

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19300168

研究課題名（和文） フルオラス相互作用を用いる機能性糖鎖デバイスの構築

研究課題名（英文） Development of functional glyco-devices using fluoruous interaction

研究代表者

畑中 研一（HATANAKA KENICHI）

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：70167584

研究成果の概要（和文）：フルオロアルキル鎖を有する糖鎖化合物を合成し、細胞を用いて効率的に糖鎖伸長させた後にフッ素材料に固定化し、インフルエンザウイルスによる認識を検討した。ウイルスによる認識にはオリゴエチレンオキシドのスペーサーが必要であることを見出し、スペーサーを有するフッ素化オリゴ糖を細胞によって合成し、固定化した糖鎖にインフルエンザウイルスが選択的に吸着することを確認した。

研究成果の概要（英文）：Glyco-compound having fluoroalkyl chain was synthesized and its carbohydrate chain was elongated using cells. The oligosaccharide having fluoroalkyl chain was immobilized on the fluoro-material and the immobilized material was tested for the absorption of influenza virus. It was found that the ethylene oxide oligomer was necessary as a spacer for recognition of influenza virus. It was confirmed that the immobilized oligosaccharide compound having oligo(ethylene oxide) spacer was specifically recognized by influenza virus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：生命工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：糖鎖、糖鎖生産、医用材料、細胞、フルオラス、糖鎖認識

1. 研究開始当初の背景

(1)フルオラステクノロジーは、フルオラス化合物（フッ素を複数個有する化合物）同士の親和性を利用して分離・分析を行うことを基盤としている。勿論、多数のフッ素原子の電子吸引性を利用した超強酸としての利用も価値が高いが、フルオラス化合物同士の親和性による分離・精製技術の利用価値は高い。1994年、T. Horvathらが、オレフィンのハイドロフォルミル化を行う際にフルオラス

触媒を用い、フルオラス触媒を溶解するパーフルオロカーボンが有機溶媒とも水とも混合しないことを利用して触媒の分離精製を容易にした（Horvath and Rabai, Science, 266, 72, 1994.）。これが、フルオラステクノロジーの始まりである。1997年には、D. P. Curranらが「フルオラスタグ」という概念を導入して（Curran, Hadida, He, J. Org. Chem., 62, 6714, 1997.）、フルオラスシリカゲルなどを用いての分離精製を行うことにより、

有機合成化学に新しい分野を開いた。日本におけるフルオラステクノロジーの集約は、2002-2004年度に(財)野口研究所により『野口フルオラスプロジェクト』として立ち上げられ、合計3回の公開シンポジウム(国内)が行われた。さらに、プロジェクトに参加した研究者が中心となって2005-2007年度には期間限定でフルオラス研究会が立ち上がっている。国際的には、主にヨーロッパ・アメリカに日本を加えたフルオラス研究者の研究機構が組織され、2003年7月にはフランスのボルドーで第1回フルオラステクノロジー国際シンポジウムが開催された。また、第2回フルオラステクノロジー国際シンポジウムが2007年7月に横浜で開催された。水層、フルオラス層、有機層の三層が分離している系では、まず水分子が水素結合によって集合し、次にフルオラス分子が双極子同士の相互作用で集合し、どちらにも入れない疎水性分子が集合している、と考えられる。ここで注目すべきは、フルオラス相互作用が水素結合と疎水性相互作用(仮想的な力)との中間の強さであるということである。即ち、フルオラス相互作用は、疎水性の有機分子の層に対しては主体性を持って働き、水層に対しては受け身に働く。このことは、フルオラス相互作用を用いて分離・分析を行う際のフルオラス化合物の設計に大きく寄与するものであると考えられる。

(2)我々は「糖鎖プライマー法」と呼ばれる細胞を用いたユニークな糖鎖合成に着手している。アルキルグリコシドと呼ばれる一連の化合物を細胞培養系の培地に添加すると、細胞内に取り込まれ、酵素によって糖鎖伸長が行われた後、培地中に放出される。この方法は、化学合成法のような複雑で多段階の反応を経由することもなく、酵素合成法に必要な糖転移酵素の単離・精製や(基質となる)糖ヌクレオチドの調製といった工程もないため、簡便で安価なオリゴ糖鎖の合成方法とすることができる。また、化学合成法のように多量の有機溶媒を必要としないため、環境に優しい合成法とも言えよう。オリゴ糖合成の原料となるアルキルグリコシドは細胞の酵素によって糖鎖伸長を受けるので、「糖鎖プライマー」と呼ばれる。糖鎖プライマーの種類を変えれば、得られるオリゴ糖鎖の構造を変化させることが可能であるが、糖鎖合成に用いる細胞の種類を変えても得られるオリゴ糖鎖が異なる。しかも、得られるオリゴ糖鎖は全て天然に存在するオリゴ糖(或いは、その一部)であるため、細胞を用いたオリゴ糖鎖の合成法は「バイオコンビナトリアル合成」と言うことができる。例えば、ドデシル(C12)ラクトシドを糖鎖プライマーとして用いるとき、B16細胞ではシアリル化された三糖が主に得られるのに対して、MDCK細胞で

は、シアリル化された三糖の他に、三糖がN-アセチルグルコサミン化された四糖、さらにガラクトシル化された五糖の混合物が生成物として得られる。さらに、この方法の特徴は、(糖転移酵素の基質特異性が及び難い)アグリコン部分(糖鎖以外の部分、この場合には長鎖アルキル部分)に生体不活性の官能基を導入できることである。例えば、アジド基を導入した糖鎖プライマーを細胞培養系の培地に加えると、糖鎖伸長後の生成物にもアジド基が存在し、化学的に還元することによってアミノ基に変換することが可能である。このアミノ基を使って、糖鎖ポリマーを合成することができる。フッ素原子もまた生体不活性である(細胞内で反応しない)ため、アグリコン中にフッ素原子を導入した糖鎖プライマーを合成して、細胞内糖鎖伸長反応に用いることができる。

2. 研究の目的

本研究では、フルオラスタグを有する糖鎖プライマーの細胞による糖鎖伸長について詳細に検討することを目的とする。また、培地中に得られる糖鎖伸長化合物のアグリコン中に導入した複数のフッ素原子を利用してフルオラス材料に固定化し、糖鎖に特異的に結合するタンパク質(毒素、ウイルスなど)を認識して除去する医用デバイスを構築することを目的とする。具体的には次に示す通りである。

(1)糖鎖伸長に最適なフルオラス基を模索する。具体的には、糖鎖生産に最適とされるドデシル基のうち、炭素4個分、6個分、8個分、10個分の水素原子をフッ素で置換したプライマーを合成し、種々の細胞培養系に添加することによって、糖鎖伸長に最適なフルオラスタグを決定する。

(2)細胞が生産した糖鎖、あるいは化学合成した糖鎖(フルオラスタグが付いているもの)の固定化を試み、固定化に最適な構造および固定化の反応条件を詳細に検討する。

(3)毒素やウイルスを対象として、糖鎖との特異的な相互作用を介する除去デバイスを構築する。

3. 研究の方法

(1)フッ素原子を有する糖鎖プライマー(フルオラスプライマー)の合成:フッ素を含む長鎖アルコールとしては、パーフルオロヘキシルヘキサノール(ドデカノールの外側半分の水素をフッ素で置換した化合物、C6F13C6H12OH)やパーフルオロデシルエタノール(ドデカノールの外側の炭素10個分の水素をフッ素で置換した化合物、C10F21C2H40H)などを用いる。フッ素を含む長鎖アルコールをアセチル化糖でグリコシル化し、生成物のアセチル基を外す。ラクト

ース (β (1 \rightarrow 4) 結合したガラクトシルグルコース) をアセチル化し、ルイス酸である三フッ化ホウ素エーテル錯体を触媒としてパーフルオロヘキシルヘキサノール

(C6F13C6H12OH) またはパーフルオロデシルエタノール (C10F21C2H40H) をグリコシル化することによってプライマー前駆体が得られる。この前駆体のアセチル基を外すとフッ素を含むプライマーが得られる。

(2) フルオラスプライマーへの糖鎖伸長反応：パーフルオロヘキシルヘキサノール

(C6F13C6H12OH) およびパーフルオロデシルエタノール (C10F21C2H40H) とラクトースから合成される (β グリコシド結合した) 糖鎖プライマーを用いて、B16 メラノーマ細胞に対する細胞毒性、糖鎖プライマーの細胞内取り込み、糖鎖伸長反応などについて調べる。培地中にフルオラスプライマーが存在するときの B16 メラノーマ細胞の様子を調べる。各フルオラスプライマーの細胞毒性について詳細に調べ、細胞毒性の原因として、細胞膜との相互作用などを物理化学的な立場から検討する。次に、フッ素を含む糖鎖プライマーの細胞膜透過性について細胞画分から得られる脂質の HPTLC により調べる。さらに、培地画分の糖脂質成分の HPTLC 解析により、糖鎖合成に対するフルオラス基の影響を調べる。

(3) フルオラスタグを有するグリコシドのフルオラス材料への固定化：ダイキン化成製品販売株式会社のポリフロンペーパー (テトラフルオロエチレン樹脂製) あるいはその他のテフロン材料へフルオラスタグ付きオリゴ糖を固定化する。固定化の溶媒、固定化の濃度、洗浄溶媒の種類について詳細に検討し、糖鎖の固定化量を測定する。固定化量の測定には、酵素標識あるいは蛍光標識レクチンなどを用いる。

(4) フルオラスタグを有するグリコシドを固定化したデバイスによる毒素やウイルスの吸着：オリゴ糖鎖を固定化した新規デバイスを用いてインフルエンザウイルスの吸着を試験する。インフルエンザウイルスに結合することが分かっている GM3 を細胞により合成し、フルオラス基を用いて固定化した材料表面へのインフルエンザウイルスの吸着を観察する。吸着量の検討は、蛍光標識したヘマグルチニン抗体を用いて行う。

4. 研究成果

(1) フッ素原子を有する糖鎖プライマー (フルオラスプライマー) の合成：フッ素を含む長鎖アルコールとしては、パーフルオロヘキシルヘキサノールやパーフルオロデシルエタノール、パーフルオロオクチルブタノール、パーフルオロオクチルプロパノール、パーフルオロオクチルエタノールを用いて、オクタ

アセチルラクトースとのグリコシル化によりフッ素を含む糖鎖プライマーを合成した。これらの含フッ素アルコールに細胞膜の疎水性部分と親和性があることが細胞膜を通過する際の必須条件となるが、水溶液中では、フルオラス化合物と疎水性化合物は水の水素結合ネットワークから逃れ、集合する傾向にある。フルオラス層を形成しないような条件にすれば、フッ素を含む糖鎖プライマーは細胞膜に突き刺さっていくと考えられる。フルオラス層を形成しないような条件とは、フッ素化合物が集合していない状態のことを指すのであるから、この場合には、フッ素を含む糖鎖プライマーが培地に溶解していて、しかもミセルを形成しない濃度 (臨界ミセル濃度以下) であればよいことになる。本研究では、フッ素を含む糖鎖プライマーの臨界ミセル濃度を測定した。その結果、フッ素を含む糖鎖プライマーの臨界ミセル濃度は $1.0 \sim 2.0 \mu\text{M}$ であり、細胞に投与する濃度ではミセル形成が起こっていると考えられる。但し、系中には単量体も存在するため、この単量体が細胞膜に突き刺さっていくと考えられる。このことを裏付けるため、フッ素を含む糖鎖プライマーとフッ素を含まない糖鎖プライマーとの混合物の水溶液の表面張力を測定することにより、フッ素を含む糖鎖プライマーが細胞膜と親和性があることを見出した。その結果、フルオロメチレン基の疎水性はメチレン基の約 1.5 倍程度であることを発見した。

(2) フルオラスプライマーへの糖鎖伸長反応：パーフルオロヘキシルヘキサノール

(C6F13C6H12OH) およびパーフルオロデシルエタノール (C10F21C2H40H) とグルコース、ガラクトース、ラクトースから合成される (β グリコシド結合した) 6 種類の糖鎖プライマーを用いて、B16 メラノーマ細胞に対する細胞毒性、糖鎖プライマーの細胞内取り込み、糖鎖伸長反応などについて調べた。また、各フルオラスプライマーの細胞毒性について詳細に調べ、細胞毒性の原因として、細胞膜との相互作用などを物理化学的な立場から検討した。

(3) フルオラスタグを有するグリコシドのフルオラス材料への固定化：市販のフッ素化材料へのフルオラスタグ付きオリゴ糖の固定化を行った。

(4) フルオラスタグを有するグリコシドを固定化したデバイスによる毒素やウイルスの吸着：フルオラス基質への非特異的な吸着を抑えるため、また、糖鎖とタンパク質との相互作用の場を作るために、フルオロアルキル鎖と糖鎖の間にポリエチレングリコールオリゴマーのスペーサーを導入した糖鎖プライマーを合成した。アセチル化ラクトースのイミデート体と 3-(パーフルオロオクチ

ル)プロピル PEGPEGOH (或いは、3-(パーフルオロオクチル)プロピル PEGPEGPEGPEGOH)を用い、三フッ化ホウ素エーテル錯体を触媒としてグリコシル化反応を行った。反応終了後、シリカゲルクロマトグラフィーによる精製により得られたアセチル保護体を、ナトリウムメトキシドを用いて脱保護し、PEG のダイマーおよびペンタマーをスペーサーとするフルオラス糖鎖プライマーを得た。これらのフルオラス糖鎖プライマーを B16 メラノーマ細胞や BHK-21(C-13)細胞の培地中に投与することによって、シアル酸が転移したフルオラス糖鎖化合物が得られた。得られた Sia α 2 \rightarrow 3Lac-0-PEG2-C3H6-C8F17 を用い、レクチンやインフルエンザウイルスの相互作用評価をドットプロット法で行った。レクチンによる相互作用評価の実験方法を以下に示す。Sia α 2 \rightarrow 3Lac-0-PEG2-C3H6-C8F17 (in MeOH/PBS =1/9, 0.8 mM)、Lac-0-PEG2-C3H6-C8F17 (in MeOH, 0.1 mM)、PEG2-C3H6-C8F17 (in MeOH, 0.1 mM)、の 3 種類の溶液をそれぞれ 5mL ずつ、ポリテトラフルオロエチレンフィルター (ダイキン製) 上へのせ、乾燥した後、BSA (牛血清アルブミン) でブロッキングをし、(GM3 を認識する) MAM レクチンと作用させ検出を行った。この時、Sia α 2 \rightarrow 3Lac-0-PEG2-C3H6-C8F17 のみが選択的に認識した。一方、インフルエンザウイルスを用いる相互作用評価の実験では、Sia α 2 \rightarrow 3Lac-0-PEG2-C3H6-C8F17 (in MeOH, 0.20 mM, 0.05 mM)、Lac-0-PEG2-C3H6-C8F17 (in MeOH, 0.20 mM, 0.05 mM) の 4 種類の溶液を、レクチンの相互評価実験と同様、ポリテトラフルオロエチレンフィルター上に固定化、ブロッキングをし、インフルエンザウイルス A/duck/Pennsylvania /10218/84 と作用させ、検出を行った。この時、Sia α 2 \rightarrow 3Lac-0-PEG2-C3H6-C8F17 のみに選択的なウイルス吸着が検出された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① M. C. Kasuya, S. Nakano, R. Katayama, and K. Hatanaka, Evaluation of the Hydrophobicity of Perfluoroalkyl Chains in Amphiphilic Compounds That Are Incorporated into Cell Membrane, *J. Fluorine Chem.*, 査読有, Vol.132, 2011, pp202-206.
- ② M. C. Kasuya, M. Tojino, M. Mizuno, and K. Hatanaka, Fluorous Tag for the Simultaneous Synthesis of Different Kinds of Glycolipids, *J. Fluorine Chem.*, 査読有, Vol.131, 2010, pp655-659.

- ③ M. C. Z. Kasuya, M. Tojino, S. Nakano, M. Mizuno, and K. Hatanaka, Effect of Fluorous Tag on Glycosylation of Saccharide Primers in Animal Cells, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 査読有, Vol.82, 2009, pp1409-1415.
- ④ Y. Haga, S.-I. Hakomori, K. Hatanaka, Quantitative Analysis of EGFR Affinity to Immobilized Glycolipids by Surface Plasmon Resonance, *Carbohydr. Res.*, 査読有, Vol.343, 2008, pp3034-3038.
- ⑤ Y. Haga, K. Hatanaka, S.-I. Hakomori, Effect of Lipid Mimetics of GM3 and Lyso-GM3 Dimer on EGF Receptor Tyrosine Kinase and EGF-induced Signal Transduction, *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有, Vol.1780, 2008, pp393-404.
- ⑥ T. Kato, M. C. Kasuya, and K. Hatanaka, Purification of Gangliosides by Liquid-Liquid Partition Chromatography, *J. Lipid Res.*, 査読有, Vol.49, 2008, pp2474-2478.
- ⑦ A. Miyagawa, M. C. Kasuya, K. Hatanaka, Inhibitory Effects of Glycopolymers Having Globotriose and/or Lactose on Cytotoxicity of Shiga-Toxin 1, *Carbohydr. Polym.*, 査読有, Vol.67, 2008, pp260-264.
- ⑧ Y. Murozuka, N. Watanabe, K. Hatanaka, and S.-I. Hakomori, Lyso-GM3, its dimer, and multimer: their synthesis and their effect on epidermal growth factor-induced receptor tyrosine kinase, *Glycoconjugate J.*, 査読有, Vol.24, 2007, pp551-563.
- ⑨ M. C. Kasuya, A. Ito, and K. Hatanaka, Simple and Convenient Synthesis of a Fluorinated GM4 Analogue, *J. Fluorine Chem.*, 査読有, Vol.128, 2007, pp562-565.

[学会発表] (計 3 件)

- ① K. Hatanaka, Incorporation of Fluorous Glycoside in Cell and Oligosaccharide Production, International Symposium on Fluorous Technologies '09, 8/25/2009, Jackson Hole (USA).
- ② S. Nakano, Cellular Uptake of Fluoroalkyl Glycoside and Saccharide-Chain Elongation, 24th International Carbohydrate Symposium, 7/28/2008, Oslo (Norway).
- ③ M. C. Kasuya, Fluorinated Saccharide: Versatile Scaffolds for Oligosaccharide Synthesis Using Cells, International Symposium on Fluorous Technologies '07, 7/30/2007, Yokohama (Japan).

〔図書〕（計1件）

①畑中研一（分担執筆）、エヌ・ティー・エス、酵素利用技術大系、2010年、総ページ数993ページ（pp404-407：細胞内糖鎖合成装置による糖脂質合成）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑中 研一 (HATANAKA KENICHI)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号：70167584

(2) 研究分担者

粕谷 マリアカルメリタ (KASUYA MARIA CARMELITA)

東京大学・生産技術研究所・助教
研究者番号：30334361
(H20→H21：連携研究者)

水野 真盛 (MIZUNO MAMORU)
(財)野口研究所・研究部・研究員
研究者番号：40271506
(H20→H21：連携研究者)

戸治野 真美 (TOJINO MAMI)
(財)野口研究所・研究部・研究員
研究者番号：70435551
(H20→H21：連携研究者)

(3) 連携研究者