総 説

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 69, No. 8, pp. 999~1011, 1995]

複合糖質に関する合成研究[†]

(1995 年度 日本農芸化学会賞受賞)

小 川 智 也

(東京大学大学院農学生命科学研究科・理化学研究所)

細胞表面の糖タンパクや糖脂質は糖鎖を細胞の外側に配向して、細胞と外部との情報交換、細胞内の認識、多くの分子種や他細胞との相互作用などに関与しつつ、生体系で重要な機能を果たしている。このような糖鎖の機能を分子レベルで解明するためには、糖鎖配列の解析とともに、それらの再構築による機能の再現、さらには糖鎖の分子設計による機能の修飾と改変等が方法論的に重要である。しかしながら、糖鎖はタンパク質や核酸の構造と異なり、鎖が枝分かれしている場合が多く、また、その構成単位である約 20 種の単糖間の結合には立体化学による異性体（アノマー）が存在する点が特徴であり、本研究を開始した 1970 年代中頃では化学合成手法による効率的な接近は極めて困難であった。著者らはそのような状況のなかで、糖鎖の分枝およびアノマーの位置および立体化学を制御する手法の開拓と、それらを応用した機能性糖鎖や複合糖質の合成研究を行ってきた。この分野の進歩は最近の 10 年間に特に著しい⁽¹⁾が、以下に著者らの主要な成果を紹介する。

1. 糖鎖伸長にかかわる新しい化学の開拓

著者らは 1974~1976 年に C-グリコシル化反応に関する研究の展開のなかで、水酸基のトリブチルスズエーテル化反応を研究し、ポリオール系での興味深い位置選択性やトリブチルスズチオエーテルの温和な反応性などを観察した⁽²⁾。これが契機となり、複雑に分枝した糖鎖の化学合成への挑戦が開始された。しかしその当時は、例えば N-アセチラクトサミンの 2 糖の合成でさえ非常に困難な状況にあった。1980 年代に入ると著

者のグループでも、いくつかの有用な手法や合成戦略が開始された。1981 年にはルイス酸 TMSOTf をグリコシル化反応へ用いて成功し⁽³⁾、その後 1987 年に伊藤幸成氏はアルキルフェニルスルフェネート ROSPh を全く新規な潜在性糖受容体として導入することに成功している。この場合、TMSOTf の様なハードなルイス酸で活性化することにより、この潜在性糖受容体からソフトな親電子反応剤である PhSOTf とハードな親核反応剤としての糖受容体 ROTMS が発生する点に新規性がある。即ち、ソフトな親核性を示す糖供与体であるグリカルやチオグリコシドを反応系に共存せしめて、非常に温和な条件下高収率で O-グリコシドを得ることができたのである⁽⁴⁾。更に、ソフトな親硫黄性反応剤としての PhSeOTf を導入し糖供与体としてチオグリコシドを組み合わせることにより、複雑な糖鎖配列の再構築研究が効率的に展開された⁽⁵⁾。チオグリコシドの活性化法に関しては、佐藤進氏による Bu₄NBr-CuBr₂-AgOTf（または HgBr₂）という有機溶媒可溶性銅反応剤の開拓⁽⁶⁾も、その後の複雑な糖鎖配列の構築に非常に有効であった。

セラミドの一级アルコールの如く、ミセルなどのアグリゲーション構造を形成し易く反応性が低い場合に、グリコシル化反応の副生成物としてオルソエステルが観察された。特にスフィンゴ糖脂質の全合成研究に際して、糖鎖部分とスフィンゴシンの脂肪酸アミドであるセラミドの誘導体との縮合収率が劣悪（1~5%程度）であることを度々観察した。佐藤進、布村茂樹両氏は糖供与体の O-2 位にピヴァロイル基やトリメチルベンゾイル基を導入し、立体制御補助基としての効果を実証し、その後の展開に貢献した⁽⁷⁾。

グリコシル化反応のなかでも隣接基炭素デオキシ型グリコシドの合成反応は、特に立体制御が困難であった。それらの代表例としてシアル酸によるグリコシル

[†] Synthetic Studies on Glycoconjugates

Tomoya OGAWA (Graduate School for Agriculture and Life Science, the University of Tokyo/The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN))

化反応がある。この難問に対処するため、1988年伊藤幸成氏はシアル酸のC-3位に立体制御補助基として、 β -エカトリアル配向したPhSおよびPhSe基を設計導入し、それらの効果を実証した⁽⁸⁾。この戦略は従来の立体選択性を飛躍的に高める(約60:1)ことに成功し、後述する如く糖タンパクの糖鎖や糖脂質の合成につらな

2. 植物生理活性糖鎖オリゴサッカリンの合成研究

1984年には植物生理学の分野において、植物や糸状菌の細胞壁多糖の断片が植物生理活性の本体として注目されるようになった⁽⁹⁾。例えば、病原菌が植物細胞に侵入する際に、植物細胞壁を構成するペクチン断片であるオリゴガラクトuron酸1が酵素的に内因性の分子として生成して、植物細胞内のファイトアレキシン生合成系を活性化し、植物に病原菌に対する抵抗性を

付与する。またヘミセルロース断片であるザイログルカン5は、植物細胞の成長や分化を制御することが示された。一方、単離精製されたこれらのオリゴ糖は 10^{-9} モル程度で植物生理活性を示すため、活性本体の証明には超微量のタンパク性成分などの混在の否定が必須であった。そこで、化学合成によりこれらのオリゴ糖を純粋に得て植物生理活性を実証することを計画した。

1984年に中原義昭氏はペクチン断片12糖1の全合成を計画し、実験を開始した。逆合成解析を行い合成鍵中間体として、2,3,4を分子設計、合成し、向山法により先ず3と4の縮合(63%)を、続いて縮合生成した8糖を糖受容体に導き、更に2との縮合に高い α 選択性で成功(64%)した。得られた α -(1 $\rightarrow$ 4)結合のガラクトシド12量体の保護体を更に酸化的に変換し、最終的に脱保護後FPLCにより純化し、1989年に1を得

ることに成功した⁽¹⁰⁾。合成オリゴ糖 **1** は大豆子葉を用いる検定系で、ファイトアレキシン生合成の惹起活性が天然から単離されたガラクトチュロン酸 **12** 量体と一致した。

ヘミセルロース断片に対応するオリゴ糖 **5** の合成は酒井啓一郎氏により研究が進行した。即ち、4 糖性糖供与体 **6** と 2 糖性糖受容体 **7** を縮合後、生成した 6 糖を選択的に酸化的脱保護して糖受容体に変換後、3 糖性糖供与体 **8** との縮合により再構築を達成した⁽¹¹⁾。6 糖性糖受容体のキシロース 6 位水酸基へのグリコシル化反応の立体選択性の向上は非常に困難であったが、最終的に前述の銅反応剤の適用により初めて $\alpha/\beta=3/1$ まで向上したものである。脱保護して得られた **5** は、遮光下エンドウ茎切片を用いたオーキシン誘導生長の検定系で天然物と同程度の阻害活性が実証された。

糸状菌の細胞壁構成成分である β -グルカンを経加水分解して得られる 7 糖が、植物細胞にファイトアレキシン生合成を誘導することが報告された⁽⁹⁾ が、その後、洪南基氏の合成研究により 6 糖構造 **9** が必要最小構造であることが判明した。更に、6 糖 **9** のコンホーメーションの解明のため、特定のグルコース残基に重水素

を導入することを検討した。これは例えば、3 糖性糖供与体 **10** と 3 糖性糖受容体 **11** の反応により達成している⁽¹²⁾。

3. 糖脂質の全合成

1980 年代の初め、杉本守氏はガングリオシドのなかでも一番単純な GM₃ **12** の合成研究を開始した。当時の文献調査では、2 級水酸基へのシアル酸のグリコシル化に関しては明確な実験データは皆無であった。同氏は先ず、既に 1966 年に報告されていたシアル酸供与体 **13** と 2 糖性糖受容体 **14** の反応生成物を詳細に分析し、1984 年に世界で初めて (2 → 3) 結合の 3 糖性生成物を立体化学を含めて同定することに成功した。この反応では生成物の α/β の比率は 1 : 2 で非天然型が優位であったが、確かにガラクトースの 3 位にグリコシル化が進行したことが示された。この実験により、1973 年に Shapiro らが tlc のデータのみから報告した生成物⁽¹³⁾ は β の立体化学であると推定される。一方、1984 年には小池勝也氏によるグルコースからセラミド誘導体 **15** への変換も完了し、1985 年には GM₃ の全合成が世界に先駆けて達成された⁽¹⁴⁾。この実験はいわゆるガングリオシド類の世界初の全合成であるが、著者らの

研究室を含めてその後の世界のガングリオシド研究の出発点になったものと評価される。シアル酸によるグリコシル化反応は、伊藤幸成氏による C-3 位立体制御補助基 (PhS) の導入により α -選択性が確保され、新しいシアル酸供与体 17 などが設計された。更に、1989 年には糖供与体の O-2 位にピヴァロイル基を有する 2 糖性糖受容体 18 を用いて、GD₃ 16 の全合成に初めて成功した⁽¹⁵⁾。1990 年には、更に糖鎖の伸長したガングリオ系ガングリオシド 19 が、20 と 21 の縮合を鍵反応として完成した⁽¹⁶⁾。

ガングリオ系のスフィンゴ糖脂質以外にも、グロボ系の SSEA-3 (22) や Forssman 抗原 23 の合成が布村茂樹氏により 1988⁽¹⁷⁾ と 1989⁽¹⁸⁾ にそれぞれ世界に先駆けて完成した。即ち、22 と 23 の糖鎖配列は共通の受容体 26 と供与体 24 および 25 を用いてそれぞれ構築された。また、佐藤進氏により細胞接着などに関与するネオラクト系の Le^x2 量体抗原 27 の合成に関しても、3 糖性糖供与体 28 と 5 糖性糖受容体 29 との鍵反応が位置選択的に 62% で実行された。更に、生成した 8 糖は 9 行程 15% で 27 に変換され、1988 年にその合成が完

36

37

38

成した⁽¹⁹⁾。27 の合成に用いられた戦略的結合切断はその後、炎症時の細胞接着に関与する 27 のシリアル体 30 にも適用され、その合成が完成している⁽²⁰⁾。ネオラクト系の糖脂質としては、神経系から単離された L2/HNK-1 抗原 31 の合成が前駆体 32 を設計して検討され、1991 年に仲野隆久氏が完成した⁽²¹⁾。更に、血球細胞や胎盤などに存在する多重分枝構造 33 は 6 糖性糖受容体 35 に 3 糖性糖供与体 34 を鈴木法⁽²²⁾により同時に 3 分子縮合させ 71% 収率で 15 糖生成物を得、1992 年に松崎祐二氏がその合成を完成した⁽²³⁾。更に、ネオラクト系 I-型 25 糖 36 の合成も同様の戦略により 38 と 37 を 37% 収率で縮合せしめて 1993 年に成功してい

る⁽²⁴⁾。合成した 36 の構造は NMR および FAB-MS⁽²⁵⁾により確認された。

1980 年代の後半には、グリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー 39 の化学合成が村形力氏により研究された。1991 年に 39 の全合成を報告した⁽²⁶⁾、その後の構造研究グループとの私信⁽²⁷⁾により、彼らの D-ミオイノシトールの構造が正しくは L-体であることが判明したため、著者らの合成した分子は 40 の構造である。即ち、村形力氏は 42 を 2 種のハイドロゲンホスホネート 41 と 43 を用いて 39 のジアステレオマー 40 の合成に成功したこととなった。また、根粒菌が宿主植物から低分子性信号分子を受けて分泌する、ホ

スト植物の根毛に形態的变化を惹起する Nod 因子 44 の合成が 45 と 46 の反応により、池下真二氏により実行された⁽²⁸⁾。

4. シクログリカンの合成

1920 年の Schardinger による化学的同定の後、シクロデキストリン類は親油性のゲスト分子に対し、ホスト分子として機能し分子認識のモデル系として研究さ

れてきた。高橋幸男氏は 1985 年に、フッ素体 48 の環化グリコシド化反応を向山法で行い 21% で目的物を得て、 α -シクロデキストリン 47 の合成に初めて成功し⁽²⁹⁾、更に γ -シクロデキストリンの合成も 1987 年に完了した。その後、森真郷氏はマンノヘキサオシルチオグリコシド 49 を $\text{PhSeOTf}^{(6)}$ を用いる伊藤法で環化反応を高収率で達成し、50 の如き機能性環状マンノヘキサオース

47

48

49

MBn = 4-MeO-C₆H₄CH₂

50

51

52

53

54

の合成にも成功した⁽³⁰⁾。また、九山浩樹氏は α -(1→4)結合したオリグラクトース **51** を環化し **52** を得るとともに、同族体 **53** と **54** の合成にも成功した⁽³¹⁾。額田恭郎氏は修正 MM2 プログラムを用いて **52**, **53**, **54** の最低エネルギー構造をそれぞれ **55**, **56**, **57** として視覚化した。これら合成環状糖鎖の機能性の解明は今後の課題である。

5. 糖タンパク糖鎖

糖タンパク糖鎖は、N-結合型と O-結合型に2分される。著者らは N-結合型糖鎖の合成研究を 1970 年代後半より開始し、初期の成果を特に額田恭郎、北島 徹、

山本久夫氏らによる高マンノース型糖鎖の合成を中心に 1984 年に総説として発表した⁽³²⁾。その後、N-結合型のなかでコンプレックス型の代表的 2 重分枝 11 糖糖鎖 **58** の全合成を 4 糖性糖供与体 **59** と 3 糖性糖受容体 **60** を設計することにより検討し、Khalid K. Sadozai、杉本守両氏は最初の全合成に 1986 年に成功した⁽³³⁾。鍵反応である **59** と **60** の反応は 56% 収率で 11 糖を与えた。更に、Khalid K. Sadozai 氏はコリオカルシノーマの分泌する hCG の異常糖鎖 **61**⁽³⁴⁾、また山崎史人氏はバイセクト型 N-アセチルグルコサミン残基の導入を研究し、1990 年に 7 糖コア構造 **62** の合成にそれぞれ成功し

た⁽³⁵⁾。一方、O-結合型糖鎖の研究はグリコホリンAのN-末端の糖鎖クラスター構造 **63** を標的として、中原義昭、飯島博之両氏により追求された。戦略的に **64**, **65**, **66** をそれぞれ設計、合成し、Fmoc 法⁽³⁶⁾ によりペプチド鎖伸長を行った。最終的に脱保護後、精製してM型血液型エピトープに対応する **63** を得ることに成功した⁽³⁷⁾。

6. グリコサミノグリカンとプロテオグリカン

プロテオグリカンとグリコサミノグリカン (GAG) に分類される糖鎖配列は主に 4 グループに分類される。即ち、(i) ヒアルウロナン、(ii) コンドロイチン硫酸及びデルマタン硫酸、(iii) ヘパリンとヘパラン硫酸と (iv) ケラタン硫酸である。著者らの合成研究から以下の 3 例をここに述べる。Ted Slaghek 氏は細胞外マト

リックス構成分子として重要なヒアルウロナンの 4 糖 **67** を標的分子として鍵中間体 **68** を設計し、合成した。更に、**68** は 7 行程 44% で酸化的に **67** に変換された³⁸。また、後藤文孝氏はコンドロイチン硫酸のペプチドとの結合領域配列 **69** を合成標的として、鍵前駆体 **70** をデザインした。**70** は 3 糖性糖供与体 **71** と 3 糖性糖受容体 **72** に逆合成解析した後、それらを前述の銅反応剤による佐藤法で 75% で縮合し 6 糖生成物を得た。更に、その後 6 行程を経て 32% で **70** に導いた。位置選択的硫酸化と脱保護を行い **70** から 36% で **69** を合成することに成功した³⁹。また、ヘパリンコファクター II に高親和性を示すデルマタン硫酸 6 糖 **74** に関し⁴⁰、その鍵前駆体 **75** を設計した。3 糖性糖受容体 **78** を 2 糖性糖供与体 **77** でグリコシル化し、更に、5 糖性生成物を受容体

に変換後 **76** と反応させてから **75** に導いた。**75** は 8 行程 11% で **74** に変換し⁴¹, **74** のヘパリンコファクター II への高親和性を実証した。

以上、著者と共同研究者による細胞表層の複合糖質を中心とする合成化学的研究の代表例を紹介した。本研究は主として科学技術庁および文部省の研究費によって支援された。また、シアル酸はメクト株式会社から恵与されたものである。本研究は、主に理化学研究所細胞制御化学研究室の中原義昭副主任研究員と伊藤幸成先任研究員を中心とする、多数の共同研究者の御協力によって遂行されたものである。学際的な協力研究に関しては、国内外の多くの方々に御指導と御協力を賜った。また、恩師、東京大学名誉教授松井正直先生にはこの研究の開始当初より、終始温かい御指導、御鞭撻を賜った。東京大学獣医生化学研究室の塩田邦男助教授、助手、大学院生諸君にはこの研究を側面から支援していただいた。この場を借り、諸先生、諸先輩、同僚諸氏に心より感謝しお礼申し上げる次第である。

- (1) R. U. Lemieux : *Chem. Soc. Rev.*, **7**, 423–45, (1978) ; H. Paulsen, *ibid.*, **13**, 15–45, (1984) ; R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **25**, 212–235, (1986) ; H. Kunz, *ibid.*, **26**, 294–

- 308, (1987) ; H. Paulsen, *ibid.*, **29**, 823–839, (1990) ; K. C. Nicolaou, *Aldrichimica Acta*, **26**, 63–73, (1993).
- (2) T. Ogawa and M. Matsui : *Carbohydr. Res.*, **54**, C17–C21, (1977), **56**, C1–C6 (1977) ; **62**, C1–C4, (1978).
- (3) T. Ogawa, K. Beppu, and S. Nakabayashi : *Carbohydr. Res.*, **93**, C6, 1981.
- (4) Y. Ito and T. Ogawa : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 2723–2726, 4701–4704 (1987) ; **29**, 1061–1064, (1988).
- (5) Y. Ito, and T. Ogawa : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 6221–6224, (1987).
- (6) S. Sato, M. Mori, Y. Ito, and T. Ogawa : *Carbohydr. Res.*, **155**, C6–C10, (1986).
- (7) S. Sato, S. Nunomura, T. Nakano, Y. Ito, and T. Ogawa : *Tetrahedron Lett.*, **29**, 4097–4100, 1988.
- (8) Y. Ito, and T. Ogawa : *Tetrahedron Lett.*, **29**, 3987–3990, 1988.
- (9) A. G. Darvill and P. Albersheim : *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1984 **35**, 243–275
- (10) Y. Nakahara and T. Ogawa : *Carbohydr. Res.*, **205**, 147–159, 1990.
- (11) K. Sakai, Y. Nakahara, and T. Ogawa : *Tetrahedron Lett.*, **31**, 3035–3038, (1990).
- (12) N. Hong, Y. Nakahara, and T. Ogawa :

- Proc. Jap. Acad.*, **69**, Ser. B 55—66. (1993).
- (13) D. Shapiro : *Pure & Appl. Chem.*, **2**, 153—166, (1974).
- (14) M. Sugimoto and T. Ogawa : *Glycoconjugate J.*, **2**, 5—00 ; (1985), *Carbohydr. Res.*, **135**, C 5—C 9, (1985).
- (15) Y. Ito, M. Numata, M. Sugimoto, and T. Ogawa : *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8508—8510, (1989).
- (16) M. Sugimoto, K. Fujikura, S. Nunomura, Y. Ito, and T. Ogawa : *Tetrahedron Lett.*, **31**, 1435—1438, (1990).
- (17) S. Nunomura and T. Ogawa : *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5681—5184, (1988).
- (18) S. Nunomura, M. Mori, Y. Ito, and T. Ogawa : *Tetrahedron lett.*, **30**, 6713—6716, (1989).
- (19) S. Sato, Y. Ito, and T. Ogawa : *Tetrahedron lett.*, **29**, 5267—5270, (1988).
- (20) M. Iida, S. Nunomura, M. Numata, M. Sugimoto, K. Tomita, and T. Ogawa : Abstracts of Papers, the Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Sendai, April, 1993, p.417
- (21) T. Nakano, Y. Ito, and T. Ogawa : *Tetrahedron lett.*, **32**, 1569—1572, (1991) ; *Carbohydr. Res.*, **243**, 43—69, (1993).
- (22) K. Suzuki, H. Maeta, and T. Matsumoto : *Tetrahedron lett.*, **30**, 4853—4856, (1989).
- (23) Y. Matsuzaki, Y. Ito, and T. Ogawa : *Tetrahedron lett.*, **33**, 6343—6346, (1992).
- (24) Y. Matsuzaki, Y. Ito, Y. Nakahara, and T. Ogawa : *Tetrahedron lett.*, **34**, 1061—1064, (1993).
- (25) T. Ii, Y. Ohashi, Y. Matsuzaki, T. Ogawa, and Y. Nagai : *Org Mass Spectrometry.*, **28**, 1340—1344, (1993).
- (26) C. Murakata and T. Ogawa : *Tetrahedron lett.*, **32**, 671—674, (1991) ; *Carbohydr. Res.*, **23**, 95—114, (1992).
- (27) Merck Sharp & Dohme (Terlings Park) の R. Baker 博士からの私信によれば D. C. Billington, R. Baker, J. J. Kulagowski, and I. M. Mawer, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1987, 314 に報告された D-および L-myo-inositol 誘導体の絶対配座は逆転されることになる。
- (28) S. Ikeshita and T. Ogawa : *Glycoconjugate J.*, **11**, 257—261, (1994).
- (29) T. Ogawa and Y. Takahashi : *Carbohydr. Res.*, **138**, C 5—C 9, (1985) ; **164**, 277—296, (1987).
- (30) M. Mori, Y. Ito, and T. Ogawa : *Tetrahedron lett.*, **31**, 3029—3030, (1990).
- (31) H. Kuyama, T. Nukada, Y. Nakahara, and T. Ogawa : *Tetrahedron lett.*, **34**, 2171—2174, (1993).
- (32) T. Ogawa, Y. Nakahara, H. Yamamoto, T. Nukada, T. Kitajima, and M. Sugimoto : *Pure and Appl. Chem.*, **56**, 779—795, (1984).
- (33) T. Ogawa, M. Sugimoto, T. Kitajima, K. K. Sadozai, and T. Nukada : *Tetrahedron lett.*, **27**, 5739—5742, (1986).
- (34) K. K. Sadozai, T. Nukada, Y. Ito, Y. Nakahara, T. Ogawa, and A. Kobata : *Carbohydr. Res.*, **157**, 101—123, (1986).
- (35) F. Yamazaki, S. Sato, T. Nukada, Y. Ito, and T. Ogawa : *Carbohydr. Res.*, **201**, 31—50, (1990).
- (36) L. A. Carpino and G. Y. Han : *J. Org. Chem.*, **37**, 3404—3409, (1972).
- (37) Y. Nakahara and T. Ogawa : *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3321—3324, (1994).
- (38) T. M. Slaghek, T. K. Hypponen, T. Ogawa : *Tetrahedron Lett.*, **34**, 7939—7942, (1993).
- (39) F. Goto and T. Ogawa : *Pure & Appl. Chem.*, **65**, 793—801, (1993).
- (40) M. M. Maimone and D. M. Tollefsen : *J. Biol. Chem.*, **256**, 18263—18271, (1990).
- (41) F. Goto and T. Ogawa : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 619—624, (1994).