

医療応用を目指した生理活性糖鎖の効率的合成研究

Efficient Synthesis of Bioactive Oligosaccharides toward Medical Treatment Applications

山口 真 範

Masanori YAMAGUCHI

(和歌山大学教育学部化学教室)

2019年10月11日受理

Abstract

シアル酸を非還元末端に有するシアロ糖鎖は、様々な生理活性を有することが知られている。しかしながらその合成の困難さから、十分な供給に至らず、その供給が応用利用や研究のボトルネックとなっている。糖鎖の供給法は天然からの抽出、有機化学合成、酵素合成から成っており、シアロ糖鎖は主に後者2つを用いて供給されている。

本研究はシアル酸加水分解酵素(シアリダーゼ)の逆反応である糖転移活性を利用した簡便なシアロ糖鎖の合成法の開発を目指したものである。

◆はじめに

糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖とも呼ばれており、近年急速に糖鎖研究が進められている。糖は我々の身体において細胞の分化、接着、免疫調節など生命を維持するために必須である様々な生命現象を担っている。他方で、ウイルス感染、ガン化、毒素や細菌の受容体となるなど我々にとって不利益になる現象にも関わるということが知られている²⁾。すなわち、糖鎖は我々にとって利益をもたらす分子でもあり、不利益をもたらす分子でもあるといえる。

それゆえ糖鎖を自在に制御することができれば、多くの病や感染症を克服することが可能となり、人類に多大な恩恵をもたらすことが可能である。更に糖鎖は毒性をもたず極めて安全な分子として知られている。安全性が担保された分子で新たな治療方法を開発することは現代医療の発展において非常に有意義なことである。

本研究では、免疫調節、ガン化、インフルエンザウイルスの感染などに深く関わるシアロ糖鎖を効率的に合成する方法を開発し、医療へ応用することを目的とした。シアロ糖鎖は非還元末端にシアル酸を有する分子の総称であり、様々な生命現象を司っている。人乳や鶏卵黄中などに有意に含まれていることが知られているが、意図した構造のシアロ糖鎖を大量に得るためには人工的に合成するほかはない。その合成過程のなかでもシアル酸を付加するシアリル化は鍵反応であり、その開発は非常に重要である。

本稿においては、種々のシアル酸加水分解酵素であるシアリダーゼの逆反応である糖転移反応を用いたシアリル化反応の開発と制御を報告する。

この方法は、収率面では糖転移酵素による合成に及ばないが、使用する基質と酵素が共に調製および入手が比較的容易で、かつ酵素の基質特異性が低いという面がある。そのことにより天然にはない多様なシアリル化糖鎖アナログを合成できるというメリットがある。

◆目的化合物の選定

糖鎖の合成は、糖供与体(ドナー)と糖受容体(アクセプター)を調製し、それら二つを任意の立体配座で任意の位置に繋ぎ合わせ目的糖鎖を得る。合成条件の最適化反応の開発においては、この二つの糖鎖が容易に調製できることが望ましい。

シアリル化条件反応開発において、目的化合物としてシアリルラクトースを選定した。本化合物はラクトースの非還元末端のガラクトースにシアル酸が付加したオリゴ糖鎖(3糖)である。そのシアル酸の結合位置の違いにより、シアリル $\alpha(2\rightarrow3)$ ラクトースとシアリル $\alpha(2\rightarrow6)$ ラクトースの二種類が知られている(図1)。

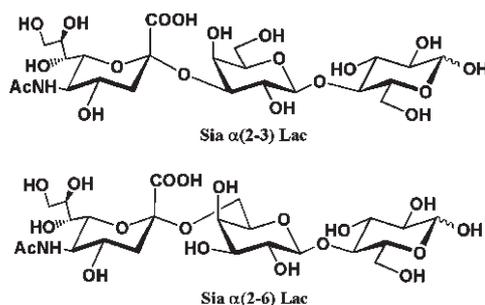


図1 シアリルラクトースの構造

ラクトースは天然から容易に入手できることから、受容体としての調製制限はかからない。また合成されるシアリルラクトースは、インフルエンザ防疫能をはじめとした種々の生理活性を有する医療応用を強く望まれている化合物の一つである³⁾。よって本化合物の合成法の開発は、化学的のみならず医学・生化学的にも非常に有意義である。

◆合成戦略

糖供与体としてpNPシアル酸を用いることにした。pNPシアル酸はシアル酸の2位にp-ニトロフェノールが α 結合したシアリル化配糖体である。合成はBrossmer, Rらの方法に従った⁴⁾(scheme 1)。

次に、合成したpNPシアル酸(糖供与体)とラクトース(糖受容体)にシアリダーゼを作用させ目的とするシアリルラクトースの合成を行うことにした(scheme 2)。シアリダーゼを用いたシアロ糖鎖の合成法の報告はいくつか例がある^{5,6,7,8)}。それらの報告は単一の反応条件のみを報告したものが大半であり、糖質加水分解酵素が演じている糖転移反応のダイナミックな全容を把握するには情報不足であることは否めない。

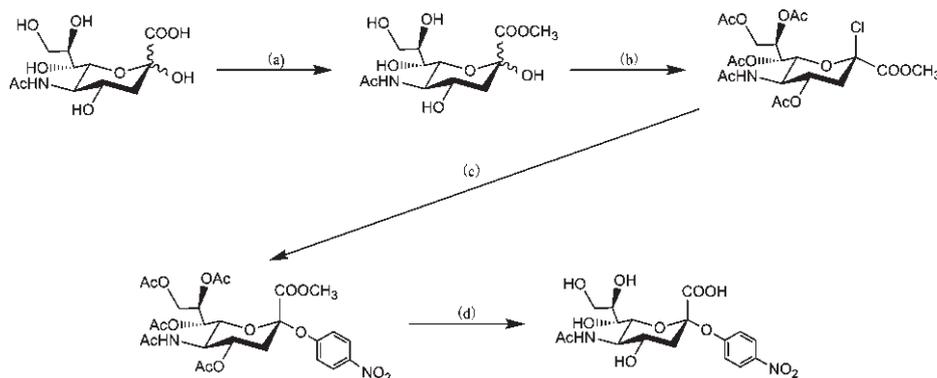
加水分解酵素の逆反応を用いた酵素反応は、糖転移酵素とは異なり一つのファクターが変化するだけで劇的に生成物の有無が変化する。よって本合成法を採用する場合、種々のファクターを組み合わせ、膨大な数の検討試験を要する。

そのなかで本稿においては、各シアリダーゼにおけるシアリルラクトースの継時的生成傾向とその種類を精査し、各酵素の特徴を明らかにすることを主目的にした。

次に、合成に用いるためのシアリダーゼの選定を行った。糖転移酵素であるシアリルトランスフェラーゼに比べると、シアリダーゼは比較的多くの種類が市販されている。よって選択の幅はシアリルトランスフェラーゼよりも少し広いといえる。

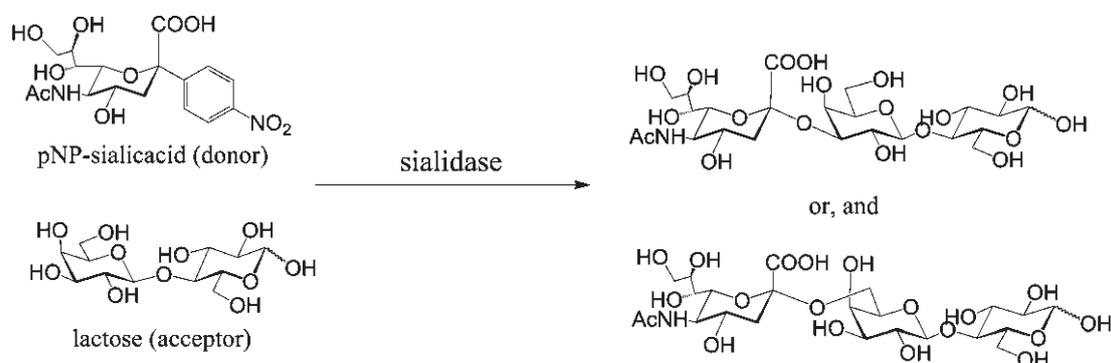
本研究は糖鎖を大量に合成する技術を開発し、医療応用へ結びつけることを主眼としているため、選定基準は次のように定めた。

- ① 将来的に大量合成を目指すため、酵素活性が高力価であること。
- ② 産業利用が可能な価格帯であること。
- ③ メーカーからの入手が可能であること。



a) MeOH, Dowex (H⁺), 40°C., b) AcCl, r.t., c) *p*-nitrophenol, TBAHS, 1 M NaOH, CH₂Cl₂, r.t., 3 steps, 68 %.
d) MeOH, NaOMe, r.t., then H₂O, 90 %.

Scheme 1 . pNPシアル酸の合成



Scheme 2 . シアリダーゼによるシアリルラクトースの合成

シアリダーゼの由来	生成物(目的物)	収率
<i>Salmonella typhimuri</i>	Sia $\alpha(2 \rightarrow 3)$ Lac	80%>
<i>Clostridium perfringens</i>	Sia $\alpha(2 \rightarrow 3)$ Lac	20%<
	Sia $\alpha(2 \rightarrow 6)$ Lac	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sia $\alpha(2 \rightarrow 3)$ Lac	15%<
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	目的物得られず	—
<i>Vibrio cholerae</i>	Sia $\alpha(2 \rightarrow 6)$ Lac	5%<

Table 1 シアリルラクトースの生成傾向

これらの選定基準に従い使用するシアリダーゼは *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Salmonella typhimuri*, *Streptococcus pneumoniae* 由来の5種類とすることにした^{9,10)}。

◆結果と考察

それぞれの酵素を用いた場合のシアリルラクトースの生成傾向を調査した。一般的に加水分解酵素の逆反応をもちいる合成の場合、アクセプター糖鎖の反応性に富んだ一級水酸基に糖が転移する 경우가多く、主生成物となることが多い。よって、本反応においてはラクトースの非還元末端側にあるガラクトースの6位にシアリル化されたSia $\alpha(2 \rightarrow 6)$ Lacの生成が優先されると予想される。それぞれのシアリダーゼは、(2→3)、(2→6)結合を切断する速度(親和性)が異なっており、結果的にはTable 1に示した生成物が得られた。

*Arthrobacter ureafaciens*由来の酵素を用いた場合は目的物であるシアリルラクトースは得られなかった。

*Clostridium perfringens*由来のシアリダーゼを用いた場合は、(2→3)、(2→6)結合体の両方のタイプのシアリルラクトースを同時に得ることが出来、双方を一挙に合成を行いたい場合には有効であると言える。しかしながら、(2→3)、(2→6)結合体のシアリルラクトースの生成する反応時間は、分析の結果一致していないことが判明した。(2→3)結合体がまず生成し、ついで(2→6)結合体が遅れて生成してくるという結果が得られた。つまり、(2→3)結合体が最も生成する反応時間では、(2→6)結合体の生成が少なく、(2→6)結合体が最も生成する反応時間では、(2→3)結合体は分解に転じており双方の最大生成時間を捉えることはできない。更に(2→3)、(2→6)結合体を同時に得た場合、それぞれのシアリルラクトースを分離精製が煩雑であるため、純品で得たい場合は混合物として得られる本酵素はあまり適格ではない。

*Salmonella typhimuri*由来のシアリダーゼを用いた場合は、(2→3)結合体のシアリルラクトースのみを高収率にて得ることに成功した。本反応系は、糖転移

酵素であるシアリルトランスフェラーゼに近い収率を出すことが出来た。転移酵素に比べると非常に安価な基質と酵素を使用し目的物を高収率にて得ることが出来ることから、研究用試薬などを合成する産業応用への転用が可能な合成系の一つと言える。

*Streptococcus pneumoniae*由来のシアリダーゼを用いた場合は、(2→3)結合体シアリルラクトースのみを行うことが出来るが、収率が15%(加水分解酵素の逆反応としては高収率)であり、*Salmonella typhimuri*の系には及ばず、次点候補とした。

最後に、*Vibrio cholerae*由来のシアリダーゼを用いた場合は、(2→6)結合体シアリルラクトースのみを低い収率ではあるが得ることが出来た。この反応系は多数の報告例があり、一様にしてその収率は高くはない。本報告における収率も5%以下と満足のいく結果は得られなかった。ただし、(2→6)結合体を単体で得られる反応系であるので、本酵素の逆反応による目的化合物の生成傾向を反応時間軸にて精査し、収率向上を目指すことにした。シアリルラクトース生成量はHPLCにて算出した。

加水分解酵素の逆反応を用いるため、逆反応で生成したシアリルラクトースは通常の正反応の基質となり再び加水分解される。

経時的に生成量の変化をみると、単純な増減カーブではなく増減を繰り返しながら徐々に減退していくことを明らかにした(Table 2)。

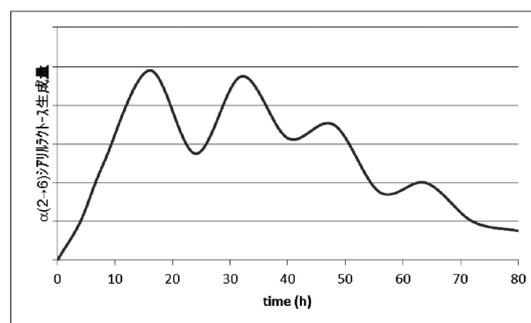


Table 2 シアリルラクトース生成量の経時変化

最大生成量を示した反応時間は16時間と32時間の2回あり、その間の24時間は両時間と比べて%の生成量であった。本酵素の反応系の場合、転移と加水分解の2つの因子を緻密に捉える必要があった。最適反応時間は、糖供与体であるpNPシアル酸が多く残存している16時間とした。なぜなら残存したpNPシアル酸は容易に精製することが出来、回収して再利用が可能というメリットがある。32時間の場合はシアリルラクトースの生成量は16時間と同等であるがpNPシアル酸は大半消費されていた。

◆まとめ

本研究では、種々のシアリダーゼの逆反応である糖転移活性を用いたシアリルラクトースの合成を行った。本反応を利用した合成は、目的物の生成が非常にダイナミックであり、基質量、酵素量、反応時間、反応pH、反応温度のすべてを合成者の側において適切にコントロールする必要があった。

例えば、*Salmonella typhimuri*由来のシアリダーゼを用いた合成で収率、80%を達成したが、その検討回数は2000回を超えた。膨大な検討を繰り返し、至適条件を見出した。これらの酵素反応は条件検討の煩雑さを伴うものの、条件がいったん確立されれば、再現性はゆるぎないものであり、経験を有しない作業者においても実施が可能である。特殊な設備や有害な試薬等を取り扱う深い経験と知識が必要な有機化学合成と比べると有利な側面である。

今回は市販されているシアリダーゼのみを用いた合成検討をおこなったが、合成の幅を広げるため新たなシアリダーゼを発掘し、その酵素を用いた合成を検討する必要があると考える¹⁴⁾。

得られた二種類のシアリルラクトースのうちSia α (2 \rightarrow 3)lactoseはトリ型インフルエンザ、Sia α (2 \rightarrow 6)lactoseはヒト型インフルエンザ感染阻害活性が見込まれる。

また本研究において開発したシアリル化の方法は、ガン、免疫疾患などに関わるシアロ糖鎖合成にも応用することができ、効率的なシアロ糖鎖合成手法の一つと成り得る。

◆実験の部

一般操作

シアリダーゼは *Clostridium perfringens* (New England Biolabs社製)、*Vibrio cholerae* (Roche社製)、*Arthrobacter ureafaciens* (Sigma - Aldrich社製)、*Salmonella typhimuri* (New England Biolabs社製)、*Streptococcus pneumoniae* (New England Biolabs社製)をそれぞれ使用した。ゲルろ過カラム担体はSphadex LH-20 (GE Healthcare社製)のものを使用した。有機合成試薬、反応溶媒、カラム溶媒、HPLC溶

媒は和光純薬工業株式会社製のものを使用した。TLCはsilica gel60F254 (merck, alminumsheets)を用い、検出は発色試薬(10% H₂SO₄-EtOH)によった。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)：島津製作所製SPD-M20Aを使用し、分析カラムはTOSOH社製DEAE-5PW(5 μ m, 7.5 \times 75 mm)を用いた。移動相は注入時の組成、水：1 M NaCl = 100：0からリニアグラジェントで2時間、1 M NaCl 100%とした。カラム温度40 $^{\circ}$ C、流速1 mL/min、検出はUV215 nm、試料注入量は20 μ Lにて行った。

pNPシアル酸保護体の合成

シアル酸(1 g, 3.23 mmol)にMeOH(18 mL)とDowex(H⁺)を加え、窒素雰囲気下、40 $^{\circ}$ Cにて61時間攪拌した。反応終了後、ガラスフィルターにて濾過し、MeOH洗浄した。濾液と洗液を合わせ、減圧濃縮し、真空ポンプにて3時間乾燥させた。得られた残渣にAcCl(10 mL, 140.7 mmol)を加え、窒素雰囲気下、室温にて36時間攪拌した。反応終了後、tolueneにて共沸し、真空ポンプにて3時間乾燥させた。得られた残渣をCH₂Cl₂(10 mL)に溶解し、TBAHS(500 mg, 1.61 mmol)、1 M NaOH(15 mL)に溶解したpNP(672 mg, 4.83 mmol)を加え、室温にて24時間激しく攪拌した。反応終了後、CHCl₃にて抽出し、H₂Oにて洗浄した。Na₂SO₄にて乾燥後、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Fuji Silysia 300mesh, ℓ = 15 cm)に供し、溶出液(2：1 AcOEt-hexane)にてpNPシアル酸保護体⁴⁾(1.3 g, 2.12 mmol, 68%)を得た。

pNPシアル酸の合成

pNPシアル酸保護体(1.3 g, 2.12 mmol)をMeOH(10 mL)に溶解し、触媒量のNaOMeを加え、室温にて5日間攪拌した。さらに、H₂Oを加え、室温にて24時間攪拌した。反応終了後、Dowex(H⁺)にて中和し、MeOHで洗浄した。それを減圧濃縮して得られたシラップをゲルろ過カラムクロマトグラフィー(Sephadex LH-20, ℓ = 32 cm)に供し、溶出液(MeOH)にてpNPシアル酸⁴⁾(822 mg, 1.91 mmol, 90%)を得た。

シアリルラクトースの合成

pNPシアル酸溶液、飽和ラクトース溶液の混合溶液に、各種シアリダーゼ溶液を37 $^{\circ}$ Cにて添加し、その混合溶液を37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートした。反応終了後、反応液をC18 Sep Packカートリッジカラムに供し、溶出液には水(1 mL)を使用して疎水性成分を除いた。続いてその溶出液をSephadex G25カラム(280 \times 10 mm)に供し、精製を行い、目的化合物を得た。

・謝辞

本研究の一部は基盤研究(C)課題番号17K01963と平成28年度
独創的研究支援プロジェクトAの助成を受けて行った。

・参考文献

- 1) A. Varki *Glycobiology*, 3, 97-130(1993).
- 2) Mammen, M., Choi, S., Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 2754-2794(1998).
- 3) (a)鈴木康夫.(1992)特集 生命科学を推進する分子ウイルス学, 37巻, 14号, pp 405-421. (b)鈴木康夫.(1993) *Mebio*, 10巻, 5号, pp 32-42. (c)鈴木康夫, 箱守仙一郎, 永井克孝, 木幡 陽. (1993) *グリコバイオロジーシリーズ*, 第6巻 *グリコパソロジー* (d)鈴木康夫, 永井克孝. (1994) *ウイルス感染と糖鎖生物学, 糖鎖II糖鎖と病態*, pp 184-196.
- 4) Eschenfelder, V., Brossmer, R. *Carbohydr Res.*, 162 (2): 294-297(1987).
- 5) Thiem, J. Treder, W. *Angew. Chem., Intl. Ed. Engl.*, 25, 1096-1097(1986).
- 6) Ajisaka, K., Fujimoto, H., Isomura, M. *Carbohydr. Res.*, 259, 103-115(1994).
- 7) Makimura, Y., Ishida, H., Kondo, A., Hasegawa, A., Kiso, M. *J. Carbohydr. Chem.*, 17, 975-979(1998).
- 8) Schmidt, D., Sauerbrei, B., Thiem, J. *J. Org. Chem.*, 65, 8518-8526(2000).
- 9) Wong-Madden, S.T. and Landry, D., *Glycobiology*. 5, 19-28(1995).
- 10) Hoyer, L.L., Roqqentin, P., Schaure, R., Vimr, E. R.. *J. Biochem.*, 110, 462-467(1991).
- 11) 数下侑平, 山口真範. (2013)糖鎖工学進展を目指した新規酵素の発掘: 海洋性生物由来のシアリダーゼの探索, 和歌山大学教育学部紀要, 63, 29-32.