

DMT- α -(GlcNAc)₂を基質に用いたキチンオリゴ糖の新規化学一酵素合成 A Novel Method for Chemo-Enzymatic Synthesis of Chitin Oligosaccharide Using DMT- α -(GlcNAc)₂ as a Glycosyl Donor

大沼貴之¹, 田中知成²¹近畿大学農学部生物機能科学科

〒631-8505 奈良市中町 3327-204

²京都工芸繊維大学, 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町 1 番地Takayuki OHNUMA^{1,*} and Tomonari TANAKA²¹ Department of Advanced Bioscience, Kindai University, 3327-204 Nakamachi, Nara, Japan² Department of Biobased Materials Science, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

1 はじめに

糖鎖は単糖がグリコシド結合によって連結して形成された分子であり、単糖の種類と連結の様式の違いにより、多様な分子種が存在している。生物はこの様な糖鎖を利用した情報伝達系を発達させており、糖鎖とその受容体の相互作用は、免疫防御、受精、ウイルス複製、寄生虫感染、細胞増殖、細胞間接着、宿主 - 病原体相互作用等の幅広い生命現象に関与している。糖鎖が生物において重要な機能性分子であることが明らかにされるにつれ、糖鎖を人工的に大量に調製し、それらを基礎研究や応用研究のツールとして利用することに対する要求が高まっている。

本研究では糖鎖の化学一酵素合成法の内、正田らによって開発された DMT-グリコシド (Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl glycoside) とアノマー一保持型糖質加水分解酵素の糖転移活性を利用して糖鎖合成法をさらに発展させ、保持型酵素に限定されていた同基質を用いた糖鎖の化学一酵素合成法を、アノマー反転型酵素にまで拡張した、新規糖鎖合成法の開発を目的とした。

2 実験

以前 Photon Factoryにおいて決定した糖質加水分解酵素ファミリー19 キチナーゼである BcChi-A (PDB 3WH1) の立体構造情報を元に、酵素の活性中心に存在する 3 つのアミノ酸残基 (E61, E70, S102) に注目し、それらの一重および二重変異体を作製した。発現、精製した変異型酵素に、アクセプター分子である (GlcNAc)₂ 存在下でドナー分子である DMT- α -(GlcNAc)₂ を反応させ、反応産物を TLC および HPLC で分析した。

3 結果および考察

各一重変異体の反応液からは、糖転移産物は全く検出されなかった。これは DMT 基がかさ高く、ド

ナー分子である DMT- α -(GlcNAc)₂ が酵素の活性中心に入り込めず、反応できなかつたためと考えられた。そこで、E70 と S102 を側鎖の短いアミノ酸残基に置換した二重変異体を作製し、再度 (GlcNAc)₂ 存在下で DMT- α -(GlcNAc)₂ と反応させたところ、糖鎖合成反応の進行と、生成物である (GlcNAc)₄ の合成が認められた[1]。 (GlcNAc)₄ の収量は、作製した二重変異体 E70G/S102G, E70G/S102C, E70G/S102A の内、E70G/S102A を用いたとき最も高くなることがわかった。

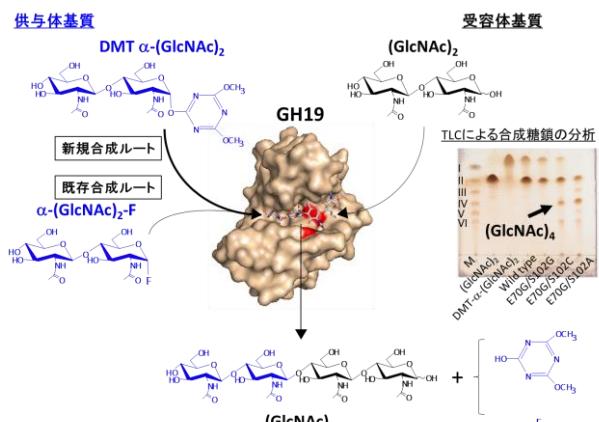


図 1 : アノマー反転型糖質加水分解酵素と DMT-グリコシドを用いた糖鎖の化学一酵素合成

4 まとめ

本研究の遂行により、アノマー反転型糖質加水分解酵素と DMT-グリコシドを用いた糖鎖の化学一酵素合成が可能であることが示された。

謝辞

X 線回折データ収集をご支援いただいた PF スタッフの方々に感謝致します。

参考文献

- [1] T. Ohnuma et al., J Biochem., 165, 497-503
(2019)
* ohnumat@nara.kindai.ac.jp