

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19750086

研究課題名(和文) 高分子および界面等の難認識性基質への酵素触媒糖鎖付加反応システムのデザイン

研究課題名(英文) Design of enzymatic glycosylation reaction system toward unrecognized substrates such as macromolecules and interface.

研究代表者

小林 厚志 (KOBAYASHI ATSUSHI)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90361138

研究代表者の専門分野：糖質工学、酵素工学

科研費の分科・細目：高分子化学

キーワード：糖鎖高分子、酵素触媒高分子反応、アマドリ転位反応

1. 研究計画の概要

糖鎖が糖鎖以外の分子と共有結合した分子である複合糖質は、生理作用を示す分子として知られるだけでなく、機能的な材料にも成り得たりすることから有用な分子群として認識されている。これら複合糖質を調製しようとした場合、各々の分子の特性が影響するため、反応温度や反応溶媒等、適した反応条件が異なる場合が多く、合理的な反応系を設計するのが困難である。しかし生体内においては、全ての共有結合の形成は酵素反応によって完結している。このことは、合理的な反応系を設計することにより、酵素反応を効率的に進行させることが可能であることを示している。本研究においては、自然界で自発的に起きている2つの現象である、アマドリ転位反応と多糖による包接現象を活用する、酵素触媒糖鎖付加反応システムを、より多様な手法とするための条件検討を行い、高効率化へ向けた手法への展開を目指す。

2. 研究の進捗状況

(1) アマドリ転位反応の促進因子の探索

これまでの予備的な研究成果から、アマドリ転位反応の促進因子としてリン酸イオン、特に (HPO_4^{2-}) が優れていることが明らかになっている。この状況を踏まえ、さらなる促進因子を見出すために条件検討を行った。第一に、容易に考えつく反応促進の手段として、反応温度を高くするということが考えられるが、同時に、アマドリ転位産物を分解する反応も促進してしまう。このとき、共存する酸素分子や金属イオンが働いているとの報告がある。以上の点を検証するに当たり、

酸素分子を除外もしくは金属イオンキレーター存在下でアマドリ転位反応を行ったところ、反応温度 $90\text{ }^\circ\text{C}$ では超純水程度を使用すれば、脱酸素もしくは金属イオンキレーターは影響しないことが明らかになった。そのときの反応添加率は1時間程度で25%であった。

(2) アマドリ化糖アクセプターの酵素認識性の検討

アマドリ化した糖脂質または糖ペプチドに対して、3種類の糖加水分解酵素を作用させ、反応生成物をMALDI-TOF MSで解析したところ、所望の糖脂質の生成が確認できた。従って、アマドリ化糖の構造は、酵素の認識性に大きく影響しないことが明らかになった。現在までのところ、生成物の効率的な分離方法が確立していないことから、レクチンカラム、ボロン酸カラム等を駆使して、生成物の構造解析などを進めていく。

(3) 包接錯体を活用した糖転移反応

これまでの予備的な研究成果から、 α -アミラーゼの糖転移反応効率の向上に、基質混合溶液への超音波照射は有効であることが示されている。本研究期間においては、東京農工大学の殿塚らによって報告されている糖転移反応効率の高い酵素である、*Thermoactinomyces vulgaris* R-47 由来 α -アミラーゼの糖転移反応における糖転移反応について検討した。その結果、当該酵素を用いた場合においても基質の包接化は有効であることのみならず、これまでに報告例のない、 α -1,3結合の生成も見られた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

当初の計画では、アマドリ転位反応の効率化を研究期間前半での達成見込みであったが、十分な効率化はなされなかった。しかし、効率化に向けた解析を行っている途中で、糖の3位の置換基が重要であることがわかり、この置換基を操作することにより、アマドリ転位産物の安定化が可能になることが示唆された。また、他の研究課題より開発された反応が、効率的な酵素反応に利用可能であることがわかり、本研究における酵素触媒糖鎖付加反応に積極的に適用することにより、研究期間内に複合糖質の新しい合成反応システムを提案できる。

4. 今後の研究の推進方策

(1) メイラード反応が進行しない人工糖合成

3位の置換基が重要であることが示唆されているが、どのような置換基が適切かは不明である。従って、次年度以降はアマドリ転位反応およびその後の反応に対する3位の置換基の影響を評価するために、3位の構造が異なる10種類程度の人工糖合成を行う。また、これら人工糖とアミン類の反応性について検証する。その上で、これまでに明らかになっているメイラード反応の反応経路と、3位の構造が異なる糖における反応を検証し、メイラード反応における3位の重要性を確認する。

(2) 天然構造に近い脂質への糖転移反応の可能性追求

これまでに行ってきた脂質は分岐を持たない直鎖上の化合物のみであった。付加価値が高く、本法の普遍性を検証するために、天然構造に近い分岐を有する脂質ないし糖脂質への配糖化について検討する。また、不斉を有するアルコールへの配糖化と、包接に用いる多糖との立体選択性の検証を行い、酵素-ラセン型多糖-糖受容体の組み合わせが、より高度な不斉選択性を引き出す優れた方法であることを確認する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

① Noguchi, M., Tanaka, T., Gyakushi, H., Kobayashi, A. and Shoda, S. (2009). Efficient Synthesis of Sugar Oxazolines from Unprotected *N*-Acetyl-2-amino Sugars by Using Chloroformamidinium Reagent in

Water. *J. Org. Chem.* **74**, 2210-2212. (査読有り)

② Tanaka, T., Noguchi, M., Kobayashi, A. and Shoda, S. (2008). A novel glycosyl donor for chemo-enzymatic oligosaccharide synthesis:

4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl glycoside. *Chem. Commun.* 2016-8. (査読有り)

[学会発表] (計10件)

① Kobayashi, A., Yamamoto, K., Itoh, H., Noguchi, M., and Shoda, S., Enzymatic synthesis of glyco-surfactant via ultrasound irradiation onto substrate mixture containing polysaccharide and glycosyl acceptor, 24th International Carbohydrate Symposium Oslo, Norway (2008年7月29日)

② Kobayashi, A., Osanai, H., Murakami, T., Noguchi, M., and Shoda, S. Chemo-enzymatic synthesis of glycoprotein from Hen Egg lysozyme via the Amadori rearrangement, 19th International Symposium on Glycoconjugates Cairns, Australia (2007年7月17日)

[図書] (計1件)

①野口真人、田中知成、小林厚志、正田晋一郎、「酵素的グリコシル化に用いる糖供与体の一段階合成技術」複合糖質の化学と最新応用技術、シーエムシー出版 83-89 ページ (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: 配糖体およびその製造方法

発明者: 正田晋一郎、小林厚志、野口真人、田中知成、永井光、松本健

権利者: 東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-150123

出願年月日: 2008年6月9日

国内外の別: 国内

[その他]

①受賞(計1件)

2008年度日本農芸化学会東北支部奨励賞受賞「糖質加水分解酵素を駆使する配糖化基盤技術の開発」