

《様式B》

研究テーマ 「ガンやアルツハイマー病治療への応用を目指した糖ヌクレオチドの1段階合成法の開発」

研究責任者 所属機関名 名古屋庫行大学

官職又は役職 准教授

氏 名 宮川淳

メールアドレス miyagawa.atsushi@nitech.ac.jp

(平成30年度募集) 第31回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000字程度)

糖鎖は僅かな構造異常によって様々な病気が引き起こすため、糖鎖を基盤とした医薬品への応用が期待されている。現在までにガンやアルツハイマー病、筋ジストロフィーなどを引き起こすことが明らかになり、その原因である糖転移反応の補助又は阻害は治療に有望である。そこで、本研究ではその糖転移反応の基質として重要な糖ヌクレオチドを化学合成によって簡便に合成可能にすることで糖ヌクレオチドの医薬品への応用やその糖鎖が関わる疾患の解明につながる考えた。

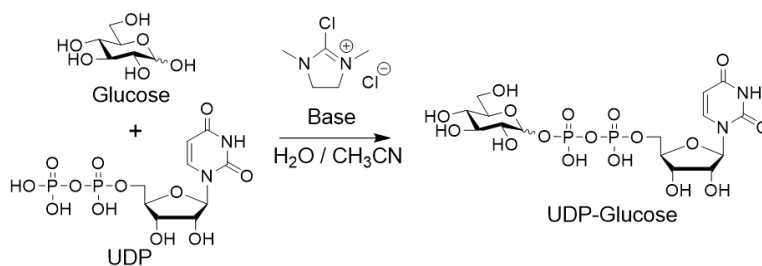
申請者が発見したグルコース(Glc)とウリジン二リン酸(UDP)の1段階反応による糖ヌクレオチド(UDP-Glc)の合成方法は15%程度の収率であったが、1回の反応及び精製で糖ヌクレオチドを構築できる。この反応の効率化を目指して、高速液体クロマトグラフィーによる分析を用いて迅速的な反応検討を行った。最初に反応進行を補助する塩基の検討を行い、有機塩基および無機塩基を用いた結果、トリチルアミンが28%と最も高い収率となった。次に溶媒検討を行い、UDPの難溶解性のため、水を加えて反応を行う必要があり、水とアセトニトリルの混合溶媒を用いることで29%の生成物を得られ、最適であると結論付けた。ここで得られた最適な反応条件を利用して、ガンやアルツハイマー病の際に起こる糖鎖異常に関わるN-アセチルアセチルグルコサミン(GlcNAc)を転移させる酵素の基質であるUDP-GlcNAcの合成を試みた。GlcNAcは連結反応を試みると2位のN-アセチル基が1位と架橋結合して、連結反応の進行を妨げる。そこでN-アセチル基をアジド基に変換して、UDPとの連結後にN-アセチル基に戻す計画とした。グルコサミン塩酸塩を用いてジアゾ転移反応を利用して、1段階でアジド基を導入したアジドグルコース(GlcN₃)を得た。この誘導体を用いて先に最適化した1段階反応によってUDP-GlcN₃を収率18%で合成した。さらにUDP-N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)の類縁体として、UDP-GalN₃の合成にも成功した。本研究で最適化した反応は、糖類縁体にも適用でき、1段階で糖ヌクレオチド類縁体を得る手法として有用であった。また合成された糖ヌクレオチド類縁体は、糖転移酵素を阻害する化合物として利用できる。さらに近年生物学の分野で広く利用されているアジド基とアルキンとのクリック反応を用いて細胞内で官能基化可能なため、細胞内における糖代謝や局在を明らかにすることができる。今後、病気に関わる酵素やタンパク質、糖鎖の機能解明に合成した糖ヌクレオチド及びその類縁体を利用して、治療につながる薬剤の開発を目指していく。

2. 実施内容および成果の説明（A4で、5ページ以内）

糖鎖はその複雑な構造が生体制御に重要であり、僅かな糖鎖の構造異常により様々な病気を引き起こす。ガンやアルツハイマー病、筋ジストロフィーでは糖鎖異常が起こっており、病気を引き起こすことが明らかである。その原因となる糖転移酵素に対する阻害剤や糖転移反応を検出する基質は、治療や原因解明に利用できる。しかし、その糖転移酵素の基質である糖ヌクレオチドは2次代謝物であるため、入手には酵素合成でも多段階反応が必要であり、化学合成でも熟練した技術を必要とする。また糖ヌクレオチドは市販品の種類が僅かであるため、その利用には制限があり、誘導体に関しては販売が行われていない。

そこで申請者が最近開発した Glc と UDP の1段階反応による糖ヌクレオチド（UDP-Glc）の合成方法を効率化するため、本研究では反応条件の最適化を行った。また、この反応を発展させて種々の構造の糖ヌクレオチド誘導体を合成することを目指した。この1段階反応は有機合成化学者だけでなく、幅広い分野で利用しやすい高効率かつ短工程である糖ヌクレオチドの新規合成方法とする。

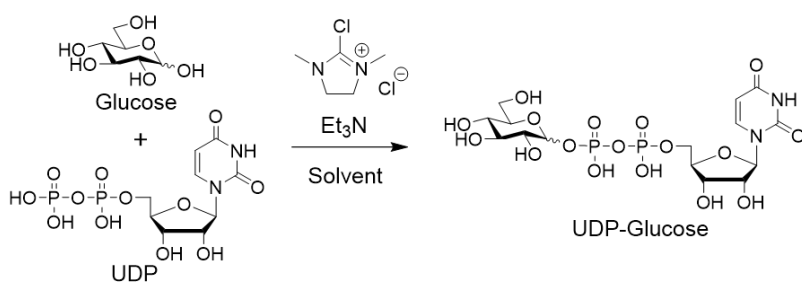
まず初めに、反応を発見した際に用いた塩基であるトリエチルアミン（TEA）だけでなく、様々な塩基による最適化の検討を行った。特にリン酸基と相性の良い無機塩は有効であると考えた。反応の進行及び収率は高速液体クロマトグラフィーを用いて解析を行い、その結果を表1にまとめた。その結果、期待された無機塩基での反応は、すべての塩基において生成物を確認することができなかった（表1， エントリー 8~12）。また有機塩基を用いた反応では、エントリー 4~7 において低収率となった。一方、最初に選択した TEA のような窒素原子に飽和炭化水素が結合した塩基（表1， エントリー 1~3）では 10%以上の収率となり、その中でも TEA が最も収率が高かった（表1， エントリー 1）。これらの結果から、最適な塩基として TEA を用いることに決定した。



| エントリー | 塩基 | 溶媒 | 収率 (%) |
|-------|--------------------------------|---------------------------------------|--------|
| 1 | TEA | | 28 |
| 2 | DIPEA | | 17 |
| 3 | TMA | H ₂ O / CH ₃ CN | 12 |
| 4 | Imidazole | (1 / 1) | 4.5 |
| 5 | DMAP | | 1.3 |
| 6 | DBU | | n.d. |
| 7 | Piperidine | | n.d. |
| 8 | NaHCO ₃ | | n.d. |
| 9 | CsCO ₃ | | n.d. |
| 10 | K ₂ SO ₄ | H ₂ O / CH ₃ CN | n.d. |
| 11 | CaCl ₂ | (2 / 1) | n.d. |
| 12 | CH ₃ COONa | | n.d. |

表1. 塩基の検討

次に反応溶媒の検討を行った。UDP の難溶解性から良溶媒の水の使用が必要であり、水とよく混和して反応に影響のない溶媒としてアセトニトリルを選択して、その比率による影響を検討した。また UDP を溶解できる有機溶媒として *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 及び *N,N*-ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて検討を行った。水を含まない有機溶媒を用いることで、活性化剤の失活や糖の活性中間体の加水分解を避けられるため、有効であると考えた。反応の進行及び収率は、高速液体クロマトグラフィーを用いて解析を行い、それらの結果を表 2 にまとめた。有機溶媒を用いた反応 (表 2, エントリー 4, 5) では、ほとんど生成物を確認できなかった。一方、水のみを用いた反応 (表 2, エントリー 1) では、水による加水分解を受けるが、23%パーセントの収率となった。この結果から UDP を溶解しやすい水が反応には必要であることが分かった。次に水とアセトニトリルの混合溶媒の検討を行った。この溶媒は水を含んでいるため、UDP を溶解しやすく、反応が進行を確認することができた。水：アセトニトリルが 2：1 の比率の混合溶媒を用いた反応において収率が 29%となり、これを最適な溶媒と決定した (表 2, エントリー 3)。



| エントリー | 溶媒 | 温度 | 収率(%) |
|-------|---|--------|-------|
| 1 | H ₂ O | on ice | 23 |
| 2 | H ₂ O / CH ₃ CN (6 / 1) | on ice | 24 |
| 3 | H ₂ O / CH ₃ CN (2 / 1) | on ice | 29 |
| 4 | DMF | on ice | 0.4 |
| 5 | DMSO | r.t. | n.d. |

表 2. 反応検討

以上の検討から、Glc と UDP の 1 段階反応による UDP-Glc の合成において、塩基として TEA、溶媒として水：アセトニトリル (2：1) が最適であると決定した。その反応条件を用い、スケールアップして反応を行って、反応後にシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行った。その結果、UDP-Glc を収率 30%で得ることができた。得られた UDP-Glc を核磁気共鳴装置によって構造解析を行った結果、アノマー位の立体化学が α : β = 1 : 17 の比であることが明らかになった。僅かに立体異性体が混ざっているため、今後、さらなる立体制御や分離方法の検討が必要である。 α 体は天然物と同じ構造であるため、糖転移酵素の基質に、 β 体はこれまで合成及び単離の報告がされておらず、その類似した構造が新規阻害剤として機能することが期待できる。

次に、病気の原因となる糖鎖異常を作り出す糖転移酵素の基質となる UDP-GlcNAc と UDP-GalNAc の合成を検討した。まず初めに *N*-アセチル基がある場合、糖の 1 位を活性化すると隣の 2 位の *N*-アセチル基によってオキサゾリンという環状構造を形成してしまうため、糖との連結反応が進行しない。そこで 2 位をアジド基に変換し、糖ヌクレオチド構造を構築した後に、*N*-アセチル基に変換する方法を計画した。近年、化学反応であるクリック反応を細胞内で行い、

アジド基とアルキンを連結して細胞内の糖鎖の代謝標識などが行われ、生命現象の解明が飛躍的に進んでいる。この応用も含めた基質となる前駆体を得ることができるため、まずグルコサミンの 2 位の amino 基をアジド基へ変換するジアゾ転移反応を行い、65%の収率で GlcN_3 を得た。同様にガラクトサミンに対しても行い、定量的に変換することで GalN_3 を得た (図 1)。

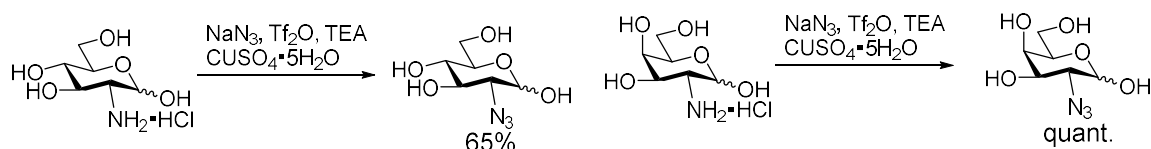


図 1. アジド基への変換反応

これらのアジド誘導体を用いて、先ほど最適化した糖ヌクレオチドの 1 段階合成反応を行った (図 2)。その結果、 Glc を用いたときと同様に反応が進行してシリカゲルクロマトグラフィーによる 1 回の精製によって、目的となる糖ヌクレオチドを得ることに成功した。 GlcN_3 及び GalN_3 の反応によって、 UDP-GlcN_3 及び UDP-GalN_3 を収率 18%、9%でそれぞれ得た。 Glc の場合、2 位に水酸基があることで反応中間体として 1,2-エポキシドが生成して反応が進行することが確認されているが、2 位がアジド基の場合はその経路を経ることができない。それにも関わらず、同様に目的物が得られたことは異なる反応経路で進行していることが推測される。また糖誘導体としてアジド基をもつ糖にも適用可能であることが明らかとなり、阻害剤や代謝標識などを利用した生物学的解析に必要な糖ヌクレオチドを短工程かつ簡便に得られ、幅広い研究者に利用できる手法である。さらに糖鎖形成異常による疾患に対する原因の解明やその薬剤の開発に応用できる画期的な手法となる。現在はアジド基の還元を簡便かつ穏和に行える条件の検討を行っており、それが達成されれば、天然型の UDP-N -アセチル糖の合成につながる。

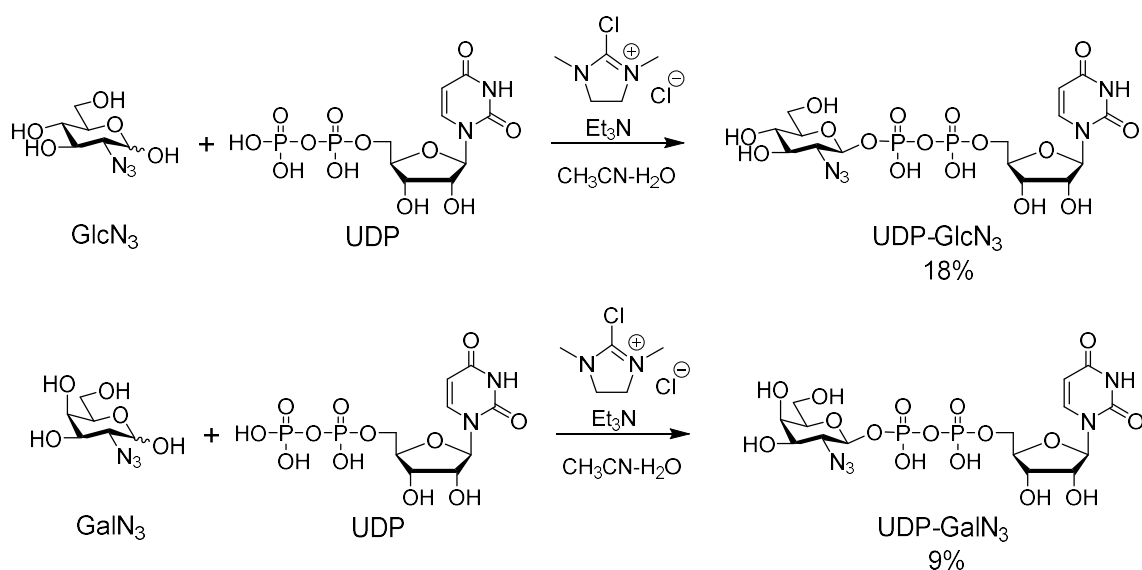


図 2. 糖ヌクレオチドの合成

以上の結果から、天然型の糖だけでなく、糖類縁体にも応用可能であることが示された。今後も様々な類縁体との反応を検討していき、簡便に糖ヌクレオチド類縁体の合成を展開していく。またさらに反応条件や分離方法の検討を行い、新規合成方法として特許の取得を目指す。そして、糖転移酵素の阻害剤となる糖類縁体による糖ヌクレオチドを簡便に得られたことで、

疾患に関連する糖転移酵素の阻害実験を検討する。その後、細胞のガン化・転移やアルツハイマー病の治療や、筋ジストロフィーなどの糖鎖異常に伴う疾患に関わるタンパク質への影響を解析して、簡便に合成可能となった糖ヌクレオチドの治療への応用を目指す。本研究の成果として、本技術を糖鎖が関わる病気の解明や医薬品を開発し、次世代産業となる糖鎖医薬開発の基盤的技術を開発していく。