

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26288056

研究課題名(和文) 合成セルロースナノシートが示す加水分解触媒活性の評価

研究課題名(英文) Evaluation of Hydrolytic Activities of Synthetic Cellulose Nanosheets

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：天然由来のナノセルロースは、持続可能な1次元ナノ材料として注目を集めている。代表者らはこれまでに、常温・常圧・中性の条件下で、アミド、リン酸、エステル結合などがナノセルロース表面で触媒的に加水分解される独創的な知見を得ている。本研究では、酵素反応を用いて化学合成した、化学構造が明確なセルロースオリゴマーからなるナノシートが天然由来ナノセルロースと同様に加水分解活性を有することを明らかにした。この際、高い活性を発現するためには、ナノシートを微細化することが必須であった。

研究成果の概要(英文)：Nature-based nanocelluloses are attractive one-dimensional nanomaterials due to their mass productivity and unique physicochemical properties. Our previous studies have reported that activated ester, monophosphate, and amide linkages of small organic substrates are hydrolyzed on the surface of the nanocelluloses. However, fundamental knowledge on the hydrolytic activities of nanocelluloses is limited. In this study, artificial sheet-like nanocelluloses composed of cellulose oligomers were synthesized by phosphorylase-catalyzed enzymatic reactions and their hydrolytic activities against small molecular substrates were characterized. As-prepared nanocelluloses showed relatively low hydrolytic activities. On the other hand, smaller nanocelluloses with greater surface areas, which were prepared by sonication-based mechanical treatment of as-prepared nanocelluloses, significantly showed great hydrolytic activities.

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 加水分解活性

### 1. 研究開始当初の背景

セルロースは、D-グルコースを構成単位とする持続可能な天然高分子である。天然物から得たセルロース原料を酸処理すると、ロッド状のセルロースナノ結晶 (CNC) の水分散液が調製できる。代表者らは研究開始当初までに、常温・常圧・中性の条件下で、アミド、リン酸、エステル結合などがこの CNC 表面で触媒的に加水分解される独創的な知見を得ている。

一方、酵素反応によるセルロースの化学合成は、セルロース鎖の生成と構造体形成 (結晶化) が金属等の触媒や有機溶媒を用いることなく一段階で進行する。よって、通常の有機化学手法では一般に困難で煩雑なセルロース分子の合成ならびにそれらの構造体形成を効率よく達成できる魅力的な反応系である。また、化学構造が明確で高純度なセルロースからなる構造体を得られる利点もある。

### 2. 研究の目的

本研究では、CNC で観察された加水分解活性について、酵素反応により化学合成した、化学構造が明確なセルロースオリゴマーからなるナノシート (セルロースナノシート、CNS) に見出すことで、結晶性セルロースの加水分解活性に関する基礎知見を得るとともに、CNS の触媒材料としての利用可能性を明らかにすることを目的とする。

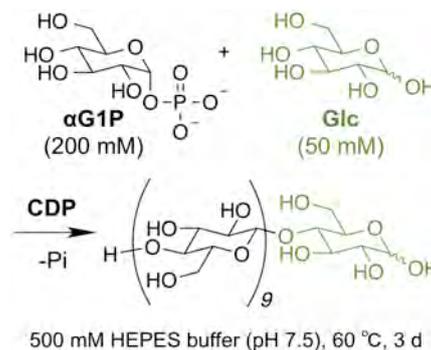
### 3. 研究の方法

既報 (M. Krishnareddy et al., J. Appl. Glycosci. 2002, 49, 1) を参考に、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 His-Tag 精製した。

既報 (M. Hiraishi et al., Carbohydrate Res. 2009, 344, 2468) を参考に、 $\alpha$ -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) を触媒に用いて CNS を酵素合成した (スキーム 1)。合成したセルロースの平均重合度は  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルにより、重合度分布は飛行時間型質量分析計を用いたマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI-TOF-MS) により評価した。また、結晶構造は広角 X 線回折ならびに赤外吸収スペクトルにより、マクロな形態は各種の顕微鏡法によりそれぞれ評価した。

加水分解活性の評価には、*p*-ニトロフェニル基で活性化されたアミド、リン酸、エステル基をもつ低分子モデル基質を適宜、用いた。基質の高濃度水溶液あるいは DMSO 溶液を準備し、ごく少量を CNS 水分散液に添加し反応させた。所定の反応時間後、遠心分離操作により CNS を沈澱させ、上清中の生成物 (*p*-ニ

トロアニリンや *p*-ニトロフェノールなど) を可視紫外吸収スペクトル装置により検出した。



スキーム 1 本研究における CNS 合成の反応式と反応条件

### 4. 研究成果

大腸菌で発現させた CDP を His-tag 精製した。SDS-PAGE により、高純度の CDP の調製を確認した。得られた CDP を用いて、スキーム 1 に示した条件下で酵素反応を行った。反応後に無色の固体状の生成物が得られた (図 1)。生成物を遠心分離操作により沈澱させ、上清を純水に置換する操作を繰り返すことにより、生成物を精製した。

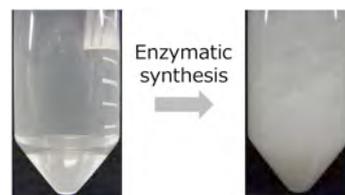


図 1 反応後の反応液の写真

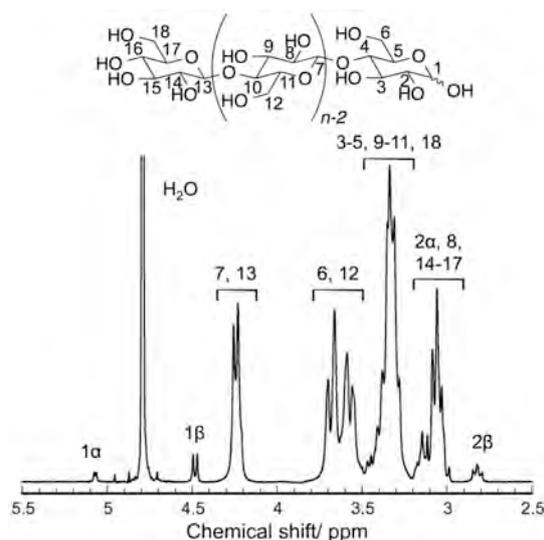


図 2 生成物の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

$\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$  を溶媒とする  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルにより (図 2)、回収した生成物は平均重合度 10 のセルロースであることが分かった。セル

ロースの生成は MALDI-TOF-MS から確認でき、そこから求めた重合度は  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルで求めた値とよく一致した。透過型電子顕微鏡ならびに原子間力顕微鏡観察により、幅数 100 nm、長さ数  $\mu\text{m}$ 、厚さ約 5 nm のシート状構造体であることを明らかにした (図 3)。広角 X 線回折 (図 4) ならびに赤外吸収スペクトルにより、得られた CNS はセルロース II 型の結晶形を有することが分かった。このように、CDP を用いた酵素反応により、CNS を化学合成できた。

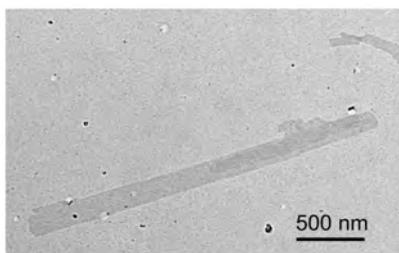


図 3 生成物の透過型電子顕微鏡像

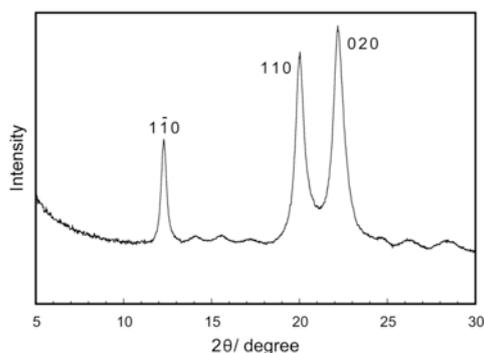


図 4 生成物の広角 X 線回折像

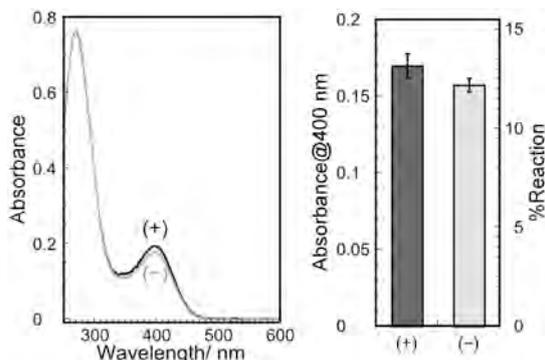


図 5 CNS による酢酸 *p*-ニトロフェニルの加水分解

*p*-ニトロフェニル基で活性化されたアミド、リン酸エステル、エステル基をもつ低分子モデル基質を用いて、合成した CNS の加水分解活性を評価した。その結果、エステル基質の一つである酢酸 *p*-ニトロフェニルを用いた際に、わずかではあるが、CNS の存在下で加水分解反応が促進され、CNS の加水分解活性を確認できた (図 5)。一方で、アミドお

よびリン酸エステル基質の加水分解は促進されなかった。このように、エステル基質に対して CNS が加水分解活性を示すことが明らかになった。しかしながら、その活性はきわめて低いことが分かった。

セルロースの加水分解活性に関する基礎知見を得るとともに、CNS の触媒材料としての利用可能性を明らかにするためには、その活性を向上する手法の開発が望まれる。そこで、CNS の表面積を増大させることが加水分解活性の向上につながるという仮説のもと、CNS の水分散液に超音波を照射することで、CNS を機械的に微細化し、その影響を評価した。プローブ型の超音波照射装置により CNS を処理したところ、長辺が  $\mu\text{m}$  の長さをもつ CNS が数 100 nm 以下の不定型な構造体に微細化できることが分かった (図 6)。この際、セルロースの結晶形は変化せず、CNS を構成するセルロースオリゴマーの平均重合度が 10 程度から 6~7 程度に低下することが分かった。この平均重合度の低下について、微細化後の CNS の低い回収率を考慮すると、微細化処理によりセルロース分子自体を断片化したのではなく、結果として、低分子量成分を選択的に回収したものと考えられる。

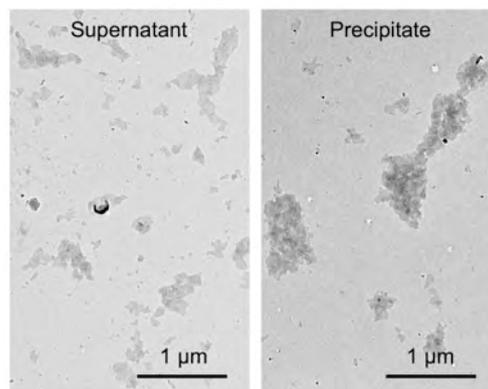


図 6 微細化 CNS の透過型電子顕微鏡像

微細化した CNS が示す加水分解活性について、モデルエステル基質である酢酸 *p*-ニトロフェニルを用いて評価した。その結果、処理前と比べて、明らかに高い加水分解活性を示すことが分かった。活性向上には最適な超音波処理時間や強度があることが分かった。よって、CNS 側面付近に特異な性質をもつ活性化された水酸基が存在し、それらが求核種として働くことにより、加水分解活性を示すことが示唆された。

超音波処理後に、遠心分離操作により容易に沈澱する成分と、上清に安定分散する成分に分離し、それぞれの加水分解活性を評価した結果、後者の活性が相対的に高いことが分かった (図 7)。そこで、微細化 CNS 水分散液を濃縮することによる高活性化について検討した。濃縮度合いを変化させた微細化 CNS 水分散液を調製し、同基質を用いて加水分解活性を評価した。その結果、濃縮度合いに対して加水分解活性は単調には増大しなかつ

た（例えば、5倍濃縮しても活性は2倍程度であった）。つまり、濃縮による高活性化は可能であるものの、濃縮の過程で微細化 CNS が凝集し、重量あたりの活性が低下することが分かった。

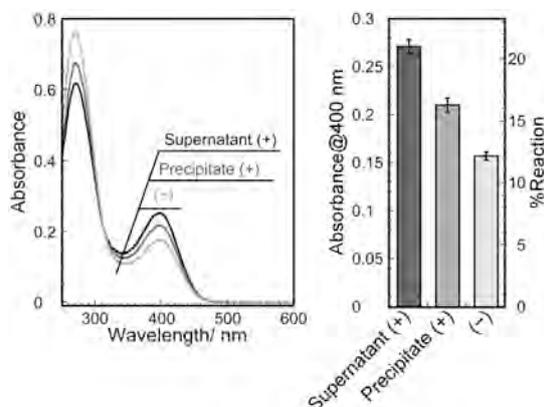


図7 微細化 CNS による酢酸 *p*-ニトロフェニルの加水分解

同基質を用いて、微細化 CNS の加水分解活性に及ぼす反応条件の効果を検討した。反応温度を変化させた結果、より低温で高い活性を示すことが分かった。低温においてセルロースの水酸基がより活性化されていることや、高温下では CNS が凝集し、見かけ上、活性が低下することが示唆された。一方、反応溶液の pH を変化させた結果、酸性条件下で活性を失うことが分かった。プロトン濃度の上昇に伴って、セルロース分子中の水酸基の求核性が低下することが示唆された。このように、CNS が示す加水分解活性の機構について、詳細な知見を得た。

微細化 CNS の再利用性について検討するために、同基質の加水分解後にそれらを回収することを試みたが、微細化 CNS の水分散性の高さや濃度の低さから、回収は困難であった。一方、超音波処理により微細化できている CNS は全体の 2%程度であった。そこで、同一の CNS を繰り返し超音波処理し、得られた微細化成分の加水分解活性をその都度、評価した。その結果、10 回に渡り活性な微細化成分を調製することができ、4 回目までは同様の活性を示した。このように、CNS を触媒材料として効果的に利用するための指針を得た。

微細化 CNS を用いて、リン酸エステル基およびアミド基を有する低分子モデル基質の加水分解反応について検討した。その結果、前者に対しては小さいながらも活性を示したものの、後者に対してはほとんど活性を示さないことが分かった。エステル基質と比較していずれの基質も反応時間が長いこと、その間に微細化 CNS が凝集し、活性を失ったことによると考えられる。

以上のように、酵素反応により化学合成した、構造が明確な CNS を用いることにより、結晶性セルロースが示す加水分解活性に関

する基礎知見を得るとともに、CNS の触媒材料としての利用可能性を明らかにすることができた。

## 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 10 件)

- ① Yusuke Yataka, Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, Chem. Commun., 査読有, Vol. 51, 2015, pp. 12525-12528, DOI: 10.1039/C5CC04378F.
- ② Takeshi Serizawa, Mari Kato, Hiromichi Okura, Toshiki Sawada, Masahisa Wada, Polym. J., 査読有, Vol. 48, 2015, pp. 539-544, DOI: 10.1038/pj.2015.125.
- ③ Yusuke Yataka, Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, Langmuir, 査読有, Vol. 32, 2016, pp. 10120-10125, DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b02679.
- ④ Takatoshi Nohara, Toshiki Sawada, Hiroshi Tanaka, Takeshi Serizawa, Langmuir, 査読有, Vol. 32, 2016, pp. 12520-12526, DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b01635.
- ⑤ 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.
- ⑥ Yuuki Hata, Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, Polym. J., 査読有, Vol. 49, 2017, pp. 575-581, DOI: 10.1038/pj.2017.22.
- ⑦ 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.
- ⑧ 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.
- ⑨ Takeshi Serizawa, Yuka Fukaya, Toshiki Sawada, Langmuir, 査読有, Vol. 33, 2017, pp. 13415-13422, DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b03653.

- ⑩ 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 53 件)

- ① 加藤麻里、澤田敏樹、芹澤武、酵素重合を用いて調製したセルロースナノシートが示す加水分解活性, 第 63 回高分子討論会, 2014 年 9 月 25 日, 口頭.
- ② Takeshi Serizawa, Enzymatic Synthesis and Functionalization of Multiphase Cellulose Materials, 8th International Conference on Materials Science and Technology, 2014 年 12 月 15 日, 口頭 (招待).
- ③ 加藤麻里、澤田敏樹、芹澤武、酵素重合法により調製したセルロースナノシートが示す加水分解活性の向上, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 28 日, 口頭.

ほか 50 件

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件)

- ①  
名称: セルロースナノ構造体及びその製造方法  
発明者: 芹澤 武ほか 4 名  
権利者: 東京工業大学、JXTG エネルギー  
種類: 特許  
番号: 2015-039443  
出願年月日: 2015 年 2 月 27 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 7 名  
権利者: 東京工業大学、JXTG エネルギー  
種類: 特許  
番号: 2015-040735  
出願年月日: 2015 年 3 月 2 日  
国内外の別: 国内

- ③  
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

- ④  
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

- ⑤  
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

- ⑥  
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  
澤田 敏樹 (SAWADA, Toshiki)  
東京工業大学・物質理工学院・助教  
研究者番号: 20581078
- (3) 連携研究者  
和田 昌久 (WADA, Masahisa)  
東京大学・農学生命科学研究科・准教授  
(現、京都大学・大学院農学研究科・准教授)  
研究者番号: 40270897
- (4) 研究協力者  
田中 浩士 (TANAKA, Hiroshi)  
酒井 崇匡 (SAKAI, Takamasa)