

## 天然薬物成分の切り札 配糖体を極める

池田 剛,<sup>\*a</sup> 宮下裕幸,<sup>b</sup> 中野大輔,<sup>c</sup> 野原稔弘<sup>b</sup>

## Fascination with Natural Glycosides

Tsuyoshi IKEDA,<sup>\*a</sup> Hiroyuki MIYASHITA,<sup>b</sup> Daisuke NAKANO,<sup>c</sup> and Toshihiro NOHARA<sup>b</sup>  
<sup>a</sup>Faculty of Medical & Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto  
862-0973, Japan, <sup>b</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University, 4-22-1 Ikeda, Kumamoto  
862-0082, Japan, and <sup>c</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,  
8-19-1 Nanakuma, Jyonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

(Received October 28, 2009)

Recent progress in glycobiology reveals that sugar-chains play a crucial role in cell-cell recognition among immunity, inflammation, and malignant tumor in the living body. To study the mechanism of action requires a sample of sufficient quantity. However, isolating a sugar chain and a glycoside in pure form, difficulty follows sugar chain composition again, and studies have been limited to a few sugar chains. Glycosides are a group of compounds known to be the active principle of a natural drug. We have isolated triterpene glycosides from a Leguminosae plant, which improved liver disorder, and steroid glycosides from a plant of the Solanaceae with cytotoxic activity against human cancer cell lines. A biological activity test suggested an important role of the aglycone part and the sugar chain part of those glycosides. Although many studies of sugar chains of glycoprotein and glycolipid are known, there are few examples of studies of the sugar chain function of a glycoside of a natural drug, and the role of a sugar chain of a glycoside for its pharmacologic action expression is unknown. Therefore, as a biological tool investigating the function of a sugar chain of a natural glycoside, we have begun to synthesize a useful “glycoside” which can be utilized as a lead compound having activity.

**Key words**—glycoside; Leguminosae; Solanaceae; triterpenoid, steroid, cytotoxic activity

## 1. はじめに

日本の生薬学領域は、伝統的に生物活性成分の探索研究を得意とし、その結果、天然有機化合物の充実が顕著である。中でも、「天然配糖体」においては質・量ともに世界一と言える。しかしながら、有効な使い道が確立されていないことから、先人が築いてきた天然有機化合物ライブラリーの多くはこれまで眠ったままである。幸いなことに、現在、生物活性評価と分析技術は目覚ましく発展している。今まさに、天然有機化合物ライブラリーの有効利用法の再検討が可能となった。そこで、筆者は、「天然

配糖体」の有効利用法の再検討として、また、創薬シーズの探索として、生物活性配糖体の活性に重要な役割を担っている糖鎖部分構造に着目し、天然配糖体の糖鎖のトランスグリコシレーション法の開発を行っている。すなわち、天然配糖体より活性糖鎖モチーフを探索し、分子設計にその糖鎖構造を組み込んだ新規の活性化化合物を創製し、DDSやフラグメント・ベース・ドラッグ・ディスカバリーへ発展を計画している。本総説では、筆者らがこれまで行っているトランスグリコシレーション法の開発について紹介する。

まず、創薬シーズの探索として、筆者が目標とする糖鎖からの創薬への道について述べる。現在までに、糖鎖関連の医薬品は、合成化合物としてシアル酸疑似単糖であるオセルタミビルリン酸塩（商品名：タミフル）、 $\alpha$ -グリコシダーゼ阻害である1-デオキシノジリマイシンなどの疑似糖、天然由来では硫酸多糖のヘパリンやアミノグリコシド系抗生物質

<sup>a</sup>熊本大学大学院医学薬学研究部天然薬物学分野（〒862-0973 熊本市大江本町 5-1）、<sup>b</sup>崇城大学薬学部生薬学研究室（〒860-0082 熊本市池田 4-22-1）、<sup>c</sup>福岡大学薬学部生薬学研究室（〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1）

\*e-mail: tiked@gpo.kumamoto-u.ac.jp

日本薬学会第129年会シンポジウムS14で発表したものを中心に記述したものである。

などが知られている。最近の生物学の進歩により、糖鎖はタンパク質の生合成や免疫系においてシグナル伝達物質として働くことが次々と明らかとなり、医薬品としても期待が高まっている。糖鎖と糖鎖レセプターはバーコードとバーコードリーダーに例えられるが、糖鎖レセプターに認識されるのは構成する糖すべてではなく、いくつかの糖の水酸基、アミノ基、硫酸基などの置換基のみである。このことから、天然に大量に存在する「天然配糖体」の糖鎖の「いくつかの糖の置換基」を活用して糖鎖レセプターとシグナル伝達を探ることは非常に魅力的な課題である。生体関連糖鎖と同等の作用の天然配糖体由来の生物活性疑似糖鎖を見出すことは、創薬シーズの発見につながると考えられる。しかしながら、糖鎖構造は多様性に富み、合成に非常に時間がかかることから、現在のところ医薬品としては不向きとされている。そこで、筆者は、合成にかかる手間を削減する画期的な方法として、天然配糖体のトランスグリコシレーション法の開発に着手した。

糖鎖の合成の困難さの原因として、水酸基の選択的保護・脱保護とアノマー位の立体選択性が挙げられる。天然に豊富に存在する生物活性配糖体から糖鎖をオリゴ糖鎖として切り出すことができれば、機能性オリゴ糖鎖を量産できる調製法となり、また、得られた糖鎖にアグリコン部を導入すると、機能性オリゴ糖鎖を含んだ多様なケミカルライブラリーの構築も可能となる。そこで、筆者は、天然配糖体より切り出されたオリゴ糖鎖に脂溶性部位であるアグリコン部を導入して配糖体として再構築する過程をトランスグリコシレーション反応と定義し、種々の生物活性天然配糖体を用いたトランスグリコシレーション法の開発を行っている (Fig. 1)。

天然配糖体のアグリコン部との結合様式は、エステル結合型とエーテル結合型に大別される。筆者は、エステル結合型の糖鎖をヨウ化リチウムとアリルアルコールを用いてアリルグリコシドとして切り出す方法を確立したので、まず、マメ科由来の生薬・合歡皮の抗腫瘍活性成分として発見されたジュリブロサイドを例にエステル結合型糖鎖のトランスグリコシレーション法を説明する。次に、エーテル結合糖鎖の切り出しは、エンドグリコシダーゼが最も効果的な方法であるが、ここでは、グリチルリチンハイドラーゼを用いたダイズサポニン、トマチ

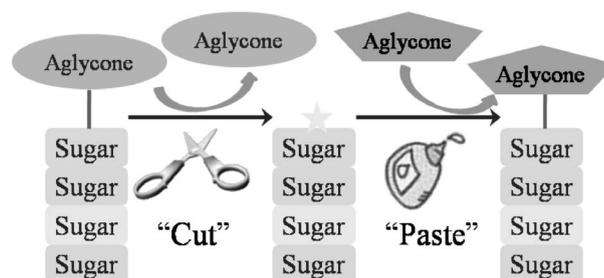


Fig. 1. Transglycosylation of Bioactive Glyco-Linkage

ナーゼを用いたトマチン糖鎖を例にエーテル結合型糖鎖のトランスグリコシレーション法について紹介する。

## 2. 生薬合歡皮配糖体・ジュリブロサイド糖鎖のトランスグリコシレーション法の開発

ジュリブロサイド類はトリテルペン配糖体の中、分子量最大級で複雑な抗腫瘍活性化化合物である。<sup>1)</sup> 分解反応によって得られた誘導体のがん細胞増殖抑制活性の構造活性相関を検討したところ、28位にエステル結合しているミモザテトラオース ( $\alpha$ -L-arabinofuransyl-(1  $\rightarrow$  4)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -D-glucopyranoside) が活性に必須と判明した。<sup>2)</sup> 各種条件検討した結果、ジュリブロサイドのがん細胞増殖抑制活性に重要な役割を果たしているミモザテトラオースをヨウ化リチウム、アリルアルコールで処理し、アリルグリコシドとして切り出すことに成功した (Fig. 2).<sup>3)</sup>

### 2-1. セラミド類似 2 本鎖糖脂質への変換反応

切り出された糖鎖は、水酸基を保護することなくオゾン酸化、還元的アミノ化、*N*-アシル化反応を行いセラミド類似の 2 本鎖糖脂質に変換した (Scheme 1).<sup>4)</sup> この合成過程においては水酸基の保護や無水反応を必要としないことから多様な誘導体の合成に適している。

### 2-2. 非天然 O-グリコシドへの変換反応

ジュリブロサイド類から切り出されたアリルグリコシ



池田 剛

1997年熊本大学大学院薬学研究科修士[博士(薬学)], 同年, 熊本大学薬学部附属薬用植物園助手, 2002年に熊本大学薬学部助教授. 1993年-1996年に理化学研究所高度技術研究生(糖情報工学研究チーム), 2001年に米国・スクリップス研究所博士研究員. 現在, 熊本大学大学院生命科学部・准教授.

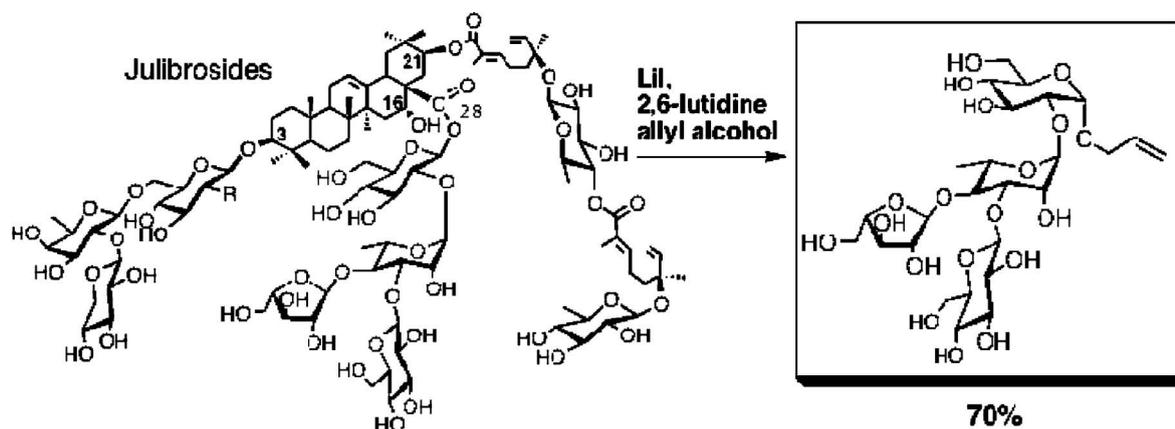
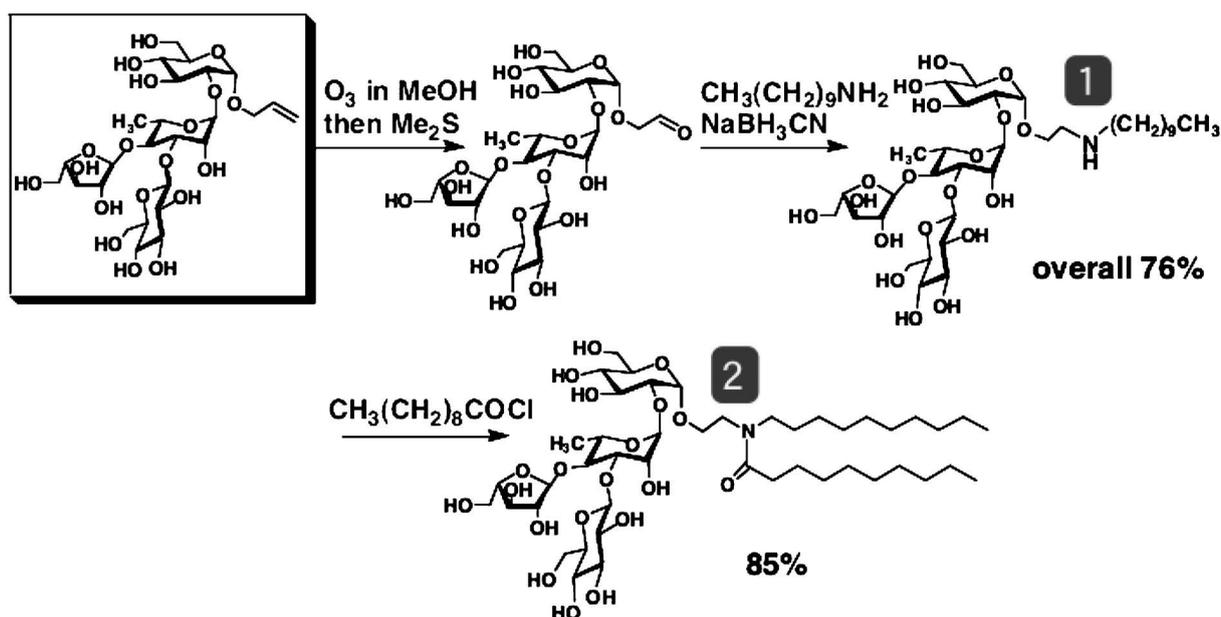


Fig. 2. Selective Cleavage of Ester-linked Oligosaccharide by Using LiI and Allyl-alcohol



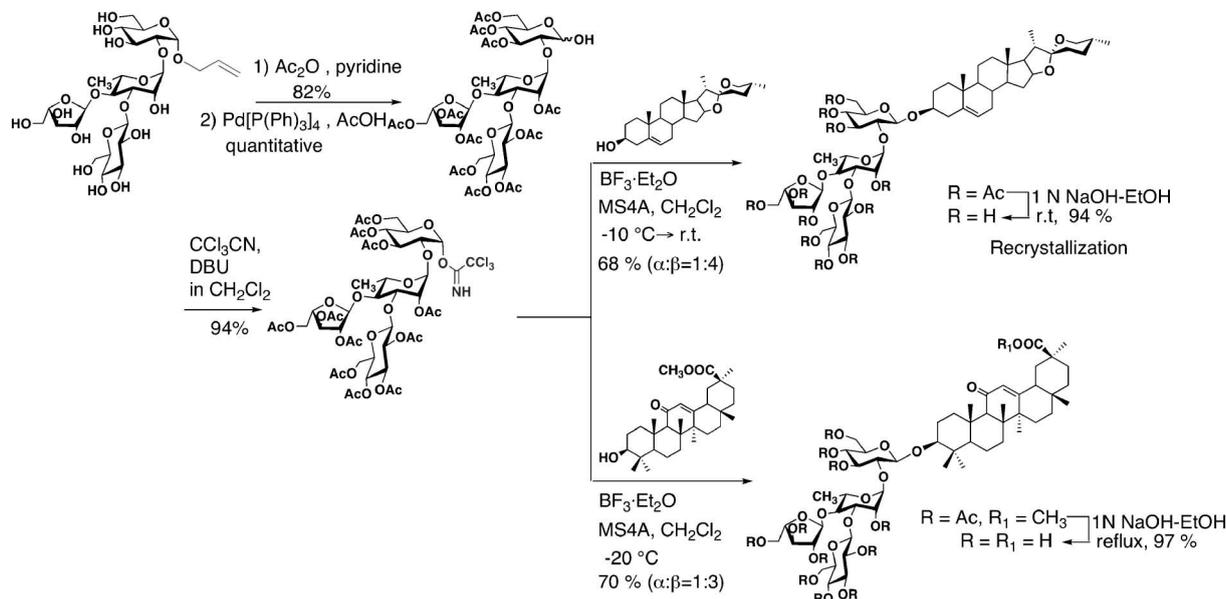
Scheme 1. Synthesis of Ceramide-like Mimosatetraoside

ドは、水酸基を保護し、脱アリル化し、トリクロロアセトイミデート体に変換した。そして、ジオスゲニン、グリチルリチン酸へトランスグリコシル化反応を行い、脱保護し、精製することにより化合物 **3**, **4** を良好な収率で得ることができた (Scheme 2).<sup>3)</sup>

ここに示した手法は、ジュリブロサイド類のようなトリテルペン配糖体に限らずエステル結合糖鎖を持つ化合物一般に適用できる。糖鎖をアリルグリコシドとして切り出すことで、アミンや種々の脂質と結合できることから、本法はエステル結合の機能性糖鎖の転移・再結合に汎用性の高い方法と言える。

### 3. ダイズサポニン糖鎖のトランスグリコシレーション法の開発

次に、エーテル結合型配糖体のトランスグリコシル化について説明する。まずは、ダイズより豊富に得られる肝保護活性のダイズサポニン<sup>5,6)</sup>の糖鎖・ファバトリオース ( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-glucuronopyranoside) を *Aspergillus niger* GRM3 より分離されたエンドグルクロニダーゼ・グリチルリチンヒドラーゼ (GHase) で切り出した。<sup>7)</sup> 得られたファバトリオースは脱塩後、ジアゾメタンでメチルエステル体とした後、水酸基をアセチル基で保護し、ついでヒドラジン酢酸塩を用いて還元末端のアノマー位のア

Scheme 2. Synthesis of *O*-Linked Artificial Mimosatetraosides

セチル基を脱保護した。その後、トリクロロアセトニトリルと 1,8-ジアザビシクロ [5.4.0] ウンデセン 7-エン (DBU) で処理し、トリクロロイミデート体を合成した。次に、三フッ化ホウ素エーテル錯体をプロモーターとして代表的なステロイド配糖体のアグリコンであるジオスゲニンとグリコシル化を行い、脱保護して  $\beta$ -ファバトリオシルジオスゲニン **5** を得た (Scheme 3)。<sup>8)</sup> このトランスグリコシル化は、還元末端がグルクロン酸である他のオレアナン型トリテルペングルクロニドの糖鎖にも適用できる。

#### 4. トマチン糖鎖のトランスグリコシル化法の開発

ナス属植物由来の抗腫瘍活性化化合物の探索研究において、糖鎖部にリコテトラオース ( $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-galactopyranoside) を持つステロイド配糖体に強いがん細胞増殖抑制活性が観察された。<sup>9)</sup> このリコテトラオースの場合、トマト地上部に大量に含まれるトマチンをトマト萎凋病菌・*Fusarium oxysporum* の産生するエンドグルコシダーゼ・トマチナーゼで処理すると一気にオリゴ糖鎖を得ることができる。<sup>10)</sup> これは、「トマトのトマト萎凋病菌に対する感染・防御機構」を有機合成に活用するものである。

##### 4-1. リコテトラオースの調製 糖鎖供給の原

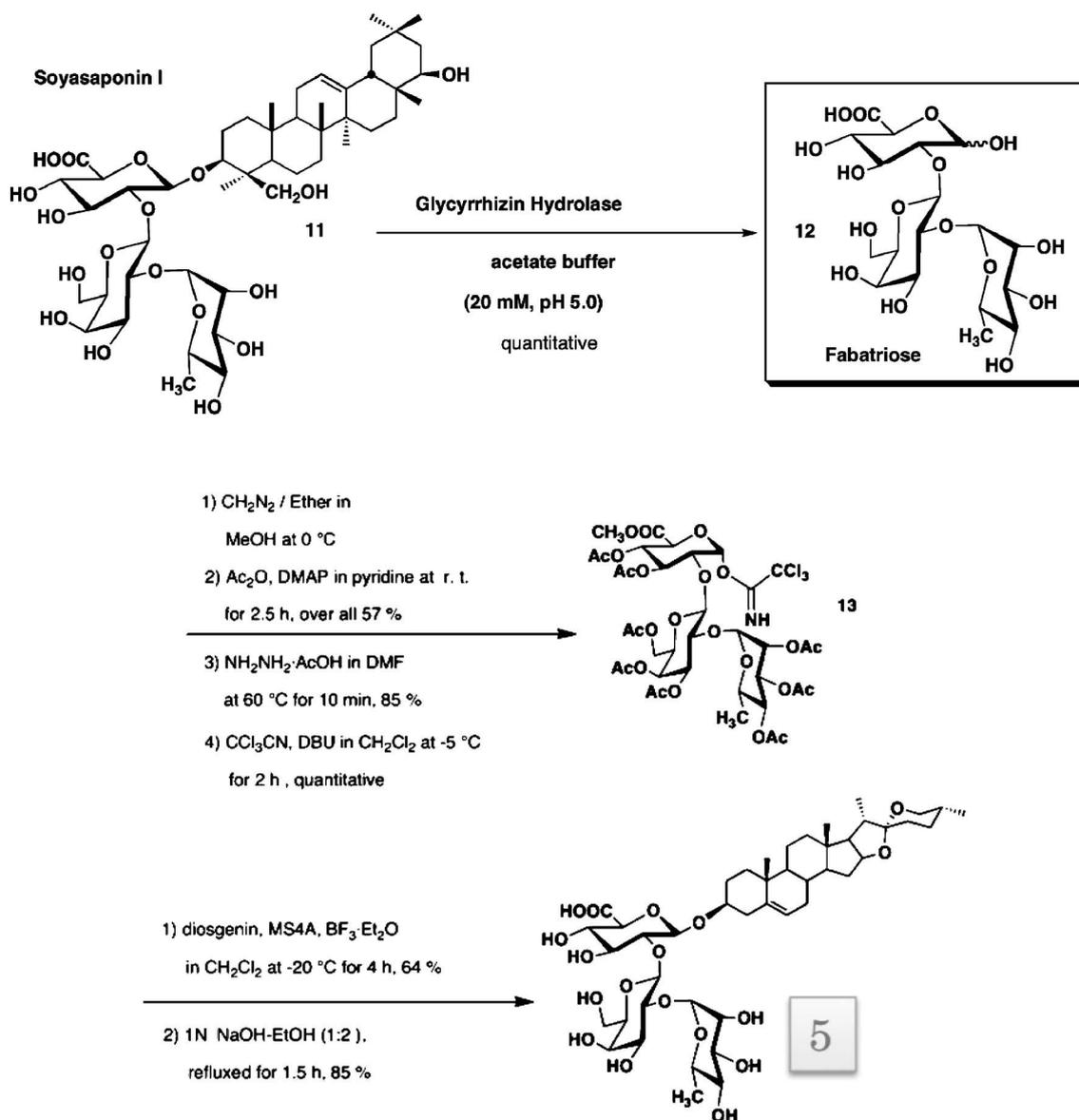
料となるリコテトラオース配糖体として、収穫後不要になったトマト地上部に大量に含有するトマチンを用いた。まず、トマト地上部から抽出・分離を行い、合成に十分量のトマチンを単離した。次に、山口大学農学部の伊藤教授よりご恵与頂いた *Fusarium oxysporum* の菌体を CA 培地で増殖させ、トマチンで刺激することでトマチナーゼの誘導を行い、培養液を硫酸沈殿し限外濾過し、粗トマチナーゼ溶液として反応に用いた (Fig. 3)。トマチナーゼ溶液に、トマチン溶液を加え、室温で一晩放置した後、反応液を遠心し沈殿を除き、上清を MCI gel, Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーで精製し、リコテトラオースを 75% の収率で“切り出し”た (Fig. 4)。

#### 4-2. リコテトラオースのトランスグリコシル化反応

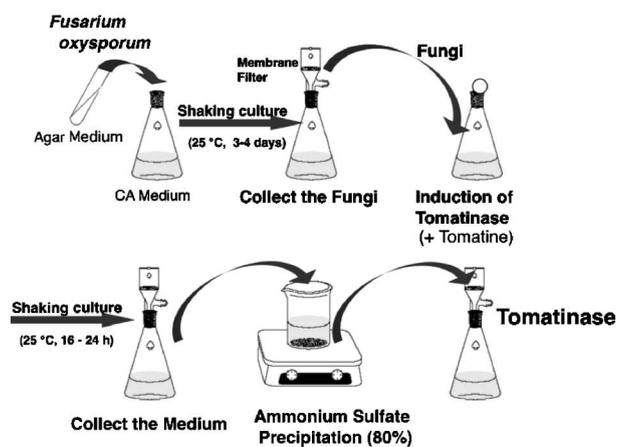
糖鎖のアグリコン部への再結合を行うために、得られたリコテトラオースをアセチル保護した後、各種糖供与体 (トリクロロアセトイミデート体、チオグリコシル体、フッ化グリコシル体) に変換した。そして、メバロネートを中心にトランスグリコシル化を行ったところ、非天然の  $\alpha$ -結合体が優位に得られた。その際、フッ化グリコシドとチオグリコシドが有効な糖供与体と判明した (Fig. 5)。<sup>11)</sup>

#### 5. 生物活性の評価

##### 5-1. マメ科植物由来の合歓皮配糖体・ジュリプロサイドとダイズサポニン由来の配糖体のがん細胞



Scheme 3. Synthesis of Diosgenin Fabatrioside

Fig. 3. Preparation of Tomatinase from *Fusarium oxysporum*

増殖抑制活性と肝保護活性 ジュリブロサイドとダイズサポニンより得られた非天然配糖体のがん細胞増殖抑制活性試験を行った。抗腫瘍活性ジュリブロサイドの糖鎖・ミモザテトラオースを有する化合物 2, 3, 4 に抑制効果がみられるのに対して、肝保護活性ダイズサポニンの糖鎖・ファバトリオース誘導体 5 には活性が認められなかった (Table 1).<sup>12)</sup> 一方、肝保護活性試験の結果、ダイズサポニン糖鎖・ファバトリオースを有する化合物 5 に最も強い効果が認められた (Table 2).<sup>12)</sup> このことから、がん細胞増殖抑制活性、肝保護作用において、天然配糖体と同等の活性を持つ化合物が得られ、それぞれの糖鎖の役割を明らかにすることができた。

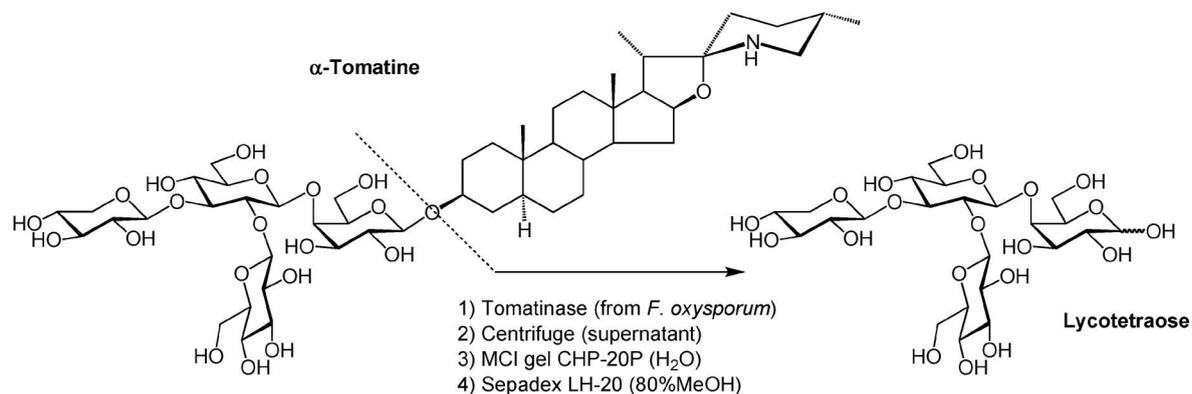


Fig. 4. Preparation of Lycotetraose

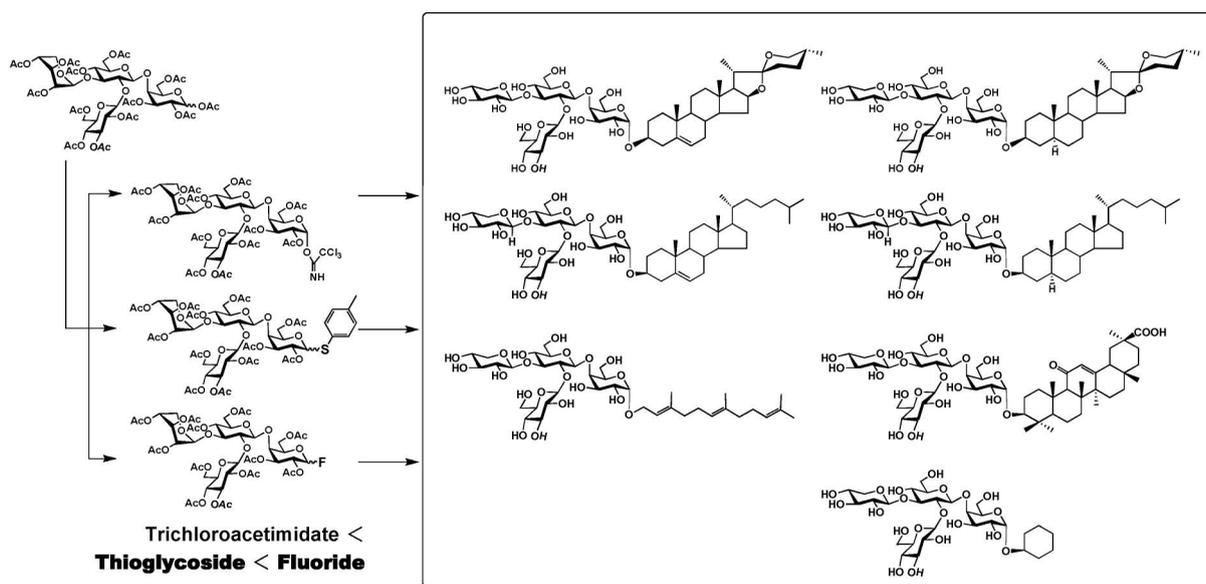


Fig. 5. Trans-glycosylation of Lycotetraose by Using Trichloroacetimidate, Thioglycoside and Fluoride

Table 1. Cytotoxic Activity of Neoglycosides (1–5) against PC-6 and P388 Cell Lines

samples	GI <sub>50</sub> (μg/ml)	
	PC-6	P388
CDDP	0.08	0.01
dioscin	1.1	0.4
1	>50	>50
2	38.8	2.2
3	7.7	9.1
4	>50	9.2
5	>50	>50

Dioscin

PC-6: human lung cancer, P388: mouse leukemia.

**5-2. トマト配糖体・トマチン由来配糖体のがん細胞増殖抑制活性** 得られた誘導体を用いて、ヒト肺がん細胞 (A549) とヒト大腸がん細胞 (HCT116) の2種の細胞に対して細胞増殖抑制活性試験を行った。試験したサンプルの中で一番強い活性を示したのは、糖鎖原料でもあるトマチンであった (Table 3)。一方、トマチンを構成するリコテトラオースのみでも、トマチジンのみでも活性は認められなかった。また、シクロヘキサノールやファルネソール誘導体のように低分子のアグリコンでも活性は認められなかった。グリチルリチン誘導体に活性がないのに対して、コレステロール誘導体では中程度の活性が認められた。今回、トランスグリコ

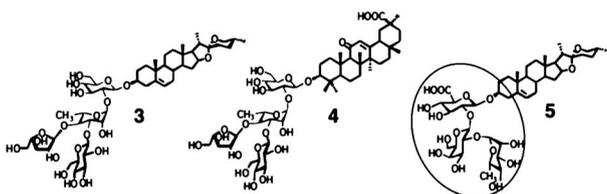
シル化したサンプルはいずれも非天然の  $\alpha$  結合体である。今後、合成法を改善することで天然型の  $\beta$ -結合体の活性も検討していく予定である。

以上、今回試験したいずれの糖鎖においても活性発現に糖鎖が重要であることが示唆された。今後、作用メカニズム解明に有効な誘導体をトランスグリコシレーション法で合成し、さらに検討する予定である。

## 6. おわりに

これまでに、合歡皮成分のジュリプロサイド由来のエステル結合糖鎖であるミモザテトラオース、ダイズサポニン由来のエーテル結合糖鎖であるファバトリオース、トマト由来のトマチンのエーテル結合糖鎖であるリコテトラオースなどの生物活性疑似糖鎖のトランスグリコシレーション法の開発を行ってきた。今後の課題として、リコテトラオースのグリコシル化反応の立体選択性や収率の向上を検討しなければならない。一方、切り出した糖鎖の還元末端にプロパルギル基などの反応活性部位を導入し、クリックケミストリーを活用して配糖体を効率よく調製し、ライブラリーの構築を行うことも検討している (Fig. 6)。また、生物活性疑似糖鎖のバイオリジカルツールとしての活用も行う必要がある。トランスグリコシル化した生物活性疑似糖鎖を含む非天然配糖体が生体反応を阻害したり亢進したりする活性を見出し、創薬のシーズとして、又は、糖鎖特異的な送達を行う DDS キャリアーとして開発を行っていく予定である。

Table 2. Hepatoprotective Activity of Glycyrrhizin, Soyasaponin I, 3, 4, and 5 toward *in Vitro* Immunological Liver Injury on Primary Cultured Rat Hepatocytes



	n	Protection (%): Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		200	500
Glycyrrhizin	4	5 $\pm$ 3%	25 $\pm$ 6% **
Soyasaponin I	4	13 $\pm$ 9%	54 $\pm$ 6% **
3	4	16 $\pm$ 6%	30 $\pm$ 6% **
4	4	10 $\pm$ 3%	19 $\pm$ 3% **
5	4	37 $\pm$ 2% **	58 $\pm$ 4% **

Significantly different from Reference, effective: \*\*  $p < 0.01$ .

Table 3. Inhibitory Effect of Human Cancer Cell Growth by Lycotetraosyl Derivatives

	[IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )]	
	A549	HCT116
5-FU	2.3	2.3
Tomatine	1.3	1.1
Tomatidine	>100	82.4
Lycotetraose	>100	>100
Cholesterol deriv.	6.8	9.3
Cyclohexanol deriv.	NT	86.6
Glycyrrhetin deriv.	NT	23.5
Farnesol deriv.	NT	67.4

A549: human lung carcinoma cells, HCT116: human colon carcinoma cells.

**謝辞** 本研究に多くのご助言頂きました大阪薬科大学 梶本哲也教授と福岡大学薬学部 金城順英教授に深謝いたします。また、本研究の一部は熊本大学大学院薬学教育部の山内 健氏、中西賢治氏、甲斐友樹氏の協力により推進されたものであり、ここに感謝いたします。本研究の遂行にあたり、GHaseをご恵与頂いた丸善製薬の水谷健二博士、トマト寄生 *Fusarium oxysporum* 菌株を分与頂いた山口大学農学部の伊藤真一教授に深謝いたします。本研究の一部は、文部科学省科学研究費、漢方医薬研究振興財団、武田科学振興財団の助成を受けたものであり、ここに記して感謝いたします。

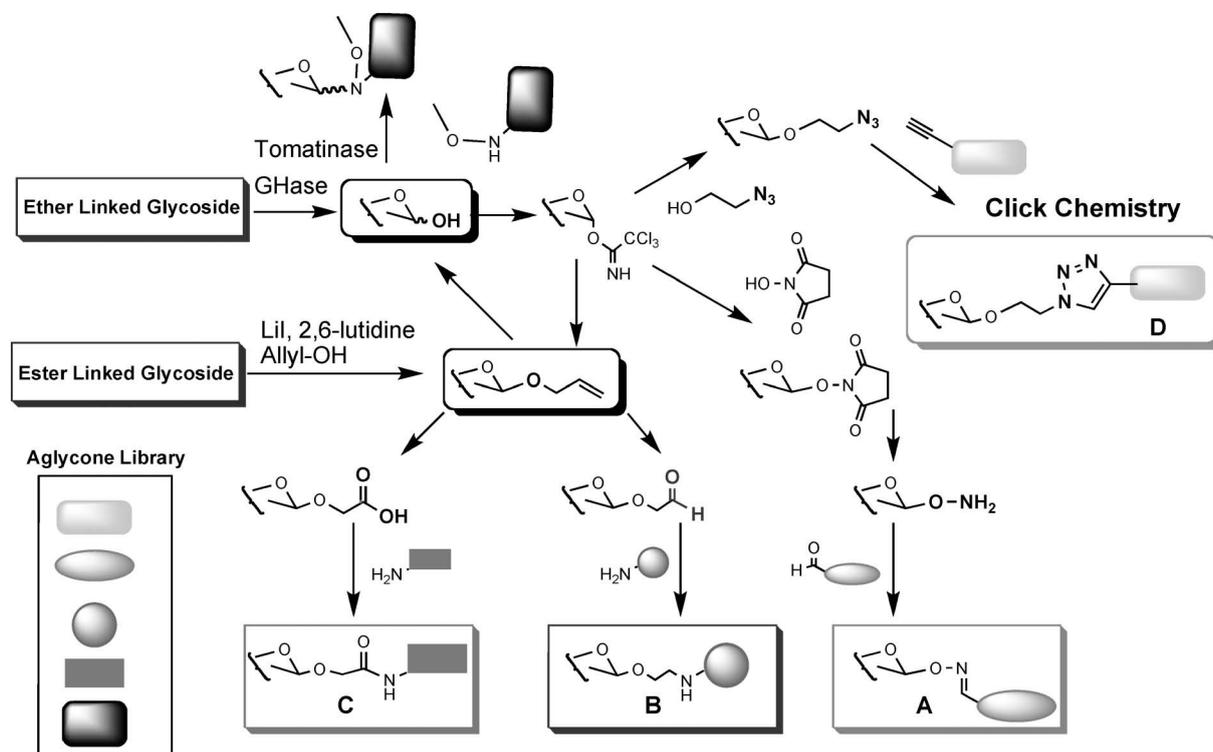


Fig. 6. Wide Range Usage of Bio-functional Oligosaccharides from Natural Glycosides

## REFERENCES

- Ikeda T., Fujiwara S., Kinjo J., Nohara T., Ida Y., Shoji J., Singu T., Isobe R., Kajimoto T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 3483–3490 (1995).
- Ikeda T., Fujiwara S., Araki K., Kinjo J., Nohara T., Miyoshi T., *J. Nat. Prod.*, **60**, 102–107 (1997).
- Ikeda T., Kajimoto T., Nohara T., Kinjo J., Wong C.-H., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1509–1510 (1995).
- Ikeda T., Kajimoto T., Wong C.-H., *RIKEN Review*, **8**, 21–22 (1995).
- Kinjo J., Nohara T., “Towards Natural Medicine Research in the 21st Century,” Elsevier, Tokyo, 1998, pp. 237–248.
- Kinjo J., Nohara T., “Studies in Natural Products Chemistry,” Vol. 25, ed. by Atta-ur-Rahman, Elsevier, Oxford, 2001, pp. 89–124.
- Muro T., Kuramoto T., Imoto K., Okada S., *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 687–692 (1986).
- Ikeda T., Kajimoto T., Kinjo J., Nakayama K., Nohara T., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 3513–3516 (1998).
- Ikeda T., Tsumagari H., Honbu T., Nohara T., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1198–1201 (2003).
- Ito S., Eto T., Tanaka S., Yamauchi N., Takahara H., Ikeda T., *FEBS Lett.*, **571**, 31–34 (2004).
- Ikeda T., Yamauchi K., Nakano D., Nakanishi K., Miyashita H., Ito S.-I., Nohara T., *Tetrahedron Lett.*, **47**, 4355–4359 (2006).
- Ikeda T., Kinjo J., Kajimoto T., Nohara T., *Heterocycles*, **52**, 775–798 (2000).