Aldolase Catalyzed Reaction for Carbohydrate Synthesis

糖分解酵素アルドラーゼを利用した糖質の合成

¹Kajimoto, T., ²Sugai, T., and ^{1,3}Wong, C.-H¹Frontier Research Program, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako-shi, Saitama 351-01, Japan, FAX: 81-48-465-8048, ²Department of Chemistry, Keio University, Kohoku-ku, Yokohama 223, Japan, and ³Department of Chemistry, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA**Key Words:** azasugar, DHAP-dependent aldolase, fluorosugar, KDO aldolase, sialic acid aldolase

Abstract

Aldolase which catalyzes aldol cleavage in the process of glycolysis also catalyzes reverse reaction, aldol condensation, to afford carbohydrates. From this point of view, aldolases are useful catalysts to synthesize novel carbohydrates. The substrate specificity for the enolate source of aldolase catalyzed reactions is very high, but, the enzymes accept many kinds of aldehyde as acceptor substrates of aldol condensation. FDP-aldolase whose enolate source is dihydroxyacetone phosphate and sialic acid aldolase whose enolate source is pyruvate are purchased cheaply and many papers on the syntheses of carbohydrates using these aldolases have been published during the last ten years. Especially, the method of synthesizing fluorosugars and azasugars from aldehydes including fluoro or azido group by using aldolases has been well established. It is needless to say that the aldol condensation catalyzed by aldolases is stereospecific and the optical purities of the condensed products are extremely high. Details of the application of the aldolase catalyzed reactions for carbohydrate synthesis will be shown below.

要 旨

エネルギー代謝の過程で糖の分解をつかさどっているアルドラーゼは、その逆反応であるアルドール縮合をも触媒し、糖の合成に利用できる。これらアルドラーゼは、エノレート源に対し高い基質特異性を示すが、種々のアルデヒド類をアルドール縮合のアクセプター基質として受け入れる。現在知られている25種類のアルドラーゼの中でも、ジヒドロキシアセトンリン酸をエノレート源とするFDP-アルドラーゼやピルビン酸をエノレート源とするシアル酸アルドラーゼは比較的安価に市販されており、利用価値の高いアルドラーゼである。フルオロ基やアジド基を有するアルデヒドとそれぞれのアルドラーゼの要求するエノレート源とを、アルドラーゼの働きにより縮合させ、フルオロ糖、アザ糖の効率良い合成法がこの10年間で確立されてきた。言うまでもなく、生成してくる縮合体の立体化学は、酵素反応であるがゆえに厳密に制御されており、光学純度も極めて高い。これらのアルドラーゼの糖質合成における利用例を紹介する。

A. Introduction

Aldolases which catalyze aldol cleavage in the process of glycolysis also catalyze reverse reactions, aldol condensation, to afford carbohydrates. For example, the reaction catalyzed by FDP-aldolase (EC 4.1.2.13) is efficient enough to equilibrate its condensation of D-glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate (DHAP), rather than its cleavage of fructose-1,6-diphosphate (FDP) (Scheme 1). In general, aldolases are excellent catalysts to synthesize carbohydrate derivatives. Although the stereospecificity of the reaction is very high, this aldol condensation works under mild conditions, i.e. in aqueous solution, at room temperature, and without any protective groups. Many successful results have been documented since Wong and Whitesides reported the first application of aldolase catalyzed reaction in organic synthesis (1).

A. はじめに

エネルギー代謝の過程で糖の分解をつかさどっているアルドラーゼは逆反応であるアルドール縮合、即ち糖の合成をも触媒する。例えば、解糖系で働いているFDP-アルドラーゼ (EC 4.1.2.13) の触媒する反応の平衡は、フルクトース-1,6-二リン酸 (FDP) の分解よりもジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) とD-グリセルアルデヒド-3-リン酸との縮合の方向に大きく片寄っている (図式1)。即ち、アルドラーゼは糖誘導体を合成するにはうってつけの触媒となり得るはずである。しかもこのアルドール縮合は無保護の基質を用い、水溶液中、室温という条件を用いるにもかかわらず、極めて高立体選択的である。Wong、Whitesidesにより初めてアルドラーゼが有機合成にも利用されることが示されて以来(1)、現在までに数多くの応用例が報告されてきた。

B. DHAP-dependent Aldolases

More than 25 aldolases were found in nature (2).

B. DHAP をエノレート源とするアルドラーゼ

現在までに知られているアルドラーゼは、約25種である

Scheme 1. Aldolase (from rabbit muscle) catalyzed reaction.

Among those, FDP-aldolase from rabbit muscle can be purchased cheaply. When the affinity of unnatural compounds to this enzyme is not so low, the aldolase can be used practically as a catalyst for carbohydrate synthesis.

The stereochemistry of the reaction can be expressed as the enzyme removes the *pro-S* hydrogen of DHAP to afford the enolate, which attacks the *si* face of aldehyde. This enzyme is rather specific for DHAP as enolate substrates; however, it reluctantly accepts many kinds of aldehydes as electrophiles instead of D-glyceraldehyde-3-phosphate.

After many carbohydrates were synthesized by using this methodology (3), many inhibitors for glycosidases, which play an important role *in vivo*, began to be synthesized by the same method. Fluorosugars, for example, can be expected to be strong inhibitors for glycosidases, because replacement of the OH group with F introduces relatively little change in the polarity and van der Waals radii (4). The condensation of DL-3-fluoro-2-hydroxypropanal (1) with DHAP in the presence of FDP-aldolase and following dephosphorylation by acid phosphatase generates a mixture of 6-deoxy-6-fluoro-D-fructose (2b) and 6-deoxy-6-fluoro-L-sorbose (3b). (Unfortunately, these were indistinguishable by HPLC or TLC.) However, treatment with isomerase yielded a mixture from which 6-deoxy-6-fluoro-D-glucose (4) was easily isolated and characterized (Scheme 2) (5).

The syntheses of azasugars - carbohydrates whose ring oxygen atoms are replaced by imino groups - have been tried. This type of nitrogenated carbohydrate has been shown to be a very effective glycosidase inhibitor (6). A number of methods for preparing 1-deoxynojirimycin (DNJ) and 1-deoxymannojirimycin (DMJ) have been developed. Wong and Effenberger independently reported at almost the same time a similar method for a short step synthesis of DNJ and DMJ using FDP-aldolase (7, 8). In their method, 3-azido-2-hydroxypropanal (5a, 5b) was condensed with DHAP using FDP-aldolase. These products were dephosphorylated and hydrogenated on Pd-C to afford DNJ and DMJ (Scheme 3).

In order to get compounds whose stereochemistry is different from that obtained by FDP-catalyzed reaction, other

(2).中でもウサギ筋肉由来のFDP-アルドラーゼは比較的安価に市販されており、非天然基質の酵素に対する親和性がそれほど低くなければ、試薬(触媒)としての利用価値は高い。

本酵素は、DHAPの3位の *pro-S* のプロトンを引き抜き、エノレートとし、これがアルデヒドの *si* 面を攻撃するタイプのアルドール縮合を触媒する(1)。エノレート源であるDHAPに代わる基質はまだ発見されていないが、本酵素は種々のアルデヒドをD-グリセルアルデヒド-3-リン酸の代わりに親電子剤として受け入れることができる。

この方法論で数多くの新規糖類の合成例が報告されはじめると(3)、生体内において特徴的な働きをするグリコシダーゼの阻害剤をアルドラーゼにより合成する試みがなされた。例えば、C-F結合はC-OH結合と双極子モーメント、結合の長さが類似するため(4)、フルオロ糖は種々のグリコシダーゼの優れた阻害剤として期待できる。DL-3-フルオロ-2-ヒドロキシプロパナール(1)とDHAPとの縮合、それに続く脱リン酸化により6-デオキシ-6-フルオロ-D-フラクトースと6-デオキシ-6-フルオロ-L-ソルボースの混合物(2b, 3b)が得られた(残念ながら、これらはHPLC、TLCにより分離できなかった)。この混合物をイソメラーゼで処理し、6-デオキシ-6-フルオロ-D-グルコース(4)が得られた(図式2)(5)。

次に糖環内の酸素原子を窒素に置換したアザ糖類の合成が試みられた。アザ糖は近年、生化学用試薬として、また、医薬品としてもその有効性が大いに期待されている化合物群である(6)。その代表とも言えるデオキシノジリマイシン(DNJ)、デオキシマンノジリマイシン(DMJ)は3-アジド-2-ヒドロキシプロパナール(5a, 5b)とDHAPとをFDP-アルドラーゼの働きにより縮合させた生成物のリン酸部分を解裂後、接触還元が付すことにより収率良く得られた(図式3)。この合成スキームは、WongとEffenbergerの二つのグループの熾烈な競争の末、ほぼ同時に達成された(7, 8)。

以上はFDP-アルドラーゼの利用について述べてきた。アルドール縮合により生成可能な他の3種の立体配置を生成させるに

Scheme 2. Synthesis of 6-deoxy-6-fluoroglucose by using FDP-aldolase and glucose isomerase.

types of DHAP-dependent aldolases, Fucose-1-P (Fuc-1-P) aldolase (EC 4.1.2.17), Rhamnose-1-P (Rham-1-P) aldolase (EC 4.1.2.19), Tagatose-1,6-PP aldolase (EC 4.1.2.18) (9) must be used (Scheme 4).

Both fucose-1-P aldolase and rhamnose-1-P aldolase abstract *pro-R* hydrogen from DHAP; the former attacks the *si* face and the latter attacks the *re* face of aldehydes (10, 11). These two aldolases as well as tagatose-1,6-PP aldolase are currently available.

We tried the condensation of **5a** and **5b** with DHAP by using fucose-1-P aldolase and rhamnose-1-P aldolase to yield phosphates of azidosugars (**6-8**). These phosphates were treated with acid phosphatase as sugar phosphates were treated in Scheme 3, and following hydrogenation, produced azasugars (**9-11**) whose stereochemistry is distinguished from DNJ and DMJ. It appears that hydrogens are delivered to the imine intermediate from the face opposite to axial OH groups (Scheme 5) (12).

C. Aldolases Whose Enolate Source Is Pyruvate

C-1. Sialic Acid Aldolase

Sialic acid is a family of *N*- or *O*-acyl derivatives of nonulosaminic acid. They are widely distributed in nature as peripheral constituents of oligosaccharides and glycoconjugates and have been found to play an important role in cell adhesion. Sialic acid aldolase catalyzes an equilibrium between *N*-acetylneuraminic acid (**12a**) and its *retro* aldol products, namely *N*-acetylmannosamine (**13a**) and pyruvate (Scheme 6, **13a** - **12a**).

The growing availability of cloned and overexpressed enzymes at lower costs (e.g. Toyobo, 500 yen/10 unit) has

は図式4で示すように Fucose-1-P (Fuc-1-P) (EC 4.1.2.17), Rhamnose-1-P (Rham-1-P) (EC 4.1.2.19), Tagatose-1,6-P₂ (EC 4.1.2.18)(9) アルドラーゼの助けを必要とする。

例えば、Fucose-1-P アルドラーゼ、Rhamnose-1-P アルドラーゼはDHAP3位の *pro-R* のプロトンを引き抜き、それぞれアルデヒドの *si* 面、*re* 面を攻撃する縮合を触媒する(10、11)。いずれも現在では入手容易なアルドラーゼである。

図式3で使用した **5a**、**5b** をアクセプターアルデヒドとして、これらの酵素存在下 DHAP と縮合させ、図式5に示す3種のアジド糖リン酸エステル(**6-8**)を得た。DNJ、DMJ 合成の場合と同様、リン酸エステル解裂後、接触還元することにより3種のアザ糖(**9-11**)を合成することができた。尚、接触還元の方法はイミン中間体の安定立体配座でのアキシアル水酸基と反対側から起きると考えると、理解できる(図式5)(12)。

C. ピルビン酸をエノレート源とするアルドラーゼ

C-1. シアル酸アルドラーゼ

酸性九炭糖 nonulosaminic acid の *N*-または *O*-アシル誘導体をシアル酸と総称する。このものは細胞表層のオリゴ糖鎖の非還元末端に存在して細胞間認識や細胞接着に重要な役割を果たしていることから、最近特に注目を浴びている糖である。このシアル酸を基質とするアルドラーゼ、シアル酸アルドラーゼは、*N*-アセチルノイラミン酸 (**12a**) を *N*-アセチルマンノサミン (**13a**) とピルビン酸とに分解する反応およびその逆反応を触媒する (図式6、**13a** - **12a**)。

この酵素はクローニング、大腸菌での発現が成功し、例えば東洋紡 (株) から比較的安価に入手が可能である(10ユニット

Scheme 3. A combined enzymatic aldol condensation and reductive amination as an efficient route to DNJ and DMJ.

Scheme 4. DHP-dependent aldolases.

Scheme 5. Synthesis of azasugars by using Fuc-1-P and Rham-1-P aldolases.

made the synthesis of Neu5Ac and its analogs possible. Augé succeeded both in the immobilization of the enzyme on ultrogel (agarose) activated by BrCN and in large scale preparation of *N*-acetylneuraminic acid by using the immobilized enzyme. By her estimate, the immobilized enzyme can be used for three repeated reactions, and a total of 2.8 mmol of *N*-acetylneuraminic acid were prepared with as little as 2.7 units of the enzyme (13). Furthermore, she succeeded in the synthesis of 5,9-diacetylneuraminic acid on a large scale by a similar method (14). Wong *et al.* also reported the immobilization of Neu5Ac aldolase on PAN [poly(acrylamide-co-acryloxysuccinimide)] (15). The yield of this reaction was 70 % with high regioselectivity. The starting material, *N*-acetylmannosamine (ManNAc), is also expensive. Whitesides *et al.* reported enzymatic preparation using a mixture of ManNAc and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), which was prepared by the chemical epimerization of GlcNAc and partially purified (16). Only the enzymatic aldol condensation of ManNAc proceeded, while contaminated GlcNAc did not react with pyruvate. One of the major drawbacks of this aldol condensation has been the tedious separation of the desired product from pyruvic acid in large, excess amounts (normally 7-10 eq), which were indispensable in achieving the higher conversion of starting sugar to the desired product. To overcome this problem, Wong *et al.* reported a method for the removal of pyruvate by combining pyruvate decarboxylase of bakers' yeast during the work-up procedure (17). With the introduction of this method, the preparation of sialic acid on a scale higher than 10 g has been facilitated.

On the other hand, Wandrey coupled the enzymatic epimerization of GlcNAc to ManNAc and sialic acid aldolase catalyzed reaction by using an enzyme membrane reactor (EMR), and established a particularly economical procedure (18).

Being highly substrate-specific for enolate source, as in the case of DHAP dependent aldolases, sialic acid aldolase can also accept many aldehydes as an electrophile. The condensation reaction of mannose (13c) or 2-deoxyglucose (13d) with pyruvate is faster than the original reaction. Condensation of mannose with pyruvate generates KDN (12c) (19). Mannose was the best substrate and the compounds which retain the *D*-manno configuration make no great difference to the enzyme. Even 2-C-phenyl-*D*-mannose gave a good result (76%) (20-22). The enzyme seems to be tolerant to modifications at position 2, 4 and 6, however, furanose such as 2-acetamido-2-deoxy-5-*O*-methyl-*D*-mannose was a poor substrate. It may be of some concern that starfish sialic acid was not cleaved to mannosamine by sialic acid aldolase.

Recent examples of the synthetic application of Neu5Ac aldolase catalyzed reaction are shown below. The most remarkable example seems to be the enzymatic bio-reactor re-

／500 円)。また、Augé らは本酵素を BrCN により活性化したアガロースに固定化し、シアル酸の大量合成法の道を切り開いた。彼らの見積ではこの固定化酵素は少なくとも3回使用することが可能であり、僅か 2.7 ユニットの酵素で 28 mmol の *N*-アセチルノイラミン酸を合成できる(13)。さらにこの方法を利用して 5,9-ジアセチルノイラミン酸の大量合成にも成功している(14)。Wong らも、アクリルアミド-アクリルオキシイミド共重合体(PAN)に固定化した酵素を用い、シアル酸の大量調製法を報告した(15)。ところで、シアル酸を酵素合成する場合、その出発原料である *N*-アセチルマンノサミン(ManNAc)もやはり高価である。Whitesides らは、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を化学的にエピメリ化させ、このものより部分精製した ManNAc と GlcNAc の混合物を出発原料とする合成法を発表した(16)。後者はこの酵素の基質とならないので、目的とするシアル酸のみが生成する。この反応は平衡反応であり、目的とする方向に反応を進ませるためには通常 7-10 当量のピルビン酸を添加する。このため、酵素反応終了後に系内に大過剰量に存在するピルビン酸とシアル酸をいかに分離するかが技術上の問題であった。これを解決する方法として、パン酵母由来のピルビン酸デカルボキシラーゼを用いて、ピルビン酸をアセトアルデヒドと二酸化炭素に分解する方法が発表された(17)。この方法に従えば、シアル酸の精製もかなり容易になり、十数グラム以上のスケールで調製可能となった。

また、Wandrey らは *N*-アセチルグルコサミンエピメラーゼ(EC 5.1.3.8) と Enzyme Membrane Reactor (EMR) とを巧く組み合わせて安価な *N*-アセチルグルコサミンからの効率の良いシアル酸合成に成功している(18)。

本酵素も DHAP 依存性のアルドラーゼと同様にエノレート源に対する選択性は極めて高いが、アルデヒドとして種々の糖を基質として利用できる。特にマンノース(13c)や 2-デオキシグルコース(13d)との反応は ManNAc よりも早い。マンノースとピルビン酸との縮合では Neu5Ac の代わりに KDN(12c)が生成してくる(19)。全体的な傾向として本酵素はマンノース型の化合物に対してかなり選択性が高いと言える。マンノース配置であれば 2 位にフェニル基のようなかさ高いグループがあっても基質となりうる(20-22)。しかし、マンノース配置の立体化学を保持していてもフラノースタイプの糖を基質としないと考えられている。ヒトデのシアル酸がアルドラーゼ耐性であることと関係していると考えられている。

以下に、シアル酸アルドラーゼを生理活性糖質合成に利用した最近の例を挙げる。Wong らにより開発された糖鎖合成バイオリアクター(23)が、その代表であろう(図式7)。糖ヌクレオシ

Scheme 6. Synthesis of sialic acid derivatives by using sialic acid aldolases.

Scheme 7. Bioreactor of oligosaccharide synthesis.

ported by Wong *et al.*, which made the synthesis of sialyl oligosaccharide possible in a non-protecting group and concise fashion (23). Sialyl trisaccharide was efficiently prepared from inexpensive starting materials by combining sugar nucleotide synthetases, glycosyl transferases, and the recycling system of co-factors. The Neu5Ac aldolase catalyzed condensation was utilized as the initial step of this bio-reactor (Scheme 7).

Based on wide acceptance of the 2-position of the substrate, several kinds of unnatural sialic acid derivatives have been enzymatically synthesized. Whitesides *et al.* prepared an *N*-Cbz derivative of sialic acid (15) as the aldolase-catalyzed condensation product, starting with *N*-Cbz-mannosamine (14). After several steps, the product was chemically converted to the derivatives that have various acyl groups on nitrogen atoms. They have been examined as inhibitors of influenza virus adhesion to chicken erythrocytes (24). A methylene homolog of a sialic acid on 5-position (17) was synthesized in a similar manner (Scheme 8)(25). The structure-activity relationship studies using these compounds may lead to further insight into the interaction between ligands and receptors in biological systems.

Recently, Wong reported that the reaction catalyzed by sialic acid aldolase is not enzyme-dependent but substrate-dependent. While the condensation of D-mannose with pyruvate generates D-KDN (12c), as mentioned above, the reaction of L-mannose with pyruvate produces L-KDN (18) (Scheme 9)(26).

Pyruvate enamine intermediate approaches the *si* face of anomeric carbon of D-mannose to form an *S* configuration in the former reaction and attacks the *re* face of anomeric carbon to generate a *R* configuration in the latter reaction. The reaction style of both aldol condensations was changed by substrates. In general, substrates can affect the reaction rate and/or the reaction constant of appropriate enzyme reactions, however, they can not change the reaction style. From this point of view, this is a very rare example. The time-dependent profile of this reaction was examined in detail. An epimer of L-KDN is initially formed when L-mannose is incubated with Neu5Ac aldolase. As the reaction proceeds, the proportion of L-sialic acid, which is a thermodynamically more stable product, increases enough to reach an equilibrated mixture (Scheme 9) (18). The reverse facial selectivity was observed only when "poor" substrates were incubated. The complexity of the reaction makes explanation of the mechanism extremely difficult, as the facial selectivity depends on the structure of the substrate. The active site of the enzyme should be resolved in the near future.

C-2. KDO Aldolase

Another example of pyruvate-dependent aldolase with much synthetic use is 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) aldolase (EC 4.1.2.23). However, its substrate-specificity and stereochemical course in aldol reactions present strik-

ド合成酵素、糖転移酵素を鍵段階に利用し、補酵素のリサイクル系を組み合わせて、安価な原料から効率良くシアリル三糖を合成する方法である。このバイオリアクターの第1段階の反応に、シアル酸アルドラーゼが用いられた(図式7)。

また、基質の2位に関する立体特異性の幅の広さを生かして、シアル酸の非天然型アナログが合成されている(図式8)。Whitesides らは、*N*-Cbz-マンノサミン (14) をアルドール縮合の基質として用い、シアル酸のCbz誘導体 (15) を合成した。このものを、化学的な変換によってさまざまな側鎖を持つアシル同族体へと誘導した(24)。さらにこれら同族体のニトリ赤血球に対する、インフルエンザウイルスの接着を阻害する活性について検討がなされている。一方、Brossmer らは、*N*-アセチルマンノサミンホモログ (16) より出発し、5位にメチレン鎖を導入したシアル酸 (17) の合成を報告した(25)。これらの化合物は、生体内における、リガンド-受容体相互作用解明のための重要な情報提供の一助となることが期待される。

最近、Wong らはシアル酸アルドラーゼの反応性は酵素依存型ではなく、基質依存性である事例を発表している。既に述べたように、本酵素の存在下、ピルビン酸とD-マンノースを縮合させると、D-KDN (12c) を生成する。そして驚くことに、L-マンノースをアルデヒド基質として用いると L-KDN (18) が生成してくる(図式9)(26)。

即ち、上の例の場合、親電子剤がD-マンノースであればエノレートはアルデヒドの*si*面から攻撃し、L-マンノースであれば*re*面から攻撃するようである。この現象は酵素が基質に応じて反応のスタイルを変えたことを意味する。一般に酵素反応において、基質を変えた場合、反応速度やその他の反応定数に影響がなくても反応のスタイルが変わることはほとんど起こらないと考えられている。この見地からもこれは珍しい例である。後に、この反応の時間的経過が詳細に調べられた(17)。L-マンノースを基質とした場合、最初に生成してくる化合物はL-KDNのエピマーである。時間がたつにつれ、熱力学的に安定なL-KDNの割合が増大し、平衡に到達することがわかった(図式9)(18)。このような事例は、元来の基質と比較して反応速度が小さい(poorな)ものに限られている。いずれにせよ、面選択性が逆転するという事実を説明する決め手とはならず、今後の活性中心の解析が待たれる。

C-2. KDO アルドラーゼ

ピルビン酸をエノレート源とするアルドラーゼのもう一つの代表選手は、3-デオキシ-D-マンノ-2-オクテロソニック酸(KDO)アルドラーゼ(EC 4.1.2.23)である。このKDOアルドラーゼの基質特異性および選択性は、シアル酸アルドラーゼ(EC 4.1.3.3.)とはかなり異なった傾向を示すので、新しい糖酸を合成するに

Scheme 8. Enzymatic synthesis of unnatural sialic acids.

Scheme 9. Synthesis of KDN by sialic acid aldolase.

ing contrast to those of Neu5Ac aldolase (EC 4.1.3.3.).

KDO (19) is a vital component of the outer membrane in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria (27) (Scheme 10). In lipopolysaccharide biosynthesis, the incorporation of KDO consists of two steps (Scheme 10): first, the formation of CMP-KDO by CMP-KDO synthetase (EC 2.7.7.38), and the subsequent coupling with a lipid-A precursor. Since the rate-limiting step is the activation of KDO moiety (28), the analogs of KDO as inhibitors of CMP-KDO synthetase are potentially useful as antibacterial agents (29). KDO aldolase (EC 4.1.2.23) was first reported by Ghallambor and Heath (*Escherichia coli* K-12 and *Aerobacter cloacae*, 1966) (30) as the enzyme responsible for the degradation pathway of KDO. After their preliminary investigation of the substrate-specificity as well as on the μmol scale synthesis of KDO, no synthetic application of this enzyme has been reported, while the related enzyme *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid) aldolase has been extensively studied. The reason is most likely due to the narrower range of substrate specificity reported in the original report in 1966.

However, after first screening of a newer source of KDO aldolase from microorganisms, we have recently found a Gram-positive bacterium, *Aureobacterium barkeri* strain KDO-37-2 (ATCC 49977), which contains high levels of KDO aldolase (31). KDO itself was successfully synthesized from D-arabinose and pyruvate in a 67% yield by catalyzing this KDO aldolase. Fortunately, this enzyme exhibited a wide substrate-specificity. Studies on the substrate specificity of the enzyme with more than 20 natural and unnatural sugars indicated that this enzyme widely accepts trioses, tetroses, pentoses and hexoses as substrate (Table I).

This enzyme especially prefers substrates with an *R* configuration on 3 position. The substituent on 2 position had little

あたって強力な武器となる。

KDO(19)は、グラム陰性菌の細胞表層にあるリポポリサッカリドの重要な成分である(27)。リポポリサッカリドの生合成経路上、KDOの取り込みは2段階の酵素反応から構築されている(図式10)。まず、CMP-KDO シンテターゼ (EC 2.7.7.38) によって活性化糖 CMP-KDO が生成し、ひきつづきリピドA中間体と縮合する。この KDO の取り込みが細胞壁生合成の律速段階となっているので(28)、もし CMP-KDO シンテターゼを阻害する KDO 誘導体の合成が可能であれば、新規抗菌性物質の創製につながる可能性が大きい(29)。KDOアルドラーゼは、GhallamborとHeathによって、1966年大腸菌K-12および *Aerobacter cloacae* から初めて単離・精製された酵素である(30)。生体内では、KDOの代謝、分解経路にあずかっている(図式10)。彼らは、基質特異性の検討を行い、マイクロモルスケールではあったが KDO 合成も達成している。しかし、有機合成化学の分野で大活躍しているシアル酸アルドラーゼとは対照的に、その後の合成的な応用についてはほとんど報告されていなかった。この理由の1つは、最初の報文の中で、「この酵素の基質特異性の幅は狭い」と述べられていたからであろう。

著者らは土壌から新しい KDO アルドラーゼを生産する微生物をスクリーニングし、グラム陽性菌の一種、*Aureobacterium barkeri* KDO-37-2 (ATCC 49977) 株を見いだした(31)。この微生物より抽出した粗酵素を用いてビルビン酸とアラビノースを反応させたところ、アルドール縮合はすみやかに進行し、KDO が 67% の収率で得られた。さらに幸運にも、今回新規に得られたアルドラーゼの基質特異性の幅は、従来報告されているものよりかなり広いことが明らかになった。20種以上の天然型・非天然型糖について検討したところ、この酵素は三～六炭糖にわたる多くのアルドースを基質とすることがわかった。天然の D-アラビノースを 100% としたときの相対速度を表1に示す。

3位が(R)-体の絶対立体配置を持つ糖が良好な基質となる。これに対し、2位の立体配置に関しては寛容である。2位がマン

Table I. Relative Rates of Several Substrates for KDO Aldolase from *Aureobacterium barkeri* KDO-37-2

substrate	relative rate ^{a)}	substrate	relative rate ^{a)}
D-arabinose	100	D-altrose	25
	N.D. ^{b)}	L-mannose	15
D-threose	128	L-arabinose	N.D.
D-erythrose	93	D-xylose	N.D.
D-ribose	72	D-allose	N.D.
2-deoxy-D-ribose	71	D-glucose	N.D.
L-glyceraldehyde	36	D-mannose	N.D.
D-glyceraldehyde	23	L-fucose	N.D.
2-deoxy-2-fluoro-D-arabinose	46	<i>N</i> -acetyl-D-mannosamine	N.D.
D-lyxose	35	<i>N</i> -acetyl-L-mannosamine	N.D.
5-azido-2,5-dideoxy-D-ribose	15	D-fructose	N.D.

a) Measured at pH 7.5 with 500 mM of sugar and 10 mM of pruvate.

Specific activity based on D-arabinose is 0.2 U/mg; 1 U = 1 μmol KDO formed per min.

b) Fluoropyruvate (10 mM) was used instead of pyruvate.

N.D.: Not detectable.

Scheme 10. KDO in the cell wall biosynthesis of gram-negative bacteria.

Scheme 11. KDO-aldolase and sialic acid aldolase catalyzed reaction.

effect on the aldol reaction, while Neu5Ac aldolase only accepted the *manno*-type configuration on the 2 position of the substrates. Nine substrates were submitted to the aldol reaction to prepare the products, including D-KDO, 3-deoxy-D-*arabino*-2-heptulosonic acid (D-DAH), 2-keto-3-deoxy-L-gluconic acid (L-KDG), and 3-deoxy-L-*glycero*-L-*galacto*-nonulosonic acid (L-KDN). It appears that the attack of pyruvate took place on the *re* face of the carbonyl group on acceptor substrates, a facial selection different from sialic acid aldolase (*si* face attack) reactions. This complementary facial selectivity is manifested by the syntheses of both enantiomers of 3-deoxy-*glycero*-*galacto*-2-nonulosonic acid (KDN) (illustrated in Scheme 11). The reaction with L-mannose gave L-KDN (61% as **20**), an enantiomer of D-KDN, a component in polysialoglycoprotein and ganglioside of rainbow trout eggs (32). The optical rotation $[[\alpha]^{25}_D +26.3^\circ (\text{CHCl}_3)]$ and $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **20** were in good accordance with those of **21** $[[\alpha]^{25}_D -26.0^\circ (\text{CHCl}_3)]$, which was obtained *via* the reaction with D-mannose catalyzed by sialic acid aldolase, except for the sign of rotation. The availability of both enantiomers of KDN may develop new analogs of sialyl oligosaccharides (33).

The aldol reaction with an unnatural sugar containing fluorine atoms (**22**) was also effective in proceeding a fluoro analog of KDO (FKDDO, **23**). A preliminary study using FKDDO toward CMP-KDO synthetase, recently cloned and overexpressed in this group (34), showed that this compound was accepted by CMP-KDO synthetase (Scheme 12). The details of the isolation and characterization of the CMP-FKDDO derivative will be reported elsewhere.

D. Which Enzyme Reaction Is More Suitable to Synthesize Higher Carbon Carbohydrates: DHAP Dependent Aldolase Catalyzed Reaction or the Pyruvate Dependent Aldolase Catalyzed Reaction ?

DHAP dependent aldolases originally catalyze the reactions which produce six-carbon carbohydrates, while pyruvate dependent aldolase catalyze the reactions which can produce eight or nine- carbon carbohydrates. Hence, the pyruvate dependent aldolase catalyzed reaction more easily synthesizes higher carbon carbohydrates. Whitesides reported that hexose-6-phosphates and pentose-5-phosphates can be substrates of FDP-aldolase and can be derived to sialic acid derivatives by condensation with DHAP (35). His method is convenient in synthesizing some sialic acid derivatives whose carboxylic acid is replaced with primary alcohol (Scheme 13).

E. Other Aldolases

The application of both the DHAP dependent aldolase catalyzed reaction and pyruvate dependent aldolase catalyzed reaction has been mentioned above. It is worth noting that other aldolase catalyzed reactions can also be used for carbohy-

ノ型の基質のみが反応するシアル酸アルドラーゼとは、対照的な傾向を示している(図式11)。この事実を力を得て、次に9種類の糖を基質として合成反応を試みた。D-KDO、3-デオキシ-D-アラビノ-2-ヘプチュロソニック酸(D-DAH)、2-ケト-3-デオキシ-L-グルコン酸(L-KDG)、3-デオキシ-L-グリセロ-L-ガラクト-ノニウロソニック酸(L-KDN)などが合成された。生成物の立体化学を検討することにより、ピルビン酸の攻撃は基質のカルボニル基の*re*面から起こることが明らかになった。この面選択性は、*si*面から攻撃するシアル酸アルドラーゼと相補的な関係にある。この関係を明確にあらわす例として、KDNの両鏡像体合成を以下に示す(図式11)。KDOアルドラーゼを用いて、L-マンノースをピルビン酸と縮合させると、L-KDN(20として収率61%)が得られた。このものは、ニジマスの卵から抽出されたポリシアロタンパク質や、ガングリオシドの構成成分であるD-KDNと鏡像関係にある化合物である(32)。誘導体20の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルおよび比旋光度は、L-マンノースからシアル酸アルドラーゼを用いて合成した20のそれに完全に一致した。また20の比旋光度の値 $[[\alpha]^{25}_D +26.3^\circ (\text{CHCl}_3)]$ は、その符号が逆であることを除いて、21のそれ $[[\alpha]^{25}_D -26.3^\circ (\text{CHCl}_3)]$ とよい一致を示した。このように調製可能となったKDNの両鏡像体は、新しいシアリルオリゴ糖の誘導体合成に展開される可能性を秘めている(33)。

フッ素を含む非天然型の基質(22)も、対応するフルオロ糖酸(FKDDO、23)に変換された。最近 Wong らにより CMP-KDO シンテターゼのクローニング、大腸菌での発現が成功した(34)。FKDDOは予備実験から、CMP-KDOシンテターゼの良好な基質となることが判明している(図式12)。生成物であるCMP-FKDDOの単離、構造決定に関しては、いずれあらためて発表したい。

D. 八炭糖、九炭糖の合成にはどのアルドラーゼの利用が有利であろうか？

DHAP 依存性アルドラーゼは本来、六炭糖を合成するアルドラーゼであり、ピルビン酸依存性アルドラーゼは、八あるいは九炭糖を合成する酵素であるから言うまでもなくピルビン酸依存性アルドラーゼの方が有利であるように見える。しかし一方で、Whitesides らはヘキソース-6-リン酸、ペントース-5-リン酸もFDP-アルドラーゼのアルデヒド基質と成りうることを報告している(35)。彼らの方法論を用い、種々のリン酸化糖とDHAPとを縮合させるとシアル酸類縁体を収率良く合成できる。シアル酸1位のカルボキシル基が一級アルコールに置換した誘導体の合成にはFDP-アルドラーゼの方が良さそうである(図式13)。

E. 他のアルドラーゼ

以上、DHAP 依存性のアルドラーゼとシアル酸アルドラーゼの利用について述べてきた。勿論、これらのアルドラーゼ以外のアルドラーゼも種々の糖質をはじめとするポリヒドロキシ

Schme 12. Synthesis of the fluorinated KDO and CMP-KDO.

Schme 13. Condensation of Man-6-P and DHAP by FDP-aldolase.

Schme 14. Synthesis of D-AB 1 by using transketolase.

Scheme 15. Synthesis of an azasugar by using DERA.

drate synthesis.

Transketolase, whose coenzyme is thiamine catalyzes the Umpolung type of aldol condensation; this reaction was also applied to synthesis of D-AB 1 (Scheme 14) (36).

Deoxyribo-5-phosphate aldolase (DERA) is a new type of aldolase; both the acceptor and the enolate source of the reaction catalyzed by this enzyme are aldehydes. Some azasugars were synthesized by using the enzyme catalyzed reaction (Scheme 15) (37).

Finally, we would like to show an interesting reaction catalyzed by an enzyme other than aldolase, although this is independent of carbohydrate chemistry. Kynureninase, which works in the metabolic pathway of tryptophan, is known to catalyze aldol condensation whose enolate source is alanine (38). In nature, this enzyme catalyzes the hydrolysis that produces anthranilic acid (25) and alanine from kynurenine (24). This enzyme was found to accept dihydrokynurenine as a substrate and release the *retro* aldol products, *i.e.* anthranilic aldehyde (26) and alanine. Why the enzyme catalyzes two different types of reaction can be ascribed to a general base catalyst

化合物の合成に利用されている。

チアミンを補酵素とするトランスケトラーゼはUmpolungタイプのアルドール縮合を触媒し、D-AB 1の合成に利用された(図式14)(36)。

デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼはエノレート源もアクセプター基質もともにアルデヒドを基質とする点で新しいタイプの酵素である。本酵素を用いても種々のアザ糖が合成された(図式15)(37)。

最後に、糖の合成から話が外れるが、少し変わったタイプの酵素によるアルドール縮合を紹介する。トリプトファンの代謝経路中で働いているキヌレニナーゼがアラニンを経源とするアルドール縮合を触媒することが報告されている(38)。本来、本酵素はキヌレニン(24)をアントラニル酸(25)とアラニンに分解する加水分解酵素である。発端はキヌレニンの還元体であるジヒドロキヌレニンも本酵素の基質となり、レトロアルドール成績体であるアントラニルアルデヒド(26)とアラニンに分解する反応の発見であった。本酵素の反応の二面性は活性部位の塩基性残基による一般塩基触媒反応として説明でき

Scheme 16. Aldol condensation by kynureninase.

character of the active site. More interestingly, the reaction of L-alanine and benzaldehyde in the presence of kynureninase results in no significant aldol reaction, however, the reaction of kynurenine and excess benzaldehyde under the same condition results in 2-amino-4-hydroxy-4-phenylbutanoic acid (27) in a comparably quantitative yield based on L-kynurenine (Scheme 16).

This phenomenon shows that the enzyme can not produce alanine anion from alanine, supplying us with another method to resolve a problem when aldol condensation does not work in the presence of aldolases. In other words, when enolate sources are not available, or the concentration of enolate is not high enough to achieve the reaction, the natural substrates can be used as an enolate source. In FDP-aldolase catalyzed reaction, FDP had been used for DHAP.

F. Afterword

It is important to note that the reactions mentioned above have not all been reported so far. Many researchers are challenging the aldolase catalyzed reactions ability to synthesize novel carbohydrates and polyhydroxy compounds. We hope that continued progress in this field will facilitate carbohydrate synthesis in the near future.

References

1. Wong, C.-H., and Whitesides, G.M. (1983) *J. Org. Chem.* **48**, 3199-3205
2. Schneider, M.P. (1986) (Ed) *Enzyme as Catalysts in Organic Synthesis*, D. Reidel Publishing Co., pp. 199-216
- 3a. Bednarski, M.D., Simon, E.S., Bischofberger, N., Fessner, W.-D., Kim, M.-J., Lees, W., Sato, T., Waldmann, H., and Whitesides, G.M. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 627-635
- 3b. Bischofberger, N., Waldmann, H., Saito, T., Simon, E.S., Lees, W., Bednarski, M.D., and Whitesides, G.M. (1988) *J. Org. Chem.*, **53**, 3457-3465
- 3c. Schmid, W., and Whitesides, G.M. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9670-9671
- 3d. Brockamp, H.P., and Kula, M.R. (1990) *Tetrahedron Lett.* **31**, 7123-7126
- 3e. Hung, R.R., Straub, J.A., and Whitesides, G.M. (1991) *J. Org. Chem.* **56**, 3849 - 3855
- 3f. Wong, C.-H., Mazenod, F.P., and Whitesides, G.M. (1983) *J. Org. Chem.* **48**, 3493-3497
4. Kent, P.W. (1972) *Ciba Foundation Symposium on C-F Compound*; Elsevier: New York, p.169
5. Durrwachter, J. R., Drueckhammer, D. G., Nozaki, K., Sweers, H. M., and Wong, C.-H. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7812-7818
6. For example, Nishimura, Y., (1991) *J. Syn. Org. Chem. Japan* **49**, 846- 857
- 7a. Osten, C.-H., Sinsky, A.J., Barbas, C.F., Pederson, R.L., Wang, Y.-F., and Wong, C.-H. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 3924 -3927
- 7b. Pederson, R.L., Kim, M.-J., and Wong, C.-H. (1988) *Tetrahedron Lett.* **29**, 4645-4648
- 7c. Pederson, R. L., and Wong, C.-H. (1989) *Heterocycles* **28**, 477-480 (1989)
- 8a. Ziegler, T., Straub, A., and Effenberger, F. (1988) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 716-717
- 8b. Straub, A., Effenberger, F., and Fischer, P. (1990) *J. Org. Chem.*, **55**, 3926-3932
9. Ozaki, A., Toone, E.J., Osten, C.H., Sinsky, A.J., and Whitesides, G.M. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4970-4971
10. Fessner, W.-D., Sinerius, G., Schneider, A., Dreyer, M., Schulz, G.E., Badia, J., and Aguilar, J. (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 555-558
11. Kajimoto, T., Chen, L., Liu, K.K.-C., and Wong, C.-H. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6679-6680
12. Liu, K.K.-C., Kajimoto, T., Chen, L., Zhong, Z., Ichikawa, Y., and Wong, C.-H. (1991) *J. Org. Chem.* **56**, 6280-6289
13. Augé, C., David, S., and Gautheron, C. (1984) *Tetrahedron Lett.* **25**, 4663-4664
14. Augé, C., David, S., Gautheron, C., and Veyrieres, A. (1985) *Tetrahedron Lett.* **26**, 2439-2440
15. Kim, M.-J., Hennen, W.J., Sweers, H.M., and Wong, C.-H. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6481-6486
16. Simon, E.S., Bednarski, M.D., and Whitesides, G.M. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7159-7163
17. Lin, C.-H., Sugai, T., Halcomb, R.L., Ichikawa, Y., and Wong, C.-H. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10138-10145
18. Kragl, U., Gaygax, D., Ghisalba, O., and Wandrey, C., (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 827-828
19. Augé, C., and Gautheron, C. (1987) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 859-860
20. Augé, C., Gautheron, C., and David, S. (1990) *Tetrahedron* **46**, 201-214
21. Drueckhammer, D.G., Hennen, W.J., Pederson, R.L., Barbas III, C.F., Gautheron, C., Krach, T., and Wong, C.-H. (1991) *Synthesis* 499-525
22. Liu, J. L.-C., Shen, G.-J., Ichikawa, Y., Rutan, J.F., Zapata, G., Vann, W.F., and Wong, C.-H. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 3901-3910

る。さらに興味深いことに、キヌレニンと大量のベンズアルデヒドを本酵素の存在下、反応させるとアラニンアニオンとベンズアルデヒドとの縮合生成物(27)を生成するにもかかわらず、アラニンとベンズアルデヒドの混合系に本酵素を作用させても縮合生成物を生成しなかった(図式16)。

この事実は本酵素にはアラニンからアラニンアニオンを生成する能力がないことを示していると同時に、酵素的アルドール縮合に一つの方法論を提供している。即ち、エノレート源となる物質が極めて入手困難である場合や、反応系中でエノレートアニオンの濃度が十分に高くない時、天然基質やその構造類似体をエノレート源として利用するとアルドール縮合がスムーズに進行する可能性を示唆している。これは FDP-アルドラーゼの利用において、フルクトース-1,6-ニリン酸(FDP)がDHAPの前駆体として利用されているのにも似ている。

F. おわりに

紙面の都合により、他のアルドラーゼの利用についての紹介を割愛させて頂いた。しかし、酵素的アルドール縮合による糖の合成の報告は確実に増えており、精力的にチャレンジされている。今後の発展に期待する。

23. Ichikawa, Y., Liu, J.L.-C., Shen, G.-J., and Wong, C.-H. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6300-6302
- 24a. Sparks, M.A., Williams, K.W., Lukacs, C., Schrell, A., Priebe, G., Spaltenstein, A., and Whitesides, G.M. (1993) *Tetrahedron* **49**, 1-12
- 24b. Zhou, P., Salleh, H.M., and Honek, J.F. (1993) *J. Org. Chem.* **58**, 264-266
25. Koppert, K., and Brossmer, R. (1992) *Tetrahedron Lett.* **33**, 8031-8034
26. Gautheron, C.-Le Narvor, Ichikawa, Y., and Wong, C.-H. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7816-7818
27. Unger, F.M. (1981) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **38**, 323-388
28. Ray, P.H., Benedict, C.D., and Grasmuk, H. (1981) *J. Bacteriol.* **145**, 1273-1280
29. Ohnishi, H., Morita, M., and Meguro, H. (1992) *Carbohydr. Res.* **224**, 319-325 and the references cited therein
30. Ghalambor, M.A., and Heath, E.C. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 3207-3215
31. Sugai, T., Shen, G.-J., Ichikawa, Y., and Wong, C.-H. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 413-421
- 32a. Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S., and Inoue, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 11550-11557
- 32b. Song, Y., Kitajima, K., Inoue, S., and Inoue, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 21929-21935
33. Ichikawa, Y., Look, G.C., and Wong, C.-H. (1992) *Anal. Biochem.* **202**, 215-238
34. Shen, G.-J., and Wong, C.-H., manuscript in preparation
35. Bednarski, M.D., Waldmann, H.-J., and Whitesides, G.M. (1986) *Tetrahedron Lett.* **27**, 5807-5810
- 36a. Ziegler, T., Straub, A., and Effenberger, F. (1988) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**, 716-717
- 36b. Kobori, Y., Myles, D.C., and Whitesides, G.M. (1992) *J. Org. Chem.* **57**, 5899-5907
- 37a. Barbas, C.F., Wang, Y.-F., and Wong, C.-H. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 2013-2014
- 37b. Chen, L., Dumas, D., and Wong, C.-H. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 741-748
38. Phillips, R.S., and Dua, R.K. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7385-7388

Received on January 30, 1993, accepted on February 10, 1993