Control of the Regioselectivity in the Enzymatic Syntheses of Oligosaccharides Using Glycosidases

加水分解酵素を利用したオリゴ糖合成における位置選択性のコントロール

Ajisaka, Katsumi ; and Yamamoto, Yuichi

Meiji Dairies Co., 540 Naruda, Odawara, Kanagawa 250-0862, Japan.

FAX : 81-465-36-2776, E-mail : kajisaka@mbc.sphere.ne.jp

Key Words : glycosidase, transglycosylation, regioselectivity

Abstract

There are two strategies for the enzymatic synthesis of oligosaccharides; the use of glycosidases and the use of transferases. The reaction using glycosidases can be further classified into two methods; the transglycosylation and the reverse hydrolysis reaction. In this review, I would like to summarize and discuss these by focusing on the regioselectivity in the synthesis of oligosaccharides by the transglycosylation and reverse hydrolysis reaction.

要 約

酵素を利用したオリゴ糖合成には、加水分解酵素の逆反応を利用する方法と、糖転移酵素(トランスフェラーゼ)を利用する方法の2種類の方法がある。さらに、加水分解酵素を利用したオリゴ糖合成法はメカニズムの面から転移反応とリバースハイドロリシス反応とに分類される。本稿では、加水分解酵素を用いた2種類の反応、即ち転移反応とリバースハイドロリシス反応について概説し、更に如何にして目的とするオリゴ糖を位置選択的に得るかという部分に焦点をあてて、我々がこれまでに明らかにしてきた知見を中心にして解説する。

A. Introduction

Glycosidases have been widely utilized in the food industry as a tool for the hydrolysis of polysaccharides or oligosaccharides (1). Furthermore, glycosidases are also used industrially for the synthesis of oligosaccharides by a reversal of the hydrolysis reaction, in the production of food additives (2). However, these industrially produced oligosaccharides are a mixture of various linkages, regioselective synthesis not being given attention until recently. Presently, on the other hand, the reaction using glycosidases is thought to be not as suitable for the synthesis of oligosaccharides of a specific linkage with high regioselectivity as the reaction using transferases. Moreover, the low yield of the reaction is another demerit of the reaction using glycosidases (3). Still, the oligosaccharide synthesis using glycosidase has a merit that not only substrates but also enzymes are relatively cheap. For such reasons, we have studied the reaction using glycosidases in order to establish a new methodology for highly regioselective syntheses of oligosaccharides.

Many review articles have been published about oligosaccharide synthesis with the aid of glycosidases (4-7). In this review, I would mainly like to discuss how to obtain oligosaccharides regioselectively and in high yield, drawing upon the results of my research. The reaction using glycosidases can be classified into two approaches; transglycosylation and reverse hydrolysis reaction. It would appear that the most direct way to achieve the synthesis of oligosaccharides of specific linkages is to clarify what is controlling the regioselectivity in these two reactions. First I will demonstrate the relation between the hy-

A. 序 論

糖加水分解酵素とは、その名のごとくオリゴ糖あるいは多糖を加水分解する酵素であり、これまでも主として食品産業において広く利用されている(1)。一方加水分解とは逆の作用であるオリゴ糖を合成するという機能を利用して、食品用オリゴ糖の製造を目的として工業的にも利用されている(2)。しかしそのような食品用オリゴ糖の生産において得られるオリゴ糖はいろいろな結合のオリゴ糖の混合物であり、位置選択的な合成という点にはあまり注意が払われて来なかった。そのために加水分解酵素を利用したオリゴ糖合成反応はトランスフェラーゼを利用した合成法に比べて位置選択性が低く、ある特定の結合のオリゴ糖を位置選択的に合成するといった目的には適さない、と言われてきた。また、加水分解酵素を利用したオリゴ糖合成法は反応収率が低いということも欠点の一つとされてきた(3)。それに対して加水分解酵素を利用したオリゴ糖合成法は、基質が安価で、酵素も比較的安価且つ容易に入手できるというメリットを有している。そのような理由から、我々は加水分解酵素を用いる反応をオリゴ糖の精密合成に利用することを目的として研究を続けてきた。

これまでに、加水分解酵素を利用したオリゴ糖合成反応に関しては数多くの総説が発表されている(4-7)。本稿では、我々が行ってきた研究を中心として、加水分解酵素を利用したオリゴ糖合成反応に於いて、如何にして目的とする結合のオリゴ糖を高い収率で得るかという部分に焦点を当てて解説する。加水分解酵素を利用したオリゴ糖合成反応は、反応方法の違いにより転移反応とリバースハイドロリシス反応という2つの方法に分けられる。従って、これらの反応における位置選択性はどのようにコントロールされているかを解明することが、位置選択

drolysis specificity of glycosidase and the regioselectivity in the synthesis of oligosaccharides. Then I would like to discuss how to obtain the oligosaccharides of target linkages.

B. Transglycosylation and Reverse Hydrolysis Reaction

In Fig. 1, transglycosylation and reverse hydrolysis reaction are schematically demonstrated. In the synthesis of lactose using β -galactosidase, Gal- β -pNP **1** binds with β -galactosidase to form an active intermediate enzyme-substrate **2**. If water molecule attacks this intermediate, galactose **3** will be formed. In contrast, if glucose molecule **4** attacks this intermediate, galactosyl-glucose **5** will be formed. In this case, the reaction is called "a transglycosylation". The linkage between galactose and glucose depends on the nature of the enzyme.

Here, it should be noted that an equilibrium exists between **2** and **3**; the intermediate **2** can be formed from galactose **3** and enzyme in the aqueous solution. In this case, galactosyl glucose will be formed if glucose molecules are also present in the solution in high concentration. Thus the reaction to produce disaccharide **5** from monosaccharide **3** via intermediate **2** is called "a reverse hydrolysis reaction". However the process generating **2** from **3** is generally very slow since the equilibrium constant of the reaction is very small, and consequently the yield of disaccharide **5** from **3** and **4** is very small. However, disaccharide **5** can be obtained from galactose **3** and glucose **4** by controlling the reaction condition.

C. Reverse Hydrolysis Reaction

As shown in Fig. 1, the reverse hydrolysis reaction is called a "condensation reaction" because of its style of reaction. In Fig. 1, the hydrolysis reaction of **5** to form monosaccharides

的合成への近道でもあろう。そこでまず、加水分解酵素の基質特異性と生成物の位置選択性の関係について解説し、さらに如何にして目的の結合を持ったオリゴ糖を選択的に合成するかという点に焦点をあてて議論したい。

B. 転移反応とリバースハイドロリシス反応

転移反応とリバースハイドロリシス反応の関係を、 β -ガラクトシダーゼを利用したラクトースの合成反応を例として図1に示す。パラニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド(Gal- β -pNP) **1** が β -ガラクトシダーゼと結合して基質-酵素活性中間体 **2** を生成する。これに水分子が攻撃するとガラクトース **3** になる。この場合、現象としては加水分解が起こったことになる。一方、これにグルコース **4** が攻撃するとラクトース **5** が生成する。これが転移反応である。この場合必ずしも β 1-4 結合のラクトースが生成するとは限らず、どのような結合の2糖が生成するかは酵素の性質によって規定される。

ここで、**2** と **3** の間の反応も平衡反応であり、水溶液中ではガラクトース **3** から基質-酵素活性中間体 **2** が生成する。この場合にも溶液中にグルコースが存在すればラクトース **5** が生成する。このように単糖 **3** から活性中間体 **2** を経て2糖 **5** が生成する反応がリバースハイドロリシス反応である。一般に平衡定数の関係から **3** から **2** が生成する割合は極めて低く、従って **3** から **2** を経てラクトース **5** が生成する割合も少ないが、原理的にはガラクトース **3** とグルコース **4** からラクトース **5** を合成することは可能である。

C. リバースハイドロリシス反応

図1に示されるように、リバースハイドロリシス反応は現象的には加水分解の逆であることから縮合反応と呼ばれることもある。図1において、2糖 **5** が加水分解されて単糖の **3** およ

Fig. 1. Action of β -galactosidase on *para*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside in an aqueous solution.

3 and 4 is catalyzed by an enzyme, but actually this reaction can occur even without enzymes. Namely, the bond between galactose and glucose in lactose is an acetal bond, which means that equilibrium exists between lactose, galactose, and glucose. Therefore, the hydrolysis of lactose or the condensation of two monosaccharides can proceed without an enzyme in principle, but actually no reaction occurs in the natural state without an enzymes since the activation energy between lactose and two monosaccharides is very high. Enzymes work to lower the activation energy for reactions between lactose and its two monosaccharides. Moreover, the hydrolysis reaction is usually observed in the dilute substrate solution, and in contrast the reverse hydrolysis reaction occurs in a solution of high substrate concentration.

Next, examples of the reverse hydrolysis using glucose as a substrate were investigated. In the reaction of highly concentrated glucose solution in the presence of α -glucosidase, many oligosaccharides are formed including α 1-2-, α 1-3-, α 1-4-, and α 1-6-linked disaccharides and, with further condensation, trisaccharides (8). In Table I, the yields of disaccharides are shown together with standard free energies obtained from literature on this subject (9). The standard free energy of α 1-6-linked disaccharide is the lowest, and the yield of this disaccharide is highest in contrast. The α 1- α 1-linked disaccharide, trehalose, exhibited the highest standard free energy and was not detected at all. It is noteworthy that the standard free energy and the yield of disaccharides are in reverse correlation. Fig. 2 shows schematically the standard free energy of disaccharides and the activation energy of reactions between monosaccharides and disaccharide. The yield of disaccharides by reverse hydrolysis reaction is highly correlated with the standard free energy, the activation energy needed to form the enzyme-substrate intermediate not being a factor. Therefore the reverse hydrolysis reaction is called an "equilibrium-controlled reaction".

In the acid catalyzed condensation reaction of highly concentrated glucose solution, disaccharides are formed with similar composition. However, in this case, isomers with β -linkages

び4になる反応では酵素が介在しているが、実際にはこの反応は酵素が存在しなくても進行する。即ち、2糖5におけるガラクトースとグルコースの間の結合はアセタール結合であり、水溶液中では2つの単糖とラクトースは平衡状態にある。従って原理的には酵素が存在しなくてもラクトースからグルコースとガラクトース、あるいはグルコースとガラクトースからラクトースへの反応は進行するはずであるが、現実にはその間の活性化エネルギーが大きいために、自然な状態でどちらかに移動するということはない。酵素はこの平衡反応の活性化エネルギーを低下させ、その往き来を容易にする役割を果たしている。また、酵素の存在下で2糖から単糖への加水分解が観測されるのは、基質が希薄な水溶液中での話である。逆に濃厚な溶液中では逆方向の反応、即ち脱水縮合反応により単糖から2糖が生成する反応(リバースハイドロリシス反応)が目に見えて多くなる。

次に、グルコースを原料としたリバースハイドロリシス反応の例を示す。グルコースの濃厚溶液に α -グルコシダーゼを添加して反応を行うと、 α 1-2結合、 α 1-3結合、 α 1-4結合、 α 1-6結合の2糖、さらにはそれらにさらにグルコースが結合した3糖など多数のオリゴ糖が生成してくる(8)。表1に2糖に関してのみではあるがリバースハイドロリシス反応における生成物の収率を示した。また表1には文献値(9)として標準自由エネルギーの値も示した。標準自由エネルギーの低い α 1-6結合の2糖の収率が最も高く、標準自由エネルギーが最も大きい α 1-1結合の2糖は検出されなかった。その他の2糖も標準自由エネルギーの値に反比例した収率で生成している。図2に、この反応における各物質の標準自由エネルギーと基質-酵素活性中間体から2糖が生成する際の遷移状態のエネルギー障壁の高さを模式的に図示した。図2示すように、リバースハイドロリシス反応における生成物の収率は、2糖が生成する際のエネルギー障壁の高さによるのではなく、最終生成物の標準自由エネルギーの値に依存する。このようなことから、リバースハイドロリシス反応はEquilibrium controlled reactionとも呼ばれている。

データとしては示さなかったが、グルコースの高濃度溶液に酸を加えて加熱しても脱水縮合反応によりオリゴ糖が生成する。この場合には α -結合と β -結合の両方の異性体ができるため

Table I. The standard free energy of glucosyl disaccharides and the reaction yield in the reverse hydrolysis reaction and the column system reaction.

Disaccharide	ΔG° , J/mol	Reaction Yield (%)	
		Reverse Hydrolysis Reaction	Column System Reaction
Glc α 1-1Glc	+6300	n.d.	n.d.
Glc α 1-2Glc	+3900	1.9	n.d.
Glc α 1-3Glc	+4200	2.5	n.d.
Glc α 1-4Glc	+6200	2.2	2
Glc α 1-6Glc	-2100	25	0.4

Fig. 2. Schematic demonstration of potential energies of substrate and produced disaccharides.

Lit.

Fig. 3. Preparative scale syntheses of disaccharides by reverse hydrolysis reaction.

are also formed (data not shown). When the composition of only α -linked disaccharides was compared with that of the enzymatic reaction, a parallel tendency was observed; namely, the acid catalyzed oligosaccharide synthesis is also controlled by the level of standard free energy.

We have synthesized various oligosaccharides comprising glycoproteins or glycolipids by reverse hydrolysis reaction. Results are summarized in Fig. 3. As shown in section E, in transglycosylation glycosyl compounds or disaccharides must be used to synthesize oligosaccharides, but in contrast, in reverse hydrolysis reactions free sugars can be used as starting materials. Although purification processes are needed in the reverse hydrolysis reaction since many isomers are produced together,

に複雑な組成となるが、 α -系列の2糖のみについて比較すると、上記の α -グルコシダーゼによるリバースハイドロリシス反応における生成比と同様の値を示した。即ち酸触媒によるオリゴ糖合成反応の場合にも、その組成を決定しているのは最終生成物の標準自由エネルギーの高低であることを物語っている。

我々はこのような原理に基づいて、複合糖質を構成する種々のオリゴ糖をリバースハイドロリシス反応により合成した。結果を図3に示す。E節の転移反応の項において詳述する転移反応では、原料としてオリゴ糖あるいはグリコシド化合物を糖供与体として用いるのに対し、このリバースハイドロリシス反応においてはフリーの糖を用いることができるという点が特徴である。またリバースハイドロリシス反応は生成物の種類が多いため精製がやっかいであるが、いくつものオリゴ糖を一挙に

it can be a merit that many oligosaccharides can be obtained in one reaction. Therefore, if a purification process is developed, the reverse hydrolysis method may be a widely applicable method for commercial synthesis of oligosaccharides.

D. Column System Reaction; a Versatile Method of Reverse Hydrolysis Reaction

We have developed a new reaction system, a column system reaction, as a modification of the reverse hydrolysis reaction (13, 14). I will demonstrate the reaction using α -glucosidase-catalyzed glucose condensation as a model reaction. A highly concentrated glucose solution was circulated continuously through an immobilized α -glucosidase column and an activated carbon column connected sequentially as shown in Fig. 4. In the immobilized α -glucosidase column, disaccharides will be produced by the reverse hydrolysis reaction, though the amount may be very small. Here, the nature of disaccharides is such that they are adsorbed on the activated carbon preferentially to monosaccharides, and similarly trisaccharides preferentially to disaccharides. Consequently, the disaccharides formed in the α -glucosidase immobilized column were adsorbed in the activated carbon column. Although glucose might be adsorbed in the activated carbon column in the beginning, disaccharides will subsequently be adsorbed and in so doing expel those glucose molecules. Therefore, only glucose comes out of the activated carbon column, and then this glucose is directed into the immobilized α -glucosidase column again. As a result, a condensation to form disaccharides is repeated continuously in the immobilized enzyme column, and disaccharides are accumulated in the activated carbon column. In Table I, a result of a column system reaction is also listed. Interestingly, the yield of α 1-4-linked disaccharide was higher than that of α 1-6-linked isomer in the column system reaction, differing from the batch method reaction.

合成できるという意味では長所でもある。後で述べる転移反応では合成が難しいオリゴ糖もリバースハイドロリシス反応ならば合成できる場合もあり、反応液から目的のオリゴ糖を精製しなければならないという条件は付くが、リバースハイドロリシス反応は実用的な合成法であるといえることができる。

D. リバースハイドロリシス反応の別法、カラム法反応

我々はリバースハイドロリシス反応の応用例として活性炭カラムを利用したカラム法反応という手法を開発した(13, 14)。このカラム法反応についてもグルコースを用いた反応を例として説明する。図4に示すように、 α -グルコシダーゼを固定化したカラムと活性炭カラムを直列に繋ぎ、これにグルコースの高濃度溶液を循環させる。すると固定化酵素カラム内でリバースハイドロリシス反応により、微量ではあるが2糖が生成するはずである。ところで、活性炭には単糖よりも2糖、2糖よりも3糖をより強く吸着する性質がある。従って、反応液を循環すると最初は活性炭カラムにはグルコースが吸着されるが、固定化酵素内で生成した2糖が活性炭カラムに入ってくると2糖がグルコースを押し退けて吸着される。従って、活性炭カラムを出てくる液はグルコースのみの溶液となり、それが循環により再度固定化酵素カラムに入って、リバースハイドロリシス反応が繰り返される。即ち、固定化酵素カラム内でリバースハイドロリシス反応によって生成した2糖は全て活性炭カラムに吸着されて、固定化酵素カラム内には常に単糖のみが入っていく。その結果、固定化酵素カラム内では、リバースハイドロリシス反応により2糖が生成するということが繰り返され、活性炭カラム内には連続的に2糖が蓄積されていくことになる。表1にはカラム法反応の収率も併せて示してある。興味あることに、リバースハイドロリシス反応では α 1-6結合の2糖が圧倒的に大きい比率で生成するのに対し、カラム法反応では α 1-6結合よりも α 1-4結合の2糖の方が生成比が大きいことが明らかになった。この場合にも先に示したエネルギー変化の模式図(図2)を利用して説明することができる。図2において、 α 1-4結合の2糖と

Fig. 4. Column system reaction.

This result can be explained referring to Fig. 2. The energy barrier of the activation intermediate of α 1-4-linked disaccharide-enzyme was lower than that of α 1-6-linked disaccharide-enzyme. Therefore the formation of α 1-4-linked disaccharide is faster than that of α 1-6-linked isomer, and the formed disaccharides will be immediately adsorbed in the activated carbon column.

Thus the column system reaction was shown to be able to limit the equilibrium reaction to the very first stage, and the column system reaction can provide a different regioselectivity from the normal reverse hydrolysis reaction.

E. Transglycosylation

If an acceptor sugar attacks the active intermediate of enzyme-substrate and a new glycosidic bond is formed as a result, the reaction is called a transglycosylation. In Fig. 5, transglycosylation reactions of *para*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside **1** as a donor and GlcNAc **6** as an acceptor are shown using various β -galactosidases of different origins. In the transglycosylation using β -galactosidase from *Bacillus circulans*, commercial name BiolactaTM, Gal β 1-4GlcNAc **8** was obtained regioselectively since this enzyme shows high specificity to β 1-4-linked disaccharides (15). In contrast, β -galactosidase from *E. coli* shows specificity to β 1-6-linkage, and the transglycosylation using this enzyme gave Gal β 1-6GlcNAc **9** regioselectively (26). *Bacillus circulans* is known to produce four kinds of β -galactosidases and we have cloned a gene encoding β -galactosidase specific to β 1-3-linkage and expressed the enzyme in *E. coli* (16). Transglycosylation using this enzyme afforded Gal β 1-3GlcNAc **7** or Gal β 1-3GalNAc derivatives, which are important intermediates for the synthesis of glycoconjugates (17). Other than this enzyme, β -galactosidase from bovine testis (18), porcine testis (19), and *Xanthomonas manihotis* (20) hydrolyzes β 1-3-linkage specifically, and catalyzes the synthesis of β 1-3-linked disaccharides regioselectively by transglycosylation. Further, β -galactosidases from

酵素との活性化中間体のエネルギー障壁の方が、 α 1-6結合の2糖と酵素との活性化中間体のエネルギー障壁よりも低いために、 α 1-4結合の2糖の方が生成速度が速く、生成した2糖は直ちに活性炭カラムに吸着されるためであると説明できる。

このようにカラム法反応は溶液中における平衡反応における極く初期の段階の反応を固定することができることが示された。またカラム法反応では、通常のリバースハイドロリシス反応とは異なる位置選択性を示すことが明らかとなった。

E. 転移反応

転移反応とは、図1に示したように基質の糖が酵素と活性化中間体を形成し、それに受容体の糖が攻撃して新たなグリコシド結合が生成する反応である。パラニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド **1** を糖供与体、GlcNAc **6** を糖受容体とした反応において、いろいろな起源の β -ガラクトシダーゼを用いて反応を行うと、酵素の起源の違いにより生成物の構造が異なることが明らかになった(図5)。即ち、Biolactaという商品名で市販されている*Bacillus circulans*由来の β -ガラクトシダーゼは、 β 1-4結合の2糖を高い特異性で加水分解するが、転移反応でも高い選択性でGal β 1-4GlcNAc **8**を与える(15)。一方*E. coli*由来の β -ガラクトシダーゼは β 1-6結合に高い特異性を示すが、転移反応でもGal β 1-6GlcNAc **9**を与える(26)。*B. circulans*は4種類の β -ガラクトシダーゼを生産していることが知られているが、我々のグループは微量生産されている β 1-3結合に特異性の高い β -ガラクトシダーゼの遺伝子をクローニングして大腸菌で発現させることに成功した(16)。この酵素を用いて転移反応を行うと、複合糖質糖鎖の合成中間体として重要なGal β 1-3GlcNAc **7**あるいはGal β 1-3GalNAcおよびこれらの誘導体が選択的且つ高収率で得られることを見出した(17)。この他にも β 1-3結合のオリゴ糖を選択的に与える酵素としては、牛あるいはブタ精巣由来の酵素(18、19)および*Xanthomonas manihotis*由来の酵素(20)が、また β 1-4結合のオリゴ糖を与える酵素としては、*Bifidobacterium bifidum*由来ある

Fig. 5. Differences of regioselectivity in the transglycosylation using β -galactosidases of different origins.

Bifidobacterium bifidum and *Diplococcus pneumoniae* are known to give β 1-4-linked oligosaccharide by transglycosylation (21).

Until now, the regioselectivity in oligosaccharide synthesis using glycosidases has been thought to be very low, but by use of glycosidases showing high specificity in the hydrolysis reaction, the transglycosylation products were shown to be highly regioselective. In Table II, enzymes and examples of the regioselective reaction are summarized.

The transglycosylation using α -fucosidase showed interesting results (22). The reaction using α -fucosidase from *Aspergillus niger* gave α 1-3-linked disaccharide in the reaction using GlcNAc as an acceptor, but gave no transglycosylation product when galactose was used as an acceptor. In contrast, the reaction using α -fucosidase from *Arthrobacter ureafaciens* gave α 1-2-linked disaccharide when galactose was used as an acceptor, but gave no transglycosylation product when GlcNAc was used as an acceptor. Thus in this case the selection of acceptor displayed an important role in the transglycosylation reaction.

Sialidase from Newcastle Disease Virus (NDV) is known to be highly specific to α 2-3-linkage and is used for the structural analysis of glycoconjugates. We have shown that NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc could be obtained in the NDV sialidase catalyzed transglycosylation using NeuAc- α -pNP as a donor and *N*-acetylactosamine as an acceptor (23). Makimura *et al* also reported that the reaction using sialidase from *Salmonella typhimurium* gives NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc in high yield (24). Further, the transglycosylation using sialidase from *Arthrobacter ureafaciens* or *Clostridium perfringens* was shown to give α 2-6-linked oligosaccharides by transglycosylation (23). By these results, it is demonstrated that transglycosylation using sialidase can achieve results similar to those of the equivalent reaction using transferase.

Although a disaccharide or glycoside compound is usu-

いには *Diplococcus pneumoniae* 由来の酵素が知られている(21)。

これまで加水分解酵素を用いたオリゴ糖の合成反応は選択性が低いことが欠点であるといわれてきた。しかし、上に示したように加水分解の特異性が高い酵素を用いれば、一種類のオリゴ糖を選択的に合成できることが明らかになってきた。位置選択性が高く、オリゴ糖の合成に実用的に利用できる酵素および反応を表IIにまとめて示した。

一方、 α -フコシダーゼを用いた反応では興味ある結果が得られた(22)。即ち、*Aspergillus niger* 由来の酵素を用いた場合には α 1-3結合の2糖を与えるが、この場合にはGlcNAcを糖受容体とし、ガラクトースを糖受容体とした場合には反応生成物を与えない。逆に、*Arthrobacter ureafaciens* 由来の酵素を用いた場合には α 1-2結合の2糖を与え、この場合にはガラクトースを糖受容体とし、GlcNAcを糖受容体とする2糖は与えない。このように酵素によっては結合の選択性と同時に糖受容体となる糖に関しても選択性を発揮することがあるということも明らかになった。

Newcastle Disease Virus由来のシアリダーゼは α 2-3結合に特異的なシアリダーゼとして知られており、糖鎖の構造解析にもよく利用されている。我々はNeuAc- α -pNPを糖供与体、*N*-アセチルラクタサミンを糖受容体として、Newcastle Disease Virus由来のシアリダーゼを用いて転移反応を行うと、NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAcを与えることを見出した(23)。さらに牧村らによって *Salmonella typhimurium* 由来のシアリダーゼを用いて同じ反応を行った場合にも NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc が収率30%以上の高収率で得られることが見出された(24)。一方、*Arthrobacter ureafaciens*あるいは*Clostridium perfringens*由来のシアリダーゼを用いれば、選択的に α 2-6結合のシアリルオリゴ糖を与えることが分かった(23)。このようにシアリダーゼを用いた転移反応もシアリルトランスフェラーゼを用いた反応に十分太刀打ちできることが示された。

転移反応においては通常2糖あるいはグリコシド化合物が

Table II. Examples of highly regioselective transglycosylation reactions.

Donor	Acceptor	Enzyme	Product	Yield	Lit.
Gal- α -pNP	Gal	α -Galactosidase from <i>Coffea arabica</i>	Gal α 1-3Gal	50%	31
Gal- α -pNP	Gal α 1-6Glc	α -Galactosidase from <i>Aspergillus niger</i>	Gal α 1-6Gal α 1-6Glc	30%	31
Gal- β -pNP	GlcNAc	β -Galactosidase from <i>Bacillus circulans</i>	Gal β 1-3GlcNAc	60%	16
Gal- β -pNP	GlcNAc	β -Galactosidase from <i>Bacillus circulans</i>	Gal β 1-4GlcNAc	50%	15
Gal- β -pNP	GlcNAc	β -Galactosidase from <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Gal β 1-4GlcNAc	50%	21
Gal- β -pNP	GlcNAc	β -Galactosidase from <i>Escherichia coli</i>	Gal β 1-6GlcNAc	50%	26
Fuc- α -pNP	GlcNAc	α -Fucosidase from <i>Penicillium multicolor</i>	Fuc α 1-3GlcNAc	40%	27
Fuc- α -pNP	Gal	α -Fucosidase from <i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Fuc α 1-2Gal	30%	22
NeuAc- α -pNP	Gal	Sialidase from <i>Salmonella typhimurium</i>	NeuAc α 2-3Gal	30%	24
NeuAc- α -pNP	Gal	Sialidase from Newcastle Disease Virus	NeuAc α 2-3Gal	20%	23
NeuAc- α -pNP	Gal	Sialidase from <i>Arthrobacter ureafaciens</i>	NeuAc α 2-6Gal	20%	23

ally used as the donor in the transglycosylation reaction, Shoda *et al* reported a unique reaction using oxazoline as a donor. Chitin was synthesized by reacting oxazoline of chitobiose in the presence of chitinase from *Bacillus* sp. in alkaline solution, after which the chitobiose was linked with β 1-4-linkage repeatedly to give chitin (25).

F. Control of Regioselectivity in the Transglycosylation

As shown above, the regioselectivity in the transglycosylation is highly correlated with the specificity in the hydrolysis reaction. However, several exceptions to this rule have been found recently. Two examples are shown below; the transglycosylation using α -fucosidase from *Penicillium multicolor* and a β -galactosidase from *B. circulans*.

F-1. Transglycosylation Using α -fucosidase From *P. multicolor*

Transglycosylation using α -fucosidase from *P. multicolor* afforded a 49% yield of Fuc α 1-3GlcNAc regioselectively using Fuc- α -pNP as a donor and GlcNAc as an acceptor (27, 28). However, contrary to expectations, α 1-3-linked disaccharide was hydrolyzed much more slowly than α 1-2-linked and α 1-6-linked disaccharides. This hydrolysis result is the reverse to that of transglycosylation. However, the relative rates of hydrolysis of Fuc α 1-2Gal, Fuc α 1-6GlcNAc, and Fuc- α -pNP should be noticed. Fuc α 1-2Gal and Fuc α 1-6GlcNAc were hydrolyzed at approximately the same rate as Fuc- α -pNP, but Fuc α 1-3GlcNAc was hydrolyzed at a much slower rate than Fuc- α -pNP. The result of the transglycosylation may be explained from the relative hydrolysis rates. That is, the rates of the formation of Fuc α 1-2Gal or Fuc α 1-6GlcNAc from Fuc- α -pNP are almost the same

糖供与体として用いられるが、正田らによってその変法ともいふべき興味ある例が報告されている。即ち、キトビオースのオキサゾリンを糖供与体として用いて、*Bacillus* 属由来のキチナーゼを作用させることにより、キトビオースが繰り返し β 1-4結合でつながりキチンが生成することが見出されている(25)。

F. 転移反応における位置選択性のコントロール

これまで示してきたように、生成するオリゴ糖の結合の選択性は加水分解の特異性に沿っていることが明らかになってきた。ところが、一見その規則に従わないと思われる例がいくつか見出されてきた。次にそのような例として、*P. multicolor* 由来の α -フコシダーゼによる転移反応の例、および *B. circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼを用いた反応例について示す。

F-1. *P. multicolor* 由来の α -フコシダーゼを用いた転移反応

Fuc- α -pNPを糖供与体、GlcNAcを糖受容体として、*P. multicolor*由来の α -フコシダーゼを用いて転移反応を行うと、Fuc α 1-3GlcNAcを49%の収率で選択的に与える(27, 28)。一方、種々の結合のフコシルオリゴ糖の加水分解のされやすさを比較したところ(図6)、Fuc α 1-2Gal および Fuc α 1-6GlcNAc は速く加水分解され、Fuc α 1-3GlcNAc に対する加水分解速度はかなり遅いことが明らかになった。この加水分解の結果は、転移反応で Fuc α 1-3GlcNAcが高度な選択性で得られるという結果と相反するものである。しかし、ここで注目しなければならないことは、糖供与体であるFuc- α -pNPと生成物である2糖の相対的な加水分解速度である。図6からFuc α 1-2Gal とFuc α 1-6GlcNAc はFuc- α -pNPと同じような速度で加水分解されるのに対し、Fuc α 1-3GlcNAcはかなり遅いことがわかる。これから、転移反応の結

Fig. 6. Relative hydrolysis rate of fucosyl disaccharides and Fuc- α -pNP in the presence of α -fucosidase from *P. multicolor*. ▲, Fuc- α -pNP; ◆, Fuc α 1-2GlcNAc; ■, Fuc α 1-6GlcNAc; ●, Fuc α 1-3GlcNAc.

as the rates of the hydrolysis of the same, and therefore Fuc α 1-2Gal and Fuc α 1-6GlcNAc are hydrolyzed as soon as they are formed. As a result, Fuc α 1-2Gal and Fuc α 1-6GlcNAc do not accumulate in the solution. In contrast, the hydrolysis rate of Fuc α 1-3GlcNAc is much slower than the rate of formation from Fuc- α -pNP, and as a result, a large amount of Fuc α 1-3GlcNAc remains in the solution. Therefore the regioselectivity is controlled by not only the relative hydrolysis rates of the target oligosaccharides, but also the relative hydrolysis rates of donor and target oligosaccharides.

F-2. Transglycosylation Using β -galactosidase From *B. circulans*

β -Galactosidase from *B. circulans* catalyzes the hydrolysis of Gal β 1-3GlcNAc specifically, and the enzyme has been reported to produce Gal β 1-3GlcNAc regioselectively by transglycosylation from Gal- β -pNP and GlcNAc (17). However, recently, Gal β 1-6Gal **12** was found to be obtained preferentially in the reaction using galactose **11** as an acceptor as shown in Fig. 7 (29).

In order to clarify this mechanism, we have synthesized various galactosyl disaccharides and compared the hydrolysis rates of the disaccharides. Results are summarized in Table III. The rates of hydrolysis of Gal β 1-3GlcNAc, Gal β 1-3GalNAc, and those derivatives are faster than those of corresponding β 1-4-linked or β 1-6-linked disaccharide derivatives. Further, in the case of Gal-Gal and its derivatives, β 1-6-linkage was hydrolyzed faster than β 1-3-linkage or β 1-4-linkage. Therefore, in this case, the regioselectivity can be explained by the general rule of hydrolysis rate correlating with the regioselectivity in transglycosylation. But it is not clear why the specificity in hydrolysis changes with the difference of aglycon structure in galactosyl disaccharides. Concerning the mechanism of this phenomenon Usui *et al* have suggested that the steric circumstances of galactose and GalNAc molecule in the enzyme pocket (29)

果は次のように説明される。即ち、Fuc- α -pNP から Fuc α 1-2Gal あるいは Fuc α 1-6GlcNAc が生成する速度と、それらが加水分解される速度が同程度であるために、Fuc α 1-2Gal および Fuc α 1-6GlcNAc は生成するや否や加水分解されてしまい、結果として蓄積されないものと解釈される。一方、Fuc α 1-3GlcNAc は生成する速度は Fuc- α -pNP の加水分解速度によって決定されるために速く生成するが、加水分解される速度が遅いために加水分解されずに残った量が多かったものと解釈できる。従って、単に目的の結合に対する特異性が高いか低い点だけではなく、糖供与体の加水分解速度との相対的な比較が重要であることが明らかになった。

F-2. *B. circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼを用いた転移反応

我々が開発した *Bacillus circulans* 起源のリコンビナント β -ガラクトシダーゼは、高い特異性で Gal β 1-3GlcNAc を加水分解し、転移反応においてもこの 2 糖が選択的に得られることを報告してきた(17)。ところが最近、ガラクトース **11** を糖受容体として用いると、Gal β 1-6Gal **12** が選択的に形成されることが見出された(29)。(図 7)

そこでその原因を解明する目的でいろいろなガラクトシル 2 糖を合成して、それらの加水分解速度の比較を行った。結果を表 III に示す。表 III から分かるように、Gal β 1-3GlcNAc あるいは Gal β 1-3GalNAc およびこれらの誘導体の加水分解速度は相当する β 1-4 結合あるいは β 1-6 結合の 2 糖誘導体の加水分解速度よりも速く、逆に Gal-Gal およびその誘導体の場合には β 1-6 結合の方が β 1-3 結合あるいは β 1-4 結合の 2 糖誘導体の加水分解速度よりも速いことが明らかになった。従って *B. circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼの場合には、加水分解速度と転移反応の生成速度に関する一般則から説明できることが示された。しかし、還元末端側の糖が GlcNAc あるいは GalNAc からガラクトースに変わるのみで加水分解の特異性がこのように劇的に変化する理由については不明である。確率によって、酵素の活性部位内でのガラクトース分子あるいは GalNAc 分子の立体的環境が異なることによってこのような現象が起こるのではないかと推察されている(29)。

Fig. 7. Difference of regioselectivity in the transglycosylation using different acceptors.

Table III. Hydrolysis velocity of glycosides and disaccharides containing β -linked galactosyl residue in the presence of β -galactosidase from *B. circulans*.

Oligosaccharides	$\mu\text{mol/min/mg}$
Gal- β -p NP	93.4
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 3)-GalNAc	81.3
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 3)-GlcNAc	58.0
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal	4.7
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal- α -OMe	5.6
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal- β -OMe	4.8
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 6)-GlcNAc	4.5
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 6)-GalNAc	4.6
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal- α -OMe	1.5
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal- β -OMe	1.6
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- α -OMe	<1
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- β -OMe	<1
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 4)-GalNAc	<1
Gal- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Glc	<1
Gal- β -OMe	<1

are involved. At any rate, in using this enzyme the structure determination of sugar chains should be given due consideration.

G. Conclusion

The regioselectivity in the enzymatic synthesis of oligosaccharides using glycosidase has been thought to be low so that the reaction yield is also low. However as demonstrated above, if one selects the enzyme appropriately, one can obtain target oligosaccharides regioselectively and with high yield, exceeding 50% in some cases. In addition, the advantage of this method is that the substrates and enzyme are usually not expensive.

Moreover, thanks to recent protein engineering techniques, the hydrolysis activity has been decreased and the transglycosylation activity increased by changing Glu-358 to Ala in β -glucosidase (30). This technology can be expected to help find and develop industrially useful enzymes.

In summary, it is important to choose the method and enzyme appropriately for the synthesis of a target oligosaccharide regioselectively and with high yield.

いずれにせよ、本酵素を糖鎖構造解析に利用する際には注意を要することが明らかになった。

G. おわりに

従来、加水分解酵素を利用するオリゴ糖合成法は、生成物の位置選択性が低く且つ収率も低いことが欠点であるといわれてきた。しかし、上に述べたように酵素の選択さえ適切ならば、目的の結合のオリゴ糖を選択的に且つ50%を越える収率で合成することも可能となってきた。さらに、この方法の利点は、基質および酵素が安価で容易に手に入るということである。さらに最近、タンパク質工学を利用して β -グルコシダーゼの358番目のグルタミン酸をアラニンに変換することにより、加水分解活性を減少させ、転移活性のみを残すという画期的な酵素の改造も報告されている(30)。この方法をさらに発展させて、工業的生産に寄与できるような酵素の開発が期待される。

以上を示してきたことから言えることは、目的のオリゴ糖を効率的に合成するには、それに適した方法と酵素を組み合わせることが重要であろうと思われる。

謝 辞

本研究の一部は、通産省(現経済産業省)の産業科学技術研究開発制度の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構より委託を受けて実施したものである。

References

1. Voragen, A.G.J. and Pilnik, W. (1989) ACS Symposium Series 389, Eds. Whitaker, J.R. and Sonnet, Ph. E. 93-115
2. Hidaka, H., Eida, T., Hashimoto, K., and Nakazawa, T. (1987) Eur. Patent, 0,133,547
3. Ichikawa, Y., Look, G.C., Wong, C.-H. (1992) Anal. Biochem. **202**, 215-238
4. Thiem, J. (1995) FEMS Microbiol. Rev. **16**, 193-211
5. Watt, G.M., Lowden, P.A.S., and Flitsch, S.L. (1997) Current Opinion in Structural Biol. **7**, 652-660
6. Fernandez-Mayoralas, A. (1997) Topics Current Chem. **186**, 1-20
7. Crout, D.H.G. and Vic, G. (1998) Curr. Opinion Chem. Biol. **2**, 98-111
8. Fujimoto, H., Nishida, H., and Ajisaka, K. (1988) Agric. Biol. Chem. **52**, 1345-1351
9. Nikolov, Z. L., Meagher, M. M., and Reilly, P. J. (1989) Biotechnol. Bioeng. **34**, 694-704
10. Ajisaka, K., Matsuo, I., Isomura, M., Fujimoto, H., Shirakabe, M., and Okawa, M. (1995) Carbohydr. Res. **270**, 123-130
11. Fujimoto, H., Isomura, M., Miyazaki, T., Matsuo, I., Walton, R., Sakakibara, T., and Ajisaka, K. (1997) Carbohydr. Res. **14**, 75-80
12. Naundorf, A. and Ajisaka, K. (1999) Enzyme Microb. Technol. **25**, 483-488
13. Ajisaka, K., Nishida, H., and Fujimoto, H. (1987) Biotechnol. Lett. **9**, 387-392
14. Fujimoto, H. and Ajisaka, K. (1988) Biotechnol. Lett. **10**, 107-112
15. Sakai, S., Katsumi, R., Ohi, H., Usui, T., and Ishido, Y. (1992) J. Carbohydr. Chem. **11**, 553-565
16. Ito, Y. and Sasaki, T. (1997) Biosci. Biotechnol. Biochem. **61**, 1270-1276
17. Fujimoto, H., Miyasato, M., Ito, Y., Sasaki, T., and Ajisaka, K. (1998) Glycoconj. J. **15**, 155-160
18. Hedbys, L., Johansson, E., Mosbach, K., and Larsson, P.-O. (1989) Carbohydr. Res. **186**, 217-223
19. Murata, T., Ito, T., Hayakawa, Y., and Usui, T. (1996) J. Biochem. **200**, 851-855
20. Fujimoto, H. (1997) J. Carbohydr. Chem. **16**, 967-970
21. Yoon, Y. -H., and Ajisaka, K. (1996) Carbohydr. Res. **292**, 153-163
22. Ajisaka, K. and Shirakabe, M. (1992) Carbohydr. Res. **224**, 291-299
23. Ajisaka, K., Fujimoto, H., and Isomura, M. (1994) Carbohydr. Res. **259**, 103-115
24. Makimura, Y., Ishida, H., Kondo, A., Hasegawa, A., and Kiso, M. (1998) J. Carbohydr. Chem. **17**, 975-979
25. Kobayashi, S., Kiyosada, T., and Shoda, S. (1996) J. Am. Chem. Soc. **118**, 13113-13115
26. Kuhn, R., Baer, H.H., and Gauhe, A. (1955) Chem. Ber. **188**, 1713-1716
27. Ajisaka, K., Fujimoto, H., and Miyasato, M. (1998) Carbohydr. Res. **309**, 125-129
28. Farkas, E., Thiem, J., and Ajisaka, K. (2000) Carbohydr. Res. **328**, 293-299
29. Zeng, X., Yoshino, R., Murata, T., Ajisaka, K., and Usui, T. (2000) Carbohydr. Res. **325**, 120-131
30. Wang, Q., Graham, R.W., Trimburt, D., Warren, R.A.J., and Withers, S.G. (1994) J. Am. Chem. Soc. **116**, 11594-11595
31. Vic, G., Scigelova, M., Hastings, J.J., Howarth, O.W., and Crout, D.H.G., (1996) Chem. Commun. 1473-1474

Received on October 4, 2001, accepted on October 25, 2001

Profile of the Author

Katsumi Ajisaka obtained his Ph.D degree in chemistry from Tokyo Institute of Technology in 1974. In the last ten years he has worked as a member of the MITI project "Technologies for Production and Utilization of Complex Carbohydrates". The details on this subject were summarized in Vol. 13 No. 71 of this Journal. His major interest is the syntheses of glycopeptides and to elucidate the function of the carbohydrates on the peptides and proteins.