

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17870

研究課題名(和文)糖タンパク質ミミックの創製を指向した糖鎖高分子デザイン

研究課題名(英文)Design of Glycopolymers for Creating Glycoprotein Mimics

研究代表者

田中 知成 (Tanaka, Tomonari)

京都工芸繊維大学・繊維学系・助教

研究者番号：70585695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖クラスター効果を有する合成分子のひとつである糖鎖高分子に着目し、糖タンパク質の構造に倣って糖鎖高分子の分子設計・合成を行い、その機能を評価した。無保護糖を原料として2段階で合成した糖アクリルアミド誘導体の糖モノマー、および種々の糖を担持していないモノマーを用いてRAFT共重合反応を行い、糖鎖高分子を得た。得られた糖鎖高分子は共重合時にモノマーの仕込組成を調整することで、水に分散できるコアシェル構造を有する凝集体を形成することが明らかとなった。さらに、糖鎖高分子の凝集体は糖結合性タンパク質であるレクチンと結合することを確認した。

研究成果の概要(英文)：We focused on glycopolymers which had pendant saccharides on a synthetic polymer backbone. Glycopolymers were designed and synthesized with the idea based on a protein structure. Acrylamide derivative glycomonomers were synthesized from free saccharides via 2 steps, direct anomeric azidation and copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. The resulting glycomonomers were subjected to RAFT copolymerization with acrylamide and other monomer substrates. The glycopolymers were able to be suspended into water depend on the ratio of monomer units and formed core-shell aggregation. On binding assay of the glycopolymers with lectins, high binding affinity were observed.

研究分野：高分子化学

キーワード：糖鎖高分子 オリゴ糖 RAFT重合 糖クラスター効果 レクチン コアシェル構造 温度応答性 保護基フリー

### 1. 研究開始当初の背景

生体内の糖鎖は、細胞表面などに複数の糖分子が密集した集合体として存在することにより、タンパク質やウイルス、毒素などとの相互作用が一分子の場合に比べて強くなることから、“糖クラスター効果”として知られている。合成高分子の側鎖に複数の糖分子を結合した糖鎖高分子は、糖担持 dendrimer などと同様に糖クラスター効果を有する合成分子のひとつとして、材料科学分野や医療分野での利用が期待されている。しかし、従来の糖鎖高分子合成は、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合成例がほとんどであり、生体内に存在する複雑な構造を有するオリゴ糖鎖を用いた糖鎖高分子合成の報告はほとんどなかった。また、合成される糖鎖高分子の多くは、直鎖状の構造を主としており、それらの集合体に関する知見は多くない。

### 2. 研究の目的

近年、筆者らは、無保護糖を原料とした保護基を使用しない(保護基フリー)糖鎖高分子の合成法を開発し、シアル酸含有の三糖であるシアリルラクトースや生体内オリゴ糖鎖として代表的なシアル酸含有 N-結合型糖鎖である複合型糖鎖に糖鎖高分子の保護基フリー合成法を適用した<sup>引用文献1</sup>。これらの糖鎖高分子は直鎖状の構造である。本研究では、糖鎖高分子の保護基フリー合成法を基盤技術として、コア-シェル構造を形成する糖鎖高分子を合成し、その集合体表面に密集して存在する糖鎖の機能を評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖モノマーの合成

無保護糖に塩基性条件下、2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド(DMC)とアジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ )を作用させて $\beta$ -グリコシルアジド **1** を得た後、アルキンを有するアクリルアミド誘導体とのアジド-アルキン環化付加反応に供することで、保護基を使用することなく糖モノマー **2** を合成した。

#### (2) 糖鎖高分子の合成

合成した糖モノマー **2** を用いて共重合反応を行い、透析により精製することで糖鎖高分子を得た。

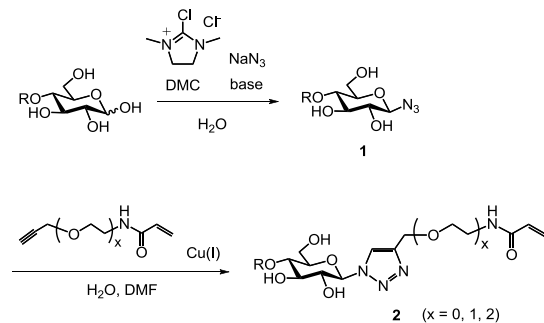
#### (3) 糖鎖高分子の機能評価

合成した糖鎖高分子を水中に分散させ、ダイナミック光散乱光度計(DLS)で分析することで凝集体の粒径を求めた。また、温度変化による相転移挙動、およびレクチンとの相互作用を UV-Vis 分光器を用いて分析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 糖モノマーの合成

DMC と  $\text{NaN}_3$  を用いて塩基性条件下、糖アノマー位の直接アジ化反応を行い、 $\beta$ -グリコシルアジド **1** を得た(Scheme 1)。続いて、アルキンを有するアクリルアミド誘導体と銅(I)を触媒とするアジド-アルキン環化付加反応を行い、糖モノマー **2** を合成した。



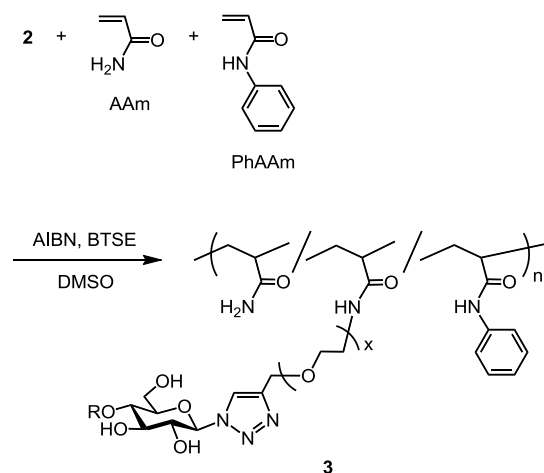
Scheme 1 糖モノマーの保護基フリー合成。

#### (2) 糖鎖高分子の合成

##### ① 疎水性基を有する糖鎖高分子の合成

合成した **2**、アクリルアミド(AAm)、および N-フェニルアクリルアミド(PhAAm)をモノマーとして、2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)(AIBN)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(BTSE)を連鎖移動剤に用いて DMSO 中で可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)共重合を行い、側鎖に糖残基および疎水性のフェニル基を有するランダム共重合体から成る糖鎖高分子 **3** を得た(Scheme 2)。

合成した **3** を水に分散させると白濁した分散液が得られた。DLS により糖鎖高分子の粒径を測定したところ、100 nm 程度の凝集体を形成していることを確認した。疎水性の PhAAm ユニットがコア、親水性の **2** ユニットがシェルとなり、水中で凝集体を形成したと考えられる。

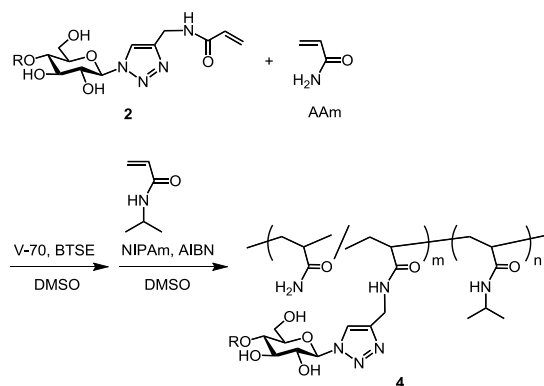


Scheme 2 糖鎖高分子 **3** の合成。

##### ② 温度応答性糖鎖高分子の合成

合成した **2** ( $x=0$ ) と AAm を用いた RAFT 共

重合を行い、得られた糖鎖高分子を末端に連鎖移動剤を有するプレポリマーとして *N*-イソプロピルアクリルアミド(NIPAm)を重合することで、側鎖に糖残基を有するポリ AAm セグメントとポリ NIPAm セグメントから成るブロック共重合体 **4** を合成した(Scheme 3)。



Scheme 3 糖鎖高分子 **4** の合成。

合成した **4** の水溶液はポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAm) よりも高い下限臨界溶液温度(LCST)を示した(Figure 1)。一方、**4** と組成の等しいランダム共重合体では、LCSTはPNIPAmと差がなかった。**4** を LCST 以上の 40 °C で DLS により粒径を測定したところ、100 nm 程度の凝集体を形成していることが確認できた。

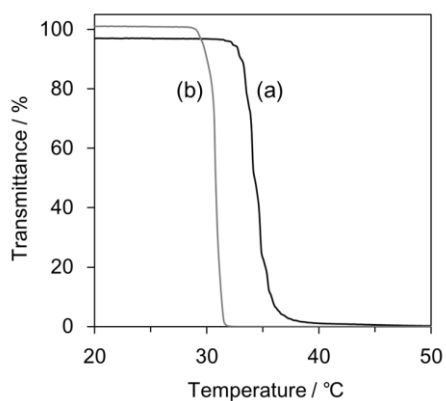


Figure 1 透過率の温度依存性. (a) **4**: P(MalAAm-co-AAm)<sub>40-b</sub>-PNIPAm<sub>272</sub>, (b) PNIPAm.

## (2) 糖鎖高分子の機能評価

### ① 疎水性基を有する糖鎖高分子の機能評価

合成した **3** (x=2) の PBS 分散液にレクチン(例えばラクトース(Lac)の場合、ピーナッツレクチン(PNA))を添加したところ、溶液の透過率(500 nm)は上昇し、凝集沈殿が生成した(Figure 2)。一方、牛血清アルブミン(BSA)を添加した場合には、透過率は変化しなかったことから、**3** の凝集体表面には糖分子が存在し、非特異結合することなくレクチンと強く結合することが確認できた。

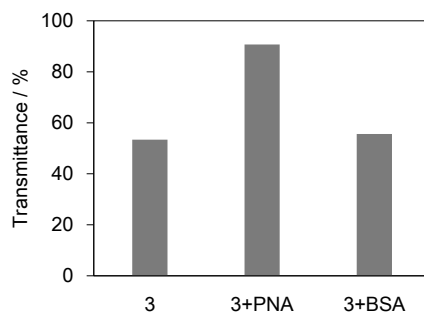


Figure 2 糖鎖高分子 **3** (P(LacAAm(x=2)-co-PhAAm-co-AAm)) のレクチン結合評価。

### ② 温度応答性糖鎖高分子の機能評価

合成した **4** は LCST 以上で凝集して白濁する温度応答性の糖鎖高分子である。マルトース(Mal)を側鎖に有する **4** を用いて、PBS 中、LCST 以上の 40 °C で Mal に結合するレクチンであるコンカナバリン A (ConA) を添加したところ、透過率は上昇し、凝集沈殿が生成した。Mal に結合しないレクチンを添加した場合には、透過率は変化しなかった。一方、LCST 以下では ConA を添加しても凝集沈殿は生成しなかった。加えて、Lac を側鎖に有する **4** の場合には、PNA を添加すると、Mal の場合と同様の結果が得られた。以上の結果より、**4** は LCST 以上で糖残基をシェルとする凝集体を形成し、対応するレクチンと強く結合することが確認できた。さらに、LCST 以上の 40 °C でレクチンを添加して凝集沈殿が生成した後、温度を LCST 以下の 25 °C に下げると凝集沈殿は溶解して消失した。このとき、溶液の吸光度(214 nm)は **4** の溶液中の濃度が上昇することで上昇した(Figure 3)。この結果は、**4** とレクチンとの結合が LCST 以下で解離したことを示唆している。さらに、この溶液を再度 40 °C に昇温すると、再び凝集沈殿が生成し、吸光度が低下した。再度 25

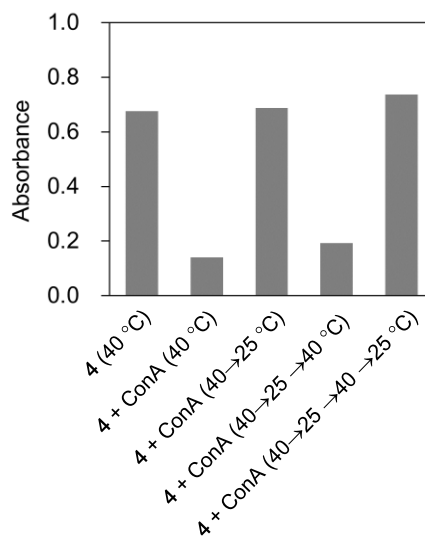


Figure 3 糖鎖高分子 **4**: P(MalAAm-co-AAm)<sub>40-b</sub>-PNIPAm<sub>272</sub> のレクチン結合評価。

℃に冷却すると、吸光度は上昇し凝集沈殿が消失したことから、**4**は温度に可逆的に応答し、LCST以上でのみレクチンと結合することが明らかとなった。すなわち、LCST以上では**4**の凝集体表面に糖分子が高密度に存在して対応するレクチンと強く結合するのに対して、LCST以下では凝集体を形成しないために糖分子の密集度が低く、レクチンとの結合が弱いことが示唆された。

<引用文献>

- ① Tomonari Tanaka, Hideki Ishitani, Yoshiko Miura, Kenta Oishi, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Shin-ichiro Shoda, Yoshiharu Kimura, Protecting-Group-Free Synthesis of Glycopolymers Bearing Sialyloligosaccharide and Their High Binding with the Influenza Virus, ACS Macro Letters, Vol.3, 2014, pp.1074-1078.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Tomonari Tanaka, Yiting Zhou, Chihiro Tamoto, Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, An  $\alpha$ 2,3-Linked Sialylglycopolymer as a Multivalent Glycoligand against Avian and Human Influenza Viruses, Journal of Applied Glycoscience, 査読有, Vol.64, 2017, pp.43-48, DOI: 10.5458/jag.jag.JAG-2017\_003
- ② 田中知成、保護基フリー合成による糖鎖高分子の新展開、高分子論文集(高分子科学・工学のニューウェーブ)、査読有、Vol.73、2016、pp.389-400、DOI: 10.1295/koron.2016-0020
- ③ Tomonari Tanaka, Protecting-Group-Free Synthesis of Glycomonomers and Glycopolymers from Free Saccharides, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 査読有, Vol.28, 2016, pp.E101-E108, DOI: 10.4052/tigg.1513.1E

[学会発表] (計14件)

- ① 田中知成、周毅婷、田本千尋、紅林佑希、高橋忠伸、鈴木隆、3'-シアリルラクトースを用いた糖鎖高分子の合成と機能評価、日本農芸化学2017年度大会、2017年3月17-20日、ウェスティン都ホテル京都・京都女子大学(京都)。
- ② Tomonari Tanaka, Yiting Zhou, Chihiro Tamoto, Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Yoshiko Miura, Protecting-group-free Synthesis and Assay of Glycopolymer Ligands for Human and Avian Influenza Viruses, The 11th SPSJ International Polymer Conference, 13-16<sup>th</sup> December 2016, Fukuoka International Conference Center (Fukuoka, Japan).

- ③ 田中知成、オリゴ糖を用いる高分子マテリアルの創製 –保護基フリー合成の戦略と実践–、平成28年度高分子学会北陸支部富山地区講演会、2016年12月5日、富山大学工学部(富山)、招待講演。
- ④ Tomonari Tanaka, Facile Synthesis of Glycopolymers from Free Sialyloligosaccharides and Their Binding Assay with Influenza Viruses, 第65回高分子分子討論会、2016年9月14-16日、神奈川大学横浜キャンパス(横浜)、日韓ジョイントセッション、招待講演。
- ⑤ 周毅婷、田本千尋、紅林佑希、高橋忠伸、鈴木隆、三浦佳子、田中知成、シアル酸含有オリゴ糖を用いたヒトおよびトリインフルエンザウイルスに結合する糖鎖高分子の合成と機能評価、第65回高分子分子討論会、2016年9月14-16日、神奈川大学横浜キャンパス(横浜)。
- ⑥ 岡本優、田中知成、QCMによるオリゴ糖を側鎖に有する糖鎖高分子と糖タンパク質の相互作用検出、第65回高分子分子討論会、2016年9月14-16日、神奈川大学横浜キャンパス(横浜)。
- ⑦ Tomonari Tanaka, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Yoshiko Miura, Use of Oligosaccharides as Multivalent Glycoligands Based on Protecting-group-free Synthesis from Free Saccharides, 3rd International Symposium on Advances in Sustainable Polymers, 4-6<sup>th</sup> August 2016, Kyoto Institute of Technology (Kyoto, Japan).
- ⑧ Yiting Zhou, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Yoshiko Miura, Tomonari Tanaka, Synthesis and Assay of Avian Influenza Virus-Recognizing Glycopolymers Using Sialyloligosaccharides, 3rd International Symposium on Advances in Sustainable Polymers, 4-6<sup>th</sup> August 2016, Kyoto Institute of Technology (Kyoto, Japan).
- ⑨ Masaru Okamoto, Tomonari Tanaka, Detection of Glycoreceptors on the QCM Substrate Using Glycopolymers, 3rd International Symposium on Advances in Sustainable Polymers, 4-6<sup>th</sup> August 2016, Kyoto Institute of Technology (Kyoto, Japan).
- ⑩ Tomonari Tanaka, Yiting Zhou, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Yoshiko Miura, Protecting-group-free Synthesis of Glycopolymers Bearing Sialyloligosaccharides via Direct Anomeric Activation of Free Saccharides, 28th International Carbohydrate Symposium, 17-21<sup>st</sup> July 2016, New Orleans, USA.
- ⑪ 岡本優、田中知成、保護基を使わない糖鎖高分子の精密合成とレセプター検出への応用、第62回高分子研究発表会(神戸)、2016年7月15日、兵庫県民会館(神戸)。

- ⑫ 周毅婷、高橋忠伸、鈴木隆、三浦佳子、田中知成、シアル酸含有オリゴ糖を用いたトリインフルエンザウイルスと強く結合する糖鎖高分子の合成と機能評価、第 65 回高分子学会年次大会、2016 年 5 月 25-27 日、神戸国際会議場・展示場 (神戸).
- ⑬ 周毅婷、田中知成、トリインフルエンザウイルスを標的としたシアル酸含有糖鎖高分子の保護基フリー合成、平成 27 年度繊維学会秋季研究発表会、2015 年 10 月 22-23 日、京都工芸繊維大学松ヶ崎キャンパス (京都).
- ⑭ 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 年 5 月 27-29 日、札幌コンベンションセンター (札幌).

[図書] (計 1 件)

- ① Tomonari Tanaka, Protecting-group-free synthesis of glycosyl derivatives, glycopolymers, and glycoconjugates, in Protecting-Group-Free Organic Synthesis: Improving Atom-Economy and Efficiency, ed. Rodney A. Fernandes, Wiley, in press.

[その他]

ホームページ等

<http://tomonari-tanaka.wixsite.com/tomonari-tanaka>

## 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・繊維学系・助教  
研究者番号： 70585695