

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14075

研究課題名(和文) 構造制御された結晶性セルロース構造体の酵素合成

研究課題名(英文) Enzymatic Synthesis of Crystalline Cellulose Assemblies with Regular Structures

研究代表者

芹澤 武 (Serizawa, Takeshi)

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：30284904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子の自己組織化は生体組織や器官を形成するうえで必要不可欠な現象である。これまでに様々な生体分子の自己組織化が研究されてきたが、結晶性オリゴ糖の自己組織化はほとんど研究されてこなかった。そこで本研究では、酵素反応により生成されるアルキル化セルロースオリゴマーに着目し、それらの自己組織化により形成される集合構造について解析した。その結果、アルキル基の長さが集合体の形態や結晶構造に大きな影響を及ぼすことを見出した。

研究成果の概要(英文)：The self-assembly of biomolecules into highly regular structures is essential in the construction of biological tissues and organs. Various biomolecular assemblies composed of nucleic acids, peptides, and lipids have been utilized as molecular building units for self-assembled materials. However, crystalline oligosaccharides have rarely been utilized in self-assembled materials. In this research, multidimensional self-assembled structures of alkylated cellulose oligomers were synthesized via in vitro enzymatic reactions. It was found that the alkyl chain length drastically affected the assembled morphologies and allomorphs of cellulose moieties. The modulation of the intermolecular interactions of cellulose oligomer derivatives by alkyl substituents was highly effective at controlling their assembly into multidimensional structures. This research proposed a new potential of crystalline oligosaccharides for structural components of unique molecular assemblies.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：セルロース 酵素合成 構造体

1. 研究開始当初の背景

セルロースの酵素合成は、セルロース鎖の生成と構造体形成(結晶化)が一段階で進行する魅力的な反応系である。例えば、 α -グルコースリン酸をモノマー、グルコースをプライマー(反応開始点)として、セロデキストリンホスホリラーゼ(CDP)によりセルロースを酵素合成すると、平均重合度10程度の短鎖セルロースが厚さ方向に対して垂直かつ逆平行にパッキングしたII型結晶を形成し、天然からは得られないシート状構造体となる。

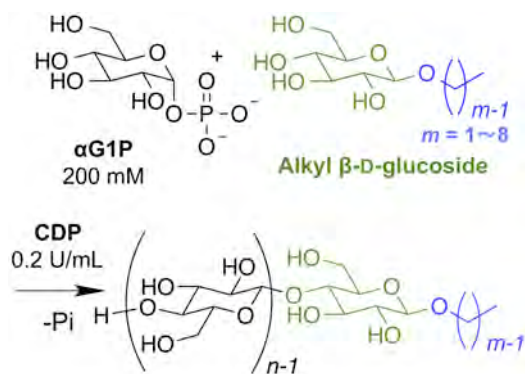
人工的に合成するセルロースはII型結晶がほとんどである。分子鎖が平行にパッキングした、天然と同様のI型結晶を得た報告例はあるものの、それは生成物のごく一部に限られている。このように、I型結晶を構成成分とするセルロース構造体の人工的な高効率合成は未だ実現できていない。

2. 研究の目的

本研究では、CDPによるセルロースの酵素合成系に、鎖長が異なるアルキル β -グルコシドをプライマーに用いることで、結晶構造および形態が制御されたセルロース構造体が合成できることを明らかにする。

3. 研究の方法

プライマーであるアルキル β -グルコシドのアルキル基の炭素数を1~8程度まで変化させ、アルキル鎖長の効果を検討した(スキーム1)。得られたアルキル化セルロースの平均重合度は核磁気共鳴法により、重合度分布は飛行時間型質量分析計を用いたマトリクス支援レーザー脱離イオン化法により評価した。また、結晶構造は広角X回折法により、マクロな形態は各種の顕微鏡法により評価した。これらにより、得られたセルロース構造体の形態や結晶構造に与えるアルキル基の影響を整理した。



Conditions: 500 mM HEPES buffer (pH 7.5), 60 °C, 3 d, CDP (112 kDa) from *C. thermocellum* YM4

スキーム1 本研究の反応式と反応条件

4. 研究成果

C末端に6残基のヒスチジンが導入された、

Clostridium thermocellum YM4由来のCDPを大腸菌により発現させた後、大腸菌を破碎し、遠心分離により酵素懸濁液を得た。これをニッケル-ニトリロ三酢酸カラムを用いて精製し、高純度のCDPを調製した。

酵素反応後の反応液を観察したところ、炭素数1から5の場合には反応液はゲル化し、ネットワーク構造を形成した。一方で、炭素数6から8の場合には生成物の水分散液が得られた(図1)。生成したアルキル化セルロースの化学構造を評価したところ、期待通りの重合反応が進んでおり、また、セルロース部位の平均重合度はアルキル基が長くなるにつれて小さくなる傾向にあり、例えば、炭素数1の場合の約10から炭素数8の場合の約7まで変化した。なお、それぞれのセルロース部位は所定の重合度分布を示した。

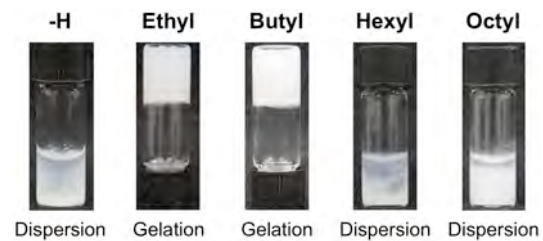


図1 酵素反応後の反応液の写真

得られた構造体の形態を観察したところ、炭素数が5まではよく成長したナノリボンネットワークを、炭素数6の場合にはらせん状のナノロッドを、炭素数8の場合には不定形のナノシートをそれぞれ形成していた(図2)。一方、得られた構造体のセルロース部位の結晶構造を評価したところ、炭素数1から5の場合に逆平行鎖のセルロースII型を、炭素数6から8の場合に平行鎖のセルロースI型の結晶形をそれぞれ形成していた(図3)。なお、各プライマーの臨界ミセル濃度を評価した結果、ミセル形成の有無が結晶形を直接決定している訳ではなかった。このように、セルロースに導入するアルキル基の長さによって、酵素反応により得られる生成物の溶液状態や形態に加え、セルロース部位の重合度や結晶構造が変化することを見出した。

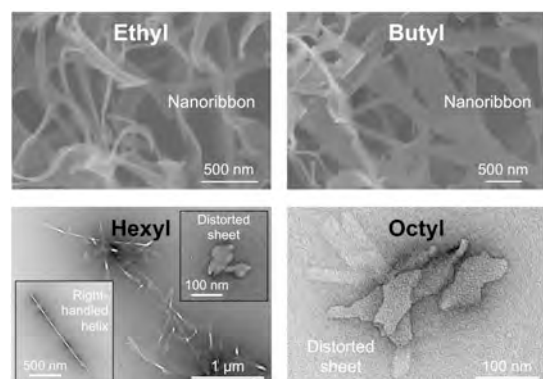


図2 生成物の形態観察

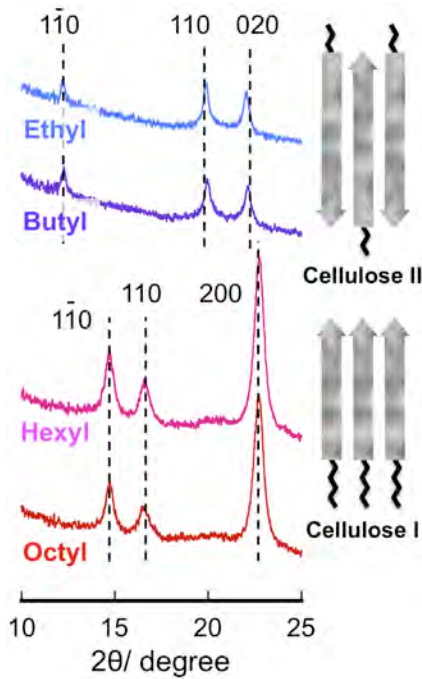


図3 生成物の結晶構造解析

ここまでで得られた知見をもとに、セルロース構造体への機能付与について検討した。主な成果を具体的に以下に述べる。

アルキル鎖長が相対的に短い場合に生成されるナノリボンネットワークからなるハイドロゲルに反応性基を導入し、自在に機能化することを目指し、アノマー位にエチル基を介してアジド基が導入されたグルコース誘導体である 2-アジドエチル-β-D-グルコピラノシドをプライマーとして、セルロースを酵素合成した。その結果、この新規なプライマーが CDP により認識されることでアジド基を有するセルロース系ハイドロゲルが酵素合成でき、また、クリック反応により、ハイドロゲルをポスト機能化できることを見出した (図4)。

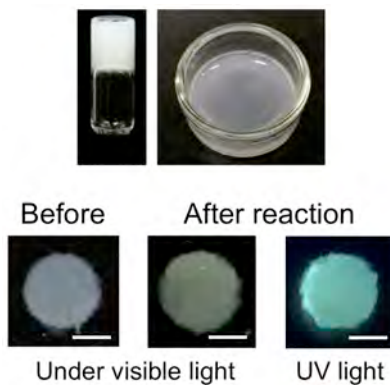


図4 反応性基を有するセルロース系ハイドロゲルの酵素合成 (上: アジド基をもつ反応性ハイドロゲル、下: 1-エチニルピレン修飾前後におけるゲルの写真、スケールバーは 0.5 mm)

さらに、2-アミノエチル-β-D-グルコピラノシドをプライマーとして、セルロースを酵素合成した。その結果、反応液はゲル化せずに分散液となった。エチル基があればゲル化するはずであるが、アミノ基間にはたらく静電反発により、生成物の分子間相互作用が変化したため、ネットワーク化するほどの自己組織化は観察されなかったものと考えられる。実際に形態を観察したところ、ナノリボン化に留まっていることがわかった (図5)。一方で、ナノリボン表面に集積したアミノ基に対する静電相互作用を利用することにより、タンパク質や金ナノ粒子を安定に固定化できることを見出した。

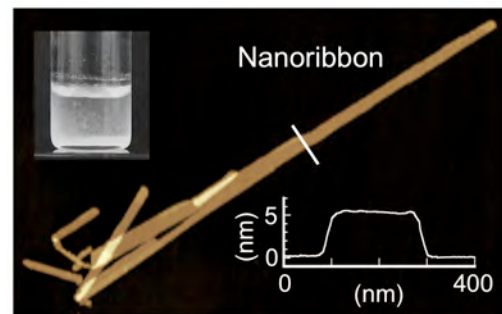


図5 2-アミノエチル-β-D-グルコピラノシドをプライマーとして酵素合成したアミノ基集積ナノリボンの原子間力顕微鏡像

アルキル鎖長が相対的に長い場合に生成されるセルロース I 型結晶を有するナノロッドや不定形ナノシートについて、より詳細に構造解析した結果、脂質集合体によく見られる二分子膜構造を基本単位として、それらの構造体が構築されていることが分かった。この事実から、得られた構造体が脂質集合体と同様の特性を示す可能性があると予想し、水分散したオクチルβ-セルロシドの水面上に対する単分子膜 (いわゆるギブス単分子膜) の形成について評価した。その結果、結晶化した固体状の水分散液であるにも関わらず、経時的に高密度な水面単分子膜を形成すること (図6)、また、それらの水面単分子膜が通常脂質単分子膜とは比較にならないほどの高い力学強度を有することを見出した。

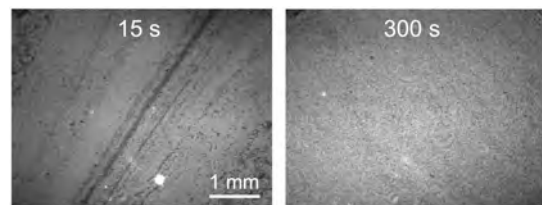


図6 オクチル化セルロースオリゴマーが形成するギブス単分子膜のブリュースター角顕微鏡像

このように、酵素反応により合成されるセ

ルコース誘導体の構造形成や機能化に関するこれまでに例のない基礎知見が得られた。

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 8 件)

- ① Yusuke Yataka, Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, *Langmuir*, 査読有, Vol. 32, 2016, pp. 10120-10125, DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b02679.
- ② Takatoshi Nohara, Toshiki Sawada, Hiroshi Tanaka, Takeshi Serizawa, *Langmuir*, 査読有, Vol. 32, 2016, pp. 12520-12526, DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b01635.
- ③ Yuuki Hata, Tomoya Kojima, Taro Koizumi, Hiromichi Okura, Takamasa Sakai, Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, *ACS Macro Lett.*, 査読有, Vol. 6, 2016, pp. 165-170, DOI: 10.1021/acsmacrolett.6b00848.
- ④ Yuuki Hata, Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, *Polym. J.*, 査読有, Vol. 49, 2017, pp. 575-581, DOI: 10.1038/pj.2017.22.
- ⑤ Takatoshi Nohara, Toshiki Sawada, Hiroshi Tanaka, Takeshi Serizawa, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 査読有, Vol. 28, 2017, pp. 925-938, DOI: 10.1080/09205063.2017.1322248.
- ⑥ Jianquan Wang, Jiabao Niu, Toshiki Sawada, Ziqiang Shao, Takeshi Serizawa, *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 18, 2017, pp. 4196-4205, DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01224.
- ⑦ Takeshi Serizawa, Yuka Fukaya, Toshiki Sawada, *Langmuir*, 査読有, Vol. 33, 2017, pp. 13415-13422, DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b03653.
- ⑧ Yuuki Hata, Toshiki Sawada, Takamasa Sakai, Takeshi Serizawa, *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 18, 2018, pp. 1269-1275, DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00092.

[学会発表] (計 32 件)

- ① Yusuke Yataka, Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, Enzymatic synthesis and Nano-Structural Control of Cellulose Derivatives with Terminal Alkyl Groups, 第 65 回高分子

年次大会, 2016 年 5 月 25 日, 口頭 (英語).

- ② Yuuki Hata, Toshiki Sawada, Takamasa Sakai, Takeshi Serizawa, Enzymatic Synthesis and Characterization of All-Cellulose Nanocomposite Hydrogels, The 9th Integrated Molecular / Materials Science & Engineering (国際学会), 2016 年 10 月 14 日, 口頭 (英語).
- ③ Yuuki Hata, Toshiki Sawada, Takamasa Sakai, Takeshi Serizawa, Enzymatic Synthesis and Characterization of Cellulosic Hydrogels with Crystalline Nanoribbon Networks, The 11th SPSJ International Polymer Conference (国際学会), 2016 年 11 月 14 日, 口頭 (英語).
- ④ Takatoshi Nohara, Toshiki Sawada, Hiroshi Tanaka, Takeshi Serizawa, Single-step Enzymatic Synthesis and Functions of Cellulose-based Supramolecular Assemblies, The 15th International Conference on Advanced Materials (国際学会), 2017 年 9 月 8 日, 口頭 (英語).

ほか 28 件

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

- ①
名称:ゼラチン共存セルロース三次元構造体
発明者:芹澤 武ほか5名
権利者:東京工業大学、JXTG エネルギー
種類:特許
番号:2016-093972
出願年月日:2016年5月9日
国内外の別:国内
- ②
名称:セルロース三次元構造体及びその製造方法
発明者:芹澤 武ほか6名
権利者:東京工業大学、JXTG エネルギー
種類:特許
番号:2016-118227
出願年月日:2016年6月14日
国内外の別:国内
- ③
名称:セルロースオリゴマーから成る三次元構造体の酵素合成
発明者:芹澤 武ほか5名

権利者：東京工業大学、 JXTG エネルギー
種類：特許
番号：2017-038137
出願年月日：2017年3月1日
国内外の別：国内

④

名称：アミノ基を持つセルロースオリゴマー
からなるナノリボン構造体とその製造方法
発明者：芹澤 武ほか6名
権利者：JXTG エネルギー、東京工業大学
種類：特許
番号：2017-82973
出願年月日：2017年5月18日
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.serizawa.polymer.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芹澤 武 (SERIZAWA, Takeshi)
東京工業大学・物質理工学院・教授
研究者番号：30284904

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

田中 浩士 (TANAKA, Hiroshi)
酒井 崇匡 (SAKAI, Takamasa)
澤田 敏樹 (SAWADA, Toshiki)