

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05605

研究課題名(和文) 生理活性多糖のミミックをめざした硫酸化交互配列グライコポリマーの精密合成

研究課題名(英文) Precise synthesis of sulfated alternating glycopolymers mimicking physiologically active polysaccharides

研究代表者

箕田 雅彦 (Minoda, Masahiko)

京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号：30229786

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)：生理活性多糖グリコサミノグリカン(GAG)のミミックとなる交互配列グライコポリマーを精密合成した。アルキン担持ビニルエーテル(VE)類とマレイミド類から前駆体交互共重合体を合成し、2種のアジ化糖との段階的ポストクリック反応で交互配列グライコポリマーを得る合成法を開拓した。例として、6位硫酸化N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を持つGAGミミック、4位、6位硫酸化GlcNAcを持つGAGミミック、非天然型の3位、4位、6位硫酸化GlcNAc担持型交互配列グライコポリマーを合成した。また、スチレン単位を持つ類縁体も合成した。得られたGAGミミックポリマーが細胞毒性を持たないことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

交互配列ポリマーゆえの機能発現を実証するには、交互配列構造を精密制御すると共に、機能発現に最適な機能基の選択が重要となる。生体機能と関係を持つ天然生理活性多糖であるグリコサミノグリカンは構成単糖が交互配列した構造が特徴であるため、そのミミックとなる交互配列グライコポリマーは、交互配列構造と機能発現との相関を検証するのに最適である。よって、それらの精密合成は学術的に意義を有し、さらに生理活性機能等の発現が達成されれば、有用物質として社会的にも意義深く、応用面での波及効果が期待される。本研究では、硫酸化交互配列グライコポリマーの系統的合成に成功し、バイオメディカル分野等での利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：A series of alternating glycopolymers mimicking physiologically active polysaccharide, glycosaminoglycans (GAGs), were precisely synthesized based on the controlled radical polymerization. The Principal Investigator have developed a synthetic method to obtain alternating glycopolymers by synthesizing precursor alternating copolymers from unprotected and TMS-protected alkyne groups-substituted vinyl ethers (VE) and maleimides by employing RAFT copolymerization followed by stepwise post-click reactions with two kinds of sugar azides. Examples include the precise synthesis of a GAG mimic with 6-sulfated N-acetylglucosamine (GlcNAc), a GAG mimic with 4- and 6-sulfated GlcNAcs, and an alternating glycopolymer having 3-, 4-, and 6-sulfated GlcNAcs. Analogous alternating glycopolymers with carbohydrate-substituted styrene units were also synthesized. Moreover, it was revealed that all the resulting GAG mimic glycopolymers exhibited no cytotoxicity.

研究分野：高分子合成化学

キーワード：交互配列ポリマー グライコポリマー 硫酸化グライコポリマー RAFT共重合 グリコサミノグリカン ミミック コンドロイチン硫酸ミミック 細胞毒性評価

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) これ迄に、天然の機能性多糖類を模したグライコポリマーや、精密高分子合成ならではの観点から分子設計されたグライコポリマーが数多く合成されてきた。特に複数のヒドロキシル基やアミノ基、硫酸基、カルボキシル基などを持つ糖残基を保護することなく側鎖に担持したビニルモノマーは、ラジカル重合による直截的な高分子化が可能のため、糖担持モノマーのラジカル重合に関する研究例が多く、近年は、精密ラジカル重合の隆盛に伴い、より精緻な構造設計を指向したグライコポリマーの精密合成に関する多数の研究例がある。

(2) しかしながら、モノマー配列の制御を念頭に置いた研究は非常に限定的で、特に交互配列構造からなるグライコポリマーの合成は先例が無く、マルチブロック型グライコポリマーの合成にとどまる。天然由来の生理活性多糖であるグリコサミノグリカン (GAG) 類では、硫酸基や COOH 基を持つ 2 種の単糖ユニットが交互配列構造により結合していることが特徴で、この特異な構造が様々な生理活性発現の拠り所になっていると考えられる。GAG のような天然生理活性多糖のミミックとなるグライコポリマーを創製する手法が開拓できれば、交互配列構造からなる新規な機能性グライコポリマーが創出可能となる。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、ビニルポリマー型の交互配列グライコポリマーの精密合成法を開拓し、機能基として機能発現を担う側鎖糖残基の交互配置をいかに担保し、高次機能発現へと結びつけるかを調査することを目的としている。二重結合の電子密度が異なるビニルエーテル (VE) 類とマレイミド (MI) 類は、ラジカル共重合により交互性の高い共重合体を与えることが古くより知られているが、研究代表者は精密ラジカル重合の一つである RAFT 重合系の適用に基づく技術的基盤を有し、糖担持モノマーの RAFT 共重合系の最適化により、2 種の糖担持モノマー単位が交互配列した交互配列グライコポリマーの精密合成に初めて成功した (*Polymers*, 11, 70/1-70/14 (2019)). 本研究では交互配列グライコポリマーの精密合成に向けて、汎用性と拡張性に富む新たな手法を開拓した。すなわち、無保護アルキン担持 VE を TMS 保護アルキン担持の MI 誘導体と RAFT 共重合させて交互配列構造からなる前駆体共重合体を合成し、2 種類の側鎖アルキンを識別しながら 2 種のアジド化糖と段階的にクリック反応させることで交互配列グライコポリマーに誘導する。本合成戦略は新規概念に基づくものであり、その実効性や適用範囲を詳細に検討し、実際に交互配列グライコポリマーを系統的に合成することをめざした。

(2) 本研究では、特に硫酸化糖を担持した交互配列グライコポリマーの精密合成に焦点を当てている。上述の GAG においては、硫酸化糖は重要な構成単糖であり、GAG が示す種々の機能発現に寄与している。また、交互配列構造を持たない硫酸化多糖類や硫酸化オリゴ糖類の生理活性についても多くの研究例がある。硫酸化糖では、硫酸化したピラノース環内ポジションと置換数により複数のバリエーションが生じるため、それらの硫酸化糖残基を側鎖に導入した交互配列グライコポリマーが合成できれば、より高次の機能発現が期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 交互配列グライコポリマーの精密合成には、適用可能性の広さや重合反応制御におけるポテンシャルの高さから、その有用性が広く認知されている RAFT 重合法を精密ラジカル重合に基づく基盤技術として利用する。RAFT 重合は官能基に対する寛容度が広く、研究代表者は無保護アルキン担持 VE の RAFT 交互共重合に成功している。さらに本研究では、アルキンとアジド化物とのクリック反応 (Huisgen 環化付加反応) を RAFT 重合と併用する点が大きな特徴である。このクリック反応は高効率で進行するため、結合形成のための有機反応として重要で、幅広い分野で利用されている。さらに、本研究ではクリック反応を段階的に行うことで、2 種の糖残基を前駆体ポリマーの所定部位に逐次的に導入する戦略に基づいており、高い独自性を有する。

(2) 精密合成して得た前駆体ポリマーならびにグライコポリマーは、SEC による分子特性解析を行った後、 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR と MALDI-TOFMS により、分子構造、特に交互配列構造の同定を行った。さらに、合成した交互配列グライコポリマーのバイオマテリアルとしての応用可能性を検証するために、NIH3T3 cell (マウス胎児線維芽細胞) を用いた細胞毒性評価を行った。

### 4. 研究成果

(1) OH 基担持 VE と MI 類との交互 RAFT 重合による温度応答性交互配列ポリマーの合成と機能性交互配列グライコポリマーの精密合成に先立ち、交互配列構造と機能発現との相関について調べるために温度応答性ポリマーを合成した。具体的には、OH 基担持 VE と MI 誘導体との RAFT 共重合により、交互配列ポリマーを合成し、温度応答性挙動を解析した。ジチオカーボネート誘導体を連鎖移動剤として、OH 基担持 VE とエチル MI の RAFT 共重合により、交互共重合体を合成した。生成した交互共重合体は構造が制御され ( $M_w/M_n < 1.4$ )、冷水 (5 ) に完全に溶解し、その水溶液は曇点 ( $T_{cp}$ ) を超えると相分離を示した。ポリマー水溶液の  $T_{cp}$  は、分子構造の差異 (分子量と分子量分布) に応じて 15 ~ 35 の範囲で変化した。

(2) コンドロイチン硫酸 C のミミックとなる VE 由来の交互配列グリコポリマーの合成

研究代表者は、ラクトース担持 VE とマルトース担持 MI との RAFT 交互共重合により、GAG ミミックのプロトタイプとなる交互配列グリコポリマーの精密合成に成功している。本法は糖担持モノマーからの直截的な合成手法であるが、拡張性に乏しいことから、より汎用性のある合成戦略として、無保護アルキン担持 VE (VEEP) と TMS 保護アルキン担持 MI (PrMI-TMS) から前駆体となる交互共重合体 (Poly(PrMI-TMS-*alt*-VEEP)) をまず合成し、続いて 2 種のアジ化糖との段階的ポストクリック反応を行うことで、交互配列グリコポリマーを効率的に合成する新たな方法を開拓した (Scheme 1)。本法の有用性を検証するために、コンドロイチン硫酸 C (CS-C) (Figure 1) のミミックとなる交互配列グリコポリマーの合成を目的として、6 位を硫酸化した 1 位アジ化糖とグルクロン酸の 1 位アジ化誘導体の合成に取り組み、反応条件や精製条件を最適化することで、カギ化合物となる 2 種のアジ化糖を純度よく合成した。トリチオカーボネート系連鎖移動剤 (2-(benzylsulfanylthiocarbonyl-sulfanyl)ethanol, BTSE) を用いる 2 種のアルキン担持 VE と MI との RAFT 共重合により前駆体のアルキン担持交互共重合体の合成に成功した。ここでは重合条件の最適化を行うとともに、モノマー反応性比の見積もりなど、詳細な重合挙動について解析した結果と、MALDI-TOFMS の解析結果より、2 種のアルキンを担持した前駆体ポリマーが高い交互性を有した構造であることを明らかにした。別途合成した、6 位硫酸化アジ化糖を VE ユニットの無保護アルキンとクリック反応させることで、6 位硫酸化糖を導入し、次いで MI 側鎖の TMS 基を脱保護した後、グルクロン酸アジドとクリック反応させることで、コンドロイチン硫酸 C ミミックとなる交互配列グリコポリマー (Scheme 1 中 Glycopolymer A) の合成に初めて成功した。ここでは、クリック反応の条件検討が重要で、DMF を溶媒とするクリック反応系を適用することで、2 種の糖残基を所定部位にほぼ定量的に導入できることを見出した。

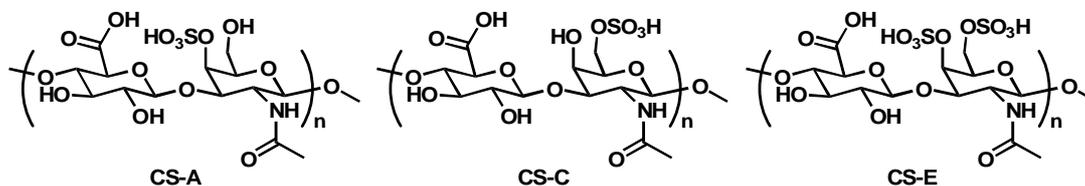
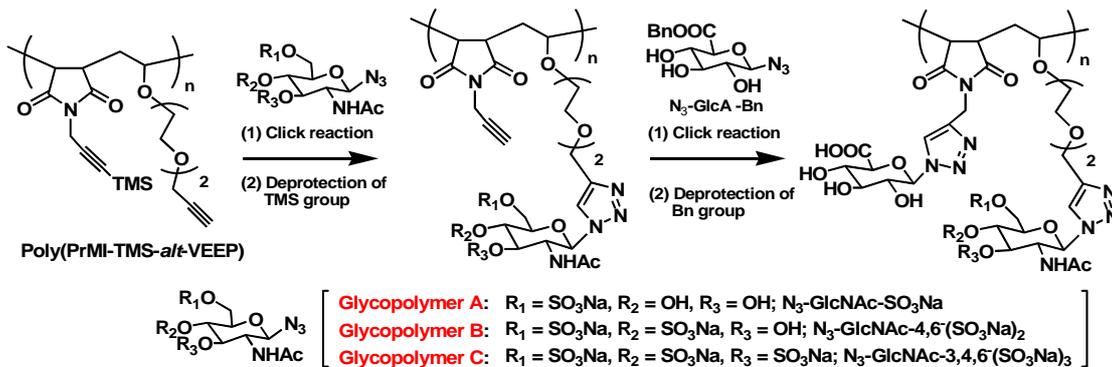


Figure 1. Structures of chondroitin sulfates.

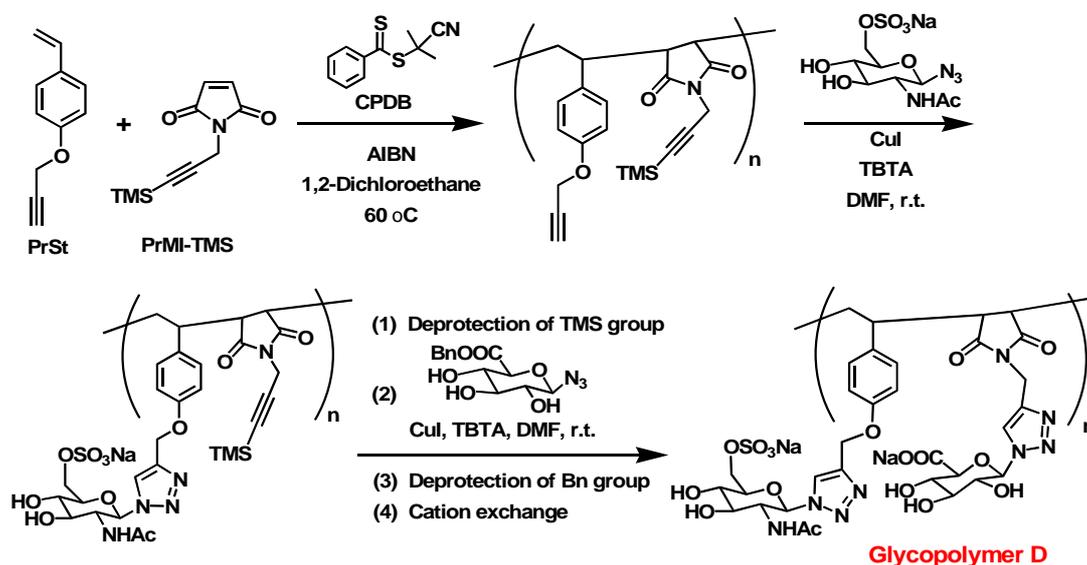


Scheme 1. Synthesis of the alternating glycopolymers as chondroitin sulfate mimics.

(3) コンドロイチン硫酸 E のミミックとなる VE 由来の交互配列グリコポリマーの合成および 3 位、4 位、6 位硫酸化 GlcNAc 担持の GAG ミミック型交互配列グリコポリマーの合成

アルキン担持 VE ならびに MI の RAFT 共重合と二段階ポストクリック反応を組み合わせた交互配列グリコポリマーの合成戦略に基づき、GlcNAc 残基の硫酸基の置換位置と置換数が異なる交互配列グリコポリマーの系統的合成を行った。原料となるアジ化糖として、4 位、6 位硫酸化 GlcNAc および 3 位、4 位、6 位硫酸化 GlcNAc の 1 位アジ化物を各々合成した。これらのアジ化糖をポストクリック反応の一段階目で使用し、グルクロン酸アジドを二段階目でクリック反応させることで、4 位、6 位硫酸化 GlcNAc 残基を担持したコンドロイチン硫酸 E (CS-E) (Figure 1) のミミックポリマー (Scheme 1 中 Glycopolymer B) ならびに 3 位、4 位、6 位硫酸化 GlcNAc 残基を担持した非天然型 GAG ミミック交互配列グリコポリマー (Scheme 1 中 Glycopolymer C) の精密合成に成功した。

(4) コンドロイチン硫酸 C のミミックとなる St 由来の交互配列グライコポリマーの合成  
 スチレン (St) と MI のラジカル共重合においても、交互共重合体が得られることが知られている。そこで、RAFT 重合系を適用した(2)、(3)に記載の合成戦略に倣って、ジチオベンゾエート系連鎖移動剤を用いて無保護アルキン担持 St と TMS 保護アルキン担持 MI の RAFT 共重合を行い、前駆体となる交互配列共重合体を合成した (Scheme 2)。<sup>1</sup>H NMR 解析より生成ポリマーの組成比がほぼ St/MI = 50/50 であることを確認し、さらに MALDI-TOFMS による解析の結果からも、生成ポリマーが交互配列構造を有していることを認めた。また、VE/MI を用いた系と同様に、RAFT 重合を経ても、2 種の側鎖アルキンが構造を保持していることを確認した。次いで、6 位硫酸化 GlcNAc のアジド化物を St ユニットの側鎖アルキンとクリック反応させて 6 位硫酸化糖を導入し、次いで MI 側鎖の TMS 脱保護と続くグルクロン酸アジドとのクリック反応により、St ユニットと MI ユニットが交互配列した骨格構造からなるコンドロイチン硫酸 C ミミックポリマーの合成に成功した (Scheme 2)。繰り返し単位の構造の差異 (VE と St) は、コンホメーションに影響を与える分子全体の柔軟性や、親水性/疎水性バランスを左右するため、バイオ分子との相互作用に基づく生理活性の発現に対しても影響を及ぼすと考えられ、グライコポリマーの分子構造と機能との相関を調べる上で有用な化合物であると期待される。



Scheme 2. Synthesis of the St-based alternating glycopolymer as a chondroitin sulfate mimic.

(5) ヒアルロン酸のミミックとなる VE 由来の交互配列グライコポリマーの合成  
 硫酸化糖担持グライコポリマーではないが、GAG ミミック型交互配列グライコポリマーとして、ヒアルロン酸ミミックの合成を行った。(2)、(3)で記載の合成戦略に倣って、VE と MI の交互配列構造を持つアルキン担持交互共重合体を前駆体として合成し、GlcNAc のアジド化物とグルクロン酸アジドを用いる段階的ポストクリック反応により、側鎖に GlcNAc とグルクロン酸が交互に導入されたヒアルロン酸ミミックの合成に成功した。

(6) 合成した交互配列グライコポリマーの細胞毒性評価  
 合成した VE/MI 交互配列構造のコンドロイチン硫酸 C ミミック型グライコポリマー (Glycopolymer A) ならびに 3 位、4 位、6 位硫酸化 GlcNAc を担持した Glycopolymer C を試料として、NIH3T3 cell (マウス胎児線維芽細胞) を用いた細胞毒性評価を行った結果、0.1 mg/mL 以下の濃度では細胞毒性を示さないことを明らかにした。同様に、St/MI 交互配列構造のコンドロイチン硫酸 C ミミック型グライコポリマー (Glycopolymer D) についても、NIH3T3 cell を用いた細胞毒性評価を行った結果、1.0 mg/mL 以下の濃度では細胞毒性を示さないことを確認した。以上より、本研究で合成した硫酸化糖担持型の交互配列グライコポリマーは、バイオマテリアルとしての応用可能性を有していることを示すことができた。

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 2件）

1. 著者名 Motoyanagi Jin, Fujishima Ayane, Minoda Masahiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Controlled Synthesis and Photoresponsive Properties of Spiropyran End-Functionalized Poly(vinyl ether)s	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Crystals	6. 最初と最後の頁 742 ~ 742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cryst12050742	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jin Motoyanagi, Ayaha Oguri, Masahiko Minoda	4. 巻 12
2. 論文標題 Synthesis of Well-Defined Alternating Copolymer Composed of Ethylmaleimide and Hydroxy-Functionalized Vinyl Ether by RAFT Polymerization and Their Thermoresponsive Properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymers (Basel)	6. 最初と最後の頁 2255(1)-2255(8)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym12102255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲岡宙紀, 雑賀涼平, 和久友則, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 硫酸化糖を担持した交互配列グライコポリマーの創製
3. 学会等名 第68回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂賀彩音, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 スチレン誘導体を一成分とする交互配列構造からなるグリコサミノグリカンミミックポリマーの創製
3. 学会等名 第68回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小倉千奈, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 周期性ポリマーを腕鎖とする星型ポリマーのミクログルコア形成による創製
3. 学会等名 第68回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小崎菜々子, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 大環状グルカンのミミックとなる環状グライコポリマーの精密合成
3. 学会等名 第68回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲岡宙紀, 雑賀涼平, 和久友則, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 硫酸化糖を担持した交互配列グライコポリマーの分子設計に基づく新規コンドロイチン硫酸ミミックの創製
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂賀彩音, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 スチレンとマレイミドの誘導体のRAFT交互共重合に基づくグリコサミノグリカンミミックポリマーの創製
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小崎菜々子, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 環拡大RAFT重合による環状グライコポリマーの精密合成
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小倉千奈, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 周期性ポリマーを腕鎖とする星型ポリマーのマイクロゲルコア形成による創製
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 雑賀涼平, 富浜宗久, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸Cミミックを指向した制御ラジカル重合による交互配列グライコポリマーの合成
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 雑賀涼平, 富浜宗久, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸Cミミックを指向した交互配列グライコポリマーのRAFT共重合とポストクリック反応による精密合成
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 雑賀涼平, 本柳 仁, 箕田雅彦
2. 発表標題 交互配列グライコポリマーの精密ラジカル重合による合成と反応特性解析
3. 学会等名 第66回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2020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

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