

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25620177

研究課題名(和文) 高機能高分子材料として期待されるキチン/キトサン立体異性体多糖の酵素合成

研究課題名(英文) Enzymatic Synthesis of Chitin/Chitosan Stereoisomers as Candidates for Functional Polymeric Materials

研究代表者

門川 淳一 (KADOKAWA, Jun-ichi)

鹿児島大学・理工学域工学系・教授

研究者番号：30241722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、耐熱性ホスホリラーゼによるグルコサミン1-リン酸(GlcN-1-P)の酵素触媒重合を利用してキチン/キトサン立体異性体多糖の合成を検討した。GlcN-1-Pを用いた酵素反応を行ったところ、キトサン立体異性体に対応するオリゴ糖の生成が確認された。さらに、反応を阻害していると考えられた無機リン酸を沈殿させることで反応が促進され、高重合度のキトサン立体異性体多糖が得られ、N-アセチル化によりキチン立体異性体多糖へと変換することもできた。さらに、グルコース1-リン酸とGlcN-1-Pをモノマーに用いた耐熱性ホスホリラーゼによる酵素触媒共重合により非天然型グルコサミノグルカンが得られた。

研究成果の概要(英文)：This study performed the synthesis of chitin/chitosan stereoisomers by thermostable phosphorylase-catalyzed enzymatic polymerization. Phosphorylase catalyzes the enzymatic polymerization of α -D-glucose 1-phosphate (Glc-1-P) as a monomer to produce amylose with liberating inorganic phosphate. Because of loose specificity for the recognition of substrates, in this study, the thermostable phosphorylase-catalyzed enzymatic polymerization of α -D-glucosamine 1-phosphate (GlcN-1-P) as an analogue monomer was achieved under the conditions for removal of inorganic phosphate from the reaction media to give a non-natural aminopolysaccharide, that is, a chitosan stereoisomer. The product was further converted into a chitin stereoisomer by N-acetylation. The thermostable phosphorylase-catalyzed enzymatic copolymerization of Glc-1-P and GlcN-1-P as comonomers was also carried out to produce a non-natural glucosaminoglycan.

研究分野：高分子化学

キーワード：キチン/キトサン 酵素触媒重合 立体異性体 ホスホリラーゼ 非天然型

1. 研究開始当初の背景

自然界においてタンパク質、核酸、多糖などの生体高分子は生物の生命活動に対して重要な役割を担っている。天然多糖は、自然界での役割に応じて構造多糖とエネルギー多糖に大別される。セルロースやキチンなどの構造多糖は生物の構造体の主成分であり、わずかな構造の違いで多種多様な生物の構造体形成を担っている。例えば、キチンは、セルロース中のグルコース残基の2位水酸基をアセタミド基に変えた構造を有しており（グルコサミン残基）、構造の違いはわずかであるにも関わらず生体内での構造体形成の役割は大きく異なる（植物の細胞壁と節足動物の甲殻）。また、キトサンはキチンから誘導されるアミノ多糖である。一方、エネルギーの貯蔵物質であるエネルギー多糖は、グルコース供給のみを担うため多様な構造は必要としない。このため、エネルギー多糖としてはデンプン、アミロース、グリコーゲンなどが存在しているのみであり、基本構造は同じである（ α -グルカン）。また、 α -グルカンとセルロース（ β -グルカン）は立体異性体であり、グルコース単位どうしを結びつける結合の立体が異なるだけで自然界での役割が大きく異なることから、多糖中の構成単位や結合様式をわずかに変えるだけで新規な機能を有する多糖が得られると考えられる。このようなことから、自然界に存在しない構成単位と結合様式の組み合わせによる非天然型多糖の構築ができれば、新しい高機能高分子材料として期待できる。

2. 研究の目的

アミロースはエネルギー貯蔵以外に、らせん構造に由来するホスト化合物として機能する高分子として知られている。アミロースらせんでは全ての水酸基がらせん外部に位置しているため、内部に疎水空間を有し、疎水性化合物をらせん空間に取り込み包接錯体を形成することができる。上述のセルロースとキチンのように多糖は構造のわずかな違いで性質や機能が大きく異なる。しかし、この関係に対応するアミロースのアミノ誘導体は天然には存在しない。もし、アミロースのアミノ誘導体（キチン/キトサン立体異性体多糖）が構築できれば、らせん構造を持つ新規な機能性アミノ多糖として期待される。しかし、従来の有機合成化学的手法ではキチン/キトサン立体異性体多糖骨格は全く得られていない。これはグルコサミンどうしを合成化学的に α -結合でつなげるのが困難なためであり、この繰り返しによる多糖合成は事実上不可能である。そこで、本研究では糖鎖合成に用いられる酵素のうち研究代表者らによって精力的に研究が展開され、糖鎖合成の有力な手法として注目されているホスホリラーゼを用いた酵素反応によってキチン/キトサン立体異性体多糖の合成を検討した。

ホスホリラーゼは α -グルカン合成に有用な酵素であり、グルコース 1-リン酸（Glc-1-P）を認識して連続的にグルコース残基を α -結合で転移させる重合を触媒し、 α -グルカン（アミロース）を得ることができる（図1）¹⁾。酵素は基質特異性を有し特定の基質のみを認識するが、酵素によっては特異性の緩さがあり、天然型基質と構造の似たアナログ基質を認識する場合がある。近年までホスホリラーゼの基質特異性については詳細には解明されていなかったが、研究代表者の研究により、ホスホリラーゼがある程度の基質特異性の緩さを有し、G-1-P アナログ基質を認識することを見出している²⁾。例えばホスホリラーゼがグルコサミン 1-リン酸（GlcN-1-P）を基質として認識し、グルコサミン残基の転移反応を触媒することを発見した³⁾。しかし、最も一般的な馬鈴薯由来のホスホリラーゼを用いた場合は、グルコサミン残基一つの転移が起こるだけである。

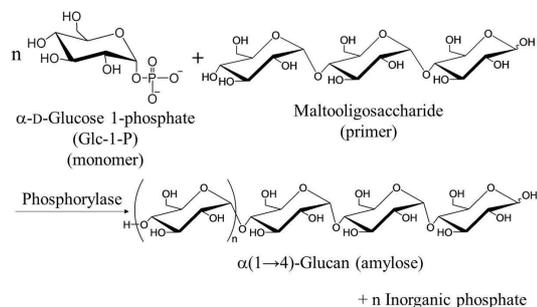


図1. Glc-1-P のホスホリラーゼ酵素触媒重合

一方、馬鈴薯以外の種々の由来のホスホリラーゼが知られており、研究代表者は、耐熱性細菌由来のホスホリラーゼ (*Aquifex aeolicus* VF5) が他のホスホリラーゼと異なる基質特異性を示すことを研究で明らかにしている。そこで、耐熱性ホスホリラーゼを用いた GlcN-1-P からの連続的糖転移反応という、触媒的にも基質的にも全く新しい概念に基づく反応を開拓することでキチン/キトサン立体異性体多糖合成を検討した。既に研究代表者の予備的検討により、耐熱性ホスホリラーゼが複数の GlcN 残基を転移させるという知見を得ており、詳細な反応検討によりキトサン立体異性体多糖の合成を行った⁴⁾。また、このキトサン立体異性体多糖の *N*-アセチル化によりキチン立体異性体多糖への変換も行った。さらに、Glc-1-P/GlcN-1-P をモノマーに用いるホスホリラーゼ酵素触媒共重合を行い、非天然型アミノ多糖（グルコサミノグルカン）の合成も検討した⁵⁾。

3. 研究の方法

(1) モノマーに GlcN-1-P、プライマーにマルトトリオース (Glc₃) を用いて種々の条件下、耐熱性ホスホリラーゼによる酵素触媒重合を行った。生成物を単離し、MALDI-TOF、¹H NMR 測定から構造を解析した。

(2) 酵素触媒生成物の無水酢酸による *N*-

アセチル化を行い、キチン立体異性体多糖の合成を検討した。

(3) Glc-1-P/GlcN-1-P をコモノマーに用いるホスホリラーゼ酵素触媒共重合を行い、非天然型グルコサミノグルカンの合成を検討した。

4. 研究成果

まず、GlcN-1-P を糖供与体、Glc₃ を糖受容体に用いる耐熱性ホスホリラーゼによるグルコサミニル化反応を行った。反応は、酢酸緩衝液 (pH 6.2) 中に Glc₃、10 当量の GlcN-1-P および耐熱性細菌由来ホスホリラーゼを加えて 40 °C で 2 日間攪拌することで行った。反応終了後、反応液を凍結乾燥し得られた粗生成物をグルコアミラーゼで処理後、無水酢酸を用いて *N*-アセチル化した生成物の HPLC 測定から、4 糖~8 糖に由来すると思われるオリゴ糖ピークが観測された。また MALDI-TOF MS 測定を行ったところ、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基を複数有するオリゴ糖に対応する分子量ピークが確認された。以上のことから、GlcN-1-P を糖供与体に用いる耐熱性ホスホリラーゼによる酵素的グルコサミニル化反応では連続的な GlcN 残基の転移が起こることが分かった。しかし、酢酸緩衝液中では 5 残基程度の転移は起こるが、それ以上の重合度を有するオリゴ糖を得ることは困難であった。これはホスホリラーゼが反応によって生成する無機リン酸を取り込むことにより、さらなる反応が阻害されているためと考えられた。

そこで、無機リン酸を反応系から沈殿として除去することでさらなる転移反応すなわち耐熱性ホスホリラーゼ酵素触媒共重合を進行させることを試みた。無機リン酸はアンモニウムイオン及びマグネシウムイオンとともに難溶性の MgNH₄PO₄ 塩を形成することが報告されている⁶⁾。そこで無機リン酸を沈殿により除去させるため、MgCl₂ を溶解させたアンモニア緩衝液(pH 8.5)を用いて反応を行った。反応は、MgCl₂ 含有アンモニア緩衝液にプライマーのマルトトリオース(Glc₃)、Glc₃ に対して 30 当量の GlcN-1-P を溶解させ、耐熱性ホスホリラーゼを加えて 40 °C で 7 日間行った (図 3)。その結果、反応の進行に伴い沈殿物が生成したことから反応の促進が示唆された。そこで、生成した沈殿物をろ別し、その重量から算出したモノマー転化率は 86.9 %であった。また生成物を単離するため、ろ液に強塩基性のイオン交換樹脂を加えて未反応の GlcN-1-P を除去後、メタノールから再沈殿を行うことで生成物を収率 61.8%で単離した。単離した生成物の ¹H NMR 測定結果より、α-グルコシド由来のシグナルに加えて α-グルコサミニド由来および GlcN 残基 2 位のシグナルが観測されたことから生成物がキトサン立体異性体多糖であることが分かった。また α-グルコシド由来のアノマープロトンに対する α-グルコサミニド由来のアノ

マープロトンのシグナルの積分比から求めた GlcN 残基の平均重合度は 20.2 であり、分子量は 3760 と算出された。

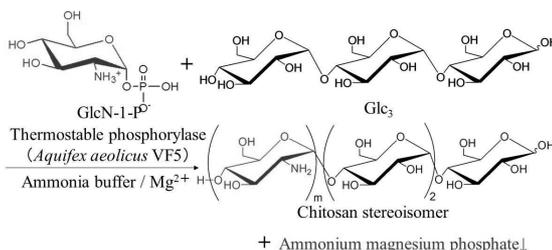


図 2. GlcN-1-P の耐熱性ホスホリラーゼ酵素触媒共重合によるキトサン立体異性体多糖の合成

つぎに無水酢酸を用いて、炭酸ナトリウム水溶液中で生成物の *N*-アセチル化を行いキチン立体異性体多糖への変換を行った。生成物の ¹H NMR 測定結果より、アセチル基由来のプロトンのシグナルが観測され、α-*N*-アセチルグルコサミニド由来のプロトンとの積分比が 1 : 3 であったことから、キチン立体異性体多糖が得られたことが分かった。

さらに Glc-1-P とそのアナログ基質である GlcN-1-P をコモノマーに用いた耐熱性ホスホリラーゼによる酵素触媒共重合を検討し、Glc 残基、GlcN 残基から構成される非天然型グルコサミノグルカンの合成を行った (図 3)。まず、MgCl₂ を溶解したアンモニア緩衝液中で、プライマーとして Glc₃、コモノマーとして Glc₃ に対して 5 当量の Glc-1-P、GlcN-1-P 及び耐熱性ホスホリラーゼを加え、40 °C で 7 日間酵素触媒共重合を行った。反応後、遠心分離により沈殿物を分離し、ろ液を凍結乾燥した。MALDI-TOF MS 測定の際に Glc 残基と GlcN 残基の分子量の差を明確にするために、得られた粗生成物の *N*-アセチル化を行い、MALDI-TOF MS 測定を行ったところ、Glc 残基および *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基が複数転移したオリゴ糖に対応する分子量ピークが観測されたことから、Glc-1-P、GlcN-1-P をコモノマーとする酵素触媒共重合の進行が確認された。また Glc₃ に対して 10 当量の Glc-1-P、30 当量の GlcN-1-P を用いて同様の反応を行い、反応終了後、遠心分離により沈殿物を分離し、その重量から算出されたモノマー転化率は 95.0 %であった。上澄みを凍結乾燥後、得られた粗生成物を強塩基性陰イオン交換樹脂で処理して未反応の Glc-1-P、GlcN-1-P を除去後、メタノールからの再沈殿により生成物を収率 29.7 %で単離した。単離した生成物の ¹H NMR 測定結果より、α-グルコシド、α-グルコサミニド由来のアノマープロトンおよび GlcN 残基 2 位のプロトンのシグナルが観測されたことから Glc 残基、GlcN 残基から構成されるグルコサミノグルカンが得られたことが分かった。また、還元末端由来のアノマープロトンと α-グルコシド由来、α-グルコサミニド由来のアノ

ノマープロトンのシグナルの積分比より Glc 残基と GlcN 残基の組成比は 1 : 2.35 であり、分子量は 6190 と算出された。

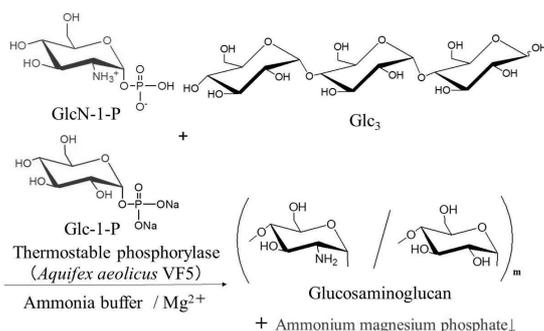


図 3. Glc-1-P/GlcN-1-P の耐熱性ホスホリラーゼ酵素触媒共重合による非天然型グルコサミノグルカンの合成

<引用文献>

- (1) G. Ziegast, B. Pfannemüller, *Carbohydr. Res.*, **1987**, *160*, 185-204.
- (2) J. Kadokawa, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **2013**, *25*, 57.
- (3) M. Nawaji, H. Izawa, Y. Kaneko, J. Kadokawa, *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343*, 2692.
- (4) J. Kadokawa, R. Shimohigoshi, K. Yamashita, K. Yamamoto, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 4336.
- (5) K. Yamashita, K. Yamamoto, J. Kadokawa, *Biomacromolecules.*, **2015**, *16*, 3989.
- (6) J. Borgerding, *J. Water Pollut. Control Fed.*, **1972**, *44*, 813.

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 3 件)

- ① Shin-ichiro Shoda, Hiroshi Uyama, Jun-ichi Kadokawa, Shunsaku Kimura, Shiro Kobayashi, *Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis*, *Chemical Reviews*, 査読有, **116**, 2307-2413 (2016), DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00472
- ② Kento Yamashita, Riko Shimohigoshi, Kazuya Yamamoto, Jun-ichi Kadokawa, *Synthesis of Non-Natural Heteroaminopolysaccharides by α -Glucan Phosphorylase-Catalyzed Enzymatic Copolymerization: $\alpha(1\rightarrow4)$ -Linked Glucosaminoglycans*, *Biomacromolecules*, 査読有, **16**, 3989-3994 (2016), DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01332
- ③ Jun-ichi Kadokawa, Riko Shimohigoshi, Kento Yamashita, Kazuya Yamamoto, *Synthesis of chitin and chitosan stereoisomers by thermostable α -glucan phosphorylase-catalyzed enzymatic polymerization of α -D-glucosamine 1-phosphate*, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有, **13**, 4336-4343 (2015), DOI: 10.1039/c5ob00167f

[学会発表] (計 28 件)

- ① Kento Yamashita, Riko Shimohigoshi, Kazuya Yamamoto, Jun-ichi Kadokawa, *Synthesis of chitin/chitosan stereoisomers by phosphorylase-catalyzed enzymatic polymerization*, Pacificchem2015, 2015 年 12 月 17 日, ホノルル (アメリカ合衆国)
- ② Kento Yamashita, Kazuya Yamamoto, Jun-ichi Kadokawa, *Synthesis of Non-Natural Aminopolysaccharides by Phosphorylase-Catalyzed Enzymatic Polymerization*, Japan-Taiwan Bilateral Workshop 2015, 2015 年 11 月 14 日, 大阪大学 (大阪府吹田市)
- ③ Kento Yamashita, Riko Shimohigoshi, Kazuya Yamamoto, Jun-ichi Kadokawa, *Enzymatic Synthesis of Chitin/Chitosan Stereoisomers by Phosphorylase-catalyzed Polymerization*, IUPAC 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, 2015 年 10 月 19 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ④ 高田祐成, 山元和哉, 門川淳一, ホスホリラーゼ酵素触媒重合による両性ブロック多糖の合成, 第 64 回高分子討論会, 2015 年 9 月 16 日, 東北大学 (宮城県仙台市)
- ⑤ 山下健人, 山元和哉, 門川淳一, ホスホリラーゼ酵素触媒重合による非天然型アミノ多糖の合成, 第 64 回高分子討論会, 2015 年 9 月 15 日, 東北大学 (宮城県仙台市)
- ⑥ 山下健人, 下吹越理子, 山元和哉, 門川淳二, ホスホリラーゼ酵素触媒共重合によるグルコサミノグルコグリカンの合成, 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 2015 年 06 月 27 日, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市)
- ⑦ 山下健人, 山元和哉, 門川淳一, ホスホリラーゼ酵素触媒共重合による非天然型アミノ多糖の合成, 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 29 日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑧ 山下健人, 下吹越理子, 山元和哉, 門川淳二, ホスホリラーゼ酵素触媒重合によるキトサン立体異性体多糖の合成, 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 29 日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑨ 高田祐成, 山元和哉, 門川淳一, 両性ブロック多糖の化学-酵素合成, 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 29 日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑩ 山下健人, 下吹越理子, 山元和哉, 門川淳二, 酵素触媒重合によるキトサン立体異性体多糖の合成, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 27 日, 日本大学 (千葉県船橋市)
- ⑪ 門川淳一, アナログ基質を用いた酵素反応による新規糖鎖の精密合成, 第 25 回繊維学会西部支部セミナー, 2015 年 2 月 6 日, 琉球大学 (沖縄県中頭郡西原町)
- ⑫ Riko Shimohigoshi, Kazuya Yamamoto, Jun-ichi Kadokawa, *Enzymatic Synthesis of*

Non-natural Aminopolysaccharide by Thermostable Phosphorylase Catalysis, The 10th SPSJ International Polymer Conference, 2014年12月3日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

⑬ Jun-ichi Kadokawa, Enzymatic Synthesis of Novel Functional Oligo- and Polysaccharides by Phosphorylase Catalysis, World Gene Convention-2014, 2014年11月14日、海口（中国）

⑭ 門川淳一、酵素で創る非天然型多糖・オリゴ糖～ホスホリラーゼのアナログ基質を用いた新規糖鎖の酵素合成～、第8回多糖の未来フォーラムシンポジウム、2014年11月6日、九州大学（福岡県福岡市）

⑮ 下吹越理子、山元和哉、門川淳一、耐熱性ホスホリラーゼによる非天然型アミノ多糖の酵素合成、第4回CSJ化学フェスタ、2014年10月15日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

⑯ Kento Yamashita, Riko Shimohigoshi, Kazuya Yamamoto, Jun-ichi Kadokawa, Thermostable phosphorylase-catalyzed enzymatic synthesis of chitosan stereoisomer, Japan-Taiwan Bilateral Workshop 2014, 2014年10月13日、台南（台湾）

⑰ 山下健人、下吹越理子、山元和哉、門川淳一、耐熱性ホスホリラーゼ触媒グルコサミンル化反応による α -グルコサミン鎖の合成と反応解析、第63回高分子討論会、2014年9月24日、長崎大学（長崎県長崎市）

⑱ Jun-ichi Kadokawa, Riko Shimohigoshi, Kazuya Yamamoto, Enzymatic synthesis of chitin/chitosan stereoisomers by thermostable phosphorylase catalysis, ACS 248th National Meeting, 2014年8月10日、サンフランシスコ（アメリカ合衆国）

⑲ 山下健人、下吹越理子、畑中大輔、山元和哉、門川淳一、耐熱性ホスホリラーゼによるキトサン立体異性体糖鎖の酵素合成、セルロース学会第21回年次大会、2014年7月17日、鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）

⑳ Riko Shimohigoshi, Kazuya Yamamoto, Jun-ichi Kadokawa, Enzymatic Synthesis of Non-natural α -Glucosamine Chains by Thermostable Phosphorylase Catalysis, 2014 IUPAC World Polymer Congress, 2014年7月10日、チェンマイ（タイ）

㉑ 下吹越理子、山元和哉、門川淳一、耐熱性ホスホリラーゼによる α -グルコサミン鎖の酵素合成、第51回化学関連支部合同九州大会、2014年6月28日、北九州国際会議場（福岡県北九州市）

㉒ 山下健人、畑中大輔、下吹越理子、山元和哉、門川淳一、耐熱性ホスホリラーゼによる非天然型アミノ糖鎖の酵素合成、平成26年度繊維学会年次大会、2014年6月12日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

㉓ 下吹越理子、山元和哉、門川淳一、耐熱性ホスホリラーゼによる連続的グルコサミン

ル化反応を利用した α -グルコサミン鎖の合成、第63回高分子学会年次大会、2014年5月28日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

㉔ 下吹越理子、山元和哉、門川淳一、耐熱性ホスホリラーゼを用いる α -グルコサミン鎖の酵素合成、日本化学会第94春季年会、2014年3月30日、名古屋大学東山キャンパス（愛知県名古屋市）

㉕ Jun-ichi Kadokawa, Enzymatic synthesis of chitin/chitosan stereoisomers, Japan-Taiwan Bilateral Workshop 2013, 2013年10月4日、鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）

㉖ Jun-ichi Kadokawa, Phosphorylase-catalyzed enzymatic glycosylations using analogue substrates toward synthesis of chitin/chitosan stereoisomers, 15th Asian Chemical Congress, 2013年8月22日、シンガポール（シンガポール）

㉗ 下吹越理子、竹本康高、山元和哉、門川淳一、耐熱性ホスホリラーゼによるキトサン立体異性体オリゴ糖の酵素合成、第50回化学関連支部合同九州大会、2013年7月6日、北九州国際会議場（福岡県北九州市）

㉘ 門川淳一、竹本康高、山元和哉、耐熱性ホスホリラーゼによる酵素反応を利用したキチン/キトサン立体異性体糖鎖の合成、第62回高分子学会年次大会、2013年5月30日、京都国際会館（京都府京都市）

〔図書〕（計 1件）

① Jun-ichi Kadokawa, American Chemical Society, *Green Polymer Chemistry: Biobased Materials and Biocatalysis*, ACS Symposium Series 1192 (2015) pp. 87-99

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門川 淳一 (KADOKAWA, JUN-ICHI)
鹿児島大学・理工学域工学系・教授
研究者番号：30241722

(2) 研究分担者

山元 和哉 (YAMAMOTO, KAZUYA)
鹿児島大学・理工学域工学系・准教授
研究者番号：40347084