

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05042

研究課題名（和文）多種多様な材質の担体に適用可能な糖鎖界面形成技術の開発とバイオ分離精製への応用

研究課題名（英文）Development of glycol-functional interface formation technique applicable to various materials and application to bioseparation/purification

研究代表者

瀬戸 弘一（Seto, Hirokazu）

福岡大学・工学部・助教

研究者番号：70621126

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：化学的に安定な糖鎖で担体表面を修飾し、抗体に匹敵する糖鎖の生体分子認識機能をバイオセパレーションに活用することが期待されている。これまでの糖鎖による表面修飾は、担体の種類によって手法を使い分けなければならず、その操作もステップ数が多く煩雑であるといった問題があった。そこで我々は、糖鎖界面の形成および糖鎖密度の制御を簡便にするため、基板固定化部位として担体の材質に依存せず接着可能なカテコール基と生体物質認識部位として糖鎖を有する高分子を設計し、糖鎖界面を容易に形成できる技術を開発した。さらに、この技術を用いて糖鎖の生体分子認識機能を利用したバイオセパレーションに応用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖はその化学的安定性から抗体などのタンパク質よりも優れており、生体物質に対する特異性も抗体に匹敵する。しかし、複雑で多様な構造をもつ糖鎖は構造解析や機能解明が難しく、タンパク質やDNAに比べて研究が遅れているのが現状である。これらの課題を踏まえ我々は、デバイスの構築プロセスにメリットをもたせる重要性に着目し、高い接着性を発現する天然ポリフェノールからアイデアを得た糖鎖界面形成技術を考案した。糖鎖の優れた生体分子認識機能を利用したバイオセパレーションが実用化されれば、バイオ医薬の製造コスト削減につながる。

研究成果の概要（英文）：It is expected that the material surfaces are modified with chemically-stable glycosides and the biomolecule recognition abilities of the glycosides, which are comparable to antibodies, are utilized for bioseparation. Conventionally, surface modification using glycosides has some problems that the method must be used properly depending on the materials, and the operation is complicated due to the large number of steps. Therefore, in order to simplify the formation of the glycol-functional interface and the control of the glycoside density, we prepared a polymer having catechol groups as a substrate immobilization site and glycosides as a biological recognition site. Furthermore, this technique was applied to bioseparation using the biomolecule recognition ability of the glycosides.

研究分野：化学工学

キーワード：糖鎖高分子 カテコール基 コーティング 分子認識界面 バイオ分離精製

1. 研究開始当初の背景

細胞表面に存在する“糖鎖”はウイルス・細菌の感染、細胞接着、ガン転移などあらゆる生命現象における分子認識に関与し、その結合力や特異性は抗体に匹敵する。その糖鎖を材料表面に固定した糖鎖界面は特異的で強い生体分子結合性を示す。この糖鎖界面が活躍する主な分野の一つが、生体物質の分離精製、すなわちバイオセパレーションである。バイオプロセスでは多くの物質が共存した粗生産物からの高純度化が要求されるため、分離精製システムが占める重要度は高い。現在広く使われている抗体はタンパク質であるため化学変性や長期保存などに問題があり、バイオ医薬の薬価を圧迫しているのが現状である。化学的に安定な糖鎖を分子認識素子として代用すれば、バイオ医薬製造における精製コストの削減につながる。

一般に、バイオセパレーションに用いられる支持担体には、微粒子、ゲル、多孔質膜等、様々な形状が使われる。また、それらの材質は、無機材料、天然多糖類、合成高分子と多種多様である。つまり、担体によって糖鎖界面の形成手法を使い分けしなければならず、その操作もステップ数が多く煩雑であるといった問題があった。ワンステップで多種多様な材質・形状に適用可能な糖鎖界面形成技術が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、糖鎖界面の形成および糖鎖密度の制御を簡便にするため、基板固定化部位として担体の材質に依存せず接着可能なカテコール基と生体物質認識部位として糖鎖を有する合成高分子を2種類設計し(図1)、糖鎖界面を容易に形成できる技術を開発した。このカテコール含有糖鎖高分子の担体固定化能およびタンパク質結合能を水晶発振子マイクロバランス(QCM)を用いて評価した。さらに、糖鎖高分子を多孔性中空糸膜に固定化し、タンパク質を連続フロー式で吸着させた。

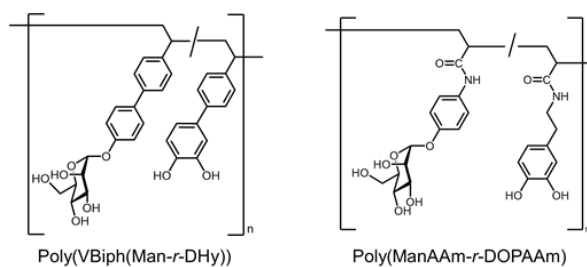


図1 スペーサーにビフェニル基をもつカテコール含有糖鎖高分子とスペーサーにアミド基をもつカテコール含有糖鎖高分子。

3. 研究の方法

①カテコール含有糖鎖高分子の作製

スペーサーにビフェニル基をもつカテコール含有糖鎖高分子は、Suzuki カップリング反応を利用した逐次的なポスト機能化によって作製した。まず、主鎖前駆体となるフェニルボロン酸を側鎖にもつ高分子をフリーラジカル重合によって合成した。次に、糖鎖リガンドとして *p*-プロモ糖鎖の仕込み濃度を変えて高分子に反応させた。さらに、大過剰の 4-プロモカテコールを反応させて残りのフェニルボロン酸に反応させた。

スペーサーにアミド基をもつカテコール含有糖鎖高分子は、糖鎖モノマーおよびカテコールモノマーの直接重合によって作製した。アセチル化処理をした糖鎖モノマーおよびカテコー

ルモノマーをジメチルホルムアミドに溶解し、ラジカル開始剤を加えて加熱した。得られた高分子にナトリウムメトキシドを添加して脱アセチル化した。

②カテコール含有糖鎖高分子の担体固定化能およびタンパク質結合能評価

異なる材質をもつ QCM センサーセルにカテコール含有糖鎖高分子溶液を供給し、高分子固定化に伴う振動数変化を QCM を用いて測定した。さらに、pH が異なる緩衝液、カテコールをもたない糖鎖高分子、およびカテコール含有糖鎖単量体を用いて、担体固定化への pH、カテコール基の有無、および高分子化の影響を調べた。糖鎖高分子を固定化した QCM センサーセルにタンパク質溶液を供給し、タンパク質吸着に伴う振動数変化を QCM を用いて測定した。タンパク質には、コンカナバリン A (Con A、糖親和性あり) およびウシ血清アルブミン (BSA、糖親和性なし) を用いた。

③糖鎖高分子固定化膜を用いたタンパク質の連続フロー式吸着

シリカアルミナ製の多孔性中空糸膜(図 2)にカテコール含有糖鎖高分子溶液に浸漬して固定化した。糖鎖高分子固定化膜に Con A および BSA 溶液をそれぞれ供給し、流出液中のタンパク質濃度を測定した。

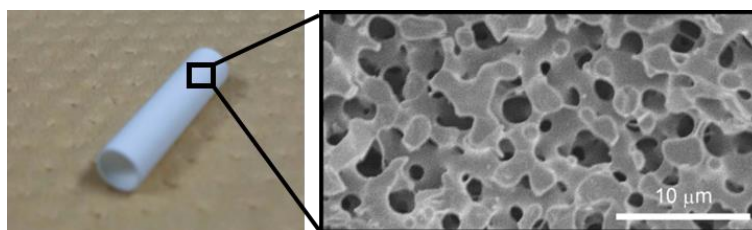


図 2 SiO₂/Al₂O₃製の多孔性中空糸膜

4. 研究成果

①カテコール含有糖鎖高分子の合成

スペーサーにビフェニル基をもつカテコール含有糖鎖高分子は、Suzuki カップリング反応を利用した逐次的なポスト機能化によって作製した。1 段階目として、*p*-ブromo糖鎖の仕込み濃度を変えて高分子に反応させると、導入率が最大で 11%の糖鎖高分子が得られた。この高分子に 2 段階目として 4-ブromoカテコールを反応させてカテコール含有糖鎖高分子を作製した。この作製方法で得られた糖鎖高分子の糖鎖導入率は低く、ビフェニル基のバルキーな構造により水溶性も低かった。

スペーサーにアミド基をもつカテコール含有糖鎖高分子は、糖鎖モノマーおよびカテコールモノマーの直接重合によって作製した。得られた高分子中の糖鎖およびカテコールの比率は 58:42 であり、仕込みのモノマー比率に近かった。この作製方法で得られた糖鎖高分子の水溶性は高かった。

②カテコール含有糖鎖高分子の担体固定化能およびタンパク質結合能評価

カテコール含有糖鎖高分子が金、シリカ、およびポリスチレン表面に固定化されることを QCM 測定により確認した。スペーサーにビフェニル基をもつカテコール含有糖鎖高分子を異なる pH でシリカ表面に固定化させると、高 pH では固定化されなかった。これはカテコール基の酸解離に起因する。また、カテコールを含有しない糖鎖高分子は固定化が確認されなかったことから、

この固定化にはカテコール基が必要であると言える。さらに、スぺーサーにアミド基をもつカテコール含有糖鎖単量体の固定化挙動と比べるとカテコール含有糖鎖高分子は低濃度から固定化され、固定化量も単量体よりも大きかった。高分子化したことで担体固定化能が向上した。

カテコール基含有糖鎖高分子を用いて形成した糖鎖界面へのタンパク質結合性を評価した。スぺーサーにビフェニル基をもつ糖鎖高分子への Con A および BSA の吸着量は同程度であり、親和性があるはずの Con A の吸着量は小さかった。これは、高分子中の糖鎖導入率が低く、形成された界面の糖鎖密度が低かったためである。一方で、スぺーサーにアミド基をもつ糖鎖高分子への Con A 吸着量は大きく、特定のタンパク質への親和性を示した。さらに、QCM 測定の結果から Con A が単層量以上に吸着していることがわかったため、このカテコール含有糖鎖高分子が多層固定されていることが示唆される。

③糖鎖高分子固定化膜を用いたタンパク質の連続フロー式吸着

スぺーサーにアミド基をもつ糖鎖高分子が Con A に対して高い親和性を示したため、この糖鎖高分子を多孔性中空糸膜に固定化し、タンパク質を連続フロー式で吸着させた。糖鎖高分子固定化膜に BSA 溶液を通液させると、直後から流出しほとんど吸着しなかった。一方で、Con A 溶液を通液させると、初め流出液中にタンパク質が検出されず膜に吸着した。そして、膜体積の 20 倍の Con A 溶液量を通液させた時に破過に達した。多孔性中空糸膜の細孔径はタンパク質よりも大きいため、Con A 除去のメカニズムはサイズ排除ではない。カテコール含有糖鎖高分子を固定化した膜は選択的に Con A を吸着でき、バイオセパレーションとしての応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Seto Hirokazu, Yasunaga Mayu, Mawatari Nami, Hirohashi Yumiko, Yao Shigeru, Shinto Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Formation of a glyco-functionalized interface on polyethylene using a side-chain crystalline block copolymer with epoxide	5. 発行年 2022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/s41428-022-00652-w	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 Seto Hirokazu, Tono Takumi, Nagaoka Akiko, Yamamoto Mai, Hirohashi Yumiko, Shinto Hiroyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Preparation and characterization of glycopolymers with biphenyl spacers via Suzuki coupling reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic and Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 4474-4477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D10B00617G	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 Hirokazu Seto, Atsushi Saiki, Ryosuke Matsushita, Wataru Mitsukami, Seiji Kamba, Makoto Hasegawa, Yoshiko Miura, Yumiko Hirohashi, Hiroyuki Shinto	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of microparticle counting sensor based on structural and spectroscopic properties of metal mesh device.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Powder Technology	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） 10.1016/j.appt.2021.04.002	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 Hirokazu Seto, Mao Harada, Hiroki Sakamoto, Hidenori Nagaura, Tatsuya Murakami, Ichiro Kimura, Yumiko Hirohashi, Hiroyuki Shinto	4. 巻 31
2. 論文標題 Visual sensing of proteins using gold nanoparticles coated with polyphenolic glycoside.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Powder Technology	6. 最初と最後の頁 4129-4133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.appt.2020.08.018	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 Hiroyuki Shinto, Miho Takiguchi, Yume Furukawa, Haruka Minohara, Maki Kojima, Chika Shigaki, Yumiko Hirohashi, Hirokazu Seto	4. 巻 31
2. 論文標題 Adhesion and cytotoxicity of positively charged nanoparticles toward budding yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Powder Technology	6. 最初と最後の頁 3686-3694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.appt.2020.06.043	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 Hirokazu Seto, Mao Harada, Hidenori Nagaura, Honoka Taniguchi, Tatsuya Murakami, Ichiro Kimura, Yumiko Hirohashi, Hiroyuki Shinto	4. 巻 -
2. 論文標題 Formation of glyco-functionalized interfaces for protein binding using polyphenolic glycoside.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	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) 10.1016/j.carres.2020.108002	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 Hirokazu Seto, Hikaru Matsumoto, Yoshiko Miura	4. 巻 -
2. 論文標題 Preparation of palladium-loaded polymer hydrogel catalysts with high durability and recyclability	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/s41428-020-0323-z	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 Hiroyuki Shinto, Tomonori Fukasawa, Kosuke Yoshisue, Hirokazu Seto, Takaharu Kawano, Yumiko Hirohashi	4. 巻 31
2. 論文標題 Effect of exposure temperature on the cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, and malignant melanocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Powder Technology	6. 最初と最後の頁 835 ~ 842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.appt.2019.12.001	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17件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 瀬戸 弘一, 長浦 秀憲, 大岩 快, 結城 亮, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸
2. 発表標題 生体分子認識部位および担体固定化部位をもつ合成高分子を用いたタンパク質のアフィニティー吸着
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maki Kojima, Chika Shigaki, Yumiko Hirohashi, Hirokazu Seto, Hiroyuki Shinto
2. 発表標題 Effect of exposure environment on adhesion and cytotoxicity of nanoparticles toward budding yeast and fission yeast
3. 学会等名 8th Asian Particle Technology Symposium APT2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬戸 弘一, 東納 拓海, 渡邊 昂甫, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸
2. 発表標題 金属触媒反応を利用した蛍光性糖鎖誘導体の合成
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬戸 弘一
2. 発表標題 あらゆる基材に適用できるコーティング剤の開発とその評価
3. 学会等名 ナノテクノロジープラットフォーム利用成果発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬戸 弘一
2. 発表標題 分子認識界面の形成および分離材料・検出材料への応用
3. 学会等名 令和2年度九州地区高分子若手研究会・冬の講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小嶋真季, 志垣知佳, 廣橋由美子, 瀬戸弘一, 新戸浩幸
2. 発表標題 酵母へのナノプラスチックの付着・取込・毒性に及ぼす曝露環境の影響
3. 学会等名 化学工学会九州支部オンライン学生発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長浦 秀憲, 瀬戸 弘一, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸
2. 発表標題 担体固定化部位および生体分子認識部位をもつ合成高分子の開発
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬戸 弘一, 原田 真緒, 長浦 秀憲, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸
2. 発表標題 天然および合成ポリフェノール配糖体を用いた生体物質吸着界面の形成
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 満畑 亮, 瀬戸 弘一, 廣橋 由美子, 藤井 文彦, 新戸 浩幸
2. 発表標題 量子ドット担持シリカ粒子の作製および蛍光粒子プローブとしての応用
3. 学会等名 第71回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小嶋 真季, 志垣 知佳, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸
2. 発表標題 出芽および分裂酵母へのナノ粒子の付着・取込・毒性に及ぼす媒体塩分濃度の影響
3. 学会等名 第71回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田 優太, 野中 康平, 田中 和輝, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸
2. 発表標題 粒子物性および曝露環境がシリカ粒子の溶血作用に対して及ぼす影響
3. 学会等名 第71回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬戸 弘一, 佐伯 篤志, 松下 亮佑, 満上 亘, 神波 誠治, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸
2. 発表標題 金属メッシュデバイスの分光特性を活用したマイクロ粒子の検出
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬戸弘一、原田真緒、谷口穂乃花、長浦秀憲、廣橋由美子、新戸浩幸
2. 発表標題 天然および合成ポリフェノールを用いた分子認識界面の構築
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小嶋真季、志垣知佳、廣橋由美子、瀬戸弘一、新戸浩幸
2. 発表標題 酵母へのナノプラスチックの付着・取込・毒性に及ぼす媒体塩分濃度の影響
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東納拓海、永岡亜希子、山本真唯、高寄亜祐、瀬戸弘一、廣橋由美子、新戸浩幸
2. 発表標題 Suzukiカップリング反応を利用した糖鎖高分子の作製およびタンパク質結合性評価
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 兒玉碧、増田優太、廣橋由美子、瀬戸弘一、新戸浩幸
2. 発表標題 マクロファージに対する糖鎖修飾粒の付着・取込のフローサイトメトリー解析
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 増田優太、熊谷理奈、久保興毅、東将大、深澤智典、廣橋由美子、瀬戸弘一、新戸浩幸
2. 発表標題 シリカ粒子による赤血球の膜破壊のメカニズム解明
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福岡大学工学部化学システム工学科 http://www.tec.fukuoka-u.ac.jp/tk/

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
---------	---------