

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03818

研究課題名(和文)精密重合を基盤にした糖鎖高分子ナノメディシンの開発

研究課題名(英文)Glycopolymer nanomedicine based on the controlled polymerization

研究代表者

三浦 佳子(Miura, Yoshiko)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：00335069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面の生理活性糖鎖は生体シグナルとして働く。糖認識タンパク質は、糖鎖の結合サイトが規則正しく分布している。糖鎖の配置を制御することで、糖タンパク質の分子認識を制御した機能性分子の開発が可能である。本研究ではリビングラジカル重合を駆使することで、糖鎖と官能基の配置を制御して、分子認識の制御が可能であるか検討した。

精密に重合できる糖鎖高分子のモノマー、連鎖移動剤(RAFT剤)、その他の条件を明らかにした。そして、タンパク質の大きさや構造にあった糖鎖高分子を合成した。設計した高分子は、強く特異的な分子認識能を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、リビングラジカル重合のような精密重合法によって、分子認識性(タンパク質、インフルエンザウイルス)を制御できることを示した。分子認識を行う高分子としては、抗体やタンパク質など、生体高分子だけが行うと考えられている。現在の高分子化学の技術を駆使することによって、ペプチドなどと同等の空間制御技術が可能であり、糖タンパク質の結合を制御することができるとわかった。すなわち、合成高分子の技術で、抗体と同じような働きをする分子が可能であることを原理的に示すことができた。合成高分子を抗体などと同じようにもし利用できれば、学術的にも興味深く、経済的な効果から及ぼす社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Saccharide on the cell surfaces plays important roles in the living system. Sugar recognition protein have well defined structure with assembly of several proteins. Since sugar binding sites are arranged regularly with nano meter distance, it is possible to design and synthesize the glycopolymers which fit the size of protein. In this research, we investigated the possibility to control molecular recognition with the polymers having precise structures via living radical polymerization. We clarified monomers of sugar chain polymer that can be precisely polymerized, chain transfer agent (RAFT agent) and other conditions. Then, glycopolymers were synthesized according to the size and structure of the protein. The designed glycopolymers were shown to exhibit strong and specific molecular recognition ability.

研究分野：生体機能性高分子、高分子合成

キーワード：糖鎖高分子 デノボデザイン リビングラジカル重合 分子認識 ブロック共重合 インフルエンザウイルス タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞表面の糖鎖は種々の分子認識に関与して生命現象を司っている。糖鎖の分子認識においては、糖鎖がタンパク質の結合サイトに複数結合することによって、多価効果を発揮して、大いに増強されることが知られている。そのため、高分子の側鎖に糖鎖を結合させた糖鎖高分子が分子認識材料として知られている。

また、分子認識を行う素材として、世間でよく知られているのは、抗体やタンパク質などの生体高分子である。このような生体高分子では、カルボン酸、アミン、疎水性官能基といった種々の官能基をターゲットに合わせて精密に多数配置することで分子認識を行っている。そのため、分子認識性の高分子は、精密な生体高分子であるべきという考え方が支配的であった。

すなわち、研究開始当初の背景として、糖鎖の分子認識作用を強めるものとして、糖鎖高分子が報告されていたが、一方で、その構造は制御されず、分子認識性の制御は報告されていなかった。抗体などの生体高分子との原理的な分子認識性の共通点も意識されていなかった。

2. 研究の目的

リビングラジカル重合のような精密な重合法を駆使することで、糖鎖の配置、官能基の配置を制御した分子認識性の高分子を開発することが目的である。分子認識性などの精密な機能を制御できるものとして、抗体などの生体高分子、合成ペプチド複合体などが考えられているが、合成高分子においても自由に空間を設計できると期待できる。

本研究ではリビングラジカル重合を駆使することによって、糖鎖およびその他の官能基を自由に配置して、分子認識を制御する高分子を作り出すこと、ナノメディシンを開発することを目的とする。同時に、生体機能性高分子を合成するのに適した、高分子合成化学の開発を行っていく。

3. 研究の方法

研究はモノマーの開発、ポリマーの開発、重合法の開発からなる。

まず、まず、リビングラジカル重合可能なモノマーの設計を行った。クリック反応を用いたポストクリックケミストリーによる糖鎖高分子の合成方法、またそのためのモノマー設計を検討した。アクリルアミド系、アクリレート系、メタクリル系のクリック型のモノマーを設計した。

また、ポリマーの合成と分子認識能について検討を行った。重合は連鎖移動剤を用いた、RAFTリビングラジカル重合を用いて行った。重合については、¹HNM、ゲル排除クロマトグラフィー、質量分析によって解析を行った。得られた糖鎖高分子の分子認識について、レクチン、インフルエンザウイルスヘマグルチニンを主に用いて、糖鎖部分の長さ、密度、配置の観点から検討を行った。レクチンとの分子認識性については、レクチンの一つであるコンカナバリン A との分子認識性を蛍光消光試験、赤血球凝集阻害試験によって評価した。また、インフルエンザウイルスとの分子認識については、赤血球凝集阻害試験に寄って行った。高分子の構造解析は光散乱によって行い、分子認識性との相関について検討した。高分子の分子構造については、理論的な検知からも検討した。

また、糖鎖の密度の制御や、分布の制御にあたって、ブロック共重合体を利用したが、アクリルアミドの速い重合速度を生かして、マルチブロック重合法やそのための RAFT 剤の検討を行った。

オリゴ糖を認識する分子として、オリゴ糖を糖モジュールとして単糖レベルに分解して、オリゴ糖と同じような分子認識性を発揮する糖鎖高分子の開発を行った。単糖のモジュールを複数配置した高分子を表面プラズモンイメージング法によって、スクリーニングした。

4. 研究成果

研究はモノマー設計、高分子の合成と機能評価、また糖鎖高分子ライブラリーの評価からなる。ポストクリックケミストリーを利用して、精密な構造を持つ糖鎖高分子の合成を行った。まず、モノマーの設計を行った。これまでの研究では、アクリルアミドフェニル型の糖鎖モノマーを用いていたが、リビング重合に適さないことがわかった。立体障害の少ない、アルキン側鎖のモノマーを設計して、あとから糖鎖を結合させる設計を採用した。アルキン側鎖と主鎖部分との共鳴特性を考えてモノマーを設計したところ、アルキンと主鎖の二重結合に共役性があると全くラジカル重合が進まないことがわかった。これらの知見をベースとして、ポストクリックケミストリーを用いて糖鎖高分子を合成する方法を開発した (Figure 1)。モノマーはアクリルアミド型、アクリレート型、メタクリレート型のモノマーを設計した。また、適切な RAFT 剤についても明らかにした (特許出願済み)。また、共重合する他のモノマーについては、エポキシ基を採用することで、他の官能基を入れる方法を開発した。

共重合体の手法によって糖鎖の配置、密度を制御する方法を明らかにした。コンカナバリン A の糖鎖間の距離、種々のホモポリマー、構造の理論計算より糖鎖高分子の長さを設計して、糖鎖を適切に配置する方法を明らかにした。トリブロックの高分子では、糖認識サイト付近にのみ、糖を配置させたブロック共重合体を調製すると効率よくタンパク質と結合した (Figure 2)。また、シアリルラクトースを、密度を変えて提示した高分子では、一定の長さ以上の分子鎖長をもっていて、糖鎖認識部位を架橋して、高密度に糖鎖を提示した高分子が優れた結合活

性をインフルエンザウイルスに対して示した (Figure3)。また、インフルエンザウイルスの糖認識タンパク質 (ヘマグルチニン) は糖鎖認識サイトが三角形に配置している。これによく適合するように、トリアームの RAFT 剤を合成して、高分子を合成した。すると星型ポリマーが得られ、糖認識サイトに対して適合した、糖鎖の提示系を持っているときに、インフルエンザウイルスに効率的に結合することがわかった。

また、こうした糖鎖高分子を得る上では、RAFT 剤の適切な設計が必要となった。ラジカルをアクリルアミドに合わせて、2級ラジカルを介するような設計にしたところ、特に分子量分布を上手く制御できることがわかった。アクリルアミドは重合速度が速いことから、ワンポッドでのマルチブロック重合が可能で、糖鎖高分子のマルチブロック重合を達成できることを示した。

高機能な糖鎖を考える上では、オリゴ糖鎖の存在を考えなくてはならない。高分子を添付レートとして種々の単糖や官能基を配置して、オリゴ糖と同じような機能を発揮させる事を考えた。糖鎖や官能基をモジュールとして考えて、高分子に沿って配置した。RAFT リビングラジカル重合を用いることで、末端にチオールを持つ高分子を合成した。これを表面プラズモンイメージングを用いることで、スクリーニングして、オリゴ糖鎖と同じような機能を持つ高分子を明らかにした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

Nagao, M. Hoshino, Y. Miura, Y. " Quantitative preparation of multiblock glycopolymers bearing glycountits at the terminal segments by aqueous reversible addition fragmentation chain transfer polymerization of acrylamide monomers " Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry, 2019, 57, 857-861. (10.1002/pola.29344)

Masanori Nagao, Teruhiko Matsubara, Yu Hoshino, Toshinori Sato, and Yoshiko Miura, " Topological Design of Star Glycopolymers for Controlling the Interaction with the Influenza Virus " Bioconjugate Chemistry, 2019, 30, 1192-1198. (10.1021/acs.bioconjchem.9b00134)

Terada, Y.; Hoshino, Y.; Miura " Glycopolymers mimicking GM1 gangliosides: Cooperativity of galactose and neuraminic acid for cholera toxin recognition ", Chemistry, An Asian Journal, 2019, 14, 1021-1027 (10.1002/asia.201900053).

Takahiro Oh, Masanori Nagao, Yu Hoshino, and Yoshiko Miura " Self-Assembly of a Double Hydrophilic Block Glycopolymer and the Investigation of Its Mechanism " Langmuir, 2018, 34, 8591-8598 (10.1021/acs.langmuir.8b01527).

Hikaru Matsumoto, Takanori Akiyoshi, Yu Hoshino, and Yoshiko Miura, " Size-tuned hydrogel network of palladium-confining polymer particles: a highly active and durable catalyst for Suzuki coupling reactions in water and ambient temperature " Polymer Journal, 2018, 50, 1179-1186 (10.1038/s41428-018-0102-2).

Xinnan Cui, Tatsuya Murakami, Yukihiko Tamura, Kazuhiro Aoki, Yu Hoshino, and Yoshiko Miura, " Bacterial Inhibition and Osteoblast Adhesion on Ti Alloy Surfaces Modified by Poly(PEGMA-r-Phosmer) Coating " ACS Appl, Mat Int, 2018, 10, 23674-23681(10.1021/acsami.8b07757).

K. Jono , M. Nagao , T. Oh , S. Sonoda , Y. Hoshino and Y. Miura " Controlling the lectin recognition of glycopolymers via distance arrangement of sugar blocks " Chem. Commun, 2018, 54, 82-85 (10.1039/C7CC07107H).

Masanori Nagao, Yurina Fujiwara, Teruhiko Matsubara , Yu Hoshino , Toshinori Sato , and Yoshiko Miura, " Design of Glycopolymers Carrying Sialyl Oligosaccharides for Controlling the Interaction with the Influenza Virus " Biomacromolecules, 2017, 18, 4365-4392 (10.1021/acs.biomac.7b01426).

Hikaru Matsumoto, Hirokazu Seto, Takanori Akiyoshi, Makoto Shibuya, Yu Hoshino, and Yoshiko Miura, " Macroporous Gel with Permeable Reaction Platform for Catalytic Flow Synthesis " ACS Omega, 2017,2, 8796-8802 (10.1021/acsomega.7b00909).

Hikaru Matsumoto, Hirokazu Seto, Takanori Akiyoshi, Makoto Shibuya, Yu Hoshino and Yoshiko Miura, " Macroporous monolith with polymer gel matrix as continuous-flow catalytic reactor " Chem Lett, 2017, 46, 1065-1067 (10.1246/cl.170360).

Yuhei Terada, Hirokazu Seto, Yu Hoshino, Tatsuya Murakami, Shuhei Shinohara, Kaoru Tamada and Yoshiko Miura, " SPR study for analysis of a water-soluble glycopolymer interface and molecular recognition properties " Polymer Journal, 2017, 49,255-262 (10.1038/pj.2016.99).

Xinnan Cui, Tatsuya Murakami, Yu Hoshino, Yoshiko Miura, " Anti-biofouling phosphorylated HEMA and PEGMA block copolymers show high affinity to hydroxyapatite "

Colloid and Surfaces B, 2017, 160, 289-296 (10.1016/j.colsurfb.2017.09.038)
Hirokazu Seto, Hikaru Matsumoto, Makoto Shibuya, Takanori Akiyoshi, Yu Hoshino, and Yoshiko Miura, "Poly(N-isopropylacrylamide) gel-based macroporous monolith for continuous-flow recovery of palladium(II) ions" Journal of Applied Polymer Science, 2017, 44385 (10.1002/APP.44385).
Hirokazu Seto, Makoto Shibuya, Hikaru Matsumoto, Yu Hoshino and Yoshiko Miura, "Glycopolymer monoliths for affinity bioseparation of proteins in a continuous-flow system: glycomonoliths" J. Mater. Chem. B, 2017, 5, (1148-1154 10.1039/C6TB02930B).
Nagao, M.; Kurebayashi, Y.; Seto, H.; Takahashi, T.; Suzuki, T.; Hoshino, Y.; Miura, "Polyacrylamide backbones for polyvalent bioconjugates using "post-click" chemistry" Polymer Chemistry, 2016, 7, 5920-2924 (10.1039/C6PY00904B).
Cui, X.; Koujima, Y.; Seto, H.; Murakami, T.; Hoshino, Y.; Miura, Y. "Inhibition of Bacterial Adhesion on Hydroxyapatite Model Teeth by Surface Modification with PEGMA-Phosmer Copolymers" ACS Biomater. Eng.2016, 2, 205-212 (10.1021/acsbiomaterials.5b00349)
Nagao, M.; Kurebayashi, Y.; Seto, H.; Tanaka, T.; Takahashi, T.; Suzuki, T.; Hoshino, Y.; Miura, Y. "Synthesis of well-controlled glycopolymers bearing oligosaccharides and their interactions with influenza viruses" Polymer Journal, 2016, 48, 745-749 (10.1038/pj.2016.14).
Seto, H.; Imai, K.; Hoshino, Y.; Miura, Y. "Polymer microgel particles as basic catalysts for Knoevenagel condensation in water" Polymer Journal, 2016, 48, 897-904 (10.1038/pj.2015.110).

[学会発表](計 91 件)

松本 光,星野 友,岩井 智弘,澤村 正也,三浦 佳子、パラジウム ホスフィン錯体を固定化した多孔質ポリスチレンモノリスを用いた液液二相系での触媒的フロー合成、化学工学会第 84 年会、2019
松本 光,星野 友,岩井 智弘,澤村 正也,三浦 佳子、活性なパラジウム錯体を選択的に形成するホスフィン固定化ポリスチレンの設計、化学工学会 第 84 年会、2019
崔 シン楠、村上 達也、田村 幸彦、青木 和広、星野 友、三浦 佳子、高分子コート材による細菌忌避活性と細胞付着促進機能を併せ持つチタン合金の開発、第 40 回日本バイオマテリアル学会大会、2018 年
服部 春香、松本 光、星野 友、三浦 佳子、プロリン含有多孔質高分子モノリスを用いたフロー不斉合成、化学工学会第 50 回秋季大会、2018 年
松本 光、星野 友、三浦 佳子、高分子ゲル内における三点架橋型ホスフィンリガンドの pd 触媒に対する配位挙動の制御、化学工学会第 50 回秋季大会、2018 年
長尾 匡憲、星野 友、三浦 佳子、インフルエンザウイルスとの相互作用制御に向けた星型糖鎖高分子の合成、第 67 回高分子討論会、2018 年
長尾 匡憲、吉瀬 誠也、星野 友、三浦 佳子、短時間かつ高収率な水系 R A F T 重合による生体機能性マルチブロック高分子の合成、第 67 回高分子討論会、2018 年
城野 一樹、長尾 匡憲、星野 友、三浦 佳子、Controlling the lectin recognition of glycopolymer by distance arrangement of sugar blocks、第 67 回高分子討論会、2018 年
三浦 佳子、崔シン楠、星野友、青木和広、リン酸含有高分子を用いたスーパー歯とスーパーインプラントの開発、第 67 回高分子討論会、2018 年
三浦佳子、糖鎖の不思議を詰め込んだプラスチックをつくる、第 16 回日本糖質科学コンソーシアムシンポジウム、2018 年
三浦佳子 長尾匡憲、城野一樹、糖鎖高分子のデノボデザイン、日本糖質学会年会、2018 年
Kazuki Jono, Shotaro Sonoda, Masanori Nagao, Yu Hoshino, Yoshiko Miura、Controlling the molecular recognition of glycopolymers via distance arrangement of sugar blocks、IUPAC macro 2018、2018 年
Masanori Nagao, Yurina Fujiwara, Teruhiko Matsubara, Yu Hoshino, Toshinori Sato, Yoshiko Miura、Design of Glycopolymers Carrying Sialyl Oligosaccharides and the Interaction with the Influenza Virus、IUPAC macro 2018、2018 年
Yoshiko Miura, Kazuki Jono, Masanori Nagao、Denovo Design of Glycopolymer、IUPAC macro 2018、2018 年
Yoshiko Miura, Hikaru Matsumoto, Makoto Shibuya、Polymer Gel for Biomimetic Reactor、IUPAC macro 2018、2018 年
Xinnan Cui, Yu Hoshino, Yoshiko Miura、Polymeric Surface Modification on Model Teeth for Anti-biofouling. Presenter、The 15th Pacific Polymer Conference (PPC-15)、2017 年
Yoshiko Miura, Masanori Nagao, Kazuki Jono、Denovo Design of Glycopolymer、International Conference on Advanced Polymers Biomaterials, and Nanomedicine、

2018年

- 寺田 侑平、星野 友、三浦 佳子、GM1 を模倣した糖鎖高分子の分子認識スクリーニング、第12回バイオ関連化学シンポジウム、2018年
- 木元 優里、寺田 侑平、星野 友、三浦 佳子、コレラ毒素認識に向けた糖鎖高分子スクリーニング、第28回バイオ高分子シンポジウム、2018年
- 服部 春香、松本 光、星野 友、三浦 佳子、多孔性高分子モノリスを用いたフローリアクターの開発、第55回化学関連支部合同九州大会、2018年
- 21 木元 優里、寺田 侑平、星野 友、三浦 佳子、コレラ毒素認識に向けた糖鎖高分子の網羅解析、第55回化学関連支部合同九州大会、2018年
- 22 木元 優里、寺田 侑平、星野 友、三浦 佳子、表面プラズモン共鳴イメージング(SPRI)を用いた疎水基含有糖鎖高分子・タンパク質間相互作用のスクリーニング、第67回高分子学会年次大会、2018年
- 23 長尾 匡憲、久保 あかね、藤原 由梨奈、松原 輝彦、星野 友、佐藤 智典、三浦 佳子、糖鎖高分子の構造設計によるインフルエンザウイルスとの相互作用制御、第67回高分子学会年次大会、2018年
- 24 服部 春香、松本 光、星野 友、三浦 佳子、触媒的フロー合成を指向した多孔質高分子モノリスの開発、化学工学会第83年会、2018年
- 25 松本 光、星野 友、三浦 佳子、パラジウムを固定化した多孔質オルガノゲルのフロー触媒合成への応用、化学工学会第83年会、2018年
- 26 H. Hattori, H. Mtsumoto, Y. Hoshino, Y. Miura, Development of macroporous polymer monolith containing L-proline-based organocatalyst and application to flow asymmetric aldol addition reaction, ISChE2018, 2018年
- 27 松本 光、星野 友、三浦 佳子、三点架橋配位を導入したオルガノゲルの金属触媒反応への応用、九州地区高分子若手研究会・冬の講演会、2017年
- 28 長尾 匡憲、久保 あかね、藤原 由梨奈、松原 輝彦、星野 友、佐藤 智典、三浦 佳子、シアリルラクトース含有糖鎖高分子の設計およびインフルエンザウイルスとの相互作用評価、第66回高分子討論会、2017年
- 29 田口 裕貴、寺田 侑平、星野 友、三浦 佳子、細胞分離への応用を目指した糖鎖高分子界面の検討、第66回高分子討論会、2017年
- 30 城野 一樹、園田 章太郎、星野 友、三浦 佳子、マルチブロック糖鎖高分子の配列制御による分子認識能の設計、第66回高分子討論会、2017年
- 31 三浦 佳子、松本 光、星野 友、多孔ゲルを用いたバイオミメティックリアクターの設計、第66回高分子討論会、2017年
- 32 松本 光、瀬戸 弘一、星野 友、三浦 佳子、ゲル空間を有する多孔質材料のフロー触媒反応への応用、化学工学会 第49回秋季大会、2017年
- 33 城野 一樹、王 尊弘、長尾 匡憲、星野 友、三浦 佳子、マルチブロック糖鎖高分子デノボデザインの検討、第27回バイオ・高分子シンポジウム、2017年
- 34 田口 裕貴、寺田 侑平、星野 友、三浦 佳子、糖鎖高分子を用いたバイオインターフェースの検討、第54回化学関連支部合同九州大会、2017年
- 35 城野 一樹、王 尊弘、星野 友、三浦 佳子、マルチブロック構造による糖鎖高分子デノボデザインの検討、第54回化学関連支部合同九州大会、2017年
- 36 田口 裕貴、寺田 侑平、星野 友、三浦 佳子、糖鎖高分子を用いたバイオインターフェースの検討、第66回高分子学会年次大会、2017年
- 37 城野 一樹、王 尊弘、星野 友、三浦 佳子、マルチブロック糖鎖高分子の配列制御と分子認識能の解析、第66回高分子学会年次大会、2017年
- 38 T.Oh, Y.Hoshino, Y.Miura, Analysis of Polymer Micelles by Double Hydrophilic Block Glycopolymer, 第66回高分子学会年次大会、2017年
- 39 M.Nagao, C.Tamoto, Y.Kurebayashi, D.Takahashi, T.Suzuki, Y.Hoshino, Y.Miura, Design of glycopolymer-ligands for efficient interaction with influenza viruses, 第66回高分子学会年次大会、2017年
- 40 Y.Terada, H.Ise, Y.Hoshino, Y.Miura, Screening Molecular Recognition of Protein by Glycopolymer using SPRI, 第66回高分子学会年次大会、2017年
- 41 松本 光、瀬戸 弘一、星野 友、三浦 佳子、サイズ制御されたゲルネットワークの流通式触媒反応への応用、化学工学会 第82年会、2017年
- 42 秋吉 孝則、松本 光、瀬戸 弘一、星野 友、三浦 佳子、高活性および長寿命をもつ Pd担持ナノゲルの設計、化学工学会 第82年会、2017年
- 43 田口 裕貴、寺田 侑平、星野 友、三浦 佳子、糖鎖高分子を用いたバイオインターフェースの開発、第19回化学工学会学生発表会、2017年
- 44 城野 一樹、王 尊弘、長尾 匡憲、星野 友、三浦 佳子、マルチブロック糖鎖高分子のシーケンスのコントロールと分子認識能の解析、第19回化学工学会学生発表会、2017年

ほか47件

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：化合物、連鎖移動剤、及び高分子の製造方法

発明者：長尾 匡憲、星野友、三浦佳子

番号：特願 2019-011490

出願年：2019 年

国内外の別：

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：星野友

ローマ字氏名：Yu Hoshino

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学院工学研究院化学工学部門

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40554689

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。