

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658293

研究課題名(和文) 斬新な機能を有すると予測される、ガラクトシクロデキストリンの合成と利用研究

研究課題名(英文) Synthetic studies of unnatural beta1-4galactosyl cyclodextrins

研究代表者

清水 弘樹 (SHIMIZU, HIROKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：30344716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ガラクトース環状糖鎖化合物(Gal-CD)の合成研究を進めた。本合成戦略として、まず「コア化合物」のリンカー先にガラクトース誘導体を導入し、そして分子内反応を進めグリコシル化反応を促進させることで目的化合物の合成を試みた。コア化合物の選定、リンカー長の検討、リンカーとコア化合物やガラクトースユニットの連結官能基の検討などを進めたが、残念ながら本研究期間において、目的とするGal-CDを得ることはできなかった。しかし、グリコシル化を酵素反応ですすめるための基礎知見となる、ガラクトース転移酵素の反応促進と制御について知見を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Although cyclodextrins, which are consisted of alpha1-4glucosides, are natural compounds and currently applied widely in our life for food, cosmetics etc. and some unnatural cyclodextrins made by lactose, mannose, rhamnose, etc are synthesized, beta1-4galactosyl cyclodextrins are not reported. According to computational chemical studies, galactosyl cyclodextrins would be realistic compounds and the character would be opposite one for natural cyclodextrins, namely it could involve hydrophilic compounds and the complex would become hydrophobic. We have tried to synthesize beta1-4galactose cyclodextrins in this project.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

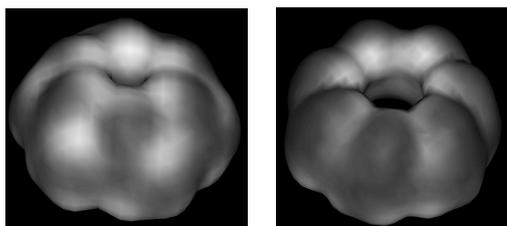
キーワード：タンパク質・糖鎖工学 シクロデキストリン 有機合成 酵素反応

### 1. 研究開始当初の背景

天然物であるシクロデキストリン(CD)はグルコース(Glc)が $\alpha$ 1-4結合した環状糖鎖化合物であり、脂溶性物質を包接して水溶化させる働きをもつ。シクロデキストリンは実用利用されており、医薬分野のほか、食品や化粧品の添加物として広く産業利用されている。

また、合成研究としては、マンノース、ラクトース、ラムノースなどで構成された非天然型の人工シクロデキストリン類縁体合成の報告は多数ある。(J. F. Stoddart et al., Chem. Eur. J., 2, 580-591, 1996はじめT. Ogawa, H. Kuzuhara, H. Yamada, T. Nakagawa, N. K. Kochetkovらの論文など)

一方、分子モデリング研究に依れば $\beta$ 1-4結合ガラクトース環状糖鎖、つまりガラクトースの非天然型人工シクロデキストリン類は、ヒドロキシル基の方向性が天然型のシクロデキストリンと異なり、分子表面が疎水性となるユニークな性質を示し、孔の形状もスムーズなものになると予想されている。(Tetrahedron: Asymm., 5, 2045-2060, 1994; Chem. Rev., 98, 1829-1873, 1998 など)我々も独自にエネルギー計算をおこなったところ、Gal-CDは理論的には充分実在するというを得た。(data not shown) また、in silicoによる分子モデリングをおこなったところ、やはりGal-CDでは表面が疎水性となり、通常のCD類は環外部が親水性で環内部は疎水性であるが、Gal-CD類では両性質が逆転した興味ある性質を有すると予測された。



<図1>

左:6残基の $\alpha$ 1-4Glcから成る天然型CD。  
右:7残基の $\beta$ 1-4Galから成る非天然型Gal-CD。濃淡で疎水性の強弱を示す。

しかし現状、ガラクトースユニットで構成されたシクロデキストリン類(Gal-CD)は、天然には存在せず(=未だ発見されていなく)、人工的に合成もされていない。その理由は、Galの4位OHの反応性(酸素原子の求核性)はポテンシャル的に低く、元来Gal $\beta$ 1-4Galは合成が難しい糖鎖シーケンスであること。

・直線型糖鎖はヘリックス等の2次構造を取ることがあり糖伸長反応や環化反応が困難になることがあること。

・また逆に、保護基が存在すると伸びた長鎖構造ともなり、環化反応の反応点が近づきに

くくなること。

などに因る。

実際、研究代表者も20年前近くの過去にこのGal-CDの合成にチャレンジしたことがある。このときは、2糖合成は成功したが3糖合成までには至らなかった。また、糖鎖合成化学で著名なLichtenthaler教授らもGal-CDの合成に挑戦しており、6糖7糖の $\beta$ 1-4Gal直鎖糖鎖の合成は達成したが、それらの環化反応には成功していない。(Carbohydr. Res., 337, 2171-2180, 2002)

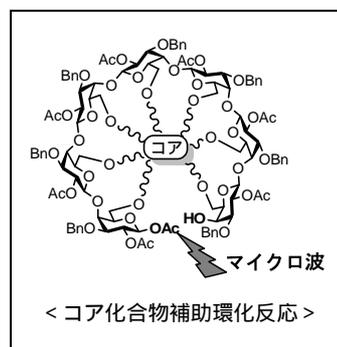
### 2. 研究の目的

本研究では、非天然型の $\beta$ 1-4Galの環状糖鎖化合物(Gal-CD)の合成を第一目的とする。そして合成が達成された後には、溶解性、溶液構造、分子包接能などのCD類化合物としての基本的なデータを収集し、計算結果で示されたとおりの物性を示すのか検証する。さらに、研究代表者らはシクロデキストリン類を酵素反応の添加剤として用いる研究に成果を挙げており(Tetrahedron Lett., 49, 3413-3418, 2008)、Gal-CD合成が達成された後、反応系における分子や官能基捕捉剤、界面活性剤開発等の新展開研究を指向する。また、反応性が低いガラクトース4位ヒドロキシル基での糖鎖環化が達成できれば、グルコサミンやラクトサミンのように、やはり反応性が低い環状糖鎖の合成が可能になると考える。グルコサミン4位ヒドロキシル基はガラクトース4位と同様にやはり反応性が低いことでよく知られているが、この直鎖高分子体はキチン、キトサンであり、ラクトサミンも直鎖高分子体が天然に存在するので、これらのシクロデキストリン類似化合物合成への展開も期待できるのではないかと考えられる。すると、シクロデキストリン類の包接研究に新たな展開を導く可能性も秘めている。

### 3. 研究の方法

Gal-CDを合成しよう、というのは特に斬新なことではないが、誰も成し得ていない研究テーマである。そこでまず、項目1.で挙げた合成困難とされているGal $\beta$ 1-4Galモチーフを、「マイクロ波照射によってグリコシル化反応を促進させる知見」と「酵素反応によるグリコシド結合の構築」を目指し、加えて「鑄型コア化合物導入による環化化合物合成法」というアイデアにて、

これまで誰も合成が出来ていないシクロガラクトオリゴ糖(Gal-CD)の合成を達成させよう



<コア化合物補助環化反応>

と計画した。

合成達成後は、この非天然物の新規機能を見出し、計算化学での予想との比較検討を行い、さらに反応系への添加など2次利用検討まで展開できればと考えた。

本研究計画を遂行する上で、研究代表者が有する研究背景として、

・グリコシル化における糖供与中間体誘導の促進化、低温下でのマイクロ波照射効果や、立体障害のために反応性の低いヒドロキシル基へのグリコシル化反応におけるマイクロ波効果などを報告している。(Tetrahedron Lett., 46, 4701-4705, 2005; Tetrahedron, 63, 2418-2425, 2007; 高分子論文集, 64, 883-896, 2007 等)

・ガラクトース転移酵素の反応促進の研究成果を有する。(Tetrahedron Lett., 49, 3413-3418, 2008)

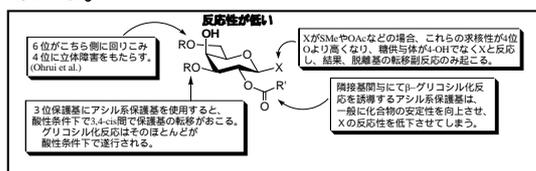
・同時に、この論文では、シクロデキストリンの添加効果を検証しており、合成が達成された後の Gal-CD 利用展開の基礎知見を有している。

などがあるが、これらの研究成果を背景に、本申請の困難な Gal-CD の全合成に取り組んだ。

#### 4. 研究成果

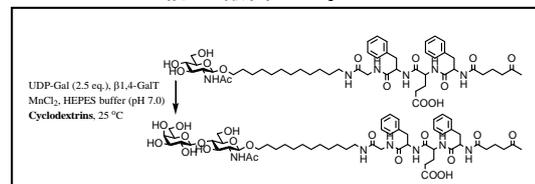
3. で示した様に Gal-CD 合成のために3つの小課題を掲げた。順次それらで得られた成果について報告する。

(1) マイクロ波照射によるグリコシル化反応を促進化研究: 研究代表者らは、過去に「ルイスX合成において、通常条件では糖受容体が有するチオメチル基の求核性がグルコサミン4位のヒドロキシル基の求核性に勝るため、ガラクトース導入反応において副反応が優先される反応系で、低温下でマイクロ波照射すると望む  $\alpha$ -グリコシル化反応が進む」ことを報告した。(Tetrahedron, 64, 10091-10096, 2008) Gal $\beta$ 1-4Gal 2 糖体合成においても同様な現象、つまり4位ヒドロキシル基より糖受容体のチオメチル基の方が反応性が高く、その結果、ガラクトース糖供与体のアノマー位の官能基交換副反応のみ進行することが知られていた。この点を、マイクロ波を利用して低温で反応を進めることで、副反応ではなく Gal $\beta$ 1-4Gal を合成することに成功した。しかしその収率はまだ満足するものではなく、現在も改良研究が続けている。



(2) 酵素反応による Gal $\beta$ 1-4Gal グリコシド結合の構築: 化学反応で Gal $\beta$ 1-4Gal グリコシド結合を形成して GalCD 合成するのが困難となった場合も想定し、酵素反応による構築

の研究をすすめた。酵素反応を全合成に利用するとき、つまりケモエンザイマティックな合成戦略を取るとき、基質の水溶性が問題となって望む酵素反応が進行しない、あるいは収率の低下が生じることがある。その解決策として基質の溶解性を向上させるため、Triton Xなどの界面活性剤を混在させることも多い。しかしこれらは分離精製の妨げとなることもある。そこで研究代表者らは、天然型のシクロデキストリンを界面活性剤の代わりに混在させ、ガラクトース転移反応の促進を図った。モデルとして、ペプチドリンカーを有したグルコサミド脂質を基質とし、ペプチド側鎖の官能基 (H, Me, Bn) と添加するシクロデキストリン種類 ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD) の関係を精査し、シクロデキストリンが分子包接の作用で基質の可溶化を導いていることを明らかとした。この研究成果は Tetrahedron 誌に報告した。



(3) 鑄型コア化合物導入による環化反応検討: 当初から最大の難関となると予想された、環化反応を利用した Gal-CD の合成研究は、やはり困難を極めた。研究要素として、「コア化合物の選択」、「リンカー長の検討」、「リンカーとコア化合物やガラクトース誘導体を結ぶ官能基の選択」、「ガラクトース誘導体の保護基とアノマー位活性基の決定」など多種の検討が必要であった。通常は順次検討して最適条件をつめていくが、検討事項とその検討数が多いこと、またこれらの条件が相補的に関与していると考えられることなどから、まずはモデリングの結果を参考にこれらの要素検討のたたき台となる初期条件を設定し、そこから最適化条件に向かって逐次各要素の検討をおこなった。

まず、ガラクトース誘導体の保護基とアノマー位活性基について検討した。グリコシル化反応で $\beta$ 1-4結合を誘導するため、2位は隣接機関と能を有するアシル保護基のアセチル基を導入した。3位はエーテル系保護基の中でかさ高くなく脱保護収率も高いアリル基で保護した。4位はグリコシル化反応の際には脱保護してヒドロキシル基とするため、他の保護基や活性基と区別して選択的に脱保護できるものでなければならない。この見地から、今回はレプリノイル基で4位を保護した。6位はリンカーと結合させるために無保護のままとした。そしてアノマー位の活性基は、マイクロ波による活性化で有利なアセチル基やチオメチル基とした。本来の目的は環状ガラクトースの合成であるが、本合成戦略の有効性を担保するべくグルコース誘導体も合成し、各種の検討はガラクトース誘導

体とグルコース誘導体で平行して進めた。グルコースユニットで利用する保護基や活性基は2位以外同じくし、グリコシル化反応で $\alpha$ 1-4結合を誘導するため、2位は隣接基関与能を有さないアリル基とした。これらの単糖誘導体の合成は、反応性から小さな困難に直面したこともあるが、定法の組み合わせで達成された。

次に、コア化合物としてカリックスアレンを選択した。他に候補としてグルコースの利用も考えていたが、カリックスアレンは側鎖方向が同一方向に向いており、環化グリコシル化反応の際、エントロピー損失が少なく反応が促進されると考えた。そして、モデリングから5量体シクロガラクトースの合成も可能という結果を得たので、5量体カリックスアレンをコア化合物の第一選択とした。

リンカー長についてはやはりモデリングの結果からC1あるいはC2の長さを選択した。そしてガラクトース誘導体とコア化合物を、エステル結合を介して連結させることをデザインした。つまり、リンカーの両末端にカルボニル基を有する「マロン酸」と「コハク酸」をリンカーとしてまず検討することにした。するとこれらリンカーをカリックスアレンに導入する反応は進行したが、糖誘導体の導入では望む5量体の確認ができなかった。問題点として、反応性自体も考えられたが、1つ~5つ糖が導入された化合物それぞれを分離精製することが、多々の条件検討に時間を費やしたにもかかわらず不可能であり、NMRとMSにて主生成物を評価することしかできなかったため定量的な評価がなされず、問題の本質をつきとめるのが困難であった。そして、エステル部の加水分解も併発している可能性を考え、アミド結合となるC1やC2のジアミノ化合物をリンカーとして試験したが、なかなか糖誘導体が5量化された化合物を得るに至っていない。先に糖ユニットとリンカーを縮合させて、それをコア化合物であるカリックスアレンに導入する試みもおこなったが、この場合もカリックスアレン導入反応で、反応性や化合物の安定性などに問題を生じた。現在、カチオン反応、アニオン反応、など反応種の違うやり方での糖誘導体の導入と、コア化合物の再選択からも検討中である。

この様に、本来の目的であるGal-CDの合成にはまだ至っていないが、複雑なガラクトース誘導体シントンの調製に成功し、またガラクトース転移酵素反応において新たな知見を得て報告するに至った。元々、Gal-CDの合成は世界中で何人もの化学者が何十年も経ても達成されていない、非常にチャレンジングな合成ターゲットであることから、2-3年の研究で達成されなくともしかたがないところもあるかもしれないが、本プロジェクトで得られた知見を今後さらに展開して、糖合成化学者として近い将来、Gal-CDの合成を達成させたい。そして、シクロデキストリン

研究分野に新しい風を吹き込みたいと願っている。

## 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 1 件)

NAGASHIMA, Izuru; SHIMIZU, Hiroki  
“Studies of Cyclodextrin Effect for Glycosylation by Galactosyltransferase”,  
Tetrahedron, vol.70, No.19, 2014,  
pp.3146-3154.  
DOI:10.1016/j.tet.2014.03.058

[その他]

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-bima/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

清水 弘樹 (SHIMIZU, Hiroki)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：30344716

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

中川 淑郎 (NAKAGAWA, Toshio)

横浜市立大学名誉教授

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・外来研究員