

Ruminococcus albus NE1 株由来 cellobiose phosphorylase を利用した

新規オリゴ糖の合成

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生物化学 小坂 拓土

1. 緒言

cellobiose phosphorylase (CBP) は cellobiose を可逆的に加リン酸分解する酵素である。逆反応では主に α -D-glucose 1-phosphate (Glc1P) を糖供与体として、様々な糖質をグルコシル基の受容体とし、多様な β -(1 \rightarrow 4)-グルコシドを生成する。*Ruminococcus albus* NE1 株由来 CBP (RaCBP) では、逆反応で8種の糖を受容体とすることが示されたが、生成物は同定されていない。また、より広範な受容体基質を検討することで、新規オリゴ糖の合成も期待される。加えて RaCBP では β ガラクトシド加リン酸分解活性を高めた変異酵素 lactose phosphorylase (LP) が作製されており、この逆反応により各種 β -(1 \rightarrow 4)-ガラクトシドの生成も可能である。本研究では以上の RaCBP および LP の逆反応を用いた各種オリゴ糖の合成を行った。

2. 結果と考察

RaCBP では Glc1P を、LP では Gal1P を糖供与体とし、26種の糖を受容体とした合成反応を行い、生成物を TLC で解析した。RaCBP を用いた場合、既知の8種を含む12種の糖で生成物が確認された。このうち isomaltose は RaCBP の糖受容体として、methyl β -D-glucoside, L-fucose および D-fructose は RaCBP に限らず CBP の糖受容体として新規のものであった。D-fructose を受容体とした反応では2種の生成物が確認された。LP を用いた反応では D-mannose, D-glucosamine, isomaltose および gentiobiose で生成物が確認された。続いて、反応生成物の定量と構造解析を行った。RaCBP を用いて Glc1P と糖受容体の濃度をいずれも 100 mM とした合成反応を行い、methyl β -D-glucoside, L-fucose および D-fructose を受容体とした反応でそれぞれ 50.0 mM, 54.0 mM および 37.3 mM の生成物が確認された。反応液 1 mL より生成物を精製し、MS および NMR により構造を解析した。各受容体からの生成物は β -D-GlcP-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcP-O-Me (収量 8.5 mg), β -D-GlcP-(1 \rightarrow 4)-L-FucP (12.2 mg), β -D-GlcP-(1 \rightarrow 3)-D-Frup (4.2 mg) および β -D-GlcP-(1 \rightarrow 4)-D-Frup (1.3 mg) であった。同様に、LP を用いた合成反応を行った。ただし、Gal1P と糖受容体の濃度をいずれも 50 mM とした。isomaltose および gentiobiose からは 27.5 mM および 24.6 mM, 反応液 1 mL からの生成物は β -D-GalP-(1 \rightarrow 4)-[α -D-GlcP-(1 \rightarrow 6)]-D-GlcP (8.2 mg) および β -D-GalP-(1 \rightarrow 4)-[β -D-GlcP-(1 \rightarrow 6)]-D-GlcP (1.2 mg) であった。次に、Gal1P を使用せず、D-galactose を出発材料としたオリゴ糖の合成を検討した。すなわち、galactokinase による D-galactose のリン酸化および pyruvate kinase による phosphoenolpyruvate (PEP) を基質とした ATP の再生と、LP を用いた反応を組み合わせたワンポット合成を行った。ATP を触媒量とし、D-galactose, PEP および糖受容体の濃度をいずれも 100 mM とした反応させた。反応 96 時間後に β -D-GalP-(1 \rightarrow 4)-[α -D-GlcP-(1 \rightarrow 6)]-D-GlcP が 51.8%, β -D-GalP-(1 \rightarrow 4)-[β -D-GlcP-(1 \rightarrow 6)]-D-GlcP が 46.2% の収率で合成された。以上から、本研究では RaCBP および LP を用いて 17 種のオリゴ糖を合成し、うち 6 種の構造を解析した。このうち、 β -D-GlcP-(1 \rightarrow 4)-L-FucP, β -D-GlcP-(1 \rightarrow 3)-D-Frup, β -D-GalP-(1 \rightarrow 4)-[α -D-GlcP-(1 \rightarrow 6)]-D-GlcP および β -D-GalP-(1 \rightarrow 4)-[β -D-GlcP-(1 \rightarrow 6)]-D-GlcP の 4 種が新規のオリゴ糖であった。さらに、2 種の新規オリゴ糖では LP を用いた効率的な合成系を確立した。