

実際に医薬品として使用するためには、グロボ三糖担持カルボシラン dendrimer の生体内での挙動を確認し毒性等についての厳密な調査が必要ではあるが、今回の研究により新たな薬剤開発への基本的コンセプトの一つを提案し得たものと考えている。

一方、最近、種々の糖鎖が生体内で毒素あるいはウイルスの感染作用において特異的かつ重要な機能を果たしていることが明らかにされつつある。したがって、カルボシラン dendrimer は、その末端に機能性糖鎖を担持することによって、標的とする毒素あるいはウイルス等にサイズ・形状などを合目的に分子設計するための担体として、研究的あるいは実用的観点から優れた材料であると考えられ、今後の発展が期待される。

謝辞

本研究は機能材料工学科、葛原弘美（元）教授の発案で始められました。ここに記して感謝致します。

本研究は平成14年度から厚生労働省科学研究補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）を受けて国立国際医療センター研究所部長、名取泰博博士、同室長、西川喜代孝博士、ジーエスプラッツ株式会社、平野弘之氏との共同研究として実施されました。記して感謝致します。マウスを用いる実験を行って頂きました奈良県立医科大、喜多英二教授に感謝致します。多くのご助言とペロ毒素とカルボシラン dendrimer の接着状態に関する計算をして頂きました持田製薬株式会社黒川美佐男博士、松末朋和氏に感謝致します。

文 献

- 1) D. Terunuma, T. Kato, R. Nishio, Y. Aoki, H. Nohira, K. Matsuoka, and H. Kuzuhara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **72**, 2129 (1999)
- 2) a) P. E. Stein, A. Boodhoo, G. J. Tyrrell, J. L. Brunton, and R. J. Read, *Nature*, **355**, 748 (1992);
b) H. Ling, A. Boodhoo, B. Hazes, M. D. Cummings, G. D. Armstrong, J. L. Brunton, and R. J. Read, *Biochemistry*, **37**, 1777 (1998)
- 3) a) A. Kiarash, B. Boyd, and C. A. Lingwood, *J. Biol. Chem.*, **269**, 11138 (1994);
b) B. Boyd, G. Magnusson, Z. Zhiuyan, and C. A. Lingwood, *Eur. J. Biochem.*, **223**, 873 (1994)
- 4) Y. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lönngren, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lönn, *J. Biol. Chem.*, **258**, 199 (1983)

- 5) a) G. D. Armstrong, E. Fodor, and R. Vanmaele, *J. Infect. Dis.*, 164, 1160 (1991);
 b) Y. Nishida, H. Dohi, H. Uzawa, and K. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.*, 39, 8681 (1998);
 c) H. Dohi, Y. Nishida, M. Mizuno, M. Shinkai, T. Kobayashi, T. Takeda, H. Uzawa, and K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 2053 (1999);
 d) P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, and D. R. Bundle, *Nature*, 403, 669 (2000);
 e) G. L. Mulvey, P. Marcato, P. I. Kitov, J. M. Sadowska, D. R. Bundle, and G. D. Armstrong, *J. Infect. Dis.*, 187, 640 (2003)
- 6) a) F. Zeng and S. C. Zimmerman, *Chem. Rev.*, 97, 1681 (1997);
 b) A. W. Bosman, H. M. Janssen, and E. W. Meijer, *Chem. Rev.*, 99, 1665 (1999);
 c) D. Astruc and F. Chardac, *Chem. Rev.*, 101, 2991 (2001);
 d) A. W. Made and P. W. N. Leeuwen, *J. Chem. Chem. Commun.*, 1400 (1992);
 e) H. Frey, C. Lach, and K. Lorenz, *Adv. Mater.*, 10, No.4, 279 (1998);
 f) J. P. Majoral and A. M. Caminade, *Chem. Rev.*, 99, 845 (1999);
 g) K. Lorenz, D. Holter, B. Stuhn, R. Mulhaupt, and H. Frey, *Adv. Mater.*, 8, No.5, 414 (1996);
 h) 土田隆樹, 島崎智恵美, 幡野健, 松岡浩司, 青木良夫, 野平博之, 江角保明, 照沼大陽, *高分子論文集*, 60, 561-568 (2003)
- 7) a) D. A. Tomaria, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith, *Polym. J.*, 17, 117 (1985);
 b) G. R. Newkome, Z.-Q. Yao, G. R. Baker, and V. K. Gupta, *J. Org. Chem.*, 50, 2003 (1985);
 c) K. Aoi, K. Itoh, M. Okada, *Macromolecules*, 28, 5391 (1995)
- 8) a) K. Matsuoka, M. Terabatake, Y. Esumi, D. Terunuma, and H. Kuzuhara, *Tetrahedron Letters*, 40, 7839-7842 (1999);
 b) K. Matsuoka, H. Kurosawa, Y. Esumi, D. Terunuma, and H. Kuzuhara, *Carbohydrate Res.*, 329, 765-772 (2000)
- 9) K. Nishikawa, K. Matsuoka, E. Kita, N. Okabe, M. Mizuguchi, K. Hino, S. Miyazawa, C. Yamasaki, J. Aoki, S. Takashima, Y. Yamakawa, M. Nishijima, D. Terunuma, H. Kuzuhara, Y. Natori, *PNAS*, 99, 7669-7674 (2002)

Advantages of Carbosilane Dendrimer as a Carbohydrate Scaffold – Application to Artificial Receptor of *E. Coli*, Influenza and Dengue Virus –

**K. Hatano,^{a,*} A. Yamada,^a T. Tetsuo,^a K. Matsuoka,^a D. Terunuma,^{a,*}
Y. Esumi,^b K. Nishikawa,^c Y. Natori,^c K. Hidari^d and Y. Suzuki^d**

^a*Department of Functional Materials Science, Faculty of Engineering, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan*

^b*The Institute of Physical and Chemical Research, 2-1 Hiroşawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan*

^c*Department of Clinical Pharmacology, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjyuku-ku, Tokyo, 162-8655, Japan*

^d*Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan*

E-mail: khatano@fms.saitama-u.ac.jp

The surface of eukaryotic cells is covered in an array of glycoconjugate such as glycoproteins and glycolipids. Carbohydrates in part of their glycoconjugates play a key role in cell adhesion process with protein of bacteria, viruses and toxins. We will report the successful syntheses of carbosilane dendrimer periphery functionalized such carbohydrates as globotriose, sialyllactose, lacto-*N*-tetraose, and results of its biological assays as artificial receptor against to Vero toxins producing *Escherichia Coli* O157:H7, hemagglutinin of influenza virus, and dengue virus.

Syntheses and Biological Assay of a Series of Lacto-*N*-neotetraose Cluster using Carbosilane Dendrimer Scaffolds

A. Yamada,^a K. Hatano,^a K. Matsuoka,^a Y. Esumi,^b C. Aoki,^c K. Hidari,^c Y. Suzuki,^c and D. Terunuma^{a,*}

^aDepartment of Functional Materials Science, Faculty of Engineering, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan

^bThe Institute of Physical and Chemical Research, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

^cDepartment of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan

E-mail: teru@fms.saitama-u.ac.jp

In recent years, dengue fever has become a major infection disease. The prevalence of dengue has increased scenically in decades. We have recently found that paragloboside and lacto-*N*-neotetraose blocked the uptake of dengue virus. Therefore lacto-*N*-neotetraose cluster compounds are expected as a candidate of artificial dengue virus inhibitor. Fundamental core structures of carbosilane dendrimers (Fan, Ball and Dumbbell shapes) were used as scaffolds for syntheses of glycoclusters (Fig. 1). The synthesis and biological assay of carbosilane dendrimers periphery functionalized lacto-*N*-neotetraose will be also described.

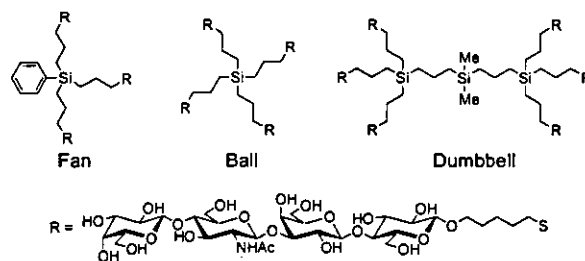


Fig. 1. A Series of Carbosilane Dendrimer periphery functionalized lacto-*N*-neotetraose

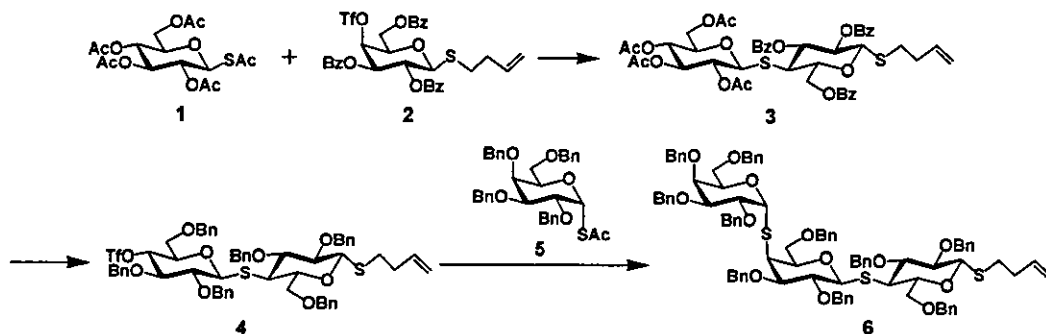
チオグリコシド型グロボ3糖誘導体の合成研究(2)

(埼玉大工・理研) ○黒澤直・小山哲夫・江角保明・幡野健・照沼大陽・松岡浩司

Synthetic studies of globotriaose analogues having interthioglycosidic bonds (2) (Fac. of Engineering, Saitama Univ., The Inst. of Phys. and Chem. Res. (RIKEN)) KUROSAWA, Sunao; KOYAMA, Tetsuo; ESUMI, Yasuaki; HATANO, Ken; TERUNUMA, Daiyo; MATSUOKA, Koji

病原性大腸菌 O157:H7 が産生するペロ毒素は腸管細胞表層上に存在する糖脂質の 1 つであるグロボトリオシルセラミドの糖鎖部分 (グロボ 3 糖) を特異的に認識し、接着する。その後、毒性を発揮するユニットが細胞内へ取り込まれ、発病する事が知られている。このグロボ 3 糖はペロ毒素のレセプターであり中和剤としての活用が期待され、その誘導体が利用されているが、O-グリコシド結合が生体内の加水分解酵素によって切断されてしまう可能性があるため、中和後の代謝系をつき止めるには至っていない。そこで本研究では、生体内においてグリコシダーゼ阻害剤として期待できる S-グリコシド結合型新規グロボ 3 糖誘導体の合成を目的とした。

グルコースの β -チオアセチル体 **1** と 1 位にブテニル基を導入したチオグリコシドのトリフレート **2** とをチオグリコシル化することにより β -S-グリコシド結合を有するセロピオース類似体 **3** を構築した。次いで **3** の 4' 位のみを遊離とした後、トリフレート化を行い **4** へと変換した。現在、目的化合物 **6** を構築するために、**4** とガラクトースの α -チオアセチル体 **5** とのチオグリコシル化反応を検討中である。



**糖鎖含有カルボシラン dendriマーの
合成研究 (VIII)
ー dendriマー中心元素の変化による
ペロ毒素阻害活性への効果ー**

(埼玉大工・理研[†]・国際医療セ研[‡]) ○山田明宏・幡野 健・松岡浩司・
江角保明[†]・西川喜代孝[‡]・名取泰博[‡]・照沼大陽

Synthetic Studies of Carbosilane Dendrimers Functionalized with Sugar Moieties (VIII) -Element Effect on Biological Assay of Dendrimers bearing Globotriaoses as Vero Toxin Neutralizer-
(Faculty of Engineering, Saitama University, [†]The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), [‡]Res. Institute, International Medical Center of Japan.) YAMADA, Akihiro; HATANO, Ken; MATSUOKA, Koji; ESUMI, Yasuaki; [†]NISHIKAWA, Kiyotaka; [‡]NATORI, Yasuhiro; [‡]TERUNUMA, Daiyo

病原性大腸菌 O157:H7 は、溶血性尿毒症症候群など深刻な被害を引き起こすペロ毒素を産生することが知られている。このペロ毒素が細胞表層に存在している糖脂質グロボトリオシルセラミドの糖鎖部分グロボ3糖を認識し接着することが感染の第1歩となる。

我々はこれまでに様々な形状・サイズのカルボシラン dendriマーを用いてグロボ3糖の集積化およびそのクラスター化合物群のペロ毒素への阻害活性評価を行ってきた。その結果、第1世代6分岐化合物 Dumbbell(1)6 (Fig. 1 EI=Si)が *in vitro* および *in vivo* においても高い阻害活性を示すことを見出している¹⁾。

今回、この Dumbbell(1)6 の中心ケイ素を炭素およびゲルマニウムで置換した新規グロボ3糖クラスター化合物 (Fig. 1 EI=C, Ge)の合成および評価を行うこととした。これらクラスター化合物の合成および中心元素によるペロ毒素阻害活性への効果について報告する予定である。

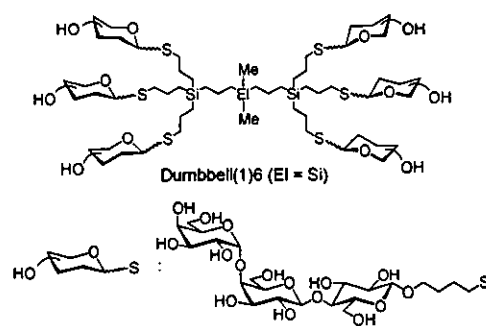


Fig. 1 Dendrimers bearing Globotriaoses

1) NISHIKAWA, K.; MATSUOKA, K. and TERUNUMA, D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 7669 (2002).

N-結合型糖ペプチドの基礎的な合成研究

(埼玉大工) ○松山恭子・鈴木美穂・小山哲夫・幡野健・照沼大陽・松岡浩司

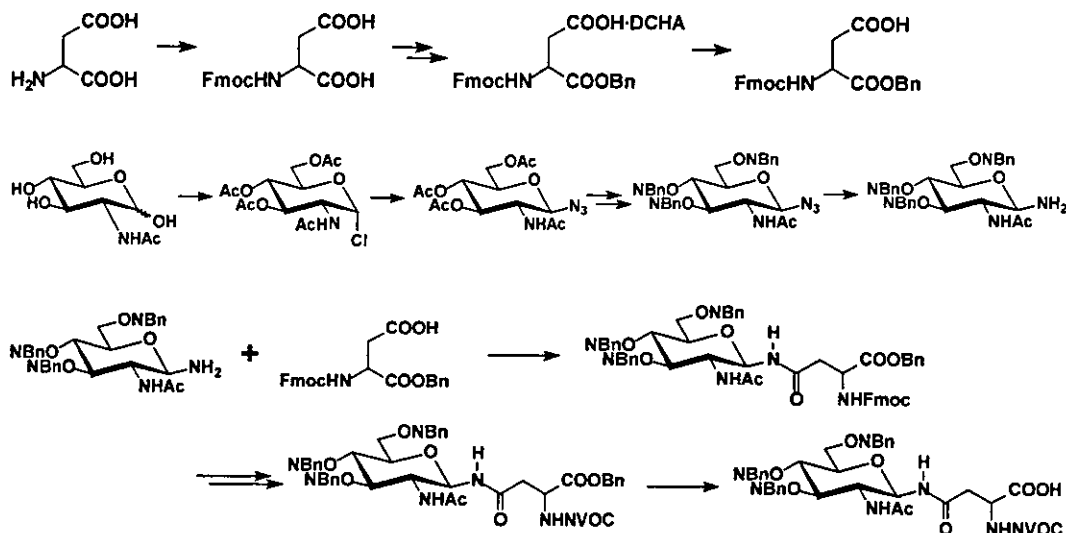
Primary synthetic studies of N-linked glycopeptide

(Faculty of engineering, Saitama university) MATSUYAMA, Kyoko; SUZUKI, Miho; KOYAMA, Tetsuo; HATANO, Ken; TERUNUMA, Daiyo; MATSUOKA, Koji

糖タンパク質は、生体内において酵素、輸送タンパク、受容体、ホルモン、構造タンパクなどとして存在し、さまざまな生命現象をつかさどっていることから、近年、糖タンパク質を医薬分野へ応用させる研究がさかんに行われている。このような背景から、どの糖鎖が、どのように機能しているのかを詳細に解明していくことが極めて重要である。

一方、一連の糖タンパク質の生合成経路において、糖鎖のタンパク質への結合位置や結合糖鎖の長さ、シーケンスは遺伝子支配を受けないため、その構造は不均一である。故に、特定の構造を持つ糖タンパク質の精製や構造決定は、しばしば困難であった。そのため、糖タンパク質の糖鎖構造の機能については、他の生体高分子と比較して研究のスピードが極めて遅いのが現状である。この問題の一つの解決方法として、有機合成の手法を用い特定の構造を持つ糖ペプチドを合成する手法が考えられる。本研究では、この合成研究の基盤となる、光分解反応によって脱保護が可能な 2-Nitrobenzyl 基(NBn 基)及び 4,5- Dimethoxy-2-nitrobenzyl 基(NVOC 基)を持つ新規糖ペプチドを合成することを目的とした。

L-Asp を出発物として、N 端を Fmoc 保護し、C 端カルボキシル基のみをベンジルエステル化したカルボン酸と、GlcNAc を出発物として、3,4,6 位を NBn 保護し、アノメリック位にアミノ基を導入したグリコシルアミンをそれぞれ合成し、2 つの化合物をカップリングさせることにより、糖アミノ酸を合成した。さらにアスパラギンの N 端 Fmoc 基を NVOC 基に変換し、最後に C 端ベンジルエステルを脱保護することにより、C 端が遊離となったグルコサミニルアスパラギンを得ることに成功した。構造決定は IR、NMR、元素分析により行った。現在、合成したグルコサミニルアスパラギンを用いたタンパク質合成について検討中である。



糖鎖デンドリマーの合成と酵素による

糖鎖伸長反応の検討

(¹埼玉大・工、²理研) ○金子礼奈¹・小山哲夫¹・江角保明²・幡野健¹・照沼大陽¹・松岡浩司¹

Chemoenzymatic Synthesis of Carbosilane Dendrimers Having Oligosaccharides (Faculty of Engineering, Saitama University, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)) KANEKO, Reina; KOYAMA, Tetsuo; ESUMI, Yasuaki; HATANO, Ken; TERUNUMA, Daiyo; MATSUOKA, Koji

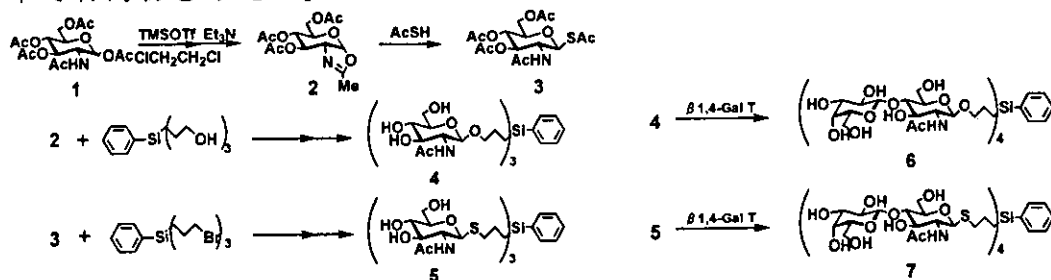
[緒言]

複合糖質として細胞表層に存在する糖鎖は、バクテリアやウイルスなどの様々な外来物質が細胞に接着する際や、細胞間相互作用の際にマーカーとしての役割を果たしている。それらの糖鎖そのものの活性はそれほど高くはないため、クラスター化することにより高い活性を発現していると考えられる。そこで、これらを模倣した人工糖鎖クラスターを構築することにより、この特性を利用しようと考えた。

糖鎖部位として、インフルエンザウイルスに認識されるシアリルラクトサミンのコア構造であり、癌細胞に特異的に発現するシアリル Le^x 抗原のコア構造でもある重要な2糖、N-アセチルラクトサミン(LacNAc)を選定した。しかし、LacNAcは高価で、化学的に合成するには多大な手間がかかる上、効率が低く、さらに分離精製も極めて困難である。一方、酵素を用いた合成は、一般に、簡便であり収率も良好なので、酵素を用いたデンドリマー上での糖鎖伸長反応を検討することとした。

[結果と考察]

化学的手法により、誘導体 **2**、**3** を合成し、2種類の新規の糖デンドリマー **4**、**5** を得た。さらに、糖転移酵素を用いて末端糖鎖の伸長を試みた。その結果、LacNAc 担持カルボシランデンドリマー **6**、**7** の合成に成功した。この方法は、以前報告した化学的手法に比べて、極めて簡便に高収率で目的物を与えた。



Scheme 1

新規ノイラミニダーゼ阻害剤の合成研究(I)

(¹埼玉大・工、²理研) ○坂本純一¹・小山哲夫¹・
江角保明²・幡野健¹・照沼太陽¹・松岡浩司¹

Synthetic study of novel neuraminidase inhibitors (I) (Faculty of Engineering, Saitama University, The Institute of Physical and Chemical Reserch (RIKEN)) SAKAMOTO, Jun-Ichi; KOYAMA, Tetsuo; ESUMI, Yasuaki; HATANO, Ken; TERUNUMA, Daiyo; MATSUOKA, Koji

【背景と目的】

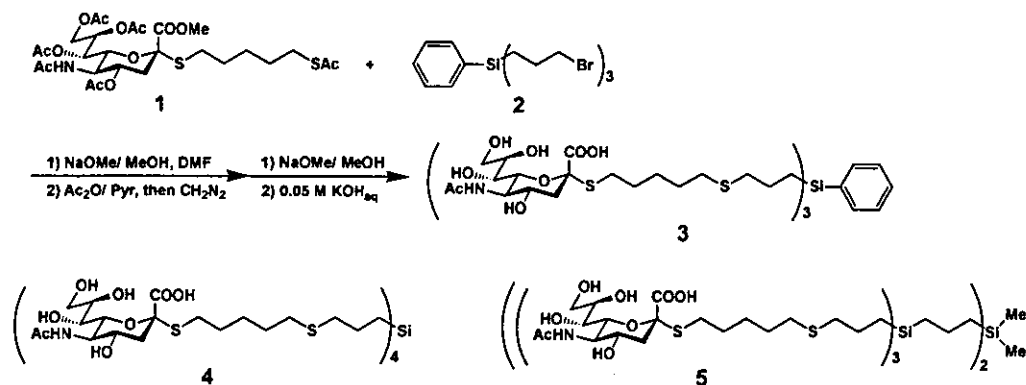
インフルエンザウイルスの感染には、ウイルスが持つヘマグルチニン(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)、これら2種類の糖タンパク質と、宿主細胞上の糖鎖末端を占めるシアル酸との特異的相互作用が重要である。HAが宿主細胞上のシアル酸を認識して結合することにより感染が始まり、細胞内で増殖したウイルスは細胞から遊離する際、結合しているシアル酸をNAで切断し、新たな細胞を求めて行くことが知られている。

本研究では、抗インフルエンザ薬としてのノイラミニダーゼ阻害剤の開発を目指し、天然のO-グリコシド結合型のシアル酸とは異なり加水分解により切断されず、NAの酵素活性部位を塞ぐことができると考えられるS-グリコシド結合型のシアル酸をカルボシランデンドリマー上にクラスター化した化合物を合成することを目的とする。

【結果と考察】

合成したシアル酸誘導体 **1** を3分岐のカルボシランデンドリマー **2** に導入した後、脱保護を行いシアル酸クラスター **3** を得た(Scheme 1)。4分岐、6分岐のシアル酸クラスター (**4**, **5**) も同様に合成した。

今後は合成した化合物群のNA阻害活性を評価し、その結果を分子設計にフィードバックしてデンドリマー骨格の最適化を行う予定である。



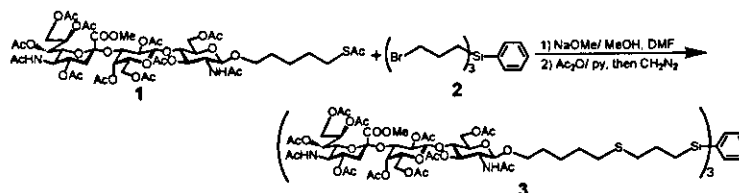
インフルエンザウイルス阻害能を 指向したシアリルラクトサミン担持 カルボシランデンドリマーの合成

(埼玉大工¹・医療機器センター²・理研³・静岡県立大薬⁴) ○森 知紀^{1,2}・
幡野 健¹・松岡浩司¹・江角保明³・左 一八⁴・鈴木康夫⁴・照沼大陽¹
Synthesis of Carbosilane Dendrimers Having Peripheral Sialyllactosamine
Pointing to Inhibition of Influenza Virus Cell Adhesion to the Host Cell
(Saitama Univ, Japan Association for the Advancement of Medical Equipment,
The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Univ. Shizuoka
School of Pharmaceutical Sciences) MORI, Tomonori; HATANO, Ken;
MATSUOKA, Koji; ESUMI, Yasuaki; HIDARI, Kazuya IPJ; SUZUKI, Yasuo;
TERUNUMA, Daiyo

【序】 インフルエンザウイルスは、宿主の細胞表層にクラスター化して存在している複合糖質の糖鎖部位であるシアリルラクトースおよびシアリルラクトサミンといった三糖構造を認識し、接着することにより生体に感染することが知られている。我々の研究室では、既に、シアリルラクトースをカルボシランデンドリマーに担持させ糖鎖を集積化させることで、インフルエンザウイルス阻害能を有する糖鎖クラスターの合成を行っている¹⁾。本発表では、インフルエンザウイルス阻害能が期待される新規糖鎖クラスターであるシアリルラクトサミン担持カルボシランデンドリマーの合成について報告する。

【結果・考察】 合成したシアリルラクトサミン誘導体(1)を三分岐型カルボシランデンドリマー骨格(2)に導入することによりシアリルラクトサミン担持カルボシランデンドリマー(3)を得た(Scheme 1)。NMRスペクトルによってキャラ

クター化を行い、三個のシアリルラクトサミン部分がデンドリマーの外



Scheme 1

面に存在する構造であることを確認した。分岐数の異なる他のカルボシランデンドリマー骨格への導入についても報告する予定である。

1) K. Matsuoka, et al., *Tetrahedron Lett.*, **42**, 3327-30 (2001).

Structural Analysis of the Interactions between Gb₃-Containing Linear Polymers That Neutralize Shiga Toxins and the Toxin B-Subunits

Miho Watanabe*, Kiyotaka Nishikawa** **, Koji Matsuoka***, Daiyo Terunuma***, ○Yasuhiro Natori*

*International Medical Center of Japan, **PRESTO, ***Saitama University

Shiga toxin (Stx), the major virulence factor of enterohemorrhagic *E. coli*, has a AB₅ holotoxin molecular structure. Stx binds via its B-subunit pentamer to the functional cell-surface receptor, globotriaosyl ceramide (Gb₃; Gal α (1-4)-Gal β (1-4)-Glc β 1-ceramide). Highly selective and potent binding of Stx to Gb₃ is attributed to the multiple interactions of the B-subunit pentamer with the trisaccharide moiety of Gb₃. Three binding sites to the trisaccharide are identified on each B-subunit, so that potentially 15 Gb₃ molecules could bind to the pentameric B-subunit.

Several Stx neutralizers in which the trisaccharide moiety of Gb₃ is combined with various core structures in multiple ways have been reported so far. We previously demonstrated that linear polymers of acrylamide with branches that consist of spacers and the trisaccharides at their termini (Gb₃-polymers) are potent Stx-neutralizers (Watanabe *et al*, *J Infect Dis* 189:360, 2004). The Gb₃-polymers specifically bound to Stx with high affinity, abolished its cytotoxicity in culture, and reduced the lethality of *E. coli* O157:H7 toward mice when orally administered after the establishment of the infection.

In the present study, we analyzed the essential structure of the Gb₃-polymers for their binding to Stx using the polymers with different density of the trisaccharide and different length of spacer between polyacrylamide chain and the trisaccharide moiety. In addition, we also analyzed the binding site of Gb₃-polymers on Stx using recombinant Stx B-subunit mutants designed to specifically and individually inactivate the three trisaccharide binding sites. For the analysis of the binding, we prepared histidine-tagged, wild type and mutant B-subunits of Stx1 and Stx2 (Stx1B and Stx2B), immobilized each of them on a Ni-fixed sensor chip, and measured the binding of Gb₃-polymers to the sensor chips by BIAcore system.

All types of Gb₃-polymers similarly bound to wild type Stx1B. In contrast, the binding affinity of Gb₃-polymers to wild type Stx2B was dependent on the trisaccharide density and the length of the spacers: a decrease of the density by a twelfth caused an increase of K_D value by ten times, and shortening of the spacer resulted in a hundred times higher K_D value. These results suggest that the interaction of Gb₃-polymers with Stx1B is different from that with Stx2B.

Then we tested the binding of Gb₃-polymers to Stx1B and Stx2B mutants. Gb₃-polymers bound to Stx1B mutants altered at sites 1 or site 3 similarly to wild Stx1B, whereas their binding to site 2 mutants of Stx1B was weak, especially in the case of the polymers with less density of the trisaccharide. In addition, Gb₃-polymers bound to a double mutant at site 1/site 3, in which only site 2 is intact, with wild type affinity. These results indicate that site 2 plays a central role for the binding of Gb₃-polymers to Stx1B. The importance of site 2 of Stx1B for binding to Gb₃ and some trisaccharide-containing Stx neutralizers has been suggested so far. On the other hand, Gb₃-polymers strongly bound to site 2 mutants of Stx2B, but not to site 1 nor site 3 mutants, when the trisaccharide density was low. These results indicate that site 2 has little effect on the binding of Gb₃-polymers to Stx2B.

Based on these observations, we conclude that the essential structure of Gb₃-polymers for neutralizing Stx2 is different from that for neutralizing Stx1, and that their binding sites on the toxins are also different. For the development of better Stx-neutralizers and absorbents for clinical use, it would be necessary to study their interactions with Stx2, the subtype clinically more relevant than Stx1.

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：埼玉大学工学部教授 照沼大陽

発表者：埼玉大学工学部助教授 松岡浩司

【結言】 糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンと呼ばれる複合糖質中の糖鎖は、細胞表層上において脂質二重膜の外側にアンテナのように存在し、種々の外来物質との相互作用に密接に関わっている。すなわち、それら糖鎖が、外来物質のレセプターとしてマーカーの役割を果たしている。しかしながら、糖鎖自身のリガンドに対するアフィニティーは、それほど高くなく、糖鎖が集積化することにより、より高い活性を発現していると考えられている。近年の研究により、それら糖タンパク質および糖脂質は、細胞表層上においてラフトあるいはパッチと呼ばれるミクロドメインを形成し、本来活性の低い糖鎖の機能を著しく向上させていることが分かってきた。本研究では、そのような複合糖質中の糖鎖の機能を人工的に効率よく発現するため、細胞を一つの巨大分子として捕らえ、それらを模倣した多価型の糖鎖含有化合物の開発を試みた。このような背景に対して多価型の化合物を構築し、さらに薬剤として利用するためには、設計段階において糖鎖を担持する骨格の選定がきわめて重要となる。我々は、それまでに液晶分子や包接機能を持つシクロデキストリンをカルボシランデンドリマー上に集積化させ、機能の向上を達成していた。[1, 2]そこで、生体に対する活性が低く中性分子と推定されるカルボシランデンドリマーを糖鎖の担持骨格として選定した。この選定は、分子の形状と大きささらに糖鎖の担持個数を厳密に制御できる利点も兼ね備えていた。一方、標的分子として病原性大腸菌 O157:H7 が産生するベロ毒素(VT)を選択した。VTによる疾患は、通常、対症療法による治癒が一般的であるが、一部の患者においては、出血性大腸炎から溶血性尿毒症症候群(Hemolytic Uremic Syndrome; HUS)など重篤な合併症が併発し、死亡するケースも報告されている。Vero 毒素産生性大腸菌 (Verotoxin-producing *Escherichia coli*; VTEC) が産生する VT は、最近、志賀毒素産生性大腸菌(Shigatoxin-producing *Escherichia coli*; STEC)が産生する志賀毒素(Stx)とも呼ばれ、何れも毒性を発揮する 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 箇所存在する多価型の毒素である。[3]この多価の結合部位を有する Stxs は、まず B サブユニットが、宿主細胞表層に存在するグロボトリオシルセラミド(Gb3; Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-ceramide)を特異的に認識し、結合した後に、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ進入後、A サブユニットがその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が可能となれば、感染やさらなる伝染の進行を未然に防ぐことができると考えられる。本研究では、この過程を効果的に阻害する化合物群の開発を目的として、多価型のカルボシランデンドリマーの合成と、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た。また、この手法を標的としてインフルエンザウィルスにも展開し、その有効性を確認したので併せて報告したい。

【結果・考察】 糖鎖を担持するコア分子となるカルボシランデンドリマー群は、合成世代・形状・分岐数を精密にコントロールしながら調製した。一方、活性部位となる糖鎖構造は、Gb3 の糖鎖部分であるグロボ 3 糖構造 (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-)であるため、容易に入手でき、且安価な D-ガラクトースと D-ラクトースを原料とし、一段階のグリコシル化反応により二分子間の α -グリコシド結合を形成させ、3 糖骨格の構築を行った。その後、種々のカルボシランデンドリマーとグロボ 3 糖を結合し、その表層をグロボ 3 糖で被覆したユニークな一連の糖鎖クラスター群を構築した。また、より合成が簡易なガラビオース(Gal α 1-4Gal β 1-)を含有するカルボシランデンドリマーの構築についても行った。それらの活性評価については、in vitro および in vivo の双方について検討し、デンドリマーの世代および形状と糖鎖個数との活性相関があることが判明した。[4] 一方、この手法をインフルエンザウィルスに対する抗ウィルス薬あるいは治療薬として利用できないかと考え、分子設計・合成・評価を行った。インフルエンザウィルスもウィルス表面にスパイク状になった糖鎖を認識す

るタンパク質が多数存在している。はじめの標的としては、そのうちのヘマグルチニン(Hemagglutinin; HA)と呼ばれる 3 量体を形成しているレクチン様タンパク質とした。この HA は、シアリルラクトース (Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ1-)と呼ばれる 3 糖構造を認識するため、この構造の構築を行い、上述の手法によりカルボシランデンドリマーに導入した。このようなシアリルラクトースを表層に担持したカルボシランデンドリマー群の活性評価も行ったので報告する。

【結論】 以上の結果、本研究で目的とした糖鎖をカルボシランデンドリマーに担持し、分子の形状・分岐数を精密にコントロールするコンセプトの有効性を明らかとすることができた。

- 1) D. Terunuma, *et al.*, *Chem. Lett.*, pp. 59 (1998).
- 2) K. Matsuoka, *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **71**, 2709 (1998).
- 3) H. Ling, *et al.*, *Biochemistry*, **37**, 1777 (1998).
- 4) K. Nishikawa, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7669 (2002).

sulfate and heparan sulfate-derived disaccharides were determined from *Drosophila*. It is very interesting that the profiles of disaccharides generated by chondroitinase treatment of *Drosophila* material resemble those generated from treatment of human bikunin, a blood plasma protein component of the inter-alpha-trypsin inhibitor family. Heparin lyases treatment of glycosaminoglycans from *Drosophila* released unsaturated disaccharides bearing *N*-, 2-*O*- and 6-*O*-sulfated species, including mono-, di- and tri-sulfated forms like vertebrates. Further examinations revealed that *Drosophila* showed tissue- and stage- specific modifications of glycosaminoglycans. Therefore, *Drosophila* has been recognized as a useful model organism for the structural and functional study on glycosaminoglycans/proteoglycans. The next question for us to consider is to determine whether *Drosophila* could provide a model system for the other glycoconjugates. In this study, we established a sensitive method for compositional analysis of amino and neutral sugars in very small amount of *Drosophila*. Ten flies were applied to pretreatment procedure, then, under one tenth of the materials were loaded onto a HPLC system for monosaccharide determination. We found that the monosaccharide compositions of *Drosophila* glycoconjugates mainly consist of GalN, GlcN, Fuc, Gal, Man and Xyl as vertebrate systems. Furthermore, we are planning to try micro-determination of N-linked oligosaccharides in *Drosophila* for the investigation of functional glycomics using this excellent model organism.

(499) Analysis of Glycosaminoglycan Oligosaccharides by Ion-Spray Mass Spectrometry

Kaoru Kojima^{1,2}, Atsushi Kon¹, Ikuko Kakizaki¹, Yoshiaki Kudo¹ and Keiichi Takagaki¹

[1] Department of Biochemistry, Hirosaki University School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki 036-8562, Japan, [2] KUSHIRO Research Laboratory, KAKUHIRO Co.Ltd, 13-1 Otanoshike, Kushiro 084-0917, Japan.

Proteoglycan, a complex glycoconjugate that is composed of core protein and glycosaminoglycan (GAG) chains, are major component of extracellular matrix. It is known that GAG has various important physiological and pathological functions including cell migration, morphogenesis, inflammation, and wound healing. GAGs are sulfated polysaccharides made of repeating uronyl-N-acetylhexosamine disaccharide units. The length and sulfation pattern of GAG are different in each kind of cell, reflecting the diversities of PG functions. Therefore, exact determination of molecular length and extent of sulfation are crucial for the elucidation of GAG functions. Recently, it has been reported that ion-spray mass spectrometry is useful tool for structural analysis of hyaluronan oligosaccharides (4-52 mer). In this study, we have applied ion-spray mass spectrometry for analysis of GAG including hyaluronan and chondroitin 6-sulfate oligosaccharides. GAG oligosaccharides were prepared by enzyme digestion with testicular hyaluronidase, followed by purification utilizing HPLC (Polyamin-II column). Each oligosaccharide with various molecular weights was applied to quadrupole mass spectrometer equipped with an atmospheric-pressure ionization source (API-100 and 300, PE-SCIEX). All mass spectra of each oligosaccharides were infused into ionization probe and operated in the negative ion mode. As a result, the molecular weight of each hyaluronan oligosaccharide, determined by ion-spray mass spectrometry, coincides with their theoretical mass, and up to 142-mer was applicable to this method. Furthermore, chondroitin 6-sulfate oligosaccharide was labeled with 2-aminopyridine to elucidate its structure and subjected to MS/MS analysis. The presence of the sulfate residue was confirmed and its binding site was also exactly determined. Therefore, these results strongly indicated that analysis by ion-spray mass spectrometry is useful method for the structural determination of GAG oligosaccharides.

(500) Synthesis and Biological Evaluation of Glycopolymer as Shiga toxin Neutralizer

Koji Matsuoka¹, Atsushi Miyagawa¹, Kiyotaka Nishikawa², Miho Watanabe², Yasuhiro Natori², Eiji Kita³, Tetsuo Koyama¹, Ken Hatano¹ and Daiyo Terunuma¹

[1] Dept. Functional Materials Sci., Saitama Univ., Saitama 337-8570, Japan, [2] Dept. Clin. Pharmacol., Res. Inst., International Med. Cent. Jpn, Tokyo 162-8655, Japan, [3] Dept. Bacteriol., Nara Med. Univ., Nara 634-8521, Japan.

Oligosaccharide chains in glycoconjugates such as glycoproteins, glycolipids, and proteoglycans play an important role in biological systems. Globotriaosyl ceramide (Gb3: Gal α 1-4Gal α 1-4Glc β 1-Cer), one of the major glycolipids, is known as a carbohydrate-based receptor for Shiga toxins (Stxs), which are produced by Shiga toxin producing *Escherichia*

coli (STEC) O157:H7. Stxs are belonging to bacterial AB5 toxin families and are classified into Stx1 and Stx2. The toxins have a number of binding sites in the holotoxin, therefore, the toxin displays multivalency. As to enhancement of weak binding efficiency between Gb3--Stx by means of sugar cluster effect, we had reported design and synthesis of a new class of glycodendrimers as the toxin neutralizer¹⁾ and demonstrated those potential activities against both Stxs in vitro as well as vivo²⁾. One of the glycodendrimers having six trisaccharide moieties of Gb3 and appropriate spacer length from the branching point of the dendritic core scaffold showed complete neutralization potency both Stxs, and rescue of mice infected by native *E. coli* O157:H7. These results strongly suggested that multivalent-type globotriaosyl residues and topologically controlled positions of the sugar residues were key factor. In this paper, we describe the synthetic approach for construction of different type of glycocluster as a potential Stx neutralizer and their biological responses against Stxs as well as *E. coli* O157:H7. In brief, glycopolymers having lactosyl or globotriaosyl residue as the carbohydrate receptor for Stxs were prepared via usual radial polymerization protocol from slightly modified carbohydrate monomers, respectively³⁾. Since these glycopolymers showed efficient solubility in water, biological activities of the polymers for a couple of Stxs were evaluated in homogeneous conditions. The results of the glycopolymers--Stxs interaction in vitro showed high binding affinity and strong inhibitory potency of cytotoxic activities of the toxins. In addition, oral administration of the glycopolymers into mice was tested after infection by *E. coli* O157:H7⁴⁾. These results will also be presented. References 1) K. Matsuoka, et al., Tetrahedron Lett., 40 (1999) 7839-7842. 2) K. Nishikawa, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 (2002) 7669-7674. 3) A. Miyagawa, et al., Carbohydr. Polym. (2004) in press. 4) M. Watanabe, et al., J. Infect. Dis., 189 (2004) 360-368.

(501) Semisynthesis of Homogeneously Glycosylated Human Interleukin-2

Yu-Ying Yang, Thomas J. Tolbert and Chi-Huey Wong

The Department of Chemistry and Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA.

Human Interleukin-2 (IL-2), also known as T-cell growth factor, is a powerful mediator in immune response. Purified human IL-2 derived from healthy donors was found to exist in three major forms. Two of them were glycosylated polypeptide species (16.5 kDa), in which their glycan structures have been identified as NeuAc(ϵ 2-3)Gal(ϵ 1-3)GalNAc and NeuAc(ϵ 2-3)Gal(ϵ 1-3)[NeuAc(ϵ 2-6)]GalNAc. The third major form (14.5kDa) is unglycosylated and has been utilized to treat cancer patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. Several experimental results have shown that modifying unglycosylated IL-2 with polar groups, sugars for example, can significantly improve its solubility at neutral pH and increase half-life time in plasma. These improved physical properties of human IL-2, which may lead to low-dosage regimen in its clinical use, were expected to be able to ameliorate the dose-related adverse effects happening in those cancer patients administrated with unglycosylated IL-2. Our interest is to attach IL-2 protein fragment with its native sugars, and explore their function in stimulating various immune cells. To this end, various glycopeptide thioesters were synthesized and chemical native ligation was employed to chemoselectively couple these synthetic glycopeptide thioesters to the expressed protein IL-2 fragment. An established quantitative IL-2 assay will be used to examine the bioactivities of these glycosylated IL-2.

(502) Development of Methodology to Identify Cell-Surface Glycoproteins

Vinita Marathe and Bruce A Macher

San Francisco State University, 1600 Holloway Avenue, San Francisco, CA-94132.

Cell surface proteins are important therapeutic targets and have been exploited for targeted treatment in several diseases including cancer. Thus, identification of cell surface proteins as therapeutic targets has been a prime area of interest in the proteomics field. However, technical challenges have hampered efforts to effectively isolate and identify cell surface proteins. Numerous studies in the literature have shown that many cell surface proteins are glycosylated. Therefore, a strategy integrating lectin affinity chromatography into a proteomics approach for the identification of cell surface proteins would seem to have merit. We present an initial assessment of protocols that use a selection of lectins to enrich for membrane glycoproteins that can be effectively coupled with protein identification via

culture medium was assayed by ELISA. Production of T cell-derived IFN- γ was also strongly suppressed by treatment with mucin. Taken together, these results suggest that mucins enhance the production of PGE₂ from macrophages, leading to suppress Th1-related immune responses and augment Th2-related immune responses.

(137) Heparan Sulfate Proteoglycans Interact with Neurocan and Promote Neurite Outgrowth from Cerebellar Granule Cells

Yuki Hosoki¹, Kaoru Akira¹, Munetoyo Toda¹, Mizue Inoue¹, Shinji Fushiki², Atsuhiko Oohira³, Minoru Okayama¹ and Hiroshi Nakada¹

[1] Dept. biotechnology, Kyoto Sangyo Univ, [2] Department of Pathology and Applied Neurobiology, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science, [3] Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center.

It is known that syndecan-3 is a membrane bound heparan sulfate proteoglycans (HSPG) and expressed on the growing axonal surface during brain development. First, we performed a ligand overlay assay with biotinylated soluble syndecan-3 to detect binding proteins for syndecan-3. One of the binding proteins was purified from mouse brains and analyzed biochemically. Treatment of the binding protein with chondroitinase ABC produced three molecular species exhibiting molecular weights of 260 kDa, 150 kDa and 130 kDa on SDS-PAGE. Sequence analysis of 260 kDa and 130 kDa components was revealed to be the same amino terminal sequence, i.e. DQPTQDTTA, which coincided with that of neurocan, indicating that these core proteins correspond to the whole molecule and the N-terminal fragment of neurocan, respectively. The N-terminal amino acid sequence of the 150 kDa core protein was LRAPKLWLP, which coincided with the N-terminal sequence of the C-terminal fragment of neurocan. Next, we asked whether neurocan could bind to other HSPGs or not. We tried to isolate neurocan binding protein using neurocan-Sepharose. Eluates from neurocan-Sepharose was subjected to SDS-PAGE before or after treatment with heparitinase I followed by immunoblotting. The major core band with 62 kDa was revealed to be glypican-1 by sequence analysis and immunoreactivity to anti-glypican-1 antibodies. It has been reported that these HSPGs interact with some extracellular matrix components and these interactions are probably involved in some biological functions such as cell adhesion, cell migration and neurite outgrowth. Thus, we investigated binding property between HSPGs and neurocan and its biological significance. The binding of these HSPGs to neurocan was prevented by treatment of these HSPGs with heparitinases I and II, but not by treatment of neurocan with chondroitinase ABC. Scatchard plot analysis indicated that neurocan has two binding sites for these HSPGs with different affinities. It is known that neurocan in the rodent brain is proteolytically processed with age into N- and C-terminal fragments. When a mixture of whole neurocan and N- and C-terminal fragments prepared from neonatal mouse brains or recombinant N- and C-terminal fragments were applied to a heparin column, the whole molecule and both the N- and C-terminal fragments bound to heparin. Centrifugation cell adhesion assay indicated that both the N- and C-terminal neurocan fragments could interact with these HSPGs expressed on the cell surface. To examine the biological significance of HSPGs-neurocan interaction, cerebellar granule cells expressing these HSPGs were cultured on the recombinant neurocan substrate. Prominent increase of neurite outgrowth was observed on the wells coated with the C-terminal neurocan fragment, but not with the N-terminal one. Neurite outgrowth-promoting activity was inhibited by pre-treatment of neurocan substrate with heparin or addition of heparitinase I into culture medium. These results suggest that HSPGs such as syndecan-3 and glypican-1 serve as the cell surface receptor of neurocan, and that the interaction of these HSPGs with neurocan through its C-terminal domain is involved in the promotion of neurite outgrowth*. * K. Akita et al. Biochem. J., in press

(138) Synthesis and Property of Carbosilane Dendrimers Functionalizing Peripheral Mannose Moieties

Tomonori Mori^{1,2}, Ken Hatano¹, Koji Matsuoka¹, Yasuaki Esumi³, Eric J. Toone⁴ and Daiyo Terunuma¹

[1] Department of Functional Materials Science, Saitama University, [2] Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, [3] The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), [4] Department of Chemistry, Duke University.

Mannose is one of the important component of N-glycans. In particular, the N-glycan, highly accumulating mannose, is called high mannose type. Clustering peripheral mannose on carbosilane dendrimer would be able to mimic the high mannose type N-glycan and the cell surface of HIV or

bacteria. In our ongoing synthetic study of neoglycoconjugates (artificial glycoconjugates), synthetic assembly of carbohydrate moieties using carbosilane dendrimers have been achieved using lactose, globotriaose, sialyllactose, and so on. So we are described herein the preparation and characterization of a series of carbosilane dendrimers carrying mannose and its oligomeric derivatives, which have α -glycoside bond of the aglycon moiety. Mannose monosaccharide derivative, 1-O-(3'-acetylthiopropyl)-D-mannopyranose (Man), was synthesized by three steps reactions from D-mannose; acetylation, 1-allylation, and then thioacetylation of olefin moiety. Mannose disaccharide derivative, 1-O-(3'-acetylthiopropyl)-2,4,6-tri-O-acetyl-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-mannopyranosyl) D-mannopyranose (Man-1,3-Man), was synthesized starting from D-mannose. Bromo 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-mannopyranose (Man-Br) was prepared from D-mannose. This is the key compound for the disaccharide synthesis because Man-Br itself was used as a glycosyl donor and 4,6-O-benzylidene-1,2-O-ethylidene-D-mannopyranose was synthesized by three steps reactions from Man-Br and used as a glycosyl acceptor of the mannose disaccharide derivative. Protecting groups of this disaccharide derivative were exchanged for acetyl group. Man-1,3-Man was synthesized after 1-allylation and following thioacetylation of olefin moiety. Mannose derivatives were introduced in carbosilane dendrimers of which generation was the zero and first. The zero generation carbosilane dendrimer scaffolds, which consist of Fan(0)3 type (three-branched) and Ball(0)4 type (four-branched), were synthesized using triallylphenylsilane and tetraallylsilane by following three steps reactions, hydroxylation, mesylation, and bromination. On the other hand, the first generation carbosilane dendrimer scaffold was prepared allylation of dichlorodimethylsilane, next hydrosilylation having the first generation skeleton, following reactions were the same as the zero generation carbosilane dendrimer scaffolds. This type of dendrimer was named Dumbbell(1)6 type (six-branched). Introduction of Man and Man-1,3-Man to carbosilane dendrimer scaffolds were done on the condition of Zemplen's manner, that is, using sodium methoxide/ methanol and N,N-dimethylformamide. As a result, six types of carbosilane dendrimers were functionalized by acetyl-protected derivatives of mannose or mannose disaccharide (Man-1,3-Man). Yields of the introduction of mannose monosaccharide type carbosilane dendrimers were 62-76 %, and those of Man-1,3-Man were 30-35 %. Deprotected products were synthesized by deacetylation using sodium methoxide/ methanol, then saponification to afford corresponding carbosilane dendrimers having peripheral mannose and mannose disaccharide, and purified by gel filtration. All six types of carbosilane dendrimers functionalized peripheral mannose moieties were synthesized and characterized by the measurements of ¹H and ¹³C NMR, and high resolution mass spectrometry. NMR showed that the α -glycoside bond between the anomeric position of mannose and the aglycon moiety is kept after the formation of carbosilane dendrimer and deacetylation. Isothermal titration calorimetry (ITC) was done for assuming binding assay between carbosilane dendrimer and concanavalin A (Con A). It was found that carbosilane dendrimers were binding to Con A more than free mannose (Man-OMe) and mannose disaccharide (Man-1,3-Man-OMe).

(139) An Endogenous Heparin-binding Growth Factor, Pleiotrophin, Mediates Neuritogenic Activity of Embryonic Pig Brain-derived Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate Hybrid Chains Toward Mouse Hippocampal Neurons in Culture

Xingfeng Bao¹, Tadahisa Mikami¹, Shuhei Yamada¹, Takashi Muramatsu^{2,3} and Kazuyuki Sugahara¹

[1] Department of Biochemistry, Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan, [2] Department of Health Science, Faculty of Psychological and Physical Sciences, Aichi Gakuin University, Nisshin, Japan, [3] Department of Biochemistry,

Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan.

Chondroitin sulfate/dermatan sulfate (CS/DS) chains, major heterogenous polysaccharides of the extracellular matrix in the central nervous system, play important roles in neuronal cell adhesion, migration and neurite formation (1,2). CS/DS hybrid chains purified from embryonic pig brains (E-CS/DS) bind various growth factors and promote neurite outgrowth toward cultured embryonic mouse hippocampal neurons (3). However, the mechanism underlying the neuritogenic activity of the E-CS/DS chains is poorly understood. Here, we show that pleiotrophin, a heparin-binding growth factor, is the predominant binding partner for E-CS/DS in the membrane-associated protein fraction of neonatal rat brain, and is produced by the hippocampal cell culture system. Subfractions of E-CS/DS, separated using a pleiotrophin-immobilized affinity column, exhibited distinct effects

シアリルラクトサミン担持カルボシランデンドリマーの合成

(埼玉大¹・医療機器センター²・理研³・静岡県立大薬⁴) ○森 知紀^{1,2}・
 幡野 健¹・松岡 浩司¹・江角 保明³・左 一八⁴・鈴木 康夫⁴・照沼 大陽¹

Synthesis of Carbosilane Dendrimers Having Peripheral Sialyllactosamine

Tomonori Mori^{1,2}, Ken Hatano¹, Koji Matsuoka¹, Yasuaki Esumi³,

Kazuya Hidari⁴, Yasuo Suzuki⁴, and Daiyo Terunuma¹

¹Department of Functional Materials Science, Faculty of Engineering, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, ²Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, ³The Institution of Physical and Chemical Research (RIKEN), and ⁴Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences

Peripheral sialyllactosamine clustered on a carbosilane dendrimer would be able to be developed as new potential anti-influenza drugs or influenza virus-trapping agents. It is described herein the preparation and characterization of a carbosilane dendrimer having three peripheral sialyllactosamine moiety.

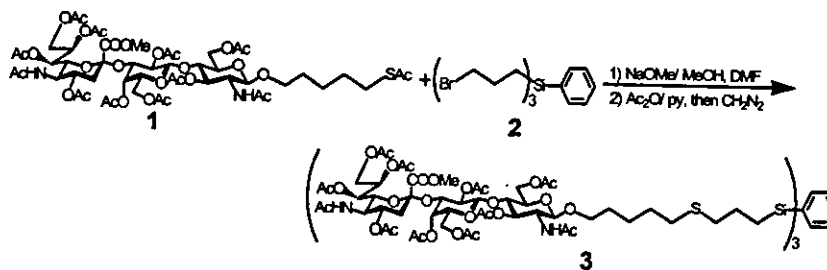
[序] インフルエンザウイルスは、宿主の細胞表層にクラスター化して存在している複合糖質の糖鎖部位であるシアリルラクトースおよびシアリルラクトサミンといった三糖構造を認識し、接着することにより生体に感染することが知られている。我々の研究室では、既に、シアリルラクトースをカルボシランデンドリマーに担持させ糖鎖を集積化させることで、インフルエンザウイルス阻害能を有する糖鎖クラスターの合成を行っている¹⁾。本発表では、インフルエンザウイルス阻害能が期待される新規糖鎖クラスターであるシアリルラクトサミン担持カルボシランデンドリマーの合成について報告する。

[結果・考察] *N*-アセチルノイラミン酸と D-ラクトースを原料としてシアリルラクトサミン誘導体(1)を合成した。1を三分岐型 (Fan(0)3型) カルボシランデンドリマー骨格

(2)に導入することによりシアリルラクトサミン担持カルボシランデンドリマー(3)を得た (Scheme 1)。

NMR スペクトル

によってキャラクタリゼーションを行い、三個のシアリルラクトサミン部分がデンドリマーの外面に存在する構造であることを確認した。他のカルボシランデンドリマー骨格への導入についても報告する予定である。



Scheme 1

1) K. Matsuoka, H. Oka, T. Koyama, Y. Esumi, and D. Terunuma, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 3327-30 (2001).

糖鎖含有カルボシラン dendリマーの合成研究 (VII)

(埼玉大工・理研^a・静岡県立大薬^b・国立国際医療センター^c) ○山田明宏・幡野 健
松岡浩司・照沼大陽・江角保明^a・左 一八^b・鈴木康夫^b・西川喜代孝^c・名取泰博^c

Synthetic Studies of Carbosilane Dendrimers Functionalized with Sugar Moieties (VII)
Akihiro YAMADA, Ken HATANO, Koji MATSUOKA, Daiyo TERUNUMA, Yasuaki ESUMI^a, Kazuya HIDARI^b, Yasuo SUZUKI^b, Kiyotaka NISHIKAWA^c, Yasuhiro NATORI^c (Department of Functional Materials Science, Faculty of Engineering, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan; ^aThe Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN); ^bDepartment of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences; ^cDepartment of Clinical Pharmacology, Research Institute, International Medical Center of Japan)

We have recently found that lactoneotetraose blocked the uptake of dengue virus. In the course of our investigation, we have interested in the preparation of the carbosilane dendrimer having lactoneotetraose derivative. The preparation and biological assay of carbosilane dendrimer having lactoneotetraose derivatives will be discussed in this paper.

<緒言>近年、糖鎖のもつ生理活性を高効率で発現させる糖鎖クラスター効果が注目を集め、様々な支持体を用いた糖鎖クラスター化合物の構築が盛んに行われている。これまで我々は有機ケイ素化合物であるカルボシラン dendリマーを支持体としてグロボ3糖やシアリルラクトースなど生理活性糖鎖の集積化を行ってきた。

カルボシラン dendリマーは世代の拡張や分岐数・鎖長の制御が容易であるなどの特徴がある。この為、カルボシラン dendリマーを用いて糖鎖を集積化した場合、標的とするウイルス・毒素の糖鎖結合部位に適した分子設計がナノオーダーで可能であり、新たな糖鎖製剤となることが期待できる。実際、我々はグロボ3糖担持カルボシラン dendリマーがペロ毒素に対し *in vivo* においても高い阻害活性を示すことを既に見出している。本研究では Dengue ウイルスと接着することが明らかとなったラクトネオテトラオースを合成しカルボシラン dendリマーへの集積化を行い、クラスター化合物の生物学的特性の評価を行うこととした。

<結果・考察>支持体となるカルボシラン dendリマーは Fig. 1 に示すファン型、ボール型、ダンベル型を基本骨格として合成を行った。糖鎖ラクトネオテトラオース誘導体は D-ラクトースを出発物として合成を行った。支持体と糖鎖誘導体の結合反応を行うことでクラスター化合物群を合成し、それぞれの生物学的特性を評価した。これらクラスター化合物群の合成および生理活性評価の詳細について報告する。

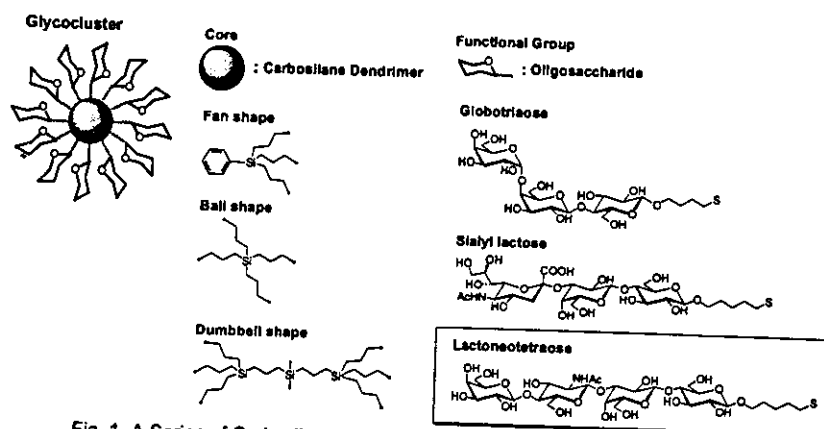


Fig. 1 A Series of Carbosilane Dendrimers Functionalized with Sugar Moieties

P-4 グロボ三糖含有カルボシラン dendrimer ライブラリの構築

(埼玉大学・工) ○小山哲夫・山田明宏・幡野健・松岡浩司・照沼大陽
 (国立国際医療センター) 名取泰博・西川喜代孝
 (理化学研究所) 江角保明

【はじめに】

我々の研究グループでは以前から、高分子の一つの形態で樹木状の構造を持つ「 dendrimer」と「糖鎖」との複合材料に関して研究を行ってきた。その中でも病原性大腸菌 O-157:H7 が作り出すペロ毒素を中和する効果が期待できる「グロボ3糖 (Gb3)」に注目し、これを dendrimer 表面上に集積化することによる「クラスター効果」がペロ毒素の阻害活性与える影響について検討を行っている。

ペロ毒素は右 (Fig. 1) に示すような構造であり、細胞表面上の Gb3 構造 (Fig. 2) を認識して細胞に接着する B サブユニットと、細胞接着後に毒性を発現する A サブユニットからなっている。B サブユニットに対し、適切な位置関係で Gb3 を与えると B サブユニットの細胞表面への接着が阻害され、感染を防ぐことが出来るはずである。

これまでの研究の結果、ペロ毒素中和効果は中心部分の dendrimer の構造に大きく依存する事が明らかとなった。 dendrimer の構造によって Gb3 同士の位置関係が決定され、B サブユニットとの接着の相互作用が左右されるというものである。

本研究では、中心部分の dendrimer の構造を変化させたうえでペロ毒素との相互作用を検討し、中和効果に関するライブラリの構築を目指している。

【実験】

目的物の合成は、中心となる dendrimer 部分と末端の Gb3 構造に分けて行った。

1) Gb3 誘導体の合成

Gb3 の合成はガラクトースを出発物質とするグリコシル供与体とラクトースを出発物質とするグリコシル受容体を結合させて行い、脱保護とアセチル化を経て dendrimer とのスペーサーとなるブテニル基を導入した。その後、誘導体のオレフィン末端をチオベンジル化して所定の Gb3 誘導体を合成した (Scheme 1)。

2) dendrimer コア分子の合成

今回合成を試みた分子の中心 (コア) 構造は「ダンベル」の形をした dendrimer を用いた。中心が Si-Et₂ であり従来の Si-Me₂ に比べて疎水場の影響の変化を比較するための第 1 世代 dendrimer・Diethyl-Dumbbell(1)-6、同じダンベル形でも dendrimer の世代と末端数が大きい第 2 世代 dendrimer・Dumbbell(2)-18 の 2 分子を合成し、末端をプロモ基とした (Scheme 2)。

3) Gb3 誘導体 dendrimer コア分子への導入

液体アンモニア中、ナトリウム存在下で Gb3 誘導体の dendrimer コア分子への導入反応を行った (Scheme 3)。

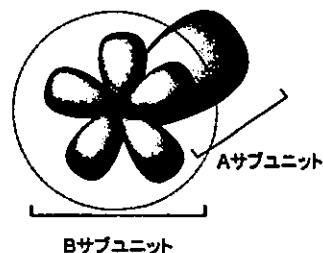


Fig. 1 ペロ毒素の構造概略図

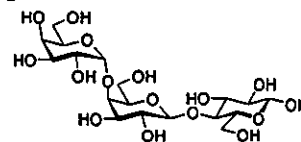
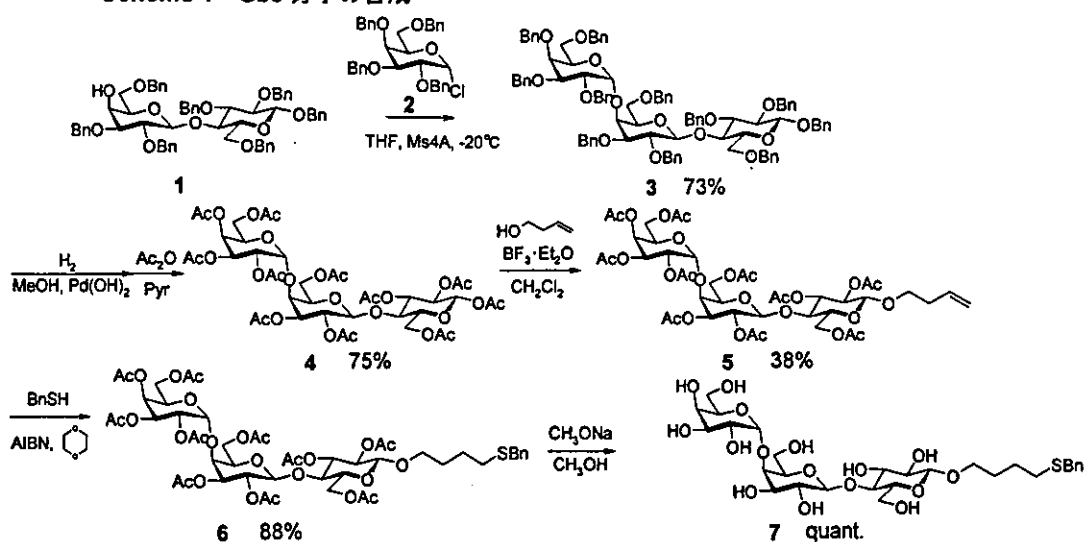
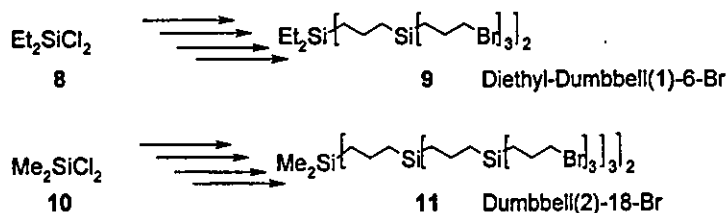


Fig. 2 グロボ3糖の構造

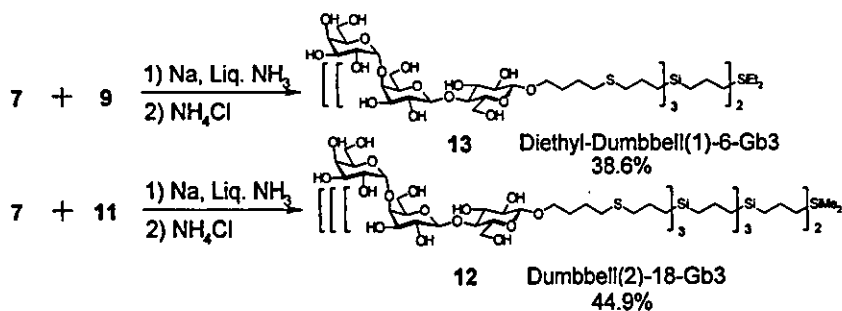
Scheme 1 Gb3 分子の合成



Scheme 2 デンドリマーコア分子の合成



Scheme 3 デンドリマーへの Gb3 の導入



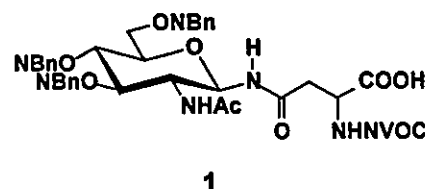
【結果】

分子の構造確認は ¹H-NMR・¹³C-NMR・MALDI-TOF マススペクトルで行った。今後、国立国際医療センターにおいて今回合成した分子とペロ毒素との相互作用について *in vitro* と *in vivo* の試験を行う予定であり、結果の詳細については当日報告する。

参考文献

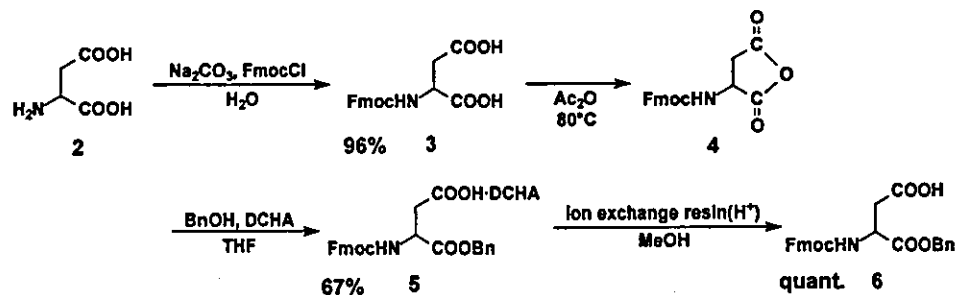
- 1) K. Nishikawa, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7669-7674, (2002).
- 2) K. Matsuoka, *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 7839-7842, (1999).
- 3) 竹澤ら, 第 83 回有機合成シンポジウム講演要旨集, 33-36, (2003).

糖タンパク質は、生体内において酵素、輸送タンパク、受容体、ホルモン、構造タンパクなどとして存在し、さまざまな生命現象をつかさどっている。ゆえに、種々の糖タンパク質の機能解明は、医療などの分野において利用するために必要不可欠である。一方、一連の糖タンパク質の生合成経路において、糖鎖のタンパク質への結合位置や結合糖鎖の長さ、シークエンスが一定ではないという構造の不均一性から、特定の構造を持つ糖タンパク質の精製や構造決定は困難であった。また、そのことにより糖タンパク質の糖鎖構造の機能については、他の生体高分子と比較して研究のスピードが遅いのが現状である。この問題の一つの解決方法として、有機合成の手法を用い特定の構造を持つ糖ペプチドを合成する手法が考えられる。本研究では、この合成研究の基盤となる、光によって容易に脱保護が可能な 2-Nitrobenzyl 基(NBn 基)及び 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl 基(NVOC 基)を持つ新規糖ペプチドの合成について報告する。



I. L-アスパラギン酸誘導体の合成

L-アスパラギン酸誘導体合成においては、アミノ保護基として Fmoc 基(9-fluorenylmethoxycarbonyl 基)を採用した。Fmoc 基はアミノ酸のラセミ化を防ぐとともに、ピペリジンなどの弱い塩基で簡単に脱保護ができるという利点を持っている。L-アスパラギン酸 2 を出発物として、アミノ基を FmocCl を用いてカルバメート 3 とした後¹⁾、ジカルボン酸の分子内脱水反応により環状無水物 4 へと変換した。さらに、ベンジルアルコールとジシクロヘキシルアミン(DCHA)を用い、C 端に相当するカルボキシル基をベンジルエステル化し、側鎖のカルボキシル基をジシクロヘキシルアミン塩へと誘導した。この塩に陽イオン交換樹脂を作用させることにより脱塩し、L-アスパラギン酸誘導体 6 を得た。



Scheme 1. Synthesis of L-aspartic acid derivatives.

II. N-アセチルグルコサミン誘導体の合成

N-アセチル-D-グルコサミンを出発物として、AcCl を用いて α -クロライド 8 に変換後、を DMF 中 80°C で NaN_3 を用いた $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応により β -アジド 10 を得た²⁾。8 の合成反応時に副生成物として完全アセチル化された 9 が生成するが、10 の合成反応が終了した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製で取り除くことができる。さらに Zenplén 法による脱アセチル化後、3,4,6 位を 2-ニトロベンジル化して 11 を得た。11 に対して、 PPh_3 を作用させることによりアジド基の還元反応を行い、グリコシルアミン 12 を得た³⁾。