

## 複合糖質を素材とした糖鎖の合成と生物活性

羽田 紀 康

## Syntheses and Biological Activities of Glycoconjugates

Noriyasu HADA

Division of Natural Medicines, Kyoritsu University of Pharmacy, 1-5-30 Shibakoen,  
Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

(Received February 13, 2007)

This review describes the oligosaccharide syntheses and biological activities of glycosphingolipids, focusing especially on those found in invertebrates like millipedes, nematoda parasites, and cestoda parasites, and model compounds related to a major antigenic epitope against antibupleurum 2IIc/PG-1-IgG from antiulcer pectic polysaccharides. A novel and simple approach for the rational design of glycoclusters and glycodendrimers by coupling with a sugar unit and a cluster unit, was developed with  $\beta$ -alanine derivatives used to construct the latter compounds.

**Key words**—glycosphingolipid; invertebrate; *Bupleurum falcatum*; glycocluster; monolayer

## 1. はじめに

20世紀末、ライフサイエンスを支える研究領域の中で、遺伝子や酵素を中心とした核酸とタンパク質を柱とする分子生物学が発展してきた。「現在の細胞生物学は情報生物学である」と言われているが、第一の鎖である核酸（ポリヌクレオチド鎖）においてその情報はその配列に、第二の鎖であるタンパク質（ポリペプチド鎖）においてはその情報は立体構造に込められている。一方で、もう1つの重要な要素である糖鎖に関する研究の遅れが次第に問題とされてきた。生体高分子の第三の鎖である糖鎖は、その種類の多さが特徴と言われている。これは、3種類のアミノ酸からなるトリペプチド鎖に可能な配列は6種類であるのに対し、3種類のヘキソースからなるトリサッカライドの結合様式は720通りにもなることから明らかであり、糖鎖が含む潜在的情報量が、核酸やタンパク質に比べ桁違いに多いことを示している。<sup>1)</sup> ヒトゲノム解析に成功し、ポストゲノム時代を迎えた今、糖鎖科学の発展に注目が集まるのも当然であろう。この糖鎖は、糖タンパク

質、糖脂質、プロテオグリカンなど複合糖質の構成成分として生体内で多種多様な分子群を形成している。最近の研究成果から、糖鎖は細胞同士の認識、接着、分化、がん化、免疫などの重要な役割を担っており、多くの生命現象に深く関与する分子種であることが明らかになってきた。<sup>2)</sup> しかしこれらの研究の着眼点は高等動物に向けられ、下等動物や植物を素材とする多くの研究は、単離構造決定に留まり、生物機能解明や生物活性解明にまでは至っていない。そこで、われわれは無脊椎動物中に含有される糖脂質と漢薬柴胡の多糖体など、複合糖質の全合成や部分合成を行い、糖鎖やその複合体の高次構造の解明と機能性糖鎖や糖鎖プローブの合成を経て、活性発現最小単位を含む機能性分子の設計という創薬プロセスを展開した。

## 2. 無脊椎動物由来の糖脂質

ホ乳類を代表とする後口系動物における糖脂質糖鎖の構造と機能は大規模に研究されており、様々な生物機能を担っていることが知られている。これらの糖鎖はコア構造の違いによってガングリオ、ラクトー、ネオラクトー、グロボー、イソグロボー系列などに分類されている (Fig. 1).<sup>3)</sup> これらのコアは、繰り返しや伸張され最終的に末端にシアル酸や硫酸基がついて血液型やその他の抗原決定基となっている。

共立薬科大学天然医薬資源学講座 (〒105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30)

e-mail: hada-nr@kyoritsu-ph.ac.jp

本総説は、平成18年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Prefix of series	Structure
Ganglio	GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc
Lacto	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Neolacto	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Globo	GalNAc $\beta$ 1-3GlcNAc $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc
Isoglobo	GalNAc $\beta$ 1-3GlcNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc

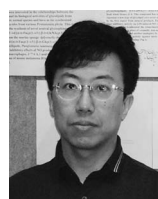
Fig. 1. Carbohydrate Structure of Glycosphingolipid Series Found in Deuterostomia Phyla

一方、無脊椎動物からの糖脂質コア糖鎖はホ乳類のそれとは大きく異なっている (Fig. 2). 通常の脊椎動物糖脂質との構造上の違いは、未調査の無脊椎動物、取り分け先口系の動物の研究的興味を促す。さらにこれらの糖鎖の機能はほとんど解明されていない。そこでわれわれはこの無脊椎動物由来糖脂質の構造と活性に興味を持ち、これまでに様々な先口系の動物から見出された新規糖脂質の合成を行ってきた。<sup>4-16)</sup> 本稿ではその中から興味深い生物活性を示したものについて述べる。

**2-1. キシャヤスデ由来の糖脂質** 周期ヤスデの一種であるキシャヤスデは、節足動物門の倍脚類に属しており、8年に1度、地表で大量にみつけられる動物である。1994年、杉田らは新規な糖脂質である  $\beta$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 4)[ $\alpha$ -L-Fucp(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ )Cer を見出した。<sup>17)</sup> この構造は新規なフコシル構造を持ち、また糖合成の中で最も難しいとされている1,2-シス $\beta$ -マンノシド結合を有している。この結合の形成は、 $\alpha$ -マンノシド結合が熱力学的にも動力学的にも優位であり、またエステルを介する隣接基関与(立体電子効果)も $\alpha$ -マンノシド結合を与える方向に進むなどの点から非常に難しい。これまでに多くの糖化学者がこの $\beta$ -マンノシド結合構築を目指してきた。<sup>18,19)</sup> 主な方法としては、A:  $S_N2$  反応を利用した直接的なグリコシル化、<sup>20-24)</sup> B: グルコタイプで縮合したのち、2位水酸基をエピマー化して得る方法、<sup>25-29)</sup> C: 分子内アグリコン転位反応(IAD)、<sup>30-35)</sup> D: 環状オルソエステルの還元開裂による方法<sup>36-38)</sup>などが知られている。われわれはまずDの方法でキシャヤスデ由来糖脂質の合成を行った。なお、この方法を天然物の合成に応用した報告は初めてである。合成ルートはScheme 1に示した。TMSOTfとTMSOMeを用いてラクトン**1**とジオール**2**を縮合させ中間体**3**を得

た。続いてLiAlH<sub>4</sub>-AlCl<sub>3</sub>を用いて**3**のオルソエステルの還元開裂とベンゾイル基の脱保護を行い立体及び位置選択的に化合物**4**を得た。**4**は6位選択的にピバロイル化し受容体としての**5**に導いた。化合物**5**とフコース供与体**6**の縮合はNIS-TfOH存在下で行われ目的の三糖誘導体**7**を得た。化合物**7**は脱ピバロイル化、ベンジル基の接触還元、アセチル化により**8**を経てイミデート**9**に変換した。最後の縮合は**9**をアジドスフィンゴシン誘導体**10**とTMSOTfを用いて行い、 $\beta$ -グリコシド**11**とし、アジド基の還元、脂肪酸とのアミド縮合を経て、脱アシル化を行い、LH20で精製して目的化合物**13**を合成した。<sup>11)</sup> 次に化合物**13**を含む当講座で合成してきたいくつかの糖脂質及び糖脂質アナログ体(Fig. 3)に対して、MTTアッセイを用いてメラノーマ細胞の増殖に対する影響を調べた。その結果、Fig. 4に示すように化合物**13**の糖鎖構造が最も強い増殖抑制を示した。このことからさらなるメカニズム追求のために、この糖脂質の合成をBの $\beta$ -マンノシル化を用いて行った(Scheme 2)。すなわち糖供与体**23**と糖受容体**24**をNIS-TfOHの系で縮合して化合物**25**としたのち、クロロアセチル基を脱保護して二糖受容体**26**を得た。**26**の2位遊離水酸基をトリフラート化したのち、テトラブチルアンモニウムベンゾエートを用いて2位をグルコースからマンノースに反転させ、化合物**27**を合成した。**27**のパラメトキシベンジル基を脱保護して二糖受容体**28**としたのち、**6**と縮合して三糖誘導体**29**に導いた。化合物**29**はイミデート体**31**に変換したのち、セラミド誘導体**32**と直接縮合し、最後に脱アシル化して**13'**を合成した。<sup>16)</sup> さらに**13'**を用いて増殖抑制のメカニズムを検討し、FAKのリン酸化やErkのリン酸化を抑制することを見出した。

**2-2. ブタ回虫由来の糖脂質** ブタ回虫は袋形動物門の線虫類に属する寄生虫である。線虫類の糖

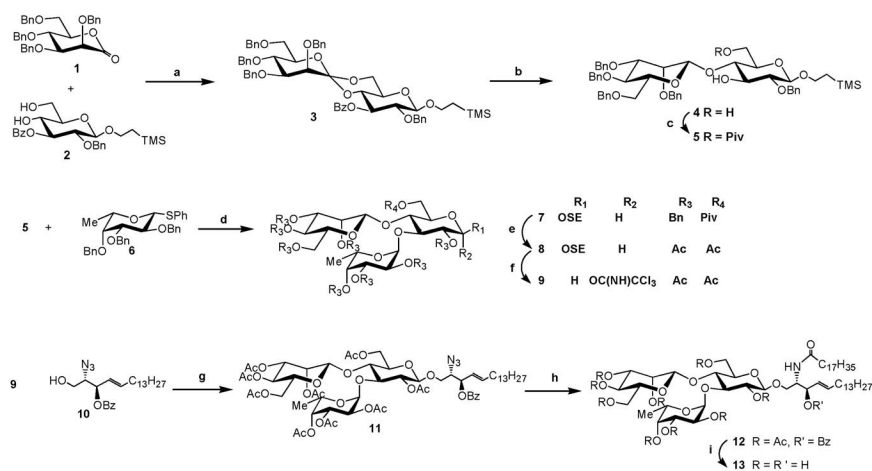


羽田紀康

共立薬科大学天然医薬資源学講座准教授。1965年生まれ。名城大学薬学部卒業。名古屋市立大学大学院博士前期・後期課程修了。1994年カナダアルバータ大学に留学。1996年国立がんセンター研究所リサーチレジデント。1997年共立薬科大学助手に着任。講師、助教を経て現職。漢方と糖化学という東西の学問に興味を持っている。

Prefix of series	Structure	Phylum
<b>Arthro</b>	<b>GlcNAc<math>\beta</math>1-3Man<math>\beta</math>1-4Glc</b>	Arthropoda, Ascheimnthes
<b>Mollu</b>	<b>Man<math>\alpha</math>1-3Man<math>\beta</math>1-4Glc</b>	Mollusca
<b>Gala</b>	<b>Gal<math>\alpha</math>1-4Gal</b>	Annelida, Platyhelminthes
<b>Neogala</b>	<b>Gal<math>\beta</math>1-6Gal</b>	Annelida, Platyhelminthes, Aschelminthes
<b>Spirometo</b>	<b>Gal<math>\beta</math>1-4Glc<math>\beta</math>1-3Gal</b>	Platyhelminthes
<b>Schisto</b>	<b>GalNAc<math>\beta</math>1-4Glc</b>	Coelenterata, Platyhelminthes

Fig. 2. Carbohydrate Structure of Glycosphingolipid Series Found in Protostomia Phyla



Scheme 1.

**Reagents:** (a) TMSOTf, TMSOMe, toluene, 67%, (b) LiAlH<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Et<sub>2</sub>O, 56%, (c) PivCl, Pyr, 0°C, 57%, (d) NIS, TfOH, MS4A, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 65%, (e) 1) NaOMe, MeOH, 2) Pd-C/H<sub>2</sub>, MeOH, 3) Ac<sub>2</sub>O, Pyr., 93% three steps, (f) 1) CF<sub>3</sub>COOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 2) CCl<sub>4</sub>CN, DBU, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 99%, (g) TMSOTf, MS4A, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40%, (h) 1) Ph<sub>3</sub>P, benzene-H<sub>2</sub>O, 2) WSC, C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>COOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 74% two steps, (i) NaOMe, 1,4-dioxane-MeOH, 98%.

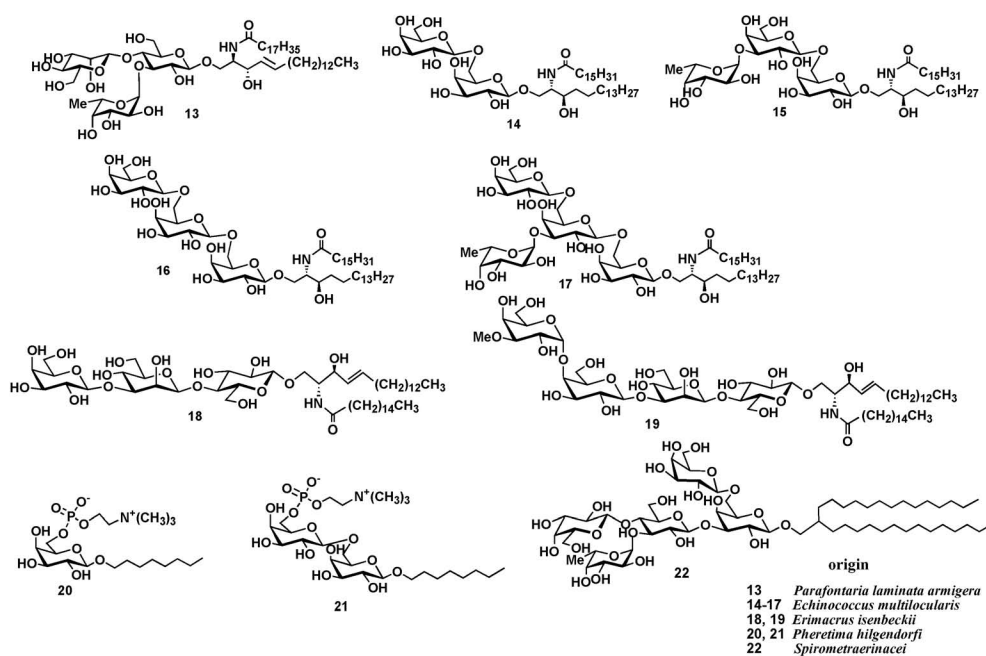


Fig. 3. Target Compounds from Various Invertebrate Species

脂質はこれまでの研究から構造的に中性、両性及び酸性糖脂質に分類される。中性、両性化合物が前口系動物糖脂質特有の  $\beta$ -D-GlcNAc $p$  (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Man $p$  (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ )Cer であるアルスロ系列と呼ばれる一方、酸性種はホスホイノシトール糖脂質とスルファチドが見出されている。両性糖脂質はさらに GlcNAc の 6 位にホスホジエステル結合のホスホコリンの存在で特徴付けられる。<sup>39)</sup> さらにこのブタ回虫から得られた五糖糖脂質は、ホスホコリ

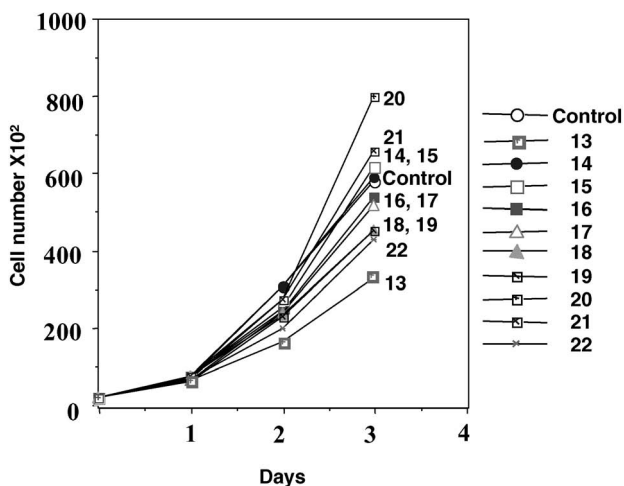
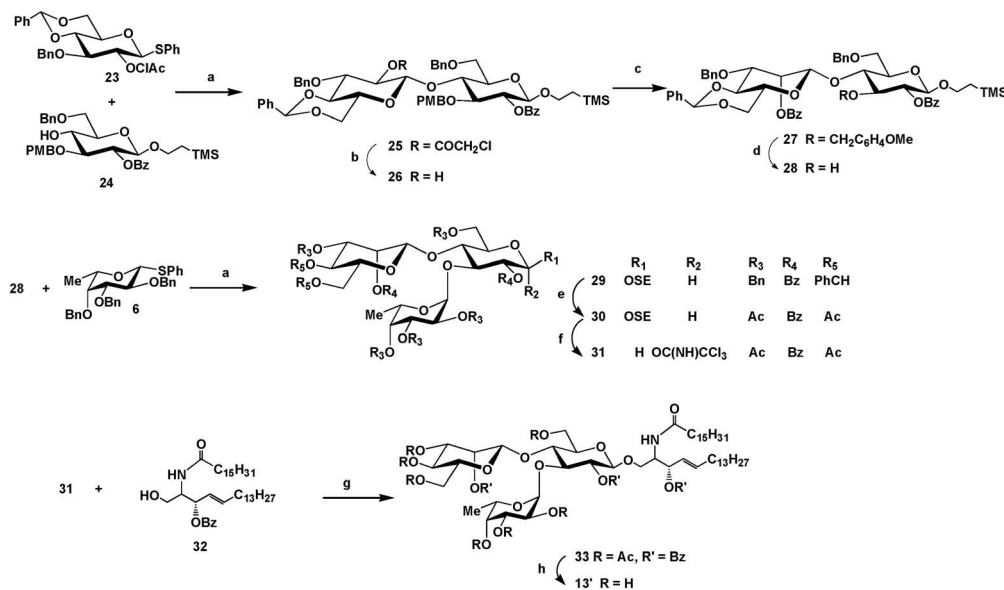


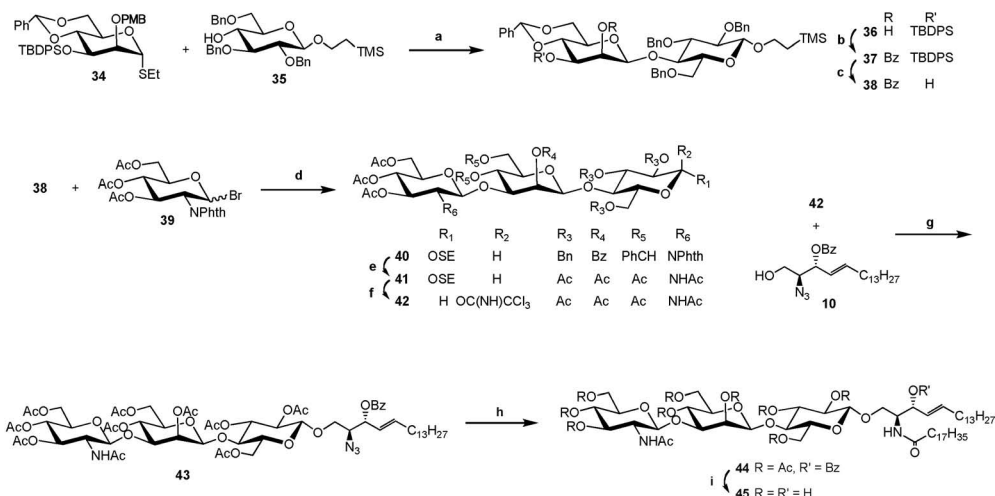
Fig. 4. Effects of Synthetic Glycolipids and the Analogs on Proliferation Mouse Melanoma B16 Cells

ンに加えてマンノース残基の 6 位にホスホエタノールアミンを有するものも見出された。これらの糖脂質は、ヒトの末梢血単核球からのサイトカイン分泌誘導効果を有することが報告されている。<sup>40)</sup> このことから  $\beta$ -D-GlcNAc $p$  (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Man $p$  (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ )Cer とホスホコリンを含んだアルキル糖鎖の合成を行い、免疫細胞を用いた生物活性を検討した。目的の三糖は上述したキシヤヤスデ糖脂質と同様にマンノース  $\beta$ 1-4 構造を持っており、ここでは C の IAD<sup>34,35)</sup> を応用した (Scheme 3)。すなわち、マンノース供与体 **34** とグルコース受容体 **35** を DDQ 存在下、橋掛け中間体である混合アセタール誘導体へと導いたのち、マンノースのアノマー位を活性化することにより二糖誘導体 **36** を合成した。得られた **36** をベンゾイル体 **37** へと変換したのちに、TBAF を用いて TBDPS 基の除去を行い **38** に導いた。二糖受容体 **38** はフタルイミド供与体 **39** と AgOTf 存在下で縮合させ三糖誘導体 **40** に導き、ベンジル基、ベンジリデン基の脱保護及びフタルイミド、ベンゾイルの脱保護を行いアセチル化して **41** を得た。**41** はイミデート体 **42** に変換したのち、上述したのと同様にアジドスフィンゴシン誘導体と縮合させ **43** としてから、アジド基の還元、脂肪酸との縮合、アシル基の脱保護を行い、目的化合物 **45**



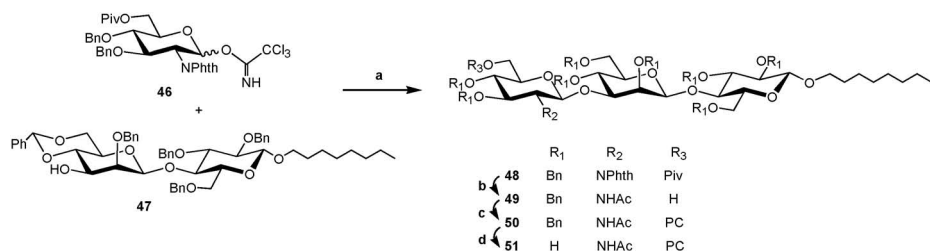
Scheme 2.

**Reagents:** (a) NIS, TfOH, MS4A CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, **25**: 57%, **29**: 99%, (b) NaHCO<sub>3</sub>, THF, 75%, (c) (i) Tf<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Pyr., (ii) Bu<sub>4</sub>NBz, DMF, 80%, (d) (i) DDQ, CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (19 : 1), 78%, (ii) Bu<sub>4</sub>NBr, BnBr, toluene, (e) (i) H<sub>2</sub>, Pd-C, MeOH-AcOH, (ii) Ac<sub>2</sub>O-Pyr., 60% two steps, (f) (i) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (ii) CCl<sub>3</sub>CN, DBU, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 98%, (g) TMSOTf, MS4A CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 35%, (h) NaOMe, 1,4-dioxane-MeOH, 94%.



Scheme 3.

**Reagents:** (a) (1) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (2) DTBMP, MeOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 37% two steps, (b) BzCl, Pyr., 89%, (c) TBAF, AcOH, THF, 80%, (d) AgOTf, MS4A, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 72%, (e) (1) Pd-C, AcOH, MeOH, (2) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, EtOH, (3) Ac<sub>2</sub>O, Pyr., 83% three steps, (f) (1) CF<sub>3</sub>COOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (2) CCl<sub>3</sub>CN, DBU, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 93%, (g) TMSOTf, MS4A, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 49%, (h) (1) triphenylphosphine, benzene-water, (2) C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>COOH, WSC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 72%, (i) NaOMe, 1,4-dioxane-MeOH, 85%.



Scheme 4.

**Reagents:** (a) TMSOTf, MS4A, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 94%, (b) (1) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, EtOH, (2) Ac<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N-MeOH, 81%, (c) (1) 2-chloro-2-oxo-1,3,2-dioxaphospholane, Et<sub>3</sub>N, benzene, (2) Me<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>CN, 69% two steps, (d) H<sub>2</sub>, Pd-C, AcOH-MeOH, 90%.

を合成した。<sup>14)</sup> また、ホスホコリンを含んだ三糖の合成は Scheme 4 に示した。アノマー位をオクチル基で保護した二糖受容体 47 と、6 位を選択的にピバロイルで保護した供与体 46 を縮合し三糖誘導体 48 を合成したのち、フタロイル基とピバロイル基を脱保護し、アミノ基のみ選択的にアセチル化した化合物 49 に変換した。その後、水酸基遊離の 6'' 位にホスホコリンを導入し、脱ベンジル化することで目的の三糖体 51 を得た。<sup>15)</sup> 次にコントロール、化合物 45, 51 及び脂質と糖鎖の係わりを調べる目的でセラミドとスフィンゴミエリンをサンプルとして、TNF- $\alpha$  存在下、レチノイン酸により好中球様に分化させた HL-60 細胞を用いて IL-8 誘導活性について検討した。その結果、2 つの合成化合物はコントロールに比べて高活性を示し、特に 51 に優位な活性上昇があり、ホスホコリンの重要性が示唆された

(Fig. 5)。また、これらのオリゴ糖は Harnett らによって注目され、フトミミズ由来糖脂質の合成糖鎖 21 とともに、マクロファージによる IL-12 及び TNF- $\alpha$  の産生誘導活性が調べられた。化合物 45 と 51 は活性を示さなかったが、化合物 21 は顕著な活性を示した (Fig. 6)。<sup>41)</sup>

**2-3. エキノコックス由来の糖脂質** エキノコックスは扁形動物門の条虫綱に属する蠕虫で、北海道の風土病「多包虫症」は、その卵の経口感染によって引き起こされる人獣共通伝染病として知られている。成虫は主にキタキツネの小腸に寄生しており、できた卵は糞として体外に出る。卵は主にゲシ目に摂取され、寄生虫の中間宿主又はヒトに偶発的に取り込まれる。しかし包虫症患者の血清診断のためのよい抗原は見出されていない。1991 年 Per-sat らは、包虫症患者血清とエキノコックスの幼生

から見出された中性糖脂質に相関があることを報告した。<sup>42,43</sup> それらの構造はネオガラ系列の糖鎖に属し  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-Fucp(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ )Cer とその部分共通糖鎖構造を持つ糖脂質群であった。この情報に基づいてわれわれは4種類の糖脂質を合成した。この項では合成と血清診断の抗原性について述べる。合成研究においては、糖脂質 **14–17** を目標とし (Fig. 3), 還元末

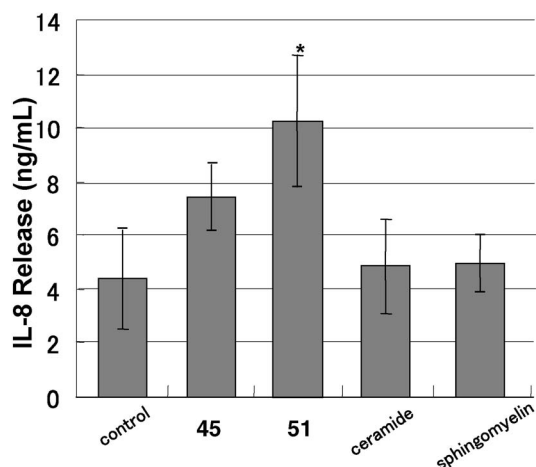


Fig. 5. Compound **45**, **51**, Ceramide and Sphingomyelin Induced IL-8 Production by HL-60 Cells, in the Presence of TNF- $\alpha$  (19 ng/ml)

Data expressed mean  $\pm$  S.D. ( $n=4$ ). \*Indicated statistically significant ( $p<0.05$ ).

端側糖鎖にチオグリコシド糖を用いて、適切に保護した単糖誘導体 (**52**, **53**, **55**) を順次段階的に合成するという系統的な経路で合成した。その流れを Scheme 5 に示した。この合成経路の鍵となるステップは、NIS 及び TfOH を用いた各チオグリコシド供与体 (**54**, **58**, **60**, **62**) とセラミド誘導体の縮合反応である。これまでにオリゴ糖とスフィンゴリピドの縮合は小川,<sup>44–47</sup> Schmidt,<sup>48–51</sup> 長谷川<sup>52–55</sup> らの先駆的な研究によって報告されてきた。特に典型的

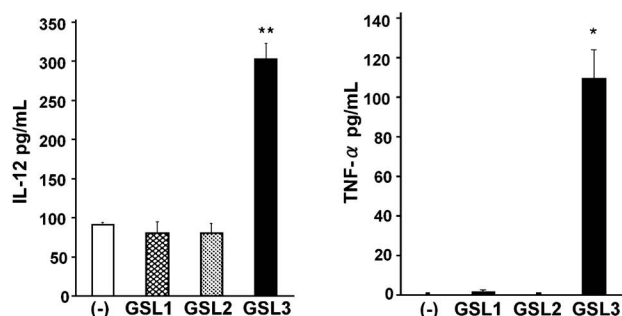
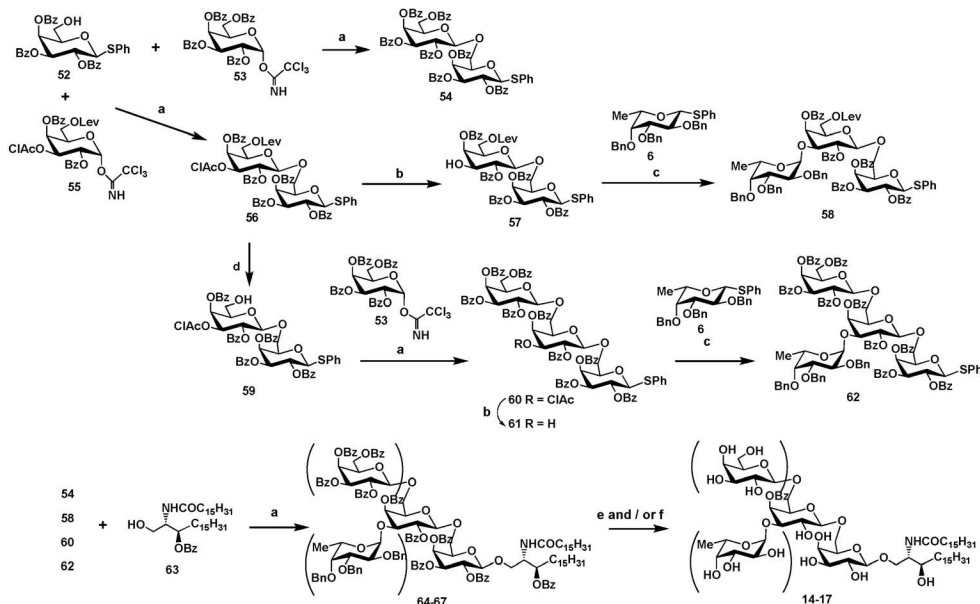


Fig. 6. Compound **21** Induces Macrophages to Produce IL-12p40 and TNF- $\alpha$

Bone marrow-derived macrophages were cultured for 42 h in media ((-), open bars), Compound **51** (GSL1, 10  $\mu$ g/ml), Compound **45** (GSL2, 10  $\mu$ g/ml), or Compound **21** (GSL3, 10  $\mu$ g/ml). Supernatants were harvested and analysed for IL-12p40 and TNF- $\alpha$  cytokine content. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ) and are representative of three independent experiments. Significance was calculated by Student's  $t$ -test and is illustrated by \*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$  compared with control levels.



Scheme 5.

Reagents: (a) TMSOTf, MS4A  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , **54**: 91%, **56**: quant., **60**: 92%, **64**: 44%, **65**: 54%, **66**: 33%, **67**: 27%, (b) thiourea, 6: 1 Pyr.-EtOH, **57**: 75%, **61**: 84%, (c) NIS, TfOH, MS4A  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , **58**: 72%, **62**: 91%, (d) hydrazine acetate, 10 : 1 THF-MeOH, 88%, (e)  $\text{H}_2$ , Pd-C, 2 : 1 THF-MeOH, (f) NaOMe, 1,4-dioxane-MeOH, **14**: quant., **15**: 73%, **16**: quant., **17**: 94%.

な縮合は  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  や  $\text{TMSOTf}$  をプロモーターとしたグリコシルイミデートとアジドスフィンゴシンの縮合である。アジドスフィンゴシンの縮合はのちに段階的な官能基変換を必要とするが、収率よく、また様々な長さの脂肪酸と縮合できる点において優れている。<sup>56)</sup> さらにグリコシルフルオリドとスフィンゴリピドの縮合は、小川<sup>47)</sup> や Nicolaou<sup>57)</sup> によって報告されてきた。しかし、チオグリコシドとの反応は、Wong<sup>58)</sup> や Danishefsky<sup>59)</sup> のアジドスフィンゴシンの縮合のみが報告されているだけで、直接セラミドとの報告はない。われわれの方法は、チオグリコシドとセラミド誘導体の縮合の初めての報告であった。続いて4種類の糖鎖抗原と血清との反応性を、健常人と強陽性患者の血清の違いから試験した (Fig. 7).<sup>60)</sup> 一般的に強陽性患者の血清はすべての糖脂質抗原に対して高い OD 値を示した。特にフコース残基を持つ **15** と **17** は健常人と比較して顕著な結果を示した。また、強陽性患者の血清には2つのタイプがあることが分かった。すなわちすべての抗原に対して同程度の値を示す患者と、フコー

スを持たない化合物 **14**, **16** よりフコースを持つ **15**, **17** に対してより強く反応する患者である。Persatらは  $\text{Gal}\beta 1\text{-6Gal}$  配列が最も有力なエピトープで、フコースが付加することでエピトープを認識する抗体の妨げになると報告している。しかし4つの合成抗原を用いたわれわれの研究では、患者血清中には2つのタイプの抗体があることを示した。1つは Persat 同様  $\text{Gal}\beta 1\text{-6Gal}$  配列を認識している抗体、そしてもう1つはフコース周辺を認識している抗体である。なお、フコース残基が抗原性に関与するケースは、ABH 血液型抗原である  $\text{Fuc}\alpha 1\text{-2Gal}$ ,<sup>61)</sup> Lewis 血液型抗原である  $\text{Fuc}\alpha 1\text{-4GlcNAc}$ <sup>62)</sup> 及びがん関連抗原である  $\text{Fuc}\alpha 1\text{-3GlcNAc}$  であり、<sup>63)</sup> 今回見出された  $\text{Fuc}\alpha 1\text{-3Gal}$  配列の抗原性は初めてのケースである。

### 3. 柴胡由来ペクチン様多糖のモデル化合物の合成とその機能

漢方処方において繁用される柴胡 *Bupleurum falcatum* は、小柴胡湯、大柴胡湯、柴胡桂枝湯などの柴胡剤の構成生薬として慢性肝炎や自己免疫疾患などの治療に用いられている。山田らはその根部から強い抗潰瘍活性を有する多糖体を見出した。<sup>64)</sup> これらはペクチンに分類され、90%以上のガラクトuron酸と少量の中性糖から構成されている。最も活性の強い多糖体 *bupleuran 2IIc* は、部分的にメチルエステル化され、その一部が2位又は3位で分岐した80%以上の(1→4)結合ポリガラクトuron部分と、櫛状に中性糖鎖が分岐したラムノガラクトuronコア部分 (PG 1)、酵素抵抗性の低分子部分 (PG 2) の3つの部分よりなることが推定され、そのなかで、PG 1部分が最も強い薬理活性を有すると報告されている。<sup>65)</sup>

一方、*bupleuran 2IIc*/PG-1 に対する抗体が作成され、そのエピトープとして、PG 1の側鎖部分である  $\text{GlcA}\beta(1\rightarrow 6)\text{Gal}$ ,  $\text{GlcA}\beta(1\rightarrow 6)\text{Gal}\beta(1\rightarrow 6)\text{Gal}$ ,  $\text{GlcA4Me}\beta(1\rightarrow 6)\text{Gal}$ ,  $\text{GlcA4Me}\beta(1\rightarrow 6)\text{Gal}\beta(1\rightarrow 6)\text{Gal}$  が関連していることが予測されている。<sup>66)</sup> またこのエピトープ部分にはリンパ球幼若化活性及び腸管免疫調節活性なども報告されており、<sup>67)</sup> これらを含んだモデル化合物を合成することは、柴胡の薬理活性の解明に有用であると考えられ、エピトープ部分のモデル化合物を合成し、腸管免疫調節活性及びリンパ球幼若化活性について検討

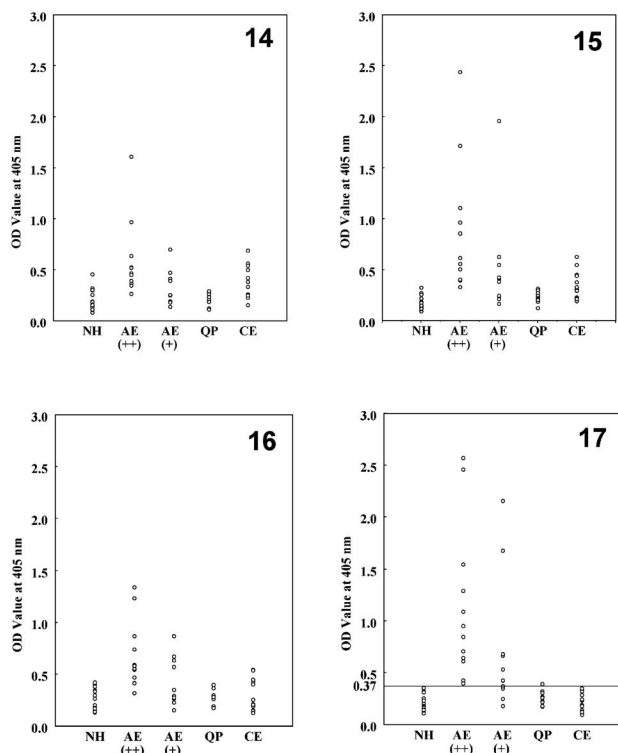


Fig. 7. Results of the ELISA Reaction between Human Sera and Four Antigens

NH: normal healthy group, AE(++): strong positive group, AE(+): weak to medium positive group, QP: quasi-positive group, CE: cystic echinococcosis group.

した。その際、受容体との親和性、活性発現増強を期待して、糖鎖のクラスター化を行った。1つはフェニルコアから三方向に糖鎖の伸びたトリマークラスター (**70, 71**) であり,<sup>68)</sup> もう1つはわれわれが開発した *N*-置換グルタミン酸をクラスターの主鎖とし、還元末端にアミノ基を有する糖鎖と縮合させたペプチド鎖のクラスター (**73, 74**) である (Fig. 8).<sup>69)</sup> ペプチドクラスターの特徴は、これまで多くの研究者によって開発されたクラスターに

比フレキシブルな構造を取ることができる。そして最初に様々な糖クラスターユニットを合成しておくことで、クラスター糖鎖間の距離や側鎖の距離を自由に変えることのできる多種類の糖クラスターを容易に化学合成でき、これらは活性発現増強とともに、受容体の構造解明にも一翼を担うと考えられる (Fig. 9).<sup>70-72)</sup> 今回のモデル化合物では、このクラスターの応用の第一歩として、ペプチド鎖は基本形のもののみを用いて糖クラスター **73** と糖デンド

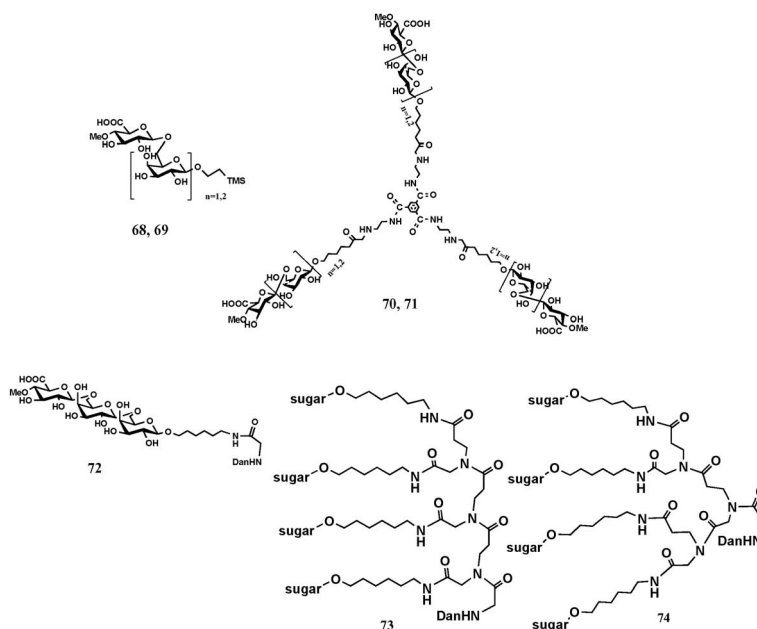


Fig. 8. Target Model Compounds of Polysaccharides from *Bupleurum falcatum*

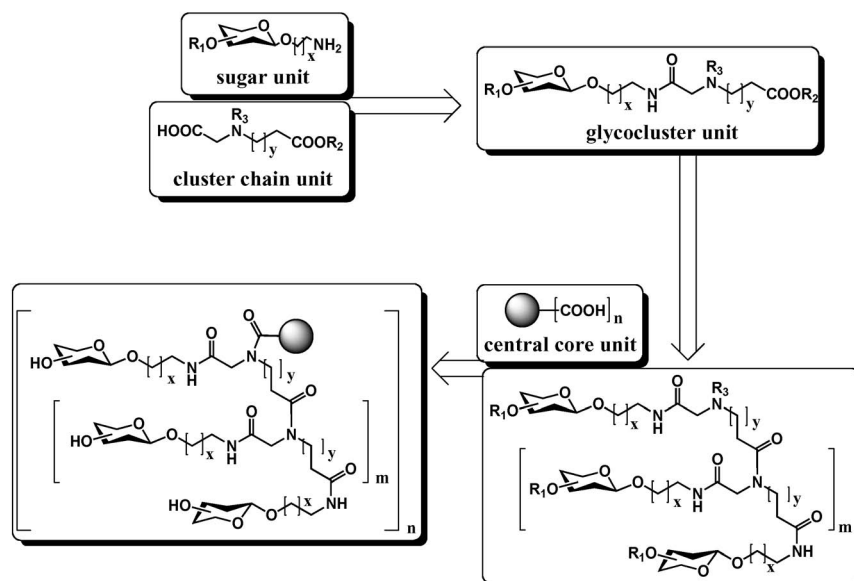


Fig. 9. Concept of the Glycocluster Syntheses

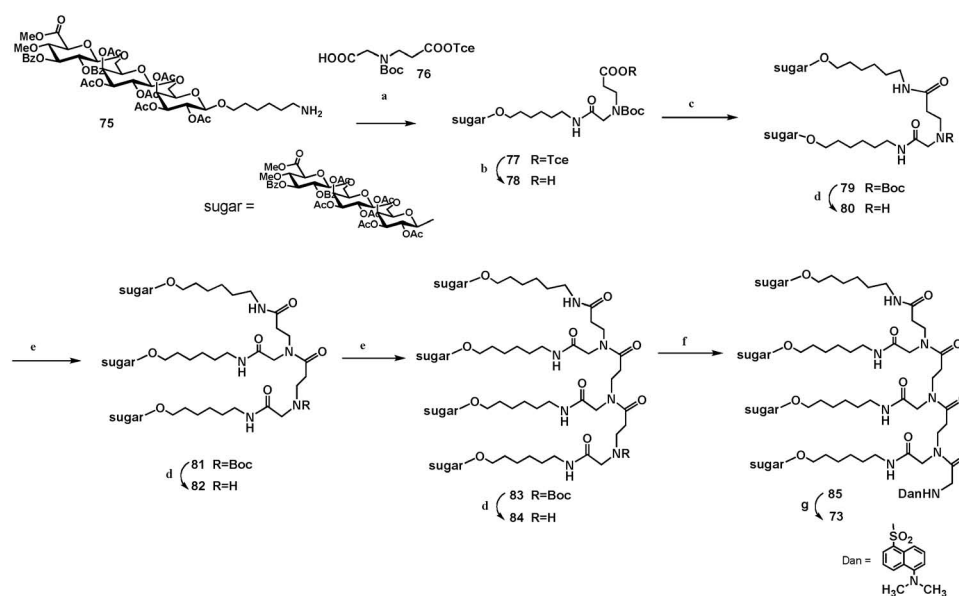


ロン **74** の 2 種類を合成した。糖クラスター **73** の合成は、糖鎖ユニット **75** とクラスター鎖ユニットである  $\beta$ -アラニン誘導体 **76** を、DEPC を縮合剤として縮合させ、糖クラスターユニット **77** に導いた。クラスター鎖の伸長は、糖クラスターユニットをアミノ基遊離とした化合物、及びカルボキシル基遊離とした化合物を縮合させ 2 量体とし、さらにそれをアミノ基遊離、カルボキシル基遊離として縮合させることで 4 量体 **73** へ導く方法で行った。すなわち化合物 **77** は亜鉛-酢酸によりカルボキシル基遊離としたのち、糖鎖ユニット **75** と縮合させ 2 量体の化合物 **79** とした。次に 50% TFA で処理し、アミノ基遊離の化合物 **80** に導いたのち、カルボキシル基遊離の化合物 **78** と順次縮合させ、4 量体の化合物 **84** に導いた。最後に化合物 **84** とダンスルグリシンを DEPC 存在下縮合させ化合物 **85** としてから、NaOMe で脱保護し、目的化合物 **73** に導いた (Scheme 6)。糖デンドロン (**74**) は、上述の  $\beta$ -アラニン誘導体 **76** のトリクロロエチル基を脱保護したジカルボン酸に、糖鎖ユニット **75** を縮合してダイマーとしたのち、Boc 基を脱保護して再度 **76** と縮合することによりテトラマーとして得られた。薬理活性については腸管パイエル板細胞からの骨髄細胞増殖促進因子産生に対する影響、腸管パイエル板細胞からのインターロイキン -6 産生に対する影響

及び脾臓リンパ球に対する幼若化活性を測定し、トリマー体 **71** 及びデンドロンタイプ **74** にそれぞれのモノマー体 **70** 及び **72** と比較してリンパ球幼若化活性の増強がみられた (Fig. 10)。また、N 末端にアルキル鎖を導入して新たに合成した単量体 **86**、及びクラスター体 **87** (Fig. 11) について、細胞膜上での挙動とクラスター化による単量体との比較を行うことで、その有効性について検討を行った。数種のガングリオシド (GM1, GM3, GD1a, GT1b) とリン脂質 (ジパルミトイルフォスファチジルコリン) からなる擬似細胞膜 (LB 膜) に化合物を加え、膜表面を原子間力顕微鏡で観察したところ、単量体 **86** を加えた膜表面は全体に均一なドメインや窪みが観察されたのに対し、クラスター体 **87** を加えた膜ではこれらが局在化していることが確認された。<sup>73,74)</sup> このことから単量体からクラスター体にすることで化合物が集積し、標的部位に薬物を集中的に投与することで薬効の向上につながるものと示唆される。Figure 12 では GM3 での結果のみを示した。<sup>73)</sup> これらの結果から、クラスター体は単量体と比較して、糖鎖-タンパク質相互作用における機能解明としてのツールや医薬への期待が望まれる。

#### 4. おわりに

無脊椎動物や植物より得られるオリゴ糖鎖は、脊椎動物のそれとかなり異なりユニークな構造を有す



Scheme 6.

**Reagents:** (a) **76**, DEPC, Et<sub>3</sub>N, DMF, 92%, (b) Zn-AcOH, 80%, (c) **75**, DEPC, Et<sub>3</sub>N, DMF, 89%, (d) 50% TFA, **80**: 88%, **82**: 76%, **84**: 66%, (e) **78**, DEPC, Et<sub>3</sub>N, DMF, **81**: 71%, **83**: 97%, (f) dansyl glycine, DEPC, Et<sub>3</sub>N, DMF, 86%, (g) NaOMe, MeOH-1,4-dioxane, 94%.

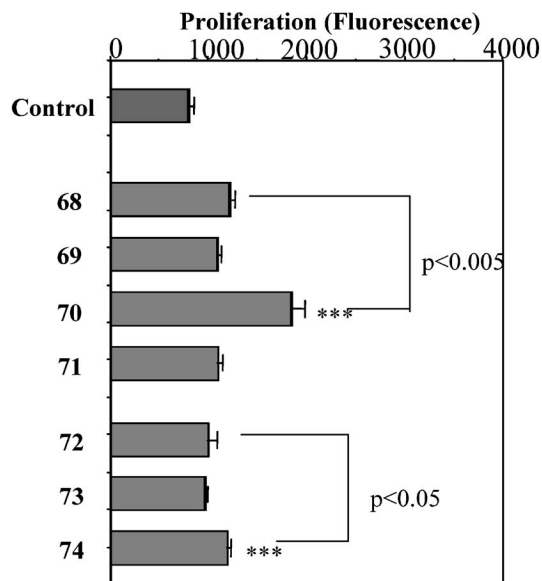


Fig. 10. Among Artificial Glycoclusters Tested, Compounds **70** and **74** Showed the Statistically Significant Stimulating Activity on the Proliferation of Splenocytes of C3H/HeJ Mice by Comparison with the Splenocytes Treated with Water (control)

Versus control: \*\*\* $p < 0.001$ , Sample concentration: 100  $\mu\text{g/ml}$ .

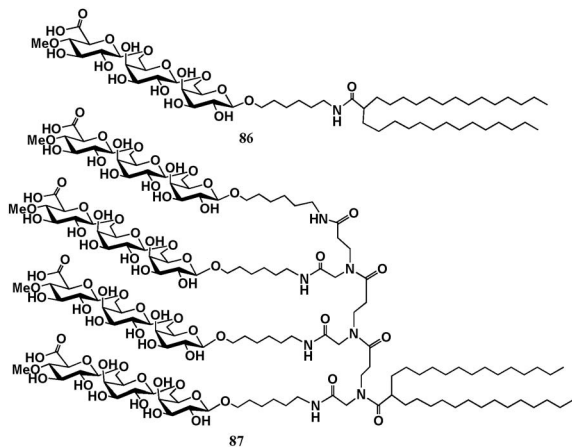


Fig. 11. The Chemical Structures of Compound **86** and **87**

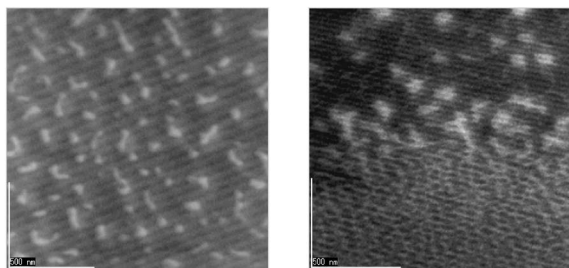


Fig. 12. AFM Image of Mixed DPPC/GM3 Monolayer Containing Compound **86** (left) and AFM Image of Mixed DPPC/GM3 Monolayer Containing Compound **87** (right)

るものが多い。複合糖質の糖鎖の担う生物活性や生物機能を解明するため、その素材は多岐に亘っており、特に高等動物由来の複合糖質の合成及び生物学的研究は、国の内外を問わず熾烈な競争が行われている。しかし下等動物や植物に目を向けたわれわれの研究は、人間とその他の生物の相互関係を分子レベルで解明するとともに新たな創薬研究の一端を担っていると確信している。今後、われわれが開発したペプチド性のクラスターを幅広く活用し、活性増強並びに受容体タンパクの構造解明に役立てたい。

**謝辞** 本研究は共立薬科大学において多くの研究協力を得て行われました。終始暖かいご指導ご鞭撻を賜りました竹田忠紘教授に深甚なる感謝の意を表します。また、合成化合物の生物活性を測定していただきました共立薬科大学生化学講座笠原 忠教授・園田よし子准教授、イギリス・グラスゴー Strathclyde Institute of Biomedical Sciences の William Harnett 教授、北海道立衛生研究所山野公明博士、北里大学北里生命化学研究所山田陽城博士・清原寛章博士・松本 司博士に深く感謝致します。糖クラスターの物理化学的性質を観測していただきました九州保健福祉大学薬学部横山祥子教授・大塚功博士に深く感謝致します。本研究にご協力いただいた当講座成川佑次博士を始め多くの大学院生、学部学生の皆様に感謝致します。機器分析を行っていただいた本学研究機器管理室の羽田純子女史に御礼申し上げます。本研究は日本学術振興会若手研究 B、勲日本科学協会笹川科学研究助成並びに勲東京生化学研究会奨励研究助成の補助により行われたものです。

## REFERENCES

- 1) Fukuda M., Hindsgaul O. (eds.) "Molecular Glycobiology," IRL Press, Oxford University Press, 1994.
- 2) Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. (eds.) "Essentials of Glycobiology," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999.
- 3) Wiegandt H. (ed.) "Glycolipid," Elsevier, New York, 1985.
- 4) Kanie O., Takeda T., Hada N., Ogihara Y., J.

- Carbohydr. Chem.*, **10**, 561–581 (1991).
- 5) Takeda T., Hada N., Ogihara Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1930–1933 (1992).
  - 6) Takeda T., Hada N., Ogihara Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 2058–2060 (1993).
  - 7) Hada N., Takeda T., Ogihara Y., *Carbohydr. Res.*, **258**, 93–104 (1994).
  - 8) Hada N., Hayashi E., Takeda T., *Carbohydr. Res.*, **316**, 58–70 (1999).
  - 9) Hada N., Matsuzaki A., Takeda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1265–1268 (1999).
  - 10) Hada N., Kuroda M., Takeda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1160–1165 (2000).
  - 11) Hada N., Ohtsuka I., Sugita M., Takeda T., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 9065–9068 (2000).
  - 12) Hada N., Sato K., Sakushima J.-I., Goda Y., Sugita M., Takeda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1464–1467 (2001).
  - 13) Ohtsuka I., Hada N., Ohtaka H., Sugita M., Takeda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 600–604 (2002).
  - 14) Ohtsuka I., Hada N., Sugita M., Takeda T., *Carbohydr. Res.*, **337**, 2037–2047 (2003).
  - 15) Yamamura T., Hada N., Kaburaki A., Yamano K., Takeda T., *Carbohydr. Res.*, **339**, 2749–2759 (2004).
  - 16) Hada N., Sonoda Y., Takeda T., *Carbohydr. Res.*, **341**, 1341–1352 (2006).
  - 17) Sugita M., Hayata C., Yoshida T., Suzuki M., Suzuki A., Takeda T., Hori T., Nakatani F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1215**, 163–169 (1994).
  - 18) Khan S. H., O'Neill R. A., "Modern Methods in Carbohydrate Synthesis," Harwood Academic Publishers, 1996, pp. 251–276.
  - 19) Fraser-Reid B. O., Tatsuta K., Thiem J. (eds.) "Glycoscience Chemistry and Chemical Biology (II)," Springer, 2001, pp. 1589–1620.
  - 20) Paulsen H., Lockhoff O., *Chem. Ber.*, **114**, 3102–3114 (1981).
  - 21) Garegg P. J., Ossowski P., *Acta Chem. Scand.*, **B 37**, 249–250 (1983).
  - 22) Crich D., Sun S., *J. Org. Chem.*, **61**, 4506–4507 (1996).
  - 23) Crich D., Sun S., *J. Org. Chem.*, **62**, 1198–1199 (1997).
  - 24) Crich D., Sun S., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 435–436 (1998).
  - 25) Lichtenthaler F. W., Adams T. S., *J. Org. Chem.*, **59**, 6735–6738 (1994).
  - 26) David S., Malleron A., Dini C., *Carbohydr. Res.*, **188**, 193–200 (1989).
  - 27) Sato K.-I., Yoshitomo A., Takai Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 885–890 (1997).
  - 28) Sato K.-I., Yoshitomo A., Nanaumi H., Takai Y., Ishido Y., *J. Carbohydr. Chem.*, **17**, 703–727 (1998).
  - 29) Matsuo I., Isomura M., Walton R., Ajisaka K., *Tetrahedron Lett.*, **37**, 8798 (1996).
  - 30) Barresi F., Hindsgaul O., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9376–9377 (1991).
  - 31) Barresi F., Hindsgaul O., *Can. J. Chem.*, **72**, 1447–1465 (1994).
  - 32) Stork G., La Clair J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 247–248 (1995).
  - 33) Ito Y., Ogawa T., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 1765–1767 (1994).
  - 34) Dan A., Ito Y., Ogawa T., *J. Org. Chem.*, **60**, 4680–4681 (1995).
  - 35) Dan A., Ito Y., Ogawa T., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 5562–5566 (1997).
  - 36) Ohtake H., Iimori T., Ikegami S., *Tetrahedron Lett.*, **38**, 3413–3414 (1997).
  - 37) Iimori T., Ohtake H., Ikegami S., *Tetrahedron Lett.*, **38**, 3415–3418 (1997).
  - 38) Ohtake H., Ichiba N., Ikegami S., *J. Org. Chem.*, **65**, 8171–8179 (2000).
  - 39) Kurimoto A., Kawakami Y., Dulaney J. T., Miyake A., Sugita M., *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.*, **49**, 127–135 (2000).
  - 40) Lochnit G., Dennis R. D., Ulmer A. J., Geyer R., *J. Biol. Chem.*, **273**, 466–474 (1998).
  - 41) Kean D. E., Ohtsuka I., Sato K., Hada N., Takeda T., Lochnit G., Geyer R., Harnett M. M., Harnett W., *Parasite Immunol.*, **28**, 69–76 (2006).
  - 42) Persat F., Vuncent C., Mojon M., Petavy A. F., *Parasitol. Immunol.*, **13**, 379–389 (1991).
  - 43) Persat F., Bouhours J.-F., Mojon M., Petavy A.-F., *J. Biol. Chem.*, **267**, 8764–8769 (1992).
  - 44) Ito Y., Numata M., Sugimoto M., Ogawa T., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8508–8510 (1989).
  - 45) Numata M., Sugimoto M., Koike K., Ogawa T., *Carbohydr. Res.*, **203**, 205–217 (1990).
  - 46) Numata M., Sugimoto M., Koike K., Ogawa T., *Carbohydr. Res.*, **163**, 209–225 (1987).
  - 47) Nakano T., Ito Y., Ogawa T., *Carbohydr. Res.*, **243**, 43–69 (1993).

- 48) Zimmermann P., Greilich U., Schmidt R. R., *Tetrahedron Lett.*, **31**, 1849–1852 (1990).
- 49) Schmidt R. R., Bar T., Apell H. J., *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, **26**, 793–794 (1987).
- 50) Lassaletta J. M., Carlsson K., Garegg P. J., Schmidt R. R., *J. Org. Chem.*, **61**, 6873–6880 (1996).
- 51) Lassaletta J. M., Schmidt R. R., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 4209–4212 (1995).
- 52) Kiso M., Nakamura A., Tomida T., Hasegawa A., *Carbohydr. Res.*, **158**, 101–111 (1986).
- 53) Murase T., Ishida H., Kiso M., Hasegawa A., *Carbohydr. Res.*, **188**, 71–80 (1989).
- 54) Hotta K., Ishida H., Kiso M., Hasegawa A., *J. Carbohydr. Chem.*, **14**, 491–506 (1995).
- 55) Kameyama A., Ehara T., Yamada Y., Ishida H., Kiso M., Hasegawa A., *J. Carbohydr. Chem.*, **14**, 507–523 (1995).
- 56) Ishida H., Kiso M., *Trends Glycosci. Glycotech.*, **13**, 57–64 (2001).
- 57) Nicolaou K. C., Caulfield T. J., Katoaka H., *Carbohydr. Res.*, **202**, 177–191 (1990).
- 58) Plettenburg O., Bodmer-Narkevitch V., Wong C.-H., *J. Org. Chem.*, **67**, 4559–4564 (2002).
- 59) Deshpande P. P., Kim H. M., Zatorski A., Park T. K., Ragupathi G., Livingston P. O., Live D., Danishefsky S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1600–1614 (1998).
- 60) Yamano K., Hada N., Yamamura T., Takeda T., Honma H., Sawada Y., *J. Helminthol.*, **80**, 387–391 (2006).
- 61) Watkins W. M., *Adv. Hum. Gent.*, **10**, 1–136 (1980).
- 62) Marcus D. M., Kundu S. K., Suzuki A., *Semin. Hematol.*, **18**, 63–71 (1981).
- 63) Kannagi R., Nudelman E., Lavery S. B., Hakomori S., *J. Biol. Chem.*, **257**, 14865–14874 (1982).
- 64) Yamada H., Sun X.-B., Matsumoto T., Ra K.-S., Hirano M., Kiyohara H., *Planta Med.*, **57**, 555–559 (1991).
- 65) Hirano M., Kiyohara H., Matsumoto T., Yamada H., *Carbohydr. Res.*, **251**, 145–162 (1995).
- 66) Sakurai M., Kiyohara H., Matsumoto T., Tsumuraya Y., Hashimoto Y., Yamada H., *Carbohydr. Res.*, **311**, 219–229 (1998).
- 67) Sakurai M., Kiyohara H., Yamada H., *Immunology*, **97**, 540–547 (1999).
- 68) Hada N., Ogino T., Yamada H., Takeda T., *Carbohydr. Res.*, **334**, 7–17 (2001).
- 69) Jin Y., Hada N., Oka J., Kanie O., Daikoku S., Kanie Y., Yamada H., Takeda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 485–492 (2006).
- 70) Sato K., Hada N., Takeda T., *Tetrahedron Lett.*, **44**, 9331–9335 (2003).
- 71) Hada N., Sato K., Jin Y., Takeda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1131–1135 (2005).
- 72) Sato K., Hada N., Takeda T., *Carbohydr. Res.*, **341**, 836–845 (2006).
- 73) Ohtsuka I., Hada N., Jin Y., Takeda T., Yokoyama S., *Mater. Technol.*, **24**(2), 104–109 (2006).
- 74) Hada N., Jin Y., Takeda T., Ohtsuka Y., Yokoyama S., *Chem. Pharm. Bull.*, **54**(9), 1281–1284 (2006).