

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19790018

研究課題名(和文) 植物グリコシルトランスフェラーゼによる新規光学分割法の開発と創薬への応用

研究課題名(英文) Development on new methodology for optical resolution using plant glycosyltransferases and its pharmacological exploitation

研究代表者

下田 恵 (SHIMODA KEI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40284153

研究成果の概要(和文)：植物培養細胞から、イオン交換カラム、アフィニティーカラム、ゲルろ過カラムを使用する各種のクロマトグラフィーにより、植物キシロシルトランスフェラーゼを精製した。本酵素により、フェニルアルキルアルコールの(*RS*)-ラセミ体の配糖体を変換したところ、本酵素は、(*R*)-体のフェニルアルキルアルコール配糖体のみをプリメベロシド二糖配糖体に変換し、未反応の(*S*)-体のフェニルアルキルアルコール配糖体を高い光学純度で与える、新規な光学分割の能力を持つことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：A plant xylosyltransferase was isolated from cultured plant cells by chromatographies using ion-exchange column, affinity column, and size excluding column. The new enzymatic resolution of (*RS*)-1-phenylalkyl  $\beta$ -D-glucosides has been achieved by stereoselective xylosylation with the enzyme to give (*R*)-1-phenylalkyl  $\beta$ -primeverosides and unreacted (*S*)-1-phenylalkyl  $\beta$ -D-glucosides with high diastereoselectivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：生物化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：有機合成化学

## 1. 研究開始当初の背景

光学活性医薬品をラセミ体混合物のまま使用すると、重大な副作用を引き起こす可能性がある。また、光学活性医薬品の生産過程において、ラセミ体混合物として合成される場合、ラセミ体混合物からの光学分割が必要となる。これまで、生体触媒としてリパーゼやエステラーゼなどの加水分解酵素が、光学分割に使用されてきており、グリコシルトランスフェラーゼによる光学分割については、詳細な研究例が無い。

我々はこれまでに、植物培養細胞により、テルペンアルコール類やベンジルアルコール類が立体選択的に糖転移触媒作用を受けることを明らかにしている。このため、植物に内在するグリコシルトランスフェラーゼの光学分割能力を、医薬品の光学純度と品質の向上、さらには糖転移反応による更なる高機能化に応用できるものと期待される。

## 2. 研究の目的

(1) 生薬成分の薬理活性作用に深い関連の

あるモノテルペンアルコール類やポリフェノール類を植物培養細胞に投与し、植物培養細胞によるグリコシル化反応の光学分割能力を明らかにする。また、生成物である糖質誘導體について、生理機能を調べ、酵素反応による高機能化について明らかにする。

(2) 植物培養細胞から当該新規光学分割に関与するグリコシルトランスフェラーゼを精製し、酵素レベルでの光学分割能力を明らかにする。

### 3. 研究の方法

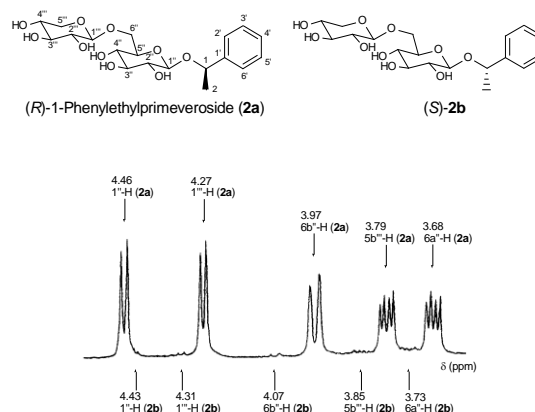
(1) ニチニチソウやタバコなどの植物培養細胞を、液体培地中において懸濁培養細胞とし、これに生理活性化合物であるモノテルペンアルコール類やポリフェノール類を基質として投与する。植物培養細胞による糖転移反応の立体選択性を、生成物の核磁気共鳴スペクトルを利用した解析によりグルコシドアグリコン部位の光学過剰率を調べることにより明らかにする。生成物である糖質誘導體の生理機能として、抗体産生抑制活性を調べる。

(2) 我々が以前報告している、ニチニチソウ植物培養細胞による立体選択的二糖化反応について、反応に関与するキシロシルトランスフェラーゼをニチニチソウ植物培養細胞から、イオン交換カラム、アフィニティーカラム、ゲルろ過カラムを使用する各種のクロマトグラフィーにより精製する。得られたキシロシルトランスフェラーゼにより、フェニルアルキルアルコールの(*RS*)-ラセミ体の配糖体を基質とした酵素反応を行い、キシロシルトランスフェラーゼの光学分割機能について調べる。

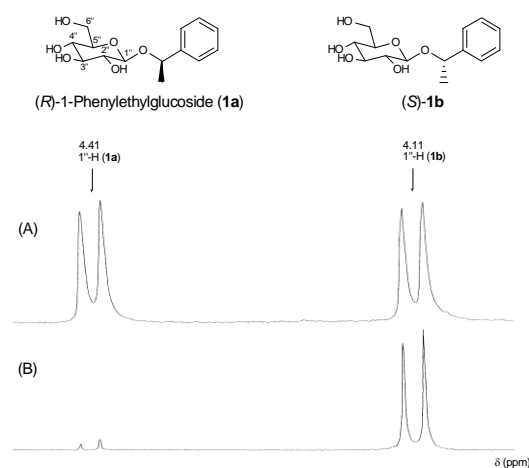
### 4. 研究成果

(1) ニチニチソウ植物培養細胞にモノテルペンであるシトロネロール、およびポリフェノールであるエピカテキンのラセミ体混合物を投与した。その結果、ニチニチソウ植物培養細胞は立体選択的にこれらの基質を変換し、対応する糖質誘導體を与えることが分かった。また、ポリフェノールの糖質誘導體は高い抗体産生抑制活性を示した。

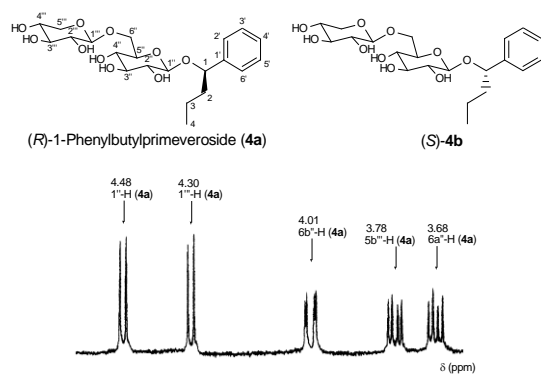
(2) ニチニチソウ植物培養細胞から精製したキシロシルトランスフェラーゼにより、フェニルアルキルアルコールである1-フェニルエチルアルコール、および1-フェニルブチルアルコールの(*RS*)-ラセミ体の配糖体を変換した。変換生成物の核磁気共鳴スペクトルを利用した解析の結果、図1および図2に示すように本酵素は、1-フェニルエチルアルコールの(*R*)-体の配糖体のみをプリメベロシド二糖配糖体に変換し、未反応の(*S*)-体のフ



**Figure 1.** Proton signals in  $^1\text{H}$  NMR of the product **2** obtained by xylosylation of (*RS*)-1-phenylethylglucoside with xylosyltransferase from *C. roseus*.

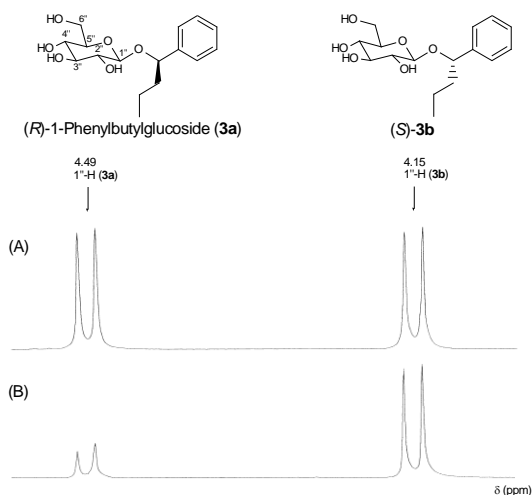


**Figure 2.** Anomeric proton signals in the  $^1\text{H}$  NMR of (A) substrate **1** and (B) **1** recovered after xylosylation by xylosyltransferase from *C. roseus*.



**Figure 3.** Proton signals in  $^1\text{H}$  NMR of the product **4** obtained by xylosylation of (*RS*)-phenylbutylglucoside with xylosyltransferase from *C. roseus*.

エニルエチルアルコール配糖体を高い光学純度で与えた。同様に、1-フェニルブチルアルコールの(*RS*)-ラセミ体の配糖体変換生成



**Figure 4.** Anomeric proton signals in the  $^1\text{H}$  NMR of (A) substrate **3** and (B) **3** recovered after xylosylation by xylosyltransferase from *C. roseus*.

物の核磁気共鳴スペクトルを利用した解析を行った結果、図3および図4に示すように本酵素は、1-フェニルブチルアルコールの(*R*)-体の配糖体のみをプリメベロシド二糖配糖体に変換し、未反応の(*S*)-体のフェニルブチルアルコール配糖体を高い光学純度で回収することが可能であった。以上のように、本酵素は新規な光学分割の能力を持つことが明らかになった。

#### 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8件)

- ① Kei Shimoda, Hiroki Hamada, Production of hesperetin glycosides by *Xanthomonas campestris* and cyclodextrin glucanotransferase and their anti-allergic activities, *Nutrients*, 査読有, Vol. 2, 2010, pp.171-180.
- ② Kei Shimoda, Hisashi Katsuragi, Enzymatic resolution of (*RS*)-1-phenylalkyl  $\beta$ -D-glucosides to (*R*)-1-phenylalkyl  $\beta$ -primeverosides and (*S*)-1-phenylalkyl  $\beta$ -D-glucosides via plant xylosyltransferase, *Tetrahedron: Asymmetry*, 査読有, Vol. 21, 2010, pp.2060-2065.
- ③ Kei Shimoda, Naoji Kubota, Yoko Kondo, Daisuke Sato, Hiroki Hamada, Glycosylation of fluorophenols by plant cell cultures, *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, Vol. 10, 2009, pp.1942-1949.
- ④ Kei Shimoda, Noriaki Sato, Tatsunari Kobayashi, Hatsuyuki Hamada, Hiroki Hamada, Glycosylation of daidzin by the *Eucalyptus* cell cultures, *Phytochemistry*, 査読有, Vol. 69, 2008, pp.2303-2306.
- ⑤ Kei Shimoda, Sou Sakamoto, Nobuyoshi Nakajima, Hatsuyuki Hamada, Hiroki Ha-

mada, Synthesis of unnatural mono- and oligosaccharides of farnesol, geraniol, and (*S*)-perillyl alcohol by biocatalytic glycosylations, *Chemistry Letters*, 査読有, Vol. 37, 2008, pp.556-557.

- ⑥ Kei Shimoda, Takafumi Hara, Hatsuyuki Hamada, and Hiroki Hamada, Synthesis of curcumin  $\beta$ -maltooligosaccharides through biocatalytic glycosylation with *Strophanthus gratus* cell culture and cyclodextrin glucanotransferase, *Tetrahedron Letters*, 査読有, Vol. 48, 2007, pp.4029-4032.
- ⑦ Kei Shimoda, Soonil Kwon, Akiko Utsuki, Shingo Ohiwa, Hisashi Katsuragi, Naoko Yonemoto, Hatsuyuki Hamada, and Hiroki Hamada, Glycosylation of capsaicin and 8-nordihydrocapsaicin by cultured cells of *Catharanthus roseus*, *Phytochemistry*, 査読有, Vol. 68, 2007, pp.1391-1396.
- ⑧ Kei Shimoda, Yoko Kondo, Masaaki Akagi, Koichi Abe, Hatsuyuki Hamada, and Hiroki Hamada, Synthesis of  $\alpha$ -tocopheryl disaccharides as potential anti-allergic agents, *Chemistry Letters*, 査読有, Vol. 36, 2007, pp.570-571.

[学会発表] (計10件)

- ① 浜田博喜, 小原隆博, 山本涼平, 下田恵, 小崎紳一, 中山亨, 葛城寿史, 植物由来糖転移酵素を活用した高機能性配糖体の合成, 第52回天然有機化合物討論会, 2010.
- ② Hiroki Hamada, Kei Shimoda, Nobuyoshi Nakajima, The effective synthesis of the lead compounds of the drug development and food supplement-Glycosylation of flavanoids using plant cultured cells, 環太平洋国際化学会議 PACIFICHEM2010, 2010.
- ③ 浜田博喜, 大広あずさ, 木村江利子, 近藤舞, 佐藤大介, 下田恵, 植物酵素触媒によるワンステップグリコシル化反応, 第95回有機合成シンポジウム, 2009.
- ④ Hiroki Hamada, Azusa Ohiro, Eriko Kimura, Mai Kondo, Daisuke Sato, Nobuyoshi Nakajima, Kei Shimoda, Glycosylation of biological active compound using plant cultured suspension cells, *Plant Biology* 2009, 2009.
- ⑤ 山本涼平, 小林達成, 比嘉望, 下田恵, 中島伸佳, 浜田博喜, 植物培養細胞を用いたフラバノン類の変換-水酸化と配糖化, 日本化学会第89回春季年会, 2008.
- ⑥ 小林達成, 佐藤大介, 下田恵, 久保田直治, 浜田博喜, 植物培養細胞によるモノテルペン類の配糖化, 日本化学会第89回春季年会, 2008.
- ⑦ 浜田博喜, 大広あずさ, 下田恵, 本間知夫,

辛くない唐辛子とブドウポリフェノールの機能解明，日本化学会第89回春季年会，2008.

⑧浜田博喜，小林達成，佐藤大介，下田恵，植物培養細胞によるモノテルペンの配糖化，日本化学会第88回春季年会，2007.

⑨小林達成，大広あずさ，石原浩二，中島伸佳，下田恵，浜田博喜，植物培養細胞によるレスベラトロールの配糖化，日本化学会第88回春季年会，2007.

⑩浜田博喜，小林達成，下田恵，生体触媒を活用した有用物質の生産，日本化学会第88回春季年会，2007.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下田 恵 (SHIMODA KEI)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号：40284153