

氏名	のぐちまさと 野口真人
授与学位	博士(工学)
学位授与年月日	平成17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	酵素的グリコシル化を指向した糖環状誘導体に関する研究
指導教員	東北大学教授 正田 晋一郎
論文審査委員	主査 東北大学教授 正田 晋一郎 東北大学教授 西野 徳三 東北大学教授 井上 祥雄

## 論文内容要旨

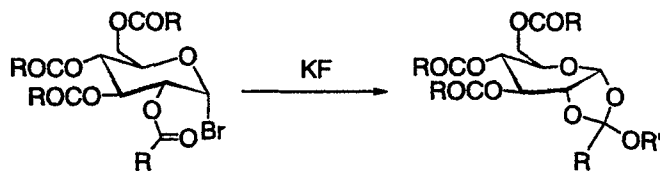
### 第1章 序論

糖鎖や核酸, タンパク質は生体高分子であり, 生命現象の根幹を担っている. 核酸やタンパク質については, 配列の決定法や調製法が既に確立されており, それぞれの機能の解明だけでなく, タンパク質・核酸間の相互作用の解明, そして, 生命現象の解明に有用な方法として用いられている. しかし, 糖鎖については, 配列の決定法や調製法において, 一般的な方法が確立されておらず, とりわけ, 調製法の確立が急務となっている. 細胞表層に存在するオリゴ糖鎖はウィルス感染や細胞の分化, 癌化, 細胞間認識など生命現象に深く関与していることが明らかとなってきた. また, 植物中に含まれるオリゴ糖には細菌に対する選択的増殖活性を示すものが存在する. オリゴ糖の持つ機能の解明や応用には, 純粋な糖鎖を多量に合成する必要がある. オリゴ糖合成における鍵反応は糖どうしを結合させるグリコシル化反応である. グリコシル化反応には大きく分けて, 有機合成手法を用いる方法と, 酵素を用いる方法に分けられる. また, 酵素を用いる方法では, 生合成経路である糖転移酵素を用いる方法だけでなく, 加水分解酵素や加リン酸分解酵素も用いられている. 有機合成手法や糖加水分解酵素触媒によるグリコシル化反応におけるドナー基質の一つとして糖環状誘導体を用いられている. 糖環状誘導体は, 内部にひずみを持つために, 特別な脱離基を有しなくても活性化基質となる. 本研究は糖環状誘導体に着目し, 糖環状誘導体の簡易合成法の確立や糖加水分解反応触媒によるグリコシル化反応のドナー基質への応用を目的とする.

### 第2章 糖オルトエステル誘導体の簡易合成と加水分解酵素のスクリーニング

糖オルトエステル誘導体は有機合成手法におけるグリコシル化反応のドナー基質や保護基として用いられており, オリゴ糖合成において有用な誘導体である. 糖オルトエステル誘導体の従来の合成法は, 第四級アンモニウム塩と嵩高い第三級アミンが必要であり, 反応後の後処理が煩雑な方法である. このため, 糖オルトエステル誘導体の簡便な合成法が望まれている. 後処理が容易な固体試薬であるフッ化カリウムを用いる糖オルトエステル誘導体の実用的な合成法を開発した(Scheme 1). フッ化カリウムを臭化グリコシルに対して2等量以上用いることで反応は効率良く進行することが明らか

となった。また、エチリデンオルトエステル誘導体のほか、ベンジリデンオルトエステル誘導体の合成や様々な糖やアルコールを用いた場合でも合成が可能であり、本反応系の汎用性を示した。また、加水分解酵素を用いるグリコシル化反応のドナー基質としての利用を目的として、単糖の糖オルトエステル誘導体を合成し、これを加水分解する酵素を探索した。数十種類の糖質加水分解酵素をスクリーニングを行ったが、糖オルトエステル誘導体を加水分解する活性は見出されなかった。



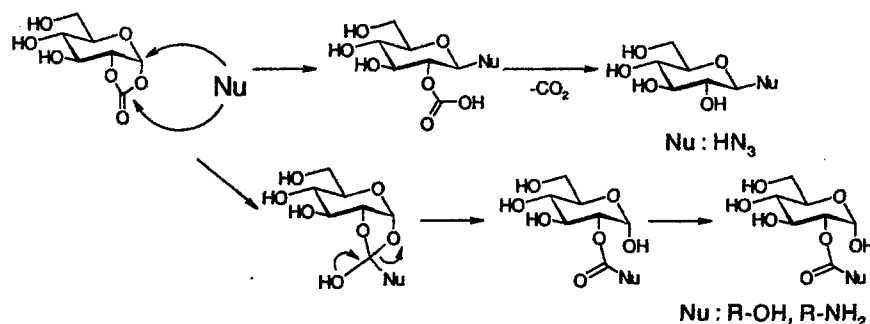
Scheme 1 Synthesis of orthoester derivatives using potassium fluoride

### 第3章 糖環状炭酸エステル誘導体の合成と化学的性質

#### 第3章 第1節 糖環状炭酸エステル誘導体の合成と化学的性質

1-*O*-炭酸エステルは、分子内脱炭酸を伴うグリコシル化反応のドナー基質として用いられている。しかし、1,2-環状炭酸エステル誘導体に関する研究は少なく、保護基としての評価程度である。この1,2-環状炭酸エステル誘導体に着目し、1,2-*O*-カルボニルグルコース (グルコース炭酸エステル) を合成し、基礎的な反応性の検討を行うために求核剤との反応生成物の解析を行った (Scheme 2)。メタノールを求核剤として用いた場合では、メタノールのヒドロキシ基が炭酸エステルのカルボニル炭素を攻撃し、エステル交換反応と脱炭酸が進行してグルコースが生成した。また、*n*-プロピルアミンを用いた場合もアミノ基が炭酸エステルのカルボニル炭素に求核攻撃し、アミドが生成した。*n*-プロピルアミンを用いた場合は、反応がさらに進行し、アミドの窒素原子がアノマー炭素を求核攻撃して環化し、オキサゾリジノン誘導体を得られた。

一方、アジ化ナトリウムを用いた場合では、アジ化物イオンがアノマー炭素へ求核攻撃し、対応するアジ化β-グルコシルが生成した。



Scheme 2 Reaction of glucose carbonate with some nucleophiles

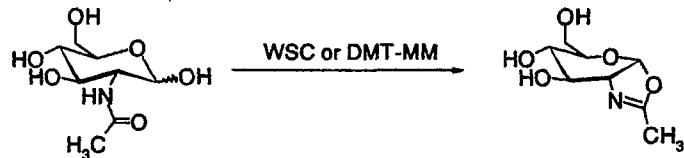
#### 第3章 第2節 炭酸エステルを加水分解する酵素のスクリーニング

1,2-環状炭酸エステル誘導体は糖オキサゾリン誘導体と類似した反応機構で加水分解反応を受けることが可能である。糖加水分解酵素を用いるグリコシル化反応のドナー基質としての利用を目的として、グルコース炭酸エステルを加水分解する酵素のスクリーニングを行った。食品添加用の酵素製剤を中心にスクリーニングを行った結果、アルカリ性において、*Rhizopus* 族由来の複数の酵素製剤 (新日本化学工業製 Sumizyme MC, Sigma 製 Amyloglucosidase, 生化学工業製 Glucoamylase) にグルコース炭酸エステルを加水分解する活性が認められた。Sumizyme MC と Amyloglucosidase をそれぞれ部分精製した結果、グルコース炭酸エステルを加水分解する活性画分は複数存在し、分子量 5000

程度の低分子量のタンパク質であることが判明した。さらに、このタンパク質はアセチルエステラーゼ活性も示すことから、基質認識の広いエステラーゼがグルコース炭酸エステルを加水分解していることが示唆された。また、多くのエキソ型グリコシダーゼの至適 pH である弱酸性において、生化学工業製 *Rhizopus niveus* 由来 Glucoamylase に加水分解活性が見られた。これらの加水分解活性を示す酵素を用いて糖転移反応を試みたが、グルコース炭酸エステルをドナー基質とする糖転移反応は進行しなかった。

#### 第 4 章 糖オキサゾリン誘導体の簡易合成法の開発

糖オキサゾリン誘導体は有機合成手法によるグリコシル化反応のドナー基質として用いられているほか、糖加水分解酵素を用いるグリコシル化反応のドナー基質としても使用されている。糖オキサゾリン誘導体のグリコシル化反応では、付加反応でグリコシル化反応が進行するために、脱離基が存在せず、反応系がクリーンな方法である。このため、オリゴ糖合成において非常に有用な誘導体である。従来の合成法では、糖加水分解酵素触媒によるグリコシル化反応のドナー基質として用いる場合、ヒドロキシ基の保護並びに脱保護が必要となる。糖オキサゾリン誘導体は、糖加水分解酵素を用いるオリゴ糖の転移反応において効率的に反応が進行するため、水溶液中での簡易合成法の開発が望まれている。糖オキサゾリン誘導体の合成は、脱水反応になることに着目し、脱水縮合剤を用いる合成を試みた。脱水縮合剤として、水溶性カルボジイミドである 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(WSC)を用いた。原料として *N*-アセチルグルコサミンを用いて反応を行った結果、オキサゾリン誘導体の生成を確認した(Scheme 3)。過剰量のカルボジイミドを用いることにより、収率 35%程度で対応するオキサゾリン誘導体が得られた。また *N,N'*-ジアセチルガラクトサミンや、*N,N'*-ジアセチルキトビオースなどでもオキサゾリン誘導体が合成可能であり、本合成法の汎用性を示した。オキサゾリン誘導体の単離も可能であり、*N,N'*-ジアセチルキトビオースに対してカルボジイミドを 1 等量用いた場合で、対応するオキサゾリン誘導体が単離収率 21%で得られた。脱水縮合剤として、水溶性カルボジイミド以外にも、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)を用いた場合もオキサゾリン誘導体が生成した。DMT-MM を用いた場合では、オキサゾリン誘導体以外にも、水溶液中で安定な(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-2-デオキシ-2-アセトアミド- $\alpha$ -D-グルコピラノシドが得られた。また、カルボジイミド由来のウレア誘導体の存在下においても、酵素反応が進行することが示され、フリーの糖を出発原料とし、単一反応容器中でオキサゾリン合成とそれに引き続く、グリコシル化反応により目的とするグリコシドを直接合成できるシステムを初めて構築した。



Scheme 3 Synthesis of oxazoline derivatives using dehydrating agent

#### 第 5 章 総括

本研究では、糖環状誘導体に着目し、糖オルトエステル誘導体の簡易合成、1,2-環状炭酸エステルの合成と糖転移反応を指向した酵素探索、糖オキサゾリン誘導体の一段階合成を行った。今後、これらの方法を利用した糖加水分解酵素を用いるグリコシル化反応の更なる応用と発展が期待される。

# 論文審査結果の要旨

糖加水分解酵素を用いるグリコシル化反応は、オリゴ糖の調製法において、工業的に有用な方法であり、様々な研究が行われている。本論文は糖加水分解酵素を用いるグリコシル化反応への応用を指向した、糖環状誘導体の簡易合成と酵素反応への応用を目的として検討を行った成果を纏めたものであり、全編5章よりなる。

第1章は序論であり、本研究の背景と目的を述べている。

第2章では、固体試薬であるフッ化カリウムを用いる糖オルトエステル誘導体の合成法について述べている。また、本合成法は、様々な糖やアルコールに適用が可能であり汎用性が高いことも示している。本合成法は反応後の処理がろ過だけで済む簡便な合成法であり、糖オルトエステル誘導体の合成において、非常に有用な反応であると言える。

第3章では、第一節で、糖環状炭酸エステルの合成と求核剤との反応性の検討を行っている。糖環状炭酸エステルの基礎的な反応性が明らかとなり、糖環状炭酸エステルを用いる誘導体合成への知見を得ている。また、第二節では、糖環状炭酸エステルを加水分解する酵素の探索と、精製について述べている。糖環状炭酸エステルを加水分解する活性を複数の *Rhizopus* sp.由来の酵素製剤中より見出し、この活性画分の精製を行っている。部分精製を行った結果、分子量 5000 程度のエステラーゼ活性を示すタンパク質画分にグルコース炭酸エステルを加水分解する活性を見出し、新規酵素であることを示している。

第4章では、水溶液中での糖オキサゾリン誘導体の一段階合成法の開発と応用について述べている。還元末端の2位にアセトアミド基を持つ糖に対して、水溶液中で脱水縮合剤と反応させることにより、オキサゾリン誘導体が生成することを示している。さらに様々な糖で、オキサゾリン誘導体の生成を確認しており、本合成法の汎用性を示している。また、糖オキサゾリン誘導体を単離せずに、酵素反応が可能であることを示し、同一の反応器内での、オキサゾリン誘導体の合成とそれに引き続く糖転移反応への応用が可能であることを明らかにしている。

第5章は結論であり、上記各章を総括している。

以上要するに本論文は、糖環状誘導体の簡易合成法の開発と、糖環状誘導体の糖加水分解酵素を用いるグリコシル化反応への応用を行ったもので、糖鎖工学、材料化学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。