

博士学位論文

澱粉の高度利用を指向する糖質・酵素工学

*Glycoengineering and Enzyme Engineering for
Effective Utilization of Starch*

日本大学大学院工学研究科

生命応用化学専攻

伊 藤 博

2 0 1 9

目次

第1章 序論	1
1.1 澱粉利用産業における機能性素材の開発	2
1.2 澱粉の特性評価	3
1.3 酵素工学を活用した澱粉からの物質生産	6
1.4 酵素工学に基づく反応特異性の評価	10
1.5 本論文の目的および概要	13
1.6 引用文献	14
第2章 糖質工学に基づく澱粉の特性評価	18
2.1 緒言	19
2.2 結果と考察	20
2.2.1 ホウ砂存在下における澱粉のゲル化挙動	20
2.2.2 ホウ酸存在下における澱粉ゲルの水分保持能	22
2.3 結論	25
2.4 実験方法	26
2.5 引用文献	27
第3章 糖質酵素工学に基づく澱粉からの物質生産	28
3.1 緒言	29
3.2 結果と考察	31
3.2.1 基質の複合化による酵素的グリコシル化反応	31
3.2.2 解析モデルの活用による酵素的グリコシル化反応の制御	35
3.3 結論	41
3.4 実験方法	42
3.5 引用文献	53
第4章 酵素工学に基づく澱粉関連酵素の反応特性の評価	54
4.1 緒言	55
4.2 結果と考察	57
4.2.1 アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性	58
4.2.2 アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性における構造の影響	64

4.2.3	アルキルチオグリコシドを糖受容体としたグリコシル化反応の評価	72
4.3	結論	98
4.4	実験方法	99
4.5	引用文献	114
第5章	総括	115
付録		119
謝辞		150

第 1 章

序論

1.1 澱粉利用産業における機能性素材の開発

澱粉は天然由来の高分子であり、我々人類の貴重な栄養源として食品加工への活用のみならず、これを原料として機能性素材を創製する上で非常に魅力的な素材である¹⁾。澱粉利用産業は、澱粉の持つゲル、結着力、粘弾性、フィルム形成、などの高分子特性を利用した食品加工や製紙、繊維工業における用途の他に、澱粉を基質とした酵素工学にもとづく酵素産業、そして得られる糖質の活用に重点を置いた糖質工学と共に大きく発展してきた (Fig.1-1)。

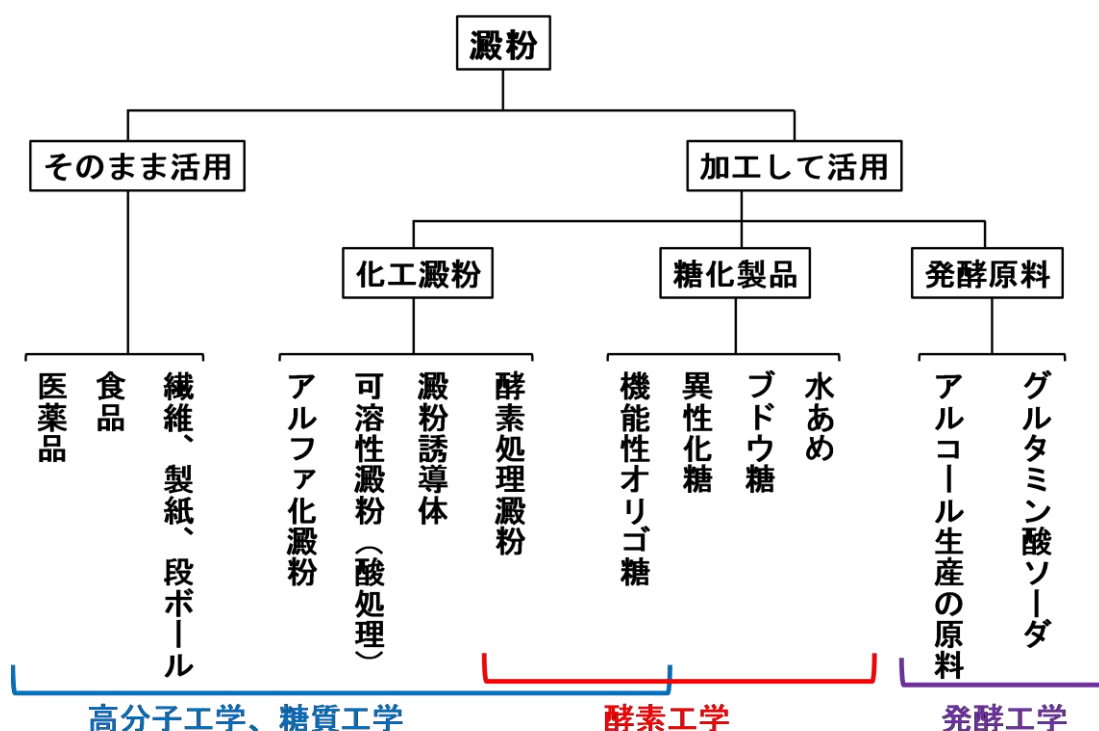


Fig.1-1 澱粉の産業的活用

澱粉産業はその目的に応じて3つの分野に産業用途を集約することができる。

1 つは澱粉自身の高分子特性を利用するものであり、澱粉（もしくは澱粉粒）の特性である糊化、老化、溶解性、粘性などを利用し、加工食品産業や製紙産業において工業的な活用がなされている²⁾。また、澱粉由来の物理化学的特性を改良する目的で化学的変性、物理的変性、酵素的変性により化工澱粉へと変換することも多い³⁾。これらの技術の発展に関しては、高分子工学、酵素工学や糖質工学による貢献が大きい。

2 つ目は、澱粉をアミラーゼ等の澱粉関連酵素の基質とし、それらの酵素反応により産出される異性化糖、オリゴ糖、糖アルコールなどの糖質を食品バイオテクノロジー、特定保健用食品などの分野において活用するというものである⁴⁾。これらの技術は、酵素産業の発展と共に進歩してきた。これら糖質生産効率の向上のためには、基質である澱粉の特性を無視することはできない。特に、プラントスケールでの生産系を構築する際は、澱粉の糊化あるいは老化特性などを考慮した上で反応条件を設定する必要がある^{5,6)}。その解決手法として、反応条件に適応した酵素のスクリーニング^{7,8)}や、タンパク質工学を基盤とした遺伝子組み換え技術を用いた酵素抽出技術の開発⁹⁾が近年の幅広い糖質の生産系の構築に貢献してきた。また、これらの技術により産出された糖質を原料として更なる機能性オリゴ糖の開発やその機能解明を行う糖質工学も発展した¹⁰⁾。

3 つ目は、澱粉を発酵原料として活用するものであり、酵母によるアルコール発酵に至るための澱粉からブドウ糖（グルコース）への変換を酵素工学の技術を活かして行うというものである^{11,12)}。これも酵素を活用した糖質の開発と同様に、酵素工学の知見が重要となる。

このように、澱粉利用産業は澱粉そのものの特性を活用する研究にとどまらず、それを支える酵素工学や糖質工学の発展と共に人類の社会に貢献してきた。

1.2 澱粉の特性評価

澱粉を高分子として利用する場合、糊化、老化、ゲル化、膨潤性、粘性などの澱粉の特性が大きく影響する。この高分子特性を利用する分野としては、工業用途としての製紙用、段ボール用、また食品用途として、水産練り製品用、麺類用および菓子用などがある。これらの他に、医薬品および繊維用途にも利用されている¹³⁾。これらの用途分野では、それぞれの澱粉に対して目的とする特異な特性が要求されることがあり、その要求に応じて化工澱粉へと改変することもある。また、澱粉そのものを合成プラスチックと混合あるいは化学反応させて生分解性プラスチックとして利用する研究も行われている^{14,15)}。これらの多岐にわたる需要の背景には、澱粉が最も安価であり安定して供給可能な原料であることが大きな要因としてあり、さらなる高機能化および用途拡大のためには糖質工学にもとづく澱粉の特性評価が重要となる。

澱粉は澱粉粒という形態で存在し、それらを構成する分子は α -D-グルコースを唯一の構成要素とする代表的なホモグリカンであり、鎖状分子のアミロースと多

岐に分岐した3次元構造のアミロペクチンの2種類の分子構造からなることが知られている (Fig.1-2)¹⁶⁾。

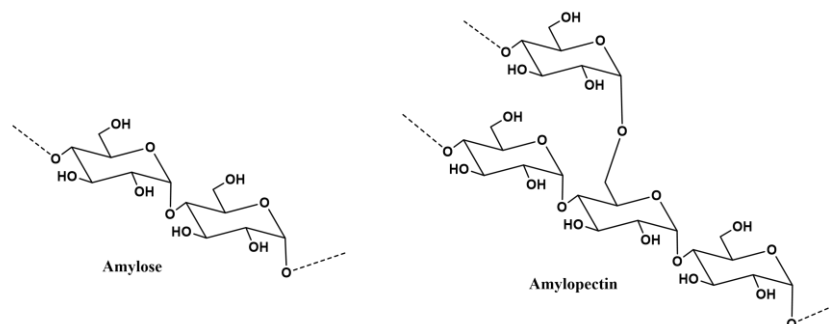


Fig.1-2 澱粉の構成成分

澱粉粒の形状や構造は、植物によって異なり、それらが機能性性質の基盤になっている。その澱粉粒の機能性側面に着目した活用例として、澱粉に対し酵素処理することで得られる多孔性澱粉を挙げる¹⁷⁾。澱粉に加水分解酵素であるアミラーゼを作用させたとき、澱粉粒の表面に多くの孔があき、酵素が内部まで侵入すると内部が空洞になる。こうして得られた多孔性澱粉の吸水性や吸油性を利用して食品、医薬、農薬、化粧品、香料などの幅広い分野においてさまざまな化学物質の吸着剤あるいはマイクロカプセルの担体として利用されている¹⁸⁾。

しかし、我々が日常生活において目にする澱粉の用途としては食品分野が最も身近である。それらの用途の対象は、麺類、冷凍食品、水産・畜産製品、菓子、パン類、ペースト状食品など多岐にわたる。その用途の目的としては、食感の改良、劣化抑制、冷凍やレトルトなどの過酷な加工条件に耐えうる高い品質安定性の向上などがある。これらの需要に澱粉が求められる理由としては、安価であることに加え、加水、加熱により起きる澱粉固有の特性である糊化や老化現象に伴う粘性向上、水分保持といった加工技術に対する高い汎用性に起因する¹⁹⁾。それらの背景のもと、澱粉に対する加工技術の発展や用途拡大を目的として水溶液中における澱粉の挙動、特に澱粉の糊化および老化現象の解明やそれらの制御について高い関心が寄せられている²⁰⁾。澱粉の糊化・老化は、植物の起源によって異なる澱粉粒の形状あるいはその構成要素であるアミロースとアミロペクチンの比により影響を受けることが知られており、その現象解明のための検証がなされてきた^{21,22)}。糊化とは、澱粉を水中で加熱した際に澱粉粒が徐々に膨潤を始め、透

明度の増大と共に粘度が上昇する現象を示す。また、このプロセスにより糊化した澱粉糊を放置した際に膨潤した澱粉粒が収縮していく現象を老化という。糊化および老化のプロセスは単なる逆行的現象ではなく、糊化前の澱粉の状態に戻るわけではない。また、糊化から老化へのプロセスは直接的である場合と、その過程でゲル状態を経由する場合がある^{23,24,25)}。このゲル形成能は古くからさまざまな食品のテクスチャーを変化させるために利用されている。澱粉のゲル形成能は、その植物起源や構成成分であるアミロースとアミロペクチンの比を正しく選定することで制御が可能であり、多種多様なゲル物性を生み出すことで多くの食品加工に利用されている²⁶⁾。そのため、植物起源ごとに澱粉粒の形態やアミロースとアミロペクチンの比が異なる澱粉の物性や特性の評価法の構築が重要となる。

一般に、澱粉あるいは澱粉粒の構造や形態を評価する場合、X線回折分析(X-ray diffraction analysis, XRD)による結晶構造の解析²⁷⁾あるいは原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope, AFM)を用いて澱粉の表面構造を観測²⁸⁾することで、分子構造のモデルが提案される。一方で、糊化や老化といった澱粉の物理化学的特性を評価する場合、示差走査熱量計(Differential Scanning Calorimetry, DSC)²⁹⁾やアミログラム法³⁰⁾によりそれぞれのプロセスを観測する。しかしながら、澱粉の起源の多様性や、タンパク、脂質、塩類などの共存物質、温度、水分、pHなどの影響によりそれらの測定手順や解析手法が煩雑になりがちとなる³¹⁾。そこで、より簡便な検証法の開発が望まれている。

本研究では、水溶液中における澱粉の糊化、ゲル化および老化のプロセスに対する澱粉の構成要素であるアミロースとアミロペクチンの比の影響に着目し、さまざまな天然型澱粉や化工澱粉を用いた場合における架橋剤の添加効果についてその状態変化の解析を行った。

1.3 酵素工学を活用した澱粉からの物質生産

前節では、澱粉自身の高分子特性に着目した活用例および構造評価について紹介した。本節では、澱粉を基質として認識する澱粉関連酵素を用いた物質生産について述べる。澱粉は、 α -D-グルコースを構成体とするホモグリカンであり、各グルコース単位は α -1,4 グルコシド結合あるいは α -1,6 グルコシド結合で繋がっている。また、 α -1,4 グリコシド結合で重合した直鎖型の糖鎖がアミロースであり、 α -1,4 グリコシド結合のほかに α -1,6 グルコシド結合を分岐構造として有する糖鎖がアミロペクチンと称される。これらのグルコシド結合を加水分解することで、グルコースやマルトースといった少糖のみならず直鎖構造を有するマルトオリゴ糖や分岐構造を有するイソマルトオリゴ糖などのさまざまな糖質を得ることができる。澱粉を加水分解する手法としては、酸処理や糖質関連酵素による加水分解反応が代表的である³²⁾。特に、酵素による加水分解反応は、選択性の良い反応を行うことができ、また水溶媒下などの比較的温和な条件下で行えることから、糖質産業において広く活用されている³³⁾。これらの糖質産業において生産される糖質としてはグルコオリゴ糖に限らず、異性化糖、糖アルコール、糖脂質などといった機能性オリゴ糖にまで多岐にわたる。

澱粉を原料として工業的に生産されている澱粉起源糖質としては、グルコース、マルトース、フルクトース、異性化糖、マルトオリゴ糖、環状のオリゴ糖であるシクロデキストリン (CD)、還元末端を有さない二糖であるトレハロース、糖アルコールなどが代表的である^{34,35)}。これら以外にも安価な澱粉を原料とした天然型糖質または人工型糖質の数多くの人工合成例が報告されている³⁶⁾。

澱粉関連酵素としては、アミロースやオリゴ糖を天然型の基質とする α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、プルラナーゼ、 β -アミラーゼ、グルコースイソメラーゼ、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase)、マルトオリゴシル-トレハロースシンターゼなど多岐にわたり、これらを単独もしくは組み合わせる使用することにより産業的に糖質を得ることが多い。

複数の酵素を組み合わせる手法としてイソマルトオリゴ糖の製造プロセスを例に挙げると、初期基質である澱粉に対し α -アミラーゼにより部分加水分解、その後 β -アミラーゼと α -グルコシダーゼを用いることで加水分解ないし糖転移反応を起こすことでイソマルトオリゴ糖であるイソマルトースやパノースを生産している (Fig.1-3)³⁷⁾。

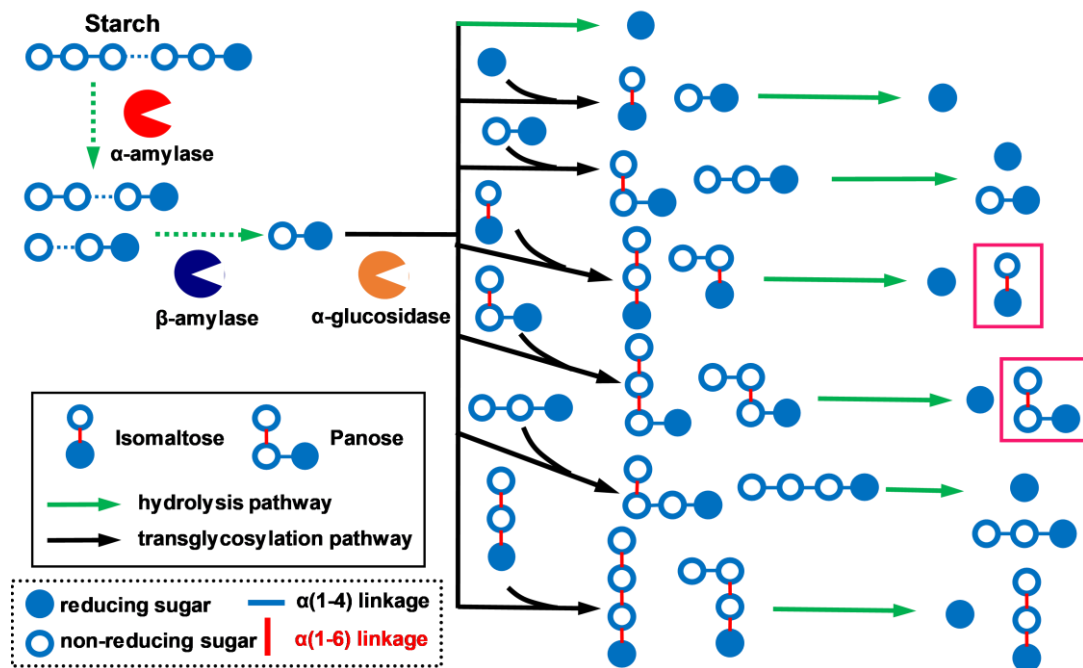


Fig.1-3 酵素合成法に則ったイソマルトオリゴ糖の生産

このような酵素の組み合わせおよび使い分けは、それぞれの酵素特有の基質に対する認識性を利用したものであり、反応ステップ毎の基質環境に適応した酵素を用いることで効率的な糖質の生産を図っている。このように、それぞれの酵素の特性（基質特異性）を知り、それらの特性を活用することで効率的な生産系を構築することは非常に重要である。特に、高分子である澱粉を初期基質とした場合は、澱粉自身の特性である溶解性や糊化および老化現象についても考慮する必要がある、基質と酵素双方の特性を把握した上で温度や pH などの反応条件を選択する必要がある。また、起源により異なる原料澱粉の糊化温度の違いは、製造工程に難易を与えることがあり、この解決法としては微生物酵素の改良などのタンパク工学的なアプローチにより克服されることが多い^{38,39)}。

一方で、これらの酵素反応を経て澱粉から得られた種々のオリゴ糖を新たな基質として酵素的グリコシル化反応により種々の配糖体を得る手法が知られている。配糖化反応とは、糖がグリコシド結合によりさまざまな原子団と結合した配糖体（グリコシド）を得ることを目的とした反応であり、配糖体の糖骨格をグリコン部位、これとグリシド結合により繋がった残りの原子団をアグリコン部位と呼称する。これらグリコンおよびアグリコン部位にさまざまな機能を有する糖鎖や官

能基を選択することで、得られる配糖体に優れた生理活性やユニークな物理、化学特性を付加することが可能であり、幅広い研究や産業活用がなされている⁴⁰⁾。

グリコシル化反応を行うに際して、目的の配糖体を的確にデザインする場合、反応のプロセスを考慮し、糖ユニットの受け渡しに焦点を当て、基質を糖供与体と糖受容体に分類し、基質と反応産物の関連性を明確にする必要がある。このようなグリコシル化反応を行う場合においても、オリゴ糖の生産プロセスと同様に、天然由来の糖質加水分解酵素やそれをもとにして遺伝子組み換え技術により開発された酵素が用いられている。このように、タンパク質工学の視点から酵素を軸としてグリコシル化効率を向上させる試みがある一方で、原料である基質分子のデザインをすることによって目的のグリコシル化反応の効率化を図る“基質エンジニアリング”という試みがある^{41,42)}。基質エンジニアリングでは、酵素反応において、基質をいかにして目的産物に到達させるかということに焦点を当てている。基質エンジニアリングの古典ともいえるべき手法として、糖供与体として優れた脱離基を有する活性化基質を選択することでグリコシル化反応の効率化を図るというものがある⁴³⁾。よく用いられる活性化基質としては、*p*-ニトロフェニル (*p*NP) グリコシド、糖オキサゾリン、フッ化グリコシルが知られている^{44,45)}。しかし、活性化基質を用いたグリコシル化反応は有効ではあるものの、活性化基質を得る合成法は一般的には容易ではない。通常は、有機化学合成反応に則り、ヒドロキシ基の保護、活性化、脱保護を含む複雑な過程を経て得られることが多い⁴⁶⁾。単糖、二糖などの比較的短い糖鎖の場合は、さほど困難は伴わないが、糖鎖が長くなるほど予期せぬ副産物により、目的の活性化糖を効率よく得ることが困難となる。このように人工型基質である活性化糖を用いた酵素的グリコシル化反応は有効ではあるものの、肝心の活性化糖を得るうえで手法が煩雑になりがちになるという点がある。

近年、基質エンジニアリングにおいて注目されている手法として、基質自身の独自の特徴を活かし、より簡便に反応系を構築するという方法がある。澱粉などの多糖あるいはオリゴ糖などの物理化学的特性の1つにCDやアミロースに代表される包接作用がある^{47,48,49)}。包接作用とは、一方の化合物(ホスト分子)が分子規模の空間をつくり、その空間内に他種の化合物(ゲスト分子)を取り込む現象であり、効率的なゲスト分子の抽出や汚染物質などをゲスト分子とした除去などを使用用途として、医薬、化粧品分野において幅広く活用されている^{50,51)}。この包接作用を利用することにより、水に難溶もしくは高濃度条件下においてミセ

ルなどの複合体を形成する糖脂質や配糖体を糖受容体とした場合においても、酵素への影響を与えることなく水への溶解度を向上させることで酵素的グリコシル化の効率化が期待できる。有名な研究事例としては、水溶性の低い *p*NP 化糖を糖受容体にし、これに対し、糖供与体として CD をホスト分子として加えることでグリコシル化効率を向上させた研究事例がある (Fig.1-4)⁵²⁾。

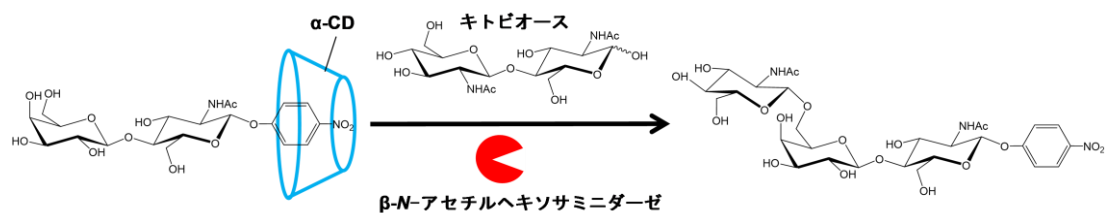


Fig.1-4 CD の包接作用を利用した酵素的グリコシル化反応

CDと同様に脂溶性分子に対する包接作用を有するアミロースでも、これをホスト分子かつ糖供与体とすることで、アミロースを天然型基質とする糖加水分解酵素である α -アミラーゼによる脂溶性分子に対するグリコシル化が期待できる。しかし、オリゴ糖である CD に対し高分子であるアミロースを用いた場合には少なくとも2つの課題があげられる。

1つ目として、シクロデキストリンよりも水溶性の低いアミロースを用いた場合、反応系内が不均一系になることから反応条件の設計が困難であることが想定される。このように、アミロースをグリコシル化反応における糖供与体とするには、そのまま使うのではなく、基質を均一に溶解させるか均一分散系に設定する必要がある。

そこで本研究では、アミロース（糖供与体）および糖脂質（糖受容体）の混合溶液に対し、超音波を照射することで反応溶液の均一分散化を図り、酵素的グリコシル化反応の効率向上を目指した。

2つ目として、水溶媒下においては α -アミラーゼによる加水分解反応およびグリコシル化反応が競合することで、糖供与体であるアミロースは反応開始直後から、その糖鎖重合度は常に変動することとなり、反応効率や得られるグリコシル産物の糖鎖長の制御が困難になることが想定される。そのため、目的とする糖鎖長を有する配糖体を得る反応条件を検討するためには、酵素反応中における糖供与体の重合度変化や濃度変化に関する膨大な数の観測データを実験的検証により得る必要がある。こういった実験的検証の煩雑さがある一方で、 α -アミラーゼ

によるポリマー型基質に対する複雑な作用様式について、統一的な定量解析を試みた”サブサイト理論”が Hiromi らにより報告されている^{53,54)}。サブサイト理論では、酵素（アミラーゼ）の活性部位にサブサイトという座標を与えることで、アミロースやオリゴ糖を構成するグルコースユニットがそれぞれ酵素によりどのように認識されるのかをミカエリス・メンテン機構を基盤とする反応速度論により表現した。このサブサイト理論をベースにした理論計算の活用により、オリゴ糖やアミロースといった基質の初期重合度、濃度、反応温度を計算プログラム上で設定することで、各種アミラーゼによる基質の分解のプロセスを事前評価することが可能となる。このような理論的計算予測を、実験的検証と組み合わせることでより効率的に酵素的グリコシル化反応条件の最適化を目指すことが期待できる。

本研究では、サブサイト理論に基づいた酵素反応シミュレーションを活用することで、効率的グリコシル化反応に適した反応条件、特に基質環境の制御に焦点を当て酵素反応条件の効率的な設計手法の構築を試みた。

1.4 酵素工学に基づく反応特異性の評価

前節で述べたように、基質エンジニアリングやサブサイト理論に基づき酵素反応場において基質のデザインや基質環境に焦点を当てることでグリコシル化反応の効率の向上を目指すことは重要であるものの、酵素による物質生産の効率向上を目指す以上、酵素自身の反応特異性や機能解明を行うことは不可欠である。酵素の反応特性を知る上で重要なのは、基質が反応場である酵素活性部位近傍においてどのように認識され、目的の反応のプロセスを経るかということである。サブサイト理論では反応産物の変化を観測することにより酵素の基質認識性や反応特性を評価することは可能⁵⁵⁾ではあるが、基質あるいは反応産物の大まかな濃度変化等を評価、予測することを目的としているため、分子レベルでの酵素 - 基質間の相互作用についての知見を得ることには向いていない。

近年、酵素の機能を評価する上で最も活用されているのは、遺伝子クローニングと X 線結晶構造解析による構造解析法である^{56,57)}。これらの技術により、酵素の 3 次元構造やアミノ酸残基の位置まで明らかにされた。しかし、このような技術の発展にも関わらず、酵素と基質の結合状態を X 線結晶構造解析で直接観測することは不可能とされている。このように酵素を測定対象とした酵素機能解析が

進む一方で、基質やその類似物質で基質とならないもの（基質アナログ）を用い、その反応産物から酵素反応を評価する手法も行われてきた^{58,59}。

一般的に、酵素触媒により所望の化合物を合成しようとした場合、酵素にとっての最適な構造を有する天然型基質を選択することが多い。しかし、酵素は時として天然とは異なる構造を有する非天然基質を基質として認識することも知られている⁶⁰。特に、糖加水分解酵素は広い基質認識性を示すものが多いため、非天然基質を取り込むことも知られている（Fig.1-5）。

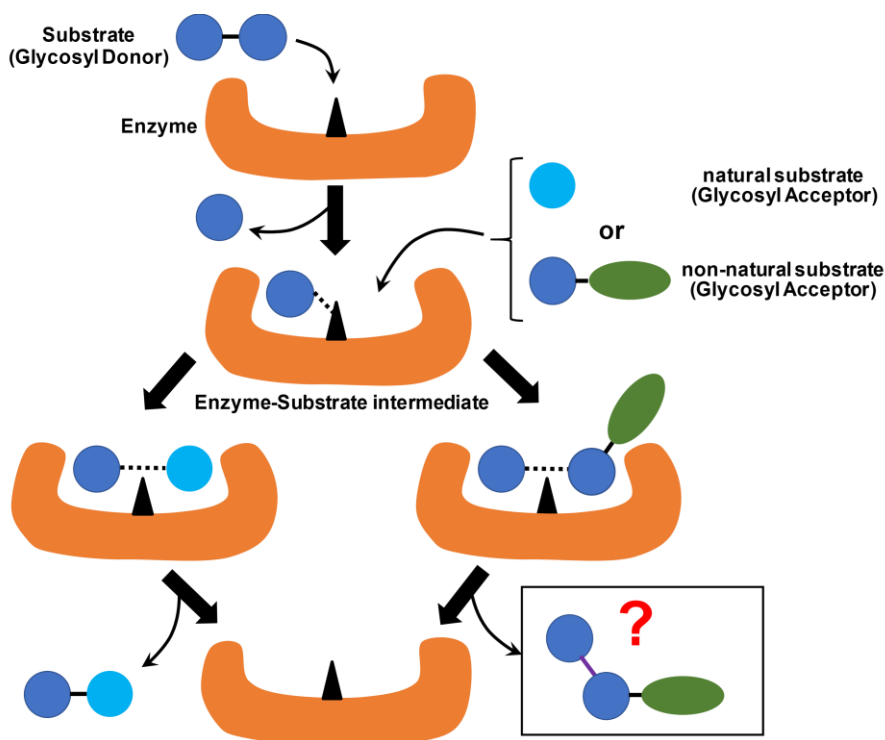


Fig.1-5 非天然型基質を用いた物質生産

近年、このような酵素の潜在的な反応特性（Enzyme Promiscuity）に着目し、酵素的グリコシル化の向上および物質生産系の拡張を図った研究が注目されている⁶¹。Enzyme Promiscuity は、それぞれ反応条件、基質、酵素のそれぞれに焦点を当てることで Condition Promiscuity、Substrate Promiscuity、Catalytic Promiscuity の3つに大別することができる。Condition Promiscuity とは、溶媒の種類や反応温度などの反応条件を変えることで、通常の場合では起こりにくい反応の触媒として酵

素が作用することである⁶²⁾。Substrate Promiscuity とは、広い基質特異性を示す酵素が非天然基質を取り込んで触媒作用を発揮する特性であり、基質を軸としている^{63,64)}。Catalytic Promiscuity とは、酵素が偶発的あるいはアミノ酸置換により新しい反応に対する触媒作用が発現することである⁶⁵⁾。これら Enzyme Promiscuity を巧みに組み合わせることで、糖加水分解酵素によるグリコシル化効率の向上が期待できる。

Enzyme Promiscuity を活用して物質生産系を構築する場合、対象となる反応系に適合したアッセイ法の選択が重要となる⁶⁶⁾。酵素反応により得られる反応産物やそれらの濃度変化などから対象の酵素の特異性を評価するアッセイ法において、基質もしくは反応産物を効率的に検出可能な分析系の構築を行うことが課題となる。一般に、糖質関連酵素の機能評価を行う際に用いられる測定用基質としては、明確な発色団を有する *p*NP 化糖などが頻繁に用いられる^{67,68)}。しかしながら、より詳細に酵素の Enzyme Promiscuity を評価することを目的とした場合、発色団を有するアグリコン骨格に限らず、アグリコンおよびグリコン部位に影響されない基質アナログを用いた酵素反応評価系の構築が重要となる。

本研究では、糖質関連酵素の Enzyme Promiscuity についてのより詳細な評価手法の構築を目指し、一般的な有機化学合成によりアグリコン骨格のデザインが容易であり、水溶液中においても安定な性質を有するアルキルチオグリコシドを糖受容体とした場合における α -アミラーゼの Enzyme Promiscuity の評価を試みた。

1.5 本論文の目的および概要

我々人類は、古来より澱粉をさまざまな機能性素材を開発するための基材として、あるいは酵素工学、糖質工学、発酵工学などにおける基質として活用してきた。これらの研究や産業の発展は、澱粉の特性のみに焦点を当てるだけでは達成できず、高分子工学、酵素工学、糖鎖工学、発酵学などさまざまな分野との連携によりなされてきた (Fig.1-6)。

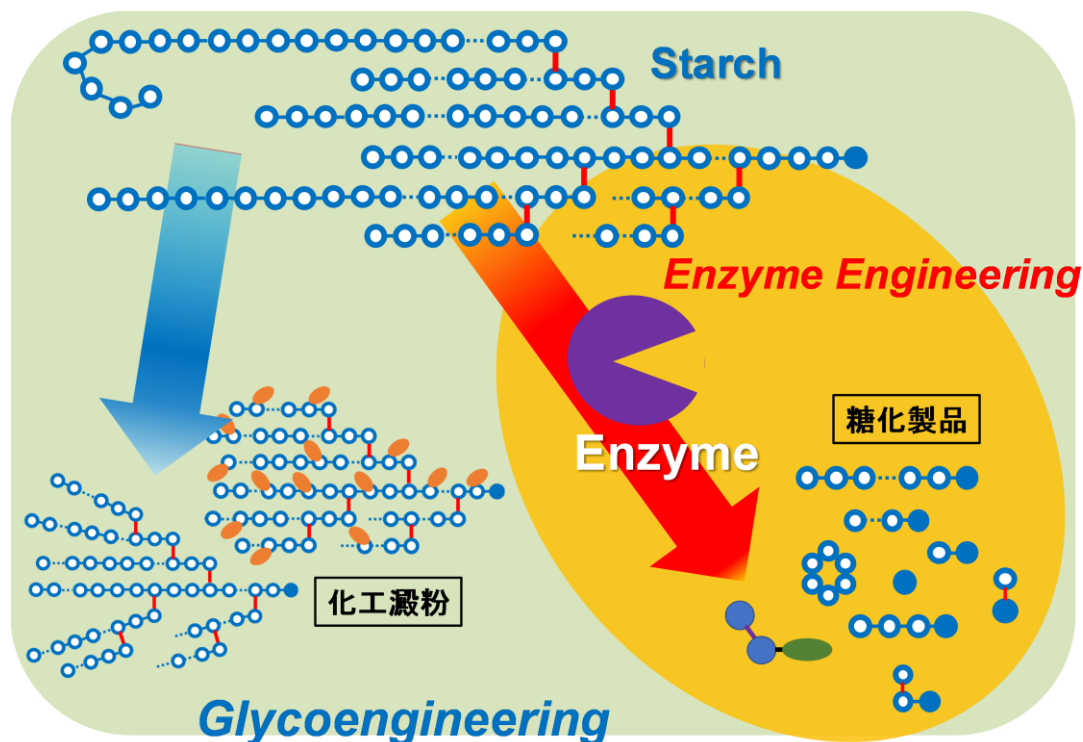


Fig.1-6 糖質・酵素工学を活用した物質生産の戦略

1.2 で述べたように、澱粉の高分子としての特性は、その構成要素、形態の多様性やそれらに対する植物起源による影響などから詳細なメカニズムの解明が困難となる。これらの特性やメカニズムの解明のための、簡便で汎用性の高い評価系の構築が可能になることで、澱粉あるいはそれ以外の天然に得られる多糖に対するより幅広い活用が期待できる。また、澱粉に関する詳細な知見を得ることで、1.3 および 1.4 で述べたような澱粉やオリゴ糖を反応原料とする酵素工学や糖質工学の発展にも貢献できる。特に、現在主流となっているタンパク質工学を軸とした酵素工学に加え、原料である基質をベースにした知見の蓄積を行うことで、酵素や糖質に関する未知の機能についての解明が期待できる。

本論文は、以下の 5 章から構成されている。

第 1 章は、本論文の序論であり、研究計画の背景、目的、意義および構成について述べている。第 2 章は、アミロース - アミロペクチン含有率が異なる天然型澱粉あるいは化工澱粉を用いた場合のホウ砂を架橋剤とした場合の添加効果について述べている。その結果、澱粉の種類が澱粉のゲル化挙動および水分保持能に影響を与えることを確認した。第 3 章は、澱粉関連酵素である α -アミラーゼによる酵素的グリコシル化をモデル反応とし、そのグリコシル化効率向上のための反応条件の探索手法について述べている。水溶液中における澱粉の包接作用に着目することで、糖脂質への効率的グリコシル化を確認した。また、 α -アミラーゼに関する既存の解析モデルを活用することで、実験的検証の手順を簡略化し、グリコシル化条件に適した反応条件の設定手順についても述べている。第 4 章は、第 3 章で用いたグリコシル化条件のための探索手順を活用し、アルキルチオグリコシドを糖受容体とした α -アミラーゼによるグリコシル化反応の評価手法について述べている。アルキルチオグリコシドが紫外短波長領域において、紫外吸収特性を有することを活用し、酵素反応溶液中の微量のグリコシル化産物の検出が可能となることを明らかにした。

最後に第 5 章では、総括としてそれぞれの章について結言を述べる。

1.6 引用文献

- 1) D. Le Corre and H. Angellier-Coussy, *Reactive and Functional Polymers*, **85**, 97 (2014).
- 2) E. Ogunsona, E. Ojogbo and T. Mekonnen. *European Polymer Journal*, **108**, 570 (2018).
- 3) B. Kaur, F. Ariffin, R. Bhat, A.A. Karim, *Food hydrocolloids*, **26**, 398 (2012).
- 4) 小巻利章ら, 各種澱粉糖 (澱粉起源糖質), 「澱粉科学の事典」, 不破英次編集, 朝倉書店, 東京, p.429-501, (2003).
- 5) MJEC Van Der Maarel *et al.*, *Journal of biotechnology* **94**, 137 (2002).
- 6) B.L. Zamost, H. K. Nielsen and R. L. Starnes, *Journal of Industrial Microbiology* **8**, 71 (1991).
- 7) Y-H. P. Zhang, M. E. Himmel and J. R. Mielenz, *Biotechnology advances* **24**, 452 (2006).

-
- 8) H. Leemhuis, Hans, R. M. Kelly and L. Dijkhuizen, *IUBMB life* **61**, 222 (2009).
 - 9) T. Kuriki, J.-H. Park and T. Imanaka, *Journal of fermentation and bioengineering* **69**, 204 (1990).
 - 10) M. Schombs and J. Gervay-Hague, in “*Glycochemical Synthesis: Strategies and Applications*”, S.C. Hung, M. M. L. Zulueta, Eds., John Willey & Sons, Inc., New York, Chap. 1, p.1 (2016).
 - 11) S. R. Couto and M. A. Sanromán, *Journal of Food Engineering* **76**, 291 (2006).
 - 12) B. A. Cinelli et al., *Fuel* **150** (2015): 721-729.
 - 13) Elvira, C., et al., *Biomaterials* **23**, 1955 (2002).
 - 14) L. Avérous, *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, **44**, 231 (2004).
 - 15) D. R. Lu, C. M. Xiao and S. J. Xu, *Express polymer letters*, **3**, 366 (2009).
 - 16) R. F. Tester, J. Karkalas and Xin Qi, *Journal of cereal Science*, **39**, 151 (2004).
 - 17) J. E. Fannon, R. J. Hauber and J. N. Bemiller, *Cereal Chem*, **69**, 284 (1992).
 - 18) A. Madene et al., *International journal of food science & technology*, **41**, 1 (2006).
 - 19) A. Alcázar, S. Carolina and M. A. A. Meireles, *Food Science and Technology*, **35**, 215 (2015).
 - 20) K. S. Sandhu and N. Singh, *Food Chemistry*, **101**, 1499 (2007).
 - 21) M. J. Miles et al., *Carbohydrate research*, **135**, 271 (1985).
 - 22) H. Fredriksson et al., *Carbohydrate polymers*, **35**, 119 (1998).
 - 23) T. Sasaki, T. Yasui, and J. Matsuki, *Food Hydrocolloids*, **14**, 295 (2000).
 - 24) S. Brouillet-Fourmann, C. Carrot and N. Mignard, *Rheologica Acta*, **42**, 110 (2003).
 - 25) K. Kainuma, H. Fukuba, S. Saito, Y. Nemoto, Y. Tanaka, H. Shimizu and R. Takahashi: Food industry and starch. in *Starch Science Handbook*, M. Nakamura and S. Suzuki, eds., Asakura Press, Tokyo, pp. 532-574 (1977).
 - 26) O. B. Wurzburg and C. D. Szymanski, *J Agric Food Chem*, **18** 997 (1970).
 - 27) N. W. H. Cheetham and L. Tao, *Carbohydrate polymers*, **36**, 277 (1998).
 - 28) M. J. Ridout et al., *Carbohydrate Polymers*, **50**, 123 (2002).
 - 29) C. G. Biliaderis, T. J. Maurice and J. R. Vose, *Journal of food science*, **45**, 1669 (1980).

-
- 30) M. Sikora and K. Pielichowski, *International journal of food science & technology*, **34**, 371 (1999).
- 31) K. Nishinari, *Colloid and Polymer Science*, **275**, 1093 (1997).
- 32) C. J. Biermann, *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, **46**, 251 (1988).
- 33) R. G. Crittenden and M. J. Playne, *Trends in food science & technology*, **7**, 353 (1996).
- 34) A. Biwer, G. Antranikian and E. Heinzle, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**, 609 (2002).
- 35) T. Nishimoto *et al.*, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **59**, 2189 (1995).
- 36) T. Kometani *et al.*, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **58**, 1990 (1994).
- 37) T. Yamamoto: Specificities and Action Patterns of Amylolytic Enzymes in “*Enzyme chemistry and molecular biology of amylase and related enzymes*”, CRC Press, Inc., p. 1-45 (1995).
- 38) J. M. Woodley, *Current opinion in chemical biology*, **17**, 310 (2013).
- 39) B. Svensson, *Plant molecular biology*, **25**, 141 (1994).
- 40) B. M. de Roode *et al.*, *Biotechnology progress*, **19**, 1391 (2003).
- 41) L. L. Lairson *et al.*, *Nature Chemical Biology*, **2**, 724 (2006).
- 42) A. Homann and J. Seibel, *Applied microbiology and biotechnology*, **83**, 209 (2009).
- 43) S. Shoda, in “Enzymatic Glycosylation. in *Glycoscience*”, Franser-Reid, B. O., K. Tsuruta, J. Theim, eds. Springer, Heidelberg : Vol. II, p. 1465 (2001).
- 44) S. Kobayashi, *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, **83**, 215 (2007).
- 45) M. Kohri, A. Kobayashi and S. Shoda, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **19**, 165 (2007).
- 46) S. C. Ranade and A. V. Demchenko, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **32**, 1 (2013).
- 47) R. Rachmawati, A. J. J. Woortman and K. Loos, *Biomacromolecules*, **14**, 575 (2013).
- 48) M. R. Eftink *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, **111**, 6765 (1989).
- 49) R. Villalonga, R. Cao and A. Fragoso, *Chemical Reviews*, **107**, 3088 (2007).
- 50) W. Saenger, *Angewandte Chemie International Edition in English*, **19**, 344 (1980).
- 51) G. Astray *et al.*, *Food Hydrocolloids*, **23**, 1631 (2009).

-
- 52) T. Murata *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1335**, 326 (1997).
- 53) K. Hiromi *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, **302**, 362 (1973).
- 54) J. A. Thoma *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, **246**, 5621 (1971).
- 55) H. Kondo *et al.*, *J. Biochem.*, **87**, 1053 (1980).
- 56) G. Davies and B. Henrissat., *Structure*, **3**, 853 (1995).
- 57) Y. Matsuura *et al.*, *The Journal of Biochemistry*, **86**, 1773 (1979).
- 58) V. H. Lillelund *et al.*, *Chemical reviews*, **102**, 515 (2002).
- 59) S. J. Williams *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, **122**, 4229 (2000).
- 60) F. J. Plou *et al.*, *Canadian journal of chemistry*, **80**, 743 (2002).
- 61) H. Renata, Z. J. Wang and F. H. Arnold, *Angewandte Chemie International Edition*, **54**, 3351 (2015).
- 62) M. Kapoor and M. N. Gupta, *Process Biochemistry*, **47**, 555 (2012).
- 63) A. Faridmoayer *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 34596 (2008).
- 64) R. P. Pandey *et al.*, *Carbohydrate research*, **393**, 26 (2014).
- 65) P. J. O'Brien and D. Herschlag, *Chemistry & biology*, **6**, R94 (1999).
- 66) M. M. Palcic and K. Sujino, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **13**, 361 (2001).
- 67) J. R. Ford *et al.*, *Analytical biochemistry*, **54**, 120 (1973).
- 68) M. M. Palcic *et al.*, *Glycoconjugate Journal*, **5**, 49 (1988).

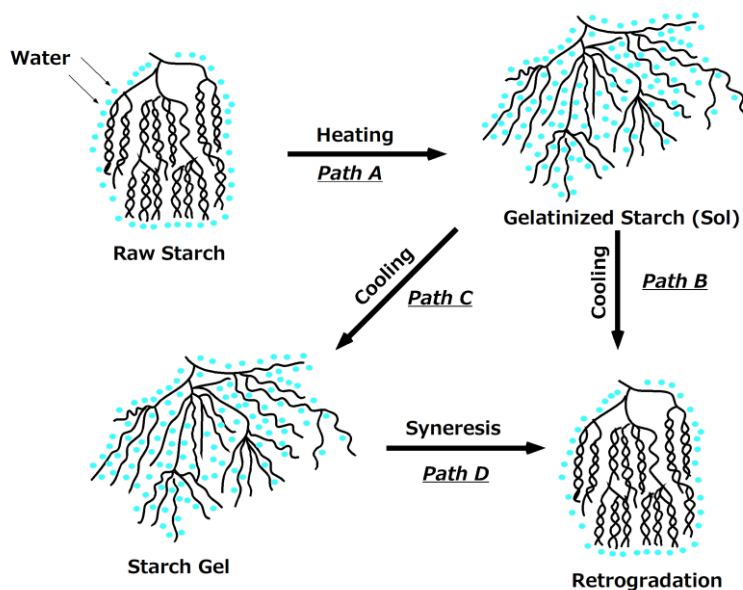
第 2 章

糖質工学に基づく澱粉の特性評価

2.1 緒言

序論で述べたように、澱粉は鎖状構造のアミロースと多岐に分岐した3次元構造のアミロペクチンの2種類の分子構造から構成され、これが要因となってさまざまな物理化学的特性を示す。糖質および酵素工学に基づいて澱粉を加工する場合、このような物理化学的特性を評価することが重要となる。

澱粉特有の性質として代表的なものに、糊化・老化現象が知られている¹⁾。澱粉は一般に水に不溶であるが、加水、加熱条件下において分子内の水素結合が外れ、水和が起こり膨潤することで糊化状態となる。糊化状態の澱粉を徐冷することで、澱粉鎖間の水素結合のランダムな再結合が起こることで老化澱粉となる。糊化から老化のプロセスにおいて一時的にゲル状態を経由することもあるが、このゲル化した澱粉も徐々に離水して老化澱粉となり、糊化前の澱粉の状態に戻ることはない (Scheme 2-1)。

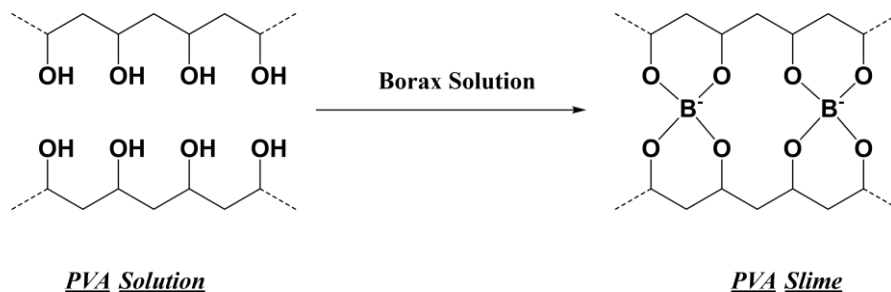


Scheme 2-1 澱粉の状態変化 (糊化 - ゲル化 - 老化)

この糊化・ゲル化・老化プロセスは、澱粉の構成成分であるアミロース - アミロペクチンの形態や存在比により影響を受けていることが知られている。また、これらの系内において脂質、界面活性剤、糖質、塩類などの共存物質が混在する場合、これらのプロセスが影響を受けることも知られている²⁾。

一方、直鎖状の高分子であるポリビニルアルコール (PVA) に対してホウ砂 (四ホウ酸ナトリウム) 水溶液を添加した場合、ゲルを形成することが知られている。

これは PVA のポリオール間にホウ酸エステル架橋を形成することで起きる (Scheme 2-2) ³⁾。



Scheme 2-2 ホウ砂の添加による PVA のゲル化

PVA と同様に多数のヒドロキシを有する澱粉でも同様にゲル化が予想される一方で、直鎖構造のみの PVA とは異なり、さまざまな分岐構造を内包する澱粉では特有のゲル化挙動を示すこと考えられる。そこで、それぞれアミロース - アミロペクチン含有率が異なる天然型澱粉あるいは化工澱粉である可溶性澱粉を含む水溶液に対し、架橋剤としてホウ砂を添加することで、それぞれの澱粉ごとのゲル化挙動の観察および澱粉ゲルの水分保持能について検証を行った。

2.2 結果と考察

澱粉ゲルに対するホウ砂添加の影響は、ゲル化に必要な澱粉の量 (Critical Concentration of Starch Gelation, CCSG) の測定および加熱式水分計を用いるゲルの保水能の測定によって評価した。また、澱粉は由来の異なる天然型澱粉 3 種 (トウモロコシ、コムギ、バレイショ) および α -1,6 結合に対して酸加水分解処理を施した可溶性澱粉を用いた。

2.2.1 ホウ砂存在下における澱粉のゲル化挙動

Fig.2-1 にホウ砂水溶液の濃度と CCSG との関係を示す。天然型澱粉であるトウモロコシ澱粉とコムギ澱粉を用いた場合、ホウ砂の濃度が上昇するにつれて CCSG が低下した。一方、可溶性澱粉を用いた場合はホウ砂の濃度が上昇するに従って CCSG が上昇した。バレイショ澱粉に関しては大きな変化は見られなかった。CCSG が高い場合、ゲル化に必要な澱粉の量が多く必要となり、ゲル化しに

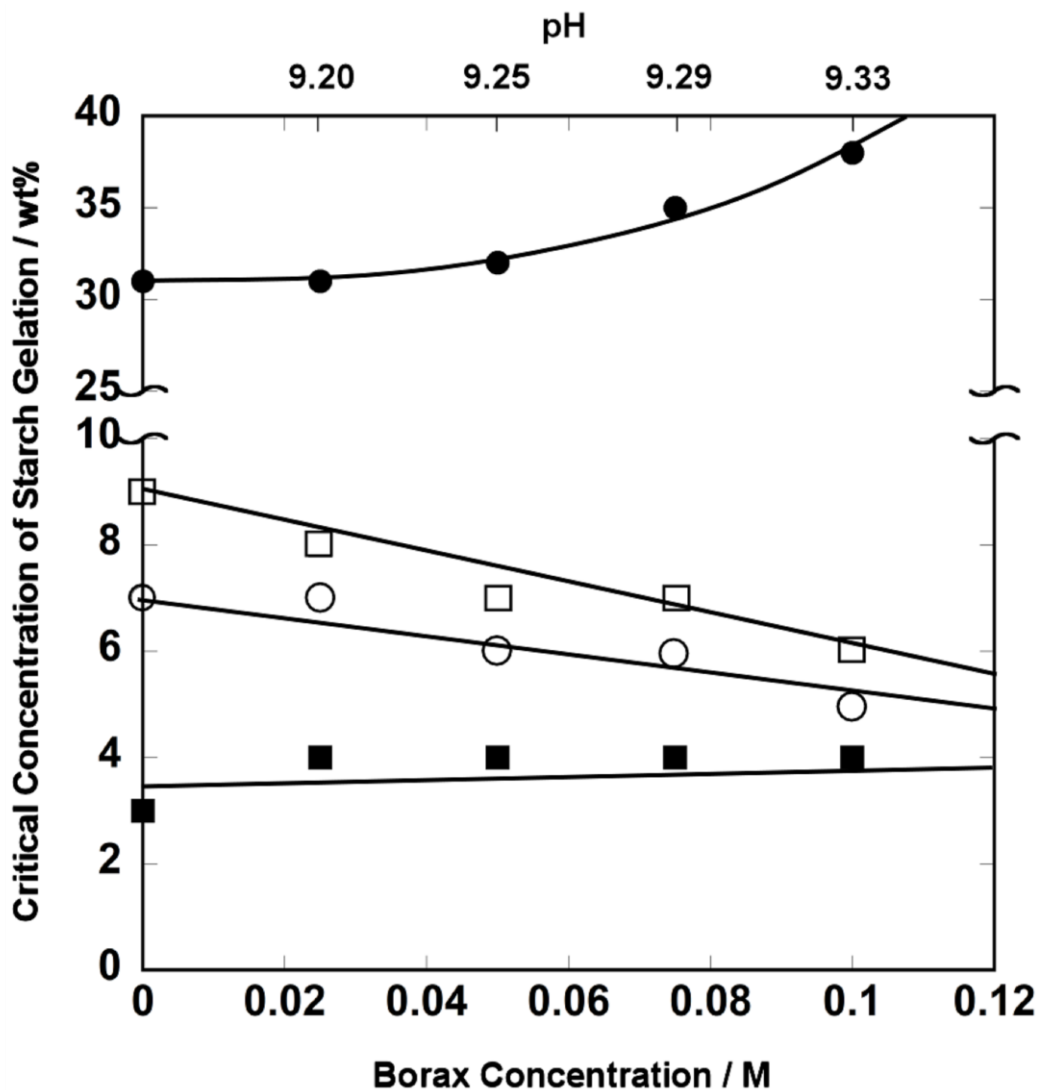


Fig. 2-1 澱粉ゲルの臨界ゲル化濃度に対するホウ砂添加による影響 (グラフ中の●、○、■、□はそれぞれ可溶性澱粉、トウモロコシ澱粉、馬鈴薯澱粉、小麦澱粉を示す。)

くくなる。逆に CCSG が低い場合は、ゲル化に必要な澱粉の量が少量ですみ、ゲル化しやすくなる。すなわち、アミロペクチンを多く含む天然型澱粉においてはゲル化の促進、アミロペクチンをほとんど含まない可溶性澱粉ではゲル化の抑制が起きる傾向が確認された^{4,5)}。

Fig.2-1 における CCSG の低下は、加水、加熱によりほどけた澱粉の末梢の二重らせん構造から露出したヒドロキシ基と、ホウ砂の添加により生成したホウ酸イオンが相互作用した結果、澱粉分子間に架橋構造ができるからと考えた。この時、澱粉の分岐構造が多い方がホウ酸イオンと澱粉との間の架橋点が多くなるため、

ゲル化しやすくなると考えられる。この仮説に基づくと、天然型澱粉で CCSG の減少、可溶性澱粉で CCSG の上昇が観測されたことは、ゲル化のしやすさと澱粉の直鎖、あるいは架橋構造の比率との間に相関性があることを示唆している。

以上の各種澱粉の構造に着目したゲル化挙動の観測より、ゲル化のしやすさの指標 (CCSG) と澱粉の形態、構造との間に何らかの相関性があることがわかった。そこで、次に得られる澱粉ゲルの形態保持能に着目し、特に、ゲル中の水分率の変化を観測することでホウ砂の添加効果について検討した。

2.2.2 ホウ砂存在下における澱粉ゲルの水分保持能

○各種由来の澱粉ゲルの水分保持能の違い

澱粉ゲルの水分保持能に対するホウ砂の添加効果について検討するために、加熱式水分計を用いて水分消失速度を測定することにより、澱粉ゲルの形態保持能を評価した。Fig.2-2 に 100 °C における澱粉ゲルの水分率の経時変化を示す。なお、天然型澱粉としてトウモロコシ澱粉を代表として用いた。

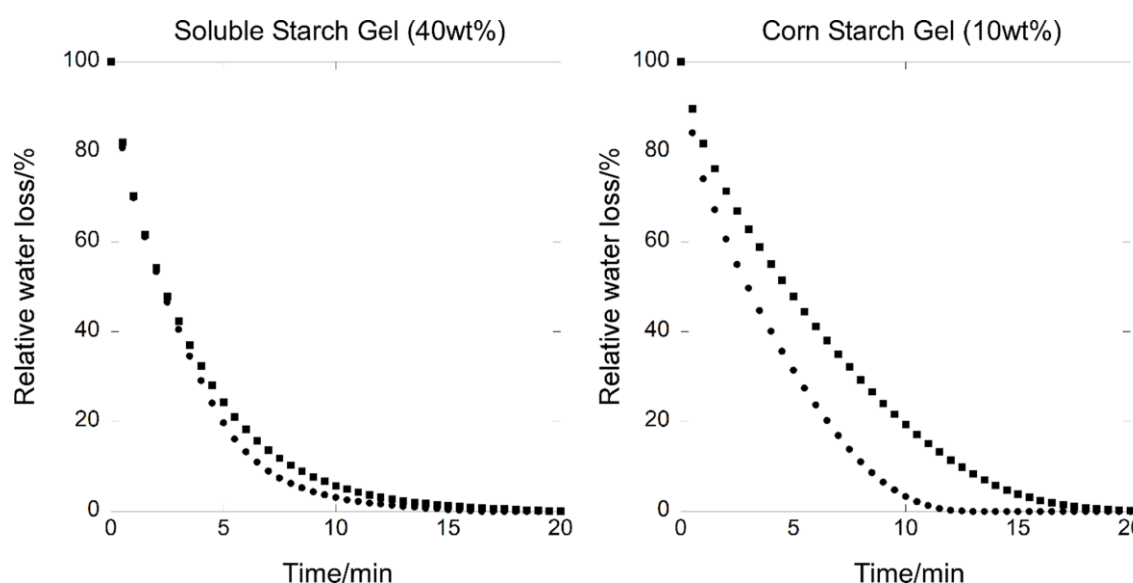


Fig. 2-2 澱粉ゲルからの相対水分質量損失の経時変化

(1.0 g の澱粉ゲルに対して 100 °C で加熱。)

■ : ホウ砂添加(0.10 M, pH 9.35)、● : ホウ砂無添加)

可溶性澱粉ゲル(40wt%)を用いてホウ砂の添加効果を調べたところ、ホウ砂の添加の有無にかかわらず水分消失速度はほぼ同様であった。一方、天然型澱粉であるトウモロコシ澱粉ゲルを(10wt%)用いて同様の実験を行ったところ、トウモロコシ澱粉単独では 10 分程度でほぼすべての水分が蒸発したが、ホウ砂を添加した場合においてはすべての水分が蒸発するのに 15 分以上必要であった。

これらの乾燥速度の違いは、Fig.2-1 のゲル化挙動における CCSG の傾向と同様に、澱粉構造中における直鎖あるいは分岐構造の比率の違いに影響されていることから生じているものと考えられる。すなわち、分岐鎖が少なく架橋点の少ない可溶性澱粉ゲル中に存在するホウ酸イオンはゲルの架橋剤としては働いていないためにゲル中の水分の保持に関与することはなく、逆に、トウモロコシ澱粉の場合は分岐鎖付近のホウ酸エステルの形成によりゲル中の水分子の捕捉効果が観察されたものと推測できる。しかし、一方で、澱粉ゲル中のホウ酸エステルの形成がゲル形成に関与とした場合、澱粉ゲル形成時における pH の影響を考慮する必要がある。

そこで、可溶性澱粉ならびにトウモロコシ澱粉ゲルの水分率の経時変化に対する pH の影響について検討した。

○澱粉ゲルの水分保持能に対する pH の影響

Fig.2-3 に 100 °C におけるホウ砂存在下 (0.10 M) における澱粉ゲルの水分率の経時変化を示す。可溶性澱粉ならびにトウモロコシ澱粉それぞれに対し、pH は 8~12 の範囲で検討した。

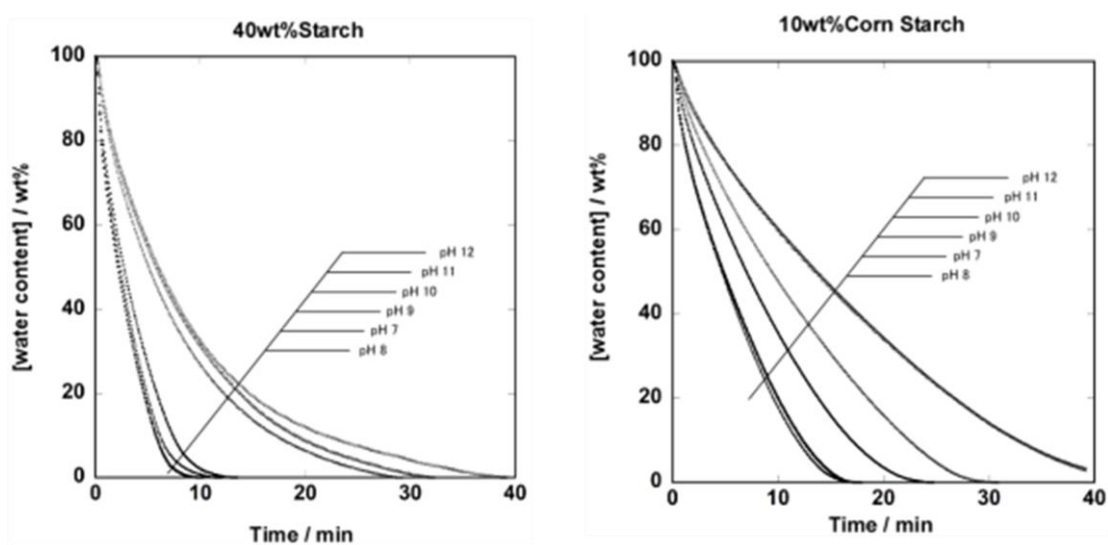


Fig. 2-3 澱粉ゲルからの相対水分質量損失の経時変化(pH 8~12)

可溶性澱粉を用いた場合、pH9 以下ではホウ砂の添加しない場合 (Fig.2-2 左) と同様の結果であったが、pH10 以上においては乾燥速度の低下が見られた。一方、トウモロコシ澱粉を用いた場合は、pH8 以下ではホウ砂無添加 (Fig.2-2 右) と同様の傾向であったが、pH9 以上では pH が上昇するにつれて徐々に乾燥速度の低下が見られた。塩基性が高くなるほど乾燥耐性が上昇したということから、ホウ酸がホウ酸イオンになること、または、澱粉のヒドロキシ基間とのホウ酸エステル形成がホウ砂添加による澱粉ゲルへの影響の主要因であると考えられる。しかし、ゲル形成前とゲル形成時での pH の影響については同一のものとして考慮できないため、オキソ酸であるホウ酸のゲル化時の挙動については別の分析系による評価が望まれる。

また、他の天然型澱粉に対しての pH による影響について確認した。Fig.2-4 に 100 °C におけるホウ砂存在下 (0.10 M) における各種澱粉ゲルの水分率の経時変化を示す。可溶性澱粉ならびに各種天然型澱粉に対し、pH は 5~11 の範囲で検討した。

トウモロコシ澱粉以外の天然型澱粉においても、pH9 以上で pH の上昇に伴って乾燥速度の低下が確認された。pH の上昇に伴う乾燥速度の低下は、可溶性澱粉でも同様に観測できるものの、アミロペクチンを多く含む天然型澱粉の方がその変化の大きさが顕著であることがわかる。したがって、澱粉の形態、構造の違いが水分保持ないしゲル形成に強く影響していることがわかった。

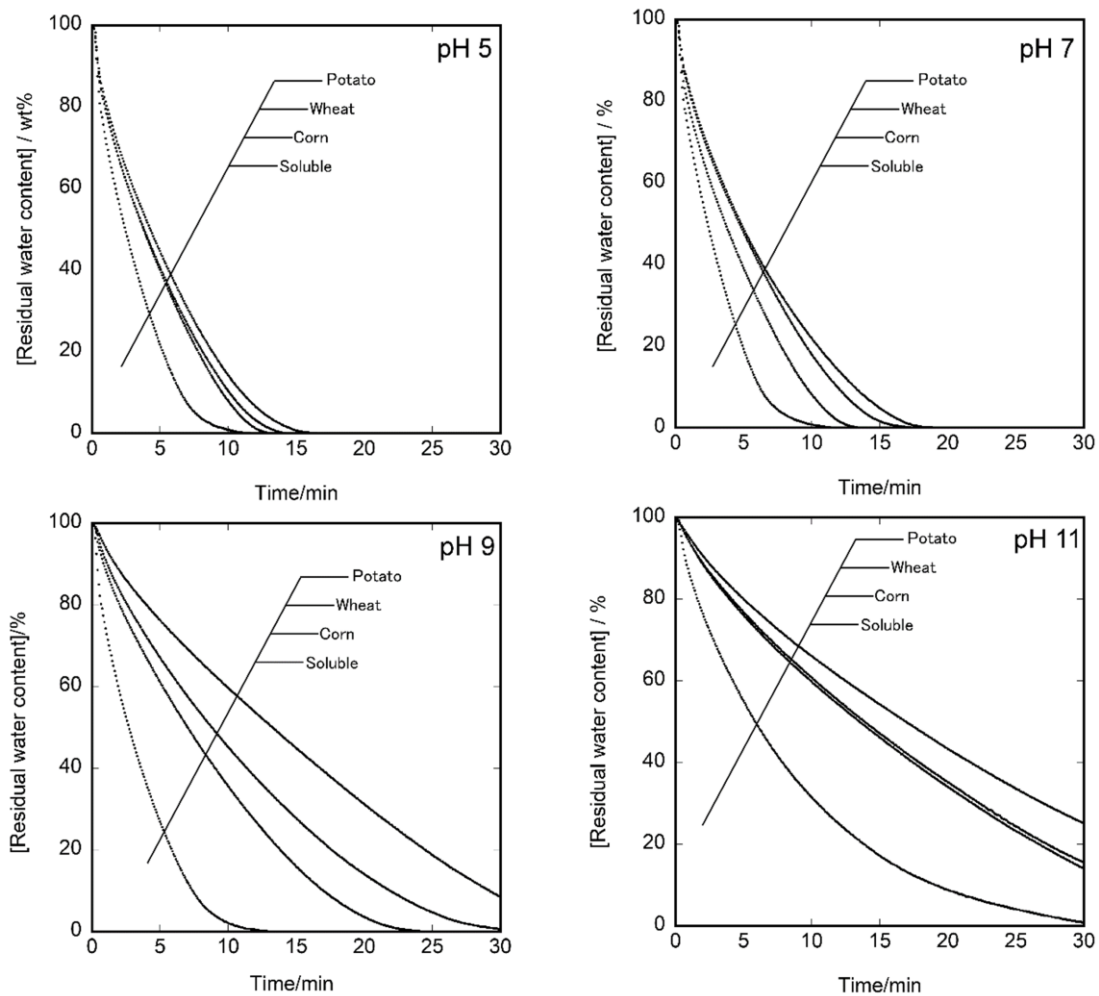


Fig. 2-4 各種澱粉ゲルからの相対水分質量損失の経時変化(pH 5~11)

2.3 結論

以上の結果について、それぞれの節ごとに結論を述べる。

・ホウ砂存在下における澱粉のゲル化挙動

澱粉ゲルに対するホウ砂添加の影響をゲル化しやすさの指標である CCSG で比較したところ、アミロペクチンを多く含む天然型澱粉においてはゲル化の促進、アミロペクチンをほとんど含まない可溶性澱粉ではゲル化が抑制される傾向が確認された。これは、澱粉に含まれる架橋構造の量に反映していると考えた。この特性を活用することで澱粉中に含まれるアミロース - アミロペクチンの比率について簡便に評価することが期待できる。

・ホウ砂存在下における澱粉ゲルの水分保持能

各種澱粉ゲル構造内における水分保持能に着目し、天然型澱粉と化工澱粉である可溶性澱粉とでホウ砂の添加効果が異なるか検証を行った。その結果、可溶性澱粉ではホウ砂の添加の有無にかかわらず水分消失速度はほぼ同じであったのに対し、天然型澱粉ではホウ砂を添加した場合、ホウ砂を添加しない場合に比べて全ての水分が蒸発するまでに約 1.5 倍の時間を要した。これは、澱粉ゲル中における水分子の捕捉効果が天然型澱粉と可溶性澱粉とで、その高次構造が異なるためと推測した。また、ホウ砂を添加した澱粉ゲルの水分保持能に対する pH の影響を確認したところ、pH が高いほど、澱粉の水分保持能が高くなる傾向が観測された。特に、天然型ではその傾向が顕著であり、溶液中におけるホウ酸イオンとの架橋構造の形成が容易になることで水分保持能が高くなるものと考えた。

澱粉のゲル化プロセスに着目し、架橋剤であるホウ砂の有無によるゲル化への影響もしくは水分保持能の変化から、各種澱粉の形態、構造について簡便に評価できることがわかった。今後、澱粉の構造からの評価のみならず、架橋剤であるオキソ酸の形態変化による影響についても、さまざまな分析手法により解明されることを期待したい。

2.4 実験方法

○装置ならびに機材

pH メーター	HORIBA	pH METER D-51
水分計	SHIMADZU	MOC63c

○溶媒と試薬

可溶性澱粉、トウモロコシ澱粉、バレイショ澱粉を関東化学株式会社から、コムギ澱粉をナカライテスク株式会社から購入した。ホウ砂（四ホウ酸ナトリウム十水和物）は関東化学株式会社から購入した。

○ゲル化検証法

ホウ砂を 0.10 M になるように調製し、これをオキソ酸溶液とした。澱粉のゲル化は内径 2.7 cm のポリメチルペンテン製の容器(50 mL Centrifuge Tube TPX, 住友

ベークライト(株))を用いて行った。容器内の全体積が 20 mL となるように、各種澱粉にオキシ酸水溶液を加え懸濁状態とした。その際に澱粉粉末の質量を調整し、澱粉濃度を変えた。次に、澱粉懸濁液を 76 °C、100 rpm、20 分間振とう恒温水槽内で加熱し、糊化状態とした。その後、20 °C の恒温槽内で垂直にしたまま、26 時間静置しゲル化させた。ゲル化の検証は試験管倒立法⁶⁾により行った。

○水分率測定

ホウ砂を 0.10 M になるように調製し、これをオキシ酸水溶液とした。サンプルの調製は内径 2.7 cm のポリメチルペンテン製の容器(50 mL Centrifuge Tube TPX, 住友ベークライト(株))を用いて行った。澱粉濃度は臨界ゲル化濃度 (CMC) 付近で測定を行うために、可溶性澱粉を 40 wt%、その他天然型澱粉を 10 wt%となるように澱粉質量を調整した。容器内の全体積が 20 mL となるように、澱粉にオキシ酸水溶液を加え懸濁状態とした。次に澱粉懸濁液を 76 °C、100 rpm、20 分間振とう恒温水槽内で加熱し、糊化状態とした。糊化状態のサンプルを 1.0 g 秤量し、アルミパン上で直径約 6 cm に延ばした上で、加熱式水分計を用いて質量変化率を測定した。水分計を用いた加熱条件は、加熱温度を 100 °C、終了条件を 30 秒間の質量変化率が 0.01 %以下とした。

2.5 引用文献

- 1) V. J. Morris, *Trends in Food Science & Technology*, **1** 2 (1990).
- 2) J. L. Jane, *Starch-Stärke*, **45**, 161 (1993).
- 3) L. V. Angelova *et al.*, *Langmuir*, **27**, 11671 (2011).
- 4) 小林厚志 *et al.*, 高分子論文集, 75 巻, pp. 99 (2018).
- 5) 星野優人, 日本大学大学院修士論文, (2018).
- 6) 田中 譲, 第 2 章ゲル化の理論とゲルの調製 第 2 節 ゲル化の評価, 「ゲルハンドブック」, 長田義仁、梶原莞爾 編集, エヌ・ティー・エス, pp.31-38, (1997).

第 3 章

糖質酵素工学に基づく澱粉から の物質生産

3.1 緒言

2章では、主に糖質工学によるアプローチにより澱粉の物理化学特性の1つである糊化・ゲル化・老化特性について着目し、架橋剤の添加による澱粉独自の特性への影響について述べた。一方で、澱粉を基質とし、酵素触媒による効率的な物質（糖質）の生産を図る場合、糖質工学に基づく澱粉への評価のみならず、酵素の機能を評価するための酵素工学に基づく知見が重要になる。本章では、糖質工学と酵素工学の橋渡し役となる糖質酵素工学について述べる。

一般に、産業的に澱粉を基質とした糖質の生産を行う場合、糖加水分解酵素を用いてオリゴ糖などの加水分解産物を得ることが多い。しかし、糖加水分解酵素は基質濃度が高い条件下においては糖転移反応により新たなグリコシド結合を形成する触媒として作用する。近年、通常の条件下では示さない酵素の触媒能（Enzyme Promiscuity）に着目し、酵素が本来作らない物質生産を促進させる試みが注目されている^{1,2,3}。そこで、澱粉を基質とする酵素である α -アミラーゼもこのような Enzyme Promiscuity を示すと考え、糖受容体に非天然型の基質を用いた酵素的グリコシル化反応を試みた。その際、グリコシル化効率の向上を目指し、澱粉元来の物理化学的特性を活用することで反応の効率化を図った。また、本酵素反応系をモデル反応とし、そのグリコシル化効率のための簡便な基質環境の設計ならびにそれらの評価系の構築も試みた。

多糖加水分解酵素である α -アミラーゼは、水溶媒下では加水分解反応を主に触媒することが知られているが、反応条件によっては糖転移反応を触媒することも知られている。一般に、糖質関連酵素によるグリコシル化効率の向上のための手段として、基質の活性化⁴あるいは変異体酵素の作製⁵により糖転移反応を効率化することが多い。一方で、 α -アミラーゼにとっての天然型基質である澱粉の物理化学的特性に焦点を当てて効率的な反応場の構築を目指した例はない。第2章で述べた澱粉中のアミロペクチンの澱粉ゲル化への強い影響に対し、アミロースは水溶液中において螺旋構造を形成し、その空洞内に脂溶性分子を取り込む包接作用を示すことが知られている。そこで、アミロースの包接作用に着目し、アミロース-脂溶性分子の基質複合化を行うことで、糖供与体と糖受容体を近接化することでグリコシル化効率の向上が期待できると考えた。

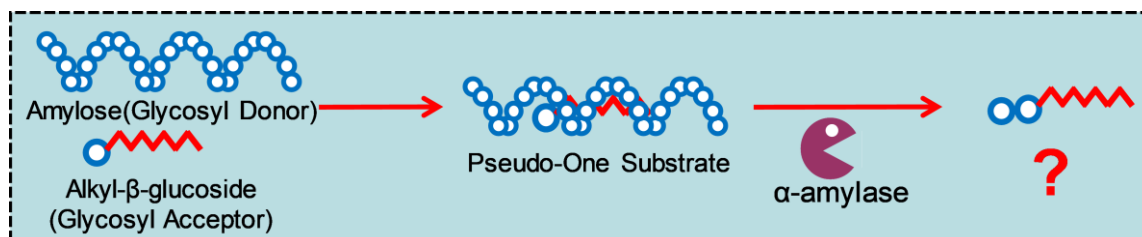
一方で、加水分解反応と糖転移反応が競合する α -アミラーゼによる酵素反応は、糖供与体の重合度や濃度が常に変動しており、その反応の評価および反応条件の設計が困難となる。そのため、効率的なグリコシル化あるいは必要とする構造を

有する配糖体を得るための反応条件の探索のためには数多くの実験的検証が必要となる。そこで、 α -アミラーゼに関する既存の反応解析モデルを活用することで糖供与体の反応系内の変化を予測でき実験手順を簡略化することで目的のグリコシル化に有利な反応条件を効率的に選択できると考えた。反応予測には、サブサイト理論^{6,7)}に基づく解析モデルを用いた。

本章では、基質ベースに Enzyme Promiscuity が誘発しやすい基質環境を設計した基質エンジニアリングに基づいた酵素的グリコシル化反応について述べる。反応モデルとして、澱粉を天然型基質として認識する α -アミラーゼとし、糖供与体にアミロースやオリゴ糖、糖受容体として糖脂質であるアルキルグリコシドを選択した。以降では、上記で述べたそれぞれの検証法について、基質複合体の調製法と反応系内の予測による反応条件の最適化にそれぞれ分けて述べる。

①基質の物理化学的特性を利用したグリコシル化反応の効率化

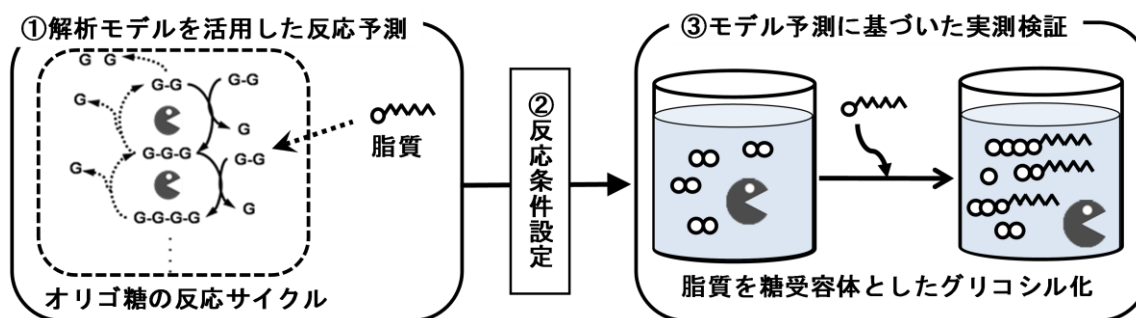
アミロースの包接作用に着目し、アミロース（糖供与体）をホスト分子、糖脂質（糖受容体）をゲスト分子と見立て、熱あるいは超音波照射下において複合化させ、酵素的グリコシル化が進行しやすくなると考えた（Scheme 3-1）。



Scheme 3-1 包接作用を利用した基質複合化

②既存の酵素反応解析モデルを活用した実験手順の簡略化

酵素 - 基質複合体の形成をベースにした酵素反応速度論に基づいたサブサイト理論から構築された α -アミラーゼに関する解析モデルを用い、酵素反応中におけるアミロースもしくはオリゴ糖の濃度変化を予測することでグリコシル化反応に適した反応条件を設定し、実際に糖脂質混在化でグリコシル化反応の実測検証を行う（Scheme 3-2）。



Scheme 3-2 解析モデルを活用した酵素反応条件の設計

3.2 結果と考察

3.2.1 基質の複合化による酵素的グリコシル化反応

酵素反応は、糖脂質である *n*-octyl β -D-glucopyranoside (C_8OGlc) を糖受容体、糖供与体に高アミロース含有澱粉 (HAS) とした混合溶液に対し、熱処理あるいは超音波処理による基質複合化処理を行った後に、酵素を添加することで反応を開始した。

○ α -アミラーゼによるグリコシル化効率の評価

Fig.3-1 に、 C_8OGlc を糖受容体とした酵素反応中の反応時間に対する転化率の変化を示す。基質混合溶液に対する熱処理あるいは超音波処理による基質複合化の効果を C_8OGlc の転化率の違いから評価した。酵素反応は、HAS を糖供与体とし、酵素反応時の濃度が 3wt% になるように設定し、糖受容体である C_8OGlc の濃度を 10 mM に設定した。 α -アミラーゼには市販の酵素製剤であるバイオザイム A (天野エンザイム) を用い、酢酸緩衝液 (50 mM, pH5.0) 中で 50 °C に保って反応を行い、観測時間ごとにサンプリングを行った。

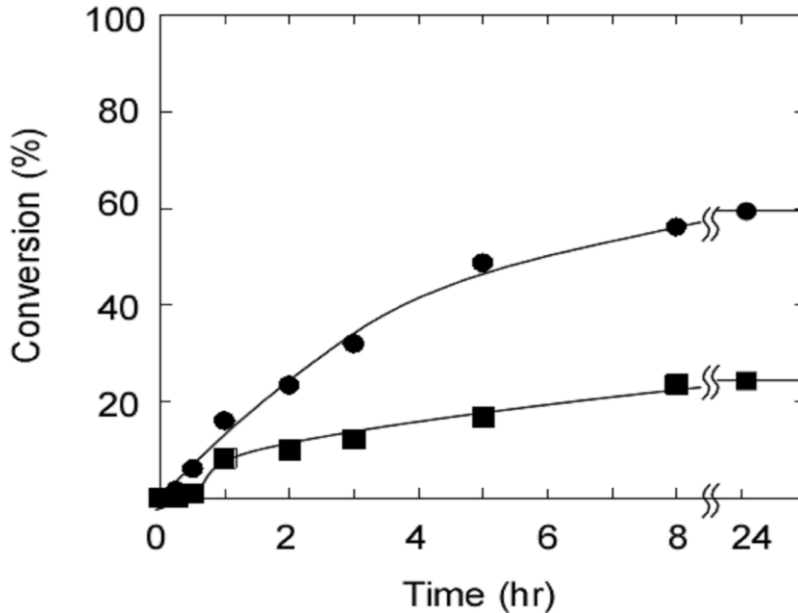


Fig.3-1 C₈OGlc の減少量から算出した反応転化率の経時変化
 (●：超音波処理にいる基質複合化、■：熱処理による基質複合化)

それぞれの複合化処理における転化率の比較から、基質混合溶液に対して超音波照射することで、C₈OGlc に対する転移反応効率が向上することが明らかになった^{8,9)}。そこで、次に超音波処理により得られたグリコシル化産物を抽出し、その構造解析を NMR および MALDI-TOF MS により行った。

○グリコシル化産物からの配糖化プロセスの推察

得られたグリコシル化産物の構造を解析したところ主生成物は、糖受容体である C₈OGlc に α-1,6 結合を介してグルコースが配糖化したオクチル β-D-イソマルトシド (C₈OIG2) であることを確認した (Fig.3-2)。

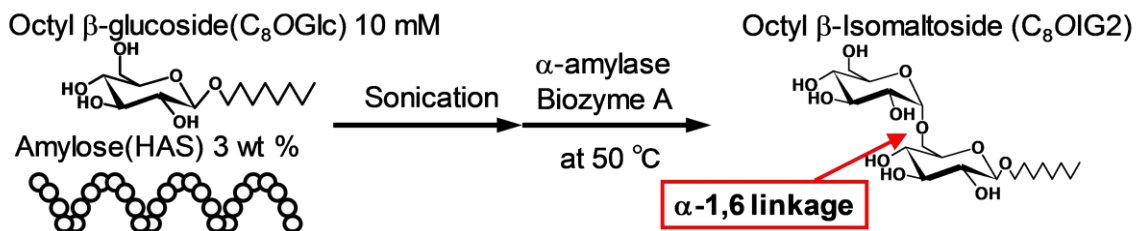


Fig.3-2 最終糖転移産物として確認された octyl β-D-isomaltosides (C₈OIG2)

通常、 α -1,4 グルコシド結合に対して高い基質特異性を有し、単糖単位での糖転移反応を触媒することが困難とされる α -アミラーゼ¹⁰⁾がグリコシル化反応により直接 C_8OIG2 を形成することは難しいと考えた。そこで、 C_8OIG2 の形成プロセスの検証を目的とし、質量分析によって酵素反応初期段階の反応溶液中に含まれる配糖化産物の構造評価を試みた (Fig.3-3)。

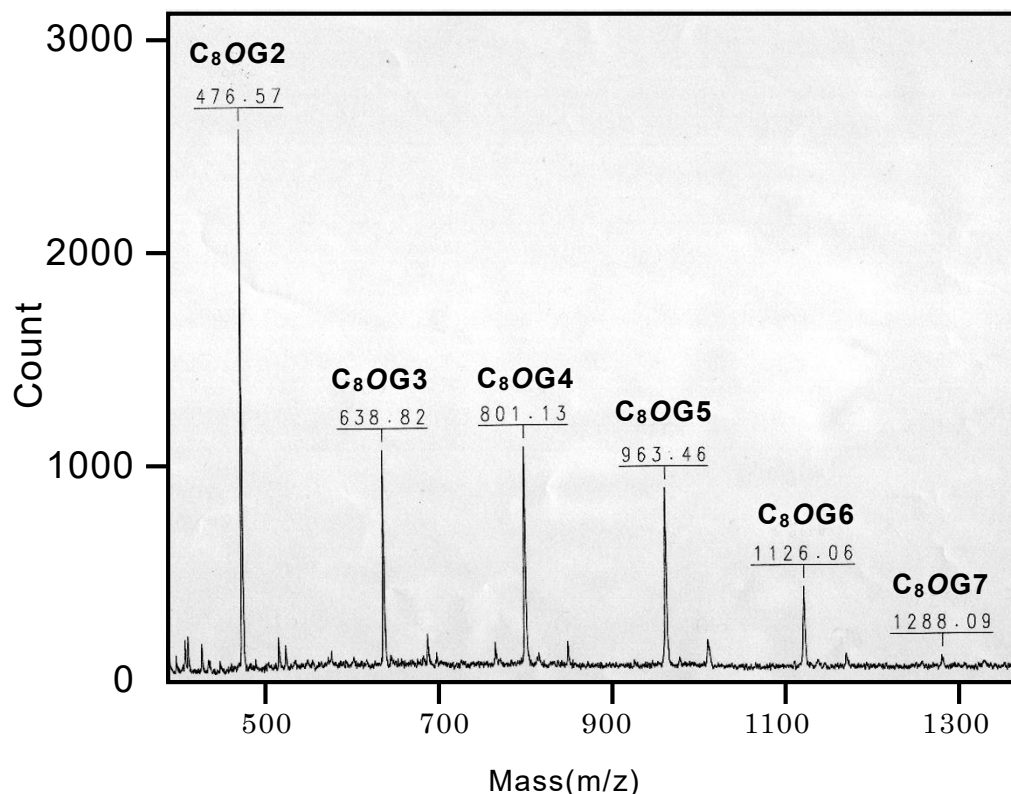


Fig.3-3 酵素初期段階の反応溶液に対する MALDI-TOF MS による構造解析

Fig.3-3 より、 C_8OIGlc に1つ糖が結合した C_8OG2 (476.57)、2つ糖が結合した C_8OG3 (638.82)、3つ糖が結合した C_8OG4 (801.13)、4つ糖が結合した C_8OG5 (963.46)、5つ糖が結合した C_8OG6 (1126.06)、6つ糖が結合した C_8OG7 (1288.09) のナトリウム付加イオンに相当する複数の m/z のピークを確認した。また、これらのピークは酵素反応の経過とともに消失していくことを確認した。これらの複数の配糖体アルキルポリグリコシド (APGs) の存在から、本酵素反応系において想定されるグリコシル化反応経路について仮説を立てた (Fig.3-4)。

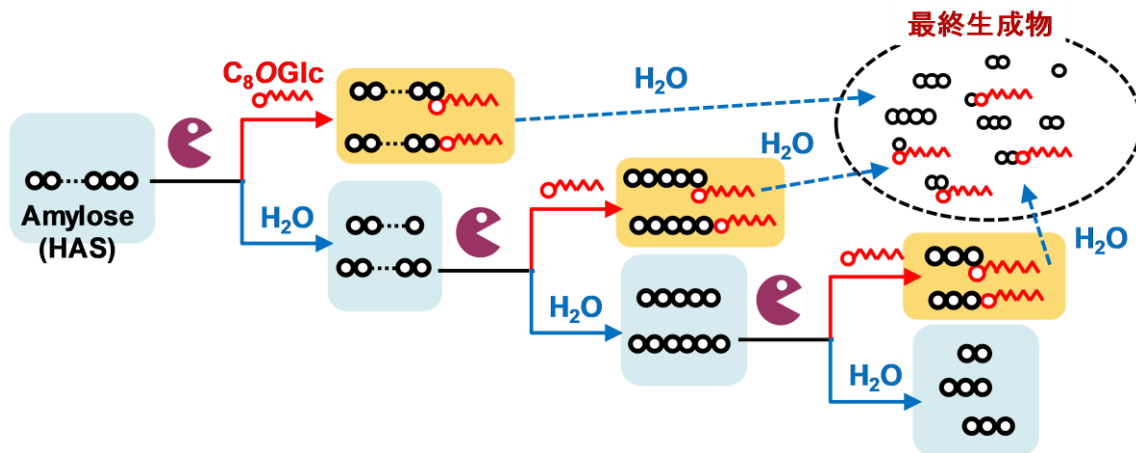


Fig.3-4 本酵素反応系において想定される APGs の形成経路

本酵素反応系では、反応初期段階において C_8OGlc に対し、糖鎖の長い糖供与体（アミロース）が糖転移することで、糖鎖長の長い APGs が形成される。その後、この APGs が加水分解反応の対象となることで反応最終工程においては短い APGs のみが残存すると考えた。 C_8OIG2 が最終糖転移産物として主生成物となる要因として、反応初期段階においては糖鎖長の長い糖供与体が系内に多量にあるため、 α -アミラーゼによる C_8OGlc への α -1,6 グリコシル化が進行したためであると考えた。しかし、他の酵素が混入している市販の酵素を用いている本検証では、そのメカニズムを解明することは困難である。

そこで、山本らは反応機構の解明および反応効率の向上を目指し、糖転移活性が高い好熱性放線菌 *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 由来の α -amylase (TVAII) を用いた反応のグルコシル化条件の検討と生成物の挙動解析について報告した¹¹⁾。その結果、 α -1,4、1,6 転移物に加え、 α -1,3 転移物の存在を確認した (Table 3-1)。

Table 3-1 2種の由来の異なる α -アミラーゼにより得られた最終糖転移産物

Enzyme	Biozyme A (酵素製剤) from <i>Aspergillus Oryzae</i>	TVA II 好熱性細菌 <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> R-47由来の α -amylase
Transglycosylation Products at final stage		

また、山本らは α -1,3 転移物が C₈OGlc やアルキルチオグリコシドといったアグリコン部位にアルキル鎖を有するものを糖受容体とした場合に形成されることも明らかにした。このことから、糖受容体の脂溶性部位がグリコシル化反応時の結合形成に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。このような反応特性は、 α -アミラーゼの Enzyme Promiscuity を示唆する重要な手がかりであると考えた。

一方で、Enzyme Promiscuity の中でも安価で生産性の向上が望める基質をベースにした Substrate Promiscuity に焦点を当てた場合、天然の酵素による反応特性を評価したほうが効率の良い物質生産系の構築につながると考えた。

しかしながら、Fig.3-4 のような複数の反応が競合する反応を評価する場合、その解析手順が煩雑となりがちであり、グリコシル化に有利な反応条件の探索が困難となる。そこで、次節ではこのような複雑な反応系の制御に対応した既存の酵素反応工学に関する知見であるサブサイト理論とその活用法について述べる。

3.2.2 解析モデルの活用による酵素的グリコシル化反応の制御

本節では、初めにサブサイト理論に関する概要とこれに基づく解析モデルの特徴について紹介した後に、その運用に関する妥当性について述べる。

○サブサイト理論に基づく解析モデルのプログラム化

一般に、酵素の特性は反応の特異性と基質に対する特異性の大きく 2 つの特異性で論じることができるが、特定の基質に対する反応評価のみでは基質の重合度に対する依存性を説明することは難しい。Hiromi⁶⁾や Thoma⁷⁾らはこれらの酵素に対する基質の重合度の依存性を説明するためにサブサイト理論を提唱した。酵素反応の第一歩は、基質が酵素の活性部位に取り込まれて酵素-基質複合体 (ES) を形成することにある。ここで、酵素の活性部位と呼ばれる領域のうち、基質を構成するそれぞれのグルコース残基が接触 (結合) する部位をサブサイトと称する。このように考えると、酵素の活性部位はいくつかのサブサイトを構造の単位として組み立てられる (Fig.3-5)。

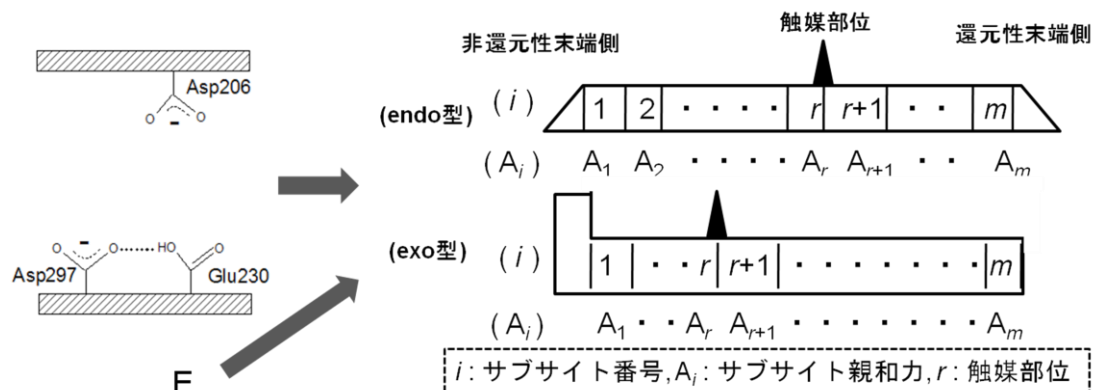


Fig.3-5 酵素の活性部位のサブサイト構造化

個々のサブサイトは、それぞれ基質のグルコース残基に対する固有の親和力を示し、これらの総和が基質との分子親和力となる。実験的に得られる各オリゴ糖に対する酵素の速度パラメータ (K_m , k_{cat}) を用いて、サブサイト親和力 A_i と真の水解速度定数 k_{int} を算出でき、逆に、予めサブサイトパラメータ A_i と k_{int} が既知である場合、 K_m , k_{cat} を推算することができる (パラメータの可逆性)。特に、X線解析、実験的アプローチから予めサブサイト骨格、サブサイト数 m 、触媒部位 r 、各サブサイト親和力 A_i と真の水解速度定数 k_{int} が求められている場合、これらのパラメータから各基質の酵素に対する結合定数 K を算出し、提案する反応モデルに組み込むことにより、基質、酵素、基質-酵素複合体の濃度を推算することができる。このサブサイト理論の特徴を活用することで、さまざまな重合度を有する基質の酵素に対する結合様式を定義し (Fig.3-6)、酵素自身の反応特性を表現したさまざまな解析モデルが提案されている^{12,13,14,15}。

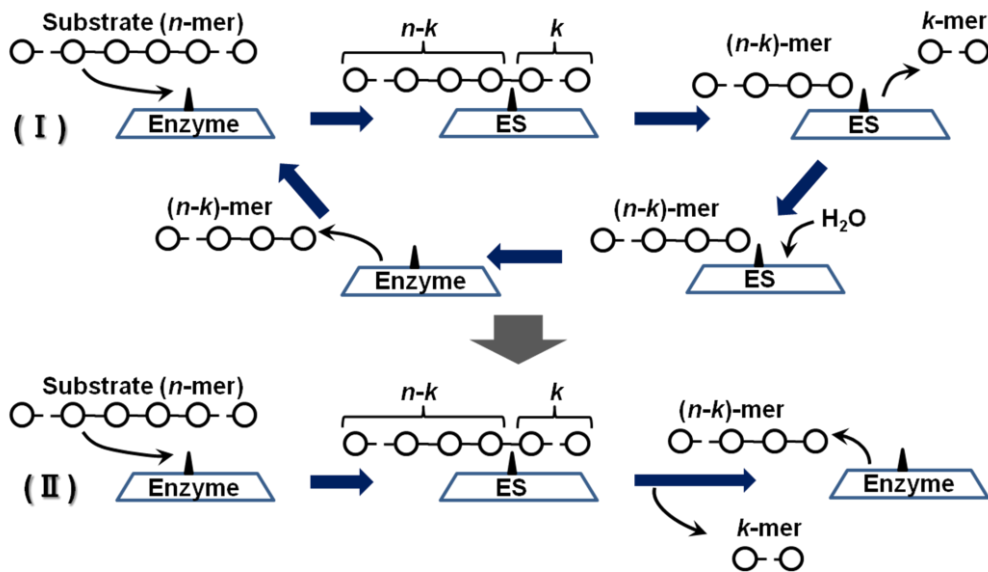


Fig.3-6 サブサイト構造を用いて表現した酵素反応機構（endo型）

これらの解析モデルにより、生成物の反応系内における濃度挙動を予め推算あるいは実験結果との比較を行うことで、複雑になりがちな酵素反応系を可視化することは非常に有用であるものの、その積極的な運用はなされていない。そこで、これらの解析モデルを活用することにより、種々の重合度を有する糖供与体および糖受容体が混在する糖加水分解酵素による配糖化反応の効率的な検証を目指した。本論文では、サブサイト理論に基づく解析モデルのうち、長い糖鎖長の基質に対応した α -アミラーゼによる効率的な加水分解反応モデル¹³⁾ (Cal.1) および長い糖鎖長の基質に対応し加水分解、糖転移、縮合反応について表現した反応モデル¹⁴⁾ (Cal.2) に着目し、シミュレーションプログラムとして復元し、これに各基質濃度、酵素濃度、反応温度を反応初期条件として入力することで活用することにした (Cal.1 および Cal.2 の解析モデルの特性、計算方法については本章の実験方法に記載)。

○実測値との比較によるプログラムの妥当性の検証

まず、Cal.1 を用いて重合度 10 のアミロースのみを基質とした場合の *Aspergillus oryzae* 由来の α -アミラーゼによる加水分解反応を想定した反応シミュレーションを行った。Fig.3-7 に、Cal.1 により算出した反応時間に対する加水分解生成物（重合度 $n=1\sim 10$ ）の濃度の挙動を示した。計算の際には、反応初期条件として、①反応条件、②酵素のサブサイトパラメータ、③反応速度定数を予め入力して推算を

行い、反応時間に対する各重合度の生成物濃度を出力した。計算において用いた反応初期条件①、②、③について以下に示す (Fig.3-10, 12 参照)。

①初期最大基質重合度 $N=10$, 初期基質濃度 $[S_N]_0=6.1 \text{ mM}$, $[S_n]_0=0$ ($n=1\sim N-1$),

初期酵素濃度 $[E]_0=76\sim 760 \text{ nM}$, 反応温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$

②サブサイト数 $m=9$, 触媒部位 $r=4$, 多重攻撃時にスライドするグルコース数 $h=3$,
 $A_1=0.8, A_2=1.7, A_3=20.5, A_4=-15.5, A_5=0.0, A_6=13.8, A_7=5.0, A_8=-2.9, A_9=3.3 \text{ kJ/mol}$

③生産型 ES における真の加水分解速度 $k_{\text{int}}=12,000 \text{ min}^{-1}$, $T=k_{s_n,j}/k_{-1_n,j}=1.0$,
 $H=K_{\text{int}}\cdot(k_{\text{int}}/k_1)=60$, (K_{int} は全てのサブサイトが基質に覆われる際の結合定数)

反応条件①は実際に検証する実験条件に合わせたパラメータとした。サブサイトパラメータ②は文献値¹³⁾のパラメータをそのまま用い、速度論パラメータは文献値¹³⁾のパラメータをもとに実験的に得られたデータと適合性のある範囲のパラメータを採用した。

Fig.3-7 (a)、(b)ともに入力した上記パラメータに示した反応初期条件①、②、③をもとに計算を行ったが、(a)は初期酵素濃度 $[E]_0=760 \text{ nM}$ 、(b)は初期酵素濃度 $[E]_0=76 \text{ nM}$ として計算を行った。すなわち、初期酵素濃度 $[E]_0$ と初期基質濃度 $[S_{10}]_0$ の比、 $[E]_0/[S_{10}]_0\cong 10^{-4}$ と 10^{-5} として計算を行った。

Fig.3-7 (a)と(b)を比較すると、 $n=5$ 以上のオリゴ糖の濃度変化の挙動、グルコース ($n=1$) の生成の有無、マルトース ($n=2$)、マルトトリオース ($n=3$) の濃度挙動の逆転の3点が大きい特徴となっている。これらの傾向は、アミロースに対する *Aspergillus oryzae* 由来の α -アミラーゼによる効率的な加水分解機構特有の反応挙動であり、 $[E]_0/[S_{10}]_0\cong 10^{-4}$ の条件で推算を行った場合、より顕著にその傾向が現れている。そこで、本モデルの適応性を確認するために計算条件 $[E]_0/[S_{10}]_0\cong 10^{-4}$ の条件に近い状態で、実験的に検証 (Exp.1) を行った結果を反応時間に対する加水分解生成物 (重合度 $n=1\sim 7$) 濃度の挙動として Fig. 3-8 に示した。酵素反応は、アミロースを糖供与体とし、酵素反応時の濃度が $1.0\text{wt}\%$ とした。 α -アミラーゼには市販の酵素製剤であるビオザイム A(天野エンザイム)を用い、 20 mM , $\text{pH}5.0$ の酢酸緩衝液存在下で $25 \text{ }^\circ\text{C}$ に保って反応を行い、観測時間ごとにサンプリングを行った。

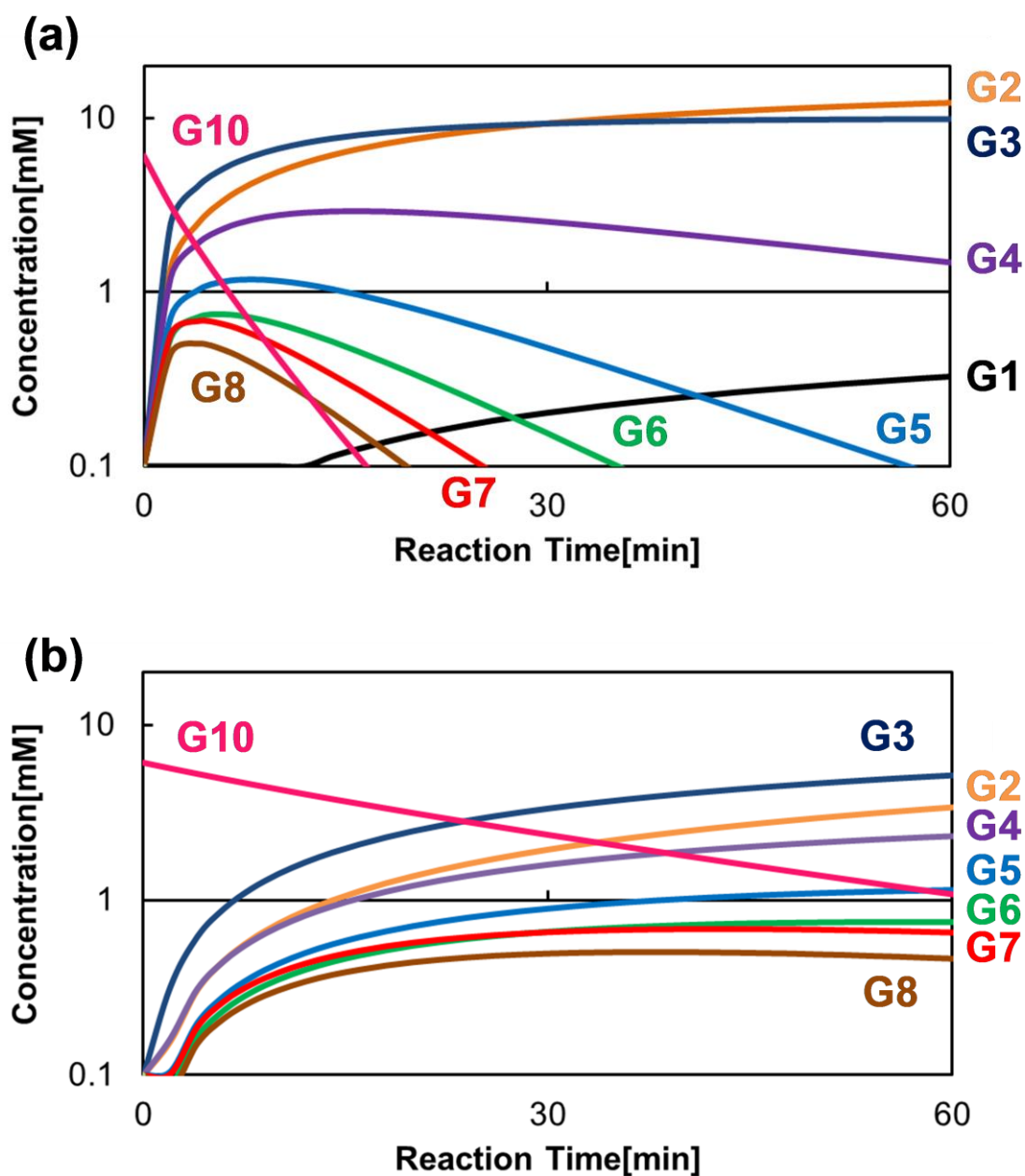


Fig.3-7 反応時間に対する基質濃度($n=1\sim 10$)の変化 (計算値)

(a) $[S_{10}]_0=6.1$ mM, $[S_n]_0=0$ mM ($n=1\sim 9$), $[E]_0=760$ nM, 温度 25 °C, $H=60$, $T=1.0$

(b) $[S_{10}]_0=6.1$ mM, $[S_n]_0=0$ mM ($n=1\sim 9$), $[E]_0=76$ nM, 温度 25 °C, $H=60$, $T=1.0$

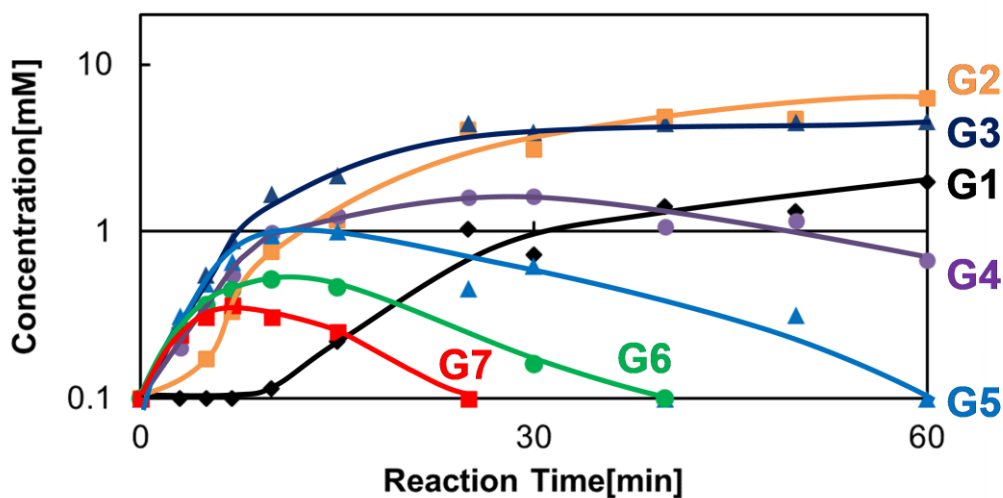


Fig.3-8 反応時間に対する基質濃度($n=1\sim7$)の変化 (実験値)
 (アミロース濃度 : 1.0wt%, 酵素溶液(3.8 μg / 1 mL), 温度 25 °C, pH 5.0)

反応初期段階における生成速度の違いやグルコースの生成挙動の違いはあるものの、全体の反応挙動の特徴は Cal.1 と Exp.1 は類似していると思われ、以降の反応条件の設定や反応評価のための手段として活用した。

そこで、これらの反応予測を用いて C_8OGlc 混在下において効率的に反応条件を探索できるかということについて確認した。

○目的のグリコシル化条件探索のための計算予測

Fig.3-9 に、Fig.3-7 (b)で推算された初期酵素濃度 $[E]_0$ と初期基質濃度 $[S_{10}]_0$ の比を参考にして、Exp.1 の手順にしたがって調製した酵素反応溶液中の APGs を、質量分析により解析した結果を示した。酵素反応は、アミロースを糖供与体とし、初期酵素濃度 $[E]_0$ と初期基質濃度 $[S_{10}]_0$ の比、 $[E]_0/[S_{10}]_0$ を 10^{-5} とし、糖受容体である C_8OGlc の濃度を 10 mM に設定した。20 mM, pH5.0 の酢酸緩衝液存在下で 25 °C に保って反応を行い、反応開始 1 時間後にサンプリングを行い、MALDI-TOF MS により構造解析を行った。

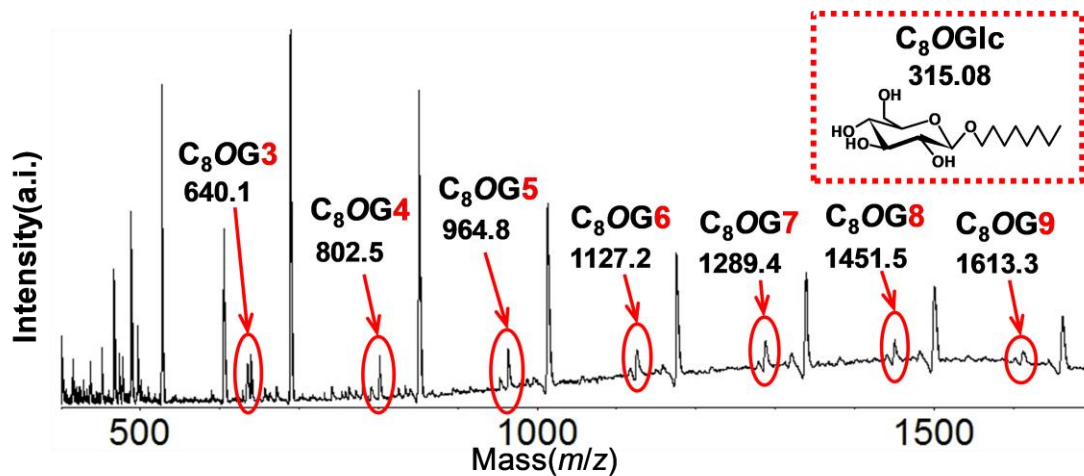


Fig.3-9 酵素反応開始から 1 時間経過した反応溶液中の APGs に対する MALDI-TOF MS による構造解析
(アミロース(DP=10) 濃度 / α -アミラーゼ濃度 $\cong 10^5$, 温度 25 °C, pH 5.0)

C_8OG3 ~ C_8OG9 までの糖鎖の領域が幅広い APGs を比較的短い反応時間で確認できた。また、この反応時間では C_8OG2 の存在は確認できなかった。

この結果より、 C_8OGlc 混在下におけるグリコシル化反応のための効率的な反応条件の探索に、解析モデルに基づく反応予測が有効であることが示唆された。

このように、実験的検証のみではなく計算的予測を活用することにより、実験操作の簡略化のみならず、実測が困難な反応の評価に活用することが期待できる。また、前者で述べた基質複合化や既存の基質エンジニアリングと組み合わせるとここで、より高効率なグリコシル化が望める。

3.3 結論

以上の結果について、それぞれの節ごとに結論を述べる。

・基質の複合化による酵素的グリコシル化反応

糖脂質である C_8OGlc を糖受容体として用い、アミロースとの基質複合化により効率的グリコシル化を図ったところ、酵素反応初期段階において糖鎖長の長い

APGs を形成し、最終的なグリコシル産物として α -1,6 グルコシド結合を有する配糖体を確認した。

・解析モデルの活用による酵素的グリコシル化反応の制御

Aspergillus oryzae 由来の α -アミラーゼによる反応モデルを用い、糖供与体にアミロース、糖受容体に C_8OGlc を用い酵素反応系に対して、効率的な反応設計を試みたところ、反応初期段階で糖鎖長の長い APGs の形成の観測が可能な反応条件を探索することができた。

このように、澱粉の物理化学的特性の活用のみならず、 α -アミラーゼに関する既存の知見を利用することで、実験手順、反応条件の設計の簡便化、効率化が可能となった。また、 C_8OGlc に対する配糖体である APGs の中に複数のグリコシル結合様式を有するものを確認したことから、 C_8OGlc のアグリコン部位のアルキル鎖の Enzyme Promiscuity への関与は示唆された。

3.4 実験方法

○装置ならびに機材

超音波破碎機	Branson	Sonifier250
NMR	BRUKER	DPX-400
	BRUKER	ORX-500
HPLC	RI Monitor	HITACHI 655A-30
	Column	GL Science Intersil ODS-3
	Pump	HITACHI 655A-12
	Integrator	SIC Chromatocorder12
MALDI-TOF-MS	BRUKER	ProteinTOF
	SHIMADZU	AXIMA-LNR
TLC	MERCK	Silica gel 60 F ₂₅₄
計算ソフト環境	Microsoft	Visual Studio 2015

○溶媒と試薬

溶媒は市販品を蒸留せずにそのまま使用した。有機化学合成反応および酵素反応に用いる試薬、溶媒は市販品(関東化学株式会社、東京化成工業株式会社、和光純薬工業株式会社、キシダ化学株式会社、ナカライテスク株式会社)をそのまま使用した。また、糖供与体としては、アミロース A (ナカライテスク) マルトース (以下 G2, 和光純薬)、フジオリゴ#360 シロップ (G36, 日本食品化工株式会社)、フジオリゴ#470 シロップ (G47, 日本食品化工) を用いた。それぞれのオリゴ糖シロップは、凍結乾燥を行うことで粉末状にした。*n*-octyl β -D-glucopyranoside (C₈OGlc, 和光純薬) を糖受容体として用いた。糖加水分解酵素である α -アミラーゼ (*Bacillus subtilis* 由来) は市販品 (キシダ化学) を用い、酵素製剤中に含まれる澱粉を予め除去した上で所定濃度にて用いた。

・高アミロース含有澱粉 (High Amylose Starch, HAS) の調製

3 g の可溶性澱粉を 90 mL の精製水に溶解させ、60 °C で 30 分振蕩させた後、徐々に温度を下げ 55 °C で保温した。これに 200 mM、pH 6 の酢酸緩衝溶液を 10 mL 添加し全量で 100 mL になるようにした。その後、プルラナーゼを 100 μ l 添加し、55 °C で 24 時間振蕩させた。反応終了後、酵素失活のために 80 °C で 30 分インキュベート行った後、60 °C まで温度を下げ保温した。その後、手早く上澄みを回収し、-85 °C 下で一晩凍らせた後、凍結乾燥を行うことで粉末を得た。

調製後の HAS は 3 wt% になるように HAS を溶かした水溶液にヨウ化カリウム、ヨウ素混合水溶液を少量滴下し、青く呈色することを確認してから以後の酵素反応で用いた。

・ *Bacillus subtilis* 由来の α -アミラーゼに含まれる澱粉の除去

購入した *Bacillus subtilis* 由来の 8.70 g の α -アミラーゼを 160 mL の蒸留水に懸濁させ、4 つのプラスチックチューブに分けた後、これを遠心分離した (3,000 rpm, 5 分間)。その後、氷冷下で各プラスチックチューブから上澄み層を採取し、300 mL ナスフラスコに移した後に凍結乾燥を行った。溶媒除去により得た粉体は上澄み層で 5.61 g であった (酵素粉体回収率 64%)。この粉体を水に溶かし、TLC (2-プロパノール/水=8/2) で確認したところ、マルトースのスポットがやや存在したものの、澱粉のスポットが消失したため、以降これを酵素として使用した。

○APGs の構造解析および分離、分析条件の検討

酵素反応溶液中に存在する生成物の分子量解析は、MALDI-TOF MS により行なった。この際、マトリックスには DHB を用いた。HPLC で確認した複数の反応産物 (APGs) のピークを、分析カラムを用いて分取した。分取の際は、溶離液を MeCN/H₂O=3/7、カラムを Inertsil ODS-3 (4.6 φ × 250 mm, GL Science、流速 0.6 mL/min、サンプルインジェクション 20 μL、カラム温度: 40 °C にして回収した。

単離した APGs の構造解析は、¹H NMR、¹³C NMR、HMQC、HMBC、¹H ¹H COSY による各種 NMR 測定により行なった。NMR 測定の際、溶媒は D₂O を用いた。なお、¹H NMR 測定のキャリブレーション用標準物質として重溶媒中に含まれる HOD (4.79 ppm) を基準として用いた。

○グリコシル化反応の反応追跡および転化率の算出

反応追跡は TLC(展開溶媒: MeCN/H₂O=85/15)および HPLC を用いて行なった。TLC プレートは Silica gel 60 F₂₅₄(MERCK)を用いた。また、発色試薬には 5%硫酸-メタノール溶液を用いた。HPLC 測定は、以下の条件で行った。

(カラム: ODS-3, 4.6 mm φ × 250 mm、溶離液: アセトニトリル/水=3/7、流量: 0.6 ml/min、温度 40 °C)

なお、反応の転化率は HPLC 測定結果における糖受容体のピークのエリア面積を基に作成した検量線から算出した。

○アルキルグリコシドを糖受容体とした酵素反応条件の設定

本章では α-アミラーゼによるグリコシル化反応に対し、2 種類の異なるアプローチにより効率化を目指した (「**基質の物理化学的特性を利用したグリコシル化反応の効率化**」、「**既存の酵素反応解析モデルを活用した実験手順の簡略化**」)。よって各手法により酵素反応手順が異なった。以降ではそれぞれのアプローチごとに酵素反応手順について示した。

①基質の物理化学的特性を利用したグリコシル化反応の効率化

基質の複合化によりグリコシル化効率の向上を図った際は、先に複合化基質混合溶液を調製した後に酵素反応を開始した。

- ・複合基質の調製
- ・超音波処理による複合化

超音波照射溶液として 0.6 g の HAS を 15 mL の精製水中に溶かし、60 °C で 30 分振蕩した後、0.06 g の C₈OGlc を添加した。この HAS、C₈OGlc 混合溶液に対し 20 kHz、25 W で 30.5 °C 一定で 30 分間超音波照射を行った。照射後の溶液は HAS の老化を防ぐため、すぐに酵素反応に用いた。

・熱処理による複合化

0.6 g の HAS を 10 mL の精製水に溶かし、60 °C で 30 分振蕩した。これとは別に 0.06 g の C₈OGlc を 5 mL の精製水中に溶かし、60 °C で 30 分保温した。その後、60 °C で振蕩下の HAS 溶液に C₈OGlc 溶液をゆっくり滴下した。得られた混合溶液を 60 °C で 4 時間穏やかに振蕩した。この混合液を室温下で放置した後、酵素反応を行った。

・ α -アミラーゼによる酵素反応

調製した複合基質溶液 300 μ L、pH 5 の酢酸緩衝液 40 μ L (200 mM)、精製水 50 μ L を混合させ、これに *Aspergillus oryzae* 由来の α -アミラーゼ (天野エンザイム) を溶かした 10 μ L の酵素溶液 (0.12 g / 500 μ L) を滴下することで反応を開始した。ブランク実験には酵素溶液の代わりに 10 μ L の精製水を添加した。反応終了後は反応液 (350 μ L) とアセトニトリル (150 μ L) を混合した後、4 °C 下で保存しすぐに分析を行った。

②既存の酵素反応解析モデルを活用した実験手順の簡略化

解析モデルを活用した酵素反応においては、酵素反応の初期反応条件 (糖供与体の選択、糖供与体初期濃度、反応温度) を、酵素反応解析モデルに基づく反応シミュレーションにより、糖供与体環境を推算した上で α -アミラーゼによるグリコシル化反応に適した条件を設定した (Scheme 3-2)。

・酵素反応解析モデルに基づく反応条件の設定

本章では、実験検証の前に、2 種の異なる計算予測工程 1 (Cal.1) あるいは 2 (Cal.2) を行い、反応系中におけるアミロースあるいはオリゴ糖の濃度挙動の推算を行った。Cal.1、Cal.2 いずれの場合も糖供与体であるアミロース、オリゴ糖のみが存在することを想定した。これにより得られた反応挙動の推算値のうち、目的とする APGs の調製に有利な条件を選択する。選択した反応条件を基に、実験検証工程 1 (Exp.1) あるいは 2 (Exp.2) を行い、反応生成物の挙動を TLC、HPLC、MALDI-TOF MS により反応追跡した。

計算予測工程

計算工程は、それぞれ用いる α -アミラーゼの由来、および実験的に行う反応条件に関連した解析モデルを選択した。それぞれ用いた解析モデルにより、計算検証工程 1 (Cal.1) あるいは 2 (Cal.2) と称する。Cal.1 では重合度 10 のアミロースを基質とした *Aspergillus oryzae* 由来の α -アミラーゼによる多重攻撃型 (M.A.) 加水分解反応を想定した (Fig.3-10)。

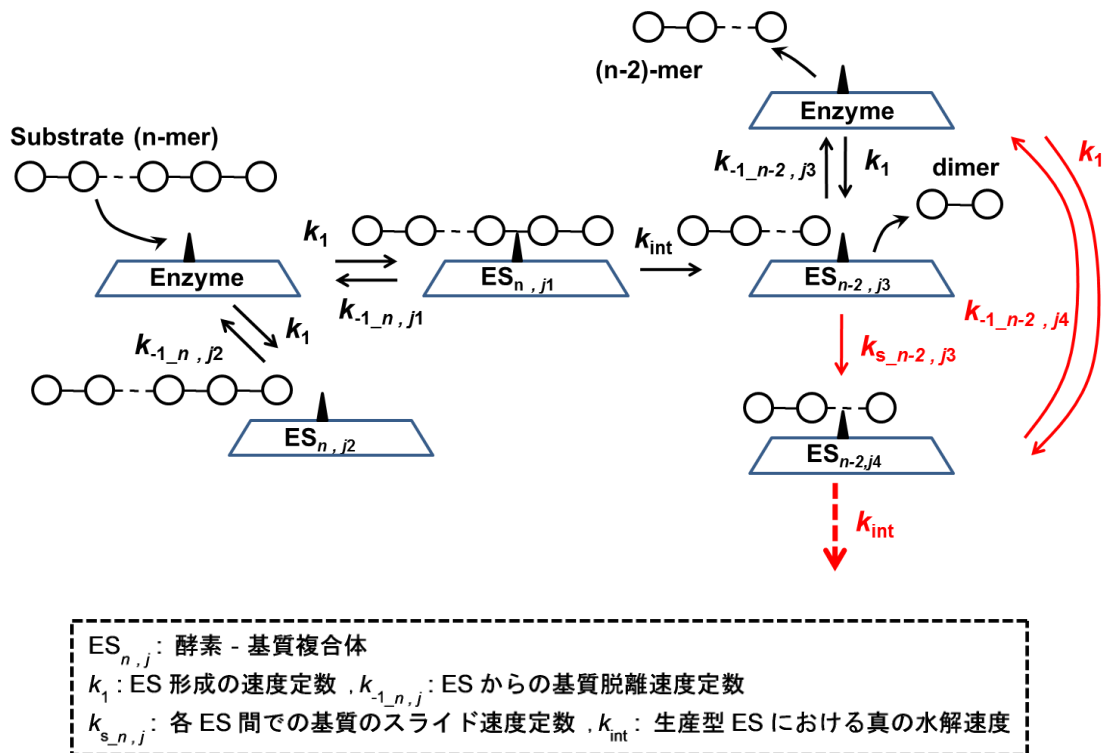


Fig.3-10 α -アミラーゼによる多重攻撃型 (M.A.) 加水分解反応機構

Cal.2 では重合度 2~4 のオリゴ糖を基質とした *Bacillus subtilis* 由来の α -アミラーゼによる加水分解、糖転移、縮合反応を想定した (Fig.3-11)。

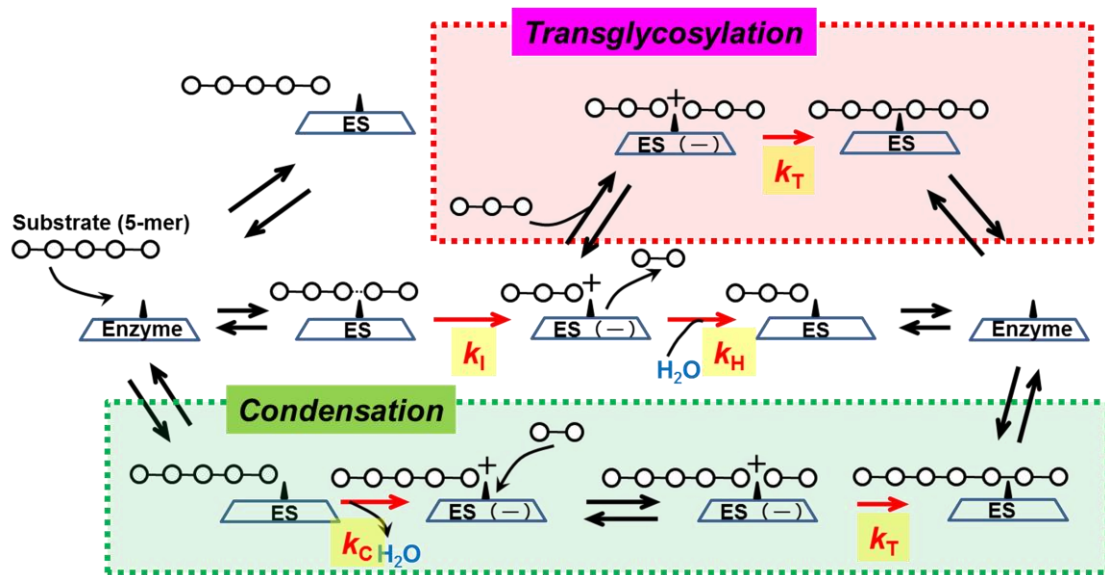


Fig.3-11 *Bacillus subtilis* 由来の α -アミラーゼによる加水分解、糖転移、縮合反応を考慮した解析モデルの概要

計算工程 1 (Cal.1)

Cal.1 では、アミロースが α -アミラーゼにより効率的に加水分解される反応機構について速度論に基づいて Kondo ら¹³⁾が提唱したものを、シミュレーションプログラムとして復元し、これに各基質濃度、酵素濃度、反応温度を反応初期条件として入力することで推算を行った。本解析モデルの特徴としては、 α -アミラーゼのサブサイト上において一度開裂したアミロースがそのまま α -アミラーゼ上をスライド（横滑り）する多重攻撃（Multiple Attack）を考慮したものであり、連続してアミロースが加水分解される様子を表現している

計算の際には、反応初期条件として、①反応条件、②酵素のサブサイトパラメータ、③反応速度定数を予め入力して推算を行い、反応時間に対する各重合度の生成物濃度を出力した。計算において用いた反応初期条件①、②、③について、図に準じた表記法で以下に示す。

①初期最大基質重合度 $N=10$ ，初期基質濃度 $[S_N]_0=6.1$ mM, $[S_n]_0=0$ ($n=1\sim N-1$)，初期酵素濃度 $[E]_0=76\sim 760$ nM，反応温度 25 °C

②サブサイト数 $m=9$ ，触媒部位 $r=4$ ，多重攻撃時にスライドするグルコース数 $h=3$ ， $A_1=0.8$ ， $A_2=1.7$ ， $A_3=20.5$ ， $A_4=-15.5$ ， $A_5=0.0$ ， $A_6=13.8$ ， $A_7=5.0$ ， $A_8=-2.9$ ， $A_9=3.3$ kJ/mol (Fig.3-12)

③生産型 ES における真の加水分解速度 $k_{int}=12,000 \text{ min}^{-1}$, $T=k_{s_{n,j}}/k_{-1_{n,j}}=1.0$,
 $H=K_{int} \cdot (k_{int}/k_1)=60$, (K_{int} は全てのサブサイトが基質に覆われる際の結合定数)

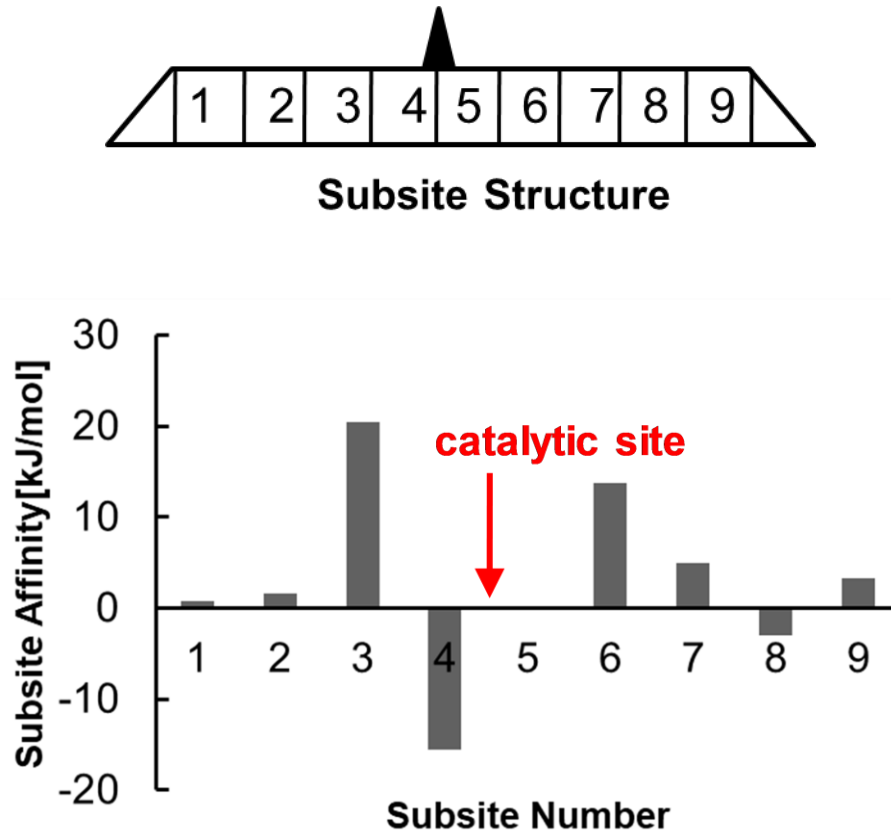


Fig.3-12 *Aspergillus oryzae* 由来の α -アミラーゼのサブサイト構造 (上)
 およびサブサイト親和力 (下)

反応条件①は実際に検証する実験条件に合わせたパラメータとした。サブサイトパラメータ②は文献値¹³⁾のパラメータをそのまま用い、速度論パラメータは文献値¹³⁾のパラメータをもとに実験的に得られたデータと適合性のある範囲のパラメータを採用した。

計算工程 2 (Cal.2)

Cal.2 は低重合度のオリゴ糖を基質とした α -アミラーゼによる加水分解、糖転移、縮合反応を想定したモデルであり¹⁵⁾、これを。シミュレーションプログラムとして復元し、これに各基質濃度、酵素濃度、反応温度を反応初期条件として入力することで推算を行った。本解析モデルの特徴としては、反応推移における各

オリゴ糖の濃度変化のみならず、「どの反応経路における寄与が特定の反応時間においてそのオリゴ糖に対して」影響しているかを推測できる点にある。

計算の際には、反応初期条件として、①反応条件、②酵素のサブサイトパラメータ、③反応速度定数を予め入力して推算を行い、反応時間に対する各重合度の生成物濃度を出力した。計算において用いた反応初期条件①、②、③について、Fig.3-13 に準じた表記法で以下に示す。また、今回は重合度 2、3、4 のオリゴ糖が単独で反応初期段階において基質として存在する系をそれぞれ別々に推算したため、これらを G2、G3、G4 系として以下にその条件を記した（②、③については共通のため、①のみ個別に示した）。

G2 系

① 初期最大基質重合度 $N=2$, 初期基質濃度 $[S_N]_0=1.0 \text{ M}$, $[S_n]_0=0$ ($n=1\sim N-1$), 初期酵素濃度 $[E]_0=10 \text{ }\mu\text{M}$, 想定最大基質重合度 $N_m=9$, 反応温度 25°C

G3 系

① 初期最大基質重合度 $N=3$, 初期基質濃度 $[S_N]_0=1.0 \text{ M}$, $[S_n]_0=0$ ($n=1\sim N-1$), 初期酵素濃度 $[E]_0=10 \text{ }\mu\text{M}$, 想定最大基質重合度 $N_m=9$, 反応温度 25°C

G4 系

① 初期最大基質重合度 $N=4$, 初期基質濃度 $[S_N]_0=1.0 \text{ M}$, $[S_n]_0=0$ ($n=1\sim N-1$), 初期酵素濃度 $[E]_0=10 \text{ }\mu\text{M}$, 想定最大基質重合度 $N_m=9$, 反応温度 25°C

② サブサイト数 $m=4$, 触媒部位 $r=3$, $A_1=9.22$, $A_2=13.4$, $A_3=5.78$, $A_4=-2.18 \text{ kJ/mol}$ (Fig.3-13)

③ $k_1=3,420 \text{ min}^{-1}$, $k_T/k_H=1,154.0$, $k_C=0.0$

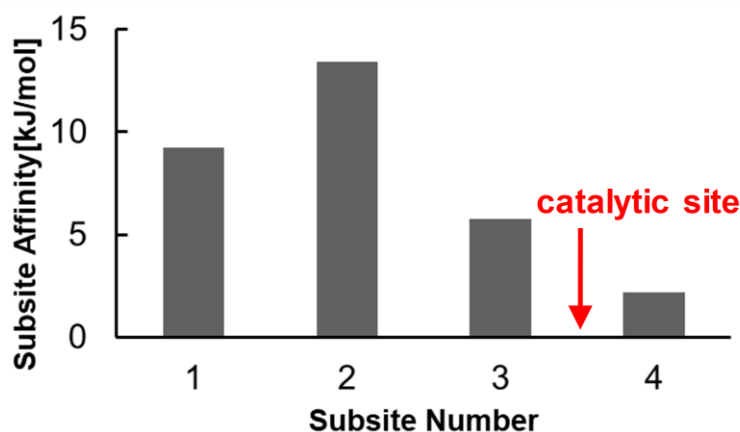


Fig.3-13 *Bacillus subtilis* 由来の α -アミラーゼのサブサイト親和力

反応条件①は実際に検証する実験条件に合わせたパラメータとした。サブサイトパラメータ②は文献値¹⁵⁾のパラメータをそのまま使い、速度論パラメータは文献値¹⁵⁾のパラメータをもとに実験的に得られたデータと適合性のある範囲のパラメータを採用した。

実験検証工程

実験工程 1 (Exp.1)

実験検証工程 1 (Exp.1) は、解析モデル適用性を確認するための工程であり、基質であるアミロースの濃度が 1.0wt%で反応を行い、アミロースの加水分解物の挙動を HPLC により追跡した (糖受容体である C₈OGlc は添加しない)。

・ C₈OGlc 添加しない工程

反応は、1.5wt%で調製した 67 μL のアミロース A 水溶液 (ナカライテスク)、10 μL の pH 5 の酢酸緩衝液 (200 mM)、22 μL の精製水を混合させ、これに *Aspergillus oryzae* 由来の α-アミラーゼ (Sigma-Aldrich) を溶かした 1 μL の酵素溶液 (3.8 mg / 1 mL) を滴下することで反応を開始し、インキュベーターで 25 °C に保った。ブランクは酵素溶液の代わりに 1 μL の精製水を添加した。反応終了時は、反応液 100 μL に対し、0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液 (50 μL) を加えた後、HPLC 分析で用いる溶離液と同じ組成になるように 225 μL のアセトニトリルを加え、4°C 下で保存しすぐに分析を行った。分析は TLC (Silica gel 60 F254、展開溶媒:アセトニトリル/水=85/15)および HPLC(カラム:NH2P-50,4.6 mm φ×250 mm、溶離液:アセトニトリル/水=6/4、流量:0.8 mL/min、温度 40°C) で行った。

・ C₈OGlc 添加した工程

反応は、アミロースを糖供与体とし、初期酵素濃度[E]₀と初期基質濃度[S₁₀]₀の比、[E]₀/[S₁₀]₀を 10⁻⁵とし、糖受容体である C₈OGlc の濃度を 10 mM に設定した。20 mM, pH5.0 の酢酸緩衝液存在下で 25 °C に保って反応を行い、反応開始 1 時間後にサンプリングを行った。

実験工程 2 (Exp.2)

実験検証工程 2 (Exp.2) は計算工程 2 (Cal.2) で得られた反応予測の知見を基に、17~39wt%の高濃度 (糖供与体、糖受容体、酵素混在下) 反応条件下で、反応初期段階で生成する高重合度 APGs の挙動を容易に観測しやすい反応手順とした。本反応系で検証する糖供与体 (糖鎖 2~4) の影響を見るために、酵素製剤に含ま

れる澱粉を予め除去した（**酵素製剤の前処理**）。それ以外の試薬は市販の状態でのまま用いた。

Exp.2 の特徴は、予め段階的に糖供与体、酵素、糖受容体を混合した状態で複合体粉末とした上で、その複合体粉末に緩衝液を含む水を添加することで酵素反応を開始する点にある（**複合体粉末の調製**）。

* 酵素溶液の調製

（*Bacillus subtilis* 由来の α -アミラーゼの分子量を 41,900¹⁵⁾ として計算）

前述で前処理した α -アミラーゼ粉末（244 mg）を蒸留水（2 mL）に溶かし、以降酵素溶液として用いた（2.91 mM 相当）。

* 糖受容体（C₈OGlc）水溶液の調製

95 mg の C₈OGlc を 12.8 mL の蒸留水に溶かし、糖受容体溶液として用いた（25 mM）。

【複合体粉末の調製】

複合体粉末の調製工程は、A（糖供与体と酵素の複合化：Gn.-En.）の後に、B（Gn.-En.と糖受容体の複合化：(Gn.-En.)-Ac.）の手順で行った。

A（糖供与体と酵素の複合化：Gn.-En.）

・(マルトース)-(α -アミラーゼ)複合体：G2.-En.

氷冷下で、マルトース水和物（342 mg, 0.949 mmol）を入れた 50 mL ナスフラスコに、4 mL の蒸留水、500 μ L の酵素溶液を加えた後 10 分間静置した。その後、溶液をナスフラスコ内で薄膜ができるように凍結させ、凍結乾燥機により溶媒を除去した。

・(フジオリゴ#360)-(α -アミラーゼ)複合体：G3.-En.

氷冷下で、フジオリゴ#360 シロップ（556 mg, 1.10 mmol 相当）を入れた 50 mL ナスフラスコに、4 mL の蒸留水、500 μ L の酵素溶液を加えた後 10 分間静置した。その後、溶液をナスフラスコ内で薄膜ができるように凍結させ、凍結乾燥機により溶媒を除去した。

・(フジオリゴ#470)-(α -アミラーゼ)複合体：G4.-En.

氷冷下で、フジオリゴ#470 シロップ（717 mg, 1.08 mmol 相当）を入れた 50 mL ナスフラスコに、4 mL の蒸留水、500 μ L の酵素溶液を加えた後 10 分間静置した。その後、溶液をナスフラスコ内で薄膜ができるように凍結させ、凍結乾燥機により溶媒を除去した。

B（Gn.-En.と糖受容体の複合化：(Gn.-En.)-Ac.）

• **(G2.-En.)-(C₈OGlc)複合体 : (G2.-En.)-Ac.**

氷冷下で、G2.-En.を入れたままの 50 mL ナスフラスコに、4 mL の糖受容体溶液を加えた後 10 分間静置した。その後、溶液をナスフラスコ内で薄膜ができるように凍結させ、凍結乾燥機により溶媒を除去した (365 mg, G2 : En. : Ac. ≈ 1,000 : 1 : 100)。

• **(G3.-En.)-(C₈OGlc)複合体 : (G3.-En.)-Ac.**

氷冷下で、G3.-En.を入れたままの 50 mL ナスフラスコに、4 mL の糖受容体溶液を加えた後 10 分間静置した。その後、溶液をナスフラスコ内で薄膜ができるように凍結させ、凍結乾燥機により溶媒を除去した (466 mg, G3 : En. : Ac. ≈ 1,000 : 1 : 100)。

• **(G4.-En.)-(C₈OGlc)複合体 : (G4.-En.)-Ac.**

氷冷下で、G4.-En.を入れたままの 50 mL ナスフラスコに、4 mL の糖受容体溶液を加えた後 10 分間静置した。その後、溶液をナスフラスコ内で薄膜ができるように凍結させ、凍結乾燥機により溶媒を除去した (648 mg, G4 : En. : Ac. ≈ 1,000 : 1 : 100)。

* これら複合体粉末は冷凍庫で保存した。

【酵素反応の手順】

反応は、各複合体粉末(Gn.-En.)-Ac. (104 mg) に 16 μL の酢酸緩衝液 (pH 5, 200 mM)、144 μL の蒸留水を混合させ、インキュベーターで 25 °C に保って行い、観測時間ごとに反応溶液から 20 μL ずつサンプリングを行った。ブランクは複合体粉末調製時に酵素溶液の代わりに精製水を添加した。サンプリングは 15 分から 18 時間の間で行い、以下に述べる抽出法を行った後に TLC および MALDI-TOF MS により、APG 生成挙動に着目して観測を行った。

【APG 抽出法とその分析法】

サンプリングした反応液 (20 μL) を冷アセトン (400 μL) 中に滴下して振盪した後、10 分間静置し、上澄み層と沈澱層に分けた。その後、それぞれを 80 °C 下で乾燥させ、4 °C 下で保存した。得られたそれぞれの固体に 10 μL の蒸留水を加え振盪した後に、TLC および MALDI-TOF MS で分析した。TLC (Silica gel 60 F254、展開溶媒 : 水/*n*-プロパノール=1/3) では、APGs のスポット領域に注目して観測を行った。また、反応溶液中に存在する生成物の分子量解析を MALDI-TOF MS により行った際は、マトリックスに DHB を用いた。

3.5 引用文献

- 1) H. Renata, Z. J. Wang and F. H. Arnold, *Angewandte Chemie International Edition*, **54**, 3351 (2015).
- 2) B. Arora, J. Mukherjee and M. N. Gupta, *Sustainable Chemical Processes*, **2**, 25 (2014).
- 3) R. D. Gupta, *Sustainable Chemical Processes*, **4**, 2 (2016).
- 4) Shoda, in “Enzymatic Glycosylation. in *Glycoscience*”, Franser-Reid, B. O., K. Tsuruta, J. Theim, eds. Springer, Heidelberg : Vol. II, p. 1465 (2001).
- 5) G. J. Davies, S. J. Charnock and B. Henrissat, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **13**, 105 (2001).
- 6) K. Hiromi *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, **302**, 362 (1973).
- 7) J. A. Thoma *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, **246**, 5621 (1971).
- 8) A. Kobayashi, H. Itoh and S. Shoda, *Chemistry Letters*, **34**, 1384 (2005).
- 9) 伊藤博, 東北大学大学院修士論文, (2002).
- 10) T. Kuriki *et al.*, *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 155 (2006).
- 11) 山本憲司, 東北大学大学院修士論文, (2008).
- 12) H. Kondo *et al.*, *The Journal of Biochemistry*, **84**, 403 (1978).
- 13) H. Kondo *et al.*, *The Journal of Biochemistry.*, **87**, 1053 (1980).
- 14) R. Matsuno *et al.*, *The Journal of Biochemistry*, **83**, 385 (1978).
- 15) H. Fujimori *et al.*, *The Journal of Biochemistry*, **82**, 417 (1977).

第 4 章

酵素工学に基づく澱粉関連酵素 の反応特性の評価

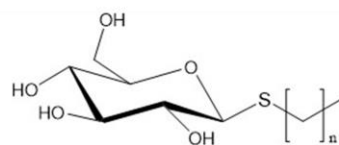
4.1 緒言

序論で述べたように、酵素の潜在的反応特性 (Enzyme Promiscuity) を活用した新たな機能性糖質の開発あるいは酵素の基質特異性などの機能評価を行う場合、対象となる酵素にとっての天然型の基質のみならず非天然型基質を用いて反応特性の評価が行われる^{1,2)}。第3章における α -アミラーゼによるグリコシル化反応においても、非天然型基質である *n*-octyl β -D-glucopyranoside (C_8OGlc) を酵素反応系内における糖受容体とした酵素的グリコシル化反応の評価を試みた。アグリコン部位に疎水性のアルキル基を有する糖脂質である C_8OGlc は、本来オリゴ糖を天然型の基質とする α -アミラーゼにとっては好ましい基質とは言えない³⁾。しかし、3章で述べたように、糖供与体であるアミロースやオリゴ糖との基質複合化や、計算モデルを活用した糖供与体環境の最適化により、ある種の α -アミラーゼが非天然型基質である C_8OGlc を糖受容体として認識しうることを確認した。そこで、次に非天然型基質に対する α -アミラーゼの基質認識性や Enzyme Promiscuity についてのさらなる評価を試みた。その際、 α -アミラーゼのグリコシル化特性に対するアルキルグリコシドのアグリコン部位のアルキル鎖の影響に焦点を当て検証を行った。本検証を行う際、種々のアルキルチオグリコシド (ATG) を酵素反応における糖受容体として用いた。

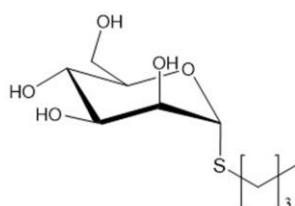
ATG を糖受容体に用いた理由は、以下の4点である。

- (1) ATG は、水溶液中において安定な構造を有する
- (2) 酵素製剤中に含まれる他の加水分解酵素による分解の標的になりにくい⁴⁾
- (3) 一般的な有機化学合成手法⁵⁾により入手が容易
- (4) 第3章で用いた糖脂質 C_8OGlc の結果と比較できる

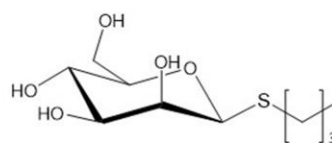
糖受容体には、種々のアルキル鎖を有するアグリコン骨格を選択した。また、種々のグリコン骨格を有する ATG も有機化学合成法により得た。合成により得た各種 ATG の構造を Fig. 4-1 に示す。本章では、これら ATG のうちグリコン部位をグルコース骨格であるものを、 α -アミラーゼのグリコシル化反応の評価に用い、反応追跡および生成物の構造解析を行った。



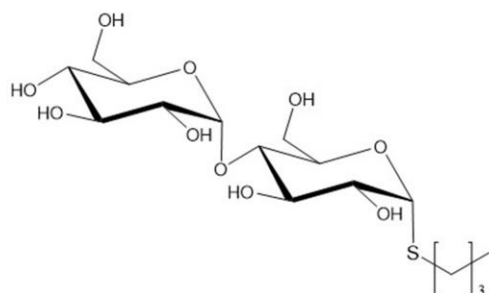
n-alkyl-1-thio-β-D-glucoside (C_n SGlcβ)
($n=0\sim7$)



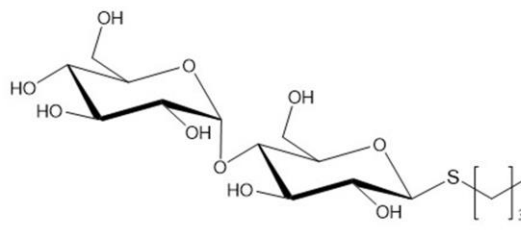
n-butyl-1-thio-α-D-mannoside (C_4 SManα)



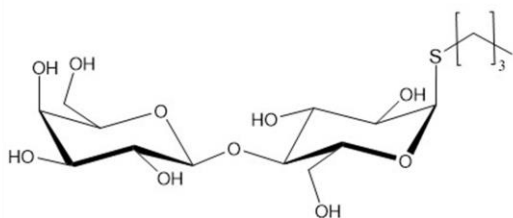
n-butyl-1-thio-β-D-mannoside (C_4 SManβ)



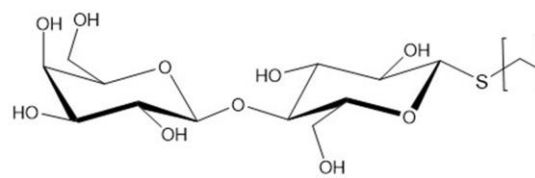
n-butyl-1-thio-α-D-maltoside (C_4 SMalα)



n-butyl-1-thio-β-D-maltoside (C_4 SMalβ)



n-butyl-1-thio-α-D-lactoside (C_4 SLacα)



n-butyl-1-thio-β-D-lactoside (C_4 SLacβ)

Fig.4-1 種々のアグリコンあるいはグリコン部位を有する ATG

4.2 結果と考察

3章までの C_8OGlc を糖受容体としたグリコシル化反応の検証結果で述べてきたように、本酵素反応はきわめて複雑なものであり、その反応産物は目的生成物である APGs のみならず、糖供与体から派生するオリゴ糖の混合物である。そのため、反応中における生成物の濃度追跡はもとより、得られる APGs の構造解析が非常に困難であり、簡便な生成物の分離、分析条件の検討が重要であった。

Fig.4-2 に、 C_8OGlc を糖受容体とした酵素反応溶液（初期基質濃度: $G4 \approx 200$ mM, $C_8OGlc = 10$ mM, 酵素 ≈ 2.0 μ M, 温度 25 $^{\circ}$ C, pH 5.0) を TLC により、その反応の評価を試みた結果を示す。

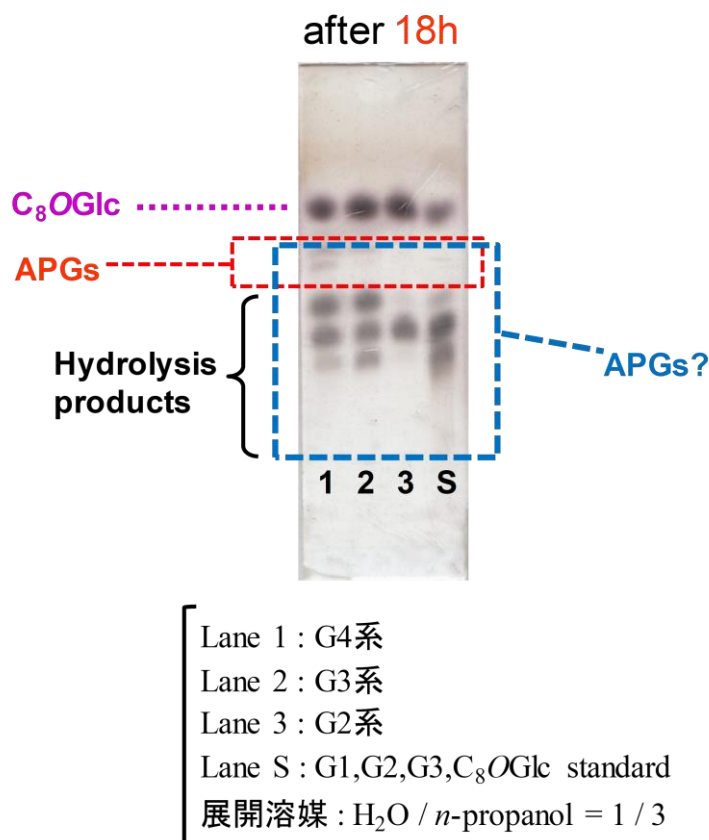


Fig. 4-2 シリカ TLC を用いた酵素反応液中の APGs の観測

初期濃度($G4$: 200 mM, C_8OGlc : 10 mM, 酵素 ≈ 2.0 μ M), 温度 25 $^{\circ}$ C, pH 5.0

TLC の APGs ならびにオリゴ糖のスポットパターン（赤枠および青枠）から確認されるように、TLC 上では APGs とオリゴ糖のスポット領域が重なっていることが予想される。このように、順相系の TLC で分離が困難な化合物群の分析を試みる場合、一般に逆相系のカラムを装着した HPLC により、その反応生成物を評

価することが多い。そこで、まず C_8OGlc あるいはこれと比較が容易な ATG として *n*-octyl 1-thio- β -D-glucopyranoside (C_8SGlc) を糖受容体とする酵素反応の評価を想定し、それぞれの糖受容体の濃度変化が容易に検出可能な分析条件の検討を、逆相カラムを装着した HPLC により試みた。また、溶離液中における不純物の影響を考慮し、検出器として示差屈折計 (RI) に加えてダイオードアレイ検出器 (DAD) でも同時に観測を行った。

4.2.1 アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性

HPLC 測定では MeCN/H₂O 系の溶離液を用い、組成は C_8OGlc , C_8SGlc ともに MeCN/H₂O=30/70 にて分析した。カラムは Mightysil RP-18 GP2 (4.6 ϕ \times 150 mm, 関東化学)を用いた。流速は 1.0 mL/min、サンプルインジェクションは 20 μ L、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C とした。 C_8OGlc と C_8SGlc の混合液 (各 7 mM) を HPLC により、RI もしくは DAD による 200 nm の固定波長で分析した結果を Fig.4-3 に示す。

Fig.4-3(a)より、RI では C_8OGlc および C_8SGlc が共に検出できたのに対し、Fig.4-3(b)の UV (200 nm) では C_8SGlc のみ検出された。明確な発色団を有さない C_8SGlc が紫外短波長領域において、このような吸収特性を示すことは驚くべきことである。そこで、次にこの C_8SGlc の特異な UV 吸収特性が ATG 固有の現象であるかという点について、200~300 nm の領域での UV 吸収スペクトルパターンをそれぞれ比較することでその評価を試みた。評価には、ATG のうちアルキル鎖の炭素鎖長が 4, 6, 8 である $C_{4, 6, 8}SGlc$ と C_8OGlc あるいはグルコース (Glc) を用いた。また、多くの ATG および C_8OGlc が臨界ミセル濃度 (CMC) を有することから^{6,7)}、それぞれのサンプルを CMC 未満の濃度である 1.0 mM の水溶液に調製することで、ATG が単一分子として UV 吸収特性を示すのかという点について確認した。

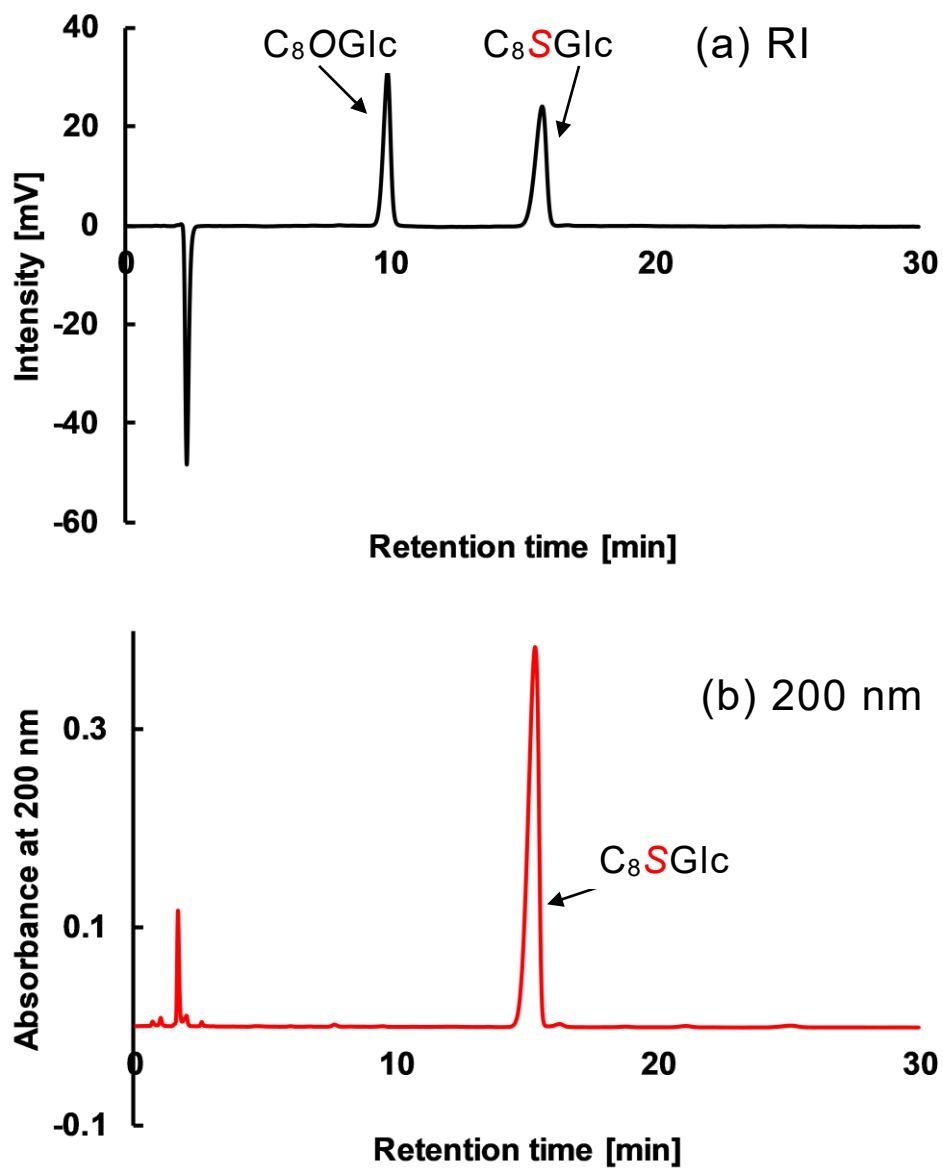


Fig.4-3 C₈OGlc(7 mM)と C₈SGlc(7 mM)の混合溶液に対し、(a) RIあるいは (b) DAD(200 nm)の検出条件で分析を行った HPLC クロマトグラムチャート (カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm), 溶離液: CH₃CN/H₂O = 3/7, 流速: 1.0 mL/min, インジェクション: 20 μL, カラム温度: 40 °C)

Fig.4-4 に、各種 ATG および C₈OGlc、Glc の水溶媒下における紫外吸収スペクトルを示す。C₈OGlc および Glc の場合はほぼ吸光度を示さないのに対し、各種 ATG の場合は短波長領域に近くなるほど、高い吸光度を示すことがわかった。また、それぞれの ATG はほぼ同様のスペクトルパターンを示すことがわかった。このことから糖化合物のうち、チオグリコシドである ATG が紫外短波長領域において特異な吸収特性を有することが示唆された。

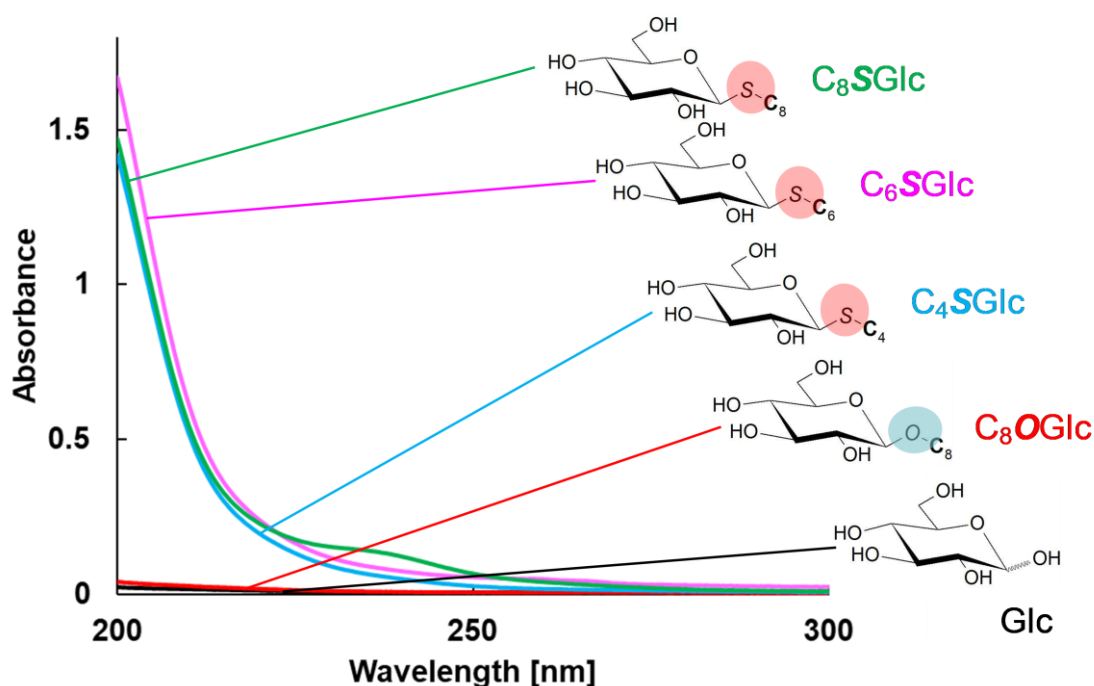


Fig.4-4 各種 ATG (C₄, ₆, ₈SGlc) および C₈OGlc、グルコース (Glc) の水溶媒下における紫外吸収スペクトル (各 1.0 mM 水溶液)

これまで、*p*NP 化糖のような明確な発色団を有する糖化合物以外の糖を酵素反応における基質とする場合、HPLC などにより酵素反応の評価を行う際は、一般的には RI を検出条件とし、その反応産物の確認や濃度追跡を行うことが多かった。そのため、微量の酵素反応産物の検出が困難になることが多く、また HPLC 分析中にその溶離液の組成を徐々に変えていくグラジエント溶出法を用いることができなかった。しかし、このように ATG が単一分子として UV 吸収特性を有するのであれば、検出条件を UV 検出器とし、感度良くかつ効率的に HPLC により

酵素反応産物の評価を行うことが期待できる。そこで、次に各種 ATG (C₄, C₆, C₈SGlc) の混合溶液に対し、グラジエント溶出法で HPLC により分析を行った (Fig.4-5)。

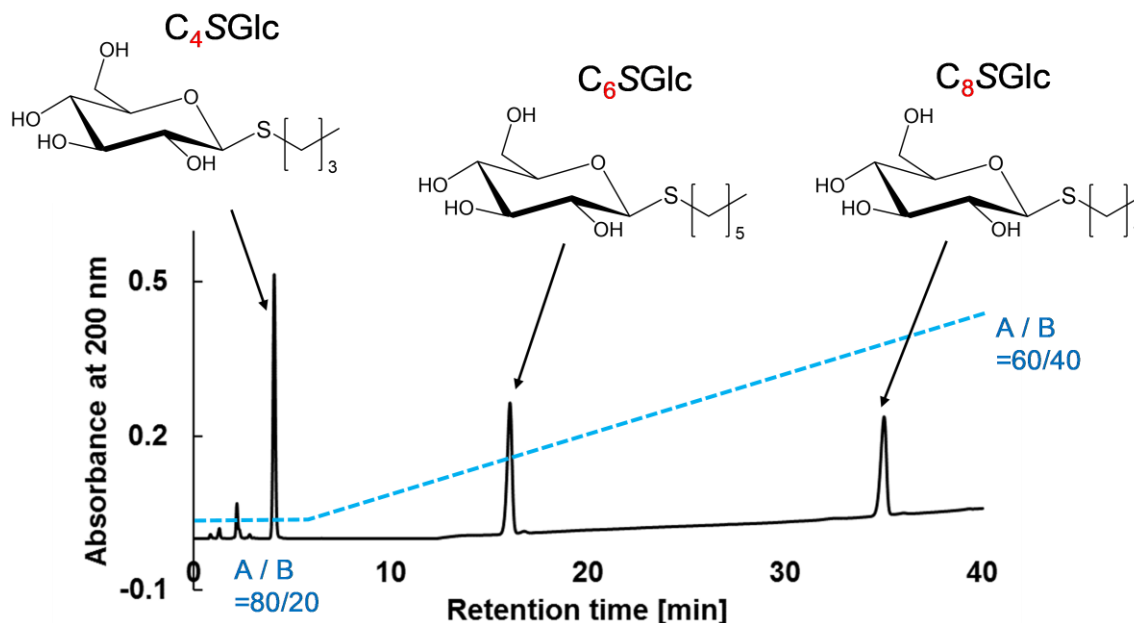


Fig.4-5 各種 ATG (C₄, C₆, C₈SGlc) の混合溶液に対して DAD(200 nm)の検出条件でグラジエント分析を行った HPLC クロマトグラム

(カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm), 溶離液: H₂O(A)/ CH₃CN(B) = 80/20 → 60/40 (Linear Gradient), 流速: 0.8 mL/min, インジェクション: 20 μL, カラム温度: 40 °C, 検出条件: DAD (200 nm))

分析は、最初に溶離液を H₂O/ CH₃CN = 80/20 の組成として 5 分間、0.8 mL/min の流速で流した後、35 分間かけて溶離液の組成を H₂O/ CH₃CN = 60/40 へとリニアグラジエントでの溶出を行い、検出は 200 nm の固定波長に設定した DAD により行った。HPLC クロマトグラムからわかるように、各種 ATG が逆相カラムに対するそれぞれの親和性に対応して溶出したことを UV 検出条件で確認できた。これは、これまで困難としてきた本酵素反応系における各種酵素反応産物 (ATG, APGs, オリゴ糖) の分離、分析条件の検討課題が、それぞれの反応産物に対するカラムの親和性と UV 検出を組み合わせることで比較的容易に解決可能であり、これまで RI 検出条件では見逃しがちであった微量の酵素反応産物の検出が可能になることを示唆している。

一方で、これら ATG の UV 吸収特性がその分子構造とどのような相関性を示すのか、あるいは、どのようなメカニズムで UV 吸収特性を示すのかということを知ることは、ATG を本酵素反応の評価におけるラベル化糖受容体として活用する際に重要となる。ここで、ATG と同様に硫黄原子に由来し、紫外短波長領域において特異的な吸収を示すものとしてジアルキルスルフィドに関する報告例がある^{8,9)}。ジアルキルスルフィドの UV 吸収メカニズムとしては $n \rightarrow \sigma^*$ 遷移に起因するものと報告されており⁸⁾、ATG も同様に $n \rightarrow \sigma^*$ 遷移機構により、UV 吸収特性を示すのではないかと考えた (Fig.4-6)。

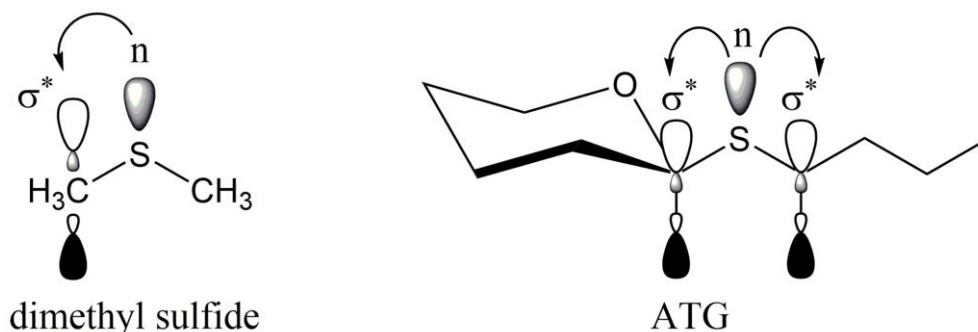


Fig.4-6 ジメチルスルフィドおよび ATG の $n \rightarrow \sigma^*$ 遷移機構

Fig.4-6 に示すように、ATG の UV 吸収特性が糖骨格側の酸素原子を含む S-C-O 結合近傍の反結合性軌道 (σ^*) と硫黄原子の孤立電子対 (n) の相互作用に起因するのならば、¹H NMR におけるアノマー位近傍のビシナル水素原子核のスピン結合定数 ($^3J_{1,2}$) が他のグリコシドとは異なる値を示すと考えられる。一般に、糖分子が安定な椅子型の配座をとるとき、糖のリングプロトンで観測される $J_{1,2}$ の大きさは、互いにトランスの位置にあるときは 7~9 Hz、ゴーシュの位置にあるときは 2~4 Hz の大きさとなる。グルコピラノース型のように ⁴C₁ 立体配座を取る場合は、H-1 と H-2 がゴーシュの配置にある α -アノマーでは ¹H NMR における $J_{1,2}$ が 3.0~3.5 Hz、トランスの配置にある β -アノマーでは $J_{1,2}$ が 7.0~8.0 Hz となり、これによりアノメリック配置を決定することができる¹⁰⁾。そこで、¹H NMR から得られる $J_{1,2}$ の知見から ATG の S-C-O 結合近傍におけるコンフォメーションの特異性が評価できるか比較検証を行った。Table 4-1 に、¹H NMR から算出した各種 ATG および単糖、2 糖、O-グリコシドの H-1 および H-1' のケミカルシフトと $J_{1,2}$ の値を示す。

Table 4-1 アノメリックプロトンのケミカルシフト^aとスピン結合定数($J_{1,2}$, Hz)^b

Compound	Anomeric proton		Glycosidic proton		Glycosidic bond
	H-1 α	H-1 β	H-1	H-1'	
Glc	5.21 (4.0)	4.62 (8.0)			
Mal	5.21 (4.0)	4.64 (7.6)		5.40 (4.4)	
Man	5.15 (1.6)	4.87 (-)			
C ₈ OGlc β			4.40 (7.6)		Sugar-O-Alkyl
C ₁ SGlc β			4.41 (9.6)		Sugar-S-Alkyl
C ₂ SGlc β			4.49 (9.6)		Sugar-S-Alkyl
C ₃ SGlc β			4.51 (10)		Sugar-S-Alkyl
C ₄ SGlc β			4.53 (9.6)		Sugar-S-Alkyl
C ₅ SGlc β			4.51 (9.6)		Sugar-S-Alkyl
C ₆ SGlc β			4.52 (9.6)		Sugar-S-Alkyl
C ₇ SGlc β			4.51 (10)		Sugar-S-Alkyl
C ₈ SGlc β			4.52 (9.6)		Sugar-S-Alkyl
C ₄ SMal (α , β)			α 5.37 (4.0) β 4.52 (10)	5.39 (4.0)	Sugar-S-Alkyl
C ₄ SLac (α , β)			α 5.37 (5.6) β 4.50 (10)	4.41 (7.6)	Sugar-S-Alkyl
C ₄ SMan (α , β)			α 5.26 (1.2) β 4.81 (-)		Sugar-S-Alkyl

^a 内部標準として HOD (4.79 ppm) を用いた。^b 室温下で D₂O を用いて測定。

それぞれの $J_{1,2}$ の値を比較した際、 C_4SMan を除く各種 ATG の β -グリコシドの $J_{1,2}$ の値が、各種単糖、2 糖、 O -グリコシドに比べて約 2 Hz 大きいことが示された。このことから、ATG (特に β -グリコシド型) の糖骨格側の酸素原子を含む S-C-O 結合近傍においてチオグリコシド特有の構造のひずみやゆがみがあり、これが ATG の UV 吸収特性に起因していることが示唆された。そこで、この仮説を支持するための検証として、Gaussian 09 による時間依存密度汎関数法 (TD-DFT)¹¹⁾ による計算化学的な見地から ATG の構造特異性について検証を行ったところ、S-C-O 結合の硫黄原子の孤立電子対が糖環内酸素に引き付けられることで、 π 電子共役系の特性を有することが示唆された¹²⁾。そこで、次に ATG の UV 吸収特性がチオグリコシドにとってより普遍的な現象なのか、特に、S-C-O 結合近傍のであるアグリコン、アグリコン部位の構造により、その UV 吸収特性がどのような影響を受けるのかという点について実験的に検証を行った。次節では、ATG のアグリコン部位におけるアルキル鎖長の UV 吸収特性への影響、グリコン部位における構造の影響について、各種 ATG の UV スペクトルパターンの比較を行うことで検証した結果について述べる。

4.2.2 アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性における構造の影響

本節では、ATG にとって UV 吸収特性が普遍的な現象なのかということについて、さまざまなグリコン、アグリコン構造を有する ATG を用い、化学構造の違いによる影響から UV 吸収特性の評価を行った結果について述べる。本節における検証の狙いは、ATG の UV 吸収特性が ATG のどのような構造部位により影響を受けるのかということを確認した上で、酵素的グリコシル化反応におけるラベル化糖受容体として活用することができるのかということを検証することにある。

○ UV 吸収特性に対する ATG のアグリコン部位構造の影響

・ UV 吸収特性に対するアルキル鎖長の影響

まず、 $C_nSGlc\beta$ ($n = 1 \sim 8$) の UV スペクトルを測定し、アグリコン部位におけるアルキル炭素鎖長が ATG の UV 吸収特性に及ぼす影響を調べた。Fig.4-7 に、1.0 mM の水溶液に調製した $C_nSGlc\beta$ ($n = 1 \sim 8$) の UV スペクトルを示す。

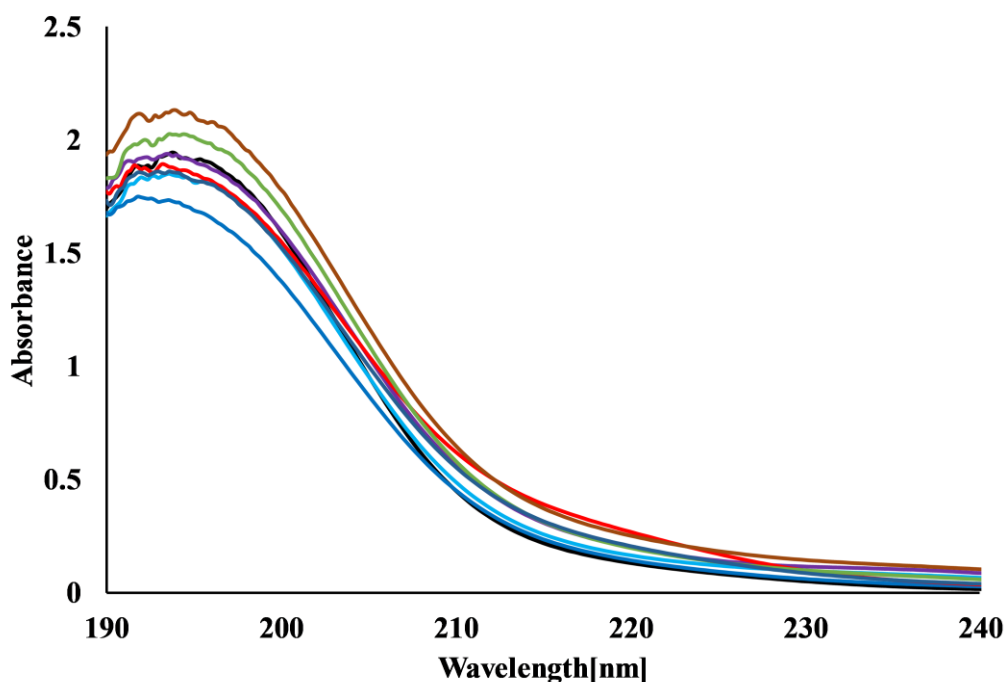
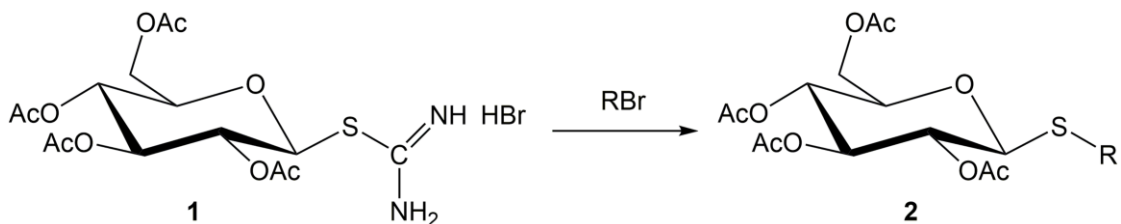


Fig.4-7 1.0 mM の各種 ATG ($C_1\sim_8SGlc$) 水溶液の紫外吸収スペクトル
($C_1SGlc\beta$: 黒色、 $C_2SGlc\beta$: 水色、 $C_3SGlc\beta$: 青色、 $C_4SGlc\beta$: 紫色、
 $C_5SGlc\beta$: 赤色、 $C_6SGlc\beta$: 緑色、 $C_7SGlc\beta$: 紺色、 $C_8SGlc\beta$: 茶色)

いずれのアルキル炭素鎖長の $C_nSGlc\beta$ を用いた場合でも、ほぼ同様の UV 短波長領域に高い吸光度を示すスペクトルを得た。また、それぞれの $C_nSGlc\beta$ 間には僅かな吸光度の違いはあったものの、アルキル炭素鎖長との間に強い相関性は示さなかった。この結果より、アグリコン部位におけるアルキル鎖長の構造の違いが ATG の UV 吸収特性に影響を与えることは無いと考えた。これは、ATG の UV 吸収メカニズムが、Fig.4-6 (右) で示した ATG の $n-\sigma^*$ 遷移機構のうち、硫黄原子の孤立電子対と糖骨格側の反結合性軌道による $n-\sigma^*$ 遷移に起因することを支持している。一方で、Fig.4-7 において観測された $C_nSGlc\beta$ 間の僅かな吸光度の違いについて、合成経路において生じる副産物の混在による影響と仮定し、その影響について検討した。

・ UV 吸収特性に対する合成副産物の影響

着目した合成経路は、イソチオ尿素 臭化水素酸塩 **1** に対するハロゲン化アルキルによるアルキル鎖導入の工程 (Scheme 4-1) であり、副生成物である脱離基の影響であると考えた。



Scheme 4-1 Synthesis of *n*-alkylthiogluco-side tetraacetate(2) from thioiminium salt (1)

そこで、各種 $C_nSGlc\beta$ のうち代表として $C_6SGlc\beta$ を選び、反応後(Scheme 4-1)において水を用いた洗浄により副生成物の除去を十分に行ったものと、不十分であるものを用いてその UV スペクトルの比較を行った(Fig.4-8)。

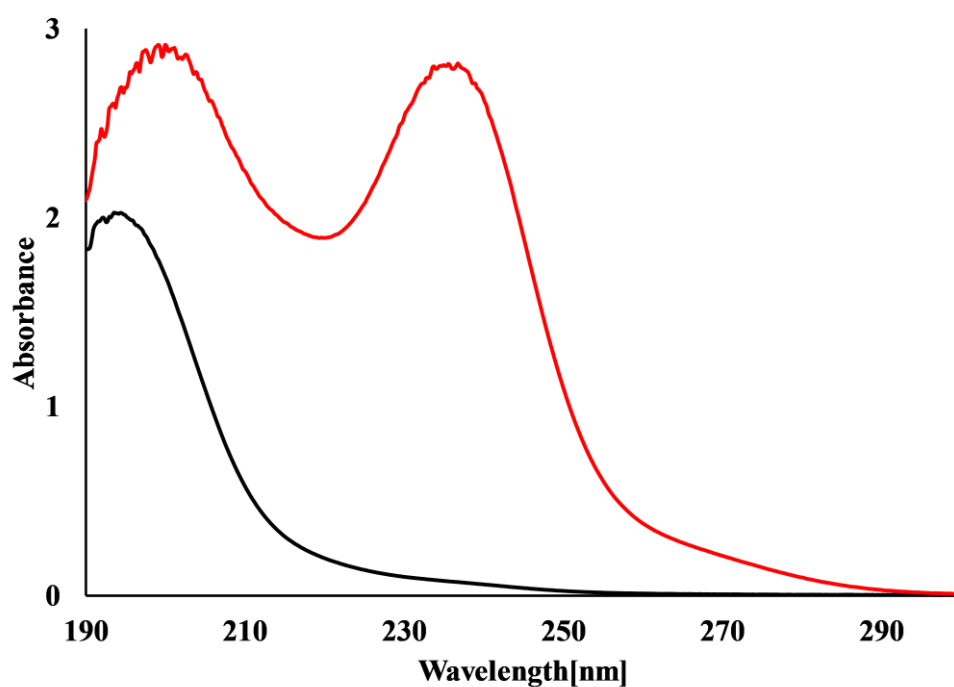


Fig.4-8 1.0 mM の C_6SGlc 水溶液の紫外吸収スペクトル
(不純物混在の $C_6SGlc\beta$: 赤色、精製した $C_6SGlc\beta$: 黒色)

Fig.4-8 における UV スペクトルの比較から、洗浄が不十分な $C_6SGlc\beta$ では 190-210 nm の ATG 特有の吸収ピークに加え、230-250 nm に新たに吸収ピークが生じていることが示された。そこで次に、230-250 nm に新たに生じた吸収ピークが副生成物によるものかという点を HPLC により確認した。Fig.4.9 に、洗浄が十分な

ものと、不十分なものを 200 nm の UV 検出条件で測定した HPLC プロフィールを示す。

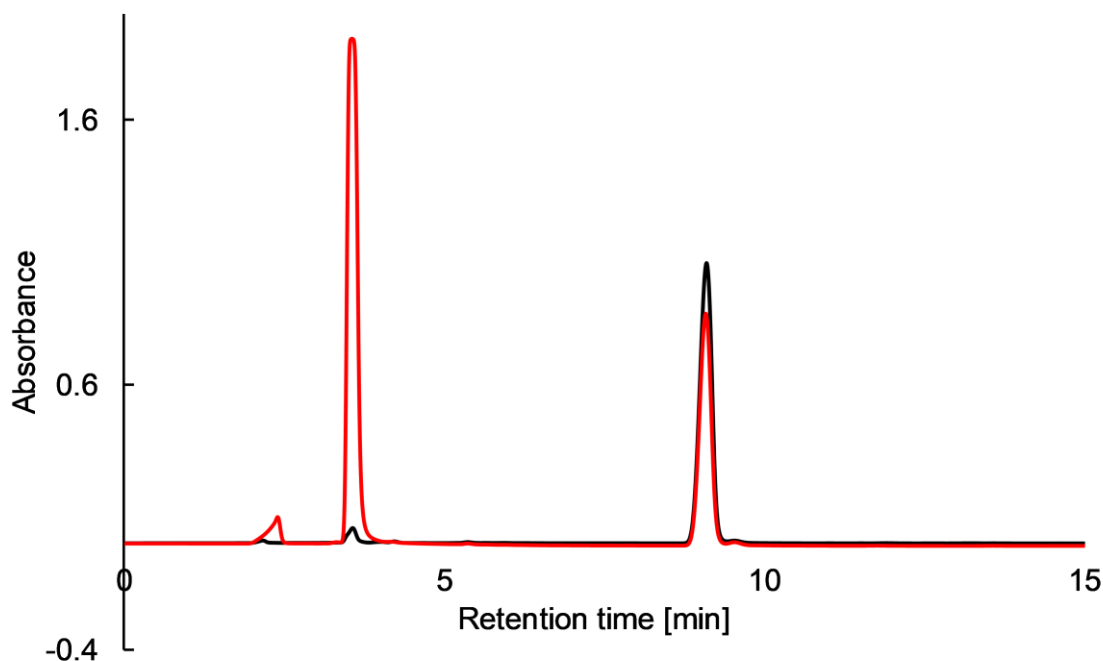


Fig.4-9 HPLC クロマトグラムによる C₆SGlc 水溶液中の不純物の確認

(不純物混在の C₆SGlcβ : 赤色、精製した C₆SGlcβ : 黒色)

【カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 250 mm), 溶離液: H₂O / CH₃CN = 70/30, 流速: 0.8 mL/min, インジェクション: 20 μL, カラム温度: 40 °C, 検出条件: DAD (200 nm)】

Fig.4-9 の HPLC プロフィールにおいて、約 9 分の保持時間で検出されたのは C₆SGlcβ であり、洗浄が不十分なサンプルにおいて検出された約 3.6 分のピークが不純物に由来するものであると考えた。Fig.4-8 および Fig.4-9 の結果から、本有機化学合成ルートで生じる副生成物混在による ATG の UV 吸収特性に対する影響は強いものの、反応後の十分な洗浄により、効果的に除去できることもわかった。このようにアグリコン部位の構造に依存すること無く安定した UV 吸収特性を示す ATG の本特性は、ATG を基質アナログとして使用する場合に、アグリコン部位の構造を自由にデザインできる点で非常に有用である。

○UV 吸収特性に対する ATG のグリコン部位構造の影響

次にグリコン部位における構造に焦点を当て、その構造の違いによる UV 吸収特性への影響について検証を行った。ATG の UV 吸収特性に対するグリコン部位の構造による影響を検証する際、

- ①グリコン部位の 4 位ヒドロキシ基に単糖が置換した場合
- ②糖骨格の C-1 炭素におけるアノマー配置が異なる場合
- ③糖骨格の C-2 炭素に結合するヒドロキシ基の配置が異なる場合

の以上の 3 点に焦点を当て、それぞれの UV スペクトルパターンと ATG の構造の相関性について検証を行った。

・グリコン部位の 4 位ヒドロキシ基に単糖が置換した場合

本項目の検証の趣旨は、ATG に対するグリコシル化産物である APGs の検出感度とその糖鎖長の伸長によって、基質である ATG に比べてその UV 吸収特性が変化するのかということを確認することである。そこで、糖受容体となる ATG である $C_nSGlc\beta$ ($n=1\sim 8$) の UV スペクトルとの比較がしやすいものとして、ATG のグリコン部位を Glc とし、その 4 位置換基に Glc もしくは Gal を導入したグリコン部位が Mal 型あるいは Lac 型の ATG を選び、それぞれの UV 吸収スペクトルを測定した。またこの際、アグリコン部位の構造がアルキル炭素鎖長 4 の $C_4SMal\beta$ と $C_4SLac\beta$ のものを代表として選択し、 $C_4SGlc\beta$ のスペクトルと比較した (Fig.4-10)。

Fig.4-10 より、いずれの ATG もほぼ同様の UV スペクトルを示した。この結果より、ATG のチオグリコシド結合に隣接する糖が Glc の場合、その 4 位置換基が変化しても UV 吸収特性に影響を与えないことがわかった。これはグリコン部位においても、S-C-O 結合近傍から距離が離れば、その UV 吸収特性に影響が出にくいことを示唆している。したがって、本酵素反応系により主に産出されるグリコシル産物 ($\alpha(1-4)$ あるいは $\alpha(1-6)$ グルコシド) であれば、その糖鎖長に影響を受けることなく感度良く UV (200 nm) 検出条件で確認できることが示唆された。

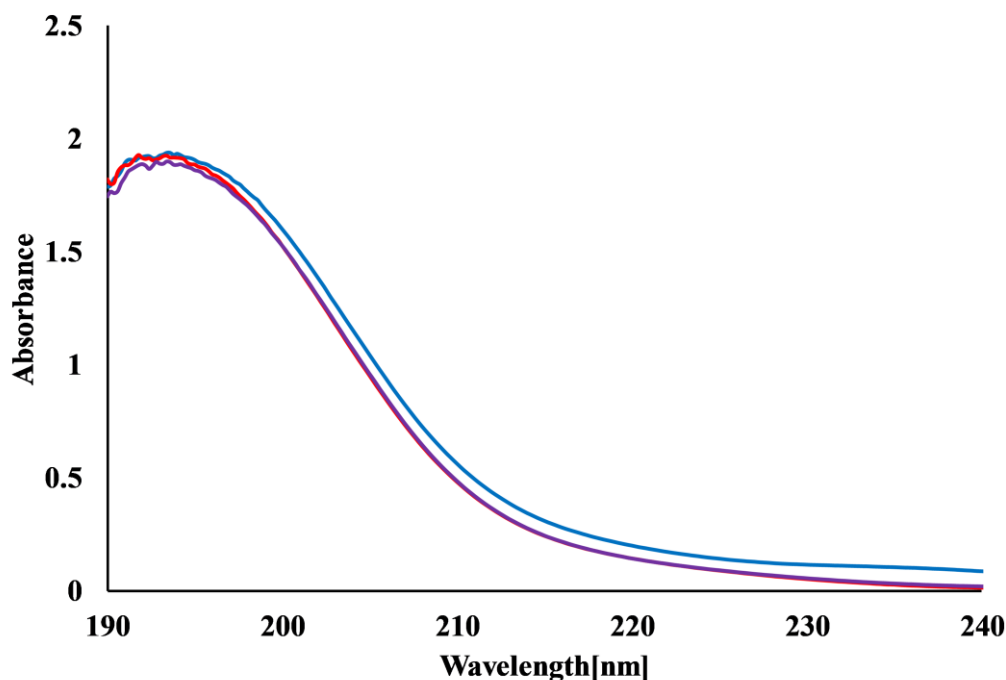


Fig.4-10 1.0 mM の各種 ATG 水溶液の紫外吸収スペクトル
(C₄SGlcβ : 青色、C₄SMalβ : 赤色、C₄SLacβ : 紫色)

・糖骨格の C-1 炭素におけるアノマー配置が異なる場合

次に、糖骨格の C-1 炭素上におけるアノマー配置が異なる場合、ATG の UV 吸収特性に影響が出るのかという点について検証を行った。その際、ATG として C₄SMal および C₄SLac の α-グリコシドと β-グリコシドを用い、それぞれのスペクトルを比較することで UV 吸収特性への影響について検討した (Fig.4-11)。

Fig.4-11 の各スペクトルの比較より、C₄SMal および C₄SLac 共に、α-グリコシドあるいは β-グリコシドで UV スペクトルが異なることがわかる。約 204 nm を境に、190-204 nm の領域で β-グリコシドの ATG が α-グリコシドの吸光度よりも高く、204-240 nm の領域では逆に α-グリコシドの方が β-グリコシドよりも高い吸光度を示すことがわかった。このスペクトルパターンの違いは、C-1 炭素上におけるアノマー配置の違いが、ATG の UV 吸収特性に重要な S-C-O 結合近傍の n-σ*遷移機構に影響を与えることで生じた現象であると考えた。

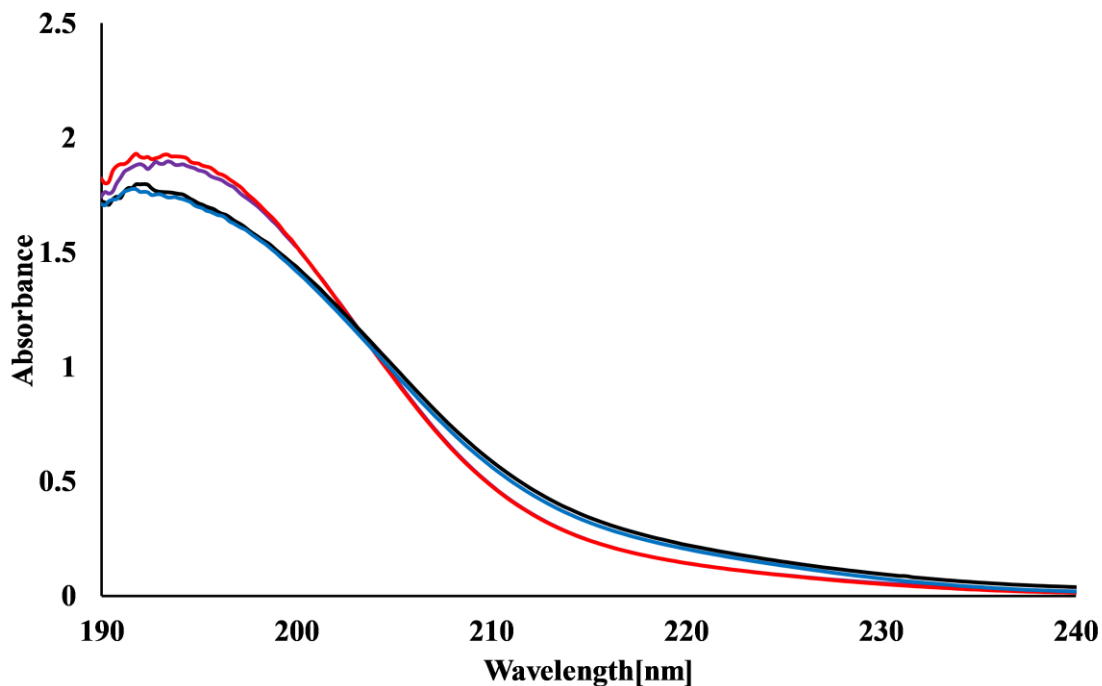


Fig.4-11 1.0 mM の各種 ATG 水溶液の紫外吸収スペクトル
 (C₄SMal β : 赤色、C₄SLac β : 紫色、C₄SMal α : 青色、C₄SLac α : 黒色)

・糖骨格の C-2 炭素に結合するヒドロキシ基の配置が異なる場合

UV 吸収特性に対する C-1 炭素上のアノマー配置の違いによる影響と同様に、S-C-O 結合近傍の電子環境に影響を与えやすい糖骨格の C-2 炭素に結合するヒドロキシ基の配置の違いによる ATG の UV 吸収特性に対する影響について検討した。本検証では、C₄SMan の α -グリコシドと β -グリコシドを用い、それぞれのスペクトルを比較することで UV 吸収特性に対する影響について検討した (Fig.4-12)。

C₄SMan の場合、 α -グリコシドおよび β -グリコシドの各スペクトルで確認された相違が、Fig.4-11 における C₄SMal および C₄SLac の場合とは異なることがわかった。C₄SMan の場合は、190-210 nm の領域で α -グリコシドの ATG が β -グリコシドの吸光度よりも大きく、210-240 nm の領域では α -グリコシド、 β -グリコシド共にほぼ同様の吸光度を示すことがわかった。C-1 炭素上におけるアノマー配置の違いと同様に、糖骨格の C-2 炭素に結合するヒドロキシ基の配置の違いは ATG の UV 吸収特性に強く影響することがわかった。

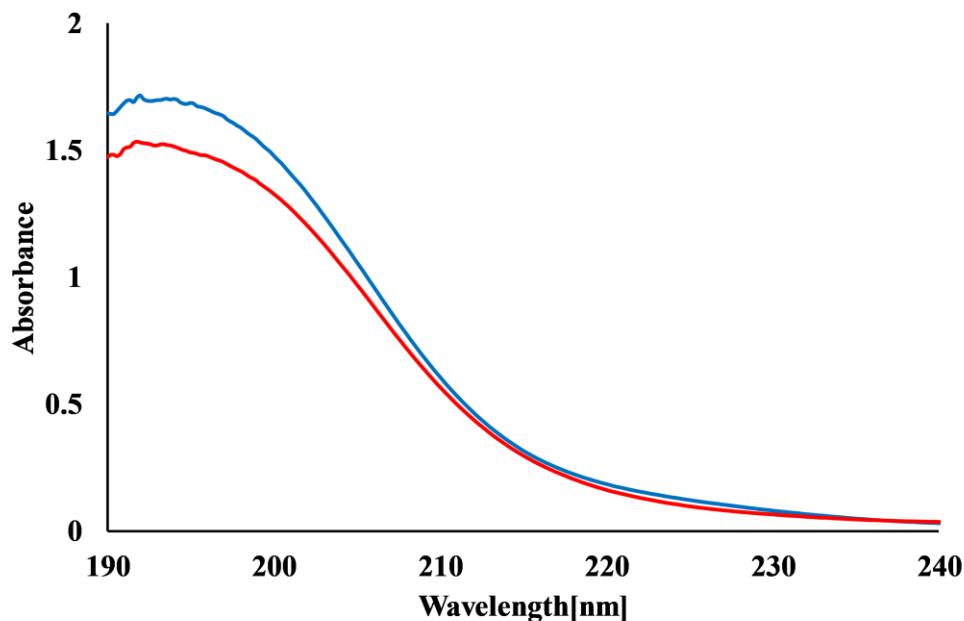


Fig.4-12 1.0 mM の各種 ATG 水溶液の紫外吸収スペクトル
(C₄SMan α : 青色、C₄SMan β : 赤色)

C₄SMal、C₄SLac および C₄SMan を用いたグリコン部位に関する検証から示されたように、C-4 炭素のような ATG の S-C-O 結合から距離が遠くなるほど、UV 吸収特性への影響は小さくなり、C-1 炭素や C-2 炭素のような S-C-O 結合に近くなるほど、UV 吸収特性に対する影響は強くなることがわかった。また、S-C-O 結合に近くなるほど、UV 吸収特性に対する影響は強くなるこの現象は、特に、190-204 nm 領域の超短波長領域において観測しやすく、この波長領域であれば S-C-O 結合近傍における電子環境の変化などを観測できることを示唆していると考えた。

以上のように、ATG は 190-204 nm 領域の超短波長領域において、S-C-O 結合近傍では、その UV 吸収特性に僅かな影響があるものの、HPLC により酵素的グリコシル化反応で生じる微量のグリコシル化産物の反応追跡を行う際、ラベル化糖受容体として十分に活用できる特性を有していることが確認できた。そこで、次節では ATG を糖受容体としたグリコシル化反応の評価手法について述べる。

4.2.3 アルキルチオグリコシドを糖受容体としたグリコシル化反応の評価

前節 4.2.2 で述べたように、ATG の UV 吸収特性は酵素反応評価におけるラベル化基質として活用できる特性を有することがわかった。しかしながら、酵素反応評価系において、従来最も活用される発色団を有する基質である *p*NP 化糖に比べた場合、タンパク質である酵素が吸収を示す 280 nm 付近に近い領域である 190-220 nm に高い吸収を示す ATG は、UV-Vis 分光器などにより反応混合溶液の状態では分析することはできない。そこで、化合物の極性に応じて、カラムにより分離が可能なシステムである HPLC との組み合わせが重要となる。

3 章で述べたように、本研究における α -アミラーゼによるグリコシル化反応系は、加水分解反応と糖転移反応が競合することに起因する多種多様な反応産物が混在する非常に複雑な反応系であり、その反応産物が有する各種溶媒に対する親和性も多様である (Fig.4-13)。

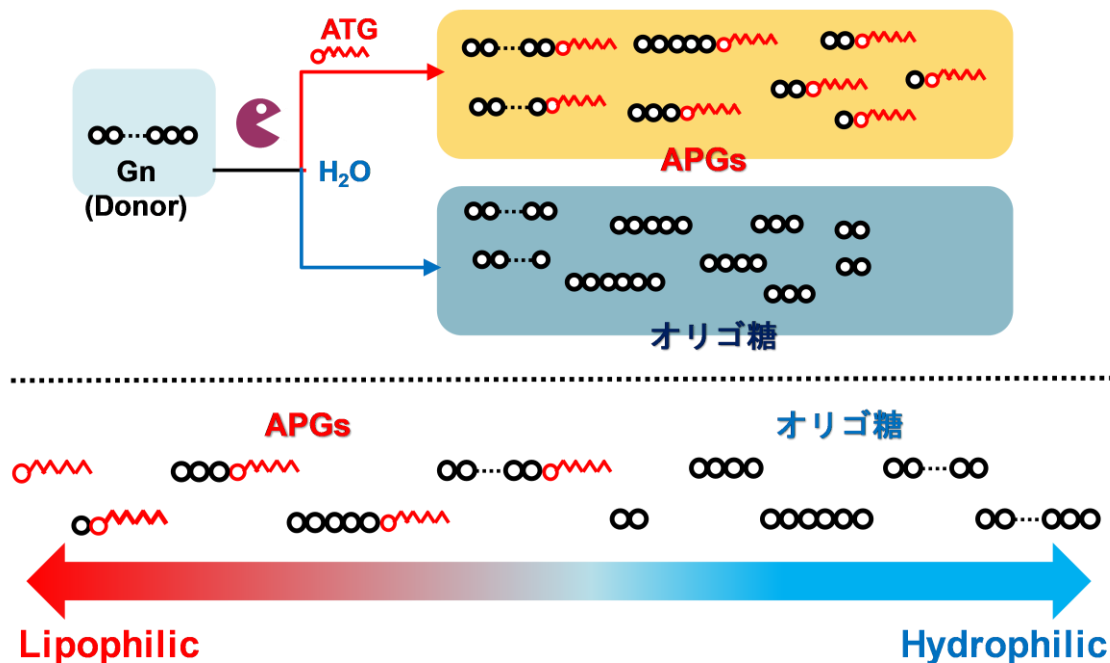


Fig.4-13 α -アミラーゼの触媒作用により起きる加水分解および糖転移反応によって形成される多様な極性を有する酵素反応産物

そのため、本酵素反応系において ATG をラベル化糖受容体として、微量のグリコシル化産物 (APGs) の評価系の構築を目指す場合、ATG および APGs の反応追跡に適した酵素反応条件 (特に ATG の種類や濃度) や、これに対応可能な分析条件の検討が重要となる。

そこで、本節では以下の項目に分け、ATGのUV吸収特性を活かした酵素的グリコシル化反応の評価系の構築を目指した。

- ①ATGの転化率からのグリコシル化効率の評価
- ②酵素的グリコシル化産物（APGs）の反応追跡と構造解析
- ③ATGのUV吸収特性を活かしたHPLCによる酵素反応産物の評価

検証①では、ATGの酵素反応中における濃度変化から、グリコシル化反応における糖受容体としての転化率を評価し、APGsの形成挙動の確認が容易な反応条件、分析条件の検討を目的としている。検討②では、検証①で選択したATGを本酵素反応におけるモデル分子とし、これを糖受容体として形成される種々のAPGsの分離条件の検討および単離された画分についての構造解析手順の構築を目的としている。検討③では、検討①、②で着目してきたATGやAPGsのみならず、酵素反応により産出される各種オリゴ糖も含めた複数の反応産物を効率的に追跡可能な分析手法の構築を目指した。

○ATGの転化率からのグリコシル化効率の評価

・簡便なグリコシル化評価系構築のための糖受容体（ATG）の選択

3章までの α -アミラーゼによる酵素的グリコシル化反応の評価では、 C_8OGlc を糖受容体として、そのグリコシル化効率あるいはグリコシル化産物について述べてきた。そこで、まず C_8OGlc と同じアルキル鎖長を有する C_8SGlc を糖受容体とした際、そのグリコシル化反応の行程がUV（200 nm）検出条件により、効率的に観測が可能かについて検討を行った。その際、比較対象として C_8SGlc よりも短いアルキル鎖長を有する C_4SGlc を用いた酵素反応産物を分析した。

Fig.4-14に、 C_4SGlc もしくは C_8SGlc を糖受容体とした酵素反応液をHPLCにより分析した結果を示す。酵素反応は、G47を糖供与体とし、それに含まれるG4の濃度が200 mMになるように設定し、糖受容体である C_4SGlc もしくは C_8SGlc は10 mMに設定した。 α -アミラーゼの濃度は、酵素反応中においてタンパク濃度で2.0 μ Mになるように設定し、20 mM, pH5.0の酢酸緩衝液存在下で25 $^{\circ}$ Cに保って反応をおこない、反応開始後24時間たったものをHPLCにより分析した。

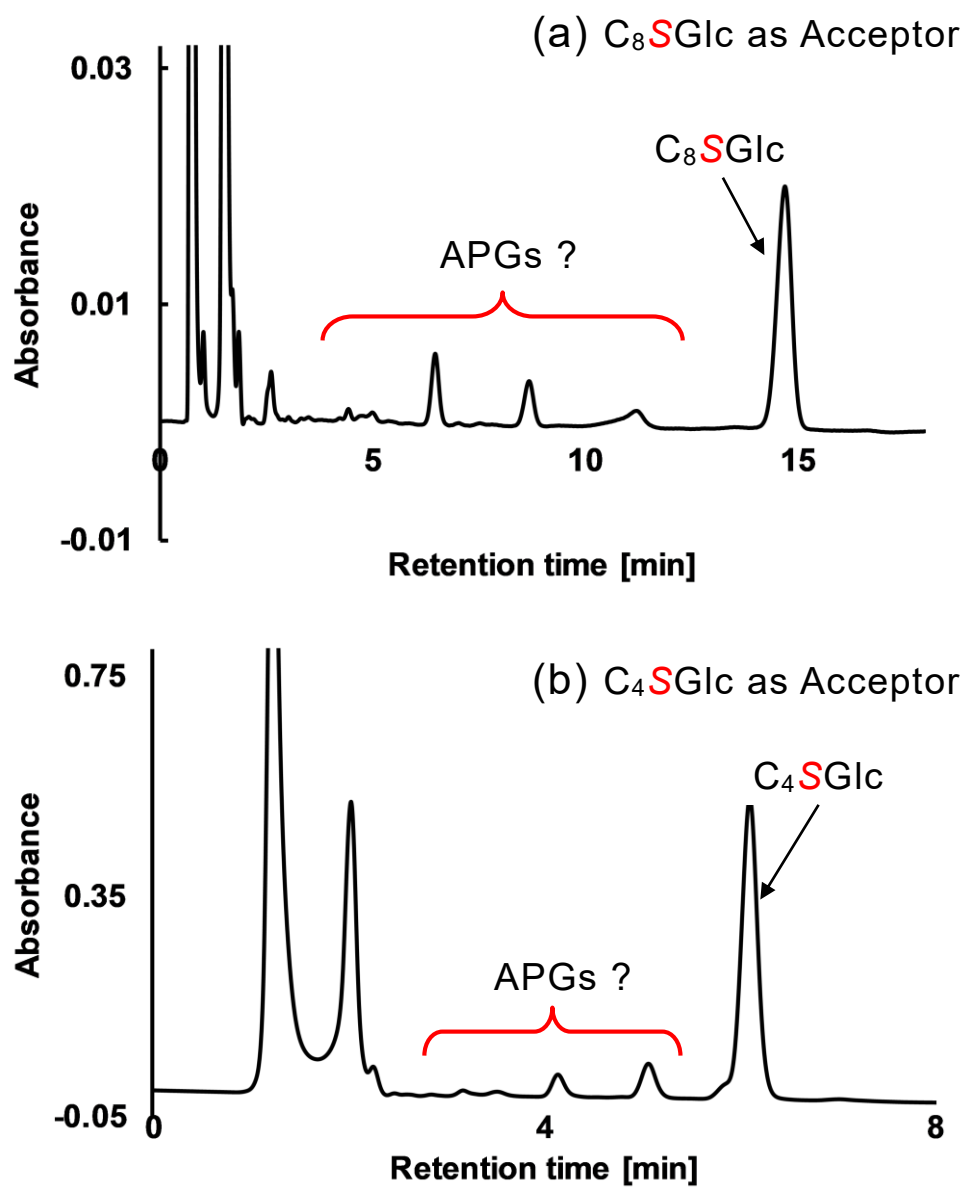


Fig.4-14 (a)C₈SGlc と(b)C₄SGlc を糖受容体とした酵素反応溶液 (初期糖供与体 (G4) 濃度: 200 mM, 糖受容体濃度: 10 mM, 酵素濃度: 2.0 μM) に対する HPLC によるクロマトグラムの比較
 (カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm), 検出: DAD(200 nm), 溶離液: CH₃CN/H₂O = (a) 30/70 or (b) 15/85, 流速 (a) 1.0 mL/min or (b)0.8 mL/min, インジェクション: 20 μL, カラム温度: 40 °C)

いずれの ATG においても APGs に相当するピークが良好に観測できた。しかし、これらのピークが本当に ATG に由来するグリコシル化産物であるのかということ判断する必要があり、そのためにはそれぞれの画分を単離した上で構造確認する必要がある。その際、HPLC による単離が容易であり、かつ、グリコシル化効率のための反応条件が容易な ATG を選択することが重要となる。Fig.4-14 の C₄SGlc および C₈SGlc クロマトグラムを比較すると、C₄SGlc の方が短時間で APGs に相当するピークが確認でき、分取が短時間で可能であることが期待できる。また、紫外短波長領域を検出条件とする本分析系においては、溶離液に含まれる有機溶媒の比率を低くすることが望ましい。そこで以降では、C₈SGlc よりも短いアルキル鎖を有する ATG を糖受容体とした。次に、C_{2, 4, 6}SGlc を糖受容体とし、そのグリコシル化効率をそれぞれの ATG の転化率から比較を行った上で、それらの中から APGs の分取が容易な ATG の選択を行った。また、この時、 α -アミラーゼによるグリコシル反応における ATG の初期濃度の影響を検証するため、2 種類の ATG 初期濃度で酵素反応を行った。

・ C_{2, 4, 6}SGlc を糖受容体とした場合の転化率の評価

Fig.4-15 に、C_{2, 4, 6}SGlc を糖受容体とした酵素反応中の反応時間に対する転化率の変化を示す。酵素反応は、G47 を糖供与体とし、それに含まれる G4 の濃度が 200 mM になるように設定し、それぞれの ATG の濃度を 10 あるいは 20 mM に設定した。 α -アミラーゼの濃度は、酵素反応中においてタンパク濃度で 2.0 μ M になるように設定し、20 mM, pH5.0 の酢酸緩衝液存在下で 25 °C に保って反応をおこない、観測時間ごとにサンプリングを行った。なお、それぞれの ATG の濃度変化は、以下の HPLC 分析条件により追跡した。

C₂SGlc:

カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 ϕ × 150 mm), 検出: UV(200 nm),
溶離液: CH₃CN/H₂O = 5/95, 流速 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C

C₄SGlc:

カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 ϕ × 150 mm), 検出: UV(200 nm),
溶離液: CH₃CN/H₂O = 15/85, 流速 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C

C₆SGlc:

カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 ϕ × 150 mm), 検出: UV(200 nm),
溶離液: CH₃CN/H₂O = 25/75, 流速 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C

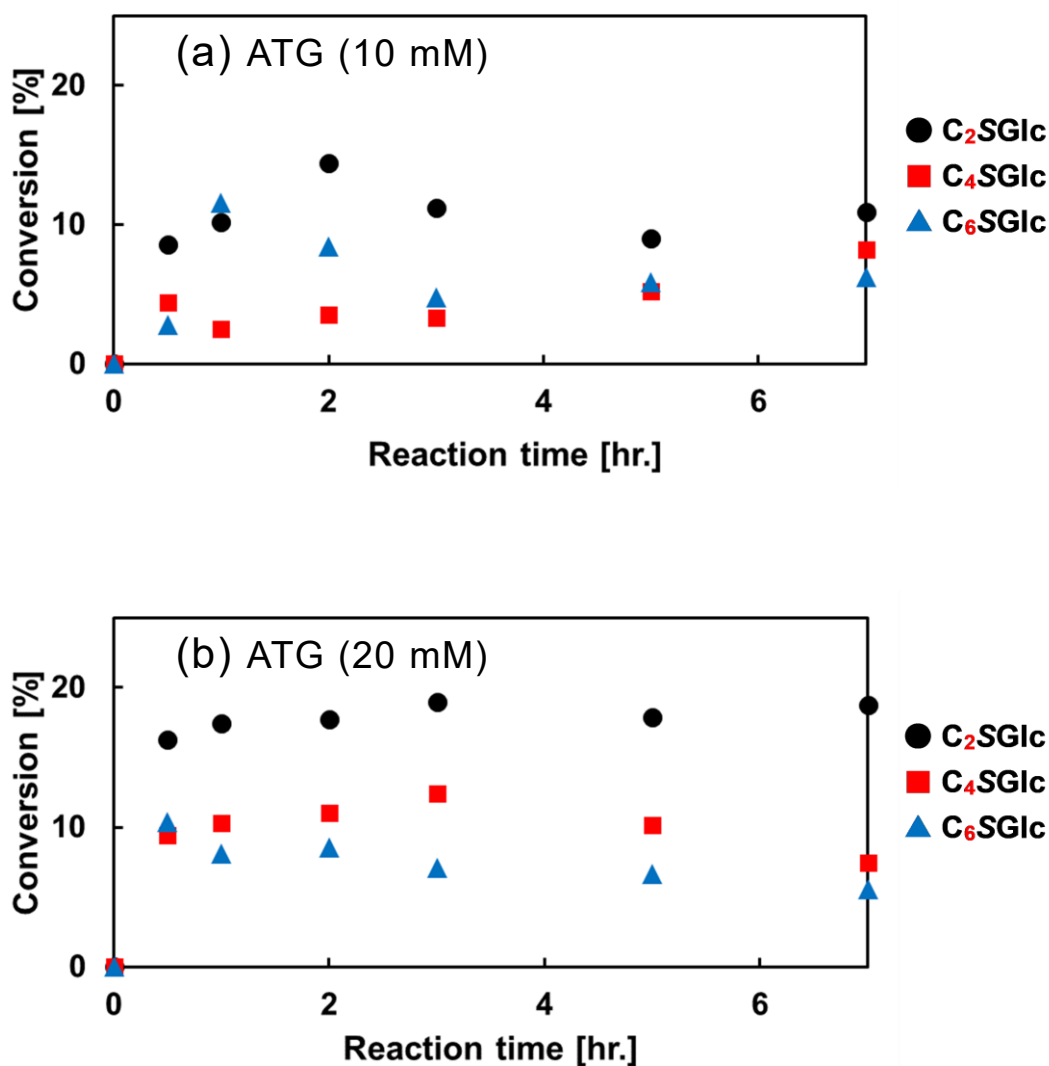


Fig.4-15 C₂, 4, 6SGlc を糖受容体とした酵素反応 (初期糖供与体 (G4) 濃度: 200 mM, 糖受容体濃度: (a)10 or (b)20 mM, 酵素濃度: 2.0 μM)における反応時間に対する転化率の変化 (20 mM, pH5.0 の酢酸緩衝液、25 °C)

Fig.4-15 の (a)、(b) 共に ATG のアルキル鎖長が長くなるほど、その転化率が低くなる傾向が確認できた。また、その傾向は初期 ATG 濃度が高い 20 mM の方が、強くなることがわかった。Fig.4-15 の ATG の転化率をもとに、効率的なグリコシル化反応によって APGs が容易に検出可能な反応条件を考慮した場合、C₂, 4,

6SGlc の順にグリコシル化効率が高いことが示唆された。また、それらの初期濃度が高い場合、グリコシル化効率の向上が期待できる。一方で、APGs 検出および分取のための分析条件を考慮した場合、ATG の転化率からの評価のみならず、APGs の分離条件を検討する必要がある。そこで、次に C_{2,4,6}SGlc を糖受容体とした酵素反応液中における APGs の分離条件を焦点とし、それぞれの HPLC クロマトグラムを比較した。

Fig.4-16 に、C_{2,4,6}SGlc を糖受容体とした酵素反応溶液中の各種 APGs の溶出時間を HPLC クロマトグラムで示す。酵素反応は、上記の反応条件と同一であり、ATG の初期濃度を 20 mM に設定し、反応開始後 24 時間たったものを HPLC により観測した。また、それぞれの ATG に対応する APGs の観測条件は、上記の ATG の HPLC 分析条件と同一であった。

Fig.4-16 のそれぞれの APGs の溶出結果を比較すると、ATG の炭素鎖が短いほど、その検出が短時間（3~6 分）で可能であることがわかるものの、それぞれの単離が困難であることがわかった。特に、C₂SGlc の場合は、糖受容体と APGs のピークが複数重なっていることが確認できる。一方で、C₆SGlc のように溶離液中のアセトニトリル比率が高くなった場合、4 分以降の溶出領域において溶離液中に含まれる不純物の影響が強くなる傾向が確認できる。

Fig.4-15 および Fig.4-16 の結果から、C_{2,4,6}SGlc のうち C₄SGlc が、反応転化率ならびに APGs の分離条件が容易な ATG として妥当であると考えた。そこで、ATG として C₄SGlc を糖受容体とした酵素反応に絞り、C₄SGlc の転化率をもとに APGs の分取が容易な酵素反応条件(初期 ATG 濃度および酵素濃度)を検討した。

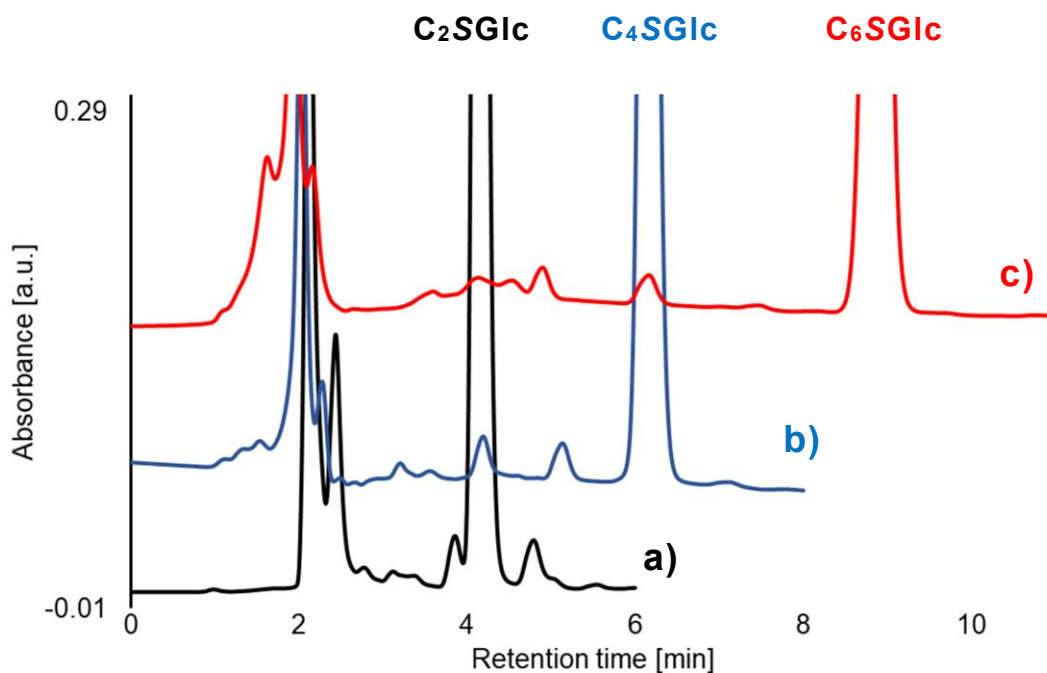


Fig.4-16 C₂SGlc, C₄SGlc, C₆SGlc を糖受容体とした酵素反応溶液（初期糖供与体（G4）濃度：200 mM，糖受容体濃度：20 mM，酵素濃度：2.0 μM）中の APGs の HPLC クロマトグラムによる比較

a) C₂SGlc:

カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm), 検出: UV(200 nm),
 溶離液: CH₃CN/H₂O = 5/95, 流速 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C

b) C₄SGlc:

カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm), 検出: UV(200 nm),
 溶離液: CH₃CN/H₂O = 15/85, 流速 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C

c) C₆SGlc:

カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm), 検出: UV(200 nm),
 溶離液: CH₃CN/H₂O = 25/75, 流速 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C

Fig.4-17 に、C₄SGlc を糖受容体とした酵素反応中の反応時間に対する転化率の変化を示す。酵素反応は、G47 を糖供与体とし、それに含まれる G4 の濃度が 200 mM になるように設定し、それぞれの ATG の濃度を 100 mM に設定した。α-アミラーゼの濃度は、酵素反応中においてタンパク濃度で 20 μM になるように設定し、20 mM, pH5.0 の酢酸緩衝液存在下で 25 °C に保って反応を行い、観測時間ごとに

サンプリングを行った。なお、C₄SGlc の濃度変化は、以降に行う APGs の分取条件の検討を考慮し、HPLC 分析条件を変えて追跡を行った。

C₄SGlc:

カラム: Mightysil RP-18 GP Aqua (4.6 φ × 250 mm), 検出: UV(200 nm),

溶離液: CH₃CN/H₂O = 10/90, 流速 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C

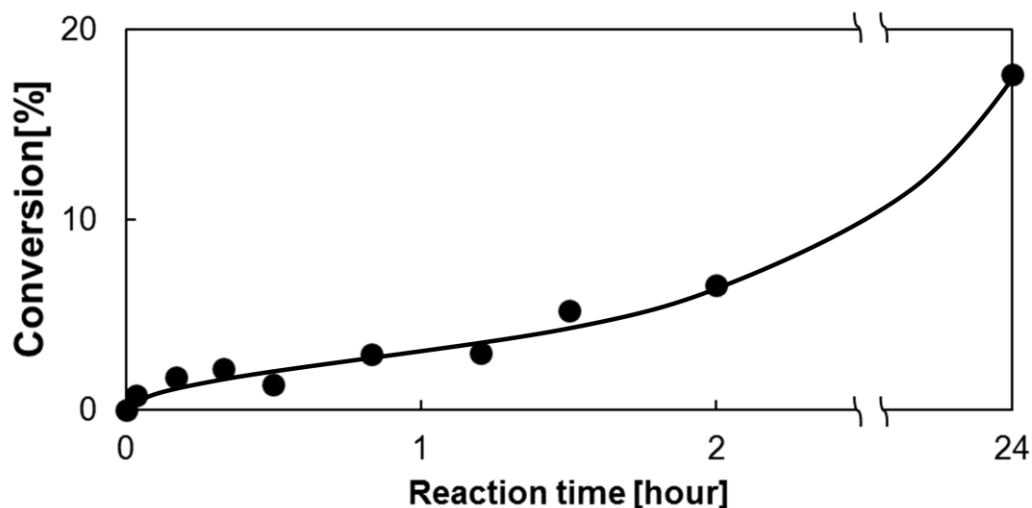


Fig.4-17 C₄SGlc を糖受容体とした酵素反応 (初期糖供与体 (G4) 濃度: 200 mM, 糖受容体濃度: 100 mM, 酵素濃度: 20 μM)における反応時間に対する転化率の変化 (20 mM, pH5.0 の酢酸緩衝液、25 °C)

Fig.4-15 の時の C₄SGlc の転化率に比べ、酵素反応開始後 24 時間で 18%近い転化率を示した。この結果より、酵素濃度あるいは初期 ATG 濃度を上げることで、比較的容易に C₄SGlc の APGs 回収効率の向上が可能であることがわかった。

そこで、次項では酵素反応条件の設定および、HPLC による分取条件の設定が比較的容易な C₄SGlc を糖受容体とし、そのグリコシル化産物の反応追跡や分取、およびそれらの構造解析について述べる。

○酵素的グリコシル化産物の反応追跡と構造解析

本項では、前項までの検証を踏まえ、C₄SGlc を糖受容体とした種々の APGs の単離およびそれらの構造解析について述べる。そこで、まず前項で検証した酵素反応条件をもとにして、酵素反応推移における APGs 形成挙動の観測を行った上で、回収するフラクションの選択および分取の条件検討を行った。

・ C₄SGlc に対するグリコシル化産物の反応追跡

Fig.4-18 に、C₄SGlc を糖受容体とした酵素反応溶液中の各種 APGs の形成挙動を HPLC クロマトグラムで重ねて示す。酵素反応は、G47 を糖供与体とし、それに含まれる G4 の濃度が 200 mM になるように設定し、C₄SGlc の濃度を 100 mM に設定した。α-アミラーゼの濃度は、酵素反応中においてタンパク濃度で 20 μM になるように設定し、20 mM, pH5.0 の酢酸緩衝液存在下で 25 °C に保って反応を行い、観測時間ごとにサンプリングを行った。APGs は、以下の HPLC 分析条件により、その形成挙動を観測した。

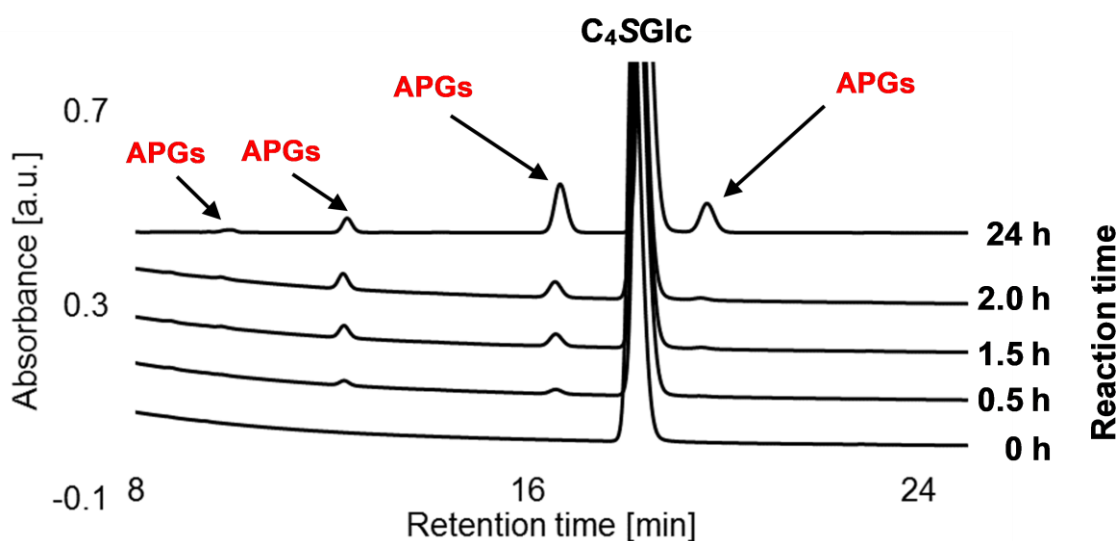


Fig.4-18 C₄SGlc を糖受容体とした酵素反応溶液 (初期糖供与体 (G4) 濃度: 200 mM, 糖受容体濃度: 100 mM, 酵素濃度: 20 μM) 中の APGs の形成挙動 (カラム: Mightysil RP-18 GP Aqua (4.6 φ × 250 mm), 検出: UV(200 nm), 溶離液: CH₃CN/H₂O = 10/90, 流速 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C)

Fig.4-18 より、酵素反応時間の推移と共に APGs に由来する複数のピークが形成される工程が確認できた。また、それぞれのピークの形成工程が異なることもわかった。酵素反応開始から 24 時間たったもののクロマトグラムに着目した場合、10 分、12 分、16.5 分、20 分の溶出時間に観測しやすい APGs のピークが確認できた (18 分は C₄SGlc)。それぞれの APGs のピークの酵素反応時間に対する形成挙動の変化を見ると、反応初期段階で 10 分、12 分および 16.5 分のピークの形成が成長した後に、反応後期に 20 分のピークが形成、蓄積されていく傾向が確認できる。そこで、本項における C₄SGlc を糖受容体とした APGs の分取および構造

解析の対象として、これら 10 分, 12 分, 16.5 分, 20 分のピークに着目した。ただし、Fig.4-18 に示したクロマトグラムの分析条件では、それぞれの画分の分離は良好であるものの、1 回当たり 20 分近い測定時間を要するため、効率良く分取可能な条件の検討を行った。また、Fig.4-18 から示されたように APGs の各ピークの形成工程は反応時間に依存することから、次に分取に適した酵素反応時間を検討した。

Fig.4-19 に、C₄SGlc を糖受容体とした酵素反応溶液中の各種 APGs に焦点を当てた HPLC クロマトグラムのうち酵素反応 2 時間および 18 時間のものを示した。酵素反応は、G47 を糖供与体とし、それに含まれる G4 の濃度が 200 mM になるように設定し、C₄SGlc の濃度を 100 mM に設定した。α-アミラーゼの濃度は、酵素反応中においてタンパク濃度で 20 μM になるように設定し、20 mM, pH5.0 の酢酸緩衝液存在下で 25 °C に保って反応を行い、観測時間ごとにサンプリングを行った。また、今回 APGs のピークの形状を確認しやすくするために、サンプリングした反応溶液を遠心濃縮機により 5 倍程度に濃縮した。APGs は、以下の HPLC 分析条件により、短時間での溶出を目指した。

カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm), 検出: UV(200 nm),

溶離液: CH₃CN/H₂O = 15/85, 流速 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C

Fig.4-19 より、酵素反応開始から 2 時間経過で確認された 3.0 分, 3.6 分, 4.2 分, 5.2 分に溶出したピークが、18 時間経過後には 3.6 分, 5.2 分のピークが大きくなる変化を観測できた。一方で、C₄SGlc のピーク (6.2 分) に重なる形で溶出した 6.0 分のピークは、18 時間経過後のサンプルでのみ検出されることから、Fig.4-18 の 20 分で検出された酵素反応後期に形成される APGs と同様であると考えられる。しかし、Fig.4-19 の 6.0 分のピークは C₄SGlc のピークと分離することが困難であると想定されたので、本単離操作では 3.0 分, 3.6 分, 4.2 分, 5.2 分の 4 つの画分に分けて回収を行った。

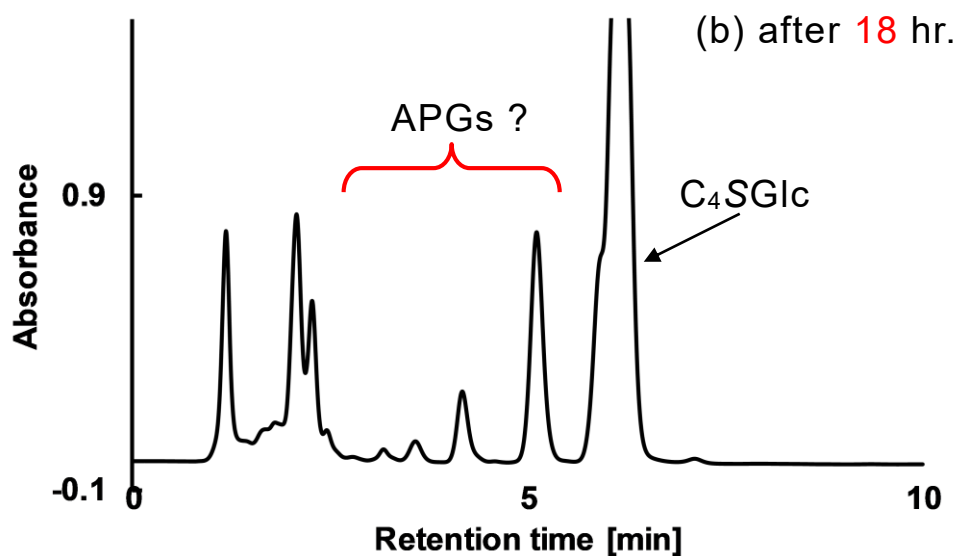
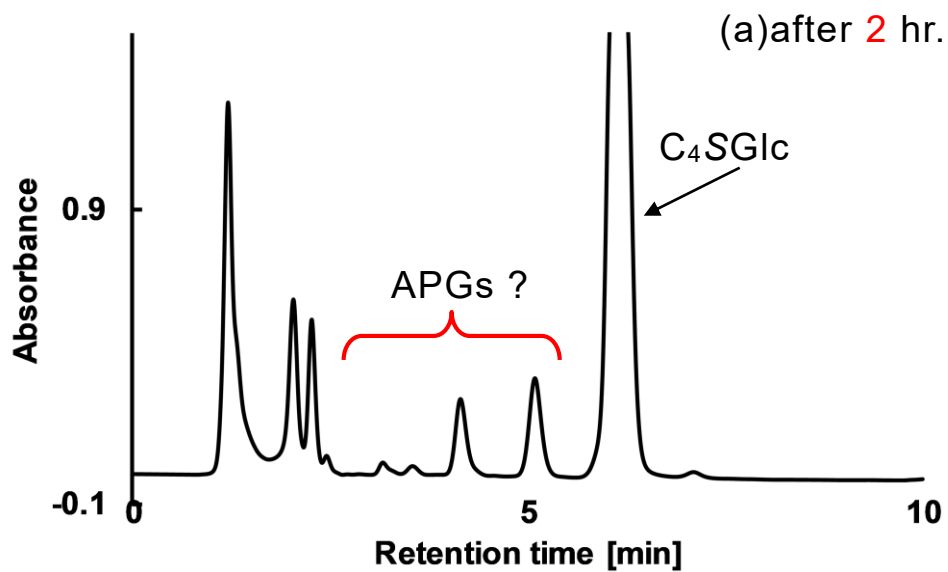


Fig. 4-19 C₄SGlc を糖受容体 (初期濃度 100 mM) とした酵素反応液に対する、APGs の分取条件の検討を目的とした反応時間別 ((a)反応開始後 2 時間, (b)反応開始後 18 時間) の HPLC クロマトグラムの比較
(カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm), 検出: UV (200 nm),
溶離液: CH₃CN/H₂O = 15/85, 流速: 0.8 mL/min, インジェクション: 20 μL,
カラム温度: 40 °C)

・ C₄SGlc に対する APGs の分取とその構造解析

各画分に分取に先立ち、Fig.4-19 の 3.0 分、3.6 分、4.2 分、5.2 分のそれぞれのピークを順に画分 A (fr.A), B (fr.B), C (fr.C), D (fr.D) と呼称した。分取は、Fig.4-19 に提示した酵素反応条件と同一であり、酵素反応は 18 時間で終了とした。反応終了後に回収した酵素反応溶液を遠心濃縮機により 5~10 倍程度に濃縮し、HPLC により 2 回に分けて単離操作を行った。

Fig.4-20 に、HPLC を用いた各種 APGs の分取時のクロマトグラムを示す。分取時の HPLC 条件は、Fig.4-19 に提示した分析条件と同一とした。

Fig.4-20(a) は、1 回目の分取操作であり、反応溶液中に過剰に残存する C₄SGlc と fr.A, B, C, D の 4 画分を分けることを目的として行った。Fig.4-20(b) は、1 回目の分取で得られた 4 画分の混合溶液をそれぞれの画分に分けた。それぞれの画分を NMR あるいは MALDI-TOF MS により構造解析する前に TLC (展開溶媒: CH₃CN/*n*-プロパノール/H₂O=5/3/2) により純度検定を行ったところ、fr.D のみ 1 スポットであることを確認した。fr.B、fr.C では 2 スポットであることを確認した。fr.A については検出不可であった。

Fig.4-21, 22 に、fr.A, B, C, D の分子量解析を MALDI-TOF MS により行なった結果を示す。その際、マトリックスにはジヒドロ安息香酸 (DHB) を用いた。

Fig.4-21(b) より、fr.A の画分には APGs に相当する m/z のピークは確認されなかった。一方で、Fig.4-21(a) より、fr.B の画分には C₄SGlc に 1 つの糖が結合した C₄SG2 (438.81)、および 4 つの糖が結合した C₄SG5 (922.43) のナトリウム付加イオンに相当する m/z のピークを確認した。このことから、fr.B の画分には、グルコシド結合様式が未知の 2 種類の APGs が混在することがわかった。同様に、Fig.4-22(a), (b) の m/z の値から、fr.C には C₄SG2 (438.77) および C₄SG4 (761.21) が混在し、fr.D には C₄SG3 (600.05) が存在することがわかった。これは、前述の TLC を用いた純度検定の結果を支持するものであり、fr.D を APGs の単一画分として回収できたことを示す。そこで、fr.D の NMR による構造解析を行った。Fig.4-23, 24 に fr.D の ¹H、¹³C、COSY、HMQC の NMR スペクトルを示す。

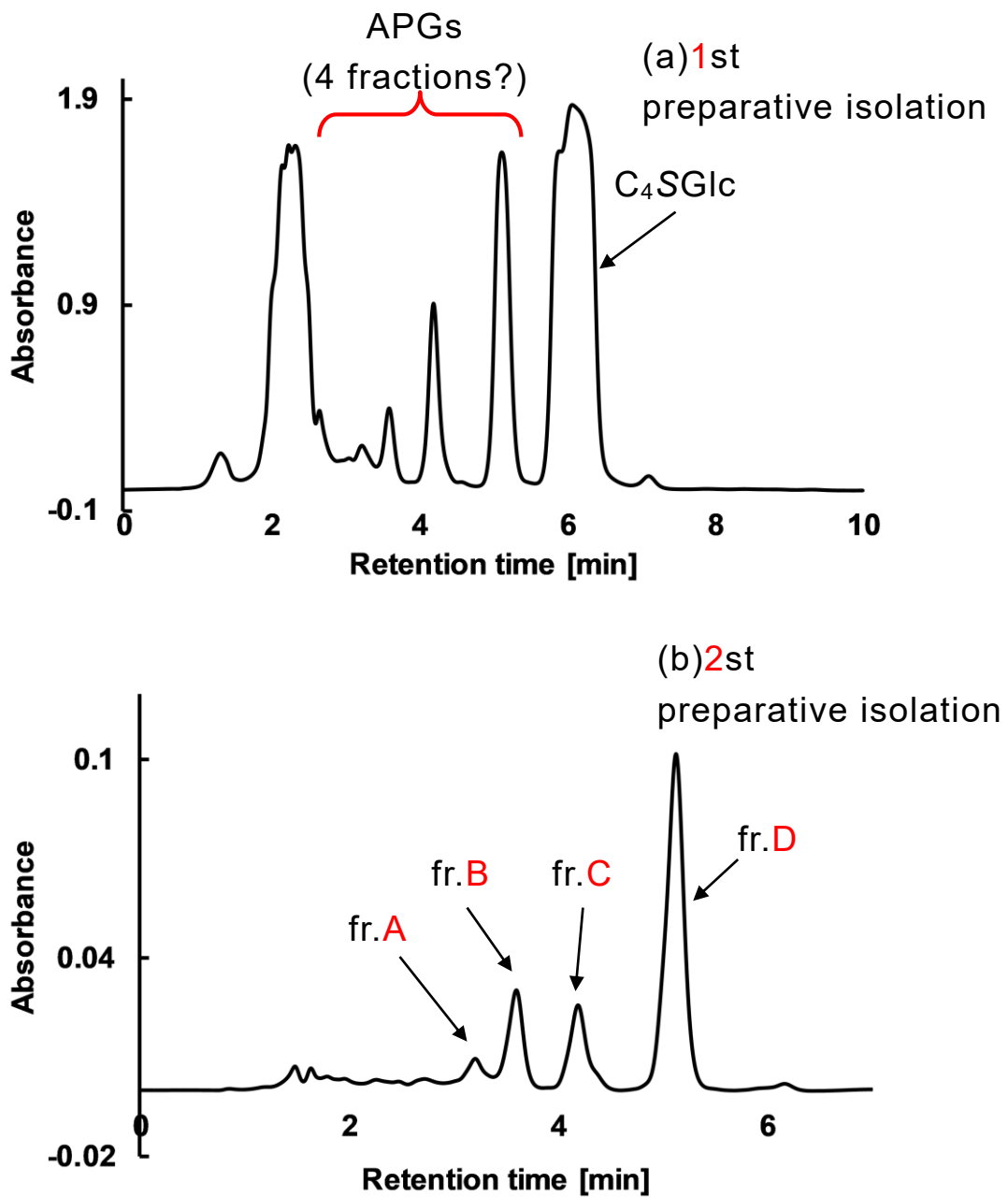


Fig. 4-20 C₄SGlc を糖受容体とした酵素反応液からの各種 APGs (fraction A, B, C, D) の分取における HPLC クロマトグラム

(a) 1 回目の分取: C₄SGlc と 4 画分の分離, (b) 2 回目の分取: 4 画分の単離
 (カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm), 検出: UV (200 nm),
 溶離液: CH₃CN/H₂O = 15/85, 流速: 0.8 mL/min, インジェクション: 20 μL,
 カラム温度: 40 °C)

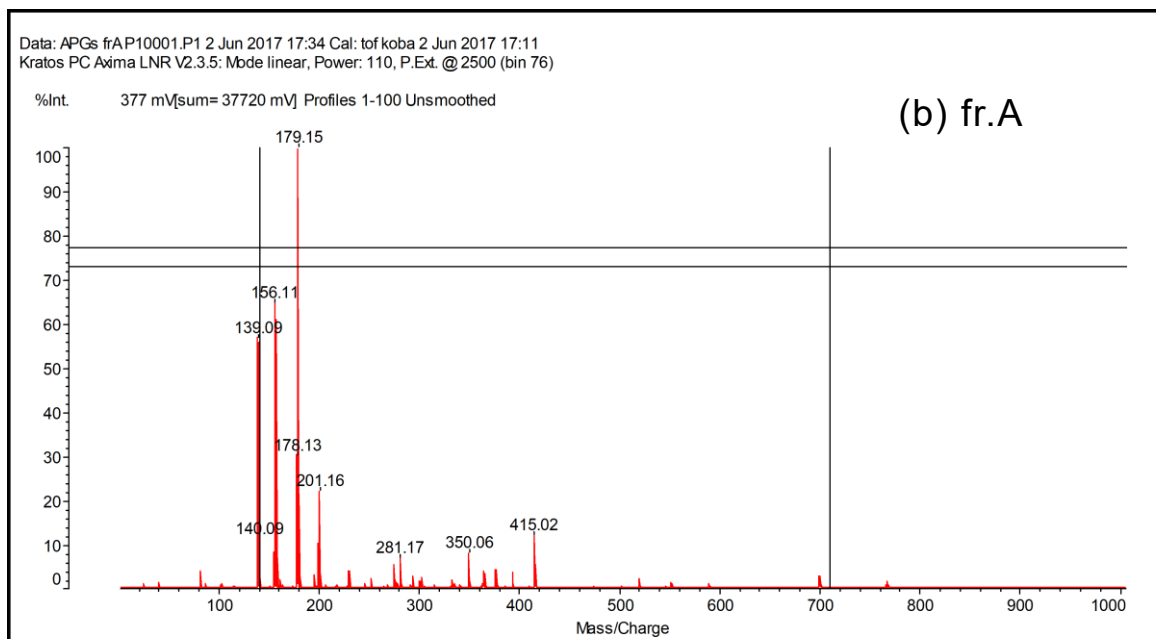
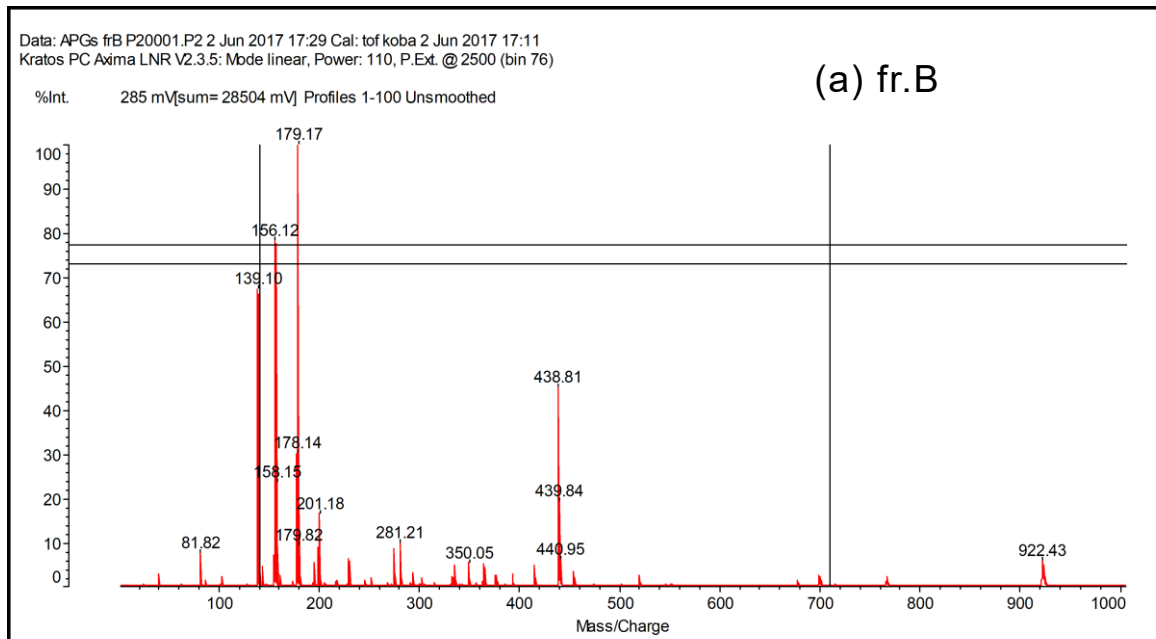


Fig. 4-21 fr.B, A の MALDI-TOF MS スペクトル(マトリックス: DHB)

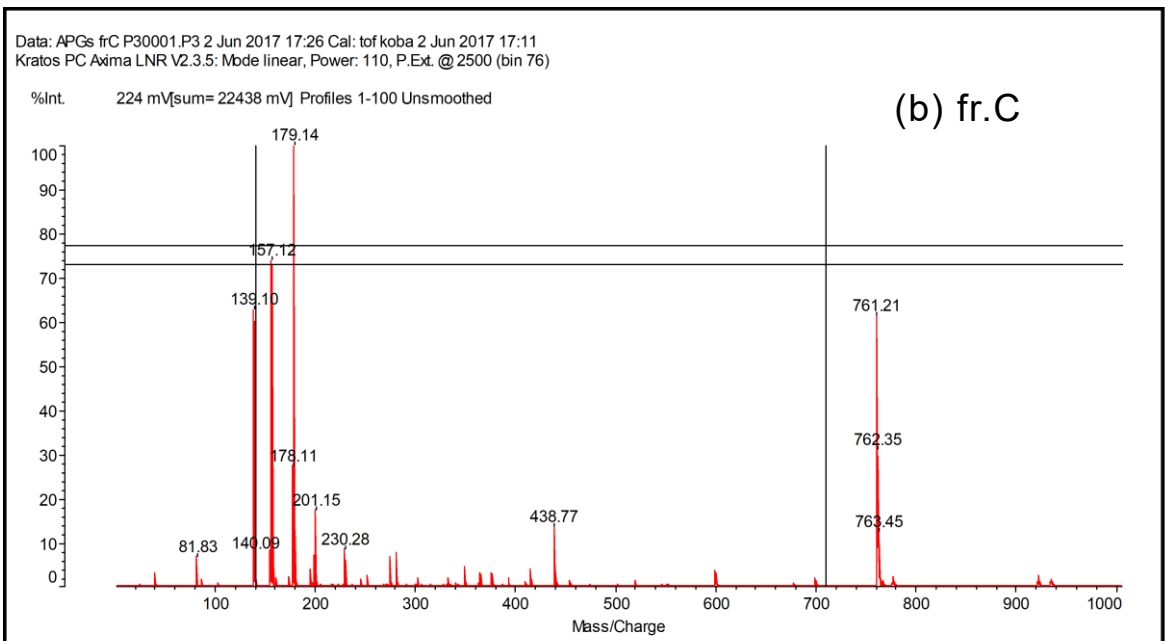
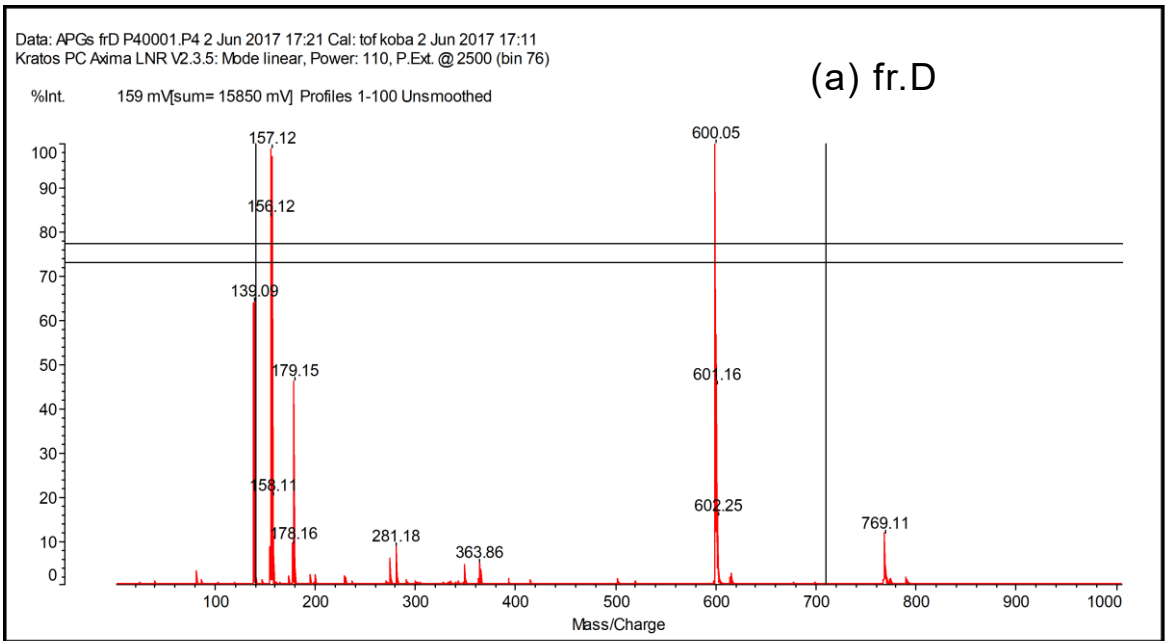


Fig. 4-22 fr.D, C の MALDI-TOF MS スペクトル(マトリックス: DHB)

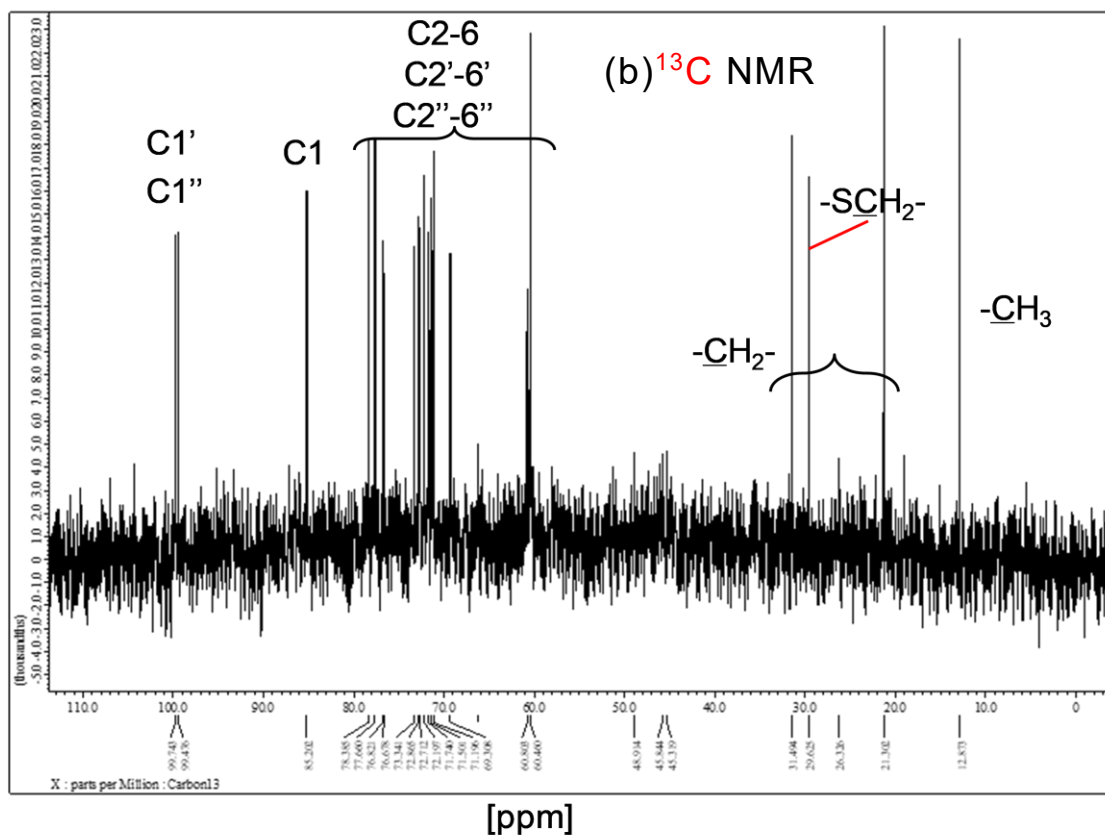
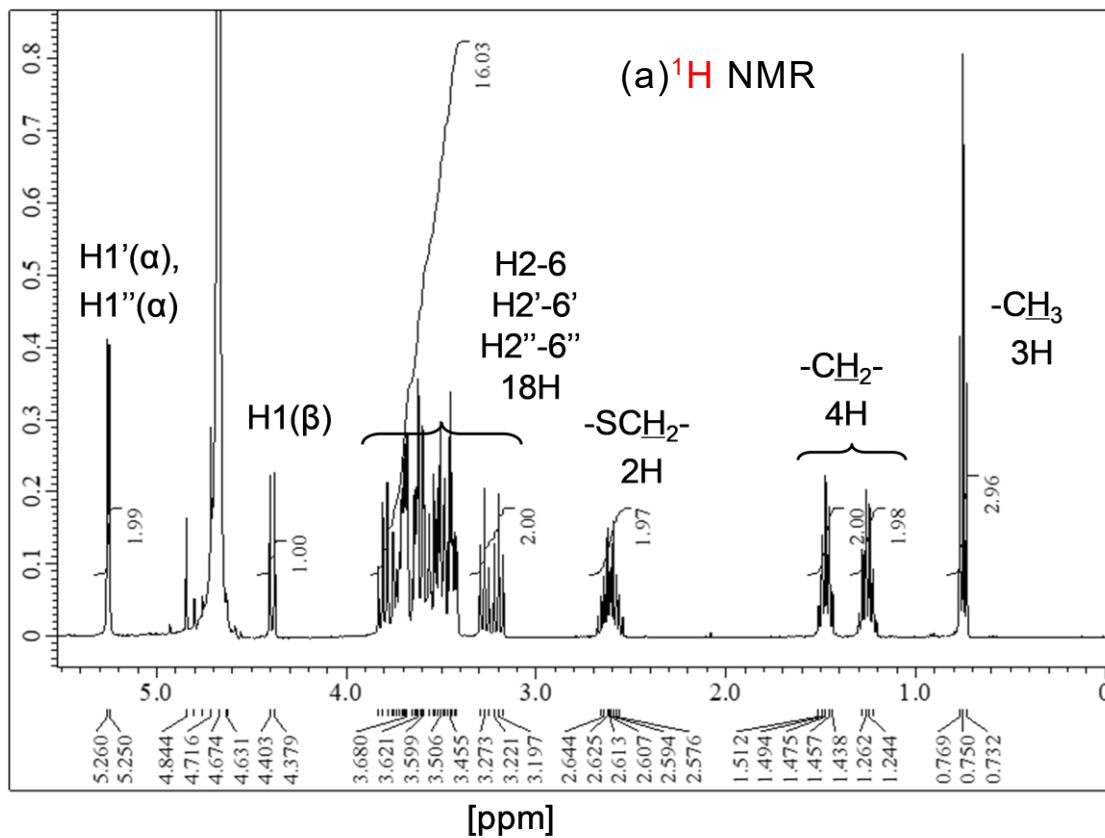


Fig. 4-23 fr.D の(a) ^1H , (b) ^{13}C NMR スペクトル(400 MHz, 4 mg / 1mL D₂O)

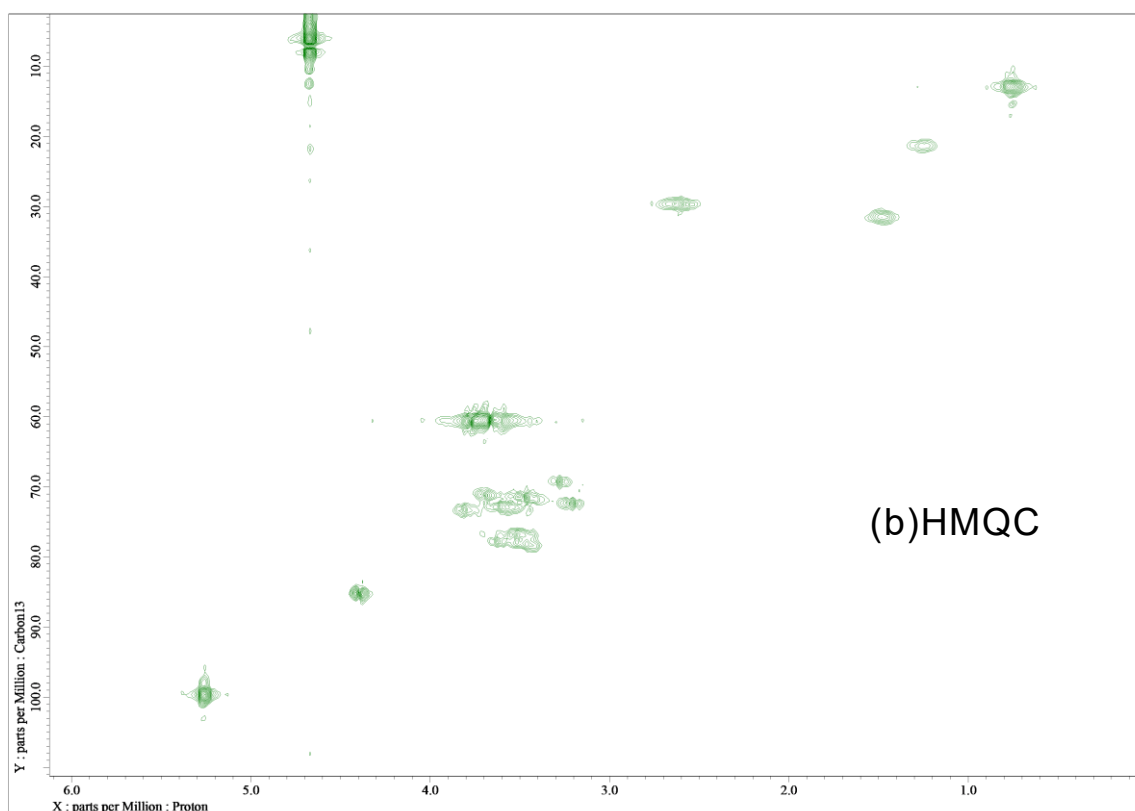
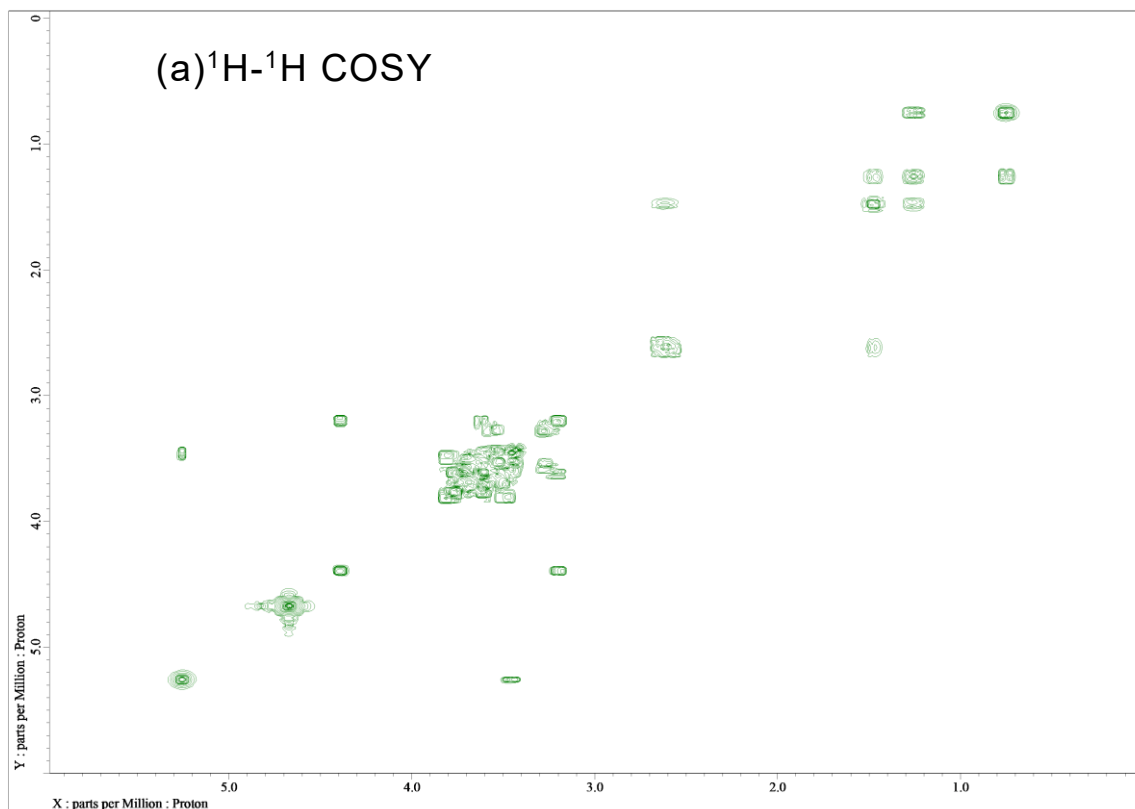


Fig. 4-24 fr.D の(a) ^1H - ^1H COSY, (b) HMQC スペクトル
(400 MHz, 4 mg / 1mL in D_2O)

Fig.4-23, 24 の NMR スペクトルをもとに fr.D の構造解析を行った結果、この画分に含まれる C₄SG3 はそれぞれのグルコース単位が α(1-4)グルコシド結合で繋がった *n*-butyl 1-thio-β-D-maltotrioside (C₄SMalG3) であることがわかった。

C₄SMalG3 (fr.D)の ¹H および ¹³C NMR 結果を以下にまとめた。

***n*-butyl 1-thio-β-D-maltotrioside (C₄SMalG3)**

¹H NMR (400 MHz, δ, D₂O): 0.75(t, 3 H, -CH₃), 1.24-1.51(m, 4 H, -CH₂-), 2.58-2.64(m, 2 H, -CH₂-), 3.20-3.68(m, 18 H, H-2-6, 2'-6', 2''-6''), 4.38(d, 1 H, H-1, *J*_{1,2}=9.6 Hz), 5.25(d, 2 H, H-1', H-1'', *J*_{1',2'}=4.0 Hz, *J*_{1'',2''}=4.0 Hz)}}

¹³C NMR (100 MHz, δ, D₂O): 12.9(-CH₃), 21.3, 29.6, 31.5(3 C, -CH₂-), 60.5, 60.8 (3C, C-6, 6', 6''), 69.3-78.4(8 C, C-2-5, 2'-5', 2''-5''), 85.2(C-1), 99.5, 99.7(C-1', 1'')

また、これらの APGs が混在するとわかった画分 (fr.B, C, D) および 4.2.2 節で用いた C₄SMalβ (有機化学合成により得た) を用い、Fig.4-19 と同一の HPLC 条件で分析したところ、Fig.4-20 の 6.0 分の画分と C₄SMalβ の溶出時間が同一であることを確認した。これと、Fig.4-19(b), 20(a)のクロマトグラムの結果から、α-アミラーゼ (*Bacillus subtilis* 由来) を用いた C₄SGlc に対するグリコシル化産物として、主に *n*-butyl 1-thio-β-D-maltotrioside (C₄SMalG3) および *n*-butyl 1-thio-β-D-maltoside (C₄SMalβ) が産出されると考えた (Fig.4-25)。

さらに、Fig.4-18 と同一の HPLC 分析条件で、fr.B, C, D および C₄SMalβ の溶出時間を確認したところ、Fig.4-26 で示すように酵素反応の進行と共に形成される APGs の構造の特徴を評価できることがわかった。

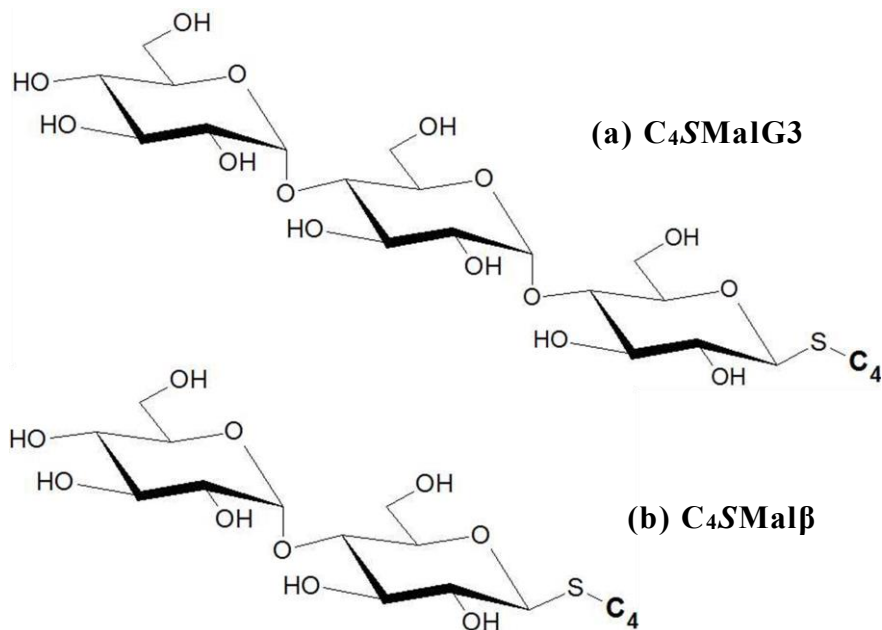


Fig. 4-25 酵素反応により主に産出される APGs

(a) $C_4SMalG3$: *n*-butyl 1-thio- β -D-maltotrioside,

(b) $C_4SMal\beta$: *n*-butyl 1-thio- β -D-maltoside

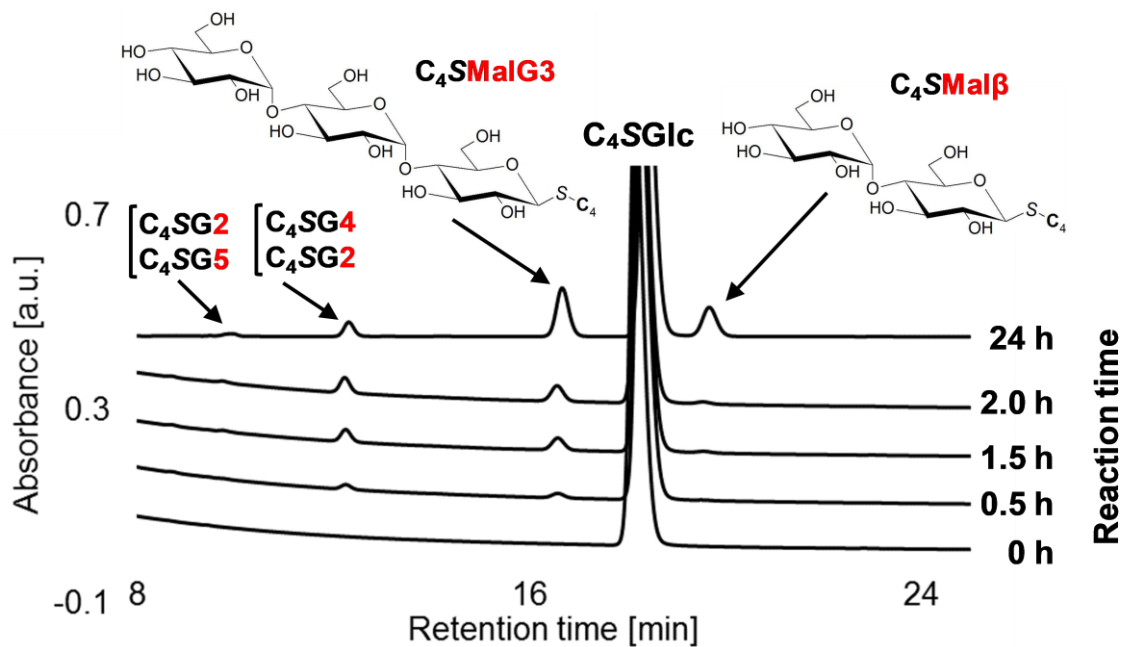


Fig.4-26 C_4SGlc を糖受容体とした酵素反応溶液 (初期糖供与体 (G4) 濃度:

200 mM, 糖受容体濃度: 100 mM, 酵素濃度: 20 μ M) 中の APGs の形成挙動

(カラム: Mightysil RP-18 GP Aqua (4.6 ϕ \times 250 mm), 検出: UV(200 nm),

溶離液: $CH_3CN/H_2O = 10/90$, 流速 0.8 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}C$)

次に Fig.4-26 の HPLC クロマトグラムにおいて確認された APGs のうち、主な糖転移反応産物と考えられる C₄SMal β 、C₄SMalG3 および C₄SG4 の形成挙動についてそれぞれのピークのエリア面積値の変化から評価を試みた。Fig.4-27 に、酵素反応時間に対する各種 APGs のエリア面積値の変化を示す。

反応時間が 24 時間の段階で、C₄SMalG3、C₄SMal β 、C₄SG4 の順に高いエリア面積値を示すことがわかった。また、C₄SMalG3 および C₄SG4 の面積値が反応初期段階から徐々に増加しているのに対して、C₄SMal β の面積値は反応後期から増加する傾向が確認された。このことから、本反応系では反応初期段階において C₄SMalG3、C₄SG4 を形成した後に、反応後期では C₄SMalG3 および C₄SMal β をグリコシル化産物として蓄積すると考えた。Fig.4-28 に、3 章で述べた *Bacillus subtilis* 由来の α -アミラーゼのサブサイト構造¹³⁾を考慮した上で想定した APGs の形成経路の概略図を示す。

酵素反応初期段階では、糖供与体である G4 と α -アミラーゼが Fig.4-28 に示した 2 種類の結合様式の酵素 - 基質複合体を経た後に、反応中間生成物として C₄SMalG3 および C₄SG4 を形成すると考えた。その後、系内に多量に存在する水分子によってこれらの中間生成物が加水分解されることで、反応後期では C₄SMalG3 および C₄SMal β を形成すると考えた。一般に糖加水分解酵素を用いてグリコシル化を検討する場合、加水分解反応と糖転移反応が競合するために微量な糖転移産物の変化を追跡することが困難となる。ATG の UV 吸収特性を活用することで、一般には見逃しがちな反応中間生成物を観測することが可能となり、Fig.4-28 のようにグリコシル化の工程を可視化することが期待できる。

また、Fig.4-26 の HPLC クロマトグラムにおける C₄SG4 および C₄SG5 の画分にグルコシド結合様式が未知の C₄SG2 が混在することから、3 章で述べた *Aspergillus Oryzae* 由来の α -アミラーゼや TVA II を用いたアルキルグリコシドに対するグリコシル化特性と同様に、*Bacillus subtilis* 由来の α -アミラーゼが ATG に対して潜在的グリコシル化特性を示すと考えた。

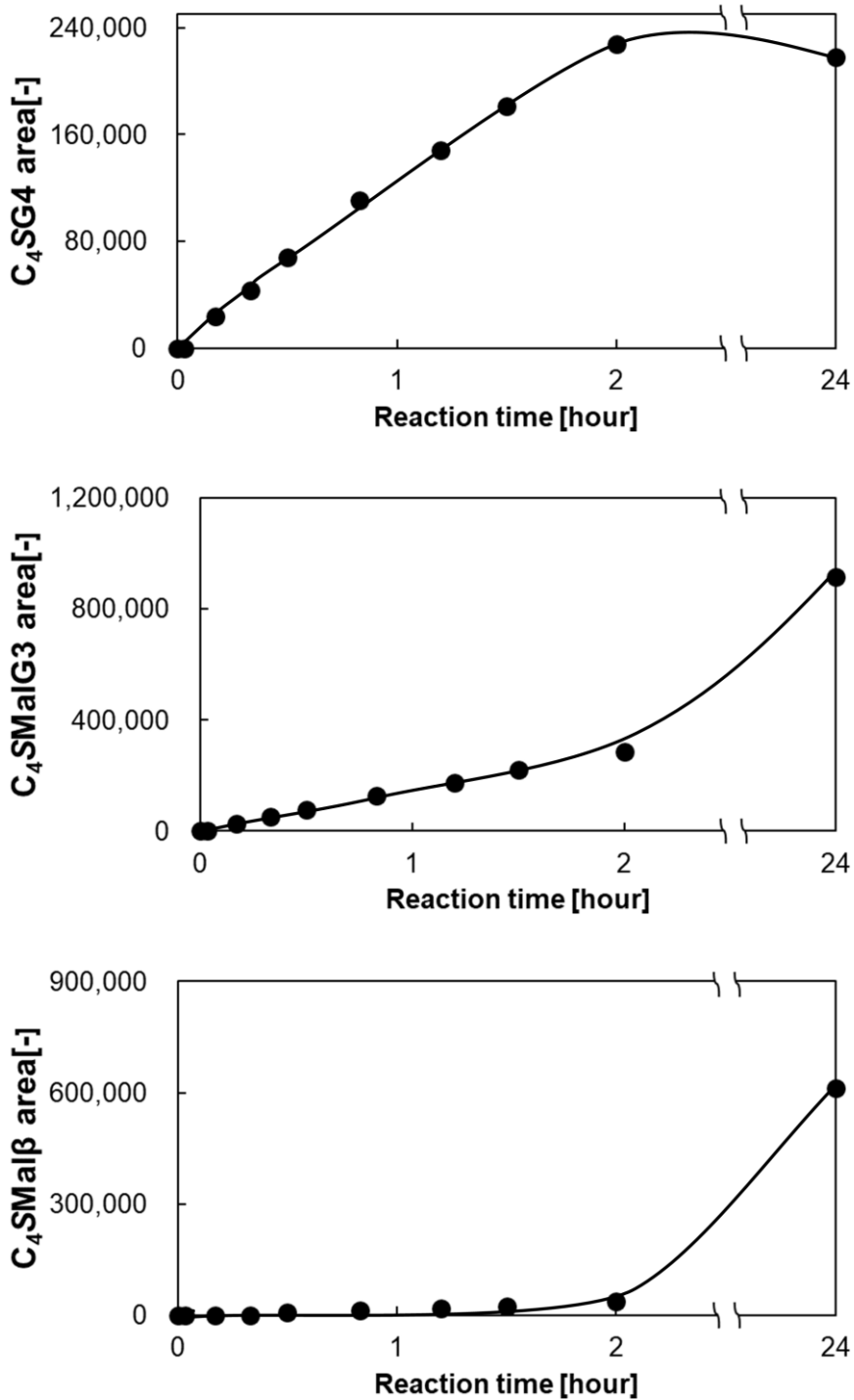


Fig.4-27 HPLC クロマトグラム (Fig.4-26) 中における C₄SMaIβ、C₄SMaIG3 および C₄SG4 のピークのエリア面積値の経時変化

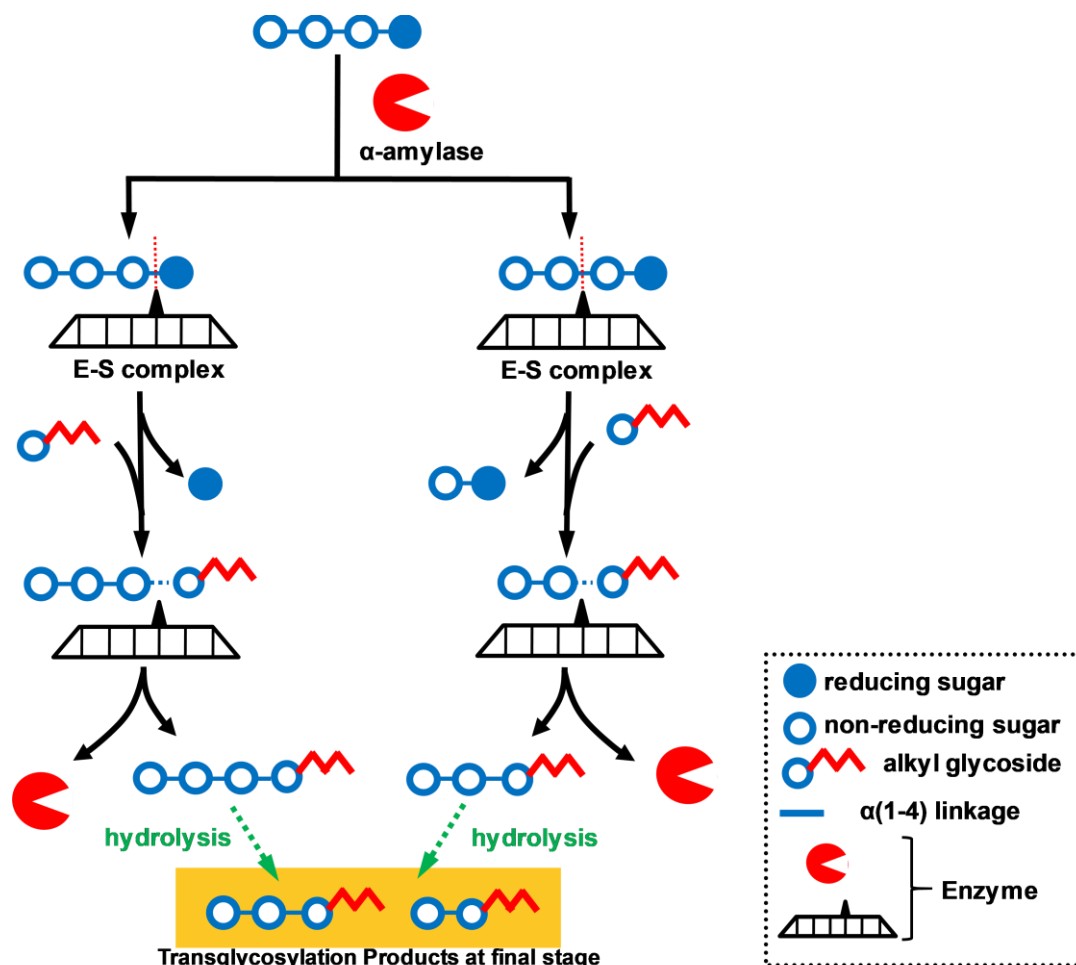


Fig.4-28 マルトテトラオース（G4）を糖供与体、ATGを糖受容体とする *Bacillus subtilis* 由来の α -アミラーゼによる酵素的グリコシル化反応から産出される APGs の形成経路

以上の各種 APGs の単離、分析条件の検討、およびそれらの構造解析から、これまで可視化が困難であった微量のグリコシル化産物である APGs の形成挙動の観測を ATG の UV 吸収特性を活かすことで可能になることがわかった。このように ATG の特性を活かした分析手法を活用することで、 α -アミラーゼによるグリコシル化反応評価に限らず、 α -アミラーゼ以外の加水分解酵素による潜在的反応特性の評価に活用することが期待できる。次項では、ATG を活用した酵素反応評価法の更なる拡張を目指し、ATG の UV 吸収特性と HPLC の分離システムを併用した酵素反応評価手法について述べる。

○ATGのUV吸収特性を活かしたHPLCによる酵素反応産物の評価

本項では、ATGを活用した酵素反応評価法の更なる拡張を目指し、ATGの特性とHPLCの分離システムを併用した以下の2つの試みについて述べる(Fig.4-29)。

- ①グラジエント溶出条件でRIおよびUV検出併用による酵素産物の評価
- ②ATGのカラムに対する親和性を活用したAPGsの評価

検証①の目的は、一度の分析により酵素反応系内の基質および酵素反応産物であるATG、APGs、オリゴ糖を同時に評価することで、煩雑になりがちな分析手順を簡略化することにある。検証②の目的は、グリコシル化産物であるAPGsをそのアグリコン、グリコン部位の特性を活用することで、多角的に評価できる分析手法を構築することにある。

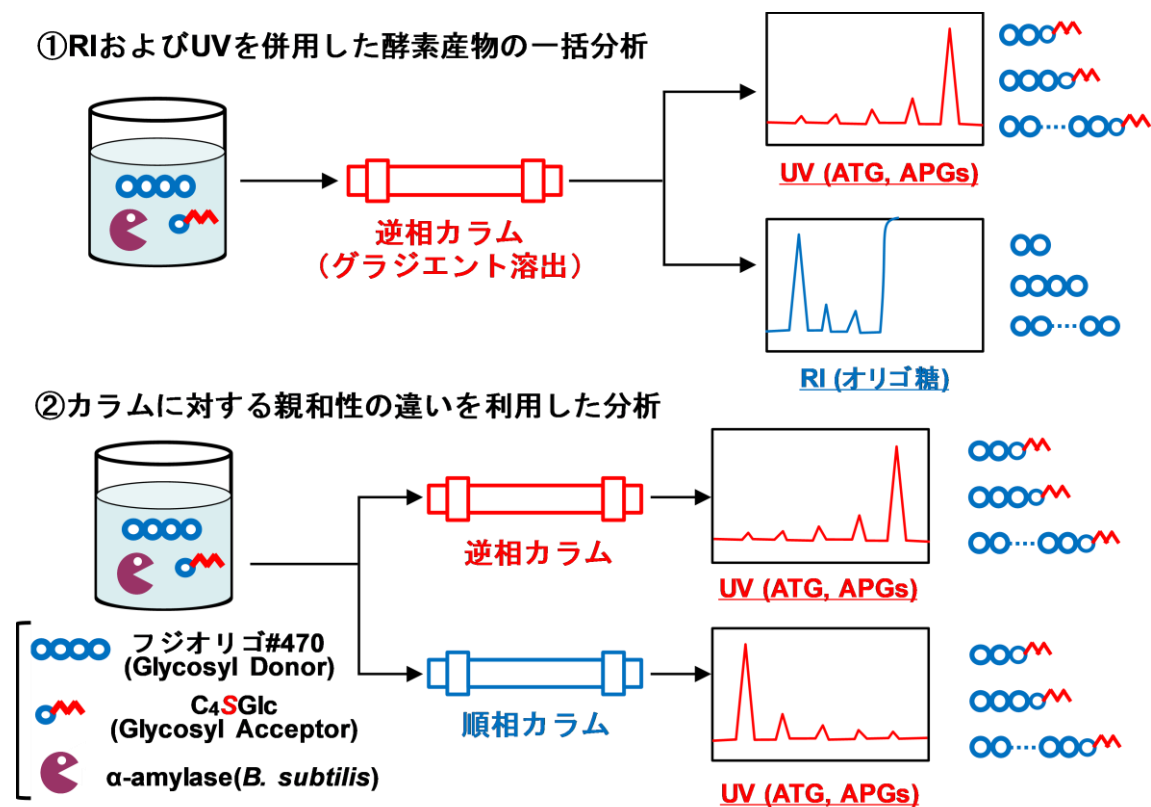


Fig.4-29 ATGのUV吸収特性を活かしたHPLCによる酵素反応評価

・RI検出器およびUV検出器を併用した酵素反応産物の同時分析

3章で述べたように、α-アミラーゼによる非天然型基質に対する潜在的グリコシル化特性を評価する場合、糖受容体であるATGの濃度変化やAPGsの形成挙動を観測するだけでは、天然型基質に対する反応特性と比較することはできない。

そのためには、糖供与体を出発原料とするオリゴ糖の濃度を追跡する必要がある。しかし、その場合、1つの酵素反応の評価において、極性がそれぞれ異なる ATG, APGs, オリゴ糖を評価する必要があり、その分析手順が煩雑となる。そこで、Fig.4-6 に示したように ATG が UV 検出条件下で HPLC によるグラジエント溶出で観測可能であることを利用し、分析初期段階では RI 検出条件でオリゴ糖を分析し、その後グラジエントプログラムにより溶出される APGs ならびに ATG を測定する手法を試みた (Fig.4-30)。

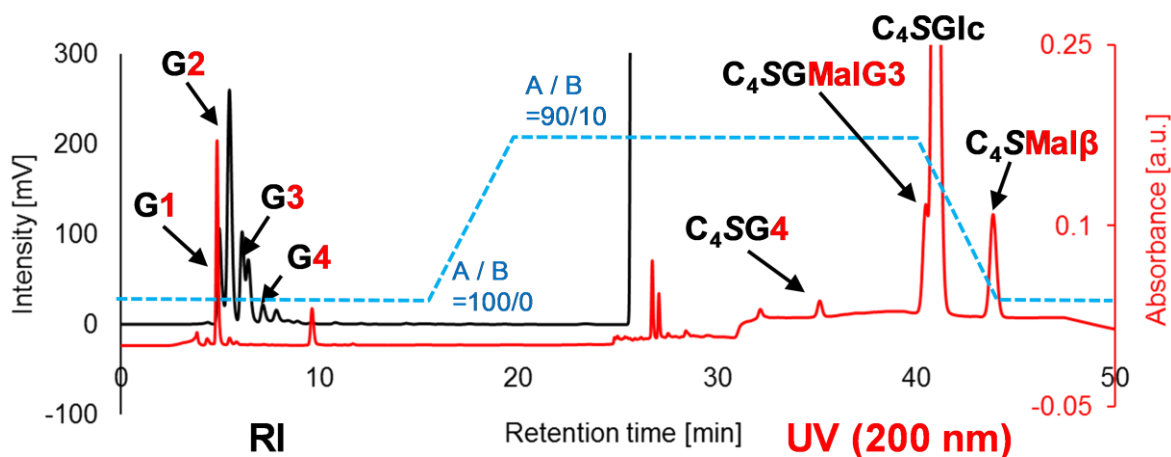


Fig.4-30 RIおよびUV検出器を併用したHPLCによる酵素反応産物の同時分析
(カラム: Mightysil RP-18 GP Aqua (4.6 φ × 250 mm),
溶離液: H₂O(A)/ CH₃CN(B) = 100/0 → 90/10 (Linear Gradient), 流速: 0.7 mL/min,
インジェクション: 20 μL, カラム温度: 40 °C, 検出条件: RI and DAD (200 nm))

分析に用いた酵素反応溶液として、糖受容体として G4 の濃度が 200 mM になるように設定した G47、糖受容体として 100 mM の C₄SGIc、20 μM の α-アミラーゼを添加して pH5.0、25 °C に保って反応を行い、反応開始後 48 時間後にサンプリングを行った。分析は、以下の条件で行った。

カラム: Mightysil RP-18 GP Aqua (4.6 φ × 250 mm), 検出: UV(200 nm) and RI,
溶離液: H₂O/ CH₃CN = 100/0 → 90/10 (Linear Gradient), 流速 0.7 mL/min,
カラム温度: 40 °C, インジェクション: 20 μL

グラジエントプログラムは、最初に溶離液を H₂O 100 %の組成で 15 分間、0.7 mL/min の流速で流した後、5 分間かけて溶離液の組成を H₂O/ CH₃CN = 90/10 へとリニアグラジエントで組成変更を行い、20 分間溶離液の組成を H₂O/ CH₃CN = 90/10 に保った後に、5 分間かけて溶離液を H₂O 100 %へとリニアグラジエントで

組成を戻した。溶出物の検出は RI および UV (200 nm)により行った。HPLC クロマトグラムからわかるように、溶出時間 10 分以内で G1~G4 までのオリゴ糖を RI で、溶出時間 30 分以降で APGs および ATG を 1 度の分析で検出することができた。Fig.4-30 の分離結果からは APGs, ATG の単離が完全にはなされていないものの、グラジエントプログラムを変更することでその単離を達成することが期待できる。また、用いる逆相カラムの充填剤の種類を変えることで、C₄SGlc よりも炭素鎖の長い ATG や短い ATG を用いた酵素反応系への本手法の適用が可能であると考えた。

・ ATG の特性と HPLC カラム特性を活用した酵素反応産物の分析

本節でこれまで述べてきたように、ATG の UV 吸収特性を活かすことで、そのグリコシル化産物である APGs に対する簡易な評価系を構築することができる。一方で、ATG は疎水性官能基であるアルキル鎖をアグリコン部位に有するため、逆相カラムに対して特異な親和性を示すことが予想される。また、配糖体である APGs はグリコン部位の糖鎖の影響が強くなるため、親水性相互作用 (HILIC) クロマトグラフィーのような順相カラムとの親和性が高くなると予測できる。そこで、逆相および順相カラムを用いることで、ATG, APGs に対するそれぞれの親和性を活かして、ATG, APGs の単離、分析に適した条件の探索を行った。

Fig.4-31 に、C₄SGlc を糖受容体とした酵素反応溶液中の各種 APGs の形成挙動に着目し、(a)逆相および(b)順相カラムによる分析から得たクロマトグラムを重ねて示す。酵素反応は、G47 を糖供与体とし、それに含まれる G4 の濃度が 200 mM になるように設定し、C₄SGlc の濃度を 100 mM に設定した。α-アミラーゼの濃度は、酵素反応中においてタンパク濃度で 20 μM になるように設定し、20 mM, pH5.0 の酢酸緩衝液存在下で 25 °C に保って反応をおこない、観測時間ごとにサンプリングを行った。

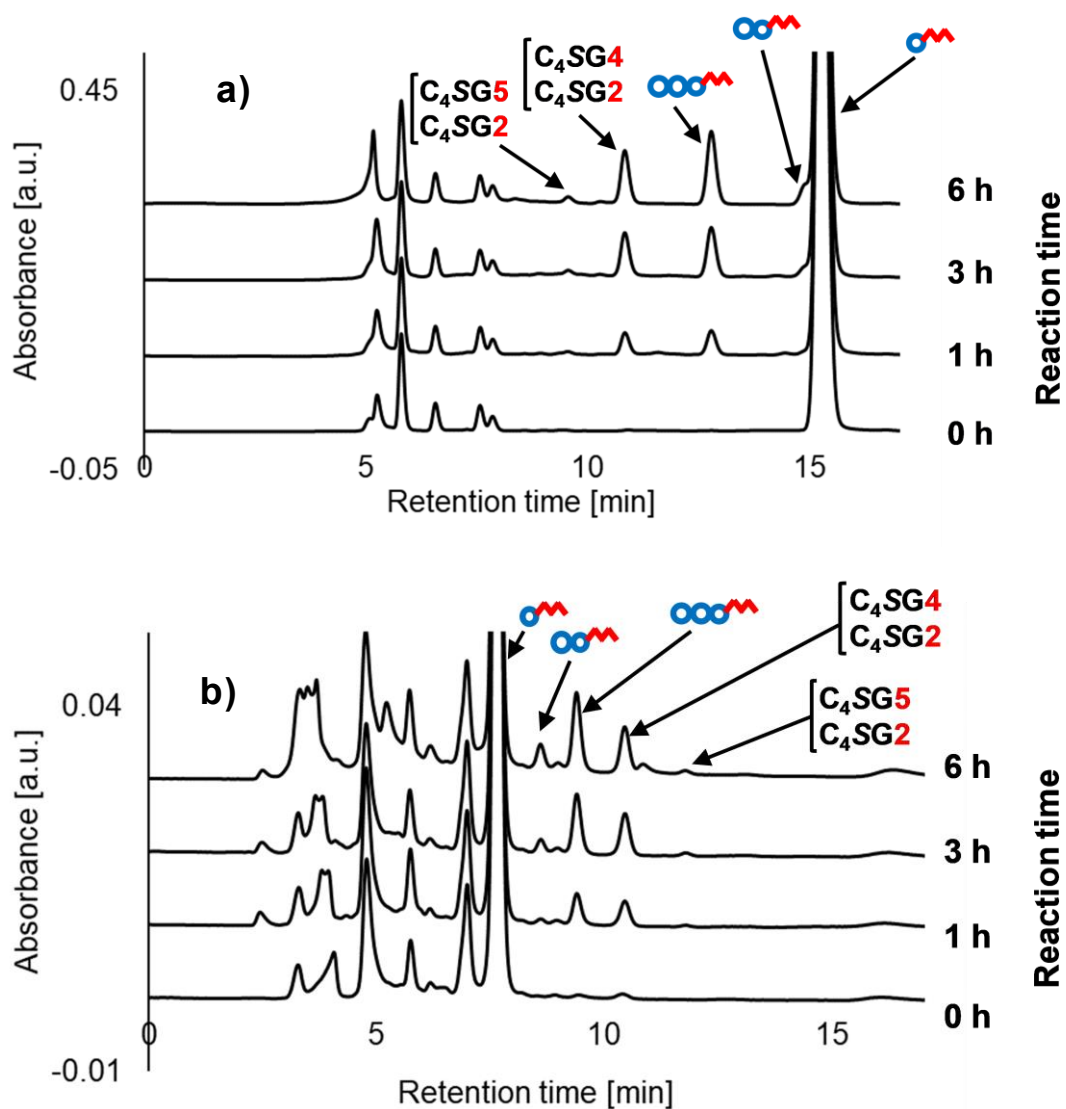


Fig.4-31 UV 検出条件として(a)逆相カラムあるいは(b)順相カラムを使い分けした HPLC による酵素反応産物の分析

a) 逆相カラムを用いた分析:

カラム: Mightysil RP-4 GP (4.6 φ × 250 mm), 検出: UV(200 nm),
 溶離液: CH₃CN/H₂O = 10/90, 流速 0.6 mL/min, カラム温度: 60 °C

b) 順相カラムを用いた分析:

カラム: ULTRON AF-HILIC-CD (4.6 φ × 250 mm), 検出: UV(200 nm),
 溶離液: CH₃CN/H₂O = 60/40, 流速 0.5 mL/min, カラム温度: 40 °C

Fig.4-31(a)の逆相カラムによる APGs の分離結果より、ほぼ良好に単離出来ているものの、酵素反応後期において形成される C₄SMalβ が C₄SGlc に重なり、完全な単離が困難であることがわかる。一方で、Fig.4-31(b)の順相カラムによる APGs の分離結果では、C₄SMalβ は良好に単離できた。また、これまで逆相カラムによる単離が困難であったグルコシル結合様式が未知の C₄SG2 が約 11 分に溶出していることが確認できた。このように検出あるいは分離が非常に困難な酵素反応産物に対しても、本手法を用いることで解決が可能であることが示唆された。

以上の ATG の UV 吸収特性の活用を念頭に置いた HPLC の分離システムとの併用、分析手順の拡張により、これまでに評価が困難であった酵素反応の評価への適用と発展が期待できる。

4.3 結論

以上の結果について、それぞれの節ごとに結論を述べる。

・アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性

3 章までおこなってきた C₈OGlc を糖受容体とした α-アミラーゼによるグリコシル化反応に対する評価系の再構築を目指し、新たに ATG (C₈SGlc) を糖受容体とした反応産物評価条件の検討をしたところ、ATG が 200-230 nm の UV 短波長領域において特異な吸収特性を有することを確認した。この現象は、ATG の S-C-O 結合近傍における n-to-σ*遷移機構により起きる特性であることを、同様の特性を有するジアルキルスルフィドとの比較により仮説として提示した。

・アルキルチオグリコシドの紫外吸収特性における構造の影響

ATG の UV 吸収特性がアルキルチオグリコシドとして普遍的な現象なのか、特に、そのグリコン、アグリコン部位の構造により、その UV 吸収特性がどのような影響を受けるのかという点について実験的にスペクトルパターンを比較することで検証を行った。その結果、S-C-O 結合近傍の C-1 炭素におけるアノマー配置および C-2 炭素に結合するヒドロキシ基の配置の違いにより、190-204 nm 領域の超短波長領域において吸収特性に僅かな影響があるものの酵素的グリコシル化反応で生じるグリコシル化産物である APGs の反応追跡を行う際、UV 検出条件下で HPLC により分析、評価できることが示唆された。

・アルキルチオグリコシドを糖受容体としたグリコシル化反応の評価

本項では、実際に酵素反応系において ATG をラベル化糖受容体として、微量のグリコシル化産物 (APGs) の評価系の構築が可能かについて、主に APGs に着目

し、酵素反応中における APGs の形成挙動が可能な反応条件、分析条件の検討を行った。グリコシル化反応における糖受容体を C₄SGlc としたモデル反応により、その APGs の形成挙動の評価を行ったところ、酵素反応推移において形成される種々の APGs を確認、構造評価を行うことができた。また、これらの APGs の形成挙動から、 α -アミラーゼによるグリコシル化特性が、第 3 章で述べた α -アミラーゼによる基質認識性に強く影響を受けていることが示唆された。

最後に、ATG の UV 吸収特性と HPLC の分離システムを活かした評価系の拡張による効率的、多角的な酵素反応産物の評価手法について提案した。

ATG のこのような UV 吸収特性を活用することで、今後、ATG をラベル化糖受容体としたさまざまな糖加水分解酵素による Enzyme Promiscuity の評価への適用、そして ATG の分子構造に着目した計算化学的検証からの分子構造、機能と立体電子効果との相関性についての重要な知見が期待できる。

4.4 実験方法

○装置ならびに機材

HPLC	RI Monitor	HITACHI	Chromaster 5450
	DAD	HITACHI	Chromaster 5430
	Column	KANTO CHEMICAL	Mightysil RP-18 GP2 (4.6 ϕ \times 150 mm)
		KANTO CHEMICAL	Mightysil RP-18 GP2 (4.6 ϕ \times 250 mm)
		KANTO CHEMICAL	Mightysil RP-18 GP Aqua (4.6 ϕ \times 250 mm)
		KANTO CHEMICAL	Mightysil RP-4 GP (4.6 ϕ \times 250 mm)
		SHINWA CHEMICAL	ULTRON AF-HILIC-CD (4.6 ϕ \times 250 mm)
	Pump	HITACHI	Chromaster 5110
MALDI-TOF MS		SHIMADZU	AXIMA-LNR
TLC		MERCK	Silica gel 60 F ₂₅₄
NMR		JEOL	ECX-400 (400MHz)
UV-Vis 分光光度計		Jasco	V-730 Bio
計算ソフト環境		Microsoft	Visual Studio 2015

○溶媒と試薬

溶媒は市販品を蒸留せずにそのまま使用した。有機化学合成反応および酵素反応に用いる試薬、溶媒は市販品(関東化学株式会社、東京化成工業株式会社、和光純薬工業株式会社、キシダ化学株式会社)をそのまま使用した。酵素反応における糖供与体としては、マルトース (以下 G2, 和光純薬)、フジオリゴ#360 シロップ (G36, 日本食品化工株式会社)、フジオリゴ#470 シロップ (G47, 日本食品化工) を用いた。それぞれのオリゴ糖シロップは、凍結乾燥を行うことで粉末状にした。ATG に対する比較対象として、*n*-octyl β -D-glucopyranoside (C₈OGlc, 和光純薬) を糖受容体として用いた。糖加水分解酵素である α -アミラーゼ (*Bacillus subtilis* 由来) は市販 (キシダ化学) のものを用い、酵素製剤中に含まれる澱粉を予め除去した上でそのタンパク濃度を文献値 ($E_{280nm}^{1\%} = 19.8 \text{ cm}^{-1}$, 分子量 41,900)¹³⁾をもとに算出し、所定濃度にて用いた。 α -アミラーゼからの澱粉の除去は次項の手順で簡易に行った。また、本章でも 3 章と同様に既存の酵素反応解析モデルに基づいたグリコシル化反応条件の検討を行っており、特に本章では糖供与体にオリゴ糖を選択しているため、3 章で紹介した計算モデル (Cal.2) により、反応推移における糖供与体環境の変化を予測した。

・ *Bacillus subtilis* 由来の α -アミラーゼに含まれる澱粉の除去

購入した *Bacillus subtilis* 由来の 8.70 g の α -アミラーゼを 160 mL の蒸留水に懸濁させ、4 つのプラスチックチューブに分けた後、これを遠心分離した (3,000 rpm, 5 分間)。その後、氷冷下で各プラスチックチューブから上澄み層を採取し、300 mL ナスフラスコに移した後に凍結乾燥を行った。溶媒除去により得た粉体は上澄み層で 5.61 g であった (酵素粉体回収率 64%)。この粉体を水に溶かし、TLC (2-プロパノール/水=8/2) で確認したところ、マルトースのスポットがやや存在したものの、澱粉のスポットが消失したため、以降これを酵素として使用した。

○各種 ATG の有機化学合成手順

全ての有機化学合成における反応追跡は、TLC を用いて行った。TLC プレートは Silica gel 60 F₂₅₄(MERCK)を用いた。発色試薬には 5 %硫酸-メタノール溶液を用いた。また、C₄SMan、C₄SMan、C₄SLac は、最終合成産物が α -および β -グリコシドの混合物であったため、逆相カラムを装着した HPLC により分取を行った。

全ての ATG は、既存の合成手順¹⁴⁾に基づいて合成を行った (Fig.4-32)。それぞれの ATG の構造解析は、¹H および ¹³C NMR によって行い、ピークの帰属については文献値^{15,16,17,18)}を基に行った。

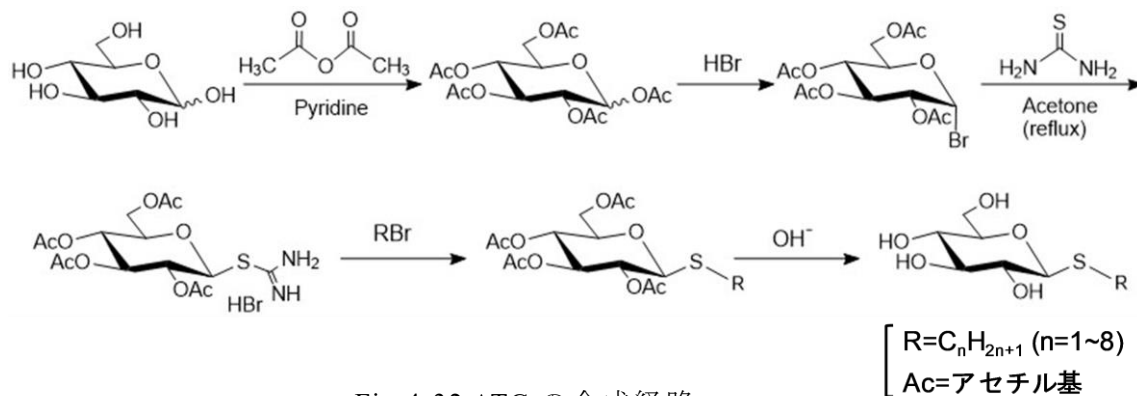


Fig.4-32 ATG の合成経路

methyl 1-thio-β-D-glucopyranoside (C₁SGlcβ)の合成

methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranoside (0.51 g, 1.3 mmol)を 20 mM ナトリウムメトキシド メタノール溶液(13 mL)に溶解させ、室温で 24 時間攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、10 mM の塩酸水溶液を加え攪拌し中和操作を行った。反応溶液が中性になったことを確認した後、メタノールで洗浄しながら濾過し、得られた濾液を減圧下溶媒除去した。さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=6/1)により精製し、減圧下溶媒除去することで無色のオイルとして C₁SGlcβ(0.25 g, 1.2 mmol, 収率: 91 %)を得た。

¹H NMR (400 MHz, δ, D₂O): 2.17(s, 3 H, -CH₃), 3.28-3.47(m, 4 H, H-2, 3, 4, 5), 3.69(dd, 1 H, H-6a, $J_{6a,5} = 5.6$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz), 3.87(dd, 1 H, H-6b, $J_{6b,5} = 2.0$ Hz, $J_{6b,6a} = 12$ Hz), 4.41(d, 1 H, H-1, $J_{1,2} = 9.6$ Hz)

1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-glucopyranoside の合成

D-グルコース (30 g, 0.16 mol) をピリジン (150 mL) に溶解させ室温で無水酢酸 (150 mL, 1.6 mol) を滴下して 24 時間攪拌した。氷水中で再沈殿・濾過を行い、ピリジンを除去した後クロロホルムを加え、飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し白色固体 (63 g, 0.16 mol, 収率: quant) を得た。

2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-glucopyranosyl bromide

D-glucose pentaacetate (63 g, 0.16 mol)をクロロホルム (380 mL) に溶解させ 0°C で 30 %HBr 酢酸溶液 (310 mL) をクロロホルム (100 mL) で希釈した混合溶液を

滴下して 1.5 時間室温で攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、過剰量のクロロホルムを加え希釈し液性が中性になるまで炭酸水素ナトリウム飽和水溶液を加えた後氷水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒除去して、褐色のオイル (64 g, 0.16 mol, 収率: 97 %) を得た。

2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl) thiopseudourea hydrobromide (1)

2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide (64 g, 0.16 mol) をアセトン (240 mL) に溶解させ、チオ尿素 (27 g, 0.35 mol) を加え約 2 時間加熱還流を行なった。反応溶液中に結晶が析出した後に、濾過・洗浄操作を行なった。これを減圧乾燥することで白色粉末 **1** (49 g, 0.10 mol, 収率: 63 %) を得た。

***n*-butyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranoside (2)**

1 (5.0 g, 10 mmol) と臭化 *n*-ブチル (1.5 g, 11 mmol) を 50 % アセトン水溶液 (250 mL) に溶解させ、炭酸カリウム (1.5 g, 11 mmol) および亜硫酸水素ナトリウム (1.0 g, 9.6 mmol) を加え室温で一晩攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、塩化メチレンで二度抽出操作を行い、水で洗浄した後に有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し黄色いオイル **2** (3.7 g, 4.7 mmol, 収率: 46 %) を得た。

***n*-butyl 1-thio- β -D-glucopyranoside (C₄SGlc β)**

粗精製の **2** (3.7 g, 4.7 mmol) をナトリウムメトキシド 20 mM メタノール溶液 (100 mL) に溶解させ、室温で 24 時間攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、10 mM の塩酸水溶液を加え攪拌し中和操作を行った。反応溶液が中性になったことを確認した後、メタノールで洗浄しながら濾過し、得られた濾液を減圧下溶媒除去した。さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=7/1) により精製し、減圧下溶媒除去することで無色のオイルとして C₄SGlc β (0.91 g, 3.6 mmol, 収率: 77 %) を得た。

¹H NMR (400 MHz, δ , D₂O): 0.91(t, 3 H, -CH₃), 1.37-1.66(m, 4 H, -CH₂-), 2.71-2.80(m, 2 H, -CH₂-), 3.28-3.50(m, 4 H, H 2, 3, 4, 5), 3.72(dd, 1 H, H-6a, $J_{6a,5}$ = 5.2 Hz, $J_{6a,6b}$ = 13 Hz), 3.91(dd, 1 H, H-6b, $J_{6b,5}$ = 2.0 Hz, $J_{6b,6a}$ = 13 Hz), 4.53(d, 1 H, H-1, $J_{1,2}$ = 9.6 Hz)

C_nSGlc β (n=2, 3 および 5~8) も C₄SGlc β と同様の手順で得た。

***n*-ethyl 1-thio- β -D-glucopyranoside (C₂SGlc β)**

C₂SGlc β は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=6/1) により精製後、減圧下溶媒除去することで無色のオイルとして C₂SGlc β (収率: 37 %) を得た。

^1H NMR (400 MHz, δ , D_2O): 1.23(t, 3 H, $-\text{CH}_3$), 2.64-2.75(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 3.22-3.45(m, 4 H, H 2, 3, 4, 5), 3.66(dd, 1 H, H-6a, $J_{6a,5}=5.6$ Hz, $J_{6a,6b}=12$ Hz), 3.85(dd, 1 H, H-6b, $J_{6b,5}=2.4$ Hz, $J_{6b,6a}=12$ Hz), 4.49(d, 1 H, H-1, $J_{1,2}=9.6$ Hz)

***n*-propyl 1-thio- β -D-glucopyranoside ($\text{C}_3\text{SGlc}\beta$)**

$\text{C}_3\text{SGlc}\beta$ は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=6/1)により精製後、減圧下溶媒除去することで無色のオイルとして $\text{C}_3\text{SGlc}\beta$ (収率: 50 %)を得た。

^1H NMR (400 MHz, δ , D_2O): 0.96(t, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.58-1.67(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 2.63-2.78(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 3.26-3.48(m, 4 H, H 2, 3, 4, 5), 3.70(dd, 1 H, H-6a, $J_{6a,5}=5.2$ Hz, $J_{6a,6b}=12$ Hz), 3.89(dd, 1 H, H-6b, $J_{6b,5}=2.4$ Hz, $J_{6b,6a}=12$ Hz), 4.51(d, 1 H, H-1, $J_{1,2}=10$ Hz)

***n*-pentyl 1-thio- β -D-glucopyranoside ($\text{C}_5\text{SGlc}\beta$)**

$\text{C}_5\text{SGlc}\beta$ は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=7/1)により精製後、減圧下溶媒除去することで無色のオイルとして $\text{C}_5\text{SGlc}\beta$ (収率: 71 %)を得た。

^1H NMR (400 MHz, δ , D_2O): 0.88(t, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.27-1.39(m, 4 H, $-\text{CH}_2-$), 1.59-1.66(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 2.66-2.80(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 3.27-3.49(m, 4 H, H 2, 3, 4, 5), 3.71(dd, 1 H, H-6a, $J_{6a,5}=5.2$ Hz, $J_{6a,6b}=13$ Hz), 3.90(dd, 1 H, H-6b, $J_{6b,5}=2.4$ Hz, $J_{6b,6a}=12$ Hz), 4.51(d, 1 H, H-1, $J_{1,2}=9.6$ Hz)

***n*-hexyl 1-thio- β -D-glucopyranoside ($\text{C}_6\text{SGlc}\beta$)**

$\text{C}_6\text{SGlc}\beta$ は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=7/1)により精製後、減圧下溶媒除去することで無色のオイルとして $\text{C}_6\text{SGlc}\beta$ (収率: 48 %)を得た。

^1H NMR (400 MHz, δ , D_2O): 0.87(m, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.26-1.42(m, 6 H, $-\text{CH}_2-$), 1.59-1.67(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 2.67-2.79(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 3.27-3.49(m, 4 H, H 2, 3, 4, 5), 3.71(dd, 1 H, H-6a, $J_{6a,5}=5.6$ Hz, $J_{6a,6b}=12$ Hz), 3.90(dd, 1 H, H-6b, $J_{6b,5}=1.6$ Hz, $J_{6b,6a}=12$ Hz), 4.52(d, 1 H, H-1, $J_{1,2}=9.6$ Hz)

***n*-heptyl 1-thio- β -D-glucopyranoside ($\text{C}_7\text{SGlc}\beta$)**

$\text{C}_7\text{SGlc}\beta$ は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=7/1)により精製後、減圧下溶媒除去することで無色のオイルとして $\text{C}_7\text{SGlc}\beta$ (収率: 44 %)を得た。

^1H NMR (400 MHz, δ , D_2O): 0.87(m, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.27-1.39(m, 8 H, $-\text{CH}_2-$), 1.59-1.65(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 2.69-2.79(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 3.27-3.49(m, 4 H, H 2, 3, 4, 5), 3.71(dd, 1 H, H-6a, $J_{6a,5} = 5.6$ Hz, $J_{6a,6b} = 12$ Hz), 3.90(dd, 1 H, H-6b, $J_{6b,5} = 2.0$ Hz, $J_{6b,6a} = 12$ Hz), 4.51(d, 1 H, H-1, $J_{1,2} = 10$ Hz)

***n*-octyl 1-thio- β -D-glucopyranoside ($\text{C}_8\text{SGlc}\beta$)**

$\text{C}_8\text{SGlc}\beta$ は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 7/1)により精製後、減圧下溶媒除去することで無色のオイルとして $\text{C}_8\text{SGlc}\beta$ (収率: 33 %)を得た。

^1H NMR (400 MHz, δ , D_2O): 0.88(m, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.28-1.40(m, 10 H, $-\text{CH}_2-$), 1.61-1.66(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 2.70-2.78(m, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 3.30-3.52(m, 4 H, H 2, 3, 4, 5), 3.75(dd, 1 H, H-6a, $J_{6a,5} = 4.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 12$ Hz), 3.89(m, 1 H, H-6b), 4.52(d, 1 H, H-1, $J_{1,2} = 9.6$ Hz)

1,2,3,6,2',3',4',6'-octa-*O*-acetyl-maltoside の合成

マルトース (11 g, 31 mmol) をピリジン (40 mL) に溶解させ室温で無水酢酸 (50 mL, 0.52 mol) を滴下して 24 時間攪拌した。氷水中で再沈殿・濾過を行い、ピリジンを除去した後クロロホルムを加え、飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し白色固体 (20 g, 29 mmol, 収率: 94 %) を得た。

2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-D-maltosyl bromide

maltose octaacetate (20 g, 29 mmol)をクロロホルム (50 mL) に溶解させ 0°Cで 30% HBr 酢酸溶液 (50 mL) をクロロホルム (10 mL) で希釈した混合溶液を滴下して 2 時間室温で攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、過剰量のクロロホルムを加え希釈し液性が中性になるまで炭酸水素ナトリウム飽和水溶液を加えた後氷水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒除去して、褐色のオイル (20 g, 収率: quant.) を得た。

2-(2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-D-maltosyl) thiopseudourea hydrobromide (3)

2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-D-maltosyl bromide (20 g, 29 mmol)をアセトン(60 mL)に溶解させ、チオ尿素(2.6 g, 33 mmol)を加え 1.5 時間加熱還流を行なった。TLC にて原料の消失を確認後、クロロホルムを加え、飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し、白色のオイルを得た。このオイルをメタノール (50 mL) で溶かした後、ヘキサンとの分液を行っ

た。回収したメタノール層を減圧下溶媒除去し、無色の固体 **3** (収率: 66 %)を得た。

***n*-butyl 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio-*D*-maltoside (**4**)**

3 (3.0 g, 3.9 mmol)と臭化 *n*-ブチル(0.69 g, 4.9 mmol)を 50 %アセトン水溶液(110 mL)に溶解させ、炭酸カリウム(0.66 g, 4.8 mmol)および亜硫酸水素ナトリウム(0.44 g, 4.2 mmol)を加え室温で一晩攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、塩化メチレンで二度抽出操作を行い、水で洗浄した後に有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し黄色いオイルを得た。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン=2/3)により精製し、減圧下溶媒除去することで黄色いオイルとして **4**(1.4 g, 2.0 mmol, 収率: 53 %)を得た。

***n*-butyl 1-thio-*D*-maltoside (**C₄SMal**)**

粗精製の **4**(1.4 g, 2.0 mmol)をナトリウムメトキシド 20 mM メタノール溶液(75 mL)に溶解させ、室温で 24 時間攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、10 mM の塩酸水溶液を加え攪拌し中和操作を行った。反応溶液が中性になったことを確認した後、メタノールで洗浄しながら濾過し、得られた濾液を減圧下溶媒除去し、無色のオイルを得た。得られた **C₄SMal** は、 α -および β -グリコシドの混合物 ($\alpha/\beta \approx 0.19$) であったため、それぞれのアノマー異性体を HPLC により分取した。

***n*-butyl 1-thio- α -*D*-maltoside (**C₄SMal α**)**

C₄SMal α は、HPLC を用いた精製により、無色のオイルとして得た。

¹H NMR (400 MHz, δ , D₂O): 0.89(t, 3 H, -CH₃), 1.35-1.62(m, 4 H, -CH₂-), 2.58-2.66(m, 2 H, -CH₂-), 3.37-4.15(m, 12 H, H-2-6, 2'-6'), 5.37(d, 1 H, H-1, $J_{1,2}=4.0$ Hz), 5.39(d, 1 H, H-1', $J_{1',2'}=4.0$ Hz)

¹³C NMR (100 MHz, δ , D₂O): 12.8(-CH₃), 21.3, 29.8, 31.0(3 C, -CH₂-), 60.4, 60.5 (2C, C-6, 6'), 69.3-77.1(8 C, C-2-5, 2'-5'), 85.3(C-1), 99.7(C-1')

***n*-butyl 1-thio- β -*D*-maltoside (**C₄SMal β**)**

C₄SMal β は、HPLC を用いた精製により、無色のオイルとして得た。

¹H NMR (400 MHz, δ , D₂O): 0.85(t, 3 H, -CH₃), 1.34-1.63(m, 4 H, -CH₂-), 2.68-2.78(m, 2 H, -CH₂-), 3.33-3.88(m, 12 H, H-2-6, 2'-6'), 4.52(d, 1 H, H-1, $J_{1,2}=10$ Hz), 5.39(d, 1 H, H-1', $J_{1',2'}=4.0$ Hz)

¹³C NMR (100 MHz, δ , D₂O): 12.9(-CH₃), 20.4, 29.6, 31.5(3 C, -CH₂-), 60.5, 60.9 (2C, C-6, 6'), 69.3-78.5(8 C, C-2-5, 2'-5'), 85.2(C-1), 99.6(C-1')

1,2,3,6,2',3',4',6'-octa-*O*-acetyl-lactoside の合成

ラクトース (51 g, 0.14 mol) をピリジン (200 mL) に溶解させ室温で無水酢酸 (200 mL, 2.1 mol) を滴下して 2 日間攪拌した。氷水中で再沈殿・濾過を行い、ピリジンを除去した後クロロホルムを加え、飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し黄色のオイル (95 g, 0.14 mol, 収率: quant) を得た。

2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-D-lactosyl bromide

lactose octaacetate (95 g, 0.14 mol) をクロロホルム (300 mL) に溶解させ 0°C で 30 %HBr 酢酸溶液 (250 mL) をクロロホルム (50 mL) で希釈した混合溶液を滴下して 2 時間室温で攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、過剰量のクロロホルムを加え希釈し液性が中性になるまで炭酸水素ナトリウム飽和水溶液を加えた後氷水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒除去して、褐色のオイル (107 g, 収率: quant.) を得た。

2-(2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-D-lactosyl) thiopseudourea hydrobromide (5)

2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-D-lactosyl bromide (107 g, 0.15 mmol) をアセトン (300 mL) に溶解させ、チオ尿素 (15 g, 0.19 mol) を加え 5 時間加熱還流を行なった。TLC にて原料の消失を確認後、クロロホルムを加え、飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し、白色のオイルを得た。このオイルをメタノール (200 mL) で溶かした後、ヘキサンとの分液を行った。回収したメタノール層を減圧下溶媒除去し、無色の固体 **5** (収率: 80 %) を得た。

***n*-butyl 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio-D-lactoside (6)**

5 (5.0 g, 6.4 mmol) と臭化 *n*-ブチル (1.0 g, 7.2 mmol) を 50 %アセトン水溶液 (150 mL) に溶解させ、炭酸カリウム (1.0 g, 7.2 mmol) および亜硫酸水素ナトリウム (0.70 g, 6.7 mmol) を加え室温で一晩攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、塩化メチレンで二度抽出操作を行い、水で洗浄した後に有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し黄色いオイルを得た。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン=2/3) により精製し、減圧下溶媒除去することで黄色いオイルとして **6** (3.1 g, 4.3 mmol, 収率: 67 %) を得た。

***n*-butyl 1-thio-D-lactoside (C₄SLac)**

粗精製の **6** (3.1 g, 4.3 mmol) をナトリウムメトキシド 20 mM メタノール溶液 (160 mL) に溶解させ、室温で 24 時間攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、10 mM の

塩酸水溶液を加え攪拌し中和操作を行った。反応溶液が中性になったことを確認した後、メタノールで洗浄しながら濾過し、得られた濾液を減圧下溶媒除去し、無色のオイルを得た。得られた C₄SLac は、 α -および β -グリコシドの混合物 ($\alpha/\beta \approx 0.11$) であったため、それぞれのアノマー異性体を HPLC により分取した。

***n*-butyl 1-thio- α -D-lactoside (C₄SLac α)**

C₄SLac α は、HPLC を用いた精製により、無色のオイルとして得た。

¹H NMR (400 MHz, δ , D₂O): 0.86(t, 3 H, -CH₃), 1.32-1.60(m, 4 H, -CH₂-), 2.55-2.63(m, 2 H, -CH₂-), 3.52-4.13(m, 12 H, H-2-6, 2'-6'), 4.41(d, 1 H, H-1', $J_{1',2'}=7.6$ Hz), 5.37(d, 1 H, H-1, $J_{1,2}=5.6$ Hz)

¹³C NMR (100 MHz, δ , D₂O): 12.8(-CH₃), 21.3, 29.7, 31.0(3 C, -CH₂-), 59.9, 61.0(2C, C-6, 6'), 68.5-78.6(8 C, C-2-5, 2'-5'), 85.2(C-1), 102.9(C-1')

***n*-butyl 1-thio- β -D-lactoside (C₄SLac β)**

C₄SLac β は、HPLC を用いた精製により、無色のオイルとして得た。

¹H NMR (400 MHz, δ , D₂O): 0.86(t, 3 H, -CH₃), 1.31-1.60(m, 4 H, -CH₂-), 2.64-2.77(m, 2 H, -CH₂-), 3.28-3.93(m, 12 H, H-2-6, 2'-6'), 4.41(d, 1 H, H-1', $J_{1',2'}=8.0$ Hz), 4.50(d, 1 H, H-1, $J_{1,2}=10$ Hz)

¹³C NMR (100 MHz, δ , D₂O): 12.8(-CH₃), 21.3, 29.6, 31.4(3 C, -CH₂-), 60.1, 61.0(2C, C-6, 6'), 68.5-78.6(8 C, C-2-5, 2'-5'), 85.2(C-1), 102.8(C-1')

1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-mannoside の合成

マンノース (10 g, 54 mmol) をピリジン (50 mL) に溶解させ室温で無水酢酸 (50 mL, 0.52 mol) を滴下して 1 晩攪拌した。氷水中で再沈殿・濾過を行い、ピリジンを除去した後クロロホルムを加え、飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し黄色のオイル (16 g, 41 mmol, 収率: 76 %) を得た。

2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannosyl bromide

mannose tetraacetate (16 g, 41 mmol) をクロロホルム (80 mL) に溶解させ 0°C で 30% HBr 酢酸溶液 (80 mL) をクロロホルム (20 mL) で希釈した混合溶液を滴下して 2 時間室温で攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、過剰量のクロロホルムを加え希釈し液性が中性になるまで炭酸水素ナトリウム飽和水溶液を加えた後氷水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒除去して、褐色のオイル (16 g, 収率: 95 %) を得た。

2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-mannosyl) thiopseudourea hydrobromide (7)

2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannosyl bromide (16 g, 39 mmol)をアセトン(60 mL)に溶解させ、チオ尿素(3.4 g, 44 mmol)を加え 1.5 時間加熱還流を行なった。TLC にて原料の消失を確認後、クロロホルムを加え、飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し、白色のオイルを得た。このオイルをメタノール (100 mL) で溶かした後、ヘキサンとの分液を行った。回収したメタノール層を減圧下溶媒除去し、無色の固体 **7** (収率: 74 %)を得た。

***n*-butyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-D-mannoside (8)**

7 (5.1 g, 10 mmol)と臭化 *n*-ブチル(1.6 g, 11 mmol)を 50 %アセトン水溶液(150 mL)に溶解させ、炭酸カリウム(1.6 g, 12 mmol)および亜硫酸水素ナトリウム(1.1 g, 11 mmol)を加え室温で一晩攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、塩化メチレンで二度抽出操作を行い、水で洗浄した後に有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これを減圧下溶媒除去し黄色いオイルを得た。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン=1/3)により精製し、減圧下溶媒除去することで黄色いオイルとして **8** (2.6 g, 6.1 mmol, 収率: 61 %)を得た。

***n*-butyl 1-thio-D-mannoside (C₄SMan)**

粗精製の **8** (2.6 g, 6.1 mmol)をナトリウムメトキシド 20 mM メタノール溶液(40 mL)に溶解させ、室温で 24 時間攪拌した。TLC にて反応終了を確認後、10 mM の塩酸水溶液を加え攪拌し中和操作を行った。反応溶液が中性になったことを確認した後、メタノールで洗浄しながら濾過し、得られた濾液を減圧下溶媒除去し、無色のオイルを得た。得られた C₄SMan は、 α -および β -グリコシドの混合物 ($\alpha / \beta \approx 5.6$) であったため、それぞれのアノマーを HPLC により分取した。

***n*-butyl 1-thio- α -D-mannoside (C₄SMan α)**

C₄SMan α は、HPLC を用いた精製により、無色のオイルとして得た。

¹H NMR (400 MHz, δ , D₂O): 0.87(t, 3 H, -CH₃), 1.33-1.62(m, 4 H, -CH₂-), 2.60-2.69(m, 2 H, -CH₂-), 3.60-4.01(m, 6 H, H-2-6), 5.26(d, 1 H, H-1, $J_{1,2}=1.2$ Hz)

¹³C NMR (100 MHz, δ , D₂O): 12.8(-CH₃), 21.2, 30.5, 30.9(3 C, -CH₂-), 60.8(C-6), 67.1-73.1(4 C, C-2-5), 84.7(C-1)

***n*-butyl 1-thio- β -D-mannoside (C₄SMan β)**

C₄SMan β は、HPLC を用いた精製により、無色のオイルとして得た。

¹H NMR (400 MHz, δ , D₂O): 0.88(t, 3 H, -CH₃), 1.31-1.62(m, 4 H, -CH₂-), 2.66-2.76(m, 2 H, -CH₂-), 3.34-3.99(m, 6 H, H-2-6), 4.81(s, 1 H, H-1)

^{13}C NMR (100 MHz, δ , D_2O): 12.9(- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.3, 30.6, 31.5(3 C, - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -), 61.1 (C-6), 66.7-80.3(4 C, C-2-5), 84.3(C-1)

○ATG の構造解析および分離、分析条件の検討

得られた各種 ATG の構造解析は、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、HMQC、 ^1H ^1H COSY による各種 NMR 測定により行なった。NMR 測定の際、溶媒は D_2O を用いた。なお、 ^1H NMR 測定のキャリブレーション用標準物質として重溶媒中に含まれる $\underline{\text{H}}\text{OD}$ (4.79 ppm) を基準として用いた。

UV-Vis 分光光度計を用いた ATG の特性評価では、190 nm から 240 nm の測定範囲でスペクトル測定、あるいは固定波長による吸光度測定を行った。分光測定の際には 10 mm の光路の石英セルを用い、サンプルの濃度は全て 1.0 mM の水溶液になるように調製した。

HPLC 測定では MeCN/ H_2O 系の溶離液を用い、組成は各種 ATG、APGs ならびにオリゴ糖の溶出条件を考慮した上でその比率を検討した。カラムの選択も同様にして行った。それぞれの糖化合物の検出には、RI ならびに DAD を用いた。サンプルループは 20 μL とした。

HPLC を用いた C_4SMal (α , β)および C_4SLac (α , β)の分取では、Mightysil RP-18 GP2 column (4.6 mm ϕ \times 250 mm, 関東化学)を用い、組成を MeCN/ H_2O =10/90 とした溶離液で、流速 0.8 mL/min、カラム温度 45 $^\circ\text{C}$ に設定し、それぞれの画分ごとに回収を行った。また、 C_4SMan (α , β)の分取では、Mightysil RP-18 GP2 column (4.6 mm ϕ \times 150 mm, 関東化学)を用い、組成を MeCN/ H_2O =20/80 とした溶離液で、流速 1.0 mL/min、カラム温度 45 $^\circ\text{C}$ に設定し、それぞれの画分ごとに回収を行った。

○ATG を糖受容体とした酵素反応条件の設定

本章でも 3 章と同様に、酵素反応の初期反応条件（糖供与体の選択、糖供与体初期濃度、反応温度）を、酵素反応解析モデルに基づく反応シミュレーションにより、糖供与体環境を推算した上で α -アミラーゼによるグリコシル化反応に適した条件を設定した (Scheme 3-2)。

・酵素反応解析モデルに基づく反応条件の設定

本章における反応検証では、非天然型基質である ATG に対する α -アミラーゼの基質特異性、潜在的反応特性についての評価系の構築を目的としているため、モデル反応として解析が容易な反応系として、糖供与体を糖鎖の短いオリゴ糖を

選択した。選択したオリゴ糖には、3章の各種オリゴ糖シロップ（G2, G36, G47）を糖供与体とした場合におけるグリコシル化特性の評価の結果から、APGsの形成を容易に確認できるものとしてマルトテトラオースを主成分とするフジオリゴ#470シロップ（G47, 日本食品化工）を用いた。その際、短鎖のオリゴ糖に対して高い基質認識性を有する α -アミラーゼとして *Bacillus subtilis* 由来のものを選択した。また、この由来の α -アミラーゼの反応様式を良好に表現できる反応モデルとして、3章で紹介した短鎖のオリゴ糖に対する α -アミラーゼの加水分解、糖転移、縮合反応を表現した計算モデル（Cal.2）を反応シミュレーションに用いた。

Fig.4-33 に、Cal.2 を用いて糖供与体環境の変化を予測した結果を示した。計算の際に入力したパラメータは、

- ① 初期最大基質重合度 $N=4$, 初期基質濃度 $[S_N]_0=200$ mM, $[S_n]_0=0$ ($n=1\sim N-1$), 初期酵素濃度 $[E]_0=2.0$ μ M, 想定最大基質重合度 $N_m=9$, 反応温度 25 $^{\circ}$ C
- ② サブサイト数 $m=4$, 触媒部位 $r=3$, $A_1=9.22$, $A_2=13.4$, $A_3=5.78$, $A_4=2.18$ kJ/mol
- ③ $k_I=3,420$ min^{-1} , $k_T/k_H=1,154.0$, $k_C=0.0$

であり、反応条件①は実際に検証する実験条件に合わせたパラメータとした。サブサイトパラメータ②は文献値¹³⁾のパラメータをそのまま用い、速度論パラメータは文献値¹³⁾のパラメータをもとに3章の結果と比較することで、本実験系に適用可能な範囲のパラメータを採用した。

Fig4-33 における糖供与体環境の濃度変化の推算値から、比較的糖鎖の長い糖供与体が系内に残存し、かつ短時間での酵素反応の検証が可能な条件として、本章の酵素反応における糖供与体（オリゴ糖シロップ G47）の初期濃度を 200 mM とし、2.0 μ M の酵素濃度で酵素反応温度を 25 $^{\circ}$ C に設定し、目的とする APGs の分離、分析条件に合わせて糖受容体である ATG の濃度を決定した。

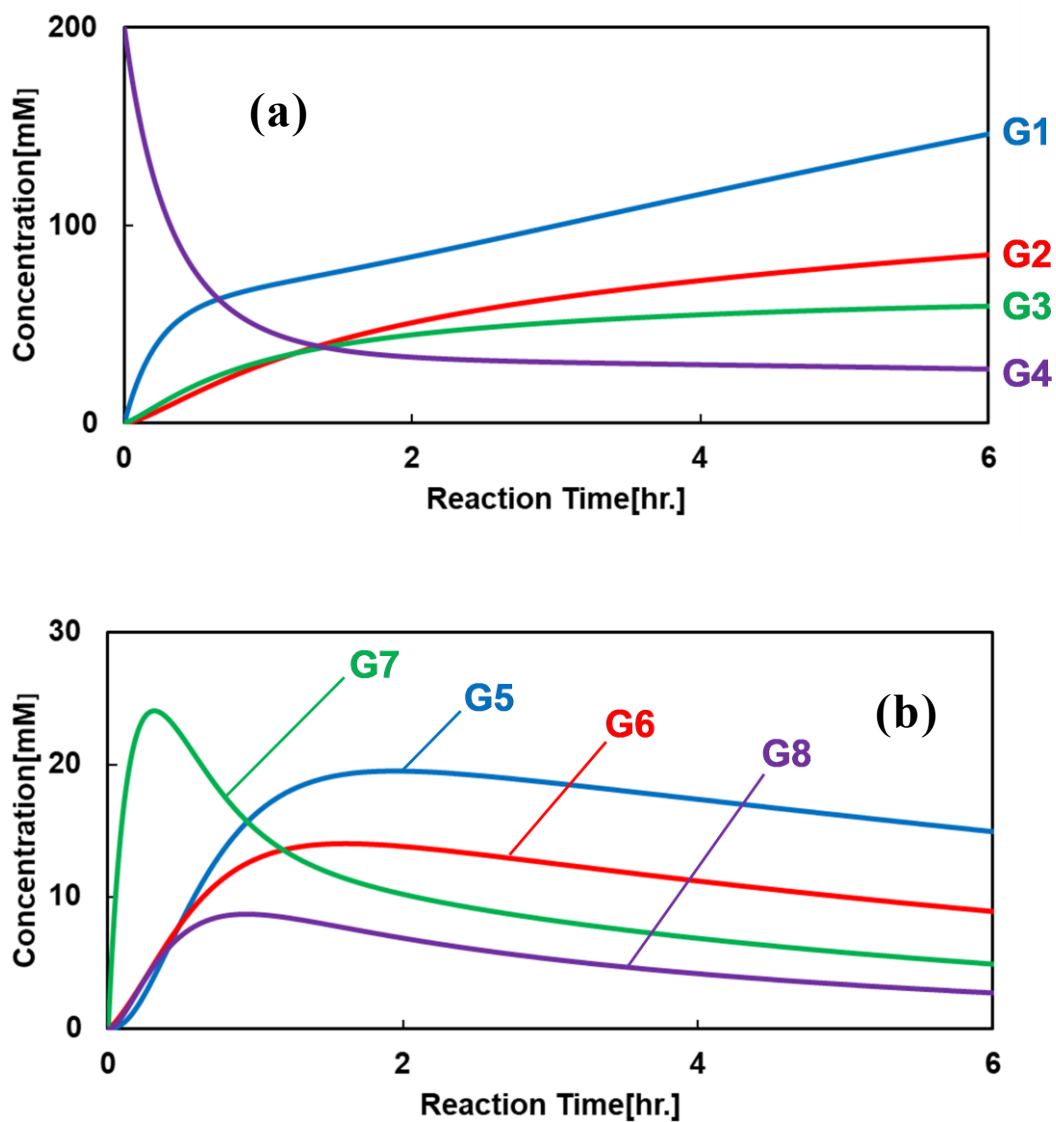


Fig. 4-33 Cal.2 による各種オリゴ糖の濃度変化の推算値
 (a) G1~G4 までのオリゴ糖、(b) G5~G8 までのオリゴ糖の推算値
 (計算条件, 初期基質濃度: $[G_4]_0=200$ mM, $[G_n]_0=0$ mM ($n=1\sim 3, 5\sim 9$),
 初期酵素濃度: $[E]_0=2.0$ μ M, 温度 25 $^{\circ}$ C, 反応時間: 0~6 hr.)

・酵素反応基質溶液の調製

Cal.2 で得られた反応予測の知見 (G4: 200 mM、酵素濃度: 2.0 μ M、酵素反応温度: 25 $^{\circ}$ C) を基に、酵素反応に用いる基質溶液の調製を行った。糖供与体としてオリゴ糖シロップ G47 を、酵素反応開始時に主成分である G4 が約 200 mM 濃度になるようにして加えた。なお、G47 中のオリゴ糖成分を HPLC により評価したところ、モル分率で G1: 7.9 %, G2: 16 %, G3: 12 %, G4: 64 %であった。糖受容体である各種 ATG あるいは C_8 OGlc は、それらの水に対する溶解性ならびに臨界ミセル濃度 (CMC) ⁶⁾を考慮した上で、酵素反応開始時における濃度を 10~100 mM の範囲で決定した。基質溶液は、プラスチックチューブ (2 mL) に秤量した G47 粉末 72 mg に対し、所定の濃度で調製した糖受容体水溶液を 200 μ L 加えた後、試験管ミキサーを用いて攪拌して糖供与体・糖受容体基質混合溶液とした。糖受容体水溶液は、pH 5.0, 20 mM の酢酸緩衝溶液 300 μ L に、各種 ATG あるいは C_8 OGlc を終濃度が 10~100 mM になるように加えて調製した。

・ α -アミラーゼによる酵素反応

調製した基質溶液 200 μ L に対し、所定の濃度に調製した 200 μ L の酵素溶液を添加することで反応を開始し、インキュベーターで 25 $^{\circ}$ C に保った。ブランク実験には酵素溶液の代わりに 200 μ L の精製水を添加した。酵素溶液は、澱粉を除去後に凍結乾燥で粉末状にした α -アミラーゼ (*Bacillus subtilis* 由来) の 40 mg の酵素製剤を 2 mL の精製水に溶かして得た。調製した酵素溶液中のタンパク濃度を文献値 ($E_{280nm}^{1\%} = 19.8 \text{ cm}^{-1}$, 分子量 41,900) ¹³⁾をもとに算出したところ、2.0 μ M であることを確認した。サンプリング時は、40 μ L の反応溶液を取り、360 μ L の精製水を加えて希釈後、HPLC 用のディスポーザブルメンブレンフィルター (pore size: 0.45 μ m, ADVANTEC) に通して反応停止とした。その後、HPLC 分析で用いる溶離液と同じ組成になるようにアセトニトリルを加え、後の HPLC 測定サンプルまで 0 $^{\circ}$ C で保管した。

○グリコシル化反応の反応追跡および転化率の算出

反応追跡は TLC(展開溶媒: *n*-プロパノール/ H_2O =3/1)および HPLC を用いて行なった。TLC プレートは Silica gel 60 F₂₅₄(MERCK)を用いた。また、発色試薬には 5%硫酸-メタノール溶液を用いた。HPLC 測定では MeCN/ H_2O 系の溶離液を用い、各種酵素反応産物の極性に合わせて、組成を MeCN/ H_2O =0/100~60/40 の範囲で分

析した。同様に、カラムも Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm, 関東化学), Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 250 mm, 関東化学), Mightysil RP-18 GP Aqua (4.6 φ × 250 mm, 関東化学), Mightysil RP-4 GP (4.6 φ × 250 mm, 関東化学), ULTRON AF-HILIC-CD (4.6 φ × 250 mm, 信和化工) でそれぞれの反応系に合わせて使い分けた。

なお、反応の転化率は HPLC 測定結果における糖受容体のピークのエリア面積を基に作成した検量線から算出した。

○ 酵素反応産物の分子量解析および構造解析

酵素反応溶液中に存在する生成物の分子量解析は、MALDI-TOF MS により行なった。この際、マトリックスには DHB を用いた。

HPLC で確認した複数の反応産物 (APGs) のピークを、分析カラムを用いて分取した。分取の際は、溶離液を MeCN/H₂O=15/85、カラムを Mightysil RP-18 GP2 (4.6 φ × 150 mm, 関東化学、流速 0.8 mL/min、サンプルインジェクション 20 μL、カラム温度: 40 °C にして各フラクションを回収した。また、効率的に APGs の分取を行うため、糖受容体 ATG の濃度を 100 mM として酵素反応を行った。各フラクションの分子量測定は MALDI-TOF MS を用い、構造解析は、¹H NMR、¹³C NMR、HMQC、¹H ¹H COSY による、各種 NMR 測定で行なった。NMR 測定の際、溶媒は D₂O を用いた。

4.5 引用文献

- 1) B. Wu *et al.*, *Tetrahedron*, **71**, 4023 (2015).
- 2) A. V. Samoshin *et al.*, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, **2014**, 1 (2014).
- 3) V. Gopalan *et al.*, *Biochemical Journal*, **262**, 541 (1989).
- 4) M. J. Kiefel and M. von Itzstein., *Chemical reviews*, **102**, 471 (2002).
- 5) H. Dohi and Y. Nishida, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **26**, 119 (2014).
- 6) B. J. Aungst, *International journal of pharmaceutics*, **105**, 219 (1994).
- 7) S. Izawa *et al.*, *The Journal of Biochemistry*, **113**, 573 (1993).
- 8) I. Torres, J. Barr, J. E. Verdasco, F. J. Aoiz, *Chem. Phys. Lett.*, **394**, 307 (2004).
- 9) M. B. Williams *et al.*, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **171**, 77 (2005).
- 10) T. Usui *et al.*, *Carbohydrate Research*, **33** 105 (1974).
- 11) Frisch, *et al.*, *Gaussian 09, Revision C.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010.
- 12) H. Itoh and A. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.*, **58**, 3678 (2017).
- 13) H. Fujimori *et al.*, *The Journal of Biochemistry*, **82**, 417 (1977).
- 14) S. Saito and T. Tsuchiya, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, **33**, 503 (1985).
- 15) L. Z. Szabó *et al.*, *Carbohydrate research*, **422**, 1 (2016).
- 16) M. Poláková *et al.*, *Carbohydrate research*, **345**, 1339 (2010).
- 17) H. A. van Doren *et al.*, *Carbohydrate research*, **194** 71 (1989).
- 18) S. A. Galema, J. B. F. N. Engberts and H. A. van Doren, *Carbohydrate research*, **303**, 423 (1997).

第 5 章

総括

澱粉は天然由来の高分子である食品としての活用のみならず、これを原料として機能性素材を創製する上で魅力的な素材である。一方で、澱粉を原料として糖質・酵素工学に基づいた物質生産系を構築する場合、澱粉もしくは澱粉関連酵素についての知見が重要となる。澱粉は、鎖状構造のアミロースと多岐に分岐した構造のアミロペクチンの2種類の分子構造からなることが知られている。このように複雑な構造を有する澱粉に対して酵素による糖質の生産を図る場合、アミロースあるいはアミロペクチンに対する触媒能はもちろんのこと、澱粉の分子構造を知ることが重要となる。また、酵素触媒により澱粉を基質とした効率的な糖質の生産系の構築を図る場合、酵素の機能をどのように評価するのかということが重要となる。近年、通常の条件下では示さない酵素の触媒能(Enzyme Promiscuity)を誘発させて物質生産を促進させる試みが注目されている。このような酵素のEnzyme Promiscuityの探索を行う場合、スクリーニングにより目的の反応を触媒する酵素を評価、選択することが重要となる。以上の背景から、本論文では、糖質および酵素工学の知見をもとに、澱粉を原料とした効率的な物質生産系の構築ならびにその評価について述べた。

第1章は、序論であり、本研究の背景として、澱粉利用産業における高分子素材としての澱粉の特性と活用、ならびに澱粉を原料とした糖質・酵素工学に基づく糖質産業および酵素産業について概説し、本論文の目的、意義および構成について述べた。

第2章は、糖質工学に基づく澱粉の特性評価について述べた。アミロース・アミロペクチン含有率が異なる天然型澱粉あるいは可溶性澱粉を含む水溶液に対し、架橋剤としてホウ砂を添加することで、それぞれの澱粉ごとにゲル化挙動が異なるか検証を行ったところ、アミロペクチンを多く含む天然型澱粉においてはゲル化の促進、アミロペクチンをほとんど含まない可溶性澱粉ではゲル化の抑制が確認された。また、澱粉ゲル構造内における水分保持能に着目し、天然型澱粉と可溶性澱粉でホウ砂の添加効果が異なるか検証を行ったところ、天然型澱粉のみホウ砂を添加することで水分保持能が高くなった。これは、澱粉ゲル中における水分子の捕捉効果が天然型澱粉と可溶性澱粉とで、その高次構造が異なることが要因となることで差が出たためと推測できる。このように、架橋剤の有無によるゲル化もしくは水分保持の挙動の違いから、簡便に澱粉の形態について評価できることがわかった。

第3章は、糖質酵素工学に基づく澱粉からの物質生産について述べた。第2章で述べた澱粉中のアミロペクチンの澱粉ゲル化への強い影響に対し、アミロースは水溶液中において螺旋構造を形成し、その空洞内に脂溶性分子を取り込む包接作用を示すことが知られている。そこで、アミロースの包接作用に着目し、アミロース-脂溶性分子の基質複合化を行うことで、糖供与体と糖受容体を近接化することでグリコシル化効率の向上を図った。糖脂質 C_8OGlc を糖受容体として用いた結果、酵素反応初期段階において糖鎖長の長い APGs を形成し、最終的なグリコシル産物として α -1,6 グルコシド結合を有する配糖体を確認した。一方で、加水分解反応と糖転移反応が競合する本酵素反応は、糖供与体の重合度や濃度が常に変動しており、効率的なグリコシル化条件探索のためには数多くの実験的検証が必要となる。そこで、 α -アミラーゼに関する既存の反応解析モデルを活用することで糖供与体の反応系内の変化を予測、実験手順を簡略化し目的のグリコシル化に有利な反応条件を選択した。反応予測には、サブサイト理論に基づく解析モデルを用いた。解析モデルを活用した本手法により、効率的に APGs の形成の観測が可能な反応条件を探索することができた。このように、澱粉の物理化学的特性の活用のみならず、 α -アミラーゼに関する既存の知見を利用することで、実験手順、反応条件の設計の簡便化、効率化が可能となった。

第4章は、酵素工学に基づく澱粉関連酵素の反応特性の評価について述べた。糖質関連酵素が有する触媒能の1つである Enzyme Promiscuity に着目し、その評価法について検討した。第3章において用いた C_8OGlc は本来 α -アミラーゼにとっては非天然型の基質であり、最終糖転移産物として確認した α -1,6 グルコシド結合の配糖体の存在が示すように、 C_8OGlc のアグリコン部位のアルキル鎖が Enzyme Promiscuity に関与した可能性がある。そこで、その詳細を知るため種々の ATG を糖受容体とし、 α -アミラーゼによる Enzyme Promiscuity についての評価を試みた。HPLC により ATG を糖受容体とした酵素反応産物の追跡条件を検討したところ、ATG が紫外 (UV) 短波長領域である 200~230 nm 領域において特異な UV 吸収を示すことがわかった。また、各種 ATG を用いた UV スペクトルの比較から、UV 吸収特性はグリコン骨格に近い S-C-O 結合近傍における n-to- σ^* 遷移機構が原因となり起きていることが示唆された。また、この UV 吸収特性により、グリコシル化産物である APGs を効率よく反応追跡できることがわかった。これは、ATG を糖受容体とすることで、種々の糖質関連酵素による Enzyme Promiscuity の評価系への適用が可能であることを示唆している。

以上のように、本論文では、澱粉の構造特性ならびに糖質関連酵素の基質特異性に関する糖質・酵素工学の知見を活用することで、効率的かつ簡便な物質生産プロセスの設計が可能であることを示した。これらの成果は、さまざまな物理化学的特性を有する多糖の構造、機能解明のための簡便な評価手法を提供する共に、天然由来の糖質関連酵素が ATG のような非天然型基質に遭遇した際に発現する Enzyme Promiscuity の評価手法について提案したものである。

付録

略記一覧

化合物等の略記

APGs: alkyl polyglycosides (アルキルポリグリコシド)

ATG: alkyl thio glycoside (アルキルチオグリコシド)

CD: cyclodextrin (シクロデキストリン)

CGTase: cyclodextrin glycosyl transferase (シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ)

DHB: dihydroxybenzoic acid (ジヒドロキシ安息香酸)

C₈OIG2: *n*-octyl β-D-isomaltoside

C₈OGlc: *n*-octyl β-D-glucopyranoside

C₈SGlc: *n*-octyl 1-thio-β-D-glucopyranoside

C_nSGlcβ: *n*-alkyl 1-thio-β-D-glucopyranoside

C₄SLacα: *n*-butyl 1-thio-α-D-lactoside

C₄SLacβ: *n*-butyl 1-thio-β-D-lactoside

C₄SMalα: *n*-butyl 1-thio-α-D-maltoside

C₄SMalβ: *n*-butyl 1-thio-β-D-maltoside

C₄SMalG3: *n*-butyl 1-thio-β-D-maltotrioside

C₄SManα: *n*-butyl 1-thio-α-D-mannoside

C₄SManβ: *n*-butyl 1-thio-β-D-mannoside

G47: oligo syrup #470 (フジオリゴ#470 シロップ)

Gal: galactose (ガラクトース)

Glc: glucose (グルコース)

Gn: glucooligosaccharides (グルコオリゴ糖)

HAS: high amylose starch (高アミロース含有澱粉)

Lac: lactose (ラクトース)

Mal: maltose (マルトース)

Man: mannose (マンノース)

*p*NP 化糖: *p*-nitrophenyl glycosides (*p*-ニトロフェニルグリコシド)

PVA: polyvinyl alcohol (ポリビニルアルコール)

TVaII: α-amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47

分析手法、機器の略記

AFM: atomic force microscope (原子間力顕微鏡)

COSY: ^1H - ^1H correlation spectroscopy:

DAD: diode array detector (ダイオードアレイ検出器)

DSC: differential scanning calorimetry (示差走査熱量計)

HMQC: heteronuclear multiple quantum correlation

HPLC: high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)

MALDI-TOF MS: matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計)

NMR: nuclear magnetic resonance (核磁気共鳴)

RI: refractive index (示差屈折)

TLC: thin-layer chromatography (薄層クロマトグラフィー)

UV: ultraviolet (紫外)

XRD: X-ray diffraction analysis (X線回折分析)

その他

CCSG: critical concentration of starch gelation (臨界ゲル化濃度)

CMC: critical micelle concentration (臨界ミセル濃度)

ES: enzyme-substrate complex (酵素 - 基質複合体)

fr.: fraction (分画)

min: minute (分)

hr: hour (時間)

s: singlet signal (一重線)

d: doublet signal (二重線)

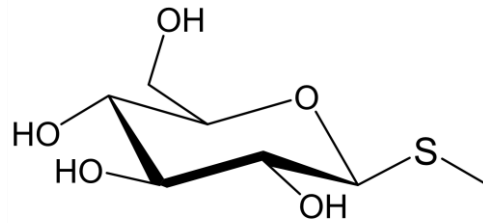
dd: double doublet signal (二重の二重線)

t: triplet signal (三重線)

q: quartet signal (四重線)

m: multiplet signal (多重線)

J : coupling constant (スピン結合定数)



***n*-methyl-1-thio- β -D-glucoside
(C₁SGlc(β))**

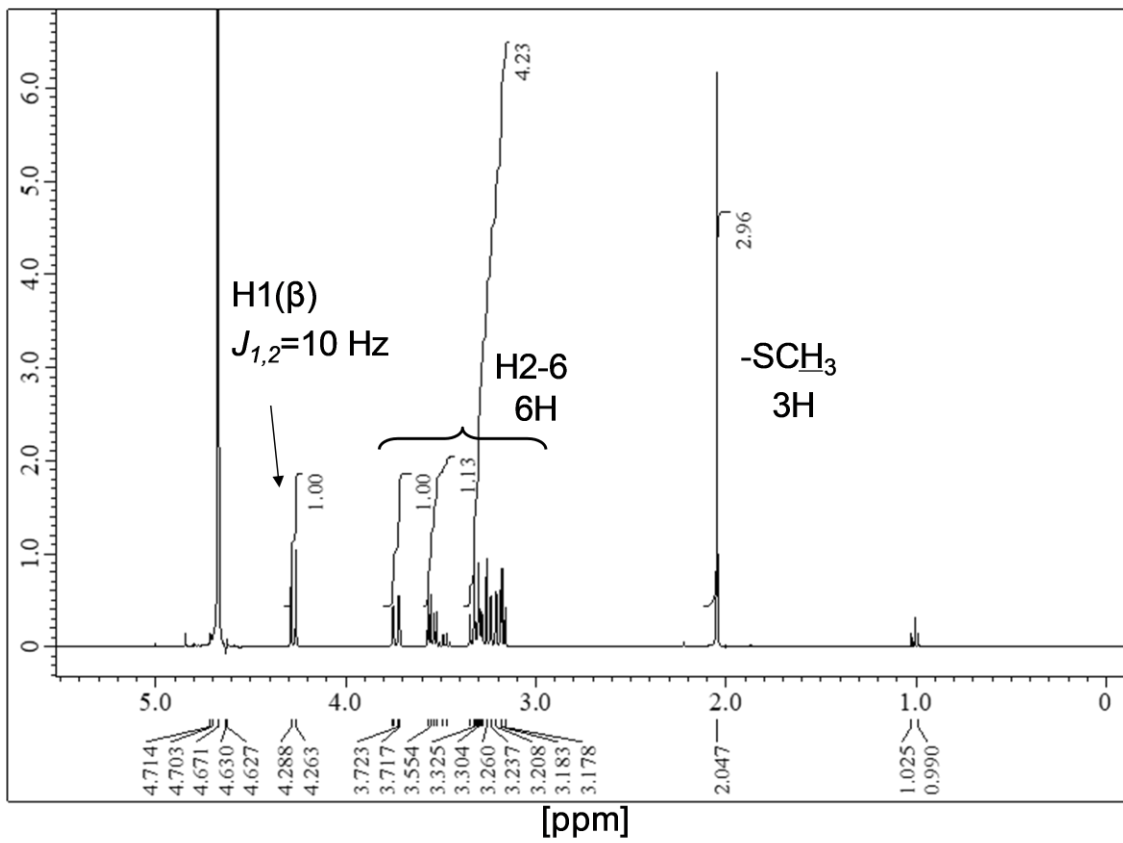
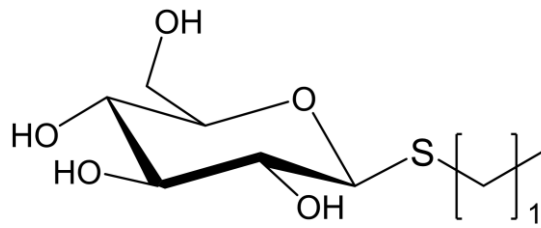


Fig.E-1 C₁SGlc(β)の ¹H-NMR スペクトル(400 MHz, in D₂O)



***n*-ethyl-1-thio- β -D-glucoside
(C₂SGlc(β))**

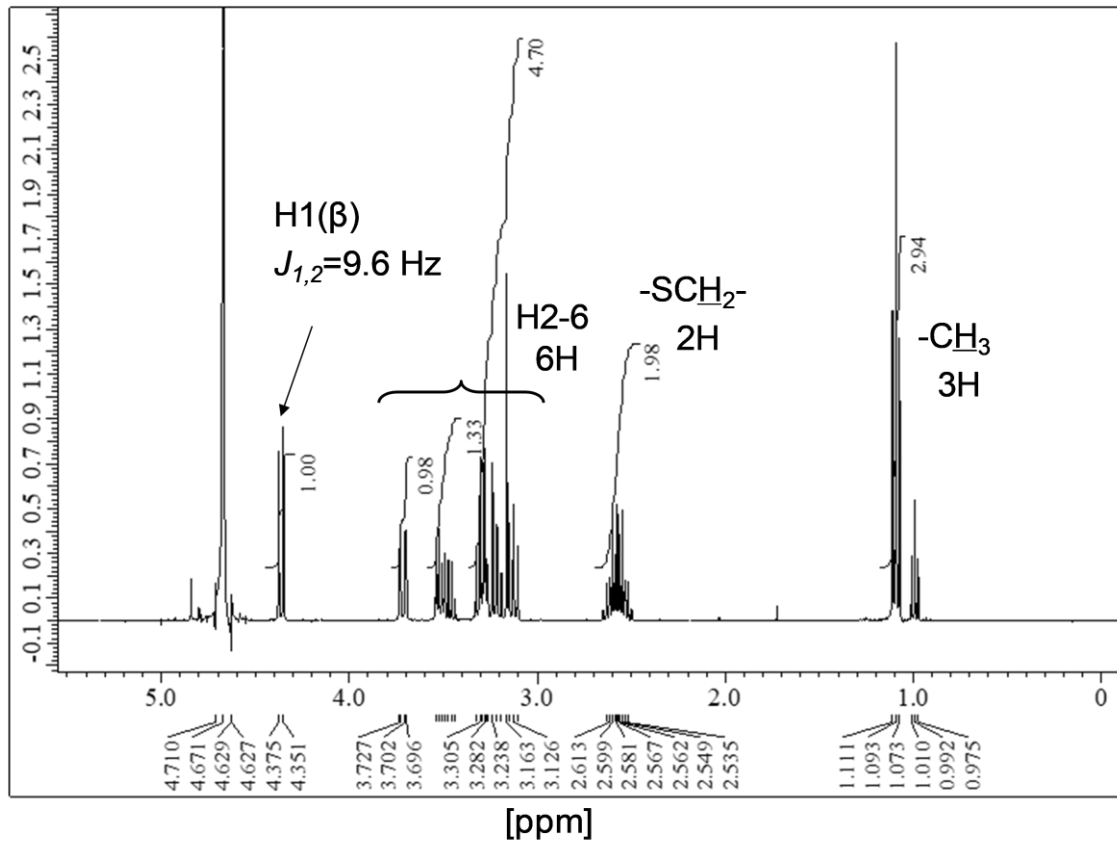
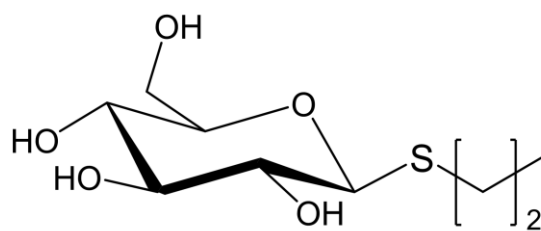


Fig.E-2 C₂SGlc(β)の ¹H-NMR スペクトル(400 MHz, in D₂O)



***n*-propyl-1-thio- β -D-glucoside
(C₃SGlc(β))**

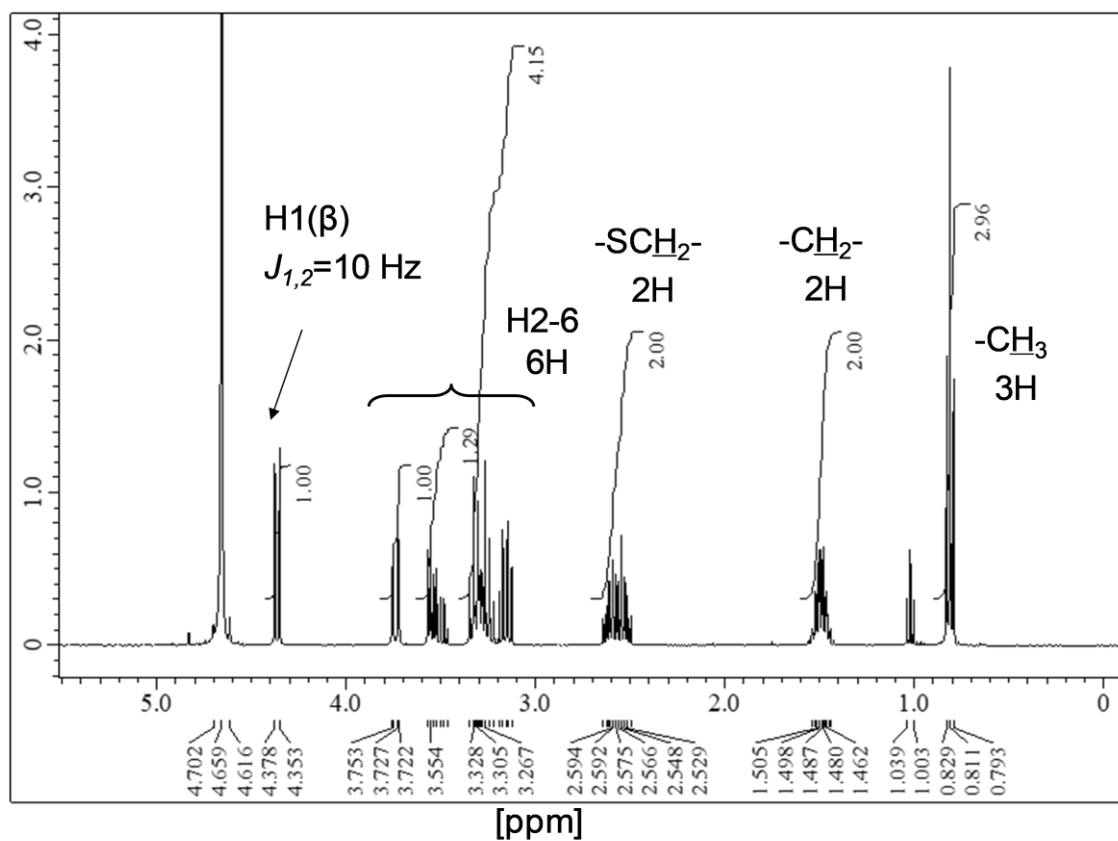
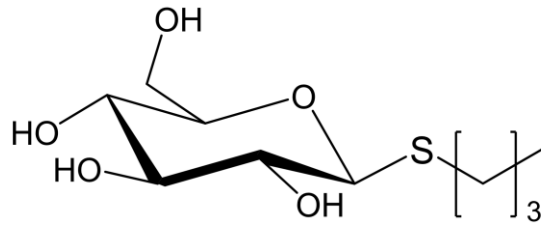


Fig.E-3 C₃SGlc(β)の ¹H-NMR スペクトル(400 MHz, in D₂O)



***n*-butyl-1-thio- β -D-glucoside
(C₄SGlc(β))**

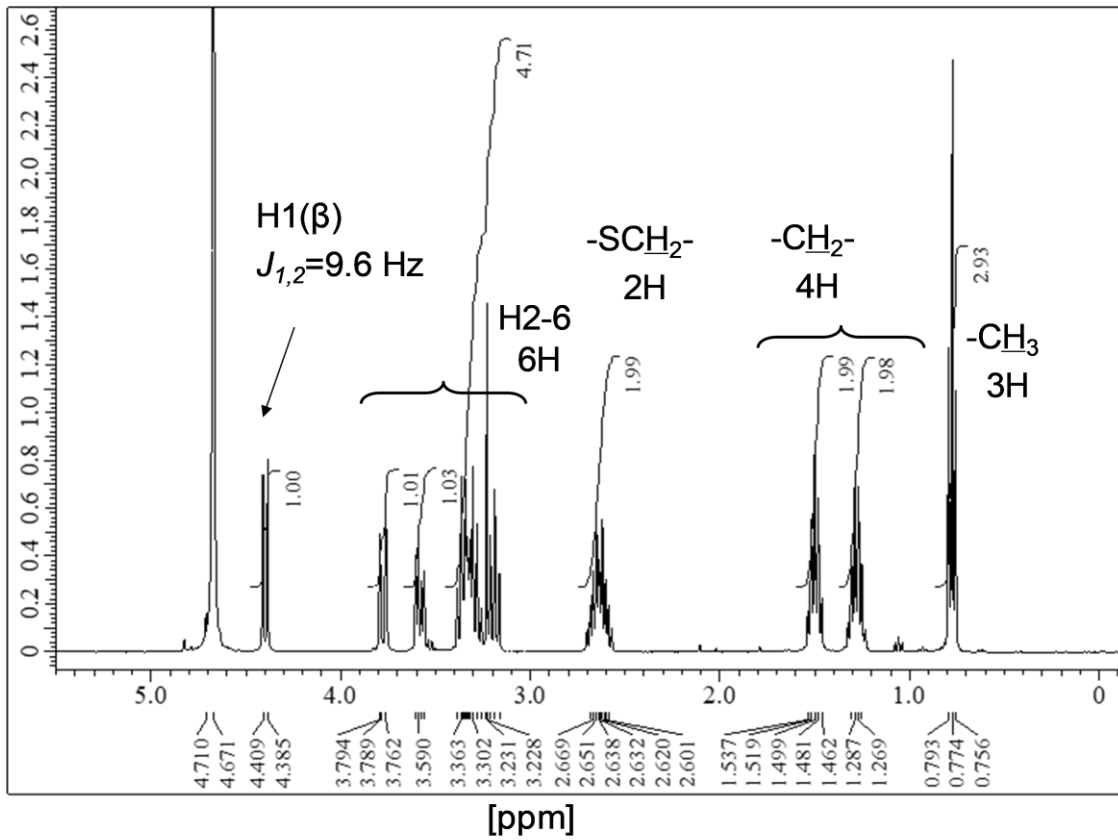
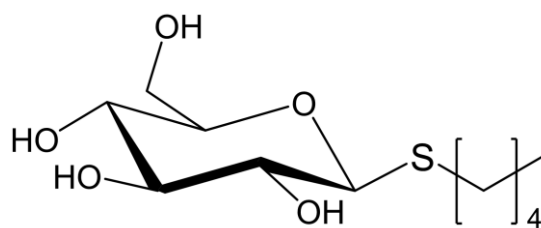


Fig.E-4 C₄SGlc(β)の ¹H-NMR スペクトル(400 MHz, in D₂O)



***n*-pentyl-1-thio- β -D-glucoside
(C₅SGlc(β))**

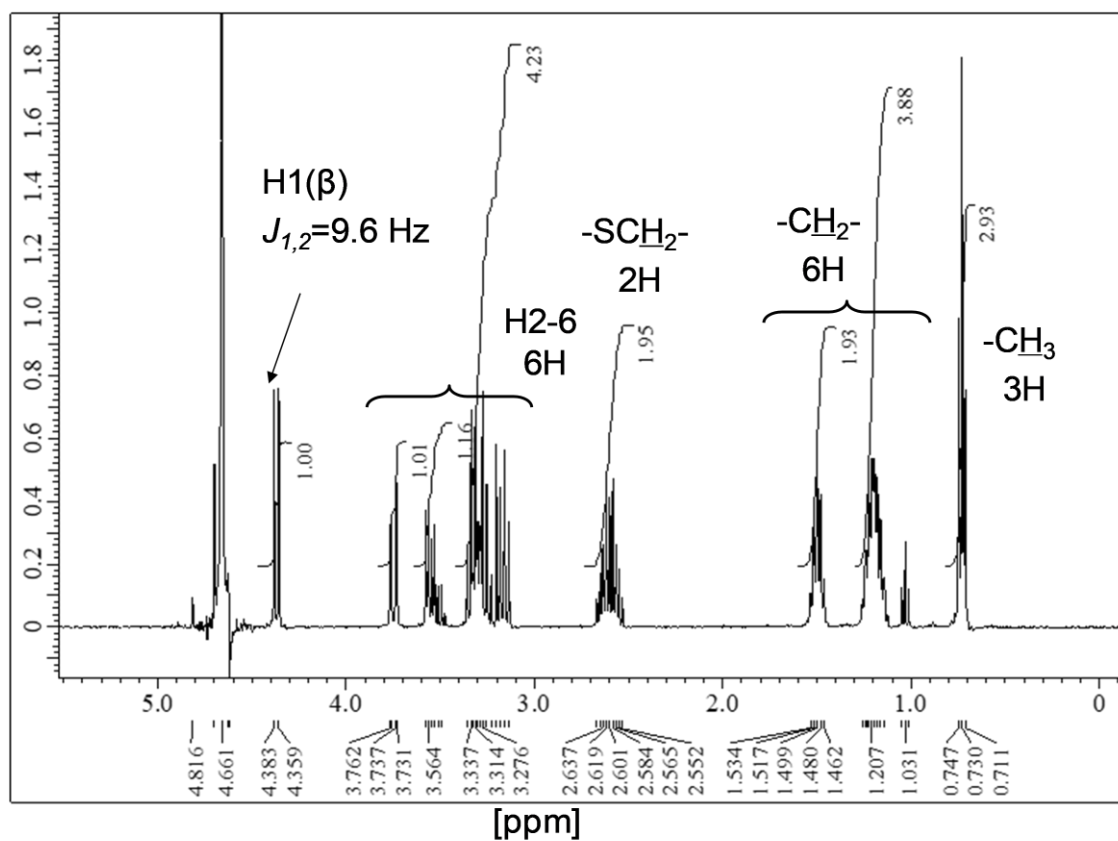
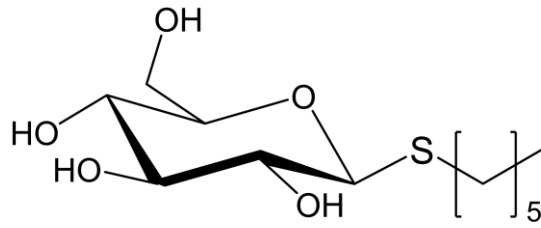


Fig.E-5 C₅SGlc(β)の ¹H-NMR スペクトル(400 MHz, in D₂O)



***n*-hexyl-1-thio- β -D-glucoside
(C₆SGlc(β))**

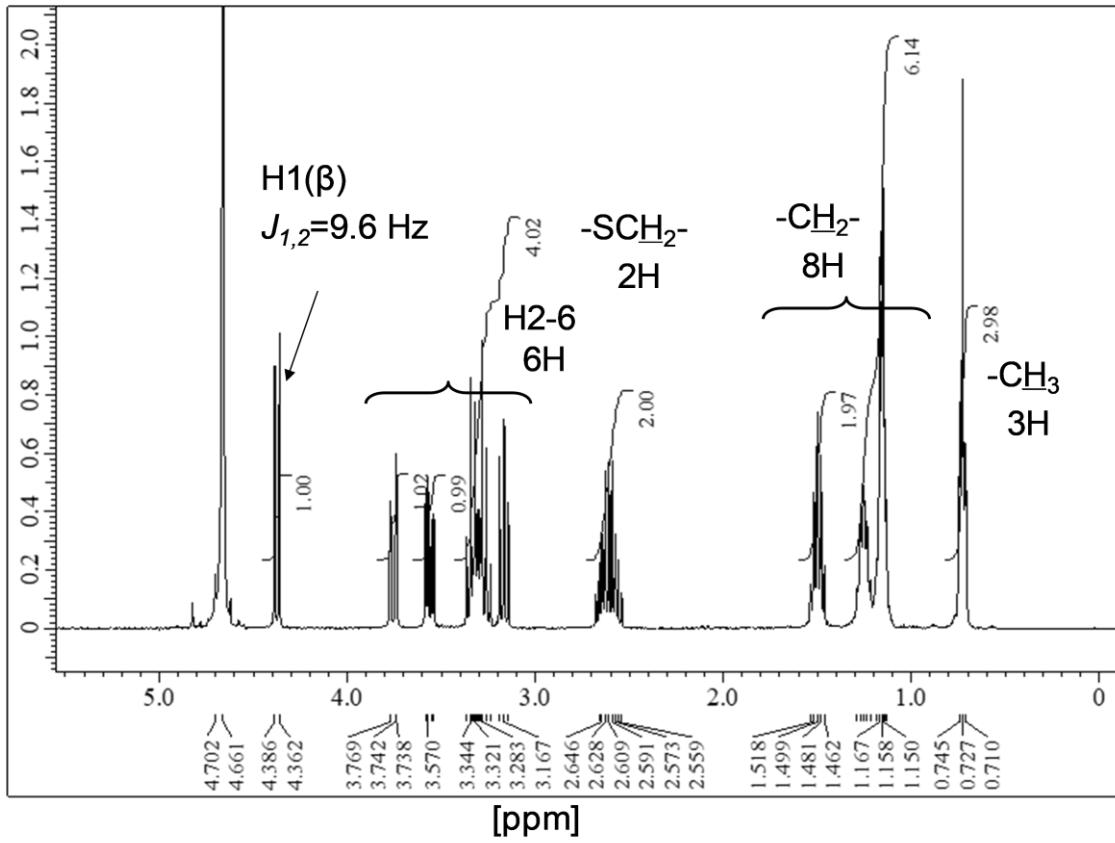
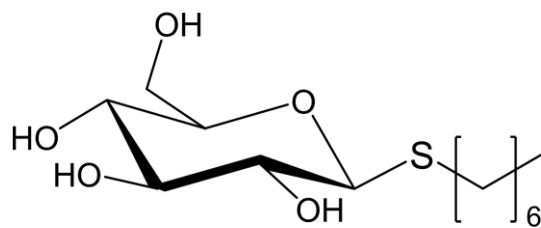


Fig.E-6 C₆SGlc(β)の ¹H-NMR スペクトル(400 MHz, in D₂O)



***n*-heptyl-1-thio- β -D-glucoside
(C₇SGlc(β))**

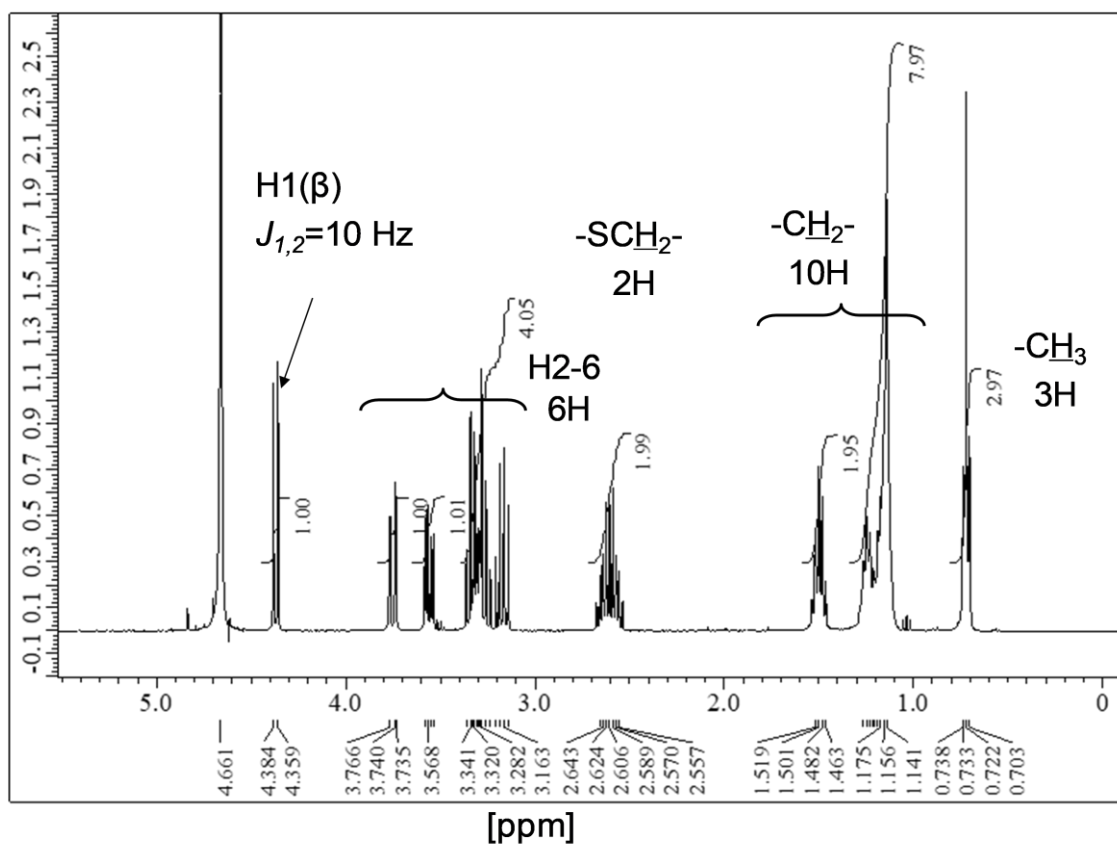
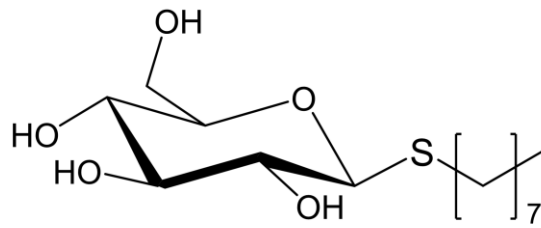


Fig.E-7 C₇SGlc(β)の ¹H-NMR スペクトル(400 MHz, in D₂O)



***n*-octyl-1-thio- β -D-glucoside
(C₈SGlc(β))**

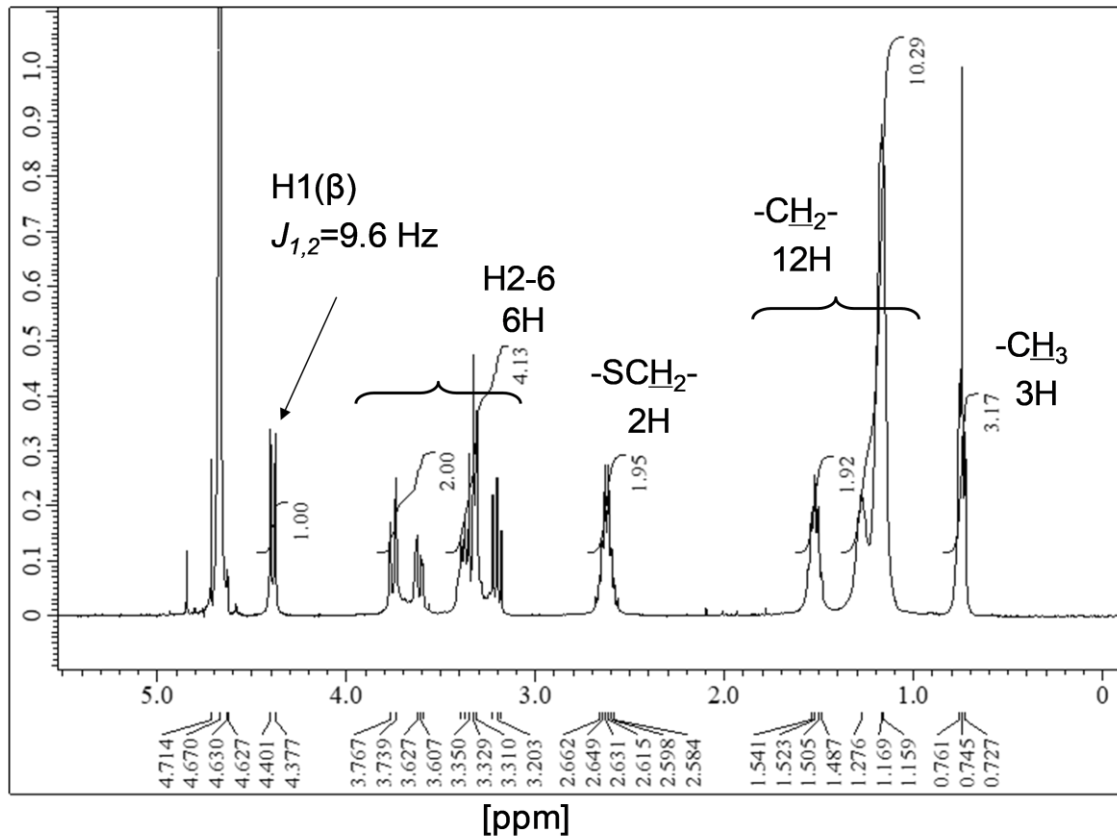
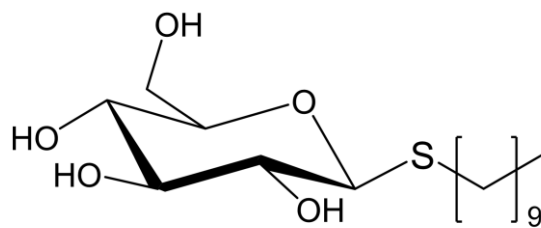


Fig.E-8 C₈SGlc(β)の ¹H-NMR スペクトル(400 MHz, in D₂O)



***n*-decyl-1-thio- β -D-glucoside
(C₁₀SGlc(β))**

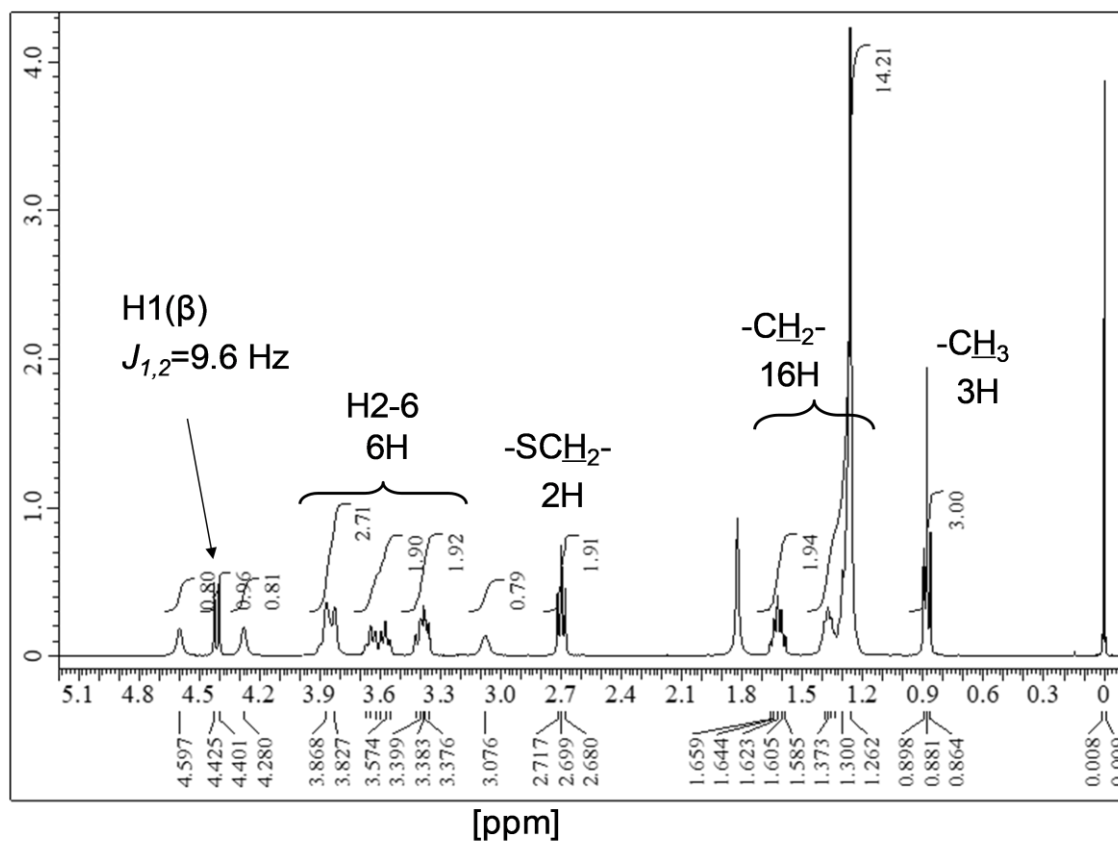
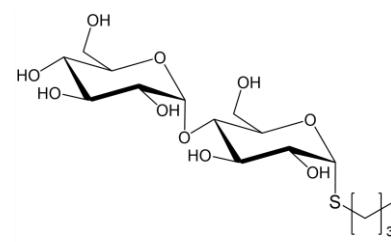


Fig.E-9 C₁₀SGlc(β)の ¹H-NMR スペクトル(400 MHz, in CDCl₃)



***n*-butyl-1-thio- α -D-maltoside
(C₄SMal(α))**

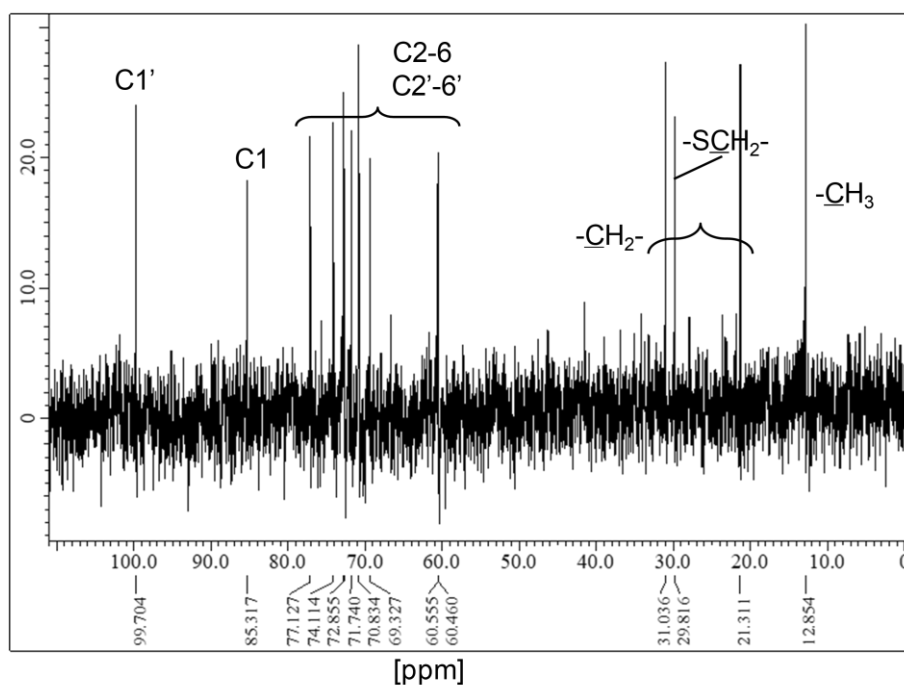
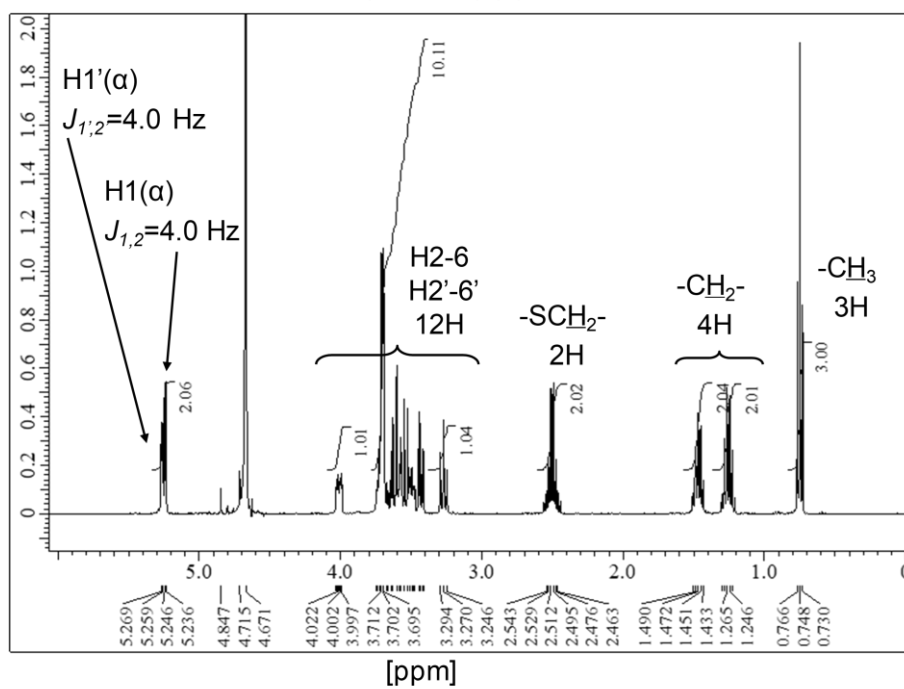
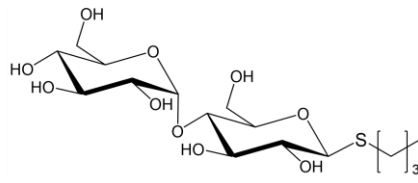


Fig.E-10 C₄SMal(α)の ¹H-NMR スペクトルおよび ¹³C-NMR スペクトル (400 MHz, in D₂O)



***n*-butyl-1-thio- β -D-maltoside
(C₄SMal(β))**

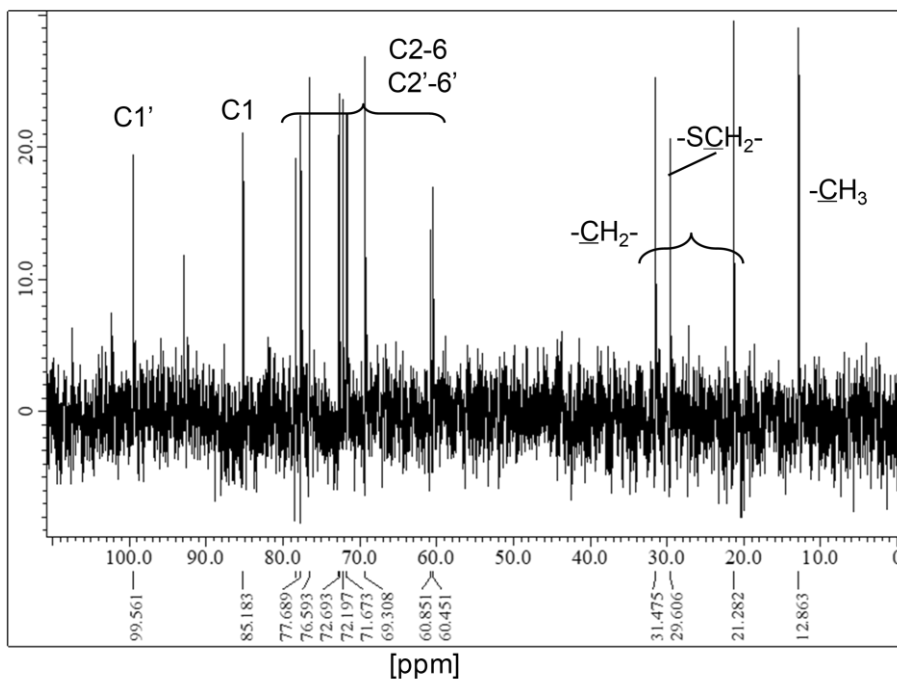
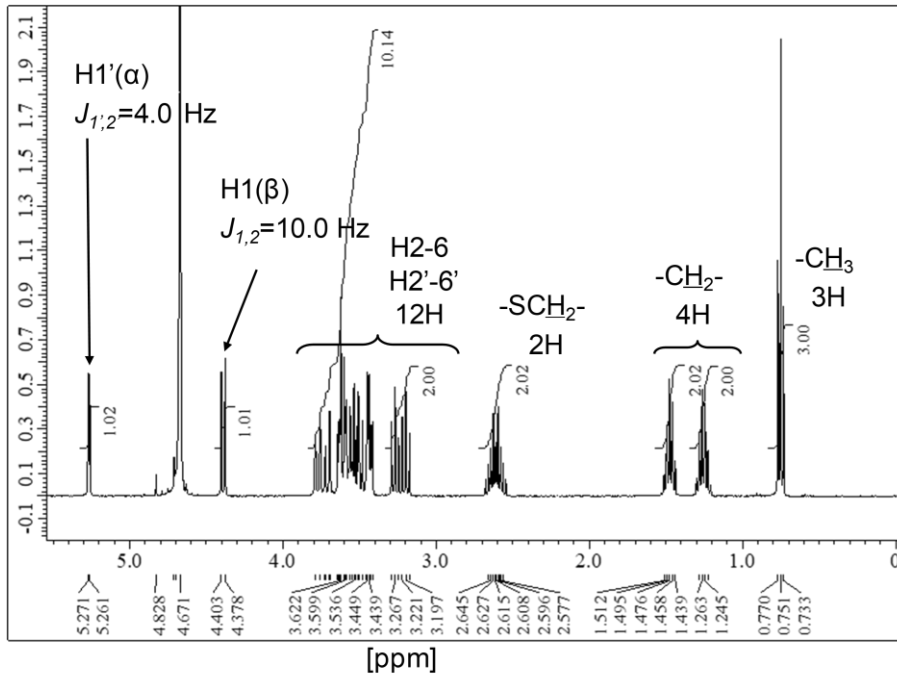
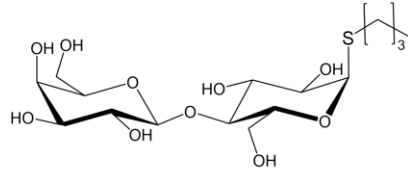


Fig.E-11 C₄SMal(β)の¹H-NMR スペクトルおよび¹³C-NMR スペクトル (400 MHz, in D₂O)



***n*-butyl-1-thio- α -D-lactoside
(C₄SLac(α))**

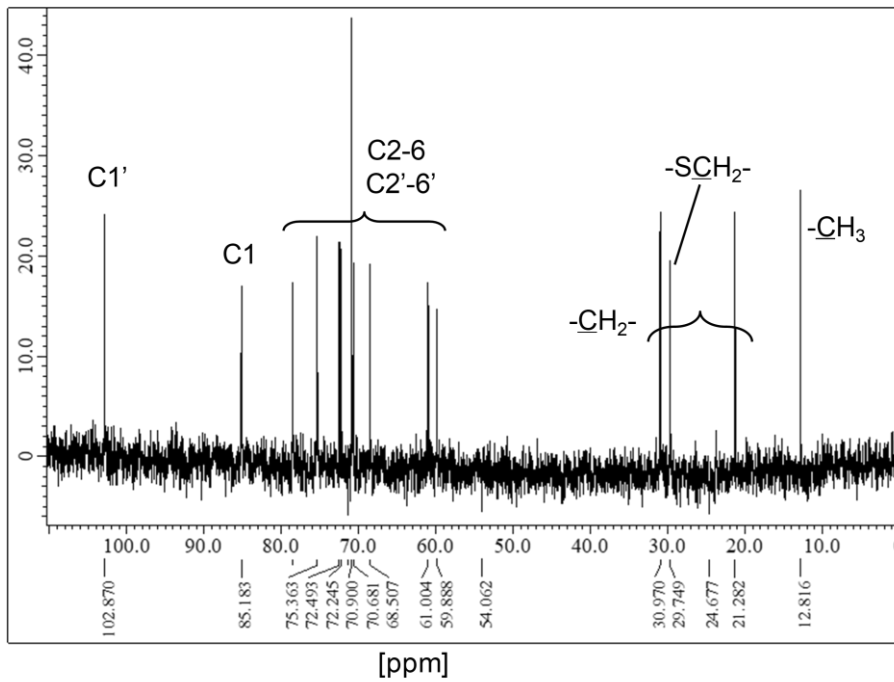
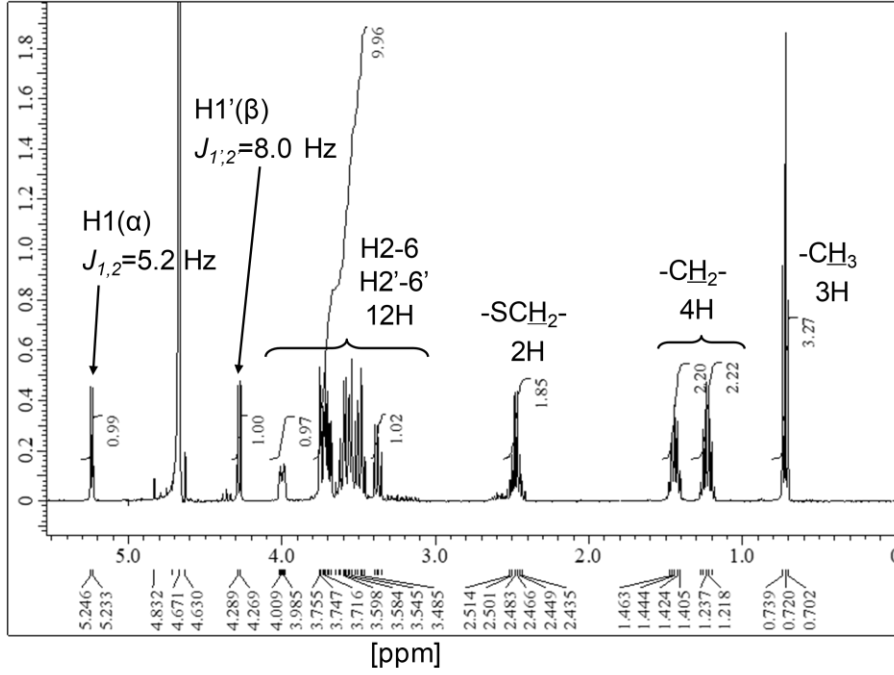
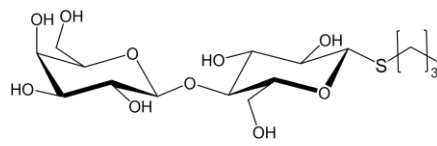


Fig.E-12 C₄SLac(α)の ¹H-NMR スペクトルおよび ¹³C-NMR スペクトル (400 MHz, in D₂O)



***n*-butyl-1-thio- β -D-lactoside
(C₄SLac(β))**

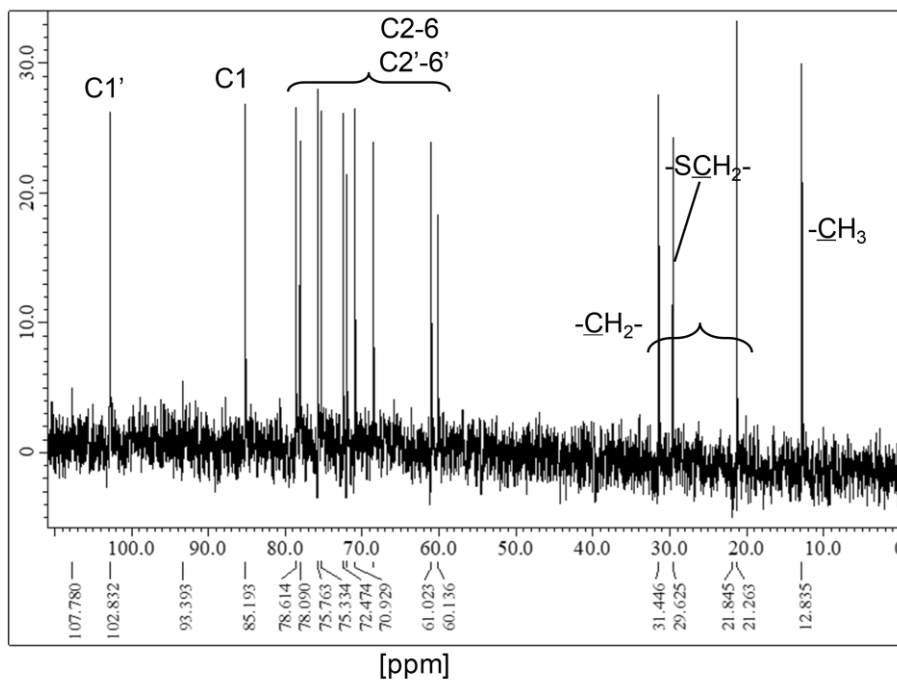
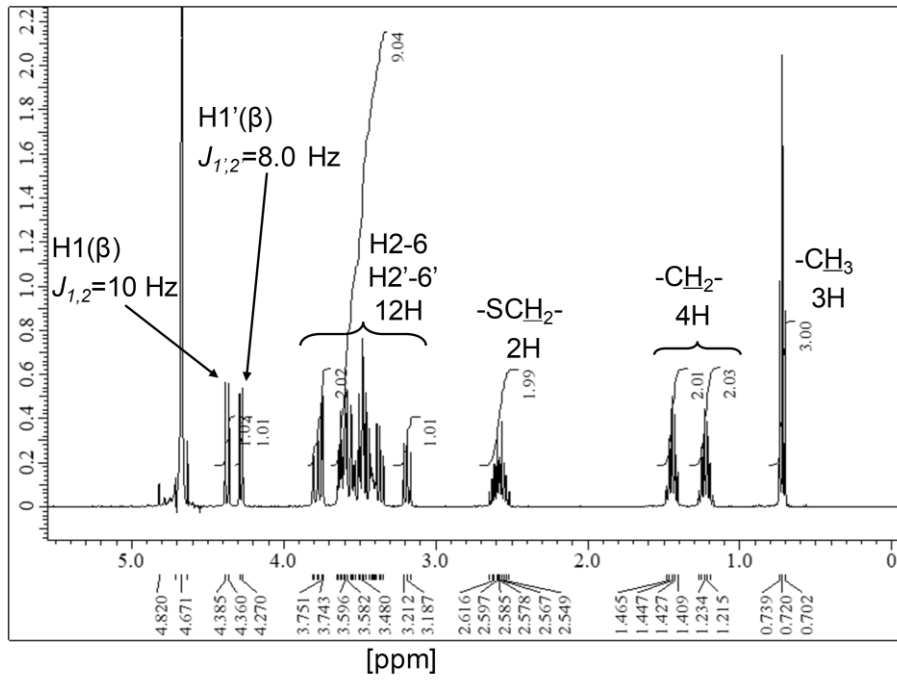


Fig.E-13 C₄SLac(β)の ¹H-NMR スペクトルおよび ¹³C-NMR スペクトル (400 MHz, in D₂O)

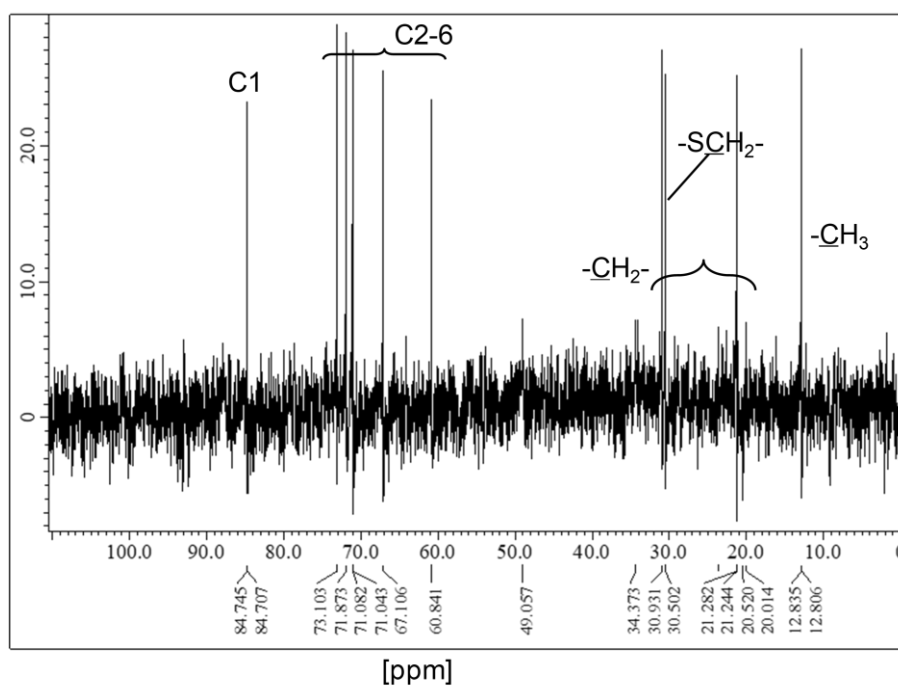
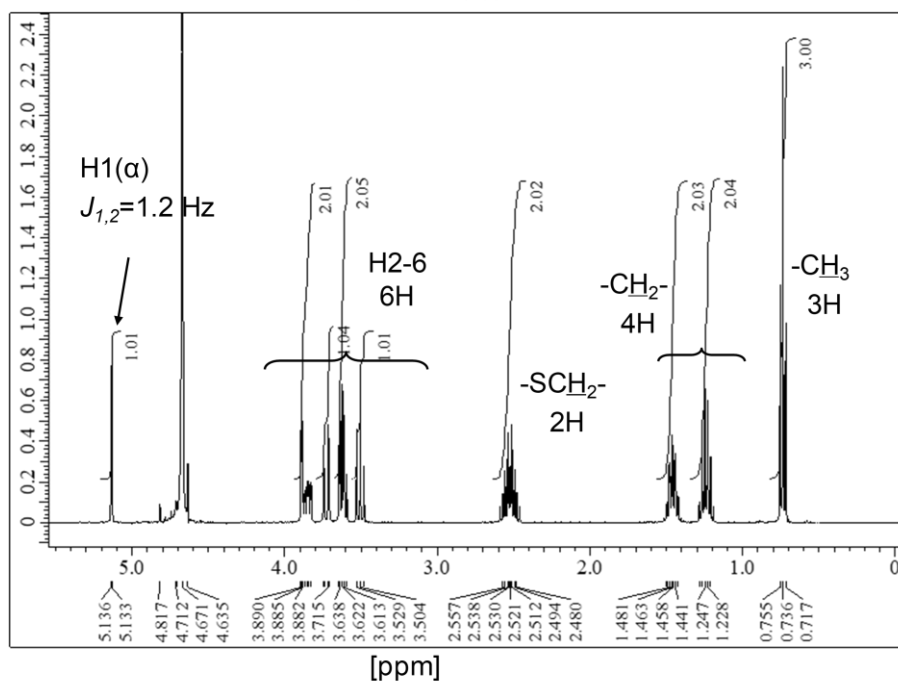
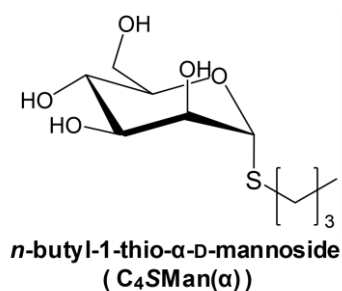
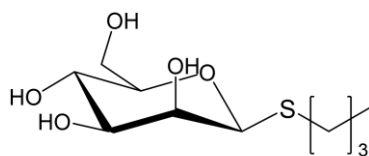


Fig.E-14 C₄SMan(α)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルおよび $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (400 MHz, in D₂O)



n-butyl-1-thio- β -D-mannoside
(C₄SMan(β))

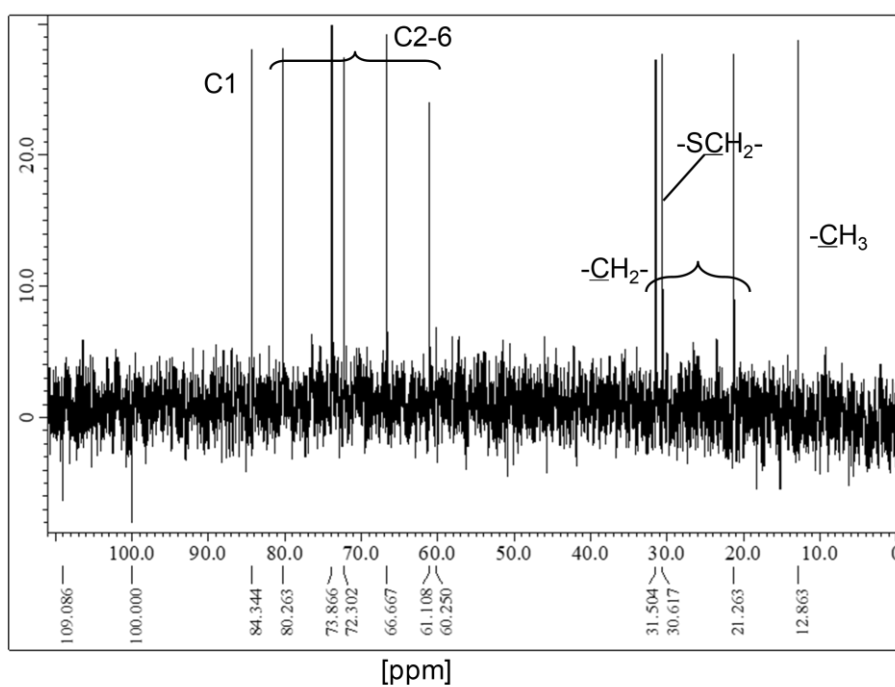
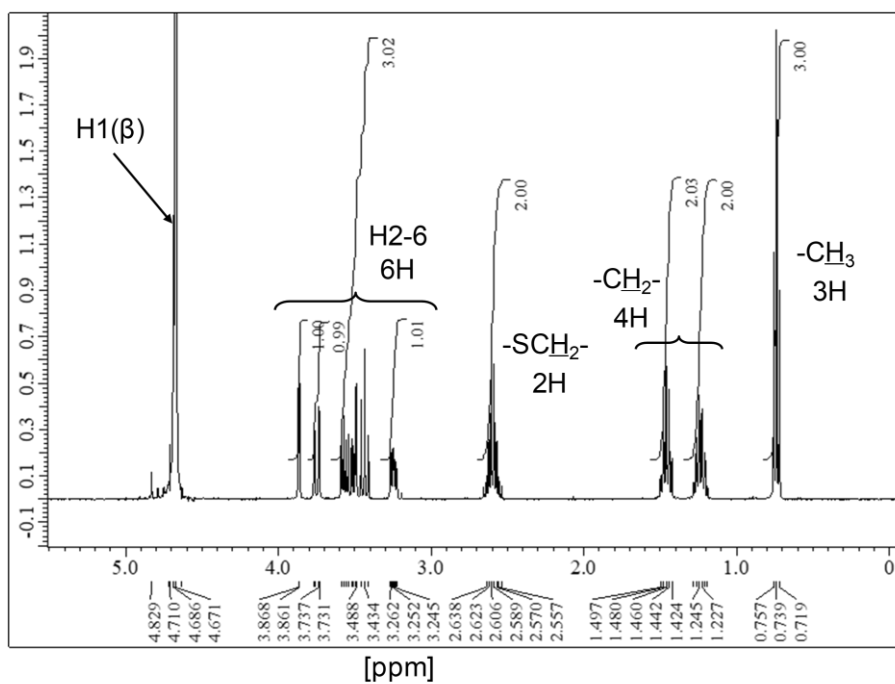
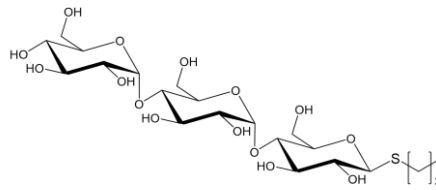


Fig.E-15 C₄SMan(β)の ¹H-NMR スペクトルおよび ¹³C-NMR スペクトル
(400 MHz, in D₂O)



***n*-butyl-1-thio- β -D-maltotriose
(C₄SMaltri(β))**

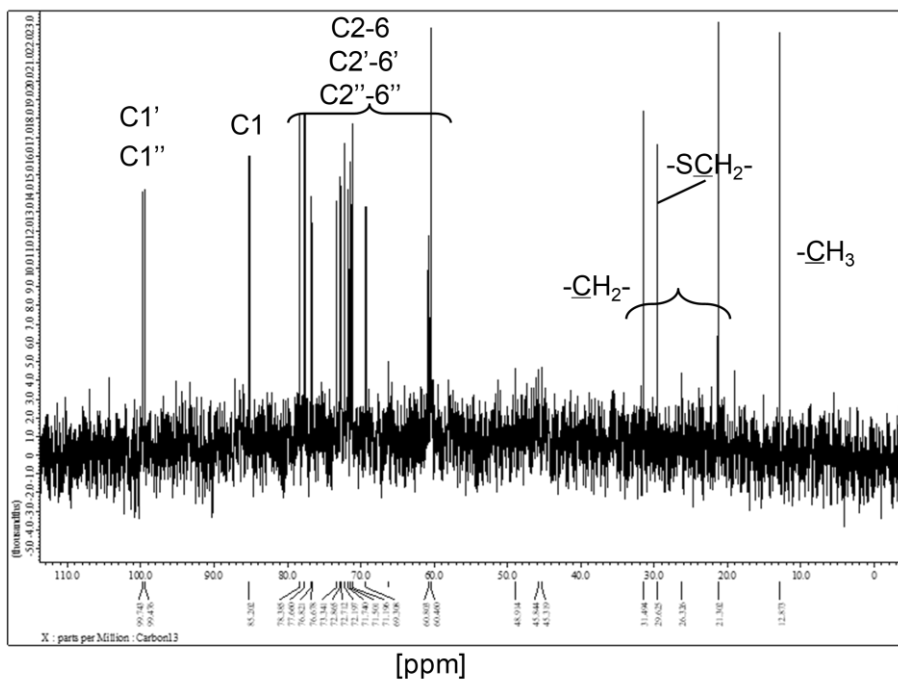
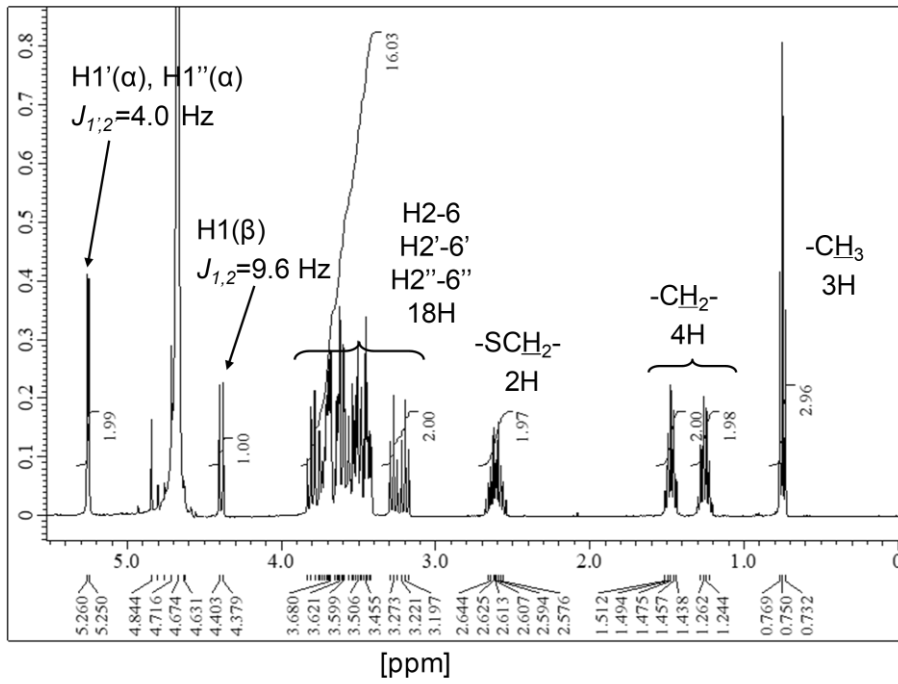


Fig.E-16 C₄SMaltri(β)の ¹H-NMR スペクトルおよび ¹³C-NMR スペクトル (400 MHz, in D₂O)

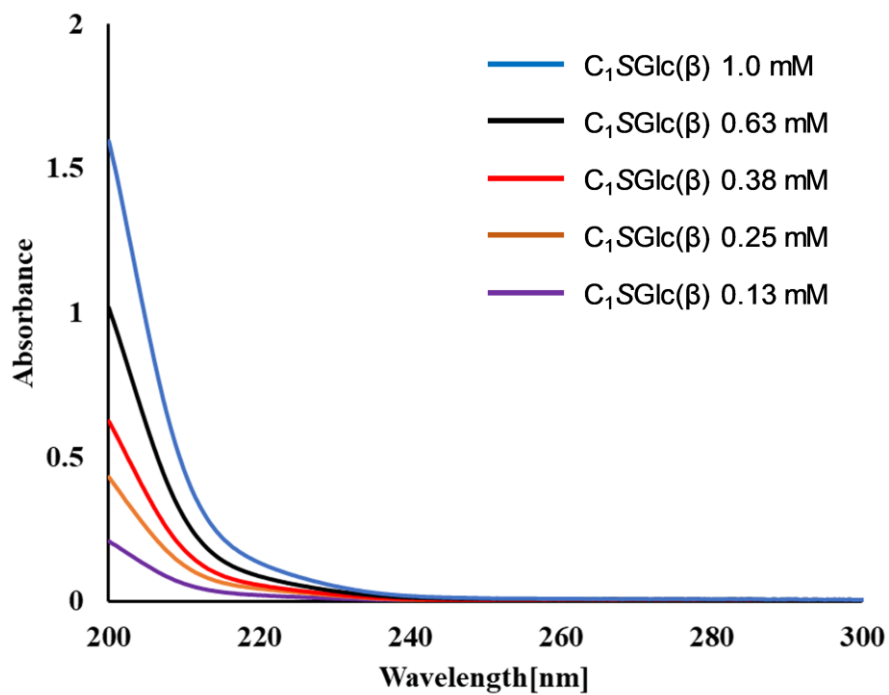


Fig.E-17 C₁SGlc(β)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

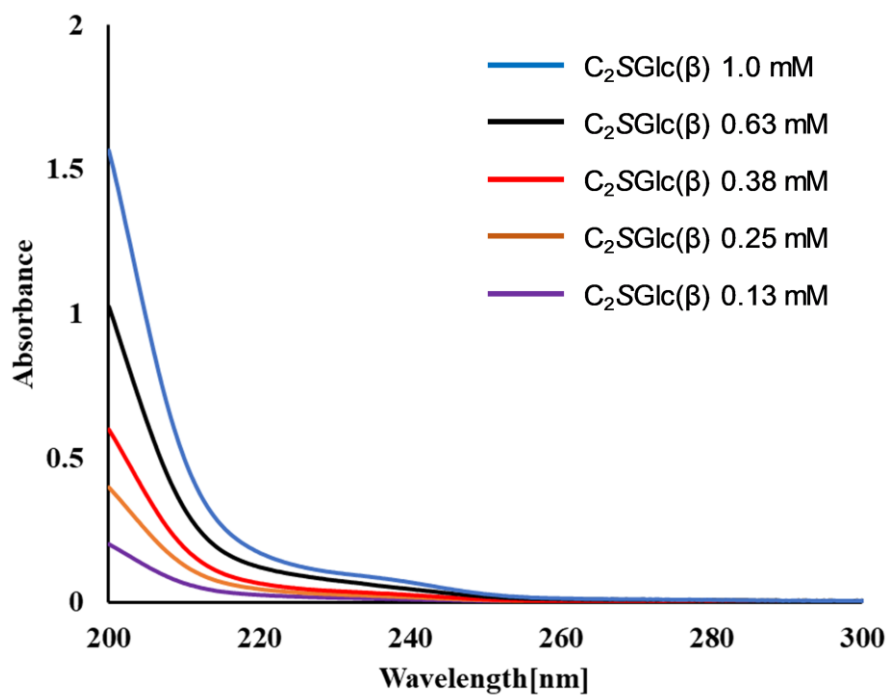


Fig.E-18 C₂SGlc(β)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

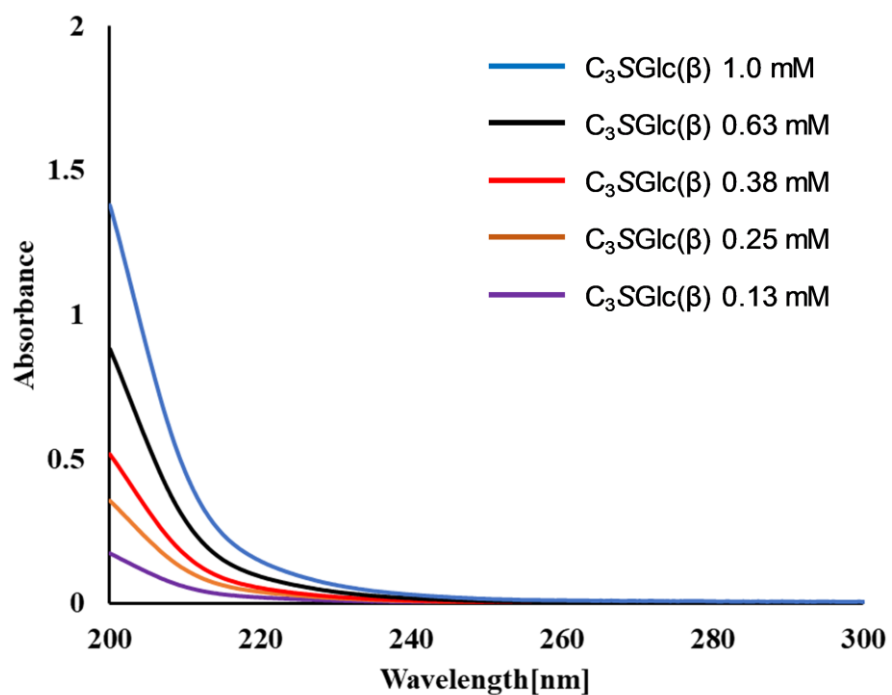


Fig.E-19 C₃SGlc(β)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

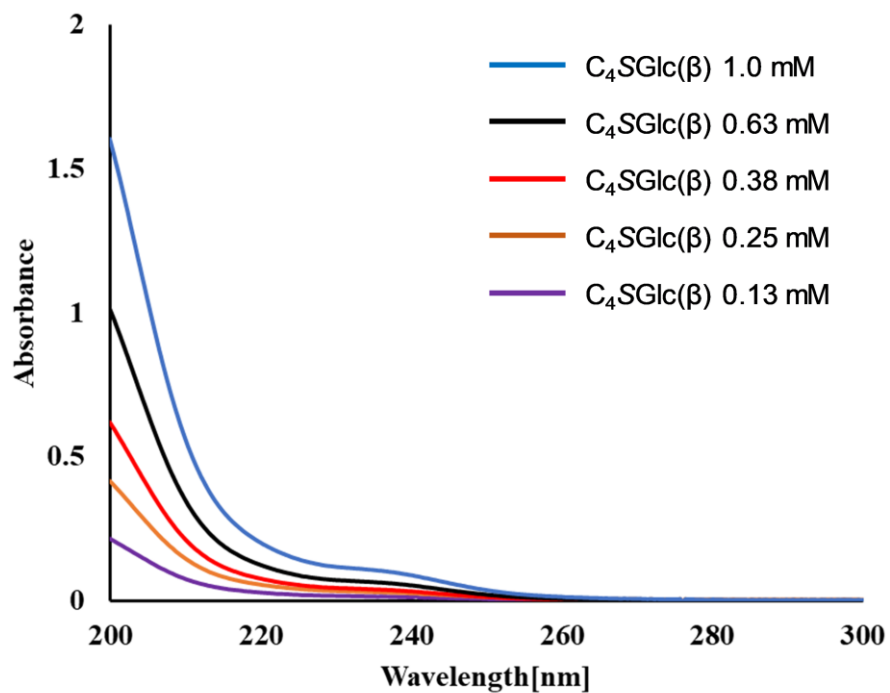


Fig.E-20 C₄SGlc(β)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

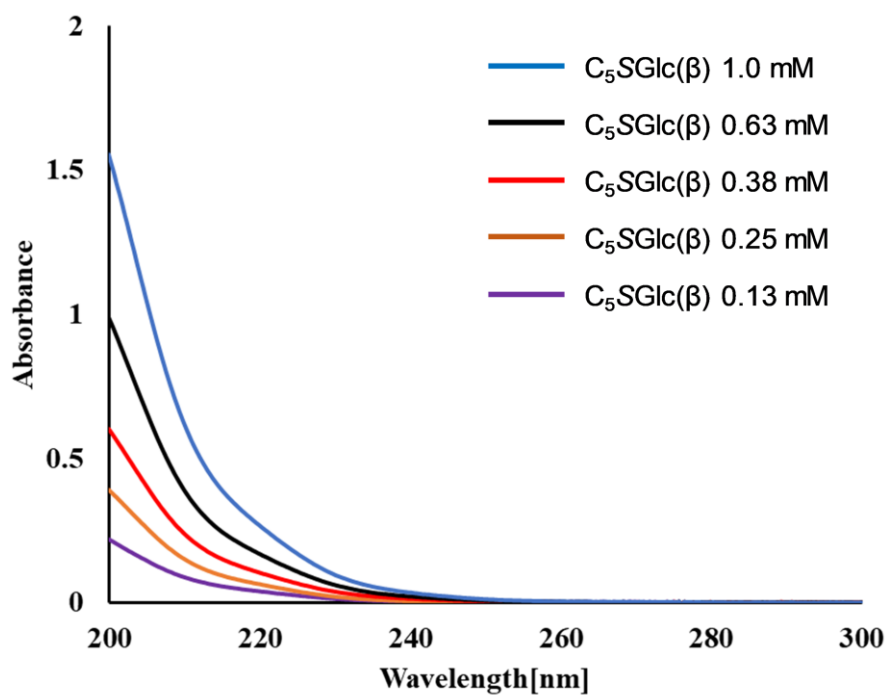


Fig.E-21 $C_5SGlc(\beta)$ の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

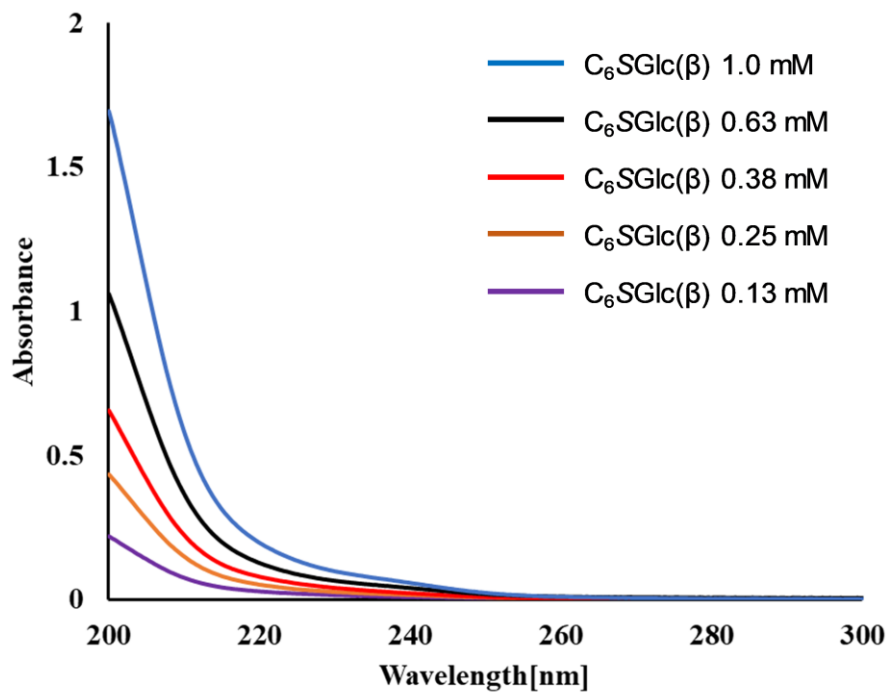


Fig.E-22 $C_6SGlc(\beta)$ の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

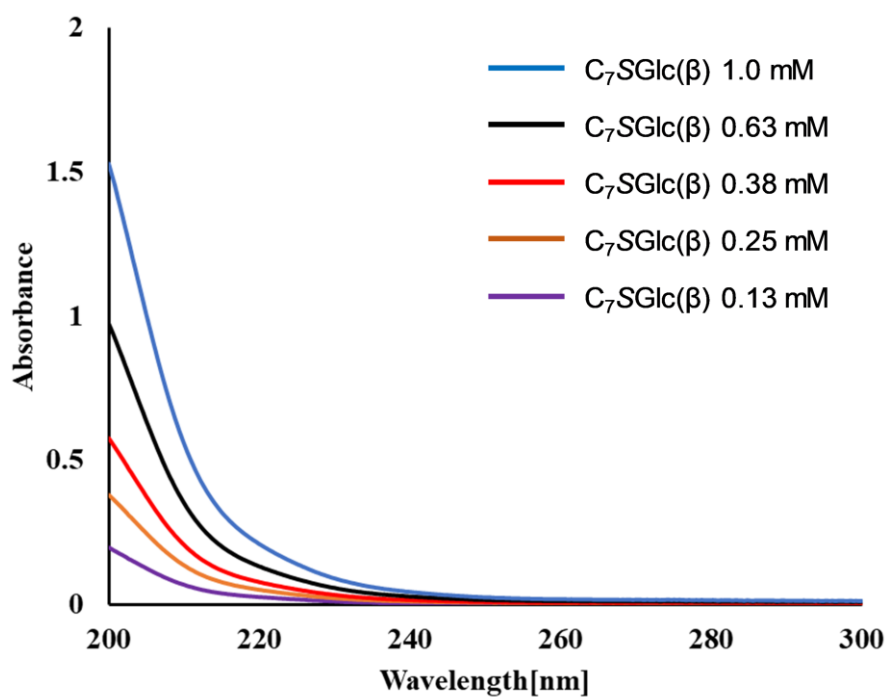


Fig.E-23 C₇SGlc(β)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

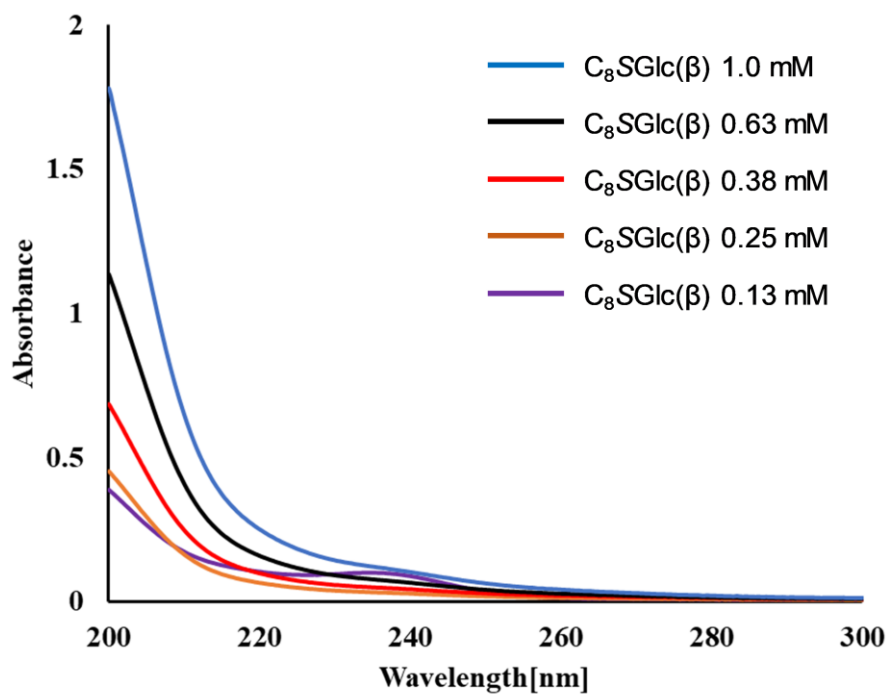


Fig.E-24 C₈SGlc(β)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

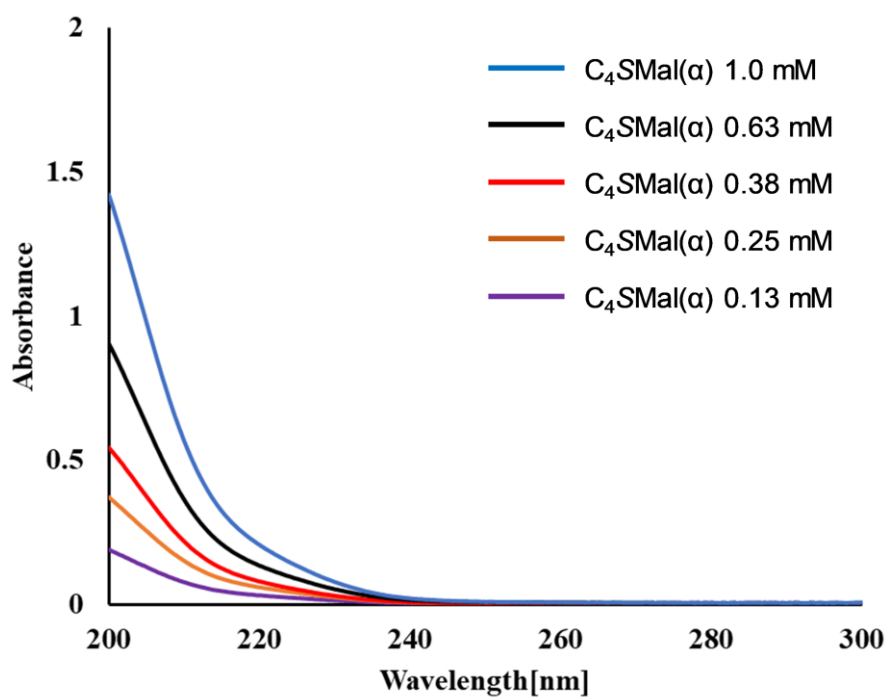


Fig.E-26 C₄SMal(α)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

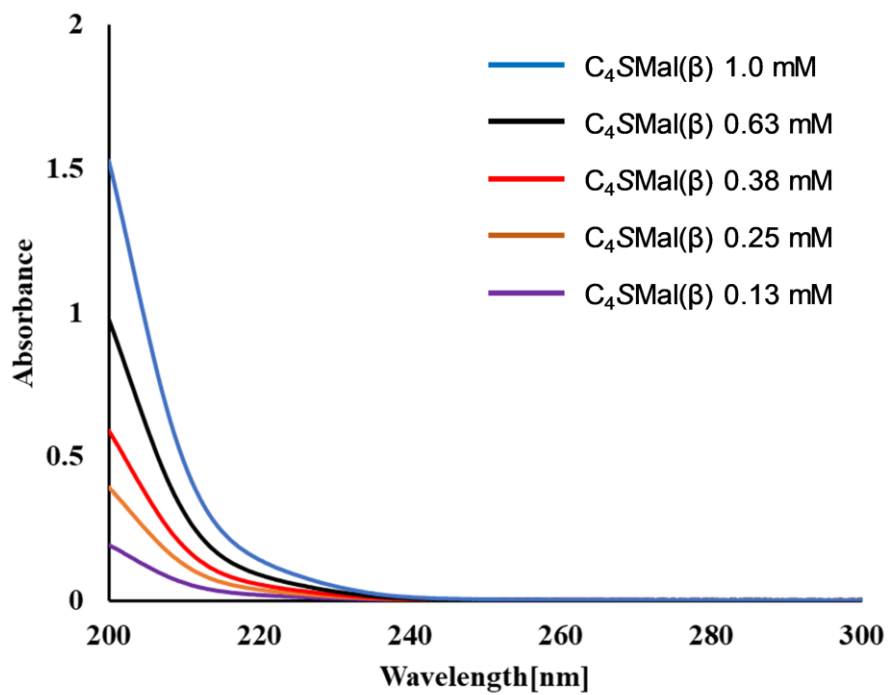


Fig.E-27 C₄SMal(β)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

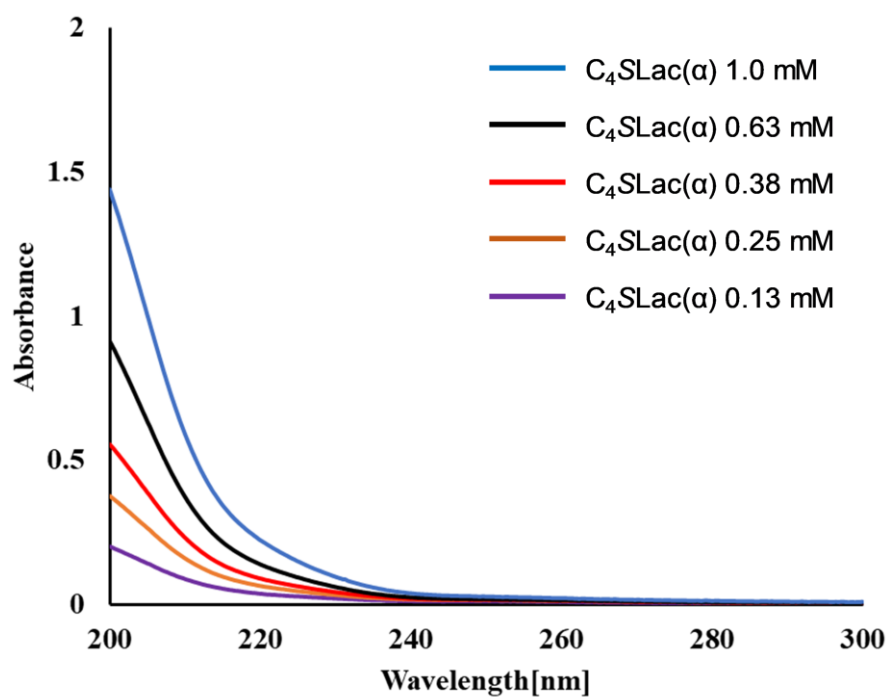


Fig.E-28 C₄SLac(α)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

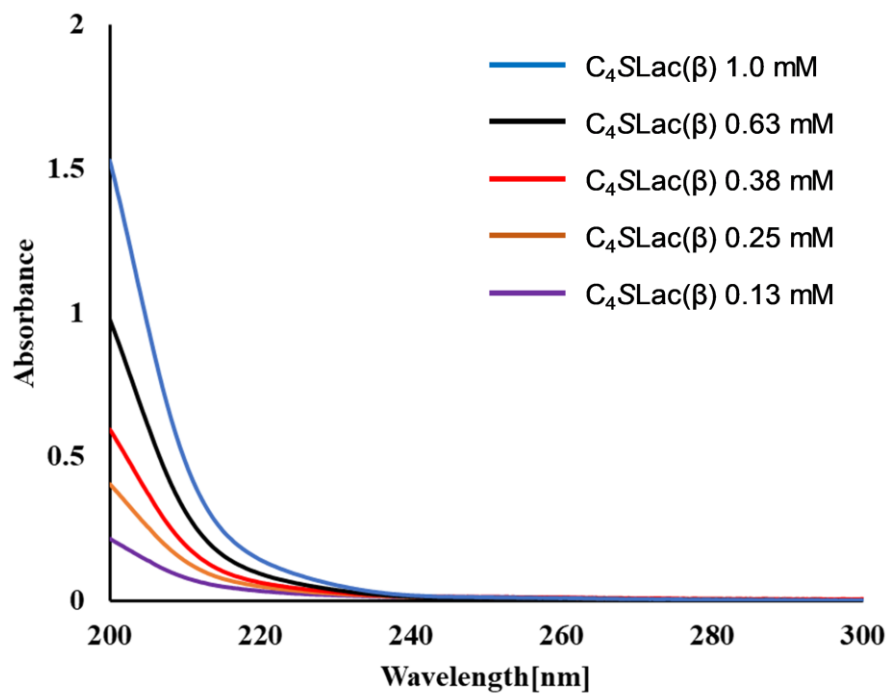


Fig.E-29 C₄SLac(β)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

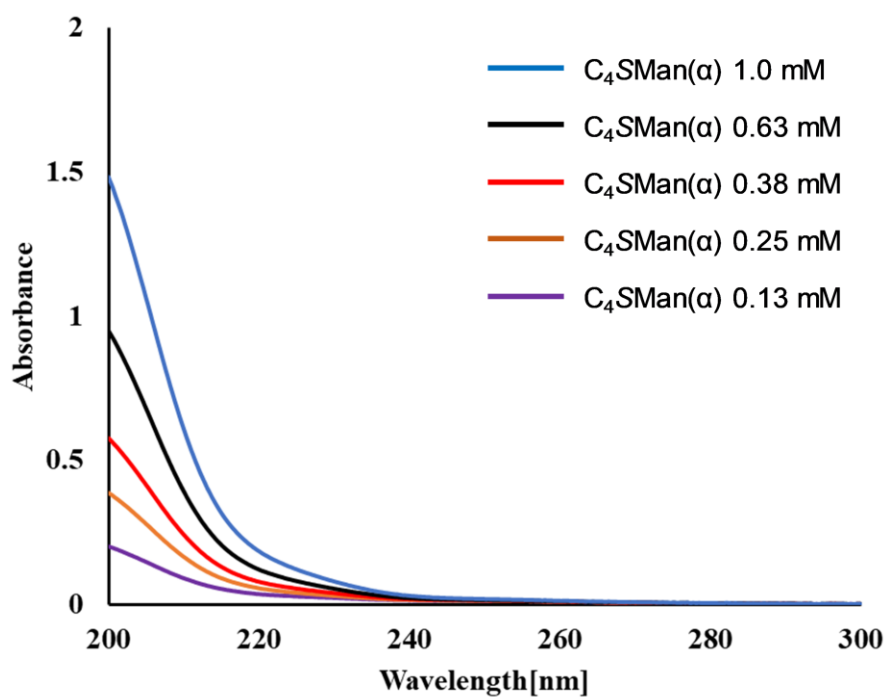


Fig.E-30 C₄SMan(α)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

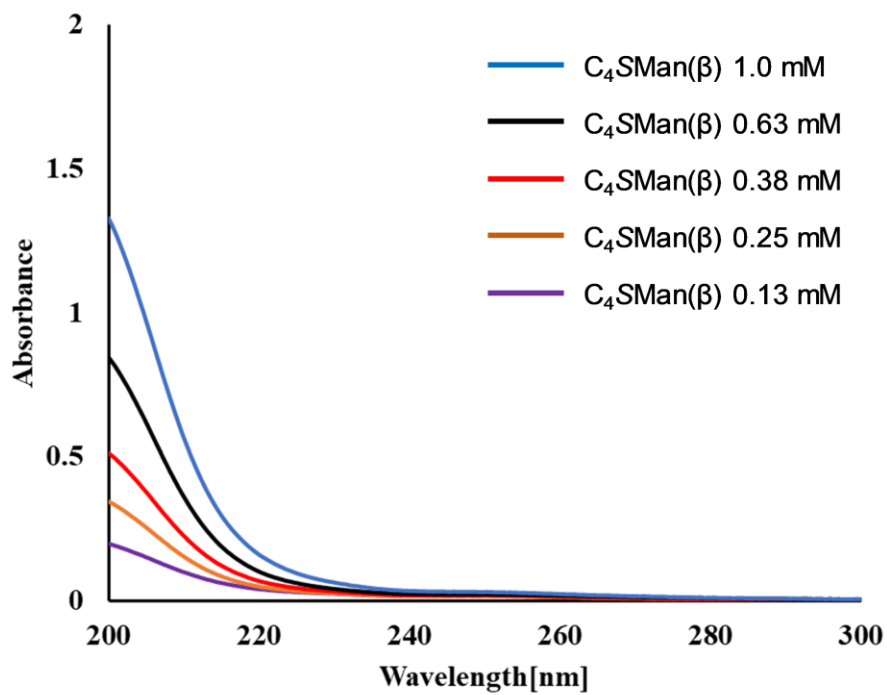


Fig.E-31 C₄SMan(β)の UV 吸収スペクトル(0.13~1.0 mM 水溶液)

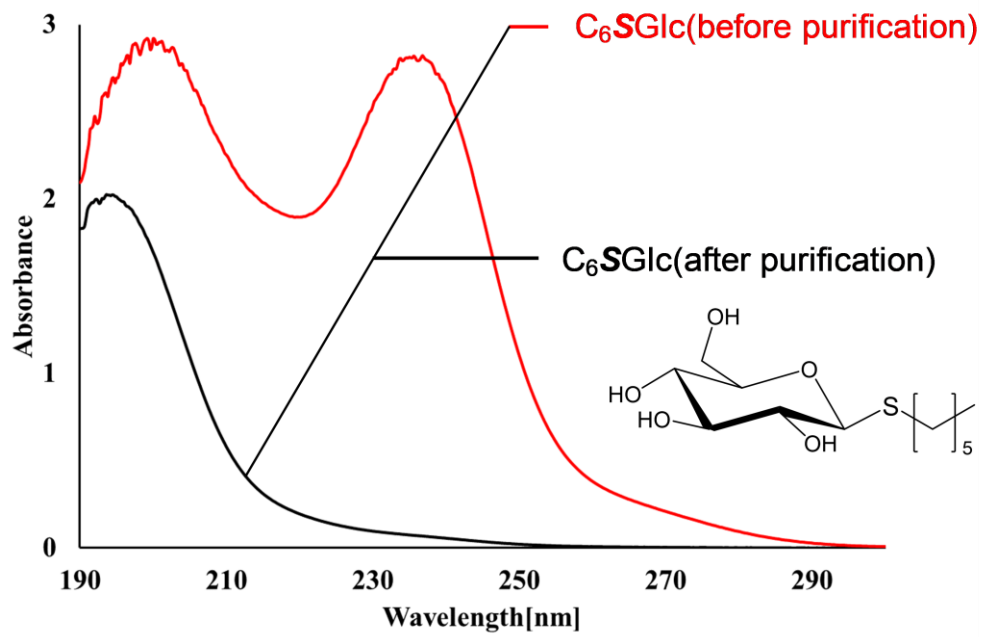


Fig.E-32 $C_6SGlc(\beta)$ 水溶液 (1.0 mM) 中に含まれる合成副産物の UV 吸収スペクトルパターンに対する影響

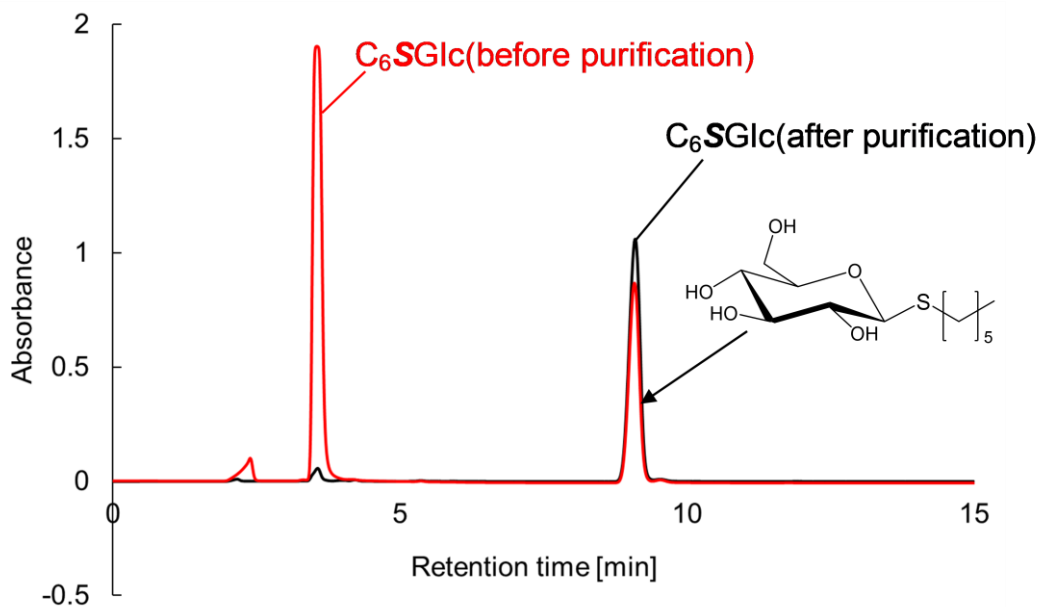


Fig.E-33 HPLC クロマトグラムから確認された $C_6SGlc(\beta)$ 水溶液中に含まれる合成副産物のピーク

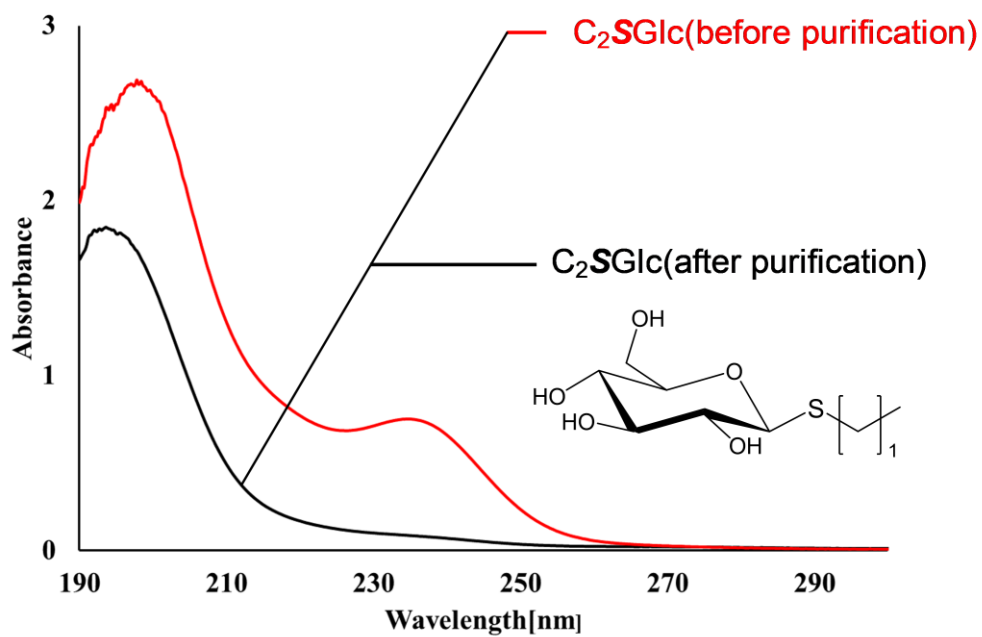


Fig.E-34 C₂SGlc(β)水溶液 (1.0 mM) 中に含まれる合成副産物の UV 吸収スペクトルパターンに対する影響

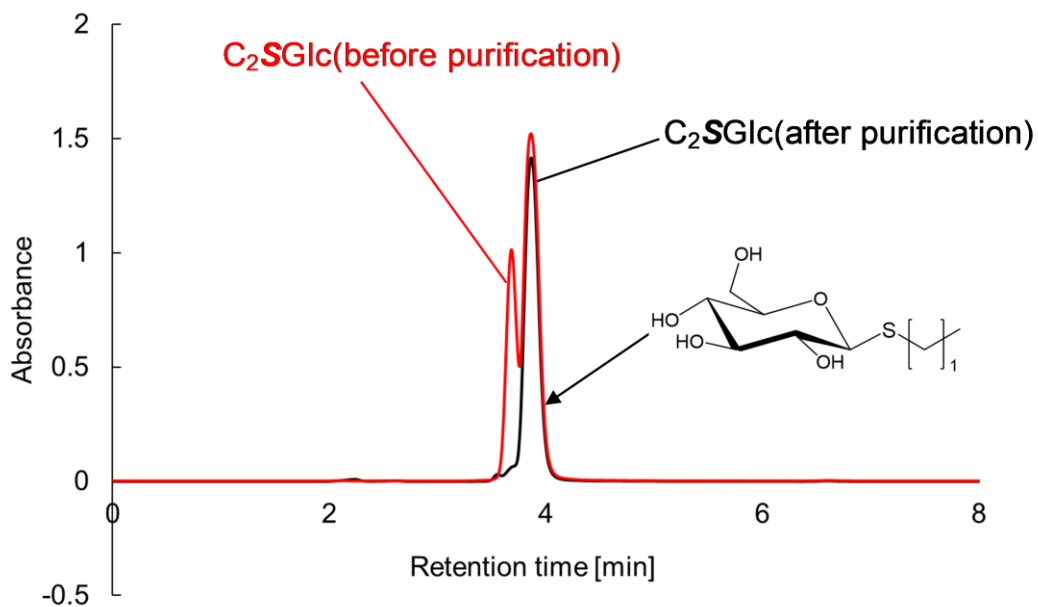


Fig.E-35 HPLC クロマトグラムから確認された C₂SGlc(β)水溶液中に含まれる合成副産物のピーク

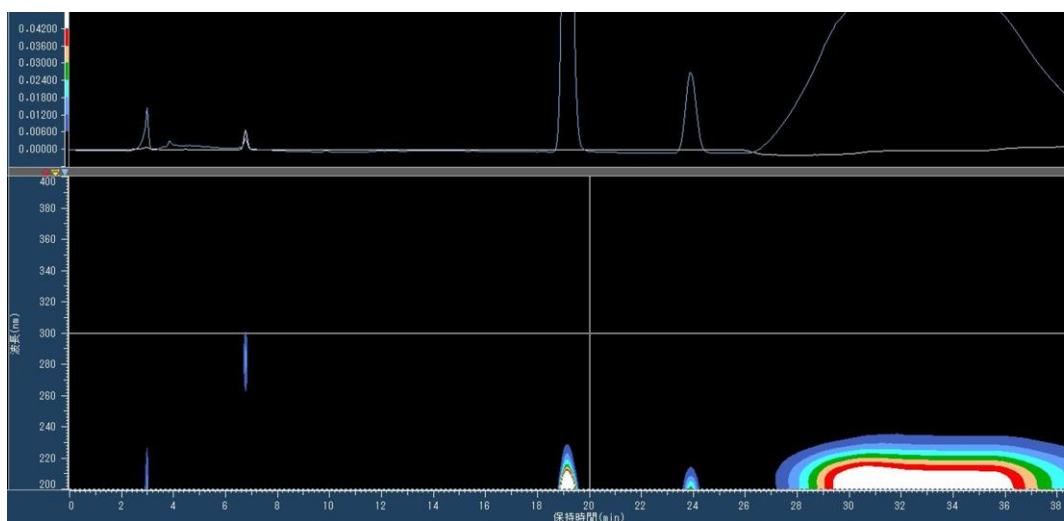
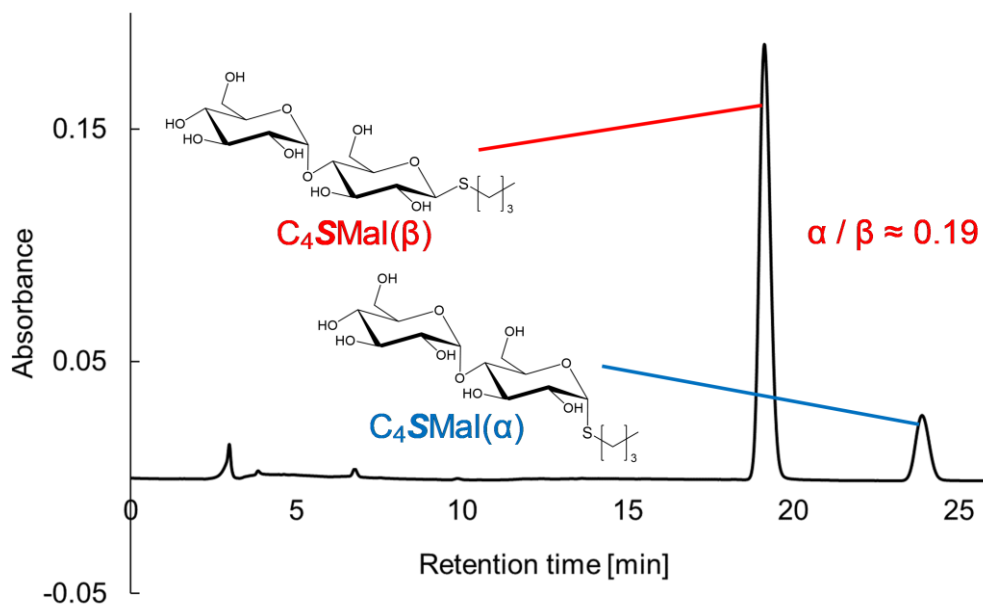


Fig.E-36 UV を検出条件とした $C_4SMal(\alpha)$ および (β) の HPLC クロマトグラム
 (上) 200 nm 固定波長、(下) 200~400 nm 領域の多波長観測
 (カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 ϕ \times 250 mm), 検出: DAD (200~400 nm),
 溶離液: $CH_3CN/H_2O = 10/90$, 流速: 0.8 mL/min, インジェクション: 20 μ L,
 カラム温度: 45 $^{\circ}C$)

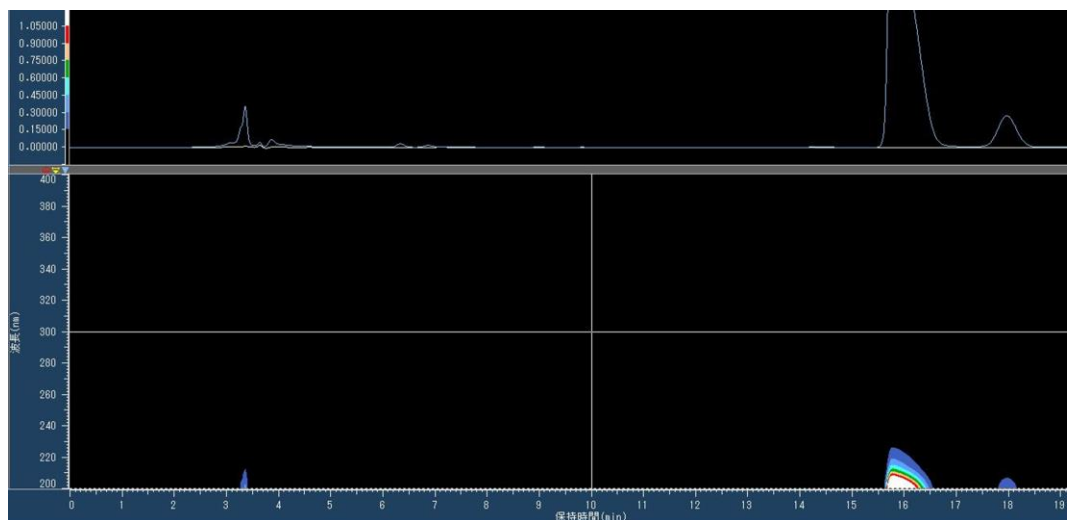
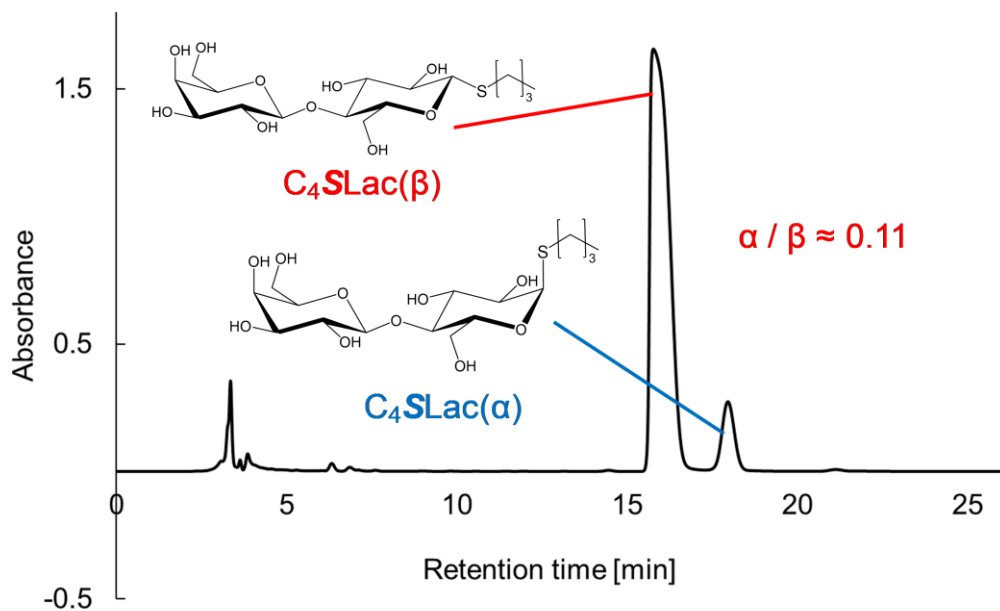


Fig.E-37 UV を検出条件とした $C_4SLac(\alpha)$ および (β) の HPLC クロマトグラム
 (上) 200 nm 固定波長、(下) 200~400 nm 領域の多波長観測
 (カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 ϕ \times 250 mm), 検出: DAD (200~400 nm),
 溶離液: $CH_3CN/H_2O = 10/90$, 流速: 0.8 mL/min, インジェクション: 20 μ L,
 カラム温度: 45 $^{\circ}C$)

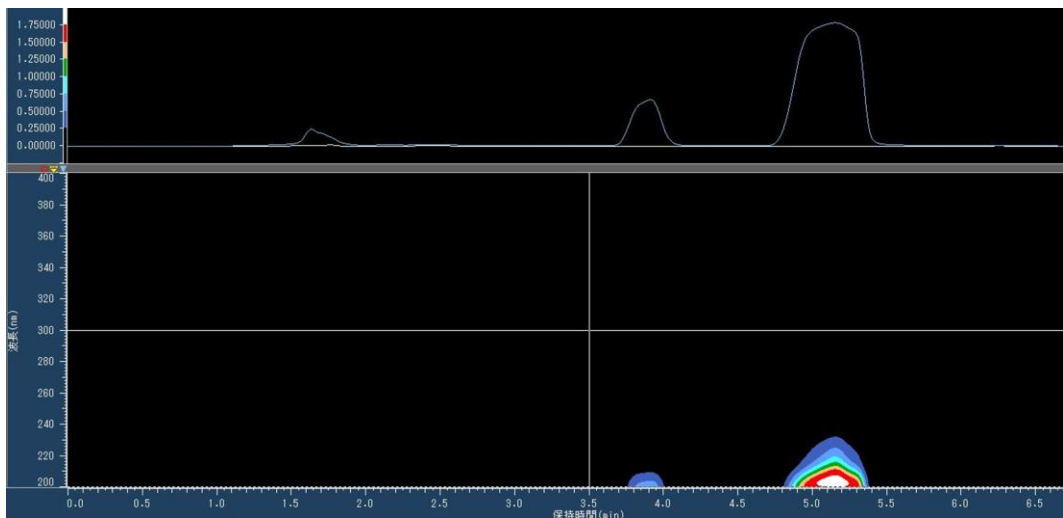
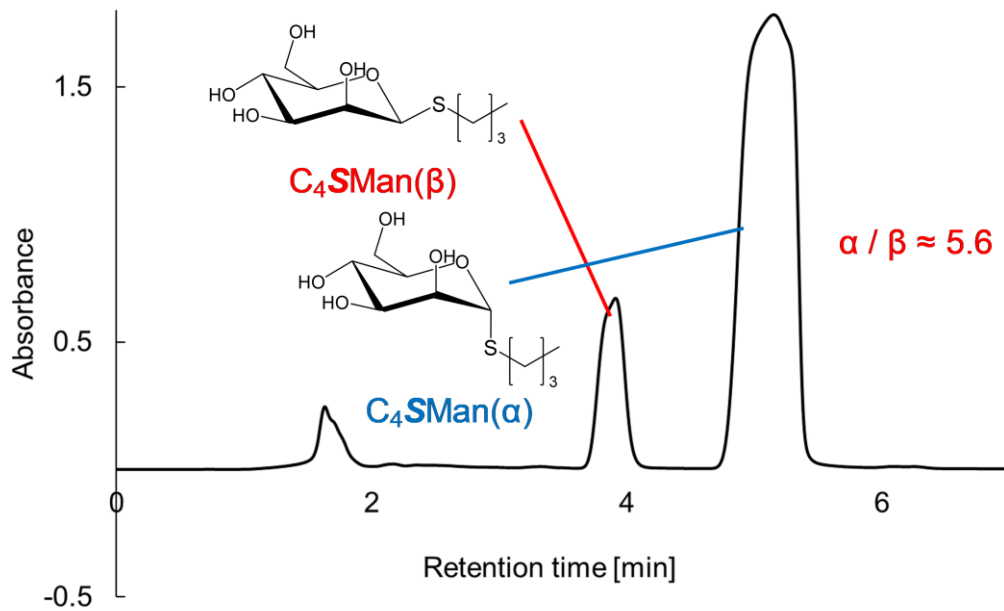


Fig.E-38 UV を検出条件とした $C_4SMan(\alpha)$ および (β) の HPLC クロマトグラム
 (上) 200 nm 固定波長、(下) 200~400 nm 領域の多波長観測
 (カラム: Mightysil RP-18 GP2 (4.6 ϕ \times 150 mm), 検出: DAD (200~400 nm),
 溶離液: $CH_3CN/H_2O = 20/80$, 流速: 1.0 mL/min, インジェクション: 20 μ L,
 カラム温度: 45 $^{\circ}C$)

謝辞

本学位論文は、日本大学工学部 生命応用化学科 糖質生命化学研究室（小林研究室）にて実施した澱粉の高度利用を指向する糖質・酵素工学に関する研究の成果をまとめたものです。

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学工学部 生命応用化学科 小林厚志 准教授に、心より御礼申し上げます。研究成果の議論を通じて、多くの知識や示唆を賜りました。今後におきましても、ご指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

本論文の作成や審査過程において、多くの有益なご助言とご指導を賜りました東北大学工学部 バイオ工学専攻 中山 亨教授、ならびに日本大学工学部 生命応用化学科 根本修克 教授、同じく石原務 教授に、深く感謝申し上げます。

第3章における糖質酵素工学に関する研究の遂行においてご助言とご指導をいただきました東北大学工学部 バイオ工学専攻 正田晋一郎 教授、同じく野口真人 准教授に深謝申し上げます。また、サブサイト理論について多くのご助言をいただきました京都大学 松野隆一 名誉教授に深く感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり、糖質生命化学研究室の後輩の皆様に、ご協力をいただきましたことを、心から感謝いたします。

最後に、本論文をまとめるまでの長き間において、暖かく見守り、経済面および精神面などのさまざまな面で支えてくださった両親に、深い感謝の意を表して謝辞といたします。

2019年2月伊藤博

本論文を構成する査読論文

1. Hiroshi Itoh, Fabio Pichierri, and Atsushi Kobayashi, "UV Absorption of *n*-alkyl 1-Thio- β -D-Glucopyranosides and its Utilization in Chromatographic Separation", *Tetrahedron Letters*, Vol.58, No.37, Aug.2017, pp.3678-3680. (第4章)
2. Atsushi Kobayashi, Hiroshi Itoh, and Shin-ichiro Shoda, "Irradiation of Ultrasound onto Substrate Mixture Enhances Transglycosylating Activity of Commercial α -Amylase Preparation", *Chemistry Letters*, Vol.34, No.10, Sept.2005, pp.1384-1385. (第3章)
3. 小林厚志, 星野優人, 上沢七海, 伊藤博, "デンプンのゲルに対するホウ砂の添加効果およびゲルの保水能評価", *高分子論文集*, Vol.75, No.1, Jan.2018, pp.99-102. (第2章)