



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

糖鎖生物学への応用を目指した機能性複合糖質の新規構築法

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 今村, 彰宏 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/3104">http://hdl.handle.net/20.500.12099/3104</a>

氏名(本国籍)	今村 彰 宏 (愛知県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第 407 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	糖鎖生物学への応用を目指した機能性複合糖質の 新規構築法
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 木 曾 真 副査 岐阜大学 教授 石 田 秀 治 副査 静岡大学 教授 碓 氷 泰 市 副査 信州大学 教授 茅 原 紘

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

糖鎖生物学の発展により、これまで未解明であった「糖鎖」の役割が次々に明らかとなってきた。糖鎖は生体内において主に複合糖質(糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカン)の形で存在し、様々な生理作用に関与する“機能性”を有することが分かっており、それらの機能解明が急がれている。機能性複合糖質の分子レベルでの機能解明を実現する為には、有機化学的手法による天然物の再構成が必要不可欠であると考えられる。純粋且つ大量の標品の提供は糖鎖生物学への多大な貢献を可能にする。本研究では複合糖質の内、糖脂質と糖タンパク質に着目し、各々に属する代表的な天然物の再構成技術の開発を行なうこととした。

第一章では、酸性糖脂質であるガングリオシド GQ1b の新規構築法の確立について行なった。従来の方法論では、シアリル化の立体選択性、総合収率、大量合成の面で課題が残されていた。そこで本研究では、ジシアリルガラクトースを鍵化合物に据える新規合成戦略を立案し、全合成を試みた。まず、ジシアル酸ドナーと適切に保護されたガラクトースアクセプターを縮合することで、効率的に鍵化合物であるジシアリルガラクトース三糖を得た。課題の一つであったシアリル化の立体制御は満足の行くものではなかったが、目的とする $\alpha$ グリコシドの精製法を確立し、効率的な調製を達成した。また、立体異性体の構造決定は二次元 NMR (HMBC)によって行なった。第四節では新規ガラクトサミン誘導体の設計を行ない、2位アミノ基と3位水酸基をトリクロロエトキシカルボニル (Troc) 基で、4,6位水酸基をベンジリデン基で保護したガラクトサミンドナーを合成した。そして、先に調製したジシアリルガラクトースアクセプターと縮合することで高収率かつ高立体選択的に GD2-epitope 四糖の構築に成功した。また、この縮合反応の際に、4,6位の保護基を Di-*tert*-butylsilylene (DTBS) 基に換えたガラクトサミンドナーを用いたところ、予想に

反して $\alpha$ グリコシドが主成績物として得られてきた。この興味深い知見(DTBS 効果)については第二章で深究することにした。GD2-epitope 四糖は二つの Troc 基を同時に脱保護し、アミノ基のみを選択的にアセチル化することで効率的に四糖アクセプターへと導いた。鍵化合物であるジシアリルガラクトースを四段階を経て効率的にドナーへ変換した後、四糖アクセプターとの縮合反応を行なったところ、92%という高収率にて GQ1b の非還元末端側七糖の構築に成功した。第七節では、グルコシルセラミドアクセプターの調製を行ない、二種類のアクセプターを合成した。これらグルコシルセラミドアクセプターと非還元末端側七糖の縮合を試みたが、目的とする GQ1b 骨格は痕跡程度にしか確認できなかった。水酸基を TMS (trimethylsilyl) 基で保護することで酸素原子の求核性を高めたアクセプターを用いた場合でも満足に行く結果を得ることは出来なかった。結果として現段階では全合成は達成されていないが、ガングリオシド合成に向けた新規合成戦略の礎は築けたと考えている。

第二章では、第一章の研究過程にて見出された「DTBS 効果」についての研究を行なった。4, 6 位に DTBS 基を有するガラクトース/ガラクトサミン供与体をグリコシル化に供すると顕著な $\alpha$ 選択性を与えるという現象を「DTBS 効果」と命名し、この効果について汎用性、実用性、反応機構の三点に着目し研究を行うことにした。第二節では、汎用性についての検証を行ない、保護基、受容体、反応温度、反応溶媒、脱離基について各々検討を行なった。その結果、ほとんどの反応条件下において「DTBS 効果」による高い $\alpha$ 選択性が観察され、汎用性の高さが示された。唯一の例外として、脱離基にブロミドを配し、縮合プロモーターに不溶性の珪酸銀塩を用いた場合に限り、 $\alpha$ 選択性は確認されなかった。第三節では、実用性を確認する為にムチン型糖アミノ酸の効率的合成を試みた。適切に保護したセリン/スレオニン受容体との縮合検討の結果、いずれの場合も非常に高い選択性にて目的とする $\alpha$ グリコシドを得ることに成功した。また、合成した糖アミノ酸の保護基を脱保護することで、糖ペプチド合成への応用が可能であることを実証した。第四節では、実用性を広げる目的で 4-methylumbelliferyl T 抗原の合成を試みた。蛍光基質 4-methylumbelliferone (4MU)をアグリコンに持つグリコシドの化学的合成は比較的困難とされ、特に $\alpha$ -GalNAc-4MU 構造については合成例がほとんど報告されていない。このような背景の下、「DTBS 効果」を利用し、 $\alpha$ -GalNAc-4MU 構造を含む 4MU-T 抗原の合成を志向した。最初、唯一の成功例を参考にした方法を試みたが、満足に行く結果は得られなかった。次に、Mitsunobu 反応をグリコシル化に応用した方法を試みたところ、収率80%を越える好結果が得られた。条件の最適化を行ない、目的とする 4MU-T 抗原の完全保護体を得た。DTBS 基を含む保護基を除去し、目的とする 4MU-T 抗原の効率的合成を達成した。第五節では、「DTBS 効果」の反応機構解明を指向し、DTBS ドナーの X 線結晶構造解析を行なった。その結果、定常状態において DTBS 基はアノマー位に向かって傾斜していることが示された。これは DTBS 基の嵩高さが「DTBS 効果」を発現する一因であることを示唆している。この事実と Milkovic らによって提唱された”Through-space” electron-donation の仮説を重ねることで、「DTBS 効果」は DTBS 基由来の *t*-butyl 基の嵩高さによる立体障害に起因する現象であると結論づけた。第二章での研究により、「DTBS 効果」は $\alpha$ -Gal/GalNAc 構造を合成する為のユニーク且つ有用性の高いツールでことが確認された。

## 審査結果の要旨

本学位論文は、糖鎖生物学への応用を目指した機能性複合糖質の新規構築法の開発を行ったものであり、2つのテーマに大別される。その1は、中枢神経系の微量ガングリオシド GQ1b の新規再構成技術の開発であり、その2は、ムチン型糖タンパク質糖鎖の効率的合成を目指した DTBS 効果の研究である。

第一章では、ガングリオシド GQ1b の新しい再構成技術を確立するための合成戦略の立案、鍵化合物であるジシアルガラクトースならびに新規ガラクトサミン・ドナーの調製法の確立、及び鍵中間体である GD2 エピトープ骨格の構築に成功している。その際、ガラクトサミン・ドナーの 4, 6 位をベンジリデン基で、2, 3 位を 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル (Troc) 基で保護すると立体選択的に  $\beta$ -グリコシドが得られることを示すと同時に、ベンジリデン基をジ-tert-ブチルシリレン (DTBS) 基に変換すると、 $\alpha$ -グリコシドが立体選択的に生成することを見出した。

GD2 エピトープ四糖は、さらにジシアルガラクトース・ドナーとの縮合により GQ1b エピトープである七糖糖鎖へと高収率にて導かれている。

第二章では、第二節から第五節にわたって、ガングリオシド GQ1b の新規再構成技術の開発過程で新たに発見された「DTBS 効果」について、その汎用性、実用性、及び反応機構について詳細に検討している。汎用性については、ガラクトサミン及びガラクトースの 4, 6-DTBS 体を用い、アミノ基と水酸基の保護基、還元末端の脱離基、グリコシル化の際の反応温度・反応溶媒ならびにグリコシル化受容体について様々な多様性を持たせることで検証を行っている。その結果、ほとんどの条件下において、「DTBS 効果」による高い  $\alpha$ -立体選択性を確認した。次に実用性を検証するため、「DTBS 効果」を利用したムチン型糖鎖アミノ酸の効率的合成を試みたところ、従来法と比較して格段に高い収率にて、 $\alpha$ -ガラクトサミニルセリン/スレオニンの構築に成功した。また本法を応用して、エンド型  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの高感度基質である 4-メチルウンベリフェリル T 抗原の短段階合成にも成功している。この様に、「DTBS 効果」を利用した  $\alpha$ -ガラクトサミニル化、 $\alpha$ -ガラクトシル化の広汎な実用性が検証された。最後に、「DTBS 効果」の反応機構について詳細な検討が行われている。すなわち、X 線結晶構造解析によるコンフォメーション解析とグリコシル化反応の解析から、オキシカルベニウムイオン反応中間体に対する through-space electron donation theory を提案している。

以上、本学位論文では、神経生理活性ガングリオシド GQ1b の新しい再構成技術を確立するとともに、新たに「DTBS 効果」を発見し、その汎用性、実用性、ならびに反応機構を明らかにした。これら機能性複合糖質の新規構築法の開発は、今後の糖鎖生物学研究に大きく貢献するものと思われる。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

- 1) Di-*tert*-butylsilylene (DTBS) group-directed  $\alpha$ -selective galactosylation unaffected by C-2 participating functionalities. Akihiro Imamura, Hiromune Ando, Satomi Korogi, Genzoh Tanabe, Osamu Muraoka, Hideharu Ishida and Makoto Kiso, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 6725-6728 (2003).
- 2) Di-*tert*-butylsilylene-directed  $\alpha$ -selective synthesis of 4-methylumbelliferyl T-antigen. Akihiro Imamura, Hiromune Ando, Hideharu Ishida and Makoto Kiso, *Organic Lett.*, **7**, 4415-4418 (2005)