

氏名	ふじた まさや 藤田 雅也
授与学位	博士（工学）
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科、専攻の名称	東北大学大学院工学研究科（博士課程）材料化学専攻
学位論文題目	非天然型多糖・オリゴ糖の化学-酵素合成
指導教官	東北大学教授 井上祥雄
論文審査委員	主査 東北大学教授 井上 祥雄 東北大学教授 西野 徳三 東北大学教授 熊谷 泉 東北大学助教授 正田 晋一郎

論文内容要旨

第1章 序論

多糖やオリゴ糖は、生分解性を有する環境に優しい機能性物質であり、天然に豊富に存在する有用な資源である。近年、多糖の有効利用に関する研究が活発に行われるようになり、種々の修飾化多糖の合成例が報告されている。しかし、これらの多糖は完全生分解性とは言い難く、さらに置換基や置換分布が明確ではないので、分子レベルでの生体との相互作用などの情報を得ることが困難である。これに対し、糖加水分解酵素を触媒として用いる多糖合成は、モノマーからの重縮合による位置および立体選択的な構築法であるので、構造明確な多糖を得る手段として極めて有効である。さらに最近、モノマーの重縮合活性酵素の一つが同定され、人工基質の認識能力を考慮することで、修飾化モノマーも酵素の基質となって重縮合し、非天然型の多糖が生成することが報告されている。以上の背景より、本研究では、まず多糖合成に必要となる酵素の探索法の確立を目指して、フッ化 β -キシロピオシルをモデル基質とし、その重縮合を触媒する酵素を粗酵素より探索・同定した。次に非天然型の新規フッ化二糖やオリゴ糖を設計・合成し、その酵素的重縮合により、構造明確な非天然型多糖が得られることを実証した。

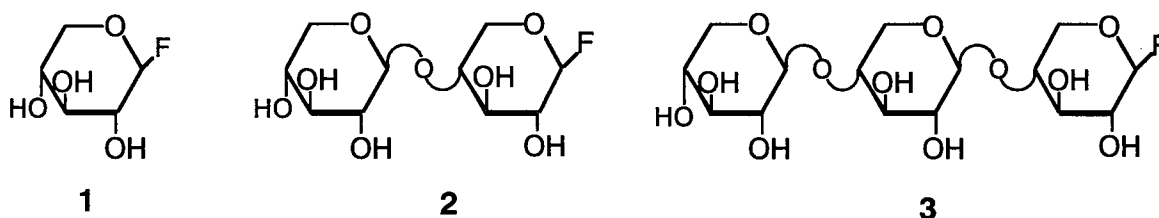
第2章 フッ化 β -キシロ糖の重縮合

*Trichoderma viride*菌は多種の糖加水分解酵素を発現することが知られている。そこで、フッ化 β -キシロピオシルに対する重縮合活性酵素を、*Trichoderma viride*菌由来のセルラーゼオノズカR-10(ヤクルト社製)について、重縮合活性により分画・精製する方法により探索した。基質は5ステップにより合成し、全収率29%で得ることができた。重縮合活性は、アセトニトリル/酢酸緩衝液(pH 5.0)中で酵素の添加により生じた水不溶多糖の収量を、フェノール-硫酸法にて算出することで測定した。

硫酸分画-ゲル濾過-陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことで、2つの活性画分AおよびBを得た。A

画分をさらにゲル濾過することで2つの活性画分、P-A-1とP-A-2を得た。P-A-2はほぼ精製された、分子量22~23kDaのタンパク画分であることが判明した。一方、P-A-1はその後陽イオン交換クロマトグラフィーなどの操作を行ったが、単一の精製画分を得ることはできなかった。しかし、この画分とほぼ同じものと考えられる市販の酵素からの精製操作によって、P-A-1は22~24kDaのタンパク質を含むことが判明した。一方、B画分は陰イオン交換クロマトグラフィー(pH5.6-3.5)-ゲル濾過-陰イオン交換クロマトグラフィー(pH 6.0 NaCl 0-0.5M)による操作によって、一つの活性画分P-B-1を得ることができた。P-B-1はほぼ精製された、分子量35~40kDaのタンパク画分であることが判明した。

以上により得られた部分精製タンパク質の同定を行うために、アミノ酸配列を解析した。P-A-1は3章によりエンドキシラーゼII(EXII from *Trichoderma reesei*)であることが判明した。P-A-2はN末端配列22残基が相同性95%でエンドキシラーゼI(EXI from *Trichoderma reesei*)であった。また、P-B-1の内部アミノ酸配列12残基が相同性100%でエンドグルカナーゼI(EGI from *Trichoderma reesei*)であることがわかった。これらの3つのタンパク質は、すべてキシラン水解活性を持ち、かつ高い糖転移能を有する酵素であることが知られている。したがって、本章で用いたフッ化二糖基質は、このような酵素を探索する有効な基質と考えられる。また、EXIおよびEXIIと同ファミリー酵素である*Aspergillus*や*Bacillus*菌由来の精製キシラーゼでも同様に重縮合活性があることがわかった。



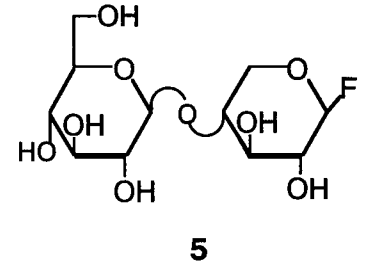
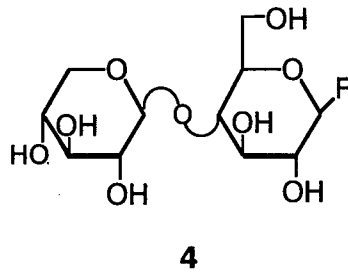
探索した酵素に対する、フッ化 β -キシロピオシル(1)、フッ化 β -キシロピオシル(2)およびフッ化 β -キシロトリオシル(3)の酵素触媒重縮合を検討した。それぞれを溶解した緩衝溶液に酵素を添加して、加水分解されるかどうかを検討したところ、2や3は酵素によってすみやかに水解するが、1はほとんど水解しないことがわかった。この事実は、すでに報告されているこれらの酵素の基質特異性に一致する。次に2の重縮合反応を行い、重縮合物の重アルカリ溶液をNMRによって解析した結果、 β 1 \rightarrow 4結合のみからなる純粋なキシランであることがわかった。

2や3の重縮合物をアセチル化した後にMALDI-TOF マススペクトルにより解析したところ、EXIやEXIIを添加したものでは、8~14糖のオリゴ糖が生成し、それらはキシロース単位の分布を示した。しかし、添加する酵素量を少なくすると、モノマー単位である偶数糖のピークが増加した。またEGIをEXIやEXIIと同モル量添加した場合、収量は10%であるがモノマー単位の分布を示した。以上のことから、酵素濃度や酵素の種類によって分子量分布に違いが生ずることがわかった。

第3章 非天然型二糖基質の酵素触媒重縮合

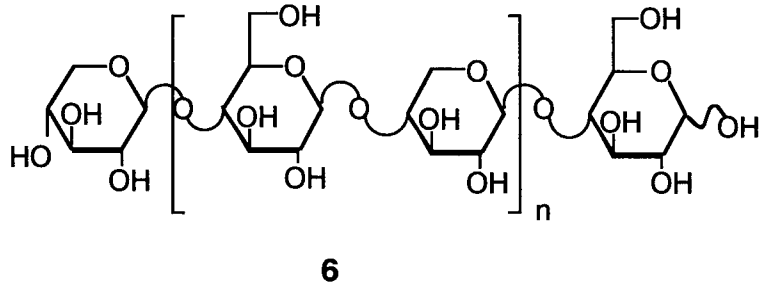
キシランとセルロースはすでに酵素触媒重縮合が行われている。そこでフッ化 β -キシロピラノシル-グ

ルコピラノシル4およびフッ化β-グルコピラノシル-キシロピラノシル5を合成し、その酵素触媒重縮合を検討した。4は、グルコースを7ステップにより誘導して得た4位にのみ水酸基を持つテトラベンジルグルコピラノシルを糖受容体とし、糖供与体である

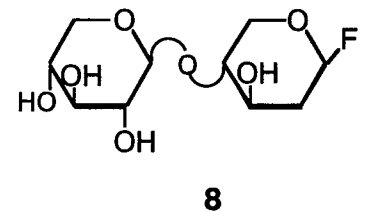
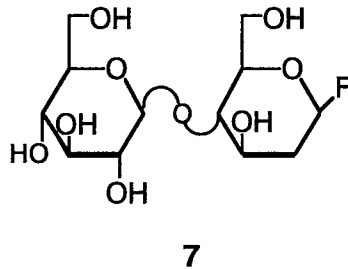


臭素化キシロピラノースとのβグリコシル化、さらに5ステップの誘導後に得ることができた。5は、キシロースを7ステップにより誘導して得た4位にのみ水酸基を持つベンジル2,3-O-アセチルキシロピラノースを糖受容体とし、糖供与体であるグルコースのトリクロロアセトイミデートとのβグリコシル化、さらに5ステップの誘導後に得ることができた。

4に対する加水分解挙動を調べたところ、市販の部分精製キシラナーゼ(SIGMA X-3876 from *Trichoderma viride*)が活性を示すことから、この酵素をさらに4の重縮合活性で精製し、酵素の同定を行った。アミノ酸配列の結果から、モノマー3の重縮合活性を併せ持つEXIIであることが判明した。また、水不溶多糖の収量は25%であった。



重縮合物を重アルカリ溶液に溶解し、NMR測定による構造解析を行った。¹H-¹H COSYおよび¹H-¹³C COSYによる解析と、既知のセロオリゴ糖とキシロオリゴ糖の¹³C NMRスペクトルとの比較によって、生成物はβ1→4結合を持ち、グルコースとキシロースを有する多糖であることがわかった。生成物をアセチル化した後にMALDI-TOF マススペクトルにより解析した



ところ、6~14糖の多糖であることがわかった。また、ピーク間隔がキシロースとグルコースの和(Mw=504)にほぼ一致することから、キシロースとグルコースの交互共重合体であることが判明した。NMRの結果と併せて、キシロースとグルコースがβ1→4結合で交互に連なった構造、換言すれば2位と6の水素結合が2糖毎に欠如したセルロースが生成したことが示された。

EXIIIは5に対しても、4と同じように水不溶重縮合生成物を与えることがわかった。MALDI-TOF マススペクトルの結果から、この生成物もキシロースとグルコースの交互共重合体(6)であることが推定された。

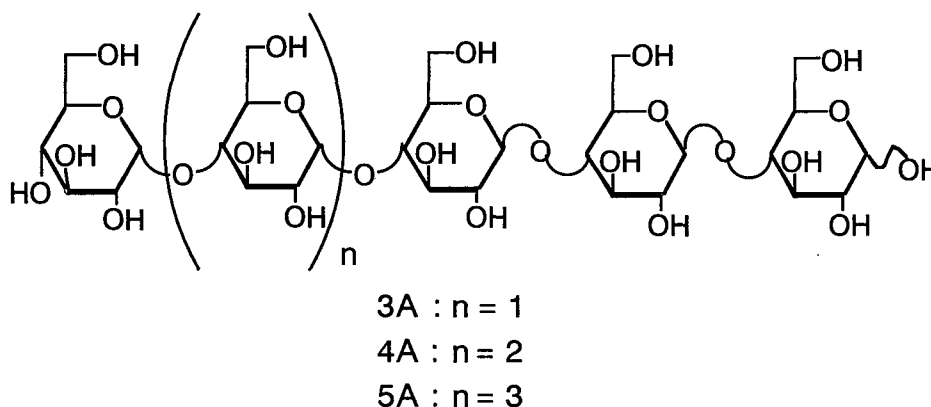
4のEXIIIによる重縮合反応溶液をHPLCにより分析して、反応系内の組成変化を測定したところ、4の水分解生成物であるキシロピラノシル-グルコピラノースはほとんど生成しないことがわかった。従って、本重

縮合反応は、水解に優先したものであることがわかった。

2-デオキシ型のフッ化二糖も重縮合すれば、2位と6の水素結合が欠如した多糖が生成する。そこで、フッ化 β -2-デオキシセロピオシル(7)およびフッ化 β -2-デオキシキシロピオシル(8)をそれぞれ5ステップで合成して、その酵素的重縮合を検討した。それぞれのモノマーを溶解した溶液にEGIおよびEXIIを添加したが、何ら変化を示さなかった。また、水不溶沈殿物も現れなかった。従って、糖水解酵素による重縮合によって、2位水酸基が必要であることが示された。

第4章 アミロース鎖を持つセロオリゴ糖の合成

性質の違う多糖が結合した、いわゆるブロック型多糖の合成例は未だ報告されていない。そこで、アミロースとセルロースのブロック型多糖の合成を目指して、セロオリゴ糖を結合させたアミロースプライマーを合成し、グルコース-1-リン酸存在下、ホスホリラーゼによるアミロース部位の糖鎖伸長反応が可能であるかどうかを検討した。 α 1 \rightarrow 4結合が2つ(3A)、3つ(4A)および4つ(5A)のものを用いて検討した結果、5Aがすみやかに糖鎖伸長することがわかった。得られた多糖を¹H NMRで解析した結果、20~25糖であることがわかった。



第5章 総括

審査結果の要旨

多糖・オリゴ糖は、生分解性を有する環境に優しい機能性物質であり、非天然型多糖を合成するための新手法の開発は新しい機能性材料の創製へとつながる重要な課題である。著者はフッ化二糖を用いる糖加水分解酵素による重縮合が位置および立体選択的に多糖・オリゴ糖を与えることに着目し、触媒である加水分解酵素の探索と、その基質特異性ならびに重縮合挙動を検討した。また非天然型多糖の構築を目指し、異種の糖質を含有する多糖の合成を行い、酵素触媒による多糖合成の可能性を広げた。本論文は、この研究成果についてまとめたもので、全文5章よりなる。

第1章は序論であり、本研究の背景及び目的を述べている。

第2章では、フッ化 β -キシロピオシルを基質とする重縮合活性酵素の探索・同定について述べている。粗酵素を、直接重縮合活性で精製・分画することで、重縮合活性酵素を簡単に探索できることを実証している。また、探索した酵素によるフッ化単糖やフッ化三糖の重合挙動から、酵素の基質に対する認識と反応過程に対する影響を考察している。さらに、フッ化二糖やフッ化三糖に対する重縮合条件を検討することで、それらモノマーユニット単位の重縮合物が得られることを実証した。これらの結果はホモ多糖・オリゴ糖を効率よく得るための手段として有用である。

第3章では、キシロースとグルコースを含む二種類のフッ化ヘテロ二糖を化学合成し、それらの酵素触媒重縮合によるキシロースとグルコースのハイブリッド多糖の合成を検討した。第2章で述べた方法により活性酵素を探索、精製し、これを触媒として二種類のモノマーからキシロースとグルコースの交互共重合体が得られることを見出ししている。また、フッ化 β -キシロピラノシル-グルコピラノシルの重縮合体の構造解析により、重縮合が完全に β 1 \rightarrow 4で、加水分解に優先して進行することを明らかにしている。次に、2-デオキシフッ化モノマーを合成し、その酵素触媒重合が進行しないことを明らかにしている。これは糖加水分解酵素による重縮合にとって2位水酸基が必要であることを示唆するものである。本章の結果は、今後新しいフッ化二糖の設計を行う上で重要な知見を与えるものである。

第4章では、加リン酸分解酵素がマルトオリゴマーの非還元末端方向にアミロース鎖を伸張させることに着目し、還元末端にセロオリゴマーを持つアミロースの化学合成およびそれをプライマーとして用いるアミロース鎖伸張反応の検討を行っている。その結果、 α 1 \rightarrow 4結合を3つ以上持つプライマーが糖鎖伸張に有効であることを明らかにしている。また、この反応を用いることにより20~25糖のアミロース-セロオリゴ糖を合成している。これらの結果は、今後異なるグリコシド結合を含む多糖合成に対し、新しい可能性を与えるものである。

第5章は総括である。

以上要するに本論文は、酵素触媒を用いる多糖合成にとって必要不可欠である重縮合活性酵素の探索を行い、酵素の基質に対する認識についての情報をより明確にし、その結果を新規糖質モノマーの重縮合に応用したものであり、高分子合成の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。