

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20880021

研究課題名（和文） 非水系酵素反応による糖鎖／カーボンナノチューブ複合体の創成

研究課題名（英文） Creation of carbon nanotube-saccharide complex
via nonaqueous enzymatic reactions

研究代表者

小川由紀子（Ogawa Yuki ko）

九州大学・大学院農学研究院・特任助教

研究者番号：80507848

研究成果の概要（和文）：本研究ではカーボンナノチューブ(CNT)と糖鎖を分子レベルで複合化させることを目的として、始めに非水系溶媒中での酵素反応による糖鎖合成を検討し、次にCNTと親和性のある両親媒性糖鎖誘導体の合成を行った。オリゴ糖とアゾベンゼンからなる両親媒性糖鎖誘導体を用いることで、CNTの高効率分散と表面の糖鎖修飾を達成した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to create the complex of the saccharide with CNT at a molecular level. Firstly, polycondensation of disaccharide monomers were successfully achieved using polymer-coated enzyme in nonaqueous medium. Secondly, amphiphilic glyco-derivatives were newly synthesized. Effective CNT dispersion and glyco-modification were achieved when glyco-derivatives with azobenzene were added.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,250,000	675,000	2,925,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：糖鎖、糖鎖合成、糖鎖修飾、カーボンナノチューブ、ゲル化剤

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸・タンパク質に次ぐ第三の生命鎖として注目されている。糖鎖は単糖の配列、結合数、結合様式等によって構造的な多様性を持ち、生体内では細胞の顔として接着、移動、分化に関わるだけでなく癌細胞の転移、最近やウイルスによる感染にも関与することが明らかとなってきた。

そこで、糖鎖が生命現象の認識シグナルと

して機能することを模倣した糖鎖修飾材料の開発が進められている。これらは実用的には、近年めざましい進歩を遂げつつある再生医工学分野における細胞培養基板や、社会的な問題となった新型インフルエンザ等の迅速な病原体の検出センサーとして応用可能である。

糖鎖修飾材料を開発する上で、糖鎖の種類や糖鎖を固定する担体を工夫することで応

用の幅が広がることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、**1)** 非水系溶媒中での糖鎖の簡易合成手法の確立と、**2)** 糖鎖結合担体として**CNT**を用いて糖鎖との分子レベルの複合体の創成を目指した。

CNTは優れた機械・電気・熱特性を有するナノテクノロジー分野で注目される素材であり、最近では生体適合性を示すことからバイオ分野でも注目される素材である。しかしながら、**CNT**の優れた物理的性質を活かすには、分散・配向性をナノレベルで制御することが望まれているが、**CNT**の強いバンドル凝集性 (π - π 相互作用)により水や通常の有機溶媒に均一分散させることが非常に困難である。

そこで、**CNT**の優れた物理的性質を損なうことなく単一分散する方法として、表面の相互作用を他の糖鎖誘導体によって非共有結合で遮蔽してバンドルの再凝集を阻止し、かつ糖鎖で修飾されるという仮説のもと研究を行った。

3. 研究の方法

1) 非水系溶媒中での糖鎖合成は、グリコシド結合加水分解酵素（セルラーゼ）と基質（セロビオース）とを反応させると、加水分解の逆反応に平衡がかたよることで、基質が縮合され、糖鎖の伸長反応が進む現象を利用した。本研究では以下の条件について非水系溶媒中で酵素反応を行い、水に不溶な糖鎖の生成収率を比較した。

① 酵素被覆材としてのポリマー種

非水系溶媒中(8%塩化リチウム/ジメチルアセトアミド溶液:基質の良溶媒)では酵素が失活するため、酵素を被覆して保護する必要がある。ここでは、数種の親水性・両親媒性ポリマーを用いて比較した。ポリマー被覆酵素は、ポリマー溶液と酵素を緩衝液中混合し、凍結乾燥することで得た。

② セルラーゼの由来

セルラーゼの由来が収量に与える影響を調べるため、*Trichoderma*属と*Aspergillus*属セルラーゼを用いて比較した。

2) **CNT**を分散し、かつその表面を糖鎖修飾できる物質として、両親媒性糖鎖誘導体を合成した。具体的には、アゾベンゼンにスパーサーとしてアミノ酸を介してオリゴ糖が結合した構造である。この化合物を用いて、以下の検討を行った。

① **CNT**分散試験

糖誘導体を水に溶解し、**CNT**を加えて超音波分散した。得られた溶液を遠心分離して未分散**CNT**を除いた上澄みの可視近赤外分光測定を行い、各種糖誘導体で比較した。

② レクチンアッセイ

①の**CNT**分散溶液を希釈して**PIFE**フィルム上に吸引濾過して**CNT**フィルムを作製し、水で洗浄した。このフィルムに糖を特異的に認識して結合するレクチンを作用させ、**CNT**フィルム上に糖が存在することを確認した。

4. 研究成果

1) 非水系酵素触媒反応による糖鎖合成

① 酵素被覆材としてのポリマー種

数種類の解離基有する親水性ポリマー及び両親媒性ポリマー（分子量**2000**～**20000**）を用いて、被覆酵素を調製し、非水系糖鎖合成を行った。その結果、いずれのポリマーでも被覆の効果は得られたが、ポリビニルピロリドン(**PVP**)で被覆した場合が最も収率が高かった。また、被覆するポリマーの量には最適値があり、これは酵素表面に存在するポリマーが多すぎると酵素と基質の会合を阻害し、少なすぎると被覆の効果が低く溶媒の影響を受けて早く失活するからであると考えられる。

界面活性剤被覆酵素でも同様に被覆の効果があるが、界面活性剤では緩衝液とトルエンの**W/O**エマルジョンから調製するのに対し、本法は、被覆酵素調製時に有機溶媒を使用せず、水溶液のみで行える利点がある。

② セルラーゼの由来

*Trichoderma*属、*Aspergillus*属由来の数種類の酵素を**PVP**で被覆し、非水系糖鎖合成を行った。その結果、*Trichoderma*属が*Aspergillus*属より収率が高かった。さらに*Trichoderma reesei*由来は*Trichoderma viride*よりも**PVP**の被覆量による影響を受けにくく、収率が最も良かった(**5.4%**)

また、基質となる二糖にセロビオースではなくラクトースを用いても同様に糖鎖伸長反応が進むことが確認された。さらに、非水系溶媒中でラクトースとセルロースフィルムを入れて酵素反応させると、セルロースフィルムがラクトースで修飾可能であることも明らかとなった。これらの結果により、非水系溶媒中で酵素反応を行うことで、複雑な化学修飾をせずに糖鎖合成が可能であることが示された。

2) CNT分散能をもつ糖誘導体の合成と評価
 両親媒性糖鎖誘導体は疎水基にアゾベンゼン、親水性の糖鎖部位にオリゴ糖（グルコース、セロビオース、メリビオース、ラクトース、マルトース、マルトトリオース）の開環ラクトン体を有し、いずれも二段階の合成を経て高収率で得られた。グルコース誘導体以外は水もしくは熱水に易溶であったので、これらをCNT分散試験に供した。

① CNT分散試験

糖鎖-アゾベンゼン誘導体は両親媒性であるため、 π - π 相互作用によってCNT表面にアゾベンゼン基が吸着することでCNTが糖鎖修飾され、水中で安定に分散状態を維持すると考えられる。末端にグルコースを持つマルトース誘導体と、対照としてCNTの良好な分散剤であるSDS (sodium dodecyl sulfate) とCMC (carboxymethyl cellulose) を同条件で超音波照射後に、上清のVis-NIR吸収を測定した結果を図1に示す。測定には光路長は1mmのセルを使用した。

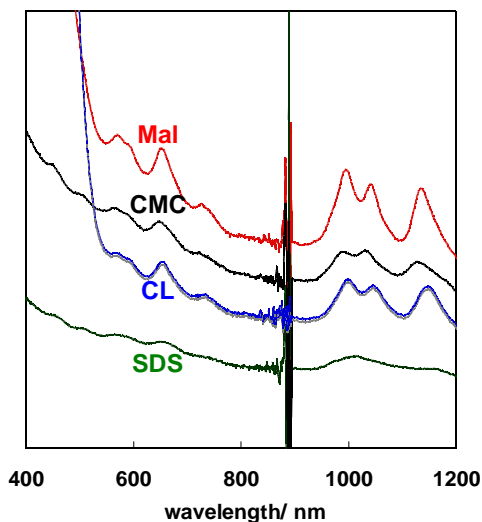


図1 各種分散剤を用いた時のCNT分散溶液のVis-NIRスペクトル (Mal: マルトース誘導体、CL: セロビオース誘導体)

マルトース誘導体のみの水溶液では550 nm近赤外光域に吸収がないことから、糖鎖-アゾベンゼン誘導体によってCMCやSDSと遜色ない分散が可能であることが判明した。

他の糖誘導体を用いた場合のCNTの分散を比較するとマルトース>セロビオース>ラクトース>メリビオース誘導体の順であった。

CNTのバイオ分野応用を考慮すると生体毒性をもつ有機溶剤を使用せず水系での分散が

望まれるため、本研究で合成した両親媒性糖誘導体を用いる方法は有効であると言える。

CNTが近赤外光を吸収して加熱することを利用して、リガンドで修飾したCNTをトランスポーターとして癌細胞に特異的に吸着させ、細胞死を誘導する試みも報告されており、本研究で合成されたCNT/糖鎖複合体も糖鎖認識型のCNTトランスポーターとして応用できる可能性がある。

② レクチンアッセイ

本実験で用いたレクチンはコンカナバリンA (ConA) と RCA120であり、前者はグルコースを、後者はガラクトースに特異的に結合する蛋白である。①の実験でマルトース誘導体で分散したCNT溶液をPIPE膜上に吸引濾過してフィルムを形成した。純粋で洗浄後にFITCラベル化ConAを作用させ、蛍光顕微鏡で観察したところ、SDSを分散剤として作製したCNTフィルムより強い蛍光を示した。さらにこのフィルムにFITCラベル化したRCA120を作用させたところ、蛍光が観察さえなかった(図2)。すなわち、本研究で合成したマルトース誘導体によりCNTを水系でグルコース修飾した複合体を作製することに成功したと言えよう。

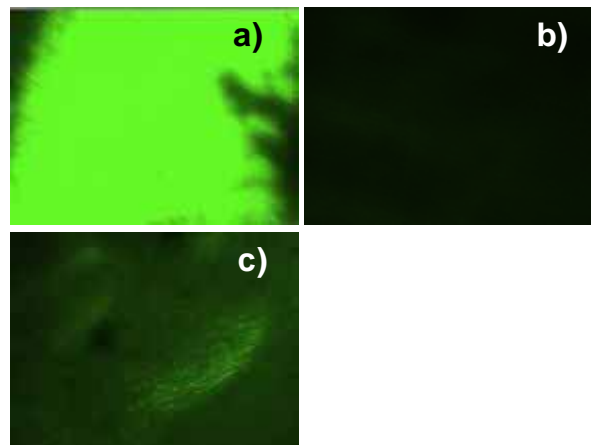


図2 FITCレクチンを作用させたCNTフィルムの蛍光顕微鏡写真 a) 分散剤: マルトース誘導体、レクチン: FITC-ConA b) 分散剤: マルトース誘導体、レクチン: RCA120, c) 分散剤: SDS、レクチン: FITC-ConA

興味深いことに、今回合成した糖誘導体は末端の糖の種類によっては0.1%という低濃度で低分子ヒドロゲル化能をもつことを見いだした。このゲルは温度やUV照射で可逆的にゾルゲル転移をし、ゲルの熱安定性は糖の種類によって大きく異なった。

SEM観察から、ゲル中で糖誘導体が三次元的に微細な繊維状複合体を形成していることが

確認され、円偏光二色性測定やUV測定の結果からアゾベンゼン基が内部配向し糖が集密した構造であると考えられる。今後、この素材はバイオ応用への展開も期待される。

3) 総括

糖鎖修飾CNTは、今後は前述のような病的細胞を標的としたトランスポーターや、CNTの構造や電気的特性を活かした透明電極として細胞のセンシングなどへ応用の幅が広がると期待される。

今回、若手スタートアップとしてこの研究を採択していただき、CNTと糖鎖の複合体の創成を目指す中で、糖鎖合成や細胞培養試験などを通して糖鎖の複雑さや有用性を実感できた。その結果、合成した糖鎖誘導体はCNTだけではなく他の担体も糖鎖修飾できることが分かり、新しい形の細胞培養基板を提案できたと自負している。最後に本研究を遂行するにあたり多大な協力をいただいた先生や学生諸氏に感謝申し上げる。

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)

- ① Okunani Y., Egusa S., Qgava Y., Kitaoka T., Goto M., Wariishi H. "One-step lactosylation of hydrophobic alcohols by nonaqueous biocatalysis" *ChemCatChem*, in press
- ② Esaki K., Yokoya S., Egusa S., Kutani Y., Qgava Y., Kitaoka T., Goto M., Wariishi H. "Preparation of lactose-modified cellulose films by a nonaqueous enzymatic reaction and their bifunctional characteristics as a scaffold for cell culture" *Biomacromolecules*, **10**(5), 1265-1269 (2009)
- ③ Egusa S., Yokota S., Tanaka K., Esaki K., Kutani Y., Qgava Y., Kitaoka T., Goto M., Wariishi H. "Surface modification of a solid-state cellulose matrix with lactose by a surfactant-enveloped enzyme in a nonaqueous medium" *Journal of Materials Chemistry*, **19**(13), 1836-1842 (2009)

[学会発表] (計20件)

- ① 吉山千春・吉池由佳・小川由紀子・北岡卓也、アゾ色素を分子アンカーとするシリコン樹脂表面の糖鎖修飾と細胞培養特性

第60回日本木材学会大会、2010年3月17-19日、宮崎

- ② Qgava Y., Yoshiyama C., Kitaoka T. "Development of sugar-based hydrogelators and their application to scaffold materials" 1st Federation of Asian Polymer Societies (FAPS) Polymer Congress 2009, Oct. 20-23 (2009), Nagoya
- ③ 小川由紀子・吉山千春・北岡卓也、糖鎖-アゾ色素誘導体の合成と固体表面の糖鎖修飾、第58回高分子討論会、2009年9月16-18日、熊本
- ④ 小川由紀子・吉山千春・北岡卓也、二糖ラクトン誘導体ヒドロゲル化剤の合成と細胞足場材料への応用 第58回高分子討論会、2009年9月16-18日、熊本
- ⑤ 奥谷友理・江草静香・小川由紀子・北岡卓也・割石博之・後藤雅宏、非水系酵素触媒反応によるバイオミメティック配糖体の one-pot 合成 第58回高分子討論会、2009年9月16-18日、熊本
- ⑥ 江草静香・小川由紀子・北岡卓也・割石博之・後藤雅宏・五十嵐圭日子・鮫島正浩、非水系酵素触媒反応による糖鎖合成 第58回高分子討論会、2009年9月16-18日、熊本
- ⑦ 小川由紀子・北岡卓也、超分子ヒドロゲル化剤を利用した糖鎖集密化ナノシリンドラーの創成、セルロース学会第16回年次大会、2009年7月2-3日、札幌
- ⑧ 江草静香・小川由紀子・北岡卓也・割石博之・後藤雅宏・五十嵐圭日子・鮫島正浩、非水系セルロース合成反応におけるセルラーゼの触媒機構、化学工学会第74年会、2009年3月18-20日、横浜
- ⑨ 小川由紀子・江草静香・北岡卓也、セルラーゼ/ポリマー複合体による非水系セルロース合成、セルロース学会第15回年次大会、2008年7月10-11日、京都
- ⑩ 奥谷友理・江草静香・小川由紀子・北岡卓也・割石博之・後藤雅宏、非水系酵素反応を利用したラクトースからの非天然オリゴ糖合成と材料機能設計、第45回化学関連支部合同九州大会、2008年7月5日、北九州

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：糖ラクトン-アゾベンゼン化合物及びその利用

発明者：小川由紀子・北岡卓也

権利者：九州大学

種類：特許
番号：特願 2009-285641
出願年月日：平成 21 年 12 月 16 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://bmwood.agr.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川由紀子 (Ogawa Yuki ko)
九州大学・大学院農学研究院・特任助教
研究者番号：80507848

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし