



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ヘテロ分岐サイクロデキストリンの合成と諸性質に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 濱保, 健一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/3126

氏名(本国籍)	濱保健一(広島県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博乙第109号
学位授与年月日	平成18年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題目	ヘテロ分岐サイクロデキストリンの合成と諸性質に関する研究
審査委員会	主査 信州大学 教授 北畑 寿美雄 副査 静岡大学 助教授 村田 健 臣 副査 岐阜大学 教授 加藤 宏 治 副査 信州大学 助教授 橋本 博 之

論文の内容の要旨

サイクロデキストリン (Cyclodextrin ; CD) および分岐 CD は、いずれもグルコースのみから構成されている環状オリゴ糖である。その内部には特徴的な空洞を有しており、この空洞内部に種々の疎水性化合物(ゲスト化合物)を取り込んで、包接化合物を形成する性質を有している。この性質を利用して、CD や分岐 CD は食品加工、医薬・化粧品工業などの分野で不安定な物質の安定化、矯味・矯臭、溶解性など物性の改善などの目的に使われている。近年、製薬業界では薬剤の副作用を少なくするため、糖質の細胞認識性に着目してこれをドラッグ・デリバリー・システムにおけるミサイル機能を持った薬剤運搬体として利用することが考えられている。また、オリゴ糖の末端にマンノース (Man) やガラクトース (Gal) 残基を持つ糖質は生体内の特定の細胞に認識されるということが報告されている。本研究では CD の新規用途を開発することを目的に、CD 環にマンノシル基、*N*-アセチルグルコサミニル基 (GlcNAc)、*N*-アセチルガラクトサミニル基 (GalNAc) およびガラクトシル基を直接、または分岐 CD の側鎖に結合させた新規ヘテロ分岐 CD を合成し、その構造を解析した。さらに、ヘテロ分岐 CD の溶解度、溶血性及び包接作用に与える影響について、非分岐 CD 及びグルコシル-CD (G1-CD) と比較した。

1. α -Mannosidase の縮合反応を用いたマンノシル基を含むヘテロ分岐 CD の合成
ジャックビーン由来の α -mannosidase の縮合反応を利用して、高濃度の Man と CD の混合溶液から、30.8% の高収率で 6-O- α -D-mannosyl-CD (Man-CD) を合成した。Man が CD 環に 2 分子結合した複分岐体 (Man₂- β 、Man₂- γ CD) は Man-CD の側鎖に、 α -1,2、-1,3、-1,4、及び -1,6 結合で Man が結合した mannobiosyl-CD 及び、CD 環を構成するグルコースに Man が別の位置に α -1,6 結

合した 6¹,6²-、6¹,6³-、及び 6¹,6⁴- di-*O*- α -D- mannosyl-CD の構造から成っていることを明らかにした。また、Man3- β CD は Man2- β CD のいずれかの Man 分子に α -1,2、-1,3、あるいは-1,4 結合で Man が結合した構造であることを明らかにした。

2. Lysozyme の転移反応および β -*N*-acetylhexosaminidase の縮合反応による *N*-アセチルグルコサミニル基を含むヘテロ分岐 CD の合成

卵白 lysozyme の糖転移反応を利用して、*N*-アセチルキトオリゴ糖とマルトシル-CD から、6-*O*- α -(3²-*O*- β -D-*N*-acetylglucosaminyl-)maltosyl-CD を合成した。CD 環に直接転移させることはできなかった。

ジャックビーン由来の β -*N*-acetylhexosaminidase の縮合反応を利用して、高濃度の GlcNAc と CD の混合溶液から、GlcNAc-CD を合成することに成功した。GlcNAc-CD は CD 環を構成するグルコシル基の C6 位水酸基に GlcNAc が結合した化合物（主生成物）と C2 位水酸基に結合した化合物（副生成物）の混合物であることを明らかにした。GlcNAc が β CD に 2 分子結合した複分岐体（GlcNAc2- β CD）は GlcNAc- β CD の側鎖 GlcNAc に β -1,6 結合で GlcNAc が結合したものと、GlcNAc 2 分子が CD 環を構成するグルコースに別々に結合した位置異性体、6¹,6⁴-、6¹,6³-、及び 6¹,6²-di-*O*-(*N*-acetyl- β -D-glucosaminyl)- β CD の混合物であることを明らかにした。

3. 微生物起源の α -galactosidase の転移反応を利用したガラクトシル基を含むヘテロ分岐 CD の合成

M. vinacea の生産する α -galactosidase 剤を用い、6-*O*- α -Gal-CD とその異性体である 2-*O*- α -Gal- α CD を含む Gal- α CD をキログラムスケールで製造することに成功した

4. 分岐側鎖の異なる CD 類（Man-CD、Gal-CD、G1-CD）の性質

Man-CD、Gal-CD などのヘテロ分岐 CD は G1-CD と同様に、非分岐 CD に比べて水溶液およびメタノール溶液中で高い溶解度を示した。特に β CD 系列では顕著な溶解度の上昇が見られた。溶血性については、分岐側鎖で違いが認められ、Man-CD > G1-CD > Gal-CD の順に溶血作用は減少し、Gal-CD の高い安全性が明らかにされた。包接作用の点では CD 濃度が低い場合には側鎖による影響は認められないが、CD 濃度の上昇に伴い側鎖の影響が認められ、Gal-CD < G1-CD < Man-CD の順にゲストの溶解度は上昇した。特に大環状医薬品であるアムホテリシン B でその影響は顕著に認められた。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文はサイクロデキストリン (CD) にグルコース以外の糖質を CD の分岐側鎖として結合させたヘテロ分岐 CD を、加水分解酵素の糖転移反応あるいは縮合反応を利用して合成し、それら生成物の諸性質（溶解度、溶血作用および包接能）を解明したものである。

分岐側鎖としてガラクトース、マンノースおよび *N*-アセチルグルコサミン残基を

含むヘテロ分岐 CD を、それぞれ *Mortierella vinacea* 由来の α -galactosidase による転移反応、ジャックビーン由来の α -mannosidase による縮合反応およびジャックビーン由来の *N*-acetylhexosaminidase による縮合反応により効率よく合成することに成功した。生成物の構造を酵素分析法、FAB-MS 分析および NMR 分析により決定した。分岐側鎖の異なる CD 類と分岐位置の異なる CD 類の性質を比較した。その結果、溶解性についてはいずれのヘテロ分岐 CD も非分岐 CD に比べて高い溶解度を示した。溶血作用に関してはガラクトシル-CD が極めて低く、高い安全性が確認された。また、包接能に関してはマンノシル-CD が高い包接能を示した。ヘテロ分岐 CD は非分岐 CD およびホモ分岐 CD に比べて溶血作用および包接能において、優れた性質を有していることが明らかにされた。

以上のことから合成したヘテロ分岐 CD は従来の溶解補助剤に代わる医薬品類の安全な溶解補助剤としての用途が期待される。また、非還元性末端にガラクトースやマンノース残基を有する糖鎖を生体の特定の細胞が認識するということが知られているが、これらヘテロ分岐 CD はドラッグ・デリバリー・システムにおけるミサイル機能を持った薬物運搬体としての利用も考えられる。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値があるものとして認めた。

学位論文の基礎となる学術論文は以下の通りである。

1. Enzymatic synthesis of mannosyl-cyclodextrin by α -mannosidase from jack bean.
Hamayasu,K., Hara,K., Fujita,K., Kondo,Y., Hashimoto,H., Tanimoto,T., Koizumi,K., Nakano,H. and Kitahata,S.
Biosci.Biotech.Biochem.,1997(5),61,825-829.
2. Synthesis of *N*-acetylglucosaminyl-maltosyl-cyclodextrin by lysozyme.
Hamayasu,K., Fujita,K., Hara,K., Hashimoto,H., Tanimoto,T., Koizumi,K., Nakano,H. and Kitahata,S. *J.Appl.Glycosci.*, 1999(4),46,445-448.
3. Enzymatic synthesis of *N*-acetylglucosaminyl-cyclodextrin by the reverse reaction of *N*-acetylhexosaminidase from jack bean.
Hamayasu,K., Fujita,K., Hara,K., Hashimoto,H., Tanimoto,T., Koizumi,K., Nakano,H. and Kitahata,S. *Biosci.Biotech.Biochem.*,1999(10),63,1677-1683.

その他の既発表論文は以下の通りである。

1. Synthesis of 2-deoxy-glucooligosaccharides through condensation of 2-deoxy-D-glucose by glucoamylase and α -glucosidase.
Nakano,H., Hamayasu,K., Fujita,K., Hara,K., Ohi,M., Yoshizumi,H. and Kitahata,S. *Biosci.Biotech.Biochem.*, 1995(9),59,1732-1736.
2. Isolation and structural analyses of positional isomers of 6⁽¹⁾, 6^(m)-di-O- α -D-mannopyranosyl-cyclomaltooctaose(m=2-5) and 6-O- α -(n-O- α -D-mannopyranosyl)- α -D-mannopyranosyl-cyclomaltooctaose(n=2,3,4, and 6).
Okada,Y., Matsuda,K., Koizumi,K., Hamayasu,K., Hashimoto,H. and Kitahata,S. *Carbohydr.Res.*, 1998,310,229-238.

3. Isolation and characterization of di- and tri-mannosyl-cyclomaltoheptaoses (β -cyclodextrins) produced by reverse action of α -mannosidase from jack bean. Koizumi, K., Tanimoto, T., Okada, Y., Takeyama, S., Hamayasu, K., Hashimoto, H. and Kitahata, S. *Carbohydr. Res.*, 1998, 314, 115-125.
4. ヘテロ分岐シクロデキストリンの合成とその性質.
濱保健一, 原浩司, 藤田孝輝, 橋本仁, 松田一葉, 岡田安代, 谷本敏子, 小泉京子, 中野博文, 北畑寿美雄. *J. Appl. Glycosci.*, 1999(2), 46, 217-225.
5. Properties and the inclusion behavior of 6-O- α -D-galactosyl- and 6-O- α -D-mannosyl-cyclodextrins. Okada, Y., Matsuda, K., Hara, K., Hamayasu, K., Hashimoto, H. and Koizumi, K. *Chem. Pharm. Bull.*, 1999(11), 47, 1564-1568.
6. Isolation and structural analyses of positional isomers of 6⁽¹⁾, 6⁽ⁿ⁾-di-O-*N*-acetyl- β -D-glucosaminy]-cyclomaltoheptaose (n=2, 3, and 4) and 6-O-[6-O-(*N*-acetyl- β -D-glucosaminy]-*N*-acetyl- β -D-glucosaminy]-cyclomaltoheptaose. Okada, Y., Semma, M., Ito, Y., Hamayasu, K., Fujita, K., Hashimoto, H., Koizumi, K. and Kitahata, S. *Carbohydr. Res.*, 2001, 336, 203-211.
7. Transglycosylation of hydroquinone and epicatechin by β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. Nakano, H., Hamayasu, K., Nakagawa, K., Tabata, A., Fujita, K., Hara, K., Kiso, T., Murakami, H. and Kitahata, S. *J. Appl. Glycosci.*, 2002(2), 49, 115-121.
8. Some pharmaceutical properties of a new branched cyclodextrin, 6-O- α -(4-O- α -D-glucuronyl)-D-glucosyl- β -cyclodextrin. Tavomvipas, S., Arima, H., Hirayama, F., Uekama, K., Ishiguro, T., Oka, M., Hamayasu, K. and Hashimoto, H. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2002, 44, 391-394.
9. 6-O- α -(4-O- α -D-glucuronyl)-D-glucosyl- β -cyclodextrin: solubilizing ability and some cellular effects. Tavomvipas, S., Hirayama, F., Arima, H., Uekama, K., Ishiguro, T., Oka, M., Hamayasu, K. and Hashimoto, H. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 249, 199-209.
10. Post-source decay analysis of novel heterogeneous sugar branched cyclodextrins by using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Yamagaki, T., Hamayasu, K., Hashimoto, H. and Nakanishi, H. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 2003, (5), 51, 550-553.
11. Inhibition of β -fructofuranosidases and α -glucosidases by synthetic thio-fructofuranoside. Kiso, T., Hamayasu, K., Fujita, K., Hara, K., Kitahata, S. and Nakano, H. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2003(8), 67, 1719-1724.
12. ヘテロ分岐サイクロデキストリンの生産技術の開発. 濱保健一.
ニューフード・クリエーション技術研究組合編集, 「炭水化物の多面的利用技術の展開」, 2003, 105-125.
13. Kothala himbutu 抽出物を配合したコトラヒム顆粒品の単回および3ヶ月連続摂取のヒト糖代謝に及ぼす影響. 別府秀彦, 鹿野昌彦, 藤田孝輝, 井谷功典, 尾崎清香, 濱保健一, 岸野恵理子, 伊藤哲也, 新保寛, 園田茂, 東口高志.
日本食品新素材研究会誌, 2005(2), 8, 105-117.