



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Development of Synthetic Routes of
Oligosaccharide Units Related to Molecular
Recognition, Employing Glycosidase-mediated
Transglycosylation

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2014-04-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 村田, 健臣 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2264

氏名（本籍）	村田健臣（滋賀県）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農博乙第19号
学位授与年月日	平成10年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Development of Synthetic Routes of Oligosaccharide Units Related to Molecular Recognition, Employing Glycosidase-mediated Transglycosylation
審査委員	主査 静岡大学教授 碓氷泰市 副査 静岡大学教授 坂田完三 副査 岐阜大学教授 加藤宏治 副査 信州大学教授 細野明義 副査 静岡大学助教授 河岸洋和

論文の内容の要旨

近年複雑な生体成分の分離・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の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研究を確立する必要がある。このような背景の下で、本研究は複合糖質のオリゴ糖鎖における重要オリゴ2～3糖を糖質水解酵素の有する特異な糖鎖交換反応（糖転移反応）を駆使して実践的合成法の開発を目指したもので、内容は次のように3部に要約される。

1. ガラクトシル2糖

Bacillus circulans 由来の β -D-ガラクトシダーゼのガラクトシル基転移反応を用い生成した *p*-ニトロフェニル基をアグリコンに持つ β -1,3、 β -1,4、 β -1,6 結合ガラクトシル-グルコシド (Gal-Glc) 2糖配糖体3種類を同時にゲルろ過クロマト操作により分離・調製できることを示した。この際、結合形成速度は $1,4 > 1,3 \gg 1,6$ の順であることから反応時間を制御することでそれぞれの異性体の選択的合成が可能であることを明らかにした。次に、ブタ精巣由来の β -D-ガラクトシダーゼの位置選択的ガラクトシル基転移反応を利用しラクト-*N*-ピオ

ース I 配糖体 (Gal β 1-3GlcNAc β -OC₆H₄NO₂-p) および Gal β 1-3GalNAc β -OC₆H₄NO₂-p の従来では達成し得ない合成法を開発した。このように本酵素は、高選択的にガラクトシル β -1,3 結合形成を触媒する特異な酵素であることを実証している。

2. N-アセチルグルコサミニル 3 糖

ポリラクトサミン系糖鎖を含有する 3 糖単位 (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc) の合成を目的として、N-アセチルラクトサミン単位への位置選択的 N-アセチルグルコサミニル基転移反応を行っている。*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、供与体基質である N, N'-ジアセチルキトビオースからの受容体基質 N-アセチルラクトサミン 2 糖配糖体 (Gal β 1-4GlcNAc β -OC₆H₄NO₂-p) への GlcNAc 転移反応を行うと目的化合物である GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -OC₆H₄NO₂-p (1) とその構造異性体 GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -OC₆H₄NO₂-p (2) と Gal β 1-4(GlcNAc β 1-6)GlcNAc β -OC₆H₄NO₂-p (3) とを生成した。この反応において受容体基質と α -サイクロデキストリン (α -CD) との包接複合体形成を利用すると基質濃度が著しく (約 4 倍) 上昇し、高濃度基質下での反応が可能となるばかりか 3 の生成を著しく抑制し目的化合物 1 の生成比および収率をも向上させる効果を有していることを見出している。この場合の 3 の生成比の減少は、受容体基質の α -CD 包接複合体形成による立体障害により GlcNAc 残基 OH-6 への転移確率が減少するものと結論づけている。

3. ムチン型オリゴ糖鎖 1 型および 2 型

ムチン型糖鎖 1 型の基本単位は 3-O- β -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、2 型はこの 1 型の GalNAc 残基に β -1,6 結合で GlcNAc が付加した分岐 3 糖をコア構造として有し、O 型糖鎖として広く分布している。本研究は、このムチン型糖鎖 1 から 2 型の全合成を行ったものである。

ブタ精巣由来の β -D-ガラクトシダーゼの *p*-ニトロフェニル α -N-アセチルガラクトサミニド (GalNAc β -OC₆H₄NO₂-p) への OH-3 位への高位置選択的ガラクトシル基転移反応を利用し、コア 1 型のミミック糖鎖 *p*-ニトロフェニル 3-O- β -ガラクトシル- α -N-アセチルガラクトサミニド (4, Gal β 1-3GalNAc β -OC₆H₄NO₂-p) を得た。次に *N. orientalis* 由来の β -NAHase を用い上記合成した化合物 4 を受容体基質として糖転移反応を行うと受容体 2 糖の OH-6 > OH6' > OH-3 の順に GlcNAc 転移し、その結果、目的のコア 2 型構造を有する Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -OC₆H₄NO₂-p が主生成物として得られることを見出した。この様に 2 種類の酵素の逐次糖付加反応を活用することでムチン

型糖鎖コア 1 型から 2 型の逐次合成が比較的容易に達成できることを明らかにした。

以上のように、本研究はグリコシダーゼを活用し生体内とは異なった極限状態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 糖を中心とした実践的合成法を確立している。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。さらにこの種のオリゴ糖の量産技術の開発は十分量のオリゴ糖の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。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、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 糖のグリコシダーゼの極限状態で発現する糖鎖交換反応（糖転移反応）を活用した従来では達成し得ない実践的酵素合成法の成果をまとめたものである。その内容は緒論に続き第 1 章では酵素機能制御によるガラクトシル 2 糖の位置選択的合成法、第 2 章は、ポリラクトサミン系糖鎖が有する 3 糖単位の特異な合成、第 3 章は、連続した逐次糖付加反応によるムチン型オリゴ糖鎖のコア 1 型から 2 型の全合成をそれぞれまとめたものである。

1) *Bacillus circulans* 由来の β -D-ガラクトシダーゼの糖転移反応を利用し β -ラクトシド配糖体とその (1 \rightarrow 3)、(1 \rightarrow 6) 結合異性体を一段階で調製する方法を考案した。糖転移生成物の生成頻度は、反応初期において(1 \rightarrow 4) > (1 \rightarrow 3) > (1 \rightarrow 6)の順であるが、反応後期ではこの生成比の関係は逆転し (1 \rightarrow 6) 結合 2 糖が増大した。このことから、反応時間をコントロールすることで希望するガラクトシル 2 糖を合成できることを実証した。次に、ブタ精巢由来の β -D-ガラクトシダーゼの高位置選択的なガラクトシル β (1 \rightarrow 3) 結合形成能を活用しラクト-N-ピオース I 配糖体 (Gal β 1-3GlcNAc β -OC₆H₄NO₂-p) の合成法を確立した。

2) 自然界に広く分布しているポリラクトサミン系糖鎖が含有する N-アセチルグルコサミニル 3 糖 (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc)の合成を目的とした。*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、供与体基質である N, N'-ジアセチルキトピオースからの受容体基質 N-アセチルラクトサミン 2 糖配糖体(Gal β 1-4GlcNAc β -OC₆H₄NO₂-p) への GlcNAc 転移反応により目的化合物である GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -OC₆H₄NO₂-p (**1**)とその構造異性体 GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -OC₆H₄NO₂-p (**2**)と Gal β 1-4(GlcNAc β 1-6)GlcNAc β -OC₆H₄NO₂-p (**3**)とを得ている。本反応を行う際、受容体基質と α -サイクロデキストリンの包接複合体を形成させながら反応を行うと高濃度で反応を行えるばかりか化合物 **3** の生成を著しく抑制し目的化合物 **1** の位置選択性の増大と収率の向上をもたらすことを見出した。

3) *p*-ニトロフェニル α -*N*-アセチルガラクトサミニド (GalNAc β -OC₆H₄NO₂-*p*)を出発基材として、まずはじめにブタ精巢由来の β -D-ガラクトシダーゼのガラクトシル基転移反応によりムチン型糖鎖コア 1 型構造を有する *p*-ニトロフェニル 3-*O*- β -ガラクトシル- α -*N*-アセチルガラクトサミニド (4, Gal β 1-3GalNAc β -OC₆H₄NO₂-*p*) を、次に *N. orientalis* 由来の β -NAHase の GlcNAc 転移反応によりコア 2 型構造を有する位置選択的 Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -OC₆H₄NO₂-*p* を得た。この様に、2 種類の酵素の逐次糖付加反応を活用することで、ムチン型糖鎖コア 1 および 2 型構造の逐次合成が比較的容易に達成できる効率的方法を開発した。

以上、本論文審査委員会は、提出論文並びに基礎となる学術論文等について慎重に審議し審査委員会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あるものと判定した。

[基礎となる学術論文]

1. Murata, T., Itoh, T., Hayakawa, Y., and Usui, T. (1996) Convenient synthesis of β -(1 \rightarrow 3)-galactosyl disaccharide α -glycoside and its analogus as mimic units of mucin-type carbohydrate, *J. Biochem.*, 200, 851-855.
2. Murata, T., Tashiro, A., Itoh, T., and Usui, T. (1997) Enzymic synthesis of 3'-*O*- and 6'-*O* *N*-acetylglucosaminyl-*N*-acetylglucosaminide glycosides catalyzed by β -*N*-acetyl-D-hexosaminidase from *Nocardia orientalis*, *Biochim Biophys Acta* 1335, 326-334.
3. Murata, T., Akimoto, S., Horimoto, M., and Usui, T. (1997) Galactosyl transfer onto *p*-nitrophenyl β -D-glucoside using β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1118-1120.
4. Murata, T., Itoh, T., and Usui, T. (1997) Enzymatic synthesis of β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 6)]- α -D-GalNAc-OC₆H₄NO₂-*p* as a carbohydrate unit of mucin-type 2 core, *Glycoconjugate J.*, accepted for publication.

[既発表学術論文]

1. Usui, T. and Murata, T. (1988) Enzymatic synthesis of *p*-nitrophenyl α -maltopentaoside in an aqueous-methanol solvent system by maltotetraose-forming amylase: A substrate for human amylase in serum, *J. Biochem.* 103, 969-972.
2. Ogawa, K., Murata, T., and Usui, T. (1991) Maltotetraose-forming, amylase mediated, *p*-nitrophenyl α - and β -maltopentaoside formation in an aqueous-organic solvent system: a substrate for human amylase in serum, *Carbohydr. Res.*, 212, 289-294.

3. Kawashima, H., Murata, T., Yamamoto, K., Tateishi, A., Irimura, T., and Osawa, T. (1992) A simple method for the release of asparagine-linked oligosaccharides from a glycoprotein purified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biochem.*, 111, 620-622.
4. Usui, T., Murata, T., Yabuuchi, Y., and Ogawa, K. (1993) Transglycosylation reaction of maltotriose-forming amylase from *Streptomyces griseus*, *Carbohydr. Res.*, 250, 57-66.
5. 村田健臣, 保田織恵, 河内全 (1994) 糖鎖の解析, pp. 171-179., 嶋田哲也 村田健臣, 青木一正, 細胞膜表面糖鎖の解析, pp. 115-117., 田沼靖一監修, アポトーシス実験プロトコール, 秀潤社, 東京.
6. Usui, T., Morimoto, S., Hayakawa, Y., Kawaguchi, M., Murata, T., Matahira, Y., and Nishida, Y. (1996) Regioselectivity of β -D-galactosyl-disaccharide formation using the β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*, *Carbohydr. Res.*, 285, 29-39.
7. 碓氷泰市, 村田健臣 (1996) オリゴ糖鎖ライブラリーの作製, 有機合成化学協会誌, 54 (7), 607-615.
8. Zhuang, C., Murata, T., Usui, T., Kawagishi, H., and Kobayashi, K. (1996) Purification and characterization of a lectin from the toxic mushroom *Amanita pantherina*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1291, 40-44.
9. Kawagishi, H., Wasa, T., Murata, T., Usui, T., Kimura, A., and Chiba, S. (1996) Two *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectins from *Phaeolepiota aurea*, *Phytochemistry*, 41(4), 1013-1016.
10. Kawagishi, H., Mitsunaga, S.-I., Yamawaki, M., Ido, M., Shimada, A., Kinoshita, T., Murata, T., Usui, T., Kimura, A., and Chiba, S. (1997) A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*, *Phytochemistry*, 44(1), 7-10.
11. Murata, T. and Usui, T. (1997) Preparation of oligosaccharide units library and its utilization, *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1059-1066.
12. Yasuno, S., Murata, T., Kokubo, K., and Kamei, M. (1997) Two-mode analysis by high-performance liquid chromatography of *p*-aminobenzoic ethyl ester-derivatized monosaccharides, *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1944-1946.
13. Murata, T., Shibatsuji, M., Hara, H., Yasuno, S., Yamaguchi, T., Kizuki, K., Hoshino, O., Tanuma, S., Moriya, H., Sweely, C.C., and Ikekita, M. (1997) Structural characterization of sialylated and neutral *N*-linked oligosaccharides labeled with *p*-aminobenzoic acid octyl ester by high performance liquid chromatography and fast atom bombardment mass

spectrometry, *Res. Commn. Biochem. Cell Mol. Biol.* accepted for publication.

14. Murata, T., Yasuda, O., Shimada, T., Shinomiya, T., Yasuno, S., Yamaguchi, T., Tanuma, S., Ikekita, M. (1997) Structural alteration of cell surface oligosaccharides on HL-60RG cells undergoing apoptosis, *Res. Commn. Biochem. Cell Mol. Biol.* accepted for publication.