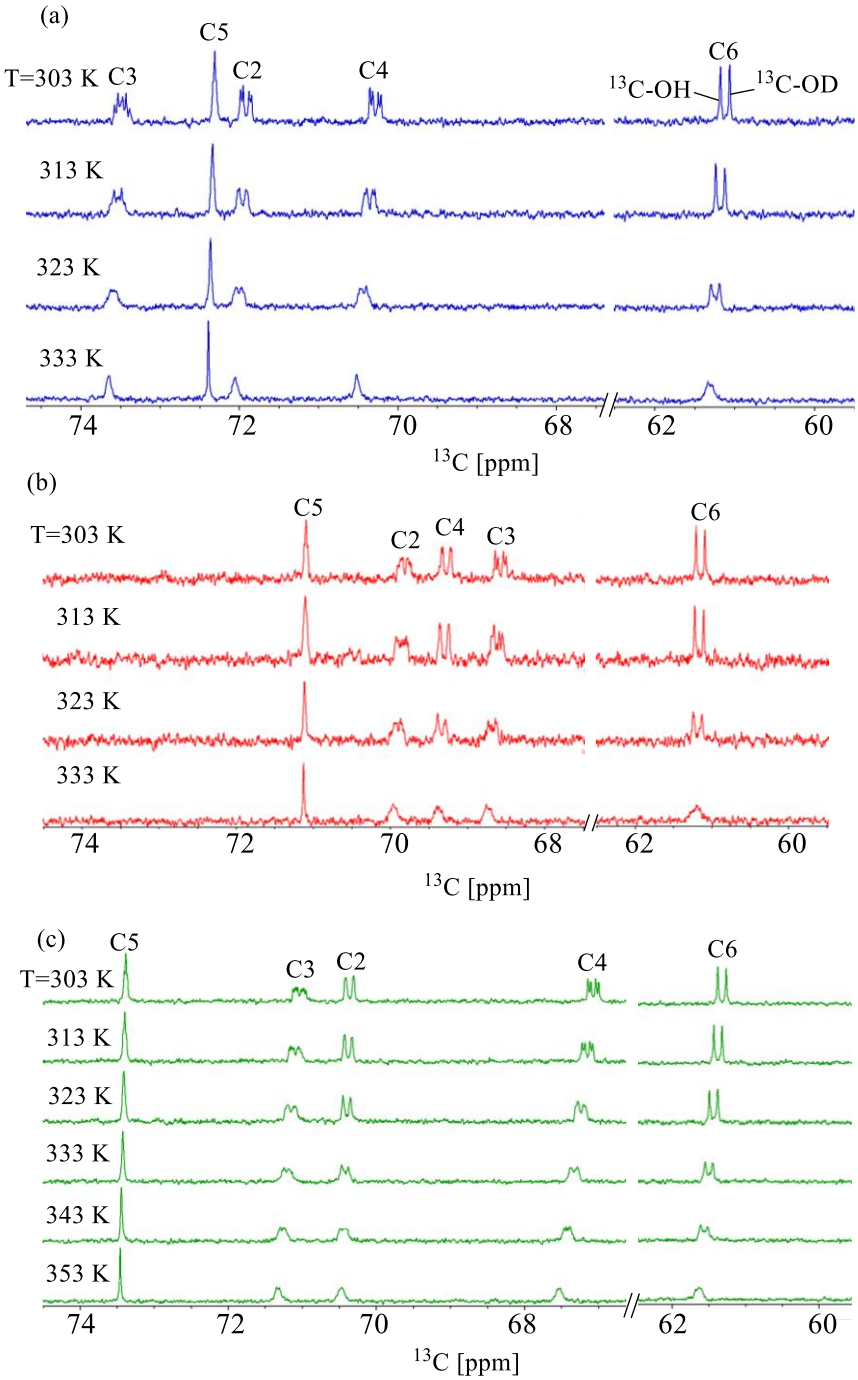
そこで、NOESY や緩和計測とは別に、H/D 同位体シフトを用いた NMR 解析を行うことを考えた。H/D 同位体シフトを用いた NMR 解析は、タンパク質中のアミドプロトンの水素交換を探索するために適用された例がある。例えば、Henry らは ^{13}C NMR を用いて、タンパク質中の NH と ND の同位体効果によるカルボニル炭素の化学シフト差を観察し、この方

法が 2-125 s^{-1} の範囲の水素交換速度に鋭敏であることを報告している[43,44]。表 2-1 の結果から、糖の各水酸基の水素交換速度がこの範囲にコントロールできていると考え、 H/D 同位体シフトを糖の水和解析へ応用することに取り組んだ。

H/D 同位体シフトを用いて糖−水相互作用を評価するために、H_2O/D_2O/DMSO-d_6 混合溶媒中で糖の ^{13}C NMR 解析を実施した。まず、混合溶媒(H_2O:D_2O:DMSO-d_6=15:15:70)を用いて、糖の 200 mM 溶液を調製し、^{13}C NMR スペクトルを様々な温度で測定した。303 K で得られた各糖のスペクトルでは、水酸基が結合する C2、C3、C4 および C6 の信号が、同位体シフトのために ^{13}C-OH および ^{13}C-OD に帰属される 2 つのシグナルとして現れた。温度を上げながら ^{13}C NMR スペクトルを測定していくと、GLC および GAL においては、333K 付近で ^{13}C-OH/D シグナルが平均化した。一方、MAN のスペクトルでは、^{13}C-OH/D シグナルの平均化が 353K 付近で生じた(図 2-7)。このことから、水により引き起こされる糖水酸基のプロトン交換の速度は、GLC および GAL よりも MAN では遅いことが示された。

グルコースとガラクトース、およびグルコースとマンノースは互いに一つの水酸基の立体配置が異なるだけのエピマーであり、分子サイズに大きな違いはない。故に、それぞれの糖で溶媒への露出部分が著しく異なるとは考えにくい。プロトン交換を阻害する要因としては、分子間会合による溶媒接触確率の低下が考えられる。そこで、各単糖に対して DOSY 測定を行い、それらの見かけの拡散係数を測定した。その結果、GLC、GAL および MAN のいずれの糖も同様の拡散係数値を与え、凝集は起こっていないことが示唆された(図 2-8)。また、 水溶液中でのプロトン交換の阻害要因として、分子内水素結合の形成も考えられる。そこで糖水酸基の ^{1}H NMR 信号の化学シフトの温度依存性を調べたところ、特徴的な温度係数は確認されず、MAN に特異的な分子内水素結合の形成がないことが示唆された（表 2-2)。さらに、分子内水素結合を検証するために、MD シミュレーションによる解析を行った。水と DMSO が共存する系での各糖のシミュレーションから、水酸基が分子内水素結合に関与する頻度を見積もったところ、GLCa、GAL および MAN についてそれぞれ 0.23、0.33 および 0.24 であった(表 2-3)。この結果からも、糖の水酸基のプロトン交換速度の違いが分子内水素結合によるものではないことが示唆された。

分子間会合と分子内水素結合の影響がほとんど見られないことから、H/D 同位体シフトを利用することで明らかにされた特徴的な糖―水のプロトン交換は、マンノース溶液中の水の挙動に起因する可能性がある。例えば Abeyratne-Perera と Chandran は、原子間力分光法を用いてマンノビオース修飾表面での水の構造化について報告している。今回 NMR 実験によって観測された MAN 水酸基の H/D 交換の効率低下は、溶液中の糖分子の周囲で水の構造化が起こっているためと考えられる。


(a)
T=303 K
C3
C5
C2
C4
C6
13C-OH
13C-OD
313 K
323 K
333 K
74
72
70
68
62
60
13C [ppm]
(b)
T=303 K
C5
C2
C4
C3
C6
313 K
323 K
333 K
74
72
70
68
62
60
13C [ppm]
(c)
T=303 K
C5
C3
C2
C4
C6
313 K
323 K
333 K
343 K
353 K
74
72
70
68
62
60
13C [ppm]

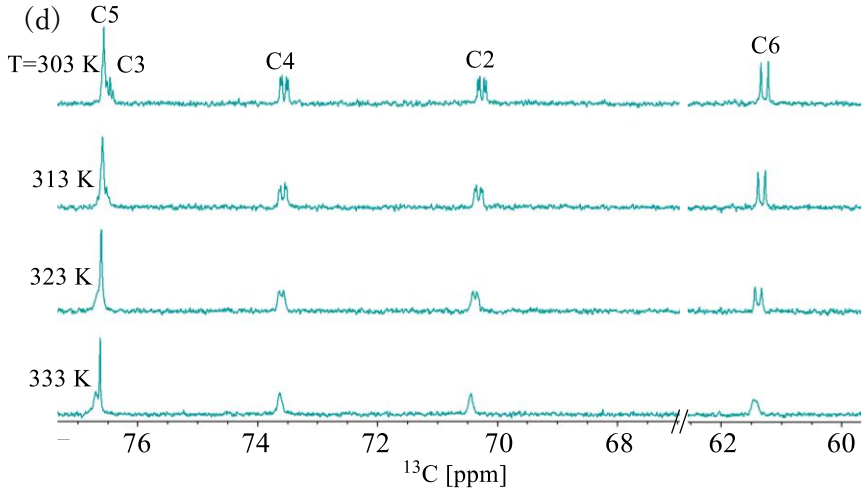


図 2-7. ^{13}C-OH/OD 同位体シフトを利用した糖−水プロトン交換の ^{13}C NMR 解析（H_2O：D_2O：DMSO-d_6＝15：15：70）(a) GLCa の 303-333K での ^{13}C NMR スペクトル、(b) GAL の 303-333K での ^{13}C NMR スペクトル、(c) MAN の 303-353K の ^{13}C NMR スペクトル、(d) GLCb の 303-333K の ^{13}C NMR スペクトル

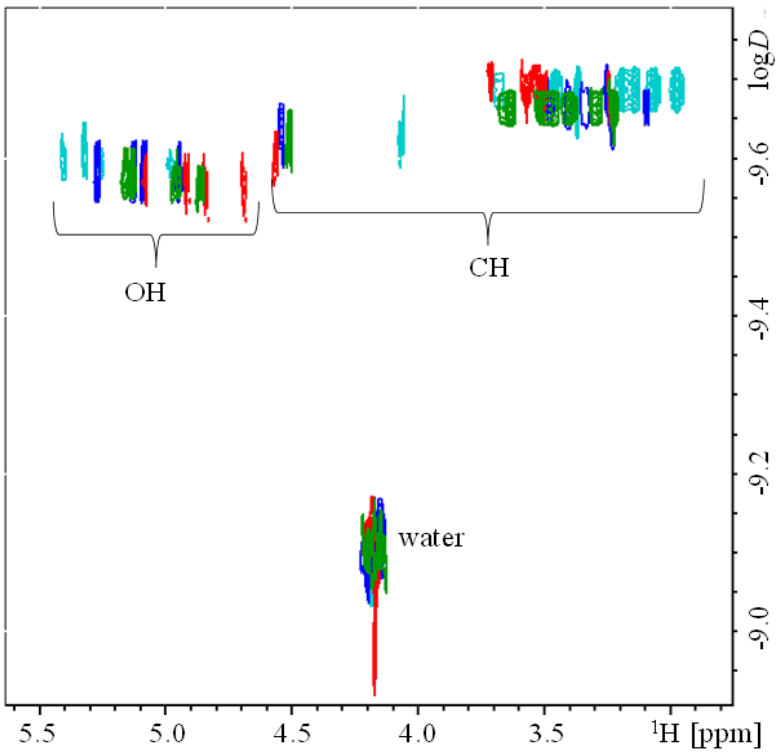


図 2-8. 30%H_2O と 70%DMSO-d_6 の混合溶媒中における単糖 GLCa（青）、GLCb（水色）、GAL（赤）および MAN（緑）の DOSY スペクトル

表 2-2.　各単糖の水酸基の ^{1}H NMR 信号の温度依存性

temperature coefficients[a)] [ppb/deg]				
	GLCa	GLCb	GAL	MAN
OH2	-9.0	-9.3	-[b)]	-9.0
OH3	-9.8	-8.6	-[b)]	-8.3
OH4	-9.1	-9.0	-8.3	-9.2
OH6	-9.8	-9.7	-9.3	-10.1

a) ^{1}H NMR は 10 K ずつ温度を上昇させ、 303 K から 353 K まで測定。
b) 信号の縮重

表 2-3. MD シミュレーションで抽出した 3,000 コンフォマー中で分子内水素結合が起こる頻度

	GLCa	GAL	MAN
OH2	0.24	0.27	0.16
OH3	0.21	0.33	0.34
OH4	0.20	0.40	0.22
OH6	0.26	0.34	0.23
average	0.23	0.33	0.24

2-5. HOH/HOD の同位体シフト解析

水分子の挙動を知るために、^{1}H NMR スペクトルにおける水シグナルに着目した[45]。溶質のない混合溶媒(H_2O:D_2O:DMSO-d_6=15:15:70)の ^{1}H NMR スペクトルでは、HOH と HOD の 2 つの異なる水シグナルが観察され、水分子間の H/D 交換が NMR 化学シフトのタイムスケールに対して遅いことが示された[46]。一方、糖を添加することによって、水の特徴的なシグナル形状が得られ、H/D 交換速度に変化が生じることがわかった(図 2-9)。GLC または GAL を溶質とした場合では水のシグナルにはほとんど変化がなかったが、MAN 溶液では HOH と HOD の 2 つの水のシグナル間のケミカルシフト差が小さくなることが分かった。すなわち MAN 溶液中では、水間のプロトン交換が GLC や GAL を溶質とした場合よりも頻繁に起こることを示している。さらに、100 mM の MAN を用いた水間の H/D 交換は、200 mM の MAN を用いた水間の H/D 交換よりも遅かった(図 2-10)。水同士のプロトン交換は、

水素結合ネットワーク内で進行することから、水の構造化の促進にともなって交換効率が上がると考えれる。

MAN 溶液に特徴的な水の挙動には、グルコースやガラクトースとは異なる配向をもつマンノース 2 位の水酸基によって引き起こされると考えられる。Simons らによる気相中での振動分光実験から、マンノースの O2 と O6 を架橋する水のブリッジ構造が報告されている[47]。またラマン分光法と ab initio MD シミュレーションを用いた Tomobe らの報告では、単糖の第 1 水和圏の水分子は主に水素結合アクセプターとして糖水酸基と相互作用し、第 2 水和圏の水分子は主にドナーとして糖と水素結合を形成することが見出されており、このことは単糖の立体化学の違いが水和殻内の水の配向に強く影響を及ぼしうることを示唆するものと言える[48]。そこで本研究においても、MD シミュレーションデータを利用し、糖と強く相互作用する水分子について調査した。その結果、隣接水酸基間のみならず遠位の水酸基を架橋する水が MAN では見出されたが、GLC または GAL では見つからなかった(表 2-4)。このような水酸基を架橋する水分子は、おそらく、MAN の周囲に水ネットワークを構築する上で重要な役割を果たしていると考えられる。このブリッジした水を起点として水分子の配向が起こり、水の構造化が進むことで、MAN 溶液中での水−水間のプロトン交換が他の糖よりも効果的に生じたものと予想される。

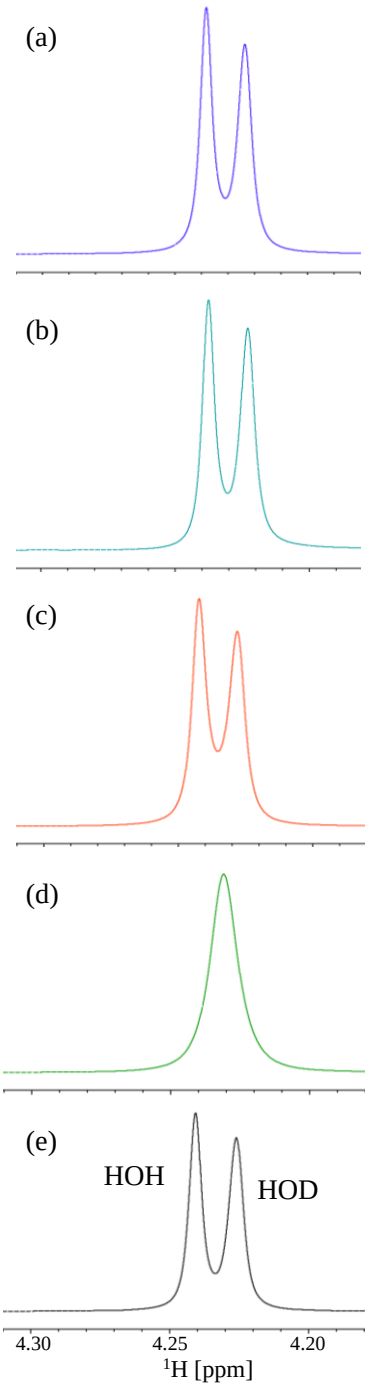


図 2-9. 水−水プロトン交換の ^{1}H NMR 解析。200 mM の混合溶媒（H_2O:D_2O:DMSO-d_6=15:15:70）で観測された HOH と HOD のシグナル (a) GLCa, (b) GLCb, (c) GAL, (d) MAN and (e) without solute

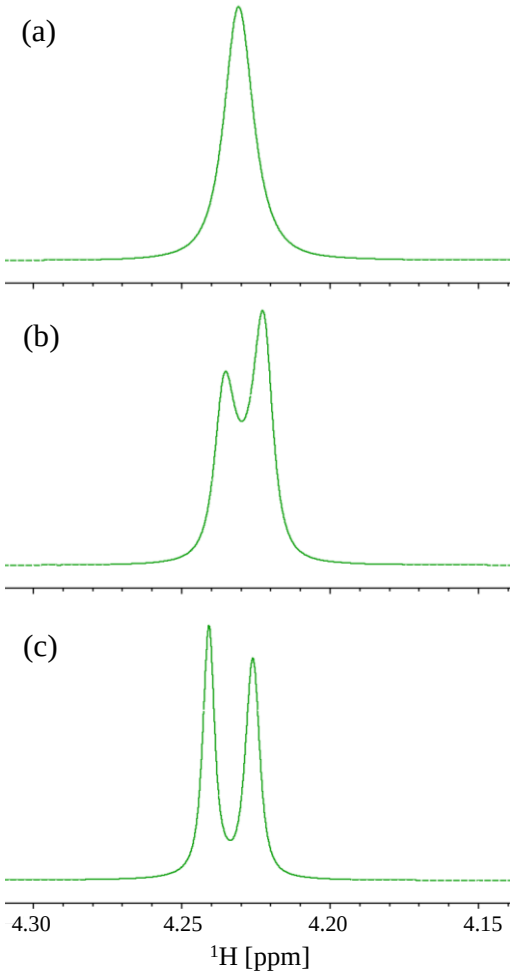


図　2-10. MAN の濃度による水−水プロトン交換の変化（H_2O:D_2O:DMSO-d_6=15:15:70） (a) 200 mM, (b) 150 mM, (c) 100 mM

表 2-4. MD シミュレーションで算出した水酸基を架橋する配位水の数

	GLCa	GLCb	GAL	MAN
O1O2	64	17	70	0
O2O3	274	153	286	179
O3O4	297	190	166	262
O4O5	0	0	48	0
O4O6	13	25	16	14
O5O6	125	77	99	118
O1O5	0	5	3	0
O1O6	2	0	6	1
O1O5O6	3	0	3	3
O2O5	0	0	0	51
O2O6	0	0	0	110
O2O5O6	0	0	0	24

2-6. 結言

本章では、糖の水和について糖と水の両面から解析するために、溶液 NMR 法によって糖の水和を解析する方法論の確立に取り組み、単糖であるグルコース(GLC)、ガラクトース(GAL)、マンノース(MAN)の水和挙動の違いを明らかにした。水溶液中における糖の水酸基のプロトンは交換が速く、詳細な情報を得ることは困難である。そこで有機溶媒を一定の割合で混合することにより交換速度を制御し、情報取得を試みた。^{1}H（H）と ^{2}H（D）の同位体シフトを利用し、DMSO/H_2O/D_2O の混合溶媒中で NMR スペクトルを比較した。^{13}C NMR スペクトルを温度を変えながら測定することにより、^{13}C-OH/OD シグナルが平均化される様子を観測した。その結果、マンノースの水酸基の H/D 交換速度が有意に遅いことが分かった。GLC と GAL、および GLC と MAN は互いに一つの水酸基の立体配置が異なるだけのエピマーであり、分子サイズに大きな違いはない。さらに、MD シミュレーションや DOSY 法による解析から、分子内水素結合や会合による分子間水素結合は各単糖で存在しないことが分かった。以上のことを踏まえると、今回の実験で得られた水酸基の化学交換速度の違いは、糖が水の水素結合ネットワークへ及ぼす影響を反映したものであると考えられる。また、^{1}H NMR スペクトルに注目すると、MAN 溶液は他の単糖に比べて HOH と HDO の交換が速く、水－水間の相互作用が強く働くことが分かった。これらの結果は、糖の種類によって異なる溶媒和環境が形成されることを示唆するものであり、MAN は他の単糖より水の構造化が進むことが考えられる。このことは、MAN は他の単糖に比べ、広い水和圏を有して

いると可能性があることを暗示しており、同位体シフトを利用した解析は水和を調査するうえで有用であることが示された。MD シミュレーションにより、水酸基を架橋する水分子を調べたところ、MAN では隣接基間のみならず、GLC や GAL では見られなかった 2 位の水酸基を起点として遠位の水酸基への架橋が見られた。MAN 溶液中での水の構造化は、この水酸基をブリッジした水分子を起点として進んだと考えられる。

2-7. 実験項

試薬

NMR 測定には，ISOTEC 社製の重水素化溶媒 D_2O (99.9 atom % D) および DMSO-d_6 (99.9 atom % D, 0.05% v/v TMS) と Millipore Milli-Q system で生成した超純水をそのまま使用した．メチル−α-D-グルコシド、メチル−β-D-グルコシド、メチル−α-D−ガラクトピラノシド一水和物、メチル−α-D-マンノピラノシドはそれぞれナカライテスク株式会社、東京化成株式会社、富士フィルム和光純薬株式会社より購入して、超純水から再結晶した。

NMR 計測

NMR スペクトルはすべて Bruker Avance III 500 spectrometer で記録し、Bruker TopSpin ソフトウェアで解析した．NMR 信号の帰属は、^{1}H-^{1}H COSY，^{1}H-^{13}C HSQC および HMBC 実験から得た。

同位体シフト観測のため，各単糖（200 mM）を体積比で 15% H_2O，15% D_2O，70% DMSO-d_6 の混合溶媒に溶かした。^{1}H NMR スペクトルは、30° フリップアングルパルスを用い，16 スキャン、緩和待ち時間 1.0 s、サンプル温度 303 K の条件で記録した。^{1}H のデジタル分解能は 0.1 Hz に設定し，得られたデータは 0.05Hz のスペクトル分解能になるようにゼロフィリングを施した。1D ^{13}C NMR 測定は、パワーゲートデカップリングを用いた 30 度フリップアングルパルスで行った。^{13}C NMR スペクトルは、303 K から 353 K まで 10 ℃ごとに 8 スキャン、緩和待ち時間 2.0 s で記録した。^{13}C デジタル分解能は 1.0 Hz に設定し、得られたデータはゼロフィリングなしで処理した。^{1}H と ^{13}C の両データは exponential multiplication window を適用してフーリエ変換した。

NOESY，ROESY、DOSY 及び緩和測定では，各単糖（200 mM）を 30% (v/v) H_2O および DMSO-d_6 の混合溶媒に溶解させた。Phase-sensitive NOESY 実験はパルス磁場勾配を用い、ミキシングタイム 0.02, 0.04, 0.06 s で、Phase-sensitive ROESY 実験は 0.2 s スピンロックで実施した。NOESY と ROESY のスペクトルは 2,048 (t_2) と 128 (t_1) のデータポイントで記録した。各データはゼロフィリングで t_2 と t_1 それぞれ 1,024 データポイントに処理し、qsine window を適用してフーリエ変換した。化学交換速度は、クロスピークと対応する対角ピークの強度 I_c/I_d の 3 回の実験の平均値をプロットし、ミキシングタイムの関数として Origin Pro 2020b で線形フィットすることにより解析した(図 2-11)[41]。DOSY 実験はスティミュレーテッドエコー法 BPP-STE シーケンスを用い、磁場勾配強度を 2%から 95%まで 32 ステッ

プで変化させ、拡散時間を 100ms、磁場勾配パルス幅を 3.6 ms で行った。DOSY データ処理は CONTIN 法で行った。緩和実験は、パルスプログラム cpmg を使用し、vc リストは、30,40,50,60,80,100,140,200,250,300 とした。

3 回の実験の平均値をプロットし、$M(\tau) = M(0)exp(-R_2\tau)$（$\tau$ ： 時間）でフィッティングした。なお、フィッティングには OriginPro 2020b を使用した。

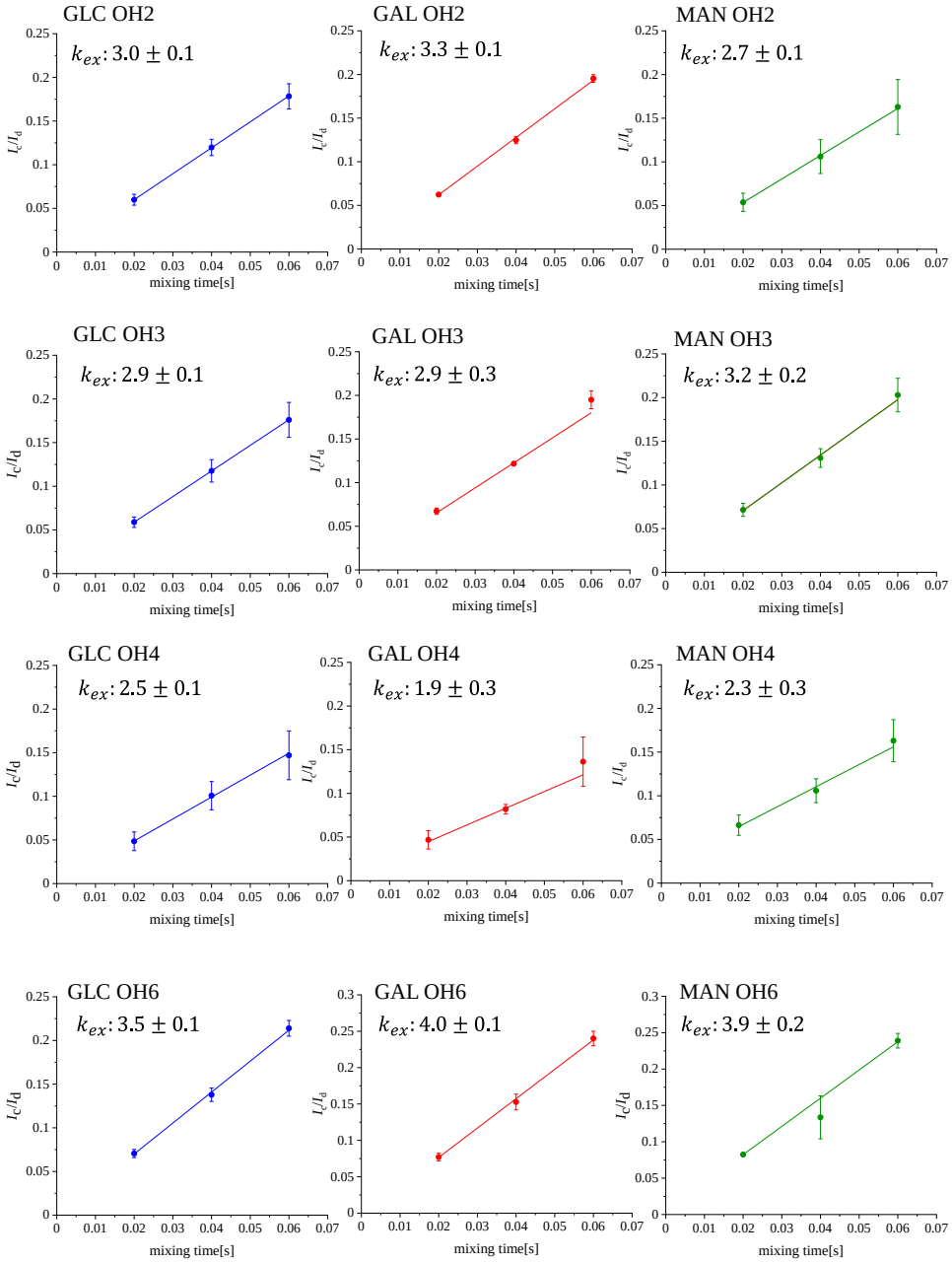


図 2-11. NOESY によるプロトン交換速度(k_{ex})の解析。クロスピークと対応する対角ピークの強度 I_c/I_d の 3 回の実験の平均値プロット

分子動力学計算

メチル−α-D-グルコシド，メチル−α-D-ガラクトピラノシド，メチル−α-D-マンノピラノシドの MD シミュレーションは，GLYCAM06EP 力場 [49] と AMBER20 プログラムパッケージ [50] を用い、JAIST 情報社会基盤研究センターの大型計算機を利用して実施した．初期構造は GLYCAM-Web (http://glycam.org)を用いて作成した。トポロジーファイルは、tLeap モジュールを用いて作成し、溶媒層には TIP5P の水モデルと DMSO 分子を追加した[51]。 α-グルコシド、ガラクトシド、マンノシドはそれぞれ 1,064 個の水と 1,059 個の DMSO、1,055 個の水と 1,059 個の DMSO、1,058 個の水と 1,065 個の DMSO を配置し計算を行った。

シミュレーションの実行には pmemd モジュールを使用し、本計算の前に、最急降下法を用いてエネルギー最小化を行った。その後，NPT アンサンブル（P = 1 atm，T = 300 K）で，初期速度をランダムにした 60 ns シミュレーションを 3 回行った。単位時間ステップは 2.0 fs で設定し、水素原子を含む結合は SHAKE アルゴリズムで拘束した。周期境界条件下、静電相互作用は粒子メッシュ Ewald 法で扱い、非結合相互作用のカットオフ距離を 12.0 Å に設定した。

計算結果の解析は CPPTRAJ モジュールを用いて行った。最初の 10 ns の部分を除いた 3 つのトラジェクトリーを 1 つにまとめ、結合したトラジェクトリーから 3,000 個のコンフォーマーを抽出して解析に用いた。水素結合の解析は、アクセプター(A)−ドナー(D)距離(3.0 Å)と A-H-D 角度(100°)をカットオフとする幾何学的基準を用いて行った。

第３章 配列や結合様式と水和の連関の解明

3-1. 緒言

本章では、糖鎖の配列や結合様式の違いが、水和にどのような影響を与えるかについて解析を行なった。各種の糖がグリコシド結合によって連結したオリゴ糖鎖は、タンパク質や脂質を修飾し、生体内の様々な現象に関わる。糖鎖は、糖残基の種類におうじた配列に加え、グリコシド結合に関わる水酸基の位置や配向の違いによる結合様式の差によって、多様な構造が生み出される。糖鎖の構造と水和挙動の関係をさらに調べるべく、Glcα1-3Manα、Manα1-3Manα 及び Manα1-2Manα 構造を対象に、NMR 手法を基軸として水和挙動を比較することを考えた。これらの 2 糖構造はいずれも、細胞内での糖タンパク質の品質管理機構に関与する、高マンノース型オリゴ糖鎖の部分構造である。

細胞内小器官の一つである小胞体では、新生タンパク質上の高マンノース型オリゴ糖鎖に対して、酵素による段階的な糖残基の切除と、レクチンによる識別が行われる[52]。こうした高マンノース型オリゴ糖鎖と酵素・レクチンとの相互作用を通して、正しい立体構造を獲得した糖タンパク質を選別し、運搬する。糖タンパク質の品質管理機構において、糖鎖の特徴的な末端構造の違いは、システムを制御するために重要な役割を果たしていると言える。非還元末端に Glcα1-3Manα 構造をもつオリゴ糖鎖は、シャペロン機能をもつレクチンとの相互作用によってタンパク質の立体構造形成を支援する[53]。またグルコース残基が除去され、Manα1-2Manα 構造が末端となったオリゴ糖鎖は、タンパク質をゴルジ体へ輸送するための目印となる。一方マンノースがさらに切除され、Manα1-3Manα 構造が末端に露出すると、タンパク質の分解を行うための信号となることが知られている[54]。

一般に糖鎖は、遺伝子工学に基づく分子生物学、あるいは酵素反応を利用した生化学的な手法による試料調製が難しい。NMR 実験に用いる均一で大量の試料を調製するため、本研究では化学合成によって対象の 2 糖を作り分けることにした。合成した Glcα1-3Manα-Me（GLC1-3MAN）、Manα1-2Manα-Me（MAN’1-2MAN）、及び Manα1-3Manα-Me（MAN’1-3MAN）を対象に、前章で確立した分析手法に基づいて NMR 解析を行ない、水和挙動の違いを明らかにすることに取り組んだ(図 3-1)。

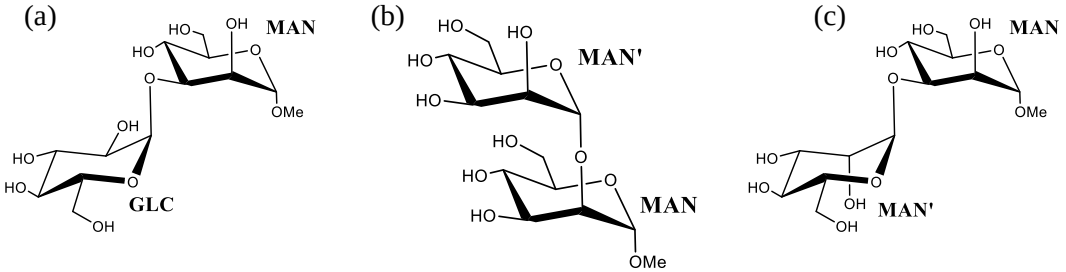


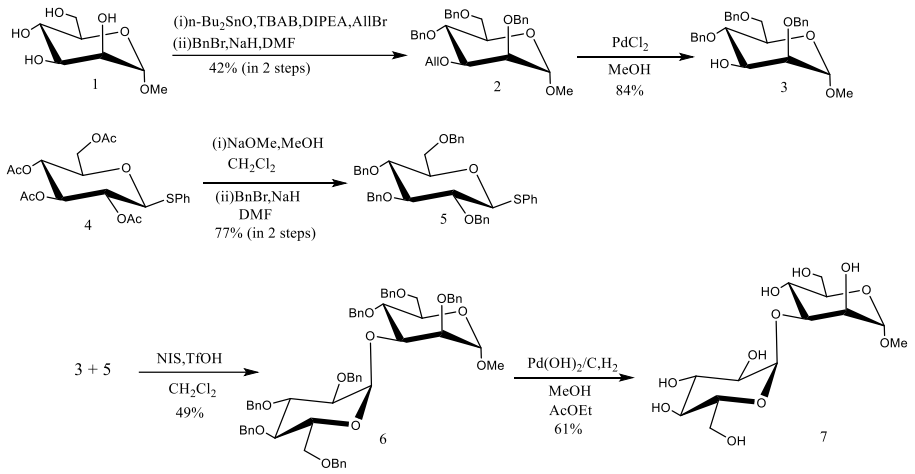
図 3-1. (a)GLC1-3MAN、(b)MAN’1-2MAN、及び(c)MAN’1-3MAN の化学構造

3-2. 末端構造の化学合成

配列による水和挙動の違いを比較するために GLC1-3MAN および MAN'1-3MAN を、また連結様式の違いによる影響を調査するために MAN'1-2MAN を設計した。対象とする糖鎖を得るために、以下に示すスキームにより糖鎖を合成した。

GLC1-3MAN の合成

Scheme1



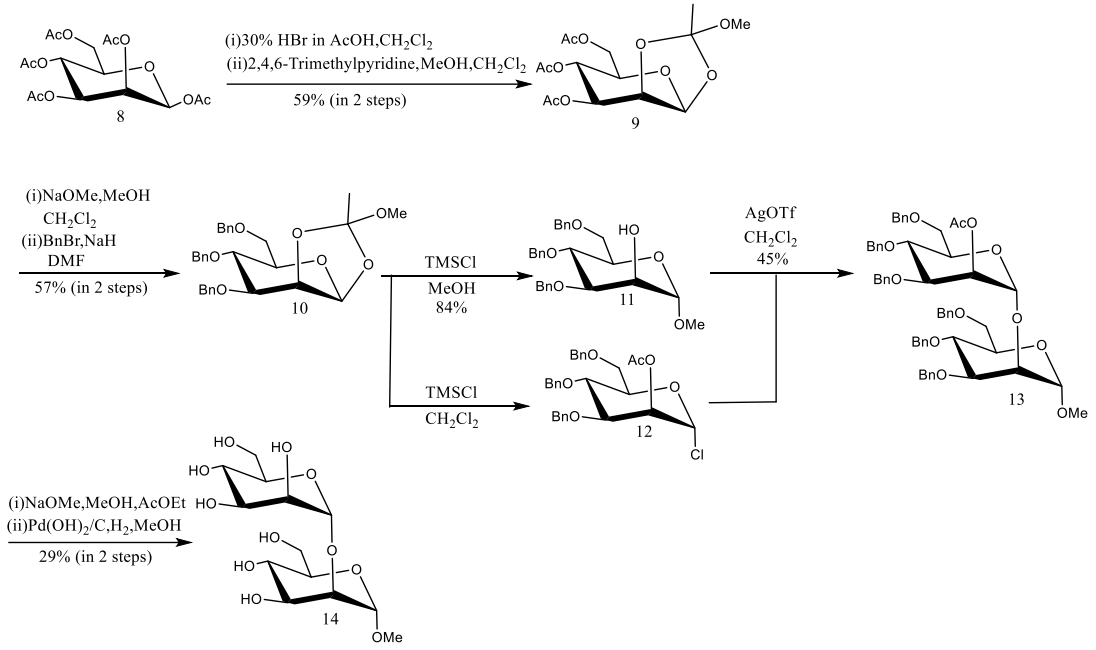
市販の α-メチルマンノシド **1** を出発物質として、dibutyltin oxide、tetrabutylammonium bromide、*N,N*-diisopropylethylamine、allyl bromide を 90 ºC で撹拌することで、3 位選択的にアリル（All）基を導入し、その後残りの OH 基をベンジル（Bn）基で保護した[55]。最後に All 基を palladium(II) chloride を用いて脱保護し、目的物であるマンノースアクセプター**3** を合成した。

グルコースドナーは、α グリコシド結合をつくるために 2 位保護基として Bn 基を導入したものを用いた。調製は、市販のチオグルコシド **4** を出発物質として、sodiume methoxide と室温で撹拌することでアセチル基を除去し、その後 OH 基を Bn 基で保護し、グルコース誘導体 **5** を合成した。

その後、合成した誘導体を用いて、目的物である 2 糖の合成を行った。最初に、マンノースアクセプター**3** とグルコースドナー**5** の 2 つを-35℃でグリコシル化反応によりカップリングし、化合物 **6** を合成した[56-58]。接触還元法によりベンジル基を除去することで、最終目的物 **7** を合成した(Scheme1)。

MAN’1-2MAN の合成

Scheme2



市販のペンタアセチルマンノース **8** を出発物質として、HBr と室温で撹拌することで、1 位選択的にブロモ化し、その後、2,4,6-trimethylpyridine を加え、マンノース誘導体 **9** を得た。アセチル基を除去したのち Bn 基で保護し、共通中間体となるマンノース誘導体 **10** を合成した。

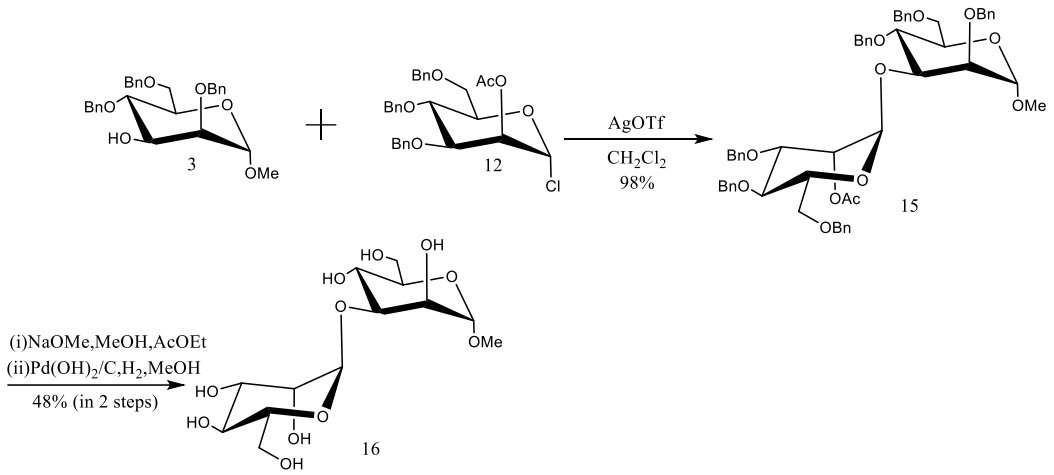
アクセプターとなるマンノース誘導体 **11** は、調製した **10** をメタノール中 trimethylsilyl chloride で処理し、1 位をメチル化、2 位を無保護の水酸基に変換することで得た。

マンノースドナー**12** は、マンノース誘導体 **11** と同様にマンノース誘導体 **10** へ trimethylsilyl chloride を加え、dry dichloromethane 中 45℃で反応させることで調製した。

その後、合成したマンノース誘導体 **12** と **13** を用いて、目的物である 2 糖の合成を行った。最初に、マンノース誘導体 **11** と **12** の 2 つを-15℃でグリコシル化反応によりカップリングし、化合物 **13** を合成した[59-61]。最後に保護基を除去することで、最終目的物 **14** を合成した(Scheme2)。

MAN’1-3MAN の合成

Scheme3



Scheme3 に従い、目的物である 2 糖の合成を行った。調製したマンノースアクセプター**3** とマンノースドナー**12** の 2 つを-15℃でグリコシル化反応によりカップリングし、化合物 **15** を合成した[59-62]。最後に保護基を除去することで、最終目的物 **16** を合成した。

3-3. H/D の同位体シフト解析

各 2 糖について、H/D 同位体シフトを用いる手法により、水和挙動を評価した。すべての 2 糖試料を冷却したエタノール、次いでジエチルエーテルで洗浄し、減圧下で乾燥した。その後、軽水と重水を含む混合溶媒(H_2O:D_2O:DMSO-d_6=15:15:70)を用いて、糖の 200 mM 溶液を調製した。

^{1}H NMR スペクトルから水の信号に着目し、各試料中の水分子の挙動を調べた。その結果、MAN’1-2MAN または MAN’1-3MAN を溶質とした溶液では水のシグナルにはほとんど変化がなく、HOH と HOD の 2 つの異なる水シグナルが観察された。一方 GLC1-3MAN 溶液では、2 つの水のシグナル間のケミカルシフト差が小さくなることが分かった(図 3-2)。GLC1-3MAN 溶液の HOH 信号と HOD 信号の平均化は、水間のプロトン交換が MAN’1-2MAN や MAN’1-3MAN よりも頻繁に起こることを示唆している。

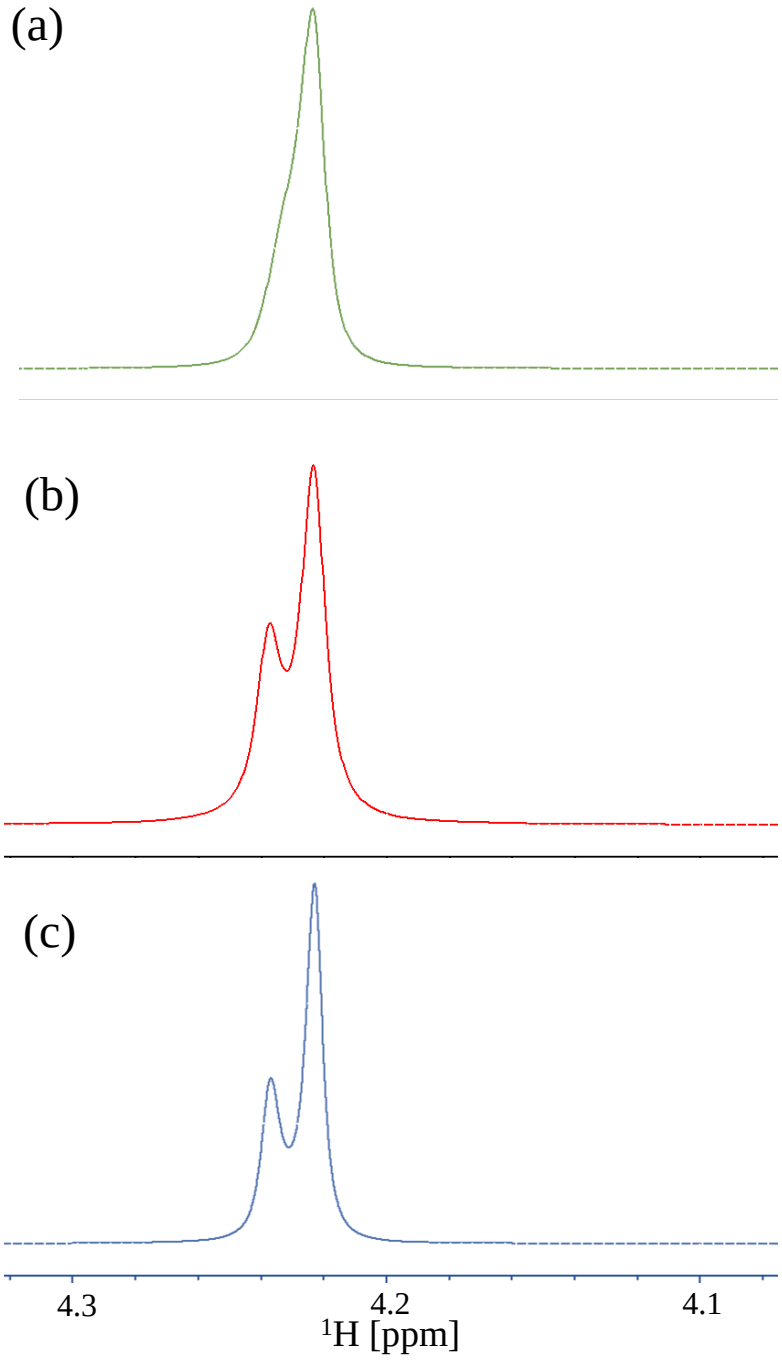


図 3-2. 水−水プロトン交換の ^{1}H NMR 解析。200 mM の混合溶媒（H_2O:D_2O:DMSO-d_6=15:15:70）で観測された HOH と HOD のシグナル (a) GLC1-3MAN, (b) MAN'1-2MAN (c) MAN'1-3MAN

また ^{1}H NMR スペクトルの糖の水酸基の信号を調べたところ、GLC1-3MAN と比べ、MAN'1-2MAN や MAN'1-3MAN の水酸基のプロトンシグナルはブロード化していた。この

ことから、各糖鎖で糖水酸基のプロトン交換速度の違いが示唆された。

そこで次に ^{13}C NMR スペクトルを温度を変えながら測定し、糖−水間の相互作用について調べた。303 K で得られた各糖のスペクトルでは、同位体シフトのために C2、C3、C4 および C6 の ^{13}C-OH および ^{13}C-OD シグナルが現れた。MAN'1-3MAN および MAN'1-2MAN のスペクトルにおいては、333 K 付近でシグナルが平均化した。一方、GLC1-3MAN のスペクトルでは、^{13}C-OH/D シグナルが 353 K 付近で平均化した(図 3-3)。また各溶液の DOSY 測定を行い、溶質の見かけの拡散係数を測定したところ、いずれの 2 糖も同様の値を与え、凝集は起こっていないことが示された(図 3-4)。これらの結果より、GLC1-3MAN では水により引き起こされる水酸基のプロトン交換速度が MAN'1-2MAN と MAN'1-3MAN に比べて遅いことが明らかとなった。

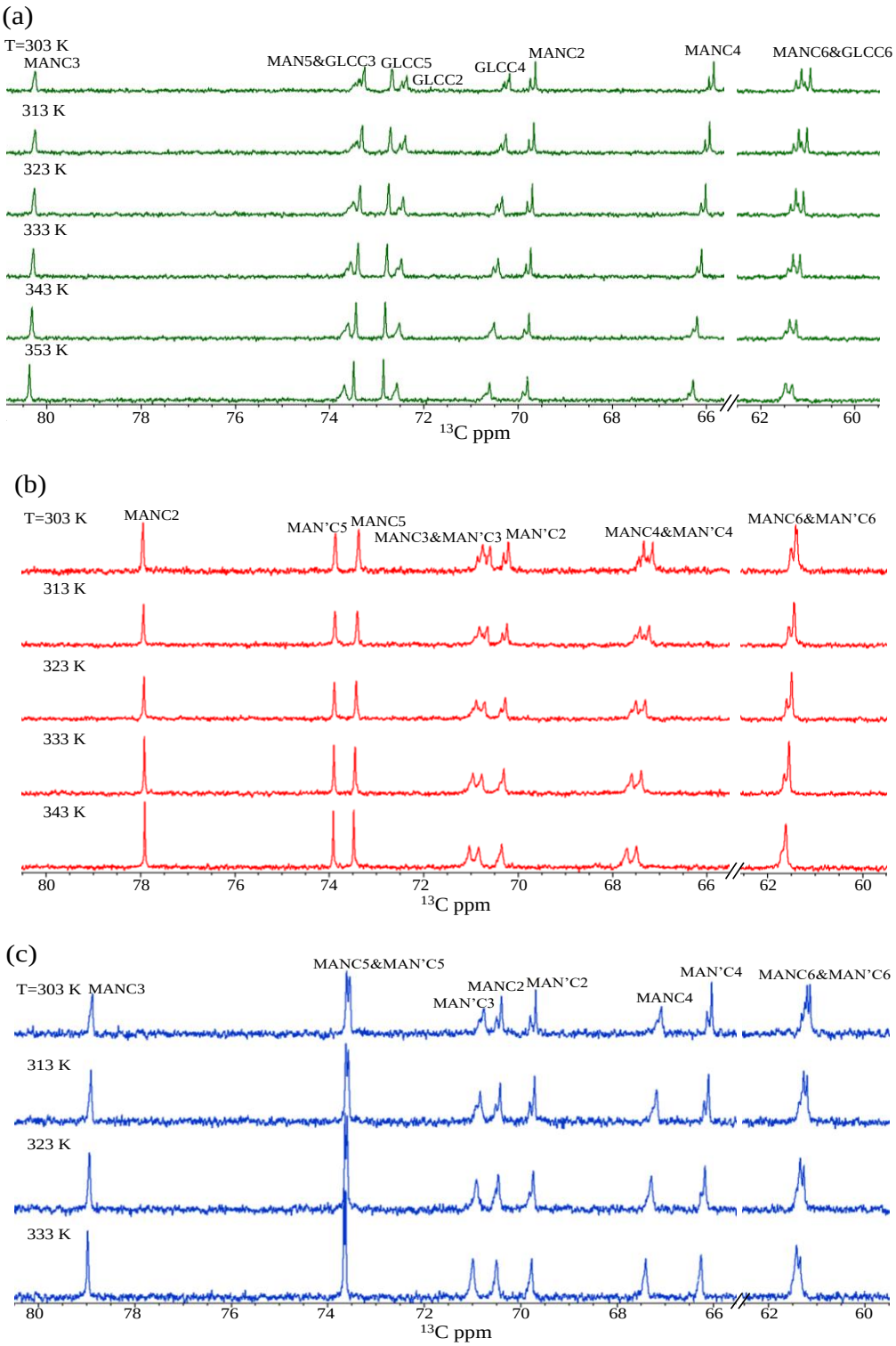


図 3-3. ^{13}C-OH/OD 同位体シフトを利用した糖−水プロトン交換の ^{13}C NMR 解析(H_2O：D_2O：DMSO-d_6＝15：15：70)(a)GLC1-3MAN の 303-353 K での ^{13}C NMR スペクトル、(b) MAN'1-2MAN の 303-343 K での ^{13}C NMR スペクトル、(c) MAN'1-3MAN の 303-333 K の ^{13}C NMR スペクトル

MAN’1-3MAN と MAN’1-2MAN については、^{13}C NMR スペクトルの解析において、ピークが平均化する温度に若干の違いが現れ、MAN’1-3MAN の方がわずかに交換速度が遅いことが示唆された。拡散時間⊿を変化させて DOSY を計測し、水酸基の信号の見かけの拡散係数の変化について調べたところ、やはり MAN’1-3MAN は MAN’1-2MAN に比べ、水酸基のプロトン交換が速いことが示唆された[62,63]。以上の結果から、同じ Man-Man 配列であっても、結合様式の違いによって糖周辺の水和挙動が違うことが分かった(図 3-5)。

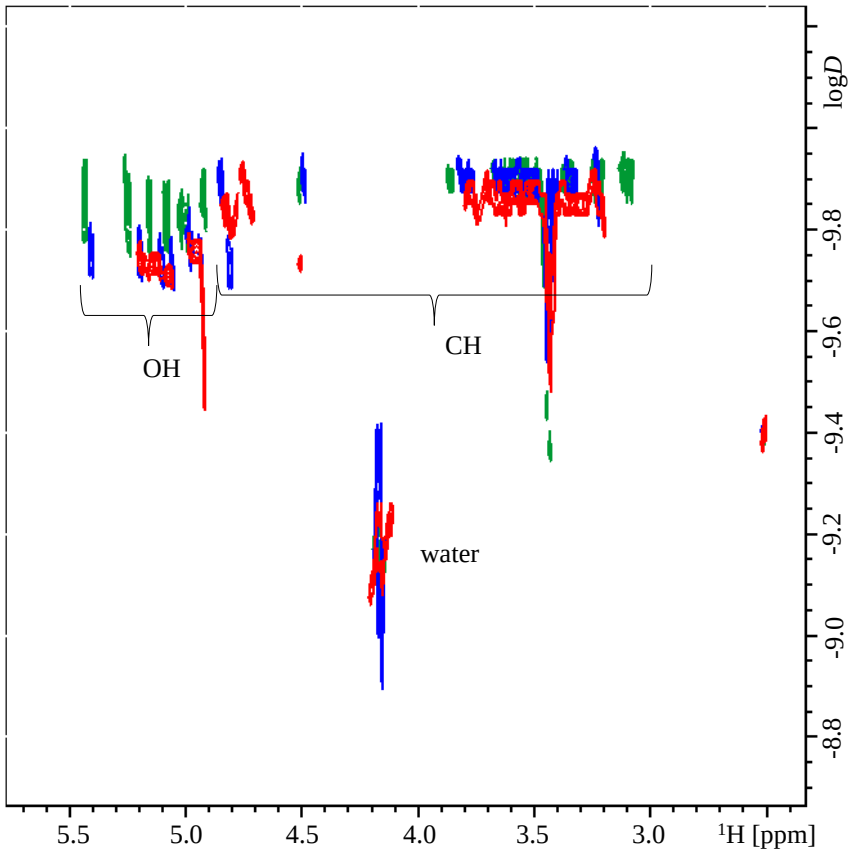


図 3-4. 30%H_2O と 70%DMSO-d_6 の混合溶媒中における GLC1-3MAN（緑）、MAN’1-2MAN（赤）および MAN’1-3MAN（青）の DOSY スペクトル

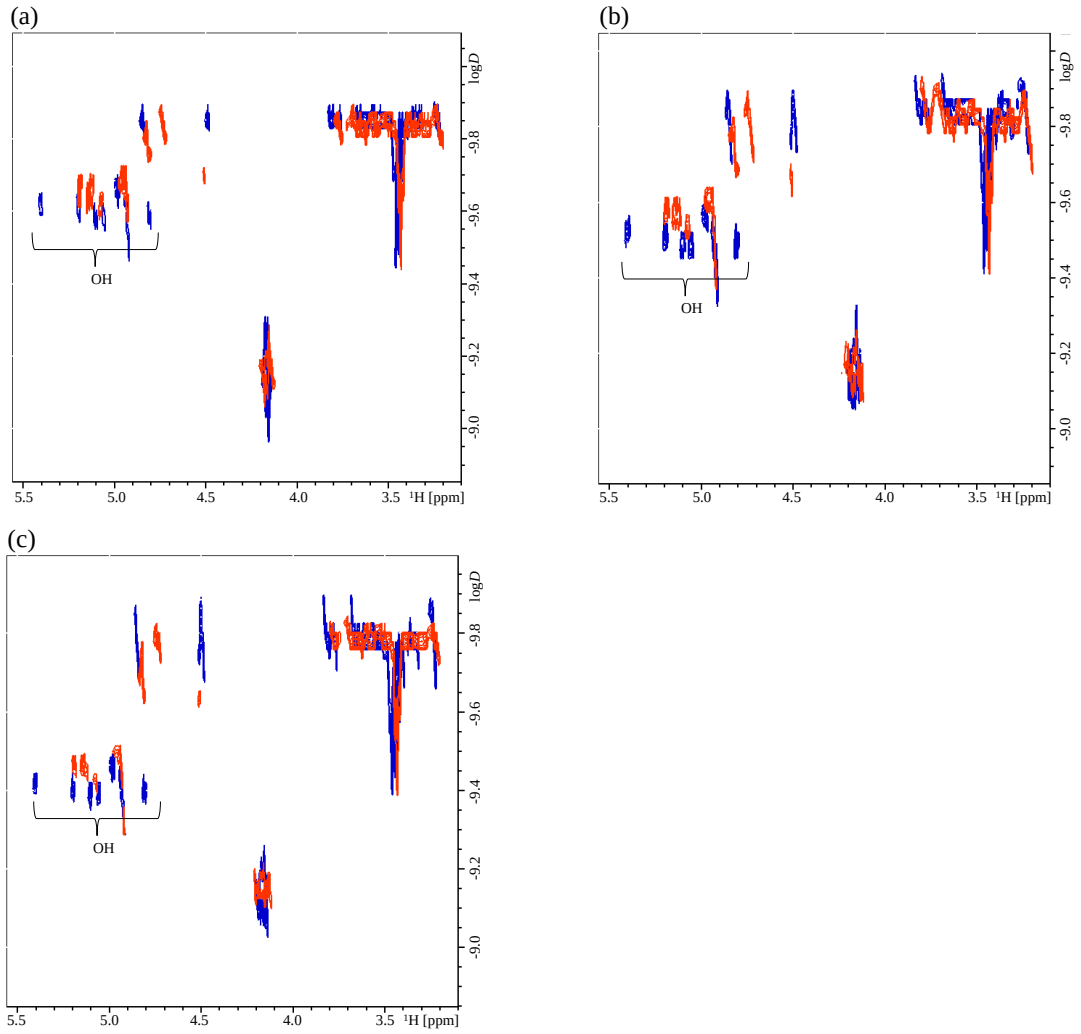


図 3-5. (a)⊿=0.15 s, (b)⊿=0.2 s, (c)⊿=0.3 s での DOSY スペクトル(H_2O:D_2O:70%DMSO-d_6=15:15:70)。MAN'1-2MAN（赤）、MAN'1-3MAN（青）を示す

3-4. 分子動力学計算による配位水の解析

NMR 実験の結果、GLC1-3MAN は、溶液中の水分子間のプロトン交換の効率を高めることが分かった。同時に、GLC1-3MAN の糖水酸基と水との間のプロトン交換は阻害を受けることが示された。このような水−水間と、水−糖鎖間の相互作用の関係性は、前章の単糖を用いた解析結果と同様であった。これらの結果から、GLC1-3MAN は水との強い結びつきにより、広い水素結合ネットワークを持つことが考えられる。この考察を深めるために、MD シミュレーションによる解析を行った。計算には、水の孤立電子対を考慮するため TIP5P モ

デルの水と、DMSO 分子を共存させ、糖鎖の力場には酸素の孤立電子対を考慮した GLYCAM06EP を使用した[51]。1 atm、300 K での NPT アンサンブルによる 60 ns のシミュレーションを 3 回行い、データを統合して解析を行った。MD シミュレーションにより水酸基間を架橋する水分子の存在を調べたところ、糖残基間を架橋する配位水が GLC1-3MAN では顕著に見出されたが、MAN'1-2MAN や MAN'1-3MAN ではほとんど見つからなかった(表 3-1)。また GLC1-3MAN の配位水は、グルコース残基の 2 位(GLCO2)と、マンノース残基の 4 位(MANO4)の水酸基間を結びつけることが分かった(図 3-6)。そのため、グルコースの 2 位エピマーであるマンノースを非還元末端側にもつ MAN'1-3MAN、MAN'1-2MAN 配列では残基間を架橋する配位水が少ないと考えられる。そこで、配位水の存在を調べるため、H_2O:DMSO-d_6=2:98 の混合溶媒を用いて、GLC1-3MAN の 50 mM 溶液の NMR 解析を行った。^{1}H NMR スペクトルから、水酸基の温度応答性を調べると、配位水の存在が示唆された GLCO2 と MANO4 の水酸基では、ケミカルシフトの変化が他の水酸基とは異なり、ケミカルシフトの変化が緩やかであった(図 3-7)。水酸基の温度応答性の違いは、水酸基のプロトン交換の違いを反映している。故に、GLCO2 と MANO4 の温度応答性の違いは、水酸基と水との水素結合が強いため、水酸基のプロトン交換が阻害されたと考えられ、GLCO2 と MANO4 の位置に実験的にも配位水の存在が示唆された。以上のことから、GLC1-3MAN では残基間を架橋し糖と強く結びついた配位水が存在することで、ブリッジした水を起点として水分子の配向が起こり周囲の水ネットワークが構築され、水の構造化が進むと予想される。

MAN'1-3MAN と MAN'1-2MAN については、残基間を架橋する水分子の数にほとんど違いはなかった。一方で、レプリカ交換 MD 法によりグリコシド結合の二面角を網羅的に調べると、MAN'1-3MAN の方が MAN'1-2MAN よりも二面角の密度分布が広がっていることが分かった(図 3-8)。このことから、MAN'1-3MAN はコンフォメーションの揺らぎが MAN'1-2MAN に比べて大きいことが示唆された。故に、NMR 実験により示唆された MAN'1-3MAN と MAN'1-2MAN の糖周辺の水和挙動の違いは、コンフォメーション変化による運動性の違いが、2 糖周辺の水の水素結合ネットワークに影響を及ぼし、MAN'1-3MAN では糖鎖のコンフォメーション揺らぎによって水の構造化が阻害されるため、糖−水間のプロトン交換が速くなったと考えられる。

表 **3-1. MD** シミュレーションで算出した糖残基間に存在する配位水の数

GLC1-3MAN		MAN'1-2MAN		MAN'1-3MAN	
MANO4-GLCO2	1011	MAN'O6-MANO6	95	MAN'O2-MANO6	124
MANO2-GLCO6	136	MAN'O6-MANO4	45	MAN'O2-MANO4	40
MANO2-GLCO4	22	MAN'O5-MANO6	29	MAN'O2-MANO5	26
MANO2-GLCO2	65	MAN'O3-MANO2	10	MAN'O2-MANO2	0
MANO4-GLCO6	8	MAN'O3-MANO4	4	MAN'O2-MANO3	0
MANO2-GLCO5	5	MAN'O3-MANO3	2	MAN'O3-MANO2	0
MANO3-GLCO2	5	MAN'O3-MANO6	1	MAN'O3-MANO3	0
MANO2-GLCO2	0	MAN'O2-MANO2	0	MAN'O3-MANO4	0
MANO2-GLCO3	0	MAN'O2-MANO3	0	MAN'O3-MANO5	0
MANO3-GLCO3	0	MAN'O2-MANO4	0	MAN'O3-MANO6	0
MANO3-GLCO4	0	MAN'O2-MANO5	0	MAN'O4-MANO2	0
MANO3-GLCO5	0	MAN'O2-MANO6	0	MAN'O4-MANO3	0
MANO3-GLCO6	0	MAN'O3-MANO5	0	MAN'O4-MANO4	0
MANO4-GLCO3	0	MAN'O4-MANO2	0	MAN'O4-MANO5	0
MANO4-GLCO4	0	MAN'O4-MANO3	0	MAN'O4-MANO6	0
MANO4-GLCO5	0	MAN'O4-MANO4	0	MAN'O5-MANO2	0
MANO5-GLCO2	0	MAN'O4-MANO5	0	MAN'O5-MANO3	0
MANO5-GLCO3	0	MAN'O4-MANO6	0	MAN'O5-MANO4	0
MANO5-GLCO4	0	MAN'O5-MANO2	0	MAN'O5-MANO6	0
MANO5-GLCO6	0	MAN'O5-MANO3	0	MAN'O6-MANO2	0
MANO6-GLCO2	0	MAN'O5-MANO4	0	MAN'O6-MANO3	0
MANO6-GLCO3	0	MAN'O5-MANO6	0	MAN'O6-MANO4	0
MANO6-GLCO4	0	MAN'O6-MANO2	0	MAN'O6-MANO5	0
MANO6-GLCO6	0	MAN'O6-MANO3	0	MAN'O6-MANO6	0

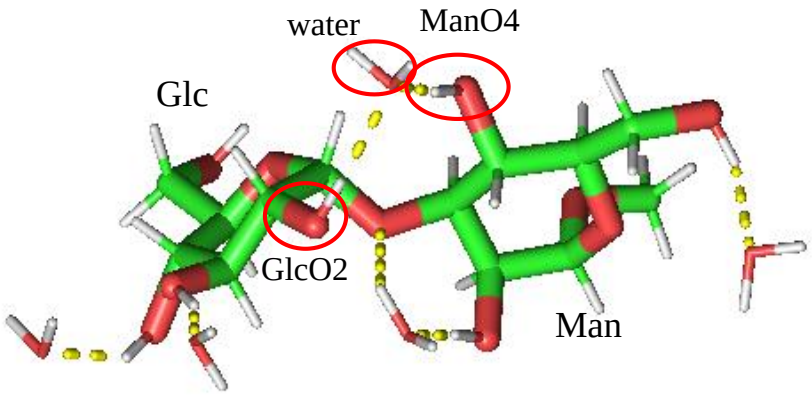


図 3-6. GLC1-3MAN の MANO4 と GLCO2 を架橋する水分子

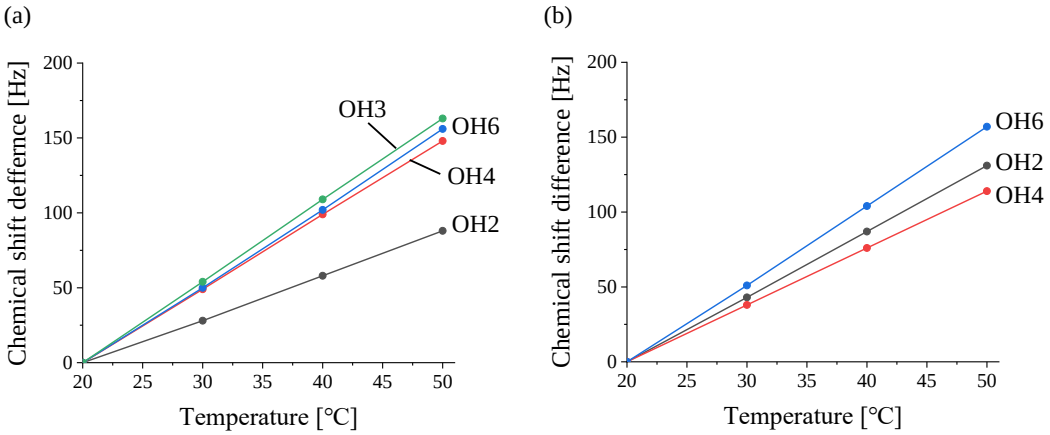


図 3-7. 20℃を基準とした GLC1-3MAN の各水酸基の温度応答性

(a)GLC 残基、(b)MAN 残基を示す

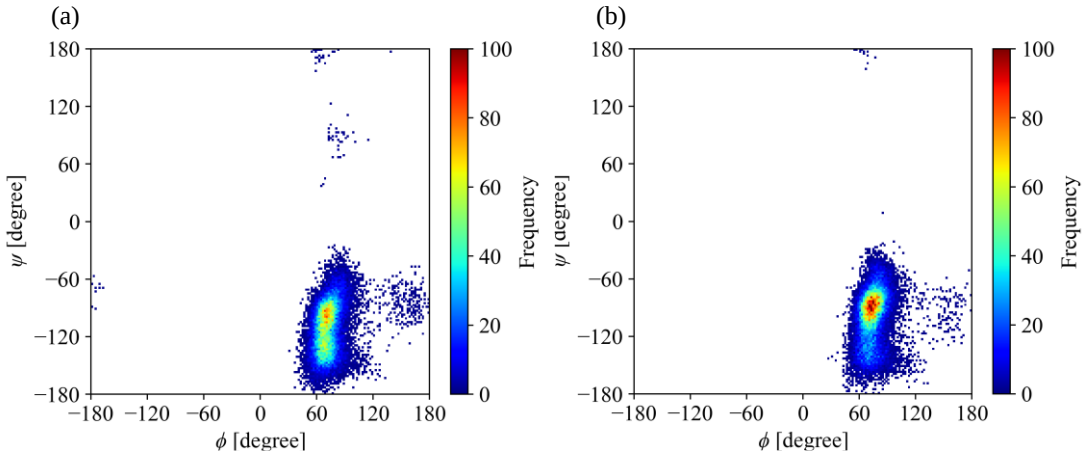


図 3-8. MD 計算によるグリコシド結合の二面角の密度分布。(a)MAN'1-3MAN、(b) MAN'1-2MAN を示している

3-5. 結言

第 2 章で確立した溶液 NMR による方法論は、単糖の解析から水酸基の配向という化学構造により水分子の挙動が変化することが分かった。そこで、糖鎖の構造と水和挙動の関係をさらに調べるべく、配列や結合様式の違いに着目し、GLC1-3MAN、MAN'1-2MAN 及び MAN'1-3MAN の解析を行った。これらの 2 糖はいずれも細胞内でレクチンと相互作用する高マンノース型糖鎖の部分構造である。有機合成により、GLC1-3MAN、MAN'1-2MAN と MAN'1-3MAN を単糖原料から調製し、解析の供とした。各 2 糖溶液での ^{13}C と ^{1}H の NMR 解析により、糖と水のプロトン交換は、GLC1-3MAN 溶液では MAN'1-2MAN と MAN'1-3MAN に比べて遅く、水分子同士の交換速いことが分かった。この結果から、GLC1-3MAN は水との相互作用が他の 2 糖とは異なことが分かった。このことは、GLC1-3MAN は他の 2 糖よりも水の構造化進むことが示唆され、配列により水の構造化が大きく変わることを示している。単糖の解析により、水酸基を架橋する水の存在が水の構造化に重要であることが示唆された。同様に MD シミュレーションにより、各 2 糖の水酸基間を架橋する水を調べたところ、隣接基間の水素結合のみならず、GLC1-3MAN では残基間を架橋する水分子が、他の二棟よりも多く確認された。以上のことから、化学構造の違いにより水素結合の様式を変化させることが分かり、それにより水和圏の範囲を調整していることが示唆された。また、MAN'1-2MAN と MAN'1-3MAN では DOSY 法の解析などにより、水酸基と水の交換速度に違いが現れた。MAN'1-2MAN と MAN'1-3MAN では残基間を架橋する水分子に有意な差は現れなかった。しかし、MD シミュレーションにより、二面角の変化を調べたところ、コンフォメーション変化に違いが現れた。この MAN'1-2MAN と MAN'1-3MAN の比較から、水の構造化には立体構造の安定性も重要であることが示唆され、配列や結合様式の違いは、水

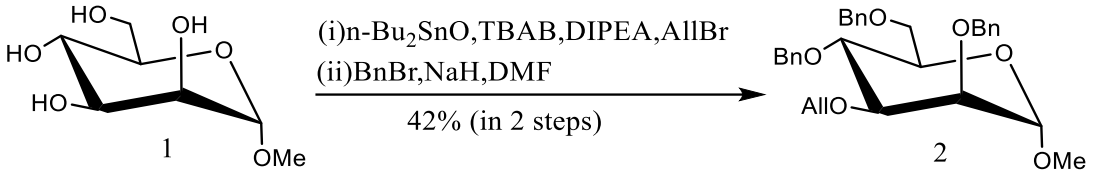
素結合の様式と立体構造の安定性の両面で水和に影響を与えることが分かった。このことは、配列や結合様式により糖鎖が固有の水和構造を持っていることを示しており、レクチンとの相互作用に影響していることが示唆された。

3-6. 実験項

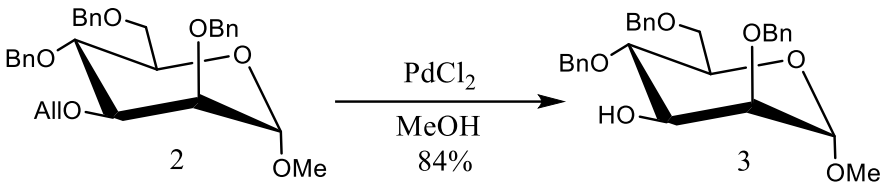
試薬や溶媒は東京化成株式会社、富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。カラムクロマトグラフィーはバイオタージの SNAP Ultra または SNAP Sfär HC D を用いた。

各化合物の同定は NMR（Bruker Biospin Inc.,AVANCE III 400MHz）、MALDI-TOF-Mass(Bruker Biospin Inc., microflex)を用いて行った。

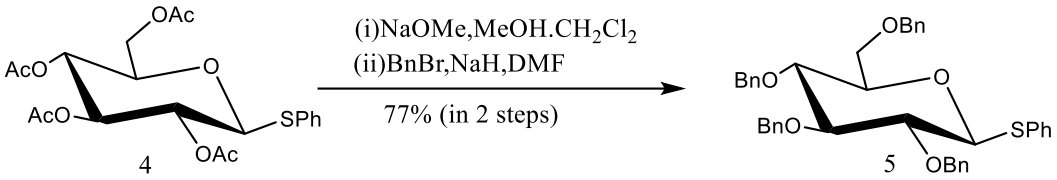
GLC1-3MAN の合成



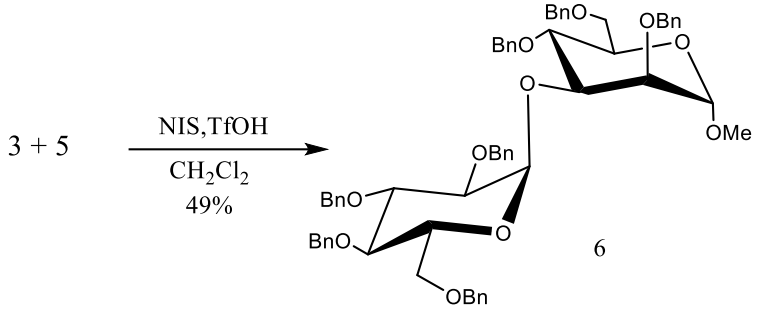
Methyl α-D-mannopyranoside (2.0 g, 10.3 mmol)、dibutyltin oxide (256 mg, 1.03 mmol)、tetrabutylammonium bromide (996 mg, 3.09 mmol)を量り、混合した。フラスコ内を N_2 置換した後、*N,N*-diisopropylethylamine (7 mL, 41.1 mmol)と allyl bromide (7.1 mL, 82.4 mmol)を加えて、90 °C で 7.5 時間加熱還流した。TLC により反応終了を確認後、反応液を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（hexan/AcOEt）で精製し、3−アリル保護体を得た。続けて試料を dry DMF (62.0 mL)で溶かし、氷冷下で撹拌しながら sodium hydride (60%, dispersion in Paraffin Liquid) (2.01 g, 83.8 mmol)を加えて、そのまま 2 時間撹拌した[55]。その後、benzyl bromide (8.8 mL, 74.5 mmol)を加えて、室温で一晩撹拌した。TLC により反応終了を確認後 methanol を加えてクエンチし、溶液をセライト濾過しさらに AcOEt で洗い流した。濾液を減圧留去した後、AcOEt (50 mL)で希釈し、H_2O (30 mL)で 3 回、brine (30 mL)で 1 回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過で取り除き、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（hexan/AcOEt）で精製し、黄色のオイルとして化合物 **2** (2.2 g, 42%)を得た。



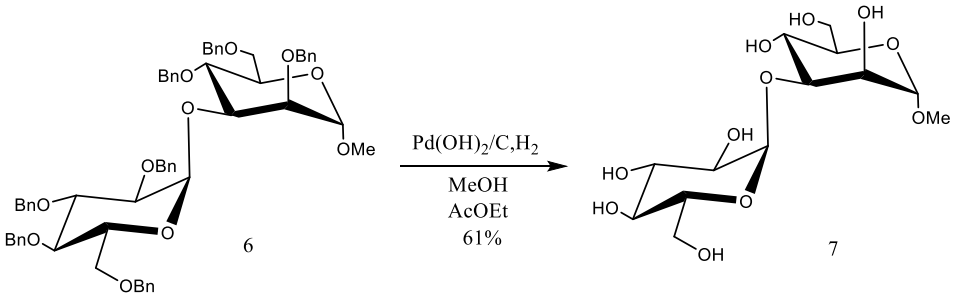
化合物 **2** (2.2 g, 4.36 mmol)を AcOEt (37.0 mL)で溶かして、methanol (53.0 mL)、palladium(II) chloride (244 mg, 1.31 mmol)を加えて、室温で 4 時間撹拌した。TLC により反応終了を確認後、反応液をセライト濾過し、濾液を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（hexan/AcOEt）で精製し、白色固体として化合物 **3** (1.7 g, 84%)を得た。



化合物 **4** (3.0 g, 6.81 mmol)を dichloromethane (1.7 mL)に溶かして、methanol (13.0 mL)を加えて、室温で撹拌した。Sodium Methoxide (392 mg)を加えて、室温で 14 時間撹拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。その後、dry DMF (23.0 mL)で溶かして氷冷下で撹拌。sodium hydride (60%, dispersion in Paraffin Liquid) (980 mg, 40.7 mmol)を加えて、そのまま 30 分撹拌した。その後、benzyl bromide (4.0 mL, 74.5 mmol)を加えて、室温で一晩撹拌した。反応終了を TLC で確認後、methanol を加えて、室温で撹拌。溶液をセライト濾過し、AcOEt で洗い流した。濾液を減圧留去した後、AcOEt (50 mL)で希釈し、H_2O (30 mL)で 3 回、brine (30 mL)で 1 回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過で取り除き、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（hexan/AcOEt）で精製し、黄色オイルとして化合物 **5** (3.3 g, 77%)を得た。

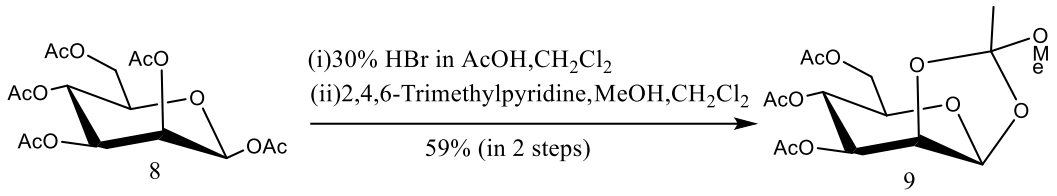


化合物 **3** (2.2 g, 4.8 mmol)と化合物 **5** (3.0 g, 4.8 mmol)を dry dichloromethane (10 mL)と dry cyclopentyl methyl ether (50 mL)で溶かして、活性化したモレキュラーシーブス (9.0 mg)を加えて室温で 30 分撹拌した。その後、*N*-Iodosuccinimide (1.3 g, 57.6 mmol)、tifluoromethane sulfonic acid (42 μL, 0.48 mmol)を加え-40 ºC で一晩撹拌した[56-58]。反応終了を TLC で確認後、triethylamine で中和し、セライト濾過した。濾液をチオ硫酸ナトリウム水溶液 (50 mL)で 3 回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL)で 3 回、brine (50 mL)で 1 回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過で取り除いてから、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（hexan/AcOEt）で精製し、薄淡黄色固体として化合物 **6** (2.3 g, 49%)を得た。

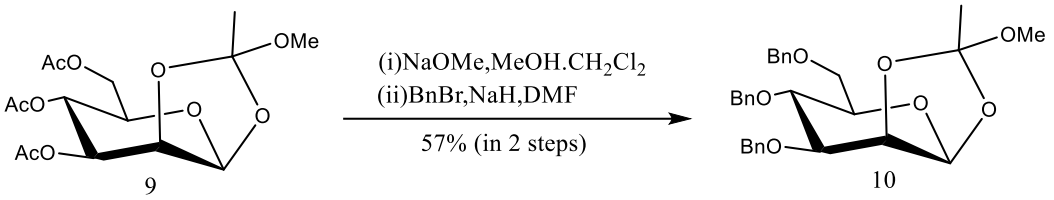


化合物 **6** (2.3 g, 2.3 mmol)を methanol (12 mL)と AcOEt(12 mL)で溶かして室温で撹拌した。palladium hydroxide on carbon (2.3 g)を加えて室温のまま撹拌した。反応容器内を脱気した後、H_2 置換し、室温で一晩撹拌した。反応終了を TLC で確認後、セライト濾過し、濾液を回収して減圧留去した。残渣をバイオタージは用いず、オープンの逆相カラムクロマトグラフィー(ODS)(H_2O/MeOH)で精製し、白色固体として脱保護体 **7** (504 mg, 61%)を得た。

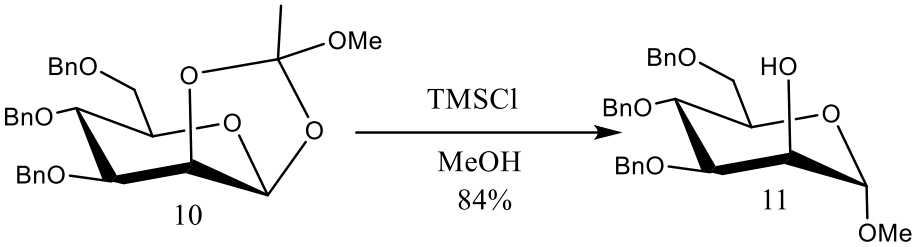
MAN'1-2MAN の合成



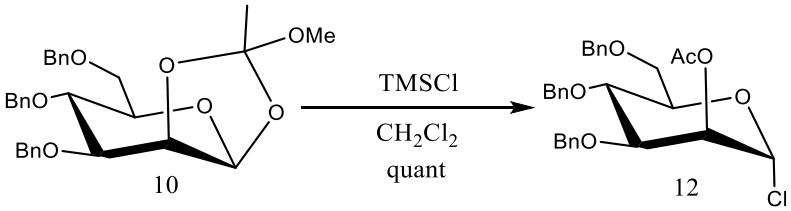
1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-mannopyranose (2.0 g, 5.1 mmol)を dry dichloromethane (3 mL)で溶かした。30% HBr in AcOH (3.0 mL, 12.8 mmol)を加えて室温で一晩撹拌した。反応終了を確認後、飽和炭酸カリウム水溶液を加えて、表水中で撹拌。dichloromethane で抽出後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL)で 3 回、brine (50 mL)で 1 回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過で取り除いてから、溶媒を減圧留去した。その後、dry dichloromethane (10 mL)で溶かした。dry methanol(8 mL)と 2,4,6-trimethylpyridine(1.9 mL,12.8 mmol)を加えた。40℃で一晩撹拌した。反応終了を確認後、塩酸(50mL)で 3 回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL)で 3 回、brine (50 mL)で 1 回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過で取り除いてから、溶媒を減圧留去した。その後、AcOEt と hexane で再沈殿させ、白色固体として化合物 **9**(1.1 g, 59%)を得た。



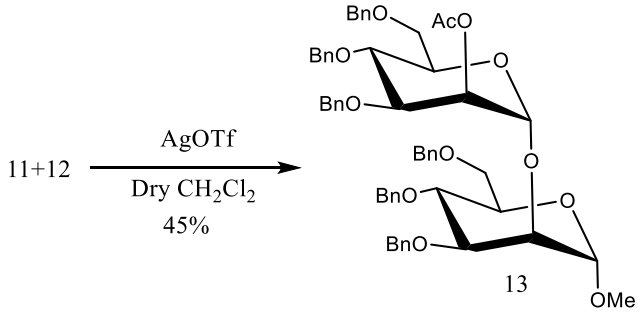
化合物 **9**(4.4 g, 12.1 mmol)を dichloromethane (3.0 mL)に溶かして、methanol (41.0 mL)を加えて、室温で撹拌した。sodium methoxide (668 mg, 12.1 mmol)を加えて、室温で一晩撹拌した。TLC で確認後、反応を終了させ、溶媒を減圧留去した。その後、dry DMF (40.0 mL)で溶かして氷冷下で撹拌。sodium hydride (60%, dispersion in Paraffin Liquid) (2.2 g, 90.0 mmol)を加えて、そのまま 2 時間撹拌した。その後、benzyl bromide (6.7 mL, 54.6 mmol)を加えて、室温で一晩撹拌した。反応終了を TLC で確認後、methanol を加えて、室温で撹拌。溶液をセライト濾過し、AcOEt で洗い流した。濾液を減圧留去した後、AcOEt (50 mL)で希釈し、H_2O (30 mL)で 3 回、brine (30 mL)で 1 回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過で取り除き、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexan/AcOEt)で精製し、黄色オイルとして化合物 **10** (3.5 g, 57 %)を得た。



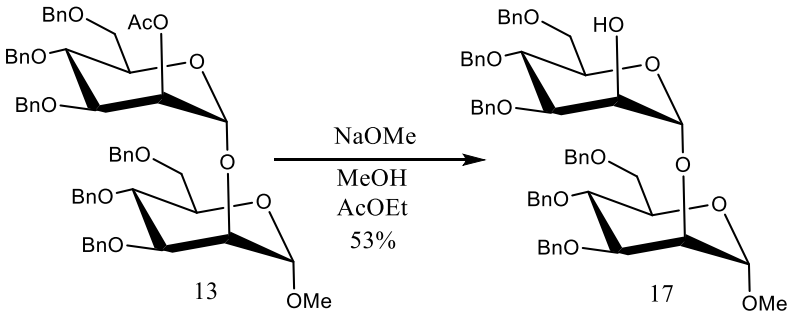
化合物 **10**(1.5 g, 3.2 mmol)を dry methanol (11 mL)で溶かして室温で撹拌した。Trimethylsilyl chloride (7 mL, 54.9 mmol)を加えて室温で一晩撹拌した。反応終了を TLC で確認後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて撹拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL)で 3 回、brine (50 mL)で 1 回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過で取り除いてから、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（hexan/AcOEt）で精製し、無色固体として化合物 **10** (1.3 g, 84%)を得た。



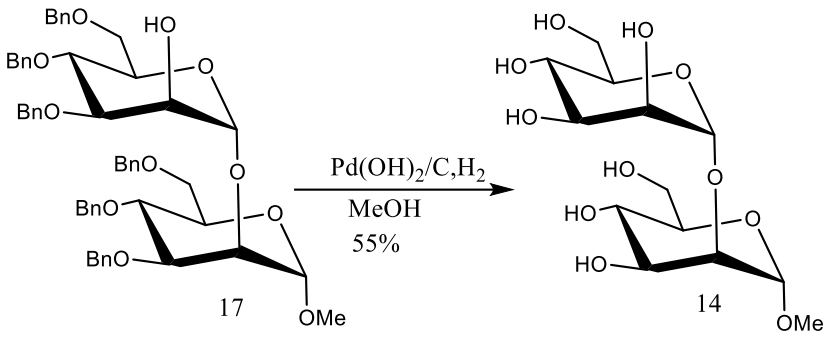
化合物 **10** (2.0 g,3.2 mmol)を dry dichloromethane (30 mL)で溶かして室温で撹拌した。45℃で Trimethylsilyl chloride (1 mL, 7.5 mmol)を加えて、4 時間撹拌した。反応終了を TLC で確認後、溶媒を減圧留去した後、精製はせず無色固体として化合物 **11** (2.0 g, quant)を得た。



化合物 **11**(1.3 g 2.7 mmol)と化合物 **12** (2.0 g, 3.9 mmol)を dry dichloromethane (15 mL)で溶かして、活性化したモレキュラーシーブス (4.0 g)を加えて-15℃で撹拌した。その後、AgOTf(1.7 g, 6.6 mmol)を Toluene(6 mL)と dry dichloromethane (5 mL)で溶かしたものを加え、一晩撹拌した[59-61]。反応終了を TLC で確認後、triethylamine で中和し、セライト濾過した。塩酸 (50mL)で 3 回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL)で 3 回、brine (50 mL)で 1 回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過で取り除いてから、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（hexan/AcOEt）で精製し、無色個体として化合物 **12** (1.2 g, 45%)を得た。

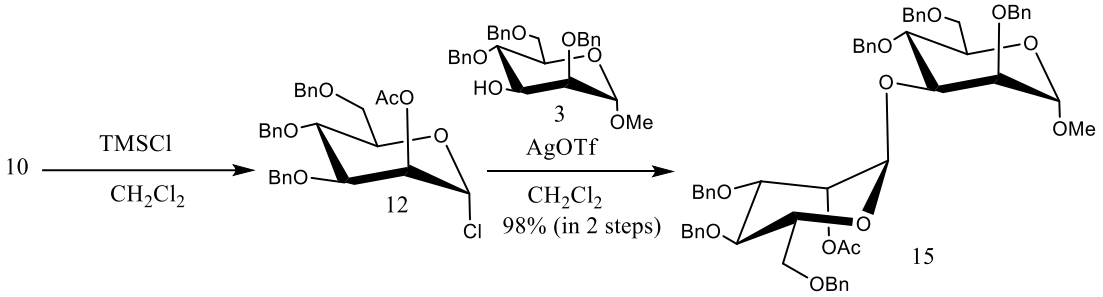


化合物 **13** (1.2 g, 1.2 mmol)を methanol (20 mL)と AcOEt(20 mL)に溶かして、室温で撹拌した。Sodium Methoxide (66 mg, 1.2 mmol)を加えて、室温で一晩撹拌した。反応終了を TLC で確認後、DOWEX™ 50Wx8 50-100 Mesh (H) Cation Exchange Resin で中和し、濾過によって樹脂を取り除いた。その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（hexan/AcOEt）で精製し、白色固体として化合物 **17**(580 mg, 53%)を得た。

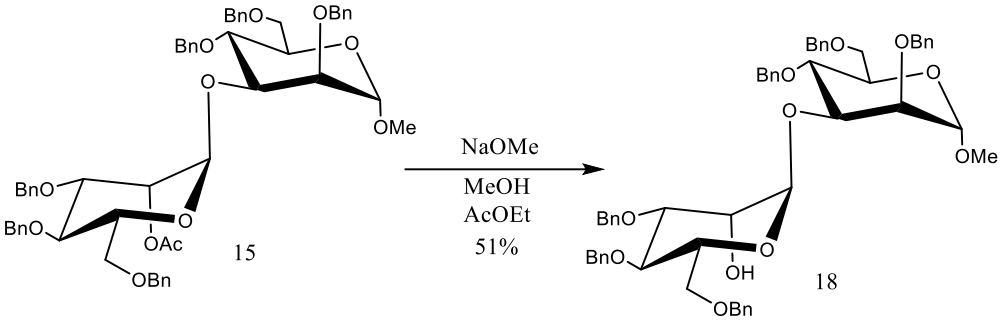


化合物 **16** (580 mg, 0.65 mmol)を methanol (32 mL)で溶かして室温で撹拌した。palladium hydroxide on carbon (580 mg)を加えて室温のまま撹拌した。反応容器内を脱気した後、H_2 置換し、室温で一晩撹拌した。反応終了を TLC で確認後、セライト濾過し、濾液を回収して減圧留去した。残渣をバイオタージは用いず、オープンの逆相カラムクロマトグラフィー(ODS) (H_2O/MeOH)で精製し、白色固体として脱保護体 **14**(126 mg, 55%)を得た。

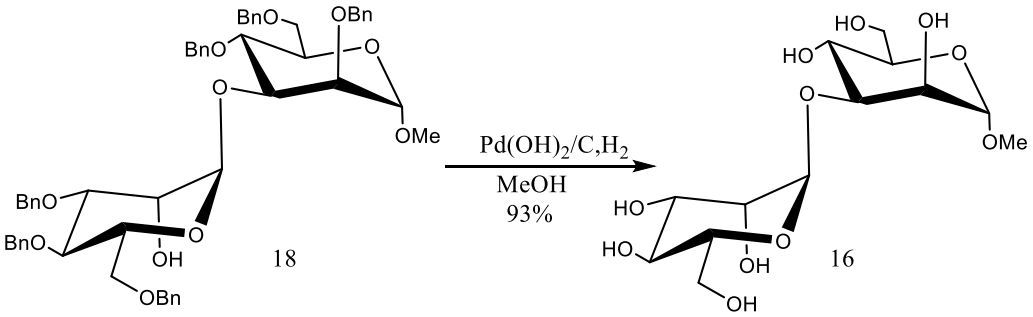
MAN'1-3MAN の合成



化合物 **10** (673 mg,1.3mmol)を dry dichloromethane (30 mL)で溶かして室温で撹拌した。45℃で Trimethylsilyl chloride (1 mL, 7.5 mmol)を加えて、4 時間撹拌した。溶媒を減圧留去した後、活性化したモレキュラーシーブス (2.0 g)と化合物 **3**(700 mg, 3.9 mmol)を加えて dry dichloromethane (5 mL)で溶かして、-15℃で撹拌した。その後、AgOTf(866 mg, 3.2 mmol)を Toluene(5 mL)と dry dichloromethane (5 mL)で溶かしたものを加え、一晩撹拌した[59-61]。反応終了を TLC で確認後、triethylamine で中和し、セライト濾過した。塩酸 (50mL)で 3 回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL)で 3 回、brine (50 mL)で 1 回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過で取り除いてから、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（hexan/AcOEt）で精製し、無色個体として化合物 **15** (1.2 g, 98%)を得た。



化合物 **15** (1.2 mg, 1.2 mmol)を methanol (20 mL)と AcOEt(20 mL)に溶かして、室温で撹拌した。Sodium Methoxide (136 mg, 2.4 mmol)を加えて、室温で一晩撹拌した。反応終了を確 TLC で認後、DOWEX™ 50Wx8 50-100 Mesh (H) Cation Exchange Resin で中和し、濾過によって樹脂を取り除いた。その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（hexan/AcOEt）で精製し、白色固体として化合物 **18**(554 mg, 51%)を得た。

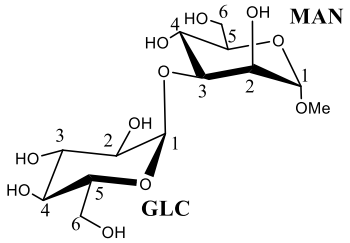


化合物 **18** (554 mg, 0.62 mmol)を methanol (22 mL)で溶かして室温で撹拌した。palladium hydroxide on carbon (554 mg)を加えて室温のまま撹拌した。反応容器内を脱気した後、H_2 置換し、室温で一晩撹拌した。反応終了を確認後、セライト濾過し、濾液を回収して減圧留去した。残渣をオープンの逆相カラムクロマトグラフィー(ODS) (H_2O/MeOH)で精製し、白色固体として脱保護体 **16** (207 mg, 93%)を得た。

GLC1-3MAN、Man1-2Man、及び Man1-3Man の帰属

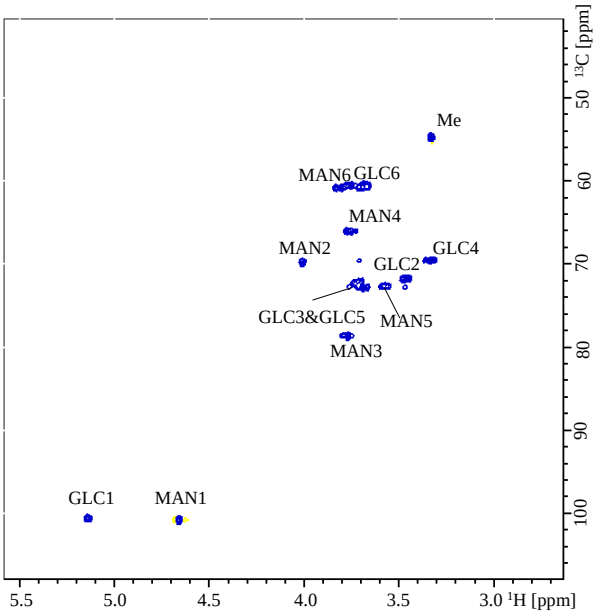
各化合物の同定は重水中で NMR（Bruker Biospin Inc.,AVANCE III 400MHz を用いて行った。精密質量からの組成解析は MALDI-FT-ICR MS(Bruker Biospin Inc., SolariX)を用いた。

GLC1-3MAN の帰属

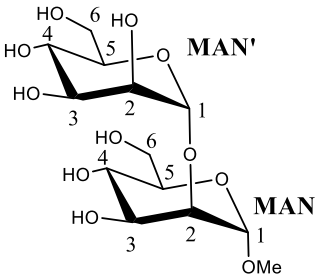


精密質量からの組成解析

$C_{13}H_{24}NaO_{11}[M+Na]^+$ calcd=379.121082
obsd=379.121106

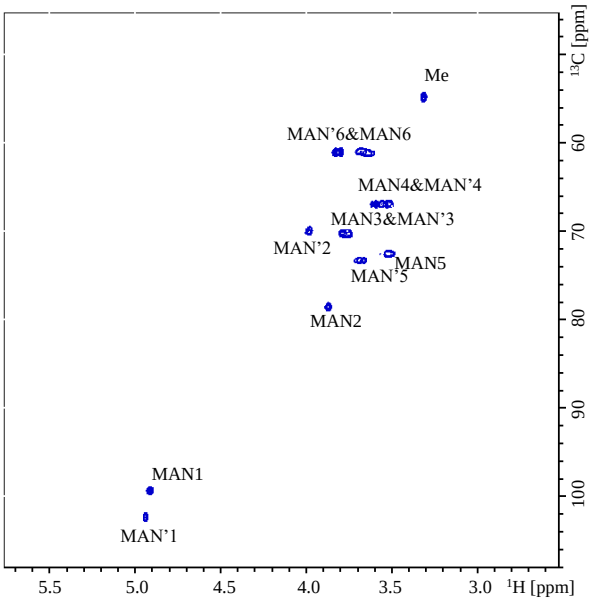


MAN’1-2MAN の帰属

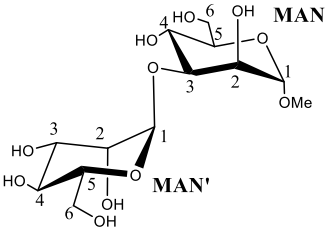


精密質量からの組成解析

$C_{13}H_{24}NaO_{11}[M+Na]^+$ calcd=379.121082
obsd=379.121006

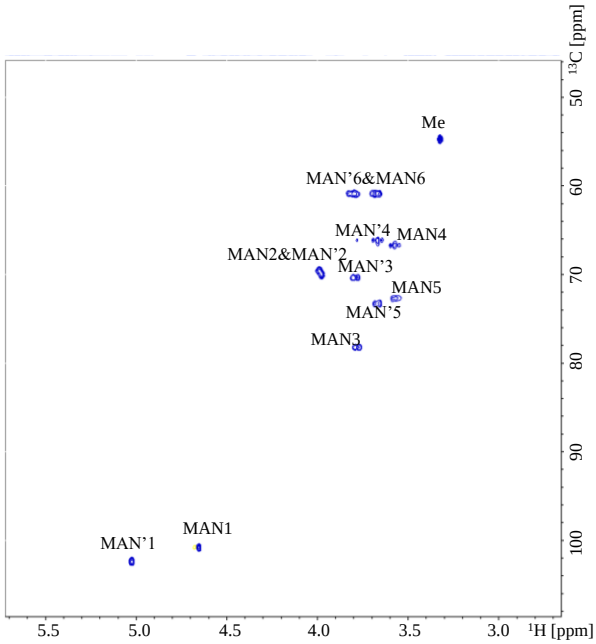


MAN’1-3MAN の帰属



精密質量からの組成解析

$C_{13}H_{24}NaO_{11}[M+Na]^+$ calcd=379.121082
obsd=379.121033



NMR 計測

NMR 計測を実施した、GLC1-3MAN、MAN’1-2MAN、及び MAN’1-3MAN の各試料は、それぞれ、凍結乾燥後、冷却したエタノールとアセトンによる洗浄を施して使用した。

NMR スペクトルは Bruker Avance III 500 spectrometer または、Bruker Avance III 800 spectrometer で記録し，Bruker TopSpin ソフトウェアで解析した。

同位体シフト観測のため、各 2 糖（200 mM）を体積比で 15% H_2O，15% D_2O，70% DMSO-d_6 の混合溶媒に溶かした。^{1}H NMR スペクトルは，303K で 30°フリップアングルパルス，16 スキャン，緩和待ち時間 1.0 s の条件で記録した。^{1}H の分解能は 0.1Hz に設定し，得られたデータは 0.05Hz のスペクトル分解能になるようにゼロフィリングを施した。^{1}D ^{13}C NMR 測定は、パワーゲートデカップリングを用いた 30 度フリップアングルパルスで行った。^{13}C NMR スペクトルは、303K から 353K まで 10℃ごとに 8 スキャン、緩和待ち時間 2.0 s で記録した。^{13}C デジタル分解能は 1.0 Hz に設定し、得られたデータはゼロフィリングなしで処理した。^{1}H と ^{13}C の両データは exponential multiplication window を適用してフーリエ変換した。

DOSY 測定では，各 2 糖（200 mM）を 30% (v/v) H_2O および DMSO-d_6 の混合溶媒に溶解させた。両極性勾配を持つ刺激スピンエコーシークエンスによる DOSY 実験は、勾配強度を 2%から 95%まで 32 ステップで変化させ、拡散時間(⊿)と勾配長をそれぞれ 100 ms と 3.6 ms で行った。DOSY データ処理は CONTIN 法で行った。

水酸基の温度応答性の解析では、各 2 糖（50 mM）を体積比で 2% H_2O, 98% DMSO-d_6 の混合溶媒に溶かした。^{1}H NMR スペクトルは、Bruker Avance III 800 spectrometer を用いて、293 K から 323 K まで 10℃ごとに 30°フリップアングルパルス，16 スキャン，緩和待ち時間

1.0 s の条件で記録した。^{1}H の分解能は 0.1Hz に設定し，得られたデータは 0.05Hz のスペクトル分解能になるようにゼロフィリングを施した。なお、グラフの作成には OriginPro 2020b を使用し、293 K を基準として各温度とのケミカルシフトの差をプロットした。

・分子動力学シミュレーション

NTP アンサンブルでの MD シミュレーションは，GLYCAM06EP 力場 [38] と AMBER20 プログラムパッケージ [39] を用い、JAIST 情報社会基盤研究センターの大型計算機を利用して実施した．初期構造は GLYCAM-Web (http://glycam.org)を用いて作成した。トポロジーファイルは、tLeap モジュールを用いて作成した。溶媒層には TIP5P の水モデルと DMSO 分子を追加した[49]。 GLC1-3MAN、MAN'1-2MAN、及び MAN'1-3MAN はそれぞれ 1,014 個の水と 1,092 個の DMSO、1,097 個の水と 1,047 個の DMSO、1,032 個の水と 1,005 個の DMSO を配置し計算を行った。

すべての MD シミュレーションは、周期境界条件下で pmemd モジュールを使用しました。本計算の前に、最急降下法を用いてエネルギー最小化を行った。その後，NPT アンサンブル（P = 1 atm，T = 300 K）で，初期速度をランダムにした 60ns シミュレーションを行った。単位時間ステップは 2.0fs で設定し、水素原子を含む結合は SHAKE アルゴリズムで拘束した。静電相互作用は粒子メッシュ Ewald 法で扱い、非結合相互作用のカットオフ距離を 12.0Å に設定した。

計算結果の解析は CPPTRAJ モジュールを用いて行った。各 2 糖について、最初の 10ns の部分を除いた 3 つのトラジェクトリーを 1 つにまとめた。そして、結合されたトラジェクトリーから 3,000 個のコンフォーマーを抽出した。水素結合の解析は、アクセプター(A)-ドナー(D)距離(3.0Å)と A-H-D 角度(100°)をカットオフとする単純な幾何学的基準で行った。

レプリカ交換 MD シミュレーションは、GLYCAM06 力場と TIP3P 水モデルを用いて実施した。MAN'1-3MAN と MAN'1-2MAN は、それぞれ 1,615 個と 1,713 個の水を配置し計算を行った。

シミュレーションの実行には pmemd モジュールを使用した。本計算の前に最急降下法を用いてエネルギーを最小化し、NPT アンサンブル（P = 1 atm，T = 300 K）で 2 ns、NVT アンサンブルで 2 ns のシミュレーションを行なった。続いて 300-500 K の温度を割り振った 64 レプリカを用いて平衡化した後、NVT アンサンブルで 60 ns シミュレーションを行った。単位時間ステップは 2.0 fs で設定し、レプリカ間の交換判定は 1,000 ステップ毎に実施した。水素原子を含む結合は SHAKE アルゴリズムで拘束し、周期境界条件下、静電相互作用は粒子メッシュ Ewald 法で扱い、非結合相互作用のカットオフ距離を 12.0Å に設定した。

計算結果の解析は CPPTRAJ モジュールを用いて行った。300 K のデータを統合し、 最初の 10 ns の部分を除いたトラジェクトリーから 25,000 個のコンフォーマーを抽出して二面角の解析に用いた。グリコシド結合の二面角は、φ=O5-C1-O'x-C'x、ψ= C1-O'x-C'x-C'x–1 で定義した。

第４章 水による糖鎖の立体構造制御

4-1. 緒言

一般に、糖鎖は、内部運動の自由度に富むグリコシド結合によって糖残基が連結しており、その立体構造は溶液中で揺らいでいる。これに加え、六員環の配座や、核酸・ペプチドとは異なる分岐構造によって、種々の運動が複雑に関係し、多様なコンフォメーションを生み出す。したがって、糖鎖が関与する分子間相互作用においては、糖鎖の運動性が分子間の結合や解離といった相互作用の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。実際に、白血球を炎症部位へ輸送するメカニズムに関係するシアリルルイス X 糖鎖とそれを認識するタンパク質セレクチンでは、シアリルルイス X 糖鎖のコア構造であるルイス X 型糖鎖の運動性がシアリルルイス X 糖鎖とセレクチンの親和性に影響を与えることが報告されている[2,3]。ルイス X 型糖鎖は、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)にガラクトース(Gal)とフコース(Fuc)が結合した分岐型 3 糖である。ルイス X 糖鎖の運動性には、各糖残基の化学構造に加え、GlcNAc を起点とする分岐構造が大きく関わっていると考えられる。この特徴的な分岐構造により、ルイス X 糖鎖の 3 つの残基間には、立体障害や疎水性相互作用、水素結合といった残基間相互作用が強く働き得る[8,9,64,65]。これらの相互作用を通して、糖残基毎の運動が互いに連動し、溶液中のルイス X 糖鎖のコンフォメーションが制御される。しかしながら、疎水性相互作用や水素結合の相互作用は、溶媒和の影響を強く受けると考えられる。そこで、ルイス X 糖鎖とガラクトース(Gal)残基をグルコース(Glc)及びマンノース(Man)に置換した立体異性体を用いて、分岐構造の違いによる運動性の違いを水溶液中と有機溶媒中の両方で調べた(図 4-1)。

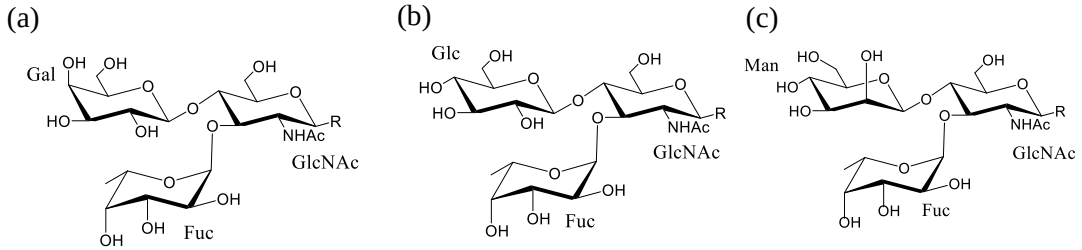


図 4-1. ルイス X 糖鎖と立体異性体

(a)ルイス X 糖鎖, (b)グルコース置換体, (c)マンノース置換体

4-2. ルイス X 糖鎖の緩和解析

ルイス X 糖鎖及びその立体異性体のコンフォメーションの違いを調べるために、NMR 現象による緩和を用いて、糖残基単位でのダイナミクスを評価した。NMR の緩和には縦緩和と横緩和があるが[66]、本研究では、横緩和に注目し、緩和時間の逆数である緩和速度定数(R_2)を算出した。R_2 値は分子の立体構造の変化と相関があり、その関係はコンフォメーショ

ン変化の頻度の増加に伴い、R_2 値が増加するというものである[67]。故に、対象残基の R_2 値を調査することで、糖残基毎の運動性を評価できると考えられる。

糖鎖の NMR 解析ではピークの縮重が起こり、解析が困難となることがある。そこで、ルイス X 糖鎖及び一連の立体異性体の NMR 信号の帰属を行った。帰属には HSQC、HMBC、COSY、HSQC-TOCSY、HMQC-CSOSY の 4 種類の測定法を用いた。帰属の結果、縮重のないアノマー位を対象に解析を行うことを考えた(図 4-2)。

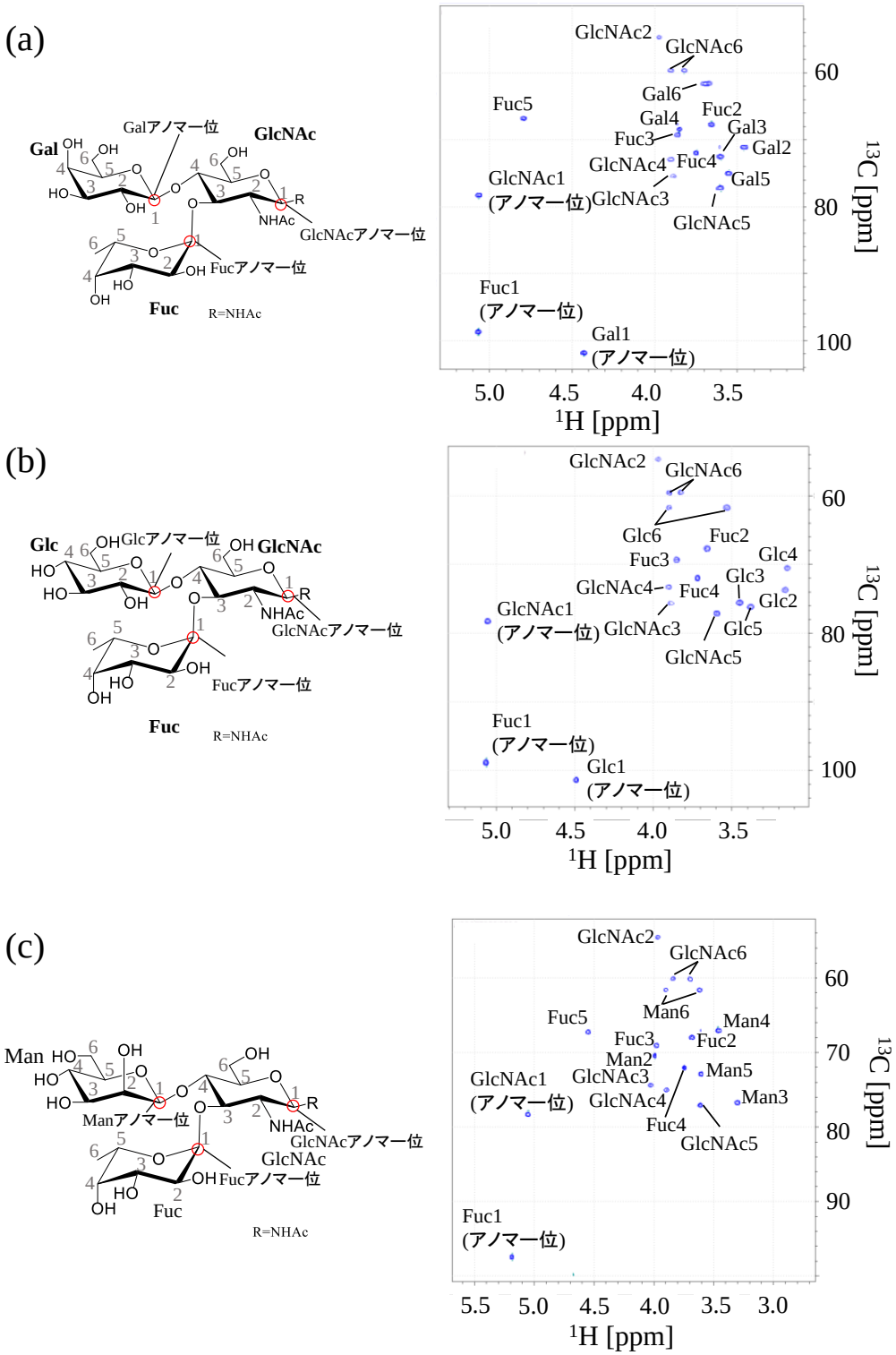
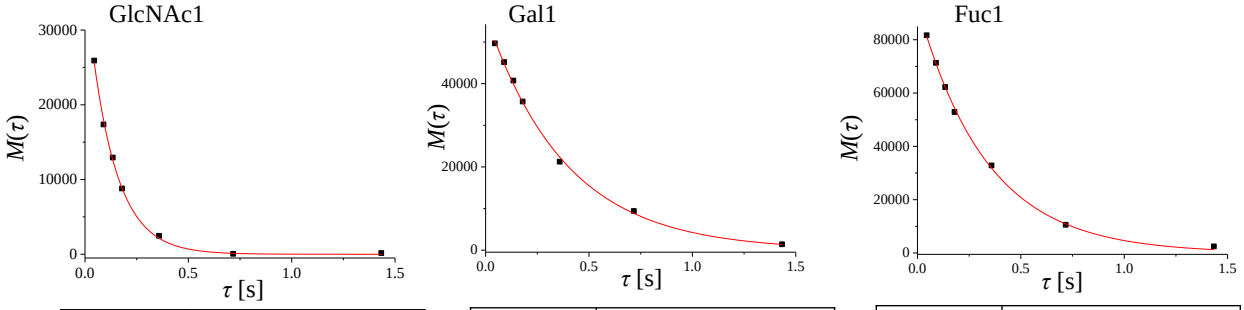


図 4-2. 各糖鎖試料の HSQC スペクトル

(a) ルイス X 糖鎖, (b) Glc の立体異性, (c) Man の立体異性体

緩和測定では、CPMG 法[45]を用いて、各試料 6 mM の D_2O 溶液(600 μL)で測定した。パルスプログラムは hsqct2etgpsi3d.2 を使用し、信号強度を $M(\tau)$として、指数関数$M(\tau) = M(0)exp(-R_2'\tau)$ (τ：時間)[67]の式にフィッティングさせて、R_2'を導いた。さらに、上記の測定を各試料 3 回ずつ行い(図 4-3)、フィッティング誤差の逆数の 2 乗を荷重とし、R_2'の荷重平均[68] R_2を求め、解析に使用した。

ルイス X 糖鎖の各残基のR_2値を求めたところ(図 4-4)、各残基毎に異なる値を示すことから、緩和測定による糖残基毎の解析は可能だと考えた。



測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	7.4 ± 0.3
2回目	7.9 ± 0.2
3回目	7.3 ± 0.3

測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	2.59 ± 0.08
2回目	2.61 ± 0.12
3回目	2.60 ± 0.06

測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	3.07 ± 0.09
2回目	2.99 ± 0.08
3回目	2.69 ± 0.15

図 4-3. フィッティング曲線とR_2'値

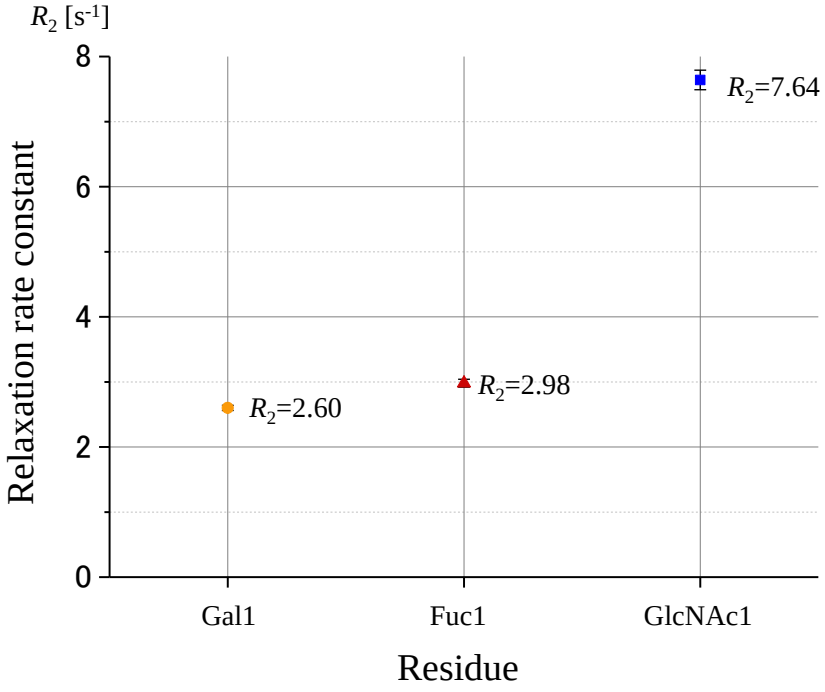


図 4-4. ルイス X 糖鎖における各残基の緩和速度定数(R_2)

4-3. 水中でのコンフォメーションの比較

3 種類の試料の共通構造である *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基とフコース(Fuc)残基に対して、水溶液中でのR_2値を求め、その結果を下記に示す(図 4-5)。GlcNAc 残基と Fuc 残基それぞれで、各試料のR_2値を比較したところ、ルイス X 糖鎖と Gal→Man 置換体の GlcNAc 残基で有意な差が生じた。一方、Fuc 残基では、各試料で有意な差は表れなかった。糖鎖の運動には、グリコシル結合の回転や六員環の配座変化が考えられるが、GlcNAc のアノマー位がグリコシル結合の接合部分から遠いことを考えると、GlcNAc 残基のR_2値に生じた差は GlcNAc 環配座の時間的変化が関係していると考えられる。

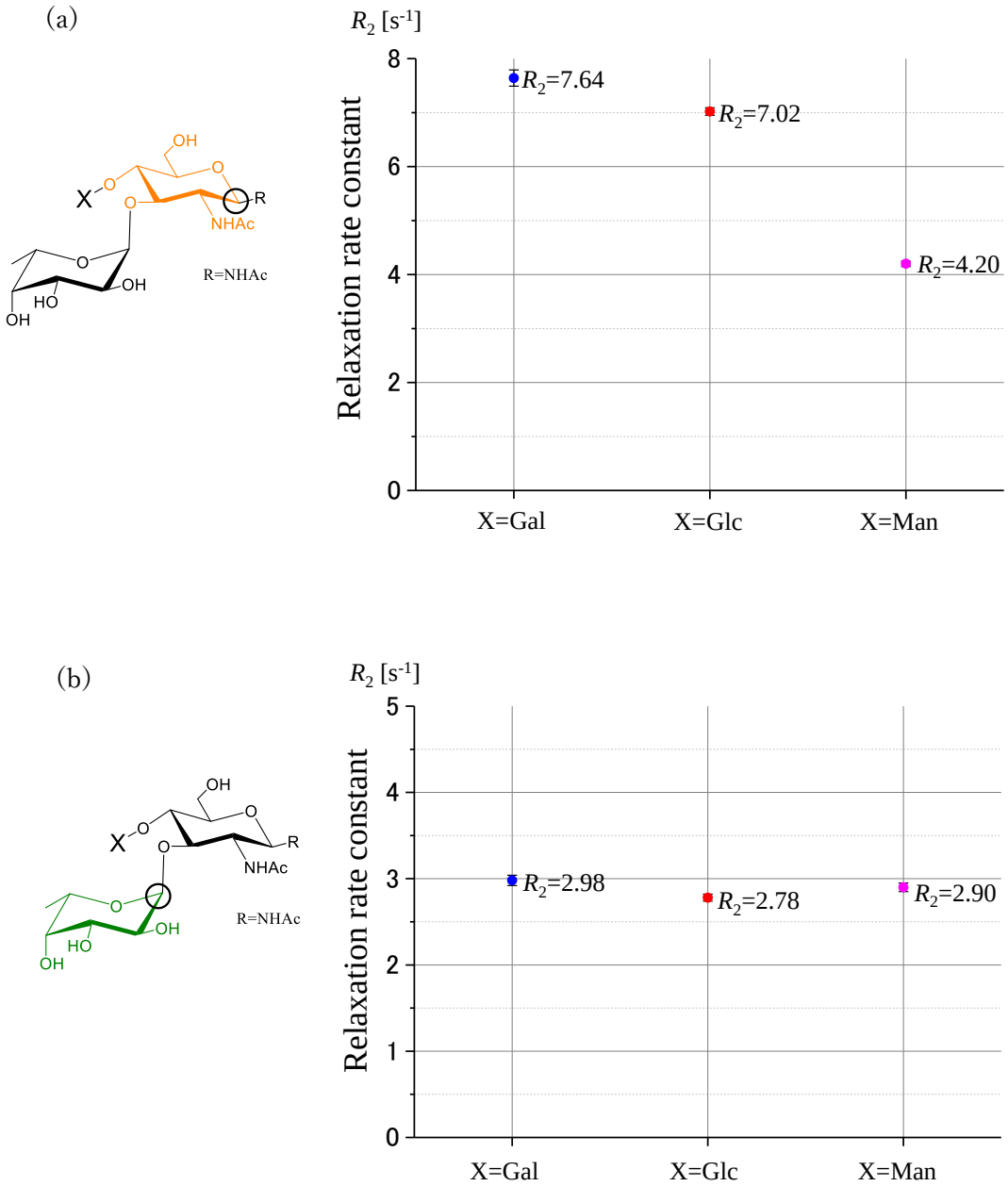


図 4-5. 各試料の共通構造についての緩和速度定数(R_2)

(a) GlcNAc 残基の緩和速度定数(R_2)

(b) Fuc 残基の緩和速度定数(R_2)

R_2値の違いが大きかった Gal→Man 置換体について、GlcNAc 残基の環配座の情報を反映するスピン結合定数($^3J_{HH}$)を調べた結果、ルイス X 糖鎖と有意な違いが確認された(図 4-6)。これらの NMR 解析から、分岐構造の違いによって GlcNAc 環配座のパッカリングに影響が出る事が示唆された。

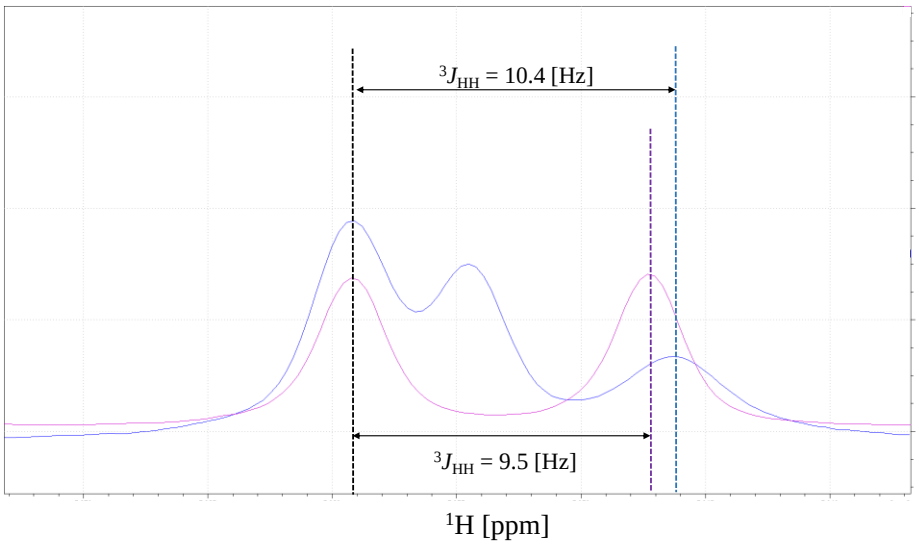


図 4-6. GlcNAc 残基のアノマー位におけるルイス X 糖鎖(青)とマンノース(Man)の立体異性体(紫)のスピン結合定数($^3J_{HH}$)

また、MD シミュレーションを用いて、GlcNAc 環の配座変化を調査した。MD 計算のプログラムパッケージは Amber20 を、力場のパラメータは糖鎖用に GLYCAM_06 を、水分子に TIP5P モデルを用いた。各糖鎖の GlcNAc 残基に対し、パッカリングの指標を表す Cremer and Pople のパラメータである θ [°]の時間変化を調べた[70,71]。そのグラフを下記に示す(図 4-7)。計 660 ns のシミュレーションデータを解析した結果、いずれの糖鎖でも GlcNAc 環のパッカリングが低頻度で生じていた。さらにマンノース置換体では他の二種類の糖鎖に比べ、環のコンフォメーションの舟型を示す θ=100°付近や、イス型 $^1C_4$ 配座を示す θ=180°への遷移が多く見られた。したがって、MD 計算による解析においても、分岐鎖の違いは、GlcNAc 環配座の時間的変化に影響を与えるという結果を得た。

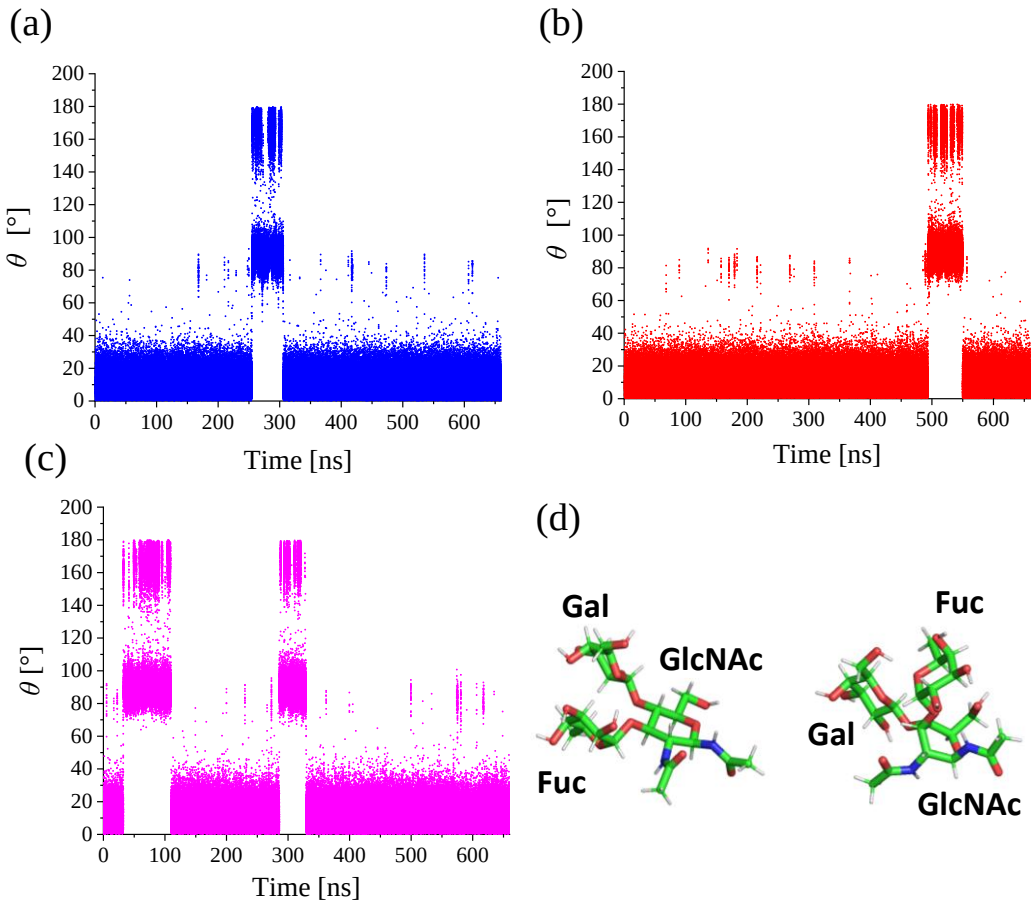


図 4-7. Cremer and Pople のパラメータ θ の時間変動

(a)ルイス X 糖鎖の解析結果，(b)Glc の立体異性体の解析結果，

(c) Man の立体異性体の解析結果

(d)環配座の変化によって誘起されるコンフォメーション変化

GlcNAc 環のパッカリングは分岐鎖の糖残基間の相互作用が影響していると考え、Fuc 残基を持たない 2 糖構造(図 4-8)の緩和測定を重水中で行った。その結果を下記に示す(図 4-9)。

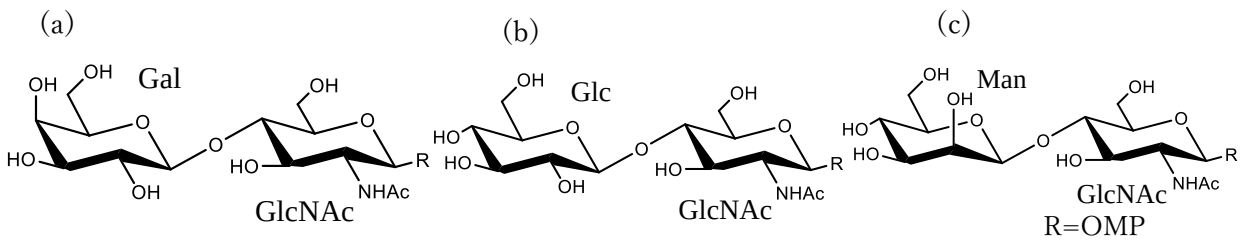


図 4-8. フコースによる分岐鎖を持たない 2 糖構造

(a)ガラクトース-*N*-アセチルグルコサミン, (b)グルコース置換体, (c)マンノース置換体

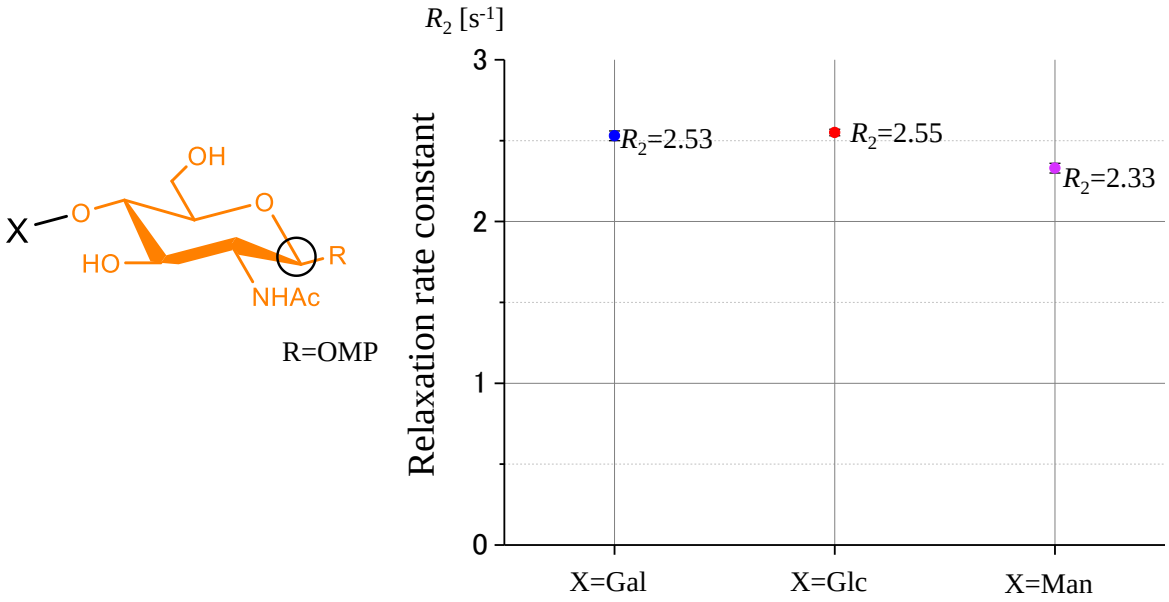


図 4-9. 各試料の GlcNAc 残基についての緩和速度定数(R_2)

分岐鎖を持つ場合、配列の違いによって GlcNAc 残基の R_2 値に有意な差が生じた。一方で、分岐鎖を持たない場合は、各試料の R_2 値に大きな違いは確認できず、GlcNAc 環の摂動は起こっていないと考えられる。このことから、ルイス X 糖鎖のコンフォメーションには、分岐鎖の Gal および Fuc 残基が重要であることが示された。

4-4. コンフォメーションに対する溶媒効果

水溶液中の MD シミュレーション結果から、各糖鎖の分岐鎖間を水分子が架橋する頻度を見積もった。その結果は、それぞれ、ルイス X 糖鎖の Gal-Fuc 間は 22.3%、グルコース置換体（Glc-Fuc 間）では 21.5%、マンノース置換体（Man-Fuc 間）では 24.3%となっており、大きな違いは見られなかった。

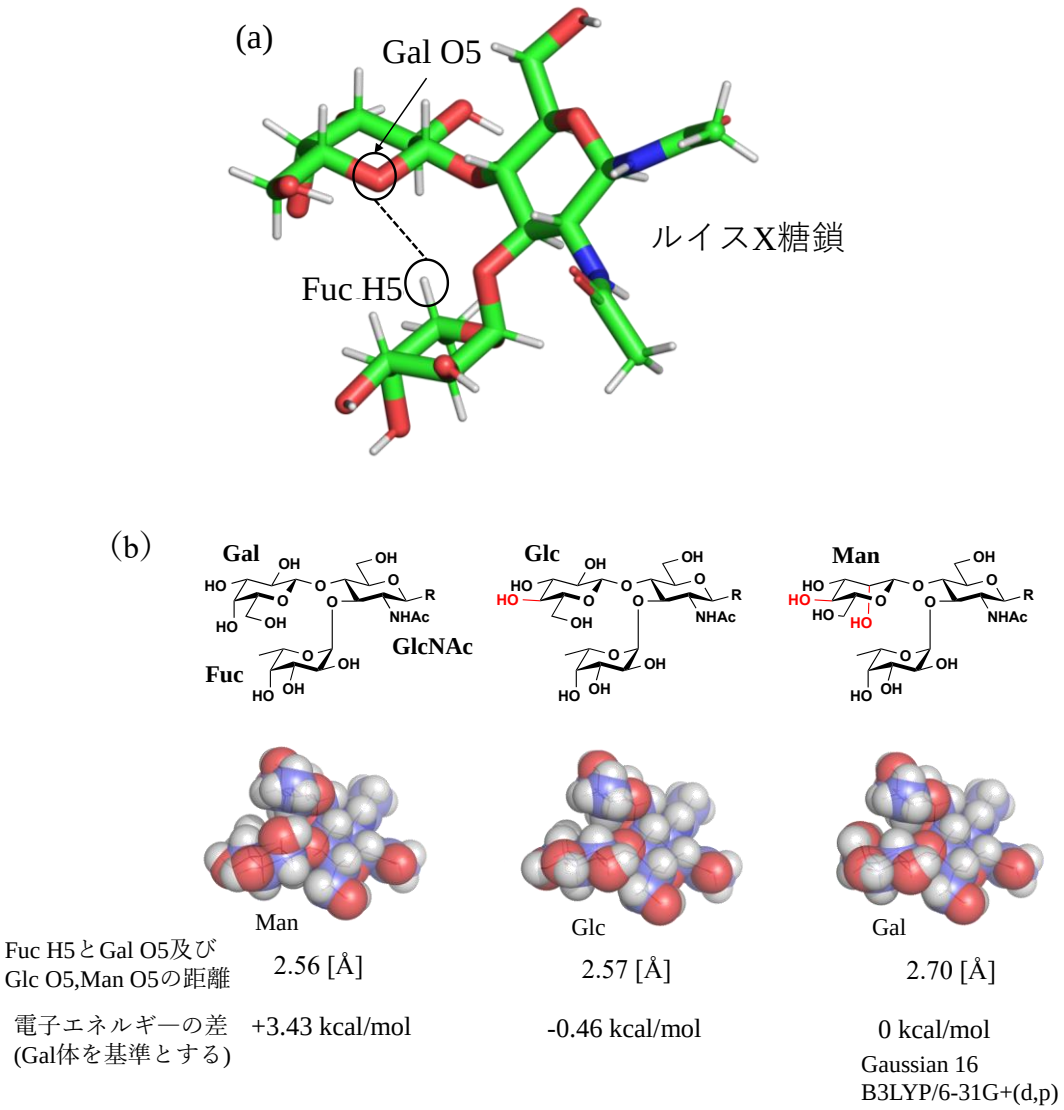


図 4-1. 量子化学計算により得られた分岐鎖間の距離

(a)Fuc H5-Gal O5 の位置

(b) Fuc H5 と Gal O5 及び Glc O5,Man O5 の距離と
ガラクトース体を基準とした電子エネルギーの差

量子化学計算を用いて、各糖鎖の最安定構造を求めた。その際、水素結合の形成が報告されている Fuc H5 と GalO5、またはその置換残基である Glc および Man 残基の O5 の距離を調べたところ、ルイス X 糖鎖では 2.56 Å、Glc 置換体では 2.57 Å、 Man 置換体では 2.70 Å であり、残基間の距離が同じでないことが分かった(図 4-1)。また Man 置換体で分岐鎖間の距離が異なるのは、マンノース 2 位のアキシャル結合の水酸基による立体障害のためと考えられた。このような安定構造の違いにより、分岐鎖間に働く相互作用の強さが異なり、各試料で GlcNAc 環の摂動に違いを生じさせていると予想される。

ルイス X 糖鎖では、Gal 残基と Fuc 残基がよくパッキングしており、そのため立体構造には、分岐鎖間に生じる疎水性相互作用や水素結合が強く影響していると予想される。そこで、立体構造と水との関わりの理解を深めるために、各糖鎖のメタノール中での NMR 解析を行った。一般に、有機溶媒中では水素結合は強くなり、疎水性相互作用は弱くなる。そのため、有機溶媒中ではルイス X 糖鎖の運動性は変化すると考えられる。そこで、重メタノール中で緩和解析を行い、各試料の重水溶液中の R_2 値との差 ΔR_2 を取ったところ、ルイス X 糖鎖及び Glc 置換体は、Man 置換体に比べ、ΔR_2 値が大きいという結果を得た(図 4-10)。いずれも R_2 値は小さくなっており、水中では GlcNAc 環配座の時間的変化がより少なかった 2 つの糖鎖で ΔR_2 値が大きかったことから、メタノール溶液中では、GlcNAc 環のパッカリングが頻繁になることが分かった。すなわち有機溶媒中では、分岐鎖間に生じる疎水性相互作用が弱まったことにより、水溶液中に比べ、GlcNAc 環の配座変化が激しくなると考えれる。以上の結果から、ルイス X 糖鎖のコンフォメーションは、Gal-Fuc 残基間の疎水性相互作用により制御されていることが示唆された。

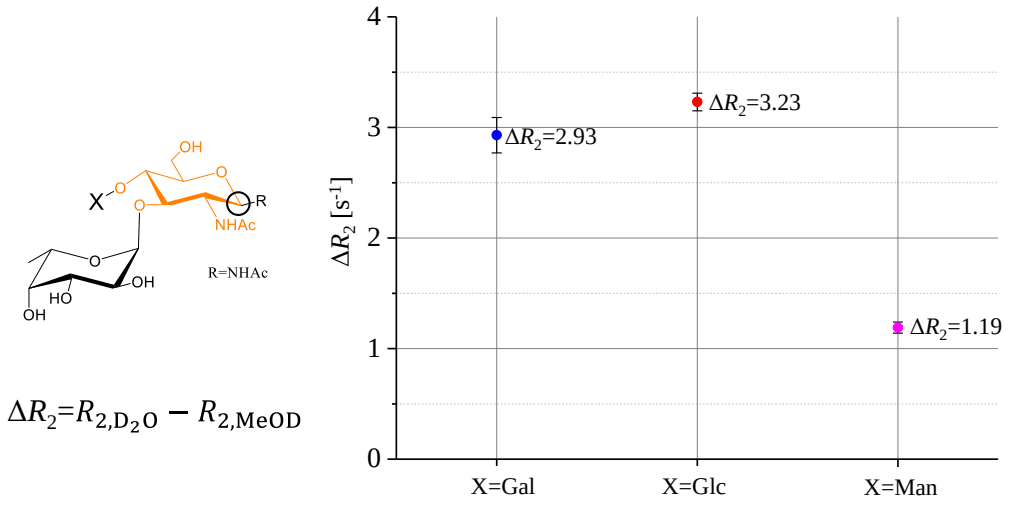


図 4-10. 各試料の重水溶液中と重メタノール溶液中の緩和速度定差(ΔR_2)

4-5. 結言

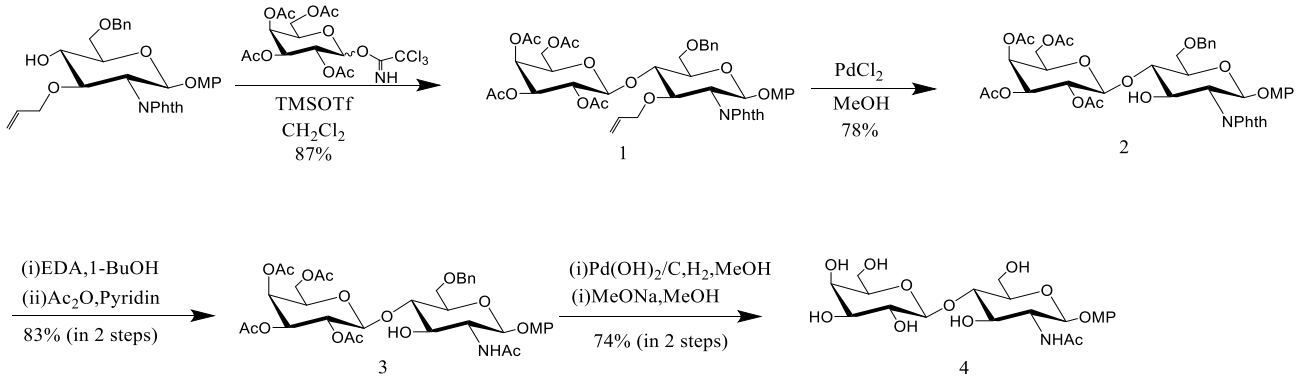
本章では、水による糖鎖への影響も糖鎖の生命機能に影響を与えると考え、水が糖鎖の立体構造に与える影響を考察した。ルイス X 糖鎖を対象として、水溶液中での糖鎖の立体構造ダイナミクスを明らかにした。ルイス X 糖鎖及びその立体異性体に対し、NMR 緩和時間測定により、糖残基毎の運動性を調べた。2 次元 ^{1}H-^{13}C HSQC スペクトルを基に、ピークの縮重がない糖残基のアノマー位における横緩和速度（R_2）値を算出した。その結果、分岐の共通コア構造である N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）残基の R_2 値に有意な差を生じる事が分かった。さらにスピン結合定数の計測や分子動力学計算による解析を行ったところ、分岐構造の違いに伴い、GlcNAc 環配座のダイナミクスが大きく変化することを明らかにした。一方、このような GlcNAc 残基への摂動は、Fuc 残基の分岐を持たない 2 糖構造では見られなかった。このことから、分岐鎖間の相互作用が GlcNAc 環の変形によるコンフォメーション変化を誘起することを示すことができた。そこで、水による相互作用の影響を明らかにしようと考え、有機溶媒中での一連の糖鎖の NMR 解析を実施した。その結果、メタノール中で構造の安定性が変化することが分かった。このことから、糖残基間に生じる疎水性相互作用が、その立体構造制御に重要であることが示唆された。以上のように、緩和解析や分子動力学計算を用いることにより、水によって安定化される、糖鎖中の六員環の変形による立体構造の変化を明らかにすることができた。

4-6. 実験項

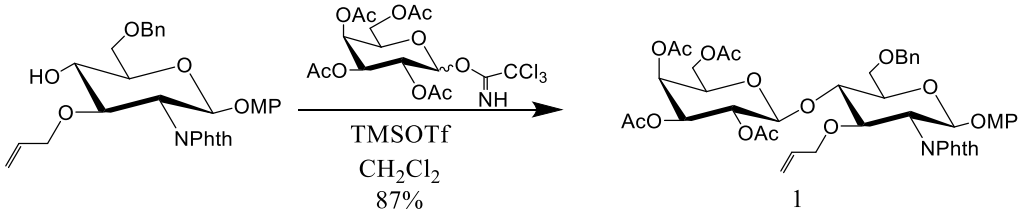
ルイス X 糖鎖および Glc 置換体、Man 置換体の各種三糖は、岡崎統合バイオサイエンスセンター(現 青森大学 薬学部 助教)・鈴木達也博士より合成試料を提供していただいた。

Gal-GlcNAc、Glc-GlcNAc、Man-GlcNAc の各 2 糖は、以下のスキームに従って合成した。各化合物の同定は NMR（Bruker Biospin Inc.,AVANCE III 400MHz）、MALDI-TOF-Mass(Bruker Biospin Inc., microflex)を用いて行った。

Galβ1-4GlcNAcβ-MP の合成

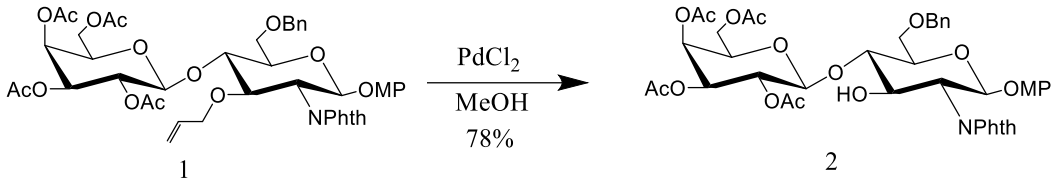


まず、市販の4-methoxyphenyl-3-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosideと2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-galactopyranosyl-2,2,2-trichloroacetimidateをシュミットグリコシル化反応によりカップリングし化合物**1**を得た[71]。これを塩化パラジウムで処理することで*N*-アセチルグルコサミンの4位を選択的に脱保護し化合物**2**を得た。その後、フタロイル基の除去、アセチル化を行い、化合物 **3**を得た。そして、$Pd(OH)_2$/Cを用いて、ベンジル基の除去を行った。その後、ナトリウムメトキシドでアセチル基の除去を行うことで、Galβ1-4GlcNAcβ-MP **4**を得た。

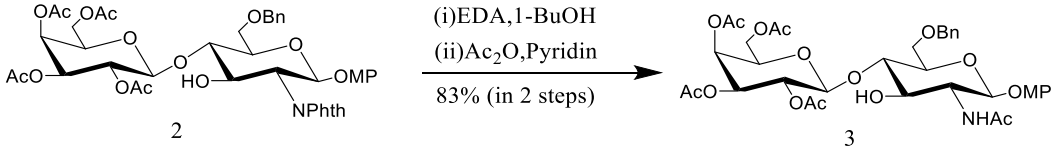


dry dichloromethane (100 mL)中、0℃で4-methoxyphenyl-3-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranoside(4 g, 7.3 mmol) 、2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-galactopyranosyl-2,2,2-trichloroacetimidate(3.6 g, 7.3 mmol)を活性モレキュラーシーブス(5.0 g)とともに30分撹拌し十分に脱水した後、-10℃でTMSOTf(44 μL, 0.24 μmol)を加えさらに2時間撹拌した。

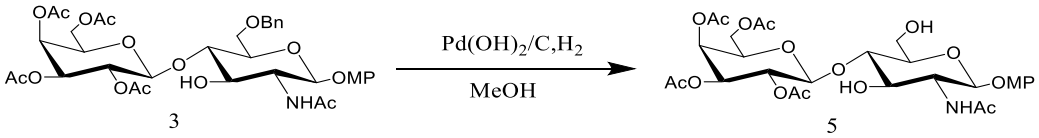
モレキュラーシーブスを減圧濾過で取り除き、濾液をトリエチルアミンで中和した。その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt =90:10 to 0:100)により精製し、白色固体として化合物 1 (5.6 g, 87 %.)を得た。



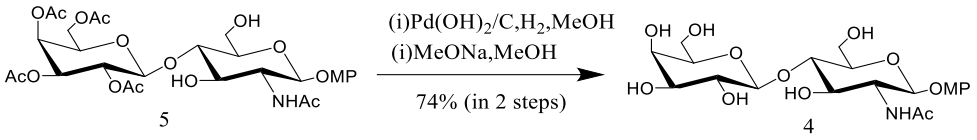
methanol (11 mL)中、化合物 **1**(500 mg, 0.57 mmol)を1時間撹拌し、塩化パラジウム(30 mg, 0.57 mmol)を加えさらに2時間撹拌した。塩化パラジウムを濾過で取り除き、その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt)により精製し、白色固体として化合物 **2** (370 mg, 78 %.)を得た。



1-butanol (14 mL)中、85 ℃で化合物 2 (370 mg, 0.44 mmol)と過剰量のethylenediamine(446 μL)を一晩撹拌した。その後、溶媒を留去し、過剰量のacetic anhydride(5 mL)、pyridine(5 mL)を加え、50℃に加熱し一晩撹拌した。溶媒を取り除いた後、クロロホルムで希釈し有機層を塩酸、炭酸水素ナトリウム水溶液、brineで洗浄、硫酸ナトリウムで脱水した。その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt)によって精製し、白色固体として化合物 **3** (292 mg, 83%)を得た。

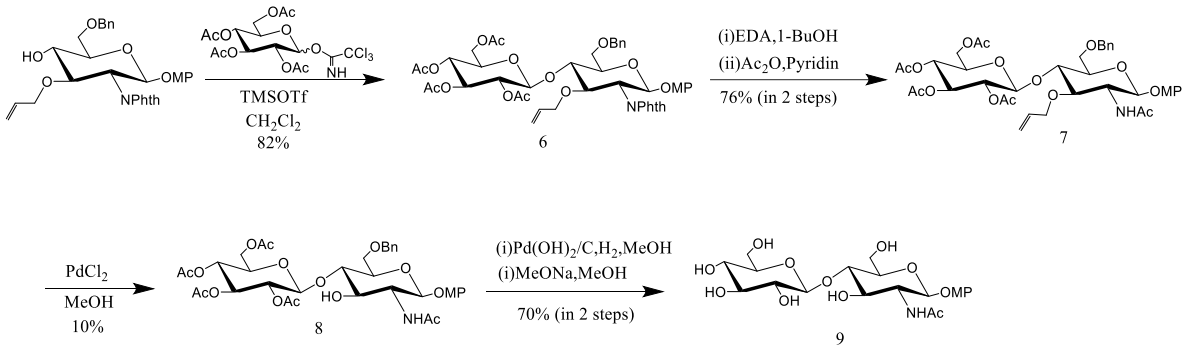


水素雰囲気下、methanol (37 mL)中で、化合物 **3** (292 mg, 0.37 mmol)、$Pd(OH)_2/C$ (292 mg)を一晩撹拌した。$Pd(OH)_2/C$ を濾過によって取り除いた。その後溶媒を減圧留去し、残渣は精製せず、次の反応に移行した。

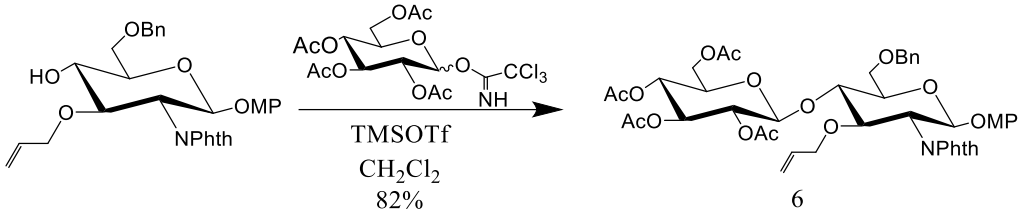


methanol (7 mL)中で、化合物 **5** (240 mg, 0.34 mmol)、ナトリウムメトキシド(19 mg, 0.34 mmol)を 6 時間撹拌した。イオン交換樹脂で中和後、溶媒を減圧留去した。その後、残渣をカラムクロマトグラフィー(ODS, H_2O: MeOH)により精製し、白色固体として Galβ1-4GlcNAcβ-MP **4** (124 mg, 73%)を得た。

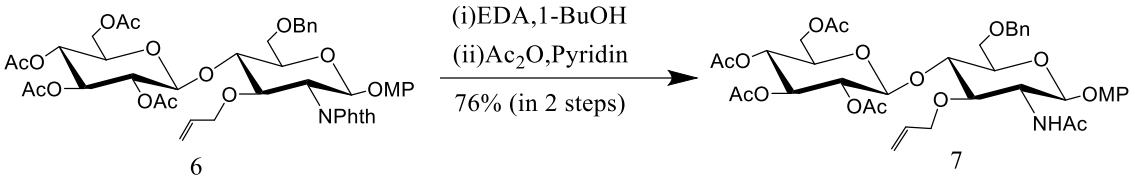
Glcβ1-4GlcNAcβ-MP の合成



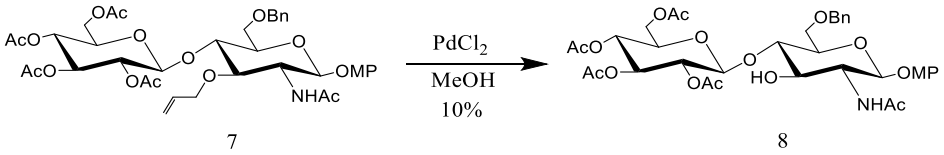
まず、市販の4-methoxyphenyl-3-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosideと2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl-2,2,2-trichloroacetimidateをシュミットグリコシル化反応によりカップリングし化合物 **6**を得た。その後、フタロイル基の除去、アセチル化を行い、化合物 **7**を得た。これを塩化パラジウムで処理することで*N*-アセチルグルコサミンの4位を選択的に脱保護し化合物 **8**を得た。そして、$Pd(OH)_2$/Cを用いて、ベンジル基の除去を行い、その後、ナトリウムメトキシドでアセチル基の除去を行うことで、Glcβ1-4GlcNAcβ-MP **9**を得た。



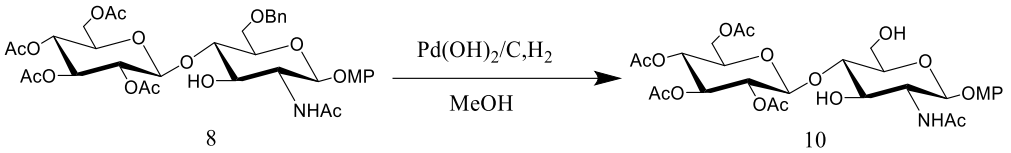
dry dichloromethane (50 mL) 中、0℃で 4-methoxyphenyl-3-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranoside(2 g, 3.7 mmol) 、2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl-2,2,2-trichloroacetimidate(1.8 g, 3.7 mmol)を活性モレキュラーシーブス(2.0 g)とともに30分撹拌し十分に脱水した後、-10℃でTMSOTf(22 μL, 0.12 μmol)を加えさらに2時間撹拌した。モレキュラーシーブスを濾過で取り除き、濾液をトリエチルアミンで中和した。その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt)により精製し、白色固体として化合物 **6** (2.6 g, 82 %.)を得た。



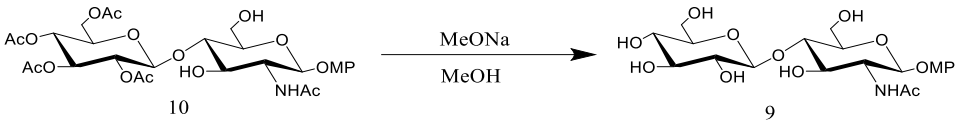
1-butanol (61 mL)中、85 ℃で化合物 **6** (1.6 g, 1.9 mmol)と過剰量のethylenediamine(4 mL)を一晩撹拌した。その後、溶媒を留去し、過剰量のacetic anhydride(20 mL)、pyridine(20 mL)を加え、50℃に加熱し一晩撹拌した。溶媒を取り除いた後、クロロホルムで希釈し有機層を塩酸、炭酸水素ナトリウム水溶液、brineで洗浄、硫酸ナトリウムで脱水した。その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt)によって精製し、白色固体として化合物 **7** (1.1 g, 76%)を得た。



methanol (10 mL)中、化合物 **7**(400 mg, 0.51 mmol)を1時間撹拌し、塩化パラジウム(27 mg, 0.15 mmol)を加えさらに2時間撹拌した。塩化パラジウムを濾過で取り除き、その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt)により精製し、白色固体として化合物 **8** (38 mg, 10 %.)を得た。

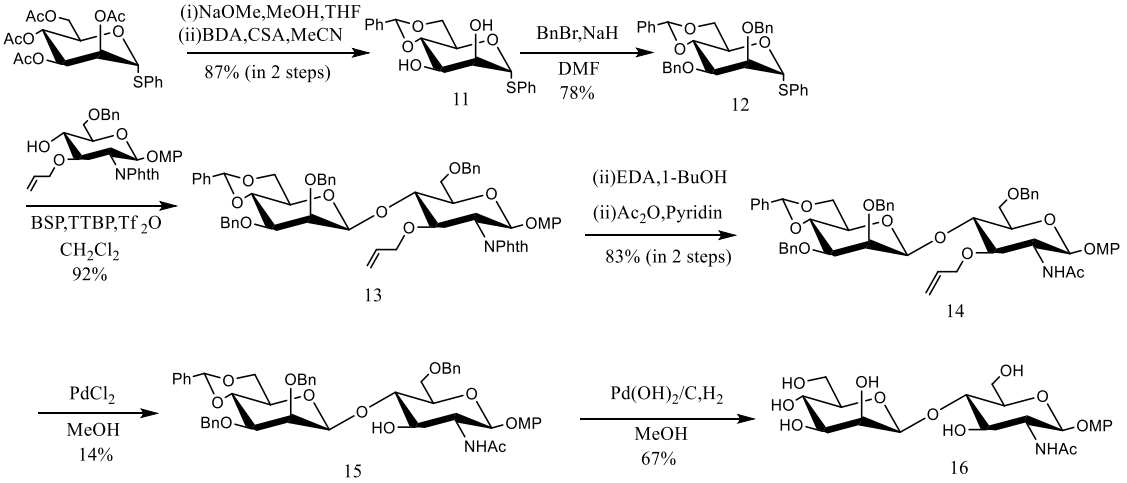


水素雰囲気下、methanol (5 mL)中で、化合物 **8** (38 mg, 0.051 mmol)、$Pd(OH)_2/C$ (38 mg)を一晩撹拌した。$Pd(OH)_2/C$ を濾過によって取り除いた。その後溶媒を減圧留去し、残渣は精製せず、次の反応に移行した。



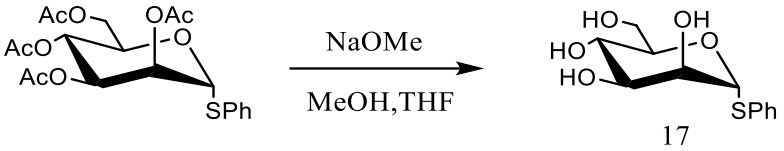
methanol (1 mL)中で、化合物 **10** (38 mg, 0.058 mmol)、ナトリウムメトキシド(3 mg, 0.058 mmol)を9時間撹拌した。イオン交換樹脂で中和後、溶媒を減圧留去した。その後、残渣をカラムクロマトグラフィー(ODS, water : MeOH = 100:0 to 0:100)により精製し、白色固体としてGlcβ1-4GlcNAcβ-MP **9** (20 mg, 70 %)を得た。

Manβ1-4GlcNAcβ-MP の合成

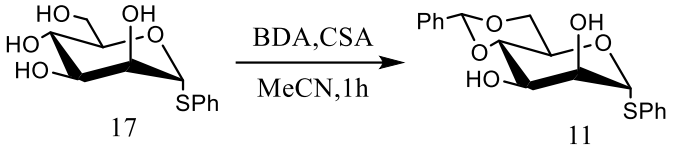


まず、市販のPhenyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-α-D-mannopyranosidのアセチル基をナトリウムメトキシドで除去し、その後、ベンジリデンにより4位と6位を選択的に保護し、化合物 **11**を得た。そして、ベンジル化により、化合物 **12**を得た。化合物 **12**と4-methoxyphenyl-3-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosideをグリコシル化反応によりカップ

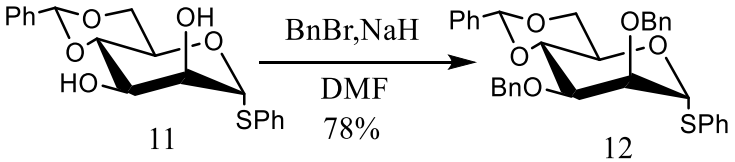
リングし化合物 **13**を得た。その後、フタロイル基の除去、アセチル化を行い、化合物 **14**を得た。これを塩化パラジウムで処理することで*N*-アセチルグルコサミンの4位を選択的に脱保護し化合物 **15**を得た。そして、$Pd(OH)_2$/Cを用いて、ベンジリデン基、ベンジル基の除去を行い、Manβ1-4GlcNAcβ-MP **16**を得た。



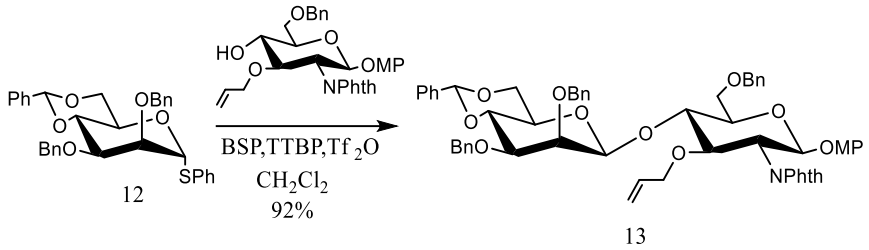
methanol (1 mL)中で、 Phenyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-α-D-mannopyranosid 4.0 g, 9.0 mmol)、ナトリウムメトキシド(49 mg, 0.058 mmol)を9時間撹拌した。イオン交換樹脂で中和後、溶媒を減圧留去した。残渣は精製せず、次の反応に移行した。



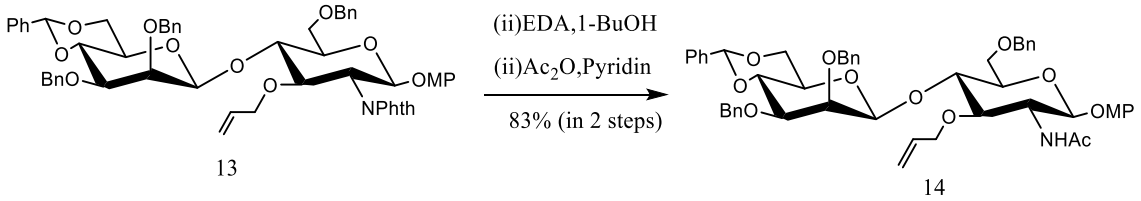
アセトニトリル (46 mL)中で化合物 **17** (2.5 g, 9.0 mmol)とBDA(1.7 mL,11 mmol)とCSA(537 mg,2 mmol)を1時間撹拌した。トリエチルアミンで中和後、溶媒を留去し、冷却したエタノールで結晶化し、白色個体として、化合物 **11** (2.9 g, 87 %)を得た。



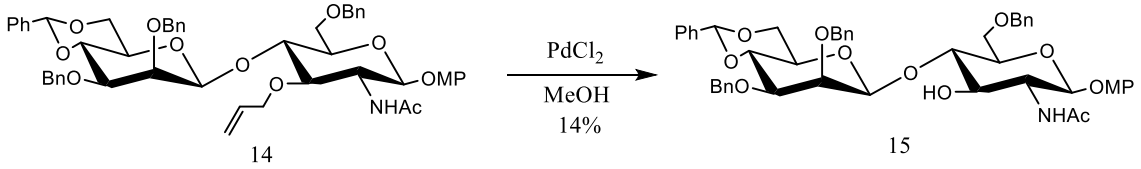
窒素雰囲気下、DMF(26 mL)中、0℃で化合物 **11**(2.9 g, 8 mmol)とNaH(854 mg, 36 mmol)を加え、5分攪拌。その後、0℃でBnBr(2.8mL, 24 mmol)を加え、室温で18時間攪拌。トリエチルアミンとmethanolでクエンチ。NaHを濾過によって取り除き、溶媒を留去し、クロロホルムで希釈し有機層を塩酸、蒸留水、炭酸水素ナトリウム水溶液、brineで洗浄、硫酸ナトリウムで脱水した。その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt)により精製し、白色固体として化合物 **12** (3.4 g, 78 %.)を得た。



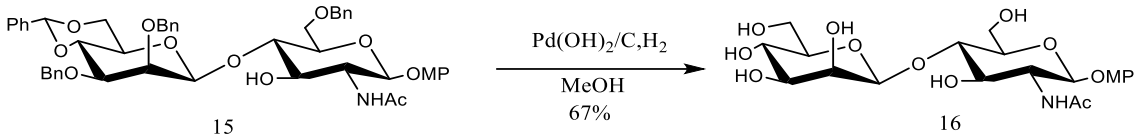
窒素雰囲気下、dry dichloromethane (8 mL)中、化合物 **12** (336 mg, 0.62 mmol) を活性モレキュラーシーブス(900 mg)とともに30分撹拌し十分に脱水した後、-80℃でBSP (156 mg, 0.75 mmol), TTBP (386 mg1.6 mmol), Tf_2O (125 μL, 0.75 mmol) を加え撹拌し、dry dichloromethane (4mL)で溶かした、市販の4-methoxyphenyl-3-O-allyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranoside(509 mg, 0.93 mmol)を10分かけ、ゆっくり加えた。炭酸水素ナトリウム水溶液で中和後、モレキュラーシーブスを濾過で取り除き、濾液をbrineで抽出、硫酸ナトリウムで脱水した。その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt)により精製し、白色固体として化合物 **13** (558 mg, 92 %.)を得た。



1-butanol (19 mL)中、85 ℃で化合物 **13** (558 mg, 0.57 mmol)と過剰量のethylenediamine(1 mL)を一晩撹拌した。その後、溶媒を留去し、過剰量のacetic anhydride(7 mL)、pyridine(7 mL)を加え、50℃に加熱し一晩撹拌した。溶媒を取り除いた後、クロロホルムで希釈し有機層を塩酸、炭酸水素ナトリウム水溶液、brineで洗浄、硫酸ナトリウムで脱水した。その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt)によって精製し、白色固体として化合物 **14**(296 mg, 83%)を得た。



methanol (7 mL)中、化合物 **14**(296 mg, 0.33 mmol)を1時間撹拌し、塩化パラジウム(18 mg, 0.1 mmol)を加えさらに3時間撹拌した。塩化パラジウムを濾過で取り除き、その後溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt)により精製し、白色固体として化合物 **15** (40 mg, 14 %.)を得た。

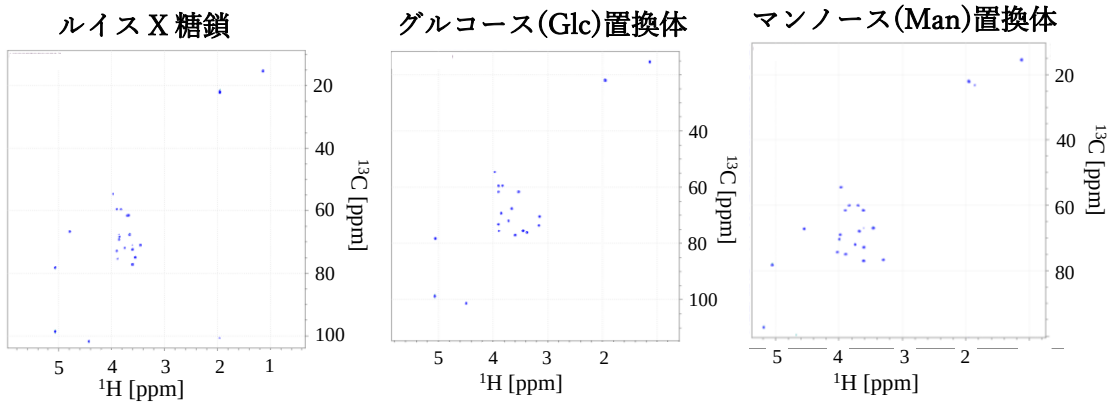


水素雰囲気下、methanol (8 mL)中で、化合物 **15** (40 mg, 0.082 mmol)、$Pd(OH)_2/C$ (50 mg)を一晩撹拌した。$Pd(OH)_2/C$ を濾過によって取り除いた。その後、残渣をカラムクロマトグラフィー(ODS, water : MeOH)により精製し、白色固体としてManβ1-4GlcNAcβ-MP **16** (27 mg, 67 %)を得た。

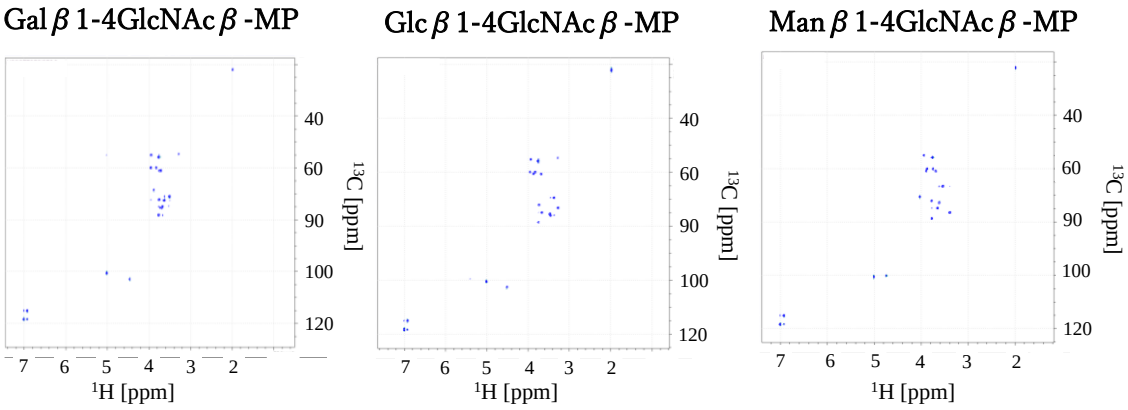
NMR

NMRによる測定は、Bruker Biospin Inc.のAvance III 800 MHzを用いて、300 Kで行った。得られたスペクトルの解析にはBruker Topspin 3.5 pl7を使用した。

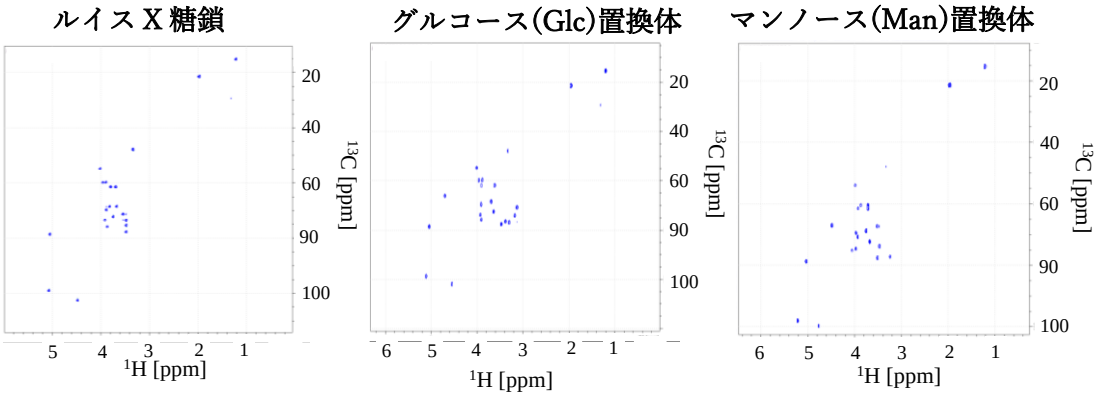
ルイスX糖鎖及びその立体異性体の重水中での^{1}H-^{13}C HSQCスペクトル



Galβ1-4GlcNAcβ-MP及びその立体異性体の重水中での^{1}H-^{13}C HSQCスペクトル



ルイスX糖鎖及びその立体異性体の重メタノール溶液中での^{1}H-^{13}C HSQCスペクトル

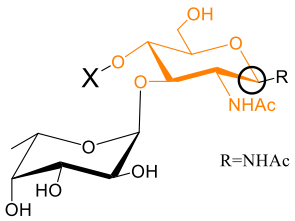


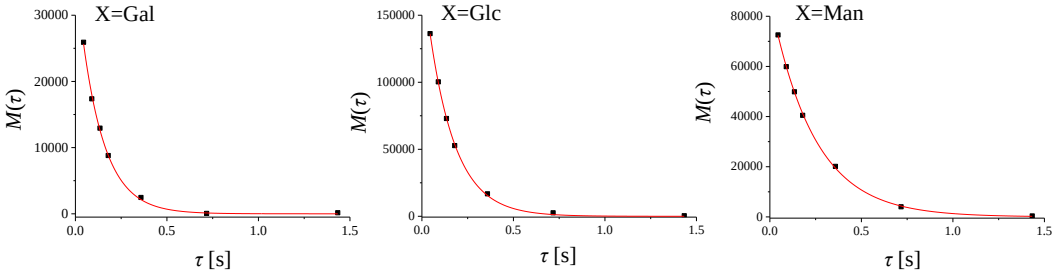
緩和解析

緩和解析では、パルスプログラムはhsqct2etgpsi3d.2を使用し、vcリストを2,4,6,8,12,16,32,64とした。

$M(\tau) = M(0)exp(-R_2'\tau)$ (τ: 時間)のフィッティングには、OriginPro 2017Jを使用した。以下に、各条件でのR_2'値を示す。

重水溶液中でのルイスX糖鎖及びその立体異性体のR_2'値

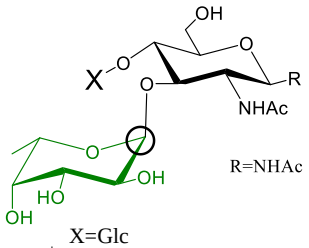


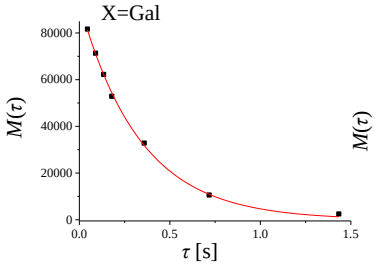


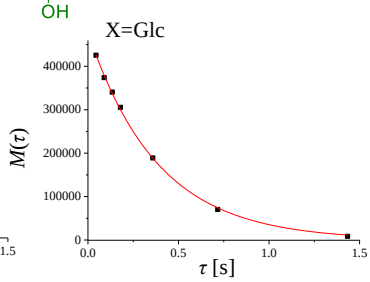
測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	7.4 ± 0.3
2回目	7.9 ± 0.2
3回目	7.3 ± 0.3

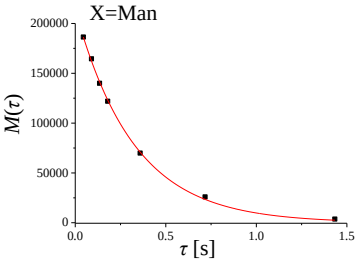
測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	7.23 ± 0.12
2回目	6.92 ± 0.10
3回目	6.89 ± 0.17

測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	4.19 ± 0.06
2回目	4.14 ± 0.12
3回目	4.27 ± 0.09







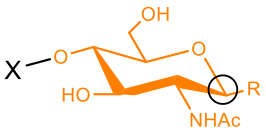


測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	3.07 ± 0.09
2回目	2.99 ± 0.08
3回目	2.69 ± 0.15

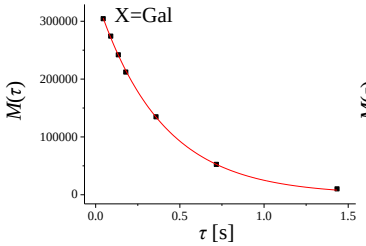
測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	3.05 ± 0.09
2回目	2.96 ± 0.10
3回目	2.60 ± 0.06

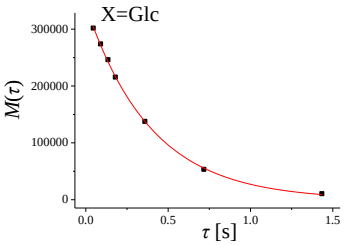
測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	3.12 ± 0.10
2回目	3.08 ± 0.07
3回目	2.51 ± 0.08

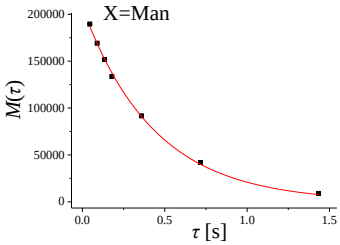
重水溶液中でのGalβ1-4GlcNAcβ-MP及びその立体異性体のR_2'値



R=OMP





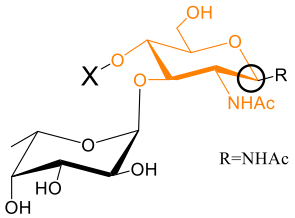


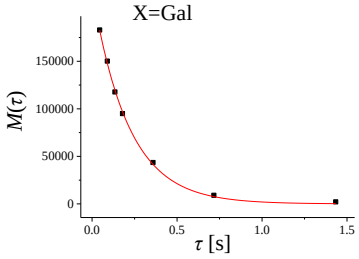
測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	2.62 ± 0.09
2回目	2.56 ± 0.03
3回目	2.53 ± 0.05

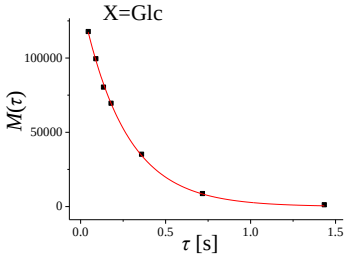
測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	2.46 ± 0.09
2回目	2.56 ± 0.03
3回目	2.53 ± 0.05

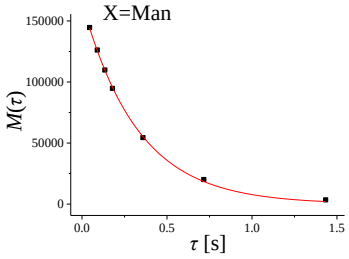
測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	2.36 ± 0.05
2回目	2.29 ± 0.06
3回目	2.33 ± 0.04

重メタノール溶液中でのルイスX糖鎖及びその立体異性体のR_2'値









測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	4.62 ± 0.17
2回目	4.75 ± 0.14
3回目	4.72 ± 0.12

測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	3.90 ± 0.15
2回目	3.91 ± 0.09
3回目	3.76 ± 0.04

測定回数	R_2' [s^{-1}]
1回目	3.11 ± 0.07
2回目	3.06 ± 0.05
3回目	2.99 ± 0.02

R_2 値の計算

今回の実験では R_2 値を荷重平均[10]により求めた。なお、1 回の測定で得られR_2'値を$R_{2,i}' = x_i \pm \sigma_i$とする。荷重平均を求める際の荷重を式(1)のようにおいた。

$$w_i = \frac{1}{\sigma_i^2} \quad (1)$$

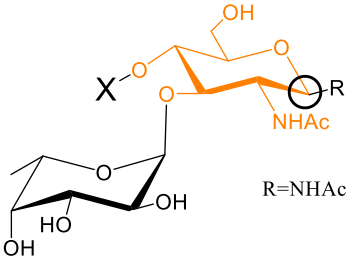
したがって、荷重平均 R_2 は式(2)で算出した。

$$R_2 = \frac{\sum_{i=1}^{3} x_i w_i}{\sum_{i=1}^{3} w_i} \quad (2)$$

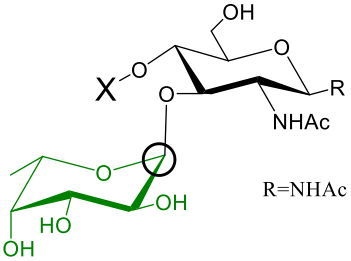
なお、誤差は式(3)で求めた。

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{\sum_{i=1}^{3} w_i}} \quad (3)$$

重水溶液中でのルイスX糖鎖及びその立体異性体のR_2値

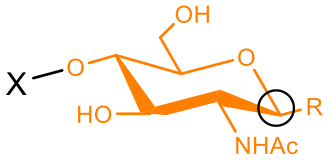


X	R_2
Gal	7.64 ± 0.15
Glc	7.02 ± 0.07
Man	4.20 ± 0.05



X	R_2
Gal	2.98 ± 0.06
Glc	2.78 ± 0.04
Man	2.90 ± 0.05

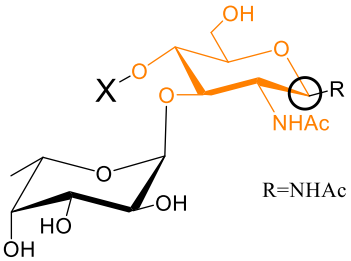
重水溶液中でのGalβ1-4GlcNAcβ-MP及びその立体異性体のR_2値



R=OMP

X	R_2
Gal	2.53 ± 0.03
Glc	2.55 ± 0.02
Man	2.33 ± 0.03

重メタノール中でのルイス X 糖鎖及びその立体異性体の R_2 値



R=NHAc

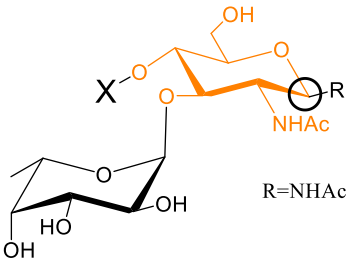
X	R_2
Gal	4.71 ± 0.08
Glc	3.79 ± 0.04
Man	3.01 ± 0.02

ΔR_2 値の算出

ΔR_2 値は重水溶液中、及び重メタノール中の R_2 値の差により求めた。なお、誤差 $\sigma_{\Delta R2}$ は式(4)により求めた。

$$\sigma_{\Delta R_2} = \sqrt{\left(\frac{\partial \Delta R_2}{\partial R_{2,\mathrm{D_2O}}}\right)^2 \left(dR_{2,\mathrm{D_2O}}\right)^2 + \left(\frac{\partial \Delta R_2}{\partial R_{2,\mathrm{MeOD}}}\right)^2 \left(dR_{2,\mathrm{MeOD}}\right)^2}$$

$$= \sqrt{\left(dR_{2,\mathrm{D_2O}}\right)^2 + \left(dR_{2,\mathrm{MeOD}}\right)^2} \qquad (4)$$



X	ΔR_2
Gal	2.93 ± 0.17
Glc	3.23 ± 0.08
Man	1.19 ± 0.05

分子動力学計算と DFT

ルイス X 糖鎖及びその立体異性体は，GLYCAM06EP 力場 [30] と AMBER20 プログラムパッケージ [31] を用い、JAIST 情報社会基盤研究センターの大型計算機を利用して実施した. 初期構造は GLYCAM-Web (http://glycam.org)を用いて作成した。トポロジーファイルは、tLeap モジュールを用いて作成し、溶媒層には TIP5P の水モデルを用いた。ルイス X 糖鎖、Glc の立体異性体、Man の立体異性体はそれぞれ水分子を 2,141 個、2,100 個、2,135 個を配置し計算を行った。

シミュレーションの実行には pmemd モジュールを使用し、本計算の前に、最急降下法を用いてエネルギー最小化を行った。その後，NPT アンサンブル（P = 1 atm，T = 300 K）で，初期速度をランダムにした 60ns シミュレーションを 6 回行った。単位時間ステップは 2.0fs で設定し、水素原子を含む結合は SHAKE アルゴリズムで拘束した。周期境界条件下、静電相互作用は粒子メッシュ Ewald 法で扱い、非結合相互作用のカットオフ距離を 12.0Å に設定した。

計算結果の解析は CPPTRAJ モジュールを用いて行った。最初の 10ns の部分を除いた 3 つのトラジェクトリーを 1 つにまとめ、結合したトラジェクトリーから 3,000 個のコンフォ

ーマーを抽出して解析に用いた。水素結合の解析は、アクセプター(A)-ドナー(D)距離(3.0Å)と A-H-D 角度(100°)をカットオフとする幾何学的基準を用いて行った。

DFT 計算については、Gaussian16 を用いて、B3LYP/6-31G+(d,p)レベルで JAIST 情報社会基盤研究センターの大型計算機を利用して実施した。

第 5 章 総括

糖鎖の生物機能は主として、レクチンとの相互作用を通して発揮される。こうした糖鎖認識における選択性や親和性には、糖鎖の化学構造や立体構造に加え、水和構造も重要な要素として関与すると考えられる。本研究は、糖鎖の機能を制御する要因として水和に注目し、糖鎖の構造-水和挙動の連関の解明に取り組んだ。

糖鎖の構造に応じた水和挙動の違いを理解するためには、糖が水に与える影響と、水が糖に与える影響の両方を調べることが重要だと考えた。そのために、溶液中の溶質と溶媒を区別でき、原子レベルの解析が行える溶液 NMR 法に着目し、研究を行った。まず、糖の水和について糖と水の両面から解析するために、溶液 NMR 法を基軸とする方法論の確立に取り組み、単糖であるグルコース、ガラクトース、マンノースの水和挙動の違いを明らかにした。

水溶液中における糖の水酸基のプロトンは交換が速く、一般的な NMR 計測のみから詳細な情報を得ることは困難である。そこで DMSO を一定の割合で混合することにより交換速度を制御し、NMR による情報取得を可能にすることを考えた。さらに、^{1}H（H）と ^{2}H（D）によるアイソトープシフトを利用し、化学シフト差から交換速度を比較することで、糖と水、および水分子同士の相互作用を調べることに着眼し、H_2O/D_2O /DMSO の混合溶媒中で NMR スペクトルを比較した。

グルコース、ガラクトース、マンノースの ^{13}C NMR スペクトルを測定することにより、糖の水酸基に結合する ^{13}C-OH および ^{13}C-OD 由来のシグナルを独立に観測することができた。さらに測定温度を変えながら、^{13}C-OH/OD シグナルが平均化される様子を観測した(図 2-3)。その結果、マンノースの水酸基の H/D 交換速度が有意に遅いことを明らかにすることができた。また、^{1}H NMR スペクトルから水の信号に注目し、^{1}H-OH および ^{1}H-OD の化学シフト差を観測すると、マンノースの溶液は他の単糖に比べて HOH と HDO の交換が速く、水－水間の相互作用が強く働くことが分かった。

グルコース、ガラクトース、マンノースの 3 種の糖で分子サイズに違いはなく、水への露出部分が著しく異なるとは考えにくい。また観測された水酸基の化学交換速度の違いは、分子内水素結合や、分子間会合によるものではないことも分かった。すなわち H/D 同位体シフトを用いた NMR 実験で得られた結果は、水の水素結合ネットワークの違いを反映したものであると考えられた。これらの結果は、糖の種類によって異なる溶媒和環境が形成されることを示すものであり、マンノースは、グルコースやガラクトースより周囲の水の構造化を進めることが示唆された。このことから、マンノースは、より広い水和圏を有していることが考えられる。

このような水の構造化は、水酸基をブリッジし、糖と強く相互作用する水分子を起点とすることで進むのではないかと考えた。MD シミュレーションにより、水酸基を架橋する水分子を調べたところ、マンノースでは隣接基間のみならず、2 位と 6 位の水酸基を架橋する水が存在することがわかった。一方、グルコースやガラクトースでは遠位の水酸基への架橋はほとんど見られなかった。

グルコースとマンノース、およびグルコースとガラクトースは、互いに一つの水酸基の立

体配置が異なるだけのエピマーである。それにも関わらず、水酸基の配向という化学構造により水分子の挙動が変化することを、NMR 解析により糖と水をそれぞれ観測することで明らかにすることができた。以上により、本手法が糖鎖の水和解析に有益であることを示すことができた。

そこで、糖鎖の構造と水和挙動の関係をさらに調べるべく、配列や結合様式の違いに着目した研究を行った。細胞内でレクチンと相互作用する高マンノース型糖鎖の部分構造である GLC1-3MAN、MAN'1-3MAN 及び MAN'1-2MAN 糖鎖を合成し、NMR 解析を行なって水和挙動の違いを明らかにした。

各糖鎖の H_2O/D_2O /DMSO 溶液での ^{13}C と ^{1}H の NMR 解析により、GLC1-3MAN 溶液では MAN'1-3MAN と MAN'1-2MAN に比べ、糖と水のプロトン交換は遅く、水分子同士の交換が速いことが分かった。この結果から、GLC1-3MAN は水との相互作用が他の 2 糖よりも強く、水の構造化を促していることが示唆され、配列により糖鎖の水和挙動が大きく変わることが明らかとなった。MD シミュレーションにより、各 2 糖の水酸基間を架橋する水を調べたところ、GLC1-3MAN では糖残基内での水和のみならず、残基間を架橋する水分子が顕著に確認された。以上のことからやはり、水酸基を架橋して糖と強く結びついた水分子の存在が重要であることが示唆された。糖残基の化学構造や配列の違いにより周囲の水の配置を変化させ、それにより水和圏の範囲を調整していることが考えられる。

また、MAN'1-2MAN と MAN'1-3MAN でも、NMR 解析から水酸基と水の交換速度にわずかな違いが生じることがわかった。MAN'1-2MAN と MAN'1-3MAN では残基間を架橋する水分子に有意な差は現れなかったが、グリコシド結合の二面角の変化に違いがあり、コンフォメーションの揺らぎが異なっていた。この結果から、水の構造化には立体構造の安定性も重要であることが示唆され、糖鎖の配列や結合様式の違いは、水素結合の様式と立体構造の安定性の両面で水和に影響を与えることを見いだすことができた。

ここまでの実験では、糖が水に与える影響を考察した。一方で、水による糖鎖への影響も糖鎖機能の制御に重要な要素だと考えられる。そこで、水が糖鎖の立体構造に与える影響を考察するために、細胞表面に見られる分岐型三糖のルイス X 糖鎖をモデルとし、水溶液中と有機溶媒中での立体構造ダイナミクスを明らかにした。

ルイス X 糖鎖（Gal1-4(Fuc1-3）GlcNAc）及びその立体異性体となる Gal→Glc 改変体、Gal→Man 改変体に対し、NMR 緩和時間測定により、糖残基毎の運動性を調べた。その結果、分岐の共通コア構造である N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）残基に有意な差を生じる事が分かった。さらにスピン結合定数の計測や MD 計算による解析を行ったところ、分岐鎖の配列の違いに伴い、GlcNAc 環配座のダイナミクスが大きく変化することを明らかにした。一方、このような GlcNAc 残基への摂動は、Fuc 残基を持たない 2 糖構造では見られなかった。このことから、糖残基間の相互作用が重要であることが分かった。そこで、水による相互作用の影響を明らかにしようと考え、メタノール中での一連の糖鎖の NMR 解析を実施した(図 4-10)。その結果、メタノール中では立体構造の安定性が変化し、GlcNAc 環の

パッカンリングが増加することが分かった。このことから、糖残基間に生じる疎水性相互作用が、ルイス X 糖鎖の立体構造制御に重要であることが示唆された。以上のように、NMR 緩和解析を用いることにより、糖鎖の立体構造が水によって安定化されることを明らかにすることができた。

以上のように、本研究では糖鎖の構造-水和挙動の連関の解明を目的に、糖から水に与える影響と、水が糖に与える影響の両方の解析に取り組んだ。溶液 NMR 法を主軸に、分子動力学計算による解析や、化学合成による糖鎖試料の作り分けを通して、糖鎖が、化学構造や配列により、水分子との相互作用をチューニングし、水和圏の範囲を変化させることを見出した。一方で、疎水性相互作用により糖残基間の相互作用を安定化し、糖鎖の立体構造のコンフォメーションが制御されることが分かった。

今回の実験で得られた知見は、水溶液中の糖鎖のふるまいを知ることへの一助になると期待でき、糖鎖の構造やダイナミクスと水和の連関を、総合的に理解するための基盤を築くことができたと考えている。糖鎖が誘起する水のネットワーク構造の違いは、生体内で糖鎖がパートナー分子と相互作用する際の結合のしやすさや安定性に影響を与えるのみならず、レクチンなどが結合部位となる配列を見極めるためのサインになっていることも考えられる。さらに、糖鎖の機能を制御し、新薬の開発やバイオマーカーへ応用するためにも、糖鎖の立体構造だけでなく、その水和構造の理解は役立つと考えられ、糖鎖の物理化学を進めた今回の知見は重要な情報になると期待できる。

参考文献

[1] Y.Kamiya, M. Yagi-Utsumi, H. Yagi, and K. Kato, *Curr. Pharm. Des.*, 2011, 17, 1672-1684

[2] S. Shanker, L. Hu, S. Ramani, R. L. Atmar, M. K. Estes, B. V. Prasad, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2017, 44, 211.

[3] Y. Watanabe, T. A. Bowden, I. A. Wilson, M. Crispin, *Biochim Biophys Acta Gen Subj*., 2019, 1863, 1480-1497.

[4] W. I. Weis, K. Drickamar, *Annu Rev. Biochem.*, 1996, 65, 441-473.

[5] M. R. Wormald, A. J. Petrescu, Y. L. Pao, A. Glithero, T. Elliott, and R. A. Dwek, *Chem.rev.*, 2002, 102, 371-386.

[6] A. Varki, *Glycobiology*, 2017, 27, 3-49.

[7] Y. Kamiya, T. Satoh, K. Kato, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 2012, 1820, 1327–1337.

[8] A. Helenius, M. *Aebi, Science*., 2001, 291, 2364.

[9] P. Valverde, A. Ardá, N. C. Rechardt, J. Jiménez-Barbero, A. Gimeno, *Med. Chem. Commun.*, 2019, 10, 1678-1691.

[10] D. Schwizer, J. T. Patton, B. Cutting, M. Smieško, B. Wagner, A. Kato, C. Weckerle, F. P. C. Binder, S. Rabbani, O. Schwardt, J. L. Magnani and B. Ernest, *Chem. Eur. J.* 2012, 18, 1342-1351

[11] A. Titz, Alberto Marra, Brian Cutting, Martin Smieško, George Papandreou, Alessandro Dondoni, and Beat Ernst, *Eur. J. Org. Chem.* 2012, 5534-5539

[12] R. M. Espinosa–Marazai, G. Fontani, F. B. Reusch, M. Roba, N. D. Spencer, R. Crockett, *Biophys. J.*, 2013, 104, 2686-2694.

[13] H. K. Abeyratne–Perera, P. L. Chandran, *Langmuir*., 2017, 33, 9178-9189.

[14] A.Gimeno, Angew. *Chem. Int. Ed*. 2019, 58, 7268 –7272

[15] Iris A. Bermejo, I. Usabiaga, J. Castro-López, A. Insausti, J. A. Fernández, A. Avenoza, J. H. Busto, J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, J. M. Peregrina, G. Jiménez-Osés, R. Hurtado-Guerrero, E. J. Cocinero, F. Corzana, *J. Am. Chem. Soc.* 2018, 140, 9952-9960

[16] G. Kozlov, C. L. Pocanschi, A. Rosenauer, S. B.Aristizabal, A. Gorelik, D. B. Williams, and K. Gehring , *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 38612-38620

[17] A. Nurisso, B. Blanchard, A. Audfray, L. Rydner, S. Oscarson, A. Varrot, A. Imberty, *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 20316-20327.

[18] L. R. Winther, J. Qvist, B. Hall, *J. Phys. Chem. B*., 2012, 116, 9196-9207.

[19] S. Bekiroglu, A. SandströmL. Kenne, C. Sandström, *Org. Biomol. Chem*., 2004, 2, 200-205.

[20] K. Tomobe, E. Yamamoto, D. Kojić, Y. Sato, M. Yasui, K. Yasuoka, *Sci. Adv.*, 2017, 3, e1701400.

[21] C. Branca, S. Magazù, F. Migliardo, P. Migliardo, *Physica A.*, 2002, 304, 314-318.

[22] C. Olsson, J. Swenson, *J. Phys. Chem. B*, 2020, 124, 3074-3082.

[23] U. Heugen, G. Schwaab, E. Bründermann, M. Heyden, X. Yu, D. MLeitner, M. Havenith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, 103, 12301-12306.

[24] M. Heyden, E. Bründermann, U. Heugen, G. Niehues, D. MLeitner, M. Havenith, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 5773-5779.

[25] N. Shukla, E. Pomarico, L. Chen, M. Chergui, C. M. Othon, *J. Phys. Chem. B.*, 2016, 120, 9477-9483.

[26] T. Matsuoka, T. Okada, K. Murai, S. Koda, H. Nomura, *J. Mol. Liq.*, 2002, 98–99, 317-327.

[27] A. Vishnyakov, G. Widmalm, A. Laaksonen, *Angew. Chem. Int. Ed*. 2000, 39, 140-142.

[28] A. V. Verde and K. Campen, *J. Phys. Chem. B.*, 2011, 115, 7069-7084.

[29] C. C. M. Groot, H. J. Bakker, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, 17, 8449-8458.

[30] M. J. Hadad, W. Zhang, T. Turney, L. Sernau, X. Wang, R. J. Woods, A. Incandela, I, Surjancey, A. Wang, M. K. Yoon, A. Coscia, C. Euell, R. Meredith, I. Carmichael, A. S. Seriani, NMR Spin-Coupling insaccarides: Relationships Between Structure, conformation and Magnitudes of J_{HH}, J_{CH} and J_{CC} values, ed K. Kato, T. Peters, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2017, pp.20-97.

[31] J. H. Prestegard, A. Eletsky, Paramagnetic RDC and RCSA Constraints in the Structural Analysis of Glycans, ed K. Kato, T. Peters, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2017, pp.123–158.

[32] R. J. Woods, *Chem. Rev*. 2018, 118, 8005−8024

[33] C. Sandström, L. Kenne, Hydroxy Protons in Structural Studies of Carbohydrates by NMR spectroscopy, ed J. F. G. Vliegenthart, R. J. Woods, The American Chemical Society, Washington DC, 2006, pp.114–132.

[34] E. M. Vilén, L. C. E. Lundqvist, D. Jouanneau, W. Helbert, C. Sandström, *Biomacromolecules.*, 2010, 11, 3487.

[35] H. C. Siebert, S. André, J. F. G. Vliegenthart, H. J. Gabius, M. J. Minch, *J. Bimol. NMR.*, 2003, 25, 197-215.

[36] J. Rönnols, O. Engström, U. Schnupf, E. Säwén, J. W. Brady, G. Widmalm, *ChemBioChem.*, 2019, 20, 2519-2528.

[37] S. Hanashima, K. Kato, Y. Yamaguchi, *Chem. Commun.*, 2011, 47, 10800-10802.

[38] M. D. Battistel, H. F. Azurmendi, D. I. Freedberg, Intramolecular Hydrogen Bonding in Glycans in Aqueous Solution, ed K. Kato, T. Peters, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2017, pp.1–19.

[39] K. Hikichi, M. Tokita, S. Nakatsuka, *Polymer J.*, 1986, 18, 891-893.

[40] K. Hikichi, *Polymer J.* 1991, 23, 1265-1267.

[41] B. Karg, L. Haase, A. Funke, J. Dickerhoff and K. Weisz, *Biochemistry*, 2016, 55, 6949-6955.

[42] S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instrum*., 1958, 29, 688-691.

[43] C. E. Dempsey, *Prog. Nucl. Magn. Reason. Spectrosc*., 2001, 39, 135-170,

[44] G. D. Henry, J. H. Weiner, B. D. Sykes, *Biochemistry*, 1987, 26, 3626-3634,

[45] J. C. Duplan, L. Mahi, J. L. Brunet, *Chem. Phys. Lett*, 2005, 413,400-403.

[46] J. R. Holmes, D. Kivelson, W. C. Drinkard, *J. Chem. Phys.*, 1962, 37, 150

[47] N. Mayorkas, S. Rudić, B. G. Davis, J. P. Simons, *laid bare*, 2011, 2, 1128-1134

[48] K. Tomobe, E. Yamamoto, D. Kojić, Y. Sato, M. Yasui, K. Yasuoka, *Sci. Adv*., 2017, 3, e1701400.

[49] S. M. Tschampel, M. R. Kennerty and R. J. Woods, *J Chem Theory Comput*., 2007, 3, 1721-1773.

[50] D.A. Case, H.M. Aktulga, K. Belfon, I.Y. Ben–Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, G.A. Cisneros, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, G. Giambasu, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, C. Jin, K. Kasavajhala, M.C. Kaymak, E. King, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, M. Machado, V. Man, M. Manathunga, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, K.A. O'Hearn, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, A. Rahnamoun, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott–Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, H. Wei, R.M. Wolf, X. Wu, Y. Xue, D.M. York, S. Zhao, and P.A. Kollman, Amber 2021, University of California, San Francisco, 2021.

[51] S. S. Stachura, C. J. Malajczuk, R. L. Mancera, *J Mol Model.*, 2018, 24, 174-182.

[52] Caramelo, J.J., Castro, O.A., Alonso, L.G., De Prat-Gay, G. and Parodi, A.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 2003, 100, 86-91.

[53] T. Kuribara, R. Usui, K. Totani, *Carbohydr. Res.*, 2021, 502, 108273.

[54] S. Ninagawa, G. George, K. Mori, *BBA*, 2021, 1865, 129812.

[55] M. E. Haque, T. Kikuchi, K. Yoshimoto, Y. Tsuda, *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, 33, 2243-2255.

[56] P. Konradsson, D. R. Mootoo, R. E. McDevitt, B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1990, 270-272.

[57] P. Konradsson,U. E. Udodong , B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Letters*, 1990, 31, 4313-4316.

[58] G.H.VeenemanS.H.van LeeuwenJ.H.van Boom, *Tetrahedron Letters*, 1990, 31, 1331-1334.

[59] G. Nestor, T. Anderson, S. Oscarson, A. Gronenborn, *J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139, 6210−6216

[60] T. Ogawa, K. Katano, M. Matsui, *Carbohydrate Res*., 1978, 64, C3-C9.

[61] T. Ogawa, K. Katano, K. Sasajima, M. Matsui, *Tetrahedron*, 1981, 37, 2779-2786.

[62] E. J. Cabrita, S. Berger, *Magn. Reason. Chem.*, 2002, 40, S122-S127.

[63] J. A. Aguilar, R. W. Adams, M. Nilsson, G. A. Morris, *J. Magn. Reason.*, 2014, 238, 16-19.

[64] M. Zierke, M. Smieško, S. Rabbani, T. Aeschabacher, B. Cutting, F. H.T. Allain, M. Schubert, and B. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 13464-13472.

[65] T. Suzuki, S. Yanaka, T. Watanabe, G. Yan, T. Satoh, H. Yagi, T. Yamaguchi, K. kato, *Biochemistry.*, 2020, 59, 3180−3185.

[66] 竹内敬人，西川美紀「有機化学のための高分解能 NMR テクニック」, 株式会社 講談社，2004 年, p36-44.
[67] 阿久津秀夫，嶋田一夫，鈴木榮一郎，西村善文「分光法シリーズ第 3 巻 NMR 分光法」, 株式会社 講談社, 2016 年, p54-59.
[68] 吉澤康和「新しい誤差論　実験データ解析法」, 共立出版株式会社, 1989 年, p126-127.
[69] D. Cremer, J. A. People, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 1354-1358.
[70] J. Topin, M. Lelimousin, J. Arnaud, A. Audfray, S. Pérez, A. varrot, A. Imberty, *ACS Chem. Biol.*, 2016, 11, 2011−2020
[71] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1980, 19, 731-732.

謝辞

本研究を行うにあたり、実験の遂行から論文の執筆まで幅広く熱心なご指導ご鞭撻を賜りました北陸先端科学技術大学院大学先端科学研究科　山口拓実准教授に深く感謝申し上げます。

試料の提供や糖鎖合成等で本研究を支えてくださった青森大学 薬学部 鈴木達也助教に深く感謝いたします。

本研究室で共に学び、共に励まし合い、苦楽を共有しました中根健汰氏、藤井和樹氏、森一樹氏、松井啓太氏に深く感謝致します。

互いに協力しながら、研究室の雰囲気を前向きなものにしてくださいました、山口拓実研究室の皆様に深く感謝致します。

学生生活を送るにあたり、私という人間を理解し、常に背中を押して下さいました両親や兄弟、祖父母など家族の皆様に深く感謝致します。

また、学部時代にお世話になりました岐阜大学の伊藤貴司教授ならび、岐阜大学の皆様にも感謝致します。

最後に、私の学生生活に関わって下さいました、すべての皆様に深く感謝し、末筆ながら謝辞とさせていただきます。博士前期課程、博士後期課程合わせて、5 年間大変ありがとうございました。

業績

学術論文

H. Tatsuoka and T. Yamaguchi, “NMR analyses of carbohydrate–water and water–water interactions in water/DMSO mixed solvents, highlighting various hydration behaviors of monosaccharides glucose, galactose and mannose”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.,* 2023, 96, 168–174.

国際学会での発表

（ポスター発表）

Hiroaki Tatsuoka, Takumi Yamaguchi,”NMR spectroscopic analyses of the hydration behavior of alpha-mannose in solution”, ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST 2021 ,　(2021 年 8 月, online)

Hiroaki Tatsuoka, Takumi Yamaguchi, Tatsuya Suzuki, Koichi Kato, “Revealing the conformational dynamics of Lewis X oligosaccharides by NMR spectroscopy and molecularsimulation “,Pacifichem 2021 Congress,　(2021 年 12 月, Hawaii)

国内学会・シンポジウムなどにおける発表

（口頭発表）

龍岡博亮, 堀由樹, 山口拓実　“NMR 計測によりルイス X 糖鎖のダイナミクス解析”,
日本化学会 第 98 回春季年会, (2018 年 3 月, 千葉）

龍岡博亮, 山口拓実, ”NMR を用いた糖の溶媒和に関する研究”
糖鎖科学中部拠点　第 16 回若手の力フォーラム, (2021 年 1 月，オンライン）

龍岡博亮, 山口拓実，“糖鎖の溶媒和に関する NMR 解析”,
日本化学会 第 102 春季年会，(2022 年 3 月，オンライン)

（ポスター発表）

龍岡博亮, 山口拓実，“NMR 計測による糖鎖のダイナミクス解析”
第 4 回 新学術領域研究「動的秩序と機能」若手研究会，（2017年11月，大阪）

龍岡博亮, 山口拓実，“緩和時間計測による糖鎖動的立体構造の解析”
第 18 回 若手 NMR 研究会，（2018 年 8 月，広島）

龍岡博亮, 山口拓実，“NMR 計測によりルイス X 糖鎖の立体構造解析”,
日本化学会 第 99 回春季年会，（2019 年 3 月，神戸）

龍岡博亮, 鈴木達也,加藤晃一, 山口拓実, ”NMR 緩和解析に基づいたルイス X 糖鎖の糖パッカリングのダイナミクス制御”, 第 14 回バイオ関連化学シンポジウム 2020, (2020 年 9 月 ,オンライン)

龍岡博亮, 山口拓実, ”トレハロースの水和挙動に関する固体及び溶液 NMR 解析”, 第 40 回 日本糖質学会年会, (2021 年 10 月, 鹿児島)

龍岡博亮, 山口拓実, ” H/D 同位体シフトを用いた糖の水和挙動の NMR 解析”, 第 16 回バイオ関連化学シンポジウム 2022, (2022 年 9 月, 愛知)

龍岡博亮, 山口拓実, ” 溶液 NMR 法を用いた糖-水間および水-水間相互作用解析”, 第 41 回 日本糖質学会年会, (2022 年 10 月, 大阪, ポスター賞受賞)

龍岡博亮, 山口拓実, “溶液 NMR 計測と分子シミュレーションを用いた糖-水および水-水間相互作用の解析”, 糖鎖科学中部拠点　第 18 回若手の力フォーラム, (2023 年 1 月, 口頭発表, 奨励賞受賞)