

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655094

研究課題名（和文）水中での脱水縮合による多糖合成

研究課題名（英文）Synthesis of Polysaccharides by Dehydrative Condensation in Water

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）：多糖類を位置および立体選択的に合成する新しい手段として、ジメチルトリアジン誘導体の水中における酵素的縮合反応を開発した。キシロビオースに水中で脱水縮合剤 DMT-MM を反応させることにより、アノマー位を DMT で活性化した糖供与体を調製した。この供与体にセルラーゼあるいはキシラナーゼを作用させたところ、重縮合反応が進行し、対応する人工キシロオリゴ糖ならびにキシランの混合物を、完全な選択性で与えた。

研究成果の概要（英文）：A novel monomer, 4,6-dimethoxy 1,3,5-triazin 2-yl xylobioside, was directly synthesized from xylobiose in water. Enzymatic polycondensation of the resulting monomer proceeded by using cellulase preparation or partially purified xylanase as an enzyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：高分子合成、多糖、重縮合、キシラン、キトオリゴ糖、セルラーゼ、キチナーゼ、脱水縮合剤

1. 研究開始当初の背景

多糖は、自然が作り上げた芸術品であり、大変美しい形をしている。セルロースの構造を眺めれば、その骨格がいかにか合目的に構築されているかに気づく。多糖の精緻な構造を水中で人工的に構築することは、高分子合成分野における挑戦的な課題である。本来親水性のオリゴ糖・多糖合成には水溶媒が適している。しかし、従来の配糖化反応では有機溶媒や保護基が多用されてきた。昨今、分子間脱水反応を水中で達成したかのような研究が散見される。しかし、それらは微視的な疎水場中で脱水反応を行っているに過ぎない。真の意味で水中での脱水縮合を行うために

は、既存の枠に捉われない新しいプロセスの構築が必要である。申請者のグループは、水中における糖の直接活性化をいち早く報告した。その過程で本挑戦的萌芽研究の着想に至った。

2. 研究の目的

我々は、脱水縮合剤 DMC を用い、水中で 2-アセタミド-2-デオキシ糖の分子内環化が起き、糖オキサゾリンが得られることを見出した (*J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 2210)。この事実は、分子内であれば、水中における脱水がきれいに進むことを示すものであった。そこで、分子内脱水反応と付加反応の組み合わせ

により、“二つの分子から水中で水をとる”という熱力学的に不利なプロセスを実現できるという着想に至った。具体的に、本研究では、分子内脱水の促進剤として水溶性脱水縮合剤である DMC および DMT-MM を、また、付加の補助剤として酵素を使用する。ここで酵素は、“触媒ではなく補助剤”という発想の転換が行われる。本研究は、従来不可能と考えられてきた水中での脱水による多糖合成を実現ことを目的とした。

3. 研究の方法

初年度は糖の水中での分子内脱水による糖オキサゾリンならびに DMT 糖供与体の生成条件を徹底的に調査し、次年度でこれらモノマーの酵素補助剤による多糖合成を達成する。具体的な標的多糖として、キトオリゴ糖ならびにキシロオリゴ糖、キシランの合成を達成する。

4. 研究成果

(1) 水中における脱水反応

従来少なくとも4段階を必要としてきた配糖体(オリゴ糖・多糖)の合成を、水中においてわずか一段階で合成する画期的な高分子合成プロセスを開発した。このようなアイデアに基づく多糖合成はこれまで皆無であった。このようなプロセスが従来存在しえなかった理由は、水中で無保護糖を一段階で糖供与体へ変換することが不可能と考えられてきたからである。我々は、各種水溶性脱水縮合剤を用いて、2-アセタミド-2-デオキシ糖から水中で対応する糖オキサゾリンや糖トリアジン誘導体を直接合成する手法を見出した。すなわち、脱水反応をプロセスとして捕らえるという全く新しいアイデアに立った原子効率の高い化学-酵素法を確立した。

これまでの糖鎖合成の常識は、合成プロセスのどこかで保護基の導入が必須であり、活性中間体の単離が必要なことであった。また、糖とアルコールから直接脱水縮合を行うためには、有機溶媒の使用が不可欠と考えられてきた。本研究では、このような常識を打ち破り、独自に開発してきた水中における活性中間体の合成という基盤技術を、高分子化学の観点から、より精巧な重合プロセスへと発展させた。

(2) 酵素触媒を補助剤とする重合反応

配糖化反応のステップは、本研究の根幹をなす部分であるので、以下の3つの観点から詳細な検討を行った。

- ① 環状の活性糖供与体あるいは DMT 供与体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)の設定

その結果、本研究により、エリシター活性を示す有用オリゴ糖であるキトオリゴ糖(重合度7)、キシロオリゴ糖、ならびに人工キシランを、出発原料から保護基を全く用いることなく、水中で製造するプロセスを開発することができた。

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10件)

1. N. Yoshida, T. Fujieda, A. Kobayashi, M. Ishihara, M. Noguchi, S. Shoda, Direct Introduction of Detachable Fluorescent Tag into Oligosaccharides, *Chem. Lett.*, 査読有, 印刷中
DOI : 10.1246/cl.130379
2. T. Tanaka, H. Fukuhara, S. Shoda, Y. Kimura, Facile Synthesis of Oligosaccharide-Poly(L-Lactide) Conjugates Forming Nanoparticles with Saccharide Core and Shell, *Chem. Lett.*, 査読有, **42**, 2013, 197-199.
DOI : 10.1246/cl.2013.179
3. 吉田尚生, 正田晋一郎, オリゴ糖還元末端の蛍光ラベル化, *Cellulose Commun.*, 査読無, **20**, 2013, 20-24.
4. 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 β -D-Glycosaminides: Novel Substrates for Transglycosylation Reaction Catalyzed by Exo- β -D-glucosaminidase from *Amycolatopsis orientalis*, *J. Carbohydr. Chem.*, 査読有, **31**, 2012, 634-646.
DOI : 10.1080/07328303.2012.698437
5. M. Nougchi, T. Fujieda, W. C. Huang, M. Ishihara, A. Kobayashi, S. Shoda, A Practical One-Step Synthesis of 1,2-Oxazoline Derivatives from Unprotected Sugars and Its Application to Chemoenzymatic

- β -*N*-Acetylglucosaminidation of Disialo-oligosaccharide, *Helv. Chim. Acta*, 査読有, **95**, 2012, 1928-1936.
6. N. Yoshida, T. Tanaka, M. Noguchi, A. Kobayashi, K. Ishikura, T. Ikenuma, H. Seno, T. Watanabe, M. Kohri, S. Shoda, One-pot Chemoenzymatic Route to Chitoheptaose via Specific Transglycosylation of Chitopentaose-Oxazoline on Chitinase-template, *Chem. Lett.*, 査読有, **41**, 2012, 689-690.
DOI : 10.1246/cl.2012.689
 7. 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 α -linked *N*-acetylglucosaminyl galactose disaccharide unit from gastric mucin, *Chem. Commun.*, 査読有, **48**, 2012, 5560-5562.
DOI : 10.1039/C2CC30946G
 8. 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 α -L-Arabinofuranosidase from *Thermotoga maritime*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, **76**, 2012, 423-428.
DOI : 10.1271/bbb.110902
 9. M. Kiyohara, T. Nakatomi, S. Kurihara, S. Fushinobu, H. Suzuki, T. Tanaka, S. Shoda, M. Kitaoka, T. Katayama, K. Yamamoto, H. Ashida, α -*N*-Acetylgalactosaminidase from Infant-associated *Bifidobacteria* Belonging to Novel Glycoside Hydrolase Family 129 is Implicated in Alternative Mucin Degradation Pathway, *J. Biol. Chem.*, 査読有, **287**, 2012, 693-700.
DOI : 10.1074/bcM111.277384
 10. N. Yoshida, M. Noguchi, T. Tanaka, T. Matsumoto, N. Aida, M. Ishihara, A. Kobayashi, S. Shoda, Direct Dehydrative Pyridylthio Glycosylation of Unprotected Sugars in Aqueous Media Using 2-Chloro-1,3-dimethylimidazolium Chloride as a Condensing Agent, *Chem. Asian J.*, 査読有, **6**, 2011, 1867-1885.
DOI : 10.1002/asia.201000896
- [学会発表] (計 16 件)
1. 小林厚志, 瀬野宗, 黄偉峻, 野口真人, 片山高嶺, 正田晋一郎, 糖オキサゾリンを糖供与体とする Lacto-*N*-tetraose の酵素合成, 日本農芸化学会, 2013 年, 3 月 26 日, 仙台
 2. 吉田尚生, 酒井謙介, 小林厚志, 正田晋一郎, アマドリ転位反応を経由する化学-酵素法により生成した人工糖タンパク質の解析, 日本農芸化学会, 2013 年, 3 月 26 日, 仙台
 3. 斎藤幸恵, 高木優香, 野口真人, 正田晋一郎, In situ で発生するルイス酸により促進されるグリコシル化, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年, 3 月 23 日, 草津
 4. 野口真人, 梶友祐, 正田晋一郎, アミノ糖の一段階活性化を用いるグリコシル化, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年, 3 月 23 日, 草津
 5. 中谷健一, 野口真人, 正田晋一郎, 水中における α -フッ化糖の一段階合成, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年, 3 月 23 日, 草津
 6. 佐藤希美, 石原正規, 野口真人, 正田晋一郎, アノマー位を先に活性化する新規配糖化プロセス, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年, 3 月 23 日, 草津
 7. 正田晋一郎, 高木優香, 斎藤幸恵, 石原正規, 野口真人, 保護基を使用しないオリゴ糖の配糖化, 日本応用糖質科学会平成 24 年度大会, 2012 年 9 月 19 日, 府中
 8. 土田明子, 藤田雅也, 森昌子, 後藤浩太郎, 弘瀬友里子, 大隅賢二, 野口真人, 正田晋一郎, 芦田久, 水野真盛, バクテロイデス菌由来 α -*N*-Acetylglucosaminidase への糖鎖結合モジュール(CBM)付与効果, 第 31 回日本糖質学会年会, 2012 年 9 月 19 日, 鹿児島
 9. 野口真人, 藤枝司, 小林厚志, 正田晋一郎, 糖オキサゾリン誘導体の一段階合成を活用したワンポット配糖化反応, 第 31 回日本糖質学会年会, 2012 年 9 月 17 日, 鹿児島
 10. 李格非, 野口真人, 正田晋一郎, Synthesis of Oligosaccharide-based Glycolipids under Hydrogenolytic Conditions, 平成 24 年度化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 16 日, 秋田
 11. 大築貴洋, 野口真人, 小林厚志, 正田晋一郎, アジ化糖を用いた固体表面の修飾, 平成 24 年度化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 16 日, 秋田
 12. 斎藤幸恵, 高木優香, 野口真人, 正田晋一郎, 平成 24 年度化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 16 日, 秋田

13. 酒井謙介, 吉田尚生, 小林厚志, 正田晋一郎, マイクロリアクターを利用した糖オキサゾリン誘導体の合成, 平成 24 年度化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 16 日, 秋田
14. 佐藤希美, 野口真人, 正田晋一郎, シリル保護された糖トリアジン誘導体を供与体とする配糖体合成, 平成 24 年度化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 15 日, 秋田
15. 中谷健一, 野口真人, 正田晋一郎, 水溶液中での無保護糖の一段階フッ素化, 平成 24 年度化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 15 日, 秋田
16. 山口祐太, 野口真人, 小林厚志, 正田晋一郎, 酵素的重縮合による人工キシランの合成, 平成 24 年度化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 15 日, 秋田

[図書] (計 2 件)

1. 野口真人, 正田晋一郎, 化学同人, 糖化学者の挑戦 - 分子量のそろった糖タンパク質をつくる -, 化学, **67**, 2012 年, 68-69.
2. 正田晋一郎, 野口真人, 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.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: N-アセチルグルコサミンが α 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

[その他]

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~poly/>

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