

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500417

研究課題名（和文）

細胞表面様単分子膜を用いたバイオイメージング技術の開発

研究課題名（英文）

Development of bio-imaging technology using cell surface-like monolayer membrane

研究代表者

古池 哲也 (FURUIKE TETSUYA)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：10360942

研究成果の概要（和文）：糖鎖クラスター素子開発の一環として、糖鎖をクラスター化させる土台部分として rigid、かつ symmetry な構造を有しているシクロデキストリン（CD）に着目し、CD 上に生理活性糖鎖、および長鎖脂肪酸が結合した糖鎖結合型両親媒性シクロデキストリン（両親媒性 GlycoCD）の合成法の確立と、調製した両親媒性 GlycoCD を用いて 2 次元的な分子集合体である単分子膜の形成挙動に関する評価を行った。

研究成果の概要（英文）：As a part of the development of glycoclustered device, we focused on cyclodextrin (CD) having the rigid and symmetrical structure. The synthetic method for the sugar-binding type of CD amphiphiles (GlycoCD amphiphiles), having bioactive sugars and long-chain fatty acids onto the CD, is established. The formation behavior of monolayers which is a two-dimensional molecular assembly is discussed by the use of the GlycoCD amphiphiles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

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：シクロデキストリン、両親媒性化合物、単分子膜、糖鎖クラスター効果、バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

次世代ポストゲノムを睨んで、タンパク質の働きにより生じる糖鎖をターゲットにした、ゲノム創薬や再生医療等の分野で網羅的な研究開発が進められてきており、近年めざましい進歩を遂げてきた。特にセレクチン、ガレクチンに代表される糖鎖結合タンパク質との糖鎖-タンパク質相互作用、あるいは

細胞接着の初期段階で非常に重要な糖鎖-糖鎖相互作用等、生体内における糖鎖の役割が、近年、分子生物学の分野において脚光を浴びてきている。物質認識の役割を担っているタンパク質のマーカー分子となるのは糖鎖であることが非常に多く、この機能をうまく利用することができれば、生体内で標的となるタンパク質や細胞などへの、効果的なドラッ

グ・デリバリー・システムなどの構築が可能となるため、医薬品をはじめ、様々な分野で国内外を問わず活発に研究が行われてきている。

しかしながら、タンパク質に対する糖鎖一分子あたりの親和性は、それほど高くないため、上記の相互作用が効率よく行われるためには、適切な空間距離と配向性を有した糖鎖の集積（クラスター）化が必要であるという極めて重要な概念（糖鎖クラスター効果）が提案された。この概念に基づいて、これまでにポリマーやデンドリマーをはじめとする糖鎖クラスター化合物が数多く開発され、天然糖鎖の持つ生物化学的情報を化学的な立場から解明しようという試みが活発に行われてきている。

以上のように、糖鎖の認識機能を最大限に生かすには、適度に糖鎖をクラスター化することが非常に重要であることから、細胞表層に、より類似したモデル分子集合体として、機能的な人工糖脂質を用いた単分子膜の有効な機能評価法が確立されたならば、細胞表層糖鎖の担っている生命現象の解明のみならず、将来的には糖鎖医薬をはじめとする様々な分野において応用されることが大いに期待できる。その意味でも、高感度かつ再現性に優れた糖鎖クラスターナノデバイスの開発が望まれている。しかしながら、ガングリオシドなどの糖脂質とリン脂質による混合膜の調製に関しては、幾つか報告例があるものの、一定量以上の糖脂質が単分子膜上に存在すると、膜の安定性が著しく低下するため、膜表面の糖鎖密度を高くすることには限界があった。これらの問題を解決するため、本研究では、糖鎖クラスター素子開発の一環として、糖鎖をクラスター化させる土台部分として rigid、かつ symmetry な構造を有している環状オリゴ糖シクロデキストリン（CD）に着目し、CD上に生理活性糖鎖、および長鎖脂肪酸が結合した糖鎖結合型両親媒性シクロデキストリン（両親媒性 GlycoCD）の合成法の確立を行う。この両親媒性 GlycoCD は、CD に十数本の長鎖脂質部分を有しているため、得られた単分子膜の浸透性、および気密性に優れ、金薄膜上で単分子膜を形成することにより表面プラズモン共鳴（SPR）用センサーチップとしても、そのまま用いることができるので、高感度な分子レベルでの糖-タンパク質間のセンシングが可能となる。以上のように、本研究により、生体膜上での糖鎖とタンパク質の相互作用に関連した分子レベルでの動態挙動に関して、これまでにない重要な基礎的知見が得られるものと考えられる。

2. 研究の目的

生体内における細胞認識の初期的段階に深く関与している生理活性物質である糖鎖の分子認識を左右する大きな要因として、生体膜上における適切な糖鎖密度が挙げられることから、これらの分子構造を生体外での確に模倣することにより、生体内における生理活性糖鎖の機能の謎を解く手がかりとなるモデル分子集積体の構築を目標とする。まず、CD をコア部分とした多彩な両親媒性 GlycoCD の合成の確立を行い、それらの単分子膜形成能に関して検討を行う。また、調製した単分子膜の生物活性機能を解析するために、近年、生理活性物質の機能解析において、有用な測定ツールとして汎用されている表面プラズモン共鳴（SPR）法におけるデバイスとしての可能性を反応速度論の検討も行う。

3. 研究の方法

本研究の発想は、糖鎖の CD 上での化学結合による強固な集積化と、単分子膜上での流動的な集積化という二段階の糖鎖クラスター化システムを併せ持つという大きな特徴がある。これにより糖鎖を特異的に認識するレセプターとの相互作用において、負の糖鎖クラスター効果の影響を受けることなく、また一方で、糖脂質同士のドメイン形成による適度な糖鎖密度の調整により、融通性に富んだ高い結合親和性を示すことが期待される。

そこで本研究は、糖鎖結合型両親媒性シクロデキストリン（両親媒性 GlycoCD）の合成、それら化合物群を用いた膜形成能に関して、系統的に研究を遂行した。

(1) バリエティに富んだ両親媒性 GlycoCD の合成

CD は、その構成単位である D-グルコピラノース残基数により α 、 β 、 γ -CD（それぞれ残基数 6、7、8 個）の 3 種類が入手可能

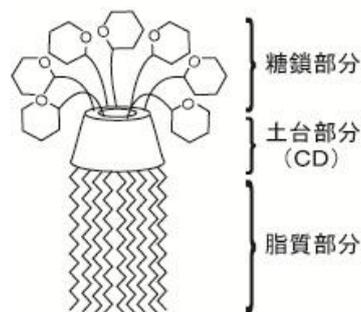


図 1. 両親媒性 CD の概略図

である。これら3種類のCDに関して、長鎖脂質酸部分としてはラウリン酸 (C12)、ミリスチン酸 (C14)、パルミチン酸 (C16)、糖鎖部分としてはガラクトース (Gal)、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、*N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) 等の単糖を用い、系統的に両親媒性 GlycoCD (図1) を効率良く合成した。

まず、 α 、 β 、 γ -CDのC-6位を

トルエンスルホン (Ts) 基により選択的保護、C-2, 3位の長鎖アシル化を行った。次に、エチレンジアミンを用いたC-6位への求核置換反応により、鍵となるCD前駆体を、各々大量に合成した。

一方で、糖質部分は、各単糖誘導体と、4-ヒドロキシ酪酸メチルエステルとのグリコシル化反応をした。脱保護の後、アグリコン部分のカルボキシル基を活性エステルに変換し、糖質誘導体の合成を行なった。

最後に、各々のCD前駆体と糖質誘導体とのカップリング反応を行うことで、目的とする両親媒性 GlycoCDの合成を行なった。

(2) 両親媒性 GlycoCD 含有単分子膜の形成能評価

(1)において合成した両親媒性 GlycoCD を用いて、2次元的な分子集合体である単分子膜の形成挙動に関する評価を行った。単分子膜は気-液界面で作製することが最も一般的な方法であり、表面圧-分子占有面積 (π -A) 等温線を測定することで、単分子膜の安定性、気密性に関する詳細な情報を得ることができる。

まず、両親媒性 GlycoCD を CHCl_3 に溶解した後、溶液を純水上に散布し、LB膜作成装置を用いて、 π -A 等温線を測定することにより、単分子膜の崩壊圧、分子占有面積等に関して検討を行った。

4. 研究成果

(1) バラエティに富んだ両親媒性 GlycoCD の合成

両親媒性 GlycoCD の合成の際には、側鎖部分となる糖質とCDとの間に適度なスペーサー部分を有することが、化合物の合成、ならびに糖の生理活性の面からも極めて重要である。本研究では、アルキル鎖をアミド結合により連結して、最終的に適度な鎖長を有するスペーサー部分の導入を行なった。

まず、CD部分は種類のCD (α 、 β 、 γ -CD) を出発原料として用い、3段階の反応工程を経て、糖質誘導体との結合部分となるアミノ基を有するCD前駆体を効率良く調製した。

この際、長鎖脂肪酸部分としては、鎖長の異なる3種類の脂肪酸 (ラウリン酸 (C12)、ミリスチン酸 (C14) およびパルミチン酸 (C16)) の導入を行なった。

一方で、糖質部分としては Gal、GlcNAc、NeuAc 誘導体を用いて、それらとC数が4のヒドロキシ酪酸誘導体をグリコシル化反応により導入し、脱保護の後、アグリコン部分の末端にカルボキシル基を有する糖質誘導体を調製した。さらに、カルボキシル基を活性エステル化した後、各々のCD前駆体とカップリング反応を行い、高収率で両親媒性 GlycoCD を調製することに成功した。

(2) 両親媒性 GlycoCD 含有単分子膜の形成能評価

(1)において得られた両親媒性 GlycoCD を用いて、気-液界面で調製した単分子膜の表面圧-分子占有面積 (π -A) 等温線を測定した結果、概ね 40-50 mN/m の崩壊圧を有することが分かった。この値は、比較物質として調製した糖鎖を持たない両親媒性CDの値とほぼ一致した。脂質部分の専有面積を算出したところ、計算値は理論値とほぼ一致し、極めて気密性の高い膜が形成されていることが示唆された。

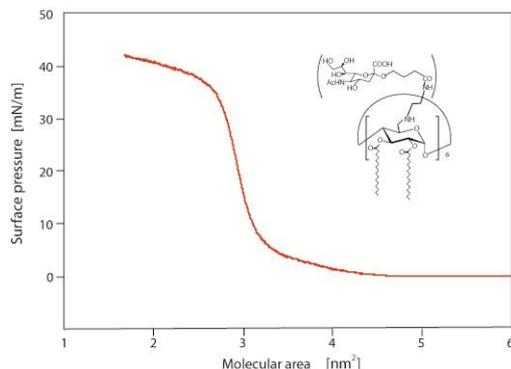


図2. NeuAc 結合型両親媒性CDの π -A等温線

本研究では、糖鎖をクラスター化させる土台部分として rigid、かつ symmetry な構造を有しているCDを用い、そのCD上に生理活性糖鎖、および長鎖脂肪酸が結合した両親媒性 GlycoCD 合成法の確立に成功した。この両親媒性 GlycoCD は、CDに十数本の長鎖脂質部分を有しているため、膜形成時における浸透性、および気密性に優れていることも確認された。さらに、一般に単分子膜は金薄膜上でも容易に形成が可能のため、表面プラズモン共鳴 (SPR) 用センサーチップへの応用が期待でき、これまでに類を見ない糖鎖クラスター

素子として、糖-タンパク質間に代表される生体相互作用をリアルタイムで観察することを可能にするであろう。

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 T. Han, N. Nwe, T. Furuike, S. Tokura, H. Tamura, Methods of *N*-acetylated chitosan scaffolds and its *in-vitro* biodegradation by lysozyme, *J. Biomedical Science and Engineering*, 査読有, 5, 2012, 15-23.
DOI:10.4236/jbise.2012.51003
- ② R. Jayakumar, K.P. Krishna, S. Srinivasan, S.V. Nair, T. Furuike, H. Tamura, Chitin scaffolds in tissue engineering, *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, 12, 2011, 1876-1887.
DOI:10.3990/ijms.12031876
- ③ M. Peter, N. Ganesh, N. Selvamurugan, S.V. Nair, T. Furuike, H. Tamura, R. Jayakumar, Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nano hydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications, *Carbohydr. Polymers*, 査読有, 80, 2010, 687-694.
DOI:10.1016/j.carbpol.2009.11.050

[学会発表] (計 20 件)

- ① 平井智也、田村裕、古池哲也、イオン液体を用いた糖鎖合成法、第 17 回先端科学技術シンポジウム、2013 年 1 月 29-30 日、大阪
- ② 岡村俊佑、田村裕、古池哲也、シクロデキストリンを用いた両親媒性化合物の合成と機能、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 17-21 日、鹿児島
- ③ 平井智也、田村裕、古池哲也、マイクロ波を用いたオリゴ糖の化学修飾、第 31 回日本糖質学会年会、2012 年 9 月 17-21 日、鹿児島
- ④ T. Furuike, H. Tamura, Chemo-enzymatic synthesis of glycoclustered cyclodextrins (GlycoCDs), The 7th International Symposium in Science and Technology: Bridging Research for Advancement of Knowledge and Technology, Aug 30-31(2012), Penang, Malaysia

- ⑤ 平井智也、田村裕、古池哲也、イオン液体を用いた糖鎖合成法。第 26 回キチン・キトサンシンポジウム、2012 年 7 月 12-13 日、札幌
- ⑥ S. Okamura, T. Hirai, T. Furuike, H. Tamura, Development of Carbohydrate Synthesis Using Ionic Liquids, The 3rd Research Symposium on Petrochemical and Materials Technology and The 18th PPC Symposium on Petroleum, Petrochemicals, and Polymers, Apr 24(2012), Bangkok, Thailand
- ⑦ 古池哲也、化学-酵素合成法を用いた人工複合糖質化合物の合成研究、第 16 回先端科学技術シンポジウム、2012 年 1 月 23-24 日、大阪
- ⑧ T. Furuike, D. Komoto, H. Nagahama, S. Maki, H. Seo, H. Tamura, Preparation and characterization of chitosan-coated PLA fiber and braided rope, The 9th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium, Aug 3-6(2011), Nha Trang, Vietnam
- ⑨ T. Hirai, H. Tamura, T. Furuike, Modification and glycosylation of carbohydrates in ionic liquids, 6th International Symposium in Science and Technology at Kansai University 2011, Collaboration between Asian countries in materials, chemistry, life science, information technology, civil engineering and ecological interface design, Aug 24-26(2011), Osaka, Japan
- ⑩ 松村勲、田村裕、古池哲也、細菌表層由来オリゴ糖の合成、第 25 回キチン・キトサンシンポジウム、2011 年 8 月 30-31 日、奈良
- ⑪ 箕輪英之、田村裕、古池哲也、固相合成法を用いたオリゴ糖の合成、第 25 回キチン・キトサンシンポジウム、2011 年 8 月 30-31 日、奈良
- ⑫ 平井智也、田村裕、古池哲也、イオン液体を用いた糖鎖合成法の開発。第 30 回日本糖質学会年会、2011 年 7 月 11-13 日、長岡
- ⑬ T. Furuike, H. Tamura, Chemical and enzymatic synthesis of cyclodextrin-scaffolded glycoclusters (GlycoCDs), Pacificchem2010, Dec 15-20(2010), Honolulu, USA
- ⑭ 森川富士、田村裕、古池哲也、キチン・キトサン関連オリゴ糖の合成、第 24 回キチン・キトサンシンポジウム、2010 年 7

月 13-14 日、東京

[その他]

ホームページ等

[http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/
biofunc/](http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/biofunc/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古池 哲也 (FURUIKE TETSUYA)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：10360942