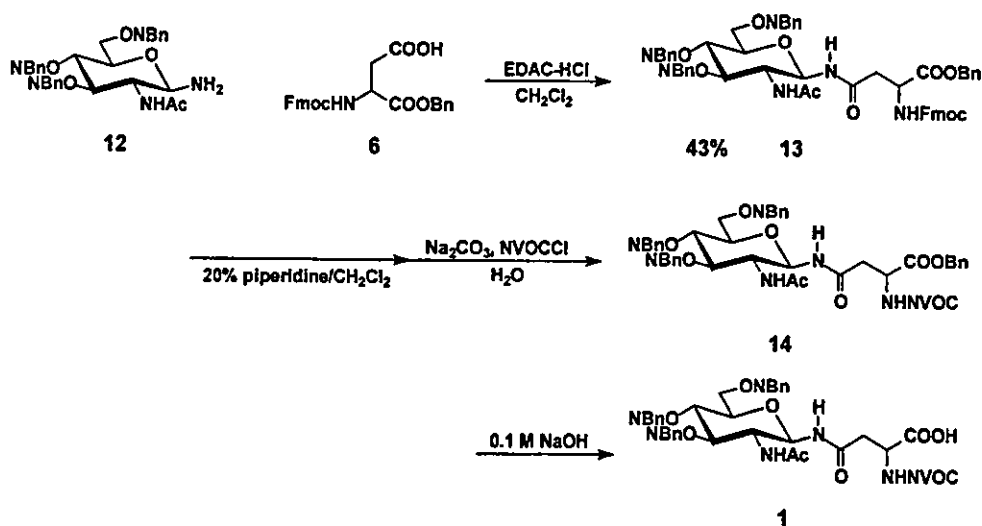


Scheme 2. Synthesis of *N*-acetylglucosamine derivatives.

III. カップリングと各保護基の変換

L-Asp 誘導体であるカルボン酸 **6** と、*N*-アセチルグルコサミン誘導体であるグリコシルアミン **12** から、EDAC-HCl⁴⁾を用いてカップリング反応を行うことにより、糖ペプチド **13** を得た。**13** に対して 20% piperidine/CH₂Cl₂ 溶液を作用させることにより脱 Fmoc 化し、さらに NVOCCl を用いて新たにアミノ酸部分のアミノ基を保護することにより、化合物 **14** を得た。次いで、0.1 M NaOH を用いて加水分解によりベンジルエステルを脱保護し、目的とする化合物 **1** を得た。



Scheme 3. Synthesis of glycopeptide **1**

IV. 結語

以上の合成法により、光で脱保護することが可能な 2-Nitrobenzyl 基と、4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl 基を有する新規糖ペプチドの合成に成功した。構造解析は ¹H NMR、¹³C NMR、IR、元素分析により行った。目的化合物 **1** のタンパク質への導入については、現在進行中である。

参考文献

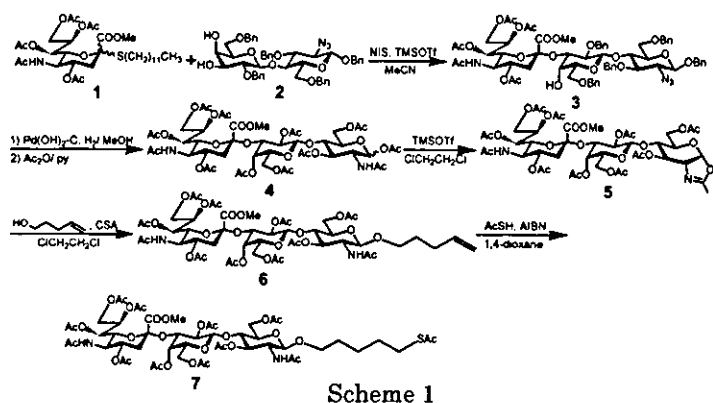
- 1) J. Martinez, J. C. Tolle, M. Bodanszky, *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 3596-3598
- 2) C. Augé, C. Gautheron, H. Pora, *Carbohydr. Res.*, **1989**, *193*, 288-293
- 3) S. Nagarajan, B. Ganem, *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 5044-5046
- 4) J. C. Sheehan, J. Preston, P. A. Cruickshank, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 2492-2493

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研究

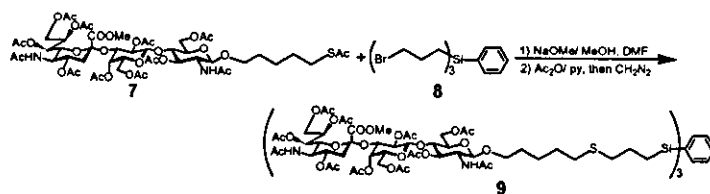
(埼玉大¹・医療機器センター²・理研³・静岡県立大薬⁴)○森 知紀^{1,2}、幡野 健¹、松岡 浩司¹、江角 保明³、左 一八⁴、
鈴木 康夫⁴、照沼 大陽¹

[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から3段階の反応で合成した(1)と、D-ラクトースから9段階の反応を経て得られた(2)から三糖誘導体(3)を合成した。保護基のアセチル基への置換(4)、オキサゾリン誘導体(5)を経て4-ペンテン-1-オールと反応させアノマー位にオレフィンを導入した(6)後、AIBN存在下でチオ酢酸と反応させることにより、デンドリマー導入のための前駆体(7)を合成した(Scheme 1)。



Scheme 1



Scheme 2

(Scheme 2)。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。

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

Synthetic Studies 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, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan, ²Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, ³The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), and ⁴Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences)

¹Tel and Fax: +81-48-858-3535, E-mail: tmori@fms.saitama-u.ac.jp

Key Word: carbosilane dendrimer/ glycocluster/ sialyllactosamine/ sialic acid/ thioacetate/ influenza virus

Abstract: The sialyllactosamine sequence, which composes of Neu5Ac(α2→3or 6)Gal(β1→4)GlcNAc-, is known as one of the receptor of hemagglutinin on the surface of the influenza virus. 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.

多価型ペロ毒素中和剤の開発

埼玉大工 ○松岡浩司、宮川淳、幡野健、照沼大陽
 国立国際医療セ 西川喜代孝、渡邊美帆、名取泰博
 奈良県医大 喜多英二

【緒言】 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。本研究では、先述の複合等質中の糖鎖の機能を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、それらを模倣した糖鎖含有高分子の合成と評価を行った。標的分子として病原性大腸菌 O157:H7 が産生するペロ毒素を選択した。Vero 毒素産生性大腸菌 (Verotoxin-producing *Escherichia coli*; VTEC) が産生するペロ毒素(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。¹⁾ 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。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てきた。その化合物群は、合成世代により分子量と表層官能基数が厳密に制御できるカルボシランデンドリマーをコアとし、その表層を 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 種類のペロ毒素双方に対して、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。^{2),3)} そこで、本研究では、さらにその方法論を発展させ、グロボ 3 糖を含む水溶性高分子に展開し、生物活性についても検討を行うこととした。

【結果・考察】 目的とする糖質高分子を合成するにあたり、グロボ 3 糖構造の構築は、これまで利用してきた手法を利用した。すなわち、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。その過程において、グリコシル化およびその後の保護基の変換などを考慮しながら、それぞれ数段階の反応工程によりガラクトース由来の糖供与体およびラクトース由来の糖受容体を合成した。得られた糖受容体と糖供与体とのグリコシル化反応は、 α -グリコシド結合を優先的に生成させるために、低温下、ジエチルエーテルを溶媒とする手法を用いた。その結果、反応は効率良く進行し、目的とするグロボ 3 糖誘導体の完全ベンジルエーテル保護体を与えた。次に、保護基の変換を

Development of Verotoxin Neutralizer having Multivalent-type Carbohydrate Chains

Koji MATSUOKA¹, Atsushi MIYAGAWA¹, Ken HATANO¹, Daiyo TERUNUMA¹, Kiyotaka NISHIKAWA², Miho WATANABE², Yasuhiro NATORI², and Eiji KITA³ (¹Dept. Functional Materials Sci., Saitama Univ., Saitama 338-8570, Japan, ²Dept. Clin. Pharmacol., Res. Inst., International Med. Cent. Jpn., Tokyo 162-8655, Japan, ³Dept. Bacteriol., Nara Med. Univ., Nara 634-8521, Japan)

¹Phone & Fax: +81-48-858-3099, E-mail: koji@fms.saitama-u.ac.jp

Key Word: verotoxins/ globotriaose/ carbohydrates/ glycoconjugates/ glycopolymers/ radical polymerization

Abstract: We describe herein the synthetic approach for development of potential verotoxin neutralizer and their biological responses against verotoxins as well as *E. coli* O157:H7. In brief, glycopolymers having lactosyl or globotriaosyl residues as a receptor for verotoxin were prepared via usual radial polymerization protocol from slightly modified carbohydrate monomers, respectively. Since these glycopolymers showed efficient solubility in water, biological activities of the polymers for a couple of verotoxins were evaluated in homogeneous conditions. The results of the glycopolymers—verotoxins 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:H7. These results will also be presented.

行った。この際、その後の反応工程において利用する末端二重結合が含まれていたため、バーチ還元反応を利用した。すなわち、金属ナトリウムが溶解した液体アンモニア溶液と基質を処理することにより、脱保護を達成した。次いで、一旦、遊離となった水酸基をアセチル基で保護し、末端の二重結合の更なる化学変換を試みた。その理由として、我々はこれまでに単純アルケニル基の重合反応を種々行ってきたが、単独重合する基質の合成には成功していない。すなわち、単純オレフィンの重合性(反応性)が低いと推定している。その問題点を回避するために、共役系の二重結合とみなせるアクリルアミド型重合性置換基を合成し、単独重合することを確認している。これにより、糖鎖密度と糖鎖の自由度をコントロールした化合物群が得られると期待できる。具体的な手法は、以下のとおりである。まず、上述の単純オレフィンに対してアミノエタンチオールをラジカル的に付加させた。この反応は、アンチマルコフニコフ型の付加反応となり、末端にアミノ基が露出する。この露出したアミノ基をアクリル酸クロリドにより処理することで、アクリルアミド構造の構築が完了した。このようにして、単純オレフィン型とアクリルアミド型の異なるアグリコンを含む2種類の水溶性の重合性グロボ3糖誘導体の合成が完了した。得られた糖鎖モノマーを単独重合、あるいはアクリルアミドと共重合することにより水溶性の糖質高分子の合成を達成した。これら高分子中の糖鎖含量は¹H-NMRの積分比から推定し、分子量はSEC法を用いて解析した。⁴⁾

得られた化合物群の生物活性評価を *in vitro* および *in vivo* の双方の系において行った。⁵⁾まず、糖鎖高分子とペロ毒素(Stx-1 および Stx-2)との解離定数(K_D)の測定を行った。解析には、BIAcore システムを用いた。その結果、コントロールとして用いたラクトース含有糖質高分子は、Stx-1 および Stx-2 の双方の毒素に対して全く結合を示さなかった。すなわち、末端 α -結合したガラクトース残基の重要性が再確認された。一方、グロボ3糖を含む糖質高分子は、糖鎖濃度(高分子の濃度ではなく、糖鎖残基濃度において比較することにより糖鎖含有量で比較ができる)に換算して非常に強い結合能を示した。また、Stx-1 に対する解離定数は、何れも同程度の活性であったのに対して、Stx-2 に対しては単独重合した糖鎖密度の最も高い糖質高分子が最も高い活性を示した。このことから、活性と高分子中の糖鎖密度においても相関関係が有りそうである。次に、放射ラベル施した毒素を用いた活性評価を行った。その結果、ラクトースを含む糖質高分子は、濃度を非常に高くした場合においても、Stx-1 および Stx-2 の双方の毒素に対して全く中和能を示さなかった。それに対し、グロボ3糖を含む高分子は、Stx-1 および Stx-2 の双方の毒素に対して、強い活性を示した。最後に、低栄養食餌によりカロリーコントロールしたマウスを用いた個体レベルの活性評価を行った。具体的には、生の大腸菌 O157:H7 を経口投与し、3日目から5日目まで、一日2回、コントロールマウスには生理食塩水、各種糖質高分子の経口投与をそれぞれ行った。その結果、コントロールのマウスはおよそ9日で全滅するのに対し、グロボ3糖を含有する糖質高分子を経口投与したマウスは、ほぼ全ての個体において、一ヶ月以上の生存が確認された。すなわち、致死量の毒素が、経口投与によって導入された糖質高分子により、完全に中和されたことを示唆している。

以上のように、グロボ3糖を含む水溶性糖質高分子の合成、ならびにそれらとタンパク質との相互作用を、具体的に *in vitro* および *in vivo* の双方の系において評価できることを示した。今後も他の生理活性糖鎖とタンパク質、さらに他の物質などに展開したいと考えている。

- 1) H. Ling, A. Boodhoo, B. Hazes, M. D. Cummings, G. D. Armstrong, J. L. Brunton, and R. J. Read, *Biochemistry*, **37**, 1777 (1998).
- 2) K. Matsuoka, M. Terabatake, Y. Esumi, D. Terunuma, H. Kuzuhara, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 7839 (1999).
- 3) 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, and Y. Natori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7669 (2002).
- 4) A. Miyagawa, H. Kurosawa, T. Watanabe, T. Koyama, D. Terunuma, and K. Matsuoka, *Carbohydr. Polym.*, in press.
- 5) M. Watanabe, K. Matsuoka, E. Kita, K. Igai, N. Higashi, A. Miyagawa, T. Watanabe, R. Yanoshita, Y. Samejima, D. Terunuma, Y. Natori, and K. Nishikawa, *J. Infect. Dis.*, **189**, 360 (2004).

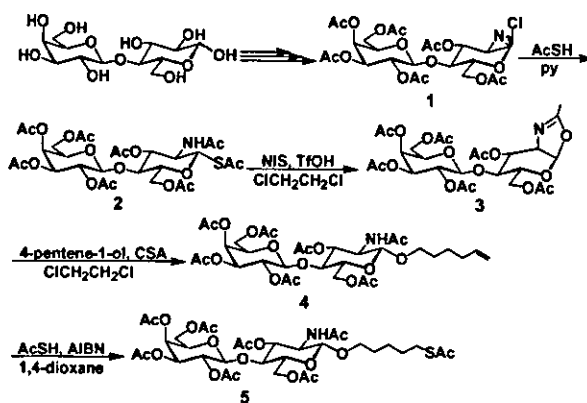
N-アセチルラクトサミン担持カルボシランデンドリマーの合成

(埼玉大¹・医療機器センター²・北大院理³・理研⁴・静岡県立大薬⁵)

○幡野 健¹、森 知紀^{1,2}、大田和 拓己³、松岡 浩司¹、江角 保明⁴、照沼 大陽¹、
左 一八⁵、鈴木 康夫⁵

【目的】 *N*-アセチルラクトサミンは、糖タンパク質および糖脂質において重要なコア構造として知られている二糖である。我々は Lemieux ら¹⁾により報告されている中間体 **1** から *N*-アセチルラクトサミンの付加価値の高い誘導体へと効率良く変換することに成功した²⁾。本研究では、*N*-アセチルラクトサミンをカルボシランデンドリマー上にクラスター化させることで細胞表層に存在する糖鎖およびその機能を模倣することを目的とした。

【結果と考察】 D-ラクトースから5段階の反応を経て中間体であるアジドクロライド(**1**)を Lemieux らの方法に従い合成した。チオ酢酸をピリジン中で反応させることによって、アジドの還元的アセトアミド化と同時に AcS⁻の S_N2 型反応も進行し、一段階の反応でアセトアミドチオアセテート(**2**)を得た。**2** からオキサソリン誘導体(**3**)を経て 4-pentene-1-ol と反応させアノマー位にオレフィンを導入した後、AIBN 存在

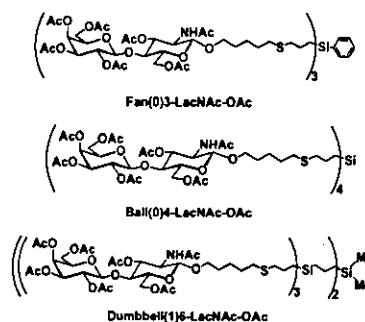


下でチオ酢酸と反応させることにより、デンドリマー導入のための前駆体(**5**)を合成した。**5** を形状の異なる三種類のカルボシランデンドリマーに導入することにより *N*-アセチルラクトサミン担持カルボシランデンドリマーを得た。NMR および MS スペクトルの解析により、それぞれの構造決定を行った。脱保護したカルボシランデンドリマー群は、インフルエンザウイルスに対する阻害剤として期待が持たれる化合物である。

1) R. U. Lemieux and R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.*, **57**, 1244-51 (1979).

2) K. Matsuoka, T. Ohtawa, H. Hinou, T. Koyama, Y. Esumi,

S.-I. Nishimura, K. Hatano, and D. Terunuma, *Tetrahedron Lett.*, **44**,
3617-20 (2003).



Syntheses of Carbosilane Dendrimers bearing *N*-Acetylglucosamines

Ken HATANO¹, Tomonori MORI^{1,2}, Takumi OHTAWA³, Koji MATSUOKA¹, Yasuaki ESUMI⁴, Daiyo TERUNUMA¹, Kazuya HIDARI⁵, and Yasuo SUZUKI⁵ (¹Department of Functional Materials Science, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan, ²Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, ³Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, ⁴The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), ⁵Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences) Tel & Fax: 048-858-3535, E-mail: khatano@fms.saitama-u.ac.jp

Key Word: Carbosilane / Dendrimer / Influenza / *N*-Acetylglucosamine / Cluster / Inhibitor

Abstract: We designed carbosilane dendrimers bearing *N*-acetylglucosamines as an inhibitor of influenza virus. Three different core structures of carbosilane dendrimer having *N*-acetylglucosamines were prepared. The preparations and biological assay of the carbosilane dendrimer derivatives will be discussed in this paper.

マンノースおよびその二糖によって機能化した
カルボシランデンドリマーの合成と性質

埼玉大¹・医療機器センター²・理研³・Duke Univ.⁴

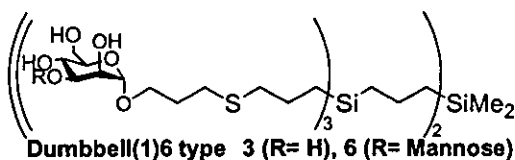
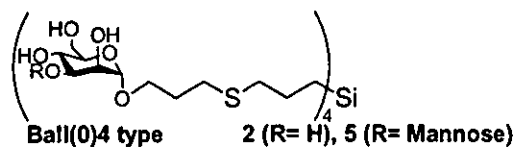
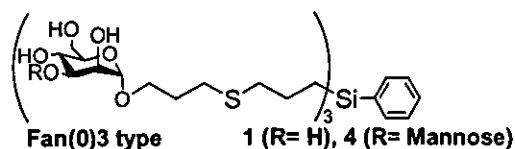
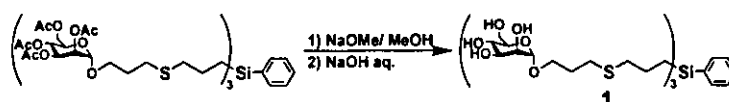
○森 知紀^{1,2}、幡野 健¹、松岡 浩司¹、江角 保明³、照沼 大陽¹、Eric J. Toone⁴

[序] マンノースは生体内において種々の生命活動を司っている糖タンパク質の構成成分であり、高度に集積化されている。マンノースを集積化することで、HIVおよびバクテリア表面を模倣することが可能になると考えられる。また、レクチン的一种であるコンカナバリン A (Con A) はマンノースと特異的に結合することが知られている。本発表では、マンノースおよびその二糖を担持したカルボシランデンドリマーの合成と Con A との結合活性について報告する。

[結果・考察] マンノースおよびその二糖のアセチル保護体をそれぞれ三種類のカルボシランデンドリマー骨格に導入したことは既に報告している。既法²⁾により脱保護を行い、

ゲルろ過 (Sephadex G-25 and/ or LH-20) にて精製することで目的のカルボシランデンドリマーを収率 70% 以上で得ることが出来た。NMR スペクトルおよびマスマスペクトル (FAB または ESI) によってキャラクタリゼーションを行い、それぞれ三個(1, 4)、四個(2, 5)、六個(3, 6)のマンノースおよびマンノースの二糖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。

等温滴定カロリメトリー(ITC)を用いて得られたマンノース担持カルボシランデンドリマーと Con A との結合活性の測定を行った結果、デンドリマー化することによって Con A との結合定数が上昇することが明らかになった。



1) T. Mori, K. Hatano, K. Matsuoka, and D. Terunuma, *Polym. Prepr. Jpn.*, IIPe013 (2003).

2) K. Matsuoka, M. Terabatake, Y. Esumi, D. Terunuma, and H. Kuzuhara, *Tetrahedron Lett.*, 40, 7839 (1999).

Synthesis and Property of Carbosilane Dendrimers Functionalized Peripheral Mannose Moieties

Tomonori MORI^{1,2}, Ken HATANO¹, Koji MATSUOKA¹, Yasuaki ESUMI³, Daiyo TERUNUMA¹, and Eric J. TOONE⁴ (¹Department of Functional Materials Science, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan, ²Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, ³The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), and ⁴Duke University)

¹Tel and Fax: +81-48-858-3535, E-mail: tmori@fms.saitama-u.ac.jp

Key Word: carbosilane dendrimer/ mannose/ *N*-glycan/ isothermal titration calorimetry/ concanavalin A/ binding assay

Abstract: Mannose is one of the important component of *N*-glycans, of which highly accumulating mannose are called high mannose *N*-glycans. Peripheral mannose clustered on carbosilane dendrimer would be able to mimic the high mannose *N*-glycans and the cell surface of HIV or bacteria. It is described herein the preparation and characterization of a series of carbosilane dendrimers having three, four, and six peripheral mannose and its disaccharide derivatives. Isothermal titration calorimetry (ITC) was done for assuming binding assay between carbosilane dendrimer and concanavalin A (Con A). Carbosilane dendrimers were binding to Con A more than free mannose (Man-OMe) and mannose disaccharide (Man- α -1,3-Man-OMe).

糖鎖含有カルボシランデンドリマーの合成研究 (VI)

—デングウイルス阻害剤の合成と生物学的評価—

(埼玉大工・理研[†]・静岡県立大薬[‡]) ○山田明宏・幡野 健・松岡浩司・照沼大陽江角保明[†]・青木千恵[†]・左 一八[†]・鈴木康夫[‡]

【背景および目的】 デング熱およびデング出血熱はいずれもデングウイルスにより惹起される。デングウイルスの感染力は極めて強く、年間の患者は数千万におよび、近年増加しつつある。近年、我々は糖脂質パラグロボシド (Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Cer) がデングウイルスと強く結合し、ウイルスの細胞への侵入を阻害することを見出した。また糖鎖部分のみでもデングウイルスの細胞への侵入を阻害することを明らかにしている。このことから、この糖鎖をデンドリマー上にクラスター化させることで、糖鎖クラスター効果によりさらに強力な結合が得られ、有望なデングウイルス阻害剤になることが期待される。パラグロボシド誘導体クラスター化合物群の合成およびデングウイルスへの生物学的評価を行うこととした。

【結果と考察】 D-ラクトースの完全β-アセチル体を原料とし、10段階の反応を経てグリコシル供与体を、5段階の反応でグリコシル受容体をそれぞれ合成した。供与体と受容体とのグリコシル化反応によりパラグロボシド構造を構築した後、保護基の変換を経て、デンドリマーへの導入のためにアグリコン末端にアセチルチオ基を有するパラグロボシド誘導体を合成した。パラグロボシド誘導体を形状の異なる3種類のカルボシランデンドリマーに導入、

脱アセチル化することによりパラグロボシドクラスター化合物群 (Fig. 1) を得た。これら化合物の構造決定は¹H, ¹³C NMR および高分解能マスペクトルの測定によりおこなった。現在、これらパラグロボシドクラスター化合物群のデングウイルスに対する阻害活性評価を行っており、生物学的評価についてもあわせて報告する予定である。

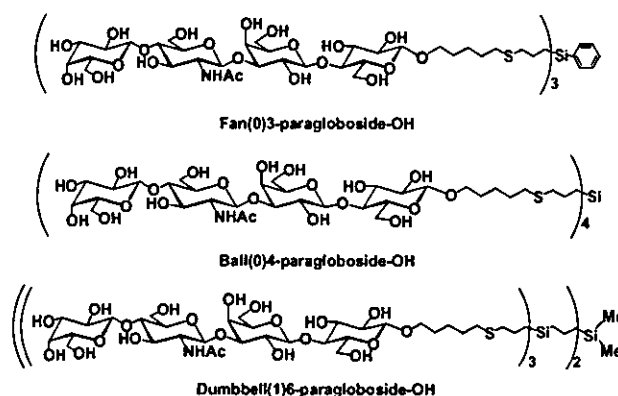


Fig. 1 paragloboside derivative cluster compounds

1) 青木千恵、左 一八、鈴木康夫ら 日本薬学会 123 年会 講演番号 27 【P2】 II-336

Synthetic Studies of Carbosilane Dendrimers Functionalized with Sugar Moieties (VI)

-The Synthesis and Biological Assay on the Dengue Virus Inhibitors-

Akihiro YAMADA, Ken HATANO, Koji MATSUOKA, Daiyo TERUNUMA, Yasuaki ESUMI[†], Chie AOKI[‡], Kazuya HIDARI[‡], Yasuo SUZUKI[‡] (Department of Functional Materials Science, Faculty of Engineering, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan; [†]The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN); [‡]Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences) Tel & Fax: 048-858-3532, E-mail: teru@fms.saitama-u.ac.jp

Key Word: Carbosilane / Dendrimer / Paragloboside / Dengue / Cluster / Inhibitor

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

II Pe165

糖鎖含有カルボシランデンドリマーの合成研究 (V) —パラグロボシド含有カルボシランデンドリマーの合成と評価—

(埼玉大工・理研[†]・静岡県立大薬[‡]) ○山田明宏・幡野 健・松岡浩司・照沼大陽
江角保明[†]・青木千恵[†]・左 一八[†]・鈴木康夫[‡]

【背景および目的】 デングウイルスとはデング熱およびデング出血熱を引き起こす病原体であり、現在、世界の熱帯、亜熱帯地域のほぼ全域にみられる。近年、感染者数の急激な増加が報告され、デングウイルスに対する治療薬の開発が急務となっている。

最近、我々は糖脂質パラグロボシド (Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-Cer) がデングウイルスと強く結合し、ウイルスの細胞への侵入を阻害することを見出した。¹⁾ また糖鎖部分のみでもデングウイルスの細胞への侵入を阻害することを明らかにしている。この糖鎖をデンドリマー上にクラスター化させることによりさらに強力な結合が得られ、有望なデングウイルス阻害剤になることが期待される。そこでパラグロボシド誘導体を合成し、パラグロボシド誘導体クラスター化合物群の合成を行うこととした。

【実験】 D-ラクトースの完全β-アセチル体を原料とし、1位がβクロリドで2位をフタルイミドとしたグリコシル供与体、1位にペンテニル基を有し3'と4'位が遊離の水酸基となったグリコシル受容体を合成した。供与体と受容体とのグリコシル化反応、保護基の変換を経て、デンドリマーへの導入のためにアグリコン末端にアセチルチオ基を有するパラグロボシド誘導体を構築した。パラグロボシド誘導体を形状の異なる3種類のカルボシランデンドリマーに導入、脱保護することによりパラグロボシドクラスター化合物群の合成を行った。

【結果と考察】 それぞれ合成した供与体と受容体とのグリコシル化反応を行うことでパラグロボシド構造を構築した。フタルイミドの隣接基関与および立体効果、3'位と4'位の水酸基の反応性の差によりβ(1→3)結合を選択的に形成した。保護基の変換を行った後、チオ酢酸のラジカル付加によりパラグロボシド誘導体 (Fig. 1) を得た。得られたパラグロボシド誘導体をカルボシランデンドリマーに導入、脱保護することによりパラグロボシドクラスター化合物群を合成した。

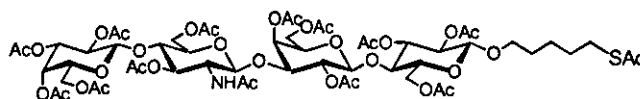


Fig. 1 paragloboside derivative

1) 青木千恵、左 一八、鈴木康夫ら 日本薬学会 123 年会 講演番号 27 [P2] II-336

Synthetic Studies of Carbosilane Dendrimers Functionalized with Sugar Moieties (V)

-The Synthesis and Properties on a Series of Carbosilane Dendrimer with Paragloboside Derivative-
Akihiro YAMADA, Ken HATANO, Koji MATSUOKA, Daiyo TERUNUMA, Yasuaki ESUMI[†], Chie AOKI[‡], Kazuya HIDARI[‡], Yasuo SUZUKI[‡] (Department of Functional Materials Science, Faculty of Engineering, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan; [†]The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN); [‡]Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences) Tel & Fax: 048-858-3532, E-mail: teru@fms.saitama-u.ac.jp

Key Word: Carbosilane / Dendrimer / Paragloboside / Dengue / Cluster / Inhibitor

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

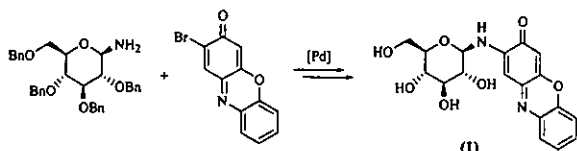
4 J2-29

N-アリアルグリコシドの合成研究

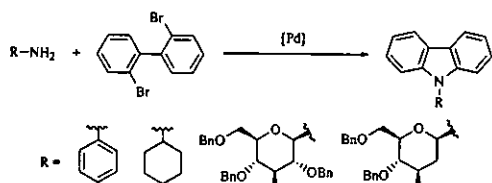
(慶大理工) ○北脇隆文・林陽子・千田憲孝

Synthetic Study on N-Aryl Glycosides (Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University) KITAWAKI, Takafumi; HAYASHI, Yoko; CHIDA, Noritaka

当研究室はスピカマイシンの合成研究¹⁾において、糖アミンとハロゲン化プリンが、パラジウム触媒によりカップリングし²⁾、N-グリコシド結合が効率的に構築される事を報告した。その後の研究において、この手法は、様々なハロゲン化アリアルに対して応用できることが見出された³⁾。本研究では、このパラジウムを用いる N-グリコシド結合構築法の有用性を示すことを目的として、放線菌の培養液より単離された glucosylquestiomycin(1) の合成を行い、これを達成したので報告する。



また本法の新たな展開として、カルバゾール環合成法の開発を試みた。様々なアミンと 2,2'-dibromobiphenyl とをパラジウムによりカップリングさせることで対応する N-置換カルバゾールを得ることが出来たので、あわせて報告する。



- 1) Chida, N. *et al. Org. Lett.*, 2000, 2, 1137.
- 2) a) Buchwald, S. L. *et al. J. Organomet. Chem.* 1999, 576, 125.
- b) Hartwig, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1998, 37, 2046.
- 3) 千田憲孝他 日本化学会第 81 春年会講演予稿集 II, 2 A2-02.

4 J2-30

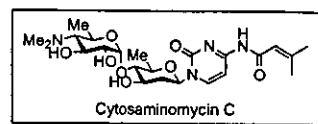
サイトサミノマイシンの合成研究

(横浜国大・教育人間科学) ○渡辺利沙・杉村秀幸

Study on Total Synthesis of Cytosaminomycin C (Yokohama National University)

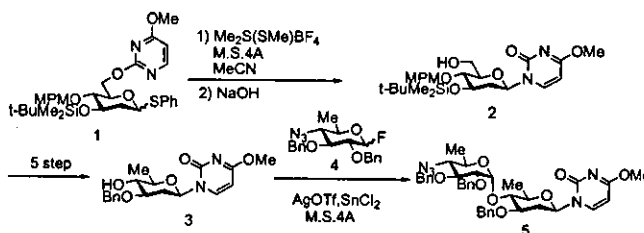
Watanabe, Risa; Sugimura, Hideyuki

サイトサミノマイシンは、放線菌の培養液より単離された抗生物質で、その生理活性に興味が持たれている。我々のグループでは、通常的手法では選択的に得ることの難しい 2'-デオキシ-β-ヌク



レオシド類を効率良く得る方法として分子内グリコシル化法を確立している。そこで、サイトサミノマイシンに含まれる 2',6'-ジデオキシ-β-ヘキソピラノシルヌクレオシド部分の合成に、この分子内グリコシル化法を適用することを計画し、サイトサミノマイシンの全合成を計画した。

市販のトリアセチルグリコールを出発として、7 工程で分子内グリコシル化反応の基質 1 を調製し、これに活性化剤としてジメチル(メチルチオ)スルホニウムテトラフルオロボラートを作用させ、その後水酸化ナトリウム水溶液で処理すると立体選択的に 2'-デオキシ-β-ヘキソピラノシルヌクレオシド 2 が収率良く得られた。この 6' 位を常法によりデオキシ化することで、サイトサミノマイシンの中核部分となる合成中間体 3 を調製し、さらにその 4' 位に別途ガラクトースより調製したヘキソース糖基 4 を導入し、二糖ヌクレオシド骨格 5 を合成した。



この後、4' 位のアジド基をジメチルアミノ基とし、ピリミジンの 6 位をアミノ基へ変換したのちにこれをアシル化、最後にベンジル基を脱保護することによって、サイトサミノマイシンの全合成に向けて検討した。

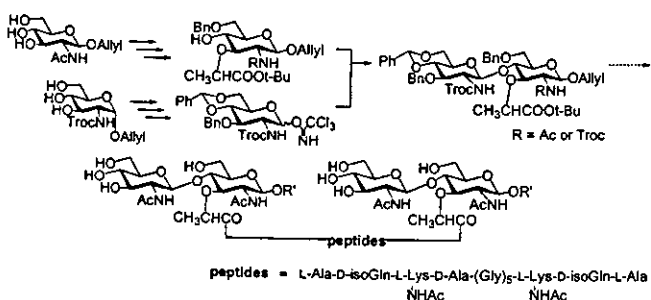
4 J2-31

TLR2 リガンド同定のための細胞壁ペプチドグリカンの合成研究

(阪大院理) ○久保修・藤本ゆかり・深瀬浩一・楠本正一
Synthetic study on microbial peptidoglycan for elucidator of TLR2 ligand (Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University)
Osamu, Kubo; Yukari, Fujimoto; Koichi, Fukase; Shoichi, Kusumoto

細菌細胞壁の主成分であるペプチドグリカンはアミノ基がアセチル化されたグルコサミンと、グルコサミンの 3 位に乳酸が縮合したムラミン酸が交互に β(1-4) 結合した二糖の繰り返し構造に、ペプチドが架橋した網目状の巨大分子である。このペプチドグリカンは免疫増強作用を示すことが古くから知られていた。

本研究ではペプチドグリカンの活性を担う構造と活性の発現機構を明らかにすることを目指して二本の糖鎖をペプチドで架橋した化合物の合成を計画した。これまでに当研究室で見出された合成法を参考に、まず二糖同士を架橋したものを合成することにした。β(1-4)グリコシド結合の構築には、アミノ基をトリクロロエトキシカルボニル(Troc)基で保護したグルコサミンイミデートを用いた。二糖縮合時の受容体側の 2 位保護基としてアセチル基と Troc 基を比較したところ、Troc 基の方が受容体としての反応性が高かった。続いてペプチド鎖を構築して、二糖と縮合し、目的化合物へと誘導している。



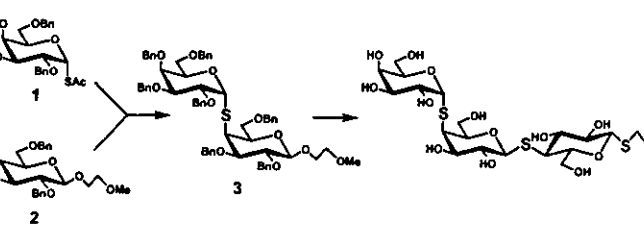
4 J2-32

チオグリコシド型グロボ 3 糖誘導体の合成研究

(埼玉大工・理研) ○黒澤直・小山哲夫・江角泰明・幡野健・松岡浩司・照沼大樹
Synthetic studies of globotriaose analogues having interthioglycosidic bonds (Fac. of Engineering, Saitama Univ., The Inst. of Phys. and Chem. Res. (RIKEN)) KUROSAWA, Sunao; KOYAMA, Tetsuo; ESUMI, Yasuaki; HATANO, Ken; MATSUOKA, Koji; TERUNUMA, Daiyo

病原性大腸菌 O157:H7 が産生するペロ毒素は腸管細胞表面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 糖をクラスタ化、ポリマー化した化合物はペロ毒素の中和剤として期待され、当研究室では様々な化合物を合成し、それらが高い活性を持つことを見出している。しかしながら、その O-グリコシド結合は生体内の加水分解酵素によって結合が切断されてしまう可能性があるため、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。

ベンジル保護されたガラクトースのアノマー位に α-チオアセチル基を導入したアクセプター 1 と、グルコースに β-メトキシエチル基を導入し 4 位に脱離基としてトリフレートを導入したドナー 2 をチオグリコシル化することにより α-S-グリコシド結合を有するガラビオース 3 を合成した。3 糖構築のため、ガラビオース 3 のアノメリック位の化学修飾と、β 選択的チオグリコシル化反応について現在検討中である。



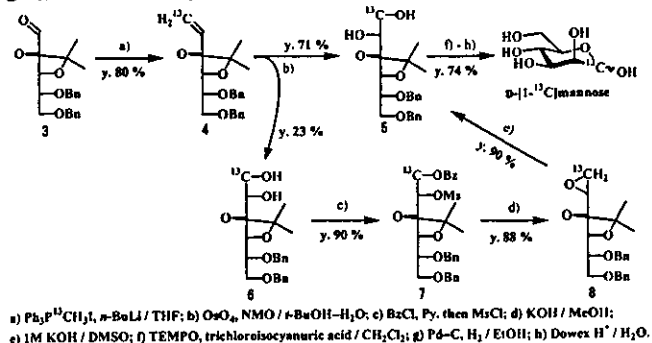
4 J2-42

¹³C 標識化 D-mannose の合成

(神奈川大工) ○用田裕樹・黒澤深太・赤井昭二・佐藤憲一
 Synthesis of ¹³C-labeled D-mannose (Faculty of Engineering Kanagawa University) Youda, Hiroki; Kurosawa, Kyoto; Akai, Shoji; Sato, Ken-ichi

1. 近年、複合糖質における糖鎖部分の機能を解明するため、生体内における糖鎖の 3 次元的構造を調べる研究が盛んに行われている。これに関し、当研究室では、効果的に ¹³C で標識化した糖を合成し^{1) 2)}、それをプローブとし、特殊 NMR 測定により立体配座を明らかにする研究を行っている。糖鎖を構成する重要単糖である D-mannose は 1 位と 6 位を ¹³C 標識化することで、¹³C から ¹H への磁化移動を通して、必要な ¹H 情報が得られる。既に、D-[6-¹³C]mannose の合成は、当研究室での知見を活かし、効率的合成に成功している¹⁾。そこで本研究では D-[1-¹³C]mannose の効率的合成法を開発することとした。D-[1-¹³C]mannose の合成は K¹³CN を用いる手法が報告されている³⁾、生じるジアステレオマーの分離が困難であることから効率的とはいえない。演者は、標識化試薬として最も安価な ¹³CH₃I から調整した Ph₃P¹³CH₃I を用い、より効率的に D-[1-¹³C]mannose を合成したので報告する。

2.3. D-mannitol から導いたアルデヒド体 3 に対して、Ph₃P¹³CH₃I (1 eq) を用い Wittig 反応し、¹³C オレフィン体 4 を収率 80% で得た。次に、4 のオレフィン を OsO₄ 酸化し manno 立体 5 と gluco 立体 6 を収率 94% (d.r.=3:1) で得た。ここで高価な ¹³C 化合物を目的物へと無駄なく導くために gluco 立体 6 は、エポキシド体を経由することにより manno 立体 5 へと導いた。続いて、5 の 1 級水酸基を触媒量の TEMPO により選択的に酸化した後、Bn 基、イソプロピリデン基を脱保護することで効率的に D-[1-¹³C]mannose を合成した。この合成ルートでの ¹³CH₃I の利用効率は 52% である。



- 1) Sato, K. et al., *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 3513-3516.
- 2) Sato, K. et al., *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 4903-4907.
- 3) Serrianni, A. S. et al., *Carbohydr. Res.* 1979, 72, 71-78.

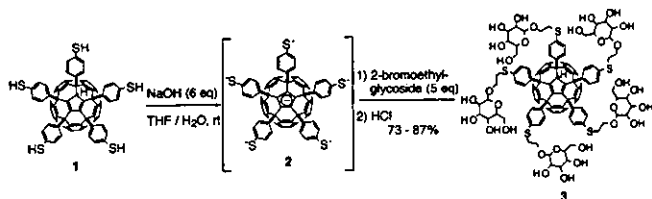
4 J2-43

分子プログラミングのための両親媒性分子「フラーレン-糖複合体」の合成

(東大院理) ○真島敏子・磯部寛之¹⁾・依光英樹・中村栄一
 Synthesis of Fullerene-Glycoconjugates As the New Amphiphiles in Molecular Programming (The Univ. of Tokyo) MASHIMA, Hiroko; ISOBE, Hiroyuki; YORIMITSU, Hideki; NAKAMURA, Eiichi

生物の細胞膜上には糖鎖が存在し、タンパクがこの膜上の複数の糖と結合することで種々の特異的認識が起こることが知られている。最近、この効果を利用し、単分子上に複数の糖を呈示することでタンパクを標的とする分子が注目されている。我々は、これまでに C₃ 対称および擬 C₃ 対称な位置に 5 つの置換基をもつフラーレンシクロペンタジエン (FCpH) の定量的合成反応の開発を行ってきた。今回、FCpH 上の置換基に無保護の糖化合物を導入する反応を開発し、5 つの糖部位をもつフラーレン-糖複合体の効率的な合成法を開発した。

疎水的なフラーレンと親水性分子は、非常に異なる親水性を示すため、その間の結合生成反応を行うことは困難である。今回合成した FCpH 1 は、塩基性条件下でチオール及びシクロペンタジエン部位が脱プロトンされ、水溶液に溶ける。ヘキサアニオン種 2 に対し水中でハロゲン化アルキルを作用させると、チオール部位への選択的アルキル化が進行した。この反応を無保護の糖部位をもつハロゲン化アルキルを用いて行うことで、5 つの糖部位を持つフラーレン-糖複合体 3 を良い収率で合成することができた。



†. PRESTO, JST

4 J2-44

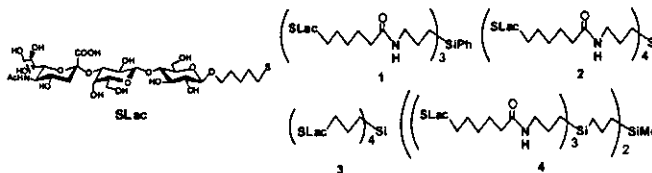
シアリルラクトース含有カルボシランデンドリマー群の合成研究

(埼玉大工・理研・静岡県立大薬) ○鈴木 朝典・小山 哲夫・江角 保明・鈴木 康夫・幡野 健・松岡 浩司・照沼 大陽

SYNTHETIC STUDIES OF A SERIES OF CARBOSILANE DENDRIMERS HAVING SIALYLLACTOSE MOIETIES
 (Fac. of Engineering, Saitama Univ., The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences) ONAGA Tomotsune; KOYAMA Tetsuo; ESUMI Yasuaki; SUZUKI Yasuo; HATANNO Ken; MATSUOKA Koji; TERUNUMA Daiyo

インフルエンザウイルスによる疾患は、そのウイルス衣殻に存在する HA3 基体が宿主細胞上にクラスター化して存在しているシアリル糖鎖を特異的に認識、接着することにより感染、その後発病することが知られている。

これまでの我々の研究において、シアリルラクトース (SLac) を結合¹⁾させたカルボシランデンドリマー化合物がインフルエンザ A 型ウイルスに対して高い阻害活性能をもつという結果を得ている。そこで本研究では、新たなカルボシランデンドリマーをコアとした SLac 含有クラスター化合物のライブラリーを構築し、その阻害活性相関を比較検討することを目的とした。HA3 量体のシアリル認識ポケット間距離は 40-50 Å と確認されており²⁾、その距離に合った骨格を設計する必要があるため、今回用いる骨格は、以前の化合物に比べて糖鎖間距離が離れ、糖鎖の自由度に幅を持たせた骨格とした。



- 1) K. Matsuoka, et al., *Tetrahedron Lett.*, 42, 3327-3330 (2001).
- 2) D. C. Wiley, et al., *Nature.*, 333, 426-431 (1988).

4 J2-45

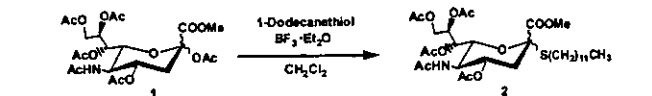
新規シアリル酸供与体の合成と反応性の検討

(埼玉大工・北大院地球環境) ○鈴木 朝典・小山 哲夫・坂入 信夫・幡野 健・松岡 浩司・照沼 大陽

SYNTHESIS OF A NOVEL SIALYL DONOR AND ITS REACTIVITY
 (Fac. of Engineering, Saitama Univ., Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido Univ) ONAGA, Tomotsune; KOYAMA, Tetsuo; SAKAIRI, Nobuo; HATANNO, Ken; MATSUOKA, Koji; TERUNUMA, Daiyo

複合糖質の中にはシアリル酸を含む糖鎖が多く存在する。それらシアリル糖鎖を化学合成するには、優れたシアリル酸供与体が必要とされる。シアリル酸供与体としてのチオグリコシド体はヨードカチオンをプロモーターとして用いることにより、容易に活性化することができる。しかし、これまで用いられてきたシアリル酸チオグリコシドの調製には硫黄原子特有の臭いを持つ低級メルカプタンが用いられていた。そこで、本研究では比較的臭いの弱いドデカンチオール¹⁾とグリコシル化を行うことより、反応に伴う悪臭の低減を達成し、新規シアリル酸チオグリコシド 2 を合成した。得られたシアリル酸チオラウリル体 2 の反応性の検討を行うため、α-, β-アノマーをそれぞれ単離し、種々のアルコール性受容体とのグリコシル化反応を行った。

その結果から、β-体が受容体として効率的に反応することを確認し、他の既知チオグリコシド類と比較して、生成、反応性ともに優れた受容体となることを見出した。



- 1) N. Sakairi, et al., *Chem. Lett.*, 326-327 (2000).

ナノサイズで制御された糖鎖クラスター型ペロ毒素中和剤の開発

埼玉大学¹、国立国際医療センター研究所²、奈良県立医大³

松岡浩司^{1*}、幡野健¹、西川喜代孝²、名取泰博²、喜多英二³、照沼大陽¹

【ファウンド名】厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

Vero 毒素産生性大腸菌 (Verotoxin-producing *Escherichia coli*; VTEC) が産生するペロ毒素 (VT) は、毒性を発揮する A サブユニットと宿主細胞に接着するための 5 個の B サブユニットから構成される AB₅ 型の毒素であり、宿主細胞表層上の糖鎖に結合する B サブユニット群の大きさは、およそ 6 nm 程度と見積もられている。本研究においては、この B サブユニット群に最も効率良く結合し、毒素の中和を達成するためのナノサイズに制御された多価型の糖鎖クラスターの合成と評価を行い、ペロ毒素中和剤としての可能性を探求する。

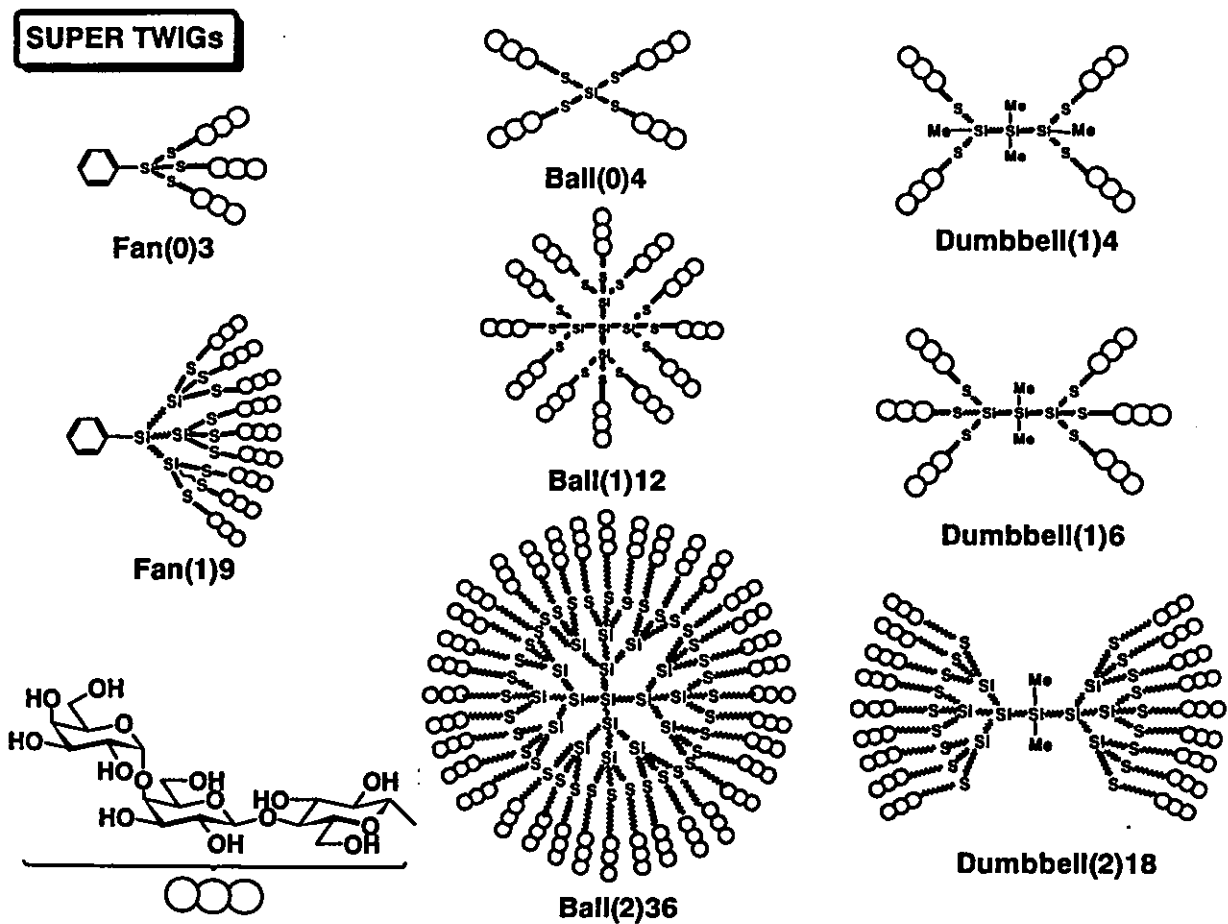


図 1

ペロ毒素に存在する糖鎖結合部位は、B サブユニット 1 分子あたり 3 箇所

存在し、5サブユニット全体で15箇所存在する。また、宿主細胞表層に存在するグロトリオシルセラミド(Gb3; Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer)を特異的に認識することも知られている。そこで、我々は最適な糖鎖数と糖鎖間距離、さらに分子の形状を見出すために、図1に示したGb3の糖鎖部分をエピトープとした種々の糖鎖クラスター化合物群の系統的な設計を行った。これらの化合物は、糖鎖クラスター効果に基づき、多価の結合部位を有するVTsに対して高い活性を発現すると期待した。さらに、コア分子として選定したカルボシランデンドリマーは、化学的に安定であり、原料の選定により自由に分子形態のアレンジおよびサイズのコントロールが可能のため、極めてユニークな糖鎖支持体として選定した。

まず、糖鎖誘導体の調製は、安価なガラクトースとラクトースから3糖骨格を構築し、種々の化学修飾を施すことによりカルボシランへの導入前駆体へと誘導した。一方、カルボシランデンドリマーは、扇型(Fan)、亜鈴型(Dumbbell)、球型(Ball)の形状と複数の糖鎖を担持するため、形状と価数に見合った原料に対して、種々の化学修飾を行い、糖鎖導入に適したカルボシランデンドリマー群を合成した。最後に、これらの糖鎖誘導体とカルボシラン誘導体とを結合させることにより、図1に示した化合物群(Super Twigs)の構築を行った。

得られた化合物を検体として、ペロ細胞を用いた *in vitro* 試験、マウスを用いた *in vivo* 試験を行った。その結果、生物活性とカルボシランデンドリマーの構造に強い相関があることを見出した。その内、亜鈴型形状のDumbbell(1)6が、合成上の調製の容易さおよび活性強度から考慮して最も活性が高いと判断した。また、このDumbbell(1)6は、マウスに経口投与した致死量のペロ毒素を完全に中和する能力を示した。

以上の結果を踏まえ、最適な化合物を見出すために、Dumbbell(1)6をリード化合物に選定し、コアカルボシランデンドリマー骨格のライブラリー化、さらにアグリコン部分に由来する鎖長の影響等を変化させ、構造活性相関を検討中である。

参考文献

- 1) K. Matsuoka, *et al.*, "Synthetic Assembly of Trisaccharide Moieties of Globotriaosyl Ceramide Using Carbosilane Dendrimers as Cores. A New Type of Functional Glyco-Materials", *Tetrahedron Lett.* **40**, pp. 7839-7842, 1999.
- 2) K. Nishikawa, K. Matsuoka, *et al.*, "A Therapeutic Agent with Oriented Carbohydrates for Treatment of Infections by Shiga Toxin-producing *Escherichia Coli*. O157:H7", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, pp. 7669-7674, 2002.

主任研究者：埼玉大学工学部 教授 照沼 大陽

発表者：国立国際医療センター研究所 室長 西川喜代孝

【目的】

0157:H7 などの腸管出血性大腸菌の感染は出血性大腸炎をひき起こすばかりでなく、時に溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症を併発させ、むしろこれらの合併症が患者を死にいたらしめる大きな原因となっている。ペロ毒素(Shiga toxin; Stx)は腸管出血性大腸菌の産生する主要な病原因子であり、血中に侵入したペロ毒素による腎や脳の微小血管内皮の障害が上記合併症の原因と考えられている。従って、血中に侵入したごく微量の Stx に結合してその作用を阻害する Stx 中和剤は、腸管出血性大腸菌感染症の有効な治療薬になると期待される。本研究では、カルボシランデンドリマーを核構造として用い、Stx に対する結合ユニットとしての糖鎖を集積させるための最適構造を独自に開発し、臨床応用に耐えうる新規な Stx 中和剤を開発することを目的とする。

【背景とこれまでの結果】

Stx は A-B5 型の毒素で、B サブユニットが細胞膜上の受容体、Gb3(globotriaosylceramide; Gal_(1-4)-Gal_(1-4)-Glc_1-Ceramide)に結合することにより細胞内に取り込まれる。B サブユニットペンタマーは Gb3 の糖鎖部(グロボ3糖; Gal_(1-4)-Gal_(1-4)-Glc_1-)を認識する。従って、グロボ3糖を高密度で集積させた化合物は、Stx に高親和性で結合し、その作用を阻害する Stx 阻害剤となりうると思われる。

我々はこれまでに、カルボシランデンドリマーを核構造とし、Stx 結合ユニットとしてグロボ3糖を集積させた化合物(SUPER TWIG)を開発している。このうち Stx に高親和性で結合し血中で Stx の毒性を強力に阻害する化合物として、1分子中にグロボ3糖を6個有する化合物(SUPER TWIG(1)6)を同定することができた。SUPERTWIG(1)6 は、0157:H7 感染実験において有効性が証明された初めての化合物である(K. Nishikawa et al., PNAS, 99, 7669-, 2002)。一方、1分子中にグロボ3糖を12個有する化合物、SUPER TWIG(1)12 は SUPER TWIG(1)6 よりもグロボ3糖の集積度が高く、in vitro では Stx に対する結合能力、Stx の細胞毒性に対する阻害活性ともに SUPER TWIG(1)6 よりも優れているにもかかわらず、血中での Stx 中和剤としての作用は非常に弱いことを見いだしている。このことは、Stx 中和剤開発には in vivo での作用を指標とした最適構造の決定が必須であることを意味する。この点について検討を行うため、昨年度において、末端のグロボ3糖数や立体配置が異なる種々の核構造を持つ一連の SUPER TWIG を合成した。今回これら化合物について、in vitro および in vivo での阻害作用を比較し、最終的に血中で有効に作用するため最適構造の決定を試みた。

【今年度の研究成果】

これまでに開発した3種の SUPER TWIG(0)3, (1)6, (1)12, に加え、新たに5種の SUPER TWIG を合成した。これら化合物の内、最もグロボ3糖を集積させたものは1分子中に36個のグロボ3糖を有する(SUPER TWIG(2)36)。またグロボ3糖数は同じだが(4個)、核構造の異なる化合物を合成し、核構造の重要性についても検討を行った。各々について、Stx1 B-subunit, Stx2 B-subunit に対する Kd 値、Stx の標的細胞への結合に対する阻害能、Stx の細胞傷害活性に対する阻害能、等の in vitro における検討、さらにマウスを用いた Stx2 静脈投与による致死性がこれら化合物共投与によりどれだけ阻害されるか、の in vivo における検討を行った。

その結果、各 SUPER TWIG の Stx1 B-subunit, Stx2 B-subunit に対する Kd 値は、グロボ3糖を4個から6, 9, 12, 18, 36と増やしていても大きくは変化しないこと、しかしながらグロボ3糖数は同じ(4個)でも核構造を変化させグロボ3糖間の距離を短くしたものでは、著しい親和性の低下が生じることが明らかとなった。このことは SUPER TWIG が高親和性で Stx に結合するためには、グロボ3糖数よりもその核構造が非常に重要であることを意味している。またその他の in vitro の検討、

さらにマウスを用いた *in vivo* における検討を行い、最終的に SUPER TWIG(1)6 より優れた化合物として、1分子中にグロボ3糖を18個有する化合物 SUPER TWIG(2)18 を同定することができた。興味深いことに、両化合物は分子全体の形が dumbbell 型であるという特徴的な共通点を有することが明らかとなった。

【今後の計画】

SUPER TWIG(1)6 および SUPER TWIG(2)18 は分子全体の形が dumbbell 型であるという特徴的な共通点を有する。そこでこの形状を基本として、さらに末端グロボ3糖の数、糖鎖間距離、世代数に対応する核構造の長さ、等が異なる SUPER TWIG を合成する予定である。これらの化合物を用いた検討から、最終的に Stx 中和剤として血中で有効に作用す驍すめに要求される最適構造を決定する予定である。

また一方で、分子全体の形が dumbbell 型であることが何故 *in vivo* での活性に要求されるのか、という疑問が生じる。この問題解決のためにはこの構造を有する SUPERTWIG と、Stx B-subunit との結合様式を明らかにすることが重要と考えられる。この点について検討を行うため、まず一つの B-subunit 上に3種類あるとされているグロボ3糖結合サイトに、それぞれ single, double, triple mutation を導入して各種 mutant B-subunit を調製していく予定である。これら mutant と SUPER TWIG(1)6 または (2)18 との結合親和性を検討し、これら SUPER TWIG と Stx B-subunit との結合にどのサイトが使われているのか、等その結合様式について検討を行う。

あとがき

本研究の基本的アイデアは埼玉大学工学部 葛原弘美（元）教授の着想によるものです。記して感謝の意を表します。

マウスを用いる感染実験を行っていただきました奈良医科大学 喜多 英二教授、生物学的評価を行っていただきました静岡県立大学 鈴木康夫教授ならびに質量分析をしていただきました江角保明氏（理化学研究所）に感謝致します。

今年度、埼玉大学において本研究に協力していただきました諸氏に感謝致します。

森知紀（流動研究員：医療機器センター）、

山田明宏（D1）、江州勇亮（M1）、坂本純一（M1）、小山哲夫技術員