

平成23年 3月31日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 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

研究成果の概要(和文)：高分子及び界面等は酵素に認識されづらいが、糖鎖の機能をより積極的に活用するためにこれらに対する付加反応の開発が必須である。本研究においては、酵素に対するこれら基質の認識性を向上させるための有機化学的な処理を行い、従来法より効率的な高分子及び界面への配糖化反応を開発した。

研究成果の概要(英文)：It is very important to develop the addition reaction onto macromolecules and interfaces by enzymes, although these substrates are difficult to be accepted by the enzymes. In this research, I successfully developed the improved enzymatic glycosylation reaction system by the simple chemical treatment of these substrates.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,000,000 | 0       | 1,000,000 |
| 2008年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 2009年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,400,000 | 420,000 | 2,820,000 |

研究分野：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. 研究開始当初の背景

生命現象の解明は、生体高分子の構造と機能の解明及び合成の歴史といっても過言では無い。DNA やタンパク質の立体構造の解明はその良い例であり、その後の生命科学研究に多大なる貢献があった。そして、核酸の自動合成や生物によるタンパク質の発現が容易になり、いわゆる“セントラルドグマ”を中心とした研究は核酸やタンパク質の網羅的解析へと既にシフトしている。一方で、第

3の生命鎖としての重要性が指摘されている“糖鎖”を調製し、その生理作用や材料としての応用研究は端緒に着いたばかりである。それは、無数のヒドロキシ基及び複雑な立体化学の制御と糖鎖の構造不均一性がいまって、研究の急速な進行を妨げているからである。

そのため、糖鎖工学の研究者は糖鎖の合成技術の確立に向けて、有機化学合成及び酵素合成の手法の展開を行ってきた。とりわけ、

本邦内では糖転移酵素遺伝子の取得数において欧米を大きく引き離しており、糖鎖の合成手法の材料調製の点で優位に立っている。これらの知見を基に、これまでに酵素反応による糖ペプチドや配糖体の糖鎖合成反応は究めて多く報告されているが、高分子、界面、糖脂質への配糖化は困難であった。それは、酵素がタンパク質でできているためであり、界面付近での酵素の失活や基質への近接不可能、さらに、基質可溶性のための有機溶媒等の添加による変性が原因として挙げられる。従って、これら特異的な環境に特化した酵素反応の反応場のデザインをする必要性があった。

## 2. 研究の目的

酵素反応による糖ペプチドや配糖体の糖鎖合成反応は究めて多く報告されているが、高分子、界面、糖脂質への配糖化は困難であった。それは、酵素がタンパク質でできているためであり、界面付近での酵素の失活や基質への近接不可能、さらに、基質可溶性のための有機溶媒等の添加による変性が原因として挙げられる。従って、これら特異的な環境に特化した酵素反応の反応場のデザインをする必要性があった。

本研究計画においては、毒性の高い有機溶媒や試薬を使うことなく、高分子や界面等、酵素が認識しにくいマテリアルへ任意の糖鎖を導入することのできる革新的な手法を確立すべく、還元糖とアミン間で自発的の起こるアマドリ転位反応と酵素触媒配糖化反応の最適化を図る。

## 3. 研究の方法

### (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が優れていることが明らかになっている。現在、アマドリ化に2週間程度必要であることから、1日程度に短縮できるような促進因子の探索を行う。多価カルボン酸、金属塩など、50種類程度の促進因子候補を検討する。アマドリ化の条件検討のための分子としては、3~5種類程度のリジンを含むオリゴペプチドと、5種類程度の酵素タンパク質、3種類程度の繊維状タンパク質を用いる。生成物の評価は、HPLCを用いて単離を行い、NMR,MSを用いて構造決定する。

### (2) アマドリ化糖アクセプターの酵素認識性の検討

これまでの研究成果から、糖脂質への配糖化条件が明らかになってきた。アマドリ転位反応物に対する配糖化反応について検討する。糖転移活性を有する酵素として、 $\alpha$ -アミラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、エンド $\beta$ -N

アセチルグルコサミニダーゼ等を用いる。糖ドナーとしては、澱粉、セルロース、キチン、N結合型糖鎖を用いる。また、糖アクセプターとしては、アルキルアミンから生成した糖脂質を用いる。

## 4. 研究成果

### (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<sub>4</sub><sup>2-</sup>)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いだ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℃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-TOFMSを用いて解析したところ、所望の糖脂質の生成を確認できた。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、正確な反応収率を求められていない。そのため、今後はレクチンカラム、ポロン酸カラム等を駆使して精製し、生成物の構造解析などを進めていく。

### (3) 今後の展望

以上の成果より、蛋白質や界面に存在するアミノ基を経由するアマドリ転位による糖鎖導入法が有効であることが明らかになった。しかし前述の通り、これまでの方法では収率の向上が望めないことから、新たな枠組みで研究を進めていく方が得策であると考えた。とりわけ、アミノ酸配列特異的に糖鎖を導入可能であることが明らかになり、また、別のプロジェクトにより酵素触媒配糖化反応のための活性化糖の合成が容易になったことを受け、今後、これまでの研究方針を組み換えて、より積極的な研究計画を立て、糖鎖複合分子の効率的な合成法の確立を目指す。

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 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., Nagai, H., Noguchi, M., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2009). One-step conversion of unprotected sugars to  $\beta$ -glycosyl azides using 2-chloroimidazolium salt in aqueous solution, *Chem. Commun.*, 3378-3379. (査読有り)
- ③ Tanaka, T., Matsumoto, T., Noguchi, M., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2009). Direct transformation of unprotected sugars to aryl 1-thio- $\beta$ -glycosides in aqueous media using 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride, *Chem. Lett.*, 38, 458-459. (査読有り)
- ④ Tanaka, T., Kobayashi, A., Noguchi, M., Kimura, K., Watanabe, K., and Shoda, S. (2009). Dimethoxy triazine glycosides as new glycosyl donors for chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides, *J. Appl. Glycosci.*, 56, 83-88.(査読有り)
- ⑤ Tanaka, T., Huang, W., Noguchi, M., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2009). Direct synthesis of 1,6-anhydro sugars from unprotected glycopyranoses by using 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride, *Tetrahedron Lett.*, 50, 2154-2157 (査読有り)
- ⑥ 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, in: J. Kadokawa (Ed.), *Interfacial Researches in Fundamental and Material Sciences of Oligo- and Polysaccharides*, Transworld Research Network, Kerala, 2009, pp. 45-68.(査読有り)

- ⑦ 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., Nagai, H., Tanaka, T., Noguchi, M., Ishihara, M., and Shoda, S., A new route to labeled oligosaccharides via glycosyl azides in aqueous media. 20 th International Symposium on Glycoconjugates. Puerto Rico, USA, (2009 年 12 月 3 日)
- ② 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)
- ③ Kobayashi, A., Osanai, H., Murakami, T., Noguchi, M., and Shoda, S. Chemo-enzymatic synthesis of glycoprotein from Hen Egg lysozyme via the Amadori rearrangement, 19 th 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 2 件)

- ①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
- ②名称：アンヒドロ糖及びその製造方法  
発明者：正田晋一郎、小林厚志、野口真人、田中知成  
権利者：東北大学  
種類：特許  
番号：特願 2007-254281

出願年月日：2007年9月28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」

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：