

ナノ構造化糖鎖素子を介した機能糖鎖集密化バイオマテリアルの創出

Functional Architectonics of Glyco-Biomaterials
Designed via Cellulosic Nano-Assemblers

北岡 卓也 (KITAOKA TAKUYA)

九州大学・大学院農学研究院・准教授



研究の概要

次世代バイオ材料として期待される界面ナノ構造を制御可能な糖鎖系バイオインターフェースの創出に向け、独自技術の「非水系酵素反応による糖鎖合成技術」と「構造化糖鎖複合集積造膜技術」の融合により、特別な生理活性のない樹木糖鎖のセルロースをナノ構造化素子として、糖鎖集密界面の生体反応・機能を制御するグライコアーキテクトニクス研究の基盤構築を図る。

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・酵素反応・自己組織化・密度制御・バイオインターフェース

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ工学とバイオ技術の融合による生体機能材料の研究開発が盛んに行われている。特に、細胞表面を覆う「糖鎖」を介した生理情報伝達系を生体外で機能模倣・材料利用する試みは、再生医用材料分野で大きな注目を集めている。糖鎖の生体機能は、クラスター効果をはじめとするナノスケールでの空間配置や密度が鍵を握っており、その高度制御に向けた技術革新が希求されている。しかし、現状ではアモルファス多糖ゲル膜等、ナノ構造制御の検討は不十分であった。

ところで、植物の細胞壁をなすセルロースは、D-グルコースが β -1,4結合のみで連なった単純な構造の多糖類でありながら、規則的な分子内・分子鎖間相互作用により、高度に制御されたナノ配列構造を形成する。特に、天然セルロース特有の平行鎖結晶構造は、糖鎖の生理機能を担う非還元末端基が集密化した状態とみなせる。しかし、その強すぎる相互作用が障壁となり、合成も配列制御も不可能であったため、ナノ構造化素子としてのポテンシャルを活かせていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、独自の「非水系酵素反応糖鎖合成技術」と「構造化糖鎖集積造膜技術」の融合・先進化により、生命現象に直結する糖鎖の構造と機能を模倣した糖鎖系バイオマテリアルの創出を目指している。特に、近年の糖鎖生物学の発展で明らかになりつつあ

るオリゴ糖アセンブリの生体機能について、その人為的構築と材料工学的応用に、樹木細胞壁を構成するセルロースなど、これまで未検討の構造化糖鎖分子を「ナノ構造化素子」として機能利用するコンセプトを提案する。細胞と直接相互作用する材料創出を通じて、糖鎖系バイオ材料の新研究領域「グライコナノアーキテクトニクス」の研究基盤を築く。

3. 研究の方法

3.1 無保護糖からの一段階多糖・配糖体合成
特殊な界面活性剤を用いて糖加水分解酵素を被覆することで非水系極性有機溶媒中での活性発現を図った。精製酵素を用いた詳細な機構検討を行うとともに、様々な酵素・基質・反応場・アクセプターの組み合わせを検討した。さらに、有機酸をわずかに系内に添加する全く新規な共触媒効果を検討した。

3.2 構造化・機能性糖鎖のハイブリッド界面
オリゴ糖鎖の還元末端特異的S誘導体化と金基板への自己組織化による糖鎖集積技術を検討した。セロヘキサオースとキトヘキサオースの強い分子間相互作用を利用して、界面の生理機能糖鎖の密度を精密制御し、生体応答反応の発現挙動との相関性を精査した。

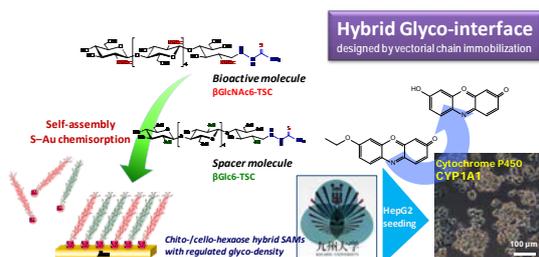
4. これまでの成果

4.1 プロトンアシスト非水系酵素触媒反応
無保護の構成糖から一段階で多糖類や複合糖質を合成可能な非水系酵素触媒反応は、低収率（～5%）が課題であった。本研究の結

果、非プロトン性有機溶媒中にわずかな有機酸を添加することで、飛躍的に収率が向上する現象を発見した(セルロース合成で約30%、キチン合成で約80%)。これは、酸触媒が基質糖のC1位を一時的に活性化することによる協奏的触媒効果と推測される。プレンステッド酸を非水系で酵素反応と組み合わせる発想は世界初であり、詳細な触媒機構について現在検討を深めている。また、水に不溶な疎水性アルコールに一段階でラクトースを導入することにも成功した。本手法は、酵素・界面活性剤・反応場・基質・アクセプター・酸触媒の組み合わせの自由度の高さから極めて有用性が高く、糖鎖材料分野での新たな合成手法として、その利用に期待が持たれる。

4.2 細胞が直接認識する糖鎖集積界面

本研究では、構造明確なセロヘキサオースとキトヘキサオースを同時に自己集積させることで、膜表面の正確な糖鎖比率の算出に成功し、キチン61%/セルロース39%の膜において、ヒト肝ガン細胞HepG2のスフェロイド形成と解毒酵素のシトクロムP4501A1の活性発現が見られた。さらに、キチンを認識するToll-like receptor 2 (TLR2)を有するHEK293細胞を用いてアッセイしたところ、膜表面のキチン密度応答的に自然免疫系のシグナル伝達が働き、細胞炎症挙動が変化する現象を明らかにした。本系では、キチン密度0.12 chains/nm²の条件で最も高い応答性を示し、これはTLR2の刺激受容スポットの占有面積と相関があった。逆にキチン密度を高くすると細胞応答性は著しく低下した。すなわち、密度制御可能な糖鎖集積界面を細胞表面に認識させ、その生理応答現象をマテリアル側のナノ構造設計で制御する本研究課題の本質に迫る成果を得た。糖鎖側の材料設計により細胞側を操作する、糖鎖系バイオインターフェースの創出に大きく近づいた。



その他にも、糖鎖の良溶媒であり金イオンから金ナノ粒子を合成可能なNMMO系溶媒を用い、ナノレベルで均一なW/Oエマルジョンを反応場とすることで、単分散(8.5±0.7 nm)の金ナノ粒子合成と、糖鎖の高密度表面修飾(~0.68 chains/nm²)にも成功した。また、アゾベンゼン基の自己会合を利用した糖鎖ハイドロゲルの合成・ナノ配列化も行い、表面に糖鎖非還元末端基が提示された光・温度応答的バイオインターフェースの創出にも成功しており、多くの成果が得られている。

5. 今後の計画

生物の細胞表面は多様多彩な糖鎖が規則的に配列・集積したナノ構造を特徴としており、生理現象・生体反応は、糖鎖を介した相互作用システムの表現形とみなせる。今後は、マイクロパターン界面やナノ粒子への糖鎖集積固定化、糖鎖レセプターを持つ動物細胞の機能・モルフォロジー制御を通じて、細胞表面に“認識させる”生理機能糖ナノ集積構造の制御とバイオ機能の高発現を目指し、本研究のフラッグコンセプトの「グライコナノアーキテクトニクス」の研究基盤を確立する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

【原著論文】(計14件)

1. Ogawa Y., Yoshiyama C., Kitaoka T., Helical assembly of azobenzene-conjugated carbohydrate hydrogelators with specific affinity for lectins, *Langmuir*, **28**, 4404-4412 (2012).
2. Yoshiike Y., Kitaoka T., Tailoring hybrid glyco-nanolayers composed of chitohexaose and cellohexaose for cell culture applications, *J. Mater. Chem.*, **21**, 11150-11158 (2011).
3. Kitaoka T., Yokota S., Opietnik M., Rosenau T., Synthesis and bio-applications of carbohydrate-gold nanoconjugates with nanoparticle and nanolayer forms, *Materials Science and Engineering C*, **31**, 1221-1229 (2011).
4. Okutani Y., Egusa S., Ogawa Y., Kitaoka T., Goto M., Wariishi H., One-step lactosylation of hydrophobic alcohols by nonaqueous biocatalysis, *ChemCatChem*, **2**, 950-952 (2010).

【受賞】北岡卓也，多糖分子と繊維素材の機能的アーキテクトニクス材料研究、第7回(平成22年度)日本学術振興会賞、2011年3月3日。

【学会発表】(国内30件・国際11件)

基調講演：Kitaoka T., Synthesis and bio-functional design of carbohydrate-gold nanoconjugates, International Conference on Chemical and Biological Utilization of Biomass Resources 2010, Nanjing, Oct. 22-26 (2010).

招待講演：Kitaoka T., Synthesis and bio-applications of carbohydrate-gold nanoparticle conjugates, Principles and Development of Bio-inspired Materials, European Cooperation in Science and Technology, Vienna, April 13-15 (2010).

【特許】糖ラクトン-アゾベンゼン化合物およびその利用、発明人：小川由紀子、北岡卓也、特許出願人：九州大学、特願2009-285641

／国際出願 PCT/JP2010/052117

ホームページ等

URL: <http://bm.wood.agr.kyushu-u.ac.jp/>