「多糖高分子工学の新展開」特集

高分子担体を利用した糖鎖合成研究

山田久里子・西村紳一郎

1. はじめに

近年の糖鎖生物学研究のめざましい発展により、糖鎖・複合糖質が生体内において示す様々で重要な生理活性が明らかになってきたが、こうした研究をより深く追求するためには、構造が明確で高純度の糖鎖化合物が大量に必要になってくる。こうした要求に応えるため、多くの糖質化学者がそれぞれの方法論によって化学的な糖鎖構築について研究を行っておりかなりの合成化学的成果をあげている。しかし、ご存じの通り、糖鎖はペプチドやオリゴヌクレオチドのような比較的単純でどちらかといえばアキラルな結合を持つ化合物とは異なり、グリコシド結合の生成に際して緻密なキラリティの制御が要求される。それに加え、糖は反応性の似通った官能基を分子内に数多く持つため、結合の位置選択性の制御もまた必要不可欠である。糖鎖の化学合成はこのような糖自身の持つ性質により、様々な保護基を用いた複雑で煩雑な合成経路を経て行われるため、非常に高度な合成技術と綿密な合成戦略が必要とされる。

このような保護基の選択や複雑な合成経路を経ずしてより簡便にグリコシド結合の立体・位置選択性を制御した糖鎖合成を行うために、最近様々な糖転移酵素や糖加水分解酵素を用いた合成法の研究も盛んになっている。いくつかの糖転移酵素や糖加水分解酵素が遺伝子クローニングされ、大量に生産されるようになったため、以前

は入手困難であったこれらの酵素が比較的容易に入手できるようになったこともあり、酵素的な糖鎖の構築はますます有効な糖鎖合成法になりつつある。

化学合成、酵素的合成のどちらにおいても、より簡単に糖鎖合成を行えるようにするため、ペプチド合成ではすでに一般的になっている固相合成法[1]をこれらの糖鎖合成に応用する試みがいくつかなされている。ここで、固相として用いる高分子担体の選択は難しく、この選択如何では一般の化学的糖鎖合成反応における糖供与体・糖受容体に比べて担体に結合した糖鎖の反応性が低かったり、反応の立体選択性が低かったりという欠点もみられる上、担体と糖鎖を結ぶリンカーが反応条件で安定性を保てない場合には担体からの糖鎖のリークが起こったりなど、結果として低収率をまねいてしまう。

高分子担体を用いる合成法は反応生成物の精製の簡便性という点で、糖鎖合成へ応用するべき手法であり、特に液相で反応が行える場合は、反応系の均一性から高反応性も期待できる。こうしたことから、糖鎖合成により適した高分子担体の開発とグリコシド結合生成の際の反応条件の検討がされている。今回は、固相・液相での高分子担体を利用した糖鎖合成法について最近の話題を中心に紹介したい。

2. 可溶性高分子担体上での化学的糖鎖合成[2-6]

可溶性高分子担体の1例として、ポリ(エチレングリコ

西村紳一郎

山田久里子

Syntheses of Polysaccharide Chains by Using Polymer Supports

著者紹介 KURIKO YAMADA and SHIN-ICHIRO NISHIMURA

Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University
北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻 大学院博士課程2年(山田氏), 教授 理学博士(西村氏)

山田氏は、糖鎖科学を専門とされ、第14回国際複合糖質学会で第1回Young Scientist Awardを受賞、趣味はプロレス観戦、釣りとのこと。

西村氏は、糖鎖科学を専門とされ、The Johns Hopkins Society of Scholars(1997)、第1回糖質学会奨励賞(1998)を受賞、著書に「糖質の科学と工学」(講談社サイエンティフィク、1997)他がある。趣味は野球とのこと。

本稿では、高分子担体を利用した糖鎖合成法について分かりやすく解説していただいた。

ール) ω -モノメチルエーテル (MPEG) の末端に α, α' -ジオキシシリルジエーテル (DOX) を導入した MPEGDOX 担体が合成されている [6]。この担体は、MPEG ストラテジーで要求される、ポリマーに結合した糖鎖合成のシントングリコシル化の際に用いる溶媒には可溶であり、均一系でのグリコシル化が可能である一方で、反応系に存在する不純物を除去するためのワークアップに際しては、これに用いる溶媒に不溶化するという性質を備えている。これは一般に生成物の精製時に行っているクロマトグラフィーの手間をこれまでに比べ大幅に軽減し得るポリマーサポートといえよう。またスペーサーに用いた DOX はグリコシル化を含めて目的物を合成するまでのほとんどの反応の条件下で安定である上に、オリゴ糖合成が終了した後、水素化分解により保護基の除去と共に容易に切断することができるというものである。スキーム 1 に MPEG ストラテジーによるオリゴ糖合成の概要を簡単に示した。

この方法は、各ステップでの糖供与体となる糖鎖化合物に位置選択的な保護と活性化が必要であるという点では従来の化学合成と同様であるが、それゆえに化学合成ならではの多様な構造をもった目的糖鎖の合成に応用可能である点や、煩雑な精製過程を大幅に簡略化したという点で高分子担体を用いた有効性が十分に発揮されている方法論である。

3. 水溶性高分子担体上における酵素的オリゴ糖合成 [7-13]

ここで筆者らが手がけている水溶性高分子担体を用いた酵素的糖鎖合成法についても、簡単に紹介させていただきたい。筆者らは糖転移酵素による糖鎖伸長反応の際に均一系で、かつマイルドな条件下で反応を行うことができ、2. で述べたのと同様に高分子であることの優位性を利用して精製の簡便化を図れるような新規水溶性高分子担体の合成を行った [10-13]。酵素的グリコシル化反応において糖受容体となる糖質に重合性を付与した糖モノ

スキーム 1

図 1

マーとアクリルアミドモノマーの共重合体を合成し、水溶性高分子担体とした。これに対していくつかの糖転移酵素と糖ヌクレオチドを用いて糖鎖伸長反応を行った。本法による糖鎖合成の流れのイメージを図1に示した。

筆者らはこれまでに特異的糖鎖切り出し点として水素感受性基をもつもの、 α -キモトリブシンによって特異的に加水分解される結合をもつもの、そしてヒル由来のセラミドグリカナーゼによって他の脂質分子にオリゴ糖がトランスグリコシレーションされるような結合をもつような高分子担体を合成している。糖転移酵素を用いた酵素的糖鎖合成法の全てに言えることだが、未だ入手することのできる糖転移酵素の数が限られているために、どんな構造の糖鎖も思いのままに作ることができるわけではない。この点では今後より多くの糖転移酵素が入手可能になることを切に願わずにはいられない。しかし、本合成法においては、糖鎖伸長のアクセプター分子が高分子化していることで発現する「糖鎖クラスター効果」により糖鎖の酵素タンパク質へのアクセシビリティが低分子アクセプターの場合に比べて格段に向上し、ほぼ定量的な糖転移反応が起こることが明らかになっており、これも高分子担体上で行う糖鎖合成の利点と言える。

4. 不溶性高分子担体上での化学的糖鎖合成[14-25]

不溶性高分子担体を用いた化学的糖鎖合成研究は、高分子担体上での糖鎖合成において最も多数の研究例がある分野である。不溶性レジンをを用いた固相合成反応といえばペプチド合成がすぐに思い浮かぶ。そこでここでは糖ペプチドの合成に固相合成を応用している例を紹介したい。最近、かなり広く行われるようになった糖ペプチド合成法は、ペプチド固相合成におけるFmocストラテジーをそのまま糖ペプチド合成する際に応用する手法である。これはムチン型糖鎖をもつ糖ペプチド合成などを行う際に用いられている例が多い。合成例をスキーム2で示す[24]。

このようにあらかじめスペーサーを介して結合したFmocアミノ酸に対して、Fmocアミノ酸に化学合成法によって糖鎖を導入した誘導体をペプチドの固相合成と同様の条件でカップリングし、その後さらにペプチド鎖を伸長していき目的とする糖ペプチドを得るという方法がよく用いられている。こうした糖ペプチドの合成を液相法で行う場合と比較すると、固相法を用いた方がペプチド部分の合成に関してはもちろん大幅に合成の簡略化が図れる

スキーム 2

が、アミノ酸の側鎖の保護基および糖鎖の官能基の保護基の組み合わせを上手く選択しなくてはならない。

ここでは紹介しないがこの他に糖鎖のみを固相法で合成したり、糖鎖、ペプチドの両方に固相合成を行いこれらをカップリングするといった例も報告されている。

不溶性高分子担体としてはポリスチレン誘導体の他にシリカゲルなども用いられているがどのような担体を使う場合にも生成物のリリース反応の条件をいかに温和なものにし、糖鎖部分への与えるダメージを軽減できるかが様々に工夫されているところである。

5. 不溶性高分子担体を用いた酵素による糖鎖合成[26-31]

固相上での酵素的な糖鎖合成法におてもまた、糖鎖が高分子担体に結合した状態でいかに酵素反応の至適条件に対応できるかが、反応効率などに大きく影響してくるであろう。ここでは水溶液中での酵素反応に馴染みやすい性質を持つセファロースゲルに固定化した糖鎖を糖受容体として、種々の糖転移酵素を用いて糖鎖伸長反応を行いシアリルルイスX型糖鎖を合成している例[31]をスキーム3に示す。

この例では固相合成法を利用したことで、比較的大きな合成スケールで反応を行うことを可能にし、かつ糖転移酵素による糖鎖合成を組み合わせることにより位置・立体選択的なグリコシル化を行っている。生体内で重要な役割を果たしている糖鎖構造の合成にも成功している。また、温和な条件で切断される結合をリンカーとして用いることにより生成した糖鎖を高収率で回収している。

6. 最後に

これまで示したように、現在行われている高分子担体上での糖鎖合成はいまだ様々な問題を抱えてはいるが、やはり高分子上で行う反応がもつメリットも無視できないものがあり、非常に複雑な糖鎖合成研究の世界に新しい道を切り開く可能性を大いに秘めているものと考えている。

高分子担体上での糖鎖合成に関してのレビューが本稿以外にもいくつか発表されている[32-34]。是非参考にさせていただきたい。

参考文献

- 1) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2149-

スキーム 3

- 2154.
- 2) S. P. Douglas, D. M. Whitfield, and J. J. Krepinsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **113** (1991) 5095-5097.
 - 3) Y. Ito, O. Kanie, and T. Ogawa, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35** (1996) 2510-2512.
 - 4) D. M. Whitfield, S. P. Douglas, and J. J. Krepinsky, *Tetrahedron Lett.*, **33** (1992) 6795-6798.
 - 5) R. Verduyn, P. A. M. van der Klein, M. Douwes, G. A. van der Marel, and J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **112** (1993) 464.
 - 6) S. P. Douglas, D. M. Whitfield, and J. J. Krepinsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 2116-2117.
 - 7) U. Zehavi, S. Sadeh, and M. Herchman, and S. Kopper, *Carbohydr. Res.*, **124** (1983) 23-34.
 - 8) U. Zehavi, M. Harchman, R. R. Schmidt, and T. Bar, *Glycoconjugate J.*, **7** (1990) 229-234.
 - 9) U. Zehavi, M. Harchman, and S. Kopper, *Carbohydr. Res.*, **228** (1992) 255-263.
 - 10) S. -I. Nishimura, K. Matsuoka, and Y. C. Lee, *Tetrahedron Lett.*, **35** (1994) 5657-5660.
 - 11) K. Yamada and S. -I. Nishimura, *Tetrahedron Lett.*, **36** (1995) 9493-9496.
 - 12) S. -I. Nishimura and K. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 10555-10556.
 - 13) K. Yamada, E. Fujita and S. -I. Nishimura, *Carbohydr. Res.*, **305** (1997) 443-461.
 - 14) J. M. J. Frechet, *Polymer-Supported Reactions in Organic Synthesis*, Wiley, New York, 1980, ch. 8, pp407.
 - 15) G. H. Veeneman, S. Notermans, R. M. J. Liskamp, G. A. van der Marel, and J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.*, **28** (1987) 6695-6698.
 - 16) S. J. Danishefsky, K. F. McClure, J. T. Randolph, and R. B. Ruggeri, *Science*, **260** (1993) 1307-1309.
 - 17) J. T. Randolph and S. J. Danishefsky, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **33** (1994) 1470-1473.
 - 18) L. Yan, C. M. Taylor, R. Goodnow Jr., and D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.*, **116** (1994) 6953-6954.
 - 19) J. T. Randolph, K. F. McClure, and S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 5712-5719.
 - 20) J. Rademann and R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.*, **37** (1996) 3989-3990.
 - 21) M. Adinolfi, G. Barone, L. De Napoli, A. Iadonisi, and G. Piccialli, *Tetrahedron Lett.*, **37** (1996) 5007-5010.
 - 22) K. C. Nicolaou, Nicolas Winssinger, Joaquin Pastor, and Frederik DeRoose, *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 449-450.
 - 23) H. Paulsen, A. Schleyer, N. Mathieux, M. Meldal and K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, (1997) 281-293.
 - 24) B. Liebe and H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **36** (1997) 618-620.
 - 25) J. Y. Roberge, X. Beebe and S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998) 3915-3927.
 - 26) A. Heckel, E. Mross, K. -H. Jung, J. Rademann and R. R. Schmidt, *Synlett*, February (1998) 171-173.
 - 27) E. Meinjohanns, M. Meldal, H. Paulsen, R. A. Dwek and K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, (1998) 549-560.
 - 28) M. Shulster, P. Wang, J. C. Paulson, and C. -H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **116** (1994) 1135-1136.
 - 29) O. Seitz and C. -H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 8766-8776.
 - 30) O. Blixt and T. Norberg, *J. Carbohydrate Chemistry*, **16** (1997) 143-154.
 - 31) O. Blixt and T. Norberg, *J. Org. Chem.*, **63** (1998) 2705-2710.
 - 32) D. J. Gravert and K. Janda, *Chem. Rev.*, **97** (1997) 489-509.
 - 33) 深瀬浩一, 化学と工業, 第51巻第8号(1998) 1186-1191.
 - 34) 伊藤幸成, 高分子, 印刷中.