

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05858

研究課題名(和文)天然物を構造モチーフとした糖鎖プローブの創製研究

研究課題名(英文) Synthetic studies on oligosaccharide probes designed based on the structural motifs in natural products

研究代表者

高橋 俊哉 (Takahashi, Shunya)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別嘱託研究員

研究者番号：00202151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体機能解明に向けた糖鎖プローブの創製を目的として、2種の天然物を標的モデル分子に選び合成研究を行った。まず、病原菌 *P. pulmonicola* の O-抗原を構成するリピートユニット3糖合成のため、Ugi反応を使った新規N-プロリニル-アミノ糖構築法を開発した。また、嫌気性菌 *C. acetobutylicum* の細胞分化制御分子 clostrienose ならびにその生合成前駆体の合成を達成し、不安定な天然物の化学構造を確定した。鍵段階は右田・小杉・スティルカップリングによるスキップトリエンユニットの構築であり、本手法は不安定な官能基を多く含む糖鎖プローブの創製にも有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原菌 *P. pulmonicola* の O-抗原多糖の合成研究を通じて、特異なアシル基を持つアミノ糖を含む糖鎖プローブの新しい合成法が開発できた。また、嫌気性菌 *C. acetobutylicum* の細胞分化を制御する clostrienose の全合成を達成し、不安定な官能基を持った糖鎖プローブの創製も可能となるような合成手法を確立することができた。これらの研究成果は、有機合成化学的にも意義のあるものと考えられ、有用な物質生産に関わる合成化学への貢献のみならず、生物化学的にも重要な糖鎖分子をターゲットにしている点から、医療・生化学分野への展開も期待できる。

研究成果の概要(英文)：For elucidation of biological functions, a couple of natural products were selected as target models for designing oligosaccharide probes, and their synthetic studies were carried out. The lipopolysaccharide O-antigen of *Pandora pulmonicola* consists of the trisaccharide repeating unit containing a novel N-oxoprolinyl-kanosamine derivative. However, the absolute configuration of the prolinyl unit regarding the pathogenicity was unknown. In order to determine the absolute configuration, we developed a novel method for preparation of the kanosamine derivative using Ugi reaction. Clostrienose is a fatty-acid glycosyl ester consisting of an unsaturated carboxylic acid and D-galactosyl-L-rhamnose, and regulates cellular differentiation of *Clostridium acetobutylicum*. Total synthesis of the unstable polyketide was achieved using Migita-Kosugi-Stille coupling as a key step. The undefined structure of the biosynthetic precursor was also unambiguously established by this synthetic work.

研究分野：有機合成化学

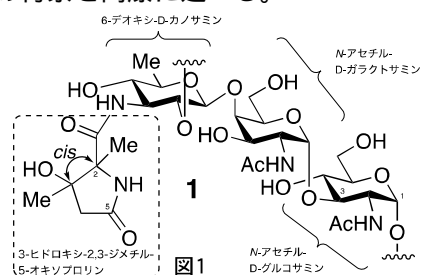
キーワード：糖鎖プローブ O-抗原多糖 Ugi反応 細胞分化制御 エステル配糖体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

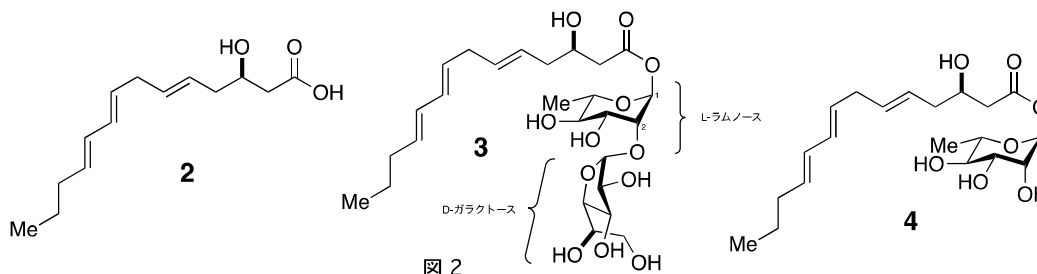
1. 研究開始当初の背景

生命科学分野における糖鎖生物学の重要性が広く認識されるようになって久しい。近年、その基盤技術の一つを担う糖鎖工学の進展もめざましいが、未だ残された課題は多い。例えば、ペプチドの自動合成法が確立されているのに対して、糖鎖合成の自動化はまだ実現できていない。その理由の一つは、グリコシド結合形成の立体制御が困難な点にある。さらに、特異な構造のアシル基の存在や、糖質にポリケチド・脂肪酸などが結合したハイブリッド天然物の構造多様性もその合成の難しさに拍車をかけている。そのため、興味ある生物活性を有するにもかかわらず、化学構造が未確定なまま残されている分子も多々存在し、ケミカルバイオロジーへの展開が滞っているとも言える。以下に、本研究の2つのプロジェクトの背景を簡潔に述べる。

(1) 化学合成による新興嚢胞性線維症病原菌 *P. pulmonicola* の O-抗原多糖の構造解析研究と機能性糖鎖プローブの構築: 嚢胞性線維症患者の肺から分離されたバクテリア *Pandora pulmonicola* strain LMG 18108 の O-抗原多糖は、特異な N-アシル-アミノ糖を含む3糖の繰り返し構造 1 で構成されていることが明らかになっている(図1)。しかし、病原性の発現に重要な役割を果たすと推定されている cis-オキソプロリン部位の絶対立体配置は、各種機器スペクトル分析を駆使しても不明であった。



(2) 嫌気性菌 *C. acetobutylicum* の細胞分化を制御する clostrienose の合成とそのプローブ化: 2017年に Zhang らは、アセトン-ブタノール-エタノール発酵に古くから利用されてきた嫌気性菌の一種 *Clostridium acetobutylicum* の培養液から、その細胞分化を制御するポリケチド類を単離構造決定した。その主成分の一つが、clostrienoic acid (2) と命名された不安定な長鎖不飽和カルボン酸と α -D-ガラクトフラノシル(1 \rightarrow 2)- α -L-ラムノースから構成された特異な化学構造を有する clostrienose (3) である(図2)。その生合成中間体と推定される 4 も単離されたが、不安定な微量成分のため十分なスペクトル分析ができず構造は未確定であった。



2. 研究の目的

多彩な生理活性を示すオリゴ糖鎖の中でも、構造未定の異常アミノ酸を含む *P. pulmonicola* の O-抗原多糖のリピーティングユニット(1)と嫌気性菌の細胞分化を制御する不安定なエステル配糖体 (clostrienose (3)) を標的分子として選び、これらを合成するための基盤技術の開発を第一の目標とした。これらの技術が確立できれば、不明である化学構造を明らかにできるばかりでなく、天然物の構造改変・類縁体の合成なども可能になる。さらに、確立できた合成技術のさらなる展開を図ることで、生体機能の解明や探索に有用な糖鎖プローブ類を創製することを究極の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化学合成による新興嚢胞性線維症病原菌 *P. pulmonicola* の O-抗原多糖の構造解析研究と機能性糖鎖プローブの構築: O-抗原は、絶対立体配置の不明なオキソプロリンが結合した新規アミノ糖を含む3糖の繰り返し構造 1 なので(図1)、まず、プロリン誘導体の両対称体を3糖に結合させた2種のオリゴ糖を合成する。プロリンを含むアミノ糖は、キラルなヒドロキシカルボン酸と糖イソニトリルとの Ugi 反応により合成する。合成された2種類の3糖の詳細な NMR スペクトル解析を実施して、天然物のデータと比較検討することで構造解析研究を進める。さらに、このオリゴ糖に機能性スパーサーを導入するなどして糖鎖プローブの創製を行う。

(2) 嫌気性菌 *C. acetobutylicum* の細胞分化を制御する clostrienose の合成とそのプローブ化: Clostrienose(3)ならびにその生合成前駆体 4 は、酸・塩基、酸素に不安定なスキップトリエン構造を含んだ β -ヒドロキシカルボン酸 (clostrienoic acid (2)) を共通のコアとして持つ(図2)。そこで、まずこの合成化学的にもチャレンジングな不飽和カルボン酸の合成法の開発を行い、その後糖鎖ユニットを合成し、それぞれを連結して標的分子へ導くという収束的な合成戦略を採用した。スキップトリエン部は、有機金属試薬を多用することで効率良く構築することとする。また、分子内に多数存在する水酸基の保護基は、最終工程の脱保護反応中での分子全体の安定性を考慮して選定する。天然物そのものの合成法が確立できたなら、化学的に安定性を持たせたバ

イオプロープ類の創製へ展開をはかる。

4. 研究成果

(1) 化学合成による新興嚢胞性線維症病原菌 *P. pulmonicola* の O-抗原多糖の構造解析研究と機能性糖鎖プロープの構築：O-抗原の病原性に関わると推定されているオキソプロリン部位の絶対構造は未決定であったので、まず、コアとなる 6-デオキシ-N-オキソプロリニル-カノサミン誘導体の合成から検討した(図1)。その合成の鍵段階は、ケトカルボン酸、アミン、そして糖イソニトリルの3成分を連結させて、カノサミン誘導体を1段階で構築する Ugi 反応であった。連結反応に必要なキラルなカルボン酸は、不斉酸化反応あるいはメンチル *p*-トルエンスルフィネートから得られたキラルなスルホキシドとカルボニル化合物とのアルドール反応によって合成できた。一方の糖イソニトリルは、D-グルコースから3位へのアジド基の導入を経て合成した。これらを、アルコール溶媒中でアミンの存在下加熱すると予想通り Ugi 反応が進行し、6-デオキシ-N-オキソプロリニル-カノサミン誘導体が一気に合成できた。生成物はジアステレオマーの混合物であったが、ジアステレオマー同士はシリカゲルクロマトグラフィーによって分離することが可能であった。こうして、プロリンに関するジアステレオマーをすべて合成することができ、詳細な NMR スペクトル解析によってそれらの構造を明らかにした。また、N-アセチル-D-グルコサミンと N-アセチル-D-ガラクトサミンで構成された2糖部分は、D-グルコサミンのアリルグリコシド誘導体と、D-ガラクトースから得られた2-アジド-D-ガラクトース誘導体をカップリングさせることで合成された。このカップリング反応では、糖供与体としてチオガラクトシドを用いると縮合体はわずか10%程度でしか得られなかったが、トリクロロアセトイミデート誘導体を用いると、ほぼ定量的にカップリング反応が進行し、望む立体化学の2糖を得ることに成功した。6-デオキシ-N-オキソプロリニル-カノサミン誘導体とのカップリングに先立ち、モデル実験として、3-アジド-3,6-ジデオキシ-グルコース誘導体とのカップリングを検討した。反応性は2位水酸基の保護基によって劇的に変化し、エステル系の保護基を用いるとカップリング体はほとんど得られず、保護基のエステル部位が転位したグルコース誘導体が主成分となった。しかし、ベンジル基を保護基として用いたところ中程度の収率ではあるがカップリングした3糖が合成できた。今後は得られた3糖をイソニトリルへ変換後、キラルなカルボン酸と Ugi 反応を行うか、あるいは6-デオキシ-N-オキソプロリニル-カノサミン誘導体と先の2糖をカップリングさせることで、O-抗原リピーティングユニットが構築できると考えられる。

これまで、特異なアシル基が含まれた糖鎖は、その生化学的な重要性から、世界中で合成法が検討されてきている。なかでも、アミノ糖にアミド結合を介してアミノ酸残基が導入された糖鎖の合成例は数多い。しかし、そのいずれもがアミノ酸側のカルボキシル基とアミノ糖側のアミノ基を結合させるアミド化反応による報告例ばかりである。したがって、本研究で開発されたような糖イソニトリルを使う方法論(Ugi 反応)は極めてユニークであり、学術的にも独創性が高いと言える。特に、用いられるカルボン酸、アミンなど多様性に富んだ低分子原料が利用できるため誘導化が容易であり、1工程で一気に望むアシル基が構築できるのは構造活性相関研究にも非常に有利である。よって、本研究で得られた成果により、機能性タグなどを導入した糖鎖プロープの構築は極めて効率的に進められると予想でき、糖鎖工学における新たな展開が期待できる。

(2) 嫌気性菌 *C. acetobutylicum* の細胞分化を制御する clostrienose の合成とそのプロープ化：Clostrienose(3)は、D-ガラクトフラノシル-L-ラムノースと長鎖不飽和脂肪酸 clostrienoic acid(2)で構成されたエステル配糖体である(図2)。その生合成中間体と推定されるL-ラムノシルエステル4も同時に単離されたが、得られたのはごく微量のためUVとLC-MSスペクトルのデータのみから構造が提出されていた。いずれも不安定な天然物であることから、これらの合成法の開発は、天然物自身の構造確定のみならず、不安定なハイブリッド天然物合成技術の確立という点でも意義がある。まず、共通のパーツである不飽和脂肪酸 clostrienoic acid(2)部分の合成から着手したが、酸・塩基や酸素に不安定なスキップトリエンシステムを効率良く合成する方法論の開発が必要であった。また、糖質内に存在する多数の水酸基と共に、脂肪酸の不飽和結合に隣接した脱離しやすい水酸基の保護基の選定も鍵であった。2-E-ヘキセナールを出発物質として、銅触媒存在下におけるグリニャールカップリングやジュリアーコシェンスキー反応、右田・小杉・スティルカップリングなどの炭素鎖延長反応を活用して clostrienoic acid 前駆体であるオールトランス C_{14} アルコール誘導体の合成を検討した。いくつかのモデル実験の結果、グリニャールカップリングでは収率の面で、また、ジュリアーコシェンスキー反応の場合には、カップリングパートナーによって幾何異性体比が低下してしまうという問題点が見い出された。ジュリアーコシェンスキー反応で得られた知見は、不安定なトリエン部分を有する天然物 chaunopyran A の合成に応用された(図3)。Chaunopyran A は、軟体動物に共生する2種の真菌を共培養すると生産される化合物であり、5の構造式が提唱されていた。ジュリアーコシェンスキー反応を経て得られた合成

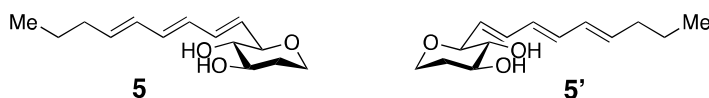


図3

品5の各種スペクトルデータは、報告されている天然物のものと良い一致を示したが、旋光度の符号は正の値を示し、天然物のものとは逆であった{合成品 $[\alpha]_D^{25} +25.8$; 天然物 $[\alpha]_D^{22} -25$ }。したがって、天然物の絶対立体配置は提出されている構造式5とは鏡像関係にある5'であることを明らかにすることができた。こういった結果などを踏まえて、炭素鎖延長には、右田・小杉・ス

ティルカップリングが最も良い結果を与えることを見出し、C₁₄アルコール誘導体を高純度で合成することができた。最後に、末端の水酸基をカルボン酸まで酸化することによりclostrienoic acid (2)の初めての合成を達成した。各種データは文献値と一致し、天然clostrienoic acidの構造が確定できた。

二つの天然物(3 および 4)の共通パーツである2が合成できたので、その前駆体を使って鍵となるエステル化を検討した。モデル実験として、微量成分であるclostrienosyl ラムノシド(4)の合成を行った。合成の最終工程は弱い酸性条件下での脱保護という合成計画を考慮し、この条件に見合った保護基を持ついくつかのL-ラムノース誘導体を調製した。Clostrienoic acid部分保護体とのカップリング反応は、脱水剤の存在下、問題なく進行することがわかり、望むエステル体が収率良く得られた。最後の脱保護は、含水酢酸中室温で処理することにより達成でき、目的のclostrienosyl ラムノシド(4)を高収率で与えた。合成品の各種スペクトルデータはよくその構造を支持しており、またUVとMSスペクトルデータは報告されている天然物のものと良い一致を認められた。したがって、本合成により未確定のままであった微量天然物の化学構造を明らかにすることができた。

構成2糖部分(D-ガラクトフラノシル- L-ラムノース)の合成には、D-ガラクトースとL-ラムノースを位置選択的に、かつ望む立体化学でカップリングさせる必要がある。このため、反応に必要な位置の水酸基は保護しておかねばならない。通常糖鎖合成における水酸基の保護基としては、糖同士のカップリング時に安定で、かつ最終段階の脱保護反応が接触還元というクリーンな条件下に行えるベンジル基が常用されている。しかし、clostrienose (3)の場合、脂肪酸部分に不飽和結合を含むため、最終的な保護基としてベンジル基は使えない。また、4の合成に用いられたような弱酸性条件下に不安定な保護基は、糖同士のカップリング反応時にはずれてしまうため、合成の初期段階からの導入は不適切である。そこで、合成途中で保護基を付け替えることとした。まず、ベンジル基で保護されたD-ガラクトフラノース誘導体と、同様の保護基を持つL-ラムノースをカップリングさせ、望む立体化学を有する2糖を得た。ついで4の合成で得られた知見を基に、水酸基の保護基をベンジル基からシリル基に付け替えた後、先に確立した条件で2の部分保護体とカップリングさせると、望むエステル配糖体が高選択的に合成できた。この場合、2位にガラクトースが導入されているため、立体化学的な要因からも望む立体化学を有するエステル体が優先的に得られたと考えられる。最終段階である脱保護反応は、室温で酢酸 水処理することにより、スキップトリエン部に隣接する水酸基の脱離やグリコシド結合の切断を起こすことなく達成できた。合成品のclostrienose (3)の各種データは報告値と良く一致し、構造を確定することに成功した。今回合成を達成したclostrienose 関連化合物は、その化学構造から推測できるようにいずれも不安定であり、アルゴン雰囲気下-40 °Cのフリーザー中の保存でも徐々に分解反応が進行してしまうことが分かった。分解物のスペクトル分析によると、スキップトリエン部が変化してしまうことが確認されたため、3の構造改変を行う際には、不飽和結合を含まない分子をデザインすることが適当であると考えられた。今後は、3をモデルとした機能性プローブ糖鎖として、長鎖飽和脂肪酸ユニットを含むオリゴ糖鎖をコアとして活用することが期待できる。

これまで、エステル配糖体のようなハイブリッド型天然物の合成例は少なく、また天然物自身が不安定な場合、ケミカルバイオロジー分野への展開もほとんど行われてこなかった。本合成研究では、3や4のような天然物に含まれる酸・塩基や酸素に不安定なスキップトリエンシステムが有機金属化学を駆使したカップリング反応により効率良く構築できること、また多数の水酸基を持つ場合でも適切な保護基の選択をすることによりグリコシド結合の切断やスキップトリエンシステムを損なうことなく脱保護反応が行えることを明らかにした。ここで得られた研究成果は、今後見出されてくるであろう不安定な天然物を扱う際にも、有益な情報になるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogawa N., Mamada S., Hama T., Koshino H., Takahashi S.	4. 巻 83
2. 論文標題 Total Synthesis of the Proposed Structure for Chaunopyran A and Its Absolute Configuration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Nat. Prod.	6. 最初と最後の頁 2537-2541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.0c00552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shunki Mamada, Shunya Takahashi, Hiroyuki Koshino, Narihito Ogawa
2. 発表標題 Total synthesis of Chaunopyran A determining absolute configuration
3. 学会等名 Pacifichem2021（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------