

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14494

研究課題名(和文)新しいイオン開環重合による非天然アミノ多糖の精密合成と特性解析

研究課題名(英文) Precision Synthesis and Characterization of Unnatural Polyaminosaccharides Prepared via Novel Ionic Ring-Opening Polymerization

研究代表者

甲田 優太 (Koda, Yuta)

大阪市立大学・大学院工学研究科・特任助教

研究者番号：90759325

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)：本研究では、多糖材料の多様化とさらなる発展に向けて、生体内では合成できない非天然のオリゴアミノ糖の開発を行った。この目的の達成のために、単糖に合成分子を連結した糖モノマーを合成し、新しい重合反応により連結することで非天然オリゴアミノ糖の合成に成功した。本研究で確立した新しい重合反応は、世界に先駆けて提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は、DNAとタンパク質に次ぐ三大天然高分子の一つであり、生体内では必要不可欠な役割を担っている。したがって、糖鎖を利用した材料は生体適合性が高く、様々な生体材料の研究に用いられてきた。しかしながら、DNAやタンパク質に比べて糖鎖の人工合成は難しく、天然物を抽出して利用していることが多いため、材料機能を新たに付加する際の制約が多く、研究が滞り始めている。そこで本研究では、新しい糖鎖合成法を開発し、天然には存在し得ない糖鎖の合成に成功した。したがって、本研究で得られた成果は、合成化学の発展に貢献するだけでなく、新たな糖鎖材料の開発へとつながり、生体材料のさらなる飛躍が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this research, the unnatural oligoaminosaccharide which cannot be prepared in biological system was synthesized toward diversifying the molecular design of glycomaterials and the development. To achieve this, the new monosaccharide monomer bearing the artificial moiety was synthesized, and the monomer was polymerized by new polymerization reaction, resulting in the formation of the desired unnatural oligoaminosaccharides. This new polymerization mechanism was proposed for the first time in the whole world.

研究分野：高分子化学

キーワード：イオン重合 開環重合 糖質重合 糖鎖化学 糖鎖生物学 アミノ多糖 多糖材料

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、DNA やタンパク質に次ぐ三大天然高分子の一つであり、翻訳後修飾によるタンパク質の安定化、細胞骨格の維持、分子認識など生命の恒常性維持のために必要不可欠な役割を担っている。しかしながら、DNA やタンパク質と比較して、生体内での糖鎖機能(糖鎖生物学)は、未解明の部分が多い。これは、糖鎖の人工合成法が他の天然高分子と比較して成熟していないことが原因の一つである。よって、種々の糖鎖を自在に合成することが可能になれば、高分子合成だけでなく、糖鎖生物学など他分野への貢献も期待できる。

有機合成技術の飛躍的な発展により種々のオリゴ糖の全合成が可能になるばかりでなく、多糖やオリゴ糖を基盤とした糖鎖材料も多く開発されてきた。例えば、糖鎖材料は、バイオセンサー、タンパク質の安定化剤、ドラッグデリバリーシステムにおけるナノ運搬体としての応用が数多く研究されている。しかし、有機合成技術を基盤とした糖鎖生物学や糖鎖材料の研究を行うためには、成熟した有機合成技術が必要であり、異分野の研究者には障壁が大きく、課題が残されている。よって、より簡便な合成技術を開発すると、これらの研究を加速させることが可能になると期待できる。

一方、これまで重合化学的手法による糖鎖の合成が検討されたが、得られた糖鎖は天然物と同一であり、重合度が10以上のものを合成することができなかった。また、天然物とは異なる構造の糖鎖の合成も研究されているが、エステル結合やアミド結合で糖ユニットが連結されており、グリコシド結合を有していない。したがって、グリコシド結合で連結された非天然糖鎖を簡便に合成するためには、新しい重合反応を開発する必要がある。グリコシド結合を有する非天然糖鎖の簡便合成が可能になると、糖鎖材料の分子設計が多様化できるだけでなく、生体内における糖鎖の分子設計の重要性、特にグリコシド結合の重要性の解明できる可能性が期待できる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、単糖(モノマー)を有機反応ではなく、新しい重合反応で連結することにより、糖鎖を簡便に、かつ人工的に合成する手法の開発を目指した(図1)。

#### (1) 単糖モノマーの設計

本研究では、重合反応により簡便に糖鎖を連結するために、オキサゾリン環を利用することを考えた。そこで、グルコサミン(GlcN)と2-メチルオキサゾリン(MeOx)が連結した双環構造を有する糖モノマー(Glc(MeOx))を設計した。

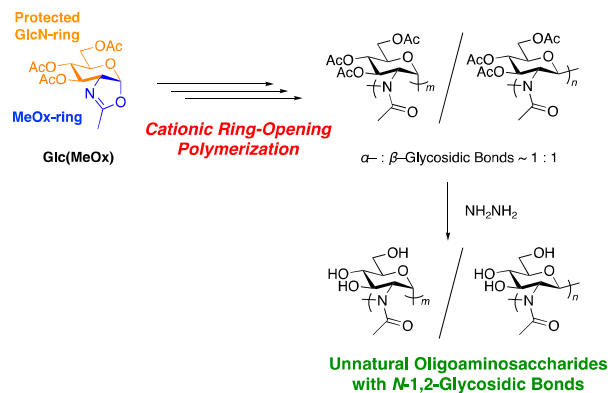


図1. オキサゾリン型糖モノマーのカチオン開環重合による非天然糖鎖の合成

#### (2) 非天然オリゴアミノ糖の創出のための新しい重合系の開発

設計した新しい糖モノマーにカチオン重合の開始剤系を作用させ、Glc(MeOx)のオキサゾリン環のみを選択的に開環することにより糖鎖を合成することを目指した。また、得られる糖鎖は、単糖ユニットがN-1,2-グリコシド結合で連結されたものであり、生体内や酵素では合成不可能な人工糖鎖の創出を目指した。

#### (3) 非天然オリゴアミノ糖の解析

本研究で得られる人工糖鎖は、生体内などの既存のシステムでは合成不可能であり、本研究で開発した重合反応によってのみ合成することが可能である。そこで、得られた糖鎖の構造決定を各種核磁気共鳴(NMR)法と質量分析(MS)により行った。また、人工糖鎖の規則構造を円偏光二色性(CD)測定により評価した。

#### (4) 非天然オリゴアミノ糖の機能

本研究で得られる人工糖鎖は天然には存在し得ないN-1,2-グリコシド結合を有している。そこで、グルコサミンがO-1,4-グリコシド結合で連結された天然糖鎖(キチン)と比較を行い、非天然結合由来の機能が発現するかを検討した。

### 3. 研究の方法

グルコサミンと2-メチルオキサゾリンが連結した双環構造を有する糖モノマーを設計した。このモノマーにカチオン重合の開始剤系を作用させることにより、カチオン開環重合を誘発し、オキサゾリン環の選択的開環反応により人工糖鎖を創出した。得られた糖鎖は、各種分光法により解析し、非天然構造由来の機能発現を目指した。

## 4. 研究成果

### (1) 単糖モノマーの設計

水酸基がアセチル基で保護された *N*-アセチルグルコサミンにルイス酸を作用させて、単糖構造における 1,2 位の位置で閉環を行った。NMR により解析したところ、グルコサミンの 1,2 位の位置が 2-メチルオキサゾリンで閉環された単糖モノマー (Glc(MeOx)) を得たことを確認した。

### (2) 非天然オリゴアミノ糖の創出のための新しい重合系の開発

#### 重合反応による糖モノマーの連結

*tert*BuI をカチオン源とし、塩化ガリウム (GaCl<sub>3</sub>) を組み合わせ、ジクロロエタン中 40 °C で Glc(MeOx) を反応させた (Glc(MeOx)/*tert*BuI/GaCl<sub>3</sub> = 1000/40/40 mM)。96 時間後、Glc(MeOx) が 86% 消費されたことを確認した。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により評価したところ、SEC 曲線が高分子量側にシフトし、オリゴマーが生成したことが明らかとなった (Mp = 950)。

#### 重合の素反応解析

Glc(MeOx) はオキサゾリン環を有しているため、研究開始当初は MeOx に適した開始剤系 (MeOTf および MeI) での重合を検討した。しかしながら、開始剤効率が悪く、しばしば重合が途中で停止してしまうことがあった。

そこで、ビニルエテルのカチオン重合系で使用されるハロゲン系開始剤を使用したところ、開始反応が効率よく進行し、反応が停止することなく、重合が完了した。

以上の検討により、Glc(MeOx) はオキサゾリン環を有しているにも関わらず、従来のオキサゾリンの重合機構 (連続 S<sub>N</sub>2 反応) では反応が進行せず、ビニルエテルカチオン中間体を経由して重合が進行していることが分かった。この反応は、連続 S<sub>N</sub>1 反応であり、オキサゾリン誘導体モノマーの新しいカチオン開環重合系を初めて提唱した (図 2)。

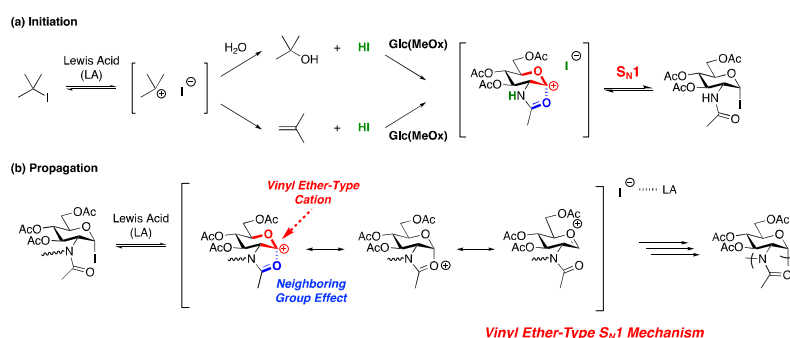


図2. 本研究で新たに提唱したオキサゾリン型糖モノマーのカチオン開環重合の重合機構

### (3) 非天然オリゴアミノ糖の解析

#### 構造決定

得られたオリゴ糖の質量分析 (ESI-MS) を行ったところ、6 つのピークが検出され、そのピーク間隔は、糖モノマーの分子量と一致した。この結果から、グルコサミンのユニットが連結されたオリゴ糖が生成していることが明らかとなった。また、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR, <sup>13</sup>C DEPT, および各種 2 次元 NMR (COSY, ROESY, TOCSY, HSQC, HMBC) 測定により、*N*-1,2-グリコシド結合で連結された非天然オリゴアミノ糖が生成していることを明らかにした。また、今回新たに開発したカチオン開環重合系は、S<sub>N</sub>1 反応を種反応として進行するため、アノマー位の立体規則性はなく、 $\alpha$ -および  $\beta$ -グリコシド結合がほぼ等量形成されていることを確認した。

得られたオリゴ糖を DMF (*N,N*-dimethylformamide) 中でヒドラジンと反応させると、アセチル基を選択的に脱保護することができた。得られた脱保護体も MS および各種 NMR 測定により生成を確認した。また、オキサゾリン側鎖の *N*-アセチル基は、ヒドラジン存在下でも加水分解されていないことも明らかにした。

以上の検討により、オキサゾリン型の糖モノマーをカチオン開環重合により連結させることにより、より簡便に、これまで天然には存在し得なかった非天然オリゴアミノ糖を合成することが可能になった。

#### 規則構造の評価

得られた非天然オリゴ糖鎖の脱保護前後における規則構造を円偏光二色性 (CD) 測定により評価した。その結果、脱保護前のオリゴ糖は、THF (テトラヒドロフラン) やジクロロエタン中で非常に大きな正のコットン効果を示し、得られたピークは温度に依存して大きく変動した。したがって、脱保護前のオリゴ糖は、有機溶媒中において規則的な二次構造を形成していることが明らかとなった。

次に、脱保護後のオリゴ糖鎖を水に溶解させて CD 測定を行った。その結果、オリゴ糖は、大きな負のコットン効果を示し、脱保護前後でその規則構造が大きく変化することが明らかとなった。

#### (4) 非天然オリゴアミノ糖の機能

上述の検討により、本オリゴ糖は、非天然 *N*-1,2-グリコシド結合を有している。そこで、この非天然結合由来の機能が発現できるか、検討を行った。*N*-アセチルグルコサミンをモノマーユニットとする天然糖鎖として、キチンがあり、*O*-1,4-グリコシド結合により *N*-アセチルグルコサミンが連結されている。よって、キチンの分解酵素であるキチナーゼを得られたオリゴ糖鎖に作用させ、加水分解耐性の有無を検証した。具体的には、合成したオリゴ糖の加水分解前後の SEC 測定を行うことにより、その分解挙動を評価した。

その結果、本研究で合成したオリゴ糖は、水中でキチナーゼによる加水分解反応により全く分解されなかった。よって、本研究で合成したオリゴ糖は、天然糖鎖の加水分解酵素に対して、難分解性の機能を有していると推察される。

以上の検討により、本研究課題では、糖鎖モノマーを意図的に設計し、重合反応で連結することにより、簡便に糖鎖材料の分子設計を多様化できる可能性を見出した。今回の検討では、オキサゾリン環を単糖に直接連結し、カチオン開環重合によりオキサゾリン環を選択的に開環することで、非天然 *N*-1,2-グリコシド結合で連結された非天然糖鎖を合成した。また、その重合機構は、通常のおキサゾリンの重合機構とは異なり、ビニルエーテルカチオン中間体を經由していることを初めて明らかにした。さらに、非天然糖鎖由来の機能発現が可能であることを見出し、今後の糖鎖材料の発展に貢献することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yuta Koda, Takaya Terashima, Makoto Ouchi	4. 巻 8
2. 論文標題 Unnatural Oligoaminosaccharides with N-1,2-Glycosidic Bonds Prepared by Cationic Ring-Opening Polymerization of 2-Oxazoline-Based Heterobicyclic Sugar Monomers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Macro Letters	6. 最初と最後の頁 1456-1460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmacrolett.9b00674	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 甲田優太、寺島崇矢、大内誠
2. 発表標題 オキサゾリン型糖モノマーのカチオン開環重合による非天然オリゴアミノ糖の合成
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲田優太、寺島崇矢、大内誠
2. 発表標題 オキサゾリン型糖モノマーの環選択的カチオン開環重合による非天然オリゴアミノ糖の合成と評価
3. 学会等名 第67回高分子学会討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲田優太
2. 発表標題 オキサゾリン型糖モノマーのカチオン開環重合による非天然オリゴアミノグリコンの合成と物性評価
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 Yuta Koda
2. 発表標題 New Synthetic Strategy for Unnatural Oligoaminosaccharide by Cationic Ring-Opening Polymerization
3. 学会等名 2nd G' L' owing Polymer Symposium in KANTO (GPS-K 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 甲田優太
2. 発表標題 非天然オリゴアミノ糖の合成に向けたオキサゾリン型双環糖モノマーの設計
3. 学会等名 日本化学会第100回春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 甲田優太
2. 発表標題 オキサゾリンハイブリッド型非天然オリゴアミノ糖の合成と機能評価
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----