

グリコシダーゼによる糖鎖組換え反応を用いた生理活性糖鎖の合成

Synthesis of Bio-active Carbohydrate Chains Using Carbohydrate Reconstruction Reaction by Glycosidase

山口 真 範

YAMAGUCHI Masanori

(和歌山大学教育学部化学教室)

2021年9月29日受理

Abstract

Carbohydrate chains are compound formed by connecting monosaccharides, and there are numerous types in consideration of the types of monosaccharides and the binding formation. Each carbohydrate chain has a different function and plays an important role in the living body. Some oligosaccharides are used in foods and cosmetics due to their functions. In the present study, we developed a synthetic method that uses carbohydrates as food that we eat on a daily basis as a raw material and converts it into bioactive carbohydrate chains having new functions by carbohydrate-rearranging reaction.

◆はじめに

糖鎖は、単糖と単糖が脱水縮合して鎖のように繋がったもので核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖とも呼ばれている。近年の糖鎖研究の伸展により、糖鎖はエネルギー源としての役割の他に、我々の身体において細胞の分化、接着、免疫調節など生命を維持するために必須である様々な生命現象を担っていることが明らかになった。また、人類にとって好ましくない現象であるウイルス感染、ガン化、毒素や細菌の受容体に糖鎖がなることが判明したり。このことは、糖鎖が我々にとって利益な分子でもあり、不利益な現象にも利用されるという二つの面を持つことを意味している。これらの特長を活かし糖鎖を利用すれば、多くの病や感染症を克服することが可能となり、人類に多大な恩恵をもたらすことが可能である。糖鎖自体は毒性をもたず、極めて安全な分子として知られている。安全性が担保された分子で新たな機能性食品や治療法を開発することは現代社会の発展において非常に有意義なことである。

本研究では、ビフィズス菌増殖作用、免疫賦活化作用、アトピー性皮膚炎改善効果および抗腫瘍活性などを有する生理活性オリゴ糖鎖のグリコシダーゼによる糖鎖組換え反応を用いた合成を報告する。

我が国における生理活性オリゴ糖の開発は1970年の初めに始まり、グリコシルスクロース、シクロデキストリン、マルトオリゴ糖などが各種酵素を用いて合成され、市場に出回るようになった²⁾。この動きは、日本が世界に先駆けて行っており、現在においても糖鎖研究は日本が世界をリードしている。その理由の一つと

して、日本には古来より続く発酵・醸造などの技術がありそこで使用する微生物起源による酵素(糖質加水分解酵素；グリコシダーゼ)の発見とその利用によるところが大きい。また糖鎖の分析・分離精製技術は日本で開発されたものが多くを占め、日本の技術が世界のスタンダードとなっているものも多い。

本稿においては、以上の背景を踏まえ、糖質加水分解酵素である α -ガラクトシダーゼを用い、その逆反応である縮合反応を用いた複数の α -ガラクトシル化オリゴ糖の合成反応の開発を報告する。

◆目的化合物の選定

目的化合物としては、3糖体であるラフィノース、2糖体であるメリビオース、ガラビオースを選定し合成を行うことにした(図1)。

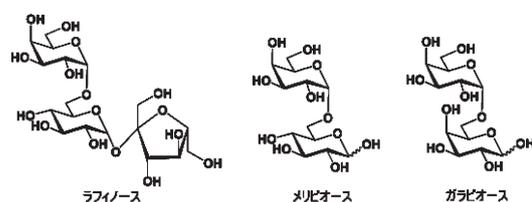


図1 目的化合物の構造

ラフィノースは、フルクトース、ガラクトース、グルコース分子が1つずつグリコシド結合によって連なったものである。甘味はスクロースの約2割、カロリーは5割程度あり、ビフィズス菌増殖作用、免疫賦活化作用、アトピー性皮膚炎改善効果、肝機能に対する効果を有している。メリビオースは、ガラクトースと

グルコースが α -1,6グリコシド結合で連なったものである。蜂蜜や大豆、テンサイなどに少量含まれており、抗腫瘍活性、アトピー性皮膚炎抑制作用、美肌効果を有している。ガラビオースは、2分子のガラクトースが主に α -1,6グリコシド結合で連なったものである。腸内細菌改善効果、および免疫賦活化作用を有している³⁾⁻⁵⁾。

それぞれ自然界に希少糖として存在し、ヒトが食経験を有する化合物を選定した。自然界に見出されていない組み合わせの糖鎖の合成も可能であるが、その場合、ヒトにとって予知できないマイナスな副作用を考慮する必要があるため、本研究では目的化合物として選定しなかった。

◆スタート化合物の選定

糖同士をつなぎ合わせる糖鎖の合成は、糖供与体(donor)と糖受容体(acceptor)の2種類の糖を用い、それら二つを任意の立体配座で任意の位置に繋ぎ合わせ目的糖鎖を得ることが必要である。本研究では α -ガラクトシル化オリゴ糖を目的化合物としているため、糖供与体にはガラクトースを用いた。糖受容体にはガラクトース、グルコースおよびスクロースを用いることにした(図2)。これらの糖は天然から容易に入手できることから、糖鎖合成ではしばしばボトルネックとなる大量調製における制限はかからない。

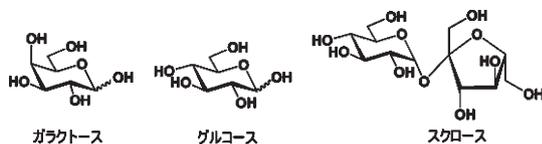


図2 糖供与体および糖受容体の構造

これらの3種類の糖は、糖鎖組換え反応の前は単に食品としての利用であり、生理活性糖鎖の部類には入っていない。糖鎖組換え反応を用いることにより、これらの糖を生理活性糖鎖へと簡便に変換することが可能になれば、糖鎖の応用利用を進展させることが出来ると考えた。

◆合成戦略

1. 糖鎖縮合反応

糖受容体と糖供与体を任意に繋ぎ合わせる手段として、糖質加水分解酵素である α -ガラクトシダーゼを用い、その逆反応である縮合反応⁶⁾を用いた方法を検討した。糖質加水分解酵素は本来、グリコシド結合を加水分解し糖を切断する働きをする。その主たる加水分解活性の他に、酵素分解物である生成物(単糖: donor)を反応系に高濃度に与えると、逆反応を触媒し他の糖(糖受容体: acceptor)へ繋ぎ合わせる縮合反応を仲介することがある(図3)。

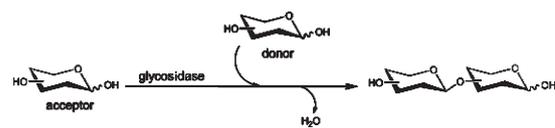


図3 縮合反応一般式

糖質加水分解酵素の全てがこの縮合反応を有しているわけではなく、その活性を引き出すには、種々のファクターを組み合わせた検討試験を要する。それらのファクターは①基質濃度、②反応pH、③反応温度、④反応時間、⑤酵素量の項目からなり、全ての条件がそろった場合に縮合反応が成立する。縮合反応は、糖供与体および糖受容体は無保護の糖を使用するため、非常に簡便かつ環境に配慮した糖鎖合成ルートとなる有利な面がある。その反面、本来の正反応の逆反応を酵素に強いることとなり、生成物の収量は多くないケースもある。

また連結されたオリゴ糖が生成しても、そのオリゴ糖が酵素の加水分解(正反応)の基質となり得る。つまりこの反応系では、オリゴ糖の生成と分解が同時に生じている。すなわち、目的としたオリゴ糖の最大生成時間をモニターし、速やかに反応を停止する必要がある。

非常に繊細な反応系ではあるが、合成条件を確立すれば、再現性は高く、特別な技術や合成環境を必要とせず、得られる糖鎖はダイレクトに様々な応用利用が可能であるため、社会的意義は大きい。

2. 使用酵素の検討

使用する酵素(ガラクトシダーゼ)の選定において次の項目を重視した。

- ① 食品および医療応用を目指すため酵素の由来微生物の安全性が担保されていること。
- ② 大量合成を目指すため、酵素活性が高力価であること。
- ③ 産業利用が可能な価格帯であること。

以上の要件を満たす酵素を選定し、食品用酵素として多用されているスミチームAGS(新日本化学工業株式会社)を候補とした。

なお、本酵素は縮合反応を触媒し、その反応は一級ヒドロキシ基において優位に進行することを確認している^{7),8)}。

3. 目的糖鎖の合成スキーム

目的とした3種類の糖鎖を合成するにおいて、以下のスキームを立てた。ラフィノースはガラクトースをdonorとしてスクロースをacceptorとして用い、メリビオースはガラクトースをdonorとしてグルコースをacceptorとして用い、ガラビオースはガラクトースをdonorとしてガラクトースをacceptorとして用い、 α -ガラクトシダーゼであるスミチームAGSを作用させることにより合成をすることにした(図4)。

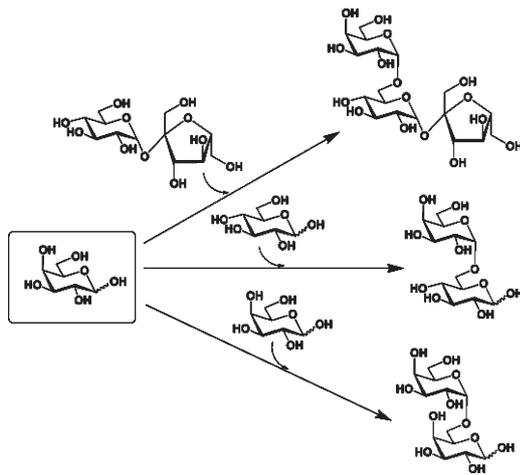


図4 目的オリゴ糖合成スキーム

◆結果と考察

1. ラフィノースの合成

ガラクトースとスクロースの混合溶液にスミチームAGSを添加し、ラフィノースの合成を試みた。反応停止後、HPLC分析を行った結果、想定していた目的物であるラフィノースの他に想定外の多数のピークが得られた。最も特筆すべきピークはフルクトースとグルコースのピークが観測されたことである。これらの糖はスクロースの構成単糖であり、この糖が検知されるということは、 α -ガラクトシダーゼであるスミチームAGSにインペルターゼ活性が含まれているということを示唆する知見が得られた(図5)。

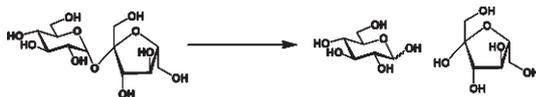


図5 インペルターゼ活性

よってスクロースのみの溶液にスミチームAGSを作用させ、分析すると、フルクトースおよびグルコースのピークが検出されたことから本酵素は α -ガラクトシダーゼ活性の他にインペルターゼ活性を併せ持つことが分かった。この知見を考慮して、本反応系を解析すると2つの酵素反応が同時に進行していることとなる。一つは α -ガラクトシダーゼの逆反応であるガラクトースを縮合反応により他の糖に導入する α -ガラクトシル化、次にインペルターゼによるスクロースの加水分解である。この現象は本来の受容体糖としての役割であるスクロースがグルコースとフルクトースへ加水分解されることから、反応系中には受容体糖としてスクロースの他にグルコースとフルクトースが加わり3種類存在することとなる複雑な反応系となった(図6)。

以上の結果を考慮して反応生成物を解析した。スク

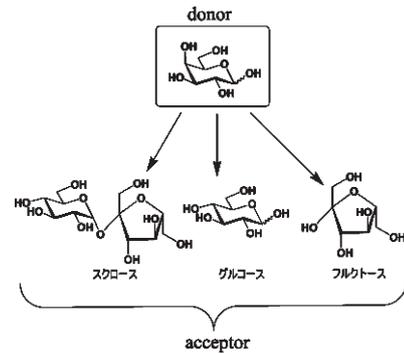


図6 ラフィノース合成における反応系

ロースに α -ガラクトシル化されたラフィノース、グルコースに α -ガラクトシル化されたメリビオース、フルクトースに α -ガラクトシル化された α -ガラクトシルフルクトースの糖鎖がそれぞれ合成されている可能性がある。スタンダード糖のHPLC分析での保持時間はそれぞれ、ラフィノース17-18 min、メリビオース12-13 min、 α -ガラクトシルフルクトース10-11 minに還元末端側の糖の立体配座に由来する $\alpha\beta$ 混合物としてブロードの1ピーク、もしくは2ピークとして検出される。ラフィノース合成におけるHPLC分析チャート(図7)をそれぞれのスタンダードと比較することにより解析した。

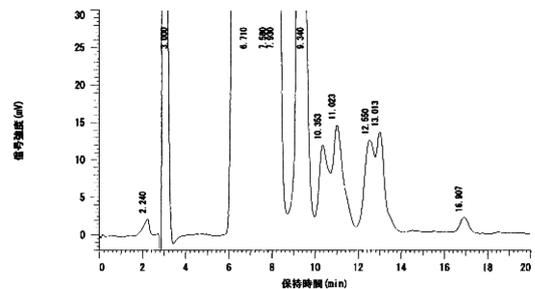


図7 ラフィノース合成HPLCチャート

順に6.71-7.93 minにフルクトース、ガラクトースおよびグルコース、9.34 minにスクロースのピークが確認された。10.35-11.02 minに α -ガラクトシルフルクトース、12.55-13.01 minにメリビオース、16.90 minにラフィノースのピークが検出された。当初想定していたメリビオースの他に2種の α -ガラクトシル化オリゴ糖を得られる結果となった。この反応系は一度に多数の有用な α -ガラクトシル化オリゴ糖を得るための有効な手段といえる。

2. メリビオースの合成

ガラクトースとグルコースの混合溶液にスミチームAGSを添加し、メリビオースの合成を試みた。

反応停止後、HPLC分析を行った。想定どおり13.73 minにメリビオースの合成を支持するピークが検出された(図8)。

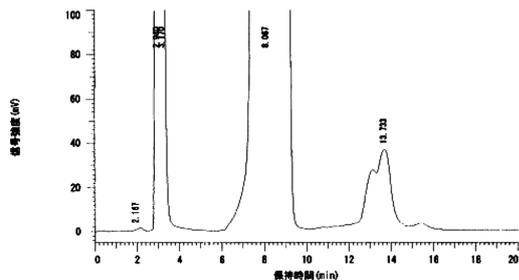


図8 メリビオース合成HPLCチャート

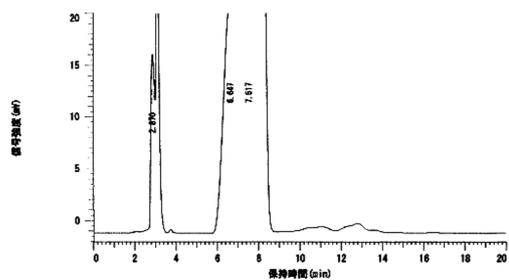


図11 酵素消化のHPLCチャート

3. ガラビオースの合成

ガラクトース溶液にスミチームAGSを添加し、ガラビオースの合成を試みた。このケースはガラクトースのみから成る2糖であるためガラクトースは糖供与体でもあり、糖受容体でもある。反応停止後、HPLC分析を行った(図9)。

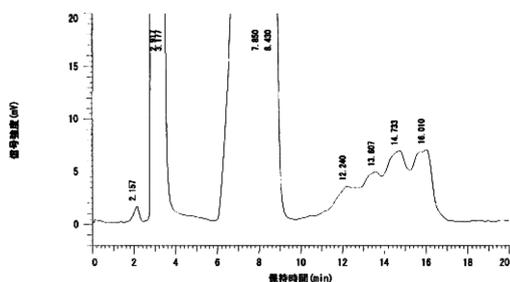


図9 ガラビオース合成HPLCチャート

分析結果から、12.24-13.60 min, 14.73-16.01 minの2成分の $\alpha\beta$ 混合物であることが判明した。本酵素の縮合反応は、一級ヒドロキシ基(この場合はガラクトースの6位)に優先的に生じる知見があったが、本ケースにおいては6位の他に4位、3位もしくは2位にガラクトースが縮合したガラビオースが生成したことを示唆する結果が得られた(図10)。

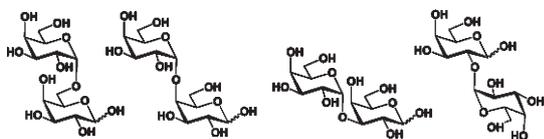


図10 生成したガラビオース構造候補

生成したガラビオースの結合様式を同定するため、得られた2糖混合物に α 1 \rightarrow 3, 6ガラクトシダーゼを作用させた。本酵素は3位、6位にガラクトシル化された化合物を選択的に分解する酵素である。よってこの酵素消化の後、HPLC分析にてピークが残存した場合、4位、2位にガラクトシル化された化合物であり、消失した場合は6位、3位にガラクトシル化された化合物であることが同定できる。

酵素消化の結果、これらのピークは全て消失していた(図11)。

すなわち、得られたガラビオースの結合様式は α 1 \rightarrow 3および α 1 \rightarrow 6であると判明した。なお先に述べたとおり一級ヒドロキシ基に優先的なガラクトシル化は本ケースにおいても行われていることから、生成量は α 1 \rightarrow 6結合体の方が多い。よって、12.24-13.60 minはGal α (1 \rightarrow 3)Galのピークであり、14.73-16.01 minはGal α (1 \rightarrow 6)Galのピークであると考察できる。Gal α (1 \rightarrow 3)Galは腸炎の原因菌である*Clostridium difficile*の毒素の中和効果を有し⁹⁾、Gal α (1 \rightarrow 6)Galは*Typanosoma brucei*のGPIアンカーの糖鎖において重要な配列である¹⁰⁾。これらのガラビオースは細菌感染において有用な治療方法の開発に貢献できる。

◆まとめ

本研究では α -ガラクトシダーゼの逆反応である縮合反応を用いた種々の α -ガラクトシル化オリゴ糖合成を行った。原材料は、使用する酵素に至るまですべて食品としての使用実績のあるものに限定した。得られるオリゴ糖の安全性は担保されている。また合成作業においては有機溶媒など有害な試薬を使用しないことから、安全かつ環境に配慮した合成法の確立に至った。これらの酵素反応は条件検討の煩雑さを伴うものの、条件がいったん確立されれば、再現性が高く、経験を有しない作業員においても実施が可能である。特殊な設備や有害な試薬等を取り扱う深い経験と知識が必要な有機化学合成と比べると、糖鎖と酵素を混ぜるだけで完了する本合成法は優位性が高い。

また本研究において開発した α -ガラクトシル化の方法は、種々の生理活性糖鎖合成にも応用することができ、効率的な合成手法の一つと成り得る。

◆実験の部

一般操作

α -ガラクトシダーゼ *Aspergillus niger* (スミチームAGS)は新日本化学工業株式会社製を使用した。 α 1 \rightarrow 3, 6ガラクトシダーゼ *Xanthomonas manihotis*はNEW ENGLAND BioLabs社製を使用した。無機塩類、糖類およびHPLC溶媒は和光純薬工業株式会社製を使用した。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)：日立製作所製 Chromaster 5450 RI を使用し、分析カラムは TOSOH 社製 TSKgel - Amide 80 (5 μ m, 4.6 \times 25 cm) を用いた。移動相は、H₂O : MeCN = 30 : 70；カラム温度 40°C；流速 1 mL / min；検出は示差屈折；試料注入量は 20 μ L にて行った。

ラフィノースの合成

ガラクトース (5 mg, 28 μ mol)、スクロース (52 mg, 152 μ mol) を 50 mM AcONa b.f. pH = 5.5 (1 mL) に溶解し、スミチーム AGS (100 μ L, 2 mg/mL) を添加し、37°C にて 72 時間インキュベートした。反応液を 100°C にて 5 分間加熱し、反応を停止した後、 Φ 0.45 nm フィルターにて濾過した後、HPLC にて分析を行った。 t_R = 16.90 min.

メリビオースの合成

ガラクトース (5 mg, 28 μ mol)、グルコース (100 mg, 0.56 mmol) を 50 mM AcONa b.f. pH = 5.5 (1 mL) に溶解し、スミチーム AGS (100 μ L, 2 mg/mL) を添加し、37°C にて 72 時間インキュベートした。反応液を 100°C にて 5 分間加熱し、反応を停止した後、 Φ 0.45 nm フィルターにて濾過した後、HPLC にて分析を行った。 t_R = 13.73 min.

ガラビオースの合成

ガラクトース (100 mg, 0.56 mmol) を 50 mM AcONa b.f. pH = 5.5 (1 mL) に溶解し、スミチーム AGS (100 μ L, 2 mg/mL) を添加し、37°C にて 72 時間インキュベートした。反応液を 100°C にて 5 分間加熱し、反応を停止した後、 Φ 0.45 nm フィルターにて濾過した後、HPLC にて分析を行った。

Gal α (1 \rightarrow 3) Gal t_R = 12.24-13.60 min.

Gal α (1 \rightarrow 6) Gal t_R = 14.73-16.01 min.

謝辞

本研究の一部は基盤研究(C) 課題番号 17K01963 と平成 28 年度独創的研究支援プロジェクト A の助成を受けて行った。

参考文献

- 1) A. Varki "Biological roles of glycans" *Glycobiology*, 27, 2017, pp 3-49.
- 2) 早川幸男、中久喜輝夫「オリゴ糖の製造方法開発と食品への応用」CMC出版 2018年。
- 3) 名倉泰三、有塚勉、佐山晃司「ラフィノースのアトピー性皮膚炎改善作用」*New Food Industry*, 42, 2000, pp 17-23.
- 4) 清信浩一、大崎忠夫、東綾美、大澤銀子、神田善姫、鴨井久一「免疫細胞に対するオリゴ糖の影響」*歯学*, 85, 1998, pp 551-558.
- 5) 額田ひかる、額田久子、渡辺篤 「ワタの成分の抗腫瘍活性」*医学と生物学*, 112, 1986, pp 69-73.
- 6) Yamaguchi, M., Yamamoto, K. "Chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoconjugates" *Comprehensive Glycoscience* 2th edn., ELSEVIER, 2021, pp 525-547.
- 7) 川室裕太郎、山口真範 「医療応用を目指した α -ガラクトシルセラミド類縁体の合成」*和歌山大学教育学部紀要、自然科学*, 65, 2015, pp 29-32.
- 8) 山口真範、反応性基導入 α -ガラクトースの製造方法、日本国特許、特許第6556448号。
- 9) V. Glaser. "Carbohydrate-based drugs move closer to market : drugs in clinical pipeline validate glycobiology targets" *Genet. Eng. News*, 18, 1998, pp 32.
- 10) M.A.J. Ferguson, S.W. Homans, R.A. Dwek, T.W. Rademacher. "Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane" *Science*, 239, 1988, pp 753-759.