

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05067

研究課題名(和文)らせん性多糖類を活用した光エネルギー変換および高感度検出系の構築

研究課題名(英文) Construction of light energy conversion and highly sensitive sensor systems based on the helical polysaccharide

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：側鎖に抗生物質を導入したカードランを用いて、病原性細菌類の対策に効果的な抗菌性薄膜の開発に成功した。この薄膜は、抗菌活性の発現に多価効果の寄与が確認され、薬剤耐性菌に対しても一定の抗菌効果を発揮することが確認された。一方、酵母残渣に対して次亜塩素酸処理することで、水に対する溶解性やらせん構造形成能などの物性が異なるベータグルカン類を分離する手法を確立した。このベータグルカンはカーボンナノチューブを単分子的に水溶化する、高分子型可溶化剤として活用できた。興味深いことに、単層カーボンナノチューブとの錯体形成においては、キラル選択性が発現することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性菌の対策は、現在の医療において最重要課題である。また、多価効果の利用は生体を模倣した有効な機能強化法として期待されてきたが、現在までに実用に至る十分な成果は得られていない。本研究の成果は、上記のいずれに対しても有効な知見を与えるものであり、多剤耐性菌の対策に実用性のある研究の発展に寄与すると期待される。また、産業廃棄物である酵母残渣から単層カーボンナノチューブの可溶化材として活用可能な多糖類の分離は、新しい機能材料開発に極めて必要な知見である。特にキラル選択性の発現は、カーボンナノチューブと可溶化剤とが持つらせん構造の相関性によるカーボンナノチューブの新しい精製法として重要である。

研究成果の概要(英文)：Using the curdlan derivatives having antibiotic side chains, it was successfully developed the antibacterial thin films which are effective against pathogenic bacteria.

It was confirmed that this thin film showed a certain antibacterial effect against antibiotic-resistant bacteria, as consequence of the multivalent-effect based on the structural properties of beta-glucans. On the other hand, a method for separating yeast-derived beta-glucans has been established by treating yeast residues with hypochlorous acid. The resulting beta-glucans showed unique physical characteristics such as water solubility and helix formation ability. These yeast-derived beta-glucans were applied as polymer-type solubilizers that monomolecularly solubilize for carbon nanotubes. Interestingly, it was revealed that chiral selectivity was exhibited in the complexation between the beta-glucans and single walled carbon nanotubes.

研究分野：分子集積化学

キーワード：超分子科学 耐性菌 抗生物質 らせん構造 多糖 カーボンナノチューブ

1. 研究開始当初の背景

β グルカン類は、特徴的な 3 重らせん構造をもつ天然由来の多糖である。これまでに新海らは、この 3 重らせん構造が可逆的に解離・再形成可能である事を利用して、DNA やカーボンナノチューブなどの特定の機能材料と複合化する手法を確立し、さらに、化学修飾した β グルカン類の開発とこれを利用したゲスト分子の包摂や高分子の組織化など、多数の成果を報告している。我々も、 β グルカン類の一つであるカードランに化学修飾を施すことで、刺激応答型の両性カードランの開発に成功し、薬物輸送系などへの応用の可能性を明らかにした。さらに、両性カードランと蛍光性高分子との複合体が劇的な蛍光色調変化を示し、分子センサーとして有用であることを報告して来た。蛍光による検出は高い感度を実現でき、検出技術的にも単純であることから、この技術はより実用性の高い検出系構築に応用することが期待される。

β グルカン類は特定の酵母の細胞壁の主成分である。これらの酵母は、食品添加物の生産などに活用されているが、標的化合物を得た後に残される酵母残渣は、その有効な活用法が確立しておらず、一部の健康食品や極めて安価な肥料などとして僅かに利用される以外は、廃棄されているのが現状である。近年申請者は、これらの酵母残渣に対して一般的な酸化反応や酵素処理を適用する事で、 β グルカン類を極めて簡便に取り出す手法を見出し、透明性の高い薄膜を簡便に調製することに成功した。さらに、処理条件を変えることで粘着性を持ち、接着効果を期待できる β グルカン類の分離にも成功している。

2. 研究の目的

本研究では「 β グルカン類の特異な構造特性を利用した機能化について更なる追求」を進めると共に、「これらの技術・知見を実学的な成果へと発展させるための方法論を確立する」事を学術的な問いとして位置づけた。病原性細菌類の対策や高感度分子センサーの開発に効果的な新たな分子システムの構築を主たる題材とし、これらの開発において産業廃棄物となっている酵母残渣の活用を検討した。本研究から得られる成果は、 β グルカン類を活用した新たな多糖材料の技術革新に貢献すると共に、産業廃棄物をバイオマス資源化するための、有効な戦略を与えるものと期待している。

3. 研究の方法

病原性細菌類の対策に効果的な新たな分子システムの構築のために、そのプロトタイプとして、Click Chemistry を鍵反応とした有機合成スキームを採用し、側鎖にバンコマイシンを導入したカードラン (VGC) を開発した。この側鎖修飾多糖の 3 重らせん形成能およびゲスト分子包接能について、各種分光学的手法により明らかにした。これらの基本情報をもとに、様々な導入率を持つバンコマイシン修飾カードランの抗菌活性について、バンコマイシン感受性菌およびバンコマイシン耐性菌に対する抗菌効果を評価することで、VGC の抗菌活性の発現における分子集積効果の発現について評価を行った。

また、産業廃棄物として扱われている酵母残渣から、特定の条件下での酸化反応を適用することで、水に対する溶解性が異なる酵母由来 β グルカン (BG) を得た。これらの 3 重らせん形成能およびゲスト分子包接能について、各種分光学的手法により明らかにした。これらの基礎情報をもとに、超音波処理操作による単層カーボンナノチューブ (SWCNT) の一分子可溶化について検討し、BG と SWCNT との錯形成過程について各種分光学的手法により、解析した。

4. 研究成果

目標とする VGC (図 1) は、カードラン (CUR) を構成するグルコースユニットの 6 位の水酸基を任意の割合でアジド基に変換したアジ化カードラン (CUR- N_3) と、バンコマイシンにスペーサーを介して末端アセチレンを導入したバンコマイシン誘導体 (Van) を別途合成し、これらを Huisgen 環化反応により縮合した後、脱保護反応を行うことで合成した。その際、合成時に使用した CUR- N_3 のアジド基導入率を変化させることで、Van の導入率が異なる VGC を調製した。

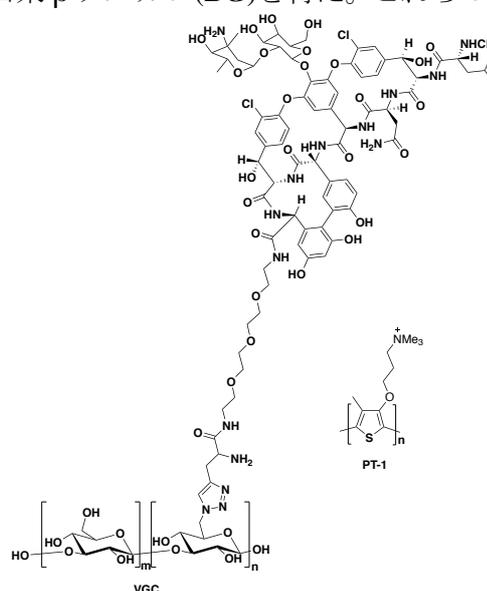


図 1 バンコマイシン導入カードラン (VGC) と PT-1 の構造

各種 VGC は定法に従って、2-アニリノナフタレン-6-スルホン酸 (2,6-ANS) を指標とした円二色性 (CD) スペクトル測定による分析することで、らせん形性能を保持していることが判明した。また、分子センサー系への応用を期待し、外部刺激により色調変化が起こすカチオン性ポリチオフェン (PT-1) との複合化実験を行った。PT-1/VGC 複合体は共らせん構造を有しており標的となる菌体の検出を行える可能性が示唆された。

抗菌活性評価は、溶液系と薄膜系の2つの方法で行った。溶液系での評価では、Van 感受性菌に対する Van の最小発育阻止濃度 (MIC) は $0.8 \mu\text{g/mL}$ であり、VGC の MIC は、VGC(5%)= $16 \mu\text{g/mL}$, VGC (30%)= $63 \mu\text{g/mL}$, VGC (60%)= $125 \mu\text{g/mL}$, VGC (90%)= $500 \mu\text{g/mL}$ であった。また、Van 耐性菌に対しては MIC を示す十分な結果が得られなかった。Van 感受性菌において、VGC は抗菌活性が Van に比べ 20 倍以上低下しており、低導入率の VGC ほど抗菌活性が高いことが判明した。これらの検討では、VGC の水溶性の低さが問題として指摘された。そこで、低分子量化することで水溶性を向上させた s-VGC(30%)を別途合成し、抗菌活性を評価したところ、その MIC は $8 \mu\text{g/mL}$ と与えられた。これは、Van に比べ 10 倍抗菌活性が低下していることを示す。しかし、VGC(30%)と比較すると 8~16 倍抗菌活性が上昇しており分子量や有効薬剤濃度が抗菌性を高めるうえで非常に重要な要素であることが判明した。薄膜系での評価では、VGC 不在の CUR 薄膜で培養した黄色ブドウ球菌の発育を全く阻害することがなかったのに対して、Van 密度が 5%未満になるように調製した、VGC 含有 CUR 薄膜で培養した場合、黄色ブドウ球菌の発育が全く観測できなかった。この結果から、VGC/CUR 薄膜は十分な抗菌性を保持していることが判明した。VGC 含有率を再度検討し十分な抗菌性を示す領域を見つける必要はあるが、薄膜化に成功したことで材料化への応用が期待できる成果である。

酵母残渣を次亜塩素酸処理することで、 β グルカン (BG) 以外の成分を分解させ、比較的高純度の BG を回収することに成功した。この BG (一段階処理 BG: 1BG) を原料として、二段階目の次亜塩素酸処理を行うことで、低分子量化された水溶性 BG (2BGws) と比較的高分子量のアルカリ性水溶液に可溶性 BG (2BGas) とを分離する手法を確立した (図 2)。有効塩素濃度を変化させながら 4°C の処理条件で回収される BG の回収率を調査した結果、より高い有効塩素濃度で処理することで、2BG 全体の回収率が低下することが確認された。これは、より厳しい条件での次亜塩素酸処理は、1BG を過剰に分解し、本実験手法では回収できないほどの小分子 (グルコース以下の分子サイズ) にまで変換される割合が増加することを意味している。一方、2BGws については、有効塩素濃度が適度に高い条件で、20~40%程度回収されることが確認された。また、2BGas は有効塩素濃度の上昇に伴って、回収率が低下することが判明した。2BGws は、より低分子量にまで分解された BG であることから、比較的厳しい次亜塩素酸処理条件において、より多く回収され、これに伴って、より高分子量の 2BGas の回収量が低下することが確認された。

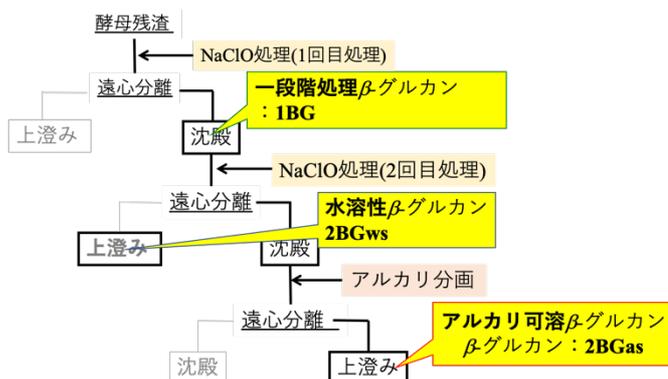


図 2 次亜塩素酸処理によるトルラ酵母由来 β -グルカンの単離プロセス

単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は発光特性や発熱特性などの特有の機能を有しており、電子材料としてだけでなく、生体の可視化や医療材料としての応用も注目されている。CNT は高い疎水性により数多くの SWCNT が束なったバンドル状態を形成しているが、この状態では SWCNT 間の相互作用が強いため、その機能を十分に発揮することができない。よって、SWCNT を応用するためには、バンドル状態を解き、単分子的な CNT を得る事が重要となり、様々な研究が進められている。本研究では水溶性の 2BGws を用いて SWCNT の単分子可溶化について検討を行った。

図 3 に複合化工程の流れ図を示す。所定量の 2BGws と Co-Mo cat 法で合成された SWCNT (数種類の半導体 CNT の混合物) を水中で混合し、バス型超音波洗浄機で 1 時間超音波照射した。その後、さらにプローブ型超音波ホモジナイザーを用いて 30 分間超音波照射した。得られた懸濁液を $100,000 \text{ G}$ の重力加速度で 20 分間遠心分離す

ることで、単分子的な CNT が可溶化された **2BGws/SWCNT** 複合体を上清として回収した。

得られた **2BGws/SWCNT** 複合体水溶液が与える吸収スペクトル (図 4 a) と発光スペクトルマッピング (図 4 b) から、確かに SWCNT が単分子的に可溶化されていることが確認された。吸光強度や見た目の色から、比較的高濃度の単分子的 SWCNT 水溶液を得る事ができたことから、**2BGws** は非界面活性剤系の天然素材でありながら、良好な SWCNT の可溶化剤として活用出来る事が明らかとなった。興味深いことに、**2BGws/SWCNT** 複合体水溶液の吸収スペクトルと、販売元から提供された SWCNT の吸収スペクトルとを比較すると、(7,5)および(7,6)のキラリティー (構造特性) を持つ SWCNT が比較的選択的に **2BGws** と複合化することが判る。このことは、SWCNT の新しい精製法の提案などに繋がる有用な知見である。

さらに、**2BGws/SWCNT** 複合体が 80°C に加熱されても安定に存在できることが確認された。最も一般的な単分子的可溶化は界面活性剤 (最も典型的な例としては SDBS) との複合化によって達成されているが、この複合体は 80°C の条件では崩壊することが確認された。以上の結果から、**2BGws/SWCNT** 複合体は高い物理的安定性を有していることが明らかとなった (図 5)。

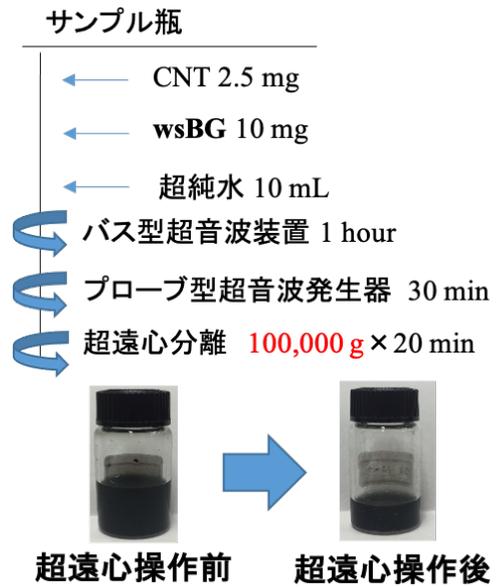


図 3 **2BGws/CNT** 複合体の調製工程

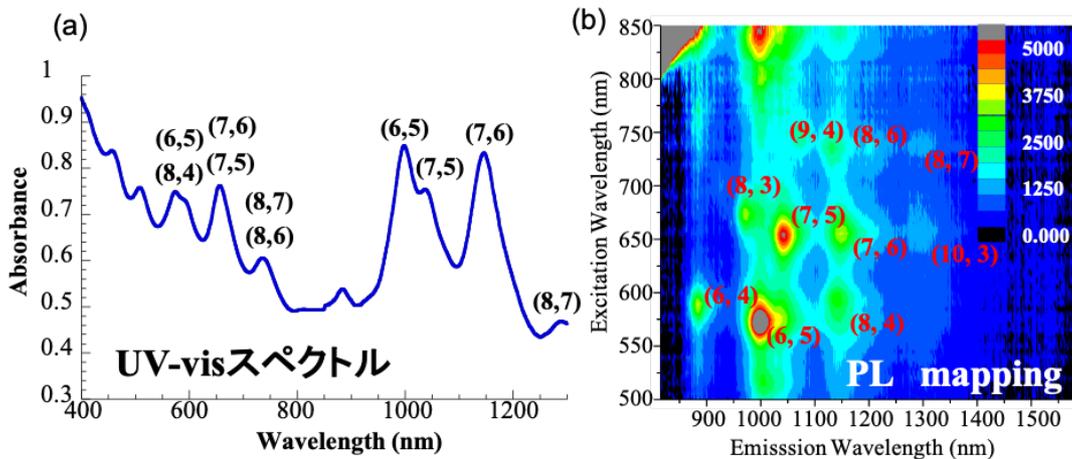


図 4 **2BGws/SWCNT** 複合体水溶液が示す吸収スペクトル (a) と発光マッピング (b)

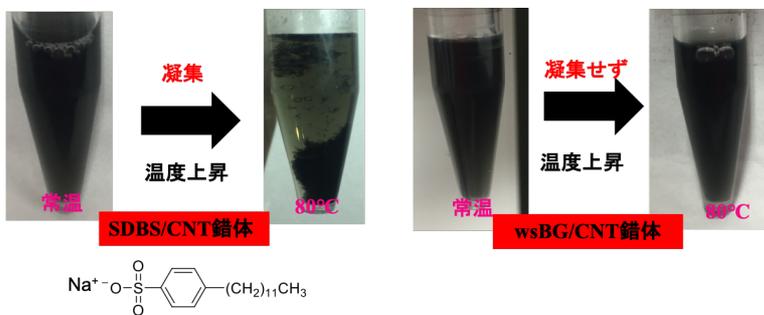


図 5 **2BGws/SWCNT** 複合体と **SDBS/SWCNT** 複合体熱安定性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naofumi Kudoda, Yukie Tounoue, Kouichiro Noguchi, Yutaro Shimasaki, Hitoshi Inokawa, Masayoshi Takano, Seiji Shinkai, Shun-ichi Tamaru	4. 巻 -
2. 論文標題 Guest-responsive supramolecular hydrogels expressing selective sol-gel transition for sulfated glycosaminoglycans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-020-0341-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamaru Shun-ichi, Miyabi Honzaki, Kinosuke Kamogawa, Kaori Hori, Miki Kubo, Naofumi Kuroda, Seiji Shinkai	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Amylose grafted Curdlan; a New Class of Semi artificial Branched Polysaccharides for Hierarchical Polymeric Superstructures Created by the Action of "Orthogonal" Binding Sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/asia.201900375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 10件）

1. 発表者名 枝元 佑貴, 黒田 尚史, 新海 征治, 田丸 俊一
2. 発表標題 自己修復性ソフトマテリアル開発を指向した超分子ヒドロゲルの物性制御
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田 尚史, 新海 征治, 田丸 俊一
2. 発表標題 ゲスト応答的なゾルーゲル相転移を利用した、グリコサミノグリカンの識別
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naofumi Kuroda, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai
2. 発表標題 Properties and function of supramolecular hybrid hydrogels toward the construction of high performance sensor
3. 学会等名 The 24th Joint Seminar of the Kyushu Branch of the CSJ and the Busan Branch of KCS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuma Ishida, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai
2. 発表標題 Development and characterization of sugar derivatives possessing beta-1,3-glucan unit
3. 学会等名 The 24th Joint Seminar of the Kyushu Branch of the CSJ and the Busan Branch of KCS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinosuke Kamogawa, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai
2. 発表標題 Polysaccharide-assisted self-assembly of functional molecules into hierarchical superstructure and its function
3. 学会等名 The 24th Joint Seminar of the Kyushu Branch of the CSJ and the Busan Branch of KCS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Tanaka, Naofumi Kuroda, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai
2. 発表標題 Properties and function of hybrid gels composed of stimuli-responsive polymer and supramolecular fiber
3. 学会等名 The 24th Joint Seminar of the Kyushu Branch of the CSJ and the Busan Branch of KCS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田 尚史, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 物質検出系構築を指向した超分子ヒドロゲル系による刺激応答性の制御
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 勝守, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 天然由来ペータグルカンを基盤とする機能材料の開発研究
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鴨川 氣ノ佑, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 半人工分岐多糖を用いたJanus型FRET系の構築
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 皓, 黒田 尚史, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 超分子ユニット導入型高分子/超分子複合ゲルが示す刺激応答性
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naofumi Kuroda, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai
2. 発表標題 Properties and function of supramolecular/polymer hybrid hydrogels toward the construction of high performance sensor
3. 学会等名 The 9th SOJO-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinosuke Kamogawa, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai
2. 発表標題 Construction of Janus-type FRET system on the bases of semi-artificial branched polysaccharide
3. 学会等名 The 9th SOJO-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuma Ishida, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai
2. 発表標題 Extraction and properties of yeast-derived beta-glucans
3. 学会等名 The 32nd International Symposium on Chemical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinosuke Kamogawa, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai
2. 発表標題 Amylose-grafted curdlan: a new class of semi-artificial branched polysaccharides for hierarchical polymeric superstructure created by action of orthogonal binding sites (Best poster presentation award)
3. 学会等名 The 32nd International Symposium on Chemical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naofumi Kuroda, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai
2. 発表標題 Preparation and stimuli-responsive properties of supramolecular/polymer hybrid hydrogels
3. 学会等名 The 32nd International Symposium on Chemical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 勝守, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 酵母由来ベータ-1,3-グルカン類の物性と機能化
3. 学会等名 日本化学会第100春期年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鴨川 氣ノ佑, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 アミロースグラフトカードランを用いたJanus型のFRETシステムの構築
3. 学会等名 日本化学会第100春期年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田 尚史, 枝元祐貴, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 超分子複合ヒドロゲルの調製と物理的特性の制御
3. 学会等名 日本化学会第100春期年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 勝守, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 対病原性微生物を指向した多糖誘導体の開発研究
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川内 智子, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 多糖が示す物質包接能の評価と発光材料への応用研究
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuma Ishida, Shun-ichi Tamaru, Seiji Shinkai
2. 発表標題 Development and properties of antibiotic-introduced beta-1,3-glucan derivatives
3. 学会等名 The 8th SOJO-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田 勝守, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 beta-1,3-グルカン骨格を有する糖誘導体の開発と物性評価
3. 学会等名 日本化学会第99春期年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鴨川 氣ノ佑, 田丸 俊一, 新海 征治
2. 発表標題 多糖による機能性分子の階層的組織化と機能発現
3. 学会等名 日本化学会第99春期年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 腎機能悪化抑制効果のある酵母抽出物	発明者 田丸 俊一、安楽 誠、庵原 大輔、福田 雄典、阿孫 健一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-6006	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 創傷治癒効果のある酵母抽出物	発明者 田丸 俊一、安楽 誠、庵原 大輔、福田 雄典、阿孫 健一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-6007	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 トルラ酵母由来の - グルカン	発明者 田丸 俊一、福田 雄 典、阿孫 健一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-132780	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関