

# 化学酵素融合法によるキチン糖類の合成・変換に関する研究

誌名	応用糖質科学：日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	尾形, 慎
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	12巻2号
掲載ページ	p. 84-91
発行年月	2022年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat





Study on Synthesis of Chitin Derivatives Using a Chemoenzymatic Approach\*

# 化学酵素融合法によるキチン糖類の合成・変換に関する研究\*

尾形 慎 (おがた まこと)<sup>1,\*</sup>

Makoto Ogata<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup> 福島大学農学群食農学類  
960-1296 福島県福島市金谷川1番地

<sup>1</sup> Faculty of Food and Agricultural Sciences, Fukushima University  
1 Kanayagawa, Fukushima city, Fukushima 960-1296, Japan

**要旨:** 海洋バイオマス“キチン糖類”の利用及び高機能化を目的として、化学酵素合成法を基盤とした有用糖質複合分子の開発研究を行った。中性溶液ホウ酸存在下における *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の熱変換では、特定のヘキソフラノース誘導体が高収率で得られることを見出した。また、これら誘導体をリード化合物とすることで、天然生理活性物質であるフラノディクチン類の二段階全合成を達成した。ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) に対する遷移状態アナログ阻害剤の研究では、キチンオリゴ4糖末端モラノリン体 (GN<sub>3</sub>M) が強力な拮抗阻害剤となるばかりか、HEWL の反応機構を再検証するための有用なツールとして機能した。さらに、キチン糖類を酵素法によりヘテロオリゴ糖に変換後、中分子や高分子に集積化することで生体内多価糖鎖を模倣した様々な生物機能分子を創製した。これらは、病原性ウイルスに対して架橋特性や強力な吸着特性などを示す機能性糖質素材であり、ウイルスの新たな高感度検出法や捕捉技術、精製技術としての応用が期待された。

**キーワード:** キチン, 糖質複合分子, 化学酵素合成, 機能設計, 分子認識\*\*\*

## 1. はじめに

キチンは糖質バイオマスとして、地球上で最大年間生産量・蓄積量を誇るセルロースと双壁を成す多糖類で、循環型社会にも対応した貴重な再生可能糖質資源である<sup>1)</sup>。キチンとセルロースでは、共にβ-(1→4)-グリコシド結合を介して連なったホモ多糖である点や類似の階層構造を持つといった共通性がある一方で、化学構造としてはキチンがD-GlcNAcのポリマー、セルロースがD-グルコースのポリマーであるという点で異なる<sup>2)</sup>。キチン発見の歴史は古く、1811年にハラタケ科のキノコから初めて抽出された<sup>3)</sup>。その後、カニやエビなどの甲殻類の外皮にキチンが豊富に含まれていることが明らかとなり、現在では主に、水産加工残渣として生じるカニ殻からキチンが工業的に製造されて

いる<sup>2)</sup>。21世紀に入り、キチンを湿式粉碎で微細化しナノファイバー材料<sup>4)</sup>を創り出す技術が開発されるなど、糖質バイオマスとしてのキチンの有効活用が盛んに研究されている。その一方で、素材としてのキチンは、その安定な結晶構造により反応性や溶解性が低く、化学反応による構造改変には不向きであり、このことが新たな材料開発を妨げる一因になっていた<sup>5)</sup>。このような背景のもと著者らは、キチン利活用の一環として、キチンよりも加工特性に優れたキチン分解物、所謂、キチン単糖やキチンオリゴ糖に着目した。具体的には、キチン単糖やキチンオリゴ糖を合成原料に用い、それらを化学法と酵素法を組合わせた独自の合成技術で改変・再構築することで有用糖質複合分子を創り出す研究開発である<sup>6-8)</sup>。本総説ではバイオオリファイナリー分野への応用に関して、キチン糖類の合成・変換及び

\*本原稿は、日本応用糖質科学会 2021 年度大会の奨励賞受賞講演で一部発表された。

\*\*連絡先 (Tel. 024-503-4982, E-mail: ogata@agri.fukushima-u.ac.jp)

\*\*\* Key words: chemoenzymatic synthesis, chitin, functional design, glycan-conjugated molecule, molecular recognition  
略記: GlcNAc, *N*-アセチルグルコサミン; HEWL, ニワトリ卵白リゾチーム; GN<sub>3</sub>M, キチンオリゴ4糖末端モラノリン体; ManNAc, *N*-アセチルマンノサミン; Chromogen I, 2-acetamido-2,3-dideoxy-D-erythro-hex-2-enofuranose; GNF, 2-acetamido-3,6-anhydro-2-deoxy-D-glucofuranose; MNF, 2-acetamido-3,6-anhydro-2-deoxy-D-mannofuranose; GN<sub>3</sub>L, キチンオリゴ4糖末端ラクトン体; β4GalTI, β-(1→4)-ガラクトシルトランスフェラーゼI; Gal (GlcNAc)<sub>3</sub>DGN, 4<sup>4</sup>-O-β-D-galactosyl-β-tri-*N*-acetylchitotriosyl 2-acetamide-2,3-dideoxy-gluc-2-enopyranose; β-NA-Hase, β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ; DMAB, *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド; MCPyV, メルケル細胞ポリオーマウイルス; VP1, カプシドウイルスタンパク質; MCPyV-LP, メルケル細胞ポリオーマウイルス様粒子; JCPyV, ヒトポリオーマウイルス; IFV, インフルエンザウイルス; HA, ヘマグルチニン; EIV, 馬インフルエンザウイルス。

その利用に焦点を当て、これら研究成果の概要を紹介する。

## 2. キチン単糖及び少糖類の活用とリゾチームの機能開発

細胞壁を構成する構造多糖のみならず、プロテオグリカンやペプチドグリカンなどの多糖成分にも、著者らが研究材料とする GlcNAc が構成糖として普遍的に存在し、その役割も構造類似のグルコースとは異なることが知られている。また、化学的安定性についても同様で、例えば、アルカリ条件下における異性化反応では、GlcNAc はグルコースよりも構造不安定であるため反応がより進行し、異性化合物以外にも数多くの生成物を与える<sup>9-11)</sup>。これら生成物の中には、*N*-アセチルマンノサミン (ManNAc) や色素化合物である 2-acetamido-2,3-dideoxy-D-erythro-hex-2-enofuranose (Chromogen I) など有用な化合物も含まれているが、反応の制御が難しく量的供給の妨げになっていた。このような状況の中、著者らは GlcNAc などの 2-アセトアミド単糖を簡便な方法で構造変換する反応条件を偶然に発見した<sup>12)</sup>。それは、中性に調製したホウ酸ナトリウム緩衝液を用いて GlcNAc を溶解し、1 時間程度加熱処理するという非常に簡単な方法である。本反応では、複雑な GlcNAc のアルカリ異性化反応とは対照的に、主に四つの生成物が得られた。具体的には、ManNAc, Chromogen I, 2-acetamido-3,6-anhydro-2-deoxy-D-glucofuranose (GNF) 及び 2-acetamido-3,6-anhydro-2-deoxy-D-mannofuranose (MNF) であり、それ

ぞれの収率は 3, 36, 10, 10% であった (図 1(A))。これら収率を合計すると、60% 近くにも達することから、比較的高収率の反応といえる。また、研究を進める中で本反応が平衡反応であることや、ホウ酸が反応促進に重要な役割を果たしていることも明らかとなった。さらに著者らは、この GlcNAc 変換反応の際に得られるヘキシフラノース誘導体 (GNF 及び MNF) が神経分化誘導活性物質 (フラノディクチン類) のリード化合物になることを見出した。フラノディクチン類は、2001 年に大島らによって細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の子実体より単離・構造決定がなされており、PC12 細胞に対して神経分化誘導活性を有する化合物としてフラノディクチン A 及び B が報告されている<sup>13)</sup>。これらは、天然物としては初めての 3,6-anhydro 構造を持ったアミノ糖誘導体という構造新規性も相まって、その後、多くの研究者によって全合成が報告されている<sup>13-16)</sup>。しかし、それら報告の多くは保護・脱保護工程を繰り返した多段階の有機合成反応を基本としており決して簡便といえるものではなかった。そこで著者らは、GlcNAc から一段階で得られる GNF 及び MNF をリード化合物として、それらの 5 位ヒドロキシ基にエステル化を行うことで、実に簡便なフラノディクチン A 及び B の二段階全合成を達成した (図 1(B))<sup>12)</sup>。

著者らはその後の研究で、本 GlcNAc 変換反応は単糖類に限らず、還元性 2-アセトアミド糖を含む化合物であれば位置選択的に一分子脱水反応が起こり、誘導体が生成されることを明らかにした<sup>17)</sup>。つまり、キチンオリゴ糖のよ

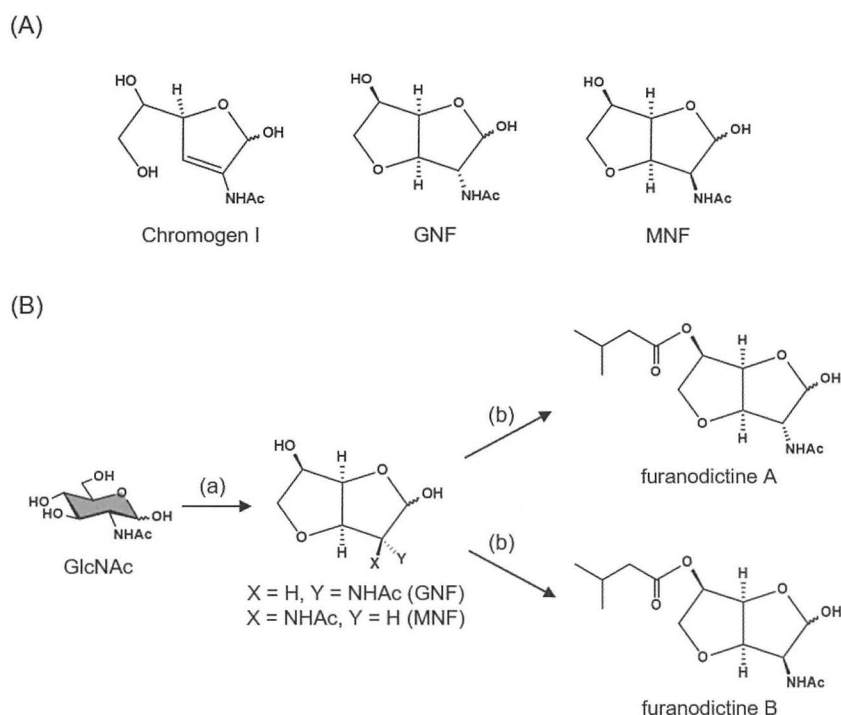


図 1. GlcNAc 変換法によって得られるヘキシフラノース誘導体と furanodictine A 及び B の二段階全合成

(A) 中性溶液ホウ酸存在下における GlcNAc の熱変換によって生成する 3 種類のヘキシフラノース誘導体。左から Chromogen I, GNF, MNF。 (B) Furanodictine A 及び B の全合成。試薬と反応条件：(a) 0.4 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0), 100°C, 2 時間。 (b) ピリジン (脱水), イソ吉草酸クロリド, 25°C, 2 時間。文献 12)より作成。

うな GlcNAc を還元末端に有する化合物に対して本反応を行えば、還元末端 GlcNAc 残基の C2 位と C3 位との間で一分子脱水反応が進行し、これまでに報告例のないキチンオリゴ糖誘導体が得られる。この発見が、その後、HEWL の反応機構を検証するための遷移状態アナログ阻害剤の合成研究へと進展した。糖質加水分解酵素ファミリー 22 に分類される HEWL は、X 線結晶構造解析によって初めて立体構造が明らかにされた酵素として有名である一方、その酵素基質間の複合体形成に関しては、オキソカルベニウムイオン中間体型 “Phillips 説” と共有結合中間体型 “Koshland 説” とで未だに様々な議論がなされている<sup>18-21)</sup>。まず、著者らは、Phillips 説を検証するための遷移状態アナログ阻害剤として、キトテトラオースを中性溶液ホウ酸存在下で加熱後、酸化処理を行うことでキチンオリゴ糖末端ラクトン体 (GN<sub>3</sub>L) を合成した (図 2(A))<sup>17)</sup>。この分子の末端 L 残基は、C1 位が  $sp^2$  混成軌道で安定な半イス型様配座を有する。一方、Koshland 説に対する遷移状態アナログ阻害剤としては、酵素法を用いてキチンオリゴ糖末端モラノリン体 (GN<sub>3</sub>M) を合成した (図 2(B))<sup>22)</sup>。GN<sub>3</sub>L とは対照的に、GN<sub>3</sub>M の末端 M 残基は C1 位が  $sp^3$  混成であり、<sup>4</sup>C<sub>1</sub> と呼ばれるイス型配座を持つ。これら 2 種類の遷移状態アナログ阻害剤を用いて HEWL の反応機構を再検証した。結果、HEWL の基質分解に対して両遷移状態アナログは共に拮抗型の阻害様式を示した。HEWL に対する結合親和性は等温滴定カロリーメトリーにて評価し、pH 7.0、25 °C の測定条件において GN<sub>3</sub>M は、GN<sub>3</sub>L や一般的な HEWL 阻害剤であるキトトリオースよりも 10 倍以上強い結合親和力 ( $K_d = 760$  nM) を示した<sup>23)</sup>。モラノリン分子単独や GN<sub>2</sub>M では HEWL に対する親和性が急激に低下することや、相互作用に伴うギブズ自由エネルギー変化には pH 依存性が確認されたことなどから以下のような推測ができる。HEWL に対する GN<sub>3</sub>M の強力な結合親和力は、GN<sub>3</sub>M のキトトリオース部分が HEWL の -4 から -2 サブサイトへ安定結合することによって、HEWL の -1 サブサイトへ GN<sub>3</sub>M のモラノリン部分が強く結合できるようにな

り、この二つの要因が協同的に作用することでもたらされる。特に、-1 サブサイトへの結合に関しては、モラノリン残基の立体配座と環窒素原子の形式電荷が大きく関わっていると考察した。この考察を証明するために、HEWL と GN<sub>3</sub>M との共結晶を作製後、X 線結晶構造解析を行った。結果、HEWL の -4 から -1 サブサイト内に GN<sub>3</sub>M 由来の電子密度マップが確認された。著者らの結果を裏付けるように、<sup>4</sup>C<sub>1</sub> イス型立体配座をとったモラノリン残基が HEWL の -1 サブサイトに位置し、その環窒素原子が活性中心の Asp52 を含む複数のアミノ酸残基と水素結合を形成している様子が観察された。この結果は、過去に Withers らが報告した不活性型 HEWL (E35Q) と NAG2FGlcF との共有結合中間体構造と極めて高い類似性を示した<sup>22,23)</sup>。今回、合成阻害剤 GN<sub>3</sub>M を用いた一連の研究によって、共有結合中間体形成の新たな実証例を示すことに成功したが、HEWL の酵素基質間の複合体形成に関しては、現在も様々な議論が続いている<sup>24)</sup>。著者らも、合成化学の観点から引き続きこの謎にチャレンジしていきたい。

さらに著者らは、HEWL のクレフト内に存在する -4 から +2 の六つの糖結合サブサイトから着想を得て、リゾチームの酵素活性を簡便に評価可能な新基質の開発を行った。ニワトリ型リゾチームはペプチドグリカンやキチンを加水分解する酵素で、その活性評価には *Micrococcus lysodeikticus* 由来の細胞壁 (ペプチドグリカン) やキチンオリゴ糖の還元末端に発色団を結合したオリゴ糖誘導体が広く用いられている<sup>25-27)</sup>。これら従来基質は、共通してリゾチームのランダム加水分解を受けるという特徴を持っている。つまり、これら基質を用いて酵素の動力学的解析などを行う場合、切断箇所ごとの詳細な分析が必要となりとても煩雑な作業を伴う。そこで著者らは、リゾチームによってランダム加水分解を受けない新たな基質の開発を目指し、キチンオリゴ糖の両末端を修飾した誘導体の合成を行った。基質合成の方法は以下の通りである。キトテトラオースに対して還元末端選択的脱水反応とウシ乳由来  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-ガラクトシルトランスフェラーゼ I ( $\beta$ 4GalTI) を用いた非還元末端ガラクトシル化を行うことで、目的物である 4<sup>+</sup>-O- $\beta$ -D-galactosyl- $\beta$ -tri-N-acetylchitotriosyl 2-acetamide-2,3-dideoxy-gluc-2-enopyranose [Gal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGN] を全収率 3.8% で得た (図 3)<sup>28)</sup>。続いて、Gal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGN が HEWL によってどのような加水分解を受けるか評価した。結果として、従来のオリゴ糖基質である (GlcNAc)<sub>3</sub>- $\beta$ -pNP や、構造類似の (GlcNAc)<sub>3</sub>DGN が HEWL によってランダム加水分解を受けたのに対して、Gal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGN は非還元末端側から数えて三つ目の  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-グリコシド結合のみが加水分解された。これは、HEWL と Gal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGN とのドッキングシミュレーションからも矛盾のない結果が得られており、Gal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGN の非還元末端ガラクトース残基が HEWL の -3 サブサイト近傍に存在する Trp 62 とスタッキング型相互作用を介して結合し、分子全体としては Gal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGN が HEWL の -3 から +2 サブサ

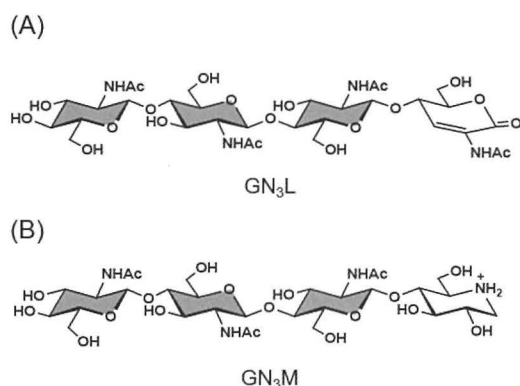


図 2. HEWL に対する 2 種類の遷移状態アナログ阻害剤

(A) GN<sub>3</sub>L の末端 L 残基は  $\alpha$ ,  $\beta$  不飽和  $\delta$  ラクトン構造を有し C1 が  $sp^2$  混成軌道で安定な半イス型様立体配座を持つ。文献 17) より作成。(B) GN<sub>3</sub>M の末端 M 残基は C1 が  $sp^3$  混成であり、<sup>4</sup>C<sub>1</sub> イス型立体配座を持つ。文献 22) より作成。

イトに位置していた。さらに著者らは、HEWLのGal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGNに対する特徴的な分解特性を利用することで、β-N-アセチルヘキソサミニダーゼ(β-NAHase)を共役酵素に用いた新たなHEWL活性測定法を開発した。具体的には、基質がHEWLによってGal(GlcNAc)<sub>2</sub>とGlcNAc-DGNに加水分解された後に、共役酵素であるβ-NAHaseがGlcNAc-DGNを加水分解することでDGNが遊離する。このDGNは水溶液中でピラノース型を維持できず、瞬時にフラノース型であるChromogen Iへと構造変化する。最後に、反応液へp-ジメチルアミノベンズアルデヒド(DMAB)を含む塩酸溶液を加えることで、Chromogen Iが590 nmの波長吸収を有する定量性に優れた化合物へ変換され、その生成速度に基づいてHEWLの酵素活性を測定することができる。これら一連の反応機構を図3に示す。結論として、Gal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGNはキチンオリゴ糖誘導体でありながらHEWLによってランダム加水分解を受けないという、これまでになく特徴を有しており、共役酵素系を用いることで優れた活性測定基質にもなり得ることを実証した<sup>28)</sup>。今後、本方法を利用することで、これまで煩雑

な分析を必要としたHEWLの反応速度論解析などが簡便化されるものと期待される。著者らはその後の研究で、共役酵素を必要としない新たな両末端修飾型キチンオリゴ糖誘導体(Galβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc-β-pNP)の合成にも成功しており、これについてはまた別の機会ですく紹介したい<sup>29)</sup>。

### 3. キチン糖類の変換及び集積化による生物機能分子の創製

糖質はエネルギー源や細胞壁の主成分としてだけではなく、タンパク質や脂質などに結合することで複合糖質として存在し、細胞の増殖や分化、受精、ガン化といった多くの生命現象に関与している<sup>30)</sup>。複合糖質は、通常、数種類のヘキソースから構成されており、著者らが研究素材に用いているGlcNAcもそれらを構成するヘキソースの一つである。例えば、GlcNAcは、N結合型糖鎖やO結合型糖鎖の構成糖として存在し、病原性ウイルスの接着や感染に関わる受容体分子の部分構造として機能する。このような背景のもと、著者らは、酵素法によりキチン糖類をヘテロオリゴ糖からなる疑似レセプター分子に変換後、化学法を用いて中分子や高分子に集積化することで病原性ウイルスなどに対する分子認識能を飛躍的に高めた生物機能分子の創製に取り組んできた<sup>7,8)</sup>。ここでは、中分子材料としてポリオーマウイルス粒子に対して架橋複合体形成能を有する中分子糖鎖クラスターを、高分子材料としてインフルエンザウイルス感染阻害剤を紹介する。

#### 3.1 ウイルス架橋能を有する中分子糖鎖クラスター

生体内には、糖ペプチドや糖タンパク質のように中分子や高分子に対して糖鎖が規則的に結合・配列した多価糖鎖が数多く存在する。これら多価糖鎖には、一価の糖鎖とは異なる特徴が存在する。それは、糖鎖が多価に存在することで相互作用分子に対して糖鎖クラスター効果が生じ、これによって糖鎖の生物情報信号としての性質を増幅させ、優れた分子認識能を発揮するようになる点である<sup>31-33)</sup>。一方、これら糖鎖と相互作用をする分子としては、糖結合性タンパク質であるレクチンが有名であるが、そのレクチンも構造的な特徴として多価の糖結合部位を有する場合が多い<sup>34)</sup>。さらに、このような多価糖鎖と多価レクチン間での相互作用では、糖鎖クラスター効果による結合親和力の増強に加え、それぞれが架橋し凝集体を形成する形態変化現象がしばしば観察される<sup>35)</sup>。この多価糖鎖と多価レクチン間でおこる架橋複合体形成反応は生体内でも見られる普遍的な現象であるにも関わらず、複合体形成のメカニズムなどに関しては未解明な部分が多く、特に病原性ウイルス表面に存在する多価レクチンを介したウイルス粒子と多価糖鎖との凝集反応に関しては、極端に研究例が少ない現状があった。著者らはこれまでに、*in vitro*における多価糖鎖と多価レクチンとの架橋複合体形成反応の基礎的知見を得

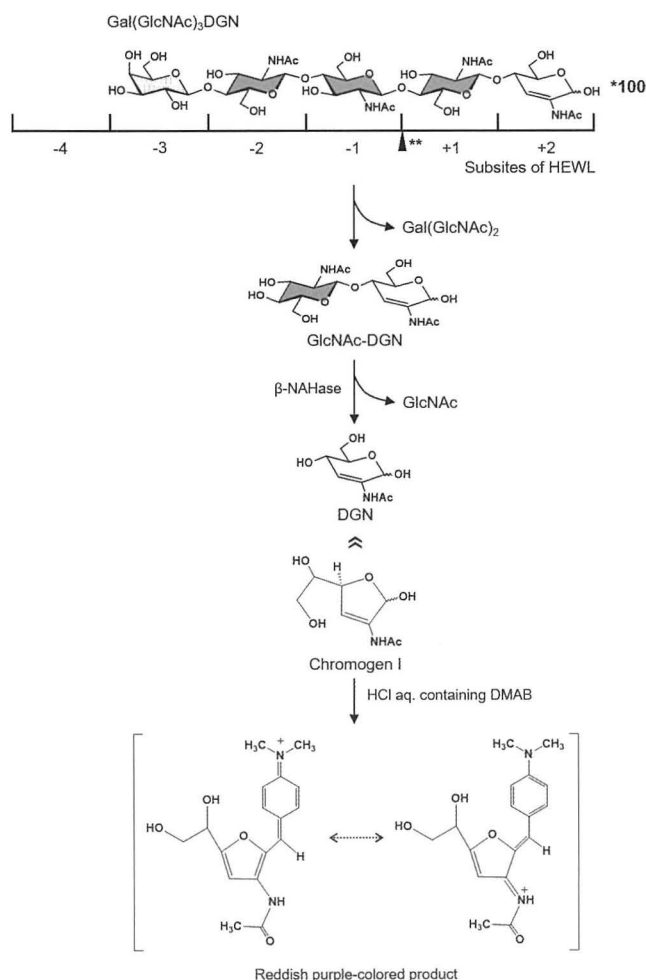


図3. Gal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGNを基質とした共役酵素系による新たなHEWL活性測定法

\*で示した数値は、グリコシド結合の切断頻度を表す。\*\*で示した矢印は、HEWLによる切断位置を表す。キチンオリゴ糖の両末端を修飾したGal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGNは、HEWLによってランダム加水分解を受けない、共役酵素系を用いることで酵素活性を測定することが可能である。文献28)より作成。

る目的で、糖鎖の価数を数個程度に制御した構造明確な中分子糖鎖クラスターの設計及び合成を進めてきた<sup>8,35-37)</sup>。ここでは、四価シアロ糖鎖クラスター (図4(A)) の病原性ヒトポリオーマウイルスに対する架橋複合体形成能について紹介する<sup>37)</sup>。本研究に使用したメルケル細胞ポリオーマウイルス (MCPyV) は72個のカプソマーで構成されており、それにはシアロ糖鎖に結合親和性を持ったカプシドウイルスタンパク質 (VP1) が多価に含まれている<sup>38,39)</sup>。まず著者

らは、GlcNAcなどを合成原料とし化学酵素合成法によって様々な中分子シアロ糖鎖クラスターを設計・合成し、ライブラリーを構築した。続いて、それら多価糖鎖とメルケル細胞ポリオーマウイルス様粒子 (MCPyV-LP) との混合液を動的光散乱法によって分析した。結果、それぞれの混合比や濃度などを試行錯誤することによって、一分子中に Neu5Acα2,6LacNAc 構造を四つ有する特定の四価シアロ糖鎖クラスター (図4(A)) が溶液中で直径約45 nmの

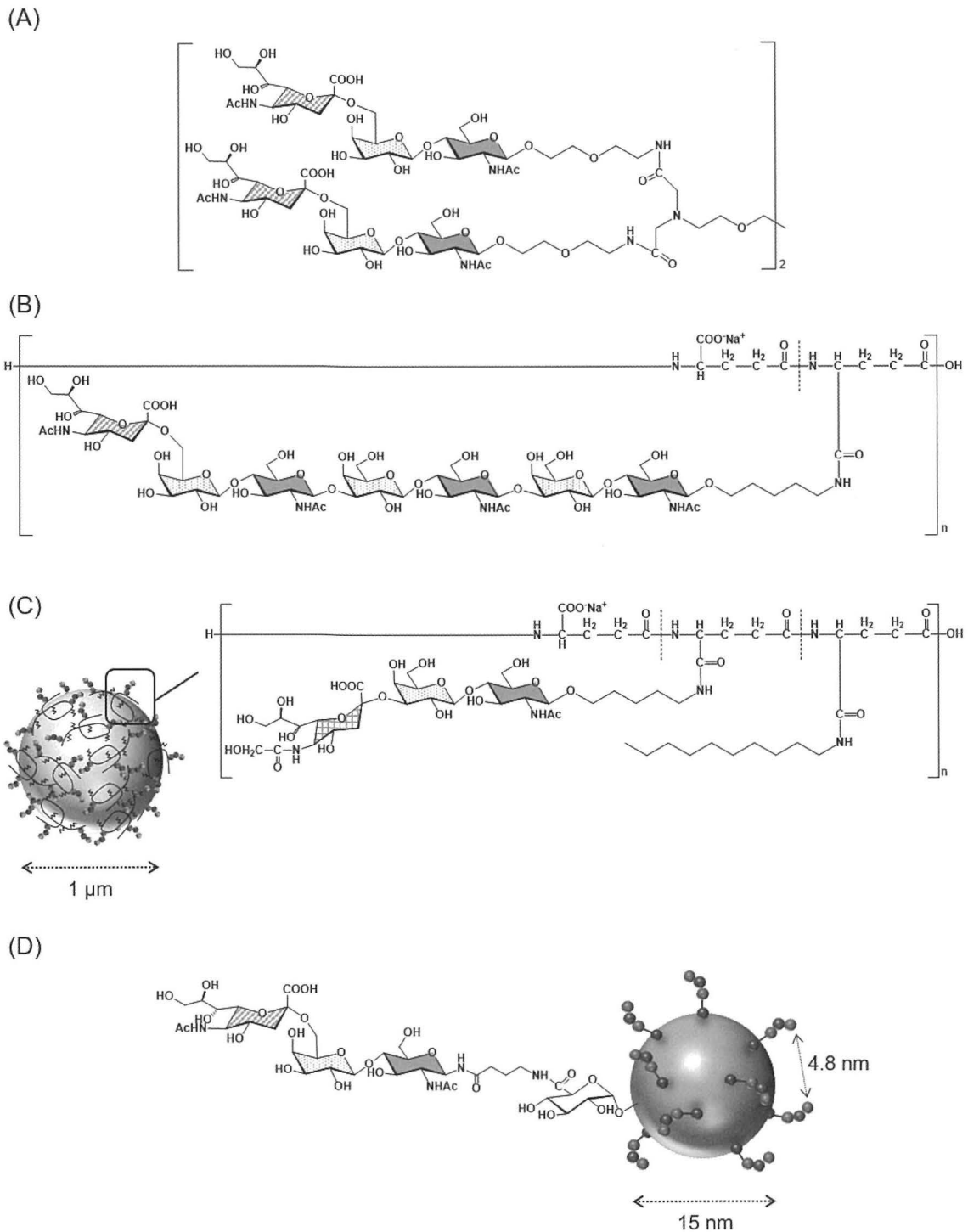


図4. キチン糖類の変換及び集積化によって合成した糖質複合分子

(A) 病原性ヒトポリオーマウイルスと架橋複合体を形成可能な四価シアロ糖鎖クラスター。文献 37)より作成。  
 (B) ヒト型 IFV の細胞感染を強力に阻害するシアロ糖含有糖鎖ポリペプチド。文献 49)より作成。  
 (C) EIV 吸着性糖鎖微粒子。本糖鎖微粒子のウイルス吸着特性とリアルタイム PCR 法とを組み合わせることで感染初期の超微量 EIV の検出を可能にした。文献 57)より作成。  
 (D) 粒子径が高度に制御されたデキストリンナノ粒子を骨格構造に有する IFV 結合性のシアロ糖多価ナノ粒子。文献 58)より作成。

MCPyV-LP を架橋し、平均直径が 2  $\mu\text{m}$  程度の複合体へと変化する様子を捉えることに成功した<sup>37)</sup>。さらに、これら一連の架橋反応を経時的に観察することによって、架橋初期と架橋終期では異なった凝集体成長過程が存在することも明らかになった。著者らはこれまで主に、植物レクチンのような比較的糖結合部位が少ない多価レクチンと多価糖鎖間での架橋反応を観察・評価してきた。しかし、今回、ウイルス粒子のように植物レクチンと比較して数倍程度大きく、100 倍以上の糖結合部位を持った多価レクチンであっても、中分子糖鎖クラスターで架橋複合体を形成可能であることを実証した。本結果は、別の見方をすると、ウイルスのようなナノ粒子を中分子糖鎖クラスターによって選択的に架橋し、マイクロスケールの複合体へと形態変化させる技術と捉えることもできる。そこで、次に著者らは本技術を利用したウイルスろ過膜法を開発した<sup>37)</sup>。その原理と方法は至ってシンプルであり、四価シアロ糖鎖クラスターによって MCPyV-LP を架橋後、その水溶液を一般的な微生物ろ過用滅菌フィルター(孔径 0.2  $\mu\text{m}$ )を用いてろ過をするだけである。通常、ウイルスは本フィルターを通過するが、マイクロスケールの架橋複合体はこれを通過できず、よって、ろ過膜上にウイルスを捕捉・回収することができる。この方法は、実際に感染性を持ったヒトポリオマウイルス (JCPyV) を含むクルド溶液に対しても有効であったことから、新たなウイルス捕捉・精製技術としての可能性を十分に秘めている。

### 3.2 インフルエンザウイルス感染阻害剤

現代社会において病原性ウイルスの感染によって引き起こされる感染症は、症状の軽いものから重篤な症状に至るものまで多岐にわたり、人々の生活において無視できない存在となっている。特に、人獣共通感染症であるインフルエンザは、インフルエンザウイルス (IFV) によって引き起こされる公衆衛生上最も重要なウイルス感染症に位置づけられる。インフルエンザウイルス (IFV) の宿主細胞への接着・感染には、ウイルス表面のヘマグルチニン (HA) と呼ばれる糖結合性タンパク質が関与しており、HA が宿主細胞表面の糖タンパク質や糖脂質などのシアロ糖鎖を認識・結合することで感染が成立する<sup>40)</sup>。一方、タンパク質が高度にグリコシル化された多価糖鎖高分子であるムチンなどは、生体内においてウイルスと特異的に結合し、感染のバリア分子として機能する<sup>41,42)</sup>。20 世紀後半以降、多くの研究者によって、ムチンのようなウイルス感染に対するバリア分子を人工的に模倣・再現したウイルス感染阻害剤や吸着剤、検出プローブ等が次々と開発されてきた<sup>43-47)</sup>。著者らも、納豆菌が産生する  $\gamma$ -ポリグルタミン酸の側鎖カルボキシ基にヒト型やトリ型 IFV-HA の疑似レセプター分子 (シアロ糖鎖配糖体) を多価導入することで、高分子型 IFV 感染阻害剤“人工ムチン”を設計・合成した<sup>48-52)</sup>。具体的には、ラクトースまたは *N*-アセチルラクトサミンと 5-トリフルオロアセトアミド-1-ペンタノールとを *Tricho-*

*derma reesei* 由来セルラーゼ中に含まれるエンド- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-グルカナーゼ I の縮合反応を用いて配糖化後、得られた二糖配糖体のアグリコン部末端を脱保護し、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸側鎖に組込むことで、実に簡単にアシアロ型糖鎖ポリペプチドを作製した<sup>48,53)</sup>。次に、各種糖転移酵素をカイコバクミド法により異種発現し<sup>54,55)</sup>、これら組換え酵素を用いて糖鎖伸長反応やシアル酸付加反応を行うことで非還元末端に Neu5Aca2,3Gal 構造や Neu5Aca2,6Gal 構造をもった計 20 種類以上にもおよぶシアロ型糖鎖ポリペプチドライブラリーを作製した<sup>48-52)</sup>。結果として、ライブラリーの中からヒト型 IFV である A/WSN/33 (H1N1) や A/Aichi/2/68 (H3N2) の MDCK 細胞への感染に対し、天然シアロフェツインを遥かに超える極めて低濃度 ( $10^{-12}$ ~ $10^{-14}$ M) で感染阻害可能な Neu5Aca2,6Gal 構造を非還元末端に有するシアロ糖含有糖鎖ポリペプチドを見出した (図 4(B))<sup>49)</sup>。また、ヒト型 IFV-HA とトリ型 IFV-HA の糖鎖認識特異性は末端シアル酸の結合様式に依存し、且つそのコアとなる内部糖鎖の長さが感染阻止活性に深く関与することを明らかにした<sup>49)</sup>。具体的には、ヒト型 IFV-HA は Neu5Aca2,6Gal 構造を非還元末端に有する長鎖の糖鎖構造に対して、トリ型 IFV-HA は Neu5Aca2,3Gal 構造を非還元末端に有する短鎖の糖鎖構造に対して強い結合親和性を示した。さらに、ヒト型 IFV-HA に対して高親和性を有する長鎖シアロ糖鎖の内部糖鎖構造は糖構造ではなく直鎖アルキル鎖に置き換えても高活性を維持することも明らかにした<sup>49)</sup>。

近年著者らは、前述の糖鎖ポリペプチドを応用利用することで、馬インフルエンザウイルス (EIV) の検出感度を向上可能な材料開発にも成功している。具体的には、EIV-HA に結合親和性を有する疑似レセプター分子 (Neu5Gca2,3LacNAc 配糖体) を  $\gamma$ -ポリグルタミン酸に多価導入することで EIV 吸着性糖鎖ポリペプチドを合成後、疎水化処理を施し、その後、直径 1  $\mu\text{m}$  の表面疎水化有機シリカ微粒子の表面に疎水相互作用を利用して固定化することで、EIV 吸着性微粒子を開発した (図 4(C))<sup>56,57)</sup>。本微粒子は、疑似レセプター分子による結合特異性と糖鎖クラスター効果による結合親和性とを兼ね備えた EIV 吸着剤であり、さらに、本性能とリアルタイム PCR 法とを組み合わせることで、従来法では捉えられなかった感染初期の超微量 EIV の検出にも成功した<sup>57)</sup>。本技術は、馬産業に大打撃を与える伝染性の高い EIV を早期発見可能な検出法として有用である。

また、これらとは全く別のアプローチとして、デキストリンナノ粒子を骨格構造に利用した IFV 吸着剤の開発にも取り組んでいる (図 4(D))。本吸着剤は、粒子径 (約 15 nm) や粒子内の活性基の数などが高度に制御された構造明確な糖ナノ粒子で、細胞毒性などもないことから高分子医薬としての応用展開も考えられる<sup>58)</sup>。

## 4. おわりに

枯渇の心配が少ない糖質資源であるキチンは、バイオリファイナリー分野における有望な合成原料として高い注目を集めている。今回著者らは、キチンの有効活用の一環として、キチン分解物から天然生理活性物質や酵素阻害剤、酵素活性測定基質、ウイルス架橋剤、ウイルス阻害剤など、いくつかの糖質複合分子を創り上げることに成功した。今後も、自然界から得られるキチンや澱粉、セルロース等の糖質資源を適切に利活用しながら、科学的な疑問解決や社会実装を志向したモノづくり研究に取り組んでいきたい。

## 謝辞

本研究の起源は、静岡大学農学部生物化学研究室にあります。私に糖質科学研究の機会を与えて下さった恩師碓氷泰市先生に心より感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり、静岡大学の村田健臣先生、朴龍洙先生、会津大学の左一八先生、産業技術総合研究所の鶴沢浩隆先生、近畿大学の深溝慶先生、大沼貴之先生、信州大学の長田光正先生、一関高専の戸谷一英先生、茨城高専の若松孝先生、苫小牧高専の甲野裕之先生ならびに多くの先生方に多大なるご支援を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。また、本研究成果は、共に同じ目標に向かって昼夜問わず研究に取り組んだ学生諸子の努力の賜物であり、改めて敬意と謝意を表します。最後になりましたが、日本応用糖質学会奨励賞の受賞にあたり、西尾俊幸会長はじめ受賞選考委員の先生方、ご推薦下さいました藤井智幸東北支部長ならびに東北支部、中部支部の方々に厚く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) S. Kaur and G.S. Dhillon: Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **35**, 44–61 (2015).
- 2) M.V. Tracey: Chitin. *Reviews of Pure and Applied Chemistry*, **7**, 1–14 (1957).
- 3) H. Braconnot: Sur la nature des champignons. *Annales de Chimie et de Physique*, **79**, 265–304 (1811).
- 4) S. Ifuku, M. Nogi, K. Abe, M. Yoshioka, M. Morimoto, H. Saimoto, and H. Yano: Preparation of chitin nanofibers with a uniform width as  $\alpha$ -chitin from crab shells. *Biomacromolecules*, **10**, 1584–1588 (2009).
- 5) S. Kobayashi, T. Kiyosada, and S. Shoda: Synthesis of artificial chitin: irreversible catalytic behavior of a glycosyl hydrolase through a transition state analogue substrate. *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 13113–13114 (1996).
- 6) M. Ogata: Chemoenzymatic synthesis and function of chitin derivatives. *Current Pharmaceutical Design*, **26**, 3522–3529 (2020).
- 7) M. Ogata: Functional design of glycan-conjugated molecules using a chemoenzymatic approach. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **85**, 1046–1055 (2021).
- 8) M. Ogata: Middle-molecular-weight glycoclusters for the crosslinking of multivalent lectins. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **33**, E 91–E 97 (2021).
- 9) B. Coxon and L. Hough: The epimerization of 2-acetamido-2-deoxy-D-pentoses. *Journal of the Chemical Society*, 1577–1579 (1961).

- 10) S. Yamaguchi, J. Ohnishi, I. Maru, and Y. Ohta: Simple and large-scale production of *N*-acetylneuraminic acid and *N*-acetyl-D-mannosamine. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **18**, 245–252 (2006).
- 11) R. Kuhn and G. Krüger: 3-Acetamino-furan aus *N*-acetyl-D-glucosamin; ein Beitrag zur Theorie der Morgan-Elson-Reaktion. *Chemische Berichte*, **89**, 1473–1486 (1956).
- 12) M. Ogata, T. Hattori, R. Takeuchi, and T. Usui: Novel and facile synthesis of furanodictines A and B based on transformation of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose into 3,6-anhydro hexofuranoses. *Carbohydrate Research*, **345**, 230–234 (2010).
- 13) H. Kikuchi, Y. Saito, J. Komiya, Y. Takaya, S. Honma, N. Nakahata, A. Ito, and Y. Oshima: Furanodictine A and B: Amino sugar analogues produced by cellular slime mold *Dicystostelium discoideum* showing neuronal differentiation activity. *The Journal of Organic Chemistry*, **66**, 6982–6987 (2001).
- 14) H. Yoda, Y. Suzuki, and K. Takabe: Novel and stereoselective asymmetric synthesis of an amino sugar analogue, furanodictine A. *Tetrahedron Letters*, **45**, 1599–1601 (2004).
- 15) H.B. Mereyala, M. Baseeruddin, and S.R. Koduru: Formal synthesis of furanodictine B from D-glucose. *Tetrahedron: Asymmetry*, **15**, 3457–3460 (2004).
- 16) D. Matsuura, T. Mitsui, T. Sengoku, M. Takahashi, and H. Yoda: Stereodivergent synthesis of new amino sugars, furanodictines A and B, starting from D-glucuronolactone. *Tetrahedron*, **64**, 11686–11696 (2008).
- 17) M. Ogata, R. Takeuchi, A. Suzuki, H. Hirai, and T. Usui: Facile synthesis of 4-O- $\beta$ -N-acetylchitooligosyl 2-acetamido-2,3-dideoxydihydro-gluconolactone based on transformation of chitooligosaccharide and its suppressive effects against the furylfuranamide-induced SOS response. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **76**, 1362–1366 (2012).
- 18) A. Fleming: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **93**, 306–317 (1922).
- 19) C.C.F. Blake, D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, and V.R. Sarma: Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **206**, 757–761 (1965).
- 20) D.C. Phillips: The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Scientific American*, **215**, 78–90 (1966).
- 21) D.E. Koshland: Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews*, **28**, 416–436 (1953).
- 22) M. Ogata, N. Umemoto, T. Ohnuma, T. Numata, A. Suzuki, T. Usui, and T. Fukamizo: A novel transition-state analogue for lysozyme, 4-O- $\beta$ -tri-N-acetylchitotriosyl moranoline, provided evidence supporting the covalent glycosyl-enzyme intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, **288**, 6072–6082 (2013).
- 23) D.J. Vocadlo, G.J. Davies, R. Laine, and S.G. Withers: Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, **412**, 835–838 (2001).
- 24) I. Tanaka, R. Nishinomiya, R. Goto, S. Shimazaki, and T. Chatake: Recent structural insights into the mechanism of lysozyme hydrolysis. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **77**, 288–292 (2021).
- 25) G. Gorin, S.-F. Wang, and L. Papapavlou: Assay of lysozyme by its lytic action on *M. lysodeikticus* cells. *Analytical Biochemistry*, **39**, 113–127 (1971).
- 26) F. Nanjo, K. Sakai, and T. Usui: *p*-Nitrophenyl penta-*N*-acetyl- $\beta$ -chitopentaoside as a novel synthetic substrate for the colorimetric assay of lysozyme. *The Journal of Biochemistry*, **104**, 255–258 (1988).
- 27) H. Fukuda, T. Tanimoto, and T. Yamada: Enhancement of the sensitivity of a fluorometric lysozyme assay system by adding  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **33**, 3375–3380 (1985).
- 28) M. Ogata, M. Matsui, H. Kono, Y. Matsuzaki, Y. Kato, and T. Usui: A novel analytical procedure for assaying lysozyme activity using an end-blocked chitotetraose derivative as substrate. *Analytical Biochemistry*, **538**, 64–70 (2017).
- 29) M. Matsui, H. Kono, and M. Ogata: Molecular design and synthesis of a novel substrate for assaying lysozyme activity. *Journal of Applied Glycoscience*, **65**, 31–36 (2018).
- 30) A. Varki: Biological roles of oligosaccharides: all of the theo-



- ries are correct. *Glycobiology*, **3**, 97–130 (1993).
- 31) Y.C. Lee, R.R. Townsend, M.R. Hardy, J. Lönngrén, J. Arnarp, M. Haraldsson, and H. Lönn: Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features. *The Journal of Biological Chemistry*, **258**, 199–202 (1983).
  - 32) J.J. Lundquist and E.J. Toone: The cluster glycoside effect. *Chemical Reviews*, **102**, 555–578 (2002).
  - 33) C.F. Brewer: Cross-linking activities of galectins and other multivalent lectins. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **9**, 155–165 (1997).
  - 34) H. Lis and N. Sharon: Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, **98**, 637–674 (1998).
  - 35) M. Ogata, M. Yano, S. Umemura, T. Murata, E.Y. Park, Y. Kobayashi, T. Asai, N. Oku, N. Nakamura, I. Mastuo, and T. Usui: Design and synthesis of high-avidity tetravalent glyco-clusters as probes for *Sambucus sieboldiana* agglutinin and characterization of their binding properties. *Bioconjugate Chemistry*, **23**, 97–105 (2012).
  - 36) M. Ogata, Y. Chuma, Y. Yasumoto, T. Onoda, M. Umemura, T. Usui, and E.Y. Park: Synthesis of tetravalent LacNAc-glyco-clusters as high-affinity cross-linker against *Erythrina cristagalli* agglutinin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **24**, 1–11 (2016).
  - 37) M. Ogata, T. Onoda, A. Koizumi, Y. Tokunaga, I. Ohta, S. Nukuzuma, E.Y. Park, T. Usui, and T. Suzuki: Agglutination of human polyomaviruses by using a tetravalent glycocluster as a cross-linker. *ACS Omega*, **5**, 21940–21947 (2020).
  - 38) U. Neu, J. Bauer, and T. Stehle: Viruses and sialic acids: rules of engagement. *Current Opinion in Structural Biology*, **21**, 610–618 (2011).
  - 39) U. Neu, H. Hengel, B.S. Blaum, R.M. Schowalter, D. Macejak, M. Gilbert, W.W. Wakarchuk, A. Imamura, H. Ando, M. Kiso, N. Arnberg, R.L. Garcea, T. Peters, C.B. Buck, and T. Stehle: Structures of merkel cell polyomavirus VP1 complexes define a sialic acid binding site required for infection. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002738 (2012).
  - 40) Y. Suzuki, Y. Nagao, H. Kato, M. Matsumoto, K. Nerome, K. Nakajima, and E. Nobusawa: Human influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligosaccharides in membrane-associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection. *The Journal of Biological Chemistry*, **261**, 17057–17061 (1986).
  - 41) G.J. Strous and J. Dekker: Mucin-type glycoproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **27**, 57–92 (1992).
  - 42) J.L. McAuley, L. Corcilius, H.-X. Tan, R.J. Payne, M.A. McGuckin, and L.E. Brown: The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunology*, **10**, 1581–1593 (2017).
  - 43) S.K. Choi, M. Mammen, and G.M. Whitesides: Generation and in situ evaluation of libraries of poly (acrylic acid) presenting sialosides as side chains as polyvalent inhibitors of influenza-mediated hemagglutination. *Journal of the American Chemical Society*, **119**, 4103–4111 (1997).
  - 44) A. Tsuchida, K. Kobayashi, N. Matsubara, T. Muramatsu, T. Suzuki, and Y. Suzuki: Simple synthesis of sialyllactose-carrying polystyrene and its binding with influenza virus. *Glycoconjugate Journal*, **15**, 1047–1054 (1998).
  - 45) A.S. Gambaryan, E.Y. Boravleva, T.Y. Matrosovich, M.N. Matrosovich, H.-D. Klenk, E.V. Moiseeva, A.B. Tuzikov, A.A. Chinarev, G.V. Pazynina, and N.V. Bovin: Polymer-bound 6'-sialyl-N-acetyllactosamine protects mice infected by influenza virus. *Antiviral Research*, **68**, 116–123 (2005).
  - 46) M. Umemura, M. Itoh, Y. Makimura, K. Yamazaki, M. Umemura, A. Masui, Y. Matahira, M. Shibata, H. Ashida, and K. Yamamoto: Design of a sialylglycopolymer with a chitosan backbone having efficient inhibitory activity against influenza virus infection. *Journal of Medicinal Chemistry*, **51**, 4496–4503 (2008).
  - 47) T. Tanaka, H. Ishitani, Y. Miura, K. Oishi, T. Takahashi, T. Suzuki, S. Shoda, and Y. Kimura: Protecting-group-free synthesis of glycopolymers bearing sialyloligosaccharide and their high binding with the influenza virus. *ACS Macro Letters*, **3**, 1074–1078 (2014).
  - 48) M. Ogata, T. Murata, K. Murakami, T. Suzuki, K.I.P.J. Hidari, Y. Suzuki, and T. Usui: Chemoenzymatic synthesis of artificial glycopolypeptides containing multivalent sialyloligosaccharides with a  $\gamma$ -polyglutamic acid backbone and their effect on inhibition of infection by influenza viruses. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 1383–1393 (2007).
  - 49) M. Ogata, K.I.P.J. Hidari, T. Murata, S. Shimada, W. Kozaki, E.Y. Park, T. Suzuki, and T. Usui: Chemoenzymatic synthesis of sialoglycopolypeptides as glycomimetics to block infection by avian and human influenza viruses. *Bioconjugate Chemistry*, **20**, 538–549 (2009).
  - 50) M. Ogata, K.I.P.J. Hidari, W. Kozaki, T. Murata, J. Hiratake, E.Y. Park, T. Suzuki, and T. Usui: Molecular design of spacer-N-linked sialoglycopolypeptide as polymeric inhibitors against influenza virus infection. *Biomacromolecules*, **10**, 1894–1903 (2009).
  - 51) M. Ogata, T. Murata, E.Y. Park, and T. Usui: Chemoenzymatic synthesis of glycan-arranged polymeric inhibitors against influenza virus infection. *Journal of Applied Glycoscience*, **57**, 137–143 (2010).
  - 52) M. Ogata, H. Uzawa, K.I.P.J. Hidari, T. Suzuki, E.Y. Park, and T. Usui: Facile synthesis of sulfated sialoglycopolypeptides with a  $\gamma$ -polyglutamic acid backbone as hemagglutinin inhibitors against influenza virus. *Journal of Applied Glycoscience*, **61**, 1–7 (2014).
  - 53) M. Ogata, Y. Kameshima, T. Hattori, K. Michishita, T. Suzuki, H. Kawagishi, K. Totani, J. Hiratake, and T. Usui: Lactosylamide-based affinity purification for cellulolytic enzymes EG I and CBH I from *Hypocrea jecorina* and their properties. *Carbohydrate Research*, **345**, 2623–2629 (2010).
  - 54) M. Ogata, M. Nakajima, T. Kato, T. Obara, H. Yagi, K. Kato, T. Usui, and E.Y. Park: Synthesis of sialoglycopolypeptide for potentially blocking influenza virus infection using a rat  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase expressed in BmNPV bacmid-injected silkworm larvae. *BMC Biotechnology*, **9**, 54 (2009).
  - 55) M. Ogata, T. Usui, and E.Y. Park: Glycosyltransferase expression in silkworm and its applications in glycobiology. In *Silkworm Biofactory - Silk to Biology*, E.Y. Park and K. Maenaka, eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 159–175 (2018).
  - 56) M. Ogata, A. Koizumi, T. Otsubo, K. Ikeda, M. Sakamoto, R. Aita, T. Kato, E.Y. Park, T. Yamanaka, and K.I.P.J. Hidari: Chemoenzymatic synthesis and characterization of N-glycolylneuraminic acid-carrying sialoglycopolypeptides as effective inhibitors against equine influenza virus hemagglutination. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **81**, 1520–1528 (2017).
  - 57) M. Ogata, T. Yamanaka, A. Koizumi, M. Sakamoto, R. Aita, H. Endo, T. Yachi, N. Yamauchi, T. Otsubo, K. Ikeda, T. Kato, E.Y. Park, H. Kono, M. Nemoto, and K.I.P.J. Hidari: Application of novel sialoglyco-particulates enhances the detection sensitivity of equine influenza virus by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *ACS Applied Bio Materials*, **2**, 1255–1261 (2019).
  - 58) M. Ogata, S. Umemura, N. Sugiyama, N. Kuwano, A. Koizumi, T. Sawada, M. Yanase, T. Takaha, J. Kadokawa, and T. Usui: Synthesis of multivalent sialyllactosamine-carrying glyconanoparticles with high affinity to the human influenza virus hemagglutinin. *Carbohydrate Polymers*, **153**, 96–104 (2016).