

酵素の高度利用技術に関する研究 —修飾酵素によるバイオ素材の利用技術—

茶谷悦司、北野道雄

要 旨

加水分解酵素を有機溶媒中で逆反応（合成反応）の触媒として利用し、新規繊維加工剤として有用な糖鎖を有する重合性モノマーを合成した。ここではこの反応に使用する最適酵素の検索を行い、反応条件を検討することにより重合性糖エステルを合成させることが可能となり、合成反応時に使用する溶媒種により反応速度や副生成物の有無などに違いが現れることを明らかにした。

また、酵素触媒重合反応を利用した単糖、二糖からのオリゴ糖合成については、セロビオースを基質とした場合 *Trichoderma viride* を起源とするセルラーゼが最も高い触媒活性を示すことを明らかにした。

1 はじめに

現在では、任意の順にヌクレオチドを組み合わせてDNAを合成すること、同様に、アミノ酸を結合してタンパク質に似たポリペプチドを合成することについては手法が確立し、自動合成装置が市販されるに至っている。

一方、核酸・タンパク質と並んで三大重要生体高分子群を構成している糖鎖の化学合成については、立体化学と位置選択性を制御する必要があるため桁違いに困難とされる。

最近、腸内の有益細菌の増殖を促進するフラクトオリゴ糖が、砂糖を出発原料として加水分解酵素（黒麹菌の β -フラクトフラノシターゼ）の転移作用を利用して工業的に製造されている。この例に見られるように、糖鎖の合成において、その立体化学と位置選択性を制御することが新規機能性物質の創製につ

ながるため、活発な研究が行われている^{1),2)}。

そこでここでは、酵素の立体・位置選択反応性を利用して糖鎖を有する化合物を合成する技術について研究を行った。

2 実験

2.1 実験材料

重合性糖エステルの酵素的合成実験には、エステラーゼ活性を持ち本来脂質等の分解反応を触媒するリパーゼやプロテアーゼを用いた。酵素反応用溶媒には、ジメチルホルムアミド、ピリジン（和光純薬(株)製）、ジメチルスルホキシドを用いた。ウリジンはKOHJIN(株)製、アジピン酸ジビニル（DVA）は東京化成工業(株)製を用いた。

単糖、二糖からの酵素的オリゴ糖合成実験には、本来セルロースの加水分解酵素である

セルラーゼを用いた。酵素反应用溶媒には、アセトニトリル／酢酸緩衝液を用いた。グルコース（単糖）、セロビオース（二糖）などの基質、その他の試薬は特に断りのない限り市販の特級を用いた。

2. 2 重合性糖エステルの酵素合成

重合性糖エステルの合成は以下の手順で行った。糖（セロビオース）あるいはヌクレオシド（ウリジン）とアジピン酸ジビニルを含むDMF溶液に、プロテアーゼあるいはリパーゼを添加し、30℃、160 rpmにて1週間撹拌した。酵素反応液を濾過して酵素粉末を除去した後、反応液を減圧濃縮しDMFを除去した。その後、生成物を分離するためシリカゲル（ワコーゲルC-200、particle size 75~100 μm）を充填したカラムに添加し、クロロホルム：メタノール（12：1）で溶出し、生成物を集めて溶媒を減圧乾燥で除去し、重合性

糖エステルの結晶を得た（図1）。

2. 3 単糖、二糖からの酵素的オリゴ糖合成

酵素触媒重合によるオリゴ糖の合成は以下の手順で行った。グルコースあるいはセロビオースを含むアセトニトリル／酢酸緩衝液溶液に、酵素（セルラーゼ、ペクチナーゼなど）を添加し、30℃、120 rpmにて20時間撹拌した。失活処理の後、酵素反応液をメタノール／水（5／1）溶液中に投入し、オリゴ糖、多糖を沈殿させた。これを濾過して沈殿物と上澄み（未反応基質、酵素、溶媒など）に分けた。さらに沈殿物を水に溶かし、溶解物（オリゴ糖）と沈殿物（多糖）に分けた（図2）。

2. 4 分析方法

重合性糖エステルの酵素合成における酵素反応中の糖の濃度は、遠心濾過で酵素を除去した後、高速液体クロマトグラフィー（株島

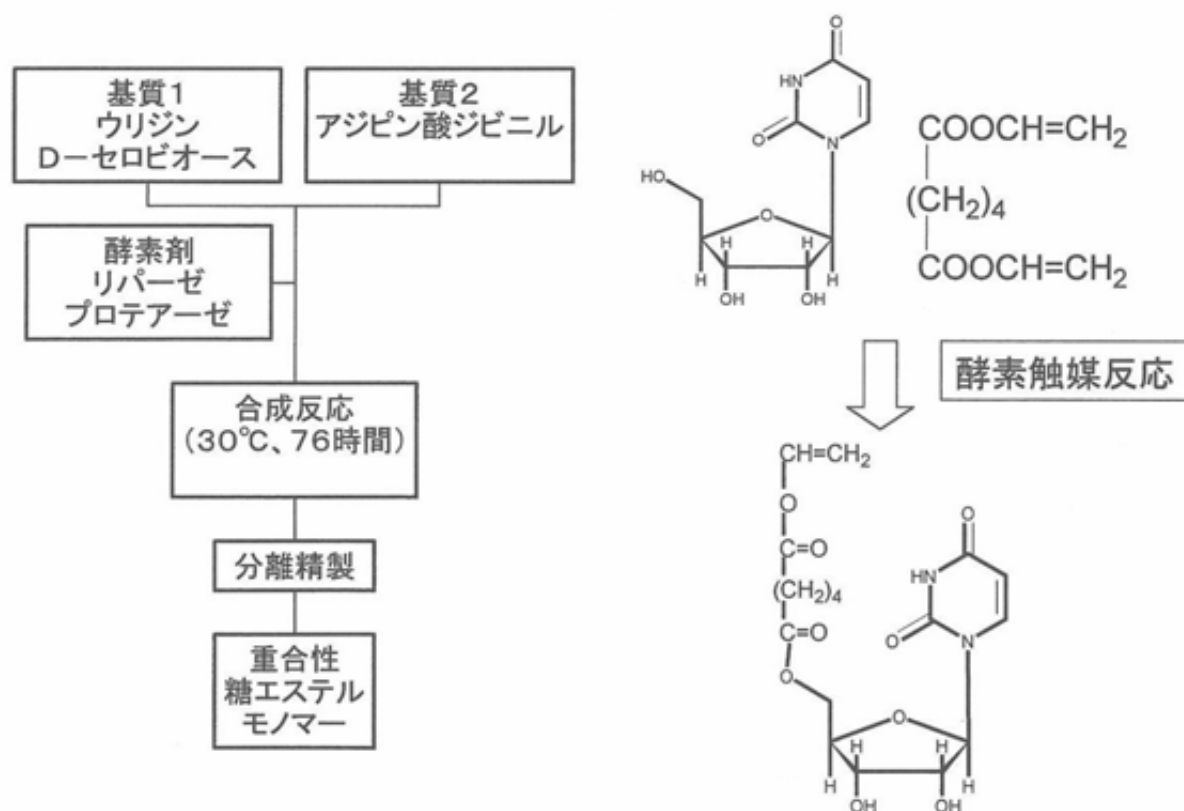


図1 重合性糖エステルモノマーの酵素的合成

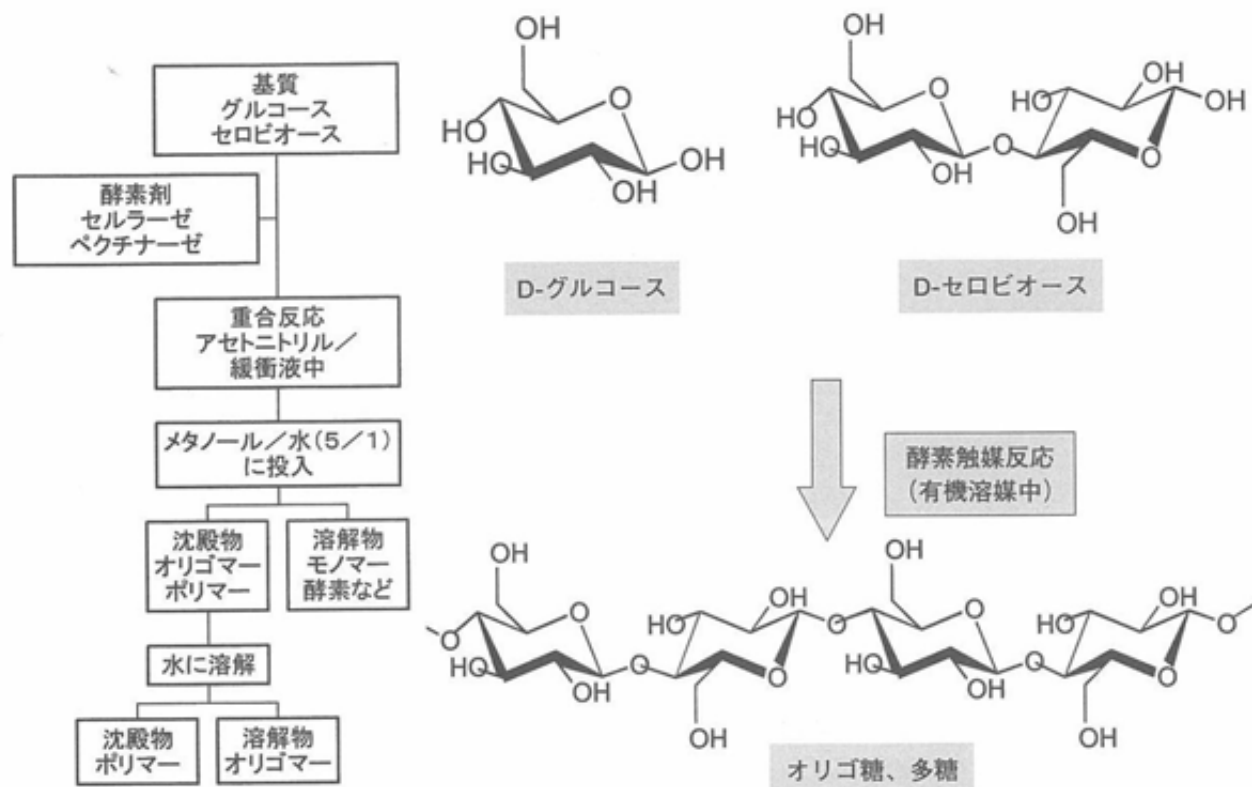


図2 オリゴ糖の酵素的合成

津製作所製、LC-9A) により基質のピーク面積の変化から定量した。測定は、アミノカラム (TOSOH TSK-gel Amide-80) に移動相のアセトニトリル/水 (10:1) の混合溶媒を流速1.0ml/minで流し示差屈折計で検出することにより行った。

ウリジンエステル、セロビオースエステルの存在を確認するために、メルク社のシリカゲル60Fプレートで薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。展開溶媒組成は、ウリジンエステルについてはエチルアセテート/メタノール/水 (17:2:1)、セロビオースエステルについては1-プロパノール/アセトン/水 (4:5:1) とした。スポットは20%の H_2SO_4 を噴霧した後、プレートを加熱することにより検出した。

赤外吸収スペクトル (IR) は臭化カリウムを用いてフーリエ変換赤外分光光度計 (株式会社津製作所製FT-IR 8100M) で測定した。

^{13}C -NMRは重水素化ジメチルスルホキシドを溶媒とし、テトラメチルシランを内部標準として、JNM-GX270 (日本電子(株)製) を用いて測定した。

酵素触媒重合によるオリゴ糖の合成における酵素の触媒能は、沈殿物の重量測定による収率評価や、薄層クロマトグラフィー (展開溶媒組成1-プロパノール/アセトン/水 (4:5:1)) で評価した。

3 結果と考察

3.1 重合性糖エステルの酵素合成

一般にリパーゼ、プロテアーゼなどの加水分解酵素をエステル交換反応に用いる場合、使用する有機溶媒としては疎水性有機溶媒が効果的であることが報告されている³⁾。しかし、基質が疎水性であり疎水性有機溶媒に溶解しやすい場合は問題ないが、ヌクレオシドは親水性が高くヘキサンなどの疎水性溶媒には

表1 重合性ウリジンエステルの酵素的合成 (プロテアーゼスクリーニング結果)

No.	Protease	Supplier	Origin	Conversion rate(%)
1	Biopraxe SP-10	Nagase Biomedicals	<i>Bacillus subtilis</i>	15.6
2	Biopraxe AL-15FG	Nagase Biomedicals	<i>Bacillus subtilis</i>	26.2
3	Orientase	Uedakagaku	<i>Bacillus subtilis</i>	33.2
4	Protease AP15	Meijiseika		1.9
5	Biopraxe 原末	Nagase Biomedicals	<i>Bacillus subtilis</i>	100.0
6	Protease Type XIV	Sigma	<i>Streptomyces griseus</i>	99.9
7	Proleather FG-F	Amano	<i>Bacillus sp.</i>	49.7
8	スミチーム AP	新日本化学		2.3
9	スミチーム LP50	新日本化学		3.4
10	スミチーム FP	新日本化学		10.7
11	スミチーム MP	新日本化学		9.0
12	スミチーム LPL	新日本化学		1.4

Uridine 0.25M,DVA 1M,Enzyme 100mg/ml

表2 重合性ウリジンエステルの酵素的合成 (リパーゼスクリーニング結果)

No.	Lipase	Supplier	Origin	Conversion rate(%)
1	Lipase PS	Amano	<i>Pseudomonas cepacia</i>	36.4
2	Lipase P	Nagase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13.0
3	Lipase AK	Amano	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	19.2
4	Immobilized lipase	Toyobo		22.0
5	Chirazyme L-5, c-f, lyo.	Boehringer Mannheim	<i>Candida antarctica</i> , fractionA	35.9
6	Chirazyme L-5, lyo.	Boehringer Mannheim	<i>Candida antarctica</i> , fractionA	98.8
7	Chirazyme L-2, c-f, C2, lyo.	Boehringer Mannheim	<i>Candida antarctica</i> , fractionB	1.4
8	Chirazyme L-2, c-f, C3, lyo.	Boehringer Mannheim	<i>Candida antarctica</i> , fractionB	17.9

Uridine 0.25M,DVA 1M,Enzyme 100mg/ml

とんど溶解しない。そこで、ヌクレオシドに対して高い溶解性を有している親水性有機溶媒DMF中において種々のプロテアーゼやリパーゼをスクリーニングした。その結果を表1,2に示す。プロテアーゼではバチルス属由来のバイオプラーゼ原末が、リパーゼではChirazyme L-5, lyo.が高い交換率を示した。そこで、これらの酵素を用いてウリジンエステル合成時の酵素濃度の影響、溶媒種の影響を検討することとした。

図3に0.25Mのウリジンと1MのDVAを使用したときの交換率に対するバイオプラーゼ濃度の影響を示す。酵素濃度の増加とともに交換率は上昇し、ここで行った反応時間中では50 mg/ml以上で100%の交換率が得られることが判明した。

同様に、図4に0.25Mのウリジンと1Mの

DVAを使用したときの交換率に対するChirazyme L-5, lyo.濃度の影響を示す。酵素濃度の増加とともに交換率は上昇し、ここで行った反応時間中では75mg/ml以上で100%の交換率が得られることが判明した。

次に0.25Mのウリジン、1MのDVA、50mg/mlの酵素を使用し合成反応を行ったときの交換率に対する溶媒種の影響を検討した結果を図5 (バイオプラーゼ原末)、図6 (Chirazyme L-5, lyo.)にそれぞれ示す。これらから明らかとなっており、溶媒種により交換率に変化がみられ、特にChirazyme L-5, lyo.を使用した場合においてそれが顕著であった。使用する溶媒種により酵素の触媒能 (基質認識能) が異なることが確認された。また、図7に示したTLCパターンから、ピリジン中で合成反応を行うとモノエステルが優先的に生成し、副生

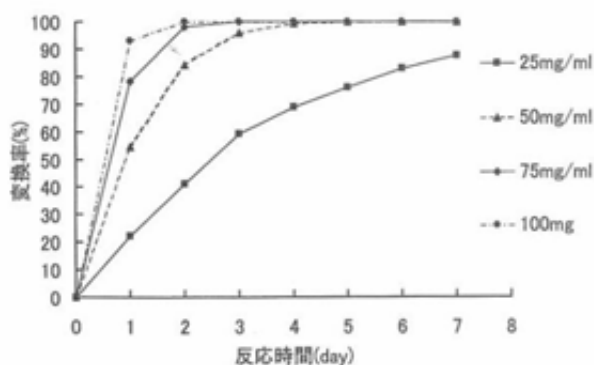


図3 プロテアーゼ (ビオプラーゼ原末) を触媒として用いたときの重合性ウリジンエステルの合成 (DMF中)

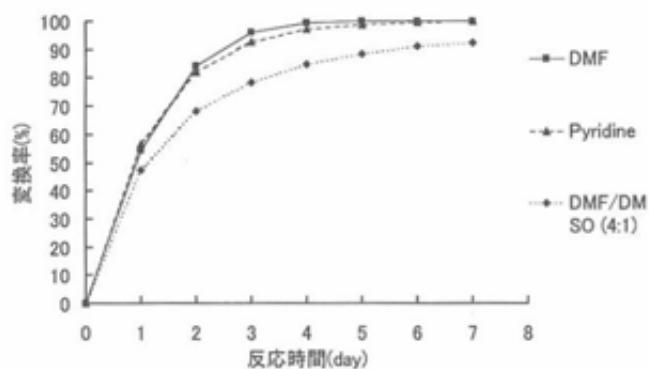


図5 プロテアーゼ (Biopraser原末) を触媒として用いたときの重合性ウリジンエステルの合成 (種々の溶媒中)

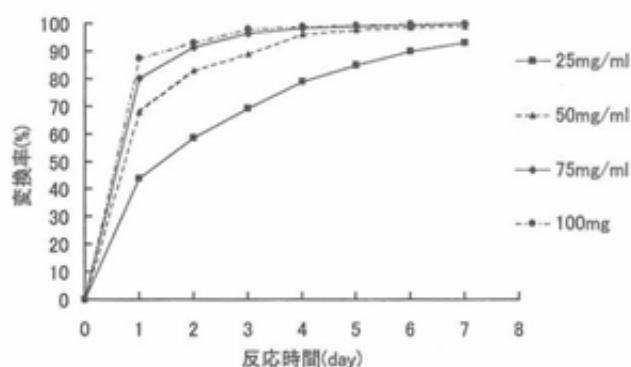


図4 リパーゼ (Chirazyme L-5, Iyo.) を触媒として用いたときの重合性ウリジンエステルの合成 (DMF中)

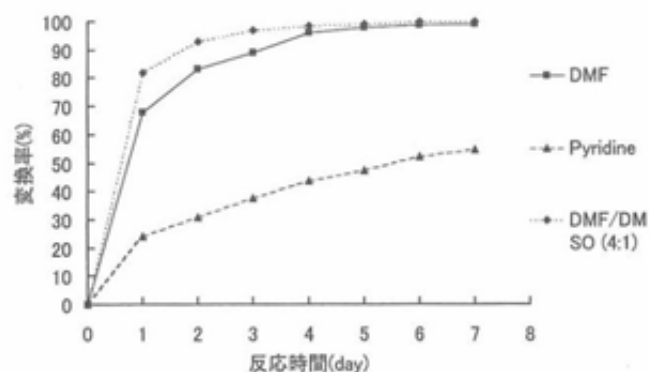
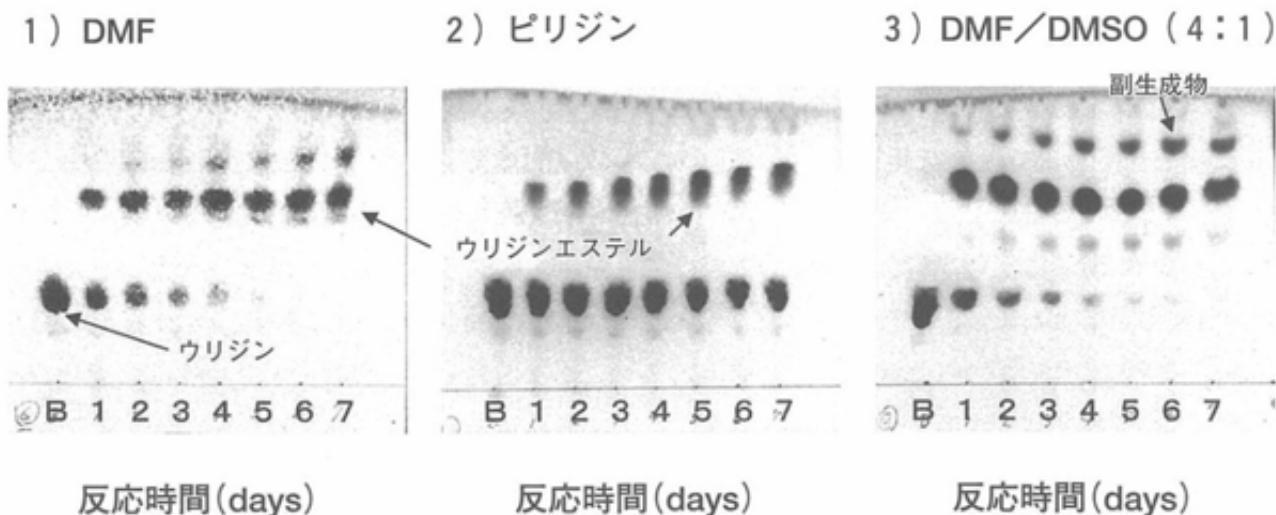


図6 リパーゼ (Chirazyme L-5, Iyo.) を触媒として用いたときの重合性ウリジンエステルの合成 (種々の溶媒中)



展開溶媒組成：酢酸エチル／メタノール／水＝17／2／1
20%硫酸噴霧後過熱して発色

図7 種々の溶媒中で酵素 (リパーゼ) を使用し合成反応を行ったときのTLCパターン

表3 重合性セロビオースエステルの合成 (リパーゼスクリーニング)

酵素名	起 源	記号	触媒能(TLC)
リパーゼA	<i>Aspergillus niger</i>	LA	○
リパーゼAY	<i>Candida rugosa</i>	LB	○
リパーゼF-AP	<i>Rhizopus sp.</i>	LC	×
リパーゼM	<i>Mucor javanicus</i>	LD	△
リパーゼPS	<i>Pseudomonas cepacia</i>	LE	×
ニューラーゼF	<i>Rhizopus niveus</i>	LF	△
パンクレアチンF	Hog pancreas	LG	△
リパーゼ「阪急」	酵母	LH	○
Chirazyme L-1, Lyo	<i>Pseudomonas cepacia</i>	LI	×
SP398	細菌 (組換えDNA)	LK	○

* 合成反応条件 使用溶媒: DMF
 酵素濃度: 50mg/ml
 基質量: セロビオース0.25M、アジピン酸ジビニル1M
 反応温度、時間: 30℃、76時間

成物 (ジエステルなど) が少ないことが確認された。

同様に、D-セロビオースとアジピン酸ジビニルから重合性糖エステルを合成する際の酵素スクリーニングを行った。合成反応は、DMF溶媒中酵素濃度50mg/ml、基質 (D-セロビオース) 0.25M、アジピン酸ジビニル1M、反応温度30℃、反応時間76時間で行った。TLCで各酵素の合成反応触媒能を評価したところ、ここで検討した10種のリパーゼのうち、約半数のもので糖エステルの生成が認められた (表3)。

3. 2 重合性ヌクレオシド(ウリジン)エステルの構造解析

このように、この合成反応により数種のウリジンエステル誘導体 (モノエステル、ジエステルなど) が生成するため、カラムクロマトを行うことによりウリジンモノエステルを分離精製し、¹³C-NMR分析によりその構造を決定することとした。なお、構造決定のためのウリジンエステルの合成反応は、DMF溶媒中酵素 (ビオプラーゼ原末) 濃度50mg/ml、基質 (ウリジン) 0.25M、アジピン酸ジ

ビニル1M、反応温度30℃、反応時間168時間で行った。その結果を図8と表4に示す。5'位の炭素が低磁場シフトし、4'位の炭素が高磁場シフトしていることから、5'位のヒドロキシル基が選択的にエステル化された5'-O-ビニルアジボイルーウリジンの構造であることを確認した。

一方、IR分析した結果からもビニルエステル構造が導入されていることが確認された。

また、得られた5'-O-ビニルアジボイルーウリジンの融点は、121℃であった。

3. 3 単糖、二糖からの酵素的オリゴ糖合成

糖は反応性の似通った官能基を分子内に数多く持つため、その合成に際しては結合の位置選択性の制御が必要である。また1位の炭素原子の立体化学の制御も必要である。糖鎖の化学合成はこのような糖の性質により、様々な保護基を用いた複雑で煩雑な合成経路を経て行われるため、非常に高度な合成技術が必要とされる。このような保護基の導入や複雑な合成経路を経ずしてより簡便にグリコシド結合の立体、位置選択性を制御した糖鎖合成を行うため、最近には様々な糖転移酵素や

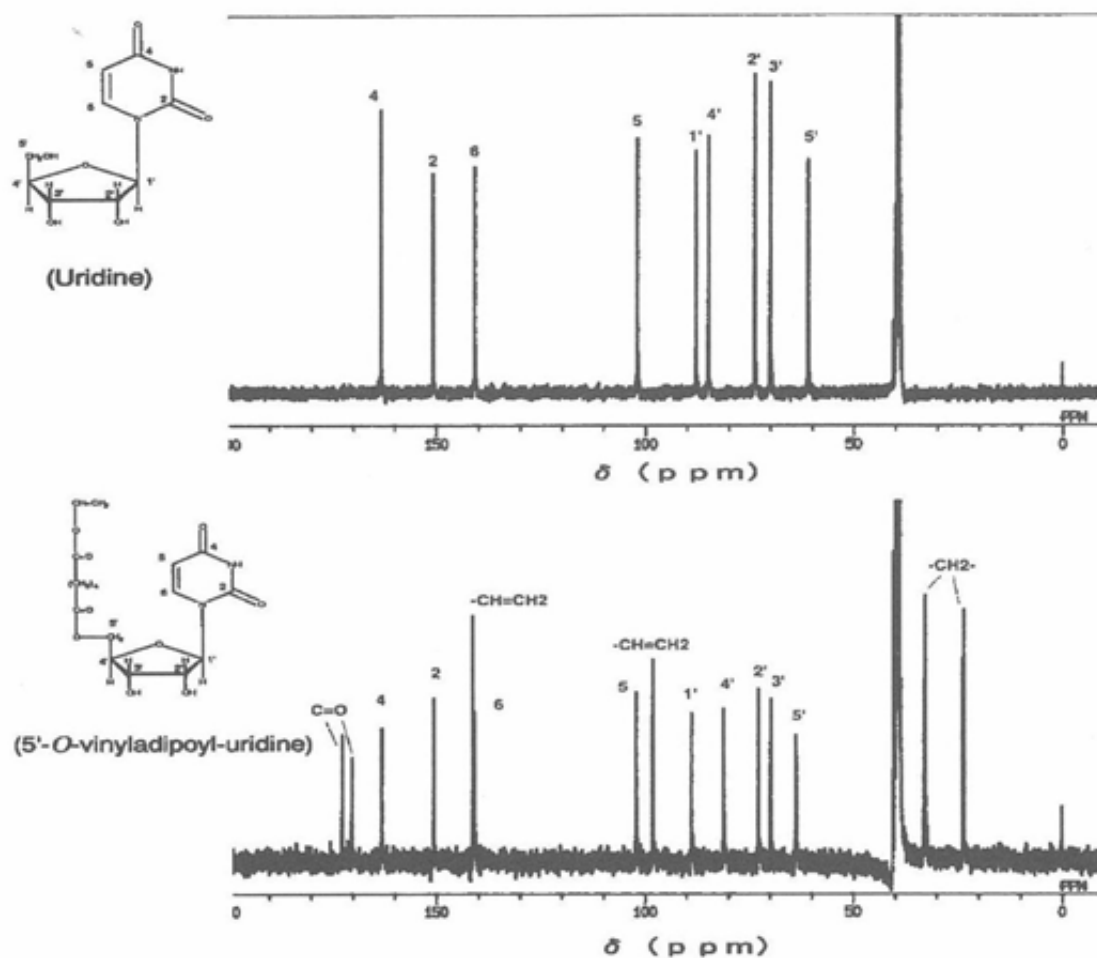


図8 ウリジンとウリジンエステルの ^{13}C -NMRスペクトル

表4 ウリジンとウリジンエステルのケミカルシフト

	炭素番号	ウリジン	ビニルウリジン エステル
塩基部分	2	150.67	150.53
	4	163.09	162.98
	5	101.67	101.92
	6	140.66	140.63
リボフラノース 部分	1'	87.60	88.66
	2'	73.46	72.65
	3'	69.79	69.67
	4'	84.72	80.99
	5'	60.75	63.58
アジピン酸部分	—CH ₂ —		23.34
			23.59
			32.58
			32.85
	C=O		170.17
	—CH=CH ₂		172.45
			97.97
			141.15

表5 酵素を使用したオリゴ糖合成（セルラーゼスクリーニング）

酵素名	起 源	記号	オリゴマーの 生成有無(TLC)	収率(%) ^{*1)}
セルラーゼA	<i>Aspergillus niger</i>	CA	×	80.7
セルラーゼT	<i>Trichoderma viride</i>	CB	○	82.0
セルロシンAC40	<i>Aspergillus niger</i>	CC	△	79.0
セルロシンT2	<i>Trichoderma viride</i>	CD	○	77.8
セルロシンTP25	<i>Trichoderma viride</i>	CE	○	71.7
セルロシンB	<i>Aspergillus niger</i>	CF	△	70.5
セルロシンPC5	<i>Aspergillus niger</i>	CG	△	71.5
セルロシンME	<i>Rhizopus sp.</i>	CH	△	77.7

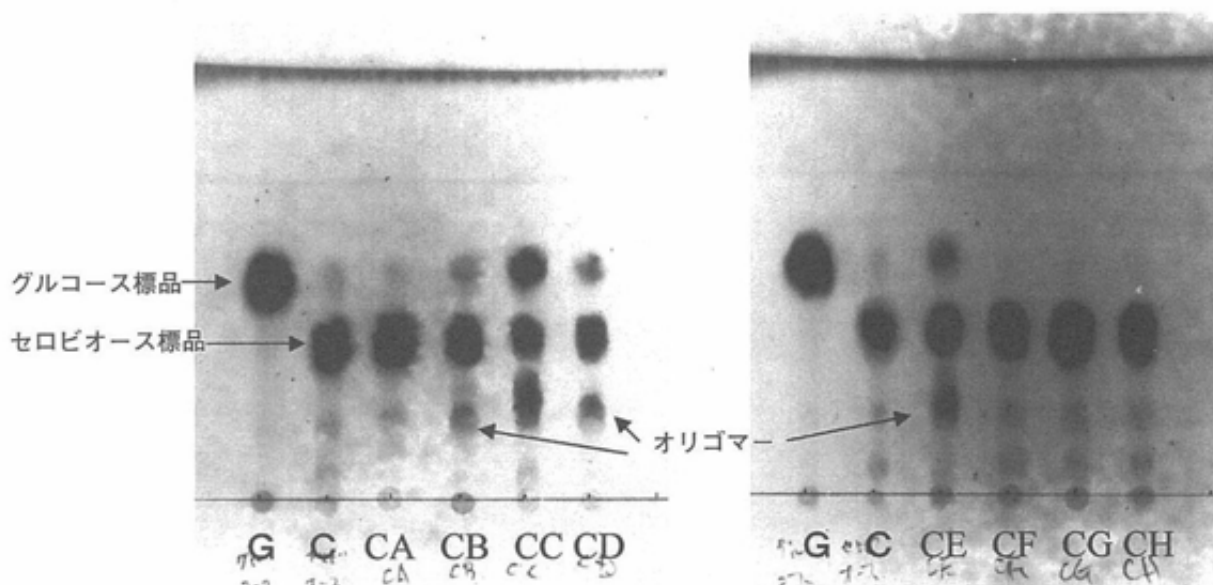
*1) 反応後、メタノール/水（5/1）に沈殿した画分

*2) 合成反応条件 使用溶媒 アセトニトリル/酢酸緩衝液（86/14）

酵素量 対基質 5 wt%

基質濃度 1 mmol

反応温度、時間 30℃、20時間



展開溶媒組成：1-プロパノール/アセトン/水=4/5/1
10%硫酸噴霧後過熱して発色

図9 酵素を使用したオリゴ糖合成（セルラーゼスクリーニング）

糖加水分解酵素を用いた合成法の研究が盛んになっている^{4),5)}。

ここでは単糖、二糖からオリゴ糖を酵素的に合成するための検討を行った。セロビオースを基質とした場合の酵素種の合成能に対する影響について検討した結果を表5と図9に示す。*Trichoderma viride*を起源とするセルラーゼ（CB, CD, CE）でオリゴマーの生成が認められ、触媒能が確認された。CCのTLC

パターンについては、オリゴマーの生成を示すスポットが現れているように見えるが、触媒として使用した酵素中に同じ位置にスポットが現れる成分が含まれているため、オリゴマーの生成はないものと推測される。

次に、反応時のアセトニトリル/酢酸緩衝液比の検討を行った結果を表6と図10に示す。アセトニトリルの配合比が50%以上でないと合成反応が進行せず、水リッチの系では、分

表6 二糖からのオリゴ糖合成 (溶媒組成の検討)

アセトニトリル/ 酢酸緩衝液比	オリゴマーの 生成有無(TLC)	収率A(%) ^{*1)}	収率B(%) ^{*2)}
100/0	○	84.6	0.7
86/14	○	84.5	0.5
57/43	△	0	0
29/71	△	0	0
0/100	△	0	0

*1) 反応後、メタノール/水 (5/1) に沈殿した画分

*2) メタノール/水に沈殿した画分のうち、水に溶解しない画分

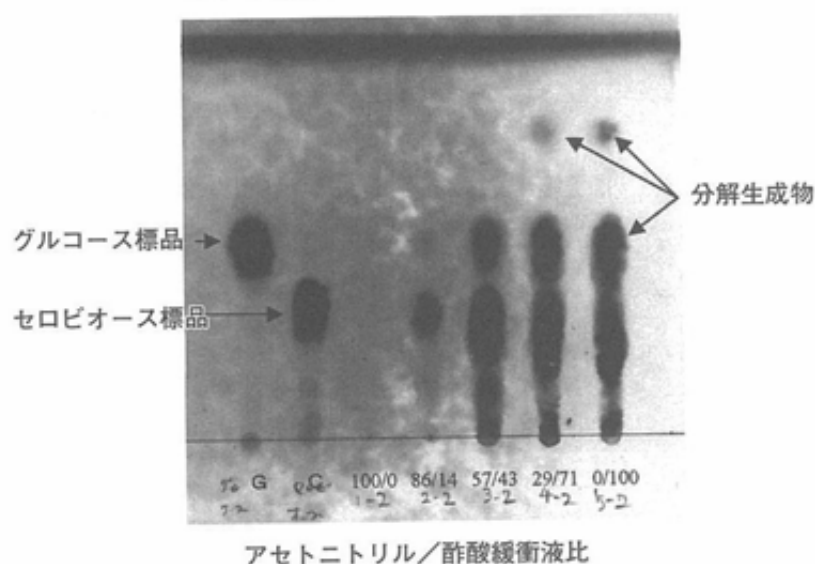
*3) 合成反応条件 酵素 セルラーゼT (*Trichoderma viride*)

酵素量 対基質 5 wt%

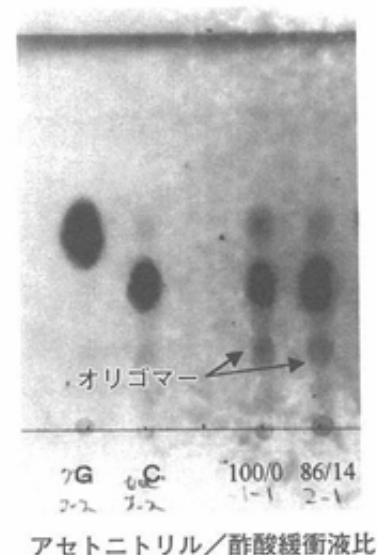
基質濃度 1 mmol

反応温度、時間 30℃、20時間

1) 上澄み



2) 沈殿物



展開溶媒組成: 1-プロパノール/アセトン/水 = 4/5/1
10%硫酸噴霧後過熱して発色

図10 二糖からのオリゴ糖合成 (溶媒組成の検討)

表7 単糖からのオリゴ糖合成 (溶媒組成の検討)

アセトニトリル/ 酢酸緩衝液比	オリゴマーの 生成有無(TLC)	収率A(%) ^{*1)}	収率B(%) ^{*2)}
100/0	×	44.4	0
86/14	×	1.9	0
57/43	×	0	0
29/71	×	0	0
0/100	×	0	0

*1) 反応後、メタノール/水 (5/1) に沈殿した画分

*2) メタノール/水に沈殿した画分のうち、水に溶解しない画分

*3) 合成反応条件 酵素 セルラーゼT (*Trichoderma viride*)

酵素量 対基質 5 wt%

基質濃度 1 mmol

反応温度、時間 30℃、20時間

解生成物であるグルコースの生成が見られ、分解反応が優位に進行することがわかる。

同様に、グルコースを基質とした場合の反応時のアセトニトリル／酢酸緩衝液比について検討したが、合成反応がほとんど進行しないことが判明した（表7）。

4 まとめ

4. 1 重合性糖エステルの合成

最適酵素の検索を行い、重合反応条件を検討することにより、重合性糖エステルを合成した。合成反応に使用する溶媒種により反応速度や副生成物の有無などに違いが現れることがわかった。本研究で得られた重合性糖エステルは、両親媒性高分子の原料モノマーとしての性質を有している。その応用分野としては、繊維機能性付与剤（グラフト化原料、共重合原料）酵素阻害剤、高分子界面活性剤や分散剤、非イオン性の吸水性ポリマー用原料などが期待される。また、PVAの主鎖、ジカルボン酸、糖からなる本ポリマー原料は、完全分解性の機能性材料となりうるものである。

4. 2 酵素触媒重合によるオリゴ糖の合成

最適酵素種の検索を行った結果、セロビオースを基質とした場合 *Trichoderma viride* を起源とするセルラーゼが最も高い触媒活性を示すことが判明した。生成物の重合度は3~4程度で、多糖は生成せずオリゴ糖程度にとどまった。糖鎖の重合度の向上のためには、酵素の基質認識能を高めてやる必要があり、基質モノマーに脱離基を導入したりして⁶⁾更に厳格な立体化学の制御、位置選択性の向上をめざす必要がある。

謝 辞

重合性糖エステルの合成研究を行うにあたり、多大なご指導ご協力を賜りました工業技術院生命工学工業技術研究所微生物機能部生態化学研究室 常盤豊室長、范紅研究員、甲南化工株式会社 楽隆生研究員に対し厚く感謝いたします。

また、酵素剤をご提供いただきました天野製薬株式会社中央研究所の平野賢一氏、阪急共栄物産株式会社新美智久氏に厚く感謝いたします。

参考文献

- 1) M.Hirayama, *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, 178,42 (1998)
- 2) 常盤豊ら、高分子論文集、55 (11)、691 (1998)
- 3) M.N.Gupta, *Eur.J.Biochem.*,203,25 (1992)
- 4) S.Kobayashi et al., *J.Am.Chem.Soc.*, 113, 3079 (1991)
- 5) 小林四郎、高分子、48,124 (1999)
- 6) D.S.Genghof et al., *Carbohydrate Res.*, 61,291 (1978)