

機関番号：72690

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20550157

研究課題名（和文） 抗ピロリ菌剤の開発に向けた糖誘導体の合成とその評価

研究課題名（英文） Synthesis and evaluation of sugar derivatives for developing the antimicrobial agent against *H. pylori*

研究代表者

山ノ井 孝 (YAMANOI TAKASHI)

公益財団法人野口研究所・研究部・主任研究員

研究者番号：20182595

研究成果の概要（和文）：抗ピロリ菌剤の開発を目指して、新規な GlcNAc 誘導体の α -立体選択的なグリコシル化法の開発を行った。本方法はステロイド骨格を有する数種類の α -GlcNAc 誘導体の合成に応用することができ、 α -GlcNAc 誘導体のライブラリー構築の一部を達成した。さらに、糖クラスター効果による効率的な抗ピロリ菌活性が期待される α -GlcNAc 集合体を、シクロデキストリンをスキヤホールド分子とする手法で合成をした。

研究成果の概要（英文）：Aiming to develop the antimicrobial agent for *H. pylori*, a novel α -stereoselective glycosidation method of GlcNAc derivatives for producing the α -GlcNAc glycosides has been successfully developed. This method was applicable to the productions of several kinds of α -GlcNAc glycosides having a steroid structure, which led to the partial library construction of the α -GlcNAc derivatives. In addition, the α -GlcNAc assembly, which was expected to have a highly efficient antimicrobial activity toward *H. pylori* based on the sugar-cluster effect, was synthesized using cyclodextrin as a scaffolding molecule.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：抗ピロリ菌・ピロリ菌・ α -GlcNAc・ステロイド・N-アセチル-グルコサミン・グリコシド・クラスター・医薬品

1. 研究開始当初の背景

胃粘膜下層の腺粘液細胞から分泌される腺液中の GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 6 (GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 3) GalNAc α 1 \rightarrow Ser(or Thr) (Gal: ガラクトース、GalNAc: N-アセチルガラクトサミン、Ser: セリン、Thr: トレオニン) ムチンが、胃や十二指腸の表層粘膜に棲息するピロリ菌（ヘリコバクターピロリ）の感染から胃粘

膜を防衛している可能性が示唆されている。このムチンのO-グリカン末端に存在する特異な結合様式の α -GlcNAc 残基が、ピロリ菌の細胞壁の構成成分である CGL (コレステニル- α -グルコピラノシド) の生合成を阻害して、ピロリ菌の増殖を抑制していると考えられている。すなわち、 α -GlcNAc 残基を有する基質がピロリ菌に対して抗菌活性を持つことが強く示唆されている。

本申請者は、化学合成した多くの α GlcNAc 基質の抗ピロリ菌活性試験により、アグリコン部分が長鎖の脂肪族や芳香族、特に一部のステロイド骨格を有する α GlcNAc 単糖誘導体に、高い抗ピロリ菌効果作用 (IC_{50} 50~100 μ M) が認められることを明らかにした。

2. 研究の目的

本申請研究では、高活性な抗ピロリ菌剤の開発を目指して、ステロイド骨格を有する α GlcNAc 誘導体の化学合成によるライブラリー化を行うこととした。また、 α GlcNAc 誘導体の集積化・クラスター化により抗ピロリ菌活性を向上させた α GlcNAc 基質の設計・合成を検討することとした。合成した α GlcNAc 基質の抗菌活性評価には、*in vitro* 試験の他に、CHL α GcT 酵素の阻害活性試験を新たに導入することで、菌体レベルでの抗菌活性及び分子レベルでの抗菌作用メカニズムを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 抗ピロリ菌活性 α GlcNAc 基質の化学合成とその評価

ステロイド骨格を有する α GlcNAc 誘導体のライブラリー合成と評価を行う。合成したステロイド骨格型 α GlcNAc 基質に対し、抗ピロリ菌活性および CHL α GcT 酵素阻害活性を評価する。 α GlcNAc 基質のアグリコン部分の構造に由来する構造活性相関を明らかにする。

(2) 抗ピロリ菌活性の増強

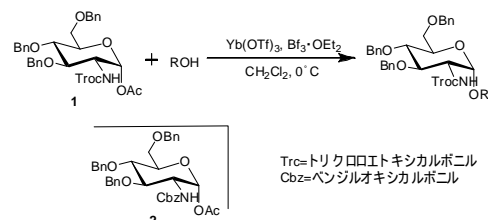
α GlcNAc 糖分子の集積化により糖クラスター効果を発現させ、抗ピロリ菌活性を向上させる。 α GlcNAc 誘導体としては、(1)で合成したステロイド骨格型 α GlcNAc 誘導体およびその他の α GlcNAc 含有糖鎖を用いる。糖クラスター効果の発現は、シクロデキストリン上に α GlcNAc 分子を集積化する技法を開発することで達成する。得られた α GlcNAc 集積化基質の抗ピロリ菌活性を評価する。

4. 研究成果

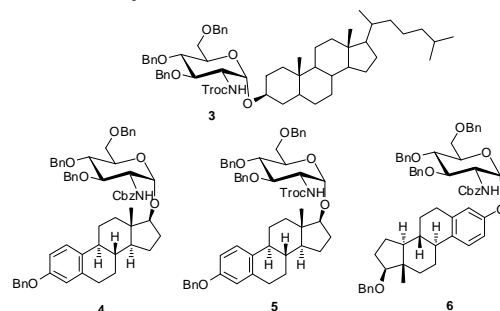
(1) 抗ピロリ菌活性 α GlcNAc 基質の化学合成とその評価

α GlcNAc を構築する新規なグリコシル化法の開発を行った。2, 3, 4, 6-テトラ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-トリクロロエトキシカルボニルアミノ-D-グルコピラノシル アセテート (1) を糖供与体を用いて、活性化剤の効果を調べた。Yb(OTf)₃ と BF₃·OEt₂ からなる混合活性化法を用いると、かさ高い第一級アルコール、第二級および三級アルコールやフェノール類では、対応するグリコシドが高い α -選択性で得られることがわかった。また、2, 3, 4, 6-テトラ-O-ベンジル-2-デオキシ-

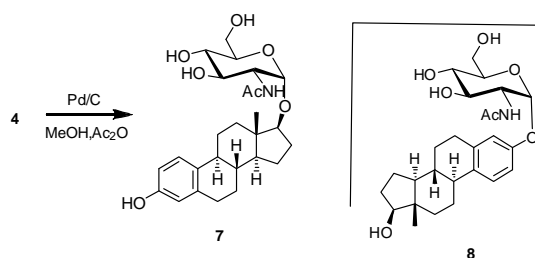
-2-ベンジルオキシカルボニルアミノ-D-グルコピラノシル アセテート (2) を糖供与体を用いた場合にも、本活性化法を用いることで種々のアルコール類と同様に反応して高い選択性で α グリコシドを得られることを明らかにした。



次に、ステロイド骨格を有する α GlcNAc 誘導体のライブラリー化に上記の活性化法を用いたグリコシル化法を応用した。すなわち、アルコールとしてステロイドの一種である 3 β -コレストアノール、コレステロールやエストラジオールでは、フェノール水酸基あるいは 17 位水酸基を適当に保護した誘導体を糖受容体を用いて、 α GlcNAc 誘導体の合成を検討した。コレステロールを用いた反応では副反応が進行して、対応するグリコシドは低収率でしか得られなかったが、3 β コレスタノールやエストラジオールでは対応するグリコシド体が高収率 (3-6) で得られることがわかった。



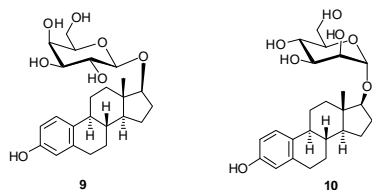
引き続き、エストラジオールの 17 位水酸基を配糖化した α GlcNTroc 及び α GlcNCbz 保護体の脱保護を検討した。 α GlcNTroc 保護体では、Zn/AcOH を用いた条件では、Troc 基の脱保護の際に、グリコシド結合が α から β への異性化が一部に起こることが見受けられた。これに対して、 α GlcNCbz 保護体では、Pd(OH)₂-H₂ を用いて糖水酸基の保護基に使用したベンジル基と同時に Cbz 基の脱保護が完



了し、異性化することなく目的とする α GlcNAc 体 (7) に誘導することができた。同

様の手法で、エストラジオールの3位水酸基を配糖化した α -GlcNCbz 保護体からも α -GlcNAc 体 (8) を調製した。

ステロイド骨格を有する α -GlcNAc 誘導体のライブラリーとして、3 β -コレスタノールとコレステロールの水酸基、及びエストラジオール3位水酸基及び17位水酸基を配糖化した α -GlcNTroc (糖水酸基保護) 体を大量に調製した。さらに、 α -GlcNAc 残基が及びす抗ピロリ活性の有効性を明らかにするため、エストラジオール17位水酸基をマンノース及びガラクトースで配糖化した化合物 (9 と 10) もライブラリーとして合成した。



得られたライブラリー化合物はいずれも水溶性に極めて乏しく、このままでは抗ピロリ活性試験に利用できないことがわかった。そこで、これらの化合物の水溶性を向上させることを検討した。エストラジオール17位水酸基を配糖化したライブラリーの化合物群では、水溶液中でエストラジオール部位の3位水酸基を、水酸化ナトリウム水溶液を用いてナトリウム塩に変換し、さらに γ -シクロデキストリンを添加することで著しく水溶性が向上することがわかった。すなわち、これらの化合物では、抗ピロリ活性試験が可能な水溶性を保持させることに成功した。

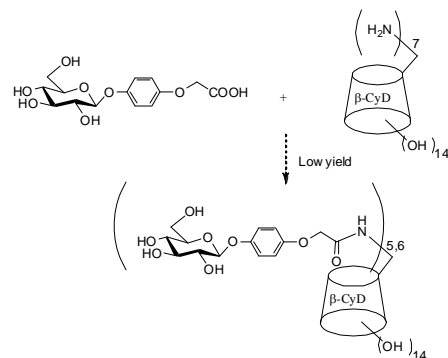
これらの基質での抗ピロリ菌活性測定を行うため、ピロリ菌の培養を行って抗菌活性測定システムを立ち上げた。いくつかの高級アルコールを用いて、抗ピロリ菌活性の再現性を確認した。これらでは抗ピロリ活性試験の評価準備に入った。

(2) 抗ピロリ菌活性の増強

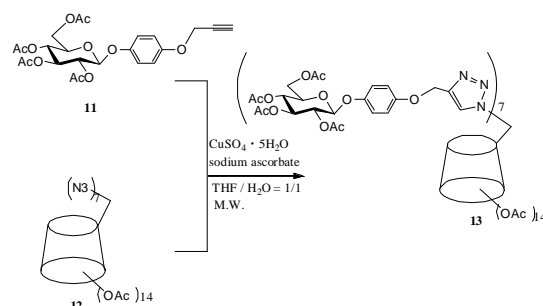
糖クラスター効果による抗ピロリ菌活性の増強を目指し、シクロデキストリン (CyD) 上への α -GlcNAc 残基の集合化を検討した。モデル反応として、アルブチン (4-ヒドロキシフェニル β -D-グルコピラノシド) のCyD上への集積化を検討した。

アルブチンから誘導されるパラ位メチルカルボキシル基体とヘプタアミノ CyD との縮合反応を検討したところ、マススペクトルによって5から6置換体の生成が確認されたものの、収率は極めて乏しいことがわかった。

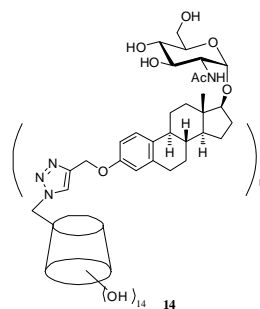
次に、高効率なクリック反応を用いた縮合反応を検討した。アルブチンから誘導されるアセチレン基含有化合物とヘプタアジド CyD 誘導体とを硫酸銅とアスコルビン酸ナトリウムを用いた定法の水溶液中でのクリック反応で縮合したところ、アジド化シクロデキ



ストリンの水溶性が極端に乏しいことから、縮合反応が容易に進行しないことがわかった。両方の基質をアセチル保護化したものを用いた反応系 (化合物 11 と 12) では、有機溶媒-水系の混合溶媒中で速やかに反応が進行して、速やかにグルコースがCyDの一級水酸基上に七置換した集合体 (13) が得られることを見出した。



次に α -GlcNAc 体を用いたクリック反応へと応用した。すなわち、(1) で得たエストラジオールの17位水酸基を配糖化した α -GlcNAc 体の3位フェノール性水酸基に水酸化ナトリウムとプロパルギルブロミを用いてアセチレン残基を導入した。現在、これらの基質でクリック反応を行い、CyD 上への α -GlcNAc 体 (14) の導入率を決定しているに至っている。



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 7 件)

- ① M. Fujita, A. Tsuchida, A. Hirata, N. Kobayashi, K. Goto, K. Osumi, Y.

- Hirose, J. Nakayama, T. Yamanoi, H. Ashida, M. Mizuno, Glycoside hydrolase family 89 α -N-acetylglucosaminidase from *Clostridium perfringens* specifically acts on GlcNAc 1,4Gal β 1R at the non-reducing terminus of O-glycans in gastric mucin, *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有、286 巻、2011、6479-6489.
- ② T. Yamanoi, K. Matsumura, S. Matsuda, Y. Oda, A synthetic approach to anhydroketopyranoses having a 6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane structure from ketopyranoses, *Heterocycles*, 査読有、82 巻、2010、531-542.
- ③ T. Yamanoi, T. Ishiyama, Y. Oda, S. Matsuda, M. Watanabe, L-Fruco- and D-psicofuranosylation reactions catalyzed by scandium triflate, *Heterocycles*, 査読有、81 巻、2010、1141-1147.
- ④ Y. Oda, S. Matsuda, T. Yamanoi, A. Murota, K. Katsuraya, Identification of the inclusion complexation between Phenyl β -D-($^{13}\text{C}_6$)glucopyranoside and β -cyclodextrin using 2D ^1H or ^{13}C DOSY spectrum, *Supramolecular Chemistry*, 査読有、21 巻、2009、638-642.
- ⑤ Y. Oda, H. Yanagisawa, M. Maruyama, K. Hattori, T. Yamanoi, Design, synthesis and evaluation of D-galactose- β -cyclodextrin conjugates as drug-carrying molecules, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有、16 巻、2008、8830-8840.
- ⑥ T. Yamanoi, Y. Oda, H. Muraiishi, S. Matsuda, Synthesis of a novel D-glucose-conjugated 15-crown-5 ether with a spiro ketal structure, *Molecules*, 査読有、13 巻、2008、1840-1845.
- ⑦ S. Matsuda, T. Yamanoi, M. Watanabe, Syntheses of a partially benzylated derivative of the anhydro-D-altro-heptulose found in *Coriaria japonica* A and of its analogs, *Tetrahedron*, 査読有、64 巻、2008、8082-8088.
- [学会発表] (計 13 件)
- ① K. Koike, T. Yamanoi, Y. Oda, A. Yoshida, M. Watanabe, Synthesis of fluorinated crown ethers and their application to fluorinated biphasic organic reaction, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies* (2010. 12. 18)
- ② T. Yamanoi, Y. Oda, W. Kaburagi, M. Midorikawa, K. Takahashi, Stereoselective formation of 1,2-cis- α -glycosidic linkages by glycosidation using 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl acetate derivatives, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies* (2010. 12. 19)
- ③ T. Yamanoi, S. Matsuda, Y. Oda, A. Yoshida, Syntheses of spirocompounds from 1-C-vinylated sugars, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies* (2010. 12. 19)
- ④ 山ノ井孝・小池健仁・小田慶喜・吉田彰宏・渡邊幹夫, B f p 基結合型フルオラスクラウンエーテル類の合成と有機合成反応への利用, 第 3 回フルオラス科学研究会シンポジウム (2010. 10. 8)
- ⑤ 山ノ井孝・小田慶喜・鬻谷要, 包接に関与するプロトンを持たないゲスト分子のシクロデキストリン包接体の NMR 解析, 第 27 回シクロデキストリンシンポジウム (2010. 9. 7)
- ⑥ T. Yamanoi, Y. Oda, K. Katsuraya, K. Osumi, C. Kurosaki, S. Koshihara, T. Inazu, K. Yamamoto, NMR determination of the glycosidic linkage formed by the transglycosylation by *Mucor hiemalis* endo- β -N-acetylglucosaminidase, *25th International Carbohydrate Symposium* (2010. 8. 4)
- ⑦ K. Katsuraya, Y. Oda, C. Kurosaki, S. Koshihara, T. Yamanoi, Molecular interactions of concanavalin A lectin with phenyl glucoside derivatives using STD NMR spectra, *25th International Carbohydrate Symposium* (2010. 8. 5)
- ⑧ 山ノ井孝, シクロデキストリン類のドキシソルビシン包接作用と NMR 解析, 第 2 回シクロデキストリンワークショップ (2009. 11. 1)
- ⑨ 山ノ井孝・藤田雅也・中山淳, Fischer グリコシド化法による N-アセチル- α -D-グルコサミニド合成と抗ピロリ菌活性評価, 第 29 回日本糖質学会 (2009. 9. 11)
- ⑩ 山ノ井孝・鬻谷要・小田慶喜, STD NMR スペクトルを用いたアルブチン誘導体のコンカナバリン A への会合特性解析, 第 29 回日本糖質学会 (2009. 9. 11)
- ⑪ 石山敏明・山ノ井孝・渡邊幹夫, 効率的な D-プシコフラノシド化法に関する研究, 第 29 回日本糖質学会 (2009. 9. 10)
- ⑫ 藤田雅也・森昌子・土田明子・山ノ井孝・

松田翔・山田一作・水野真盛・閻会敏・
星野瞳・中山淳、N-アセチルグルコサ
ミン含有物質の *H.pylori* への増殖抑制効
果、第15回日本ヘリコバクター学会
(2009. 6. 25)

- ⑬ 石山敏明・山ノ井孝・渡邊幹夫、希少糖、
L-フルクトース及び D-ブシコースを用
いたグリコシル化反応の研究、日本化学
会第2回関東支部大会 (2008. 9. 8)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：N-アセチルグルコサミンβ結合単糖誘
導体を含有するピロリ菌増殖抑制制御
発明者：中山淳・白井孝・山ノ井孝・藤田雅
也・森昌子
権利者：信州大学・野口研究所
種類：特許
番号：特願 2008-263880
出願年月日：20 年 10 月 10 日
国内外の別：国内

名称：フルオラス化糖結合型クラウンエーテ
ル誘導体
発明者：山ノ井孝・吉田彰宏・小田慶喜
権利者：野口研究所
種類：特許
番号：特願 2010-055097
出願年月日：22 年 3 月 11 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.noguchi.or.jp/annai_kiso.htm
1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山ノ井 孝 (YAMANOI TAKASHI)
公益財団法人野口研究所・研究部・主任研
究員
研究者番号：20182595

(2) 研究分担者

藤田 雅也 (FUJITA MASAYA)
公益財団法人野口研究所・研究部・研究員
研究者番号：20321672
小田 慶喜 (ODA YOSHIKI)
公益財団法人野口研究所・研究部・研究員
研究者番号：00442567