

高度に官能基化されたオリゴ糖の合成戦略

日大生産工（院） 永塚健宏
産総研 鵜沢浩隆
名大・工 西田芳弘
日大生産工 平松秀夫

緒言

グリコサミノグリカン(GAGs)は天然に広く存在し、血液凝固阻害、免疫系の活性化、抗炎症活性、抗ウイルス、抗寄生虫作用などの多彩な生理活性機能を持つ事が知られている。これらの GAG は、ウロン酸と硫酸化ヘキソサミンが交互に繰り返した構造から構成された、複雑な天然糖鎖である。そのため、GAG は鎖長数の異なる混合物であり、また、繰り返し 2 糖構造の硫酸基の位置や数も不均一である。それゆえ、構造の明確な GAG と生理機能との関連は、必ずしも十分に研究されていない。硫酸基の数と位置、さらには、鎖長数を厳密に制御した GAG の合成が必要である。

これまで有機合成による GAGs の合成や、酵素法、あるいは、GAGs の部分的または位置選択的硫酸化および脱硫酸化などの方法によって GAG を構造改変する研究が行われてきた¹⁻³⁾。最近では硫酸基の位置および数を制御した GAGs を合成する方法⁴⁾が報告されているが、糖鎖の伸長に重合反応を用いるため、鎖長の厳密な制御は難しい。このため、生理活性分子の明確な構造相関および合成のために硫酸基の位置と数および鎖長数を制御した GAGs を得る簡便な合成法の確立が望まれている。

目的

GAG の構成糖であるグルクロン酸と硫酸化糖から構成される繰り返し 2 糖構造を、化学的に全合成することは容易ではない。また、転移酵素を使用した合成法も GAG の大量生産には向いていない。そこで本研究では、安価な加水分解酵素を用いた糖転移反応によって 1 段階でグリコシル化を達成させ、硫酸基の位置と数、糖の鎖長数を制御した 2 糖合成シントンの実用的な合成戦略を確立することを目的とした。

実験

糖供与体にあらかじめ炭酸水素ナトリウム水溶液で pH7.0 に調製した *p*-nitrophenyl -D-glucuronide を用いて(以下 GlcA- -OpNP(1))、糖受容体に 6 位を位置選択的に硫酸化した *p*-nitrophenyl 6-*O*-sulfo- -D-glucopyranoside(以下 6S-Glc- -OpNP(2))、*p*-nitrophenyl 6-*O*-sulfo- -D-galactopyranoside (以下 6S-Gal- -OpNP(3))、*p*-nitrophenyl-6-*O*-sulfo-1-thio- -D-glucopyranoside(以下 6S-Glc- -SpNP(4))、*p*-nitrophenyl-6-*O*-sulfo-1-thio- -D-galactopyranoside(以下 6S-Gal- -SpNP(5))の計 4 種類を用いてグルクロン酸加水分解酵素(bovine liver 由来)による転移反応について検討した。また、反応のモニタリングは HPLC(20%MeOH 水溶液 0.1%蟻酸)によって行った。

Synthetic strategy for highly functionalized oligosaccharides

Takehiro NAGATSUKA, Hirotaka UZAWA, Yoshihiro NISHIDA and Hideo HIRAMATSU

糖受容体の硫酸化

化合物(2) 1 g (3.32 mmol)を脱水ジメチルホルムアミド 20 cm³に溶解し 40°C に加熱した。そこに三酸化イオウトリメチルアミン 1.38 g (9.92mmol)の 15 cm³の脱水ジメチルホルムアミド 15 cm³溶液を 30 分かけて滴下した。40°C で 90 分間攪拌した後、メタノール 10 cm³を加えて 1 日攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を中圧液体クロマトグラフィー (ODS (YAMAZEN Cat No. 7488), 溶離液 H₂O, 波長 300 nm)で精製し、化合物 1 を 994 mg 得た。収率 68 %。他の化合物(3),(4),(5)も同様に硫酸化を行い同様な結果を得た。

結果および考察

グルクロン酸加水分解酵素による硫酸化糖への転移反応に世界で初めて成功した。各生成物は、¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC 及び HMBC によって構造の確認をした。その結果 1 と 2 の 1-2 結合のものが 2.5%, 1-3 結合のものが 34.4%, 1 と 3 の 1-3 結合のものが 42.5%, 1 と 4 の 1-2 結合が 5.1%, 1-3 結合が 29.3%, 1 と 5 の 1-3 結合が 39.6%の収率で得られた。グルコース型の糖において 1-2 結合と 1-3 結合の生成物が得られ、1-3 結合が優先する位置選択的の反応であるのに対して、ガラクトース型では 1-3 結合のみが得られる、位置特異的な反応であった。これ等のことから酵素の基質特異性が糖水酸基の 4 位がアキシャルかエカトリアルかの違いによる水素結合の違い、また、アグリコン部の僅かの違いも認識していることが示唆された。

以上より、GAG を模倣した 2 糖シントンのスモールライブラリーが構築できた⁵⁾。これらは、配糖体部位を還元後、適切なチオアルキルカルボン酸とカップリングさせ、センサー基板上に固定化すれば、GAG のさまざまな生理機能を評価できる⁶⁾。

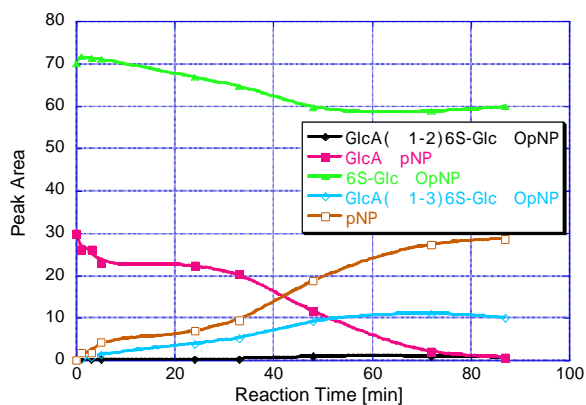


Fig.1 Time course of bovine glucuronidase transglycosylation with GlcA- -OpNP 1 (donor), 6-SO₃-Glc- -OpNP 2 (acceptor), two products, GlcAbeta1-2(6-SO₃)-Glc- OpNP and GlcAbeta1-3(6-SO₃)-Glc-OpNP.

参考文献

- 1) van Boeckel, *et al.*, *J. Carbohydr. Chem.*, **4**, 293-321 (1985).
- 2) Sinay, P. *et al.*, *Carbohydr. Res.*, **132**, C5-C9 (1984).
- 3) Kuzuhara, H. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 611-614 (1986).
- 4) 小林四郎ら, 第 25 回日本糖質学会年会, 2005, P3-07.
- 5) Uzawa, H., Nagatsuka, T. *et al.*, 投稿中
- 6) Uzawa, H. *et al.*, *Tetrahedron*, **61**, 5895-5905 (2005).