

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410186

研究課題名(和文) Dual糖鎖クラスター効果による抗ピロリ菌剤の開発

研究課題名(英文) Development of the antimicrobial agent against *H. pylori* based on dual carbohydrate cluster effect

研究代表者

山ノ井 孝 (Yamanoi, Takashi)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：20182595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、胃粘膜の表層粘膜に棲息するピロリ菌がルイスb型糖鎖に結合し、胃粘膜下層のGlcNAcを有するムチン型糖鎖がピロリ菌に対し抗菌作用を有するという二つの知見を基に、まず、GlcNAc集積体の合成を達成し、その抗ピロリ菌作用を明らかにした。さらに、ルイスb型糖鎖とGlcNAcを混在させたハイブリッド糖質集積体を化学合成して、新たな概念である“Dual糖鎖クラスター効果”の発現による抗ピロリ菌剤の開発に繋げた。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori lives in the surface mucous membrane of stomach, and binds to Lewis b sugar chain. The sugar chains containing the GlcNAc residues show the growth inhibitory activity against *H. pylori*. Based on these two facts, this study achieves the synthesis of two types of GlcNAc assemblies, and their antibacterial activities for *H. pylori* were clarified. In addition, this study accomplished the synthesis of the hybrid type sugars-assemblies composed of two kinds of sugars. Therefore, this study successfully leads to the development of the antibacterial agent for *H. pylori* involving the novel concept of “dual carbohydrate cluster effect”.

研究分野：糖質化学

キーワード：ピロリ菌 糖鎖クラスター GlcNAc ルイスb糖鎖 デンドリマー シクロデキストリン

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌(ヘリコバクターピロリ)は胃表層粘膜に棲息して、ピロリ菌のリガンド糖鎖はその表層粘液層中のルイスb {Fuc 1 2 Gal 1 3 (Fuc 1 4) GlcNAc-R} 及びその類縁糖鎖(以後、ルイスb型糖鎖)であることが明らかにされている。

また、胃粘膜下層の腺粘液細胞から分泌される腺粘液中のムチン型糖鎖 {GlcNAc 1 4Gal 1 4GlcNAc 6 (GlcNAc 1 4Gal 1 3) GalNAc 1 Ser(or Thr)} が、ピロリ菌の感染から胃粘膜を防御している可能性が示唆されている。

ムチン型糖鎖をピロリ菌に作用させると、ピロリ菌の増殖能や運動能が著しく抑制され、菌体の伸長や輪郭に著しい変化を生じることが報告されている。このムチン型糖鎖末端に存在する GlcNAc 残基は天然には稀な結合様式を持ち、ピロリ菌の細胞壁の構成成分であるコレステニル-β-グルコピラノシドの生合成を阻害して、ピロリ菌の増殖を抑制していると考えられている。すなわち、GlcNAc 誘導体がピロリ菌に対して抗菌活性を持つことが強く示唆されている。

2. 研究の目的

本申請研究では、胃粘膜の表層粘膜に棲息するピロリ菌がルイスb型糖鎖に結合し、胃粘膜下層の GlcNAc を有するムチン型糖鎖がピロリ菌に対し抗菌作用を有するという二つの知見を基に、従来の抗生物質とは異なる機序でのピロリ菌を標的とした抗菌剤を開発する。すなわち、ルイスb型糖鎖と GlcNAc 誘導体の2つの糖質から成るハイブリッド型糖集積体を用いた高活性な抗ピロリ菌剤の創製を目指す。この抗菌剤の仕組みは、ルイスb型糖鎖がピロリ菌のトラップ剤として機能し、近傍の GlcNAc 誘導体が抗菌剤として働く。そして本研究では、2種類の糖質の効果による新しい概念である“Dual 糖鎖クラスター効果”の発現を目指す。

3. 研究の方法

本研究では下記の1-4)開発が必要と考えた。1)ピロリ菌が結合するルイスb型糖鎖、及びピロリ菌に対して抗菌作用を有する GlcNAc 誘導体の設計と合成、2)糖誘導体を多価で集積させるスキャフォールド材として機能するアミノ酸型 dendリマーやシクロデキストリン誘導体の化学合成、3)シクロデキストリンや dendリマーへの糖誘導体の集積化法、および2種類の糖誘導体を用いたハイブリッド集積化法の開発、4)得られた糖誘導体や糖誘導体集積化物の抗ピロリ菌活性評価、である。

4. 研究成果

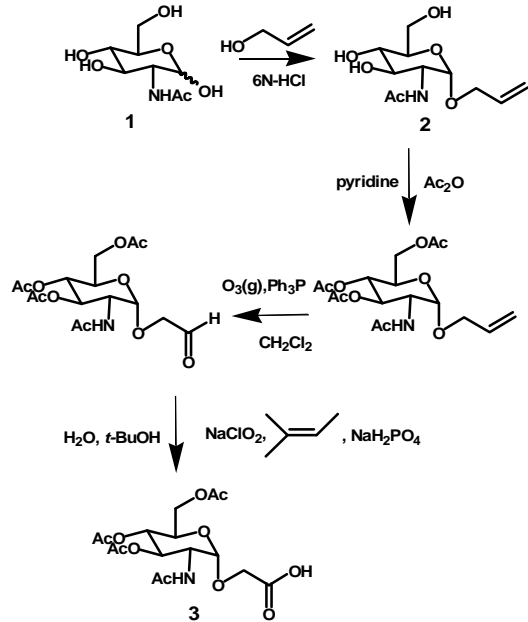
1) GlcNAc 集積体の合成法の開発

アミノ酸 dendリマーおよびシクロデキストリンをスキャフォールド材とした

GlcNAc 集積化法の開発を検討した。

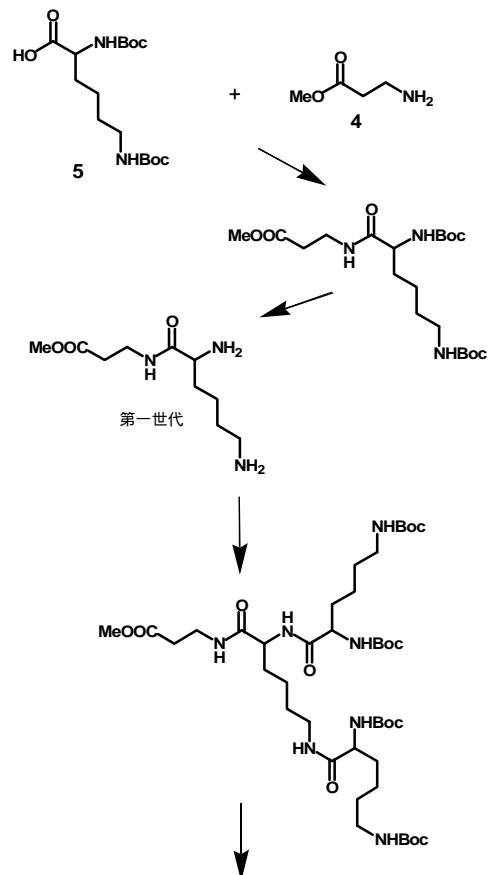
1-1)アミノ酸 dendリマーへの GlcNAc 集積化法の開発

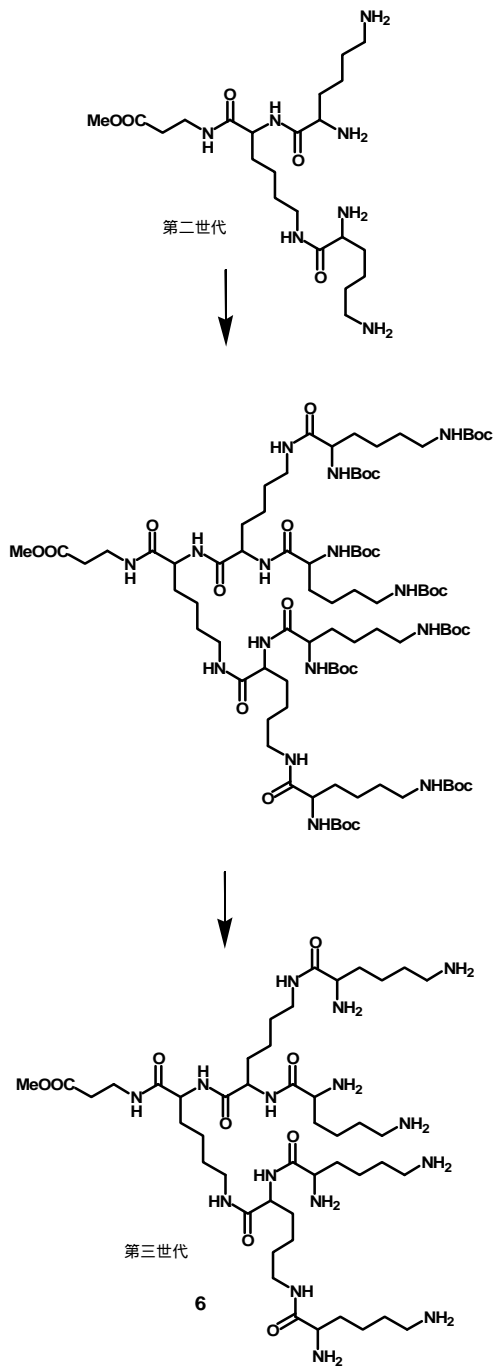
まず、GlcNAc 誘導体 3 の合成について検討した。市販の GlcNAc 1 を酸性条件下、フィッシャーグリコシル化法によってアリルグリコシド体 2 に導き、常法によってアセチル化を行った後に、アリル基をオゾン酸化等によってカルボキシメチル基に変換して、3 を



得た。

次にアミノ酸 dendリマー 6 の合成を検討した。メチルアラニン 4 をコアとして、リ



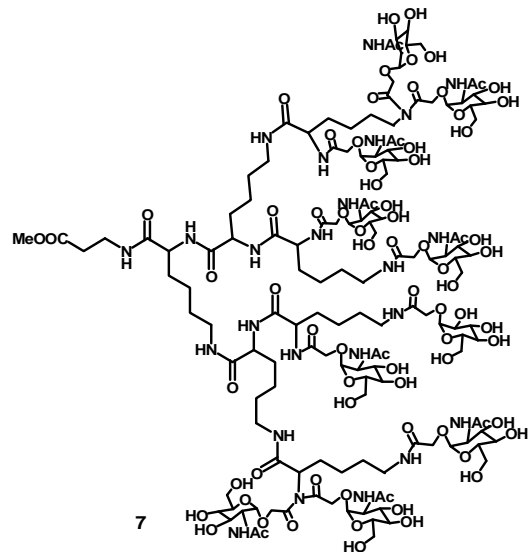


ジン残基 **5** を Boc 化法によって、三世代延長させて、目的の **6** を合成した。

次にアミノ酸 dendリマー **6** に GlcNAc 誘導体 **3** の導入法を検討した。常法により、**3** と **6** をカップリング縮合させて、アセチル基を脱保護することによって、GlcNAc が 10 残基担持した dendリマー誘導体 **7** の合成に成功した。**7** は MALDI TOF MS によって構造を確認した。

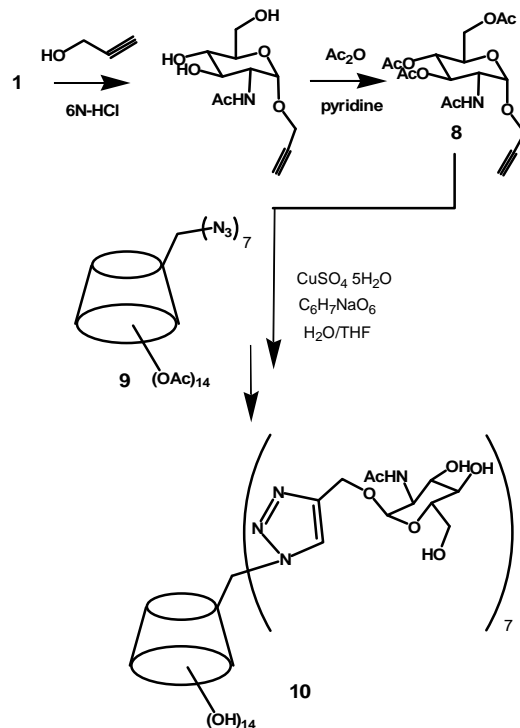
### 1 - 2) シクロデキストリンへの GlcNAc 集積化法の開発

まず、GlcNAc 誘導体 **8** の合成について検討した。酸性条件下のフィッシャーグリコシル化法によって、GlcNAc **1** とプロパルギルアルコールを反応させた後に、アセチル化を行



って、**8** を収率良く得た。クリックケミストリーとして知られている Huisgen 環化付加反応を用いて、**8** と **9** とを銅塩触媒下で反応させ、次いで脱アセチル化反応を行うことで、

GlcNAc 残基が 7 分岐したシクロデキストリン誘導体 **10** を収率良く得た。**10** は MALDI TOF MS によって生成を確認した。



### 2) 抗ピロリ菌活性評価と再分子設計

GlcNAc 集積体 **10** を用いて抗ピロリ菌活性評価を行った。

*in vitro* でのピロリ菌増殖阻害活性を調べたところ、**10** は顕著な抗菌活性作用を示さないことがわかった。GlcNAc 残基がシクロデキストリンと接近しているために、GlcNAc 残基の自由度が低いこと。また、ピロリ菌へ取り込まれるには、GlcNAc 残基の他

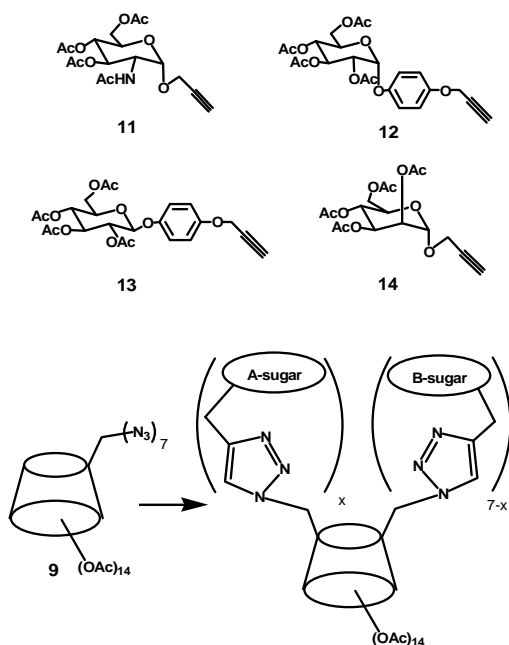
に脂溶性ユニットが必要なことが示唆された。

そこで、本研究ではシクロデキストリンを用いたスカフォールド材としての分子設計を再検討した。オリゴエチレングリコールをスペーサーとして、その末端に GlcNAc 残基を導入することで、GlcNAc 残基の自由度向上を図った分子設計を考えた。そして、七分岐のオリゴエチレングリコール鎖を有するシクロデキストリン誘導体の合成を達成した。

さらに、アグリコン部位に脂溶性の高い官能基を持つ GlcNAc 誘導体を化学合成して、その抗ピロリ菌増殖阻害活性を調べた。アグリコン部位にステロイドを有する GlcNAc 誘導体を化学合成して、その抗ピロリ菌増殖阻害活性を調べたところ、ステロイド GlcNAc 誘導体では、良好な抗ピロリ菌活性を示すことを明らかにした。

### 3) 2種類の糖誘導体を用いたハイブリッド集積化法の開発

2種類の糖誘導体を用いたハイブリッド集積化法の開発を検討した。糖誘導体としては、GlcNAc 誘導体 **11** の他に、糖誘導体 **12 - 14** を用いた。集積化では効率性が高い Huisgen 環化付加反応を利用した。



**11 - 14** のいずれの任意の 2 種類の糖質の組み合わせにおいても、モル比をコントロールすることで、シクロデキストリンに望む導入率で 2 種類の糖誘導体を導入できることを明らかにした。

ルイス b 糖鎖および GlcNAc 誘導体を用いたハイブリッド集積化においても、同様な方法によって、シクロデキストリンに様々な導入率で 2 種類の糖質を組み込むことが可能であると考えられる。

以上、本研究を通じて、“Dual 糖鎖クラス

ター効果”の発現が期待される抗ピロリ菌剤の開発に繋がる成果が得られた。

### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 6 件)

- 1) T. Yamanoi, M. Midorikawa, and Y. Oda, Formation of 1,2-*cis*- $\alpha$ -aryl-glycosidic linkages directly from 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyl acetate by the mixed activating system using ytterbium(III) triflate and catalytic boron trifluoride diethyl etherate complex, *Heterocycles*, 査読有, **2014**, 88, 201-206.  
DOI: 10.3987/COM-13-S(S)44
- 2) S. Matsuda, A. Yoshida, J. Nakagawa, M. Watanabe, Y. Oda, and T. Yamanoi, Stereocontrolled spirocyclization of *exo*-glucal derivatives for stereodivergent synthesis of spiro[5.5]ketals, *Tetrahedron Lett.*, 査読有, **2014**, 55, 6394-6398.  
DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.09.095
- 3) Y. Oda, M. Midorikawa, and T. Yamanoi, Formation of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosidic linkages *via* glycosidation using a combination of two Lewis acids, *Heterocycles*, 査読有, **2015**, 90, 198-215.  
DOI: 10.3987/COM-14-S(K)4
- 4) T. Yamanoi, Y. Oda, K. Katsuraya, T. Inazu, and K. Hattori, Synthesis, structure, and evaluation of a  $\beta$ -cyclodextrin-artificial carbohydrate conjugate for use as a doxorubicin-carrying molecule, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, **2016**, 24, 635-642.  
DOI: 10.1016/j.bmc.2015.12.030
- 5) T. Yamanoi, Y. Oda, K. Katsuraya, T. Inazu, and K. Yamamoto, Complete NMR assignment of a bisecting hybrid-type oligosaccharide transferred by *Mucor hiemalis* *endo*- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, *Carbohydr. Res.*, 査読有, **2016**, 427, 60-65.  
DOI: 10.1016/j.carres.2016.03.013
- 6) T. Yamanoi, Y. Oda, T. Ishiyama, and M.

Watanabe, Stereoselectivity of D-psico-  
furanosylation influenced by protecting  
groups of psicofuranosyl donors,  
*Heterocycles*, 査読有, 2016, in press.

DOI: 10.3987/COM-15-S(T)39

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) SSA レクチンのシアロ糖鎖に対する認識特  
異性の解明、山ノ井孝、鬘谷要、石村敬久、  
吉田孝、第 33 回日本糖質学会 (2014 年 8  
月)
- 2) ベンジル化 C - グルコピラノシド修飾  
- シクロデキストリンのドキシソルビシン  
包接特性とその構造、山ノ井孝、小田慶喜、  
鬘谷要、服部憲治郎、第 31 回シクロデキ  
ストリンシンポジウム (2014 年、9 月)
- 3) GlcNAc 結合ステロイド誘導体の合成と、  
そのピロリ菌に対する増殖阻害活性作用、  
山ノ井孝、小田慶喜、中山淳、第 34 回日  
本糖質学会 (2015 年 8 月)
- 4) D-フルクトピラノシル化反応の開発と利  
用、石川順子、小泉晶彦、山ノ井孝、日本  
薬学会第 136 年年会 (2016 年 3 月)
- 5) エストラジオールを用いた -GlcNAc 誘  
導体の合成と、そのピロリ菌に対する増殖  
阻害活性作用、蓮見悠介、小泉晶彦、中山  
淳、山ノ井孝、日本薬学会第 136 年年会  
(2016 年 3 月)
- 6) ドキシソルビシン輸送キャリア分子として  
の C - グルコシド結合型 - シクロデキス  
トリン誘導体の合成、構造解析と評価、山  
ノ井孝、小田慶喜、鬘谷要、服部憲治郎、  
日本薬学会第 136 年年会 (2016 年 3 月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.josai.ac.jp/education/pharma  
cy/medicine\\_dep/laboratory/yukiyakukaga](http://www.josai.ac.jp/education/pharmacy/medicine_dep/laboratory/yukiyakukaga)

ku.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山ノ井 孝 (YAMANOI TAKASHI)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：20182595

(2) 研究分担者

小田 慶喜 (ODA YOSHIKI)

公益財団法人野口研究所・研究部・研究員

研究者番号：00442567

(2015 年度のみ)