

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・報告  
ラマン分光法による診断法の開発  
糖質化学的手法を活用するラマン分光法による診断法の開発  
小林 厚志(日大工・生命)

緒言

生物は時間の経過とともに老化する。これは、生物は誕生してから分子レベルでの不可逆的な変化を重ねていくためである。その分子レベルでの変化が視認可能、または、生化学検査などにより顕在化する前に、個体毎にその老化のレベルを知ることは健康寿命を延ばす上で必要なことである。分子レベルでの変化の観察は、個体への影響を考えると非破壊的な方法であることが望ましい。そこで本研究では、非破壊的な手段で分子の変化を追跡可能なラマン分光法に焦点を当て、生体内分子の変化を観察する方法の開発を目指した。そのモデル系として細胞外に豊富に存在する糖質を採用し、①多糖類である澱粉の状態変化の観察(ラマン分光法による多糖類の構造解析)および②糖脂質の酵素合成に適した酵素のハイスループットな検出法(酵素反応産物の効率的検出法/新規酵素探索のための酵素活性測定法の開発)について検討したので報告する。

1. ラマン分光法による多糖類の構造解析

当グループではこれまでに、澱粉のゲル化に対するオキソ酸イオンの影響について検討してきた。特に影響の大きかったホウ酸イオン(ホウ酸イオン源として四ホウ酸ナトリウムを用いた)の影響について詳細に検討したところ、添加効果が澱粉の構成成分によって異なることが分かった。直鎖状のアミロースを主成分とする可溶性澱粉ではゲル形成能の低下が、分岐構造を有するアミロペクチンを主成分とする天然型澱粉ではゲル形成能の向上が見られた(Figure 1)。さらにこれら澱粉ゲルの保水能に対するホウ酸イオンの添加効果を調べるために、加温条件下(100℃)での重量

減少を測定したところ、可溶性澱粉ではその影響が見られなかったが、トウモロコシ澱粉では重量減少速度が小さくなった(Figure 2)。以上のことにより、澱粉の種類によりホウ酸イオンの存在形態が異なることを予想した。

最近、これらゲル中におけるホウ酸イオンの存在形態を調べるために、ラマン分光法による解析を始めた。ホウ酸イオンは中性付近では三配位が優勢であり、高塩基性条件下では四配位のホウ酸イオンになる(Figure 3)。

まず、0.10 M ホウ砂水溶液のラマンスペクトルを測定した。870-880  $\text{cm}^{-1}$  が三配位ホウ酸で、740-750  $\text{cm}^{-1}$  が四配位ホウ酸イオンである(Figure 4)。Figure 5 に 10 wt%の澱粉-ホウ砂溶液混合物のラマンスペクトルを示す。ホウ砂水溶液の pH は 7(青), 9(赤), 10(緑), 11(紫)に調製したものをを用いた。パレイシヨ澱粉と可溶性澱粉を比較してみたが、スペクトルに大きな違いは見られなかった。今後は引き続き、様々な澱粉とホウ砂の混合物に対してラマンスペクトルを測定することにより、澱粉構造の微細な構造の変化を捉える事を目標とする。

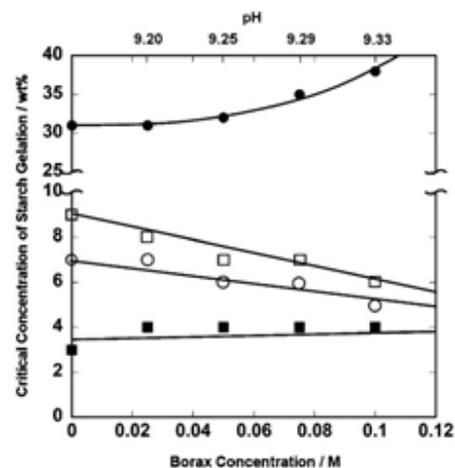


Figure 1 澱粉のゲル化に必要な最少濃度に対するホウ砂の添加効果

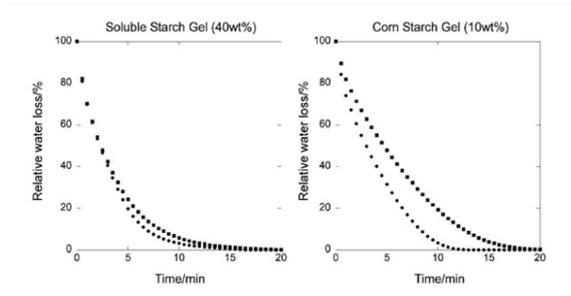


Figure 2 100 °Cにおける澱粉ゲルの水分量変化

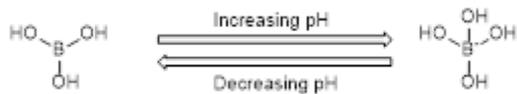


Figure 3 ホウ酸の水溶液中での平衡

## 2. 酵素反応産物の効率的検出法

生理活性を示す生体分子の一つに糖脂質がある。これまでに、糖脂質の合成研究は多くなされており、多種多様な糖脂質の合成が達成されている。糖脂質等が薬剤などに用いられる場合には、天然の構造体と同じものを用いるよりも部分的に構造を変えていることが多く、特に安定性向上のために、Figure 6 に示すような本来酸素原子が存在する部位を硫黄原子に置換したアナログ体を用いることがある。例えば酵素的に分解されるのを防ぐためである。

このような化合物は安定性に優れているために利用価値は高いが、定量を行うための紫外可視領域に吸収が見られないため、各種解析のための吸光光度計の活用は難しいとされてきた。最近、我々のグループでは、このようなチオグリコシドが UV 領域において吸収を示すことを明らかにした。この事実を活用して、HPLC においてチオグリコシドの選択的検出可能性について確認したところ、Figure 7 に示すような結果を得た。赤線で示すクロマトグラムは UV 検出によるものであり、チオグリコシドの吸収のみ確認され、黒線で示す

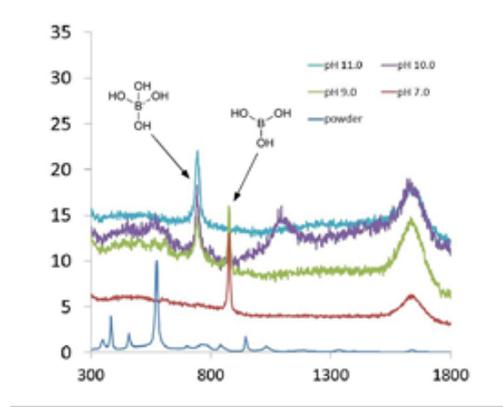


Figure 4 ホウ砂水溶液のラマンスペクトル

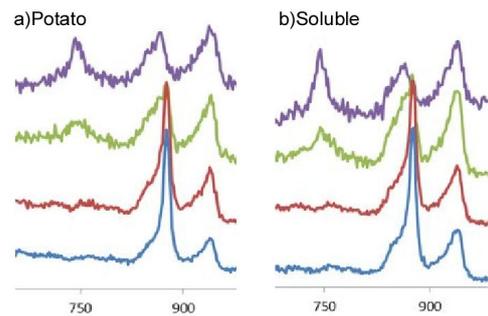


Figure 5 10wt%澱粉-ホウ砂溶液混合物のラマンスペクトル

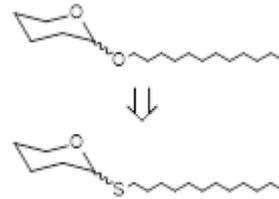


Figure 6 O-グリコシドとS-グリコシドの構造

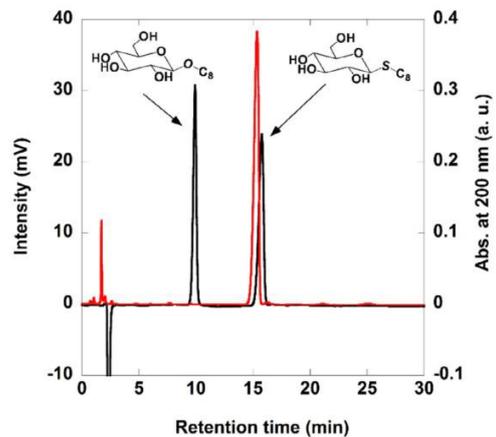


Figure 7 逆相 HPLC による O-グリコシドと S-グリコシドの分離と検出

クロマトグラフは RI 検出によるものであり、両グリコシドが検出された。現在、この現象の普遍性を検証するために、グルコース以外の糖のチオグリコシド体の UV 吸収について検証しているところである。

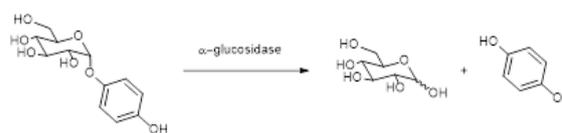


Figure 8  $\alpha$ -グルコシダーゼによるアルブチンの加水分解反応

### 3. 新規酵素探索のための酵素活性測定法の開発

糖鎖の化学合成においては、常に立体及び位置選択性の問題が生じる。従って、合理的な反応経路の選択は非常に重要である。その反応経路を合理化するために、しばしば酵素触媒の選抜の必要性が生じることがある。従って、酵素の性能評価をするアッセイ系の構築は重要である。我々のグループでは、合成が簡単で水溶性の高い人工基質であるアルブチン (Figure 8) に着目し、これを活用するアッセイ系の構築を計画した。遊離したヒドロキノンの還元力の測定法の活用が有力であるものの、同時に生成するグルコースの還元力も検出される。従って、ヒドロキノンのみ選択的に検出可能な方法を用いる必要がある。

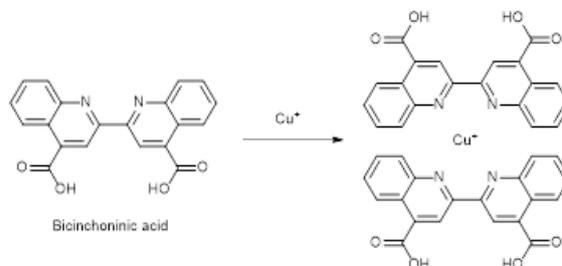


Figure 9 BCA 法の発色原理

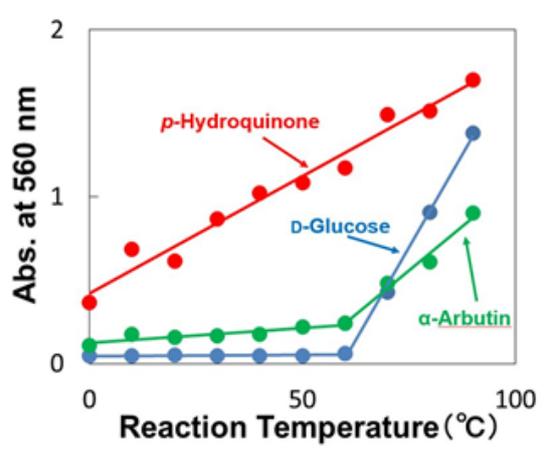


Figure 10 各種還元性物質の BCA 法による発色に対する反応温度の影響

まず、還元糖の代表的な検出法の一つである、BCA (ビスンコニン酸) 法 (Figure 9) を用いることとした。通常は反応温度 90 °C で行うが、より低い温度にすることによりグルコースとヒドロキノンの還元力に差が生じると仮定して温度の効果の検証を行った。

Figure 10 に還元性物質による BCA 試薬の発色に対する温度の影響に関するグラフを示す。グルコースにおいては、約 60 °C を境目として、それより低い温度ではほとんど発色を示さなかった。一方、*p*-hydroquinone においては、発色の度合いは温度の影響を受けるものの、0 °C 付近においても発色を確認することができた。 $\alpha$ -アルブチンは 90 °C を境目として発色の度合いは低下したものの、若干の発色を示した。従って、温度を下げるだけでは基質による還元力の影響を受けるため、他の要因

を変更することにより発色の選択性を向上させる必要がある。

### 平成 29 年度の活動

#### 投稿論文

- (1) UV Absorption of *n*-Alkyl 1-thio- $\beta$ -D-glucopyranosides and its Utilization in Chromatographic Separation, Hiroshi Ito, Fabio Pichierri, Atsushi Kobayashi, *Tetrahedron Letters*, **58**, 3678-3680 (2017)

#### 学会発表

日本農芸化学会 2018 年度大会 3 月 15 日-18 日 名城大

- (1) ホウ砂含有澱粉ゲルの乾燥耐性、上沢七海, 星野優人, 伊藤博, 小林厚志
- (2) アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性におけるアルキル鎖長とグリコン部位の影響、伊藤博<sup>1</sup>, 小林厚志<sup>1</sup>, PICHIERRI Fabio<sup>2</sup> (<sup>1</sup>日大工, <sup>2</sup>東北大院工)

**第8回福島地区 CE セミナー 12月16日 日本大学工学部**

- (3) アルキル-β-D-チオグリコシドの単分散ポリマー粒子表面へのワンポット固定化、磯井友真<sup>1</sup>, 荒川史弥<sup>1</sup>, 尾形慎<sup>1</sup>, 車田研一<sup>1</sup>, 伊藤博<sup>2</sup>, 小林厚志<sup>2</sup>, 山内紀子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>福島高専, <sup>2</sup>日大工)

**第60回日本大学工学部学術講演会 12月9日 日本大学工学部**

- (4) チオグリコシドの UV 吸収特性を活かした酵素的配糖化産物の効率的な分析手法、伊藤博, 小林厚志
- (5) アルブチンを基質とする酵素活性測定法の開発、鈴木大樹, 伊藤博, 小林厚志
- (6) ホウ酸含有澱粉ゲルの保水能に対する pH の影響、星野優人, 伊藤博, 小林厚志
- (7) 双頭型ピリジニウム塩を用いるアルギン酸のゲル化、上沢七海, 伊藤博, 小林厚志

**2017 高分子学会東北支部研究発表会 11月9日-10日 山形大学米沢キャンパス**

- (8) 還元糖定量法を用いる糖加水分解酵素の簡便な活性測定法の開発、鈴木大樹, 伊藤博, 小林厚志
- (9) 双頭型ピリジニウム塩のアルギン酸ゲルの架橋剤としての評価、上沢七海, 伊藤博, 小林厚志

**第60回高分子討論会 9月20日-22日 愛媛大学**

- (10) Effect of oxoacids on the water-holding ability of starch gels、星野優人, 伊藤博, 小林厚志

**平成29年度化学系学協会東北大会 9月16日-17日 岩手大学理工学部**

- (11) Rational design of reaction condition for the formation of glycosidic linkage catalyzed by glycosyl hydrolase: A case of α-amylase、小林厚志 (依頼講演)

- (12) Optimization of α-amylase-catalyzed maltooligosyl transfer reaction to various *n*-alkyl β-thio-glucosides、伊藤博, 小林厚志

- (13) A novel method for the detection of activity of glycosyl hydrolases by using synthetic glycosides having reducing activity、鈴木大樹, 伊藤博, 小林厚志

- (14) Evaluation of water-holding ability to starch gels containing oxoacid、星野優人, 伊藤博, 小林厚志

- (15) Complex formation between sodium alginate and *n*-Alkanediyl α,ω-bis(*N*-pyridinium bromide)、上沢七海, 伊藤博, 小林厚志

**2017 年度日本応用糖質科学会大会 9月6日-8日 日本大学湘南キャンパス**

- (16) チオグリコシドを糖受容体とする α-アミラーゼによる効率的グリコシル化のための反応評価、伊藤博, 小林厚志

- (17) オキソ酸イオン添加澱粉ゲルの特性解析 星野優人, 伊藤博, 小林厚志

**2017 年度日本応用糖質科学会東北支部講演会 7月15日 東北大学青葉山キャンパス**

- (18) アルキルチオグリコシドを糖受容体とする酵素的配糖化反応の最適化、伊藤博, 小林厚志

- (19) 還元糖の定量法に対するフェノール誘導体の影響、鈴木大樹, 伊藤博, 小林厚志

- (20) オキソ酸イオン添加による澱粉ゲルの物理特性への影響、星野優人, 伊藤博, 小林厚志

- (21) 酸性多糖における双頭型ピリジニウム塩の架橋剤としての効果、上沢七海, 伊藤博, 小林厚志

**平成30年度  
投稿論文及び準備中論文**

- (1) 澱粉のゲルに対するホウ砂の添加効果およびゲルの乾燥耐性評価、小林厚志、星野優人、上沢七海、伊藤博、高分子論文集, **75**, 99-102 (2018)
- (2) Kinetic Analysis of Drying Process of Gelatinized Starch to Investigate the Effect of Boric Acid. Atsushi Kobayashi, Nanami Kamizawa, Yuto Hoshino, Hiroshi Itoh, and Yasushi Numata, *ECS Transactions, in press*
- (3) Effect of pH on the drying process of the gelatinized starch containing boric acid at 100 °C. Atsushi Kobayashi, Nanami Kamizawa, Yuto Hoshino, Hiroshi Itoh, and Yasushi Numata, *Journal of the Electrochemical Society, manuscript in preparation*
- (4) Effect of the structure of alkylthioglycosides on UV absorption property and elucidation of the UV absorption mechanism. Hiroshi Ito, Fabio Pichierri, Atsushi Kobayashi, *Tetrahedron Letters, manuscript in preparation*

#### 学会発表

2018 高分子学会東北支部研究発表会 11月15日-16日 岩手大学理工学部

- (1)  $\alpha$ 化澱粉の挙動解析, 上沢七海, 長崎 茜・松葉 豪・伊藤 博・沼田 靖・小林 厚志  
第 67 回高分子討論会 9月12日-14日 北海道大学 札幌キャンパス
- (2) ホウ砂含有澱粉ゲルの乾燥耐性, 小林厚志, 上沢七海, 星野優人, 伊藤博, 沼田靖  
日本応用糖質科学会平成 30 年度大会(第 67 回)  
9月10日-12日 秋田県立大学生物資源学部
- (3) アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性におけるアルキル鎖長とグリコン部位の影響, 伊藤博<sup>1</sup>, 小林厚志<sup>1</sup>, PICHIERRI Fabio<sup>2</sup> (1 日大工, 2 東北大院工)
- (4) ホウ砂含有澱粉ゲルの乾燥耐性, 上沢七海, 星野優人, 伊藤博, 小林厚志

First International Conference on 4D Materials and Systems 8月26日-30日 山形大学工学部

- (5) Effect of Starch on the Equilibrium of Boric Acid, Atsushi Kobayashi, Nanami Kamizawa, Yuto Hoshino, Hiroshi Itoh, and Yasushi Numata

平成 30 年度第 10 回日本応用糖質科学会東北支部講演会 7月7日 山形大学工学部

- (6) ホウ砂含有澱粉ゲルの乾燥耐性, 上沢七海, 星野優人, 伊藤博, 小林厚志  
第 46 回東北地区高分子若手研究会夏季ゼミナール 7月6日-7日 山形市黒沢温泉「悠湯の郷 ゆさ」
- (7) ホウ酸を活用する澱粉の状態変化解析, 小林厚志 (招待講演)