

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510243

研究課題名（和文） 多分岐複合糖質糖鎖化学合成へのアプローチ

研究課題名（英文） Approach toward chemical synthesis of highly branched glycans of glycoconjugate

研究代表者

石渡 明弘 (ISHIWATA AKIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・伊藤細胞制御化学研究室・専任研究員

研究者番号：70342748

研究成果の概要（和文）：立体選択的構築困難な 1,2-*cis*-グリコシド結合の合成に、遠隔立体制御による分子内アグリコン転移反応の開発を行った。結核菌由来アラビナン多糖の4分岐 22糖及び31糖構造の収斂的構築検討、及び多分岐構造構築ストラテジーの開発研究を行った。分子内アグリコン転移反応を改良し、*N*-結合型糖タンパク質糖鎖コア構造、*Upis ceramoides*由来不凍活性糖鎖などの合成に成功した。また、溶媒凍結条件下グリコシル化反応が加速される際、溶媒凍結による濃縮効果について知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Long-distance intramolecular aglycon delivery (IAD) was conducted to construct 1,2-*cis* glycosidic linkages whose stereoselective synthesis is one of the most difficult. The convergent strategy toward tetrabranched docosa- and hentriaconta-saccharide arabinan from Mycobacterial arabinan and the strategy for construction of highly branched structure have been studied. IAD method has been improved to achieve the syntheses of core structure of *N*-glycan and antifreeze glycan fragment from *Upis ceramoides*. The concentration effect on various factors of accelerated *O*-glycosylation when the reaction solvent was frozen has been studied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域、糖化学、有機合成化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：(1)糖鎖合成 (2)オリゴ糖 (3)立体選択的合成 (4)グリコシル化

(5)収斂的合成 (6)複合糖質糖鎖 (7)多分岐糖鎖

1. 研究開始当初の背景

複合糖質研究の遂行におけるの鍵の糖鎖の供給の観点より、化学合成により純粋な糖鎖関連化合物を調整することが重要である。その手段として、立体制御の難しい 1,2-*cis* グ

リコシル化を中心とした立体選択的合成研究、多糖合成に必須な収斂的な接続や分岐糖鎖構造の構築が非常に重要であるが、従来法は稀で、反応効率改善の必要がある状況であった。

2. 研究の目的

本申請では、「多分岐複合糖質糖鎖化学合成へのアプローチ」を取り上げる。合成化学的に極めて構築困難な糖鎖分岐構造の、収斂的糖鎖構築へ向けた新規方法論を開発し、結核菌細胞壁成分のアラビノガラクトサンや、腫瘍の転移や浸潤に関与が示唆される複合型糖タンパク質糖鎖などの構築を目的とする。本研究では、糖鎖の多分岐構造をターゲットに研究を進める上で、立体選択的構築困難な1,2-*cis*-グリコシド結合の構築検討をすすめ、反応効率の点で大問題がある多分岐構造構築の検討をおこなう。その際、特殊反応場の効果などの利用を模索していく。

3. 研究の方法

結核菌細胞壁成分のアラビノガラクトサンや、腫瘍の転移や浸潤に関与が示唆される複合型糖タンパク質糖鎖などに含まれる立体選択的構築困難な1,2-*cis*-グリコシド結合の構築検討をすすめた。また、反応効率の点で大問題がある多分岐構造および多糖構造の構築検討をおこなった。さらに、反応効率向上のための反応加速に重要である、凍結反応条件などの特殊反応場のグリコシル化反応への影響などを検討した。

4. 研究成果

本申請では、「多分岐複合糖質糖鎖化学合成へのアプローチ」を取り上げ、合成化学的に極めて構築困難な糖鎖分岐構造の、収斂的糖鎖構築へ向けた新規方法論を開発し、結核菌細胞壁成分のアラビノガラクトサンや、腫瘍の転移や浸潤に関与が示唆される複合型糖タンパク質糖鎖などを標的に研究を進めた。

結核菌由来アラビナン多糖の新規収斂的手法、及び、分岐構造構築戦略の開発研究を行った。多分岐構造構築は反応効率の点で大問題があり、その問題解決は必須である。考慮した点は、1) 分岐構造は単糖程度の反応性の高い供与体を用いてそれぞれ構築、2) その分岐フラグメントを、より安定で保存可能で、構造決定の容易な還元末端アセトニド体として調製、3) 温和な条件下活性化可能なチオグリコシドへとアセトニド体より3工程で効率的に変換、4) オリゴ糖チオグリコシドの2位をアセチル基とし、立体制御可能なトランス体を合成する手法でのフラグメント縮合、であるが、これらをクリアし、オリゴ糖合成戦略の構築に成功した。分岐構造を有する糖供与体に対して、他の分岐フラグメントを、反応性を考慮し、分岐部をさけて直線部分で縮合するルートで、4分岐22糖構造を効率的に構築することができた (Ishiwata, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2275)。本合成戦略はさらに大きな糖鎖への変換にも応用可能であると考えている。結核菌

由来アラビナン多糖の4分岐31糖構造の収斂的合成手法による構築検討を行い、NMRでの構造解析及び質量分析を行い、生成を確認した。

なお、フラグメントの合成には、立体選択的構築困難な1,2-*cis*-グリコシド結合があり、遠隔立体制御による分子内アグリコン転移にて、高立体選択的に構築することができた (Ishiwata, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2275)。本手法により、フラグメント合成経路が短縮できる。

高度に分岐した構造の構築には凍結反応条件などの特殊反応場の反応加速効果の利用を計画しているため、溶媒凍結による濃縮効果について知見を得ることとした。溶媒凍結条件において、種々反応条件下、反応加速への影響を見だし、それは基質濃縮が主要因であることが明らかとなった。また、以前より示唆されていた立体選択性への影響については、基質の濃縮効果が大きく影響している、などの重要な知見を得た (Ishiwata, et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3678)。

さらに立体選択的構築困難な1,2-*cis*-グリコシド結合をもつ分岐フラグメントの構築に、分子内アグリコン転移を応用して高立体選択的に構築する検討をすすめた。これまで立体選択性の発現には環状保護基が必須であったが、ナフチルメチル基を介した分子内アグリコン転移の場合、他の非環状保護基を用いた場合でも、立体特異的に反応が進行することがわかった。その応用としてまず、 β -マンノシドを有する糖タンパク質糖鎖のコア構造の立体選択的かつ高効率な構築に成功した (Ishiwata, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19524)。この手法を応用して、アラスカに生息する甲虫の凍結耐性に重要な新規不凍活性多糖の(β -マンノース- β -キシロース)繰り返し構造からなるキシロマンナンの部分構造の立体選択的合成にも成功した。

また、これまでの合成戦略を展開し、更に複雑なオリゴマンノシドキャッピング構造を有するリポアラビノマンナン多糖合成を行うために、新たに分子内アグリコン転移反応によるフラグメント縮合を検討した。その結果、望む1,2-*cis*グリコシド結合構築可能であることを見いだした。直鎖型の基質については、収率及び立体選択性よく対応する目的化合物を得たが、分岐構造構築への応用については、当初より懸念していた立体障害のため成功せず、今後更に検討する余地が残った。改良した分子内アグリコン転移反応は植物由来糖タンパク質のオリゴ糖成分の β -L-アラビノフラノシド誘導体の合成に応用可能であることも示すことができた (投稿準備中)。

以上、本課題における成果は複合糖質糖鎖の立体選択的かつ効率的合成戦略の新たな概念を提示したものである。

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 8 件)

1. Ishiwata, A. “**Biotechnological approaches toward the synthesis of eukaryotic N-linked glycoprotein**” *Trends in Glycosci. Glycotech.* **2012**, *24*, 225–227. (査読有) 10.4052/tigg.24.225
2. Ishiwata, A.; Sakurai, A.; Ito, Y. “**Accelerated O-glycosylation under frozen conditions and its application to the synthesis of complex glycans**” *Trends in Glycosci. Glycotech.* **2012**, *24*, 179–189. (査読有) 10.4052/tigg.24.179
3. 石渡明弘, 伊藤幸成 “分子内アグリコン転移反応と立体選択的糖鎖合成への応用” *有機合成化学協会誌* **2012**, *70*, 382–394. (査読有) 10.5059/yukigoseikyokaishi.70.382
4. Ishiwata, A.; Sakurai, A.; Nishimiya, Y.; Tsuda, S.; Ito, Y. “**Synthetic study and structural analysis of the antifreeze agent xylomannan from *Upis ceramoides***” *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19524–19535. (査読有) 10.1021/ja208528c
5. Ishiwata, A. ” **Drug-resistant tuberculosis and inhibition of biosynthetic enzymes for polysaccharides in mycobacterial cell wall**” *Trends in Glycosci. Glycotech.* **2011**, *23*, 106–107. (査読有) 10.4052/tigg.23.106
6. Ishiwata, A.; Ito, Y.* “**Synthesis of docosasaccharide arabinan motif of mycobacterial cell wall**” *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2275–2291. (査読有) 10.1021/ja109932t
7. Ishiwata, A.; Lee, Y. J.; Ito, Y.* “**Recent advances in stereoselective glycosylation through intramolecular aglycon delivery**” *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3596–3608. (査読有) 10.1039/C004281A
8. Ishiwata, A.; Sakurai, A.; Dürr, K.; Ito, Y.* “**Effects of frozen conditions on stereoselectivity and velocity of O-glycosylation reactions**” *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3678–3695. (査読有) 10.1016/j.bmc.2010.04.013

[学会発表] (計 20 件)

- 1) ○石渡明弘, Sophon Kaeothip, 伊藤幸成, “分子内アグリコン転移反応を利用した、β-L-アラビノフラノシド誘導体の合成研

究”, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 仙台, 2013, 03. 24–27.

- 2) ○石渡明弘, 伊藤幸成, “分子内アグリコン転移反応を利用した、マンノースキャッピングされたアラビナン構造の構築検討”, 日本化学会第 93 春季年会, 滋賀, 2013, 03. 22–25.
- 3) ○石渡明弘, 櫻井絢花, 伊藤幸成, “新規不凍活性物質キシロマンナンの合成研究と構造解析”, GlycoTOKYO2012 シンポジウム, 東京, 2012, 11. 17.
- 4) ○Ishiwata, A.; Ito, Y. “**Stereoselective Constructions of Complex Bacterial Glycans**”, *4th Asian Communication for Glycobiology and Glycotechnology*, Jeju, Korea, 2012, 10. 28–31. (Invited)
- 5) ○石渡明弘, 櫻井絢花, 伊藤幸成, “NAP エーテルを介した分子内アグリコン転移反応の応用: 1,2-*cis* グリコシドを含む、キシロマンナンフラグメントの立体選択的構築”, 第 31 回日本糖質学会年会, 鹿児島, 2012, 09. 17–20.
- 6) ○Ishiwata, A.; Sakurai, A.; Ito, Y. “**Application of NAP ether-mediated intramolecular aglycon delivery to stereoselective construction of xylomannan fragment containing 1,2-*cis* glycosides**” *26th International Carbohydrate Symposium*, Madrid, Spain, 2012, 07. 22–27.
- 7) ○石渡明弘, 櫻井絢花, 伊藤幸成, “分子内アグリコン転移反応を利用した、*Upis ceramoides* 由来キシロマンナン不凍多糖の合成研究と構造解析”, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都, 2012, 03. 22–26.
- 8) ○石渡明弘, 伊藤幸成, “結核菌由来アラビナン 4 分岐 31 糖の合成研究”, 日本化学会第 92 春季年会, 横浜, 2012, 03. 25–29.
- 9) ○石渡明弘, “細菌由来複合糖質糖鎖の合成研究”, GlycoTOKYO2011 シンポジウム, 和光, 2011, 12. 09. (招待講演)
- 10) ○Ishiwata, A. “**Strategies toward stereoselective construction of complex bacterial glycans**” *14th Asian Chemical Congress 2011*, Bangkok, Thailand, 2011, 09. 05–08. (Invited)
- 11) ○石渡明弘, 伊藤幸成, “結核菌細胞壁多糖アラビナンの合成研究” (poster), 第 30 回日本糖質学会年会, 長岡, 2011, 07. 11–13.
- 12) ○石渡明弘, 伊藤幸成, “結核菌由来アラビナン 8 糖フラグメントの合成とフラグメントカップリング”, 日本農芸化学会

- 2011 年度大会, 京都, 2011, 03. 25–28.
- 13) ○石渡明弘, 伊藤幸成, “結核菌由来アラビナン分岐 7 糖フラグメント構築へ向けた分子内アグリコン転移反応の応用”, 日本化学会第 91 春季年会, 横浜, 2011, 03. 26–29.
 - 14) ○石渡明弘, 伊藤幸成, “細菌由来複合糖質糖鎖の合成研究” (poster), 京都大学グローバル COE-基幹研究所 合同シンポジウム, 和光, 2011, 01. 28.
 - 15) ○Ishiwata, A.; Ito, Y. “**Synthetic study of mycobacterial arabinan**” PACIFICHEM 2010, Hawaii, USA, 2010, 12. 15–20.
 - 16) ○Ishiwata, A.; Sakurai, A.; Dürr, K.; Ito, Y. “**Accelerated glycosylation under frozen conditions: Effect on stereoselectivity and velocity of O-glycosylation**” PACIFICHEM 2010, Hawaii, USA, 2010, 12. 15–20.
 - 17) 石渡明弘, ○櫻井絢花, 李龍柱, 伊藤幸成, “NAP エーテルを介する分子内アグリコン転移反応を利用した、 β -マンノシル化の検討” (poster), GlycoTOKYO2010 シンポジウム, 東京, 2010, 11. 27.
 - 18) Lee, Y. J.; Kubota, A.; ○Ishiwata, A.; Ito, Y. “**Synthetic study of pseudaminic acid from bacterial glycoprotein**” (poster & short talk), 第 52 回天然有機化合物討論会, 静岡, 2011, 09. 29–10. 01.
 - 19) ○石渡明弘, “細菌由来複合糖質糖鎖の合成研究”, 第 59 回高分子討論会, 札幌, 2010, 09.15-17. (招待講演)
 - 20) ○Ishiwata, A.; Ito, Y. “**Synthetic study of mycobacterial arabinan**” International Carbohydrate Symposium, Tokyo, 2010, 08. 01–06.

[その他]

- *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3596–3608 に掲載された高選択的グリコシル化反応に関する論文 (論文 7) は表紙に採用された。
- *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 2275–2291. に掲載された結核菌多糖の合成に関する論文 (論文 6) は RIKEN RESEARCH で紹介された。
<http://www.rikenresearch.riken.jp/jpn/research/6871>
- *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 19524–19535. に掲載された不凍糖の合成と構造解析に関する論文 (論文 4) は *Asian Research News*, **2012**. 12. で紹介された。また、RIKEN RESEARCH で紹介された。
<http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/research/6592>

ホームページ等
理化学研究所 ホームページ
<http://www.riken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石渡 明弘 (ISHIWATA AKIHIRO)
独立行政法人理化学研究所・伊藤細胞制御化学研究室・専任研究員
研究者番号：70342748

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。