

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05580

研究課題名(和文)オリゴ糖鎖担持高分子の保護基フリー水中合成を基盤とするグライコクラスターの創製

研究課題名(英文) Development of glycoclusters based on the protecting-group-free synthesis of glycopolymers in water

研究代表者

田中 知成 (Tanaka, Tomonari)

京都工芸繊維大学・繊維学系・准教授

研究者番号：70585695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：水中での重合後修飾法に利用できる新規な水溶性活性エステル担持ポリマーを開発し、水中でのオリゴ糖鎖担持糖鎖高分子合成に利用することを目的とした。2種類の水溶性活性エステル担持アクリルアミド誘導体モノマーを新規に合成し、これらをRAFT重合することで水溶性活性エステル担持ポリマーが得られた。合成したモノマーおよびポリマーの水中での安定性を評価した。水中で安定であった水溶性活性エステル担持ポリマーを用いて、水中でN-結合型糖鎖を有する糖ペプチドを付加することにより糖鎖高分子を合成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成高分子の側鎖に多数の糖分子が結合した構造の機能性高分子のひとつである糖鎖高分子は、原料の入手が容易で合成化学的に取り扱いが容易な単糖や二糖などのモデル化合物での報告がほとんどであり、複雑な構造を有するオリゴ糖鎖を用いた例は極めて少ない。さらに、糖の良溶媒である水を溶媒とした水中での糖鎖高分子合成は、昨今の環境負荷低減にも合致する。本研究では、水中で糖鎖高分子をはじめとする機能性高分子の合成に利用できる新規なポリマーを開発した。

研究成果の概要(英文)：The purpose in this study is development of novel polymers bearing water-soluble activated ester moieties and their use for the synthesis of oligosaccharide-grafted polymers in water. Novel acrylamide derivatives bearing a water-soluble activated ester moiety were synthesized as monomers and subjected to RAFT polymerization to obtain polymers bearing water-soluble activated ester moieties. The stability of the monomers and polymers in water were evaluated. The resulting polymers, which were stable in water, were reacted with a sialylglycopeptide (SGP) by a post-polymerization modification in water to obtain SGP-grafted glycopolymers.

研究分野：高分子化学

キーワード：糖鎖高分子 水中合成 水溶性活性エステル 糖鎖 ラジカル重合

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久しい糖鎖は、生体内の細胞表面に糖タンパク質、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。このような糖鎖は一分子での生理機能は弱い、複数の糖分子が高密度に密集して集合体を形成すること(クラスター化)により、タンパク質やウイルス、毒素などとの結合が強くなり、様々な生理機能を示すことが知られている。これは“糖クラスター効果”と呼ばれている。しかし、糖クラスター効果を保持した状態のオリゴ糖鎖を天然から得ることは、非常に困難であり、また、生体内のオリゴ糖鎖は構造が不均一である上、入手可能な量は極めて少ない。そのため、生体内オリゴ糖鎖と同等あるいはそれ以上の機能を有する糖鎖の集合体(糖鎖クラスター)を有機化学および高分子化学的手法を用いて合成するアプローチが古くから試みられてきた。合成高分子を主鎖とし、その側鎖に糖分子を結合した糖鎖高分子もそのひとつであり、機能性高分子としてナノ材料や医療材料への利用が検討されている。しかし、糖鎖高分子の研究開発は、原料の入手が容易で合成化学的に取り扱いが容易な単糖や二糖などのモデル化合物での報告がほとんどであり、複雑な構造を有するオリゴ糖鎖を用いた例は極めて少なく、オリゴ糖鎖を用いた糖鎖高分子の一般的かつ簡便な合成法の開発が必要である。特に、オリゴ糖鎖の良溶媒である水を溶媒とした水中合成法の開発は、昨今の環境負荷低減にも合致するため、特に強く求められている。

糖鎖高分子の合成において、あらかじめ合成した高分子の側鎖に糖鎖を付与する方法(重合後修飾法)は、糖担持モノマーを重合して糖鎖高分子を合成する方法と並んで、広く利用されている合成法である。活性エステルと呼ばれるアミノ基との高い反応性を有するエステル基を高分子側鎖に担持した活性エステル担持ポリマーは、アミノ基含有糖誘導体との反応による重合後修飾法での糖鎖高分子合成に一般的に利用されるもののひとつであるが、汎用されているペンタフルオロベンゼン(PFB)エステルやN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルなどの活性エステルは疎水性であるため、水のみを溶媒とする反応系に利用することは容易ではない(図1)。また、親水性の水溶性活性エステルとして、硫酸化テトラフルオロベンゼン(sulfoTFB)エステルや硫酸化N-ヒドロキシスクシンイミド(sulfoNHS)エステルが知られており、水溶性活性エステル担持モノマーおよびポリマーの合成も報告されているもの(例えば、*ACS Macro Lett.*, 2017, 6, 1109.)、これらは水中で不安定であるため単離も困難で、水中での重合後修飾法に利用することは極めて限定的であった。

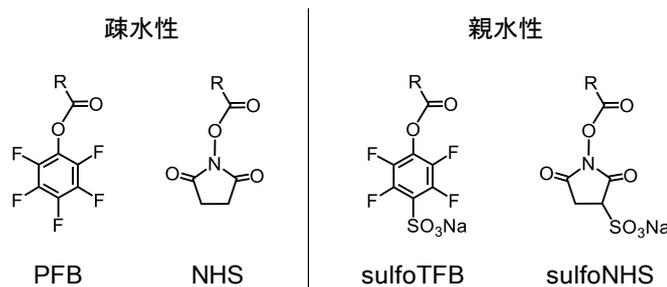


図1. 活性エステルの化学構造

2. 研究の目的

本研究では、水中での重合後修飾法に利用できる水中で安定な水溶性活性エステル担持モノマーおよびポリマーを開発し、新しい水中での機能性高分子合成法を開発することを目的とする。新規に合成した水中で安定な水溶性活性エステル担持ポリマーと市販の複合型N-結合型糖鎖を有する糖ペプチド(SGP)を用いた水中での重合後修飾法によって、SGPを側鎖に担持した糖鎖高分子を合成する。得られたSGP担持糖鎖高分子は、糖結合性タンパク質との結合性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 新規な水溶性活性エステル担持モノマーの合成

2,3,5,6-テトラフルオロ-4-ヒドロキシベンゼンスルホン酸ナトリウムまたはN-ヒドロキシスクシンイミドナトリウムを原料に、水溶性活性エステルを担持したアクリルアミド誘導体をモノマーとして合成した。合成したモノマーは、sulfoTFBの場合はジエチルエーテル/*tert*-ブタノール、sulfoNHSの場合はジエチルエーテルを用いて再沈殿により精製した。sulfoTFBエステル担持モノマーにおいては、アミド基と活性エステル基の間のアルカンジイル基の鎖長が異なるものも合成した。合成した各モノマーの水溶性活性エステル部分の安定性を¹Hまたは¹⁹F NMRで経時的に確認した。

(2) 水溶性活性エステル担持ポリマーの合成

合成したsulfoTFBまたはsulfoNHS担持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、側鎖にsulfoTFBまたはsulfoNHSを有するポリマーを合成した。合成したポリマーは、sulfoTFBの場合は酢酸エチル/メタノール、sulfoNHSの場合はエタノール/メタノールを用い

て再沈殿により精製した。合成したポリマーの水溶性活性エステル部分の安定性を ^1H または ^{19}F NMR で経時的に確認した。

(3) 水溶性活性エステル担持ポリマーの糖鎖高分子水中合成への利用

合成した水溶性活性エステル担持ポリマーを用いて、水中で SGP 分子中のペプチド部分のアミノ基と反応することにより、側鎖にオリゴ糖鎖を有する糖鎖高分子の水中合成を行った。糖鎖高分子は透析によって精製した。得られた SGP 担持糖鎖高分子は金基板上に固定化し、水晶発振子マイクロバランス (QCM) を用いて、レクチンなどとの結合性を評価した。

4. 研究成果

(1) 新規な水溶性活性エステル担持モノマーの合成

2,3,5,6-テトラフルオロ-4-ヒドロキシベンゼンスルホン酸ナトリウムまたは *N*-ヒドロキシスルホスクシンイミドナトリウムと 6-アクリルアミドヘキサノ酸を、*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) による脱水縮合反応に供し、sulfoTFB エステルまたは sulfoNHS エステル担持アクリルアミド誘導体モノマーを合成した (図2, $n=5$)。また、sulfoTFB の場合には、アミド基と活性エステル基の間のアルカンジイル基から成るリンカー鎖長が異なる sulfoTFB 担持モノマー ($n=1\sim 4$) を合成した。合成したモノマーは水中で水溶性活性エステル部分が徐々に加水分解されるため、その分解挙動を ^1H または ^{19}F NMR を用いて確認したところ、 $n=5$ の場合、sulfoTFB では半減期が 50 時間と非常に安定であることを確認した (図3)。一方、sulfoNHS では $n=5$ の場合、半減期は 15 時間であり、sulfoTFB 担持モノマーの方が水中で安定であることが明らかとなった。また sulfoTFB の場合、リンカー鎖長が短くなるに連れて安定性が徐々に低下し、 $n=1$ および 2 では安定性が急激に低下した。水中で不安定な $n=2$ の sulfoTFB のモノマーの場合には、水中での安定性は高濃度になると安定性が高くなる濃度依存性が見られたが、水中で安定性の高い $n=5$ の場合には、濃度依存性はなかった。各 sulfoTFB 担持モノマーに対して疎水性環境で蛍光発色する試薬のナイルレッドを用いて疎水性を評価したところ、リンカー鎖長が長くなるにつれて蛍光強度の増大が観測されたことなどから、本研究で合成した水溶性活性エステル担持モノマーの水中での安定性は、テトラフルオロベンゼンなど活性エステル基自体の立体障害や疎水性に加えて、アルカンジイルリンカー鎖が長くなることによるエステル基周辺の疎水性の増大も効果を与えていることが示唆された。

(2) 水溶性活性エステル担持ポリマーの合成

合成した水溶性活性エステル担持モノマーの内、不安定な 2 種類 (sulfoTFB, $n=1, 2$) を除いた 4 種類のモノマー (sulfoTFB, $n=3, 4, 5$ 、sulfoNHS, $n=5$) を用いて RAFT 重合を行い、水溶性

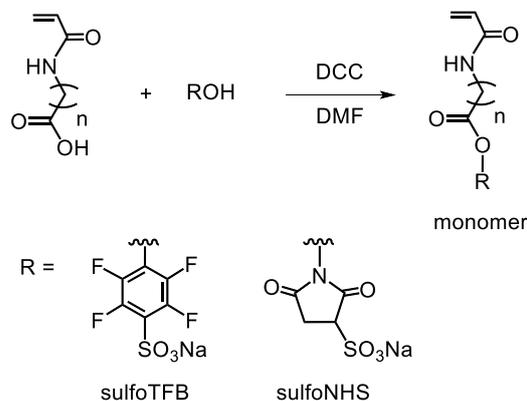


図2. 水溶性活性エステル担持モノマーの合成

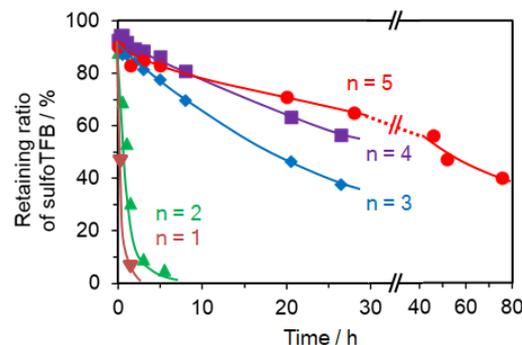


図3. sulfoTFB 担持モノマーの水中での分解挙動

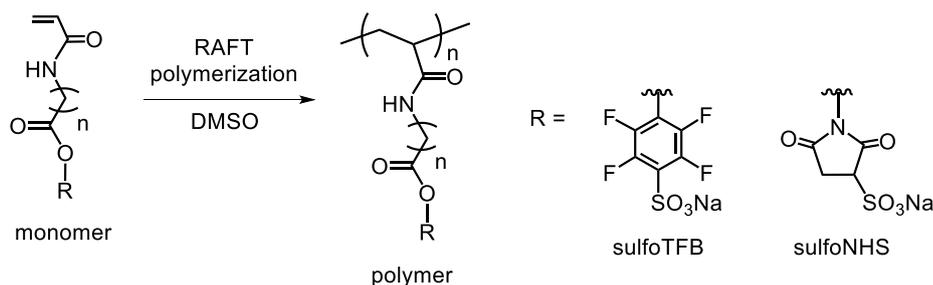


図4. 水溶性活性エステル担持ポリマーの合成

活性エステル基を側鎖に有するポリマーを合成した(図4)。RAFT 重合は、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、トリチオカーボネート誘導体を連鎖移動剤に用いて、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で行った。重合時にモノマーと連鎖移動剤の仕込比を 50:1、100:1、150:1 と変えることで重合度が制御された比較的分子量分布の狭いポリマーが得られた。単離したポリマーの水中での分解挙動をモノマーと同様に ^1H または ^{19}F NMR を用いて経時的に確認したところ、いずれのポリマーも対応するモノマーより安定性が高くなった。また、モノマーと同様にリンカー鎖長が長くなるにつれてポリマーの安定性が高くなった(図5)。特に、sulfoTFB の $n = 5$ の場合、20%分解するまでに 100 時間以上を要するほど非常に安定なポリマーであることを確認した。一方、sulfoNHS の $n = 5$ の場合は、10 時間で 20%分解したことから、モノマーと同様に sulfoTFB を担持したポリマーの方が水中での安定性が高いことが明らかとなった。

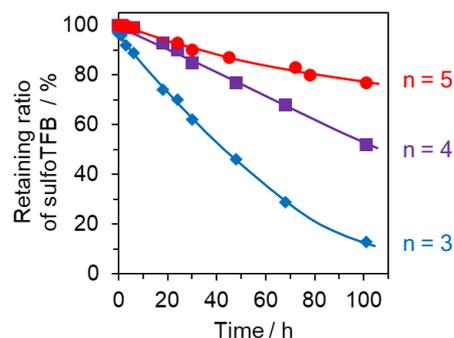


図5. sulfoTFB 担持ポリマーの水中での分解挙動

(3) 水溶性活性エステル担持ポリマーの水中での糖鎖高分子合成への利用

合成した水溶性活性エステル担持ポリマーを用いて、水中で水溶性活性エステルに対するアミノ基の付加反応による SGP の付加を行い、糖鎖高分子を合成した(図6)。SGP 付加反応後に高分子側鎖に残存する水溶性活性エステル基は、過剰量の 2-アミノ-1-プロパノール (AP) を添加して反応することで、全て除去した。 $n = 5$ の sulfoTFB および sulfoNHS は共に水中での安定性が高いため SGP を良好に付加することができ、SGP 導入率が 5~24%の糖鎖高分子が得られたことから、新規に合成した水溶性活性エステル担持ポリマーが水中での重合後修飾法による糖鎖高分子合成に利用できることを確認した。

合成した SGP 担持糖鎖高分子の糖結合性タンパク質との結合性を確認するため、RAFT 重合によって合成した糖鎖高分子の末端トリチオカーボネート基を、水素化ホウ素ナトリウムを用いてチオールへと変換した後、QCM 金基板上に固定化してニホンニワトコ (*Sambucus Sieboldiana*) レクチンまたはヒトインフルエンザ A 型ウイルス (A/Brisbane/10/2007 (H3N2)) ヘマグルチニンとの結合性を評価した。いずれも SGP のオリゴ糖鎖部分の非還元末端に存在する $\alpha,6$ -シリアルガラクトシドに特異的に結合するタンパク質である。SGP 導入率に関わらず、ニホンニワコレクチンまたはヘマグルチニンとの結合定数は $10^7 \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ オーダーの値が得られ、糖クラスター効果を示す高い値が確認できた。

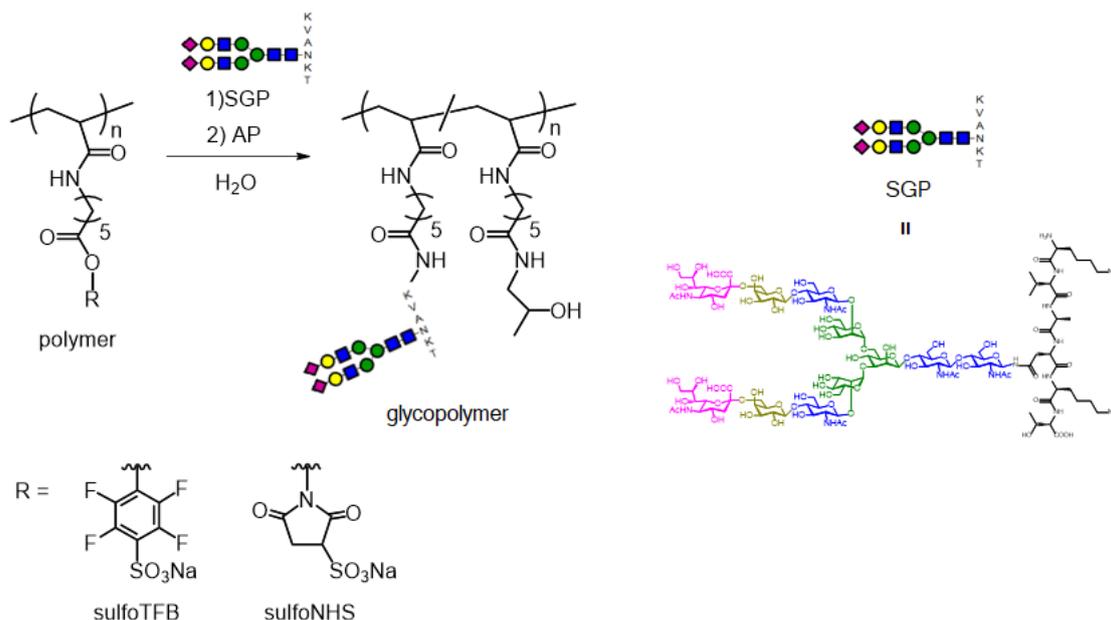


図6. 水溶性活性エステル担持ポリマーを用いた水中での SGP 担持糖鎖高分子合成

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 Sotaro Tsuji, Yuji Aso, Hitomi Ohara, Tomonari Tanaka	4. 巻 58
2. 論文標題 Aqueous Synthesis of Sialylglycopeptide-Grafted Glycopolymers with High Affinity for the Lectin and the Influenza Virus Hemagglutinin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Polymer Science	6. 最初と最後の頁 548-556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pol.20190184	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 Sotaro Tsuji, Kazuma Kobayashi, Toshiki Fujii, Hiroaki Imoto, Kensuke Naka, Yuji Aso, Hitomi Ohara, Tomonari Tanaka	4. 巻 in press
2. 論文標題 Polymers with Pendant Water-soluble Tetrafluorobenzene Sulfonic Acid Activated Esters: Synthesis, Stability, and Use for Glycopolymers in Water	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecular Chemistry and Physics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/macp.202200072	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18件（うち招待講演 3件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 辻爽太郎, 小林千真, 田中知成
2. 発表標題 新規水溶性活性エステル担持ポリマーを用いたオリゴ糖クラスターの水中合成
3. 学会等名 第21回関西グライコサイエンスフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻爽太郎, 小林千真, 田中知成
2. 発表標題 水中で安定な水溶性活性エステル担持モノマーおよびポリマーの合成
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林千真, 辻爽太郎, 田中知成
2. 発表標題 水中で安定なテトラフルオロベンゼンスルホン酸エステル担持ポリマーの合成
3. 学会等名 第67回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻爽太郎, 小林千真, 田中知成
2. 発表標題 水中で安定な新規水溶性活性エステル担持ポリマーの合成と水中重合後修飾
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻爽太郎, 小林千真, 田中知成
2. 発表標題 水溶性活性エステル担持ポリマーの合成と安定性: オリゴ糖鎖高分子合成への利用
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中知成
2. 発表標題 サステイナブルな合成化学 ~糖鎖高分子の水中合成を例に~
3. 学会等名 京都工芸繊維大学繊維科学センター「未来環境を考える講演会」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sotaro Tsuji, Kazuma Kobayashi, Tomonari Tanaka
2. 発表標題 Synthesis of polymer backbones with pendant water-soluble activated esters for synthesizing oligosaccharide-grafted glycopolymers by aqueous post-polymerization modification
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中知成
2. 発表標題 保護基を使わない糖鎖高分子の水中合成
3. 学会等名 セルロース学会関西支部第17回若手セミナー2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻爽太郎, 田中知成
2. 発表標題 重合後修飾によるオリゴ糖鎖高分子の水中合成とタンパク質結合性評価
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻爽太郎, 田中知成
2. 発表標題 非還元末端の異なるオリゴ糖鎖高分子の合成とタンパク質結合性
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻爽太郎, 田中知成
2. 発表標題 シアロ複合型糖鎖クラスターの水中合成とタンパク質結合性
3. 学会等名 日本応用糖質科学会第46回近畿支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomonari Tanaka
2. 発表標題 Protecting-group-free Synthesis of Glycopolymers in Water and Their Binding Affinity with Glycoreceptors
3. 学会等名 Trilateral Symposium on Bioinspired and Biobased Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻爽太郎, 田中知成
2. 発表標題 シアリルグライコペプチドを原料とした糖鎖高分子の水中合成
3. 学会等名 第20回関西グライコサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻爽太郎, 田中知成
2. 発表標題 水溶性活性エステル担持ポリマーと糖ペプチドを用いた糖鎖高分子の合成
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻爽太郎, 田中知成
2. 発表標題 水溶性活性エステル担持ポリマーの合成と糖鎖高分子への応用
3. 学会等名 第65回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻爽太郎, 田中知成
2. 発表標題 複合型糖鎖担持高分子の水中合成とリガンド結合性評価
3. 学会等名 第38回日本糖質学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻爽太郎, 田中知成
2. 発表標題 水溶性活性エステル担持ポリマーを用いた糖鎖高分子の水中合成と機能評価
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sotaro Tsuji, Tomonari Tanaka
2. 発表標題 Aqueous synthesis of glycopolymers using water-soluble polymers with pendant activated esters
3. 学会等名 5th International Symposium on Advances in Sustainable Polymers (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田中知成（共著）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 10
3. 書名 水中有機化学反応プロセスの開発動向	

〔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
---------	---------