

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25810075

研究課題名(和文)糖鎖高分子の保護基フリー合成による簡便なオリゴ糖鎖のクラスター化

研究課題名(英文)Facile and protecting-group-free synthesis of glycopolymers

研究代表者

田中 知成 (Tanaka, Tomonari)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・助教

研究者番号：70585695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体内に存在するオリゴ糖鎖は、密集すること(クラスター化)によって強い生理活性機能を発現している。従来の有機合成法では合成が煩雑あるいは困難なオリゴ糖鎖を側鎖に有する糖鎖高分子を、保護基を使用することなく簡便に合成することに成功した。さらに、得られた糖鎖高分子を用いてレクチンとの相互作用を水晶共振子マイクロバランス法により解析したところ、遊離糖よりも数千倍強い結合定数を示したことから、合成した糖鎖高分子がクラスター効果を有することを確認した。さらに、シアル酸含有オリゴ糖鎖を側鎖に有する糖鎖高分子は、ヒトまたはトリインフルエンザA型ウイルスと強力に結合することを赤血球凝集阻止試験により確認した。

研究成果の概要(英文)：Glycopolymers having pendant oligosaccharides were successfully synthesized from free saccharides without any protection on the saccharides. The glycomonomers were synthesized via thioglycosides or glycosyl azides via the direct anomeric activation of free saccharides using 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride as a condensing agent. The resultant glycomonomers were copolymerized with acrylamide by a reversible addition-fragmentation chain transfer technique. Each of the glycopolymers were obtained and then immobilized on a gold-coated sensor of quartz crystal microbalance to analyze their binding behavior with the lectin. The glycopolymers strongly bound with the corresponding lectin without nonspecific adsorption in aqueous solution. The strong binding was attributed to the glycocluster effect of the glycopolymer. In addition, the glycopolymer bearing a complex-type sialyl N-linked oligosaccharide was found to strongly bind with both human and avian influenza A viruses.

研究分野：高分子化学

キーワード：糖鎖高分子 糖クラスター効果 無保護糖活性化 RAFT重合 オリゴ糖 N-結合型糖鎖 レクチン インフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

核酸、タンパク質に次ぐ“第3の生体高分子鎖”として注目を集めている糖鎖は、生体内で糖タンパク質、糖脂質などとして存在し、様々な生命現象に関与することが解明されてきている。このような生体内オリゴ糖鎖は、糖鎖一分子ではタンパク質やウイルス、毒素などとの相互作用は弱い、細胞表層などに密集して存在すること(クラスター化)により、その相互作用が強くなるということが明らかになってきている(この現象は“クラスター効果”と呼ばれている)。しかしオリゴ糖鎖を、クラスター効果を保持した状態のまま、天然から抽出・精製することは、非常に困難であるため、糖鎖高分子やデンドリマー、ハイパーブランチポリマーなどの人工的に糖鎖を密集させた分子の設計・合成が多数報告されているが、そのほとんどは入手が容易で合成化学的な取扱いが容易な単糖や二糖などのモデル化合物であり、複雑な構造を有する生体内オリゴ糖鎖にも適用可能な簡便かつ効率的なクラスター化オリゴ糖鎖の合成法の開発が求められている。

2. 研究の目的

合成高分子の主鎖上に糖鎖が密集した構造を有する糖鎖高分子の合成は、通常、多段階かつ煩雑である。具体的には、無保護糖を原料とする場合、ヒドロキシ基の保護、糖アノマー位の活性化、重合基の導入、脱保護を経て合成した糖モノマーを、重合反応に供することにより糖鎖高分子を得るのが一般的な合成法のひとつである。本研究では、脱水縮合剤 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride (DMC)を用いるグリコシルアジドおよびチオグリコシドの一段階水中合成法を基盤に、保護基を使用することなく無保護糖から糖モノマーを簡便に合成し、合成した糖モノマーを用いた重合反応により、オリゴ糖鎖にも適用可能な糖鎖高分子の合成法を開発することを目的とした。さらに得られた糖鎖高分子の機能評価として、レクチンおよびインフルエンザウイルスとの結合能を評価した。

3. 研究の方法

(1) 糖モノマーの合成

脱水縮合剤 DMC を用いて、無保護糖から一段階合成したグリコシルアジドと *N*-プロパルギルアクリルアミドを、アジド-アルキン環化付加反応(クリックケミストリー)により糖モノマーを合成した。また、DMC を用いて無保護糖から一段階合成したチオグリコシドを単離することなくアクリロイルクロリドと反応することで、ワンポットで糖モノマーを合成した。

(2) 糖鎖高分子の合成

合成した糖モノマーを用いて可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合を行い、糖鎖高分子

を合成した。

(3) 糖鎖高分子の機能評価

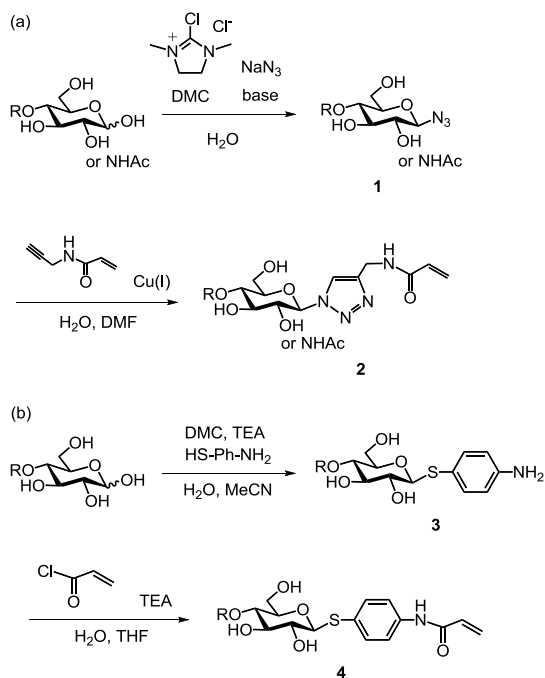
合成した糖鎖高分子を金微粒子、水晶発振子マイクロバランス(QCM)金基板に固定化し、レクチンとの相互作用を測定した。また、赤血球凝集阻止(HI)試験により、インフルエンザウイルスとの結合能を評価した。

4. 研究成果

(1) 糖モノマーの合成

塩基性条件下、脱水縮合剤 DMC とアジ化ナトリウムを用いて、糖アノマー位の直接アジド化反応を行い、無保護糖からグリコシルアジド **1** を得た(Scheme 1a)。続いて、銅(I)触媒およびリガンドとしてトリス[(1-ベンジル-1*H*-1,2,3-トリアゾール-4-イル)-メチル]アミン存在下、*N*-プロパルギルアクリルアミドとのクリックケミストリーにより 1,2,3-トリアゾール環を介して重合基を有する糖モノマー **2** を得た。無保護糖原料には、二糖のラクトース(Lac)、ラクトースの 6'位にシアル酸がα結合した 6'-シアリルラクトース(SA-Lac)、非還元末端にシアル酸を有する複合型 *N*-結合型糖鎖(N-glycan)を用いた。

同様に、DMC と 4-アミノベンゼンチオールを用いて合成したチオグリコシド **3** を単離することなくアクリロイルクロリドと反応することで、無保護糖からワンポットで糖モノマー **4** を合成した(Scheme 1b)。無保護糖原料には、単糖のガラクトース(Gal)、マンノース(Man)、および二糖の Lac を用いた。

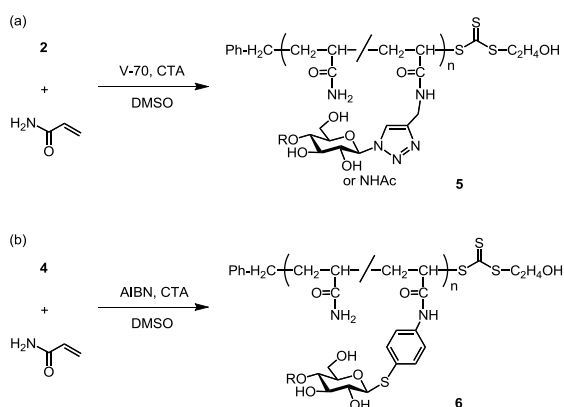


Scheme 1 糖モノマーの保護基フリー合成。

(2) 糖鎖高分子の合成

合成した糖モノマー **2** および **4** を用いて、アクリルアミドとの RAFT 共重合反応を行っ

た。糖モノマー**2** の場合には、2,2'-アゾビス(4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル)(V-70)を開始剤、2-(ベンジルスルファニルチオカルボニルスルファニル)エタノールを連鎖移動剤(CTA)に用いてDMSO中35°Cで反応した(Scheme 2a)。糖モノマー**4** の場合には、 α,α' -アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)を開始剤としてDMSO中70°CでRAFT共重合した。合成した糖鎖高分子**5**、**6**は透析により精製した。



Scheme 2 糖鎖高分子の合成.

(3) 糖鎖高分子の機能評価

合成した糖鎖高分子**5**、**6**のCTA由来のトリチオカーボネート末端を、水素化ホウ素ナトリウムを用いてチオールへと還元した後、金微粒子(粒径40 nm)に固定化し、レクチンとの相互作用を確認するため、分光器を用いて金微粒子の吸光度の変化を測定した。GalおよびLacを有する糖鎖高分子は、 β -Gal残基に結合するレクチンであるピーナッツレクチンと、Manを有する糖鎖高分子はコンカナバリンAと、SA-LacおよびN-glycanを有する糖鎖高分子は、 α 2-6シアリルガラクトシル構造に結合するニホンニワトコレクチンと各々強く結合し、金微粒子に由来する吸光度の減少が確認できた。同様に金基板に固定化した糖鎖高分子と対応するレクチンとの相互作用をQCMにより解析したところ、レクチンの結合を示す周波数の低下が観測され(Fig.1a)、結合定数 K_a はいずれの場合にも $10^7 M^{-1}$ オーダーの値が算出された。一方、牛血清アルブミン(BSA)を添加した場合には、周波数の低下は観測されなかった(Fig.1b)。一般的に糖一分子とレクチンとの相互作用の K_a は $10^3 \sim 10^4 M^{-1}$ と報告されているため、合成した糖鎖高分子はクラスター効果によって対応するレクチンと強く相互作用することが示唆された。

さらに、ヒトインフルエンザA型ウイルス(A/Memphis/1/1971(H3N2))を用いたHI試験では、SA-LacおよびN-glycanを有する糖鎖高分子が活性を示した。特にN-glycanの場合には、SA-Lacの場合より510倍、糖タンパク質のフェツインより160倍低濃度で活性を示し

た。遊離のN-glycanはHI試験で活性を示さないことから、合成した糖鎖高分子のクラスター効果によりインフルエンザウイルスに強く結合することが示唆された。また、主に α 2-3シアリルガラクトシル構造に結合することが知られているトリインフルエンザA型ウイルス(A/duck/Hong Kong/313/4/1978(H5N3))を用いたHI試験では、SA-Lacの場合には活性を示さなかったのに対して、N-glycan含有糖鎖高分子は活性を示した。N-glycan分子内の分岐構造と糖鎖高分子によるクラスター効果によってトリインフルエンザA型ウイルスとの結合が検出でき、天然のオリゴ糖鎖構造が重要であることが示唆された。

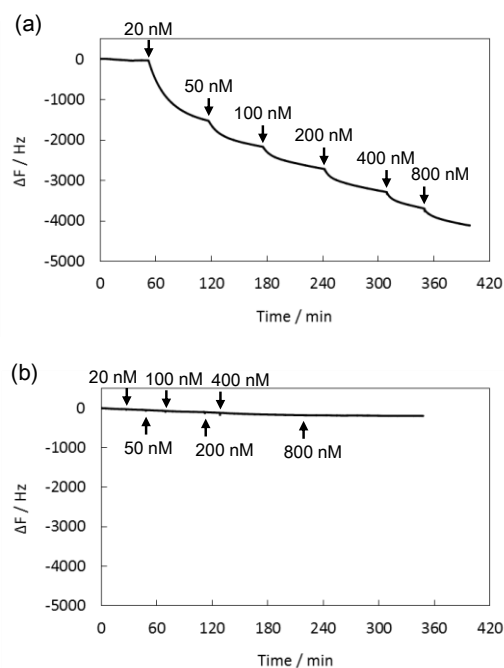


Fig. 1 QCMによるSA-Lac含有糖鎖高分子とレクチンの結合解析 (a)SSA, (b)BSA.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① [Tomonari Tanaka](#), Hideki Ishitani, Yoshiko Miura, Kenta Oishi, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Shin-ichiro Shoda, Yoshiharu Kimura, Protecting-Group-Free Synthesis of Glycopolymers with Pendant Sialyloligosaccharide and Their High Binding with the Influenza Virus, *ACS Macro Letters*, 3(10), 1074-1078 (2014), 査読有, DOI: 10.1021/mz500555x.
- ② [Tomonari Tanaka](#), Genri Inoue, Shin-ichiro Shoda, Yoshiharu Kimura, Protecting-Group-Free Synthesis of Glycopolymers Bearing Thioglycosides Via One-Pot Monomer Synthesis from Free Saccharides, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 52(24), 3513-3520 (2014), 査読有, DOI:

[学会発表] (計 20 件)

- ① 田中知成, 保護基フリー合成法によるグライコマテリアルの創製, 第 64 回高分子学会年次大会, 2015/5/27, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌).
- ② ○田中知成, 石溪秀樹, 三浦佳子, 大石健太, 高橋忠伸, 鈴木隆, シアロ複合型糖鎖を有する糖鎖高分子の保護基フリー合成とインフルエンザウイルスに対する結合評価, 日本化学会第 95 春季年会, 2015/3/29, 日本大学船橋キャンパス(千葉・船橋).
- ③ ○ Tomonari Tanaka, Hideki Ishitani, Yoshiko Miura, Kenta Oishi, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Protecting-group-free Synthesis and Binding with Influenza Virus of Glycopolymers Bearing Sialyloligosaccharides, Society for Glycobiology & Japanese Society of Carbohydrate Research 2014 Joint Annual Meeting, 2014/11/17, Honolulu (USA).
- ④ ○ Hideki Ishitani, Tomonari Tanaka, Yoshiko Miura, Kenta Oishi, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Synthesis of Glycopolymers Bearing N-Glycan and Their Binding with Influenza Virus, Kyoto International Symposium on Neo Fiber Technology, 2014/10/3, Kyoto Institute of Technology (Kyoto).
- ⑤ ○石溪秀樹, 田中知成, 三浦佳子, 大石健太, 高橋忠伸, 鈴木隆, シアル酸含有オリゴ糖を用いる糖鎖高分子合成とインフルエンザウイルスとの結合評価, 第 63 回高分子討論会, 2014/9/25, 長崎大学文教キャンパス(長崎).
- ⑥ ○田中知成, 石溪秀樹, 三浦佳子, 大石健太, 高橋忠伸, 鈴木隆, インフルエンザウイルスと結合するシアリルオリゴ糖含有糖鎖高分子の合成と機能評価, 第 33 回日本糖質学会, 2014/8/10, 名古屋大学豊田講堂(愛知・名古屋).
- ⑦ 田中知成, 脱水縮合剤による無保護糖の直接活性化を基盤とするグライコマテリアルの創製, 第 60 回高分子研究発表会(神戸)・60 周年記念講演会, 2014/7/25, 兵庫県民会館(兵庫・神戸).
- ⑧ ○石溪秀樹, 三浦佳子, 田中知成, シアリルラクトースを側鎖に有する糖鎖高分子の保護基フリー合成とバイオセンシングへの応用, 第 60 回高分子研究発表会(神戸)・60 周年記念講演会, 2014/7/25, 兵庫県民会館(兵庫・神戸).
- ⑨ ○田中知成, 福本浩之, 石溪秀樹, 三浦佳子, グリコシルアジドの一段階合成とクリックケミストリーを利用するオリゴ糖鎖グラフト化高分子の合成と金微粒子修飾, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014/5/28, 名古屋国際会議場(愛知・名古屋).
- ⑩ 田中知成, 糖鎖認識分子検出のためのプローブ開発, BIO tech 2014 第 13 回国際バイオテクノロジー展/技術会議 アカデミックフォーラム, 2014/5/14, 東京ビッグサイト(東京・有明).
- ⑪ ○田中知成, 井上玄理, チオグリコシドを側鎖に有する糖鎖高分子の保護基フリー精密合成と機能評価, 日本化学会第 94 春季年会, 2014/3/28, 名古屋大学東山キャンパス(愛知・名古屋).
- ⑫ 田中知成, 保護基を使わない有用糖質化合物の合成とグライコマテリアルへの展開, 産業技術総合研究所第 4 回触媒化学融合研究センター講演会, 2013/11/29, 産業技術総合研究所つくばセンター第 5 事業所(茨城・つくば).
- ⑬ ○井上玄理, 田中知成, 保護基を使わないチオグリコシド型糖鎖高分子の精密合成, 第 62 回高分子討論会, 2013/9/13, 金沢大学角間キャンパス(石川・金沢).
- ⑭ ○田中知成, 福本浩之, 石溪秀樹, 笹山祥太, 山元和哉, 門川淳一, 木村良晴, 一段階合成可能となったグリコシルアジドを鍵物質とする糖鎖高分子および多糖超分子の合成, 第 64 回 FCCA セミナー・FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2013・糖鎖インフォマティクス若手の会, 2013/8/8, 大阪大学豊中キャンパス(大阪・豊中).
- ⑮ ○石溪秀樹, 福本浩之, 三浦佳子, 田中知成, シアル酸含有オリゴ糖モノマーおよび糖鎖高分子の保護基フリー合成, 第 64 回 FCCA セミナー・FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2013・糖鎖インフォマティクス若手の会, 2013/8/8, 大阪大学豊中キャンパス(大阪・豊中).
- ⑯ ○田中知成, 井上玄理, 福本浩之, 石溪秀樹, 三浦佳子, 保護基フリー合成法による遊離オリゴ糖のモノマー化および糖鎖高分子化, 第 32 回日本糖質学会, 2013/8/7, 大阪国際交流センター(大阪).
- ⑰ ○井上玄理, 田中知成, 無保護糖の直接チオグリコシド化に立脚した糖質モノマーの保護基フリー合成, 第 59 回高分子研究発表会(神戸), 2013/7/12, 兵庫県民会館(兵庫・神戸).
- ⑱ ○福本浩之, 田中知成, グリコシルアジドの一段階合成を基盤とするオリゴ糖のモノマー化と重合, 第 59 回高分子研究発表会(神戸), 2013/7/12, 兵庫県民会館(兵庫・神戸).
- ⑲ ○井上玄理, 田中知成, 糖鎖高分子合成のためのチオグリコシドモノマーの保護基フリー合成, 第 62 回高分子学会年次大会, 2013/5/30, 京都国際会館(京都).
- ⑳ ○福本浩之, 田中知成, クリック反応を用いた簡便な糖質モノマーおよび糖鎖高分子の合成, 第 62 回高分子学会年次大会, 2013/5/30, 京都国際会館(京都).

[図書] (計 1 件)

- ① Tomonari Tanaka, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Protecting-Group-Free Synthesis of Glycopolymers and Their Binding Assay with Lectin and Influenza Virus, *Methods in Molecular Biology: Macro-Glycoligands - Methods and Protocols*, Edited by Xue-Long Sun, Springer, 2015, in press.

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 知成 (TANAKA Tomonari)

京都工芸繊維大学・大学院工芸科学研究科・助教

研究者番号：7 0 5 8 5 6 9 5