



Title	新規分岐シクロデキストリン類の化学合成とそれらの分子認識に関する研究
Author(s)	生田, 亜希子
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44601">https://hdl.handle.net/11094/44601</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	生田 亜希子
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第18880号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	新規分岐シクロデキストリン類の化学合成とそれらの分子認識に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 真弓 忠範 (副査) 教授 前田 正知 教授 今西 武 教授 小林 資正

## 論文内容の要旨

シクロデキストリン(CD)は、微生物が生産する cyclodextrin glucanotransferase (CGTase、EC2.4.1.19) を澱粉に作用させることにより得られ、D-グルコピラノースが $\alpha$ -(1→4)結合により環状に連なったオリゴ糖である。構成糖のグルコース分子が6、7および8個のCDは、それぞれ $\alpha$ CD、 $\beta$ CDおよび $\gamma$ CDと命名されている。CDは、環の狭い方の口に一级水酸基、広い方の口に二级水酸基を有し、環の外側は水溶性で、環の内側は疎水性であるため、水溶液中では種々の疎水性分子と包接化合物を形成する。CDはきわめて安全性が高く、包接能を有するため、医薬、農薬、食品、化粧品、香料などの分野で広く利用されている。近年、CDの溶解性を改善する目的で、CDにグルコースやマルトース分子を側鎖として結合させたホモ分岐CDが合成されている。

一方、薬物投与の精密化、最適化をはかろうとするドラッグデリバリーシステム(DDS)が重要視され、その手法の一つであるターゲッティング DDS の薬物キャリヤーとして、糖質の有効性が検討されている。そこで、生体内の特定の細胞が非還元末端にガラクトースやマンノース残基を持つ糖鎖を認識することに注目して、分岐CDをターゲッティング DDS の薬物キャリヤーとして利用することにした。特に、分子認識能を高めるため、2分岐体に着目した。2分岐体は、 $\alpha$ CDおよび $\beta$ CDでは3種類( $6^1,6^2$ -、 $6^1,6^3$ -、 $6^1,6^4$ -)、 $\gamma$ CDでは4種類( $6^1,6^2$ -、 $6^1,6^3$ -、 $6^1,6^4$ -、 $6^1,6^5$ -)の位置異性体が存在する。これらのCDのうち、 $\gamma$ CDを優先的に生産する $\gamma$ -CGTaseが見つけられたのは比較的新しいため、 $\gamma$ CDに関する研究はたちおくれている。また、 $\gamma$ CDは空洞径が大きいため、 $\alpha$ CDや $\beta$ CDでは包接できない分子を包接できる可能性が高いという理由から、 $\gamma$ CDを研究対象の中心とした。

そこで本研究では、まず、糖修飾2分岐CDを効率良く化学合成するため、置換位置の明確な6位保護基を有する2置換 $\gamma$ CD誘導体の合成およびトリクロロアセトイミダート法を用いたグリコシリ化反応の条件について検討した。有効な2置換誘導体を得るために、4-monomethoxytrityl (MMTr) 基および4,4'-dimethoxytrityl (DMTr) 基を $\gamma$ CDに導入した誘導体の合成を行った。DMTr-2置換 $\gamma$ CD誘導体のHPLCにおける分離パターンはこれまでのどの誘導体よりも分取するためには最適で、さらに4つの位置異性体が全て高収率で調製でき、2分岐CDを化学合成するための誘導体は、 $6^1,6^n$ -di-O-DMTr- $\gamma$ CDs ( $n=2-5$ )が効率的であることを見い出した。また、トリクロロアセトイミダート法を用いたグリコシリ化反応における糖供与体の保護基(benzyl基またはacetyl基)と触媒( $CF_3SO_3H$ または $CF_3SO_3Si(CH_3)_3$ )の組み合わせについて検討した結果、立体配置の制御を達成できる条件を見い出した。

次に、特定の細胞に認識されるガラクトースやマンノース、または、それらが末端に結合したオリゴ糖を化学修飾

した CD (ヘテロ分岐 CD) の合成を行った。CD 環に結合する側鎖糖鎖の長さが分岐 CD の分子認識能に与える影響を検討するため、側鎖糖としてガラクトース、二糖であるラクトース、三糖である 4-O- $\beta$ -D-galactosyl-lactose が結合した 2 分岐  $\beta$  CD を合成した。4-O- $\beta$ -D-Galactosyl-lactose はラクトースに *Bacillus circulans* 由来の  $\beta$ -D-galactosidase を作用させることにより得た。また、CD 環に結合する側鎖糖鎖の置換位置の影響を検討するため、ガラクトースを非還元末端に持つ三糖を側鎖とした 4 種の 2 分岐  $\gamma$  CD、6<sup>1</sup>,6<sup>n</sup>-di-O-(4-O- $\beta$ -D-galactosyl- $\beta$ -maltoyl)- $\gamma$  CDs (n=2-5) を合成した。分岐糖鎖として細胞表面構成糖であるマンノオリゴ糖を有する 2 分岐  $\gamma$  CD を合成した。マンノオリゴ糖はパン酵母マンナンのアセトリシスにより得た。合成した分岐 CD は HPLC により分離精製し、それらの構造は MS および NMR 測定により確認した。以上、トリクロロアセトイミダート法により、末端にガラクトースやマンノース残基を有する、単糖またはオリゴ糖が結合した分岐 CD の化学合成を行い、15 個の 2 分岐 CD と 11 個の 1 分岐 CD を得た。

さらに、表面プラズモン共鳴法を用いて、合成した分岐 CD の分子認識能を評価するために、特定の糖鎖を認識し結合するレクチンとの相互作用を検討した。バイオセンサーキュベット表面のレクチンは細胞膜表面に顕在するレセプターのモデルとみなすことができるので、キュベットにレクチンを単一層に固定化し、分岐 CD の濃度を変化させて親和性の強度の指標となる会合平衡定数 ( $K_A$ ) を求めた。CD 環に結合する側鎖糖鎖の長さが分岐 CD の分子認識能に与える影響を検討するため、ガラクトース、ラクトース、4-O- $\beta$ -D-galactosyl-lactose が結合した分岐  $\beta$  CD を用いて、ガラクトース結合レクチンである peanut agglutinin (PNA, *Arachis hypogaea*) との相互作用を解析した。 $K_A$  を比較すると、レクチンとの親和性は CD 環に結合する側鎖糖鎖の長い分岐 CD ほど高い親和性を示した。また、CD 環に結合する側鎖糖鎖の置換位置についての検討を行うため、4 種の 2 分岐体、6<sup>1</sup>,6<sup>n</sup>-di-O-(4-O- $\beta$ -D-galactosyl- $\beta$ -maltoyl)- $\gamma$  CDs (n=2-5) について、PNA との  $K_A$  を求めた。 $K_A$  より、6<sup>1</sup>,6<sup>4</sup>-体が最も高く、次に 6<sup>1</sup>,6<sup>3</sup>-体が高い親和性を示した。非還元末端にマンノースを持つ二糖から四糖までのマンノオリゴ糖が結合した分岐  $\gamma$  CD とマンノース結合レクチンである concanavalin A (ConA, *Canavalia ensiformis*) との相互作用を解析した結果、四糖より三糖の方が親和性が高く、同じ三糖同士では末端の結合が異なると親和性に違いが生じ、結合様式がその分岐 CD の分子認識能に重要であることが判明した。

以上、本研究ではターゲッティング DDS の薬物キャリアとして、合成して得られた全ての 2 分岐 CD の利用が可能であるが、分岐糖鎖の長さは三糖、分岐糖鎖の置換位置は 6<sup>1</sup>,6<sup>4</sup>-体または 6<sup>1</sup>,6<sup>3</sup>-体が有効であることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

シクロデキストリン (CD) は、D-グルコピラノースが  $\alpha$ -(1→4)結合により環状に連なったオリゴ糖である。構成糖のグルコース分子が 6、7 および 8 個の CD は、それぞれ  $\alpha$  CD、 $\beta$  CD および  $\gamma$  CD と命名されている。CD は環の狭い方の口に一級水酸基、広い方の口に二級水酸基を有し、環の外側は水溶性で、内側は疎水性であるため、水溶液中では種々の疎水性分子と包接化合物を形成する。CD は極めて安全性が高く、包接能を有するため、医薬品、農薬、食品、化粧品、香料などの分野で広く利用されている。一方、薬物投与の精密化、最適化を図ろうとするドラッグデリバリーシステム (DDS) が重要視され、ターゲッティング分子として糖質の有効性が注目されている。そこで著者は、生体内の特定細胞が非還元末端にガラクトースやマンノース残基を持つ糖鎖を認識する事に着目して、分岐 CD をターゲッティング DDS の薬物キャリアとして利用するための検討を開始した。 $\gamma$  CD の研究が立ち後れている事、また  $\gamma$  CD は空洞経が大きいため  $\alpha$  CD や  $\beta$  CD では包接出来ない薬物分子でも包接出来る可能性が高いという理由から  $\gamma$  CD を研究対象とした。その結果、以下の成果が得られた。

- 1) 2 分岐 CD を効率よく合成するための 6 位保護基の検討を行った結果、4,4'-dimethoxytrityl- $\gamma$  CD 誘導体が効率的である事を見いだした。
- 2) トリクロロアセトイミダート法を用いたグリコシル化反応の条件を検討し、立体配置の制御を達成出来る条件を見いだした。

- 3) 末端にガラクトースやマンノース残基を有する单糖またはオリゴ糖が結合した分岐 CD の化学合成を行い、15 個の 2 分岐 CD と 11 個の 1 分岐 CD を得た。
- 4) 分岐 CD の分子認識能を評価するために、レクチンとの相互作用を表面プラズモン共鳴法を用いて検討し、分岐糖の種類、分岐糖鎖の長さおよび分岐糖鎖の置換位置が、レクチンとの相互作用に重要である事を明らかにした。以上、ターゲティング DDS の薬物キャリアーとして、合成して得られた全ての 2 分岐 CD の利用が可能であるが、分岐糖鎖の長さは三糖、分岐糖鎖の置換位置は 6<sup>1</sup>、6<sup>3</sup>-体が有効である事を明らかにした点、今後の DDS 研究に極めて重要な指針を提供しており、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと考える。