Design Syntheses of Inhibitors of Glycoenzymes

糖鎖関連酵素阻害剤のデザイン合成

Yuasa, Hideya ; Saotome, Chikako ;and Kanie, Osamu

Tokyo Institute of Technology (Tokyo Tech)

Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS)

FAX: 81 42-724-6317, E-mail: kokanee@libra.ls.m-kagaku.co.jp

Key Words : glycosidases, mechanism, inhibitors, glycosides, oligosaccharides**Abstract**

The glycoconjugates existing at the cell surface and proteoglycan, an extracellular matrix, are synthesized by the sequential actions of multiple enzymes which hydrolyze or transfer specific glycosidic linkages. The specific inhibitors of such enzymes therefore are considered to play important roles in the functional investigation of oligosaccharides. Alkaloids and nucleotide analogs from natural sources are known to be inhibitors of these enzymes. Recent advances in the three dimensional analysis of glyco-related enzymes, especially the accumulated crystal structures of the glycosidases, have prompted chemists to design and synthesize inhibitors of glycoenzymes. A combined approach with combinatorial chemistry is also a current focus.

要 約

細胞表面に存在する糖タンパク、糖脂質や細胞間マトリックスであるプロテオグリカン等の複合糖質は、複数の糖加水分解酵素、糖転移酵素の連続的な作用により合成される。したがって、各々の糖鎖関連酵素の選択的な阻害物質は糖鎖の機能解析のために重要な役割を担うと考えられる。従来、天然物質として種々のアルカロイドやヌクレオチド類似物質が阻害能を有することが知られている。近年、糖鎖関連酵素の3次元構造の解析、特に糖加水分解酵素の結晶構造に基づき酵素阻害剤のデザイン合成が行われるようになってきた。また、コンビナトリアル合成の方法論を取り込んだ半デザイン合成によるアプローチも注目される。

A. Introduction

The cell surface is covered with a variety of oligosaccharides which are anchored covalently to lipids and proteins. It is known that changes in the structure and population of the oligosaccharides are associated with cell development, cancer, etc., suggesting that the oligosaccharides play important roles in multi-cellular systems. Recently, structural and functional studies of proteins that are the products of genomic information have been the focus of attention. Most proteins secreted in soluble form or attached to the cell surface, however, are glycosylated.

There are three different types of biopolymers, nucleic acids, proteins and oligosaccharides. Each consists of its corresponding monomers, namely, four nucleotides, twenty amino acids, and nine monosaccharides, respectively, and the combination of the monomers yields a large number of molecules. The diverse molecules thus created interact with each other and such interactions in living organisms await to be revealed. Although nucleic acids and proteins have linear structures based on the sequential combinations, there is, in theory, a greater potential number of oligosaccharides because of the presence of stereoisomers and regioisomers in addition to the sequential isomers. This indicates that oligosaccharides can contain the largest set of information within a limited space of a given structure. Among the vast number of potential structures in this di-

A. 序

細胞表面は糖脂質、糖タンパク質として存在する多様な糖鎖により覆われている。糖鎖構造や特定糖鎖の比率が、分化、がん化等により変化することが知られており、糖鎖が多細胞生物の営みに重要であることが示唆されている。近年、遺伝情報の翻訳物質であるタンパク質の網羅的構造・機能解析(プロテオミックス)に関する研究が行われているが、細胞表面および細胞外に放出されるタンパク質のほとんどは、糖鎖による修飾を受けている。

これら生体高分子には核酸、タンパク質、糖鎖の3種がある。それらはそれぞれの構成単位の組み合わせ配列により構成されており、これにより膨大な組み合わせの数を与えている。核酸は4種のヌクレオチドの、タンパク質は20種のアミノ酸の、そして糖鎖は主に9種の単糖の組み合わせからなっている。このようにして作り出される多様な物質の相互作用の中に、生命の巧みな仕組みが隠されている。糖鎖は、核酸やタンパク質の一筆書きのできる配列の組み合わせ構造に加え、立体と位置の異性体によりさらに膨大な可能性領域を与える。言い換えると、単位体積に対して最も多くの“情報”を持ちうる特徴があ

versity space, only a limited number of structures are synthesized by the sequential processes of the glycosidases and glycosyltransferases, and such oligosaccharides are involved in important cellular functions (1,2). The glycoform associated with structural heterogeneity makes the investigation of the function of a protein difficult (3,4). Differently presented glycolipids on a cellular surface are considered to be the equivalent of the glycoform of proteins at the cellular level reflecting a developmental stage *etc.* For this reason, oligosaccharides are described as the face or fingerprint of the cell.

For the functional analysis of oligosaccharides, one of the major approaches is the genetic knockout of the oligosaccharide processing enzymes. It is, however, extremely difficult to knock out multiple genes at the same time. Inhibitors of such enzymes may be used alternatively for this purpose. When several oligosaccharides, sharing the same precursor, exist and exhibit a similar function, it is difficult to understand the individual functions by means of knockout experiments. Knocking out an enzyme that is involved in many early synthetic processes may affect downstream pathways. The inhibitors of oligosaccharide processing enzymes can be used alternatively to address these difficulties. Alkaloids from natural sources are known inhibitors of glycoenzymes (5-7). However, a set of functionally orthogonal inhibitors of such enzymes is required to address this problem.

The glycosidases and glycosyltransferases are the targets of the inhibition. The design of the inhibitors depends on the availability of structural information on the target enzyme. While the 3D structures of glycosyltransferases are becoming available, this information is still not yet sufficient for the design of inhibitors. On the other hand, a considerable amount of information on the glycosidases is available, and the design and synthesis of inhibitors are currently underway (8-10). The present review summarizes the status of the design and synthesis of inhibitors of glycosidases.

B. Background

Human oligosaccharide structures are composed of a combination of mainly nine monosaccharides. Each glycosidic linkage in an oligosaccharide is hydrolyzed by a corresponding glycosidase where some of the glycosidases may share a common substrate because of structural similarity. Further, there are α - and β -glycosidases, each of which hydrolyzes a corresponding glycosidic linkage. In general, two carboxyl groups are involved in the hydrolysis of a glycosidic bond, where it is believed that one of the carboxylates is protonated and the other is not. (Fig. 1) It has been proposed that each of the carboxyl groups has an exceptional pKa value (6.1-6.5 and 4.7-5.1). (11,12)

To further discuss the catalytic mechanisms of the glycosidases, let us focus on the β -glycosidase. A glycoside, having a chair conformation at ground state as shown in Figure 1, is

る。膨大な構造的可能性の中で、特定の糖転移酵素、糖加水分解酵素の連続的作用により形成される一部の糖鎖構造が細胞機能を担っている(1,2)。特定タンパク質に注目すると、糖鎖構造の不均一性によるグリコフォームはタンパク質の機能解析を複雑にしている(3,4)。また、糖脂質は分化や発生段階に応じて変化し“細胞レベルでのグリコフォーム”を形成していると考えられ、糖鎖が細胞の顔や指紋に例えられるゆえんである。

糖鎖機能を詳細に研究するために特定糖鎖遺伝子のノックアウトを作成することが研究の主流となっている。しかし、複数遺伝子のノックアウトは非常に困難であり、酵素阻害剤により解決される可能性がある。すなわち、同様の機能を有する複数複合糖質が存在し、それらが合成中間体を共有するとき、一つの合成経路を絶つことではその糖鎖が担う機能の究明は不可能である。糖鎖配列においてより“根本”に近い(還元末端側)糖を転移する酵素のノックアウトも考えられるが、様々な合成経路を遮断する可能性がありやはり特定糖鎖の機能に迫ることは困難と考えられる。このような問題を解決するために、特異的酵素阻害剤の利用が考えられる。糖鎖関連酵素阻害剤としては天然アルカロイドの有効性が既に多く知られている(5-7)。しかしながら、上述の用途にはさらに数多くの機能的にオルトゴナルな(阻害能が交差しない)阻害物質群が必要である。

標的となる酵素には糖転移酵素と糖加水分解酵素がある。阻害剤のデザインには目的とする酵素の構造情報が必要である。糖転移酵素については、近年結晶構造が明らかにされつつあるが、阻害物質の設計にはまだ情報不足の感が否めない。一方、糖加水分解酵素についてはかなりの情報が入手可能となっており、デザイン合成も活発に行われている(8-10)。本総説は、糖加水分解酵素に対する阻害剤のデザインについての現状について主に議論することとする。

B. 背景

人間の体には主に9つの単糖の組み合わせからなるオリゴ糖が存在し、それぞれのグリコシド結合に対して特異的な加水分解酵素が存在する。部分構造が重複する場合もあるので必ずしも糖鎖構造の数だけ存在するわけではない。それらについてさらにアノメリック位の立体(α グリコシドおよび β グリコシド)に対応するグリコシダーゼ(α グリコシダーゼおよび β グリコシダーゼ)が存在する。一般的に酵素反応部位にある2つのカルボン酸残基がグリコシド結合の加水分解反応を触媒しているとされており、また、反応機構の面から対応するグリコシル結合に従い一方のカルボン酸はプロトン化されており、もう一方は脱プロトン化されているとされている。(図1)この時、各々のカルボキシル基は例外的なpKa値(6.1~6.5、4.7~5.1)(11,12)をとることが推測されている。

さらに話をすすめるためにここで β グリコシダーゼについて反応機構の違いによる分類について説明する。基底状態において上図に示したように椅子型配座をとる糖グリコシドは、プ

Fig. 1. Schematic representation of α- and β-glycosidases where protonation of glycosidic oxygen atom by one of a pair of carboxylates is shown.

first protonated and the protonated aglycon acts as a leaving group. The carbocation formed at an anomeric center is stabilized by delocalization of a lone pair of ring oxygen to form a transition state complex. The cationic species is stabilized further by a nucleophile, the other carboxylate. When stabilization occurs through a water molecule, inversion of the anomeric configuration occurs via an S_N2 -like mechanism (Fig. 2). (13) This mechanism is supported by an interesting experiment using a β-amylase with α- and β-fluorosugars as substrates. When a glycosyl fluoride with a “correct” configuration (α) is used as a substrate, maltose with a β-anomeric configuration is formed (Fig. 3b). On the other hand, a product with an inverted anomeric configuration is produced from a “wrong” glycosyl fluoride (β) (Fig. 3c). (14)

In contrast to the mechanism where a water molecule is involved, a product is formed as a result of a competitive attack by aglycon and a water molecule. Stereochemistry, in this case, is retained (Fig. 4). (13) The initial product thus formed reaches a thermodynamic equilibrium to yield anomeric mixtures. Thus, it is expected that the distance between these carboxyl groups involved in the hydrolysis reactions is different (Fig. 1, 2, 4).

Whether or not a covalent intermediate exists for the inverting enzyme has been an issue. (15,16) The presence of a covalent intermediate was suggested based on an experiment using an isotope. (17) Furthermore, the mechanism was strongly supported by an approach using a 2-fluorinated substrate analog. (18,19) The glycosyl ester intermediate is stabilized due to the presence of an electron withdrawing substituent in a nearby anomeric center, which disturbs the formation of oxocarbenium cationic species. A synthetic non-natural suicidal substrate can be effectively used to determine an enzyme mechanism. In contrast to this mechanism, it has been shown that the nucleophilic carboxylate is not necessary for the catalytic reaction in the case

Transition state of inverting enzyme

Fig. 2. Hypothetical transition state of the inverting enzyme.

ロトネートしたアグリコンが脱離基となり、生ずるアノメリック位の炭素陽イオンを環酸素非共有電子対による電荷の非極在化により安定化した遷移状態複合体を形成する。この正電荷を帯びた中間体は、対極に存在する脱プロトン化したカルボキシル基により安定化されるが、この時、水分子を介して安定化される場合 S_N2 様の反応機構となり、生成物のアノメリック位の立体は反転する (図2)。(13) この機構はα-およびβ-フルオロ糖を用いる興味深い実験によって支持されている。すなわち、βアミラーゼの反応 (図3 a) の基質として「正しい」立体のマルトシルフルオリド (α) を用いると、β立体配置のマルトースが生成し (図3 b)、「間違った」立体のマルトシルフルオリド (β) を用いると、アノメリック位の反転を伴ったグリコシドを与える (図3 c) というものである (14)。

一方、直接カルボキシル基が安定化に寄与する場合は、アグリコンと水分子の攻撃の平衡状態から生成物が生じ、アノメリック位の立体は保持される (図4) (13)。その後、これらの初期生成物は、熱力学的平衡状態に従いアノマー混合物を与える。反応機構に関わるカルボキシル基の距離は異なっていることが予想される (図1、2、4)。

反転を伴う酵素反応において、共有結合による中間体形成が存在するか否かが長年の議論となっている (15, 16)。この反応機構は、同位元素を用いる研究から共有結合中間体の存在が示唆された (17)。また、最近、2-F 基質類似体を用いた研究から、共有結合中間体の存在が強く示唆されるにいたった (18, 19)。これは、電子吸引性置換基を C-1 位の近傍に導入することでオキソカルベニウム陽イオン中間体形成を阻害することでグリコシルエステルを安定物質として得た結果であり、非天然の合成自殺基質を用いる酵素反応機構の解明に貢献している。一方、リゾチームの点変異体を用いる研究からは求核性カルボン酸が必

Fig. 3. A mechanism of the β -amylase.

Fig. 4. Transition state complexes involved in the retention enzyme.

of lysozyme based on an experiment using point mutagenesis. (20) The reaction proceeds via an oxazolinium intermediate formed by participation of a carbonyl group of the acetamido at the C-2 position with the carbocation.

Other terminology used to describe glycosidases is exo- and endo-glycosidases (Fig. 5). A series of enzymes that hydro-

ずしも必須ではないことも示されている(20)。この場合、隣接するアセタミドカルボニル基が炭素陽イオンの安定化に寄与、オキサゾリニウム中間体を経由し、反応が進行する。

糖加水分解酵素にはもう一つの分類の方法がある。Exo-グリコシダーゼとendo-グリコシダーゼである(図5)。Exo-グリ

Fig. 5. Schematic representation of the exo- and endo-glycosidases.

lyze the terminal sugar is called an exo-glycosidase. Generally, the exo-glycosidases have a low preference towards the aglycon and have a relatively small catalytic site. An exo-glycosidase is often used for the synthesis of glycoconjugates by “swapping” the aglycon due to the characteristics described above. (21) However, it is difficult to design an inhibitor for this class of enzyme because affinity enhancement cannot generally be expected. Another class of the enzyme is the endo-glycosidase, which produces oligosaccharides from a polysaccharide or hydrolyzes the connecting linkages between glycoprotein and glycolipid. Representatives of this class are the amylases, *N*-glycanases, and glycosylceramidases. A general feature of the endo-glycanases is the presence of multiple subsites, on both sides of the glycosidic linkage to be cleaved, which are deeply involved in the substrate specificity. The importance of using these enzymes in the reconstruction of glycoproteins (22–25) and glycolipids (26) in the glycotechnology field is widely recognized.

In order to synthesize inhibitors of enzymes based on a rational design, all of the basics described above, as well as the amino acid sequences and 3D structures, if available, should be taken into consideration.

C. Design Synthesis

The design of glycosidase inhibitors is often described as a computational method in which a molecule is virtually docked into an enzyme pocket built on the coordinates obtained from the x-ray analysis of an inhibitor-enzyme complex (27–29). Indeed, computation has been successful in designing a very potent sialidase inhibitor, zanamivir, which is marketed as an anti-influenza drug (30–33). However, this method is not always successful and a number of glycosidase inhibitors have been designed based on a chemical point of view in consideration of the mechanisms of glycosidases (34). Many lead inhibitors have also been found by high-throughput screenings (35). What can we hope for the future with respect to glycosidase inhibitor design? In this chapter, we discuss the potential for design synthesis of glycosidase inhibitors in terms of the six

considerations. コシダーゼは、複合糖質糖鎖を非還元末端側から糖一残基を切断する酵素であり、アグリコンに対する特異性が一般的に弱く反応部位にあたるポケットが小さい。アグリコンに対する特異性が低いことを利用してアグリコンの“挿げ替え”による新たな糖鎖や糖グリコシドの合成に利用することができる(21)。しかし、阻害剤のデザインの際にはアグリコンによる親和性や特異性の増強も一般性を持たないため、現状のデザイン手法によれば糖残基の修飾が困難である。一方、多糖類をオリゴ糖単位で分解、あるいは、糖タンパクや糖脂質から糖鎖を根元から切り出す酵素が存在し、これらはendo-グリコシダーゼと呼ばれる。このカテゴリーには、アミラーゼや*N*-グリカナーゼ、グリコシルセラミダーゼ等がある。一般的特徴は切断されるグリコシド結合の両側に基質特異性と密接な関係のあるサブサイトが存在することである。近年、糖タンパク(22–25)や糖脂質(26)の再構築にこのような酵素が用いられ、糖鎖工学における重要性が示されている。

酵素阻害剤をデザイン合成するには、以上述べてきた事柄を考慮に入れることはもとより、可能であればターゲットである酵素のアミノ酸配列、3D構造等できる限り多くの情報を加味するべきである。

C. デザイン合成

グリコシダーゼの阻害剤のデザインあるいは設計というと、コンピューターを使って酵素の結晶構造のポケットにリガンドをドッキングさせて相互作用エネルギーを計算させる方法を思い起こさせるかもしれない(27–29)。実際、この方法で強力なシアリダーゼ阻害剤が設計・合成され、抗インフルエンザ薬(zanamivir)として販売されるにまでなっている(30–33)。しかし、グリコシダーゼ阻害剤の設計においてこのような例は稀であり、多くの場合、グリコシダーゼのメカニズムを考慮したマニュアル設計の方針がとられる(34)。また、特にリード化合物となる阻害剤の多くは、天然物からのスクリーニング(high-throughput screening)により発見されているのが現状である(35)。では、グリコシダーゼ阻害剤の設計において、新たな進展は今後あるだろうか。本章では、これまでわかってきている阻害活性発現のメカニズムを、以下のように六つに分類し、デザイン合成の今

known inhibition mechanisms, which are:

- 1) Ionic binding with a nucleophilic carboxylate
- 2) Mimicking the transition state structure
- 3) Hydrogen bonding with an acidic carboxylate
- 4) Ionic binding with a non-catalytic group
- 5) Hydrophobic binding
- 6) Induced fitting by rearrangement of the enzyme loop domain

The computational design method can be used for mechanisms 1) to 5), if the coordinates of an inhibitor-enzyme complex are known. Induced fitting, 6), however, is difficult to predict with current technologies (27-29,36). On the other hand, many unknown inhibitors may be based on this mechanism, as suggested by the unusual structures recently discovered from nature as glycosidase inhibitors (37,38).

C-1. Ionic Binding with a Nucleophilic Carboxylate

Azasugars are the most studied glycosidase inhibitors (Fig. 6). Deoxynojirimycin **1** is a ring-nitrogen analog of 1-deoxyglucose and is an inhibitor of both α - and β -glucosidases (34,39,40). Isosagomine **2**, in which the location of the nitrogen atom corresponds to the anomeric center, shows strong and specific inhibition against β -glucosidase (41,42). The differences among these inhibitors in the enzyme specificity against α - and β -glucosidases originate from the location of the nucleophilic carboxylate in the catalytic sites. In configuration-retaining glycosidases, the carboxylate of α -glucosidases resides above the β face of the pyranose ring, while that of β -glucosidases is below the α face, in order to meet the steric requirements for the formation of intermediate glycosyl-enzyme complexes (Fig. 1,6). Thus, the more efficient complexes with regard to the carboxy-

後の可能性について論じる。

- 1) 求核性触媒基であるカルボキシレートとのイオン性結合形成
- 2) 遷移状態の構造をミミック
- 3) 酸性触媒基であるカルボン酸との水素結合形成
- 4) 触媒基以外の部分でイオン性結合形成
- 5) 疎水性相互作用による結合形成
- 6) 酵素内ペプチド鎖の立体配座の再配列による誘導適合 (induced fit)

1)から5)までの要素は、ある阻害剤とグリコシダーゼの複合体の結晶構造がわかっていれば、コンピューターで再現できるかもしれない。しかし、誘導適合による認識現象は、今のプログラムでは再現が難しい(27-29,36)。逆に、未知の阻害剤はこの領域に隠れている可能性がある。最近、天然から意外な構造を持つ化合物がグリコシダーゼ阻害剤として単離されているが(37,38)、これらはこの誘導適合による認識により説明されるかもしれない。

C-1. 求核性触媒基であるカルボキシレートとのイオン性結合形成

グリコシダーゼ阻害剤として最も研究されているのは、アザ糖類であろう(図6)。例えば、デオキシノジリマイシン **1** は α および β グルコシダーゼの阻害剤である(34,39,40)。一方、窒素の位置がアノマー炭素に相当する位置にずれたイソファゴミン **2** は、著しい β グルコシダーゼ選択的阻害活性を示す(41,42)。この酵素特異性の違いは、 α 、 β 両グルコシダーゼにおける求核性触媒基の位置の違いに起因するものと解釈できる。すなわち、立体保持型のグルコシダーゼにおいては中間体である糖-酵素複合体を形成するために、 α グルコシダーゼではピラノース環の β 面の上に求核性のカルボキシレートイオンがある。一方、 β グルコシダーゼは全く反対にピラノース環の α 面の下にカルボキシレートイオンを持つ(図1、6)。これらのカルボキシレートイオンと効率良くイオン対を作るには、 α グルコシダーゼと **1**、

Fig. 6. Structure and inhibition mechanisms of azasugars (1-3) and their inhibitory activities against glucosidases in IC_{50} (μ M).

late-ammonium ion interaction are formed between α -glucosidase and **1**, and between β -glucosidase and **2**. This mechanism is strongly supported by the strong inhibitory activities against both α - and β -glucosidases by the piperazine derivative **3** synthesized by Bols and coworkers (43).

C-2. Mimicking the Transition State Structure

Enzymes promote reactions by lowering the activation energy, which is the result of the strong binding to the transition state structure among the other structures during the reaction course, so that the transition state binding governs the substrate-specificity. The transition state structure in the hydrolysis of glycosides is believed to be the oxocarbenium ion intermediate **4** with a flat shape (Fig. 2,7). This means that mimicking this planar structure would lead to a strong inhibitor of a glycosidase. The planar structure of gluconolactone **5**, a classic glucosidase inhibitor, is thought to mimic the transition state structure (34).

Bicyclic compound **6**, which is comprised of deoxynojirimycin and tetrazole rings, has a half-chair structure that mimics the transition state structure. Indeed, **6** exhibited a very specific inhibition against a β -glucosidase among the glycosidases tested in a previous study, and a good correlation between its inhibitory activity against each glycosidase and the activation energy exhibited by each substrate, thereby supporting the inhibition mechanism by mimicking the transition state structure (34).

Amidine **7**, amidrazone **8**, and amidoxime **9** were designed and synthesized as oxocarbenium ion analogs and are good inhibitors of β -glucosidases (Fig. 7) (44). It was pointed out that these analogs do not perfectly mimic the transition state

β グルコシダーゼと **2** という組み合わせが良いと考えられる。さらに、Bols らにより合成されたピペラジン誘導体 **3** は α 、 β 両グルコシダーゼに対して同等の強い阻害活性を持つことも上の説を強く支持している(43)。

C-2. 遷移状態の構造をミミック

酵素は、ある反応の遷移状態の構造により強く結合することにより、活性化エネルギーを低下させ反応を促進する。この遷移状態構造の認識は厳密であり、基質特異性は主にこの認識に由来する。糖加水分解の遷移状態はオキソカルベニウムイオン中間体 **4** に近い平面的な構造を持つと考えられる(図2、7)。したがって、この平面構造を模倣できれば、非常に強力な阻害剤を作ることができると考えられる。グルコノラクトン **5** のグルコシダーゼ阻害活性の原因は、この遷移状態の構造をミミックしているためとする説もある(34)。

テトラゾールとデオキシノジリマイシンを融合したような双環化合物 **6** は半椅子型構造を持ち、遷移状態疑似化合物となり得ると考えられる。実際、この化合物は非常に特異的な阻害活性を示し、各種グリコシダーゼに対する阻害活性はそれぞれの基質の加水分解における活性化エネルギーと良い相関が見られ、この化合物が遷移状態の構造を模倣している可能性を強く支持した(34)。

オキソカルベニウムイオンアナログとしては、この他、グルコノアミジン **7**、アミドラゾン **8**、アミドキシム **9** などが設計・合成され、 β グルコシダーゼの良い阻害剤になることが示されている(図7)(44)。これら一連の化合物は阻害活性の酵素特

Fig. 7. Structure of oxocarbenium ion analogs (**5**–**9**) and their inhibitory activities against glucosidases in K_i (μ M).

structure, because the enzyme specificities exhibited by these compounds are too low to be transition state analogs (34). However, it is also apparent that many planar analogs of glycopyranosides, like glycals, are glycosidase inhibitors. For example, the 2,3-ene derivative **11** of sialic acid(**10**) is a good inhibitor of sialidases (45).

Another approach to mimic the transition state structure is to construct a 5-membered ring as a basic structure. Pyrrolidine **12** was designed and synthesized as a glycosidase inhibitor mimicking the transition state structure and its positive charge (39,40). These inhibitors generally show potent inhibitory activity against glycosidases, despite their low specificity. Recently it was shown that modification of the side chain of pyrrolidine ring including changing stereochemistry enhances selectivity and inhibitory activity (Fig. 8). Comparison of compound **12** and **13**, where the orientation of the side chain is different, revealed that the former is a superior inhibitor against both α - and β -glucosidases (46). Elongation of the side chain (**15,16**) resulted in inhibitory activity weakening only in α -glucosidase. This suggests that bulk substitution at the aglycon part may produce a specific inhibitor of β -glucosidase. In fact, compound with acetamide group (**17**) is highly specific toward β -glucosidase. Interestingly compound

異性が低く、遷移状態の構造をうまく模倣していない可能性が指摘されている(34)。しかし、平面的な構造を設計すると、グリコシダーゼ阻害剤として成功する場合は多いのは事実である。これは、グリカル類がグリコシダーゼ阻害剤となる場合が多いことから明らかである。シアル酸(**10**)の2, 3位を二重結合にした化合物 **11** も、シアリダーゼ阻害剤となる(45)。

遷移状態構造をミミックするもう一つのアプローチは、五員環構造を構築することである。ピロリジン化合物 **12** は半イス型の遷移状態の形および電荷を模倣する阻害剤として開発された(39,40)。これらの化合物はグリコシダーゼの強い阻害剤となるが、一般的に特異性が乏しい。しかし、側鎖の立体配置、修飾等により特異性と阻害能の増強が可能であることが示されている(図8)。例えば、対応する側鎖部分の立体配置の異なる化合物 **12** と **13** では、前者において α -および β -グルコシダーゼ両者に対し阻害活性の増強が見られる(46)。さらに、炭素鎖の伸長を行う(**15, 16**)と、 α -グルコシダーゼに対する阻害能のみが減弱する。このことは、アグリコン部分に嵩高い置換基を導入すれば β -グルコシダーゼに対して選択性の高い酵素阻害剤になることを示唆しているが、事実、側鎖末端にアセタミド基を導入する(**17**)と β -グルコシダーゼ選択的な阻害剤となる。興味深いことに、化合物 **17** はヘキソサミニダーゼに対し極めて弱い阻害能

	13	12	14
α -glucosidase, yeast	80	0.73	380
β -glucosidase, almonds	52	1.7	poor
β -N-acetylhexosaminidase, human placenta p	-	-	0.08

	15	16	17
α -glucosidase, yeast	330	28	poor
β -glucosidase, almonds	50	2.6	2.2
β -N-acetylhexosaminidase, human placenta p	-	-	poor

K_i (μ M) values poor: IC₅₀ > 0.5 mM; -: not determined

Fig. 8. Relationship between structure and inhibitory activity for pyrrolidine compounds (12–17).

Fig. 9. Structures of azole-type glycosidase inhibitors (6, 19–21) and their inhibitory activities against β -glucosidase from almonds in K_i (μM).

17 is a poor inhibitor of β -N-acetylhexosaminidase but compound 14 which carries a shorter side chain is a specific inhibitor against the enzyme (47). Aminocyclopentitols such as compound 18 are similar to pyrrolidines with respect to their inhibitory mechanisms (48).

C-3. Hydrogen Bonding with an Acidic Carboxylate

Triazole 19 and imidazole 20 are bicyclic compounds similar to compound 6 (Fig. 9). These compounds require the exo-pyranoid nitrogen atom adjacent to the anomeric center for their inhibitory activity, as suggested by the absence of an inhibitory effect of the exo-methylene type triazole 21 against β -glucosidases. Thus, an inhibition mechanism where the acid carboxylate and the nucleophilic carboxylate synergistically operate has been proposed (Fig. 10) (34). In this model, the hydrogen bonding between the carboxylate and the exo-pyranoid nitrogen atom causes an increase in positive charge at the anomeric center, promoting the ion-ion interaction with the nucleophilic carboxylate. This model requires a coplanar arrangement of the pyranose ring and the acid carboxylate and it was confirmed that the all-available structures of β -glycosidases corresponded to this regime (34). It was also suggested that lactone 5 and amidine 7 are inhibitors, whose inhibition mechanisms are explainable by cooperation between the two carboxylates (Fig.10).

しか持たないが、炭素鎖の短い14は本酵素に特異的となる(47)。化合物18に代表される、アミノサイクロペンチール類もこのカテゴリーに属するグリコシダーゼ阻害剤といえる(48)。

C-3. 酸性触媒基であるカルボン酸との水素結合形成

トリアゾール19、イミダゾール20などはテトラゾール6と同様の化合物である(図9)。しかし、エキソメチレン型トリアゾール21は β グルコシダーゼに対して阻害活性がないことからエキソメチレン部分に窒素原子が必須であることがわかる。このことから、酸触媒としてのカルボキシレートと求核触媒としてのカルボキシレートが共同して阻害に関わる図10のような機構が示唆されている(34)。この場合、酸触媒はピラノース環とはほぼ同一平面になければならないが、いくつかのグリコシダーゼの結晶構造からグリコシダーゼ全般に共通する要素であることが指摘されている(34)。ラクトン5やアミジン7などもこの酸触媒との水素結合と、求核性触媒によるイオン性結合の共同作用により阻害が発現している可能性も指摘されている(図10)。

Fig.10. Proposed mechanism involving a hydrogen bonding network among carboxylates and the inhibitor.

C-4. Ionic Binding with a Non-Catalytic Group

Zanamivir **22** is a rationally designed sialidase inhibitor, which has recently been placed on the market. This drug was designed by modification of the 2,3-ene analog **11**, which has moderate inhibitory activity and specificity against sialidase. Docking of **11** into the virtual sialidase pocket built on the sialic acid-sialidase complex coordinates disclosed the existence of polar groups, Glu119 and Glu227, around 4-OH of **11** with an enough room for their counter ion, a guanidino group. This room was found only in influenza sialidases. Thus **22**, the 4-guanidino derivative of **11**, was expected to show strong and specific inhibition against influenza sialidase, and this indeed was found to be the case (49).

A novel type of glucosidase inhibitor, salacinol **23**, was recently isolated and synthesized (50–54). Compound **23** has an interesting spirocyclic structure comprised of an intramolecular salt between a tetrahydrothiophene sulfonium ion and a sulfate tethered with an erythritol chain. The inhibition mechanisms of **23** have not been clarified. However, it is interesting to note that a similar tetrahydrothiophene sulfonium ion compound **24**, designed and synthesized as a transition state analog inhibitor, shows weak glucosidase inhibition (55). It was proposed that the sulfonium ion interacted with the nucleophilic carboxylate in the catalytic site, as was suggested for the inhibitory mechanism of pyrrolidine **12**, since the methyl sulfonium ion **26** showed good inhibition (56) while 1,4-epithioarabinitol **25** did not.

Salacinol **23** has greater inhibitory activity and specificity against α -glucosidases than **26**. Hence, the sulfate group is believed to be important for the increased activity and specificity of **23**. This is also supported by a docking of **23** into the binding site of glucoamylase, whose coordinates were taken from

C-4. 触媒基以外の部分でイオン性結合形成

抗インフルエンザ薬として市販されている zanamivir **22** は、合理的ドラッグデザインにより誕生した。先に示した 2, 3-不飽和シアル酸 **11** は活性や特異性が医薬品として用いるにはあまり優れたものではなかった。シアル酸とシアリダーゼの複合体の結晶構造からシアル酸を除いて、各種の阻害剤のモデルをドッキングさせることによりシアル酸の 4 位に強い塩基性を持つグアニジノ基をつけると (**22**)、Glu119 と Glu227 の両方とイオン結合をして強力な阻害活性を示すことが予想された。この予想は的中し、非常に強力でインフルエンザシアリダーゼに特異的な阻害剤が誕生した(49)。

最近、新しいタイプのグルコシダーゼ阻害剤としてサラシノール **23** が天然から単離され合成も行われた(50–54)。この化合物 **23** は五員環スルホニウムイオンをベースに分子内で硫酸イオンと塩を形成し、スピロ環状になっているという興味深い構造を持つ。この化合物の阻害機構はまだ明らかになっていない。しかし、五員環スルホニウムイオン構造を持つ化合物 **24** がデザイン合成され、弱いながらグルコシダーゼ阻害活性を持つことが報告されている(55)。また最近、1, 4-エピチオアラビニール **25** はグルコシダーゼ阻害活性を持たないが、相当するメチルスルホニウムイオン **26** がグルコシダーゼ阻害活性を持つことも明らかにされた(56)。すなわち、スルホニウムイオン部分が五員環ピロリジン **12** と同様にカルボキシレートとイオン結合して阻害活性を発揮していることが推定される。

この五員環スルホニウムイオン構造をベースに適当なリンカーを介して硫酸基を導入するとサラシノール **23** になり、これは阻害活性、特異性ともに顕著に向上する。つまり、この硫酸基がもう一つの鍵官能基となり、阻害活性に寄与していることが想像される。実際、グルコアミラーゼの結晶構造(57)にサラシ

the crystal structure of an acarbose-glucosylase complex (57), indicating close contact between the sulfonium and sulfate ions with Glu400 and Arg305, respectively. α -Amylase (58) and β -glucosidase from *Bacillus* (59) also contain arginine in their sugar-binding sites, but no such residues were found in other glycosidases in the protein database. The specificity of **23** towards certain glucosidases may be derived from the strong noncovalent binding of its sulfate group to such arginine residues in the binding sites.

The above two glucosidase inhibitors, zanamivir **22** and salacinal **23**, represent good examples of the notion that an extra-functional group added to a non-specific inhibitor causes enhancement in activity and specificity. This idea will be increasingly applied to the design synthesis of glucosidase inhibitors, as coordination data for inhibitor-glycosidase complexes accumulate and computational chemistry improves.

C-5. Hydrophobic Interaction

The sugar-binding pocket of glycosidases is usually made up of several hydrophobic groups, such as tryptophan and tyrosine, surrounding a ligand sugar. Accordingly, it is a reputed modification to put a hydrophobic group as an aglycon analog into a catalytic group targeted glycon analogs like azasugars. The modification of aminocyclopentitol (**27**) (60), calystegine B₂ (**29**) (61), and tetrahydroimidazopyridine (**20**) (62) by introducing a benzene ring into an appropriate position (compounds **28**, **30**, **31**) increased the glucosidase inhibition activity by 40- to 100-fold. The fact that the introduction of *N*-phenyl cyclicisourea(**32**) into **18** caused a 50-fold increase in α -glucosidase inhibition (63) should be, at least in part, due to the hydrophobic effects.

The hydrophobic groups in the glycon-binding sites are potential targets of glycosidase inhibitors, though in many cases, as in azasugars, the catalytic groups have been targeted for ionic binding. Carbafructose (**33**) (64) and 5-thiofructose (**34**) (65) are

ノールをドッキングしてみると、スルホニウムイオンがカルボキシレート Glu400 と、硫酸イオンがアルギニン Arg305 と近接する構造が可能であった。結晶構造が入手可能なものの中で、グリコシダーゼのポケット内にアルギニンがあるのはこのグルコミラーゼと α -アミラーゼ(58)および *Bacillus* 由来の β グリコシダーゼ(59)だけであり、他のグリコシダーゼの基質認識部位にはアルギニンは確認されなかった。このことから、サラシノール **23** の特異性は酵素ポケット内に硫酸基と結合できるアルギニンがあるかどうかによって生じているものと思われる。

Zanamivir **22** とサラシノール **23** に共通していることは、母体となる非特異的な阻害剤に新たに官能基を加えると阻害活性と特異性が上昇するということである。今後は、結晶構造解析データの蓄積とコンピューター化学の進展に伴い、上記アイデアに従ったデザイン合成が盛んになるであろう。

C-5. 疎水性相互作用の利用

グリコシダーゼ類の糖認識部位はトリプトファンやチロシンなどの疎水性基で囲まれている場合が多い。そこで、グリコシダーゼ部位はアザ糖など触媒基をターゲットとしたもので構築し、アグリコン部分に疎水性基を導入してより強いグリコシダーゼ阻害剤を作る手法は常套的に行われている。例えば、アミノサイクロペンチトール **27**(60)、カリスティジン B₂ **29**(61)、テトラヒドロイミダゾピリジン **20**(62)などでは、ベンゼン環を適切な位置に導入することにより (**28**, **30**, **31**)、グリコシダーゼ阻害活性を 40 倍から 100 倍も向上させることに成功している。化合物 **18** に *N*-フェニル環状イソ尿素を導入すると (**32**)、 α グリコシダーゼに対する活性が 50 倍も上昇するの、少なくとも一部は疎水性相互作用に起因すると考えられる(63)。

グリコシダーゼ部位には触媒基があるので、アザ糖などでイオン性結合による阻害活性を狙う場合が多い。しかし、グリコシダーゼ部位の疎水性基も充分ターゲットとなりうる。例えば、フコースのカルバ糖アナログ **33** (64)および環硫黄原子アナログ **34** (65)は

K_i (μ M) bovine kidney
 α -fucosidase:
27 R = H: 15
28 R = CH₂CH₂Ph: 0.4

K_i (nM) almonds
 β -glucosidase:
20 R = H: 100
31 R = Ph: 1.2

K_i (μ M) bovine liver
 β -glucosidase:
29 R = Me: 300
30 R = Ph: 2.5

32: IC₅₀ 7.6 nM (yeast α -glucosidase)

K_i (μ M) bovine α -fucosidase:
33 X = CH₂, Y = OH: 43 (kidney)
34 X = S, Y = OH: 42 (epididymis)
35 X = S, Y = S-(*p*-nitrophenyl): 3.3 (epididymis)

36: IC₅₀ 2.0 μ M (α -glucosidase)

37 R = H; IC₅₀ 6300 nM (influenza A sialidase)
38 R = (CH₃CH₂)₂CH; IC₅₀ 1 nM

analogues in which the ring oxygen atom of fucose is replaced by less polar groups, and these analogues have shown good fucosidase inhibition. Replacement of the ring oxygen atom with a sulfur atom causes an approximate 1 kcal/mol gain in the binding free energy (66). Further addition of a hydrophobic group into **34** at the aglycon site (**35**) caused a 10-fold increase in inhibitory activity (67). The hydrophobic contact between the ring sulfur and Trp136 can be viewed in the crystal structure of the 5-thioglucose-xylose isomerase complex (68).

Tetrachlorophthalimide **36**, a strong α -glucosidase inhibitor which appeared in the pharmacological studies of thalidomide, has an interesting structure (69). It is electronically neutral and consists mainly of hydrophobic parts, except for the imide-nitrogen and carbonyl-oxygen atoms. Though it is not reminiscent of pyranose, the tetrachlorophthalimide portion may mimic the glycon and the pendant benzene the aglycon.

Influenza A sialidase recognizes the 8-OH and 9-OH of sialic acid **10** by bidentate hydrogen bonding with Glu276. Thus, this area of the binding pocket is usually considered to be a polar site. However, Kim and coworkers intuitively paid attention to the fact that C8 of the glycerol side chain was subjected to hydrophobic contacts with the hydrocarbon chain of Arg224 (45). Thus, they introduced alkyl chains, in place of the glycerol side chain of sialic acid, into a shikimic acid-analog (**37**) of the oxocarbenium ion intermediate in sialic acid hydrolysis, and studied their sialidase inhibition activities. They found lengthening the alkyl chain up to three methylenes simply increased the inhibition activity, and that the 3-pentyl compound **38** showed the best inhibition among the many alkyl chains tested, including branched chains. The crystal structure of the **38**-sialidase complex indicated that Glu276 was forced outward and that the hydrophobic hydrocarbon chains of Glu276, Arg224, Ala246, and Ile222 were in close contact with the 3-pentyl group. These results represent an example of induced fitting, which will be discussed in the following section.

C-6. Induced Fitting by Rearrangement of the Enzyme Loop Domain

As described in the recognition event of sialic acid analog **38** by a sialidase, receptor proteins are usually capable of recognizing a wider range of ligands than expected from the crystal structure because of the induced fitting with an alterna-

フコースの環酸素原子を極性の低い原子に置換したアナログで、いずれもフコシダーゼの良い阻害剤になる。環硫黄原子に置換することによる結合エネルギーの増加は約 1 kcal/mol と見積もられている(66)。この環硫黄原子アナログのアグリコン部位に疎水性基をさらに付ける (**35**) と阻害活性が 10 倍程向上する(67)。キシロースイソメラーゼと 5 チオグルコースの複合体の結晶構造(67)では、疎水性基の Trp136 と環硫黄原子が近接しており、疎水性相互作用の存在が示唆される。

サリドマイドの薬理学的研究の結果生まれた強力なグリコシダーゼ阻害剤である、テトラクロロフタルイミド **36** は非常に興味深い構造を持っている(69)。中性であり、イミド部位以外はほとんど疎水性と思われる。糖の面影はないが、テトラクロロフタルイミド部分がグリコンをベンゼン環がアグリコン部位をミミックしていると考えられる。

インフルエンザAウイルスのシアリダーゼはシアル酸の 8, 9 位の水酸基を Glu276 による水素結合で認識している。一方 Kim らは、シアル酸 **10** のグリセロール側鎖の C8 がシアリダーゼの Arg224 の炭化水素鎖により疎水的に認識されていることに着目した(45)。彼らは、シアル酸の加水分解におけるオキソカルベニウムイオンのミミックであるシキミ酸アナログ **37** を骨格として、グリセロール側鎖に相当する位置に各種のアルキル鎖を導入し、そのシアリダーゼ阻害活性を調べた。その結果、メチレンが 3 個までは単純に活性が増加し、分岐鎖も種々検討した結果、3-ペンチル **38** により最大の阻害活性を示した。この化合物とシアリダーゼの複合体の結晶構造から、Glu276 はポケットの外側に押しやられ、その炭化水素鎖がこの化合物のペンチル鎖と接触しているほか、Arg224、Ala246、Ile222 の炭化水素鎖もペンチル鎖を疎水的に認識していることがわかった。この結果は、次に述べる酵素の誘導適合による阻害剤の認識の一例ともなる。

C-6. 酵素内ペプチド鎖の立体配座の再配列による誘導適合

シアル酸アナログ **38** のシアリダーゼによる認識の際に、シアリダーゼの一部のペプチド鎖の立体構造が元の状態から変化したように、レセプタータンパク質は誘導適合により広範なりガンドを認識しうる。この誘導適合は、最適なりガンドの予測

tive conformation of peptide loops. Induced fitting makes it difficult to design the most optimized inhibitors, but widens the potential of the inhibitor study. Tetrachlorophthalimide **36**, described above, may be such an inhibitor.

An example of induced fitting can be seen in the recognition event of a glycogen phosphorylase, though it is not a glycosidase (70). High-throughput screening disclosed compound **40**, which bound to the allosteric site 1000 times more strongly than the regular substrate glucose-6-phosphate **39**. The crystal structure of the complex showed several hydrophobic interactions, including one with the chlorophenyl ring of compound **40** sandwiched by Phe196 and Val45'. This sandwich structure was found to be the result of an induced fitting by shifts in the Phe196 side-chain atoms of up to 2.9 Å and Val45' side-chain atoms of 1.2 Å compared with those in the complex with glucose-6-phosphate.

The structure of compound **40** is totally different from that of glucose-6-phosphate, and this kind of unusual inhibitor could only be discovered by high-throughput screening among the currently available methods. However, we may be able to create novel inhibitors based on this type of unusual structure from those serendipitously discovered. For example compound **41**, isolated from Umbelliferae (a plant family) in Mongolia, is a strong inhibitor of α -glucosidase (37). Compound **42** is also a strong inhibitor of α -glucosidase and was isolated from a marine sponge in Japan (38). Since the structures of these compounds do not bear the slightest resemblance to glucose derivatives, induced fitting via hydrophobic interactions would be the only plausible explanation for the mechanisms of inhibition. The sulfate groups in **42** may play the same role as those in the proposed mechanism of inhibition for salacinol **23**.

をより困難なものにしていると同時に、阻害剤研究の可能性を広げている。先に述べたテトラクロロフタルイミド化合物 **36** もそういう阻害剤の一つかもしれない。

その一つの例を、糖加水分解酵素ではないが、グリコーゲンホスホリラーゼに見ることができる(70)。通常、グルコース6リン酸 **39** などを結合するアロステリック結合部位に、化合物 **40** が1000倍近く強く結合することがハイスループットスクリーニングによりわかった。複合体の結晶構造解析から、化合物 **40** のクロロフェニルリングが酵素のPhe196とVal45'にはさまれて疎水性相互作用しているほか、多くの疎水性基により認識されていることがわかった。さらに、グルコース6リン酸との複合体と比べると、Phe196側鎖が2.9Å、Val45'側鎖が1.2Åほど移動していることがわかり、化合物 **40** は誘導適合により認識されていることがわかっている。

化合物 **40** はグルコース6リン酸とは似ても似つかぬ構造をしており、こういう阻害剤を発見する有力な手段は今でもハイスループットスクリーニング以外にはないだろう。しかし、こういう意外な構造をヒントにしてさらに新たな阻害剤を構築することは可能だろう。次に最近見つかった、意外な構造をもつグリコシダーゼ阻害剤を紹介する。化合物 **41** はモンゴルのセリ科植物から単離された化合物で α グルコシダーゼの強い阻害剤となる(37)。化合物 **42** は八丈島沖の海綿体から単離された化合物でやはり α グルコシダーゼの阻害剤である(38)。これらの化合物は、糖類とは似ても似つかぬ構造を持っており、やはり誘導適合により疎水性相互作用を中心に認識されている可能性がある。化合物 **42** は硫酸基を持っており、サラシノール **23** と同様、硫酸基の阻害活性との関連の解明が待たれる。

39

40

41: IC₅₀ 9.3 μ M (yeast α -glucosidase) 42: IC₅₀ 1.3 μ M (yeast α -glucosidase)

D. Synthesis of Inhibitor Library of Glyco-Related Enzymes

Due to the difficult problems associated with the rational design and synthesis of glyco-related enzymes such as glycosidases as discussed above, it is believed that a combinatorial chemistry approach could effectively be applied in conjunction with the results obtained from natural products and rationally designed compounds. The combinatorial library approach and high throughput screening have been widely used in the pharmaceutical chemistry field for the discovery of active agents (71). There have been a few reports regarding the library synthesis of inhibitors of glycosidases and glycosyltransferases that are involved in oligosaccharide processing pathways. A general characteristic of carbohydrates is the presence of multiple hydroxyl groups, and this is apparently used in the enzyme-substrate recognition event. The synthetic approach therefore inevitably requires a synthetic method to efficiently obtain suitable synthons. Furthermore, it was shown that mimics of the glycon portion have low specificity against various enzymes, however, it still may be possible to create a library of functionally orthogonal inhibitors of this class of enzymes.

D-1. Thioglycoside Library

Although not discussed in the design synthesis section, thioglycosides are generally resistant to acidic and enzymatic hydrolysis. The structure of a thioglycoside closely resembles that of the natural substrate. Thus, this class of molecule inhibits glycosidases (72). This characteristic of thioglycosides makes them suitable for crystal structural elucidation. In fact, thioglycosides are used to determine the bound structure of enzyme-substrate complexes (73-76).

Application of this concept to combinatorial chemistry where the glycosidic oxygen was replaced with a sulfur atom and the cyclic aglycons with variables to mimic the next sugar and to enhance binding affinity with the targeted enzyme has been reported (77). (Fig. 11) The library synthesis was achieved relying on the solution-phase parallel synthetic approach where

D. 糖加水分解酵素の阻害剤ライブラリーの合成

上述のように、グリコシダーゼをはじめとする糖関連酵素の効果的なデザイン合成には困難な問題点が多く残されている。従って、天然物やデザイン合成によって得られた結果に基づき、これに不特定要素をコンビケムの手法により加えるアプローチが有効と考えられる。コンビナトリアルライブラリー合成法はハイスループットスクリーニング法と合わせて迅速に活性の高い化合物を見出す有効な手段として医薬品開発分野において近年注目されているが(71)、糖鎖の生合成に関与する糖加水分解酵素及び糖転移酵素の阻害剤のライブラリー合成の報告はまだ少ない。糖は一般的性質として水酸基を多く持ち、酵素の認識にそれらの官能基が重要な役割を果たすため、阻害剤のライブラリー構築には原則的には多官能基を有する合成中間体の効率的な合成法が必須である。さらに、グリコン部分のミミックのみでは選択性に難点があったが、これを克服し機能的にオルトゴナルな酵素阻害剤ライブラリーを導く可能性も秘めている。

D-1. チオグリコシドライブラリー

デザイン合成としては述べなかったが、チオグリコシド類は酸加水分解および酵素加水分解に対して一般的に耐性を示す。構造は天然基質に酷似しており、従って、糖類のチオグリコシドは対応する加水分解酵素の阻害剤となる(72)。また、酵素基質複合体の結合様式をX線結晶回折により詳細に知るためには、糖をできる限り修飾しないことが望まれる。阻害剤でもあるチオグリコシドはこの目的に最適であり、いくつかの酵素—基質複合体の立体構造が明らかにされ、重要な情報を与えている(73-76)。

このコンセプトを基盤とするアプローチとして、グリコシド結合の酸素を硫黄に置換し、酵素との親和性を高める目的で糖をミミックするような環状化合物をアグリコンとして結合させた擬似糖鎖ライブラリーの合成が報告された(77)。(図11) ライブラリー合成は液相中パラレル合成により行い、副生成物及び

Fig. 11. A possible example of inhibitory affinity enhancement.

Scheme 1

a lauryl ester was used as the protecting group to ease the isolation of products by solid-phase extraction. The Michael reaction of compound **43** prepared from galactose with 5–7 membered α , β -unsaturated ketones furnished a series of condensates. Subsequent reduction of the ketone to an alcohol or reductive amination with a series of amino acids yielded a library with 30 compounds. (Scheme 1) In the synthetic design, cyclic structures were chosen as the Michael acceptor to mimic a disaccharide. Furthermore, the functional groups with the potential hydrogen bond donor or acceptor and either the hydrophobic or aromatic group were introduced into the structure. The library compounds were tested as potential inhibitors of β -galactosidase (*E. coli*, $K_m = 0.12$ mM against methyl β -D-galactopyranoside (78)), and compound **44a** was found to have 10-fold stronger inhibition (with $K_i = 1.7$ μM) towards a related compound, cyclohexyl 1-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranoside. Compound **44b**, a diastereomer of **44a**, was also found to show similar inhibitory activity but the other set of diastereomers are weak inhibitors. It is still difficult to determine the bound conformation of the series of compounds, although it may be clarified when the crystal structure becomes available.

D-2. Library Construction Targeted at the Nucleophilic Carboxylate

Synthesis of a library where azasugars, known as a class of inhibitors of glycosidases, are used as the core unit is addressed. In order to enhance the affinity of an azasugar to a target enzyme, the synthesis of an intermediate capable of modification at the “anomeric” position and some transformation reactions of the compound aiming at a library synthesis have been reported. (79) The imine **45** ($K_i = 6.9$ nM: α -fucosidase from bovine epididymis) (80) was reacted with a cyanide and the subsequent reduction yielded compound **46**, the “anomeric” position of which can be modified. (Scheme 2) Compound **48**, which carries an aldehyde group, was also synthesized from **47** ($K_i = 5.6$ nM: α -fucosidase from bovine epididymis). Compounds **49a–c** obtained by the reactions between **46** and a series of amino acids were examined as potential inhibitors of α -fucosidase. It was revealed that **48** was the most potent inhibitor among these

試薬を除去するため、精製を保護基のラウリル基を用いた C18 シリカゲルによる固相抽出により簡便に行った。ガラクトースから調製した **43** に 5 種類の 5–7 員環 α , β -不飽和ケトンの Michael 反応を行った後、ケトンのアルコールへの還元、もしくは還元的アミノ化反応により 5 種類のアミノ酸と縮合させ、30 種類の化合物を含むライブラリーを合成した。(Scheme 1) Michael アクセプターとしては二糖をミミックするよう環状化合物を用い、さらに水素結合ドナー、アクセプター、また、疎水性基や芳香環を導入した。合成したライブラリーの β -ガラクトシダーゼ (*E. coli*, $K_m = 0.12$ mM methyl β -D-galactopyranoside (78)) に対する阻害活性試験を行い、比較に用いた cyclohexyl 1-thio- β -D-galactopyranoside に対して阻害定数が約 10 倍の阻害能 ($K_i = 1.7$ μM) を有する化合物 (**44a**) を見出すことに成功した。化合物 (**44a**) のジアステレオマーである **44b** も同程度の阻害能を有することが分かったが、残る 1 対のジアステレオマー混合物の阻害活性は弱く、これら化合物の立体配座と阻害活性の間の相関関係の解釈が困難であるが今後の結晶解析に興味をもたれる。

D-2. 求核性触媒基であるカルボキシレートを標的とするライブラリーの構築

糖加水分解酵素の代表的な阻害剤であるアザ糖を母核とした、ライブラリー合成の試みも最近行われている。酵素の活性部位との親和性を増すような官能基を導入し阻害活性は改善する目的で、フコ型アザ糖の窒素とアノマー位の修飾が可能な中間体の合成と、そのライブラリー合成への応用が検討された (79)。FDP アルドラーゼを用いて合成したフコ型アザ糖 **45** [$K_i = 6.9$ nM: α -fucosidase (bovine epididymis) 由来] (80) にシアンを反応させた後還元し、アノマー位の修飾可能な合成中間体 **46** を、**47** [$K_i = 5.6$ nM: α -fucosidase (bovine epididymis)] から 3 行程で環窒素の修飾可能なアルデヒド体 **48** を合成した。(Scheme 2) **45** をアミノ酸とカップリングさせた化合物 **49a–c** と合成中間体の阻害活性を調べたところ、**48** が最も強い阻害剤 [$K_i = 8.0$ nM : α -

three, with K_i values of 8.0 nM and 1.5 nM for α -fucosidase from bovine epididymis and from *Arthrobacter oxydans*, respectively, while **46** was a poor inhibitor.

The pseudodisaccharide **50** exhibits approximately a 60-fold stronger inhibitory activity than isofagomine (**2**) against glucoamylase (81). This affinity enhancement is believed to be due to binding between the enzyme subsite and the aglycon. A racemic form of **3** was thus chosen as the core unit of a library design where a peptide library was created at one of the amino functions to mimic the aglycon (82,83) (Scheme 3). Serine, threonine, and hydroxyproline were selected because they carry hydroxyl functionality, which is the characteristic functional group in carbohydrates. Amino acids such as alanine and phenylalanine that do not possess hydrophilic functions were also used. The library consists of 125 compounds (**51**) and was created by the split and mix method where an acetyl group attached to "anomeric" of compound **3** was used as a linker between **3** and

fucosidase (bovine epididymis)], $K_i = 1.5 \text{ nM}$: α -1,2-fucosidase (*Arthrobacter oxydans* F1)] であり良好な阻害能が確認されたが、構造的に類似の **46** は阻害能が減弱した。

疑似二糖 **50** は isofagomine (**2**) に比べグルコアミラーゼに対して約 60 倍の阻害活性を有するが、これはアグリコン部位に対するサブサイトとの結合による相乗効果と考えられる(81)。そこでラセミ体ではあるが大量合成が可能であり β -グルコシダーゼの阻害剤である化合物 (**3**) を母核とし、アミノ基の 1 つをアグリコンミミックになるようなペプチドで修飾したライブラリーをデザインし合成した(82, 83)。糖の代表的官能基である水酸基を有するアミノ酸(セリン、スレオニン、ヒドロキシプロリン)と極性基を持たないアミノ酸(アラニン、フェニルアラニン)を用いてトリペプチドを固相スピリットミックス法で合成し、酢酸リンカーを介して **3** のアノマー対応位と結合させ 125 化合物 (**51**)

Scheme 2

Scheme 3

Scheme 4

the peptides. The inhibition experiments of the library against β -glycosides revealed that a compound carrying three hydroxyl prolines was the strongest inhibitor among the library with decreased inhibition constant (K_i = 40 μ M) where the specificity enhancement was observed.

D-3. A Library of Five-Membered Azasugars

There are two types of induced fitting for enzyme-substrate binding. One of the categories of induced fitting is a structural change in the enzyme's binding site and the other is the case in which the structural change is induced in the substrate (or inhibitor). Five-membered azasugars may not only mimic the half-chair conformation in the transition state of a hydrolysis reaction but also mimic various sugars because of their flexibility in the ring structure. In other words, one of the conformers of such azasugar may be 'chosen' by a given enzyme by induced fitting.

Based on these considerations, a library of five-membered azasugars was synthesized using compound **52** (84) as a core unit (85). The introduction of a large alkyl group on the ring nitrogen often leads to a weakening of the inhibitory activity (47,86). On the other hand, modifications of the "anomeric" position of the inhibitors are often tolerated by the glycosidases. (47,84) Thus, modification of the "anomeric" position was examined where the ring nitrogen was left unmodified. In addition, considering the size of the catalytic site of the exo-glycosidase, a method for introducing diversity in a small area was attempted instead of a "linear" type of reaction such as peptide synthesis. The synthesis of a library was carried out in a parallel manner. Aldehyde **53** was subjected to the reductive amination

からなるライブラリーを合成した。合成したライブラリーの β -グルコシダーゼ阻害活性を調べたところ、全てのアミノ酸がヒドロキシプロリンである化合物 (K_i = 40 μ M) が最も阻害活性が強いことが分かったが、親化合物 **3** より酵素選択性は上がったものの阻害活性は減弱した。

D-3. 五員環アザ糖ライブラリー

誘導適合には酵素がその構造を変化させる場合と、基質あるいは阻害物質が酵素活性部位の構造に合うように構造変化する場合がある。五員環化合物は遷移状態の半椅子型立体配座を模倣するのみならず、環構造は自由度に富み、特定立体配置の水酸基を有する五員環アザ糖は、立体配座変化に伴い異なる糖をミミックする可能性がある。すなわち、この種の化合物は、誘導適合により与えられた酵素により適当な配座が選択される可能性がある。

こうして五員環アザ糖化合物 **52**(84)を母核としたアザ糖のライブラリー合成がなされた(85)。アルキル化により環窒素に大きな置換基を導入すると阻害活性が減少する傾向(47,86)があるが、アノマー対応位の修飾(47,84)は比較的寛容されるという知見を基に、窒素の修飾は行わずアノマー対応位のみ修飾が検討された。また、exo-型加水分解酵素の活性部位の大きさを考慮し、リニア型反応(ペプチド合成等)は行わず、狭い範囲の修飾を行った。ライブラリー合成は液相中平行合成により行った。アルデヒド体 **53**と9種のアミンとの還元的アミノ化

and the Strecker reaction, and subsequent transformation of the nitrile group into the aminomethyl and amide groups yielded a small library with 27 compounds. (Scheme 4) Inhibitory assays against two galactosyltransferases and five glycosidases were carried out and compounds **54** and **55** were found to be specific and extremely potent inhibitors of α -N-acetylgalactosaminidase (α -GalNAc-ase) and α -mannosidase (α -Man-ase), respectively. Thus, a novel concept of the library with conformational diversity was proposed and its potential was shown.

E. Summary

The present review has discussed the rational design and synthesis of glycosidase inhibitors, as well as an alternative combinatorial library approach for finding glycosidase inhibitors. This emerging area of research may require speculative decisions based largely on a chemistry point of view because there are few crystal structures of this class of enzyme available. A number of studies have enabled us to design glycosidase inhibitors by mimicking the transition state structure and placing an appropriate functional group to bind the catalytic carboxylates. A chemical equation, in general, does not contain any special information, the possible position of the side chain of the amino acid residue to be targeted is a matter of speculation. For example, a carboxyl group acts as a general acid and a base might occupy a similar space in both the retaining and inverting enzymes, however, the position of the nucleophilic carboxylate would be totally different. The nucleophilic carboxyl group in the retaining enzyme would be in close vicinity of an oxocarbenium species because the functional group is directly involved in stabilization of the cationic species. On the other hand, the reaction in the inverting enzyme takes place via a water molecule, and thus the nucleophilic carboxyl group would be located far from the carbocation. Information on the crystal structures of such enzymes can be used effectively to design inhibitor structures with optimal activity and specificity by adding new functional groups. Furthermore, the design of a compound that inhibits multiple proteins can be achieved depending on the availability of information. Such a design synthesis was reported for the inhibition of influenza hemagglutinin and sialidase.

反応及びストレッカー反応を行った後、ニトリルのアミノメチル基及びアミド基への変換を行って27種類の化合物を含むライブラリーを合成した(Scheme 4)。

合成したライブラリーを2種類のガラクトシルトランスフェラーゼ及び5種類のグルコシダーゼに対する阻害活性について検討し、 α -ガラクトサミニダーゼと α -マンノシダーゼに対する極めて選択性が高く、強力な阻害剤**54**と**55**を見出すことに成功した。立体配座の多様性による利用価値が加わったライブラリー構築の可能性とその有用性が示された。

E. まとめ

本総説では糖加水分解酵素阻害剤のデザイン合成とライブラリー合成について議論したが、今後さらなる研究の展開が予想される。結晶解析データの少ないグリコシダーゼ阻害剤のデザインにあたっては化学的な観点からより綿密な反応の予測も必要である。遷移状態の構造を模倣し、触媒基であるカルボキシレートに相補的な官能基を適切な位置に導入する手法については、非常に多くの検討がなされ、合理的な阻害剤の設計が可能となった。化学式としての酵素反応の一般式は、空間情報についてはもっておらず、例えば加水分解反応を例にとれば、酸・塩基となるカルボン酸は立体保持の場合も反転の場合も同様の空間配置をとることが予想されるが、求核性のカルボン酸は様子が大きく異なると考えられる。すなわち、立体保持の場合にはオキシカルベニウムイオンを直接安定化するためカルボニル炭素は非常に狭い領域に存在するはずであるのに対し、反転型の酵素では水を仲介するため、求核性カルボン酸の存在する可能性域はかなり広い。従って、酵素阻害剤のデザインにはこのようなターゲットとなるアミノ酸側鎖の空間的な配置も考慮する必要がある。一方、近年のX線結晶構造情報の増加に伴い、合理的デザインの可能性も増している。また、ターゲットとする酵素と阻害剤の複合体の結晶構造が得られれば、新たな官能基を導入し、さらに強力かつ特異的な阻害剤を設計することもわかってきた。さらに、複数タンパクを同時に阻害する化合物も設計可能であり、インフルエンザウイルスの感染に関与する

(87,88) However, rational design is not yet almighty, because the induced fitting events are difficult to predict by computational methods. In this regard, no methods are superior to the high-throughput screenings in finding lead inhibitors. Detailed studies of the structure-activity relationships of the inhibitors, those discovered often by chance, would create a new designing principle. Computational chemistry may become much more advanced to enable the reproduction of the induced fitting events in the near future, leading to the perfect design of novel inhibitors. The emerging combinatorial approach to generate a potential inhibitor library may serve as an excellent source for the above reasons.

This review has dealt with the synthetic approaches for glycosidases. However, research on glycosyltransferases is equally important although the number of reports is still limited (89). The discovery of functionally orthogonal inhibitors of these enzymes may help us to understand the roles of oligosaccharides of glycoproteins and glycolipids in cellular functions and in multicellular systems. Pharmaceutical applications of inhibitors of this class of enzymes are expected because some of these enzymes are involved in cancer metastasis, immunodeficiency, and leumatoides (90,91).

ヘマグルチニンとシアリダーゼの両者の共通阻害剤のデザイン合成の報告もある(87,88)。合理的阻害剤のデザインが万能でないのは、コンピュータープログラムでは再現が難しい誘導適合があるからである。この点に関しては、ハイスループットスクリーニングに勝るものはないが、発見された新たな阻害剤の構造活性相関を詳細に検討していけば、新たな阻害剤デザインの方針が見出される可能性は充分にある。また、もしコンピューターの分野が発達し、誘導適合を良く再現できるようになれば、合理的デザインにより、新たな化合物が得られる時代となるであろう。ライブラリー合成による糖関連酵素阻害剤の研究も研究が開始されたばかりの分野であるが、上述の理由で今後大いに期待できる。

以上、糖加水分解酵素の阻害剤の合成について論じたが、糖転位酵素に対する合成阻害剤開発研究も同様に重要なテーマである。しかし、その数は限られており(89)、ターゲットに糖転位酵素を含めて機能上オルトゴナルな酵素阻害剤群の開発研究が、糖鎖の糖タンパクや糖脂質の機能におよぼす役割の解明、さらには糖鎖の多細胞システムにおける機能の解明の一翼を担うと考えられる。また、糖関連酵素は癌転位、免疫不全、リュウマチ等に関与しており、従って阻害剤の研究から医薬への展開が期待される(90,91)。

References

- Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631–664
- Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M. Eds., Springer, Tokyo, 2002
- Rademacher, T. W., Parekh, R. B., Dwek, R. A. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 785–838
- Chakel, J. A., Pungor Jr, E., Hancock, W. S., Swedberg, S. A. (1977) *J. Chromatogr. B.* **689**, 215–220
- Elbein, A. D. (1987) *Methods Enzymol.* **138**, 661–709
- Hughers, A. B., Rudge, A. J. (1994) *Natur. Prod. Rep.* 135–162
- Butters, T. J., Dwek, R. A., Platt, F. M. (2000) *Chem. Rev.* **100**, 4683–4696
- Ganem, B. (1996) *Acc. Chem. Res.* **29**, 340–347
- Wong, C.-H., Halcomb, R. L., Ichikawa, Y., Kajimoto, T. (1995) *Angew. Chem. Int. Eds. Engl.* **34**, 412–432
- Wong, C.-H., Halcomb, R. L., Ichikawa, Y., Kajimoto, T. (1995) *Angew. Chem. Int. Eds. Engl.* **34**, 521–546
- Parsons, S.M., Raftrey, M.A. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**, 45–49
- Kuramitsu, S., Ikeda, K., Hamaguchi, K. (1977) *J. Biochem.* **82**, 585–597
- Sinnot, M.L. (1990) *Chem. Rev.* **90**, 1171–1202
- Hehre, E.J., Brewer, C. F., Genghof, D. S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5942–5950
- Strynadka, N.C.J., James, M.N.G. (1991) *J. Mol. Biol.* **220**, 401–424
- Chipman, D.M., Sharon, N. (1969) *Science* **165**, 454–465
- Sinnot, M.L. (1978) *FEBS Lett.* **94**, 1–9
- Sabin, E., Sulzenbacher, G., Dauter, M., Dauter, Z., Jørgensen, P.L., Schleif, M., Dupont, C., Davies, G.J., Wilson, K.S., (1999) *Chem. Biol.* **6**, 483–492
- Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R., Withers, S.G. (2001) *Nature* **412**, 835–838
- Matsumura, I., Kirsch, J.F. (1996) *Biochem.* **35**, 1881–1889
- Crout, D.H.G., Vic, G. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 98–111
- Yamamoto K., Kadowaki S., Watanabe J., Kumagai H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 244–252
- Wang, L.X., Fan, J.-Q., Lee, Y.C. (1996) *Tetrahedron Lett.* **37**, 1975–1978
- Takegawa K., Tabuchi M., Yamaguchi S., Kondo A., Kato I., Iwahara S., (1996) *J. Biol. Chem.* **270**, 3094–3099
- Mizuno M., Haneda K., Iguchi R., Muramoto I., Kawakami T., Aimoto S., Yamamoto K., Inazu T. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 284–290
- Horibata Y., Higashi H., Ito M. (2001) *J. Biochem.* **130**, 263–268
- Abagyan, R., Totrov, M. (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 375–382
- Klebe, G. (2000) *J. Mol. Med.* **78**, 269–281
- Gane, P.J., Dean, P.M. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 401–404
- Ison, M.G., Hayden, F.G. (2001) *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 482–490
- Gubareva, L.V., Kaiser, L., Hayden, F.G. (2000) *Lancet* **355**, 827–835
- Von Itzstein, M., Wu, W.-Y., Kok, G.B. (1993) *Nature* **363**, 418–423
- Von Itzstein, M., Wu, W.-Y., Jin, B. (1994) *Carbohydr. Res.* **259**, 301–105

34. Heightman, T.D., Vasella, A.T. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 750–770
35. Watson, A.A., Fleet, G.W.J., Asano, N., Molyneux, R.J., Nash, R.J. (2001) *Phytochem.* **56**, 265–295
36. Davis, A.M., Teague, S.J. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 736–749
37. Choudhary, M.I., Baig, I., Nur-e-Alam, M., Shahzad-ul-Hussan, S., ndougnee, P., Buderya, M., Oyun, Z., Atta-ur-Rahman (2001) *Helv. Chim. Acta* **84**, 2409–2416
38. Nakano, Y., Maki, T., Matsunaga, S., van Soest, R.W.M., Fusetani, N. (2000) *Tetrahedron* **56**, 8977–8987
39. Kajimoto, T., Liu, K.K.-C., Pederson, R.L., Zhong, Z., Ichikawa, Y., Porco, Jr.J.A., Wong, C.-H. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6187–6196
40. Look, G.C., Fotsch, C.H., Wong, C.-H. (1993) *Acc. Chem. Res.* **26**, 182–190
41. Bols, M. (1998) *Acc. Chem. Res.* **31**, 1–8
42. Ichikawa, Y., Igarashi, Y., Ichikawa, M., Suhara, Y. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3007–3018
43. Bols, M., Hazell, R.G., Thomsen, I.B. (1997) *Chem. Eur. J.* **3**, 940–947
44. Ganem, B.B. (1996) *Acc. Chem. Res.* **29**, 340–347, b) Papandreou, G., Tong, M.K., Ganem, B. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11682–11690
45. Kim, C.U., Lew, W., Williams, M.A., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., Bischofberger, N., Chen, M.S., Mendel, D.B., Tai, C.Y., Laver, W.G., Stevens, R.C. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 681–690
46. Legler, G., Korth, A., Berger, A., Ekhardt, C., Grading, G., Stütz, A.E. (1993) *Carbohydr. Res.* **250**, 67–77
47. Takebayashi, M., Hiranuma, S., Kanie, Y., Kajimoto, T., Kanie, O., Wong, C.-H. (1999) *J. Org. Chem.* **64**, 5280–5291
48. Berecibar, A., Grandjean, C., Siriwardena, A. (1999) *Chem. Rev.* **99**, 779–844
49. Von Itzstein, M., Wu, W.-Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Phan, T.V., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W., Colman, P.M., Varghese, J.N., Ryan, D.M., Woods, J.M., Bethell, R.C., Hotham, V.J., Cameron, J.M., Penn, C.R. (1993) *Nature* **363**, 418–423
50. Yoshikawa, M., Morikawa, T., Matsuda, H., Tanabe, G., Muraoka, O. (2002) *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1547–1554
51. Yoshikawa, M., Murakami, T., Shimada, H., Matsuda, H., Yamahara, J., Tanabe, G., Muraoka, O. (1997) *Tetrahedron Lett.* **38**, 8367–8370
52. Yuasa, H., Takada, J., Hashimoto, H. (2000) *Tetrahedron Lett.* **41**, 6615–6618
53. Ghavami, A., Johnston, B.D., Jensen, M.T., Svensson, B., Pinto, B.M. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6268–6271
54. Ghavami, A., Johnston, B.D., Pinto, B.M. (2001) *J. Org. Chem.* **6**, 2312–2317
55. Yuasa, H., Kajimoto, T., Wong, C.-H. (1994) *Tetrahedron Lett.* **35**, 8243–8246
56. Yuasa, H., Takada, J., Hashimoto, H. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 1137–1139
57. Aleshin, A.E., Stoffer, B., Firsov, L.M., Svensson, B., Honzatko, R.B. (1996) *Biochem.* **35**, 8319–28
58. Qian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee E., Payan F. (1994) *Biochem.* **33**, 6284–94
59. Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J.A., Martinez-Ripoll, M., Lequerica, J.L., Polaina, J. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 491–502
60. Blaser, A., Reymond, J.-L. (2001) *Helv. Chim. Acta* **84**, 2119–2131
61. Garca-Moreno, M.I., Benito, J.M., Mellet, C.O., Fernandez, J.M.G. (2001) *J. Org. Chem.* **66**, 7604–7614
62. Panday, N., Canac, Y., Vasella, A. (2000) *Helv. Chim. Acta* **83**, 58–79
63. Uchida, C., Kimura, H., Ogawa, S. (1997) *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 921–939
64. Ogawa, S., Sekura, E., Maruyama, A., Odagiri, T., Yuasa, H., Hashimoto, H. (2000) *Carbohydr. Lett.* **4**, 13–20
65. Hashimoto, H., Fujimori, T., Yuasa, H. (1990) *J. Carbohydr. Chem.* **9**, 683–694
66. Yuasa, H., Nakano, Y., Hashimoto, H. (1996) *Carbohydr. Lett.* **2**, 23–26
67. Tsuruta, O., Yuasa, H., Hashimoto, H. (1996) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 1989–1992
68. Collyer, C.A., Hendrick, K., Blow, D.M. (1990) *Carbohydr. Lett.* **2**, 23–26
69. Sou, S., Mayumi, S., Takahashi, H., Yamasaki, R., Kadoya, S., Sodeoka, M., Hashimoto, Y. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 1081–1084.
70. Zographos, S.E., Oikonomakos, N.G., Tsitsanou, K.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Skamnaki, V.T., Bischoff, H., Goldmann, S., Watson, K.A., Johnson, L.N. (1997) *Structure* **5**, 1413–1425
71. Dolle, R.E. (1997) *Mol. Diversity* **2**, 223–236
72. Helferich, B., Trk, D. (1956) *Chem. Ber.* **89**, 2215
73. Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, W.P., Bevan, D.R., Henrissat, B., Esen, A. (2001) *Biochem. J.* **354**, 37–46
74. Parsiegla, G., Reverbel-Leroy, C., Tardif, C., Belaich, J.P., Driguez, H., Haser, R. (2000) *Biochem.* **39**, 11238–11246
75. Sulzenbacher, G., Driguez, H., Henrissat, B., Schleim, M., Davies, G.J. (1996) *Biochem.* **35**, 15280–15287
76. Parsiegla, G., Juy, M., Reverbel-Leroy, C., Tardif, C., Belach, J.-P., Driguez, H., Haser, R. (1998) *EMBO J.* **17**, 5551–5562
77. Nilsson, U. J., Fournier E. J.-L., Hindsgaul, O. (1998) *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 1563–1575
78. De Bruyne, C. K., Yde, M. (1977) *Carbohydr. Res.* **56**, 153–164
79. Wischnat, R., Martin, R., Takayama, S., Wong, C.-H. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3353–3358
80. Takayama, S., Martin, R., Wu, J., Laslo, K., Siuzdak, G., Wong, C.-H. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8146–8151
81. Dong, W., Jespersen, T., Bols, M., Skrydstrup, T., Sierks, M. R. (1996) *Biochem.* **35**, 2788–2795
82. Lohse, A., Jensen, K. B., Bols, M. (1999) *Tetrahedron Lett.* **40**, 3033–3036
83. Lohse, A., Jensen, K. B., Lundgren, K., Bols, M. (1999) *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 1965–1971
84. Saotome, C., Kanie, Y., Kanie, O., Wong, C.-H. (2000) *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 2249–2261
85. Saotome, C., Wong, C.-H., Kanie, O. (2001) *Chem. Biol.* **8**, 1061–1070
86. Asano, N., Kizu, H., Oseki, K., Tomioka, E., Matsui, K., Okamoto, M., Baba, M. (1995) *J. Med. Chem.* **38**, 2349–2356
87. Sun, X.-L., Kanie, Y., Guo, C.-T., Kanie, O., Suzuki, Y., Wong, C. H. (2000) *Eur. J. Org. Chem.* **14**, 2643–2653
88. Guo, C.-T., Sun, X.-L., Kanie, O., Shortridge, K., Suzuki, T., Miyamoto, D., Hidari, K.I.-P.J., Wong, C.-H., Suzuki, Y. (2002) *Glycobiology* **12**, 183–190
89. Compain, P.; Martin, O.R. (2001) *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 3077–3092
90. McAuliffe, J.C., Hindsgaul, O. (1997) *Chem. Indus.* **3**, 170–174
91. Sears, P., Wong, C.-H. (1998) *Chem. Commun.* 1161–1170

Received on June 6, 2002, accepted on June 20, 2002

Profile of the Authors

Hideya Yuasa is Associate Professor of Life Science, Graduate School of Bioscience and Biotechnology at the Tokyo Institute of Technology. He graduated from the Department of Chemistry (1986) and obtained a PhD in Bioscience (1991) at the same university. He has postdoctoral fellowship experience at the University of Alberta (Canada), supervised by Professor Ole Hindsgaul (1991–1993), and at RIKEN (Frontier Research Program; FRP) under Professor Chi-Huey Wong (1993–1994). He returned to the Tokyo Institute of Technology as Assistant Professor of Life Science (1994–2000) and has been in his current position since 2000. He is pursuing the synthesis of oligosaccharide analogs with unusual structural properties and interesting bioactivity.

★★★★★★★

Chikako Saotome is a Postdoctoral Fellow at Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS). She received her PhD degree from Toho University in 2001. She is interested in the biological significance of conjugates of carbohydrates.

★★★★★★★

Osamu Kanie is Group Leader of the Glycotechnology Research Unit, at MITILS. He graduated from Agricultural Chemistry, Gifu University, and obtained a PhD in Pharmaceutical Sciences from Nagoya City University. He did a postdoctoral fellowship with Professor Hindsgaul (1990–1994), was a Special Researcher for Basic Research with Professor Tomoya Ogawa at RIKEN (1995–1997), and was Deputy Leader of the Glycotechnology Group at FRP, RIKEN (1997–1999). He has been in his current position since 1999 and is interested in developing a molecular device based on carbohydrates that can be used as an interface between chemistry, technology and biology.