オリゴ糖鎖ライブラリーの作製

碓 氷 泰 市*・村 田 健 臣*

Preparation of Oligosaccharide Units Library

Taichi USUI* and Takeomi MURATA*

Significant attentions have been focused on the application of glycosidase-catalyzed transglycosylation for practical synthesis of oligosaccharides involved in glycoconjugates. The enzymatic synthesis has become more practical by the use of several glycosidases available in sufficient quantity. This review describes convenient syntheses of di and trisaccharide units, which are related to molecular recognition, by employing regioselective transgalactosylation, trans-*N*-acetylglucosaminidation, transfucosylation and transmannosylation. The regioselectivity could be manipulated to some extent by using following techniques: (1) careful selection of enzymes, (2) organic co-solvent system, (3) inclusion complex of acceptor glycoside with cyclodextrin.

Key words: Oligosaccharides, Enzymatic synthesis, Glycosidases, Transglycosylation, Glycoconjugates, Regioselectivity.

1. はじめに

近年複雑な生体微量成分の分離・分析技術の進歩により、生物化学の研究対象が細胞レベルにまで広がり、細胞表層の糖タンパク質や糖脂質を構成するオリゴ糖鎖が、細胞相互の情報伝達に深く関わっていることが明らかになってきている。しかしながら、このようなオリゴ糖鎖の果たす役割を明らかにするために、研究に必要な十分量のオリゴ糖鎖を得るための効率的な合成法を確立する必要がある。一般に、オリゴ糖鎖を調製する方法としては、1)天然糖鎖からの分離、2)有機化学的合成、3)酵素合成等が用いられている。1)の方法では、生体微量成分でしか存在しない糖鎖の量産は困難である。2)の方法に関しては、既に様々なオリゴ糖合成法について報告がなされている。しかしながら、一般的に、これらの合成プロセスにおける化学的グリコシル化反応は、立体的制御や多くの保護・脱保護の手順を繰り返さなければならず、必要量の量産という観点からは限界がある。これに対し3)の方法は、保護・脱保護の工程を含まないので、高い選択性が確保できれば実践的合成法として期待

できる。

このような酵素法としては、グリコシルトランスフェラーゼを用い、糖ヌクレオチドをドナーとしてアクセプター糖に転移する極めて反応特異性の高い方法と、糖質加水分解酵素(グリコシダーゼ、多糖水解酵素)の糖転移・縮合反応によるグリコシル形成反応を活用した方法とが知られている。このような背景の下で、糖質分解酵素法は比較的十分量の酵素や基質の入手が容易であることから、2-4糖程度のオリゴ糖鎖の実践的合成法として有効な方法となっている。一般的に、グリコシダーゼは、糖転移反応の際生成するグリコシド結合の立体配置に対しては高い立体選択性を示す。一方、アクセプターである糖基質の結合位置に対しては、多少の選択性を示すものの、その選択性は一般的に低い。したがって、収率の向上および位置選択性の向上を目的とした様々な工夫がなされている。一方、多糖水解酵素法は、糖転移のアクセプターに対する位置選択性は高いものの、アクセプター認識が厳格なため、糖鎖合成への応用は限られたものとなっている。

本稿では、複合糖質の糖鎖構造に基づいてグリコシダーゼの転移・水解反応を活用し、オリゴ糖鎖ライブラリーの作製を目指した重要オリゴ糖鎖(2-3糖単位)の系統的かつ効率的な酵素合成法を述べる。

* 静岡大学農学部 ()

* Faculty of Agriculture, Shizuoka University ()

2. β -ガラクトシル 2 糖

N-アセチラクトサミン (LacNAc, Gal β 1-4 GlcNAc) は、複合糖質のオリゴ糖部位を構成する代表的な認識単位として知られている。従来本 2 糖の合成法としては、有機合成法^{1,2)}とガラクトシルトランスフェラーゼを用い、UDP-Gal を GlcNAc の 4 位にガラクトシル転移させる方法³⁾とが知られている。ここでは LacNAc ならびに関連オリゴ 2 糖の簡易でかつ効率の合成法を紹介する。

2.1. *N*-アセチラクトサミンと *N*-アセチルイソラクトサミン

Bacillus circulans 培養液から調製した市販 β -D-ガラクトシダーゼ標品(ビオラクタ)を直接用い、ラクトースをドナー、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) をアクセプターとしてモル比 1:2 で 40% の高基質濃度で糖転移反応を行った。このような高基質濃度での反応は、糖転移効率を上げる最も効果的な方法として、一般に利用される。本酵素反応液を直接活性炭-セライトカラムに供し、目的生成物 LacNAc をエタノールにより溶出、容易に分離、結晶化して、本 2 糖をドナー当たり 40% の高収率で得た⁴⁾。同様な方法で、*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) をアクセプターとした時、Gal β 1-4 GalNAc をドナー当たり 24% の収率で得ている⁵⁾。

一方、*Cluyvenomyces lactis* 由来の β -D-ガラクトシダーゼを用い、ラクトースと GlcNAc から反応を行うと優先的に *N*-アセチルイソラクトサミン (IsoLacNAc, Gal β 1-6 GlcNAc) が、少量の LacNAc とともに生成してきた。しかし両生成物のクロマト分離が困難であったので、本酵素反応液を直接希釈して *B. circulans* 由来の β -D-ガラクトシダーゼを添加、加水分解反応を行うと選択的に LacNAc のみを分解、目的 IsoLacNAc を単離することができる。この LacNAc の選択的除去操作は、*B. circulans* の β -ガラクトシダーゼの LacNAc に対する水解速度が、IsoLacNAc の 50 倍の速度差があることを利用し

ている。

この水解処理した反応液を活性炭-セライトカラムに供することで目的化合物 IsoLacNAc をドナー当たり 35% の収率で得ることができた⁴⁾。このように、LacNAc, IsoLacNAc のグラムスケールでの合成が、一段階のクロマト操作により可能となった。

2.2. *N*-アセチラクトサミン関連化合物

B. circulans 由来 β -D-ガラクトシダーゼによる特異な糖転移反応は、さらに GlcNAc や GalNAc を含む 2 糖誘導体の合成に向けられた。大過剰のラクトースをドナーとして *p*-ニトロフェニル β -*N*-アセチルグルコサミニド (GlcNAc β -pNP) および *p*-ニトロフェニル β -*N*-アセチルガラクトサミニド (GalNAc β -pNP) をアクセプターとしてそれぞれ糖転移反応を行った。この場合、反応系への高濃度 (50~60%) の親水性有機溶媒 (Me₂SO, CH₃CN) 添加は、アグリコン部に *p*-ニトロフェニル基を有するアクセプターの高基質濃度での反応を可能にした。それぞれの転移生成物を Toyopearl HW-40 S カラムクロマトに供するだけで、 β -(1-4) ガラクトシル 2 糖誘導体 Gal β 1-4 GlcNAc β -pNP (1) と Gal β 1-4 GalNAc β -NP (2) とをアクセプター当たり 15~21% の収率で得ることができた⁵⁾。この場合の反応系への有機溶媒添加は、いったん最大生成に達した後のそれぞれの反応の主生成物 1, 2 の分解を抑制する効果のあることが明らかとなった。このように本酵素反応での β -D-ガラクトシル転移はアクセプターである GlcNAc や GalNAc 残基の 4 位の水酸基の配向に関係なく、その位置に高選択的であることが判明した (図 1)。

2.3. ムチン型糖鎖ガラクトシル 2 糖誘導体

ムチン型糖鎖 I 型の基本単位は 3-*O*-ガラクトシル-*N*-アセチルガラクトサミンが α 結合でセリンやスレオニンの水酸基に結合している *O*-型糖鎖で、アスパラギンが結合した *N*-型糖鎖と並んで糖タンパクに広く分布している。ここではこのようなムチン型糖鎖のミミック単位としてアグリコン部に α 結合した 2 糖誘導体、*p*-

Fig. 1 Predominant mode on the transglycosylation of *B. circulans* β -D-galactosidase.

ニトロフェニル 3-O- β -ガラクトシル-N-アセチル- α -ガラクトサミニド (3, Gal β 1-3 GalNAc α -pNP) の酵素合成法を紹介する⁶⁾。

ブタ精巢 (porcine testes) 抽出液 20~75% 硫酸画分から順次、イオン交換クロマト、ゲル濾過クロマトにより β -D-ガラクトシダーゼと α -N-アセチルヘキソサミニダーゼとを相互分離し、後者の酵素活性を含まない前者の部分精製酵素を得た。この操作は、下記の酵素反応で用いるアクセプターの分解を防ぐために行った。本酵素標品を用い、アクセプターである *p*-ニトロフェニル N-アセチル- α -ガラクトサミニドと等モルの β -D-シクロデキストリン (β -CD) とを包接複合体としてから、ラクトースをドナーとする反応を行った。この場合、ドナーとアクセプターのモル比は 40:1、全基質濃度 21% である。反応液を順次 Chromatorex-ODS カラムクロマト、Toyopearl HW 40 S カラムクロマトに供し、主生成物として 3 をドナー当たり 22% の収率で得た。本化合物

は、エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (*Alcaligenes* sp.) の基質として、速度論量 $K_m = 0.041$ mM, $K_o/K_m = 2030$ $\text{mM}^{-1}/\text{min}^{-1}$ を示し、本酵素活性の分析適応性に優れた基質となる。

同様な反応を、アクセプターとして β 配向である *p*-ニトロフェニル N-アセチル- β -ガラクトサミニドに適用すると、主生成物として Gal β 1-3 GalNAc β -pNP が高選択的に得られた。一方、アクセプターを *p*-ニトロフェニル N-アセチル- β -グルコサミニドにして反応を行うと、主生成 2 糖として (1-3) 結合の他に (1-4) 結合糖が得られた。しかし、両 2 糖のクロマトによる相互分離が困難であったので、上述した *B. circulans* の β -D-ガラクトシダーゼによる水解処理を行い、(1-4) 結合 2 糖のみを選択的に除去後、この反応液をゲル濾過クロマトに供することで、目的 2 糖誘導体 Gal β 1-3 GalNAc β -pNP を得た。このようにブタ精巢由来の β -ガラクトシダーゼは、GlcNAc や GalNAc をアクセプターにした時、 β -(1-3)-ガラクトシル 2 糖の位置選択的合成に利用できた。

2.4. β -ガラクトシル転移の特性

B. circulans 由来の β -D-ガラクトシダーゼは GlcNAc, GalNAc をアクセプターとした時に、OH-4 の配置に関係なく優先的に (1-4) 結合形成が起こり、OH-3 への転

移形成能を示さなかった。この転移特性をさらに究明する目的で、アクセプターとしてメチル β -グルコシドやメチル β -ガラクトシドを用い、ガラクトシル転移反応を行った。すると主生成 2 糖として (1-4) 結合の他に (1-3) 結合異性体を得られた。このことから本酵素反応は、2-アセトアミド-2-デオキシ糖をアクセプターにした場合、活性部位での基質認識において C-2 の N-アセチル基の存在が OH-3 位への転移形成の障害となり、OH-4 位への選択性を高めていると考えている⁷⁾。また本酵素は、アクセプターの重合度 (DP 3-5) が増大しても、非還元末端糖残基 OH-4 位への高い位置選択性と糖転移形成能を保持していた⁸⁾。一方、ブタ精巢由来の β -D-ガラクトシダーゼを用いたガラクトシル転移反応の位置選択性は、GlcNAc や GalNAc をアクセプターにした時、OH-3 位への結合形成能を有していた。すなわち、GlcNAc に対し主に OH-3, OH-4 位に、低い確率で OH-6 位に転移能を示し、GalNAc に対しては、OH-4 位への結合形成は観察されず優先的に OH-3 位に、低い確率で OH-6 位に転移を示した。いずれにしても本酵素の糖転移特性は、*B. circulans* 由来の β -D-ガラクトシダーゼのそれとは異なり、GlcNAc や GalNAc に対し OH-3 位に高い位置選択性を示し、OH-4 位に対する選択性はこの水酸基の立体配置に依存していた。(1-6) 転移結合形成を優先的に起こす酵素反応については、Hedbys らが *Escherichia coli* 由来の β -D-ガラクトシダーゼを用い、ラクトースと GalNAc から Gal β 1-6 GalNAc を 20% の収率で高選択的に得ている⁹⁾。彼らはまた、牛精巢と *E. coli* 由来の β -D-ガラクトシダーゼの高選択的な転移・水解反応の組み合わせで、ラクトースと GlcNAc あるいは GlcNAc β -SEt から、(1-3) 結合 2 糖 Gal β 1-3 GlcNAc と Gal β 1-3 GlcNAc β -SEt とを、それぞれ 12% と 17% の収率で得ている¹⁰⁾。本酵素の糖転移特性は、ブタ精巢起源のそれと極めて類似していた。このように起源の異なる β -D-ガラクトシダーゼによるガラクトシル転移反応

Fig. 2 Regioselectivity of β -D-galactosidase on transglycosylation.

と、場合によっては選択的水解反応を組み合わせることによって、図2に示すような組み合わせが可能な β -ガラクトシル還元2糖 Gal-GlcNAc, Gal-GalNAcの実践的合成法が可能となっている。

3. *N*-アセチルグルコサミニルオリゴ糖

リゾチームや β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ(β -NAHase)による*N*-アセチルグルコサミニル転移反応を利用し、オリゴ糖鎖関連の β -*N*-アセチルグルコサミニルオリゴ2-3糖の酵素合成を試みた。

3.1. 4-*O*- β -*N*-アセチルグルコサミニル-マンノース

我々は、*N,N'*-ジアセチルキトビオース((GlcNAc)₂)が市販のニワトリ卵白リゾチームの糖鎖伸長反応によって生ずる重合度6-7の*N*-アセチルキトリオリゴ糖形成のドナーにもアクセプターにもなりうることを実証している¹¹⁾。このことにヒントを得、(GlcNAc)₂をドナー、マンノースをアクセプターとして同様な反応を行った。この場合、ドナーとアクセプターのモル比を1:4、全基質濃度を40%、大過剰のリゾチーム(3%)添加、40°Cで長時間(2日間)の反応を行った。反応液を順次、活性炭-セライトカラムクロマトそしてBio-Gel P-2ゲル濾過クロマトに供し、2段階の操作でドナー当たり21%の収率で目的化合物4-*O*- β -*N*-アセチルグルコサミニル-マンノース(4, GlcNAc β 1-4 Man)を得た¹²⁾。本

反応におけるアクセプター残基OH-4位への*N*-アセチルグルコサミニル化は位置特異的であった。この場合、4糖*N,N',N'',N'''*-テトラアセチルキトテトラオースをドナーとして同様な反応を行うと、(GlcNAc)₂のそれと比較し4の最大生成に達する速度は40倍上昇した。しかし実戦的合成という立場から、容易にキチンから化学的、酵素的手法で量産できる(GlcNAc)₂を基質として利用した。この場合、*p*-ニトロフェニル β -マンノシドをアクセプターとした時は、高濃度の有機溶媒添加(50% Me₂SO)により高基質濃度での反応が可能となった。酵素反応液を直接Toyopearl HW-40 Sカラムクロマトに供し、一段階の操作でドナー当たり10.5%の収率でGlcNAc β 1-4 Man β -pNPを得た。このようにリゾチームによる糖転移反応は、マンノースをアクセプターとして受け入れ可能であった。そこで本酵素の(GlcNAc)₂からの転移特性を明らかにする目的で各種アクセプター糖を

用い検討した。一般に、多糖水解酵素であるキチナーゼ¹³⁾、アミラーゼ¹⁴⁻¹⁶⁾、セルラーゼ¹⁷⁾等で報告されている糖転移反応の位置選択性は極めて高いことが知られている。本酵素反応においても、*p*-ニトロフェニル β -*N*-アセチルグルコサミニドをアクセプターとした場合、(1-4)転移形成反応のみを触媒した。しかし、アグリコン部が α 配置の異性体(*p*-ニトロフェニル、 α -*N*-アセチルグルコサミニド)や α 結合オリゴ糖(*p*-ニトロフェニル α -グルコシド)をアクセプターとすると(1-4)の他に(1-3)結合形成による転移物が生じた。一方、ガラクトース、GalNAcおよびこれらグリコシド誘導体はすべてアクセプターになり得なかった。これらの結果より、本酵素の*N*-アセチルグルコサミニル転移反応の特性は、アクセプター糖のOH-4位の配置に依存しているばかりでなく、その残基のアグリコンの立体化学にも大きな影響を与えていることが判明した¹⁸⁾。

3.2. ラクト-*N*-トリオースIIおよび関連化合物

ラクト系列の糖脂質としては、ラクトおよびラクトネオテトラグリコシルセラミド4糖と、これに糖一残基少ないラクトトリグリコシルセラミド3糖が知られている。これらは、共通してラクト-*N*-トリオース(GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc)単位を含み、これまでにいくつかの有機化学的方法を用いその合成法が開発されてきている^{19,20)}。そこで筆者らは、本3糖単位の効率的かつ位置選択的な酵素合成を試みた²¹⁾。*Nocardia orientalis*由来の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ(β -NAHase)を用い、(GlcNAc)₂をドナー、メチル β -ラクトシドをアクセプターとしてモル比1:2でできるだけ高基質濃度(40%)になるように反応を行った。3種の転移生成物を順次、活性炭-セライトカラム、HPLCによる分取カラムによるクロマト操作に供し、目的とするメチル β -ラクト-*N*-トリオシド(GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc β -OMe)の他に、(1-6)結合異性体であるGlcNAc β 1-6 Gal β 1-4 Glc β -OMeとGal β 1-4[GlcNAc β 1-6]Glc β -OMeとそれぞれ20:21:59の生成比で、全収率ドナー当たり17%で得た。一方、*p*-ニトロフェニル β -ラクトシドをアクセプターとした場合、本基質の水に対する溶解度(2%<)が低かった。そこで、 β -CDと包接複合体となすことでその溶解度を4倍上昇させた結果、高基質濃度での反応が可能となった。すなわち、本酵素を用い、*p*-ニトロフェニル β -ラクトシドと β -CDをモル比1:1となるように包接複合体となし、これにドナーである(GlcNAc)₂を加え、アクセプターとドナーのモル比が1:1となるように、全基質濃度15%で反応を行った。この結果生じた3種の転移生成物を順次、Toyopearl HW-40 Sカラム、

HPLC による分取カラムクロマトにより分離, *p*-ニトロフェニル β -ラクト-*N*-トリオシド (5, GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc β -pNP), GlcNAc β 1-6 Gal β 1-4 Glc β -pNP (6) そして Gal β 1-4 [GlcNAc β 1-6] Glc β -pNP (7) を 27 : 43 : 30 の生成比で, 全収率ドナー当たり 7 % で得た。

3.3. 包接複合体を利用した位置選択的制御

上記アクセプターとの複合体形成を利用した転移特性を検討した。CD 非存在下での *p*-ニトロフェニル β -ラクトシドをアクセプターとした時の *N*-アセチルグルコサミニル転移反応の生成物 5, 6, 7 の生成比は, 14 : 26 : 60 であった。このように本酵素の転移反応は, アクセプター残基の一級水酸基である OH-6 と OH-6' 位に優先的に進行し, OH-3' へは 14 % と低確率でしかなかった。一方, 本アクセプターと各種 CD とをそれぞれモル比 1 : 1 で行うと, 5, 6, 7 の生成比は, α -CD で 24 : 37 : 39, β -CD で 27 : 43 : 30, 2,6-ジ-*O*-メチル- β -CD (DM- β -CD) で 27 : 48 : 25, ヒドロキシプロピル- β -CD (HP- β -CD) で 29 : 38 : 33 となった (図 3)。このように CD 添加は, 7 の生成を著しく抑制し, 目的化合物 5 と 6 の位置選択性を増大させる効果を有し, 5 の生成比は CD 非存在下と比較し 2 倍となった。この場合の 7 の転移生成比の低下は, 明らかにアクセプターの CD 包接によるグルコース残基の近接効果による立体障害により, OH-6 位への転移確率が低くなったことを示している。

同様に, *p*-ニトロフェニル β -*N*-アセチルラクトサミニド (Gal β 1-4 GlcNAc β -pNP) をアクセプターとした場合, CD 非共存下では GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 GlcNAc β -pNP (8), GlcNAc β 1-6 Gal β 1-4 GlcNAc β -pNP (9), Gal β 1-4 [GlcNAc β 1-6] GlcNAc β -pNP (10) が,

Fig. 3 Structures of carbohydrates used as targets for β -NAHase-catalyzed transglycosylation. Percentages above the arrows are the fraction of a given *N*-acetylglucosaminidation compared with the total.

11:33:56の生成比に対し、 α -CD、 β -CD、2,6-ジ-O-メチル- β -CDおよびヒドロキシプロピル- β -CD共存下では、それぞれ17:55:28, 18:62:20, 22:59:19となった。この場合のN-アセチルグルコサミン転移は、*p*-ニトロフェニル β -ラクトシドをアクセプターとした時と同様に、2糖アクセプターのGal残基側のOH-3', OH-6'位への選択性を増大させる効果を有していた。

4. フコシルオリゴ3糖

L-フコース(6-デオキシ-L-ガラクトース)は、海藻フライタン(硫酸多糖)の糖主成分をなしている。一方、フコースが血液型物質の成分として、抗原性の発現に重要な役割を演じていることが認められて以来、オリゴ糖鎖中に α 結合したフコースが様々なエピトープの形で含まれていることが明らかになってきている。そこでこれからエピトープのミミック単位としてのフコシル3糖の簡易合成を試みた(図4)²²⁾。

4.1. 3'-O- α -フコシル-N-アセチルラクトサミン

Alcaligenes sp. 由来の α -L-フコシダーゼを用い、*p*-ニトロフェニル α -L-フコシドをドナー、N-アセチルラクトサミンをアクセプターとしてモル比1:25、基質濃度11.5%で反応を行った。酵素反応液を直接、活性炭-セライトカラムクロマトに供し、一段階の操作で化合物3'-O- α -フコシル-N-アセチルラクトサミン(Fuc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc)を分離、結晶化した。本フコシル転移反応は極めて位置選択性が高く、ドナー当たり45%の高収率であった。このように大過剰のアクセプターを用いることで、高価なドナー基質に対する見かけの転移効

率を上げることが可能であった。また未反応のアクセプターは、転移生成物とともにクロマト操作により分離、そして回収、再利用が可能であった。フコシル3糖に関しては、Rosevearらが α -1,2-フコシルトランスフェラーゼを用い、GDP-フコースをドナー、Gal β 1-4GlcNAc β -O(CH₂)₆NH₂をアクセプターとしてGal残基上に位置特異的に(1-2)結合を導入してしている²³⁾。

4.2. 3'-O- α -フコシル-ラクトース

上記と同様に、フコシル転移反応を*p*-ニトロフェニル α -L-フコシドとラクトースを用い、モル比1:19、全基質濃度9%で反応を行った。反応液を直接、活性炭-セライトカラムクロマトを行うだけで目的化合物3'-O- α -フコシル-ラクトース(Fuc α 1-3Gal β 1-4Glc)がドナー当たり31%の収率で得られた。同様な反応条件で、メチル β -ラクトシドをアクセプターとするとドナー当たり42%の収率でメチル3'-O- α -フコシル- β -ラクトシド(Fuc α 1-3Gal β 1-4Glc β OMe)を得た。このように本反応は、2糖アクセプターのGal残基上にフコシル基を高選択的に(1-3)結合で導入できる反応特性を有していた。フコースを含むオリゴ糖の酵素合成については、SvensonとThiemがブタ肝臓 α -L-フコシダーゼのフコシル転移反応を用いて、*p*-ニトロフェニル α -L-フコシドとメチル β -ガラクトシドから(1-2)と(1-6)結合が2:3の生成比からなるフコシル2糖を得ている²⁴⁾。AjisakaとShirakabeは*Aspergillus niger*由来の α -L-フコシダーゼを用い、グルコースやGlcNAcをアクセプターとして、同様にフコシル転移反応を行い、高選択的に(1-3)結合したフコシル2糖を60%の高収率で得ている²⁵⁾。

5. 4'-O- β -マンノシル-N,N'-ジアセチルキトビオース

N-型糖鎖のコア構造の共通の3糖単位として、4'-O- β -マンノシル-N,N'-ジアセチルキトビオース(11, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc)が知られている。本3糖の有機合成に関しては様々な方法が試みられているが、その合成プロセスは長く煩雑である²⁶⁻²⁸⁾。とくに β -マンノシル基の立体選択性を示す効率的なグリコシル化は重要な研究課題となっている²⁷⁾。そこで酵素法による11合成のための簡便な β -マンノシル基導入法を試みた²⁹⁾。

11

Fig. 4 Transglycosylation mode of α -L-fucosidase *Alcaligenes* sp.

Aspergillus niger の培養液から調製した市販のヘミセルラーゼ (ヘミセルラーゼ AC) を酵素源とした。本酵素標品に含まれる β -D-マンナーゼと β -NAHase とを、予めイオン交換クロマトにより相互分離し、後者の活性を含まない部分精製酵素標品を調製した。これを用い、マンノトリオース (Man β 1-4 Man β 1-4 Man) をドナー、(GlcNAc)₂ をアクセプターとしてモル比 2:1、基質濃度 14.5% で反応を行った。生成物を順次、活性炭-セライトカラムクロマト、HPLC による分取クロマトにより分離、化合物 11 をドナー当たり 3.7% の低収率で得た。このように本 β -マンノシル転移反応は、アクセプターの非還元末端 GlcNAc 残基の OH-4 位に高い位置選択性を示すものの、その転移能は必ずしも高いものではなかった。また本酵素は、マンノビオース (Man β 1-4 Man) をもドナー基質として利用できたが、11 の生成速度は著しく低下した。

6. 糖鎖高分子の合成と反応性

生物活性をもたらす糖鎖の認識は短いオリゴ糖 (あるいは単糖) であっても、それに応じた特徴的な認識信号として機能発現することがわかってきた。例えば、ラクトース置換スチレン重合体が、肝細胞を特異的に接着し、肝細胞の細胞培養材料として優れた特性を発現することが見いだされている³⁰⁾。この特性は、この重合体のガラクトース残基が肝細胞表面にあるアシアロ糖タンパクレセプターに強く結合するためである。このような背景に基づいて筆者らは、名古屋大学小林一清教授との共同研究により系統的に酵素合成した β -ガラクトシル 2 糖を中心にして、これらを側鎖に持つ糖鎖高分子の合成を試みた。

6.1. 糖鎖高分子

LacNAc 糖鎖は分化抗原やガン関連抗原として重要なオリゴ糖鎖構成単位である。そこで図 5 に示すスキームに従って LacNAc を側鎖に持つ高分子の合成を行った³¹⁾。酵素合成で得た *p*-ニトロフェニル *N*-アセチル- β -ラクトサミニドを出発原料に用いてニトロ基を接触還元によりアクロイルアミノフェニル 2 糖配糖体とした。これをモノマーとしてアゾビスイソブチロニトリル (AIBN) を開始剤として Me₂SO 中 60°C で単独重合を行い、LacNAc 2 糖単位を側鎖に持つ糖鎖高分子ポリ *p*-アクロイルアミノフェニル重合体 (pA-LacNAc) を得た。pA-LacNAc は、水、Me₂SO に可溶で、水溶液中で分子量は、光散法により 32 万と推定された。同じ合成プロセスで各種糖鎖高分子: pA-IsoLacNAc, pA-ラクトース (pA-Lac), pA-(Gal β 1-3 Glc), pA-イソラクトー

Fig. 5 Synthesis of pA-LacNAc via a chemical-enzymatic hybrid process.

ス (pA-IsoLac), pA-(GlcNAc)₂ を合成した。

6.2. レクチンとの反応性

ガラクトース, GlcNAc および LacNAc 結合性として知られている各種レクチンを用いて糖鎖高分子との相互作用を解析した。寒天ゲル内二重拡散法において pA-LacNAc は、LacNAc 2 糖単位と相互作用することが知られているチョウセンアサガオ (DSA), 小麦胚芽 (WGA) とエリスリナ (EC), ヒマ種子 (RCA) 由来の各種レクチンと沈降反応を示し、前 2 者とは強く反応した。しかしピーナッツ (PNA) レクチンとは反応しなかった。一方、上記 5 種のレクチンに対し pA-IsoLacNAc は、WGA とのみ、pA-Lac は、RCA, PNA, EC と、pA-IsoLac はいずれとも反応しなかった。また pA-(Gal β 1-3 Glc) は PNA とのみ、pA-(GlcNAc)₂ は WGA とのみ反応性を示した。このように高分子化することによって 2 糖の結合様式に依存したレクチンとの反応性の違いを、直接に解析することができた。

同様に赤血球凝集阻害試験でも、これら糖鎖高分子は、本来のレクチンの糖鎖結合性と矛盾のない結果を得た。しかしながら個々の反応性においては、レクチンの糖鎖認識を反映した著しい阻害活性の違いを示した。例えば pA-LacNAc における LacNAc のモノマー構造当たりの、EC や RCA に対するモル濃度での阻害活性は、遊離の LacNAc 2 糖のそれと同等もしくは幾分高い程度の数値を示した。これに対し WGA や DSA では、この阻害濃度の 10^{-2} から 10^{-3} 倍の低い濃度で活性を示した。WGA や DSA は、アンテナ構造の糖鎖と強く結合することが知られているが、このように強い pA-LacNAc との糖鎖認識も、この高分子表面から糖鎖が高密度で突き出ているクラスター効果によって影響されたものと推測した。このように 2 糖鎖程度の短鎖オリゴ糖を側鎖に持つ糖鎖高分子であっても、レクチンの糖鎖認識に基づいた結合特性を有するばかりか、高分子特有の反応性をも合わせ持つことが示された。

7. おわりに

生体内に存在し様々な生命現象に関与するオリゴ糖鎖は微量にしか存在せず、このようなオリゴ糖を量産することは、糖鎖工学を推進するうえで重要な研究課題である。そこで本研究では、安価な基質と十分量の確保可能な糖質水解酵素を活用し、生体内とは異なった極限状態(高基質濃度、有機溶媒添加等)で糖転移反応を行わせることで複合糖質オリゴ糖鎖の分子認識に関わるとされる重要 2・3 糖を中心とした系統的、かつ実践的合成法を確立してきた。このことはオリゴ糖鎖の分野において、さらなる多彩な合成法の開発の可能性を示唆するものである。またこのような合成オリゴ糖の利用法の例として、短いオリゴ糖であってもそれに応じた機能発現をもたらすことを LacNAc および関連オリゴ 2 糖を側鎖に持つ糖鎖高分子を構築し、分子認識材料として極めて有用な素材となりうることを実証できた。またこの種のオリゴ糖の別な利用法として最近、Biospecific Interaction Analysis (BIAcore System) を用い、LacNAc をセンサーチップ表面にリガンドとして固定化、レクチンとの特異的相互作用の解析に有用であることが報告されている³²⁾。このようにオリゴ糖の量産技術の開発は、十分量のオリゴ糖の供給が可能となることにより、糖鎖工学において様々な利用法が期待されるであろう。

(平成 8 年 2 月 14 日受理)

文 献

1) R.T. Lee, T.O. Lee, *Carbohydr. Res.*, 77, 270

- (1979)
- 2) J. Alais, A. Veyrieres, *Carbohydr. Res.*, 93, 164 (1981)
 - 3) C.H. Wong, S.L. Haynie, G.M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, 47, 5416 (1982)
 - 4) S. Sakai, R. Katsumi, H. Ohi, T. Usui, Y. Ishido, *J. Carbohydr. Chem.*, 11, 553 (1992)
 - 5) T. Usui, S. Kubota, H. Ohi, *Carbohydr. Res.*, 244, 315 (1993)
 - 6) T. Murata, T. Itoh, Y. Hayakawa, T. Usui, submitted to *J. Biochem.*
 - 7) T. Usui, S. Morimoto, Y. Hayakawa, M. Kawaguchi, T. Murata, Y. Matahira, Y. Nishida, *Carbohydr. Res.*, 285, 29 (1996)
 - 8) T. Usui, K. Ogawa, H. Nagai, H. Matsui, *Anal. Biochem.*, 202, 61 (1992)
 - 9) L. Hedbyds, P.-O. Larsson, K. Mosbach, S. Svensson, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 123, 8 (1984)
 - 10) L. Hedbys, E. Johansson, K. Mosbach, P.-O. Larsson, A. Gunnarsson, S. Svensson, H. Lönn, *Glycoconjugate J.*, 6, 161 (1989)
 - 11) T. Usui, H. Matsui, K. Isobe, *Carbohydr. Res.*, 203, 65 (1990)
 - 12) Y. Matahira, K. Ohno, M. Kawaguchi, H. Kawagishi, T. Usui, *J. Carbohydr. Chem.*, 14, 213 (1995)
 - 13) T. Usui, Y. Hayashi, F. Nanjo, K. Sakai, Y. Ishida, *Biochim. Biophys. Acta*, 923, 302 (1987)
 - 14) T. Usui, T. Murata, *J. Biochem.*, 103, 969 (1988)
 - 15) K. Ogawa, T. Nakakuki, T. Usui, *J. Carbohydr. Chem.*, 10, 85 (1991)
 - 16) K. Ogawa, T. Murata, T. Usui, *Carbohydr. Res.*, 212, 289 (1991)
 - 17) S. Kobayashi, K. Kainuma, T. Kawasaki, S. Shoda, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 3079 (1991)
 - 18) H. Matsui, H. Kawagishi, T. Usui, *Biochim. Biophys. Acta*, 1035, 90 (1991)
 - 19) Y. Ito, S. Sato, M. Mori, T. Ogawa, *J. Carbohydr. Chem.*, 7, 359 (1988)
 - 20) A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.*, 200, 269 (1990)
 - 21) Y. Matahira, A. Tashiro, T. Sato, H. Kawagishi, T. Usui, *Glycoconjugate J.*, 12, 664 (1995)
 - 22) T. Murata, S. Morimoto, T. Watanabe, T. Usui, in preparation
 - 23) P.R. Rosevear, H.A. Nunez, *Biochemistry*, 21, 1421 (1982)
 - 24) S. Svensson, J. Thiem, *Carbohydr. Res.*, 200, 391 (1990)
 - 25) K. Ajisaka, M. Shirakabe, *Carbohydr. Res.*, 224, 291 (1992)
 - 26) C.D. Warrer, C. Auge, M.L. Larer, S. Suzuki,

- D. Power, R.W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.*, 32, 71 (1980)
- 27) T. Ogawa, T. Kitajima, T. Nukada, *Carbohydr. Res.*, 123, C-5 (1983)
- 28) H. Paulsen, R. Lebuhn, *Carbohydr. Res.*, 130, 85 (1984)
- 29) T. Usui, M. Suzuki, T. Sato, H. Kawagishi, K. Adachi, H. Sano, *Glycoconjugate J.*, 11, 105 (1994)
- 30) A. Kobayashi, T. Akaike, K. Kobayashi, H. Sumitomo, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 7, 645 (1988)
- 31) K. Kobayashi, N. Kakishita, M. Okada, T. Akaike, T. Usui, *J. Carbohydr. Chem.*, 13, 753 (1994); (b) K. Kobayashi, T. Akaike, T. Usui, *Methods in Enzymology*, 242, 226 (1994)
- 32) Y. Shinohara, H. Sota, F. Kim, M. Shimizu, M. Gotoh, M. Tosu, Y. Hasegawa, *J. Biochem.*, 117, 1076 (1995)

書 評

合成香料：化学と商品知識

印藤元一 著

化学工業日報社 1001 ページ 定価 15,000 円

本書は、実用的な香料化学物質事典というべきものである。テルペン、香料化学分野のみならず有機化学、天然物化学、合成化学分野で仕事をするものにとっては化合物の由来や物理的・化学的性質、既存の製法などが手早く調べられる本は非常に都合がよい。著者の「はしがき」にもあるように奥田 治博士による「香料化学総覧」は大変にすばらしい香料事典で我々も愛用しているが、刊行以来 20 年近くもなり、近年の合成化学の格段の進歩から見て新しいデータブックが必要と考えていた。本書は、長年にわたり香料工業業界の中核で有機合成の専門家としてテルペン、香料化学の基礎と実用両面に携わってきた著者がこの点に着目し、自身の経験も生かしてまとめたもので、合成香料を中心とする香料化学事典である。

まず最初に合成香料概論が約 10 ページにわたってあり、香りと産業や生活、安全性を始め構造や分類など化学的な側面を含め概説的に述べてある。この部分が非常に簡潔で冗長でなく、必要最低限でしかも的確に記述されているのが良い。

以下、1,240 種にも及ぶ合成香料およびそれに関わる天然原料品の物理的、化学的性状、用途、製造業者、毒性・安全性等が詳述されている。特に構造上特徴のあるものについては立体異性体や絶対配置に関する記載もあり、実用面からも重要な化合物については工業的製造法を含めた製法もきちんと書かれている。取り上げられた化合物の品目はこれまでの各種事典と比較して決して多いわけではないが、香気と物質面での性状の明らかな香料化学物質を、著書の経験と知識を通じて実際面での重要性を考慮し的確に選択したものである。

引用文献には実用的見地からのせいもあって特許文献が多くみられるが、総説、成書なども多く引用されており、また CAS の登録番号もそれぞれに記載されているのでそれを利用すれば検索も容易であろう。

以上の点から、本書は手近な合成香料物質データブックとして、業界はもちろん大学において有機化学や天然物化学に関わる研究者にとっては非常に有用な必携の書といえよう。

(北原 武)