様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：３２６０７
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ１４７９６

研究課題名（和文）ワクチンアジュバントの創製を目指したオンジサポニンのフロー合成と性質の評価

研究課題名（英文）Flow synthesis and characterization of onjisaponins for the creation of vaccine adjuvants

研究代表者
小西　成樹（Konishi, Naruki）

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：７０８４４５６２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：オンジサポニンの全合成経路の確立に向けて、オンジサポニンのアグリコン骨格類似のオレアノール酸を基質として、以下の基礎的な反応条件検討を行った。①マイクロフローリアクター式C-3位配糖化の適用検討②D-フコース位置選択的シンナモイル化と分子内転位反応の検討
マイクロフローリアクターの使用は、D-フコースなどの低反応性デオキシ糖の配糖化に有効だった。量的供給が可能となったサポニンを基質として、ボリン酸型の触媒であるジフェニルボリン酸2-アミノエチルと求核塩基であるキヌクリジンの使用により、位置選択的シンナモイル化体が合成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
オンジサポニン類のように糖鎖構造にシンナモイル基が結合する配糖体の合成は、縮合反応や脱保護段階でカラム分離不可能なcis/trans異性体を生じやすい課題があった。本研究の成果である合成終盤段階でのサポニン糖鎖直接的Cin基導入法は、異性体を生じる課題の解決策として天然配糖体や誘導体合成への利用を期待できる。また、開発が求められている次世代型の粘膜ワクチンは皮下接種ワクチンと比較して病原体の初発感染を防ぐ抗原特異的分泌型IgAの産生や変異抗原にも対応できる交叉免疫の付与が可能である。今後本課題を達成することで、臨床応用例の少ない経鼻接種インフルエンザ粘膜ワクチンアジュバントの実用化に繋がる。

研究成果の概要（英文）：In order to establish the total synthetic route of onjisaponins, the following basic reaction conditions were investigated by using oleanolic acid substarate, which is similar to the aglycon skeleton of onjisaponins.
(1) Application of microfluidic C-3 glycosylation; (2) Regioselective cinnamoylation of D-fucose and intramolecular rearrangement reaction. The use of microflow reactors was effective in the glycosylation of low-reactive deoxysugars such as D-fucose. Regioselective cinnamoylated compounds could be synthesized with the use of the borinic acid-type catalyst (2-aminoethyl diphenylborinic acid), and the nucleophilic base, (quinuclidine) by using saponin, which became available in large quantities, as a substrate.

研究分野：有機合成化学

キーワード：オンジサポニン　フロー合成　オレアノール酸　配糖化

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

医薬品として実用化されているサポニン (薬用植物の甘草含有のグリチルリチンやマナマコ含有のホロトキシン類) には様々な用途がある (Man, S. *et al. Fitoterapia* **2010**, *81*, 703.) 。その一つとしてアジュバントと呼ばれるワクチンの免疫増強作用の補助剤が知られている。新型コロナウイルス感染症を例としても、ワクチン開発は予防医学に重要である。しかし、ウイルス抗原を不活化した安全性の高いワクチンは単体では十分な効果を発揮せず、アジュバントの併用が必要である。サポニンアジュバントにはシャボンの木由来のキラヤサポニン (Wang, P. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3256.) が実用化されている他、我々の研究グループが生薬オンジ由来のサポニン類のインフルエンザウイルス粘膜ワクチンアジュバント活性を明らかにしている (Nagai, T.; *et al. Vaccine* **2001**, *19*, 4824.) 。粘膜ワクチンは従来の皮下接種ワクチンと異なり、全身性免疫の抗原特異的 IgG 抗体価の上昇だけでなく、粘膜免疫の抗原特異的 IgA 抗体価の上昇を期待できる。また、経鼻・経膣・経皮などの接種ルートを介した安全性における利点も大きい。

しかし、オンジサポニンの構造類縁体が生薬中には数多く存在し、個々の成分含有量が乏しくなり供給量に問題があった (Sakuma, S.; Shoji, J. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *30*, 810.) 。一方、化学合成法は産業上で供給可能なサポニンに現状では限りがあるものの、全合成経路の確立や新規誘導体の創製を可能とする利点があった。オンジサポニンを全合成するには、保護・脱保護・配糖化の工程を繰り返すゆえに、複雑な構造 (位置選択的な糖鎖の結合及び D-フコース 4’位選択的シンナモイル基のエステル結合) の構築が鍵となる。研究代表者はこれまでの研究でオンジサポニンの類縁アグリコンであるオレアノール酸と単糖を基質としたマイクロフローリアクター (以下フローと称す) を利用した C-28 位配糖化法の確立を主に行ってきた (Konishi, N. *et al. J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 6703.) 。

２．研究の目的

本研究ではオンジサポニンの全合成経路の確立を最終目的として、(1)マイクロフローリアクターを利用した配糖化法の適用拡大、(2)位置選択的なシンナモイルエステル結合構築法の確立を行った。

３．研究の方法

(1)マイクロフローリアクター式オレアノール酸 C-3 位配糖化の適用拡大

オレアノール酸の C-28 位をベンジル (Bn) 基で保護した糖受容体 (アクセプター) とベンゾイル (Bz) 基で保護した各種糖供与体 (ドナー) を用いたフロー式配糖化-脱保護連続反応を行った。すなわち、ジクロロメタン (CH_2Cl_2) に溶解させた活性化剤 TMSOTf 溶液及びアクセプターと 1.5 当量のドナーの混合溶液を別途調製し、それぞれをシリンジに取りフロー本体 (Comet X-01) に接続した。フロー管の長さと断面積はそれぞれ 1.0 m と 1.0 mm とし、シリンジからテフロンチューブへと溶液を流しフロー管内で C-3 位配糖化を行った。フロー管の出口には配糖化後の溶液を回収するバッチ式容器に予め Bz 基の脱保護剤である 10 当量の水素化ナトリウム (NaH, 60% oil in despersion) と MeOH を加えて試みた。その後、得られた C-28 位ベンジル配糖体を基質としてパラジウム炭素 (Pd/C) を用いた接触水素化還元を行った。

(2)位置選択的シンナモイル化法の検討

オレアノール酸の C-3 位を TES 基で保護したアクセプターとアセチル (Ac) 基で保護した各種ドナーを用いたフロー式配糖化-脱保護連続反応を行って配糖体を調製した。すなわち、ジクロロメタン (CH_2Cl_2) に溶解させた活性化剤 TMSOTf 溶液及びアクセプターと 1.5 当量のドナーの混合溶液を別途調製し、それぞれをシリンジに取りフロー本体 (Comet X-01) に接続した。フロー管の長さと断面積はそれぞれ 1.0 m と 1.0 mm とし、シリンジからテフロンチューブへと溶液を流しフロー管内で C-3 位配糖化を行った。フロー管の出口には配糖化後の溶液を回収するバッチ式容器に予め Bz 基の脱保護剤である 10 当量の水素化ナトリウム (NaH, 60% oil in despersion) と MeOH を加えて試みた。次に、得られた配糖体を用いて位置選択的なシンナモイル化を検討した。すなわち、各種縮合剤や有機触媒を用いて D-フコースを始めとしたデオキシ糖の 1,2-*cis* ジオール上におけるエカトリアル部位の位置選択的シンナモイル化を試みた。さらに、得られたシンナモイルサポニンを基質として、各種塩基試薬を用いた分子内アシル基転位反応を利用して、アキシャル部位を位置選択的シンナモイル化したシンナモイルサポニンの合成を検討した。

４．研究成果

(1)マイクロフローリアクター式オレアノール酸 C-3 位配糖化の適用拡大

まずオレアノール酸 C-28 位カルボキシ基のベンジル化で得たアクセプター **1** 及び D-グルコースをベンゾイル基で保護したイミダート糖供与体 **2a** を調製した。続いて、**1** と 1.5 当量の **2a** に対して常温下で 1 当量の TMSOTf を用いると、C-3 位配糖化は副生成物のオルトエステル体を生成することなく円滑に進行した。続く Bz 基の連続的な脱保護と MeOH 中でパラジウム/炭素(Pd/C)触媒を用いた接触水素化還元によるベンジル(Bn)基の脱保護を行い、 サポニン **3a** を β-選択的に合成できた。フロー配糖化では、同条件のバッチ式配糖化と比較して 20%以上の収率を改善できた。続いて他の単糖（D-ガラクトース、D-マンノース、D-キシロース、L-アラビノース）、デオキシ糖（L-ラムノース、D-フコース）、二糖（D-セロビオース、D-ラクトース、D-マルトース）に対応するドナー**2b-2j** を用い、フロー配糖化を実施した。それぞれの C-3 位配糖化と Bz 基脱保護連続反応は首尾良く進行し、続く Bn 基の脱保護によって 9 種類のサポニン **3b-3j** を α もしくは β-選択的に得た。なお、フロー配糖化は他のアグリコンである植物ステロイド・トリテルペン等にも応用可能だった (図 1) 。それゆえ、C-3 位に結合する糖やアグリコンの種類を改変した誘導体合成にも応用でき、構造活性相関の解明を視野に入れた配糖化法として確立できた。

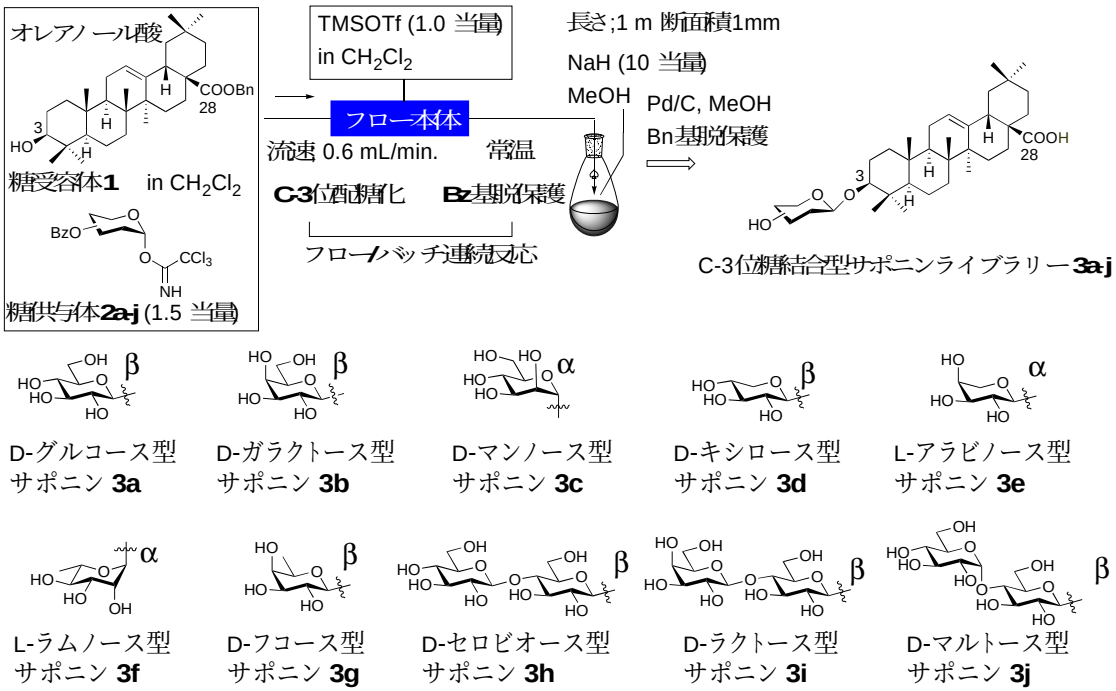

図1 フローC-3位配糖化を利用した種々の糖が結合するサポニンライブラリーの構築

(2)位置選択的シンナモイル化法の検討

はじめに、オレアノール酸 C-3 位ヒドロキシ基の TES 化で得たアクセプター **4** 及び D-フコースをアセチル (Ac) 基で保護したイミダート糖供与体 **5** を調製した。続いて、**4** と 2.0 当量の **5** に対して常温下で 1 当量の BF_3•OEt_2 を用いると、C-28 位配糖化は円滑に進行した。D-フコースのように 4 位ヒドロキシ基がアキシャル側に配している糖は静電的安定化によってオキソカルベニウムイオンを生じやすく、形成したグリコシド結合が分解を受けやすく不安定であることが知られている (Asahina, Y.; Ando, T.; Hojo, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2022**, *95*, 1196.) 。フロー配糖化によって反応後の生成物を速やかに回収し、続く Ac 基の連続的な脱保護を MeOH 中で 10 当量の水素化ナトリウム (NaH in oil; 60% disp.) を用いたメタノリシス反応で行うと、過剰な酸を中和しながら再現性良く配糖体 **6** を β-選択的に高収率で合成できた (図 2) 。

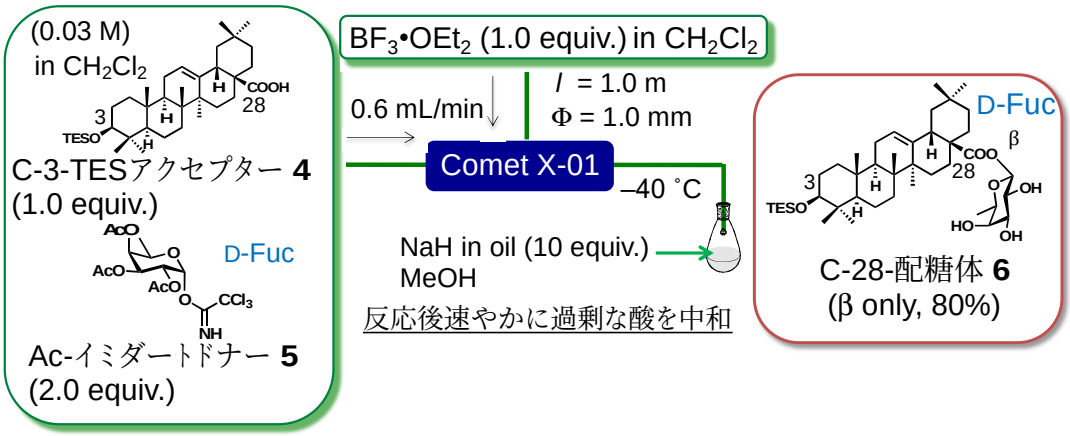

図2 フローC-28位配糖化と脱保護反応の2段階合成を利用したD-フコース型のサポニンの合成

続いて、配糖体 6 に対して化学量論量のジフェニルボリン酸 2-アミノエチル (2-APB) を用いると、D-フコースの 3'位選択的 Cin 化が良好な収率で進行した。続いて、C-3 位 TES 基を Dowex resin+で脱保護したサポニン 7 に対して、求核塩基であるキヌクリジンを用いると、サポニン糖鎖上で分子内アシル基転位反応が進行し、4'位シンナモイルサポニン 8 が首尾良く得られた (図 3) 。本法はメトキシ基の結合したシンナモイル基や種々のデオキシ糖を基質として検討した結果、2 箇所に糖鎖構造を有するビスデスモシド構造のサポニン合成にも応用可能だった。

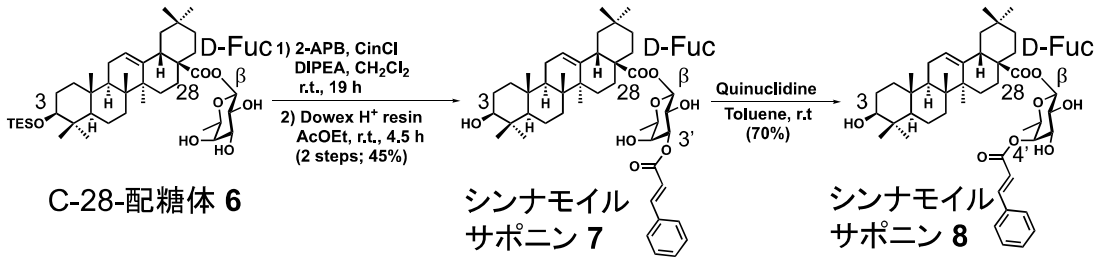

図3 位置選択的シンナモイル化法を利用したシンナモイルサポニンの合成

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2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 Naruki Konishi, Tatsuya Shirahata, Yuki Yoshida, Noriko Sato, Eisuke Kaji, Yoshinori Kobayashi	４．巻 510
２．論文標題 Efficient synthesis of diverse C-3 monodesmosidic saponins by a continuous microfluidic glycosylation/batch deprotection method	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Carbohydrate Research	６．最初と最後の頁 108437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.carres.2021.108437	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 －

１．著者名 小西成樹	４．巻 55
２．論文標題 サポニンアジュバント合成を目指したフロー配糖化	５．発行年 2023年
３．雑誌名 月刊細胞	６．最初と最後の頁 39-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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　0件）

１．発表者名 小西 成樹 ， 白畑 辰弥 ， 首藤 美琴 ， 金子 優香 ， 佐藤 倫子 ， 小林 義典
２．発表標題 位置選択的アシル化と分子内転位反応を利用したオレアノール酸ビスデスモシドシンナモイルサポニンの合成
３．学会等名 東京糖鎖研究会　Glyco Tokyo 2022
４．発表年 2022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