

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20790017

研究課題名（和文）人工合成ワクチンの創製を目指した簡便な糖鎖合成法の開発とその実践

研究課題名（英文）Development of novel type of sequential glycosylation for creation of the synthetic vaccine.

研究代表者

白畑 辰弥 (TATSUYA SHIRAHATA)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：30414056

研究成果の概要（和文）：グリコシルカルバメートとグリコシルカルバモチオエートを用いて、ワンポットのグリコシル化を行ったところ温度を変えるだけで、 $\alpha\alpha$ 選択的に三糖を合成することが出来、簡便に糖鎖を構築する方法を見出した。グルコース、ガラクトース、マンノースで本方法が適用可能であることを明らかにすることができた。今後はこの方法を応用させて人工合成ワクチン合成に適用することを検討したい。

研究成果の概要（英文）：The novel type of one-pot sequential glycosylation with glycosyl carbamate and carbamothioate was achieved by changing the reaction temperature to utilize reactivity between those two glycosyl donors. This method could be applicable to synthesize various trisaccharides such as glucose, galactose and mannose. Further application of synthetic vaccine are in progress in our laboratory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：合成化学、糖鎖合成

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖鎖は、糖の組み合わせにより生体内でたんぱく質や脂質などの表面に結合し細胞内外の情報伝達や免疫システムに関与し細胞のガン化やウイルス感染に重要な役割を果たす事が知られている。そのため糖鎖は核酸、たんぱく質に次ぐ「第三の生命鎖」とも呼ばれ、

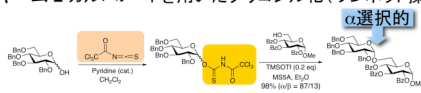
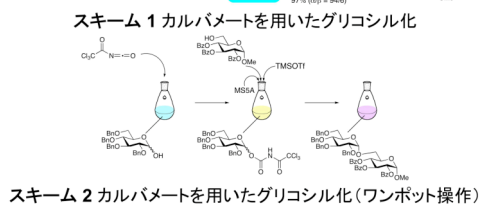
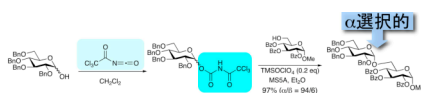
「次世代ポストゲノム研究の重要課題」として位置付けられている。その一例として糖鎖が生体内の防御機構に関与し、抗体産生時に重要な役割を果たしている事が知られている。実際にこれまでにマラリア原虫の表層に存在する糖鎖を合成しマウスに糖鎖を投与しその糖鎖が人工合成ワクチンとしての作用をする

事が報告されている (Seebergerら、*Nature*、2005年、418巻、785-789)。

(2) 巨大な糖鎖を合成する場合多くの工程数を有しその合成は容易ではない。そこで糖鎖を簡便に合成する事が非常に重要であると考えられ、世界中で新たな糖鎖合成法の開発が行われている。これまでの糖鎖合成の問題点を考察すると、グリコシルドナーを合成する際の煩雑さ、糖鎖合成には保護基の脱着といった反応工程数の増加を伴う等、未だ改善の余地があるという結論に達した。この事を考慮すると今後開発すべきグリコシル化反応はグリコシルドナーを簡単に合成する事ができ (①) 保護基の脱着を必要としない方法論 (②) が必要だと考えた。

(3) そこで我々は簡便に合成できるグリコシルドナーの開発を目的に研究を開始した。イソシアネートが水酸基と活性化剤無しで容易に反応する事、さらに生じたカルバメートのグリコシル化の脱離基としての高い反応性に着目し**スキーム1**に示す様にカルバメートを用いたグリコシル化を行う事ができた。さらに**スキーム2**の様在同一フラスコ内で脱水的に二段階を経て二糖を得る事ができた。

(Shirahataら、*Tetrahedron Letters*、2006年、47巻、267-271、*Carbohydrate Research*、2010年、345巻、740-749)



(4) この様に簡便なグリコシルドナーの開発に成功したので、保護基の脱着を必要としない方法論の開発に着手し、オルソゴナルグリコシレーションを採用する事にした。そこに至るには新たなグリコシルドナーが必要となる。すでにグリコシルカルバメートが容易に合成可能な事を見いだしたので、新たな

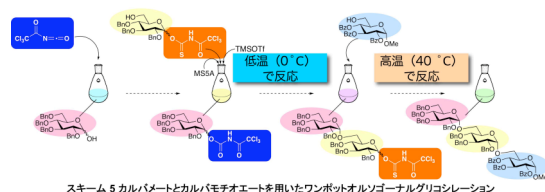
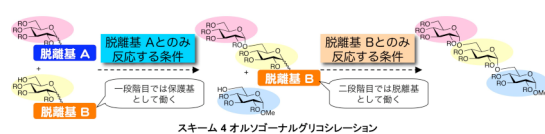
グリコシルカルバメートを開発し2つ目のグリコシルドナーとすることを考えた。そこで申請者は硫黄を含んだイソシアネート (イソチオシアネート) を合成し、それを糖に導入する事を考案した。その結果、イソチオシアネートを用いて新たにグリコシルドナーを合成する事ができた、さらに生じたカルバモチオエートをグリコシルドナーとしてルイス酸により活性化させグリコシル化を行う事ができた。(スキーム3)

## 2. 研究の目的

(1) これまでの研究結果を応用し、人工合成ワクチンの研究の進展のために糖鎖を簡便に大量に合成する事を考案した。具体的には簡便な糖鎖合成法の開発を行い、その合成法を利用してこれまで開発した新規グリコシルドナーを用いて糖鎖合成法を確立する。そしてその方法論を利用して糖鎖の大量合成ならびに生物学的研究への基質合成をおこなう予定である。本研究を通して糖鎖を簡便に合成する事を追求し実践的な合成を行い生物学的な実験を行うために研究を遂行する。

## 3. 研究の方法

(1) オルソゴナルグリコシレーションとはある反応では保護基として働くが他方の反応ではグリコシル化の脱離基として作用する反応性を利用して**スキーム4**の様糖鎖を一挙に合成する方法である。この方法に我々のこれまでの研究結果を利用する事とした。これまでの検討結果から2つのグリコシルドナー間には温度による反応性の相違が見られるので、**スキーム5**に示す脱水的なワンポットオルソゴナルグリコシレーションが可能ではないかと考えた。すなわち同じ活性化剤存在下で反応温度依存的に反応性が異なれば1段階目は低温 (0 °C) で2段階目では高温 (40 °C) でといった様同一フラスコ内で一挙に1段階目終了時に反応温度を変化させるだけで簡便に三糖が合成できると考えた。これらの反応の検討は困難が予想されるので、コンピューターを用い、立体選択性の予測、ならびに反応経路の解明を行う。



(2) 前述したオルソゴナルグリコシレーションの検討を基に、糖の種類を変え様々な糖鎖を合成し本糖鎖合成の適用範囲を検討する。そして実際に病原細菌表層に含まれる糖鎖を合成し、大量合成を行い、最後に人工ワクチンへの創製を視野に入れ生物学的実験を行うために糖鎖を誘導化する。

### 3. 研究成果

#### (1) Orthogonal glycosylation の検討

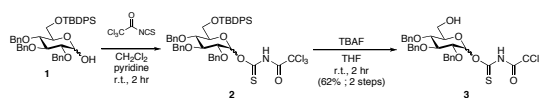
##### a) Orthogonal glycosylation の合成計画(グルコースを基質として)

グリコシルカルバメートとグリコシルカルバモチオエートを用いたグリコシル化の検討結果から、溶媒に Et<sub>2</sub>O を用いたとき両者には反応性の相違が見られた。すなわち、グリコシルカルバメートは 0 °C で反応し、グリコシルカルバモチオエートは室温にて反応が進行することが明らかとなった。

そこで、これらの反応温度の違いを利用し、orthogonal glycosylation を行うことが出来ると考えた。すなわち、一段階目をルイス酸存在下によるグリコシルカルバメートとグリコシルカルバモチオエートによるグリコシル化を低温下 (0 °C) で行い、引き続いて 6-OH グリコシルドナーを加え、反応温度を上昇 (室温) させるだけで簡便に三糖が得られると期待できる。

##### b) 6-OH グリコシルドナーの合成

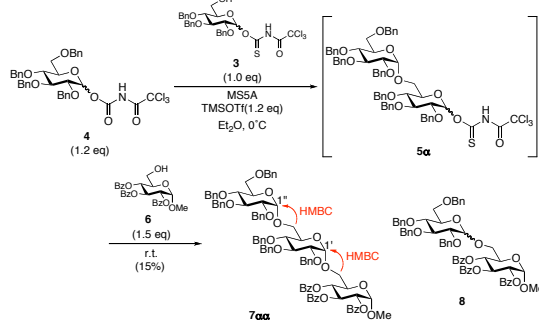
6-OH グリコシルドナーの合成を Scheme 6 に示す。1 にイソチオシアネートを作用させることで 2 とし、未精製のままで、TBAF を作用させ、6 位の TBDPS 基を脱保護することで、目的の 6-OH グリコシルドナー 3 を合成することが出来た。



Scheme 6.6-OH グリコシルドナー 3 の合成

##### c) One pot orthogonal glycosylation (初期の検討)

6-OH グリコシルドナー 3 を合成することが出来たので、実際に one pot orthogonal glycosylation を行った。Scheme 7 に示した様に 1 段階目のグリコシル化が終了するのを TLC により確認した後に、温度を室温に上昇させて 2 段階目のグリコシル化を行った。すると、温度を変えるだけで簡便に三糖 7 $\alpha\alpha$  を合成することが出来た。



Scheme 7. One pot orthogonal glycosylation 1

$\alpha\alpha$ 体 7 $\alpha\alpha$  の単離に成功したものの、それは大変困難であった。その原因として、未反応であるドナー 4 とアクセプター 6 が反応した二糖 8 が副生成物として得られたためであった。そこで筆者は、この方法論の確立には副生成物を抑制することが必要であると考える反応条件の検討を行うこととした。

##### d) 1 段階目のグリコシル化の検討

まず、反応系中でドナー 4 が消失すればこの問題を解決することが出来ると考えた。これまで、カルバメートを用いたグリコシル化は、ドナー側を過量に用いた検討しか行っていないので、1 段階目のグリコシル化の再検討を行った (Table 1)。まず、entry 1-3 に示した様にアクセプターの当量を検討したところ、entry 3 に示した様に 1.5 当量するとき、良好な結果が得られた。

さらなる向上を目指し、ルイス酸の当量の検討を行った。その結果、TMSOTf を 1.5 当量用いたときに TLC 上での 4 の消失を確認し、一番良好な結果が得られた (entry 3-5)。この

ことから、1段階目のグリコシル化のアクセプター及びルイス酸の当量をそれぞれ 1.5 当量に決定した。

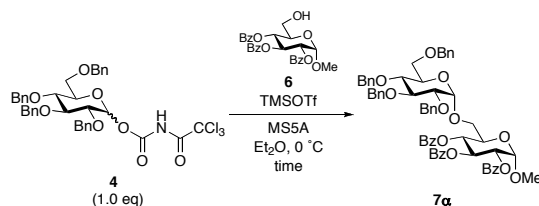
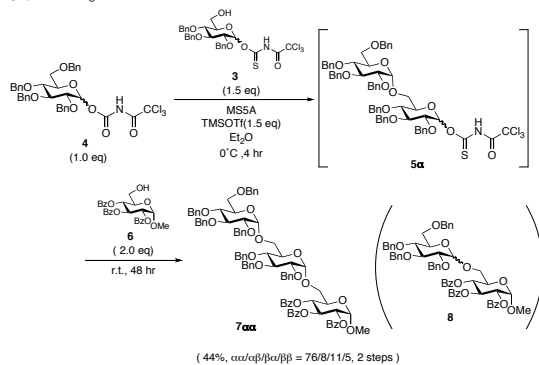


Table 1. 1段階目のグリコシル化の検討

entry	6	TMSOTf	time	yield	ratio ( $\alpha/\beta$ )
1	1.0 eq	1.0 eq	20 hr	85%	91/9
2	1.2 eq	1.0 eq	5 hr	86%	88/12
3	1.5 eq	1.0 eq	4 hr	85%	88/12
4	1.5 eq	1.2 eq	5 hr	82%	84/16
5	1.5 eq	1.5 eq	4 hr	94%	86/14

実際に、アクセプター**6** とルイス酸の当量を 1.5 当量に変更し one pot orthogonal glycosylation を行った (Scheme 8)。TLC 上でドナーが消失したことを確認した後に、温度を室温まで上昇させて2段階目のグリコシル化を行った。その結果、副生成物である二糖**8**の生成は減少し目的物を単離することに成功した。



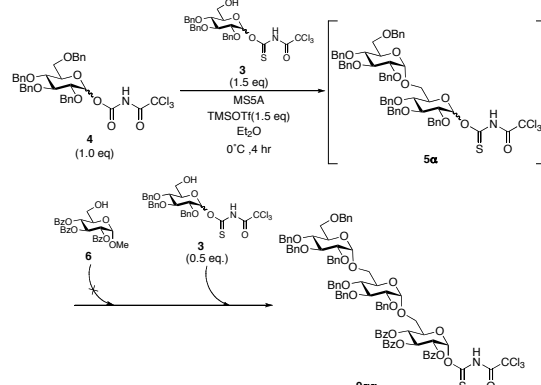
Scheme 8. One pot orthogonal glycosylation 2

しかし、この反応における収率は、中程度 (44%) にとどまったので、それぞれの反応について確認する必要がある。ここでの1段階目のグリコシル化においては、既に検討しているため、2段階目のグリコシル化に問題があるのではないかと考えた。

#### e) 当量の検討(アクセプター**6**について)

これまでの検討において得られた生成物を単離、構造決定したところ**9αα**であると判

明した。**9αα**は、Scheme 9に示した様に**4**と**3**の反応により**5α**が生成、引き続いて本来反応することが望ましい**6**ではなく、**5α**と反応して**9αα**が出来ると考えられる。



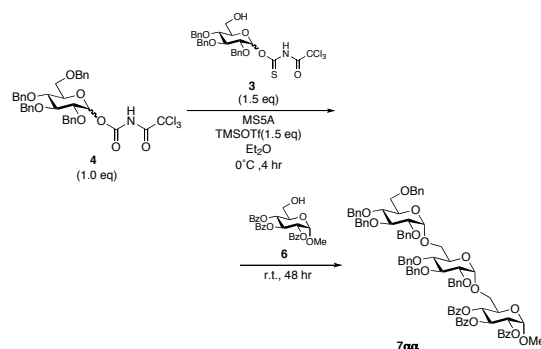
Scheme 9. One pot orthogonal glycosylationにおける副生成物

そこで、収率改善のための戦略として、この副反応を防ぐために2段階目のグリコシル化でのアクセプター**6**の当量を増やすことで見かけ上**6**の反応性が増し、収率が向上すると考えた。

実際に、2段階目のグリコシル化においてのアクセプター**6**の当量の検討を行った (Table 2)。Entry 2に示した様に、アクセプターの量を2.5当量に変えて検討を行ったところ、収率の向上は見られなかった。次に、3.0当量を増やし、検討したが同等の結果となった (entry 3)。

このような結果から、アクセプターの当量を変えても収率の改善は出来ないと考え、アクセプター**6**の当量をこれまで通り 2.0 当量と決定した。

Table 2. アクセプター**6**の当量の検討



entry	6	Yield (2 steps)	ratio ( $\alpha\alpha/\alpha\beta/\beta\alpha/\beta\beta$ )
1	2.0 eq	44%	76/8/11/5
2	2.5 eq	43%	76/10/8/6

## f) 温度の検討 (2段階目のグリコシル化において)

これまでの検討から one pot での反応における低収率の理由は、副生成物の生成よりもむしろ2段階目のグリコシル化において **6** の反応が不十分であるためと考えた。そこで、次の戦略として温度を上昇させることで反応速度が増し、三糖 **7** の収率が向上すると考え、温度の検討を行った (Table 3)。

まず、30 °C で検討を行ったところ、収率は室温時より上昇し 50% となった (entry 2)。さらに、40 °C で検討したところ収率はさらに向上し 72% でグリコシル化が進行することが明らかとなった (entry 3)。Et<sub>2</sub>O の沸点が、36 °C であるためこれ以上の反応温度の上昇は困難であると考え、2段階目のグリコシル化の温度を 40 °C と決定した。

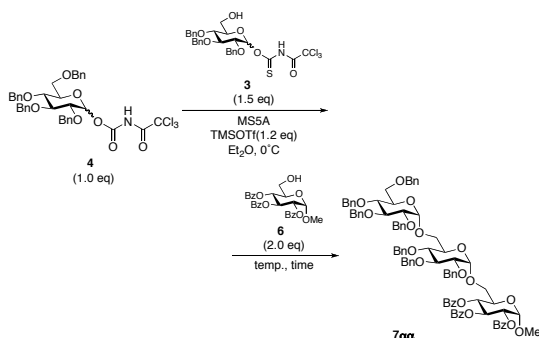


Table 3. 温度の検討

entry	temp.	time	Yield	ratio
			(2 steps)	( $\alpha\alpha/\alpha\beta/\beta\alpha/\beta\beta$ )
1	r.t.	48 hr	44%	76/8/11/5
2	30 °C	24 hr	50%	77/8/10/5
3	40 °C	24 hr	72%	75/10/9/6

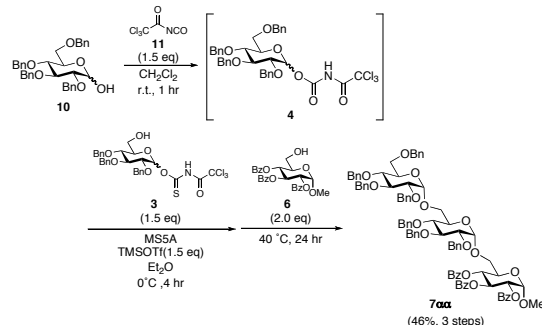
以上のような検討から、カルバメート **4** とカルバモチオエート **3** を用いて one pot orthogonal glycosylation を行ったところ、温度を変えるだけで簡便に三糖を合成する方法論を確立することが出来た。

## (2) One pot dehydrative orthogonal glycosylation (グルコースを基質として)

カルバメートを用いたグリコシル化において、1-OH 糖誘導体から one pot で脱水的にグリコシル化出来る利点を有することから、

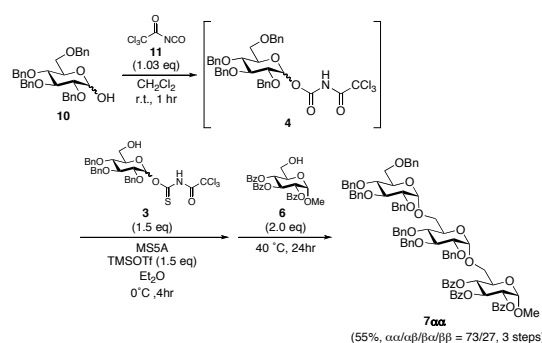
この方法がこれまで述べた one pot orthogonal glycosylation にも適用できるのではないかと考えた。すなわち、ドナーの調製並びにそのグリコシル化を連続的に行う one pot dehydrative orthogonal glycosylation の検討を行った (Scheme 10)。

その結果、**10** から one pot で脱水的に三糖 **7 $\alpha\alpha$**  を合成することが出来た。しかし、副生成物も多く見られた。これは、未反応である 0.5 当量のイソシアネート **11** がアクセプターの OH 基と反応したためと考えた。



Scheme 10. One pot dehydrative orthogonal glycosylation 1

そこで、副生成物の生成を減少させるためにイソシアネート **11** の当量を最小限に減らすことで、収率が向上するのではないかと考え検討を行った (Scheme 11)。その結果、1.03 当量のイソシアネート **11** を用いることで、反応は良好に進行し、かつ副生成物の生成を抑え、**10** から 3 steps で簡便に三糖 **7 $\alpha\alpha$**  を合成することが出来、収率の向上を実現した。



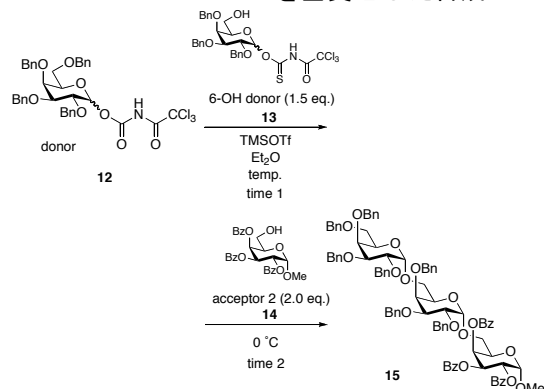
Scheme 11. One pot orthogonal dehydrative glycosylation 2

## (3) Orthogonal glycosylation (グルコース以外の糖を基質として)

## a) Galactose を基質とした合成

ガラクトースによる3糖合成の検討を行った(Table 4)。始めに、グルコースでの最適条件を用いて反応を試みたが、目的物 **15** は得られなかった(entry 1)。そこで、反応を緩和な条件にしたところ、低収率ながら、目的物 **15** を得る事ができた(entry 3,4)。この時、TLC の結果より、1段階目の反応において6-OH donor **13** のβ体が十分に反応が進行していないと推測できたため、6-OH donor **13** のα体のみを作用させたところ、収率の改善が認められた(entry 4)。さらに、TMSOTfの当量数を減少させても、反応が進行する事がわかった (entry 5)。entry 4,5 に関してはHPLCを用いて異性体の存在比を測定し、αα 選択的に進行する事を確認した。

**Table 4.** Galactose を基質とした合成

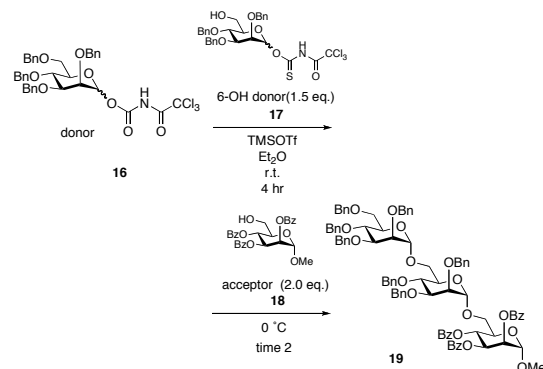


entry	TMSOTf (eq.)	time 1	temp.	time 2	yield	αα/others
1	1.5	4 hr	40 °C	24 hr	trace.	-
2	1.5	4 hr	r. t.	2 hr	19%	-
3	1.5	2 hr	r. t.	2 hr	24%	-
4	1.5	2 hr	r. t.	2 hr	57%	71/29
5	1.0	2 hr	r. t.	2 hr	49%	72/28

**b) Mannose を基質とした合成**

同様に、マンノースにおいても検討を行った(Table 5)。副生成物の増加を避けるため、TMSOTf を 1.0 eq. に設定し、反応を試みたところ、αα 選択的に目的物 **19** を得る事ができた(entry 1)。そこで、time 2 を延長する事で反応の完全な進行を期待したが、収率の上昇は見られなかった(entry 2)。また、ガラクトースと比較して反応性が高いと推測できたため、TMSOTf を触媒量である 0.2 eq. にしたところ、低収率ながら目的物を得る事ができ

(entry 3)、0.5 eq. に設定したところ、大幅に収率を減少させる事なく、目的物 **19** を得る事ができた(entry 4)。さらに、副生成物の減少を期待して、6-OH donor **17** を 1.1 eq. としたが、収率の改善はみられなかった(entry 5)。



**Table 5.** Mannose を基質とした合成

entry	6-OH donor (eq.)	TMSOTf (eq.)	time 2	yield
1	1.5	1.0	2 hr	73%
2	1.5	1.0	20 hr	73%
3	1.5	0.2	2 hr	15%
4	1.5	0.5	4 hr	61%
5	1.1	0.5	4 hr	52%

以上のようにしてこれまで多工程要して合成した糖を1工程にて合成する方法論を確立することができ、この方法を様々な糖の合成に適用することに成功した。

この方法論を人工合成ワクチンの合成に用いることが期待される。

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 2 件)

- ① Shirahata, Tatsuya; Matsuo, Jun-ichi; Teruya, Satoko; Akimoto, Nanao; Kurimoto, Taku; Kaji, Eisuke; Ōmura, Satoshi: **Improved catalytic and stereoselective glycosylation with glycosyl N-trichloroacetylcarbamate: application to various 1-hydroxy sugars** *Carbohydrate Research*, 2010, Vol 345, pp. 740-749. (査読有)
- ② Nagai, Takayuki; Shimizu, Yuriko; Shirahata, Tatsuya; Sunazuka, Toshiaki; Kiyohara, Hiroaki; Ōmura, Satoshi; Yamada Haruki: **Oral adjuvant activity for nasal influenza vaccines causes by**

**combination of two trihydroxy fatty acid stereoisomers from the tuber of Pinellia ternate:** *International Immunopharmacology*, 2010, Vol 10, pp. 665-661. (査読有)

〔学会発表〕 (計 1 件)

① 白畑辰弥, 小島麻実, 照屋智子, 横山将来, 松尾淳一, 牧野一石, 砂塚敏明, 小林義典, 梶 英輔, 大村智、グリコシルカルバメートとカルバモチオエートを用いた簡便な糖鎖連結の方法論の開発、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月 29 日、岡山・桃太郎アリーナ

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ；

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/shoyaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白畑 辰弥 (TATSUYA SHIRAHATA)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：30414056

