The Japanese Society of Applied Glycoscience

Cp-4

オリゴキトサン異性化による *cis*-オリゴキトサン創製

理化学研究所
○眞鍋史乃，伊藤幸成

【目的】アミノピラノシドの２位アミノ基と３位水酸基をカーバメート基で保護すると、弱い酸性条件でβ-グリコシドがα-グリコシドへと異性化することを見出している。本異性化反応を新規糖鎖創製への応用の端緒を拓くすることを目的とする。キトサンテトラマーに 2,3-*trans* カーバメート基を導入し、ルイス酸処理を行うことにより、既存のβ-グリコシド結合を変換し、新規 *cis* キトサンオリゴマーを創製する。
【方法】化学合成したキトサンテトラマーに *N*-アセチル-2,3-*trans* カーバメート基を導入し、２当量の BF_3·OEt_2 処理を行った。
【結果】４つのアノマー位の立体化学が一挙に変換され、1,2-cis 結合したグルコサミンテトラマーが収率 83% で創製できた。本異性化反応により、複数の既存のグリコシド結合の立体化学を一挙に変換することが可能となることを示した。

Cp-5*

ホスホリラーゼを用いた 1,2-β-グルコオリゴ糖調製と 1,2-β-グルカン大量合成

東理大院・理工[1]，新潟大・農[2]，農研機構・食総研[3]
○豊泉大幸[1]，阿部紘一[1]，中島将博[1,3]，中井博之[2]、北岡本光[3]，田口速男[1]

【目的】ホスホリラーゼは、厳密な基質特異性と反応の可逆性からオリゴ糖の合成に有用とされる。近年、我々は 1,2-β グルカンに作用する新規酵素 1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼ (OGP) を発見した。本研究では OGP を用いた 1,2-β-グルコオリゴ糖の調製及び 1,2-β-グルカンの大量合成を行った。
【方法、結果】高濃度の OGP を用いてグルコースとα-グルコース-1-リン酸(G1P)を反応させると、反応初期にポリマーが生成し、長時間反応ではポリマーが減少してオリゴ糖が蓄積した。この反応を利用して、グルコース 0.25 M、G1P 0.5 M、OGP 0.2 mg/mL を含む 20 mL の反応液で酵素反応を 14 日間行い、熱処理、電気透析、ゲルろ過クロマトグラフィーによりオリゴ糖を精製した。その結果、2 糖から 5 糖の 1,2-β-グルコオリゴ糖をそれぞれ 98 mg、120 mg、100 mg、36 mg 得た。1,2-β-グルカンは、安価なスクロースとグルコースを出発材料とした、スクロースホスホリラーゼ(SP)と OGP によるワンポット反応により合成した。グルコース 0.5 M、スクロース 1.0 M、リン酸ナトリウム 100 mM、SP と OGP の濃度比率=1:4 の条件で 2 L のワンポット反応を 12 日間行ったところ、1,2-β-グルカンはグルコース換算濃度で 0.8 M 以上蓄積した。反応液の一部の除タンパク質、酵母処理後、1,2-β-グルカンをエタノールにより沈殿させた。沈殿物の凍結乾燥により、167 g の精製 1,2-β-グルカンを得た。

Cp-6*

Listeria innocua 由来β-グルコシダーゼの機能構造相関

東理大院・理工[1]，東工大[2]，新潟大・農[3]，農研機構・食総研[4]
○吉田龍太[1]，中島将博[1]，宮永顕正[2]，中井博之[3]，北岡本光[4]，田口速男[1]

【目的】*Listeria innocua* 由来の Lin1840 タンパク質は糖加水分解酵素ファミリー3(GH3)に属する遺伝子と同一クラスター内に存在する遺伝子が新規ホスホリラーゼ、1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼ(OGP)をコードすることが近年明らかになった。そのため、Lin1840 タンパク質はβ-1,2-グルカンの代謝に関与するβ-グルコシダーゼと推測されるが、その機能と構造は未解明である。そこで、Lin1840 タンパク質の機能解析と構造解析を行った。
【方法・結果】大腸菌を用い組み換え Lin1840 タンパク質(Lin1840r)を生産した。本酵素の pNP 糖に対する特異性を検討したところ、pNP-β-Glc のみに活性を示したことから Lin1840r はβ-グルコシダーゼであることが示された。また、β結合を持つグルコ 2 糖に対する本酵素の活性を調べたところ、ソホロースとラミナリビオースに対して高い活性を示し、セロビオースとゲンチオビオースに対しては全く活性を示さなかった。次に、構造機能相関を明らかにするために Lin1840r の X 線結晶構造解析を行った。Lin1840r は 2 量体であり、隣のサブユニットの活性中心へと伸びる特徴的なループ(L568-F598)を有していた。大麦由来 GH3 酵素とセロビオース複合体構造との比較から、Lin1840r のサブサイト+1 を形成する R572 がセロビオースの C6 の立体障害となる位置に存在していた。現在、Lin1840r とβ結合を持つグルコ 2 糖との複合体構造を解析中である。

Cp-7*

1,2-β-グルカナーゼの同定

東理大院・理工[1]，岩手大・農[2]，新潟大・農[3]，農研機構・食総研[4]
○阿部紘一[1]，中島将博[1]，豊泉大幸[1]，山下哲郎[2]，中井博之[3]，北岡本光[4]，田口速男[1]

【目的】1,2-β-グルカンは一部のグラム陰性菌が分泌する環状糖として知られており、宿主との共生・宿主免疫系からの回避などに重要とされる。一方、1,2-β-グルカン分解酵素に関しては基質の入手が容易でないために、いくつかの菌で活性の報告があるのみである。本研究では、演者らが大量合成した直鎖状 1,2-β-グルカンを用い、活性既知のグラム陰性細菌 *Chitinophaga arvensicola* から 1,2-β-グルカナーゼの単離同定を試みた。
【方法·結果】*C. arvensicola* を 1,2-β-グルカンを唯一の炭素源として培養し、細胞抽出液を得た。この細胞抽出液から 1,2-β-グルカナーゼを DEAE-セファロース、ハイドロキシアパタイト、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製酵素を SDS-PAGE に供し、ゲル内消化を行い、LC/MS/MS により分析した。得られた結果から *de novo* シークエンシングにより内部配列を構築し、ゲノム既知の近縁種 *Chitinophaga pinensis* に対して BLAST による相同性検索を行った。最上位にヒットした遺伝子(*SGL*)は既知の糖加水分解酵素とは相同性のない新規アミノ酸配列をコードしていた。*SGL* を大腸菌 BL21(DE3)を宿主として発現させ、組換えタンパク質を調製した。このタンパク質と 1,2-β-グルカンを反応させたところ、1,2-β-グルカンが分解され 1,2-β-グルコオリゴ糖が生成された。このことから、*SGL* は 1,2-β-グルカナーゼ遺伝子であることが明らかとなった。

NII-Electronic Library Service