

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18750103
 研究課題名（和文） 多糖とカーボンナノチューブの超分子融合による
 新規バイオ・ナノ材料群の創成
 研究課題名（英文） Development of novel bio-nano materials through supramolecular
 conjugations of polysaccharides and carbon nanotubes
 研究代表者
 長谷川 輝明 (HASEGAWA TERUAKI)
 東洋大学・生命科学部・准教授
 研究者番号：90423566

研究成果の概要：セルロースは天然に最も大量に存在する生分解性材料であり、持続可能な文明社会の構築に必要な不可欠なエコマテリアルである。このセルロースを直接化学修飾することにより、有用な高機能性セルロース群を創成することを目指し研究を行った。本課題の研究により、セルロースの 6 位のみに望みの機能性基を導入するための普遍的な手法の開発とともに、実際にオリゴ糖鎖を導入によってタンパク質認識能を付与したセルロースの合成等に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,700,000	360,000	4,060,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：多糖・位置特異的・定量的・化学修飾・糖鎖高分子

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化や増え続けるゴミの問題、さらには近年の食料価格の高騰など、現代の人間社会の諸問題は燃料・原料としての石油依存に端を発している。石油依存社会の仕組みを変革し、永続的に発展可能な文明社会を形成するためには、石油に変わるエネルギー源の確保の他、各種石油化学製品を、植物性の生分解性素材に置換する必要があり、この点においてセルロースを代表とする多糖への注目が申請当時極めて高まっていた。また、多糖が免疫賦活作用（キチン・キトサン）や抗ガン活性（シゾフィラン）を始めとする多種多様な生理活性を有するバイオマテリアルであることと共に、天然に存在する最も安価かつ重要なキラルマテリアルであることを忘れてはならない。多糖を骨格にした生分解

性材料の開発やキラルな機能性材料の開発の観点からも、また多糖の生理活性の解明や多糖新薬の開発の観点からも、多糖に対して機能性ユニットを修飾することで、望みの機能を有する機能性多糖マテリアル群を開発することは非常に重要な研究課題であった。しかし、多糖に対する化学修飾は未だに多くの困難を抱えており、有機合成化学を専門としない一般の研究者が幅広く参入可能な状況にはなっていなかった。

例えば、機能性セルロース誘導体を合成するために用いられていた手法は、(A)セルロースを原料に用いた直接修飾法(ダイレクト修飾法) および(B)有機化学的に合成した糖モノマーを糖加水分解酵素の逆反応を利用して重合する手法(ボトムアップ法)の二種類であったが、いずれも致命的な欠点を

多く抱えていた。

例えば(A)のダイレクト修飾法では主として多糖水酸基の求核性を利用して修飾を行うため、望みの水酸基のみと位置選択的に反応させることが難しく、合成した機能性セルロース誘導体の構造が不明確なことが短所である。また(B)のボトムアップ法では重合過程において酵素を利用することから、酵素の基質とならない大きな置換基を導入することができないこと(本手法によって導入可能な置換基はメトキシ基など極めて小さな置換基に限定される)が問題であった。また、糖モノマーの合成には多段の合成ステップを要し、一部の有機合成化学に特化した研究室でのみ実行可能な方法であり、有機合成化学を専門としない大多数の科学者がこの領域に参入するにはあまりにも敷居が高い。

機能性多糖の開発に対する医学・薬学・材料科学といった様々な領域の研究者の参入を促し、この領域の研究を更に活性化させるためには、望みの機能性基を特定位置のみに定量性に導入するための簡便かつ一般的な手法の開発が重要であることは言うまでもない。しかし、現在までこの様な条件を全て満たす普遍的な多糖化学修飾法は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究課題では多糖の位置選択的かつ定量的な機能性基導入法を開発し、多糖の立体構造(棒状やせん状など)を保持したまま機能性基を自在に導入する方法を確立させる。それと同時に、多糖が本来有している様々な機能に新規導入した機能性を組み合わせ、全く新しい機能を発現する新規多糖材料群を創成することを目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

われわれは多糖に対する位置選択的かつ定量的な修飾法として、天然多糖に対する二段階反応に基づいた全く新しい有機化学的修飾方法を試みた。この二段階反応とは(1)多糖の6位水酸基に対する位置特異的かつ定量的なプロモ化/アジド化による6-アジド-6-デオキシ多糖の合成および(2)その後のCu⁺触媒を用いたアルキン末端を有する機能性モジュールの化学選択的かつ定量的な導入から成り立つ二段階反応である。一段階目のアジド化までの反応により、完全なる位置選択性を達成すること。さらには二段階目の反応で様々な機能性モジュールを自在かつ化学選択的にアジド基へ導入できると考えた。

4. 研究成果

カードランやセルロース等の直鎖状天然多糖を、窒素雰囲気下においてトリフェニルホスフィンおよび四臭化炭素と作用させることにより、6位を選択的にプロモ化した。反応溶液に水を加えて再沈殿を行い、遠心分離によって沈殿物を回収したのち、沈殿をメタノールで洗浄することでプロモ化カードラン(6-プロモ-6-デオキシカードラン: CUR-Br)およびプロモ化セルロース(6-プロモ-6-デオキシセルロース: Cel-Br)を得た。¹³C NMR スペクトル測定(DMSO-d₆, 60℃)を行ったところ、これらの多糖の6位水酸基(-CH₂-OH)に該当するピークが消失し、プロモメチル基(-CH₂-Br)由来のピークが新たに観測された。この結果により、これらの多糖の6位水酸基が全て(定量的に)プロモ化されていることが示唆された。また、6位炭素以外の多糖炭素ピークに、プロモ化による明確な化学シフト値の変化は見られず、プロモ化が6位水酸基特異的に進行していることが示唆された。

次に、前段のプロモ化多糖をDMSOなどに溶解させ、アジ化ナトリウムと共に85℃にて磁気攪拌することでプロモ基からアジド基への変換を行った。反応溶液を大量の水に加えて再沈殿を行い、その後遠心分離を行った。得られた沈殿をメタノールで洗浄することによりアジド化カードラン(6-アジド-6-デオキシカードラン: CUR-N₃)およびアジド化セルロース(6-アジド-6-デオキシセルロース: Cel-N₃)を得た。赤外吸収(IR)スペクトルを測定したところ、2100cm⁻¹付近にアジド基由来の吸収が確認でき、これらの多糖へのアジド基の導入が確認できた。また、¹³C NMR スペクトル測定(DMSO-d₆, 60℃)を行ったところ、多糖の6位水酸基(-CH₂-OH)やプロモメチル基(-CH₂-Br)由来のピークは全く観測されない一方で、新たにアジドメチル基(-CH₂-N₃)のピークの出現が確認できた。この結果より、多糖の6位水酸基が全て(定量的に)アジド化されていることが確認できた。また、6位炭素以外の多糖炭素ピークに化学シフト値の変化は見られず、アジド化が6位水酸基特異的に進行していることが示唆された。また、得られたアジド化多糖の¹³C NMRは非常に単純で、主要なピークは6本しか確認できなかった。このことは、本合成法によって6位水酸基のみが位置特異的かつ定量的にアジド化された多糖誘導体が得られたことを示している。

これらのアジド化多糖とカップリングする機能性モジュールとして、ラクトースやマルトースなどのオリゴ糖鎖を選択した。オリゴ糖鎖を導入した理由は、オリゴ糖が高い水溶性を有し、オリゴ糖導入多糖も結果として高い水溶性を有することが期待できること、

さらにはオリゴ糖鎖が選択的なタンパク質認識能を示すことから、多糖にオリゴ糖を導入することでターゲットタンパク質に対する選択的な認識能を多糖に付与することができることなどである。有機化学的にオリゴ糖に対する化学修飾を行い、末端アルキンを有する様々なオリゴ糖誘導体を合成し、多糖とのカップリングに用いた。まず、アジド化多糖(20 mg)をサンプル瓶に入れ、そこにDMSO(2 ml)を加えた後、60 °Cにて一晩インキュベーションしてアジド化セルロースを完全溶解させた。この反応溶液に末端アルキン修飾オリゴ糖(200 mg)、CuBr₂(2 mg)、アスコルビン酸(6 mg)およびプロピルアミン(0.01 ml)を加え、室温にて一晩静置した。反応終了後、反応溶液に水を加えて希釈し、その後透析(MWC08000、水)を行うことにより精製を行った。得られた水溶液を凍結乾燥することにより、淡黄色粉末としてオリゴ糖導入多糖を得た。得られたオリゴ糖導入多糖の赤外吸収(IR)スペクトルを測定したところ、2100cm⁻¹付近のアジド基由来の吸収が消失しており、多糖へのアジド基の導入が確認できた。また、¹³C NMR スペクトル測定(DMSO-d₆, 60 °C)を行ったところ、アジドメチル基(-CH₂N₃)由来のピークが全く観測されない一方で、1,4-トリアゾール基に由来するピークの出現が確認できた。その他の¹³C NMR ピークは全て主鎖多糖または側鎖オリゴ糖に帰属可能であり、帰属不可能なピークは全く確認できなかった。この結果より、セルロースの全ての6位に1,4-トリアゾールを介してオリゴ糖が導入された多糖誘導体が合成できたことが確認できた。本手法を用いることにより、定量的かつ定量的な機能性基の導入が可能となったことになる。

前述のカップリングによって多糖にオリゴ糖由来の機能が付与できたことを確認するため、蛍光標識レクチンを用いた蛍光滴定

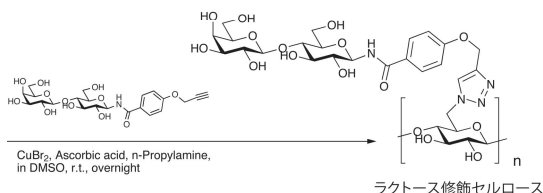
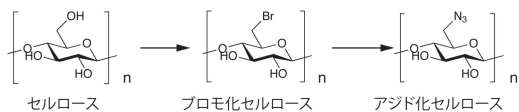


図 「鍵マテリアル」としてのアジド化多糖の合成方法およびその後のアルキン末端修飾オリゴ糖との化学選択的カップリングによるオリゴ糖修飾多糖の合成(ラクトース修飾セルロースを例として)

法により、オリゴ糖導入多糖のレクチン認識能を評価した。たとえばラクトース認識レクチンである RCA₁₂₀ を蛍光性色素であるフルオレセインイソチオシアネート(FITC)で標識した FITC-RCA₁₂₀ のトリスバッファー(pH 7.2, [CaCl₂] and [MnCl₂] = 0.1 mM) 溶液に対してラクトース導入セルロースを添加したところ、FITC-RCA₁₂₀ 由来の蛍光強度の減少が見られ、両者の相互作用を確認できた。添加したラクトース導入セルロースの濃度に対する FITC-RCA₁₂₀ の蛍光強度をプロットし、そのカーブフィッティングより結合の強さを算出したところ、その解離定数(K_d)は 1.46 × 10⁻⁷ M となり、両者が非常に強く相互作用していることが明らかとなった。同様の実験をマンノース認識レクチンである ConA を用いて行ったところ、FITC-ConA の蛍光強度はラクトース導入セルロースの添加によってもそれほど減少しなかった。オリゴ糖鎖の導入により、多糖に特異的なレクチン認識能を付与できたことになる。

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3件)

Erika Yamashita, Kiyomi Okubo, Kaori Negishi, Teruaki Hasegawa "Regioselective and Quantitative Modification of Cellulose to Access Cellulose-based Advanced Materials: Cellulose-based Glycoclusters" *Chem. Lett.*, 38, 122-123 (2009) 査読あり

Teruaki Hasegawa, Munenori Numata, Shiro Okumura, Taro Kimura, Kazuo Sakurai, Seiji Shinkai "Carbohydrate-appended curdlans as a new family of glycoclusters with binding properties both for a polynucleotide and lectins" *Org. Biomol. Chem.*, 5, 2404-2412 (2007) 査読あり

Masato Ikeda, Teruaki Hasegawa, Munenori Numata, Kouta Sugikawa, Kazuo Sakurai, Michiya Fujiki, Seiji Shinkai "Instantaneous Inclusion of a Polynucleotide and Hydrophobic Guest Molecules into a Helical Core of Cationic 1,3-Glucan Polysaccharide" *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 3979-3988 (2006) 査読あり

[学会発表](計13件)

根岸かおり、山下恵里佳、長谷川輝明「部位特異的かつ定量的なセルロース化学修飾

によるセルロース型糖鎖高分子の合成」日本化学会第 89 春季年会 (2009 年 3 月 28 日) 日本大学船橋キャンパス、船橋

Misako Okada, Kanako Ide, Teruaki Hasegawa, Convenient Synthetic Approach toward glycoclusters based on porphyrin core via “click chemistry” between an Alkyne-tethered Porphyrin and Azide-terminated Glycosides, *The 6th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology*, P-36, 60 (November 7th 2008), Inoue Enryo Hall, Hakusan Campus, Toyo University, Hakusan, Tokyo

Erika Yamashita, Kaori Negishi, Teruaki Hasegawa, Quantitative and regio-selective approach to develop new artificial glycopolymers having cellulose-scaffold, *The 6th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology*, P-35, 59 (November 7th 2008), Inoue Enryo Hall, Hakusan Campus, Toyo University, Hakusan, Tokyo.

Sho Sekiguchi, Teruaki Hasegawa, Artificial glycoclusters as tools to investigate carbohydrate-carbohydrate interactions (2): glycosylated bipyridines, *The 6th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology*, P-34, 58 (November 7th 2008), Inoue Enryo Hall, Hakusan Campus, Toyo University, Hakusan, Tokyo.

Atsushi. Otsuka, Teruaki Hasegawa, Artificial glycoclusters as tools to investigate carbohydrate-carbohydrate interactions (1): glycosylated ferrocenes, *The 6th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology*, P-33, 57 (November 7th 2008), Inoue Enryo Hall, Hakusan Campus, Toyo University, Hakusan, Tokyo.

山下恵里佳、長谷川輝明「位置特異的修飾を利用した新規セルロース型糖質高分子の開発」第 57 回高分子討論会 (2008 年 9 月 24-26 日) 大阪市立大学杉本キャンパス、大阪

山下恵里佳、長谷川輝明「セルロースを骨格とする新規糖鎖高分子の合成と機能」第 3

回バイオ関連科学合同シンポジウム (2008 年 9 月 20 日) 東京工業大学すずかけ台キャンパス、横浜

岡田美佐子、井手加奈子、長谷川輝明「クリックケミストリーを利用した糖クラスター修飾ポルフィリンの合成と機能」第 3 回バイオ関連科学合同シンポジウム (2008 年 9 月 20 日) 東京工業大学すずかけ台キャンパス、横浜

関口翔、長谷川輝明「糖鎖間相互作用の解明に向けた糖修飾ピビリジンの合成」第 3 回バイオ関連科学合同シンポジウム (2008 年 9 月 20 日) 東京工業大学すずかけ台キャンパス、横浜

大塚睦司、長谷川輝明「糖鎖間相互作用の解明に向けた軸不斉糖クラスター分子の合成」第 3 回バイオ関連科学合同シンポジウム (2008 年 9 月 20 日) 東京工業大学すずかけ台キャンパス、横浜

Atsushi Otsuka, Teruaki Hasegawa “Synthesis of artificial glyco-clusters based on meso-meso linked porphyrin dimers” *The 5th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology*, P-73, 104 (December 4th-5th 2007), Prince Hotel Kawagoe, Kawagoe, Japan.

Teruaki Hasegawa, Seiji Shinkai “Quantitative and regio-selective approach to develop functional polysaccharide derivatives” *The 5th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology*, P-72, 103 (December 4th-5th 2007), Prince Hotel Kawagoe, Kawagoe, Japan.

大塚睦司、長谷川輝明「ポルフィリンメソダイマーを骨格とする糖クラスター化合物の合成」第 22 回生体機能関連化学シンポジウム (2007 年 9 月 28-29 日) 東北大学多元物質科学研究所、仙台

〔産業財産権〕
出願状況 (計 3 件)

長谷川輝明・岡田美佐子「ポルフィリン誘導体」東洋大学・特願 2008-169306 (出願日: 2008 年 6 月 27 日)

長谷川輝明・山下恵里佳「セルロース誘導体」東洋大学・特願 2008 -162015（出願日：2008年6月20日）

新海征治・池田将・沼田宗典・長谷川輝明・杉川幸太・櫻井和朗「イオン性カードラン誘導体および該カードラン誘導体と疎水性高分子から成る複合体」独立行政法人科学技術振興機構・特願 2007 -48690（出願日：2007年2月27日）

6．研究組織

(1)研究代表者

長谷川 輝明（HASEGAWA TERUAKI）

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：90423566

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし