

リサイクル型 SEC によるチオシアロシド糖鎖の精製

Purification of thiosialosides by a recycle-type SEC

大学院理工学研究科物質科学部門 松岡 浩司

Division of Material Science

Koji MATSUOKA

Abstract

An efficient separation between fully acetylated thiosialoside methyl esters and fully acetylated Neu5Ac2en methyl esters was accomplished by means of the SEC method. Purity and structural elucidation of the isolated compounds were performed by a combination of elemental analyses and spectroscopic analyses, including IR, ^1H , and ^{13}C NMR, and mass spectroscopic analyses.

はじめに

生体内において普遍的に存在している複合糖質は、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンと呼ばれる物質の総称であり、それら複合糖質中の糖鎖は、ペプチド、核酸に次ぐ第三の生命鎖とも呼ばれ様々な生命現象に深く関与している。しかしながら、遺伝子の支配を受けず、また糖に起因する化学的特徴により複雑な構造を提示しているため、糖鎖構造と機能についての完全な解明には至っていない。しかしながら、生命現象に関連した情報の担い手として重要な情報を担っていることは間違いなさそうである。このような生理活性を持つ糖鎖に対する種々のタンパク質とのアフィニティーは、単独では通常 mM (10^{-3} M) のオーダーであり、それほど高いとはいえない。1970年代における Lee らの先駆的な研究により、糖鎖の価数を増やすことにより著しい活性の向上が見られる現象(糖鎖クラスター効果)が見出された¹⁾。最近の研究において、細胞表層上では、糖タンパク質や糖脂質が、自己組織化によるパッチ²⁾あるいはラフト³⁾と呼ばれるマイクロドメインを形成することにより糖鎖のクラスター化が起こり、その結果として外来物質に対するアフィニティーの向上が発現していると考えられている。糖鎖デンドリマーは、このような機能性糖鎖を人工的に規則正しく共有結合により集積化させた分子であり、多価となった糖鎖の機能を効果的に発現し、著しい活性の向上ができることと期待される⁴⁾。しかしながら、糖鎖自身の精製およびデンドリマーの精製においては、多くの問題が存在し、特にシアル酸の誘導体の単離・精製は極めて重要な課題であった。とりわけ、シアル酸のチオグリコシドの精製において、副生成物としてのグリカールの除去に困難が伴っていた⁵⁾。ここではその問題を分子量により分別できるサイズ排除クロマトグラフィー(Size-exclusion chromatography; SEC)を利用したので紹介したい⁶⁾。

結果と考察

シアル酸由来の2,3-グリカール **3** の副生が、既知のクロリド **1** とチオ酢酸カリウム(KSAc)との単純な $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応により目的とするチオアセテート **2** の生成ととともに起こる。(図 1)これは、 $\text{S}_{\text{N}}2$ と同時に起こる脱離反応により HCl が抜けて生じる副生成物である。この副生成物の除去は、通常クロマトグラフィー、結晶化などを試みたが、失敗に終わった。すなわち、化合物 **2** と **3** の TLC における R_f 値は、種々の展開溶媒を試したが同じであり、シリカゲルクロマトグラフィーによる精製も不可能であった。シアル酸由来のチオグリコシドの精製は、von Itzstein らによる報告例があるように、保護体においては極めて困難であるため、彼らは混合物を脱保護した後、HPLC により精製している⁵⁾。我々は、保護基を含む合成中間体において精製できないかと考え、SEC の利用⁷⁾を検討した。

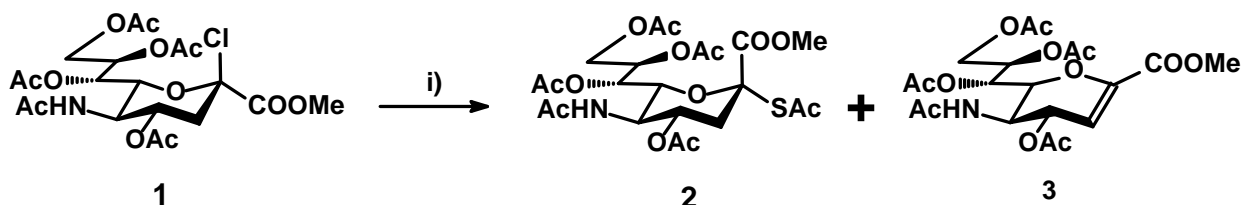


図 1. Reagents and conditions: i) KSAc (5 molar excess), dichloromethane, 0 °C → rt, 2 d.

一例として、図 2 にシアル酸チオグリコシド由来のオリゴ糖合成を示す。ハロゲン糖 **4** とチオアセテート **2** との縮合は、ジメチルアミン処理による **2** のチオラートとブロミドによるスルフィド形成反応により達成された。しかしながら、シリカゲルクロマトグラフィーによる精製においては、純粋な目的物の単離には至らず、グリカール **3** との混合物であった。**3** と **5** との混合物の ^1H NMR スペクトルを図 3A に示す。両化合物に起因する特徴的なシグナルが検出されている。シリカゲルクロマトグラフィーは固相と化合物の物理的吸着の度合による分離モードであるが、SEC は物理的吸着を伴わない分子量による分離モードである。そこで、異なる分子量の **3** と **5** の混合物に対する分離手法に SEC の適用を試みた。ここでは、カラムの理論段数を見掛け上格段に上げることができるリサイクル型 SEC 装置に着目し、その混合物の分離を実行した。

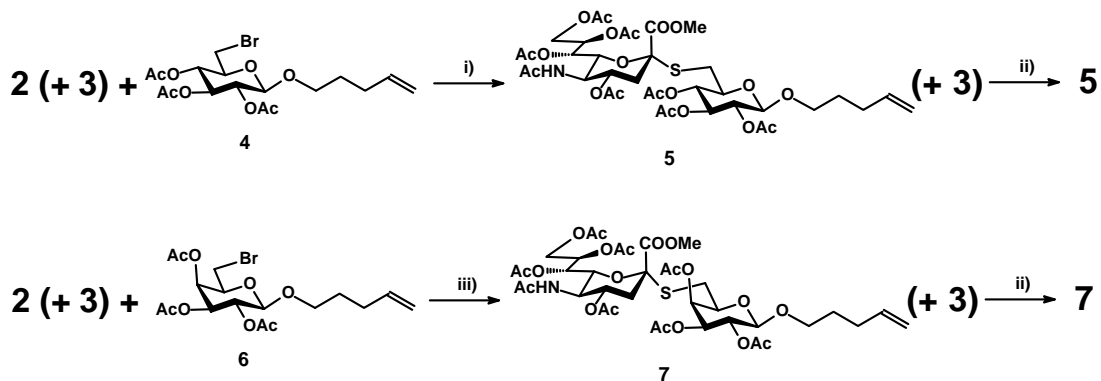


図 2. Reagents and conditions: i) Diethylamine (10 molar excess vs Br), DMF, 0 °C → rt, overnight; ii) purified by SEC; iii) K_2CO_3 , MeOH—DMF, 0 °C → rt, 2 d, then Ac_2O —Pyr, rt, overnight.

リサイクル型 SEC による **3** と **5** との混合物の分離プロファイルを図 4 に示す。**3** と **5** との混合物は、当初、単一ピーク(I)であり、全く異なる不純物(impurity)は最初のサイクルの段階で除去した。その後、単一ピーク I は徐々に分裂し、4 サイクル目には、ピーク II とピーク III の完全な分離とともにそれぞれの単離に成功した。グリカール **3** を含むチオアセテート **2** (図 3B), および単離したチオグリコシド **5** (図 3D) と **3** (図 3C) の ^1H NMR スペクトルは、それぞれの構造に特有のシグナルと純度情報を与えた。

この方法論の有効性を検証するために異なるシアロシドの単離を実施した。ハロゲン糖 **6** とチオアセテート **2** との縮合は、炭酸カリウム存在下、効率よく進行した。再アセチル化後、シリカゲルクロマトグラフィーによる精製を施すことにより、グリカール **3** との混合物として単離した。同様にして、この混合物をリサイクル型 SEC 装置により分離し、チオグリコシド **7** を純粋な化合物として単離することに成功した。これらの化合物は何れも質量分析、元素分析等の物性評価により構造確認された。

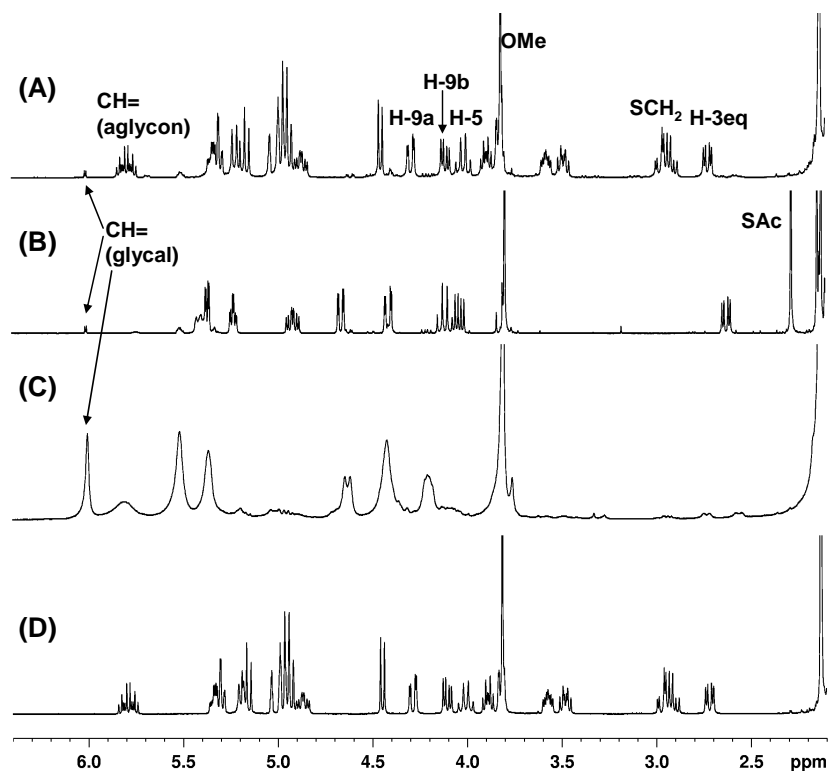


Figure 3. ^1H NMR spectra of (A) mixture of disaccharide **5** and glycal **3**, (B) thioacetate **2**, (C) glycal **3**, and (D) pure disaccharide **5**.

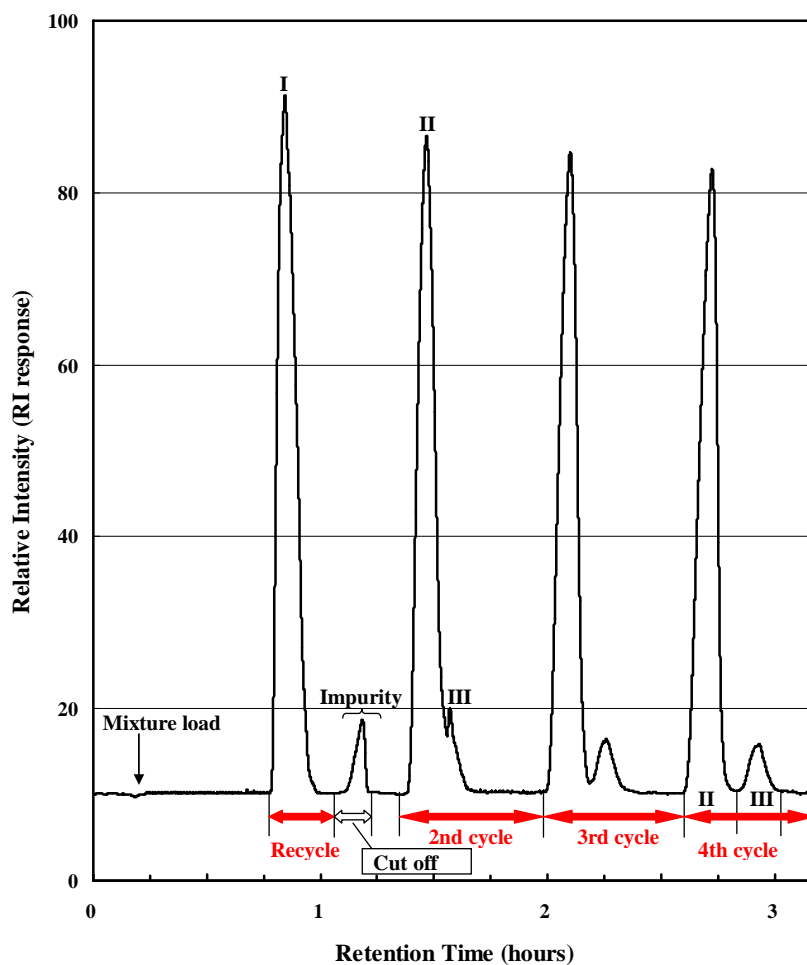


Figure 4. SEC profile of the separation of disaccharide **5** and glycal **3**. The inseparable mixture was injected into SEC columns at mixture load.

まとめ

ここではシアル酸由来のチオグリコシドの効率的な分離を目指し、リサイクル型 SEC 装置による分離方法が効果的であることを示した。得られた化合物の構造の同定および純度は、¹H NMR スペクトルにより分析した。さらに、それぞれの化合物の元素分析、質量分析測定を行うことにより、確かに目的とした化合物であることを確認した。

謝辞

本研究において紹介した分離技術は、小山哲夫博士、坂本純一博士、多喜田智春修士の協力により確立された。この場を借りて厚く御礼申し上げます。また、本研究において使用した NMR 装置、元素分析装置、質量分析装置は、本学科学分析支援センターに設置されている機器を利用させて頂いた。関連する教職員の方々に御礼申し上げます。

文献

- 1) Y. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lönngren, J. Arnarp, M. Haraldsson, and H. Lönn, *J. Biol. Chem.*, **258**, 199 (1983).
- 2) 箱守仙一郎, *別冊日経サイエンス*, **111**, 20 (1994).
- 3) 例えば, 山路顕子, *化学と生物*, **39**, 301 (2001).
- 4) a) K. Nishikawa, K. Matsuoka, E. Kita, N. Okabe, M. Mizuguchi, K. Hino, S. Miyazawa, C. Yamasaki, J. Aoki, S. Takashima, Y. Yamakawa, M. Nishijima, D. Terunuma, H. Kuzuhara, and Y. Natori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7669 (2000); b) H. Oka, T. Onaga, T. Koyama, C.-T. Guo, Y. Suzuki, Y. Esumi, K. Hatano, D. Terunuma, and K. Matsuoka, *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 5465 (2009).
- 5) D.R. Groves, S.J. Bradley, F.J. Rose, M. Kiefel, and M. von Itzstein, *Glycoconjugate J.*, **16**, 13 (1999).
- 6) J.-I. Sakamoto, C. Takita, T. Koyama, K. Hatano, D. Terunuma, and K. Matsuoka, *Carbohydr. Res.* **343**, 2735 (2008).
- 7) T. Kimura, F. Xue, T. Kobayashi, T. Onoda, and H. Yamamoto, *Polymer J.*, **36**, 205 (2004).