

エンド開裂反応による異性化を利用したヘパリン合成研究

Synthesis of Heparin by Anomerization Reaction via Endocyclic Cleavage Reaction

(日本糖質学会推薦)

代表研究者 理化学研究所 眞鍋 史乃 RIKEN Shino MANABE

Heparin, which is a sulfated polysaccharide comprising 1,4-glucosamine-glucuronic acid/iduronic acid, is an anticoagulant drug and affects various biological events. Because of the wide range of its molecular weight as well as sulfation number and position, heparin is the most diversified polysaccharide. Homogeneous heparin is important from the viewpoint of clinical and basic research. In the chemical synthesis of homogeneous heparin, the most challenging step is the preparation of 1,2-*cis* aminoglycoside. Pyranosides containing the *N*-acetyl 2,3-*trans* carbamate group are anomerized from the β - to the α -form via endocyclic cleavage. By exploiting the anomerization, we synthesized heparosan, the biosynthetic precursor of heparin. The *N*-substituent of the carbamate had a significant effect on the anomerization reaction; in particular, the *N*-acetyl group facilitated rapid and complete α -anomerization. Two 1,2-*trans* aminosugar linkages in the tetrasaccharide were anomerized to the 1,2-*cis* form. By using the anomerization methodology, aminoglycosides containing multiple 1,2-*cis* glycosidic bonds were formed from 1,2-*trans* glycosides in a one-step process. Moreover, a operationally simple glycosyl fluoride activation method using $\text{Hf}(\text{OTf})_4$, and a novel protecting group, namely sulfonyl carbamate were developed. Compared with conventional acyl protecting groups, the novel protecting group was stable under harsh alkaline conditions; however, it could be removed under mild basic conditions.

研究目的

ヘパリンは、グルクロン酸/イズロン酸4位にグルコサミンが 1,2-*cis* 結合した繰り返し2糖骨格に硫酸化修飾を受けた糖鎖であるが、分子量、硫酸化の数と位置の違いに起因する最も多様性を持つ糖鎖群である (Figure 1)。医薬品としては、抗血液凝固薬としてブタ小腸から単離された混合物が使用されているが、品質が均一でないことからの副作用の問題から、より厳密な品質管理を目的として、分画ヘパリンや超低分子量ヘパリンへの移行がなされつつある。特に、近年、過硫酸化コンドロイチン硫酸が人為的に混入されたことが原因とされる死者が出たことから、厳密な品質保証が可能である化学合成品への移行が望まれており、ハラル対応の面からも合成品の市場拡大が期待される。ヘパリンは、抗血液凝固作用の他にも炎症反応など様々な生命現象に関

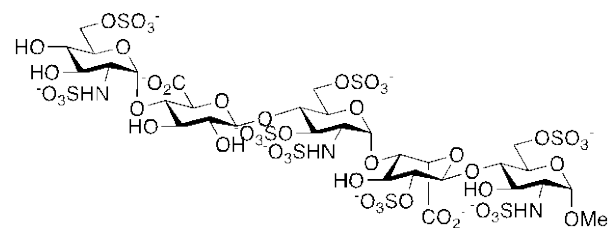
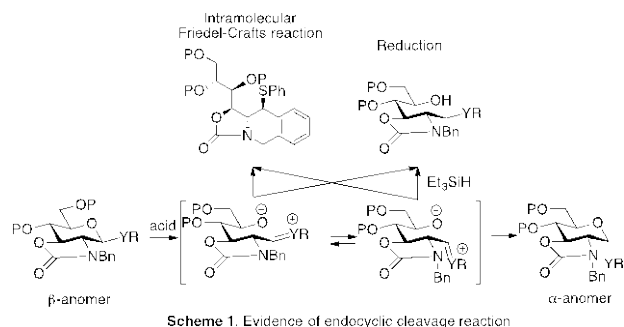


Figure 1. An example of heparin (Fondaparinux)

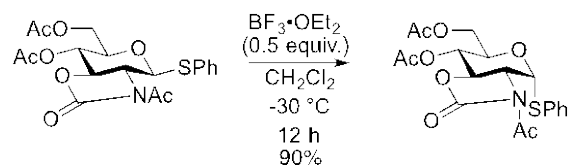
与しており、糖鎖生物学研究のためにも純粋な化合物が渴望されている。ヘパリンの化学合成は、欧米において糖化学の一大潮流となっているが、合成上最も困難なポイントは、1,2-*cis* 結合のアミノ糖の構築である。1,2-*cis* アミノグリコシドの形成は、1970年代に開発された2位にアジド基を持つ糖供与体が現在においても第一選択肢として用いられている。しかしながら、2-アジド糖は、安全面、操作面において調製に問題点があることに加え、グリコシル化

反応における選択性も高くない。この問題点を解決するために、我々は、2位アミノ基と3位水酸基をカーバメート基で保護した糖供与体がグリコシル化反応において、高い1,2-*cis* 選択性を示すこと、さらに弱いルイス酸存在下、2,3-*trans* カーバメート基を持つピラノシドの1,2-*trans* 結合が容易に1,2-*cis* 結合に異性化することを見出していた。また、この異性化反応が、アノマー炭素と環内酸素の間の結合が切断されて鎖状カチオンを経て再環化する *endocyclic cleavage* 反応を経ることを還元、分子内 Friedel-Crafts 反応により中間体鎖状カチオンを捕捉することにより明らかにしている (Scheme 1)。本課題においては、より効率がよい異性化反応条件を見出し、ヘパリン合成へと展開することを目的とした。



研究経過

まず、2,3-*trans* カーバメート基を持つピラノシドの異性化反応の最適化を行うために、カーバメート基窒素上置換基の異性化反応への影響を検討した。系統的に置換基を変化させたところ、置換基がアルキル基の場合には、中程度の異性化反応が観測されるが、カーバメート基やアセチル基などに置換すると、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 存在下、完全な異性化反応がおこることが明らかになった (Scheme 2)。特に、アセチル基の場合に効率的に異性化し、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ の当量を 0.1 当量まで減らせることや、1 分以内に異性化反応が完結していることが、明らかになった。溶媒効果も顕著であり、エーテル中では異性化がほとんどおこらないが、ジクロロメタン、特にアセトニトリル中では、幅広い基質において異性化反応がおこることを明らかにした。

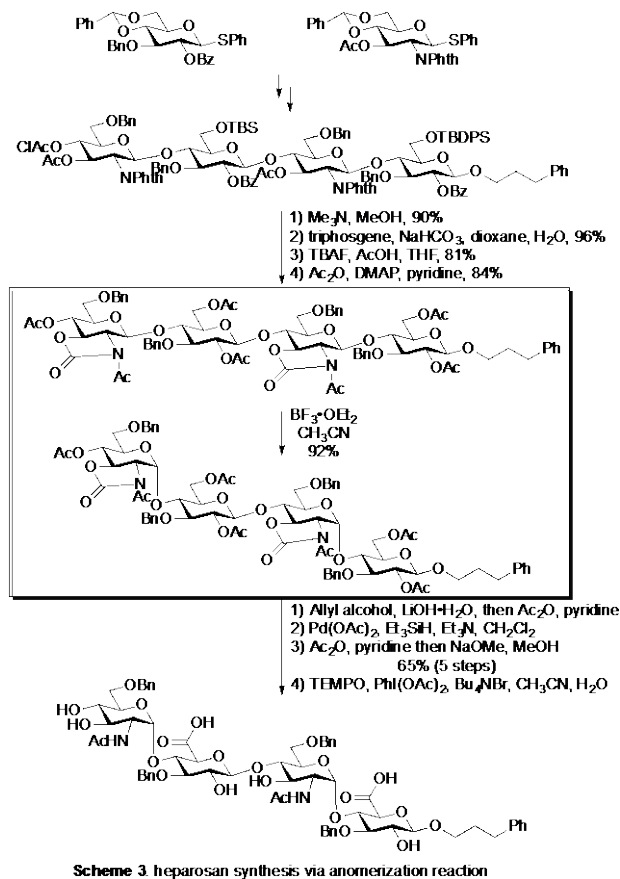


Scheme 2. Anomerization reaction of pyranoside with *N*-Acetyl 2,3-*trans* carbamate

続いて、異性化反応を1,2-*cis* アミノグリコシドの構築に適用してヘパリンを合成することとした。完全化学合成によるヘパリン合成は、硫酸基の位置を制御するために、選択的除去可能である多くの保護基の使用が必要となる。一方で、ヘパリン生合成にかかる酵素を駆使した全酵素合成の試みも行われているが、合成可能性が限られる。酵素法と化学法を組み合わせることにより、少ない種類の保護基で、ヘパリン骨格を化学合成し、さらにヘパリン生合成に関係する酵素による修飾を行うことで、効率的なヘパリン合成、及び、化学合成したひとつの中間体からのヘパリンライブラリーを合成できると期待される。硫酸基修飾が行われていない、*N*-アセチルグルコサミンがグルクロン酸に1,4-結合した2糖繰り返し構造であるヘパロサンは、生合成の上でもヘパリン前駆体である。ヘパリン合成研究の第一段階として、ヘパロサンの化学合成を行うことで、異性化反応の合成化学的有用性を示すと同時に、硫酸基を酵素により位置選択的に導入する基質を合成することができると考えた。また、合成中間体を用いて保護基の選択的除去に続く硫酸化を行うことにより、ヘパリン全化学合成へ展開することも可能である。

以上の合成戦略にのっとり、1,2-*trans* グリコシド結合を形成させるために、グルコサミンの2位アミノ基をフタルイミド基として保護、グルコースの2位水酸基をベンズイル基として保護、他の水酸基も適宜、適切に保護した。これらの糖供与体を用いて、グリコシル化反応、一時的保護基の除去の繰り返しにより、グルコースとグルコサミンからなる4糖への伸張を行った。グルコースの6位水酸基には、後に必要とされるカルボン酸への変換のために選択的に除去可能であるシリル基を導入した。4糖構築後、フタルイミド基とアシル基を除去、トリホスゲンによりカーバメート基を導入、シリル基を除去後、DMAP 存在下無水酢酸により水酸基とカーバメート窒素上にアセチル基を導入した。4糖のうち、*N*-アセチル 2,3-*trans* カーバメート基を持つアミノ糖

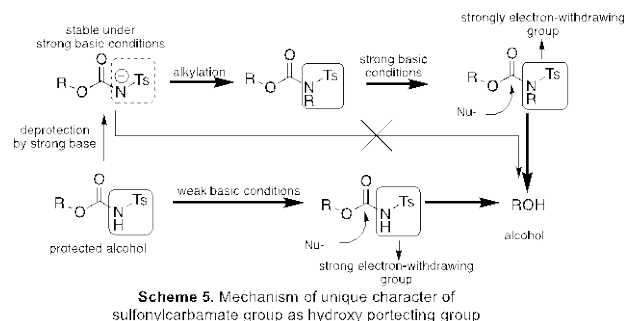
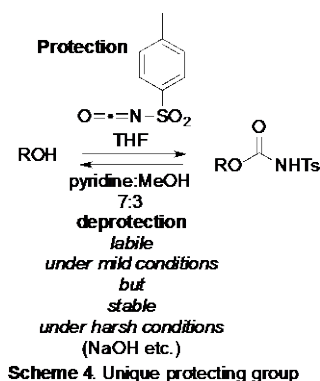
の2つの1,2-*trans* グリコシドは、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 存在下、1,2-*cis* 体へと完全に異性化した。 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 存在下、アリルアルコールを作用させ、カーバメート基を除去し、アリルオキシカルボニル基を除去し、アセトアミド基へと変換した。TEMPO により2級水酸基存在下、1級水酸基のカルボン酸への酸化を選択的に行い、現在、最終脱保護を行っている。



また、本研究遂行に当たり、副次的成果として、フッ化糖の新規活性化法の開拓と、新規保護基の開発を行うことができた。フッ化糖は、チオグリコシド、イミデートと並び、汎用される糖供与体であるが、活性化に複数の試薬が必要であることや試薬調製の煩雑さの問題点があった。市販されている $\text{Hf}(\text{OTf})_4$ は、これまでのフッ化糖活性化法と同等の活性化能力を持ち、実験操作も簡便であることを示した。

加えて、弱い塩基性条件で除去可能で、強い塩基性条件他において安定である保護基を開発した。新規保護基は、一般的に使用される、強い塩基性で除去され、弱い塩基性では安定である保護基とは逆の反応性を持つ。水酸基の保護は、基質と市販されて

いる *p*-トルエンスルホニルイソシアネートを反応させることにより、中性条件において高収率で行うことができる。生じたスルホニルカーバメート基は、酸化反応、Grignard 試薬などの条件に安定である。また、強塩基性条件 (1 M ~5 M NaOH aq. など) において、安定である一方で、弱塩基性条件 (pyridine:MeOH 7:3) で除去可能である (Scheme 4)。この特異な性質は、スルホニルカーバメート基上の窒素上水素の酸性度によって説明できる (Scheme 5)。スルホニルカーバメート基の強い電子求引性のため、スルホニルカーバメート基窒素上水素は、カルボン酸程度の酸性度を持つ。そのため、強い塩基性条件においては、窒素原子上水素の引き抜きが起こり、窒素上にアニオンが生じるために、求核剤の攻撃がおこらない。一方、弱い塩基性条件においては、水素原子の引き抜きがおこらず、スルホニルカーバメート基が非常に強い電子求引性を持つので、求核剤の攻撃が容易におこり、保護基の除去がおこる。スルホニルカーバメート基を用いて糖の水酸基をオルソゴナルに保護・脱保護することが可能であった。



考察

E. Fisher によるグリコシル化反応の開発以来、糖供与体と糖受容体のユニットを用いてのグリコシド結合生成時にアノマー位の立体配置が決定されてき

た。一方、今回見出した異性化反応では、既存の複数のグリコシド結合の立体配置を一挙に変換可能であることを示した。特に、1,2-*cis* 型のアミノグリコシド結合の選択的形成は、これまでの合成法では困難であることが知られており、本異性化反応は、有機合成化学的にも非常に有用な手法になる。

共同研究による Density Functional Theory 計算の結果、2,3-*trans* カーバメート基を導入することにより、ピラノシドと 5 員環カーバメートからにひずみが生じるためにアノマー炭素-環内酸素間の結合が切断されやすくなることが示唆された。また、異性化反応における窒素上置換基の効果については、アシル基のカルボニル酸素がアノマー炭素近傍に位置して、生じたカチオンを安定化することが明らかになった。オキシカルボニル基に対するアセチル基の優位性については、オキシカルボニル基よりもカーバメート基窒素-置換基炭素単結合の回転障壁が低く、アセチル基のカルボニル基のアノマー付近への存在確率が上昇するためであると説明できる。

Endocyclic cleavage 反応は、糖科学において非常に珍しい反応であり、その存在が議論の対象となっていたが、中間体の捕捉を契機として、合成化学的有用性を示す段階まで展開することができた。今後、様々な生理活性物質や新規糖鎖高分子の創製が可能になると期待される。

研究の発表

口頭発表

1. 眞鍋史乃、石井一之、越野広雪、伊藤幸成：ピラノシドのエンド開裂反応と置換基効果、第 133 回日本薬学会年会、横浜、2013 年 3 月。
2. 眞鍋史乃、伊藤幸成：既存グリコシドの異性化反応を利用した新規糖鎖合成、日本プロセス化学会 2013 サマーシンポジウム、筑波、2013 年 7 月。
3. 眞鍋史乃、伊藤幸成：鎖状カチオンを経由する 1,2-*cis* グルコサミンオリゴマーの合成：第 32 回日本糖質学会、大阪、2013 年 8 月。
4. Shino Manabe, Yukishige Ito: Synthesis of α -glycosamine oligomer from β -glucosamine oligomer by endocyclic cleavage reaction, 10th Asia-Pacific Chitin & Chitosan Symposium, Yonago, Oct. 2013.
5. 眞鍋史乃、佐藤寛子、Jurg Hutter, Hans Peter Luthi, Teodoro Laino, 伊藤幸成：鎖状カチオンを経由したピラノシドの異性化反応による 1,2-*cis* アミノグリコシドオリゴマーの合成、第 39 回反応と合成の進歩シンポジウム、福岡、2013 年 11 月。
6. 眞鍋史乃、伊藤幸成：異性化反応による 1,2-*cis* アミノグリコシドの合成、第 94 回日本化学会年会、名古屋、2014 年 3 月。

誌上発表

1. “Hafnium(IV) Tetratriflate as a Glycosyl Fluoride Activation Reagent” Shino Manabe, Yuksihige Ito, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4568–4572.
2. “Sulfonylcarbamate as a Versatile and Unique Hydroxy-Protecting Group: Protecting Group Stable under Severe Conditions and Labile under Mild Conditions” Shino Manabe, Masanori Yamaguchi, Yukishige Ito, *Chem. Comm.* **2013**, *49*, 8332–8334.
3. “Hafnium(IV) Tetratriflate in Selective Reductive Carbohydrate Benzylidene Acetal Opening Reaction and Direct Silylation Reaction” Shino Manabe, Yukishige Ito, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 6838–6840.
4. “Significant substituent effect on the anomerization of pyranosides: mechanism of anomerization and synthesis of a 1,2-*cis* glucosamine oligomer from the 1,2-*trans* anomer” Shino Manabe, Hiroko Satoh, Jürg Hutter, Hans Peter Lüthi, Teodoro Laino, Yukishige Ito, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 124–132. (Selected in ChemistryViews)
5. “Glycosylation Reaction: Relationship between Conformation and Reactivity, Investigation From Experimental and Computational Chemistry” Hiroko Satoh, Shino Manabe, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4297–4309.
6. 「2,3-*trans* カーバメート基を持つ糖構造の特異な反応性：糖化学におけるエンド開裂反応の再発見」、有機合成化学協会誌、眞鍋史乃、佐藤寛子、**2013**, *71*, 616–624.
7. “Pyranosides with 2,3-*trans* Carbamate groups: Exocyclic or Endocyclic Cleavage Reaction?” Shino Manabe, Yukishige Ito, *Chem. Rec. in press*. 10.1002/tcr.201402004.

