

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19750087
研究課題名（和文） 直接活性化法を用いる遊離糖鎖からの多糖の一段階合成
研究課題名（英文） One step synthesis of polysaccharide from free saccharide 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：多糖の化学-酵素合成法における合成法の簡略化を目的として、活性化糖モノマーの簡易合成法の確立と、ワンポットでの酵素触媒重合の検討を行った。その結果、活性化糖モノマーの合成においては収率良く対応するモノマーを得る方法を見出し、単離したものをを用いて重合反応を行った結果、対応する多糖が得られることが分かった。しかし、ワンポットでの合成では酵素の失活等による重合反応の停止が見られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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，活性化糖誘導體

1. 研究開始当初の背景

多糖の人工合成は構造が単一であり純粋な生成物が得られることから、多糖の化学的・物理的な特性を評価する上で重要である。また、天然から得られる多糖とは結晶形や物理的性状の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、重合後に行うヒドロキシ基の脱保護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、化学合成の場合と比べて合成ステップが少ないこと

や、モノマー合成の段階でヒドロキシ基の脱保護を行うために、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なため、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-酵素法による多糖の合成法における、活性化糖誘導体であるモノマーの合成を簡素化する方法が挙げられる。本研究課題では、遊離糖鎖からモノマーを一段階で合成することにより、モノマー合成の簡素化を行い、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) 活性化糖誘導体モノマーの簡易合成法の確立

これまでの研究の結果から、ワンポットでの酵素触媒重合反応を達成するにはモノマーである、糖オキサゾリン誘導体や脱離基を有する活性化糖誘導体などのモノマーの水溶液中における一段階合成とその収率の向上にある。そこでまず第一に、活性化糖誘導体の効率的な合成法の開発を行った。活性化糖誘導体として、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体と、脱離基を有する活性化糖誘導体の両方の基質の合成を行った。

(2) 合成したモノマーを用いる酵素触媒重合反応とワンポット重合反応への展開

上記(1)で確立した活性化糖誘導体の一段階合成法を基にモノマーの大量調製を行い、酵素触媒重合反応の検討を行った。また、更なる省力化のために、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

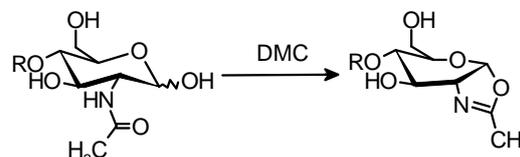
(1) 活性化糖誘導体モノマーの簡易合成法の確立

①糖オキサゾリン誘導体の水溶液中無保護での一段階合成法の開発

糖オキサゾリン誘導体の一段階合成における収率改善を目的として、脱水縮合剤に代表される様々な求電子剤を探索した。その結果、ホルミアミジニウム型脱水縮合剤の一種である塩化 1,3-ジメチルイミダゾリニウム (DMC) を求電子剤に用いることにより、水溶液中において非常に高い収率で対応する糖オキサゾリン誘導体を合成できることが見出された (Scheme 1)。本反応は従来合成が困難であったオリゴ糖などにも適用可能で、非常に有用な反応であることが示された (表 1)。

また、DMC は 1,6-アンヒドロ糖の合成にも適用可能であり、好収率で対応する 1,6-アンヒドロ糖の合成が可能であることが示された。この 1,6-アンヒドロ糖は合成中間体としてだけでなく、化学合成法による多糖合成のモノマーとして利用されている汎用性の高

い糖誘導体である。しかし、従来では多段階のステップを経て合成されてきた基質であり、本反応を利用することによって極めて簡便で合成することが可能となった。この手法を用いることにより、化学合成による多糖の合成法の簡素化への応用も期待される。



Scheme 1 DMC によるオキサゾリン誘導体の合成

表 1 オキサゾリン誘導体の合成収率

Entry	Saccharide	DMC (eq.)	Base (eq.)	Yield ^a (%)
1	GlcNAc	3	9	90
2	GalNAc	10	30	47
3	ManNAc	10	30	76
4	LacNAc	10	30	90
5	(GlcNAc) ₂	10	30	77
6	(GlcNAc) ₃	15	45	75
7	(GlcNAc) ₄	15	45	83
8	(GlcNAc) ₅	15	45	69
9	(GlcNAc) ₆	15	45	81
10	GlcNAc-6-sulfate	3	9	84
11	GlcNAc-6-phosphate	3	9	79
12	Man ₅₋₇ GlcNAc	10	30	64
13	Disialooligosaccharide	15	45	92

^a NMR により決定

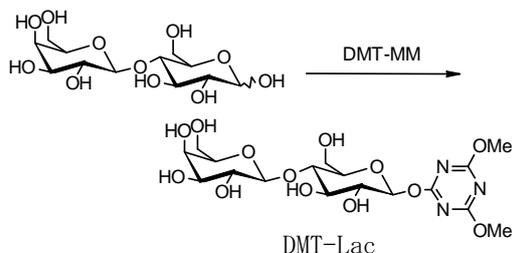
②脱離基を有する活性化糖誘導体の水溶液中無保護での簡易合成法の開発

前述の脱離基を持たない糖オキサゾリン誘導体は還元末端の糖の 2 位が *N*-アセチル化されている必要があり、汎用性に乏しいという欠点がある。このため、脱離基を持つ活性化糖誘導体の合成が必要となる。また、この活性化糖誘導体は多糖合成だけでなく、化学-酵素法による配糖体合成に非常に有用な基質となる。このため、優れた脱離基を持つ活性化糖誘導体の合成を目的として、糖オキサゾリン誘導体の合成法と同様に脱水縮合剤に代表される様々な求電子剤を探索した。その結果、トリアジン骨格を有する脱水縮合剤である 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) を用いることで、中程度の収率で活性化糖誘導体を合成することができた (Scheme 2)。また、本反応は、*trans*-グリコシドが優先的に生成することが明らかとなった。

本反応は様々なオリゴ糖に対して適用が可能であり、従来活性化糖誘導体の合成が困難であった長鎖オリゴ糖においても適用可能であることが示された。

また、トリアジン誘導体のアルコキシ部分

が、糖加水分解酵素による加水分解反応における加水分解活性に影響を及ぼすことが考えられたため、様々なトリアジン誘導体を合成して糖の活性化を行った。その結果、アルコキシ部分を変化させた場合では、合成時の収率が若干変化したほか、加水分解活性に関しても変化はあまり大きくなかった。このため、トリアジン誘導体の扱いやすさなどの観点からジメトキシトリアジン誘導体(DMT)が最も適していることが明らかとなった。



Scheme 2 トリアジン誘導体 DMT-MM による活性化糖誘導体(DMT-Lac)の合成

(2) 合成した活性化等誘導体モノマーを用いる酵素触媒重合反応とワンポット重合反応への展開

①糖オキサゾリン誘導体をモノマーとする人工キチン並びにキトオリゴ糖の合成

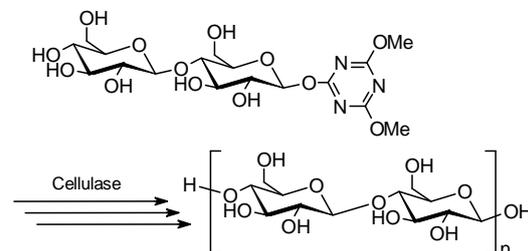
糖オキサゾリン誘導体を用いる人工キチン合成に関してはすでに報告があるため、単離したものを重合する合成法は行わなかった。そこで、糖オキサゾリン誘導体の合成法である、ホルミアミジニウム誘導体を求電子剤とする糖オキサゾリン誘導体合成法を用いてワンポットでのキチン合成を試みた。この手法を用いて糖オキサゾリン誘導体を調製した後に酵素触媒重合を行ったが、活性化剤であるホルミアミジニウム誘導体により酵素が失活してしまったため、高重合度の人工キチンを得ることはできなかった。しかし、特定のモノマーの組み合わせを用いることにより、好収率で低分散度のキトオリゴ糖が得られることが分かり、本手法の有効性が示唆された。キトオリゴ糖は従来選択的合成が困難なオリゴ糖のひとつであり、この合成法は非常に簡便にオリゴ糖を合成する技術として有効である。高重合度のキチンを得るためには、酵素が重合活性を維持できる糖オキサゾリン誘導体の合成条件並びに過酷な反応条件においても活性が保てる酵素の探索が今後の課題である。

②糖トリアジン誘導体をモノマーとする多糖の合成

合成した糖トリアジン誘導体が重合触媒となる糖加水分解酵素により認識するかの

検討を行った。その結果、合成したラクトースのトリアジン誘導体(DMT-Lac)はセルラーゼの一種である *Trichoderma reesei* 由来のエンドグルカナーゼに認識され、加水分解されることが分かった。また、トリアジン環のアルコキシ部分の置換基を変更した種々のラクトースのトリアジン誘導体を用いて加水分解活性の評価を行ったところ、一番活性の低い誘導体と一番活性の高い誘導体の加水分解活性の変化は3倍程度であり、劇的な活性向上は見られなかった。このため、合成時の収率や基質の安定性等を考慮した結果、ジメトキシトリアジン誘導体(DMT 化糖)が最も適していることが分かった。

モノマーとして、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-Cel)を用いて *Trichoderma reesei* 由来のエンドグルカナーゼによる重合反応を行った(Scheme 3)。その結果、重合度 20 程度のセロオリゴマーが得られることが分かった(図 1)。しかし、当初の目的である活性化と重合を連続して行う場合には糖オキサゾリン誘導体同様、酵素の活性維持が難しく、重合反応は進行しなかった。また、糖トリアジン誘導体の合成では 30%程度生成する副生物のため、重合反応を阻害していることも考えられた。糖オキサゾリン誘導体と同様に、重合活性を維持できる反応条件並びに酵素の探索と糖トリアジン誘導体の選択的合成法の確立が今後の課題である。



Scheme 3 DMT-セロビオシドをモノマーとする重合反応

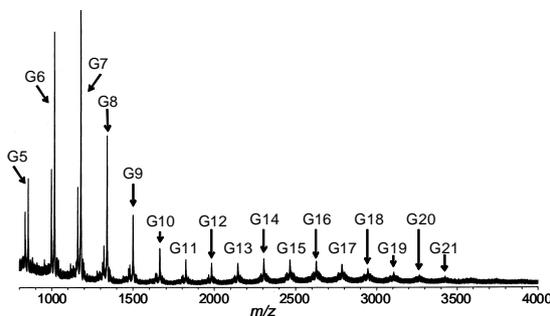


図 1 DMT-セロビオシドの重合物のMALDI-TOF MS スペクトル

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 Tomonari Tanaka, Wei Chun Huang, Masato Noguchi, Atsushi Kobayashi, and Shin-ichiro Shoda, "Direct synthesis of 1,6-anhydro sugars from unprotected glycopyranoses by using 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride", Tetrahedron Letters, 50, 2154-2157, 2009, 査読有
- ② Masato Noguchi, Tomonari Tanaka, Hidetoshi Gyakushi, Atsushi Kobayashi, and Shin-ichiro Shoda, "Efficient Synthesis of Sugar Oxazolines from Unprotected *N*-Acetyl-2-amino Sugars by Using Chloroformamidinium Reagent in Water", Journal of Organic Chemistry, 74, 2210-2212, 2009, 査読有
- ③ Tomonari Tanaka, Masato Noguchi, Atsushi Kobayashi and Shin-ichiro Shoda, "A novel glycosyl donor for chemo-enzymatic oligosaccharide synthesis: 4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl glycoside", Chemical Communications, 2016-2018, 2008, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 野口真人・田中知成・小林厚志・正田晋一郎, "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 89 回春季年会, 2009 年 3 月 29 日, 船橋
- ② 野口真人・田中知成・伊藤志保・木村敬一・渡部和仁・小林厚志・正田晋一郎, "トリアジン誘導体による糖の活性化と配糖化", グライコサイエンス若手の会, 2008 年 8 月 21 日, つくば
- ③ 野口真人・渡部和仁・三澤卓也・田中知成・小林厚志・正田晋一郎, "1,3,5-トリアジングリコシド-酵素触媒重合における新規モノマー", 第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 30 日, 横浜
- ④ 野口真人・田中知成・三澤卓也・渡部和仁・小林厚志・正田晋一郎, "セルラーゼによる糖トリアジン誘導体の加水分解活性評価", 日本化学会第 88 回春季年会, 2008 年 3 月 28 日, 東京
- ⑤ Masato Noguchi, Tomonari Tanaka,

Masaki Ishihara, Atsushi Kobayashi and Shin-ichiro Shoda, "Synthesis of artificial cellulose from novel activated glycosides catalyzed by cellulase and related enzymes", International Cellulose Conference, 2007 年 10 月 22 日, 東京

[図書] (計 1 件)

- ① 正田晋一郎・小林厚志・野口真人, "セルロース利用技術の最先端", シーエムシー出版, 77 頁~82 頁, 2008 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称: 配糖体及びその製造方法
発明者: 正田 晋一郎, 小林 厚志, 野口 真人, 田中 知成, 永井 光, 松本 健
権利者: 東北大学
種類: 特許
番号: 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: 2007-254281
出願年月日: 2007 年 9 月 28 日
国内外の別: 国内

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: