

研究紹介

アルキン型リンカーを用いた糖鎖固相合成
—— 菌頭反応による高反応部位の選択 ——泉 実
(生物資源化学講座)Solid-phase Synthesis of Oligosaccharides
Using Novel Alkyne-type Linkers
—— Selection of Reactive Sites on the Support
by Sonogashira Reaction ——Minoru Izumi
(Department of Bioresources Chemistry)

Two new alkyne-type linkers having alkynylmethoxy moieties were elaborated for solid-phase synthesis of oligosaccharides. A propargyl glycoside-type linker between a sugar residue and a solid support was formed by the Sonogashira reaction of a propargyl glycoside with polymer-supported iodobenzene. A propargyl ester-type linker was also constructed by the same reaction of a 4-(propargyloxy)benzyl glycoside with the latter. Both linkers are stable against acids such as TFA but can be readily cleaved with this acid after conversion to the corresponding alkyne-cobalt complex by treatment with $\text{Co}_2(\text{CO})_8$. The latter ester linker is generally advantageous in that mild cleavage liberates a product as its carboxybenzyl glycoside which is readily purified. The Sonogashira reaction was found to proceed only at spatially reactive sites on the solid support where the reagent accesses readily, so that the subsequent reactions including glycosylation on solid phase proceeded smoothly to result in high total yields of the desired oligosaccharides.

Key words : oligosaccharides, solid-phase synthesis, carbohydrates, glycosylation, cross-coupling

緒 言

酵母やヒトなどの真核生物から細菌などの原核生物にいたるまで、細胞表面は糖鎖によって覆われている。そのため外界との相互作用の中には糖鎖が関与するものが知られている。実際、糖鎖は細胞分化、神経機能、

細胞接着、炎症、癌の転移などに関わっており、インフルエンザウイルス、コレラ毒素、ペロ毒素、大腸菌線毛のレセプターは糖あるいは糖鎖である。また細胞表面の硫酸化多糖プロテオグリカンは細胞増殖因子や酵素などの様々な蛋白質と結合しその活性を制御していること、高等動物の免疫系を活性化する細菌表面複合糖質が存在することなど、生体内で極めて多様な役割を担っていることが明らかにされてきた¹⁻⁴⁾。このようなことから糖関連化合物は抗炎症薬、抗感染薬、癌転移抑制あるいは免疫増強剤のリード化合物としても注目されている。ところが、生物学的に重要な機能を有する糖鎖は一般に天然には微量にしか存在せず、また多くの場合構造が不均一であるため、精密な機能解析が困難であることが多い。糖鎖合成は均一な構造を有する糖鎖を、研究するうえで必要十分な量を供給することができるため、糖鎖機能の解明に大きな役割を果たしてきた。

最近では糖鎖合成も大きな発展を遂げ、液相合成によれば相当複雑な化合物でも合成できるようになった。しかし、一般に糖鎖合成を行うには多数の水酸基の選択的保護、脱保護、立体選択的なグリコシル化を行う必要がある。また合成経路の設定、保護基の用い方、グリコシル化反応の選択など経験を要するものが多い。また、各反応段階で精製の必要があるなど合成を進めるうえでの労力も相当なものがあり、糖鎖合成はいまだに必ずしも容易なものとは言えない。ペプチドや核酸は固相合成法が確立されており、化合物供給が容易であるために機能研究も容易であるのに対して、糖鎖機能解明の研究はこれらに比べ遅れていた。筆者の所属する研究室でも効率的かつ汎用性のある糖鎖合成法を確立させることを目指して研究が行われ、糖鎖合成の基本をなす水酸基の保護ならびにグリコシル化反応についていくつかの新しい方法が見出されてきた⁵⁻⁷⁾。さらには糖鎖の固相合成、糖鎖の化学-酵素合成法についても研究が行われている。本研究は、糖鎖の効率的かつ汎用性のある固相合成法の実現を目指し、さらにはその方法を用いて実際に天然糖鎖を合成することを目的に展開したものである。

研究背景

メリフィールドによって開発された固相合成⁸⁾は、ペプチド、DNA、RNA 合成の標準的手段となり、医薬品開発を目指した低分子合成についても近年爆発的な進歩をとげた。固相合成法では、過剰な反応剤はろ過などの簡便な操作で容易に除去できるため、過剰の反応剤を使用して完全に反応を進行させることができる。さらに合成方法が決まれば反応させる成分の組み合わせを変えるだけで多種類の化合物を迅速に合成できるという利点を有している。糖鎖の固相合成も近年目覚ましい進歩を遂げ

てはいるものの、糖鎖合成の基本をなすグリコシル化反応を固相担体上で定量的に進行させるのは未だに容易ではない。これは固相担体上に分布する官能基の反応性が、それが存在する固相上の部位によって大きく異なるという問題点によるもので、グリコシル化反応の中間体のように、一般に分子サイズの大きい反応剤、イオン対を形成する反応中間体、クラスターを形成する反応剤などでは固相上の反応性の低い部位で反応を完全に進行させるのは難しい。これは糖鎖に限らず、全ての有機化合物の固相合成におけるこの基本問題である。この問題を解決するためには、最初に固相担体上の反応性の高い反応場を選択すれば、その後の反応を高収率で進行させることができるものと考えた。すでに糖受容体を固相担体にアシル化反応によって結合する際に、導入量を減らすことによってある程度の制御ができることを見出していたが、アシル化反応は反応性の低い部位でも進行するため、反応性の高い場を選択することは十分にはできていなかった。そこで本研究では効率的な糖鎖の固相合成を目指し、固相上の反応性の高い場を選択するための新しい方法論について検討することにした。

深瀬らは水酸基ならびにアミノ基の新しい保護基としてプロパルギルオキシカルボニル (Proc) 基を、カルボン酸の保護基としてプロパルギルエステル (Fig. 1) を報告した⁹⁾。これらの保護基はトリフルオロ酢酸 (TFA) に対して安定であるが、 $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ と TFA を作用させるとアルキン-コバルト錯体を経て容易に切断される。

筆者はプロパルギル基の末端アセチレンと固相上のハロゲン化アリアルの間で菌頭カップリング反応を行うことにより、アルキン型リンカーを介して糖を固相に導入できるものと考えた。菌頭反応においてヨウ化銅 (CuI) を反応系に加えた場合、反応中間体はアルキニル銅錯体を経由するものと考えられる。一般にこのようなイオン性を帯びた反応剤はポリスチレン鎖のような疎水性の高い反応場には浸透しにくいだけでなく、反応剤によってはクラスターを形成するため、立体障害の大きい部位には接近しにくいものと考えられる。そのため菌頭カップリング反応により固相上の反応性の高い場を選択できるのではないかと考えた。

方法および結果

菌頭カップリング反応は塩基性条件下で行うため、リンカーとしては Proc 型は適当でないので、プロパルギル基を用いること、その導入位置としてはグリコシド位を選ぶことにした (Fig. 2)。そのためにはプロパルギルグリコシドが必要となるが、これまでプロパルギルグリコシドが糖鎖合成に用いられた例は多くなかった。そこでまず新しいグリコシドの保護基としてのプロパルギルグリコシドの使用について検討することにした。

それに先立ってプロパルギルグリコシドの効率的な調

製法について検討した。Fischer 法はアルコール還流下に酸を作用させて一段階でグリコシドを形成する古典的方法で、最も簡便なグリコシド結合形成法である。しかしこの方法ではプロパルギルアルコールの重合などのために、収率よくプロパルギルグリコシドを合成することはできない。本研究ではアルコール中でトリメチルシリルクロリド (TMSCl) を酸として作用させることで、室温でもグリコシル化が進行することを見出した¹⁰⁾。N-Troc-グルコサミンおよびグルコースを用い、アルコール中で過剰の TMSCl を室温で作用させたところ、対応するグリコシドが高収率で得られた。この反応では TMSCl は脱水剤としても働いているものと考えられる (Scheme 1)。

温和なこの方法によるとプロパルギルグリコシドも容易に合成することができた。またプロパルギル基は 50% TFA/ CH_2Cl_2 - H_2O (10:1) 中で $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ を作用させることによって選択的切断が可能であり、アノマー位の保護基として有用であることを見出した (Scheme 2)。

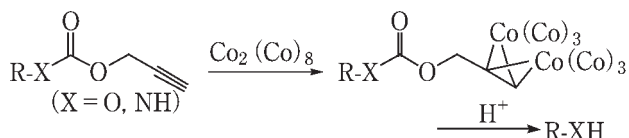


Fig. 1 Propargyloxycarbonyl (Proc) group as protection for hydroxy and amino group.

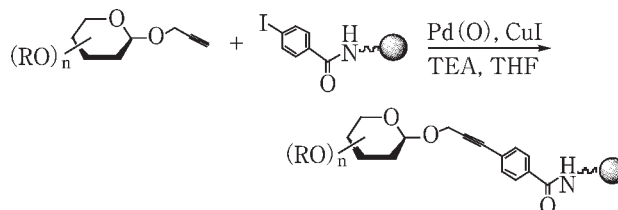
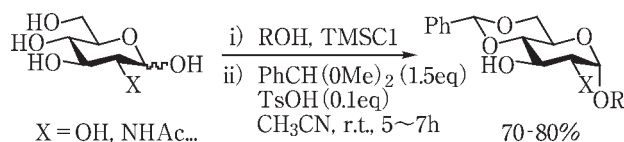
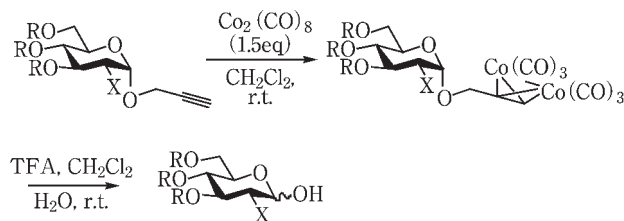


Fig. 2 Propargyl glycoside-type linker for solid-phase synthesis.



Scheme 1 New convenient Fischer glycosidation using trimethylsilylchloride (TMSCl).



Scheme 2 Cleavage of propargyl group via alkyne-cobalt complex under acid condition.

得られたプロパルギルグリコシドを用いて、固相上のハロゲン化アールとの菌頭カップリング反応を行ったところ、カップリング反応が進行して糖を固相に結合させることができた。導入された糖を糖受容体として固相上でグリコシル化反応を行ったところ、定量的にグリコシル化反応が進行した。この結果から菌頭反応によって、固相上の反応性の高い場を選択することができることがわかった (Scheme 3)。

この固相方法は糖鎖だけでなく全ての固相合成に応用できる。なおこのリンカー部も $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ を作用させてアルキン-コバルト錯体に導いた後に TFA を作用させることによって容易に切断された。

プロパルギルグリコシド型リンカーを切断して得られるのは、アノマー位が遊離の糖であるために、生成物は α 体と β 体の混合物となる。単純な構造の糖鎖の場合には問題ではないが、複雑な糖鎖の場合は、アノマーの存在が精製を困難にするおそれがある。そこで新しいアルキンエステル型のリンカーを考案した (Fig. 3)。このリンカーは糖のベンジルグリコシドにエステル結合でプロパルギル基を結合させた構造を有する。この場合も、プロパルギルエステルを有する単糖と固相担持ヨードベ

ンゼンとの菌頭反応によって、固相に糖を導入することが可能であった。

このリンカーは $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ を作用させてアルキン-コバルト錯体を形成させた後に TFA を作用させるか、あるいはアルカリ加水分解によって切断することができる。このリンカーの有用性を調べるために糖供与体としてイミデート糖を用いて固相上でのグリコシル化を行い、二糖へと導いた。アルカリ条件下で処理してリンカー部を切断したところ、それぞれ目的の二糖が高収率で得られた。同様にして三糖も効率良く合成することができた (Scheme 4)。このリンカーの場合も固相上の反応性部位が選択できていたことがわかる。続いてこのリンカー

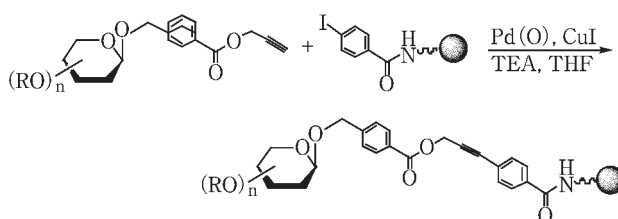
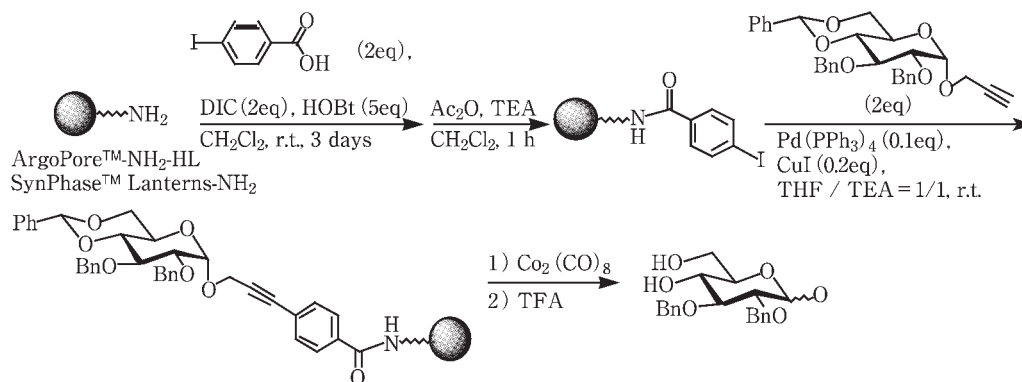
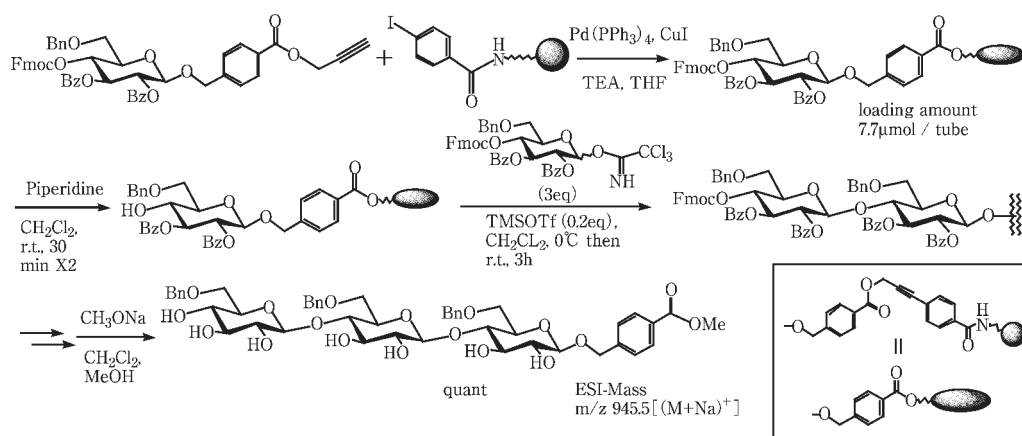


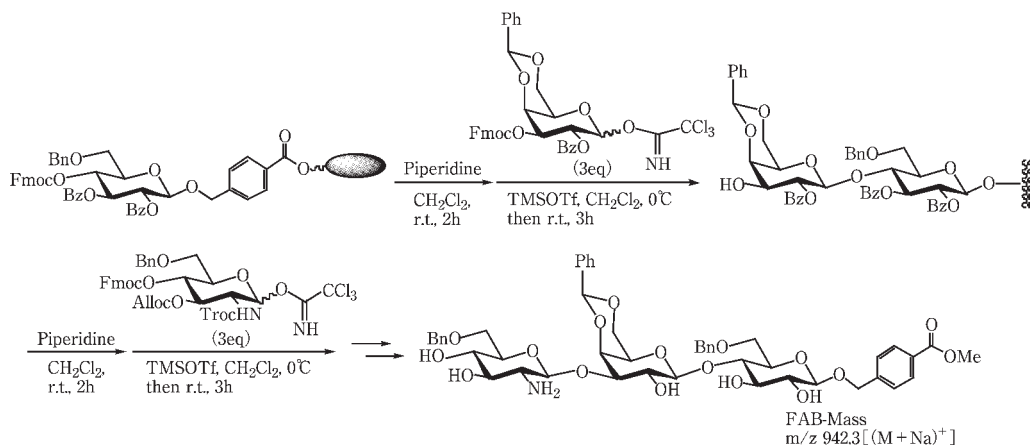
Fig. 3 Propargyl ester-type linker for solid-phase synthesis.



Scheme 3 Solid-phase synthesis of oligosaccharide using propargyl glycoside-type linker.



Scheme 4 Solid-phase synthesis of oligosaccharide using propargyl ester-type linker.



Scheme 5 Solid-phase synthesis of sialyl Lewis X using propargyl ester-type linker.

を用いた様々な天然糖鎖合成への展開を計画し、白血球表層の糖鎖であるシアロリス X の部分構造に相当する三糖の固相合成も定量的に行うことができた¹¹⁾。

保護基の組み合わせ、糖鎖伸長の順序、その他のグリコシル化反応の適用など課題は残っているが、この研究により固相上で糖のグリコシル化反応を定量的に行うという糖鎖固相合成における最も基本的な問題の解決策を示すことができ、一般的な糖鎖固相合成法の確立に向けて、基礎を築くことができたと考えている。

謝 辞

本研究は、筆者が大阪大学大学院理学研究科化学専攻在学中に行った研究であり、終始御指導・御鞭撻頂きました大阪大学名誉教授・楠本正一先生（現・サントリー生物有機科学研究所所長、福井工業大学教授）にこの場をお借りして御礼申し上げます。また、公私にわたり御指導・御協力頂きました同理学研究科助教授・深瀬浩一先生（現・教授）に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Rademacher, T. W., R. B. Parekh and R. A. Dwek : Glycobiology, *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 785-838 (1988)
- 2) Sairam, M. R. : Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction, *FASEB*, **3**, 1915-1926 (1989)
- 3) Varki, A. : "Unusual" modifications and variations of vertebrate oligosaccharides : Are we missing the flowers for the trees? *Glycobiology*, **7**, 707-710 (1996)
- 4) Mammen, M., S.-K. Choi and G. M. Whitesides : Polyvalent interactions in biological systems : Implica-

tions for design and use of multivalent ligands and inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37**, 2755-2794 (1998)

- 5) Fukase, K., Y. Nakai, K. Egusa, J.A. Porco Jr. and S. Kusumoto : A novel oxidatively removable linker and its application to alpha-selective solid-phase oligosaccharide synthesis on a macroporous polystyrene support, *Synlett*, **7**, 1074-1078 (1999)
- 6) Egusa, K., K. Fukase, Y. Nakai and S. Kusumoto : Stereoselective glycosylation and oligosaccharide synthesis on solid support using a 4-azido-3-chlorobenzyl group for temporary protection, *Synlett*, **1**, 27-32 (2000)
- 7) Zhang, S.-Q., K. Fukase, M. Izumi, Y. Fukase and S. Kusumoto : Synthesis based on affinity separation (SAS) : Separation of products having barbituric acid tag from untagged compounds by using hydrogen bond interaction, *Synlett*, **5**, 590-596 (2001)
- 8) Merrifield, R. B. : Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154 (1963)
- 9) Fukase, Y., K. Fukase and S. Kusumoto : Propargyloxycarbonyl and propargyl groups for novel protection of amino, hydroxy, and carboxy functions, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 1169-1170 (1999)
- 10) Izumi, M., K. Fukase and S. Kusumoto : TMSOTf as a mild and effective source of acidic catalysis in Fischer glycosidation and use of propargyl glycoside for anomeric protection, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 211-214 (2002)
- 11) Izumi, M., K. Fukase and S. Kusumoto : Solid-phase synthesis of oligosaccharides using novel alkyne-type linkers : Selection of reactive sites on the support by Sonogashira reaction, *Synlett*, **9**, 1409-1416 (2002)