

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20350051

研究課題名（和文）保護基を全く用いない水中での糖質モノマーの一段階合成とその重合

研究課題名（英文）One-step Synthesis and Polymerization of Glyco-monomers  
in Aqueous Media without Using Protecting Groups

研究代表者

正田 晋一郎 (SHODA SHIN-ICHIRO)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10143364

研究成果の概要（和文）：糖は、分子内に多くのヒドロキシ基を持つ化合物である。これまでは、糖のヒドロキシ基を保護してから、有用な物質に変換しなければならなかった。本研究では、そのような常識を覆し、ヒドロキシを全く保護することなく、糖質モノマーを合成する手法を開発した。糖質モノマーとは、さまざまな糖を含むポリマー合成の重要な原料である。この反応は、水中で行うことができるので、環境にやさしい合成プロセスである。

研究成果の概要（英文）：Sugar molecules have many hydroxyl groups. In order to derivatize sugar molecules, the hydroxyl groups must be protected. In the present research, we have developed a completely different synthetic process of glycol-monomers without using any protecting groups in aqueous media. The resulting glyco-monomers can be utilized as starting materials of various glyco-polymers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：糖鎖工学

科研費の分科・細目：複合科学・高分子化学

キーワード：保護基・配糖化・糖質・一段階合成

## 1. 研究開始当初の背景

世界の人口はやがて 90 億に達する。エネルギー・環境問題に加え、今こそ食糧の恒常的確保について真剣に考えねばならない。農作物の増産は大変重要な課題である。植物は病原菌が体内に侵入すると敏感に反応して、病原菌の増殖を阻止する物質ファイトアレキシンを放出する。この自己防衛の引き金となるのがエリシターである。最近、さまざまなオリゴ糖が、エリシターとして有効に働くことが報告された。エビヤカニの甲羅の成分

キチンを分解して得られるオリゴ糖のうち、重合度 7～9 程度が特に有効である。また、東南アジアで食されているタマリンド種子の分解物オリゴキシログルカンもエリシター活性を示す。しかし、工学とりわけ高分子合成の観点から見ると、これらオリゴ糖をきれいに生産する技術は未だに確立されていない。高収率、高選択性、低環境負荷で、かつ、将来実用化できる真に力量ある新しい合成手法が強く求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究において、エリシター活性を有するオリゴ糖を、保護基を全く用いることなく、水中において、連続的に合成する画期的なプロセスを提供する。このようなプロセスがこれまで存在しなかった理由は、無保護糖を出発原料として、水中で糖鎖をきれいに伸ばしていく技術、とりわけ、無保護糖から糖モノマーを直接合成することが、長い間不可能と考えられてきたからである。

本研究では、次の三つの工程を、中間体を分離することなく連続的にを行い、エリシター活性を有するオリゴ糖を効率よく生産するプロセスを4年間で開発することを目的とする。すなわち、(1) 多糖バイオマスからリファイン化原料の調製、(2) 無保護状態における糖の1位の活性化、(3) 酵素による完全選択的な重合、という一連のプロセスである。これにより、有機溶媒や試薬を大幅に削減することができ、低環境負荷型のオリゴ糖合成プロセスが達成される。

## 3. 研究の方法

すでに我々は、本研究の遂行に必要な不可欠な新しい素反応を次々と開発してきた。すなわち、水に安定な糖モノマーを設計・調製し、これらを酵素触媒を用いて重合させることにより、水中でオリゴ糖鎖を一気に構築する方法を見出した。また、最近になって、従来は有機溶媒中で行われていた糖モノマーの調製も、無保護糖を出発原料として、水中で一段階で行えることを予備実験的に認めている。つまり、各種水溶性脱水縮合剤を用いて、2-アセタミド-2-デオキシ糖からの水中での脱水反応により、対応する糖オキサゾリンを一段階で合成するというものである。

本研究では、上記の知見を踏まえ、多糖バイオマス原料から有用オリゴ糖を連続的に合成する原子効率の高い化学-酵素プロセスを確立する。

## 4. 研究成果

(1) 多糖バイオマスから本研究に不可欠なリファイン化原料の調製を行った。すなわち、グリコサミノグリカンから、還元末端に2-アセタミド-2-デオキシ糖を有するオリゴ糖を調製する。すなわち、市販のヒアルロン酸を酵素により限定的に加水分解することにより、断片化し、これらを分取液体クロマトグラフィーにより分離・精製した。

また、タマリンド種 (*Tamarindus indica*) 由来のキシログルカンを出発原料とし、一連の酵素反応ならびにクロマトグラフィーによる分離を経て、リファイン化原料を調製した。

上記により得られたキシログルカンオリゴ糖に、2, 6-ールチジンの存在下、

脱水縮合剤 DMT-MM を作用させたところ、対応する  $\beta$  型の活性化糖誘導体が高収率で得られることを見出した。また、生成活性化糖は、セルラーゼによる加水分解を受け、糖供与体としても利用できることを明らかにした。

(2) 従来のオリゴ糖の合成の常識を覆すような全く保護基を用いない合成プロセスを開発した。そのために必要な基礎反応として以下に記載する糖オキサゾリンの水中における一段合成を達成した。無保護糖の2位にアセタミドを有する糖原料を分子内で脱水することにより目的とする糖オキサゾリンが得られるものと考え、当該年度は、水溶性脱水縮合剤を徹底的にスクリーニングした。その結果、カルボジイミド系試薬、トリアジン系試薬に加え、新たにイミダゾリジニウム塩系試薬が、極めて有効な脱水縮合剤であることを突き止めた。各種アセタミド糖を水中で、トリエチルアミンの存在下、DMC (dimethyl imidazolium chloride) で処理すると、目的とする糖オキサゾリン誘導体が高収率で合成できることを見出した。この事実は、従来技術では不可能であったような、オリゴ糖のオキサゾリン化も可能になることを示している。そこで、キトオリゴ糖に対して、同様の反応を行ったところ、いずれの場合も高い収率で対応するオキサゾリン誘導体へと変換できることが分かった。

(3) トリアジン系脱水縮合剤である DMT-MM を無保護糖に作用させることにより、水中で、対応する活性糖供与体を一段階で合成した。すなわち、グルコース、セロビオース、キシロビオースならびにキシログルカンオリゴ糖を、対応する DMT 糖へと変換した。

配糖化反応は、本研究の根幹をなす部分であり、特に綿密な実験計画が必要であったので、以下の3つの観点から周到な準備を行った。すなわち、①: 得られた活性糖モノマーを最もよく認識する酵素触媒の探索、②: 反応系内に混在すると予想されるさまざまな化学種に対する触媒酵素の安定性に関する基礎的知見の集積、③: 配糖体収率向上のために必要な諸条件 (温度、濃度、pH 等) の最適化、について詳細に検討した。

以上の結果を基に、最適な糖転移反応条件の設定を行った。その結果、DMT 化反応をオリゴ糖に適用することにより、これまで合成困難とされていた DMT 化オリゴ糖を調製することができた。さらに、対応する糖加水分解酵素の存在下、適切な糖受容体に対して配糖化反応を行うことにより、各種オリゴ糖を収率よく合成する手法を開発した。

(4) 2-クロロ-N,N-ジメチルイミダゾリニウム系脱水縮合剤を、卵黄から調製される非還元末端にシアル酸を有する N-結合型オリゴ糖に作用させることにより、水中で対応

する糖オキサゾリン誘導体を一段階で合成した。配糖化反応は、特に綿密な実験計画が必要であるので、以下の3つの観点から詳細な検討を行った。まず、糖オキサゾリンを最もよく認識する酵素触媒の探索を行った。EndoM酵素の変異体について、その糖転移能力を比較検討した結果、N175Q変異体を用いると最も高い収率で配糖体が生成することが分かった。

反応系内に混在すると予想されるさまざまな化学種に対する触媒酵素の安定性に関する基礎的知見を集積した。すでに、2-クロロ-N,N-ジメチルイミダゾリニウム系脱水縮合剤の副産物である、トリエチルアミン塩酸塩が、EndoM酵素触媒の活性に与える影響を予備実験的に調査した結果、酵素活性の低下が見られたことから、トリエチルアミン塩酸塩の除去方法を検討した。その結果、電気透析を用いることにより、塩化物イオンを除去することができた。また、脱水縮合剤として、塩素含まない2-フェニルオキシイミダゾリニウム塩を用いることで、酵素活性を低下させることなく、糖転移反応が可能であることを示した。

さらに、配糖体収率向上のために必要な諸条件（温度、濃度、pH等）の最適化を行った。種々反応条件を検討した結果、脱水縮合剤5当量、塩基としてリン酸カリウムを用いると、p-ニトロフェニルN-アセチルグルコサミニドへの転移が80%の好収率で進行することが分かった。

#### 5. 主な発表論文等

（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17件）

- ① M. Noguchi, M. Nakamura, A. Ohno, T. Tanaka, A. Kobayashi, M. Ishihara, M. Fujita, A. Tsuchida, M. Mizuno, S. Shoda, A dimethoxytriazine type glycosyl donor enables facile chemo-enzymatic route toward  $\alpha$ -linked N-acetylglucosaminyl galactose disaccharide unit from gastric mucin, *Chem. Commun.* 査読有, 印刷中
- ② N. Yoshida, T. Tanaka, M. Noguchi, A. Kobayashi, K. Ishikura, T. Ikenuma, H. Seno, T. Watanabe, M. Kohri, S. Shoda, One-Pot Chemo-Enzymatic Route to Chitoheptaose via Specific Transglycosylation of Chitopentaose Oxazoline on Chitinase-Template *Chem. Lett.* 査読有, 印刷中
- ③ T. Tanaka, T. Wada, M. Noguchi, M. Ishihara, A. Kobayashi, T. Ohnuma, T. Fukamizo, R. Brzezinski, S. Shoda, 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl  $\beta$ -D-glycosaminides: Novel Substrates for Transglycosylation Reaction Catalyzed by Exo- $\beta$ -D-glucosaminidase from *Amycolatopsis orientalis*, *J. Carbohydr. Chem.* 査読有, 印刷中
- ④ D. H. Im, K. Kimura, F. Hayasaka, T. Tanaka, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, K. Miyazaki, T. Wakagi, S. Fushinobu, Crystal Structures of Glycoside Hydrolase Family 51 a-L-Arabinofuranosidase from *Thermotoga maritime*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 2012, **76**, 423-428
- ⑤ M. Kiyohara, T. Nakatomi, S. Kurihara, S. Fushinobu, H. Suzuki, T. Tanaka, S. Shoda, M. Kitaoka, T. Katayama, K. Yamamoto, H. Ashida,  $\alpha$ -N-Acetylglactosaminidase from Infant-associated Bifidobacteria Belonging to Novel Glycoside Hydrolase Family 129 is Implicated in Alternative Mucin Degradation Pathway, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 2012, **287**, 693-700
- ⑥ N. Yoshida, M. Noguchi, T. Tanaka, T. Matsumoto, N. Aida, M. Ishihara, A. Kobayashi, S. Shoda, Direct Dehydrative Pyridylthio Glycosidation of Unprotected Sugars in Aqueous Media Using 2-Chloro-1,3-dimethylimidazolium Chloride as a Condensing Agent, *Chem. Asian J.*, 査読有, 2011, **6**, 1867-1885
- ⑦ T. Tanaka, M. Noguchi, K. Watanabe, T. Misawa, M. Ishihara, A. Kobayashi, S. Shoda, Novel Dialkoxytriazine-type Glycosyl Donors for Cellulase-catalysed Lactosylation, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 2010, **8**, 5126-5132
- ⑧ M. Umekawa, T. Higashiyama, Y. Koga, T. Tanaka, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, W. Huang, L. X. Wang, H. Ashida, K. Yamamoto, Efficient transfer of sialo-oligosaccharide onto proteins by combined use of a glycosynthase-like mutant of *Mucor hiemalis* endoglycosidase and synthetic sialo-complex-type sugar oxazoline, *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有, 2010, **1800**, 1203-1209
- ⑨ T. Tanaka, M. Noguchi, M. Ishihara, A. Kobayashi, S. Shoda, Synthesis of

- Non-natural Xyloglucans by Polycondensation of 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl Oligosaccharide Monomers Catalyzed by Endo- $\beta$ -1,4-glucanase, *Macromol. Symp.*, 査読有, 2010, **297**, 200-209
- ⑩ A. Kobayashi, T. Tanaka, K. Watanabe, M. Ishihara, M. Noguchi, H. Okada, Y. Morikawa, S. Shoda, 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazine oligoxyloglucans: Novel one-step preparable substrates for studying action of endo- $\beta$ -1,4-glucanase III from *Trichoderma reesei*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, 2010, **20**, 3588-3591
- ⑪ T. Tanaka, A. Kobayashi, M. Noguchi, K. Kimura, K. Watanabe, S. Shoda, Dimethoxy Triazine Glycosides as New Glycosyl Donors for Chemo-enzymatic Synthesis of Oligosaccharides, *J. Appl. Glycosci.*, 査読有, 2009, **56**, 83-88
- ⑫ T. Tanaka, H. Nagai, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, One-step conversion of unprotected sugars to b-glycosyl azides using 2-chloroimidazolium salt in aqueous solutions, *Chem. Commun.*, 査読有, 2009, 3378-3379
- ⑬ R. Izumi, Y. Suzuki, Y. Shimizu, M. Fujita, M. Ishihara, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, Synthesis of artificial oligosaccharides by polycondensation of 2'-O-methyl cellobiosyl fluoride and mannosyl-fluoride catalyzed by cellulase, *Transworld Research Network*, 査読有, 2009, **37/661**, 45-67
- ⑭ T. Tanaka, T. Matsumoto, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, Direct Transformation of Unprotected Sugars to Aryl 1-Thio- $\beta$ -glycosides in Aqueous Media Using 2-Chloro-1,3-dimethylimidazolium Chloride, *Chem. Lett.*, 査読有, 2009, **38**, 458-459
- ⑮ T. Tanaka, W. C. Huang, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, Direct synthesis of 1,6-anhydro sugars from unprotected glycopyranoses by using 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride, *Tetrahedron Lett.*, 査読有, 2009, **50**, 2154-2157
- ⑯ M. Noguchi, T. Tanaka, H. Gyakushi, A. Kobayashi, S. Shoda, Efficient Synthesis of Sugar Oxazolines from Unprotected N-Acetyl-2-amino Sugars by Using Chloroformamidinium Reagent in Water, *J. Org. Chem.*, 査読有, 2009, **74**, 2210-2212
- ⑰ T. Tanaka, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, A novel glycosyl donor for chemo-enzymatic oligosaccharide synthesis: 4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl glycoside, *Chem. Commun.*, 査読有, 2008, 2016-2018
- [学会発表] (計 7 件)
- ① S. Shoda, Protection-Free Glycosylations, The 3rd Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology, 2011 年 10 月 28 日, 上海 (中国)
- ② S. Shoda, Architecture of Sugar-Materials Based on Concept of Glyco-Chemistry Cycle, 6th International Symposium on Chemical-Environmental-Biomedical Technology, 2011 年 9 月 6 日, Hsinchu (Taiwan, R. O. C)
- ③ S. Shoda, Facile Chemo-Enzymatic Glycosylating Process through Dialkoxotriazine (DAT) Synthetic Intermediate, International Carbohydrate Symposium, 2010 年 8 月 3 日, 東京
- ④ S. Shoda, New Frontier of Chemo-enzymatic Glycosylation, 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Society for Glycoscience, 2009, 11 月 13 日, Daejeon, Korea
- ⑤ S. Shoda, A. Kobayashi, M. Noguchi, T. Tanaka, K. Ishikura, One-pot Chemo-enzymatic Synthesis of Polysaccharides by Using Novel Glycosyl Donors, Jpn-Euro Cellulose Workshop, 2009, 9 月 18 日, Hamburg, Germany
- ⑥ S. Shoda, T. Tanaka, M. Noguchi, A. Kobayashi, Novel glycosyl donors for enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis, 237<sup>th</sup> ACS National Meeting, 2009 年 3 月 24 日, Salt Lake City, USA
- ⑦ S. Shoda, One-pot chemo-enzymatic glycosylation, 236<sup>th</sup> ACS National Meeting, 2008 年 8 月 21 日, Philadelphia, USA
- [図書] (計 6 件)
- ① 正田晋一郎, シーエムシー出版, バイオ医薬品開発における糖鎖技術, 2011 年, 96-105
- ② 正田晋一郎, 小林厚志, 野口真人, NTS, 酵素利用技術体系, 2010 年, 408-413
- ③ 野口真人, 田中知成, 小林厚志, 正田晋一郎, シーエムシー出版, 複合糖質の化学と最新応用技術, 2009 年, 83-89
- ④ 正田晋一郎, 小林厚志, 野口真人, シーエムシー出版, セルロース利用技術の最先端, 2008 年, 77-82
- ⑤ S. Shoda, Wiley-VCH, Handbook of Chemical Glycosylation, 2008 年, 29-59
- ⑥ S. Shoda, Springer, Experimental Glycoscience, 2008 年, 169-172

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称: N-アセチルグルコサミンが  $\alpha$  で結合した糖誘導体の調製方法  
発明者: 藤田雅也、土田明子、正田晋一郎、田中知成、明石景泰  
権利者: 財団法人野口研究所  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-190079  
出願年月日: 2011 年 8 月 31 日  
国内外の別: 国内
- ② 名称: N-アセチルグルコサミンが  $\alpha$  で結合した糖誘導体の調製方法  
発明者: 藤田雅也、土田明子、正田晋一郎、田中知成  
権利者: 財団法人野口研究所  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-054874  
出願年月日: 2010 年 3 月 11 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2011/02/press20110208-2.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

正田 晋一郎 (SHODA SHIN-ICHIRO)  
東北大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 10143364