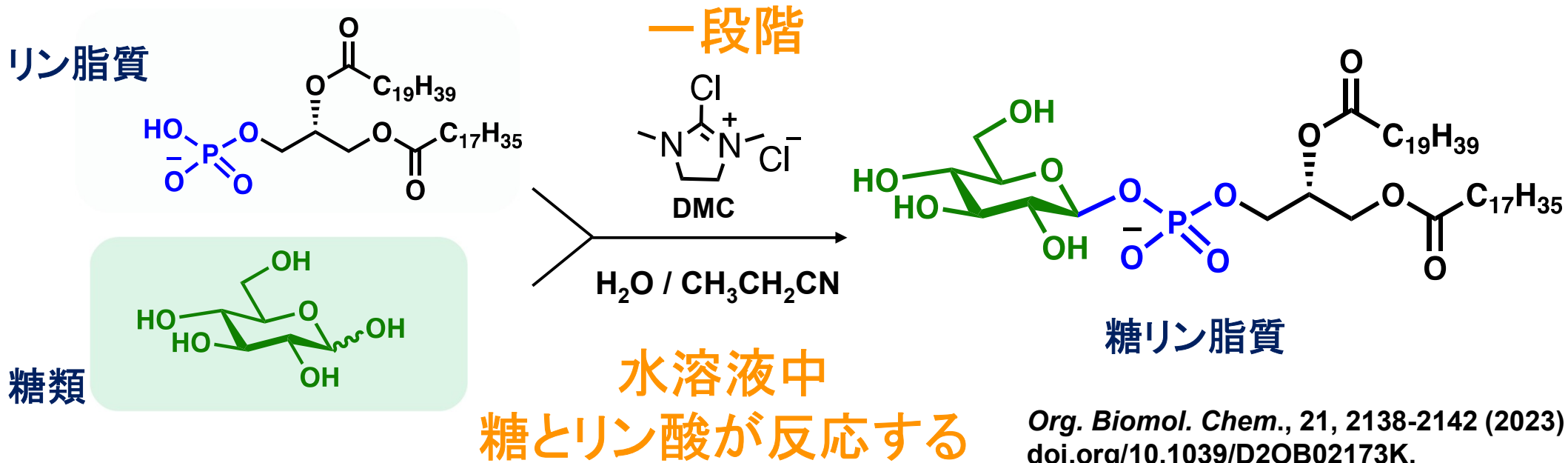


グルコシル化リン脂質の 新規合成法

群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門
教授 松尾 一郎

2023年11月16日

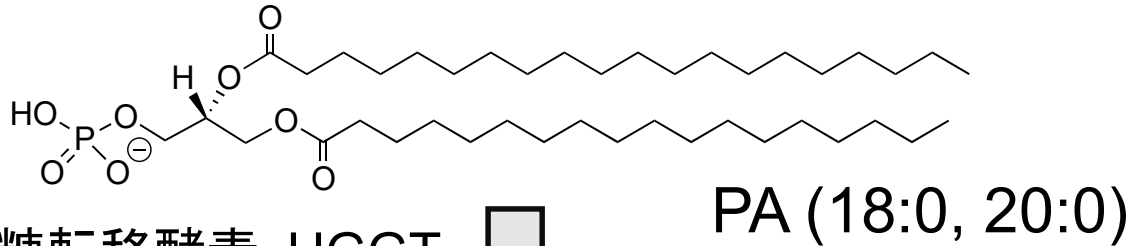
糖リン脂質の簡便合成



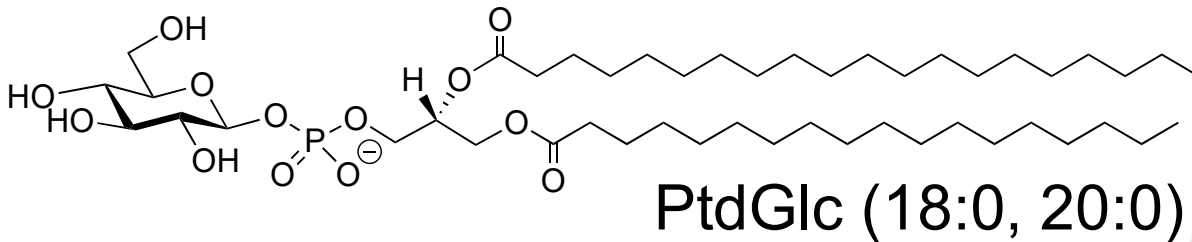
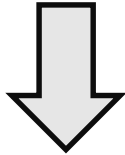
水溶液中、無保護の糖を2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド(DMC)で活性化、リン脂質と反応させることで糖リン脂質が簡便に合成できるようになった。

本反応は様々な糖類に適応が可能で、例えばアジド基修飾糖を用いることで糖部分が修飾された糖リン脂質が合成できる。得られた糖リン脂質をリポソーム化後、クリック反応により、リポソーム表面に対して任意の置換基の導入が可能となった。

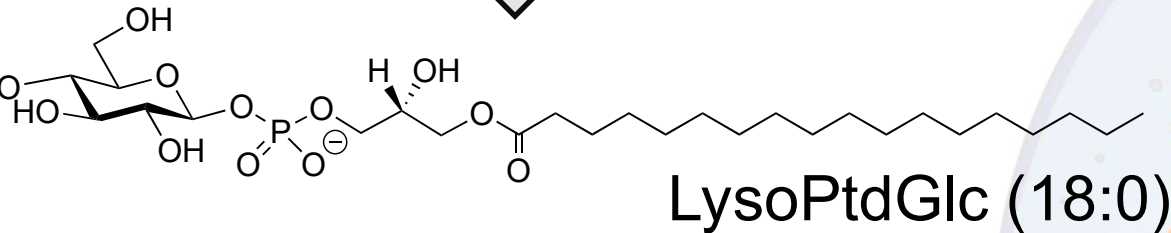
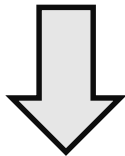
糖リン脂質は生理活性を有する



糖転移酵素: UGGT

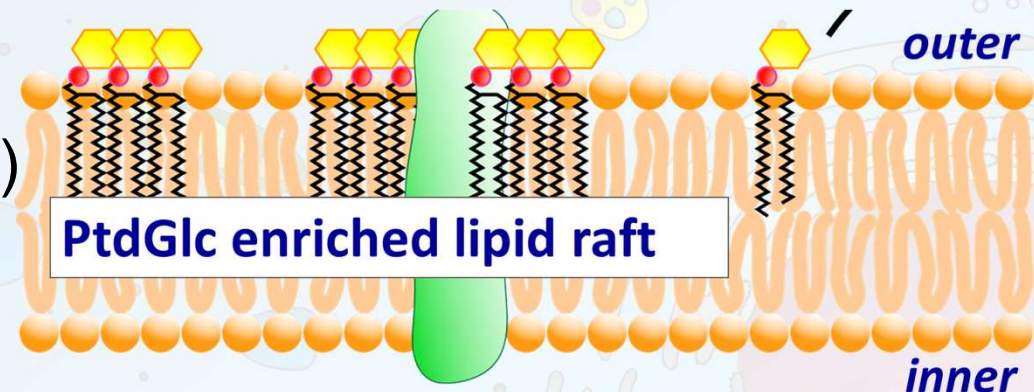


リパーゼ: PLA2



ホスファチジルグルコシド

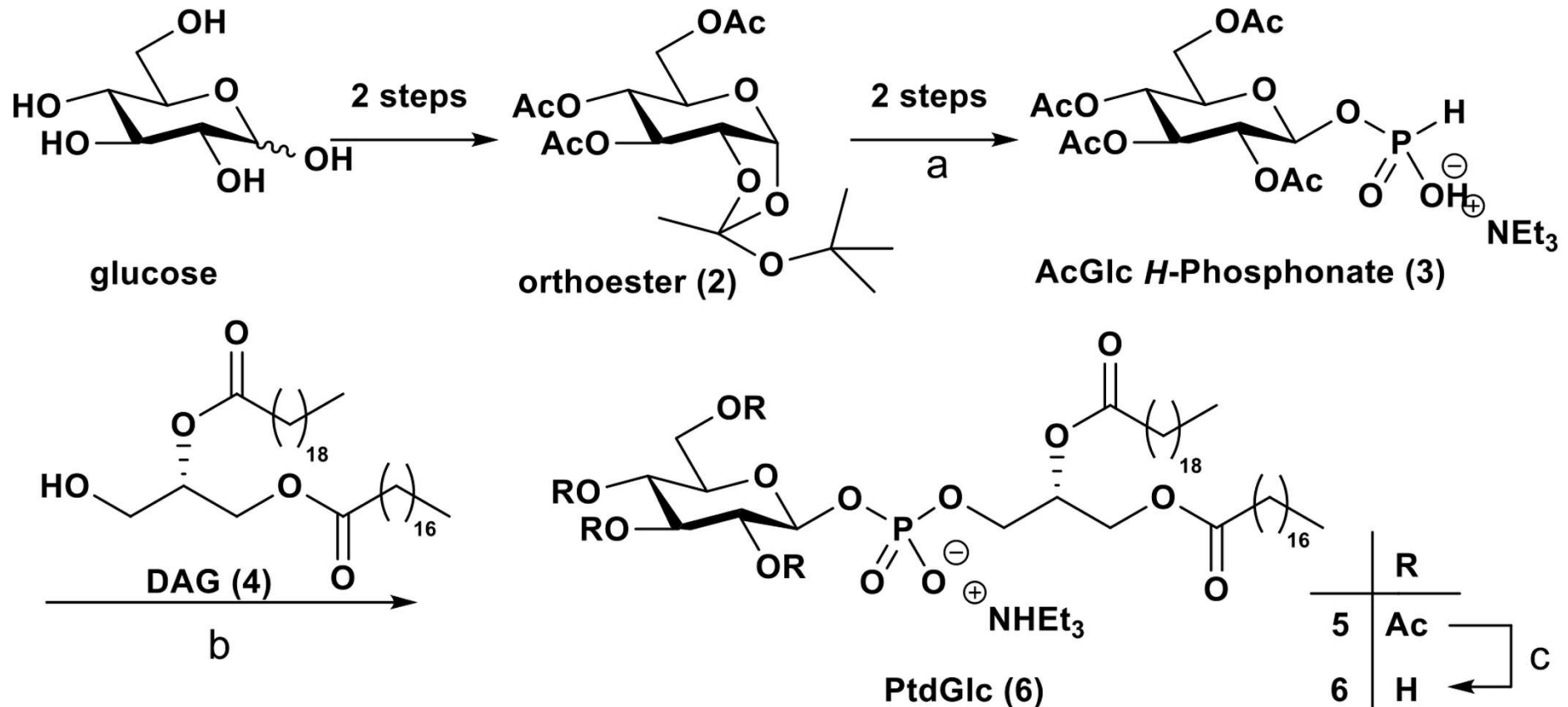
- 哺乳類で初めて見出された¹⁾グルコース含有リン脂質
- 脂質マイクロドメインを構成する²⁾
- ホスファチジン酸のリン酸がUGGT (UDP-グルコース:糖タンパク質グルコース転移酵素)によってグルコシル化されることが示唆されている³⁾。



1) Nagatsuka et al., FEBS Lett. 2010 497, 141,
2) Murase, et al., Biochemistry 2010 49, 4732
3) Hung et al., PNAS 2022, 119, 51, e2214957119

これまでの糖リン脂質の合成は 多工程が必要であった

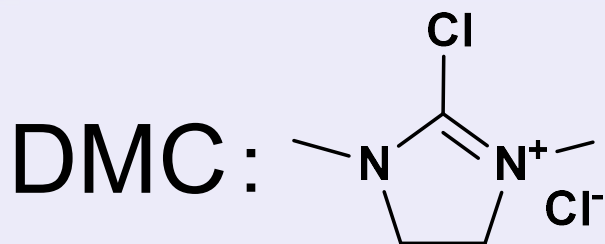
Greimel らの報告^{1),2)}



Conditions: (a) (i) H_3PO_3 , THF, (ii) NEt_3 , 4 °C, 55%, (b) (i) PivCl, pyridine, THF, 0 °C, rt, (ii) I_2 , pyridine/ H_2O , 76%, (c) $\text{N}_2\text{H}_4/\text{HOAc} = 4:1$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1:2.5$, 67%.

1) Tetrahedron Lett. 2008 49, 3562, 2) Science 2015, 349, 974.

水中で糖の一位を活性化する試薬

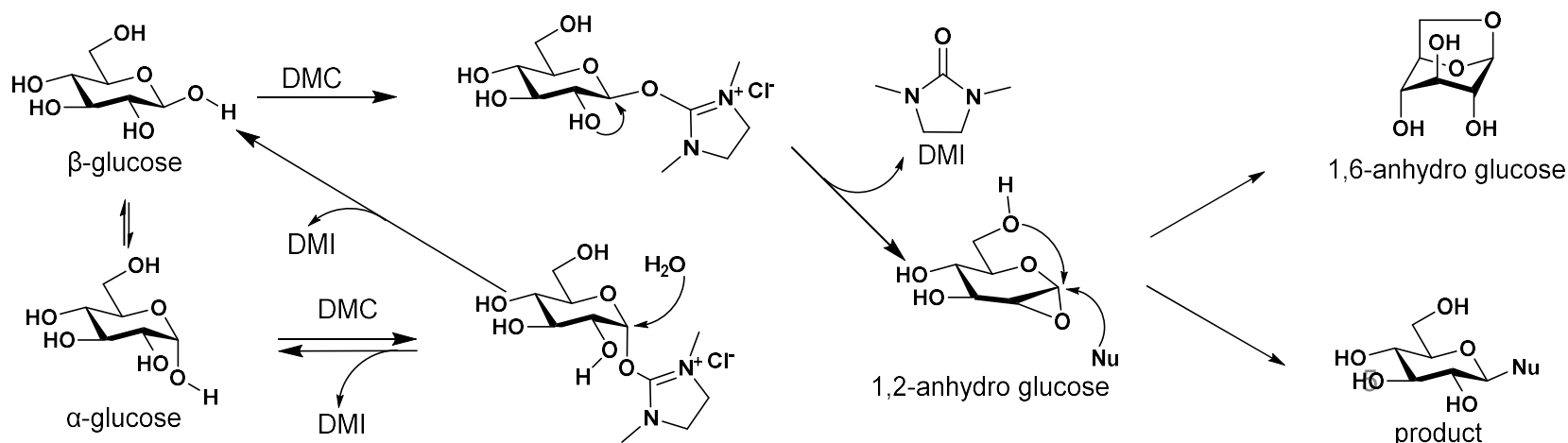


2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド

2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride

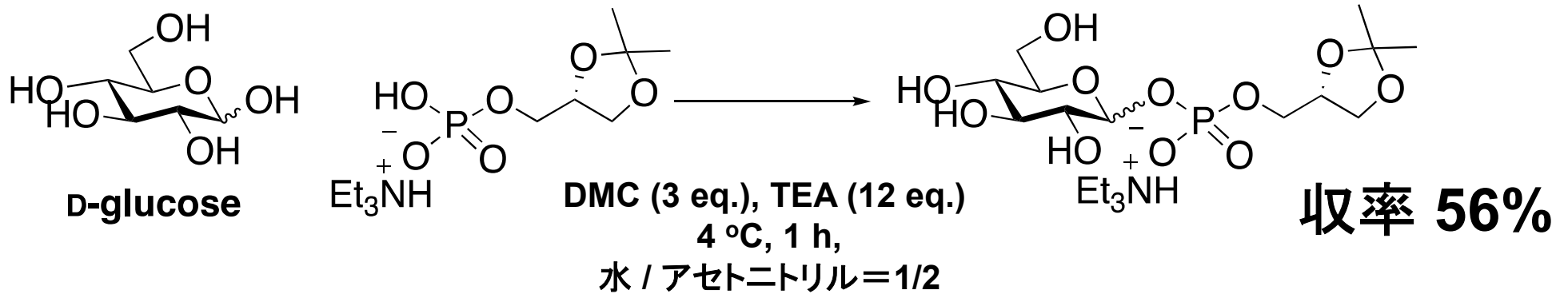
- 1972年 H.B. Koenigらがペニシラン酸のアミド化のために初めて利用¹⁾
- 1999年 Isobe, Ishikawaらが脱水縮合剤として汎用的な利用例を報告²⁾
- 2009年 Shodaらが糖の1位を活性化できることを発見、糖鎖合成に幅広く応用^{3, 4)}
- 2021年 FairbanksがDMCをShoda's試薬と提唱³⁾

正田らは、DMCが水溶液中、糖の1位を活性化することを見出した^{4,5,6)}

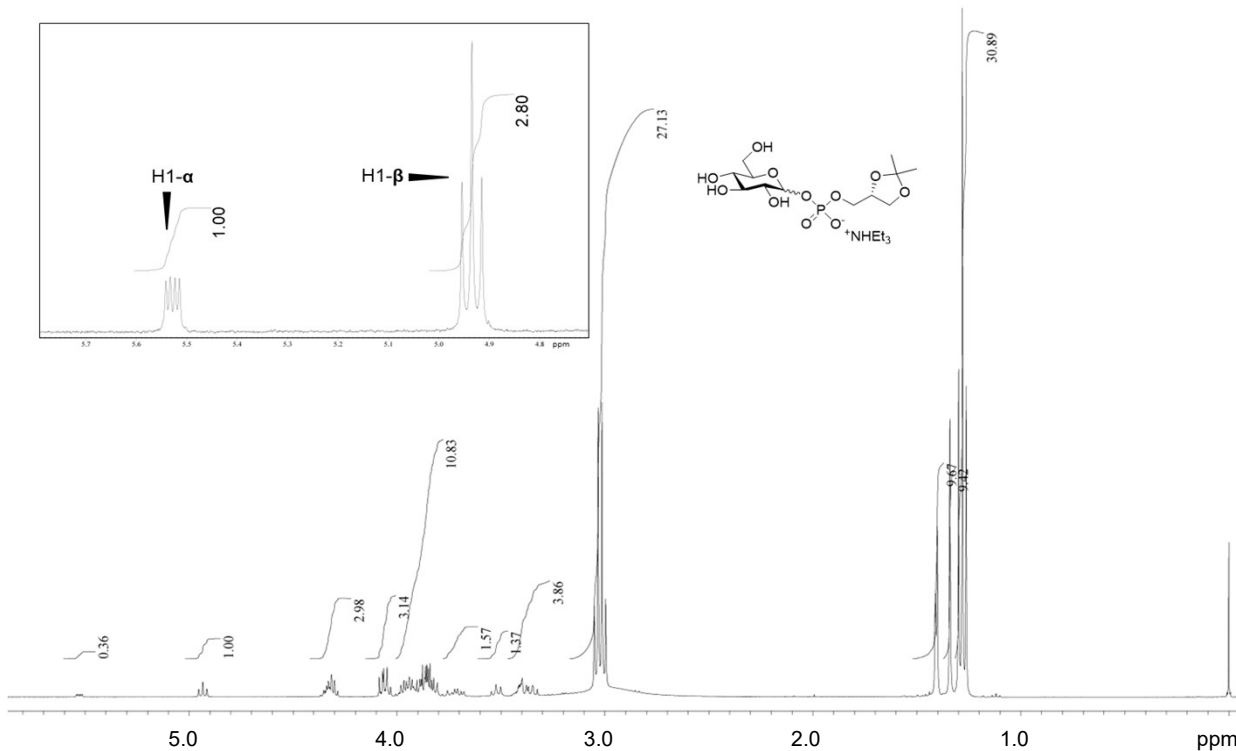


1) H.B. Koenig *et al.*, *Chem. Abstr.* **1972**, 77, 140048, 2) T. Isobe, T. Ishikawa, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 6984-6988, 3) A. J. Fairbanks, *CR* **2021**, 499, 108197, 4) T. Tanaka *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 2154, 5) K. Serizawa *et al.*, *Chem. Lett.* **2017**, 46, 1024, 6) G. Li *et al.*, *CHIMIA* **2018**, 72, 874.

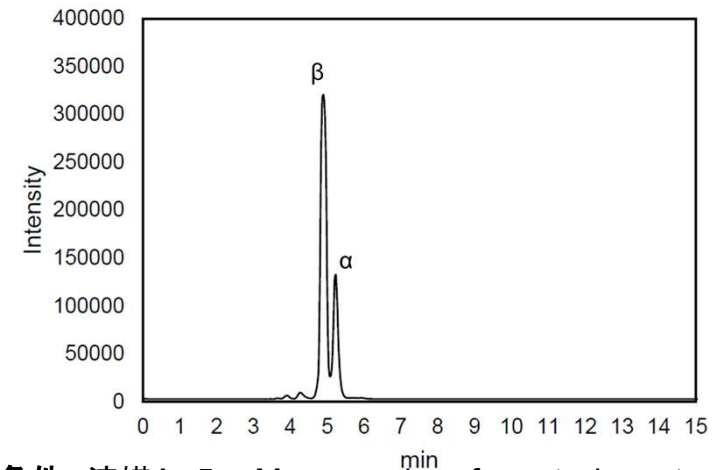
DMCを用いた糖リン酸結合の構築



600 MHz ¹H NMR spectrum in D₂O



質量分析装置による解析



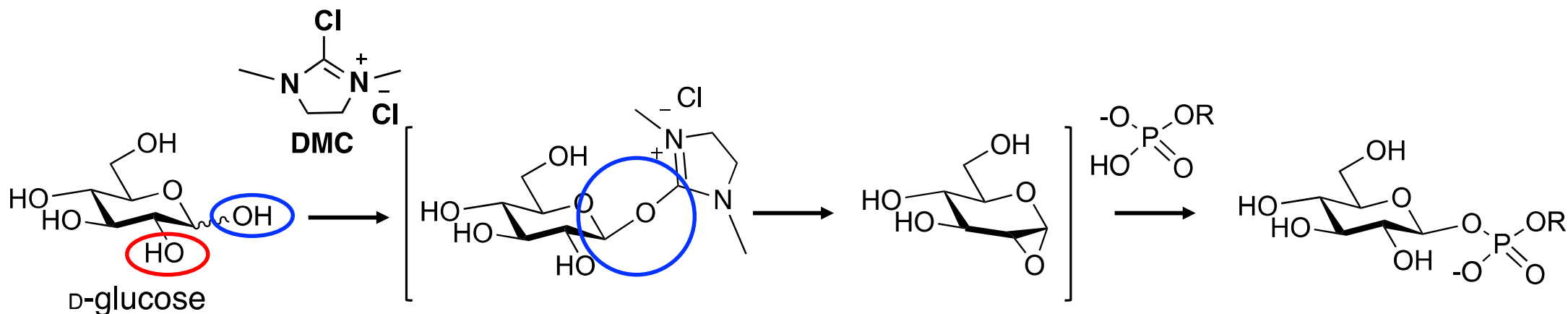
分析条件: 溶媒A: 5 mM ammonium formate in water pH4,
 溶媒B: 5 mM ammonium formate in water/acetonitrile =
 5/95 v/v pH4, solvent B = 80% isocratic, column: TOSOH
 Amide 80, 2.0 mm I.D. x 15 cm 3 μm, flow rate: 200 μL/min,
 Oven temperature: 40 °C, Ionization mode: ESI negative,
 The MS detector was run in SIM mode, m/z = 373.10,
 sample: The reaction mixture was diluted with 2,500 times
 by mixed solvent (solvent A/B=30/70) and injected 3 μL.

糖ーリン酸結合反応における溶媒効果

Entry ^a	Sugar	Solvent (v/v) ^b	Yield (%) (α / β) ^{c, d}
1	D-glucose ($\alpha / \beta = 45/55$)	H ₂ O	5 (1/77)
2	D-glucose	H ₂ O/CHCl ₃ (1/1)	7 (1/3)
3	D-glucose	H ₂ O/CH ₂ Cl ₂ (1/1)	15 (1/5)
4	D-glucose	H ₂ O/dioxane (1/1)	39 (1/6)
5	D-glucose	H ₂ O/THF (1/1)	36 (1/7)
6	D-glucose	H ₂ O/DMF (1/1)	29 (1/4)
7	D-glucose	H ₂ O/DMSO (1/1)	22 (1/3)
8	D-glucose	H ₂ O/acetone (1/1)	44 (1/8)
9	D-glucose	H ₂ O/CH ₃ CN (1/1)	39(1/11)
10	D-glucose	H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CN (1/1)	28(1/19)
11	D-glucose	H ₂ O/CH ₃ CN (1/2)	41(1/10)
12	D-glucose	H ₂ O/CH ₃ CN (2/1)	23(1/20)
13	D-glucose	H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CN (1/2)	41(1/11)
14	D-glucose	H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CN (2/1)	18(1/27)
15	D-glucose	H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CN (4/1)	14(1/40)

^a All reactions were performed under the following conditions: sample concentration: 0.05 M glucose (3.2 μ mol), 0.05 M glycerophosphate (3.2 μ mol), TEA (28.8 μ mol), DMC (9.6 μ mol); solvent (v/v); total volume: 69 μ L; reaction temperature: 4 $^{\circ}$ C; reaction time: 1 h. ^b Indicated solvent ratio is volume/volume. ^c The reaction yield was calculated from LC-MS chromatograms of the reaction mixture based on a standard curve of product. ^d The α/β ratio was determined via LC-MS.

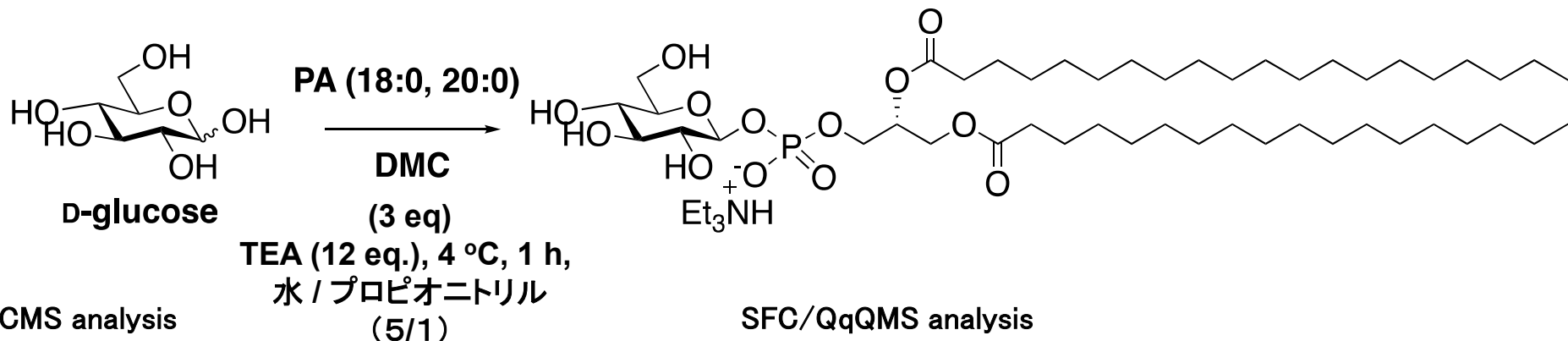
糖ーリン酸結合反応の反応機構の理解に向けて



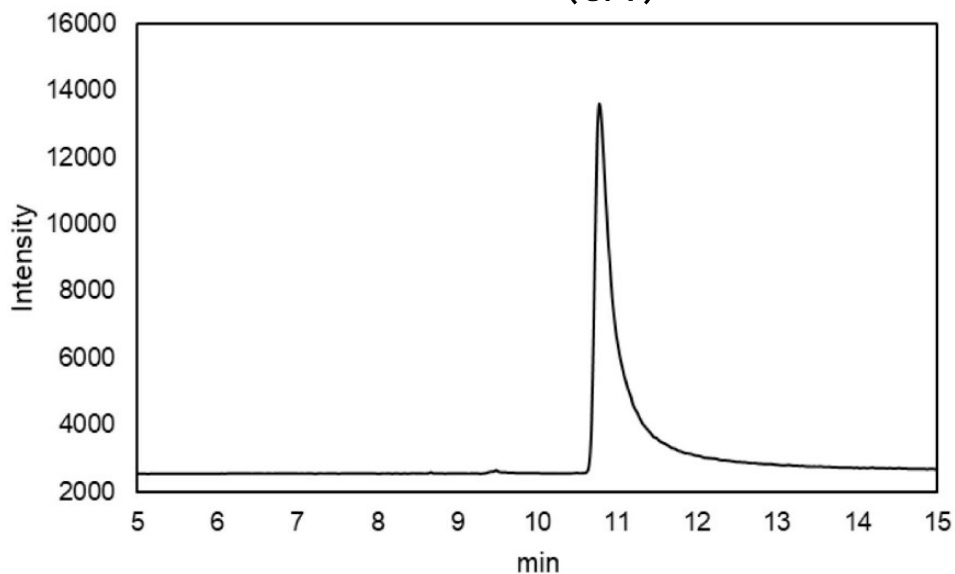
Entry ^a	Sugar	Solvent (v/v) ^b	Yield (%) (α/β) ^{c, d}
1	D-glucose ($\alpha/\beta = 45/55$)	H ₂ O/CH ₃ CN (1/1)	39(1/11)
2	α -D-glucose	H ₂ O/CH ₃ CN (1/1)	32(1/11)
3	β -D-glucose	H ₂ O/CH ₃ CN (1/1)	35(1/11)
4	2-deoxy-D-glucose	H ₂ O/CH ₃ CN (1/1)	--- ^e

^a All reactions were performed under the following conditions: sample concentration: 0.05 M glucose (3.2 μ mol), 0.05 M glycerophosphate (3.2 μ mol), TEA (28.8 μ mol), DMC (9.6 μ mol); solvent (v/v); total volume: 69 μ L; reaction temperature: 4 $^{\circ}$ C; reaction time: 1 h. ^b Indicated solvent ratio is volume/volume. ^c The reaction yield was calculated from LC-MS chromatograms of the reaction mixture based on a standard curve of product. ^d The α/β ratio was determined via LC-MS. ^e Less than 1% of the product was detected during LC-MS analysis.

水溶液中でのPtdGlcの一段階合成

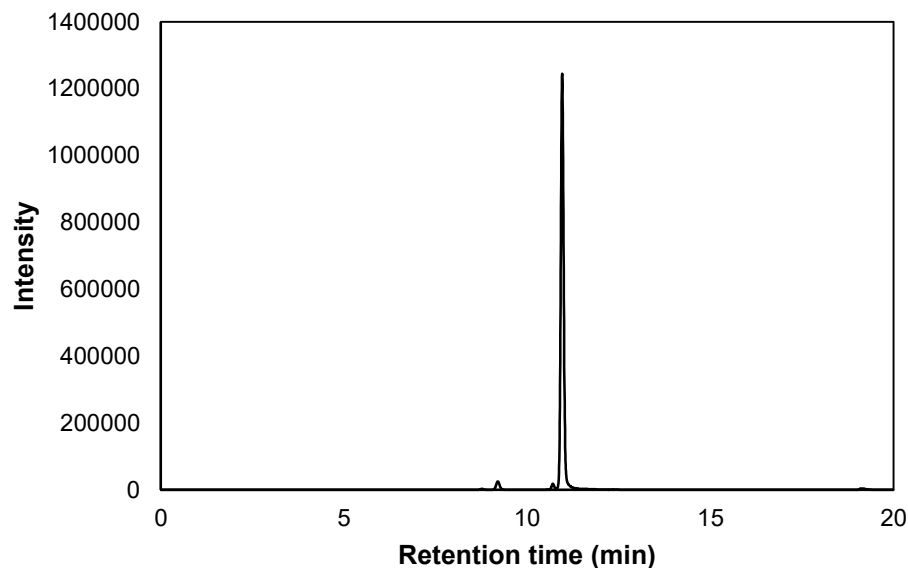


LCMS analysis



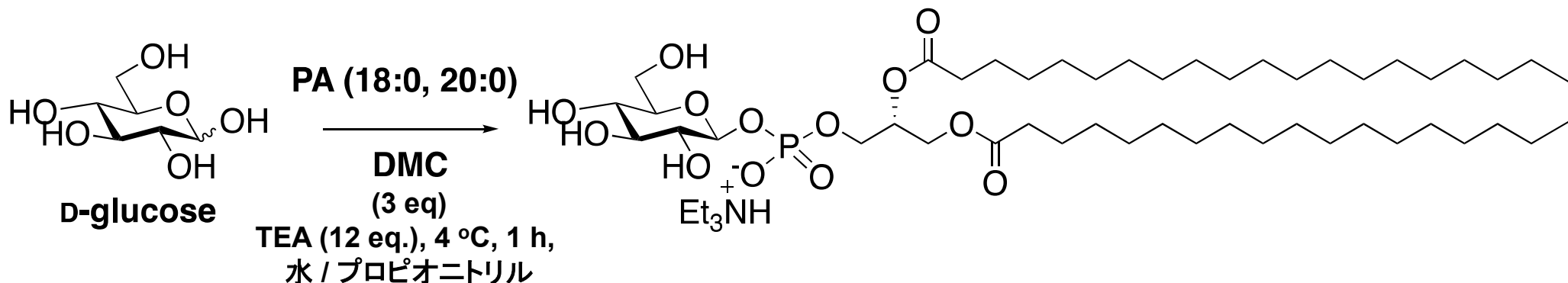
分析条件: (A) solvent system A: 5 mM ammonium formate in water/methanol/acetonitrile = 1/3/96 v/v pH7, solvent system B: 20 mM ammonium formate in water/methanol = 10/90 v/v pH7, solvent B = 0-40% gradient, 30min, column: Waters BEH Amide 2.1 mm I.D. x 15 cm, 1.7 μ m, flow rate: 600 μ L/min, Oven temperature: 40 $^\circ$ C, Ionization mode: ESI negative, The MS detector was run in SIM mode, m/z = 893.61, sample: 100 μ M, 3 μ L

SFC/QqQMS analysis



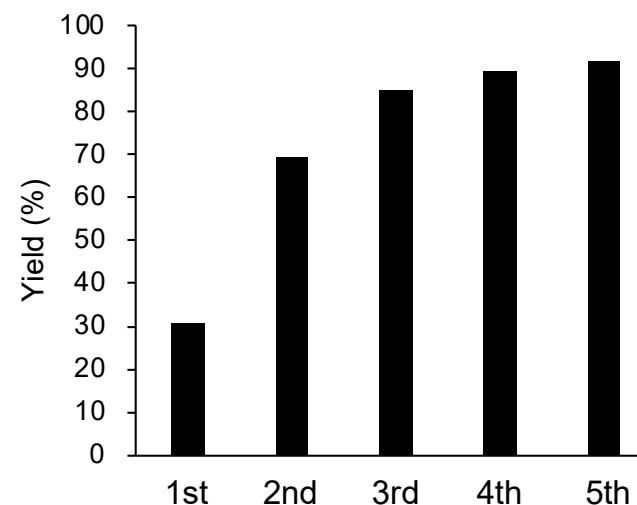
分析条件: Analytical conditions: mobile phase A: CO₂, mobile phase B: 0.1% w/v ammonium acetate in MeOH/H₂O = 95/5 v/v, mobile phase B = 1% (0-1 min), 1-65% (1-12 min), 65% (12-18 min), 65-1% (18-18.1min), 1% (18.1-20min), column: Waters Torus DEA, 1.7 μ m, 3.0 mm I.D. x 10 cm, flow rate: 1 mL/min, Oven temperature: 50 $^\circ$ C, back pressure: 10 MPa, ionization mode: ESI negative, The MS/MS detector was run in MRM mode, m/z = 893.5 > 283.2, sample: The reaction mixture was diluted with 50,000 times by MeOH and injected 1 μ L.

PtdGlcの収率向上の取り組み



DMCとグルコースを段階的に加えることで収率が向上

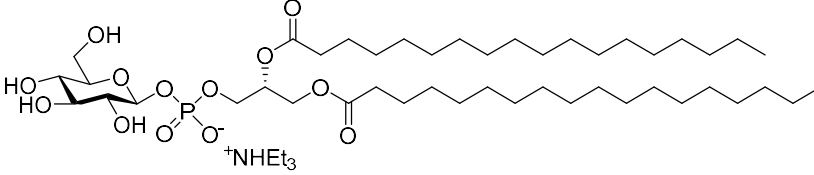
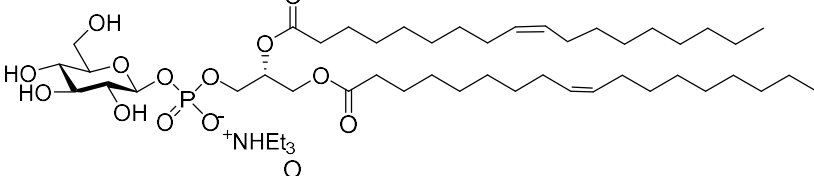
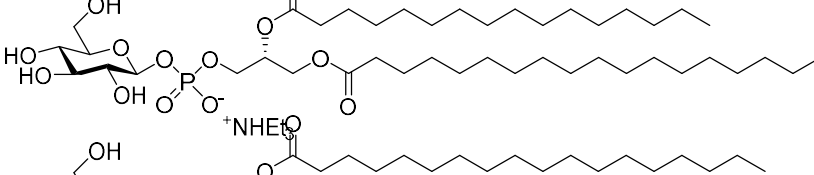
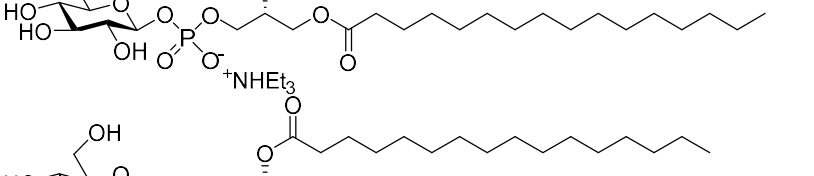
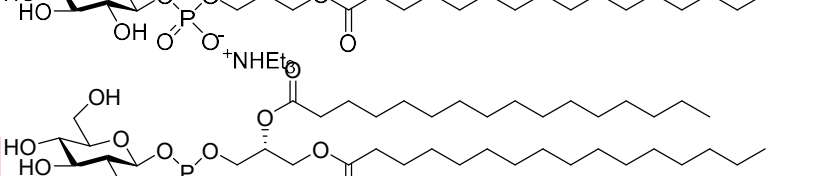

Entry ^a	Solvent (v/v) ^b	Yield (%) ^c	α/β ratio ^d
1	H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CN (1/5)	37	1/2
2	H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CN (1/2)	56	1/7
3	H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CN (1/1)	55	1/19
4	H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CN (2/1)	46	1/32
5	H ₂ O/CH ₃ CH ₂ CN (5/1)	35 ^e	1/68



All reactions were performed under the following conditions: sample concentration: 0.15 M glucose (3.6 μmol), 0.05 M phosphatidic acid: 3 (1.2 μmol), TEA (14.4 μmol), DMC (3.6 μmol); solvent (v/v); total volume: 24 μL ; reaction temperature: 4 $^\circ\text{C}$; reaction time: 1 h. ^b Indicated solvent ratio is volume/volume. ^c The reaction yield was calculated based on a standard curve of PtdGlc 4 via LC-MS analysis. ^d The α/β ratio was determined by SFC/QqMS. ^e Isolated yield.

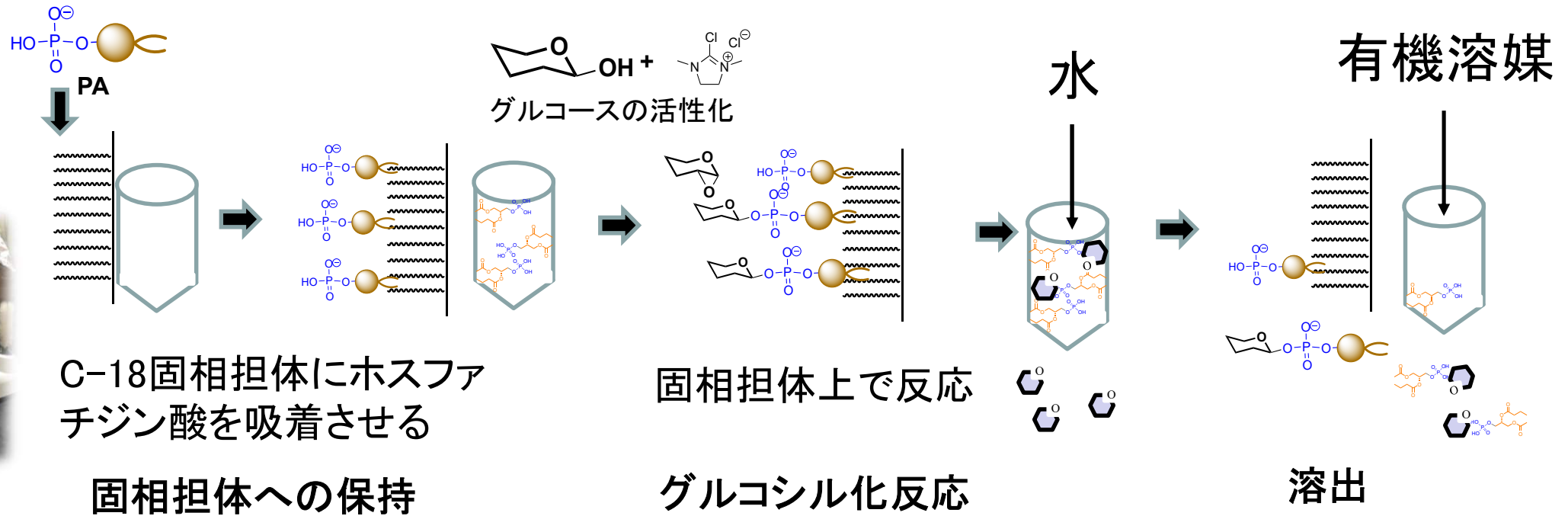
Reaction conditions: phosphatidic acid (6 μmol), D-glucose (3 equiv.), DMC (9 equiv.), and TEA (36 equiv.) in H₂O/CH₃CH₂CN (5:1, total volume: 90 μL) were allowed to react at 4 $^\circ\text{C}$. At each step, additional glucose (3 equiv.), DMC (9 equiv.), and TEA (18 equiv.) in H₂O/CH₃CH₂CN (5:1, total volume: 45 μL) solution were added.

アシル鎖長が異なるPtdGlcの合成

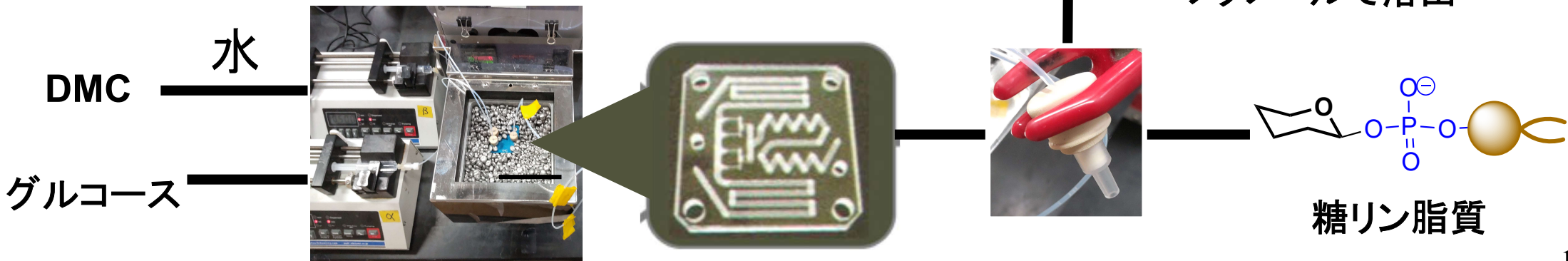
Entry	Phosphatidic acid	Product	yield (%)	α/β ratio
1	(18:0, 18:0-PA) TEA salt		32	1 / 54
2	(18:1, 18:1-PA) TEA salt		29	1 / 40
3	(18:0, 16:0-PA) TEA salt		28	1 / 48
4	(16:0, 18:0-PA) TEA salt		27	1 / 73
5	(16:0, 16:0-PA) TEA salt		31	1 / 50
6	(16:0, 16:0-PA) Na salt (市販のPA)		20	1 / 50

All reactions were performed under the following conditions: sample concentration: 0.15 M sugar (3.6 μ mol), 0.05 M phosphatidic acid (1.2 μ mol), TEA (14.4 μ mol), DMC (3.6 μ mol); solvent: H₂O/CH₃CH₂CN (1/5); total volume: 24 μ L; reaction temperature: 4 °C; reaction time: 1 h. ^b Isolated yield. ^c The content of α anomer was determined via ¹H-NMR analysis. Relative quantification errors were estimated as outlined in the supporting information. n.d., below limit of detection. ^d The sodium salt of the PA acceptor was used.

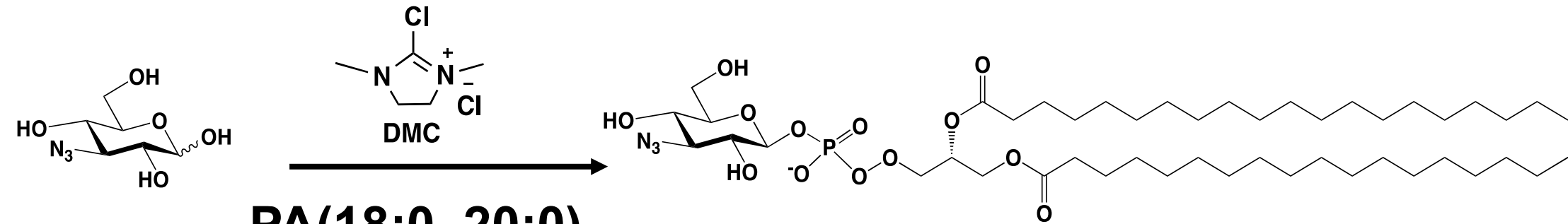
固相上でリン脂質に対する糖の導入が可能



マイクロフロー反応装置によるPtdGlcの合成



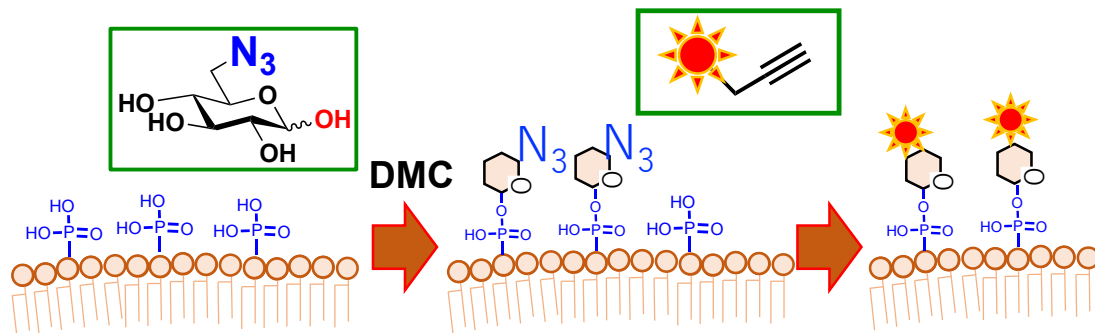
化学修飾したグルコースを用いても同様の反応が進行 (糖修飾リポソームへの展開)



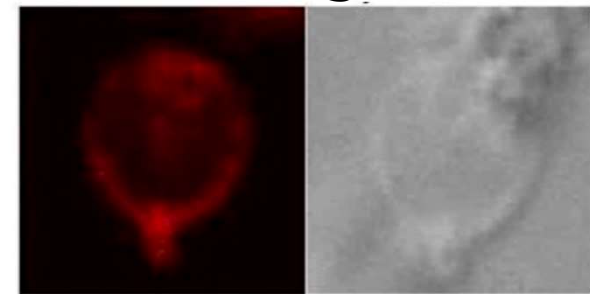
PA(18:0, 20:0)
CH₃CH₂CN/H₂O
(5/1)

1) DOPC/PtdN₃Glcを用いたリポソームを調製

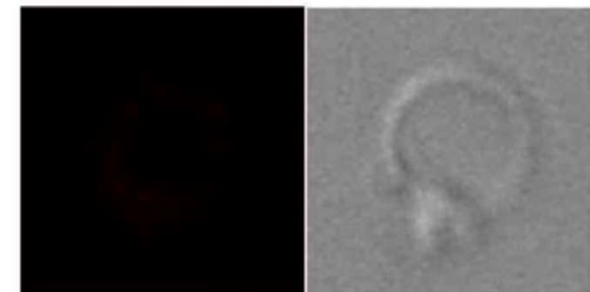
2) クリック反応の条件で蛍光標識



PtdN₃Glc



PtdGlc



5 μm

従来技術とその問題点

既に報告されている糖リン脂質の合成は合成工程が長く、精製に有機溶媒が必要など効率的ではなかった。

多段階反応に起因する煩雑さ

精製工程が必要で有機溶媒が必要等の問題があり、広く利用されるまでには至っていない。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、工程数を大幅に短縮することに成功した。
- 従来は各段階で精製が必要であったが固相反応を利用することで効率よく合成することが可能となった。
- 本技術の適用により、一段階の反応で糖リン脂質が合成できるため、コストも使用する有機溶媒も大幅に削減されることが期待される。

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、リン脂質の高機能化・高付加価値化
- 糖リン脂質を利用した高機能化リポソーム調製とDDSなど医療応用。
- 上記以外に、安定同位体標識糖リン脂質を合成することで、生体内の生理活性糖リン脂質の分布など生物化学研究試薬としての利用も期待される。

実用化に向けた課題

- 現在、100 mgスケールの反応でグルコースの導入が可能なことは確認済み。
- オリゴ糖の導入も確認しているが応用例が少ないので今後検討が必要である。
- 立体選択性を制御すると収率が低下する傾向にあるので、糖のグリコシドの立体異性体の混合物としても利用可能な材料に展開できるか検討が必要。

企業への期待

- リン脂質のリン酸基の化学修飾法とし、材料分野での利用を期待
- リン脂質の技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- 糖リン脂質の単離精製条件は確立しているが分取レベル（グラムスケール）で検討したことがないため量産化を期待。
- 糖リン脂質を医療応用や生体分析用の試薬としての開発の企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 糖リン脂質の製造方法、及び糖リン脂質
- 出願番号 : 特願2022-195299
- 出願人 : 群馬大学
- 発明者 : 松尾一郎、石井希実、狩野航輝

- 発明の名称 : 糖リン脂質の製造方法
- 出願番号 : 特願2023-122231
- 出願人 : 群馬大学
- 発明者 : 松尾一郎、石井希実、狩野航輝

お問い合わせ先

群馬大学
産学連携・知的財産活用センター

T E L : 0277-30-1171~1175

F A X : 0277-30-1178

e-mail : tlo@ml.gunma-u.ac.jp