

機能性高分子の合成研究

2016 年 9 月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）
理工学専攻（主指導教員 松岡 浩司 教授）

木村 珠美

1. 緒言	1
2. Sialyl LacNAc 誘導体の細胞を用いた効率的生産法の検討	5
2.1 背景	6
2.2 実験方法	11
2.2.1 一般	11
2.2.2 有機合成	11
2.2.3 細胞実験	21
2.2.3.1 GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 の糖鎖伸長の確認	21
2.2.3.2 GlcNAc-2C6 の糖鎖伸長生成物の構造決定 (分子量)	23
2.2.3.3 酵素による Sialic acid 結合様式の確認	25
2.2.3.4 GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C12 の糖鎖伸長の確認	26
2.2.3.5 アルキル鎖構造の違いによる糖鎖伸長生成物生成量の比較	28
2.2.3.6 GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 の細胞毒性について	29
2.2.3.7 GlcNAc と GlcNAc-2C6 の B16 細胞への同時投与	30
2.2.3.8 GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 の B16 細胞への同時投与	32
2.3 結果と考察	34
3. Sialyl LacNAc 誘導体ペンダントポリマーの作成	54
3.1 背景	55
3.2 実験方法	56
3.2.1 一般	56
3.2.2 有機合成	57
3.2.3 細胞実験	60
3.2.3.1 GlcNAc-C12N ₃ の細胞毒性の検討	60
3.2.3.2 Sialyl LacNAc 誘導体の大量生産について	62

3.2.3.3	プロパルギル基を有する高分子の合成	64
3.2.3.4	糖鎖高分子の合成	64
3.3	結果と考察	65
4.	フッ素樹脂の合成とぬれ性の測定	67
4.1	背景	68
4.2	実験方法	69
4.2.1	一般	69
4.2.2	有機合成	70
4.2.3	ぬれ性の評価	73
4.3	結果と考察	73
5.	蛍光性シアル酸誘導体の合成	77
5.1	背景	78
5.2	実験方法	81
5.2.1	一般	81
5.2.2	蛍光性シアル酸誘導体モノマーの合成	81
5.2.3	ダンシル誘導体モノマーの合成	95
5.2.4	蛍光性シアル酸誘導体モノマーとダンシル誘導体モノマーから成るコポリマーの作成	97
5.2.5	蛍光性シアル酸誘導体が Neuraminidase 基質であるかの確認	98
5.3	結果と考察	98
6.	総括	101
7.	参考文献	104

8. 投稿論文リスト	108
9. 謝辞	110

1. 緒言

機能性ポリマーとは特定の官能基を持つポリマーまたは物理的・化学的・生物学的・薬理的または特定の官能基によるほかの用途を持つポリマーと定義されている (PAC, 2004, 76, 889)。例えば、機能性ポリマーの‘機能性’とは触媒活性、特定の種への選択的な結合、電荷キャリアまたはエネルギーの捕獲や輸送、光-電荷キャリア間の変換、薬剤の特定の臓器への輸送である (PAC, 2004, 76, 889)。この定義中の“特定の官能基による用途をもつポリマー”としてフッ素化された側鎖を持ちその特徴的な性質から物理的・化学的・生物学的に利用されているフッ素化ポリマーの研究と生理活性糖鎖酸誘導体をペンダントトップに配置したポリマーの研究を行った。

初めに、インフルエンザやペロ毒素など様々な病原体との関わりが明らかになっている Sialyl LacNAc 誘導体を効率的に生産する方法について検討した。Sialyl LacNAc 誘導体は非還元末端側から、*N*-acetylneuraminic acid - galactose - *N*-acetylglucosamine の順に単糖が連なった糖鎖構造をしている。糖鎖の合成法には主に有機合成と酵素合成があるが、いずれの方法も誰でも簡単に糖鎖を合成できる方法ではない。そこで、新たな糖鎖合成法として誰でも簡単に糖鎖を合成できる”糖鎖プライマー法”がある⁽¹⁾。これは、モノアルキルグリコシドを有機合成によって合成し、細胞にモノアルキルグリコシドを投与すると、細胞内にある酵素の働きによってモノアルキルグリコシドを糖鎖伸長させ、糖鎖伸長生成物を得るという方法である。”糖鎖プライマー法”は他の方法に比べて簡便ではあるが、細胞から得られる糖鎖伸長生成物の量は微量である。そこで、より多くの糖鎖伸長生成物を得るために細胞に投与するモノアルキルグリコシドの構造を最適化した。

次に糖鎖プライマー法を用いて、細胞によって糖鎖伸長された糖鎖伸長生成物をペンダントトップに配した Sialyl LacNAc 誘導体ポリマーを作成した。糖鎖プライマー法では細胞に投与するモノアルキルグリコシドの種類と用いる細胞の種類を変えることで、様々な糖鎖構造を持つ糖鎖伸長生成物を得ることが

できる⁽¹⁾。糖鎖が関係する疾患の一つに病原体が細胞表面の糖鎖を認識することで起こる疾患がある。この場合、病原体によって認識する糖鎖構造が異なることから、病原体ごとに様々な糖鎖構造を用意する必要がある。これまでに報告されている糖鎖誘導体ペンダントポリマーは有機合成や酵素合成により合成した糖鎖誘導体をペンダントトップに配したポリマーであった⁽²⁾。本研究では、様々な糖鎖構造を簡便に作成することができる糖鎖プライマー法によって得た糖鎖伸長生成物をペンダントトップに配したポリマーを作成した。ポリマーに糖鎖プライマー法によって得られた糖鎖伸長生成物を担持できたことによって、病原体が認識する細胞表面を模したポリマーを病原体ごとに簡便に作成できる可能性が示唆された。

次に、糖鎖誘導体ペンダントポリマーを診断材料に応用しようと考え、診断感度向上のために非特異相互作用の少ないポリマーの検討を行った。これまでに作成した糖鎖誘導体ペンダントポリマーはインフルエンザウイルスが認識する糖鎖構造を持っているため、診断材料の中でもインフルエンザ診断材料への応用を検討した。現行のインフルエンザ診断材料は希釈した検体（主に鼻腔ぬぐい液や咽頭ぬぐい液）をそのまま、診断材料（迅速診断キット）に滴下し行われている。検体にはインフルエンザウイルス以外にも様々な成分が含まれていることから、不純物が非特異相互作用しにくいポリマーとしてフッ素化ポリマーを作成し、ぬれ性の測定と臨界面張力の計算を行った。

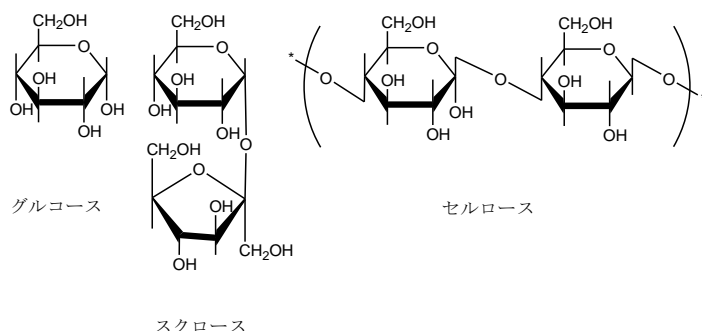
最後に、インフルエンザ診断材料への応用を目指し、蛍光性シアル酸誘導体モノマーとダンシル誘導体モノマーを用いてコポリマーを作成した。インフルエンザウイルスの診断は元来、数日かけてインフルエンザウイルスの型や毒性の強さを調べて行われてきた。近年、インフルエンザウイルスの迅速診断キットが開発され、30分程度で診断が行えるようになった。迅速診断キットはイムノクロマトグラフィー法を原理としたものやノイラミニダーゼ活性を利用したものが臨床で使用されている。前者はウイルス量が少ない場合に正しい診断を

することができず、後者は前者に比べて検出感度が悪い^{(3)・(4)}。そこで、ノイラミニダーゼ活性と蛍光共鳴エネルギー移動（**FRET**）⁽⁵⁾を利用して少ないウイルス量でも高感度にウイルスを検出可能な材料の作成を目指した。

2. Sialyl LacNAc 誘導体の細胞を用いた効率的生産法の検討

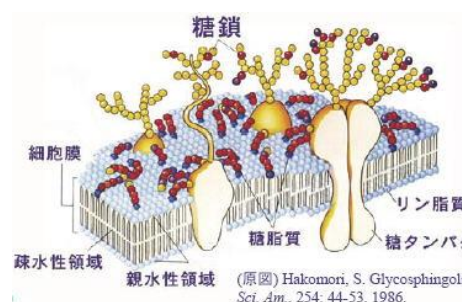
2.1 背景

“糖”は単糖・オリゴ糖・多糖と糖のつながる数によって様々に呼ばれている。単糖は一般に炭水化物とも呼ばれており、動植物における主要なエネルギー源であるグルコースもこれにあたる。オリゴ糖とは 2 個以上の単糖が



(Figure 1. 糖質の構造)

グリコシド結合でつながった化合物をさし、身近なものではコーヒーに入れる砂糖（スクロース）などがある。多糖とは連なる糖の数がオリゴ糖よりさらに多い化合物のことをいい、植物の細胞壁（セルロース）としてその構造を支えているものや、グルコースが連なったエネルギーの貯蔵物質であるグリコーゲンやデンプンなどがある。

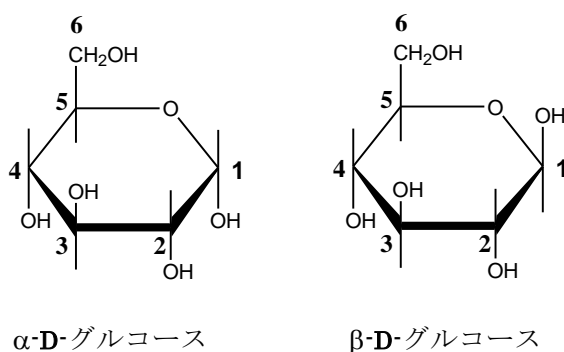


(Figure 2. 細胞表面の糖鎖) (8)

”糖”は 1960 年代から細胞表面における生体情報伝達に関っているのではないかと研究され始め、その働きが明らかになってきた(6), (7)。

スクロースは多くの植物で組織全体にエネルギーを運ぶのに使われている。オリゴ糖は細胞表面で糖脂質・糖タンパク質として十糖を超える糖鎖が連なって存在し、細胞の発生やガン化、免疫、接着、受精などの生命現象を起こしている。(Figure. 2) (8)。

このように、重要な化合物であることは明らかであるにもかかわらず、糖質の合成と分析は困難で、近年の科学技術の進歩と共に糖質の科学は発展してきた。

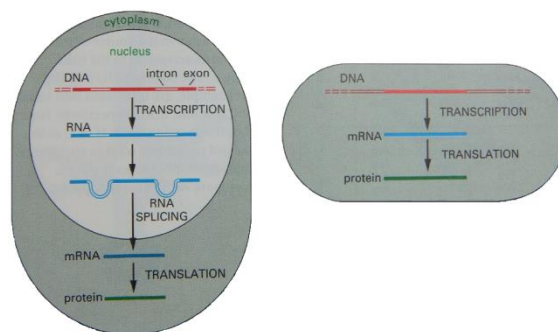


(Figure 3. グルコースの異性体)

オリゴ糖の合成には化学合成・酵素合

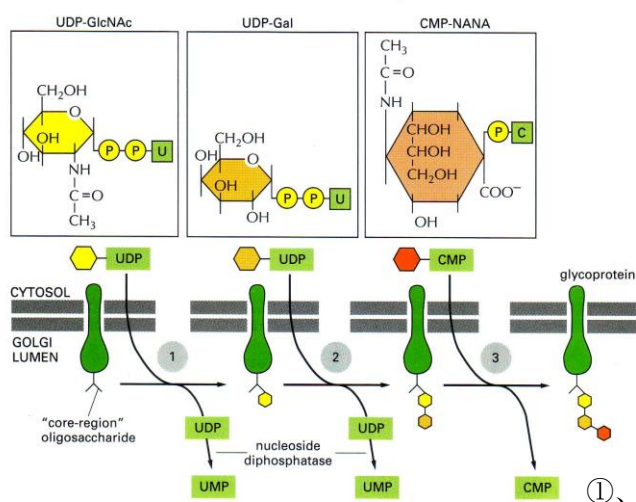
成がある。化学合成の場合、糖質は同一分子中に多数の水酸基を持つためどの水酸基を反応させるか、また、どのような立体構造(α - or β -)を作るのかと反応を制御することが難しい (Figure 3.)。一般に、糖質を有機合成すると官能基の保護と脱保護を繰り返す複雑な反応になることが多い。

一方、酵素合成の場合は酵素 (糖転移酵素) が小胞体やゴルジの膜にあるため、膜から取り出すと活性が落ちるなど不安定な場合や、高価なドナー (糖ヌクレオチド) を用意する必要がある。また、糖質の合成は核酸やタンパク質の合成とは異なり、複雑である。核酸やタンパク質は鋳型からコピーを作るといった手法で、同じ酵素を使った反応の繰り返しである (Figure



(Figure 4. タンパク質の生合成経路) (9)

4.) (9)。一方、糖質の合成では糖鎖伸長させる糖 (アクセプター) ごとに働く酵

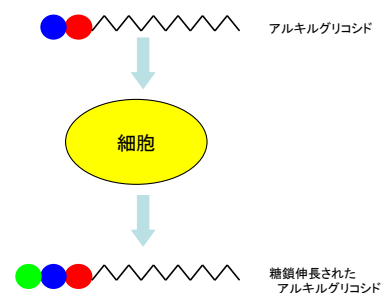


①、②、③は別々の糖転移酵素

(Figure 5. オリゴ糖の生合成経路) (9)

素が異なる。そのため、単糖が 2 糖、3 糖と糖鎖伸長されていく場合、それぞれの過程で異なる酵素が必要になる (Figure 5.) (9)。

そこで、簡単なアルキルグリコシドの有機合成と細胞の糖鎖生産システムを用いて糖鎖を生産する “糖鎖プライマー” 法に着目した (Figure 6.)⁽¹⁾。この方法では、細胞に内在する糖転移酵素とドナー (糖ヌクレオチド) を用いて有機合成したアルキルグリコシド (アクセプター) を糖鎖伸長する。糖転移酵素と糖

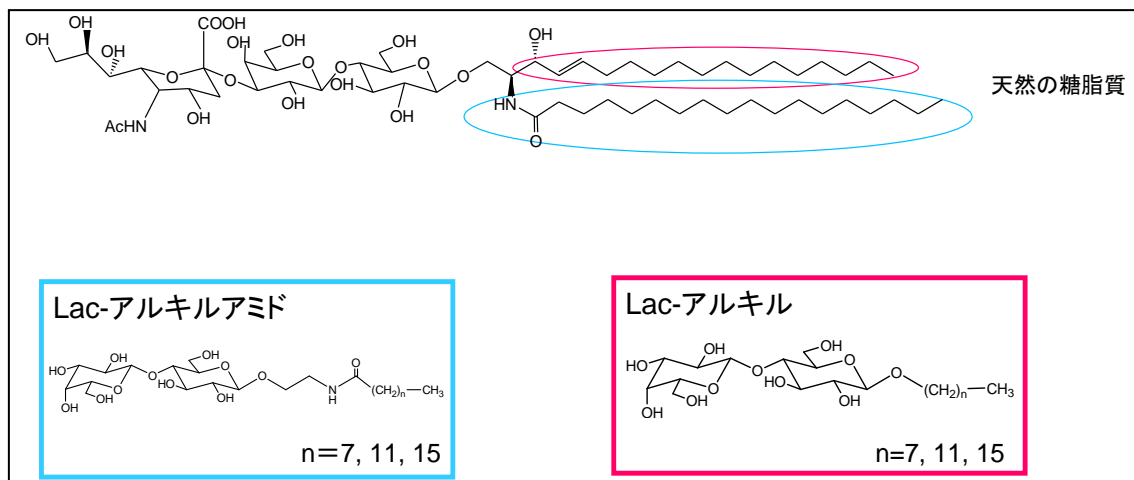


(Figure 6. 糖鎖プライマー法)⁽¹⁾

ヌクレオチドは細胞内に準備されているので、酵素の活性が不安定になることもなく、高価なドナーを準備する必要もない。また、細胞が作る糖鎖の種類は生物の種類や臓器の部位によっても異なるため、細胞ごとに様々な糖鎖を生産することができる (Table 1.)⁽¹⁾。これは、動物の種や臓器によって糖転移酵素の発現パターンが異なるためだ。さらに、細胞へ投与するアルキルグリコシドの種類を変えることでも糖鎖伸長されるアルキルグリコシドの種類を変えることができる。つまり、糖鎖プライマー法を用いることで細胞とアルキルグリコシドを様々組み合わせることによって多様な糖鎖を合成することができる。

(Table 1. 各細胞が産生している糖鎖構造) ⁽¹⁾

B16 (マウスメラノーマ)	GM3, GD3
COS7 (アフリカミドリザル腎臓由来)	GM3, GM2, GM1, GD1a
PC12 (ラット副腎髄質由来の褐色細胞種)	Gb3, Gb4, Gala1-3Gb3
MDCK (イヌ腎臓由来の上皮様細胞)	GM3, Gb3, Gb4, GalNAca-Gb4(Forssman), GlcCer, GalCer, Gal-GalCer, LacCer, GalCer- I 3-sulfate, LacCer- II 3-sulfate
HL60 (ヒト骨髓性白血病由来)	GM3, GD3, GDb1, GTb1, Galb1-4GlcNAcb1-3LacCer(paragloboside), Le-x, A antigen, B antigen, Le-y, sialyl paragloboside, sLe-x, GlcNAcb1-3LacCer
Human Fibroblast (ヒト線維芽細胞)	GM3, GD3, Gb3, Gb4, GlcCer, LacCer
RAW117-P(low-metastatic) RAW117-H10(high-metastatic) (マウス悪性リンパ種)	Gg3, Gg4, GM1b, GD1a, LacCer
Colo201 (ヒト大腸がん細胞)	Galb1-3-GlcNAcb1-LacCer, Saa2-3Galb1-3GlcNAcb1-LacCer, sLe-a, Le-a, o antigen, Le-b, Galb1-4GlcNAcb1-LacCer, sialyl paragloboside, sLe-x, Le-x
Hela (ヒト子宮頸がん細胞)	GM, Gb3
Hep G2 (ヒト肝がん細胞)	GM3, asialo GM2, GM1, 3-fucosyl lactosamine, Galactosylgloboside, GlcCer, LacCer
BMEC (ウシ乳腺上皮細胞)	GM3, GM2, GM1, GD3, GD2, GD1b, GT1b, GT3



(Figure 7. これまでに検討されたアルキルグリコシド) (10), (11)

“糖鎖プライマー法”に用いられてきたアルキルグリコシドは、天然の糖脂質に着目して研究されてきた(10), (11)。天然の糖脂質は、糖質がセラミドに *O*-グリコシド結合した構造をしている(Figure 7.)。天然の糖脂質のアルキルアミド構造に着目して作られた分子が Lac-アルキルアミド、アルキル構造に着目して作られた分子が Lac-アルキルである。これまでの研究で、B16 細胞による糖鎖伸長を試みたところ、Lac-Amido-C12 は Lac-C12 と比べて糖鎖伸長された生成物が細胞膜に留まりやすいという結果が得られた。これは、Lac-Amido-C12 のアルキルアミドが細胞膜と水素結合するためだと考えられる。また Lac-C12 を B16 細胞を用いて糖鎖伸長させた場合、アルキル鎖が短いと糖鎖伸長されず、長いと糖鎖伸長生成物が細胞から培地中へ放出されないことが分かった(1), (10), (11)。このことから、アルキル鎖の長さを調整することで細胞により糖鎖伸長され糖鎖伸長生成物を細胞膜の外に排出できることがわかった。

2 章では糖鎖プライマー法により得られる糖鎖伸長生成物の量を増やすための研究を行った。これまでの研究結果を受けて、細胞により糖鎖伸長され細胞外へ排出される機構に重要なのは C12 という疎水性なのか、または C12 というアルキル鎖の長さなのかを明らかにするための研究を行った。GlcNAc-2C6 と

GlcNAc-2C12 を化学合成し、アルキル鎖部分の構造が糖鎖プライマー法による糖鎖伸長にどのような影響を与えるかについて調べた。

2.2 実験方法

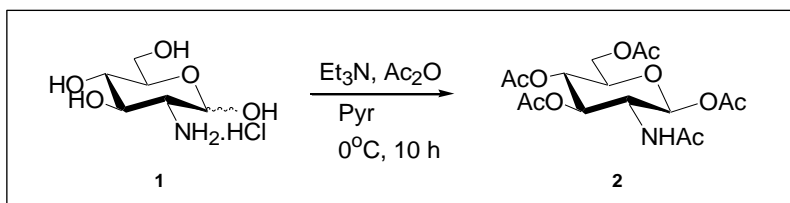
2.2.1 一般

^1H NMR スペクトルは JEOL 600 MHz スペクトロメーターを用いて測定した(JEOL, Tokyo, Japan)。全ての反応は Silica Gel 60 F-254 を塗布した薄層クロマトグラフィーに anisaldehyde- H_2SO_4 を噴霧し、加熱することによって確認した(E. Merck, Darmstadt, Germany)。カラムクロマトグラフィーは Silica Gel 60 (230-400 mesh, E. Merck, Darmstadt, Germany)を用いて行った。

B16 細胞は Riken Cell Bank から購入した (Tsukuba, Japan)。 Dulbecco Modified Eagles's Medium/Ham's F-12 (D-MEM/F-12) と Insulin-Transferrin-Selenium-X (ITS-X)は Life Technologies の製品を用いた (Carlsbad, CA, USA)。 Fetal bovine serum (FBS)は JRH Biosciences から購入した (Lenexa, KS, USA)。 Antibiotic-antimycotic solution (100 \times) は Nacalai Tesque の製品を用いた (Kyoto, Japan)。 SepPak C18 cartridges は Waters の製品を用いた(Boston, MA, USA)。 高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) (Silica Gel 60 F-254)は E. Merck の製品を用いた(Darmstadt, Germany)。

2.2.2 有機合成

・ 2-Acetamido-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranose (2)

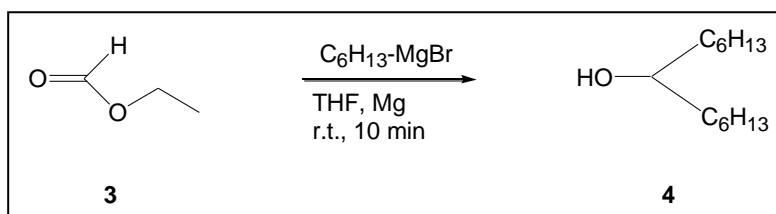


2-amino-2-deoxy-**D**-glucopyranose hydrochloride、pyridine、triethylamine、acetic anhydride をアルゴンガス雰囲気下、0℃で 10 時間攪拌した。エバポレーターで濃縮し、氷水で洗浄した。その後 chloroform で抽出し、1M sulfuric acid、saturated sodium bicarbonate aq、brine で洗浄し、濃縮後、ethanol で再結晶した。

2-amino-2-deoxy- D -glucopyranose hydrochloride	triethylamine	acetic anhydride	Yield
0.10 mol 22 g	0.10 mmol 16 mL	1.0 mmol 97 mL	78% 30 g

2-Acetamido-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-β-**D**-glucopyranose (**2**); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ 1.79, 1.93, 1.98, 2.01, 2.05 (s, OAc, 15H), 3.94 (d, J=12 Hz, H-2, 1H), 3.98 (m, H-6_a, 1H), 3.99 (m, H-5, 1H), 4.19 (m, H-6_b, 1H), 4.89 (t, J=24 Hz, H-3, 1H), 5.18 (t, J=24 Hz, H-4, 1H), 5.72 (d, J=6 Hz, H-1, 1H), 7.99 (d, J=12 Hz, NH, 1H).

• 7-Tridecanol (**3**)⁽¹²⁾

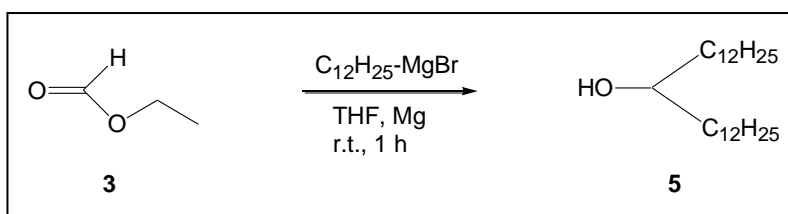


マグネシウムを 23 時間窒素雰囲気下で攪拌した。THF を加え、1-bromohexane、ethyl formate の順に加え、還流が穏やかになるまで 10 分攪拌した。次に水、1M sulfuric acid の順に加え、セライトろ過を行った後、ethyl acetate で抽出後、acetonitrile で再結晶し、目的化合物 (**4**) を得た。

ethyl formate	magnesium	1-bromohexane	Yield
50 mmol	120 mmol	110 mmol	72%
4.0 mL	2.9 g	14 mL	7.2 g

7-Tridecanol (**4**); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ 0.85 (t, $J=6.6$ Hz, 6H), 1.20-1.30 (br, 20H), 3.25 (br, 1H), 4.10 (d, $J=5.52$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ 14.07, 22.61, 25.61, 29.38, 31.84, 37.49, 72.02.

・ 13-Pentacosanol (**5**)

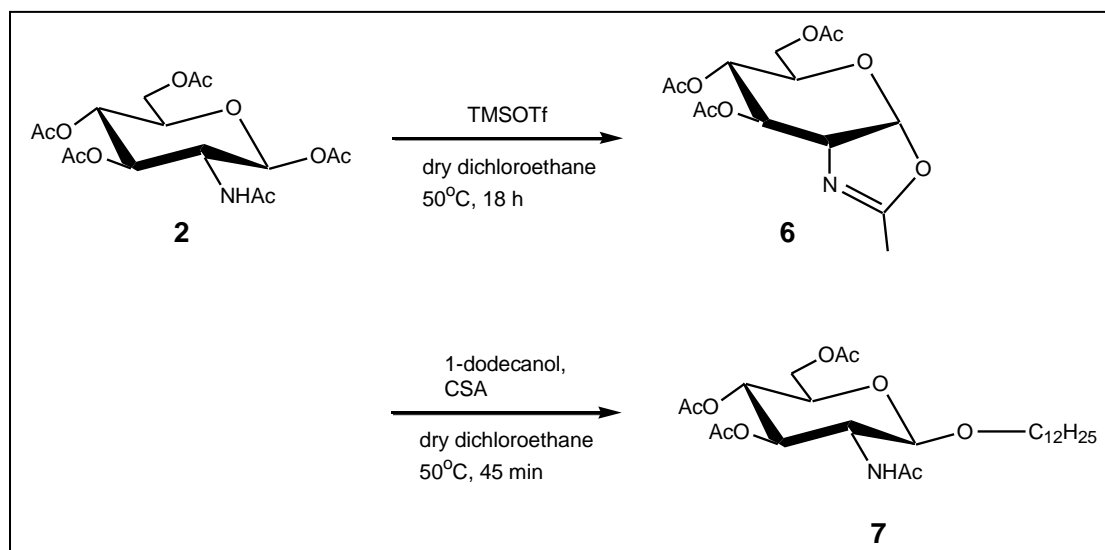


マグネシウムを 18 時間窒素雰囲気下で攪拌した。THF を加えて、1-bromododecane、ethyl formate の順に加え、還流が穏やかになるまで 1 時間攪拌した。ここに水と 1M sulfuric acid を加え、セライトろ過を行い、acetonitrile で再結晶をした。

ethyl formate	magnesium	1-bromododecane	Yield
41 mmol	120 mmol	90 mmol	89%
3.3 mL	2.9 g	22 mL	13 g

13-Pentacosanol (**5**); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ 0.86 (t, $J=7.14$ Hz, 6H), 1.22-1.30 (br, 44H), 3.35 (br, 1H).

- ・ Dodecyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose (GlcNAc-C12)(8)⁽¹³⁾



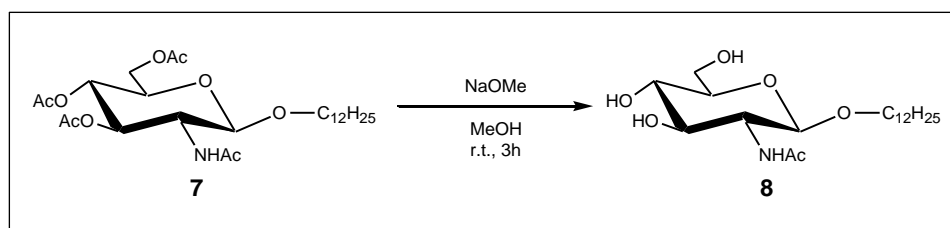
2-Acetamido-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranose に dry dichloroethane を加え、0°Cにした。ここに TMSOTf を加え、50°C で 17 時間攪拌した。攪拌後、再び 0°C に冷やし triethylamine を加えた。chloroform で抽出し、saturated sodium bicarbonate、brine で洗浄し、magnesium sulfate で乾燥させ、オキサゾリン誘導体を得た。

2-Acetamido-tetra- <i>O</i> -acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranose	TMSOTf	Triethylamine	Yield
1.5 mmol	1.9 mmol	3.6 mmol	—
0.60 g	0.30 mL	0.50 mL	—

オキサゾリン誘導体に、dry dichloroethane、1-dodecanol を加えた。0°C に冷やし、10-camphorsulfonic acid (CSA) を加え、90°C で 4 時間攪拌後、chloroform で抽出した。saturated sodium bicarbonate、brine で洗浄後、magnesium sulfate で乾燥させた。シリカゲルクロマトグラフィーによって精

製し、目的化合物 (7) を得た (toluene : ethyl acetate=1 : 1)。

1-dodecanol	CSA	Yield (2 steps)
1.5 mmol	2.2 mmol	17%
0.30 mL	0.50 g	127 mg



Methanol に sodium methoxide を加え、3 時間攪拌し、陽イオン交換樹脂を用いて中和した。少量のイオン交換水を加え、エバポレーターで乾燥させ、アセチル基を脱保護した。

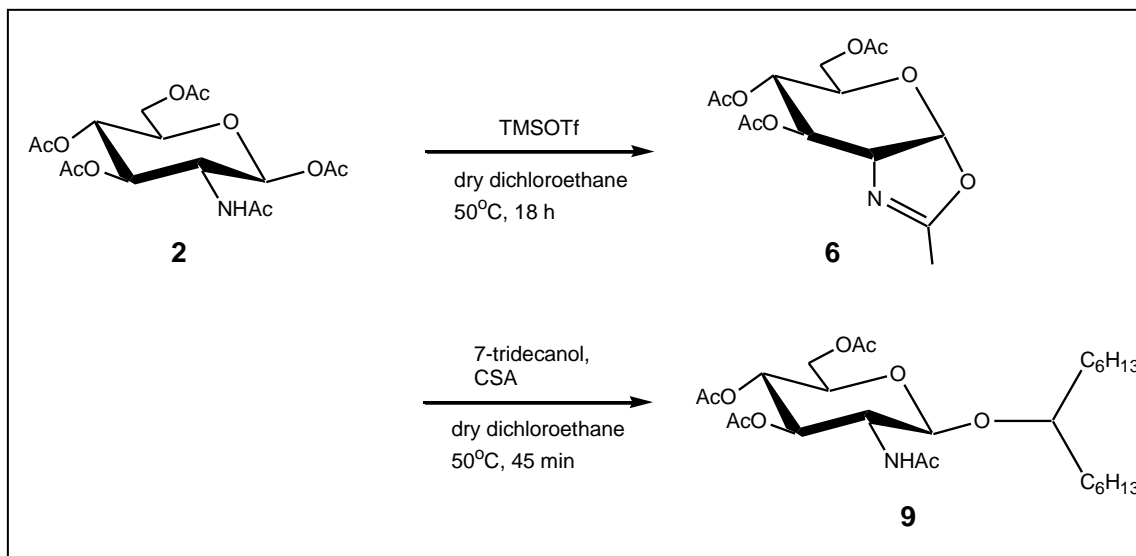
Dodecyl-2-acetamido-tetra- <i>O</i> -acetyl-2-deoxy-β- D -glucopyranose	sodium methoxyde	methanol anhydrous	Yield
0.20 mmol 127 mg	0.20 mmol 12 mg	5.0 mL	quant.

Dodecyl-2-acetamido-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-β-**D**-glucopyranose (7); ¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ 0.83 (t, J=6.6 Hz, 3H), 1.20-1.25 (br, 18H), 1.47-1.55 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 3.42 (q, J=7.1, 7.1 Hz, 1H), 3.66-3.67 (m, 1H), 3.75-3.83 (m, 2H), 4.08 (d, J=12.1 Hz, 1H), 4.22 (dd,

$J=4.4$ Hz, 12.1H), 4.65 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 5.02 (t, $J=9.6$ Hz, 1H), 5.28 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 5.66 (d, $J=8.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz): δ 14.06, 20.67 (t, $J=8.6$ Hz), 22.62, 23.26, 25.81, 29.30 (d, $J=3.42$ Hz), 29.37, 29.57, 29.60, 31.84, 54.79, 62.14, 68.68, 69.92, 71.64, 72.31, 100.62, 169.39, 170.13, 170.72, 170.83.

Dodecyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (GlcNAc-C12) (**8**) ; ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ 0.90 (t, $J=7.17$ Hz, 3H), 1.29-1.35 (br, 18H), 1.52-1.55 (m, 2H), 1.97 (s, 3H), 3.25-3.32 (m, 3H), 3.42-3.46 (m, 2H), 3.61-3.69 (m, 2H), 3.86-3.89 (m, 2H), 4.38 (d, $J=8.8$ Hz, 1H) ; ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ 14.45, 22.99, 23.74, 27.16, 30.50-30.83 (m), 33.08, 57.42, 62.80, 70.58, 72.13, 76.07, 77.95, 102.72, 173.61.

・ 7-tridecyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (GlcNAc-2C6) (**10**)



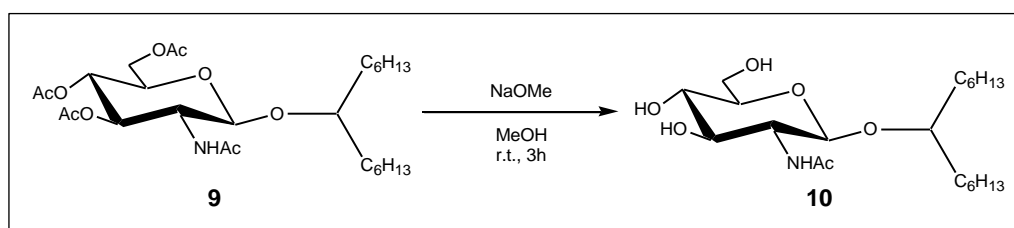
2-Acetamido-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranose に dry dichloromethane を加え、0°Cにした。ここに TMSOTf を加え、50°Cで 19 時間

攪拌した。攪拌後、再び 0℃に冷やし triethylamine を加えた。

2-Acetamido-tetra- <i>O</i> -acetyl- 2-deoxy-β- D -glucopyranose	TMSOTf	triethylamine	Yield
1.5 mmol	1.9 mmol	3.6 mmol	—
0.60 g	0.30 mL	0.50 mL	—

7-Tridecanol を加え、0℃に冷やし、CSA を加え、90℃で 30 分攪拌した。chloroform で抽出した。saturated sodium bicarbonate aq、brine で洗浄後、magnesium sulfate で乾燥させた。

7-Tridecanol	CSA	Yield (2 Steps)
1.5 mmol	1.9 mmol	18%
0.30 g.	0.50 g	141 mg



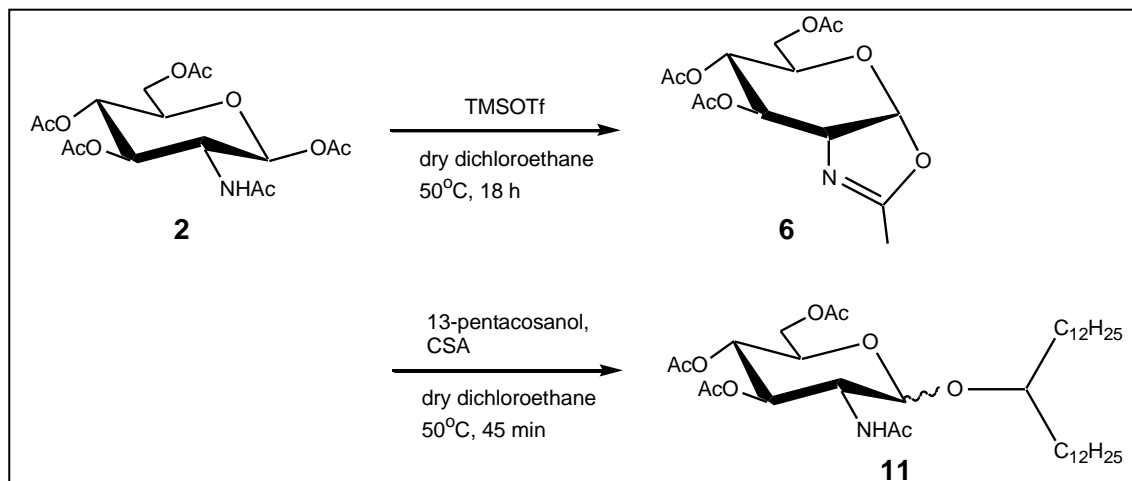
methanol に sodium methoxide を加え、2 時間 30 分攪拌し、陽イオン交換樹脂で中和した。少量のイオン交換水を加え、エバポレーターで乾燥させ、アセチル基を脱保護した。

7-Tridecanol 2-acetamido-tetra - <i>O</i> -acetyl- 2-deoxy-β- D -gluco pyranose	sodium methoxide	methanol anhydrous	Yield
0.30 mmol 141 mg	0.092 mmol 5.0 mg	2.0 mL	quant.

7-Tridecyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-β-**D**-glucopyranoside (**9**) ; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 0.84 (q, J=6.6, 7.1 Hz, 6H), 1.21-1.40 (br, 20H), 1.89 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.99 (s, 1H), 2.03 (s, 3H), 3.50 (t, J=5.8 Hz, 1H), 3.64-3.72 (m, 2H), 4.08 (dd, J=1.4, 11.3 Hz, 1H), 4.17 (dd, J=4.9, 12.1 Hz, 1H), 4.71 (d, J=8.3 Hz, 1H), 4.99 (t, J=9.6 Hz, 1H), 5.32 (t, J=9.9 Hz, 1H), 5.57 (d, J=8.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ 14.03 (d, J=2.3 Hz), 20.64 (d, J=9.2 Hz), 22.58 (d, J=5.7 Hz), 23.26, 25.03 (d, J=6.9 Hz), 29.28, 29.51, 31.82 (d, J=12.6 Hz), 34.00, 34.68, 55.47, 62.46, 69.00, 71.41, 72.35, 81.11, 100.20, 169.44, 169.95, 170.63, 170.80.

7-Tridecyl 2-acetamido-2-deoxy-β-**D**-glucopyranoside (GlcNAc-2C6) (**10**) ; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ 0.90 (t, J=7.17 Hz, 6H), 1.23-1.40 (br, 16H), 1.41-1.63 (br, 4H), 3.20-3.26 (m, 1H), 3.28-3.36 (m, 2H), 3.48 (t, J=9.6 Hz, H), 3.53-3.63 (m, 2H), 3.69 (dd, J= 5.5, 11.6, 1H), 3.85 (d, J=11.5 Hz, 1H), 4.46 (d, J=8.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ 14.47, 23.13, 23.76 (d, J=4.6 Hz), 25.94, 26.21, 30.61, 30.84, 33.09 (d, J=14.9 Hz), 34.84, 35.80, 57.91, 62.89, 72.14, 75.89, 77.66, 81.48, 102.20, 173.41.

・ 13-pentacosyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside
(GlcNAc-2C12)(12)

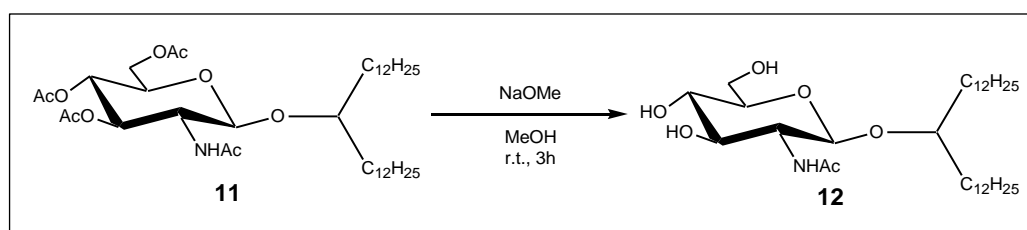


2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranoside に dry dichloroethane を加え、0℃にした。ここに TMSOTf を加え、50℃で約 18 時間攪拌した。再び0℃に冷やし triethylamine を加え、chloroform で抽出を行った。Saturated sodium bicarbonate aq、brine で洗浄後、magnesium sulfate で乾燥させ、濃縮した。

2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl- 2-deoxy-β-D-glucopyranoside	TMSOTf	triethylamine	Yield
3.1 mmol	3.7 mmol	2.2 mmol	—
1.2 g	0.67 mL	0.3 mL	—

dry dichloromethane を加え、13-pentacosanol を加えた。0℃に冷やし、CSA を加え、50℃で 45 分攪拌し、chloroform で抽出した。saturated sodium bicarbonate、brine で洗浄後、sodium sulfate で乾燥させた。分取クロマトグラフィー (toluene : ethyl acetate=1 : 1) にて精製を行った。

13-Pentacosanol	CSA	Yield (2 steps)
3.1 mmol	3.1 mmol	11%
1.1 g.	0.70 g	232 mg



methanol に sodium methoxide を加え、2 時間 30 分攪拌し、陽イオン交換樹脂で中和した。少量のイオン交換水を加え、エバポレーターで乾燥させ、アセチル基を脱保護した。

13-Pentacosanol -2-acetamido-3,4, ,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2- deoxy- β -D-glucop yranoside	Sodium methoxide	methanol anhydrous	Yield
0.30 mmol 232 mg	0.043 mmol 2.3 mg	3.0 mL	quant.

13-Pentacosyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (11) ; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ 0.84 (t, $J=7.14$ Hz, 6H), 1.14-1.32 (br, 44H), 1.89 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.99 (s, 1H), 2.03 (s, 3H), 3.49 (t, $J=2.7$ Hz, 1H), 3.63-3.73 (m, 2H), 4.08 (dd, $J=2.8, 12.1$ Hz, 1H), 4.17 (dd, $J=4.9, 12.1$ Hz,

1H), 4.71 (d, J=8.3 Hz, 1H), 4.99 (t, J=9.6 Hz, 1H), 5.32 (t, J=9.9 Hz, 1H), 5.58 (d, J=8.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ 14.08, 20.65 (d, J=9.2 Hz), 22.64, 23.28, 25.09, 29.31, 29.68, 31.86, 34.95, 34.68, 55.44, 62.43, 68.96, 71.38, 72.31, 81.17, 100.20, 169.45, 169.96, 170.64, 170.81.

13-Pentacosyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (12) ; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ 0.90 (t, J=6.9 Hz, 6H), 1.22-1.40 (br, 40H), 1.42-1.63 (br, 4H), 3.22-3.25 (m, 1H), 3.30-3.35 (m, 2H), 3.48 (t, J=9.6 Hz, 1H), 3.55-3.63 (m, 2H), 3.69 (dd, J= 5.5, 12.0 Hz, 1H), 3.85 (dd, J=2.2, 12.1 Hz, 1H), 4.46 (d, J=8.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ 14.49, 23.17, 23.77, 25.90, 26.22, 30.52, 30.82 (t, J=11.4 Hz), 31.14, 33.11, 34.75, 35.73, 57.91, 62.89, 72.14, 75.89, 77.67, 81.44, 102.20, 173.40.

2.2.3 細胞実験

2.2.3.1 GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 の糖鎖伸長の確認

○培地の調整

・血清培地

培地 : D-MEM/F-12

添加物 : ウシ胎児血清 (Fatal Bovine Serum: FBS)、抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic: ABAM)

・無血清培地

培地 : D-MEM/F-12

添加物 : Insulin-Transferrin-Selenium-X Supplement(ITS-X)

○細胞の調整

B16 細胞（マウスメラノーマ細胞）を 10 cm シャーレ 9 枚にそれぞれ 2.0×10^6 個播種し、血清培地（7.0 mL）中で細胞が各シャーレに単層に増えるまで 48 時間培養した。

○GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 の B16 細胞への投与

無血清培地(3.0 mL)で細胞を洗浄した。各アルキルグリコシド (GlcNAc-C12、GlcNAc-2C6) を濃度が 1.0 mM になるように滅菌ジメチルスルホキシド (DMSO)に溶解させた。この DMSO 溶液を各アルキルグリコシドの濃度が 50 μ M になるように無血清培地に溶解させ、ここからシャーレ 1 枚当たり 7.0 mL を用いて B16 細胞を 48 時間培養した。

○精製方法

アルキルグリコシドを投与してから 48 時間の培養後、細胞画分と培地画分に分け、それぞれ抽出と精製を行った。

・培地画分

各シャーレから培地を回収し、リン酸緩衝生理食塩水(-) (PBS) 2.0 mL で各シャーレを洗浄し、洗浄液も培地と共に回収した。エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) が 0.25%溶解した PBS(-)溶液 (2.0 mL) を各シャーレに加え、5 分間インキュベートした。その後、剥離した細胞の懸濁液をエッペンチューブに移した。エッペンチューブを 2500 rpm、25°C で 5 分遠心した。上澄みを培地と洗浄液を回収したエッペンチューブに移し、培地画分とした。また、エッペンチューブに残った細胞を細胞画分とした。

培地画分は Sep-Pak (C18) (2.0 g) カラムを用いて精製を行った。まず、Sep-Pak (C18) カラムに methanol、イオン交換水の順にそれぞれ 10 mL ずつ

流し、次に回収した培地を 2 度流した。10 mL のイオン交換水を流して親水性の化合物（塩など）を洗い流した。最後に、methanol (3.0 mL)を流し、続いて chloroform : methanol=2 : 1 の溶液 4.0 mL 流し、両親媒性の化合物を流出させ、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

・細胞画分

培地画分の回収作業中に得られた細胞画分に chloroform : methanol=2 : 1 の溶液 1.0 mL を加え、vortex で攪拌し、超音波に 30 分間当て、細胞膜を壊して中の脂質を抽出した。その後、15000 rpm、4℃で 30 分遠沈し、上澄みをエッペンチューブに回収した。次に、chloroform : 2 - propanol : イオン交換水=7 : 11 : 2 の溶液を 1.0 mL 細胞に加え、超音波に 30 分間当て、15000 rpm、4℃で 30 分遠沈し上澄みを回収し、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

○高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) の展開方法

遠沈エバポレーターによって乾燥させた培地画分と細胞画分をそれぞれ chloroform : methanol=2 : 1 の溶液 50 μ L に溶かし、それぞれの溶液 (5.0 μ L) を HPTLC に滴下した。HPTLC は chloroform : methanol : 0.25% KCl aq=5 : 4 : 1 で展開した。その後、レゾルシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。その後、オレシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。

2.2.3.2 GlcNAc-2C6 の糖鎖伸長生成物の構造決定 (分子量)

○培地の調整

・血清培地

培地 : D-MEM/F-12

添加物 : ウシ胎児血清 (Fatal Bovine Serum: FBS)、抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic: ABAM)

- ・無血清培地

培地：D-MEM/F-12

添加物：Insulin-Transferrin-Selenium-X Supplement(ITS-X)

○細胞の調整

B16 細胞（マウスメラノーマ細胞）を 15 cm シャーレ 9 枚にそれぞれ 5.0×10^6 個播種し、血清培地（20 mL）中で細胞が各シャーレに単層に増えるまで 48 時間培養した。

○GlcNAc-2C6 の B16 細胞への投与

無血清培地(5.0 mL)で細胞を洗浄した。GlcNAc-2C6 を濃度が 1.0 mM になるように滅菌 DMSO に溶解した。この DMSO 溶液を GlcNAc-2C6 の濃度が 50 μ M になるように無血清培地に溶解させ、ここからシャーレ 1 枚当たり 20 mL を用いて B16 細胞を 48 時間培養した。

○精製方法

アルキルグリコシドを投与してから 48 時間の培養後、細胞画分と培地画分に分け、それぞれ抽出と精製を行った。

- ・培地画分

各シャーレから培地を回収し、PBS(-)溶液 5.0 mL で各シャーレを洗浄し、洗浄液も培地と共に回収した。EDTA が 0.25%溶解した PBS(-)溶液（5.0 mL）を各シャーレに加え、5 分間インキュベートした。その後、剥離した細胞の懸濁液をエッペンチューブに移した。エッペンチューブを 2500 rpm、25°C で 5 分遠心した。上澄みを培地と洗浄液を回収したエッペンチューブに移し、培地画分とした。また、エッペンチューブに残った細胞を細胞画分とした。

培地画分は Sep-Pak（C18）（10 g）カラムを用いて精製を行った。まず、

Sep-Pak (C18) カラムに methanol、イオン交換水の順にそれぞれ 50 mL ずつ流し、次に回収した培地を 2 度流した。50 mL のイオン交換水を流して親水性の化合物（塩など）を洗い流した。最後に、methanol 濃度 0%~100% のイオン交換水-methanol 混合溶媒（計 11 種類）を用いて、methanol 濃度 0% から順に流した。両親媒性の化合物を流出させ、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

○HPTLC の展開方法

遠沈エバポレーターによって乾燥させた培地面分を chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 150 μ L に溶かし、それぞれの溶液（5.0 μ L）を HPTLC に滴下した。HPTLC は chloroform : methanol : 0.25% KCl aq = 5 : 4 : 1 で展開した。その後、レゾルシノールを噴霧して 120°C で 20 分加温した。その後、オレシノールを噴霧して 120°C で 20 分加温した。

○MS スペクトルの測定

イオン交換水-methanol の混合溶媒で溶出した画分を HPTLC に展開したところ、70%~100% に化合物が含まれていることが分かった。そこで、Milli-Q にマスマススペクトル測定用のアセトニトリルを 10% 加えた溶媒を用いて 70%~100% の各画分の内容物を溶解させ、分子量を測定した。

2.2.3.3 酵素による Sialic acid 結合様式の確認

2.2.3.2 で単離された GlcNAc-2C6 糖鎖伸長化合物を用いて、Sialic acid の結合様式を確認した。

○酵素実験

酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）（100 μ L）に NeuNAc-Gal-GlcNAc-2C6 に溶解したエッペンチューブと、酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）（100 μ L）に

NeuNAc-Gal-GlcNAc-2C6 を溶解しさらに、 α 2,3-Sialidase にを加えたエッペンチューブを 37℃ の恒温槽に入れて、18 時間振とうした。次に、それぞれを反応容器ごと氷の中に入れ、酵素反応をとめた。

○精製方法

反応容器中の溶液を冷水で 10 mL にメスアップした。希釈した反応溶液を Sep-Pak (C18) (2.0 g) カラムを用いて精製を行った。Sep-Pak (C18) カラムに methanol、イオン交換水の順にそれぞれ 10 mL 流し、次に希釈した反応溶液を 2 度流した。10 mL のイオン交換水を流して親水性の化合物を洗い流した。最後に、methanol (3.0 mL) を流し、続いて chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液を 4.0 mL 流し、両親媒性の化合物を流出させ、遠沈エバポレーターによって乾燥させた。

○HPTLC の展開

chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 50 μ L を加え、内容物を溶解し、内容物が溶解した溶液 5.0 μ L を HPTLC に滴下した。HPTLC はクロロホルム : メタノール : 0.25% KCl aq = 5 : 4 : 1 で展開した。その後、レゾルシノールを噴霧して 120℃ で 20 分加温した。その後、オレシノールを噴霧して 120℃ で 20 分加温した。

2.2.3.4 GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C12 の糖鎖伸長の確認

○培地の調整

・血清培地

培地 : D-MEM/F-12

添加物 : FBS、ABAM

- ・無血清培地

培地：D-MEM/F-12

添加物：ITS-X

- 細胞の調整

B16 細胞を 10 cm シャーレ 9 枚にそれぞれ 2.0×10^6 個播種し、血清培地 (7.0 mL) 中で細胞が各シャーレに単層に増えるまで 48 時間培養した。

- GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C12 の B16 細胞への投与

無血清培地(3.0 mL)で細胞を洗浄した。各アルキルグリコシド (GlcNAc-C12、GlcNAc-2C12) を濃度が 1.0 mM になるように滅菌 DMSO に溶解させた。この DMSO 溶液を各アルキルグリコシドの濃度が 50 μ M になるように無血清培地に溶解させ、ここからシャーレ 1 枚当たり 7.0 mL を用いて B16 細胞を 48 時間培養した。

- 精製方法

アルキルグリコシドを投与してから 48 時間の培養後、細胞画分と培地画分に分け、それぞれ抽出と精製を行った。

- ・培地画分

各シャーレから培地を回収し、PBS(-)溶液 2.0 mL で各シャーレを洗浄し、洗浄液も培地と共に回収した。EDTA が 0.25%溶解した PBS(-)溶液 (2.0 mL) を各シャーレに加え、5 分間インキュベートした。その後、剥離した細胞の懸濁液をエッペンチューブに移した。エッペンチューブを 2500 rpm、25°C で 5 分遠心した。上澄みを培地と洗浄液を回収したエッペンチューブに移し、培地画分とした。また、エッペンチューブに残った細胞を細胞画分とした。

培地画分は Sep-Pak (C18) (2.0 g) カラムを用いて精製を行った。まず、Sep-Pak (C18) カラムに methanol、イオン交換水の順にそれぞれ 10 mL ずつ流し、次に回収した培地を 2 度流した。10 mL のイオン交換水を流して親水性の化合物（塩など）を洗い流した。最後に、methanol (3.0 mL) を流し、続いて chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 4.0 mL 流し、両親媒性の化合物を流出させ、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

・細胞画分

培地画分の回収作業中に得られた細胞画分に chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 1.0 mL を加え、vortex で攪拌し、超音波に 30 分間当て、細胞膜を壊して中の脂質を抽出した。その後、15000 rpm、4℃で 30 分遠沈し、上澄みをエッペンチューブに回収した。次に、chloroform : 2 - propanol : イオン交換水 = 7 : 11 : 2 の溶液を 1.0 mL 細胞に加え、超音波に 30 分間当て、15000 rpm、4℃で 30 分遠沈し上澄みを回収し、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

○HPTLC の展開方法

遠沈エバポレーターによって乾燥させた培地画分と細胞画分をそれぞれ chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 50 μ L に溶かし、それぞれの溶液 (5.0 μ L) を HPTLC に滴下した。HPTLC は chloroform : methanol : 0.25% KCl aq = 5 : 4 : 1 で展開した。その後、レゾルシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。その後、オレシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。

2.2.3.5 アルキル鎖構造の違いによる糖鎖伸長生成物生成量の比較

2.2.3.1 と 2.2.3.4 で生成した糖鎖伸長生成物を chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 50 μ L に溶かし、それぞれの溶液 (5.0 μ L) を HPTLC に滴下した。HPTLC は chloroform : methanol : 0.25% KCl aq = 5 : 4 : 1 で展開した。その後、レゾ

ルシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。その後、オレシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。その後デンストメーターを用いて、アルキル鎖構造の違いによる糖鎖伸長生成物生成量を比較した。

2.2.3.6 GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 の細胞毒性について

○培地の調整

・血清培地

培地：D-MEM/F-12

添加物：FBS、ABAM

・無血清培地

培地：D-MEM/F-12

添加物：ITS-X

○細胞の調整

B16 細胞を 10 cm シャーレ 8 枚にそれぞれ 2.0×10^6 個播種し、血清培地 (7.0 mL) 中で細胞が各シャーレに単層に増えるまで 48 時間培養した。

○GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 の B16 細胞への投与

無血清培地(3.0 mL)で細胞を洗浄した。各アルキルグリコシド (GlcNAc-C12、GlcNAc-2C6) を濃度が 1.0 mM になるように滅菌 DMSO に溶解させた。この DMSO 溶液を各アルキルグリコシドの濃度が 50 μ M、100 μ M、150 μ M、200 μ M になるように無血清培地に溶解させ、ここからシャーレ 1 枚当たり 7.0 mL を用いて B16 細胞を 48 時間培養した。

2.2.3.7 GlcNAc と GlcNAc-2C6 の B16 細胞への同時投与

○培地の調整

- ・血清培地

培地：D-MEM/F-12

添加物：FBS、ABAM

- ・無血清培地

培地：D-MEM/F-12

添加物：ITS-X

○細胞の調整

B16 細胞を 10 cm シャーレ 9 枚にそれぞれ 2.0×10^6 個播種し、血清培地 (7.0 mL) 中で細胞が各シャーレに単層に増えるまで 48 時間培養した。

○GlcNAc と GlcNAc-2C6 の B16 細胞への投与

無血清培地(3.0 mL)で細胞を洗浄した。GlcNAc と GlcNAc-2C6 を濃度が 1.0 mM になるように滅菌 DMSO に溶解させた。この DMSO 溶液を GlcNAc と GlcNAc-2C6 の濃度が 50 μ M になるように無血清培地に溶解させ、ここからシャーレ 1 枚当たり 7.0 mL を用いて B16 細胞を 48 時間培養した。

○精製方法

アルキルグリコシドを投与してから 48 時間の培養後、細胞画分と培地画分に分け、それぞれ抽出と精製を行った。

- ・培地画分

各シャーレから培地を回収し、PBS(-)溶液 2.0 mL で各シャーレを洗浄し、洗浄液も培地と共に回収した。EDTA が 0.25%溶解した PBS(-)溶液 (2.0 mL) を

各シャーレに加え、5 分間インキュベートした。その後、剥離した細胞の懸濁液をエッペンチューブに移した。エッペンチューブを 2500 rpm、25℃で 5 分遠心した。上澄みを培地と洗浄液を回収したエッペンチューブに移し、培地画分とした。また、エッペンチューブに残った細胞を細胞画分とした。

培地画分は Sep-Pak (C18) (2.0 g) カラムを用いて精製を行った。まず、Sep-Pak (C18) カラムに methanol、イオン交換水の順にそれぞれ 10 mL ずつ流し、次に回収した培地を 2 度流した。10 mL のイオン交換水を流して親水性の化合物（塩など）を洗い流した。最後に、methanol (3.0 mL)を流し、続いて chloroform : methanol=2 : 1 の溶液 4.0 mL 流し、両親媒性の化合物を流出させ、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

・細胞画分

培地画分の回収作業中に得られた細胞画分に chloroform : methanol=2 : 1 の溶液 1 mL を加え、vortex で攪拌し、超音波に 30 分間当て、細胞膜を壊して中の脂質を抽出した。その後、15000 rpm、4℃で 30 分遠沈し、上澄みをエッペンチューブに回収した。次に、chloroform : 2 - propanol : イオン交換水=7 : 11 : 2 の溶液を 1.0 mL 細胞に加え、超音波に 30 分間当て、15000 rpm、4℃で 30 分遠沈し上澄みを回収し、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

○HPTLC の展開方法

遠沈エバポレーターによって乾燥させた培地画分と細胞画分をそれぞれ chloroform : methanol=2 : 1 の溶液 50 μ L に溶かし、それぞれの溶液 (5.0 μ L) を HPTLC に滴下した。HPTLC は chloroform : methanol : 0.25% KCl aq=5 : 4 : 1 で展開した。その後、レゾルシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。その後、オレシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。

2.2.3.8 GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 の B16 細胞への同時投与

○培地の調整

・血清培地

培地：D-MEM/F-12

添加物：FBS、ABAM

・無血清培地

培地：D-MEM/F-12

添加物：ITS-X

○細胞の調整

B16 細胞を 10 cm シャーレ 9 枚にそれぞれ 2.0×10^6 個播種し、血清培地 (7.0 mL) 中で細胞が各シャーレに単層に増えるまで 48 時間培養した。

○GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 の B16 細胞への投与

無血清培地(3.0 mL)で細胞を洗浄した。各アルキルグリコシド (GlcNAc-C12、GlcNAc-2C6) を濃度が 1.0 mM になるように滅菌 DMSO に溶解させた。この DMSO 溶液を各アルキルグリコシドの濃度が 50 μ M になるように無血清培地に溶解させ、ここからシャーレ 1 枚当たり 7.0 mL を用いて B16 細胞を 48 時間培養した。

○精製方法

アルキルグリコシドを投与してから 48 時間の培養後、細胞画分と培地画分に分け、それぞれ抽出と精製を行った。

・培地画分

各シャーレから培地を回収し、PBS(-)溶液 2.0 mL で各シャーレを洗浄し、洗浄液も培地と共に回収した。EDTA が 0.25%溶解した PBS(-)溶液 (2.0 mL) を各シャーレに加え、5 分間インキュベートした。その後、剥離した細胞の懸濁液をエッペンチューブに移した。エッペンチューブを 2500 rpm、25℃で 5 分遠心した。上澄みを培地と洗浄液を回収したエッペンチューブに移し、培地画分とした。また、エッペンチューブに残った細胞を細胞画分とした。

培地画分は Sep-Pak (C18) (2.0 g) カラムを用いて精製を行った。まず、Sep-Pak (C18) カラムに methanol、イオン交換水の順にそれぞれ 10 mL ずつ流し、次に回収した培地を 2 度流した。10 mL のイオン交換水を流して親水性の化合物 (塩など) を洗い流した。最後に、methanol (3.0 mL) を流し、続いて chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 4.0 mL 流し、両親媒性の化合物を流出させ、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

・細胞画分

培地画分の回収作業中に得られた細胞画分に chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 1.0 mL を加え、vortex で攪拌し、超音波に 30 分間当て、細胞膜を壊して中の脂質を抽出した。その後、15000 rpm、4℃で 30 分遠沈し、上澄みをエッペンチューブに回収した。次に、chloroform : 2 - propanol : イオン交換水 = 7 : 11 : 2 の溶液を 1.0 mL 細胞に加え、超音波に 30 分間当て、15000 rpm、4℃で 30 分遠沈し上澄みを回収し、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

○HPTLC の展開方法

遠沈エバポレーターによって乾燥させた培地画分と細胞画分をそれぞれ chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 50 μ L に溶かし、それぞれの溶液 (5.0 μ L) を HPTLC に滴下した。HPTLC は chloroform : methanol : 0.25% KCl aq = 5 :

4 : 1 で展開した。その後、レゾルシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。その後、オレシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。

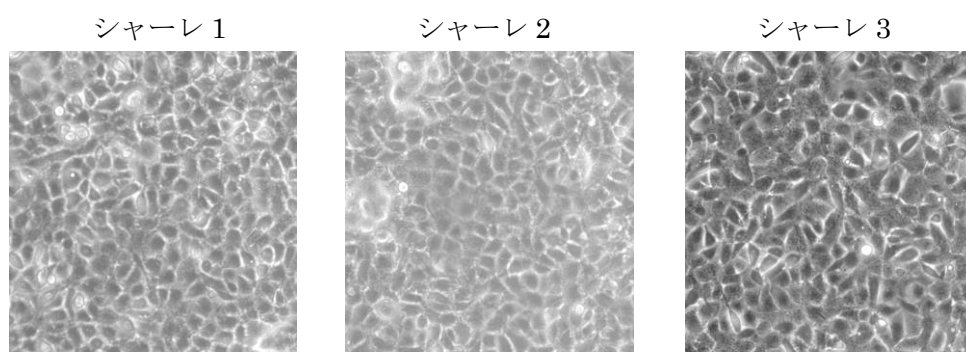
2.3 結果と考察

グリコシル化に用いるアルコール 7-Tridecanol (4) と 13-Pentacosanol (5) Grignard 反応によってそれぞれ収率 72%、89%で得ることができた。13-Pentacosanol (5) は還流中でも結晶が出てきた。これはモノアルキル鎖からジアルキル鎖になることによって疎水性が増し、THF への溶解性が落ちたためと考えられる。

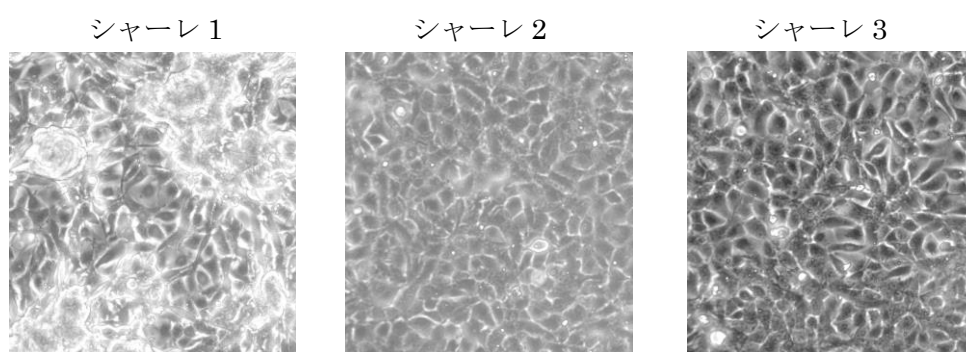
グリコシル化反応の前半は速度論的に反応が支配され、反応の後半では熱的に反応が支配される。よって、TLC により反応を細かく確認し、反応を熱力学的に安定な α 体が生成する前に止めることで、 β 体を選択的に得ることができた。アセチル保護基が付いた GlcNAc-2C6 (9) は収率 18%で β 体を得ることができた。アセチル保護基が付いた GlcNAc-2C12 (11) は収率 11%で β 体を得ることができた。13-Pentacosanol (5) が dichloroethane に溶解しなかったため、13-Pentacosanol (5) のグリコシル化反応は dichloromethane 中で行った。13-Pentacosanol (5) はジクロロメタンに溶解しているように観察されたが、収率は GlcNAc-2C6 ほど高くはなかった。これは、アルコールのアルキル鎖が長くなったために、反応部位であるヒドロキシル基が GlcNAc の C-1 位に近づきづらかったためと考えられる。

DMSO (ネガティブコントロール)、GlcNAc-2C6、GlcNAc-C12 を細胞へ投与した後の細胞の様子を次に示す (Figure 8.)。いずれの化合物を B16 細胞へ投与しても細胞が死ぬことはなかった。

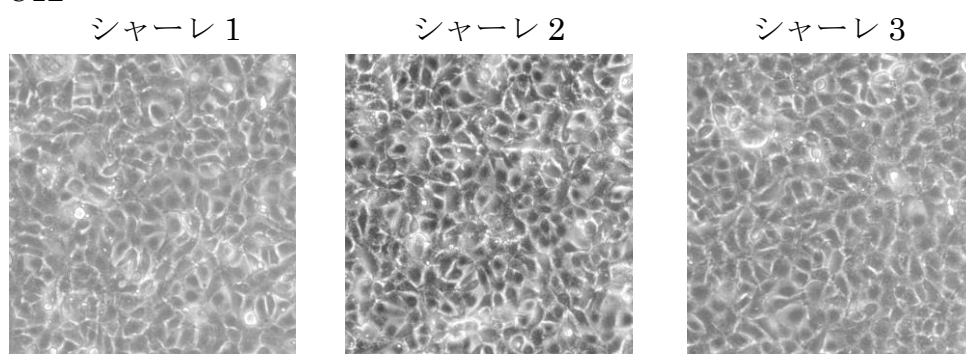
・ DMSO



・ GlcNAc-2C6

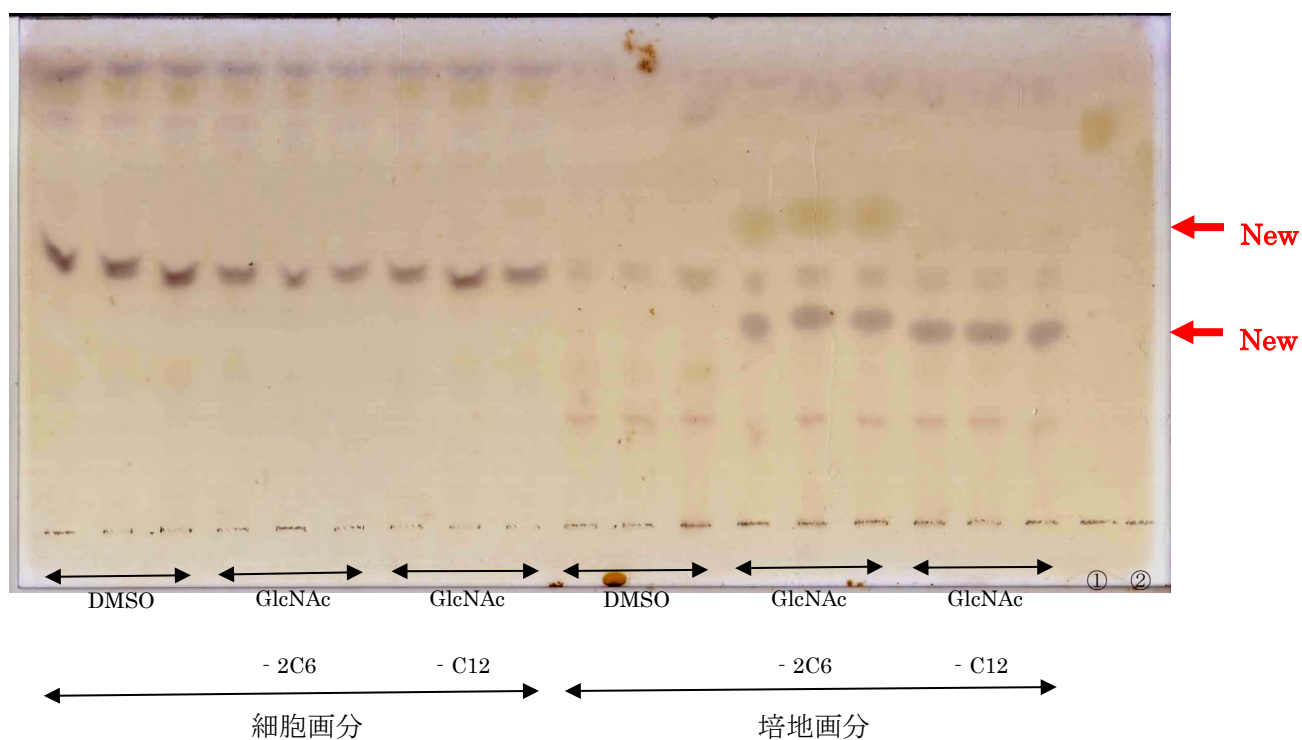


・ GlcNAc-C12



(Figure 8. DMSO、GlcNAc-2C6、GlcNAc-C12 を B16 細胞へ投与してから 48 h 後の細胞の様子)

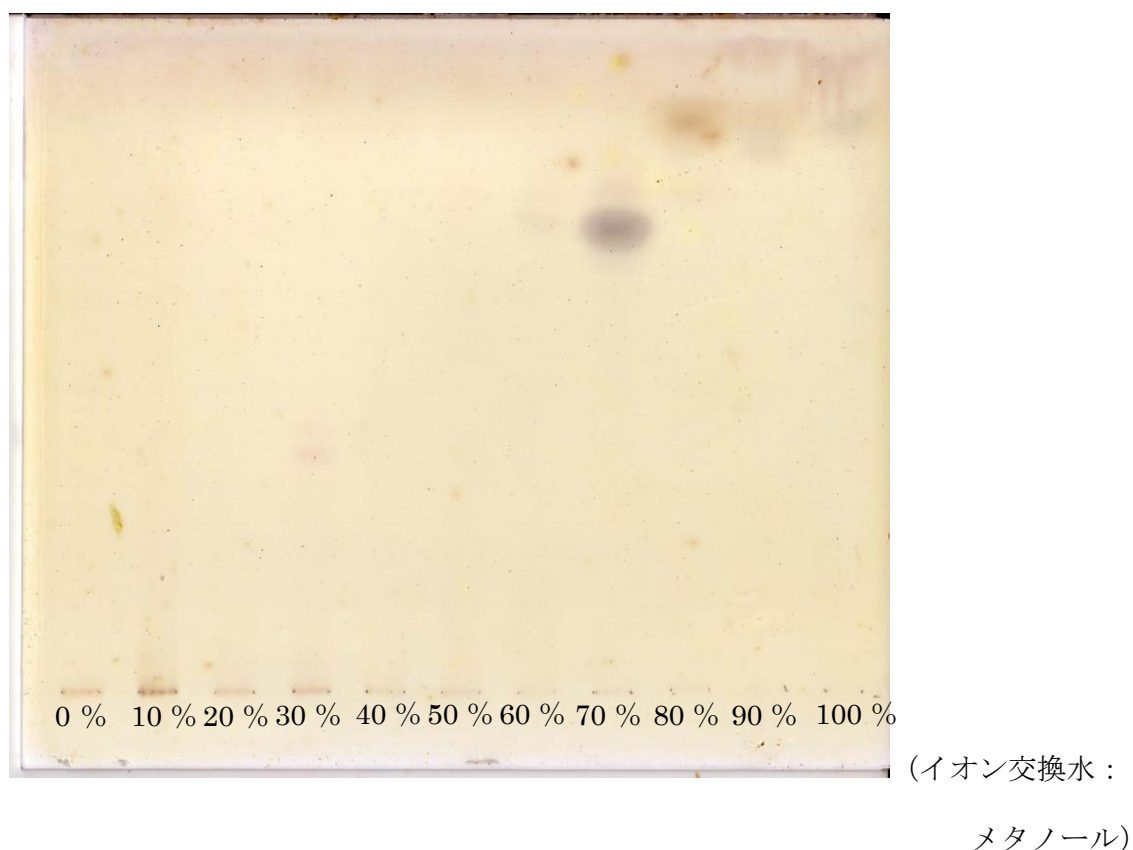
HPTLC の結果を次に示す。



(Figure 9. DMSO、GlcNAc-2C6、GlcNAc-C12 を B16 細胞へ投与した場合の HPTLC)

GlcNAc-2C6 は B16 細胞によって糖鎖伸長されることが分かった (Figure 9.)。これまでに用いられてきた GlcNAc-C12 を B16 細胞に投与すると、1 種類の糖鎖伸長生成物が得られた。一方、GlcNAc-2C6 を B16 細胞に投与すると 2 種類の糖鎖伸長生成物が得られた。そこで、各化合物の構造をマスペクトルと酵素反応によって決定した。

イオン交換水-methanol 混合溶媒を用いることにより、methanol 濃度 70%～100%のフラクションから GlcNAc-2C6 糖鎖伸長生成物を得ることができた (Figure 10.)。

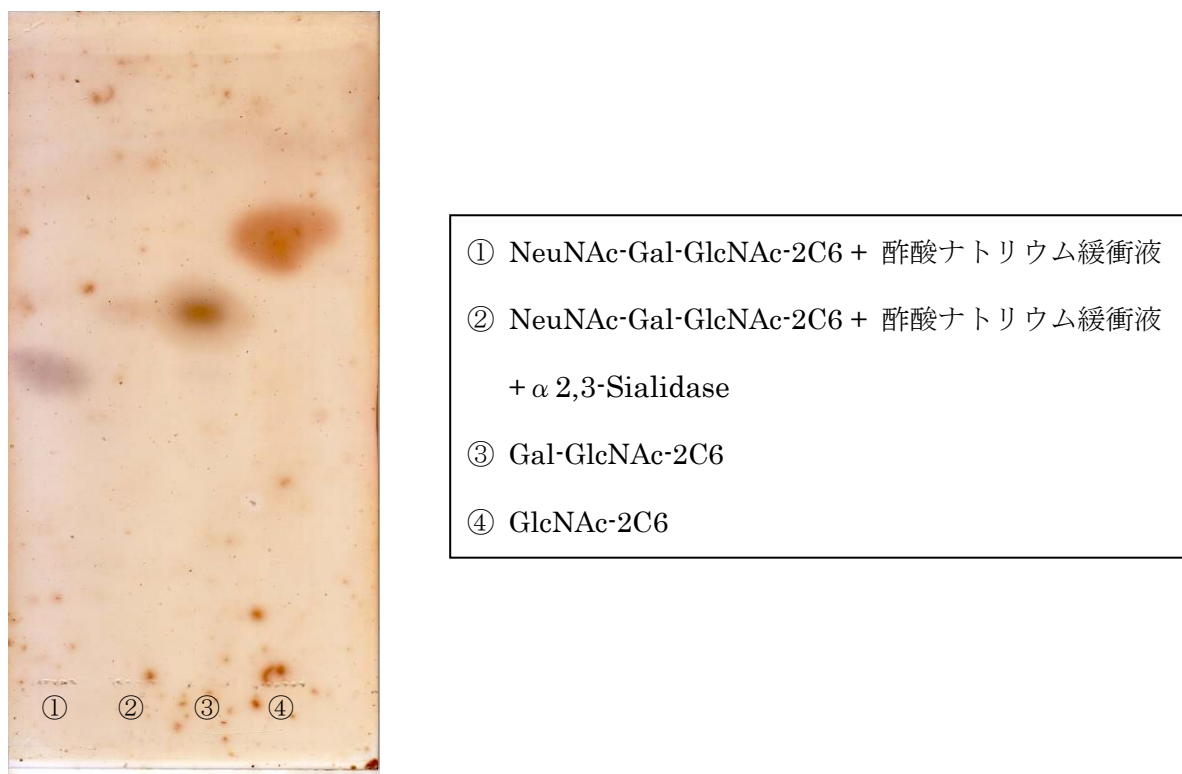


(Figure 10. GlcNAc-2C6 糖鎖伸長生成物の単離)

次に、70%～100%のフラクションより得られた化合物を 10%acetonitrile 水溶液に溶解させ、MS スペクトルを測定した。その結果、70%のバンドは NeuNAc-Gal-GlcNAc-2C6、80、90%の画分のバンドは Gal-GlcNAc-2C6 であることが分かった。さらに、100%の画分からは GlcNAc-2C6 が検出されなかったことから、細胞に投与した GlcNAc-2C6 は糖鎖伸長されたり、分解されたことが示唆される。次に、酵素による実験から、立体異性を同定した。

Sialic acid と galactose の α 2,3 結合を特異的に切断する α 2,3-Sialidase を用

いて、NeuNAc-Gal-GlcNAc-2C6 の Sialic acid の結合の仕方を調べた。酵素反応後の HPTLC を下記に示す(Figure 11.)。



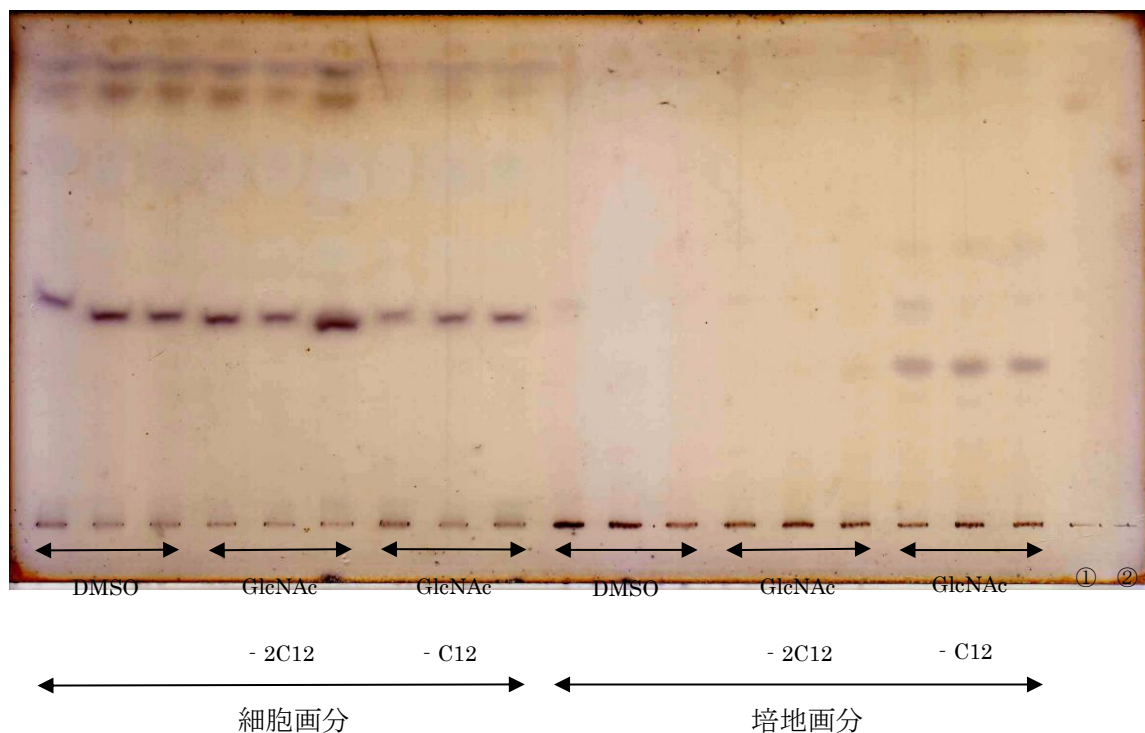
(Figure 11. Sialic acid-Gal の結合様式確認)

Sialic acid が切れ、Gal-GlcNAc-2C6 ができていることがわかる。このことから、Sialic acid とガラクトースの結合は NeuNAc β 2-3Gal-GlcNAc-2C6 であることが分かった(Figure 11.)。

GlcNAc-C12 を細胞に投与した場合、培地画分から糖鎖伸長された新たなバンドが確認されたが、GlcNAc-2C12 を投与した場合は新たなバンドが確認されなかった(Figure 12.)。この結果は GlcNAc-2C12 が糖鎖伸長されなかったことを示している。

GlcNAc-2C12 の細胞画分をマスマススペクトルにより分析すると、GlcNAc-2C12 は細胞に糖鎖伸長されずにとどまっていることがわかった。DMSO のみを加え

た細胞画分から GlcNAc-2C12 の細胞画分と同じ位置にバンドを確認できるが、これらのバンドは異なる組成だった。

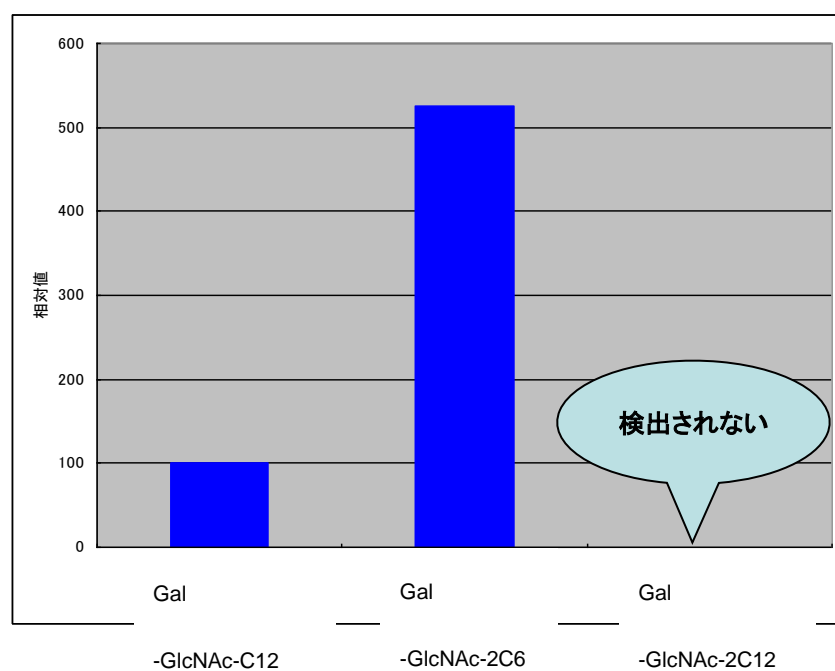


① GlcNAc - 2C12

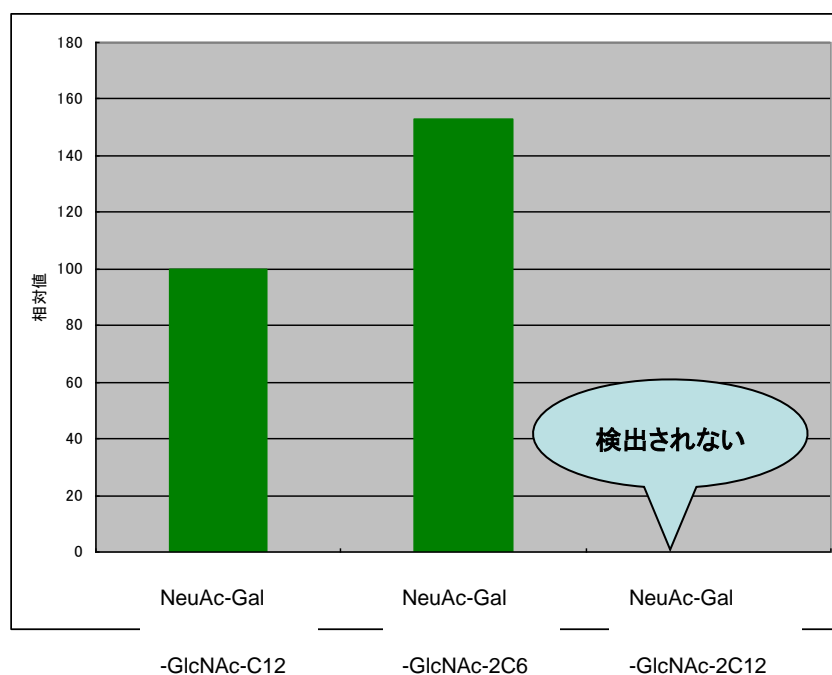
② GlcNAc - C12

(Figure 12. DMSO、 GlcNAc-2C6 、 GlcNAc-C12 を B16 細胞へ投与した場合の HPTLC)

GlcNAc-C12 に比べて、 GlcNAc-2C6 を細胞に投与すると、Gal が付加したアルキルグリコシドの場合 5.3 倍、NeuAc と Gal が付加したアルキルグリコシドの場合 1.5 倍多く糖鎖伸長生成物を得ることができた(Figure 13.、Figure 14.)。これは、アルキル鎖の構造が 2 本鎖になることによって、細胞膜へ取り込まれやすくなった可能性、ゴルジへ運ばれやすくなった可能性、糖転移酵素が働きやすくなった可能性、分解されにくくなった可能性を示唆している。



(Figure 13. Gal が付加したアルキルグリコシドの量)

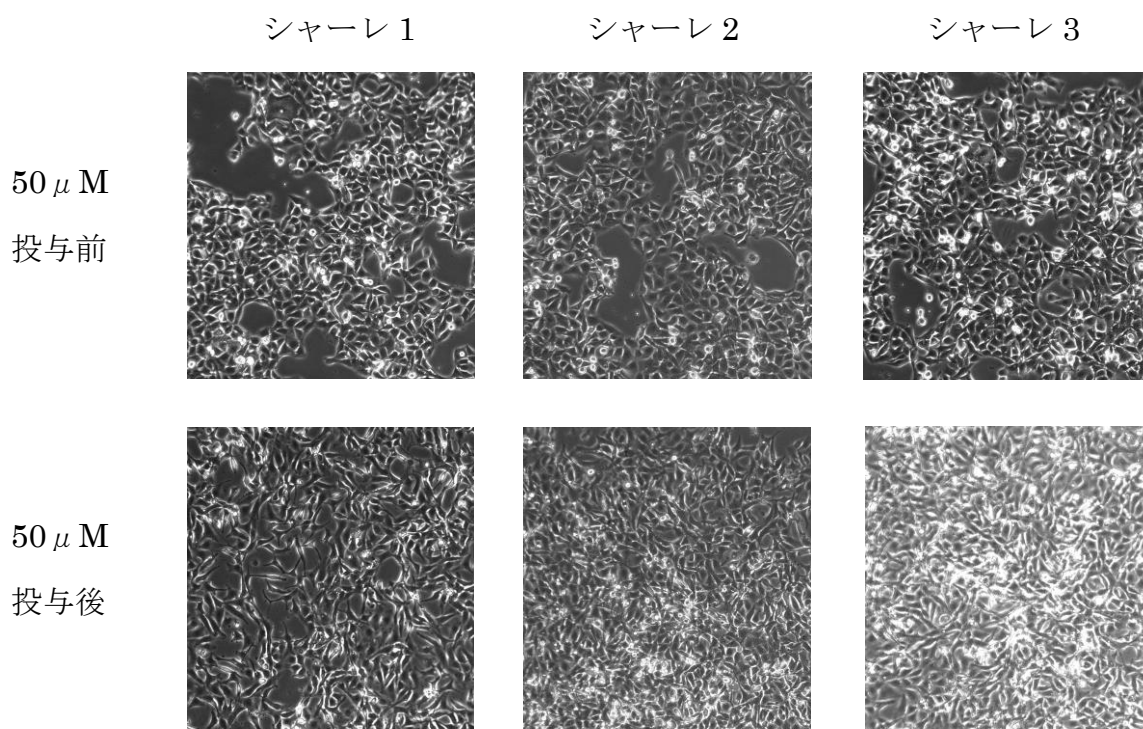


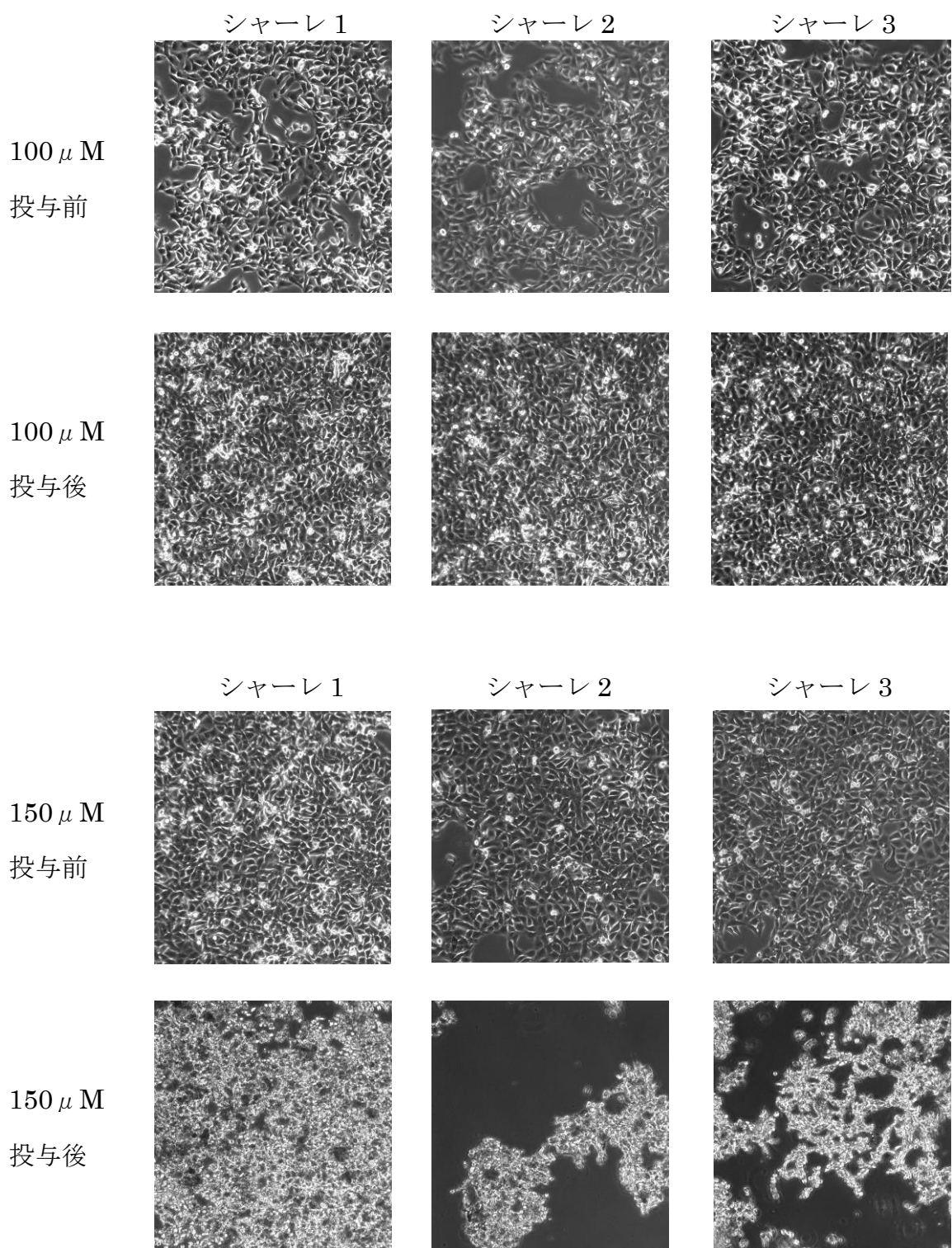
(Figure14. NeuNAc と Gal が付加したアルキルグリコシドの量)

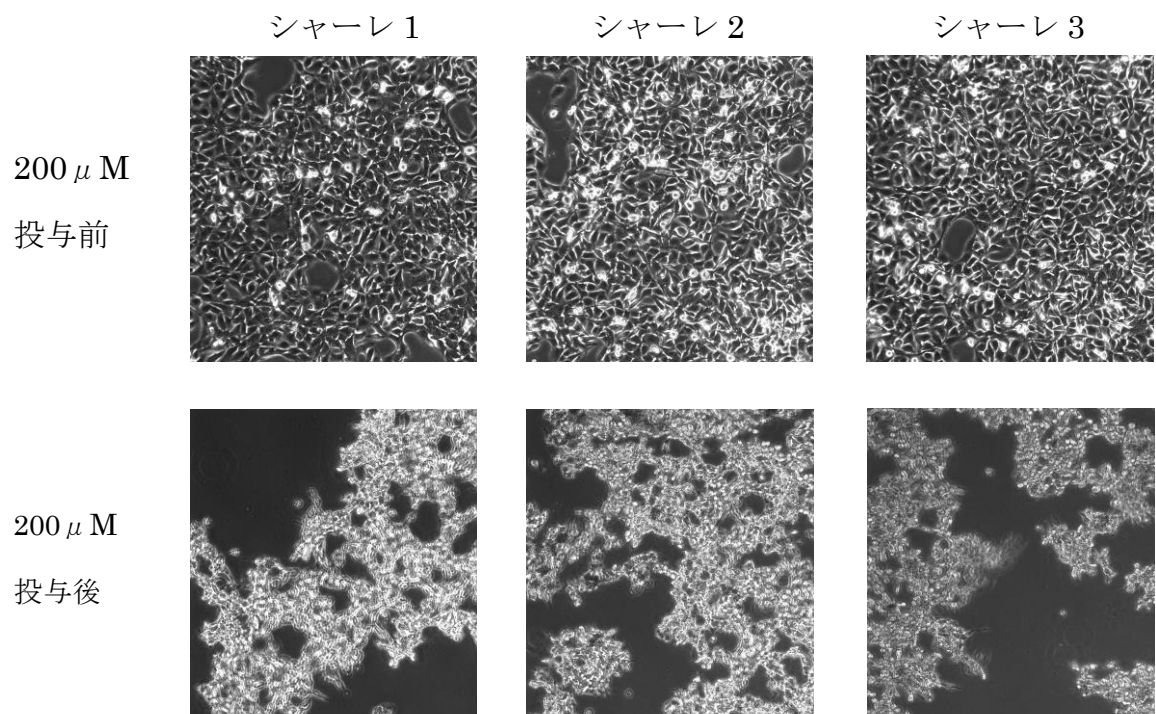
B16 細胞に 50 μ M、100 μ M、150 μ M、200 μ M の濃度で GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 を投与したところ、GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 いずれのプライ

マーも 150 μ M から毒性を示した(Figure 15、16)。

• GlcNAc-C12







(Figure 15. GlcNAc-C12 を様々な濃度で B16 細胞へ投与した前後の細胞の様子)

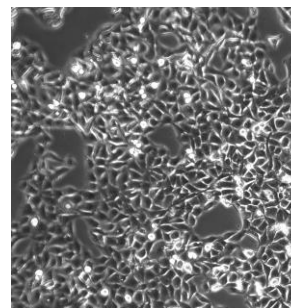
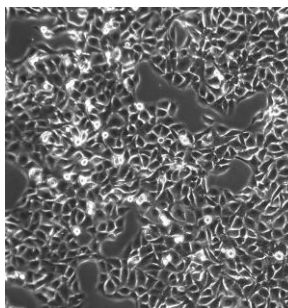
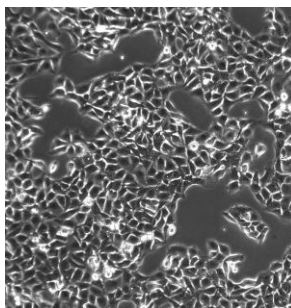
・ GlcNAc-2C6

シャーレ 1

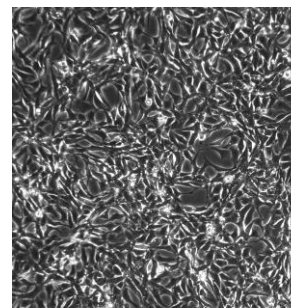
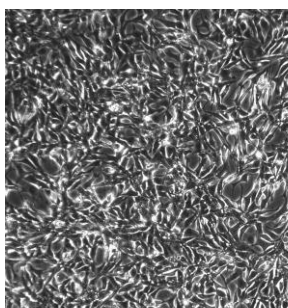
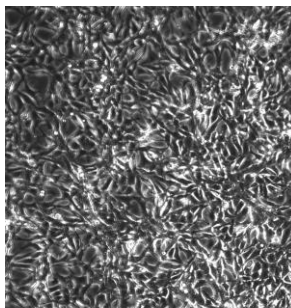
シャーレ 2

シャーレ 3

50 μ M
投与前



50 μ M
投与後

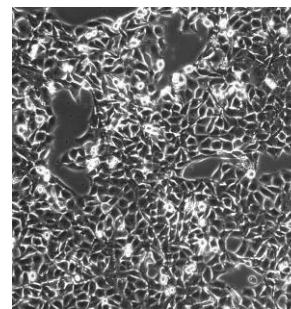
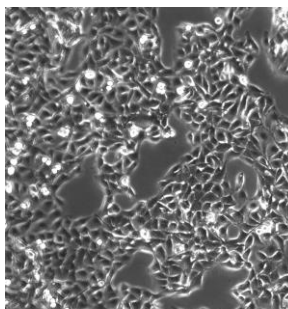
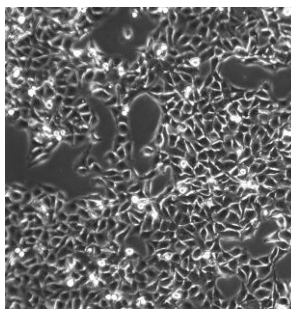


シャーレ 1

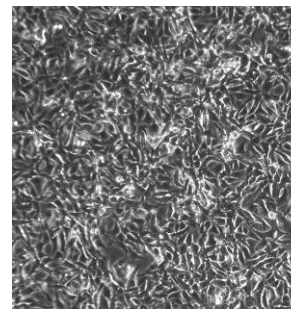
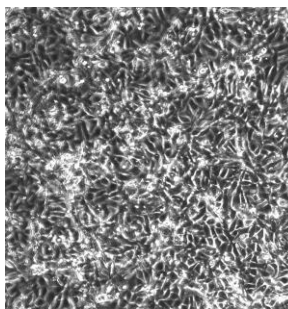
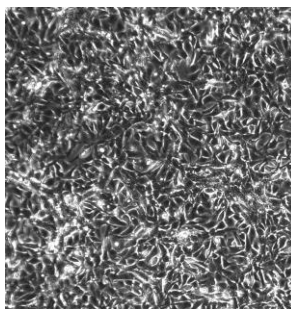
シャーレ 2

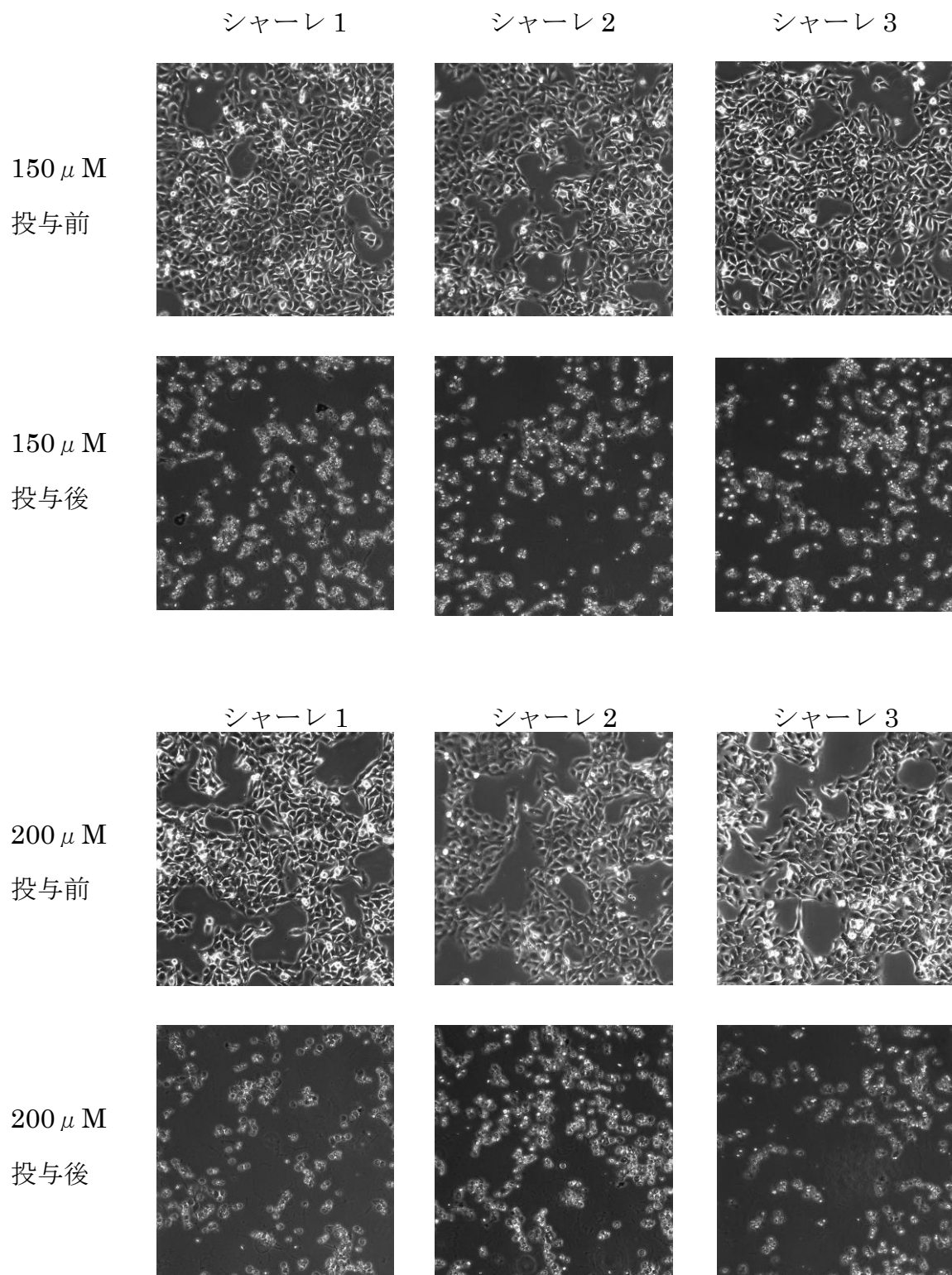
シャーレ 3

100 μ M
投与前



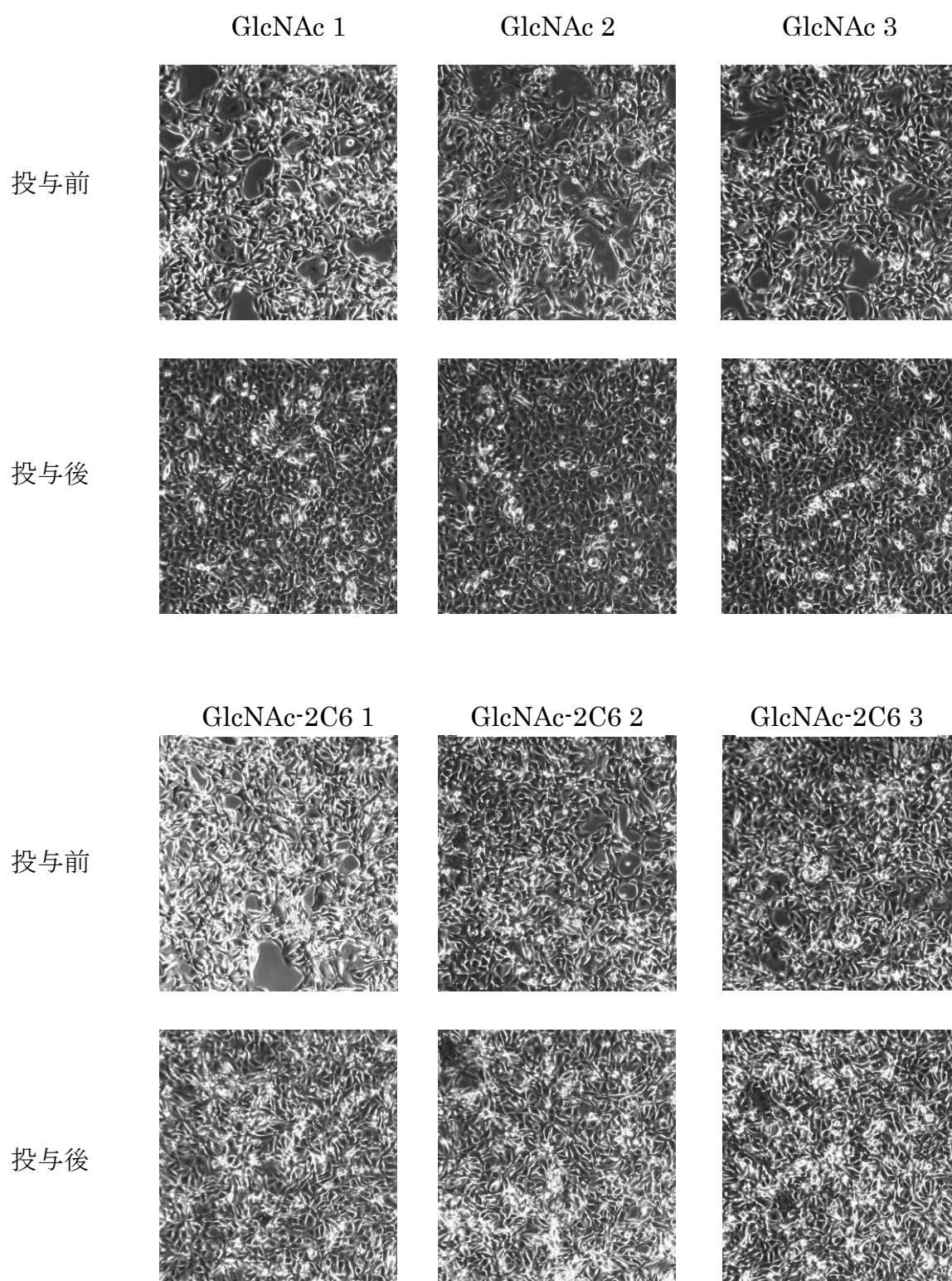
100 μ M
投与後

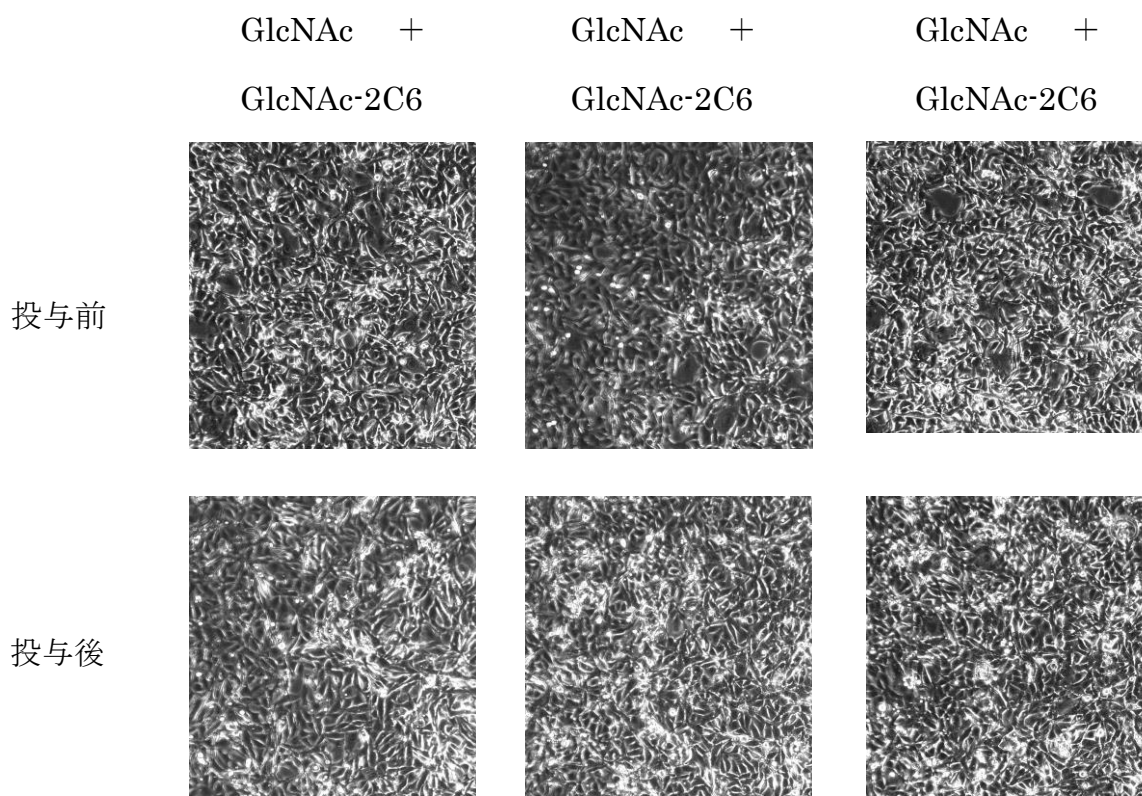




(Figure 16. GlcNAc-2C6 を様々な濃度で B16 細胞へ投与した前後の細胞の様子)

各化合物を細胞への投与する前後の細胞写真を示す。

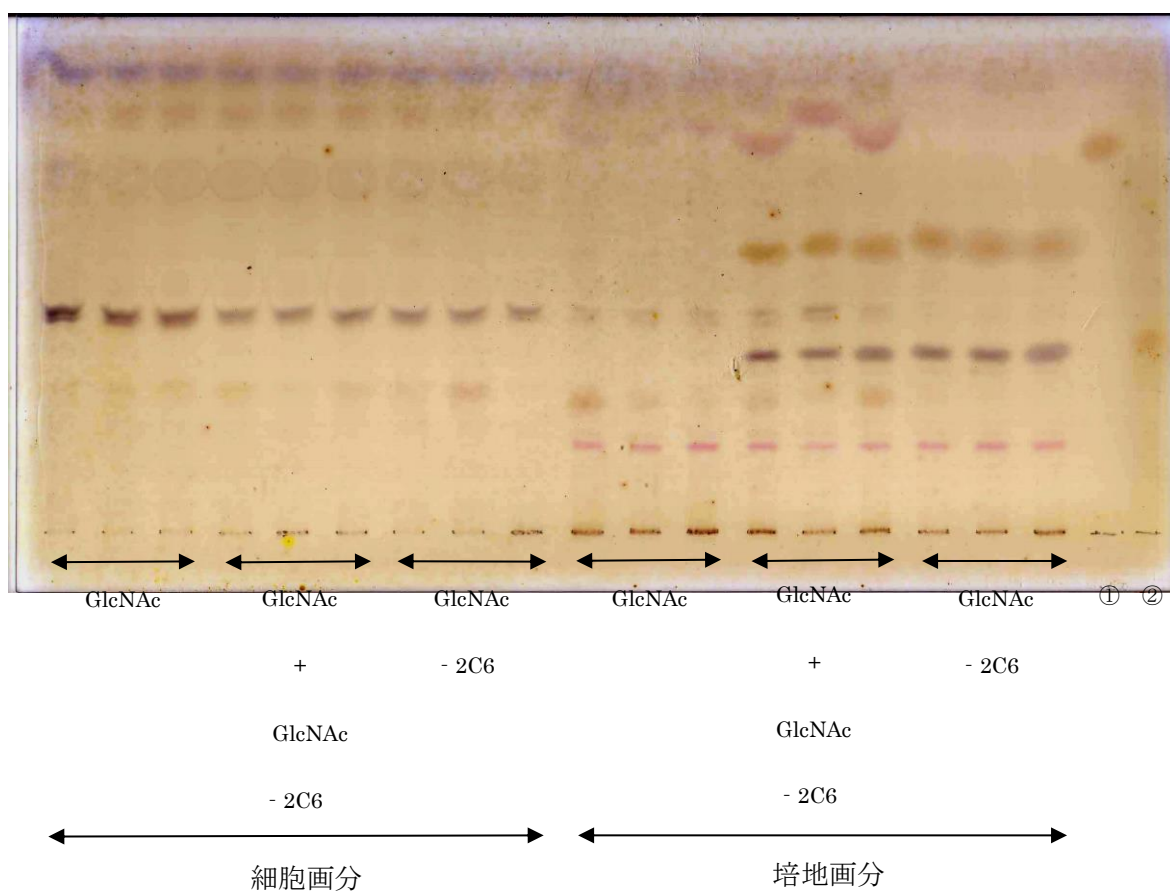




(Figure 17. GlcNAc と GlcNAc-2C6 を B16 細胞へそれぞれ、または同時に投与した前後の B16 細胞の写真)

GlcNAc と GlcNAc-2C6 をそれぞれに投与しても、同時に投与しても、細胞毒性は示さなかった。

次に、GlcNAc と GlcNAc-2C6 をそれぞれ、または同時に投与した場合の HPTLC の結果を示す (Figure 18.)。この実験は GlcNAc の取り込みが細胞表面のレセプターによるものであることが報告されていることから⁽¹⁴⁾、GlcNAc-2C6 の細胞への取り込みが GlcNAc と同様に細胞表面のレセプターによるものなのか、平衡によるものなのかを調べるために行った。実験の結果、生成した糖鎖伸長プライマーの量にばらつきがあり、どちらの経路で細胞へ取り込まれているのか明らかにすることはできなかった。



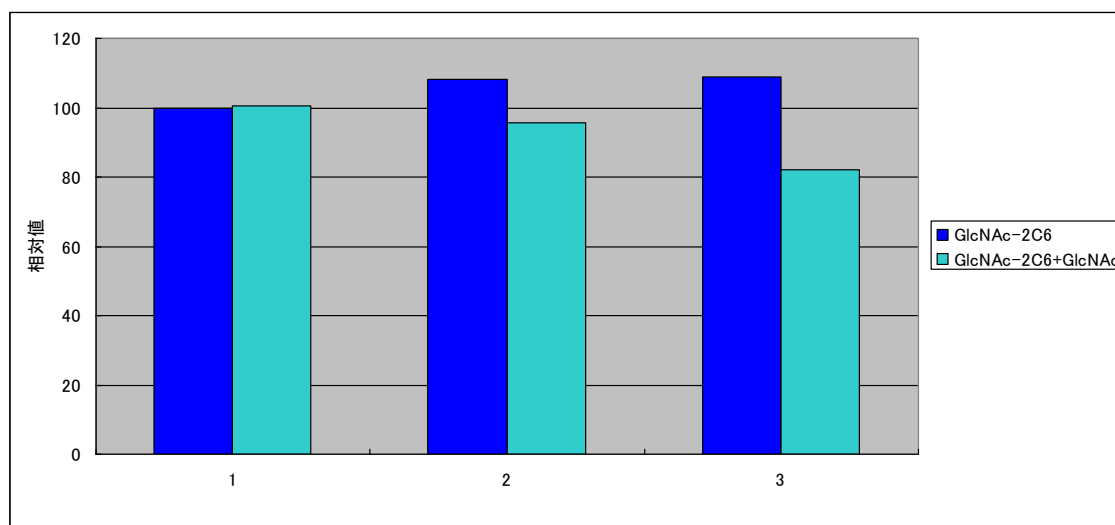
① GlcNAc

② GlcNAc-2C6

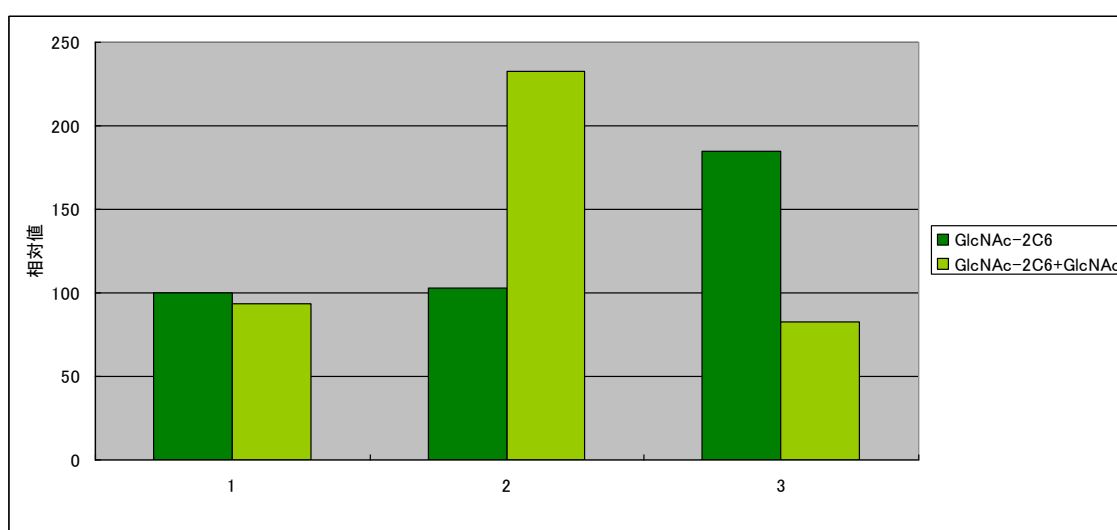
(Figure 18. GlcNAc と GlcNAc-2C6 をそれぞれ、または同時に投与した場合の HPTLC)

HPTLC を見ると、GlcNAc と GlcNAc-2C6 を同時に投与しても、細胞画分に違いは見られなかった(Figure 18.)。培地画分では GlcNAc を投与したシャーレからは新たなバンドは見られなかった。GlcNAc-2C6 を投与したシャーレからは NeuNAc-Gal-GlcNAc-2C6 と Gal-GlcNAc-2C6 が生成していた。GlcNAc と GlcNAc-2C6 を同時に投与したシャーレからも、NeuNAc-Gal-GlcNAc-2C6 と Gal-GlcNAc-2C6 が生成していた。次に、GlcNAc と GlcNAc-2C6 を同時に投与した場合と GlcNAc-2C6 のみを投与した場合の NeuNAc-Gal-GlcNAc-2C6 と

Gal-GlcNAc-2C6 の量をそれぞれデンストメータで分析した結果を次に示す。



(Figure 19. Gal-GlcNAc2C6 の生成量の比較)

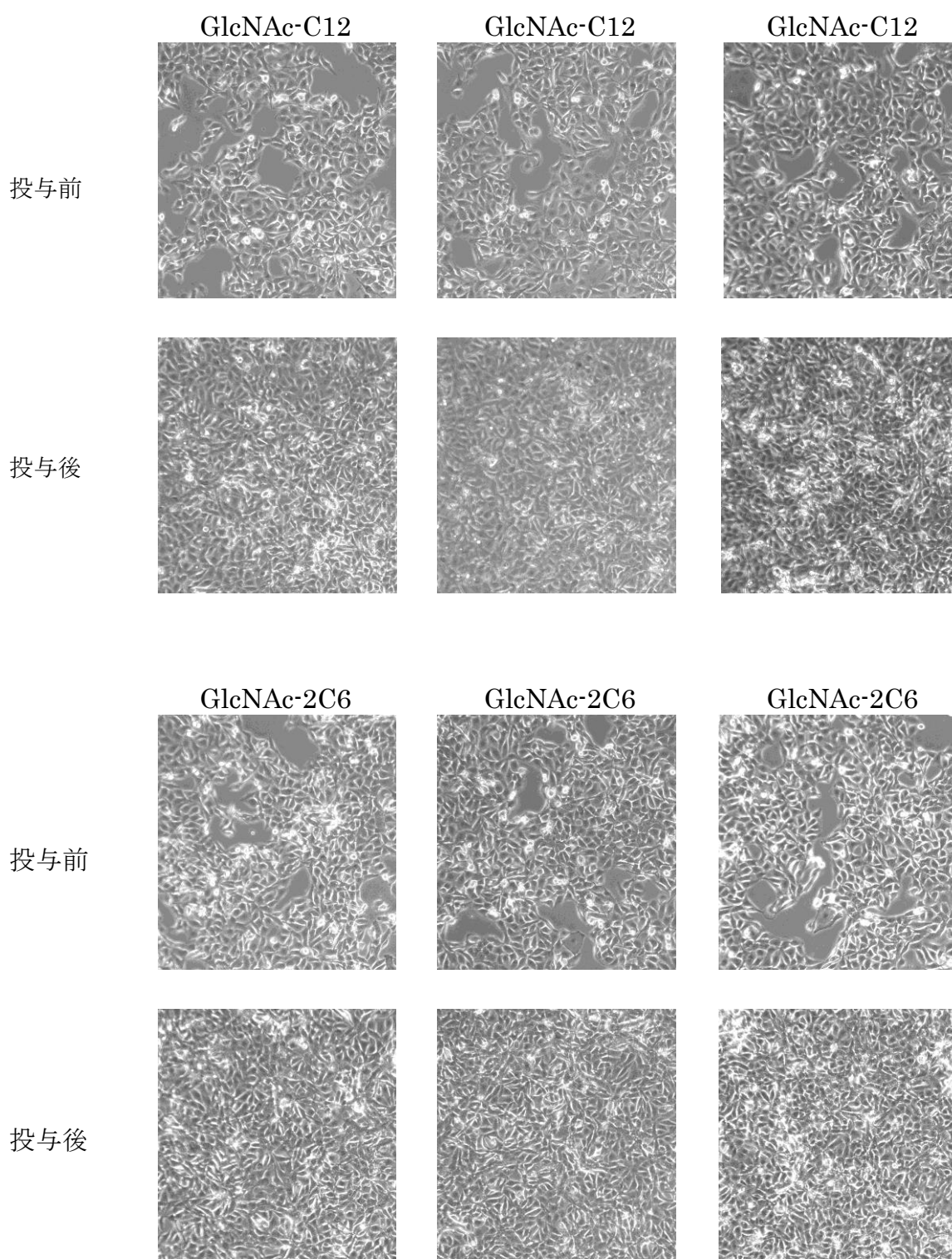


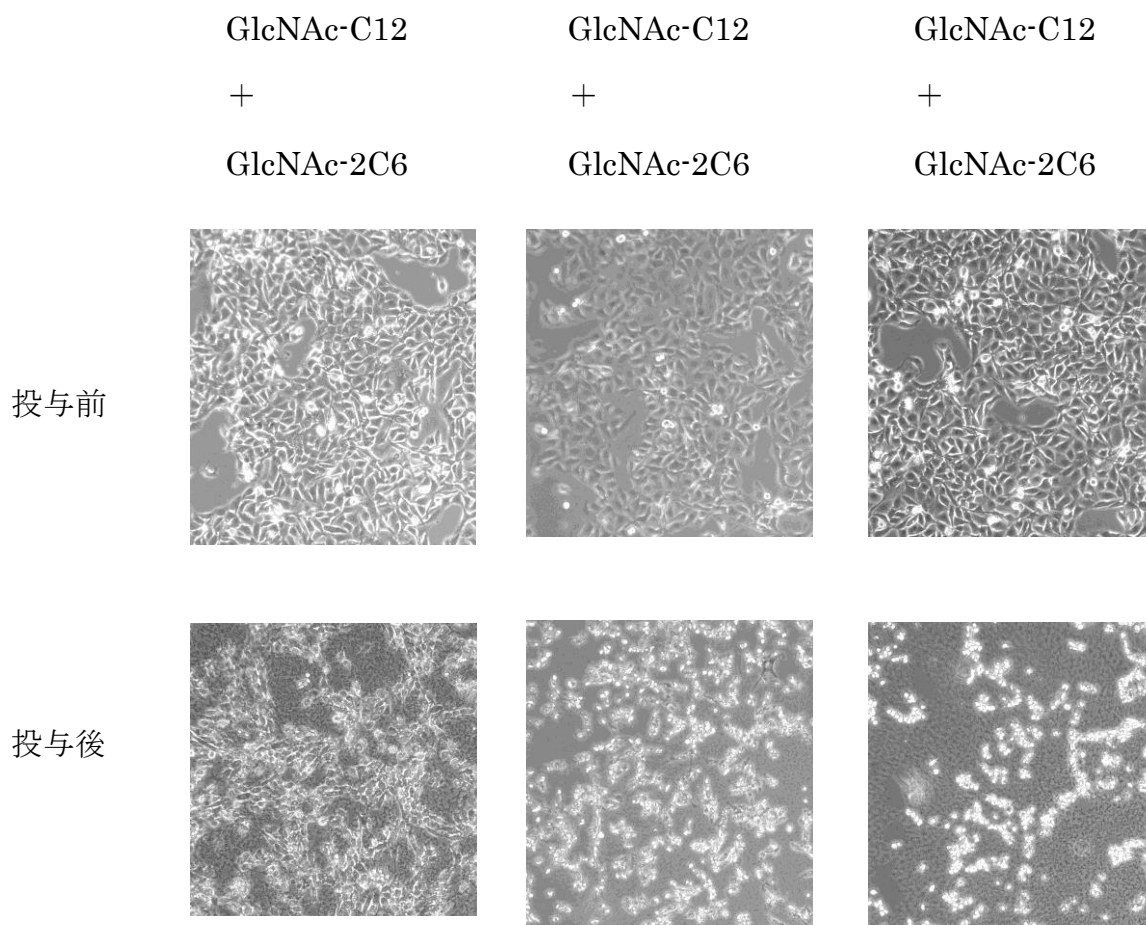
(Figure 20. NeuNAc-Gal-GlcNAc2C6 の生成量の比較)

Gal-GlcNAc-2C6 の生成量は GlcNAc-2C6 のみを B16 細胞へ投与したときと GlcNAc-2C6 と GlcNAc を同時に投与したときで大きな違いは見られず、GlcNAc-2C6 の細胞への取り込みは、レセプターによるものではないことが示唆された(Figure 19.、Figure 20.)。しかし、NeuNAc-Gal-GlcNAc-2C6 の生成量を見ると、ばらつきがあり、一概に GlcNAc-2C6 の細胞への取り込みはレセ

プターによるものではないといえない結果となった。

GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 をそれぞれ、または同時に投与した際の細胞の写真をいかに示す。



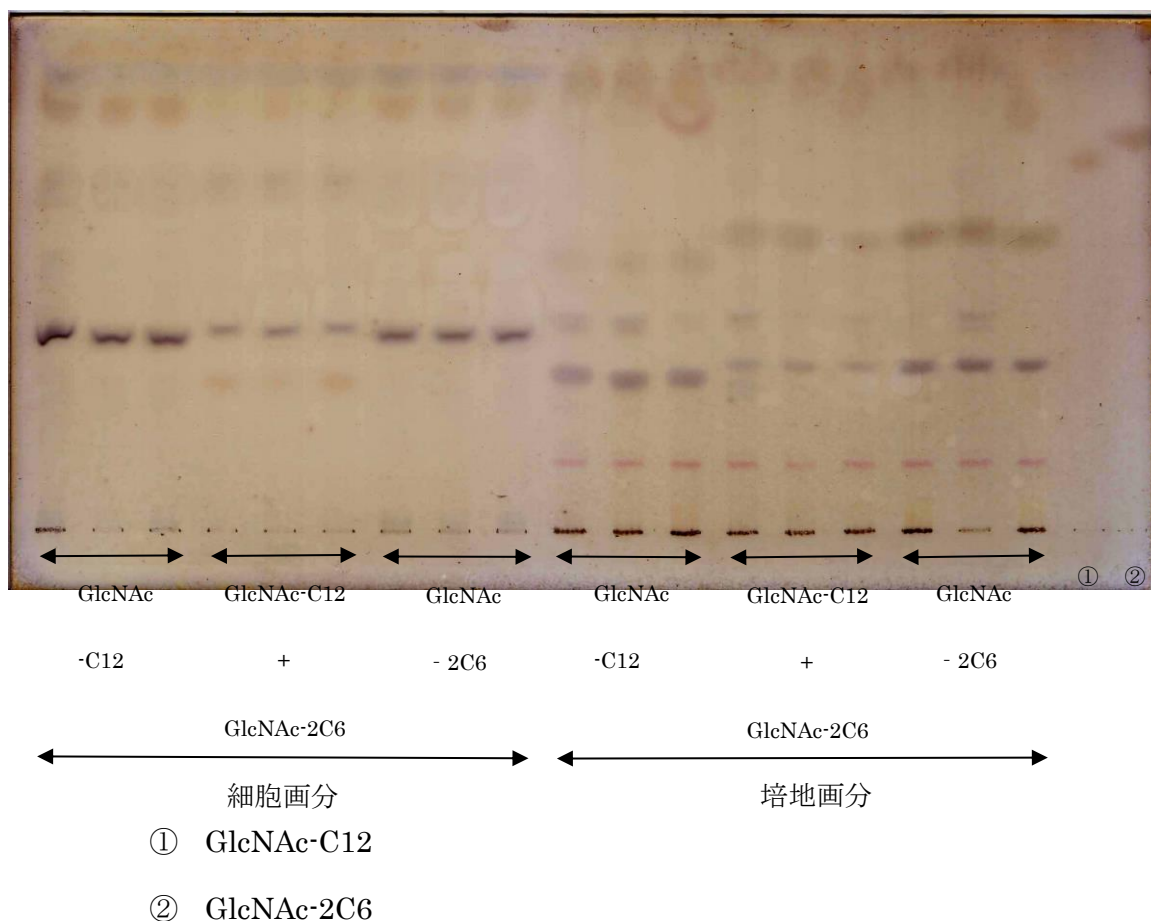


(Figure 21. GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 をそれぞれ、または同時に投与した場合の投与前後の細胞写真)

GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 をそれぞれ投与した場合、細胞毒性は示さないが、GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 を同時に投与すると細胞毒性を示した (Figure 21.)。先の実験 (2.2.3.6) で、GlcNAc-C12、GlcNAc-2C6 をそれぞれ別々に細胞へ投与した場合、細胞毒性を示す濃度はそれぞれ 150 μM 以上であることがわかっている。培地中でモノアルキルグリコシドとジアルキルグリコシドがミセルを作るとき、ジアルキルグリコシドの疎水性が高いので、ジアルキルグリコシドがミセルを作り、アルキルグリコシドはミセルを作れずに培地中に単体で多量に存在して界面活性剤として働いた結果、細胞膜を壊してしまったので

はないかと考えられる。

次に、HPTLC の画像を記載する(Figure 22.)。



(Figure 22. GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 をそれぞれ、または同時に投与した際の HPTLC)

細胞画分は GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 をそれぞれ投与した場合、同時に投与した場合で、大きな違いは見られなかった(Figure 22.)。培地画分では、GlcNAc-C12、GlcNAc-2C6 をそれぞれ投与した場合、糖鎖伸長生成物がそれぞれ生成した。GlcNAc-C12 と GlcNAc-2C6 を同時に投与した場合は細胞が死んでしまっていたため、生成した糖鎖伸長生成物が少なくなっていた。本実験は、GlcNAcC12 と GlcNAc-2C6 のどちらのアルキルグリコシドが糖鎖伸長されやす

いかを明らかにする目的で行った。GlcNAcC12 と GlcNAc-2C6 をそれぞれまたは同時に投与したシャーレの培地画分をマススペクトルにより分析してみたところ、生成した糖鎖伸長生成物は GlcNAc-2C6 が糖鎖伸長されたもののみであった。GlcNAc-C12 はアルキルグリコシドのままでも、糖鎖伸長生成物としても検出されなかった。GlcNAc-2C6 はアルキルグリコシドの状態で存在しているものもあったが、これは、細胞が死んでしまったために、糖転移反応を受けられなかったものと考えられる。

これらの結果から、GlcNAc-2C6 の方が GlcNAc-C12 とより B16 細胞において糖鎖伸長されやすいことが分かった。

3. Sialyl LacNAc 誘導体ペンダントポリマーの作成

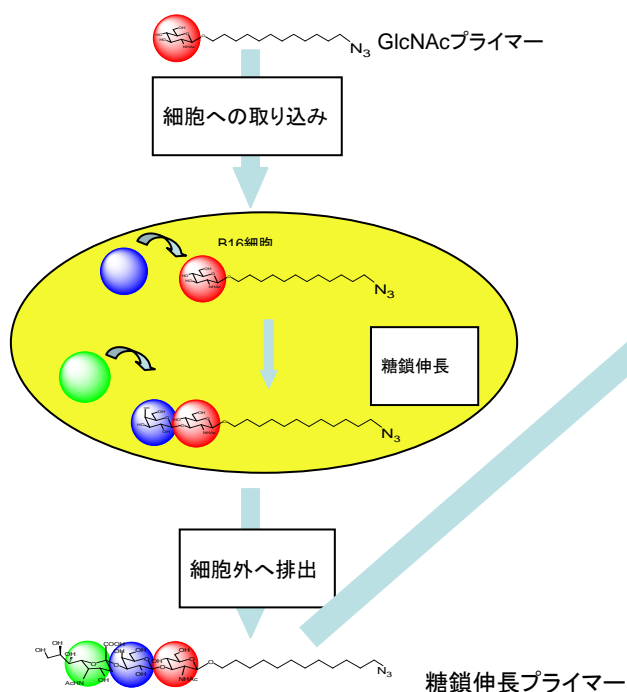
3.1 背景

糖鎖は細胞膜の外側に存在しており、タンパク質の安定化や活性化、輸送の制御、細胞間の情報伝達にもかかわるなど生体において重要な機能を果たしている。この糖鎖がタンパク質や脂質に結合して、細胞の発生やガン化、免疫、接着、受精などの生命現象を起こしている^{(15)・(19)}。このように重要とされながらも糖鎖の研究は近年になってから発展し始めた。それは、直鎖状高分子である核酸やタンパク質と異なり、糖鎖が枝分かれ構造を有するためその構造が多様で分析が困難であるのと同時に合成も困難であることに起因する。

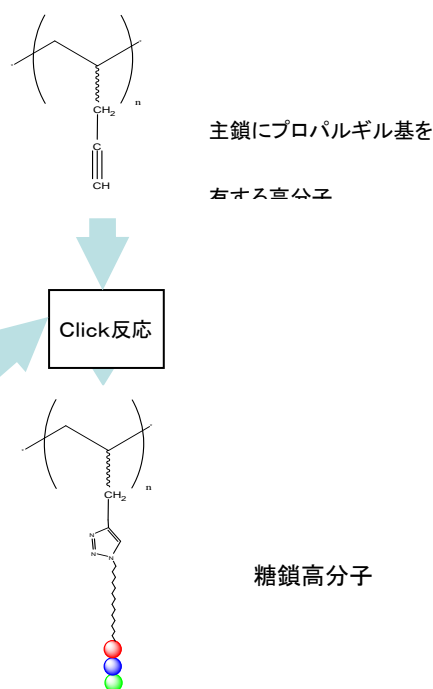
糖鎖の合成法は、化学合成と酵素合成があり、酵素合成はさらに糖転移酵素を用いた合成法と加水分解酵素を用いた合成法に分かれる。化学合成は大量に精密な合成をすることができるが、目的物を得るまでに保護・脱保護を繰り返すし、実験操作においても熟練した技術が必要とされる。一方、酵素合成のうち糖転移酵素を用いる方法では精密な構造を少量合成でき、加水分解酵素を用いる方法では単純な構造を多量に合成することができる。また、糖転移酵素を用いた糖鎖の合成法は生合成と同じ仕組みであり、生体内にあるさまざまな糖転移酵素のうち目的物を得るために必要な糖転移酵素を単離して用いたのがこの方法である。そこで、容易な操作手順で多量の糖質誘導体を得る方法として糖鎖を合成する糖転移酵素を有する細胞を糖鎖の生産として用いる糖鎖プライマー法を用いることにした⁽¹⁾。

次に、糖鎖プライマー法によって得られた糖鎖伸長生成物を高分子鎖に結合させ、糖鎖高分子を合成した。この高分子はインフルエンザやペロ毒素等の病原体との関わりが指摘されている Sialyl LAcNAc 構造を有する。糖鎖プライマー法ではアルキルグリコシドの構造とアルキルグリコシドを投与する細胞の種類を変えることで、さまざまな糖鎖伸長生成物を合成することができる。糖鎖プライマー法で得られた糖鎖伸長生成物をそのまま高分子鎖へ導入することを可能にし、さまざまな病原体に対する診断材料に応用できないか検討した。

・細胞による糖鎖伸長



・糖鎖高分子の構築



(Figure 23. SialylLacNAc 誘導体ペンダントポリマー作成法の概略図)

3.2 実験方法

3.2.1 一般

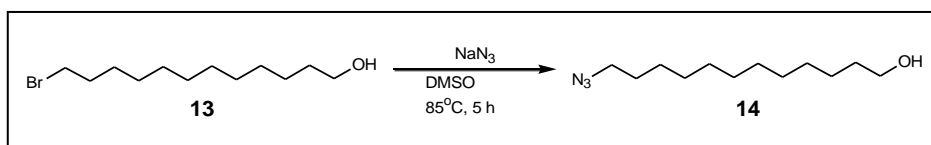
^1H NMR スペクトルは JEOL 600 MHz スペクトロメーターを用いて測定した (JEOL, Tokyo, Japan)。全ての反応は Silica Gel 60 F-254 を塗布した薄層クロマトグラフィーを anisaldehyde- H_2SO_4 を噴霧し、加熱することによって確認した (E. Merck, Darmstadt, Germany)。カラムクロマトグラフィーは Silica Gel 60 (230-400 mesh, E. Merck, Darmstadt, Germany) を用いて行った。

B16 細胞は Riken Cell Bank から購入した (Tsukuba, Japan)。D-MEM/F-12 と ITS-X は Life Technologies の製品を用いた (Carlsbad, CA, USA)。FBS は JRH Biosciences から購入した (Lenexa, KS, USA)。Antibiotic-antimycotic solution (100×) は Nacalai Tesque の製品を用いた (Kyoto, Japan)。SepPak

C18 cartridges は Waters の製品を用いた(Boston, MA, USA)。HPTLC (Silica Gel 60 F-254)は E. Merck の製品を用いた(Darmstadt, Germany)。

3.2.2 有機合成

・ 12-bromododecan-1-ol (**13**)

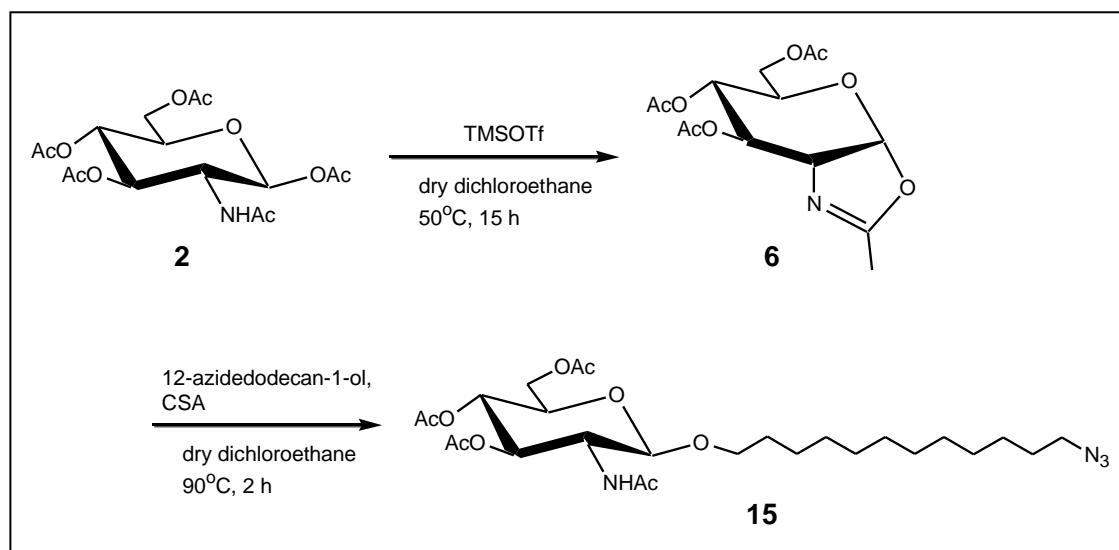


12-bromododecan-1-ol と DMSO を混合し、 85°C に加熱した。sodium azide を加え、 85°C で 5 時間攪拌した。氷水を加え、ethyl acetate で抽出、magnesium sulfate で乾燥させた。エバポレーターで濃縮した後、シリカゲルカラムで精製し、目的化合物 (**14**) を得た。

12-azidedodecan-1-ol	Sodium azide	DMSO	Yield
37 mmol	0.20 mol		69%
9.8 g.	12 g	200 mL	6.7 g

12-azidedodecan-1-ol (**14**); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ 1.19–1.34 (br, $-(\text{CH}_2)_8-$, 16H), 1.39, 1.52 (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$, 4H) , 3.30 (m, $-\text{CH}_2-\text{N}_3$, 2H), 3.36 (m, $-\text{CH}_2-\text{OH}$, 2H), 4.33 (t, $J=10.4$ Hz, OH, 1H).

• 12-azidedodecyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (**16**)



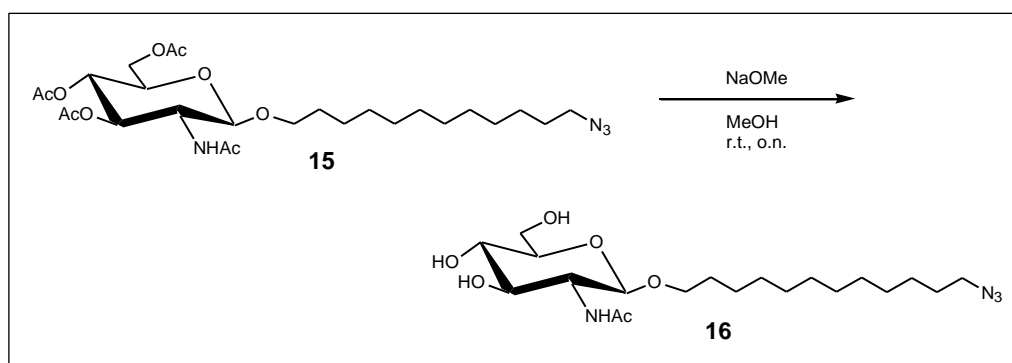
2-Acetamido-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranose と dry dichloroethane を 0℃で溶けるまで攪拌した。これに TMSOTf を加え、50℃で 15 時間攪拌した。室温まで冷ました後、さらに 0℃に冷やして triethylamine 加え、TLC で反応の様子を確認後 chloroform で抽出した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、目的化合物 (**6**) を得た (chloroform : methanol=20 : 1 (v/v))。

2-Acetamido-tetra- <i>O</i> -acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranose	TMSOTf	triethylamine	dichloroethane anhydrous	Yield
3.1 mmol	3.7 mol	7.2 mmol		93%
1.2 g.	0.67 mL	1.0 mL	10 mL	0.94 g

オキサゾリン誘導体を dry dichloroethane に溶かし、12-aziddodecan-1-ol を加えて 0℃で攪拌した。その後、CSA を加え、90℃で 2 時間攪拌した。TLC で反応の様子を確認し、chloroform で抽出した。濃縮後、カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、目的化合物 (**15**) を得た (ethyl acetate : toluene=2 :

1 (v/v))。

12-azidododecan-1-ol	CSA	dichloroethane anhydrous	Yield
3.1 mmol	3.1 mmol		15%
0.70 g.	0.70 g	10 mL	2.4 mg



12-azidedodecyl-2-acetamido- tetra-*O*-acetyl-

2-deoxy-β-D-glucopyranoside を methanol に溶かし、sodium methoxide を加えて、一晩攪拌した。TLC で反応を確認後、陽イオン交換樹脂を用いて中和し、methanol で再結晶して目的化合物(**16**)を得た。

12-azidedodecyl-2-acetamido- tetra- <i>O</i> -acetyl- 2-deoxy-β-D-glucopyranoside	sodiummethoxyde	methanol anhydrous	Yield
0.0040 mmol	0.13 mmol		81%
2.4 mg	6.8 mg	5.0 mL	132 mg

12-azidedodecyl-2-acetamido- tetra-*O*-acetyl-

2-deoxy- β -D-glucopyranoside (**15**); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1.19–1.39 (br, $-(\text{CH}_2)_{10}-$, 20H), 1.95, 2.03, 2.04, 2.05, 2.08 (s, OAc, 15H), 3.26 (t, $J=6$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{N}_3$, 2H), 3.50 (q, $J=$ Hz, $-\text{CH}_{2a}-\text{OH}$, 1H), 3.79 (m, $-\text{CH}_{2b}-\text{OH}$, 1H), 3.89 (m, H-6, 2H), 4.14 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, 1H), 4.28 (dd, $J=$ Hz, NH, 1H), 4.75 (d, $J=$ Hz, H-2, H-3, H-4, H-5, 1H), 5.06 (t, $J=$ Hz, H-2, H-3, H-4, H-5, 1H), 5.34 (t, $J=$ Hz, H-2, H-3, H-4, H-5, 1H), 6.74 (d, $J=8.76$ Hz, H-1, 1H).

12-azidedodecyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (**16**); ^1H NMR ($\text{MeOH}-d_3$, 600 MHz): δ 1.16–1.32 (br, $-(\text{CH}_2)_{10}-$, 20H), 1.90 (s, NHAc, 3H), 3.19 (m, $-\text{CH}_2-\text{N}_3$, 2H), 3.20 (m, $-\text{CH}_2-\text{OH}$, 2H), 3.37 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, 2H), 3.61 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, 1H), 4.14 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, 1H), 3.80 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, 2H), 4.31 (d, $J=8.82$ Hz, H1).

3.2.3 細胞実験

3.2.3.1 GlcNAc-C12N₃ の細胞毒性の検討

○培地の調整

・血清培地

培地 : D-MEM/F-12

添加物 : FBS、ABAM

・無血清培地

培地 : D-MEM/F-12

添加物 : ITS-X

○細胞の調整

B16 細胞を 10 cm シャーレ 6 枚にそれぞれ 2.0×10^6 個播種し、血清培地 (7.0 mL) 中で細胞が各シャーレに単層に増えるまで 48 時間培養した。

○GlcNAc-C12N₃ の B16 細胞への投与

無血清培地 (3.0 mL) で細胞を洗浄した。GlcNAc-C12N₃ を濃度が 1.0 mM になるように滅菌 DMSO に溶解させた。この DMSO 溶液を GlcNAc-C12N₃ の濃度が 50 μ M になるように無血清培地に溶解させ、ここからシャーレ 1 枚当たり 7.0 mL を用いて B16 細胞を 48 時間培養した。

○精製方法

アルキルグリコシドを投与してから 48 時間の培養後、細胞画分と培地画分に分け、それぞれ抽出と精製を行った。

・培地画分

各シャーレから培地を回収し、PBS(-)溶液 2.0 mL で各シャーレを洗浄し、洗浄液も培地と共に回収した。EDTA が 0.25% 溶解した PBS(-)溶液 (2.0 mL) を各シャーレに加え、5 分間インキュベートした。その後、剥離した細胞の懸濁液をエッペンチューブに移した。エッペンチューブを 2500 rpm、25°C で 5 分遠心した。上澄みを培地と洗浄液を回収したエッペンチューブに移し、培地画分とした。また、エッペンチューブに残った細胞を細胞画分とした。

培地画分は Sep-Pak (C18) (2.0 g) カラムを用いて精製を行った。まず、Sep-Pak (C18) カラムに methanol、イオン交換水の順にそれぞれ 10 mL ずつ流し、次に回収した培地を 2 度流した。10 mL のイオン交換水を流して親水性の化合物 (塩など) を洗い流した。最後に、methanol (3.0 mL) を流し、続いて chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 4.0 mL 流し、両親媒性の化合物を流出さ

せ、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

- ・細胞画分

培地画分の回収作業中に得られた細胞画分に chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 1.0 mL を加え、vortex で攪拌し、超音波に 30 分間当て、細胞膜を壊して中の脂質を抽出した。その後、15000 rpm、4℃で 30 分遠沈し、上澄みをエッペンチューブに回収した。次に、chloroform : 2 - propanol : イオン交換水 = 7 : 11 : 2 の溶液を 1.0 mL 細胞に加え、超音波に 30 分間当て、15000 rpm、4℃で 30 分遠沈し上澄みを回収し、遠沈エバポレーターで乾燥させた。

○HPTLC の展開方法

遠沈エバポレーターによって乾燥させた培地画分と細胞画分をそれぞれ chloroform : methanol = 2 : 1 の溶液 50 μ L に溶かし、それぞれの溶液 (5.0 μ L) を HPTLC に滴下した。HPTLC は chloroform : methanol : 0.25% KCl aq = 5 : 4 : 1 で展開した。その後、レゾルシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。その後、オレシノールを噴霧して 120℃で 20 分加温した。

3.2.3.2 Sialyl LAcNAc 誘導体の大量生産

○培地の調整

- ・血清培地

培地 : D-MEM/F-12

添加物 : FBS、ABAM

- ・無血清培地

培地 : D-MEM/F-12

添加物 : ITS-X

○細胞の調整

B16 細胞を 15 cm シャーレ 40 枚にそれぞれ 7.1×10^6 個播種し、血清培地 (20 mL) 中で細胞が各シャーレに単層に増えるまで 48 時間培養した。

○GlcNAc-C12N₃ の B16 細胞への投与

無血清培地 (5.0 mL) で細胞を洗浄した。GlcNAc-C12N₃ を濃度が 1.0 mM になるように滅菌 DMSO に溶解した。この DMSO 溶液を GlcNAc-C12N₃ の濃度が 50 μ M になるように無血清培地に溶解させ、ここからシャーレ 1 枚当たり 20 mL を用いて B16 細胞を 48 時間培養した。48 時間後に培地を回収し、新しい培地を 20 mL 与えた。この操作を 4 回繰り返す、計 5 回 B16 細胞に GlcNAc-C12N₃ を投与し、糖鎖伸長生成物を得た。

○精製方法

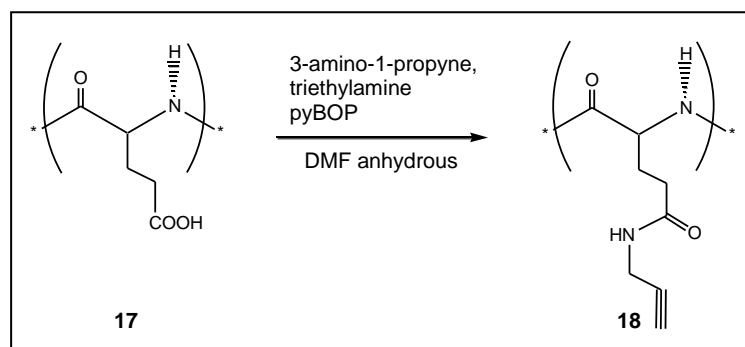
HP20 を methanol で洗浄し、GlcNAc-C12N₃ を投与してから 48 時間ごとに回収した培地に加えた。カラムに HP20 を充填し、イオン交換水で親水性化合物を取り除いた後、Methanol 濃度が 0%~100% のイオン交換水-methanol 混合溶液を methanol 濃度 0% のイオン交換水-methanol 混合溶液から順に流し、糖鎖伸長生成物を精製した。

○MS スペクトルの測定

イオン交換水-methanol の混合溶媒で溶出した画分を HPTLC に展開したところ、methanol 濃度 60% のフラクションに化合物が含まれていることが分かった。そこで、Milli-Q にマスマススペクトル測定用のアセトニトリルを 10% 加えた溶媒を用いて methanol 濃度 60% の各画分の内容物を溶解させ、分子量を測定した。

3.2.3.3 プロパルギル基を有する高分子の合成

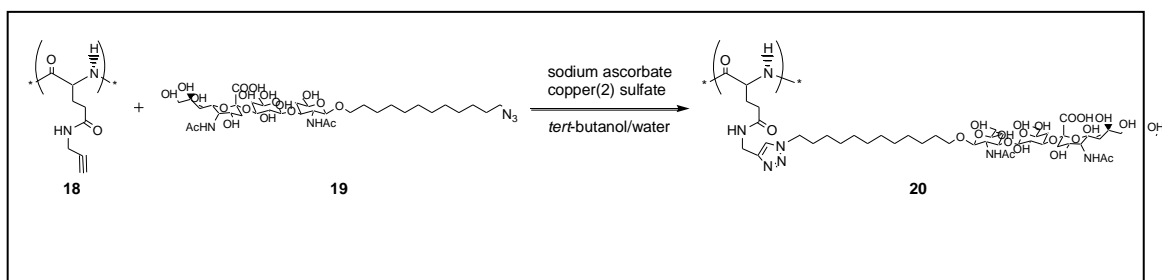
• Poly (propargyl-L-glutamate)(18)の合成



Poly-L-glutamic acid sodium salt (25 mg , 0.19 mmol) をイオン交換水に溶かし、陽イオン交換樹脂を詰めたカラムに流した。カラムを通った水溶液を凍結乾燥した。乾燥した poly-L-glutamic acid (15 mg , 0.12 mmol) を無水 DMF (8.0 mL) に溶かし、propargylamine (9.7 μ L , 0.15 mmol)、triethylamine (32 μ L , 0.23 mmol)、PyBOP (67 mg , 0.13 mmol)、の順に加え、室温で 17 時間攪拌した。chloroform に溶解し、methanol で再沈した後、500 の透析膜で 3 日間透析し、凍結乾燥して、目的化合物 (28) (3.0 mg , 16%) を得た。

IR: (KBr): ν (cm^{-1}) 3292, 1700, 1649, 1550, 1450, 1173, 1090, 1017, 658.

3.2.3.4 糖鎖高分子の合成



B16 細胞によって糖鎖伸長された化合物(19) (300 μ g, 0.34 μ mol)、poly (propargyl-L-glutamate) (18) (1.0 mg, 6.0 μ mol) を溶媒 (*tert*-butanol:water =1:1) に溶かし、5 分間室温で攪拌した。sodium ascorbate (0.33 mg, 1.7 μ mol)、copper (II) sulfate pentahydrate (54 μ g, 0.34 μ mol) を加え、室温で 1 晩攪拌した。2 日間透析し、目的化合物(30)を得た。

Sialyl LacNAc introduced poly-L-glutamine; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz):

δ 1.16–1.32 (br, $-(\text{CH}_2)_{10}-$, 20H), 1.90(s, NHAc, 3H), 3.19 (m, $-\text{CH}_2-\text{N}_3$, 2H), 3.20 (m, $-\text{CH}_2-\text{OH}$, 2H), 3.37 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, 2H), 3.61 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, 1H), 4.14 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, -1H), 3.80 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, 2H), 4.31 (d, $J=8.82$ Hz, H1).

3.3 結果と考察

アセチル基で保護された GlcNAc のオキサゾリン誘導体を介して N-acetylglucosamine sodium salt と 12-azidododecan-1-ol をグリコシル化し、アセチル基を脱保護した後、GlcNAc-C12N₃ を (16) を得た。

この GlcNAc-C12N₃ を 50 μ M の濃度で B16 細胞に投与したところ、細胞毒性がないことがわかった。また HPTLC の結果より培地面分から糖鎖伸長を受けた化合物が確認された。糖鎖伸長は細胞内の小胞体やゴルジ体の脂質膜で起こるため、長鎖アルキル基を 1 本しか持たない GlcNAc-C12N₃ は糖鎖伸長を受けたあと細胞外に排出されたものと考えられる。さらに、糖鎖伸長生成物を MS スペクトルにより分析を行うと、galactose と sialic acid が結合していることがわかった。

プロパルパルギル基を有する glutamate の構造決定は赤外分光法により行なった。glutamate のみの赤外スペクトルと propargylamine を反応した後の glutamate の赤外スペクトルを比較したところアミド結合とカルボキシル基の吸収の強度が反応の前後で変化していることがわかった。反応後の赤外吸収ス

ペクトルではアミド結合の吸収の強度が上がっていた。これはプロパルギル基を結合する際に新たにできたアミド結合の吸収であると考えられる。

最後に Click 反応によって、プロパルギル基を導入した poly(propargyl-L-glutamate) (18) に Sialyl LacNAc 誘導体 (分子量 883) (19) を導入した。Sialyl LacNAc 誘導体が入導された糖鎖高分子 (20) は ^1H -NMR により構造の確認を行った。8.1~8.2ppm 付近に poly(propargyl-L-glutamate) 由来のプロトンを確認でき、Sialyl LacNAc 誘導体のアルキル鎖のプロトンを 1.1ppm 付近に、GlcNAc の α 位のプロトンを 4.4ppm 付近にそれぞれ確認された。そして、トリアゾール環のプロトンも 7.7ppm 付近に確認できたため、目的物を合成することができたと考えた。また、高分子鎖中のプロパルギル基のうちの 24% に Sialyl LacNAc 誘導体が入結合していることがわかった。

4. フッ素樹脂の合成とぬれ性の測定

4.1 背景

フッ素樹脂とは炭素－フッ素の強力な結合をもつフルオロカーボンからなるポリマーを指し、Roy J. Plunkett によって 1938 年に polytetrafluoroethylene(PTFE)が見いだされたことから研究が始まった⁽²⁰⁾。PTFE に代表されるフッ素樹脂は耐熱・耐寒性、耐薬品性、難燃性、電気特性、低摩擦性、非粘着性、耐候性といった特有な性質を持ち、工業分野から医療分野に渡る広い領域で用いられている。よく知られているフッ素樹脂の製品として、非粘着性の性質を活かしたフッ素樹脂加工のフライパンがある。非粘着性の性質はフッ素樹脂が局所的（炭素原子－フッ素原子）には分極しているが、大域的（分子全体）に見ると、それぞれの双極子モーメントが打ち消されて無極性のように振る舞うことから現れる。そのため、フッ素樹脂は水や油との相互作用が極めて小さくなる。

目的にあった表面特性を発現させることは材料を構築するにあたり重要である。たとえば、ポリスチレンは細胞のディッシュへの接着をサポートする疎水性材料として知られている⁽²⁴⁾。長鎖のポリエチレングリコールは親水性を与える材料として知られており、タンパク質の吸着を防ぐために用いられている⁽²⁵⁾

フッ素化されたポリマーは熱的安定性・化学安定性・難燃性・低い誘電率・低摩擦特性・特徴的な表面特性を持ち、バイオマテリアルを設計する際の魅力的な材料のひとつである^{(26)・(32)}。これらの特性の中でもフッ素化された化合物に特徴的である表面特性によって、フッ素化された化合物はフッ素化されていない化合物の付着を防ぐため、タンパク質接着を防ぐような生体適合性のある材料として用いられている⁽³³⁾。一般的に親和性は親水性か親油性かという観点から議論される。しかし、高度にフッ素化された化合物は疎水性でも疎油性でもなく親フッ素性という性質を持つ⁽³⁴⁾。

固体と液体間の親和性評価の方法の一つに接触角を測定する方法がある。接触角が小さい（ $<90^\circ$ ）場合は高い親和性を示し、接触角が大きい（ $>90^\circ$ ）場合

は親和性が低いことを示している⁽³⁵⁾。親和性は液体の表面張力と固体の臨界表面張力を比較することで予測することができる。液体の表面張力が固体の臨界表面張力よりも低い場合、液体は固体をぬらすことができる。Zisman らのアプローチによって固体の臨界表面張力を計算することで、液体と固体表面間のさらなる表面相互作用の情報を得ることができる⁽²¹⁾⁻⁽²³⁾。4 章では、バイオマテリアルへの応用が期待されるフッ素樹脂を合成し、それらの接触角を測定した。また、Zisman らのアプローチを用いて臨界表面張力を測定し、作成したフッ素樹脂がバイオマテリアルに適した表面特性を持つかどうか調べた。

4.2 実験方法

4.2.1 一般

¹H NMR スペクトルは JEOL 600 MHz スペクトロメーターを用いて測定した(JEOL, Tokyo, Japan)。全ての反応は Silica Gel 60 F-254 を塗布した薄層クロマトプレート(E. Merck, Darmstadt, Germany)に anisaldehyde-H₂SO₄ を噴霧し、加熱することによって確認した。カラムクロマトグラフィーは Silica Gel 60 (230-400 mesh, E. Merck, Darmstadt, Germany)を用いて行った。作成したフッ素化ポリマーの溶解には Novec™ 7100(3M Japan, Tokyo, Japan)を用いた。

$$\text{R-OH} \xrightarrow[\text{acetonitrile, r. t., o. n.}]{\text{acryloyl chloride, triethylamine}} \text{R-O-C(=O)-CH=CH}_2$$

$$\text{R} = \text{21 } \text{CH}_3\text{CH}_2\text{C(F)}_2\text{OCH}_2\text{C(F)}_2\text{OCH}_2\text{C(F)}_2\text{OCH}_2\text{C(F)}_2\text{OCH}_2\text{C(F)}_2\text{F}, \text{22 } \text{CH}_3\text{CH}_2\text{C(F)}_2\text{C(F)}_2\text{C(F)}_2\text{C(F)}_2\text{C(F)}_2\text{F}$$

1H,1H-perfluoro-3,6,9-trioxadecan-1-ol を 0°C に冷やした脱水 asetonitrile 溶媒中に、triethylamine 、 acryloyl chloride と共にを加え、室温で 2 時間反応させた。反応終了後、イオン交換水を加え、ethylacetate で抽出を行った。反応溶液は saturated sodium bicarbonate aq、イオン交換水、brine を用いて洗浄し、magnesium sulfate で脱水後、濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィー (1 : 20=ethyl acetate : hexane) で精製し目的化合物 (21) を得た。

1H,1H-perfluoro- 3,6,9-trioxadecan-1-ol	acryloyl chloride	triethylamine	asetonitrile anhydrous	Yield
5.0 mmol	5.5 mmol	6.0 mmol		48%
2.0 g	445 µL	842 µL	9.8 mL	

74

・ 1H,1H-perfluorohexyl acrylate (F-alkyl モノマー) (**22**)

1H,1H-perfluorohexan-1-ol を 0°C に冷やした脱水 tetrahydrofuran 中に triethylamine、acryloyl chloride と共にを加え、室温で一晩反応させた。反応終了後、水を加え、dichloromethane を用いて抽出した。反応溶液は saturated sodium bicarbonate aq、イオン交換水、brine を用いて洗浄し、magnesium sulfate で脱水の後に濃縮した。35°C で減圧蒸留により精製し、目的化合物(**22**)を得た。

1H,1H-perfluorohexane-1-ol	acryloyl chloride	triethylamine	tetrahydrofuran anhydrous	Yield
10 mmol 1.9 mL	31 mmol 2.5 mL	31 mmol 4.3 mL	20 mL	68%

1H,1H-perfluorohexyl acrylate (**22**) ; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ 4.67 (t, $J=26.94$ Hz, 2H), 6.00 (d, $J=10.50$ Hz, 1H), 6.19 (dd, $J=10.44$, 17.58 Hz, 1H), 6.53 (d, $J=17.58$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz): δ 59.39, 59.56, 59.75, 126.57, 133.34, 164.31.

23, 24

$\left[\begin{array}{l} \text{R=} \\ \text{23 } \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CF}_2\text{OCF}_2\text{CF}_2\text{OCF}_2\text{CF}_2\text{OCF}_2\text{CF}_2\text{F} \\ \text{24 } \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{F} \end{array} \right]$

F-TEG モノマー(21)	AIBN	DMF	Yield
0.70 mmol	6.6 μ mol		79%
0.30 g	1.1 mg	321 μ L	

76

F-alkyl モノマー(22)	AIBN	DMF	Yield
1.7 mmol	17 μ mol		87%
0.60 g	2.8 mg	824 μ L	

F-alkyl polymer (**24**); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1.41-2.00 (br, 1H), 2.00-2.30 (br, 1H), 2.03-2.75 (br, 1H), 4.40-4.80 (br, 2H).

4.2.3 めれ性の評価

シリコンウエハーを hexane・ethanol・chloroform を順次用いて、それぞれ 10 分間ずつ超音波洗浄した。F-TEG ポリマー(**23**)と F-alkyl ポリマー(**24**)を Novec™ 7100 に 5.0w%濃度で溶かし、シリコンウエハー上にキャスト法を用いて薄膜にした。それぞれの溶媒 (Milli Q、1-pentanol、1-heptanol、1H,1H,5H-octafluoro-1-pentanol、1H,1H-perfluoro-1-hexanol、1H,1H,7H-dodecafluoro-1-heptanol、ethylene glycol、1-propanol、glycerol) を 5 μ L ずつそれぞれの薄膜上に滴下し、接触角を測定した。それぞれの溶媒を用いて少なくとも 5 回以上測定した。

4.3 結果と考察

1H,1H-perfluoro-3,6,9-trioxadecyl acrylate (**21**)はフルオロトリエチレングリコールモノマーとして、1H,1H-perfluorohexyl acrylate (**22**)はフルオロアルキルモノマーとして 2 つのタイプのフッ素化されたモノマーは合成された (Scheme 1)。これらのモノマーと AIBN を用いてフリーラジカル重合によりフッ素化されたポリマーを得た (F-TEG ポリマー(**23**)、F-alkyl ポリマー(**24**))。ポリマーが重合していることは ^1H NMR を用いて確認した。それぞれのポリマーの分子量は静的光散乱を用いて測定した (Table 2)。

Table 2. F-TEG polymer (23) と F-alkyl polymer (24)の収率と分子量

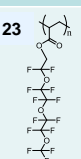

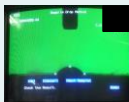





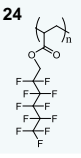





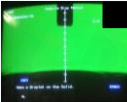
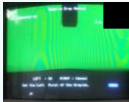
いずれのポリマーも Novec™ 7100 に溶かすことができた。シリコンウェハー上にそれぞれのポリマーの薄膜をキャスト法で作成し、さまざまな溶媒を用いて接触角を測定した。F-TEG ポリマー(23)は F-alkyl ポリマー

Polymer	Yield [%]	M _w ¹ [Da]
23	79	4.7x 10 ⁵
24	87	1.2x 10 ⁶

¹ Calculated by Static light scattering.

(24)よりも water とフッ素化されていない溶媒に対して小さい接触角を示し、F-TEG ポリマー(23)は F-alkyl ポリマー(24)よりも hydrophilic であり、また alcoholphilic であることがわかった。いずれのフッ素化されたポリマーもフッ素化されアルコールに対してはきわめて 0°に近い接触角を示した。これらの結果から、どちらのフッ素化されたポリマーも water やフッ素化されていないアルコールと相互作用しており、フッ素化されたアルコールとはより強く相互作用していることがわかった。

Table 3. F-TEG ポリマー(23)と F-alkyl ポリマー(24)のさまざまな溶媒に対する接触角測定の結果

	water	1-pentanol	1-hexanol	1-heptanol	1H, 1H, 5H-octafluoro-1-pentanol	1H, 1H-perfluoro-1-hexanol	1H, 1H, 7H-dodecafluoro-1-heptanol
23 	 101.4°	 57.4°	 58.3°	 61.1°	 nearly 0°	 nearly 0°	 nearly 0°
24 	 126.7°	 69.1°	 78.3°	 82.5°	 nearly 0°	 nearly 0°	 nearly 0°

また、ethylene glycol、1-propanol、glycerol を用いて接触角を測定し、その結果からそれぞれのポリマーの臨界表面張力を計算した。F-TEG ポリマー(23)の臨界表面張力(18 mNm⁻¹)は F-alkyl ポリマー(24)の臨界表面張力(7.0 mNm⁻¹)より大きかった(Figure 25)。F-alkyl ポリマー(24)の臨界表面張力はこれまでに報告されている中でも小さかった。F-TEG ポリマー(23)の臨界表面張力は polytetrafluoroethylene (PTFE) と同等だった⁽³⁶⁾。

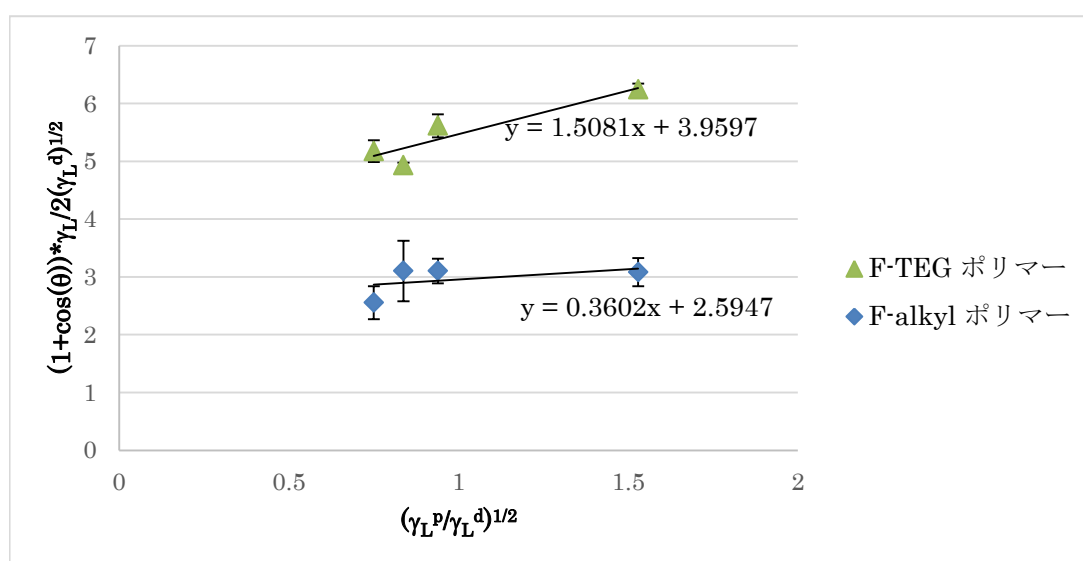


Figure 24. F-TEG ポリマー (23)と F-alkyl ポリマー (24)の Zisman plots

F-alkyl ポリマー(24)は著しく低い臨界表面張力を持つことから、F-alkyl ポリマー(24)はさまざまな付着物を防ぐことができると考えられ、汚れにくいバイオマテリアルとして用いることができるかもしれない⁽³⁷⁾。

F-TEG ポリマー(23)の臨界表面張力はバイオマテリアルを含むさまざまな分野で用いられている PTFE と同等であった。PTFE は固体の粒子として重合される不溶性の物質であり、PTFE を用いて材料表面をコートするのは困難である。一方、F-TEG ポリマー(23)は Novec™ 7100 のようなフッ素化された溶媒に溶解することができる。したがって、F-TEG ポリマー(23)を用いてバイオマ

テリアルをコートすることができるかもしれない。

バイオマテリアルへの応用の 1 つとしてのノイラミニダーゼ活性を用いた後述のインフルエンザの迅速診断キットを考えるとこれらのフッ素化ポリマーの性質は有益である。ノイラミニダーゼの活性部位は帯電したアミノ酸残基(Arg 118, Glu 119, Asp 151, Arg 152, Asp 198, Arg 224, Glu 227, Asp 243, His 274, Glu 276, Glu 277, Arg 292, Asp 330, Lys 350 and Glu 425)で覆われており、また疎水性であることが知られている⁽³⁸⁾。フッ素化樹脂は C-F 結合の分極率は大きいが結合距離が短いことから分極率が低く、誘電率が低いことが知られている。また、接触角測定や Zisman's plot の結果から、F-TEG ポリマー(23)、F-alkyl ポリマー(24)ともに非粘着性であるため、ノイラミニダーゼを特異的に基質（シアル酸）に相互作用させるために役立つことが期待される。

5. 蛍光性シアル酸誘導体の合成

5.1 背景

元来、インフルエンザ診断はウイルス分離、血清抗体検査、RT-PCRによって行われてきた。しかし、この方法では検査結果が出るまで1～3日かかり、さらに特別な装置や施設を必要とすることから近年、インフルエンザウイルスの迅速診断キットの研究が盛んにおこなわれてきた。インフルエンザウイルスの迅速診断キットにはイムノクロマトグラフィー法を原理としたものやノイラミニダーゼ活性を利用したものがあるが、国内で販売されているインフルエンザ迅速

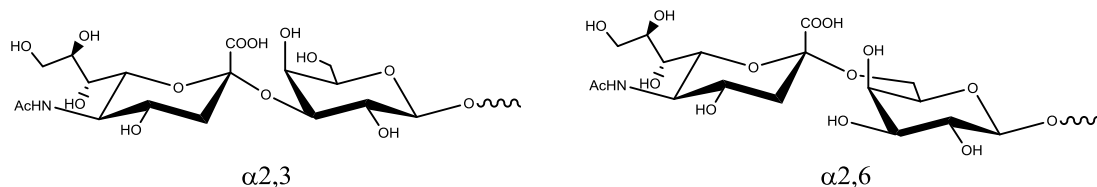


Figure 25. シアル酸の結合様式

速診断キット（全20種類）（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター調べ（2013.5.23））は全てがイムノクロイマトグラフィーに基づいている。これは、イムノクロマトグラフィー法を原理としたキットを用いた場合、抗体にA型、B型インフルエンザウイルス核タンパク質に対応する抗体を用いるため、1回の試験で感染の有無だけでなくA型、B型いずれのウイルスに感染しているかも知ることができるからである。検出限界は $7.8 \times 10^3 \sim 4.7 \times 10^4$ pfuで測定にかかる時間は製品によって5～30分である⁽³⁾。

ノイラミニダーゼ活性を利用したキットは国内で販売されて

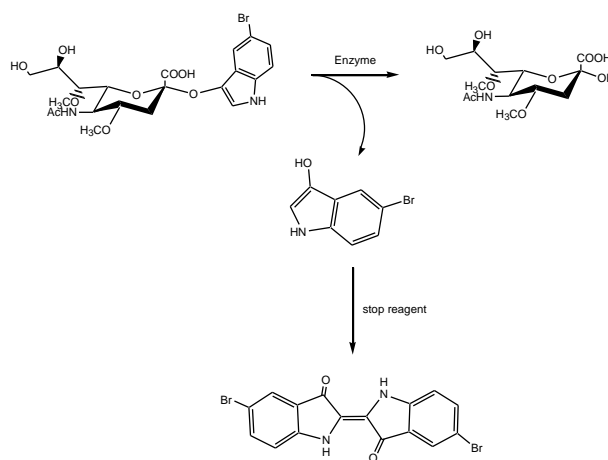


Figure26. ZstatFlu[®]の呈色機構⁽⁴⁾

はないがアメリカの Zyme Tx,Inc. の ZstatFlu[®]がある⁽⁴⁾。これは 5-bromoindoxyl-4,7-dimethoxy-N-acetylneuraminic acid から 5-bromoindole がウイルスの持つノイラミニダーゼによって切り離され、stop reagent を加えることで 5-bromoindole が二量化し、indigo 誘導体になることで呈色するという機構で診断を行う (Figure 26.)。ZstatFlu[®]の検出限界は $3.3 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^5$ pfu/assay⁽⁴⁾でイムノクロマトグラフィー法と比べて著しい差はないが、感度の点でノイラミニダーゼ活性を用いた迅速診断キットはイムノクロマトグラフィー法を用いた迅速診断キットより劣っていることから、研究が進んでいない (イムノクロマトグラフィー法の感度：81%、ノイラミニダーゼ活性を用いる場合の感度：67%)⁽⁴⁾。ZstatFlu[®]の感度が悪い理由の一つとして、陽性の検体であつても発色の程度が弱いことが指摘されている。

現在、インフルエンザの診断において主流となっているイムノクロマトグラフィー法は 1 : 1 の反応である抗原-抗体反応に基づいている。そのため、抗原であるインフルエンザウイルスの量が少ないと、正しい診断が行われないう問題点がある。適切な診断を行うためには、発症後 12 時間以降に抗原を採取する必要があるといわれているが、適切な時間に抗原が採取された場合でも、採取する人の技術により採取される抗原量が足りず、正しい判断が行われないう場合がある。さらに、現在使われているインフルエンザ治療薬は、体内のインフルエンザウイルスを殺すことはできない。インフルエンザウイルスが細胞から、次の細胞へと移動しウイルス数を増やすのを防ぐための薬で、ウイルスの体内からの除去は免疫に頼っている。既存のインフルエンザ治療薬は発症後 48 時間以内に投与することで効果があるとされているが、より患者の負担を減らすためには早期 (体内のインフルエンザウイルスが少ない時期) の正確な診断が求められる。そこで、ノイラミニダーゼ活性を利用した酵素反応によるインフルエンザ診断材料の開発を試みた。インフルエンザウイルスの持つ酵素が基質に対して繰り返し反応することで、少ないウイルス数でも正確な診断が可能

になるかもしれない。

診断はインフルエンザウイルスがある場合とない場合で変化する蛍光によって行おうと考えた。そのために蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が起こるようなポリマーを設計した。FRETはタンパク質間相互作用を検出する方法として生物学の分野で多く用いられており、蛍光基間の距離によって蛍光強度が指数関数的に変化する。蛍光ドナーと蛍光アクセプター間の距離が近い場合

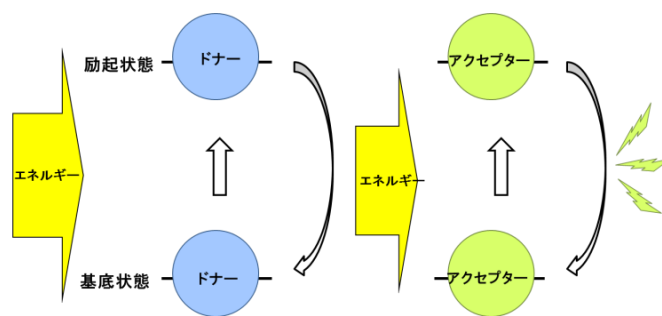


Figure 27. FRET の仕組み ⁽⁵⁾

($\sim 100 \text{ \AA}$)、蛍光ドナーを励起させると、蛍光ドナーが基底状態に戻るときのエネルギーが蛍光アクセプターに伝わり、最終的に、蛍光ドナーを励起させることで蛍光アクセプター由来の蛍光が観測される。

この仕組みをインフルエンザ診断材料に取り入れ、インフルエンザウイルスがない場合は FRET により蛍光アクセプター由来の蛍光が観測されるが、インフルエンザウイルスがある場合は、インフルエンザウイルスが持つシアリダーゼによって基質となる蛍光シアル酸誘導体（蛍光アクセプター）が切り離され、蛍光ドナー由来の蛍光が観測されるような材料づくりを目指した。

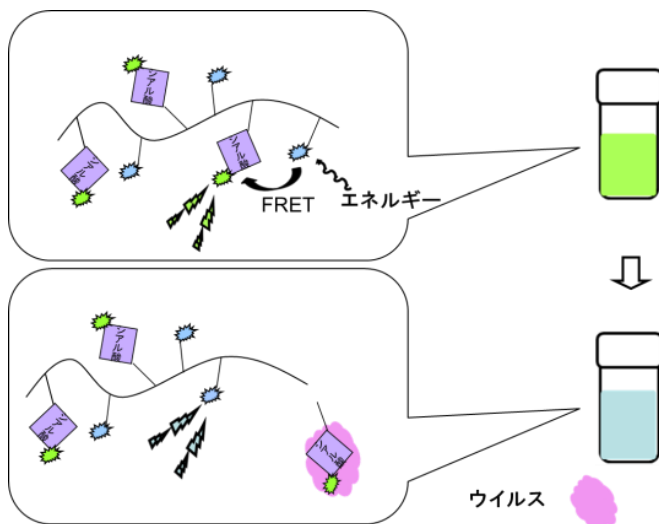


Figure 28. FRET を用いたインフルエンザ診断法の概略

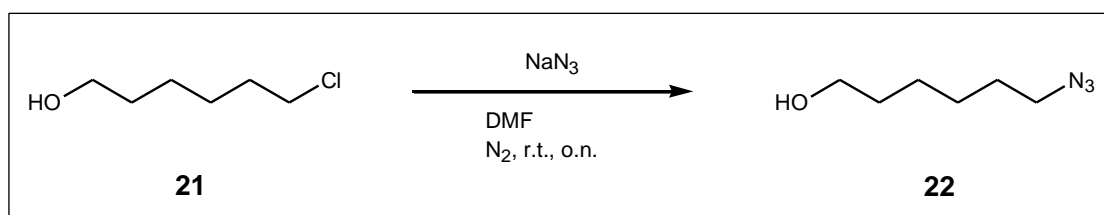
5.2 実験方法

5.2.1 一般

^1H NMR スペクトルは AVANCE 500 MHz、AVANCE 400 MHz+Cryo スペクトロメーターを用いて測定した(Bruker, Kanagawa, Japan)。全ての反応は Silica Gel 60 F-254 を塗布した薄層クロマトプレートに anisaldehyde- H_2SO_4 を噴霧し、加熱することによって確認した(E. Merck, Darmstadt, Germany)。カラムクロマトグラフィーは Silica Gel 60N (40-50 μm , Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan) (63-210 μm , Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan)を用いて行った。

5.2.2 蛍光性シアル酸誘導体モノマーの合成

・ 6-azido-hexan-1-ol(**22**)

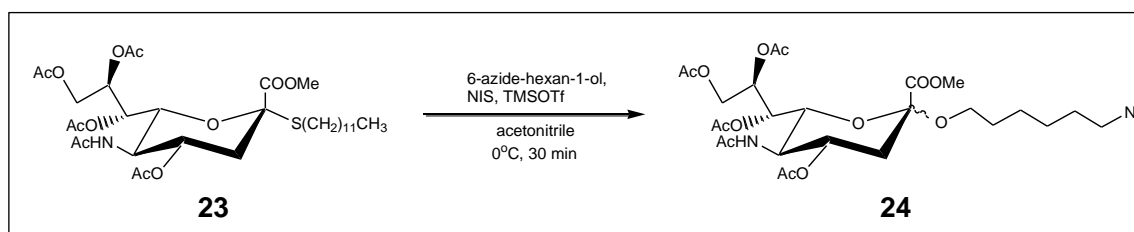


Sodium azide を氷冷した DMF に溶解し、6-chloro-hexan-1-ol (**21**) を滴下する。室温で一晩反応後、イオン交換水 20 mL を加えて反応を止め、chloroform で抽出を行った。シリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、目的化合物 (**22**)を得た (ethyl acetate : hexane=1 : 1)。

6-chloro-1-hexanol	sodiumazide	DMF	Yield
37 mmol	40 mmol		quant.
4.9 mL	2.6 g	80 mL	5.2 g

6-azido-1-hexanol (**22**); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1.41 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 4H), 1.61 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 4H), 3.27 (t, $J=14.00$ Hz, N_3-CH_2- , 2H), 3.66 (q, $J=6.5$, 11 Hz, $-\text{CH}_2-\text{OH}$, 2H).

• methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-(6-azidehexyl)-*D*-glycero-*D*-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**24**)



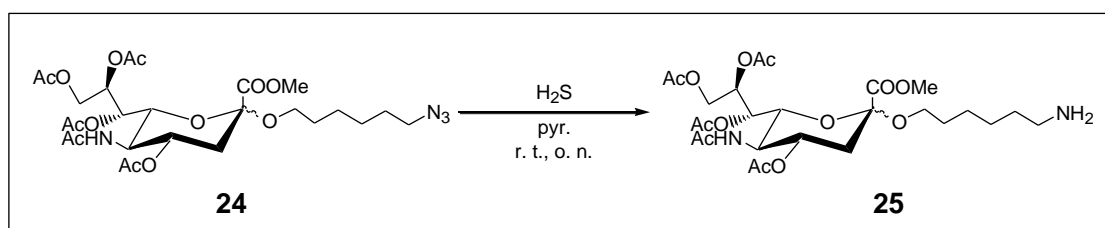
methyl (dodecyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio-*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosid)onate (**23**) と 6-azido-hexan-1-ol を acetonitrile に溶解し、 0°C に冷やした。*N*-iodosuccinimide(NIS)を反応溶液に溶解させ、trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate(TMSOTf)の acetonitrile 溶液を滴下した。反応終了後、chloroform で抽出し、カラムクロマトグラフィーを用いて精製した (toluene : ethyl acetate=1 : 2)。

23	6-azido-hexan-1-ol	NIS	TMSOTf	acetonitrile	Yield
16 mmol 11 g	8.1 mmol 1.2 g	32 mmol 7.3 g	1.6 mmol 293 μL	200 mL	4.2 g 83%

methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-(6-azidehexyl)-**D**-glycero- α -**D**-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**24 α**)
 ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1.37–1.42 (br, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 4H), 1.54–1.64 (br, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 4H), 1.88, 2.03, 2.04, 2.14, 2.15 (s, OAc, H3-ax, 16H), 2.58 (dd, $J=4.5$, 13 Hz, H3-eq, 1H), 3.27 (m, $-\text{OCH}_a\text{H}_b-$, 1H), 3.76 (m, $-\text{OCH}_a\text{H}_b-$, 1H), 3.80 (s, OMe, 3H), 4.10 (m, H-9a, H-5, H-6, 3H), 4.32 (dd, $J=3$, 12.5 Hz, H-9b, 1H), 4.85 (m, H-4, 1H), 5.19 (d, $J=9.5$ Hz, NHAc, 1H), 5.33 (dd, $J=2$, 8.5 Hz, H-7, 1H), 5.40 (m, H-8, 1H).

methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-(6-azidehexyl)-**D**-glycero- β -**D**-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**24 β**); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1.37–1.42 (br, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 4H), 1.54–1.64 (br, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 4H), 1.88, 2.03, 2.04, 2.14, 2.15 (s, OAc, H3-ax, 16H), 2.46 (dd, $J=5$, 13 Hz, H3-eq, 1H), 3.27 (m, $-\text{OCH}_a\text{H}_b-$, 1H), 3.76 (m, $-\text{OCH}_a\text{H}_b-$, 1H), 3.80 (s, OMe, 3H), 3.93 (dd, $J=2$, 10 Hz, H-6, 1H), 4.10 (m, H-9a, H-5, 2H), 4.32 (dd, $J=3$, 12.5 Hz, H-9b, 1H), 4.85 (m, H-4, 1H), 5.19 (d, $J=9.5$ Hz, NHAc, 1H), 5.33 (dd, $J=2$, 8.5 Hz, H-7, 1H), 5.40 (m, H-8, 1H).

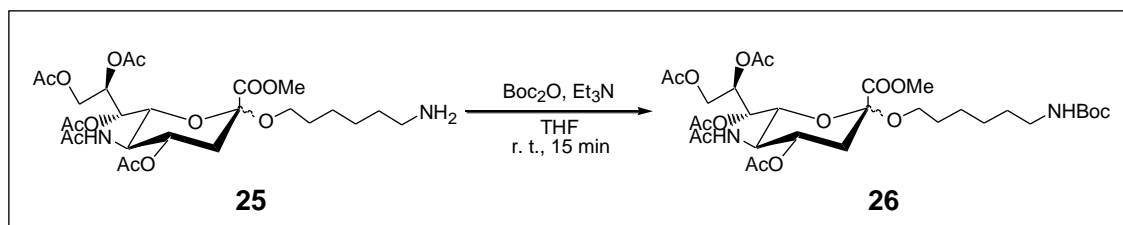
• methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-(6-aminohexyl)-**D**-glycero-**D**-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**25**)



methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-
 (6-azidehexyl)-**D**-glycero-**D**-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**24**)を pyridine
 に溶解し、triethylamine を加えた。hydrogen sulfide ガスを反応溶液に 1 時間
 通した。反応溶液のまま一晩静置し、濃縮した。

24	hydrogen sulfide	triethylamine	pyridine	Yield
2.7 mmol		95 mmol		quant.
1.7 g	1.0 h	13 mL	31 mL	1.5 g

• methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-
(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminoheptyl)-D-*glycero*-D-*galacto*-non-2-ulopyranos
ylonate (26)



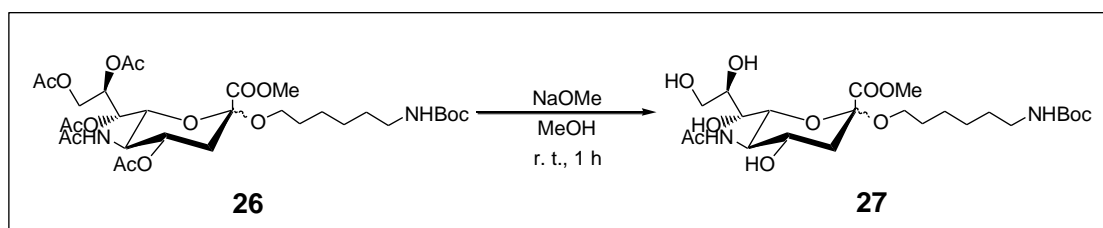
methy1 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-(6-aminohexyl)-**D**-glycero**D**-galacto-non-2-ulopyranosylonate (25) を tetrahydrofuran(THF)に溶解し、triethylamine を加えて 0°C まで冷やした。Di-*tert*-butyl dicarbonate、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP)を加え、室温で 15 分攪拌し、反応を終了した。chloroform で抽出を行い、シリカゲルクロマトグラフィーで精製した (ethyl acetate)。

25	di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate	DMAP	triethylamine	THF	Yield
3.5 mmol 2.0 g	17 mmol 3.7 g	0.90 mmol 0.11 g	8.8 mmol 2.4 mL	32 mL	34% 0.82 g

methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-
(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-**D**-*glycero*-**D**-*galacto*-non-2-ulopyranos
ylonate (**26**)

; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 1.30–1.64 (br, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, *tert*-Boc, 17H), 1.88, 2.01, 2.03, 2.07, 2.15 (s, OAc, H3-ax, 16H), 2.48 (dd, J=5, 13 Hz, H3-eq, 1H), 3.33 (m, -OCH_aH_b-, 1H), 3.50 (m, -OCH_aH_b-, 1H), 3.79 (s, OMe, 3H), 4.14 (m, H-5, H-6, H-9_a, 3H), 4.83 (d, J=3 Hz, NHAc, 1H), 5.23 (m, H-4, H-7 2H), 5.41 (m, H-7, 1H).

• methyl 5-acetamido-3,5-dideoxy-2-
(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-**D**-*glycero*-**D**-*galacto*-non-2-ulopyranos
ylonate (**27**)

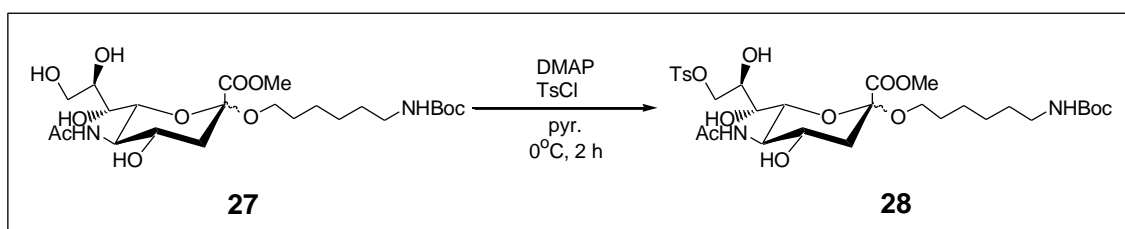


methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-
(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-**D**-*glycero*-**D**-*galacto*-non-2-ulopyranos
ylonate (**26**)を methanol に溶解し、sodium methoxide を加えた。室温で 1 時

間攪拌し、陽イオン交換樹脂を加えた。陽イオン交換樹脂をろ過によって取り除き、濃縮して目的化合物(27)を得た。

26	Sodium methoxide	methanol	Yield
0.54 mmol	0.18 mmol		quant.
0.37 g	9.5 mg	3.7 mL	0.3 g

• methyl 5-acetamido-9-*p*-toluenesulfonyl-3,5-dideoxy-2-
(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-D-*glycero*-α-D-*galacto*-non-2-ulopyran
osylonate (28)



methyly 5-acetamido-3,5-dideoxy-2-
(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminoheptyl)-D-*glycero*-D-*galacto*-non-2-ulopyranos
ylonate (27)を pyridine に溶解し、DMAP を加え 0°C まで冷却した。
p-toluenesulfonyl chloride を加え、0°C で 2 時間攪拌した。反応終了後、
chloroform で抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、目的化合
物(28)を得た (chloroform : methanol=10 : 1)。続いて、高速液体クロマトグ
ラフィー(HPLC)を用いて、 α 体と β 体に分けた (chloroform : methanol=10 : 1)。

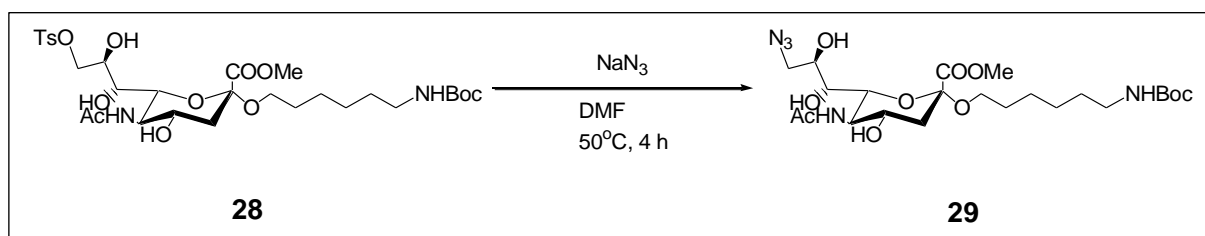
27	<i>p</i> -toluenesulfonyl chloride	DMAP	pyridine	Yield
0.51 mmol 0.29 g	0.68 mmol 0.13 g	0.049 mmol 6.0 mg	2.6 mL	29.0% α : β =1:1

methyl 5-acetamido-9-*p*-toluenesulfonyl-3,5-dideoxy-2-
(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-**D**-glycero- α -**D**-galacto-non-2-ulopyran
osylonate (**28 α**); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1.19–1.36, 1.36–1.56 (br,
-CH₂CH₂CH₂CH₂-, *tert*-Boc, 17H), 1.82 (t, J =2.4, H-3_{ax}, 1H), 2.04 (s, NHAc,
3H), 2.44 (s, CH₃-Ph-, 3H), 2.72 (dd, J =3.6, 12.4 Hz, H-3_{eq}, 1H), 3.07 (d, J =6
Hz, -CH₂-NH-CO-, 2H), 3.25 (q, J =3.6, 8.8 Hz, H-9_a, 1H), 3.45 (m, H-7, H-8,
2H), 3.71 (m, H-4, H-5, H-9_b, 3H), 3.83 (s, OMe, 3H), 4.05 (t, J =4 Hz, H-6, 1H),
4.18 (m, -O-CH_{2a}-, 1H), 4.32 (d, J =1.6 Hz, -O-CH_{2b}-, 1H), 7.36 (d, J =6.8 Hz,
p-Ph, 2H), 7.78 (d, J =6.8 Hz, *p*-Ph, 2H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz):
 δ 18.28, 21.58, 22.92, 25.48, 26.32, 28.37, 29.25, 29.79, 40.27, 40.44, 52.84, 53.18, 64.
07, 67.49, 68.38, 69.03, 71.94, 73.44, 79.07, 98.69, 127.92, 129.90, 132.43, 144.93, 156
.12, 169.85, 173.92.

methyl 5-acetamido-9-*p*-toluenesulfonyl-3,5-dideoxy-2-
(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-**D**-glycero- β -**D**-galacto-non-2-ulopyran
osylonate (**28 β**); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1.24–1.38, 1.38–1.60 (br,
-CH₂CH₂CH₂CH₂-, *tert*-Boc, 17H), 1.61 (t, J =1.8, H-3_{ax}, 1H), 2.05 (s, NHAc,
3H), 2.38-2.48 (br, CH₃-Ph-, H-3_{eq}, 4H), 3.05 (s, -CH₂-NH-CO-, 2H), 3.17 (q,
 J =0.8, 1.6 Hz, H-9_a, 1H), 3.50 (d, J =1.2 Hz, H-8, 1H), 3.61 (q, J =8, 12 Hz, H-9_b,
H-1), 3.70-3.83 (br, OMe, H-5, H-6, 5H), 4.10 (m, -O-CH_{2a}-, H-4, H-7, 3H), 4.40
(d, J =8 Hz, -O-CH_{2b}-, 1H), 7.31 (d, J =6.8 Hz, *p*-Ph, 2H), 7.82 (d, J =6.8 Hz,

p-Ph, 2H) ; ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz):
 δ 21.63, 23.00, 25.41, 26.06, 28.46, 29.11, 29.57, 40.27, 40.60, 52.63, 53.09, 63.25, 66.
 73, 68.33, 68.74, 70.95, 73.26, 79.35, 98.60, 128.01, 129.99, 132.36, 145.07,
 156.38, 169.06, 173.73.

• methyl 5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxy-2-
 (*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyran
 osylonate (**29**)



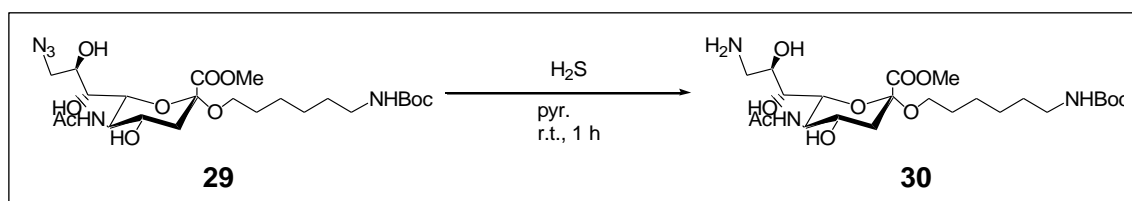
methyl 5-acetamido-9-*p*-toluenesulfonyl- 3,5-dideoxy-2-
 (*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyran
 osylonate (**28**)を DMF に溶解し、0°C まで冷却した。Sodium azide を加え、0°C
 で 4 時間攪拌した。反応終了後、chloroform で抽出し、シリカゲルクロマトグ
 ラフィーにより精製し、目的化合物(**29**)を得た (chloroform : methanol=6 : 1)。

28	sodium azide	DMF	Yield
0.070 mmol	0.21 mmol		quant.
0.050 g	13 mg	1.3 mL	0.040 g

methyl 5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxy-2-
 (*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyran

osylonate (**29 α**); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1.20–1.38, 1.38–1.54 (br, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, *tert*-Boc, 17H), 1.88 (t, $J=2.4$, H-3_{ax}, 1H), 2.04 (s, NHAc, 3H), 2.75 (dd, $J=3.6$, 12.4 Hz, H-3_{eq}, 1H), 3.01–3.13 (br, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$, 2H), 3.28 (q, $J=6.8$, 15.6 Hz, H-9_a, 1H), 3.42 (m, H-6, 1H), 3.62 (m, H-4, H-8, 2H), 3.95 (m, H-9_b, 1H), 3.83 (s, OMe, 3H), 3.93 (d, $J=3.2$ Hz, H-7, 1H), 4.05 (m, H-5, 1H), 4.28 (m, $-\text{O}-\text{CH}_{2a}-$, 1H), 4.72 (m, $-\text{O}-\text{CH}_{2b}-$, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 22.92, 25.50, 26.36, 28.39, 29.30, 29.86, 40.12, 40.49, 53.09, 53.26, 53.76, 64.06, 67.68, 69.55, 70.68, 73.94, 78.97, 98.75, 156.11, 162.65, 170.11, 173.74.

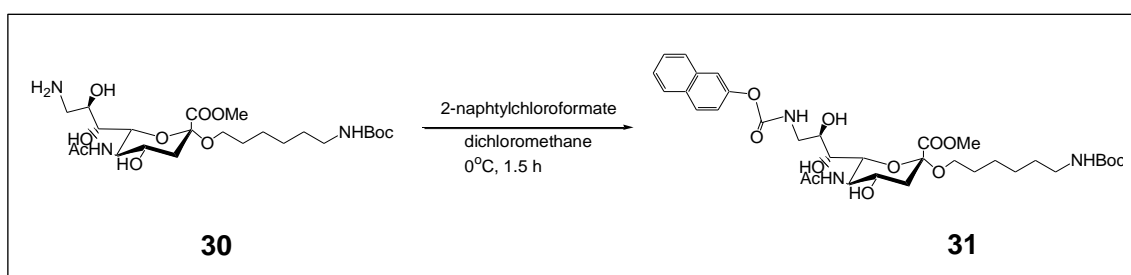
• methyl 5-acetamido-9-amino-3,5,9-trideoxy-2-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**30**)



methyl 5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxy-2-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**29**)を pyridine に溶解し、triethylamine を加えた。Hydrogen sulfide ガスを反応溶液に 1 時間通した。反応溶液のまま一晩静置し、濃縮した。

29	hydrogen sulfide	triethylamine	pyridine	Yield
0.070 mmol		0.28 mmol		quant.
0.040 g	1.0 h	39 mL	1.0 mL	0.040 g

• methyl 5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**31**)



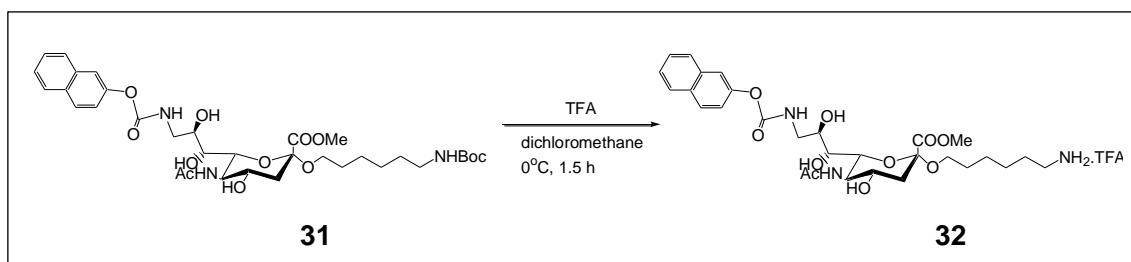
methyl 5-acetamido-9-amino-3,5,9-trideoxy-2-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**30**)を dichloromethane に溶解し、0°C まで冷却した。2-Naphthoyl chloride と triethylamine を加え、0°C で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、methanol でクエンチし、chloroform で抽出した。その後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、目的化合物(**31**)を得た (chloroform : methanol=6 : 1)。

30	2-naphthoyl chloride	triethylamine	dichloro methane	Yield
0.13 mmol		0.28 mmol		78%
0.070 g	37 mg	57 mL	3.8 mL	0.070 g

methyl 5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-(*N-tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-*D-glycero-α-D-galacto*-non-2-ulopyranosylonate (**31α**); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 1.20–1.38, 1.38–1.54 (br, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, *tert*-Boc, 17H), 1.89 (t, J=6.0, H-3_{ax}, 1H), 2.00 (s, NHAc, 3H), 2.74 (dd, J=4.4, 12.8 Hz, H-3_{eq}, 1H), 2.96-3.14 (br, -CH₂-NH-CO-, 2H), 3.27 (m, H-9_a, 1H), 3.53 (d, J=9.6 Hz, H-7, 1H), 3.60 (d, J=12 Hz, H-4, 1H), 3.71 (m, H-6, H-8, H-9_b, 3H), 3.79 (s, OMe, 3H), 4.07 (m, H-5, 1H), 4.34 (m, -O-CH_{2a}-, 1H), 4.72 (m, -O-CH_{2b}-, 1H), 7.53 (m, naphthyl, 2H), 7.86 (m, naphthyl, 3H), 8.33 (s, naphthyl, 1H), 8.60 (s, naphthyl, 1H); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz):

δ 22.92, 25.40, 26.34, 28.10, 29.30, 29.67, 40.28, 40.47, 43.99, 52.23, 53.24, 53.40, 58.20, 64.09, 67.78, 70.31, 71.22, 73.63, 79.10, 98.90, 125.52, 126.54, 129.40, 131.33, 132.60, 134.76, 135.52, 156.17, 168.47, 170.07, 173.92.

• methyl 5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-(6-aminohexyl)-*D-glycero-α-D-galacto*-non-2-ulopyranosylonic trifluoroacetic salt (**32**)

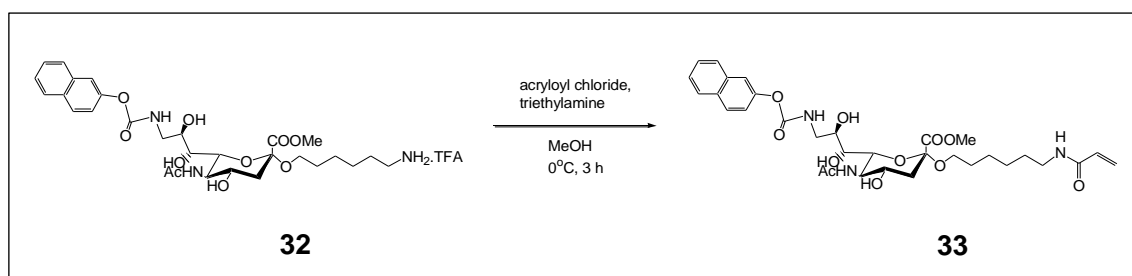


methyl 5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-(*N-tert*-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-*D-glycero-α-D-galacto*-non-2-ulopyranosylonate (**31**)を dichloroethane に溶解し、0°C まで冷却した。Trifluoroacetic

acid を加え、0°C で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、methanol を加え、濃縮し、目的化合物(32)を得た。

31	Trifluoroacetic acid	dichloromethane	Yield
0.10 mmol	0.010 mmol		quant.
0.070 g	1.1 mL	3.8 mL	

• methyl 5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-
(*N*-acryloylaminohexylamino)-**D**-glycero- α -**D**-galacto-non-2-ulopyranosylonate
(**33**)

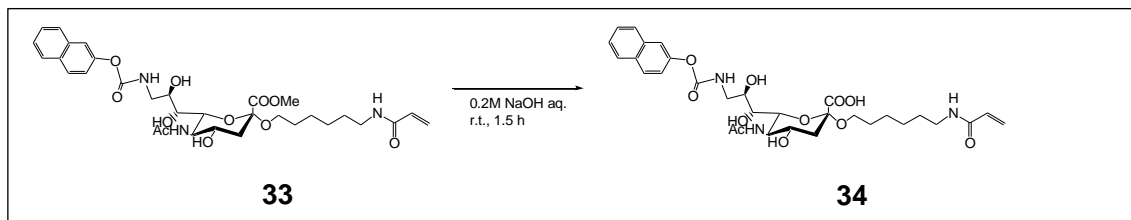


methy 5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-
(6-aminohexyl)-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosylonic trifluoroacetic
salt (32)を methanol に溶解し、0°C まで冷却した。Triethylamine、acryloyl
chloride を加え、0°C で 3 時間攪拌した。反応終了後、chloroform で抽出、濃
縮した。その後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、目的化合物(33)
を得た (chloroform : methanol=6 : 1)。

32	triethylamine	acryloyl chloride	methanol	Yield
0.10 mmol	0.81 mmol	0.87 mmol		60%
70 mg	1.1 mL	70 μ L	14 mL	40 mg

methyl 5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-(*N*-acryloylaminohexylamino)-**D**-glycero- α -**D**-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**33a**); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1.32 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 8H), 1.77 (t, $J=12.0$, $\text{H}-3_{\text{ax}}$, 1H), 1.99 (s, NHAc , 3H), 2.68 (dd, $J=4.4$, 12.8 Hz, $\text{H}-3_{\text{eq}}$, 1H), 3.17-3.18 (br, $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$, 2H), 3.32 (m, $\text{H}-9_{\text{a}}$, 1H), 3.51 (d, $J=8$ Hz, $\text{H}-7$, 1H), 3.65 (m, $\text{H}-4$, $\text{H}-6$, $\text{H}-8$, $\text{H}-9_{\text{b}}$, 4H), 3.84 (s, OMe , 3H), 4.08 (m, $\text{H}-5$, 1H), 5.62 (dd, $J=4.4$, 5.2 Hz, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, 1H), 6.20 (m, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, 2H), 7.58 (m, naphthyl, 2H), 7.94 (m, naphthyl, 3H), 8.40 (s, naphthyl, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 22.91, 26.71, 27.68, 30.23, 30.60, 40.48, 40.60, 45.04, 53.52, 53.92, 54.01, 58.45, 65.32, 68.58, 71.16, 72.12, 74.71, 100.40, 124.90, 126.72, 128.84, 128.89, 128.95, 129.46, 130.10, 132.09, 132.83, 134.07, 136.28, 168.26, 171.20.

• 5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-(*N*-acryloylaminohexylamino)-**D**-glycero- α -**D**-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**34**)



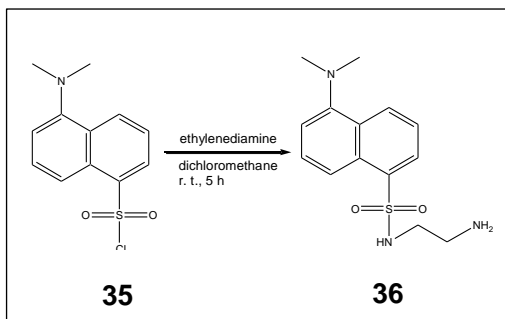
methyle 5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-(*N*-acryloylaminohexylamino)-**D**-glycero- α -**D**-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**33**)を 0.2M の sodium hydroxide aq.に溶解し、1.5 h 攪拌した。反応終了後、イオン交換樹脂で中和し、目的化合物 (**34**) を得た。

33	0.2M sodium hydroxide aq.	Yield
0.060 mmol		quant.
40 mg	1.5 mL	

5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-(*N*-acryloylaminohexylamino)-**D**-glycero- α -**D**-galacto-non-2-ulopyranosylonate (**34a**); ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ 1.31 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 8H), 1.77 (t, $J=12.4$, $\text{H}-3_{\text{ax}}$, 1H), 2.01 (s, NHAc , 3H), 2.71 (dd, $J=4.4$, 12.4 Hz, $\text{H}-3_{\text{aq}}$, 1H), 3.18 (m, $-\text{CH}_2\text{NHCO}-$, 2H), 3.32 (m, $\text{H}-9_{\text{a}}$, 1H), 3.54 (d, $J=6.8$ Hz, $\text{H}-7$, 1H), 3.65 (m, $\text{H}-9_{\text{b}}$, 1H), 3.83 (m, $\text{H}-4$, $\text{H}-6$, $\text{H}-8$, 3H), 4.07 (m, $\text{H}-5$, 1H), 5.66 (dd, $J=2.8$, 12.0 Hz, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, 1H), 6.20 (m, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, 2H), 7.60 (m, naphthyl, 2H), 7.95 (m, naphthyl, 3H), 8.40 (s, naphthyl, 1H); ^{13}C NMR(CD_3OD , 100 MHz): δ 22.98, 26.60, 27.58, 30.09, 30.52, 40.51, 40.64, 41.60, 44.79, 44.92, 53.89, 53.97, 65.46, 68.88, 71.51, 72.08, 74.64, 100.38, 124.84, 127.18, 128.12, 128.87, 128.94, 129.14, 129.60, 130.15, 131.91, 131.96, 132.69, 134.02, 136.29, 168.69, 171.09, 172.54.

5.2.3 ダンシル誘導体モノマーの合成

・ 2-dansylamino-ethylamine (**36**)

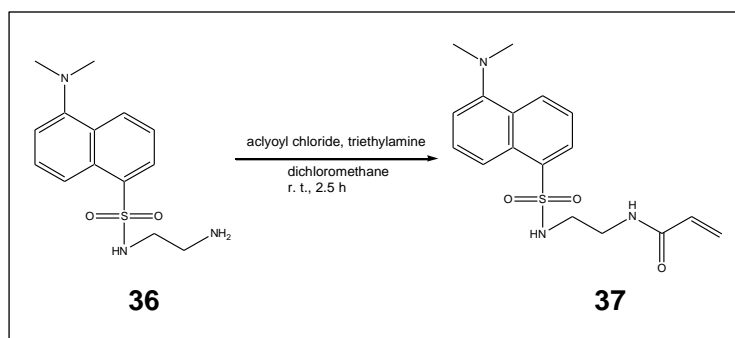


Ethylenediamine を dichloromethane に溶解し、0°C まで冷却した。Dansyl chloride (**35**) の dichloromethane 溶液を滴下し、室温で 5 h 攪拌した。1M hydrochloric acid aq.を加え、chloroform で抽出後、濃縮し、目的化合物 (**36**) を得た。

35	ethylenediamine	dichloromethane	Yield
7.4 mmol	339 mmol		—
2.0 g	22 mL	280 mL	—

2-dansylamino-ethylamine (**36**); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 2.70 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2H), 2.90 (s, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, 6H), 2.91 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2H), 7.20 (d, $J=7.2$ Hz, ArH , 1H), 7.53 (dd, $J=8.4$, 7.2 Hz, ArH , 1H), 8.26 (d, $J=7.2$ Hz, ArH , 1H), 8.31 (d, $J=8.4$ Hz, ArH , 1H), 8.55 (d, $J=8.4$ Hz, ArH , 1H).

• dansylaminoethyl-acrylamide (**37**)

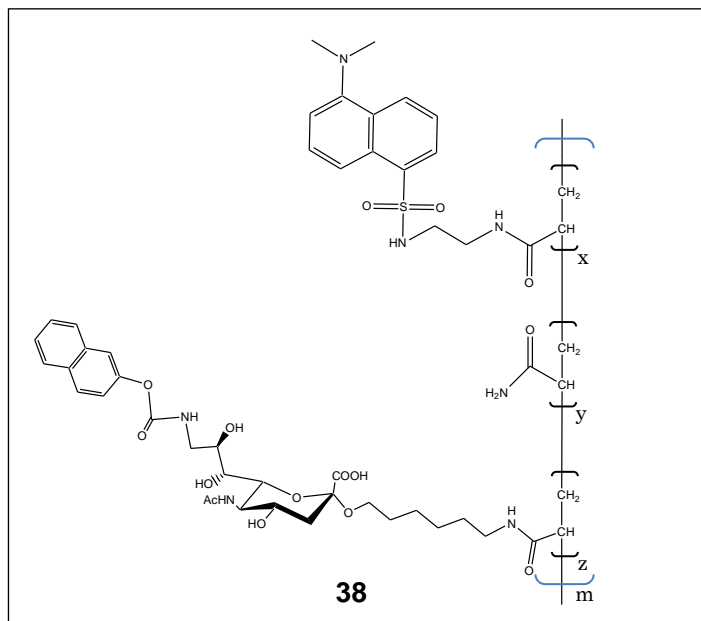


2-dansylamino-ethylamine (**36**) と triethylamine を dichloromethane に溶解し、0°C まで冷却した。Acryloyl chloride の dichloromethane 溶液を滴下し、室温で 2.5 h 攪拌した。chloroform で抽出後、濃縮した。その後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、目的化合物(**37**)を得た (ethylacetate:toluene = 1 : 1)。

36	acryloyl chloride	triethylamine	dichloromethane	Yield (2 steps)
7.4 mmol	8.3 mmol	8.3 mmol		37%
2.3 g	0.67 mL	1.2 mL	57 mL	0.95 g

2-dansylamino-ethylamine (**37**); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 2.36 (s, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, 6H), 3.07 (s, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}-$, 2H), 3.36 (s, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}-$, 2H), 5.45 (d, $J=11.1$ Hz, $-\text{COCH}=\text{CH}_2$, 1H), 5.95 (m, $-\text{COCH}=\text{CH}_2$, 1H), 6.12 (dd, $J=17.4$ Hz, $-\text{COCH}=\text{CH}_2$), 7.08 (d, $J=7.6$ Hz, ArH , 1H), 7.43 (m, ArH , 2H), 8.25 (m, ArH , 2H), 8.55 (d, $J=8.5$ Hz, ArH , 1H).

5.2.4 蛍光性シアル酸誘導体モノマーとダンシル誘導体モノマーから成るコポリマーの作成



蛍光性シアル酸誘導体 (34)、ダンシル誘導体 (37)、acrylamide を 20% DMSO-Milli Q (1.3 mL)に溶解させ、30 分減圧してアルゴン置換した。N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (31 μ L, 211 μ mol)と 10% ammonium persulfate aq.(241 μ L, 106 μ mol)を添加し、2 晩撹拌した。反応終了後、1 晩透析の後、凍結乾燥を行い、目的化合物 (38) を得た。

Monomer ratio (x:y:z)	Composition (x:y:z)	Yield
0.1:10:1	0.1:10:1	67%

5.2.5 蛍光性シアル酸誘導体が Neuraminidase 基質であるかの確認

○酵素の性質

酵素：Neuraminidase

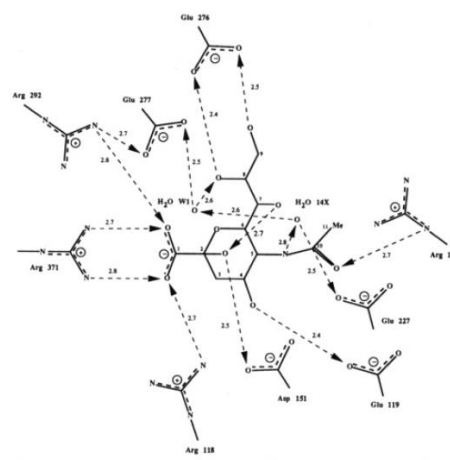
起源：Arthrobacter ureafaciens

基質特異性：シアル酸の α (2-3)、 α (2-6)、 α (2-8)

5-acetamido-9-(2-naphthoylamido)-3,5,9-trideoxy-2-(*N*-acryloylaminohexylamino)-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosylonate (34) を 0.20M Sodiumasetate 緩衝溶液 (pH 5.0) (150 μ L) に溶解したエッペンチューブを 2 つ作成した。片方に、neuraminidase を 0.10 u 加え、37°C で 24 h 加温した。

5.3 結果と考察

シアル酸はインフルエンザウイルスのシアリダーゼと下記のように相互作用していることが分かっている(38)。1 位のカルボキシレートは Arg 371 と塩橋でよく結合しており、Arg 118、Arg 292 とは電荷-電荷相互作用、バルク溶



媒とは部分的に水素結合している。2 位のヒドロキシル基は Asp 151 ときわめて弱く水素結合している。4 位のヒドロキシル基は Glu 119 と水素結合している。5 位カルボニル基中の酸素原子は Arg 152 と水素結合している。7 位のヒドロキシル基は活性部位の外に位置し、シアリダーゼと直接水素結合を形成していない。8 位と 9 位のヒドロキシル基は

Figure 29. シアル酸とインフルエンザウイルスシアリダーゼとの相互作用(38)

ネガティブチャージした Glu 276 (-) と二座の相互作用をしており、8 位のヒドロキシル基は、さらに構造水と水素結合し、アセトアミドの水素原子と構造水は水素結合しており、炭素原子は Trp178、Ile 222 の近くに位置している。アセトアミドのカルボニル酸素と Arg152 は水素結合しており、バルク溶媒とも部分的に水素結合している。ピラノース環上の酸素原子はわずかに Arg292 と電荷-双極子相互作用している。2 位、4 位、7 位、9 位のヒドロキシル基は活性部位のアミノ酸残基よりもバルク溶媒の水素原子と強く水素結合している。この先行研究を受けて、シアル酸を修飾すべき場所はインフルエンザウイルスシアリダーゼと相互作用の弱い 3 位や 7 位のヒドロキシル基であるが、5 章では 2 位に重合基、9 位に蛍光基を導入した。それぞれの部位が修飾しやすい部分であったのと同時に、シアリダーゼとの結合エンタルロピーが低く、酵素反応過程において 2 位と 9 位は重要ではないという報告があるからだ。

酵素反応が起こるメカニズムは①酵素と基質が結合する、②触媒反応が起こる、③触媒作用を受けた基質が酵素から離れると進行する。シアリダーゼとシアル酸が結合するのに関与するのはシアル酸の 1 位のカルボキシレート、ピラノース環上の酸素原子、2 位と 3 位のヒドロキシル基である。溶液中で Arg 118、Arg 292、Arg 371 がシアル酸に近づくと、カルボキ

シレートがアキシャルから疑似エクアトリアルに電荷-電荷相互作用によって替わり、シアロシドが活性化される⁽¹⁷⁾。触媒反応は酸性残基の Glu 35 がプロトンを与えて、2 位と Asp 52 がグリコシルカチオン中間体を安定化させることで起こる⁽³⁹⁾。これらの先行研究から 9 位のヒドロキシル基を修飾しても酵



- ① 蛍光性シアル酸誘導体
+sodiumasetate 緩衝溶液
- ① 蛍光性シアル酸誘導体
+sodiumasetate 緩衝溶液
+Neuraminidase

Figure 30. 蛍光性シアル酸誘導体に Neuraminidase を作用させた TLC.
(展開溶媒 chloroform:methanol=5:1)

素反応に影響が出ないのではないかと示唆された。さらに、インフルエンザウイルスの持つシアリダーゼは糖タンパク質、糖脂質、オリゴ糖鎖から末端 α -ケトシド結合したシアル酸を遊離させるので^{(38)·(40)}、2位の修飾は酵素活性に影響しないと思われた。

蛍光性シアル酸誘導体モノマーが Neuraminidase の基質になりえるかを確認した。その結果、蛍光性シアル酸誘導体モノマー**(34)**に Neuraminidase を 24 h 作用させると、蛍光性シアル酸誘導体モノマー**(34)**のスポットが消失した。これは、蛍光性シアル酸誘導体モノマーの蛍光性シアル酸誘導体部位が neuraminidase によって加水分解され、遊離したことを示している。

6. 総括

緒言では、機能性高分子の定義 (PAC, 2004, 76, 889) に基づき、フッ素化された側鎖を持ち、その特徴的な性質から物理的・化学的・生物学的に利用されているフッ素化ポリマーの研究と生理活性糖鎖誘導体をエピトープとしてペンダントトップに配置した高分子の研究について述べた。その前提として、生理活性糖鎖の細胞による糖鎖伸長反応を検討し、最後に双方の機能を発現する高分子の作成に取り組んだことについても記述した。

2章では合成が難しいとされる Sialyl LacNAc 誘導体を効率的に得る方法について研究を行った。Sialyl LacNAc は有機合成・酵素合成によって得ることができるが、有機合成では官能基の保護・脱保護を繰り返す複雑な合成になり、酵素合成では必要な酵素の取り扱いが難しい場合がある。糖鎖を得る別の方法として、簡単なモノアルキルグリコシドを合成し、それを細胞に投与することで、細胞の持つ糖鎖伸長機構によって糖鎖を伸長させる“糖鎖プライマー法”がある。2章では糖鎖プライマー法で用いる細胞に投与するモノアルキルグリコシドの構造を最適化し、従来の1.5倍の糖鎖伸長生成物を得ることが可能になった研究について述べた。

3章では糖鎖プライマー法によって得られた糖鎖伸長生成物を用いて、Sialyl LacNAc 誘導体ペンダントポリマーの作成を行った。シアル酸はインフルエンザウイルス等の感染と深くかかわっていることが知られており、Sialyl LacNAc 誘導体ペンダントポリマーはインフルエンザ診断材料としての応用が考えられる。

4章ではフッ素化ポリマーの合成とぬれ性の評価について述べた。3章で作成した Sialyl LacNAc ポリマーをインフルエンザの診断材料として用いる場合、酵素を基質に特異的に相互作用させるためには高分子主鎖と糖鎖部分をつなぐリンカーの物性が重要である。ぬれ性を測定し、固体の臨界表面張力を計算により導き出すことで、どのようなポリマー表面がポリマー表面の付着物量を減らすことができるのか予測しようと試みた。その結果、F-alkyl ポリマーの臨界表面張力は 7 mNm^{-1} で、これまでに報告されている中で最も低い臨界表面張力を示

した。このことから、F-alkylポリマーはさまざまな付着物を防ぐことができると考えられ、インフルエンザの診断材料への利用の可能性が示唆された。F-TEGポリマーの臨界表面張力は 18 mNm^{-1} で、PTFEと同等であった。PTFEは金属やポリマー表面にコートされフッ素化ポリマー特有の性質を発揮しているが、不溶性の物質であり、加工が難しい。一方、同等の臨界表面張力を持つF-TEGポリマーはNovecTM7100のようなフッ素化された溶媒に溶解することできるため、取扱いが容易であり、PTFEと同等の性質をPTFEよりも簡単に実現可能であると期待された。

5章ではインフルエンザ診断材料への応用を目指して、蛍光性シアル酸誘導体コポリマーの作成について記述した。さらに、作成された蛍光性シアル酸誘導体コポリマー中の蛍光性シアル酸誘導体はインフルエンザウイルスの持つノイラミニダーゼの基質となりえることが分かった。

以上のように、本論文では機能性高分子の合成と物性の評価を行った。今後、本研究で明らかになった高分子の興味深い機能を使った新しい材料として、社会に貢献していくことが期待される。

7. 参考文献

- (1) Sato, T.; Hatanaka, K.; Hashimoto, H.; Yamagata, T. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. **2007**, 19, 1-17.
- (2) Cao, S. D.; Roy, R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3421-3424.
- (3) Shimizu, H.; Watanabe, S.; Kawakami, C.; Hirai, Y.; Mitamura, K.; Sugaya, N.; Imai, M. *Kansenshogakkaishi*. **2000**, 74, 1038-1043.
- (4) Mitamura, K.; Yamazaki, M.; Kimura, K.; Sugaya, N.; Nirasawa, M.; Takahashi, K.; Shimizu, H.; Hirai, Y.; Watanabe, S.; Imai, M. *Kansenshogakkaishi*. **2000**, 74, 12-16.
- (5) Forster, T. *Ann. Phys.* **1948**, 2, 55-75.
- (6) Lee, Y. C. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. **2010**, 22, 95-106.
- (7) Kamitakahara, H.; Suzuki, T.; Nishigori, N.; Suzuki, Y.; Kanie, O.; Wong, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1524-1528.
- (8) Hakomori, S. *Sci. Am.* **1986**, 254, 44-53.
- (9) THE CELL third edition.
- (10) Nakajima, H.; Miura, Y.; Yamagata, T. *J. Biochem.* **1998**, 124, 148-156.
- (11) Miura, Y.; Yamagata, T. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1997**, 241, 698-703.
- (12) Zemlyakov, A. E.; Tsikalova, V. N. ; Tsikalov, V. V. ; Chirva, V. Y. ; Mulik, E. L. ; Kalyuzhin, O. V. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. **2006**, 32, 382-388.
- (13) Nishimura, S.; Matsuoka, K.; Furuike, T.; Ishii, S.; Kurita, K.; Nishimura, K. *Macromolecules*. **1991**, 24, 4236-4241.
- (14) Daniotti, L. J.; Iglesias-Bartolome, R. *IUBMB Life*. **2011**, 63, 513-520.
- (15) Ajit. Varki, *Glycobiology*. **1993**, 3, 97.

- (16) S. Hakomori, *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 733.
- (17) Y. C. Lee, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2010**, *22*, 95.
- (18) S. Hakomori, *Glycoconj. J.* **2000**, *17*, 143.
- (19) D. J. Miller and R. L. Ax. *Molecular Reproduction and Development.* **1990**, *26*, 184.
- (20) Plunkett, R. J. US2230654 A **1941**
- (21) Fox, H. W.; Zisman, W. A. *J. Colloid Sci.* **1952**, *7*, 428-442.
- (22) Vicente, C. M. S.; Andre, P. S.; Ferreira, R. A. S. *Rev. Bras. Ensino Fis.* **2012**, *34*, 3312-1-3312-5.
- (23) Hejda, F.; Solar, P.; Kousal J. *WDS '10 Proceedings of Contributed Papers. Part III*, **2010**, 25-30.
- (24) Curtis, A. S. G.; Forrester, J. V.; McInnes, C.; Lawrie, F. *J. Cell. Biol.* **1983**, *97*, 1500-1506.
- (25) Pan, C. J.; Hou, Y. H.; Zhang, B. B.; Dong, Y. X.; Ding, H. Y. *J. Mater. Chem. B.* **2014**, *2*, 892-902.
- (26) Souzy, R.; Ameduri, B. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 644-687.
- (27) Kostov, G.; Ameduri, B.; Sergeeva, T.; Dolbier, W. R.; Jr. Winter, R.; Gard, G. L. *Macromolecules.* **2005**, *38*, 8316-8326.
- (28) Im, J. S.; Lee, S. K.; In, S. J.; Lee, Y. S. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **2010**, *89*, 225-232.
- (29) Nagendra, S. B.; Sidharam, P. P.; Cees, J. M. van R.; Han, Z. *Langmuir.* **2014**, *30*, 12532-12540.
- (30) Hougham, H.; Cassidy, P. E.; Johns, K.; Davidson, T. *Fluoropolymers*; Kluwer Academic/Plenum, U.S.A., 1999
- (31) Tingting, Y.; Li, Y.; Hui, P.; Shiyuan, C.; In, J. P. *J. Fluor. Chem.*, **2006**, *127*, 1105-1110.
- (32) The example of similar polymer to Fluoroethylene glycol polymer was prepared by Sano S (WO2011010676 (2011)).
- (33) Jahangir, A. R.; McClung, W. G.; Cornrlus, R. M.; McCloskey, C. B.; Brash, J. L.; Santerre, J. P. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 135-147.
- (34) Horvath, T. I.; Rabai, J. *Science* **1994**, *266*, 72-75.
- (35) Yuan, Y. Contact Angle and Wetting Properties.; Springer, 2013.
- (36) Fox, H. W.; Zisman, W. A. **1950**, *5*, 514-531.
- (37) Paynter, R. W.; Ratner, B. D.; Horbett, T. A.; Thomas, H. R. *J. Colloid. Interface Sci.* **1984**, *101*, 233-245.

- (38) Taylor, N. R.; Itzstein, M. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 616-624.
- (39) Klenk, E.; Faillard, H.; Lempfrid, H. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1958**, 301, 235-246.
- (40) Gottschalk, A. *Biochem. Biophys. Acta.* **1957**, 23, 645-646.

8. 投稿論文リスト

• Tamami Kimura^{1,2}, Maria Carmelita Z. Kasuya¹, Kenichi Hatanaka^{1*} and Koji Matsuoka², Chemistry and Biodiversity, **12**, 239-247, 2015.

• T. Kimura, M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka, and K. Matsuoka., Molecules, **21**, doi: 10.3390, 2016.

9. 謝辭

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご指導を頂きました松岡浩司教授、小山哲夫博士をはじめとする埼玉大学科学分析支援センターの皆様、松岡研究室の皆様に心より感謝いたします。また、様々な場面でご指導を承りました東京大学生産技術研究所 畑中研一教授、粕谷マリアカルメリタ助教、奥山光一技術員へ心より御礼申し上げます。