

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590008

研究課題名 (和文) 生物活性天然配糖体の糖鎖を基盤とした新薬創成に有用なケミカルライブラリーの開発

研究課題名 (英文) Development of novel chemical libraries for drug discovery based on the oligosaccharides moieties of significant bio-active glycosides.

研究代表者

池田 剛 (IKEDA TSUYOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：80295138

研究成果の概要 (和文)：

トマト地上部に高含有するトマチンを原料として、ガン細胞増殖抑制活性に関与が示唆されているリコテトラオースをトマト萎凋病菌の産生するトマチナーゼでプロパルギル誘導体として切り出した。糖鎖部のアセチレン基とアグリコン部のアジド基の環化反応を応用して、リコテトラオースの様々な誘導体を合成した。このクリックケミストリーを応用したリコテトラオース誘導体の調製は水酸基の保護を必要とせず、簡便で応用範囲の広い方法である。

研究成果の概要 (英文)：

In tomato plant bodies including leaves and stems, a steroidal alkaloid "tomatine" is the major ingredient of all. We prepared the propargyl lycotetraoside from the tomatine by using end-glycosidase "tomatinase" in the presence of propargyl alcohol. We applied to synthesize several lycotetraosyl derivatives coupled with an acetylene group in the propargyl lycotetraoside and azide groups in aglycone parts. The synthesis procedure is very simple and effective to get many kinds of lycotetraosyl derivatives having triazole ring without protection of hydroxyl group in lycotetraosides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：糖鎖・ケミカルバイオロジー・癌・生活習慣病・植物

1. 研究開始当初の背景

天然化合物は、生物活性・化学構造の多様に富んでおり、ケミカルバイオロジー研究や新薬創成に有用な化合物の宝庫である。ケミカルライブラリーの充実ハイスループットスクリーニング法の開発と共にこれからの創薬研究において重要な研究課題である。著者らは、天然化合物の中でも生薬・天

然薬物の有効成分として知られる配糖体に着目し、これらをリード化合物として合成化学的手法（トランスグリコシレーション法）により調製された天然型合成化合物ライブラリーの構築を行っている。さて、最近の糖鎖生物学の進歩により、糖鎖が生体内で免疫、炎症、悪性腫瘍化、細胞間認識などさまざまな生命現象に深く関わっていることが明ら

かにされている。近年の研究において、抗生物質バンコマイシンの糖鎖部を改変すると耐性菌に対しても活性を持つことなど、配糖体の糖鎖部が生物活性に重要な役割を担っていることが分かってきた。このような糖鎖の生体内現象を分子レベルで解明するためには純粋で十分量のサンプルが必要である。しかし、糖鎖や配糖体を純粋な形で単離すること、また、糖鎖合成は困難が付きまとい、研究は一部の糖鎖に限られている。ところで、配糖体は、生薬・天然薬物の有効成分としてもよく知られる化合物群である。著者らはこれまでにマメ科植物より肝障害改善作用を有するトリテルペン配糖体、ナス属植物よりガン細胞増殖抑制活性、抗 HSV-1 活性を有するステロイド配糖体の単離・構造決定を行ってきた。その結果、それらの配糖体の糖鎖がアグリコン部と共に生物活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、糖タンパク質や糖脂質の糖鎖研究に対し、植物性天然物配糖体の糖鎖構造機能の研究は十分といえず、薬理作用発現のための配糖体の糖鎖の役割は未解明である。糖鎖は、細胞表面のレクチン等を認識し、生体高分子と親和性を持ち作用が発現すると予想される。そこで、糖鎖の機能を利用して、より有用な配糖体を合成するために、1) 多数の糖鎖構造を様々なアグリコンにトランスグリコシル化し、糖鎖とアグリコンの相互作用を多角的に検証するとともに、2) 詳細な構造活性相関を検討し、それぞれの糖鎖における最適なアグリコン部のファーマコフォアを明らかにすることを想起した。構造活性相関並びに構造の最適化を効率よく行うためには、オリゴ糖鎖部分とアグリコンの組み合わせを多数合成する必要がある。これまでに、ヨウ化リチウムを用いるエステル結合糖鎖の切り出し(ミモザテトラオース)やエンドグリコシダーゼによるエーテル結合糖鎖の切り出し(ファバトリオース、リコテトラオース)、位置選択的な保護基の導入によるカコトリオースの迅速合成法の開発に成功し、オリゴ糖鎖の調製は飛躍的に容易になった。しかしながら、配糖体の調製において、現在の α -グリコシル化反応では厳密な無水反応を必要とし、収率や立体選択性においてまだまだ検討しなければならぬ課題が多く誘導体の合成を思うように進めることが出来ない。そこで、オリゴ糖鎖部分とアグリコン部分を容易に組み合わせて、構造の多様性を持ったオリゴ糖鎖を基盤としたケミカルライブラリーを構築する方法の開発が必要である。さらに、糖鎖の構造多様性を創成しケミカルライブラリーの充実を図る目的で、動脈硬化や糖尿病性腎症の病変部位に蓄積することが知られる AGE (Advanced Glycation End product) の生成を抑えるオンジサポニ

ンと抗癌ワクチンのアジュバンドとして最近、注目されているキラヤサポニンからオリゴ糖鎖を調製することとした。

2. 研究の目的

(1) 中国・上海地方で伝統的に腫瘍の治療に用いられている生薬・竜葵 (イヌホウズキ *Solanum nigrum*) の成分研究が契機となり、著者らにより展開されたナス属植物の成分研究の結果、主要成分として desgalactotigonin 等の多種多様なステロイド配糖体が単離・構造決定された。これまでに得られたステロイド配糖体の細胞増殖抑制活性試験の結果、糖鎖部に lycotetraose (β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-galactopyranose) を有するスピロスタノール配糖体に強い活性が認められたことから、様々なアグリコン部を有するリコテトラオース誘導体を合成し、活性の比較を行ってきた。本研究では、アグリコン部分とリコテトラオース部分のグリコシル化反応の問題を改善する方法として、また、生体分子への結合も考慮して、リコテトラオースの還元末端にプロパルギル基を導入し、各種誘導体の合成法を検討することとした。

(2) 生薬や健康補助食品等の有効成分として注目されている多くの生物活性天然配糖体に関して、その糖鎖部分の役割は殆ど明らかにされていない。著者は、天然配糖体の糖鎖部分の生物学的役割を明らかにするアプローチとして、配糖体由来の糖鎖部分をオリゴ糖鎖として切り出すこと、また、選択的に保護基を導入することで容易に糖鎖を調製すること、そして、得られたオリゴ糖鎖を様々な誘導体に変換し配糖体を再構成するトランスグリコシル化法の開発を行っている。今回、著者は、アジュバンド活性を有する天然配糖体として最近注目されているキラヤサポニンから機能性糖鎖を切り出すことを試みた。

3. 研究の方法

(1) Click chemistry を応用した lycotetraose 誘導体の合成

著者は lycotetraose をアグリコン部と結合させるために、click chemistry の代表的反応である Huisgen 反応を応用することにした。Huisgen 反応は、acetylene 基と azide 基を Cu 触媒下で triazole 環に縮合させる反応である。Huisgen 反応を利用した click chemistry を行う為、lycotetraose の propargyl 誘導体を合成することにした (図 1)。この Cu 触媒を使った Huisgen 反応は水酸基の保護が必要でないこと、糖部に導入する acetylene 基とアグリコン部の azide 基が特異的に反応すること、また、それぞれの官

能基が分解しにくいことから、簡便に特異的に様々なアグリコンを配糖化できる。Lycotetraose に propargyl 基を導入する方法として、tomatinase を用いたトランスグリコシレーション法、並びに化学的変換による手法により調製を行った。

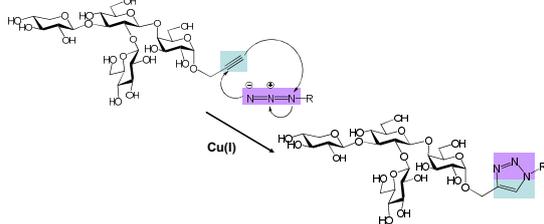


図1 Huisgen 反応を応用した Lycotetraose 誘導体の合成

アグリコン部として、市販の benzylazide、3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT)、さらに cholesterol と diosgenin の 3 位の水酸基を azide 化して用いた。

(2) キラヤサポニン糖鎖の切り出し

強いアジュバンド活性を持ち、臨床でも用いられているトリテルペン配糖体であるキラヤサポニン (図2) を構成する 28 位エステル結合糖鎖ならびに還元末端にグルクロン酸を有する 3 位エーテル結合型糖鎖を様々なアグリコン部に導入するために、オリゴ糖鎖として切り出す方法を検討した。

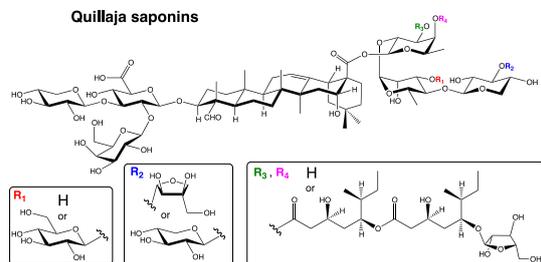


図2 キラヤサポニンの化学構造

キラヤサポニンの 28 位エステル結合糖鎖群をヨウ化リチウム、2,6-ルチジン中、アリルアルコールと還流してアリルグリコサイドとして切り出す。また、キラヤサポニンの 3 位にエーテル結合している糖鎖は還元末端の糖がグルクロン酸であることからグリチルリチンハイドラーゼ (GHase) を用いて切り出すことが出来る。GHase の調製はリコテトラオースの切り出しの際に用いた方法に準じ、NBRC より購入した *Aspergillus niger* を用いて合成に活用する。

4. 研究成果

(1) トマト糖鎖・lycotetraose に関する研究

一般にエンドグリコシダーゼを含めた加水分解酵素は可逆反応であることから、H₂O

の代わりにアルコールを加えると、対応するグリコサイドを得ることが可能である。そこで、tomatinase の加水分解反応の逆反応を利用して、propargylalcohol 体の調製を試みた。Tomatinase (リン酸緩衝液、pH 7.0) 溶液に、 α -tomatine (1) (~10% DMSO) 溶液、propargylalcohol を加え、室温で一晩放置した。反応液を遠心し、沈殿 (tomatidine) を除き、反応溶液上清を MCI gel, silica gel カラムクロマトグラフィーで分離・精製し、propargyl alcohol 体 (3) を 8% の収率で得た。本反応では、加水分解産物として lycotetraose (2) が 35% の収率で得られた。また、原料の α -tomatine が 48% 回収された (図3)。

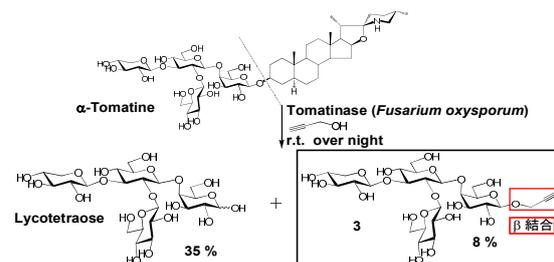


図3 Tomatinase を利用した β -propargyl lycotetraoside の合成

化合物 3 の ¹H-NMR (in pyridine-*d*₅) において δ 3.17 (1H, s, $-\text{C}\equiv\text{CH}$) にアセチレン基のプロトン、 δ 4.89 (1H, d, $J=7.4$ Hz, gal H-1) と、galactose のアノメリックプロトンの J 値 (7.4 Hz) から 3 は β 体であると決定した。次に、lycotetraose (2) をアセチル化して得られた lycotetraosyl acetate の 1 位に直接プロパルギルアルコールを導入する方法、lycotetraosyl acetate の還元末端の脱アセチルを行い、トリクロロアセトイミデート体を調製し、プロパルギルアルコールとグリコシル化する方法の 2 通りで化学的にプロパルギル体を合成した (図4)。

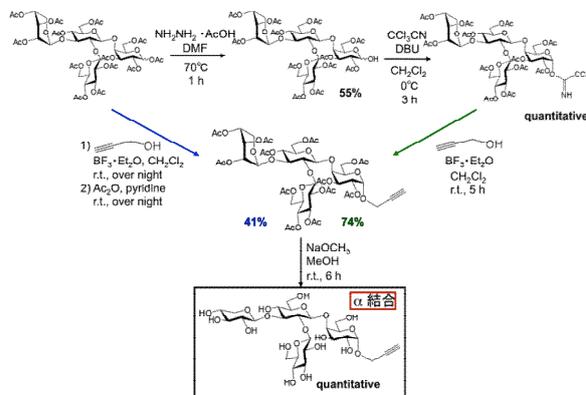


図4 化学的手法による α -Propargyl lycotetraoside の合成

得られた生成物はいずれも α 体で、収率もほぼ同じであるが、トリクロロアセトイミデート体経由は精製が容易である。このプロパルギル体を脱保護することで目的とする lycotetraosyl 誘導体を得た。

調製した propargyl lycotetraoside と各種アジド体について、Huisgen 反応の条件の検討を行った。まず、 α -propargyl lycotetraoside を MeOH に溶解し、benzyl azide、 $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ を用いる条件で反応を行ったところ生成物である benzyltriazole 体が 48% の収率で得られた。次にアジド基として抗エイズ薬として広く使われている AZT を用いて反応を行った。しかし、benzyl azide と同じ条件では反応が進行しなかった。そこで、sodium ascorbate と TBTA を添加剤として加え、条件検討を行ったところ、それぞれ 14%、85% の収率で生成物を得ることができた。また、 β -propargyl lycotetraoside についても、 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 溶液とし、AZT、 $\text{Cu}(\text{Oac})_2$ 、TBTA を用いることで、 β 体を 51% の収率で得ることができた (図 5)。

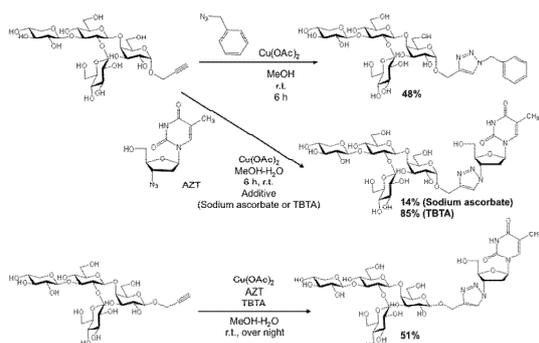


図 5 Huisgen 反応の条件の検討

次に、コレステロールとジオスゲニンの 3 位の水酸基をアジド化した誘導体と、propargyl lycotetraoside の反応を行った。 α -Propargyl lycotetraoside とコレステロールアジド体 ①、 β -propargyl lycotetraoside とコレステロールアジド体 ①、ジオスゲニンアジド体 ② について、 MeOH 、 H_2O 、hexane、*n*-butanol の混合液中、 $\text{Cu}(\text{Oac})_2$ と活性化剤の TBTA を加え、 60°C で反応を行った。その結果、それぞれ目的とするトリアゾール誘導体を 88%、35%、36% で得ることができた (図 6)。 β 体の反応収率が低いのは基質の溶解性が悪いことから未反応の原料が多量に回収されることによる。

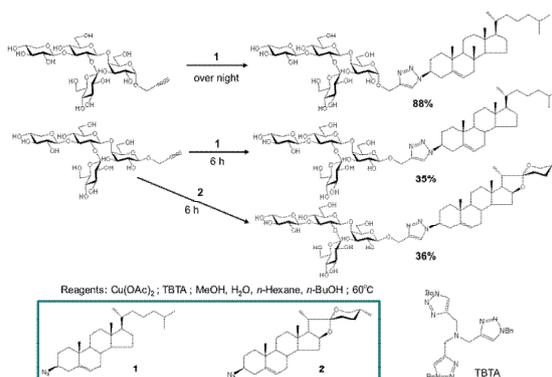


図 6 Click chemistry (Huisgen 反応) を応用した Lycotetraosyl 誘導体の合成

(2) キラヤサポニン糖鎖に関する研究

Quillaja saponaria 樹皮抽出物を ODS カラムクロマトで精製し、キラヤサポニン画分を得た。キラヤサポニン画分の 28 位エステル結合糖鎖は、アリルアルコール存在下、ヨウ化リチウムを用いて処理することでアリルグリコサイドとして切り出した。各種カラムクロマトにより分離しオリゴ糖鎖を得ることが出来たが、構造確定には更に精製が必要である。3 位のエーテル結合糖鎖はエンドグルクロニダーゼ (グリチルリチンヒドラーゼ: GHase) で切り出せるか検討した。NBRC より購入した *Aspergillus niger* を CA 培地で 3 日間振盪培養し菌体を増殖後、キラヤサポニンを含む CA 培地で更に 1 日培養することで酵素誘導を行った。菌体を除去した培養液を硫酸分画し、限外濾過することで粗酵素液を得た。得られた GHase をキラヤサポニン画分と反応させたが生成物は得られなかった。一方、28 位エステル結合糖鎖を切り出したプロサポゲニンを原料としたところ、GHase による生成物を得ることが出来た。得られた糖鎖 (GH-1) の構造は ^1H 、 ^{13}C -NMR により決定した (図 7)。

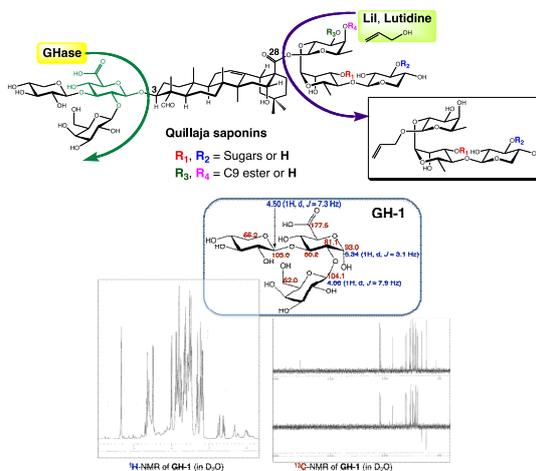


図 7 GHase によるキラヤサポニン 3 位糖鎖の切り出し

以上、トマト地上部より得られたトマチンを、トマト萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* より調製した tomatinase で処理する際に propargyl alcohol を添加することで β -propargyl lycotetraoside を得ることができた。一方、切り出された lycotetraose は化学的手法により α -propargyl lycotetraoside として選択的に得ることができた。それぞれのプロパルギル誘導体に対して、コレステロール、ジオスゲニンのアジド体と Huisgen 反応を行ったところ、 $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ と TBTA の組み合わせによりそれぞれの生成物を得ることができた。この反応条件を応用することで、アジド基を導入した様々なアグリコンを有する lycotetraosyl 誘導体を簡便に得ることができると期待される。今後、今回得られたリコテトラオース誘導体と天然から得られた配糖体について活性の比較を行っていく予定である。

一方、キラヤサポニンの3位のエーテル結合糖鎖は *Aspergillus niger* より調製した GHase 粗酵素液と、28位エステル結合糖鎖を切り出したプロサボゲニンを用いることで切り出すことが出来た (**GH-1**)。今後、加水分解反応の可逆反応を利用して **GH-1** のプロパルギル誘導体を調製し、Click chemistry を応用して各種糖鎖誘導体を合成していく予定である。また、エステル結合糖鎖の収量の増加を検討し、多様性のある糖鎖を調製していく必要もある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Manabe H., Murakami Y., El-Aasr M., Ikeda T., Fujiwara Y., Ono M., Nohara T., "Content variations of the tomato saponin esculeoside A in various processed tomatoes", *J. Nat. Med.* (査読有), **65**, 176-179 (2011).
- ② Nohara T., Ono M., Ikeda T., Fujiwara Y., El-Aasr M., "The tomato saponin, esculeoside A", *J. Nat. Prod.* (査読有), **73**, 1734-1741 (2010).
- ③ Nohara T., Nakano A., El-Aasr M., Ikeda T., Miyashita H., Yoshimitsu H., Murakami K., "Study of constituents of *Veronicastrum villosulum*", *J. Nat. Med.* (査読有), **64**, 510-513 (2010).
- ④ Ono M., Shiono Y., Tanaka T., Masuoka C., Yasuda S., Ikeda T., Okawa M., Kinjo J., Yoshimitsu H., Nohara T., "Three new aromatic glycosides from the ripe fruit of cherry tomato.", *J. Nat. Med.* (査読有), **64**, 500-505 (2010).
- ⑤ Ikeda T., Miyashita H., Nakano D., Nohara T., "Fascination with natural glycosides.", *Yakugaku Zasshi* (査読有), **130**, 679-686 (2010).
- ⑥ El-Aasr M., Fujiwara Y., Takeya M., Ikeda T., Tsukamoto S., Ono M., Nakano D., Okawa M., Kinjo J., Yoshimitsu H., Nohara T., "Onionin A from *Allium cepa* Inhibits Macrophage Activation.", *J. Nat. Prod.* (査読有), **73**, 1306-1308 (2010).
- ⑦ Li D.-P., El-Aasr M., Ikeda T., Ogata M., Miyashita H., Yoshimitsu H., Nohara T., "Two new Cucurbitane-type glycosides obtained from roots of *Siraitia grosvenori* SWINGLE.", *Chem. Pharm. Bull.* (査読有), **57**, 870-872 (2009).
- ⑧ Motomura K., Fujiwara Y., Kiyota N., Tsurushima K., Takeya M., Nohara T., Nagai R., Ikeda T., "Astragalosides Isolated from the Root of *Astragalus Radix* Inhibits the Formation of Advanced Glycation End-products.", *J. Agric. Food Chem.* (査読有), **57**, 7666-7672 (2009).
- ⑨ Iijima Y., Fujiwara Y., Tokita T., Ikeda T., Nohara T., Aoki K., Shibata D., "Involvement of Ethylene in the Accumulation of Esculeoside A during Fruit Ripening of Tomato (*Solanum lycopersicum*).", *J. Agric. Food Chem.* (査読有), **57**, 3247-3252 (2009).
- ⑩ Miyashita H., Nohara T., Ikeda T., "Efficient Synthesis of α - and β -Chacotriosyl Glycosides Using Appropriate Donors, and their Cytotoxic Activity.", *Carbohydr. Res.* (査読有), **343**, 1309-1315 (2008).
- ⑪ Kiyota N., Shingu K., Yamaguchi K., Yoshitake Y., Harano K., Yoshimitsu H., Miyashita H., Ikeda T., Tagawa C., Nohara T., "New C(28) Steroidal Glycosides from *Tubocapsicum anomalum*.", *Chem. Pharm. Bull.* (査読有), **56**, 1038-1040 (2008).
- ⑫ Fujiwara Y., Kiyota N., Motomura K., Mera K., Takeya M., Ikeda T., Nagai R., "Some natural compounds enhance N^{ϵ} -(carboxy-methyl)lysine formation", *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (査読有), **1126**, 152-154 (2008).

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① 池田 剛、トマト萎凋病菌の産生するトマチナーゼを用いたリコテトラオース誘導体の合成、第 27 回日本薬学会九州支部大会、2010 年 12 月 11 日、長崎大学薬学部
- ② 池田 剛、キラヤサポニン糖鎖の切り出しに関する研究、日本生薬学会第 57 回年会、2010 年 9 月 26 日、徳島文理大学薬学部
- ③ 池田 剛、トマト配糖体糖鎖・リコテトラオース誘導体の合成法に関する研究、第 26 回日本薬学会九州支部大会、2009 年 12 月 12 日、九州大学薬学部
- ④ 池田 剛、天然薬物成分の切り札 配糖体を極める、日本薬学会第 125 年会、2009 年 3 月 26 日、京都国際会館

〔図書〕（計 1 件）

- ① 伊藤美千穂、久城哲夫、池田 剛、京都廣川出版、生薬学へのいざない-生薬学は今日の医療にどう役立つのか-、2009 年、121-128（分担）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 剛 (IKEDA TSUYOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：80295138