

# 事業報告書

2019年4月1日

2020年3月31日

## 事業の概要

当研究所は、我が国化学工業界のパイオニアであり旧日窒コンツェルンの創始者である故野口遵がその私財を投じて1941年に設立した研究所である。設立趣旨は「化学工業の振興を期するため、諸般の研究並びに調査を行うとともに広く重要な研究に対し援助をなし、なお研究者の養成、発明・考案の工業化にも力を注ぐ…」と、設立当時の要請にこたえるものとなっている。この精神を尊重しつつ、今日の社会ニーズにこたえるような基礎的研究と人材育成を目的として公益のための事業を行っている。

活動は研究事業、研究助成事業および人材育成事業からなっている。

研究事業については糖鎖バイオロジー分野を研究領域と定め、取り組んでいる。

この研究領域で長年の歴史のある糖鎖合成技術、構造解析技術に加えて糖鎖機能解析技術にも重点を置いている。この3つの技術を併せ持つことを当研究所の強みとして基礎的研究を進めている。

これまで重点テーマとしてモデル糖タンパク質の糖鎖を人為的に均一改変する技術（糖鎖リモデリング技術）の構築を進めてきた。この研究で蓄積した技術を応用して第2世代の抗体医薬として期待されている抗体薬物複合体(ADC)創製につながる研究を開始し、2種類の方法につき可能性を見出した。今後、細胞障害性薬物の導入などの検討を進める。

上記の合成系の研究のほか、疾患と糖鎖修飾の関わりに関する研究や糖構造を有する生理活性物質の探索研究にも継続して力を入れ、疾病克服の一翼を担うことを目指している。今年度は悪性度の高い胃がん細胞の腹膜播種の過程で糖鎖結合たんぱく質の一種であるガレクチン分子が重要な役割を果たしていることを動物実験により突き止めた。引き続きメカニズムの解明に取り組む。

また、糖鎖研究を支援するため、競争的資金を活用したデータベース開発プロジェクトに参画し、糖タンパク質データベースの構築にも注力している。

研究成果は学会報告、論文投稿を実施するとともに、取得特許をホームページに掲載、及び野口研究所時報に掲載し配布するなどして、成果を広く使っていただく事を目指して活動している。

研究助成事業は、挑戦的な若手研究者を支援するために野口遵研究助成事業を継続している。本年度は「ライフサイエンス」、「エネルギー・資源・環境」及び「新しい電子材料・デバイス」の3課題で募集し、164名の応募の中から13名に助成金を授与した。本年度の野口遵賞は2015年度の助成者である東北大学の内田健一氏に贈呈した。受賞テーマ名は「磁性・スピントロニクス材料がもたらす革新的熱エネルギー制御原理・技術の開拓」であった。

野口遵研究助成事業は創設10周年を迎え、これを記念して10周年記念講演会を開催した。基調講演には旭化成(株)名誉フェローの吉野彰氏に、また講演を5名の採択者の方をお願いしたが、約150名の聴衆を集め盛会のうちに実施することができた。

なお研究助成金採択者および野口遵賞受賞者に対する贈呈式を3月に予定していたが、新型コロナウイルス感染拡大防止の観点より延期し、2020年度の贈呈式と共に合同開催することとした。

人材の育成については大学への講師派遣4名、卒業研究生2名の受け入れを継続して実施した。

財政面について、当研究所の運営費は資産運用収入を柱に寄付金、公的機関からの競争助成金等で賄っている。長引く低金利の影響で、これまでの債券による資産運用では運営資金を確保することが難しくなってきたため、満期償還を迎えた債券を上場投資信託(ETF)に切り替えている。今年度は17億円をETF購入にあてた。

今年度の現金収支について、支出面では人件費や消費税アップなどの増加要因があったが経費削減に努め支出総額を削減することができた。収入面では保有債券の6割を占める豪ドル建て債券の収入が円高により大幅な収入減少となったが、現金収支は辛うじてプラスを確保した。

## 事業の内容

### 1. 研究事業

#### 1) 糖鎖工学研究

##### 1)－1 糖鎖リモデリング法の開発と抗体上の糖鎖機能解明

糖鎖を自由にデザインした糖タンパク質が合成できれば、学問的には糖鎖の構造と機能の相関や、バイオ医薬品等の開発、改良ターゲットの明確化が期待できる。我々はバイオ医薬品の中でも隆盛を極め分子内一か所のみ不均一なN結合型糖鎖を有する抗体医薬にフォーカスし、糖鎖リモデリング法により均一な糖鎖を持つ各種抗体分子を調製し、糖鎖構造と活性の相関を解析してきた。糖鎖リモデリング法とはまず酵素反応を利用して、糖タンパク質の糖鎖を切除し、G1cNAc一個のみを有する均一なタンパク質部分を調製する(これをアクセプターと呼ぶ)。一方、別途人為的に調製した任意の糖鎖を用意し(これをドナーと呼ぶ)、このアクセプターとドナーを酵素反応を利用して人為的に連結し、目的物を分離精製する。これにより、任意の糖鎖構造を持った均一な糖タンパク質を自由自在に合成できる。これまでに高マンノース糖鎖、バイセクティング糖鎖、多分岐糖鎖等を含めた28種(25種はSGPより誘導)のドナー糖鎖を酵素・化学的手法で合成し、抗Her2抗体(ハーセプチン)or抗CD20抗体(リツキサン)由来のアクセプターと連結させ40種以上の高純度の均一糖鎖抗体を創製した。そして其々活性評価を実施し、糖鎖構造と機能に関する種々の重要な知見を得て報告してきた。(PLOS ONE誌2015、BBB誌2018、Mab誌2019<国衛研との共同>Glycobiology誌2020 accept)。

今年度は懸案であった一本鎖糖鎖搭載抗体の創製、評価が漸く完了し、これまでの糖異性体評価結果と併せ、抗体の機能において少なくともFcγRIIIaとの結合、ADCC活性発現に関しては複合型2本鎖のうちα1-6側糖鎖のみがあれば必要十分である事を結論づけた。(現在論文投稿準備中)

##### 1)－2 リモデリング技術を活用した抗体医薬の機能向上、改善へ向けた研究。

###### ・ADCC活性の向上へ向けた探索

上記研究過程において我々は天然型糖鎖のみならず非天然型糖鎖であるPEG化糖鎖、アジドPEG化糖鎖も同リモデリング法により抗体の糖付加部位に連結可能である事、PEG化糖鎖搭載抗体もADCC活性を保持している事を見出した。今後、クリックケミストリーを活用し、アジドPEG化糖鎖

搭載抗体に各種官能基を導入し、活性向上の可能性を探っていく。

・抗体薬物複合体（ADC）創製スキャットホルド（足場）の探索

ADCとは抗体医薬品に細胞障害性低分子医薬品等をリンカーを介して結合させた両医薬の利点を併せ持つ複合体であり第二世代の抗体医薬として期待されている。すでにグローバルに6品目（国内は4）が上市され、多くの新規品目が開発されつつある。ADC創製においては抗体分子の特定部位に、特定数の薬剤を搭載させる事が望まれている。しかしながら抗体分子上多数存在するシステイン残基 or リジン残基を主な結合部位とする現行法では部位及び薬物搭載数の制御が困難である。我々は両制御を可能とする技術として、抗体分子中1か所のみ存在する糖鎖付加部位に種々のアジド基含有糖鎖誘導体を搭載させたものをスキャットホルドとし、クリックケミストリーを活用して薬剤を連結する方法の検討を開始した。現在足場としては（1）上述のアジド化PEG糖鎖誘導体と（2）G2糖鎖を酵素-化学的にアジド化したものの2種を考えている。（1）に関してはアジド化PEG5糖鎖誘導体搭載リツキサンのアジド基に蛍光物質をモデル薬剤として導入し、抗原発現細胞特異的な発光を予備的に確認した。今後は細胞障害性薬剤の導入、特異的細胞障害活性を確認した後、PEG鎖の鎖長、導入アジド基の数等を検討しスキャットホルドの最適化を図っていく（一部は共同研究）。（2）に関してはモデル基質によるG2糖鎖の酵素-化学的手法による位置選択的修飾が確認できた。今後はアジド基含有誘導体の合成、G2糖鎖搭載抗体への付加修飾、クリックケミストリーを活用した薬剤導入、活性評価を順次進め、スキャットホルドとしての総合的性能を見極める。

1)－3 複数個所に糖鎖を有する糖タンパク質、糖ペプチドのリモデリング法の開発

一般に糖タンパク質は複数個所で糖鎖付加が起こっており、それぞれの糖鎖機能を解明するには特定の箇所に特定の糖鎖を付加できる技術が必要となる。上記抗体に適用したリモデリング技術では複数の付加部位を有する糖タンパク質への適用は困難と考えられる。GlcNAc-Asnもしくはその前駆体をタンパク質、ペプチドの特定部位に導入できれば上記のアクセプターとドナーの酵素連結反応により特定部位に特定糖鎖構造を有する糖タンパク質、糖ペプチドの合成が可能となる。我々は脱保護法の異なる2種の保護基を有するGlcNAc-Asnを利用して特定箇所に異なる糖鎖構造を有するモデル糖ペプチドを合成する事に成功している。また、GlcNAc-Tyrに関しては化学的にtRNAに連結させた後、in vitroの翻訳システムによりタンパク質に導入可能であることを確認した（北陸先端大との共同研究）。今後はGlcNAc-Asnへの変換可能な前駆体の探索、直行系のアミノアシルtRNA合成酵素-tRNAの探索等を通して複数個所の糖鎖リモデリング技術の確立を目指す。

2) 疾患と糖鎖の関連解析研究

2)－1 癌と糖鎖の研究

我々は糖鎖伸長に関わる特定の糖転移酵素である $\beta$ 4GalNAc-T4、 $\beta$ 4GalNAc-T2がそれぞれ乳がん細胞悪性形質の抑制、腎がん細胞の悪性化等に寄与する事を、当該遺伝子高発現細胞を用いて解明してきた。また今年度、悪性度の高い胃がん細胞の腹膜播種の過程で糖鎖結合タンパク質の一種であるガレクチン分子が重要な役割を果たしている事を、当該遺伝子を欠損させた細胞を用いた動物試験により突き止めた。有望な新規創薬標的の発掘、新規治療法考案の糸口となる知見を得るべく、引き続き種々の切り口でこれら乳がん、腎がん、胃がん細胞に上記形質変換を引き起こすメカ

ニズムの解析を実施する。更に癌の診断、治療の新たな標的候補となる疾患特異的なグライコフォームを有する糖タンパク質を特定する事を目指し、グライコプロテオミクス (GP) アプローチによる探索研究を開始した。まずはエクソソームの膜糖タンパク質で、癌との関連性が種々報告されているテトラスパニンファミリーにフォーカスし、悪性形質を獲得した細胞とその親細胞それぞれが放出するエクソソーム間で当該タンパク質由来のN結合型糖ペプチドの比較解析を行う事を計画し準備を進めている。将来的にはO結合型糖ペプチド解析法も含めた解析技術のブラッシュアップを行い、エクソソームの膜糖タンパク質全体、更には細胞膜総糖タンパクへと GP 解析の幅を拡張し、新たな標的分子の発掘に挑む。抗体医薬を含めた創薬標的の枯渇が叫ばれて久しいが、GP アプローチは従来のオミックス手法では見逃されて来た標的を発掘できる可能性を秘めた手法であると期待される。

## 2) - 2 骨格筋領域の疾患と糖鎖

加齢に伴い全身の筋量、筋力が低下するサルコペニア (近年疾患として認知) の診断、予防、治療に繋がる知見を提供すべく、糖鎖を切り口とした本病態の発症、進行進展のメカニズム探索研究を実施している。まずは本病態と糖鎖の関連を検証すべく骨格筋モデル細胞で糖鎖関連酵素の発現が異なる細胞株群を樹立した。今後これらの細胞の機能、糖鎖構造の解析等を実施し仮説を検証する。その後、重要糖タンパク質の同定作業、メカニズム解析等を実施していく。

### 糖鎖有機化学研究室 :

糖・複合糖質・糖タンパク質合成に向けた、有機合成・酵素合成の要素技術研究、及び糖・糖タンパク質糖鎖の質量分析による構造解析技術研究を行っている。また、インフォマティクス技術を活用し、糖質科学支援システムであるグライコナビ TM の開発も行っている。(2019 年度の年初計画)

- ①グライコプロテオミクス解析手法の確立を目指した技術開発を行う。
- ②糖タンパク質、及び糖ペプチドの効率的合成法の開発を行う。
- ③非天然アミノ酸のタンパク質への導入技術を用いて、タンパク質を糖鎖で修飾するための要素技術研究を行なう。
- ④ENGase の糖鎖転移活性を利用した位置選択的なタンパク質の PEG 化法の開発を行う。
- ⑤PEG 化糖鎖を有する均一抗体の創製検討と機能評価、及びその応用。
- ⑥JST・統合化推進プログラムとして実施している「糖鎖科学ポータル構築」において糖鎖構造リポジトリの基盤となる、糖質構造の文字列表記「Web3.0 Unique Representation of Carbohydrate Structure (WURCS)」の開発および複合糖質構造の整理・データベース化を行う。
- ⑦糖鎖技術の普及に向けて、分野の異なる研究者を含め糖質研究をサポートする「糖質科学支援システム」“グライコナビ TM” のコンテンツを拡充するため、糖タンパク質データベースの開発を行う。
- ⑧ボロン酸誘導体を用いた質量分析法による新規糖鎖構造解析法の開発を行う。
- ⑨ $\alpha$ -ジストログリカン糖鎖関連化合物等、生化学的知見に有用な糖質誘導体の合成を行う。
- ⑩糖質科学の研究進展に寄与する新規技術の探索研究を行う。

(今期の成果)

グライコプロテオミクス解析手法の確立を目指した研究に関しては、①O-結合型糖タンパク質のグライコプロテオミクス解析手法の開発、及び②癌細胞由来エクソソーム上のN-結合型糖タンパク質のグライコプロテオミクスを行った。①に関しては、市販のホエイプロテインから得られる糖ペプチドライブラリーを用いて、エンドグリコシダーゼとO結合型糖鎖認識プロテアーゼの活性の評価を行い、グライコプロテオミクスに有効なMS測定技術と消化酵素の開発に成功した。さらに、O結合型糖鎖のグライコミクスで使用されているBEP ( $\beta$ -elimination pyrazolone)法の改良を行い、ピーリング反応の少ない糖鎖切断効率の良い手法の開発にも成功した。②に関しては、癌細胞由来エクソソームのエクソソームマーカーである膜4回貫通型タンパク質CD9、CD63のターゲットグライコプロテオミクスを行い、それぞれのLC-MSによる解析方法を確立した。また、エクソソーム及び細胞から膜タンパク質を抽出し、CD63及びCD9を免疫沈降にてエンリッチする手法を確立した。

糖タンパク質、及び糖ペプチドの効率的合成法の開発としては、糖水酸基をtert-ブトキシカルボニル(Boc)基で保護した、簡便かつ高収率な糖ペプチド合成法の開発を行っている。本年度は本手法のフコシルペプチド合成への応用を検討し、最終脱保護時における $\beta$ 脱離等の副反応をほぼ抑制できることを明らかにした。

非天然アミノ酸のタンパク質への導入に関する研究に関しては、無細胞タンパク質合成系を用い、非天然型糖アミノ酸のタンパク質への導入に成功した。また非天然型糖アミノ酸の糖部位に対してグライコシターゼによる糖鎖転移反応が進行することが明らかとなった。

タンパク質の位置選択的なPEG化法、及びPEG化糖鎖を有する均一抗体の創製に関して、本年度は本手法を用いた抗体への位置選択的な薬物の導入、すなわち位置選択的に薬物が導入された抗体薬物複合体(ADC)の合成法の開発を目的に、①PEG化糖オキサゾリンのPEG末端をアジド基で修飾した「アジドPEG化糖オキサゾリン」の合成、②抗体への位置選択的なアジド基の導入及びクリックケミストリーによるアジド基への基質の導入の検討を行った。アジドPEG化糖オキサゾリンの合成に関しては、昨年度までに予試験的には成功した。しかし収率や精製工程に一部問題があることも明らかとなったので、本年度はグラムスケール合成に適した合成ルートの見直しと最適化の検討を行った。その結果、①に関しては目的とするアジドPEG化糖オキサゾリンの1工程前の化合物まで、合成工程を確立することに成功した。②に関してはアジドPEG化糖オキサゾリンの抗体への導入に関しては、昨年度合成したアジドPEG化糖オキサゾリンを用い、ENGaseによりリツキシマブへの導入を行い、目的とするアジドPEG化リツキシマブの合成に成功した。さらに、得られたアジドPEG化リツキシマブに対してクリックケミストリーにより蛍光基の導入にも成功した。このようにして調製された蛍光化リツキシマブはCD20抗原を有する細胞に選択的に作用することが明らかとなり、アジドPEG化リツキシマブがADCの前駆体となりうる可能性が示唆された。

JST・統合化推進プログラム「糖鎖科学ポータル構築」に関しては、WURCSを活用したツール、複合糖質表記法、糖鎖構造の可視化ツールの開発を実施した。さらに糖鎖構造リポジトリGlyYouCanおよび糖鎖科学ポータルGlyCosmosの開発を実施した。また、糖鎖科学ポータルGlyCosmosが日本糖質学会に公認された。

糖タンパク質データベースの開発に関しては、“グライコナビTM”のコンテンツとして、疾患糖

鎖データベース、糖鎖立体構造データベースの開発を実施した。

ボロン酸誘導体を用いた新規糖鎖構造解析法の開発に関しては、有機ボロン酸のジオールと結合する性質を利用し、通常の質量分析法やNMRでは識別が困難な糖異性体を識別できる、高感度かつ特異性の高い質量分析法の開発を行っている。本年度は、昨年度選定した糖鎖と親和性の高い有機ボロン酸を用い、2糖の糖鎖ライブラリーを用いた異性体識別能や糖鎖結合能に関する評価を行い、論文化のためのデータ解析を行った。

有用な糖質誘導体の合成に関しては、AMED「難治性疾患実用化研究事業」の一環として、 $\alpha$ -ジストログリカンの糖アミノ酸ユニットである Man-Thr の合成を行った。

新規技術の探索研究に関しては、複合型糖鎖の非還元末端の新規修飾法開発を行った。高い薬物抗体比を有する抗体薬物複合体の開発を目的として、抗体ヘアジド基を8個、または16個導入する方法の開発を行った。その結果、モデル物質として用いた糖ペプチドに対して、アジド基4個（抗体の場合のアジド基8個に相当）を導入することに成功した。

#### 糖鎖生物研究室：

癌などの疾患や加齢に伴う糖鎖構造変化を捉え、その構造変化の果たす役割並びに分子機構の解明により、有用なバイオマーカーの発見、更には疾患の予防・治療に関する新たな情報を提供する。

（2019年度の年初計画）

- ①LDN糖鎖による乳癌進行抑制メカニズムを解明する。
- ②患者癌細胞CTOS由来、癌細胞株由来および精漿由来PSAのグライコフォームの比較解析により見出された癌性変化に関連する可能性のあるグライコフォームに関し、新たな癌マーカーとしての可能性を検証する。
- ③GalNAc-DSLc4及びその合成酵素と腎癌悪性化との関連を解明するため、エクソソームの役割に着目しその関与を調べる。
- ④特定の組織の癌で異所的に発現が亢進するガレクチン-4に着目し、ガレクチン-4の癌転移・線維化に関与するメカニズムを解明する。
- ⑤骨格筋の機能変化における糖鎖の役割に関する仮説を証明するために、細胞ならびに動物を用いた解析を行う。
- ⑥リモデリング技術を活用した抗体医薬の機能向上、改善へ向けた探索。
- ⑦確立した均一糖鎖構造を持つ糖タンパク質調製法を応用し、標的糖タンパク質を拡充すると共に、機能物質を有する糖タンパク質を調製して性質検討を行なう。

（今期の成果）

LDN (LacdiNAc) 糖鎖による乳癌進行抑制メカニズムに関する研究は、LDN 生合成酵素の  $\beta$  4-N-acetylgalactosaminyltransferase4 遺伝子強制発現乳癌細胞株を用いることで対照株に比して悪性形質が抑制されることを明らかにしてきた。今年度は、上記細胞における形態変化に着目し、LDN糖鎖の発現増大が細胞に及ぼす影響について解析を進め、この糖鎖の増大によって乳癌細胞の間葉-上皮移行が誘導されることを明らかにした。

癌性変化に関連するグライコフォームに関する研究では、前立腺癌患者由来 CTOS (Cancer

tissue-originated spheroid) および前立腺癌細胞株由来 PSA に共通に存在し、健常人精漿由来 PSA にはほとんど存在しないグライコフォームを Con A レクチンカラムを利用して分離することに成功した。その後、種々のレクチンカラムでの分析や質量分析等により、高分岐糖鎖型および無糖鎖型 PSA を新たな癌マーカー候補として見出した。しかし、合成抗原による家兔免疫によって無糖鎖型 PSA 特異抗体の取得を目指したが目的とする抗体が得られなかった為、新たな前立腺癌スクリーニング方法の開発は断念し、それまで得られた結果をまとめて論文化を行った。

GalNAc-DSLc4 と腎癌悪性化に関する研究は、GalNAc-DSLc4 安定発現株が分泌するエクソソームに着目し、腎癌の肺転移における GalNAc-DSLc4 糖鎖抗原の「がん微小環境」構築への関与について検討を進めてきた。今年度は、血管内皮細胞へのエクソソーム添加実験から GalNAc-DSLc4 安定発現株由来エクソソームがコントロールに比べて細胞の増殖を強く阻害することを明らかとし、real-time qPCR 解析結果からも細胞周期関連遺伝子の発現変化を確認することができた。また、免疫系細胞に与える影響について検討を開始し、NK92 細胞と腎癌細胞株との共培養実験により悪性腎がん細胞株由来のエクソソームが NK92 細胞の細胞障害活性を低下させることを明らかにした。

癌転移・線維化とガレクチンに関する研究では、腹膜播種能を有し悪性度の高い胃癌細胞に高発現するガレクチン-4 の悪性形質への関与を調べている。今年度は、CRISPR-Cas9 システムによって作製したガレクチン-4 ノックアウト細胞に加え、遺伝子導入によりガレクチン-4 を再発現させたレスキュー株の作製も行った。これらの細胞をマウスの腹腔に投与して腹膜播種試験を行うと共に、株間で発現の変化する分子の探索や腹膜播種に関与する細胞の性質を調べることにより、ガレクチン-4 の腹膜播種への関与機構を様々な側面から解析した。

骨格筋の機能変化と糖鎖の役割に関する研究は、加齢により進行性かつ全身性に筋肉量および筋力が低下するサルコペニアなどの骨格筋領域の疾患について、その発症や進展における糖鎖の役割を明らかとして予防や治療に関する情報を提供することを目的として進めている。今年度は、糖鎖関連酵素遺伝子をノックダウンさせた筋芽細胞株を樹立することができ、現在仮説を検証するためにこれらの細胞の機能や糖鎖構造の解析等を実施している。

HGP プロジェクトは昨年度末に終了したが、今年度は成果の論文化に向けて各種作業を実施した。多分岐糖鎖を有する抗体の調製については、ENGase およびその変異体と多分岐糖鎖オキサゾリンを用いた糖転移反応の至適化の検討とラージスケールでの調製を行った。G3a 型 3 本鎖糖鎖、G3b 型 3 本鎖糖鎖および G2B 型 bisecting GlcNAc 含有糖鎖は、それぞれ EndoS2 D182Q 変異体、EndoF3 D165Q 変異体および EndoF3 を用いてコアフコースを有する抗 CD20 抗体 (リツキシマブ) アクセプターに対する糖転移反応を実施し、各反応とも 8~9 割の効率で当該糖鎖を転移させることができた。また G4 型 4 本鎖糖鎖の転移は EndoF3 を用い、反応系に経時的にオキサゾリン基質を追加することで効率良く抗体アクセプターに当該糖鎖を転移させ、均一糖鎖構造を有する抗体を調製することができた。また、コアフコースを有さない G0 型糖鎖含有抗 HER2 抗体 (トラスツズマブ) に対して各種糖転移酵素を作用させることで多分岐糖鎖を有する抗体を調製する手法については、今年度は新たに 4 本鎖糖鎖を有する抗体 1 種に関して純度を高めたものを取得し、3 本鎖糖鎖を有する抗体 4 種および 4 本鎖糖鎖を有する抗体 2 種の調製が完了した。これら調製した多分岐糖鎖を有する抗体の表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による Fc $\gamma$  レセプターとの相互作用解析では、新たにセンサーチップ側に Fc $\gamma$  レセプターを捕捉し希釈系列を作った抗体を送液する形での測定系を採用し、2 本鎖糖

鎖を有するトラスツズマブと解離定数を比較した。また、糖鎖間で構造的に異性体関係にある各種均一糖鎖抗体を調製して生物活性評価を行う研究では、トラスツズマブをターゲット抗体として新たに1本鎖糖鎖を有する抗体の調製も進め、SPR法によるFc $\gamma$ レセプターとの相互作用解析を実施した。これら分岐異性体糖鎖を有するトラスツズマブは、HER2高発現乳がん細胞株であるSK-BR-3をターゲットとした抗体依存性細胞障害（ADCC）活性測定によってG2、G0またはM3糖鎖を有するトラスツズマブとの活性比較を実施した。

これまでに確立してきた均一糖鎖抗体創製技術を活用し、糖鎖有機化学研究室で開発および合成したポリエチレングリコール（PEG）化糖鎖の非還元末端側にN<sub>3</sub>基を結合させたオキサゾリン誘導体の抗体糖鎖結合部位への導入を検討した。さらにN<sub>3</sub>基を介したヒュスゲン環化付加反応により糖鎖結合部位に化合物を導入した抗体も調製し、培養細胞を用いた実験へと展開した。

また糖鎖有機化学研究室が調製したホエイ由来のO型糖鎖含有糖ペプチドなどの解析に用いる新規のムチン分解酵素3種類を大腸菌発現させ、その調製と活性の確認を行った。その結果、これらの酵素にはNeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc-あるいはGal $\beta$ 1,3GalNAc-といったO型糖鎖が結合したSer/Thr近傍のペプチド結合を切断する活性が認められた。

## 1-2 その他

当研究所はフルオラス科学の研究振興を継続して支援している。2019年度は、フルオラス科学研究会第12回シンポジウムを名城大学松儀真人教授にご尽力いただき、10月18日名城大学天白キャンパス・タワー75にて開催した。（別添資料1）

## 1-3 大学等公的機関及び企業との共同研究

（競争的委託研究事業）

- ・国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）ライフサイエンスデータベース統合推進事業（統合化推進プログラム）

研究開発課題名：糖鎖科学ポータル構築

- ・国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）「難治性疾患実用化研究事業」

研究開発課題名：新規修飾体リビトールリン酸の病態生理機能に着目した福山型筋ジストロフィーの発症機序の解明と治療法の開発

- ・国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」

研究開発課題名：革新的中分子創薬技術の開発／中分子シミュレーション技術の開発

- ・科学研究費補助金 基盤研究（B）

研究開発課題名：老化現象の解明に資する、オープンデータを体系的に利用した知識推論基盤構築



- ・ 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果公開促進費（データベース）  
データベース名称：グライコナビ

（共同研究）

- ・ 旭化成株式会社（上期で終了）
- ・ 旭化成ファーマ株式会社
- ・ 大阪府立病院機構（井上正宏部長）
- ・ 東京化成工業株式会社
- ・ 北陸先端科学技術大学院大学（芳坂貴弘教授）
- ・ 大阪大学大学院理学研究科（深瀬浩一教授）
- ・ 慶応義塾大学医学部百寿総合研究センター（佐々木貴史講師）
- ・ 東京都健康長寿医療センター研究所老化機構研究チーム（遠藤玉夫シニアフェロー）
- ・ 東海大学工学部応用化学科（稲津敏行教授）
- ・ 北海道大学大学院医学研究科（古川潤一特任准教授）
- ・ 国立精神・神経医療研究センター（武田伸一理事）
- ・ 国立医薬品食品衛生研究所（橋井則貴室長）
- ・ 東京大学医科学研究所（山梨裕司教授）
- ・ 立命館大学（松村浩由教授）

## 2. 研究助成事業

### 2-1 野口遵研究助成金

2009年度より野口遵研究助成金を始めた。本助成金は国内の大学またはそれに準じる研究機関に所属する39歳以下の若手研究者を対象に、ライフサイエンス、エネルギー・資源・環境、新材料・デバイスの3分野で募集し、2019年度は164件の応募の中から13件に第11回助成金を贈呈した。（別添資料2）

本助成金の採択者は11年間で延べ150人となった。過去の採択者のその後の調査では、職位の上がった研究者、各種の賞の受賞者も多くみられ若手研究者の研究を助成するという本助成金の趣旨にそった成果が得られつつある。本年度より、多様な雇用形態に対応し、よりフレッシュな研究者や女性研究者の応募拡大を図るため、非常勤でも応募可能とした。その結果、女性の応募者数の大きな増加がみられた。

2020年度も野口遵研究助成金を継続する。

### 2-2 野口遵賞

2014年度に「野口遵賞」を新設した。「野口遵賞」の設置目的は、過去の助成者の中から、特に優れた実績をあげている研究者に贈呈し、更なる研究の発展を支援することである。2019年度は2015年度、2016年度の採択者の中から東北大学の内田健一氏に「第6回野口遵賞」を贈呈した。

## 2-3 10周年記念講演会

本研究助成制度は10周年を迎えその記念事業として講演会を開催した。副題を「若き挑戦者とともに化学の力で未来を動かそう」とし、過去の採択者5名に講演を依頼し化学の未来を考える機会を提供した。基調講演は本助成金の選考委員を務める、リチウムイオン電池の発明と事業化の功績をもつ旭化成(株)名誉フェローの吉野彰氏に依頼した。この一ヶ月後ノーベル化学賞を受賞され時宜に適った講演会となった。

## 3. 人材育成事業

化学者の育成は当研究所の設立趣意書にも記載されている重要な使命の一つである。2019年度は2名の卒業研究等の指導を行った。また、非常勤講師として研究員4名を各大学に派遣し、化学系技術者の教育・育成活動に努めた。(別添資料3)

## 4. 研究の成果 (別添資料4)

### (1) 特許出願関係

- |          |                |
|----------|----------------|
| ・ 国内特許出願 | 3件 (うち共同出願 1件) |
| ・ 国内特許公開 | 0件 (うち共同出願 0件) |
| ・ 国内審査請求 | 4件 (うち共同出願 2件) |
| ・ 国内特許登録 | 3件 (うち共同出願 0件) |
| ・ PCT出願  | 1件 (うち共同出願 0件) |
| ・ 外国特許出願 | 0件 (うち共同出願 0件) |
| ・ PCT公開  | 0件 (うち共同出願 0件) |
| ・ 外国特許公開 | 0件 (うち共同出願 0件) |
| ・ 外国特許登録 | 1件 (うち共同出願 0件) |

(2) 学会発表 24件 (うち国際学会 3件)

(3) 誌上発表 6件

(4) 依頼講演 4件

## 別添資料 1

フルオラス科学研究会第12回シンポジウムプログラム

2019年10月18日(金)

名城大学天白キャンパス タワー75

〒468-8502 名古屋市天白区塩釜ロー丁目 501 番地

フルオラス科学研究会

第12回シンポジウムプログラム

9:50~10:00 会長挨拶

10:00~10:15 座長：中村 修一（名古屋工業大）

口頭発表 0-1

キラル p-Cu(II)触媒によるエナンチオ選択的  $\alpha$ -フッ素化反応

○石原 一彰, 西村 和揮, 山川 勝也（名大院工）

10:15~11:00 座長：矢島 知子（お茶の水女子大）

招待講演 1

ヘキサフルオロイソプロピルアルコール(HFIP)のカチオン安定化効を活用する合成反応

市川 淳士 教授（筑波大学大学院数理物質科学研究科）

11:15~12:00 座長：網井 秀樹（群馬大）

招待講演 2

フェイズ・バニシング法：フルオラス溶媒の疎有機性と大きな比重を活用した有機合成手法

松原 浩 教授（大阪府立大学大学院理学系研究科）

13:30~14:15 座長：伊藤 彰近（岐阜薬科大）

招待講演 3

含窒素芳香環の特性を活用したアルキル化剤の開発

国嶋 崇隆 教授（金沢大学大学院医薬保健学総合研究科）

14:15~14:45 座長：折田 明浩（岡山理科大）

14:15~14:30 口頭発表 0-2

フルオラス分離技術を利用した微量生体成分の HPLC 分析法の開発研究

轟木 堅一郎（静岡県立大薬）

14:30~14:45 口頭発表 0-3

フッ化炭素側鎖を持つ蛍光色素を含むシアリダーゼプローブの合成

○池田 潔 1 , 紅林 佑希 2 , 南 彰 2 , 高橋 忠伸 2 , 鈴木隆 2 , 寺岡 文照 1 , 大坪 忠宗 1  
(広島国際大薬 1 , 静岡県立大薬 2 )

15:00~15:45 座長 : 三浦 剛 (東京薬科大)

招待講演 4

パーフルオロシクロペンテン誘導体を触媒として用いた合成反応の開発  
是永 敏伸 教授 (岩手大学理工学部化学・生命理工学科)

16:00~16:45 ポスターセッション \* (タワー75 ラウンジ)

P-1 フェイズ・バニシング (PV) 法によるボランの発生その利用

○曾我 寧々, 松原 浩 (阪府大院理)

P-2 DITB を用いた臭素化反応へのフッ素溶媒の利用

○太田 史弥, 湯畑 康太朗, 松原 浩 (阪府大院理)

P-3 含フッ素 Deng ウイルス感染阻害剤の合成研究 (III)

○寺岡 文照, 向原 大貴, 佐藤 理貴, 大坪 忠宗, 池田 潔 (広国大薬)

P-4 ホスフェート型フルオラス抽出剤によるセリウムイオンの抽出

○横内 優, 山口恭弥, 広瀬貴也, 稲津敏行, 浅沼徳子 (東海大・工)

P-5 固相/液相間移動型フルオラスプロリン触媒を用いる不斉アルドール反応

○小林 佑基, 大林 里帆, 石原 稿太郎, 塩入 孝之, 松儀 真人 (名城大農)

P-6 分子内フルオロフィリック効果を活用した鉄(III)サレン錯体の不斉空間構築と不斉エポキシ化

○渡辺 優樹, 小林 佑基, 塩入 孝之, 松儀 真人 (名城大農)

P-7 DPPA によるフルオラス媒体中での Beckmann 転位経路型 1,5-tetrazole 合成

○石原 稿太郎, 塩入 孝之, 松儀 真人 (名城大農)

P-8 ホスホリルイナミンを出発原料に用いたアミノトリアゾール合成

○折田 明浩, 奥田 靖浩, 今福 和篤, 土田 喜之, 鯖戸 泰生 (岡山理科大)

P-9 有機分子触媒を用いた・・・不飽和トリフルオロメチルケトンに対する不斉 Henry 反応

○河田 雅宏, 小坂井 皓啓, 山田 美咲, 阿久津 裕士, 中島 康介, 平島 真一, 三浦 剛  
(東京薬科大)

P-10 [2.2]パラシクロファン骨格を有する面不斉ビスチオウレア触媒によるニトロアルカンの付加反応

○吉田 圭佑, 松本 高利, 本山 大夢, 服部 友美, 鈴木 晶絵, 霜依 莉子, 武田 紗和, 小園 友明, 野田 さやか, 武永 尚子, 北垣 伸治 (名城大薬)

P-11 ビスイミダゾリン-銅(II)トリフラート触媒によるケチミンへの不斉ビニロガス-マンニッヒ反応の開発

○松坂 康市, 中村 修一 (名工大院工)

P-12 オキシラニルアニオンを用いた Gymnocin-B の GHIJKL フラグメント合成

○坂井 健男, 榊原 英晃, 尾本 弓美, 常川 真里菜, 森 裕二 (名城大薬)

P-13 酸化型ステロイドの自在合成法の開発

渡邊 正悟, 西川 俊夫, ○中崎 敦夫 (名大院生命農)

P-14 ペリレン光触媒を用いたビニルスルホンの脱スルホニル化反応

○渡部 光, 中嶋 和輝, 枝川 領太, 奥田 靖浩, 福山 高英, 柳 日馨, 折田 明浩 (岡山理科大)

P-15 糖加水分解酵素を利用したタンパク質の位置選択的な PEG 化法の開発

後藤 浩太郎, 朝倉 大堯, 高島 晶, 田中 智博, 黒河内 政樹, 森 昌子, 松田 昭生, ○水野 真盛 (公益財団法人野口研究所)

別添資料 2

採択者名	所属*	研究テーマ名
鬼塚 和光	東北大学多元物質科学研究所	RNA 標的創薬を指向した RNA 結合小分子新規探索システムの構築
寺坂 尚紘	東京大学大学院理学系研究科化学専攻	標的特異的ドラッグデリバリーを可能にするタンパク質カプセルの分子進化
水野 洋輔	東京工業大学科学技術創成研究院未来産業技術研究所	任意波形変調と動画像処理技術に基づくブリルアン光相関領域反射計の性能進化
鈴木 康介	東京大学大学院工学系研究科	金属ナノ複合材料の精密設計とその触媒機能
緒明 佑哉	慶應義塾大学理工学部	2次元ランダム共重合による共役高分子材料の創製とエネルギー分野への応用
江島 広貴	東京大学工学部	海棲生物の接着メカニズムにヒントを得た高強度水中接着剤の開発
松田 泰斗	九州大学大学院大学医学研究院	ミクログリアからニューロンへのダイレクトリプログラミングによる脊髄損傷治療法開発
塩田 拓也	宮崎大学テニユアトラック推進機構	グラム陰性菌 $\beta$ バレル型膜タンパク質アセンブリー阻害ペプチドの作用機構解析
高原 茉莉	北九州工業高等専門学校生産デザイン工学科	酵素反応と薬物融合ペプチドを基盤とした部位特異的な抗体-薬物複合体の開発
伊藤 英人	名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻	Hetero-APEX 反応の開発と新奇ヘテロ多環芳香族化合物の迅速合成
加藤 英明	東京大学大学院総合文化研究科	自閉症治療に向けたペプチド受容体構造解析と構造情報に基づいたバイアスリガンド開発
貞清 正彰	東京理科大学理学部第一部	次世代蓄電池を指向した革新的電解質材料の開発
鈴木 健仁	東京農工大学大学院工学研究院	屈折率ゼロ材料による THz デバイスの創出

\*所属は応募時のもの

### 別添資料 3

#### (1) 学生の受け入れ

東海大学から卒業研究生を2名を受け入れ、下記のテーマにより研究を行った。

卒業論文研究テーマ

- ・ ENGase とクリック反応を利用したタンパク質の位置選択的修飾化法の開発
- ・ 糖水酸基保護基として Boc 基を用いたフコシルペプチドの合成

#### (2) 職員の教育活動

今年度は下記の職員が大学の非常勤講師として教育活動に携わった。

黒河内政樹、大隅賢二、山田一作、後藤浩太郎

## 別添資料 4

### 1. 学会発表 24件 (うち国際学会 3件)

第 67 回質量分析総合討論会 (2019. 5. 11-13)	1 件
日本ケミカルバイオロジー学会 第 14 回年会 (2019. 6. 10-12)	1 件
第 19 回日本蛋白質科学会年会 第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 (2019. 6. 24-26)	1 件
第 38 回日本糖質学会 (2019. 8. 19-21)	7 件
American Chemical Society National Meeting 2019 San Diego (2019. 8. 25-29)	1 件
25th International Symposium on Glycoconjugates (Glyco25) (2019. 8. 25-31)	1 件
第 68 回日本応用糖質科学会大会 (2019. 9. 11-13)	1 件
第 92 回日本生化学会大会 (2019. 9. 18-20)	2 件
トーゴーの日シンポジウム 2019 (2019. 10. 5)	1 件
フルオラス科学研究会第 12 回シンポジウム (2019. 10. 18)	1 件
第 56 回ペプチド討論会 (2019. 10. 23-25)	1 件
2019 Society for Glycobiology Annual Meeting (2019. 11. 2-5)	1 件
GlycoTOKYO2019 (2019. 11. 6)	1 件
第 10 回グライコバイオリジクス研究会 (2019. 11. 26)	1 件
第 37 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2019. 11. 27-29)	1 件
第 42 回日本分子生物学会年会 (2019. 12. 3-6)	1 件
日本農芸化学会 2020 年度大会 (2020. 3. 25-28)	1 件

### 2. 誌上発表 6件

Effects of terminal galactose residues in mannose  $\alpha$ 1-6 arm of Fc-glycan on the effector functions of therapeutic monoclonal antibodies

Michihiko Aoyama, Noritaka Hashii, Wataru Tsukimura, Kenji Osumi, Akira Harazono, Minoru Tada, Masato Kiyoshi, Akio Matsuda, and Akiko Ishii-Watabe  
MAbs, 11, 826-836 (2019)

Efficient Synthesis of N- and O-linked Glycopeptides using Acid-Labile Boc Groups for the Protection of Carbohydrate Moieties

Tomohiro Tanaka, Mika Shiraishi, Akio Matsuda and Mamoru Mizuno  
Tetrahedron Lett., 60, 151106 (2019)

Site-specific protein PEGylation catalyzed by endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase

Kohtaro Goto, Masaki Kuroguchi, Shou Takashima, Masako Mori, Akio Matsuda, Mamoru Mizuno  
Tetrahedron Lett., 60, 151475 (2020)

Preparation of O-Glycopeptides from commercial bovine whey proteins using offline liquid chromatography-Mass spectrometry



Masaki Kuroguchi, Akio Matsuda, Mamoru Mizuno

Carbohydr. Res., 491, 107981 (2020)

Study of glycosylation of prostate-specific antigen secreted by cancer tissue-originated spheroids reveals new candidates for prostate cancer detection

Hiroko Ideo, Jumpei Kondo, Taisei Nomura, Norio Nonomura, Masahiro Inoue and Junko Amano  
Scientific Reports, 10, 2708 (2020)

LacdiNAcylation of N-glycans in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in changes of morphological appearances and adhesive properties of the cells

Kiyoko Hirano, Yoshio Takada, Kiyoshi Furukawa  
Histochemistry and Cell Biology, 153, 17 (2020)

### 3. 講演 4件

創価大学糖鎖生命システム融合センターキックオフ(2019.4.12)

「糖鎖科学の情報基盤構築」

山田一作

統合データベース講習会：AJACS 徳島(2019.6.6)

「化合物データベース (PubChem Bioassay、他)」

山田一作

CBI 学会 講演会(2019.11.27)

「MALDI-MS による糖鎖多様性の解明」

天野純子

SPARC Japan 2019 第3回セミナー(2020.2.7)

「糖鎖科学における研究データ管理」

山田一作

## 庶務関係

### 1. 評議員会・理事会に関する事項

#### 1-1 2019年5月29日 理事会開催

##### ・決議事項

- ① 平成30年度事業報告書及びその附属明細書並びに計算書類（貸借対照表・正味財産増減計算書・附属明細書・財産目録）の承認
- ② 理事5名及び監事2名の辞任に伴い、後任候補者として白井博史氏、野崎貴司氏、内村正純氏、小笠真男氏、大塚信之氏を、また新たな理事候補者として小宮山 眞氏を推薦することを承認。監事候補者として中尾正文氏、山本 宏氏を推薦することを承認。
- ③ 定時評議員会開催の承認

##### ・報告事項

研究活動を中心とする事業活動を松田常務理事、平成30年度の決算については入江理事が説明。

#### 1-2 2019年6月19日 定時評議員会開催

##### ・決議事項

- ① 小堀秀毅評議員を議長に選出。
- ② 平成30年度事業報告書及びその附属明細書並びに計算書類（貸借対照表・正味財産増減計算書・附属明細書・財産目録）の承認
- ③ 評議員1名辞任に伴い、評議員候補者として山田敬三氏を選任。
- ④ 理事5名及び監事2名の辞任に伴い、後任候補者として白井博史氏、野崎貴司氏、内村正純氏、小笠真男氏、大塚信之氏を、また新たな理事候補者として小宮山 眞氏を推薦することを承認。監事候補者として中尾正文氏、山本 宏氏を推薦することを承認。
- ④ 議事録署名人に評議員の後藤泰行氏、柴田一豊氏、2名を選任。

##### ・報告事項

研究活動を中心とする事業活動を松田常務理事、平成30年度の決算については入江理事が説明。

#### 1-3 2019年11月14日 理事、監事の方への下記の新運用を書面にて説明

##### ・報告事項

E T F（上場投資信託）の令和元年の上期の運用実績について

#### 1-4 2020年3月16日 理事会開催

##### ・決議事項

2020年度事業計画書並びに収支予算書の承認

##### ・報告事項

研究活動を中心とする事業活動を松田常務理事、2019年度の決算については入江理事が説明。

#### 2. 登記に関する事項

- ① 2019年6月25日 新評議員の山田敬三氏の登記を完了
- ② 2019年6月25日 新理事の白井博史氏、野崎貴司氏、大塚信之氏、内野正純氏、小笠真男氏、小宮山真氏の登記を完了
- ③ 2019年6月25日 新監事の中尾正文氏、山本宏氏の登記を完了

#### 3. 研究所の体制及び方針

理事の職務の執行が法及び定款に適合することを確保するための体制。

その他職務の適正を確保するための体制

当研究所が一般社団・財団法人法第90条第4項第5号、施行規則第14条に基づき、業務の適正を確保するための体制の整備につき、理事会で以下の通り決定している。

##### (1) 理事の職務の執行に係る情報の保存及び管理に関する体制

- ①評議員会、理事会、常任理事会の議事録を法令及び規程に従い作成し、適切に保存・管理している。
- ②経営、研究及び業務執行に係る重要な情報、決定事項、所内通達などは、所管部所で作成し、適切に保存・管理している。

##### (2) 損失の危険の管理に関する規程その他の体制

理事は、会計処理規程、安全衛生管理規程、購買管理規程等を遵守の上、所管する研究所内のあらゆるリスクに対する管理責任を負っている。  
リスク管理については、コンプライアンス規程に適宜適切な対応が図れるように制度を整備、明確化している。

##### (3) 理事の職務の執行が効率的に行われることを確保するための体制

年2回の理事会の開催で、予算・決算を確定し、月2回の常任理事会において職務の執行が効率的に行われるようにしている。また、効率向上のため職務権限規程を作成し、使用人への権限委譲を行っている。  
監事は、理事会への出席を通じ、理事の業務執行を監視している。

##### (4) 使用人の職務の執行が法令及び定款に適合することを確保するための体制

理事は、理事会が別途定める倫理規程の理念と規範に則り、「行動基準」の周知徹底を心がけ、コンプライアンス規程等諸規程に従い全使用人による職務執行が適正に行われるよう監督している。また、法令違反行為の

防止等を目的に、コンプライアンスホットライン運営要綱を定めている。

- (5) 監事はその職務を補助すべき使用人を置くことを求めた場合における当該使用人に関する事項

総務部を監事の職務を補助すべき組織として位置づけている。

- (6) 前号の使用人の理事からの独立性に関する事項

前号の使用人が、監事から補助すべき業務についての指定を受けた場合において、当該業務の遂行に関し、理事からの指揮命令は及ばないものとしている。

- (7) 理事及び使用人が監事に報告するための体制その他の監事への報告に関する体制。

理事及び使用人は下記の事項を監事に報告している。

- ・ 研究所に著しく損害を及ぼすおそれのある事実
- ・ 上記の他、監事はその職務遂行上報告を受ける必要があると判断した事項

- (8) その他監事の監査が実効的に行われることを確保するための体制

監事が、理事及び使用人からヒアリングを実施し、重要案件の決裁書の確認などにより、その権限が支障なく行使できる体制になっている。

#### 4. 研究助成金の講演会に関する事項

贈呈式および節目の年の記念講演会の開催について、内閣府へ変更申請を行い認定された。

#### 5. 職員に関する事項

期末現在の在籍者は 28 名（前年度末 32 名）である（役員・顧問を除く）

以上

## 2019年度事業報告書 附属明細書

2019年度事業報告には、「一般社団法人及び一般財団法人に関する法律施行規則」第34条第3項に規定する附属明細書「事業報告の内容を補足する重要な事項」が存在しないので作成しない。

2020年5月

公益財団法人 野口研究所