

糖や細菌を目視で見分ける 超分子複合体

上智大学 理工学部 物質生命理工学科
教授 橋本 剛

2023年8月29日



本技術に関する知的財産権

1. キラル糖分子のキラル認識方法および複合体

出願番号: 特願2022-129691

出願人: 学校法人上智学院

発明者: 鈴木 陽太、早下 隆士、橋本 剛

2. ナノ構造体、細菌凝集剤、細菌検出剤、グラム陰性菌検出剤、細菌検出キット、グラム陰性菌検出キット、細菌を凝集する方法、細菌検出方法、グラム陰性菌検出方法、ナノ前駆構造体、及びナノ構造体の製造方法

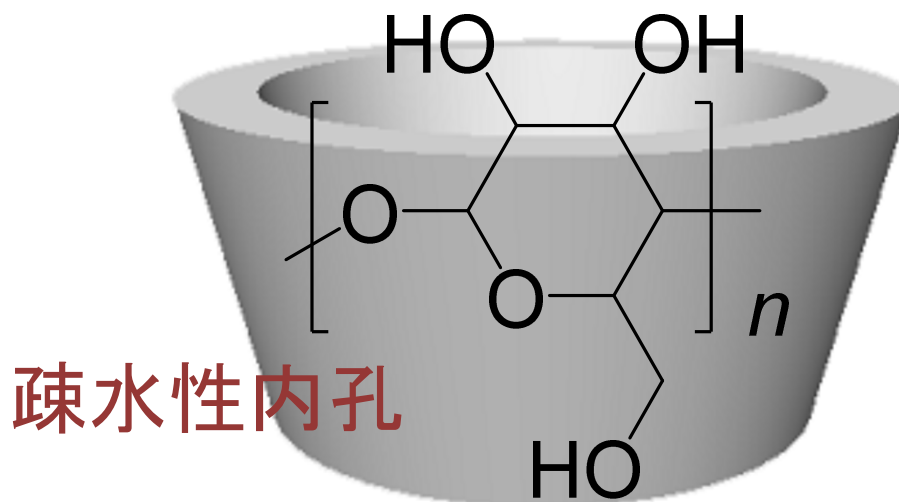
出願番号: 特願2022-131134

出願人: 学校法人上智学院

発明者: 早下 隆士、橋本 剛、提箸 弘大

シクロデキストリンの構造

親水性外孔



$$\alpha : n = 6$$

$$\beta : n = 7$$

$$\gamma : n = 8$$

疎水性内孔

※シクロデキストリン：外側が親水性，内側が疎水性の環状化合物。
疎水性化合物を内包し，水に可溶化する。

1. キラル糖分子のキラル認識方法および複合体

出願番号：特願2022-129691

出願人：学校法人上智学院

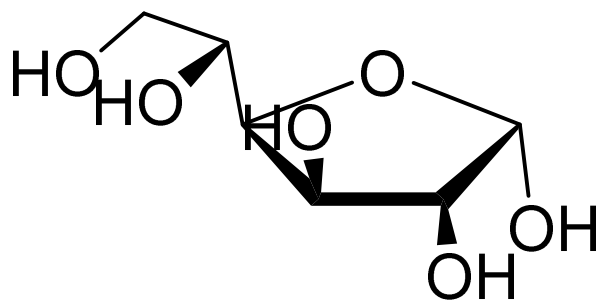
発明者：鈴木 陽太*，早下 隆士，橋本 剛

* 現 埼玉大学工学部 助教

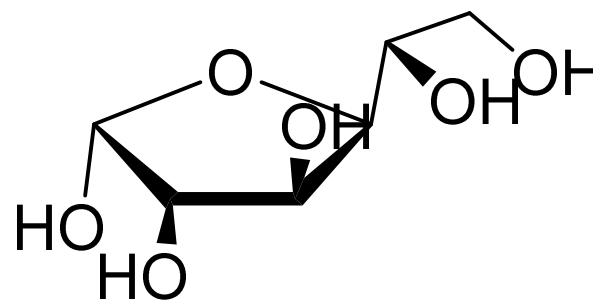
発明の背景と概要：キラル化合物

- 多くの有機化合物は互いに対となる鏡像異性体を持つ
 - ほとんどの性質が完全に一致するため，識別や分離が困難である（特殊なHPLCやGCなどの大型装置が必要）。
 - 生理活性が大きく異なる。例) サリドマイド薬害

グルコース（ブドウ糖）の例



D-グルコース
天然に多く存在



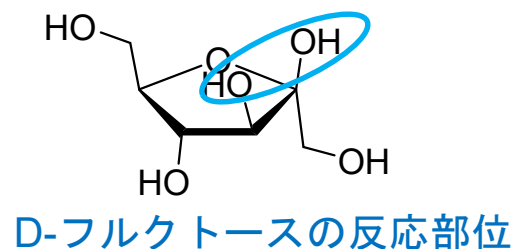
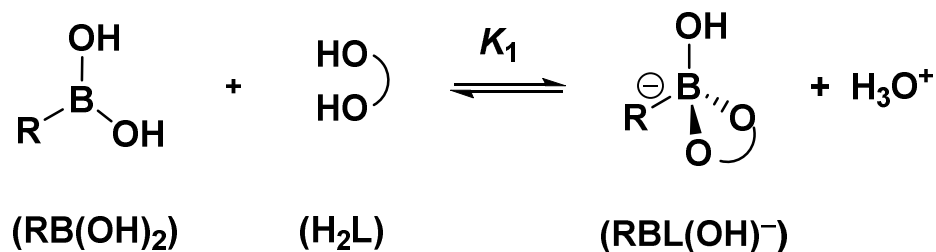
L-グルコース

- 鏡像異性体の識別は，製薬・生物学など分野からの関心度が非常に高い^[1]。

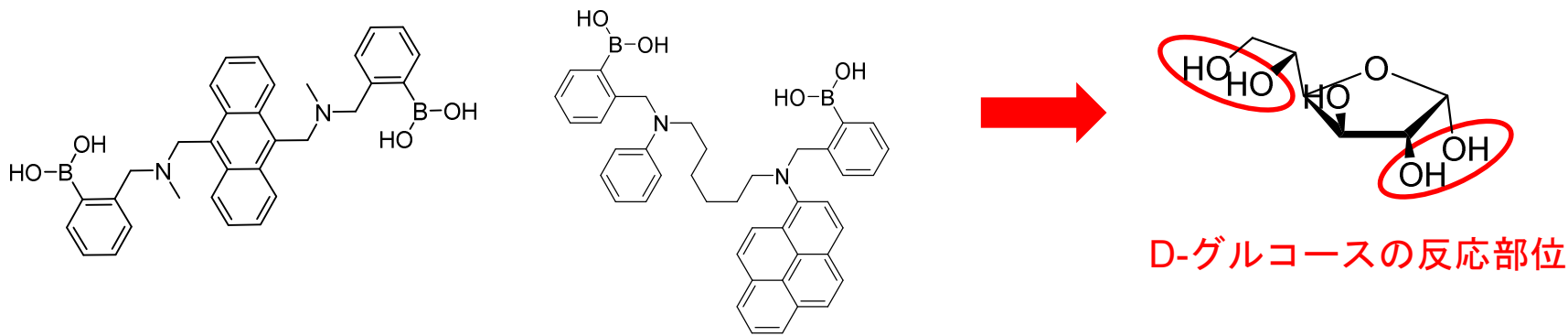
[1] X. Zhang et al., *Chem. Rev.*, 2014, 114, 4918.

ボロン酸型化学センサー

- ボロン酸は糖類と水溶液中で反応する.



- ボロン酸部位を2つもつジボロン酸化合物は、グルコースと選択的に反応する^[2].

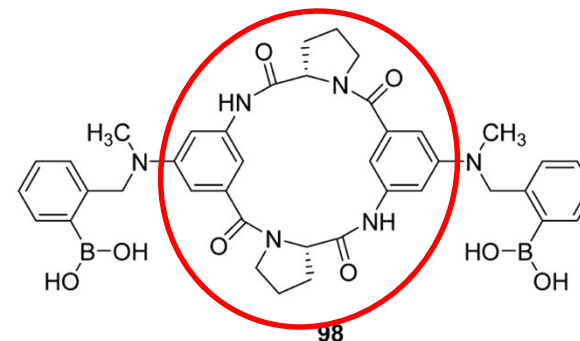
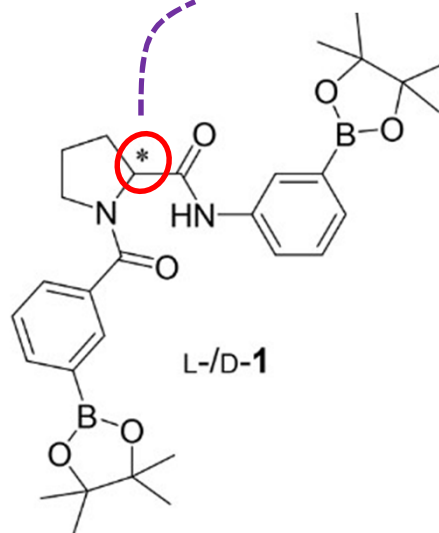
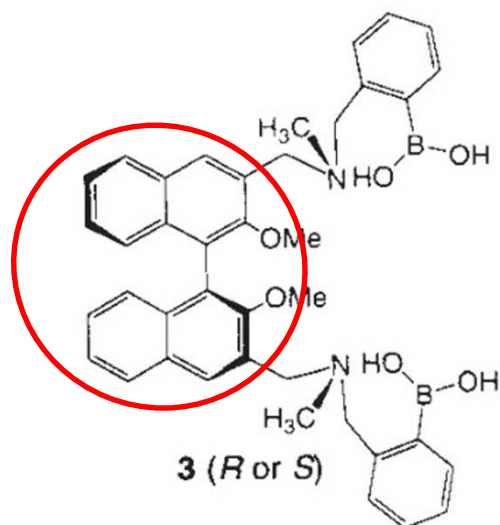


[2] X. Sun and T. D. James, *Chem. Rev.*, **2015**, 8001.

従来技術の概要・問題点

- 不斉炭素原子や疎水性発色団を適切に導入する必要
→ 合成の難度が非常に高く、水溶性が低い

※不斉炭素原子：反応によっては立体が反転する



[3] T. D. James *et al*, *Nature*. **1995**, 374, 345.

[4] L. Guo *et al*, *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 15128.

[5] G. Heinrichs *et al*, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4177.

- ・ 低水溶性
(MeOH/Water, 1/3, pH 7.77)
- ・ 合成のための出発原料の入手が困難

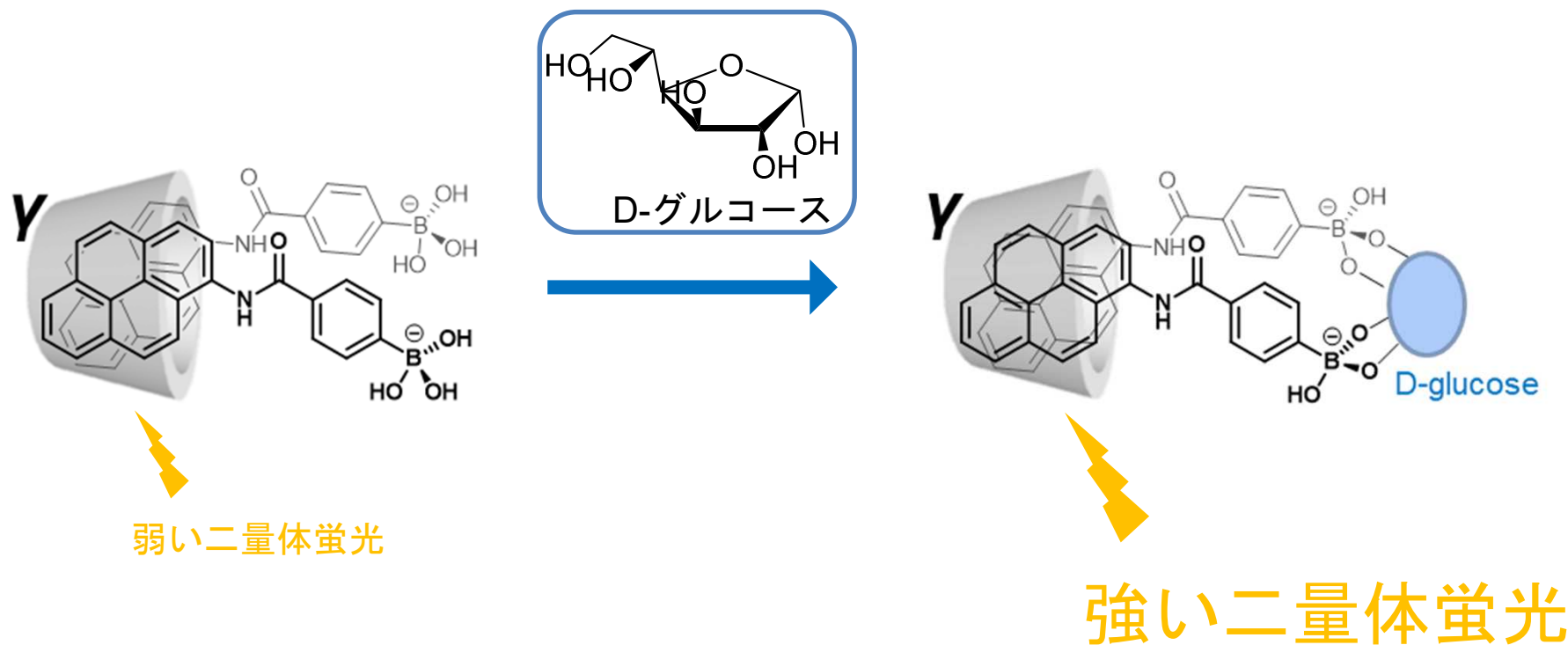
- ・ 低水溶性
(MeOH/water, 1/1, pH 10)
- ・ 5段階の複雑な合成操作が必要
- ・ 光らない

- ・ 低水溶性
(MeOH/ water, 1:1, pH 11.7)
- ・ 7段階以上の複雑な合成操作が必要

構造は記載文献又は文献[2]から抜粋しました。

本発明(新技術)の概要

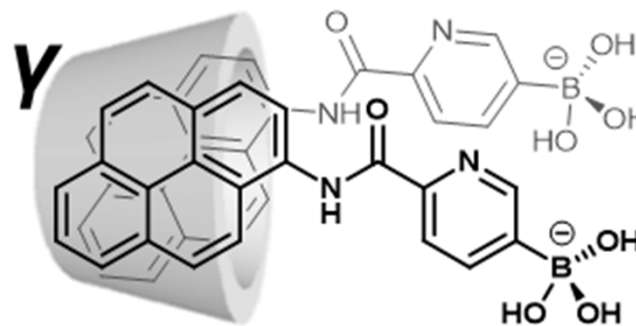
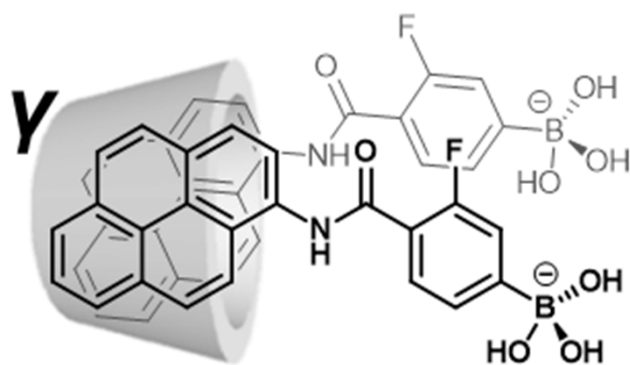
- シクロデキストリンに内包された二分子のボロン酸型ピレンプロローブがD-グルコースを認識し、分子振動が抑制されることで、強いピレン二量体蛍光を示す。 ※当研究室が過去に報告した^[6]。



[6] T. Hashimoto *et al.*, *Front. Chem. Sci. Eng.*, 2020, 14, 53.

本発明(新技術)の概要

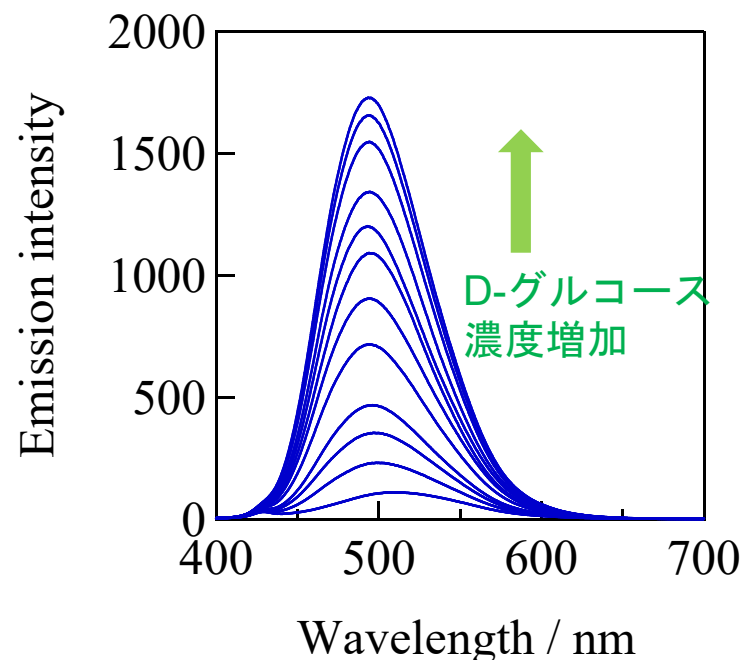
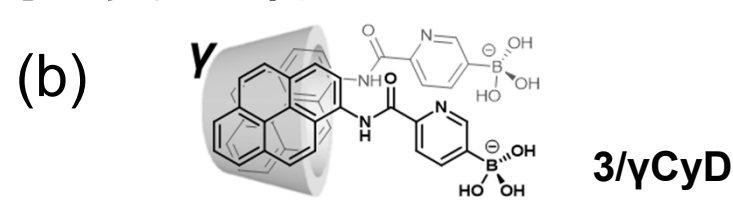
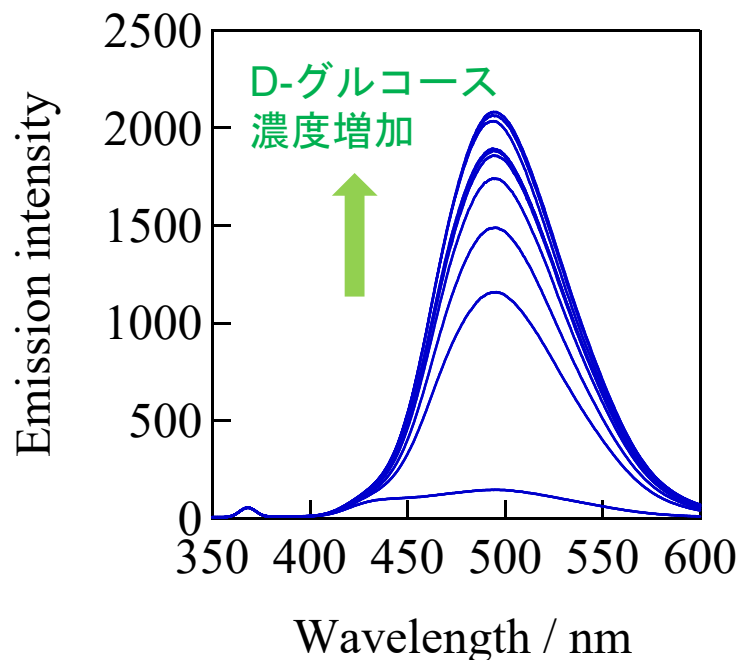
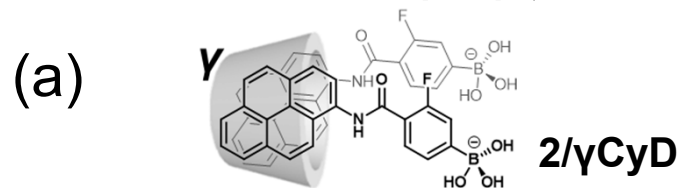
- キラルな空孔を持つシクロデキストリンに、単純な構造の蛍光性ボロン酸型プローブが包接された超分子複合体を用いることで、水中でのD-グルコースをキラル認識が可能になる。



- ・ 水に易溶
- ・ 合成が簡単 (加熱, カラム精製が不要)

糖添加による蛍光スペクトルの変化

- 2/ γ CyDと3/ γ CyDは、水を98%含むpH 7.4の溶媒中でD-グルコースを認識して蛍光強度の増大を示した^{[7][※6]}.



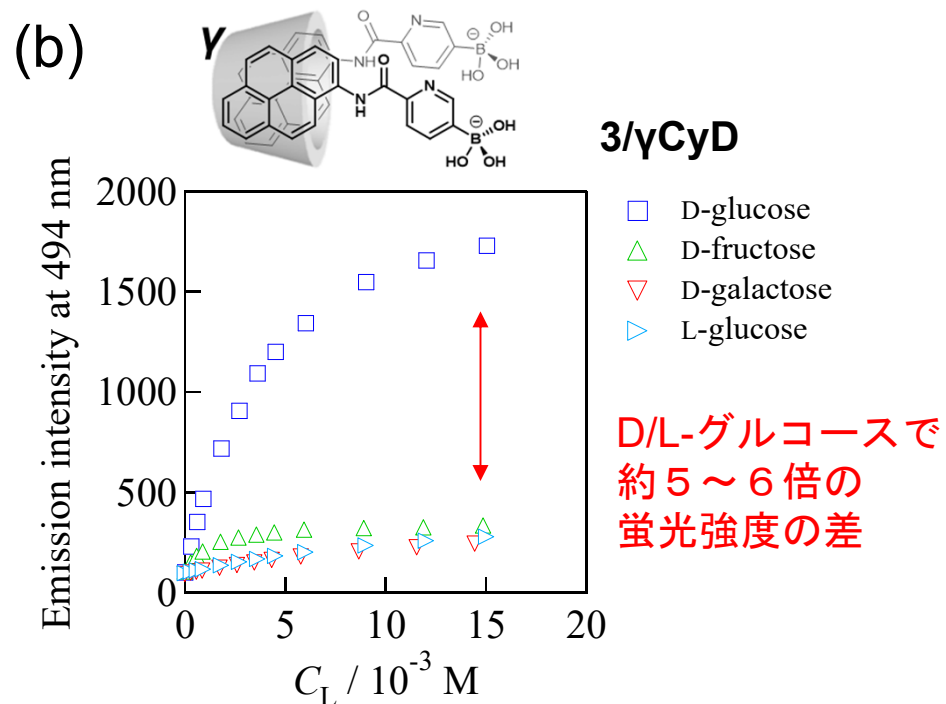
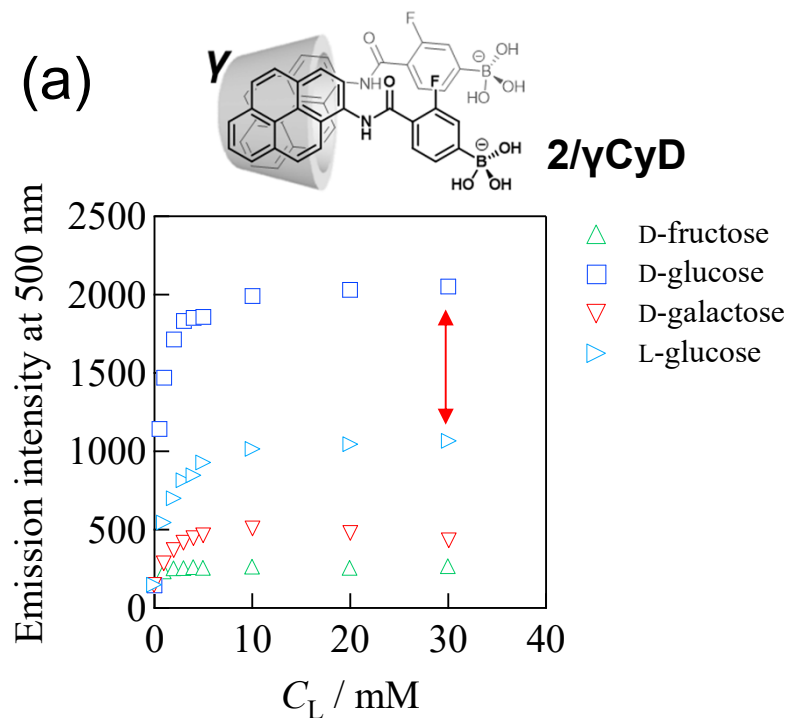
2種のプローブ/ γ -シクロデキストリン複合体における様々なグルコース濃度での蛍光強度変化^[7]

[7] Y. Suzuki *et al.*, *ACS Sens.*, **2023**, 8, 218-277.

※1/ γ CyDはpH 11.3で蛍光強度の増大を示した ([6] T. Hashimoto *et al.*, *Front. Chem. Sci. Eng.*, **2020**, 14, 53.) .

蛍光強度の糖濃度依存性

- 水を98%含むpH 7.4の溶媒中でD-グルコースの高いキラル識別能が確認された。 [7]
 - 特に3/ γ CyDはD/L-グルコース間で顕著な応答性の違いが見られた。



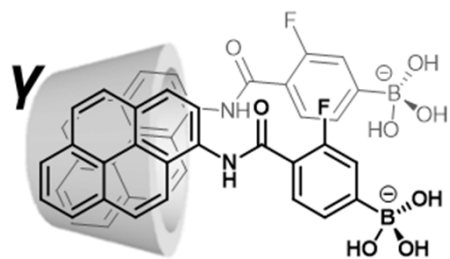
2種のプローブ/ γ -シクロデキストリン複合体における様々な糖濃度での蛍光強度変化^[7]

[7] Y. Suzuki *et al.*, *ACS Sens.*, **2023**, 8, 218-277.

単糖の選択性

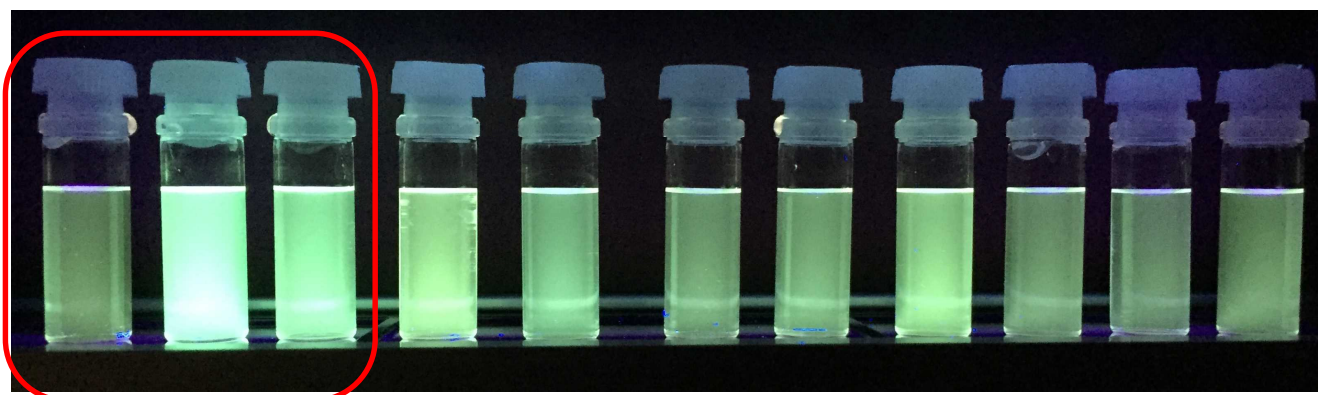
- D-グルコースの **目視による** 検出が可能

(a)

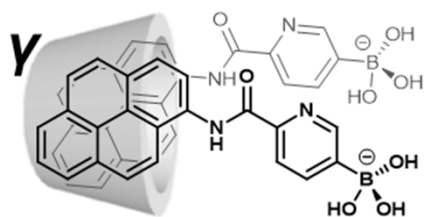


※DMSO/水混合溶媒
(2/98 in v/v) pH 7.4

+ D-glucose + D-fructose + D-mannose + D-ribose + D-maltose
糖添加前 + L-glucose + D-galactose + D-xylose + L-arabinose + Methyl β-D-glu.



(b)



+ D-glucose + D-fructose + D-mannose + D-ribose + D-maltose
糖添加前 + L-glucose + D-galactose + D-xylose + L-arabinose + Methyl β-D-glu.



2種のプローブ/γ-シクロデキストリン複合体における様々な糖溶液での蛍光発光の様子^[7]

[7] Y. Suzuki *et al.*, *ACS Sens.*, 2023, 8, 218-277.

発明(新技術)の特徴・従来との比較

- **単純な構造**のボロン酸型プローブとシクロデキストリンが形成するキラルな超分子複合体によって、**水中でのD-グルコースの高感度なキラル蛍光認識を可能にした点**.
 - 既報のキラル認識能を持つジボロン酸型化学センサーの多くは、構造内に疎水性の発色団を導入する必要があるため水溶性が低い.
 - 既報のアプローチでは、構造内に不斉炭素原子・2つのボロン酸部位・発色団を適切な位置に導入する必要があるため、化学センサーの合成の難度が非常に高い.
- 本発明の超分子複合体は、D/L-グルコースそれぞれの共存時の蛍光強度を比較したとき、**約5~6倍の強度の差**が生み出されるという大きな蛍光応答の違いを示した点.
 - 例えば、既報[5]の化学センサーでは2.5倍程度の応答性の差

想定される用途・課題①

- D-グルコースのキラル純度の簡易判定の為の分析試薬
 - ✓ 有機化合物の各鏡像異性体は、それぞれ大きく異なる生理活性を有することが多い。
 - ✓ 創薬や生理学の現場において、グルコースを原料や中間体とした薬剤・イメージングバイオマーカーを開発する際、グルコースの光学純度に注意することは重要である。
 - ユーザーとなる研究機関やメーカーにおいてどの程度のニーズがあるのかが不明である。
 - 市場規模が不明

想定される用途・課題②

• L-グルコースの精製システムの基盤となる高分子材料

- ✓ L-グルコースはD-グルコースよりもはるかに高価である。
(D-グルコース: 72円/1 g, L-グルコース: 10,400円/1 g)※
- ✓ L-グルコースはD-グルコースと同程度の甘味を持つ一方で、体内で代謝されないため、低カロリーの甘味材料として注目されている^[8].
- ✓ 捕集システムの開発により、L-グルコースの低価格化が期待できる。
- 本発明をベースとした、更なる別の発明が必要



2. ナノ構造体、細菌凝集剤、細菌検出剤、グラム陰性菌検出剤、細菌検出キット、グラム陰性菌検出キット、細菌を凝集する方法、細菌検出方法、グラム陰性菌検出方法、ナノ前駆構造体、及びナノ構造体の製造方法

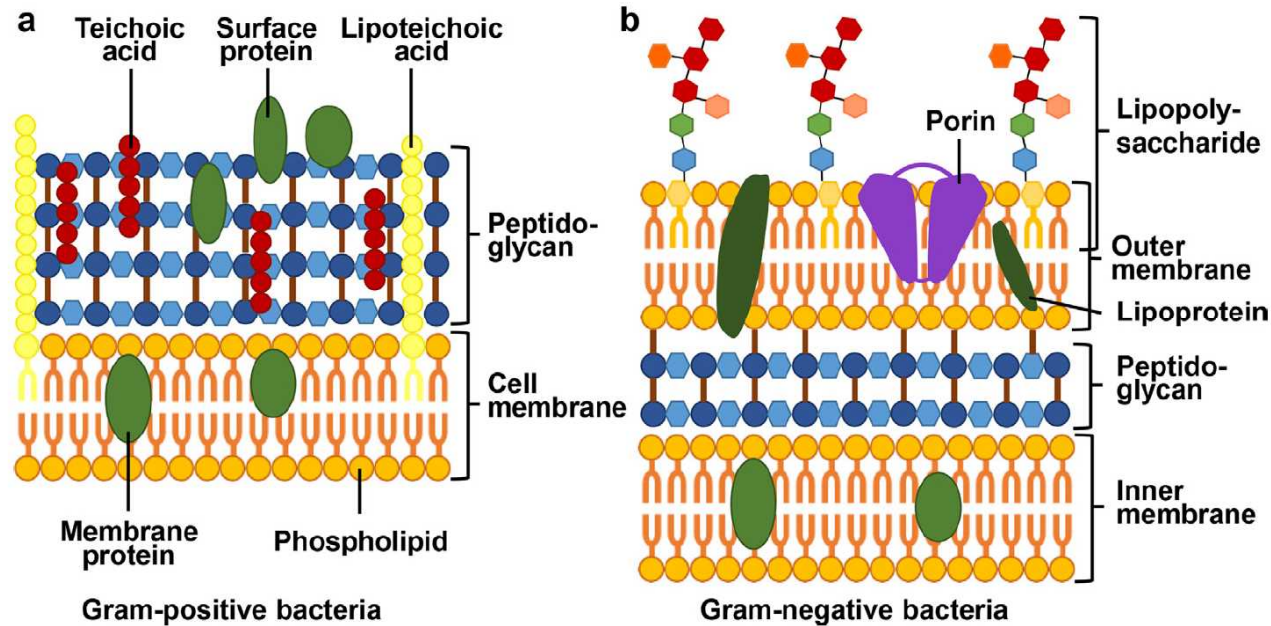
出願番号：特願2022-131134

出願人：学校法人上智学院

発明者：早下 隆士、橋本 剛、提箸 弘大

発明の背景と概要

細菌



Scheme of the cell wall structures of (a) Gram-positive bacteria and (b) Gram-negative bacteria.¹⁾

[9] X. Ye, T. Feng, L. Li, T. Wang, P. Li and W. Huang. *Acta Biomaterialia.*, **125**, 29-40 (2021).

- 細菌にはグラム染色法により、グラム陽性菌とグラム陰性菌に大別できる。^[9]
- 細菌に薬剤耐性を獲得させないために、薬効範囲を狭めた抗生剤等の使用が求められるため、迅速に菌種を識別する手法が求められている

※グラム染色法では、菌種のその場での識別を行う事が出来ない。

従来技術の概要・問題点

[10] 早下隆士他「構造体ならびにこれを用いた細菌の捕集および検出方法」, 特許第6252933号, (2017).

凝集形成

細菌 + PAMAM dendrimer + Phenylboronic acid → B-PAMAM

凝集形成

<S. aureus> <E. coli>

None PAMAM B-PAMAM None PAMAM B-PAMAM

グラム陽性菌の選択的な凝集形成^{[10],[11]}

[11] Y. Tsuchido, R. Horiuchi, T. Hashimoto, K. Ishihara, N. Kanzawa, T. Hayashita, *Anal. Chem.*, **91**(6), 3929-3935 (2019).

●凝集形成の評価

S. aureus or *E. coli*
(4.5×10^8 CFU/mL), 0.75 mL

probe (6.6×10^{-6} M or none), 0.75 mL

10 min mixing (2000 rpm)

10 min standing

Measurement

凝集による上澄み液の濁度 (OD_{600}) の減少を測定

問題点: グラム陰性菌 選択的な凝集は, 見出されていない

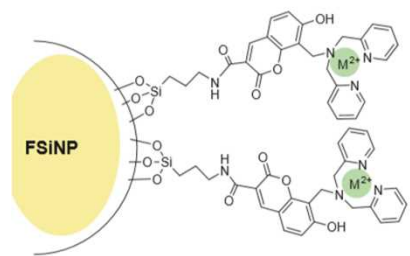
本発明(新技術)の概要

ジピコリルアミン金属錯体(M(II)-dpa)

- M(II)-dpa は、水中で細菌表面のリン酸基を認識できる.[12]



Image of M(II)-dpa.



M-dpa修飾シリカナノ粒子.



Confocal images of *S. aureus* (10^8 CFU cm^{-3}) treated with **M-dpa-HCC/FSiNP** (0.025 mg cm^{-3} , $M = \text{Cu}^{2+}$).⁴⁾

シクロデキストリン(CyD)ナノゲル

- CyDナノゲルは、5~20 nmサイズで、有機物に対し優れた包接機能を有するナノ構造体である.[13][14]

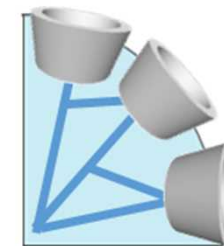
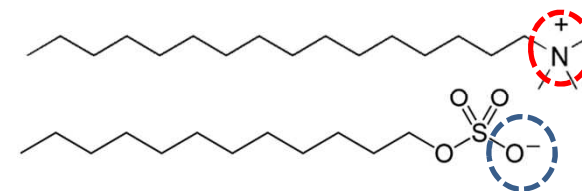


Image of CyD nanogels.

イオン性界面活性剤

- イオン性界面活性剤には、カチオン性とアニオン性があり、CyDナノゲルに包接されることで、界面の電荷を制御できる。



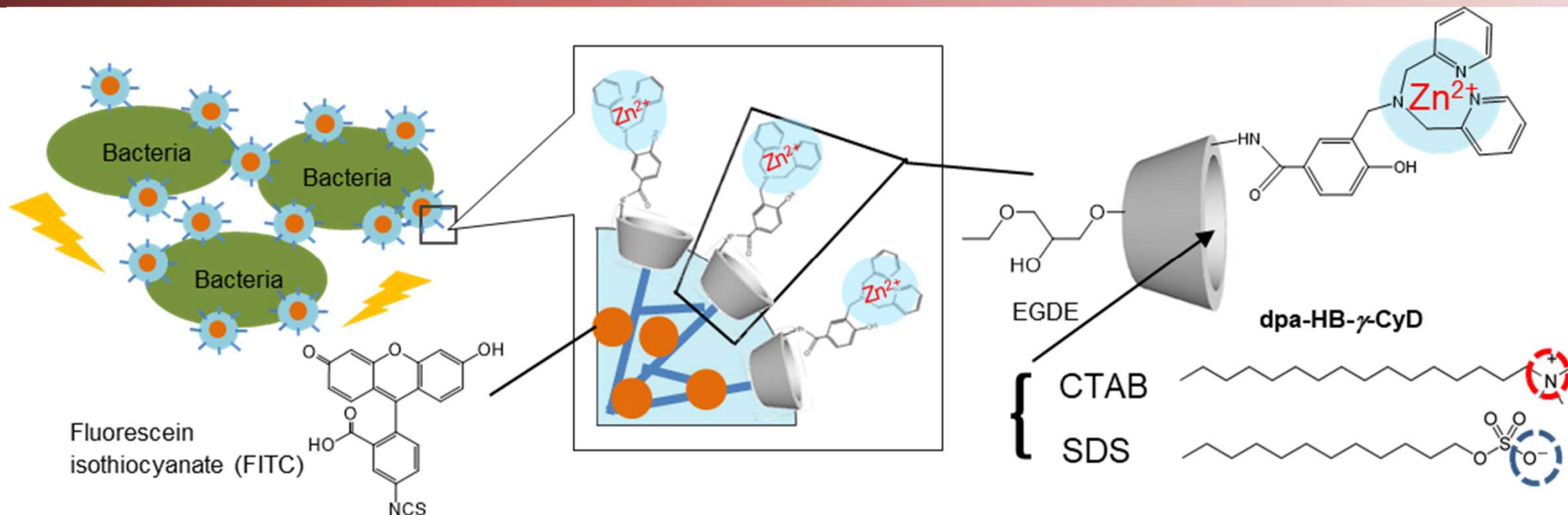
Structure of CTAB and SDS.

[12] Y. Kasai *et al.*, *Chem. Lett.*, **45**, 749–751 (2016).

[13] 早下隆士ほか,「ポリシクロデキストリンの超微細ナノゲル粒子及びその製造方法」特願 2019-152363.

[14] S. Takeuchi, *et al.*, *Chem. Commun.*, **59**, 4071-4074 (2023).

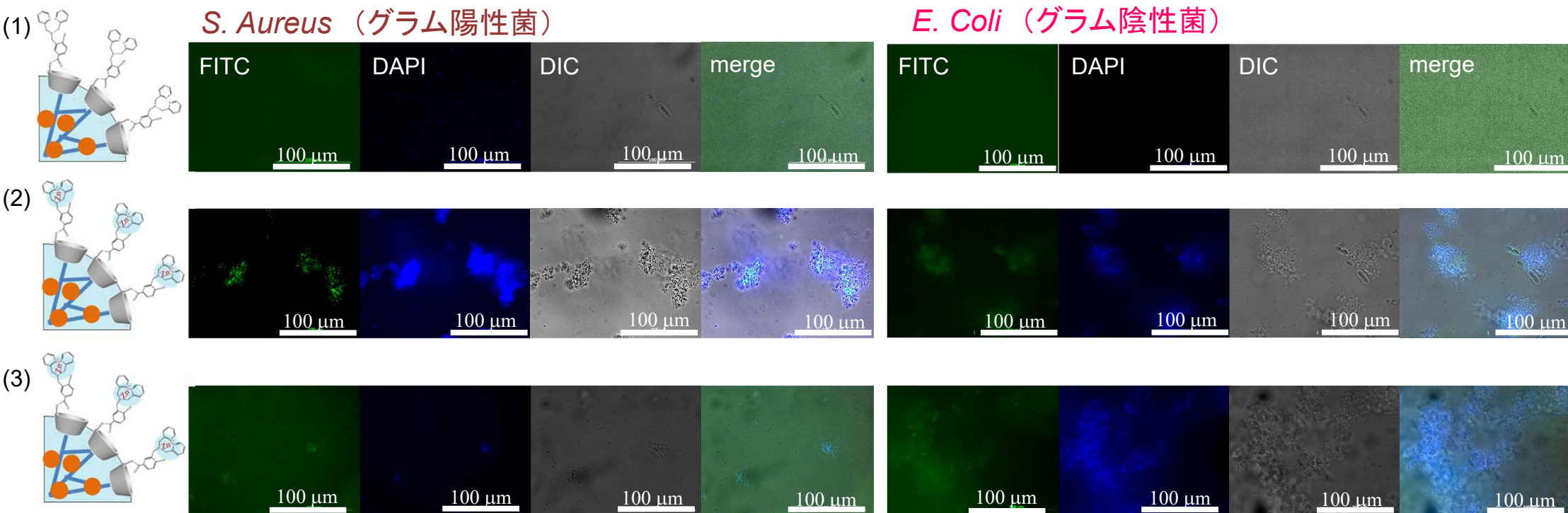
本発明(新技術)の概要



- 本研究では、**Zn-dpa-HB-γ-CyD** ナノゲルにイオン性界面活性剤を包接させることで**ナノゲルの表面電荷を制御し**、細菌の凝集挙動を調べた。
- カチオン性界面活性剤では、細菌種に関係なく凝集が促進されるのに対し、アニオン性界面活性剤を用いると、**グラム陰性菌に選択的な凝集が起こる**ことを発見した。

アニオン性界面活性剤の効果

【蛍光顕微鏡観察】



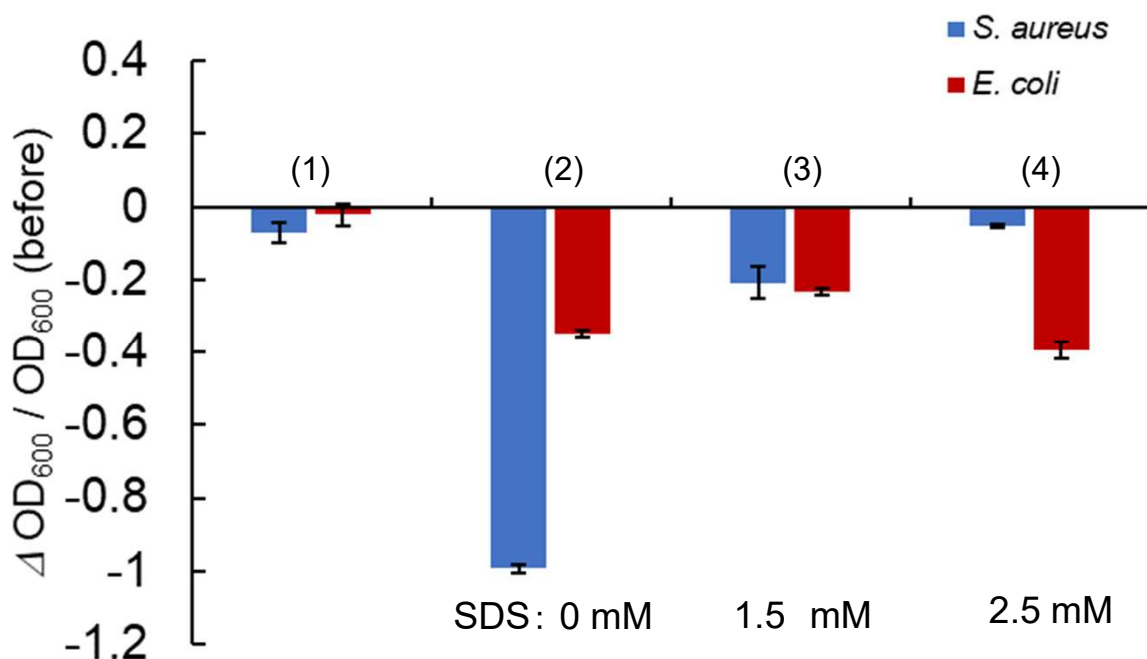
+

Fluorescence microscopy images of *S. aureus* and *E. coli* (10^8 CFU cm^{-3}) incubated with **dpa-HB- γ -CyD** nanogels. Bacteria was stained with DAPI. $\lambda_{\text{ex}}=359$ nm and 494 nm for DAPI and FITC, respectively. $[\text{Zn}^{2+}] = 200 \mu\text{M}$, $[\text{SDS}] = 1.5$ mM, Scale bar = 100 μm .

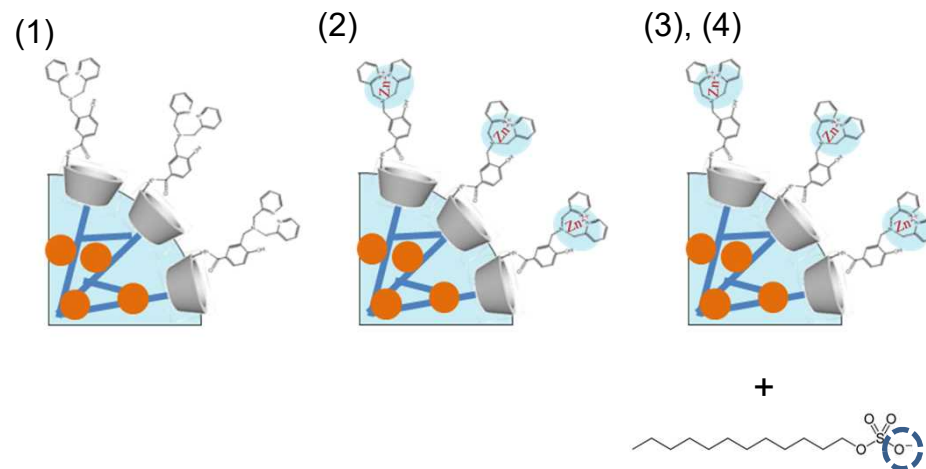
- SDSの添加により、グラム陽性菌である*S. aureus* とグラム陰性菌である*E. coli* の凝集挙動に違いが見られることを見出した。

アニオン性界面活性剤の効果

【濁度変化】



Decreasing ratio of OD₆₀₀ in addition of (1) **dpa-HB-γ-CyD** nanogels only (2) **dpa-HB-γ-CyD** nanogels + Zn²⁺ (3) and (4) **dpa-HB-γ-CyD** nanogels + Zn²⁺ + SDS to *S. aureus* and *E. coli* in PBS buffer (pH 7.4) ($n = 3$). [**dpa-HB-γ-CyD** nanogels] = 0.356 mg cm⁻³, [Zn²⁺] = 200 μM, [SDS] = (3) 1.5 mM, (4) 2.5 mM, [Bacteria] = 1.0 × 10⁸ CFU cm⁻³.

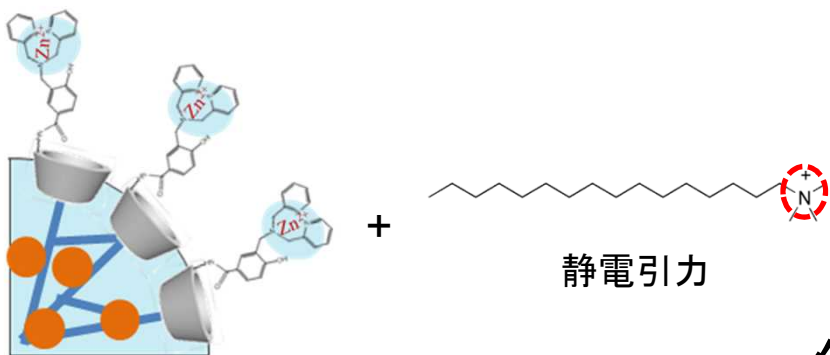


- SDSの添加につれてグラム陽性菌の凝集能は著しく減少するのに対し、グラム陰性菌の凝集能に大きな変化は見られなかった。

→ SDSの添加による**グラム陰性菌選択的な凝集**を発見。

表面電荷制御に基づく細菌識別

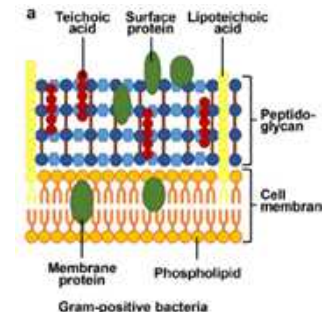
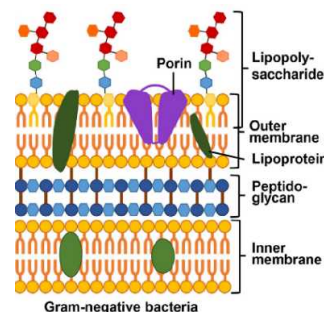
カチオン性界面活性剤



E. Coli (グラム陰性菌)

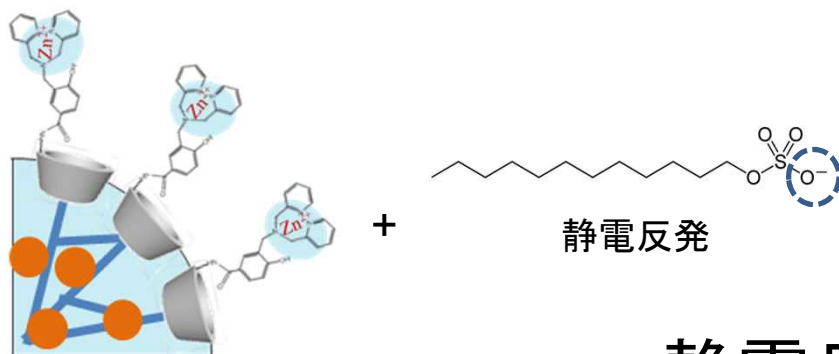


S. aureus (グラム陽性菌)



- 細菌種によらず凝集能が増加。

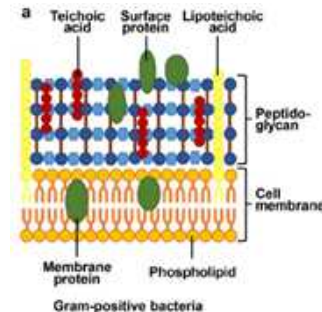
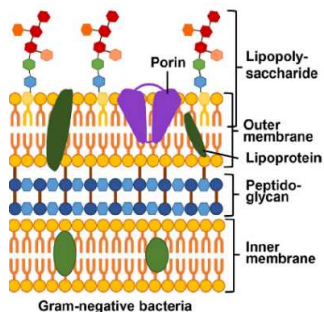
アニオン性界面活性剤



E. Coli (グラム陰性菌)



S. aureus (グラム陽性菌)



- 静電反発によりグラム陽性菌の凝集能が著しく減少し、**グラム陰性菌選択的な凝集を実現。**

発明の特徴・従来技術との比較

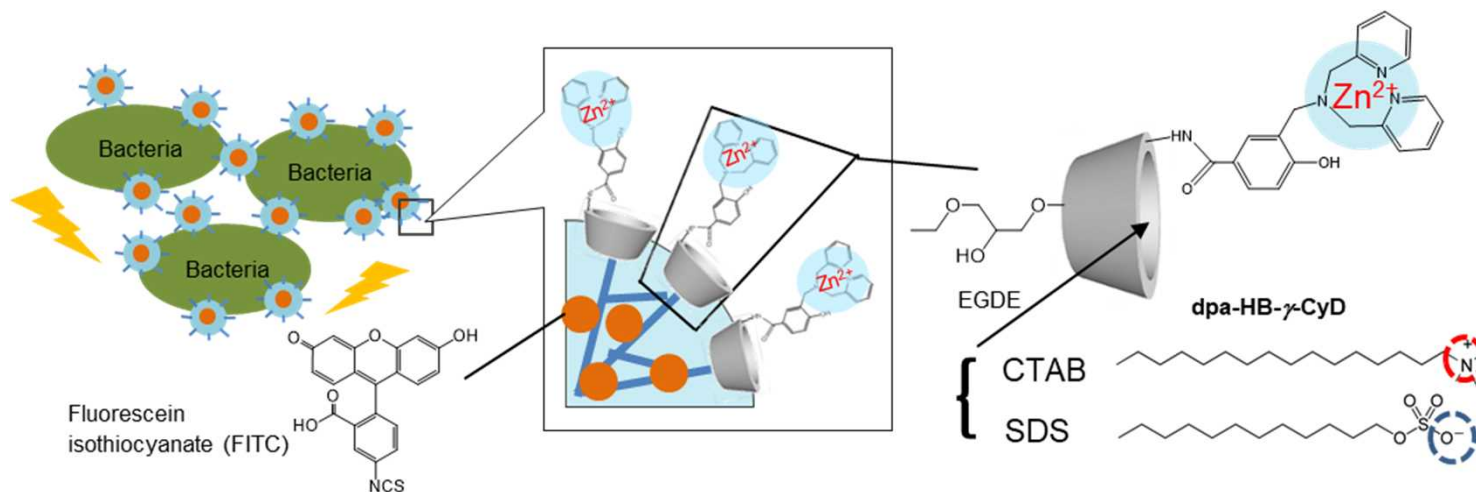
- 本発明は、シクロデキストリンナノゲルの包接機能に着目し、イオン性界面活性剤の包接によってナノゲル界面の電荷制御が可能となることを見出した。
 - ✓ 細菌表面への分子認識相互作用に加え、**静電引力/静電反発に基づく細菌識別機能の制御**が可能となる。
- 既存のグラム染色法は、検査結果を得るには2時間（顕微鏡形状識別）～72時間（培養法）を要している。
 - ✓ 本発明の技術を用いれば、**細菌の識別**にかかる所要時間を**0.5～1時間程度**に短縮できる可能性がある。

想定される用途・課題

● 感染症の治療薬を選択するための迅速な検査薬剤

- ✓ 薬剤耐性を獲得させないために、薬効範囲を狭めた抗生物質等の使用
→ 抗生物質の選択の為には、迅速に菌種を識別する系の開発が必要

- 検査薬剤とするには、事業者の評価と検査薬としての治験を経てから薬剤認可を得る段階があり、相応の期間を要する。
→ 共同研究企業を特定し、評価計画の準備が必要

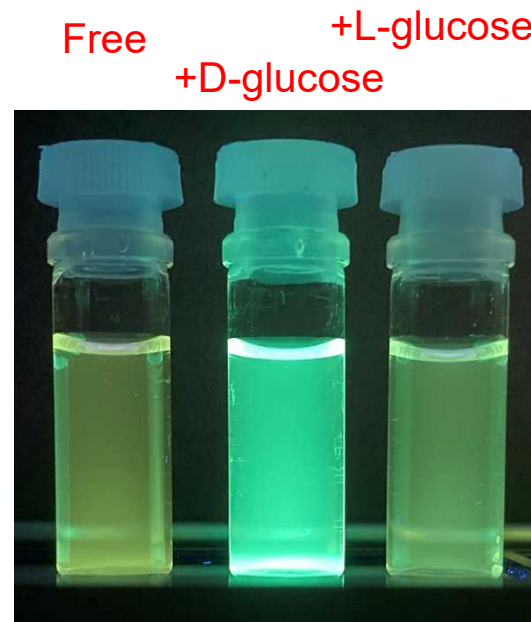
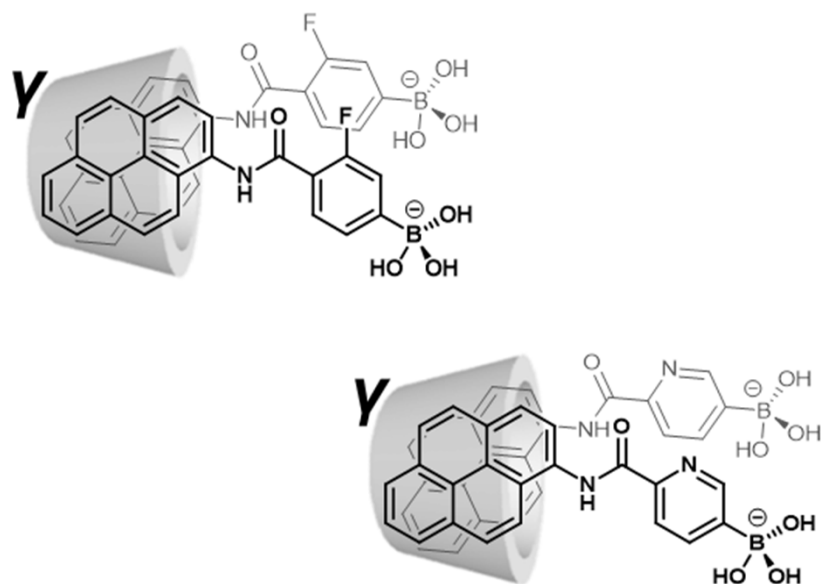


まとめ

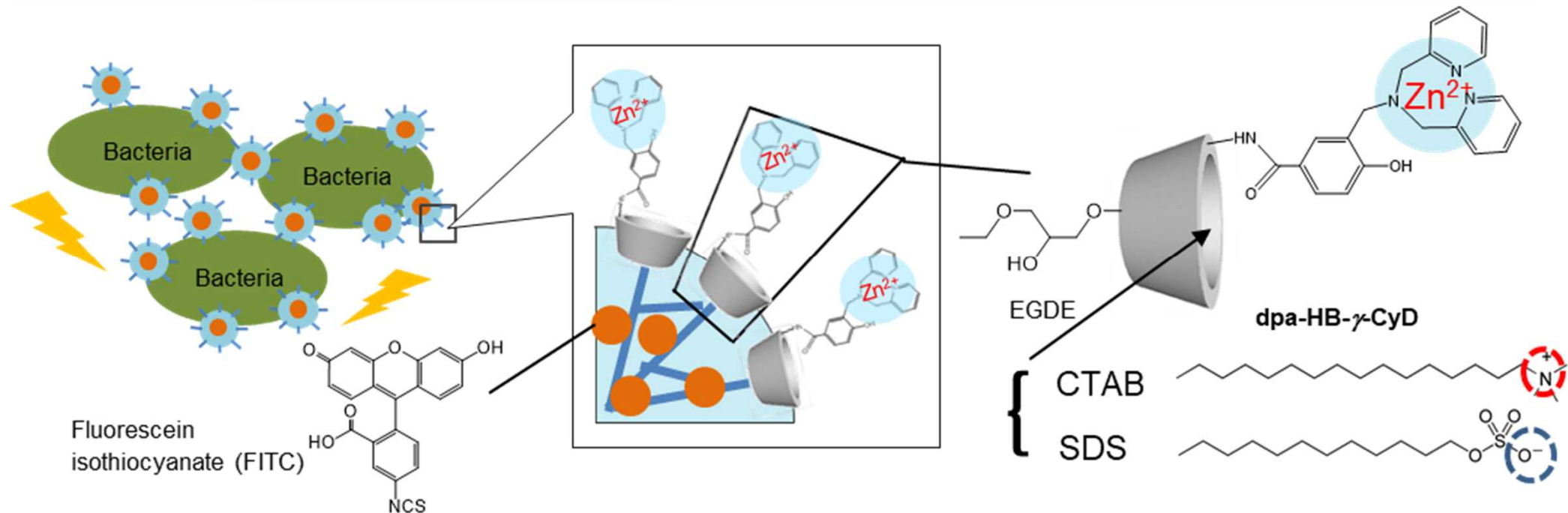


本発明のまとめ①

- キラルな空孔を持つシクロデキストリンと単純な構造のボロン酸型プローブの超分子複合体によって、水中でのD-グルコースのキラル認識を可能にする方法である。
- pH7.4の水中でD-グルコースを特異的にキラル認識して蛍光強度の増大を示すことを明らかにした。



本発明のまとめ②



- ジピコリルアミンの亜鉛錯体を化学修飾したシクロデキストリンナノゲルに電荷の異なるイオン性界面活性剤を加えることにより、ナノゲルの表面電荷を制御し、**グラム陽性菌とグラム陰性菌の凝集識別**を可能とする方法である。
- 細菌表面への分子認識相互作用に加え、静電引力や静電反発に基づく細菌識別機能の制御が初めて可能となることを明らかにした。

企業への期待

＜共同研究の可能性(例)＞

- ターゲットとなる糖類・菌の選別/培養
- 検出方法の最適化
- 試薬・ナノゲルの大量合成
- 装置化(連続モニタリング)

お問い合わせ先

上智大学研究推進センター

E-mail: g_rant-co@sophia.ac.jp

Tel: 03-3238-3173

FAX: 03-3238-4116