

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2014

課題番号：21106008

研究課題名(和文) マイクロフロー合成と固相合成を基盤にした糖鎖ならびに関連化合物の高度集積合成

研究課題名(英文) Integrated Synthesis of Glycans Using Microfluidic and Solid-phase Methods

## 研究代表者

深瀬 浩一 (FUKASE, Koichi)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80192722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要：本研究では、マイクロフロー合成装置や固相合成装置を用いて、生物活性糖鎖や複合糖質などの糖関連化合物の効率合成を達成することを目的とした。特に生体分子認識において注目を集めているシアル酸含有糖鎖およびN-結合型糖タンパク質糖鎖、ならびにバクテリア由来のペプチドグリカンについて効率合成法を確立させ、さらにはライブラリー作成を目指した。一方、ペプチドグリカンフラグメントを、マイクロアレイに導入し、得られた糖鎖マイクロアレイを用いて、ペプチドグリカン認識タンパク質との相互作用解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the synthesis of various glycans from both animals and microbes in order to investigate their biological functions. The former targets are the N-glycans containing core fucose, bisecting glucosamine or bis-sialylated motif. The key issues for the synthesis were stereoselective glycosylation reactions and we developed highly efficient methods by using microfluidic conditions. We then achieved the solid-phase synthesis of sialylated N-glycan. Microbial glycoconjugates such as partial structures of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) from bacteria as well as inositol phospholipids from *Entamoeba histolytica* were also synthesized. For the synthesis of *E. histolytica* phospholipids, we developed new synthetic methods including regioselective phosphorylation and synthesis of the long-chain fatty acids by Ni catalyzed sp<sup>3</sup>-sp<sup>3</sup> cross coupling reaction. We also adopted a new protecting group strategy utilizing allyl group as the permanent protecting group.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：マイクロフロー 固相合成 N-グリカン 自然免疫リガンド グリコシル化

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖として注目され、様々な機能を有している。特に、細胞表面においては、多数の糖タンパク質や糖脂質が存在し、細胞間コミュニケーションや感染症などに深く関与する。加えて、糖鎖は膜タンパク質の活性制御や脂質ラフト(細胞膜上でシグナル伝達や物質輸送の窓口として機能するドメイン)形成の制御にも重要な役割を担っている。*N*-結合型糖鎖(*N*-グリカン)は)タンパク質のアミノ酸残基に結合する糖鎖で、多様な構造を持ち、その構造の違いがタンパク質の活性を制御する。

また、細菌細胞表面成分であるペプチドグリカンやグラム陰性菌リポ多糖などの複合糖質は、自然免疫活性化因子として知られ、その分子レベルでの機能解明が求められている。

しかしながら、*N*-グリカン、細菌由来複合糖質ともに、天然では多様な構造の混合物として存在するため、その構造に基づいた機能の解析は進んでいない。

### 2. 研究の目的

*N*-グリカンや細菌由来複合糖質の機能発現の分子基盤を解明するためには、純粋な化合物を調整し、その機能を調べることが必須であると考えた。一方で、これらの分子量1000を超える比較的巨大的な分子であり、これらを合成するためには、中間体となる糖質フラグメントの大量合成や、巨大なフラグメント間の連結を行う効率的なグリコシル化など、合成化学的にチャレンジングな課題が多い。そこで、これらを解決し、*N*-グリカンおよび細菌由来複合糖質の実用適合性法の開発を目指し、マイクロフロー合成装置や固相合成装置を用いた集積化合成を検討した。特に、本研究では、疾病とさまざまな関連があることが示されているコアフコース含有 *N*-グリカンとバイセクティング含有 *N*-グリカン、ピロリ菌由来リポ多糖部分構造、細菌細胞壁ペプチドグリカン部分構造の合成に注力して糖鎖骨格の構築を行った。

### 3. 研究の方法

グリコシル化反応においては、立体選択性が極めて重要となる。一方で、グリコシル化反応においては触媒として一般的にルイス酸を用いるが、これは、糖化合物は水酸基をはじめとする多くのルイス塩基を持っており、反応開始時に中和にともなう大きな発熱が起こる。この発熱は、反応スケールが大きい場合に特に顕著で、これがグリコシル化の立体選択性の低下の原因となることを見出した。そこで、グリコシル化反応をマイクロフロー系で行うことで、反応の暴走を防ぎ、厳密に条件をコントロールした状態でのグリコシル化を可能とする。また、今回対象とする *N*-グリカンやリポ多糖部分構造のような巨大な分子においては反応性が低下する

ことが大きな問題となる。この点に関して、水素結合を介して形成されるクラスターを壊すというアプローチを取ることで、反応性の向上を目指した。加えて、溶媒を徹底的に検討することで中間体を安定化し、反応性の低いグリコシル化においても高収率で目的物を得る方法を検討した。

一方で、グリコシル化はグリコシル化反応の繰り返しにより目的物が得られる。そのため、この糖鎖を DNA やタンパク質と同様に固相合成により調整する方法を確立できれば、糖鎖合成は格段に簡便となり、その利用が実用的なレベルになる。そこで、*N*-グリカン、ペプチドグリカン部分構造の固相合成についても検討した。

### 4. 研究成果

・マイクロフロー法による 選択的シアリル化法

シアリル酸含有糖鎖の合成において、立体選択的  $\alpha$ -シアリル化反応は鍵反応であるが、(1) 4級炭素上でのグリコシル化反応であること、(2) 隣接基関与を利用した立体制御ができないこと、(3) 熱力学的に  $\beta$ -シアリル体の生成が有利であること、(4) グリカル体が生成しやすいこと、などの特徴から高収率かつ高選択的な反応が困難であった。我々はシアリル酸のアミノ基をフタルル基で保護することにより、プロピオニトリルの溶媒効果を利用して完全な選択性でグリコシル化を行えることを見出していた。しかし僅かなスケールアップによりグルカールの副成が促進され、収率と選択性が低下した。触媒の TMSOTf を添加した際の発熱が問題であると考えられたためマイクロフロー合成を適用したスケールアップを検討した結果、定量的かつ完全な選択性で目的のシアリル化二糖が得られた。一方、天然型の *N*-アセチルノイラミン酸誘導体 **1** を糖供与体に用いると、グリコシル化反応の選択性が低く(多くの場合 選択性は 7~8 割程度) 対応するグリカルを多量に副生することが常識であった。我々は改めてこの糖供与体に注目し、低温下で厳密な温度制御の下に反応を行うことで、高選択的かつ好収率で目的のシアロシドが得られることを見出した (Fig.1)。

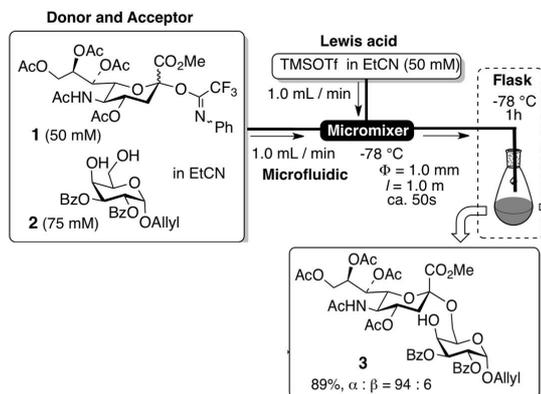


Fig.1 マイクロフローシアリル化

・マイクロフロー法による 選択的マンノシル化

以前に、*N*-フェニルトリフルオロアセトイミデートを脱離基を持つマンノース供与体 **4** と高高いルイス酸である TMSB(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>4</sub> とのコンビネーションにより、高収率および高立体選択的な  $\alpha$ -マンノシル化を達成していた。大量スケールでの反応のために、TMSOTf を触媒に用いて、マイクロフロー法を適用して、好収率で目的の  $\alpha$ -マンノシドを得た (Fig.2)。

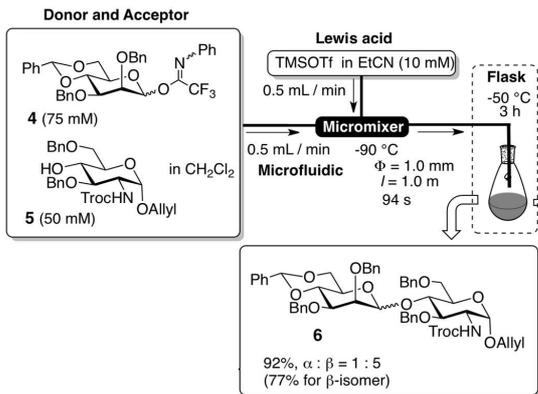


Fig.2 マイクロフローマンノシル化

・ *N*-グリカンの効率合成

*N*-グリカンの固相合成について検討した (Fig.3)。フラグメント **a**、フラグメント **b** は上記のようにマイクロフロー系反応を用いて合成した。これらのフラグメントを固相上で順次縮合して、シアル酸含有複合型 *N*-結合型糖鎖の固相全合成に初めて成功し、構造多様性に対応可能な *N*-結合型糖鎖の高度集積合成における基盤を築いた。さらに *N*-結合型糖鎖について、コアフコース含有型糖鎖、バイセクティング型糖鎖の合成研究を進めた。ここではより複雑なグリコシルアスパラギン構造を有する糖鎖を合成対象とし、まずマイクロフロー合成を適用することで、効率的なグリコシルアスパラギン構造の構築に成功した。さらに、3つの四糖セグメントという比較的大きなセグメント間でのグリ

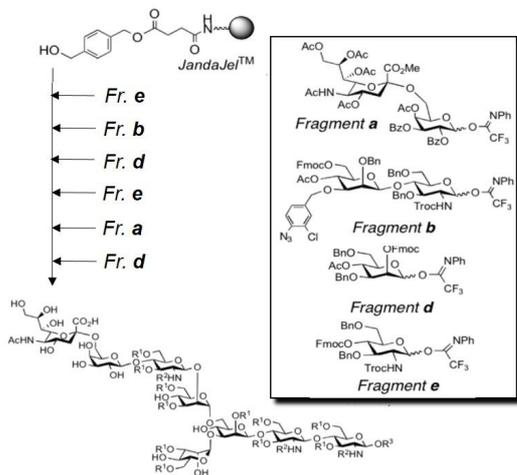
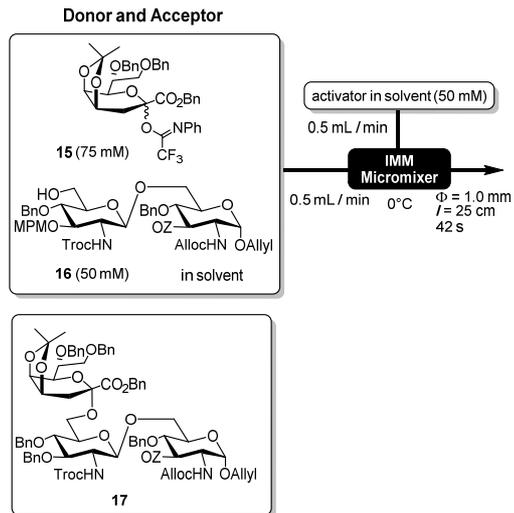


Fig.3 *N*-グリカンの効率合成  
コシル化を繰り返すことで、コアフコース含

有ならびにバイセクティング型保護 12 糖の合成に成功した。

・微生物由来複合糖質の効率合成

寄生菌であるヘリコバクターピロリ菌のリポ多糖をターゲットとして、Kdo と呼ばれる酸性糖とリポド A からなる 3 糖の合成を行った (Fig.4)。Kdo 残基のグリコシル化において、マイクロフロー法により効率が劇的に向上した。効率的な混合により、分子間のグリコシル化が促進されたと考えられる。



conditions

entry	reaction type	activator	solvent	donor (equiv.)	yield, $\alpha$ , $\beta$ (calcd. from acceptor)
1	batch	TBSOTf	CPME	5.0	70%, 95 : 5
2	microflow	TBSOTf	CPME	1.5	72%, 95 : 5
3	batch	TfOH	CH <sub>3</sub> CN	5.0	quant., 75 : 25
4	microflow	TfOH	CH <sub>3</sub> CN	2.0	95%, 76 : 24

Fig.4 マイクロフロー-Kdo グリコシル化

細菌細胞壁ペプチドグリカンについても液相による効率合成ならびに固相合成を達成した。赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* のイノシトールリン脂質の合成研究においては、神戸らとの共同研究により Ni 触媒存在下 Grignard 試薬を用いた sp<sup>3</sup>-sp<sup>3</sup> クロスカップリング反応を用いた長鎖脂肪酸の合成法を確立した。また北村らとの共同研究により Ru 触媒を用いて、最終工程において全てのアリル系保護基を切断するという新たなアリルストラテジーを確立した。

この他にも、柳らとの共同研究によりマイクロフロー系を用いたベンジル位の光臭素化法を開発した。また時間集積合成として、アミンやアルコールが媒介する共役イミンの新規 [4+4] 型縮合反応の開発を進め、反応機構の解析を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 42 件)

1. Hsu Y.; Ma HH.; Lico LS.; Jan JT.; Fukase K.; Uchinashi Y.; Zulueta MM.; Hung SC. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2014**, 53(9), 2413-2416

2. Tanaka, K.; Kitadani, M.; Tsutsui, A.; Pradipta, AR.; Imamaki, R.; Kitazume, S.; Taniguchi, N.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*(9), 1412-1418.

3. Tanaka, K.; Nakamoto, Y.; Siwu, ER.; Pradipta, AR.; Morimoto, K.; Fujiwara, T.; Yoshida, S.; Hosoya, T.; Tamura, Y.; Hirai, G.; Sodeoka, M.; Fukase, K.\* *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*(42), 7326-7333.

4. Tanaka, K.; Moriwaki, K.; Yokoi, S.; Koyama, K.; Miyoshi, E.; Fukase, K.\* *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1074-1077.

5. Wang, N.; Huang, C.-y.; Hasegawa, M.; Inohara, N.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.\* *ChemBioChem* **2013**, *14*, 482-488.

6. Iwasaki, T.; Higashikawa, K.; Reddy, V. P.; Ho, W. W. S.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.\*; Terao, J.; Kuniyasu, H.; Kambe, N. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2956-2960.

7. Tanaka, K.; Siwu, R. O. E.; Hirotsaki, S.; Iwata, T.; Matsumoto, R.; Kitagawa, Y.; Pradipta, A. R.; Okumura, M.; Fukase, K.\* *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5899-5902.

8. Tanaka, K.; Yokoi, S.; Morimoto, K.; Iwata, T.; Nakamoto, Y.; Nakayama, K.; Koyama, K.; Fujiwara, T.; Fukase, K.\* *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1865-1868

9. Fujimoto, Y.; Shimoyama, A.; Suda, Y.; Fukase, K.\* *Carbohydrate Research* **2012**, *356*, 37-43.

10. Fujimoto, Y.; Shimoyama, A.; Suda, Y.; Fukase, K.\* *Carbohydrate Research* **2012**, *356*, 37-43.

11. Tanaka, K.; Mazumder, K.; Siwu, E. R. O.; Nozaki, S.; Watanabe, Y.; Fukase, K.\* *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1756-1759.

12. Shimoyama, A.; Saeki, A.; Tanimura, N.; Tsutsui, H.; Miyake, K.; Suda, Y.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.\* *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (51), 14464-14474.

13. Uchinashi, Y.; Nagasaki, M.; Zhou, J.; Tanaka, K.; Fukase, K.\* *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7243-7248.

14. Shimoyama, A.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.\* *Synlett* **2011**, *16*, 2359-2362.

15. Tanaka, K.; Fukase, K.\*; Katsumura, S. *Synlett* **2011**, *15*, 2115-2139.

16. Huang, C.-y.; Wang, N.; Fujiki, K.; Otsuka, Y.; Akamatsu, M.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.\* *J. Carbohydr. Chem.* **2010**, *29*, 289-298.

17. Tanaka, K.; Siwu, R. O. E.; Minami, K.; Hasegawa, K.; Nozaki, S.; Kanayama, Y.; Koyama, K.; Chen, C. W.; Paulson, C. J.; Watanabe, Y.; Fukase, K.\* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (44), 8195-8200.

18. Probe design and synthesis of Galβ(1→3)[NeuAcα(2→6)]GlcNAcβ(1→2)M an motif of N-glycan.  
Bao, G.-m.; Tanaka, K.; Ikenaka, K.;

Fukase, K.\* *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 2010, 3760-3766.

19. Tanaka, K.; Miyagawa, T.; Fukase, K.\* *Synlett* **2009**, *10*, 1571-1574.

20. Tanaka, K.; Fujii, Y.; Tokimoto, H.; Mori, Y.; Tanaka, S.; Bao, G.; Siwu, E. R. O.; Nakayabu, A.; Fukase, K.\* *Chem. Asian J.* **2009**, *4* (4), 574-580.

〔学会発表〕(計 81 件)

1. “Imaging and Sensing Biomolecular Function and Assembly” Synthesis and Bio-imaging study of glycans. Koichi Fukase, Osaka university-University of Bordeaux International Symposium, Institut Européen de Chimie et Biologie, University of Bordeaux, Pessac, France, 2014.3.14-15 (Invited)

2. Synthetic Study of Microbial and Animal Glycans. Koichi Fukase, 27th International Carbohydrate Symposium (ICS27), Bangalore, India, 2014.1.12-17 (Invited)

3. マイクロフロー合成を基軸とした集積合成法の開発と生体制御分子創製への展開. 深瀬浩二、第3回慶應義塾大学戦略的研究基盤形成支援事業シンポジウム-グリーンイノベーションとライフイノベーションの架け橋、慶應義塾大学、横浜、2013.12.21 (招待講演)

4. Synthesis and Bio-imaging study of glycans towards immunoregulation. Koichi Fukase, Yukari Fujimoto, Yoshiyuki Manabe, and Katsunori Tanaka, First Osaka university-EPFL International Symposium, Osaka Univ., 2013.12.2-4 (Invited)

5. Synthetic Study of Microbial and Animal Glycans. Koichi Fukase, Yukari Fujimoto, Katsunori Tanaka, and Yoshiyuki Manabe, The 11th International Symposium on Organic Reaction (ISOR-11), Taipei, Taiwan, 2013.11.19-22 (Invited)

6. 化学プロセスインテグレーションと化合物インテグレーション: 生体反応の制御を目指した化学システムの創成. 深瀬浩二、第3回CSJ化学フェスタ2013、タワーホール船堀、東京、2013.10.21-23 (招待講演)

7. Synthesis and Bio-functional Studies of Animal and Bacterial Glycans. Koichi Fukase, 17<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Tel-Aviv, Israel, 2013.7.7-11 (Invited)

8. 生物機能分子と生体分子機能の探索を目指した新しいアッセイシステム: シグナル遮断分子とグライコバイオイメージング. 深瀬浩二、理研シンポジウム: 第8回有機合成化学のフロンティア/JST-ERATO シンポジウム生細胞分子化学、鈴木梅太郎記念ホール、和光、2013.7.5 (招待講演)

9. マイクロリアクターを利用した反応制御と糖鎖合成. 深瀬浩二、岡山マイクロリアクターネット例会、岡山大学工学部、2013.6.7 (招待講演)

10. 有機合成と生体イメージングを基盤とすると糖鎖化学生物学. 深瀬浩一、理研シンポジウム-未来に繋ぐ天然物合成化学-, 大阪大学会館、2013.5.31 (招待講演)

11. Synthetic Studies of Glycans and Glycoconjugates for Chemical Glycobiology. Koichi Fukase, 5th Gratama Workshop, Tokyo Institute of Technology, 2013.5.29-6.1. (Plenary)

12. マイクロリアクターを利用した反応制御と糖鎖合成 (特別企画講演) 深瀬浩一、日本化学会第93春季年会(2013)、滋賀県草津立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2013.3.22.-25 (招待講演)

13. Synthesis of regulatory molecules and probes for innate immunity and glyco-imaging. Koichi Fukase, The 7th Glycan Forum Berlin 2013, nhw Hotel, Berlin, Germany, 2013.3.20-23 (Invited)

14. Comprehensive Approaches for New Antitumor Agents and Immunoregulatory Molecules, Regulation of Innate Immune Responses and Signal Transductions. Koichi Fukase, First International Symposium on Pharmaceutical Sciences: A Global Approach, Department of Pharmacy, University of Science & Technology, Chittagong, Bangladesh, 2013.2.26 (Plenary)

15. 有機合成を基盤とする生物活性分子の機能解析と創製. 深瀬浩一、ヘテロ原子部会平成24年度第2回懇話会、京都大学・宇治おうばくプラザ、2012.12.14 (招待講演)

16. Immunoactivation and immunomodulation using synthetic PRR ligands. Koichi Fukase, The 1st International Symposium on Chemical Biology of Natural Products Target ID and Regulation of Bioactivity, Kyoto, Kyoto Century Hotel, 2012.10.31-11.1 (Invited)

18. Immunoactivation and immunomodulation using synthetic PRR ligands. Koichi Fukase, International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 (IEIIS2012), National Institute of Informatics, Tokyo, Japan, 2012.10.23-26 (Invited)

19. 有機合成とイメージングを基盤とする生物活性分子の機能解析と創製: 新しい抗腫瘍療法を目指して. 深瀬浩一、大塚 有機合成シンポジウム、大塚製薬 能力開発研究所 (徳島) 2012.10.15-16 (招待講演)

20. Synthesis of bacterial glycoconjugates for regulation of immune system. Koichi Fukase, 5th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Suzdal, Russia, 2012.9.2-6 (Invited)

21. 化学合成で糖鎖の生物機能に迫る. 深瀬浩一、第15回機能性分子シンポジウム、筑波大学総合研究棟、2012.1.28. (招待講演)

22. Integrated Synthesis of Bioactive Glycans and Heterocycles. K. Fukase, 10th International Symposium on Organic Reactions (ISOR10). Faculty of Science and Technology, Keio University, Yokohama, Japan, 2011.11. 21-24

(Invited)

23. Glyco-imaging for glycan dynamics study. K. Fukase, The 71st Okazaki Conference "New perspectives on molecular science of glycoconjugates", Osaka Conference Center, NINS, Japan, 2011.10.12-14 (Invited)

24. Structures and functions of bacterial lipopolysaccharides. K. Fukase, Bilateral Joint Seminar: Glycobiology Japan-Netherlands Joint Seminar 2011. Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan, 2011.10.8-11 (Invited)

25. Glycoimaging of whole-body system: application to glycoproteins, glycan dendrimers, and glycan-engineered cells Koichi Fukase, Katsunori Tanaka, 43rd IUPAC World Chemistry Congress. "Balancing Life with Glycoconjugates", Puerto Rico Convention Center, Puerto Rico, 2011.8.1 (Invited)

26. New functional analysis of glycans based on chemical synthesis and bio-imaging. Koichi Fukase, Frontiers of Chemical Biology at Peking University Shenzhen Graduate School, the School of Chemical Biology and Biotechnology, China, 2011.4.14-16 (Invited)

27. 標的指向型ライブラリー構築と生命科学への貢献. 深瀬浩一、日本化学会第91回春季年会、神奈川大学、2011.3.26-29 (特別企画講演)

28. 精密有機合成と生体イメージングを基盤とする生物活性複合糖質の機能解明. 深瀬浩一、日本化学会第91回春季年会、神奈川大学、2011.3.26-29 学術賞受賞演

29. 免疫制御を指向したケミカルグリコバイオロジー. 深瀬浩一、日本化学会第91回春季年会、神奈川大学、2011.3.26-29 依頼講演

30. Synthetic approach for in vivo functional studies of glycans: Application of PET imaging. Koichi Fukase, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010) Honolulu, USA, 2010.12.14-20 (Invited)

〔図書〕(計 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

深瀬浩一 (FUKASE, Koichi)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号 : 80192722