

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻
平成 21 年度 博士課程進学
氏 名 田村 直之
指導教員名 磯貝 明

論文題目 (1→3)-β-グルカンの TEMPO 触媒酸化に関する研究

(1→3)-β-グルカンは天然に広く存在し、抗ガン作用や抗ウイルス作用といった生理活性や、三重らせん構造という特徴的な構造を持つ多糖として知られている。直鎖状(1→3)-β-グルカンとしてカードランやパラミロンが挙げられるが、水不溶性のため化学改質により水溶性を付与することが必要となる。そこで、多糖の化学改質法として 2,2,6,6 テトラメチルピペリジン-1-オキシラジカル(TEMPO)を触媒量用いた 1 級水酸基の酸化法に着目した。TEMPO 触媒酸化の特徴としては、水系かつ温和な反応条件で 1 級水酸基をアルデヒド基を経て、最終的にカルボキシル基へと選択的に酸化可能な点である。この反応を多糖類に適用すると、多糖の 1 級水酸基である C6 位の水酸基のみが選択的に酸化されることが報告されている。

一方、これまでの TEMPO 触媒酸化は得られる反応生成物が著しく低分子化してしまうことが課題として報告されている。これは、弱アルカリ条件において反応が進むため、再生セルロースやデンプン等の多糖類に適用した場合には、反応中間体として生成するアルデヒド基によるβ脱離反応などの副反応によって、グリコシド結合の開裂が起こるためと考えられている。これまでも、低分子化を抑えるために様々な反応条件が検討されてきたが、いずれも低分子化の抑制には成功していない。このことから、反応条件である弱アルカリ条件が低分子化の主原因であると考えた。

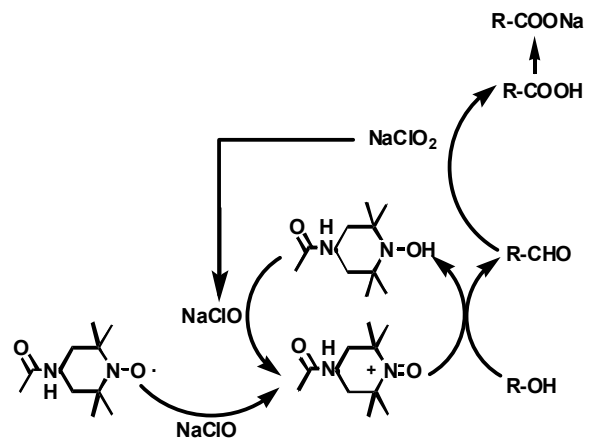


図1. 弱酸性下でのTEMPO酸化の反応モデル

そこで本研究では、近年有機溶剤系で報告された弱酸性下での TEMPO 触媒酸化反応を水系で適用した（図 1）。反応条件を中性から弱酸性とすることで、弱アルカリ条件による副反応が抑制されることが期待される。これまで TEMPO を用いた多糖類の酸化において、分子量が 100000 を超えるような高分子量のポリグルクロン酸を調製した報告例はない。本研究において、弱酸性下での TEMPO 触媒酸化を完全水系で(1→3)-β-グルカンに適用し、得られた生成物の分析を行うことにより、反応条件と生成物の分子量や化学構造との関連について、従来の弱アルカリ下での反応と比較検討を行った。

弱アルカリ性条件における(1→3)-β-グルカンのTEMPO触媒酸化

水不溶性のパラミロン及びカードランから、TEMPO/NaBr/NaClO システムによって水系、pH 10 の条件で水溶性の生成物を得ることができた。主酸化剤である次亜塩素酸ナトリウム 15 mmol/g の添加条件で、ほぼすべての C6 位の 1 級水酸基が酸化され、カルボキシル基へと酸化された（図 2）。このように、β-1,3 結合のほぼ均一な構造を持つポリグルクロン酸ナトリウム塩が、TEMPO 触媒酸化により化学量論的に調製することができた。一方、反応中にβ-1,3 グリコシド結合の開裂によって、著しい低分子化が起こり、元のパラミロン及びカードランが 1670、6790 であったのに対し、得られた水溶性生成物の重合度はパラミロン及びカードランでそれぞれ、68、86 となってしまった。

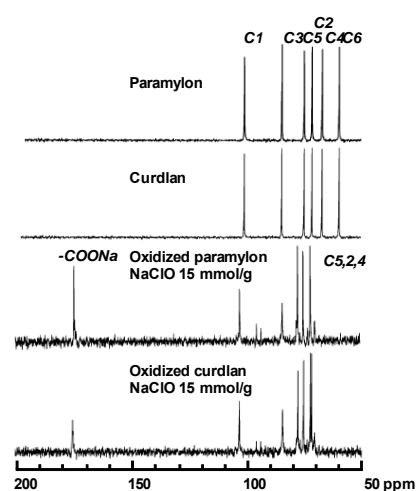


図 2. 元のパラミロン及びカードラン (DMSO- d_6)、TEMPO触媒酸化パラミロン及びカードランの ^{13}C -NMRスペクトル

弱酸性TEMPO触媒酸化を用いた高分子量ポリグルクロン酸調製の検討

弱酸性 TEMPO 触媒酸化 (4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂; pH 4.7; 35 °C; 24 時間) によって、低分子化を抑制しつつ、C6-OH が選択的にカルボキシル基へと酸化されたカードランを調製することができた。反応時間を 4 - 24 時間とすることで、酸化カードランのカルボキシル基量を 2.27 - 4.85 mmol/g (C6-OH の酸化度; 40 - 95%) と制御することができた。また、カードランの場合ではカルボキシル基量が 2 mmol/g を超えると、水可溶化することが分かった。酸化中の低分子化を完全に抑制することはできなかったが、C6-OH の酸化度 95%、重合度 1000 を超える酸化カードランを調製することができた（表 2）。各種デンプンやアミロース、プルランに適用した場合は、導入されたカルボキシル基量は同じ反応条件でもカードランと比べて少なかった。このことから、(1→4)-α-グルカンの C6-OH は(1→3)-β-グルカンと比べ、酸化を受けにくく、また、α-1,6 結合近傍の C6-OH もまた、TEMPO により酸化されにくいことが明らかになった（表 1）。

表1. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 35℃, 24時間) を用いて調製したTEMPO触媒酸化カードラン、各種スターチ、アミロース及びプルランのカルボキシル基量及び収率

	Carboxylate content (mmol/g)	Oxidation ratio of C6-OH (%)	Yield (%)
Oxidized curdlan	4.85	95.0	90
Oxidized starch from			
Potato	2.23	>39.3	83
Corn	1.64	>28.2	85
Wheat	1.34	>22.8	84
Oxidized amylose	2.74	49.2	96
Oxidized pullulan	0.32	8.0	90

表2. 元のカードラン、TEMPO/NaBr/NaClOシステム (pH 10) 及び4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 35℃, 24時間) を用いて調製したTEMPO触媒酸化カードランの重量平均及び数平均分子量 (M_w, M_n) 及び重合度 (DP_w, DP_n)

Sample	Reaction time (h)	Oxidation ratio of C6-OH (%)	M _w (DP _w)	M _n (DP _n)	M _w /M _n
Original curdlan	-	-	1,100,000 (6790)	890,000 (5490)	1.24
Oxidized curdlan prepared by					
TEMPO/NaBr/NaClO at 25°C and pH 10	0.8	100	17,000 (86)	13,500 (68)	1.26
4-AcNH-TEMPO/NaClO/NaClO ₂ at 35°C and pH 4.7	24	95	197,000 (1020)	130,000 (670)	1.52

カーデュロン酸水溶液の粘弾性特性に関する検討

弱酸性 TEMPO 触媒酸化によりカードランから得られた高重合度のポリグルクロン酸(カーデュロン酸)の溶液物性を調べるため、カーデュロン酸水溶液の粘弾性測定を行った。濃度依存性を調べたところ、濃度が増加するにつれ粘度増加が見られたが、濃度 20wt%においても、ゲル化せずに溶解状態を保っていたことが分かった。また、濃度の増加に伴い降伏応力が増加していることから、濃度増加に伴う粘度上昇は分子鎖の絡み合いによるものであることが分かった(図3)。貯蔵弾性率の周波数依存性から、低周波数領域に平坦部が見られ、絡み合い点間重合度を算出したところ、試料の重合度よりも遥かに大きな値であったことから、カーデュロン酸分子は、水中において比較的大きな分子会合体を形成していることが示された。

カーデュロン酸と化学構造の似た物質であるアルギン酸ナトリウムやCMCと比較すると、同濃度においてカーデュロン酸水溶液は1ケタ以上、低粘度であることが分かった(図3)。測定に供した試料の重合度は、カーデュロン酸が最も大きいことから、水溶液中での溶解状態がアルギン酸ナトリウムやCMCとは異なることが明らかになった。

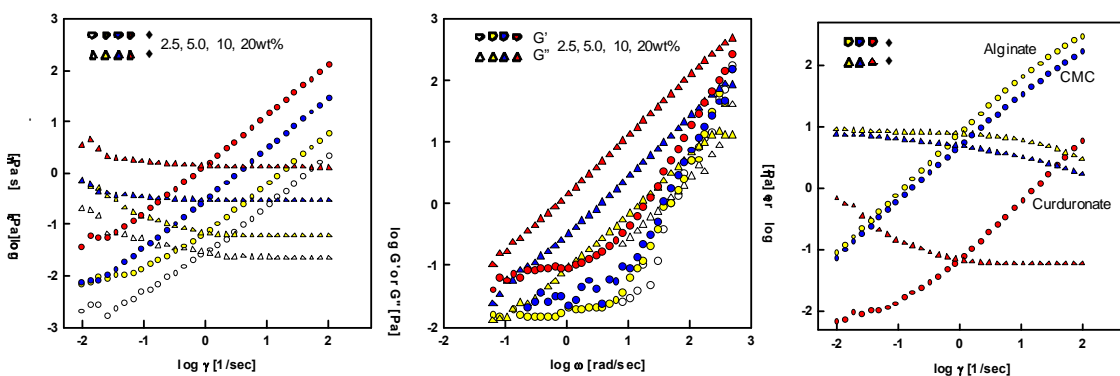


図3. 2.5-20wt%カーデュロン酸水溶液の◆及び◇のせん断速度依存性(左)、及びG', G''の周波数依存性(中央)、5.0wt%におけるカーデュロン酸、アルギン酸ナトリウム、CMC水溶液の◆及び◇のせん断速度依存性(右)

20wt%カーデュロン酸水溶液に各種金属塩化物水溶液を添加すると、アルカリ土類金属塩の添加によってゲルが形成された。塩化カルシウム水溶液の添加についてより詳細に検討を行ったところ、カルボキシル基量に対して、モル等量で1/50程度のカルシウム塩を添加

することでゲル化することが分かった。以上から、カーデュロン酸水溶液は高濃度においても低粘度であり、希薄な金属イオン添加によってゲル化することから、ドラッグデリバリー等で用いられる新規内包剤としての応用が期待される。

弱酸性TEMPO触媒酸化を用いたパラミロンナノフィブリルの調製

パラミロンに弱酸性 TEMPO 触媒酸化を適用すると、低結晶性のカードランと異なり、完全には水可溶化せず、168 時間後においても水不溶性分が約 20%存在した。X 線回折から、水不溶性分は各結晶面のピークが低角側へシフトしていることから、カルボキシル基の導入により、面間隔が増加していることが分かった(図 8)。TEMPO 触媒酸化後では結晶サイズの減少が見られたものの、元のパラミロンと似た X 線回折パターンが得られたことから、三重らせん構造は維持されていた。

パラミロンに弱酸性 TEMPO 触媒酸化を適用し、超音波による微細化処理を行うことにより TEMPO 触媒酸化パラミロンナノフィブリル (TOPN) を調製することができた。TOPN の形状観察を透過型電子顕微鏡 (TEM) 及び原子間力顕微鏡を用いて行ったところ、長さ 380 nm、幅 1.98 nm であった。X 線回折により明らかになっている三重らせん構造の直径 1.556 nm と、重合度より算出した三重らせん構造の長軸方向の長さ 560 nm を併せて考えると、調製した TOPN は長軸方向にグリコシド結合の開裂が見られるものの、三重らせん構造を維持していることが予想される。

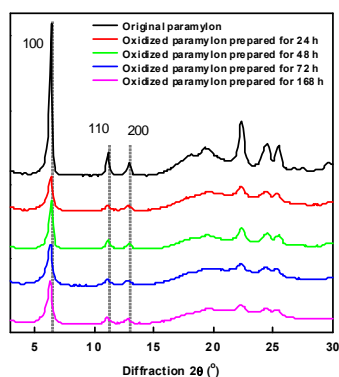


図8. 元のパラミロン及び、4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 35°C, 24-168 h)システムを用いて調製したTEMPO触媒酸化パラミロンの水不溶性分のX線回折パターン

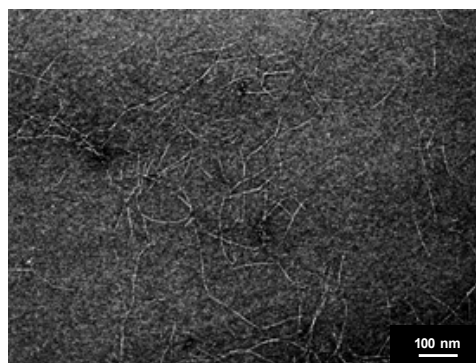


図9. 0.01%TOPN水分散液のTEM観察像