I. 生体機能関連

糖鎖工学—糖鎖機能解明を目的とする糖鎖および糖鎖類似体の合成

梶 本 哲 也*・伊 田 喜 光*

Glycotechnology : Synthesis of Carbohydrates and Carbohydrate Mimetics

Tetsuya KAJIMOTO* and Yoshiteru IDA*

Carbohydrates on cell surfaces play important roles in various cell adhesion processes such as bacterial and viral infection, neutrophil recruitment, cell differentiation and so on by binding proteins like lectins, antibodies, and glycoenzymes (glycosidases and glycosyltransferases). Carbohydrate analogues which inhibit the interaction between carbohydrates and proteins are promising molecules to clarify and control biological functions of oligosaccharides, and some of the analogues were prepared by using aldolase catalyzed reactions without any tedious procedures. For example, a mimetic of sialyl Lewis X which is a ligand of E-selectin was synthesized by using L-threonine aldolase catalyzed reaction as a key step. In addition, synthetic approach to KDO and 4-azido-2-deoxy-4-deoxy-L-glucuronic acid by using kynureninase and the L-threonine aldolase, respectively, is almost achieved.

This review article shows solid phase synthesis and combinatorial synthesis of carbohydrates and treats the details about the utility of aldolases on making carbohydrate mimetics as one of the chemical approaches of glycotechnology.

Key words: Sialic acid, Sialyl Lewis X, L-Threonine aldolase, Iduronic acid, KDO, Kynureninase, Combinatorial synthesis.

1. はじめに

複合糖質として細胞表面に存在する「糖鎖」は、特に個々の生物に特徴的な神経、生殖細胞や免疫系において多様な構造をとり、生命の多様性を表現する役割を果している。たとえば、卵細胞表面の糖鎖は受精できる精子を選択し、発生過程の受精卵表面糖鎖は次々に構造を変えて分化を助ける。また、細菌やウイルスは宿主の細胞表面糖鎖を認識して宿主への侵入を開始し、これら微生物の表面糖鎖は宿主の免疫系を刺激するハプテンやエンドトキシン(細菌内毒素)として働く。これら糖鎖の機能

解明を目的とした有機化学的研究は2つに大別できる。その第一は生体成分として構造決定された生理活性糖鎖の合成法を確立し、純粋な糖鎖試料の調製を可能にする研究であり、第二はレクチンや糖鎖関連酵素などの糖認識タンパク質との相互作用を持った糖鎖類似体を設計・合成する研究である。

本稿では、前者の方法論として近年特に盛んになってきた固相合成について具体例を紹介し、後者について筆者の酵素を利用した糖鎖類似体の合成研究を中心に解説する。

2. 生体内糖鎖の固相合成について

生体成分としての糖鎖の合成が盛んになった背景には、シアル酸、KDO、グルクロン酸やイズロン酸などを構成ユニットとする酸性糖鎖とレクチン間の極めて選択的で強固な相互作用の発見がある。インフルエンザウイルスによる感染(ヘマグルチネーション)や白血球の創傷

* 昭和大学薬学部生薬学・植物薬品化学教室()

* Department of Pharmacognosy & Phytochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University ()

部位への遊走¹⁾は、酸性糖鎖-レクチン相互作用が引き金になる生物活性の代表例である。最近、これら糖鎖の簡便で迅速な合成を目指して、固相法による糖鎖合成が盛んにチャレンジされている。現在では、化学的グリコシル化反応や糖転移酵素を利用した還元末端側からの合成とグリカルへの糖付加反応を利用した非還元末端側からの合成が確立されており、糖鎖の性状に応じて還元末端側から、あるいは非還元末端側からの合成が可能にな

りつつある(スキーム1)。化学的グリコシル化においては、液相法と同様にもっぱら trichloroimidate や thioglycoside がドナー糖として用いられる。Nicolaou は光照射で合成糖鎖を支持体から遊離させるために *o*-nitrobenzyl ether を結合させたポリスチレンを固相として選び、thioglycoside-DMTST 法によるグリコシル化を繰り返して *Phytophthora megasperma* 由来のファイトアレキシニンエリシター7糖(1)の合成を達成してい

By Nicolaou

By Wong

By Danishefsky

Scheme 1 Solid phase synthesis of oligosaccharides.

る²⁾。また、Roush はスルホン酸樹脂を用いた固相グリコシル化において Schmidt 法が液相より固相で高いアノマー選択性を与えることを指摘し、固相法に高い期待を寄せている³⁾。糖転移酵素を利用した例としては、Wong によるシアロルイス X (2) の合成がある⁴⁾。また、Danishefsky は独自に開発したグリカルへの糖付加反応を固相合成に応用し、*N*-結合型糖タンパク糖鎖 (3) の合成に成功している⁵⁾。

現在までのところ、固相法での酸性糖のグリコシル化の報告例は Wong の方法だけであるが、固相合成法の進歩は生理活性糖鎖の合成をペプチドや核酸の合成と同程度以上に能率的にしてくれるものと期待される。

3. 糖鎖類似体の設計と合成

一方、大量かつ容易に調製できる糖鎖類似体を設計・合成し、糖鎖-タンパク質相互作用に及ぼす影響を検討して医薬品などに利用する研究も盛んである。糖鎖認識タンパク質には、上述したレクチンの他に抗体や糖鎖関連酵素がある。特に酵素と相互作用できる糖鎖類似体は相互作用の結果として阻害活性を示すことが多く、生理活性糖鎖としてよりも毒素や抗生物質、医薬品のリード化合物として取り扱われてきた傾向がある。天然物として単離された糖鎖類似体においては本傾向はさらに強く、 α -アミラーゼ阻害活性を有するアカルボースの糖尿

病治療薬としての利用はその代表例である。

3.1. シアロルイス X 類似体

近年、特に報告数の多い糖鎖類似体合成は、白血球表面の糖鎖であるシアロルイス X (2) に関するものである。シアロルイス X はフコース、*N*-アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸から構成されている四糖であり、創傷部位の血管内皮細胞に発現する E-セレクトインのリガンドとして働く。この相互作用は白血球の炎症部位への遊走の第一段階であり¹⁾、シアロルイス X およびその類似体は白血球の過剰な遊走を抑制できることから抗炎症剤として期待されている。長谷川、木曾らによると、フコースの 2,3,4-位とガラクトースの 4,6-位の水酸基ならびにシアル酸のカルボキシル基が E-セレクトインとの結合に必須である⁶⁾。白血球と E-セレクトインとの結合を阻止できると報告されているシアロルイス X 類似体を図 1 に示す⁷⁾。

筆者らも、E-セレクトインとの相互作用に必須の水酸基とカルボキシル基を有するペプチドがシアロルイス X 類似体となり得ると考え、図 2 に示す 2 種のペプチド様物質 (4, 5) をシアロルイス X 類似体として設計した。4, 5 の構造中、非天然アミノ酸である γ -hydroxy-*allo*-L-threonine は L-スレオニナルドラーゼを利用して合成できると予想した。

L-スレオニナルドラーゼは、本来 L-スレオニンを

Fig. 1 Structures of mimics of SLe^x.

Fig. 2 Binding conformation of sialyl Lewis X to E-selectin and structure of its mimetics.

グリシンとアセトアルデヒドに分解する酵素であるが、逆反応であるアルドール縮合をも触媒してβ-ヒドロキシ-α-L-アミノ酸を与える(スキーム2)。種々の基質の中で、特にα-位に酸素または窒素官能基を有するアルデヒド(6~9)を用いた場合に *erythro*/*threo* 比が高く、しかも高収率が得られた(表1)⁸⁾。

Scheme 2 L-Threonine aldolase catalyzed reaction.

α-Benzyloxyacetaldehyde(6)とグリシンとの縮合(表1, entry 1)を鍵反応として利用することによって4, 5の合成は極めて容易に達成された(スキーム3)。4はE-セレクトインと白血球の結合を阻害したのに対して、5には本阻害活性は見られなかった⁹⁾。

両者の構造上の違いは、フコースとγ-hydroxy-*allo*-L-threonine 間のメチレン数の差だけであり、E-セレクトインとの結合における構造-活性相関に興味を持たれた。一般に糖鎖構造の中で、それぞれの中性単糖のグリコシド結合(C₁-OR)はC₁-C₂結合とアンチペリプラナーとなる最安定配座をとっており(エキソアノメリック効果),

Table 1 L-Threonine aldolase catalyzed reaction with glycine.

Substrates	Products		Yield
	<i>erythro</i>	<i>threo</i>	
6 			88 %
7 			87 %
8 			75 %
9 			90 %

末端のシアル酸結合はアンチペリプラナー型だけではなくシンクリナル構造もとると考えている¹⁰⁾。E-セレクトインに結合しているシアロリスXの立体配座については、Cooke らがトランスファー-NOE から得られた距離情報に基づいて予想し¹¹⁾、後に Scheffler らは力場計算(MMC)の結果を上述の距離情報に加え、Cooke らの結果を支持している(図2)¹²⁾。筆者らは朝倉教授(東京農工大)のご協力を得、NOE スペクトルと DADAS 90 計算とを組み合わせ、4と5の水溶液中でのコンフォメーションを求めた。その結果、4では活性発現に必須の官能基がすべて同一面に配向しているのに対して、5

Scheme 3 Synthetic route of sialyl Lewis X mimetic (4).

ではそれら官能基が互いに無関係な方向に配向していることが明らかとなった(図3)¹³。ちなみに、ここで得られた4の安定配座はシアロリスXの活性配座と重ね合わせることが可能である。

余談になるが、L-スレオニアルドラーゼは糖鎖のペプチド類似体の合成だけでなく、核酸類似体の合成においてもその特長を発揮する。筆者らはすでに、本酵素を利用してRNA塩基を残基に持つアミノ酸の合成に成功しており、核酸領域での利用も試みている。特に昨年、

多数の犠牲者を出した大腸菌O-157の産生するベロ毒素がリボソーム-RNAの特定位置のアデニンを開裂するアデノシングリコシダーゼであることに着目し、本酵素の阻害剤となるRNA様ペプチド(10)を合成している(スキーム4)¹⁴。

3.2. ヘパリン/ヘパラン硫酸中のb-FGF結合ドメイン類似体の合成

血液凝固阻止活性を有することで有名なヘパリン/ヘパラン硫酸は分子量約1万の高分子多糖で、グルコサミン(GlcN)とイズロン酸(IdoA)からなるGlcN-IdoAドメインと、グルコサミンとグルクロン酸(GlcA)からなるGlcN-GlcAドメインを構成ユニットとする。前者のGlcN-IdoAドメインは一般に硫酸基に富むことから「高硫酸化クラスター」と呼ばれている。この高硫酸化クラスターはO-硫酸化とN-硫酸化によって多くの硫酸化パターンをとることが可能であり、糖配列と硫酸化パターンの違いが種々のタンパク質とヘパリン/ヘパラン硫酸との相互作用に極めて高い特異性を与えている。近年、細胞の増殖に関与する塩基性繊維芽細胞成長因子(b-FGF)と結合する高硫酸化クラスターの構造(11)が解明されて注目を集めている(図4)¹⁵。

このb-FGF結合ドメインは、イズロン酸の4位にグルコサミンが結合し、そのグルコサミンの4位にイズロン酸が結合する繰り返し二糖ユニットが規則正しく硫酸化された構造をとっており、系統的な類似体の設計や合成が可能である。そこで、筆者らは合成容易なFGF-結合ドメイン類似体(12)の設計とその大量合成を計画した。その第一段階として、入手困難でしかもグリコシル化反応についての知見が乏しいイズロン酸をモデル化した4-アザイズロ

Fig.3 Stable conformation of sialyl Lewis X mimetics(4, 5).

ベロ毒素認識 r-RNA 配列

Scheme 4 Structures of vero-toxin recognized RNA sequence and designed inhibitor.

Fig.4 FGF-Binding domain of heparine or heparane sulfate(11).

Scheme 5 Mimetic of b-FGF binding domain (12) and its synthetic scheme.

ン酸(13)を合成ターゲットとした。4-アザイズロン酸(13)はアミノ酸でもあることから、リンゴ酸から容易に調製されるアルデヒド(14)とグリシンを本アルドラーゼ存在下で縮合させたところ、予想どおり合成中間体である新規アミノ酸(15)の大量合成に成功した。続いて、還元的脱ベンジリデン化し、アミノ基とカルボキシル基をそれぞれ Boc 基とメチル基で保護した。現在、一級水酸基の活性化と環化反応を検討中である(スキーム 5)¹⁶⁾。

3.3. ガングリオシド GQ_{1b} 類似体およびセラミド類似体の合成

複合糖鎖は、糖鎖部分と脂質またはタンパク質部分との協同により生物機能を発現している。特にガングリオシドと呼ばれる糖脂質は、脂質部分のセラミドが活性発現に重要とされているため、セラミド誘導体の合成も糖鎖研究における重要な課題である。筆者らは、冬虫夏草菌から単離された免疫抑制物質 mycestericin D(16)がセラミド誘導体であることに注目し、野出教授(京都薬大)との協同で L-スレオニアルドラーゼを利用した

16の全合成に成功し(スキーム 6)¹⁷⁾、本アルドラーゼがセラミド誘導体の合成にも有用であることを実証した。

本法をさらに生理活性ガングリオシド類似体の合成に利用しようと思案していたところ、日本ガイシ株式会社がシアル酸のポリマーであるコロミン酸を菌体表面に生産する大腸菌の培養に成功し、その部分加水分解により sialyl α (2-8)sialoside(17)の大量調製に成功していると知らされた。そこで筆者らは、 α 2,8-結合したシアル酸二糖(18)が神経突起伸長作用を有するガングリオシド GQ_{1b} 糖鎖の特徴構造である点に着目し、L-スレオニアルドラーゼを利用して調製できるスフィンゴシン誘導体と 17 の誘導体(19)とを還元的アミノ化により結合させ、GQ_{1b} に類似した化合物の合成研究を手掛け、神経突起伸長作用発現の機構を分子レベルで解明しようと計画している。なお、ホスファチジルエタノールアミン(PE)と 19 とを縮合した GQ_{1b} 類似体(20)の合成はすでに終わっている(スキーム 7)¹⁸⁾。

3.4. エンドトキシン類似体の合成

Scheme 6 Total synthesis of mycestericin D.

Scheme 7 Synthesis of GQ_{1b} mimetic and the structure of GQ_{1b}.

コレラ菌(*Vibrio cholera*)や大腸菌(*E. coli*)などのグラム陰性細菌の菌体表面に存在する特有な複合糖鎖は、発熱や下痢といった感染症特有の症状を引き起こす原因物質であるが、ワクチン製造用のハプテンとしても期待されている。その化学構造はポリムラミン酸に種々の脂肪酸やリン酸が複雑に結合したリピッド A (21) に 8 炭糖の KDO (22) が結合した複合糖脂質であり、KDO の構造を変えることによって新規な生物機能を引き出すことができると期待される。須貝, Wong は、KDO を基質(あるいは生成物)とする KDO-アルドラーゼを利用して KDO およびその類縁体を合成している¹⁹⁾。さらに幅の広い誘導体の合成ルートの開拓を目的として、筆者らはキヌレニン分解酵素が触媒する反応を利用した KDO 類縁体の合成を検討している。

キヌレニン分解酵素は、本来、トリプトファンの代謝中間体であるキヌレニン (23) をアントラニル酸 (24) とアラニンに分解する加水分解酵素である。本酵素は現在のところアルドラーゼに分類されていないが、興味あるアルドール縮合を触媒する。Phillips らは、本酵素反応液中にベンズアルデヒドを共存させてベンズアルデヒドとアラニンのメチルアニオンとが縮合したアルドール生成物を得、本酵素がキヌ

レニンを分解する過程でメチルアニオンを発生させると同時にアルデヒドと縮合させることを報告している²⁰⁾。最近、筆者らはベンズアルデヒド以外の芳香族アルデヒドも本酵素反応の基質になることを見いだした。とりわけ、フルフラール (7) などの 5 員環ヘテロ芳香族アルデヒドを基質とした時に得られる生成物 (25) は炭素数 8 の γ -ヒドロキシ- α -アミノ酸であり、 γ -位の水酸基は *R*-配置を有することが判明している²¹⁾。アミノ基のカルボニル化反応により γ -ヒドロキシ- α -ケト酸 (26) へと変換すると、KDO が持つ「カルボキシル基→カルボニル基→メチレン→*R*-配置水酸基→C4 の側鎖」という骨格の構築が達成できる (スキーム 8)。筆者らは、本法により短工

Scheme 8 Synthesis of KDO and its derivatives by using kynureninase catalyzed reaction.

程でKDO類似体の合成ができ、さらには人工エンドトキシンの合成ができると考え、検討を進めている。

4. 糖鎖合成の将来への展望

前節では、糖鎖構造と機能の理解に基づいて考案した糖鎖類似体の戦略的な合成について述べてきた。特に酵素を鍵段階に利用する方法は、反応の極めて高い立体選択性と操作の簡便さ故にプレパラティブスケールでの短工程合成に適している。しかし、糖鎖の構造と生物機能の相関をもっと短時間でスクリーニングするためには、微量であっても多種類の糖鎖類縁体を一挙にかつ手当りしだいに合成する方法論が上述の戦略的合成の相補的手段として必要である。医薬品開発の新技术として最近話題になっているコンビナトリアル法と呼ばれる系統的なランダム固相合成は、この目的に打って付けの方法論である。

昨年 Kahne らは、ELISA(酵素結合型抗体)法を応用した酵素結合型レクチン法とも呼べる新アッセイ法を指標に、独自に開発した sulfoxide グリコシル化をコンビナトリアル合成に適用し、1300種の合成糖鎖の中から *Bauhinia purpurea* レクチンの本来のリガンドとなる糖鎖(Gal- β 1,3-GalNAc)よりも強く結合する人工糖鎖を発見している(スキーム9)²²⁾。今日の糖鎖研究ブームの火付け役となったシアロロイス X-E-セレクトイン相互作用も mM レベルの極めて弱い結合であることから、もっと強く E-セレクトインと結合する糖鎖リガンドが他に存在すると信じられている。糖鎖の真の生物機能解明や新規生理活性糖鎖リガンドの発見において、生体内糖鎖より強く糖鎖認識タンパク質と相互作用する人工糖鎖の設計・合成・発見は、糖鎖研究の発展にますます重要な役割を担うことになり、生命の多様性を追及する糖鎖研究のブレイクスルーを作ると期待できる。

本稿が糖鎖機能を分子レベルで解明しようとする糖鎖工学に従事している研究者諸氏の発想転換に役立てば幸いである。

謝 辞 本稿の執筆を終えるにあたり、本研究に携わっていただいた多くの協同研究諸氏、特に Chi-Huey Wong 教授、藤多哲朗教授(摂南大・薬学部)、野出 学教授、朝倉哲郎教授、藤井政幸助教授(近畿大・九州工学部)、Vassil P. Vassilev 博士、内山武人博士、蛭間和美博士、新宮一司博士、三浦 剛博士、武林万紀修士、柴田佳代子修士、金子光明修士に感謝いたします。

(平成9年1月31日受理)

文 献

- 1) M.L. Phillips, E. Nudelman, F.C.A. Gaeta, M. Perez, A.K. Singhal, S. Hakomori, J.C. Paulson, *Science*, **250**, 1132 (1990)
- 2) K.C. Nicolaou, N. Wissinger, J. Pastor, F. DeRoose, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 449 (1997)
- 3) J.A. Hunt, W.R. Roush, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9998 (1996)
- 4) M. Schuster, P. Wang, J.C. Paulson, C.H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1135 (1994)
- 5) J.Y. Roberge, X. Beebe, S.J. Danishefsky, *Science*, **269**, 202 (1995)
- 6) A. Hasegawa, T. Ando, M. Kato, H. Ishida, M. Kiso, *Carbohydr. Res.*, **257**, 67 (1994)
- 7) B.N.N. Rao, M.B. Anderson, J.H. Musser, J.H. Gilbert, M.E. Shaefer, C. Foxall, B.K. Bradley, *J. Biol. Chem.*, **269**, 19663 (1994); T. P. Kogan, B. Dupre, K.M. Keller, I.L. Scott, H. Bui, R.V. Market, P.J. Beck, J.A. Voytus, B.M. Revelle, D. Scott, *J. Med. Chem.*, **38**, 4976 (1995); K. Hiruma, T. Kajimoto, G. Weitz-Schmidt, I. Ollmann, C-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9265 (1996)
- 8) V.P. Vassilev, T. Uchiyama, T. Kajimoto, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 4081 (1995); *Idem, ibid.*, **36**, 5063 (1995)
- 9) T. Uchiyama, V.P. Vassilev, T. Kajimoto, W. Wong, H. Huang, C.-C. Lin, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5395 (1995); Uchiyama, T.J. Woltening, W. Wong, T. Kajimoto, M. Takebayashi, G. Weitz-Sch-

Scheme 9 Solid phase carbohydrate library by Kahne.

- midt. T. Asakura, M. Noda, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.*, **4**, 1149 (1996)
- 10) S. Sabesan, J.O. Duus, T. Fukunaga, K. Bock, S. Ludvigsen, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3236 (1991)
- 11) R.M. Cooke, R.S. Hale, S.G. Lister, G. Shah, M.P. Weir, *Biochemistry*, **33**, 10591 (1994)
- 12) K. Sheffler, B. Ernst, A. Katopodis, J.L. Magnai, W.T. Wang, R. Weismann, T. Peters, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 1841 (1995)
- 13) T. Asakura, M. Noda, O. Saita, M. Demura, K. Umemoto, T. Kajimoto, C.-H. Wong, *Reports on Progressive Polymer Physics in Japan*, in press (1996)
- 14) M. Kaneko, K. Shingu, T. Miura, T. Kajimoto, Y. Ida, M. Ishizuka, M. Fujii, unpublished
- 15) S. Faham, R.E. Hileman, J.R. Fromm, R.J. Linhardt, D.C. Rees. *Science*, **271**, 1116 (1996)
- 16) M. Kaneko, T. Kajimoto, Y. Ida, unpublished
- 17) K. Shibata, K. Shingu, V.P. Vassilev, K. Nishide, T. Fujita, M. Node, T. Fujita, T. Kajimoto, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 2791 (1996)
- 18) T. Miura, M. Aonuma, T. Kajimoto, Y. Ida, M. Kawase, Y. Kawase, Y. Yoshida, *Synlett*, in press (1997)
- 19) T. Sugai, G.-J. Shen, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7816 (1993)
- 20) R.S. Phillips, R.K. Dua, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7385 (1991)
- 21) T. Miura, T. Kajimoto, Y. Ida, unpublished
- 22) R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, D. Kahne, *Science*, **272**, 1520 (1996)

会員増強運動にご協力を!!

本協会では会員増強運動を展開しております。お知り合いの友人・学生に是非ご入会をお勧め下さいませようお願いします。本協会の財政基盤は会費に大きく依存しています。あなたの行動が明日の協会を支えます。

なお、入会申込書は、本年度協会誌の毎号に綴込みのものをご使用下さい。また、事務所にご一報下されば直ちにお送りいたします。

事務局：社団法人 有機合成化学協会 会員係

〒101 東京都千代田区神田駿河台 1-5 化学会館（電話 03-3292-7621）