

高立体選択的グリコシル化反応の開発

分子内アグリコン転移による α -マンノシル化と
その糖タンパク糖鎖化学合成への応用理化学研究所細胞制御化学研究室主任研究員
伊藤 幸成

糖タンパク、糖脂質、プロテオグリカン等の複合糖質は、糖鎖と呼ばれるオリゴ糖部分を有しており、これらは生体内での機能に重要な役割を果たしている¹⁾。例えば糖タンパク質においては、糖鎖が種々のタンパク質の生体内活性、安定性、細胞内輸送等に関与していることが知られている。従来、糖鎖は糖タンパクのいわば付随的な部分と考えられがちであったが、実はその三次元構造の構築や保持にも重要な寄与をしていることが証明されている²⁾。例えば、アスパラギン結合型糖鎖は、付加部位周辺の立体配座をアスパラギンターン型から β -ターン型へと変化させて結果としてタンパク質全体の三次元構造に大きな影響を与える³⁾。このことは、他の種類の翻訳後修飾と較べて付加される置換基（糖鎖）が格段に大きいことから容易に想像される。またERに存在するシャペロンであるカルネキシンやカルレキュリンは糖タンパク生合成の過程で生ずる特定の糖鎖構造を特異的に認識するいわゆるレクチン活性を持っていることが明らかとなっている⁴⁾。

複合糖質糖鎖の多くはその糖鎖部分が細胞の表層においていわば細胞の顔として機能している⁵⁾。例えば細胞の癌化や分化に伴って糖鎖の構造が変化すること⁶⁾や炎症反応における白血球-血管内皮相互作用に代表される細胞間接着現象におけるリガンドとして糖鎖が機能していること等が証明されている⁷⁾。このように、糖鎖はタンパク質、核酸に続く第三の生体分子としての市民権を確かなものにしつつあるが、その一方、抗生物質に代表される生理活性天然物においても、糖鎖の重要性が急速に認識されている。特に最近ユニークで強力な抗腫瘍活性から注目されているエンジン抗生物質や、大多数の耐性菌に対して有効なバンコマイシンにおいては、糖部分が決定的な役割を果たしていることが明らかとなり、糖鎖化学において確立された方法論を利用して活発な研究が展開されている^{8), 9)}。これらの背景をもとに、当研究室では特に糖タンパク質に特異的に発現される糖鎖構造に注目し、それらの合成研究について総合的に検討を行なっている¹⁰⁾。ここでは特に糖鎖化学合成における様々な問題点が集約されている、複合型とよばれる糖タンパク糖鎖を標的分子として展開してきた研究について紹介したい。

糖タンパク糖鎖は著しい多様性を持つ分子群であるが、これらはタンパク質との結合様式によって、*O*-結合型（セリン/スレオニン結合型或いはムチン型とも呼ばれる）と*N*-結合型（アスパラギン結合型）に分類される¹¹⁾。後者は更にその基本構造に従って高マンノース型、混成型、複合型の3種に大別される。その中で複合型糖鎖は特に複雑な構造を持っており、その末端にしばしばガラクトース、シアル酸、フコース等分子認識に重要な糖残基を発現している¹²⁾。また、繰り返し構造による巨大分子化や硫酸基によるエステル化、多重分枝化等も見られ、糖タンパクの構造多様性という観点から最も重要な糖鎖構造である。図1に複合型糖鎖の代表的な構造（1）を示した。

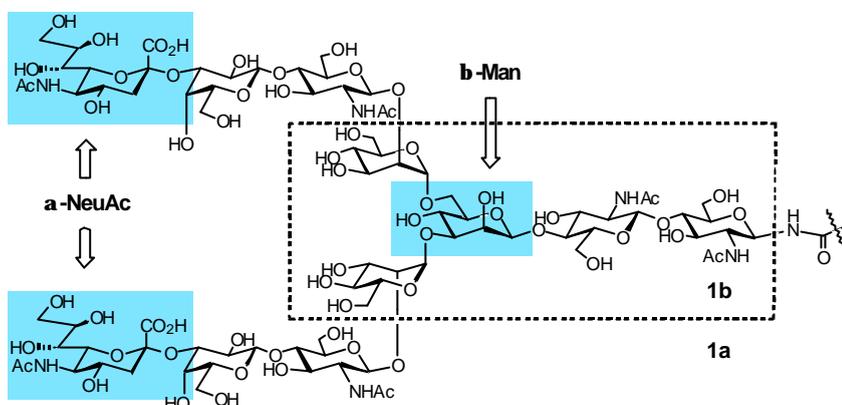


図1 典型的な複合型糖タンパク糖鎖の構造

ところで、糖鎖の機能を厳密に解析するためにはこれらを単一な分子種として得ることが重要である。もちろんこれは糖鎖に限ったことではなくすべての生体分子や生理活性物質にあてはまることであろう。しかし、実際に細胞に存在する複合糖質糖鎖を単離することは一般的には非常に困難を伴う。これは糖鎖の構造多様性から容易に想像がつくことである。糖鎖の構造パターンは糖タンパク質の種類やそれを発現する生物種や臓器によって異なる。また、ヒトの血液型（A,B,AB,O）の実体が赤血球表面の糖鎖構造であることからわかるように、個体差も無視できない。加えてさまざまな病変によって糖鎖構造が変化することも知られている。更に面倒なことには、同一の個体が発現する糖タンパクにおいてもその糖鎖構造にはかなりの不均一性が存在している¹³⁾。

このような状況を考えると、糖鎖を化学的に合成することが様々な利点を持ちうることは明白である。すなわち、合成化学的手法を用いれば、純度の高い糖鎖を比較的大量に得ることができるはずであるし、また天然には存在しないあるいは生物試料からの単離が著しく困難なものの供給も可能になるであろう。

タンパク質科学の分野においても分子生物学全盛の時代に有機合成化学の入り込む余地はないと思われがちであったが、実際には“native chemical ligation”などに代表される、いわば有機化学の側からの反撃によって新たな局面が開けている¹⁴⁾。

糖鎖の化学合成は純粋化学的な課題としても興味深い問題点を含んでいる。エナンチオ選択的反応（特に触媒的不斉合成）、特異な環構造の構築（タキソール、エンジン等）、非環状系での立体化学制御（ポリエーテル、マクロリド）等を花形として発展してきた近代有機合成化学の中で、*O*-グリコシル化反応を鍵とするオリゴ糖の合成はどちらかという脚光を浴びにくい領域であったと言えるかもしれない。糖化学はともすれば特殊な領域と考えられ、反応の結果の複雑さや技術的な側面のみが強調されてきた感がある。しかし、これを改めて有機合成化学の課題として眺めると色々な切り口が可能ではないであろうか。

さて、糖鎖はその名の通り糖が連なってできているわけであるから、これを有機化学的に合成するためには糖残基をつなぐグリコシド結合をいかにして選択的にしかも収率良く合成するかが鍵となる¹⁵⁾。糖鎖の合成における反応制御には糖残基間の結合位置の制御

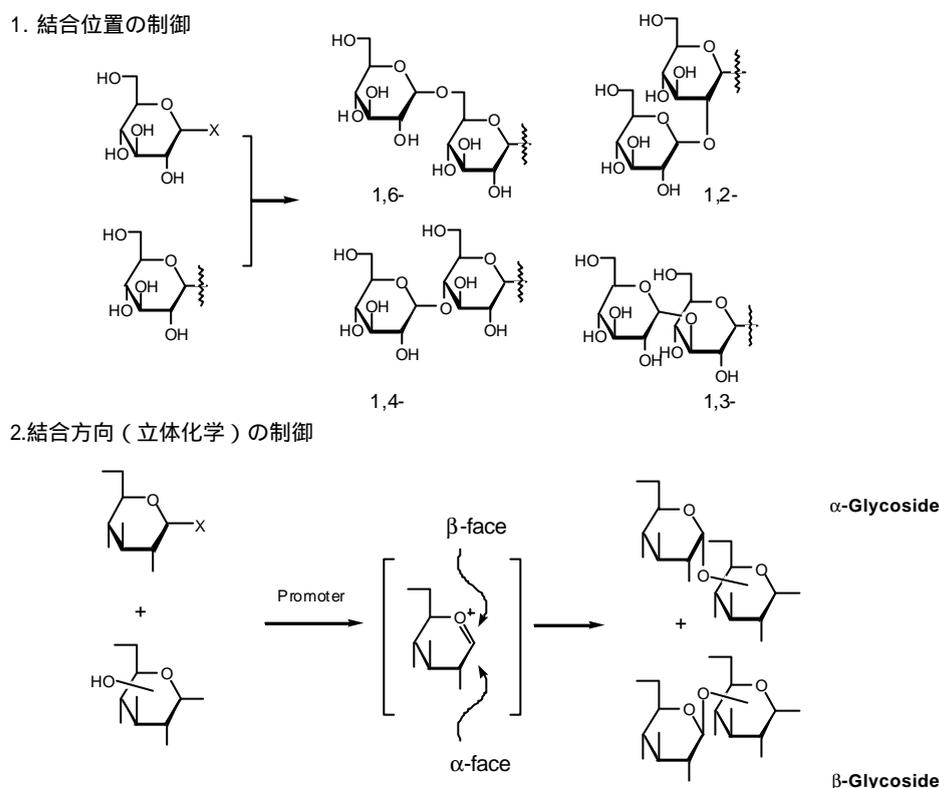


図2 糖鎖合成における反応制御

(位置選択性)と結合方向の制御(立体選択性)がある。(図2)前者は基本的には水酸基の選択的な保護基の導入によって達成される。現在では様々な性質を持つ多種多様の保護基が目的に合わせて使用できるようになっていることから¹⁶⁾, 手間を厭わない限りにおいてはその達成はさほど困難ではない。

一方、後者は糖鎖の合成においてより本質的な問題点である。多数の糖残基を有する糖鎖を合成するためには、*O*-グリコシル化反応を繰り返す必要がある。一般的にはこのような反応を行なう度に、 α 、 β の2種類の立体異性体が生成する可能性がある。この制御を行なうことが当然要求されるわけであるが、そこで用いられる方法論や制御の難易はグリコシド結合の性質(糖の種類、立体化学)によって大きく異なる。また、糖供与体の脱離基(X)の種類やそれを活性化するためのプロモーター、糖受容体の反応性によっても反応の効率や選択性は影響される¹⁷⁾。従って合成戦略の選択を誤ると満足のいく結果を与えないばかりか、望む異性体が全く得られないこともある。一般的にはグリコシル化反応の効率、選択性は、予測しがたいのが現状であり、様々な反応条件をスクリーニングして初めて満足の行く結果が得られるということが多い。

このような状況は他の生体分子であるペプチド¹⁸⁾や核酸¹⁹⁾の領域とは対照的である。これらを合成する反応においては新たな不斉中心が生じるわけではないので(アミノ酸のラセミ化を除けば)立体化学的な曖昧さが無い。また、反応条件の最適化も著しく進んでおり、最新の手法を駆使すれば各ステップごとにほぼ定量的な収率が実現できる。現在ではこれら

の領域では自動合成機が市販されルーチンの合成に用いられるまでに至っている。同様なことがオリゴ糖の合成においても可能であれば糖鎖科学の進展のためのブレークスルーになるはずである。しかし、その上でグリコシル化反応の立体選択性の問題が大きな障壁として立ちはだかっている。

それでは一般的にどのようなグリコシド結合が立体化学的に簡単であり、どのようなものが難しいのであろうか。図3に α -グリコシル化反応の経路を簡略化して示した。ここでアノマー効果²⁰⁾とよばれる立体電子効果を考慮するとアキシャル(D-ヘキソピラノシドでは-)の立体化学を与える経路が有利と考えられる。すなわち、糖供与体(2)の活性化によって生ずるイオン対間の平衡が十分に速ければより反応性の高い3bを経由して糖供与体の立体化学とは無関係に-グリコシド4aを主生成物として与える。一方、C-2位をアシル系の置換基で保護した供与体5を用いると、5員環(アシロキシニウム)中間体6を経て反応が進行し、1,2-トランスグリコシド7を選択的に与える。従って以上の範疇に入らないグリコシド結合が合成的に難しいものということになるが、それを天然に存在する糖鎖構造から探したすと、シアル酸の-グリコシド(α -NeuAc)及びマンノースの-グリコシド(b -Man)がこれにあてはまる。(図1)これらはエクアトリアルに配向したグリコシド結合を持ち、1,2-トランスの隣接炭素を持たないため立体電子の効果も隣接基関与も利用することができないからである。シアル酸の-グリコシド形成に関しては酵素法を含めて有効なアプローチがいくつか開発され²¹⁾、かなりの程度解決されたと考えられる。そこで、いわば残された問題点であったマンノースの立体選択的-グリコシド形成反応を解決すべく以下の検討を行なった。

-マンノグリコシドの選択的合成は困難な課題であるが、糖タンパク糖鎖の合成研究を行なう上で極めて重要である。アスパラギン結合型糖鎖はそのすべてが共通構造としてマンノース3分子、*N*-アセチルグルコサミン2分子からなる5糖(1b)を有している。その中核を形成するのが-マンノグリコシド結合(β Man1 \rightarrow 4 β GlcNAc)である。(図1)

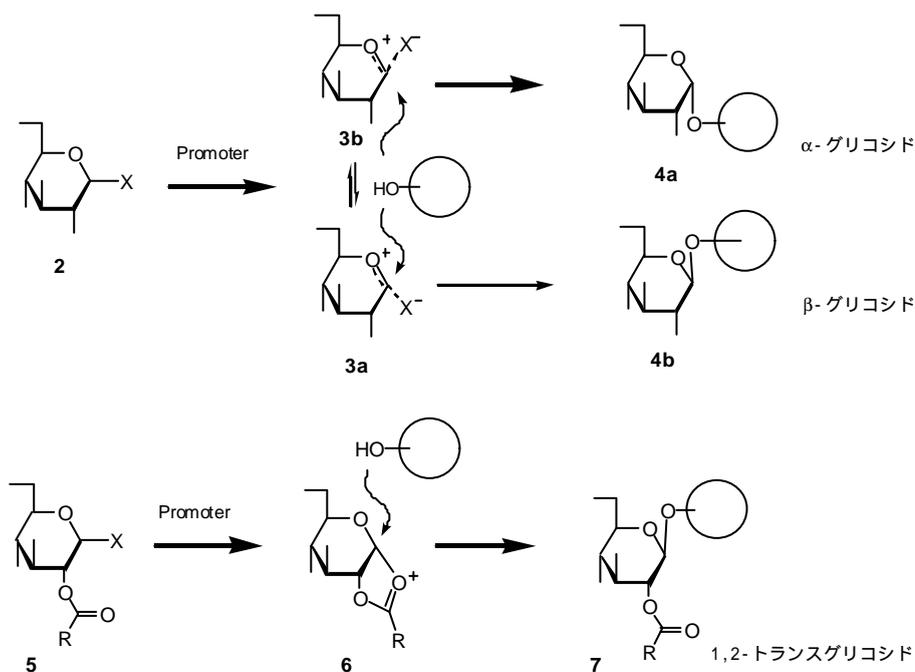


図3 グリコシル化反応の経路

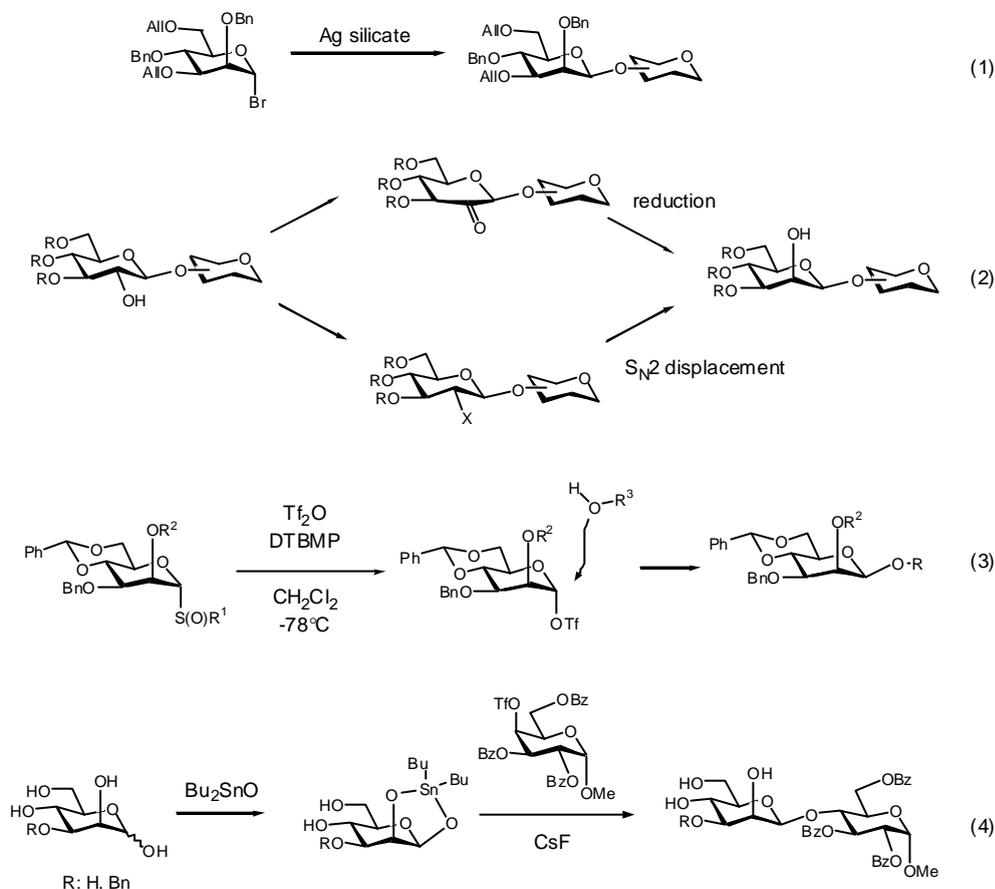


図4 代表的な α -マンノシル化反応

ここで、このグリコシド結合の形成のためにこれまで検討されてきた方法について簡単に言及しておきたい。(図4) これらの中で最も代表的なものに Paulsen ら²²⁾, Garegg ら²³⁾, van Boeckel ら²⁴⁾ によって検討されてきた不溶性の銀塩を用いる方法がある。(式1) この反応は固体表面に活性化された糖供与体が固定化されることによってアノマー位のエピメリ化を抑制して S_N2 型の反応を促進することがポイントである。ただしこの種の反応においてはそのメカニズムから想像されるように化合物の構造や反応性による選択性のばらつきが大きく一般的な方法としては問題がある。一方、グルコース又はガラクトースから(1,2-トランス)グリコシドを合成しておいて、立体化学の変換によって α -マンノグリコシドを得る試みも種々行われている²⁵⁾。(式2) 特に松尾, 鯨坂ら²⁶⁾, Unverzagt ら²⁷⁾ はこのアプローチによって複雑なアスパラギン結合型糖鎖の構築にまで研究を展開している。一方、最近米国のD. Crich らは糖スルホキドを低温下 Tf_2O で活性化する高選択的 α -マンノシル化反応を開発している²⁸⁾。(式3) この反応はおそらく α -マンノシドを直接合成するタイプのなかでは今のところ最も優れたものであろう。ここでは活性中間体としてトリフラートを經由する S_N2 型反応経路が提唱されており、このメカニズムはNMRを用いた詳細な解析でも支持されている²⁹⁾。一方, Hodosi, Kovác は1,2-スタニレンアセタールを利用するアプローチを行ない、良好な収率で α -マンノシドを得ている³⁰⁾。(式4) ここで注

目されるのは全く無保護のマノースを用いても反応を行なうことができるということであり、他に例を見ないユニークな結果と言えるであろう。一方、池上らは環状オルトエステルを中間体とする反応を開発している³¹⁾。また、マンノシダーゼ、マンノース転移酵素等による α -マンノシル化反応もある程度の成功を収めている^{32, 33)}。

以上の試みは全て高い評価に値するものであるが、複雑で多様な糖タンパク糖鎖構造への一般的な適用性は明確ではない。

一方、分子内アグリコン転移反応 (Intramolecular Aglycon Delivery : IAD) という新しい概念が1991年にカナダのHindsgaulらによって提唱された³⁴⁾。この反応は、グリコシド結合の立体選択性に関してはまったく紛れがないという特色がある。ここではマンノース供与体のC-2位と受容体 (アグリコン) の水酸基をなんらかの橋架け構造で結ぶ事によって立体化学の制御を行なうというのが基本的なアイデアである。(図5) 彼らはその目的にイソプロピリデンアセタールを利用している。また、コロンビア大学のStorkらはシラケタール中間体を用いて同様の結果を得ている³⁵⁾。以上のアプローチはIADの概念が実際に高選択的な α -マンノシル化を行なう上で妥当なものであることを明確に示している。しかし、反応の結果得られる生成物の収率自体は従来法と較べて必ずしも優れたものではなく、複雑な糖鎖の合成への適用性も明確ではない。

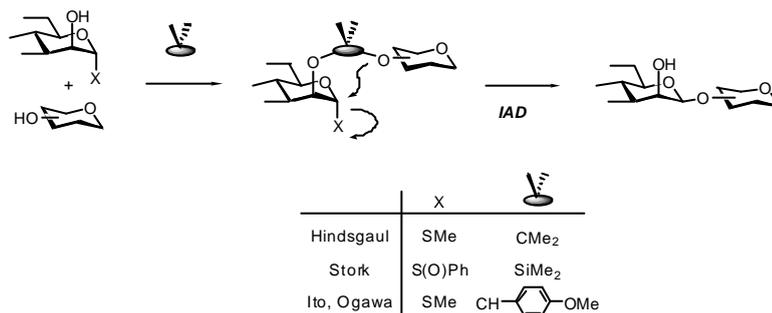


図5 分子内アグリコン転移反応による α -マンノグリコシドの選択的形成

それに対して我々はIADの基本的な概念を活かしつつ、次のような新たなアプローチを試みることにした。ここではマンノース供与体8のC-2位にパラメトキシベンジル (PMB) 基を導入しておきその選択的な酸化を利用することを考えた³⁶⁾。(図6) PMB基は水酸基の優れた保護基として天然物の全合成等に広く活用されている³⁷⁾。ベンジル基と同様に接触水素化で除去が可能であるが、それ以外にDDQ, CANのような酸化剤でも円滑に脱保護が進行するという特色がある。従って他の汎用される殆どの保護基、例えばアセチル基、ベンジル基、イソプロピリデン基、シリル基、アリル基等を全く傷めることなく脱保護することが可能である。またペプチド結合や各種の(O-, N-, C-, S-, F-)グリコシド結合もこの条件下で安定であることが予想される。この反応の正確な機構はさておき、その中間体としてキノンメチド型の活性種9が想定される。ここで水が存在すればヘミアセタールを経て加水分解すなわち脱保護が進行するわけである。この経路が正しければ次のようなことが期待

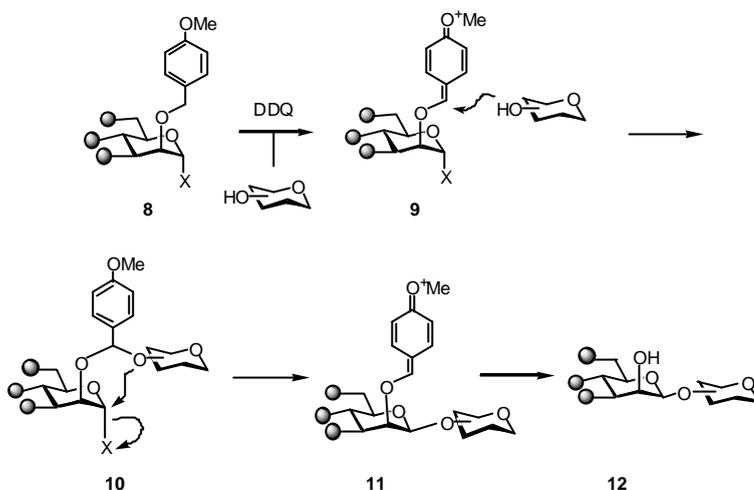


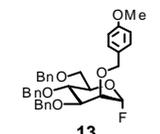
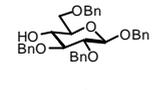
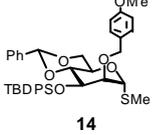
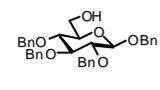
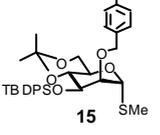
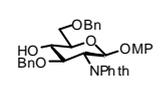
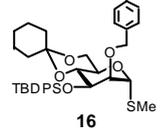
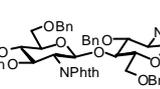
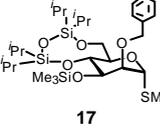
図6 パラメトキシベンジル基を利用する分子内アグリコン転移

される。すなわち PMBエーテルの酸化において無水条件を保ちつつアルコール（糖受容体）を共存させれば混合アセタール10 が得られると考えられる。さて、この考察と Hindsgaul, Stork によって報告されている IAD の結果を考え合わせると次のような筋書きを描くことができる。つまり C-2 位水酸基を PMB で保護したマンノース供与体8とアグリコンから出発して、DDQ による *p*-メトキシベンジリデン混合アセタール10 の形成とそれに続く C-1 位の活性化によって α -マンノシド12 の選択的な生成を行なうというものである。

以上の筋書きが実現可能であればその利点として次のようなことが考えられる。まず、PMB 基は汎用されている保護基であるため、その導入には色々な手法を用いることができる。たとえば、塩基性条件下によるアルキル化、酸性条件下でのトリクロロアセトイミダートの活性化³⁸⁾、還元条件下での環状アセタールの開環³⁹⁾ 等である。次に、IAD における橋架け中間体となる混合アセタールが中性に近い温和な条件で形成できることである。この条件ではすでに述べたように殆どの保護基は影響を受けないであろうし、チオ基やフルオリド等のグリコシル化において有用な脱離基も共存可能であろう。また、IAD の過程においても我々の戦略は大きな利点を持つことが期待される。つまり、混合アセタールの上の置換基となる *p*-メトキシフェニル基の電子供与性によって IAD の進行に伴って生じるカチオン性の中間体11（もしくは遷移状態）が安定化されるはずである。以上を考え合わせ、我々がデザインした系は Hindsgaul や Stork の系と較べて多くの面で優れた性質を兼ね備えていると考えた。

以上の仮説を検証するために、C-2 位水酸基が PMB 基で保護された種々のマンノース供与体を合成した。アグリコンとの反応は期待通り DDQ の存在下で円滑に進行し、混合アセタールを与えた。IAD を行なうためのアノマー位の活性化にはフルオリド（X=F）の場合は AgOTf-SnCl₂⁴⁰⁾ チオグリコシド（X=SMe）の場合は MeOTf⁴¹⁾ を用いた。なお、後者についてはその活性化に有効とされる試薬（NIS-TfOH, DMTST, PhSeOTf, NBS 等）をスクリーニングしたが、これまでのところ MeOTf のみが満足いく結果を与えている。また、混合アセタールの酸に対する不安定性のため、いずれの場合も塩基としての 2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-メチルピリジン（DTBMP）の共存を必要とする。 α -マンノシドの生成は予想通り立体選択的に進行して、C-2 位が遊離水酸基となった12を与えた。表1に示した様に、IAD

表 1 マンノース供与体の保護基の影響

Donor	Acceptor	Yield	
 <p>13</p>	A	52	 <p>A</p>
	B	74	
	C	40	
 <p>14</p>	C	60	 <p>B</p>
	D	60	
 <p>15</p>	C	60	 <p>C</p>
	D	85	
 <p>16</p>	C	83	 <p>D</p>
	D	85	
 <p>17</p>	C	75	

の効率はマンノース上の脱離基及び保護基のパターンにかなり依存することがわかった。(表1) すなわち、チオグリコシドの方がフルオリドより良い結果を与える⁴²⁾ こと、IADの効率的な進行のためには4,6-位を環状アセタールで保護することが有効であるという2点が重要な知見として得られた。中でも、シクロヘキシリデン基を有する16を用いると80%を超える収率で望む生成物が得られた⁴³⁾。(図7) 反応性の低さからこれまで -マンノシル化が困難とされてきた24, 25との反応がこのように高い効率で進行したことは我々の方法論の有効性を際立たせるものであろう。類似の性質を持つと考えられる4,6-イソプロピリデン体15を供与体とすると収率は再び60%に低下した。つまり、IADの効率に与える影響は4,6-シクロヘキシリデン(16) > 4,6-ベンジリデン(14) = 4,6-イソプロピリデン(15) > 3,4,6-ベンジル(13)の順となり、マンノースのイス型構造をなるべくrigidに固定化することが重要な因子であるらしい。これは6員環のコンフォーメーションが固定化されることにより副反応を伴うS_N1型の経路を抑えたと考えれば説明可能であろう。ちなみにCrichらの反応においても4,6-位を環状アセタールで保護することが必須であると報告されている²⁸⁾。

ここで得られる18, 19はアスパラギン結合型糖タンパク糖鎖に共通の2糖(Manβ1 → 4GlcNAc)及び3糖構造(Manβ1 → 4GlcNAcβ1 → 4GlcNAc)に相当するものであり、我々の反応が天然型糖タンパク糖鎖への応用において極めて適したものであることが証明されたと考えている。一方、ジシロキサン基(TIPDPS)で保護された17を用いた場合も収率の向上が見られた。一見フレキシブルなTIPDPS基がどうして良好な結果を与えたのかは不明で

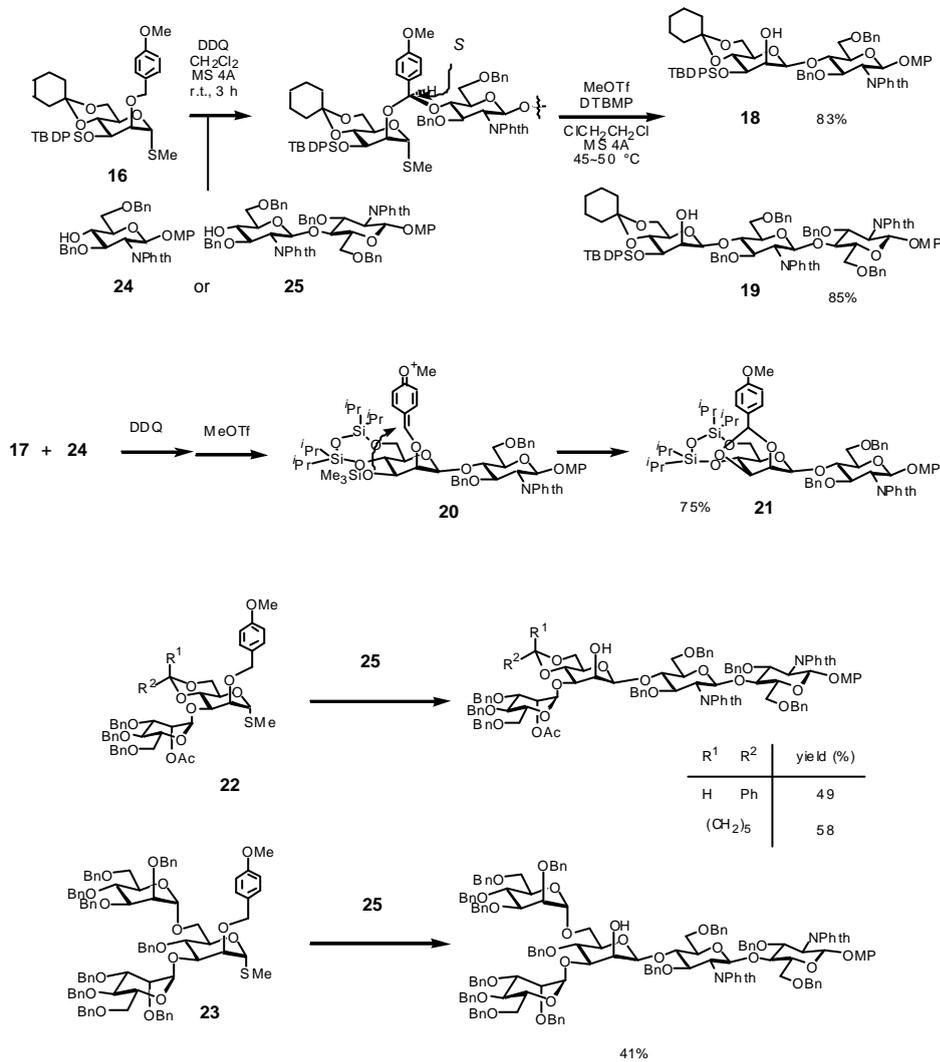


図7 選択的 -マンノシル化反応の例

あるが、この場合はC-3位のOTMS基の関与によって環状アセタール21を与えることに起因しているのかもしれない。つまり、IADの過程において生じるカチオン性中間体20が環化反応によって有効にトラップされることが(少なくとも部分的には)副反応の抑制につながっているのであろう。

ところで本反応において混合アセタール(9)の形成に伴って新たな不斉中心が生じるが、興味深いことにこのステップは高い立体選択性で進行しており、図7に示したようにその立体化学は専ら*S*-配位を有していることが明らかとなった⁴⁴⁾。

また、本反応のもう一つの特徴としてオリゴ糖フラグメント縮合への適応性があげられる。(図7)一般的に複雑な化合物の合成においてはconvergentな合成経路が有利となる。糖鎖の合成においても、ある程度の大きさを持つものであれば、標的分子をいくつかのフラグメントに分けて合成しておいてそれらをカップリングさせる方が得策となる場合が多い。例えば我々は以前に25個の糖残基から構成される糖脂質糖鎖の合成を達成したが⁴⁵⁾、この

場合も種々のオリゴ糖フラグメントを合成単位として用いた。我々の α -マンノシド合成法のフラグメント縮合への応用は2糖(22)及び3糖(23)を供与体として合成し、受容体24, 25との反応を行なうことによって検証した。その結果、単糖を用いた反応に較べて収率は低下するものの、立体選択的に3~5糖が得られた。このようにフラグメント縮合の場において完全立体選択的な α -マンノシル化を実現したのは、他に例を見ない結果であるといっても差し支えないであろう^{42, 46)}。

ところで以上の反応においてマンノースの4,6-位を環状の保護基で保護することが重要であることはすでに述べた通りである。このようにマンノースの位置選択的な保護を必要とするのは本反応の欠点であるように見えるかもしれない。しかし、反応の結果得られる α -マンノシドは後述のように糖タンパク糖鎖の構築の上で適した保護のパターンを持つことになることに注目していただきたい。

ところで我々の研究室では高分子担体を用いた糖鎖の合成を柱の一つとして様々な検討を行なっているが⁴⁷⁾、その様な方向性と関連して次のような反応を考えた⁴⁸⁾。上記の α -マンノシル化反応において(21を除いては)PMB基は最終的に切り出されC-2位に遊離の水酸基を持つ生成物として α -マンノシドが得られている。それでは高分子担体に固定化された供与体を用いればどのような結果が期待されるであろうか。例えばPMB基のメチル基を介して高分子担体に結合した供与体26を用いたとする。そうすると最初の混合アセタールの形成において未反応の受容体は当然のことながら担体には結合していないのでこの段階で簡単に除去することができる。続いてPMB基の場合と同様にIADが進行したとすると、望む生成物27はそのC-2位が遊離水酸基となるので高分子画分から遊離して来るはずである。その際、加水分解、1,2-脱離等の副反応によって生じた生成物は依然として担体に結合していると考えられる。すなわち、DDQによる混合アセタールの生成、MeOTfによるIADという二つの操作を行なって、高分子担体から切り出されて来る画分を取れば、その大部分は(少なくとも糖を含む部分は)望む生成物である α -マンノシドになるであろう。(図8)

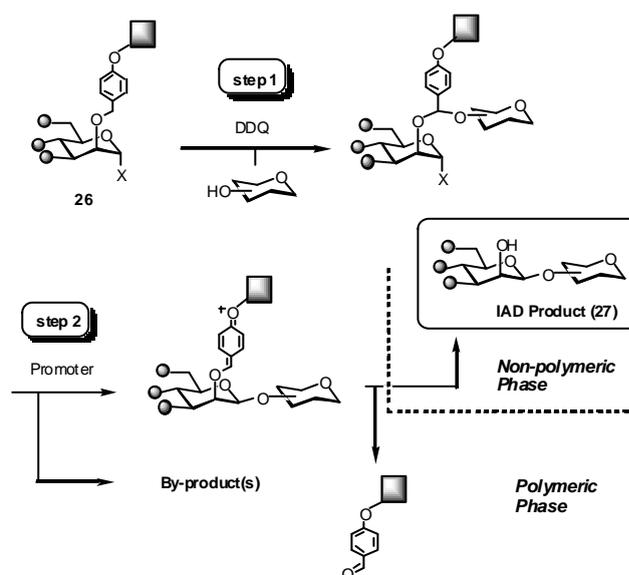


図8 高分子担体上での分子内アグリコン転移反応

このような仮説を証明すべく、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル (PEGOMe, MW ~5,000) に結合させたチオマンノシド 28 を調製した。ここで、高分子担体として可溶性の PEGOMe を用いたのは次のような理由による。まず、可溶性の担体に担持させておくことにより、いわゆる固相反応とは異なり化合物の構造や純度が NMR 等の手段によって容易に確認できることである。次に反応が均一条件で実行できるため、固相合成においてしばしば問題となる “pseudo-high dilution” や反応環境のばらつきに起因する反応効率の低下が避けられることである。これは我々の目的にとっては特に重要なポイントである。というのは、PMB エーテルからの混合アセタールの形成においてはある程度 (~100 mM) の基質濃度で反応を行なうことが必要であるからである。また、グリコシル化反応は通常 molecular sieves 等の脱水剤を共存させて行われるが、これらの分離も濾過によって容易に行なえる。一方、PEG 誘導体はグリコシル化において汎用されるハロゲン系溶媒 (塩化メチレン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン等) やトルエンには溶けるが、ある種の溶媒 (エーテル系、アルコール系) を加えることによって沈殿させることができる。従って、反応終了後適当な後処理を行なって沈殿させることにより、簡単に高分子画分を取り出すことができる。実際、PEG のこのような特性を利用した糖鎖の合成が Krepinsky らによって報告されている⁴⁹⁾。これ以外にも可溶性担体を用いる合成は従来の液相反応と固相反応の利点を合わせ持つものとして最近注目されている⁵⁰⁾。

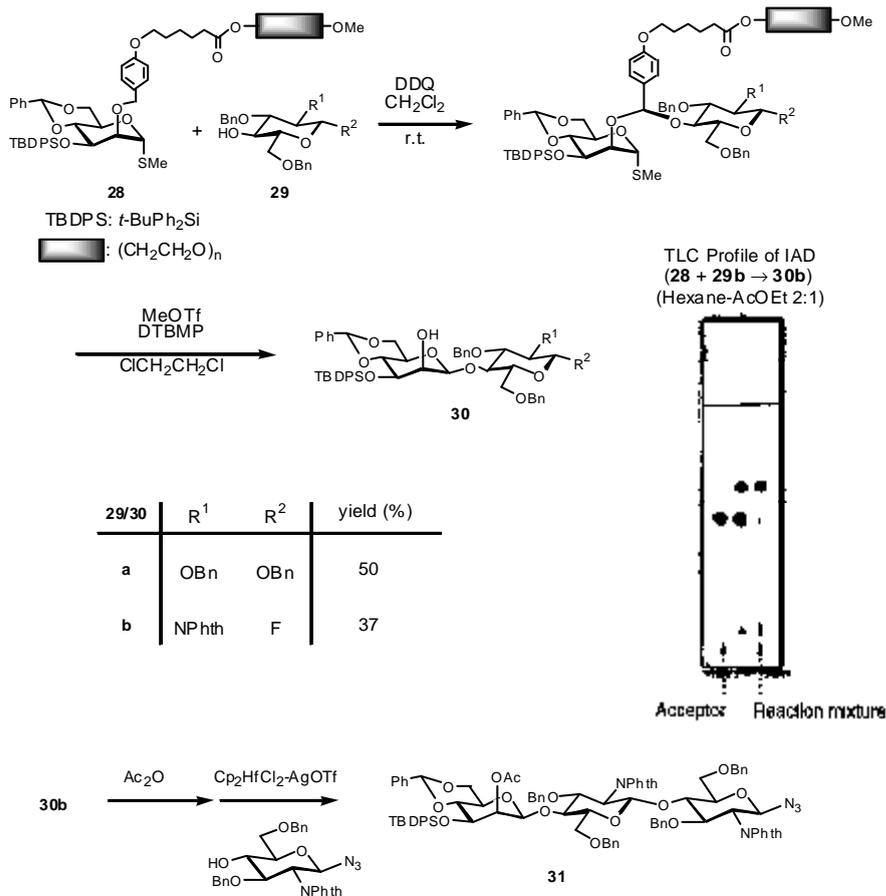


図9 ポリエチレングリコールを担体として利用する α -マンノシル化

混合アセタールの形成はDDQによって円滑に進行し、*tert*-ブチルメチルエーテルからの沈澱化を行なって単離した。この化合物はプロトンNMRでマンノースのC-1位及びパラメトキシベンジリデンアセタールに対応するシグナルが観察されたことからその構造が確認された。こうして得られた30はNMRから判断する限り高い純度を有しており、混合アセタールの形成が効率良く進行していること及びこの時点での相分離が有効に機能していることを示している。続いてMeOTf-DTBMPで処理してIADを行なうと、図に示すように原点を除くとTLC上殆ど均一の反応混合物を与えた。つまり、副生成物はPEGに担持されているため高い極性を持ち（従って原点に留まり）、当初期待したように望む α -マンノシドのみが展開されていることを示している。この混合物は簡単なシリカゲルのカラムを通すことにより、30を単離することができた。（図9）

ところで、グルコサミン誘導体29bとの反応で得られる30bはアノマー位がフルオリドであるので、我々のグループの蟹江らによって糖鎖の迅速合成に有用な方法論として提唱された“オルトゴナルグリコシル化”という概念にしたがって糖供与体として用いることが可能である⁵¹⁾。例えば、GlcNAc誘導体とのグリコシル化によって3糖31を合成することができた。

以上の反応はグリコシル化反応の立体化学の制御が完璧に行なえるのみならず目的とする生成物のみが特異的に遊離してくる点においても通常の高分子担体を用いる糖鎖合成反応とは大きく異なっており、糖鎖合成における新たな概念を提供するものであると考えている。

さて、以上の様にして高い選択性と糖タンパク糖鎖合成への適応性を兼ね備えた α -マンノシル化反応を開発することができた。そこでこれを用いて複合型糖タンパク糖鎖の合成を試みた。アスパラギン結合型糖鎖の合成研究に関しては以前に共通5糖部分の合成を行なったが、更に高い収率で α -マンノシドを与える供与体16を見出したのでこれを用いて複合型糖鎖の中で代表的な構造を持つ11糖32の全構造を構築することを目標とした⁵²⁾。合成に当たっては33（ β Man1 \rightarrow 4 β GlcNAc1 \rightarrow 4GlcNAc）及び34（ α NeuAc2 \rightarrow 3 β Gal1 \rightarrow 4 β GlcNAc1 \rightarrow 2 α Man）のフラグメントに分割する計画を立てた。（図10）コア3糖フラグメント33は前述

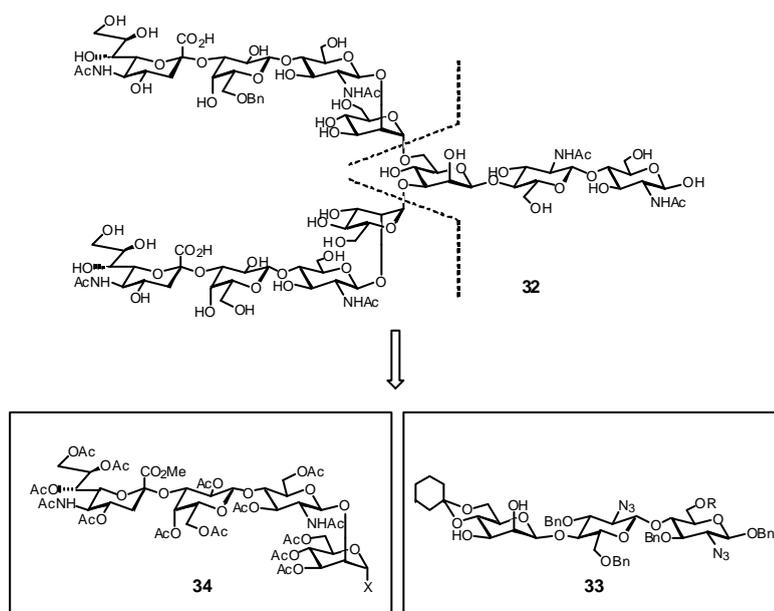


図10 複合型11糖の合成計画

のマンノース供与体 16 と 2 糖 35 とのカップリングによって合成した。(図 11) 複合型糖鎖には末端 GlcNAc の 6- 位にフコースを含むものがあり, この位置を *p*-メトキシフェニル基で保護したのはこれらの構造へも適用できることを念頭に置いたためである。縮合はすでに述べた条件 (1. DDQ / CH₂Cl₂; 2. MeOTf, DTBMP / ClCH₂CH₂Cl) で行ない, 望む α -マンノシド 36 を 78% の収率で得た。続いてマンノースの C-2 及び C-3 位の選択的な変換を行なって縮合前駆体 37 を得た。

一方, 4 糖 38 は長谷川らの手法による立体選択的シアル酸グリコシル化^{21d)} を鍵反応として構築した。ここで末端に導入したトリクロロアセトイミデートは Konstanz 大学の Schmidt によって開発された手法に従ったものであり, この反応は現在最も汎用性が高いグリコシル化反応として知られている⁵³⁾。両フラグメントの縮合は BF₃•OEt₂ によって行ない, 立体選択的に 39 を得た。この例からもわかるようにマンノースの α -選択的グリコシル化はかなりの大きさのフラグメント縮合においてもかなりの効率で行なうことが可能であり, α -マンノシル化とは対照的であることが理解いただけるであろう。更に β -結合マンノースの 4,6-シクロヘキシリデン基を外してジオールとした後再び 38 を用いて 4 糖単位を導入し, 1 1 糖 40 を得た。その後, 官能基変換と完全脱保護を行なって, 目的の 32 へと導いた。

以上の様に, パラメトキシベンジル基の特性を利用して新たな発想による完全立体選択的な α -マンノシル化反応を開発することができた。今後はこの反応を駆使して様々なタイプのアスパラギン結合型糖鎖の合成が可能になるものと考えている。また, この反応は一般的に選択的な 1,2-*cis* グリコシドの合成に適用できることが期待される。ごく初期的な結果ではあるが, 実際にフコースの β -グリコシドが選択的に合成できるという知見を得ている。

生体内現象や生理活性天然物における糖の重要性が認識されるようになったことに伴って, 様々なグリコシル化反応が開発されてきたし, 今後もこのような流れは続くと思われる。糖鎖の合成においてはしばしば複数の反応を試す必要に迫られることがある。その結果, 同一のタイプのグリコシドの形成においても反応ごとに明らかに優劣があることをしばしば経験している。更に, その優劣も一般化できるものではなく, 反応ごとに適性があるように思われるが, この理由を説明することは容易ではない。例えば, プロミド, トリクロロアセトイミデート, チオグリコシド, フルオリドをそれぞれ AgOTf, TMSOTf, NIS-TfOH, AgOTf-SnCl₂ で活性化した場合何れも似たような活性種を生ずるはずである。にもかかわらず, ある場合には A という反応が最も良い結果を与え, 別の場合には B という反応でのみ生成物が得られるというようなことがしばしば見られる。そもそも新しいグリコシル化反応の開発を考えても, そのデザインはアノマー位の置換基を脱離させカチオン種を発生させるというところで留まらざるを得ない。現状での糖化学における立体電子的な理解の範囲内では何らかの因子を付加しない限り, 論理的なデザインに基づくグリコシル化反応にはなり難い。ここに紹介した α -マンノシル化反応はこのような認識に基づくものである。

一方, 我々の反応の欠点として次の点が指摘される。まず, 当然のことながら反応が 2 段階で行われることである。その結果, 操作が煩雑にならざるを得ないし, 技術的なファクターによって支配される部分が大きくなることも予想される。また, 通常のグリコシル化反応においては副反応は主として供与体の方で起きる。従って反応の効率が低くても未反応のアグリコンはそのまま回収されるし, 理屈の上では (選択性は別にして) 大過剰の供与体を用いれば反応を完結させることも可能であろう。それに対し, 我々の反応においてはこのようなことは期待できない。すなわち供与体とアグリコンからまず橋架け中間体を形成させてから反応を行なうため, 収率が低い場合にもアグリコンを回収することはできない。天然物の全合成のようにアグリコンが著しく貴重である場合には, これは深刻な問題であろう。また,

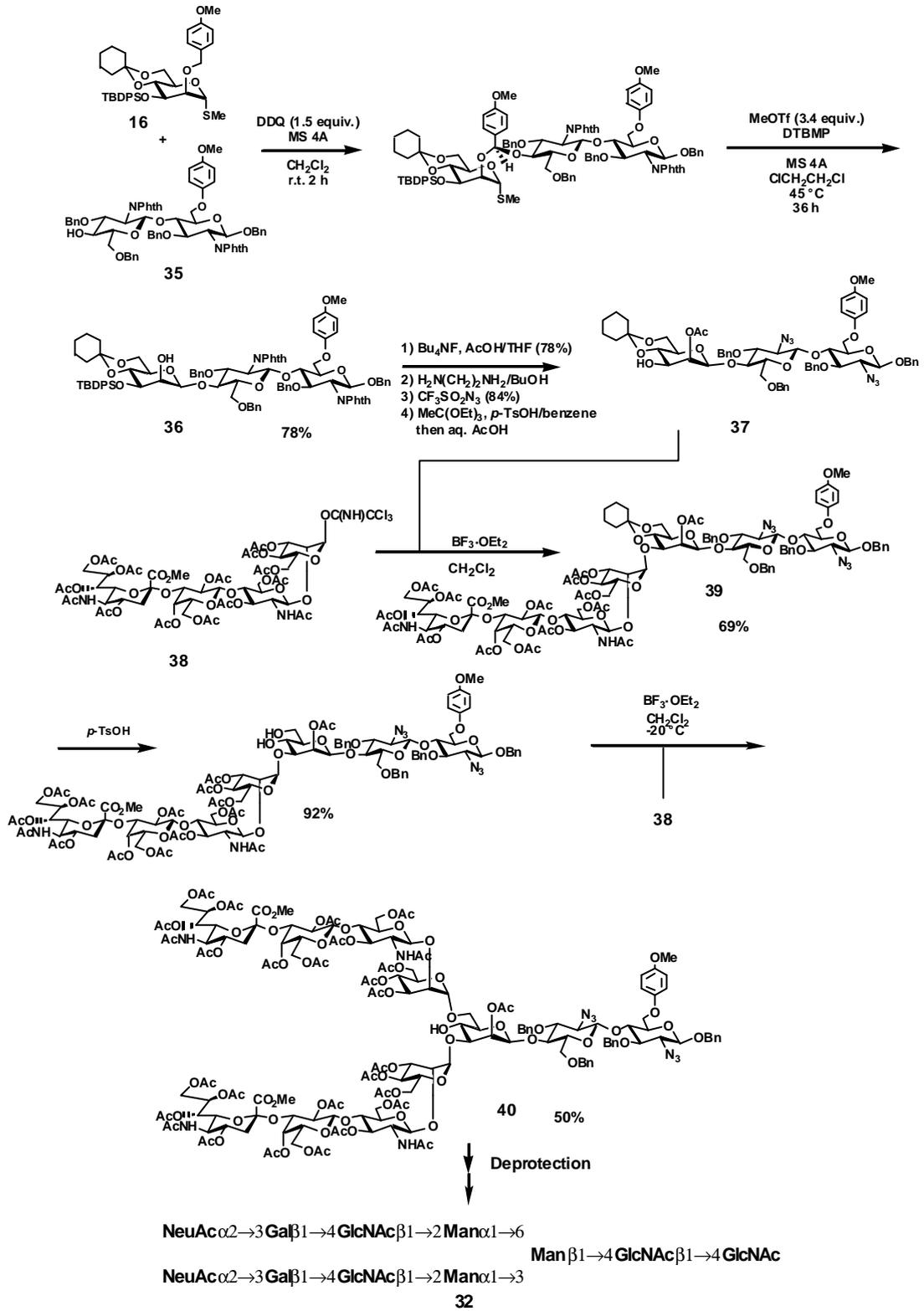


図 1 1 複合型糖鎖の立体選択的合成

反応自体は中性に近い条件で行われるものの、DDQ を用いることやIAD に比較的長時間を要すること等から、酸化条件に敏感な化合物や安定性に問題がある化合物への適用にも問題がある。

しかし、これらの点を踏まえても、我々が開発した反応は様々な点で従来の α -マンノシル化反応の壁を打ち破るものであろう。少なくともアスパラギン結合型糖鎖の合成には極めて適した特性を有しており、今後この反応の応用を通じて天然型糖タンパク合成への展開を計りたいと考えている。

本稿では、我々の研究活動の中から複合型糖タンパク糖鎖の合成研究を紹介した。現在研究室ではその他にも糖タンパクに特異的な構造の合成を中心に糖鎖固相合成、大分子量糖タンパクの完全化学合成等も視野に入れて研究を行なっている。本稿では紹介できなかった最近のトピックとして、ある種のタンパクに見られる極めて特異な構造である C-結合型マンノシルトリプトファンの合成⁵⁴⁾ を挙げておきたい。その詳細については別の機会に譲るとして、今後も“糖鎖”をキーワードに合成化学の立場から独自の方向性を打ち出すよう努力を続けていきたいと考えている。

最後に、理化学研究所に入所以来終始ご援助、ご助言を賜った小川智也(前理化学研究所主任研究員,現理事,東京大学名誉教授),中原義昭(前理化学研究所副主任研究員,東海大学工学部教授)の両先生に厚く御礼申し上げます。また、研究の遂行に携わった研究室の諸氏に心より感謝致します。

引用文献

- 1) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.
- 2) Dewk, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.
- 3) O'Conner, S. E.; Imperiali B. *Chem. Biol.* **1998**, 5, 427-37; **1996**, 3, 803-12.
- 4) Ellgaard, L.; Molinari, M.; Helenius, A. *Science* **1999**, 286, 1882-8.
- 5) Crocker, P. R.; Feizi, T. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 679-91.
- 6) Fukuda, M. *Cancer Res.* **1996**, 56, 2237-44; Kim, Y. J.; Varki, A. *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 569-76.
- 7) Kansas, G. S. *Blood* **1996**, 88, 3259-87; Varki, A. *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 158-62; 福田穰 生化学 **2000**, 72, 269-283.
- 8) Nicolaou, K. C.; Smith, B.; Pastor, J.; Watanabe, Y.; Weinstein, D. S. *Synlett* **1997**, 401-10.
- 9) Thompson, C.; Ge, M.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1237-44; Ge, M.; Chen, Z.; Onisgi, R.; Kohler, J.; Silver, L. L.; Kerns, R.; Fukuzawa, S.; Thompson, C.; Kahne, D. *Science*, **1999**, 284, 507-11; Nicolaou, K. C.; Mitchel, H. J.; Jain, N. F.; Winssinger, N.; Hughes, R.; Bando, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 240-4.
- 10) Kanie, O.; Ogawa, T.; Ito, Y. *J. Syn. Org. Chem. Jpn.* **1998**, 56, 952-62.
- 11) Bill, R. M.; Reveres, L.; Wilson, I. B. H. "Protein Glycosylation" Kluwer Academic (1998).
- 12) Kobata, A. *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 319-324.
- 13) Varki, A. in "Essentials of Glycobiology" pp. 31-39, Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J., Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999).
- 14) Kochendoerfer, G. G.; Kent, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 665-71. Cotton, G. J.; Muir, T. W. *Chem. Biol.* **1999**, 6, 247-259; Mayo, K. H. *Trends Biotech.* **2000**, 18, 212-7; Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Rio, G. D.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E.; Bredesen, D.; Pasqualini, R. *Natuer Med.* **1999**, 5, 1032-8.
- 15) Boons, G.-J. *Tetrahedron* **1996**, 52, 1095-121.
- 16) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. "Protective Groups in Organic Synthesis" 3rd Ed., John Wiley & Sons (1999).
- 17) Paulsen, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 823-38.

- 18) Wellings, D. A.; Atherton, E. *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 44-67.
- 19) Caruthers, M. H. *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24, 278-84.
- 20) Kirby, A. J. *Acc. Chem. Res.* **1984**, 17, 305-11.
- 21) a) Okamoto, K.; Goto, T. *Tetrahedron* **1990**, 5835-57. b) DeNinno, M. P. *Synthesis* **1991**, 583-93. c) Ito, Y.; Gaudino, J.; Paulson, J. C. *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 753-62. d) Hasegawa, A.; Ohki, H.; Nagahama, T.; Ishida, H.; Kiso, M. *Carbohydr. Res.* **1991**, 212, 277-81. e) Ito, Y.; Numata, M.; Sugimoto, M.; Ogawa, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8508-9.
- 22) Paulsen, H.; Lockhoff, O. *Chem. Ber.* **1981**, 114, 3102-14.
- 23) Garegg, P. J.; Ossowski, P. *Acta. Chem. Scand.* **1983**, B37, 249-50.
- 24) van Boeckel, C. A. A.; Beetz, T. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **1987**, 106, 596-8.
- 25) Sato, K.-I.; Yoshitomo, A.; Takai, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, 70, 885-890 and references cited therein.
- 26) Matsuo, I.; Isomura, M.; Walton, R.; Ajisaka, K. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8795-98.
- 27) Seifert, J.; Unverzagt, C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6527-30.
- 28) Crich, D.; Sun, S. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 4506-7; Crich, D.; Sun, S. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1198-9; Crich, D.; Sun, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 435-6.
- 29) Crich, D.; Sun, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11217-23.
- 30) Hodosi, G.; Kováč, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2335-6.
- 31) Ohtake, H.; Iimori, T.; Ikegami, S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3413-4; Iimori, T.; Ohtake, H.; Ikegami, S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3414-8.
- 32) Singh, S.; Scigelova, M.; Crout, D. H. G. *Chem. Commun.* **1996**, 993-4; Scigelova, M.; Singh, S.; Crout, D. H. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 777-82.
- 33) Watt, G. M.; Revers, L.; Webberley, M. C.; Wilson I. B. H.; Flitsch, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2354-6.
- 34) Barresi, F.; Hindsgaul, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9376-7; *Synlett* **1992**, 759-61; *Can. J. Chem.* **1994**, 72, 1447-65.
- 35) Stork, G.; Kim, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1087-8; Stork, G.; La Clair, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 247-8.
- 36) Ito, Y.; Ogawa, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1765-7.
- 37) 米光幸 有機合成化学協会誌, **1985**, 43, 691-702.
- 38) Nakajima, N.; Horita, K.; Abe, R.; Yonemitsu, O. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4139-42.
- 39) Johansson, R.; Samuelsson, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1984**, 2371-4.
- 40) Mukaiyama, T.; Murai, Y.; Shoda, S. *Chem Lett.* **1981**, 431-2.
- 41) Lönn, H. *J. Carbohydr. Chem.* **1987**, 6, 301-6.
- 42) Dan, A.; Ito, Y.; Ogawa, T. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 4680-1.
- 43) Ito, Y.; Ohnishi, Y.; Ogawa, T.; Nakahara, Y. *Synlett* **1998**, 1102-4.
- 44) Lergenmüller, M.; Nukada, T.; Kuramochi, K.; Dan, A.; Ogawa, T.; Ito, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1367-1376.
- 45) Matsuzaki, Y.; Ito, Y.; Nakahara, Y.; Ogawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1061-4.
- 46) Dan, A.; Ito, Y.; Ogawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7487-90.
- 47) Ito, Y.; Manabe, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 701-8.
- 48) Ito, Y.; Ogawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5562-6.
- 49) Gravert, D. J.; Janda, K. D. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 489-509.
- 50) Douglas, S. P.; Whitfield, D. M.; Krepinsky, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5095-7.
- 51) Kanie, O.; Ito, Y.; Ogawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 12073-4.
- 52) Seifert, J.; Lergenmüller, M.; Ito, Y. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 531-4.
- 53) Schmidt, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212-35.
- 54) Manabe, S.; Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9754-5.

執筆者紹介 伊藤 幸成 (いとう ゆきしげ) 理化学研究所細胞制御化学研究室主任研究員

[ご経歴] 1982年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了, 薬学博士。米国マサチューセッツ工科大学化学科(正宗悟教授)博士研究員(1982~1984)を経て, 1984年理化学研究所研究員, 1998年12月より現職。この間(1991.1~1993.3)米国サンディエゴCYTEL Corporation及びScripps Research InstituteにてVisiting Scientistとして研究(Dr. James C. Paulson)。埼玉大学大学院理工学研究科客員教授(1999~)。1993年日本農芸化学奨励賞受賞。

[ご専門] 糖質化学, 特に複合糖質糖鎖の精密合成。