

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460138

研究課題名(和文) 1,5-アンヒドロアルジトールの簡便調製法の開発と応用研究

研究課題名(英文) Research and development to preparation of 1,5-anhydroalditol

研究代表者

内山 武人 (UCHIYAMA, Taketo)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：90261172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：無保護糖から簡便かつ重金属を用いない環境に優しい1,5-アンヒドロアルジトール類の調製法を確立した。本法により「安価」なグルコースから「高価」な1,5-アンヒドログルシトール(1,5-AG)を数十グラムのスケールでクロマトグラフィーを用いずに調製することができた。1,5-AGはヒトの血中に存在し、糖尿病の重症度を定めるための重要な一つのマーカーであるが、その生理的意義についてはまだよくわかっていない。本法により大量供給が可能であることから、体内における1,5-AGの役割の解明が期待されるのみならず、本法に基づく1,5-アンヒドロアルジトール由来新規生物活性物質の開発研究へも展開が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Facile and environmental-friendly (heavy metal free) preparation of 1,5-anhydroalditols from unprotected sugar was established. In particular, it was possible to prepare 1,5-anhydroglucitol(1,5-AG) from glucose on the multi-gram scale by this method. 1,5-AG in human blood, is one of important marker for determining the severity of diabetes, but still poorly understood for its physiological significance. Since it is possible to mass provided by the established method, a further elucidation of the role of 1,5-AG in the body are expected. As for the other 1,5-anhydroalditols, can be also expected to a new function as carbohydrate-based derivatives.

研究分野：Carbohydrate chemistry

キーワード：1,5-anhydroalditol 1,5-anhydroglucitol glycosyl iodide facile preparation

1. 研究開始当初の背景

(1) 新しい糖供与体の発見

研究代表者らは、糖供与体としてグリコシルヨードイドを用いることで、重金属を必要としない環境に優しい新規グリコシレーション法を見出した。(Synlett, 499-501, 1996)この方法は無保護糖より3工程で目的とするグリコシド結合を形成できる簡便なグリコシレーション法で、世界中の研究者によりしばしば用いられている。(例えば、ChemBioChem, 12, 932-941, 2011)本研究では、このグリコシルヨードイドを用いて研究を展開した。

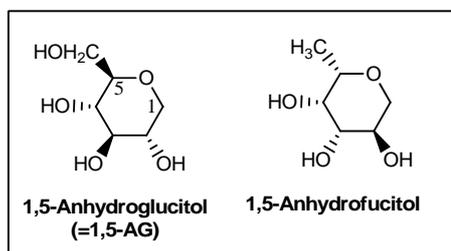
(2) アセタールをもたない糖脂質誘導体のデザインと合成

グラム陰性菌の生育阻害物質の探索研究の一環として糖脂質合成酵素 LpxC に着目し、世界に先駆け新しいタイプの酵素阻害剤をデザイン・合成した。(Org. Lett., 5, 539-541, 2003)デザインした構造は、LpxCの基質である糖ヌクレオチドのヌクレオチド部を欠如したもので、X線結晶構造解析によりLpxCは基質構造のヌクレオチド部を認識していないことが明らかとなった。(Nature Structural Biology, 10, 645-651, 2003)この結果は、糖のアノメリック位の構造変化が生物活性に影響しない場合があることを示唆している。

(3) なぜ、1,5-アンヒドロアルジトールに着目するのか?

代表的な1,5-アンヒドロアルジトールである1,5-アンヒドログルシトール(1,5-AG; 次図参照)は、糖尿病の重症度を見極める際の重要なマーカーである。しかし、1,5-AGを含め1,5-アンヒドロアルジトールの生物活性に関する報告は数例あるのみである。(例えば、1,5-AGのグリコーゲン合成酵素阻害; 特願2010-140073、1,5-アンヒドロ-D-フルクトースの抗菌活性; 特願2000-249604)報告が少ない理由の一つとして、化学的に1,5-アンヒドロアルジトールを調製する方法が十分に確立されていないことが挙げられるが、その調製法を確立し1,5-アンヒドロアルジトールに新たな生物活性を見出すことが本研究のチャレンジングなテーマであり目的の一つである。

1,5-アンヒドロアルジトールの例



2. 研究の目的

生命活動の維持に必要不可欠なD-グルコースの水溶液中における構造は、アノメリッ

ク位の結合様式の違いにより、鎖状構造および環状構造の平衡状態であることが知られている。糖のアノメリック位の構造が生物活性に及ぼす影響を検討するため、本研究ではまず、平衡状態を有しない糖類である1,5-アンヒドロアルジトールの新規調製法の確立を試みる。

無保護糖を出発物質とした環境に優しい1,5-アンヒドロアルジトールの簡便調製法を確立し、この手法を用いて糖のヘミアセタールがメチレン基へ変換した化合物ライブラリーを作成する。次に、調製された化合物のグリコーゲン分解酵素阻害活性やグリコシダーゼ阻害活性、ならびにがん細胞・正常細胞への活性評価を行い、構造活性相関を検討する。最終的に活性発現に重要な化合物の配座および部位を明らかにする。

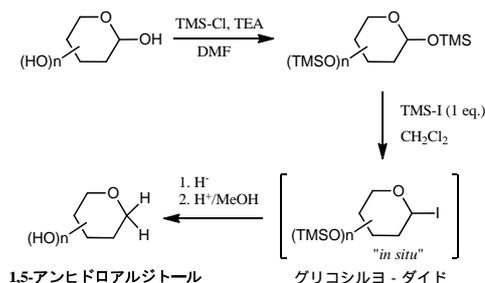
研究代表者らが発見した糖供与体であるグリコシルヨードイドを用いることで、これまでにない簡便で環境に優しい新規1,5-アンヒドロアルジトール調製法の確立が期待できるが、本研究で得られる知見はグリコシルヨードイドと様々な求核試薬を用いた新規反応開発のための礎となる。また、1,5-アンヒドロアルジトールの生物活性に関する報告がほとんどなされていないことから、本研究により得られた結果は、糖尿病やがんの治療における医薬品開発に有益な情報を与えるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 1,5-アンヒドロアルジトールの簡便調製法の確立と化合物ライブラリーの作成

無保護糖の水酸基をジメチルホルムアミド(DMF)中トリエチルアミン(TEA)存在下、トリメチルシリルクロリド(TMS-Cl)を作用させ、すべての水酸基をTMS基で保護する。次に、ジクロロメタン(CH₂Cl₂)中、1当量のトリメチルシリルヨードイド(TMS-I)を作用させ、系中でグリコシルヨードイドとする。この際、糖の種類によっては不安定なものもあることが予想されるので温度、時間等の条件の最適化をおこなう。また、グリコシルヨードイドの生成はNMRを用いて確認することも可能であるので適宜利用する。(Synlett, 499-501, 1996)続いて、*in situ*で生成したグリコシルヨードイドに各種ヒドリド還元剤を作用させ、糖の1位をメチレン基へ変換する。さらに系中で酸性樹脂存在下アルコールを加えることでTMS基の脱保護をおこない、目的とする1,5-アンヒドロアルジトールを得る。(次図参照)本調製法の全工程は出発物質から目的物質までが3段階と短く、さらに糖のアノメリック位活性化に重金属は使用しないため環境に負荷がかからないという特徴をもつ。一方、ヒドリド試薬については溶媒や後処理等の問題も含め、最も適しているヒドリド試薬を選定する必要がある。化合物ライブラリーとして30種類以上の1,5-アンヒドロアルジトール

を調製する予定だが、本調製法が中性アルドースのみならず、アミノ糖（例えば、グルコサミン）や酸性糖（例えば、グルクロン酸）、さらに二糖類や三糖類などの多糖にも適用可能かどうか見極めたい。



「無保護糖から1,5-アンヒドロアルジトールの簡便調製法」
 長所
 ・重金属を用いない
 ・短工程
 問題点
 ・ヒドリド試薬の選定
 ・アミノ糖や酸性糖、多糖類への適用は可能か

(2) 調製された化合物に対する生物活性の評価

グリコーゲン分解酵素阻害活性およびグリコシダーゼ阻害活性

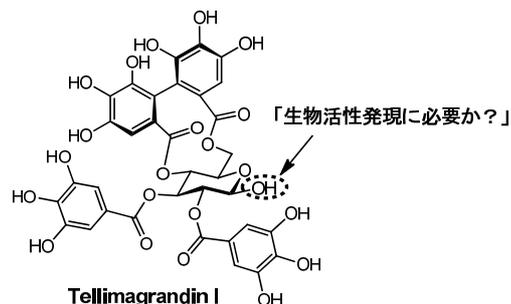
グリコーゲン分解酵素阻害活性は、グリコーゲン分解反応に関わる3種の酵素、グリコーゲンホスホリラーゼ、ホスホグルコムターゼおよびグルコース-6-ホスファターゼを用い、1,5-AGを指標として評価する。一方、グリコシダーゼが様々な疾患に関与することが知られていることからグリコシダーゼ阻害活性については、糖尿病治療薬として重要なターゲットである および β -グルコシダーゼに着目し、評価をおこなう。これまでに研究代表者らは、グラム陰性菌の脂質生合成に関わる酵素阻害活性化合物の探索研究をおこない、報告している。(*J. Biol. Chem.*, **275**, 11002-11009, 2000)

細胞傷害活性

ヒト神経芽腫細胞 (IMR-32) などのがん細胞に対する細胞傷害活性を評価する。細胞傷害活性の認められた化合物については、その活性がアポトーシス誘導に基づくものかどうかを flow cytometry 法により検証する。また、各種がん細胞と正常細胞（例えば、HUVEC；正常ヒト臍帯静脈内皮細胞）との作用の比較検討を行ない、がん細胞に選択的に作用する化合物を探索する。これまでに研究代表者（内山）と研究分担者（田畑）は共同研究により、天然物由来化合物の細胞傷害活性について、そのメカニズムも含め、研究・報告を重ねている。（例えば、 *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1749-1753, 2009）

活性化化合物が見つからない場合：他の酵素（例えば、シアリダーゼ）やがん細胞（例えば、肝がん細胞；HepG2）を用いてさらなる生物活性の検討を加える。また、本研究の新たな展開を模索するため、グルコシダーゼ阻

害活性を有する Tellimagrandin I (*Org. Biomol. Chem.*, **10**, 2590-2593, 2012) のヘミアセタール性水酸基を欠如した 1,5-アンヒドログルシトール誘導体の合成を試みる。（次図参照）



4. 研究成果

糖のヘミアセタール構造が生物活性に及ぼす影響を検討するため、1,5-アンヒドロアルジトールの新規調製法の確立を試みたところ、研究代表者らが発見した糖供与体であるグリコシルヨードを用いることで無保護糖から簡便（実質2日間）でかつ重金属を用いない環境に優しい調製法を確立することができた。すなわち、すべてのヒドロキシ基をトリメチルシリル (TMS) 基で保護した糖に、1 等量のトリメチルシリルヨードを作用させ系中でグリコシルヨードとし、水素化ホウ素リチウムによる還元、つづく TMS 基の脱保護により目的物を得るというものである。本調製法により、D-およびL-糖由来の計20種類以上の1,5-アンヒドロアルジトール類の合成に成功した。特に、「安価」なグルコースから「高価」な1,5-アンヒドログルシトール (1,5-AG) の調製については、カラムクロマトグラフィーを用いずに数十グラムのスケールで調製できることを明らかにした。残念ながらアミノ糖については本調製法を適用することができなかった。本法により調製された各種1,5-アンヒドロアルジトール類についてグリコーゲン分解酵素阻害活性を検討したところ、興味深いことに1,5-AGにのみ阻害活性が認められた。また、1,5-AGの6-NH₂誘導体にはグルコシダーゼ阻害活性が認められた。さらに、神経芽腫細胞の一つであるIMR-32に対する細胞傷害活性について検討した結果、いずれの化合物にも活性は認められなかった。一方、ヘミアセタール構造を有しながらユニークな生物活性を併せ持つ天然物のモデル化合物として、エラジタンニンの一つである Tellimagrandin I に着目し、ヘミアセタール構造を欠いている1,5-AGを出発原料としてその誘導体の前駆体合成にも成功した。（第59回日本薬学会関東支部大会において優秀ポスター賞を受賞）

本研究により確立できた1,5-アンヒドロアルジトールの簡便調製法は、分子内にヘミアセタール構造を有しない新しい機能をもつ糖質素材の開発に寄与できるものと考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

依藤藍子、内山武人、大嶋勇貴、宮入伸一
「Tellimagrandin 誘導体の合成研究」 第
59回日本薬学会関東支部大会 2015年9月12
日 日本大学薬学部(千葉・船橋)

内山武人、大嶋勇貴、芹澤佑香、依藤藍子、
宮入伸一 「1,5-アンヒドログルシトールの
マルチグラムスケール合成とその応用研究」
日本薬学会第135年会 2015年3月27日 デ
ザイン・クリエイティブセンター神戸(兵
庫・神戸)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/page-2166.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 武人 (UCHIYAMA, Taketo)
日本大学・薬学部・准教授
研究者番号：90261172

(2) 研究分担者

田畑 恵市 (TABATA Keiichi)
日本大学・薬学部・准教授
研究者番号：30366629

鈴木 孝 (SUZUKI Takashi)
日本大学・薬学部・教授
研究者番号：40318457

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：