

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 1日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21750109

研究課題名（和文）直接活性化を用いる遊離糖鎖からの多糖の大量合成

研究課題名（英文）Preparative synthesis of polysaccharide by using direct activation method

研究代表者

野口 真人 (NOGUCHI MASATO)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：10400285

研究成果の概要（和文）：

均一な構造を持つ人工合成多糖の大量合成を目的として、原料であるモノマーの合成と、多糖合成反応である酵素触媒重合反応についての検討を行った。モノマー合成では、キシラン合成用モノマーを原料から一段階で合成することに成功し、モノマーを1.8g程度得ることができた。また、キチン合成用モノマーであるオキサゾリン誘導体の合成を、新規脱水縮合剤を用いることで、原料から一段階・好収率で得られる方法を確立し、引き続き酵素触媒重合反応が、モノマーの精製を行わずに進行することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To obtain the polysaccharide consisting of definite structure, a preparative synthetic method for monomer and enzymatic polymerization reaction were investigated. We have achieved direct synthesis of monomer substrate from free saccharide and successively obtained 1.8 g amounts of monomer. We have also developed a novel condensing agent for the direct synthesis of oxazoline derivative in sufficient yield. One-pot polycondensation reaction occurred by using of novel condensing agent and chitinase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：酵素触媒重合反応，多糖合成，活性化糖誘導体，大量合成

1. 研究開始当初の背景

人工合成した多糖は構造が明確であり純粋な生成物であることから、多糖の化学的・物理的な特性を評価する標準試料として重要である。また、天然から得られる多糖とは結晶形が異なるものが得られる可能性があり、生分解性の新素材としても有望である。このため、大量合成法の確立が望まれている。

しかし、化学合成法による多糖の合成では、ヒドロキシ基の保護を必要とするほか、重合後に行うヒドロキシ基の脱保護反応が不完全になりやすいことや、モノマーの合成に多段階のステップが必要であり、実験操作が煩雑であるなどの問題があった。その一方で、化学-酵素法による多糖の合成法は、化学合成法と比べて合成ステップが少なく済むほ

か、モノマーの状態ではヒドロキシ基が脱保護されているために、重合後の脱保護操作が無いことから、純粋な多糖が得られやすい特長がある。しかしながら、この方法においてもモノマーとして用いられている糖オキサゾリン誘導體やフッ化グリコシルなどの活性化糖誘導體モノマーの合成には、糖に多数存在するヒドロキシ基の保護と脱保護を含む数段階のステップを経なければならない。従って、これらの方法では煩雑な操作が必要のため、多糖の人工合成による大量合成法は確立しておらず、簡便なモノマーの調製法が求められている。

2. 研究の目的

上記の問題を解決する方法の一つとして、化学-酵素法による多糖合成において、活性化糖誘導體であるモノマーの合成を簡素化し、大量合成可能な技術を確認する方法が挙げられる。そこで、本研究課題では、遊離糖鎖から活性化糖誘導體モノマーを一段階で大量合成することにより、モノマーの簡便な調製法を確認し、また、引き続き酵素触媒重合反応をもワンポットで行うことにより、さらなる効率的な合成法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 活性化糖誘導體モノマーの簡易合成法の確立とその重合

これまでの研究成果から、多糖合成を大量に行うためには、糖モノマーの簡便な合成法の確立が必要である。そこで、大量合成可能な活性化糖誘導體の効率的な合成法の開発を行った。活性化糖誘導體として、脱離基を持たず、分子内脱水縮合反応で得られる糖オキサゾリン誘導體と、脱離基を有する活性化糖誘導體の両方の基質の合成を行った。

(2) 活性化糖誘導體モノマーの重合

上記(1)で確立した活性化糖誘導體の一段階合成法を基にモノマーの調製を行い、酵素触媒重合反応の検討を行った。また、原料となる遊離糖鎖の活性化とそれに引き続き酵素触媒重合反応を連続して行うワンポット合成法の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 活性化糖誘導體モノマーの簡易合成法の確立とその重合

① 糖オキサゾリン誘導體合成用新規脱水縮合剤の開発

既に研究代表者は、水溶性脱水縮合剤である 2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド(DMC)を用いることで糖オキサゾリン誘導體の水溶液中での一段階での合成を達成している。しかし、糖オキサゾリン誘導體を好収率で合成するためには、過剰量の DMC を必要とした。これにより、オキサゾリ

ン誘導體の精製が煩雑になることから、脱水縮合剤の使用量を減らすことのできる新規脱水縮合剤の開発を行った。DMC が縮合反応に用いる際に過剰量必要である理由を、DMC の自発加水分解であると考え、DMC を安定化する構造の検討を行った。また、DMC が強い潮解性を示すことから、潮解性の改善も必要である。検討の結果、DMC の骨格に疎水性基を修飾することにより、安定性と潮解性の改善が可能であると考え、2-クロロ-1,3-ジメチルベンゾイミダゾリニウムクロリド(CDMBI)を *o*-フェニレンジアミンから合成し(図 1)、その脱水縮合剤としての性質を調べた。合成した CDMBI は明確な潮解性を示さないが、水溶性の安定な固体であることが分かった。

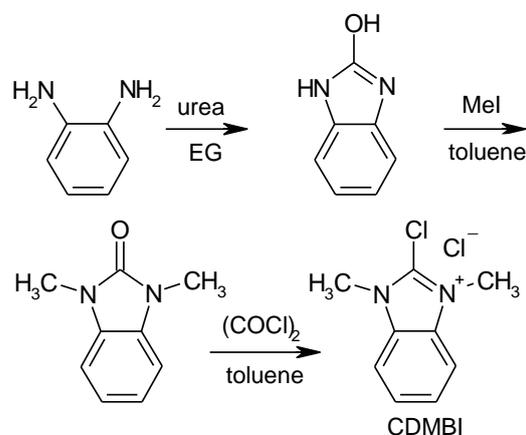


図 1 CDMBI の合成

合成した CDMBI を用いて、*N*-アセチルグルコサミンから、対応するオキサゾリン誘導體への変換反応を行った。条件を検討した結果、トリエチルアミンなどの有機塩基のほか、リン酸三ナトリウムや炭酸ナトリウムを塩基として用いた場合に収率よく対応するオキサゾリン誘導體へと導くことができた(図 2, 表 1)

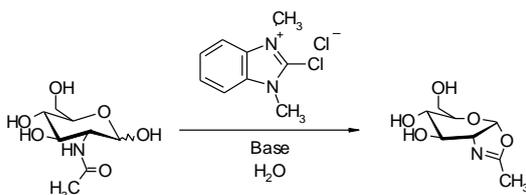


図 2 *N*-アセチルグルコサミンのオキサゾリン誘導體の一段階合成

また、基質の適用範囲の検討を行ったところ、*N*-アセチルグルコサミンのオリゴマーや、ラクト-*N*-ビオースなどの中性オリゴ糖のほか、硫酸エステルを有する糖やシアル酸を含むオリゴ糖への適用が可能であることが分かった(表 2)。DMC を利用する場合には大過剰量の縮合剤を必要とする基質が低濃度の条件においても、CDMBI を用いる場合は 5 当量で済むことが判明した。

表 1 CDMBI によるオキサゾリン誘導体の合成

Entry	CDMBI(eq.)	Base (eq.)	Time (h)	Yield (%) ^a
1	3	Et ₃ N (7.5)	1	79
2	3	EtMe ₂ N (15)	45	58
3	3	Na ₃ PO ₄ (7.5)	1	81
4	3	K ₃ PO ₄ 3H ₂ O (7.5)	1	76
5	3	Na ₂ CO ₃ (7.5)	1	64
6	3	K ₂ CO ₃ (7.5)	1	65
7	3	K ₂ CO ₃ (9)	1.5	68
8	5	K ₂ CO ₃ (12.5)	1.5	80
9	3	NaOH (7.5)	1	24

反応条件 ; GlcNAc 150 mM, 0 °C

^a determined by ¹H NMR

表 2 様々な基質でのオキサゾリン誘導体の合成

Entry	Saccharide (mM)	CDMBI (eq.)	Base (eq.)	Time (h)	Yield (%) ^a
1	GlcNAc6-sulfate (125)	5	K ₂ CO ₃ (15)	1	88
2	Lacto-N-biose (100)	3	Na ₃ PO ₄ (7.5)	1.5	93
3	(GlcNAc) ₂ (150)	3	Na ₃ PO ₄ (7.5)	2	89
4	(GlcNAc) ₂ (10)	5	Na ₃ PO ₄ (12.5)	1	90
5	(GlcNAc) ₃ (50)	5	Na ₃ PO ₄ (12.5)	2	87
6	(GlcNAc) ₅ (10)	5.2	Na ₃ PO ₄ (12.5)	10	82 ^b
7	Disialo-Oligosaccharide (50)	5	K ₃ PO ₄ (15)	2	91

反応条件 ; 0 °C

^a determined by ¹H NMR

^b 単離収率

② 4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン 2-イルβ-キシロビオシド (DMT-Xyl₂) の大量合成法の検討

既に研究代表者は、セロビオースを原料として用いる 4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン 2-イルβ-セロビオシド (DMT-Ce1) の合成を報告している。4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン 2-イル基を有するモノマーの汎用性を確認するために、DMT-Xyl₂ を合成し、その重合によるキシランの合成を試みた。キシロビオースを原料として、4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン 2-イル)メチルモルホリニウムクロリド (MDT-MM) を作用させることにより、DMT-Xyl₂ の生成を確認した。しかし、DMT-Ce1 の場合と異なり、DMT-Xyl₂ は再結晶による精製が不可能であったため、カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。

DMT-Xyl₂ は二段階のカラム精製を必要とするものの、1.58 g の粗精製キシロビオースから、1.0 g の DMT-Xyl₂ を得ることに成功した。また、更なるスケールアップにより、1.8 g の DMT-Xyl₂ の合成にも成功した。

(2) 活性化糖誘導体モノマーの重合

① 糖オキサゾリン誘導体を経由するワンポット重合反応

オキサゾリン誘導体の合成において、脱水縮合剤の使用量を低減することに成功したため、モノマー合成と引き続き酵素触媒重合反応をワンポットで行う、ワンポット重合反応の検討を行った。キシロビオースをモノマー前駆体として、CDMBI を 3 当量用いて、オキサゾリン誘導体へと変換した後、変異型キチナーゼ (*Bacillus circulans* WL-12 由来キチナーゼ A1 W433A 変異体) を入れて重合を行った。その結果、重付加反応が進行し、MALDI-TOF MS の結果から 7 糖までの生成を確認した。

② ヘミセルラーゼ製剤による DMT-Xyl₂ の重合反応の検討

合成した DMT-Xyl₂ に対して高い重合活性を示す酵素製剤のスクリーニングを行った。その結果、*Trichoderma viride* 由来の酵素製剤であるオノズカ RS に強い重合活性を有する酵素が存在することが判明した。50%のアセトニトリルを含む pH 5.0 の酢酸緩衝液中で重合反応を行った結果、反応液の MALDI-TOF MS からは、20 糖までのキシランが生成していることを確認した (図 3 上)。

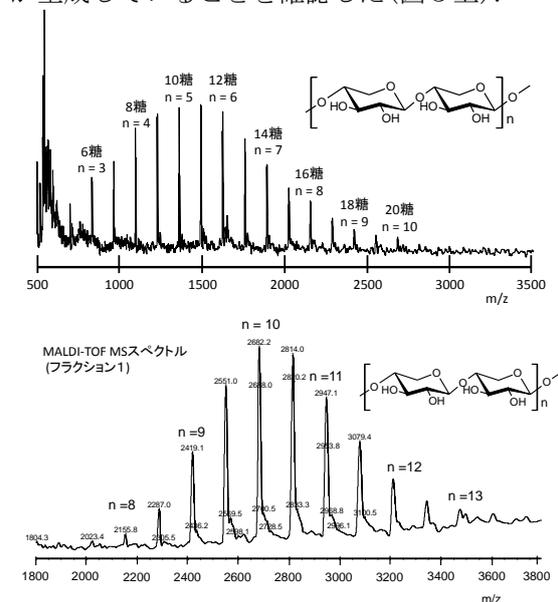


図 3 DMT-Xyl₂ の重合反応生成物の MALDI-TOF MS (上: 精製前, 下: SEC 精製後)

また、SEC カラムによる分離を行った結果、高重合度の画分では、26 糖までのキシランの生成を確認した (図 3 下)。

さらに、生成したキシランの ^{13}C NMR (DEPT 135) の結果から、1-4 結合したキシランであることが分かり、構造明確なキシランの合成に成功した(図4)

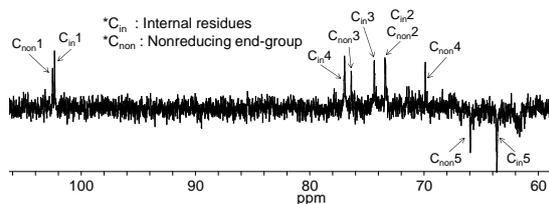


図4 重合反応で得られたキシランの DEPT 135 NMR

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 9 件)

① Im, D.; Kimura, K.; Hayasaka, F.; Tanaka, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S.; Miyazaki, K.; Wakagi T.; Fushinobu, S., Crystal Structures of Glycoside Hydrolase Family 51 α -L-Arabinofuranosidase from *Thermotoga maritime*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2012**, *76*, 423-428. 査読有

② Yoshida, N.; Noguchi, M.; Tanaka, T.; Matsumoto, T.; Aida, N.; Ishihara, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S., Direct dehydrative pyridylthio-glycosidation of unprotected sugars in aqueous media using 2-Chloro-1,3-dimethylimidazolinium chloride as a condensing agent. *Chemistry an Asian Journal* **2011**, *6*, (7), 1876-1885. 査読有

③ Tanaka, T.; Noguchi, M.; Watanabe, K.; Misawa, T.; Ishihara, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S., Novel dialkoxytriazine-type glycosyl donors for cellulase-catalysed lactosylation. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8* (22), 5126-5132. 査読有

④ Kobayashi, A.; Tanaka, T.; Watanabe, K.; Ishihara, M.; Noguchi, M.; Okada, H.; Morikawa, Y.; Shoda, S., 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*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20* (12), 3588-3591. 査読有

⑤ Umekawa, M.; Higashiyama, T.; Koga, Y.;

Tanaka, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S.; Huang, W.; Wang, L. X.; Ashida, H.; Yamamoto, K., 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. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2010**, *1800* (11), 1203-1209. 査読有

⑥ Tanaka, T.; Noguchi, M.; Ishihara, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S.-i., Synthesis of Non-natural Xyloglucans by Polycondensation of 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl Oligosaccharide Monomers Catalyzed by Endo- β -1,4-glucanase. *Macromolecular Symposia* **2010**, *297* (1), 200-209. 査読有

⑦ Tanaka, T.; Kobayashi, A.; Noguchi, M.; Kimura, K.; Watanabe, K.; Shoda, S., Dimethoxy Triazine Glycosides as New Glycosyl Donors for Chemo-enzymatic Synthesis of Oligosaccharides. *Journal of Applied Glycoscience* **2009**, *56*, 83-88. 査読有

⑧ Tanaka, T.; Matsumoto, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S., Direct Transformation of Unprotected Sugars to Aryl 1-Thio-beta-glycosides in Aqueous Media Using 2-Chloro-1,3-dimethylimidazolinium Chloride. *Chemistry Letters* **2009**, *38* (5), 458-459. 査読有

⑨ Tanaka, T.; Nagai, H.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S., One-step conversion of unprotected sugars to beta-glycosyl azides using 2-chloroimidazolinium salt in aqueous solution. *Chemical Communications* **2009**, (23), 3378-3379. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① 野口 真人, “新規脱水縮合剤による水溶液中での糖オキサゾリン誘導体の一段階合成”, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 27 日, 横浜

② 野口 真人, “一段階で調製可能なキシロピオースモノマーの酵素的重縮合”, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月 27 日, 大阪

③ 野口 真人, “DMT 誘導体の酵素的 β -N-アセチルグルコサミンル化反応によるピロリ菌増殖抑制オリゴ糖の合成”, 日本化学

会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 11 日, 日本化学会第 91 春季年会(2011)講演予稿集(震災発生により予稿集発行で発表に代えられたものである)

④ 野口 真人, “水溶性脱水縮合剤を用いる遊離糖鎖からの多糖合成”, 化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日, 盛岡

⑤ M. Noguchi, “Practical Synthesis of Sugar Oxazoline Derivative in Water”, 25th International Carbohydrate Symposium, 2010 年 8 月 3 日, 幕張

⑥ 野口 真人, “オキサゾリン誘導体の直接合成を利用した遊離糖からの多糖合成”, 第 59 回高分子学会年次大会, 2010 年 5 月 26 日, 横浜

⑦ 野口 真人, “オキサゾリン誘導体の直接合成を活用した遊離糖からのワンポット配糖化反応”, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 28 日, 東大阪

⑧ 野口 真人, “脱水縮合剤を利用した水溶液中でのチオグリコシドの一段階合成”, 第 58 回日本応用糖質科学会平成 21 年度大会, 2009 年 9 月 16 日, 弘前

⑨ 野口 真人, “水溶液中における還元末端アノマー位の直接活性化と誘導化”, 第 29 回日本糖質学会年会, 2009 年 9 月 11 日, 高山

⑩ M. Noguchi, “Direct Synthesis of Sugar Oxazoline Derivatives in Water”, 15th European Carbohydrate Symposium, 2009 年 7 月 23 日, ウィーン

[図書] (計 1 件)

正田 晋一郎, 野口 真人, CMC 出版, バイオ医薬品開発における糖鎖技術, 第 9 章 オキサゾリン基質中間体と糖タンパク質医薬品 p. 96-105 2010 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 真人 (NOGUCHI MASATO)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号 : 10400285

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号 :