

## シアル酸とその誘導体

Sialic acid and its derivatives

李 章 鎬\*・妹 尾 学\*

Jangho LEE and Manabu SENO

最近その生理作用から注目されているシアル酸の工業的利用の目的で、これまでに行われているシアル酸の化学変換による誘導体について概説し、我々が行っているシアリルリン脂質の合成について述べる。シアリルリン脂質はホスファチジルコリンのリポソームに組み込まれ、シアル酸残基を表面にもつリポソームが合成された。

## 1. シアル酸の分布と生物学的役割

シアル酸 (Sialic acid) は1931年にBlixがウシ唾液腺ムチンから取り出し、唾液 (Saliva) にちなんで命名されたが、1941年Klenkはガングリオシドのメタノール水解物中からはじめて結晶性ポリオキシアミノ糖を単離して、ノイラミン酸 (neuraminic acid) と命名した。

1957年Blixらは基本となるアミノ糖酸 5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-nonulopyronosonic acid をノイラミン酸、一連のノイラミン酸のアシル誘導体をシアル酸と呼ぶことを提案し、今日、その命名法が用いられている。

シアル酸はガングリオシド (シアル酸含有スフィンゴ糖脂質)、糖タンパク質の構成成分として生物の各種の組織に存在し、糖鎖を構成する部分にその構成単位としてグリコシド結合して存在する。

シアル酸が多く存在する組織は顎下腺ムチン、乳汁、脳、血液や各種の臓器の複合糖質と呼ばれる部分である。遊離のシアル酸が体液や組織中に見られることがあるが糖鎖末端のシアル酸が切断されたものである。

生物分野から見ると、大部分の哺乳動物の組織や体液中に見られるほか、魚、イカ、エビなどの下等動物、さらにはある種の細菌 (E. Colik 235) にはコロミン酸としてシアル酸の重合物が存在する。植物中には一般に見いだされていない<sup>1)</sup>。

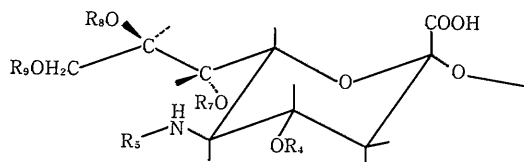
組織内糖鎖中のシアル酸の構造は炭素9個から成り、ピラノース型で存在し、大きな側鎖をもつ酸性の糖で、デオキシ糖でもあり、かつアミノ糖でもある。フリーのノイラミン酸ではほとんど存在せず、図1に示すようにアミノ基はアセチル、もしくはグリコリル化されていて、4個の水酸基もエステル化、メチル化、硫酸化されていることがある。またシアル酸分子に複数のO-置換基が存

在することもある。置換基のそのような相違によって、天然には30種以上のシアル酸が存在している。

また複合糖質のオリゴ糖鎖に結合しているシアル酸はそのオリゴ糖の側鎖として、または他の糖にはさまれて存在する。シアル酸はガラクトースやN-アセチルガラクトサミンに結合したものが多く見られ、まれにN-アセチルグルコサミンに結合したものも見られる。これら糖鎖間におけるシアル酸の結合様式は $\alpha 2 \rightarrow 3$ ,  $2 \rightarrow 6$ ,  $2 \rightarrow 8$ ,  $2 \rightarrow 9$  結合がほとんどである。(図2参照)

このようにシアル酸は生物の種類やその組織によって存在様式が異なるため多様な構造変化が可能である。

シアル酸は糖タンパク質やガングリオシドのなかで、その立体構造の形成や機能の発現に重要な役割を果たしている。シアル酸分子のもつ負電荷のために陽イオンと結合したり、細胞膜や分子間で反発しあったり、薬剤と結合する働きをすると同時に、シアル酸が高分子中に存在することによってタンパク質はその立体配座が安定となることが多くの研究によって明らかになっている。主要な役割をまとめると、①細胞表面荷電、細胞凝集および細胞形態に及ぼす影響：細胞膜のシアル酸は負に荷電



$R_5 = -COCH_3, -COCH_2OH$

$R_6 = R_7 = H, -COCH_3$

$R_8 = H, -COCH_3, -CH_3, -SO_3H$

$R_9 = PO_3H_2$

図1 天然の糖鎖中に存在するシアル酸の構造

\*東京大学生産技術研究所 第4部

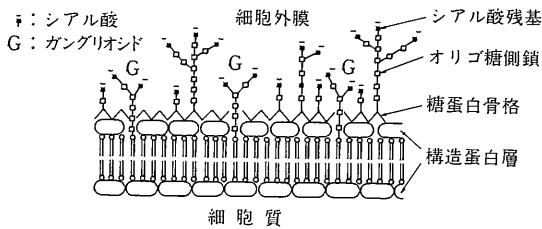


図2 細胞膜モデル (Lehninger, A.L.: Proc. Nat. Acad. Sci., 60, 1069, (1968) より引用)

し、細胞膜になんらかの強度を与え、細胞相互は反発し、ゆ着を防ぎ、組織や器官の構造や形態の維持に働く、その作用は血小板や赤血球などの凝集防止作用に見られる。②レセプター分子の構成成分として働く：細胞膜でのウイルスや物質との結合作用、すなわち受容体作用や物質の血しょう内輸送担体としての作用を有する。③細胞や高分子の正常な機能とその生存期間の調節：血球、血清糖タンパク質などの正常機能や寿命、さらにはがん細胞の増殖作用に関与する。一般に脱シアロ糖タンパク質の寿命は著明に短縮する。④細胞性免疫のマスキング：シアル酸は正常細胞やがん化細胞の免疫学的反応を抑制している。⑤免疫防御系によって認識される特異抗原として働く：ただしシアル酸が遊離の形でなく他の糖に結合した形で存在するときのみに限られる。

また最近、ある種のガングリオシド (GQ<sub>1b</sub>) が神経芽腫細胞に対して分化誘導作用を示すという注目すべき報告もある<sup>2)</sup>。

しかしこれらの生物学的役割は必ずしも十分に解明されているわけではない。

## 2. シアル酸の化学変換

以上に述べたような生理学的重要性から、最近、有機化学的手法を用いて生体内に存在するシアル酸誘導体やその類縁体の合成が盛んに行われている。ガングリオシドはシアロスフィンゴ糖脂質で多彩な生理活性を有していることなどから、特に注目されている分子種である。しかもガングリオシドは生体内においてごく微量しか存在せず、オリゴ糖鎖の構造の多様性に加えてシアル酸およびセラミド分子にも多様性があり、天然から純粋に単一化合物として単離することは困難であることから、単一天然型化合物およびその類縁体の有機合成が行われるようになった。

幸いにも有機合成原料としてのシアル酸は、アマツバメの巣を原料として垂液を抽出し、希硫酸で加水分解する方法、卵のカラザおよび卵黄膜の希硫酸による加水分解、牛乳を原料にした方法によって供給されてきたが、最近、発酵法で得られるコロミン酸の加水分解により大

量に得られるようになった。コロミン酸はシアル酸の2-8位で結合したホモポリマーである。塚田<sup>3)</sup>らはK1抗原型 *Escherichia coli* を用い、炭素源としてソルビトールなどの糖アルコールを利用する発酵法により、1操作で数Kgのコロミン酸を生産できることを見いだした。このものは酵素分解法によりほぼ定量的にシアル酸を生成する。面白いのはフランスに代謝異常の患者が1人いて、その患者の尿から1日5~7gのシアル酸が得られ、販売されている<sup>4)</sup>。

ところで、ガングリオシド合成はシアル酸のグリコシド化反応と換言できるほど、通常のピラノース類とは異なった難しさがある。これはシアル酸のアノマー位が3級炭素であり、さらに電子吸引性のカルボキシル基が結合しているため、脱離反応が起きやすく、グリコシル化の効率が悪いこと、また3-デオキシ糖で、熱力学的に不安定な $\alpha$ 結合を形成しなければならないからである。

シアル酸のグリコシド化反応は、従来ノイラミン酸の水酸基をすべてアセチル基で保護した2 $\beta$ -クロロ誘導体を糖供与体として用いるKoenigs-Knorr反応が有用な手段として用いられてきた。しかし選択性や収率に多くの問題があった。

長谷川<sup>5)</sup>らはグリコシル供与体としてシアル酸の2位を $\alpha$ -SMe基で活性化した誘導体を合成し、糖受容体として6-OH基を選択的にベンゾイル化した2-(trimethylsilyl) ethyl  $\beta$ -D-galactopyranosideを用い、反応促進剤としてDimethyl(methylthio) Sulfonium triflate (DMTST)を選択することにより、目的とするガラクトースの3位OH基へシアル酸を高収率かつ高立体選択的に導入した。図3に示すようにシアル酸供与体のチオグリコシド誘導体は前述の2 $\beta$ -クロロ誘導体にチオ酢酸カリウムを作用させて2- $\alpha$ -チオアセテートとしたのち、選択的にメタノリシスして得られるナトリウム塩にハロゲン化アルキルを作用させチオグリコシドに導びいたものである。この方法を利用してガングリオシドGM<sub>4</sub>を合成している。

小川<sup>6)</sup>らはシアル酸のC-3位に隣接基関与をする置換基 (SPh基, SePh基) を導入したシアル酸供与体を合成し、活性化剤としてAgOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>-SnCl<sub>2</sub>を用いることによって、2,3-デヒドロ体の副成を防止しつつ立体選択的に好収率で目的とする $\alpha$ -配糖体を得た。図4に示すように、SePh基の導入はアセチル保護のデヒドロ体から3工程で保護基をベンジル基に変換したテトラベンジル誘導体をトリメチルシリルトリフラート存在下PhSeCl-AgOCOCH<sub>3</sub>で処理し、得られるアセトキシセレンニドおよびセレンニドの混合物をNaOMeで処理することによって脱アセチルとC-3位のエピメリ化を起こし、 $\alpha$ -セレンニドを得て、さらにDAST (ジエチルアミノサルファトリフルオリド) で処理して供与体のフルオリドを合成し

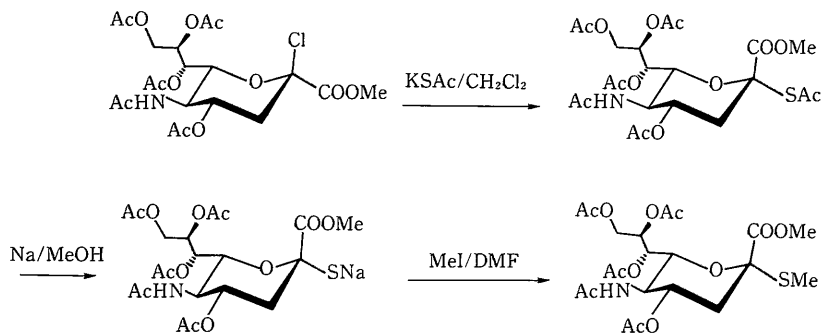


図3 シアル酸チオグリコシドの合成

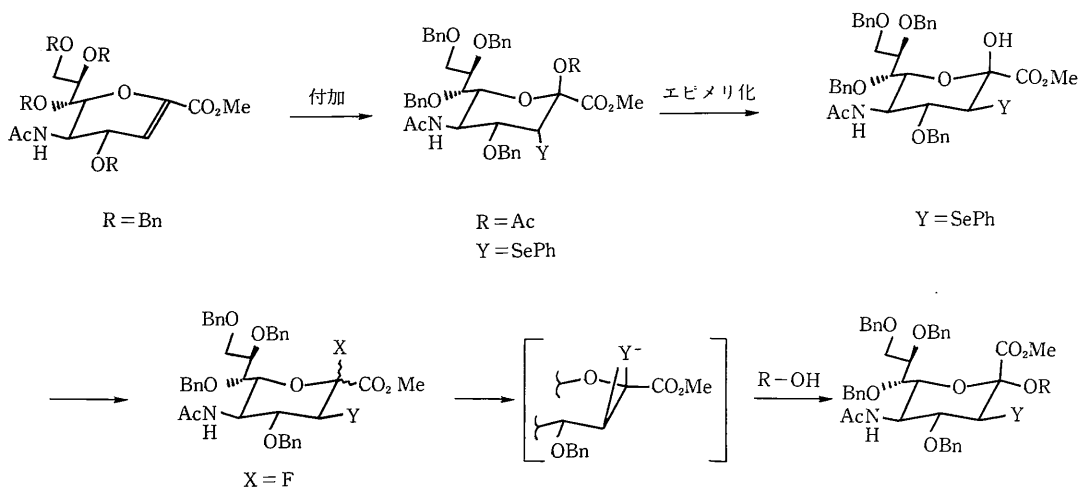


図4 シアル酸セレニドの合成

た。SPh基の導入は前述のテトラベンジル体をNBSで処理して得られるプロモヒドリンをt-BuOKの存在下、チオフェノールで処理し、3位のアキシカル位にSPh基を導入した後、DBUを用いて3位の異性化、さらにハロゲン化によりSPh誘導体を合成した。プロモ体が最も反応性が高い。縮合物のPhS基、PhSe基はスズヒドリド還元により直接除去できる。この方法を応用してメラノース関連抗原のGD<sub>3</sub>を合成した。

後藤<sup>7)</sup>らはデヒドロ体の臭素付加反応、プロモヒドリン反応により3位に水酸基およびハロゲン置換基を導入したシアル酸供与体を合成した。3位の隣接基関与を利用しようとするものであるが、グリコシル化反応を検討した結果、縮合物の $\alpha$ 選択性は必ずしも実用上満足なものではないようである。

一方、天然に存在しないシアル酸誘導体の医学生物学への応用を目指して、小倉<sup>8)</sup>らは常法のKoenigs-Knorr反応を用いてムチン類縁体のNANA $\alpha$  (2-6) GluNAc  $\beta$  (1 $\rightarrow$ ) Ser, および図5に示すような含シアル酸変型ヌクレオシドを合成した。このものはがん転移抑制剤として現在商品化されている。

従来より転移がんの増殖時にはシアル酸転移酵素 (Sialyl-transferase) 活性が高くなるとの報告があり、シアル酸転移酵素阻害剤として作用するものと思われる。

実際、この化合物はcolon adenocarcinoma 26由来の肺転移がんNL-17のシアル酸転移酵素活性を阻害し、細胞表面シアル酸量を減少させる。さらに肺転移結節数を著明に抑制した。

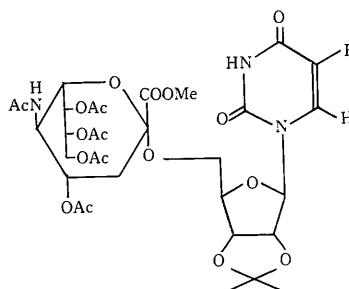


図5 含シアル酸変型ヌクレオシド

## 3. シアリルリン脂質の合成

シアル酸を用いる有機合成の主流はなんとと言ってもガングリオシドの合成である。我々はシアル酸のレセプター分子としての認識作用に着目し、薬物運搬システム(ドラッグデリバリーシステム:DDS)のリポソームへの応用を目指して研究を行ってきた。

前述のように細胞膜表面に存在するシアル酸含有複合糖質は生体内の重要な生理的現象に関与している。

一方、リン脂質は細胞膜の主構成成分である。リン脂質にシアル酸を化学修飾させることにより表層にシアル酸を有するリポソームの調製が可能である。

そこで我々は大豆リン脂質より分別したホスファチジルコリン(PC)をホスホリポーゼD(PLD)を利用してコリンを加水分解的に切断し、このリン酸残基にシアル酸を結合させ、親水基としてシアル酸をもつリン脂質を合成し、リポソーム化することによってDDSに用いる膜物質への応用を検討した。合成スキームを図6に示した。

はじめにシアル酸(N-アセチルノイラミン酸)(1)を

メタノール中、Dowex50(H<sup>+</sup>)存在下、室温で4時間かくはんさせることによりメチルエステル誘導体(2)を得た。つぎに(2)を塩化アセチル中で塩化水素を飽和させ、室温で20時間反応させることによりパーアセチル-2-クロロ誘導体(4)を直接得た。(4)をジクロロメタン中、モレキュラーシープ4A, AgCO<sub>3</sub>存在下1.8-オクタンジオールのモノメチルエステルとグリコシル化させ得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりグリコシル化物(8)を得た。同様な方法によりグリコシル化物(5), (6), (7)も得た。(8)をメタノール中, CH<sub>3</sub>OKの存在下, 0°Cで脱アセチル化させることによって脱アセチル化物(12)を得た。同様に(9), (10), (11)も得た。

つぎに(12)をエーテル, 水の混合溶媒中で酢酸カルシウム, 酵素PLD存在下, 室温で6時間反応させ, 粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し目的とするシアリルリン脂質(16)を得た。同様な方法により(15)も得られるが(13), (14)はほとんど得られない。酵素PLDはリン脂質のリン酸エステル部分を加水分

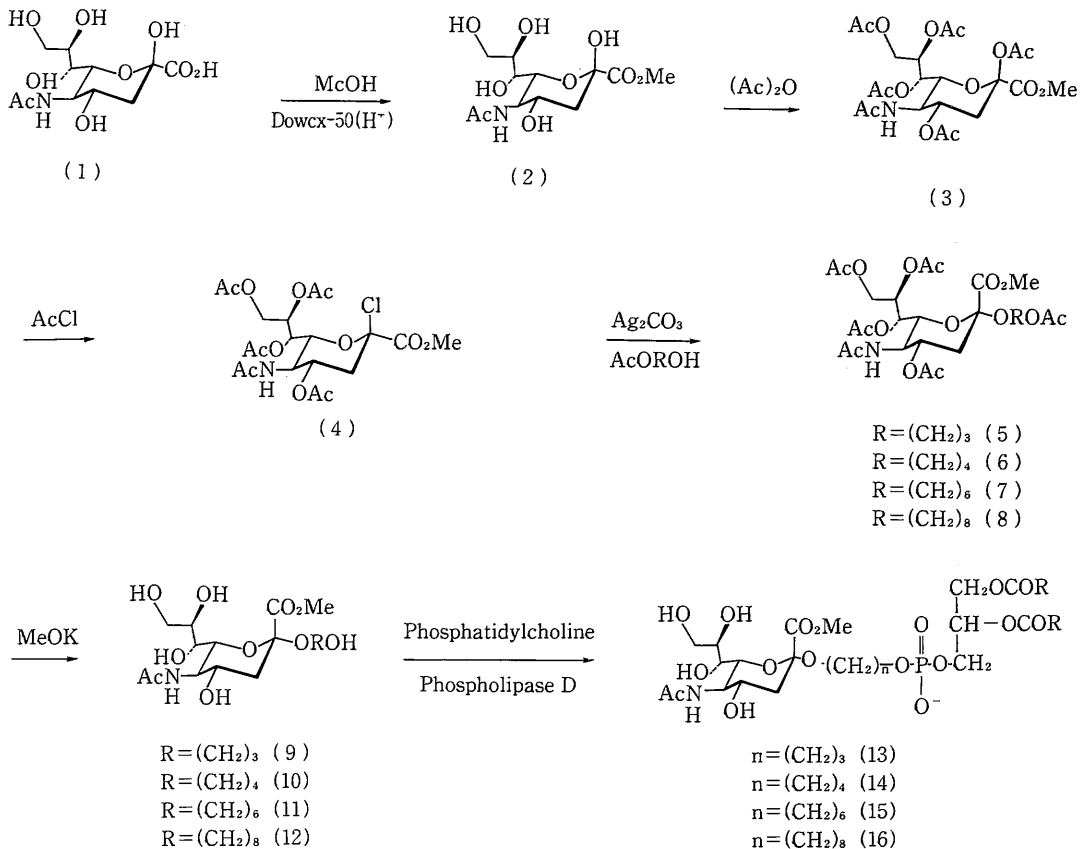


図6 シアリルリン脂質の合成

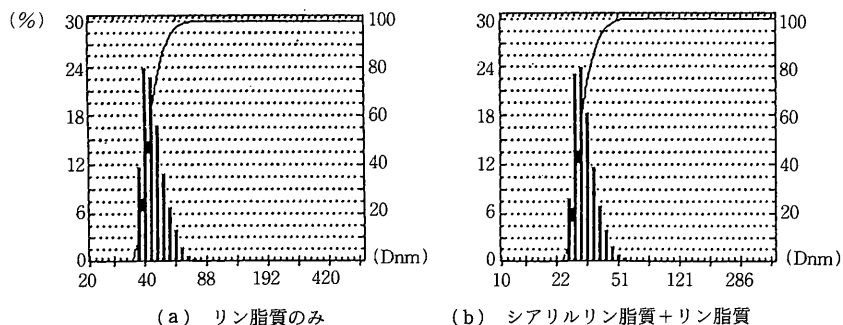


図 7 シアリルリン脂質を含むリポソーム

解的に切断すると同時に、リン酸残基に一級アルコールを特異的に結合させる。シアル酸は分子内に一級アルコールを有すが(2)とPCとの予備実験の結果、シアル酸の側鎖一級アルコールとは反応しないことが分った。(16)のTLCは単一のスポットを示し、Ditmmmer試薬、レゾルシン試薬の両方に呈色反応を示すことにより分子内にリン脂質とシアル酸残基を同時に有することが示唆される。

(16)のリポソーム化を常法によりトリス緩衝液(PH7.2)に懸濁させたあと超音波処理によりリポソームを作成した。光散乱計を用いて粒径を測定した結果を図7に示す。図7の(a)にPCだけのリポソーム、(b)にPCと(16)の2:1の場合のリポソームの粒径を示した。それぞれの平均粒径は53nm, 40nmでシアル酸含有リポソームの方がやや小さい。

リポソームの特性を利用して、薬物のDDS, 特にターゲティングを目的とした研究は数多く行われている<sup>9)</sup>。

赤血球の血中挙動は膜上のシアル酸の量によってコントロールされており、デシアル化された赤血球は血中から速やかに消失する。リポソーム膜にシアル酸を組み込んだ場合、リポソームの肝への取り込みが抑制される。また、赤血球膜から抽出したシアル酸含有タンパク質をリポソームに組み込むと、リポソームの多形核白血球に

よる取り込みが抑制されるという報告もある<sup>10)</sup>。

リポソームの医薬分野への応用にはこのほか、制御放出、毒性低下などの用途にも利用できる。

我々の合成したシアリルリン脂質のリポソームが、ある種の細胞もしくは組織に特異的な親和性を示すことを期待している。  
(1990年8月16日受理)

#### 参 考 文 献

- 1) R. Schauer Ed., "Sialic Acids, Chemistry, Metabolism, and Function", Springer-verlag, Wien (1982).
- 2) 辻崇一, 永井克孝: 蛋白質 核酸 酵素 **35**, 535 (1990).
- 3) 塚田陽二ら: 日本農芸化学会誌, **64**, 855 (1990).
- 4) 小倉治夫: ファインケミカル **1986**, 47.
- 5) A. Hasegawa et al., J. Carbohydr. chem. **5**, 11 (1986).
- 6) Y. Ito, T. Ogawa, Tetrahedron Lett., **28**, 6211 (1987).  
Y. Ito, T. Ogawa, *ibid.*, **29**, 3987 (1988).  
Y. Ito, T. Ogawa, Tetrahedron, **46**, 89 (1990).
- 7) 岡本馨ら: 有機合成化学協会誌, **47**, 349 (1989).
- 8) 小倉治夫ら: 有機合成化学協会誌, **42**, 536 (1984).
- 9) 横山和夫: フレグランス ジャーナル, **87**, 56 (1987).
- 10) S. Utsumi et al., Immunology, **49**, 113 (1983).