

1. 4-アシルアミノガラクトサミン誘導体の合成

プロテオグリカン(PG)は、グリコサミノグリカン(GAG)鎖と呼ばれる硫酸化多糖がコアタンパク質に結合した構造を持つ巨大糖タンパク質分子の総称であり、組織構築に重要な役割を持つ細胞外マトリックスや細胞表面、細胞内分泌顆粒などに広く存在している。

GAG 鎖は、アミノ糖(ガラクトサミン、グルコサミン)とウロン酸(グルクロン酸、イズロン酸)またはガラクトースからなる繰り返し2糖領域と、橋渡し領域といわれる共通の4糖領域の2つの領域から構成されている。また、繰り返し2糖領域の糖の組み合わせにより、GAG 鎖はコンドロイチン硫酸(chondroitin sulfate; CS)、デルマトン硫酸(dermatan sulfate; DS)、ヘパリン(heparin; Hep)、ヘパラン硫酸(heparan sulfate; HS)、ケラタン硫酸(keratan sulfate; KS)、ヒアルロン酸(hyaluronic acid; HA)に分類される(Figure 1-1)。

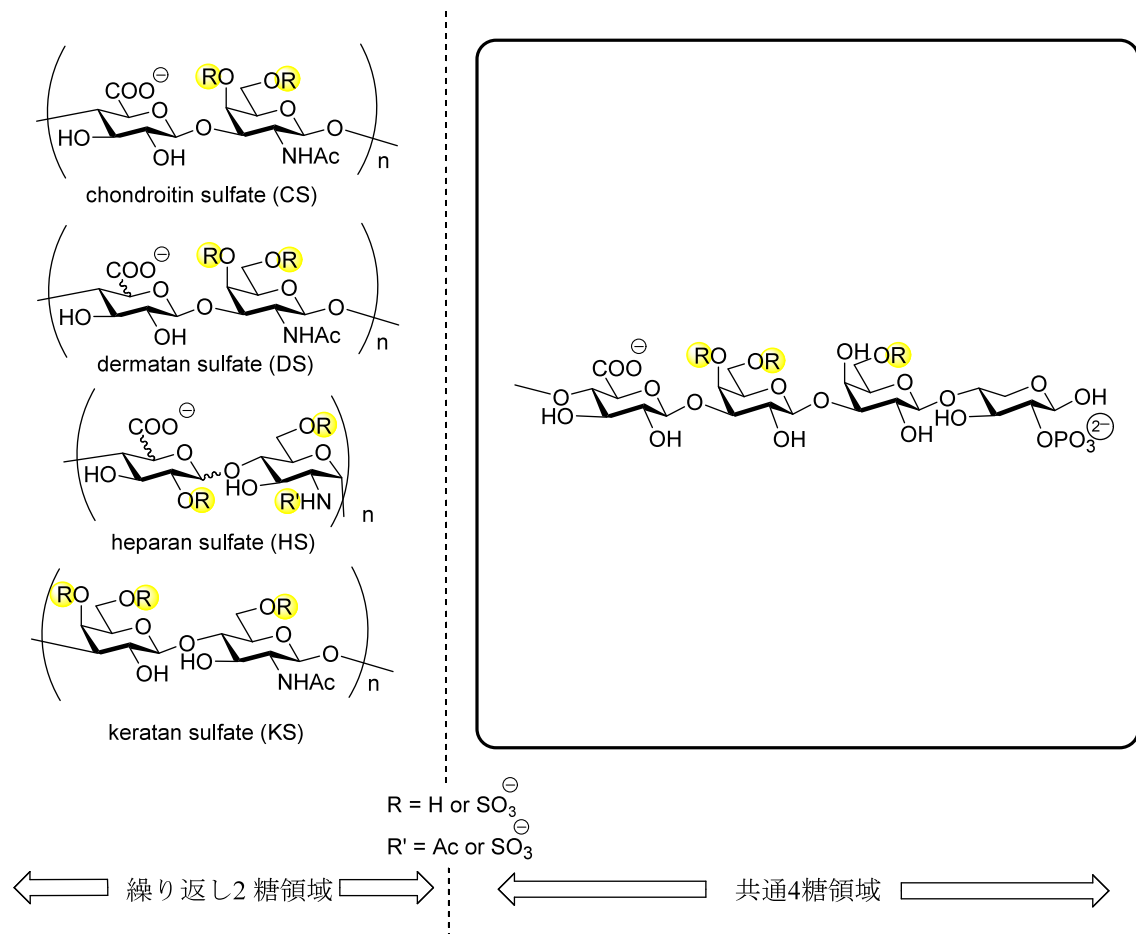


Figure 1-1. 硫酸化グリコサミノグリカン

GAG に多様性を持たせる上で鍵となる糖鎖の硫酸化は、硫酸基の供与体であ

る活性硫酸(3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate; PAPS) (Figure 1-2)を基質として、糖残基の特定の部位に硫酸基を転移する硫酸転移酵素によって触媒される^{1,2}。

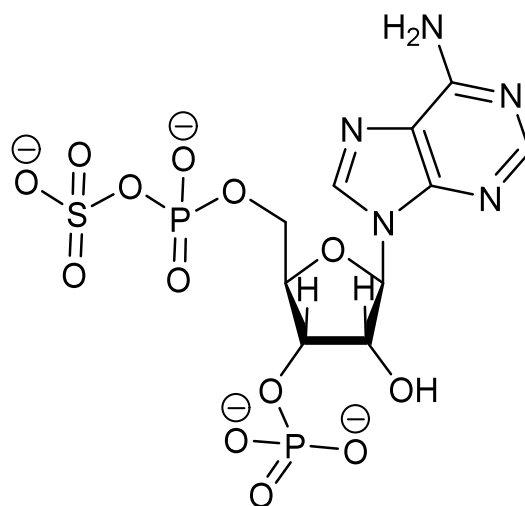


Figure 1-2. PAPS

GalNAc4S-6ST (*N*-アセチル-D-ガラクトサミン 4-硫酸 6-O-硫酸転移酵素)は、コンドロイチン硫酸あるいはデルマタン硫酸における GalNAc(4SO₄)残基の 6 位に PAPS の硫酸基を選択的に転移させることが知られており、特定の硫酸化 GAG の合成に重要な働きを持っている。また、コンドロイチン硫酸 E 及び非還元末端の GalNAc(4,6-bis-SO₄)構造の合成に関与している。それゆえ、GalNAc4S-6ST に作用する選択的阻害剤の合成開発は、硫酸化糖鎖の生物学的意義解明にとって重要な課題である。

当研究室では³、阻害剤の候補として、3,4 及び 6 位のうち 1 ヲ所が硫酸化されている phenyl *O*-galactopyranoside 誘導体を系統的に合成し、その阻害活性を比較検討した。その結果、Phenyl β-GalNAc(4SO₄)に強い阻害活性が認められ、この構造が基質である GalNAc(4SO₄)残基に類似しているためであると推測された。この結果から、酵素活性にはアグリコンの構造、αあるいはβアノマー、硫酸基の位置の違いが関わってくるということが分かった。

そこで、当研究室では⁴様々なアグリコンを有する GalNAc(4SO₄)誘導体を合成し、阻害活性を測定した。測定の結果、アグリコンにオクチル基や *p*-クロロ基、ベンジル基などを導入した場合に高い阻害効果が得られた。また、アグリコンにかさ高く疎水性の高いものを導入した場合は、エストラジオールを用いた時に高い阻害効果を得た。さらに、硫酸化糖は、その大きな負電荷によって細胞膜を透過しにくいことが明らかにされた。

そこで、当研究室では、細胞膜透過性を上げるための別のアプローチとして、硫酸基と構造が類似であり、かつ負電荷を持たない置換基を 4 位に導入した化合物の合成を検討した。

本研究の鍵となるアジド基をもつ共通合成中間体は、大量合成が可能とするために、入手が容易なグルコサミン塩酸塩からの合成法を確立できた。その方法は、2 位を Troc 基で保護し、他をアセチル化し、チオグリコシドを調製する。このチオグリコシドをグリコシルドナーに用い導入させたいアルコールと反応させ、アセチル基を脱保護後、ピバロイル基を選択的に 3,6-位に導入し、4-位をトリフラートとしてアジ化物イオンによる求核置換反応により合成中間体を合成できた。最初にグリコシル化することで 1 位に置換基を導入した GalNAc 誘導体の 3,6-位のピバロイル基を脱保護、それに続く Pd-C 触媒を用いたアジド基の還元によりアミノ糖の合成ができた。これを無水酢酸、塩化ベンゾイルや塩化ピバロイルで *N*-アシル化し、目的物である硫酸基を模倣した糖誘導体への効率良い変換法が確立できた。

2. 4 位に Triazolyl 基をもつガラクトサミン誘導体の合成

1,2,3-Triazole は含窒素複素環で、5 員環に 3 つの窒素原子を含むものを指す。芳香族性を持つため、3 つの窒素原子が隣接した構造を持つ化合物としては非常に安定である。この構造を持つ化合物は近年、広い範囲での生物的活性を示すことが報告されており、新しい生理活性物質や機能性物質、触媒など、様々な分野で広く採用されている⁵。1,2,3-Triazole の合成方法は、Huisgen によって開発された 1,3-双極子付加環化反応が最初である。この方法は熱を加えてアルキンとアジドを反応させる方法である。その後、Sharpless と Meldal が銅 (I) 触媒を用いた銅 (I) 触媒アジドアルキン付加環化反応(CuAAC, Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)を独自に開発した。この方法はクリックケミストリー(Click Chemistry)として、効果的な 1,2,3-Triazole の合成方法として利用されている。今回は糖の構造が熱に弱いことと生成物が一種類であることの 2 つを考慮して、後者の方法でアプローチすることにした(Figure 2-1)。

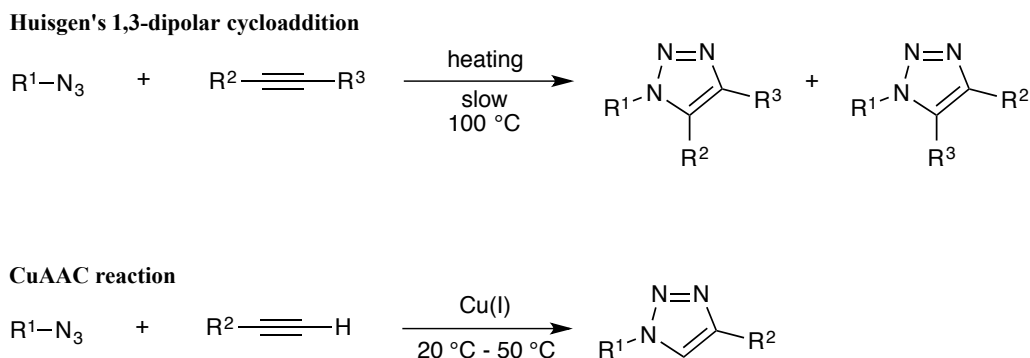


Figure 2-1

反応の原料は、1. で述べた方法で合成した。次に、銅触媒を用いた銅 (I) 触媒アジドアルキン付加環化反応において、溶媒をメタノール、ジクロロメタン、アセトニトリル、DMF、*t*-ブチルアルコールに変えて反応を行ったが、エタノールの場合と同じく、反応は進行していなかった。これは、原料が溶媒への溶解性が低いためだと推測された。そこで、溶媒への溶解性を上げるために、3,6 位を一度アセチル化してトリアゾール化し、その後脱保護することで目的物の合成に成功した。

3. デングウイルス感染阻害剤の開発

デング熱・出血熱は、推定年間約 1 億人の感染者、約 50 万人のデング出血熱患者が存在する熱帯・亜熱帯地域における最大のウイルス感染症である。現在日本国内での発生は年間約 50 例が報告されており、ウイルス媒介可能なヒトスジシマカが常在しているため、本ウイルス感染症は、輸入感染症として改正感染症法で全数把握の第四類感染症に分類される。最近の報告において、グルクロン酸残基がデングウイルス感染作用を有することが示唆された。そこで、化学的に合成されたグルクロン酸誘導体の感染阻害作用、細胞毒性の評価を行い、新たなデングウイルス感染阻害糖誘導体が見出された(Figure 3-1)。しかしその阻害活性は低く不十分であり、新たな阻害剤の開発が期待されている⁶。

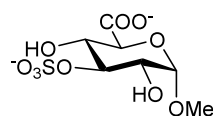


Figure 3-1. 既に合成されている阻害剤

そこで、本研究では、コンドロイチン硫酸 E の繰り返し単位であるガラクトサミン残基に対して注目し、単糖単位での感染阻害作用を評価するために、ガラクトサミン誘導体合成の検討を行った。合成する 4,6-二硫酸は、ガラクトサミン誘導体の 4 位と 6 位のヒドロキシ基が硫酸化された化合物である。これを合成するにあたり、GalNAc4S-6ST 阻害剤の 6 位デオキシ体の合成経路を元に合成を進めることにした。本合成ルートでは、4 位ヒドロキシ基の反転に際して、6 位選択的な保護基の導入及び脱保護を行うことで 4,6 位に硫酸基を導入した後の反応で脱保護を行うだけにしている。本研究では、合成を進め、目的物の糖骨格の保護基選択導入まで進めることができた。

文献

1. グリコサミノグリカンの硫酸化に関わる硫酸転移酵素。未来を拓く糖鎖科学 (永井克考 監修) pp184-186(2005) 出版社：金芳堂.
2. プロテオグリカン硫酸化に働く硫酸転移酵素の分子的多様性と生物機能蛋白質 核酸 酵素 第 48 巻 8 号, 2003.
3. Sawada, T.; Fujii S.; Nakano, H.; Ohtake, S.; Kimata, K.; Habuchi, O. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1983-1996.
4. Nozaki, H.; Tomoyama, Y.; Takagi, H.; Yokoyama, K.; Yamada, C.; Kaio, K.; Tsukimori, M.; Nagao, K.; Itakura, Y.; Ohtake-Niimi, S.; Nakano, H.; Habuchi, O. *Glycoconj. J.* **2010**, *27*, 237-248.
5. Franck Amblard; Jong Hyun Cho; and Raymond F. Schinazi, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4207-4220; Natalia Seus; Maiara T. Saraiva; Eduardo E. Alberto; Lucielli Savegnago; Diego Alves, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 10419-10425; Liyuan Liang; Didier Astruc *Coordination Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933-2945; Morten Meldal; Christian Wenzel Tornøe *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-2957.
6. 左 一八, 鈴木 隆, 生化学 第 82 巻 第 8 号 751 (2010).

本研究は、愛知教育大学現代学芸課程自然科学コース分子機能・生命科学専攻において行ったものである。以下の研究は当研究室所属の学生との共同研究である。

1. 4-アシルアミノガラクトサミン誘導体の合成 荒木 史子
2. 4 位に Triazolyl 基をもつガラクトサミン誘導体の合成 小島 俊太郎
3. デングウイルス感染阻害剤の開発 神谷 昭範