たず
多糖を温ねて新しきを知る

小林 厚志・正田 晋一郎

1. はじめに

われわれの身の回りの衣食住に関する数多くの製品が天然高分子を原料にして生産されている。天然高分子は生分解性を示すことから、循環型社会を支える材料として有望視されている。なかでも、セルロースやデンプンに代表される植物由来の多糖は、太陽光と水と二酸化炭素からつくられる再生可能な資源であり、材料科学のみならず環境科学の立場からも大いに注目されている(図1)。

しかし、これら多糖類は、古くからの伝統的な素材として扱われることが多く、その活用技術はともすれば“枯れた技術”という印象を与える。高分子学会においても、多糖の出る幕は格段に減少しており、材料としての発展性の期待値も一見して低いものに見える。しかし、ISI社のWeb of Scienceにより“polysaccharide”を唯一のキーワードとして検索すると、2004年から2006年6月までに発表された論文のうち、多糖に関するものが4,000件以上ヒットした。一方、“polymer”で検索すると50,000件弱であるので、大雑把ではあるが高分子研究の10分の1は多糖関連と見積もることができる。本稿では、古い材料と考えられがちな多糖類に関する最近の話題を提供することにより、わが国が得意とする糖科学の一翼を担う“多糖”を再び表舞台に引き出し、多糖に秘められた可能性を高分子科学の立場から述べてみたい。

2. 多糖の“かたち”を利用した機能性分子

多糖の規則的な構造を巧みに利用した例としてもっとも

セルロース

アミロース(デンプン)

図1 セルロースおよびアミロース(デンプン)の構造

有名なものは、セルロースやアミロースのフェニルカーバメート誘導体によるキラルカラムであろう¹⁾。これら多糖誘導体のおかげで多くの光学異性体を分離することが可能になり、基礎研究のみならず医薬品開発における貢献度はきわめて高い。

多糖を機能化するためには、分子内に多く存在するヒドロキシ基の修飾が必須であると考えられてきた。事実、多くの置換多糖誘導体が、製紙工業や食品工業などにおいて汎用されている。しかしながら多糖の機能化は、共有結合によってのみ達成されるわけではない。多糖の規則構造の中に有機分子を包接することによる機能化も可能であり、デンプンの構成成分であるアミロースのらせん空腔に疎水性分子が包接されることを利用した機能化が図られている²⁾。

ここで、少し話題を変えて多糖骨格そのものを構築する最近のトピックスをひとつ紹介しよう。一般に、デンプン

KOBAYASHI, Atsushi (左)

東北大学大学院工学研究科(980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-11-513)・助手、博士(工学)。2000年 東京工業大学大学院生命理工学研究科博士後期課程修了。専門は糖鎖工学。

SHODA, Shin-ichiro (右)

同上・(980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-11-514)・教授、理学博士。1981年 東京大学大学院理学系研究科博士課程修了。専門は糖鎖工学、高分子合成。

He that would know, what shall be, must Consider what "Polysaccharides" are

図2 セルロースからアミロースへの酵素による変換プロセス

から抽出したアミロースには、 α -1,6 結合が混在してしまい、分子量分布も一定ではない。そこで、構造明確で分子量が制御されたアミロースとして、ホスホリラーゼによる酵素合成アミロース³⁾が専ら用いられてきた。しかし、モノマーであるグルコース- α -1-リン酸が高価であるために、大スケールでの合成は長い間困難であった。最近、セルロースを原料として、酵素的作用により、アミロースへと変換するプロセスが開発され、酵素合成アミロースの製品化への道が開けつつある⁴⁾ (図2)。糖ドナーである糖リン酸は、リン酸緩衝液中で多糖ないしオリゴ糖にホスホリラーゼを作用させることにより容易に調製できる⁵⁾。セルロースは、まずセルラーゼ的作用によりセロビオースへと変換され、セロビオースからセロビオースホスホリラーゼによるグルコース-1-リン酸の生成、グリコーゲンホスホリラーゼによる酵素合成アミロースの生成というステップを経ることにより、アミロースへの変換プロセスが達成された^{6), 7)}。ヨウ素を取り込んだ偏光フィルムや、キチンとの抗菌性ブレンドフィルムなど⁸⁾、今後のさらなる機能化が期待されている。

環状の多糖類のかたちを利用した機能も興味深い。シクロデキストリンは、グルコース分子6~8個が α -1,4 結合でつながった環状オリゴ糖である。シクロデキストリンは、その内空が疎水的になるため、水溶液中において疎水性分子を包接することができる。この性質を利用して、位置選択的な有機合成反応や分子の捕捉などが報告されている。シクロデキストリンは工業的には酵素的に生産されるが、その前駆体としてグルコースが20~30分子つながった大環状のシクロデキストリンが見いだされた^{9), 10)} (図3)。この大環状シクロデキストリンは、らせん構造をとることができるので、シクロデキストリン同様その内空に疎水性分子を取り込むことができる^{11), 12)}。

図3 大環状シクロデキストリンの構造 (文献12より引用)

大環状シクロデキストリンの包接能を活用した、分子シャペロンシステムを紹介しよう。Machida らは、アンフォールディングしたタンパク質が、大環状シクロデキストリン的作用によって、リフォールディングする現象を見いだした¹³⁾。大腸菌などの異種ホストで発現させたタンパク質は、フォールディングがうまくいかずに不溶化して封入体を形成し、機能を発現しないことがよくある。この封入体は疎水性相互作用により凝集しているだけであるので、界面活性剤を用いて水溶液に分散させることができる。こうしてできた界面活性剤-タンパク質複合体からゆっくりと界面活性剤をはがしてやれば、タンパク質が再び正しく折りたたまれるようになる。実際に数種類の酵素を用いて実験を行ったところ、界面活性剤-タンパク質複合体溶液中に大環状シクロデキストリンを添加することによって、各々の酵素の活性が回復した。つまり、大環状シクロデキストリンが、生体内におけるタンパク質の折りたたみの介助役であるシャペロンに似た機能を有することがわかった。

アミロースをアミロペクチンに変換する転移酵素であるブランチングエンザイムを用いて生成した環状構造を有する非還元性多糖であるクラスターデキストリンの合成が報告されている。すでに食品添加物として利用されているが、その高い水溶性から今後さまざまな機能化が期待できる。

筆者らは、アミロースのらせん構造を活用した効率的な糖脂質合成法を開発した。デンプンの加水分解酵素である α -アミラーゼは、糖転移反応の触媒にもなる酵素であるが、糖脂質への配糖化は困難であった。これは糖脂質の水への溶解性が低いために、糖ドナーであるデンプンと糖アクセプターである糖脂質が空間的に接近することができず、糖転移反応に至る前に糖ドナーの加水分解反応が優先的に起きてしまうからである。糖脂質の水への溶解度を向上させる手法として、シクロデキストリン存在下で酵素反

a) シクロデキストリンを用いる方法

b) デンプンを用いる方法

図4 a) シクロデキストリンの包接現象を利用した酵素による配糖化反応
b) デンプンの包接現象を利用した酵素による糖脂質の合成

応を行う方法がある¹⁴⁾(図4 a))。この手法をヒントに、多糖-糖脂質複合体を形成することができれば、糖加水分解酵素による糖脂質の配糖化反応が効率よく進行するものと考え、デンプン存在下、α-アミラーゼ触媒による糖脂質への配糖化を試みた¹⁵⁾(図4 b))。一般に包接錯体は水溶性が低下することが知られているが、基質混合時に超音波照射をすることによって良好な分散状態にすることができた。これまでも、高濃度のデンプンを基質として糖転移反応を行った例はいくつか報告されているが¹⁶⁾、包接現象を利用して高効率な酵素反応場を構築した例は本報告が初めてである。

3. 多糖類の新しい溶剤—イオン液体—

多糖は有用な材料であるが、良好に溶解する溶媒が少ないという問題点がある。セルロース、キチン、デンプンは、親水性基を多く有するにもかかわらず、親水性基どうしの水素結合により強固な会合体を形成するために、ほとんどの溶媒に難溶である。とりわけ、再生セルロースを調製するにあたり、水酸化ナトリウム溶液などの強アルカリが必要であり、環境負荷の小さい新しい溶媒の開発が期待されていた。

最近、イオン液体がセルロースの良好な溶媒となることが見いだされ注目されている^{17), 18)}。イオン液体とは、およそ100℃以下で液体として存在する有機塩であり、蒸気圧をほとんどたず、再生可能な溶媒であることから、グリーンケミストリーに適合した媒体として期待されている。各種の有機合成反応の媒体としてだけでなく、最近では酵素反応の溶媒としても利用されている¹⁹⁾。

セルロースをよく溶かすことのできる代表的なイオン液

図5 代表的なイオン液体の構造

体を図5に示した。驚くべきことに、これらのイオン液体は、セルロースを25 wt%も溶解することができる¹⁷⁾。この事実をもとに、イオン液体を用いるアセチル^{20), 21)}およびカルバミル化セルロース²²⁾の調製法に関する報告がなされている。さらに、再生セルロースを作製し、さまざまな用途に向けた材料開発も行われてきている^{23), 24)}。このようにいくつかの優れた性質を有するイオン液体であるが、将来工業レベルで利用されるためには、より低価格での製造が必須である。

4. 高分子反応を利用した修飾多糖類の合成

ヒドロキシ基を部分的にアセチル化した多糖誘導体は、有用な化合物であり、非常に大きな市場を形成している。多糖誘導体の合成は、あたかも成熟した技術のように思われているが、従来の有機化学的手法では困難な多糖の位置選択的な修飾など、魅力的かつ挑戦的なテーマが数多くある学問領域である。最近、キシランの脱アセチル化酵素であるアセチルキシランエステラーゼを用いるオリゴ糖へのアセチル化反応が報告されている²⁵⁾。糖鎖を修飾する酵素反応²⁶⁾も見いだされている。

筆者らは、キチンを硫酸化するための触媒として、工業用酵素製剤中からスルファターゼをスクリーニングし、酵素触媒高分子反応による硫酸化キチンの新しい製造法を開発した²⁷⁾。最近では、多糖に吸着するタンパク質ドメイン

図6 キメラ酵素を用いる酵素触媒高分子反応

図7 シゾフィランの構造

の働きに関する知見も増え、これらのタンパク質が単に選択的吸着しているだけでなく、積極的に分解反応に関与していることが明らかになっている。今後は、これら吸着ドメインと触媒ドメインのキメラ酵素を用いることにより、効率のよい高分子反応の開発が可能になるであろう（図6）。

5. 多糖類と生体高分子の相互作用

キトサンは、分子内に多数のアミノ基を有することから、ポリアニオンであるDNAなどの核酸と複合体を形成する。また、アルギン酸はカルボキシ基をもつ多糖であり、タンパク質と複合体を形成することが知られている。これに対し、電荷をもたない中性多糖に関しては、環状オリゴ糖であるシクロデキストリンを除き、生体高分子と特異的に相互作用する例はほとんど報告されていない。

シゾフィランはグルコースが β -1,3結合でつながった多糖であり、部分的に β -1,6結合を介してグルコースが付加した構造を有している（図7）。興味深いことに、この多糖は水溶液中で三重らせん構造をとることが知られている。 β -1,3/1,6-グルカン構造は現時点では動物中には見いだされておらず、微生物中にのみその存在が確認されることから、マクロファージ活性化に寄与していると考えられている^{28), 29)}。実際、 β -1,3/1,6-グルカンが動物に対して免疫賦活作用を示すことが報告された。

シゾフィランによる核酸の分子認識が報告されている。SakuraiらはアンチセンスDNAとシゾフィラン(s-SPG)

の相互作用を調べ、シゾフィランが塩基配列特異的にリボ核酸と結合することを見いだした³⁰⁾。さらに、ジメチルスルホキシド(DMSO)中においては一本鎖として存在しているシゾフィランに核酸を添加した後、溶媒を水に置換することにより、核酸-シゾフィラン三重らせん構造が形成されることも示された³¹⁾。この複合体は水に非常によく溶解し、かつ消化酵素の影響を受けにくく安定であることから、遺伝子キャリアーとして働くことが期待された。細胞への取り込み効率を高めるために、1,6-分岐しているグルコースユニットをアミノ酸やペプチドで修飾したシゾフィラン-核酸三重らせん複合体を用いてアンチセンス効果を評価したところ、この複合体が速やかに細胞へ取り込まれ、かつ、アンチセンス効果を示すことがわかった^{32), 33)}。最近では、クリックケミストリーを利用した位置特異的修飾³⁴⁾やカーボンナノチューブの可溶化³⁵⁾など、多方面への展開が期待される。

6. 今後の展望

すでに多くの多糖類が工業的に利用されているにもかかわらず、現在でもさまざまな観点から学術研究が活発に行われていることに改めて気づく。それは、自然界から新たな多糖が次々と見いだされていること、多糖には不可思議な挙動を示すものがあること、そして、現在利用されている多糖の修飾技術でさえもまだ完全とはいえず、新たな合成技術や解析法が求められていることなどに起因するものである。すでに、日本化学会に糖鎖化学研究会が発足しており、2006年11月には多糖関連学会共催の“多糖の未来シンポジウム”も開催される。多糖の未来をさまざまな視点から考察することにより、基礎研究から産業レベルに至る連綿とした体制づくりが達成できるものと思われる。

文 献

- 1) T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, Y. Okamoto: *Polym. J.*, **38**, 91 (2006)
- 2) Y. Kaneko, J. Kadokawa: *Chem. Rec.*, **5**, 36 (2005)
- 3) H. Waldmann, D. Gygax, M. D. Bednarski, W. Randall Shangraw, G. M. Whitesides: *Carbohydr. Res.*, **157**, c 4 (1986)
- 4) K. Ohdan, T. Takaha: *Cellulose Commun.*, **13**, 66 (2006)
- 5) M. Kitaoka, K. Hayashi: *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **14**, 35 (2002)
- 6) K. Ohdan, K. Fujii, M. Yanase, T. Takaha, T. Kuriki: *Bio-catal. Biotrans.*, **24**, 77 (2006)
- 7) K. Ohdan, T. Takaha, T. Kuriki, K. Kudo, M. Wasa, M. Sunako, J. Takahara: *PTC Int. Appl.*, WO2005056811, p. 71 (2005)
- 8) S. Suzuki, K. Shimahashi, J. Takahara, M. Sunako, T. Takaha, K. Ogawa, S. Kitamura: *Biomacromolecules*, **6**, 3238 (2005)
- 9) Y. Terada, M. Yanase, H. Takata, T. Takaha, S. Okada: *J. Biol. Chem.*, **272**, 15729 (1997)

- 10) T. Takaha, M. Yanase, H. Takata, S. Okada, S. M. Smith: *J. Biol. Chem.*, **271**, 2902 (1996)
 - 11) W. Saenger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S. M. Smith, T. Takaha: *Chem. Rev.*, **98**, 1787 (1998)
 - 12) K. Gessler, I. Uson, T. Takaha, N. Krauss, S. M. Smith, S. Okada, G. M. Sheldrick, W. Saenger: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4246 (1999)
 - 13) S. Machida, S. Ogawa, S. Xiaohua, T. Takaha, K. Fujii, K. Hayashi: *FEBS Lett.*, **486**, 131 (2000)
 - 14) T. Murata, A. Tashiro, T. Itoh, T. Usui: *Biochim. Biophys. Acta*, **1335**, 326 (1997)
 - 15) A. Kobayashi, H. Itoh, S. Shoda: *Chem. Lett.*, **34**, 1384 (2005)
 - 16) D. Li, S. A. Roh, J. H. Shim, B. Mikami, M. Y. Baik, C. S. Park, K. H. Park: *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6516 (2005)
 - 17) R. P. Swatloski, S. K. Spear, J. D. Holbrey, R. D. Rogers: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4974 (2002)
 - 18) S. D. Zhu, Y. X. Wu, Q. M. Chen, Z. N. Yu, C. W. Wang, S. W. Jin, Y. G. Ding, G. Wu: *Green Chem.*, **8**, 325 (2006)
 - 19) F. van Rantwijk, R. Madeira Lau, R. A. Sheldon: *Trends Biotechnol.*, **21**, 131 (2003)
 - 20) A. P. Abbott, T. J. Bell, S. Handa, B. Stoddart: *Green Chem.*, **7**, 705 (2005)
 - 21) J. Wu, J. Zhang, H. Zhang, J. He, Q. Ren, M. Guo: *Biomacromolecules*, **5**, 266 (2004)
 - 22) S. Barthel, T. Heinze: *Green Chem.*, **8**, 301 (2006)
 - 23) M. B. Turner, S. K. Spear, J. D. Holbrey, R. D. Rogers: *Biomacromolecules*, **5**, 1379 (2004)
 - 24) M. B. Turner, S. K. Spear, J. D. Holbrey, D. T. Daly, R. D. Rogers: *Biomacromolecules*, **6**, 2497 (2005)
 - 25) P. Biely, M. Mastihubova, G. L. Cote, R. V. Greene: *Biochim. Biophys. Acta*, **1622**, 82 (2003)
 - 26) V. Puchart, P. Biely: *Biochim. Biophys. Acta*, **1726**, 206 (2005)
 - 27) T. Kotake, A. Kobayashi, S. Shoda: Prep. 10th Annu. Meet. Cellu. Soc. Jpn., p. 1 (2003)
 - 28) G. D. Brown, S. Gordon: *Immunity*, **19**, 311 (2003)
 - 29) G. D. Brown, S. Gordon: *Nature*, **413**, 36 (2001)
 - 30) K. Sakurai, S. Shinkai: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4520 (2000)
 - 31) K. Sakurai, M. Mizu, S. Shinkai: *Biomacromolecules*, **2**, 641 (2001)
 - 32) T. Matsumoto, M. Numata, T. Anada, M. Mizu, K. Koumoto, K. Sakurai, T. Nagasaki, S. Shinkai: *Biochim. Biophys. Acta*, **1670**, 91 (2004)
 - 33) R. Karinaga, T. Anada, J. Minari, M. Mizu, K. Koumoto, J. Fukuda, K. Nakazawa, T. Hasegawa, M. Numata, S. Shinkai, K. Sakurai: *Biomaterials*, **27**, 1626 (2006)
 - 34) T. Hasegawa, M. Umeda, M. Numata, C. Li, A. H. Bae, T. Fujisawa, S. Haraguchi, K. Sakurai, S. Shinkai: *Carbohydr. Res.*, **341**, 35 (2006)
 - 35) M. Numata, M. Asai, K. Kaneko, A. H. Bae, T. Hasegawa, K. Sakurai, S. Shinkai: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5875 (2005)
-