

# Glycosynthesis and Glycomaterials Design by Nonaqueous Biocatalysis Using Surfactant- Enveloped Enzymes

江草, 静香

<https://hdl.handle.net/2324/1398287>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

|            |  |
|------------|--|
| 氏名・(本籍・国籍) | えぐさしずか<br>江草 静香 (岡山県)  |
| 学位の種類      | 博士(農学)   |
| 学位記番号      | 生資環博甲第714号   |
| 学位授与の日付    | 平成25年6月30日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻  |
| 学位論文題目     | Glycosynthesis and Glycomaterials Design by Nonaqueous Biocatalysis Using Surfactant-Enveloped Enzymes (界面活性剤被覆酵素を用いた非水系糖鎖合成および糖鎖材料設計) |
| 論文調査委員     | (主査) 准教授 北岡 卓也<br>(副査) 教授 近藤 哲男 教授 堤 祐司  |

## 論文内容の要旨

近年、糖鎖が生体内で重要な生理機能を担うことが明らかになり、その機能をマテリアルとして利用する糖鎖材料工学に大きな注目と期待が集まっている。しかし、糖鎖の特徴である構造多様性から既存の有機化学的合成法には限界があり、新規な糖鎖合成技術の開発が希求されている。本研究では、糖質加水分解酵素を界面活性剤で被覆した修飾酵素触媒 Surfactant-enveloped enzyme (SEE) を創出し、酵素反応系としてこれまで適用例の無い多糖良溶剤の非水系極性有機溶媒中で、加水分解の逆反応である脱水縮合反応を触媒する新規糖鎖合成法の構築を試みた。

まず、高い構造規則性と低い溶媒溶解性から合成が極めて困難な樹木多糖類のセルロースの合成に挑戦した。セロビオースからのセルロース合成では、伸長反応の進行に伴い生成物が析出するため、従来法では重合度 20 程度までしか得られていない。そこで、セルロースの良溶剤である非水系塩化リチウム含有ジメチルアセトアミド (DMAc) を反応場とし、セルラーゼから調製した SEE を用いて合成したところ、一段階で重合度 100 以上の高分子セルロースが 5%の転化率で得られた。一般に、酵素は非プロトン性極性溶媒中では速やかに活性を失うが、非イオン性界面活性剤で被覆することで様々な有機溶媒に対して高い耐性を付与することができた。また、既存の酵素反応では必須の有機合成による基質糖のアノマー炭素の活性化が全く不要で、脱水縮合に適した反応場を選択できる本系の利点が明らかとなった。水系での酵素の作用機序は SEE でも保存され、プロセス型セルラーゼでは高転化率でオリゴマーが、非プロセス型では重合度 60 程度が低転化率で得られた。すなわち、長鎖セルロースの合成における複数の酵素の協奏的な作用機構が示唆された。

次に、本非水系酵素触媒反応に共触媒としてブレンステッド酸を加えることで、多糖合成の転化率が飛躍的に向上する効果を発見した。セルロース合成では重合度 120 の高分子体が転化率 26%で

得られ、5 倍以上の転化率向上を達成した。さらに、本手法を同じく構造的な多糖のキチンの合成に適用したところ、リゾチームから調製した SEE を用い、DMAc 中で有機スルホン酸を共触媒としてキトビオースから脱水縮合反応を行うことで、重合度 210 の長鎖キチンが 80% の転化率で得られた。

最後に、本手法のバイオマテリアル応用を志向して、生理的に不活性な紙表面へのラクトースの直接導入を検討した。SEE を用いる非水系反応により、セルロース繊維の表面にガラクトース末端基を一段階で導入することが可能であった。アジアロ糖タンパク質レセプターを持つラット肝細胞の良好な細胞接着挙動が観察され、生理活性を有するバイオアクティブペーパーの創出に成功した。

以上のように、本研究で構築した界面活性剤被覆酵素を用いる非水系酵素反応による糖鎖合成法は、酵素・基質・界面活性剤・共触媒・反応場の組み合わせの自由度が高く、様々な糖鎖合成および糖鎖材料設計に応用可能であり、糖鎖機能材料開発における新手法として大いに期待が持たれる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、再生可能資源としてのみならず、生体機能分子としても注目を集めている糖鎖の新規合成法の創出と、生理機能を有する糖鎖材料の開発に向けた技術応用について検討したものである。

まず、高い構造規則性に起因する低い溶媒溶解性や反応様式の多様性から、合成が極めて困難な樹木多糖類のセルロースの合成に挑戦した。糖加水分解酵素のセルラーゼを非イオン性界面活性剤で表面被覆した Surfactant-Enveloped Enzyme (SEE) を開発し、酵素反応系としてこれまで適用例の無かった多糖良溶剤の非水系極性有機溶媒ジメチルアセトアミド・塩化リチウム中で、加水分解反応の逆反応である脱水縮合反応を試みたところ、一段階で重合度 100 以上の高分子セルロースの合成に世界で初めて成功した。一般に、酵素は非プロトン性極性溶媒中では速やかに活性を失うが、非イオン性界面活性剤で被覆することで様々な有機溶媒への高い耐性を付与することができた。また、既存の酵素反応による糖鎖合成では必須の有機合成による基質糖の活性化が不要であった。すなわち、非水系で酵素反応が可能になったことで、複雑な基質糖設計が必要なくなり、従来の酵素反応の制約を凌駕して、酵素を合成触媒として利用できる本手法の優位性を明らかにした。

次に、非水系酵素触媒反応に共触媒としてブレンステッド酸を加えることで、多糖合成の転化率が飛躍的に向上する効果を発見した。セルロース合成では重合度 120 の高分子体が転化率 26% で得られ、収率の大幅な向上を達成した。さらに、本手法を同じく構造的な多糖類のキチンの合成に適用したところ、リゾチームから調製した SEE を用い、有機スルホン酸を共触媒としてキトビオースの脱水縮合反応を行うことで、一段階で重合度 210 の長鎖キチンを約 80% の転化率で合成することに成功した。

続いて、確立した新規合成法のマテリアル開発への技術応用を志向して、身近な生活素材である紙に生理活性糖のラクトースを導入することで、バイオ機能の発現を試みた。セロビオースとラクトースの双方を基質とする SEE を用いることで、セルロース繊維表面にラクトースを一段階で導入することが可能であった。ガラクトース末端基を認識するアジアロ糖タンパク質レセプターを持つラット肝細胞の良好な細胞接着挙動が観察され、生理活性を有するバイオアクティブペーパーを創出した。

以上要するに、本論文は、これまで合成が困難であった糖鎖の合成戦略として、糖加水分解酵素を界面活性剤で被覆することで、基質特異性の高い酵素を脱水反応に有利な非水系で用いる新しいコンセプトを提案するものである。本手法は、酵素、基質、界面活性剤、共触媒、反応場の組み合わせの自由度が高く、様々な糖鎖合成および糖鎖材料設計に応用可能であることから、糖鎖材料化学および生物資源化学の発展に寄与する価値ある業績である。よって、本研究者は博士（農学）の

学位を得る資格を有するものと認める。