

20030619

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 dendrimer 製剤の

設計技術開発に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 照沼 大陽

平成16（2004）年 4月

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

## 目 次

I	総括研究報告	
	糖鎖担持カルボンランデントリマー製剤の 設計技術開発に関する研究	1
	昭昭大陽、松岡侑司、幡野健、森 知紀	
A	研究目的	
B	結果および考察	
B-1	クロホ三糖担持カルボンランデントリマーの系統的合成	
B-2	クロホ三糖担持カルボシランテントリマーの系統的生理活性評価	
B-3	クロホ三糖大量合成法の開発	
B-4	クロホ三糖担持カルボンランテントリマーの熱力学的評価	
B-5	マンノース担持カルボシランテントリマーの設計技術開発に関する研究	
B-6	立体特異的アクリコン導入法を用いたN-アセチルラクトサミンの 新規合成法の研究	
C	結論	
D	健康危険情報	
E	研究発表	
II	分担研究報告	
1	糖鎖担持カルボシランテントリマーの 生理活性評価及び病理学的解析	30
	名取泰博	
2	糖鎖担持カルボンランテントリマー実用化のための 調査報告	34
	平野弘之	
	(資料) ヘ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	38
IV	研究成果の刊行物 別刷	70

平成15年度 厚生労働省科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）  
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

主任研究者 照 昭 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  
森 知紀 医療機器センター 流動研究員

研究要旨

平成14年度までに病原性大腸菌 0157 H7 が産生するへろ毒素を効果的に中和する、まったく新しい形の化合物を創成した。より効果の高い化合物の開発およびこのコンセプトの拡張を目指して本年度は以下の点について検討を行った。

- I-1 グロホ三糖担持カルボシランデンドリマーの系統的合成
- I-2 グロホ三糖担持カルボシランデンドリマーの系統的生理活性評価
- I-3 グロホ三糖大量合成法の開発
- I-4 グロホ三糖担持カルボシランデンドリマー-へろ毒素接着の熱力学的考察
- I-5 マンノース担持カルボシランデンドリマーの設計技術開発に関する研究
- I-6 立体特異的アクリコン導入法を用いた N-アセチルラクトサミンの新規合成法の研究

なお、分担研究者報告書として以下の項目を記載する。

- II-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  
分担研究者 国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部 名取泰博
- II-2 糖鎖カルボシランデンドリマー実用化のための調査報告  
分担研究者 株式会社シーエスプラッツ 平野 弘之

分担研究者

名取 泰博 国立国際医療センター研究所  
部長  
西川喜代孝 国立国際医療センター研究所  
室長  
平野 弘之 株式会社シーエスプラッツ  
部長

A 研究目的

腸管出血性大腸菌の産生するへろ毒素/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か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か報告され、これらのサイトのいくつかか細胞表面の糖脂質クラスターに結合することか、毒素か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か考えられ、このアイデアによりいくつかの毒素中和剤か合成され、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か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へろ毒素か引き起こす。従って同菌感染後ても体内で毒素を中和し、合併症の発症を抑制する治療法か開発されれば、重症例や死亡例の減少か期待される。

へろ毒素を認識する糖鎖はクロホ三糖（Gb3）であることか知られており、クロホ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か合成されその効果について検討かなされてきた。しかし、前述のことく、これまでへろ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たされていない。

我々は特異な構造を有し、これまでに知られていない機能を発揮することか期待されるカルホシラントリマーに着目し、クロホ三糖をカルホシラント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。カルホシラントリ

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への糖鎖を同一環境下に配置でき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へろ毒素Bサブユニットに対する認識・接着物質としへろ毒素中和剤の開発に有効であることか期待できると考え、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）にも応用か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か発足する以前、我々は以下の成果をあげていた。

- 1 グロホ三糖を担持するカルホシラントリマーの構造と *in vitro* および *in vivo* におけるへろ毒素中和活性には強い相関かある。
- 2 *In vitro* の活性と *in vivo* の活性は必ずしも一致しない。
- 3 我々か 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。

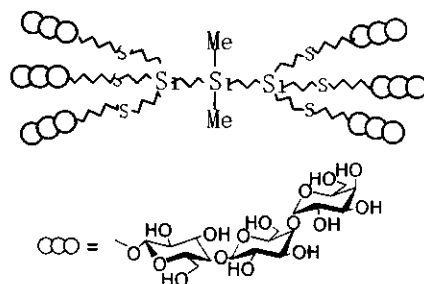


図1 Dumbbell(1)6

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。

- 1 これまで *in vivo* においてもっとも生物活性が高いことか認められた Dumbbell(1)6 をリート化合物として、ヘロ毒素中和剤の最適構造について検討する。
- 2 Dumbbell(1)6 を中心としてヘ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 ヘ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15年度は以下の項目について検討した。

- I-1 グロホ三糖担持カルホシランテントリマーの系統的合成
- I-2 グロホ三糖担持カルホシランテントリマーの系統的生理活性評価
- I-3 クロホ三糖大量合成法の開発
- I-4 クロホ三糖担持カルホシランテントリマー-ヘロ毒素接着の熱力学的考察
- I-5 マンノース担持カルホシランテントリマーの設計技術開発に関する研究
- I-6 立体特異的アグリコン導入法を用いた *N*-アセチルラクトサミンの新規合成法の研究

#### (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

### B-1 グロホ三糖担持カルホシランテントリマーの系統的合成

グロホ三糖担持カルホシランテントリマーのヘロ毒素中和活性に対する構造最適化を行うことを目的として、平成14年度に、これまでもっともヘロ毒素阻害活性の高い効果を示したクロホ三糖担持カルホシランテントリマー・Dumbbell(1)6 をリート化合物として以下のテントリマー群の合成を完了した (Fig 1)。

平成15年度には、これら合成したカルホシランテントリマーそれぞれにグロホ三糖誘導体を導入した。同時にカルホシランテントリマーと糖鎖間の距離を調整するため、これまで用いてきたアグリコンメチレン数4個に加えて、メチレン数5個および6個のクロホ三糖誘導体をあらたに合成し、それぞれを Dumbbell(1)6 骨格のカルホシランテントリマーに導入した。

今回合成した化合物をまとめて Fig 2 に示す。

カルホシランテントリマーにクロホ三糖を導入する反応について Dumbbell(1)6 を例に以下に示す。

D-ガラクトース 1 を出発原料としクリコシルトナー(5)合成した (Scheme 1)。この合成法に関してはすでに当研究室で確立された方法に従って行った。

一方、グロホ三糖合成の受容体となるヘンシル誘導体12の合成を行った (Scheme 2)。この反応もこれまで当研究室でアグリコンメチレン数4個の誘導体の合成法に準じて行うことかてきた。

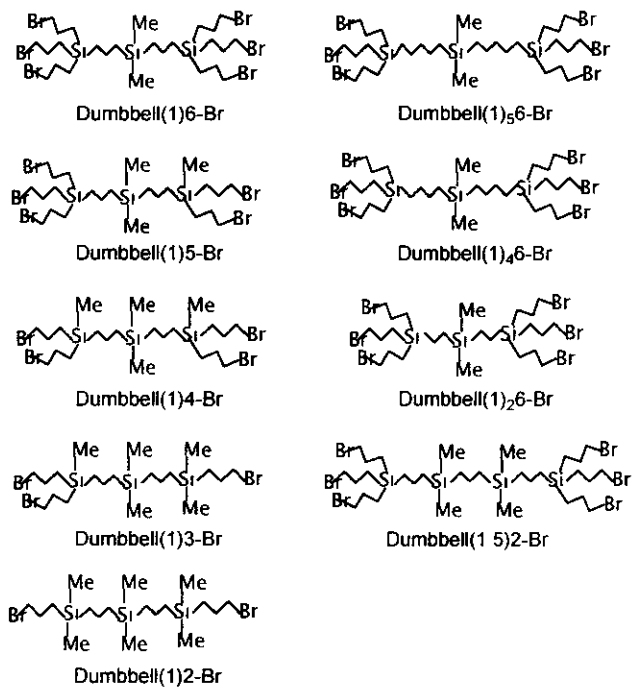


Fig 1

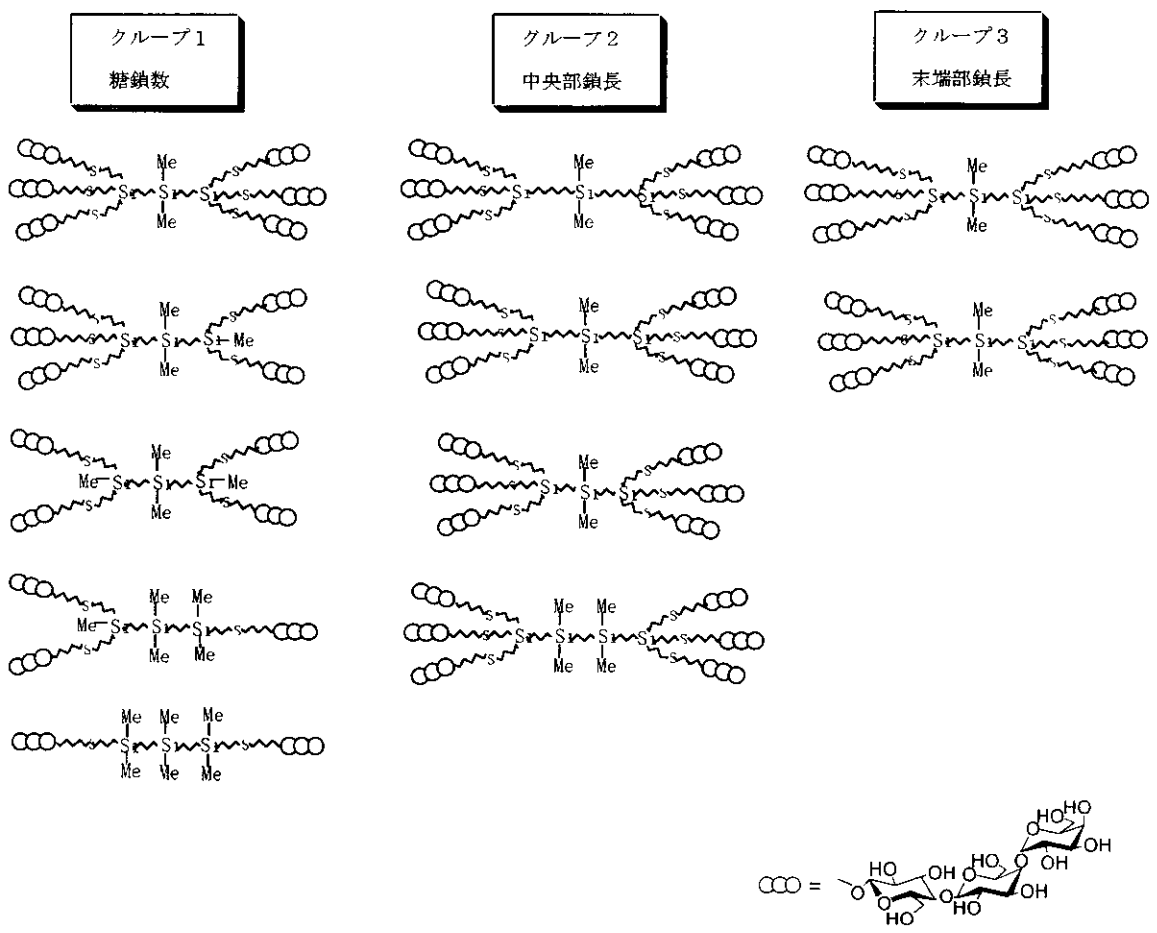
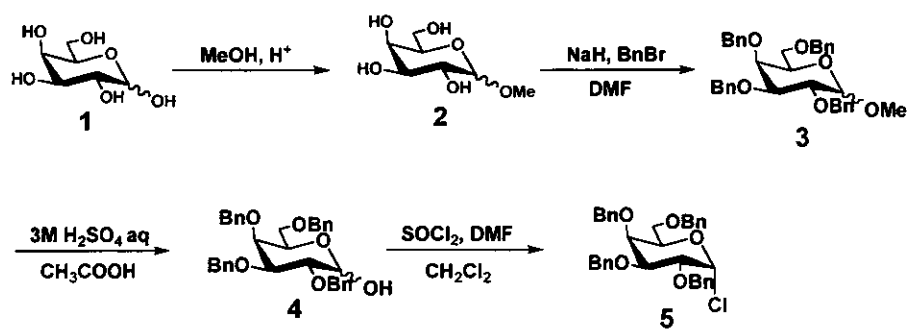
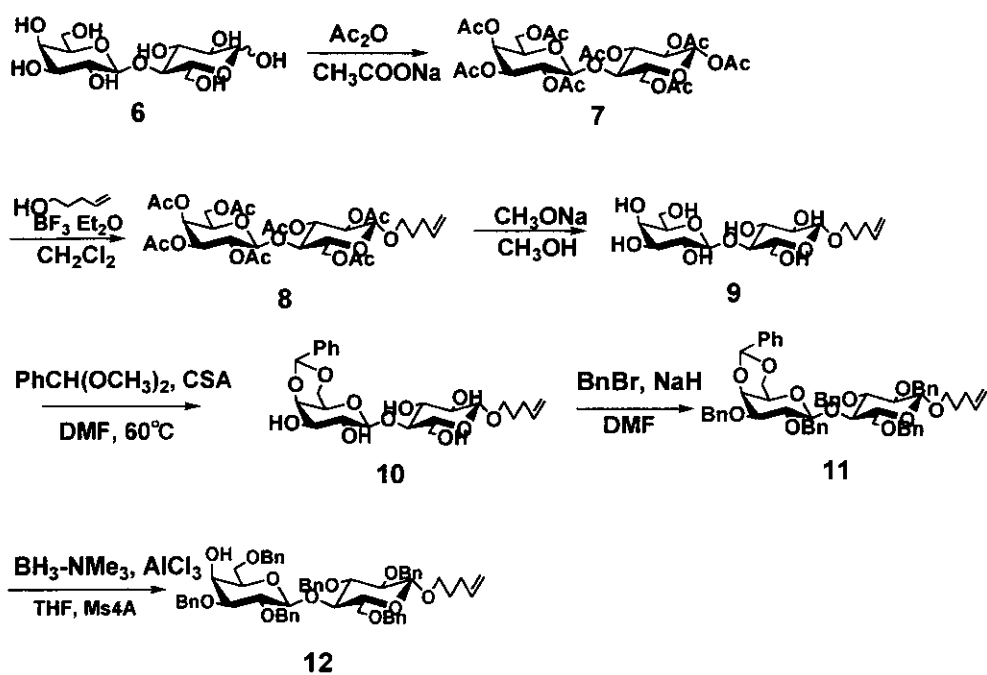


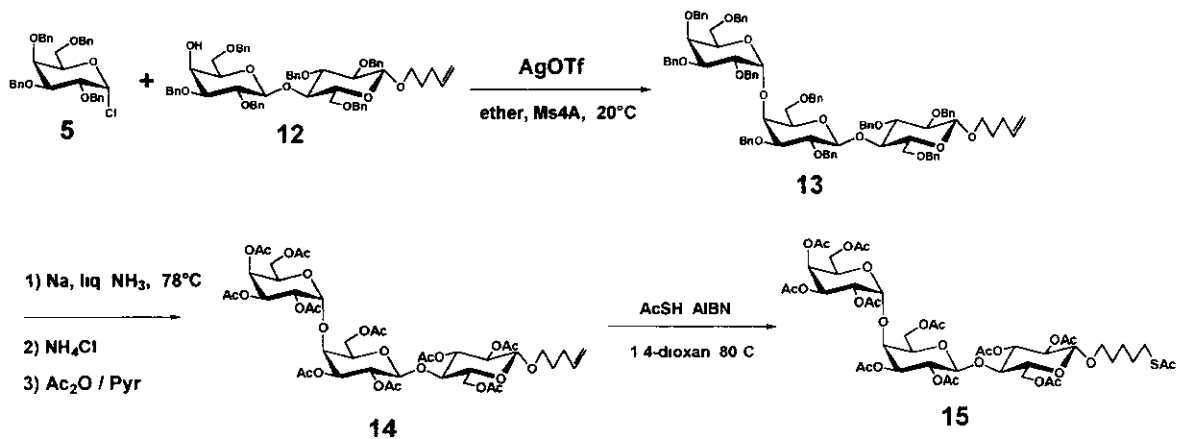
Fig 2



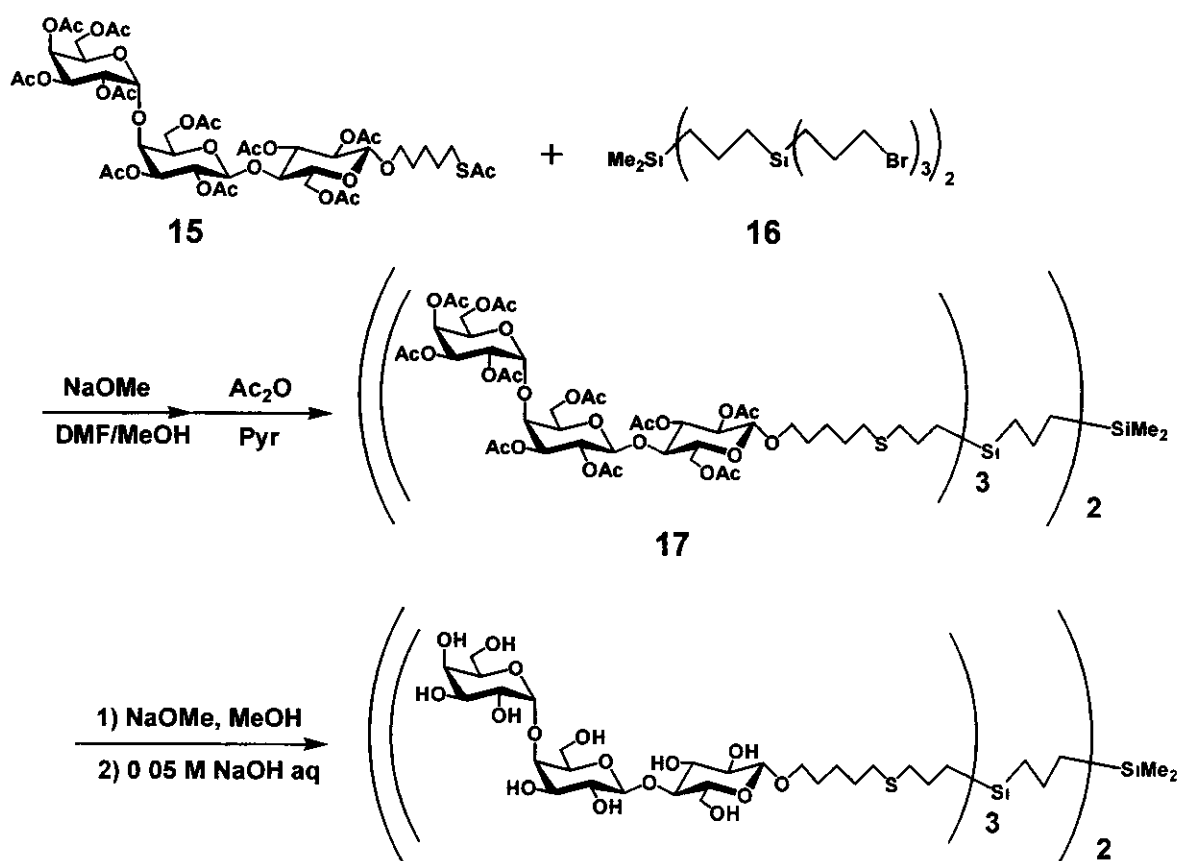
Scheme 1



Scheme 2



Scheme 3



Scheme 4

こうして得た供与体5を受容体12に作用させてアクリコンメチレン鎖数5個のクロホ三糖誘導体を合成し、さらにメチレン鎖末端にチオヘンシル基を有する化合物15を合成した (Scheme 3)。

次に、別途合成した Dumbbell(1)6-Br(16)に化合物15を作用させて、目的物であるアクリコンメチレン鎖数5個のクロホ三糖担持カルホンランテントリマー20を得ることかてきた (Scheme 4)。

#### 実験の部

Methyl D-galactopyranoside (2)

窒素雰囲気下、D-ガラクトース1 (20.0 g, 111 mmol) をメタノール (200 ml) に溶か

し、イオン交換樹脂 IR-120B (H+) (17.8 g) を加え、70 °Cで22時間攪拌した。反応終了後、イオン交換樹脂を濾別して濃縮した。イソプロパノールで再結晶し化合物2 (11.8 g, 54.9%) を得た。

Methyl

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-galactopyranoside (3)

50%油性水酸化ナトリウム (44.4 g, 924 mmol) をヘキサノールで3回洗浄して油分を除去した後、DMF (400 ml) を加え、水冷下、化合物2 (30.0 g, 154 mmol) のDMF (200 ml) 溶液を滴下した。さらに、ヘンシルフロミト (147 ml, 1.23 mol) を滴下し、水冷下で30分攪拌したのち、室温で16時間



半撈拌した。反応終了後、水冷下、メタノール (37.5 ml) を加え、反応液を濃縮した。残渣をシエチルエーテルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を乾燥した後、溶液を濃縮した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (ヘキサン 酢酸エチル 8:1) で精製し化合物 3 (82.0 g, 95.8%) を得た。

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-galactopyranose (4)

化合物 3 (13.1 g, 23.6 mmol) の酢酸 (150 ml) 溶液に 3M 硫酸 (16 ml) を加え、80 °C で 50 分間撈拌した。反応終了後、反応液を水水にあげ、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。有機層を乾燥した後濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (ヘキサン 酢酸エチル 3:1) で精製し化合物 4 (9.03 g, 70.7%) を得た。

2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl chloride (5)

窒素雰囲気下、化合物 4 (3.00 g, 5.54 mmol) の 1,2-シクロロメタン (30 ml) 溶液に、DMF (0.214 ml, 2.77 mmol) を加え、水冷下、塩化チオニル (1.21 ml, 16.6 mmol) を加え、水冷下、3 時間撈拌し、その後、室温で 20 時間撈拌した。反応終了後、溶液を濃縮し、トルエンで共沸させて化合物 5 (3.14 g, 101%) を得た。

4-O-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-1,2,3,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (7)

酢酸ナトリウム (5.69 g, 69 mmol) を無水酢酸 (68.2 ml, 0.72 mol) に懸濁し、110 °C に加熱した。そこへ、D-ラクトース 1 水和物 6 (20 g, 55.5 mmol) を少しずつ加え、

2 時間撈拌する。反応終了後、反応液を水水にあげ、1 時間撈拌し、溶液をろ過し、冷水で洗い、結晶化した。生成物をエタノールから再結晶し化合物 7 (24.0 g, 64.7%) を得た。

n-Pentenyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (8)

窒素雰囲気下、化合物 7 (50.0 g, 73.7 mmol) のシクロロメタン (200 ml) 溶液に、4-ペンテン-1-オール (38.1 ml, 368 mmol) を加えた。反応混合物を -7 °C に冷やし、BF<sub>3</sub> Et<sub>2</sub>O (93.4 ml, 737 mmol) を加え、30 分間撈拌し、0 °C で 30 分間、室温で 4 時間撈拌した。反応終了後、反応液を水水にあげ、クロロホルムで抽出した。有機層を乾燥後、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフ (ヘキサン 酢酸エチル 1:1) で精製し化合物 8 (28.3 g, 54.5%) を得た。  
n-Pentenyl 4-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside (9)

窒素雰囲気下、化合物 8 (27.9 g, 39.6 mmol) のメタノール (280 ml) 溶液に、ナトリウムメトキシド (1.50 g, 27.7 mmol) を加え、室温で 2 時間半撈拌した。反応終了後、反応液にアンバーライト IR-120B (H+) (21.9 ml) を加え、中和した。溶液からイオン交換樹脂をろ別した後、濃縮し化合物 9 (16.2 g, 99.9%) を得た。

n-Pentenyl-4-O-(4,6-O-benzylidene- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside (10)

化合物 9 (0.50 g, 1.22 mmol) の DMF (2.5 ml) 溶液に、ヘンスアルテヒトシメチルアセタール (0.275 ml, 1.83 mmol) と CSA (28.34 mg, 0.122 mmol) を加え、減圧下、

60 °C で 2 時間半攪拌し、反応終了後、反応液を室温まで戻し、トリエチルアミン (34  $\mu$ l, 0.244 mmol) を加え、濃縮し、トルエンで共沸した。残渣をシエチルエーテルで洗浄し、ろ過して目的物 10 (0.668 g, 110%) の混合物を得た。さらなる精製は行わず次の反応に用いた。

n-Pentenyl

4-O-(2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzylidene- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (11)  
50%油性水素化ナトリウム (0.42 g, 17.55 mmol) に DMF (15 ml) を加え、水冷下、化合物 10 の混合物 (0.583 g, 1.17 mmol) の DMF (15 ml) 溶液を滴下した。滴下後、アスピレーターで発生する水素を引き、30 分間攪拌した。さらに水冷下、ヘンシルフロミト (1.39 ml, 11.7 mmol) を滴下し、室温で 2 時間半攪拌した。反応終了後、水冷下、メタノール (0.355 ml) を加え、反応液を濃縮した。残渣をシエチルエーテルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を乾燥後、溶液を濃縮した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフ (ヘキサノール/酢酸エチル=4/1) で精製し化合物 11 (0.267 g, 46%, 2steps) を得た。

n-Pentenyl

4-O-(2,3,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (12)  
窒素雰囲気下、化合物 11 (119 mg, 0.125 mmol) の THF (1.95 ml) 溶液に、モレキュラーシーブ 4Å パウダー (119 mg) を加え、室温で 30 分間攪拌した。続いて、ホラントリメチルアミン錯体 (63.8 mg, 0.875 mmol) を加え、水冷下、塩化アルミニウム

(117 mg, 0.875 mmol) を数回に分けて加え、室温で一晩攪拌した。反応終了後、セライトろ過し、ろ液をクロロホルムで希釈し、水、0.5 M 硫酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を乾燥した後、濃縮した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフ (ヘキサノール/酢酸エチル=3/1) で精製し化合物 12 (91 mg, 76.3%) を得た。

n-Pentenyl-4-O-[4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl-

- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-2,3,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (13)

窒素雰囲気下、グリコシル供与体 7 (6.10 g, 10.9 mmol) とグリコシル受容体 12 (4.35 g, 4.57 mmol) のシエチルエーテル (200 ml) 溶液に、モレキュラーシーブ 4A パウダー (4.14 g) を加え、室温で 30 分間攪拌した後、-20 °C で AgOTf (3.52 g, 13.7 mmol) を加え、3.5 時間攪拌した。反応終了後、反応液をクロロホルムで希釈し、セライトろ過した。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。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフ (ヘキサノール/酢酸エチル=8/1) で精製し化合物 13 (4.80 g, 71.3%) を得た。

n-Pentenyl

4-O-[4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-2,3,6-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (14)

-78 °C の液体アンモニア (50 ml) へ全量ナトリウム (0.978 g, 42.6 mmol) を加え、そこに化合物 13 (1.57 g, 1.06 mmol) の

1,2-シメトキシエタン (10 ml) 溶液を滴下し、20 分間攪拌し、塩化アンモニウム (2.28 g, 42.6 mmol) を加えて1時間半攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣をピリシン (10.3 ml) に懸濁し無水酢酸 (6.03 ml) を加え、室温、オーバーナイトで攪拌した。反応終了後、反応液を濃縮し、クロロホルムで希釈して水水にあげて抽出し、1N 塩酸、飽和炭酸水素水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶液をろ過して濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ (ヘキサン 酢酸エチル=1:1) で精製し、結晶の化合物 14 (0.738 g, 69.9%) を得た。

5-(Acetylthionyl)pentyl-4-O-[4-O-(2,3,4,6,-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-2,3,6-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (15)

窒素雰囲気下、化合物 14 (480 mg, 0.489 mmol) の1,4-ジオキサン (8.0 ml) 溶液に、チオ酢酸 (1.39 ml, 19.6 mmol) を加え、温度を 50 °C に上げる。50 °C まで上かったら、AIBN (321 mg, 1.96 mmol) を加え、さらに温度を 80 °C にまで上げ、3 時間攪拌した。反応終了後、室温に戻し、シクロヘキセン (5.96 ml, 58.7 mmol) を加え、反応液を濃縮した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (トルエン 酢酸エチル 1:1) で精製し化合物 15 (502 mg, 97.1%) を得た。

Dumbbell(1)6-Gb3(C-5)-Ac (17)

Dumbbell(1)6-Br テントリマー-16 (27.5 mg, 29.6  $\mu$ mol) とクロホ3糖誘導 15 (300 mg, 0.284 mmol) を DMF (0.3 ml)、MeOH (0.3 ml) を加え均一になるまで攪拌した。ナト

リウムメトキシシト (16.8 mg, 0.311 mmol) を加え一晩攪拌した。酢酸 (0.8 ml) を加え、数分間攪拌した後、濃縮した。濃縮後、ピリシン (6 ml)、無水酢酸 (3 ml) を加え、一晩攪拌する。反応終了後、反応液を濃縮し、水を入れ1時間攪拌した。その後、クロロホルムで希釈して水水にあげて抽出し、1N 塩酸、飽和炭酸水素水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を乾燥した後、濃縮した。粗生成物を、なす、GPC (1H-2.5H) でモノマー及びタイマーを取り除いた。その後、生成物を GPC (2H-2.5H) で精製して化合物 17 (109 mg, 56.5%) を得た。

Dumbbell(1)6-Gb3(C-5)-OH (18)

Dumbbell(1)6-Gb3(C-6)-Ac テントリマー-17 (59 mg, 9.03  $\mu$ mol) のメタノール (1 ml) 溶液に、ナトリウムメトキシシト (54.2  $\mu$ mol) を加え、室温で一晩攪拌した。0.025 M 水酸化ナトリウム水溶液を (1 ml) 加え、さらに一晩攪拌した。反応液に陽イオン交換樹脂 (IR-120B) (2 ml) を加え、数分攪拌した後、反応液をろ過し、濃縮した。生成物をケルろ過により精製した後、凍結乾燥して脱保護された化合物 18 (34 mg, 93.9%) を得た。

## B-2 グロホ三糖担持カルボシランテンドリマーの系統的生理活性評価

生理活性評価については分担研究報告 (名取泰博担当) に詳述するように、これまでに合成したカルボシランテンドリマーおよびグロホ三糖誘導体を用いて以下の3つのグループに分けて系統的な評価を行っている。

第1グループ 担持糖鎖数の違いの効果

第2グループ カルボシランテンドリマー

内部鎖長の違いの効果

第3グループ クロホ三糖とカルホシラン  
テントリマー間の鎖長の効果

これまでに、第1群の結果が判明している。その結果、*in vitro* においてはクロホ三糖担持数が4以上でヘロ毒素阻害活性が急激に上昇することか明らかとなった。しかし、*in vivo* では担持数4および5のものはほとんど効果が認められず、担持数6のものか強い阻害活性を示した。

以上の結果、テントリマーに担持する糖鎖数が阻害活性に大きな影響を与えることが明らかとなり、さらに、これらの手法がまったく新しい形のヘロ毒素中和剤開発の手法となりうることを証明することかできた。

### B-3 グロホ三糖大量合成法の開発

本研究室でこれまで確立しているクロホ3糖の合成経路は、ラクトース受容体の合成初期段階にフテニルアルコールやペンテニルアルコール等のアルコールを用いて、末端2重結合をもつアクリコンを導入したのち、3糖を合成するという経路で行っている (Fig 1)。

しかし、この合成経路は大量合成を目的とする場合以下の難点がある。

初期段階に非常に高価なアルコールを多量に用いる

化合物の結晶性が悪く、ほぼすべての段階においてカラムクロマトグラフィーによる精製が必要となる。

アクリコンに2重結合を含むため、ヘンシル保護基を除去する際 Birch 還元を用いている。

ここでは上記難点を解決するため新たな合

成経路の確立に向けて検討を行った。もっとも改善が必要とされる点は、カラムクロマトグラフィーによる精製を可能な限り少なくすること、および脱ヘンシル反応において Birch 還元で代えて水素添加反応を使用できるようにする点にある。

これらの問題を解決するため、結晶性の高い誘導体を与えることが期待されるヘンシル基を保護基として用い、オレフィンを含むアクリコン部分を合成の最終段階で導入することとした。

以下、具体的な反応経路について述べる。

まず、ラクトース・アセテート (1) を出発物質としてアノマー位水酸基をヘンシル基で保護し化合物 3 を得た。ついて、4'位に無保護な水酸基を残し他のすべての水酸基をヘンシル基で保護した化合物 6 を得た (Scheme 1)。

以上の結果、ここまでの段階でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを使わず、すべて再結晶で精製する経路を確立した。ラクトース $\alpha$ -アセテート 1 から 5 ステップでの収率は 18.1%であった。

次に別途合成したクリコニル供与体 5 と受容体 6 を用いてグリコシレーション反応を行った。ここではシリカゲルクロマトグラフィーで精製を行いヘンシル保護体 7 を得た (Scheme 2)。

次に水素添加法によってヘンシル基を除去し、アセチル化をおこなった。こうして得た化合物 9 に 4-ペンテン-1-オールを用いてクリコニル化を行い、ペンテニル基の導入を行い、カルホシランテントリマーへの導入の前駆体となる化合物 10 を得た (Scheme 3)。

以上の結果、受容体の合成において精製

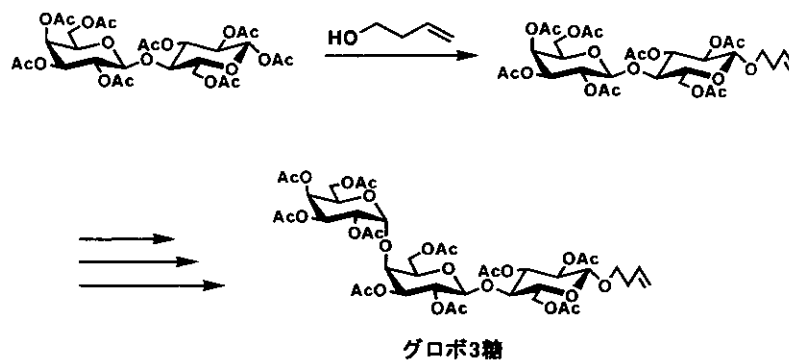
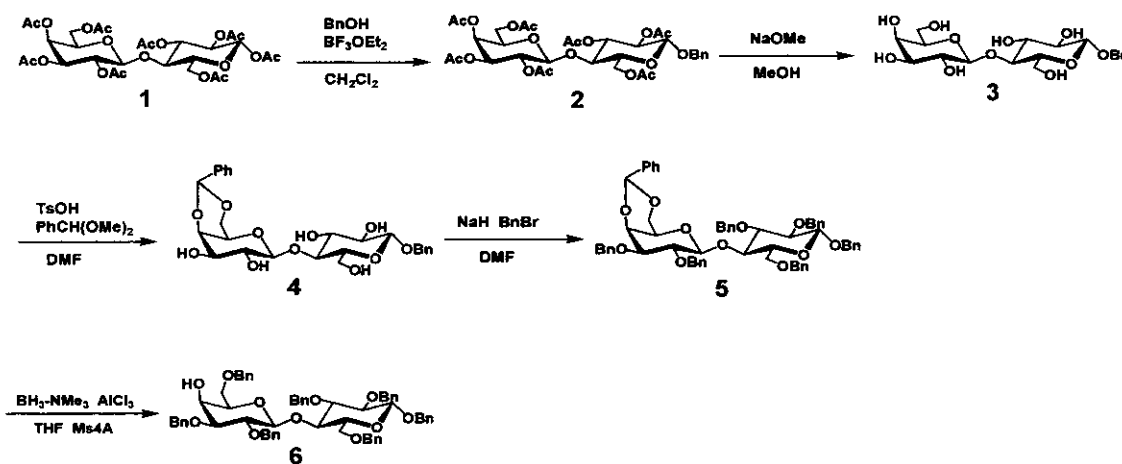


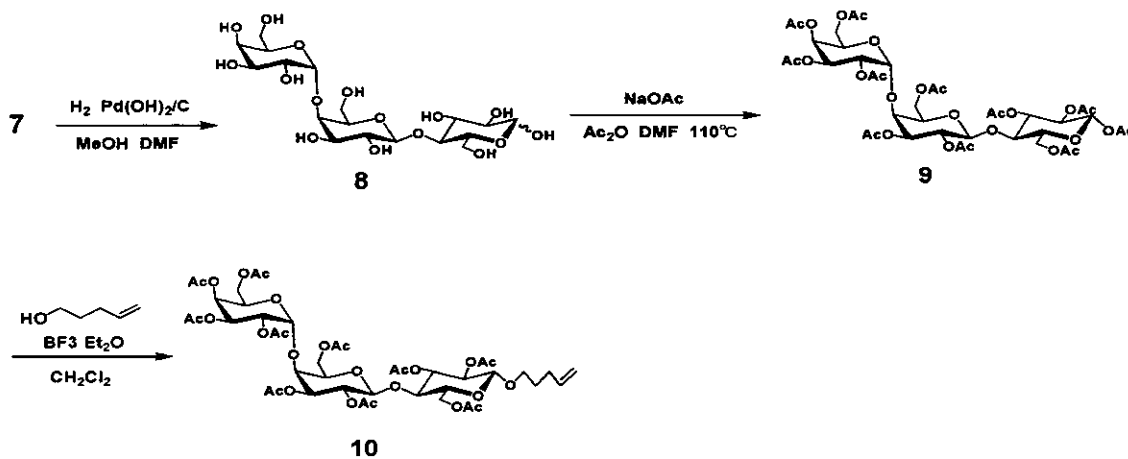
Fig 1



Scheme 1



Scheme 2



Scheme 3

はすべて再結晶化で行え、これにより、旧経路に比べ、容易に受容体を合成できるようになった。また、Birch 還元に代えて水素添加反応を利用することか可能となり、大量合成の反応経路を確立することかできた。

#### 実験の部

Benzyl

4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (2)

窒素雰囲気下、化合物 1 (61.8 g, 91.1 mmol) のシクロロメタン (370 ml) 溶液に、ヘンシルアルコール (47.1 ml, 0.456 mol) を加えた。-5 °C に冷やし、BF<sub>3</sub> Et<sub>2</sub>O (115 ml, 0.911 mmol) を加え、30 分間攪拌し、0 °C で 30 分間、室温で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、反応液を水水にあげ、クロロホルムで抽出し、飽和炭酸ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を乾燥した後、濃縮し、生成物をヘキサンで洗浄して上澄みをテカントで取り出した。それを数回行った後、メタノールによる再結晶化を行い化合物 2 (30.41 g, 46.1%) を得た。

Benzyl

4-O-(β-D-galactopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3)

窒素雰囲気下、化合物 2 (24.2 g, 33.4 mmol) のメタノール (240 ml) 溶液に、ナトリウムメトキシド (1.26 g, 23.4 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、反応液に陽イオン交換樹脂 (IR-120B) (18.5 ml) を加え中和した。溶液からイオン交換樹脂をろ別した後、濃縮し化合物 3 (14.4 g, 100%) を得た。

Benzyl

4-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-galactopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4)

化合物 3 (5.0 g, 11.6 mmol) の DMF (25 ml) 溶液に、ヘンスアルテヒトシメチルアセター (2.61 ml, 17.4 mmol) と TsOH (600 mg, 3.48 mmol) を加え、室温で 17 時間半攪拌した。反応終了後、トリエチルアミン (0.65 ml, 4.64 mmol) を加え、濃縮し、トルエンで共沸した。生成物をエタノールで再結晶し化合物 4 (5.25 g, 87.0%) を得た。

Benzyl-4-O-(2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl-β-D-glucopyranoside (5)

窒素雰囲気下、50%油性水素化ナトリウム (9.4 g, 196 mmol) に DMF (100 ml) を加え、水冷下、化合物 4 (10.2 g, 19.6 mmol) の DMF (100 ml) 溶液を滴下した。滴下後、アスピレーターで発生する水素を引き、30 分間攪拌した。さらに水冷下、ヘンシルフロミト (23.4 ml, 196 mmol) を滴下し、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、水冷下、メタノール (20 ml) を加え、反応液を濃縮した。残渣をシエチルエーテルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を乾燥した後、濃縮した。生成物をエタノールで再結晶し化合物 5 (11.2 g, 58.9%) を得た。さらに、再結晶母液から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) により精製し化合物 5 を (2.4 g, 12.6%) 得た。

Benzyl

4-O-(2,3,6-tri-O-benzyl-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl-β-D-glucopyranoside (6)

窒素雰囲気下、化合物 5 (5.0 g, 5.15 mmol)

の THF (50 ml) 溶液に、モレキュラーシーブ 4Å パウター (5.0 g) を加え、室温で 30 分間攪拌した。続いて、ホラントリメチルアミン錯体 (2.63 g, 36.1 mmol) を加え、水冷下、塩化アルミニウム (4.81 mg, 36.1 mmol) を数回に分けて加え、室温で一晩攪拌した。反応終了後、セライトろ過し、ろ液をクロロホルムで希釈し、水水、0.5 M 硫酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を乾燥した後、濃縮した。生成物をエタノールで再結晶し化合物 6 (3.88 mg, 77.4%) を得た。

Benzyl-4-O-[4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-2,3,6-tri-O-benzyl-1- $\beta$ -D-glucopyranoside (7)

窒素雰囲気化、グリコシル供与体 5 (1.00 g, 1.79 mmol) とグリコシル受容体 6 (869 mg, 0.894 mmol) を THF (20 ml) に溶かし、モレキュラーシーブ 4Å パウター (1.0 g) を加え、室温で 30 分間攪拌した後、 $-20^{\circ}\text{C}$  で AgOTf (689 mg, 2.68 mmol) を加え、40 分間攪拌した。反応終了後、反応液をクロロホルムで希釈し、セライトろ過した。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。生成物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=20/1)で精製し化合物 7 (1.00 g, 74.6%)を得た。

Acetyl  
4-O-[4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-2,3,6-tri-O-acetyl-1- $\beta$ -D-glucopyranoside (9)

3 糖誘導体 7 (5.30 g, 35.4 mmol) の DMF (25 ml), メタノール (25 ml) 混合溶液に、20% 水酸化パラシウム/活性炭 (32 g) を加え、水素雰囲気下、接触還元装置を用いて激しく攪拌した。反応終了を TLC で確認後、反応液をセライトろ過し、ろ液を濃縮して脱ヘンシル体 8 を得た。さらなる精製は行わず、次の反応に用いた。無水酢酸 (19 ml, 194 mmol)、酢酸ナトリウム (376 mg, 459 mmol)、 $110^{\circ}\text{C}$  の溶液で、DMF (20 ml) に溶解させた 8 を滴下し、2 時間攪拌した。反応終了後、溶液を水水にあげ、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。有機層を乾燥した後、濃縮した。生成物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=1/1)で精製し化合物 9 (2.83 g, 82.9%, 2 steps) を得た。

n-Pentenyl-4-O-[4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-2,3,6-tri-O-acetyl-1- $\beta$ -D-glucopyranoside (10)

窒素雰囲気下、化合物 9 (1.15 g, 1.19 mmol) のシクロロメタン (10 ml) 溶液に、4-ペンテン-1-オール (0.614 ml, 5.95 mmol) を加えた。 $-15^{\circ}\text{C}$  に冷やし、 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (1.5 ml, 11.9 mmol) を加え、 $0^{\circ}\text{C}$  で 40 分間、室温で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、反応液を水水にあげ、クロロホルムで抽出し、飽和炭酸ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を乾燥した後、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 2 : 1）で精製し化合物 10（573 mg, 48.6%）を得た。

#### B-4 グロホ三糖担持デンドリマー化合物の熱力学的評価

埼玉大工 松岡 浩司

##### 概要

トゥーン教授の下において、大腸菌 O157 H7 が産生するへろ毒素の B サブユニットのみを発現する大腸菌を培養し、そこからへろ毒素 B サブユニットタンパク質の単離を行った。単離したタンパク質と糖鎖含有カルホシランテントリマーとの相互作用を等温滴定カロリーメトリーの手法により、テントリマーの骨格と糖鎖の個数が毒素タンパク質との相互作用にどのように影響を与えるかについて研究を行った。また、合成中間体として有用なクロホ 3 糖誘導体の調製を行った。

##### 目的

Vero 毒素産生性大腸菌 (Verotoxin-producing *Escherichia coli*, VTEC) が産生するへろ毒素 (VT) は、毒性を発揮する A サブユニットと細胞に接着する 5 つの B サブユニットから構成される AB5 型の毒素である。さらに、糖鎖結合部位は、B サブユニット 1 個あたり 3 箇所存在するため、全体で 15 箇所存在することも知られている。この多価の結合部位を有する VTs は、まず B サブユニットか、宿主細胞表面に存在するグロホトリオンルセラミド ( $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\alpha 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Ceramide Gb3}$ ) を

特異的に認識し、結合した後に、エントサイトーシスにより A サブユニットかその細胞に侵入し、細胞の蛋白質合成を阻害する。すなわち、この感染初期段階となる毒素と宿主細胞との結合を、阻害あるいは中和することか可能となれば、感染やさらなる伝染の進行を未然に防ぐことかできると考えられる。これまでに我々は、この過程を効果的に阻害する化合物群の合成を目的として、多価型のカルホシランテントリマーの合成と、それらの活性評価に関する基礎的研究を行い、多価型化合物の有効性を確認してきた。その化合物群は、毒素に多数存在する糖鎖認識部位に積極的に結合させるために、合成世代により分子量と表層官能基数か厳密に制御できるカルホシランテントリマーをコアとし、その表層を Gb3 の糖鎖部分であるクロホ 3 糖構造 ( $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\alpha 1-4\text{Glc}\beta 1-$ ) で被覆したユニークな糖鎖クラスターである。さらに、これらは 2 種類のへろ毒素双方に対して、化合物群の合成世代や形状に応じて活性に影響を与える興味深い現象を見出してきた。そこで、本研究では、これらの毒素タンパク質とクロホ 3 糖含有カルホシランテントリマーとの相互作用を等温滴定カロリーメトリー (Isothermal Titration Calorimetry ITC) 分析により詳細に検討することとした。この側定によるメリットは、1) 結合に伴う熱変化を直接的に測定できること、2) 真の溶液法であるため、リガントとレセプター双方の固定化か不要であること、3) 濁りや色のついた溶液、もしくは懸濁微粒子についても側定か可能であることなどが挙げられる。中でも、リガント—レセプター相互作用に伴う熱変化を直接測定できる



ため、真の相互作用を熱力学的に解析できる。また、この際得られるパラメーターは、結合定数(KD)、反応の結合比(n)、エンタルピー変化( $\Delta H$ )、エントロピー変化( $\Delta S$ )であり、一度の測定により完全な熱力学的プロファイルを把握することかできる。しかしながら、その相互作用において測定可能な量の熱の発生もしくは吸収を必要とするため、リガントとレセプターの双方ともある程度の物質量が必要となる。本研究では、まず、A サブユニットを含まないヘロ毒素の大量調製を行った。すなわち、B サブユニットを発現するプラスミドを組み込んだ大腸菌の大量培養を行い、そこから毒素タンパクを抽出、各種クロマトグラフにより精製を行った。一度の操作により、およそ100 mg 程度の毒素が得られてくる。この操作を二回繰り返すことにより、200 mg 以上のタンパク質を単離した。タンパク質の純度などは、通常用いる SDS-PAGE ではなく、Native Gel による電気泳動により確認した。一方、クロホ3糖担持カルホシランテントリマーは、これまでの手法により調製されたものを用いた。すなわち、クロホ3糖誘導体とカルホシランテントリマーとを結合させ、保護基の変換と精製を行うことにより、各種テントリマー誘導体を調製した。これらのテントリマーは、何れも水溶性であり、溶液状態で毒素タンパク質との相互作用を測定できた。以下に用いたテントリマーの構造を示す(Fig 1)。Dumbbell(1)6 は、第一世代6個のクロホ3糖を担持していることを示している。また、これまでのところ、この Dumbbell(1)6 が合成的容易さと活性の高さから、リード化合物として選定している。

これらの化合物と単離精製した毒素タンパク質との相互作用を、等温滴定型マイクロカロリーメトリーによって測定した。以下に、一例としてその測定において得られたデータを示す(Fig 2)。

これは、ある濃度の毒素タンパク質溶液に、上述のテントリマー水溶液を滴下した際の滴定ピークと滴定曲線である。これらの曲線を付随の解析ソフトによりデータ処理することにより、各種パラメーターの決定が可能となる。現在、ヘースラインの補正等を含めて、詳細に検討している。

最後に、アクリコンにアミノ基を持つクロホ3糖誘導体の合成も行った。この化合物は、反応性の高いアミノ基をアクリコン部に持つため、各種誘導体化が可能で鍵中間体である。合成法は、これまで我々が開発してきた手法を応用した。3糖の構築には、カラクトース由来のヘンシルカラクトースアノメリンクロリトとラクトース由来の4'-位の水酸基が遊離となったヘンシルラクトース誘導体を用い、無水エーテル中、銀トリフレートに触媒として縮合させた。その結果、目的とした3糖誘導体1が効率良く調製できた。この誘導体のアクリコン部の末端二重結合に対して9-BBNを用いたヒドロホウ素化反応を行ったところ、反応は、効率良く進行し、予期したとおりの末端に水酸基が付加したアルコール体2を高収率で与えた。このアルコール体をメンルクロリトと反応させ、末端に脱離基を導入後、アミノ前駆体となるアント基に置換した。最後に、脱ヘンシル化とアント化を一気に行

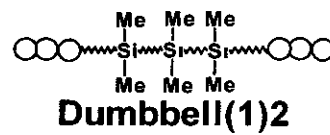
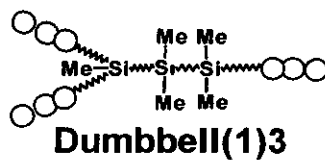
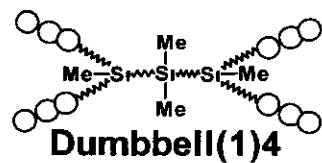
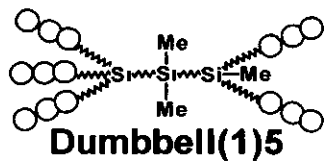
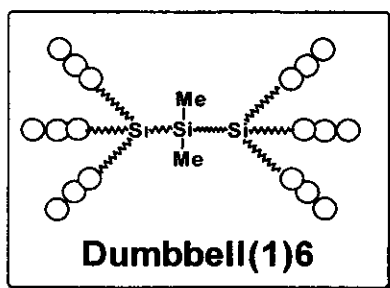


Fig 1

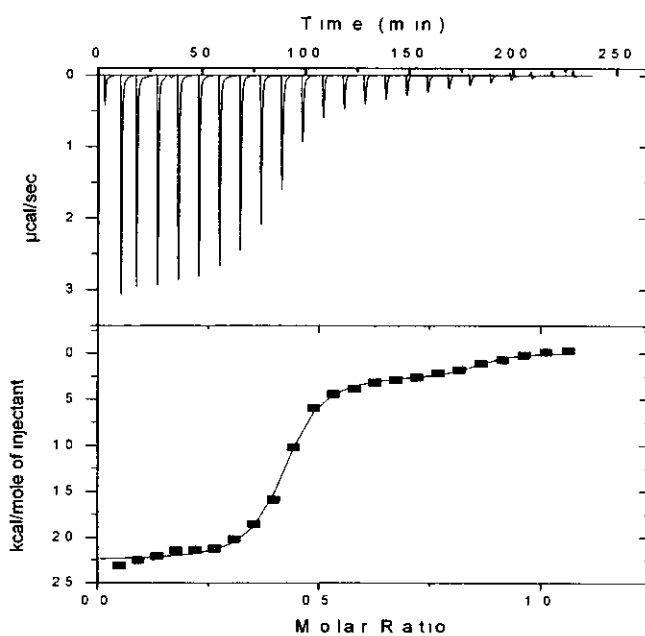
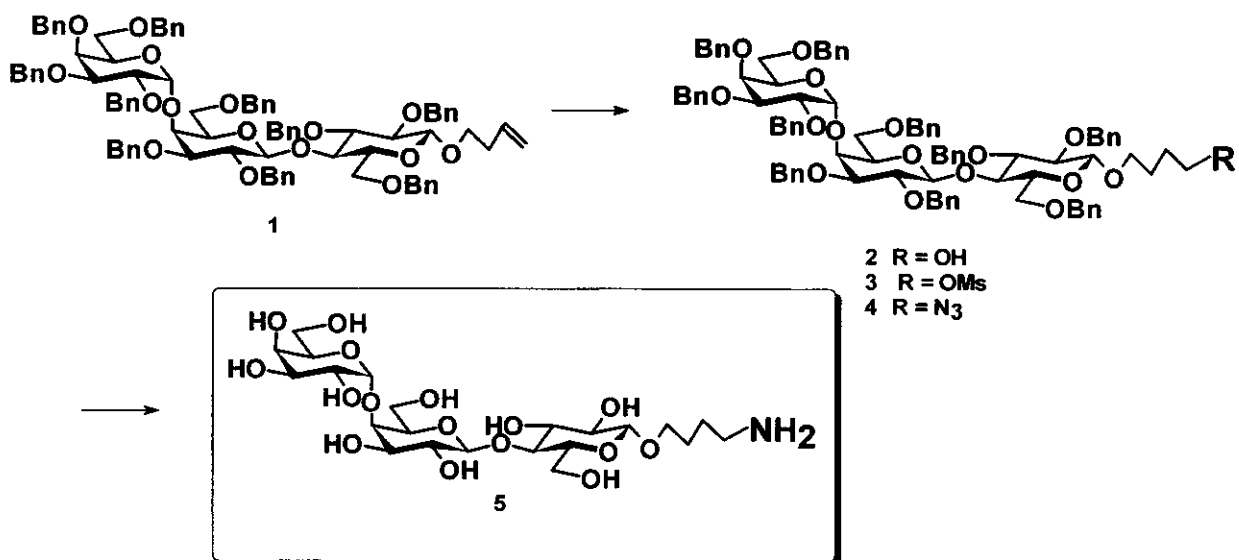


Fig 2



Scheme1

い、目的としたクロホ3糖のアミノ化合物5の調製を行った (Scheme1)。現在、この化合物の化学変換を検討中である。

## 成果

本派遣事業では、米国Duke大学化学科EJ Toone教授の下で大腸菌0157 H7が産生するへロ毒素の糖鎖を認識するサブユニットの調製と単離を行い、タンパク質の精製技術を習得した。また、得られたタンパク質とそのタンパク質の人工レセプターとみなすことかできるクロホ3糖含有カルホシランテントリマー群との結合における相互作用を、等温滴定カロリーメトリー分析により行った。その結果、テントリマー上に存在する糖鎖の個数と形状に活性相関が存在していることを推定した。このような相互作用を詳細に検討した例は無く、我々の研究かこれからも展開できると期待している。

### B-5 マンノース担持カルホシランテントリマーの設計技術開発に関する研究

担当 森 知紀

3, 4 および 6 分岐型カルホシランテントリマー骨格にマンノースおよびその二糖誘導体 (Man- $\alpha$ -1, 3-Man) を導入することで、六種類のマンノース担持カルホシランテントリマーを新規に合成した。

#### 【序】

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) はエイズとして知られる疾患の原因ウイルスである。HIV の感染は、ウイルス表面に存在する

gp120 分子が標的細胞表面に存在する CD4 分子と結合することから始まる。gp120 分子は、ポリペプチド部分の 24 ヶ所に N-結合型糖鎖が結合している糖タンパク質であり、糖鎖は gp120 の約半分を占めている。N-結合型糖鎖は、マンノースのオリゴ糖フラグメント (3~9 個) 構造が基本となっている。特に、gp120 には高マンノース型糖鎖が多く存在している。糖タンパク質のポリペプチド部分はコンパクトに折りたたまれているか、糖鎖部分はタンパク質表面で大きく伸展して存在する。そのため、gp120 は糖鎖で包まれたような分子であると考えられている。更に、HIV が外界と接するの、感染する際に標的細胞と結合するの、gp120 表面の糖鎖であり、この糖鎖上に多く存在するマンノースであるといえる。従って、HIV はマンノースの集積場と考えることか出来る。

一方、本プロジェクトにおいて埼玉大学ではクロホ3糖担持カルホシランテントリマーのへロ毒素中和活性やシアリルラクトース担持カルホシランテントリマーのインフルエンザウイルスへの接着といった種々の糖鎖を集積化させたカルホシランテントリマー製剤の設計技術開発に関する研究を行ってきている。昨年度の本研究報告書では、糖鎖構造の最適化としてクロホ3糖の先端二糖部分 (ガラヒオース Gal- $\alpha$ -1, 4-Gal) を合成し、それをカルホシランテントリマー骨格上に担持させ、病原性大腸菌 0-157 H7 が産生するへロ毒素に対する結合阻害活性が認められたことを報告している。

そこで本研究は、HIV (表面) のモデルとしてマンノースのその二糖

(Man- $\alpha$ -1,3-Man と以下略記することかある) 誘導体を合成し、カルホシランテントリマーに担持させクラスター化することでマンノースの人工的な集積場を構築し、従来の「酵素を標的」とする抗 HIV 剤ではなく「糖鎖を標的」とする新規の薬剤開発の可能性の検討を行うことを目的とする。今年度は、マンノースおよびその二糖誘導体の合

成と、それらを導入した糖鎖担持カルホシランテントリマーの合成について報告する。

### 【糖部分の合成】

Scheme 1 にマンノース単糖部分の合成を、Scheme 2 にマンノース二糖部分の合成を示した。

マンノース単糖誘導体については、常法によりマンノースのアセチル化を行い、グルコ三糖および昨年度本研究報告で記載したカラヒオース誘導体と同様の方法で糖の1位にオレフィン(本報告の場合、アリルアルコール)を導入し(2)、オレフィン部分をチオアセチル化(3)した。3のアリル基は、マンノースの1位と $\alpha$ -クリコシトを形成していることかわかった。これは、従来合成してきた一連の糖鎖担持カルホシランテントリマーにおいて、糖鎖とスペーサー部分か $\beta$ -クリコシトを形成していることと異なっている。

二糖誘導体は、Bromo2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside(4)を原料として、4と4から合成した4,6-Benzylidene-1,2-ethylidene- $\beta$ -D-mannopyranoside(6)をトリフルオロメタンスルホン酸銀存在下クリコシテーションを行

い $\alpha$ -1,3-結合を有するマンノース二糖(7)を合成した。保護基を全てアセチル基にした後、マンノース単糖の場合と同様の方法で糖の1位にアリル基を導入し、オレフィン部分をチオアセチル化して10を得た。単糖誘導体の場合と同様に、還元末端はアグリコン部分と $\alpha$ -クリコシトを形成している。

### 【マンノース担持カルホシランテントリマーの合成】

カルホシランテントリマー骨格として、埼玉大学で既に合成された典型的な三分岐型(Fan(0)3-Br)、四分岐型(Ball(0)4-Br)、および六分岐型(Dumbbell(1)6-Br)を導入反応に用いた。使用したカルホシランテントリマー骨格をFig. 1に示した。

マンノース単糖誘導体3およびマンノース二糖誘導体10をそれぞれ三種類のカルホシランテントリマー骨格に導入した。導入反応および脱保護反応はクロホ三糖およびカラヒオースの場合の実験方法を参考にして行った。これらの反応の一例(10をFan(0)3-Brに導入)をScheme 3に示した。他のテントリマー骨格およびマンノース単糖誘導体3についても同様の反応を行い、Fig. 2に示す六種類のマンノース担持カルホシランテントリマーを新規に合成した。

### 【結論】

マンノースおよびマンノース二糖誘導体を担持させた3, 4, および6分岐型のカルホシランテントリマーを新規に六種類合成した。糖のアグリコン部分はいずれも $\alpha$ -クリコシト結合を形成していることか