

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 5月17日現在

研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19780250  
研究課題名（和文）グラム陰性細菌が産生する複合糖脂質の「酸性内部コア糖鎖」の合成研究  
研究課題名（英文）Synthetic study of acidic inner core oligosaccharides of lipooligo- and lipopolysaccharides produced by gram-negative bacteria  
研究代表者  
一柳 剛（イチヤナギ ツヨシ）  
鳥取大学 農学部 准教授  
研究者番号：00302240

研究成果の概要（和文）：グラム陰性細菌が細胞外膜に産生する複合糖脂質のうち、酸性糖 2-ケト-3-デオキシマンノオクトロン酸(Kdo)を中心とした「酸性内部コア糖鎖」の合成を目的とし、その合成に適した新しいKdo合成中間体として、7,8-*O*-ジベンゾイル-4,5-ジイソプロピリデン-D-マンノオクトロン酸メチルの設計・合成に成功した。この中間体から、グラム陰性菌のLOS/LPS に最も保存された酸性2糖（Kdo( $\alpha$ 2-4)Kdo) および 4,5-分岐構造を有するHep( $\alpha$ 1-5)[Kdo( $\alpha$ 2-4)]Kdoの合成を達成した。

研究成果の概要（英文）：

Design and synthesis of novel Kdo derivative, methyl 7,8-di-*O*-benzoyl-4,5-*O*-isopropylidene-D-*manno*-octulosonate, for the synthesis of inner-core oligosaccharide of LOS/LPS produced by gram-negative bacteria was successively achieved. It was easily converted to Kdo donor and 4,5-dihydroxyl or 7,8-dihydroxyl Kdo acceptor for the synthesis of Kdo( $\alpha$ 2-4)Kdo and Kdo( $\alpha$ 2-8)Kdo. Conjugation of Kdo and neutral tetrasaccharide, (Lac( $\beta$ 1-4)[Hep( $\alpha$ 1-3)]Hep), with human serum albumin (HSA) was also accomplished.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

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：糖鎖工学，リポオリゴ糖，リポ多糖，グラム陰性菌，2-ケト-3-デオキシマンノオクトロン酸

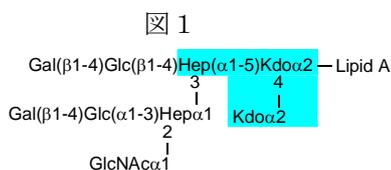
## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌は、細胞外膜に複合糖脂質リポオリゴ糖 (LOS) を産生する。LOS はオリゴ糖 (OS) が Lipid A に結合した構造であり、その OS には「コア糖鎖」と呼ばれる属種間での変異が少ない構造不変領域がある。その中に 3-デオキシ-D-マンノオクトロン酸 (Kdo) と L-グリセロ-D-マンノヘプトース (Hep) からなる「酸性内部コア糖鎖」が存在する。この糖鎖は、病原性グラム陰性細菌による感染予防のためのワクチン開発の標的として研究開発が進められている。

酸性内部コア糖鎖の有機化学的手法による合成は、欧州のグループ (Paulsen, Brade, Oscarson) と国内グループ (深瀬ら, 高橋・田中ら) により取り組まれている。そしてこれまでに *Escherichia* 属, *Chlamydia* 属由来の「 $\alpha$ 2-8 または  $\alpha$ 2-4 結合した Kdo のみからなる糖鎖」の合成が達成されている。

我々はこれまでの研究において、上記糖鎖をインタクトな形でタンパク上に提示させるため、還元末端となる Kdo へ  $\alpha$  選択的にイソシアン酸由来のリンカーを導入する手法を開発してきた。その後、これをアミノ酸と結合する方法も確立し、糖鎖コンジュゲート合成の基礎を確立してきた。

このような成果が得られてきているが、図 1 の着色部に示すような分岐構造を持つ酸性内部コア糖鎖の合成は未開拓である。この合成には、1) 属間で異なる構造を持つ酸性内部コア糖鎖の合成に対応可能な汎用性の高い還元末端 Kdo 受容体がない 2) Kdo 供与体を用いたグリコシル化反応の  $\alpha$  選択性が低いためである。以上 2 つの問題を克服する新たな分子設計と合成法の確立が必要となっている。



## 2. 研究の目的

本研究では、以下に示す 3 つのアプローチで研究を行い、LOS の分岐構造を持つ酸性内部コア糖鎖合成法を確立することを目的とする。

- (1) 汎用性の高い Kdo 受容体の設計・合成：属間で異なる構造を持つ可能性がある酸性内部コア糖鎖の合成に対応可能な還元末端 Kdo 受容体として、4, 5 位または

4, 8 位に遊離水酸基を持つ Kdo 誘導体の効率的な合成法を確立する。

- (2) Kdo 供与体を用いる新しい  $\alpha$  グリコシル化反応の開発： $\alpha$  選択的グリコシル化を達成するために、分子内環化反応とする反応場の新たな設計と検証する。また立体配座を変えた Kdo 供与体の設計と有効性を検証する。
- (3) 分岐 Kdo 糖鎖の最適合成経路を決定：4, 5 分岐 Kdo 糖鎖の構築における糖または糖鎖の最適な導入順序を検証する。

## 3. 研究の方法

これまで合成されている Kdo 受容体は、分岐糖合成を想定した分子設計がなされていないため、新たに分子を設計する必要がある。一般的に LOS の内部コア糖鎖は還元末端 Kdo の 4, 5, 8 位から糖鎖が伸張する。よって、4, 5, 8 位いずれの位置からも糖鎖伸張可能な汎用性の高い Kdo 受容体を下記の 2 つの方法で合成することとした。

### (1) 汎用性の高い Kdo 受容体の設計・合成

- ① 4, 5, 8 位に遊離水酸基を持つ鎖状 Kdo 受容体

マンノースから誘導した 5, 6 位の環状硫酸エステルを、求核置換反応によってこの硫酸エステルを開環、増炭する。得られた開環体を直接糖受容体として、または水酸基を保護したのち、環化して受容体とする。この合成はマンノースの 6 位から炭素伸張する方法であり、従来の合成と異なる合成方法である。

- ② 4, 5 位に遊離水酸基を持つ Kdo 受容体

Horner-Wadsworth-Emmons 型反応によりマンノースの 1 位から増炭する。得られる不飽和エステルの酸化とピラノース体への環化、続く保護基の選択的除去によって、受容体とする。

- ③ Kdo・オリゴ糖供与体の合成

Kdo 供与体は、4, 5 および 7, 8 位をエーテル系の保護基で保護した、及びカルボキシル基と 5 位水酸基をエステル化により結合した 2 環性のものをそれぞれ合成し供与体とする。これら化合物は、上記 1) で合成したもの、および Kdo から合成する。

オリゴ糖供与体は、ナイセリア属が産生する LOS のうち最も共通に存在するオリゴ

糖鎖を選択する。これらの糖鎖のアルキルチオ，あるいはトリクロロアセトイミデート誘導体へと変換し，糖供与体とする。

## (2) Kdo供与体を用いる新しい $\alpha$ グリコシル化反応

Kdo は3位に置換基を持たないため，隣接基効果を利用して立体選択的グリコシル化反応をおこなうことは出来ない。そのため特別な分子設計が必要である。本研究では2つのアプローチでKdoの $\alpha$ グリコシドを構築する。

- ① 糖供与体と糖受容体をエステル結合で結び，分子内アグリコン転移を行う方法
- ② 糖供与体を分子内環化させてピラノース環の立体配座を変えた供与体を利用する方法

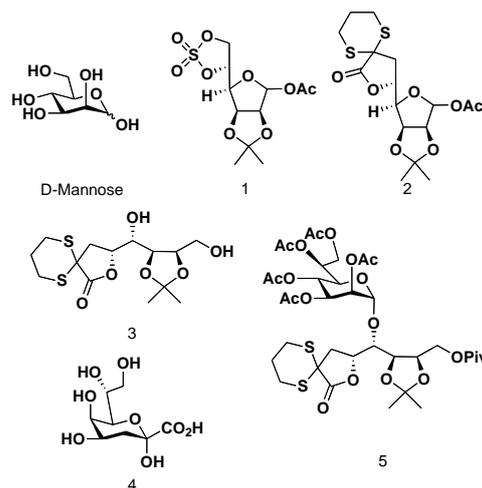
## (3) 分岐酸性内部コア糖鎖の合成

モデル実験としてヘプトース単糖供与体を用いて上記で得られたKdo糖鎖の還元末端Kdoの5位水酸基へグリコシル化反応を行い，反応条件の最適化を行う。続いてオリゴ糖の導入を行い，ナイセリア属の酸性内部コア糖鎖の合成を行う。もし収率が著しく低い場合は，先に5位に糖鎖を導入したのち，4位にKdoを導入するアプローチに変更する。

## 4. 研究成果

### (1) 汎用性の高いKdo受容体の設計・合成

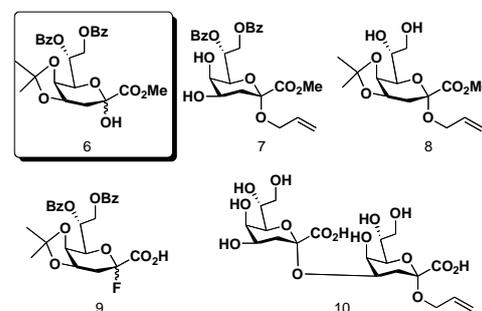
① Kdoの合成は従来マンノースのアノマー炭素から2炭素伸長して合成されてきた。本方法ではこれまでとは異なり，6位炭素から2炭素伸長して合成する方法を設計し，糖鎖合成に適したKdo受容体を合成することとした。1-*O*-アセチル-2,3-*O*-イソプロピリデンマンノフラノースの5,6-位水酸基を環状硫酸エステル(1)へと変換後，位置選択的に6位にジチアニル酢酸誘導体を付加することで，Kdoの8炭素骨格(2)を収率良く構築した。フラノース環を還元的に開裂することによって，5,8位に水酸基を有する鎖状Kdo受容体(3)を合成した。全ての保護基を除去することにより，Kdo(4)の合成を達成した。(J. Carbohydr. Chem. 2009, 28(2), 58-63). さらに8位を保護したのち5位にマンノヘプトースを $\alpha$ 選択的に導入したHep( $\alpha$ 1-5)Kdo誘導体(5)の合成を達成した。これにより，糖鎖合成に適した新しいKdo受容体を見いだすことができた。(学会発表1・3・7・8・9)



### ② 4,5位に遊離水酸基を持つKdo受容体

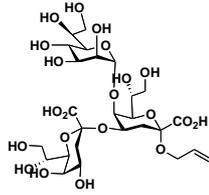
LOS/LPSのコア糖鎖のうち，Kdo糖鎖部分のは，Kdo( $\alpha$ 2-4)Kdo，またはKdo( $\alpha$ 2-8)Kdoの2種類の結合様式を有する。これら糖鎖を任意に合成可能なKdo誘導体として，上記合成法とは別に，7,8位にベンゾイル基，4,5位にイソプロピリデン基を有するKdo中間体(6)を新たに設計した。

このKdo中間体は，5,6-*O*-ベンゾイル-2,3-*O*-イソプロピリデンマンノフラノースからWittig反応をと環状硫酸エステルを経由する方法で合成した。その後脱保護することによりKdoへと変換することができた。(学会発表6)。このKdo中間体は4,5位を酸加水分解することにより，4,5位から糖鎖伸張可能なKdo受容体(7)へ，また加メタノール分解により，7,8位から糖鎖伸張可能なKdo受容体(8)へと変換できた。さらに，2位のアノマー水酸基を脱離基に変換することにより，Kdo供与体(9)へと変換もできた。受容体(7)と供与体(9)を縮合，続いて全ての保護基を除去することにより，還元末端にアリル基を有するKdo 2糖糖鎖(Kdo( $\alpha$ 2-4)Kdo)(10)の合成を達成した。



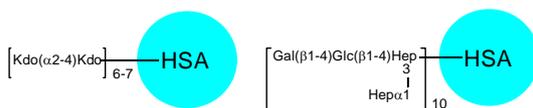
## (2) 分岐Kdo糖鎖の合成

上記 Kdo ( $\alpha$ 2-4)Kdo 誘導体の還元末端側の Kdo の5位水酸基にヘプトースを  $\alpha$  選択的に導入することができた。これにより、設計した Kdo 中間体が、LOS/LPS のコア糖鎖合成に適した有用な合成中間体であることが証明された。



## (3) 糖タンパクコンジュゲート合成

既に合成を達成しているコア糖鎖の中性4糖および Kdo 単糖のヒト血清アルブミン (HSA) へのコンジュゲートを検討した。その結果、HSA 1分子当たり中性4糖が平均10個、Kdo が平均7個結合した糖鎖コンジュゲートの合成を達成した。(学会発表 2・4・5・11) これらの糖鎖コンジュゲートの合成方法は、まだ反応条件などを最適化する余地がある。



合成したコンジュゲートは、人間に対する抗原になるかを検証するプローブとしての利用が期待され、病原性グラム陰性細菌に対する安全なワクチン開発のモデルとしての利用が期待される。

### 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 2 件)

- (1) Tsuyoshi Ichianagi “Recent convergent synthesis of homogenous N-linked glycopeptides” *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2010**, in press. 査読有
- (2) Tsuyoshi Ichianagi, Naoko Sakamoto, Kazutoshi Ochi, Ryohei Yamasaki, “A chemical synthesis of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid from D-mannose” *J. Carbohydr. Chem.*, **2009**, 28(2), 58-63. 査読有

[学会発表] (計 1 1 件)

- (1) Tsuyoshi Ichianagi, Kazuhiko Kishi, Mayumi Fukunaga, Yoshinori Kawano “Synthesis of Kdo-Human Serum Albumin Conjugate”, 20<sup>th</sup> International Symposium on Glycoconjugates, San Juan, Puerto Rico, 2009年11月30日

- (2) 一柳剛, 山崎良平「LOS/LPS に共通に存在する 2 糖 Hep ( $\alpha$ 1-5)Kdo の合成研究」, 第 29 回日本糖質学会年会, 飛騨・世界生活文化センター, 2009年9月11日
- (3) 福永真弓, 田頭亮哉・一柳剛・山崎良平「4, 5:7, 8 に異なる保護基を有する Kdo 誘導体の合成とリンカー導入」, 第 29 回日本糖質学会年会, 飛騨・世界生活文化センター, 2009年9月11日
- (4) 一柳剛, 谷間雄太「8-amino-3, 8-dideoxy-manno-oct-2-ulosonic acid の合成研究」, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 福岡マリンメッセ, 2009年3月29日
- (5) 一柳剛, 山崎良平「リポオリゴ糖に存在する 2 糖 Hep ( $\alpha$ 1-5)Kdo の合成研究」 日本農芸化学会 2009 年度大会, 福岡マリンメッセ, 2009年3月29日
- (6) 豊田清薫, 前田紗弥香, 一柳剛, 山崎良平「リポオリゴ糖のオリゴ糖鎖合成研究: 分岐オリゴ糖鎖の構築」 日本農芸化学会中四国支部大会(第 22 回講演会), 鳥取大学, 2008年9月13日
- (7) 田頭亮哉, 一柳剛, 山崎良平「LOS/LPS のコア糖鎖合成に向けた KDO 誘導体の合成」日本農芸化学会中四国支部大会 (第 22 回講演会), 鳥取大学, 2008年9月13日
- (8) 一柳剛, 山崎良平「 $\alpha$ -アシル化による分岐オリゴ糖鎖のスペーサー化」小林郁子, 山下泰治, 豊田清薫, 第 27 回日本糖質学会年会, 九州大学 2007 年 8 月 2 日
- (9) 坂本尚子, 一柳剛, 山崎良平, 「Mannose の 6 位から炭素伸長をする Kdo の合成」第 27 回日本糖質学会年会九州大学, (福岡) 2007 年 8 月 2 日
- (10) 豊田 清薫, 前田紗弥香, 西島茂樹, 一柳剛, 山崎良平「リポオリゴ糖内の分岐オリゴ糖鎖の合成」, 第 27 回日本糖質学会年会九州大学, (福岡) 2007 年 8 月 2 日
- (11) 一柳剛, 坂本尚子, 山崎良平「3-デオキシ-D-マンノオクトロン酸の新しい合成」日本農芸化学会 2007 年度大会, 東京農大, 2007 年 3 月 26 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一柳 剛 (ICHIYANAGI TSUYOSHI)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00302240