

# 新規トレハロース型二糖 2-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-ethyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside の合成

飯田 翔吾<sup>\*1</sup> 小田 慶喜<sup>\*2</sup> 藤原 章司<sup>\*3</sup> 高橋圭子<sup>\*4</sup>

## Synthesis of artificial trehalose type disaccharide, 2-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-ethyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside

Shogo Iida<sup>\*1</sup> Yoshiki Oda<sup>\*2</sup> Shoji Fujiwara<sup>\*3</sup> Keiko Takahashi<sup>\*4</sup>

Trehalose is a natural disaccharide formed by an  $\alpha$ , $\alpha'$ -1,1'-glucoside bond between two  $\alpha$ -glucose units. It has high water retention capabilities, and is used in food and cosmetics. Trehalose is used in a broad spectrum of applications. As a precursor for artificial trehalose type disaccharide, 2-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-ethyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside was prepared.

### 緒言

#### オリゴ糖の化学

オリゴ糖 (oligosaccharide) は糖質が健康に良くないというイメージが蔓延しているなか、唯一「何か体にいいもの」と認識されている糖質である。「オリゴ(oligo)」とはギリシャ語の oligos (少ないという意味) に源を発し、単糖が2個から10個つながった糖を示す。オリゴ糖には様々な種類がある。原材料をもとにすると、ブドウ糖 (グルコース) が $\alpha$ -1,4 結合で連なった多糖である澱粉を原料とするもの、グルコースとフルクトースが縮合しているショ糖 (スクロース) を原料とするもの、乳糖 (ラクトース) を原料とするもの、その他の糖質を原料とするものに分類できる。筆者らが研究対象としているシクロデキストリン(cyclodextrin: CyD)も $\alpha$ -グルコースが6から8個連なっている澱粉を原料とする環状オリゴ糖である。1970年代以降、我が国では発酵・醸造伝統技術に基づいて新規糖質関連酵素が連続して発見され、加水分解反応、糖転移反応、縮合反応、異性化反応に有効利用されるようになった。その結果、1980年代にはグリコシルスクロース、マルトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、CyDなどのオリゴ糖が工業規模で生産されるようになり、機能研究も展開され、現在に至っている<sup>2)</sup>。

オリゴ糖の「何か体にいいもの」とされている源は消化性および難消化性に関する栄養機能にあるのであろう。難消化性、すなわち低カロリーという事実である。一般に糖質は4 kcal/gのエネルギー換算係数が用いられるが、イソマルトオリゴ糖、大豆オリゴ糖は3 kcal/gであり、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ラクトスクロース、ラクチュロースは2 kcal/gである。 $\alpha$ -CyDに至っては消化されない。0 kcal/gである。この機能を一次機能とすると、二次機能は物理化学的機能である。甘味度、味質、粘性、保

湿・吸湿性、水分活性、浸透性、包接性、着色性、熱、pH安定性、皮膚効果、たんぱく質に対する保護・安定化、でんぷん質食品の老化防止効果など、すべて食品の日持ち効果とおいしさに関係する特性である。さらに三次機能として、生物学的特性に係る機能も有する。抗う蝕作用(虫歯になりにくくする機能)、ミネラル吸収促進作用、整腸作用、血液中のブドウ糖(血糖値)もしくはコレステロールの上昇抑制作用、免疫賦活作用が知られている<sup>3)5)</sup>。

このようにオリゴ糖は食品が必要とする機能特性と用いる場合の加工特性の観点から評価されて用いられている。今後も様々なオリゴ糖の機能特性は科学的に評価・実証され健康の維持・増進に貢献することが期待されている。

#### トレハロース

トレハロースもオリゴ糖である。グルコース2分子が $\alpha$ -1,1'結合した二糖類で1832年に発見された (Figure 1)<sup>6)</sup>。グルコースが $\alpha$ -1,4 結合したマルトース(4-O-( $\alpha$ -D-glucopyranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranose)や $\beta$ -1,4 結合したセロビオース(4-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranose)との大きな違いはヘミアセタール基を有していないので、非還元性であることである。微生物から動植物まで広く自然界に存在しており、古来より食されてきた。現在ではでんぷんを原料として酵素法により工業規模で製造されている<sup>7)9)</sup>。熱や酸に対して極めて安定であり、食品加工の加熱工程

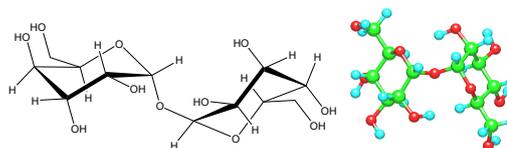


Figure 1. Molecular structure of trehalose.

<sup>\*1</sup> 東京工芸大学大学院工学研究科工業化学専攻博士課程前期課程 2015 年度修了生,

<sup>\*2</sup> 東京工芸大学大学院工学研究科工業化学専攻博士課程後期課程中退, 博士(理学) 東海大学研究推進部技術共同管理室技術職員,

<sup>\*3</sup> 東京工芸大学大学院工学研究科工業化学専攻博士課程後期課程 2013 年度修了生博士(工学) 明治学院大学法学部化学実験室助手,

<sup>\*4</sup> 東京工芸大学大学院工業化学専攻教授

2017 年 9 月 21 日受理

における分解, 着色がほとんどない. さらにトレハロース結晶に付随する2分子の結晶水が水存在環境において水構造を安定化する. そのため高保水性, 高水和力, 高いガラス転移温度<sup>10)</sup>, 氷結晶成長抑制効果<sup>11)</sup>などの物理化学的特性を有し, 結果として, トレハロース添加は食品に乾燥, 冷凍, 加熱, 浸透圧などの環境ストレス耐性を付与する.

さらに, トレハロースは(1) 低う蝕性と抗菌周病作用, (2) 持続的エネルギー供給性および低インスリン分泌性, (3) 脂肪細胞肥大化抑制・体脂肪率低減, (4) 喫煙時や酸を多く含む食品摂取時に起こる口腔粘膜障害保護作用, (5) 細胞保護効果, (6) コラーゲン合成促進効果, (7) 抗炎症効果や抗骨粗鬆症効果, (8) 神経変性疾患抑制効果, (9) オートファジー誘導作用, (10) 寿命延長・老化抑制効果などの多種多様な生理作用・生理機能を有し, 食品や化粧品分野で応用されている<sup>12)</sup>. しかし, 物理化学的特性とストレス耐性発現との相関性は詳細に解明されていない. 新規機能性糖質の開発にはトレハロースの作用機序を明らかにすることが重要である<sup>13)</sup>.

### 新規糖質の合成

生体内においてオリゴ糖はタンパク質や脂質との複合体を形成し, 複合糖質として存在し, 糖鎖と呼ばれている. 糖鎖は核酸鎖, タンパク質鎖に次ぐ, 第三の生命鎖である. すべての細胞の最外層は複合糖質で覆われており, 細胞認

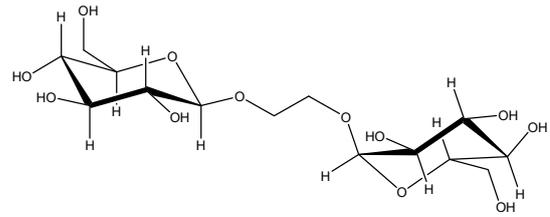
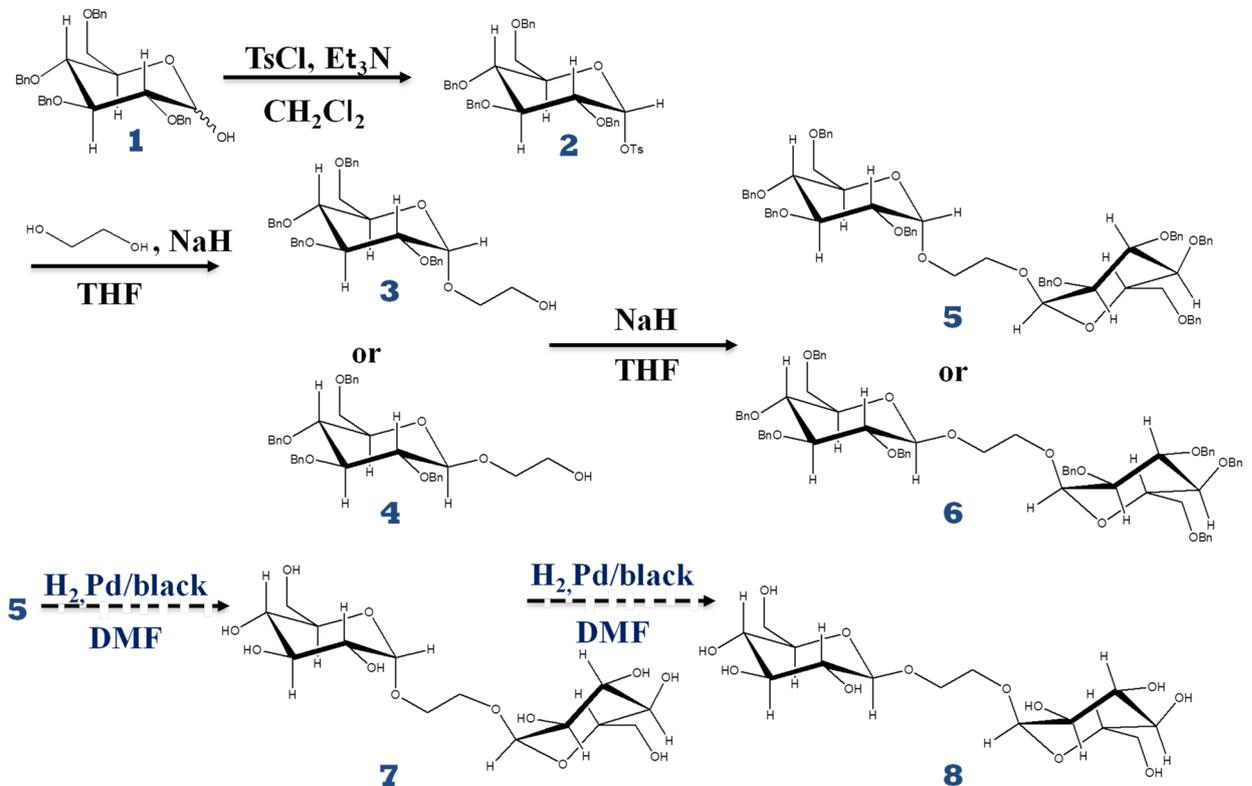


Figure 2. An artificial trehalose-type disaccharide (8).

識特異性は糖鎖で決定される. ABO型血液型や受精も糖鎖構造で左右されている. がん細胞では細胞膜糖鎖異常現象が生じ, この異常糖鎖マーキングがガン診断マーカーとなる. 糖の研究は重要課題である. 薬理作用確定のために様々な類縁体が合成, 比較検討されたように, 化学的新規糖類縁体合成法開発が必要である. 糖質合成の難点はアノマー異性体( $\alpha$ -体と $\beta$ -体)を有することにある. 例えば, 先述したマルトースとセロビオースは構造が類似しているにもかかわらず生物学的には性質が著しく異なる. ヒトはセロビオースを消化できないうえ, 酵母による発酵もできないが, マルトースは容易に消化され, 発酵させることもできる. 新規糖質合成においてはアノマー異性体のいずれかを確定し, 特異的に合成することが必要である.

### 本研究の目的



Scheme 1 Strategy for an artificial trehalose-type disaccharide.

本研究では、新規糖修飾シクロデキストリン合成で用いた分岐糖合成法<sup>14)-18)</sup>を二糖合成に応用して、最小分子量で非還元性末端を有し、機能性の高いトレハロースの結合部分を変換した類縁体、フレキシブルメチレン鎖アームを介した $\alpha,\alpha'$ -1,1'グリコシド結合新規二糖合成を目的として検討を進めた。(Figure 2).

## 実験および方法

### 試薬

反応溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO), テトラヒドロフラン(THF), アセトニトリル, ジクロロメタン, *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF), トルエンは和光純薬(株)製, 有機合成用(無水)をそのまま用いた. 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glucopyranose (**1**), 無水酢酸, トリエチルアミン(TEA), *p*-トルエンスルホニルクロリド(TsCl), 28%ナトリウムメトキシドは和光純薬(株)製を, トリフルオロメタンスルホン酸は ACROS 社製をそのまま用いた. 水素化ナトリウム(NaH)和光純薬(株)製はヘキサン洗浄, 減圧乾燥処理後使用した. NMR 重溶媒は, ALDRICH 社製または和光純薬(株)製 99.9%を用いた. 分離精製用薄層クロマトグラフィー(PTLC)は, MERCK 社製シリカゲル 60GF254 (20 cm×20 cm)を, セライトは和光純薬(株)製 No.500, No.545 を用いた.

### 機器

NMR は JEOL NMLA500 もしくは JEOL NMECZR にて 5 mm $\phi$ 試料管を用いて 30.0 °Cで測定した. <sup>1</sup>H 核では 32 回, <sup>13</sup>C 核では 4400 回積算した. 超音波処理は US-3 (エヌエヌディ(株)製)を, 質量分析 (MS)は AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 を用いた.

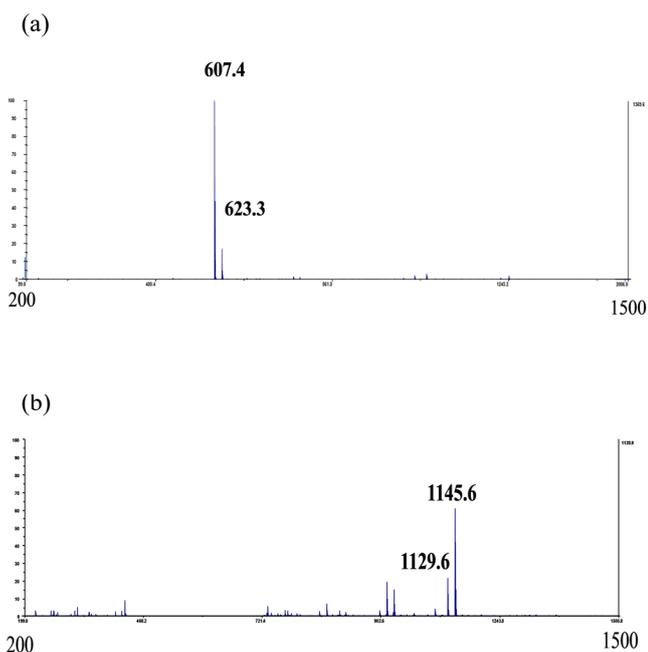


Figure 3. MALDI TOF-MS spectra of **3** or **4** (a; upper) and **5** or **6** (b; bottom).

## 合成

### Hydroxyethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (**4**)

2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glucopyranose (**1**) 0.5046 g ( $9.25 \times 10^{-4}$  mol) をジクロロメタン 10 mL に溶解させ, 0 °Cにてトリエチルアミン 1.3 mL ( $9.25 \times 10^{-3}$  mol) と共に 15 分間攪拌し, TsCl 0.549 g ( $2.76 \times 10^{-3}$  mol) を添加したのち, 3 時間反応させた. クエン酸にて反応を停止し, ジクロロメタンにて抽出した. 置換 Ts 基の脱離反応を抑え, 高収率で 2-hydroxyethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$  もしくは  $\beta$ -D-glucopyranoside (**3** or **4**)を得るために, TLC にて新スポット出現と原料スポット消失の確認のみで, tosyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (**2**)の生成を確認し, 精製操作をせずに次反応に進めた. 0.269 g ( $9.16 \times 10^{-5}$  mol) エチレングリコールと **2**, 0.5206 g ( $2.29 \times 10^{-4}$  mol) を NaH 22.9 mg ( $9.5 \times 10^{-4}$  mol) 存在下, 70 °Cで 72 時間反応させた. メタノールにて反応を停止し, 酢酸エチルにて抽出した. 抽出液を無水硫酸ナトリウム乾燥処理後, PTLC (展開溶媒; ヘキサン:酢酸エチル=2:1 v/v) にて精製し, 無色油状物 **4**, を 0.1086 g, **1** からの収率 10% で得た. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):  $\delta$  3.40-3.60 (m, 4H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>), 3.65-4.00 (m, 6H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 4.40 (d,  $J = 7.95$  Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.50-5.00 (m, 8H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.10-7.40 (m, 20H, Ph). MALDI TOF-MS: m/z Calcd. C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup>; 607; C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub>K<sup>+</sup>; 623; Found. 607.4, 623.3.

### 2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-ethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (**6**)

**2**, 0.589 g ( $8.41 \times 10^{-4}$  mol) と **4**, 0.108 g ( $1.84 \times 10^{-4}$  mol) を THF 中, NaH 90.1 mg ( $3.68 \times 10^{-3}$  mol) 存在下, 70 °Cで 120 時間反応させた. メタノールにて反応を停止し, 酢酸エチルにて抽出した. 抽出液を無水硫酸ナトリウム乾燥処理後, PTLC (展開溶媒; ヘキサン:酢酸エチル=3:1 v/v) にて精製し, 無色油状物 **6** を 0.050 g (収率 24%) で得た. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):  $\delta$  3.40-3.80 (m, 12H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>2</sub>', H<sub>3</sub>', H<sub>4</sub>', H<sub>5</sub>', H<sub>6</sub>'), 4.05-4.52 (m, 4H, H<sub>7</sub>, H<sub>7</sub>'), 4.52-5.16 (m, 16H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.63 (d,  $J = 7.95$  Hz, H<sub>1</sub>), 5.20 (d,  $J = 3.40$  Hz, H<sub>1</sub>'), 7.10-7.50 (m, 40H, Ph) MALDI TOF-MS: m/z Calcd. C<sub>70</sub>H<sub>74</sub>O<sub>12</sub>Na<sup>+</sup>; 1129; C<sub>70</sub>H<sub>74</sub>O<sub>12</sub>K<sup>+</sup>; 1145; Found. 1129.6, 1145.6.

## 結果と考察

合成経路を Scheme 1 に示した. なお, 生成物はすべて無色油状物であり, PTLC で精製した. 得られた生成物はすべて TLC にて 1 スポットであり, 過不足ない NMR シグナルが妥当な積分比で観測された. 分子量も理論値と同一であり, 糖の水酸基保護基であるベンジル基 (Bn) 脱離段階までは実現できなかったが, 各生成物は精製が達成され, レギオ特異的合成戦略は妥当であったと考えられる. アノマー異性体解析も含めた各反応の詳細を以下に述べる.

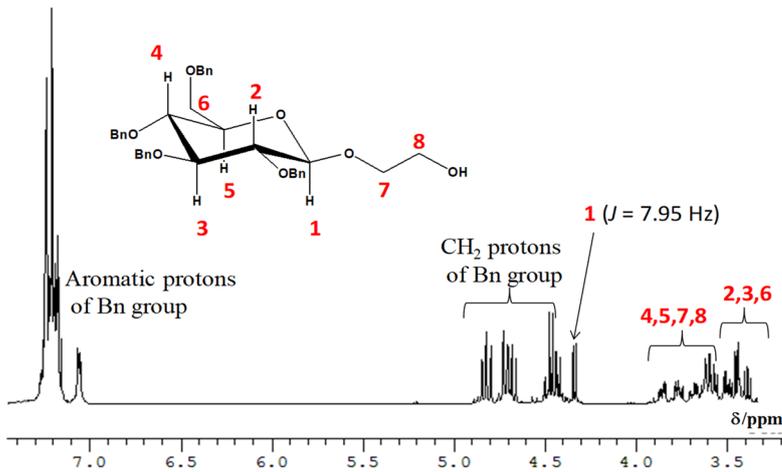


Figure 4.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **3** or **4** in  $\text{CDCl}_3$  at rt.

る。**1**をジクロロメタン中でTsClと2時間反応させた。トシル化合物,**2**の精製分離を試みたが、非常に不安定でTs基の脱離が起こり精製操作は最終生成物を得るには有効ではないことが判明した。TLCにより原料スポット消失と新スポット出現確認のち、乾燥処理を処し、精製操作なしに次の反応に進行した。**2**とエチレングリコールをNaH存在下、70℃で24時間反応させた。MALDI TOF-MSによると精製物は**1**とは異なる分子量ピークを607.4および623.3m/zに示し、**2**のNa, K付加物の理論値、 $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Na}$ ; 607,  $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{K}$ ; 623とそれぞれ合致している (Figure 3(a)).

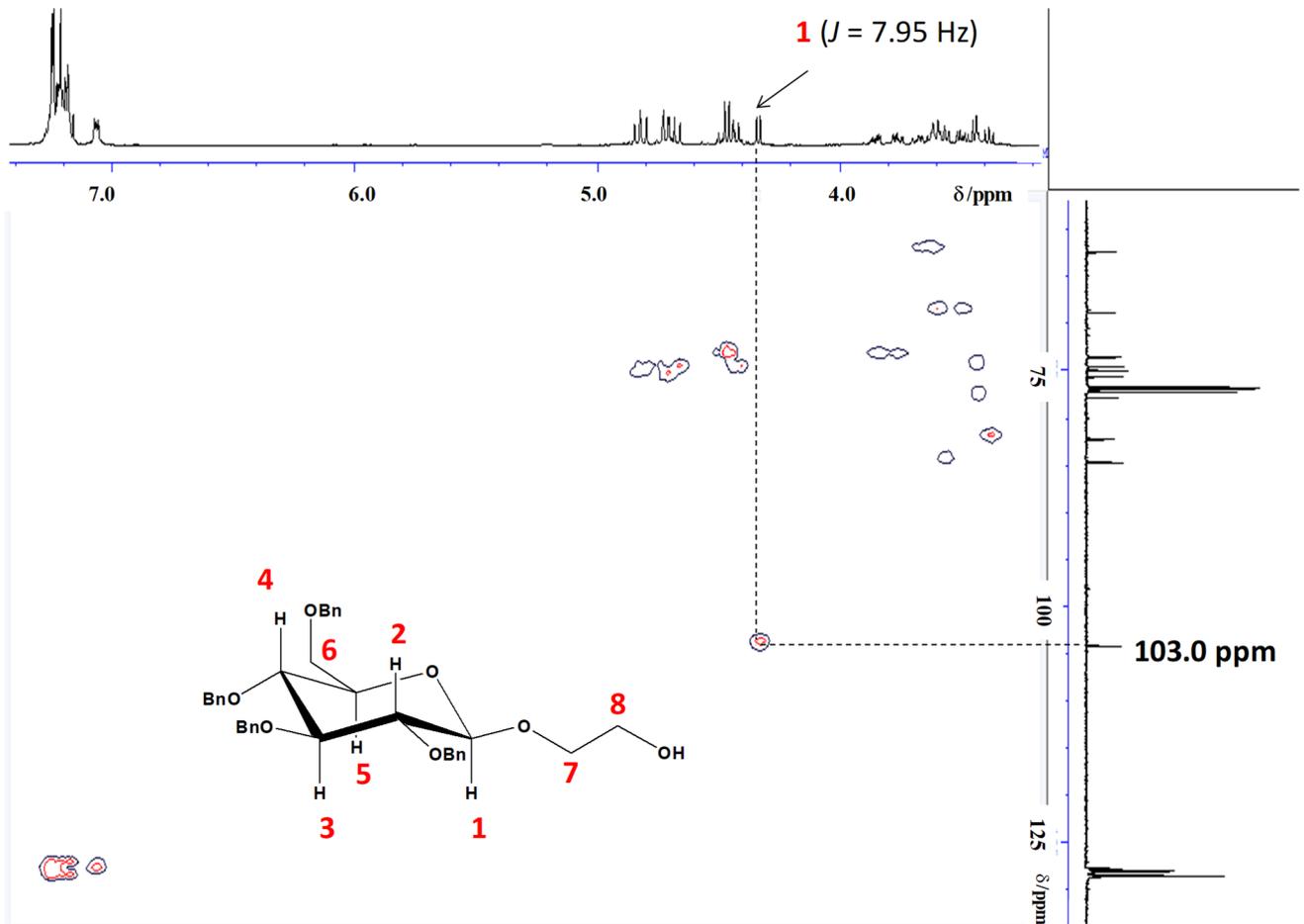
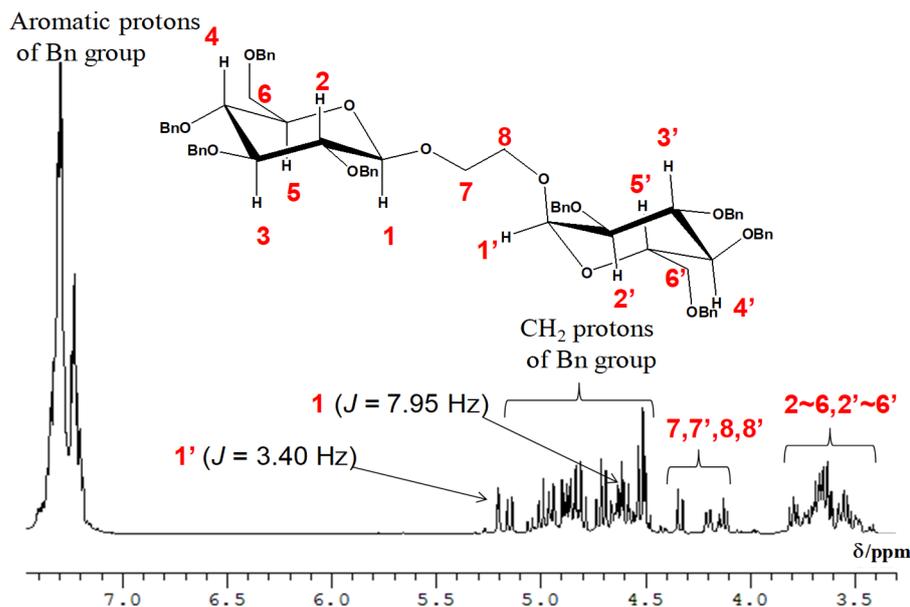


Figure 5. HSQC spectrum of **4**.

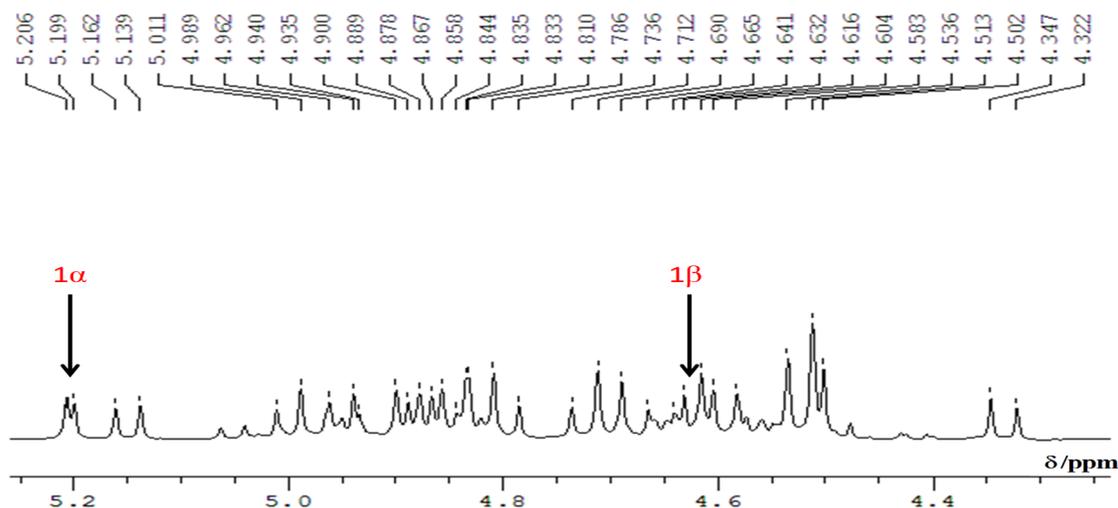
Figure 6.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **6** in  $\text{CDCl}_3$  at rt.

生成物の  $\text{CDCl}_3$  中における  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを Figure 4 に示した. 7.10 ~ 7.50 ppm に Bn 基芳香族, 4.48 ~ 5.00 ppm に Bn 基結合メチレン基に帰属されるシグナルがそれぞれ観測された. 観測された 4.40 ppm にグルコース H1, 3.65 ~ 4.00 ppm に H4, H5 位とアームのメチレン基 7, 8 が, 3.40 ~ 3.65 ppm にグルコース H2, H3, H6 に帰属されるシグナルがそれぞれ観測され, **3** もしくは **4** 由来のシグナルが妥当な積分比で過不足なく観測され, 合成を確認した.

原料 **1** はアノメリック異性体 ( $\alpha$ - および  $\beta$ -体) 混合物であり,  $^1\text{H}$  NMR で  $\alpha$ -および  $\beta$ -体それぞれに対応する 2 種類の異なるシグナルパターンが観測される. **2** は配糖体合成中間生成物として周知されており,  $\alpha$ -体である. しかし, 生成物の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいてアノメリック C1 は 103 ppm に観測され, HSQC スペクトルでは相関をもつプロトンは 1 シグナルのみであった (Figure 5). この相関に

対応する 3.65 ~ 4.00 ppm に観測されている H1 シグナルの  $J$  値は 7.95 Hz であった.  $\alpha$ -体であれば, C1 は 100 ppm 未満, H1 シグナルの  $J$  値は約 4 Hz に観測される. 得られた新規二糖類は  $\beta$ -体, すなわち **4** であることが判明した.

**2** と **4** を NaH 存在下 70  $^\circ\text{C}$  で 48 時間反応させたところ, 精製後の化合物は **2** の分子量と異なる 1129.66 および 1145.6 m/z に分子量ピークを示し, これは **5** もしくは **6** の Na, K 付加物の理論値,  $\text{C}_{70}\text{H}_{76}\text{O}_{14}\text{Na}$ ; 1130, および  $\text{C}_{70}\text{H}_{76}\text{O}_{14}\text{K}$ ; 1146 と一致している (Figure 3(b)).  $\text{CDCl}_3$  中における  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルにおいて (Figure 6), 7.10 ~ 7.50 ppm に Bn 基芳香族, 4.52 ~ 5.16 ppm に Bn 基結合メチレン基に帰属されるシグナルがそれぞれ観測された. 4.63 ppm にグルコース H1, 4.05 ~ 4.52 ppm に糖を結合するメチレン基, 3.40 ~ 3.80 ppm にグルコース H2 ~ H6, H2' ~ H6' に帰属されるシグナルがそれぞれ観測された. さらに, 糖由来シ

Figure 7. Expanded  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **6** in  $\text{CDCl}_3$  at rt.

グナル範囲を拡大して詳細に観測すると (Figure 7), 5.2 ppm 付近に 4.63 ppm H1 帰属シグナルとほぼ同じ積分値を有する新たなダブルレットシグナルが観測され,  $J$  値は 3.40 Hz であった.  $\alpha$ -体アノメリックプロトンであると推測できる. 明らかに 2 パターンの糖由来シグナルが観測されていることから生成した二糖は非対称である. 全帰属には至っていないが, 水酸基保護基 Bn 基とアームのメチレン基、糖由来のシグナルが妥当な積分比で過不足なく観測されている. 以上の結果を総合すると, 第一段階のエチレンジグリコールとは  $S_N2$  反応をして  $\alpha$ -体から ethyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside を生成し, 第二段階ではアグリコンが立体的に嵩いたため, **2** は反転せずに反応して, 最終的に **6** が生成したと推測される.

エーテル結合を含むアームを介した新規非還元型  $\alpha$ ,  $\beta$ -1,1'結合二糖前駆体が合成できた. **6** を DMF 中, パラジウムカーボン (Pd/black)にて脱ベンジル化をすると, 非還元型  $\alpha$ ,  $\beta$ -1,1'結合二糖が得られるが, 実現には至っていない.

## 結論

C-C'分岐糖合成方法を単糖グルコースに展開し, エーテル結合アームを介した新規トレハロース型 1,1'結合二糖合成戦略をたて, 脱ベンジル化には至らなかったが新規二糖合成を達成した. NMR 解析の結果, フレキシブルメチレン鎖置換反応において特異的に  $\beta$ -アノマーのみが生成し, 次段階の糖結合においては  $\alpha$ -アノマーのみが生成し,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ 結合タイプではなかったが, アノメリック特異的  $\alpha$ ,  $\beta$ -1, 1'結合タイプを得ることができた. 元来, 新規糖質は非天然糖質であっても酵素合成法が大部分であり, それでもアノメリック特異性合成は困難である. 化学合成法でアノメリック特異的反応を達成したことは評価に値する. これには卒業生を含め多大な NMR 測定解析技術と糖質合成技術の集約に帰するところが多い. 新規糖質の特性・機能性評価までは達成できなかったが, 人工的非還元末端含有二糖合成戦略を達成した.

新規二糖はフレキシブルアームを有しており, 特性評価が実現すれば, その機序が未解明であるトレハロース作用機序の解明とさらなる糖質の応用展開に大いに寄与すると期待できる.

## 参考文献

- 1) 中久喜輝夫, *応用糖質科学*, **1**, 281-285, **2011**.
- 2) オリゴ糖の製法開発と食品への応用, 監修 早川由紀夫, 中久喜輝夫, シーエムシー出版 東京 **2013**.
- 3) T. Nakakuki, *J. Appl. Glycosci.*, **42**, 275-283, **1995**.
- 4) T. Nakakuki, *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 35-44, **2002**.
- 5) 早川幸男, 小林昭一監修, (社)菓子・食品新素材技術センター食品新素材事業部幹事会編集, 良くわかる食品新素材. (株)食品化学新聞社, 東京 11-132, **2002**.

- 6) H. A. L. Wiggers, *Annal. Pharm.*, **1**, 129-182, **1832**.
- 7) 杉本利行, *食品工業*, **38**, 34-39, **1995**.
- 8) T. Nakada, K. Maruta, K. Tsusaki, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2210-2214, **1995**.
- 9) T. Nakada, K. Maruta, H. Mitsuzumi, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2215-2218, **1995**.
- 10) T. Sei, T. Gonda, Y. Arima, *J. Cryst. Growth*, **220**, 218-229, **2002**.
- 11) 向井 和久, 新井 千加子, *New Food Industry*, **53**, **4**, **2011**.
- 12) 櫻井実, 浅川直紀, 井上義夫, *食品工業*, **41**(20), 64-72, **1999**.
- 13) 西田毅弘, オリゴ糖の製法開発と食品への応用, 監修 早川由紀夫, 中久喜輝夫, pp68-76, シーエムシー出版 東京 **2013**.
- 14) Y. Oda, and T. Yamanoi, *Synthesis*, **19**, 3021-3031, **2007**.
- 15) S. Matsuda, A. Yoshida, J. Nakagawa, M. Watanabe, Y. Oda, and T. Yamanoi, *Tetrahedron Lett.*, **55**, 6394-6398, **2014**.
- 16) K. Takahashi, H. Nakamura, T. Kawaguchi, S. Fujiwara, Y. Oda, T. Yamanoi, *Proceedings of 4<sup>th</sup> Asian Cyclodextrin Conference (ACC2007), Kyoto, Japan 2007*.
- 17) 藤原章司, 東京工芸大学大学院工学研究科博士論文, **2013**.
- 18) 飯田翔吾, 東京工芸大学大学院工学研究科修士論文, **2015**.