糖鎖高分子を用いた人工抗体の開発

三 浦 佳 子*

Development of Artificial Antibody by Glycopolymers

Yoshiko MIURA*

Glycopolymers, having saccharide at the sidechain, are bio-functional polymers that specifically recognize sugar recognition proteins. The glycopolymers were synthesized by RAFT living radical polymerization. When the block polymer was precisely designed, only the glycopolymers, which bound to the multiple sugar recognition sites, exhibited the strong interactions based on the multivalent effects. It was suggested that if the block polymer can be designed to fit the sugar recognition proteins, it is possible to design molecular recognition by sequence-controlled macromolecules such as proteins and nucleic acids.

1．イントロダクション

近年盛んに開発されるようになった薬剤は抗体やタンパク質などの生体高分子である。高分子による薬剤は、病原体であるタンパク質を効果的に捕えることができ、低分子の薬剤では治療効果が薄かった、癌やリュウマチなどの疾患についても高い治療効果を発揮することができる。低分子薬剤と高分子薬剤の違いは、高分子が作る大きな反応場であり、タンパク質全体を捕えることができる。高分子薬剤では、水素結合、静電相互作用、疎水性相互作用などの弱い相互作用を組み合わせることで、特異的で強い分子認識を達成する。こうした薬剤は抗体、タンパク質、多糖などの生体高分子に限られている。一方で、強くて特異的な分子認識で重要なのは高分子による大きな反応場である、そのため、タンパク質や抗体のような生体“高分子”である必要はなく、合成”高分子”であっても良いに違いない。

生体高分子と合成高分子で一番異なるのは、官能基の精密な配置を達成する精密な構造を達成できるかであり、それにより、弱い相互作用の特異的な集積が起こせるかである。天然の高分子は官能基を精密に配置させて特異的に分子認識している。一方で合成高分子を考えると、同じ高分子であるが、その組成は一般的にシンプルなもので、生体高分子のように複雑な官能基の提示はこれまで達成できていなかった。それゆえ、もし合成高分子をタンパク質、核酸、多糖といった、生体高分子のように精密なシーケンス配列をすることができれば、天然高分子と同じように優れた分子認識を達成することが可能になると思われる。合成高分子を精密な高分子に導く重合法としてリビング重合法がある。リビング重合では、タンパク質、抗体のようにシーケンスを制御した高分子の合成が可能になる。

本研究では、生体分子のリガンドである糖を側鎖に配置した糖鎖高分子をリビングラジカル重合によって精密に重合することで、タンパク質を効率的に捕える材料の開発を行う。糖鎖高分子では、糖鎖（リガンド）とタンパク質のレセプター部位が、多点的に結合して多価効果を発揮することこれまでも知られてきた。しかしながら、これまでに検討されてきた、その多くは、フリーラジカル重合によって得られた高分子であって、糖鎖とレセプタータンパク質の相互作用を効果的に制御できていなかった。

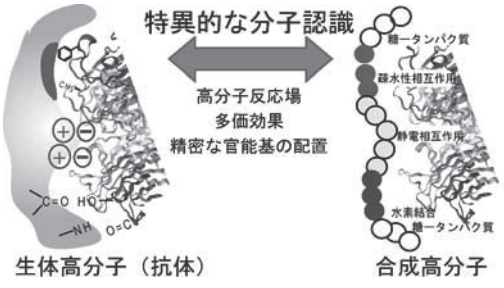

図１高分子のタンパク質の分子認識の仕組み

糖鎖高分子のリビングラジカル重合による設計では重合性糖鎖モノマーが嵩高く、重合特性に劣ることが、分子設計の上で問題となっていた。本研究では嵩高い、モノマーをも重合可能にする、リビングラジカル重合法である、可逆的付加開裂連鎖移動（RAFT）剤を利用し、糖鎖モノマーについてはポストクリックケミストリーを利用することで、糖鎖高分子のマルチブロック高分子の設計と合成を可能にした。[1]本研究では、リビングラジカル重合を駆使した、糖鎖高分子マルチブロック重合による、生体機能性高分子の設計について、検討を行った。

2018年3月28日 受理
* 豊田理研スカラー
九州大学大学院工学研究院化学工学部門

２．糖鎖高分子ブロック重合による、分子認識能の設計[2]

図２に示すような、糖鎖高分子の設計、合成を行った。プロパルギルメタクリレート（PrMA）、トリエチレングリコールメタクリレート（TEGMA）を RAFT リビングラジカル重合によって、重合し、アジドマンノース(Man)を Huisgen 反応によって付加することで、糖鎖高分子を得た。糖鎖高分子は分子鎖長を 25，50，100，140 量体と変化させて合成した。糖鎖の分布について、TEGMA（糖が結合しないモノマー）との共重合体によって調製した。糖鎖高分子については、マンノース認識タンパク質である、コンカナバリン A （ConA)との結合については、蛍光法、赤血球凝集阻害試験によって解析した。また、高分子の分子鎖については、動的光散乱による実測と、半経験的フローリーモデルによる分子鎖長の解析を行った。

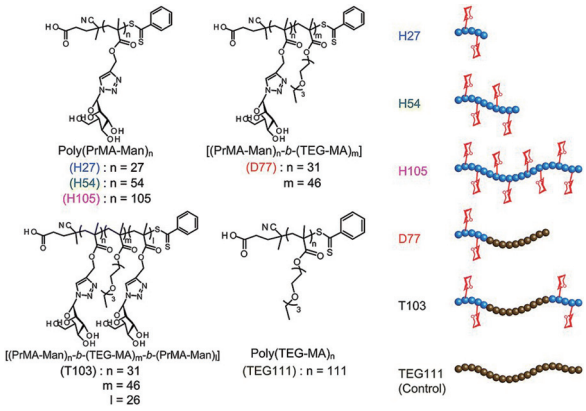

図２　RAFT リビングラジカル重合によって合成した、糖鎖高分子ブロックポリマー

ConA は糖鎖結合サイトが４つある、4 量体タンパク質であり、糖鎖結合サイト間の距離は 6.5nm と離れている。糖鎖の結合サイトに上手く適合するように、糖鎖ブロックを設計し、分子認識能力のデザインを行った。ホモポリマーの分子認識では、25，50 量体は 6.5nm 以下で、100 量体以上になると分子鎖長が 7nm 程度になる。これらの分子認識能について、結合定数を比較すると、100 量体になると結合定数が急激に上昇して 106M-1 オーダーとなるが、25、50 量体では殆どないことがわかった。一方で、ブロックポリマーについては 100 量体の長さがあっても、Poly(Man50-co-TEG50 MA)の結合定数は 25、50 量体とほぼ同程度であった。これは ConA のマンノースレセプター２箇所に対して結合すると多点的な相互作用を発揮して、強く結合することに起因する。一方で、糖鎖高分子部位が末端２箇所に存在するような高分子、Poly(Man25-TEG50-Man25)野結合定数は、ホモポリマー100 量体とほぼ同等で、強く 106M-1 であった。高分子は、TEG の立体障害によって、一分子ずつ存在しており、設計通りの分子認識能を発揮していることがわかった。

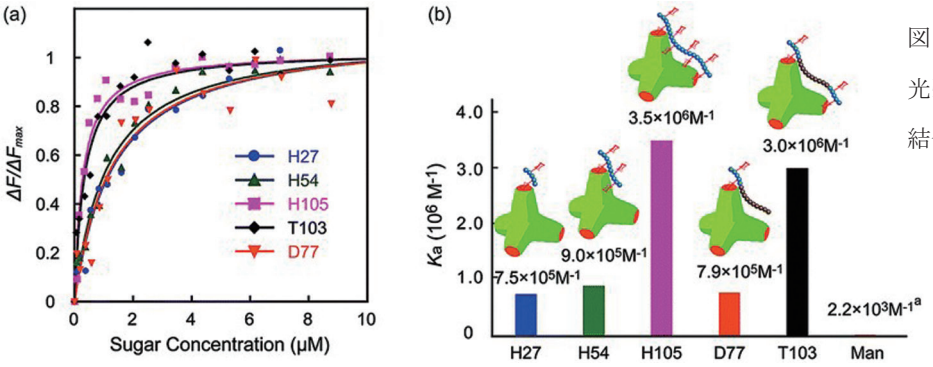

図２　（a）糖鎖高分子と ConA の蛍光強度変化試験。(b) 各ポリマーの結合定数

3.　糖鎖高分子の精密設計によるインフルエンザウイルス中和活性の検討[3]

インフルエンザウイルスは、膜中のヘマグルチニンというタンパク質が、シアル酸を含むオリゴ糖を認識することで、感染することが知られている。ヘマグルチニンは 3 量体の膜タンパク質で、糖鎖結合間サイトが３つ存在する。このシアリルオリゴ糖がタンパク質のレセプターサイトの複数に結合すれば、インフルエンザウイルスを効果的に阻害することができる。水溶性の高い、シアリルオリゴ糖と高分子を混和させるために、アクリルアミド型のアセチレン結合型のモノマーを合成し、分子鎖長と糖密度を変化させた糖鎖高分子を合成した。その結果、高分子の分子鎖長は 100 量体以上で 70%の側鎖糖含有量を持つ糖鎖高分子がインフルエンザウイルス A 型に強く結合して、これを中和することがわかった。

REFERENCES

（１）Miura, Y.; Hoshino, Y.; Seto, H. *Chem Rev.* **2016**, *116*, 1673-1692.
（２）Jono, K.; Nagao, M.; Oh, T.; Sonoda, S.; Hoshino, Y.; Miura, Y, *Chem Comun*, **2018**, *54*, 82-85.
（３）Nagao, M.; Fujiwara, Y.; Matsubara, T.; Hoshino, Y.; Sato, T.; Miura, Y. *Biomacromolecules*, **2017**, 4385-4392.