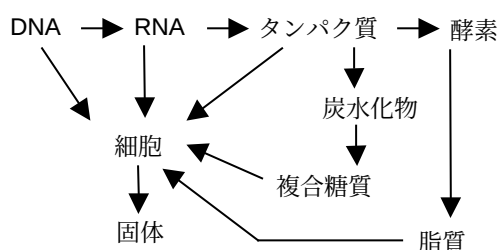


スルファターゼ加水分解酵素の基質及び位置特異性に関する研究

日大生産工（院）○永塚健宏
産総研 箕浦憲彦 鵜沢浩隆
日大生産工 平松秀夫

緒 言

2003 年 4 月 14 日、ヒトゲノムの解読計画の完了が宣言され、生命科学の研究は新たな段階に入った。そこで糖鎖の研究が DNA、タンパク質につぐ第三の生命鎖として注目され、研究が行われている。しかし、これにより分子生物学の中心的パラダイムはさらに複雑なものとなった。



糖は同じ官能基を多数持ち、また多数の不斉炭素を持つことから複雑な構造を持つが、近年の分離・分析技術の発達により、生体内における糖鎖の役割が徐々に解明されてきている。糖鎖は、細胞表面に糖脂質か糖タンパクの形で存在し、ウイルス感染、免疫反応、ガン転移、受精、発生などの様々な生命現象に深く係っていることが知られている。中でも硫酸化糖が生命活動において重要な役割を担っていることが分かり、注目を集めている。代表的なものは、スルファチドで、従来インフルエンザウイルスは、シアル酸を含むある

特定の糖鎖を認識して結合し、感染すると言われていたが、この様なシアル酸を持たない糖脂質にも結合することが見出された。他にも、ヘパリンに代表されるグリコサミノグリカン類が生命現象において重要な役割を担っていることが分かってきている。これらのことから、硫酸化糖を合成する技術の発展が望む声が高まってきている。

目 的

糖の化学合成のみによる位置選択的な硫酸化は保護・脱保護の操作が数多くなることがほとんどで、その工程は糖鎖の伸長とともにさらに増えることが予測される。多置換された硫酸化糖などに硫酸基加水分解酵素（スルファターゼ）を作用させることで望みの硫酸化糖が手に入れば、有機合成における技量の差による収率の低下を避けることができ、また、有機溶媒の使用を最少限に抑えることができるため、グリーンケミストリーの観点からも支持できる。本研究は、3 種類のスルファターゼを用いて基質特異性を調べると共に、得られた結果を硫酸化多糖の合成の応用へと展開する。

実 験 pNP 3-O-sulfo- α -D-manno- pyranoside, sodium salt の合成¹⁾

pNP α -D-mannopyranoside (70mg, 0.23 mmol)と Bu₂SnO (69mg, 0.28mmol) をトルエ

Substrate selectivity and regioselectivity in the sulfatase-catalyzed
reactions of sulfo sugars

Takehiro NAGATSUKA, Norihiko MINOURA, Hirotaka UZAWA and Hideo
HIRAMATSU

ン-THF(1/1(v/v), 500cm³)で3時間還流し、溶媒を除去後、脱水 DMF 中で SO₃NMe₃ (53mg, 0.38mmol)を加えて4時間40分間、室温で反応させた。メタノール(10cm³)で反応を停止させ、逆相カラムによって精製後、Na 置換して、硫酸化糖 (pNP 3-O-sulfo- α -D-mannopyranoside, sodium salt)を51mg(54%)得た。この硫酸化糖を0.25M 酢酸緩衝液(pH6.8)中、スルファターゼ [(E.C.3.1.6.1), Snail (*Helix pomatia*), Abalone, Limpet (*Patella vulgata*)由来]を加え、反応経過をHPLC(移動相:10% MeOH-water+0.1% TPA; ODS カラム)によって追跡した。

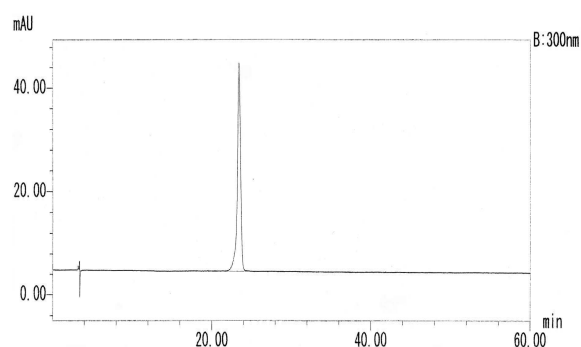


図1 pNP 3-O-sulfo- α -D-mannopyranoside, sodium salt の HPLC

結果および考察

生成物は¹H NMR, ¹³C NMR, FAB-MSによって確認し、さらにHPLCで純度の確認をしたところ、ほぼ100%の純度で目的物が得られていることが分った(図1)。酵素反応を利用したガラクトース系の硫酸化糖とグルコース系の硫酸化糖においては、一部例外があるが、6位の硫酸化を含む二および三硫酸化糖では6位の硫酸基を残して加水分解する傾向にあり²⁾、6位が硫酸化されていない硫酸化糖において加水分解は行われなかった。今回のマンノースでも同様の結果が得られたが、例外的にpNP 3-O-sulfo- α -D-mannopyranoside, sodium saltにおいてLimpet由来のスルファターゼが3位の硫酸基を特異的に加水分解することが明らかとなった(図2)。

また、比較のため各種由来のスルファターゼを使用したときの反応平衡時でのTLC(展開溶媒:クロロホルム:MeOH=2:1)を図3に示しておく。

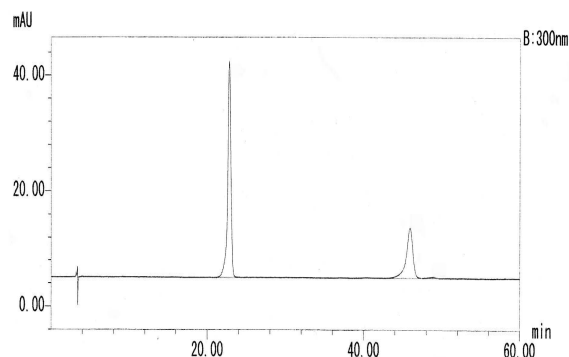


図2 酵素反応(Limpet)の平衡時のHPLC

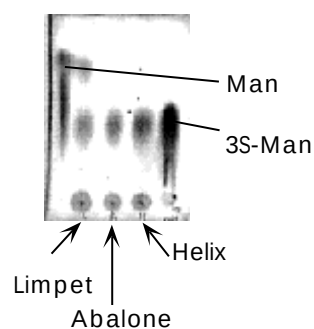


図3 各種酵素の反応平衡時のTLC

参考文献

- 1)H.Uzawa, T.Nagatsuka, H.Hiramatsu, et al., "Synthetic Potential of Molluscan Sulfatases for the Library Synthesis of Regioselectively O-Sulfonated D-Galacto-Sugars ", Carbohydrate Research, 339 (2004) 1597-1602.
- 2) H.Uzawa, Y.Nishida, K.Kobayashi, et al., "Sulfatase-catalyzed assembly of regioselectively O-sulfonated p-nitrophenyl α -D-glucos- and α -D-mannopyranosides ", Chem BioChem., 4 (2003) 101-108.