

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05636

研究課題名（和文）zwitterion構造を持つポリペプチドによるセルロースの可塑化と複合体形成

研究課題名（英文）Dissociation and hybridization of cellulose using zwitterionic polypeptides

研究代表者

土屋 康佑 (Tsuchiya, Kousuke)

京都大学・工学研究科・特定准教授

研究者番号：40451984

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）：酵素を利用した化学酵素重合法を利用して、セルロース結晶を溶解するイオン液体に類似したzwitterion構造を取り入れたポリペプチドを新規に設計・合成した。得られたzwitterion型ポリペプチドの水溶液は、作用させることでセルロース結晶を効果的に解離することができることが分かった。また、植物培養細胞へ作用させると細胞壁のセルロースネットワークを緩める働きがあることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発されたzwitterion型ポリペプチドは、不溶不融で成型加工性に乏しいセルロースの結晶を効果的に解離することが可能であり、セルロースの化学構造を改変することなく簡便に加工する技術として産業的に有用性が高い。また、細胞毒性をほとんど示さずに植物細胞壁のセルロースネットワークを緩めることができ、植物細胞への効率的な物質輸送など植物科学分野への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Novel polypeptides containing a zwitterionic structure similar to ionic liquids, which dissolve cellulose crystals, were designed and synthesized by chemoenzymatic polymerization using enzymes. The aqueous solution of the zwitterionic polypeptides effectively dissociated the bundle of cellulose nanocrystals. It was found that the cellulose network in the cell walls of cultured plant cells was dissociated by treatment with the zwitterionic polypeptides.

研究分野：高分子化学

キーワード：ポリペプチド 双性イオン セルロース 酵素 細胞壁

1. 研究開始当初の背景

持続可能社会の実現に向けてサステナブルな材料への転換が求められている中で、バイオマス由来の素材を利活用することがますます注目を集めている。植物由来のバイオ高分子としてセルロースやリグニンは高強度・高耐熱性といった魅力的な材料物性を示す生体由来の高分子材料として従来から知られる用途に限らない様々な応用研究がなされている。しかし、セルロースやリグニンは不溶・不融であることから、材料へ応用するためには改質が必要不可欠である。セルロースは分子間で非常に強固な水素結合を多数形成しており、極性の高い多糖でありながら水に不溶である。このため、成形加工する際に可溶化などの工夫が必要となる。

セルロースの材料利用を可能とする既知の技術として、セルロースに酵素処理、TEMPO 処理などの化学的処理を施し、ナノファイバー化する方法がある。また、セルロースを単純に可溶化するイオン液体などの溶媒の開発も進められている。しかしながら、これらの手法ではセルロースの化学修飾や分子量低下を伴うことや、溶解による結晶構造の消失のため、セルロースが本来有している力学特性が損なわれてしまう可能性がある。

以上の背景を基に、優れた力学特性を担う結晶構造を壊すことなくセルロースを自在に可塑性化することが可能になれば、成型加工や複合化を制御することでセルロース本来の力学的性質を活かしながら優れたセルロース複合材料を創製することができると考えた。

2. 研究の目的

以上の背景を鑑み、申請者はセルロースを選択的に可塑性化することができるイオン液体と同様の zwitterion 構造を有する機能性ポリペプチドを提案した。本研究では、セルロースを可溶化することができるイオン性液体に着目した。セルロースと特異的に相互作用することが可能な zwitterion 型構造を持つイオン液体と同様の構造を導入した新規ポリペプチドを設計・合成し、これを利用したセルロースの選択的な可塑性化を行うことを目的とする。合成したポリペプチドを用いて、セルロース結晶との相互作用の制御およびそれを利用したセルロースのナノ複合化を図る。

3. 研究の方法

(1) zwitterion 構造を有する新規ポリペプチドの合成

セルロースを溶解することが可能なイオン液体として、イミダゾリウム型カチオンを含むイオン液体が用いられている。特に、カルボキシレート型の対アニオンを共有結合で結合した zwitterion 型の構造を持つイオン液体において、細胞毒性をほとんど示さずに細胞壁由来のセルロースを溶解できることが報告されている。そこで、イミダゾールを側鎖に有するヒスチジンを含む配列を持ったオリゴエステルモノマーを設計し、プロテアーゼ(パパイン)を触媒として用いた化学酵素重合法によりヒスチジンを含む反復配列ポリペプチドを合成した。さらに、ヒスチジン側鎖のイミダゾール部位へ後修飾を行うことにより、カルボキシレート型アニオンを有する zwitterion 構造へ変換した。

(2) zwitterion 型ポリペプチドを用いたセルロース結晶の解離

合成した zwitterion 型ポリペプチドをセルロース結晶への影響を調べるために、ホヤ由来のセルロース微結晶へ作用させた際の形態変化の観察および力学的物性評価を原子間力顕微鏡 (AFM) により行った。zwitterion 型ポリペプチドおよび類似の構造を有するイオン液体の溶液 ($0.5\text{-}2\text{ mg mL}^{-1}$) を調製し、セルロース微結晶へ1時間作用させた後、AFM により表面観察を行った。また、フォースカーブを測定することで、微結晶表面の弾性率を求めた。

(3) zwitterion 型ポリペプチドによる植物細胞壁への影響

タバコ由来植物培養細胞 (BY-2 cell) を用いて、zwitterion 型ポリペプチドの溶液を作用させた後の細胞壁の形態変化を高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) により観測した。

4. 研究成果

セルロースを効果的かつ選択的に可溶化するイオン液体の分子構造に着目し、類似した構造を持つ zwitterion 型ペプチドの設計及び合成を行った。GlyHisGly 配列を有するトリペプチドモノマーを合成し、パパインを用いた化学酵素重合により GlyHisGly の繰り返し配列を有するポリ

ペプチドを合成した。得られたポリペプチドの側鎖イミダゾール部位をブチレート基で修飾することで zwitterion 型ポリペプチド P(GlyHis^{zw}Gly)を合成した(図1)。zwitterion 構造への変換率は55%であった。

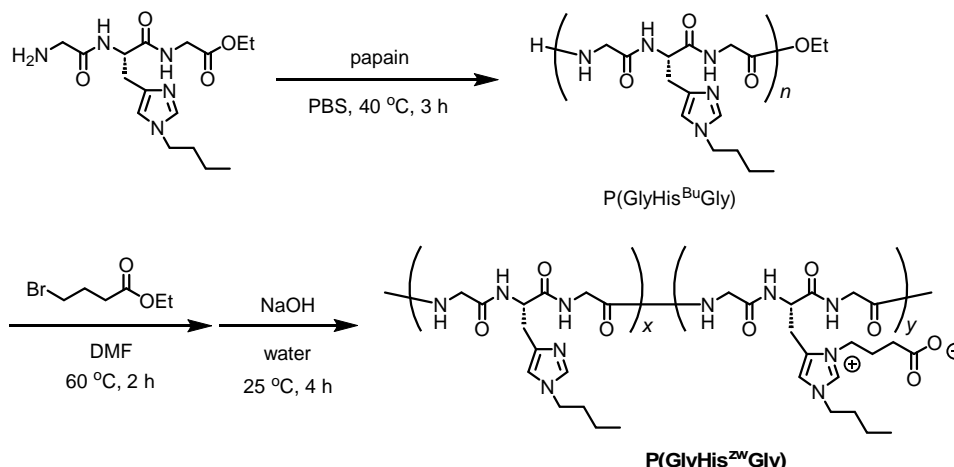


図1 . パパインを用いた化学酵素重合による zwitterion 型ポリペプチドの合成

またモノマーの配列および構造を変えた様々な zwitterion 型ポリペプチドを設計し、化学酵素重合による合成を行った。ヒスチジンを含むジペプチドもしくはトリペプチドエステル誘導体をモノマーとした化学酵素重合において、アミノ酸配列および側鎖構造の違いにより重合活性が異なることが明らかとなった。特に、GlyHis および HisGly 配列を有するジペプチドエステルについて、前者の重合では全く重合が進行しないのに対して後者の重合では高重合度のポリペプチドが得られるなど、重合活性において顕著な差が見られた(図2)。高い重合度が得られたペプチドを用いて zwitterion 構造へ変換することで、zwitterion 構造の含有量が90%以上のペプチドを合成することができた。得られた zwitterion 型ポリペプチドを用いて、セルロース微結晶に作用させた際の影響について調査を行った。

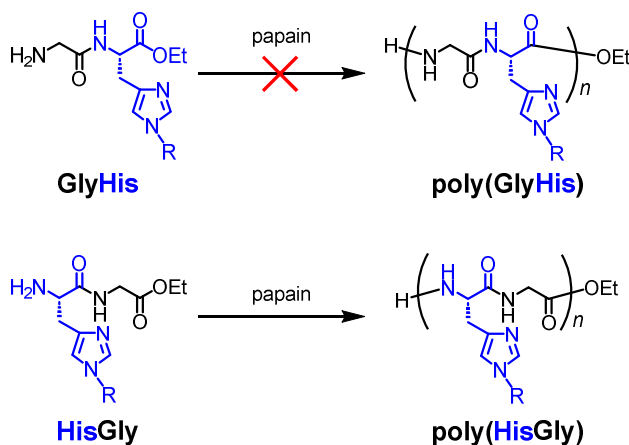


図2 . パパインを用いたヒスチジンを含むジペプチドエステルの配列依存的重合

得られたポリペプチドをホヤ由来のセルロース微結晶へ作用させることで、セルロース微結晶が解離してより細かな結晶となっていることがAFMによる観測から明らかとなった(図3)。同じ濃度のイオン液体水溶液(2 mg mL⁻¹)を作用させた場合、セルロース微結晶のサイズ変化はほとんど見られなかったことから、zwitterion 構造を繰り返し配列に有するポリペプチドを用いることで、局所的にセルロースと作用する zwitterion 構造が局所的に集積している効果が現れていることが示唆された。また、AFMを用いたフォースカーブ測定によりセルロース微結晶の弾性率を測定した結果、zwitterion 型ポリペプチドを作用させたセルロースの弾性率が増加していることが分かった(図4)。この結果から、zwitterion 型ポリペプチドがセルロース結晶表面の非晶部分を溶解し、効果的に結晶束を解離させていることが示唆された。

植物培養細胞に zwitterion 型ポリペプチドを作用させて、細胞壁表面の形態観察をHS-AFMにより行った。この結果、植物細胞壁のセルロースネットワークを zwitterion 型ポリペプチドが解離することで部分的に100 nm程度の空孔が形成されることが確認できた。このことから、zwitterion 型ポリペプチドを利用して植物細胞壁を緩めることで植物細胞への効果的な物質輸送を可能とする“細胞透過性ペプチド”としての利用可能性を見出した。

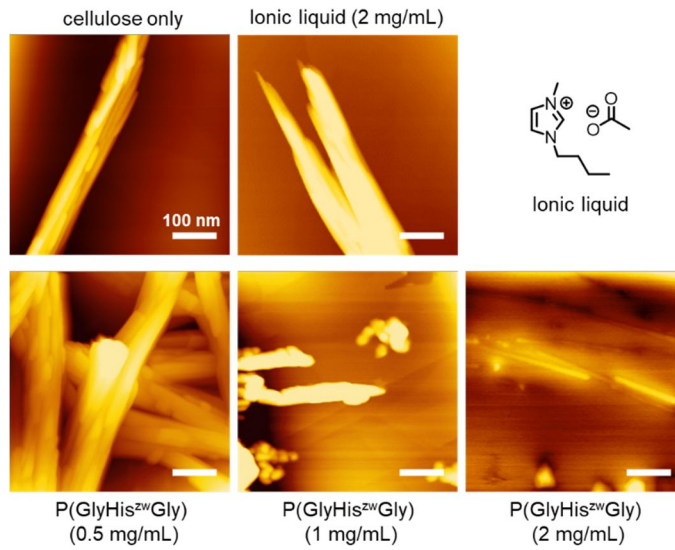


図 3 . AFM による zwitterion 型ポリペプチドを作用させたセルロース微結晶の形態変化の観察

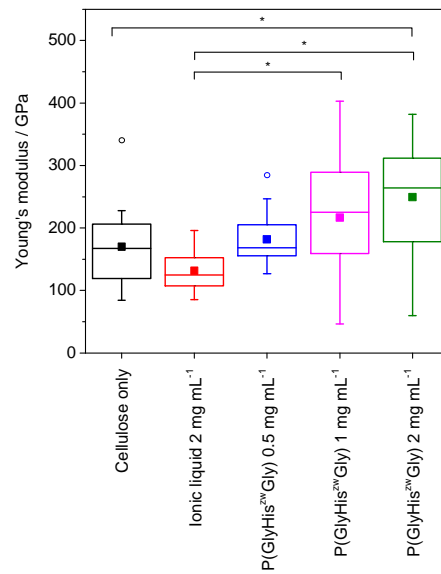


図 4 . zwitterion 型ポリペプチドを作用させた前後のセルロース微結晶表面の弾性率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujita Seiya, Tsuchiya Kousuke, Numata Keiji	4. 巻 1
2. 論文標題 All-Peptide-Based Polyion Complex Vesicles: Facile Preparation and Encapsulation of the Protein in Active Form	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Polymers Au	6. 最初と最後の頁 30-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acspolymersau.1c00008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Numata Keiji, Tsuchiya Kousuke	4. 巻 2
2. 論文標題 From structural to functional materials: a green way to produce functional biopolymers based on polypeptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 AsiaChem Magazine	6. 最初と最後の頁 42-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.51167/acm00021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Takumi, Terada Kayo, Takemura Shogo, Masunaga Hiroyasu, Tsuchiya Kousuke, Lamprou Alexandros, Numata Keiji	4. 巻 -
2. 論文標題 Chemoenzymatic Polymerization of <sc>l</sc>-Serine Ethyl Ester in Aqueous Media without Side-Group Protection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Polymers Au	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） 10.1021/acspolymersau.1c00052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kousuke Tsuchiya, Neval Yilmaz, Takaaki Miyamoto, Hiroyasu Masunaga, Keiji Numata	4. 巻 21
2. 論文標題 Zwitterionic Polypeptides: Chemoenzymatic Synthesis and Loosening Function for Cellulose Crystals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 1785-1794
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biomac.9b01700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 土屋康佑、沼田圭司
2. 発表標題 Synthesis of polypeptides containing an alternating sequence of lysine/glutamic acid via chemoenzymatic polymerization
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋康佑、寺田佳世、沼田圭司
2. 発表標題 化学酵素重合によるヒスチジンを周期的に含有するポリペプチドの合成
3. 学会等名 2021年繊維学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋康佑、藤田聖矢、河崎陸、渡邊健太、小田原真樹、沼田圭司
2. 発表標題 ペプチドポリイオンコンプレックスによるベシクルキャリアを用いた植物へのタンパク質送達
3. 学会等名 第31回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋康佑、寺田佳世、沼田圭司
2. 発表標題 zwitterion型ポリペプチドによる植物細胞壁のセルロースネットワーク解離効果
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋康佑、渡邊拓巳、沼田圭司
2. 発表標題 化学酵素重合によるポリセリンの合成
3. 学会等名 2021年繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kousuke Tsuchiya, Keiji Numata
2. 発表標題 Polypeptides containing zwitterionic structures: chemoenzymatic synthesis and ability to loosen cellulose network
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Tsuchiya, J. Gimenez-Dejz, K. Terada, P. G. Gudeangadi, K. Numata
2. 発表標題 Chemoenzymatic polymerization using proteases for synthesis of functional polypeptides with periodic sequences
3. 学会等名 ACS National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋康佑、宮本昂明、Neval Yilmaz、沼田圭司
2. 発表標題 zwitterion構造を有するポリペプチドによる植物細胞壁の過疎化作用
3. 学会等名 第30回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋康佑、沼田圭司
2. 発表標題 化学酵素重合を利用した繰り返し配列を持つ機能性ポリペプチドの合成
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋康佑、沼田圭司
2. 発表標題 酵素重合を利用したzwitterion構造を有するポリペプチドの合成
3. 学会等名 2020年繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 土屋康佑	4. 発行年 2020年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 560
3. 書名 生分解性、バイオマスプラスチックの開発と応用	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 バイオマス材料処理剤およびバイオマス材料の処理方法	発明者 沼田圭司、土屋康佑	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-049180	出願年 2020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
---------	---------