

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 28日現在

機関番号：14303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22850010

研究課題名（和文） グリコシルアジドの一段階水中合成を基盤とする簡便な複合糖質合成法の開拓

研究課題名（英文） Facile Synthesis of Glycoconjugate based on Direct Synthesis of Glycosyl Azide in Water

研究代表者

田中 知成 (TANAKA TOMONARI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教

研究者番号：70585695

研究成果の概要（和文）：有機合成法によりオリゴ糖鎖を複合体化することは、糖に多数存在するヒドロキシ基の保護・脱保護が必須であるため非常に煩雑であり、簡便な糖鎖複合体の合成法の開発が求められている。本研究では、保護基を使わないグリコシルアジドの一段階合成法とクリックケミストリーを用いて、従来法よりも簡便かつオリゴ糖鎖にも適用可能な糖鎖付与技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：It is very difficult to prepare glycoconjugates with oligosaccharide by chemical synthesis because it necessitates laborious tasks including protection and deprotection of hydroxy groups. Then, the facile method of glycoconjugates with oligosaccharide is demanded. In this research, I successfully developed the protecting-group-free addition of oligosaccharide by direct azidation of unprotected sugar and Click chemistry starting from unprotected sugar.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,250,000	375,000	1,625,000
2011年度	1,150,000	345,000	1,495,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：糖鎖工学

科研費の分科・細目：複合化学・合成化学

キーワード：糖鎖高分子、オリゴ糖、クリックケミストリー、無保護、脱水縮合剤

1. 研究開始当初の背景

核酸、タンパク質に次ぐ「第3の生体高分子鎖」として注目されている糖鎖は、近年、細胞表層に存在するオリゴ糖鎖が、細胞の分化、ガン化、細胞間情報伝達など様々な生命現象に関与することが解明され、益々研究が盛んになっている。しかし、オリゴ糖鎖は、幾種類もの単糖類が様々な位置および立体でグリコシド結合しているために非常に複雑な構造を有しており、有機合成による調製

は非常に困難である。また、天然から抽出できる量は非常に微量な上、構造が不均一なものが多いことも、オリゴ糖鎖の機能解明やマテリアル化などを進める上で問題となっている。

糖質関連化合物の有機合成は、これまで極めて多く報告されているが、糖に多数存在するヒドロキシ基の保護・脱保護の工程が不可欠であり、非常に煩雑である。高分子鎖に糖を付与した糖鎖高分子の合成においても、同

様の煩雑な合成法が多い。さらに、単糖や二糖などの低分子量の糖を対象としたものがほとんどであり、高分子量のオリゴ糖鎖に対して効率的に適用できる方法はほとんどない。例えば、アジド基を導入した糖とアセチレン基を有する化合物とのクリックケミストリー(Huisgen 反応)は、副反応がほとんどない簡便な方法として非常に多く利用されているが、糖へのアジド基導入のための有機合成は煩雑であり、通常、糖のヒドロキシ基の保護、アジド基の導入、脱保護、と多段階の工程が必要である。よって、複合糖質の簡便な合成を達成するためには、無保護糖から目的化合物までの工程数を短縮、特に基質合成の簡便化は非常に有効であり、糖鎖複合体の合成において解決すべき課題である。

2. 研究の目的

簡便で副反応もほとんどない反応として広く利用されているクリックケミストリー(Huisgen 反応)は、これまでアジド基を有するオリゴ糖鎖を簡便かつ効率的に調製することはほとんど不可能であったため、高分子量のオリゴ糖鎖を用いた検討は少ない。

本研究では、様々な鎖長のアジド化糖鎖を調製し、アセチレン基を有する化合物とのクリックケミストリーを利用して、N-結合型糖鎖など生体内オリゴ糖鎖にも適用可能な簡便な複合糖質合成法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 基質合成

脱水縮合剤 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride (DMC)を用いて、保護基を使用せず簡便かつ高収率にβ-グリコシルアジドを合成する(*Chem. Commun.*, 3378 (2009))。原料とする無保護糖は市販の単糖から直鎖状七糖、さらには還元末端にシアル酸を有するN-結合型糖鎖を用いる。また、アセチレン基を有する化合物は、適宜合成して使用する。

(2) クリックケミストリーによる糖質複合体の合成

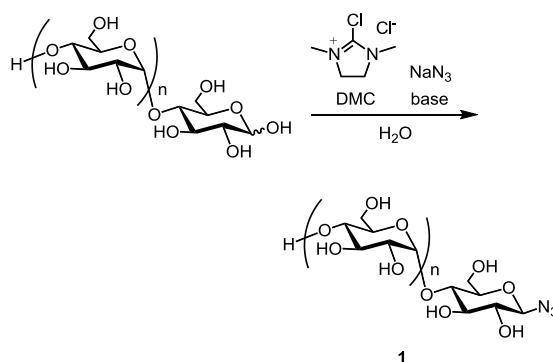
得られたβ-グリコシルアジドを基質としてアセチレン基を有する化合物とのクリックケミストリーについて、高収率で生成物が得られるよう反応条件を詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) 基質合成

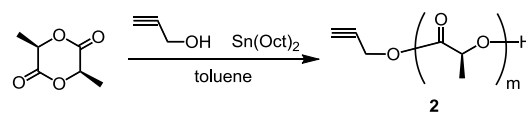
塩基性水溶液中、脱水縮合剤 DMC とアジ化ナトリウムを用いて、糖に多数存在するヒドロキシ基を保護することなく、糖アノマー位の直接アジド化反応を行った(Scheme 1)。無保護の単糖、および二糖から七糖までの直鎖状オリゴ糖、さらには、非還元末端にシア

ル酸を有する N-結合型糖鎖を原料とした。N-結合型糖鎖は、卵黄由来の糖ペプチドを糖加水分解酵素 *endo-β-N-acetylglucosaminidase* で加水分解処理した後、ゲルろ過クロマトグラフィで精製して調製した。生成物であるβ-グリコシルアジド **1** は、いずれも定量的に得られ、ゲルろ過クロマトグラフィ、あるいは HPLC 分取により単離したのち、NMR により構造を確認した。



Scheme 1 β-グリコシルアジドの一段階合成.

続いて、合成したβ-グリコシルアジドとアセチレン基を有する化合物の間での銅触媒によるクリックケミストリー(Huisgen 反応)を検討した。本研究では、親水性のオリゴ糖と相反する疎水性高分子としてアセチレン基を有するポリ乳酸を取り上げて検討した。ポリ乳酸は、近年、バイオベースポリマーとして注目を集め、工業化も始められている高分子である。このポリ乳酸は、乳酸の二量体である L-ラクチドを原料として、プロパルギルアルコールを開始剤としたオクチル酸スズ触媒による開環重合により、ポリマー末端にアセチレン基を有するポリ-L-乳酸 **2** を合成した(Scheme 2)。合成した **2** は、NMR および GPC により構造を確認した。



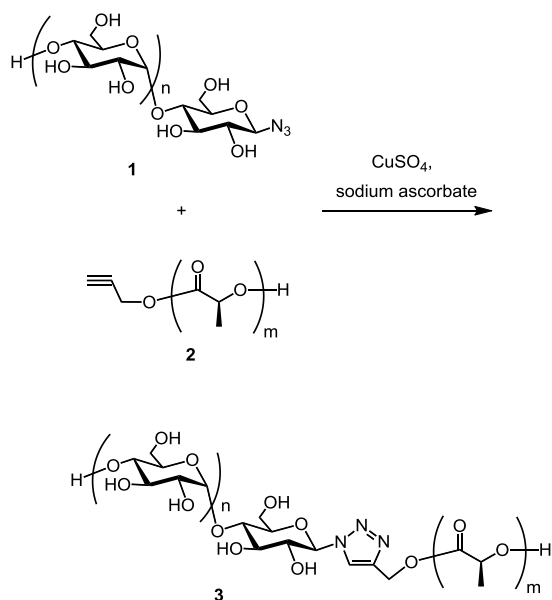
Scheme 2 アセチレン基を有するポリ乳酸の合成.

(2) クリックケミストリーによる糖質複合体の合成

合成したβ-グリコシルアジド **1** とアセチレン基を有するポリ-L-乳酸 **2** を基質としてクリックケミストリーによる糖修飾ポリ乳酸 **3** の合成を検討した(Scheme 3)。本クリックケミストリーでは、銅触媒として硫酸銅(II)五水

和物と L-アスコルビン酸ナトリウムを用いた。反応溶媒は、親水性の糖と疎水性のポリ-L-乳酸を共に溶解させるために水と有機溶媒の混合溶媒を用いた。有機溶媒には水への溶解性が高く、ポリ乳酸の良溶媒である 1,3-ジオキソランを用いることで、高収率で反応が進行した。分子量が大きく水への溶解度が低い直鎖状オリゴ糖の場合には、ジメチルスルホキシドを加えることで良好に糖基質を溶解して反応することができた。また、リガンドとして tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] amine を添加することにより、銅触媒の量を低減させることができた。

合成した糖修飾ポリ-L-乳酸 **3** は、片末端に多数の親水性基(ヒドロキシ基)を有する疎水性ポリマーであることから、各種有機溶媒中でヒドロキシ基同士の相互作用により会合体を形成することが、動的分散法(DLS)、および原子間力顕微鏡(AFM)による観察により明らかとなった。



Scheme 3 クリックケミストリーによる糖修飾ポリ乳酸の合成。

また、本法を利用してアセチレン基を導入したポリスチレン樹脂などの固相担体への糖鎖の導入を試みたが、IR による分析では糖鎖の導入は確認できなかった。固相への効率的な導入については今後の課題である。

以上、保護基を使わないグリコシルアジドの一段階合成法とクリックケミストリーを用いて、従来法よりも簡便かつオリゴ糖鎖にも適用可能な糖鎖付与技術を開発した。本合成法を利用することで、様々な高分子へ任意の糖鎖を簡便かつ効率的に導入できるため、多種多様なオリゴ糖鎖のマテリアル化や機能解明が益々発展することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- ① Tomonari Tanaka, Tomonori Wada, Masato Noguchi, Masaki Ishihara, Atsushi Kobayashi, Takayuki Ohnuma, Tamo Fukamizo, Ryszard Brzezinski, Shin-ichiro Shoda, “4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl β-D-glycosaminides: Novel Substrates for Transglycosylation Reaction Catalyzed by Exo-β-D-glucosaminidase from *Amycolatopsis orientalis*”, *J. Carbohydr. Chem.*, in press, 査読有.
- ② Masato Noguchi, Miwa Nakamura, Ayaka Ohno, Tomonari Tanaka, Atsushi Kobayashi, Masaki Ishihara, Masaya Fujita, Akiko Tsuchida, Mamoru Mizuno, Shin-ichiro Shoda, “A dimethoxytriazine type glycosyl donor enables a facile chemo-enzymatic route toward α-linked *N*-acetylglucosaminyl-galactose disaccharide unit from gastric mucin”, *Chem. Commun.*, 48, 5560-5562 (2012), 査読有.
DOI: 10.1039/C2CC30946G
- ③ Masashi Kiyohara, Takashi Nakatomi, Shin Kurihara, Shinya Fushinobu, Hideyuki Suzuki, Tomonari Tanaka, Shin-ichiro Shoda, Takane Katayama, Kenji Yamamoto, Hisashi Ashida, “An α-*N*-Acetylgalactosaminidase from Infant-associated *Bifidobacteria* Belonging to a Novel Glycoside Hydrolase Family 129 is Implicated in an Alternative Mucin Degradation Pathway”, *J. Biol. Chem.*, 287, 693-700 (2012), 査読有.
DOI: 10.1074/jbc.M111.277384
- ④ Do-Hyun Im, Kei-ichi Kimura, Fumitaka Hayasaka, Tomonari Tanaka, Masato Noguchi, Atsushi Kobayashi, Shin-ichiro Shoda, Kentaro Miyazaki, Takayoshi Wakagi, Shinya Fushinobu, “Crystal structures of glycoside hydrolase family 51 α-L-arabinofuranosidase from *Thermotoga maritime*”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 423-428 (2012), 査読有.
DOI: 10.1271/bbb.110902
- ⑤ Naoki Yoshida, Masato Noguchi, Tomonari Tanaka, Takeshi Matsumoto, Naoya Aida, Masaki Ishihara, Atsushi Kobayashi, Shin-ichiro Shoda, “Direct Dehydrative Pyridylthio-glycosidation of Unprotected Sugars in Aqueous Media Using 2-Chloro-1,3-dimethylimidazolium Chloride as a Condensing Agent”, *Chem. Asian J.*, 6, 1876-1885 (2011), 査読有.
DOI: 10.1002/asia.201000896
- ⑥ 田中知成, “簡便な糖鎖合成を目指して - 保護基を使わない糖誘導体の直截的水

中合成”, *繊維学会誌 (繊維と工業)*, 67, 322-324 (2011), 査読無.
https://www.jstage.jst.go.jp/browse/fiber/67/11/_contents/-char/ja/

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① Tomonari Tanaka, Hiroyuki Fukuhara, Yoshiharu Kimura, “Protecting-group-free Synthesis of Saccharide-terminated Polylactides by Direct Azidation of Unprotected Sugar and Click Chemistry”, 26th International Carbohydrate Symposium, 2012/7/23, Madrid, Spain.
- ② 田中知成, 福原浩之, 中嶋元, 木村良晴, “糖修飾ポリ乳酸の保護基フリー合成と会合挙動解析”, 第 22 回バイオ・高分子シンポジウム, 2012/6/25, 東京大学.
- ③ 田中知成, 福原浩之, 中嶋元, 木村良晴, “無保護糖直接活性化法とクリックケミストリーによるオリゴ糖修飾ポリ乳酸の保護基フリー合成”, 第 61 回高分子学会年次大会, 2012/5/29, パシフィコ横浜.
- ④ 福原浩之, 田中知成, 木村良晴, “オリゴ糖鎖に適用可能な糖鎖高分子の保護基フ

リー合成”, 第 1 回 4 大学連携研究フォーラム, 2011/12/9, 京都工芸繊維大学.

- ⑤ 福原浩之, 田中知成, 木村良晴, “オリゴ糖による末端修飾ポリ乳酸の保護基フリー合成”, 第 60 回高分子討論会, 2011/9/30, 岡山大学.

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 知成 (TANAKA TOMONARI)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教
研究者番号 : 7 0 5 8 5 6 9 5

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :