[*J. Appl. Glycosci.*, Vol. 49, No. 1, p. 45–55 (2002)]

平成 13 年度日本応用糖質科学会奨励賞受賞講演

糖水酸基が α -グリコシダーゼとリパーゼの活性と特異性に 及ぼす影響について

西尾俊幸*

日本大学生物資源科学部 (252-8510 藤沢市亀井野 1866)

Effect of Sugar Hydroxyl Groups on Activities and Specificities of α -Glycosidase and Lipase

Toshiyuki Nishio*

*Department of Biological Chemistry, College of Bioresource Sciences, Nihon University
(1866, Kameino, Fujisawa 252-8510, Japan)*

Using possible monodeoxy derivatives of *p*-nitrophenyl (*p*NP) α -D-glucopyranoside, -mannopyranoside, and -galactopyranoside as probe substrate, glycon specificities of α -glucosidases, -mannosidases, and -galactosidases from various sources were investigated, through hydrolysis of them. α -Glucosidases of *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus stearothermophilus*, and honeybee hydrolyzed no deoxy derivatives, while the enzymes of rice, sugar beet, flint corn, and *Aspergillus* (*A.*) *niger* hydrolyzed the 2-deoxy derivative with substantially high activities. Moreover, flint corn and *A. niger* enzymes showed, although low, activities against the 3-deoxy derivative. Jack bean and almond α -mannosidases both showed sufficient activities toward 6-deoxy derivative. *A. niger* α -galactosidase acted on only 2-deoxy derivative with substantially high activity, while the enzymes of green coffee bean and *Mortierella vinacea* hydrolyzed not only the 2-deoxy derivative but also 6-deoxy one with low activities. Oligosaccharides that contain 2- or 3-deoxygenated glucose were synthesized by the transesterification reaction of *A. niger* α -glucosidase. α - and β -Anomers of methyl 6-*O*-(*p*-tolylsulfonyl)-D-glucopyranoside, -mannopyranoside, and -galactopyranoside were acetylated partially by lipase-catalyzed transesterification with vinyl acetate. A lipase from *Pseudomonas cepacia* (lipase PS) revealed high activity and regioselectivity for the esterification of them. α -Glycopyranosides were acetylated preferentially at the C-2 hydroxyl group, while corresponding β -anomers were acetylated preferentially at the C-3 hydroxyl group. The best selectivity was observed in the reaction of the glucopyranosides. Using methyl 3-*O*-acetyl-6-*O*-(*p*-tolylsulfonyl)- β -D-glucopyranoside, which was prepared in quantitative yield by the lipase PS-catalyzed regioselective acetylation, as a common starting material, highly deoxygenated monosaccharides, namely 2,6-dideoxy-D-*arabino*-hexopyranose, 2,4-dideoxy-D-*threo*-hexopyranose, and 2,4,6-trideoxy-D-*threo*-hexopyranose, respectively, were chemically synthesized in good yields.

はるか太古から、光合成を行うことができる生物は、太陽光のエネルギーを使って豊富に存在する二酸化炭素と水を糖類に変換することで、光エネルギーを貯蔵可能な化学エネルギーの形に変えて利用できるようにしてきた。このようにして地球上に大量に蓄えら

れるようになった糖類に対し、多くの生物はそれを認識して分解することで生命活動のエネルギーを獲得するようになり、また、生体構成分子の生合成のための材料としても利用するようになった。この過程において、生物は糖類に係わる酵素の糖構造認識能と反応性をより高度に進化させていったものと思われる。

糖類は、複数の不斉炭素原子を骨格として持つポリ

* nishio@brs.nihon-u.ac.jp

ヒドロキシア aldehidあるいはケトンとして特定され、多くのジアステレオマーが存在し、一般に環状構造をとっている。このような糖分子の生物学的認識において、単糖やオリゴ糖のレベルでは、多くの場合その水酸基個々の「存在」と「立体配置」が重要な要素になっていると考えられる。つまり、糖の構造を認識する種々のタンパク質は、その水酸基群を正確に捉えることで他の化合物や糖分子と区別していることが推測される。実際に、糖に結合する数種類のタンパク質について、X線回折などによりその水酸基群との正確な相互作用（水素結合など）が示唆されている。部分的に修飾した糖誘導体を基質として用い、各種の酵素の作用における糖水酸基群の役割と重要性について調べた研究が、近年いくつか報告されるようになってきた。しかし、このような研究の報告数はまだ非常に少ない。そこで、本研究では糖質加水分解酵素の一種である α -グリコシダーゼと、糖質関連酵素ではないが糖類にも作用する油脂加水分解酵素リパーゼに関し、糖水酸基がこれら酵素の活性や特異性に及ぼす影響について、合成したさまざまな誘導体に対する作用を通して調べた。

α -グリコシダーゼの作用における 基質グリコン水酸基の重要性について

一般に、グリコシダーゼはオリゴ糖に対し高い加水分解活性を示すエキソ型酵素として知られているが、アルキルまたはアリールグリコシドや多糖に対しても高い活性を示すものも数多くある。本酵素は、基質グリコシドの非還元性末端糖（グリコン）の構造に対する高い特異性により分類されており、そのため、基質特異性については従来からアグリコンの種類やその結合の位置（アグリコンが糖の場合）などに関して調べられてきた。グリコシダーゼのグリコン特異性について調べる場合には、一般に糖の種類は固定しその部分

修飾体を用いて行うことが多い。たとえば、古くは Emil Fischer らによるエムルシンなどに関して行われた研究¹⁾に遡るが、最近では *Aspergillus* (A.) 属糸状菌²⁻⁴⁾や *Agrobacterium* 属細菌⁵⁾の β -グルコシダーゼ、大腸菌⁶⁾や子羊小腸⁷⁾の β -ガラクトシダーゼ、および大麦の α -グルコシダーゼ⁸⁾の部分デオキシ基質などに対する反応性の結果から、これらの酵素の作用における基質グリコンの各水酸基の重要性が論じられている。しかし、グリコシダーゼのグリコン特異性に関する研究には、まだ十分なデータが蓄積されているとはいえない。そこで、より多くの種類と由来の異なる酵素についてグリコン特異性を調べることにより、グリコシダーゼによるグリコン認識に関する何らかの傾向を見出せるのではないかと考えた。本研究では、まだ研究例の少ない α -グリコシダーゼのうち、 α -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20)、 α -マンノシダーゼ (EC 3.2.1.24)、および α -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.22) を対象とし、各種デオキシ基質に対するそれらの加水分解活性について調べた。また、 α -グルコシダーゼの糖転移反応を利用したデオキシ糖含有オリゴ糖の合成についても検討し、オリゴ糖生成に及ぼす糖水酸基の影響についても調べた。

1. α -グリコシダーゼのモノデオキシ基質に対する反応性について

p-ニトロフェニル (pNP) α -D-グルコシド (1)、-マンノシド (6)、および-ガラクトシド (11) の 2-, 3-, 4-, 6-モノデオキシ体 (Fig. 1) をそれぞれ化学合成し、それらのコンホーメーションを重水中での¹H-NMR や MM2 を用いた分子力場計算によるエネルギー最小化により調べたところ、いずれも非デオキシ体と同様に⁴C₁ イス型であることを確認できた⁹⁻¹¹⁾。そこで、さまざまな生物由来の α -グルコシダーゼ、-マンノシダーゼ、および-ガラクトシダーゼ（いずれも精製したもの）を対応するデオキシ基質に作用させて

Fig. 1. Structures of substrates used in this study.

Table 1. Relative rates of hydrolysis of each α -glycosidase against corresponding PNP α -D-glycopyranoside and its monodeoxy derivatives.A) α -Glucosidase

Enzyme source	Relative rate of hydrolysis (%) ^a			
	Substrate			
	2	3	4	5
<i>S. cerevisiae</i>	—	—	—	—
<i>B. stearothermophilus</i>	—	—	—	—
Honeybee I	—	—	—	—
Honeybee III	—	—	—	—
Rice	175	—	—	—
Sugar beet	244	—	—	—
Flint corn	231	3.7	—	—
<i>A. niger</i>	259	11.9	—	—

B) α -Mannosidase

Enzyme source	Relative rate of hydrolysis (%) ^a			
	Substrate			
	7	8	9	10
Jack bean	—	—	—	92.2
Almond	—	—	—	118

C) α -Galactosidase

Enzyme source	Relative rate of hydrolysis (%) ^a			
	Substrate			
	12	13	14	15
Green coffee bean	15.0	—	—	3.3
<i>M. vinacea</i>	19.0	—	—	8.8
<i>A. niger</i>	230	—	—	—

A) Hydrolytic activity of each α -glucosidase was assayed under following condition: *S. cerevisiae* and *B. stearothermophilus*; in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at 37°C, honeybee I; in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) at 35°C, honeybee III; in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) at 35°C, rice and *A. niger*; in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) at 37°C, sugar beet and flint corn; in 50 mM sodium acetate buffer containing 0.05% Triton X-100 (pH 4.5) at 37°C. B) Hydrolytic activity of each α -mannosidase was assayed in 100 mM sodium citrate buffer (pH 4.5) at 25°C. C) Hydrolytic activity of each α -galactosidase was assayed under following condition: green coffee bean; in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) at 25°C, *M. vinacea*; in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 4.9) at 40°C, *A. niger*; in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) at 25°C. ^aRelative rate of hydrolysis was expressed by comparison with the amount of *p*-nitrophenol that was released from corresponding α -D-glycopyranoside for 30 min by each α -glycosidase, which was taken as 100%. —, activity was too low to be measured.

みた。Table 1 は、おのおのの酵素についてのデオキシ基質分解の様子と非デオキシ基質分解活性を 100% としたときの相対活性を示したものである。反応はそれぞれの酵素について最適 pH で行い、酵素活性は反応により遊離した *p*-ニトロフェノールを定量することにより評価した。 α -グルコシダーゼについては、*Saccharomyces* (*S.*) *cerevisiae* (注 1), *Bacillus* (*B.*) *stearothermophilus* (注 2), およびミツバチ¹²⁾の酵素のようにいずれのデオキシ基質にも有意な活性を示さないものと、ライス¹³⁾, テンサイ¹⁴⁾, フリントコーン¹⁵⁾, および *A. niger*¹⁶⁾の酵素のように 2-デオキシ体 (2) に対し高い活性を示すものがあった。また、フリントコーンや *A. niger* の酵素は、活性は低いが 3-デオキシ体 (3) にも作用することがわかった⁹⁾。このように、 α -グルコシダーゼにはその作用において、基質グリコンのすべての水酸基の存在が必須であるものと、特定の水酸基 (2 位や 3 位) の重要性が低い、少なくとも二つのタイプのものがあることが明らかとなった。 α -グルコシダーゼは、そのアミノ酸配列の相同性に基づいてファミリー I と II の二つのグループに大きく分けられている^{17,18)}。前者のタイプの酵素はファミリー I に、また、後者のタイプの酵素はファミリー II に属している。このことは、本酵素のデオキシ糖認識能とアミノ酸相同性には明らかな相関があることを示している。 α -グルコシダーゼには、テンサイ、ライス、および *A. niger* のもののよう、マルトースの非還元性末端よりも還元性末端グルコースに対して高い親和性を示すものがある^{16,19)}。酵素作用におけるアグリコン糖の重要性も考慮して、今後は部分デオキシ化マルトース誘導体に対する作用についても検討してゆく必要があると考えている。

α -マンノシダーゼについては、ナタ豆 (注 3), アーモンド (注 4) の酵素とも 6-デオキシ体 (*p*NP α -D-ラムノシド, 10) をよく加水分解したことから、これらの酵素の作用においては、基質グリコンの 6 位水酸基は必須でないことが明らかとなった¹⁰⁾。

注 1) Pure grade enzyme was purchased from Oriental Yeast Co., and it was further purified by cation exchange and gel-filtration chromatography.

注 2) Pure grade enzyme was purchased from Sigma Chemical Co.

注 3) Pure grade enzyme was purchased from Wako Pure Chemical Ind.

注 4) Pure grade enzyme was purchased from Sigma Chemical Co.

α -ガラクトシダーゼについては、*A. niger* (注5) の酵素のように2-デオキシ体 (12) のみに高い活性を示すものと、コーヒー豆 (注6) や *Mortierella* (*M.*) *vinacea* (注7) の酵素のように活性は低い2-デオキシ体ばかりでなく6-デオキシ体 (*p*NP α -D-フコシド, 15) にも作用する二つのタイプのものがあった¹¹⁾。いずれにしても、これらの酵素の作用においては、2位水酸基は重要でないことが明らかとなった。前者と後者のアミノ酸配列の相同性 (*A. niger*-コーヒー豆間; 35%, *A. niger*-*M. vinacea* 間; 32%) は、後者の二つの酵素間の相同性 (コーヒー豆-*M. vinacea* 間; 43%) よりも低かった。 α -グルコシダーゼほど明瞭ではないが、この事実は α -ガラクトシダーゼについてもデオキシ糖認識能とアミノ酸配列の相同性には相関があることを示している。

モノデオキシ体と同様に、おのおのの *p*NP α -D-グリコシドについてモノメチル化体をすべて合成し、それらに上記の α -グリコシダーゼを作用させてみた。しかし、いずれの誘導体に対しても有意な加水分解活性を示さなかったため、ここではモノメチル化体に関しての実験の詳細は特に記載しなかった。メトキシ基の立体障害のためにこれらの誘導体は酵素活性部位に入れないことが、この原因ではないかと考えている²⁰⁾。

いくつかの β -グルコシダーゼや β -ガラクトシダーゼでは、その作用において基質グリコンの2位水酸基が必須であることが確かめられている¹⁻⁷⁾。さらに、*Cellulomonas fimi* の生産する β -グルコシダーゼでは基質グリコンの2位水酸基が酵素-基質中間体の遷移状態安定化に寄与していることが、X線回折やポイントミューテーションの手法を用いた研究により指摘されている²¹⁾。このような基質グリコンの2位水酸基の重要性は、酵母の α -グルコシダーゼでも指摘されている²²⁾。一方、大麦の α -グルコシダーゼについては、基質グリコンのすべての水酸基が酵素-基質中間体の遷移状態安定化に寄与しているが、4位と6位の水酸基は特に酵素への結合に重要であることが示唆された⁸⁾。また、*A. niger* のグルコアミラーゼについても、マル

トースの非還元性末端の4位および6位水酸基が酵素への結合において重要な役割をしていることが確かめられている²³⁻²⁵⁾。これらの事実と本研究の結果から、酵素の作用において基質の各グリコン水酸基の役割は異なり、また、その傾向は α -グルコシダーゼと β -グルコシダーゼ間ばかりでなく種々の α -グリコシダーゼ間においても違っていることが明らかとなった。また、デオキシ糖特異性は同種 α -グリコシダーゼにおいてはほぼ同様な傾向があるものの、 α -グルコシダーゼのように大きく二つのグループに分かれるような場合もあることがわかった。一方、用いたすべての α -グリコシダーゼにみられる共通点としては、それぞれの4-デオキシ体 (4, 9, 14) には作用しないことが挙げられる。 α -グリコシダーゼに関しては、基質グリコンの4位水酸基が糖との結合において共通に重要な役割を担っているのではないかと考えている。

Table 2. Kinetic parameters of the α -glucosidases for the hydrolysis of PNP α -D-glucopyranoside (1) and its 2- and 3-deoxy derivatives (2 and 3).

	Substrate		
	1	2	3
Rice			
K_m (mM)	2.62	6.66	
V_{max} (μ mol/min/mg protein)	26.3	142	
V_{max}/K_m	10.0	21.3	
Sugar beet			
K_m (mM)	1.04	5.70	
V_{max} (μ mol/min/mg protein)	0.065	0.42	
V_{max}/K_m	0.063	0.074	
Flint corn			
K_m (mM)	0.88	7.38	9.98
V_{max} (μ mol/min/mg protein)	1.82	15.2	0.57
V_{max}/K_m	2.07	2.06	0.057
<i>A. niger</i>			
K_m (mM)	0.59	6.23	10.2
V_{max} (μ mol/min/mg protein)	1.04	29.8	1.30
V_{max}/K_m	1.76	4.78	0.13

Hydrolytic activity of each α -glucosidase was assayed at substrate concentrations between 0.5 and 2.5 mM under following condition: rice and *A. niger*; in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) at 37°C, sugar beet and flint corn; in 50 mM sodium acetate buffer containing 0.05% Triton X-100 (pH 4.5) at 37°C. The values of K_m and V_{max} were calculated from reciprocal plots of the reaction curves. Protein in the solution was determined by the method of Lowry using bovine serum albumin as a standard.

注5) Pure grade enzyme was purchased from Sigma Chemical Co.

注6) Pure grade enzyme was purchased from Boehringer Mannheim Co.

注7) Pure grade enzyme was purchased from Seikagaku Ind.

Table 3. Kinetic parameters of the α -mannosidases for the hydrolysis of PNP α -D-mannopyranoside (6) and its 6-deoxy derivative (10).

	Substrate	
	6	10
Jack bean		
K_m (mM)	1.96	22.3
V_{max} (μ mol/min/mg protein)	18.3	69.0
V_{max}/K_m	9.34	3.09
Almond		
K_m (mM)	2.51	3.57
V_{max} (μ mol/min/mg protein)	40.8	52.6
V_{max}/K_m	16.3	14.7

Hydrolytic activity of each α -mannosidase was assayed at substrate concentrations between 1.0 and 5.0 mM in 100 mM sodium citrate buffer (pH 4.5) at 25°C. The values of K_m and V_{max} were calculated from reciprocal plots of the reaction curves. Protein in the solution was determined by the method of Lowry using bovine serum albumin as a standard.

2. α -グリコシダーゼのモノデオキシ基質分解の反応速度解析

デオキシ基質を加水分解した上記の酵素について、反応の速度論的解析を非デオキシ基質とともにに行い比較してみた。Table 2 に示したように、 α -グルコシダーゼについては、ライス、テンサイ、フリントコーン、*A. niger* の酵素とも 2-あるいは 3-デオキシ体 (2 あるいは 3) に対する K_m 値は非デオキシ体のものに比べ大きくなっており、デオキシ化による酵素-基質間の親和性の低下が確認された。しかし、2-デオキシ体 (2) に対する V_{max}/K_m の値はいずれの酵素においても非デオキシ体のそれとほぼ等しいかまたは大きくなっており、反応効率の点からは劣っていなかった。これは、グリコンの 2 位水酸基を水素に置換したことで電子吸引力が失われ、反応中間体であるカルボニウム-オキシニウムカチオンがより生じやすくなったことが原因であると思われる。いずれにしても、これらの酵素は(とくに *A. niger* の酵素は)高い 2-デオキシ- α -D-アラビノ-ヘキシダーゼ活性を有することがわかった⁹⁾。

α -マンノシダーゼについては、Table 3 に示したようにナタ豆およびアーモンドの酵素とも 6-デオキシ体 (10) に対する K_m 値は非デオキシ体のものに比べ大きくなったことから、やはりデオキシ化による親和性の低下が確認された。しかし、アーモンドにおいてはそれほど大きな K_m 値の低下はみられず、また、

Table 4. Kinetic parameters of the α -galactosidases for the hydrolysis of PNP α -D-galactopyranoside (11) and its 2- and 6-deoxy derivatives (12 and 15).

	Substrate		
	11	12	15
Green coffee bean			
K_m (mM)	0.85	27.4	38.5
V_{max} (μ mol/min/mg protein)	11.7	16.9	4.80
V_{max}/K_m	13.8	0.62	0.12
<i>M. vinacea</i>			
K_m (mM)	0.96	10.2	27.0
V_{max} (μ mol/min/mg protein)	47.1	95.2	111.1
V_{max}/K_m	49.1	9.33	4.11
<i>A. niger</i>			
K_m (mM)	0.54	2.63	
V_{max} (μ mol/min/mg protein)	19.3	175	
V_{max}/K_m	35.7	66.5	

Hydrolytic activity of each α -galactosidase was assayed at substrate concentrations between 0.8 and 2.4 mM under following condition: green coffee bean; in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) at 25°C, *M. vinacea*; in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 4.9) at 40°C, *A. niger*; in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) at 25°C. The values of K_m and V_{max} were calculated from reciprocal plots of the reaction curves. Protein in the solution was determined by the method of Lowry using bovine serum albumin as a standard.

V_{max}/K_m 値も非デオキシ体のものとほぼ同じであった。このことは、アーモンドの酵素は α -D-マンノシダーゼとほぼ同等の α -D-ラムノシダーゼとしての機能を有していることを示している¹⁰⁾。

α -ガラクトシダーゼについては、Table 4 に示したようにコーヒー豆と *M. vinacea* の酵素では 2- および 6-デオキシ体 (12 および 15) に対する K_m 値は非デオキシ体のものに比べ大きくなっており、また V_{max}/K_m 値も小さかったことから、デオキシ化による親和性、反応効率とも低下したことが確認された。しかし、*A. niger* の酵素については α -グルコシダーゼの場合と同様に、基質グリコンの 2-デオキシ化による親和性の低下は見られるものの、高い 2-デオキシグリコシド分解活性(2-デオキシ- α -D-リキソ-ヘキシダーゼ活性)を示すことがわかった¹¹⁾。

3. *A. niger* の α -グルコシダーゼのデオキシ糖認識能と糖転移反応を利用したデオキシ糖含有オリゴ糖の酵素合成

抗生物質などの天然由来の生物活性物質には、その構成成分としてオリゴ糖を有するものが数多くある

Fig. 2. Oligosaccharides produced by transesterification reaction of *A. niger* α-glucosidase.

が、その機能については明確になっていない。それらオリゴ糖のほとんどが特殊糖より構成されており、中でも2位がデオキシ化された糖を含むものが非常に多い²⁶⁾。そのため、2-デオキシオリゴ糖の化学合成については多くの報告がなされている²⁷⁾。しかし、2-デオキシ糖のグリコシレーション反応は、用いるドナー糖の安定性や1位の立体制御の点で通常のグリコシレーション反応に比べて良好な結果を得るのが難しい。そこで、*A. niger* のα-グルコシダーゼのデオキシ糖認識能と糖転移反応を利用して、2-デオキシ糖含有オリゴ糖やその他3-デオキシ糖含有オリゴ糖についても酵素合成を検討した²⁸⁾。

基質として、ドナー糖には

-

ニトロフェニル α-D-グルコシド (1) とその2-および3-デオキシ体 (2 および 3, 1 当量) を、アクセプター糖にはエチルチオ β-D-グルコシド (16, 6 当量) を用いた。*A. niger* の酵素は精製品を用い、反応はバッファーとアセトニトリル=1:1 の反応液中において 37°C で行った。酵素添加量は、それぞれの

-

ニトロフェニル化基質に対する加水分解活性単位で同量になるようにした。その結果、いずれも主生成物としてイソマルトース誘導体 (17, 18, 19) を生成し、また、1 と 16 および 2 と 16 の反応では副生成物としてマルトース誘導体 (20, 21) が確認できた (Fig. 2)。いずれの反応においても、三糖以上のオリゴ糖の生成は確認できなかった。イソマルトシドやマルトシド (生成率約 20%) に比べ、その非還元性末端 2- および 3-デオキシ体については約 60% という非常に高い生成率が得られた。酵素の添

加量を増やしてもこれらデオキシ 2 糖の加水分解率は上昇せず、やはり高いオリゴ糖生成率 (約 60%) を保っていた。この原因としては、イソマルトシドやマルトシドは *A. niger* のα-グルコシダーゼにより速やかに加水分解されるが、これらのデオキシ体は酵素による加水分解を受けにくく、そのため反応液中に蓄積して行くためであると考えている。デオキシオリゴ糖の酵素合成については、中野らによっても *A. niger* のα-グルコシダーゼのデオキシグルコース縮合反応を利用して検討されており、やはり良好な結果が得られている²⁹⁾。

上記の結果は、デオキシ糖を認識し作用できるグリコシダーゼの糖転移反応が、化学合成では難しいデオキシオリゴ糖類の合成に利用できることを示すものである。

リパーゼによる糖エステル合成に 及ぼす基質糖水酸基の立体配置 の影響について

リパーゼ (EC 3.1.1.3) はトリグリセリドのエステル結合を加水分解する酵素であり、微生物から高等動物に至るまでさまざまな生物に見いだされている。本酵素は三大消化 (加水分解) 酵素の一つであり、他の二つのアミラーゼやプロテアーゼと同様に、工業用酵素として開発され油脂分解などに利用されている。リパーゼの反応は可逆的であり、反応系の水分を減らすことによりエステル結合の生成を触媒する。また、エステル交換反応をも触媒し、この反応は油脂の改質

に利用されている。リパーゼは基質の立体および反応位置に対する特異性がきわめて高いことや有機溶媒に対して比較的安定であることから、有機溶媒中で不斉触媒として使用され、そのエステル交換反応によってさまざまな光学活性アルコールやエステルの合成が検討され多くの成果が挙げられている。最近の10年間をみても、リパーゼを用いた光学活性アルコールやエステルの合成に関して膨大な数の報告がなされており、また、優れた総説やそれらをまとめた冊子もたくさん出されている。

糖もアルコールの一種であり、リパーゼの基質になることから、そのエステル交換反応を利用した部分エステル化糖の酵素合成がさかんに検討され報告された³⁰⁻⁴⁵⁾。それらの多くは、特定の糖誘導体について行われたもので、糖分子構造とエステル化の位置特異性に関する規則性についてはあまり触れられていない。そこで本研究では、リパーゼのエステル交換反応による糖エステル合成において、用いる糖の構造の違いがそれらの2-3位の2級水酸基のエステル化に及ぼす影響について調べることにした。また、リパーゼの反応によって得られた糖エステルを利用し、高度デオキシ糖の化学合成についても検討した。

1. リパーゼによる糖のエステル化反応に及ぼす基質糖構造の影響⁴⁶⁾

リパーゼによる糖エステル合成の基質としては、Fig. 3に示した6位トシル化メチルグルコシド、ガラクトシド、マンノシドの α 、 β 両アノマー体の合計6種(22-27)を用いた。6位水酸基をトシル化したのは一級水酸基保護の意味だけでなく、デオキシ化、アミノ化、ハロゲン化などが容易に行え、さまざまな6位置換誘導体を作ることができるからである。リパーゼについては、工業用に開発され市販されている微生物由来の粗酵素製剤を使用し、反応はアシルドナーでもあるビニルアセテート中での非水系で行った。反応は、500 mgの基質を含む10 mLのビニルアセテート中にリパーゼ製剤1 gを加え、45°Cでマグネティックスターラーにより攪拌しながら行った。

α -グルコシド(22)を基質として用い、5種類のリパーゼ製剤について上記反応を行ったところ、*Pseudomonas cepacia*由来の酵素剤であるリパーゼPS(天野エンザイム)の反応効率が最も高かった。そこで、以降の実験では、すべてリパーゼPSを用いることとした。Table 5は、各誘導体について反応を行い、基質がほぼ消失した時点で得られた生成物の種類と収率について示したものである。いずれのグリコシドについてもモノアセチル体が主生成物として得られ、 α -

Fig. 3. Structures of substrates used in this study.

Table 5. Lipase PS-catalyzed acetylation of α - and β -anomers of the glucoside (22 and 23), mannoside (24 and 25), and galactoside (26 and 27) derivatives.

Substrate	Conversion (%) ^a	Reaction time (h)	Monoacetate(%) ^b			Isolated yield (%) ^c
			2-O-Acetate	3-O-Acetate	4-O-Acetate	
22	100	24	100	0	0	99.1 ^d
23	100	6	0	100	0	98.5 ^d
24	83	144	73	27	0	83.8 ^e
25	97	96	35	65	0	85.8 ^e
26	95	24	100	0	0	50.2 ^d
27	98	9	30	70	0	85.1 ^e

^aDetermined by HPLC analysis. Column: Shodex C-18 (4.6×150 mm); eluent: 55: 45 acetonitrile-H₂O (22, 23, 25, 26 and 27), 40: 60 acetonitrile-H₂O (24). ^bAs determined by ¹H-NMR. ^cObtained by column chromatography on silica gel. ^dMonoacetate. ^eMixture of 2-O-acetate and 3-O-acetate.

アノマーでは2位の、 β -アノマーでは3位の水酸基が優先的にアセチル化されていた。しかし、 α -ガラクトシド (26) についてはジアセテートもかなりの量が生成していた。各グリコシドとも、 α -アノマーよりも β -アノマーの方が反応速度が高く、また、マンノシドはグルコシドやガラクトシドに比べて反応性が低かった。これらのことは、リパーゼによる単糖誘導体の2-3位水酸基のエステル化の位置については1位水酸基の立体が、位置特異性の高さについては2-3位水酸基の立体が、そして反応速度については両者がそれぞれ影響していることを示している。エステルの速度および位置特異性の高さに関し、グルコシドにおいて最も良い結果が得られ、2-アセテートと3-アセテートが α -アノマー (22) および β -アノマー (23) からそれぞれほぼ定量的に得られた。このように、リパーゼが自然界で最も多く存在するグルコースの構造に対してきわめて高い特異性と反応性を示すことはたんなる偶然であろうか、それとも何らかの意味があるのであろうか、大変興味を持たれるところである。

2. リパーゼ反応で合成した部分アセチル化糖を原料として用いた高度デオキシ糖の化学合成⁴⁷⁾

糖の特定の水酸基を他の原子や官能基で置換した誘導体を化学合成する場合、原料糖の水酸基群を部分的に保護することがしばしば必要となる。糖水酸基の部分保護については、従来からさまざまな方法が検討されており、その中でも有機スズ試薬を用いた方法は選択性・収率ともに優れている。しかし、有機スズについては、その毒性や環境ホルモンとしての有害性が指摘されている。リパーゼを利用した部分保護糖の酵素合成は、その簡便性と安全性から化学試薬を用いる方

法によって変わり有用な手段になるものと思われる。ここでは、上記のリパーゼによるエステル交換反応により、 β -グルコシド (23) から定量的に合成することができた部分アセチル化糖 3-O-acetyl-6-O-(*p*-tolylsulfonyl)- β -glucopyranoside (28) を出発原料として用い、Chromomycin⁴⁸⁾, Chlorothricin⁴⁹⁾, そして Olivomycin⁵⁰⁾ など数多くの天然生物活性物質中に構成成分として見出される 2,6-ジデオキシ-D-アラビノ-ヘキソピラノース (29)⁵¹⁻⁵³⁾ や、その他 2,4-ジデオキシ-D-スレオ-ヘキソピラノース (30)⁵⁴⁾, 2,4,6-トリデオキシ-D-スレオ-ヘキソピラノース (31) といった高度デオキシ糖の化学合成について検討した (Fig. 4)。2,6-ジデオキシ糖 (29) は、2位水酸基のフェノキシチオカルボニル化→ラジカル還元による2位デオキシ化→4位水酸基のアセチル化→還元による6位デオキシ化とそれに続く脱アセチル化→グリコシドの加水分解の5工程により、28 から全収率約37%の好収率で合成できた。2,4-ジデオキシ糖 (30) は、2,4位水酸基のフェノキシチオカルボニル化→ラジカル還元による2,4位デオキシ化→6位の脱トシル化→グリコシドの加水分解の4工程により、28 から全収率約40%の好収率で合成できた。また、2,4,6-トリデオキシ糖 (31) は、2,4位水酸基のフェノキシチオカルボニル化→ラジカル還元による2,4位デオキシ化→還元による6位デオキシ化とそれに続く脱アセチル化→グリコシドの加水分解の4工程により、28 から全収率約28%の好収率で合成できた。

以上のように、リパーゼにより合成した部分アセチル化糖を用い、簡便かつ好収率で各種の高度デオキシ糖を合成することに成功した。これは、リパーゼ反応

Fig. 4. Syntheses of highly deoxygenated monosaccharides from compound 28.

の糖誘導体合成への有用性を示すものである。

このたびは栄誉ある日本応用糖質科学会奨励賞をいただき、誠にありがとうございました。身に余る光栄と存じます。岡田巖太郎会長、谷口 肇副会長、三橋正和副会長、南浦能至副会長、ご推薦いただきました東日本支部長の坂野好幸先生、ならびに学会賞受賞選考委員の諸先生方に厚くお礼申し上げます。また、ご支援を賜り、そして貴重な酵素をご提供下さいました北海道大学農学部の中葉誠哉先生、木村淳夫先生、さまざまなご支援を賜りました同大学の松井博和先生に心より感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、終始暖かいご支援ご指導を賜りました日本大学生物資源科学部の奥 忠武先生、伊藤定一郎先生、研究プロジェクトに入れていただきご支援を賜りました同学部・生命科学研究所長の別府輝彦先生、ならびに貴重なご助言を賜りました同学部の山崎真鈴先生、石津 敦先生に深く感謝申し上げます。また、研究プロジェクトに入れていただき、さらに各種の機器分析においてご協力を賜りました国立医薬品食品衛生研究所の宮田直樹先生、栗原正明先生、ならびに理化学研究所の中田 忠先生、高月 昭先生に深く感謝申し上げます。また、貴重な酵素をご提供下さいました天野エンザイム(株)の住田光夫氏、ならびに機器分析においてご協力いただきましたバリアンテクノロジージャパンの串田克彦氏、清 悦久氏、渡辺裕之氏の各氏にお礼申し上げます。

本研究は、日本大学生物資源科学部農芸化学科生物有機化学研究室の大学院学生と共に行ったものであります。精力的に研究に取り組み協力してくれました三宅弥生さん(現・加藤美峰園本舗(株))、袴田 航氏(現・理化学研究所)、藤倉 勉氏(現・キューピー(株))、金井知香さん(現・宮島醤油(株))、および積極的に研究に協力してくれました石井 圭氏(現・北興化学工業(株))、安田真紀さん(現・曾田香料(株))の各氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) E. Fischer, M. Bergmann and H. Schotte: Über das glucal und seine umwandlung in neue stoffe aus der gruppe des traubenzuckers. *Chem. Ber.*, **53**, 509-547 (1920).
- 2) K.-R. Roeser and G. Legler: Role of sugar hydroxyl groups in glycoside hydrolysis, cleavage mechanism of deoxyglucosides and related substrates by β -glucosidase A₃ from *Aspergillus wentii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **657**, 321-333 (1981).
- 3) T. Mega and Y. Matsushima: Energy of binding of *Aspergillus oryzae* β -glucosidase with the substrate, and the mechanism of its enzymic action. *J. Biochem.*, **94**, 1637-1647 (1983).
- 4) B.W. Sigurskjold, B. Duus and K. Bock: Hydrolysis of substrate analogues catalysed by β -D-glucosidase from *Aspergillus niger*. Part II; deoxy and deoxyhalo derivatives of cellobiose. *Acta Chem. Scand.*, **45**, 1032-1041 (1991).
- 5) M.N. Namchuk and S.G. Withers: Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase, kinetic analysis of the role of noncovalent enzyme/substrate interaction. *Biochemistry*, **34**, 16194-16202 (1995).
- 6) J.D. McCarter, M.J. Adam and S.G. Withers: Binding energy and catalysis. *Biochem. J.*, **286**, 721-727 (1992).
- 7) A. River-Sagredo, F.J. Canada, O. Nieto, J. Jimenez-Barbero and M. Martin-Lomas: Substrate specificity of small-intestinal lactase, assessment of the role of the substrate hydroxyl groups. *Eur. J. Biochem.*, **209**, 415-422 (1992).
- 8) T.P. Frandsen, F. Lok, E. Mirgorodskaya, P. Roepstorff and B. Svensson: Purification, enzymatic characterization, and nucleotide sequence of a high-isoelectric-point α -glucosidase from barley malt. *Plant Physiol.*, **123**, 275-286 (2000).
- 9) W. Hakamata, T. Nishio and T. Oku: Synthesis of *p*-nitrophenyl 3- and 6-deoxy- α -D-glucopyranosides and their specificity to rice α -glucosidase. *J. Appl. Glycosci.*, **46**, 459-463 (1999).
- 10) T. Nishio, Y. Miyake, T. Tsujii, W. Hakamata, K. Kadokura and T. Oku: Hydrolytic activity of α -mannosidase against deoxy derivatives of *p*-nitrophenyl α -D-mannopyranoside. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 2038-2042 (1996).
- 11) W. Hakamata, T. Nishio and T. Oku: Hydrolytic activity of α -galactosidases against deoxy derivatives of *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside. *Carbohydr. Res.*, **324**, 107-115 (2000).
- 12) S. Takewaki, S. Chiba, A. Kimura, H. Matsui and Y. Koike: Purification and properties of α -glucosidase of the honey bee *Apis mellifera* L. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 731-740 (1980).
- 13) N. Takahashi, T. Shimomura and S. Chiba: Studies on α -glucosidase in rice. Part I. isolation and some properties of α -glucosidase I and α -glucosidase II. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 2015-2024 (1971).
- 14) S. Chiba, S. Inomata, H. Matsui and T. Shimomura: Purification and properties of an α -glucosidase (glucoamylase) in sugar beet seed. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 241-245 (1978).
- 15) S. Chiba and T. Shimomura: Purification and some properties of flint corn α -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1033-1040 (1975).
- 16) A. Kita, H. Matsui, A. Somoto, A. Kimura, M. Takata and S. Chiba: Substrate specificity and subsite affini-

- ties of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2327–2335 (1991).
- 17) S. Chiba: Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1233–1239 (1997).
 - 18) S. Chiba: Studies on molecular mechanisms in glycosidases. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **73**, 1001–1012 (1999).
 - 19) S. Chiba: Action and classification of α -glucosidase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **27**, 84–90 (1980).
 - 20) W. Hakamata, T. Nishio, R. Sato, T. Mochizuki, K. Tsuchiya, M. Yasuda and T. Oku: Synthesis of monomethyl derivatives of *p*-nitrophenyl α -D-glucose, galactose, and mannopyranosides and their hydrolytic properties against α -glycosidases. *J. Carbohydr. Chem.*, **19**, 359–377 (2000).
 - 21) V. Notenboom, C. Birsan, M. Nitz, D.R. Rose, R.A.J. Warren and S.G. Withers: Insights into transition state stabilization of the β -1,4-glycosidase Cex by covalent intermediate accumulation in active site mutants. *Nature Struct. Biol.*, **5**, 812–818 (1998).
 - 22) K.S.E. Tanaka, J. Zhu, X. Huang, F. Lipari and A.J. Bennet: Glycosidase-catalyzed hydrolysis of 2-deoxyglucopyranosyl pyridinium salts; effect of the 2-OH group on binding and catalysis. *Can. J. Chem.*, **78**, 577–582 (2000).
 - 23) K. Bock and H. Pedersen: The substrate specificity of the enzyme amyloglucosidase (AMG). Part I. Deoxy derivatives. *Acta Chem. Scand.*, **B 41**, 617–628 (1987).
 - 24) T.P. Frandsen, B.B. Stoffer, M.M. Palcic, S. Hof and B. Svensson: Structure and energetics of the glucoamylase-isomaltase transition-state complex probed by using modeling and deoxygenated substrates coupled with site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.*, **263**, 79–89 (1996).
 - 25) M.R. Sierks and B. Svensson: Energetic and mechanistic studies of glucoamylase using molecular recognition of maltose OH groups coupled with site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **39**, 8585–8592 (2000).
 - 26) A. Kirschning, A.F.-W. Bechthold and J. Rohr: Chemical and biochemical aspects of deoxysugars and deoxysugar oligosaccharides. *Top. Curr. Chem.*, **188**, 1–84 (1997).
 - 27) J. Thiem and W. Klaffke: Synthesis of deoxy oligosaccharides. *Top. Curr. Chem.*, **154**, 285–332 (1990).
 - 28) C. Kanai, Y. Yoshihara, Y. Suzuki, N. Yamamoto, T. Nishio and T. Oku: Enzymatic synthesis of deoxyoligosaccharides by α -glucosidase. in *Abstracts Annual Meeting of Japan Society for Biosci. Biotech. Agrochem.*, Kyoto, Japan, 24 th–26 th March, p. 229 (2001).
 - 29) H. Nakano, K. Hamayasu, K. Fujita, K. Hara, M. Ohi, H. Yoshizumi and S. Kitahata: Synthesis of 2-deoxyglucosyloligosaccharides through condensation of 2-deoxy-D-glucose by glucoamylase and α -glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1732–1736 (1995).
 - 30) M. Therisod and A.M. Klibanov: Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5638–5640 (1986).
 - 31) M. Therisod and A.M. Klibanov: Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugars catalyzed by lipases in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3977–3981 (1987).
 - 32) W.J. Hennen, H.M. Sweers, Y.-F. Wang and C.-H. Wong: Enzymes in carbohydrate synthesis: Lipase-catalyzed selective acylation and deacylation of furanose and pyranose derivatives. *J. Org. Chem.*, **53**, 4939–4945 (1988).
 - 33) F. Nicotra, S. Riva, F. Secundo and L. Zucchini: An interesting example of complementary regioselective acylation of secondary hydroxyl groups by different lipases. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1703–1704 (1989).
 - 34) B. Daniel and P.D. Bellis: Enzyme-mediated regioselective acylations of flavonoid disaccharide monoglycosides. *Helv. Chim. Acta*, **73**, 1837–1844 (1990).
 - 35) P. Ciuffreda, D. Colombo, F. Ronchetti and L. Toma: Regioselective acylation of 6-deoxy-L- and -D-hexosides through lipase-catalyzed transesterification. Enhanced reactivity of the 4-OH function in the L series. *J. Org. Chem.*, **55**, 4187–4190 (1990).
 - 36) D.G. Drueckhammer, W.J. Hennen, R.L. Pederson, C. F. Barbas, C.M. Gautheron, T. Krach and C.-H. Wong: Enzyme catalyzed in synthetic carbohydrate chemistry. *Synthesis*, **1991**, 499–525 (1991).
 - 37) D. Colombo, F. Ronchetti and L. Toma: Enzymic acylation of sugars, rationale of the regioselective butyrylation of secondary hydroxyl groups of D- and L-galactose and mannopyranosides. *Tetrahedron*, **47**, 103–110 (1991).
 - 38) M.J. Chinn, G. Lacazio, D. G. Spackman, N.J. Turner and S.M. Roberts: Regioselective enzymatic acetylation of methyl 4, 6-O-enzyldene- α - and β -D-glucopyranoside. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1992**, 661–662 (1992).
 - 39) F. Moris and V. Gotor: Lipase-mediated alkoxycarbonylation of nucleosides with oxime carbonates. *Tetrahedron Lett.*, **48**, 9869–9876 (1992).
 - 40) L. Panza, M. Luisetti, E. Crociati and S. Riva: Selective acylation of 4,6-O-benzylidene glucopyranosides by enzymatic catalysis. *J. Carbohydr. Chem.*, **12**, 125–130 (1993).
 - 41) R. Pulido and V. Gotor: Towards the selective acylation of secondary hydroxyl groups of carbohydrates using oxime esters in an enzyme-catalyzed process. *Carbohydr. Res.*, **252**, 55–68 (1994).
 - 42) A.T.J.W. Goeda, M. Oosterom, M.P.J. Deurzen, R.A. Sheldon, H. Bekkum and F. Rantwijk: Selective lipase-catalyzed esterification of alkyl glycosides. *Biocatalysis*, **9**, 145–155 (1994).
 - 43) D.A. MacManus and E.N. Vulfson: Substituent ef-

- fects on the regioselectivity of enzymatic acylation of 6-*O*-alkylglycopyranosides using *Pseudomonas cepacia* lipase. *Carbohydr. Res.*, **279**, 281–291 (1995).
- 44) N.B. Bashir, S.J. Phythian, A.J. Reason and S.M. Roberts: Enzymatic esterification and de-esterification of carbohydrates: Synthesis of a naturally occurring rhamnopyranoside of *p*-hydroxybenzaldehyde and a systematic investigation of lipase-catalysed acylation of selected arylpyranosides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1995**, 2203–2222 (1995).
- 45) M.Gelo-Pujic, E. Guibe-Jampel, A. Loupy, S.A. Galema and D. Mathe: Lipase-catalysed esterification of some α -D-glucopyranosides in dry media under focused microwave irradiation. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1996**, 2777–2780 (1996).
- 46) T. Nishio, T. Fujikura, Y. Onishi, W. Hakamata, N. Osada, J. Kaneko and T. Oku: Regioselective acetylation of secondary hydroxyl groups of carbohydrates by lipase-catalyzed transesterification. *J. Appl. Glycosci.*, **44**, 9–14 (1997).
- 47) T. Nishio, T. Fujikura, N. Osada, W. Hakamata, J. Nakate and T. Oku: Synthesis of highly deoxidized monosaccharides from methyl 3-*O*-acetyl-6-*O*-(*p*-tolylsulfonyl)- β -D-glucopyranoside. *J. Appl. Glycosci.*, **44**, 175–181 (1997).
- 48) M. Miyamoto, Y. Kawamatsu and M. Shinohara: Structures and properties of the sugars obtained from the chromomycins. *Tetrahedron*, **22**, 2785–2799 (1966).
- 49) R. Muntwyler and W. Keller-Schierlein: Die struktur des chlorothricins, eines neuartigen makrolid-antibiotikums. *Helv. Chim. Acta*, **55**, 2071–2094 (1972).
- 50) J. Thiem and B. Meyer: Studies on the structure of olibomycin A and mithramycin by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Tetrahedron*, **37**, 551–558 (1981).
- 51) W.W. Zorbach and J.P. Ciaudelli: 2-Deoxy sugars. IX. 2,6-Dideoxy-D-arabino-hexose. *J. Org. Chem.*, **30**, 451–452 (1965).
- 52) K. Bock, I. Lundt and C. Pedersen: The preparation of some bromodeoxy- and deoxy-hexoses from bromodeoxyaladonic acids. *Carbohydr. Res.*, **90**, 7–16 (1981).
- 53) W.R. Roush and R.J. Brown: Total synthesis of carbohydrates; stereoselective syntheses of 2,6-dideoxy-D-arabino-hexose and 2,6-dideoxy-D-ribo-hexose. *J. Org. Chem.*, **47**, 1371–1373 (1982).
- 54) A.F. Cook and W.G. Overend: 2, 4-Dideoxy-D-threo-hexose. *Chem. Ind. (London)*, 1141–1142 (1966).

(2001 年 8 月 30 日受付)