

# 新規な構造を有するヒアルロン酸類似多糖の開発

東京工業大学生命理工学部

畑 中 研 一

Syntheses of analogous polysaccharides to hyaluronic acid were attempted in order to better understand the relationship between physical and biological properties and the chemical structure.

The polymerizable 1,6-anhydro-2,4-di-*O*-benzyl-3-*O*-1- (methoxycarbonyl) ethyl- $\beta$ -D-glucopyranose (1) was synthesized by selective benzylation at C-2 and C-4 of 1,6-anhydro- $\beta$ -D-glucopyranose, followed by 1- (methoxycarbonyl) ethylation with methyl 2-chloropropionate. Polymerization of 1 with phosphorus pentafluoride as initiator in methylene chloride at low temperature under high vacuum gave a stereoregular (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glucopyranan derivative. Copolymerization of 1 and tri-*O*-benzylated monomer gave copolysaccharides having various amounts of carboxylates. The calculated values of monomer reactivity ratios were 0.88 and 0.99 showing the distribution of each monomeric unit in the obtained copolymer was random. Hydrolysis of carboxylate groups was achieved by the reaction with potassium *tert*-butoxide, giving the stereoregular polysaccharide containing the carboxylic acid. However, debenylation of the polysaccharide was unsuccessful.

## 1 緒 言

生理活性を有する機能性多糖の開発は最近の重要な課題であり、生体の応答性と密着した解析が必要である。しかしながら現在、機能性多糖の合成法も未熟であり、生体との相互作用のメカニズムも未開発である。本研究では、機能性多糖設計による生体応答制御のモデル系として、ヒアルロン酸類似多糖を化学合成し、皮膚との相互作用について調べる。

ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸との交互共重合体構造を有するヘテロ多糖であるが、細胞間隙に水を保持するのに役立つ、皮膚の潤滑性や柔軟性を保っていると考えられている。皮下組織のヒアルロン酸が少なくなってくると、皮膚にみずみずしさがなくなり、しわがよってくる。

本研究では、ヒアルロン酸のどのような化学構造が保水性や細胞との相互作用に関わっているのか（ヒアルロン酸様の生理活性を発現するためにはどのような化学構造が最低限必要なのか）を詳細に調べるため、アミノ基を有する糖とカルボキシル基を有する糖の共重合体を化学合成する。化学合成であるが故に、多糖ポリマー鎖上における官能基の位置や分布を自由に变化させることができるため、構造と機能の相関が（天然物と比べて）より明確にわかると思われる。

ヒアルロン酸ナトリウムとして販売されている粉末の市販品は、その水溶液の粘度や保湿性が分子量によって異なることがわかっている。また、ヒアルロン酸ナトリウムの保湿性は、周囲の環境（相対湿度）の影響を受けにくいのが特徴であることが赤坂日出道氏らにより報告された<sup>1,2)</sup>。しかしながら、ヒアルロン酸の化学構造や高次構造が保湿性に対してどのように影響するのかを調べた報告はない。また、ヒアルロン酸類似の糖鎖化合物を化学合成しようとする試みもなされていない。

糖質工学において、天然多糖の化学修飾は古くから行われてきたが、精密構造を制御するまでには至っていない。一方、無水糖誘導体の開環重合

Syntheses of New Analogous Polysaccharides to Hyaluronic Acid



Kenichi Hatanaka

Faculty of Bioscience and  
Biotechnology  
Tokyo Institute of Technology

やオルトエステルグリコシル化法といった優秀な多糖合成法が開発されて以来、官能基を有する多糖合成は比較的容易に行われるようになった。無水糖誘導体のうちでは、1,6-無水糖の重合が最もよく研究されていて、精密構造を有する機能性多糖合成の土台となっている。

本研究では、開環重合反応に及ぼす影響の小さいC-3位に乳酸エステル基を導入し、多糖鎖を構築することによって、ヒアルロン酸類似多糖を開発することを目的としている。

## 2 実験

### 2.1 モノマー合成

現在までに開環重合法によって合成された多糖の種類はかなりの数に上る。様々な糖残基の種類や結合様式のものはもちろん、水酸基を選択的に保護することで種々の置換基を位置特異的に導入することも多く行われてきた<sup>3)</sup>。本研究の目的は、モノマーユニットにあらかじめカルボキシル基を保護した状態で導入し重合および共重合すること

で、位置特異的にカルボキシル基を持つ立体規則性多糖を合成することであるため、ここではD-グルコースを出発原料として、モノマーの合成を行った。1,6-β-無水環構造を持たせたのは、重合反応における立体規則性の制御が容易であるとともに、他の結合様式に較べて高い分子量のポリマーが得られることが予想されるからである。すなわち1,6-無水糖の重合は完全に1,6-開裂であり、反応を低温で行うとオキシニウムイオン機構で進行し、立体反転を伴ってα-結合のポリマーを与える。つまり、(1→6)-α-結合の立体規則性多糖誘導体が得られるのである<sup>4)</sup>。また、無水グルコースの3位に置換基を導入した背景には、重合において3位の保護基の影響が最も小さいことが知られているとともに、1,6-無水グルコースの2位と4位を簡単に選択的保護することができるという事実がある<sup>1)</sup>。無水糖の重合における保護基にはエーテル系保護基であるベンジル基が良好なものとして知られているため、ここでも同じ保護基を用いた。ベンジル基は液体アンモニア中ナトリウムによる還元(Birch還元)で、短時間で

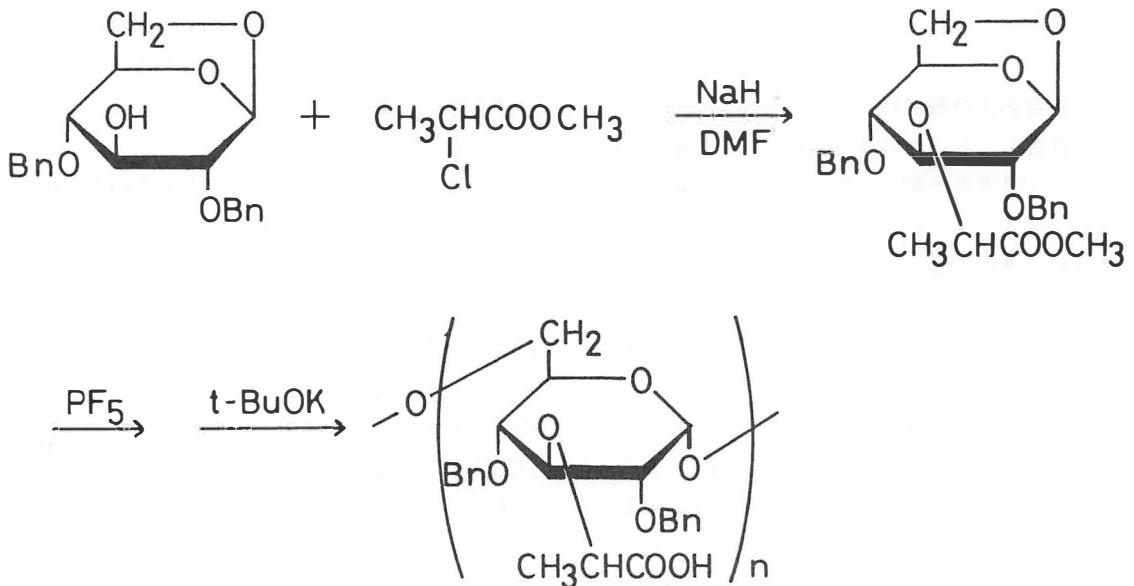


Fig. 1. Synthesis and polymerization of 1,6-anhydro-2,4-di-O-benzyl-3-O-1-(methoxycarbonyl) ethyl-β-D-glucopyranose and hydrolysis of the obtained polymer.

定量的に脱保護することができる<sup>5, 6)</sup>。

1, 6-無水グルコースの合成は、かつてはデンプンや微結晶セルロースの真空熱分解によって行われていた<sup>7)</sup>が、1984年にFraser-Reidが、6位トシル化後アルカリによって閉環させる方法<sup>8)</sup>を開発し、1989年に大量合成法が確立されたので、ここでもそれに従うこととした。この方法の利点としては、遊離のD-グルコースを原料として極めて安価な試薬で合成できること、また容易にスケールアップできることなどが挙げられる。カルボキシル基(メチルエステルで保護)の導入は、オーソドックスなエーテル合成法により行った。天然のムラミン酸にヒントを得た1-(メトキシカルボニル)エチル基<sup>10)</sup>を導入した(Fig. 1)。水酸化ナトリウム6.0gをn-ヘキサンで洗浄して、窒素気流下、ジメチルホルムアミド(乾燥、蒸留したもの)100mlに加え、しばらく懸濁させた後、2, 4-ジベンジル化1, 6-無水グルコース12.0gを加え、2時間激しく攪拌した。その後、2-クロロプロピオン酸メチル6.0mlを滴下し、3時間反応させた。反応停止はメタノール添加によって行い、常法に従って後処理した後、シリカゲルカラム(酢酸エチル:n-ヘキサン=1:4)により精製を行った。

## 2. 2 重合および脱保護

予め作製しておいた溶媒管を用いて、Fig. 2のような重合装置を作製し、真空ラインに接続した。ピンホールチェック、二回の加熱乾燥の後、窒素気流下にてAを切断してモノマー化合物を導入、同じくBを切断して開始剤前駆体( $\rho$ -クロロベンゼンジアゾニウムヘキサフルオロホスファート)を導入し、それぞれ融封した。

一晩高真空下で乾燥してから真空ラインのコックを閉じ、Cのブレイカブルシールを割って重合管を液体窒素で冷却、塩化メチレンを真空蒸留してモノマーを溶解させた。溶液を均一にしてから1時間室温のまま放置、Cのアンプルを液体窒素で冷却して塩化メチレンをもとのアンプルに戻し、凍結させた状態で真空につなぎ、Dのしぼり部を融封した。(この操作はモノマー中に微量に含

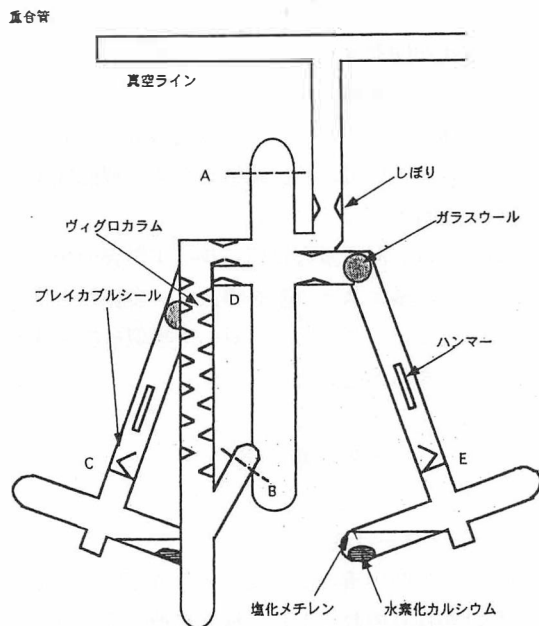


Fig. 2. Polymerization apparatus.

まれる水などの不純物を除去するために行った。)

次にEのブレイカブルシールを割って重合管を冷却し、重合溶媒となる塩化メチレンを導入してEを切り離した。溶液を均一にしてから液体窒素で凍らせ、弱火で開始剤前駆体を熱分解させて、生じた五フッ化リンを重合管内に蒸着させた後、触媒管を切り離して脱気しながら重合管を真空ラインから切り離した。

所定重合温度に設定したエタノール恒温槽内で重合管を10分間激しく振とうし、重合反応を開始した。一定時間後、重合反応の停止は、重合管の一部を切断してメタノールを添加することで行った(この際ポリマーが生成していれば、白沈を生じる)。この溶液をクロロホルムに溶かし、10%炭酸水素ナトリウム水溶液で中和、脱イオン水で三回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムによる乾燥、ろ過を行い、減圧濃縮した。ポリマーをクロロホルム/メタノール系で再沈精製し、ベンゼン溶液にして凍結乾燥を行った。

多糖ポリマー鎖におけるカルボキシル基の脱保護は、水を含むTHF中のカリウム $\tau$ -ブトキシドにより行った。また、液体アンモニア中のナトリウ

ム金属により脱ベンジル化を試みた。

### 3 結果と考察

#### 3.1 モノマー合成

D-グルコースを出発物質とする2,4-ジベンジル体の合成は、酸化バリウムを作用させて得る既知の方法<sup>11)</sup>に従って行った。この化合物の3位に種々の置換基を導入してカチオン開環重合性を検討した例は多く、様々な応用目的のもとに合成されている。本研究ではまず、カルボキシル基を持たせることを目的に、メトキシカルボニルメチル基の導入を、オーソドックスなエーテル合成法により試みた。反応溶媒にはジメチルホルムアミドおよびジオキサソラン、反応試薬にはクロロ酢酸メチルおよびブロモ酢酸メチルを検討するとともに、反応条件として温度、濃度などを検討した。しかし20回にも及ぶ予備試験を行ったものなかなか収率の向上がみられず、むしろ全く反応しなかったり精製困難な多くの生成物を与えたりということの方が多かった。最終的にジメチルホルムアミド溶媒中でブロモ酢酸メチルを60°Cで長時間反応させるという手段をとり、なんとか収率を30%以上にすることができたが、これも再現性は低かった。

そこで、30%という低収率を改善すべく、次に反応試薬を2-クロロプロピオン酸メチルに変え、ジメチルホルムアミド溶媒中室温にて同様の反応を行った。これはすなわち一級ハロゲン化試薬か

ら二級ハロゲン化試薬に変えたことになるのであるが、結果として反応速度が著しく増大し、室温にて二時間後にはほとんど反応が終了した。この反応に関して、以前、我々は光学活性な2-クロロプロピオン酸を反応させた場合にラセミ化を伴って反応が進行することを観察し、化合物5の生成反応がSN1機構で進んでいることを証明した<sup>10)</sup>。一般の有機化学の教科書で述べられている通り、ハロゲン化アルキルのSN1反応における反応性は第三級>第二級>第一級の順である。これはカルボカチオンの陽電荷を非局在化させる程度によっている。これを考慮すると、上記の反応はいずれもSN1機構をとる傾向にあり、カルボカチオンの安定性の差が実際の反応速度および収率に反映したと考えることができる。過去にメチル2-アセトアミド-4,6-O-ベンジリデン-2-デオキシ- $\alpha$ -D-グルコピラノシドの3位にクロロ酢酸<sup>12)</sup>およびDL-2-クロロプロピオン酸<sup>13)</sup>を反応させた例が報告されているが、単純に比較はできないもののこの場合も二級試薬のほうがはるかに収率が高くなっている。今回ラセミ体の二級試薬を用いた合成でも収率は高く、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルのアノメリックプロトンから判断すると、生成物はジアステレオマー1:1の混合物であった。

#### 3.2 重合、共重合および脱保護

1,6-アンヒドロ-2,4-ジ-O-ベンジル-3-O-1-(メトキシカルボニル)エチル- $\beta$ -D-グルコピラノ

Table 1. Polymerization of 1,6-anhydro-2,4-di-O-benzyl-3-O-1-(methoxycarbonyl) ethyl- $\beta$ -D-glucopyranose (1)<sup>a</sup>

No.	Initiator (mol%)	Temp. (°C)	Time (h)	Yield (%)	M <sub>n</sub> <sup>b</sup> (x10 <sup>4</sup> )
1	5	-60	12	70	28.7
2	15	-60	24	46	9.8
3	10	0	24	53	-

a. Monomer concentration in dichloromethane: 0.26-0.50 g/mL; initiator: PF<sub>5</sub>.

b. Determined by GPC.

ースの単独重合性については既に調べられているので、まず既報<sup>10)</sup>の結果を示す。五フッ化リンを開始剤として重合を行うことにより、高収率(61.9~63.7%)で高重合度(最高で平均重合度400程度)の多糖誘導体が得られている。得られた多糖誘導体の立体規則性は、<sup>13</sup>C-NMRおよび比旋光度から $\alpha$ -コンフィギュレーションの単一構造であると結論されている。本研究でもこのカルボキシルモノマーの単独重合を行い、Table 1に示すような結果を得た。前例よりも重合時間を短くすると、数平均分子量28.7万という高分子量ポリマーを得ることができた。これは、重合時間が長くなると残存触媒によりポリマー主鎖が切断されるということを示していると思われる。大量にモノマーを仕込んだ重合の収率および得られたポリマーの分子量低下は、モノマー仕込み濃度が低かったこと、および開始剤の量が多かったことが原因であると考えられる。ここで、低温における重合で得られたポリマーの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルにおいてアノメリック炭素(C-1)が97.4ppmのみに単一のピークを与えていること、またIRスペクトルにおいて844cm<sup>-1</sup>に $\alpha$ -コンフィ

ギュレーションに相当(エクアトリアルC1-Hの変角振動に由来)するピークが認められることから、得られた多糖誘導体は、 $\alpha$ -グリコシド結合から成る立体規則性多糖誘導体、2,4-ジ-O-ベンジル-3-O-1-(メトキシカルボニル)エチル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラナンであると結論した。

次に、多糖鎖中のカルボキシル基含量が物性に及ぼす影響を調べることを目的として、カルボキシル基含量の異なる種々のポリマーを共重合によって合成した。カルボキシル基を有するモノマーとトリベンジル化1,6-無水グルコースとの共重合結果をTable 2に示す。重合時間を短く、収率を低く抑えてあるのは、モノマーの反応性を調べるためである。仕込みモノマー比を変化させることによって、カルボキシル基含量が14~100%の共重合体を得た。Kelen-Tudös法により求めたモノマー反応性比は、0.88と0.99であり、共重合体中の各モノマーユニットは、ほぼランダムに分布していると言える。

さらに、カルボキシル基を有する多糖誘導体の脱保護を試みた。カリウムペーブトキシドで処理したポリマーの<sup>1</sup>H-NMRスペクトル中には、メチ

Table 2. Copolymerization of 1,6-anhydro-2,4-di-O-benzyl-3-O-1-(methoxycarbonyl)ethyl- $\beta$ -D-glucopyranose (1) with 1,6-anhydro-2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranose (2)<sup>a</sup>

No.	Mole fraction of 1 in feed (%)	Yield (%)	Mole fraction of 1 in copolymer <sup>b</sup> (%)
1	0	68.0	0.0
2	10	3.2	14.5
3	20	3.8	23.2
4	30	7.0	33.3
5	40	18.5	37.8
6	50	13.9	48.8
7	60	12.0	59.0
8	70	6.6	70.4
9	80	9.0	75.3
10	90	8.2	89.7
11	100	11.4	100.0

a. Total monomers, 1.17 mmol; initiator: PF<sub>5</sub>, 5 mol%; solvent: dichloromethane, 1 mL; temperature, -60 °C; time: 1-9 min.

b. Determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy.

ルエステルに帰属されるメチルプロトンの吸収が消失し、エステルの加水分解が完全に起こっていることを示した。カリウム塩とした多糖は、モノマーユニット当たり2個のベンジル基を有しているにもかかわらず水溶性で、有機溶媒には不溶であった。

バーチ還元による脱ベンジル化は、現在までのところ成功していない。前記のようにエステル加水分解生成物が水にしか溶解しないため、適当な反応溶媒がなく、不均一系となってしまうためである。また、エステル加水分解前のポリマーは有機溶媒可溶であるが、還元反応中にエステル基がアルコールにまで還元されてしまったのである。現在、接触水添による脱ベンジル化について検討中である。

### 3.3 アミノ基前駆体を有するモノマーとの共重合

前述のように、ヒアルロン酸にはグルコサミン残基が含まれている。ウロン酸ユニットとアミノ糖ユニットとの交互共重合体であることから、事実上50%のアミノ糖含有率ということになる。今までに行われたグリコサミノグリカンの構造活性相関に関する研究はすべて交互共重合体であることを前提として話を進めているので、アミノ基およびアセトアミド基の活性に対する存在的必然性は、これまでほとんど議論されたことがなかった。そこで各官能基の存在量比が活性にどれだけ影響するかを調べる場合、カルボキシル基のユニットとアミノ基のユニットとの相対含量を変化させたサンプルが必要となる。そのような多糖サンプルは、現在のところ開環重合法でしか得ることができないと考えてよい。

本研究では2位にアミノ基前駆体を導入した重合性モノマーと前述のカルボキシルモノマーとの共重合によって、合成多糖鎖中にアミノ基を有するユニットとカルボキシル基を有するユニットを同時に持たせることに挑戦した。

2位にアミノ基前駆体であるフタルイミド基が導入されたモノマーは、単独重合において置換基

のかさ高さ(立体障害)によって $\beta$ -グリコシド結合からなるオリゴ糖誘導体(平均重合度5~7)を与えることがわかっている。このフタルイミド基はヒドラジン-水和物を用いて容易にアミノ基に変換することができる<sup>14)</sup>。

予備的な実験では、アミノ基を有するユニットとカルボキシル基を有するユニットがほぼ1:1の割合でランダムに存在するコポリマーを得ることができた。詳しい構造については現在検討中である。

## 4 総括

1,6-無水糖誘導体の開環重合および共重合によって、カルボキシル基を種々の割合で持つ多糖を、かなり自在に設計して合成できるようになった。しかしながら、脱保護がうまくいっていないため、当初の予定であった保湿性と化学構造の相関を調べるまでには至っていない。今後、脱ベンジル化の方法を確立しなければならない。あるいは、ベンジル基以外の保護基を検討する必要があるのかもしれない。一方で、アミノ糖前駆体モノマーとの共重合が成功したことにより、ヒアルロン酸類似多糖の合成は期待できると考えられる。

## 参考文献

- 1) 赤坂日出道、瀬戸進、柳光男、福島正二、光井武夫、日本化粧品技術者会誌、22 35(1988)
- 2) 赤坂日出道、山口敏二郎、フレグランスジャーナル、14 42(1986)
- 3) 瓜生敏之、畑中研一、有機合成化学協会誌、42 557 (1984)
- 4) N. K. Kochetkov, *Tetrahedron.*, 43 2389 (1987)
- 5) T. Uryu, *Prog. Polym. Sci.*, 18 717 (1993)
- 6) E. R. Ruckel and C. Schuerch, *Biopolymers.*, 5 515 (1967)
- 7) 瓜生敏之、畑中研一、阪本吉弘、針間一成、萩野新、伊藤克博、船本明士、松崎啓、日本化学会誌、10 1638 (1982)

- 8) M. Georges and B. Fraser-Reid, *Carbohydr. Res.*, 127 162 (1984)
- 9) M. A. Zottola, R. Alonso, G. D. Vite, and B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.*, 54 6123 (1989)
- 10) K. Hatanaka, T. Uryu, S. Miyahara, and H. Kuzuhara, *J. Med. Chem.*, 30 810 (1987)
- 11) T. Iversen and D. R. Bundle, *Can. J. Chem.*, 60 299 (1982)
- 12) T. Miyazaki and Y. Matsushima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 41 2723 (1968)
- 13) R. W. Jeanloz, E. Walker, and P. Sinay, *Carbohydr. Res.*, 6 184 (1968)
- 14) K. -I. Kanno, Y. Kobayashi, S. -I. Nishimura, H. Kuzuhara, and K. Hatanaka, *J. Carbohydr. Chem.*, in press.