

解 説

三重らせん多糖シゾフィランの化学修飾と 溶液中の分子形態

吉場 一真^a, 佐藤 尚弘^b

^a群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門

^b大阪大学 大学院理学研究科 高分子科学専攻

(受取日: 2016年4月10日, 受理日: 2016年5月13日)

Chemical Modification and Conformation of Schizophyllan, a Triple-Helical Polysaccharide

Kazuto Yoshiba^a and Takahiro Sato^b

^a Graduate School of Science and Technology, Gunma University

^b Graduate School of Science, Osaka University

(Received Apr. 10, 2016; Accepted May 13, 2016)

The chemical modification is important to improve the solubility to various solvents, physical properties, and immunological functions in polysaccharide chemistry. Oxidation is one of the familiar methods in the chemical modification of polysaccharides not only for industrial applications but also in fundamental studies, such as the structural determination, the first step of the functionalization, and so on. We focus a triple helical polysaccharide, schizophyllan, to study the effects of the carboxylation on the ordered structure of the polysaccharide. The oxidation of schizophyllan side chains is performed by two-step oxidation using periodate and chlorite in aqueous solutions to obtain the carboxylated sample, showing the polyelectrolyte character. The carboxylation of schizophyllan affects the triple helical conformation and the order-disorder transition with respect to the schizophyllan side chain in aqueous solutions, and solution properties governed by the conformation of this polysaccharide. The triple helical conformation was investigated mainly using the size-exclusion chromatography with a multi-angle light scattering detector, and the order-disorder transition with respect to the schizophyllan side chain was studied by differential scanning calorimetry and optical rotation.

Keywords: schizophyllan, periodate oxidation, size exclusion chromatography, light scattering, differential scanning calorimetry, optical rotation



吉場 一真
Kazuto Yoshiba
E-mail: yoshiba@gunma-u.ac.jp



佐藤 尚弘
Takahiro Sato
E-mail: tsato@chem.osaka-u.ac.jp

1. はじめに

生体高分子の多くは、水溶液中で水分子と強く相互作用をしながら、その分子形態を維持し、また生物学的機能を発現している。したがって、生体高分子と水分子との相互作用の研究手法を確立することは重要な課題である。我々は、以前に生体高分子の一種である三重らせん多糖シゾフィランが水溶液中で水分子を介して側鎖に関する秩序状態をとり、温度変化によって秩序-無秩序転移を引き起こすことを熱測定と誘電分散測定により明らかにし、本雑誌の解説記事¹⁾で紹介した。

最近我々は、このシゾフィランを一部酸化し、イオン化することにより、その物理化学的性質がどのように変化するかについて検討している。多糖の酸化は、工業的にも重要な化学修飾法である。酸化によりカルボキシ基が導入され、中性多糖を高分子電解質に変換でき、水に対する溶解性が格段に改善される。²⁾ また、酸化反応により反応活性な官能基を多糖鎖に導入できるので、機能性多糖を合成する第1ステップの反応として利用できる。さらには、酸化多糖に架橋剤を添加すると、多糖ゲルを形成でき、その用途が広がる。これまでに、セルロースやアミロースをはじめとする汎用多糖の酸化について研究がなされてきたが、最近では種類の異なる様々な多糖の酸化についても研究が進んでいる。³⁻⁵⁾

我々の主目的は、この酸化シゾフィランの側鎖に関する秩序-無秩序転移を調べることであるが、その前に酸化シゾフィランの主鎖の三重らせん構造について調べておく必要がある。本稿では、まず多糖を化学修飾する方法として過ヨウ素酸酸化について紹介したのち、酸化シゾフィランの三重らせん構造を、多角度光散乱検出器付サイズ排除クロマトグラフィー (SEC-MALS) で調べた結果について紹介する。その後、側鎖の秩序-無秩序転移を、示差走査熱量測定と旋光度の温度依存性により調べた。ただし、この秩序-無秩序転移については、まだ予備的結果を得た段階であることをお断りしておく。

2. 過ヨウ素酸酸化

過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO₄) は反応選択性の高い酸化剤であり、多糖の構造研究に主に利用されてきた。⁶⁾ 過ヨウ素酸酸化では、グルコース環の炭素-炭素結合のうち隣接の OH 基をもつ炭素-炭素結合が切断されアルデヒドとなる。この酸化は水溶液中で反応させることができ、1モルの過ヨウ素酸の消費に対し2モルのアルデヒド基の生成が化学量論的に起こる。多糖に過ヨウ素酸酸化を適用すると、グルコースが開環してアルデヒド基が導入された鎖状の構造のユニットが生成される。低濃度の酸化剤の反応条件では、ほぼ化学量論的に多糖鎖と反応するため、反応中に添加する酸化剤の量により置換度の異なる酸化多糖を合成できる。

アミロースやセルロースでは、主鎖 α -1,4-グルコース (セルロースでは β -1,4-グルコース) の C2-C3 結合が過ヨウ素酸酸化により切断され、ジアルデヒド型の鎖状構造のユニットが生成される。(Fig. 1)^{6,7)}

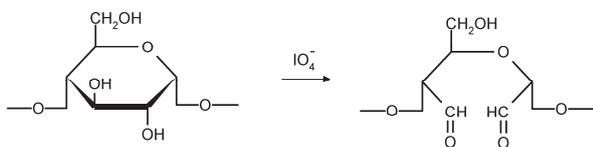


Fig.1 Glycol-cleavage reaction by the periodate oxidation of α -1,4-glucose.

α -1,6-グリコシド結合をもつプルランでは、過ヨウ素酸により C2-C3 結合、もしくは C3-C4 結合が開環・酸化されるが、再酸化されてアルデヒド側鎖とギ酸を生成する。(Fig.2)^{6,8)}

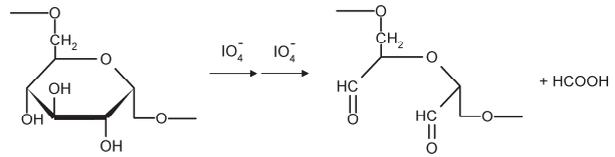


Fig.2 Glycol-cleavage reaction by the periodate oxidation of α -1,6-glucose.

シゾフィランなどの β -1,3-グルカンでは、主鎖の β -1,3-グリコシド結合は過ヨウ素酸の反応選択性のため酸化・開環を受けないが、末端基と側鎖グルコースは酸化を受ける。Fig.3 にシゾフィランの側鎖グルコースに対する過ヨウ素酸酸化の反応経路を示す。⁹⁾ シゾフィランに過ヨウ素酸酸化を適用すると、側鎖の β -1,6-グルコースの C2-C3 結合、もしくは C3-C4 結合が開環・酸化されるが、再酸化を受けてアルデヒド側鎖とギ酸を生成する。

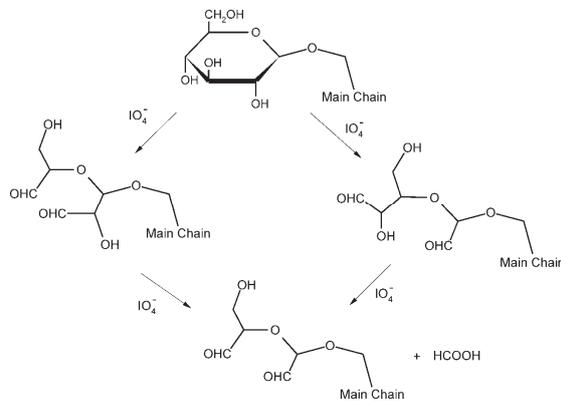


Fig.3 The oxidation path in the periodate oxidation of the side chain of schizophyllan.

反応性の高い置換基を導入したことで、アルデヒド型シゾフィラン (Scleraldehyde) を中間物質として、さまざまなシゾフィラン誘導体が合成されている。¹⁰⁻¹³⁾ また、Scleraldehyde に水素化ほう素ナトリウム (NaBH₄) を用いて還元反応を行うと、低分岐度の試料が得られる。¹⁴⁾ この反応では、側鎖のアルデヒド基はヒドロキシ基に還元される。さらに Smith 分解を行うと酸化・還元反応を受けた側鎖はポリアルコールとして主鎖から切断される。天然で得られる低分岐度の β -1,3-グルカンとは異なり分岐構造がランダムとなるが、分岐度の低下により凝集するなど水溶液への溶解性は変化し、分岐側鎖がないと水に難溶となる。¹⁴⁾

過ヨウ素酸酸化ではグルコース環の開環が起こるので、導入されたアルデヒド基をもつ鎖状ユニットによる分子形態への影響について研究が行われている。⁵⁾ 溶液中の高分子鎖の分子形態を表すために Kratky と Porod のみみず鎖理論が利用される。¹⁵⁾ みみず鎖モデルは回転半径だけでなく固有粘度などに対して定式化されており、実験で得られたこれらの重合度依存性から、らせんピッチ h 、及び多糖鎖の剛直性を表す持続長 q を決定できる。溶液中の多糖の分子形態は、化学構造に由来する内部回転の制限だけでなく、溶媒との相互作用、あるいは多糖の規則構造により固有の剛直性を有することになる。

アルギン酸などの電解質多糖では、溶液中の塩濃度に固

有粘度が依存することが知られている。¹⁶⁻²¹⁾ これは、溶液中の塩濃度の低下につれて鎖上の静電反発が増大することにより分子形態が変化するためと考えられており、主鎖の屈曲性が高いと分子形態が溶媒中の塩濃度に大きく依存する。この固有粘度の塩濃度依存性は、多糖鎖の剛直性に対する経験的評価方法として利用されてきた。¹⁶⁾ 電解質多糖に過ヨウ素酸酸化を行うと、反応前の多糖に比べて、回転半径や固有粘度が低下する。¹⁸⁻²¹⁾ これは、多糖に導入されたアルデヒド型の鎖状ユニットが主鎖の屈曲性を増加させるためである。また、屈曲性の高い中性多糖に電解質基を導入すると静電相互作用の寄与が支配的となり回転半径は増加する。²²⁾

3. カルボン酸型シゾフィラン

過ヨウ素酸酸化により多糖鎖に導入したアルデヒド型ユニットを亜塩素酸による酸化反応を行うと、カルボキシ基に化学構造を変えることができる。²³⁾ Crescenzi らはシゾフィランと同一の化学構造を持つスクレログルカン²⁴⁾を用いてカルボン酸型の側鎖を持つ酸化スクレログルカン (Sclerox) を合成した (Fig.4)。^{25,26)} Sclerox は過ヨウ素酸酸化に用いる酸化剤を調節することで酸化度の異なる試料が得られる。²⁷⁾ この酸化多糖は水溶性であり、塩濃度や pH など溶媒条件により溶液中の分子形態が変化する。^{28,29)} 過ヨウ素酸酸化、亜塩素酸酸化は比較的温和な反応条件で行うことができ、低置換度の酸化試料ではその化学構造を部分的にしか変化しない。これらの酸化反応の特徴により天然構造を保持したまま電解質特性をもつカルボン酸型シゾフィランを合成することができる。

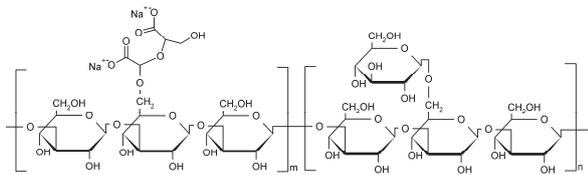


Fig.4 Chemical structure of the carboxylated schizophyllan (Sclerox-X) by partial periodate oxidation and subsequent chlorite oxidation.

TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) を用いて酸化反応を行うと、多糖に含まれる第一級アルコールが選択的にカルボキシ化される。さまざまな多糖に対して適用されている比較的新しい化学修飾法である。de Nooy らは TEMPO と臭化ナトリウム、及び次亜塩素酸を用いてスクレログルカンを酸化し、Sclerox とは化学構造の異なるカルボン酸誘導体を合成した。³⁰⁾ スクレログルカンに TEMPO 酸化を適用すると、主鎖、及び側鎖グルコースの C6 炭素が酸化される。この反応では、過ヨウ素酸酸化と異なりグルコース環の開裂は起こらない。そのため、TEMPO 酸化では立体化学的特徴を変えることなく多糖を電解質化することができる。従来行われてきたクロロ酢酸の求核置換反応で起こるカルボキシメチル化によってもシゾフィランを電解質化できるが、置換度の高い試料では三量体ではなく単一鎖となることが報告されている。^{30,31)}

4. 水溶液中のカルボン酸型シゾフィランの三重らせん構造

近年、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に多角度光散乱検出器 (MALS) を連結し、高分子のモル質量分布を測定する SEC-MALS 法が装置の性能の向上により発展

している。この方法では、SEC により分離・溶出した試料のモル質量を多角度光散乱検出器により連続的に決定する。³²⁾ 加えて、SEC-MALS に粘度検出器 (VIS) を接続し拡張することもできる。SEC カラムに利用可能な溶媒の制限があるが、現在では溶液中の多糖鎖の分子形態に対する知見を得るための最も有力な方法といえる。SEC-MALS(-VIS)法の発展により化学修飾前後の多糖の回転半径、固有粘度のモル質量依存性を定量化されるようになったため、従来の経験的方法¹⁶⁾にかわって、上述のみみず鎖理論を用いて多糖の分子形態を解析できるようになった。¹⁸⁻²¹⁾ 次に、我々が行った SEC-MALS 測定による分子特性解析³³⁾を中心にカルボン酸型シゾフィラン (Fig.4) の水溶液中の分子形態について解説する。

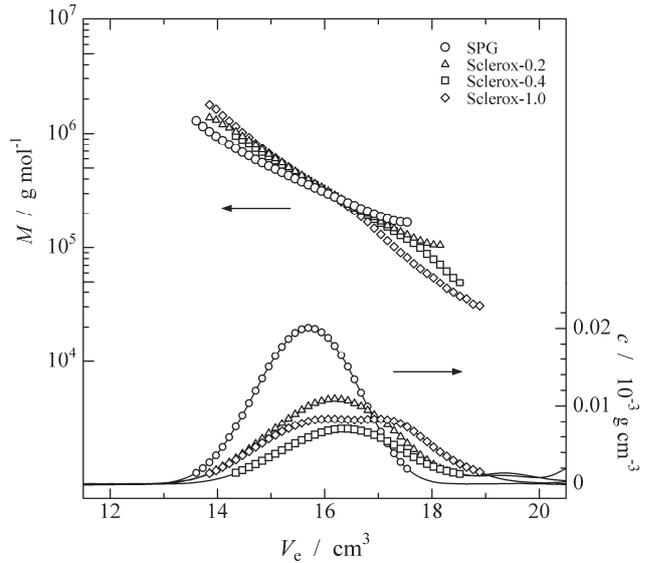


Fig.5 SEC-MALS results for schizophyllan (SPG) and Sclerox-X with different degrees of substitution in aqueous 0.1 M NaCl at 40 °C. X denotes the molar ratio of sodium periodate for schizophyllan in the reaction.

Table 1 Molecular characteristics of Sclerox-X samples.

Sclerox-X	DS	$M_w / g \text{ mol}^{-1}$	M_w/M_n
SPG	0	470,000	1.20
Sclerox-0.2	0.16	366,000	1.48
Sclerox-0.4	0.19	305,000	1.54
Sclerox-1.0	0.38	338,000	2.42

Fig.5 に 0.1 M NaCl 水溶液中、40°C で測定された酸化反応前後のシゾフィラン (SPG), 及び Sclerox-X の SEC-MALS の結果を示す。ここで X は酸化反応に用いた過ヨウ素酸のモル分率を示している。Fig.5 の c と M は、示差屈折計で検出された試料の質量濃度、及び MALS 検出器の散乱強度から決定したモル質量、 V_e は溶出体積を表す。ここで質量濃度、及びモル質量の決定には試料の比屈折率増分 $(\partial n/\partial c)_D = 0.141 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ を用いた。SPG の溶出曲線中の $V_e = 16 \text{ cm}^3$ 付近にピークが観測される。低酸化度試料である Sclerox-0.2 ではわずかな低モル質量への移動が観測されるが、溶出曲線には一つのピークしか観測されない。高酸化度試料の Sclerox-1.0 の溶出曲線には、二つのピークが観測され、一部の三重らせんが酸化反応後に構造変化したことを表している。Fig.5 の SEC-MALS データから求めた重量

平均モル質量 M_w , 及び分布 M_w/M_n を計算し Table 1 にまとめた。表中の DS は酸塩基滴定から求めた酸化度を示す。Coviello らにより行われた Sclerox-X 水溶液の角 X 線散乱測定の結果³⁴⁾でも、酸化度が高いとき反応後に三量体と単一鎖の混合状態となると考えられている。これらのことから、過ヨウ素酸酸化、及び亜塩素酸酸化後に、高酸化度のシゾフィラン試料は三量体を解離させ水溶液中の分子形態を変化させるが、低酸化度試料では三量体を維持していると考えられる。

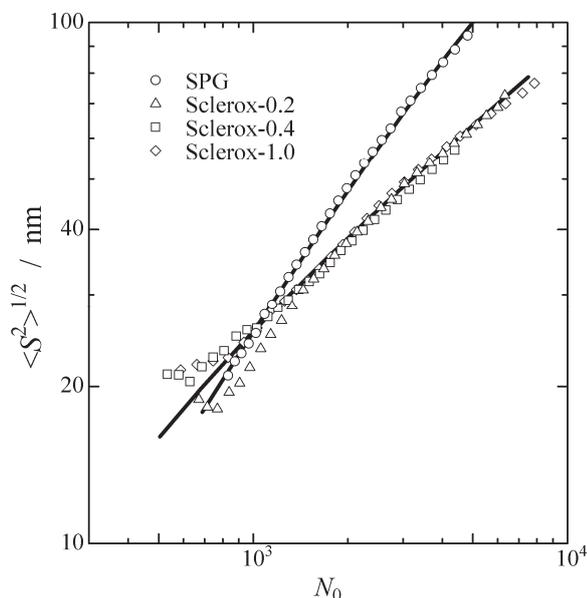


Fig.6 Conformation analysis for schizophyllan and sclerox-X samples with different degrees of substitution in aqueous 0.1 M NaCl at 40 °C. Solid curves are fitting results by the wormlike chain model; $q = 120$ nm, $h = 0.28$ nm for SPG; $q = 16$ nm, $h = 0.51$ nm for Sclerox-X. Symbols are the same as those of Fig.5.

Fig.6 に Sclerox-X の 0.1 M NaCl 溶液に対して決定された回転半径 $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ の重合度依存性を示す。ここで N_0 は主鎖グルコースあたりの重合度を表す。($N_0 = M / M_0$; M_0 はグルコース単位の平均モル質量を示す。) SPG にはきわめて強い重合度依存性が観測される。低 N_0 領域ではほぼ N_0 に比例しており、SPG の三重らせん構造は真っ直ぐな棒として水溶液中に溶解していることを示している。^{35,36)} 一方で、Sclerox-X の $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ は SPG と比べて高 N_0 領域で大きく低下しており、酸化により剛直性が変化したことがわかる。みみず鎖モデルを適用してらせんピッチ h と持続長 q を求めると、SPG に対して $h = 0.28$ nm, $q = 120$ nm と Sclerox-X に対して $h = 0.51$ nm, $q = 16$ nm と解析できる。なお、この解析では、Sclerox-1.0 のデータの低モル質量領域は単一鎖が共存するためデータ解析から除外している。らせんピッチの増加と持続長の大幅な減少は、Sclerox-X の三量体が完全なシゾフィラン三重らせんとは異なるコンフォメーションであることを意味している。また、電解質化したプルラン²²⁾ と比べて、測定された Sclerox-X の $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ には酸化度の依存性がほとんど見られない。プルランは極めて屈曲性の高い主鎖構造を持つことか知られており³⁷⁾、電解質化することで分子形態が著しく変化することを示している。一方で、Sclerox では主鎖の剛直性のため、導入されたカルボキシ基の静電的相互作用があまり寄与していないことを示している。以上、SEC-MALS を利用した分子特性解析の結果から、Sclerox-X の三量体は、完全なシゾフィラン三重らせん構造と比べて屈曲性が増加し、伸びたコンフォメーションを水溶液中でとることがわかった。

5. カルボン酸型シゾフィランの側鎖に関する秩序-無秩序転移について

本雑誌の前の解説記事¹⁾ で紹介したように、三重らせん多糖シゾフィランは低温水溶液中で水分子を介して側鎖に関する秩序状態をとり (**Fig.7** 参照)、昇温によって非常に協同的な秩序-無秩序転移を引き起こすことが知られている。この秩序-無秩序転移は熱測定、旋光度測定、および誘電分散測定により詳細に調べられている。

上述のように、低酸化度の Sclerox が水溶液中で三量体を維持していることを SEC-MALS による分子特性解析から明らかにしたが、現在我々は、Sclerox の三重らせんにおける協同的な秩序-無秩序転移が、酸化度にどのように影響されるかを調べている。シゾフィランの側鎖に関する秩序-無秩序転移は、**Fig.7** に示すように、三重らせんの外側を向いている側鎖グルコース残基が水分子を介して形成しているある秩序構造が昇温による脱水和によって無秩序な構造に変化する現象である。**Fig.4** に示したように、Sclerox はシゾフィランの側鎖の一部を化学変化させるので、側鎖に関する秩序-無秩序転移への影響は興味ある研究対象である。

現時点では、この秩序-無秩序転移に関してまだ予備的な実験結果が得られた段階で、本解説記事で紹介するのは時期尚早とも考えたが、熱測定の格好の研究対象なので、あえて紹介することにする。

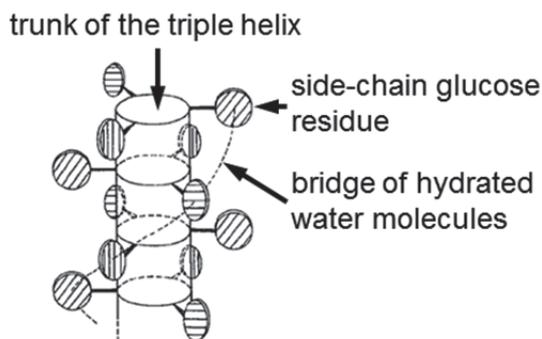


Fig.7 Schematic illustration of the ordered state of schizophyllan side chains in aqueous solution.

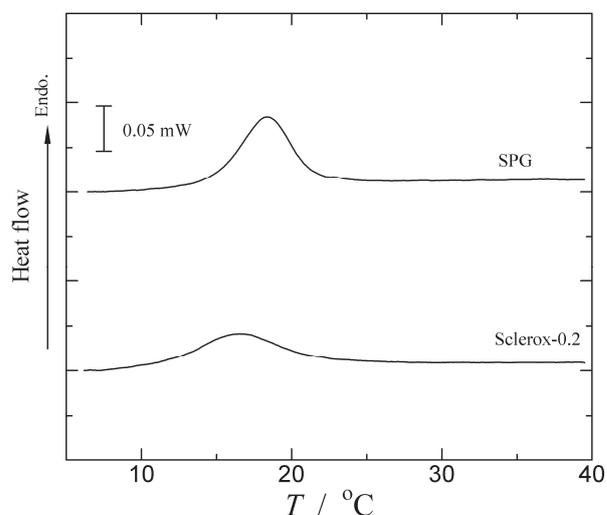


Fig.8 Heat flow curves for schizophyllan (SPG) and Sclerox-0.2 (10 wt%) in D_2O with 0.1 M NaCl at the scanning rate of 2.0 °C min^{-1} . The DSC curves were obtained on the second heating after cooling from 40 °C.

Fig.8には、0.1 M NaCl 重水溶液中のSPGとSclerox-0.2に対して走査速度2.0 °C/minで行ったDSC測定の結果を示す。Fig.8中のSPGのDSC曲線には18.4 °Cに吸熱のピークが観測される。このピークが脱水和を伴う側鎖に関する秩序-無秩序転移に起因しており、温度可逆的な転移である。³⁸⁻⁴⁰⁾吸熱ピークの面積から転移エンタルピーを3.9 kJmol⁻¹と求めた。一方で、Sclerox-0.2の転移温度は16.6 °Cへ移動し、転移エンタルピーは3.0 kJmol⁻¹に減少した。また、ピークが少しブロードになっている。

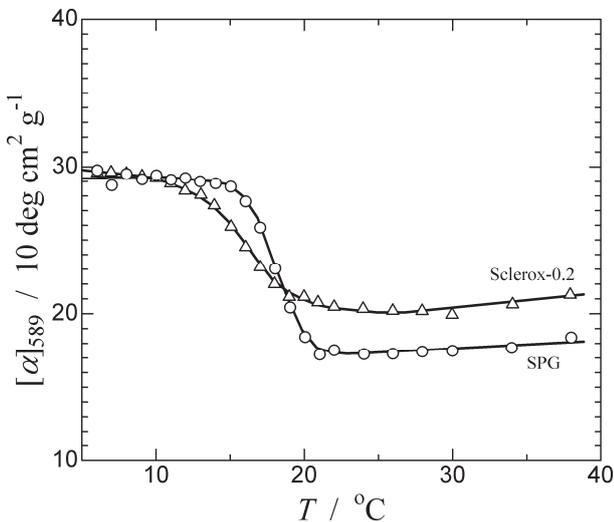


Fig.9 Specific rotation at the wavelength of 589 nm for 1 wt % solutions of schizophyllan (unfilled circles) and Sclerox-0.2 (unfilled triangles) in D₂O with 0.1 M NaCl.

Fig.9には、0.1 M NaCl 重水溶液中のSPGとSclerox-0.2の旋光度[α]₅₈₉の温度依存性を比較する。SPGとSclerox-0.2ともに、DSCと同じ温度で急激な[α]₅₈₉の減少が観測され、またSclerox-0.2に関する変化の方がSPGに関する変化よりも少し低温側にずれて緩やかになっている点も、Fig.8のDSCの結果と一致している。

シゾフィラン側鎖の秩序-無秩序転移は、非常に協同的で、側鎖に関する転移であるにもかかわらず、強いモル質量依存性を呈する。¹⁾これは、シゾフィラン側鎖と水和している水分子が一次元協同系を形成していて、シゾフィランのモル質量に比例して、その一次元協同系が長くなっているためであると解釈されている。シゾフィランの酸化は側鎖の化学構造を変化させるので、Scleroxの三量体中の酸化された側鎖は転移に関与せず、酸化を受けていない側鎖のみが秩序-無秩序転移を引き起こしていると考えられる。側鎖の酸化がランダムに起これば、酸化により一次元協同系の長さが酸化度の増加に伴い次第に短くなっているはずである。一次元協同系は短くなるに従い、協同性が減少し、その結果、転移温度が低下し、転移がよりブロードになる。Fig.8とFig.9に示したDSCおよび旋光度の予備的な実験結果は、この解釈により定性的に説明される。

6. まとめ

過ヨウ素酸、及び亜塩素酸を用いた酸化反応による三重らせん多糖シゾフィランの規則構造への影響について解説した。水中で三重らせん構造を形成するシゾフィランは過ヨウ素酸を用いた選択的反応により、側鎖グルコースが開環されアルデヒド型の側鎖構造に酸化される。亜塩素酸酸化によりアルデヒド基がカルボキシ基へ酸化されると、電

解質多糖の性質を持つカルボン酸型シゾフィランとなる。低酸化度のカルボン酸型シゾフィランは水溶液中で三量体を保持しているが、シゾフィラン三重らせんよりも屈曲性が高く、伸びた分子形態となる。高酸化度では一部の三量体が解離し、単一鎖との混合状態となる。酸化された側鎖は水溶液中でおこる秩序-無秩序転移に寄与しないため、カルボン酸型シゾフィランの転移エンタルピーは減少し、一次元協同系が短くなるために、転移温度は低下し転移がよりブロードになる。

本稿では、カルボン酸型シゾフィランの酸化前後で変わる溶液中の分子形態を中心に解説した。しかし、シゾフィランには、秩序-無秩序転移以外にも異種高分子との複合体形成^{41,42)}などの三重らせん構造に起因する性質をもつことが知られている。秩序-無秩序転移は三重らせん構造の外側に配置されるグルコース側鎖と溶媒との間で形成される水和構造に由来すると考えられている。^{43,44)}この分子機構の解明には、水と水だけでなく側鎖の役割を明確にする必要がある。多糖の部分的な化学修飾による物理化学的性質の変化を明らかにすることで、この転移の分子機構の解明や、新しい官能基の導入による分子形態の変化を利用した多糖ゲルの特性の改良などに新しい知見をもたらすと考えられる。

謝 辞

多糖の化学修飾、SEC-MALS測定について大変貴重なご意見をいただきましたNorwegian University of Science and Technology (NTNU)のBjørn E. Christensen教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 吉場一真, 寺本明夫, 宮崎裕司, 佐藤尚弘, 熱測定 **37**, 198-205 (2010).
- 2) R. Whistler ed. "Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives (2nd ed.)" Academic press, N. Y. (1973).
- 3) T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecci, F. Alhaique, *J. Control Release* **119**, 5-24 (2007).
- 4) M. Rinaudo, *Polym. Int.* **57**, 397-430 (2008).
- 5) K. A. Kristiansen, A. Potthast, and B. E. Christensen, *Carbohydr. Res.* **345**, 1264-1271 (2010).
- 6) A. S. Perlin "Glycol-cleavage oxidation" in W. Pigman, D. Horton eds. "The Carbohydrates. Chemistry and Biochemistry IB" Chapter 25, Academic press, N. Y. (1980).
- 7) B. Casu, U. Gennaro, S. V. Meille, M. Morrone, A. Naggi, M. S. Occhipinti, and G. Torri, *Int. Biol. Macromol.* **6**, 89-92 (1984).
- 8) D. Bruneel and E. Schacht, *Polymer* **34**, 2628-2632 (1993).
- 9) B. E. Christensen, E. Aasprong, and B. T. Stokke, *Carbohydr. Polym.* **46**, 241-248 (2001).
- 10) K. Koumoto, T. Kimura, M. Mizu, T. Kunitake, K. Sakurai, and S. Shinkai, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2477-2484 (2002).
- 11) M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, T. Matsumoto, M. Numata, S. Shinkai, T. Nagasaki, and K. Sakurai, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8372-8373 (2004).
- 12) T. Nagasaki, M. Hojo, A. Uno, T. Satoh, K. Koumoto, M. Muzu, K. Sakurai, and S. Shinkai, *Bioconjugate Chem.* **15**, 249-259 (2004).
- 13) K. Koumoto, R. Karinaga, M. Mizu, T. Anada, K. Sakurai, T. Kunitake, and S. Shinkai, *Biopolymers* **75**, 403-411 (2004).
- 14) A. S. Magee, R. R. Langeslay, P. M. Will, M. E. Danielson, L. R. Wurst, and V. A. Iiams, *Biopolymers* **103**, 665-674

- (2015).
- 15) H. Yamakawa and T. Yoshizaki, “*Helical Wormlike Chain in Polymer Solutions*” (2nd Ed.), Springer, Berlin (2016).
 - 16) O. Smidsrød and A. Haug, *Biopolymers* **10**, 1213-1227 (1971).
 - 17) I. Donati, S. Holtan, Y. A. Mørch, M. Borgogna, M. Dentini, and G. S. Skjåk-Bræk, *Biomacromolecules* **6**, 1031-1040 (2005).
 - 18) Y. Lee, K. H. Bouhadir, and D. J. Mooney, *Biomacromolecules* **3**, 1129-1134 (2002).
 - 19) M. N. Vold, K. A. Kristiansen, and B. E. Christensen, *Biomacromolecules* **7**, 2136-2146 (2006).
 - 20) B. E. Christensen, I. M. N. Vold, and K. M. Vårum, *Carbohydr. Polym.* **74**, 559-565 (2008).
 - 21) K. A. Kristiansen, M. Ø. Dalheim, and B. E. Christensen, *Pure Appl. Chem.* **85**, 1893-1900 (2013).
 - 22) A. E. J. de Nooy, A. C. Besemer, J. A. P. P. van Dijk, J. A. M. Smit, *Macromolecules* **29**, 6541-6547 (1996).
 - 23) B. T. Hofreiter, I. A. Wolff, and C. L. Mehlretter, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6457-6460 (1957).
 - 24) J. Johnson Jr, S. Kirkwood, A. Misaki, T. E. Nelson, J. V. Scalleti, and F. Smith *Chem. Ind.* **18**, 820 (1963).
 - 25) V. Crescenzi, A. Gamini, G. Paradossi, and G. Torri *Carbohydr. Polym.* **3**, 273-286 (1983).
 - 26) A. Gamini, V. Crescendi, R. Abruzzese *Carbohydr. Polym.*, **4**, 461-472 (1984).
 - 27) B. T. Stokke, A. Elgsaeter, O. Smidrød, and B. E. Christensen *Carbohydr. Polym.* **27**, 5-11 (1995).
 - 28) T. Coviello, M. Dentini, and V. Crescenzi *Polym. Bull.* **34**, 337-343 (1995).
 - 29) T. Coviello, M. Dentini, V. Crescenzi, and A. Vincenti *Carbohydr. Polym.* **26**, 5-10 (1995).
 - 30) A. E. J. de Nooy, V. Rori, G. Marsci, M. Dentini, and V. Crescenzi, *Carbohydr. Res.* **324**, 116-126 (2000).
 - 31) A. Casadei, P. Matricardi, G. Fabrizi, M. Feeney, and P. Paolicelli, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **67**, 682-689 (2007).
 - 32) 柴山充弘, 佐藤尚弘, 岩井俊昭, 木村康之編著 “光散乱法の基礎と応用” 講談社 (2014).
 - 33) K. Yoshiba, T. Sato, T. Osumi, A.-S. T. Ulset, and B. E. Christensen, *Carbohydr. Polym.* **134**, 1-5 (2015).
 - 34) T. Coviello, H. Maeda, Y. Yuguchi, H. Urakawa, K. Kajiwara, M. Dentini, and V. Crescenzi, *Macromolecules* **31**, 1602-1607 (1998).
 - 35) T. Norisuye, T. Yanaki, and H. Fujita, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **18**, 547-558 (1980).
 - 36) Y. Kashiwagi, T. Norisuye, and H. Fujita, *Macromolecules* **14**, 1220-1225 (1981).
 - 37) P. Roger, M. A. V. Axeios, and P. Colonna, *Macromolecules* **33**, 2446-2455 (2000).
 - 38) T. Itou, A. Teramoto, T. Matsuo, and H. Suga, *Carbohydr. Res.* **160**, 243 (1987).
 - 39) T. Hirao, T. Sato, A. Teramoto, T. Matsuo, and H. Suga, *Biopolymers* **29**, 1867 (1990).
 - 40) K. Yoshiba, T. Ishino, A. Teramoto, N. Nakamura, Y. Miyazaki, M. Sorai, Q. Wang, Y. Hayashi, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, *Biopolymers* **63**, 370 (2002).
 - 41) K. Sakurai and S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4520-4521 (2000).
 - 42) K. Sakurai, M. Mizu, and S. Shinkai, *Biomacromolecules* **2**, 641-650 (2001).
 - 43) K. Yoshiba, A. Teramoto, N. Nakamura, K. Kikuchi, Y. Miyazaki, and M. Sorai, *Biomacromolecules* **4**, 1348 (2003).
 - 44) K. Yoshiba, A. Teramoto, N. Nakamura, Y. Miyazaki, M. Sorai, T. Shikata, Y. Hayashi, and N. Miura, *Biomacromolecules* **5**, 2137 (2004).