

機関番号：34413

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成20年度～平成22年度

課題番号：20590022

研究課題名（和文） 環境に優しい「無臭ベンゼンチオール」をグリコシル化反応に利用する糖鎖合成法の開発

研究課題名（英文） Development of Novel Glycosylation Reaction Using Odorless Benzenethiols

研究代表者

梶本哲也（Kajimoto Tetsuya）

大阪薬科大学・薬学部・教授（特任）

研究者番号：80185777

研究成果の概要（和文）：申請者は、*p*-オクチルオキシベンゼンチオール（**1**）が無臭で取扱い容易な有機硫黄試薬であることを見出し、これを用いたチオグリコシド（**2**）の調製およびこれに続くグリコシル化反応が、無臭条件下、高収率で進行することを見出した。さらに、本無臭ベンゼンチオールを用いて調製したチオグリコシドをスルホキシド体（**3**）へと酸化し、これを受容体基質（アクセプター糖）とするグリコシル化反応を展開し、*N*-フタルイミド保護された1-チオ-D-グルコサミニド誘導体をNIS / TfOHで活性化するグリコシル化反応においては、比較的高収率で二糖を合成できる明らかにした。最後に、本手法を利用して、がん細胞において活性の高い*N*-アセチルグルコサミン転移酵素Vの活性測定に利用できる三糖誘導体（**4**）の非還元末端からの合成を行った。具体的には、**2**をドナー（糖供与体）、**3**を受容体とするグリコシル化反応で得られた *p*-ドデシルフェニル *N*-フタルイミド-D-グルコサミニル-β（1→2）-D-マンノシルスルホキシド誘導体を、PPh<sub>3</sub>/CCl<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN 試薬系によって対応するチオグリコシド誘導体に還元し、続く次のステップにおいては、本チオグリコシドをドナーとするグリコシル化を行い、標的分子である *N*-フタルイミド-D-グルコサミニル-β（1→2）-D-マンノシル-β（1→6）-D-グルコピラノシド誘導体（**4**）を合成することに成功した。

今回合成した三糖誘導体は、従来、一般的に利用されてきた還元末端からの合成を先に行い、最終工程でアグリコン部を交換する手法では合成できなかった化合物であり、従来、ほとんど報告例のなかった非還元末端からの糖鎖合成の有用性を示した点で新規であった。

研究成果の概要（英文）：

*p*-Octyloxybenzenethiol (**1**) was first synthesized as a new odorless benzenethiol. Using **1**, 1-(*p*-octyloxy)phenyl-*thio*-glycosides (**2**) were prepared as a new type of glycosyl donors in the glycosylation reaction. After trying the glycosylation reactions under several conditions, it was found that **2** were excellent glycosyl donors in glycosylation reaction activated with *N*-iodosuccinimide and triflic acid. All the procedure from the preparation of **2** to the glycosylation reaction could be attained completely under conditions where no malodorous stench was generated.

Next, another glycosylation reaction was performed using a combination of **2** and 1-(*p*-octyloxy)phenyl glycosyl sulfoxides (**3**), which were prepared by the oxidation of **2**, as a glycosyl donor and an acceptor, respectively. Promising results were obtained when *p*-octyloxyphenyl *N*-phthalimido-D-*thio*-glucosaminide derivative was activated with NIS and TfOH for the glycosylation of **3** carrying a free hydroxyl group, especially, at the C-6 position. Successive reduction of the resulting disaccharyl sulfoxides with Ph<sub>3</sub>P/CBr<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN provided the corresponding *thio*-glycosides, which could be used as the glycosyl donors in a following glycosylation reaction to afford trisaccharides in good yield. Using the present method, 4-iodo-phenylalkyl β-D-*N*-acetylglucosaminyl-(1-2)-β-D-mannopyranosyl(1-6)-α-D-glucopyranoside (**4**), which was designed as a monitoring glycoconjugate for the activity of malignant tumor specific *N*-acetyl-D-glucosaminyltransferase-V.

Finally, it is noteworthy that the glycosylation reaction using a combination of **2** and **3**, which was developed in the present study, provided a novel and useful synthetic method of oligosaccharides, *i.e.*,

the glycosylation reaction from the non-reducing ends.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,900,000 円	570,000 円	2,470,000 円
21年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
22年度	700,000 円	210,000 円	910,000 円
年度			
年度			
総計	3,700,000 円	1,110,000 円	4,810,000 円

研究分野：医学（薬学）

科研費の分科・細目：化学系薬学

キーワード：(1) *p*-オクチルオキシベンゼンチオール (2) 無臭ベンゼンチオール (3) グリコシル化反応 (4) 1-チオ-D-グルコサミニド (5) *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 V (6) NIS/TfOH (7)  $\text{PPh}_3/\text{CCl}_4/\text{CH}_3\text{CN}$  試薬系 (8) 非還元末端からの糖鎖合成

### 1. 研究開始当初の背景

20 世紀末より急速に発展した糖鎖生物学の研究成果を基に、糖鎖および糖鎖関連化合物を新薬の開発に利用する機運が高まってきた。これら糖鎖医薬品の実用化においては、グリコシル化を繰り返す糖鎖合成の効率（収率、スピード、簡便性）が成功の鍵を握っており、近年、クロロイミデート化糖を利用する Schmidt 法やフッ化糖を活性化する鈴木法など、優れたグリコシル化法が数多く開発されてきた。とりわけ、チオグリコシドをグリコシルドナーとする手法は、収率、活性化の特異性の高さから広くオリゴ糖合成に利用されている。しかし、本手法には、チオグリコシドの調製時およびグリコシド結合形成時に有機硫黄試薬であるチオール特有の悪臭を発生するという操作上の欠点があり、スケールアップ可能なグリコシル化法とは言えなかった。

幸いにも、申請者は、2004 年から、本申請における研究協力者の野出学博士（京都薬科大学・教授）、小関稔博士（京都薬科大学・助教）とともに「有機硫黄試薬を利用する反応の無臭化に関する研究」を進めてきた経緯から、*p*-オクチルオキシベンゼンチオールが無臭で取扱い容易な有機硫黄試薬であることを見出し、チオグリコシドの調製に有用な試薬であることを報告してきた。

### 2. 研究の目的

申請者らが開発した *p*-オクチルオキシベンゼンチオール (1) などの無臭ベンゼンチオールを使って調製したチオグリコシド (2) をドナーとするグリコシル化反応の反応条

件の最適化を行い、その有用性を示す。また、その一方で、グリコシル化ドナーとして調製したチオグリコシドを酸化してスルホキシドやスルホン誘導体に変換し、今度は、これらをグリコシル化受容体として利用してグリコシル化を行い、続いて、得られたスルホキシド二糖またはスルホン化二糖をチオオリゴ糖へと還元し、これをさらなるグリコシル化のドナーとして利用する手法を確立し、従来、ほとんど報告されてこなかった非還元末端側からの糖鎖合成の開発とその応用について検討する。

### 3. 研究の方法

まず、*p*-オクチルオキシベンゼンチオール (1) と単糖のアセチル化体とを  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  の存在下に反応させ、*p*-オクチルオキシフェニルチオグリコシド (2) を合成し、これらチオグリコシドを NIS/TfOH または NIS/TfOAg で活性化し、グリコシル化ドナーとしての反応性（有用性）を詳細に検討する。次に、本グリコシル化法を利用して、転移能の高い腫瘍細胞において発現率が高いといわれている *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 V の受容体となる D-グルコサミニル-β (1→2) -D-マンノシル-β (1→6) -D-グルコピラノシドを糖鎖部分を持つオリゴ糖鎖誘導体 (4a, 4b) の合成を試みる。

また、その一方で、*p*-オクチルオキシフェニルチオグリコシド (2) を *m*-CPBA でグリコシルスルホキシド (3) またはグリコシルスルホン誘導体 (5) に酸化し、これをグリコシル化反応の受容体とする反応の条件を検討する。さらには、本グリコシル化で得られた二糖誘導体を還元する手法を検討す

るとともに得られるチオ二糖をドナーとする糖鎖(三糖)合成(具体的には、**4a**, **4b**の別途合成)についても検討し、非還元末端からの糖鎖合成の可能性と有用性を見出す。

#### 4. 研究成果

申請者は、*p*-オクチルオキシベンゼンチオール (**1**) が無臭で取扱い容易な有機硫黄試薬であることを見出し、これを用いたチオグリコシド (**2**) の調製およびこれに続く **2** をドナー(糖供与体)とするグリコシル化反応が、無臭条件下、高収率で進行することを見出した。そして、本グリコシル化反応を鍵段階として利用することにより、腫瘍細胞において発現率が高いといわれている *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 **V** の特異的受容体となり得るトリメチルシリルエトキシ *D*-グルコサミニル-β(1→2)-*D*-マンノシル-β(1→6)-*D*-グルコピラノシド (**4a**) の合成を達成した。

次に、発想を逆転し、上記研究でグリコシル化ドナーとして調製したチオグリコシド (**2**) を酸化してスルホキシド (**3**) やスルホン誘導体 (**5**) に変換し、今度は、これらをグリコシル化受容体として利用してグリコシル化を行うことにした。種々のグリコシルドナーとグリコシル受容体の組合せでグリコシル化反応を検討したところ、チオグリコシド (**2**) をドナーとし、グリコシルスルホン誘導体 (**5**) を受容体とするグリコシル化反応においては、いずれの反応においても優れた収率(約 90%)でグリコシル化が進行した。しかし、チオグリコシド (**2**) をドナーとし、グリコシルスルホキシド (**3**) を受容体とするグリコシル化反応においては、*N*-フタルイミド保護された 1-チオ-*D*-グルコサミニド誘導体を *NIS* / *TfOH* で活性化するグリコシル化反応においてのみ、比較的高収率で二糖を合成できることが明らかになった。その一方で、**3** を糖受容体として生成した二糖のスルホキシドは、*Ph*<sub>3</sub>*P*/*CBr*<sub>4</sub>/*CH*<sub>3</sub>*CN* 試薬系で容易に還元でき、さらに続くグリコシル化のドナーとして利用できることはできたが、**5** を糖受容体として得られた二糖のスルホン誘導体をチオグリコシル体へと還元し、続くグリコシル化のドナーとして利用できる方法を見いだせなかった。

そこで、最後に、グリコシルスルホキシド (**3**) を受容体とするグリコシル化反応の有用性を示すために、トリメチルシリルエトキシ *D*-グルコサミニル-β(1→2)-*D*-マンノシル-β(1→6)-*D*-グルコピラノシド (**4a**) のアグリコンのトリメチルシリルエチル基を *p*-ヨードフェニルアルキル基に置換した人工複合糖鎖 (**4b**) の合成を検討した。

なお、本糖鎖は、**4a** にフッ素イオンを反応させてアグリコンと糖鎖部位の解裂をし、その後、アグリコン部分の変換をしようと試みたが、合成できなかった分子である。また、アグリコン部のヨウ素 (<sup>127</sup>I) を放射性ヨウ素 (<sup>131</sup>I) に置換することで、SPECT や PET での癌診断薬として利用できることが期待されている糖鎖化合物でもある。

実際の合成においては、*N*-フタルイミド保護された 1-チオ-*D*-グルコサミニド誘導体 (*p*-octyloxyphenyl 2-phthalimido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-*D*-glucopyranosaminide) をドナー、*D*-マンノシルスルホキシド誘導体 (*p*-octyloxyphenyl 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-α-*D*-mannopyranosyl sulfoxide) を受容体とするグリコシル化を行い、*D*-グルコサミニル-β(1→2)-*D*-マンノシル-*p*-ドデシルフェニルスルホキシド誘導体 (3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-*N*-phthalimido-β(1-2)-*D*-glucosaminyl-3-*O*-benzyl-(4,6)-benzylidene-β-*D*-mannopyranosyl *p*-octyloxyphenyl sulfoxide) を得、これを *PPh*<sub>3</sub>/*CCL*<sub>4</sub>/*CH*<sub>3</sub>*CN* 試薬系によって対応するチオグリコシド誘導体に還元し、続く次のステップにおいては、本チオグリコシドをドナーとするグリコシル化を行い、三糖保護体である *N*-フタルイミド-*D*-グルコサミニル-β(1→2)-*D*-マンノシル-β(1→6)-*D*-グルコピラノシド誘導体を合成することに成功した。最後に、脱保護を行い目的とする糖鎖化合物 (**4b**) を合成することに成功し、従来、ほとんど報告例のなかった非還元末端からの糖鎖合成の有用性を示すことができた。

#### 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 9 件)

- 1) Application of Odorless Thiols for Cleavage of 2- and 4-Nitrobenzenesulfonamide, M. Matoba, T. Kajimoto, M. Node, *Synthetic Commun.*, **38**, 1194—1200 (2008).
- 2) Selective C-N bond oxidation: demethylation of *N*-methyl groups in *N*-arylmethyl-*N*-methyl-α-amino esters utilizing *N*-iodosuccinimide (*NIS*), T. Katoh, T. Watanabe, M. Nishitani, M. Ozeki, T. Kajimoto, M. Node, *Tetrahedron Lett.*, **49**, 598—600 (2008).

- 3) The First Enantioselective Synthesis of Imino-deoxydigitoxose and Protected Imino-digitoxose by Using L-Threonine Aldolase-Catalyzed Aldol Condensation, T. Nishiyama, T. Kajimoto, S. S. Mohile, N. Hayama, T. Otsuda, M. Ozeki, M. Node, *Tetrahedron: Asymmetry*, **20**, 230—234 (2009).
- 4) Inhibitors against Glycosidases as Medicines, T. Kajimoto, M. Node, *Curr. Topics in Med. Chem.*, **9**, 13—33 (2009).
- 5) Synthesis of inhibitors of glycosyltransferases, T. Kajimoto, M. Node, *Synthesis*, 3179—3210 (2009).
- 6) Total synthesis of (+)-negamycin and its 5-*epi*-derivatives, S. Nishiguchi, M. O. Sydnes, A. Taguchi, T. Regnier, T. Kajimoto, M. Node, Y. Yamazaki, F. Yakushiji, Y. Kiso, Y. Hayashi, *Tetrahedron*, **66**, 314—320 (2010).
- 7) Development of Novel Asymmetric Reaction and Its Application to Synthesis of Natural Products, M. Node, T. Kajimoto, M. Ozeki, *Heterocycles*, **81**, 1061—1092 (2010).
- 8) Glycosylation from the Non-reducing End Using a Combination of Thioglycoside and Glycosyl Sulfoxide as the Glycosyl Donor and the Acceptor, T. Kajimoto, K. Arimitsu, M. Ozeki, M. Node, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 758—764 (2010).
- 9) Synthesis and Evaluation of a Radioiodinated Trisaccharide Derivative as a Synthetic Substrate for Sensitive *N*-Acetylglucosaminyltransferase V Radioassay, T. Mukai, M. Hagimori, K. Arimitsu, T. Katoh, M. Ukon, T. Kajimoto, H. Kimura, Y. Magata, E. Miyoshi, N.

Taniguchi, M. Node, H. Saji, *Bioorg. Med. Chem.*, in press (2011).

[学会発表] (計 4 件)

1. 有光健治、吉増秀礼、梶本哲也、野出學、チオグリコシド誘導体の組み合わせによる効率的グリコシル化反応の開発、第 39 回複素環化学討論会、2009 年 10 月 14—15 日、さわやかちば県民プラザ(千葉)。
2. 有光健治、吉増秀礼、梶本哲也、野出學、チオグリコシド関連糖供与体の化学選択的グリコシル化反応、第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2009 年 10 月 24 日、近畿大学(大阪)。
3. K. Arimitsu, H. Yoshimasu, T. Kajimoto, M. Node, Chemoselective Glycosylation by Using Thioglycoside from Odorless Benzenethiol, The 11<sup>th</sup> International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, 2009年11月9—13日、リーガロイヤルホテル京都(京都)。
4. 有光健治、木村寛之、梶本哲也、野出學、GnT-Vを標的とした三糖誘導体の合成研究、第130年会 日本薬学会、2010年 3月28—30日、岡山大学(岡山)。

[図書] (計 1 件)

1. 梶本 哲也 日本発ブロックバスターを目指して「第3編 プロセス支援研究の最前線、第5章 酵素反応によるC—C結合形成と創薬研究への展開」(p 238—248) シーエムシー出版 (2010)。

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶本 哲也 (Kajimoto Tetsuya)  
大阪薬科大学・薬学部・教授 (特任)

研究者番号：80185777

### (2) 研究分担者

野出 學 (Node Manabu)  
京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60027076

小関 稔 (Ozeki Minoru)  
京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40465597

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：