

# 糖鎖 dendriマーの合成と酵素による

## 糖鎖伸長反応の検討

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

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

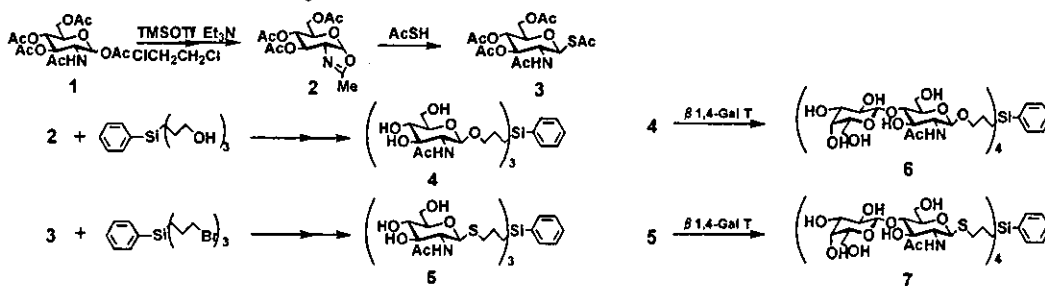
### [緒言]

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<sup>x</sup> 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 dendri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 dendri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 dendri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。



## 新規ノイラミニダーゼ阻害剤の合成研究(I)

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

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

### 【背景と目的】

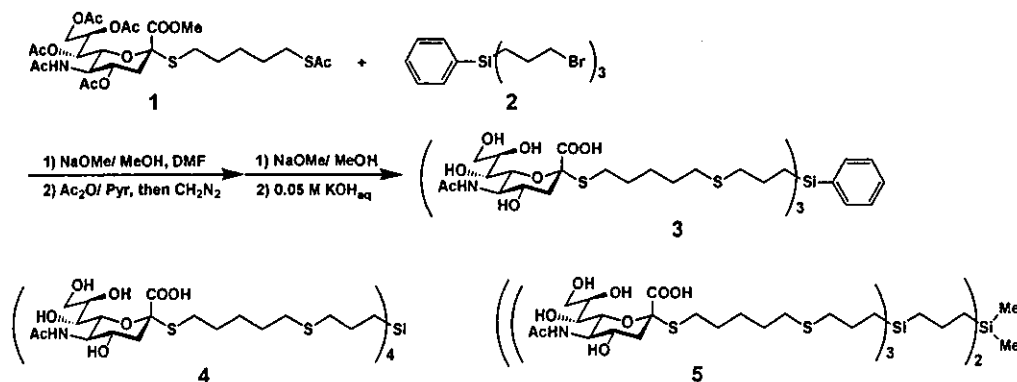
インフルエンザウイルスの感染には、ウイルスが持つヘマグルチニン(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)、これら2種類の糖タンパク質と、宿主細胞上の糖鎖末端を占めるシアル酸との特異的相互作用が重要である。HAが宿主細胞上のシアル酸を認識して結合することにより感染が始まり、細胞内で増殖したウイルスは細胞から遊離する際、結合しているシアル酸をNAで切断し、新たな細胞を求めて行くことが知られている。

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。



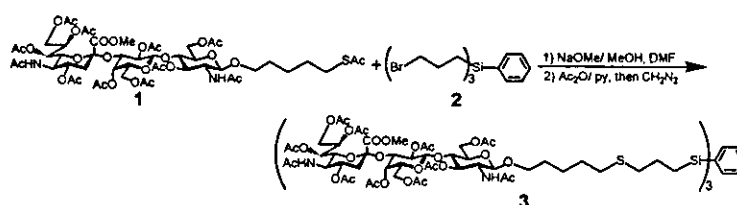
# インフルエンザウイルス阻害能を 指向したシアリルラクトサミン担持 カルボシランデンドリマーの合成

(埼玉大工<sup>1</sup>・医療機器センター<sup>2</sup>・理研<sup>3</sup>・静岡県立大薬<sup>4</sup>) ○森 知紀<sup>1,2</sup>・  
幡野 健<sup>1</sup>・松岡浩司<sup>1</sup>・江角保明<sup>3</sup>・左 一八<sup>4</sup>・鈴木康夫<sup>4</sup>・照沼大陽<sup>1</sup>  
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<sup>1)</sup>。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



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 Gb<sub>3</sub>-Containing Linear Polymers That Neutralize Shiga Toxins and the Toxin B-Subunits

Miho Watanabe\*, Kiyotaka Nishikawa\*<sup>•</sup> \*\*, 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 AB<sub>5</sub> holotoxin molecular structure. Stx binds via its B-subunit pentamer to the functional cell-surface receptor, globotriaosyl ceramide (Gb<sub>3</sub>; Gal $\alpha$ (1-4)-Gal $\beta$ (1-4)-Glc $\beta$ 1-ceramide). Highly selective and potent binding of Stx to Gb<sub>3</sub> is attributed to the multiple interactions of the B-subunit pentamer with the trisaccharide moiety of Gb<sub>3</sub>. Three binding sites to the trisaccharide are identified on each B-subunit, so that potentially 15 Gb<sub>3</sub> molecules could bind to the pentameric B-subunit.

Several Stx neutralizers in which the trisaccharide moiety of Gb<sub>3</sub> 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 (Gb<sub>3</sub>-polymers) are potent Stx-neutralizers (Watanabe *et al*, J Infect Dis 189:360, 2004). The Gb<sub>3</sub>-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 Gb<sub>3</sub>-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 Gb<sub>3</sub>-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 Gb<sub>3</sub>-polymers to the sensor chips by BIAcore system.

All types of Gb<sub>3</sub>-polymers similarly bound to wild type Stx1B. In contrast, the binding affinity of Gb<sub>3</sub>-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<sub>D</sub> value by ten times, and shortening of the spacer resulted in a hundred times higher K<sub>D</sub> value. These results suggest that the interaction of Gb<sub>3</sub>-polymers with Stx1B is different from that with Stx2B.

Then we tested the binding of Gb<sub>3</sub>-polymers to Stx1B and Stx2B mutants. Gb<sub>3</sub>-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, Gb<sub>3</sub>-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 Gb<sub>3</sub>-polymers to Stx1B. The importance of site 2 of Stx1B for binding to Gb<sub>3</sub> and some trisaccharide-containing Stx neutralizers has been suggested so far. On the other hand, Gb<sub>3</sub>-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 Gb<sub>3</sub>-polymers to Stx2B.

Based on these observations, we conclude that the essential structure of Gb<sub>3</sub>-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 dend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

**【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。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マイ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 dend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 dend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 が産生するペロ毒素(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 AB<sub>5</sub> 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 $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 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 dend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イルスにも展開し、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 dend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 $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 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 $\alpha$ -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 dend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 $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-)を含有するカルボシラン dend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、dend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イルスに対する抗ウイ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。インフルエンザウイルスもウイ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 (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-)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<sup>1,2</sup>, Atsushi Kon<sup>1</sup>, Ikuko Kakizaki<sup>1</sup>, Yoshiaki Kudo<sup>1</sup> and Keiichi Takagaki<sup>1</sup>

[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 results, 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 Matsuoka<sup>1</sup>, Atsushi Miyagawa<sup>1</sup>, Kiyotaka Nishikawa<sup>2</sup>, Miho Watanabe<sup>2</sup>, Yasuhiro Natori<sup>2</sup>, Eiji Kita<sup>3</sup>, Tetsuo Koyama<sup>1</sup>, Ken Hatano<sup>1</sup> and Daiyo Terunuma<sup>1</sup>

[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 $\alpha$ 1-4Gal $\alpha$ 1-4Glc $\beta$ 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 neutralizer<sup>1)</sup> and demonstrated those potential activities against both Stxs in vitro as well as vivo<sup>2)</sup>. 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, respectively<sup>3)</sup>. 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:H7<sup>4)</sup>. 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( $\epsilon$ 2-3)Gal( $\epsilon$ 1-3)GalNAc and NeuAc( $\epsilon$ 2-3)Gal( $\epsilon$ 1-3)[NeuAc( $\epsilon$ 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- $\gamma$  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 Hosoki<sup>1</sup>, Kaoru Akira<sup>1</sup>, Munetoyo Toda<sup>1</sup>, Mizue Inoue<sup>1</sup>, Shinji Fushiki<sup>2</sup>, Atsuhiko Oohira<sup>3</sup>, Minoru Okayama<sup>1</sup> and Hiroshi Nakada<sup>1</sup>  
[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<sup>1,2</sup>, Ken Hatano<sup>1</sup>, Koji Matsuoka<sup>1</sup>, Yasuaki Esumi<sup>3</sup>, Eric J. Toone<sup>4</sup> and Daiyo Terunuma<sup>1</sup>

[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  $\alpha$ -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 skelton, 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 Zemplén'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 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and high resolution mass spectrometry. NMR data showed that the  $\alpha$ -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 Bao<sup>1</sup>, Tadahisa Mikami<sup>1</sup>, Shuhei Yamada<sup>1</sup>, Takashi Muramatsu<sup>2,3</sup> and Kazuyuki Sugahara<sup>1</sup>

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

Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan.

Chondroitin sulfate/dermatan sulfate (CS/DS) chains, major heterogeneous 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

(埼大工<sup>1</sup>・医療機器センター<sup>2</sup>・理研<sup>3</sup>・静岡県立大薬<sup>4</sup>) ○森 知紀<sup>1,2</sup>・幡野 健<sup>1</sup>・松岡 浩司<sup>1</sup>・江角 保明<sup>3</sup>・左 一八<sup>4</sup>・鈴木 康夫<sup>4</sup>・照沼 大陽<sup>1</sup>

## Synthesis of Carbosilane Dendrimers Having Peripheral Sialyllactosamine

Tomonori Mori<sup>1,2</sup>, Ken Hatano<sup>1</sup>, Koji Matsuoka<sup>1</sup>, Yasuaki Esumi<sup>3</sup>,

Kazuya Hidari<sup>4</sup>, Yasuo Suzuki<sup>4</sup>, and Daiyo Terunuma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Functional Materials Science, Faculty of Engineering, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, <sup>2</sup>Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, <sup>3</sup>The Institution of Physical and Chemical Research (RIKEN), and <sup>4</sup>Department 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.

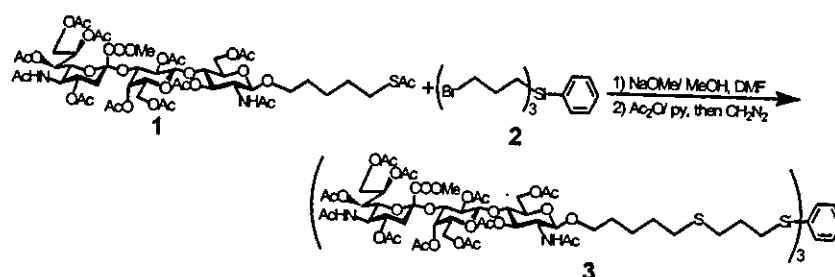
[序] インフルエンザウイルスは、宿主の細胞表層にクラスター化して存在している複合糖質の糖鎖部位であるシアリルラクトースおよびシアリルラクトサミンといった三糖構造を認識し、接着することにより生体に感染することが知られている。我々の研究室では、既に、シアリルラクトースをカルボシランデンドリマーに担持させ糖鎖を集積化させることで、インフルエンザウイルス阻害能を有する糖鎖クラスターの合成を行っている<sup>1)</sup>。本発表では、インフルエンザウイルス阻害能が期待される新規糖鎖クラスターであるシアリルラクトサミン担持カルボシランデンドリマーの合成について報告する。

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

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

Akihiro YAMADA, Ken HATANO, Koji MATSUOKA, Daiyo TERUNUMA, Yasuaki ESUMI<sup>a</sup>, Kazuya HIDARI<sup>b</sup>, Yasuo SUZUKI<sup>b</sup>, Kiyotaka NISHIKAWA<sup>c</sup>, Yasuhiro NATORI<sup>c</sup> (Department of Functional Materials Science, Faculty of Engineering, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan; <sup>a</sup>The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN); <sup>b</sup>Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences; <sup>c</sup>Department 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。

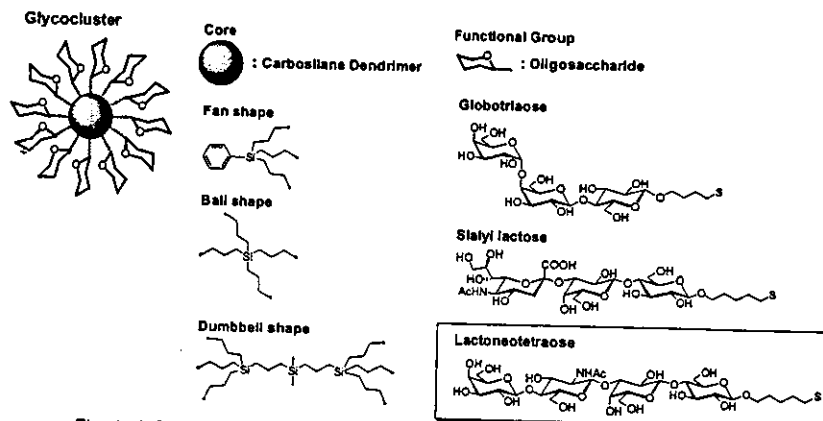


Fig. 1 A Series of Carbosilane Dendrimers Functionalized with Sugar Moieties

## 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-Et<sub>2</sub> であり従来の Si-Me<sub>2</sub> 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)。

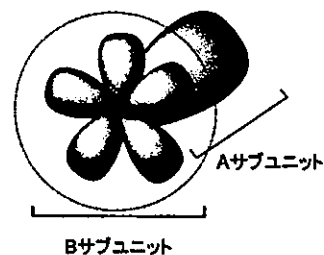


Fig. 1 ペロ毒素の構造概略図

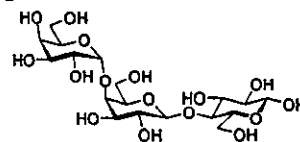
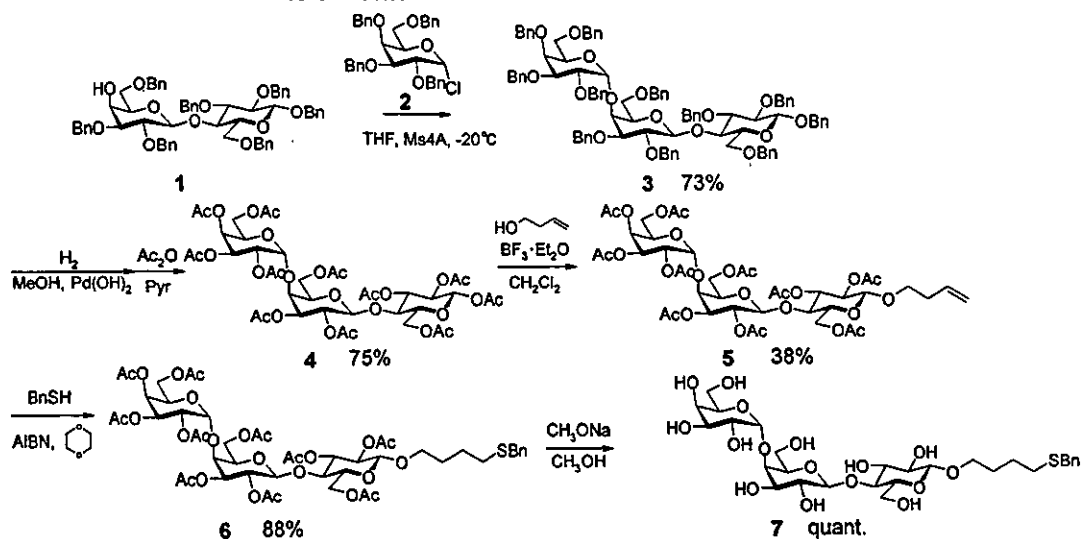
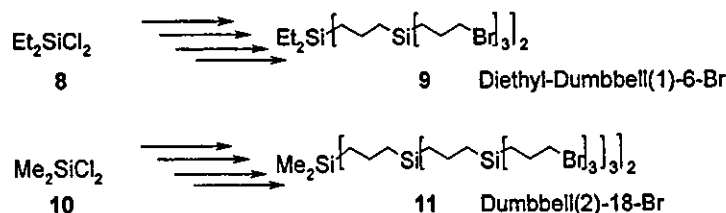


Fig. 2 グロボ3糖の構造

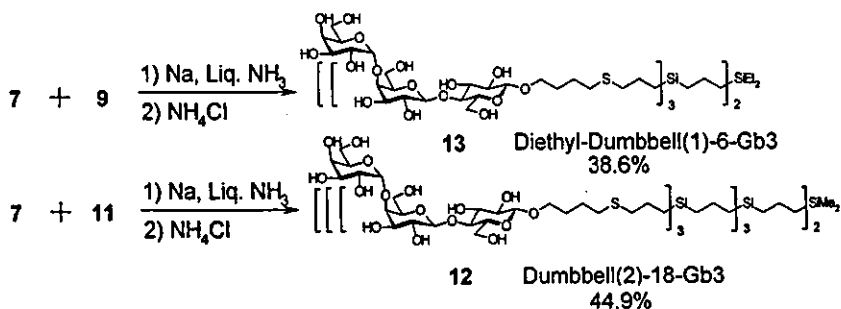
## Scheme 1 Gb3分子の合成



## 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



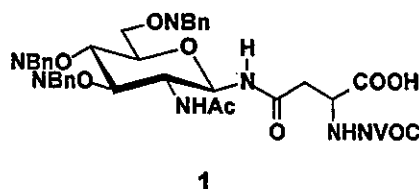
## 【結果】

分子の構造確認は <sup>1</sup>H-NMR・<sup>13</sup>C-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

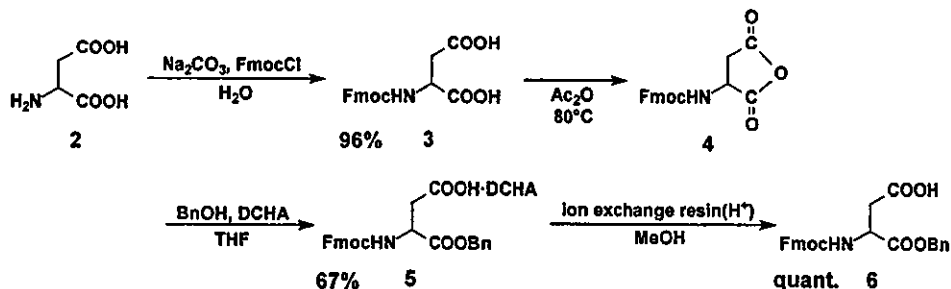
- 1) K. Nishikawa, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7669-7674, (2002).
- 2) K. Matsuoka, *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 7839-7842, (1999).
- 3) 竹澤ら, 第 83 回有機合成シンポジウム講演要旨集, 33-36, (2003).

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、シーケ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

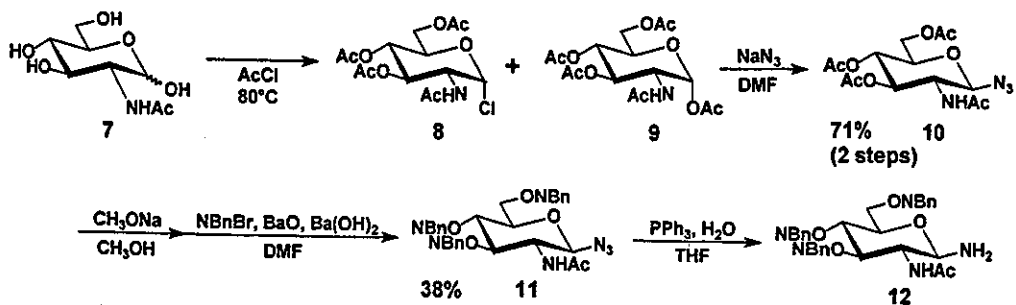
L-アスパラギン酸誘導体合成においては、アミノ保護基として Fmoc 基(9-fluorenylmethoxycarbonyl 基)を採用した。Fmoc 基はアミノ酸のラセミ化を防ぐとともに、ピペリジンなどの弱い塩基で簡便に脱保護ができるという利点を持っている。L-アスパラギン酸 **2** を出発物として、アミノ基を FmocCl を用いてカルバメート **3** とした後<sup>1)</sup>、ジカルボン酸の分子内脱水反応により環状無水物 **4** へと変換した。さらに、ベンジルアルコールとジシクロヘキシルアミン(DCHA)を用い、C 端に相当するカルボキシル基をベンジルエステル化し、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

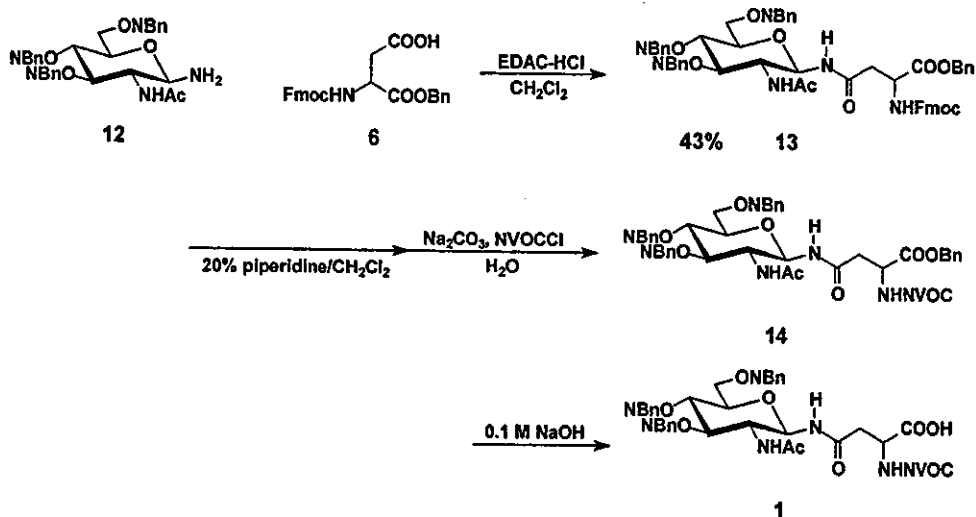
N-アセチル-D-グルコサミンを出発物として、AcCl を用いてα-クロライド **8** に変換後、を DMF 中 80°C で  $\text{NaN}_3$  を用いた  $\text{S}_{\text{N}}2$  反応によりβ-アジド **10** を得た<sup>2)</sup>。**8** の合成反応時に副生成物として完全アセチル化された **9** が生成するが、**10** の合成反応が終了した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製で取り除くことができる。さらに Zenplén 法による脱アセチル化後、3,4,6 位を 2-ニトロベンジル化して **11** を得た。**11** に対して、 $\text{PPh}_3$  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<sup>3)</sup>。



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-HCl<sup>4)</sup>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/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液を作用させることにより脱 Fmoc 化し、さらに NVOCCI 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 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C 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

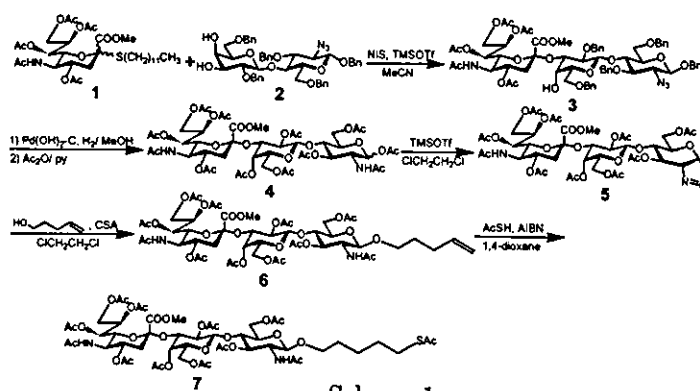
- 1) J. Martinez, J. C. Tolle, M. Bodanszky, *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 3596-3598
- 2) C. Augé, C. Gautheron, H. Pora, *Carbohydr. Res.*, **1989**, *193*, 288-293
- 3) S. Nagarajan, B. Ganem, *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 5044-5046
- 4) J. C. Sheehan, J. Preston, P. A. Cruickshank, *J. Am. Chem.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

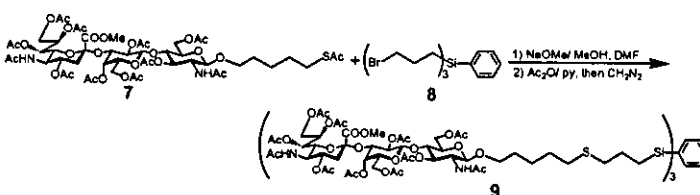
(埼玉大<sup>1</sup>・医療機器センター<sup>2</sup>・理研<sup>3</sup>・静岡県立大<sup>4</sup>)○森 知紀<sup>1,2</sup>、幡野 健<sup>1</sup>、松岡 浩司<sup>1</sup>、江角 保明<sup>3</sup>、左 一八<sup>4</sup>、  
鈴木 康夫<sup>4</sup>、照沼 大陽<sup>1</sup>

〔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<sup>1)</sup>。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)。7を三分岐型(Fan(0)3型)カルボシランデンドリマー骨格(8)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(9)を得た(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。



Scheme 1



Scheme 2

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

## Synthetic Studies of Carboxysilane Dendrimers Having Peripheral Sialyllactosamine

Tomonori MORI<sup>1,2</sup>, Ken HATANO<sup>1</sup>, Koji MATSUOKA<sup>1</sup>, Yasuaki ESUMI<sup>3</sup>, Kazuya HIDARI<sup>4</sup>, Yasuo SUZUKI<sup>4</sup>, and Daiyo TERUNUMA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Functional Materials Science, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan, <sup>2</sup>Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, <sup>3</sup>The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), and <sup>4</sup>Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences)

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

**Key Word:** carboxysilane dendrimer/ glycluster/ 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 carboxysilane 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 carboxysilane dendrimer having three peripheral sialyllactosamine moiety.

## 多価型ペロ毒素中和剤の開発

埼大工 ○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

【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。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 AB<sub>5</sub> 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。<sup>1)</sup> 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 $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 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 $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 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。<sup>2),3)</sup> そこで、本研究では、さらにその方法論を進展させ、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 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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 MATSUOKA<sup>1</sup>, Atsushi MIYAGAWA<sup>1</sup>, Ken HATANO<sup>1</sup>, Daiyo TERUNUMA<sup>1</sup>, Kiyotaka NISHIKAWA<sup>2</sup>, Miho WATANABE<sup>2</sup>, Yasuhiro NATORI<sup>2</sup>, and Eiji KITA<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Dept. Functional Materials Sci., Saitama Univ., Saitama 338-8570, Japan, <sup>2</sup>Dept. Clin. Pharmacol., Res. Inst., International Med. Cent. Jpn., Tokyo 162-8655, Japan, <sup>3</sup>Dept. Bacteriol., Nara Med. Univ., Nara 634-8521, Japan)

<sup>1</sup>Phone & 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、パ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<sup>1</sup>H-NMRの積分比から推定し、分子量はSEC法を用いて解析した。<sup>4)</sup>

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。<sup>5)</sup>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 $\alpha$ -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).

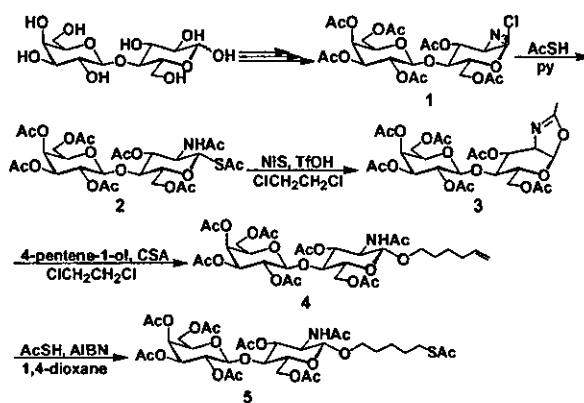
## N-アセチルラクタサミン担持カルボシランデンドリマーの合成

(埼玉大<sup>1</sup>・医療機器センター<sup>2</sup>・北大院理<sup>3</sup>・理研<sup>4</sup>・静岡県立大薬<sup>5</sup>)

○幡野 健<sup>1</sup>、森 知紀<sup>1,2</sup>、大田和 拓己<sup>3</sup>、松岡 浩司<sup>1</sup>、江角 保明<sup>4</sup>、照沼 大陽<sup>1</sup>、  
左 一八<sup>5</sup>、鈴木 康夫<sup>5</sup>

【目的】 *N*-アセチルラクタサミンは、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<sup>1)</sup>により報告されている中間体 **1** から *N*-アセチルラクタ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<sup>2)</sup>。本研究では、*N*-アセチルラクタ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、アジドの還元アセトアミド化と同時に AcS<sup>-</sup>の S<sub>N</sub>2 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** からオキサゾリン誘導体(**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

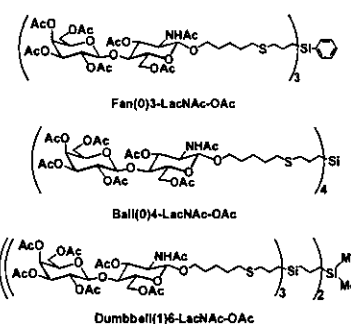


下でチオ酢酸と反応させることにより、デンドリマー導入のための前駆体(**5**)を合成した。**5** を形状の異なる三種類のカルボシランデンドリマーに導入することにより *N*-アセチルラクタサミン担持カルボシランデンドリマーを得た。NMR および MS スペクトルの解析により、それぞれの構造決定を行った。脱保護したカルボシランデンドリマー群は、インフルエンザウイルスに対する阻害剤として期待が持たれる化合物である。

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*-Acetylactosamines

Ken HATANO<sup>1</sup>, Tomonori MORI<sup>1,2</sup>, Takumi OHTAWA<sup>3</sup>, Koji MATSUOKA<sup>1</sup>, Yasuaki ESUMI<sup>4</sup>, Daiyo TERUNUMA<sup>1</sup>, Kazuya HIDARI<sup>5</sup>, and Yasuo SUZUKI<sup>5</sup> (<sup>1</sup>Department of Functional Materials Science, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan, <sup>2</sup>Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, <sup>3</sup>Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, <sup>4</sup>The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), <sup>5</sup>Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences) Tel & Fax: 048-858-3535, E-mail: [khatano@fms.saitama-u.ac.jp](mailto:khatano@fms.saitama-u.ac.jp)

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

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

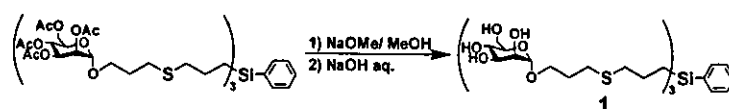
マンノースおよびその二糖によって機能化した  
カルボシランデンドリマーの合成と性質

埼玉大<sup>1</sup>・医療機器センター<sup>2</sup>・理研<sup>3</sup>・Duke Univ.<sup>4</sup>

○森 知紀<sup>1,2</sup>、幡野 健<sup>1</sup>、松岡 浩司<sup>1</sup>、江角 保明<sup>3</sup>、照沼 大陽<sup>1</sup>、Eric J. Toone<sup>4</sup>

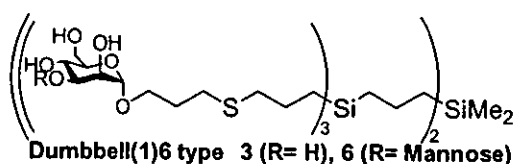
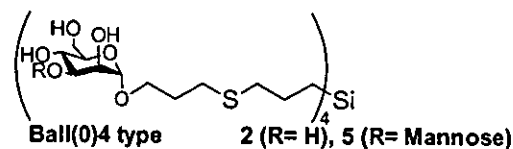
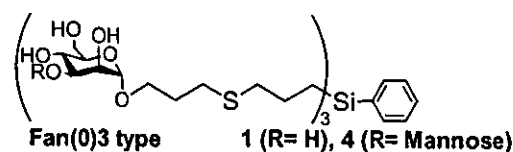
【序】 マンノースは生体内において種々の生命活動を司っている糖タンパク質の構成成分であり、高度に集積化されている。マンノースを集積化することで、HIVおよびバクテリア表面を模倣することが可能になると考えられる。また、レクチン的一种であるコンカナバリン A (Con A) はマンノースと特異的に結合することが知られている。本発表では、マンノースおよびその二糖を担持したカルボシランデンドリマーの合成と Con A との結合活性について報告する。

【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<sup>1)</sup>。既法<sup>2)</sup>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。

等温滴定カロリーメーター(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 Carborasilane Dendrimers Functionalized Peripheral Mannose Moieties

Tomonori MORI<sup>1,2</sup>, Ken HATANO<sup>1</sup>, Koji MATSUOKA<sup>1</sup>, Yasuaki ESUMI<sup>3</sup>, Daiyo TERUNUMA<sup>1</sup>, and Eric J. TOONE<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Department of Functional Materials Science, Saitama University, 255 Shimo-ohkubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan, <sup>2</sup>Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, <sup>3</sup>The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), and <sup>4</sup>Duke University)

<sup>1</sup>Tel and Fax: +81-48-858-3535, E-mail: [tmori@fms.saitama-u.ac.jp](mailto:tmori@fms.saitama-u.ac.jp)

**Key Word:** carborasilane 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 carborasilane 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 carborasilane dendrimers having three, four, and six peripheral mannose and its disaccharide derivatives. Isothermal titration calorimetry (ITC) was done for assuming binding assay between carborasilane dendrimer and concanavalin A (Con A). Carborasilane dendrimers were binding to Con A more than free mannose (Man-OMe) and mannose disaccharide (Man- $\alpha$ -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<sup>†</sup>・静岡県立大薬<sup>‡</sup>) ○山田明宏・幡野 健・松岡浩司・照沼大陽江角保明<sup>†</sup>・青木千恵<sup>‡</sup>・左 一八<sup>‡</sup>・鈴木康夫<sup>‡</sup>

**【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、近年増加しつづけている。近年、我々は糖脂質パラグロボシド (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\alpha$ -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<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C 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。

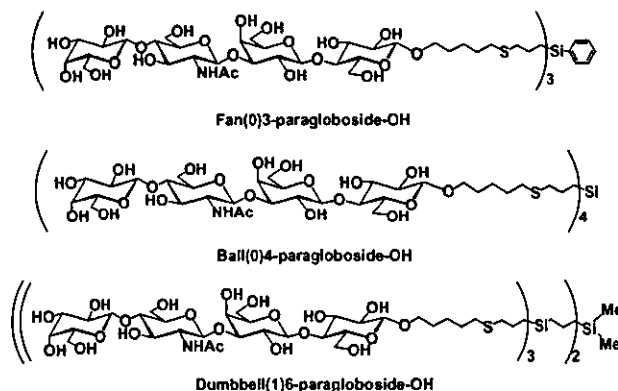


Fig. 1 paragloboside derivative cluster compounds

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