

研 究 解 説

生理活性を有する分枝多糖の合成

Synthesis of Bioactive Branched Polysaccharide

畑 中 研 一*

Kenichi HATANAKA

1. は じ め に

生体内に存在し、様々な生命現象に深く関わっている高分子化合物は大別して、核酸、タンパク質、多糖の3種類である。その他、天然ゴムや天然のポリエステルなどの高分子も存在するが、生命を維持するという点において前三者が抜きん出ていることは言うまでもない。よく知られているように、核酸とタンパク質が直鎖状の高分子なのに対して、多糖は直鎖状と分岐のものが存在する。ヌクレオチドやアミノ酸には結合に関与する官能基が1対のみ存在するので、酵素による脱水反応の結果得られるポリヌクレオチド(DNA および RNA) やポリアミノ酸(タンパク質) は直鎖状の高分子である。一方、糖はグリコシド結合に関与できる水酸基を複数個有するため、枝分かれが可能となる。但し、直鎖状であるか枝分かれ状であるかは、糖鎖を形成する過程において作用する酵素(糖転移酵素と呼ばれる一群)の基質特異性によって決定される。

一般的に、多糖の合成においては、働く酵素は一種類あるいは二種類であり、糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質中に存在するオリゴ糖の合成においては、色々な種類の糖転移酵素が作用する(図1)。したがって、枝分かれの多いオリゴ糖が細胞間における分子認識などといったような精密な生体機能の発現を得意としているのに対して、直

鎖状高分子の集まりである多糖は骨格の形成(細胞壁を形成するセルロースやヘミセルロースなど)およびエネルギーの貯蔵(デンプンやグリコーゲン)に適している。オリゴ糖鎖上に存在する生命情報が遺伝情報により(酵素を介して)間接的に支配されていることは言うまでもない。しかしながら、ヘパリンに代表されるグリコサミノグリカン鎖などの酸性多糖は、直鎖状の多糖であるにも拘らず、精巧な情報伝達と密に関わりあっている。このことは、例えば、多糖上の水酸基を硫酸化する酵素の位置選択性(糖ユニットに複数個存在する水酸基のうちどれが優先的に反応するのかということ)や部位選択性(ポリマー=多糖鎖上における硫酸化の不均一性によって高硫酸化度と低硫酸化度の部位が局在化すること)によるところが大きく、遺伝子の影響は極めて小さいと考えられる。

生体反応に関与するグリコサミノグリカン上の官能基は硫酸基やカルボキシル基であり、多糖鎖はそれらの官能基を空間的に提示するためのバックボーンにすぎない。一方、糖タンパク質におけるオリゴ糖鎖はまさに官能基であり、ポリペプチドがバックボーンとなっている。このように考えると、生体高分子における糖鎖の役割は2種類あると言ってよさそうである。それらは官能基を提示する役割と官能基そのものとしての役割である(図2)。そこで『分枝多糖』という化合物に注目してみる。分枝多糖とは枝分かれ多糖の一種で、一本の長い多糖の幹に短いオリゴ

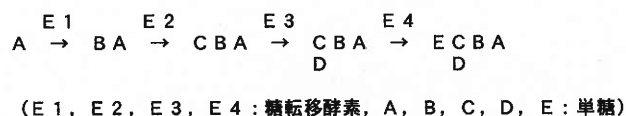
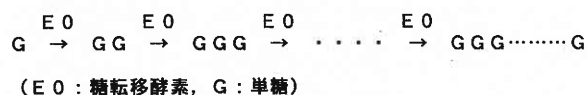
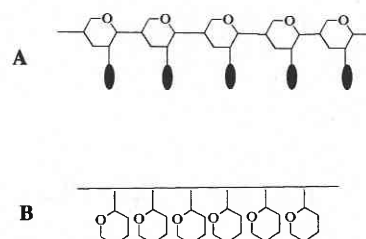
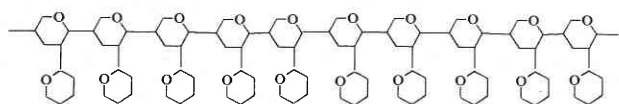


図1 多糖とオリゴ糖の生合成における違い

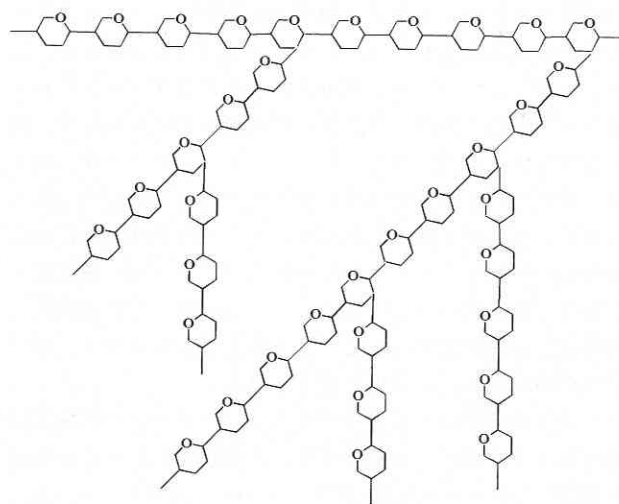
図2 生体高分子における糖鎖の役割
(A)官能基を提示する役割と(B)官能基としての役割

*東京大学生産技術研究所 第4部

糖鎖が何本もぶらさがっている化合物とする。そこでは、多糖ポリマーの主鎖を形成するバックボーン部分と官能基として働くであろうオリゴ糖鎖（または単糖）部分にはっきりと分けられる。これに対してグリコーゲンのような樹状の枝分かれ多糖を『分岐多糖』と呼ぶことにすれば、そこでは枝と幹の区別がなく、全ての非還元末端が官能基であり、全ての糖鎖がバックボーンを形成していると考えることができる（図3）。しかしながら、厳密には『分枝多



分 枝 多 糖



分 岐 多 糖

図3 分枝多糖と分岐多糖

糖』と『分岐多糖』に境界線を引くことは難しく、本稿では、単糖の枝のみを有する最も単純なタイプの『分枝多糖』を扱うこととする。

分枝多糖には様々な生理活性が存在し、枝糖がないと生理活性が全くない例が多々見られる。例えば、サルノコシカケなどの菌類に存在する β (1 \rightarrow 3)-D-グルカンは制ガン活性があることが知られているが、C-6位に β -D-グルコースの枝が存在しないと活性が全くない。また、植物の防御機構（動物における免疫に相当する）を担当するファイトアレキシン活性は β (1 \rightarrow 6)-D-グルカンに存在するが、C-3位に β -D-グルコースの枝が存在しないと活性が全くない。この場合には、枝糖を有するグルコースユニットが一つ置きに存在することも活性発現にとって必須である。さらに、ニンジン中に含まれる中性多糖には血糖値を下げる働きがあるが、この中性多糖は α (1 \rightarrow 6)-D-グルカンであるが、C-3位に α -D-グルコースの枝が存在しないと活性が全くない。

これらの化合物では幹ポリマーバックボーンもD-グルコースであり、官能基となる枝糖もD-グルコースである。すなわち、全く異なる用途に（奇しくも）グルコースという同一のパーツを用いていることになる。一般に、生体では、一種類の化合物を複数の部位に用いていることが多く見られるが、このことは生体を小型化することや、化合物の生合成経路を簡略化することにつながっているの言うまでもない。

本稿では、単糖の枝を有する分枝多糖がどのようにして合成されるのかについて例を挙げて解説する。分枝多糖の合成経路は大別して3つのルートによる（図4）。それらは（A）天然多糖への枝糖の付与、（B）直鎖状多糖の合成と得られた合成多糖への枝糖の付与、そして（C）枝糖を有する単糖（すなわち二糖）の重合、である。（A）と（B）とは一見同じ方法のように思われるが、次のような点で大きく異なっている。枝の付与を受ける水酸基のみを

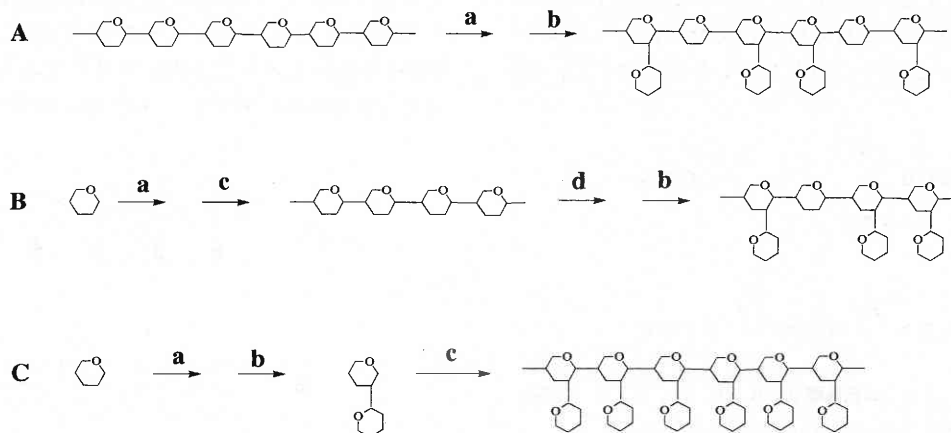


図4 分枝多糖の合成経路

フリーにするために、その他の水酸基に適当な保護基を導入するのであるが、その保護基導入の反応を多糖に対して行うのか、あるいは単糖に対して行うのか、という点である。

2. 天然多糖への枝糖の付与（グリコシル化）による分枝多糖の合成

天然にはセルロースのように多量に存在する多糖が数多くあり、合成原料としては頼もしい限りである。一方、天然多糖は合成多糖と異なり、不純物が含まれることも多く、純度に対してやや不安がある。天然多糖はグリコシル化される前にまずグリコシル化を受ける水酸基以外の水酸基がブロックされなければならない。すなわち、位置特異的な保護基の導入を行うのである。ここで問題となってくるのが保護基の導入を受けるのが多糖（ポリマー）であるという点である。多糖への位置特異的な保護基の導入においては困難な点が二つある。第一に、多糖（特に直鎖状の多糖）は溶媒に溶解しにくい点が挙げられる。さらに、多糖は複数個の水酸基を有するため、水以外の溶媒（有機溶媒など）には溶解しにくく、保護基の導入反応は不均一系で行われることが多い。第二に、保護基の導入率が極めて高い必要がある。なぜなら、通常の有機化学の反応では、位置特異的な保護基の導入が90%以上であれば、再結晶やクロマトグラフィー等により分離し、高収率で高純度のものを得ることができるのに対して、多糖（高分子）上への反応では、反応が同一分子鎖上の複数箇所へ同時に起こるため、未反応ユニットを除くことができない。すなわち、100%に近い反応性および選択性を示さなければ、位置特異的な保護基の導入は達成されないのである。

ここでは、制ガン活性を有しない直鎖状の β (1 \rightarrow 3) - D-グルカン（カードラン）のC-6上への位置特異的なグリコシル化反応による分枝多糖の合成を紹介する（図5）。 β (1 \rightarrow 3) - D-グルカンのC-6位へのグリコシル化を

行うためには、C-6位の水酸基のみをフリーとする必要があるが、C-6位は反応性の高い一級水酸基であるため、C-6位を残して、C-2位とC-4位に保護基を導入することは極めて困難である。そこで、まずC-6位へ立体障害の大きいトリフェニルメチル（トリチル）基を導入し、次いでC-2位とC-4位にフェニルカルバモイル基を導入し、最後に脱トリチル化反応を行うことによって、C-6位のみをフリーの水酸基とすることができる。脱トリチル化は酸性条件下で行われるため、ポリマー主鎖の切断（グリコシド結合（=アセタール結合）の加水分解）が起こる。そこで、トリチル基をジメトキシトリチル基で置き換えることにより、主鎖切断することなく脱トリチル化反応を行うことができる。得られる修飾カードランをテトラベンジルグルコーストリクロロアセトイミデート（グルコシルドナー）と反応することにより、置換度が25%程度に分枝多糖が得られる。

高い枝の導入率を達成するためには、最初のトリチル化反応の位置選択性と反応率を100%に近づけることが重要であるが、枝糖の導入率が50%以下の分枝多糖を合成するためには、70~80%程度のトリチル化度でもよい。

最後に、分枝多糖を得るためには、グリコシル化反応の後、C-2位とC-4位の保護基を外さなければならない。すなわち、C-2位とC-4位の保護基には次のような条件がつく。(1)トリチル基やグリコシド結合が安定な反応条件で導入が可能なこと。(2)脱トリチル化反応およびグリコシル化反応の際に安定であること。(3)強い酸を使わずに脱保護が可能であること（強い酸を使用すると、グリコシド結合が切断される）。このような条件に合う保護基としては、フェニルカルバモイル基の他に、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基などが挙げられる。以上のような糖質合成に用いられる保護基は糖の種類や反応条件によって様々である。糖の化学が『保護基の化学』と呼ばれる所以である。

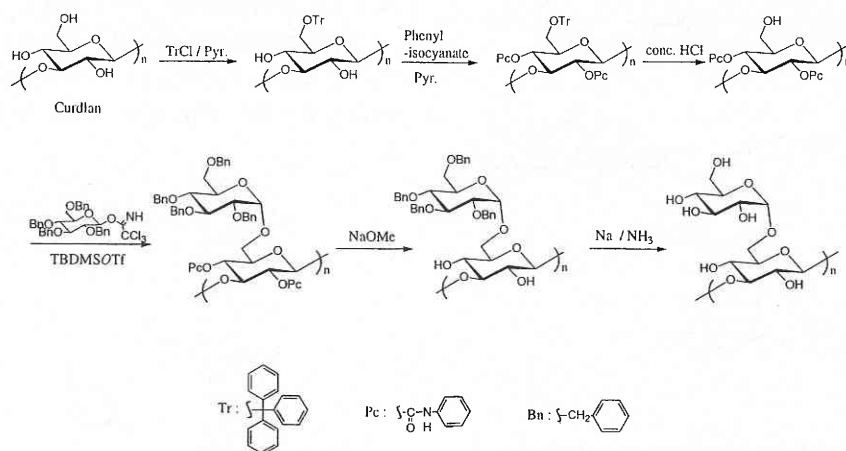


図5 カードランのグリコシル化による分枝多糖の合成

3. 合成多糖への枝糖の付与（グリコシル化）による分枝多糖の合成

前述したように、単糖の段階での位置特異的な保護基の導入は、多糖への導入ほど困難ではない。ここでは、重合性のある無水糖に二種類の保護基を導入し、それを重合することによって、位置特異的に保護された多糖が合成できることを紹介する（図6）。

グルコースを出発原料とした一連の反応により得られた1, 6-無水グルコース（レボグルコサン）のC-2位とC-4位にベンジル基を導入し、C-3位にベンゾイル基を導入することによって、重合性の無水糖モノマー1, 6-アンヒドロ-3-O-ベンゾイル-2, 4-ジ-O-ベンジル- β -D-グルコピラノースが合成される。これをルイス酸により開環重合し、得られたポリマーをナトリウムメトキシドにより脱ベンゾイル化することによって、C-3位の上に水酸基を有する α (1 \rightarrow 6)-D-グルコピラナンが合成される。このC-3位の水酸基へのグルコース枝糖の導入は、テトラベンジルグルコーストリクロロアセトイミデートを用いて行われる。

一般にグリコシル化反応は α 体と β 体の混合物を与えるが、この場合も同様に、二種類のジアステレオマーが存在する。しかも同一ポリマー鎖上に起こっているところが少しやっかいである。 α 体と β 体は互いにジアステレオマーであるため、本来は分離可能な混合物である。しかしこの場合には、同一多糖鎖上に乗っているため、分離することができない（図7）。とすれば、枝糖による置換度を少し低下させてもよいならば、意図していない方のグリコシルアノマーを切断除去してもよさそうである。ここでは、血糖降下作用を有する α (1 \rightarrow 3)-D-グルコピラノシル- α (1 \rightarrow 6)-D-グルコピラナンを目的化合物として

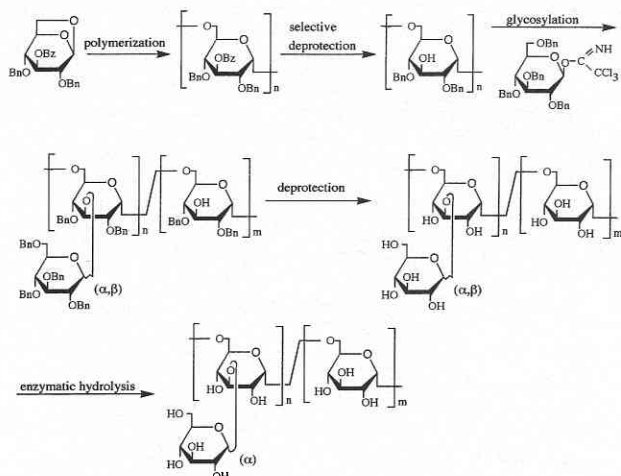


図6 二種類の保護基を有する無水糖の重合とグリコシル化による分枝多糖の合成

いるため、 β -グルコシル残基のみを加水分解除去する。 α -グルコシル基の存在下で β -グルコシル基のみを加水分解するためには酵素を用いるのが便利である。この場合には、セルラーゼ中に含まれる β -D-グルコシドグルコヒドラーゼが有効であり、 β -グルコースの枝糖のみを切り離すことができる。このように、合成過程の一部に酵素を用いることは『chemo-enzymatic synthesis』として注目されており、これからの合成化学の一つの方向とも言える。

得られた分枝多糖を用いてマウスによる *in vivo* 実験を行うと、血糖値を低下させるためには枝糖の存在が不可欠であることが示されている。

また、C-3位に α -D-グルコピラノースの枝を有する α (1 \rightarrow 6)-2-デオキシ-D-グルコピラナン（天然には存在しない構造）などを合成することも可能である。天然に存在しない構造の類似化合物を合成できることは、生化学の研究における合成化学の大きな武器であり、生体反応や生体認識などの生命現象を解明することに役立つばかりでなく、しばしば天然物を超越する機能を示すこともある。特筆すべきことに、このグルコース分枝デオキシグルカン分枝度は100%である。グルコシル受容体（ポリマー側）のC-2位の置換基が無くなったため、立体障害が著しく減少し、このような高置換度の分枝多糖が得られたと考えられる。

4. 無水二糖の重合による分枝多糖の合成

前項で述べたように、分枝度100%の多糖（樹形多糖という）を得るためには、反応率が100%で、アノマー選択性（ α or β ）も100%でなければならない。このことは高分子鎖上に起こる反応の宿命である。これを脱却するためには、反応を低分子で行ってからポリマー化すればよいことになる。すなわち、モノマーの段階で枝糖を付与することにより、必要としない立体選択性で起こった反応の生成物や未反応物を取り除いて重合することができるため、完全な形の樹形多糖が得られるというわけである。

セロビオース誘導体やマルトース誘導体などの重合に見られるように、一般的に言って、無水二糖の重合活性は極

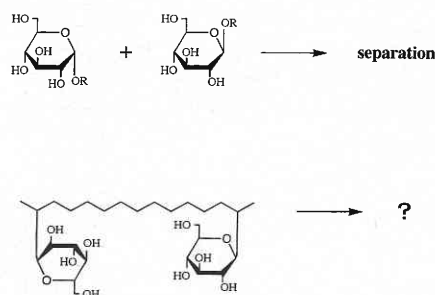


図7 グリコシル化における二種類の異性体（ α と β ）の生成

めて低い。したがって、重合性の高い無水糖をモノマーとして選ぶ必要がある。これまで重合の試みられてきた1, 6-無水糖のうちで重合活性の最も高いモノマーの一つに前項でも扱った1, 6-無水-2-デオキシ-D-グルコース誘導体が挙げられる。2-デオキシグルコースは重合の際の立体障害が極めて小さいため、非常に高い重合性を示すと考えられる。そこで、本稿では、1, 6-無水-2-デオキシ-D-グルコースのC-4位にグルコースの枝を有する二糖の合成とその重合について紹介する。

4.1 無水二糖誘導体の合成

二糖を合成する際に、グリコシル化する側の試薬を糖供与体（グリコシルドナー）、グリコシル化を受けるアルコール（すなわち反応後にアグリコン部分となる方）を糖受容体（グリコシルアクセプター）と呼ぶ。但し、二糖の合成においては、合成された二糖の還元末端側の糖ユニット（グリコシル化を受けた方）はアグリコンとは呼ばない。アグリコンとは本来「糖以外の部分」という意味だからである。糖供与体の方は、アノマー炭素がハロゲンやイミデートによって活性化されているのが通常であり、アノマー炭素以外に結合している水酸基には保護基が導入されている。これに対して、糖受容体では、グリコシル化を受ける水酸基のみがフリーであることが一般的である。すなわち、両方の化合物において、グリコシル化反応に関与しない水酸基には保護基を導入する必要がある。特に糖受容体では、位置特異的な保護基の導入が必要となる。

1, 6-無水-2-デオキシ-D-グルコースは、C-4位が保護された1, 6:2, 3-ジアンヒドロ- β -D-マンノピラノースの水素化リチウムアルミニウムによる還元反応によって合成するのが容易である。したがって、C-4位がベンジル化された1, 6:2, 3-ジアンヒドロ- β -D-マンノピラノースを還元してからグリコシル化すれば、C-3位に枝糖を有するモノマーが得られるし、C-4位をグリコシル化してから還元すれば、C-4位に枝糖を有するモノマーが得られる（図8）。ここでは後者について紹介する。

1, 6:2, 3-ジアンヒドロ- β -D-マンノピラノースは図9のようにして合成される。まず、1, 6-アンヒドロ- β -D-グルコピラノースのC-2位とC-4位

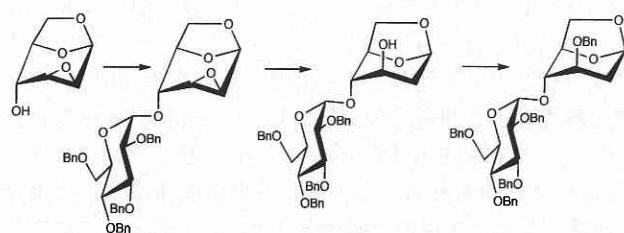


図8 C-4位に枝糖を有するモノマー

を選択的にパラトルエンスルホン酸（トシル）化し、ナトリウムメトキシドにより3, 4-エポキシ化する。次に、ベンジルアルコールによってエポキシ環を開環するのであるが、この S_N2 置換反応はステロイド化合物にも見られるように、アクシャル位が優先的に置換する。

したがって、O-ベンジル基はC-4位に導入され、1, 6-アンヒドロ-4-O-ベンジル-2-O-トシル- β -D-グルコピラノースが得られる。ここでナトリウムメトキシドによるエポキシ化を再度行くと、今度は2, 3-エポキシ化が起こり、1, 6:2, 3-ジアンヒドロ-4-O-ベンジル- β -D-マンノピラノースが得られる。この化合物を水素化リチウムアルミニウムによって還元すれば無水2-デオキシ糖となるのであるが、ここではC-4位に枝糖を有する無水二糖を合成することを目的としているため、グリコシル化反応を先に行う。1, 6:2, 3-ジアンヒドロ-4-O-ベンジル- β -D-マンノピラノースの脱ベンジル化によって得られる1, 6:2, 3-ジアンヒドロ- β -D-マンノピラノースが糖受容体（グリコシルアクセプター）となる。

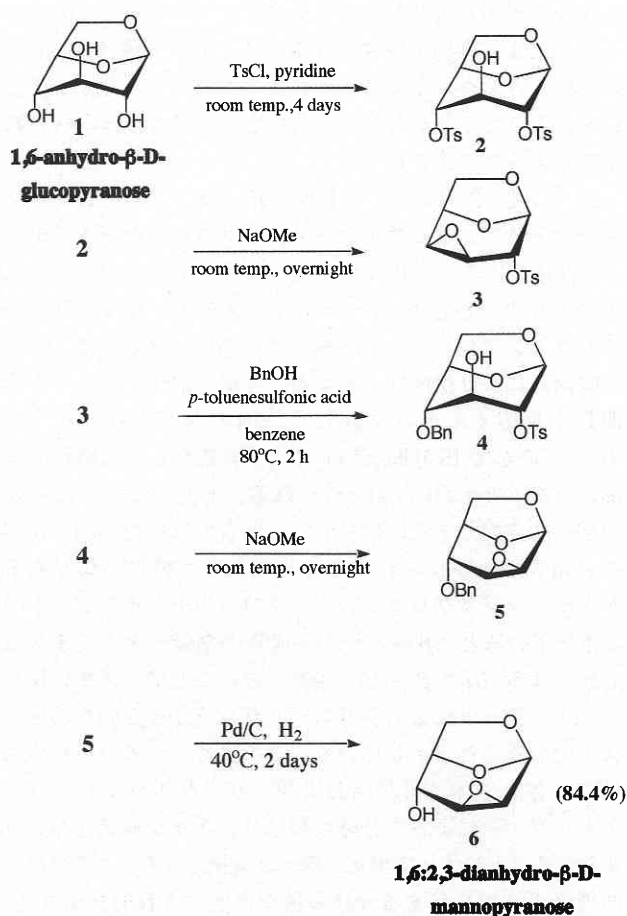
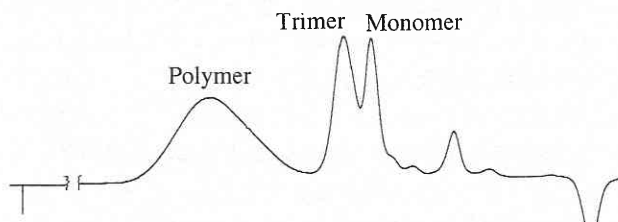
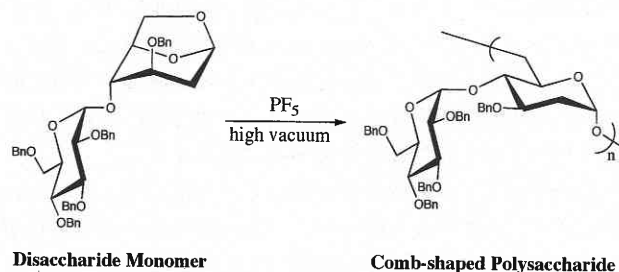


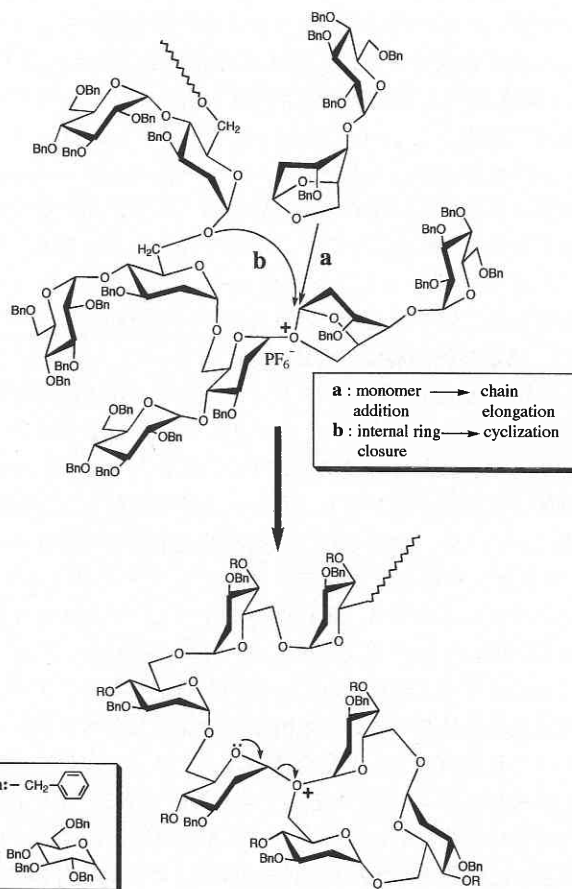
図9 1, 6:2, 3-ジアンヒドロ- β -D-マンノピラノース（糖受容体）の合成



一方、糖供与体（グリコシルドナー）となるテトラベンジルグルコーストリクロロアセトイミデートは、テトラベンジルグルコースとトリクロロアセトニトリルを反応させることにより容易に合成できる。イミデート体は α 体と β 体が得られるが、イミデートによるグリコシル化が S_N1 反応であることを考えると、どちらを用いてもほぼ同様の結果を与えると予想される。

1, 6 : 2, 3-ジアンヒドロ- β -D-マンノピラノースをテトラベンジルグルコーストリクロロアセトイミデート (β 体) によりグリコシル化 (塩化メチレン中で炭酸水素ナトリウム存在下, *t*-ブチルジメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート触媒) する際に、反応条件 (温度と時間) により生成物が異なる。室温 (24°C) 以上で5時間以上反応すると α 結合した二糖のみが得られる。一方、-30°Cで15分間反応すると、 β 結合した二糖が優先的に (α : β = 20 : 80) 得られる。したがって、後者が速度論的支配であるのに対して、前者では熱力学的に安定な α 結合のみが得られると考えられる。糖供与体であるテトラベンジルグルコーストリクロロアセトイミデートの α 体を用いると、 β 結合した生成物の割合を大きくすることができる (α : β = 10 : 90)。このことは、予想に反して、イミデートによるグリコシル化反応が S_N2 的な部分を含んでいることを示している。このようにして得られる二糖の α 体と β 体は再結晶およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分離精製され、各々を還元とベンジル化することによって無水二糖へと変換できる。ここでは、血糖降下作用を有する分枝多糖を合成する目的を踏まえ、以下の反応は α 体のみについて紹介する。

1, 6 : 2, 3-ジアンヒドロ-4-O-(2', 3', 4',



6'-テトラ-O-ベンジル- α -D-グルコピラノシル)- β -D-マンノピラノースは水素化リチウムアルミニウムによってエポキシ環が還元され、デオキシ糖に変換される。この場合も前述の還元と同じように求核剤 (ヒドリド) がアクシアル側から攻撃するので、2-デオキシグルコース誘導体得られる。最後にC-3位の水酸基をベンジル化することによって重合に用いる無水二糖誘導体、1, 6-アンヒドロ-3-O-ベンジル-4-O-(2', 3', 4', 6'-テトラ-O-ベンジル- α -D-グルコピラノシル)- β -D-グルコピラノースが得られる。

4.2 無水二糖誘導体の重合による分枝多糖の合成

1, 6-アンヒドロ-3-O-ベンジル-4-O-(2', 3', 4', 6'-テトラ-O-ベンジル- α -D-グルコピラノシル)- β -D-グルコピラノースをルイス酸である5フッ化リンを開始剤として低温で重合する (図 10) と、 S_N2 機構による開環重合が起こり、C-4位に α -グルコピラノースの枝を有する α -(1 \rightarrow 6)-D-グルコピラノース誘導体得られる。この分枝多糖誘導体はバーチ還元 (液体アンモニア中の金属ナトリウムによる還元) によって脱ベンジル化され、目的とする分枝多糖となる。

重合生成物を GPC により分析すると、分枝多糖誘導体 (ポリマー) と未反応モノマーの他に、オリゴマーのピークが見られる (図 11)。オリゴマーの全生成物に対する割合は、重合温度が高いほど、また重合時間が長いほど大きくなる。したがって、生成するオリゴマーは熱力学的に安定な化合物であると考えられる。このオリゴマーを GPC により分取し、MALDI-TOF マススペクトル及び ^{13}C -NMR スペクトルを測定することにより、環状三量体 (図 12) であることが証明される。つまり、活性末端が 3 つ前のアセタール酸素を攻撃 (Back Biting) することによって環状三量体が生成したものと考えられる。

このことを証明するために、重合生成物のうちポリマー

のみを GPC で分取し、室温において 5 フッ化リンで処理すると環状三量体が生成する。

5. 結 語 に

生理学的に意味のある分枝多糖に焦点を当て、その合成法として 3 種類を紹介してきたが、各々の方法に長所と欠点があり、Target に応じて適宜選んでいくことが必要であろう。このことは、糖鎖の生合成が核酸やタンパク質と比べて複雑であることと類似しており、より複雑であるだけ可能性を感じる。

(2000 年 1 月 24 日受理)