

20020759

厚生労働省科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

糖鎖担持カルボシラン dendリマー製剤の

設計技術開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 照沼 大陽

平成15（2003）年 4月

分担研究者	名取	泰博
	西川	喜代孝
	宮澤	淳夫
	平野	弘之
	松岡	浩司
	幡野	健

目 次

I. 総括研究報告

糖鎖担持カルボシランデンドリマー製剤の 設計技術開発に関する研究	-----	1
照沼大陽、松岡浩司、幡野健		

II. 分担研究報告

1. 糖鎖担持カルボシランデンドリマーの 生理活性評価及び病理学的解析	-----	23
名取泰博		
2. ベロ毒素、糖鎖担持カルボシランデンドリマー (Fan(1)3-Gal2)の結合様式の解析	-----	26
宮澤淳夫		
3. 糖鎖担持カルボシランデンドリマーの 実用的合成および用途の検討	-----	30
平野弘之 (資料) ベロ毒素中和剤関連特許等の検索結果		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	59
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	62
-----------------	-------	----

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

糖鎖担持カルボシランデンドリマー製剤の設計技術開発に関する研究

主研究者 照沼大陽 埼玉大学 教授
分担研究者 松岡浩司 埼玉大学 助教授
分担研究者 幡野 健 埼玉大学 助手

研究要旨

これまで、病原菌大腸菌 O15:H7 が産生するペロ毒素中和剤として構造が明確な化合物はまったく知られていない。我々は、グロボ三糖を担持したカルボシランデンドリマー化合物を考案し実際に分子設計・合成を行い、個体（マウス）に対して治療薬として有効な化合物を初めて見いだした（1998年）。本プロジェクトではペロ毒素中和剤の構造最適化、作用機構の解明、実用生産の可能性について検討し、さらに、種々の糖鎖を担持したカルボシランデンドリマーを合成してこのコンセプトの適用範囲の拡大をはかることを目的としている。

本年度は、ペロ毒素中和剤のさらなる構造最適化、接着構造の解析の試み、および実用化の可能性について検討を行った。

まず、グロボ三糖の認識部位である先端二糖部分をカルボシランデンドリマーに導入し、その効果について評価を行った。また、多種類のグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーについて評価し、培養細胞レベルにおいては4個の糖鎖を有するデンドリマーでも強いペロ毒素/志賀毒素結合阻害活性を有すること、その活性にはデンドリマーの世代数が重要であることを明らかにした。さらに、グロボ三糖カルボシランデンドリマーのペロ毒素中和剤の最適構造を探索することを目的として、カルボシランデンドリマーを系統的に合成した。一方、グロボ三糖担持カルボシランデンドリマーの実用的合成法開発を目指して糖鎖合成に関する企業の調査を行った。

分担研究者

名取泰博 国立国際医療センター 部長
西川喜代孝 国立国際医療センター 室長
宮澤淳夫 理化学研究所 連携研究員
平野弘之 株式会社ジーエスプラッツ 部長

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の産生するペロ毒素/志賀毒素やコレラ菌の産生するコレラ毒素など、ある種の細菌性腸管感染症の病原因子は糖脂質を受容体とする菌体外毒素である。これらの毒素は毒性の本体である酵素活性を担うAサブユニットと、受容体結合

活性を有する B サブユニット 5 量体からなり、B サブユニット 5 量体が標的細胞の表面にある糖脂質に結合することが毒性発揮に必須である。また B サブユニット 5 量体には最大 15 個までの糖脂質結合サイトの存在が報告され、これらのサイトのいくつかが細胞表面の糖脂質クラスターに結合することが、毒素が強く細胞に結合するために重要と考えられている。このことから、分子内に複数の糖鎖を有する化合物（クラスター構造を有する化合物）はこれらの毒素と強く結合し、標的細胞への毒素の結合を阻害する可能性が考えられ、このアイデアによりいくつかの毒素中和剤が合成され、その活性について報告された。しかし現在に至るまで、実際に薬剤として開発が進んでいる化合物はない。

腸管出血性大腸菌感染症における主な死因は脳症などの合併症であり、それらは体内に侵入したペロ毒素が引き起こす。従って同菌感染後でも体内で毒素を中和し、合併症の発症を抑制する治療法が開発されれば、重症例や死亡例の減少が期待される。また我が国を始めとする先進国ではコレラによる死者がほとんどいないのに対して、ペロ毒素の方は平成 8 年の堺など我が国各地で起きた腸管出血性大腸菌感染症の集団発生を契機とし、昨年には宇都宮での集団発生で我が国最悪の死者 9 名が出たこともあって、国民への大きな脅威となっている。

ペロ毒素を認識する糖鎖はグロボ三糖 (Gb3) であることが知られており、グロボ三糖を集積化することによるクラスター効果を期待してポリマー担持物等が合成されその効果について検討がなされてきた。しかし、前述のごとく、これまでペロ毒素を

個体中で効果的に中和できる明確な構造を有する化合物は見いだされていない。

我々はこれまで特異な構造を有し、これまでに知られていない機能を発揮することが期待されるカルボシランデンドリマーに着目し、グロボ三糖をカルボシランデンドリマーに担持してまったく新しいタイプのクラスター化合物を創製した。カルボシランデンドリマーはその構造を自由に設計できることから、担持する糖鎖数、分子のサイズなどを自由に構築でき、さらに担持されたすべての糖鎖を同一環境下に配置することも大きな特徴である。これらのことから対称性の高いペロ毒素 B サブユニットに対する認識・接着物質としペロ毒素中和剤の開発に有効であることが期待できると考え、実証してきた。さらに、このコンセプトは他の糖鎖（インフルエンザウイルスを認識・接着するシアリルラクトースなど）にも応用が可能と考えられることから、さらに種々の糖鎖について設計・合成を行う計画である。

具体的に、平成 14 年度に本プロジェクトが発足する以前、我々は以下の成果をあげていた。

1. グロボ三糖を担持するカルボシランデンドリマーの構造と *in vitro* および *in vivo* におけるペロ毒素中和活性には強い相関がある。
2. *In vitro* の活性と *in vivo* の活性は必ずしも一致しない。
3. 我々が Dumbbell(1)6 と呼称する化合物 (図 1) はマウスを用いた実験で、治療薬とし強い効果を発揮する。

これらの成果をもとに、本プロジェクト

の研究計画を以下のように定めた。

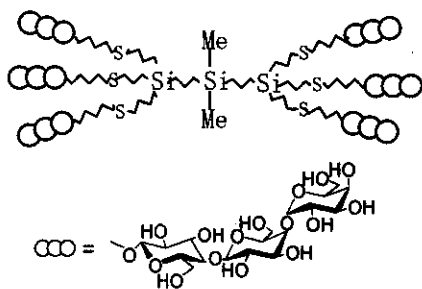


図1. Dumbbell(1)6

1. これまで *in vivo* においてもっとも生物活性が高いことが認められた Dumbbell(1)6 をリード化合物として、ペロ毒素中和剤の最適構造について検討する。
2. Dumbbell(1)6 を中心としてペロ毒素中和について生体内での作用機構について検討する。
3. ペロ毒素に対する治療薬、予防薬として使用できる可能性について、医学的および実生産の立場からそれぞれ検討する。
4. 本コンセプトを他の糖鎖に応用し、その適用範囲を拡大する。

上記研究計画に従い、平成14年度は以下の項目について検討を進めた。

1. まず、実用的合成を実施することを考慮してグロボ三糖に比べてより合成が容易な二糖 (Gal α 1-4Gal β 1) (Gal2) をカルボシランデンドリマーに担持し、その生物活性について検討する。
2. Dumbbell(1)6 をリード化合物としてカルボシランデンドリマー構造およびスペーサー長の異なる糖鎖を系統的に合成し、それぞれのグロボ三糖担持物を合

成する。

3. 合成した化合物の生理活性評価を行い、その構造活性相関について検討する。
4. ペロ毒素 B サブユニットと糖鎖担持カルボシランデンドリマー接着体の構造について検討する。
5. 実用生産するさいの諸問題について、具体的な企業の調査・交渉を行う。

(倫理面への配慮)

国立国際医療センター研究所における動物実験に際しては同研究所実験動物運営規定にのっとり、動物愛護に充分配慮して実験をおこなっている。また、評価を委託する各研究機関においても同様な配慮を行って実施している。

B 結果および考察

1. 合成結果および考察

1) 糖鎖構造の最適化

病原性大腸菌 0157:H7 の産生するペロ毒素が、生体内の細胞表層に存在するグロボトリアオシルセラミドに吸着される事で 0157:H7 への感染が開始する事が知られている。我々はこの感染メカニズムを参考に、グロボトリアオシルセラミドの一部分であるクロボ三糖 [Gal \cdot (1 \rightarrow 4)-Gal \cdot (1 \rightarrow 4)-Glc] をカルボシランデンドリマー末端に集積化させた Dumbbell(1)6 (図1) が、ペロ毒素に対し高い吸着能と無毒化作用があることを初めて見出した。

ペロ毒素への接着部分となるグロボ三糖の合成は、有機合成的に複雑な合成ステップが多段階含まれている。今後、製薬としての実用化を視野に入れた場合、時間的・経済的な面から合成経路の簡略化は重要な

課題の一つである。一方、ペロ毒素への接着にはグロボ三糖の中の先端二糖部分が特に強く関与しているという最近の研究報告がある。この先端の二糖はガラビオース [Gal · (1→4)-Gal] と呼ばれ、グロボ三糖に比べグルコース (Glc) 1 つ分少ない分子である。ガラビオースは、酵素を用いた反応によりガラクトースより容易に、かつ大量に合成可能な物質であり、これを担持したカルボシランデンドリマーが 0157:H7 に対して高い阻害活性を示せば治療薬としての実用化に一步前進できると考えられる。

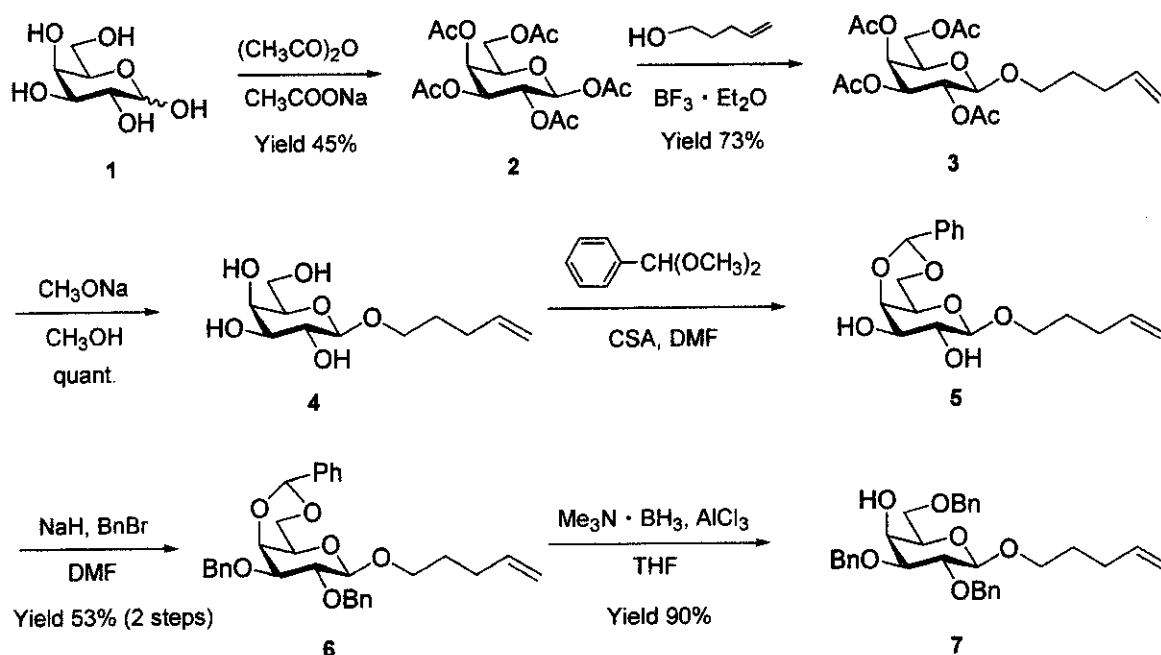
そこで糖鎖構造の最適化の第 1 段階として、グロボ三糖の代わりにガラビオースを担持したカルボシランデンドリマーの新た

に合成を試みた。合成方法は、グロボ三糖担持カルボシランデンドリマーの合成を参考に以下のように行った (式 1)。

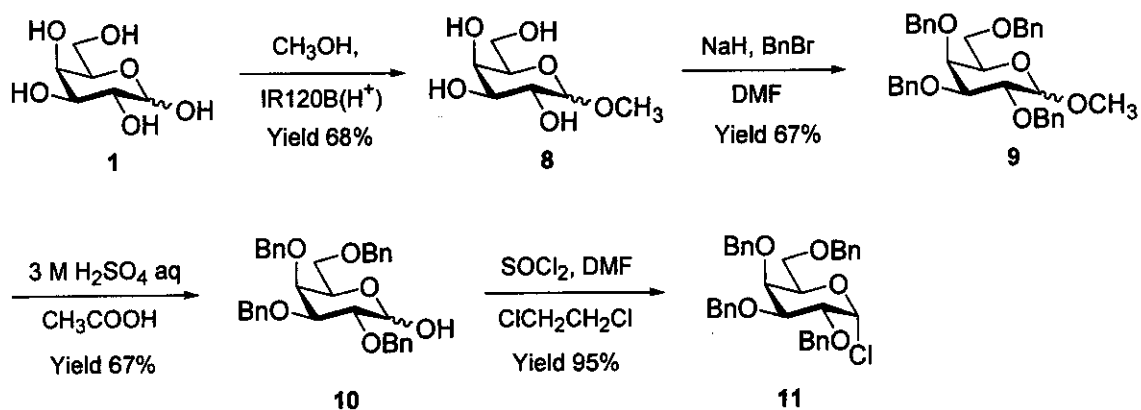
ガラビオース誘導体の合成

式 1 に示した経路で、ガラクトース (1) を出発物質としてグリコシル受容体 (5)、およびグリコシル供与体 (11) を別途合成し、最終的にこれらのグリコシデーションによりガラビオース誘導体 (12) を合成した (式 2)。更に、カルボシランデンドリマーへ導入可能にするため、ガラビオース誘導体に官能基化 (チオアセチル基: SAc) を施した (式 3)。

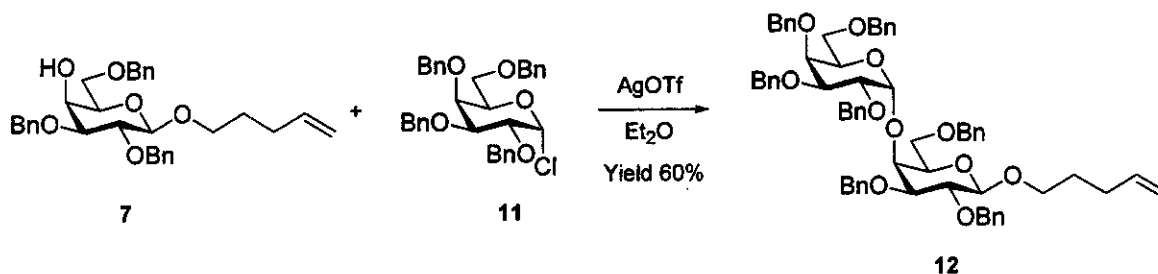
式 1. グリコシル受容体の合成



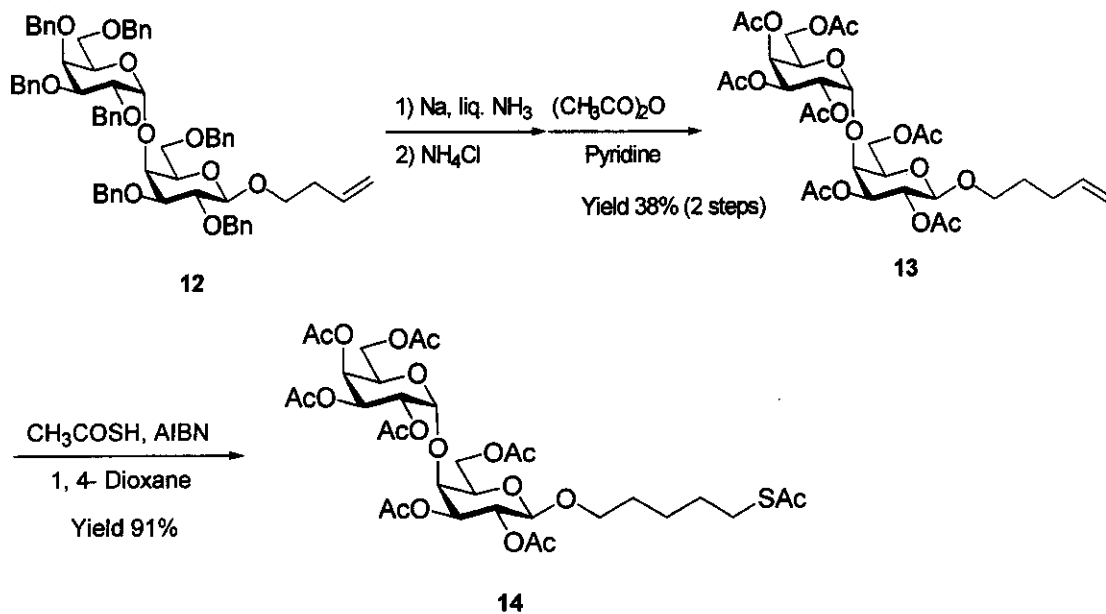
グリコシル供与体の合成



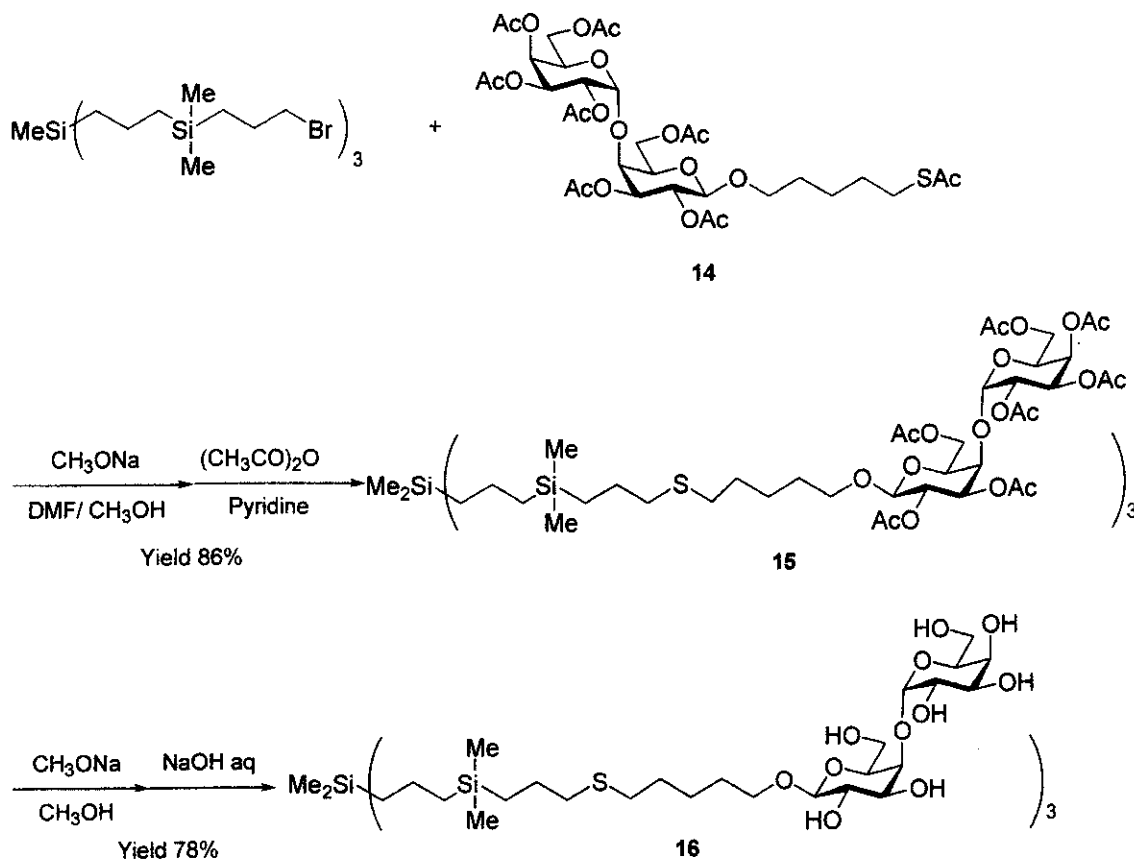
式2. グリコシデーション



式3. ガラビオース誘導体の官能基化



式4. カルボシランデンドリマーへの導入



ガラビオース担持カルボシランデンドリマーの合成

カルボシランデンドリマーへのガラビオース誘導体の導入は、グロボ三糖を導入する方法を参考にし、下図に示す反応条件でガラビオース誘導体(14)を用い、カルボシランデンドリマーへガラビオース誘導体を担持させた(式4)。その際、カルボシランデンドリマーの分子サイズを、ペロ毒素とガラビオース担持カルボシランデンドリマーのサイズを考慮して、グロボ三糖を担持し

た場合よりも大きくなるよう分子設計したものを合成した。その後、ガラビオースの保護基であるアセチル基(Ac)を脱保護して目的とするガラビオース担持カルボシランデンドリマーの一つである16を合成する事に成功した。同様の方法にて他のガラビオース担持カルボシランデンドリマー合成を行った。また、Fan(1)3-Gal2(16)同様に下記に示すDumbbell(2)6-Gal2およびDumbbell(2)4-Gal2を合成する事に成功した(図2)。

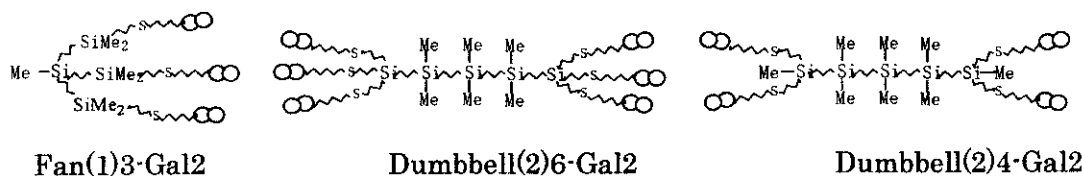


図2. ガラビオース担持カルボシランデンドリマー

図2において、各化合物の下に示した名称は、骨格の形状、世代、糖鎖の個数を示し、Gal2は2個のガラクトース残基を示している。また、構造式中の○印は、ガラクトース残基を示し、各カルボシランデンドリマー骨格の末端にガラビオース (Gal・1-4Gal・1-) が結合していることを意味している。

合成方法

2: 酢酸ナトリウム(17.1 g, 208 mmol)を無水酢酸(134 ml, 1.42 mol)に懸濁し、110 ° Cに加熱した。そこへ、D-ガラクトース(1: 30 g, 167 mmol)を少しずつ加え、2時間半攪拌する。反応終了後、反応液を氷水にあげ、一晚攪拌し、溶液を濾過し、水で洗い、結晶化した。粗結晶をエタノールに溶かし再結晶し、2を得た。収量 29.5 g (収率 45%)
¹H NMR (CDCl₃): δ=5.67 (d, 1 H, H-1)

3: アルゴン雰囲気下、2 (28.8 g, 73.9 mmol)を dry-1,2-ジクロロエタン(290 ml)に溶かし、4-ペンテン-1-オール (38.1 ml, 369.4 mmol)を加えた。-10 ° Cに冷やし、BF₃・O Et₂ (93.2 ml, 738.7 mmol)を加え、-10 ° Cで60分、室温で3時間攪拌した。反応終了後、反応液を氷水にあげ、クロロホルムで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶液を濾過して濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(トルエン: 酢酸エチル= 4: 1)で精製し、3を得た。収量 19.0 g (収率 73%) Rf 値 0.31 (トルエン: 酢酸エチル= 4: 1)

4: アルゴン雰囲気下、3 (21.5 g, 51.7 mmol)を dry-メタノール(220 ml)に溶かし、ナトリウムメトキシド (1.12 g, 20.67 mmol)を加え、室温で4時間攪拌した。反応終了後、反応液にアンバーライト IR-120B(H⁺) (16 ml)加え、中和した。溶液からイオン交換樹脂を濾別した後、濃縮し4を得た。収量 13.5 g (定量的)

5: 4 (13.29 g, 53.5 mmol)を dry-DMF(65ml)に溶かし、ベンズアルデヒドジメチルアセタール(12.1 ml, 80.3 mmol)と CSA (1.24 g, 5.35 mmol)を加え、減圧下、60 ° Cで4時間攪拌した。反応終了後、反応液を空冷後、トリエチルアミン(2.0 ml)を加え、濃縮し、トルエンで共沸した。残渣をジエチルエーテルで洗浄し、濾過して目的物5の混合物を得た。収量 23.3 g

6: 62%油性水素化ナトリウム (7.69 g, 208.4 mmol)をアルゴン雰囲気下、ヘキサンで洗浄して油分を除去した後、dry-DMF(800 ml)を加え、氷冷下、5 (23.3 g, 69.5 mmol)の dry-DMF (100 ml)溶液を滴下した。さらに、氷冷下、ベンジルブロミド (33 ml, 277.8 mmol)を滴下し、室温で4時間攪拌した。反応終了後、氷冷下、dry-メタノールを加え、反応液を濃縮した。残渣をジエチルエーテルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶液を濾過して濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(トルエン: 酢酸エチル=95: 5)で精製し6を得た。収量 13.2 g Rf 値 0.21 (トルエン: 酢酸エチル= 95: 5)

7: アルゴン雰囲気下、6 (5.03 g, 9.75 mmol)を dry-THF (80 ml)に溶かし、モレキュラーシーブ 4Åパウダー (5.0 g)を加え、室温で 60 分攪拌した。続いて、ボラントリメチルアミン錯体(5.0 g, 68.2 mmol)を加え、氷冷下、塩化アルミニウム (9.10 g, 68.2 mmol)を数回に分けて加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、反応液をセライト濾過し、濾液をクロロホルムで希釈し、氷水、1 N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶液を濾過して濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=7:3)で精製し、25 を得た。収量 4.54 g (収率 90%) Rf 値 0.25 (ヘキサン:酢酸エチル= 7 : 3)

8: アルゴン雰囲気下、D-ガラクトース 1 (60.0 g, 330 mmol)を dry-メタノール (600 ml)に溶かし、乾燥状態のイオン交換樹脂 IR120B (H⁺) 39 g を加え、加熱還流下 2 日間攪拌した。反応終了後、空冷し、イオン交換樹脂を濾別して濃縮した。少量のイソプロパノールで再結晶し、 α 、 β の混合物として 8 を得た。収量 34.9 g (収率 54%) ¹H NMR (D₂O): δ = 4.715 (d, 1 H, H- α 1), 4.195 (d, 1 H, $J_{\beta 1,2}$ =8.0 Hz, H- β 1), 3.844 (s), 3.783(m), 3.694 (s), 3.618-3.653 (m), 3.588 (s, 3 H, β -OCH₃), 3.453 (s), 3.294 (s, 3 H, α -OCH₃)

9: 62%油性水素化ナトリウム (14.8 g, 618 mmol)をアルゴン雰囲気下、ヘキサンで洗浄して油分を除去した後、dry-DMF (700 ml)を加え、氷冷下、8 (20.0 g, 103 mmol)の

dry-DMF (100 ml)溶液を滴下した。さらに、氷冷下、ベンジルブロミド (98 ml, 824 mmol)を滴下し、室温で 3.5 時間攪拌した。反応終了後、氷冷下、dry-メタノール (50 ml)を加え、反応液を濃縮した。残渣をジエチルエーテルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶液を濾過して濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル= 4 : 1)で精製し 9 を得た。収量 39.0 g (収率 68%) Rf 値 0.21~0.22(ヘキサン:酢酸エチル= 4 : 1) ¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.238-7.319(m, 20 H, -Ph \times 4), 4.821 (d, 1H, $J_{\alpha 1,2}$ = 6.9 Hz, H- α 1), 4.427 (d, 1 H, $J_{\beta 1,2}$ =7.78 Hz, H- β 1), 3.541 (s, 3 H, β -OCH₃), 3.366 (s, 3 H, α -OCH₃)

10: 9 (13.5 g, 24.4 mmol)を酢酸(135 ml)に溶かし、3 M 硫酸水溶液 (16.2 ml)を加え、80 ° Cで 20 分攪拌した。反応終了後、反応液を氷水にあげ、クロロホルムで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶液を濾過して濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル= 2 : 1)で精製し 10 を得た。収量 8.83 g (収率 67%) Rf 値 0.23~0.26(ヘキサン:酢酸エチル= 2 : 1) ¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.28 (m, 20 H, Ph \times 4), 5.274. (s, 1 H, H1), 3.017 (d, 1 H, $J_{1,OH}$ = 1.88 Hz, -OH)

11: アルゴン雰囲気下、10 (3.92 g, 7.26 mmol)を dry-1,2-ジクロロエタン(40 ml)に溶かし、dry-DMF (0.28 ml)を加え、30 分

攪拌後、氷冷下、塩化チオニル(1.58 ml, 21.9 mmol)を加え氷冷下、1 晩攪拌した。反応終了後、反応液をシリカゲル濾過し、溶液を濃縮し、トルエンで共沸させて、11 を得た。収量 3.85 g (収率 95%) ¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.28 (m, 20 H, Ph×4), 6.137 (d, 1 H, J_{1,2} = 3.64 Hz, H-1), 4.503 (dd, 1 H, H-2)

12: アルゴン雰囲気下、グルコシル供与体 11 (10.08 g, 18.03 mmol)とグリコシル受容体 7 (4.54 g, 8.77 mmol)を dry-ジエチルエーテル(300 ml)に溶かし、モレキュラーシーブ 4Åパウダー (5.0 g)を加え、室温で 30 分攪拌した後、-20 °C で AgOTf (6.76 g, 26.31 mmol)を加え、1 時間半攪拌した。反応終了後、反応液をクロロホルムで希釈し、セライト濾過した。溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(トルエン:酢酸エチル= 95:5)で精製した。

収量 5.48 g (収率 60%) Rf 値 0.43 (トルエン:酢酸エチル= 95:5)

13: -72 °C に冷却した液体アンモニア (150 ml)にナトリウム (4.68 g, 203 mmol)を溶解させた濃青色の混合物に、1,2-ジメトキシエタンに溶解した 12 (5.16 g, 4.96 mmol)を滴下した。-72 °C を保ちながら、45 分間攪拌した。塩化アンモニウムを反応溶液に加え、液体アンモニアを留去した。残渣をピリジン無水酢酸によって処理し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製し 13 を得た。収量 1.3 g (収率 38%) Rf 値 0.34 (ヘキサン:酢酸エチル= 1:1)

14: アルゴン雰囲気下 13 (899.2 mg, 1.28 mmol)を 1,4-ジオキサン(0.2 ml)に溶かしチオ酢酸 (3.6 ml, 51.04 mmol)を加え、40 °C に加熱し、AIBN (847.7 mg, 51.04 mmol)を加え、80 °C で 3 時間攪拌した。その後過剰な AIBN を潰すためシクロヘキセン(5 ml, 5.16 mmol)を加え室温で 10 分攪拌した。反応液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=1:1)で精製し 13 を得た。収量 910 mg (収率 91%) Rf 値 0.22 (ヘキサン:酢酸エチル= 1:1)

15:アルゴン雰囲気下、デンドリマー (22.1 mg, 0.033 mmol)と糖鎖 14 (152.6 mg, 0.195 mmol)を dry-DMF (0.25 ml)に溶かし、dry-メタノール(0.25 ml)を加え、室温で 1 時間攪拌した。そこへ、ナトリウムメトキシド (11.6 mg, 0.215 mmol)を加え、室温で一晩攪拌した。反応終了後、酢酸(0.25 ml)を加え 10 分間攪拌した後、濃縮し、残渣にピリジン(3 ml)に懸濁し、無水酢酸(3 ml)を加え、室温で 5 時間攪拌した。反応終了後、反応液を氷水にあげ、クロロホルムで抽出し、有機層を 1N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶液を濾過して濃縮した。GPC 分取精製をおこない化合物 15 を得た。収量 75.6 mg (収率 86%)

16: 化合物 15 (64.6 mg, 0.024 mmol)に CH₃ONa の 0.1 M メタノール溶液 (1.0 ml)を加え室温で 7 時間攪拌した後、0.025M NaOH 水溶液(5 ml)を加え室温で一晩攪拌した後、イオン交換樹脂 IR120B (H⁺)を加え中和

した。綿栓ろ過後濃縮し、ゲルろ過を行うことにより無機塩を取り除き目的物 16 を得た。収量 32.8 mg (収率 78%)

2) デンドリマー構造の最適化

これまでに我々は、ペロ毒素のレセプターであるグロボ三糖をいくつかの基本的な骨格のカルボシランデンドリマーに導入し、ペロ毒素の生理活性評価を行ってきた。その結果、ペロ毒素中和能がカルボシランデンドリマー骨格の形状や末端グロボ三糖の数に強く関与している事が分かってきた。そこで、これまでに合成したグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーの中で *in vivo* 試験でもっとも生理活性が高いことが認められた Dumbbell(1)6 をリード化合物として、デンドリマー骨格の最適化を行うこととした。

現在では X 線構造解析によりペロ毒素構造が明らかにされており、これによるとグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーが接着する B サブユニットのサイズは 62 Å であることが分かっている。一方、*in vivo* 試験でもっとも生理活性が高いことが認められた Dumbbell(1)6 は分子軌道計算によると全長 47 Å しかない。Dumbbell(1)6 が B サブユニットの結合サイトに接着した状態の分子シミュレーションでは Dumbbell(1)6 のデンドリマー骨格はほぼ完全に伸長したコンフォメーションをとっていることが示唆されている。

そこで、本プロジェクトでは標的としているペロ毒素の B サブユニットサイズにより効果的に接着するグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーを探索するため、Dumbbell(1)6 をリード化合物とした新規な

カルボシランデンドリマー骨格を設計し、系統的に合成することにした。この系統的な新規カルボシランデンドリマー骨格の開発は、主に 3 つのカテゴリーに分類できる。グループ 1 はカルボシランデンドリマーの分岐数を調整し、担持糖鎖数の異なる糖鎖カルボシランデンドリマーを分子設計した。グループ 2 では、カルボシランデンドリマーの中央部の鎖長を、また、グループ 3 では分岐ケイ素から糖鎖までの鎖長を延ばした構造のカルボシランデンドリマー骨格を分子設計した。本年度は、これらのグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーを実際にすべて合成し、担持糖鎖数、中央部鎖長、および末端部鎖長がペロ毒素中和活性に与える影響について調査する事とした (図 3)。その後、得られたペロ毒素中和活性とカルボシランデンドリマーの構造の関係を解析し、グロボ三糖担持カルボシランデンドリマーの最適構造を分子設計する方針である。

カルボシランデンドリマー骨格の合成

新規なカルボシランデンドリマー骨格の合成は、すでに確立されている Dumbbell(1)6 骨格の合成方法と同様に行った。カルボシランデンドリマーは分子設計が比較的自由であり、合成が容易であることが特徴の一つである。カルボシランデンドリマー骨格は、ヒドロシリル化反応とそれに続く Grignard 反応の繰り返しで構築することが可能である。従って、中央部鎖長を Dumbbell(1)6 より短くした Dumbbell(1)₂6 (18) の合成の場合、用いる Grignard 試薬に炭素鎖長の短い物に変更するのみで、その他の反応試薬など一切変更

することなく容易に合成することが出来た (式5)。

同様にグループ1～3の化合物を合成するために必要なカルボシランデンドリマー骨格は図3に示した10個の基本構造である。平成14年度はこれらすべてのカルボシランデンドリマー基本骨格の合成を終了し、すでにグロボ三糖を導入する先駆体まで誘

導するところまで完了した (図4)。更に、これらのうち Dumbbell(1)₂-6-Br、Dumbbell(1)₄-6-Br、Dumbbell(1)₆-6-Brには、すでにグロボ三糖を導入し、現在これらのベロ毒阻害活性を評価している段階である。今後、残ったカルボシランデンドリマーへ順次グロボ三糖を導入し、同様に阻害活性評価を行っていく予定である。

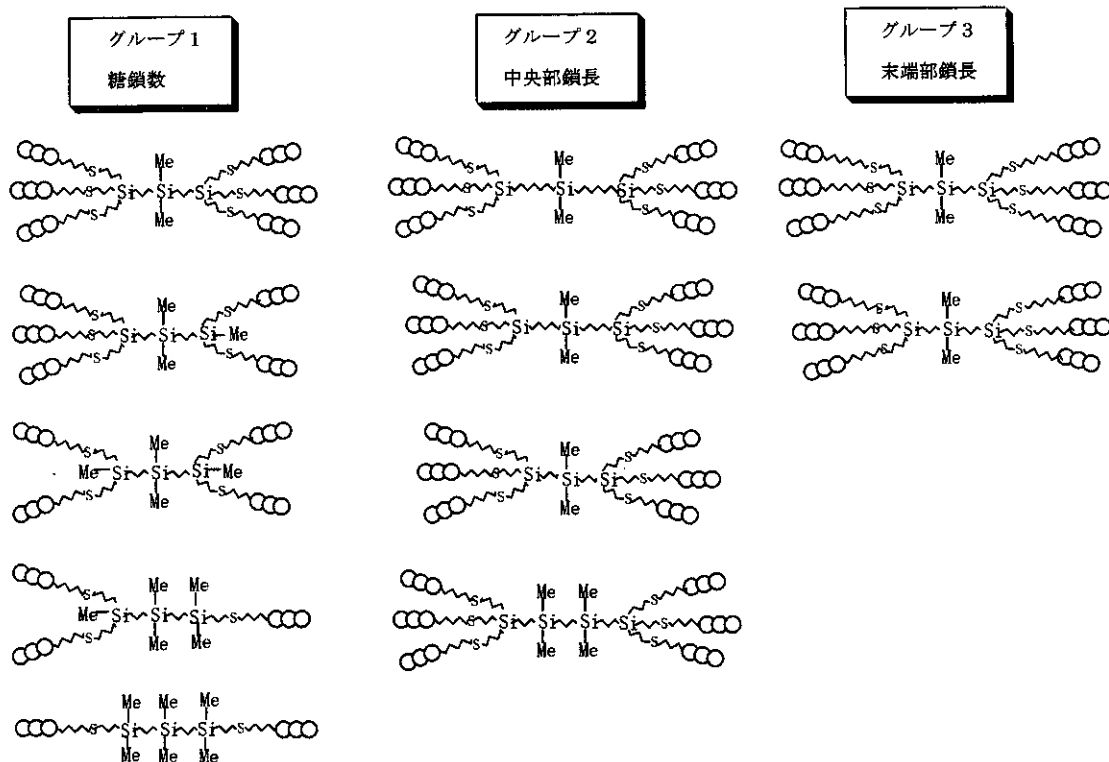


図3. Dumbbell(1)₆をリード化合物とする誘導体

式5. カルボシラン骨格の合成と官能基の導入

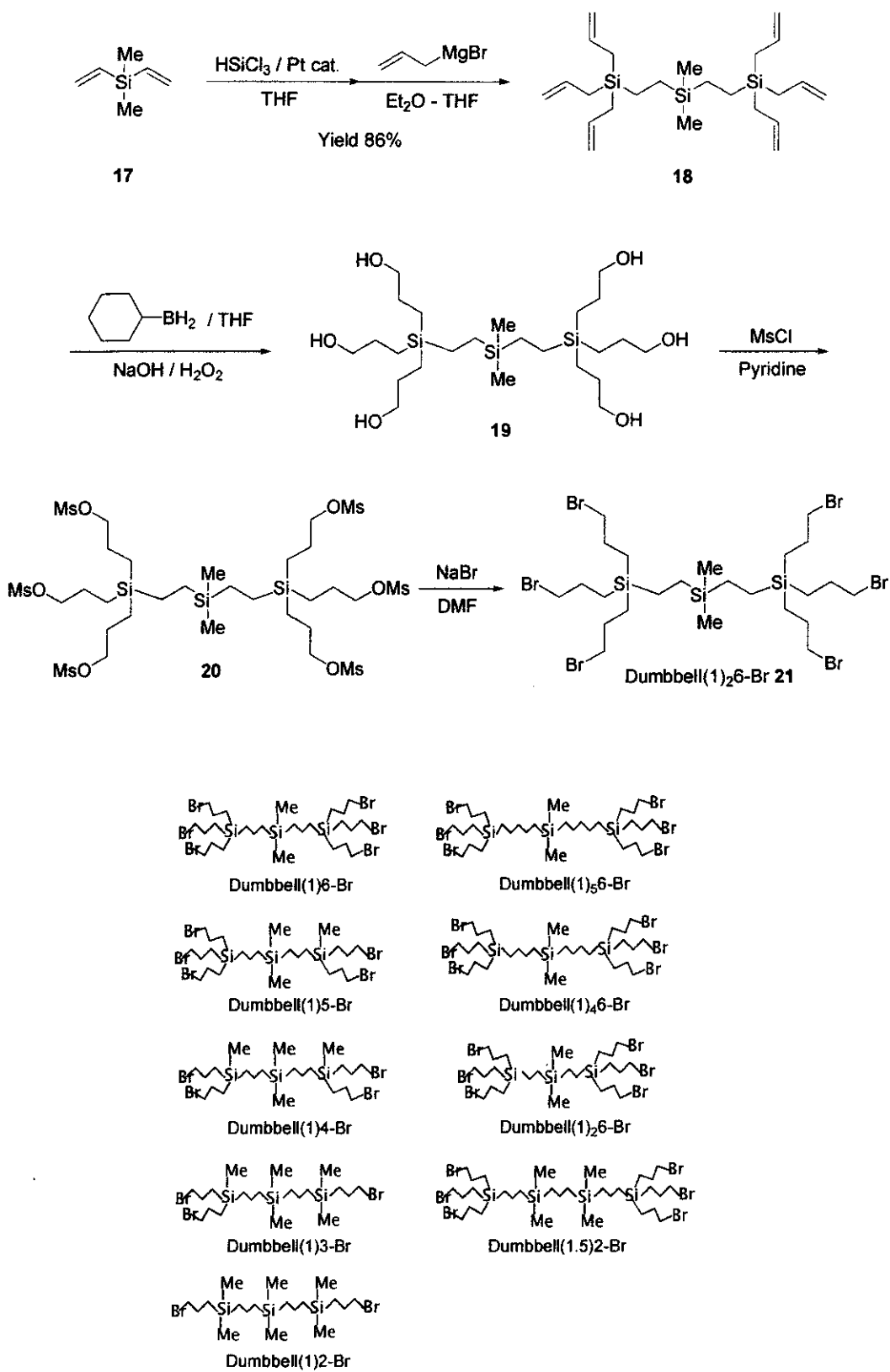


図4. 合成したカルボシランデンドリマー誘導体

合成

18: ニロナス型フラスコにアルゴン風船をつけた蛇管冷却器と滴下ロートを備え付けた装置の系内をアルゴン置換した。フラスコ内にジメチルジビニルシラン 17 (1.30 g, 11.6 mmol) と dry-THF (10 ml)、少量の Speier 触媒を入れた。そこへ、氷浴下でトリクロロシラン (4.81 g, 35.5 mmol) の dry-THF (10 ml) 溶液を滴下した。滴下終了後、室温で一晩攪拌し、さらに反応を完結させるため 2 時間加熱還流した。次に滴下ロートを蒸留装置に代えて、過剰なトリクロロシランを THF とともに常圧留去し、新たに dry-THF (20 ml) を加えた。あらかじめ別の装置で 3-プロモプロペン (16.8 g, 139 mmol) とマグネシウム (3.70 g, 153 mmol) により調整した Grignard 試薬を、そこへ滴下ロートを用いて氷浴下で滴下した。滴下終了後、1 時間加熱還流し、再び蒸留装置を取り付けてエーテルを常圧留去した。留去後、一晩加熱還流させた。反応終了後、1 N HCl (40 ml) を氷浴下で滴下し、有機層を分取した。有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え乾燥した。溶媒を減圧留去した後、シリカゲルのカラムクロマトグラフィー (Hexane) で精製することにより 18 を無色の液体として得た。

収量 4.83 g (収率 85.5%) Rf 値 0.414 (Hexane) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -0.05$ (s, 6 H, Si- CH_3), 0.43 (m, 8 H, Si- CH_2 - CH_2 -Si), 1.59 (d, 12 H, $J = 8.2$ Hz, Si- CH_2 -C=C), 4.87 (m, 12 H, -C= CH_2), 5.78 (m, 6 H, C- $\text{CH}=\text{C}$). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -4.53$ (Si- CH_3), 3.31, 6.32 (Si- CH_2 - CH_2 -Si), 19.15 (CH_2 -CH), 113.41

(CH= CH_2), 134.46 ($\text{CH}=\text{CH}_2$).

19: ニロナス型フラスコにアルゴン風船をつけた蛇管冷却器とセプタムを備え付けた装置の系内をアルゴン置換した。フラスコ内に 1 M BH_3 -THF (10.8 mmol) を入れた。そこへ、シクロヘキセン (1.77 g, 21.6 mmol) の dry-THF (10 ml) を氷浴下で滴下した。滴下終了後、氷浴下で 1 時間攪拌し、シクロヘキシルボランを調製した。次に 18 (0.50 g, 1.20 mmol) の dry-THF (10 ml) 溶液を氷浴下で滴下した。滴下終了後、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、メタノール (5 ml) を氷浴下で滴下し、過剰なボランを分解した。次にセプタムに代えて滴下ロートを取り付け、氷浴下で 3 M NaOH (11.8 ml) と 30% 過酸化水素水 (4.82 ml) を順に滴下した。滴下終了後、60 ° C で 1 時間攪拌した。反応後、有機層を分取し、水層を THF で抽出した。有機層と抽出液を合わせ、飽和食塩水で 2 回洗浄した後、硫酸ナトリウムを加え乾燥した。その後溶媒を減圧留去し、再沈殿で 2 回 (Hex : AcOEt = 3 : 1) 精製することにより 19 を無色の液体として得た。

収量 499 mg (収率 79.4%) $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): $\delta = -0.09$ (s, 6 H, Si- CH_3), 0.41 (m, 20 H, Si- CH_2 - CH_2 -Si- CH_2 -C), 1.37 (m, 12 H, C- CH_2 -C), 3.29 (m, 12 H, C- CH_2 -O), 4.39 (t, 6 H, $J = 5.4$ Hz, -OH).

20: ニロナス型フラスコにアルゴン風船をつけた蛇管冷却器とセプタムを備え付けた装置の系内をアルゴン置換した。フラスコ内に 19 (366 mg, 0.697 mmol) の dry-ピリ

ジン (3 ml) 溶液を入れた。そこへ、塩化メタンスルホニル (1.0 ml, 12.9 mmol) を -20°C で滴下した。滴下終了後、 -20°C のまま3時間攪拌した。反応終了後、クロロホルムを加え、過剰な塩化メタンスルホニルを分解するために水を滴下し、有機層を分取した。クロロホルムで抽出し、残っているピリジンを除くために5%硫酸水溶液で4回、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗浄した後、硫酸マグネシウムを加え乾燥した。その後溶媒を減圧留去し、シリカゲルのカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=50:1$) で精製することにより 20 を無色の液体として得た。収量 648 mg (収率 93.5%) Rf 値 0.328 ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=50:1$) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -0.03$ (s, 6 H, Si- CH_3), 0.41 (br d, 8 H, Si- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si}$), 0.64 (m, 12 H, $\text{CH}_2\text{-C-C-O}$), 1.74 (br m, 12 H, C- $\text{CH}_2\text{-C}$), 3.01 (s, 18 H, $-\text{S-CH}_3$), 4.17 (t, 12 H, $J = 6.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$).

21: 二口ナス型フラスコにアルゴン風船をつけた蛇管冷却器と活栓を備え付けた装置の系内をアルゴン置換した。フラスコ内に 20 (637 mg, 0.641 mmol) の dry-DMF (8 ml) 溶液を入れた。そこへ、NaBr (1.60 g, 15.5 mmol) を入れ、 80°C で3時間攪拌した。反応終了後、水とエーテルで希釈し、有機層を分取した。水層をエーテルで抽出し、有機層と抽出液を合わせ、水と飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムを加え乾燥した。その後溶媒を減圧留去し、シリカゲルのカラムクロマトグラフィー (Hex: AcOEt=95:5)、GPC 分取 (CHCl_3) で精製することにより 21 を無色の液体として得

た。収量 461 mg (収率 79.6%) Rf 値 0.431 (Hex: AcOEt=95:5) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -0.04$ (s, 6 H, Si- CH_3), 0.40 (m, 8 H, Si- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si}$), 0.68 (m, 12 H, $\text{CH}_2\text{-C-C}$), 1.82 (m, 12 H, C- $\text{CH}_2\text{-C}$), 3.39 (t, 12 H, $J = 6.9$ Hz, C- $\text{CH}_2\text{-Br}$). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -4.54$ (Si- CH_3), 3.95 (Si- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si}$), 6.39 (Si- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si}$), 10.93 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 27.65 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 37.05 ($-\text{CH}_2\text{-Br}$). IR (neat): 1238 cm^{-1} ($-\text{CH}_2\text{Br}$).

2. 生理活性評価、構造解析結果および考察

大腸菌 0157:H7 が産生する志賀様毒素は2種類存在し、これらの毒素が出血性大腸炎やその後の一連の微小血管障害である重症合併症 [溶血性尿毒症症候群 (HUS)、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)] などを引き起こす。Stx1 として表記される毒素は、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae* Type 1) の産生する志賀毒素とアミノ酸配列が同一である。一方、Stx2 と表記される毒素は、Stx1 とアミノ酸配列が 50~60%の相同性が認められている。これらの毒素は、そのアミノ酸配列のわずかな違いがあるものの、タンパク質合成阻害による細胞毒性や腸管毒性などの活性を示す。Stx は、二種類のサブユニット (A と B) から構成される AB_5 型の毒素であり、A サブユニット 1 分子の周りに B サブユニット 5 分子が疎水性結合により取り囲んでいる。毒性を担っているのが A サブユニットであり、B サブユニットは、細胞表層上に存在する糖鎖受容体に結合する役目を担っている。毒素の X 線結晶構造解析などによる詳細な検討により、B

サブユニット 1 分子中に糖鎖の結合部位が 3 ヶ所存在していることが解明されてきている。すなわち、1 分子の Stx 中には、5 分子の B サブユニットが存在することから、合計 15 箇所の結合部位を提示していると推定される。このような多価型の糖鎖を認識するタンパク質に対して、Lee らにより提唱されている糖鎖クラスター効果を適用すると極めて高い親和力を保持した化合物の調整が可能となる。本研究においても、人工的に糖鎖を集積化した dendroliamer 化合物を利用して、Stx との高い親和力を生み出す化合物の構造活性相関を検討している。(分担研究者の名取の項を参照していただきたい) 上述した二種類の Stx の B サブユニットは、細胞表層上に存在する Gb3 として知られている糖脂質であるグロボトリアシルセラミド (Gal・1-4Gal・1-4Glc・1-ceramide) を特異的に認識し、接着する。本研究においては、合成上の簡略化と活性相関を考慮して、グロボ三糖 (Gal・1-4Gal・1-4Glc) の末端二糖に相当するガラビオース (Gal・1-4Gal) をカルボシラン dendroliamer コア骨格に導入するこ

とにより新規な糖鎖担持カルボシラン dendroliamer 群を調製後、構造活性相関を検討した。

カルボシラン dendroliamer をコア骨格に選定した一連のグロボ 3 糖含有カルボシラン dendroliamer 化合物群を用いて行ってきた研究結果から、Dumbbell 型の骨格が最適であると推定し、その中でも Dumbbell(1)6 をリード化合物に選定し、その周辺化合物群の合成と構造活性相関を行った。

図 2 に示した 3 つの化合物を用いて、結合阻害活性試験と細胞毒性中和活性試験の 2 種類について検討した。前者の結合阻害活性試験は、二種類の Stx をそれぞれ I¹²⁵ により標識した毒素と培養細胞としてベロ細胞を用いて化合物の活性を検定した。その結果を図 5 に示す。

図 5 において▲印は Fan(1)3-Gal2、●印は Dumbbell(2)4-Gal2、◆印は Dumbbell(2)6-Gal2 を阻害剤として用いていることを示している。これらのグラフは、縦軸が標識した各毒素の評価値、横軸がガラビオース担持 dendroliamer 化合物の濃度を示している。また、このグラフにおいて低い濃度方向で

表 1. ガラビオース担持 dendroliamer 化合物による各 Stx とベロ細胞との結合阻害活性試験から求めた IC₅₀ 値

	結合阻害活性	
	IC ₅₀	
	Stx1 ($\mu\text{g/mL}$)	Stx2 ($\mu\text{g/mL}$)
Fan(1)3-Gal2	33.5	31.6
Dumbbell(2)4-Gal2	56.2	56.2
Dumbbell(2)6-Gal2	47.3	44.7

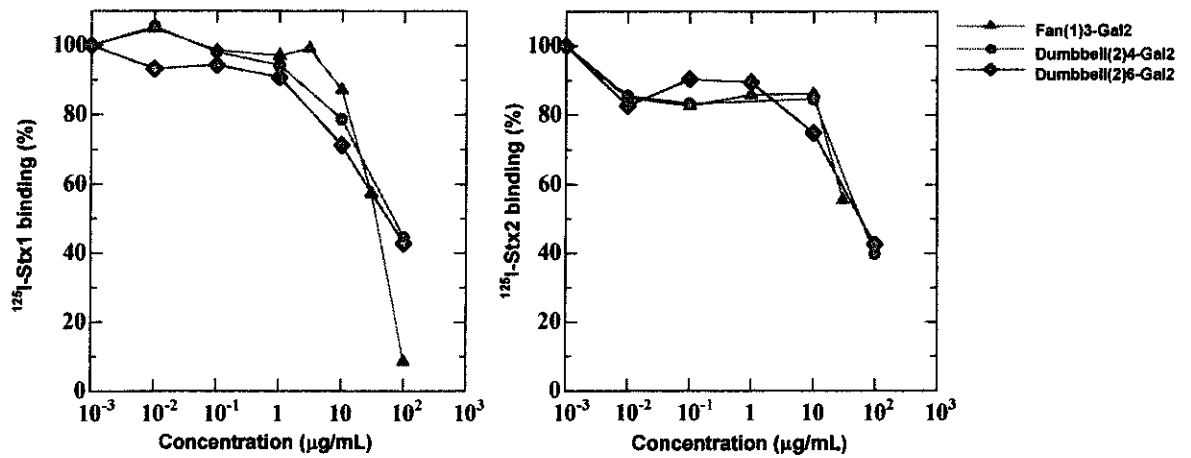


図 5. ガラビオース担持デンドリマー化合物による各 Stx とペロ細胞との結合阻害活性試験

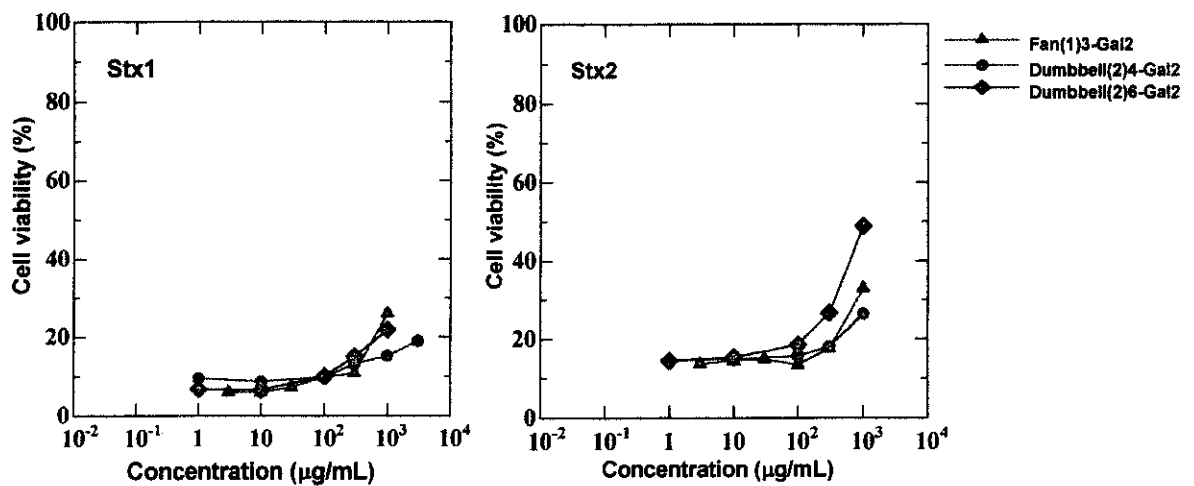


図 6. ペロ細胞に対する各 Stx のガラビオース担持デンドリマー化合物による細胞毒性中和活性試験

縦軸の値が 0 に近づくほど活性が高い化合物を示す。したがって、用いた 3 種類の化合物においては若干の変化はあるものの、大きな活性の違いは認められなかった。得られた IC₅₀ の値を表 1 に示す。

以上の結果から、ガラビオース担持デンドリマーは、何れも結合阻害活性を示すことが明らかとなったが、用いた化合物間での明確な構造活性相関は認められなかった。また、IC₅₀ の値から、これらの化合物群の活性ポテンシャルは、これまで用いてきたグロボ三糖含有カルボシランデンドリマーと比較して低いものと推定される。

次に、細胞毒性中和活性試験の結果を示す。この活性試験においては、ガラビオース含有デンドリマー群が、二種類の Stx それぞれによるペロ細胞への毒性を中和する活性を測定するため、WST 法を利用した比色定量法により検定した。その結果を図 6 に示す。

このグラフにおいても▲印は Fan(1)3-Gal2、●印は Dumbbell(2)4-Gal2、◆印は Dumbbell(2)6-Gal2 を示している。図 6 のグラフは、縦軸が WST 法によって求めた培養後のペロ細胞の生存率、横軸がガラビオース担持デンドリマー化合物の濃度を示している。また、このグラフにおいて低い濃度方向で縦軸の値が大きくなるほど活性が高い化合物を示す。この活性評価試験においても先述の活性評価法と類似して、用いた 3 種類の化合物において若干の活性の変化はあるものの、大きな活性の違いは認められなかった。また、化合物の活性が低い場合、この方法による測定濃度域での IC₅₀ の算出には至らなかった。これまで他のグループによって報告されてきているガラビ

オース由来の誘導体は、確かに活性が低いとされてきているが、クラスター化によりその活性が向上すると期待して合成を行った。しかしながら、今回合成した化合物群からは、活性の高い誘導体は見出されなかった。本研究において確立した合成ルートを考えると、合成上のメリットは捨て難く、ガラビオース誘導体による高い活性を保持した化合物は、極めて魅力的であると考えられる。今後、世代、形状や糖鎖の個数を変化させることによって、より高い活性を保持した化合物を見出すことを期待している。

一方、生理活性試験の結果よりガラビオース担持カルボシランデンドリマーの Stx に対する活性は低く見積もられはしたが、今後の合成上のメリットを考慮して、Stx とガラビオース担持カルボシランデンドリマーとの結晶構造解析を別途検討した。ガラビオース担持カルボシランデンドリマー群は、各測定における活性は低かったものの、Stx の各結合部位には、結合していると推定される。ここで用いた実験系の詳細については、分担研究者の宮澤の項を参照していただきたい。簡略化して記述すると、精製した Stx2 の B サブユニットペンタマー (Stx2B) とガラビオース担持カルボシランデンドリマー [用いた化合物は、最も単純な構造である Fan(1)3-Gal2] とを種々の条件下において、共結晶化を試みた。ガラビオース担持カルボシランデンドリマーを除いたコントロールでは毒素由来と推定される結晶が得られた。一方、デンドリマーが共存する数種類のバッファーを用いた系においても結晶が観察されたことから、目的とした共結晶が得られたのではないかと推定し

た。しかしながら、X線を利用した詳細な結晶構造解析による分析には、結晶の大きさや形状（得られた結晶が針状結晶）が適切でなかったため、現在のところ至っていない。つぎに、得られた結晶がガラビオース担持カルボシランデンドリマーと Stx2B との錯体であることを証明するために、直接分子量の測定が可能である質量分析法を採用した。コントロールのガラビオース担持カルボシランデンドリマーと Stx2B は、それぞれ基準ピークを与えることを確認した後、得られた共結晶の分子量測定を行った。その中から、特定のバッファー条件を適用した結晶のみが双方のピークを与えたことから、共結晶化が成功していることが示唆された。今後、このバッファー条件により X線結晶構造解析に用いることが可能な共結晶を得ることを優先課題としたいと考えている。

3. 実用化調査・検討結果

糖鎖担持カルボシランデンドリマーの医薬開発を行うためには薬物動態、毒性試験など非臨床段階に必要な中量から実生産に近い原体の製造が必要になる。しかしながら糖鎖担持カルボシランデンドリマーの糖鎖部分の製造、特にグロボ三糖の化学的合成は工程数が多く工業化は難しく、原料糖鎖を提供する企業も少量の生産にとどまっている。(株)ジーエスプラッツは下記のグロボ三糖の製造方法について調査した。

1) 糖鎖担持カルボシランデンドリマーの実用化のための中量以上の製造企業の検討

①発酵生産システム

このシステムを利用すれば、グロボ三糖を実生産可能なコストまた量的に生産する見通しがある。しかしグロボ三糖を産生するための糖転移酵素遺伝子関連の特許があり、医薬品開発を想定した生産には実施許諾契約が必要となるため発酵生産システムの技術をもつ協和発酵では研究段階以上の提供には困難であるとしている。

②デンプン糖の異化酵素を利用した生産システム

二糖(Gal α 1-4Gal β 1)(Gal2)を効率的に生産する事が可能となっているが、研究所レベルで製造するため数10g~100g程度を共同研究として供給することができるという状況である。

糖鎖担持カルボシランデンドリマーではグロボ三糖を担持させた化合物が最も良好な成績を示しており、二糖(Gal α 1-4Gal β 1)糖担持デンドリマーよりも優先させる計画となっている。

③1,4- α ガラクトシルトランスフェラーゼによる製造方法

生化学工業株式会社は糖鎖関連の酵素試薬を最も多く扱っているが、取り扱いはなかった。

HS財団は医療・医薬領域の先端的・基盤的科学技术の振興をはかり、健康と福祉に寄与するため1986年厚生労働省の支援と約130社の企業によって設立され、この目的に沿う事業として1995年より、研究者へ研究資源を提供する事業を行っている。HSRRBの遺伝子バンクには国立感染症研究所と国内外の研究機関から提供された遺伝子が保管・提供されている。HSRRB研究資源カタログを入手したところ現在1,4- α ガラクトシルトランスフェラーゼは登録されてい