

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006年～2008年
 課題番号：18750153
 研究課題名（和文） 多糖・機能性高分子複合体を用いた新規バイオナノマシンの創製
 研究課題名（英文） Creation of bio-nanomachine utilizing polysaccharide/polymer complexes
 研究代表者
 沼田 宗典（NUMATA MUNENORI）
 京都府立大・生命環境科学研究科・准教授
 研究者番号：70423564

研究成果の概要：

有機溶媒／水の界面にてシゾフィランを Renature させ、疎水性ポリマーへのラッピングを行った。このような界面でのラッピング過程を利用することにより超分子ポリマーの形成が可能となると期待される。得られた水溶液の DLS 測定の結果、直径 100-200 nm の構造体の形成が示唆された。さらに、TEM による観察の結果では内部に疎水性ドメインを持つ水溶性巨大ミセルの形成が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,100,000円	0円	1,100,000円
19年度	1,100,000円	0円	1,100,000円
20年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
年度			
年度			
総計	3,600,000円	420,000円	4,020,000円

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：多糖、超分子化学、らせん高分子

1. 研究開始当初の背景

天然 β 1, 3 グルカンが規則的な 3 重らせん構造をとり、まさに多糖を構成単位とした天然の超分子構造体と呼べる。最近、我々は 3 重らせん構造の最安定構造を理論化学的に評価する過程でらせん構造の内部に疎水的な 1 次元空間が存在していることを突き止めた。申請者はこの 1 次元ナノ空間が疎水性高分子を取り込む最適な空間になっていることに着目した。検討の結果、SWNT のみならず、導電性高分子、無機ナノ粒子、機能性有機分子などが疎水空間に取り込まれコンポジットを形成するという興味深い現象を見出している。柔軟性を備えた 3 本の β 1, 3 グルカン鎖の協調的ならせん形成過程がゲスト分子の性質や形状によらない

”Induced-fit”型の取り込みを可能とし、 β 1, 3 グルカンがこれまでにない全く新しいタイプの 1 次元ホストとして機能する事を発見した。

”Induced-fit”型の相互作用様式はゲストポリマーの性質や形状に依存しない。これは β 1, 3 グルカンが異なる 2 種のポリマー（核酸、SWNT）と同時に相互作用し、ハイブリッド型のナノコンポジットが創製できることを意味する。さらに、形成されるナノコンポジット表面では β 1, 3 グルカン固有の高次構造が再構築されている。これにより、部位特異的に化学修飾を施した β 1, 3 グルカンがなお 1 次元ホストとして機能し、コンポジットへの超分子化学的な機能付与を可能としている。 β 1, 3 グルカンによって水溶

性・生体適合性だけでなく細胞膜透過性、細胞指向性などを同時に付与できれば得られるバイオナノマシンとしてのコンポジットの機能は格段に向上するはずである。

2. 研究の目的

カーボンナノチューブはその優れた機能からナノテクノロジーだけでなくバイオテクノロジーにおいても中核を担う機能性材料として注目されている。しかし、ファイバー間での凝集性が極めて強く、水溶液としての取り扱いが困難であるという理由から、実用化に向けた研究はほとんど進展していないのが現状である。最近、申請者は天然多糖・ β 1, 3 グルカン類が1次元ホストとして働き単層カーボンナノチューブ (SWNT) を取り込んだ水溶性のナノコンポジットを形成する事を見出している。得られる複合体は天然多糖に由来する生体適合性だけでなくSWNTの機能を合わせ持つことになり新規バイオナノマテリアルとしての応用研究が待望されている。今回、申請者は特にSWNTが近赤外領域に大きな吸収帯を有し、近赤外線を効率的に熱に変換できる性質を有している事に着目した。既に β 1, 3 グルカンは核酸と複合体を形成しアンチセンスDNAの有効なキャリアーとしての実績がある。今回、 β 1, 3 グルカン、SWNT、核酸からなる3元系複合体を形成し、ジーンキャリアーとしての機能とSWNTに由来する近赤外光吸収機能を1つのナノコンポジット内で融合することを試みた。これにより、近赤外線をトリガーに核酸のリリースができる全く新しい遺伝子デリバリーシステムの構築を目指す。さらに β 1, 3 グルカンの1次元空孔に疎水性薬剤を内包させることによりドラッグデリバリーシステムへの展開についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 3元系複合体の創製： β 1, 3 グルカンはDMSO中で1本のランダムコイル鎖として存在する。この β 1, 3 グルカンDMSO溶液と核酸の水溶液を混合すると3重らせんへの巻き戻りが起こり β 1, 3 グルカン・核酸複合体が得られる。同様に核酸水溶液の代わりにSWNTの水分散液を用いることで β 1, 3 グルカン・SWNT複合体が得られることが明らかとなっている。これらの知見を基に、 β 1, 3 グルカンの巻き戻り過程に核酸とSWNTの両方を共存させると3元系の複合体が得られると期待される。具体的にはシゾフィランのDMSO溶液に核酸、SWNT水溶液を同時に加えることでコンポジット形成を行った。コンポジット形成の確認はUV-visスペクトル、CDスペクトル、NIRスペクトル、AFM、TEMを用いて総合的に検討した。

(2) 細胞指向性基を持つシゾフィランの合成：シゾフィランを過ヨウ素酸で酸化すると

側鎖のみが酸化的に開裂する。これと還元的アミノ化を組み合わせることにより我々はシゾフィラン側鎖に様々な官能基を導入する手法を開発してきた。シゾフィラン側鎖は核酸やSWNTと直接相互作用せず、化学的修飾によってもシゾフィランのコンポジット形成能は保持される。実際、細胞接着因子であるRGDペプチドなどを側鎖に導入したシゾフィランがアンチセンスやCpG-DNAの効果的なキャリアーとして機能することが実証されている。また、このような化学修飾 β 1, 3 グルカンがSWNTや導電性高分子に対する1次元ホストとしても機能することも既に明らかとしている。まず、ガン細胞が葉酸に対するレセプターを発現していることを利用し、葉酸シゾフィランを用いガン細胞をターゲットとしたデリバリーを検討した。

(3) 導電性高分子複合体：これまでに得られた知見を基にSWNT以外の導電性高分子をゲストとした系へと展開し、本システムのさらなる可能性を検索した。導電性高分子は水中では凝集し発光特性を失うため生体組織内での利用は困難とされてきた。しかし、これまで申請者は β 1, 3 グルカンを1次元ホストとして利用すると、導電性高分子1本を水中で安定に孤立分散させ、消光を抑制できることを明らかとしている。まず、導電性高分子の優れた発光特性を利用したバイオプローブの創製を目的とする。さらに、核酸試薬や抗生剤を取り込んだ3元系へと展開した。

(4) 高分子型ミセルの創製：親水性ポリマーと疎水性ポリマーが共有結合にて連結した両親媒性ポリマーは水中で自己組織的に集合し、巨大なミセルやベシクルなどの超構造体を形成することがよく知られている。これら集合体の構造は、一本の高分子鎖における親水ドメインと疎水ドメインの相対的な大きさ、位置、数によって劇的に変化する。このため、多様な機能と構造を持った集合体の創製には一本の高分子鎖内でこれらのファクターを厳密に制御することが求められ、簡便かつ有効な方法の確立が待望されている。

天然多糖であるシゾフィランは様々な疎水性ポリマーをラッピングすることにより水溶性コンポジットを与える。もし、このラッピング過程で疎水性ポリマーに巻き付くシゾフィランの領域を制御することができれば、ラッピング過程を利用した両親媒性ポリマーの創製が可能になるはずである。このような、自己組織的なラッピングを利用したブロックポリマーの創製は高分子合成の視点からみても興味深いはずである。今回、シゾフィランの疎水性ポリマーへのラッピングをキーププロセスとした超分子化学的なブロックポリマーの創製を試みた。

まず、疎水性ポリマーを有機溶媒に溶解し、水中でエマルジョン化した。ここにシゾフィランの DMSO 溶液を加え、有機溶媒/水の界面にて Renature させ、疎水性ポリマーへのラッピングを行った。このような界面でのラッピング過程を利用することにより超分子ポリマーの形成が可能となると期待される。得られた水溶液の DLS 測定の結果、直径 100-200 nm の構造体の形成が示唆された。さらに、TEM による観察の結果では内部に疎水性ドメインを持つ水溶性巨大ミセルの形成が明らかとなっている。

4. 研究成果

(1) 天然多糖、シゾフィラン、カードランは、水中で三本鎖から成るヘリックス構造を取る β -1, 3-グルカン系多糖類である。三本鎖構造は水中で安定であるが、DMSO 中では一本鎖に解離する。さらに、この DMSO 溶液を水で希釈すると、三本鎖から成るヘリックス構造が再生される。このヘリックス構造の内部が比較的疎水性であるため、シクロデキストリンの 1 次元集積体と見なす事ができる。この空孔はさらにキラルであることが容易に想像される。これまでこの 1 次元空孔に種々の機能性パーティクルや高分子を 1 次元配列できることを報告している。これは β -1, 3-グルカンが天然の 1 次元”ホスト”として機能することを示唆している。本研究では β -1, 3-グルカン類が形成する 1 次元空孔内に、(1) ナノ粒子、(2) カーボンナノチューブ、(3) 導電性高分子などを内包し、得られる 1 次元コンポジットを機能性のナノマテリアルとして応用することを目的として研究を展開してきた。

カードランの 6 位水酸基への選択的かつ定量的な官能基の導入法を開発した。これにより、カードランをシゾフィラン同様の 1 次元ホストとして利用できるようになると期待される。カードランはシゾフィランより安価であり、ナノマテリアルの素材としては極めて有望な天然高分子である。そこで、カチオン性あるいはアニオン性基を導入した水溶性のカードランを合成し、これらカードランがカーボンナノチューブを効率的に内包し、水中に安定に分散できることを見出した。AFM による観察の結果、これらイオン性基を持つカードランがカーボンナノチューブ表面をらせん状に被覆し、天然の β -1, 3-グルカン同様のラッピング機能を保持していることを明らかとしている。さらに、種々の分子認識能を持つ官能基の導入にも成功しており、ラッピングを利用した機能性 1 次元コンポジット群の創製が可能になりつつある。得られた 1 次元コンポジットを構成単位としたナノ薄膜や配向性ナノ材料の創製を目指して、さらに研究を展開した結果、コン

ポジット間の相補的な相互作用を利用することにより、カーボンナノチューブが階層的に集積したナノシートの形成に成功した。また、本結果を拡張し、その他の導電性高分子をゲストとしたコンポジットについても検討したところ、同様の組織構造が得られる事を明らかとしている。

(2) 緑色光合成細菌内では、クロロソームと呼ばれる器官が光を集光し伝達する機能を担っている。この自己会合体は、クロロフィル色素分子 3' 位の配位性の水酸基が他の分子の中心マグネシウムに配位結合し、さらにその配位結合で酸性度が大きい水酸基が立体的に空いた 13 位のケトカルボニル基と水素結合し、さらに π - π 相互作用によって Q_y 軸方向に綺麗に並んだ高秩序な J 会合体を形成する。この自己会合体により吸収された光エネルギーは、膜内に配置された色素タンパク質複合体に伝達される。

ヘキササンなどの低極性有機溶媒中で脂質膜内の疎水環境を再現することが可能であり、合成クロロフィルなどを用いて人工クロロソームを創製しようとする試みに注目が集まっている。クロロフィル分子の自己組織性を利用すると、適切な疎水性環境においてナノ~マイクロメートルサイズの超分子型光合成アンテナを簡便に創製することができる。そこで、ポリスチレンなどの合成高分子と天然多糖からなるマイクロ相分離構造内でクロロフィル分子を自己組織化することにより、半人工クロロソームの創製を試みることにした。その結果、相分離した疎水性ドメイン内で、クロロフィル分子が自己組織化し、高秩序な J 会合体を形成していることが UV/VIS によって確認された。さらに光エネルギーのアクセプター色素を疎水性ドメイン内に導入し、光エネルギーの伝達が可能であるか検討した結果、効率的なエネルギー移動が起きている事が確認され、クロロソーム類似の光化学機能を有している事が明らかとなった。

(3) β 1, 3 系の天然多糖であるシゾフィランおよびカードランは様々な疎水性ポリマーをラッピングすることにより水溶性コンポジットを与える。このラッピング過程で疎水性ポリマーに巻き付くシゾフィランの領域を制御し、ラッピングを利用した新規な超分子ブロックコポリマーの創製を試みた。このような、自己組織的なラッピングを利用したブロックポリマーの創製は高分子合成の視点からみても興味深いはずである。

まず、疎水性ポリマーを有機溶媒に溶解し、水中でエマルジョン化した。ここにシゾフィランの DMSO 溶液を加え、有機溶媒/水の界面にて Renature させ、疎水性ポリマーへのラッピングを行った。このような界面でのラッピング過程を利用することにより超分子ポリマ

一の形成が可能となると期待される。得られた水溶液のDLS測定の結果、直径100-200 nmの構造体の形成が示唆された。さらに、TEMによる観察の結果では内部に疎水性ドメインを持つ水溶性巨大ミセルの形成が明らかとなった。

次に、このミセル内部に疎水性の制がん剤であるカンプトテシンを内包することを試みた。ここでは得られるミセルにバイオ材料としての適性を持たせる為に、ポリ乳酸を疎水性ポリマーとして使用した。種々の条件を検討した結果、カンプトテシンを内包したミセルの調製に成功し、一定の成果を得る事ができた。本成果を基に、今後は実用的なステージへとさらに研究を展開させ、多糖を基体とした新規ドラッグデリバリーシステムの開発へと繋げたい。

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16件)

(2) "Creation of Hierarchical Carbon Nanotube Assemblies through Alternative Packing of Complementary Semi-Artificial β -1,3-Glucan/Carbon Nanotube Composites", M. Numata, K. Sugikawa, K. Kaneko, and S. Shinkai, *Chemistry A European Journal*, 14, 2398-2404 (2008). 査読あり

(2) "Instantaneous Inclusion of a Polynucleotide and Hydrophobic Guest Molecules into a Helical Core of Cationic β -1,3-Glucan Polysaccharide", M. Ikeda, T. Hasegawa, M. Numata, K. Sugikawa, K. Sakurai, M. Fujiki, and S. Shinkai, *Journal of American Chemical Society*, 129, 3979-3886 (2007). 査読あり

(3) " β -1,3-Glucan Polysaccharide (Schizophyllan) Acts as a One-Dimensional Host for Creating Supramolecular Dye Assemblies", M. Numata, S. Tamesue, T. Fujisawa, S. Haraguchi, T. Hasegawa, A.-H. Bae, C. Li, K. Sakurai, and S. Shinkai, *Organic Letters*, 8, 5533 (2006). 査読あり

[学会発表] (計10件)

天然らせん高分子によるラッピングを利用した人工クロソームの創製、叶野徹、沼田宗典、民秋均、新海征治、平成21年3月28日、日本化学会第89回春季年会、日大船橋キャンパス

[図書] (計3件)

「有機・無機・金属ナノチューブ」-非カーボンナノチューブ系の最新技術と応用展開-清水敏美、木島 剛 編集、第4章 高分子系ナノチューブ ” β -1,3-グルカン系多糖高

分子を用いた一次元シリンダーホスト” 沼田宗典、新海征治、フロンティア出版、2008年3月

[産業財産権]

○出願状況 (計10件)

(1) 番号 2006-144930、発明者：新海征治／沼田宗典／広瀬良治／李春、発明名称：高分子による細胞の可視化、権利者：JST、三井製糖、出願日：2006.5.25.国内

(2) 番号：2006-114929、発明者：新海征治／沼田宗典／広瀬良治／櫻井和朗、発明名称：核酸／多糖／カーボンナノチューブ複合体、権利者：同上、出願日：2006.5.25.国内

○取得状況 (計 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

京都府立大・生命環境科学研究科・准教授
沼田 宗典

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者