

球状糖質高分子「シュガーボール」の合成と機能

岡田 鉦彦

中部大学生物機能開発研究所

1. はじめに

近年、分子生物学のめざましい進展によって、生体内にある糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質が、情報の伝達・制御を通じて、受精や発生、分化、成長、老化、ガン化など、細胞レベルから臓器、個体に至る生命現象に深い関わりを持っていることが次々に明らかにされてきた。有機合成化学や高分子合成化学の分野においては、構造の明確な複合糖質を精密に合成し、その機能の発現と分子構造あるいは超分子構造との相関を調べることによって、生体における複合糖質の精密な機能を分子レベルで解明しようとする研究が活発に行われている。また、応用的な観点からは、精緻な生体機能を発現する機能物質をキーマテリアルとして用いた新しい生医学用材料の開発研究が盛んである。

このような人工複合糖質のうち高分子化合物を活用したものとしては、合成が比較的容易なこともあって、側鎖に単糖やオリゴ糖を有する構造からなるビニルポリマーが圧倒的に多い。このような型の複合糖質高分子は、レクチンなどと相互作用するさいに遊離の単糖やオリゴ糖に比べてはるかに強い結合力を示すことが多い。これは糖質が濃密に存在することに基づくクラスター効果によるものである。しかし高分子鎖は複雑多様な形態をとり、しかも溶液中では時々刻々その形態を変化させている。したがって、こうした型の複合糖質高分子を用いて生体物質を凌駕するほどの精緻な機能を発現させることはきわめて困難であろうと想像される。それゆえ、生体においてアンテナ型複合糖質が発揮しているような、高効率でかつ精密な機能を人工的に発現させようとするためには、糖質の幾何学的配置を制御できるような分子設計が不可欠であろうと考えられる。

筆者らは、複合糖質高分子を研究する過程で、

Tomaliaら (Tomalia et al.,1985;1990) によって開発されたポリ (アミドアミン) デンドリマーに着目した。デンドリマーとは、樹木状に規則正しく枝分かれした構造からなり、理想的には分子量が均一の高分子のことをいう。分岐の度合いが増すほど分子の形は球状に近づく。分子の大きさは数ナノメートルから大きなものでは十数ナノメートルに及ぶ。このような球状に近い分子の表面に糖質を結合させることによって、糖質の幾何学的な配置を制御できるのではないかと筆者らは考えた。このようにして得られた複合糖質高分子は、一見表面が糖質で覆われた球のように見えるであろうと想像されるので、これを「シュガーボール (Sugar Ball)」と名付けた (Aoi et al.,1995)。その後、世界のいくつかの研究グループから、この種の複合糖質高分子が相次いで報告されている。ここでは主として筆者らの研究を中心に、シュガーボールの合成とその期待される機能について解説する。

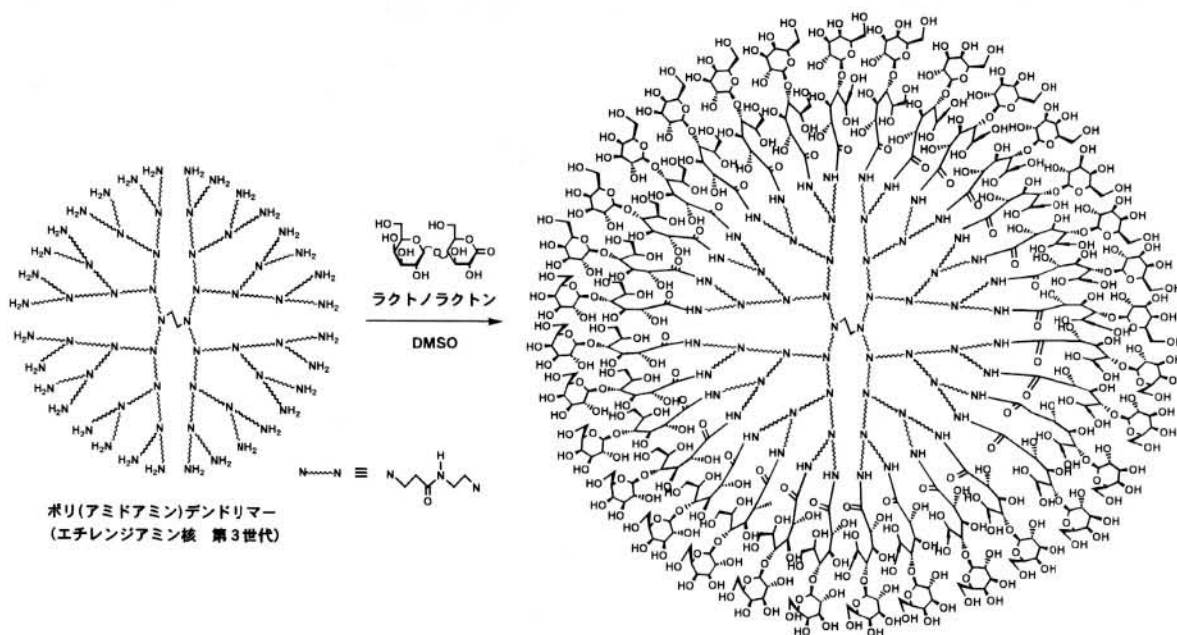
2. シュガーボールの合成法

シュガーボールの合成法は基本的にはデンドリマー骨格の合成法に基づいてDivergent 法とConvergent 法とに大別できる (岡田ら, 1996; 2000a)。

Divergent 法はデンドリマーの中心核の部分から順次外側に向けて分岐構造を構築していく方法である。まずシュガーボールに用いるデンドリマー骨格を合成し、最後に各末端の官能基に糖質を結合させる。筆者らは、第3世代 (中心核がアンモニアの場合には24末端、エチレンジアミンの場合には32末端) から第5世代 (中心核がアンモニアの場合には96末端、エチレンジアミンの場合には128末端) までのポリ (アミドアミン) デンドリマーの末端1級アミノ基に、マルトノラクトンあるいはラクトノラクト

キーワード：分子認識、デンドリマー、自己集合、糖ペプチド、糖質高分子。

受 理 日：2000年12月14日



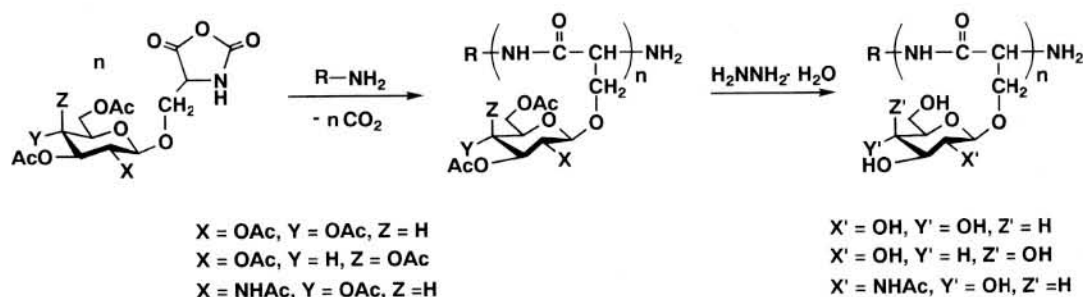
第1図 ラクトノラクトンとポリ(アミドアミン)デンドリマーとの反応によるラクトース型シュガーボールの合成

ンをジメチルスルホキシド中で反応させ、対応する糖質がアミド結合を介してデンドリマーに結合したシュガーボールを合成した(第1図)。この方法は、糖のヒドロキシル基を保護しなくても、糖ラクトンのカルボニル基の炭素原子へデンドリマーの末端アミノ基の求核反応のみが選択的に起こるという大きな利点がある。

反応性の官能基が多数存在する糖質の反応では、目的とする反応のみを選択的に起こさせるために反応に関与してほしくない官能基を適当な保護基でふさいでおき、反応終了後に保護基をはずして元の官能基に戻すのが常套手段である。かさ高い基で保護した糖質を用いると、その立体障害のために、世代の高いデンドリマーでは表面に導入できる糖質分子の数は無保護の糖質を用いるときに比べて制限される。別の言い方をすれば、保護基を有する糖質をデンドリマー表面に導入したあと脱保護すると、表面の

糖質間にかかなりの空隙ができることになる。従って、デンドリマー表面の糖質密度をできるだけ高くするためには、保護基を必要としない糖質導入法を用いるのが望ましい。

n-ヘキシルアミンのような1級アミンを開始剤に用いて、 α -アミノ酸の*N*-カルボキシ無水物(NCA)を開環重合させると、脱炭酸重合が起こって対応するポリペプチドが生成することが古くから知られている。筆者らはグルコースやガラクトースあるいは*N*-アセチルグルコサミンなどの糖質を置換したシセリンのNCA(以下糖置換NCAと略称)の開環重合を詳しく調べた(青井ら, 1997; Okada et al, 1997)。一般にかさ高い置換基を有するアミノ酸のNCAの開環重合では副反応が起こり易いといわれているにもかかわらず、上述の糖置換NCAの重合では、糖を側鎖に有する分子量のよく揃ったポリペプチドが得られることがわかった(第2図)。



第2図 1級アミンを開始剤とする糖置換 L-セリン N-カルボキシ無水物(NCA)の開環重合による糖ペプチドの合成

また速度論的な研究からは、重合の開始反応が成長反応に比べて2000倍以上も速いこともみつかった。

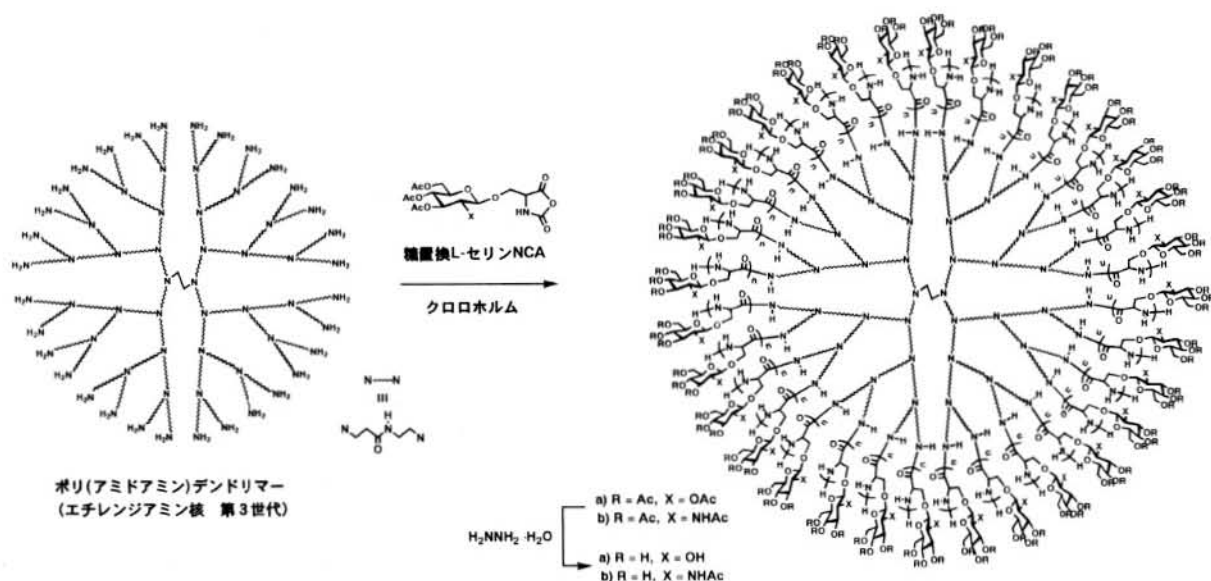
このような糖置換NCAの反応性を利用すれば、糖ペプチド構造を導入したシュガーボールを合成することができるはずである。事実、1級アミノ基を末端に有するポリ(アミドアミン)デンドリマーとそのアミノ基に対して僅かに過剰の糖置換NCAとをクロロホルム中 -30°C で短時間反応させると、1級アミノ基のすべてに1分子の糖誘導体置換L-セリン単位を導入することができた。生成物をメタノール中ヒドラジンを用いて脱アセチル化することにより、第8世代までのポリ(アミドアミン)デンドリマー骨格からなる糖ペプチド型シュガーボールを合成した(第3図, $n=1$, 図は第3世代のデンドリマー骨格)(Aoi et al.,1998)。また、デンドリマー表面のアミノ基に対する糖誘導体置換NCAのモル比を増やし、反応温度を室温まで上げることによって、糖を側鎖に有するオリゴペプチド鎖がデンドリマー表面から放射状に伸びた星型シュガーボールを合成することにも成功した(第3図, $n=3.5-3.8$)(Aoi et al.,1997)。デンドリマーの末端に少し工夫をこらしておいて、デンドリマー表面から伸びた糖ペプチド鎖をデンドリマーから切り離して分子量を測定してみると、分子量が比較的良好にそろっていることが確かめられた。

この重合反応について速度論的な研究を行っ

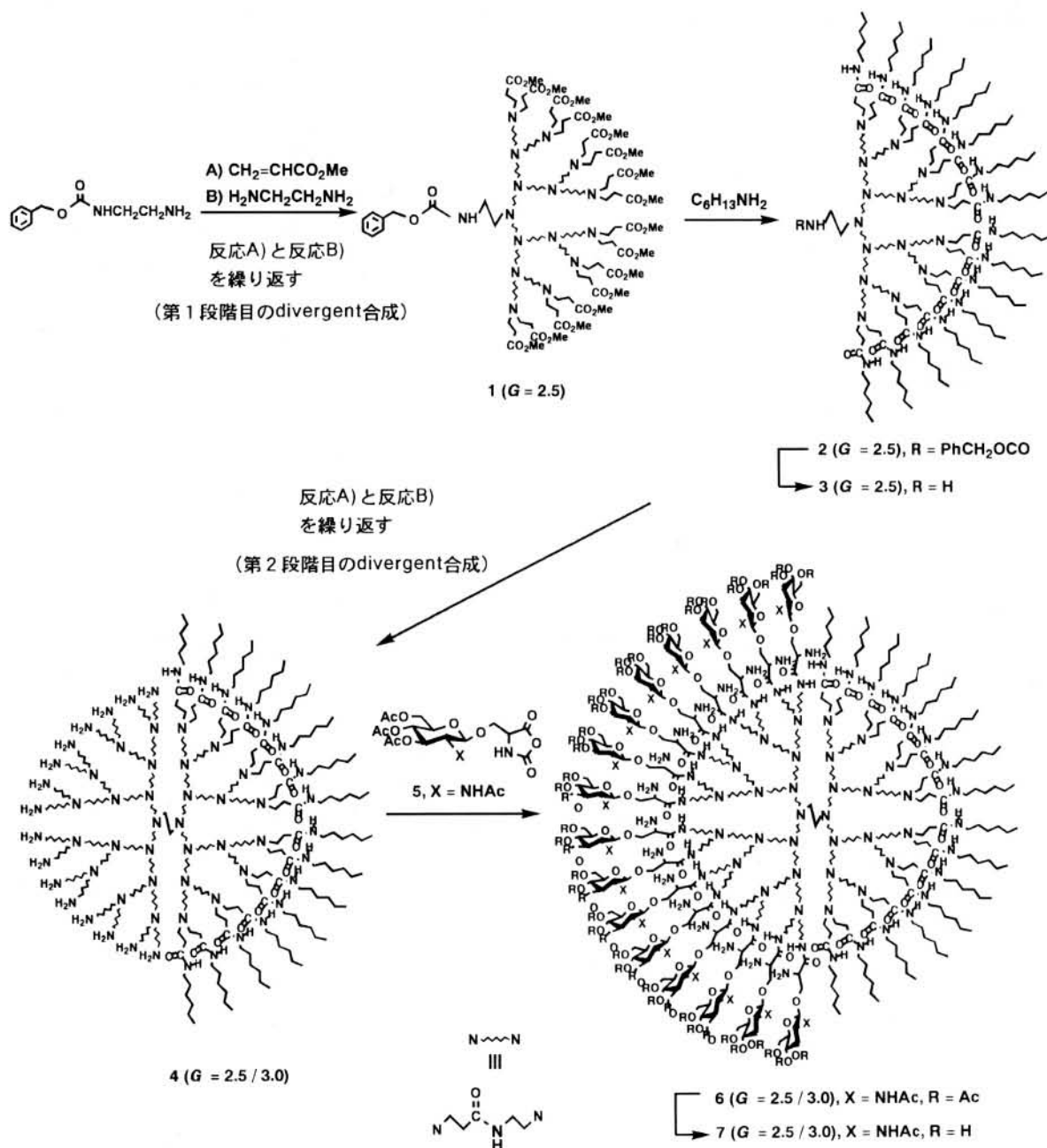
た結果、思いがけない重合の加速現象が見つかった。すなわち、末端に1級アミノ基を有するデンドリマーを開始剤に用いると、低分子の n -ヘキシルアミンを開始剤に用いたときに比べて成長反応の速度定数は数十倍にも達した。ポリ(アミドアミン)デンドリマーの世代数が大きいほど、また成長鎖の重合度が小さいほど(いいかえれば重合初期ほど)、大きな加速効果が認められた。糖構造を含まないサルコシン(N-メチルグリシン)NCAの重合でも同様な加速現象が認められたことから、この現象が糖置換NCAに特有のものではなく、普遍的な現象であることがわかった。

溶媒や温度を変えてNCAの重合反応を詳しく調べた結果を総合すると、このような加速現象は次のように説明できる。すなわち、デンドリマー表面の微小界面領域は溶媒のクロロホルムに比べて極性が高いので、極性の高いNCAモノマーが濃縮されて、反応点近傍のNCAの局所濃度が増していると考えられる。そのために成長末端のアミノ基とNCAとの見かけの反応速度定数が増大したと考えられる。また、反応初期ではデンドリマー表面から放射状に重合鎖が成長しやすいので、成長末端とNCAモノマーとの衝突確率が増していることも速度定数の増大に寄与している可能性がある。

上述のシュガーボールは、いずれもデンドリマー表面全体に一樣に糖質が導入されたものであった。筆者らは、デンドリマーの半球表面に



第3図 糖置換NCAとポリ(アミドアミン)デンドリマーとの反応による糖ペプチド型シュガーボール($n=1$)と糖ペプチド星型シュガーボール($n=3.5-3.8$)の合成(図は第3世代のデンドリマー)



第4図 両親媒性表面ブロック型シュガーボール（ハーフシュガーボール）の合成経路

は糖質を、残りの半球表面には疎水性基を導入した表面ブロック型デンドリマー（ハーフシュガーボール）も合成した (Aoi et al., 1997b)。2通りの方法でこのようなハーフシュガーボールの合成を試みたが、ここではDivergent/Divergent法による合成例を紹介しておくにとどめる (第4図) (青井ら, 1998)。

エチレンジアミンの二つのアミノ基の一方を保護し、もう一方のアミノ基からアクリル酸メチルの付加とエチレンジアミンによるアミド化反応を繰り返してポリ（アミドアミン）デンドリマー半球骨格を構築する。目的とする世代のところでエチレンジアミンの代わりに n -ヘキシ

ルアミンを反応させて、ヘキシル基を表面に導入した疎水性のポリ（アミドアミン）デンドリマー半球ブロックを合成する。ついでコアの保護基を外し、遊離したアミノ基から再びデンドリマー骨格の構築を行う。最後に前述の方法により糖置換NCAを反応させたのち保護基を外し、親水性の糖質で被覆された半球表面とすることにより、両親媒性のハーフシュガーボールを得た。

これまで述べてきたシュガーボールはいずれもデンドリマー骨格の合成にDivergent法を用いている。デンドリマー骨格をつくるもう一つの方法はConvergent法である。この方法ではデン

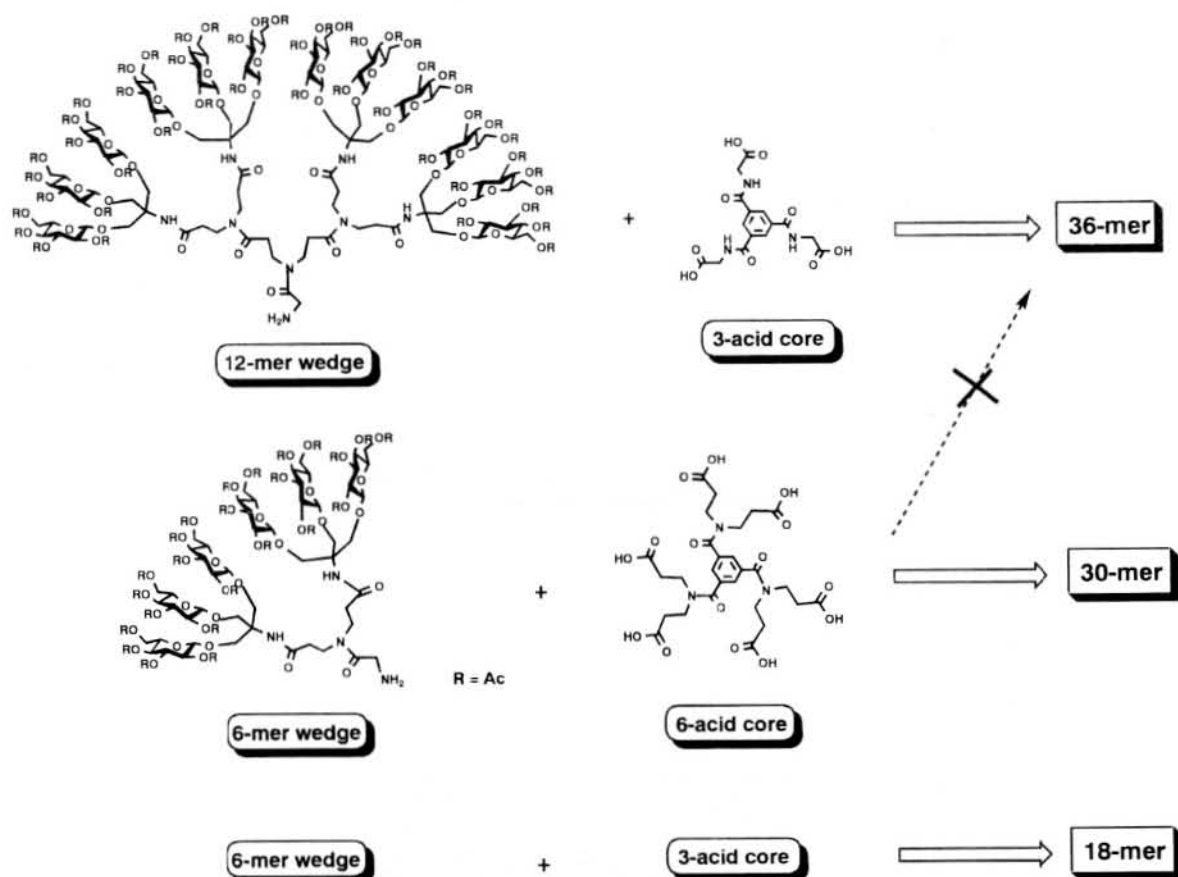
ドリマーの最も外側となる部分から出発して、次第に内側に向けてデンドリマー骨格を組立ていき、扇型の多分岐構造（デンドロンという）をつくる。このようにして得られたデンドロンをコアとなる多官能性化合物と最後にカップリングさせてデンドリマーとする。

Ashtonら (Ashton et al., 1997) はトリス（ヒドロキシメチル）アミンを出発原料として用い、6個および12個のグルコース誘導体単位を有するデンドロンを調製した。ジシクロヘキシルカルボジイミドと1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを縮合剤に用いてこのデンドロンの扇の要の位置にあるアミノ基とトリカルボン酸とを反応させたのち、常法によりアセチル保護基を外し、それぞれ18個および36個のグルコース単位を最外殻に有するデンドリマーを合成した（第5図）。なお、6個の糖誘導体有するデンドロンと6個のカルボキシル基を有するカップリング剤との反応では、反応の進行に伴い立体障害が増すため、6個のカルボキシル基のうち一つのカルボキシル基は未反応のまま残り、目的と

する糖単位が36個のシュガーボールは得られず、糖単位が30個の生成物が得られた。

一般にConvergent法でデンドリマーを合成する場合には、世代が増すほど、目的とする生成物と反応が完結しなかった化合物とで分子量の違いが大きくなる。そのため比較的容易に両者を分離することができ、欠陥部のないデンドリマーを合成することができる利点がある。しかし世代が上がるほど最終段階でのカップリング反応は困難になるので、分子量のあまり大きなデンドリマーを構築することはできない。また、糖質は反応性に富むものが多いので、この方法で使用できる糖質は安定性の高いものに限られる。

これに対して前述のDivergent法では中心部から外側へ向けて分岐構造を伸ばしていき、最後に糖質を導入するので、分子量の大きなものでも構築できるし、比較的安定性の低い糖質の導入も可能であるという利点がある。ただし、欠陥部のある化合物が生成しても、目的物と分子量の差が小さく、それを分離することは一般



第5図 コンバージェント法によるシュガーボールの合成、12個の糖単位を有するデンドロンと3官能性のコアとの反応では36個の糖単位を有するシュガーボールを合成できるが、6個の糖単位を有するデンドロンと6官能性のコアとの反応では1個のカルボキシル基が未反応で残り、30個の糖単位を有するシュガーボールしか得られない。

にはできない。

ペプチドの固相合成法は古くから知られているが、Royらは固相合成法を応用して構造の制御された多分岐構造からなる糖ペプチドをいくつか合成した (Llinares and Roy, 1997)。たとえば、Wangの樹脂を用いた固相合成法によりリシンを分岐単位とする多分岐オリゴペプチドを合成し、*N*-クロロアセチル化した末端に、チオール基を有するラクトサミンやシアル酸誘導体をカップリングさせたのち、高分子担体から生成物を切り離し、最後に糖の保護基を外して、最大16個の糖単位を有するクラスター型の糖ペプチドを合成した。このほかにも3, 3'-イミノビス (プロピルアミン) を基盤にしたデンドリティック α -シアロシド (Zanini and Roy, 1996)、あるいは3, 4, 5-トリヒドロキシ安息香酸誘導体を3官能性の分岐点とし、テトラエチレングリコールをスペーサとするデンドリティックラクトシドなど (Roy et al., 1995) も合成し、それらが高い分子認識能を発現することを実証した。

3. シュガーボールの機能

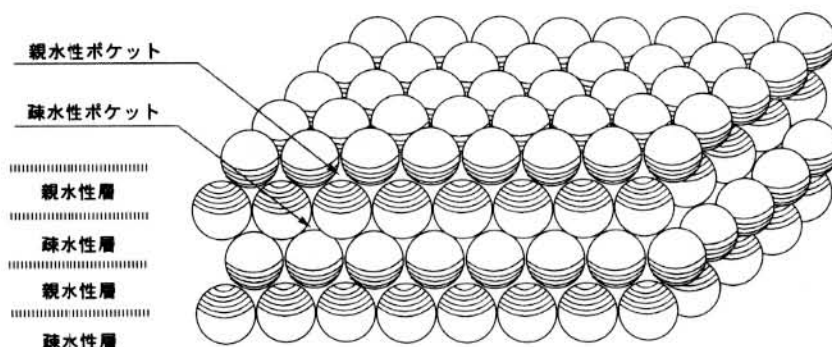
デンドリマー骨格の表面に糖質を導入したシュガーボールは水によく溶ける。第3世代ラクトース型シュガーボールの重水中での中性子散乱測定によれば、濃度0.25~3.0%では千個程度の分子がより集まった球状集合体が生成していることがわかった。また、デンドリマーの半球表面に親水性の糖質を有し、残りの半球表面には疎水性の n -ヘキシル基を有する両親媒性表面

ブロック型デンドリマー (ハーフシュガーボール) の水溶液では、明瞭な臨界ミセル濃度 (CMC) が二つ存在することが表面張力測定により確かめられた (岡田ら, 2000b)。二つのCMCの間の濃度の重水溶液を調製して中性子散乱測定を行った結果、2量体の大きさに相当する会合体が生成していることがわかり、ミセルの形成が2段階で進行していることが示唆された。

このようなハーフシュガーボールの分子設計のねらいのひとつには、これらの球状の素構造を規則正しく層状に配列させることがある (Aoi et al., 1999)。親水性部分どうしは水素結合で、疎水性部分どうしは疎水性相互作用で、互いに規則正しく配列させることができれば、層状の組織構造が得られるだろう (第6図)。一つひとつの素構造の形がほぼ球状に保たれるならば、親水性部分に囲まれたポケット、疎水性部分に囲まれたポケットができることになる。これらのポケットに特定の分子を取り込ませたり、その中で反応させたりすることができれば、新しい機能性素材の開発への道が開けるだろう。

生体中で複合糖質が発現する精緻な分子認識力は、その分岐した糖鎖構造に基づく多価相互作用によることが明らかにされている。筆者らのシュガーボールの合成の最も大きなねらいは、デンドリマーを骨格に用いることによって、その表面の糖質の空間的な配置を制御し、タンパク質や細胞などと特異的に相互作用する機能物質や機能材料を創製することにある。マルト

両親媒性球状分子の超分子自己組織化



第6図 両親媒性球状分子の超分子自己組織化の概念図

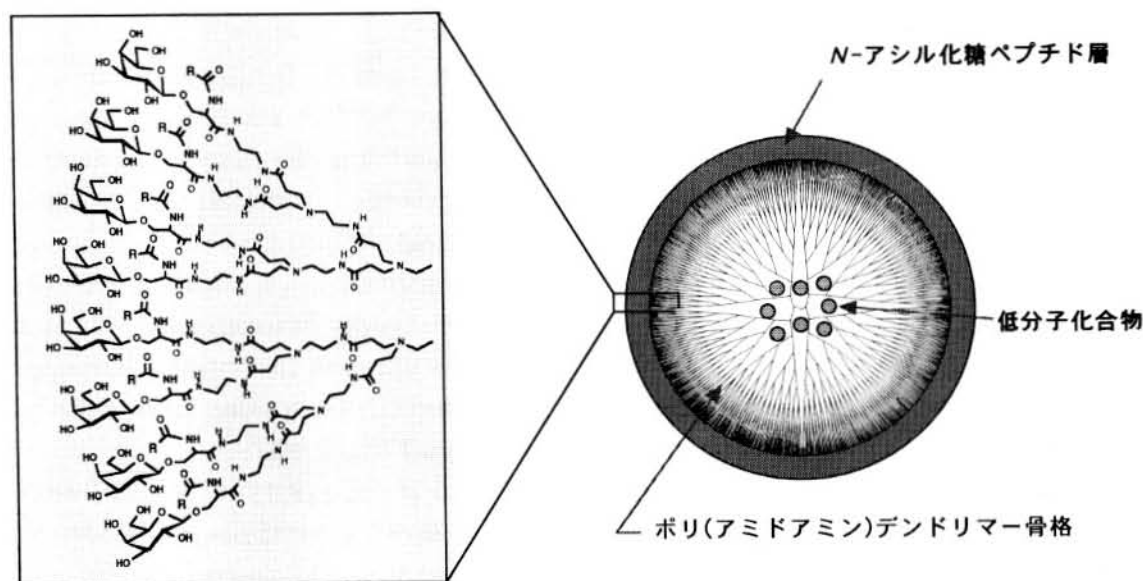
ース型シュガーボールとコンカナバリンA、ラクトース型のシュガーボールとピーナツレクチン、*N*-アセチルグルコサミンを有する糖ペプチド星型シュガーボールと小麦胚芽レクチンとが、それぞれ特異的に強い相互作用を示し、その強さが骨格デンドリマーの世代数、および星型シュガーボールの場合には表面から伸びたオリゴペプチド鎖の鎖長にも強く依存することが認められた (Aoi et al., 1995; 1997)。すなわち、レセプターの幾何学的な配置とデンドリマー表面の糖質の配置とが最もよく適合したときに強い相互作用が現れる。デンドリマーの世代数を上げて表面の糖質密度を高くすればするほど認識力が強くなるというものではない。

シュガーボールの骨格をなすデンドリマーには内部に空隙があるので、そこへ低分子化合物を封じ込めることができる。一方、表層の糖質部は、上述の認識サイトとしての働きのほかに、球状構造を保持し、内部に取り込んだ分子の漏洩を防ぐ役割も果たすものと思われる。事実、アミノ末端型のポリ(アミドアミン)デンドリマーと8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム(ANS)とを溶液中で混合したのち、糖置換NCAを反応させて表面に糖ペプチド構造を導入することにより、ANS分子をシュガーボール内にカプセル化することができた (Tsutsumiuchi et al., 1999)。

注意しなければならないのは、紙面に描いたデンドリマーの2次元的な図では表面近傍は非常に混み合っているが、実際にはかなりの余

裕があるということである。分子模型を組んでみるとこのことが実感としてよくわかる。筆者らが用いたポリ(アミドアミン)デンドリマーは分岐点間に6個の原子が存在するので、分岐点間の原子数が3個のポリ(トリメチレンイミン)デンドリマーに比べて骨格鎖の混み具合ははるかに小さい。そのため、効果的にシュガーボール内へANSなどの低分子をカプセル化するためには世代の高いポリ(アミドアミン)デンドリマーを用いなければならない。

また同じ世代のシュガーボールであっても表面に導入する糖質の種類によって低分子の取り込み能は大きく異なる。例えば、表面に*N*-アセチルグルコサミンを導入した第8世代のポリ(アミドアミン)骨格のシュガーボールでは、一つのデンドリマー分子内に8個程度のANS分子を取り込ませることができたが、表面にガラクトースを導入した同じ骨格のシュガーボールにはほとんどANS分子は取り込まれなかった。後者の場合には、表面に糖質を導入したのち、さらに末端の1級アミノ基をヘキサノイル化してはじめてうまくANS分子をシュガーボール内部にカプセル化することができた(第7図)。導入したアルキル基の疎水性相互作用による遮蔽効果のほかに分子自体が収縮していることもカプセル化能の増大に寄与していることがわかった。このようにシュガーボールが分子認識力と低分子カプセル化能をあわせもつことを考えると、標的指向性ドラッグデリバリーシステムへの応用が期待される。



第7図 *N*-アシル化糖ペプチド型シュガーボールによる低分子のカプセル化

このほかにも、シュガーボールがDNAとコンプレックスを形成することがCDスペクトルや電気泳動の測定から確かめられている(岡田ら, 2000b)。コンプレックスを形成することによってDNAの熱安定性やヌクレアーゼに対する耐性が増すし、コンプレックスを形成した状態でレクチンと相互作用する。遺伝子キャリアーとしての可能性も秘めているといえるだろう。

引用文献

- 青井啓悟, 堤内 要, 岡田鉦彦 1997. 複合糖質高分子の精密構築—シュガーボールと糖ペプチド. 高分子論文集 54: 649-660.
- 青井啓悟, 岡田鉦彦 1998. デンドリマーの分子設計 —新しいナノスケールアーキテクチャーへの招待—. 現代化学 (6) 20-27.
- 岡田鉦彦, 青井啓悟 1996. 球状糖鎖高分子 “シュガーボール” の合成と応用. バイオインダストリー13 (8): 42-50.
- 岡田鉦彦, 青井啓悟 2000a. デンドリマーに基づく材料設計の方法論. 岡田鉦彦 編 デンドリマーの化学と機能. アイピーシー, 東京. pp15-78.
- 岡田鉦彦, 青井啓悟 2000b. デンドリマーの生化学・生医学材料設計への応用. 岡田鉦彦 編 デンドリマーの化学と機能, アイピーシー, 東京. pp205-240.
- Aoi, K., Itoh, K., Okada, M. 1995. Globular Carbohydrate Macromolecule “Sugar Ball”. 1. Synthesis of Novel Sugar-Persubstituted Poly (amido amine) Dendrimers. *Macromolecules* 28:5391-5393.
- Aoi, K., Tsutsumiuchi, K., Yamamoto, A., Okada, M. 1997a. Globular Carbohydrate Macromolecule “Sugar Ball”. 3. Radial-Growth Polymerization of Sugar-Substituted α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides (GlycoNCAs) with a Dendritic Initiator. *Tetrahedron* 53: 15415-15427.
- Aoi, K., Itoh, K., Okada, M. 1997b. Divergent/Convergent Joint Approach with a Half-Protected Initiator Core to Synthesize Surface-Block Dendrimers. *Macromolecules* 30:8072-8074.
- Aoi, K., Tsutsumiuchi, K., Yamamoto, A., Okada, M. 1998. Globular Carbohydrate Macromolecule “Sugar Ball”. 2. Synthesis of Mono (glycopeptide)-Persubstituted Dendrimers by Polymer Reaction with Sugar-Substituted α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides. *Macromol. Rapid Commun.* 19:5-9.
- Aoi, K., Motoda, A., Ohno M., Tsutsumiuchi, K., Okada, M., Imae, T. 1999. Synthesis and Assembly of Amphiphilic Tadpole-Shaped Block Copolymers Based on Poly (amido amine) Dendrimers. *Polym. J.* 31:1071-1078.
- Ashton, P. R., Boyd, S. E., Brown, C. L., Jayaraman, N., Stoddart, J. F. 1997. A Convergent Synthesis of a Carbohydrate-Containing Dendrimer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36:732-735.
- Llinares, M., Roy, R. 1997. Multivalent Neoglycoconjugates: Solid-Phase Synthesis of *N*-Linked α -Sialodendrimers. *Chem. Commun.* 2119-2120.
- Okada, M., Aoi, K., Tsutsumiuchi, K. 1997. Synthesis of Glycopeptide-Conjugates via Ring-Opening Polymerization of Sugar-Substituted α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides (GlycoNCAs). *Proc. Japan Acad.* 73, ser. B:205-209.
- Roy, R., Park, W. K. C., Wu, Q., Wang, S.-N. 1995. Synthesis of Hyper-branched Dendritic Lactosides. *Tetrahedron Lett.* 36:4377-4380.
- Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. 1985. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* 17:117-132.
- Tomalia, D. A., Naylor, A. M., Goddard, III, W. A. 1990. Starburst Dendrimers: Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology and Flexibility in the Conversion of Atoms to Macroscopic Materials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29:138-176.
- Tsutsumiuchi, K., Aoi, K., Okada, M. 1999. Globular Carbohydrate Macromolecule “Sugar Balls” IV. Synthesis of Dendritic Nanocapsules with Molecular Recognition Sites on Periphery. *Polym. J.* 31:935-941.
- Zanini, D., Roy, R. 1996. Novel Dendritic α -Sialosides: Synthesis of Glycodendrimers Based on a 3,3'-Iminobis (propylamine) Core. *J. Org. Chem.* 61:348-7354.

Title: Syntheses and functions of globular
glycopolymers "Sugar Balls"

Author: Masahiko Okada

Key words: dendrimer, glycopeptide, glycopoly-
mer, molecular recognition, self-assembly