

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15336

研究課題名(和文) 温度応答性非天然オリゴアミノ糖の合成と機能発現制御

研究課題名(英文) Synthesis of Thermoresponsive Unnatural Oligoaminosaccharides and the Control of the Functions

研究代表者

甲田 優太 (Koda, Yuta)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：90759325

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)：本研究では、糖鎖材料の分子ライブラリーの拡大と新たな機能性材料を開発するために、新たな単糖モノマーの合成およびその重合、物理化学的性質の評価(結晶構造、熱安定性、温度応答性)、および細胞毒性評価を行った。物理化学的評価により本オリゴアミノ糖は、まだ十分な分子量に対していないにも関わらず、配向性を有していることが明らかになった。さらに、細胞毒性評価を行ったところ、細胞毒性が低く、新しい糖鎖材料として展開可能であることを見出した。

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る。糖鎖は、分子認識、細胞骨格の維持、タンパク質の安定化などの重要な役割を担っており、生命維持に欠かせない分子である。よって、糖鎖の人工合成が容易になり、その分子ライブラリーが拡大することで人工機能が付与された糖鎖材料を開発できるようになると、新たな糖鎖材料が医療応用の発展に繋がることが期待できる。そこで本研究では、新たな非天然オリゴアミノ糖を合成に挑むのみならず、すでに合成に成功していた非天然オリゴアミノ糖の物理化学的性質の解明や、細胞毒性の評価を行った。これらの成果は、高分子化学の発展のみならず、新たな生体材料への開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this work, the new 2-oxazoline-based saccharide monomers were synthesized to expand the molecular library of the unnatural oligoaminosaccharides. In addition, the physical properties and cytotoxicity of the unnatural oligoaminosaccharides were also investigated for the future application of new glycomaterials. In spite of the low molecular weight of the oligomers, oligo(Glc(MeOx)) showed the orientation in the bulk state. Furthermore, oligo(Glc(MeOx)) showed the very low cytotoxicity even under the high concentration of oligo(Glc(MeOx)).

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 温度応答性 糖鎖材料 アミノ多糖

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天然三大高分子の一つである。糖鎖は、生体内で分子認識、細胞骨格の維持、タンパク質の安定化などの機能を有しており、生命維持に不可欠な生体分子である。しかし、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による DNA の人工合成や、固相反応や無細胞合成によるタンパク質の人工合成と比較して、糖鎖の人工合成は未だに困難を極める。糖鎖の合成の困難さ故に、糖鎖の新機能解明の障壁になり得る。よって、糖鎖の新しい合成法の確立はと分子ライブラリーの拡大は、糖鎖関連の生物学と高分子化学双方の分野において、重要課題の一つであると言える。

糖鎖合成の一般的な合成法は、(1)天然糖鎖の高分子反応による化学修飾、(2)酵素を用いた酵素重合、(3)糖モノマーの重合により合成される。特に高分子反応による化学修飾と酵素重合による合成では、天然糖鎖を基盤としているため、高い生体適合性が得られる。よって、これらの合成法で得られる糖鎖は、ドラッグデリバリーシステムの運搬体やバイオセンサーなどバイオマテリアルとしての応用が展開されてきた。これら糖鎖材料をさらに発展させていくためにも新しい糖鎖材料を開発していかなければならない。

このような背景の中、代表者は、これまでにオキサゾリン型の糖モノマーを設計し、カチオン開環重合により新しい非天然オリゴアミノ糖を開発してきた。オキサゾリン型糖モノマーは、単糖の 1,2 位にオキサゾリンを連結させた双環型の単糖モノマー(Glu(ROx))である。この単糖モノマーは、オキサゾリン環を有するにも関わらず、通常のアミノ糖とは異なる重合機構で進行することを明らかにし、新しい重合機構を世界に先駆けて提唱してきた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまでに開発してきた新しい非天然オリゴアミノ糖の物理的性質を明らかにしつつ、非天然オリゴアミノ糖の分子ライブラリーを図ることを目的とした。特に、ポリオキサゾリンは、水中で温度応答性の溶解挙動を示すことが知られている。代表者が開発した非天然オリゴアミノ糖もオリゴアミノ糖の骨格を有しているため、同様の温度応答性の機能発現を目指した。さらに、生体材料への応用展開を見据えて、細胞毒性の評価を開始した。

(1) 新しいオキサゾリン型単糖モノマーの合成

非天然オリゴアミノ糖の分子ライブラリーを拡充するために、新しいオキサゾリン型モノマーの合成を試みた。特に、温度応答性発現を目指し、オキサゾリン側鎖のアルキル鎖の延長を目指した。

(2) 新しいオキサゾリン型単糖モノマーの重合

非天然オリゴアミノ糖の分子ライブラリーを拡充するために、代表者が開発した新しい開環重合系を用いて、上記で合成できたオキサゾリン型モノマーのカチオン開環重合を試みた。

(3) 非天然オリゴアミノ糖の物理化学的性質の評価

代表者は、これまで新しい非天然オリゴアミノ糖を開発し、その新しい重合機構を提唱してきた。しかし、その結晶構造や物理化学的性質は十分に明らかにできていなかった。新しい糖鎖材料の開発へと繋げるためには、分子の物理化学的性質を明らかにしなければならない。そこで、本研究では、その結晶構造や熱安定性などの物理化学的性質の評価を行った。さらに、水中での溶解性の温度応答性を評価した。

(4) 非天然オリゴアミノ糖の細胞毒性評価

糖鎖材料を生体材料へと展開するためには、毒性評価を行わなければならない。そこで、本研究ではこれまでに開発した非天然オリゴアミノ糖の細胞毒性評価を行った。

3. 研究の方法

(1) 新しいオキサゾリン型単糖モノマーの合成

グルコサミンをピリジンに溶解させ、無水酸(エチル酸、プロピオン酸、酪酸)を加えて、室温で攪拌した。一晚反応させた後、減圧下で溶媒を除去後、カラムクロマトグラフィーにより生成物を単離した。単離した生成物を 1,2-ジクロロメタンに溶解させ、trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf)を加えてオキサゾリン環の形成を行なった。減圧下で溶媒を除去後、カラムクロマトグラフィーにより単離した。

(2) 新しいオキサゾリン型単糖モノマーの重合

合成した単糖モノマーを 1,2-ジクロロメタンに溶解させ、*tert*BuI と GaCl₃を加えた。40 に加熱し、カチオン開環重合を行った。

(3) 非天然オリゴアミノ糖の物理化学的性質の評価

これまで開発した非天然オリゴアミノ糖の結晶構造を X-ray diffraction (XRD)により解析した。熱安定性と熱物性は、thermogravimetric/differential thermal analysis (TG/DTA)、および differential scanning calorimetry (DSC)により評価した。水中溶解性の温度応答性は、UV/Vis 装置の透過光強度により評価した。

(4) 非天然オリゴアミノ糖の細胞毒性評価

これまで開発した非天然オリゴアミノ糖の細胞毒性評価を行った。HeLa 細胞に非天然オリゴアミノ糖を添加し、WST-8 により細胞毒性評価を行った。

4. 研究成果

新しい非天然オリゴ糖を開発してその分子ライブラリーを拡大するだけでなく、新しい糖鎖材料への開発へと展開していくために、新しいオリゴアミノ糖を合成するだけでなく、その物理化学的性質の評価を同時並行で行なった。また、生体材料への展開を目指して、その毒性評価を行った。

(1) 新しいオキサゾリン型単糖モノマーの合成

上記の方法で、新しいオキサゾリン型単糖モノマーの合成を行った。無水酸の炭素鎖が長くなるほど、収率が低下した。これは、炭素鎖が長くなるほど、立体障害が大きくなるためであると推察される。今後、分子設計、および反応条件を検討することにより収率向上を目指していく。

(2) 新しいオキサゾリン型単糖モノマーの重合

合成した単糖モノマーを代表者が開発したカチオン開環重合系を用いて重合を検討した。アシル保護基の炭素鎖が長くなるほど、重合率が低下した。これは、立体障害が大きくなるため、生長反応が起こりにくくなるためだと考えられる。エチル酸保護したオキサゾリン型単糖モノマーは、既に合成していた非天然オリゴアミノ糖(oligo(Glc(MeOx)))と同等の分子量のオリゴマーを得ることができた。今後、モノマー構造を最適化することにより、重合率の向上を目指していく。

(3) 非天然オリゴアミノ糖の物理化学的性質の評価

結晶構造解析

これまで合成に成功していた oligo(Glc(MeOx))の物理化学的性質を明らかにする検討を開始した。まず初めに、脱保護前後の oligo(Glc(MeOx))の結晶構造解析を行った(図 1)。N-アセチルグルコサミンと比較して、ブロードな回折ピークが2つ観測された。よって、脱保護の有無に関わらず、oligo(Glc(MeOx))の結晶性は、N-アセチルグルコサミンよりも大きく低下した。しかし、非晶性高分子のような単一ハローピークではなく、2つの回折ピークが観測された。故に、脱保護前後の oligo(Glc(MeOx))は、結晶性はないが非晶性高分子よりは配向性があることが明らかになった。今後、分子量の増大などが可能になると、非天然オリゴアミノ糖の結晶性制御も可能になると期待される。

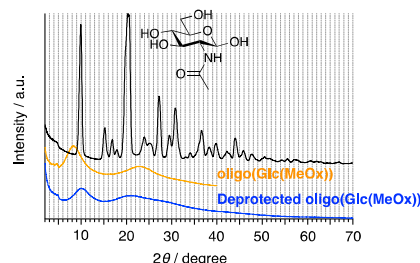
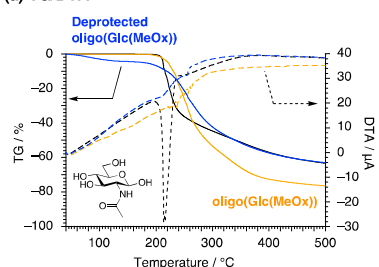


図1 oligo(Glc(MeOx))の結晶構造解析

熱物性、および熱安定性評価

Oligo(Glc(MeOx))の熱物性を明らかにするために、まず初めに TG/DTA により熱安定性の評価を行った(図 2a)。脱保護後の oligo(Glc(MeOx))は、潮解性を有していたため、加熱開始後から緩やかな重量減少を示した。N-アセチルグルコサミンと比較して、緩やかな重量減少を示したため、オリゴマー構造

(a) TG/DTA



(b) DSC

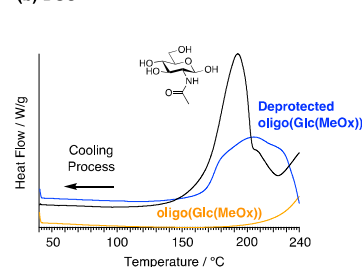


図2 oligo(Glc(MeOx))の熱物性解析

によりその熱安定性が向上したことが明らかになった。また、結晶構造解析からオリゴマーになることで結晶性が大きく低下したことから分かるように、脱保護の有無に関わらず明確な融解ピークは観測されなかった。今後、分子量を向上させて結晶性を制御することが可能にな

ると、熱安定性の向上も同時に期待することができる。次に、DSC による熱物性評価を行った。240 °C まで高温した後、40 °C まで低下させてオリゴマーの配向性評価を行った。N-アセチルグルコサミンと比較して、脱保護後の oligo(Glc(MeOx))のピークはブロード化した。XRD や TG/DTA 解析からも明らかにできたように、DSC 測定からも oligo(Glc(MeOx))の配向性があることが明らかになった。

水中での温度応答性評価

合成した非天然オリゴアミノ糖（メチル、エチル側鎖）を水に溶解させ、その溶解性の温度応答性を評価した（5 - 95 °C）。メチル、およびエチル側鎖は疎水性が大きくないため、これらの非天然オリゴアミノ糖は、高温条件下でも水に均一に溶解した。今後、分子設計や重合条件の最適化により非天然オリゴアミノ糖の分子ライブラリーが拡大すると、温度応答性の非天然オリゴアミノ糖の創出が期待できる。

(4) 非天然オリゴアミノ糖の細胞毒性評価

生体材料への展開を目指し、非天然オリゴアミノ糖の細胞毒性評価を行った。まず初めに、HeLa 細胞を 96 ウェルの各ウェルに 5000 個の細胞を播種し、24 時間 37 °C で前培養を行った。その後、oligo(Glc(MeOx))を溶解させた培地に交換し、さらに 24 時間 37 °C で培養した([oligo(Glc(MeOx))] = 0.01, 0.1, 1.0, 10 mg/mL)。WST-8 試薬を各ウェルに 10 μ L 加えて、2 時間培養した後に 450nm の波長における吸光度を測定し、細胞毒性評価を行った。Oligo(Glc(MeOx))の濃度が 10mg/mL という高濃度条件下でも、細胞毒性が低いことが明らかとなった。よって、本オリゴアミノ糖は、生体材料への展開が可能な糖鎖材料になることが期待できる。

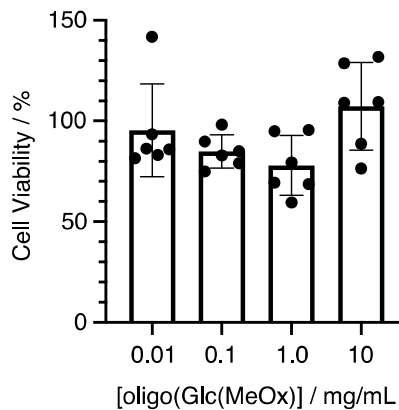


図 3 oligo(Glc(MeOx))の細胞毒性評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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 2020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 2020年

1. 発表者名 甲田優太
2. 発表標題 カチオン重合によるオリゴアミノ糖鎖の合成：開始剤系の設計と生分解性評価
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuta Koda
2. 発表標題 Design and Toxicity Study of Unnatural Oligoaminosaccharides Prepared by Cationic Ring-Opening Polymerization
3. 学会等名 3rd G' L' owing Polymer Symposium in KANTO (GPS-K 2020)
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
---------	---------