

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05491

研究課題名(和文)らせん性多糖を活用した新規スマートマテリアルの開発

研究課題名(英文) Development of new type of smart materials on the bases of helical polysaccharides

研究代表者

田丸 俊一 (TAMARU, Shun-ichi)

崇城大学・工学部・教授

研究者番号：10454951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アミロースを側鎖に導入した β -1,3-グルカン類からなるらせん性半人工多糖「アミロースグラフトカーダン(AGC)」を開発した。AGCを用いることで、その特異な構造的特徴と、分子捕捉能を基盤として、自己組織化戦略に基づく、階層性分子集合体の構築に極めて有用なホスト分子を開発することに成功した。さらに、ポリチオフェン誘導体のらせん性多糖との錯形成に伴う物性変化を効果的に利用することで、同一の分子をFRETペアに変換し、高効率な光エネルギー捕集システムを構築することにも成功した。このような同一分子からなるユニークなFRETペアの開発は他に例を見ない物であり、我々は本系をヤヌス型FRETペアと名付けた。

研究成果の概要(英文)：Semi-artificial branched-polysaccharides, amylose-grafted curdlans, were synthesized utilizing enzymatic polymerization. Amylose side chains on AGC maintain the original helical structure and the molecular inclusion ability. Despite of introduction of bulky amylose chains, CUR main chain also retains the original helical structure and the co-helical complex formation ability with conductive polymers, CNT or polythiophene. Thank to the difference in their molecular recognition properties between β -1,3-glucan and α -1,4-glucan, AGC forms heterogeneous supramolecular assemblies possessing well-defined hierarchical superstructure. On the bases of this dendritic superstructure of AGC, a self-organized "Janus-type FRET system" was successfully constructed by assembling PT-1 with AGC, and therein, fluorescence energy of PT-1 on amylose side chain transfers to PT-1 on CUR main chain.

研究分野：分子集積化学

キーワード：多糖 らせん構造 自己組織化 光捕集系 階層構造

1. 研究開始当初の背景

β -1,3-グルカン類は水中で三重らせん構造を形成する天然由来の多糖類である。この三重らせん構造形成は可逆的であり、一本鎖構造から三重らせん構造を再形成する過程で DNA やカーボンナノチューブ (CNT) などの特定の分子を共存させることで、 β -1,3-グルカンと複合して超分子を形成することが可能である。申請者らのグループでは β -1,3-グルカン類のひとつであるカードラン (CUR) の側鎖を選択的に化学修飾することでタンパク質に見られる構造変換特性を示す両性 CUR を開発することに成功した。この両性 CUR の三重らせん構造形成は pH によって精密に制御することが可能であり、イオン性の薬剤モデル分子を pH 応答的に放出する薬剤キャリアとしての応用の可能性を示すことに成功している。

2. 研究の目的

本研究では β -1,3-グルカン類が示す超分子的分子捕捉能 (ホスト分子) を活用して、高い構造的規則性を持つ超分子型光電変換系の開発と新しい刺激応答性材料の開発指針の確立を目指して研究を実施した。

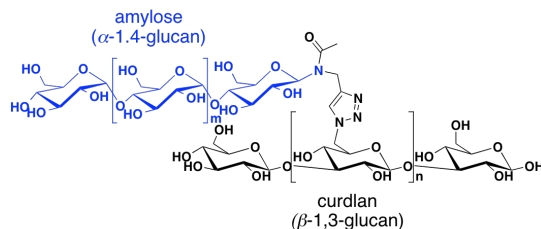
アミロースはらせん性多糖であり、このらせん構造の内部に物質を包摂可能である。この様な特長は β -1,3-グルカン類と同様であるが、 β -1,3-グルカン類とアミロースのらせん構造は根本的に異なるため、その包摂能やゲスト分子選択性は大きく異なると考えられる。そこで、アミロースを側鎖に導入した半人工分岐カードラン (アミロースグラフトカードラン (AGC)) を用いて、明確な樹状構造を持つ超分子複合材料の開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

アミロースは Phosphorylase A による酵素反応によってオリゴマルトースを基質として合成可能である。すでに、Huisgen 環化反応を利用して、カードランのグルコースユニットの 6 位に選択的にオリゴマルトースを導入し、その後酵素反応によってアミロースが側鎖に導入されたカードラン誘導体を合成することに成功している。そこで、アジド基導入率が異なるアジ化カードランを出発分子とし、ここに Huisgen 環化反応を用いてアミロースの側鎖にマルトペンタオースを導入した。続いて、マルトペンタオース側鎖をプリカーサとして酵素反応による糖鎖伸張反応を行う事で、アミロース導入量の異なる 3 種類の AGC (AGC₂₁, AGC₄₃, AGC₅₈: 下付数字はアミロース側鎖の導入率を示す) を合成した。各種顕微鏡観察、および旋光度・円二色性スペクトル測定などを用いて、AGC の構造特性を調査し、ヨウ素デンプン反応やカーボンナノチューブなどとの錯形成を検討する事でアミロース部・カードラン部のらせん構造形成能と物質包摂能の違いを明らかに

し、枝部と中心部に異なる分子を選択的に複合化した明確な樹状構造を持つ超分子の構築を検討した。さらに、アミロース枝部にドナー分子、カードラン中心部にアクセプター分子をそれぞれ包摂した樹状超分子複合体を調製し、この超分子複合体が示す光エネルギー捕集能について評価した。

4. 研究成果



AGC ₂₁ : n = 21%, m = m	Glc5-CUR ₂₁ : n = 21%, m = 3
AGC ₄₃ : n = 43%, m = m	Glc5-CUR ₄₃ : n = 43%, m = 3
AGC ₅₈ : n = 58%, m = m	Glc5-CUR ₅₈ : n = 58%, m = 3

上記により合成した AGC はいずれも CNT と錯形成し、水溶性の CNT 複合体を形成した (図 1b)。この複合体の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察像からは、直線状の複合体が観測され、CNT がアミロース側鎖に包摂されたことを示す、樹状の複合体は観察されなかった (図 1c)。

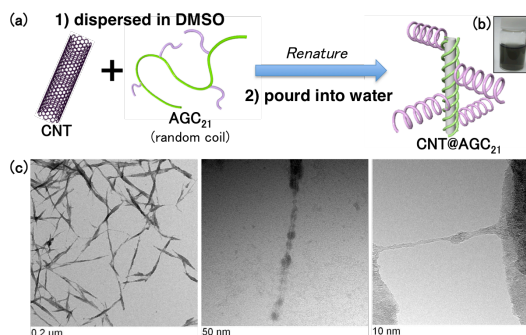


図 1. (a) AGC₂₁/CNT 錯体形成の模式図, (b) AGC₂₁/CNT 錯体水溶液の写真の TEM 像

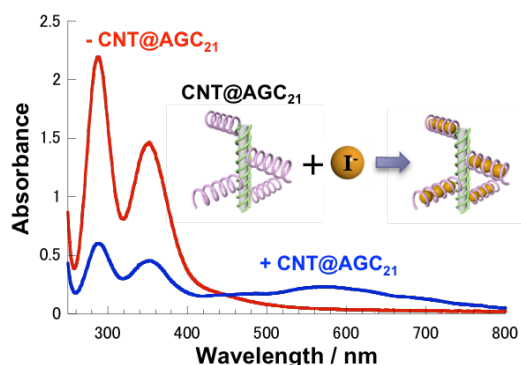


図 2. AGC₂₁ の CNT 錯体が示すヨウ素デンプン反応

更に、この CNT 複合体はヨウ素デンプン反応に対して陽性であった (図 2)。以上の結果は、(1) CNT は AGC の CUR 主鎖と選択的に錯形成しアミロース側鎖とは錯形成しないこと、

(2) アミロース側鎖は I_3^- をそのらせん構造内部に一直列に整列させながら包摂可能であること、をそれぞれ示している。この様に AGC を用いることで、中心部と枝部に異なる物質を取り込ませた、明確な樹状構造を持つ超分子の構築に成功した。

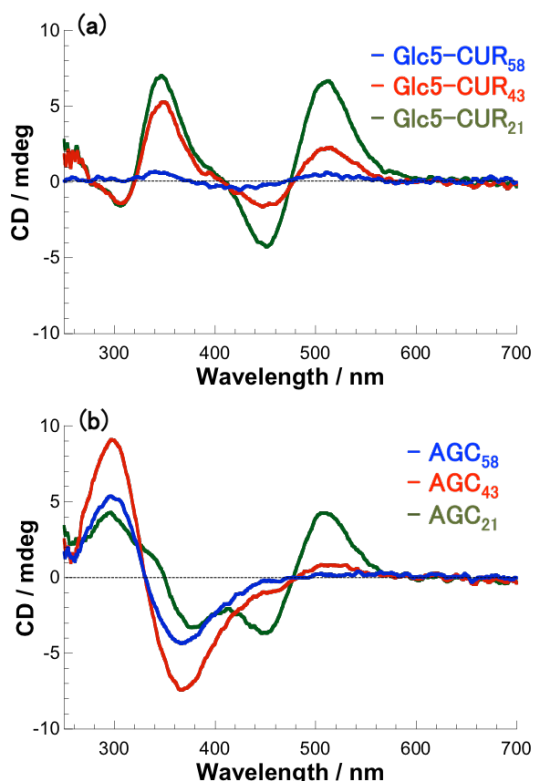


図3. pH 7 条件下で **Glc5-CUR/PT-1** 錯体 (a)および、**AGC/PT-1** 錯体が示す CD スペクトル(b)

続いて、これらの AGC とその前駆体である マルトペンタオースグラフとカードラン (**Glc5-CUR**) を用いて、カードラン主鎖のらせん構造形成能を詳細に調査した。pH 7 の水中でアニオン性のポリチオフェン誘導体である **PT-1** と **Glc5-CUR** の錯形成を円二色性 (CD) スペクトルを用いて検討したところ、側鎖へのマルトペンタオースの導入率に依らず、500 nm 付近に **PT-1/CUR** 主鎖のらせん状錯体の形成を示す典型的に分裂型のコットン効果が観測された (図 3a)。このことから、**Glc5-CUR** の **CUR** 主鎖は本来の 3 重らせん形成能を保持していることが確認された。しかし、このコットン効果の強度はマルトペンタオースの導入率の増加に伴って減少することが確認された。以上の結果は、カードラン主鎖に側鎖として糖鎖の導入する事で、三重らせん形成能が低下することを示唆するとも考えられるが、先の CNT との錯形成の結果も合わせると、むしろ、カードラン主鎖はらせん構造を形成するものの、その構造は本来の β -1,3-グルカン類が示す物よりも緩く、やや多様な錯体構造を採ったものと考えられる。以上の結果を踏まえて、pH 7 の水中で **PT-1** と **AGC** の錯形成について検討した

ところ、**PT-1**/アミロース側鎖間のらせん状錯体の形成を示す分裂型のコットン効果が 330 nm 付近に観測されると共に、**Glc5-CUR** の錯形成と同様に、**PT-1/CUR** 主鎖のらせん状錯体の形成を示す分裂型のコットン効果が観測された (図 3b)。以上の結果から、**AGC** は **CUR** 主鎖、アミロース側鎖の双方に自発的に錯形成する事が確認された。また、**AGC** においても、側鎖導入率の上昇に伴って **PT-1/CUR** 主鎖が示す CD シグナルの現象が確認された。これまでの研究から、**PT-1** はアミロースと錯形成することで 330 nm に特有の CD シグナルを与えるだけでなく、錯形成に伴って吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルが短波長シフトし、一方、 β -1,3-グルカン類との錯形成する事で 500 nm に特有の CD シグナルを与えるだけでなく、錯形成に伴って吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルが長波長シフトすることが明らかとなっている。つまり、このアニオン性ポリチオフェンは、アミロースおよび β -1,3-グルカン類と錯形成する事で、異なるコンフォメーションとこれに伴う異なる電子状態を採り、全く異なる物性を示す分子に変換される。**AGC/PT-1** 錯体が示す CD、吸収、蛍光スペクトルは、いずれも、**PT-1/CUR** 主鎖錯体が示す特徴と **PT-1**/アミロース側鎖錯体が示す特徴を足し合わせた結果であった。よって、**AGC** を用いることで、自己組織化戦略に基づいて、各成分の単純な混合という簡便な手法によって、ポリチオフェン誘導体を全く異なる電子状態に誘導しつつ、明確な樹状構造に配置した、階層構造を持つ超構造体へと変換する事に成功した。

興味深いことに、上記の様な **PT-1** の電子状態変化に基づく、吸収・蛍光スペクトル変化は、**PT-1**/ β -1,3-グルカン類錯体と **PT-1**/アミロース錯体とは、それぞれ互いに蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) のドナーおよびアクセプターとして FRET ペアになり得る事を示している。その点、**AGC/PT-1** 錯体は FRET アクセプターとなる **PT-1/CUR** 主鎖錯体を中心に、FRET ドナーとなる **PT-1**/アミロース側鎖錯体が **PT-1/CUR** 主鎖錯体と近接した位置に、無数の枝状に配置された超構造を持つ。よって、**AGC/PT-1** 錯体は枝部で捕集した光エネルギーを効率良く中心部に受け渡すことが出来る、高効率な光捕集系となることが示唆された。そこで、**AGC/PT-1** 錯体の形成条件と FRET 発現効率について検討を行った。まず、比較実験として市販のアミロース (平均分子量: 2800) と **PT-1** の混合系において錯形成の pH 依存性を確認したところ、**PT-1**/アミロース錯体は、pH にほとんど依存することなく、安定に形成する事が確認された。一方、水溶性の天然 β -1,3-グルカン類であるシゾフィラン (SPG) と **PT-1** の混合系において、同様に錯形成の pH 依存性を確認したところ、**PT-1/SPG** 錯体は pH10 以上の塩基性条件下において、より形成しやすいことが確

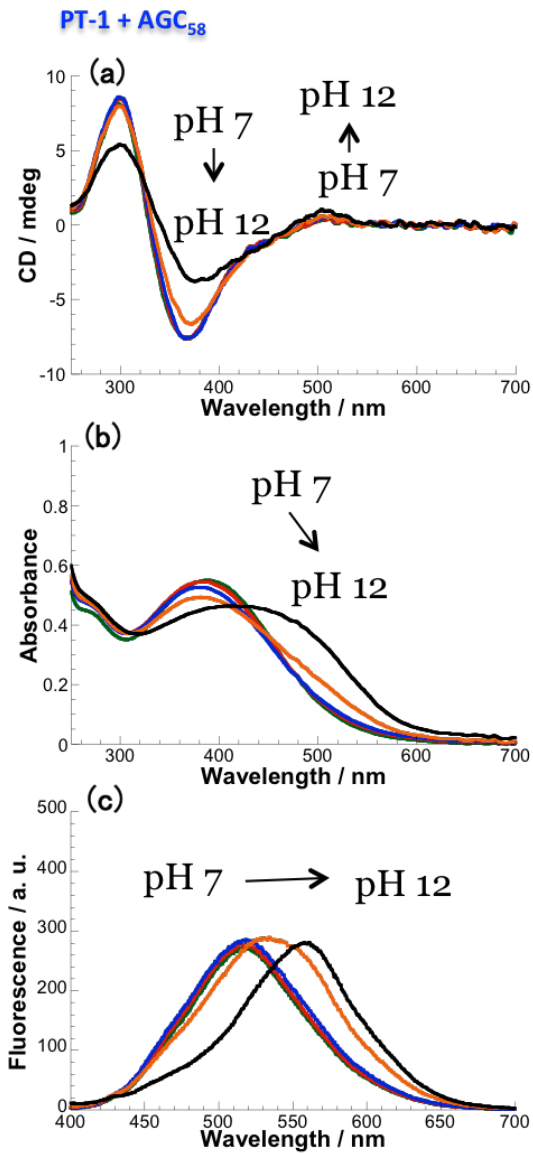


図 4. pH 変化に伴って PT-1/AGC₅₈ 混合水溶液が示す CD (a), 吸収 (b), および蛍光スペクトル変化 (c)

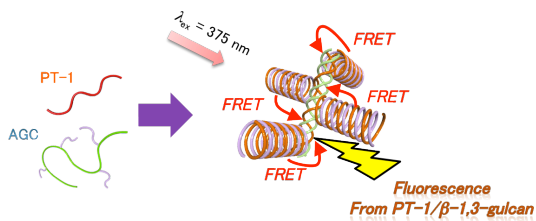


図 5. PT-1/AGC₅₈ 混合系を 375 nm で励起した時に発現する蛍光の模式図

認められた。そこで、次に AGC₅₈/PT-1 錯体を用いて、同様に錯形成の pH 依存性を確認したところ、中性付近の pH 領域ではほぼ完全に PT-1/アミロース側鎖錯体のみが存在しているのに対して、pH 12 の条件下では、PT-1/CUR 主鎖錯体と PT-1/アミロース側鎖錯体とが、十分に比較できる比率で共存することが確認された (図 4a, b)。PT-1/アミロ

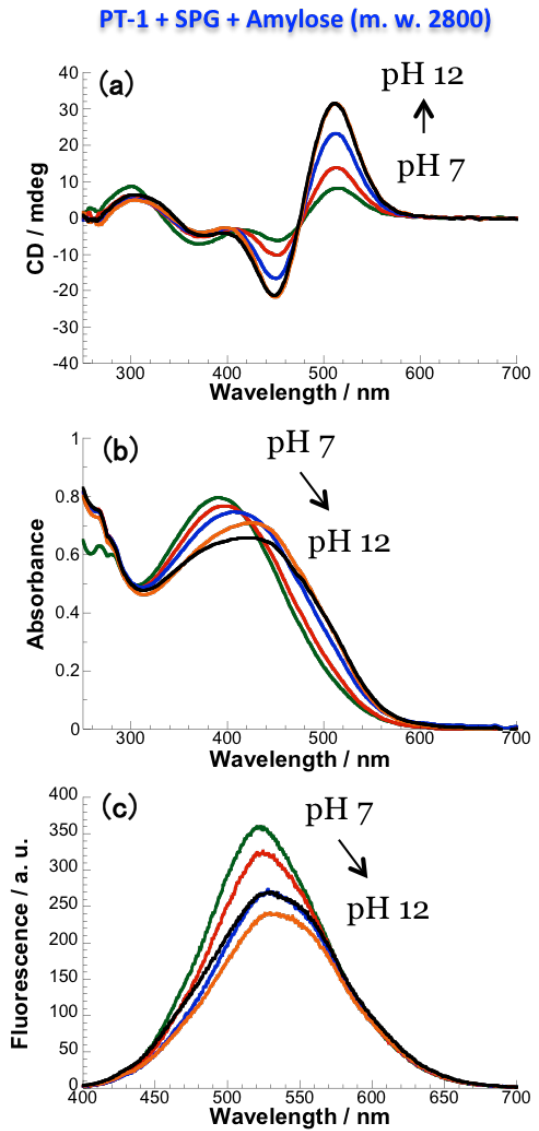


図 6. pH 変化に伴って PT-1/SPG/amylose 混合水溶液が示す CD (a), 吸収 (b), および蛍光スペクトル変化 (c)

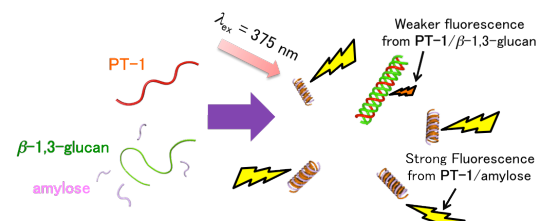


図 7. PT-1/ β -1,3-グルカン/amylose 混合系を 375 nm で励起した時に発現する蛍光の模式図

ロ側鎖錯体の極大吸収波長は 375 nm 付近に観測される。一方、PT-1/CUR 主鎖錯体は 480 nm 付近に吸収極大波長を持ち、375 nm 付近の吸光度は 480 nm の半分程度である。よって、PT-1/アミロース錯体と PT-1/ β -1,3-グルカン錯体が混在する系を 375 nm で励起すると、主に PT-1/アミロース錯体からの蛍光が優位に観測される。事実、上記の

参照実験に使用した市販のアミロースと SPG の混合溶液に PT-1 を添加し、pH 変化に伴う錯形成状態変化を追跡したところ、CD および吸収スペクトルでは、中性条件下での PT-1/アミロース錯体の優先的生成と、塩基性条件下での PT-1/アミロース錯体と PT-1/SPG 錯体の混在が示されたが(図 6a, b)、375 nm 励起によって発現する蛍光スペクトルは pH 条件に依らず、常に PT-1/アミロース錯体が優先的に観測され、pH 12 条件下でも PT-1/SPG 錯体由来の蛍光は僅かに観測されるのみであった(図 6c)。AGC₅₈/PT-1 錯体が示す CD および吸収スペクトルは、参照実験である市販のアミロースと SPG および PT-1 の混合溶液で観測された結果とほぼ同様の pH 依存性スペクトル変化を与えた。これに対して、375 nm 励起によって発現する AGC₅₈/PT-1 錯体の蛍光スペクトルは、中性付近では PT-1/アミロース側鎖錯体由来のシグナルを与えたものの、pH が塩基性側に移行するに従って徐々に長波長シフトし、pH 12 条件下ではほぼ完全に PT-1/CUR 主鎖錯体由来のシグナルを与える事が明らかとなった(図 4c)。pH 12 条件下で観測される CD、吸収スペクトルから、この条件下でも PT-1/アミロース側鎖錯体の方が PT-1/CUR 主鎖錯体よりも優勢に形成しており、かつ、375 nm という PT-1/アミロース側鎖錯体を励起する上で優れた励起波長を使用しているにもかかわらず、pH 12 条件下ではほぼ完全に PT-1/CUR 主鎖錯体由来のシグナルを与えたと言う実験事実は、AGC₅₈ を媒として自発的に集積した PT-1 が、(1) アミロース側鎖と CUR 主鎖のそれぞれと錯形成する事で、互いに FRET ペアに変換されたこと、(2) FRET アクセプターが幹、FRET ドナーが枝葉となる階層的樹状構造を形成する事で、枝葉で捉えた光エネルギーを幹に効果的に捕集する、光エネルギー捕集システムが構築された事を意味している。

以上のように、AGC はその特異な構造的特徴と、分子捕捉能を基盤として、自己組織化戦略に基づく、階層性分子集合体の構築に極めて有用なホスト分子を開発することに成功した。さらに、ポリチオフェン誘導体のらせん性多糖との錯形成に伴う物性変化を効果的に利用する事で、同一の分子を FRET ペアに変換し、高効率な光エネルギー捕集システムを構築することにも成功した。この様な同一分子からなるユニークな FRET ペアを我々はヤヌス型 FRET ペアと名付けた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Environment-induced sequential interconversion of amphoteric β -1,3-glucans/polythiophene complexes: a unique system applicable

to a naked-eye detectable fluorogenic pH probe, Shun-ichi Tamaru, Kaori Hori, Seiji Shinkai, *Chemistry Letters*, 2015, 44, 1667 - 1669. DOI:10.1246/cl.150791 (査読有)

2. Supramolecular Assembly of Achiral Alkynylplatinum(II) Complexes and Carboxylic β -1,3-Glucan into Different Helical Handedness Stabilized by Pt...Pt and/or π - π Interactions, Chung, Clive Yik-Sham; Tamaru, Shun-ichi; Shinkai, Seiji; Yam, Vivian Wing-Wah, *Chemistry - A European Journal*, 2015, 21, 5447-5458. DOI:10.1002/chem.201405035 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1. 半人工分岐多糖を利用した階層性分子集積体の構築 久保美樹・田丸俊一・新海征治 第 54 回化学関連支部合同九州大会, 2017 年 7 月 1 日, 福岡, 北九州国際会議場
2. Development and self-assembly of semi-artificial helical polysaccharides to construct the heterogeneous nano-assemblies Shun-ichi Tamaru, Kosuke Nagahara, Seiji Shinkai, 11th The International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, July 10-14, 2016, The K-Hotel Seoul, Korea
3. Development and self-assembly of semi-artificial helical polysaccharides. Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai, 65th SPSJ annual meeting, Kobe, Kobe convention center, 25-27, May 2016.
4. 側鎖修飾カードランによる階層的超構造の構築 田丸俊一, 本崎弥夜美, 新海征治 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 24-27 日, 京都, 同志社大学京田辺キャンパス
5. らせん性半人工分岐多糖の開発と自己組織化挙動 本崎弥夜美・田丸俊一・新海征治, 高分子学会支部特別講演会, 2015 年 12 月 4 日, 福岡, 九州大学西新プラザ (招待講演 -第 52 回化学関連支部合同九州大会ポスター発表賞受賞講演-)
6. 超分子化学的手法を利用した動的機能材料の開発 (有機合成化学協会九州山口支部奨励賞受賞講演) 田丸俊一 平成 27 年度第 2 回有機合成化学講演会, 2015 年 11 月 26 日, 大分, 住友化学大分工場
7. 動的機能を発現するらせん性多糖の開発 (招待講演) 田丸俊一 第 3 回バイオ九州若手の会 2015 年 9 月 12 日, 熊本, 熊本大学
8. らせん性半人工分岐多糖の開発と自己組織化挙動 本崎弥夜美・田丸俊一・新海征治 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 2015 年 6 月 27 日, 福岡, 北九州

国際会議場

9. らせん性半人工分岐多糖の開発と自己組織化挙動 本崎弥夜美・田丸俊一・新海征治 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 27~29 日, 北海道, 札幌コンベンションセンター
10. Development and function of the stimuli-responsive helical polysaccharide derivatives, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinaki, 64th SPSJ annual meeting, Sapporo, Sapporo convention center, 27-29, May, 2015

[図書] (計 1 件)

1. Supramolecular Wrapping by Beta-(1 → 3)-D-Glucans toward Polysaccharide-Based Functional Materials, M. Numata, K. Sugikawa, S. Haraguchi, T. Shiraki, S.i. Tamaru, S. Tamesue, S. Shinkai, Beta-Glucans: Applications, Effects and Research, pp. 35-92, 2017.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nano.sojo-u.ac.jp/laboratory/tamaru/01-src/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田丸 俊一 (TAMARU Shun-ichi)

崇城大学・工学部ナノサイエンス学科・教授

研究者番号 : 10454951