酵素による有機溶媒系での糖転移反応・縮合反応†

安井 恒 男*, 飯 塚 佳 恵

(筑波大学応用生物化学系)

最近, 少糖類の生理活性に興味が持たれるようになり, 酵素の転移作用・縮合作用による少糖類の合成が注目され始めている.

プロテアーゼやリパーゼ等の酵素による有機溶媒系での転移反応, 縮合反応, 交換反応の研究は非常に多くなされている. しかしこれまで, 有機溶媒系での糖に関する酵素反応の研究はいずれもプロテアーゼ, リパーゼによる糖のエステル化反応のみで, glycosidation に関する報告は少なかった.

糖類の加水分解酵素も加水分解以外に, 転移反応, 縮合反応 (縮合: reversed hydrolysis, 加水分解逆反応) を触媒し, それらの反応は次式で示される.

G; glycosyl, GOR₁; 少糖または glycoside, R₁OH; 糖またはアルコール等の aglycon, EH; 酵素, R₂OH; 糖またはアルコール類 (受容体), GOH; 糖 (単糖, 少糖), GOR₂; 新たに生成した少糖, または glycoside, E·G; glycosyl・酵素中間体

少糖 GOR₁ (または glycoside) は酵素と酵素基質複合体の形成を経て, 糖 R₁OH (または aglycon) の放出と同時に glycosyl・酵素中間体, EG を形成すると想定される. E·G に H₂O が受容体として作用すれば (1) 加水分解反応, 糖またはアルコール (R₂OH) が受容体として作用すれば (2) 転移反応となり, 新たに別の少糖または glycoside が生成される. (1) の逆反応は縮合

反応で, 脱水過程を経て少糖類, glycoside が生成される. (1) の反応を逆に進めるためには, 脱水反応であるから水分含量を減らすほうがよい. また (1) と (2) の反応では E·G が受容体として H₂O と R₂OH とに競合的に作用するから, (2) の転移反応を進めるにも水が少ないほうが有利である. このようなことから, 糖の転移反応・縮合反応でもプロテアーゼやリパーゼに見られるように有機溶媒系で水分含量の少ない状態で行うのが有利と考えられる.

glycosidase は一般に糖転移作用が強いが, これまで転移作用がないといわれた Endo 型, Exo 型 glycanase (たとえば α amylase, glucoamylase 等) も厳密に検討するとすべて転移・縮合作用を示し, これらの作用を示さないものはないといっている.

glycosidase の縮合作用による単糖から少糖の生成は平衡支配の過程と見ることが出来る. 平衡という面からいえば通常の基質濃度では加水分解に傾いている. そのため縮合で少糖の収率を高めるために高濃度の糖液を用いている (glucose 90% w/v,

mannose 85% w/w. しかも高温で反応を行い, 基質の飽和濃度を高めるとともに反応速度を速めている. 都合のよいことに多くの場合, 高濃度糖液中で酵素は安定化される. また縮合生成物の蓄積を促す方策として, 生成する少糖を活性炭素に吸着させ, 生成物を反応系外に追出して反応を進める方法がとられている.

転移反応では一般に縮合反応より高濃度の生成物が速やかに蓄積する. それゆえ縮合より少量の酵素を用いて, しかも縮合より高い収率をあげることができる. しかし基質 (glycosyl 供与体) の加水分解も同時に起こり最高収率は転移生成物の生成速度と基質の加水分解速度に影響される. この基質加水分解を減ずることとともに, 高濃度の, しかも有効な glycosyl 受容体の利用が糖

† Transglycosylation and Glycosyl Condensation by Enzyme in Organic Cosolvent Systems. Tsuneo YASUI and Yoshie IIZUKA (Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tsukuba 305)

* Present Address: Seitoku Junior College of Nutrition.

転移反応を有利にする。転移生成物の2次的な加水分解も収率を減少させることになり、最終的には平衡状態まで生成物を減少させる。この2次加水分解の阻止も重要である。

これまでの糖の有機溶媒系での研究の結果をまとめると 1) 有機溶媒系は転移反応・縮合反応にあまり効果がないとするもの、2) 実際に有機溶媒系での酵素反応で、少糖・glycoside を得ている例、3) アルコール類を受容体とする転移反応・縮合反応で alkyl glycoside の酵素的合成、の3つに分けられる。

1) プロテアーゼによるペプチド合成、リパーゼによるエステル化反応・交換反応では有機溶媒系の反応で水分含量を低くすると収率が顕著に増加する場合が多い。しかし Nilsson⁽¹⁾ は glycosidase の場合逆の傾向を観察している。予備的実験の段階であるが α -galactosidase の糖転移反応が dimethylformamide の 30% (v/v) の添加で収率 32% から 22% に減少し、極端な場合 14% まで低下した。また有機溶媒が酵素の触媒活性、安定性を減ずるとしている。著者らは有機溶媒系が少糖の生成に有利かどうかさらに研究の必要があるとしているが、またある実験で2糖類の生成が反応温度を 50°C から 4°C に下げることにより 33% から 47% に増加したことから、反応温度、圧力も収率に関係する可能性があることを示唆している。

2) Ooi ら⁽²⁾ は化学的に不安定な cardiac glycoside の酵素合成を試みた。Aspergillus oryzae 由来市販酵素 (β -galactosidase, β -glucosidase 活性を含む) を用い、phenyl glycoside を供与体として実験した。この酵素は種々の水溶性、不溶性アルコールを受容体とし有効に alkyl glycoside を合成できるが、これに種々の有機溶媒 (acetone, dioxane, methanol, acetonitrile) を添加してその影響を調べた結果、50% acetonitrile の添加が最も効果的で、4°C の反応では酵素が安定なことも確認された。

そこで digitoxigenin, strophanthidin 等の水不溶性の genin について 50% acetonitrile 溶液中 20°C, 10 分、もしくは 10°C, 720 分の酵素反応を行い、40~70% の収率で genin β -galactoside, genin β -glucoside を得ている (反応条件; genin 0.5 g, 1.28 mmol, phenyl glycoside 1.27 g, 5 mmol, 62.5% acetonitrile 40 ml, 0.1 M リン酸緩衝液 pH 5.0, 10 ml)。この場合水不溶性アルコールに対する転移反応は acetonitrile 添加でと

くに改善されるわけではないので acetonitrile 添加の主な効果は、不溶性 genin の溶解性の向上にあると考えられる。

有機溶媒共存下での glucoamylase による glucose の縮合反応が Laroute ら⁽³⁾ により報告されている。多くの水溶性有機溶媒について Rhizopus niger の glucoamylase の安定性を検討した結果、diethylene glycol diethyl ether (DGDEE) と triethylene glycol dimethyl ether (TGDME) が最適であった。これら溶媒を含む系で酵素反応を行った (反応系; glucoamylase 2.5 mg, 10 unit, glucose 濃度 20 g/l, 溶媒, 水溶液を含む 1 ml, 40°C, 50°C)。

両溶媒存在下水分含量は 10% (v/v) が最適であった。40°C, 72 時間の反応で DGDEE の場合、少糖の収率は 37% (maltose 0.7, isomaltose 5.12, panose 0.38, isomaltotriose 1.20 g/l), TGDME の場合 22.0% で、溶媒のない状態で高濃度糖液で得られた収率に匹敵していた。

Bacillus subtilis levansucrase の levan 合成反応と sucrose の加水分解反応に対する有機溶媒 (acetonitrile, acetone, dioxane, DMSO) 添加の影響が Chambert ら⁽⁴⁾ により調べられている。60% acetonitrile の存在で sucrose の加水分解は完全に抑えられ、D-fructose の遊離は認められなかった。用いた溶媒は DMSO を除き、すべて酵素の activator として作用した。溶媒の効果はその誘電率、双曲子能率とはとくに関係なかった。levan 合成の収率は、水溶液では 5~7% であったが、60% acetonitrile 存在下では 100% となり、合成初速度は3倍となった。またこの状態で酵素は安定であった。sucrose, raffinose に対する K_m 値は溶媒の存在でほとんど変らなかったが k_{cat} は水溶液に比べ5倍高くなった。

3) 溶媒としてアルコールを用いると、これが glycosyl 受容体となり alkyl glycoside が生成される。この転移反応は多くの場合効率よく進行する。この分野に関しては、Aspergillus oryzae β -galactosidase⁽²⁾, β -glucosidase⁽²⁾, almond β -glucosidase⁽⁵⁾, Asp. niger β -xylosidase^(6,7), yeast invertase⁽⁸⁾ 等多くの研究例がある。

篠山ら^(6,7) はこれまで転移作用が強いといわれている数種の糸状菌 β -xylosidase を比較検討した結果、Asp. niger β -xylosidase が有機溶媒中での反応速度 (加水分解)、安定性ともに最もすぐれていた。有機溶媒 (ace-

tone, DMSO, dioxane, acetonitrile, アルコール) は全般的に酵素活性を低下させるが, acetone は影響が少なかった。この酵素を用い xylobiose から xylotriose の生成における acetone (25, 50% v/v) の影響を調べ, acetone 添加が xylotriose 生成に効果があることを示した。またアルコールの存在下では xylotriose は蓄積せず, alkyl β -xyloside の生成を認めた。 *Asp. niger* の酵素は多くの水溶性アルコールを受容体とし, phenyl β -xyloside (xylobiose, xylooligo 糖) を供与体として理論値に近い alkyl β -xyloside を生成した。水溶性の 1 級, 2 級アルコールのほか, 水不溶性 1 級アルコール, 3 級アルコールにも転移作用を示した。 hexyl~octyl アルコールのように不溶性の場合, 2 液相での反応となるが, 転移反応は速やかに進行し, 生じた alkyl xyloside は有機溶媒相に移行し, 反応終了後溶媒相を分離し溶媒を除去することにより容易に目的物を得ることができる。ちなみに xylobiose, xylose はすべて水相にとどまる。 2-propyl xyloside の生成につき詳細に検討した結果, 生成された xyloside は 25% 以上の 2-propanol の存在で加水分解を受けず, 平衡が 2-propyl β -xyloside の生成に傾いているためと結論された。

不溶性アルコールの 2 液相反応は almond β -glucosidase についても研究されている。 Vulfson ら⁽⁶⁾は酵素を支持体として XAD-4 に固定し pentanol~octanol に対する転移を見ている。 hexyl β -glucoside の生成は水分含量 60~90 μ l/ml が最適で, methyl β -glucoside (0.5~1.0 mmol), cellobiose (0.5 mmol) を供与体とし, 48 時間反応で供与体基準 25~28% の収率を得ている (反応系: XAD-4 固定化酵素 0.75 g, 20 ml アルコール, 50 mM 酢酸緩衝液 pH 5.0 に溶解した 2.5 M glucose 指定量, 60°C 振盪)。同様な条件で glucose からの縮合反応によって, 多くの 1 級アルコールからそれに相当する β -glucoside が合成されている (10 g/l)。

同じように酵母 invertase による alkyl β -fructoside の合成の研究がある⁽⁸⁾。アルコールとしては methanol, ethanol, propanol (各 10, 30, 50% v/v) が用いられた (反応系: 2 ml 0.146 M sucrose, 0.6 U invertase, pH 5.0, 25°C, 30 時間)。 fructoside の生成は 30% が最適で, この条件下酵素量を変動 (2.4, 24, 240 U/ml) したところ, 2.4 U/ml の場合の収率が最高 (全糖基準 18.2%) であった。酵素量を多くすると収率が極端に減少するのは, 生成 fructoside の加水分解によるものと考え

えられる。 D-fructose から縮合により alkyl β -fructoside が合成されるが, 収率はかなり低かった。

最近, 有機溶媒に可溶ないわゆる hybrid 酵素による反応が報告されている⁽⁹⁾。 polyethylene glycol (PEG) を 1,1'-carbonyl-diimidazole で活性化した活性化 PEG で *Asp. oryzae* の β -galactosidase を化学的に修飾した。各種の活性化 PEG で修飾された酵素を精製後使用した。酵素の NH_2 基はいずれも 50% 以上修飾されており, *o*-NO₂phenyl- β -galactoside に対する K_m 値は未修飾酵素と大差なく, $V_{\max}$ も 30~100% の値を持ち, 基質の親和性, 反応速度に関しても著しい変化のないことが示唆されている。この修飾酵素は trichloroethan 等の塩素系溶媒に可溶で, trichloroethan, DMSO と hexanol (13:1:6) の混液に 33 mM methyl β -galactoside, 指定量の 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 5.0 を含むように調製し, これに 140 μ g/ml の修飾酵素を含む trichloroethan 溶液を加え, 37°C で反応を行った。転移反応には水の添加が必要で 4~6% が最適であった。この酵素は乾燥溶媒中では安定であるが, 水, DMSO の添加により不安定になった。この安定化が今後の課題であろう。先に述べたように 2 液相系の反応では hexanol に比しさらに長鎖のアルコールでは転移速度が低下するが, この修飾酵素の場合には鎖長による影響が少ない点とくに興味がある。また複合糖脂質の合成への適用が期待される。

以上述べたように有機溶媒系での糖の転移反応・縮合反応の研究はあまり多くはなく, これからの問題であるが, 結論として次のようにまとめることができる⁽¹⁰⁾。

1. 転移反応・縮合反応活性の高い酵素源の選択。2. 目的によって特異性の高低をえらぶ。3. 有機溶媒中での酵素の安定性。4. 有機溶媒中で酵素活性が十分発揮できること。5. 有機溶媒添加効果についてはどちらともいいにくいだが, 条件を検討することにより効果が期待される。6. アルコール中での反応で各種 alkyl glycoside の酵素合成は有効に行われる。7. 有機溶媒の添加は水に不溶な反応物の場合有効である。

- (1) K. G. I. Nilsson: *TIBTECH*, **6**, 256 (1988).
- (2) Y. Ooi, T. Hashimoto, N. Mitsuo and T. Astoh: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1808 (1985).
- (3) V. Laroute and R.-M. Willemot: *Biotechnol. Lett.*, **11**, 249 (1989).
- (4) R. Chambert and M.-F. Petit-Glatron:

- Carbohydr. Res.*, **191**, 117 (1989).
- (5) E. N. Vulfson, R. Patel, J. E. Beecher, A. T. Andrews and B. A. Law : *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 950 (1990).
- (6) 篠山浩文, 安井恒男 : 農化, **62**, 1339 (1988).
- (7) H. Shinoyama, Y. Kamiyama and T. Yasui : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2197 (1988).
- (8) B. Selisko, R. Ulbrich, A. Schellenberger and U. Müller : *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1006 (1990).
- (9) J. E. Beecher, A. T. Andrews and E. V. Vulfson : *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 955 (1990).
- (10) H. Shinoyama and T. Yasui : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2375 (1988).
-