

親水性 RAFT 剤を用いた精密糖鎖高分子の合成

Synthesis of well-defined glycopolymer via hydrophilic RAFT reagent

豊島 雅幸¹⁾

Masayuki Toyoshima¹⁾

Abstract : The sugar-protein interaction can be amplified by the multivalency, so-called glycol-cluster effect. Therefore, the glycol-cluster compounds, such as glycopolymer, dendrimer and calixarene, are the potential candidates to detect the sugar-protein interaction. In particular, RAFT living radical polymerization is the applicability to a wide range of monomers and to a diverse reaction conditions. In addition, they realize the conjugation of other materials with complex architecture.

In this study, I designed hydrophilic RAFT reagent via exchanged Na, and synthesized sugar carrying glycopolymers by the living radical polymerization with a hydrophilic RAFT. The glycopolymer can control molecular weight, modify label material and expect to design the new biomaterials.

Keywords : Glycopolymer, RAFT living radical polymerization, Hydrophilic RAFT reagent

1. 緒言

糖は細胞表層に多種多様な形で存在しており、タンパク質やウイルスなどと特異的な接着をすることで、妊娠や疾病を引き起こすなど、我々の生命現象を担う物質である¹⁾。そのため、糖を利用した認識材料は我々の生命現象の解明や新しい診断薬などへの利用が期待されている²⁾。

一方で、糖は単独ではターゲットとの相互作用が弱く、また光特性などを持たないため相互作用の確認ができないという、2点の大きな問題があり、材料設計は困難とされてきた。

第一の欠点である糖の相互作用の弱さについては、糖が集合体を形成すると、糖多価効果によって相互作用が飛躍的に上昇することが知られている³⁾。実際、生体内の糖は細胞平面に糖が密集したラフトや陥凹構造中に糖が集団を形成するカベオラなどがある。つまり、糖を用いた材料においては糖の集合体を模倣した構造を設計することで克服ができる。実際、デンドリマーやカリックスアレン、高分子⁴⁾に糖を導入する方法が多数報告されている。特に高分子の側鎖に糖を導入した糖鎖子分子は、決まった構造をとらず、ターゲットに対して多様な接手法をとるため、相互作用の数値的解析には不向きな反面、多価効果を効果的に引き起こすため鋭敏なセンシングが期待できると同時に合成が比較的簡便であることや糖の選択性が広いことなどから材料利用に向いているとされている。

第二の欠点である相互作用におけるラベル機能の欠如は、それらの機能を有する蛍光物質⁵⁾や金属⁶⁾、微粒子⁷⁾の導入で克服できる。

特に RAFT 剤を用いた精密重合は、ラジカル重合の弱点である不均一な分子量を解決できるだけでなく、重合後に

還元させることでチオール基を末端に配位させることが可能になり、高分子末端位ラベル材を導入することが可能となる。また、RAFT リビングラジカル重合は重合進行速度が調製できるため、多様なモノマーの重合へ用いることが可能となる。こうした RAFT 剤を用いた機能性材料とラベル材を組み合わせたハイブリッド材料は多数報告されている⁸⁾。

しかしながら、これまで糖をはじめとする親水性モノマーを用いた RAFT リビングラジカル重合は報告例が少なく、また用いた RAFT 剤溶解させるための溶媒として DMSO を使用する例がほとんどで水溶媒のみの重合検討は非常に少ない。

本報告では、既存の RAFT 剤を Na 塩化させることで親水性を持たせ、水溶媒のみで分子量を制御した糖鎖高分子を合成し、金微粒子への付加検討を行うことで、新たな糖鎖高分子材料設計を行った。

2. 実験項

2.1. 実験試薬

次の試薬類は購入した状態で用いた。D-マンノース (キシダ化学, 大阪), S-(Thiobenzoyl) thioglycolic acid (シグマアルドリッチ, 米国), 40 nm 金微粒子 (田中貴金属, 東京), アクリルクロライド (東京化成, 東京), p-ニトロフェノール, 無水酢酸, Pd/C, 無水 DMF, 無水 MeOH, メタノール, ナトリウムメトキシド (関東化学, 東京)。アクリルアミド (関東化学, 東京) はクロロホルムとメタノールの混合溶媒 (CHCl₃ : CH₃OH = 10 : 3) によって再結晶して精製した。

¹⁾東京都立産業技術高等専門学校 ものづくり工学科, 一般科目

2.2. 測定方法

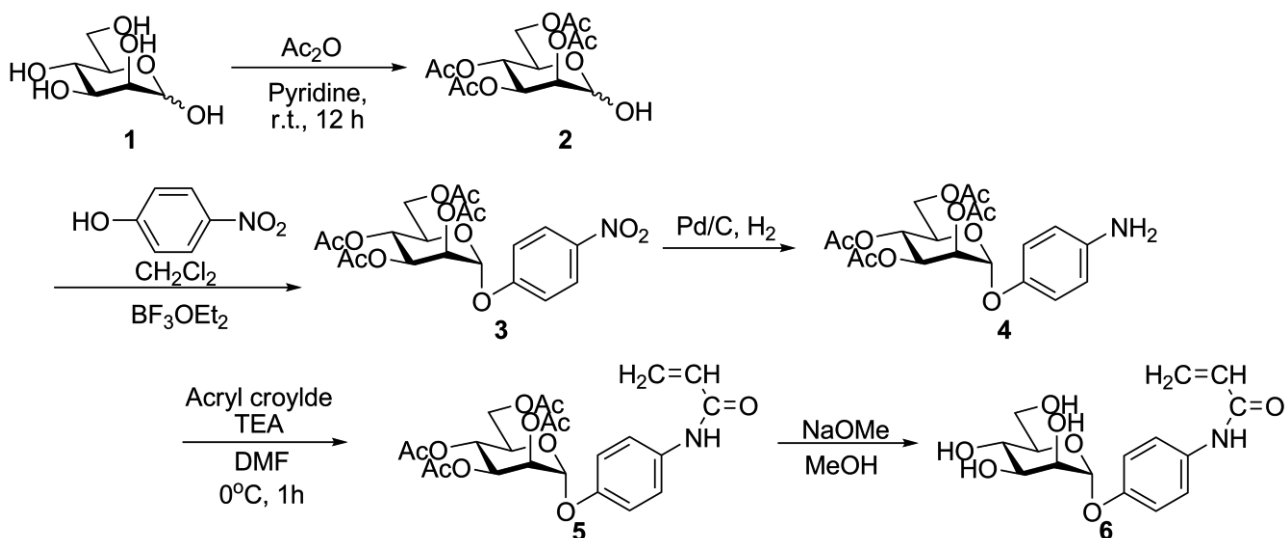
分子の同定については、核磁気共鳴装置 (^1H NMR(300 MHz) (Varian Inova), フーリエ変換赤外線分光光度計 (IR Prestige21, 島津) によって行った。分子の純度については、TLC (Merk) によって 2 種類以上の混合溶液において同定した。高分子の分子量については JASCO800 シリーズの高速液体クロマトグラフィーを用いて、Shodex Ohpac の SB-803 HQ を用いて PBS(-) バッファーを溶離液として測定し、標準分子量はプルランサンプルを元に 4 点補正を行い算出した。TEM 撮影は H-9000NAR (日立ハイテクノロジーズ製) でグリッド(応研商事製, STEM150 Cu-A) を用いて行った。

2.2 合成方法

2.2.1. *p*-(N-Acrylamido) phenyl α -D-mannoside の合成

D-マンノース (**1**) (5.00 g, 27.7 mmol) をピリジン (40 mL) に溶解し、氷浴中で無水酢酸 (44 mL, 466 mmol) を加え終夜反応させ、TLC で反応終了を確認後、トルエンを用いて共沸した。これを酢酸エチルに溶解させ、1N HCl, 飽和 NaHCO_3 , H_2O でそれぞれ 2 回洗浄し、濃縮乾燥後シリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル:ヘキサン = 2 : 1) によって精製し白色の粉末 (**2**) を得た。

得られた **2** (10.7 g, 27.5 mmol) と *p*-nitrophenol (11.5 g, 82.5 mmol), モレキュラーシーブス, ジクロロメタンを窒素条件下で攪拌させた。**2** が完全に溶解した後、氷浴中で BF_3OEt_2 (20 mL, 150 mmol) を加え、終夜反応させた。TLC で反応の終了を確認後、モレキュラーシーブスを濾過により取り除き、クロロホルムで希釈した溶液を 1N NaOH, H_2O で洗浄し有機層を硫酸マグネシウムで脱水後、濃縮乾燥させ、黄色粉末を得た。この粉末を酢酸エチル、ヘキサンで再結晶させ白色粉末 (**3**) を得た (yield 45.0%)。



Scheme 1 Synthesis of *p*-(N-Acrylamido) phenyl α -D-mannoside

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ = 8.22 (d, 2H, Ar), 7.20 (d, 2H, Ar), 5.60 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H-1), 5.51 (dd, 1H, J = 3.6 Hz, 9.9 Hz, H-3), 5.44 (dd, 1H, J = 1.8 Hz, J = 3.6 Hz, H-2), 5.36 (t, 1H, J = 9.9 Hz, H-4), 4.25 (dd, 1H, J = 5.7 Hz, J = 12.3 Hz, H-6-ProR), 4.07 (dd, 1H, J = 2.4 Hz, J = 12.3 Hz, H-6-ProS), 4.00 (m, 1H, H-5), 2.19 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 9H, Ac)

3 (215 mg, 0.46 mmol) を NaOH に溶解させ、Pd/C を加え水素雰囲気下において 2 時間室温で反応させた。TLC で反応終了を確認した後、濃縮乾燥し黄色固体 (**4**) を得た。**4** を DMF に溶解させ、氷浴中でアクリル酸クロライド (25 μL , 0.55 mmol) トリエチルアミン (100 μL , 0.70 mmol) を加え、1 時間反応させた。TLC で反応終了を確認し、濃縮乾燥後シリカゲルクロマトグラフィー(CHCl_3 : MeOH = 20 : 1) によって精製し白色粉末 (**5**) を得た (yield 81.0%)。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ = 7.49 (d, 2H, Ar), 7.07 (d, 2H, Ar), 6.40 (d, 1H, J = 18.0 Hz, $\text{H}_2\text{C} = \text{CH}$), 6.22 (t, 1H, J = 9.9 Hz, $\text{H}_2\text{C} = \text{CH}$), 5.77 (d, 1H, J = 18.0 Hz, $\text{H}_2\text{C} = \text{CH}$), 5.51 (dd, 1H, J = 3.6 Hz, 9.9 Hz, H-3), 5.46 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H-1), 5.42 (dd, 1H, J = 1.8 Hz, J = 3.6 Hz, H-2), 5.36 (t, 1H, J = 9.9 Hz, H-4), 4.25 (dd, 1H, J = 5.7 Hz, J = 12.3 Hz, H-6-ProR), 4.07 (dd, 1H, J = 2.4 Hz, J = 12.3 Hz, H-6-ProS), 4.00 (m, 1H, H-5), 2.19 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 9H, Ac)

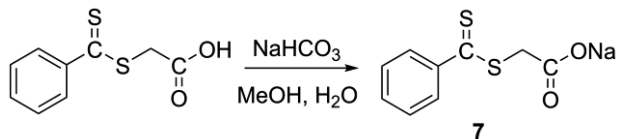
5 (150 mg, 0.30 mmol) を無水 MeOH (20 mL) に溶解させ、NaOMe (15 mg) を加え室温で 1 時間反応させた。TLC で反応終了を確認後、濃縮乾燥させ、白色粉末 (**6**) を得た (yield 98.0%)。 (Scheme 1)

^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ = 7.35 (d, 2H, Ar), 7.07 (d, 2H, Ar), 6.34 (d, 1H, J = 18.0 Hz, $\text{H}_2\text{C} = \text{CH}$), 6.28 (t, 1H, J = 9.9 Hz, $\text{H}_2\text{C} = \text{CH}$), 5.77 (d, 1H, J = 18.0 Hz, $\text{H}_2\text{C} = \text{CH}$), 5.46 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H-1), 4.02 (dd, 1H, J = 1.8 Hz, J = 3.6 Hz, H-2), 3.89 (dd, 1H, J = 3.6 Hz, 9.9 Hz, H-3), 3.63 (t, 1H, J = 9.9 Hz, H-4), 3.59 (m, 3H, H-5, 6)

2.2.2 RAFT 剤の Na 化

S-(Thiobenzoyl) thioglycolic acid をメタノールに溶解させ、水に溶解させた NaHCO₃ を中性になるまで加え、しばらく反応させた後、濃縮乾燥させることで水にかような赤色の粉末 (7) を得た (Scheme 2)。

IR (KBr, v cm⁻¹): 3394, 3051, 1593, 1437, 1398, 1361, 1230, 1174, 1097, 1036, 889, 756



Scheme 2 Synthesis of hydrophilic RAFT reagent

2.2.3. 糖鎖高分子の合成

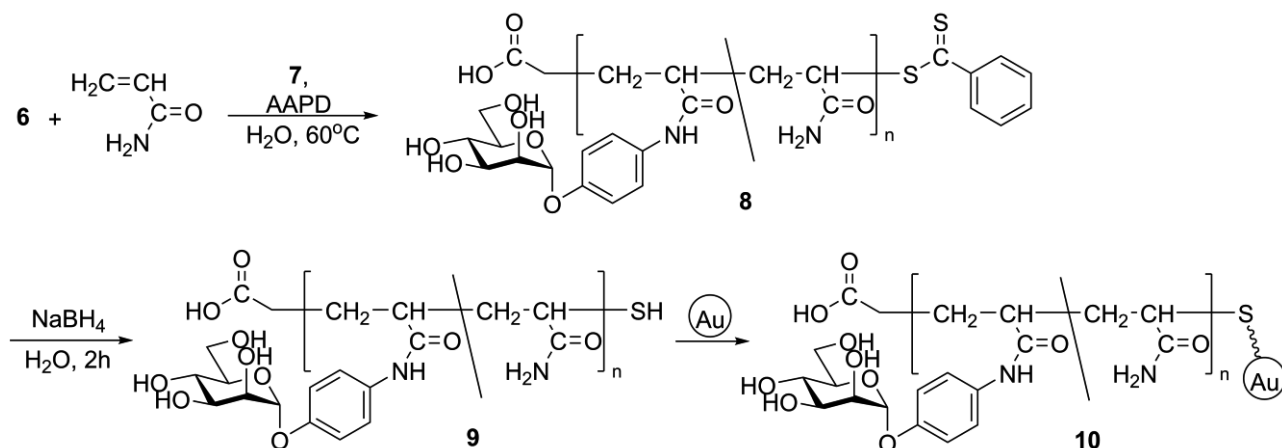
モノマーである、*p*-(N-Acrylamido) phenyl α -D-mannoside (6) とアクリルアミド (計 1.50 mmol) と Na 化した RAFT 剤 (7) (1.6 mg, 7.50 μ mol) を H₂O (1.50 mL) に溶解させ、2,2'-Azobis

(2-amino propane)-Dihydrochloride (AAPD) (0.40 mg, 1.5 mmol) を加えた反応溶液を重合管に入れ、真空脱気を 3 回行った後真空状態で封管した。60 °C の水浴中で振とうさせ重合を行った。反応終了後、反応溶液を遠沈管にいたアセトン溶液中に滴下し、3000 rpm, 20 分遠心分離したのち、透析して凍結乾燥させ、白色のポリマー (8) を得た。(Scheme 3)

¹HNMR (300 MHz, D₂O): δ 7.35(d, Ar), 7.08 (d, Ar), 5.48 (d, J = 1.8 Hz, H-1), 4.02 (dd, J = 1.8 Hz, J = 3.3 Hz, H-2), 3.89 (dd, J = 3.3 Hz, J = 8.7 Hz, H-3), 3.60 (m, H-4, 5, 6), 2.10 (m, -CH₂-CH-), 1.45 (m, -CH₂-CH-)

2.3. 糖鎖高分子の金微粒子への修飾

糖鎖高分子と NaBH₄ を H₂O 中で反応させ、糖鎖高分子の末端を還元してチオール基に変換した (9)。還元させた糖鎖高分子 (10 mg) と 40 nm 金微粒子 (1 mL) を遮光した上で終夜振とうさせた。反応終了後、超遠心分離 (75000 rpm, 45 min) した後上澄みを取り除き凍結乾燥させ、赤色の粉末 (10) を得た (Scheme 3)。



Scheme 3 Polymerization of mannose carrying monomer and preparation of gold nanoparticles with mannose carrying glycopolymer.

Table 1 Polymerization of mannose carrying monomer in the absence of the hydrophilic RAFT reagent.

Run No.	Monomer ^a (0.300 mmol)		RAFT (7)	Time	Yield (%)	Mn ^b (g/mol)	Mw/Mn	Sugar ratio in polymer ^c (%)
	(6)	Acrylamide						
1	0.030 mmol	0.270 mmol	1.50 x 10 ⁻³ mmol	3	10	5,600	1.4	21
2	0.030 mmol	0.270 mmol	1.50 x 10 ⁻³ mmol	6	15	6,700	1.3	18
3	0.030 mmol	0.270 mmol	1.50 x 10 ⁻³ mmol	12	14	6,500	1.4	17
4	0.030 mmol	0.270 mmol	1.50 x 10 ⁻³ mmol	24	22	10,000	1.2	15
5	0.030 mmol	0.270 mmol		3	85	190,000	2.7	11
6	0.150 mmol	0.150 mmol	1.50 x 10 ⁻³ mmol	3	30	6,500	1.4	72
7	0.300 mmol		1.50 x 10 ⁻³ mmol	3	65	14,000	1.3	100
8	0.300 mmol			3	88	250,000	2.2	100
9		0.300 mmol	1.50 x 10 ⁻³ mmol	3	9.4	4,200	1.4	0
10		0.300 mmol		3	90	200,000	2.6	0

^aMonomer 0.30 mmol, AAPD 0.3 mol%, 60°C; ^bdetermined relative to pullulan standard; ^cdetermined using 300MHz ¹HNMR

3. 結果と考察

3.1 糖鎖モノマーの精密重合

モノマー : RAFT = 200 : 1 の割合でモノマーである p-(N-Acrylamido) phenyl α -D-mannoside (**6**) とアクリルアミドの割合および重合時間を変化させたところ、反応時間に応じて分子量の増大が見えるとともに、RAFT 剤を用いない場合に比べて分子量が小さくなっていることがわかる。このことから分子量が制御されていることがわかる (Table 1)。また、 ^1H NMR によって、得られた高分子末端に RAFT 剤由来のピークが見られたことから、得られた糖鎖高分子の両末端に RAFT 剤が付加していることがわかる (Fig. 1)。

しかしながら、得られた糖鎖高分子の糖含有率はモノマーの比率に比べて大きくなっていることから、分子量の精密な制御ができていない結果となった。これは共重合体に用いているアクリルアミドのアミノ基が RAFT 剤の C=S 部分と相互干渉し、RAFT 剤における重合制御ができなかったのが原因と考えられる⁹。

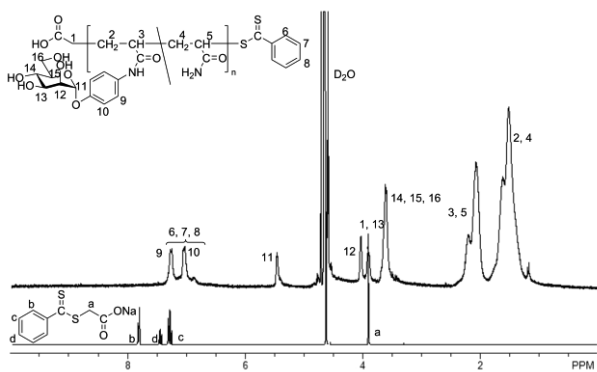


Fig. 1 ^1H NMR spectrum of mannose carrying polymer (**8**)

3.2 糖鎖高分子の金微粒子への修飾

濃度 0.5 mg/mL の糖鎖高分子で修飾した金微粒子は均一に分散し、赤紫色を呈した。修飾後の状態は TEM (Fig. 2) によっても分散していることが分かった。また DLS 測定により粒径 40 nm の金微粒子が 50 ± 3 nm に増大していること、金微粒子表面上の ζ 電位が -15 ± 1.5 mV で安定していることから、金微粒子表面上に末端チオールを配位した糖鎖高分子が修飾されたことが分かった。この状態で常温において1週間以上放置した後も凝集による変色が見られなかったことから安定に分散されていることがわかった。

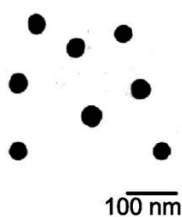


Fig. 2 TEM micrographs of GNP-glycopolymer (**10**) (40 nm)

4. まとめ

カルボキシル基を有する RAFT 剤を Na 化させることで、水溶性 RAFT 剤を調製し、アクリルアミド誘導体の糖鎖モノマーの精密重合を行った。水溶性 RAFT 剤をもちいることで、親水条件下において分子量の制御された高分子を容易に合成することができた。また、RAFT 剤が高分子の両末端に付加していることから、末端還元によって新たな機能を付加させることが可能であることがわかり、強い親水性によって疎水性の強い金微粒子を水に可溶化させることができた。

しかしながら、精密なリビング性を見出すことができなかったことから、用いる RAFT 剤のさらなる検討が必要となる。

参考文献

- [1] A. Varki: Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology*, 3, pp.97-130, 1993
- [2] R. Jelinek and S. Kulusheva : Carbohydrate Biosensors, *Chem. Rev.*, 104, pp. 5987-6015, 2004
- [3] Y. C. Lee : Synthesis of some cluster glycosides suitable for attachment to proteins or solid matrices, *Carbohydr. Rev.*, 67, pp. 509-514, 1978
- [4] K. Kobayashi, A. Kobayashi and T. Akaike : Culturing hepatocytes on lactose-carrying polystyrene layer via asialoglycoprotein receptor-mediated interactions , *Methods Enzymol.*, 247, pp. 409-418, 1994
- [5] C. Bai, H. Ohri, Y. Nishida and H. Meguro : A fluorometric determination method for D, L configurations of per-O-methylated monosaccharides by anomeric 2-methyl-2-betanaphthyl-1,3-benzodioxole 4-carboxylation and high performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 246, pp. 246-252, 1997
- [6] M. Toyoshima, T. Oura, T. Fukuda, E. Matsumoto and Y. Miura : Biological specific recognition of glycopolymer-modified interfaces by RAFT living radical polymerization, *Poly. J.*, 42, pp. 172-178, 2010
- [7] M. Toyoshima and Y. Miura : Preparation of Glycopolymer-Substituted Gold Nanoparticles and Their Molecular Recognition, *J. polym. Sci. A. Polym. Chem.*, 47, pp. 1412-1421, 2008
- [8] G. Moad, E. Rizzardo and A. H. Thang : Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Second Update, *Aust. J. Chem.*, 62, pp. 1402-1472, 2009
- [9] D. B. Thomas, B. S. Sumerlin, A. B. Lowe, and C. L. McCormick : Conditions for Facile, Controlled RAFT Polymerization of Acrylamide in Water, *Macromolecules*, 36, pp. 1436-1439, 2003