

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20750088
研究課題名（和文）糖鎖高分子を用いた病原体防除材料の開発

研究課題名（英文） Pathogen Removal Materials by Glycopolymers

研究代表者

三浦 佳子 (MIURA YOSHIKO)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・准教授

研究者番号：00335069

研究成果の概要（和文）：

細胞表面に存在する糖鎖と病原体の結合を利用した新規な糖鎖高分子材料の合成と機能の解析を行った。硫酸化糖、ウロン酸を側鎖にもつポリアクリルアミド誘導体を合成して、グリコサミノグリカンのモデル分子として働きを検討して、アミロイド β の凝集抑制効果を示すことを明らかにした。糖鎖高分子について、RAFT 剤を用いたリビングラジカル重合を検討し、チオール末端を有する糖鎖高分子を得ることができた。得られた糖鎖高分子については、金や金微粒子に対し容易に結合して、複合材料を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

The acrylamide derivatives of sulfonated glucosamine and uronic acid were synthesized as glycosaminoglycan model polymers. The polymers were bound to amyloid β peptides to inhibit the aggregation of peptides. The living radical polymerization of glycopolymers was investigated with RAFT reagents. The living radical polymerization provides the glycopolymers with thiol terminal, which were combined with gold substrates and gold nanoparticles. The glycopolymer hybrid materials showed the specific affinity to protein, pathogen and bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：生体関連高分子、糖鎖高分子、リビング重合

1. 研究開始当初の背景

(1) 生理活性糖鎖を側鎖に有する、“糖鎖高分子”が生理活性機能材料として注目を集めている。生理活性糖鎖は、生体のシグナル分子として働き、ウイルス、毒素タンパク質、細菌などの細胞感染や疾病に関わっている。糖鎖とタンパク質の相互作用は単独では弱いですが、糖鎖高分子として集合化させると、“糖鎖クラスター効果”と呼ばれる多価効果によって強く成る。加えて、糖鎖高分子は高分子の構造に基づく、材料形成能を持っているために、優れた生体機能材料になることが知られている。

(2) これまでに糖脂質や糖タンパク質糖鎖を結合させた糖鎖高分子の開発が進んできていた。当時はより複雑な構造を持つ、多糖、グリコサミノグリカンの機能を実用化する材料の開発が望まれていた。グリコサミノグリカン類は、多くの生命現象に関わっており、その機能の再構築と実用化が最も強く求められている天然高分子である。天然のグリコサミノグリカンは大変高価であるため、再合成の研究が積極的に行われている。生物学分野では、国内外で糖鎖合成酵素の解析、クローニングが進められている。また、有機化学分野では、グリコサミノグリカン含有糖鎖合成について粛々で行われている。しかし、こうした手法ではグリコサミノグリカンの構成糖鎖の合成はできても、材料展開に至る、高分子量の多糖の合成、及び実践的な量の確保は難しかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では生理活性多糖（グリコサミノグリカン）を模倣した高分子の合成を行い、この高分子によって病原体を防除する材料の創製を行うことを目的とした。

①グリコサミノグリカンは種々の硫酸化糖やウロン酸（カルボン酸を含む糖鎖）の共重合体で、不斉反転構造を含む、複雑な化学構造をしている。グリコサミノグリカンの機能解析は、含有オリゴ糖の合成を通じた見事な研究によって証明されてきた。しかし、オリゴ糖鎖では、機能材料として展開させることが難しい上、高分子物性や多価効果などの多糖特有の働きを再現することはできない。そこで、研究代表者はグリコサミノグリカン含有糖鎖構造を抽出して、ビニル型のモノマーとして誘導体化、高分子化し、模倣するバイオミメティックな手法によって、グリコサミノグリカンモデル高分子、ライブラリー高分子の合成を行うことを目的とした。

②病原体を除去する材料への開発に向けて、他の材料に接合した糖鎖高分子の調製手法を検討することについても目的とした。

3. 研究の方法

(1) グリコサミノグリカンに含まれる糖鎖を取りだして、これをアクリルアミド誘導体として合成した。得られたモノマーについては、フリーラジカル重合及び、リビングラジカル重合によって高分子化して、グリコサミノグリカンモデル高分子を得た。これらの高分子について、アルツハイマー病アミロイドβとの結合活性を調べた。

(2) リビング重合については、RAFTリビングラジカル重合を行い、精密な高分子を得ると同時に、末端にチオールを導入することで、金微粒子、金基板やマレイミドを介した基材のカップリングを検討した。金微粒子や金基板については結合特性について分光学的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) 6位硫酸化グルコサミン、グルクロン酸、アセチルグルコサミンのアクリルアミド誘導体を合成し、アクリルアミドとの共重合体をラジカル重合することによって得た。これらのモノマーの分率、分子量を調製することで、グリコサミノグリカンモデルポリマーを合成した。このポリマーについて、アルツハイマー病アミロイドβペプチドの凝集抑制活性を調べた。

①6位硫酸化糖を含む高分子は、アミロイドβペプチドに対する結合活性を示し、凝集を抑制した。グルクロン酸と6位硫酸化糖の高分子が最も強い凝集抑制能を示した。アミロイドβの凝集に対する糖鎖高分子の効果を速度論的な解析を行ったところ、硫酸化糖ユニットがアミロイドβ同士の凝集核形成を抑制する効果があり、グルクロン酸ユニットは線維の伸長を抑制する効果があることがわかった。硫酸化糖とグルクロン酸の双方を持っている共重合体の高分子では、この2つの働きを両方とも持っているために最も優れた凝集抑制活性を示したと考えられた。これらの糖ユニットの役割の違いについては、硫酸化糖やグルクロン酸を含む天然多糖である、ヘパリン、ヒアルロン酸でも検証した。ヘパリンが強いアミロイドβタンパク質との結合能を持つことや、ヒアルロン酸がアミロイドβの線維の伸長抑制に一定の効果があることを見出した。

②また、主鎖をポリγグルタミン酸にして、硫酸化糖や硫酸基を導入した高分子も合成して、生分解性のグリコサミノグリカンモデル高分子についても合成を行った。生分解性のグリコサミノグリカンモデル高分子については、側鎖にカルボン酸ユニットがあるため、ウロン酸様の働きがあり、硫酸基を導入することによって、アミロイドβへの凝集抑

制能と線維伸長抑制効果の双方を発揮することがわかった。

(2) RAFTリビングラジカル重合を利用した糖鎖高分子の合成と複合材料の開発を検討した。マンノースやグルコサミンを側鎖に有するアクリルアミド誘導体について、リビングラジカル重合を行うことで、分子量が均一に制御された糖鎖高分子を得た。この末端を還元することで、チオールを末端に持つ糖鎖高分子を合成し、金基板や金微粒子と複合化した。

①金微粒子と複合化させた糖鎖高分子については認識が対応するレクチンを加えると、金微粒子が凝集して、色調変化が起こることが観察された。その色調変化は特異的で、対応しないレクチンやアルブミンでは起こらなかった。かつ、金微粒子は何も加えなければ半年以上にわたって安定であることがわかった。糖鎖高分子修飾金微粒子を用いて、これを大腸菌に接触させた上で、遠心分離することで、大腸菌を取り除ける材料になることがわかった。

②糖鎖高分子を金基板に接合させて、糖鎖高分子修飾基板を作成した。この基板について、タンパク質との結合を表面プラズモン(SPR)によって測定すると、高分子のクラスター効果による糖鎖-レクチンの強い相互作用が確認された。また、基板上でも糖鎖とレクチン間の相互作用は特異的で、S/Nで15倍以上と非常に高いことが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Yoshiko Miura, Hikaru Mizuno, "Interaction Analyses of Amyloid beta Peptide (1-40) with Glycosaminoglycan Model Polymers" Bull Chem Soc Japan,

- (掲載確定) 査読有
2. Yoshiko Miura, “Inhibition of Protein amyloidosis by glycomaterials”
Trends in Glycosci. Glycotech, 2009, 21, 324-334. 査読有
 3. M. Toyoshima, Y. Miura, “Preparation of Glycopolymer-substituted Gold Nanoparticles and Their Molecular Recognition”, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2009, 47, 1412-1421. 査読有
 4. K. Funato, N. Shirahata, Y. Miura, “The monolayer of α -Man via Si-C bond formation and protein recognition”, Thin Solid Films 2009, 518, 699-702. 査読有
 5. Y. Miura, C. You, R. Ohnishi, “Inhibition of Alzheimer amyloid β aggregation by polyvalent trehalose”, Sci. Technol. Adv. Mat., 2008, 9, 24407. 査読有
 6. Y. Miura, K. Yamamoto, K. Yasuda, Y. Nishida, K. Kobayashi, “Inhibition of Alzheimer Amyloid Aggregation with Sulfate Glycopolymers”, Advances in Science and Technology, 2008, 57, 166. 査読無
 7. 三浦佳子, “糖質有機薄膜を用いた生体検出”, 表面, 2008, 46, 9, 443. 査読無
- [学会発表] (計 24 件)
1. 豊島雅幸、三浦佳子、精密糖鎖高分子を用いたハイブリッド材料の創製と生体認識、生命化学研究会 2010. 1. 8、福井
 2. 松岡真未、井上雄介、三浦佳子、自己組織性糖鎖高分子による機能性材料の創製、MRS-J、2009. 12. 7、横浜
 3. 豊島雅幸、大浦智之、福田知博、松本絵里乃、三浦佳子、精密糖鎖高分子を用いたハイブリッド材料の創製と生体認識能、第 58 回高分子討論、2009. 9. 19、熊本
 4. 和田将也、宮澤雄太、三浦佳子、糖鎖高分子を用いたアミロイド抑制材料の開発、第 58 回高分子討論会、2009. 9. 18、熊本
 5. 伊藤彰浩、三浦佳子、グラフト重合による糖鎖高分子固定化テフロン膜の形成とそのレクチン認識特性、第 58 回高分子討論会、2009. 9. 18、熊本
 6. 船戸幸司、三浦佳子、光反応を利用した水素末端シリコン基板上への単分子膜の形成、第 58 回高分子討論会、2009. 9. 18、熊本
 7. 三浦佳子、水野光、グリコサミノグリカンモデル高分子によるタンパク質アミロイド化の抑制、第 58 回高分子討論会、2009. 9. 17、熊本
 8. 宮澤雄太、和田将也、三浦佳子、“トレハロース誘導体合成とアルツハイマー阻害剤の開発”、第 89 回日本化学会年会、2009. 9. 17、熊本
 9. Masaya Wada, Yuta Miyazawa, Yoshiko Miura, Inhibition of amyloid fibril formation using oligosaccharide carrying polymer, Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium, 2009. 9. 11, Tokyo
 10. 三浦佳子、糖鎖高分子を利用したアミロイド β タンパク質の凝集抑制効果の検討、第 29 回日本糖質学会、2009. 9. 10、高山
 11. Yoshiko Miura, Hikaru Mizuno, Interaction of glycosaminoglycan model polymers with amyloid beta peptide, 238th ACS National Meeting, 2009. 8. 19, Washington, DC (USA)
 12. Masayuki Toyoshima, Tomoyuki Oura, Yoshiko Miura, Preparation and biological properties of glycopolymer modified gold nanoparticle, 238th ACS National Meeting, 2009. 8. 19, Washington, DC (USA)
 13. Koji Funato, Yoshiko Miura, Monoalayer of saccharide formation via Si-C bond formation and protein recognition, 238th ACS National Meeting, 2009. 8. 17 Washington, DC (USA)
 14. 三浦佳子、水野光、“グリコサミノグリカンモデル高分子によるアミロイド β との相互作用機構の解析”、第 89 回日本化学会年会、2009. 3. 28、船橋
 15. 伊藤彰浩、三浦佳子、“ガラス基板上への O 結合型糖鎖共重合体の固定化とそのレクチン認識特性” 第 89 回日本化学会年会、2009. 3. 27、船橋
 16. 和田将也、宮澤雄太、三浦佳子、“糖鎖高分子を用いたアミロイド抑制材料の開発” 第 89 回日本化学会年会、2009. 3. 27、船橋

17. 松本絵里乃、福田知博、三浦佳子、“糖鎖自己組織化膜を用いたアミロイドβとの相互作用解析”、第57回高分子討論会、2008.9.26、大阪
18. 水野光、山本清文、三浦佳子、グリコサミノグリカンモデル高分子を用いたアミロイドβ凝集阻害剤の創製、第57回高分子討論会、2008.9.25、大阪
19. 和田健彦、三浦佳子、Introductory Remarks、第57回高分子討論会、2008.9.24、大阪
20. Yoshiko Miura, Hikaru Mizuno, ” Interaction of Glycosaminoglycan Model Polymers with Amyloid beta peptide” 236th ACS National Meeting, 2008.8.19, Philadelphia, USA
21. 水野光、山本清文、三浦佳子、グリコサミノグリカンモデル高分子を用いたアミロイドβ凝集阻害剤の創製、第28回日本糖質学会、2008.8.19、つくば
22. 船戸幸司、白幡直人、三浦佳子、“Si-C結合を利用したシリコン基板上での糖鎖単分子膜の形成”第28回日本糖質学会、2008.8.19、つくば
23. 宮澤雄太、三浦佳子、“トレハロース誘導体を用いたアミロイドβ凝集阻害剤の創製”第28回日本糖質学会、2008.8.19、つくば
24. Yoshiko Miura, Kiyofumi Yamamoto, Kikuko Yasuda, Yoshihiro Nishida, Kazukiyo Kobayashi, “Inhibition of Alzheimer Amyloid Aggregation with Sulfate Glycopolymers” CIMTEC, 2008.6.12, Italy.

[図書] (計1件)

三浦佳子、複合糖質の化学と最新応用技術、pp285-292、糖鎖材料を用いたアルツハイマー病へのアプローチ、シーエムシー出版、2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab/9/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 佳子 (MIURA YOSHIKO)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・准教授

研究者番号：00335069

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：