

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15221

研究課題名（和文）オンデマンドな糖鎖認識を可能にするDNA模倣オリゴマーの創製

研究課題名（英文）Creation of DNA-mimetic oligomers for on-demand glycan recognition

研究代表者

大石 雄基 (Ohishi, Yuki)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：00778467

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：糖鎖を標的とした医薬品の創出を目指し、糖認識部位を有するモノマーを DNA と同じホスホジエステル結合で連結したオリゴマーの開発を検討した。本オリゴマーは糖鎖と多点で相互作用することで水中での強力な会合が実現できると期待された。Meggers らが報告した人工核酸 GNA の構造を利用し、糖認識部位にベンゼン環を導入したホモオリゴマーの合成を検討した。数種のモノマーのアミダイト体を合成し、ホスホロアミダイト法によるオリゴマーの固層合成を検討した。5-10量体のホモオリゴマーを合成し、各種糖鎖との会合を等温滴定型カロリメトリーで評価したところ、グリコーゲンに対する親和性が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は新たな創薬ターゲットとして注目されているが、その研究は未開拓である。糖鎖は水和されやすいだけでなく、高次構造が柔軟であるため、糖鎖と強力に会合する人工分子を1から設計することは難しい。また、糖鎖の化学構造は類似性が高いため、会合の選択性を制御することも困難である。本研究で創製した糖認識オリゴマーの設計は、糖鎖を標的とする医薬品を創製するための基盤になり得るものであり、ペプチド医薬と核酸医薬に次ぐ中分子創薬の開拓につながると期待される。また、本オリゴマーは糖鎖を検出するバイオプローブとしての応用も可能であり、特定の糖鎖を有する細胞やウイルスを検出する分析技術の開拓に対しても貢献できる。

研究成果の概要（英文）：We aimed creating drugs targeting saccharides and investigated the development of oligomers consisting of monomers with saccharide recognition sites linked by phosphodiester bonds. The oligomers were expected to interact with saccharides at multiple points to realize high affinity for saccharides in water. We synthesized GNA-like homo-oligomers with benzene rings as the saccharide recognition sites. The binding of homo-oligomers to various saccharides were analyzed by isothermal titration calorimetry. We confirmed that the oligomer showed the affinity for glycogen.

研究分野：創薬化学

キーワード：糖認識 人工DNA オリゴマー ホスト-ゲスト

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は細胞間の接着や情報伝達を担う化合物群であり、DNA とタンパク質に次ぐ第三の生命鎖と呼ばれている。がんの転移やウイルスの感染において重要な役割を果たしていることから、糖鎖は新たな創薬ターゲットとして注目されている。これまでに糖鎖そのものを利用したバイオ医薬品やその糖鎖を合成するための研究は進められているが、糖鎖と会合する医薬品の研究は未開拓である。糖鎖は水和されやすいだけでなく、高次構造が柔軟であるため、糖鎖と強力に会合する人工分子を1から設計することは難しい。また、糖鎖の化学構造は類似性が高いため、会合の選択性を制御することも困難である。「糖鎖と会合する人工分子の創製」という学術的難題を解決できれば、糖鎖を標的とした新たな作用機序の医薬品の創出につながると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は、糖鎖と会合する医薬品になり得る人工分子の開発を目的とする。その人工分子の設計として、糖認識部位を有するモノマーを DNA と同じホスホジエステル結合で連結したオリゴマーを考案した。本オリゴマーは糖鎖と多点で相互作用することで水中での強力な会合が実現できると期待される。また、本オリゴマーは DNA のように固相合成法で合成できるため、任意の配列のオリゴマーを容易に調製できる。すなわち、多様な糖認識部位とリンカー部位を有するモノマーを用意することで、配列の変更により様々な糖鎖との会合に適応できると期待される。さらに、ホスホジエステル結合は負電荷を有しているため、単なるリンカーとしてだけではなくオリゴマーの水溶性の向上にも寄与する。

### 3. 研究の方法

#### (1)オリゴマーの設計

今回開発したオリゴマーの設計を図1に示す。オリゴマーの主骨格には Meggers らが報告した人工核酸 GNA (JACS, 2005, 127, 4174) の構造を利用した。このリンカーの長さは糖鎖の単糖ユニット間の距離とほぼ一致している。このため、糖認識ユニットと単糖ユニットが 1:1 の対となって、オリゴマーと糖鎖が会合体を形成すると期待された。

糖認識ユニットは、ホスホロアミダイト法によるオリゴマー合成において、安定かつ反応を阻害しない特性が必要である。また、報告者のこれまでの糖認識ホスト分子に関する研究の中で、水中での糖認識において、水素結合よりも疎水性相互作用が重要であることが示唆されている。これらの知見や MacroModel

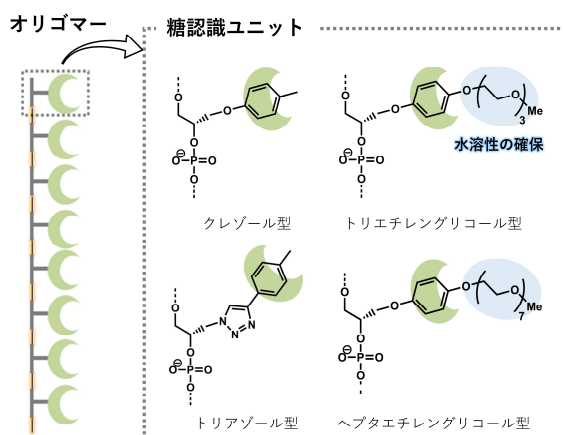


図1 オリゴマーの設計

による糖鎖との会合体の構造予測から、本研究で合成するオリゴマーの糖認識ユニットには、糖の C-H 結合と疎水性相互作用が可能なベンゼン環が必要であると考えた。まずは、オリゴマーの合成法と評価法を確立するために、糖認識部位にクレゾール骨格を持つシンプルなオリゴマー(図1,クレゾール型)の開発に着手した。また、クレゾール骨格の疎水性により、オリゴマーの水溶性が低下する可能性も考えられたため、両親媒性のオリゴエチレングリコール鎖を導入したオリゴマー(図1,トリエチレングリコール型、ヘプタエチレングリコール型)の開発も並行して進めた。さらに、多様な糖認識部位を導入したオリゴマーへの展開を見据え、クリック反応を利用して合成が可能なオリゴマー(図1,トリアゾール型)の開発も検討した。

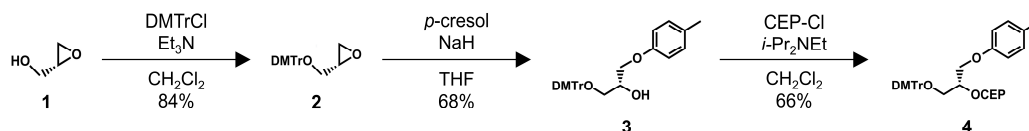
#### (2)オリゴマーの合成と評価

Meggers らの論文を参考に各オリゴマーのモノマーのアミダイト体を合成し、ホスホロアミダイト法によるオリゴマー化を検討した。オリゴマー合成では DNA/RNA 自動合成装置 (M-2-A8R6TU) を利用し、最適なオリゴマーの合成条件を探索した。合成したオリゴマーの精製には逆相 HPLC を利用し、最適な精製法を探索した。精製したオリゴマーと様々な糖鎖との会合は、当初は報告者の研究機関で所有する表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置を用いて評価する予定であったが、故障からの復旧の目処が立たなかったため、等温滴定型カロリーメトリー (ITC) 測定により評価した。

## 4. 研究成果

### (1) モノマーの合成の検討

式1にクレゾール型オリゴマーの合成に用いるモノマーのアミダイト体の合成を示す。市販のキラルなグリシドール **1** を出発原料とし、ヒドロキシ基をジメトキシトリチル (DMTr) 基で保護することで **2** を合成した。その後 *p*-クレゾールとの位置選択的な反応によりエポキシドが開裂した **3** へと誘導し、最後に 2-Cyanoethyl N,N-Diisopropylchlorophosphoramidite (CEP-Cl) と反応させることでアミダイト体の **4** を得ることができた。*p*-クレゾールを変更した同様の経路によって、トリエチレングリコール型とヘプタエチレングリコール型のモノマーも合成できた。また、*p*-クレゾールを反応させる工程でアジ化ナトリウムによるアジ化を行い、その後クリック反応を行うことでトリアゾール型のモノマーも合成できた。



式1 クレゾール型オリゴマーのモノマーの合成

### (2) オリゴマーの合成と精製の検討

クレゾール型アミダイト体を用いて、5-mer の固相合成と精製方法の最適化を進めた (図2)。伸長時のカップリング効率は DMTr 基の脱保護によって生じるカチオン種の吸収によって見積もることができた。本研究のオリゴマーは、一般的な DNA や RNA よりも伸長効率が悪かったが、カップリング時間を 30 分と長くすることでほぼ定量的なカップリング効率となることがわかった。オリゴマー合成後、DMTr 基を脱保護した後に、固層からの切り出しを行い、オリゴマーの精製を行った。しかし、この方法では生成物の HPLC チャートが複雑となり、目的物に由来する MS は観測されなかった。カップリング効率に問題がないことは合成中のモニタリングで確認できていたため、オリゴマーの水溶性が問題となり、合成や精製時に問題が生じていると考えた。そこで、同様の固相合成条件で、トリエチレングリコール型とヘプタエチレングリコール型、トリアゾール型のアミダイト体のオリゴマー合成を検討した。しかし、これらのモノマーを用いた場合でも目的のオリゴマーを得ることができなかった。そこで、DMTr 基の脱

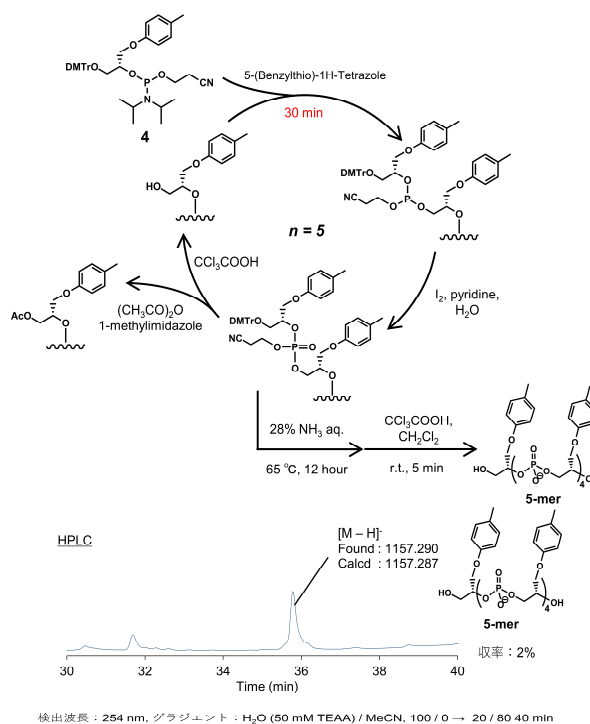


図2 クレゾール型オリゴマーの合成と精製

保護後に生じるヒドロキシ基によって、切り出し時に化合物が分解している可能性を考え、オリゴマー切り出し後に DMTr 基の脱保護を行う手順に変更した。この手順の変更により、目的のクレゾール型オリゴマーを収率 2% で得ることに成功した。しかしながら、精製したオリゴマーを凍結乾燥後、もう一度 HPLC によって分析したところ、オリゴマーの分解が確認された。これらの結果から、DMTr 基の脱保護後の本オリゴマーは化学的に不安定であることが確認できた。今後は、固相合成の最後に導入するモノマーの DMTr 基をエチレングリコール鎖に変更することで、脱保護せずに糖認識が可能なオリゴマーを合成することを計画している。

### (3) オリゴマーと糖鎖との会合能評価

精製後のクレゾール型の 5-mer と様々な糖鎖との会合を ITC 測定により評価したところ、グリコーゲン添加時に発熱ピークが見られ、会合が確認された。しかしながら、本オリゴマーは不安定であり、純度が保証できないため、その会合定数を見積もることができていない。今後は、安定性を向上させたオリゴマーを基に糖認識骨格の改変を進め、糖鎖と強力に会合するオリゴマーを探索する計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayashi Tomoya, Ohishi Yuki, Chiba Junya, Inouye Masahiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis of Rigid Macrocyclic Phenols and Their Catalytic Applications in Diels Alder Reactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 e202200136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.202200136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohishi Yuki, Chiba Junya, Inouye Masahiko	4. 巻 87
2. 論文標題 Chiral Assemblies of Planar and Achiral <i>meta</i> -Arylene Ethynylene Macrocycles Induced by Saccharide Recognition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 10825 ~ 10835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.2c01095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大石雄基, 井上将彦
2. 発表標題 ビリジン - アセチレン - アニリン大環状分子の合成と糖認識能
3. 学会等名 第18回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石雄基, 井上将彦
2. 発表標題 天然糖の抽出によって誘起されるビリジン - アセチレン - アニリン大環状分子のキラル集合
3. 学会等名 第31回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石雄基, 千葉純哉, 井上将彦
2. 発表標題 meta-アリーレンエチニレン大環状分子の糖認識に伴うキラルな自己集積
3. 学会等名 第32回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関