



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

複合糖質関連N-アセチルグルコサミニルオリゴ糖鎖 の酵素合成

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2014-04-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 又平, 芳春 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2418

氏名(国籍)	又平芳春(静岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第77号
学位授与年月日	平成8年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	複合糖質関連 <i>N</i> -アセチルグルコサミニルオリ ゴ糖鎖の酵素合成
審査委員	主査 静岡大学教授 碓水泰市 副査 静岡大学助教授 河岸洋和 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 静岡大学教授 坂田完三

論文の内容の要旨

複合糖質の糖鎖がもつ細胞内相互作用、細胞認識等の情報分子としての機能が明らかになるにつれて、糖鎖を積極的に活用しようとする糖鎖工学(Glycotechnology)という分野が生まれた。複合糖質糖鎖の生物学的重要性を明らかにし、さらなる学問領域の進展をはかるためには、純度の高い充分量の糖鎖標品の入手、供給が必須となっており、近年様々な合成研究が進展してきている。このような背景の中で、本研究は複合糖質における *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基を含む重要オリゴ2~3糖鎖の効率的酵素合成法の確立を目指したもので、本研究の内容は次のように要約される。

市販のニワトリ卵白リゾチームの *N*-アセチルグルコサミニル転移反応を利用し、マンノース(Man)残基のOH-4位に位置選択的に転移させ、目的2糖である4-*O*- β -*N*-アセチルグルコサミニル-マンノース(GlcNAc β 1-4Man)を一段階のクロマト操作で非常に効率的に合成できる方法を確立した。さらに本酵素の糖転移反応における位置選択性の特性を明らかにする目的で、各種受容体となる糖基質を用い検討した。その結果、グルコース(Glc)、GlcNAc及びそのグリコシド誘導体は受容体基質となり得たが、ガラクトース(Gal)、*N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)はなり得ず、4位水酸基の配向性が位置選択性を支配していることを明らかにしている。

次に糖脂質中にみられるラクト系オリゴ糖鎖の共通コア構造であるラクト-*N*-トリオースII(GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)の酵素合成を目指した。しかしながら本3糖を合成するため

には出発物質となるラクトース誘導体を充分量調製しなければならない。そこで、*Bacillus circulans* 起源の β -D-ガラクトシダーゼを用い、高位置選択的ガラクトシル β -(1-4) 転移反応を利用し、メチル β -ガラクトシド (1) と、*p*-ニトロフェニル β -ガラクトシド (2) の従来では達成し得ない実践的合成法を確立している。

上記ラクトシド化合物を受容体基質として、*Nocardia orientalis* 起源の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (NAHase) を用い、*N*-アセチルグルコサミニル転移反応を行うことで、3種類の転移生成物を得ている。1から β -(1-3) 結合転移した目的化合物メチル β -ラクト-*N*-トリオシド (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -OMe) とその構造異性体である2種の β -(1-6) 転移物を得ている。この場合の転移反応は、受容体糖残基の1級水酸基 (OH-6, OH-6') に優先的であり、目的のOH-3'位へは低い転移確率であった。次に、化合物2を受容体基質として同様に反応を行うと、(1-3) 転移した *p*-ニトロフェニル β -ラクト-*N*-トリオシド (3, GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -pNP)、(1-6) 転移したGlcNAc β -1-6Gal β 1-4Glc β -pNP (4) とGal β 1-4 [GlcNAc β 1-6] Glc β -pNP (5) の3種の生成物を得た。この場合の反応で、2と β -サイクロデキストリン (β -CD) とを包接複合体とし転移反応を行うと、5の生成を著しく抑制し、目的化合物3と4の収率は向上した。即ち、3の生成割合は β -CD非存在下に比較して顕著に増大し、位置選択性を増大させる効果を有していることを明らかにしている。またこの場合の5の転移生成割合の低下は、受容体基質の β -CD包接複合体によるグルコース残基の隣接効果によって、OH-6'位への転移確率が低くなるものと結論付けられる。

以上の成果から、容易に入手可能なリゾチームやNAHaseのような糖質水解酵素が併せ持つ糖転移反応を巧みに操作することで、GlcNAcを非還元末端にもつ複合糖質オリゴ糖鎖に関係した重要2~3糖の量産可能な実践的合成法を開発している。

審 査 結 果 の 要 旨

平成8年1月31日、静岡大学農学部において、審査員全員出席のもとに約40分間に亘る発表と約20分間の質疑応答が行われた。各審査員からの質問に対する的確に対応できており、発表態度も良好であった。

本研究は複合糖質オリゴ糖鎖の重要オリゴ2~3糖の酵素利用技術を用いた実践的オリゴ糖合成プロセスを確立することが目的である。現在世界的にも先端研究となっている糖鎖工学を進展させるためにも、オリゴ糖の量産技術開発は期待される場所である。本研究は下記の学術雑誌に掲載され、その内容は次のように要約される。

第一報 (J. Carbohydr. Chem. 誌 (アメリカ)、掲載済) :

市販ニワトリ卵白リゾチームを用い、本酵素の *N*-アセチルグルコサミニル転移反応を利用し、マンノースを受容体基質として高位置選択的に4-O-*N*-アセチルグルコサミニル- β -D-マンノース (GlcNAc β 1-4Man) を2段階のクロマト操作で容易に調製できることを明らかにした。このような転移特性を他

の受容体にも適用し、その反応性を詳細に解析している。

第二報 (Glycoconjugate J. 誌 (イギリス)、掲載済) :

Nocardia orientalis 起源の β -N-アセチルヘキソサミニダーゼのN-アセチルグルコサミニル転移反応を利用し、メチル β -ラクトシドを受容体基質とすると、目的化合物メチル β -ラクト-N-トリオシドII (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc- β -OMe) の他に2種類の β -(1-6)転移物が得られた。p-ニトロフェニルガラクトシドを受容体とする場合、これと β -サイクロデキストリン(β CD)とを包接複合体として反応を行うと、高基質濃度での反応が可能になるばかりか目的化合物p-ニトロフェニル β -ラクト-N-トリオシドII (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc- β -pNP) の収率と転移生成割合が著しく拡大することが判った。このように本反応系への β -CD添加は目的化合物の収率向上ばかりでなく、ある程度の位置選択的制御も可能であることを明らかにした。

以上の成果から、リゾチーム及び β -N-アセチルヘキソサミニダーゼのN-アセチルグルコサミニル転移反応を利用し、複合糖質に関係したN-アセチルグルコサミンを含む重要オリゴ2~3糖の量産可能な酵素合成プロセスを確立した。