

新規な複合糖質糖鎖迅速合成法の開発

眞鍋史乃

Development of Novel Methodology for Rapid Conjugated
Oligosaccharide Synthesis

Shino MANABE

RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), Hirosawa,
Wako City, Saitama 351-0198, Japan

(Received January 30, 2002)

Glycosylation is one of the most important post-translational modifications of proteins, which affects biological activities by way of controlling higher order structure. Recently, the novel structure of glycoprotein, namely C-glycosyl protein was identified in various proteins. The first total synthesis of the naturally occurring C-glycosyl amino acid and peptide was achieved. The mannose and tryptophan moiety was connected via ring opening reaction of epoxide by lithiated indole derivative. After functional group conversion and deprotection, the glyco-amino acid was synthesized in a concise and stereoselective manner. To develop the rapid oligosaccharide construction methodology, the soluble polymer supported oligosaccharide was investigated. Due to high polarity of polymer support, the purification of PEG bound compound is achieved quite easily. The real-time monitoring of the glycosylation reaction was performed by MALDI-TOF MS, whereas the deprotection reaction of chloroacetyl group was performed by color test using (*p*-nitrobenzyl) pyridine. The purification of PEG bound compound which has chloroacetyl group, is achieved by capture-release strategy by use of resin bound cysteine derivative. By combination of these methodologies and novel linker, tetrasaccharides were synthesized.

Key words—carbohydrate; polymer supported synthesis; linker; real-time reaction monitoring; capture-release purification

はじめに

糖鎖は、生体内で主に脂質やタンパク質と結合してそれぞれ複合糖質と呼ばれる糖脂質、糖タンパク質として存在しており、細胞間認識やシグナル伝達に深く関わっている。¹⁾ また、細菌表層の細胞壁は peptidoglycan からなっており、抗生物質には細胞壁の生合成を阻害する働きをするものも多い。²⁾ タンパク質は DNA の遺伝情報をもとに RNA を経て生合成されるがそのままでは機能を発揮することができず、リン酸化やジスルフィド結合の形成などの翻訳後修飾を受けて成熟した形として発現し、また機能の調節が行われることも多い。糖鎖付加もタンパク質翻訳後修飾の 1 つの形態であるが、糖部分が非常に嵩高いために、分解酵素からタンパク質を保

護したり、アスパラギンターンを β -ターンに変えるなどペプチド主鎖のコンフォメーションに重要な影響を及ぼす。³⁾

一方、低分子化合物においても抗生物質バンコマイシンの糖鎖部を改変することにより耐性菌に対しても活性をもつようにしたり、⁴⁾ エンジン系抗生物質の糖鎖部は DNA 配列の認識に重要な役割を果たすことが示唆されている。⁵⁾ 細胞のガン化と細胞表面糖鎖の認識の重要性は糖鎖-BSA コンジュゲートを用いてガンに対するワクチンを開発しようとする試みが行われているに至っている。⁶⁾

「糖鎖生物学」は生命の根幹であるいわゆるセントラルドグマから外れていることに加え、糖鎖が生体内で Glycoform と呼ばれる微細構造が少しずつ違う一群の化合物として存在しているために、単一の化合物として得ることが非常に難しいこと、また微量にしか存在しないことからこれまで困難がつきまわってきたが、今後の発展が期待される分野であ

理化学研究所 (〒351-0198 和光市広沢 2-1)

e-mail: smanabe@postman.riken.go.jp

*本総説は、平成 14 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

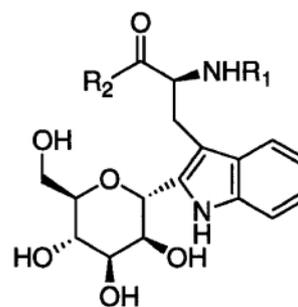
る。有機合成化学は入手困難な化合物を純粋な形で十分な量を供給するというにより貢献してきた。さらに天然に存在しない構造の化合物も供給可能である。そのような見地から糖鎖合成についての研究を行っているが、ここでは、天然より見出された C-結合型糖ペプチドの初の合成と糖鎖迅速合成法についての新手法の開発について最近得られた知見について述べる。

C-結合型糖アミノ酸，糖ペプチドの合成

さて、糖タンパク質糖鎖部は大きく二つに分類される。⁷⁾ すなわち、アスパラギンの側鎖アミド基と糖鎖部がアミド結合を介して結合している N-結合型糖鎖とセリン又はスレオニンのヒドロキシル基と糖鎖部が結合している O-結合型糖鎖である (Fig. 1)。しかしながら、1994年ヒト RNase よりマンノースとトリプトファンが炭素結合を介して結合した C-結合型糖アミノ酸 **1** が同定された (Fig. 2)。⁸⁾ その後、この C-結合型糖アミノ酸 **1** はヒトだけではなく、海綿にも存在することが明らかになった。⁹⁾ また、properdin においては 20 個のトリプトファンの内、実に 17 個がマンノースで修飾されていることが見出され、¹⁰⁾ このタンパク質修飾の形は当初考えられていたよりも普遍的に存在するのでは

ないかと考えられている。また、ペプチドにおける認識部位は両末端にトリプトファンを含むテトラペプチドであること¹¹⁾ や Dolichyl-phosphate-mannose が生合成経路においての前駆体であることも明らかになっている。¹²⁾

さて、この C-マンノシルトリプトファン **1**、及びそれを含むペプチド **2** の合成を行うこととした。生化学的プローブとなるように短行程であり、かつ同位体導入や誘導体合成が容易になることを念頭に



1 R₁ = H, R₂ = OH
2 R₁ = Phe-Thr, R₂ = Ala-Gln-Trp

Fig. 2. The Structure of C-Linked Glyco-Amino Acid and Glycopeptide

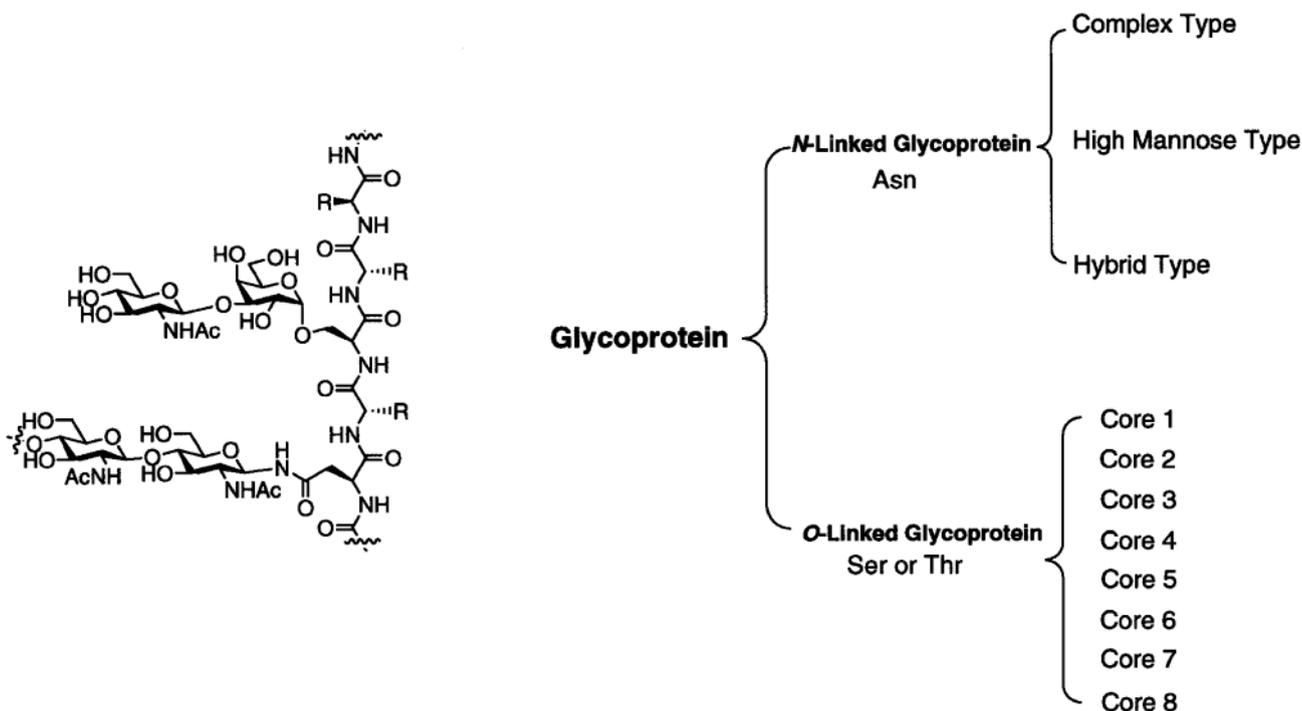
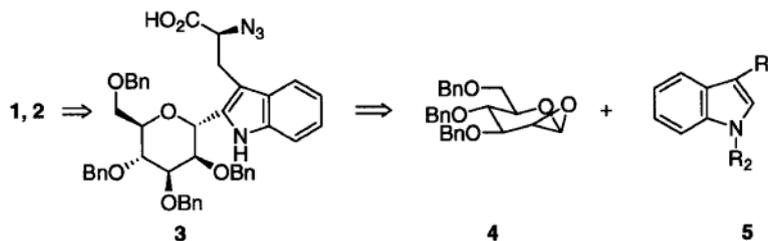


Fig. 1. N-Linked Glycoprotein and O-Linked Glycoprotein

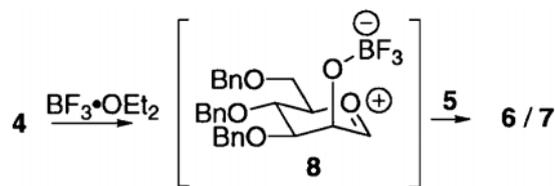


Scheme 1. The Retrosynthesis of **1** and **2**
 R_1 =amino acid moiety precursor, R_2 =protecting group.

おき、逆合成を行った。鍵となるのはマンノースとトリプトファンのインドール部分をどのように結合させるか、またアミノ酸部分の不斉炭素をどのように構築するかということである。糖部分とアミノ酸部分の結合はマンノースから7行程で誘導されるエポキシド**4**とインドール誘導体**5**のメタロ体の反応により合成できると考えられた (Scheme 1)。またさまざまなインドール誘導体を反応させることができるので誘導体合成にも有効であると思われる。さて、エポキシドと有機金属化合物の反応は S_N2 反応で進行することが知られている。したがってマンノースのアノマー位においては望む立体配置である α 体のみが得られると期待された。しかしながら驚いたことにエポキシド**4**とインドール誘導体**5**のリチオ体を $BF_3 \cdot OEt_2$ 存在下反応させたところ、 α 体と β 体の混合物として付加物が得られた (Table 1)。これはルイス酸である $BF_3 \cdot OEt_2$ がエポキシドを活性化するとオキソカルベニウムイオン**8**が生じて S_N1 反応で反応が進行するためと説明できる (Scheme 2)。また、立体異性体の比はインドール誘導体の構造に大きく依存することも明らかになった。すなわち、インドール窒素の保護基をベンゼンスルフォニル ($PhSO_2$) 基にするとインドール β 位の置換基が大きくなるほど α 選択性が増大する。一方、Boc基にかえると逆に β 位の置換基が大きくなるほど β 選択性が増大する。また、 α 体は 1H -NMRにおいて1位と2位とのカップリング定数が7.6 HzであることとNOEがH-1とH-5に観測されることから 1C_4 コンフォメーションをとることが明らかになった。これはC-グリコシドではO-グリコシドに見られるアノマー効果がないことやインドールが嵩高いためにequatorial方向に配置するためと考えられる。¹³⁾

Table 1. The Stereochemistry of the Reaction between 1,2-Anhydro Mannose and Lithiated Indole Derivatives

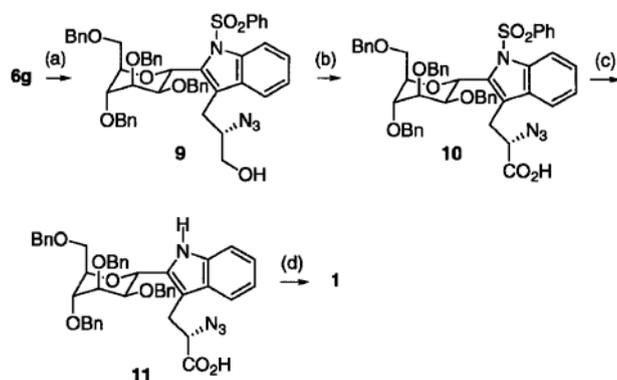
entry	5	R_1	R_2	yield (%)	products	α/β ^a
1	a	H	SO_2Ph	39	6a/7a	69:31
2	b	H	Boc	49	6b/7b	34:66
3	c	CH_3	SO_2Ph	39	6c/7c	87:13
4	d	CH_3	Boc	56	6d/7d	17:83
5	e	CH_2CH_3	SO_2Ph	38	6e/7e	>95/5
6	f	CH_2OTBS	SO_2Ph	50	6f/7f	>95/5
7	g	H_2C-CH_2-OTBS N_3	SO_2Ph	63	6g/7g	95:5
8	h	H_2C-CH_2-OTBS N_3	SO_2Ph	18	6h/7h	55:45
9	i	H_2C-CH_2-OMe MeO	SO_2Ph	18	6i/7i	56:44



Scheme 2. The Oxocarbenium Intermediate

α 選択的に付加物を得るために以下のようにインドール誘導体をデザインした。すなわち、インドール窒素の保護基を $PhSO_2$ 基とし、アミノ酸部のカルボン酸を一旦還元してアルコールのシリルエーテ

ルとして保護することとした。この高さは α 選択性の発現に役立つ。PhSO₂基はインドール窒素を保護すると同時に α 位のリチオ化を促進し、また電子吸引基であるので側鎖水酸基をカルボン酸へと戻す酸化反応の際、インドール環を酸化から保護する働きを持つ。エポキシドとインドール誘導体の付加反応は期待通り、 α 選択的に生成物を与えた (Table 1, entry 7)。インドール側鎖にヘテロ環を含む基質 **5h**, **5i** は付加体を **1** に導くことが可能であるが、収率、選択性ともに低かった (Table 1, entry 8, 9)。化合物 **6g** の官能基変換後、脱保護を行い、C-マンノシルトリプトファン **1** の初の全合成に成功した (Scheme 3).¹⁴⁾ 磯部らもアセチレン誘導体

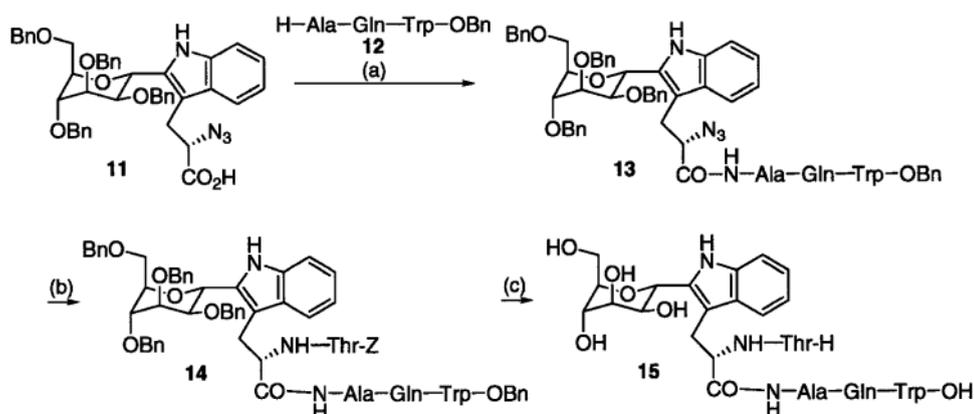


Scheme 3. Reagents and Yields: (a) (i) BnBr, *n*-Bu₄NI, NaH, DMF (92%), (ii) TsOH · xH₂O, MeOH (91%), (b) TEMPO, iodosobenzene diacetate, CH₃CN, H₂O (97%), (iii) 10% NaOH, EtOH, H₂O (78%), (c) 20% Pd(OH)₂/C, H₂, EtOH, THF, H₂O (57%).

を C-グリコシル化した後、パラジウム触媒によるインドール閉環、続くアミノ酸不斉炭素部導入による合成に成功している。¹⁵⁾ 中間体 **10** の PhSO₂ 基を脱保護して得られる **11** はペプチド合成のユニットとしても有用である。すなわち、カルボキシル基を *in situ* にて TFFH (tetramethylfluoroformidium hexafluorophosphate) により酸フッ化物としてアミン **12** と反応させた。アジド基はペプチド結合形成反応において隣接基関与しないため、ラセミ化しないと期待される。また、アジド基を trimethylphosphine により選択的に還元してアミノ基とし、さらにペプチドを伸長させることも可能であった (Scheme 4)。

糖鎖迅速合成に向けて

1967年 Merrifield がペプチド固相合成を開発して以来、¹⁶⁾ さまざまな改良が施され、「だれにでも」欲しいペプチドを合成できるようになったことは生化学に非常に大きく貢献した。その威力はペプチド自動合成機、核酸自動合成機が市販されるまでに至っていることでも明らかであろう。さて、核酸、ペプチドに続く「第3の生体内高分子」である糖鎖についても1970年代に固相合成法が検討された。¹⁷⁾ しかしながら、当時は固相反応に適したグリコシル化反応がなかったことなどから一般的手法として確立するには至らなかった。しかし、1993年 Danishefsky が彼ら独自に開発したグリカール法を固相反応に応用したことにより、¹⁸⁾ 再び注目を集めるようになった。¹⁹⁾ また、低分子化合物も固相で合

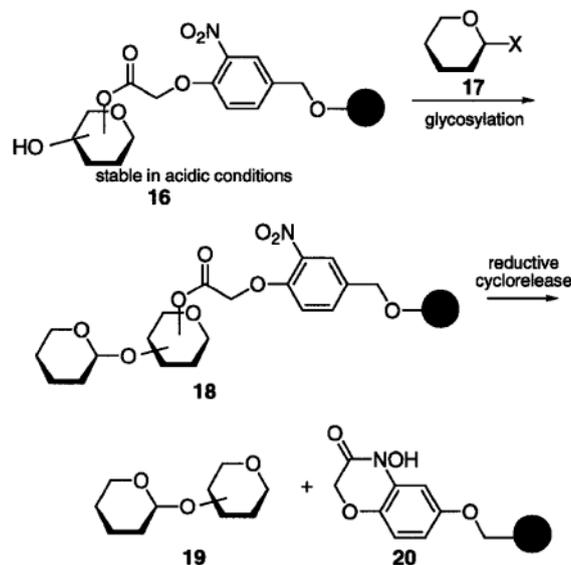


Scheme 4. Reagents and Yields: (a) TFFH, Na₂CO₃, CH₂Cl₂, H₂O (76%), (b) i) PMe₃, THF, H₂O, ii) Fmoc-Thr-OH, WSCDI, HOBT, DMF (quant. 2 steps), iii) piperidine, DMF, iv) Z-Phe-OH, WSCDI, HOBT, DMF (76%, 2 steps), (c) 20% Pd(OH)₂/C, EtOH, THF, H₂O. WSCDI=water soluble carbodiimide; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide · HCl.

成することが近年盛んに行われている。これは固相合成法が過剰の試薬を用いても固相樹脂をろ過、洗浄するだけで過剰の試薬を洗い流すことができる長所があるため、自動化のみならず、コンビナトリアル・ケミストリーの基盤技術にもなる理由による。

近年盛んに研究が展開されている糖鎖固相合成であるが、さまざまな問題点が存在していることも事実である。例えば、固相での反応の追跡方法が開発されていないこと、固相反応では反応系が固-液の不均一反応系となるために反応性が著しく低下すること、糖鎖固相合成に適したリンカーが開発されていないことなどである。そこでこれらの問題点の解決を目指した。

リンカーは非常に嵩高い固相と基質との距離を離し、かつ最終物の固相からの切り出しを可能にする固相反応に必要不可欠のものである。リンカーは最終生成物に至るまでのすべての反応条件で安定でなければならず、しかも最終生成物を損なうことなく固相からの切り出しを行うことができない。糖鎖固相合成が酸性条件で行うグリコシル化反応と塩基性条件で行う一時的な脱保護反応の繰り返しとして成り立っていることを考えると、糖鎖固相合成でのリンカーは酸性条件でも塩基性条件においても安定で、かつ他の条件で切り出しが円滑に行われなければならない。これまで固相反応はペプチド合成を目的として発展してきた経緯があるためにそのほとんどが酸性条件での切り出しを行うように設計されている。しかしながら、糖鎖合成に欠かせないグリコシル化反応はルイス酸条件で行うことが多く、それらのリンカーの安定性に問題があることが知られていた。したがってグリコシル化反応の条件設定に非常に制約を受けてしまう。そこで、Wang (*p*-alkoxybenzyl) タイプのリンカーに非常に強い電子吸引性基であるニトロ基を導入し、酸に対する安定性を増すこととした。事実、このリンカーは糖供与体としてイミデート、チオグリコシド、フッ化糖を用いる典型的グリコシル化反応の条件で安定であることが示された。切り出しは Sn(SPh)₂-PhSH-Et₃N を用いてニトロ基をヒドロキシルアミンへと還元するとすみやかに環化反応が起り、最終物が液相へと放出される (Scheme 5)。このときに糖鎖合成で汎用されるアシル基、ベンジル基、アセタール基、フタルイミド基は安定であるこ

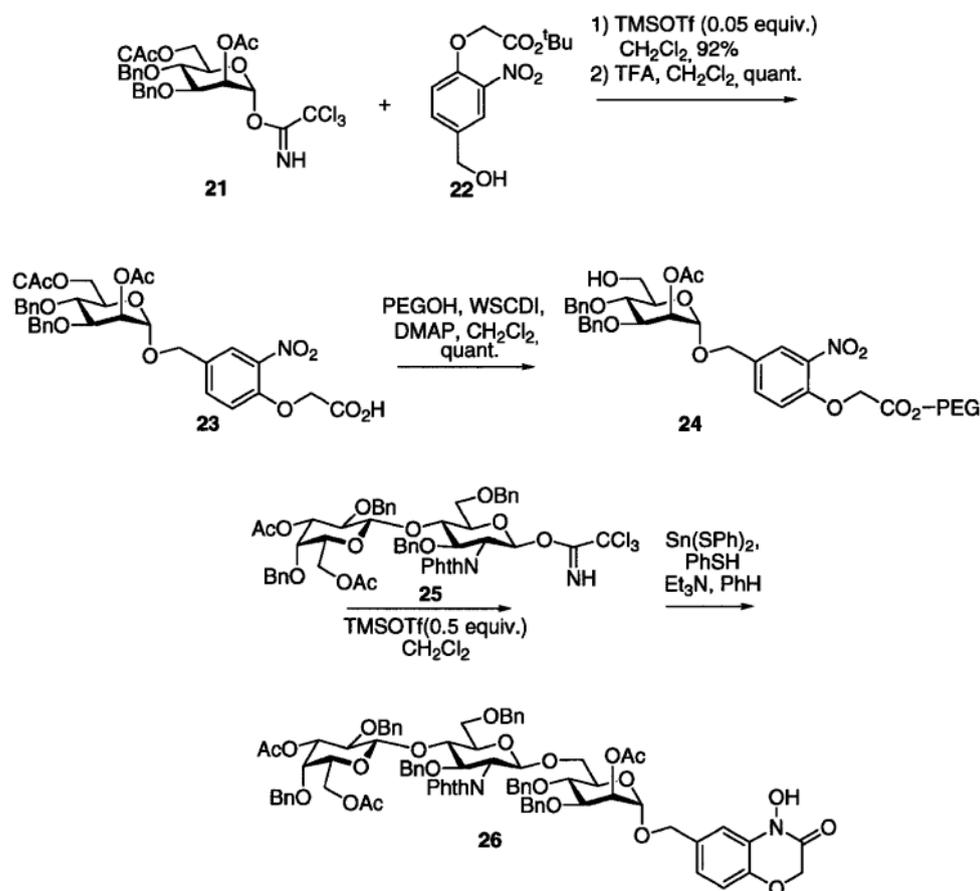


Scheme 5. The Novel Linker for Oligosaccharide Synthesis

とが分かった。すなわち、他のさまざまな保護基と相補的に用いることが可能である。²⁰⁾ また、本リンカーは固相樹脂にもポリエチレングリコールなどの高分子担体にも利用可能である。²¹⁾ また糖受容体、糖供与体のいずれも固定化することができた。このリンカーを利用して *N*-結合型糖鎖の部分構造 **26** を合成することも可能であった (Scheme 6)。

「タグ」としてのポリエチレングリコール

固相反応では固-液反応となるために反応性が著しく低下する欠点がある。その欠点を克服するために過剰の試薬や基質を用いているが、固相上においても 99% 以上の収率で進行するようにさまざまな検討が行われているペプチド結合形成反応と違ってグリコシル化反応は液相においても 5 割から 9 割程度でしか進行しないので反応性が著しく落ちる固相反応においては過剰な基質を用いても反応を完結させることは非常に難しい。そこで平均分子量 550 のポリエチレングリコール (PEG) を高分子担体として用いることとした。短鎖 PEG はほとんどの溶媒に可溶であるので均一性の反応系を与えるので、反応性の高さを維持できる。また、担持されている化合物の構造や純度は通常の ¹H-NMR で確認可能である。また、分子量が小さいのでそれ自身の分子量が非常に大きい固相樹脂に比べ、スケールアップも行える。さらに、反応後、PEG の極性の高さを利用して短いシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製できる。すなわち、反応後、反応液をシリカ



Scheme 6. CAc=chloroacetyl, PEG=poly (ethylene glycol) methyl ether (average M. W. 5000), TMSOTf=trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate, WSCDI=water soluble carbodiimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide · HCl, Phth=phthalimide.

ゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させ、酢酸エチルで溶出させると試薬などは溶出される。しかし、PEGに担持された化合物はその極性の高さから原点に留まっている。ここで酢酸エチル—メタノールを流すとPEGが付いた化合物が溶出される。すなわち、極性の高さがPEGを「タグ」として働かせるに至っている。²²⁾「タグ」を付けることにより、他の化合物との分離を容易にでき、しかも液相で反応を行うことができるので反応性を低下させなくてすむ利点がある。最近、低分子化合物の合成においても分離精製を簡便にするための種々の「タグ」が開発されていることを付け加えておきたい。²³⁾

リアルタイムモニタリング法の開発

さて、実験を進めるうちにPEGの極性の高さゆえに反応の進行をTLCで追跡することが困難であることが分かった。これは固相反応や高分子担体上での反応に共通する欠点である。従来の液相反応に

おいては極少量の反応液をキャピラリーで取り出してTLCなどで解析し、反応進行状況の確認や副生成物の有無などの確認を行い、反応条件にただちにフィードバックさせることができるが、固相反応ではそのような技術がないために通常一旦固相から基質を切り出して反応の解析を行わなければならない(Fig. 3)。そのために反応条件の設定や反応条件最適化には多大な時間を要することとなる。ペプチド固相合成ではアミノ基の検出に用いられるニンヒドリン反応が反応追跡の手段として有名である。²⁴⁾しかしながら糖鎖合成における主要な官能基であるヒドロキシル基の固相上での検出法、及び、保護基の検出法についてはほとんど確立されていない。Rigueraらは固相上のヒドロキシル基 $\mathbf{27}$ をトシル化して脱離基へと変換した後、(*p*-nitrobenzyl)pyridine $\mathbf{29}$ と反応させ、piperidineで処理してzwitterion $\mathbf{31}$ を発生させている。このzwitterion $\mathbf{31}$

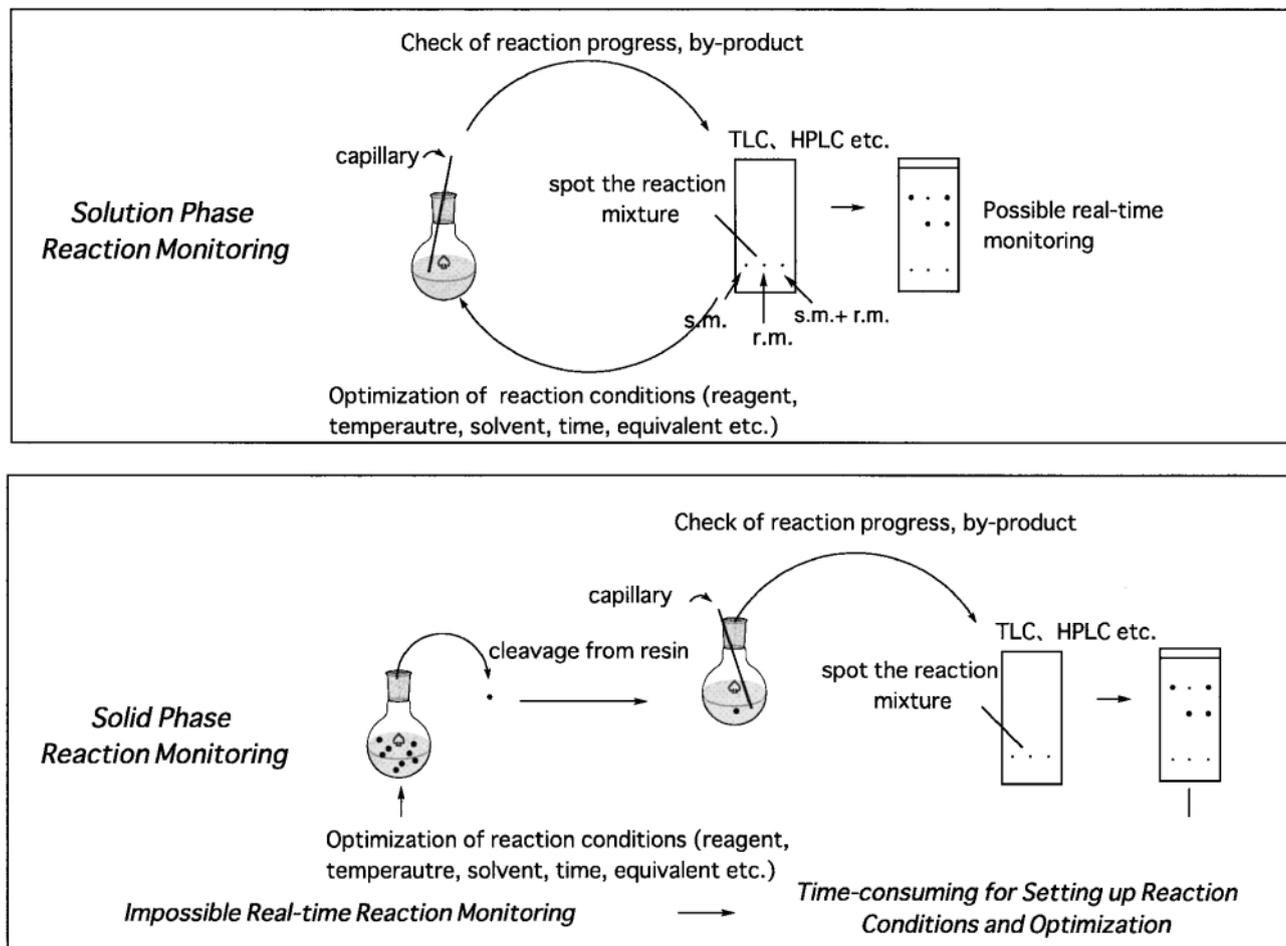
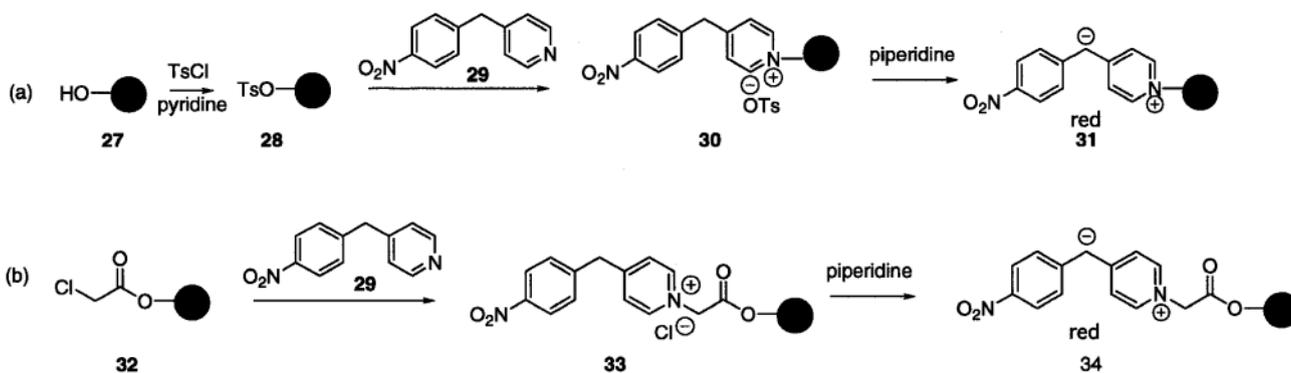


Fig. 3. Comparison of Reaction Monitoring between Solution Phase of Solid Phase



Scheme 7. (a) The Detection Method of Hydroxy Group on Solid Phase Developed by Riguera, (b) The Detection Method of Chloroacetyl Group on Solid Phase

は、赤い色を示すことからヒドロキシル基の有無を簡単に知ることができる (Scheme 7(a)).²⁵⁾ この手法を糖ヒドロキシル基に対して応用しようとしたところ、恐らく低分子化合物のヒドロキシル基に比べて糖のヒドロキシル基の反応性が低いことからうま

くいかなかった。そこでより反応性の高いと思われるクロロアセチル (CAC) 基 **32** の塩素原子を脱離基として利用することにした (Scheme 7(b))。この反応を利用すると CAC 基の脱保護反応を固相あるいは高分子担体から切り出すことなくモニターす

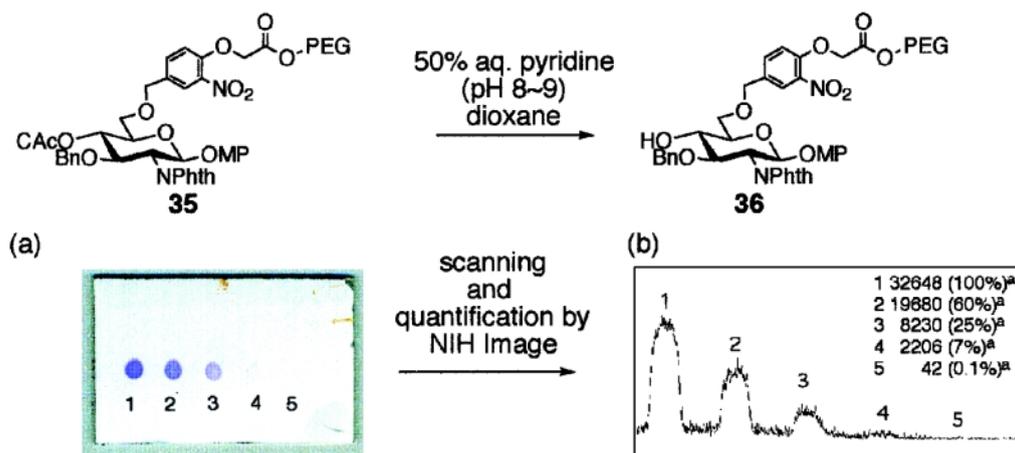


Fig. 4. Monitoring of Dechloroacetyl Group of **35** by Coloring with (*p*-nitrobenzyl) Pyridine

(a) TLC profile (lane 1; 0 h, lane 2; 0.5 h, lane 3; 3 h, lane 4; 3.5 h, lane 5; 6 h), (b) plot profile and density values analysed by NIH Image program (numbers are corresponding to theirs in (a)).^{a)} Density percentage to that of lane 1. MP=*p*-methoxyphenyl.

ることができる。可溶である PEG を担体としてクロロアセチル基の脱保護をリアルタイムでモニターしながら行った。すなわち、2 μ l ずつ反応液を取り出し、TLC にスポットし、(*p*-nitrobenzyl) pyridine 溶液をスプレーして熱した後に piperidine 溶液に浸した。呈色反応は時間が経過するごとに薄くなり、CAc 基の脱保護反応が進んでいることが示唆された。この TLC をスキャナーでコンピュータに画像として取り込み、面積定量ソフトである NIH-Image²⁶⁾ で定量化することも可能であった。事実、¹H-NMR の積分値からの CAc 体と脱保護体の比と NIH-Image による積分値は比例関係があった (Fig. 4)。本方法は以下の特徴を持つ。CAc 基はいろいろな条件、とくに塩基性条件で外れやすい保護基であり、固相や高分子担体から切り出す条件で脱保護されてしまうこともあり、切り出時の反応進行の確認は難しいので、固相樹脂、高分子担体上での解析は威力を発揮する。また、糖鎖合成においては合成最後まで使う“permanent”な保護基 (例えばベンジル基) と次にグリコシル化反応を行いたいヒドロキシル基をグリコシル化反応のときだけ保護しておき、次のグリコシル化反応の前には脱保護してしまう“tentative”な保護基 (例えば CAc 基) が使い分けられるが、CAc 基はこれまでの糖鎖合成で一時的な保護基としての有用性が確立しているのでそれを含む糖ユニットの合成法などにこれまでの糖化学の蓄積が固相合成法にも応用できると期待される。また、安価、迅速、選択的に CAc 基を選択で

きる利点を持つ。CAc 基が保護基として働くと同時に潜在的クロモフォアとしても働いている訳である。本方法を用いると単糖 **35** の CAc 基の脱保護は含水ピリジン中、室温で 6 時間必要とするが、4 糖のクロロアセチル基の脱保護は 30 時間かかることもすぐに明らかになった。糖鎖固相合成のモニタリング法は実はいろいろと試みがなされている。¹³C でラベル化したアセチル基を用いての *gete decoupling* 法による ¹³C-NMR による追跡²⁷⁾ や保護基にフッ素原子を用いて ¹⁹F-NMR で追跡する方法²⁸⁾ が開発されている。これらの方法は定量できる長所がある反面、反応を一旦止めてからでないと測定できない欠点を持つ。呈色反応を用いて固相反応の追跡、及び反応系の評価を行うことは糖鎖固相合成でのみならず行われている。蛍光クロモフォアを付けた基質を用いて Heck 反応の反応条件最適化を行った例²⁹⁾ や光学分割を色素を用いて検討した例³⁰⁾、種々の官能基の有無を色素を用いて検出する例³¹⁾ が報告されている。また、DNA マイクロアレイを意識した「リアクションマイクロアレイ」も開発されている。³²⁾

さて、グリコシル化反応の追跡は短鎖 PEG の性質を生かすことにした。すなわち、PEG は炭素鎖長が正規分布している一群の化合物として販売されているので、MALDI TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization time of flight MS) のシグナルは正規分布の山のような特徴的な形状を示すことから他の化合物由来のシグナルと容易に区別ができる。

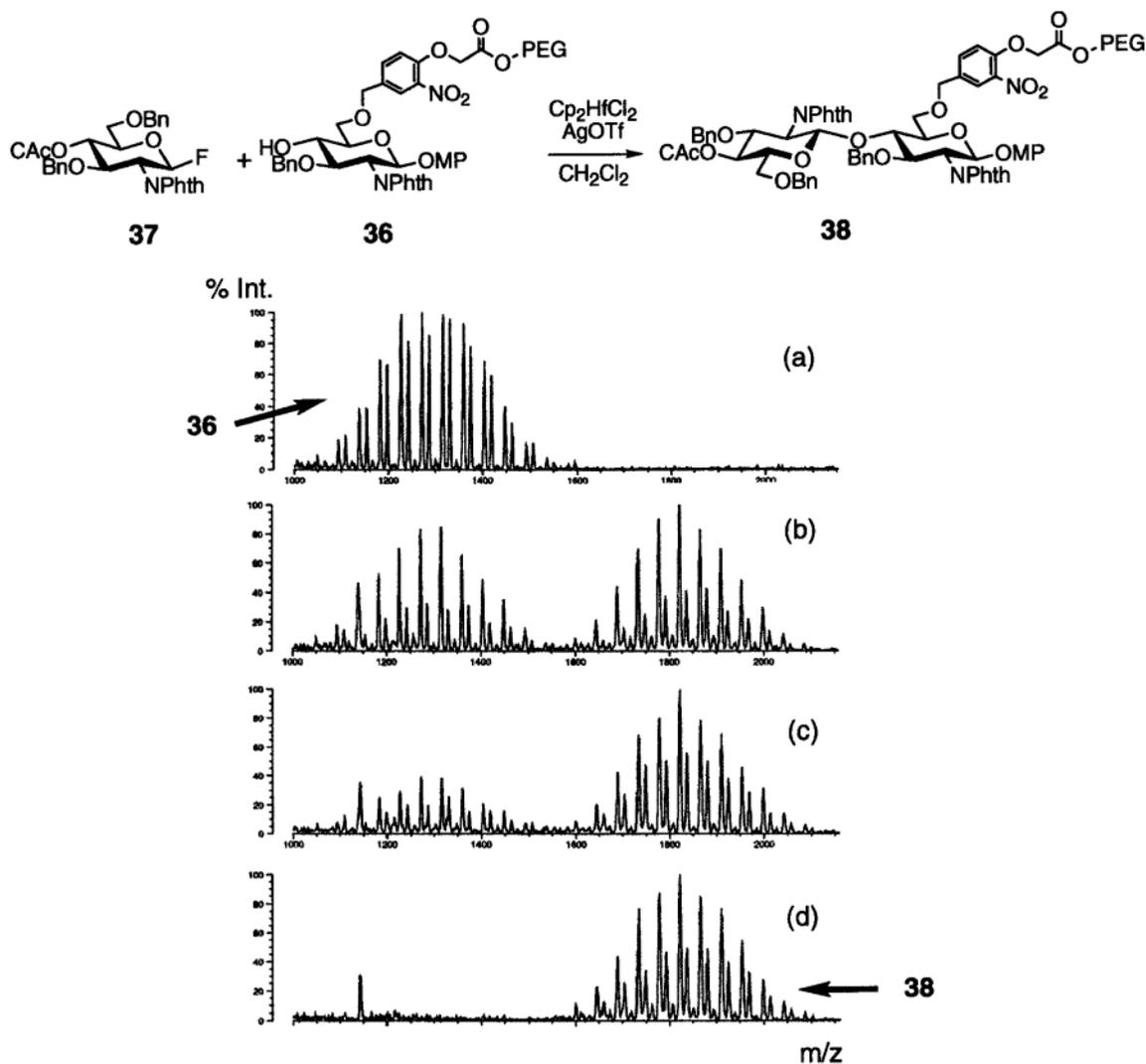


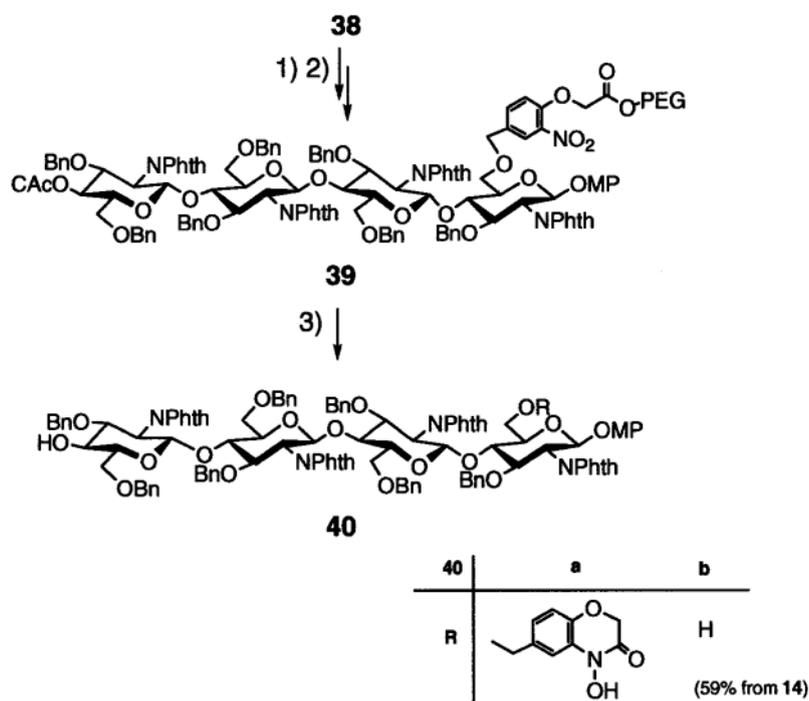
Fig. 5. MALDI-TOF MAS Spectra Showing the Course of Coupling Reaction of 36 and 37
(a) 0 min, (b) 1 min, (c) 3 min, (d) 20 min.

PEG に結合した糖受容体 **36** にフッ化糖 **37** を用いて Cp_2HfCl_2 - AgOTf を活性化剤とする鈴木法によりグリコシル化反応を行った。反応が進むにつれて山のようなシグナルは分子量が大きい方へと移動し、反応は 20 分で完結することが分かった (Fig. 5)。以上、糖鎖合成での基本反応であるグリコシル化反応と脱保護反応のリアルタイムモニタリング法を確立することができた。PEG が精製を簡便にする「タグ」として働いていると同時に反応モニタリングでも MS スペクトルにおいて特徴あるシグナルを示すことから“reporter”として働いている。新規リンカーとリアルタイムモニタリング法を用いて PEG 上で迅速に 4 糖 **39** を合成した。リンカーのニトロ基を還元することにより、PEG から切り

出しを行い、さらにリンカー由来のヒドロキサム酸を含むベンジルエーテルを酸性条件で除去し、高い収率で化合物 **40** を得ることに成功した (Scheme 8)。³³⁾

高分子—固相樹脂ハイブリッド法による精製の開発

糖鎖合成の基本反応であるグリコシル化反応は液相中においても収率は 50%—90% に留まっているので、反応性の低下する高分子担体上や固相樹脂上ではさらに収率が低下する。いくら過剰の基質、試薬を用いても反応を完結させることは難しい。したがって何回かのグリコシル化反応を高分子上で行うと長さの違う糖鎖、及びそれに由来する副生成物が生成してしまい、切り出し後の目的物の単離は困難



Scheme 8. Synthesis of Tetrasaccharide on PEG and Its Reductive Cyclo-Release

1) aq. Pyridine, 2) 37, Cp_2HfCl_2 , AgOTf , CH_2Cl_2 , 3) i) aq. Pyridine, ii) $\text{Sn}(\text{SPh})_2$, PhSH , Et_3N , PhH , iii) CSA , MeOH . 40: 74% yield from 39: 49% yield from 36.

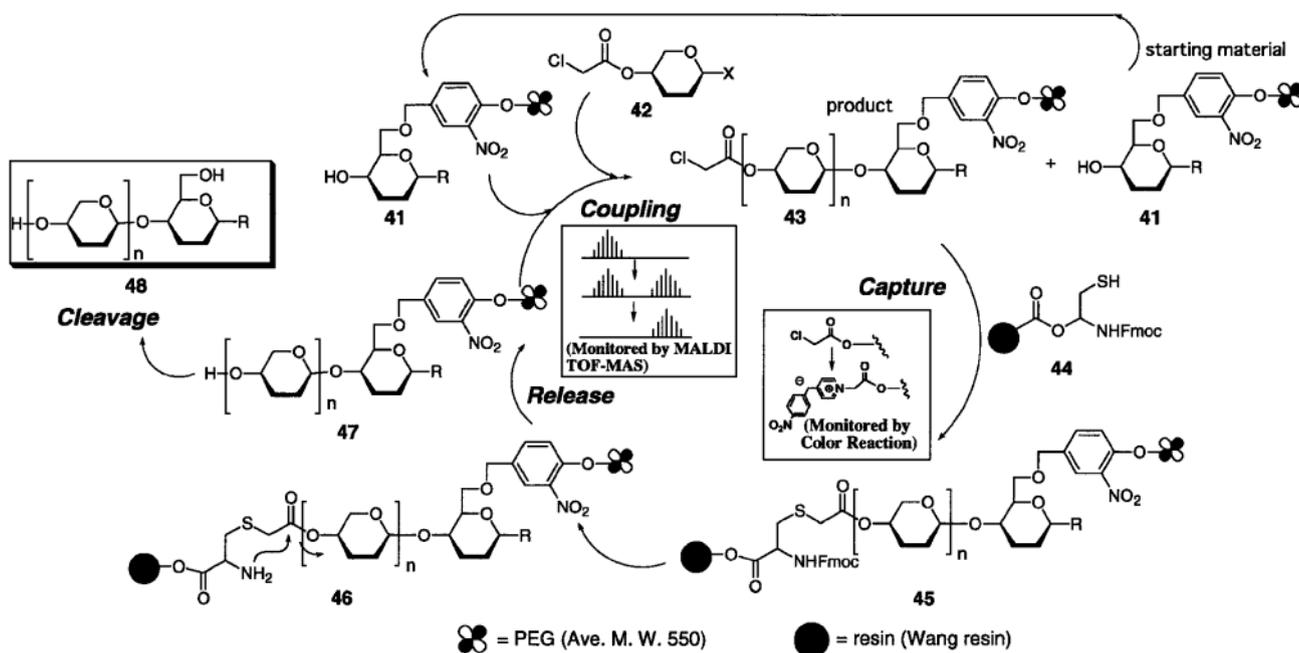
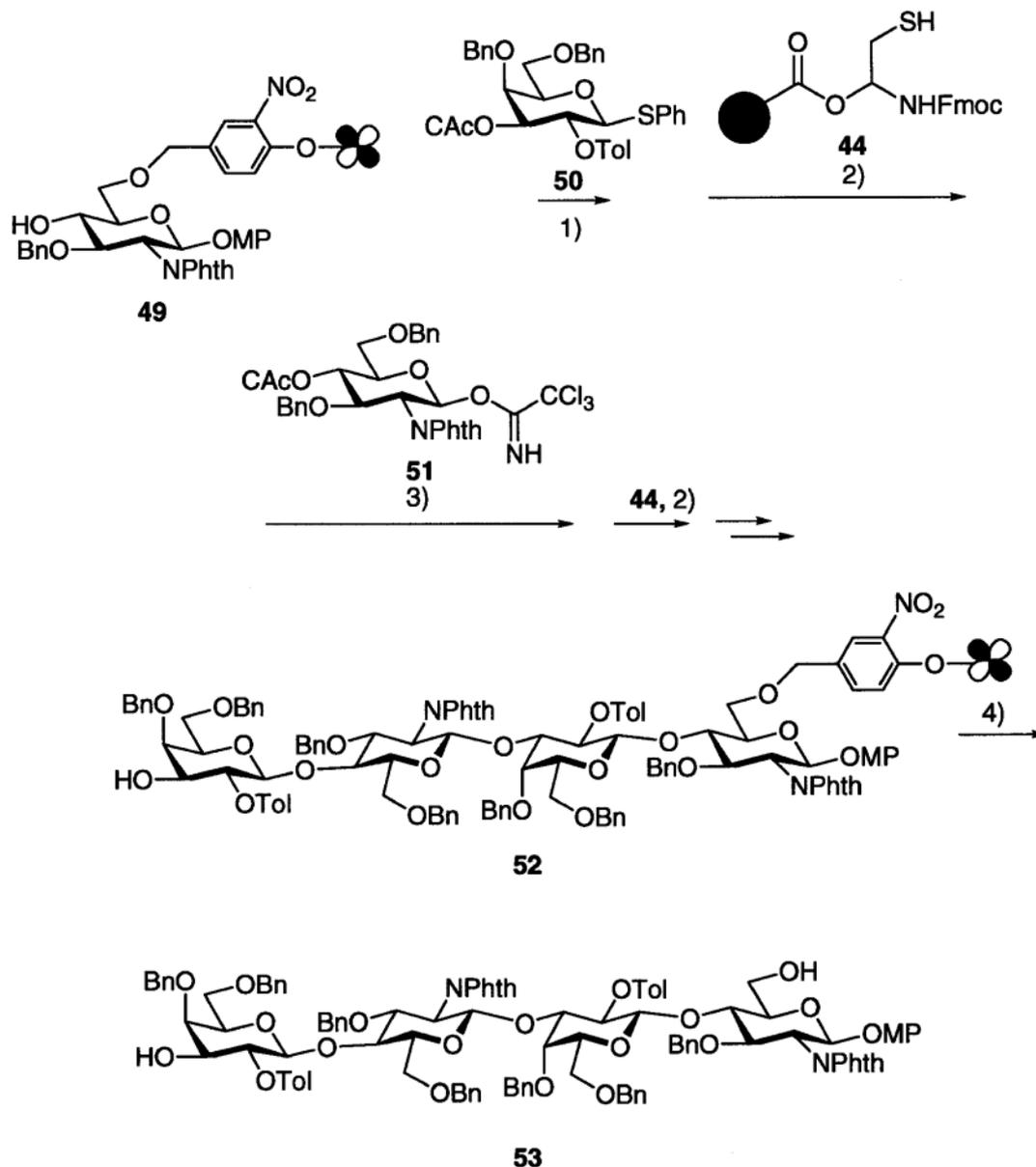


Fig. 6. The Cycle of Capture-Release Purification

を極めることとなる。一方で収率を高めるために多大な条件検討を行うことは迅速合成の目的から外れることになる。これは液相での反応と違って反応終了後の精製が高分子に基質が結合したままの状態

できないことに起因する。そこで CAc 基の反応性を利用し、高分子担体に基質を結合させたまま精製を行う手法を開発することとした。すなわち、CAc 基を持つ糖ユニット 42 を糖供与体として用いて



Scheme 9. The Synthesized Poly (Lactosamine) on PEG with Capture-Release Purification

1) DMTST ((Dimethylthio) methyl sulfonyl triflate), MS 3A, CH_2Cl_2 , 2) i) $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, CH_2Cl_2 , CH_3CN , ii) 4- (aminomethyl) piperidine, THF, 3) TMSOTf, CH_2Cl_2 , 4) i) Cu-Zn, acetylacetone, THF, ii) Ac_2O , Et_3N , iii) DDQ, dichloroethane, H_2O .

PEG 上の糖受容体 **41** と反応させると反応が完結しない場合、原料である糖受容体 **41** と CAc 基を持つ 2 糖 **43** が PEG 上に存在することになるが、PEG が非常に高い極性を持つためにこの 2 つの化合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーでは分離することができない。そこで PEG 成分のみをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離した後、固相樹脂に担持されたシステイン誘導体 **44** を加えた。すると固相樹脂に担持されたシステインのチオール基と CAc 基の塩素原子は置換反応を起こし、CAc 基

を持つもののみが固相樹脂上へ「つりあげ (Capture)」られる。「つりあげ」の反応は CAc 基を検出する (*p*-nitrobenzyl) pyridine 法で追跡し、終了を知ることができる。一方、ヒドロキシル基である未反応の糖受容体 **41** は反応しないので、固相樹脂をろ過、洗浄することにより洗い流すことができる。すなわち、この段階でシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離できない高分子上の複数の化合物の分離が固相樹脂を用いることにより可能になった。次にアミノ基の保護基を脱保護するとすみやかに

に環化反応により 2 糖 **47** は高分子担体ごと液相へと放出 (Release) される。この一連の反応は CAc 基の脱保護反応にもなっており、次のグリコシル化反応の糖受容体として使用可能である (Fig. 6)。¹H-NMR により PEG に結合している化合物の純度が上がっていることが確かめられた。この方法を利用して精製を行いながら、自然界に広く存在するポリラクトサミン 4 糖 **53** を合成することに成功した (Scheme 9)。³⁴⁾

おわりに

糖鎖研究はポストゲノム時代の科学的興味のターゲットの 1 つとなることであろう。固相合成法は担持された基質の単離がろ過、洗浄でよいので簡便であることが強調されるが、一方、反応性が著しく低下するのを克服するために過剰の試薬を用いるので、例えば 1 級水酸基と 2 級水酸基の区別など選択的な反応条件を設定するには困難がつきまとうなどの欠点がある。しかしながら最近、固相樹脂自身や反応装置にもさまざまな改良が加えられたり、固相樹脂上の化合物の構造解析の手法も開発され、さまざまな展開支援がはかられている。それにつれて天然物、及び類縁体の固相合成も行われているが、固相合成の上で複雑な骨格を持つ化合物を多段階を要して合成することは、溶媒による固相樹脂の膨潤なども考慮に入れた綿密な合成計画のみならず、新しい概念や手法が必要となることであろう。また糖鎖は他の生体内高分子であるペプチドや核酸と違って枝別れ構造を持つという特徴があり、純粋化学合成のためには相補的な条件で保護、脱保護ができる保護基の開発、より高い収率を与え、アノマー位の立体化学を完璧に制御し得るグリコシル化反応の開発など根本的解決に向けての努力もなされなければならない。今後、自動化、コンビナトリアル・ケミストリーに向けてのさらなる展開を行いたいと思っている。

謝辞 理化学研究所伊藤幸成主任研究員には御指導、御助言を賜りました。ここに厚く感謝いたします。共同研究者の方々にも御礼申し上げます。併せて財政的援助を頂いた科学技術振興事業団 (CREST)、新エネルギー産業技術総合開発機構、理化学研究所理事長ファンド、薬学奨励財団、文部科学省に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) a) Varki A., *Glycobiology*, **3**, 97–130 (1993); b) Dwek R.A., *Chem. Rev.*, **96**, 683–720 (1996).
- 2) a) Bugg T. D. H., *Compr. Nat. Prod. Chem.*, **3**, 241–294 (1999); b) Goldman R. C., Gange D., *Curr. Med. Chem.*, **7**, 801–820 (2000).
- 3) O'Connor S. E., Imperiali B., *Chem. Biol.*, **5**, 427–437 (1998).
- 4) Ge M., Chen Z., Onishi H. R., Kohler J., Silver L. L., Kerns R., Fukuzawa S., Thompson C., Kahne D., *Science*, **284**, 507–511 (1999).
- 5) a) Nicolaou K. C., Smith B. M., Pastor J., Watanabe Y., Weinstein D. S., *Synlett*, **1997**, 401–410; b) Sissi C., Aiyar J., Boyer S., Depew K., Danishefsky S., Crothers D. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 10643–10648 (1999).
- 6) a) Kudryashov V., Glunz P. W., Williams L. J., Hintermann S., Danishefsky S. J., Lloyd K. O., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **98**, 3264–3269 (2001); b) Gilewski T., Ragupathi G., Bhuta S., Williams, L. J., Musselli C., Zhang X-F., Bencsath K. P., Panageas K. S., Chin J., Hudis C. A., Norton L., Houghton A. N., Livingston P. O., Danishefsky S. J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **98**, 3270–3275 (2001).
- 7) Kobata A., *Acc. Chem. Res.*, **26**, 319–324 (1993).
- 8) Hofsteenge J., Müller D. R., de Beer T., Löffler A., Richter W. J., Vliegthart J. F. G., *Biochemistry*, **33**, 13524–13530 (1994).
- 9) Garcia A., Lenis L. A., Jiménez C., Debitus C., Quinoá E., Riguera R., *Org. Lett.*, **2**, 2765–2767 (2000).
- 10) Hartmann S., Hofsteenge J., *J. Biol. Chem.*, **275**, 28569–28574 (2000).
- 11) Krieg J., Hartmann S., Vicentini A., Gläsner W., Hess D., Hofsteenge J., *Mol. Bio. Cell.*, **9**, 301–309 (1998).
- 12) Doucey M.-A., Hess D., Cacan R., Hofsteenge J., *Mol. Bio. Cell.*, **9**, 291–300 (1998).
- 13) Manabe S., Ito Y., Ogawa T., *Chem Lett.*, 919–920 (1998).
- 14) Manabe S., Ito Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9754–9755 (1999).
- 15) Nishikawa T., Ishikawa M., Wada K., Isobe

- M., *Synlett*, **2001**, 945–947.
- 16) Merrifield B., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149–2152 (1963).
- 17) Frechet J. M. J., Schuerch C., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 492–496 (1971).
- 18) Danishefsky S. J., McClure K. F., Randolph J. T., Ruggeri R. B., *Science*, **260**, 1307–1309 (1993).
- 19) a) Ito Y., Manabe S., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 701–708 (1998); b) Seeberger P. H., Haase W. C., *Chem. Rev.*, **100**, 4349–4393 (2000).
- 20) Manabe S., Nakahara Y., Ito Y., *Synlett.*, **2000**, 1241–1244.
- 21) Manabe S., Ito Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1234–1235 (2001).
- 22) Jiang L., Hartly C., Chan T.-H., *Chem. Commun.*, **1996**, 2193–2194.
- 23) a) Pozgay V., *Org. Lett.*, **1**, 477–480 (1999); b) Perrier H., Labelle M., *J. Org. Chem.*, **64**, 2110–2113 (1999); c) Zhang S.-Q., Fukase K., Kusumoto S., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 7479–7483 (1999); d) Itami K., Mitsudo K., Kamei T., Koike T., Nokami T., Yoshida J., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12013–12014 (2000); e) Ley S. V., Massi A., Rodríguez F., Horwell D. C., Lewthwaite R. A., Pritchard M. C., Reid A. M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 1053–1055 (2001).
- 24) Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I. *Anal. Biochem.*, **34**, 595–598 (1970).
- 25) Kuisle O., Lolo M., Quinoá E., Riguera R., *Tetrahedron*, **55**, 14807–15812 (1999).
- 26) <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>
- 27) Kanemitsu T., Kanie O., Wong C.-H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 3415–3418 (1998).
- 28) Mogemark M., Elofsson M., Kihlberg J., *Org. Lett.*, **3**, 1463–1466 (2001).
- 29) Shaughnessy K. H., Kim P., Hartwig J. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2123–2132 (1999).
- 30) Weingarten M. D., Sekanina K., Still W. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9112–9113 (1998).
- 31) a) Attardi M. E., Falchi A., Taddei M., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 7395–7399 (2000); b) Maddar A., Farcy N., Hosten N. G. C., De Muynck H., De Clercq P. J., Barry J., Davis A. P., *Eur. J. Org. Chem.*, 2787–2791 (1999); c) Burkett B. A., Brown R. C. D., Meloni M. M., *Tetrahedron Lett.*, **42**, 5773–5775 (2001); d) Badyal J. P., Cameron A. M., Cameron N. R., Coe D. M., Cox R., Davis B. G., Oates L. J., Oye G., Steel P. G., *Tetrahedron Lett.*, **42**, 8531–8533 (2001).
- 32) Korbel G. A., Lalic G., Shair M. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 361–362 (2001).
- 33) Ando H., Manabe S., Nakahara Y., Ito Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3848–3849 (2001).
- 34) Ando H., Manabe S., Nakahara Y., Ito Y., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 4725–4728 (2001).