

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05014

研究課題名(和文)らせん性多糖類の構造的的特異性を基盤とした機能性バイオ材料の開発

研究課題名(英文) Development of functional bio-materials on the bases of the helical polysaccharides

研究代表者

田丸 俊一 (Tamaru, Shun-ichi)

崇城大学・工学部・教授

研究者番号：10454951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酵母由来のらせん性多糖を活用することで、単層カーボンナノチューブの単分子的に包接した複合体の形成による水溶化に成功した。さらに、複合化の過程に界面活性剤を介在させることで、複合体形成の効率を飛躍的に高めることに成功した。カチオン性の水溶性ポリチオフェンとピレン誘導体が形成する超分子型の複合材料をインジケータースとしてアニオン性多糖であるグリコサミノグリカン類を明瞭な色調変化により検出・識別することに成功した。共役系とペプチドからなるボラ型両親媒性分子を活用することで、より簡便な手法によるグリコサミノグリカン類を識別とヘパリン中に混入するヘパリン様毒性物質の検出が可能である事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫賦活効果などの生理活性を持つ多糖類と複合化させることで単分子水溶化されたカーボンナノチューブは、新たなバイオイメージングやドラッグデリバリーシステムの構築への貢献が期待される。グリコサミノグリカン類は細胞外マトリックスの構成や神経細胞の制御などに関与するため、グリコサミノグリカンに関する異常は、様々な疾病を引き起こす。また、ヘパリンは凝血防止剤として活用されているが、この中にヘパリンと構造が類似したヘパリン様物質が混入すると重度のアレルギー反応を誘発するため、ヘパリン製剤の純度は厳しく検査されている。本研究の成果は、これらの医療的な問題の解決に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：By utilizing yeast-derived helical polysaccharides, we have succeeded the individual water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by the formation of a complex with the polysaccharides. Furthermore, the efficiency of complex formation was dramatically improved by the intervention of a surfactant in the complexation process. The detecting and identifying glycosaminoglycans, which are anionic polysaccharides, were successfully carried out with a clear color change by using supramolecular composites composed of cationic water-soluble polythiophene and anionic pyrene derivatives as an indicator. By using a bora-type amphiphilic molecule composed of a pi-conjugated system and peptides, we found that it is possible to identify glycosaminoglycans and detect heparin-like toxic substances in heparin using simpler manipulations.

研究分野：超分子化学

キーワード：超分子化学 多糖 らせん構造 センシング カーボンナノチューブ グリコサミノグリカン

### 1. 研究開始当初の背景

$\beta$ グルカン類は、特徴的な 3 重らせん構造をもつ天然由来の多糖である。新海 (研究協力者) らは、この 3 重らせん構造の可逆的形成能を利用して、特定の機能材料と包接・複合化する手法を確立し、化学修飾した  $\beta$ グルカン類の開発とこれを利用したゲスト分子の包接や高分子の組織化など、多数の成果を報告している。当研究室でも、刺激応答型の両性  $\beta$ グルカンの開発と薬物輸送系・蛍光検出系への応用、アミロースと  $\beta$ グルカンからなる分岐多糖による光捕集系の開発を達成し、最近では、グルコサミノグルカン類の新規識別法の開発に成功している。これらを通して、 $\beta$ グルカン類の 3 重らせん構造形成能がもたらす恩恵は、これまでに活用してきた「分子包接能の発現」だけでなく、「 $\beta$ グルカン上に導入した分子の効果的な集積」を可能にし、さらに「他の天然・人工高分子では稀有な剛直な一次元構造」を提供できることにありと結論づけるに至った。さらに、植物、酵母類 (特に食品添加物製造工程の廃棄物である酵母残渣) から効率的に  $\beta$ グルカン類を取り出す手法を確立し、それらが創傷治癒効果や腎不全の症状軽減効果を示すことを明らかにした。

一方、グリコサミノグリカン類に代表されるアニオン性多糖類は、細胞外マトリックスの構成分子として生体の骨格形成に寄与しており、神経細胞の制御などにも関与している。このため、グリコサミノグリカンに関する異常は、様々な疾病を引き起こす。ヘパリン (HP) は凝血防止剤として活用されているが、この中に過硫酸化コンドロイチン硫酸 (OSCS) の様な HP と構造が類似したヘパリン様物質が混入すると重度のアレルギー反応を誘発するため、ヘパリン製剤の純度は厳しく検査されている。以上から、グリコサミノグリカン類の識別は、医学的な観点からも重要な研究課題である。

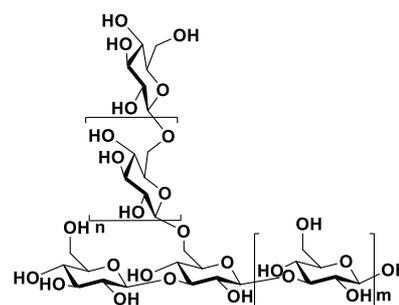


Fig. 1, 酵母由来  $\beta$ グルカン (BG) の構造.

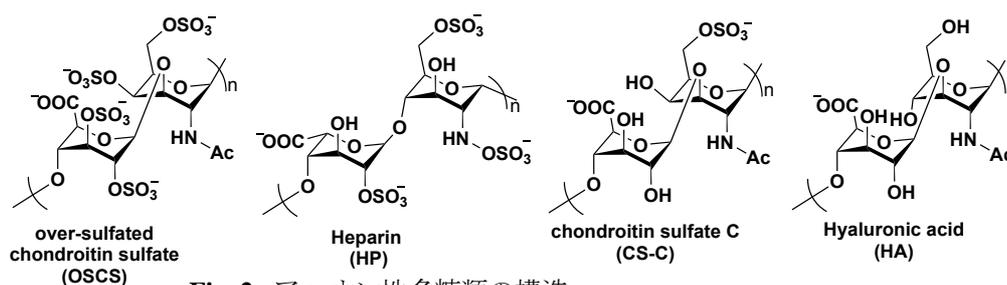


Fig. 2, アニオン性多糖類の構造.

### 2. 研究の目的

本研究では、らせん構造を持つ多糖類 ( $\beta$ グルカン類) を活用して、多価効果を基盤とした 1) 病原性細菌などに対する高い抗菌活性の実現や、2) ウイルスなどを簡便かつ高感度に検出する分子システムの構築を目指す。以上に加えて、天然由来の  $\beta$ グルカン類とのキラリティー相関に基づくカーボンナノチューブの新しい選択的分離法と単分子水溶化の達成を目指す。天然由来の素材を活用する本研究は、持続可能な開発目標に合致しており、本研究により、 $\beta$ グルカン類を活用した機能材料開発に関する学術的な知見を深め、さらに実学的な成果へと結びつけることで、多糖類を利用したバイオマス技術イノベーションに、新たな可能性を提案する。

また、本研究および関連研究を実施する過程で見出した知見を元に、超分子化学的戦略に基づくグリコサミノグリカン類の効率的検出と識別を実現する新しい検出系の構築を目標とすることで、製薬・医療分野に貢献する研究成果を得る事を目的とした。

### 3. 研究の方法

酵母由来の水溶性  $\beta$ グルカンは、酵母残渣を次亜塩素酸処理する事で回収した粗精製  $\beta$ グルカンを、再度次亜塩素酸処理する事で調製した。水溶性  $\beta$ グルカン (BG) と単層カーボンナノチューブ (SWCNT) の複合化は、これらを水中で懸濁混合した後、界面活性剤存在・不在下の両方で超音波照射を行い、得られた混合物を超遠心分離 (100,000 rpm) により分離することで、目標の BG/SWCNT 錯体を上清成分として回収する事で検討した。BG/SWCNT 錯体溶液中の SWCNT の状態は、紫外可視吸収スペクトル法により近赤外領域まで測定し、さらに発光スペクトル解析を行うことで評価した。

水溶性ポリチオフェン誘導体 (PT-1) を用いたアニオン性多糖の識別に関しては、まずこれまでの報告例に従って PT-1 を合成した後、PT-1 と各種アニオン性多糖を 1-ピレンスルホン酸 (1-PyS) 存在・不在下で混合することで得られる紫外・可視吸収スペクトル変化と目視による色調変化により評価した。

テトラチオフェン-ペプチド双頭型界面活性剤 (Th4-FR) を用いたアニオン性多糖の識別につ

いては、まずこれまでの報告例に従って **Th4-FR** を合成した後、**Th4-FR** と各種アニオン性多糖との混合による紫外・可視吸収スペクトル変化および溶解性の変化を評価した。さらに、得られた知見を元に、同様の実験を 96 穴プレートを用いて系統的に実施しその結果を統計的に処理することで、**Hep** 中に混入する **OSCS** の検出への応用の可能性を評価した。

#### 4. 研究成果

##### 酵母由来水溶性 $\beta$ グルカンによる単層カーボンナノチューブの単分子的可溶化

本課題研究を開始する段階までに、酵母残渣から段階的な次亜塩素酸処理により回収した各種 **BG** と **SWCNT** を超純水中で混合した後、所定の時間超音波照射を行い、得られた懸濁液を超遠心分離することで、**SWCNT** が単分子的可溶化した **BG/SWCNT** 錯体を調整することに成功していた。さらにこの錯形成過程には **SWCNT** 上のカイラリティーに対してある程度の選択性を示すことが見出されていた。また、得られた **BG/SWCNT** 複合体は、比較的高い熱安定性を示し、一旦乾固した後も再度水中に溶解させることが可能であったことから、他の **SWCNT** の単分子的可溶化と比較しても、高い有意性を持つことが確認されていた。一方、その複合化率は使用した **SWCNT** の数%程度に留まっており、改善の必要があった。そこで、**BG/SWCNT** 錯体の複合化率の向上を目指して、界面活性剤/**SWCNT** 錯体から界面活性剤と **BG** とを交換することによる間接的な **BG/SWCNT** 錯体の調製を検討した。界面活性剤ミセルから **BG** への **SWCNT** 交換には、界面活性剤/**SWCNT** 錯体が不安定化し、**BG/SWCNT** 錯体がより安定に形成できる条件が必要となる。そこで、「有機溶媒滴下」、「加熱」、「臨界ミセル濃度(CMC) 以下への希釈」の3種類による交換実験を試みた。界面活性剤には、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (**SDBS**) およびドデシルスルホン酸ナトリウム (**SDS**) を採用した。

【有機溶媒滴下法】有機溶媒にはメタノール、ジメチルスルホキシド(**DMSO**)を用いた。あらかじめ調製した単分子的可溶化状態の **SDBS/SWCNT** 錯体水溶液中に **BS** を加え、超音波照射しながら有機溶媒を滴下した。その後、透析と限外ろ過により界面活性剤と余剰の **BS** を取り除いた。得られた溶液の紫外可視吸収スペクトルから、いずれの有機溶媒を用いても **BS/SWCNT** 錯体の形成が確認されたが、**SWCNT** のバンドル化も示された。

【加熱法】予備実験から 50 °C 付近で **SDBS/SWCNT** 錯体が不安定化するのに対して、**BG/SWCNT** 錯体は比較的安定であることが確認された。そこで、単分子的可溶化 **SDBS/SWCNT** 錯体水溶液中に **BS** を加えた後温度を徐々に上昇させながら超音波照射を行った。その後、透析により界面活性剤を除去、再分散、遠心分離操作により錯体を回収した。紫外可視吸収スペクトルから、本手法でも **BG/SWCNT** 錯体は形成したものの **SWCNT** はバンドル化していることが確認された。

【希釈法】あらかじめ **SDBS** または **SDS/SWCNT** 錯体水溶液を調製し、この水溶液を超音波照射下で **BS** 水溶液にそれぞれの界面活性剤の **CMC** 付近になるまで徐々に滴下した。その後、透析により界面活性剤を除去したのち再分散し、遠心分離により錯体を上清として回収した。紫外可視吸収スペクトルから、得られた錯体はよりバンドル化が抑制されていることが確認された。

興味深いことに、界面活性剤/**SWCNT** 錯体水溶液の滴下量増加に伴って **BG/SWCNT** 錯体の複合化率も直線的に上昇した (Fig. 3)。複合化されずに回収された **SWCNT** が僅かにしか観測されなかったことことから、本手法により **BG/SWCNT** 錯体の形成が定量的に進行することが確認され、目標であった **BG/SWCNT** 錯体の複合化率を大幅に向上することに成功した。

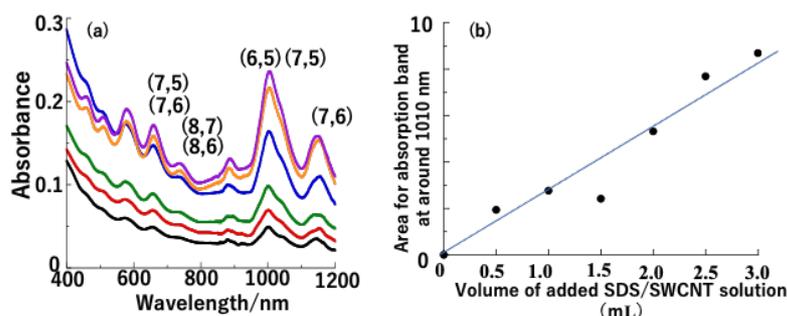


Fig. 3, (a) 希釈法による **BG/SWCNT** 複合体形成における **SDS/SWCNT** 溶液添加量変化に伴う **BG/SWCNT** 溶液の吸収スペクトル変化. (b) 同実験における 1010 nm 付近の吸収帯の面積変化のプロット。

##### 蛍光性高分子/蛍光分子の錯形成を利用した多様な多糖類の識別

ポリチオフェン誘導体は、コンフォメーションや会合状態の変化に基づき、光学的特性を多様に変化させることが可能であるため、検出系の構築において有望な材料である。当研究室では、カチオン性ポリチオフェン(**PT-1**)とらせん性多糖との錯体の形成に伴い、特有の **CD** スペクトルの発現を誘導することに成功している。**PT-1** は、各種らせん性多糖とは共らせん型の錯形成、アニオン性多糖類とは静電相互作用を利用した錯形成を行うことが期待できることから、**PT-1**

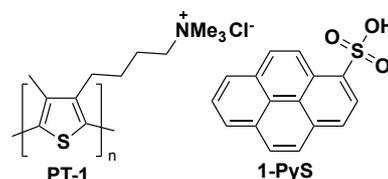
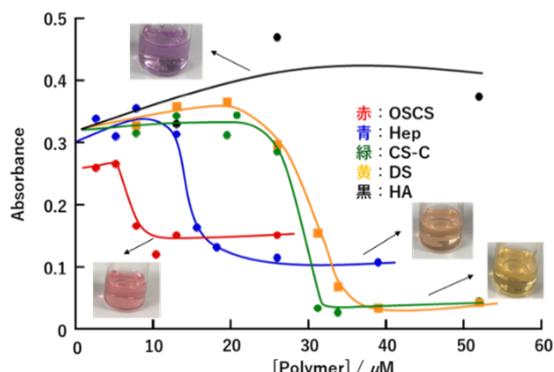


Fig. 4, **PT-1** と **1-PyS** の構造。

の様々なコンフォメーション変化を誘導することができ、多様な多糖類の選択的識別へ応用できると考えた。

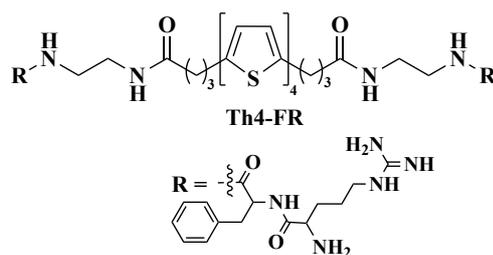
**PT-1** は 1-ピレンスルホン酸(**1-PyS**)と錯体の形成に伴い、550 nm ~ 600 nm の吸収帯が上昇し、**PT-1** 水溶液の色調も黄色から紫色へと劇的に変化した。この変化はポリチオフェン環が効率的な  $\pi$ スタッキングにより、直線性の高いコンフォメーション状態で固定された **PT-1** が集積体を形成したことによるものである。この **PT-1/1-PyS** 錯体を利用し、アニオン性多糖類の検出系の構築を検討した。**PT-1/1-PyS** 錯体水溶液に対して、**1-PyS** と競合するアニオン性多糖類を添加することで、**PT-1/1-PyS** 錯体から **1-PyS** の引き剥がしが進行し、溶液の色調が変化すると考えられる。**1-PyS** の引き剥がしという機構に基づくことから、多糖上のアニオン電荷の種類や個数に影響を受けて応答性が変化すると期待した。**PT-1/1-PyS** 錯体水溶液に対し、各種アニオン性多糖水溶液添加に伴う紫外可視吸収スペクトルと色調の変化を調査したところ、**OSCS**、**Hep**、**CS-C**、**デルマトン硫酸 (DS)** の順に薄い濃度領域で引き起こされ、構造内にスルホ基を有しない **HA** はほとんど変化を示さなかった(**Fig. 5**)。さらにこの色調変化は、スルホ基の数が少ないほど大きくなるというアニオン性多糖類へ特徴的な応答性を示した。以上のように、応答濃度と色調変化の度合いを利用することで、アニオン性多糖の識別に成功した。



**Fig. 5**, アニオン性多糖添加に伴う **PT-1/1-PyS** 錯体水溶液の  $\lambda=595$  nm の吸光度プロット。

#### $\pi$ 共役系骨格を有する両親媒性分子の錯形成に伴うアニオン性多糖類の識別

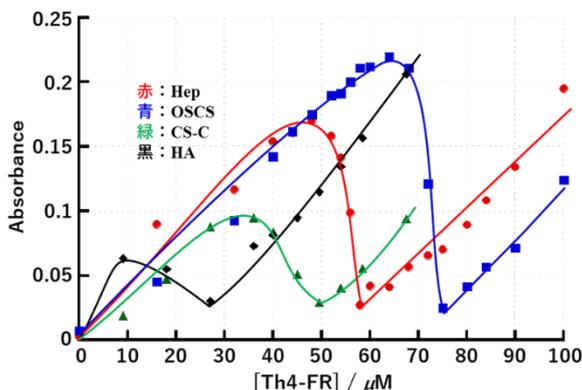
本研究課題の開始までに、テトラチオフェン骨格とペプチドからなるボラ型両親媒性分子が、特定のグリコサミノグリカンを識別して錯形成し、ヒドロゲル化することを見出していた。本研究では、本系の発展として、より簡便な手法でグリコサミノグリカン類を識別する手法の確立を目指して、**Th4-FR** とアニオン性多糖類の錯形成に伴う溶解性の変化を利用した検出系の構築を行った。



**Fig. 6**, **Th4-FR** の構造。

本系を構築するにあたり、**Th4-FR** の荷電状態の変化に伴う会合特性を検討するために、**Th4-FR** の pH 応答性を紫外可視吸収スペクトルと蛍光スペクトル測定により評価した。その結果、**Th4-FR** は酸性条件で安定して溶解しているものの、中性から塩基性条件に移行すると急激に会合が進行することが示された。これは、**Th4-FR** が荷電状態の変化に鋭敏に応答し会合体を形成するという性質を持つことを示している。そこで **Th4-FR** によるアニオン性多糖の識別について検討した。

アニオン性多糖水溶液に **Th4-FR** 水溶液を添加するという形式の検出系を構築した。本手法では、初期段階では **Th4-FR** の濃度上昇に伴って吸光度が上昇していくが、ある濃度領域まで **Th4-FR** が添加されると、錯形成に伴う急激な凝集が進行し、**Th4-FR** が沈澱すると考えられる。この状態からさらに **Th4-FR** を添加すると、溶液中にはすでにアニオン性多糖が存在しないことから、**Th4-FR** の濃度が単純に上昇し、吸光度も上昇すると考えられる。このような特徴的な吸光度の変化はアニオン電荷の数が多ければ多いほど **Th4-FR** が濃い濃度領域で引き起こされると考えられるので、本来硫酸化度が高すぎるために、静電相互作用を利用した識別が困難なグリコサミノグリカンを正確に識別できると期待した。本手法に基づき、各種アニオン性多糖水溶液に **Th4-FR** を添加し、それに伴う吸光度の変化を調査した。**Fig. 7** に示したように、それぞれ異



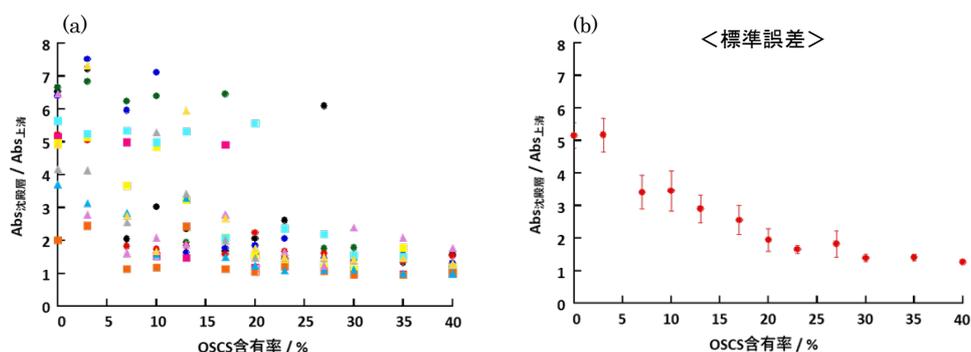
**Fig. 7**, 各種多糖溶液への **Th4-FR** 水溶液添加・遠心分離後の上澄み液の  $\lambda_{\text{abs}}=385$  nm における吸光度変化と **Th4-FR** 濃度依存性。

なる濃度領域で沈殿形成に伴う吸光度の減少が確認され、その序列は想定通り **HA < CS-C < Hep < OSCS** となった。さらに多糖上のアニオン電荷の個数が多いほど大きな吸光度の減少を引き起こすことも確認できた。この結果から、アニオン性多糖上のアニオン電荷の個数に基づいた識別系の構築に成功したといえる。

**Fig. 7** より、**[Th4-FR]=58 mM** 条件時の **Hep** 溶液の吸光度はほぼ 0 であるのに対して、**OSCS** 溶液では十分な吸光度が保持されていることが明らかとなった。この大きな差に注目し、より簡便な実験操作で **Hep** と **OSCS** の混合比の計測を可能にする検出系の構築を計画した。96 穴プレートとプレートリーダーを用いることで、短時間で同一サンプル検査数を確保することができるため、その検査精度の向上が期待できる。

実験操作としては、96 穴プレート上で **OSCS** 含有 **Hep** 水溶液と **Th4-FR** 水溶液を混合し、**[Th4-FR]=58 mM**、**Hep** と **OSCS** の比率が異なるサンプル溶液を調製した。1 時間静置した後、遠心分離操作を行い、沈殿物を沈降させたウェル（沈殿層）から上清の半分を隣のウェル（上清）に移した。プレートリーダーでの測定により、得られた各ウェルの吸光度を  $Abs_{\text{沈殿層}}$  と  $Abs_{\text{上清}}$  として計測し、それらの吸光度の比 ( $Abs_{\text{沈殿層}}/Abs_{\text{上清}}$ ) を算出することで **OSCS** 含有 **Hep** に対する応答性を評価した。

**Fig. 8a** より、得られたデータはばらつきが多いものの、**OSCS** 含量が **Hep** に対して 20%未満の領域で  $Abs_{\text{沈殿層}}/Abs_{\text{上清}}$  の値が連続的に上昇することが確認された。このことから 20%未満の **OSCS** 混入 **Hep** の **OSCS** 含有濃度を決定することができることが示された。標準誤差のプロット(**Fig. 8b**)では、ばらつきが小さかったことから、本手法は試行数を十分確保し、結果を平均化することで精度よく結果を得ることが示された。さらに  $Abs_{\text{沈殿層}}/Abs_{\text{上清}}$  の値をとるという手法を用いることで、測定値の変化を大きくすることができ、検出精度の向上につながるという有益な知見を得た。



**Fig. 8**, (a) **OSCS** 含有 **Hep** 水溶液への **Th4-FR** 添加・遠心分離後の  $Abs_{\text{沈殿層}}/Abs_{\text{上清}}$  のプロット、(b)の標準誤差プロット。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 村上宗周・田丸俊一
2. 発表標題 抗生物質導入らせん性多糖の開発と抗菌活性発現機構の解明
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥江真海・田丸俊一
2. 発表標題 抗多剤耐性菌活性を示す抗生物質導入多糖の開発研究
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲田慶后・田丸俊一
2. 発表標題 機能性分子の可溶化剤における酵母由来 グルカンの特性の評価
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 枝元祐貴・田丸俊一
2. 発表標題 自己修復性超分子ヒドロゲルの複合化による物性制御
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲田慶后・田丸俊一
2. 発表標題 酵母由来 $\beta$ -グルカンによるカーボンナノチューブの単分子的可溶化法の探索
3. 学会等名 日本化学会第103春期年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥江眞海・田丸俊一
2. 発表標題 側鎖修飾 $\beta$ -グルカン類の錯形成能の評価と制御
3. 学会等名 日本化学会第103春期年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 枝元祐貴・田丸俊一・新海征治
2. 発表標題 自己修復性超分子ヒドロゲルの物性制御
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田尚史・田丸俊一・新海征治
2. 発表標題 ゲスト応答的なゾル-ゲル相転移を利用したアニオン性多糖類の識別
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田尚史・田丸俊一
2. 発表標題 Guest-responsive supramolecular hydrogels expressing selective sol-gel transition for sulfated glycosaminoglycans
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 枝元祐貴・田丸俊一
2. 発表標題 自己修復性ソフトマテリアル開発を指向した超分子複合ヒドロゲルの物性制御
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田丸俊一
2. 発表標題 Amylose-grafted curdlan; a new class of semi-artificial branched polysaccharides for hierarchical polymeric superstructures created by the action of orthogonal binding sites
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ゲスト応答型超分子ヒドロゲルを用いたグリコサミノグリカン類の識別
2. 発表標題 田丸俊一・黒田尚史
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山大喜・田丸俊一
2. 発表標題 -グルカン誘導体のらせ形性能の評価とヘテロらせん構造形成の試み
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥江眞海・田丸俊一
2. 発表標題 抗生物質導入 グルカンの活性発現機構の解明
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masami Okue, Shun-ichi Tamaru
2. 発表標題 Structure and anitibacterial activity of vancomycine-grafted -glucans
3. 学会等名 The 12th SOJO-UTP joint seminar on nano and bio research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keigo Inada, Shun-ichi Tamaru
2. 発表標題 Study on individual solubilization of singel walled carbon nanotubes utilizing yeast-derived -glucans
3. 学会等名 The 12th SOJO-UTP joint seminar on nano and bio research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥江眞海・田丸俊一
2. 発表標題 -1,3-グルカン誘導体の三重らせん構造形成に基づく機能発現
3. 学会等名 日本化学会第104春期年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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