

氏名	たなか ともなり 田中 知成		
授与学位	博士(工学)		
学位授与年月日	平成21年9月9日		
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項		
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科(博士課程) バイオ工学専攻		
学位論文題目	Direct Anomeric Activation of Unprotected Sugars for Oligosaccharide Synthesis (無保護糖アノマー位の直接活性化を基盤とするオリゴ糖合成)		
指導教員	東北大学教授 正田 晋一郎		
論文審査委員	主査	東北大学教授 正田 晋一郎	東北大学教授 中山 亨
		東北大学教授 大井 秀一	

## 論文内容要旨

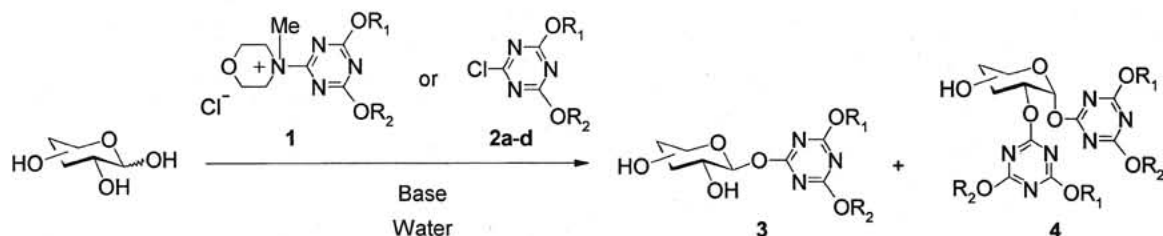
### 第1章 序論

糖鎖は、古くからバイオマス資源として利用されている他、近年では様々な生命現象に関与することが解明されていることから第3の生体高分子として注目を集めており、構造明確な糖鎖の簡便な調製法が求められている。有機合成法は糖に多数存在するヒドロキシ基(OH基)の保護・脱保護が必須であり多段階工程を要する。また、酵素法においても利用する基質の調製は有機合成法に依存している。本研究では、無保護糖アノマー位に唯一存在するヘミアセタール性OH基に着目し、水溶性脱水縮合剤を用いることで糖加水分解酵素を用いるグリコシル化反応の糖供与体、さらには各種グリコシドの一段階合成を行った。

### 第2章 新規糖供与体の一段階合成と利用

#### 第1節 トリアジン型縮合剤を用いる無保護糖の直接活性化

市販の水溶性脱水縮合剤 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM, **1**)、あるいは塩化シアヌルから合成したトリアジン誘導体 **2a-d** を用いて、糖アノマー位にトリアジン誘導体を有する新規な糖化合物を、塩基存在下、無保護糖から水中で一段階合成した。原料糖の2位に equatorial の OH 基を有する場合、得られた主生成物のアノマー位の立体はβ型(**3**)であった(Scheme 1)。アノマー位と2位にトリアジン誘導体が結合

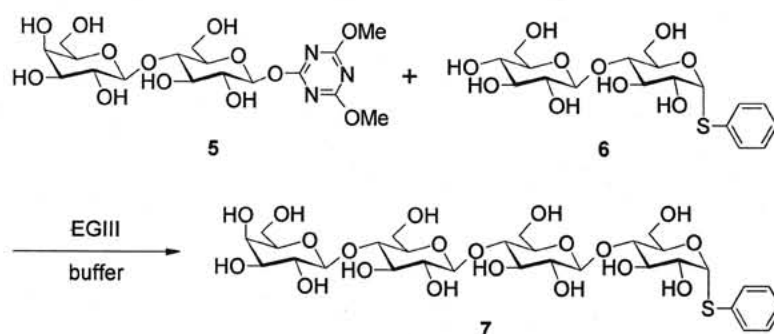


**Scheme 1** Direct synthesis of sugar triazine derivatives by using triazine-type reagents ( $R_1, R_2 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{and/or } \text{CH}_2\text{CF}_3$ ).

した $\alpha$ 型の副生成物(4)も得られた。一方、原料糖の2位に axial の OH 基、あるいは equatorial のアセトアミド基を有する場合、いずれも $\alpha$ 型の糖トリアジン誘導体が主生成物として得られた。本反応は、アノマー位にヘミアセタール性 OH 基を有する単糖から高分子量のオリゴ糖にまで適用可能であった。さらに、得られた糖トリアジン誘導体3に、各々対応する糖加水分解酵素を作用させたところ、速やかに加水分解反応が進行し、アノマー位のトリアジン部分が遊離したことから、糖トリアジン誘導体3が糖加水分解酵素を用いるグリコシル化反応の糖供与体として有用であることが示された<sup>1,2)</sup>。

## 第2節 糖トリアジン誘導体を用いる酵素的グリコシル化反応

無保護のラクトースから一段階で合成した DMT- $\beta$ -Lac(5)を糖供与体として *Trichoderma reesei* 由来 endo- $\beta$ 1,4-glucanase III (EGIII)を用いた酵素的グリコシル化反応を行った (Scheme 2)。 $\alpha$ -セロビオシド誘導体 6 を糖受容体とした場合、最大95%の収率(6 基準)でラクトシル化生成物 7 が得られた。また、糖供与体 5 の合成は



**Scheme 2** EGIII-catalyzed lactosylation reaction using DMT- $\beta$ -Lac 5 as a glycosyl donor.

水溶液中で行うことから、5を精製することなくワンポットで7を合成することも可能であった<sup>1,2)</sup>。

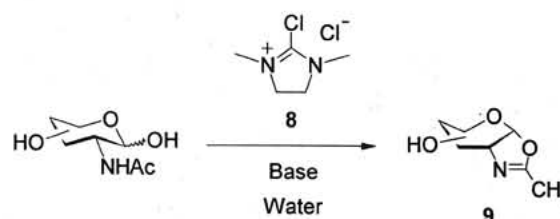
従来の有機合成法では、高分子量、かつ酸試薬により切断されやすい $\alpha$ 1,6結合の分岐を有するキシログルカンオリゴ糖の供与体合成は非常に困難であった。しかし、本合成法は、高分子量のオリゴ糖においても対応する無保護糖から一段階で簡便に糖供与体を合成でき、得られた基質をモノマーとした酵素的重縮合反応が可能となった<sup>2)</sup>。

## 第3章 ホルムアミジン型縮合剤を用いる無保護糖アノマーの直接活性化

### 第1節 無保護糖アノマー位における分子内脱水反応

#### 糖オキサゾリンの一段階合成と酵素的キトオリゴ糖合成

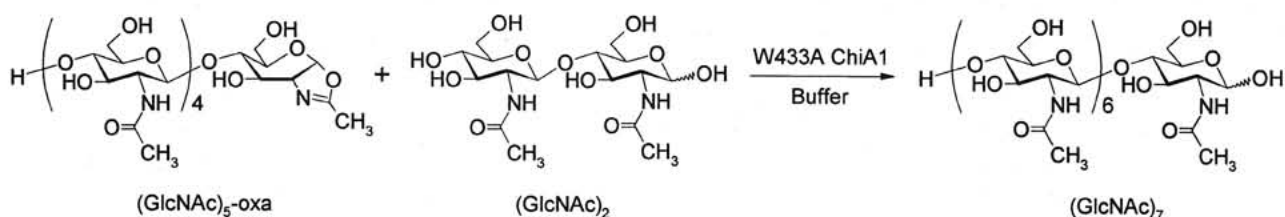
糖オキサゾリンは有機合成法、酵素法いずれにおいても有用な糖供与体であるが、その調製は多段階を要する有機合成法が必須であった。本節では、ホルムアミジン型の水溶性脱水縮合剤 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride (DMC, 8)を用いることで一段階での簡便な糖オキサゾリン合成法を見出した(Scheme 3)<sup>3)</sup>。無保護の *N*-アセチル-2-ア



**Scheme 3** Direct synthesis of sugar oxazolines by using DMC.

ミノ糖水溶液に塩基存在下、DMC(8)を作用させると、目的とする糖オキサゾリン9が定量的に得られた。本合成法は、単糖だけでなくキトオリゴ糖(2~6糖)、硫酸基やリン酸基を有する基質、さらには高分子量の高マンノース型糖鎖や非還元末端にシアル酸を有する複合型糖鎖においても、還元末端のN-アセチル-2-アミノ糖のオキサゾリン化が可能であった。

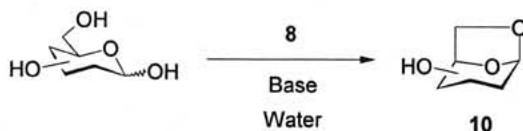
得られた様々なキトオリゴ糖のオキサゾリン体((GlcNAc)<sub>n</sub>-oxa, (n = 1~6))を基質として変異型キチナーゼ(W433A ChiA1)によるグリコシル化反応を検討したところ、(GlcNAc)<sub>5</sub>-oxa と(GlcNAc)<sub>2</sub>を各々、糖供与体、糖受容体とすることで高エリター活性を有する(GlcNAc)<sub>7</sub>の高選択的な合成に成功した(Scheme 4)。



**Scheme 4** Chitinase-catalyzed chitoheptaose synthesis using sugar oxazoline as a glycosyl donor.

### 1,6-アンヒドロ糖の一段階合成

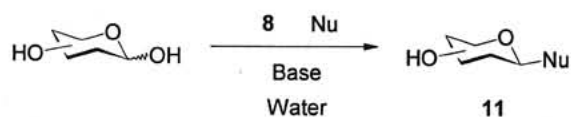
1,6-アンヒドロ糖は、各種グリコシド合成の前駆体、開環重合による直鎖状糖鎖高分子やハイパーブランチポリマー合成のモノマーとして利用されているが、その調製法は多段階を要する有機合成法や多糖類の熱分解が主であり、高分子オリゴ糖の1,6-アンヒドロ体を調製することはほぼ不可能であった。本節では、DMC(8)を用いて無保護糖アノマー位と6位の間での脱水縮合反応によって一段階かつ定量的な1,6-アンヒドロ糖10の合成が可能であることを見出した(Scheme 5)<sup>4)</sup>。本合成法は、原料糖の2位にequatorialのOH基を有していること、立体障害となるため3位に置換基を有していないことが必須であることを明らかにした上、高分子量のオリゴ糖にも適用可能であった。



**Scheme 5** Direct synthesis of 1,6-anhydro sugars by using DMC.

### 第2節 分子間求核反応による各種グリコシドの一段階合成

前節でのDMC(8)を用いる無保護糖の分子内脱水反応に対して、本節では反応系内への求核剤の添加により、無保護糖アノマー位での分子間求核反応を伴った各種グリコシドの一段階合成が可能であることを見出した(Scheme 6)。求核剤は無保護糖に対して大過剰量必要であったものの、



**Scheme 6** Direct synthesis of  $\beta$ -glycosides by using DMC and nucleophiles. (Nu: N<sub>3</sub>, ArSH, F, ROH).

β体 **11** が高選択的に得られた。特にアジ化物イオンやアリールチオールといった求核性の高い試薬を添加した場合には、グリコシルアジド<sup>5)</sup>、チオグリコシド<sup>6)</sup>が高収率で得られた。また、フッ化物イオンや各種アルコールを求核剤とした時も低収率ながら生成物が得られた。

本章で見出した DMC(**8**)を用いる無保護糖からの各種グリコシドの一段階合成は、アノマー位のヘミアセタール性 OH 基が他の OH 基や水に比べて酸性度が高く反応性に富んでいることにより進行していると考察できる。

即ち、無保護糖アノマー

位のβ-OH 基と DMC(**8**)

によってβ-イソウレア中

間体 **12** が生成、**12** は 2

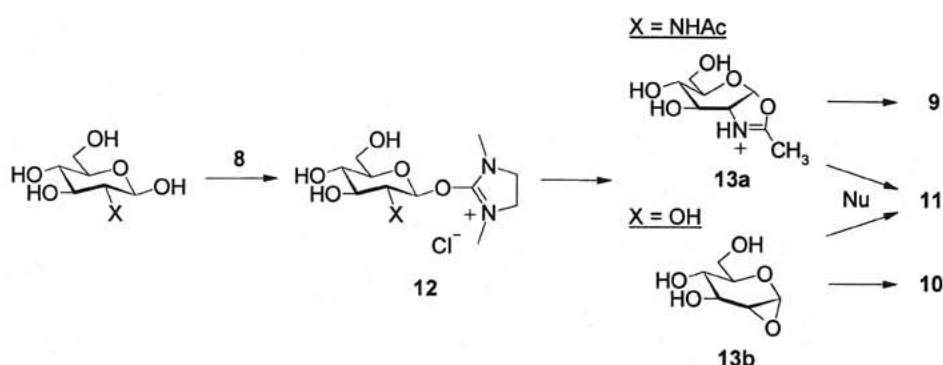
位の隣接基関与によって

直ちに中間体 **13a, b** へと

変換された後、各種生成

物 **9-11** が得られたと考

えられる(Scheme 7)。



Scheme 7 Plausible reaction mechanism of direct anomeric transformation by using DMC.

#### 第4章 総括

本研究では、水溶性脱水縮合剤を用いることで無保護糖アノマー位のヘミアセタール性 OH 基を水溶液中で直接活性化し、糖加水分解酵素によるグリコシル化反応の糖供与体基質や各種の糖誘導体を、OH 基を保護することなく一段階合成した。本研究によって、従来困難であった高分子量のオリゴ糖鎖を一段階で簡便に誘導化することが可能となり、糖鎖工学の更なる発展に多大な影響を与えることが期待される。

#### 【文献】

- 1) T. Tanaka, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, *Chem. Commun.*, **2008**, 2016.
- 2) T. Tanaka, A. Kobayashi, M. Noguchi, K. Kimura, K. Watanabe, S. Shoda, *J. Appl. Glycosci.*, **2009**, 56, *in press*.
- 3) M. Noguchi, T. Tanaka, H. Gyakushi, A. Kobayashi, S. Shoda, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 2210.
- 4) T. Tanaka, W. C. Huang, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 2154.
- 5) T. Tanaka, H. Nagai, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, *Chem. Commun.*, **2009**, 3378.
- 6) T. Tanaka, T. Matsumoto, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, *Chem. Lett.*, **2009**, 38, 458.

# 論文審査結果の要旨

糖鎖は、古くからバイオマス資源として利用されている他、近年では様々な生命現象に関与することが解明されていることから第3の生体高分子として注目を集めており、構造明確な糖鎖の簡便な調製法が求められている。糖鎖合成においては、有機合成法、酵素法共に利用する基質の調製を多段階で煩雑な有機合成法に依存しているところが大きいのが現状であり、中でもアノマー位の活性化は最も重要な合成工程のひとつである。本論文は、水溶性脱水縮合剤を用いることで無保護糖のアノマー位を直接活性化でき、各種の有用な糖誘導体の一段階合成法を開発した成果をまとめたものであり、全編4章より構成されている。

第1章は序論であり、本研究の背景と目的を述べている。糖アノマー位の活性化について、従来の多段階で煩雑な有機合成法、および近年報告されたヒドロキシ基の保護を必要としない簡便な活性化法について解説した上で、本研究では、更に簡便かつ効率的な無保護糖アノマー位の直接活性化法を開発することを目的として、水溶性脱水縮合剤に着目した点について述べている。

第2章では、トリアジン型の水溶性脱水縮合剤を用いる無保護糖アノマー位の直接活性化について述べている。第1節では、市販の縮合剤 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM)、および合成した誘導体を用いて糖加水分解酵素を触媒とするグリコシル化反応の糖供与体として利用できる新規な糖トリアジン誘導体を無保護糖から一段階で合成している。本合成法は、単糖から分子量の大きいオリゴ糖にまで適用可能なことも示している。第2節では、合成した糖トリアジン誘導体が、セルラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの各糖加水分解酵素を触媒とするグリコシル化反応の糖供与体として利用できることを示している。さらには、糖トリアジン誘導体を精製することなく、無保護糖からのワンポットグリコシル化にも成功しており、糖加水分解酵素を触媒とする糖鎖合成への貢献は、高く評価できる。

第3章では、ホルムアミジン型の水溶性脱水縮合剤 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride (DMC) を用いる無保護糖アノマー位の直接活性化について述べている。第1節では、糖分子内での脱水反応により糖供与体として利用されている糖オキサゾリン、および有用な合成中間体である 1,6-アンヒドロ糖の高収率な一段階合成に成功している。さらに、合成した糖オキサゾリンを用いて、変異型キチナーゼを触媒とした高エリター活性を示すキトヘプタオースの選択的合成にも成功している。第2節では、無保護糖アノマー位での分子間求核反応を伴う、各種グリコシド(グリコシルアジド、チオグリコシド、O-グリコシド等)の $\beta$ 選択的一段階合成に成功している。本合成法は、生化学的に重要なオリゴ糖である高マンノース型糖鎖や非還元末端にシアル酸を有する複合型糖鎖にも適用可能なことを示しており、その適用性の広さと生成物の多様性は高く評価できる。

第4章は、上記各章を総括している。

以上要するに本論文は、無保護糖を原料とし、水溶性脱水縮合剤を用いて糖加水分解酵素を触媒とする糖鎖合成に利用できる糖供与体、さらには有用な糖化合物の一段階合成法を開発したもので、糖鎖工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。