

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620092

研究課題名(和文) 酸を添加しない酸触媒によるグリコシル化 -不可能なオリゴ糖脂質の合成と組織化-

研究課題名(英文) Glycosylation without adding any acid catalysts -Synthesis and organization of impossible oligosaccharide glycolipids-

研究代表者

正田 晋一郎 (Shoda, Shin-ichiro)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10143364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：オリゴ糖を直接活性化中間体である4,6-ジベンジルオキシトリアジン誘導体へ変換する反応を開発した。得られた中間体のトリアジン環上のベンジル基を水素還元により、対応するヒドロキシ基へと変換し、その酸性度を利用して、アノマー位選択的な活性化を行った。ここでは、迅速な水素の付加を行うことが重要であるので、触媒量、温度、基質濃度等に関して詳細な条件検討を行った。

アルコールとして、第一級アルコール、第二級アルコール、第三級アルコールを用い、収率ならびに立体選択性( )に与える影響を詳細に調査した。その結果、従来法では合成不可能な酸に不安定なオリゴ糖の糖脂質誘導体の合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Glycolipids play important roles in cell processes such as bio-recognition on the cell membranes. Chemically, amphiphilic glycolipids can self-assemble into 3D architectures that are attractive smart hydrogels for biomolecular microarrays and drug delivery. Meanwhile, vinyl-contained glycolipid is potential monomer for the synthesis of glycopolymer, synthetic polymer with saccharide pendants, and has received considerable attention in the fields of material science and biomedicine. We have developed a reductive synthetic method towards glycolipid by the alcoholysis of the one-step preparable glycosyl donor, 4,6-dibenzyloxy-1,3,5-triazin-2-yl glycosides under reductive conditions, without adding any acid catalysts. Through this reaction, glycosidic bonds between oligosaccharides and alcohols were constructed with the site specific activation at the reducing end under extremely mild reaction conditions, which had been impossible to carry out for a long time.

研究分野：高分子合成

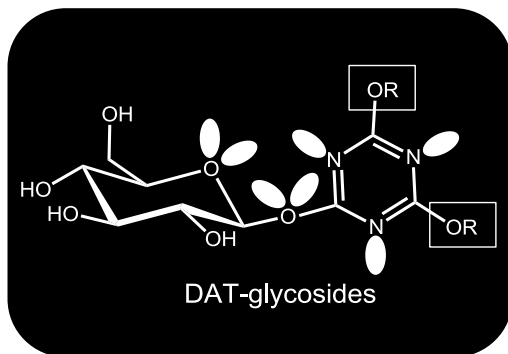
キーワード：糖脂質 活性化 トリアジン誘導体 水素添加 グリコシル化 立体選択性 オリゴ糖 酸触媒 アノマー直接

## 1. 研究開始当初の背景

糖脂質は、親水部と疎水部の絶妙なバランスにより組織を形成する、まさに自然が作り上げた芸術品である。細胞膜の構造を眺めると、その骨格がいかにか目的に構築されているかに気づく。本研究の背景には、糖脂質の精緻な構造を、無保護の糖から直接的に構築する方法論が長年実現されていない、という高分子合成化学における歴史的な事実がある。我々は、真の意味で新しい機能をもつ組織をつくり出すためには、既存の枠に捉われない新しい素材が必要であり、そのためにはその素材をつくる新しいプロセス構築（道具作り）が必須であるという考え方に沿って、高分子合成研究を進めている。

一方、糖質化学の歴史の中で、オリゴ糖を直接グリコシル化するのは長い間不可能と考えられてきた。このことに対し、我々は、水中で糖アノマー位の直接活性化が可能であることを初めて示し、いくつかの有用な反応を提供してきた。以下、本研究の着想に至った経緯を述べる。

我々は、トリアジン系脱水縮合剤を用い、水中で、オリゴ糖の還元末端を選択的に活性化し、対応するジアルコキシトリアジン誘導体(DAT-glycoside)を調製する新しい手法を見出した(例えば *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 5126) (下図)。



この事実は、トリアジン環上の置換基を自由自在にデザインできることを示すものであった。そこで、発生の期のプロトンにトリアジン環上に生じさせることにより、“外部から酸を添加せずにアノマー位のみを活性化”するというこれまで不可能と考えられた反応を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、ベンジル基で置換されたトリアジン糖供与体(DBT-glycoside)と長鎖アルコールから、水素還元条件下でグリコシル化を進行させることにより、オリゴ糖の長鎖アルコールによるグリコシル化という従来法では不可能であるような糖脂質誘導体を初めて合成することに挑戦した。この反応では、反応促進剤となるプロトンは“外から添加す

る酸からではなく水素分子に由来する”という発想の転換を行う。本研究は、不可能と考えられてきたオリゴ糖脂質の合成を無保護で実現しようという極めて挑戦的なものである(下図)。得られる糖脂質誘導体は、超分子化学、ケミカルバイオロジー、糖鎖工学等の分野における新しい組織体として多様な機能を発揮するものと期待できる。



従来法では不可能な新しい糖脂質を基盤とする組織構築

## 3. 研究の方法

### 平成25年度

#### (1) 2-アセタミド-2-デオキシ糖を還元末端に有するオリゴ糖原料の調製

キチン、グリコサミノグリカン、細胞表面オリゴ糖を対応する多糖バイオマスから調製する。すなわち、天然のキチンをコロダイルキチンとし、限定的酵素分解、それに引き続くクロマトグラフィー分離により、キトオリゴ糖を調製する。

卵黄300個を原料として、シアル酸を非還元末端に有するオリゴ糖ペプチドを調製する。得られたオリゴ糖に順次、シアリダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、N-アセチルグルサミダーゼを作用させ、適切なカラム選択によりオリゴ糖をグラムスケールで単離する。

#### (2) グルコースを還元末端に有するオリゴ糖リファイン化原料の調製

タマリンド種(*Tamarindus indica*)由来のキシログルカンを、エンドグルカナナーゼで処理することにより、6位が置換されていないグルコースユニットにおいて、位置選択的にグリコシド結合を切断し、オリゴ糖の混合物を調製する。さらに、この混合物にβ-ガラクトシダーゼを作用させ、7糖とした後、イソプリメベロース合成酵素で処理して小糖を得る。それぞれの段階でオリゴ糖の分離を適切なカラムを用いて行い、8種類のリファイン化原料をグラムスケールで調製する。

#### (3) オリゴ糖を水中で直接活性中間体へ変換する技術の確立

考えられる水溶性脱水縮合剤を徹底的に設計・合成し、スクリーニングすることにより、オリゴ糖を直接活性化中間体へ変換する反応の開発を行う。すでに、我々は、2-アセタミド-2-デオキシ糖に水溶性トリアジン誘導体を作用させると、対応するα型トリアジン誘導体が中程度の収率で生成することを予備実験的に認めている。本研究では、収率

95%以上という目標値を掲げ、4,6-ジベンジルオキシトリアジン誘導体への変換を試みる。還元末端にグルコースを有するオリゴ糖に関しては、生成物がより活性なβグリコシド結合を有することから、それらの構造決定と同時に水中での安定性について精査する。

## 平成26年度

### (4) 接触水素化条件におけるグリコシル化プロセスの構築

グリコシル化反応のステップは、本研究の根幹をなす部分である。以下に述べる観点から詳細な反応条件の検討を実施する。

本反応は、トリアジン環上のベンジル基を水素還元により、対応するヒドロキシ基へと変換し、その酸性度を利用して、アノマー位選択的な活性化を図るものである。したがって、迅速な水素の付加を行うことが重要であるので、触媒量、温度、基質濃度等に関して詳細な条件検討を行う。

アルコールとして、第一級アルコール、第二級アルコール、第三級アルコールを用い、収率ならびに立体選択性(α/β)に与える影響を詳細に調べる。

本手法は水素添加を行っており、不飽和結合を有するアルコールに適用することが困難であると予想される。そこで、Pd触媒とシランを用いて、不飽和結合を還元することなく選択的に脱ベンジル化を行った文献(R. S. Coleman et al., *Synthesis*, 1999, 1399)を参考に、本反応へ適用するべく反応条件を検討する。すなわち、Pd(OAc)<sub>2</sub>-トリエチルシラン-トリエチルアミン系での反応を試みる。また、上記反応の触媒種は0価パラジウムと考えられることから、Pd(OAc)<sub>2</sub>の代わりにPd/C触媒についても検討する。

活性中間体として予想される4,6-ジヒドロキシトリアジン誘導体を確認するため、アミン存在下で水素添加を行い、塩としての単離を試みる。さらに、弱酸で中和することにより、活性種を再生させグリコシル化反応の有無を調べることにより、中間体の確認を行う。

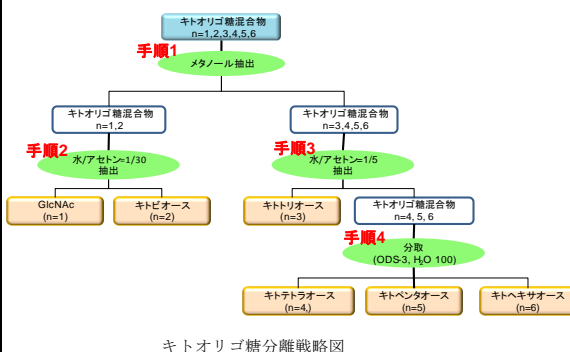
アルコールの分子量の増加に伴い、糖トリアジン供与体のアルコールに対する溶解性が低下することが懸念される。そこで、可溶化操作としてTMS化を試みる。ここで、TMS基は、反応後メタノールを添加するだけで容易に除去可能である。この一時的な可溶化は、選択的なアノマー位の活性化により初めて可能となるものであり、これも本反応の大きな特色である。

本研究において開発するベンジルトリアジン型糖供与体と各種脂質分子などの糖受容体との反応により、目的とする各種糖脂質誘導体をグラムスケールで合成し、糖鎖工学における一般的方法論として確立する。

## 4. 研究成果

### (1) 2-アセタミド-2-デオキシ糖を還元末端に有するオリゴ糖原料の調製

安価なキトオリゴ糖混合物から高価なキトオリゴ糖を分離する方法の検討を行い、手順1~4の操作により、キトオリゴ糖の分離を達成した。すなわち、重合度別にわずかに異なるキトオリゴ糖の溶解性の差を活用することにより、カラムレスで二糖キトビオースの分離を達成した。またカラムレスで三糖キトトリオース(純度, 80%)、分取を組み合わせることで四糖キトテトラオース(純度80%)、五糖キトペンタオース、六糖キトヘキサオースの分離を達成した。



### (2) グルコースを還元末端に有するオリゴ糖リファイン化原料の調製

大日本住友製薬株式会社製のキシログルカン分解物には XXXG, XLLG, XLXG や糖以外の不純物が含まれている。そこでキシログルカン分解物中に含まれる XXXG, XLLG, XLXG を HPLC やサイズ排除クロマトグラフィーを用いて分取の検討を行った。しかしながら XXXG, XLLG, XLXG のピークの retention time が近く、一度に得られる収量が少量であったため、短期間で大量に分取することは難しいと考えた。そこで XLLG や XLXG のガラクトース残基を全て加水分解することにより XXXG に変換し、XXXG を回収する方法を用いれば容易かつ大量に XXXG を得ることができると考えた。

キシログルカン分解物中の XLLG や XLXG のガラクトース残基を加水分解するために大和化成株式会社製の *bacillus circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼ製剤であるビオラクタ(β-ガラクトシダーゼ: 30%, ラクトース 70%)を用いることとした。ビオラクタに含まれるラクトースを除去するため、MWC0 3500の透析膜を用いて2.5日間透析を行った。透析後、透析膜内に残った溶液を凍結乾燥し、除ラクトースビオラクタを得た。

キシログルカン分解物 10.65 g を pH 6 リン酸バッファー 50 ml に溶解させたのち、除ラクトースビオラクタ 1 g を加え、37°C で 10 時間酵素加水分解反応を行った。酵素反応後の溶液には XXXG の他に酵素、ガラクトース、不溶物等が含まれているためそれらの除去

を行った。反応終了後、反応溶液を2日間限外ろ過し、ろ液と酵素を回収した。次に限外ろ過後のろ液に含まれるガラクトースを除去するため、MWC0 100~500の透析膜を用いて3日間透析を行った。透析後、透析膜内に残った溶液を遠心し、水に不溶な物質を沈殿させた。続いて上清を凍結乾燥しXXXGを約4g得た。

### (3) オリゴ糖を水中で直接活性中間体へ変換する技術の確立

我々は、脱水縮合剤である4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド(DMT-MM)を用いることにより、水中で無保護糖から一段階でアノマー位にトリアジン環を有する活性化糖誘導体を合成することに成功している。この反応により、糖分子内のヘミアセタール性、第一級、第二級ヒドロキシ基の反応性の違いを利用して選択的にアノマー位にトリアジン環を導入することができる。また、酸を用いることなく反応が進行するため、オリゴ糖に適用可能である。トリアジン誘導体は安価な塩化シアヌルから簡便に合成可能であり、アルコールを変えることによりトリアジン環上のアルコキシ基を容易に変更することができる。よって、反応性の異なる糖トリアジン誘導体を合成することができる。既往の報告にアルコールとしてメタノール、エタノール、2,2,2-トリフルオロエタノールを用いた例があり、いずれも対応するトリアジン誘導体の合成に成功している。そこで、アルコキシ基をヒドロキシ基に変更したジヒドロキシトリアジン糖誘導体の合成を試みたが、無保護糖とトリアジン誘導体から直接合成することが困難であった。そこで、トリアジン環上の4,6位をベンジル基で保護したジベンジルオキシトリアジン糖誘導体を合成し、この脱ベンジル化によりジヒドロキシトリアジン糖誘導体の合成を試みた。メタノール溶媒中、Pd/Cと水素ガスを用いる接触還元を行ったところ、目的生成物であるジヒドロキシトリアジン糖誘導体ではなくメチル $\alpha$ -グルコシドが高収率かつ高選択的に生成することを見出した。

### (4) 接触水素化条件におけるグリコシル化プロセスの構築

糖ドナーにオリゴ糖のDBT誘導体を用い、本反応のオリゴ糖への適用を行った。ドナー0.2 mmolに対してPd/Cを5 wt.%, アルコールを2 ml用い室温で反応した。TLC上で反応の進行が見られなくなった時点で反応を終了し、フィルター濾過を行った。反応生成物を乾燥後、未反応の原料、トリアジン環が脱離した糖およびフィルター濾過により除去しきれなかったシアヌル酸を取り除くためシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。シアヌル酸を完全に除去するには至っていない。各種NMRの測定結果

から、オリゴ糖のグリコシド結合が開裂することなく、立体選択的に目的生成物が得られることを確認した。

### 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10件)

- ① Satoru Iwata, Mitsunori Abe, Shin-ichiro Shoda, Shiro Kobayashi  
Oxidation-reduction alternating copolymerization of germylene and *N*-phenyl-*p*-quinoneimine  
Polymer Journal  
査読有, 47巻, 31-36, 2014年  
DOI:10.1038/pj.2014.84
- ② Tomonari Tanaka, Genri Inoue, Shin-ichiro Shoda, Yoshiharu Kimura  
Protecting-Group-Free Synthesis of Glycopolymers Bearing Thioglycosides Via One-Pot Monomer Synthesis from Free Saccharides  
Polymer Chemistry  
査読有, 52巻, 3513-3520, 2014年  
DOI:10.1002/pola.27417
- ③ Tomonari Tanaka, Hideki Ishitani, Yoshiko Miura, Menta Oishi, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Shin-ichiro Shoda, Yoshiharu Kimura  
Protecting-Group-Free Synthesis of Glycopolymers Bearing Sialyloligosaccharide and Their High Binding with the Influenza Virus  
ACS Macro Letters  
査読有, 3巻, 1074-1078, 2014年  
dx.doi.org/10.1021/mz500555x
- ④ Masaki Ishihara, Yuka Takagi, Gefei Li, Masato Noguchi, Shin-ichiro Shoda  
Protection-free Synthesis of Alkyl Glycosides under Hydrogenolytic Conditions  
Chemistry Letters  
査読有, 42巻, 1235-1237, 2013年  
DOI:10.1246/cl.130646
- ⑤ Naoki Yoshida, Tsukasa Fujieda, Atsushi Kobayashi, Masaki Ishihara, Masato Noguchi, Shin-ichiro Shoda  
Direct Introduction of Detachable Fluorescent Tag into Oligosaccharides  
Chemistry Letters  
査読有, 42巻, 1038-1039, 2013年  
DOI:10.1246/cl.130379
- ⑥ 正田晋一郎, 小林厚志, 野口真人  
分子量のそろった糖タンパク質をつくる  
有機合成化学協会誌

- ⑦ 査読無, 71 巻, 1252-1258, 2013 年  
正田晋一郎  
 完全グリコシル化への果てしなき道  
 化学と工業
- ⑧ 査読無, 66 巻, 997-999, 2013 年  
 吉田尚生, 正田晋一郎  
 オリゴ糖還元末端の蛍光ラベル化  
 Cellulose Communications
- ⑨ 査読無, 20 巻, 20-24, 2013 年  
正田晋一郎, 野口真人  
 糖オキサゾリン基質の簡易合成  
 野口研究所時報
- ⑩ 査読無, 56 巻, 15-22, 2013 年  
 Tomonari Tanaka, Hiroyuki Fukuhara,  
Shin-ichiro Shoda, Yoshiharu Kimura  
 Facile synthesis of  
 oligosaccharide-poly(L-lactide)  
 Conjugates Forming Nanoparticles  
 with Saccharide Core and Shell  
 Chemistry Letters  
 査読有, 42 巻, 197-199, 2013 年  
 DOI:10.1246/cl.2013.197

[学会発表] (計 7 件)

- ① 正田晋一郎, 多糖バイオマスからグリコシル化合物の高効率合成, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 28 日, 日本大学理工学部 (船橋)
- ② Shin-ichiro Shoda, Specific Anomeric Activation in Water, 2014 Japanese-European Cellulose Workshop, 2014 年 10 月 13 日, Fraunhofer Institute (ベルリン, ドイツ)
- ③ 正田晋一郎, オリゴ糖合成における基質と酵素のデザイン, 日本応用糖質科学会平成 26 年度大会, 2014 年 9 月 25 日, 朱鷺メッセ (新潟)
- ④ 正田晋一郎, 分子量のそろった糖タンパク質をつくる -水中におけるオリゴ糖の直接活性化技術-, 化学系学協会東北大会, 2014 年 9 月 21 日, 山形大学工学 (米沢)
- ⑤ 正田晋一郎, 水中における最短グリコシル化プロセスを目指して, 第 2 回福島大学共生システム理工学類日韓親善学術講演会, 2013 年 11 月 27 日, 福島大学 M1 教室 (福島)
- ⑥ 正田晋一郎, 現場で役立つグリコシル化の基本, 有機合成化学講習会, 2013 年 11 月 20 日, 日本薬学会長井記念ホール (東京)
- ⑦ 正田晋一郎, オリゴ糖脂質を合成する新手法の開発, 第 11 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 2013 年 10 月 26 日, 東北薬科大学 70 周年記念講堂 (仙台)

[図書] (計 2 件)

- ① Shin-ichiro Shoda, Atsushi Kobayashi, Masato Noguchi, Springer 社

Sugar Oxazolines as Directly Preparable Glycosyl Donors from Unprotected *N*-Acetyl-2-amino Sugars: Towards One-Pot Chemo-Enzymatic Synthesis of Glycoproteins Catalyzed by *N*-Acetylglucosaminidases  
 Glycoscience: Biology and Medicine, 2015, 1568(402-407).

- ② 正田晋一郎, 小林厚志, 野口真人  
 シーエムシー出版  
 グリコシルアジドの一段階合成  
 クリックケミストリー -基礎から応用まで-  
 2014, 260(61-70).

[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:  
 出願年月日:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
<http://www.che.tohoku.ac.jp/~poly/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正田 晋一郎 (SHODA, SHIN-ICHIRO)  
 東北大学・大学院工学研究科・教授  
 研究者番号: 10143364

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: