糖転移酵素反応の遷移状態アナログへのアプローチ

— β -1,4-ガラクトース転移酵素の選択的阻害剤のデザインと合成—

橋 本 弘 信*・梶 原 康 宏**

Approach to Transition State Analogue of Glycosyltransferase Reaction —Design and Synthesis of Selective Inhibitor of β -1,4-Galactosyltransferase—

Hironobu HASHIMOTO* and Yasuhiro KAJIHARA**

In order to create specific inhibitors against glycosyltransferases, tethering glycosyl donor to acceptor was planned. Mono-*O*-methylated UDP-Gal and related analogues were synthesized, and their behaviors toward β -1,4-galactosyltransferase were examined. The allowance for the *O*-methylation of Gal moiety was decreased in the following order: 2-, 3-, 4- and 6-positions and it was suggested that the modification at the 2-position does not affect the affinity but retards the reaction rate by preventing the conformational change to the transition state, which develops so-called dynamic binding. Modification of the glycosyl acceptor (GlcNAc) moiety showed the tethering probability in the 3'- and 6'-positions. Bisubstrate tricomponent analogues linked through 2,6'-methylene and 2,6'-ethylene groups were synthesized and found to be potent inhibitors against bovine GlcNAc: β -1,4-galactosyltransferase, with K_i values of 1.35 and 1.95 μ M, respectively, for the acceptor.

Key words: Glycosyltransferase, Inhibitor, Bisubstrate analogue, β -1,4-Galactosyltransferase.

1. はじめに

化学の諸分野において生物学との接点が拡大しているが、糖合成化学はそのような動向の顕著な分野の1つである。それは細胞表面に存在する複合糖質が多様な生物学的事象に関与していることが解明され、または、解明されつつあるためである。癌関連糖鎖抗原の発見とその診断への応用や臓器・組織特異的なレクチンの発見に伴う選択的医薬投与への夢などが刺激となり、多様な研究が展開されてきた。インフルエンザウイルスや大腸菌な

どの感染、受精における精子と卵の結合、白血球の炎症部位への浸潤、癌の転移などにおける糖鎖の機能の解明が進んでおり、今や糖鎖が生命現象全般において多様な機能を果たしていることが認識されるに至った¹⁾。

2. 糖鎖構造の精密な改変と糖転移酵素の特異的阻害剤

糖鎖を自在に改変することはその機能の解明のみならず、機能を制御することをも可能にすると考えられ、すでにいくつかの手法が開発されている²⁾。その1つに糖鎖の生合成に関与する酵素の阻害剤を用いる方法がある³⁾。たとえば、抗生物質であるツニカマイシン存在下で糖タンパク質のアスパラギン(Asn)結合糖鎖の生合成が、また、D-トレオ-PDMP(1-フェニル-2-ドデカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール)存在下で糖脂質糖鎖の生合成が阻止される。Asn 結合糖鎖の場合にはプロセシングと称される糖鎖修飾過程の初期に関与する α -グルコシダーゼや α -マンノシダーゼの阻害剤によっても、多様な糖鎖の形成を阻止することができる⁴⁾。し

* 東京工業大学生命理工学部生命学科 ()

** 横浜市立大学理学部機能科学科 ()

* Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology ()

** Department of System Function, Yokohama City University ()

かし、これらはいずれも糖鎖を全く形成させないか、Asn 糖鎖をコアの部分のみにするもので、糖鎖構造の精密な改変ではない。

精密な改変は、糖鎖形成に関与する1結合-1酵素といわれている多様な糖転移酵素を特異的に阻害することが可能になればその道が開けてくるものと思われる。たとえば、図1に模式的に示した4本のアンテナ構造の構

Fig.1 Various *N*-acetylglucosaminyltransferases (I-V) constructing core structure of Asn-linked carbohydrate chain.

築に関与する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素(GlcNAcTase)と称される酵素群の中の1つを特異的に阻害することができれば、癌化に関与すると考えられているマンノースの6位へGlcNAcが結合したアンテナの形成のみを妨げることが可能になると考えられ、化学合成による阻害剤の探索も行われている⁵⁾。

糖転移酵素の特異的阻害剤の設計はどのようにしたらよいのか。糖転移酵素はLeloir 供与体と呼ばれる糖ヌクレオチドから受容体である糖鎖へ糖残基を転移する反応を触媒する(図2)。供与体は通常共通なので酵素の特

Fig.2 Glycosyltransferase reaction.

異性の発現は受容体である糖鎖の認識に依存するはずである。従って、有効な特異的糖転移酵素阻害剤のデザインには図3に示すように糖供与体および糖受容体を結合することが必須と思われる。今回、β-1,4-ガラクトース転移酵素(β-1,4-GalTase) [EC2.4.1.22/90]をターゲットとしてデザインした2基質複合型のアナログが非常に

Fig.3 Bisubstrate complex of GlyTase.

強い阻害作用を示すことを見出したので、その経緯について報告する。

3. β-1,4-ガラクトース転移酵素(β-1,4-GalTase)

ガラクトースが糖タンパク質の血中からのクリアランスのシグナルであることはよく知られている⁶⁾。また、マウスでは精子のGalTaseが受容体であるポリラクトサミン様O-グリコシド糖鎖に結合するとされている⁷⁾。複合糖質の糖鎖に見られるガラクトピラノースの結合様式はアノマー位の立体配置はβとα、受容体はGlcNAc, Gal, GalNAcなどがある。本研究で取り上げたUDP-Gal:GlcNAc-OR β-1,4-GalTaseはラクトース合成酵素[EC2.4.1.22]として1960年代から研究されている。ラクトース合成酵素は2種のタンパク質からなるが、一方がβ-1,4-GalTaseで他方がラクトアルブミンと称されるユニークな制御タンパク質で、受容体に対する酵素の基質特異性をGlcNAcからグルコース(Glc)に変化させる。従って、このβ-1,4-GalTaseはラクトアルブミンの有無によって、*N*-アセチラクトサミンとラクトースをつくり分けることができる(図4)。β-1,4-GalTaseは他に先駆けてクローニングが行われた糖転移酵素である。β-1,4-GalTaseは本来膜酵素で、分子量は約6万であるが、プロテアーゼによりステム部分で切断され可溶化したものとしては分子量4.2万と5.1万が得られており、これらは10数%の糖鎖を含んでいる⁸⁾。

Fig.4 Lactose synthetase composed of β-1,4-GalTase and α-lactalbumin.

また、以前より癌化した細胞で GalTase 活性が上昇することは知られていたが、最近そのアイソザイムとしての実体の解明がようやく進んだり、GalTase の活性化により生成すると考えられる Gal 残基を非還元末端に有するパラグロボシドが癌関連糖質として注目されるなど、癌転移と β -1,4-GalTase との関連について明らかにされようとしている⁹⁾。GalTase としては、他に自己免疫疾患に関与する UDP-Gal:Gal β -1-4-GlcNAc-OR α -1,3-GalTase や血液型物質 B の生合成に関与する UDP-Gal:Fuc α -1-2-Gal-OR α -1,3-GalTase などがよく研究されている^{1a)}。筆者は上記の β -1,4-GalTase をターゲットとして、2 基質複合体アナログに特異的な阻害作用を発現させることを目的として、供与体(UDP-Gal)および受容体(GlcNAcOR)両基質アナログを合成し、それらの酵素に対する挙動を調べることにした。

4. 修飾 UDP-ガラクトースの合成

β -1,4-GalTase の糖供与体である UDP-Gal の転移される糖(Gal)部分に対する基質認識に関しては多くの研究が行われ、10 以上の Gal 類縁体が転移可能であることが明らかにされている¹⁰⁾。しかし、Gal 部分の修飾に際し、導入する官能基のかさ高さに対する許容度や水素結合形成能の影響は明らかではない。そこで、今回筆者らがデザインした 2 基質複合体アナログの繋ぎ手がメチレンまたはエチレンであることを考慮して、ガラクトースの各水酸基がメチル基で保護された UDP-Gal 1-4 を中心に検討することとした(図 5)¹¹⁾。

Fig.5 Modified UDP-Gal and related UDP-sugars.

これらの合成は、スキーム 1 から 5 に示すように、ガラクトースの特定の水酸基をメチル化した後、他の水酸基をアセチル基、あるいはベンジル基で保護し、ついで 1 位のみをリン酸化して、ウリジン 5'-モノリン酸(UMP)と縮合することにより行った。リン酸どうしを縮合してピロリン酸を形成する反応は¹²⁾、イミダゾリド誘導体を用いて行った。2-O-メチル 1(スキーム 1)、3-O-

(a) MeI, NaH/DMF, 97%; (b) 1) 70% AcOH, 60°C, 2) Ac₂O/pyridine, 93.5% (2 steps); (c) 1) Pd-C/MeOH, 60°C, 2) HgCl₂, HgO/acetone-H₂O, 79% (2 steps); (d) BuLi, (BnO)₂POC/THF, -78°C, α -anomer 34%, β -anomer 10%; (e) H₂, Pd-C, Bu₃N/MeOH; (f) N, N'-carbonyldimidazole/DMF; (g) 1) UMP·Bu₃N/DMF, 2) Et₃N-MeOH-H₂O, 14% (4 steps).

Scheme 1 Synthesis of UDP-2-O-Me-Gal (1).

(a) Bu₂SnO/MeOH, reflux, 2) MeI, Bu₄N/toluene, reflux, 3) Ac₂O/pyridine, 71% (3 steps); (b) 1) Pd-C/MeOH, 60°C, 2) HgCl₂, HgO/acetone-H₂O, 64%; (c) BuLi, (BnO)₂POC/THF, -78°C, 41%; (d) H₂, Pd-C, Bu₃N/MeOH; (e) N, N'-carbonyldimidazole/DMF; (f) 1) UMP·Bu₃N/DMF, 2) Et₃N-MeOH-H₂O, 10% (4 steps).

Scheme 2 Synthesis of UDP-3-O-Me-Gal (2).

-メチル 2(スキーム 2)、6-O-メチル 4(スキーム 4)誘導体の場合は、ガラクトース側のリン酸をイミダゾリド化し、また、4-O-メチル 3(スキーム 3)、6-O-アセチル誘導体 5 の場合(スキーム 5)は、UMP 側をイミダゾリド化して縮合を行った。得られた UDP-Gal 誘導体はトリエチルアミン-メタノール-水の混合溶媒により処理して脱アセチルし、モノ-O-置換 UDP-Gal 1-5 を合成した。これら生成物は、Sephadex-G 15 を用いるゲル濾過により精製し、 β -1,4-GalTase の阻害剤である UMP 等を混入していないことを確認し、酵素に対する挙動を調べた。

(a) MeI, NaH/DMF, 73.5%; (b) 1) t-BuOK/DMSO, 60°C, 2) HgCl_2 , $\text{HgO}/\text{acetone-H}_2\text{O}$, quant. (2 steps); (c) BuLi, $(\text{BnO})_2\text{POCl}/\text{THF}$, -78°C 45%; (d) H_2 , Pd-C, $\text{Bu}_3\text{N}/\text{MeOH}$; (e) UMP-imidazolide/DMF, 11% (2 steps).

Scheme 3 Synthesis of UDP-4-O-Me-Gal (3).

(a) H_2NNH_2 AcOH, 60°C, (b) BuLi, $(\text{BnO})_2\text{POCl}/\text{THF}$, -78°C 49%; (c) H_2 , Pd-C, $\text{Bu}_3\text{N}/\text{MeOH}$; (d) N, N'-carbonyldiimidazole/DMF; (e) 1) UMP- $\text{Bu}_3\text{N}/\text{DMF}$, 2) $\text{Et}_3\text{N-MeOH-H}_2\text{O}$, 22% (4 steps).

Scheme 4 Synthesis of UDP-6-O-Me-Gal (4).

(a) t-BuLi, $(\text{BnO})_2\text{POCl}/\text{THF}$, -78°C 35%; (b) H_2 , Pd-C, $\text{Bu}_3\text{N}/\text{MeOH}$; (c) UMP-imidazolide/DMF, 14%.

Scheme 5 Synthesis of UDP-6-O-Ac-Gal (5).

5. 修飾 UDP-Gal の酵素に関する挙動と β -1,4-GalTase の基質認識

β -1,4-GalTase による、受容体である GlcNAc への Gal 残基の転移反応は、UDP-[^{14}C]Gal を用いて追跡した¹³⁾。表 1 には、修飾 UDP-Gal 25 μM における転移阻害率および拮抗阻害であることを仮定して算出した見かけの K_i 値を示してある¹¹⁾。モノ-O-メチル誘導体は、2-

Table 1 The fractional inhibition at 25 μM and estimated K_i values of UDP-Gal analogues and other UDP-sugars.

Inhibitor	Inhibitory activity [I] = 25 μM	K_i ^a (μM)
UDP-2-O-Me-Gal (1)	51 %	20
UDP-3-O-Me-Gal (2)	31 %	46
UDP-4-O-Me-Gal (3)	7 %	270
UDP-6-O-Me-Gal (4)	(48%) ^b	(44)
UDP-6-OAc-Gal (5)	(48%) ^b	(44)
UDP-Fuc (6)	67 %	10
UDP-Man (7)	70 %	8.8
UDP-6-deoxy-Gal	0 %	—
UDP	30 %	48 ^c

UDP-Gal: 3 μM , GlcNAc: 500 μM

^a Apparent K_i values estimated assuming the inhibition is competitive and calculated from the equation $i = [I] / ([I] + K_i(1 + [S] / K_m))$, where i is the fractional inhibition, $[I]$ the inhibitor concentration, and $[S]$ the substrate concentration. Among the reported K_m values for UDP-Gal 13.7 μM ^{11a)} was used for estimation considering the assay conditions.

^b Inhibitory activity at $[I] = 50 \mu\text{M}$.

^c A reported K_i value for *N*-acetylglucosamine formation reaction (competitive inhibition).

O-メチル-1, 3-O-メチル-2, 4-O-メチル-UDP-Gal 3 の順に β -1,4-GalTase に対する阻害活性が低下し、6-O-メチル 4, 6-O-アセチル 5, 6-デオキシ誘導体については 25 μM では阻害活性が見られなかった。これらの修飾 UDP-Gal の中で、2-O-メチル誘導体と 6-デオキシ誘導体は転移活性があり、転移速度は天然のガラクトースに比べ 1% 程度であるが、相当する *N*-アセチルラクトサミン誘導体を効率よく酵素合成することができる^{10h, 10i, 11)}。2-デオキシ UDP-Gal が UDP-Gal に匹敵する転移速度を示す^{10d, 10g)}ことや、2 位が NHAc により修飾された UDP-ガラクトース誘導体 (UDP-GalNAc) も転移する^{10e)}ことを合わせ考えると、2 位水酸基は認識に必須ではなく、酵素の外側もしくは空間的に余裕のある部分に位置すると考えられ、6 位水酸基と 4 位水酸基は酵素との結合に関わっていることが示唆された。特に、前者は基質認識に必須ではないがその周辺の空間的許容度は小さいと推定される。

また、この度のデザインには利用しなかったが、ガラクトース部分が他の糖に置換された UDP-フコース 6, UDP-マンノース 7 が非常に強い阻害活性を示したことは興味深い。これらは、今まで最も強いとされていた阻害剤である UDP¹⁴⁾ よりも活性が強く、UDP-Gal と酵素の結合状態を推測する際に新たな情報ではないかと考えている¹¹⁾。

以上のことを考慮すると、今まで見えていなかった UDP-Gal の結合状態が推定できる。UDP は、その K_i 値からみても単独でも β -1,4-GalTase に対する親和力は

大きく、特にウラシル、リン酸部分が強く認識されていると考えられる。また、ガラクトース部分は、6位、4位、3位の順に水酸基が強く認識されていることから、図9に示すように、ウラシル、ピロリン酸、6位および4位の水酸基が酵素の結合サイトに面していると考えられる。

6. *N*-アセチルグルコサミニド誘導体のβ-1,4-GalTase に対する挙動

ガラクトース残基の受容体である *N*-アセチルグルコサミニド (GlcNAc-OR) に対する酵素の基質認識を調べる際にも、阻害作用を目安とすることができる。しかし、研究をスタートする時点で阻害剤は見いだされておらず、GlcNAc-OMe の 4-デオキシや 4-*O*-メチル誘導体は、β-1,4-GalTase に全く結合しないことが知られていた¹⁶⁾。タンパク質による糖残基の認識には、水素結合が関与している。水素結合の形成に際して、糖の個々の水酸基が水素受容体・水素供与体いずれとして機能しているかを知ることは基質アナログの設計に役立つ。水素に対する親和力の強いフッ素原子で置換すれば水素受容能が、一方、水素受容能の弱いチオールで置換すれば、相対的に水素供与能が強調されると推測される。また、デオキシ化された誘導体では、水素受容能および水素供与能ともに消失すると考えられる。そこで、GlcNAc-OR の各水酸基をフッ素原子、チオール基、水素原子に置換した誘導体 8-16 (図6) を合成し、β-1,4-GalTase に対する挙動を調べた。合成については誌面の都合で割愛する。

Fig. 6 Synthesized *N*-acetylglucosaminide derivatives.

Method A

Method B

Fig. 7 Assay methods of galactosyl transfer.

これらの誘導体に対する転移反応の解析は、UDP-[¹⁴C]-Gal を用いて図7のように行った¹³⁾。転移反応が進行する誘導体は、A 法を用いて K_m 値を、阻害が観測される誘導体は B 法を用いて K_i 値を算出した (表2)。

Table 2 Kinetics parameters of GlcNAc-OR derivatives for the galactosylation with bovine β-1,4-GalTase.

Compd	K_m (mM)	V_{max} (relative)
8	0.5	55
9	1.0	94
10	1.2	33
11	0.2	1.7
12	no binding	
13	no binding	
14	no binding	
15	4.2	34
16	2.7 ^a	< 1
17	no binding	
18	no binding	
19	no binding	
20	1.5	100
21	1.4	94
22	1.0	108
23	2.8	100
24	0.7	66

^a K_i value.

2位のアセトアミド基に関してはメチル基をより長鎖のアルキル基で置換しうる¹⁵⁾ことは知られていたが、新たにアセトアミド基の水素原子、カルボニル基をそれぞれメチルおよびメチレンに置換した誘導体 17, 18 について検討した。しかし、これら誘導体はβ-1,4-GalTase に対し不活性であり受容体とはならなかった。また、基質である GlcNAc-OR の 10 倍量を加えたときにも阻害は観察されなかった (B 法)。さらに、2-*O*-アセチルアナログ 19 も受容体にはならない。従って、β-1,4-GalTase

への結合にはアミド基が必須であることが判明した。

3位のデオキシ誘導体 15 は、未修飾の基質 20 に比べ K_m 値がやや大きくなるものの転移反応は進行した。一方、3位のフッ素誘導体 16 ではほとんど転移反応が進行しなかったが、その K_i 値は GlcNAc-OR の K_m 値の2倍程度であり、3位の化学修飾は基質の β -1,4-GalTase 活性部位への親和力にはあまり影響を与えず、ガラクトース残基の転移段階を妨げることが判明した。

4位については、デオキシ誘導体 12、フッ素誘導体 13、チオール誘導体 14 は、いずれも β -1,4-GalTase に全く結合しなかった。チオール誘導体 14 も全く酵素に結合しないことから、Hindsgaul らの4位の水素原子が酵素の塩基性官能基への結合に必須であるという推論^{5b)}は検討の余地があると思われる。

6位に関しては、デオキシ誘導体 8、フッ素誘導体 9、チオール誘導体 10 は、 β -1,4-GalTase に対し基質 20 と同程度の親和力をもつことが判明した。一方、チオールが酸化されて得られるジスルフィド誘導体 11 は、酵素に対する親和力は増し、逆に反応速度が著しく低下することが判明した。

GlcNAc を非還元末端とする二糖 21-24 の K_m 値は、アグリコン部位の結合様式や単糖の種類に関係なくほぼ同じ値を示し、また、単糖 20 と相違がないことから β -1,4-GalTase は、アグリコン部分に対する認識は弱いことが判明した。

以上のことをまとめると、GlcNAc の2位のアセトアミド基と4位水酸基が認識に必須な官能基であり、 β -1,4-GalTase はこれら官能基がつくる極性部位を認識していることが伺える。また、GlcNAc のように4位水酸基と2位アセトアミド基がW字型に配置されているアミノ糖は複合糖質を構成する糖鎖には存在しないので、酵素がこの部分を他の糖残基との識別に用いるのは理に適っているように思われる。西田らは β -1,4-GalTase による3-アセトアミド-3-デオキシ-D-グルコース 25 のガラクトシル化で、1位の水酸基がグリコシル化を受けることを報告しているが¹⁷⁾、これも基質認識に2位のアミド結合と4位の水酸基(25においては3位のアミドと1位の水酸基に相当)が重要であることを支持している(図8)。また、ジスルフィド結合した二糖 11 が 20 より低い K_m 値を示すこと、シアル酸あるいはフコースが結合^{16b)}しているにもかかわらず β -1,4-GalTase によるガラクトシル化が可能であることから、6位水酸基周辺は空間的に余裕があると予想される。従って、N-アセチルグルコサミンが酵素に結合したときは、図9に示すように、1位および6位が酵素の外側に向いていることが考えられる。

Fig.8 Galactosylation of 25 with β -1,4-GalTase.

Fig.9 Transfer of galactosyl residue.

7. 2 基質複合体アナログのデザインと合成

β -1,4-GalTase の基質である UDP-Gal および GlcNAc-OR のアナログに対する挙動が明らかとなったので、どのような形で2基質を結合させるのが次の問題である。糖転移反応を有機化学的に見ると、3つの構成成分が必須である。すなわち、求電子的な糖残基(Gal)、脱離基(UDP)および求核的な受容体(GlcNAc-OR)である。図9には S_N2 型反応を想定した機構、および5節および6節での結果から推測される GalTase により認識される側面を示している。2基質複合体アナログの設計には、2つの点が重要である。1)どこで両基質をつなぐかと、2)脱離基周辺の構造をどのようにすれば転移が進行しないようになるかである。1)については、図9のような両基質の相対的配置を考えると、Gal の2位と GlcNAc の6'位または Gal の6位と GlcNAc の3'位でつなぐ2種の方法があるが、前2節の結果からは、前者の方が有望であることが予想できる。一方、2)に関しては UDP-Gal のホスホン酸アナログなどが知られている¹⁸⁾が、そのような構造を組み込んだ2基質複合体アナログは合成されていない。

5節で述べたように筆者らは明らかに活性中心に取り込まれるが、転移反応は進行しない供与体を見いだした。それは脱離基に修飾を加えなくとも阻害剤となりうることを示している。酵素反応のエネルギーダイアグラ

Fig. 10 Energy profile of enzyme-catalyzed reaction and design of inhibitor.

ムを描いたものが図10である。基質は基底状態でも酵素の活性部位に親和力(passive binding)をもつが、反応が起こるには遷移状態へのコンホメーション変化が必須である。不安定な遷移状態を安定化し、反応をスムーズに進行させるには基質と酵素の強い結合(dynamic

Fig. 11 Designed bisubstrate analogues.

(a) 1) $n\text{-Bu}_2\text{SnO}$ / MeOH , reflux; 2) BnBr , $n\text{-Bu}_4\text{NI}$ / toluene , reflux, 53.6 %; (b) $\text{PhCH}(\text{OMe})_2$, $p\text{-TsOH}$ / DMF , 60°C , 64.7 %; (c) MTMCl , NaH , NaI / DMF , 69.6 %; (d) MeOTf , MS4A / CH_2Cl_2 , 51.0 %; (e) 1) tert-BuOK / DMSO , 60°C ; 2) HgCl_2 , HgO / $\text{acetone-H}_2\text{O}$, 79.2 %; (f) 1) $n\text{-BuLi}$, $(\text{BnO})_2\text{POCl}$ / THF , -78°C , 27.3 %; (g) 1) Pd/C , H_2 , $n\text{-Bu}_3\text{N}$ / MeOH ; 2) UMP-lmd / DMF .

Scheme 6 Synthesis of 2,6'-tethered bisubstrate analogue 26.

binding)¹⁹⁾がなければならない。従って、阻害剤のデザインにおいては遷移状態アナログが注目され、事実グリコシダーゼなどに対しては中間体として考えられるオキソカルベニウムイオンを模した種々のアナログが合成されている。しかし、糖転移酵素の $\text{S}_{\text{N}}2$ 型反応の遷移状態において想定されている5価の炭素原子を模したアナログを合成する手法は開発されていない。UDP-Galのアナログ1が、基質としては認識されるが転移が著しく阻害されるという結果は、明らかに遷移状態への移行過程が妨げられると考えられるので、dynamic bindingが部分的にも期待できるのではないかと推論した。そこで、2基質複合型アナログのデザインとして、つなぎ手にはメチレンとエチレンを選択した2種のアナログ26、27(図11)が有望であると考えた。前者の合成をスキーム6に示す²⁰⁾。

8. 2基質複合型アナログの阻害活性

合成した2基質複合型アナログ26、27の β -1,4-Gal-Taseに対する阻害活性は ^{14}C で標識したUDP-Galを用いて糖転移を測定し算出した。結果を関連化合物の K_i 値とともに表3に示した。これからわかるように従来

Table 3 Inhibitory activities of synthesized bisubstrate analogues (26, 27) and related compounds.

Bisubstrate analogues	Apparent K_i values (μM)	
	UDP-Gal	GlcNAc
26	3.3 (competitive)	1.35 (competitive)
27	7.6 (noncompetitive)	1.95 (noncompetitive)
K_i values of other inhibitors	(UDP) 43 (UMP) 820	(16) 2700

最も強い阻害を示すとされるUDPよりはるかに強い活性を示し、 β -1,4-Gal-Tase阻害剤として有望であることが判明した。特に26は糖供与体および糖受容体いずれに対しても拮抗型の阻害を示し(図12)²⁰⁾、デザインしたとおりに活性部位のそれぞれのサイトに結合していると考えられる。今後、 β -1,4-Gal-Tase以外のガラクトース転移酵素に対する活性を測定し、狙ったおりの特異的な阻害を示すことを確認する必要がある。しかし、試験管内で糖転移反応の特異的な阻害が達成されたとしても、細胞レベルでの糖鎖合成の阻害をいかに達成しうるかなどの問題はあつたものの、糖鎖の生合成の精密な制御

Assay conditions: (A) UDP- ^{14}C -Gal (690 cpm/pmol, 2.25 μM); GlcNAc (0.5-3 mM); GalTase (2.2 μunit); MnCl_2 (10 mM); BSA-containing HEPES buffer (50 mM, pH 7.0); inhibitor **26** (0-12.5 μM); Incubation time, 7 min at 37 $^{\circ}\text{C}$; (B) diluted UDP- ^{14}C -Gal by a cold UDP-Gal (Total count: 45000 cpm, 3-27 μM); GlcNAc (3 mM); GalTase (10 μunit); MnCl_2 (10 mM); BSA-containing HEPES buffer (50 mM, pH 7.0); inhibitor **26** (0-12.5 μM); Incubation time, 6 min at 37 $^{\circ}\text{C}$.

Fig. 12 Lineweaver-Burk plots of 2,6'-tethered bi-substrate analogue **26** for acceptor (A) and donor (B).

に半歩なりとも近づいたのではないかと感じている。

9. おわりに

複合糖質の糖鎖合成に関与する転移酵素は結晶化が困難でいまだにX線解析が行われたものはない。生物有機化学的な手法で何とか転移機構の詳細に迫れないかと基質アナログの阻害作用を手掛かりに始めた仕事が今回の2基質複合体アナログのデザインへと進展した。2基質複合体アナログとしてデザインされた最初の阻害剤は、 α -1,2-フコース転移酵素に対するものであるが、それは先に述べた3成分のうち、転移される糖残基(フコース)を欠いた2成分からなるものである²¹⁾。最近、糖転移に関与する3成分を組み込んだ2基質複合体のアナログの合成やデザインが報告されているが、その活性に関しては現時点では不明である²²⁾。もちろん筆者のデザインも他の糖転移酵素に普遍的に適用できるのかを明らかにする必要がある。一方、2基質を共有結合ではなく、

イオン結合で結んだと考えられる、2基質による相乗的な阻害が α -1,4-FucTaseに対してごく最近報告された²³⁾。これらの手法も合わせ糖鎖合成を意のままに制御しうることが来るであろう。また、このような2基質複合体アナログの創製が活性中心における基質との相互作用の解明に役立つものと期待している。最後に、筆者以外で本研究に携わった、湯浅英哉、遠藤 剛、佐藤憲一、名取美智子諸氏に深謝いたします。

(平成9年1月8日受理)

文 献

- 1) (a) *Molecular Glycobiology*, ed. by M. Fukuda, O. Hindsgaul, Oxford University Press, Oxford, 1994; (b) R.A. Dwek, *Chem. Rev.*, **96**, 683 (1996); (c) 細胞社会グリコバイオロジー, 永井克孝, 箱守仙一郎, 本幡 陽編, 講談社サイエンスフィク, 東京, 1993; (d) 糖鎖研究の最先端, 福田 穰編, 羊土社, 東京, 1995
- 2) P. Stanley, *Glycobiology*, **2**, 99 (1992)
- 3) A.D. Elbein, "Cell Surface and Extracellular Glycoconjugates", ed. by D.A. Roberts, R.P. Mecham, Academic Press, New York, 1993, p. 119
- 4) A.D. Elbein *FASEB J.*, **5**, 3055 (1991)
- 5) (a) M.M. Palcic, J. Ripka, K.J. Kaur, M. Shoreibah, O. Hindsgaul, M. Pierce, *J. Biol. Chem.*, **265**, 6759 (1990); (b) O. Hindsgaul, K. J. Kaur, G. Srivastava, M. Blaszczyk-Thurin, S.C. Crawley, L.D. Heerze, M.M. Palcic, *ibid.*, **266**, 17858 (1991)
- 6) (a) G. Ashwell, J. Harford, *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 531 (1982); (b) 糖鎖の細胞における運命, 永井克孝, 箱守仙一郎, 本幡 陽編, 講談社サイエンスフィク, 東京, 1993
- 7) P.M. Wasserman, *Ann. Rev. Cell. Biol.*, **3**, 109 (1987)
- 8) (a) R.L. Hill, R. Barker, K.W. Olsen, J.H. Shaper, I.P. Trayer, "Metabolic Interconversion of Enzymes", ed. by O. Wieland, Springer Verlag, Berlin, 1972, p. 331; (b) G. D'Agostaro, B. Bendiak, M. Tropak, *Eur. J. Biochem.*, **183**, 211 (1989)
- 9) 瀧 孝雄, 実験医学増刊(癌転移の分子機構と転移の防止), 井川洋二, 青木元治, 鶴尾 修, 広橋説雄編, 1994, **12**, p.941
- 10) (a) L.J. Berliner, L.D. Robinson, *Biochemistry*, **21**, 6340 (1982); (b) O. Hindsgaul, K.J. Kaur, U.B. Gokhale, G. Srivastava, G. Alton, M.M. Palcic, In *Enzymes in Carbohydrate Synthesis, ACS Symposium Series 466*, ed. by M.D. Bednarski, E.S. Simon, (1990), p.38;

- (c) O. Hindsgaul, K.J. Kaur, G. Gokhale, G. Srivastave, G. Alton, M.M. Palcic, *ACS Symp. Ser.*, **466**, 38 (1991); (d) J. Thiem, T. Wiemann, *Angew. Chem.*, **108**, 1184 (1991); (e) M.M. Palcic, O. Hindsgaul, *Glycobiology*, **1**, 205 (1991); 最近, ラクトアルブミンの共存が効率のよい転移を促すことが報告された [K.-I. Do, S.-I. Do, R.D. Cummings, *J. Biol. Chem.*, **270**, 18447 (1995)]; (f) H. Yuasa, O. Hindsgaul, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 5891 (1992); (g) G. Srivastave, O. Hindsgaul, M.M. Palcic, *Carbohydr. Res.*, **245**, 137 (1993); (h) H. Kodama, Y. Kajihara, T. Endo, H. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 6419 (1993); (i) Y. Kajihara, T. Endo, H. Ogasawara, H. Kodama, H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.*, **269**, 273 (1995)
- 11) T. Endo, Y. Kajihara, H. Kodama, H. Hashimoto, *Bioorg. Med. Chem.*, **4**, 1939 (1996)
 - 12) D.E. Hoard, D.G. Ott, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1785 (1965)
 - 13) H. Babad, W.Z. Hassid, *J. Biol. Chem.*, **241**, 2672 (1966)
 - 14) B.S. Khatra, D.G. Herries, K. Brew, *Eur. J. Biochem.*, **44**, 537 (1974)
 - 15) L.J. Berliner, M.E. Davis, K.E. Ebner, T.A. Beyer, J.E. Bell, *Mol. Cell. Biochem.*, **62**, 37 (1984)
 - 16) (a) S.K. Sinha, K. Brew., *Carbohydr. Res.*, **81**, 239 (1980); (b) M.M. Palcic, O.P. Srivastava, O. Hindsgaul, *ibid.*, **159**, 315 (1987)
 - 17) Y. Nishida, T. Wiemann, V. Sinnwell, J. Thiem, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2536 (1993)
 - 18) (a) M.M. Vaghehi, R.J. Bernacki, N.K. Dalley, B.E. Willson, R.K. Bobins, *J. Med. Chem.*, **30**, 1383 (1987); (b) M.M. Vaghehi, R. J. Bernacki, W.J. Hennen, R.K. Robins, *ibid.*, **30**, 1391 (1987)
 - 19) A.J. Kirby, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 707 (1996)
 - 20) H. Hashimoto, T. Endo, Y. Kajihara, *J. Org. Chem.*, **62**, in press.
 - 21) M.M. Palcic, L.P. Heerze, O.P. Srivastava, O. Hindsgaul, *J. Biol. Chem.*, **264**, 17174 (1989)
 - 22) (a) B.M. Heskamp, G.H. Veeneman, G.A. van der Marel, C.A.A. van Boeckel, J.H. van Boom, *Tetrahedron*, **51**, 8397 (1995); (b) B.M. Heskamp, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, *J. Carbohydr. Chem.*, **14**, 1265 (1995); (c) H. Streicher, A. Geyer, R.R. Schmidt, *Chem. Eur. J.*, **2**, 502 (1996)
 - 23) (a) C.-H. Wong, D.P. Dumas, Y. Ichikawa, K. Koseki, D.J. Danishefsky, B.W. Weston, B.J. Lown, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7321 (1992); (b) L. Quao, B.W. Murray, M. Shimazaki, J. Schultz, C.-H. Wong, *ibid.*, **118**, 7653 (1996)