

研究課題別評価

1 研究課題名：

糖鎖迅速合成と多様性合成への挑戦

2 研究者氏名：眞鍋史乃

研究員：植木 章晴 （研究期間 H. 15. 4～H. 17. 7）

研究員：山田 聡 （研究期間 H. 15. 7～H. 15. 9）

研究員：土肥 弘久 （研究期間 H. 16. 4～H. 17. 2）

研究員：山口 真範 （研究期間 H. 16. 4～H. 16. 12）

研究員：石井 一之 （研究期間 H. 17. 4～H. 18. 3）

研究員：杉岡 智教 （研究期間 H. 17. 4～H. 18. 3）

3 研究のねらい：

糖鎖は生体内において様々な活性を持つことが知られてきた。しかしながら、糖鎖研究は自然界からの入手の難しさ、精製の難しさがネックとなっている。有機化学的手法により糖鎖を供給することは非常に糖鎖科学に貢献することとなる。しかしながら、有機化学的手法による合成では、糖鎖延長合成に必要である素反応の種類は限られているにも関わらず、反応終了後の精製の多大な労力と時間が必要となる。これらの問題点を解決するために、糖鎖合成自動化、機械化を目的として、検討を行う。また、糖鎖ライブラリーの構築法について検討を行う。

4 研究成果：

糖鎖はグリコシル化反応、一時的保護基の除去反応の素反応の繰り返しからなる行程を経て合成される。生体内高分子であるペプチドや核酸においては自動合成機が市販されており、最近では受託合成も盛んになっており、生化学の分野に大きな貢献を果たしている。糖鎖合成を自動化する試みは1960年代にも行われたが、当時のグリコシル化反応の収率や基質一般性における限界により、しばらく研究はとどまっていた。1994年 Danishefsky が彼らのグリカール法を固相反応に応用したことを契機として再び研究されるようになったものの、いまだ明確なビジョンは見えていない。糖鎖は自然界からの供給に限界があり、また、タンパク質や核酸と違い、分子生物学的手法により合成、増幅することはできない。有機合成的手法によれば、天然、非天然の構造に関わらず、充分量合成できる。

可溶性高極性である低分子量ポリエチレングリコール (PEG) を支持担体としてマニュアル操作により糖鎖合成を行う手法の開発を行っていた。本手法の特長は以下のとおりである。PEGの高極性により、反応後の目的物のみの単離が短いシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより簡便に行える。これは固相合成における濾過操作に相当する。固相合成法においては固相に基質を担持することにより、濾過を可能にする物理化学的性質を一定に揃え、かつ、他

の試薬と分離できるようにする。PEG の高極性により、目的物の物理化学的性質を一律に揃え、反応後の精製をルーチン化できる。また、反応系が均一系であるので、反応性を高いまま保つことができる。また、PEG に基質を結合させたまま、通常の NMR や MS、呈色反応により、反応追跡を行うことができる。

一連の糖鎖合成を自動化、機械化することは実用化の視点からも非常に意義深い。自動化を実現した経緯を以下に述べる。

まず、ひとつひとつのマニュアル作業を逐一、書き出し、デジタルカメラで撮影し、機械化において解決すべき点を、機械の設計、組み立てを行った島津製作所株式会社、およびエステック株式会社とともに洗い出した。その結果、機械操作においては、固体試薬を用いることができない、すなわち、乾燥に用いられる Na_2SO_4 や糖鎖合成において用いられるモレキュラーシーブは使用することができない制約があることが明らかになった。また、分液操作も機械化において困難であるとされたので、後処理における水の使用を行わないこととした。また、低温反応は機械に負担になることもあり、グリコシル化反応の温度は -20°C から室温付近がよいことも明らかになった。

以上の知見をもとに、機械化を目的として反応系を最適化することとした。加えてグリコシル化反応、一時的保護基の脱保護反応、キャッピング反応それぞれがお互いに干渉しないこと、シリカゲルカラムにおいての PEG 溶出極性において用いた試薬が混入しないこと、室温にて長時間安定である試薬のみを用いることが求められた。

	最適化前	問題点	最適化後
グリコシル化反応	チオグリコシドあるいはフッ化糖を糖供与体	固体試薬が使用できない 反応温度 -40°C	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ などを活性化剤としてイミデートを糖供与体にする 反応温度 0°C
キャッピング反応	$\text{Ac}_2\text{O} - t\text{Pr}_2\text{Et}$	$t\text{Pr}_2\text{Et}$ がシリカゲル精製においてPEG画分に混入	Ethyl isocyanate formate (中性条件)に変更
脱保護反応	Pyridine- H_2O あるいは HDTG	水が使用できない HDTG は室温で不安定	Pyridine-MeOHに変更

そこで、糖供与体をチオグリコシドあるいはフッ化糖から可溶性の試薬のみを使用できるイミデートへと変え、また、一時的保護基であるクロロアセチル基の脱保護反応はピリジンメタノールにより行うこととした。キャッピング反応は中性条件において水酸基と速やかに反応するイソシアネートを用いることとした。

機械は、反応容器、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行う精製部、試薬、溶媒を保存する場所、ニードル(溶媒を注入する大容量ニードル、試薬を注入する小容量ニードル、反応溶液、精製液を移動する溶液ニードルの3種)、及びニードル洗浄部、熱循環制御ユニット、真空制御ユニット、動作制御部(PC, およびソフトウェア)から成る。



ソフトウェアはエクセルをインターフェースソフトとしており、ログファイルにより、動作確認や問題点の洗い出しができるようにした。また、有機化学者の視点にたち、反応追跡が可能であり、反応時間や温度などについてフレキシブルな対応が可能であることも考慮した。また、有機溶媒、酸性試薬に対する耐久性に優れた機械部品の選択や形状についても検討した。例えば、溶媒のキャップの直径の 1 mm の差がニードルをさす操作の再現性に影響することや、ニードルの穴を下部からサイドに変更することにより、セプタムの詰まりを防ぐことが明らかになった。

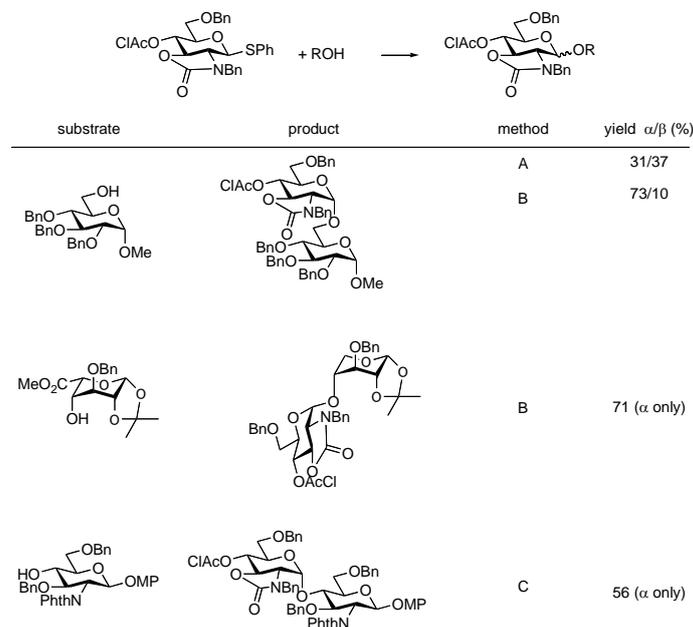
現時点においてマニュアルで行っていたグリコシル化反応、キャッピング反応、脱保護反応それぞれが進行することを確認している。機械化における反応条件設定を行っており、今後実際に糖鎖合成を行う予定である。

糖鎖合成自動化、機械化に関しては多段階合成の場合、途中で混合物を分離できないために、液相における合成よりもより厳密な立体制御のグリコシル化反応が必要となる。また、特に2-amino-2-deoxy 糖に関しては、糖鎖合成化学の始祖である Lemieux や Paulsen がアジド基を保護基として糖鎖合成化学に導入して以来40年間、1,2-*cis* グリコシル化反応反応については解決されていない。2-アジド糖は立体選択性が充分ではなく、また、その合成法にも問題がある。

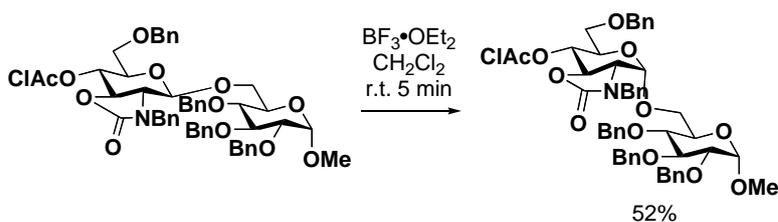
2, 3-trans アミノアルコールをオキサゾリジノンにして固定化することにより、ピラノース環にひずみを生じさせることにより α 選択性を増すことにした。検討の結果、この新規糖供与体は高い 1, 2-*cis* 選択性を示すことが明らかになった。

新規糖供与体は簡便に合成できる。また、反応性の高い糖受容体を用いてグリコシル化反応を行うと α 体と β 体の混合物を与えてしまうが、溶媒としてジオキサソートルエンを用いることにより、反応性の高い水酸基に対しても高い α 選択性を達成することができた。反応性の低い水酸基を糖受容体とすると、溶媒に関わらず、高い α 選択性を与えることも明らかにした。また、本糖供与体の特長としては、可溶性の糖供与体活性化試薬で活性化可能であり、0°Cから室温において反応できるので、機械化、自動化に適した糖供与体である。また、糖受容体として用いたもののなかには医薬品として用いられているヘパリン合成に有用である化合物を含んでおり、更なる展開を目指す予定である。

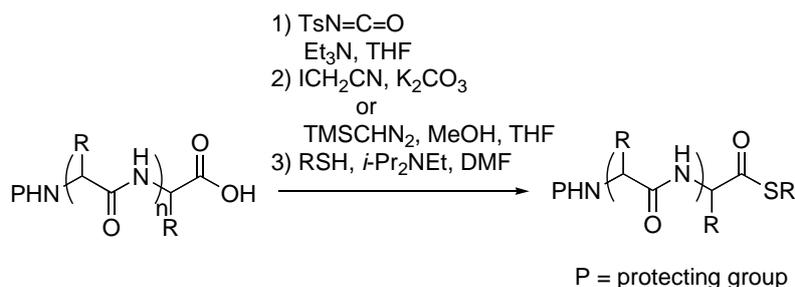
非常に興味深いことに、このひずんだ構造を持つ糖構造はたとえ β 体が生じたとしても、比較的弱い酸性条件において熱力学的に安定である α 体に異性化できる。このような弱い酸性条件において異性化する糖ユニットは初めて見出されたものである。このアノメリゼーションはオキソカルベニウムイオンを介するものであると想定できるが、一方、同じようにオキソカルベニウムを与えるはずのグリコシル化反応においての活性化については反応性が高くない。現在、この相反する反応機構について解明中である。



methods: A) AgOTf, PhSCI, DTBMP, CH₂Cl₂, rt. B) AgOTf, PhSCI, DTBMP, dioxane-toluene (3:1), 0 to rt. C) N-(Phenylthio)- ϵ -caprolactam, Ti₂O, CH₂Cl₂, rt.

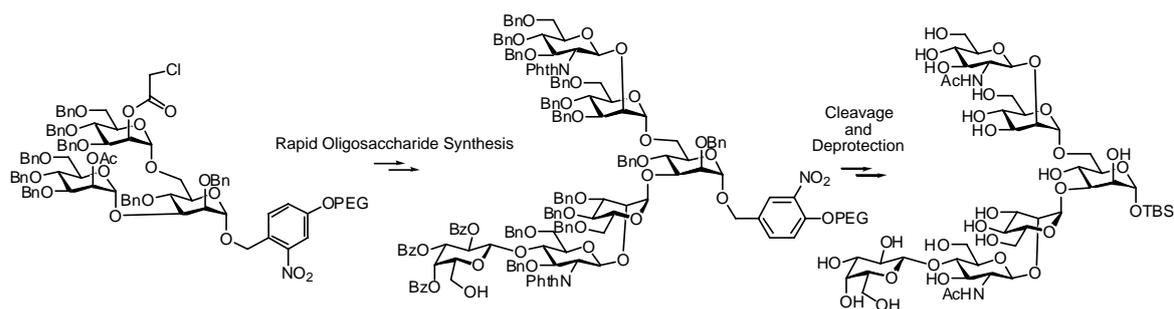


糖鎖合成から複合糖質合成への展開は非常に興味深い。生体内においては糖鎖は何らかの生体内分子と結合して複合糖質として存在している。特に糖タンパク質はポストゲノム時代の研究テーマとして注目されるであろう翻訳後修飾を持つ。また、現在の分子生物学的手法においては均一な糖タンパク質を供給できない。そこで、均一な糖鎖を持つ糖ペプチドや糖タンパク質を合成することは非常に大きな意味を持つと思われる。現在のペプチド化学において native chemical ligation 法や block 合成においてチオエステルは非常に大きな役割を持つ。しかし、現在一般的に広く用いられている Fmoc 固相合成法においては Fmoc 除去時の塩基性条件においてチオエステル部の不安定性に問題があり、合成に困難が生じている。この問題点を解決すべく種々の検討が行われているが、一長一短がある。我々はカルボン酸に *p*-toluenesulfonyl isocyanate を塩基性条件において作用させ、ペプチド側鎖官能基を損なうことなく、トシルアミドを温和な条件において合成する手法を開発した。ヨードアセトニトリルやトリメチルシリルジアゾメタンにより、トシルアミドをアルキル化し、チオールを塩基性条件により作用させることにより、チオエステルを合成できる。本手法は糖ペプチドにも応用可能であった。通常の Fmoc 法によるペプチド合成、切り出し後、チオエステルへと変換できる一般性の高い手法であり、糖ペプチド合成へも応用できると考えている。



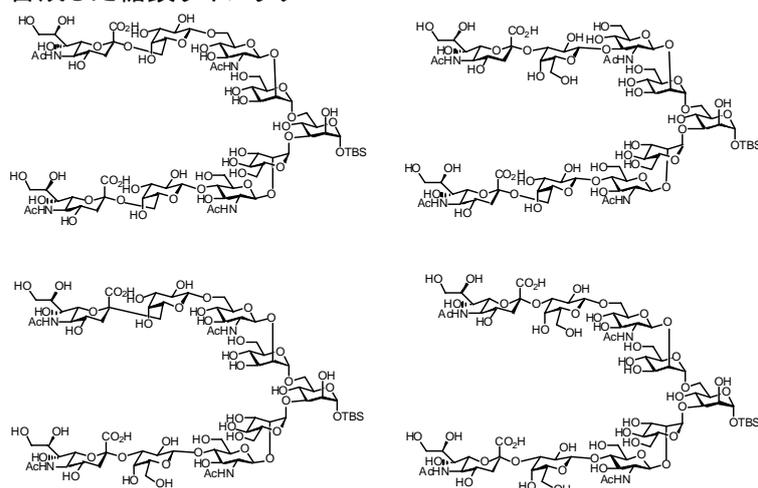
また、本手法によれば、チオエステル部のアルキル、アリアル部に様々な修飾を行ったチオールを導入できる。この手法を用いて、one-pot において one-pot において2回 block coupling を行うことが可能であった。ペプチド合成においてはその性質に起因する精製の難しさなどを考慮すると本手法は非常に有効であると期待できる。

また、実験室におけるマニュアル合成によりタンパク質 *N*-結合型糖鎖 Complex タイプの迅速系統的合成を行った。PEGを用いる糖鎖迅速合成において6糖の合成に成功し、さらにこの6糖をもとにして糖転移酵素の基質特異性を利用しての糖鎖ライブラリーの合成を行った。末端シリル基はアノマー位の保護基としてと同時に、疎水性タグとしてはたらき、酵素、糖供与体を逆相カラムクロマトグラフィーにより単離する場合に有用であった。



以上、糖鎖自動合成を主目的として、糖鎖自動合成機の設計、実現、また、新規立体選択的糖供与体の開発、複合糖質合成への展開を行うことができた。

合成した糖鎖ライブラリー



5 自己評価：

糖鎖自動合成機に関して実現化を達成し、素反応に関して条件設定を行った。実現にあたっては非常に優れた外部協力者を得ることができた。今後は素反応を組み合わせる糖鎖合成を行う。

また、高分子担体を用いて合成した6糖を基にして、酵素の基質特異性を利用して糖鎖ライブラリーを合成することに成功した。また、糖鎖合成から、ペプチドが結合した複合型糖鎖の合成への発展の足がかりをつかむことができた。

研究当初には考えていなかったアミノ糖に関する新規 1,2-*cis* グリコシル化反応を見出すことができた。この反応は有用性のみならず、メカニズムの観点からも現時点で説明できない部分があり、非常に興味深く、今後発展させていく予定である。

これらの結果をもとに、今後、得られた新規 1,2-*cis* 選択的と自動化を組み合わせる

リコサミノグリカンのような生理活性を持つ糖鎖の自動合成を目指す予定である。

迅速合成系において、世界的に 1,2-*cis* グリコシドの形成、分岐型糖鎖の合成については未解決の問題となっている。リアルタイムモニタリングを行いながらの分岐型糖鎖の迅速合成については反応条件を見出したものの、複雑な構造を持つ糖鎖の合成には至っていないが、今後これらの方法論を組み合わせ、糖鎖合成を行いたい。

6 研究総括の見解：

タンパクの固相自動合成は広く行われているが、糖鎖にはこの方法は適用し難い。本研究では、高分子であるポリエチレングリコールを基盤として順次糖鎖を延長する方法を開発した。この方法で糖鎖ライブラリー構築への利用に成功した。また、本方法を改良し、糖鎖の自動合成装置を開発した。他の多くの研究がメリットを受ける成果であり高く評価される。

7 主な論文等：

さきがけの成果を発表した論文、特許、受賞、招待講演等の件数および主要なもの（5件以内）をそれぞれ分けて（論文、特許、受賞、招待講演等に分類して）記載する。

論文

1. Shinya Hanashima, Shino Manabe, Kei-ichiro Inamori, Naoyuki Taniguchi, Yukishige Ito, “Synthesis of Bisubstrate Type Inhibitor of N-acetylglucosaminyltransferases using Polymer-resin Hybrid Strategy” *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 5674-5677.
2. Shinya Hanashima, Shino Manabe, Yukishige Ito, “Divergent Synthesis of Sialylated Glycan Chains: Combined Use of Polymer Support, Resin Capture-release and Chemo-Enzymatic Strategies” *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44, 4218-4244.
3. Shinya Hanashima, Kei-ichiro Inamori, Shino Manabe, Naoyuki Taniguchi, Yukishige Ito, “Systematic Synthesis of Bisubstrate-Type Inhibitors of N-acetylglucosaminyltransferases” *Eur. Chem. J.* in press.
4. Shino Manabe, Tomoyuki Sugioka, Yukishige Ito, “Synthesis of Peptide Thioesters Compatible with Solid-Phase Fmoc methodology”, *Peptide Science*, in press.

特許

発 明 者：眞鍋史乃、山口真範、花島慎弥、伊藤幸成、田中浩二、濱崎勇二

発明の名称：糖鎖合成方法および糖鎖自動合成装置；2004-320361

出 願 人：独立行政法人理化学研究所、科学技術振興機構、株式会社島津製作所

出 願 日：2004年11月4日出願

発 明 者：眞鍋史乃、山口真範、伊藤幸成

発明の名称：糖鎖合成におけるキャッピング試薬；2004-363017

出 願 人：科学技術振興機構、独立行政法人理化学研究所

出 願 日：2004年12月25日出願

発 明 者：眞鍋史乃、杉岡智教、伊藤幸成

発明の名称：ペプチドチオエステルの新規合成法

出 願 人：独立行政法人理化学研究所、科学技術振興機構

出 願 日：2005年10月22日出願

発 明 者：眞鍋史乃、石井一之、伊藤幸成

発明の名称：cis グリコシドを与える新規糖供与体

出 願 人：独立行政法人理化学研究所、科学技術振興機構

出 願 日：2006年2月22日出願

招待講演

1. 「糖鎖固相合成のルネッサンス」、近畿化学協会ロボット・マイクロ合成研究会10回公開講演会、2003年8月、大阪
2. 「高分子担体／固相糖鎖合成における新手法の開発」、第53回高分子学会、2004年9月、札幌
3. 「糖鎖固相合成のルネッサンス」、第14回光学活性化合物シンポジウム、東京、2004年10月