

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750199

研究課題名(和文)カルバ糖を基盤としたヒト型擬似糖鎖の系統的合成法の開発

研究課題名(英文)Development of the systematic synthetic method of human pseudo-oligosaccharides which have the carbasugar at the nonreducing end

研究代表者

宮崎 達雄 (MIYAZAKI, Tatsuo)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：70410222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：DOIから合成した6-O-Ac-カルバ-β-D-グルコースに対するランダムピバロイル化反応により一挙に得られる部分保護体を鍵原料として、5a-カルバ-β-D-ガラクトース、5a-カルバ-β-D-マンノース、5a-カルバ-β-D-アロース、5a-カルバ-N-アセチル-β-D-マンノサミンの合成を達成した。

さらに、DOIより誘導したカルバ-β-D-グルコース供与体と受容体を、高濃度条件下、0℃でカップリング反応することで、ジカルバ-β-D-イソマルトース誘導体(47%)、ジカルバ-β-D-マルトース誘導体(3%)、ジカルバ-β-D-トレハロース誘導体(37%)の合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Recently, the production of 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI) was accomplished by the bioconversion using metabolically engineered E. coli. DOI which is cyclohexanone derivative having four OH groups is suitable as a precursor of carbasugars.

First, 6-O-Ac-carba-β-D-Glc was synthesized from DOI. Then, we attempted to the synthesis of carbasugars featuring the random pivaloylation of 6-O-Ac-carba-β-D-Glc, by which partially protected products are obtained at a time. As the results, we accomplished the synthesis of 5a-carba-β-D-Gal, 5a-carba-β-D-Man, 5a-carba-β-D-All and 5a-carba-β-D-ManNAc by use of the partially protected products.

Additionally, synthesis of 5a,5a'-dicarba-β-D-isomaltose derivative (47%), 5a,5a'-dicarba-β-D-maltose derivative (3%) and 5a,5a'-dicarba-α,β-D-trehalose derivative (37%) were achieved by the coupling reaction between carba-β-D-glucose donor and acceptor under high-concentration condition of substrates at 0 degrees Celsius.

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：2-デオキシ-シロ-イノソース カルバ糖 擬似糖 擬似糖鎖 ジカルバグルコピオース

1. 研究開始当初の背景

近年、糖鎖の生体内での役割や疾病との関わりが分子レベルにて解明されている。こうした背景から、世界中で糖鎖の合成研究、糖鎖微量分析技術の開発研究、糖鎖の機能解明研究が活発に展開されている。そのため、将来的には糖鎖を利用した創薬研究に発展すると予想される。申請者は、その際に糖を模倣した化合物群(擬似糖)が、再び脚光を浴びると考えている。つまり、機能・効能を有する糖鎖をそのまま生体内に投与したとしても、代謝酵素により容易に分解されることが推測されるため、生体内安定性に優れた擬似糖により糖鎖末端をキャップして分解を防ぐ技術が必要になると考えている。本申請課題は、その問題を解決するための基盤研究である。

糖鎖末端に導入する擬似糖の候補としては、糖の環酸素原子を炭素原子・窒素原子・硫黄原子・リン原子に置き換えたカルバ糖・アザ糖・チオ糖・フォスファ糖などが挙げられるが、カルバ糖に分類されるインフルエンザ治療薬「タミフル」や糖尿病治療薬「ボグリボース」が実用化され人類の健康に大きく貢献している実績を鑑み、化学構造的に最も強固なカルバ糖を選択した。カルバ糖の合成研究は、1966年 McCaslandらにより初めてカルバ- $\beta$ -DL-タロースの合成法が報告されて以来、これまでに様々な手法が報告されている。しかしながら、これまで報告されている化学法では、キラルなカルバ糖を合成することが困難であり、また多段階の変換反応が必要であるので大量合成には不向きであった。しかしながら近年、微生物による物質生産技術を巧みに利用することで、これらの問題点を改善する手法が確立しつつある。

Hudlickyらはシキミ酸代謝系酵素の遺伝子を組み込んだ大腸菌から生産されるデヒドロシキミ酸を原料とし、カルバ- $\beta$ -D-グルコース誘導体(4工程, 11.1%)へと導く手法を報告している(J. W. Frost et. al., *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 11581; T. Hudlicky et. al., *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 2591)。一方、我々は平成16~17年度に新潟薬科大学 高木正道らと東京工業大学 柿沼勝巳らとともに参画した(財)にいがた産業創造機構のわざづくり支援事業の採択課題「米ぬかから化学工業原料カテコールを生産する新技術の確立」の研究において、大部分が廃棄される米ぬかをバイオマスとして利用し、そこから取り出したグルコースを原料に、組換え大腸菌により2-deoxy-scyllo-inosose (DOI)と呼ばれる物質を数百グラムスケールにて大量生産・精製する手法を確立した。さらにプロジェクト終了後、得られたDOIを鍵原料としたカルバ糖合成を検討し、カルバ- $\beta$ -D-グルコース(9工程, 40%)、カルバ- $\beta$ -L-イドース(9工程, 42%)、カルバ- $\beta$ -D-キシロース(7工程, 35%)を合成することに成功している。

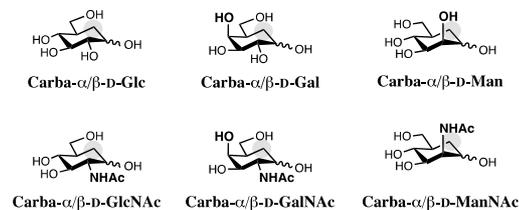
特にカルバ- $\beta$ -D-グルコースの合成は、ほとんどの合成中間体が再結晶により単離できるため、シリカゲルカラムによる精製操作は2回しか必要とせず、大量合成に適している。さらに、その収率は現在までに報告している相当するカルバ糖を遙かに凌駕している。

2. 研究の目的

本申請課題では、「組換え大腸菌による物質変換技術」と「有機化学的手法」を組み合わせることにより、バイオマス資源を出発原料とした高効率・系統的なカルバ糖合成法を確立することを第一の目的とする。合成完了後は、これら生体内安定性に優れ、かつ立体構造が天然型の糖と類似している特徴を有するカルバ糖を糖鎖非還元末端部分に組み込む手法を検討し、ヒト型擬似糖鎖の合成に着手する。最終ターゲットである擬似糖鎖は、生体内の代謝機構に抵抗性を有する新たな糖鎖リガンドとして、糖鎖の機能解明研究に多大な貢献をもたらすことが可能である。

3. 研究の方法

当研究室では、バイオマスを原料に組換え大腸菌より生産したDOI培養液からDOIを簡便に精製する手法を確立しており、約500g所有している。それを鍵原料としてヒト型構成カルバ糖合成を遂行する。さらに申請者は、DOIの有する4つのキラルな水酸基の立体配置を利用したカルバ- $\beta$ -D-グルコースの高効率な合成ルートを確認している(9工程, 40%)。そこで、本申請課題ではDOIが有する同程度の反応性を持つ4つの水酸基に対して部分保護反応を行い、次いで遊離の水酸基の反転反応を試みることによりDOIからジアステレオマー群へ変換し、その後、得られた生成物に上記カルバグルコースの合成ルートを適用してヒト型構成単糖のカルバ糖類(図1)を合成することを計画した。



Glc: グルコース, Gal: ガラクトース, Man: マンノース, GlcNAc: N-アセチルグルコサミン  
GalNAc: N-アセチルガラクトサミン, ManNAc: N-アセチルマンノサミン

図1. 代表的なヒト型構成単糖のカルバ糖

合成が完了したカルバ糖を糖鎖末端部分へ導入する手法は、カルバ糖のアノメリック位に脱離基としてトリフレート基を組み込み、アルコキシドとした糖鎖を求核種として反転反応を試みる。ターゲットは、ヒトの代表的な糖タンパク質糖鎖である複合型糖鎖とハイマンノース型糖鎖の末端部分構造を模倣した三糖を選択している(図2)。

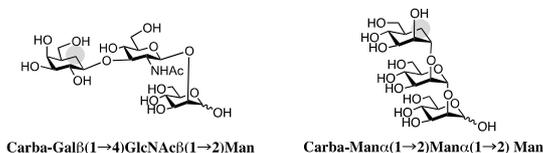


図2. 本申請課題のターゲット

#### 4. 研究成果

(1) DOI の有する4つのエクアトリアル結合のヒドロキシ基の部分保護反応を確立するために、DOI ジメチルケタール体のアシル化反応(アセチル化、ベンゾイル化、ピバロイル化)を検討した。その結果、その高高さのために比較的反応速度の遅いピバロイル化反応の制御がもっとも容易く、部分保護反応に適していることが判明した。具体的には、10当量のピバロイルクロライドを用い0にて反応を行うことで、4種類のジピバロイル体(1,2-*O*-Piv, 1,3-*O*-Piv, 1,4-*O*-Piv, 2,3-*O*-Piv)と3種類のトリピバロイル体(1,2,3-*O*-Piv, 1,2,4-*O*-Piv, 1,3,4-*O*-Piv)、併せて7種類の部分保護体が一挙に合成できた。また、ピバロイルクロライドを5.5当量使用し、-20にて反応することで、1,3-*O*-ジピバロイル体を収率76%で合成できた。その際、他の3種類のジピバロイル体も同時に得られることがわかった。一方、ピバロイルクロライドを1当量、-10にて反応を行うと、3種類のモノピバロイル体が合成可能であった。これらの結果より、DOIのピバロイル化反応が、1位、3位、2位、4位の順番に進行することを見出せた。

上記の反応で主生成物として得られた1,3-*O*-ジピバロイル体を原料に、1,2,3-*O*-トリピバロイル体へと変換し、その後、CsOAcにより4位を反転させることで87%の収率にて4-*epi*-DOI誘導体を合成した。また2-*epi*-DOI誘導体の合成においては、1,3-*O*-ジピバロイル体の有する2位ヒドロキシ基の反応性が4位よりも高いことを利用し、2位選択的にトリフレート化、4位ヒドロキシ基のアセチル化、CsOAcによる2位の反転反応の3段階の反応を確立した(56%)。その後、得られたそれぞれのDOI誘導体のエピマーのカルボニル基をヒドロキシメチル基に変換し、良好な収率にて5a-カルバ-D-ガラクトース(10%, 13工程)と5a-カルバ-D-マンノース(18%, 12工程)の合成を達成した。

(2) 結合を有するカルバ糖の新たな合成法として、DOIから合成した6-*O*-Ac-カルバ-D-グルコースの有する4つのエクアトリアル位のヒドロキシ基に対してランダムにピバロイル化する反応を鍵工程とするルートを立案した。その結果、-20にて反応を行うと1,3-*O*-Piv体が主生成物として得られることが判明した(65%)。一方、80にてピバロイル化反応を試みると主生成物はトリピバロイル体となり、1,2,3-*O*-Piv体、

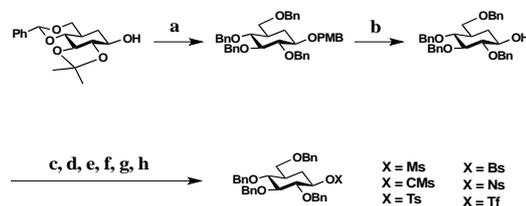
1,3,4-*O*-Piv体、1,2,4-*O*-Piv体の収率がそれぞれ35%, 21%, 21%となることがわかった。これらの部分保護体より5a-カルバ-D-ガラクトース、5a-カルバ-D-マンノース、5a-カルバ-D-アロースの効率的な合成を達成した。

(3) 上記(2)にて得られた6-*O*-Ac-1,3-*O*-Piv体の2位ヒドロキシ基にトリフレート基を導入後、4位のヒドロキシ基をアセチル化し、最後にアジ化ナトリウムを求核試薬として用いて2位のアジド化反応を試みた。次いでアジド基をアセトアミド基に変換し脱保護することで、5a-カルバ-*N*-アセチル-D-マンノサミンの合成を達成した。この合成を種々検討した結果として、アミノ糖のカルバ糖を合成する場合は、先にWittig反応とヒドロホウ素化反応により6位のヒドロキシメチル基を構築し、その後、アセトアミド基を導入する手法が好ましいことが判明した。

(4) ヒトの代表的な糖タンパク質糖鎖であるハイマンノース型糖鎖の部分構造であるMan 1-2Manを、高濃度基質条件下にて塩酸を触媒とした新規手法により合成した。マンノース5gを水1mLに加え高濃度マンノース溶液を調製後、塩酸存在下、60にて反応させた。65時間後、塩酸を水酸化ナトリウムにより中和して反応を終了させた。次いで反応液を-マンノシダーゼにより処理することで、結合を有するマンノオリゴ糖を加水分解した。最後に活性炭カラムにより分離精製することにより、Man 1-2Man(8%), Man 1-3Man(8%), Man 1-6Man(29%)を簡便にかつ安価に合成することに成功した。

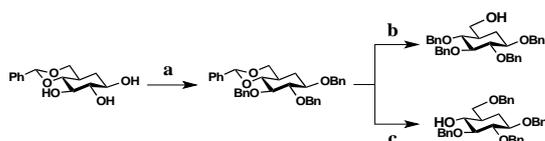
(5) カルバ糖を糖鎖末端部分に組み込むためのモデル実験として、高収率にて大量合成可能なカルバ-D-グルコースを原料に、カルバ糖同士のカップリング反応を検討することとした。

DOIより数十グラムスケールで合成したカルバ-D-グルコースを原料に1位に活性基を有するカルバ-D-グルコース供与体を6種類(メシル体、クロロメシル体、トシル体、プロシル体、ノシル体、トリフレート体)合成した。



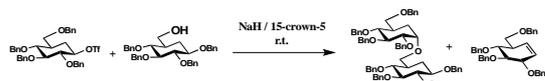
Reagents: (a) p-MeOBnCl, NaH, DMF; 80% AcOH, 60 °C; BnBr, NaH, DMF,  $y = 78\%$  (3 steps); (b) CAN, MeCN : H<sub>2</sub>O = 9 : 1,  $y = 90\%$ ; (c) MsCl, pyridine, 0 °C,  $y = 96\%$ ; (d) chloromethylsulfonyl chloride, pyridine, 0 °C,  $y = 87\%$ ; (e) p-TsCl, pyridine, DMAP, 50 °C,  $y = 96\%$ ; (f) 4-bromobenzenesulfonyl chloride, pyridine, DMAP, 40 °C,  $y = 87\%$ ; (g) 4-nitrobenzenesulfonyl chloride, pyridine, DMAP, 40 °C,  $y = 88\%$ ; (h) Te<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2,6-di-*t*-butyl-4-methylpyridine, 0 °C,  $y = 94\%$

またカルバ-*-D*-グルコースの4位と6位をベンジリデン基で保護後、1位から3位のヒドロキシ基をベンジル化し、次いでベンジリデンアセタールの還元開裂反応を試み、4位もしくは6位にヒドロキシ基を有するカルバ-*-D*-グルコース受容体を合成した(4-OH体、6-OH体)。加えて、4,6-O-ベンジリデン-カルバ-*-D*-グルコースの2位と3位をイソプロピリデン基で保護し、次いで、*p*-メトキシベンジル化、アセタール基を脱保護後、ベンジル化し、最後にCANにより*p*-メトキシベンジル基を除去することで、1位にヒドロキシ基を有するカルバ-*-D*-グルコース受容体を合成した(1-OH体)。



Reagents: (a) BnBr, NaH, DMF,  $\gamma = 94\%$ ; (b)  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\gamma = 89\%$ ; (c) triethylamine borane,  $\text{AlCl}_3$ , THF, MS-4A,  $\gamma = 84\%$

(6) 上記(5)にて合成した6種類のカルバ-*-D*-グルコース供与体と3種類のカルバ-*-D*-グルコース受容体を用いて、カルバグルコース同士のカップリング反応を検討した。はじめに、最も脱離能の高いトリフレート体と反応性の高い1級ヒドロキシ基を有する6-OH体の組み合わせを試みた。基質濃度を検討した結果、NaHを塩基として用い、供与体と受容体を高濃度条件下(それぞれ680 mM, 1.7 M)にてカップリング反応することで、ジカルバ-*-D*-イソマルトースを32%の収率にて合成することができた。



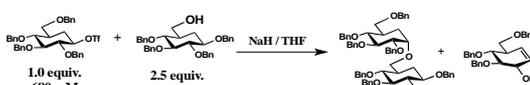
Entry	Donor 1.0 equiv.	Acceptor 2.5 equiv.	THF	15-crown-5	Dicarbha glucobiose	Olefine
1	80 mM (15 mg)	200 mM (30 mg)	200 $\mu\text{L}$	67 $\mu\text{L}$ (15 eq)	8 %	72 %
2	340 mM (10 mg)	840 mM (20 mg)	-	44 $\mu\text{L}$ (15 eq)	28 %	43 %
3	680 mM (10 mg)	1.7 M (20 mg)	-	22 $\mu\text{L}$ (7.3 eq)	32 %	40 %
4	1.4 M (10 mg)	3.4 M (20 mg)	-	11 $\mu\text{L}$ (3.7 eq)	24 %	51 %

本反応が低収率であった原因は、供与体が脱離してオレフィン体を生成することであった。そのため、次に脱離能のより低い供与体を用い、6-OH体に対する高濃度条件下でのカップリング反応を検討した。しかしながら、全てのケースにおいて目的物であるジカルバイソマルトース保護体を得ることはできなかった。メシル体、クロロメシル体、トシル体を用いた場合の副生成物は、トリフレート体を用いた場合と同様、オレフィン体であった。またプロシル体およびノシル体を用いた際の副生成物は、パラ位のプロモ基とニトロ基が脱離基として働き、そこに受容体が求核攻撃した生成物であった。



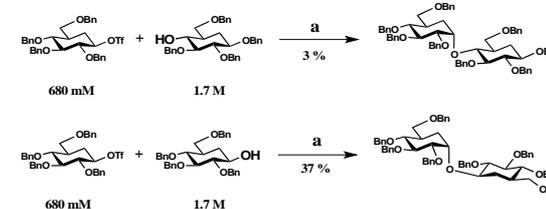
Entry	Donor X 1.0 equiv.	Acceptor 2.5 equiv.	15-crown-5 7 equiv.	Temp.	Olefine by-product	Recovered Donor
1	Ms 680 mM (9 mg)	1.7 M (20 mg)	22 $\mu\text{L}$	r.t.	-	88 %
2	Ms 680 mM (17 mg)	1.7 M (37 mg)	41 $\mu\text{L}$	50 °C	41 %	-
3	CMs 680 mM (10 mg)	1.7 M (20 mg)	22 $\mu\text{L}$	r.t.	26 %	-
4	Ts 680 mM (11 mg)	1.7 M (20 mg)	22 $\mu\text{L}$	r.t.	49 %	18 %
5	Bs 690 mM (15 mg)	1.7 M (26 mg)	29 $\mu\text{L}$	r.t.	-	24 % 39 %
6	Bs 690 mM (15 mg)	1.7 M (26 mg)	29 $\mu\text{L}$	60 °C	43 %	-
7	Ns 680 mM (22 mg)	1.7 M (40 mg)	44 $\mu\text{L}$	r.t.	-	19 %
8	Ns 680 mM (15 mg)	1.7 M (28 mg)	31 $\mu\text{L}$	40 °C	-	22 %
9	Ns 680 mM (15 mg)	1.7 M (28 mg)	31 $\mu\text{L}$	60 °C	54 %	-

これらの結果より、脱離が起こるもののトリフレート体が最も良い供与体であることが示唆された。そこで、さらにトリフレート体を用いたカップリング反応を検討した。その結果、最終的に反応温度を0にすることで、収率を47%まで向上させることに成功した。



Entry	15-crown-5	Temp.	Time	Dicarbha glucobiose	Olefine
1	7.3 equiv.	r.t.	1 h	32 %	40 %
2	7.3 equiv.	0 °C	6 h	37 %	26 %
3	3.7 equiv.	r.t.	1.5 h	33 %	49 %
4	3.7 equiv.	0 °C	6.5 h	47 %	33 %
5	3.7 equiv.	-10 °C	20 h	44 %	34 %
6	3.7 equiv.	-40 °C	3 days	37 %	26 %
7	-	0 °C	4 days	31 %	17 %

その後、最適化した反応条件を4-OH体と1-OH体に適用することで、ジカルバ-*-D*-マルトース保護体(3%)とジカルバ-*-D*-トレハロース保護体(37%)の合成にも成功した。最後に、各々のカップリング生成物を脱保護することで、ジカルバ-*-D*-イソマルトース、ジカルバ-*-D*-マルトース、ジカルバ-*-D*-トレハロースの合成を達成した。



Reagents: (a) NaH, 15-crown-5 ether, THF, 0 °C

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Katsumi Ajisaka, Misato Yagura, and Tetsuo Miyazaki, A novel two-step synthesis of  $\alpha$ -linked mannosides based on an acid assisted reverse hydrolysis

reaction, *Carbohydr. Res.*, 査読有, 2012, 347, 147-150

〔学会発表〕(計11件)

Carba-*-D*-glucose の乳がん細胞に対する抗腫瘍効果についての研究: 酒巻利行、酒井哉、五十嵐優、中島志帆、佐藤浩二、鰺坂勝美、宮崎達雄: 日本薬学会第134年会(熊本) 2014年3月27日~30日

高濃度条件下での分子間カップリング反応によるジカルバグルコピオースの合成: 館田尚家、宮崎達雄、鰺坂勝美: 日本農芸化学会 2014年度大会(東京) 2014年3月27日~30日

カルバグルコースを構成糖とする擬似二糖の合成研究: 宮崎達雄、館田尚家、鰺坂勝美: 第7回東北糖鎖研究会(新潟) 2013年9月27日~28日

分子間カップリング反応による 5a,5a'-ジカルバ-*-D*-グルコピオースの合成研究: 館田尚家、宮崎達雄、鰺坂勝美: 第65回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(新潟) 2013年5月18日

カルバグルコースを構成糖とする 5a,5a'-ジカルバ-*-D*-グルコピオースの合成研究: 館田尚家、宮崎達雄、鰺坂勝美: 日本農芸化学会 2013年度大会(仙台) 2013年3月24日~27日

*o*-キシリレンリンカーを介した分子内カップリングによるカルバマルトースの合成研究: 館田尚家、宮崎達雄、鰺坂勝美: 第31回日本糖質学会年会(鹿児島市民文化ホール) 2012年9月17~20日

STUDY ON SYNTHESIS OF 5a-CARBA-*-D*-MANNOPYRANOSE AND 5a-CARBA-*-D*-*N*-ACETYL MANNOSAMINE FROM 2-DEOXY-SCYLLO-INOSOSE: Naoya Tateda, Tatsuo Miyazaki, Kazuya Arisaka, Tatsuya Kano, Katsumi Ajisaka: 26<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium (Madrid, Spain); 22-27, July, 2012

2-デオキシ-*scyllo*-イノソース(DOI)を原料としたカルバ-*-D*-マンノースとカルバ-*-D*-*N*-アセチルマンノサミンの合成研究: 館田尚家、宮崎達雄、有坂和也、館田尚家、狩野達也、鰺坂勝美: 日本農芸化学会 2012年度大会(京都) 2012年3月22~25日。

2-deoxy-*scyllo*-inosose を原料としたカルバ糖の系統的合成法の研究: 宮崎達雄、館田尚家、狩野達也、千田俊彦、鰺坂勝美: 第5回東北糖鎖研究会。(仙台) 平成23年12月9~10日

DOI を原料としたカルバ-*-D*-ガラクトースとカルバ-*-D*-マンノースの合成: 館田尚家、宮崎達雄、狩野達也、有坂和也、鰺坂勝美: 第30回日本糖質学会年会。(長岡) 平成23年7月11~13日

酸を触媒とした脱水縮合反応によるマンノオリゴ糖の効率的合成研究: 鰺坂勝美、矢倉美里、宮崎達雄: 第30回日本糖質学会

年会。(長岡) 平成23年7月11~13日

〔図書〕(計1件)

高久 洋暁、宮崎 達雄、脇坂 直樹、山崎 晴丈、鰺坂 勝美、高木 正道、シーエムシー出版「合成生物工学の隆起 -有用物質の新たな生産法構築をめざして-」有用化学工業原料中間体 2-deoxy-*scyllo*-inosose(DOI)の発酵高生産とその利用、2012年4月, pp169-179

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 達雄 (MIYAZAKI, Tatsuo)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教

研究者番号: 70410222