

-D-グルコース1-リン酸アナログ基質を用いたグルカンホスホリラーゼによる酵素的グリコシル化反応

誌名	応用糖質科学
ISSN	21856427
著者名	門川, 淳一
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	4巻2号
掲載ページ	p. 160-166
発行年月	2014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





Glucan Phosphorylase-catalyzed Enzymatic Glycosylations Using Analogue Substrates of α -D-Glucose 1-Phosphate*

α -D-グルコース 1-リン酸アナログ基質を用いた グルカンホスホリラーゼによる酵素的グリコシル 化反応*

(2014年1月14日受付；2014年2月4日採択)

門川 淳一 (かどかわ じゅんいち)^{1,**}

Jun-ichi Kadokawa^{1,**}

¹ 鹿児島大学大学院理工学研究科
890-0065 鹿児島市郡元 1-21-40

¹ Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University
1-21-40 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

要旨：酵素的グリコシル化反応は構造明確な糖鎖を得る有力な手法であり、近年の発展は目覚ましい。例えば、グルカンホスホリラーゼは α -D-グルコース 1-リン酸 (Glc-1-P) を糖供与体、マルトオリゴ糖を糖受容体とするグリコシル化反応を触媒し、選択的に α -(1 \rightarrow 4)-グルコシド結合が形成される。この酵素がある程度の基質認識の緩さを有していることを利用して、Glc-1-Pのアナログ基質を糖供与体に用いる酵素的グリコシル化反応が開拓されてきた。馬鈴薯グルカンホスホリラーゼが α -D-マンノース、2-デオキシ- α -D-グルコース、 α -D-キシロースおよび(N-ホルミル)- α -D-グルコサミン 1-リン酸を糖供与体として認識することで、それぞれ対応するグリコシル化反応が進行することが報告された。また、耐熱性グルカンホスホリラーゼが他のアナログ基質を認識することも見出され、例えば α -D-グルクロン酸 1-リン酸を用いたグルクロニル化反応が起こることも報告された。さらに、耐熱性グルカンホスホリラーゼの糖受容体に対する認識性の緩さにより、 α -D-マンノース 1-リン酸を用いた連続的なマンノシル化反応が進行することも見出された。

キーワード：グルカンホスホリラーゼ、酵素的グリコシル化反応、 α -D-グルコース 1-リン酸、アナログ基質、非天然型糖鎖***

1. はじめに

新規な機能を有する糖鎖材料の開発のためには構造明確な糖鎖構造の構築が重要であり、すなわちグリコシド結合生成 (グリコシル化反応) が鍵である。通常、化学的なグリコシル化反応は、アノマー位が活性化された糖供与体と遊離のヒドロキシ基を有する糖受容体を用いて行われる¹⁻⁴⁾。反応では、アノマー位の立体配置の異なった2種類の異性体 (α 体と β 体) の生成が可能であることに加えて、反応に関与する位置以外のヒドロキシ基を保護するため、糖鎖材料に導くには最後に脱保護の工程が必要である。このため目的とするグリコシド生成物を得るためには、活性化基、保護基、触媒 (活性化剤)、溶媒などの多くの因子から最適な条件を選択しなければならない。このようなグリコシル化反応を繰り返して単糖を逐次的に延長させることにより糖鎖の構築が可能であるが、高選択的に

グリコシル化反応を繰り返して、多くの位置および立体異性体の中で1つの糖鎖を得ることは容易ではない。

一方、酵素を触媒とするグリコシル化反応では保護基を導入していない基質を用いても、反応は酵素-基質複合体の形成を経由することで位置および立体選択的に進行するため、構造明確な糖鎖合成に有用であり、近年、注目されている (図 1)⁵⁻⁹⁾。これまでに、主に糖転移酵素、糖加水分解酵素、加リン酸分解酵素 (ホスホリラーゼ) がグリコシル化反応の触媒として用いられている。糖転移酵素は糖ヌクレオチドを糖供与体として生体内の糖タンパク質や糖脂質の糖鎖部分の構築を触媒する酵素の総称である⁹⁾。この反応は糖ヌクレオチドの高エネルギー結合の開裂を伴うため、グリコシド結合形成方向への不可逆反応であり効率的に進行する。しかしこの酵素は不安定で高価なものが多く、基質の取り扱いも容易ではないため、実用的な合成反応として利用するためには克服すべき点も多い。糖加水分

* 本原稿は、日本応用糖質科学会平成 25 年度大会応用糖質科学シンポジウムで一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 099-285-7743, Fax. 099-285-3253, E-mail: kadokawa@eng.kagoshima-u.ac.jp)

*** Key words: glucan phosphorylase, enzymatic glycosylation, α -D-glucose 1-phosphate, analogue substrate, non-natural saccharide-chain

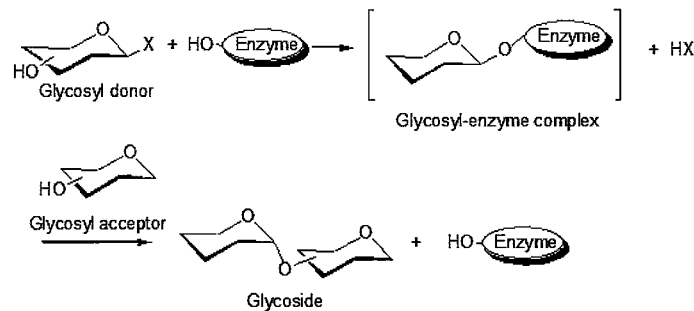


図1. 酵素-基質複合体を経由する酵素的グリコシル化反応

酵素的グリコシル化反応では、無保護の基質を用いても酵素-基質複合体を形成することで、位置および立体選択的に進行する。

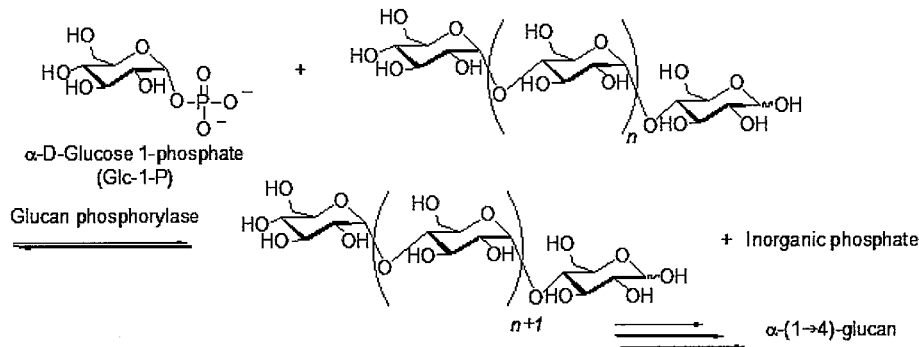


図2. グルカンホスホリラーゼによる酵素反応

グルカンホスホリラーゼによる加リン酸分解は可逆的であり、Glc-1-Pを糖供与体を用いたグリコシル化反応も触媒する。過剰のGlc-1-P存在下では重合が進行する。

解酵素は糖鎖のグリコシド結合の加水分解を触媒する酵素であるが、逆反応触媒作用を利用してグリコシド結合生成が可能である^{5-8,10,11)}。通常、反応は加水分解方向に有利であるが、アノマー位を活性化した基質を用いることで効率的にグリコシル化反応を進行させることができる。

ホスホリラーゼは、無機リン酸存在下、糖鎖の非還元末端グリコシド結合を加リン酸分解し、単糖残基の1-リン酸エステル(ヘキソース1-リン酸)と重合度の1つ小さい糖鎖を生成する反応を触媒する酵素である¹²⁻¹⁵⁾。糖リン酸エステル結合のエネルギーとグリコシド結合のエネルギーが同等であるためホスホリラーゼによる反応は可逆的であり、ホスホリラーゼはグリコシル化反応の触媒に用いることができる。ホスホリラーゼによる酵素的グリコシル化反応では、糖供与体のヘキソース1-リン酸から糖受容体の非還元末端へのヘキソース残基の転移が起こり、無機リン酸の生成を伴って位置および立体選択的にグリコシド結合が生成する。

これまでに知られている種々のホスホリラーゼの中でグルカンホスホリラーゼ(EC 2.4.1.1)は最も広く研究されており、動物、植物、微生物中に広く存在している¹⁶⁾。グルカンホスホリラーゼは、無機リン酸存在下、グリコーゲンや澱粉のような α -(1 \rightarrow 4)-グルカンの非還元末端グリコシド結合を加リン酸分解し、 α -D-グルコース1-リン酸(Glc-1-P)を生成する反応を触媒する酵素である。このため、この酵素はしばしばグリコーゲンホスホリラーゼやスターチホスホリラーゼとも呼ばれる。上述のようにホスホ

リラーゼによる加リン酸分解反応は可逆的であるので、グルカンホスホリラーゼはGlc-1-Pを糖供与体としたグリコシル化反応も触媒する(図2)。糖受容体としてはグルカンホスホリラーゼが認識できる最小基質以上の糖鎖が用いられる。馬鈴薯などの植物から単離されたグルカンホスホリラーゼ触媒での最小糖受容体はマルトテトラオース(Glc₄)であるのに対して、耐熱性細菌から単離されたグルカンホスホリラーゼを用いた場合の最小糖受容体はマルトトリオース(Glc₃)であると報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。グルカンホスホリラーゼによる酵素的グリコシル化反応において、糖受容体に対して過剰のGlc-1-Pが存在する場合は連続的に反応が起こり、糖受容体の非還元末端側から α -(1 \rightarrow 4)-グルカン糖鎖を伸長させることができる(図2)^{19,20)}。すなわち、Glc-1-Pをモノマー、糖受容体を開始点(プライマー)とした酵素触媒重合が可能であり、Glc-1-P/プライマーの仕込み比によって種々の重合度を有する構造明確な α -(1 \rightarrow 4)-グルカン(アミロース)を得ることができる¹⁹⁾。また、プライマー(マルトオリゴ糖)の反応に関与しない末端(還元末端)を他の物質に固定化しても重合は進行するため、固定化プライマーを用いたグルカンホスホリラーゼ酵素触媒重合による様々な機能性アミロースの合成も行われている^{8,14,22,23)}。以上のようにグルカンホスホリラーゼは機能性高分子材料開発の点でも有用な触媒であることから、このような分野でホスホリラーゼといえればグルカンホスホリラーゼを指すことも多い。

酵素は通常、特定の基質のみを認識するが、酵素によつ

ては基質構造に対するある程度の認識の特異性に緩さを示す。この性質を利用した天然基質と構造の類似したアナログ基質を用いる酵素的グリコシル化反応は、非天然型糖鎖合成の有用な手法である。このような観点から、本総説では、Glc-1-Pのアナログ基質を糖供与体を用いたグルカンホスホリラーゼによる酵素的グリコシル化反応について解説する。

2. アナログ基質を用いる馬鈴薯グルカンホスホリラーゼによるグリコシル化反応

既に、最も一般的な馬鈴薯由来のグルカンホスホリラーゼがグリコシル化反応においてある程度の糖供与体に対する特異性の緩さを有し、いくつかのGlc-1-Pアナログ基質を認識することが報告されている(図3)²⁹⁾。例えば、馬鈴薯ホスホリラーゼが α -D-マンノース1-リン酸(Man-1-P)を糖供与体としたマンノシル化反応を触媒することで、糖受容体Glc_nの非還元末端にMan残基が1つ転移した五糖の生成が報告されている²⁹⁾。また、2-デオキシ- α -D-グルコース1-リン酸(dGlc-1-P)も馬鈴薯グルカンホスホリラーゼによる反応の糖供与体となることも見出されている²⁹⁾。実際のデオキシグリコシル化反応ではD-グルカールが疑似的糖供与体として用いられており、若干量(0.05当量)の無機リン酸存在下、*in-situ*でdGlc-1-Pに変換されることで糖供与体として挙動している²⁹⁾。すなわち、まず無機リン酸の触媒作用によりD-グルカールが糖受容体Glc_nの非還元末端に転移し、2-デオキシ- α -D-グルコース残基を有する五糖が生成する。次にグルカンホスホリラーゼによる生成五糖の非還元末端の加リン酸分解が起こりdGlc-1-Pを生成する。これが糖供与体として挙動してデオキシグリコシル化反応が進行する。反応生成物のサイズ排除クロマトグラフィー解析により、2-デオキシ- α -D-グルコシル化五糖、六糖、七糖以外に平均重合度12の高分子量糖鎖の生成も確認されている。

筆者は、 α -D-キシロース1-リン酸(Xyl-1-P)を糖供与体を用いた馬鈴薯グルカンホスホリラーゼによるキシロシル化反応を試みた²⁹⁾。その結果、Glc_nを糖受容体を用いて反応を行って得られた生成物のMALDI-TOF MSおよび¹H NMR測定から、非還元末端にXyl残基を1つ有する五糖が主生成物であることが確認され、馬鈴薯グルカンホスホリラーゼがこのキシロシル化反応を触媒することがわかった。また、MALDI-TOF MS測定結果においてXylユニットを二つ有するオリゴ糖に対応する分子量ピークもわずかに観測されたことから、複数のXyl残基の転移反応も起こることが推定された。

さらにアミノ糖鎖合成を目的にグルコサミン誘導体の1-リン酸エステルを糖供与体を用いた馬鈴薯グルカンホスホリラーゼによるグルコサミニル化反応を検討した²⁹⁾。まず α -D-グルコサミン1-リン酸(GlcN-1-P)を糖供与体、Glc_nを糖受容体を用いて酵素的グルコサミニル化反応を行った。反応終了後、無水酢酸を用いて粗生成物のN-アセチル化を行った後、MALDI-TOF MS測定を行った。これは、アンヒドログルコースユニットとアンヒドログルコサミンユニットの分子量の差が1であり、後者をN-アセチル化することで分子量の差を明確にするためである。N-アセチル化粗生成物のMALDI-TOF MS測定結果からはN-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)残基を1つ有する五糖の分子量ピークが観測された。またHPLCを用いて単離した主生成物の¹H NMR測定結果もこの五糖の構造を支持した。これらのことから、馬鈴薯グルカンホスホリラーゼがGlcN-1-Pを糖供与体として認識することでGlc_nの非還元末端へのグルコサミニル化反応が進行したことが確認された。

つぎにGlcN-1-PのN置換誘導体を糖供与体を用いた馬鈴薯グルカンホスホリラーゼによるグルコサミニル化反応を行い、置換基の違いによる認識性について検討した。上記のGlcN-1-Pを用いた場合と同条件でN-アセチル- α -D-グルコサミン1-リン酸(GlcNAc-1-P)を糖供与体を用いてグ

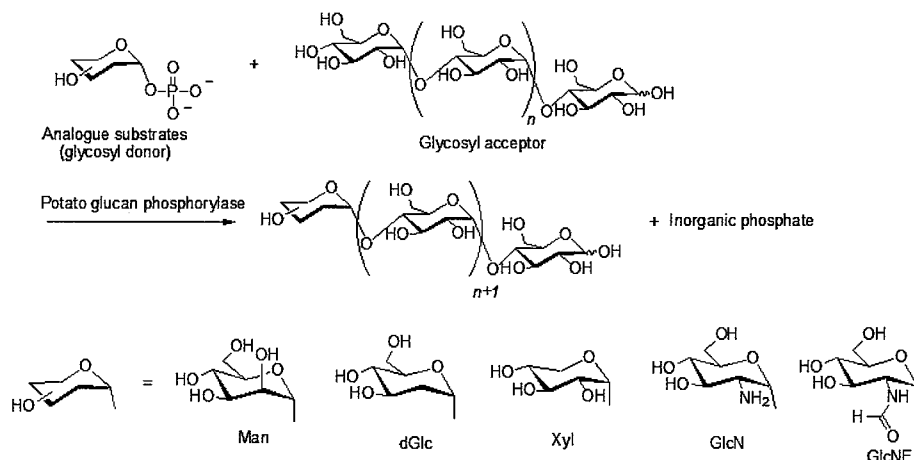


図3. Glc-1-Pアナログ基質を用いた馬鈴薯グルカンホスホリラーゼによるグリコシル化反応

馬鈴薯グルカンホスホリラーゼはMan-1-P、dGlc-1-P、Xyl-1-P、GlcN-1-PおよびGlcNF-1-Pを糖供与体として認識し、対応するグリコシル化反応を触媒する。

ルコサミニル化反応を行ったが、反応生成物の MALDI-TOF MS 測定結果からは反応の進行が確認できなかった。一方、より小さいホルミル基で置換した *N*-ホルミル- α -D-グルコサミン 1-リン酸 (GlcNF-1-P) は馬鈴薯グルカンホスホリラーゼに認識され、対応するグルコサミニル化反応が進行することが見出された³⁰⁾。GlcNF-1-P と Glc₄ を用いた反応生成物の MALDI-TOF MS 測定結果では GlcNF ユニット 1 つを有する五糖の分子量ピークのみが観測され、Glc₄ の非還元末端への GlcNF 残基 1 つの転移が起こったことが確認された。また HPLC により単離した主生成物の ¹H NMR 測定からもこの五糖の構造が支持された。以上のことから、アセチル基で置換した GlcNAc-1-P を用いた場合は、高い置換基が馬鈴薯グルカンホスホリラーゼ活性中心への取り込みを妨げているのに対して、GlcNF-1-P の場合は、より小さい置換基のため影響が少なく、馬鈴薯グルカンホスホリラーゼに認識されたと考えられる。

3. アナログ基質を用いる耐熱性グルカンホスホリラーゼによるグリコシル化反応

上述のように馬鈴薯由来と耐熱性細菌由来のグルカンホスホリラーゼでは、糖受容体として認識できる最小基質が異なっていることがわかっている¹⁷⁻¹⁹⁾。このことから両者では糖供与体の認識能も異なることが予想される。このような観点から筆者は、耐熱性細菌由来のグルカンホスホリラーゼ (耐熱性グルカンホスホリラーゼ, *Aquifex aeolicus* VF 5)³⁰⁾ を用いて酵素的グリコシル化反応の新しい糖供与体の開拓に取り組んできた。その結果、 α -D-グルクロン酸 1-リン酸 (GlcA-1-P) を糖供与体に用いることで非天然型の酸性糖鎖の合成が達成された³²⁾。上述のようにこの酵素の糖受容体としての最小基質は Glc₃ であり、馬鈴薯グルカンホスホリラーゼとは異なっている。そこで、GlcA-1-P を糖供与体、Glc₃ を糖受容体に用いて耐熱性グルカンホスホリラーゼによるグルクロニル化反応を 50°C, 48 時間、行ったところ (図 4), 得られた粗生成物の MALDI-TOF MS 測定結果では GlcA 残基を 1 つ有する四糖に対応する分子量ピークが観測された。このことから耐熱性グルカンホスホリラーゼによるグルクロニル化反応が進行し、Glc₃

の非還元末端への GlcA 残基の転移が起こったことがわかった。また、生成物の ¹H NMR 測定による解析からも GlcA 含有五糖の構造が支持された。

つぎに、Glc₄ を糖受容体に用いて耐熱性グルカンホスホリラーゼによるグルクロニル化反応を同条件で検討し、上記反応との比較を行った。その結果、粗生成物の MALDI-TOF MS 測定結果において GlcA 残基を 1 つ有する四糖から八糖の分子量ピークが観測された。このことから Glc₄ を糖受容体に用いたときには GlcA-1-P によるグルクロニル化反応と Glc-1-P によるグリコシル化反応の両方が起こったことが示唆された。Glc₄ は耐熱性グルカンホスホリラーゼの触媒作用により無機リン酸存在下、加リン酸分解されて Glc-1-P と Glc₃ となる。このため、反応初期において GlcA 残基が GlcA-1-P から Glc₄ に転移することで無機リン酸が生成した際には、直ちに他の Glc₄ の加リン酸分解が起こって Glc-1-P と Glc₃ が得られる。天然基質の Glc-1-P は GlcA-1-P と比較してより効率的に酵素に認識されるので、Glc-1-P から Glc₃ あるいは Glc₄ へのグリコシル化反応が起こり、Glc₅~Glc₇ のようなより高重合度のマルトオリゴ糖が生成するのであろう。これらのマルトオリゴ糖を糖受容体としたグルクロニル化反応が併発することで複数の生成物が得られたと考えられる (図 5)。

興味深いことに馬鈴薯グルカンホスホリラーゼは GlcA-1-P を認識しないことから、耐熱性グルカンホスホリラーゼは糖供与体に対する認識性がより緩いと考えられる。さらに最近の研究において耐熱性グルカンホスホリラーゼは、馬鈴薯グルカンホスホリラーゼが認識しない GlcNAc-1-P や α -D-ガラクトース 1-リン酸を糖供与体に用いたグリコシル化反応も触媒することが見出されており、この酵素が Glc-1-P アナログ基質を用いる酵素的グリコシル化反応における有用な触媒であることが確認された。

筆者は GlcA-1-P を用いた耐熱性グルカンホスホリラーゼによるグルクロニル化反応を利用して多分岐状酸性多糖の合成も行った (図 6)³³⁾。この目的のために多分岐状環状デキストリン (グルカンドロマー, GD) を糖供与体として用いた。これはブランチング酵素 (EC 2.4.1.18) によるアミロペクチンの環化反応によって得られる水溶性デキストリンである³⁴⁻³⁶⁾。GD は多数の α -(1→4)-グルカン非

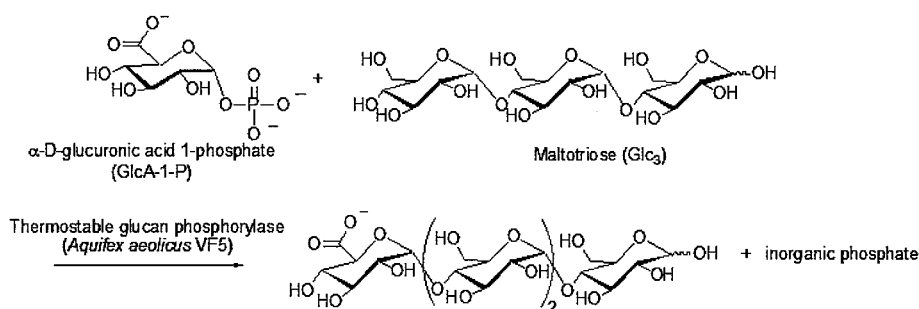


図 4. GlcA-1-P を糖供与体に、Glc₃ を糖受容体に用いた耐熱性グルカンホスホリラーゼ (*Aquifex aeolicus* VF 5) によるグルクロニル化反応

耐熱性グルカンホスホリラーゼ (*Aquifex aeolicus* VF 5) は GlcA-1-P も糖供与体として認識し (馬鈴薯グルカンホスホリラーゼはこの基質を認識しない)、グルクロニル化反応を触媒する。

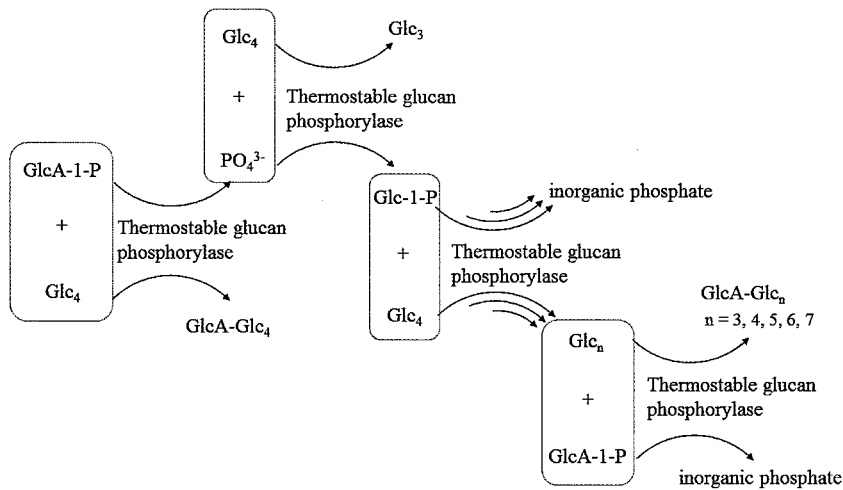


図5. Glc_4 を糖受容体に用いた耐熱性グルカンホスホリラーゼ (*Aquifex aeolicus* VF5) によるグルクロニル化反応での予想される反応経路

Glc_4 を糖受容体に用いたグルクロニル化反応の場合は加リン酸分解も起こるため、マルトオリゴ糖の不均化も進行し、種々の重合度のマルトオリゴ糖の非還元 GlcA 残基を有する生成物が得られる。

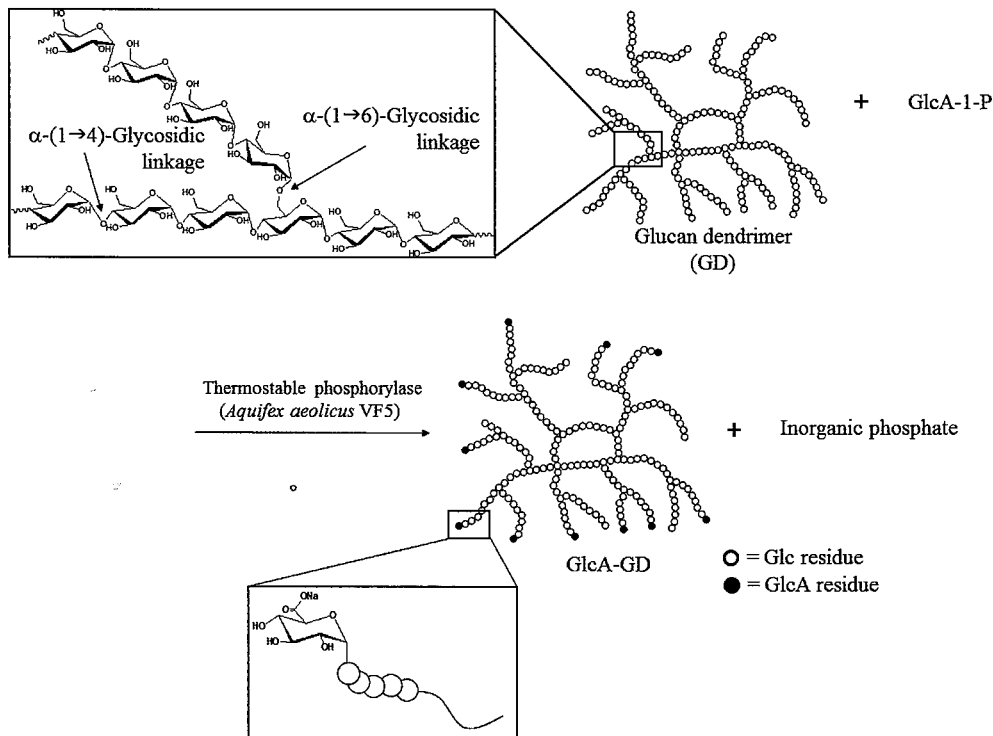


図6. 多分岐状環状デキストリン (グルカンデンドリマー, GD) を糖供与体として用いた耐熱性グルカンホスホリラーゼ (*Aquifex aeolicus* VF5) によるグルクロニル化反応

GD は多数の α -(1 \rightarrow 4)-グルカン非還元末端を有しているため、耐熱性グルカンホスホリラーゼによるグルクロニル化反応のマルチ糖受容体として挙動し、多分岐状酸性多糖が得られる。

還元末端を有しているため、グルカンホスホリラーゼによるグリコシル化反応のマルチ糖受容体として挙動する。グルクロニル化反応は、 GlcA-1-P /非還元末端 = 0.5, 1, 2 の仕込み比で行われ、単離生成物の¹HNMR測定より GlcA 残基の導入が確認された。さらに、 GlcA 残基の存在をより詳細に解析するために生成物をイソアミラーゼ (EC 3.2.1.68) とグルコアミラーゼ/ α -アミラーゼ (EC 3.2.1.3/EC 3.2.1.1) で順次、加水分解して低分子化し、MALDI-TOF MS 測定を行った。その結果、 GlcA-Glc_2 三糖に対応する分子量ピークが確認されたことから、 GlcA 残基を末

端に有する分岐状酸性多糖の生成が確認された。また、¹HNMR 測定から求めた GlcA 残基の導入率は仕込み比に応じて調整できることもわかった。

近年、耐熱性グルカンホスホリラーゼは馬鈴薯グルカンホスホリラーゼと比較して糖受容体に対しても緩い認識性を示すことがわかってきた。このことから、耐熱性グルカンホスホリラーゼによるアナログ基質を用いた連続的なグリコシル化反応の進行が可能であり、非天然型糖鎖を得ることができる。例えば、 Man-1-P を糖供与体、 Glc_3 を糖受容体に用いた耐熱性グルカンホスホリラーゼによるマンノ

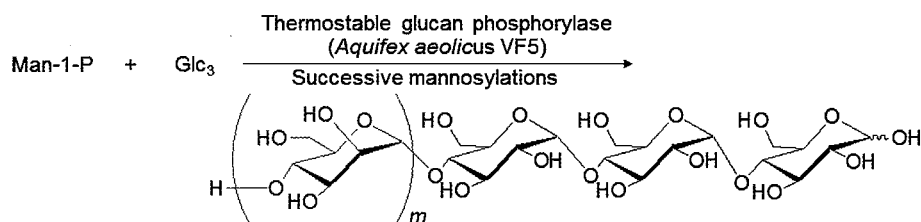


図7. Man-1-Pを糖供与体として用いた耐熱性グルカンホスホリラーゼ (*Aquifex aeolicus* VF5) による連続的マンノシル化反応

耐熱性グルカンホスホリラーゼ (*Aquifex aeolicus* VF5) は糖受容体側にも認識性の緩さを示すため Man-1-P を糖供与体を用いたマンノシル化反応では連続的な転移が起こる。

シル化反応では、Glc₃ 非還元末端から Man 残基の連続的な糖鎖伸長が起こり、 α -(1→4)-マンナン糖鎖を有するオリゴ糖が得られることがわかった (図7)⁷⁾。粗生成物の MALDI-TOF MS 測定結果からは Glc₃ に Man 残基が5つまで転移したオリゴ糖の生成が確認され、HPLCにより単離した六糖生成物の¹HNMR 測定結果からも Man 残基の連続的な転移による糖鎖の生成が支持された。上述のように馬鈴薯グルカンホスホリラーゼによるマンノシル化反応では Man 残基は1つしか転移しないことから、Man 残基を非還元末端に有するマルトオリゴ糖を糖受容体として認識しないと考えられる。これに対して耐熱性ホスホリラーゼは非還元末端が α -(1→4)-マンナン鎖構造であっても糖受容体として認識したことから、受容体側における認識性の緩さも実証され、この酵素が非天然型糖鎖合成において非常に有用であることがわかった。

4. おわりに

本総説では、Glc-1-Pのアナログ基質を糖供与体を用いたグルカンホスホリラーゼによる酵素的グリコシル化反応について概説した。本反応を用いることにより構造明確なオリゴ糖合成が達成された。また、耐熱性グルカンホスホリラーゼは馬鈴薯グルカンホスホリラーゼと比較して基質の認識性に緩さを有するため、より多くのアナログ基質を用いることができ、Man-1-Pを用いた場合は連続的なマンノシル化反応の進行による α -(1→4)-マンナン糖鎖の合成へも適用できた。一方、アナログ基質は有機合成手法によって調製されるため、本稿記載のような研究を行うには有機合成化学の視点からのアプローチが必須である。酵素化学と有機合成化学の両分野の効果的かつ相補的な協力関係により、今後、新規な酵素的グリコシル化反応の開拓と機能性糖鎖合成への更なる発展が期待される。

謝辞

著者は、文献に共著者として記載された共同研究者の献身的な協力に深謝する。

文献

1) H. Paulsen: Advances in selective chemical syntheses of complex oligosaccharides. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **21**, 155-

173 (1982).
 2) R.R. Schmidt: New methods of the synthesis of glycosides and oligosaccharides - Are there alternative to the Koenigs-Knorr methods? *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **25**, 212-235 (1986).
 3) K. Toshima and K. Tatsuta: Recent progress in *O*-glycosylation methods and its application to natural products synthesis. *Chem. Rev.*, **93**, 1503-1531 (1993).
 4) L.K. Mydock and A.V. Demchenko: Mechanism of chemical *O*-glycosylation: from early studies to recent discoveries. *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 497-510 (2010).
 5) S. Kobayashi, H. Uyama and S. Kimura: Enzymatic polymerization. *Chem. Rev.*, **101**, 3793-3818 (2001).
 6) S. Shoda, R. Izumi and M. Fujita: Green process in glycotecology. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **76**, 1-13 (2003).
 7) S. Kobayashi and A. Makino: Enzymatic polymer synthesis: An opportunity for green polymer chemistry. *Chem. Rev.*, **109**, 5288-5353 (2009).
 8) J. Kadokawa: Precision polysaccharide synthesis catalyzed by enzymes. *Chem. Rev.*, **111**, 4308-4345 (2011).
 9) C. Rupprath, T. Schumacher and L. Elling: Nucleotide deoxy-sugars: Essential tools for the glycosylation engineering of novel bioactive compounds. *Curr. Med. Chem.*, **12**, 1637-1675 (2005).
 10) S. Kobayashi: New developments of polysaccharide synthesis via enzymatic polymerization. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **83**, 215-247 (2007).
 11) J. Kadokawa and S. Kobayashi: Polymer synthesis by enzymatic catalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **14**, 145-153 (2010).
 12) M. Kitaoka and K. Hayashi: Carbohydrate-processing phosphorylolytic enzymes. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **14**, 35-50 (2002).
 13) J. Seibel, H.-J. Jördening and K. Buchholz: Glycosylation with activated sugars using glycosyltransferases and transglycosidases. *Biocatal. Biotransform.*, **24**, 311-342 (2006).
 14) J. Kadokawa and Y. Kaneko: *Engineering of polysaccharide materials - by phosphorylase-catalyzed enzymatic chain-elongation*, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Boulevard (2013).
 15) H. Nakai, M. Kitaoka, B. Svensson and K. Ohtsubo: Recent development of phosphorylases possessing large potential for oligosaccharide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17**, 301-309 (2013).
 16) R.J. Fletterick and S.R. Sprang: Glycogen phosphorylase structures and function. *Acc. Chem. Res.*, **15**, 361-369 (1982).
 17) B. Boeck and R. Schinzel: Purification and characterisation of an α -glucan phosphorylase from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, **239**, 150-155 (1996).
 18) M. Yanase, H. Takata, K. Fujii, T. Takaha and T. Kuriki: Cumulative effect of amino acid replacements results in enhanced thermostability of potato type L α -glucan phosphorylase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5433-5439 (2005).
 19) M. Yanase, T. Takaha and T. Kuriki: α -Glucan phosphorylase and its use in carbohydrate engineering. *J. Food Agric.*, **86**, 1631-1635 (2006).
 20) G. Ziegast and B. Pfannemüller: Phosphorolytic syntheses with di-, oligo- and multi-functional primers. *Carbohydr. Res.*, **160**, 185-204 (1987).
 21) K. Fujii, H. Takata, M. Yanase, Y. Terada, K. Ohdan, T. Takaha, S. Okada and T. Kuriki: Bioengineering and application of novel glucose polymers. *Biocatal. Biotransform.*, **21**,

- 167-172 (2003).
- 22) J. Kadokawa: Synthesis of amylose-grafted polysaccharide materials by phosphorylase-catalyzed enzymatic polymerization. *ACS Symp. Series*, **1105**, 237-255 (2012).
- 23) J. Kadokawa: Synthesis of new polysaccharide materials by phosphorylase-catalyzed enzymatic α -glycosylations using polymeric glycosyl acceptors. *ACS Symp. Series*, **1144**, 142-161 (2013).
- 24) J. Kadokawa: Synthesis of non-natural oligosaccharides by α -glucan phosphorylase-catalyzed enzymatic glycosylations using analogue substrates of α -D-glucose 1-phosphate. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **25**, 57-69 (2013).
- 25) B. Evers and J. Thiem: Further syntheses employing phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 857-863 (1997).
- 26) B. Evers, P. Mischnick and J. Thiem: Synthesis of 2-deoxy- α -D-arabino-hexopyranosyl phosphate and 2-deoxy-maltooligosaccharides with phosphorylase. *Carbohydr. Res.*, **262**, 335-341 (1994).
- 27) M.D. Percival and S.G. Withers: Application of enzymes in the synthesis and hydrolytic study of 2-deoxy- α -D-glucopyranosyl phosphate. *Can. J. Chem.*, **66**, 1970-1972 (1988).
- 28) M. Nawaji, H. Izawa, Y. Kaneko and J. Kadokawa: Enzymatic synthesis of α -D-xylosylated maltooligosaccharides by phosphorylase-catalyzed xylosylation. *J. Carbohydr. Chem.*, **27**, 214-222 (2008).
- 29) M. Nawaji, H. Izawa, Y. Kaneko and J. Kadokawa: Enzymatic α -glucosaminylation of maltooligosaccharides catalyzed by phosphorylase. *Carbohydr. Res.*, **343**, 2692-2696 (2008).
- 30) S. Kawazoe, H. Izawa, M. Nawaji, Y. Kaneko and J. Kadokawa: Phosphorylase-catalyzed *N*-formyl- α -glucosaminylation of maltooligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, **345**, 631-636 (2010).
- 31) S.H. Bhuiyan, A.A. Rus'd, M. Kitaoka and K. Hayashi: Characterization of a hyperthermostable glycogen phosphorylase from *Aquifex aeolicus* expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **22**, 173-180 (2003).
- 32) Y. Umegatani, H. Izawa, M. Nawaji, K. Yamamoto, A. Kubo, M. Yanase, T. Takaha and J. Kadokawa: Enzymatic α -glucuronylation of maltooligosaccharides using α -glucuronic acid 1-phosphate as glycosyl donor catalyzed by a thermostable phosphorylase from *Aquifex aeolicus* VF 5. *Carbohydr. Res.*, **350**, 81-85 (2012).
- 33) Y. Takemoto, H. Izawa, Y. Umegatani, K. Yamamoto, A. Kubo, M. Yanase, T. Takaha and J. Kadokawa: Synthesis of highly branched anionic α -glucans by thermostable phosphorylase-catalyzed α -glucuronylation. *Carbohydr. Res.*, **366**, 38-44 (2013).
- 34) H. Takata, T. Takaha, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka: Cyclization reaction catalyzed by branching enzyme. *J. Bacteriol.*, **178**, 1600-1606 (1996).
- 35) H. Takata, T. Takaha, S. Okada, S. Hizukuri, M. Takagi and T. Imanaka: Structure of the cyclic glucan produced from amylopectin by *Bacillus stearothermophilus* branching enzyme. *Carbohydr. Res.*, **295**, 91-101 (1996).
- 36) H. Takata, T. Takaha, H. Nakamura, K. Fujii, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka: Production and some properties of a dextrin with a narrow size distribution by the cyclization reaction of branching enzyme. *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 119-123 (1997).
- 37) R. Shimohigoshi, Y. Takemoto, K. Yamamoto and J. Kadokawa: Thermostable α -glucan phosphorylase-catalyzed successive α -mannosylations. *Chem. Lett.*, **42**, 822-824 (2013).

質疑応答

[質問] 近大・農 大沼
 α -1,4 結合でつながった多糖は安定なのか。また、そのような糖は天然に存在するのか。

[回答]
 本反応で得られた程度の重合度のものなら安定です。重合度が大きくなった場合の安定性は不明です。構成単糖残基の種類によりますが、ほとんど天然に存在しないと思います。

[質問] 大阪市工研 村上
 非天然型のオリゴ糖は、従来型のオリゴ糖 (キチンなど) と比較して物理化学的性質に特徴や差異はあるのか。

[回答]
 現在のところ物理化学的特徴については検討していませんので分かりません。今後の検討課題です。

[質問] 信州大・工 天野
 連続的にグリコシル化するためには、生成物やリン酸を除去する方法が有効ではないか。

[回答]
 ご指摘の通り、生成するリン酸が反応を阻害していて、途中でグリコシル化が止まると考えられます。現在、リン酸を除去しながら反応を進める系を検討中です。

[質問] 食総研 北岡
 フッ化糖を基質に利用する可能性はあるのか。また、反応のスケールアップを考えたとき、酵素と基質の合成のどちらがネックになるのか。

[回答]
 確かにグルカンホスホリラーゼはフッ化糖も認識することが知られています。しかし、フッ化糖は糖 1-リン酸基質と比較して合成は容易ですが認識性は格段に低いので、用いる糖残基、目的物等によってどちらを用いた方がよいか決まると思います。糖 1-リン酸の合成には多段階の反応ステップが必要で収率も低いので、スケールアップのためには基質合成がネックになると思います。いかに高収率で基質を得るかが求められます。