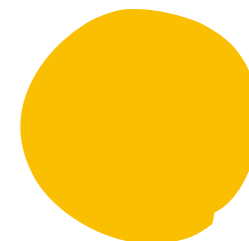


野口 研究所 時報



THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.57 2014

CONTENTS

Noguchi-Shitagau Research Grant Tsutomu INADA
 Encounter with Noguchi Institute
 ~ More than ten years that I walked with "FLUOROUS" ~ Kenichi HATANAKA
 Oligosaccharide synthesis by using fluorous tag method Kohtaro GOTO
 Biological roles of LacdiNAc groups on N-glycans
 in the progression of human cancer cells Kiyoko HIRANO
 Akio MATSUDA
 Takashi SHIRAI
 Kiyoshi FURUKAWA

Development of Stable Isotope Labeling for
 Relative Quantitative Analysis of Glycopeptides using MALDI-TOF MS Masaki KUROGOCHI
 Ending is beginning: "Database Integration Coordination Program" Issaku YAMADA
 Hisashi NARIMATSU

An outline of a development of glycoprotein identification software, GLIDE Junko AMANO
 61th ASMS Conference on Mass Spectrometry Junko AMANO
 Report on ISoFT'13 (1) Nobuto HOSHI
 Report on ISoFT'13 (2) Mamoru MIZUNO

Glyco-Informatics Meeting Report
 ~ ACGG-DB, GLYCO22, GlycoHackathon 2013 in Dalian ~ Issaku YAMADA
 Report on 7th Asian Cyclodextrin Conference Yoshiki ODA
 Environment and culture on research activity Wataru TSUKIMURA
 The Activities of the Institute Takashi SHIRAI
 Outline of the Institute Tsuguo SAITO
 Noguchi Shitagau Research Grant
 Abstracts of Publications

ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

巻頭言 野口遵研究助成金について 稲田 勉
 野口研究所との出会い ~ フルオラスと過ごした十余年 ~ 畑中 研一
 フルオラスタグ法を用いた糖鎖合成 後藤浩太郎
 腫瘍形成におけるN型糖鎖上のLacdiNAc群の生物学的意義 平野 清子
 松田 昭生
 白井 孝
 古川 清

MALDI-TOF MSによる糖ペプチドの相対定量解析の為の
 安定同位体標識法の開発 黒河内政樹
 終わりは始まり:「統合化推進プログラム」 山田 一作
 成松 久

JST先端計測分析技術・機器開発プログラム採択課題研究開発報告 天野 純子
 61st American Society for Mass Spectrometry Conference (ASMS) 報告 天野 純子
 International Symposium on Fluorous Technologies 2013 参加報告(1) 星 信人
 International Symposium on Fluorous Technologies 2013 参加報告(2) 水野 真盛

糖鎖インフォーマティクス会議報告
 ~ACGG-DB, GLYCO22 and GlycoHackathon2013@大連~ 山田 一作
 7th Asian Cyclodextrin Conference参加報告 小田 慶喜
 研究環境と研究文化 月村 亘
 2013年度活動概要 白井 孝
 研究所の概要 齊藤 継男
 野口遵研究助成金
 2013年度誌上発表論文抄録集

巻頭言 野口遵研究助成金について	稲田 勉 ……	1
野口研究所との出会い ～ フルオラスと過ごした十余年 ～	畑中 研一 ……	4
フルオラスタグ法を用いた糖鎖合成	後藤浩太郎 ……	9
腫瘍形成におけるN型糖鎖上のLacdiNAc群の生物学的意義	平野 清子 松田 昭生 白井 孝 古川 清 ……	22
MALDI-TOF MSによる糖ペプチドの相対定量解析の為の 安定同位体標識法の開発	黒河内政樹 ……	29
終わりは始まり：「統合化推進プログラム」	山田 一作 …… 成松 久	35
JST先端計測分析技術・機器開発プログラム採択課題研究開発報告	天野 純子 ……	38
61st American Society for Mass Spectrometry Conference(ASMS)報告	天野 純子 ……	42
International Symposium on Fluorous Technologies 2013 参加報告(1)	星 信人 ……	44
International Symposium on Fluorous Technologies 2013 参加報告(2)	水野 真盛 ……	47
糖鎖インフォマティクス会議報告 ～ACGG-DB, GLYCO22 and GlycoHackathon2013@大連～	山田 一作 ……	49
7th Asian Cyclodextrin Conference参加報告	小田 慶喜 ……	52
研究環境と研究文化	月村 亘 ……	54
2013年度活動概要	白井 孝 ……	56
研究所の概要	齊藤 継男 ……	67
野口遵研究助成金	……	75
2013年度誌上発表論文抄録集	……	81

THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.57 2014

C O N T E N T S

Noguchi-Shitagau Research Grant	Tsutomu INADA	1
Encounter with Noguchi Institute ~ More than ten years that I walked with "FLUOROUS" ~	Kenichi HATANAKA	4
Oligosaccharide synthesis by using fluorous tag method	Kohtaro GOTO	9
Biological roles of LacdiNAc groups on N-glycans in the progression of human cancer cells	Kiyoko HIRANO Akio MATSUDA Takashi SHIRAI Kiyoshi FURUKAWA	22
Development of Stable Isotope Labeling for Relative Quantitative Analysis of Glycopeptides using MALDI-TOF MS	Masaki KUROGOCHI	29
Ending is beginning : "Database Integration Coordination Program"	Issaku YAMADA Hisashi NARIMATSU	35
An outline of a development of glycoprotein identification software, GLIDE	Junko AMANO	38
61th ASMS Conference on Mass Spectrometry	Junko AMANO	42
Report on ISoFT' 13 (1)	Nobuto HOSHI	44
Report on ISoFT' 13 (2)	Mamoru MIZUNO	47
Glyco-Informatics Meeting Report ~ ACGG-DB, GLYCO22, GlycoHackathon 2013 in Dalian ~	Issaku YAMADA	49
Report on 7th Asian Cyclodextrin Conference	Yoshiki ODA	52
Environment and culture on research activity	Wataru TSUKIMURA	54
The Activities of the Institute	Takashi SHIRAI	56
Outline of the Institute	Tsuguo SAITO	67
Noguchi Shitagau Research Grant		75
Abstracts of Publications		81

— 卷頭言 —

野口遵研究助成金について

Noguchi-Shitagau Research Grant

理事長 稲田 勉

President Tsutomu INADA

より大きな共同体の声を聞け (岸見・古賀「嫌われる勇気」より)

今回は我々の事業のPRをさせていただくことにします。

前号の巻頭で、研究資金が短期的なテーマに偏り、研究の裾野を失うことに対する危機感から、海のものとも山のものとも分からない10年早い段階の探索研究を支援してゆく重要性に触れました。そしてわれわれ野口研究所は、自らの研究活動を通じた支援に加えて、運営する野口遵（のぐちしたがう）研究助成金事業について、「他の助成制度にかかりにくいような、面白いネタを孵化するお手伝いができることを願っています。」と書きました。今年は早速この基本的思い（フィロソフィ）を具体化してゆきます。

野口遵研究助成金事業は野口研究所が2009年に立ち上げた事業で、今年度（2014年度）で第6回目の募集になります。選考委員長を元日本化学会会長の岩澤康裕電通大教授（東京大名誉教授）にお願いし、化学系で著名な大学教授の皆様と民間で有数の実績をお持ちの研究者の方々に選考委員を構成しております。

応募課題はいろいろ変遷してきましたが、

現在は次の4分野を設定しています。

「化学」を根底に置いていますが、幅広い分野で構えています。

- 1) ライフサイエンスの進展に資する物質やデバイスに関する研究
- 2) 地球資源並びに環境の保全に寄与するプロセスや新材料に関する研究
- 3) 蓄エネルギー、創エネルギー、省エネルギーに寄与する新材料やデバイスに関する研究
- 4) 新しい電子材料やそれを活用した新たなプロセスやデバイスに関する研究

39歳以下の若手研究者を対象としており、成果は2年後に報告していただきますが、研究目的であれば助成金の用途は自由であることが特徴です。これまで72名の研究者を助成してきましたが、使いやすさでとても好評です。昨年度は207名の応募の中から15名を選び220万円／人の助成をさせていただいています。

昨年度の選考データ詳細は本巻末に掲載してありますのでご参照ください。

5回目にして初めて200名を超える応募を得て、ようやく認知されはじめてきた実感があります。そこで、これをきっかけとして、本年度からは次のステップへ進むべく、制度を改定し新しい仕組みを導入することにしました。改定の目的は、

- a) 助成応募のインセンティブを高め、本制度の存在を広くアピールする。
- b) 本制度をより個性のあるものにし、数ある研究助成制度の中での存在意義を明確にする。

昨年度までの選考では冒頭で述べた「他の助成制度にかかりにくいような」というところはあまりうまく反映することができませんでした。応募段階では他制度の採否は不明な場合が多いからです。また、助成後の実績評価が十分でなく、本制度の存在価値を広く世間にアピールできているとはいえませんでした。これらの欠点を補い上記目的を達成するために、選考委員の先生方のアドバイスをいただきながら、募集要項の「助成の趣旨」にフィロソフィを反映させるとともに、新たに「野口遵賞」という仕組みを導入することにしました。

①「助成の趣旨」

「独創的かつチャレンジングな若手研究者の独立した研究を助成します。応募課題分野で産業応用までには課題が多く短期的な産業有用性は見えにくいものであっても、ロジックがしっかりしていて、実現できた場合の学術性や発展性が強く期待されるものの孵化をお手伝いすることが狙いです」

②「野口遵賞」の概要

- ・過去の助成採択者の中から助成後の業績評価により、毎年1名に授与する（2014年度は2009～2011年度の助成者から選

抜）。

- ・副賞として500万円を大学等所属研究機関に奨学寄付金として支給する（本制度総支給額は変えず、助成金授与件数を調整する）。
- ・選考には実績以外に研究資金環境（他の助成金等の恩恵に浴していないこと）も考慮する。

2014年度の助成者が「野口遵賞」の選考対象になるのは2017年度からで、この仕組みが定常化するまでに期間を要しますが長い目で見ていきたいと思っています。最初の助成に加え、2段ロケットで次の段階を支援する制度で、これにより次の様な効果が期待できると考えています。

1. まとまった副賞額に加え、賞の形態をとることで研究者は受賞歴として扱いやすくなり、助成応募のインセンティブが増す。
2. 他の制度にかかりにくい研究者を優先支援することができ、本制度の存在意義を高めることができる。

今年度の応募期間は9月1日～10月31日となっています。多くの「チャレンジングな若手研究者」の応募を期待しているところです。詳しくは大学等研究機関に配布している応募要領をご覧ください（この時報がお手元に届くのは10月に入ってしまうと思います。遅きに失すご紹介で申し訳ありません。間に合わない場合は来年度よろしく願いいたします）。これまでの実績で残念なのは女性の応募者が少ないこと。2013年度は応募総数207人中、名前から推測すると女性はわずか10人でした。研究者の比率はこんなものではないはずで、どうしたらもっと積極的に応募いただけるか、いささか悩んでおります。

公益財団法人野口研究所は財産の資金運用と賛同企業等からの寄付金が主要収入源で事業を運営しています。本制度には賛同企業等の公益活動に対する意志も反映していることになります。営利企業が自社ではなかなか進めにくい長期的視点での公益支援の志を弊所を通じて実現するという側面もあるわけです。我々も自らの研究活動と並ぶ大切な事業として、本制度を発展させてゆこうと考えています。

ささやかながら、科学の裾野の強化に貢献できると信じて。

追記

実用化研究を否定しているわけではないので誤解なきよう。我々の対象である化学をベースとする分野の研究目的はあくまで実用化であって、基礎研究、探索研究といえども、

実用化までのしっかりしたロジック（もちろん仮説を含む）のない研究は認められません。しかしながら、短期実用化となると話は別で、グローバル化のなかでビジネスリソースの局在化が進んでいる現代、弊所の規模で出る幕はありません。逆に、長期実用化については短期的成果の重圧がますます強くなっているビジネスと折り合わず、世界的に留守になっているわけです。

基礎研究とか探索研究とか言わず、長期実用化研究と呼ぶ方が誤解がないのかもしれませんが。長期実用化ロジックのなかの肝になる仮説の部分、分岐点、「だめだったらごめんなさい、でもやってみなければわからないからやらせてください」のリスクを取りやってみる、やらせてみることに我々の出番が残されています。弊所の研究も研究助成もこの視点を持ち続けることは基本だと考えています。

野口研究所との出会い ～フルオラスと過ごした十余年～

Encounter with Noguchi Institute

～ More than ten years when I walked with "FLUOROUS" ～

畑中 研一*

Kenichi HATANAKA

私が野口研究所を知ったのは、稲津敏行先生が学会で糖鎖合成に関する発表を精力的にされていて、「すごい人がいるものだなあ」と感じたのが最初である。その後、ジャーナルの編集委員会などで知り合うようになり、同じ昭和30年生まれであることもあって懇意にさせていただき、野口研究所を見学に訪れたりもした。2001年の秋にはNoguchi Fluorous Projectのことを知り、稲津先生に問い合わせてみたら、「是非応募してください」とのことだったので、糖鎖の生命工学が専門の私が、『フッ素』という未知の分野に足を踏み入れるきっかけとなった。

さて、プロジェクトに参加するために「どのようにして『フッ素』を料理していこうか」という問題が起こったのは言うまでもない。当時から長鎖アルキル基を有するグリコシドを細胞に与えて細胞内の酵素と糖ヌクレオチドを用いて糖鎖合成をするという研究を行っていたので、「長鎖アルキルの代わりにフルオロアルキルを用いることができないか？」と考え、フルオラス初心者ながら、無事参加させていただいた。年間50万円の研究費に関しては、稲津先生から「野口研も初めての試みなので、どのような手続きが大学として

使い勝手が良いのか教えてほしい」と言われ、「奨学寄付金」が最も使い易いことを伝えた。このことが、現在の『野口遵研究助成金』の「研究するために使い勝手の良い助成金」の考え方に繋がっていると思っている。

そうこうしているうちに1年目が終了し、2003年1月にはNoguchi Fluorous Projectの第1回公開シンポジウムが池袋のメトロポリタンプラザで開催された。シンポジウムでは、私にとって初めて知るフルオラス研究の数々に興味津々であった。しかしながら、2003年4月に稲津先生が東海大学教授に御栄転されたため、野口研としては糖鎖研究とフルオラス科学研究の中心人物を失うこととなる。そのことが引き金となって、Noguchi Fluorous Projectが3年目に入った2004年の夏、当時の山本修司常務理事と新任の白井孝常務理事が東大生研の私の研究室にいらして、「次の糖鎖有機化学研究室長が決まるまで、手伝ってほしい」との要請があった。私の専門が近いこともあったと思うが、私の自宅が野口研から近いことが主な理由であったのかもしれない。理由はどうあれ、昔から困っている方々を放っておけない性分なもので、顧問のお話も快諾させていただいた。

* 東京大学 生産技術研究所 教授／野口研究所 学術顧問

私がNoguchi Fluorous Projectで行った研究は、フルオロアルキルグリコシドを細胞に与えて糖鎖生産を行うというものであり、フルオロアルキル鎖の長さによって、細胞による取り込み、細胞内での蓄積、ゴルジ体での糖鎖伸長、生成物の細胞外への放出、のどれもが大きく異なる。フルオロアルキル鎖の疎水性 (hydrophobic) や疎油性? (lipophobic?)、剛直性などが、細胞膜との親和性に大きく影響していると考えられる。当時はC12の化合物が生産に最も適していると信じて疑わなかったもので、 $C_6F_{13}C_6H_{12}-$ や $C_8F_{17}C_4H_8-$ とか $C_{10}F_{21}C_2H_4-$ を使っていたのだが、後になって、 $-CF_2-$ は $-CH_2-$ の約1.5倍の疎水性を持っていることが判って愕然としたものである。即ち、初心者の未熟さとはいえ、疎水性の異なる化合物を用いてフルオラス性の違いを議論していたのである。しかしながら、研究の不備を指摘されることなく (少なくとも私自身は若干の研究計画ミスを自覚しているのだが) 最初の研究成果が、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 599-604 (2004) と *Chem. Lett.*, **34**, 856-857 (2005) に掲載されている。

3年間続いたNoguchi Fluorous Projectが2005年3月に終了した後は、折角全国から集まったフルオラス研究者がこのまま離れてしまうのは勿体ないということで、岡山理科大学の大寺純蔵教授に会長になっていただき、『フルオラス研究会』という任意団体を作った。事務局 (まとめ役) は野口研究所である。フルオラス研究会では、研究の実用化を目標として、フルオラス関連企業の研究所などを訪問したが、企業の熱意がそれほどでもなかったような記憶がある。その数年後に起こるPFOS PFOA問題を企業は察知していたかのような対応が感じられた。また、フルオラス研究会では、シンポジウムやセミナーを活発に行い、研究者間の情報交換に十分に貢献

したと言える。

Noguchi Fluorous Projectが終了してフルオラス研究会が発足した2005年には、もう一つセンセーショナルな誕生がある。ISoFT (International Symposium on Fluorous Technologies) の発足である。記念すべき第1回のシンポジウムはフランスのボルドーで開催された。Dr. Richard H. FishとDr. Jean-Mark Vincentがオーガナイザーで、驚きのシンポジウムであった。朝から夕方まで全員参加の研究発表とディスカッションがびっしりあるのは、100人規模のシンポジウムではよくあることだが、昼食は豪勢なフランス料理にワイン付きだし、夜は12時を過ぎても飲んでいるのである。実は2014年にも7月にボルドーでシンポジウムがあるのだが、オーガナイザーのJean-Markは「We actively work on the organization, but still have to select the wine !」とメールしてきた。

そして、2005年にフルオラス研究会を発足させた日本が、第2回のISoFT開催 (2007年) を引き受け、港が見える横浜での研究発表と鎌倉へのエクスカーション、中華街でのバンケットが計画された。私もオーガナイザーに加えていただき、大寺会長を中心に基調講演や招待講演の選択、受賞者の決定、各種行事の設定など、(事務局として大変だった野口研究所の方々には申し訳ないが) とても楽しい準備であった。中でも特筆すべきは、バンケットの料理を決定するために、事前に聘珍楼で試食をしたことであった。実行委員 (主にフルオラス研究会の評議員) がくじ引きをして3つのテーブル席に分かれ、それぞれのテーブルに6千円、8千円、1万円のコースが運ばれるという趣向であるが、それぞれのテーブルに運ばれてくるコースの値段は各人には知らされていない。あまりの楽しさに、結果的に本番でいくらのコースを選

択したのかは私の記憶にない。さて、2007年の夏、ついにISoFT'07が開催された。招待講演者や座長を招待した蕎麦屋での前夜祭から盛り上がり、次の日のオープニングを心配したほどである。ところが前日のドンチャン騒ぎとは裏腹に、シンポジウムでのディスカッションは辛辣なものであった。とことん飲んだ仲間だからこそ相手を信頼して、腹を割った本音で（相手に失礼なぐらいの）歯に衣着せぬディスカッションができるのであろう。懇親会はこうあるべきだと学ばせていただいた。鎌倉へのエクスカージョンも勿論楽しかったが、最も印象的だったのは、バンケットの際に受賞者に贈られた浴衣を喜んでもらえたことである。Dr. Dennis P. Curran (ISoFT'07 Noguchi Award) とDr. John A. Gladysz (ISoFT'07 FTI Award) のお二人は、慣れない浴衣姿を心から堪能しているように見受けられた。また、ポスター賞の選考委員長だった稲津敏行先生が、選考委員の一人であるDr. N. P. が真面目に審査しないことに憤慨しておられたのも印象に残っている。いろいろなハプニングもあったが、全体としてはかなり成功であったと思うし、何よりも世界中から集まったフルオラス研究者に日本にいるフルオラス研究者のコミュニティーを分かってもらえたことが収穫の一つであろう。

一方、日本のフルオラス研究会に目を向けてみると、2008年には、それまで活動を続けてきたフルオラス研究会を解消し、年に一度のシンポジウム開催を軸とした息の長い研究会にしましょうということで、新たに『フルオラス科学研究会』が発足した。会長は引き続き大寺先生にお願いした。そして、第一回の記念すべきシンポジウムは、新潟薬科大学の武内征司先生にお引き受けいただいた。会場設定から研究発表会、情報交換会に至るまで、全て完璧な運営であったが、武内先生のご自慢は、情報交換会ですらりと揃った新潟

の名酒であった。その後、フルオラス科学研究会シンポジウムは年に一回の開催となり、2009年の金沢（金沢大学の国嶋崇隆先生）、2010年の岐阜（岐阜薬科大学の伊藤彰近先生）、2011年の大阪（大阪府立大学の柳日馨先生）、2012年の仙台（東北大学の根東義則先生）、2013年の岡山（岡山理科大学の折田明浩先生）、2014年の札幌（北海道大学の門出健次先生）へと繋がっていく。オーガナイザーをお引き受けいただいた各先生に御礼申し上げます。

さて、2009年のISoFT'09はアメリカのJackson Holeで19th International Symposium on Fluorine Chemistryと合同で行われた。フッ素のシンポジウムと合同で開催したことは、それまでの垣根を取り払った意味で大きな改革であると思われるが、それを画策したオーガナイザーのDr. Dennis P. Curranが腰を痛めてシンポジウムにご欠席であったのは残念であった。Jackson HoleはGrand Teton National Parkの中にあり、ロッジから見える湖の眺めも最高で、夜の天の川も綺麗に見えたのであるが、特筆すべきはYellow Stone National Parkにも近いことであり、開催地としては絶好のロケーションと言える。一方、日本のフルオラス科学研究会に関して言えば、このISoFT'09の地で会長の交代劇が待っていようとは思ってもよらなかった。大寺会長がそろそろ会長を辞めたいと申し出られ、我々は次の会長を大阪府立大学の柳日馨先生にお願いすることで一致した。いろいろな意味で非常に内容の濃いISoFT'09であったが、私自身は大学院入試のために皆さんより早く帰国しなければならず、Yellow Stoneに後ろ髪を引かれながらJackson Holeを後にした。

2010年には、私のフルオラス研究にも転機が訪れる。当時、野口研究所の理事長でお

られた明石影泰先生から「フルオラス溶媒で細胞培養をやってみたらどうですか?」と提案され、早速試してみると、培地交換をしない状況で、細胞が何日間も生き続けることがわかった。勿論、フルオラス溶媒で細胞培養した研究は過去にも存在するが、何か新しいフルオラス工学分野の開拓に繋がるように感じている。研究に外からアドバイスしてもらおうことの大切さを知った。そういえば、ワシントン大学の箱守仙一郎先生が「私はオーラルで講演するのもポスターで1対1のディスカッションするのも両方大切だと思います」と仰って、ASBC (American Society of Biological Chemists) の年次大会で、ポスターを出されてご発表になられていたことを思い出す。フルオラス溶媒中での細胞培養に関しては、私の研究室の粕谷助教が香港の ISoFT'11 (オーガナイザーはDr. István T. Horváth) でポスター発表をして、優秀ポスター賞をいただいた。ISoFT'11では私も50分のPlenary Lectureで話し、我々の研究を十分に知ってもらう機会をいただいた。フルオラス溶媒中での細胞培養はフルオラス溶媒なら何でも良いわけではなく、フルオラス溶媒と細胞膜(脂質)や膜タンパク質との相性が影響していると考えている。ISoFT'11は香港開催であったため、旅費が安く済むので、私の研究室は大学院生全員が参加した。会場の香港市立大学では、香港の学生たちが朝早くから夜遅くまで廊下やホールでディスカッションをしたり文献を読んだりしていて、日本から行った学生たちには良い刺激になったと思っている。香港は百万ドルの夜景で有名であるが、丘に登るケーブルカーが満員なのは驚かされた。夕方はテーマパーク並の2時間待ちである。こんなに沢山の人がどこから集まってきたのだろうと思うぐらいの混雑だった。私は学生たちと丘の上で待ち合わせたのが、用心深い私が2時間前に出発して、ほぼ丁度の時刻に到着したので、多分彼

らは遅れるだろうと想像していたところ、案の定、30分ぐらい遅れてやってきた。タクシーに乗って急いで来たらしく、待ち合わせ場所に手を振りながら一生懸命に走ってやってきた2人の女子学生は、さながら青春映画を観ているようであった。また、ISoFT'11のシンポジウム発表後には、Jean-Markから「フルオラス溶媒だけじゃなくてフルオラスゲルで細胞培養したら面白そうだね」と言われ、現在の共同研究に発展している。フランスCNRSに所属するJean-Markからゲルの専門家であるDr. André Del Guerzoを紹介していただき、フルオラスアルコールのゲルを作ることができた。現在、フルオラスアルコールのゲルを使った細胞培養は国立国際医療センター研究所との共同研究にも発展している。

2013年開催のISoFT'13は、私の友人でもあるDr. József Rábaiがオーガナイズして、ハンガリーのブダペストで行われた。ブダペストは美しい街であり、歴史的な建物等が散らばっていて、実に魅力的なのであるが、シンポジウムの発表時間は全員参加の全員討論、食事や飲み会はとことん騒いで打ち解けるのがISoFT流なため、我々が街に繰り出したのは、シンポジウムが終わった最終日の午後からであった。小雨の降る中、お城へ登るケーブルカーに乗り、ようやく街を一望することができた。私が一番気に入ったのは、地下迷路。さすがにヨーロッパのお城だけあって、地下迷路も入り組んでいて複雑である。一見の価値有りだと思う。一方、マーケットの朝市も素晴らしく、キャビアが安いことに驚かされる。偽物かと思わせる程の安さである。ISoFT'13におけるInternational Advisory Boardの会議では、近年のフルオラス研究の閉塞感や若手研究者の減少などが話題となり、ISoFT'09でDennisが採用したように、フッ素のシンポジウムと合同で行うのがbetterであろうとの結論に達した。既に決まってい

たISoFT'15 (イタリアのComo湖) の合同開催に続き、これまで隔年に開催してきたISoFTを3年に一度の開催として、フッ素のシンポジウムに合わせることにした。よって、ISoFT'15の次はISoFT'18 (ロンドンで開催予定) ということになった。楽しい仲間たちに会えるのが2年に一度から3年に一度になるのは寂しい気もするが、彼らのことなので、より一層凝縮した時間を作り出すに違いないことは容易に想像できる。また、ISoFT'13では、前回のオーガナイザーでありISoFTの中心人物でもあるIstvánが危機感のある発表を行った。所謂PFOS PFOA問題に端を発するフルオラス化合物の毒性を危惧するものであった。Istvánは毒性が低いであろうと推測されるフルオロブチル基を側鎖に有するポリマーの使用を模索していたが、フルオラス性に若干の不安を感じたのは私だけではないと思う。C4程度のフルオラス基を側鎖に有するマルチバレントな化合物の分子間力を測定する(或いは計算する)必要性を感じる。また、ISoFT'13では講演のなかった私にJózsefが気を使ってChairmanを依頼してくれた。二日酔い気味だった私は、講演者にストレートな質問をぶつけていたらしく、休憩時間になって野口研常務理事の白井先生から「鋭い質問に演者が困っていましたよ!」と教えていただいた。横浜のISoFT'07で学んだISoFT流の歯に衣着せぬディスカッションがやっと実践できたようで嬉しかったのを憶えている。

以上に掲げたフルオラス国際シンポジウムが開催された都市のうち、ISoFT'05、ISoFT'11、ISoFT'13の3回に共通するのは、食べ物が安価で美味しいということであった。ボルドーで食べたロブスター、香港で食べたセロリの餃子とセロリのラーメン (両方とも

鮮やかな若草色)、ブダペストで食べたグヤーシュは、(私の中では) ISoFTにおける三大絶品である。

これまで日本国内で毎年開催されてきたフルオラス研究会シンポジウム/フルオラス科学研究会シンポジウムでは、研究会に属さない研究者に招待講演・依頼講演をお願いすることが多かったが、招待した次年度からもシンポジウムに参加してくださる先生も居られる。実に嬉しいことである。私見ではあるが、研究と芸術は心で行うものであると思っている。いくら上手なピアノ演奏であっても、心がこもっていなければ聞くに耐えない。しかし、時々隣の鍵盤に指が触れようとも、一生懸命に弾いていると私の心が動かされる。おそらく、鍵盤に乗せる指の重力の配分が心地よい音の要因であろう。鍵盤を叩くのもってのほかである。以前にショパンの幻想即興曲を聞かされたことがあるが、「どうだ、俺は上手いだろう」という心が聴こえてきて、うんざりしたものである。学問も同じであると思っている。謙虚な心と弛まぬ好奇心が必要不可欠である。その意味で、何とかしてフルオラスの研究を社会で役立てようとする研究会の心に賛同していただける仲間が増えることはとても嬉しく思っている。Noguchi Fluorous Projectの最大の功績は、このようなコミュニティーを作る基盤を築いたことにあると思う。

最後に、これまでフルオラス研究会およびフルオラス科学研究会、ISoFTを暖かい眼で見守っていただき、最大限に応援していただいた野口研究所の歴代理事長に感謝申し上げます。

フルオラストグ法を用いた糖鎖合成

Oligosaccharide synthesis by using fluororous tag method

糖鎖有機化学研究室 後藤 浩太郎

Kohtaro GOTO

1. はじめに

近年、生体内の細胞表層上に存在する糖鎖が細胞間の認識や接着など重要な機能に参与することが明らかにされている（文献1-3）。しかしながら、一般にそれら糖鎖自身は微小不均一性を持つため、天然から単一化合物として種々の糖鎖を得ることは極めて困難である。このような背景から糖鎖の機能解明を分子レベルで行うためには、有機化学的手法による糖鎖およびその誘導体の合成が重要となるが、多くの天然物合成がそうであるように、糖鎖の合成も非常に困難であり、反応条件の最適化や反応生成物の分離精製に膨大な労力と時間を必要とする。このため、効率的な糖鎖合成法を確立するために、今なお研究が行われているのが現状である。そこで我々は新しい糖鎖合成法を開発するためのツールとしてフルオラスケミストリーに着目した。本稿ではこれまで筆者らが報告してきた「フルオラストグ法を用いた糖鎖合成」を中心に、最近のフルオラストグ法を用いた糖鎖の有機合成手法について紹介したい。

2. フルオラス化学

フロリナートFC72TM (C₆F₁₄) に代表される高度にフッ素化されたフルオラス（新フルオロカーボン性の）溶媒は、水およびほとんどの有機溶媒とは混和せず、図1に示すような分離層を形成する。さらにフッ素含量の高

い化合物に対して高い分配能を有することから、通常の有機化合物からフルオラス化合物を分配操作のみで選択的に分離できる性質を持つ。1994年にHorváthらがこの性質を応用したFluorous Biphasic System (FBS) を提唱した（文献4）。さらにこの方法論を有機合成の分野に利用したものがフルオラストグ法であり、1997年にCurranらによって固相合成に匹敵する方法として報告された（文献5）。

このフルオラストグ法の概念を図2に示した。まず、通常の有機分子にフルオラストグを導入し、分子全体をフルオラスな状態にする。このフルオラス化された基質に対し液相反応を行った後、反応後にフルオラス



図1

メディアを用いた簡単な分離操作を行う。現在、この反応後の分離精製手法としては、図2に示したフルオラス液-液抽出法 (F-LLE法) の他に、フルオラスシリカゲルを用いるフルオラス固相抽出法 (F-SPE法) が存在する。これらいずれかの分離操作を行うことで、カラム精製をすることなくフルオラス化

合物のみを通常の有機化合物から容易に分離することができる。この手順を目的物の骨格を構築するまで繰り返した後、最後にフルオラスタグを除去した後、再度フルオラスタグを用いた分離操作を行うことで目的物が得られる。一方除去されたフルオラスタグ残基はフルオラスタグに分離、回収される。また、合成の途中で得られる各反応中間体は通常の液相合成の際に用いる様々な分析手法 (NMR、MS、TLCなど) をそのまま使用する

ることができる。このようにフルオラスタグ法は、通常の有機合成において最も時間と労力を要するカラムクロマトグラフィーなどに代表される精製工程を大幅に簡略化できる優れた合成手法であると言える。またこれらフルオラスタグ法は合成化学だけでなく、触媒や生化学の分野等にも幅広く展開されており、成書、あるいは総説としてまとめられているので参考にしてほしい (文献6-9)。

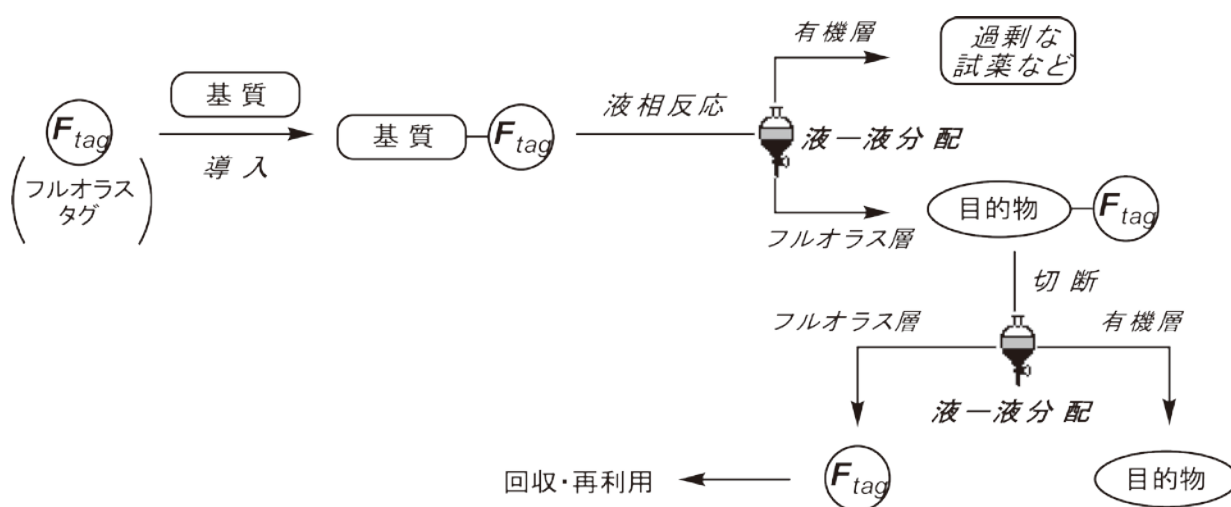


図2

3. F-LLE法を用いた糖鎖合成

3-1. Bnf基を用いた二糖合成 (文献10)

F-LLE法を用いた糖鎖合成の最初の報告例としては、図3に示したようにCurranらによる二糖合成が挙げられる。すなわち、糖供与体であるグリカール1の水酸基にBnf基を導

入し、糖供与体2へと変換した後、ついで酸触媒の存在下で糖受容体と反応させて二糖誘導体3の合成を行っている。これ以降、フルオラスタグ法を用いた糖鎖合成についての様々な報告が成されている (文献11-15)。

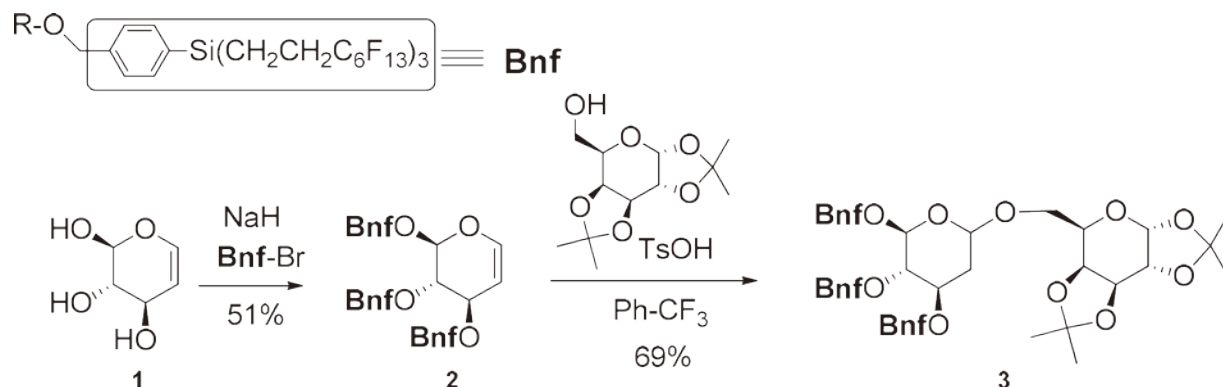


図3

3-2. Bfp基を用いた糖鎖合成 (文献16, 17)

我々のグループにおいても、図4に示すようなそれまで報告例の無かったアシル型のフルオラスタグ導入試薬**Bfp-OH** (**4**)を開発し糖鎖合成へと応用した。この**Bfp-OH**は調製が容易であり、さらに通常のアシル系の保護基と同様に収率良く糖水酸基に導入、除去することができる。この**Bfp-OH**を用いて、植物の分化、成長因子と考えられているアラビノガラクトタン-プロテイン (文献18) の構成糖鎖である β - (1 \rightarrow 6) -ガラクトペンタオース (**10**) の合成を試みた。すなわち、ガラ

クトース誘導体**5**の遊離の水酸基3箇所にも**Bfp**基を導入し、次いで化合物**6**のトリチル基を除去して糖受容体**7**へと変換した。その後、Schmidt法 (文献19) による糖供与体**7**とのグリコシル化およびTBDPS基の選択的除去を繰り返して五糖類**9**を1回のカラムクロマトグラフィーにより収率29% (9工程) で得ることに成功した。その際、各合成中間体はFC72と有機溶媒との液-液分配 (F-LLE法) により容易に分離することができた。その後すべての保護基を除去し、目的の β - (1 \rightarrow 6) -ガラクトペンタオース**10**を効率的に合成することに成功した。

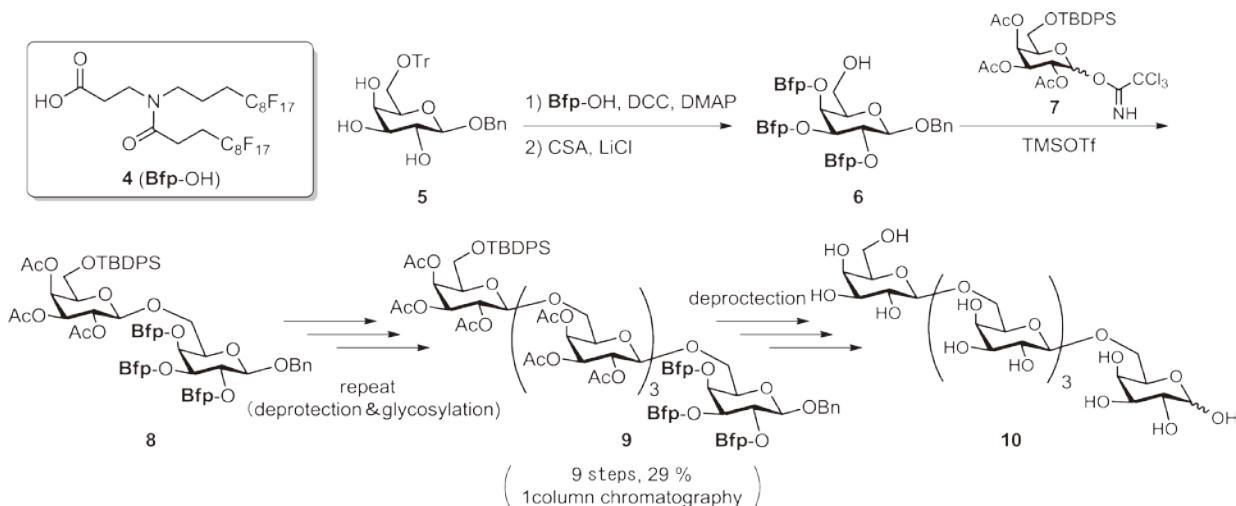


図4

3-3. Hfb基を用いた糖鎖合成 (文献20, 21)

フルオラス溶媒への分配効率をより向上させた6本のパーフルオロアルキル鎖を有するフルオラスタグ**Hfb-OH** (**11**)を開発し、糖鎖の効率的な合成に成功した。図4に示したように**Bfp**基を用いて糖鎖合成を行う場合には、分配操作の際にフルオラス層への高い分配効率を得るために複数の糖水酸基に**Bfp**基を導入する必要がある。しかし例えば分岐型の糖鎖を合成することを考慮に入れた場合には、複数の水酸基に導入できない場合も十分に考えられる。その点を改善するために**Bfp**基を改良し、糖水酸基一箇所に導入するだけで**Bfp**基を複数箇所導入した場合

と同様の分配効率を得られるフルオラスタグ**Hfb**基を開発した。この**Hfb**基を用いて図5に示すように三糖類**20**の合成に成功した。すなわち、まずグルコース誘導体**12**の遊離のアノマー水酸基のみにPyBOPを縮合剤として用いることで**Hfb**基を導入し、化合物**13**へと変換した。ついでTBDPS基の除去およびSchmidt法によるグリコシル化を繰り返すことで三糖誘導体**19**へと導いた。この際、**Hfb**基の結合した各合成中間体はFC-72とメタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒との分配操作だけで容易に分離精製することができた。さらに、この化合物**19**の**Hfb**基は通常のアシル基と同様にナトリウムメトキシ処

理により容易に除去でき、反応後のメタノールとFC-72による分配操作により、メチルエステル**21** (Hfb-OMe) としてFC-72層より回収できた。一方、メタノール層からは三糖誘導体**20**の粗生成物が得られ、この最終段階のみシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製することにより、化合物**20**を6工

程42%で得ることに成功した。

また、我々のグループではこれら**Bfp**基や**Hfb**基以外にも分子内にアミド骨格を有する様々なフルオラストグを開発し、それらを用いた糖鎖やペプチド合成について既に報告している (文献22-31)。

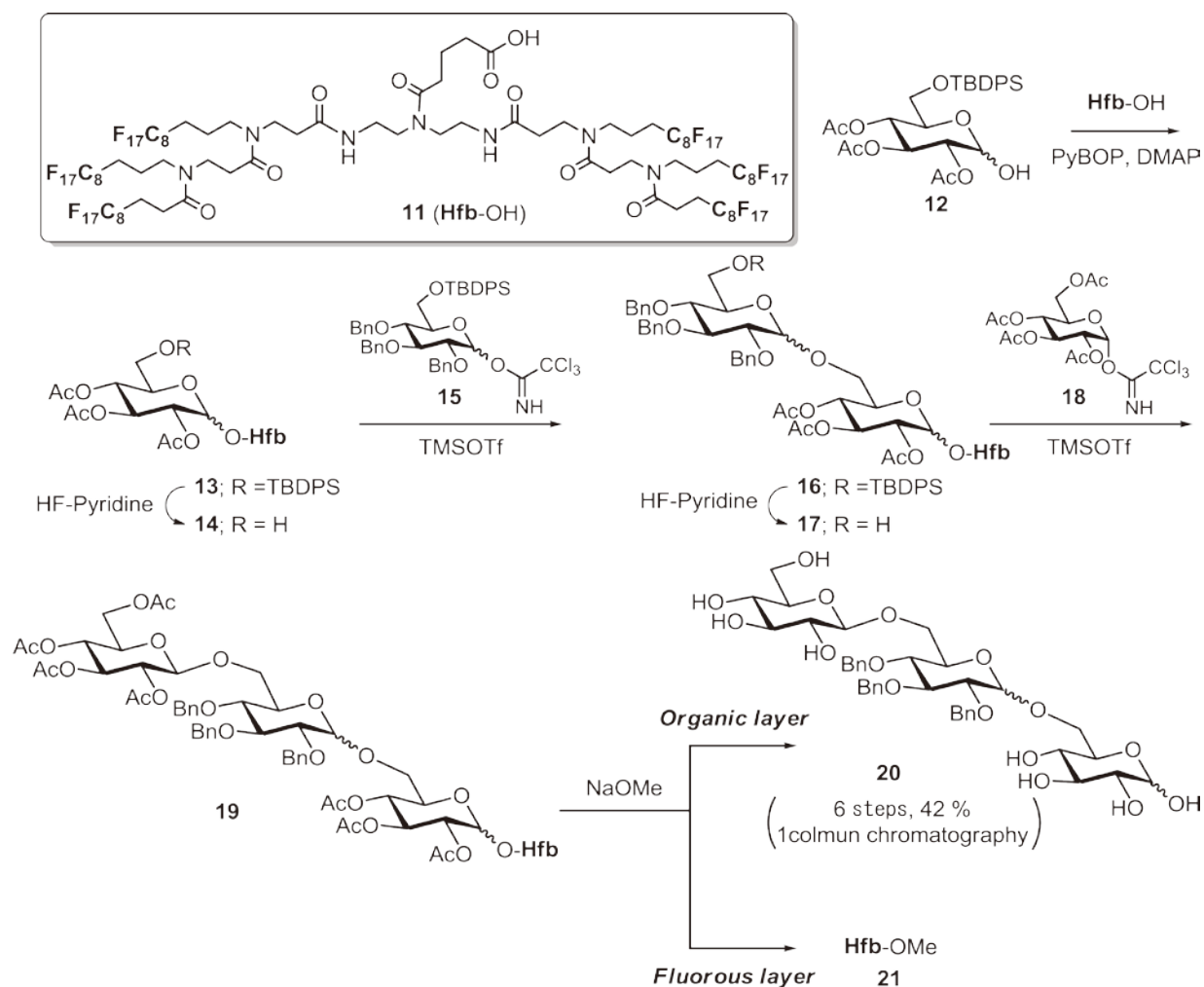


図5

3-4. 単糖ユニット合成 (文献32-34)

糖鎖合成を効率的に行うには、グリコシド結合を形成させるグリコシル化反応だけではなく、原料となる単糖ユニットを効率的に合成できる方法の確立が必要不可欠である。しかしながら、フルオラストグ法の応用範囲は我々の方法も含め、そのほとんどが縮合反応であるグリコシル化および脱程の繰り返し工

程に限定されており、単糖ユニットの部分は含まれていなかった。一般にこれら糖受容体や糖供与体といった単糖ユニットの合成は再結晶を用いて合成することが可能である。さらに近年では市販されている単糖ユニットの数も増加傾向にある。しかし、当然すべての単糖ユニットが結晶化できるわけではなく、さらに必要なすべての単糖ユニットが市販さ

れているわけでない。このような理由から単糖ユニットに関しては今なおその多くが手間と時間のかかる通常の有機合成法で調製されているのが現状である。すなわち糖鎖合成全体の効率化を考えた場合、グリコシル化だけでなく単糖ユニットも簡便に合成できる手法の確立が必要不可欠である。そこでF-LLE法による単糖ユニット合成を試みることにした。

まず、従来のポリアミド骨格を有するフルオラストグ (**Bfp**基や**Hfb**基など) を用いて単糖ユニット合成を行うことを考えた。しかしながら、これらのタグは分子内に存在するアミド結合の影響により、水酸基の保護基として必要不可欠なエーテル結合構築の際にいくつかの問題が存在する。例えば、分子

内にアミドプロトンがあるフルオラストグの場合、*N*-アルキル化が併発してしまう。また、水酸化ナトリウムや水酸化カリウムを用いる加熱条件下などでは、アミド結合が部分的に分解してしまう可能性がある。このためこれらの強塩基性化合物 (NaH、NaOH等) の使用が制限されてしまう。さらに、アミド骨格の影響によりNMRのカップリング定数の解釈が困難になってしまうという問題があった。これらの理由よりポリアミド骨格を有するフルオラストグは、単糖ユニット合成には適切ではないと判断した。そこで、従来の**Bfp**基や**Hfb**基のようなアミド骨格を有するフルオラストグの持つこれらの欠点を克服可能なポリエーテル型フルオラストグ *F*-2、*F*-3、*F*-4タグをそれぞれ合成した (図6)。

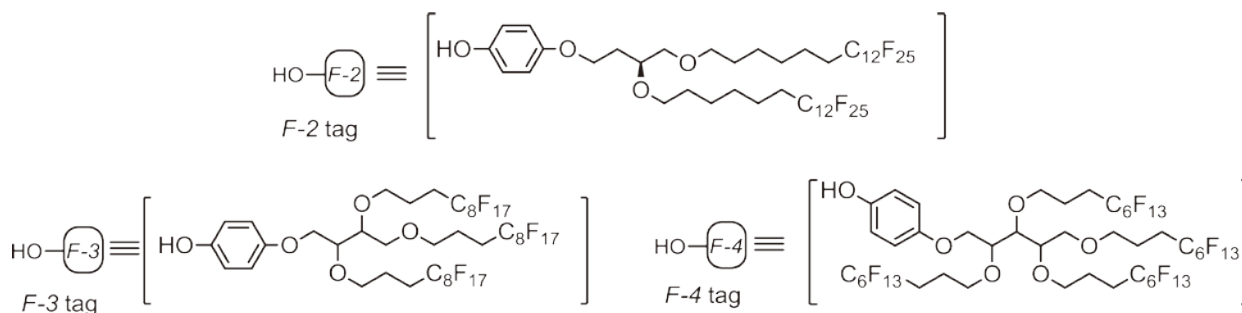


図6

これらのタグは分子内にほぼ同数のフッ素原子を有しており、これらのタグをベースに種々の単糖ユニットを合成し、その分配効率の測定することで構造の最適化を試みた。分配系としてはフルオラス溶媒として最も代表的なFC72を用い、一方有機溶媒としてはフルオラストグ法による液-液分配の際に使用頻度が高いメタノール、アセトニトリル、トルエンを用いた。その結果、これら3つのタグは分子内に含まれるフッ素原子の数にほとんど差がないにもかかわらず、*F*-3のタグの結合した単糖ユニットが最も高い分配効率を持つ傾向があることが明らかとなった。この結果より、単糖ユニット合成にはフルオラス

タグ *F*-3が最も適していることが判明した (表1)。

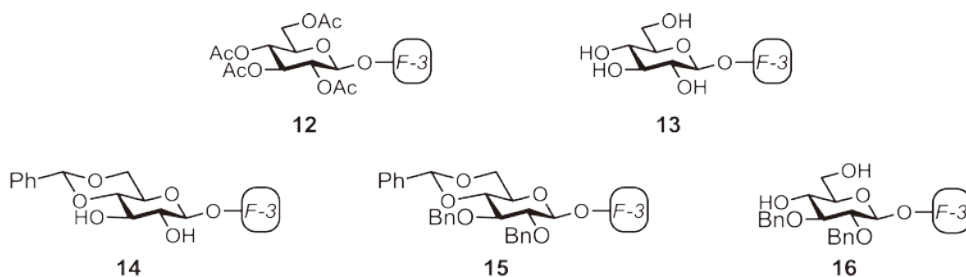
次にこの結果を元に、*F*-3タグを用いて分配系の最適化を試みた (表2)。まずFC72をフルオラス溶媒とし、種々の有機溶媒との分配効率について検討を行ったところ、化合物ごとに分配効率に大きなばらつきが見られた (run1-4)。これは各単糖誘導体のFC72への低い溶解性が影響していると考えられ、さらに化合物ごとに分配溶媒を設定する必要が生じてしまうことを示すため、良い結果とは言えない。そこでフルオラス化合物の分配効率を向上させるために、Curranらの報告している solvent turning (文献35) の概念を応用

run	substrate	n	F content (wt%)	partition coefficient		
				[FC-72:MeOH]	[FC-72:MeCN]	[FC-72:PhMe]
1		4	58.6	50 : 50	69 : 31	64 : 36
		3	60.8	95 : 5	91 : 9	73 : 27
		2	59.3	low solubility	low solubility	low solubility
2		4	49.1	7 : 93	5 : 95	1 : 99
		3	50.3	81 : 19	57 : 43	1 : 99
		2	49.1	low solubility	low solubility	<1 : >99
3		4	51.1	2 : 98	50 : 50	88 : 12
		3	52.5	98 : 2	91 : 9	94 : 6
		2	51.3	low solubility	low solubility	low solubility
4		4	53.4	2 : 98	14 : 86	95 : 5
		3	55.2	57 : 43	96 : 4	99 : 1
		2	53.8	low solubility	low solubility	low solubility

表1

することとした。すなわち、FC72に両親媒性フルオラス溶媒であるHFE7100 (文献36) を添加した均一系混合溶媒 (FC72:HFE7100 = 1:4) をフルオラス溶媒とし、5%含水有機

溶媒による分配効率の検討を行ったところ、有機溶媒がアセトニトリルの場合、いずれの糖誘導体 (12-16) においても実用的な分配効率が得られた (run 7)。



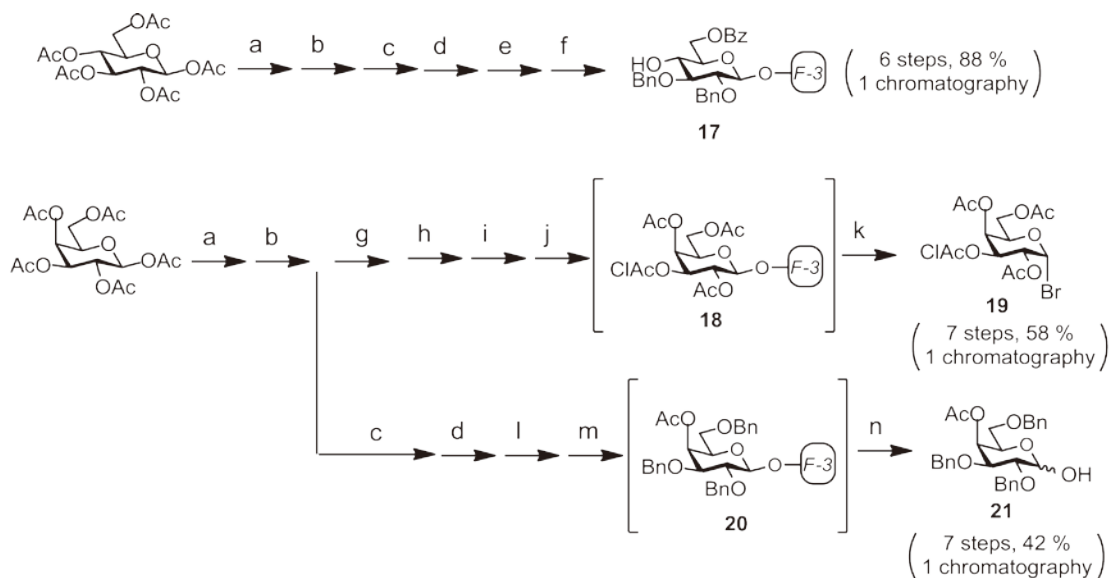
run	partition coefficient	12	13	14	15	16
1	FC72 / MeOH	81 : 19	57 : 43	98 : 2	emulsion	49 : 51
2	FC72 / MeCN	57 : 43	96 : 4	91 : 9	87 : 13	75 : 25
3	FC72 / PhMe	<1 : >99	>99 : <1	94 : 6	<1 : >99	30 : 70
4	FC72 / AcOEt	<1 : >99	<1 : >99	<1 : >99	<1 : >99	<1 : >99
5	FC72+HFE7100 / MeOH (1 : 4) with 5% H ₂ O	94 : 6	45 : 55	66 : 34	94 : 6	68 : 32
6	FC72+HFE7100 / EOH (1 : 4) with 5% H ₂ O	67 : 33	21 : 79	33 : 67	59 : 41	31 : 69
7	FC72+HFE7100 / MeCN (1 : 4) with 5% H ₂ O	97 : 3	90 : 10	83 : 17	97 : 3	93 : 7

表1

次に、この新しいフルオラス混合溶媒を使用する新しい分配系を用いた単糖ユニットの合成を試みた (図7)。すなわち、*F*-3タグを市販のグルコースあるいはガラクトースのアセチル体へとそれぞれ導入した後、種々の単糖ユニット合成を行うことでそれぞれ良好な収率で単糖ユニット**17**、**19**、**21**も合成することができた。この*F*-3タグの結合した単糖ユニットは最終工程で臭化亜鉛・臭化アセチル処理により**19** (文献32) のようなグリコシルブロミドに容易に変換できる。さらにこの

-アルコキシフェニル型のリンカー部分は硝酸セリウム (IV) アンモニウム (CAN) 処理で選択的に除去され、単糖ユニット**21**

(文献33) のような1位遊離の単糖ユニットが得られる。一方、いずれの場合もフルオラス層からは高収率でフルオラスタグが回収され、これらは再利用が可能である。*F*-3タグの結合した各反応中間体はフルオラス混合溶媒 (FC72:HFE7100 = 1:4) と95%アセトニトリル水溶液を用いる改良した分配系を用いることで、いずれも高い割合でフルオラス層に分配され、それぞれ最終工程後のみシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製を行った。なお、フルオラスタグの結合した各反応中間体はそれぞれフルオラス混合溶媒で3回分配した後、有機層には残っていないことをTLCによって確認している。



Reaction conditions (a) *F*-3 tag, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$; (b) NaOMe; (c) $\text{PhCH}(\text{OMe})_2$, CSA; (d) BnBr, NaH, 15-Crown-5; (e) 95% aq. TFA; (f) BzCl, Et_3N ; (g) $n\text{-Bu}_2\text{SnO}$, BnBr, TBAI; (h) Ac_2O , Et_3N , DMAP; (i) $\text{Pd}(\text{OH})_2$, H_2 gas; (j) ClAc_2O , Pyr; (k) ZnBr_2 , AcBr; (l) Et_3SiH , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$; (m) Ac_2O , Et_3N ; (n) CAN

図7

3-5. ベンジル型フルオラスタグ23を用いた糖鎖合成 (文献37, 38)

さらに、我々はより使い勝手の良いフルオラスタグ**23**を開発し糖鎖合成へ応用した。このフルオラスタグ**23**は、従来の*F*-3タグと比較して高い対称性を持つ。このためフルオラスタグ自体のNMRシグナルが糖のシグナルにほとんど影響を及ぼさなくなり、フルオラスタグの結合した各反応中間体のNMR解

析が格段に簡単になった。さらにベンジル型リンカーを有しているためこれまでほとんどの場合糖のアノマー位限定されていたフルオラスタグの導入部位を任意の位置に高収率で導入できるようになった。

実際にオリゴ糖合成の応用例として、まずフルオラスタグ**23**を用いて、胃粘膜由来のムチン型たんぱく質糖鎖 (文献39) の末端構造に由来する化合物**26**の合成を試みた。ま

ず、dibutyltin oxideを用いてガラクトースの3位水酸基に導入した後、ユニット合成、Schmidt法によるグリコシル化を経て、最後にすべての保護基を除去した後に、最終生成物のみをカラムクロマトグラフィー精製を行い、目的の二糖誘導体を収率55% (8工程) で得た。このベンジル型フルオラスタグ**23**は通常のベンジル基と同様にPd(OH)₂を用いた接触還元によりかつ高収率で除去できる。

さらに我々はフルオラスチオグリコシド**27**を用いて、がんマーカー (文献40) として期待されているLacdiNac誘導体の前駆体

である二糖類**29**の合成についても行った。まず、ベンジル型フルオラスタグ**23**をチオ尿素処理によりフルオラスチオール**27**へと変換した後、グルコサミン誘導体を縮合することで、フルオラスチオグリコシド**28**へと2工程収率82%で変換することが可能できた。さらにユニット合成と2回のグリコシル化を経て目的の二糖類**29**を6工程収率39%で合成することができた。この結果より、このフルオラスチオグリコシドは糖受容体としてのみならず糖供与体としても用いることができること示すことができた (図8)。

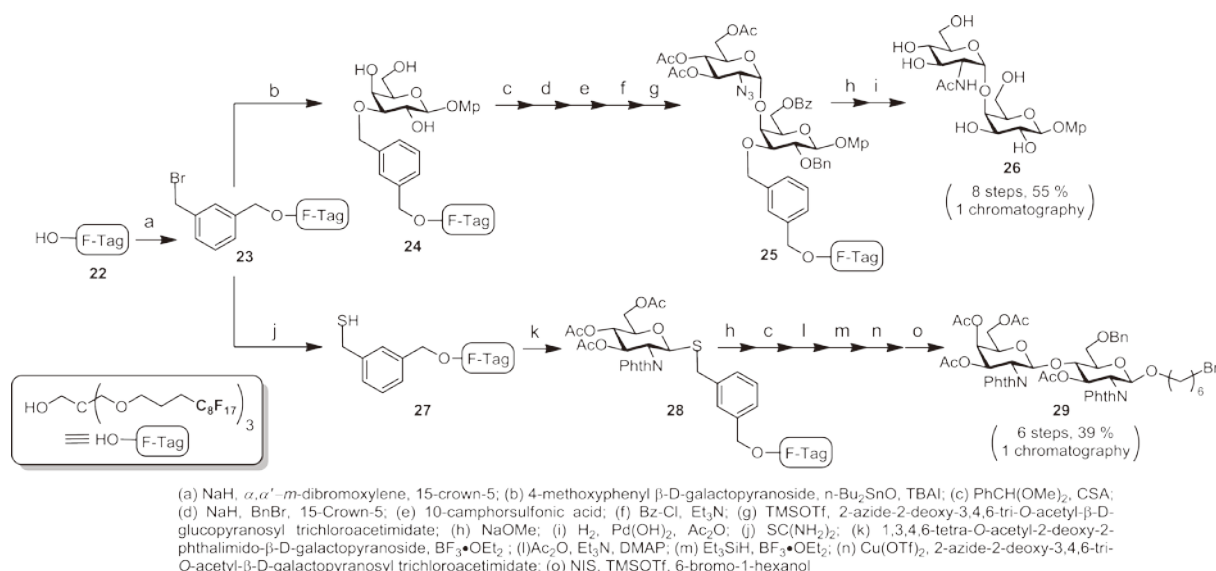


図8

これら2種類のオリゴ糖合成において、フルオラスタグの結合した各反応中間体は前述した改良した分配系を用いるF-LLE法によって分離され、簡単に精製することができた。さらに、いずれの場合も最終工程のみにカラム精製を行うだけで良好な収率でそれぞれ目的の化合物**26**および**29**を得ることができた。

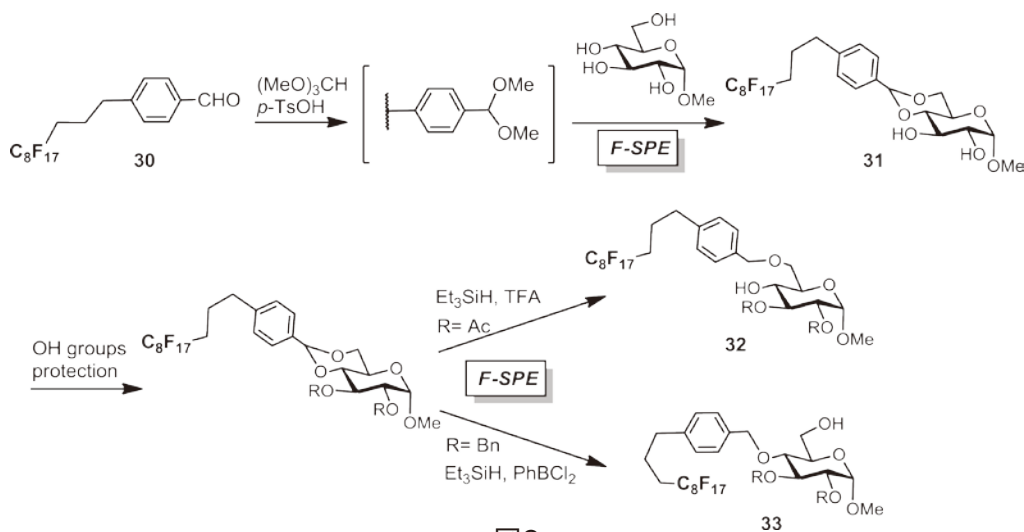
以上の結果から、今回示したポリエーテル骨格を有するフルオラスタグは単糖ユニット合成に用いる様々な反応条件下だけでなく、グリコシル化の反応条件下でも安定であり、糖鎖合成全体にわたって使用可能であることを明らかにすることができた。

4. F-SPE法を用いた糖鎖合成

4-1. フルオラスベンズアルデヒド**30**を用いた糖鎖合成 (文献41)

武内らはフルオラスベンズアルデヒド**30**がF-SPE法による糖鎖合成に有用であることを報告している (図9)。このフルオラスベンズアルデヒド**30**は通常のベンズアルデヒドと同様にグルコースやガラクトースの4位と6位にベンジリデン基として導入でき、さらに位置選択的開裂 (Et₃SiH-TFA系あるいはEt₃SiH-PhBCl₂系) により4位水酸基、あるいは6位水酸基のみを選択的に遊離にすることが可能である。また得られた糖受容体**32**お

よび**33**はグリコシル化反応にも利用できる F-SPEで簡便に行っている。
ことを報告している。なお各中間体の精製は

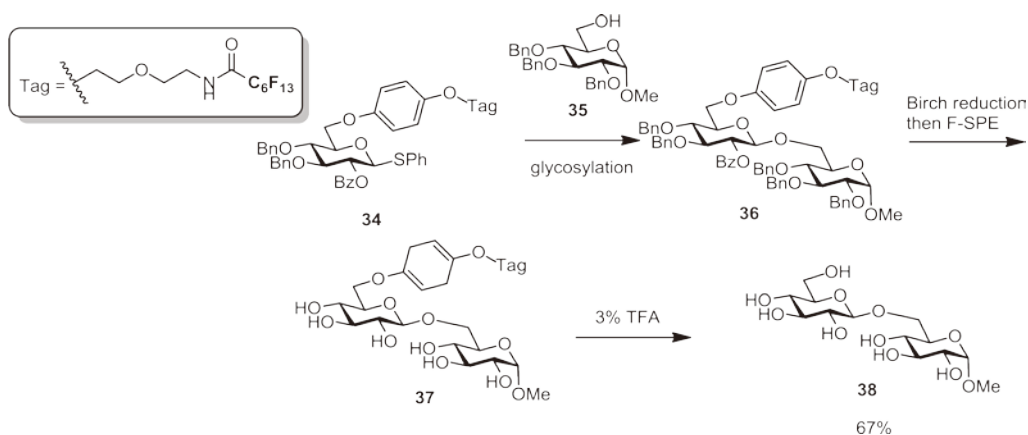


4-2. セーフティーキャッチリンカーとフルオラストグ法の組み合わせ (文献42)

田中らはフルオラストグ法とセーフティーキャッチリンカーの概念を組み合わせたオリゴ糖合成について報告している。通常、フェニルエーテルは酸性塩基性両条件下で非常に安定である。しかしBirch還元を行うことでビニルエーテルへと変換した後は温和な酸性条件下で切断することが可能である。またBirch還元はエステルやベンジルエーテルなどの保護基も同時に脱保護することができる。さらに、この手法にF-SPE法を組み合わせることで、脱保護後の高極性のオリゴ糖の分離精製を簡便に行うことができる。田中ら

は実際にこの方法を用いることで、二糖誘導体**38**の効率的な合成に成功している。

すなわち、まずフルオラストグの結合したチオグリコシド**34**および糖受容体**35**をグリコシル化し二糖**36**へと変換した。ついでBirch還元によってリンカーの芳香環の還元および脱保護を同時に行った。この際F-SPE法を用いることで、通常シリカゲルカラムでは精製することが困難な極性の高い化合物**37**を簡便に得ることができた。最後に3%TFA処理によりリンカーを切断することで目的の二糖**38**を収率67%で得ることに成功している (図10)。



4-3. マイクロリアクターとF-SPE法の組み合わせ (文献43)

マイクロリアクターは一般的に3次元構造を持つ反応装置であり、内部は数十から数百ナノメートルの微細な流路をもつ。その特徴の一つとして一般的なバッチ式の反応装置と比較して体積あたりの表面積が非常に大きいという性質を持つ。この構造を持つことにより、バッチ式の反応装置よりはるかに厳密に全体の反応温度、圧力、流速、滞在時間、物質移動さらには熱移動などの各パラメーターを制御することが可能である。このため、マイクロリアクターは従来の手法と比較して短時間にかつより安全にパイロットスケールやテクニカルスケールへ移行することができる。その際にセル内の反応パラメーターを変えることなく、複数のマイクロリアクターを組み合わせることによって生産量を簡単に向上させることができる。この手法をナンバリングアップという。このような理由から、マイクロリアクターは次世代型の反応装置として非常に期待されている。

SeebergerらはこのマイクロリアクターにF-SPE法を組み合わせることで、(1→6)結合したグルコースの繰り返し四糖の合成について報告している。すなわち、フルオラスリンカーに対して、6位の糖水酸基がFmoc化された糖供与体**40**とのグリコシル化および脱Fmoc化を繰り返すことで四糖レベルの合成に成功した。その際、得られる各反応中間体はF-SPEを用いることにより、高収率かつ高純度で容易に精製することに成功している。

さらに、マイクロリアクターを用いることで各グリコシル化の反応条件の最適化を容易に行うことができ、それらの反応条件を用いることにより高収率で目的の各オリゴ糖のスケールアップについても成功した。例えば、フルオラスリンカーとの1回目のグリコシル化で得られる単糖誘導体を1日あたり11.3 mmol合成することに成功している。この生産量は、反応装置を並べる(ナンバリングアップ)するだけでさらに飛躍的に向上させることができる。

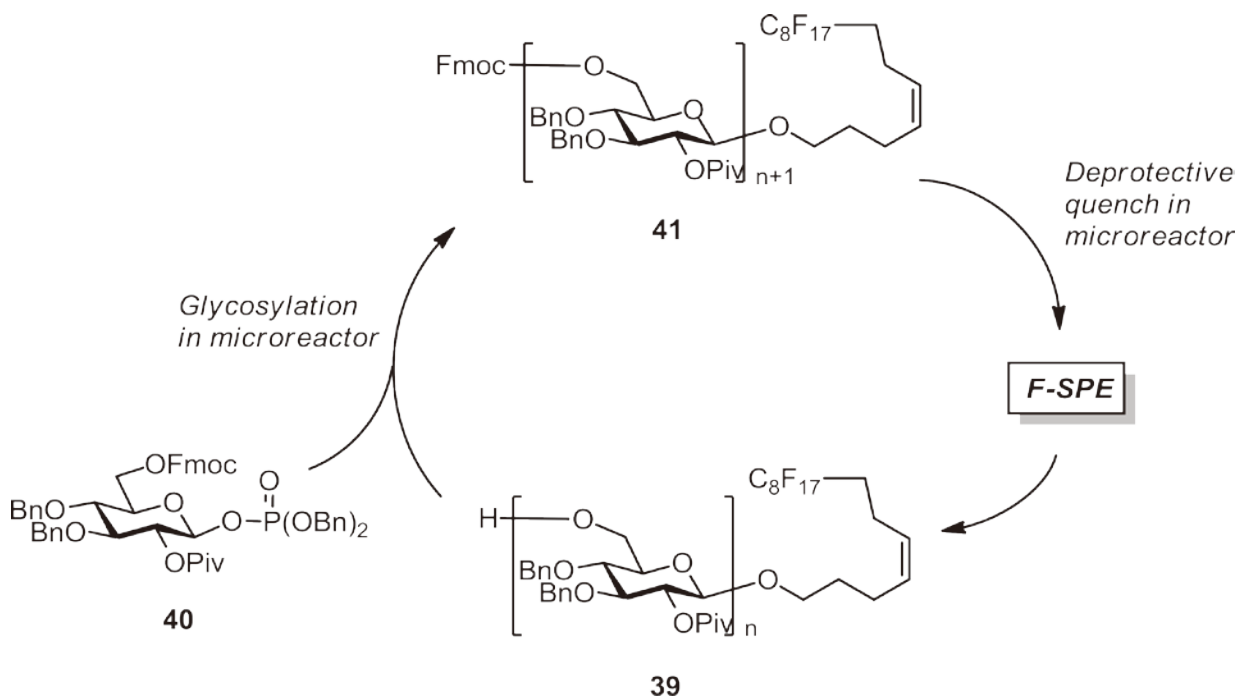


図11

文 献

- Varki A. (1993) *Glycobiology* **3**, 97-130.
- Dwek, R. A. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 683-720.
- Blithe, D. L. (1993) *Trends Glycosci. Glycotech.* **5**, 81-98.
- Horváth, I. T., Rábai, J. (1994) *Science* **266**, 72-75.
- Studer, A., Hadida, S., Ferritto, R., Kim, S.-Y., Jeger, P., Wipf, P., Curran, D. P. (1997) *Science* **275**, 823-826.
- Gladysz, J., Curran, D. P., Horváth, I. T., Eds., (2004) *Handbook of Fluorous Chemistry*, Wiley / VCH, Weinheim.
- Curran, D. P. (1998) *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1174-1196.
- Zhang, W. (2004) *Chem. Rev.* **104**, 2531-2556.
- Zhang, W. (2008) *Chem. Commun.* 5686-5694.
- Curran, D. P., Ferritto, R., Hua, Y. (1998) *Tetrahedron Lett.* **39**, 4937-4940.
- Edwards, H. D., Nagappayya, S. K., Pohl, N. L. B. (2012) *Chem. Commun.* **48**, 510-512.
- Tojino, M., Mori, M., Kasuya, M. C. Z., Hatanaka, K., Kawaguchi, A., Nagata, K., Takashi Shirai, T., Mizuno, M. (2012) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 1251-1254.
- Hogendorf, W. F. J., Kropec, A., Filippov, D. V., Overkleeft, H. S., Huebner, J., van der Marel, G. A., Codée, J. D. C. (2012) *Carbohydr. Res.* **356**, 142-151.
- Yang, B., Jing, Y., Huang, X. (2010) *Eur. J. Org. Chem.* 1290-1298.
- Tanaka, H., Tateno, Y., Takahashi, T. (2012) *Org. Biomol. Chem.* **10**, 9570-9582.
- Miura, T., Hirose, Y., Ohmae, M.; Inazu, T. (2001) *Org. Lett.* **3**, 3947-3950.
- Miura, T., Goto, K., Waragai, H., Matsumoto, H., Ohmae, M., Ishida, H., Satoh, A., Inazu, T. (2004) *J. Org. Chem.* **69**, 5348-5353.
- Kuroyama, H., Tsutsui, N., Hashimoto, Y., Tsumuraya, Y. (2001) *Carbohydr. Res.* **333**, 27-39.
- Schmidt, R. R., Michel, J., Roos, M. (1984) *Liebigs Ann. Chem.* 1343-1357.
- Miura, T., Goto, K., Hosaka, D., Inazu, T. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 2047-2051.
- Goto, K., Miura, T., Hosaka, D., Matsumoto, H., Mizuno, M., Ishida, H., Inazu, T. (2004) *Tetrahedron* **60**, 8845-8854.
- Miura, T. (2003) *Trends Glycosci. Glycotech.* **15**, 351-358.
- Goto, K., Miura, T., Mizuno, M., Takaki, H., Imai, N., Murakami, Y., Inazu, T. (2004) *Synlett* 2221-2223.
- Miura, T., Satoh, A., Goto, K., Murakami, Y., Imai, N., Inazu, T. (2005) *Tetrahedron Asymmetry* **16**, 3-6.
- Miura, T., Tsujino, S., Satoh, A., Goto, K., Mizuno, M., Noguchi, M., Kajimoto, T., Nobe, M., Murakami, Y., Imai, N., Inazu, T. (2005) *Tetrahedron* **61**, 6518-6526.
- Goto, K., Miura, T., Mizuno, M. (2005) *Tetrahedron Lett.* **46**, 8293-8297.
- Mizuno, M., Goto, K., Miura, T., Inazu, T. (2006) *QSAR & Comb. Sci.* **25**, 742-752.
- Mizuno, M., Matsumoto, H., Goto, K., Hamasaki, K. (2006) *Tetrahedron Lett.* **47**, 8831-8835.
- Mizuno, M., Goto, K.; Miura, T., Hosaka, D., Inazu, T. (2003) *Chem. Comm.* 972-973.
- Mizuno, M., Goto, K., Miura, T., Matsuura, T., Inazu, T. (2004) *Tetrahedron Lett.* **45**, 3425-3428.

31. Mizuno, M., Goto, K., Miura, T. (2005) *Chem. Lett.* **34**, 426-427.
32. Goto, K.; Mizuno, M. (2007) *Tetrahedron Lett.* **48**, 5605-5608.
33. Mizuno, M., Kitzawa, S., Goto, K. (2008) *J. Fluorine Chem.* **129**, 955-960.
34. Kawakami, H., Goto, K., Mizuno, M. (2009) *Chem. Lett.* **38**, 906-907.
35. Yu, M., S., Curran, D. P., Nagashima, T. (2005) *Org. Lett.* **7**, 3677-3680.
36. MeOC₄F₉ is a commercially available fluorocarbon solvent (3M, Tokyo), which is called NovecTM HFE7100 and miscible in common organic solvents and fluorous solvents.
37. Goto, K., Mizuno, M. (2010) *Tetrahedron Lett.* **51**, 6539-6541.
38. Goto, K., Nuermairaiti, N., Mizuno, M. (2011) *Chem. Lett.* **40**, 756-757.
39. Kawakubo, M., Ito, Y., Okimura, Y., Kobayashi, M., Sakura, K., Kasama, S., Fukuda, M. N., Fukuda, M., Katsuyama, T., Nakayama, J. (2004) *Science* **305**, 1003-1006.
40. Fukushima, K., Satoh, T., Baba, S., Yamashita K. (2010) *Glycobiology* **20**, 452-460.
41. Kojima, M., Nakamura, Y., Takeuchi, S. (2007) *Tetrahedron Lett.* **48**, 4431-4436.
42. Tanaka, H., Tanimoto, Y., Kawai, T., Takahashi, T. (2011) *Tetrahedron* **67**, 10011-10016.
43. Carrel, F. R., Geyer, K., Codée, J. D. C., Seeberger, P. H. (2007) *Org. Lett.* **9**, 2285-2288.
44. Zong, C., Venot, A., Dhamale, O., Boons, G.-J. (2013) *Org. Lett.* **15**, 342-345.

腫瘍形成におけるN型糖鎖上のLacdiNAc群の生物学的意義

Biological roles of LacdiNAc groups on N-glycans in the progression of human cancer cells

平野 清子*¹、松田 昭生*²、白井 孝*³、古川 清*⁴

Kiyoko HIRANO, Akio MATSUDA, Takashi SHIRAI, Kiyoshi FURUKAWA

【要旨】

癌化に伴い細胞表面のタンパク質や脂質上の糖鎖構造が変化することは広く知られている。糖タンパク質上のN型及びO型糖鎖の非還元末端のGalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc (LacdiNAc あるいはLDN) 構造は、哺乳動物においては比較的珍しい構造である。我々は以前ヒトの乳癌において糖タンパク質のN型糖鎖上のLacdiNAc群の発現量がこの癌の悪性化に伴い顕著に減少することを見いだした。その一方でヒト前立腺癌、卵巣癌及び膀胱癌においては癌の進行に伴いLacdiNAc群の発現量が増加する。このことからこの糖鎖の発現量の増減は癌組織依存的であると考えられる。これまでにLacdiNAc群の生成を司る2つの糖転移酵素 β 4-N-acetylgalactosaminyltransferases (β 4GalNAcTs)、すなわち β 4GalNAcT3 及び β 4GalNAcT4がそれぞれ同定されており、組織特異的に発現し、この糖鎖の発現量を制御している。

1. 序論

糖鎖非還元末端のGalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc (LacdiNAcあるいはLDN) 構造 (以下その修飾された構造をLacdiNAc群と呼ぶ) は、

脊椎動物及び無脊椎動物のN型及びO型糖鎖の両者にみられる構造である。LacdiNAc群は*Schistosoma mansoni*などの寄生蠕虫に豊富に検出されることが知られている [1]。しかしながらこの糖鎖は哺乳動物の糖タンパク質上にはほとんど存在しない稀少糖鎖であり、以前はウシ脳下垂体糖ホルモンなどの限られた糖タンパク質上には存在しないと考えられてきた [2, 3]。しかし最近の糖鎖解析技術の進歩に伴い、少量ながらもLacdiNAc群が哺乳動物の様々な糖タンパク質上に存在していることが明らかにされてきた [4]。LacdiNAc構造は主に糖タンパク質のN型糖鎖上にみられ、硫酸化 [5-7]、シアリル化 [8-11] あるいはフコシル化 [8, 11] などの各種修飾を受ける。また報告例は多くないものの、ウシ副腎皮質刺激ホルモン proopiomelanocortin やマウスの透明帯 zona pellucida glycoprotein 3 のO型糖鎖上にもLacdiNAc群が存在することが分かっている [12, 13]。最近、リン酸化されたLacdiNAc構造GalNAc β 1 \rightarrow 4 (PO₃ \rightarrow GlcNAc β 1 \rightarrow 6) がヒトとウシのzona pellucida glycoprotein 3 及び α -dystroglycanなどのO型糖鎖上に存在することが確認されている [14]。また

*1 糖タンパク質工学研究室 研究員

*2 研究部 部長 兼 糖タンパク質工学研究室 室長

*3 常務理事

*4 長岡技術科学大学 教授

今日までにLacdiNAc群が脳下垂体ホルモン lutropinの血液循環サイクル中における半減期を制御していることや [15- 17]、ウシ乳腺上皮細胞の分化に伴いこの糖鎖構造の発現量が変動することが報告されている。[18, 19]。

以前我々はヒト乳癌において糖タンパク質に結合したN型糖鎖上のLacdiNAc群の発現量が、患者の生存率に逆相関することを示した [20]。一方、ヒト前立腺癌、卵巣癌及び膀胱癌由来の細胞株では、逆にこの糖鎖の発現量が正常細胞由来のものと比較して一様に増大していることが報告されている [21- 24]。このことからLacdiNAc群の発現量は各種癌組織特異的に制御されていると推測される。本総説ではLacdiNAc群の発現量及びこの糖鎖の生成を司る糖転移酵素と癌の悪性度との関係について述べていきたい。

2. 癌化に伴うLacdiNAc糖鎖発現量の変化

我々は最初、ウシ乳脂肪球皮膜から精製したCD36のN型糖鎖上にLacdiNAc構造が存在することを見だし、その後、多くのウシ乳腺上皮膜糖タンパク質上にもこの構造が存在することを明らかにした [9, 25]。またLacdiNAc群の発現量はウシの乳腺上皮細胞の分化に伴い上昇することも見いだした [19]。次にヒトの乳癌患者由来検体を用いてこの糖鎖の発現量について解析を行った。その結果、LacdiNAc群の発現量は周辺的正常組織と比較して癌部において減少しており、さらに癌の進行に伴ってこの糖鎖の発現量が減少することを明らかにした (図1) [20]。そこで乳癌細胞におけるLacdiNAc群の生物学的意義を検討すべく、この糖鎖の生成を司る糖転移酵素 β 4-N-acetylgalactosaminyltransferase 4 (β 4GalNAcT4) のcDNAを乳癌由来細胞MDA-MB-231に導入し、この糖転移酵素の過剰発現株を樹立した。これらの細胞を用いてコロニー形成能及び浸潤能に関する

評価を行った。その結果、対照と比較して β 4GalNAcT4遺伝子過剰発現株ではいずれも低下していることが明らかになった。一方増殖能に関しては差が認められなかった (Hirano *et al.*, 論文準備中)。同様に β 4GalNAcT3を過剰発現させたヒト神経芽細胞腫細胞SK-N-SH及びSH-SY5Yにおいても細胞遊走能や浸潤能などが低下することが報告されている [26]。これらのことから、糖タンパク質に付加したLacdiNAc糖鎖がどのように乳癌や神経芽細胞腫の腫瘍形成の抑制に関与するのかを解明することは非常に重要であると考えられる。

一方、Prostate specific antigen (PSA) という特定の糖タンパク質に関して、そのN型糖鎖上のLacdiNAc群の発現量は前立腺の癌化に伴い上昇することが後述の通り明らかになっている。前立腺癌においては患者血清中のPSA濃度が上昇するため、血中のPSA濃度を指標とした診断法が現在広く用いられている。しかしながら前立腺肥大症などの良性疾患の患者血清中においてもPSA濃度の上昇が見られることから、診断率の向上が課題とされている。PSAはN型糖鎖を1つ持つ糖タンパク質であり、これまでに癌化に伴いこの糖鎖構造が変化することが数多く報告されている [27- 30]。従ってPSAの糖鎖構造の質的变化に着目することによって、より精度の高い診断法の開発につながると期待される。我々は前立腺癌及びBPHの患者血清中からそれぞれPSAを精製後、その糖鎖構造を解析し比較した。その結果、癌患者由来のPSA糖鎖ではBPHの患者由来のものと比較して、糖鎖非還元末端の一方がLacdiNAc構造になっているものの割合が増加していることを見いだした (図2) [21]。またFukushimaらは前立腺癌患者血清中のPSAはBPH患者由来のものと比較して、*Trichosanthes japonica* agglutinin-II (TJA-II) [31] に結合するものの割合が増加することを報告した [22]。

TJA-IIはGlcNAcに β 1,4結合した末端のGalNAcを認識するレクチンでもあることから、PSA糖鎖上にLacdiNAc群をもつものが増加することが示唆された。このことから同著者らはTJA-IIを利用した新たな前立腺癌の診断法の開発を提唱している [22]。

上記PSAの場合に見られるような、癌化に伴うLacdiNAc群の発現量の増加は、他の癌においても、特に各種株化された細胞で報告されている。例えば、膵癌由来細胞Capan-1から産生されるribonuclease I (RNase I)のN型糖鎖上にはLacdiNAが存在するが、一方健常人の膵臓において産生されるRNase Iにはこの糖鎖の存在は認められない [32]。また卵巣癌由来細胞SKOV3、RMG-1においてこれらの細胞で産生される糖タンパク質にLacdiNAc群、特にRMG-1においては硫酸化されたLacdiNAc構造が存在しているこ

とが報告されている [23、33]。これらはいずれも細胞株を用いた結果であり、今後実際にこれらの癌患者の癌部非癌部におけるLacdiNAc群の発現量の解析等が待たれるところである。

なお、癌細胞中のLacdiNAc群の検出例は糖タンパク質のN型糖鎖上に限られており、O型糖鎖上については未だ報告がなされていない。これはLacdiNAc群を持つ糖タンパク質量が非常に限られていることが後者の検出を困難にしていることの要因であると考えられる。実際、 β 4GalNAcT3と β 4GalNAcT4は両者ともO型糖鎖上のGlcNAc残基にGalNAcを転移することが可能であることが報告されている [34]。今後、癌組織におけるO型糖鎖上のLacdiNAc群についての検討も行っていくべき課題の1つであると考えられる。

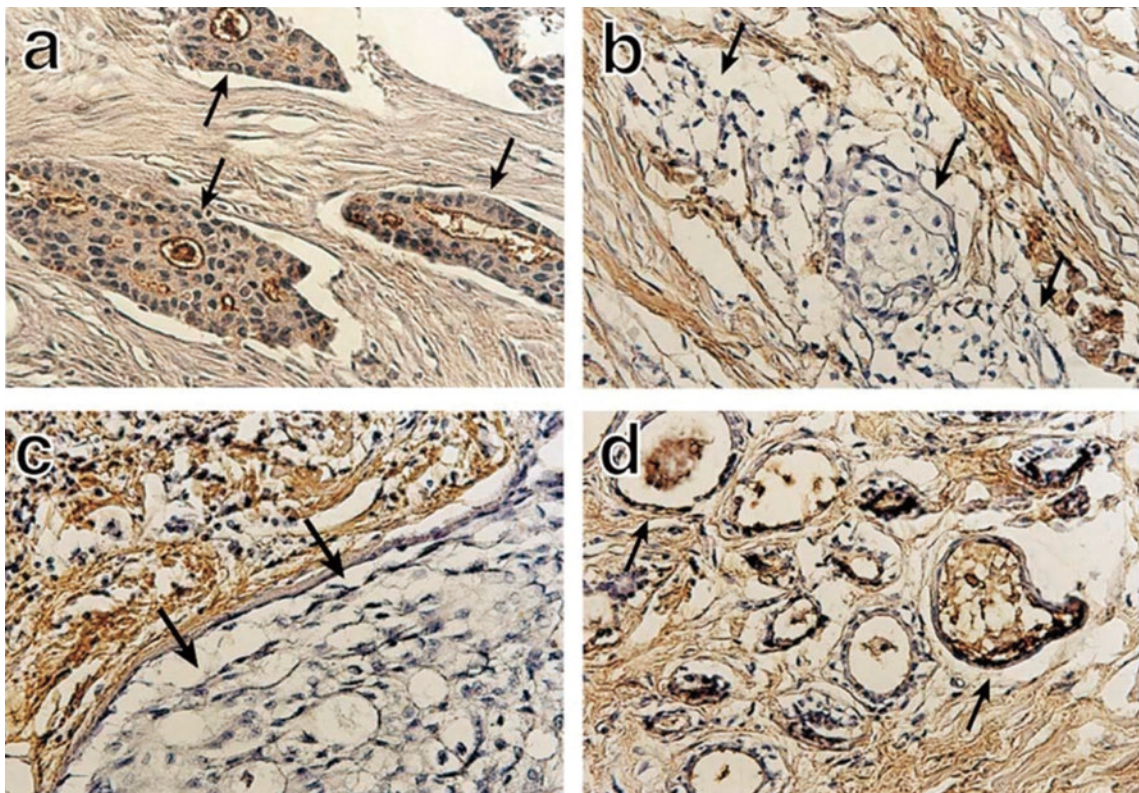


図1 ヒト乳癌組織の*Wisteria floribunda* agglutinin (WFA)による免疫組織化学染色
 パネルa, b及びcはそれぞれ乳癌患者のステージI, II及びIIIの組織切片、パネルdは乳腺線維嚢胞症の患者組織切片をWFAレクチン染色したもの。WFAはLacdiNAc構造の検出に用いられ、WFAに反応する部位は茶色に染まっている。なお矢印は腫瘍部分を示す。

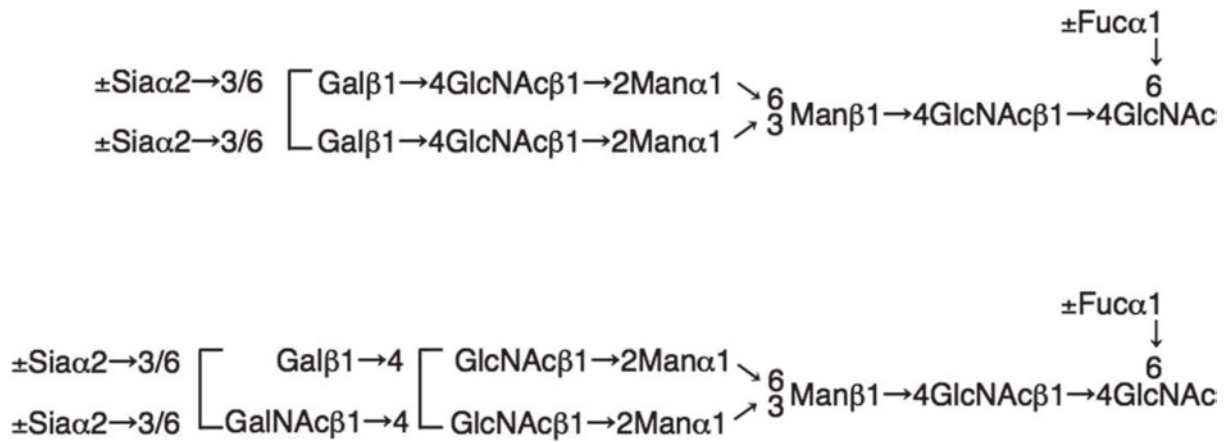


図2 PSAのN型糖鎖構造

前立腺癌及び前立腺肥大症(BPH)の患者血清中からPSAを精製し、そのN型糖鎖構造をMALDI-QIT TOFMSを用いて解析した。Fuc, fucose; Gal, galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; GlcNAc, N-acetylglucosamine; Man, mannose; Sia, N-acetylneuraminic acid.

3. 癌細胞中における β 4GalNAcTs による LacdiNAc群の生成制御

癌細胞においてLacdiNAc群の生成がどのようにして制御されているのか興味深い。現在までにヒトではLacdiNAc構造の生を司る2種類の β 4GalNAcTs、すなわち β 4GalNAcT3 (β 4GalNAcT3, GeneBank™ AB089940) 及び β 4GalNAcT4 (β 4GalNAcT4, GeneBank™ AB089939) がそれぞれ同定されており、これらはアミノ酸レベルで43%の相同性を示す [35, 36]。 β 4GalNAcT3と β 4GalNAcT4はヒト β 4-galactosyltransferaseファミリーに属し、chondroitin sulfate synthasesと非常に高い相同性を示す [35, 36]。これらの糖転移酵素はUDP-GalNAcから N-acetylgalactosamine (GalNAc) を、N型及びO型糖鎖上の非還元末端のN-acetylglucosamine (GlcNAc) に β -1,4結合様式にて転移する反応を触媒する。これら2つの糖転移酵素は*in vitro*において類似した基質特異性を示すものの、その発現は組織特異的であることが報告されている。例えば β 4GalNAcT3は胃や結腸さらには精巣で高い遺伝子発現がみられ、一方 β 4GalNAcT4遺伝子は卵巣及び脳において豊富に発現していることが報告されている

[36]。

これまでにこれら β 4GalNAcTsが腫瘍形成に関与することを示唆する報告がなされている。Huangらはヒトの結腸癌において、 β 4GalNAcT3遺伝子の発現量が正常のものに比べて上昇していることを見いだした[24]。さらに彼らはヒト結腸癌由来細胞HCT116に β 4GalNAcT3遺伝子を過剰発現させると、この細胞の細胞外マトリックスへの接着能、細胞遊走能、コロニー形成能及び浸潤能が対照と比較して顕著に亢進することを明らかにした。ゼノグラフト試験により、 β 4GalNAcT3過剰発現株は、対照と比較して腫瘍形成能及び転移能が亢進していることが示された。

また正常組織のものと比較して、前立腺癌組織においては β 4GalNAcT4遺伝子発現量が増加していることが報告されている [22]。さらに前立腺癌由来細胞LNCaP及びPC3等においても β 4GalNAcT4遺伝子の発現量の増加が同様に報告されている [22]。従って前述の前立腺癌由来のPSA糖鎖上のLacdiNAc群の発現量の増加 [21, 22] は、この糖転移酵素の発現量の増加によるものと推測される。

一方、上述の結腸癌及び前立腺癌での場合と異なり、Hsuらは β 4GalNAcT3遺伝子を神経芽細胞腫細胞SK-N-SH及びSH-SY5Yにそれぞれ過剰発現させた場合には、細胞増殖能、コロニー形成能、細胞遊走能及び浸潤能が対照と比較して低下することを明らかにした。また実際に神経芽細胞腫では β 4GalNAcT3の発現量が、患者の生存率に逆相関していることも示されている [26]。なお先に述べたようにヒト乳癌細胞に β 4GalNAcT4遺伝子を過剰発現させた場合、同様にコロニー形成能などが抑制されることが明らかになっている。

各癌組織における β 4GalNAcTs及びN型糖鎖上のLacdiNAc群の発現量について表1にまとめた。前述のように結腸癌や前立腺癌においては β 4GalNAcTs遺伝子の増加が癌の進行に伴いみられる [22, 24]。その一方、

神経芽細胞腫においては逆に β 4GalNAcT3の発現量の低下が、また乳癌においては β 4GalNAcTsの反応生成物であるLacdiNAc群の発現量の減少がみられる [26]。また β 4GalNAcTsの過剰発現株を用いた実験では、結腸癌由来細胞に β 4GalNAcT3に発現させると細胞増殖能や浸潤能等の亢進が見られる。これに対して神経芽細胞腫や乳癌細胞に β 4GalNAcTsを過剰発現させた場合、各種の癌の悪性度を抑制していることが分かっている。各々癌細胞に特有のLacdiNAc修飾タンパク質の変動が、例えば細胞内の種々の情報伝達経路に影響を与え、ある場合は癌の進行を正にある場合は負に制御していると推測される。従って、その要因を解明する為に今後癌化に伴いLacdiNAc構造の発現量に変化が見られる糖タンパク質を同定解析することが重要であると考えられる。

表1 ヒト癌細胞中のLacdiNAc群及び β 4GalNAcTsの発現量

癌組織 癌由来細胞株	LacdiNAc	β 4GalNAcTs	癌の悪性度	参考文献
乳癌	↓	ND	↓	[20]
MDA-MB-231 (T4)	↑	β 4GalNAcT4 ↑	↓	
神経芽細胞腫細胞	ND	β 4GalNAcT3 ↓	↓	[26]
SK-N-SH/ SH-SY5Y (T3)	↑	β 4GalNAcT3 ↑	↓	[26]
結腸癌	↑	β 4GalNAcT3 ↑	↑	[24]
HCT116 (T3)	↑	β 4GalNAcT3 ↑	↑	[24]
前立腺癌	PSA ↑	β 4GalNAcT4 ↑	↑	[21,22]
LNCaP	PSA ↑	β 4GalNAcT4 ↑	ND	[22]
PC3	ND	β 4GalNAcT4 ↑	ND	[22]
子宮癌				
SKOV3	↑	ND	ND	[23]
RMG-1	↑	ND	ND	[33]
膵癌				
Capan-1	RNaseI ↑	ND	ND	[32]

ND：未検

癌細胞由来株のうち () 内のT3及びT4はそれぞれ β 4GalNAcT3または β 4GalNAcT4遺伝子を過剰発現させた株を表す。矢印↑は増加を、↓は減少を表す。

4. 結論

これまでに前立腺癌や乳癌等の患者検体と正常のものとを比較すると、稀少糖鎖 LacdiNAc群の発現量に差異がみられることから、将来この糖鎖の検出を利用した診断法の開発が期待される。この糖鎖構造及びβ4GalNAcTsの発現量は各種の癌組織特異的に制御されている。今後、各種癌細胞におけるこの糖鎖及びβ4GalNAcTsが果たす機能の解明に向けて、一層の研究が必要であると考えられる。

参考文献

- [1] I. van Die, and R. D. Cummings, *Glycobiology*, **20**, 2-12, 2010.
- [2] S. M. Manzella, L. V. Hooper, and J. U. Baenziger, *J. Biol. Chem.*, **271**, 12117-12120, 1996.
- [3] K. Furukawa, N. Kitamura, T. Sato, and S. Hiraizumi, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **491**, 313-323, 2001.
- [4] T. Sakiyama, M. Kabayama, M. Tomita, J. Nakamura, H. Mukai, Y. Tomita, and K. Furukawa, *Biochim. Biophys. Acta*, **1380**, 268-274, 1998.
- [5] E. D. Green, H. van Halbeek, I. Boime, and J. U. Baenziger, *J. Biol. Chem.*, **260**, 15623-15630, 1985.
- [6] E. D. Green, and J. U. Baenziger, *J. Biol. Chem.*, **263**, 25-35, 1988.
- [7] E. D. Green, and J. U. Baenziger, *J. Biol. Chem.*, **263**, 36-44, 1988.
- [8] S. B. Yan, Y. B. Chao, and H. van Halbeek, *Glycobiology*, **3**, 597-608, 1993.
- [9] N. Nakata, K. Furukawa, D. E. Greenwalt, T. Sato, and A. Kobata, *Biochemistry*, **32**, 4369-4383, 1993.
- [10] T. Sato, K. Takio, A. Kobata, D. E. Greenwalt, and K. Furukawa, *J. Biochem.*, **117**, 147-157, 1995.
- [11] A. Dell, H. R. Morris, R. L. Easton, M. Panico, M. Patankar, S. Oehninger, R. Koistinen, H. Koistinen, M. Seppala, and G. F. Clark, *J. Biol. Chem.*, **270**, 24116-24126, 1995.
- [12] R. A. Siciliano, H. R. Morris, H. P. Bennett, and A. Dell, *J. Biol. Chem.*, **269**, 910-920, 1994.
- [13] A. Dell, S. Chalabi, R. L. Easton, S. M. Haslam, M. Sutton-Smith, M. Patankar, F. Lattanzio, M. Panico, H. R. Morris, and G. F. Clark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 15631-15636, 2003.
- [14] I. Breloy, S. Pacharra, P. Ottis, D. Bonar, A. Grahn, and F. G. Hanisch, *J. Biol. Chem.*, **287**, 18275-18286, 2012.
- [15] D. Fiete, V. Srivastava, O. Hindsgual, and J. U. Baenziger, *Cell*, **67**, 1103-1110, 1991.
- [16] J. U. Baenziger, S. Kumar, R. M. Brodbeck, P. L. Smith, and M. C. Beranek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 334-338, 1992.
- [17] D. S. Roseman, and J. U. Baenziger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 9949-9954, 2000.
- [18] M. Ujita, K. Furukawa, N. Aoki, T. Sato, A. Noda, R. Nakamura, D. E. Greenwalt, and T. Matsuda, *FEBS Lett.*, **332**, 119-122, 1993.
- [19] T. Sato, J. Taka, N. Aoki, T. Matsuda, and K. Furukawa, *J. Biochem.*, **122**, 1068-1073, 1997.
- [20] N. Kitamura, S. Guo, T. Sato, S. Hiraizumi, J. Taka, M. Ikekita, S. Sawada, H. Fujisawa, and K. Furukawa, *Int. J. Cancer*, **105**, 533-541, 2003

- [21] K. Hirano, T. Nakamura, and J. Amano, International Patent WO/2010/064683, December 3, 2009.
- [22] K. Fukushima, T. Satoh, S. Baba, and K. Yamashita, *Glycobiology*, **20**, 452-460, 2010.
- [23] E. Machado, S. Kandzia, R. Carilho, P. Altevogt, H. S. Conradt, and J. Costa, *Glycobiology*, **21**, 376-386, 2011.
- [24] J. Huang, J. T. Liang, H. C. Huang, T. L. Shen, H. Y. Chen, N. Y. Lin, M. I. Che, W. C. Lin, and M. C. Huang, *Mol. Cancer Res.*, **5**, 543-552, 2007.
- [25] T. Sato, K. Furukawa, D. E. Greenwalt, and A. Kobata, *J. Biochem.*, **114**, 890-900, 1993.
- [26] W. M. Hsu, M.I. Che, Y. F. Liao, H.H. Chang, C. H. Chen, Y. M. Huang, Y. M. Jeng, J. Huang, M.J. Quon, H. Lee, H. C. Huang, and M.C. Huang, *Am. J. Path.*, **179**, 1394-1404, 2011.
- [27] R. Peracaula, G. Tabarés, L. Royle, D. J. Harvey, R. A. Dwek, P. M. Rudd, and R. Llorens, *Glycobiology*, **13**, 457-470, 2003.
- [28] C. Ohyama, M. Hosono, K. Nitta, M. Oh-eda, K. Yoshikawa, T. Habuchi, Y. Arai, and M. Fukuda, *Glycobiology*, **14**, 671-679, 2004.
- [29] G. Tabarés, C. M. Radcliffe, S. Barrabés, M. Ramírez, R. N. Aleixandre, W. Hoesel, R. A. Dwek, P. M. Rudd, R. Peracaula, and R. de Llorens, *Glycobiology*, **16**, 132-145, 2006.
- [30] M. Tajiri, C. Ohyama, and Y. Wada, *Glycobiology*, **18**, 2-8, 2008.
- [31] K. Yamashita, T. Ohkura, K. Umetsu, and T. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, **267**, 25414-25422, 1992.
- [32] R. Peracaula, L. Royle, G. Tabarés, G. Mallorqui-Fernandez, S. Barrabés, D. J. Harvey, R. A. Dwek, P. M. Rudd, and R. Llorens, *Glycobiology*, **13**, 227-244, 2003.
- [33] S. Yu, L. Chang, C. Cheng, C. Chou, M. N. Fukuda, and K. Khoo, *Glycoconj. J.*, **30**, 183-194, 2013.
- [34] D. Fiete, M. Beranek, and J. U. Baenziger, *J. Biol. Chem.*, **287**, 29204-29212, 2012.
- [35] T. Sato, M. Gotoh, K. Kiyohara, A. Kameyama, T. Kubota, N. Kikuchi, Y. Ishizuka, H. Iwasaki, A. Togayachi, T. Kubo, T. Ohkura, H. Nakanishi, and H. Narimatsu, *J. Biol. Chem.*, **278**, 47534-47544, 2003.
- [36] M. Gotoh, T. Sato, K. Kiyohara, A. Kameyama, N. Kikuchi, Y. D. Kwon, Y. Ishizuka, H. Nakanishi, and H. Narimatsu, *FEBS Lett.*, **562**, 134-140, 2004.

— 研究報告 —

MALDI-TOF MSによる糖ペプチドの相対定量解析の為の 安定同位体標識法の開発

Development of Stable Isotope Labeling for Relative Quantitative Analysis of Glycopeptides using MALDI-TOF MS

糖鎖生物学研究室 黒河内 政樹
Masaki KUROGOCHI

1. 本研究の背景

近年、生体内の糖鎖の働きが注目され、グライコプロテオミクスが盛んになっている。グライコプロテオミクスは、試料中の糖ペプチドを網羅的に解析する手法であり、高性能の質量分析計を用いてペプチド鎖の配列同定、糖鎖構造と結合部位の同定、糖鎖プロファイル情報を調べる手法である。糖タンパク質をターゲットとした生体機能の解明や疾患バイオマーカー探索にグライコプロテオミクスの技術が使われている。グライコプロテオミクスを行う上での問題点は、生体試料から調製した糖ペプチドは他の生体分子が邪魔をして検出しにくい点と糖ペプチド上の糖鎖が同一のペプチド鎖に不均一に分布している為、量的な問題から検出が容易ではない点がある。この問題点を解決する為、グライコプロテオミクスに求められる技術は 1) 生体試料からの糖ペプチドの抽出、2) 糖ペプチドの高感度検出、3) 極少量の糖ペプチドの定量である。本研究では、MALDI-TOFMSにおいて糖ペプチドの検出を向上させる新規の標識化合物の探索を行い、その標識化合物の安定同位体標識試薬を作成し、安定同位体標識とMALDI-TOF MSを用いた糖ペプチド

定量法の開発を行った。

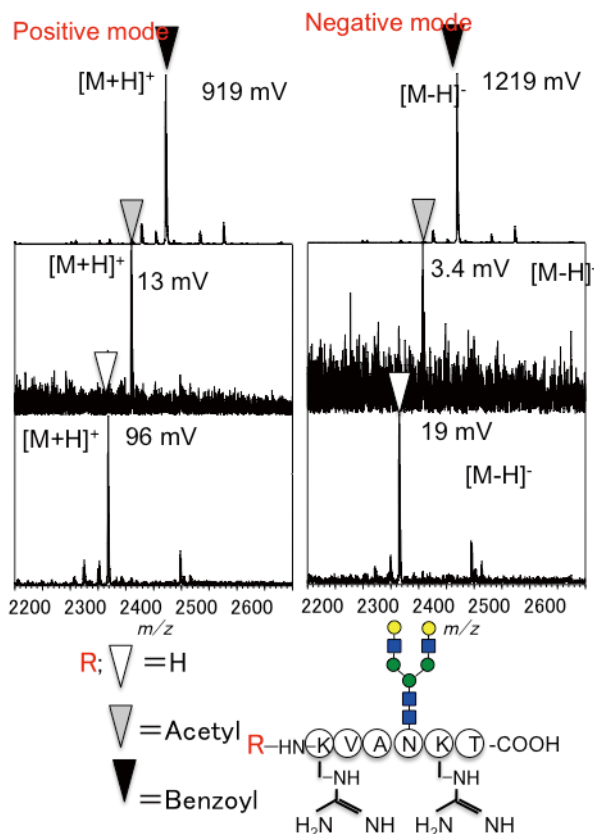
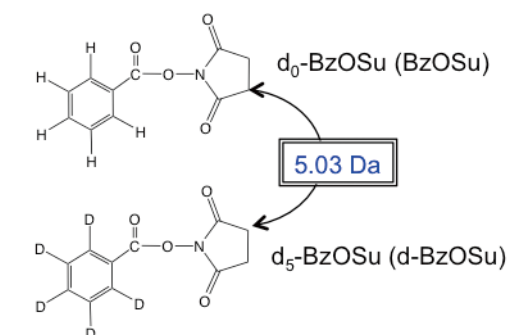
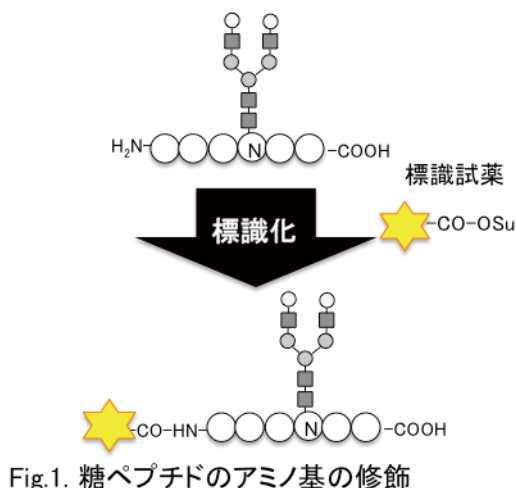
2. 実験及び結果

2-1. 糖ペプチドの高感度標識試薬の探索

通常、ペプチド、糖鎖をターゲットとしたプロテオミクス、グライコミクスの分野では第4級リンを持つTMPP、第3級、4級アミンを持つTMT等の電荷（カチオン）を持つマスタグが開発されている(1,2)が、糖ペプチドでは糖の多数の水酸基に起因する極性を帯びた性質とペプチドの疎水性、電荷を持つ性質が複雑に入り組んでいる為、上記のような電荷を帯びたマスタグはMALDI-TOFMSにおいて糖ペプチドではあまり効果がない。私達の研究では、糖ペプチド中のペプチド鎖のアミノ基に非電荷の疎水性を持つマスタグを導入する事によって、イオン検出の向上を狙った。これは、カルボキシル基に対してイオン対となるアミノ基の電荷をつぶし、糖鎖の親水性相互作用を阻害するような疎水性を持つタグを導入する事によって、試料（糖ペプチド）の凝集を防ぎ、解離（イオン化）を促進させ、イオン検出を向上させる事を概念として正電荷、負電荷でもイオン検出を向上させる事を目的としている。この概念

をもとにマスタグの探索を行った (Fig.1)。探索の為に卵黄由来の糖ペプチドからN末端のみアミノ基を有する糖ペプチドを調製した。糖ペプチドのペプチド鎖のアミノ基にアセチル基、ベンゾイル基等を導入した後に標識した糖ペプチドのMSシグナルの強度比較をpositive, negative modeにおいて行った (Fig.2)。その結果、MALDI-TOF MSによ

る糖ペプチドの一番良いマスタグは適度な疎水性を示すベンゾイル基であった。次に、ペプチド配列の異なるウシリボヌクレアーゼB由来の糖ペプチド、ヒト血清免疫グロブリンG由来の糖ペプチドに導入した結果、positive, negative mode共に糖ペプチドのMALDI-TOF MSの検出感度が向上している事が分かった (data not shown)。



2-2. 糖ペプチドの安定同位体標識試薬の開発

プロテオミクスの分野では、ICAT試薬 (3) やiTRAQ等 (4) の安定同位体標識試薬を用いた相対定量比較 (ディファレンシャル解析) が進み、数多くのバイオマーカーが発見されている。本研究でも、糖ペプチドの安定同位体化合物を開発する事によって、同様の定量が行える事を考えた。ベンゾイル基標識が糖ペプチドのMALDI-TOF MS検出に有効である事が分かったので、ベンゾ

イル基の軽水素 (H) 標識試薬 (BzOSu)、重水素 (D) 標識試薬 (d-BzOSu) を作成し (Fig.3)、その標識試薬の糖ペプチドに対する最適な反応条件を開発した。数種類の糖鎖構造が不均一な濃度で発現している事が知られているヒト血清由来IgG (5) を用いて、これらの標識試薬の反応試験を行った。一般的なヒト血清由来IgGは、サブクラス1~4に分類されるIgG1, IgG2, IgG3, IgG4がそれぞれ66%, 23%, 7%, 4%で存在し、それらすべてにN結合型糖鎖が存在している (6,7)。

このヒト血清由来IgGをトリプシンで処理した物にBzOSu、d-BzOSuの標識試薬をそれぞれ反応させ、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を利用して、標識された糖ペプチドを抽出した。得られたBz、d-Bz標識された糖ペプチドを1:1で混合した物をMALDI-TOF MSで測定した。その結果、ヒトIgG1のペプチド配列 (EEQYNSTYR) とヒトIgG2のペプチド配列 (EEQFNSTFR) に10種類の糖鎖が結合している糖ペプチドが

観測され、その糖ペプチドも様々な量比で存在している事が分かった。20個の糖ペプチドピークすべてにおいて1:1の強度比がある5Da差のピークペアが観測され、分子量差5DaのBzOSu、d-BzOSu標識試薬が量比の異なる糖ペプチドに対して定量的に反応している事 (標識効率) とこの手法による一連の糖ペプチド抽出の再現性が高い事を示している (Fig. 4)。

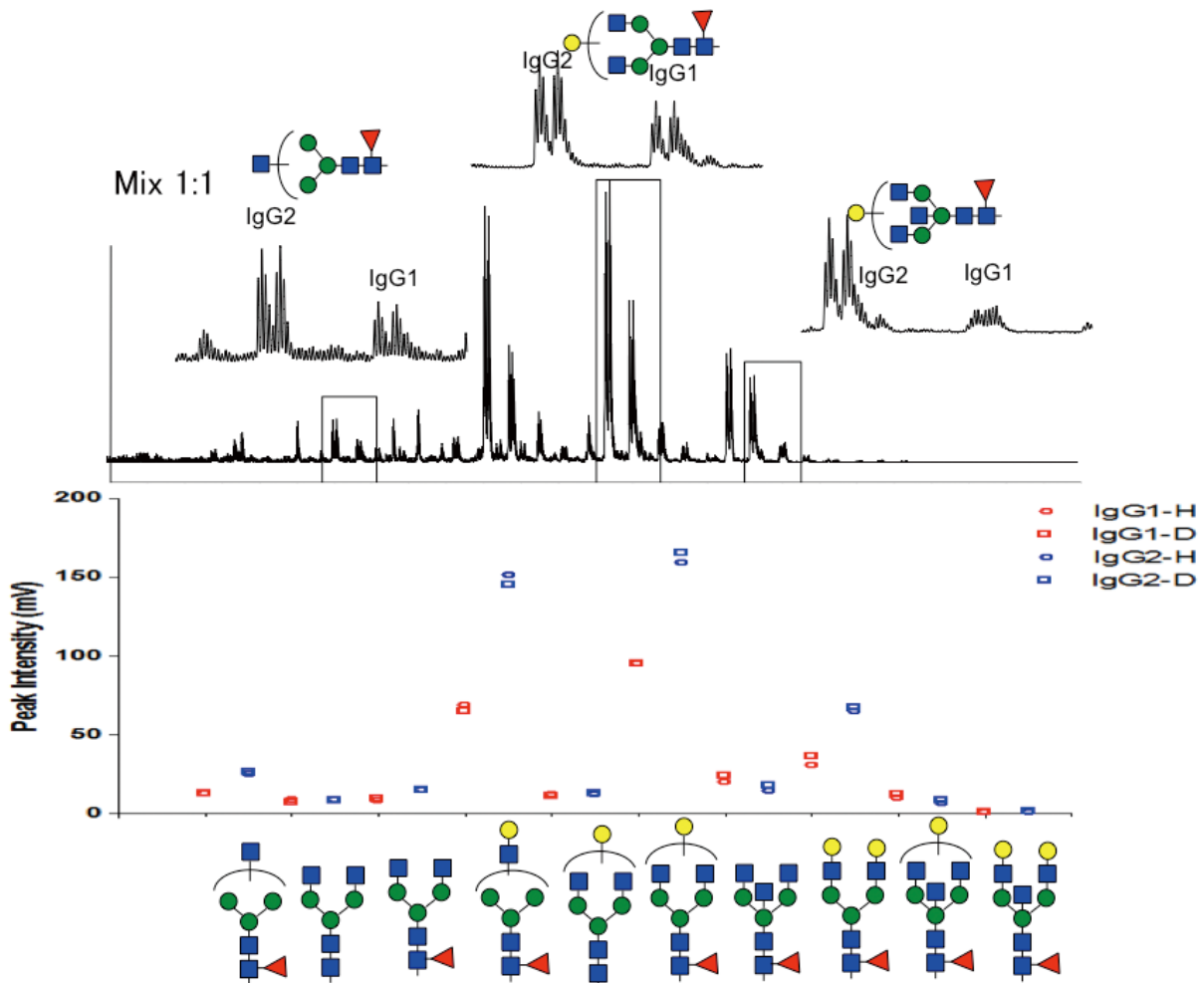


Fig. 4. ヒト血清由来IgGのBz標識、d-Bz標識された糖ペプチドの1:1の混合物のMALDI-TOF MS スペクトルと糖鎖毎のプロット図

2-3. 安定同位体標識を利用した生体試料中の糖タンパク質の定量

IgG1, IgG2, IgG3, IgG4が混在しているヒト血清由来IgG中のIgG1の割合を精製されたヒトIgG1を用いた2試料間の糖ペプチドの相対

定量比較 (ディファレンシャル解析) を行う事で算出した。それぞれの試料をトリプシンで処理した後にd-Bz、Bz標識、抽出を行う事によって、標識された糖ペプチドを得て、様々な重量比で混ぜた試料をMALDI-

TOF MS測定した。その混合物のスペクトルからピークペアを示すIgG1部分の糖ペプチドを抜き出し、同じ同位体標識を持つIgG1糖ペプチドの総量を比較して、ヒト血清由来IgG中のIgG1の糖ペプチド含量を計算した。この結果、5.0 μg 中のヒト血清由来IgG中のIgG1の糖ペプチド含量は、1.6 μg 中の精製さ

れたIgG1の糖ペプチドの2倍である事から、ヒト血清由来IgG中のIgG1は、タンパク質重量の割合で64%である事が算出された。つまり、標準となる糖タンパク質 (糖ペプチド) があれば、複雑な混合物の中から目的の糖タンパク質 (糖ペプチド) の含有量がこの手法によって算出する事ができる。

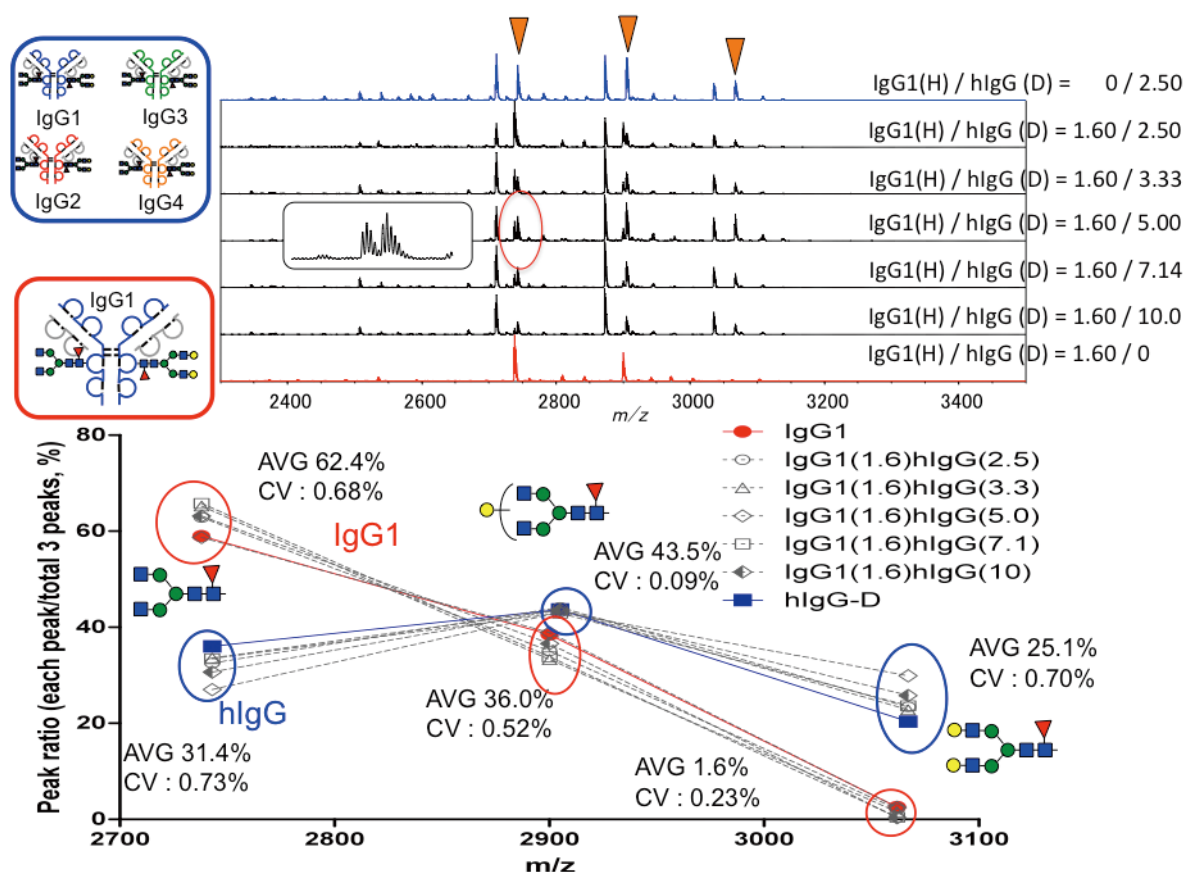


Fig.5. ヒト血清由来IgGのd-Bz標識糖ペプチドとIgG1のBz標識糖ペプチド、並びに様々な比率の混合物のMALDI-TOF MSスペクトルとそれぞれのIgG1上の糖ペプチドの存在比のプロット図

2-4. 基質特異性の高いエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (endo-D) と安定同位体標識を利用した糖ペプチドの糖異性体の割合の算出

MS測定では、識別が出来ない同じ分子量を有する糖異性体の割合を基質特異性の高い酵素と安定同位体標識による定量法で算出した。肺炎双球菌由来のエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (endo-D) は、*N*結合型糖鎖の5糖のコア構造の1-3結合したマン

ノースが非修飾であれば、*N*結合型糖鎖のジ-*N*-アセチルキトビオース構造を切断するという高い基質特異性を持っている (8)。ここでは、ヒト血清由来IgG中のIgG1とIgG2の糖ペプチドに結合している複合型糖鎖のガラクトースの上付きと下付きの異性体の割合を算出する事とした。上記と同様に、ヒト血清由来IgGを用いてdBz、Bz標識した糖ペプチドを調製し、続いてガラクトースが付加していない非還元末端側の*N*-アセチルグルコサミン

を β 1-2,3,4,6- *N*-アセチルグルコサミニダーゼで切断し、コア構造のマンノースを非還元末端に露出させ、endo-Dの基質となりうる糖ペプチド混合物を同じ組成かつ同じ濃度で調製する事ができた (Fig.5のBz標識した糖ペプチドとd-Bz標識した糖ペプチドと等量混ぜたMALDI-TOF MSスペクトルから)。次に、Bz標識した糖ペプチドのみにendo-Dを反応させ、反応させていないd-Bz標識した糖ペプチドと等量混ぜたMALDI-TOF MSスペクトルを測定した。それぞれのスペクトルを並べて観察すると、コア構造のマンノースが露出している糖ペプチドは完全に切断されている事とコア構造のマンノースが完全に修飾

されている糖ペプチドは全く切断されていない事が分かる。一方、上付きと下付きの糖鎖が伸びた糖異性体が混在している糖ペプチドは、IgG1では20%のピーク強度が切れ残り、IgG2では40%のピーク強度が残っている事が分かった。検量線を用いてピーク強度比から濃度比に変換すると、ガラクトースの上付き、下付きの割合が、IgG1は81:19であり、IgG2では、57:43である事が分かった。これによって、従来のMS分析では困難だった糖ペプチド上の糖異性体の定量が基質特異性の高い酵素と安定同位体標識による定量法によって可能となった。

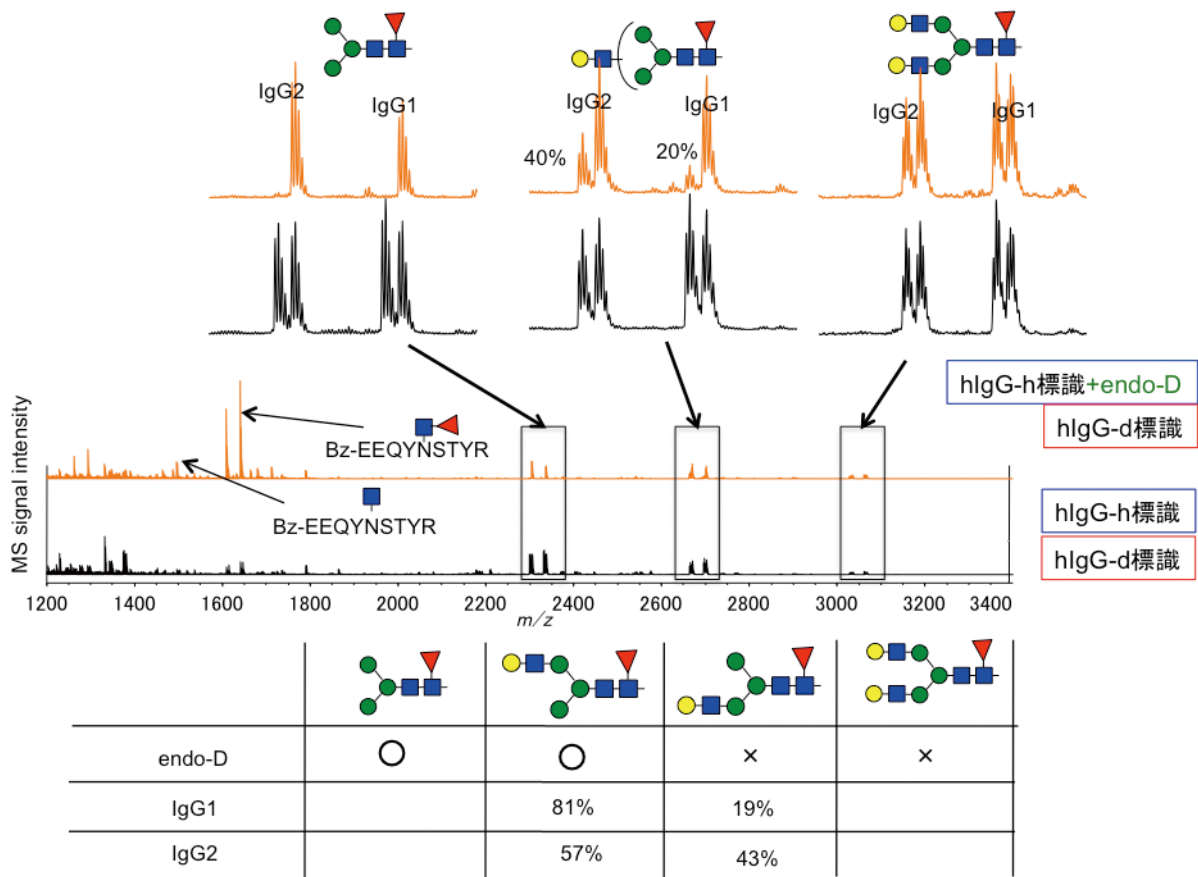


Fig.5. ヒト血清由来IgGから調製したd-Bz標識、Bz標識糖ペプチドの混合物、並びにendo-Dで反応したBz標識糖ペプチドと反応させていないd-Bz標識糖ペプチドの混合物のMALDI-TOF MSスペクトルとIgG1、IgG2上の糖ペプチドの糖異性体の存在比

3. 結論

我々は、糖ペプチドの高感度MALDI検出用の標識を発見し、その安定同位体標識試薬の開発によって、糖ペプチドの相対定量法の技術を開発した (9)。質量分析計による検出は、その分子の性質に大きく依存する為に同じ組成で、尚且つ同じ濃度領域で2試料間のターゲット分子の相対定量比較 (ディフュゼンシャル解析) が可能な安定同位体標識法は、プロテオミクスやメタボロミクス分野では非常に大きな成果を挙げている。その為、今回の糖ペプチド用の安定同位体標識試薬もグライコプロテオミクスの分野で大きな成果を挙げてくれると期待している。

今後、この標識手法を使って様々な試料の糖ペプチドの定量を試みると共に、より分離能の高いLC-MSと組み合わせて応用していく事を考えている。

References

- Huang, Z. H.; Wu, J.; Roth, K. D.; Yang, Y.; Gage, D. A.; Watson, J. T. A picomole-scale method for charge derivatization of peptides for sequence analysis by mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 137-144.
- Dayon, L.; Hainard, A.; Licker, V.; Turck, N.; Kuhn, K.; Hochstrasser, D. F.; Burkhard, P. R.; Sanchez, J. C. Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2921-2931.
- Gygi, S. P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H.; Aebersold, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994-999.
- Ross, P. L.; Huang, Y. N.; Marchese, J. N.; Williamson, B.; Parker, K.; Hattan, S.; Khainovski, N.; Pillai, S.; Dey, S.; Daniels, S.; Purkayastha, S.; Juhasz, P.; Martin, S.; Bartlett-Jones, M.; He, F.; Jacobson, A.; Pappin, D. J. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics.* **2004**, *3*, 1154-1169.
- Takahashi, N.; Ishii, I.; Ishihara, H.; Mori, M.; Tejima, S.; Jefferis, R.; Endo, S.; Arata, Y. Comparative structural study of the N-linked oligosaccharides of human normal and pathological immunoglobulin G. *Biochemistry.* **1987**, *26*, 1137-1144.
- Morell, A.; Skvaril, F.; Hitzig, W. H.; Barandun, S. IgG subclasses: development of the serum concentrations in "normal" infants and children. *J. Pediatr.* **1972**, *80*, 960-964.
- Wuhrer, M.; Stam, J. C.; van de Geijn, F. E.; Koeleman, C. A.; Verrips, C. T.; Dolhain, R. J.; Hokke, C. H.; Deelder, A. M. Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. *Proteomics* **2007**, *7*, 4070-4081.
- Tai, T.; Yamashita, K.; Ogata-Arakawa, M.; Koide, N.; Muramatsu, T.; Iwashita, S.; Inoue, Y.; Kobata, A. Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation to the endo-beta-N-acetylglucosaminidase specificity. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 8569-8575.
- Kurogochi, M.; Amano, J. Relative Quantitation of Glycopeptides based on Stable Isotope Labeling using MALDI-TOF MS. *Molecules* **2014**, *19*, 9944-9961.

終わりは始まり：「統合化推進プログラム」

Ending is beginning: “Database Integration Coordination Program”

山田一作*¹、成松久*²

Issaku YAMADA, Hisashi NARIMATSU

平成23年度JST・NBDC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」が終了したので、ここに報告する。

第3期「科学技術基本計画」（平成18年3月28日閣議決定）に基づき総合科学技術会議が策定したライフサイエンス分野の推進戦略において、戦略重点科学技術の一つである「世界最高水準のライフサイエンス基盤整備」が掲げられた。そこで、平成18年度より文部科学省「ライフサイエンス分野の統合データベース事業」が開始され、ライフサイエンスにおけるデータベース環境改善がはじまった。

糖鎖研究においても様々なデータが各研究機関などに蓄積されており、我が国における糖鎖データベースの統合化については、「文部科学省統合データベースプロジェクト」の補完課題として「糖鎖修飾情報とその構造解析データの統合」が産業技術総合研究所（代表者：成松久）において開始され、日本糖鎖科学統合データベース(JCGGDB)による統合化がはじまった。野口研究所では、文部科学省統合データベースプロジェクトと同時期に独自にGlycoNAVIのコンテンツである糖質化学合成法のデータベース化を開始し、産業

技術総合研究所 糖鎖医工学研究センターの協力の下、JCGGDBの一部として連携・統合化を実施した。

文部科学省の「ライフサイエンス分野の統合データベース事業」は平成23年3月末に終了したが、これらの成果を継続発展させることを目的として、平成23年4月に科学技術振興機構(JST)に「バイオサイエンスデータベースセンター」(NBDC: National Bioscience Database Center)が設置された。NBDCのミッションの一つに、ライフサイエンス分野のデータベースの統合があり、そのためのプログラムとして、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」が実施されている。本プログラムの主な目的は、データの共有・統合を通して、我が国のライフサイエンス研究の成果を活用できる環境を構築することで、ライフサイエンスにおけるイノベーションを促すものである。

平成23年度に採択された統合化推進プログラムの課題は、

- ・ヒト脳疾患画像データベース統合化研究
岩坪威 東京大学 大学院医学系研究科 教授
- ・メタボローム・データベースの開発

*1 糖鎖有機化学研究室 研究員

*2 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員

金谷重彦 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 教授

- ・ゲノム情報に基づく疾患・医薬品・環境物質データの統合

金久實 京都大学 化学研究所 特任教授

- ・ゲノム・メタゲノム情報を基盤とした微生物DBの統合

黒川顕 東京工業大学 地球生命研究所 教授

- ・ゲノム情報に基づく植物データベースの統合

田畑哲之 かずさDNA研究所 所長

- ・ヒトゲノムバリエーションデータベースの開発

徳永勝士 東京大学 大学院医学系研究科 教授

- ・生命と環境のフェノーム統合データベース
豊田哲郎 理化学研究所 情報基盤センター
統合データベース特別ユニットリーダー

- ・蛋白質構造データバンクの国際的な構築と統合化

中村春木 大阪大学 蛋白質研究所 教授

- ・糖鎖統合データベースと研究支援ツールの開発

成松久 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター センター長

- ・大規模ゲノム疫学研究の統合情報基盤の構築

松田文彦 京都大学 大学院医学研究科 附属ゲノム医学センター センター長・教授

であり、ライフサイエンスの幅広い領域を横断している。

統合化推進プログラムでは、前述したように糖鎖分野において、研究開発課題名「糖鎖統合データベースと研究支援ツールの開発」研究代表者「産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター センター長 成松久」が採択され、産業技術総合研究所、立命館大学、理化学研究所、野口研究所、創価大学が参画した。

研究実施体制は、(1)「糖鎖統合データベースの運営と統合化支援、データベース更新作業」グループ(産業技術総合研究所 成松久)

(2)「GlycoEpitopeの新システムの開発とGlycoPODの新規拡大」グループ(立命館大学 川寄敏祐)

(3)「糖鎖修飾データベース、糖鎖NMRデータベース、理研糖鎖コンフォメーションデータベースの開発」グループ(理化学研究所 山口芳樹)

(4)「グライコナビデータベースの開発・合成反応データベース」グループ(野口研究所)で、日本糖鎖科学統合データベース(JCGGDB)を中核に据えて統合化を推進した。

各グループは、必要に応じて以下に示すような研究開発を協力・連携して推進した。実施した研究項目は、1) JCGGDBの運営と統合化支援、データベースの更新・機能拡張、2) GlycoEpitopeの新システム開発・データ更新、3) 糖鎖科学実験プロトコル集GlycoPODの新規拡大、4) 理研糖鎖コンフォメーションデータベースの開発、5) グライコナビデータベースの開発(合成反応(Syns)・分離精製法データベース(TLC、PurifM)、6) GlycoNMRの開発、7) セマンティックウェブのための新しい国際糖鎖標準表記法(WURCS: Web3.0 Unique Representation Carbohydrate Structure)の開発[1]である。

また、本プログラムでは、アジア及び国際連携のため産業技術総合研究所が国内外で主催した会議において各国の状況とデータベース等の進捗報告・国際連携のための議論が行われた[2]。また、富山で開催されたバイオハッカソンおよび大連(中国)で開催されたバイオハッカソンのサテライトにおいて、糖鎖オンロジー開発などを国内外の研究者が協力して実施した。これらの会議を経て、平成25年6月22日の大連(中国)において開

催されたACGG (Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology)-DB会議において、糖鎖構造データのリポジトリシステム開発の必要性が議論された [3]。

これらの経緯を受けて、平成25年度まで本プログラムにおいて実施してきた成果を継続・発展させた、「糖鎖統合データベースおよび国際糖鎖構造リポジトリの開発」(研究代表者 成松久 (産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員))が、平成26年度から開始される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」へ採択された。本プログラムへは、産業技術総合研究所、創価大学、立命館大学、新潟大学、野口研究所が参画している。野口研究所においては、国際糖鎖構造リポジトリの基盤となる国際糖鎖標準表記法 (WURCS) の普及及び拡張を実施することになっている。

平成18年から開始された文部科学省による「ライフサイエンス分野の統合データベース事業」および、継続プロジェクトとして、平成23年から開始されたJST・NBDC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」により、データベース環境の改善がなされてきた。しかし、データベースは継続的に進めることが肝要であり、糖鎖科学においては、「国際糖鎖構造リポジトリ」が重要課題の一つとして挙げられる。このようなデータベース開発の取り組みが、糖鎖科学を含むライフサイエンスの発展に必要不可欠であり、継続して実施できる体制が望まれる。

【Uniform Resource Locator (URL)リスト】

- ・ 日本糖鎖科学統合データベース (JCGGDB)
<http://jcgddb.jp>
- ・ GlycoNAVI
<http://www.glyconavi.org>
- ・ GlycoEpitope
<http://www.glycoepitope.jp>
- ・ GlycoPOD
<http://jcgddb.jp/GlycoPOD/>

【参考文献】

1. “WURCS: Web3 Unique Representation of Carbohydrate Structures”, *J. Chem. Inf. Model.*, 2014 Jun 23;54(6):1558–66.
DOI: 10.1021/ci400571e
PMID: 24897372
2. “The Third ACGG-DB Meeting Report: Towards an international collaborative infrastructure for glycobioinformatics”, *Glycobiology*. 2013 Feb;23(2):144-6.
DOI: 10.1093/glycob/cws167
PMID: 23271684
3. “The Fifth ACGG-DB Meeting Report: Towards an International Glycan Structure Repository”, *Glycobiology*. 2013 Dec 23;(12):1422–1424.
DOI: 10.1093/glycob/cwt084

JST先端計測分析技術・機器開発プログラム 採択課題研究開発報告

An outline of a development of glycoprotein identification software, GLIDE

糖鎖生物学研究室 室長 天野 純子
Junko AMANO

独立行政法人科学技術振興機構(JST)研究成果展開事業（先端計測分析技術・機器開発プログラム）に係る委託研究開発として以下の研究開発を実施したので報告する。

開発課題名：

「MSⁿスペクトルから糖ペプチド構造を推定するソフトウェアの開発」

開発期間：2010～2012年度

タイプ：ソフトウェア開発タイプ

チームリーダー氏名：

天野 純子（野口研究所）

サブリーダー氏名：

高羽 洋充（東北大学）

分担開発者氏名：

金澤 光洋（株式会社ライフィクス）

開発の背景

細胞が産生するタンパク質の多くは翻訳後修飾として糖鎖が結合している。この糖鎖構造が細胞の状態（分化や疾患など）によって変化し、タンパク質の機能発現に糖鎖構造が関与することやリアルタイムのマーカーとして有効であることは周知である。しかし、従来のプロテオミクスでは糖鎖が付加したペプチドを検出できず、重要な分子を見落としてきた可能性がある。そこで、我々は、糖鎖を切り離さずに糖ペプチドのまま解析すること

を目指してきた。この方法の有利な点は、タンパク質情報が得られるのみでなく、ペプチドへの糖鎖の結合位置とそこに結合している糖鎖構造パターンが同時に判明し、部位特異的な糖鎖構造が同定できることである。

その糖ペプチド高感度解析法開発の一端として、糖鎖生物学研究室では、2007～2009年度にJST先端計測分析技術・機器開発プログラムの委託研究開発として課題名「ピレン誘導体化による超微量糖ペプチドMALDI-MSⁿ」を実施した。独自の糖ペプチドの高感度ピレン標識法を基盤として、プレート上に載せた試料を直接標識反応させた後MALDI-QIT-TOF MS測定を行う簡便・迅速な前処理法を開発した（Anal. Chem. 82, 8738, 2010; 特許4907334）。また、様々な要素技術を開発し、結果として、1fmolの糖ペプチドをMSで検出し、10fmolでMS³解析が実現し超高感度測定が可能になった。

しかしながらMSⁿ測定は可能になったが、MSスペクトルを解析するソフトウェアがなく、複雑な糖鎖構造をデータから導き出すのは容易ではないという課題が残った。その課題を解決するため、本プロジェクトはJST先端計測分析技術・機器開発プログラムのソフトウェア開発として新たに実施されたものである。

ソフトウェアの概略

ソフトウェアは、糖鎖部分のMS²スペクトルを基に構造推定を行う。図1に示したように、まずデータベースに類似スペクトルがあるかどうかを検索する。データベースで照合できない新規の場合は、候補組成式からフラ

グメント予測プログラムによってシミュレーションしたスペクトルとの比較を行い、候補構造をランキングして表示する。これを達成するために、実測データベース構築とともに以下の7項目のプログラムを開発した。

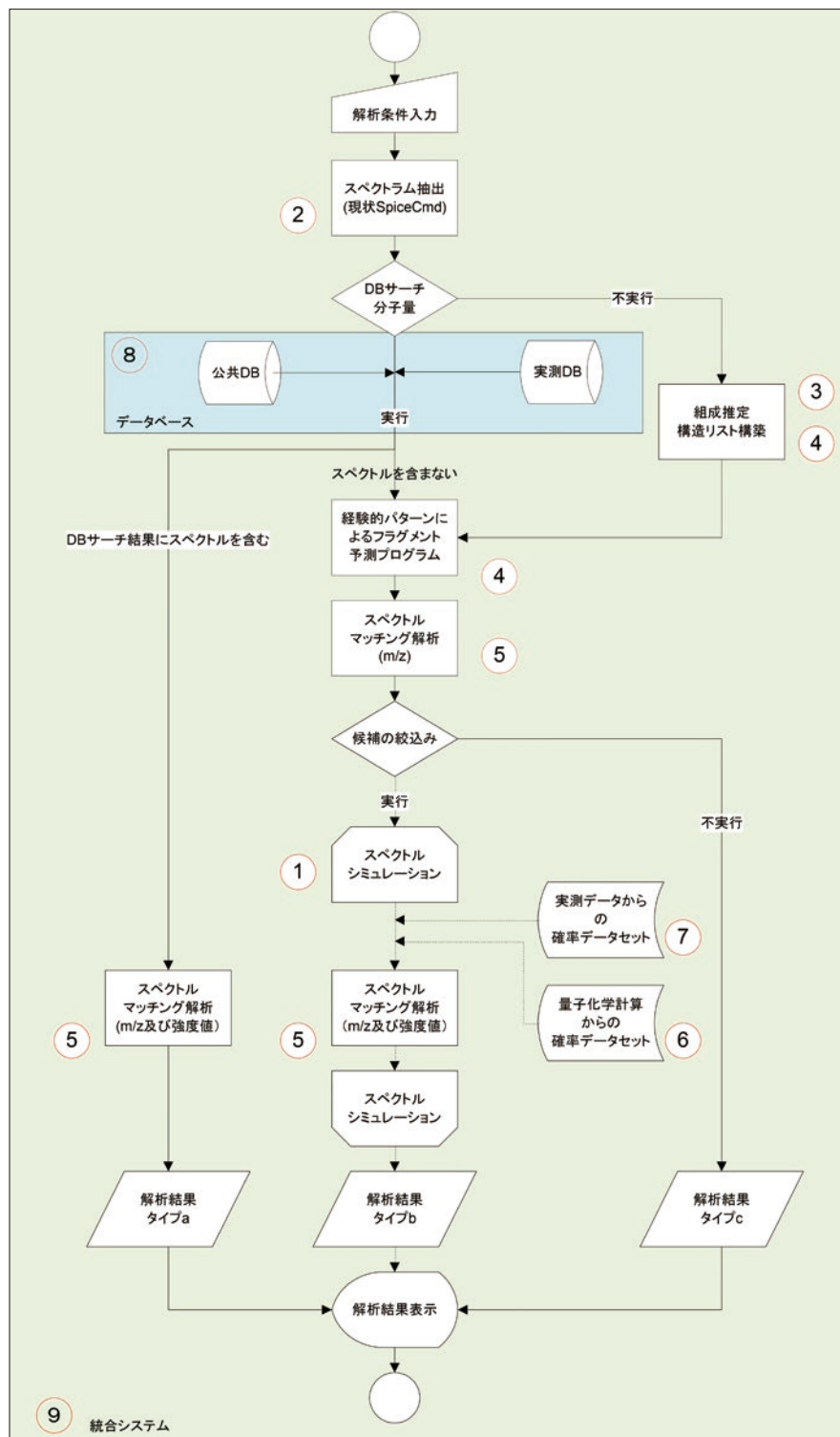


図1.ソフトウェア概略

- ①「切断確率、脱プロトン確率、電子移動確率」に基づくスペクトルシミュレーションプログラムの開発
- ②スペクトルデータのテキストデータへの変換プログラム
- ③分子量から分子組成を算出するプログラム
- ④組成から構造候補を作成するプログラムの開発
- ⑤スペクトルの比較評価プログラムの開発
- ⑥量子化学計算を利用した「切断確率、脱プロトン確率、電子移動確率」の算出方法およびそのデータセットの集積
- ⑦実測データからの確率類推プログラムの開発とそのデータセットの集積

プログラムの特徴

本プログラムの特筆すべき特徴は高速化の工夫である。

糖鎖の分子量から、構成単糖分子組成の組合せを自動計算し、さらに分子組成から候補構造を選定するプログラムを作成した。

糖鎖は異性体が多く、分子量が大きくなると候補数が莫大になり（例えば分子量2000程

度で6万候補構造など）計算時間が長くなる問題点がある。本プログラムでは候補構造の推定アルゴリズムを最適化することで、6万程度の構造を2秒以内に選定できるプログラムの開発に成功した（汎用パソコンで十分機能する）。

さらに、分子量、組成、部分構造をあらかじめ指定できる絞り込み機能、データベースからの類似構造のみを算出する絞り込み機能をプログラムに加えることで、より効率的な候補構造の選定を実現した（図2）。

各種脱プロトン化体の安定エネルギーを量子化学計算により算出し比較することにより興味深い知見が得られた。すなわち、負イオン化エネルギーとネガティブイオンのMSスペクトルの間に良好な相関性があることを見出した。その相関性に基づいて、負イオン化エネルギーから、脱プロトン確率を算出する方法を考案した。また、脱プロトン確率とスペクトル強度に正の相関があることを見出し、脱プロトン確率からスペクトル強度を予測する方法を考案した。ここで考案した方法を用いれば、量子化学計算の結果から脱プロ

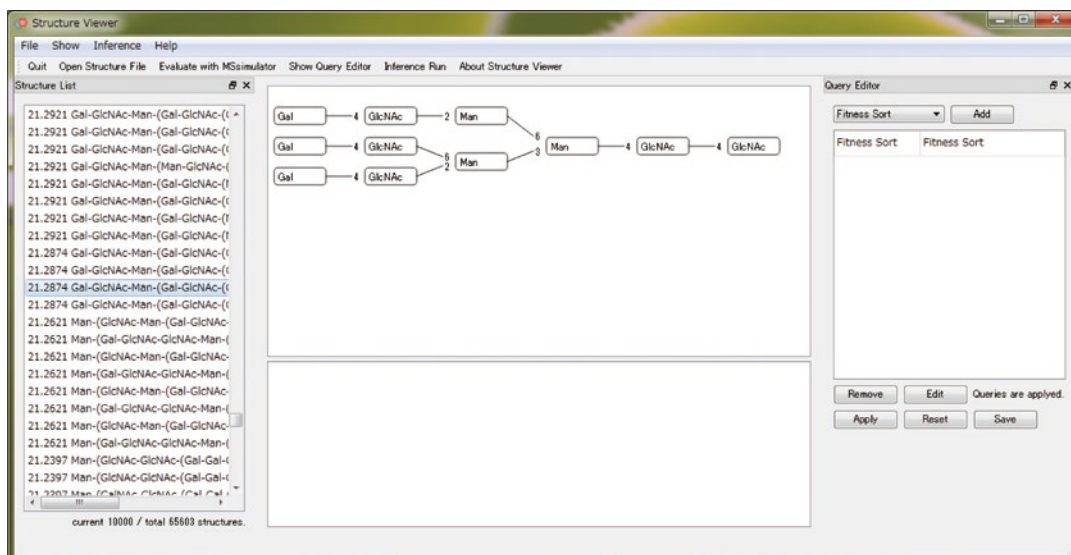


図2 入力： $m/z=2006$ とした場合の候補構造選定結果（65,603構造）表示のスクリーンショット。65,603構造を選定するのに要する時間は2秒。左ウィンドウ：候補構造の化学式と比較評価結果（数値）の表示パネル、中央ウィンドウ：各候補の構造表示パネル、右ウィンドウ：絞り込み機能の入力パネル

トン確率を求め、最終的にMSスペクトルを予測することが可能になる。本知見は、学術的に大変重要な成果である同時に、シンプルなアルゴリズムでMSスペクトルを予測する手段を与えるものである。

量子計算から算出した負イオン化エネルギーから脱プロトン確率を求め、確率に基づいてスペクトルをシミュレーションするプログラムで算出したスペクトルを図3に示す。実測データとよい一致を示していることがわかる。

この量子化学計算による検討結果に基づいて、当初考えていた確率パラメータの種類を3つから1つに減らすことに成功した。具体的には、脱プロトン確率のみに確率パラメータを減らし、結合の切断箇所については、経験的なフラグメント生成パターンを考慮することで十分に対応できた。

また、データセットの集積による学習という観点から、脱プロトン確率はランダムに最適化して決定するのではなく、糖鎖の局所構造に基づいて決定することにした。本プロジェクトで開発したプログラムでは、与えられた糖鎖構造の局所構造を自動的に判別し、個別の脱プロトン確率を自動的に振り分ける機能を付け加えた。これにより、未知の構造についても脱プロトン確率を類推することが可能となり、それらを用いてスペクトルを予測することができるようになった。

これらの改良により、確率類推プログラムでは計算時間が大幅に短縮された。当初の遺伝アルゴリズムを用いた類推では、1構造あたり汎用パソコンで数日を要したが、改良プログラムでは1構造あたり0.1秒以下で計算することができるようになった。この処理の高速化により、数万に及ぶ構造候補についても数分以内で確率を類推し、スペクトルを予測することができるようになった。これにより、分子量と実測スペクトルを入力さえすれば、考えられる全ての構造候補と予測するス

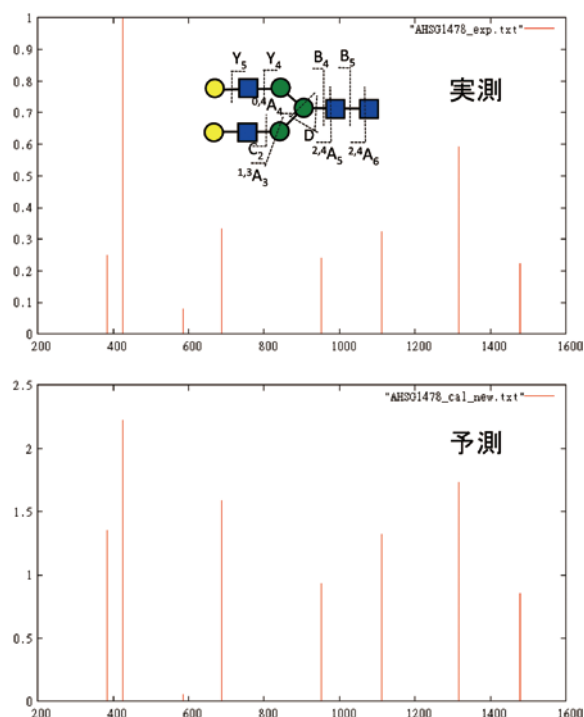


図3.スペクトルシミュレーションの例

ペクトルが計算され、実測スペクトルとの自動比較から、最も可能性の高い構造を選定することが、一つのプログラムで実施できることになる。

おわりに

スペクトルから構造推定までの一連の要素プログラムのベータ版は完成したが、ユーザーコントロールやインターフェースの開発までは至っていない。幸いにも、2013年度からJST実用化プログラム（チームリーダー：金澤、サブリーダー：天野、分担開発者：高羽）に採択され、現在、これらのプログラムを統合し一つのシステムとして機能するソフトウェアの製品化を目指して開発を進めている。抗体医薬品の台頭で、糖タンパク質の解析に関心が持たれるようになり、興味を示す大手製薬会社や装置メーカーも数社現れている。

専門家でなくても容易に構造推定ができる有用なソフトウェア製品として早く世の中に出してゆきたいと頑張っているところである。

61st American Society for Mass Spectrometry Conference (ASMS) 報告

61st American Society for Mass Spectrometry Conference (ASMS)

糖鎖生物学研究室 室長 天野 純子
Junko AMANO

第61回ASMS (2013年6月10日～13日、ミネソタ州ミネアポリスコンベンションセンターにて開催)に参加したので報告する。

野口研究所からは以下の4題のポスターを発表した。

1. Glycoform determination of a recombinant IgG prepared from transgenic silkworms

Junko Amano, Kazuko Hirose-Hachisu, Takashi Shirai

カイコ組換え体IgGの糖鎖構造解析に関するもので、動物細胞由来と異なり、複合型糖鎖ではなくハイマンノース型やパウチマンノース型糖鎖を特徴とし、コアフコースもほとんど存在しなかったことを報告した。

2. Negative-ion MALDI-QIT-TOF MSⁿ of *N*-glycans derivatized with pyrene butanoic acid hydrazide

Kazuko Hirose-Hachisu, Junko Amano

3. Novel strategy for prediction of MSⁿ spectrum of glycans from its structure

Hiromitsu Takaba, Qi Xiaofeng, Hiroshi Setogawa, Atsushi Ogiwara, Kazuko Hirose-Hachisu, Mitsuhiro Kanazawa,

Junko Amano (東北大学、株式会社ライフイクス、野口研究所)

4. GLIDE: Glycoprotein identification software

Atsushi Ogiwara, Hisae Anyoji, Mitsuhiro Kanazawa, Kazuko Hirose-Hachisu, Hiromitsu Takaba, Junko Amano (株式会社ライフイクス、東北大学、野口研究所)

2～4はJST先端計測分析技術・機器開発プログラム・ソフトウェア開発の委託研究開発「MSⁿスペクトルから糖ペプチド構造を推定するソフトウェアの開発」の成果発表である。2は異性体や類似構造を有する一連の標準糖鎖のMSⁿデータを取得し糖鎖構造とCIDフラグメントの相関について考察したもので、ソフトウェアの精度を向上させるパラメータ設定に重要な成果である。3および4は東北大学およびライフイクス社との共同発表で、フラグメント予測の基本原則とソフトウェア概要の紹介である。いずれのポスターも盛況で、糖鎖解析(ソフト)への関心が高いことを実感した。

学会の概要は、例年のように、一日のポスター発表数が約800で4日間、つまり約3200題、口頭発表は午前、午後8つずつのセッ

ションがあり、それぞれ約6講演なので、約380題、それ以外にワークショップがあった。企業のブースもポスター展示と同じくらい占めており、アカデミアとビジネスが協調し皆でMSについて語り楽しもうという雰囲気にあふれていた。毎年、各社この学会に照準を合わせて新製品の発表を行うが、今回はサーモフィッシャーサイエンティフィックが圧巻であった。四重極、オービトラップおよびリニアイオントラップを装備したOrbitrap Fusion Tribridをリリースしていた。さらに、他社のイオンモビリティも装着可能という。もちろん、価格も3台分?ではないが高価である。一台でこれだけのトラップがつけば何でもできそうであるが、問題は分析物質の量であろう。いくら高感度であるといっても、トラップに移動するたびにイオン量は約1/10に減っていくので、いろいろな解析をするにはある程度の試料量を確保する必要がある。しかし、工夫次第で今までに解析できなかった試料を詳細に測定できるだろう。

本会の傾向はイメージングMSや脂質を中心としたメタボロミクスの発表が増加していた。翻訳後修飾もリン酸化だけでなく、メチル化、アセチル化、ユビキチン化などの解析例も見受けられた。翻訳後修飾の中で、糖鎖修飾については発表数が多く、糖ペプチドでの解析も増加している。しかし、同定は可能になりつつあるが、まだ定量は難しい。

gPRG(glycoprotein Research Group)がgPRG 2013 Interlaboratory Study: Quantitative N-Glycan Profiling of Prostate Specific Antigen(N. Leymari, *et al*) という発表をしていた。糖タンパク質解析の現状を調査する目的で、PSAとPSA high isoformのサンプルを、アメリカ (20)、ヨーロッパ (12)、オーストラリア (1)、日本 (1)、中国 (1)の計35ラボに配布し、グライコシレーション

プロファイルの解析結果をまとめた。実際には26のラボからデータが返送された。うち17チームはボトムアップ解析で、4チームはトップダウン解析、5チームはPNGaseFなどで糖鎖を切り出した遊離糖鎖解析だった。11のチームはサーモフィッシャーサイエンティフィック製質量分析装置、9チームがブルカ製を使用していた。また、全チームのデータを合わせると、142の糖鎖構造が示された。うち7種のN-glycanは65%以上のグループで検出され、さらに11種のN-glycanは30-65%のグループで検出された。それ以外の様々なN-glycanも検出されていたが、組成のみの表示で、MS²以上で解析されていないようであるため信憑性は低いと思われる。シアル酸以外に硫酸やリン酸が結合した糖鎖も見られた。硫酸化糖に関しては我々も同定しているので、存在することは間違いなさであろう。以前に、HUPOでトランスフェリンを世界各地の研究機関に配布して構造同定をした報告があったが、このときは質量分析に限らず種々の分析方法で実施され妥当な結果であった。やはり複雑なグライコフォームを持つ糖タンパク質では、前処理法を含めて標準化された解析方法を指定しなければ測定結果の信頼性に問題があると改めて思った。

デコンボリューションをはじめとする解析ソフトウェアの進歩により、タンパク質分子のトップダウン解析が増えてきた。1分子を丸ごと測定できれば、同一分子上の複数の翻訳後修飾が判明するようになり、機能解析には必須の情報である。また、酵素消化など前処理中の副反応による修飾の回避もできる。現状では、マイクログラムの試料が必要であるようだが、組換え体タンパク質製剤の品質管理や評価への応用が期待される。

来年はボルティモアで開催される。新しい情報を得るのが楽しみである。

International Symposium on Fluorous Technologies 2013

参加報告(1)

Report on ISoFT' 13(1)

機能性材料研究室 室長 星 信人
Nobuto HOSHI

2013年6月2日～4日、Hungary、BudapestのEötvös大学で開催された、第5回フルオラステクノロジー国際会議(ISoFT' 13)に参加した。学会の世話人は同大学のRábai先生。開催地の古都Budapestはドナウ川の真珠とも言われ、川沿いの高台にある王宮や、中心街につながる「くさり橋」等の歴史地区が世界遺産に登録されており、特にきれいな夜景でも有名な街である。また温泉やロマ音楽でも有名。会場のEötvös大学は中心部のややドナウ川下流側、川沿いに位置する。

学会の参加総数は67名で少なめであったが、都合がつかず欠席した先生方も多かったと聞いており、時期が悪かったためと思われる。日本からの参加者は地元Hungaryに次いで多かったものの、12名のみ（前回26名）。参加者は少なかった一方で、参加者の研究機関の所在国は22か国に及んでおり、アルバニア、フィンランド、イラン、カタール、ケニヤ、南アフリカ、メキシコ等からの参加者も

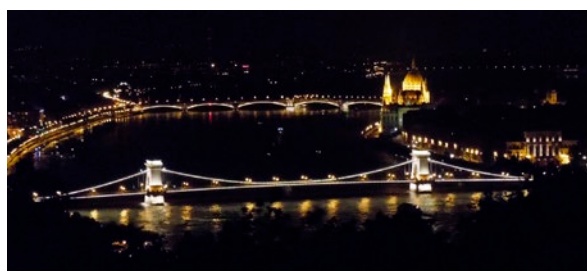
いた。このような国々へのフルオラス科学の展開はやや奇異な印象を受けた。

発表数は口頭24件、ポスター15件で、ポスター件数の少なさが気になった。

今回のAward受賞はカリフォルニア大バークレー校のR. H. Fish先生とボルドー大のJ. -M. Vincent先生であった。Fish先生は授賞講演でフルオラスMn(II)、Co(II)、Cu(I, II)系酸化触媒及び最近の固液相間移動触媒について講演された。またVincent先生は、二相系でのパーフルオロカルボン酸塩の溶解性ということで、高極性のRu錯体のRfCOOH塩は有機相に分配するものの、水素結合でつながった2量体(RfCOOH)₂塩にするとフルオラス相に分配し、スイッチングも可能といった内容の講演をされた。

今回のシンポジウムで特徴的だったのは¹⁹F-MRI診断への応用である。フッ素化合物を造影剤として用いることになるが、最適化合物が開発途上で、多フッ素であるフルオラス化合物が各研究グループでの開発ターゲットとなっている。

フルオラス科学の創始者の1人である香港城市大のHorváth先生はPFOA/PFOS問題によるフルオラス科学の将来への懸念が強く、C₄の短鎖でありながらフルオラス性の高い(CF₃)₃C-O-化合物の活用を勧めていた。このような分岐化合物は概して原料が高コスト、



ブダペストの夜景 手前はくさり橋

高毒性であることが多いことが難点ではあるが。

海外でのフルオラス関係学会では毎度のことながら、相変わらず、それはフッ素化学であって、フルオラス化学ではないだろうという発表も散見された。どう見てもフルオラス性のなさそうな化合物（例えばモノフルオロ化合物）を、フルオラス化合物と言い切る発表までであった。十分に多フッ素化合物に関する研究なのに、「これフルオラスの学会で発表してもいいんでしょうか？」と遠慮気味に仰る日本の研究者とは雲泥の差であると感じた。

筆者も今回ポスター発表を行ったが、思いのほか批判的なコメントはなく、面白いと言ってくれる好意的な先生方が多かった。

次回は2015年、国際フッ素化学シンポジウムと共催でイタリア・コモでの開催（世話人はミラノ工科大のMetrangolo先生）が決定していたが、次々回はイギリス・オックスフォードでの開催が決まった。世話人はLeicester 大のHope先生。

学会当時、Hungaryをはじめ中欧各地は大規模な水害に見舞われており、ドナウ川上流で大量に降った雨で水位が日に日に上昇しつつあった。学会途中のExcurtion（ドナウ川上流のSzentendre、Visegrádを訪問、後者では武術ショーを見学後、Banquet）で、バスで通過した川沿いの道も翌日には冠水して通行止めになっていたほどである。水位が最高（過去最高を更新）に達したのは帰国の数日後だったそうである。

以下、注目した発表についていくつか紹介する。

英国Leicester大のE. G. Hope先生の基調講演は、フルオラス二相系反応の連続化に関するものであった。フルオラスホスフィンリガンドを有する触媒を用いて、ハイドロホルミル化反応を検討したもので、Leicester大でも二相系反応の連続装置を検討していたとの

こと。しかしながら野研の、フルオラスLewis酸触媒反応の連続装置についての言及はなかった。

ミラノ工科大学のP. Metrangolo先生の基調講演は、ハロゲン結合に関するものであった。Metrangolo先生はこの分野の第一人者で、本年にはハロゲン結合に関する第1回の国際シンポジウムを主導している。ハロゲン結合のドナー側の強さは $I > Br > Cl > F$ の順で、ヨウ化パーフルオロアルキル化合物は好適化合物である。 $I-(CF_2)_n-I$ と $CN-R-CN$ や $I^-Me_3N^+-R-N^+Me_3I^-$ 等とのハロゲン結合はセルフアセンブリーによる結晶生成等に活用でき、イオン性液晶(ILC)等への応用が検討されている。

香港城市大のI. T. Horváth先生は、フルオラス化学のSustainabilityというテーマで基調講演された。これまでのフルオラス化学の中心であった C_6-C_{12} のパーフルオロアルキル化合物は、PFOS/PFOA問題で規制されている。しかし代替品となる $C1-C4$ の短鎖化合物ではフルオラス性不足で使いにくい。そこで活用を勧めているのが $(CF_3)_3C-O$ -誘導体というわけである。今回は $(CF_3)_3C-O$ -基を側鎖に有するアルケン、アルキンを合成、重合してポリマーを得ている。物性はポリテトラフルオロエチレン(PTFE)ライクながら短寿命とのこと。尚、PTFE表面は $-CF_2-$ であるが、このポリマーなら表面が $-CF_3$ なので、PTFE以上の超撥水性が期待できそうである。

一方、プラハ化技研のJ. Kvičala先生が招待講演でパーフルオロポリエーテルポニーテールのフルオラス性に関する話をされた。Grubbs触媒への導入等でパーフルオロポリエーテルポニーテールのfluorophilicityを、パーフルオロアルキル基との比較も含めて検証したもので、得られた序列は、分岐perfluoropolyoxaalkyl < perfluoroalkyl < 直鎖perfluoropolyoxaalkylということであった。この結果は、分岐の $(CF_3)_3C-O$ -がフルオ

ラス性が高いという上記Horváth先生らの考え方とは逆と考えられ、今後の動向が気になった。

Maryland大のY. B. Yu先生の招待講演テーマは ^{19}F -MRI用 dendrimer 開発である。 ^{19}F -MRIは高感度な上、 ^1H -MRIのようなバックグラウンドがないため、イメージングが容易という特徴がある。しかし最適な造影剤は各種提案されているものの、未だ開発途上とのこと。強いシグナルを得るためには分子の対称性が重要ということで、Yu先生らは dendrimer を発想した。一方、生体内に導入するためには溶解性も必要であることから、フッ素残基からなる扇状の dendrimer と親水性基からなる扇状の dendrimer を組み合わせた化合物を開発した。 ^{19}F を243個まで導入できたそうである。

関連する発表として、イタリアTrieste大のL. Pasquato先生の ^{19}F -MRI用に、金-チオール-スパーサー-フルオロカーボンユニット-PEG鎖という構造の金ナノパーティクル造影剤開発の発表があった。細胞毒性がないことまで確認できているそうである。

チェコ科学アカデミーのP. Beier先生の講演は、エーテル、アルコールとパーフルオロカーボンとの相互溶解性に関するものであった。その前の研究で、フルオラス溶媒中でのリパーゼ (PPL, CRL, CAL) の反応 (ヘキサン/パーフルオロヘキサン二相系で含フッ素エステルの加水分解を行う。リパーゼは粉末のまま使用し、反応後、濾別。) を検討し、生成物の分配で反応平衡をずらし、反応を進めようとしたが、予想したほど反応が進まなかったことから、より反応を進めるための基礎データとして各種溶媒の相互溶解性を調べたというものである。さらには三成分系のダイアグラムも作成していたが、結構相互溶解するものだという印象を受けた。

ドイツMünster大のM. Sajid先生の発表は、Frustrated Lewis Pairsに関するもの

であった。立体障害で直接quenchできないLewis酸とLewis塩基のpairはFrustrated Lewis Pairs (FLPs) と呼ばれ、例えば H_2 と反応してヘテロ分離できる ($\text{H}-\text{A} \cdots \text{B}-\text{H}$) とのことである。今回の発表はP/B-FLPs (Lewis酸: $-\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_2$ 、Lewis塩基: $-\text{PMes}_2$ とを分子内に有するFLPs) と、NO、COとの反応についてであった。NOとの反応ではヘテロ環フリーラジカル” P/B-FLP-NO \cdot ” を生成し、スチレンの重合開始能を持つとのこと。興味深い発表ではあったが、どこがフルオラスかという質問もあった。

ハンガリー科学アカデミーのT. Soós先生の発表テーマは、触媒デザインにおけるフッ素の役割に関するもので、最近開発した超安定Pd(0)触媒を紹介した。Pdに $-\text{P}[\text{C}_6\text{H}_3(\text{CF}_3)_2]_2$ を3個配位させたもので、熱、湿気、空気に安定で、2、3年は安定だそうである。フッ素残基が劣化要因をうまく排除する効果を持ったものと解される。

南京工科大のC. Cai先生は3年くらい前までスルフォネート系のフルオラスルイス酸の論文を多く出していた先生である。最近是有機触媒系の論文が多く、イントロでもフルオラス有機触媒の説明から入ったが、今回の発表の主題はフルオラスキラルリガンド (ビスオキサゾリン) の合成と、それを利用した銅触媒の反応 (ニトロアルドール反応) の発表だった。何かと研究の方向転換を図っているようである。eeは96-99%となかなかの成績であったが、収率は中程度に止まっていた。



Visegrádでの武術ショーで引っ張り出された先生方

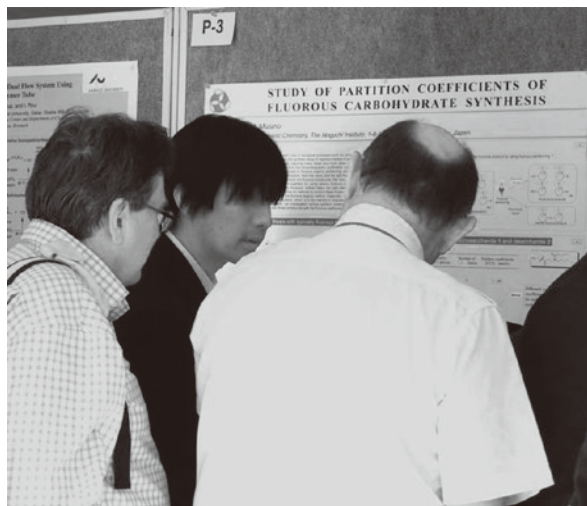
International Symposium on Fluorous Technologies 2013

(ISoFT'13) 参加報告(2)

Report on ISoFT' 13(2)

糖鎖有機化学研究室 室長 水野 真盛
Mamoru MIZUNO

International Symposium on Fluorous Technologies 2013 (ISoFT'13) がハンガリーのブダペストで2013年6/2～6/5の期間で開催された。参加者は12カ国、67名であった。今回筆者は「ACID-STABLE HEAVY FLUOROUS TAG WITH THREE FLUOROUS CHAINS FOR CARBOHYDRATE SYNTHESIS」という演題で、化学的に安定な炭素-炭素結合で構成されたヘビーフルオラスタグの合成と糖鎖合成への展開についての口頭発表を行った。また、当研究室からは後藤研究員が「STUDY OF PARTITION COEFFICIENTS OF FLUOROUS CARBOHYDRATE SYNTHESIS」という演題でポスター発表を行った。



写真：後藤研究員のポスター発表(筆者撮影)

今回の Fluorous Technology Award は Prof. R. H. Fish (ローレンス・バークレー国立研究所) と Prof. J.-M. Vincent (ボルドー大学) が受賞し、初日の夕方に受賞講演が催された。

以下、いくつか興味深い発表について報告する。

招待講演 1 :

Prof. J. Kvičala

「PERFLUOROPOLYETHER-BASED POLYTAILS AS A KEY MOTIF IN FLUOROUS LIGANDS」

Institute of Chemical Technology in Prague

フルオラス基の種類による触媒活性の差異についての発表。モデルとしてフルオラス化されたHoveyda-Grubbs触媒を使用。その結果、perfluoropolyether(PFPE)型触媒は、perfluorocarbon(PFC)型よりも若干程触媒の活性が低下する。またPFPE型では分岐型のほうが直鎖型より低活性になる。フルオラス性の強さについてはPFC型>直鎖PFPE型>分岐PFPE型の順だが、理由についてはまだ明らかになっていない。しかしこのようなデータはフルオラスタグのフルオラス性を制御する際に有用であると思われる。

口頭発表3 : Prof. P. Beier

「MISCIBILITY OF ETHERS AND ALCOHOLS WITH PERFLUOROCARBONS」

Academy of Sciences of the Czech Republic

リパーゼによるアルコールとカルボン酸の脱水縮合をモデル反応としたフルオラス溶媒中での酵素反応についての発表。反応系は Fluorous bis-phase system を採用。反応は均一溶媒系（高温系）で行い、反応後低温系で相分離させ生成物のエステルをフルオラス相に分配する。ただし酵素反応なので均一溶媒系にする温度はあまり高くない方がよい。

今のところ酵素としては有機溶剤耐性の高い酵素しか使えず、またフルオラス溶媒中でも時間経過とともに酵素活性が失活してしまう。本発表ではフルオラス溶媒と有機溶媒との混和する温度に関するデータ発表もあり、フルオラス化学合成法にとっても非常に有用なデータである。

口頭発表7 :

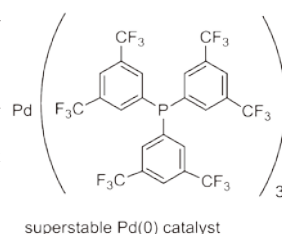
Prof. T. Soós

「FLUORINE AS AN ENABLING ELEMENT IN CATALYST DESIGN」

Research Centre for Natural Sciences of Hungarian Academy of Sciences

超安定化パラジウム (0) 触媒についての発表。パラジウム触媒の配位子側にパーフル

オロメチル基を導入することで「超安定性パラジウム触媒」になることを見出した。従来の Pd[PPh₃]₄ と比べると配位子数は3に減ったが湿気や空気に対してかなりの安定性を示すようになる (2~3年放置しても安定)。理由としては π-π 相互作用のほか、CF-π 相互作用が安定性に寄与している可能性。従来型と比べ TOF は減少するが、TON は高くなる。



招待講演3 :

Prof. Y. B. Yu

「DEVELOPING FLUORINATED DENDRIMERS FOR 19F MAGNETIC RESONANCE IMAGING」

University of Maryland

19F を MRI のイメージング剤として利用するにはフッ素の dendron 化 (F-dendron) が必要だが、F-dendron 領域を拡大するとそれに伴い疎水性も増大するため、水溶性を確保するために親水性基 (PEG) の dendron 化 (H-dendron) 領域も大きくする必要がある。そのため計算式をつくり、それに基づきフッ素を 243 個有する dendron の合成に成功した。



糖鎖インフォマティクス会議報告

～ACGG-DB, GLYCO22 and GlycoHackathon2013@大連～

Glyco-Informatics Meeting Report

～ACGG-DB, GLYCO22, GlycoHackathon2013 in Dalian～

糖鎖有機化学研究室 山田一作
Issaku YAMADA

中華人民共和国東北部遼寧省南部の大連市で開催されたACGG-DB5、GLYCO22、グライコハッカソン2013に参加した。大連市は、人口600万人を超える都市で宿泊したホテルから空港や会場へのアクセスも良いところであった。

The 5th ACGG-DB Meeting in Dalian

大連賓館（南満州鉄道株式会社が経営していた旧大連ヤマトホテル）において平成25年6月22日に開催されたACGG-DB5へ参加した。本会議は、糖鎖データベースに関するアジアおよび国際連携のための会議である。はじめに、会議の趣旨説明が行われた。そして、*Activities for Glycan Data Standardization* セッション、

- “Activities in Japan for Glycan Data Standardization” 澤木 弘道先生（産総研）
- “標準化糖鎖構造表記法（Web3 Unique Representation for Carbohydrate Structure: WURCS）の概要” 筆者
- “The minimum information required for a glycomics experiment (MIRAGE) project” R. Ranzinger先生（The University of Georgia）



大連賓館ロビー

Resource and Proposal for Glycan Data Standardization セッション、

- “JCGGDB” 鹿内俊秀先生（産総研）
- “UniCarbKB” M. Campbell先生（Macquarie University）
- “Carbohydrate Structure Database (CSDB)”

P. Toukach先生 (Zelinsky Institute of Organic Chemistry)

- “Update on Functional Glycomics: Progress and Challenges Ahead” R. Cummings 先生 (Emory University)、
- が行われた。他にもBeijing Institute of Radiation MedicineのW. Ying先生、Academia SinicaのD. K. Hsu先生らが発表された。

最後に、“*International Glycan Data Repository System*”について話し合いが行われた。糖鎖構造のデータベースに関しては、各研究機関等において独自にデータを収集しているのみで、国際的な糖鎖構造の登録システムは存在しなかった。この問題を解決すべく今回の会議において、日本が糖鎖構造の登録システムを構築することで同意が得られた [1]。



ACGG-DB会議参加メンバー

GLYCO22 (国際複合糖質シンポジウム)

平成25年6月23～28日に中国科学院大連化学物理研究所：Dalian Institute of Chemical Physics (DICP)で開催された22nd International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO22)に参加した。

GLYCO22では、平成25年6月24日に開催された”Workshop I - Current and future glycan-related databases and informatics”に参加した。本ワークショップでは、

- “CSDB and other carbohydrate databases” P. Toukach先生
- “UniCarbKB: Building a Glycomics Plat-

form in the Cloud” M. Campbell先生

- “Enhancement of the search function in JCGGDB” 鹿内俊秀先生
- “MIRAGE: Minimum Information Required for A Glycomics Experiment” R. Ranzinger先生
- “Informatics Tools for Glycoscience Research” 創価大学・木下聖子先生
- “Recent Efforts of Global Collaborations for Interconnecting Glycan-related Databases on the Semantic” 澤木弘道先生
- “WURCS: Unique Representation of Carbohydrate Structures for Semantic Web” 筆者

が発表された。ワークショップが著名な先生の講演とスケジュールが重なった割には参加者が多く集まり、様々なことが議論され有意義なワークショップであった。



Glyco22会場前

GlycoHackathon2013

GlycoHackathon2013は、糖鎖インフォマティクスのメンバーがGLYCO22に参加するため、同日程で開催されたBioHackathon2013 (東京) のサテライトとしてGlyco22と同じDICPにおいて平成25年6月24～27日に開催された。参加者は、野口研から筆者・松原正陽研究員、産総研から澤木弘道先生・鹿内俊秀先生・新町大輔先生、理研から加藤雅樹先生、新潟大から奥田修二郎先生、

創価大から木下聖子先生、The University of GeorgiaからR. Ranzinger先生、Zelinsky Institute of Organic ChemistryからP. Toukach先生、Macquarie UniversityからM. Campbell先生であった。今回のハッカソンは、糖鎖データベースのセマンティックウェブ対応において重要である糖鎖オントロジーの開発などを行った。

大連において様々な会議や学会に参加でき、多様な研究者とも交流できたことは非常に有意義であった。

[1] “The Fifth ACGG-DB Meeting Report: Towards an International Glycan Structure Repository” , *Glycobiology* (2013) 23 (12): 1422-1424.

doi: 10.1093/glycob/cwt084

7th Asian Cyclodextrin Conference参加報告

Report on 7th Asian Cyclodextrin Conference

糖鎖有機化学研究室 小田 慶喜

Yoshiki ODA

2013年11月27日から29日、タイ王国・バンコクのチュラーロンコン大学にてシクロデキストリンの国際学会、7th Asian Cyclodextrin Conferenceが開催された。本大会は、2年に1度開かれ、今回はおよそ60人位が参加した。そのうち20人位が日本人、続いて中国、タイ、韓国、オーストラリア、オーストリア、フランス人であった。今回の会場である大学は、タイで最も古く、国王が創立した大学であり、大学生は国王から頂いた制服を着て学生生活を送っている。

ところで、シクロデキストリン (CyD) は、グルコースが α 1 \rightarrow 4結合で環化した化合物であり、グルコース残基が6, 7, 8のものを、それぞれ α 、 β 、 γ -CyDと呼ぶ。CyDは水溶性を示すが、CyDの環の内側は疎水性である。この構造的性質から、一般的に水中では疎水性分子を包接して、水中に溶解させるホスト分子として知られている。この包接作用に着目し、CyDは超分子の分野 (材料) や食品、化粧品、医薬分野への利用が期待され、一部は実用化されている。また、最近ではCyDそのものが医薬になるという研究も行われており、注目をあびている。

今回のシンポジウムでも、8割くらいが医薬関係であった。医薬関係においてCyD化学は、基礎研究から応用研究へと大きくシフトしていることが実感できた。以下に本シンポジウムで発表された研究の一部を報告する。

まず、以前私が所属していた糖質基礎化

学研究室でも、NMRスペクトル法を用いたCyDの医薬利用における評価方法の開発を行っていた。CyDと薬物 (ゲスト分子) は、必ずしも1対1で包接体を形成するとは限らず、ゲスト分子の性質や、各モル比に応じて組成比の異なる包接体を形成することがある。組成比の異なる包接体は、場合によっては物理的性質や、薬理効果が異なる。その為、CyDを医薬利用するにあたり、その包接体構造を知ることは重要なことである。本研究は、NMR法のDOSY法、およびROESY法を組み合わせた評価について発表した。DOSY法とは、系内に存在する各分子種の固有の値である自己拡散係数 (分子が単位面積あたりを短時間に移動する大きさ) の違いを利用してプロトンNMRスペクトルを分離する手法である。すなわち、系内に1対1包接体や1対2包接体が存在すれば、それらをNMRスペクトル上で分離することが可能である。続いて、ROESYスペクトルを用いることにより、分子の微細な構造を明らかにすることが出来、各包接体の構造を明らかにすることが可能であることを説明した。この発表に対し、薬学系の先生方は大変興味を示していた。

オーストラリア・ウィーン大学のPeter Wolschannらは、CyDをドラッグデリバリーシステム (DDS) に利用するにあたり、CyDの物性や、ゲスト分子との包接体形成における溶媒の検討などを詳細に行っていた。彼らは、 β CyDと、 β CyDの水酸基をランダムに

メチル化したCyD誘導体 (RMCyD) を用いていた。制吐薬として知られるナビロンをゲスト分子として、 β CyD、およびRMCyDとの混合試料を調整したところ、 β CyDでは殆ど溶解しなかったのに対し、RMCyDでは速やかに溶解し、さらに蛍光スペクトルによって、包接体の形成が確認された。次に、各種アルコールに対する溶解性について評価していた。その結果、4%、8%、12%のエタノール水溶液中でも包接することを見出した。同様に、プロパノール、ブタノールでも実験を行ったところ、いずれも包接現象が起きることを見出した。その包接の強さはエタノール4% > エタノール8% > エタノール12% > プロパノール4% > プロパノール8% > プロパノール12% > ブタノール4% > ブタノール8% > ブタノール12% となったようである。この発表は、包接体を形成させる為に、水だけでなく、アルコールも用いることが出来、様々な薬剤に適用が可能であることを示唆したものであり、CyD化学において、貴重な情報であると考えられる。

また、CyDの類縁体として、環状オリゴ糖の報告があった。東京工芸大学の高橋圭子教授らは、グルコースが7から11個 α 1 \rightarrow 6結合をしたCIというものを扱っていた。これには、CI-7, CI-8, CI-9, CI-10, CI-11...CI-17とあり、分子そのものはかなりの自由度があり、CyDのようにしっかりとした環状構造を保っていないらしい。しかし、例えば、CI-10は、1対1の混合比でタキソールを包接し、水に溶解させることが出来ることが知られている。今回、CI-17を用いて、半経験的分子軌道計算ソフトとして知られるMOPACを用いて、分子の形状を計算していた。その結果、CI-17は、スカートを広げたような構造になっており、中心に空洞が存在していた。この研究の意義は、特に述べられていなかったが、私が興味を持った理由は、グルコースが9個以上連なった大環状CyDと呼ばれるものは、

グルコース残基が多くなるに従い、自由度が増し、本来のドーナツのような空洞を保つことが出来なくなり、ねじれた構造をとることが知られている。それに対し、CI-17は空洞を保っていたので、6位を固定 (結合) した構造は、今後CyDの形状を安定化させるために、有利なことではないかと感じた。

さらに、韓国のDeham Jeongらは、21残基のグルコースが β 1 \rightarrow 2結合して環化したcyclosophoraose (Cys) の包接挙動について報告していた。Cysは高い水溶性を示す。一点修飾を行い、ダイマーを合成したところ、カテキン誘導体を包接する能力を持つことが判った。

今後、このCI やCysの研究が発展すれば、新しい薬剤キャリアとして大いに期待される。

そして、今回の8th Asian Cyclodextrin Conferenceは、熊本大学薬学部の有馬先生が担当することが決まり、閉幕した。



会場に掲げられた学会ポスター



会場の様子

研究環境と研究文化

Environment and culture on research activities

糖タンパク質工学研究室 月村 亘
Wataru TSUKIMURA

まずは、私が初めて野口研究所を訪ねたときのエピソードからご紹介していこうと思う。

野口研究所に見学のため初めて足を踏み入れた日は、厳しい寒さが続く今年1月の末日であった。野口研究所のホームページを見たところ、研究所への最寄り駅がいくつか記載されており、地図で場所を確認したところ、都営三田線の板橋区役所前駅からの道のりが初めて訪問する者でも比較的迷わず辿り着くと思い、この駅を選択した。

ところが当日向かってみると、そろそろこの辺りが研究所ではないかと思ったがなかなかそれらしき標識や建物が見えて来ず、道を間違えたかと思い少々不安になってきた。不安を覚えたそのとき、目の前に交番があったため警察官の方に念のため確認してみることにした。

「すみません、野口研究所はこの道でよろしいでしょうか？」と私が尋ねたところ、予想していなかった答えが返ってきた。

「野口研究所?? 初めて聞いたなあ、この辺に野口研究所ってあったけ？」

私は道を間違えたと思い、一瞬凍りついた。だが次の瞬間、もう1人の警察官が奥からゆっくり出てきて「この道を真っ直ぐ行って左手ですよ。」と教えて下さった。

2人目の警察官が教えて下さった通り、2

～3分足らず歩くと「公益財団法人 野口研究所」と書かれた標識が見え、なんとか無事到着することができ胸を撫で下ろした。

敷地内に入ると、平屋もしくは最も高くても2階建ての建物が立ち並んでいた。当時の私は、たまたま地上20階建ての築年数があまり経過していない建物の中で勤務していたことに加え、「東京23区内」や「研究所」というキーワードを基に頭の中で想像していた建物とは少々異なるものではあった。建物内に入ると、天井の高さや各部屋の入り口の建て構えなど、歴史を感じさせるものがあった。過去には東京第二陸軍造兵廠として使用されていた建物であり、1923年の関東大震災を乗り越え、3年前の東日本大震災でも建物への被害はなかったとの話をお聞きし、その頑丈さに驚かされた。

そして、今年4月よりこの野口研究所で勤務させていただくことになり、今度は1人の研究員として足を踏み入れた。出勤初日には、所内や周辺の石神井川の遊歩道沿いに桜が咲き誇り絶景であった。所内では、勤務の合間に野菜や植物等をお世話されている方もおり、研究を行いながら身近に自然にも触れ合える貴重な研究環境を備えていると感じている。そのような環境での生活も3ヵ月半以上が経過し、雰囲気にもだいぶ慣れてきた今日この頃である。今後四季折々の所内の風景

を目の当たりにできることを楽しみにしている。

さて、ここからは私が研究を行っている中で時折過去を思い出し、懐かしく感じることについて少々書こうと思う。私は在籍期間の長短はあるが、遺伝子やタンパク質、動物細胞等を取り扱う研究室ならびに研究施設に学生時代から数えてこれまでに計4カ所でお世話になってきた。メンバー構成も様々であり、学生が在籍する研究室、職員のみから構成される集団などがあつた。当然のことながらトップの方の意向に反映されるケースが多いが、部屋に在室しなければいけないコアタイム、ゼミの進め方、雑務の分担などその研究室特有のルールが存在する。各自が過去に所属していた研究室の特徴を持ち寄って話題にすると、それぞれの文化の相違点に話が盛り上がるケースが多い。実験面では、同じ操作の実験を行う場合でも置いてある試薬のメーカーが異なり、最初は戸惑うこともしばしばある。その部屋でのお気に入りのメーカー、出入りする業者さんの都合等に影響される傾向がある。もっとも1つのメーカーに売り上げが偏らず分散することは良いことではあるが…。

私が経験した中で、ある研究室はキット(一連の操作に必要な複数の試薬が既に調製された状態でセットとなって販売されているもの)を使用して操作を行うのに対し、別の研究室は試薬をお手製で全て調製し、1つ1つ順を追って加えながら操作するという相違点があるケースがあつた。具体的には、大腸菌から目的の遺伝子が挿入されたプラスミドDNAを抽出する操作での話である。キットを使用する場合の利点としては、1番に作業時間の効率化が挙げられる。一方、自身で調製した試薬を加えていく方法は、研究室に常備されている一般的な試薬を量りとして調製

するため、特に人数が多い研究室等ではコスト面で安く済むという利点がある。キットを使って作業することを知らない集団にキットを使用していたときの体験話をすれば羨ましがられ、逆にキットを使うことを当たり前のことのように思っている集団にとっては、使わない作業は非常に面倒なことと感じたようであつた。だがよく考えてみると、キットの場合試薬には中身の成分が記載されていないケースも多く見受けられ、無意識にA液、B液…と加えることになり、その場でどのような科学的現象が起こり、どのような意味を持つ操作を行っているかについて考察する機会が失われてしまう危険性がある。後で聞いたところによると、キットを使わない理由の狙いは、考えながら作業するための教育的な側面が大きかったようだ。やみくもに「手軽だから」という理由で決めるのではなく、その場の環境や状況に適応した実験操作の選択も必要であることを学んだ経験であつた。

上で挙げたものは一例ではあるが、これまでに私が複数の研究室ならびに研究施設に在籍し、様々な研究に関する文化に触れることができたことは1つの大きな財産であると考えている。そして、4月よりお世話になっている野口研究所でもまた独自の文化の中で研究を実施している最中である。現在は、有機合成や質量分析、分子生物学等の様々な専門分野を抱えた方々が集まるHGPプロジェクトに参加させていただいている。異分野の方々が身近に集まるプロジェクトに参加する機会はこれまであまりなかったため、とても刺激になっている。異分野の知識習得にも積極的に取り組んでいきたいと考えている。

このような経験を通して、研究活動の中に自身が良いと感じた文化を取り入れ、自分なりの特色を出していくことが大切なのではないかと思う。

－ 事業概要 －

2013年度活動概要

The Activities of the Institute

常務理事 白井 孝
Takashi SHIRAI

公益財団法人野口研究所は1941年に、旧日窒コンツェルンの創始者故野口遵が全私財を投げうって設立した、70年以上の歴史をもつ研究所である。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…」となっている。この精神を尊重しつつ、今の時代のアンメットニーズ（満たされていない社会ニーズ）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進めている。

研究開発では、糖鎖バイオロジー分野を軸とした研究が中心になっている。更に、触媒研究も白金を使わない電極の開発等、環境負荷の低減に資する研究を継続している。また、当研究所で長年取り組んできた、溶媒・廃棄物による環境負荷の少ないと期待されるフルオラス科学も糖鎖合成や触媒反応の研究において固有技術の一つとして役立っている。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。

一方、単独でできることには限りがある。当研究所のレベル維持向上にも大切な事でも

あるので、国家プロジェクトへの参画、公的機関や企業との共同研究も積極的に進めている。

研究助成事業は、挑戦的な若手研究者を支援する目的で平成21年度から実施している。平成25年度はライフサイエンス、地球環境・資源、エネルギー、電子材料の分野の4課題で募集し、2月上旬に開催された選考委員会において207件の応募の中から15件を選考した。

人材の養成については講師派遣、卒業研究生受け入れを実施している。その他の活動として学会活動補助、見学会を実施している。

活動の中心である糖鎖研究は、歴史的にはDNA、タンパク質に比べ特殊な分野であり、応用が限られてきたが、バイオサイエンスの飛躍的な進展に伴い、糖鎖が生命システムに重要な役割を果たしてきていることが解明されてきている。なかでも、抗体医薬に代表されるバイオ医薬品等で糖鎖の役割に注目が集まり、糖鎖の研究も新しい時代に入って来ている。幅広い応用分野が開けそうで、新たな活動の時期に入ったと認識しており、平成22年度より実際の研究活動に反映させてきた。今年度も引き続き、糖タンパク質合成をベースとした技術を展開し、糖タンパク質標品の糖鎖を自由にデザインする技術に結実させてゆくべく研究を推進した。そして新たに、こ

れらで培ってきた技術と経験の当然の出口として、疾患と糖鎖修飾の関わりに関する研究にも力を入れ、疾病克服の一翼を担うことを目指した研究にも着手した。

平成25年度は当研究所の原資のおよそ85%を糖鎖研究、15%をナノ材料・機能性材料研究に配置した。

財政面では当研究所は資産運用益を柱とし、それに寄付金、公的機関からの競争的研究助成金を充当している。今期の経常収益は、資産運用の為替リンク債が円安効果により対予算33.1百万円の増益となり、一方経常費用は、前年度に引き続き研究の選択と集中により経費の削減に努め対予算2.1百万円の微増で済んだ。

結果、正味財産増減額は、投資有価証券の評価損等18.0百万円計上したにもかかわらず、予算の△21.1百万円に対し△1.8百万円にとどまった。

1. 研究事業

1-1 糖鎖研究

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と考え検討している。いわゆるバイオ医薬品はCHOに代表される動物細胞を利用し、主にタンク培養により製造されている。抗体医薬の場合、10 g/Lの高い最終生産物濃度に達し、精製も容易になってきており、製造プロセスはほぼ完成されている。しかし、生きた細胞を用いる為、生物反応特有の不確定性や不均一性は避けられない。既に遺伝子 (DNA) で決まるタンパク質は遺伝子組み換えで、ヒト型のものが作れるようになったが、後で付加する糖鎖は生産に用いた動物種固有のものとなるしひとつの動物でも糖鎖の種類は多様なものができる。動物細胞で製造されたバ

イオ医薬品 (糖タンパク質) ではタンパク質部分は同じだが付加される様々な糖鎖構造の違いが薬効や安全性に大きく影響する事が明らかとなり、FDAのガイドライン (2012年2月) でも多様性のある糖鎖構造を定量的に分析し、どの糖鎖構造がどの割合で含まれるのかを明らかにするよう求められてきている。糖鎖を自由にデザインする事・即ち、糖鎖リモデリングの社会的ニーズは確実に高まってきている。平成23年度HGP (Homogeneous GlycoProtein) プロジェクトを立ち上げ、糖鎖リモデリングによる均一な糖鎖を持つ糖タンパク質合成技術の確立を目指してきた。糖鎖リモデリング法とは、まずヘテロな糖鎖を持つタンパク質より、分解酵素を利用して、糖鎖を切除し、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合成酵素を用いて人為的に連結する。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。又、一般的にCHO細胞から製造された糖タンパク質を用いてアクセプターを調製すると、根元にフコースを持つ (コアフコースと呼ぶ) アクセプターがメインとなる。コアフコースの有無により、制癌活性が100倍異なるとの報告もあるのでコアフコースの有無も構造活性相関の重要な要因になる事がわかってきている。そこで我々はもともとコアフコースを持たない糖タンパク質のみ合成するカイコに着目し、カイコで合成された糖タンパク質を (株)免疫生物研究所から入手する事にした。これにより、コアフコースのないアクセプター調製にも目途がたった。今後、これらの技術を推し進め、種々のドナー糖鎖を調製する事と、コアフコースの有無の両方のアクセプターを調製する事で種々の均一糖タンパク質標品の調製を可能にする様な技術へと仕上げていきたい。

今年度は糖タンパク質工学研究室を新設し、糖鎖有機化学研究室の酵素合成機能を移管した。さらに糖質基礎化学研究室を廃止し、有機化学機能を糖鎖有機化学研究室に統合した。

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を行っている。平成25年度の年初計画は

- ①HGPプロジェクトと協力し、糖転移酵素、および糖加水分解酵素の大量発現・安定化・固定化・高活性化を行う。さらに糖供与体改良も行う。
- ②フルオラス合成法による迅速糖鎖合成法の開発を行う。また、フルオラスケミストリーの新規活用法の探索も行う。
- ③糖質加水分解酵素による無保護の糖を利用した複合糖質合成を行う。
- ④癌関連糖鎖に対する生物学的、及びケミカルバイオロジー的アプローチ
- ⑤糖鎖技術の普及に向けて、分野の異なる研究者でも簡単に糖鎖合成法が検索できる「糖鎖合成支援システム」“グライコナビTM”を開発。また昨年度に引き続き、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」の「糖鎖統合データベースと研究支援ツールの開発」に参加し、「合成反応データベース、NMRスペクトルデータベース、TLCデータベース、精製法データベースの開発事業」を行う。

今期の成果

糖鎖リモデリング法にてドナーとして使用するSG-OH (114 mg)、G2-OH(70 mg)、G0-OH(41 mg)の3種類をSGP原料より調製した。また、SGP からの調製が困難であるM3-OH (100mg) を化学合成により調製した。更に得られた前駆体のうちSG-OHよりSG-oxa (11 mg)、G2-OHよりG2-oxa(10 mg)

を調製してIgGへの糖鎖転移反応用に供給した。

新規に開発した耐酸性ヘビーフルオラスタグに対して、アリル型やp-アルコキシベンジル型リンカーの導入に成功した。また、従来切断が困難であった、フルオラスタグとリンカー間のエーテル結合部位の効率的な切断方法を見出し、耐酸性ヘビーフルオラスタグのリサイクルにも成功した。更に本耐酸性ヘビーフルオラスタグによる単糖ユニット合成、及び糖鎖合成にも成功した。

③、④は9月以降糖タンパク質工学研究室に移行。

JSTライフサイエンスデータベース統合推進事業における各種データベースの開発を行い、データの拡充、及びデータベースの検証を行った。また、世界共通糖鎖構造データベースの開発を行っており、その基盤技術として不可欠である国際糖鎖標準表記法（WURCS：Web3.0 Unique Representation Carbohydrate Structure）の開発をおこなっている。

糖質基礎化学研究室（廃止）：有機合成的なアプローチによる糖鎖作用の向上化技法及びNMRによる糖鎖機能の迅速な解析技法の開発を行う。平成25年度の年初計画では、抗菌・抗ウイルス剤の開発に焦点をあて、

- ①糖鎖作用を高める複合的な糖鎖クラスター効果発現系の開発
- ②糖鎖機能の新しいスクリーニング手法の確立を目指す

今期の成果

研究テーマ見直しの為、研究室を廃止。糖鎖有機化学研究室に統合した。

糖タンパク質工学研究室（新設）：癌の進行・進展に伴う糖鎖構造変化を捉え、その病態形成に果たす役割、構造変化を来す分子機構を解明する事により有用なバイオマーカー

更には治療薬開発における新たな標的分子の発掘を目指す。平成25年度の年初計画は

- ①糖質加水分解酵素による無保護の糖を利用した複合糖質合成を行う。
- ②LDN構造が癌の進行、進展に果たす役割を解析する。
- ③GalNAc-DSLc4及びその合成酵素が腎癌の悪性化に果たす役割を解析する。

今期の成果

2種の糖鎖構造と癌の進展、悪性化との関連を解明すべく研究している。1つは哺乳類では稀少糖鎖構造とされているGalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc(LacdiNAc or LDN) 構造と乳癌並びに前立腺癌との関連に関するものであり、他は酸性糖脂質の一種で、こちらも比較的稀少構造であるGalNAc-Disialyl Lc4(RM2-抗原) と腎癌の悪性化に関するものである。

LDNの形成に関与する糖転移酵素 β 1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase (β 4GalNAcT3 & 4)の発現や機能に着目してこれらの検討を行っている。乳癌由来細胞MDA-MB-231細胞に β 4GalNAcT4を発現させた細胞株では移植マウスでの腫瘍形成能が消失したことからLDN糖鎖が少なくとも乳癌においては癌の進行を抑制する機能を有することが強く示唆された。

腎癌細胞株の細胞表面に発現している糖鎖抗原の解析により、Disialyl化された糖鎖の発現パターンの変化が腎癌での悪性化や転移性に関連していることが推測されている。本研究では、GalNAc-DSLc4安定発現腎癌細胞株を樹立し、このDisialyl糖鎖の機能解析を進めている。抗GalNAc-DSLc4抗体によりGalNAc-DSLc4発現細胞の増殖亢進が抑制されることが分かった。一部の悪性形質とGalNAc-DSLc4が直接関連する事を証明した。

糖鎖生物学研究室：糖鎖とペプチドを遊離せ

ず糖鎖付加位置情報を含む糖タンパク質のMSによる分析技術研究（前立腺癌診断マーカーの精度アップ）。糖ペプチドをピレンラベル化してMALDI-TOF-MSで測定すると感度上昇する事を本研究室で開発。平成25年度の年初計画は、

- ①一層の高感度化および高再現性の追求
- ②この技術のバイオ医薬品の品質管理・規格化への展開
- ③この技術を阻害剤の作用メカニズムやスクリーニングに展開
- ④上記技術のMSスペクトルから糖ペプチド構造を推定するソフトウェアのバージョンアップ

今期の成果

MSによる糖ペプチド解析の高感度化および高再現性の追求：MALDI-MSは、簡便迅速な測定が可能であるが、マトリックス結晶状態に依存するので再現性や定量性に課題が残る。そこで、レーザーを吸収する官能基を付加した修飾メソポーラスシリカを用いてイオン化を検討した。また、比較定量解析のため糖ペプチド誘導体化法を開発した。具体的にはペプチドのN末アミノ基をラベル化する事を考え、ベンゾイル化が最適である事を見出し、前立腺癌診断マーカー PSA糖ペプチドのMS解析を行っている。さらに同位体標識と組み合わせることで、血清IgGグライコフォーム解析や酵素基質特異性を明らかにした。

MSスペクトルから糖ペプチド構造を推定するソフトウェアのバージョンアップ：独自の糖鎖の高感度ピレン標識法をMALDI-QIT-TOFMS測定に適用した革新的な糖鎖構造解析技術にて、従来法では検出困難である20pgの糖ペプチドの測定を達成した。更にその成果をもとに、糖ペプチドの構造同定を行うためのソフトウェアの開発を実施し、プロトタイプソフトウェアを完成させた。これらのアウトプットの実用化を目的として、平成25年

10月より、JST研究成果展開事業（先端計測分析技術・機器開発プログラム）に採択され、開発課題「MSⁿスペクトルによる糖鎖構造推定ソフトウェアの製品化」としてライフイクス株式会社および工学院大学と共同で研究開発を行っている。プロトタイプで、糖鎖構造推定技術を確立することが出来たが、インターフェースおよび処理速度を改善して一般のユーザーの利便性が向上した製品として完成させるため、プログラム全体を再コーディングしている。さらにプロトタイプの構成プログラムやGUI(Graphic User Interface)の問題点および新規機能の追加などに関して、分担者と協議している。

HGPプロジェクト：研究室横断的に力を結集し、均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質を合成する技術確立を進めるプロジェクト。平成25年度の年初計画は

- ① (株) 免疫生物研究所でカイコを用いて合成された糖タンパク質を用い、GlcNAc糖鎖のみが付加したアクセプター糖タンパク質調製法を確立する。
- ② 選択した糖タンパク質医薬品で均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質を合成する。

今期の成果

(株) 免疫生物研究所からカイコ中部絹糸腺で産生した抗体を入手した。この抗体をエンド酵素 (Endo-S, Endo-LL, Endo-D) の3酵素の混合により、糖鎖を切除し、アクセプターを調製した。

まず、ヘテロな糖鎖を持つ抗体の糖鎖プロフィールの精密定量を野研オリジナルの糖ペプチド誘導体化法にて実施した。ついで、新たに*Lactococcus lactis*から新規エンド酵素をクローニングし、Endo-LLと命名した。これらエンド酵素 (Endo-S, Endo-H, Endo-M, Endo-D, Endo-LL, Endo-F1, Endo-F2, Endo-F3) を用いて抗体の糖鎖切除を行い、さらにトリプシン消化によって糖ペプチドを

作成し、野研オリジナルの糖ペプチド誘導体化法にて糖ペプチドの糖鎖構造プロフィールを得た。これらの強度比を重ね合わせて棒グラフを作成する事により、簡便にエンド酵素によってどの糖鎖が切断できたかを判別できる。この解析を元に (Endo-S, Endo-LL, Endo-D) の3酵素の混合によりヘテロな糖鎖を持つ抗体からアクセプターを調製できた。

1-2 触媒研究

ナノ・メソポーラス研究では、バイオマス原料 (グルコース) からの有用化学品製造プロセスの開発を目指して、グルコースの高選択的酸素酸化触媒の研究を実施したが、期待していた性能に届かず中止した。高価で希少な白金を使用しない燃料電池用の非白金系電極触媒材料の開発については京都大学、東北大学と共同で行っている。

機能性材料研究ではフルオラス技術を武器とする合成研究を行っている。酵素反応の工業利用を目的に、酵素固定の検討を行っている。

ナノ・メソポーラス材料研究室：ナノポーラス・メソポーラスを切り口とした機能性材料の技術開発。

バイオマス原料 (グルコース) からの有用化学品製造プロセスの開発を開始した。平成25年度の年初計画は、

- ① グルコースの酸化反応によるアジピン酸製造における高選択性触媒の研究を継続する。
- また燃料電池用非白金系電極材の研究開発では、

- ① ダイマー構造を有するルベアン酸配位高分子の水素極触媒としての研究開発を行う。

今期の成果

グルカル酸収率の向上を目指して種々の触媒を調製し、目標とするグルカル酸収率に近

い触媒を開発できた。しかし触媒活性とグルカル酸収率にはトレードオフの関係があり、収率が高い触媒は、活性が低い傾向がある。触媒活性、収率とも高い触媒を見いだすことはできなかった。また、アジピン酸は、最近の市況から新たにプロセスを開発すべき魅力的なモノマーではなくなった。以上のことから本研究は、今年度をもって終了とする。

バイオエタノールを燃料とする燃料電池用非白金系電極材料の研究開発成果である、ルベアン酸配位高分子の合成および燃料電池触媒活性の評価技術をもとに、ルベアン酸配位高分子を合成して、電極反応における水素酸化の触媒活性の有無を詳細に亘って調べた。その結果、水素に対して電気化学的酸化触媒活性を示すルベアン酸配位高分子をいくつか確認した。さらに活性向上のためのいくつかの手段も確認できた。また、触媒活性発現機構については、ルベアン酸配位高分子には水素ガスを化学吸着することが、吸脱着測定から確認出来た。化学計算による触媒活性の理論解明と構造の最適化を継続実施中である。

機能性材料研究室：フルオラス技術を武器とする合成研究。酵素反応の工業利用を目的に、酵素固定の検討を行っている。平成25年度の年初計画は、

- ①酵素固定の効率や活性発現に対して、フルオラス基材の依存性がきわめて大きいことが分かったことから、基材側の必要要件を解明するとともに、より優れた基材のデザインを行う。
- ②固定酵素の種類を増やし、一般性を高めるとともに、実用酵素への展開も試みる。

今期の成果

フルオラス修飾した酵素をフルオラス基材（担体）に、フルオラス相互作用を利用して固定化させる方法を検討している。フルオラス担体側の、Rf基鎖長の効果や、多孔質vs無孔質の比較を行ったところ、炭素数8のRf基

に比べ、炭素数4のRf基や無孔質シリカでは保持性が極端に悪く、Rf基鎖長や多孔性の重要性が示唆された。

1-3 その他

当研究所ではフルオラス科学の研究振興においても国内の中心的な役割を担っている。フルオラス科学は化学合成の精製工程を短縮でき、糖鎖の効率的合成には有効な化学合成手法である。当研究所は糖鎖研究を行う中で当化学の研究をスタートし、研究の成果をベースに、触媒、糖鎖研究のための情報交換とフルオラス科学の普及啓蒙の目的で、平成14年野口フルオラスプロジェクトを立ち上げてフルオラス科学研究の専門家を招請し、シンポジウムを開催してきた。この野口フルオラスプロジェクトに賛同した大学の先生方の参画を得て、平成20年当研究所が中心になり、更にフルオラスの化学合成以外の適用も目指してフルオラス科学研究会が発足した。当研究所は、情報交換の場の重要性から、フルオラス科学研究会シンポジウムの活性化に尽力している。研究会では今年度フルオラスの定義を改定し、日本フッ素化学会との連携を強め、ホームページの相互リンクから開始した。フルオラス科学研究会第6回シンポジウムを岡山理科大学工学部折田明浩教授にご尽力いただき、11月1日岡山国際交流センターにて開催した。（別添資料1）

1-4 国家プロジェクトへの参画及び外部機関との共同研究

1-1、1-2に述べた研究に大半の人員がかかっているが、単独でできることには限りがある。当研究所のレベル維持向上にも大切な事でもあるので、国家プロジェクトへの参画、公的機関や企業との共同研究も積極的に進めている。平成25年度も下記の研究機関や企業と積極的に共同研究を実施した。

(競争的委託研究事業)

- ・ 科学技術振興機構 (JST) 研究成果展開事業【先端計測分析技術・機器開発プログラム】実用化プログラム「MSⁿスペクトルによる糖鎖構造推定ソフトウェアの製品化」、チームリーダー：金澤光洋 (ライフイクス株式会社) サブリーダー：天野純子 (糖鎖生物学研究室室長) 参画機関：工学院大学
- ・ 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：「糖鎖統合データベースと研究支援ツールの開発」の中の「合成反応データベース、NMRスペクトルデータベース、TLCデータベース、精製法データベースの開発事業」

(共同研究)

- ・ 旭化成株式会社
- ・ 旭化成ファーマ株式会社
- ・ 千葉大学大学院融合科学研究科 (西田芳弘教授)
- ・ 株式会社伏見製薬所
- ・ 石川県立大学生物資源工学研究所 (山本憲二教授)
- ・ 鹿児島大学大学院 (米澤傑教授)
- ・ 慶應義塾大学医学部 (高柳淳講師)
- ・ 慶應義塾大学理工学部 (佐藤智典教授)
- ・ 株式会社高分子加工研究所/JNC株式会社
- ・ 工学院大学工学研究科 (高羽洋充准教授)
- ・ 明治大学理工学部 (室田明彦講師) / 和洋女子大学服飾造形学類 (鬘谷要教授)
- ・ 株式会社免疫生物研究所
- ・ 長岡技術科学大学 (古川清教授)
- ・ 名古屋大学大学院医学系研究科 (古川鋼一教授)
- ・ 日本大学医学部泌尿器科学講座 (高橋悟主任教授)
- ・ 大阪府立成人病センター (井上正宏部長) / 株式会社ルネッサンス・エナジー・インベストメント

- ・ ライフィクス株式会社
- ・ 信州大学大学院医学系研究科 (中山淳教授)
- ・ 東北大学未来科学技術共同研究センター (宮本明教授)
- ・ 東北大学大学院工学研究科 (正田晋一郎教授)
- ・ 東北薬科大学分子生体膜研究所 (井ノ口仁一教授)
- ・ 東海大学工学部応用化学科 (稲津敏行教授)
- ・ 東京都健康長寿医療センター (遠藤玉夫副所長)
- ・ 株式会社豊田中央研究所
- ・ 山口大学大学院医学系研究科 (小賀厚徳講師)

2. 野口遵研究助成 (応募型)

化学者の養成・援助は当研究所の設立趣意書にも記載されている重要な任務である。平成21年度より、野口遵研究助成金制度を立ち上げ、平成25年度は第5回目を実施した。

国内大学又はそれに準ずる研究機関の若手研究者を対象にし、平成25年度はライフサイエンス、地球環境・資源、エネルギー、電子材料の4分野で募集し、総数207件の応募があった。この中から選考委員による厳正な選考の結果15件が採択された。(詳細は76頁)

3. 学生の育成

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。平成25年度は2名の学生を受け入れ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7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2)

4. 研究の成果 (別添資料3)**(1) 特許出願関係**

- ・ 特許出願 7件 (うち共同出願 2件)

- | | |
|------------------------|---------------------------|
| ・特許公開 6件 (うち共同出願 2件) | ・外国特許公開 0件 (うち共同出願 0件) |
| ・審査請求 7件 (うち共同出願 1件) | ・外国特許登録 3件 (うち共同出願 0件) |
| ・特許登録 15件 (うち共同出願 3件) | (2) 学会発表 32件 (うち国際学会 12件) |
| ・PCT出願 0件 (うち共同出願 0件) | (3) 誌上发表 5件 |
| ・外国特許出願 2件 (うち共同出願 0件) | (4) 依頼講演 4件 |
| ・PCT公開 0件 (うち共同出願 0件) | 以上 |

【別添資料1】

フルオラス科学研究会第6回シンポジウムプログラム

2013年11月 1日 (金) 岡山国際交流センター 2F 国際会議場 (岡山市北区奉還町2 丁目2-1)

10:00 ~ 10:05 会長挨拶

10:05 ~ 10:55 特別講演1 座長：門出 健次 (北海道大学 先端生命科学研究院)

「パーフルオロ化合物の炭素—フッ素結合切断を基盤とするフルオラス化合物の精密合成」(大阪大学大学院工学研究科) 大橋 理人

10:55 ~ 11:10 口頭発表

O-1 「12 個のフルオロエトキシ基が創るサブタロシアニンのフルオラス π 空間」(名古屋工大) ○徳永恵津子, 飯田紀士, 森 悟, 柴田哲男

11:15 ~ 11:30 口頭発表 座長：中村 豊 (新潟薬科大学)

O-2 「細胞培養基質としての新規フルオラスゲルの開発」(東大生研1・Univ. Bordeaux 2) ○宮島浩樹1・粕谷マリアカルメリタ1・畑中研一1・A. Del Guerzo2・J. M. Vincent2

11:30 ~ 11:45 口頭発表

O-3 「ライトフルオラスエンコード法による Tenuocyclamide A 全立体異性体のスプリット型液相ミクスチャー合成」(名城大学) ○江口文崇・杉山祐也・高橋広明・濱本博三・塩入孝之・松儀真人

11:45 ~ 12:00 口頭発表

O-4 「フルオラス溶媒:細胞培養のための酸素reservoir」(東大生研) ○粕谷マリアカルメリタ、畑中研一

13:10 ~ 13:25 口頭発表 座長：松原 浩 (大阪府立大学 大学院)

O-5 "Revealing a complex chemical structure of the supramolecular chain" (バーゼル大 1・岡山理大2) ○川井 茂樹1・A. Sadeghil・R. Pawlak1・折田明浩2・大寺純蔵2・S. Goedecker1・E. Meyer1

13:25 ~ 14:15 特別講演2

「含フッ素 π 電子系の開発とエレクトロニクス応用」(大阪大学産業科学研究所) 家 裕隆

14:20 ~ 14:35 口頭発表 座長：松儀 真人 (名城大学)

O-6 「含フッ素亜リン酸エステル触媒を用いる位置及び立体選択的ブロモポリエン環化反応」(名大院工1・岡山大院自然2・CREST3) ○石原 一彰1,3・澤村 泰弘1・仲辻 秀文1・坂倉 彰2

14:35 ~ 15:25 特別講演3

「フッ素系アルコールを活用する不斉触媒反応の創出」(群馬大学理工学研究院)
網井 秀樹

15:50 ~ 17:20 ポスター発表

- P-01 フッ素系アルコール溶媒を用いる超原子価ヨウ素試薬による芳香族脱炭
酸的ハロゲン化反応(名城大農1, 近畿大薬2) 濱本博三1, ○伊藤芽衣子1,
松儀真人1, 藤村一真2, 服部翔2, 前川智弘2, 三木康義2
- P-02 フルオラス有機触媒を用いた不斉共役付加反応(東京薬大1, 岐阜薬大2)
○三浦剛1, 上戸悠史2, 益田晃2, 湯浅裕貴2, 多田教浩2, 伊藤彰近2, 中
島康介1, 平島真一1, 古石裕治1
- P-03 フッ素化ポリマーの合成(埼大理工, 東大生研) ○木村珠美, 粕谷マリア
カルメリタ, 松岡浩司, 畑中研一
- P-04 Bfp 基集積化シクロデキストリンの合成と含フッ素溶媒中での特性(野口
研) ○山ノ井孝, 皆川哲也, 小田慶喜
- P-05 パーフルオロアルキル基を有するキラルゲル化剤の合成とその物性(お茶
女大院1, 愛媛大院理工2, 東邦大理3) ○佐々木美香1, 矢島知子1, 佐藤
久子2, 山岸皓彦3
- P-06 酸触媒条件下で利用できるフルオラスベンジル化剤の開発(金沢大院医薬
保) ○国嶋崇隆, 浅尾亮平, 山田耕平, 北村正典
- P-07 耐酸性ヘビーフルオラストグを用いた糖鎖合成(千葉大院融合科学1, 野
口研糖鎖有機2) ○福田和男1,2, 戸治野真美2, 後藤浩太郎2, 土肥博史1,
西田芳弘1, 水野真盛2
- P-08 フッ化水素酸溶液からの金属フルオラス抽出(東海大工, 東海大糖鎖研)
○留奥友基, 太田和隆太郎, 伊藤慎, 稲津敏行
- P-09 フルオラス山口試薬の合成とその利用(阪府大院理) ○河津朱里, 松原 浩
- P-10 BTF 系ハイブリッド溶媒の開発と有機合成への利用(阪府大院理) ○葛
原満広, 松原 浩
- P-11 フタロシアニンのフルオラス空間とソルバトクロミズム(名工大院工) ○
徳永恵津子, 森悟, 飯田紀士, 柴田哲男
- P-12 パーフルオロ tert-ブトキシ基をフルオラストグとする環境調和型ピロリジ
ン触媒を用いたマイケル付加反応(新潟薬大応用生命科学) ○牛腸明子,
渡辺未希, 小島 勝, 武内征司, 中村 豊
- P-13 糖を出発原料とする環境低負荷型有機触媒の開発-フルオラスイミノヘキ
サフラノースの合成とその触媒活性評価(新潟薬大応用生命科学) ○安野
喜明, 小島 勝, 渡邊亜華音, 武内征司, 中村 豊
- P-14 フルオラス N-フェニルカルバモイル基を用いたククルビトシドC の合成研
究(新潟薬大応用生命科学) ○長谷川貴章, 小島 勝, 武内征司, 中村 豊
- P-15 フルオラストグ法による2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル4-O-(カルボキ
シアセチル)-β-D-グルコピラノシド誘導体の迅速合成(新潟薬大応用生
命科学) ○小島 勝, 藤井俊佑, 武内征司, 中村 豊

P-16 フェイズ・バニシング法によるBH3 の発生と反応 (阪府大院理) ○川本拓治, 佐藤葵生, 柳 日馨

【別添資料2】

(1) 学生の受け入れ

東海大学から1名の卒業研究生、千葉大学大学院から1名の博士論文研究生を受け入れ、下記のテーマにより研究を行った。

卒業研究

①分子内アシル転移反応の抑制を目指したWilliamsonエーテル合成法の改良

博士論文研究

①耐酸性ヘビーフルオラスタグを用いた糖鎖合成

(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。

天野純子、水野真盛、大隅賢二、吉田彰宏、山田一作、菅原州一、後藤浩太郎

【別添資料3】

1. 学会発表 32件 (うち国際学会 12件)

International Symposium on Fluorous Technology 2013 (2013.6.2-5)	3件
61th ASMS Conference on Mass Spectrometry (2013.6.9-13)	4件
22nd International Symposium on Glycoconjugates (2013.6.23-28)	2件
第64回FCCAセミナー 糖鎖インフォマティクス若手の会 (2013.8.8)	1件
第61回質量分析総合討論会 (2013.9.10-12)	4件
第86回日本生化学会大会 (2013.9.11-13)	2件
第30回シクロデキストリンシンポジウム (2013.9.12-13)	4件
The 12th Human Proteome Organization World Congress 2013 (2013.9.14-18)	1件
フルオラス科学研究会第6回シンポジウム (2013.11.1)	2件
トーゴの日シンポジウム 2013 (2013.11.4-5)	1件
第4回グライコバイオリジクス研究会 (2013.11.20)	1件
The 7th Asian Cyclodextrin Conference (2013.11.27-29)	1件
The 5th International Symposium on Languages in Biology and Medicine (2013.12.12-13)	1件
日本化学会第94春季年会 (2014.3.27-30)	2件
日本農芸化学会2014年度大会 (2014.3.27-30)	1件
日本薬学会第134回年会 (2014.3.27-30)	2件

2. 誌上発表 5件

Convenient synthesis of glycosyl bromide from 1-O-acetyl sugars by photo-irradiative phase-vanishing reaction of molecular bromine

Mami Tojino, Yuriko Hirose, Mamoru Mizuno

Tetrahedron Letters, 54(52), 7124-7126, 2013

Phosphorylation and externalization of galectin-4 is controlled by Src family kinases

Ideo H, Hoshi I, Yamashita K, Sakamoto M.

Glycobiology, 23(12),1452-62 ,2013

The Fifth ACGG-DB Meeting Report:

Towards an International Glycan Structure Repository

Kiyoko F Aoki-Kinoshita, Hiromichi Sawaki, Hyun Joo An, Matthew Campbell, Qichen Cao, Richard Cummings, Daniel K Hsu, Masaki Kato, Toshisuke Kawasaki, Kay-Hooi Khoo, Jaehan Kim, Daniel Kolarich, Xianyu Li, Mingqi Liu, Masaaki Matsubara, Shujiro Okuda, Nicolle H Packer, René Ranzinger, Huali Shen, Toshihide Shikanai, Daisuke Shinmachi, Philip Toukach, Issaku Yamada, Yoshiki Yamaguchi, Pengyuan Yang, Wantao Ying, Jong Shin Yoo, Yan Zhang, Yang Zhang and Hisashi Narimatsu
Glycobiology, 23, 1422-1424. (2013)

Introducing glycomics data into the Semantic Web

Kiyoko F Aoki-Kinoshita, Jerven Bolleman, Matthew P Campbell, Shin Kawano, Jin-Dong Kim, Thomas Lütteke, Masaaki Matsubara, Shujiro Okuda, Rene Ranzinger, Hiromichi Sawaki, Toshihide Shikanai, Daisuke Shinmachi, Yoshinori Suzuki, Philip Toukach, Issaku Yamada, Nicolle H Packer and Hisashi Narimatsu*
Journal of Biomedical Semantics, 4:39, 2013

Application of fluorous chemistry for Oligosaccharide synthesis

Kohtaro Goto, Mamoru Mizuno

TIGG 25(146), 1-11, 2013

3. 講演 4件

レニショーセミナー Inside Raman 2013 (2013.10.18)

「MALDIの謎に迫る MALDI結晶のラマンイメージング」

天野 純子

糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (2013.10.25)

「均一糖鎖構造を持つ糖タンパク質合成の動向と展望」

白井 孝

データ統合Hands-on ワークショップ (2014.1.27-30)

「糖鎖データベースの紹介」

山田 一作

第3回コンビナトリアル科学研究推進セミナー (2014.3.11)

「異分野技術を利用した複合糖質合成」

水野 真盛

研究所の概要

Outline of the Institute

理事 齊藤 継男

Tsuguo SAITO

1. 設立と目的

当研究所は、わが国化学工業界のパイオニアであり、日本窒素肥料（現JNC株式会社）、旭ベンベルグ絹糸（現旭化成株式会社）、鴨緑江水電を初め20数社の社長として内外地で大電力を自給し、世界的規模で各種化学工業を振興した不世出の起業家野口遵がその私財（当時2,500万円）を投じ、化学工業発展の一助とすることを目的として、昭和16年2月10日財団法人として設立したものである。

創設者の名を記念して「野口研究所」と命名された当研究所は、その目的として化学の基礎および応用に関する研究・調査を行い、化学工業の発展に寄与することを使命としている。

2. 土地・建物

当研究所が使用している土地建物は、旧東京第二陸軍造兵廠の東京研究所の置かれていたところであり、設立当初研究活動を行っていた横浜研究所が、終戦により連合国に接收されたため、昭和21年1月大蔵省からこの地を借り受け今日に至っている。

敷地は約13,700㎡、建物は国有のもの約2,300㎡であるが、このほかに当研究所で新築・増築した建物が2,000㎡ある。

3. 賛同会社

当研究所は研究所の公益事業活動にご理解とご賛同のもと寄附金をいただき運営の一助

にあてている。寄附金は主として研究所の機器の購入・整備および自主研究の費用にあてられる。

現在次の10社から寄附金をいただいている。

旭化成株式会社
J N C 株式会社
積水化学工業株式会社
株式会社ニッチツ
西松建設株式会社
センコー株式会社
K I S C O 株式会社
株式会社東京シンクサービス
株式会社高分子加工研究所
千葉ファインケミカル株式会社

4. 公益財団法人移行

平成22年10月26日付で内閣総理大臣より公益財団法人の認定を受け、平成22年11月1日に登記をし、公益財団法人へ移行した。

これにより、主務官庁は従来の文部科学省から内閣府になった。

5. 役員

当研究所の役員は理事12名、評議員6名、監事3名で、次のとおりである。

理事長 稲田 勉*
常務理事 白井 孝*
理事 齊藤 継男* 上ノ山智史
木幡 陽 中尾 正文

	野崎 貴司	畑中 研一
	廣瀬 弘明	堀 一良
	増村 正志	松本 誠
評 議 員	浅野 敏雄	岩澤 康裕
	小堀 秀毅	澤本 光男
	根岸 修史	森田美智男
監 事	浦 一昭	寺田 生弘
	永原 肇	

*は常勤 常勤以外は五十音順

6. 学術顧問

当研究所の学術顧問は平成26年7月末日現在次のとおりである。

木幡 陽 畑中 研一
柴崎 一郎

7. 職員

2014年7月末日現在の職員の在籍者は38名である。このほかに技術アドバイザー 3名が勤務している。

8. 特許および商標

当研究所所有の特許権は103件、商標権は4件である (2014年7月末日現在)。

8-1 特許権

発明者	発明の名称	登録番号	登録日
羽田 勝二 稲津 敏行	複合糖質の製造方法	3732871	2005.10.21
羽田 勝二 稲津 敏行	複合糖質の製法	3776952	2006.03.03
羽田 勝二 稲津 敏行	新規複合糖質の製造方法	3811527	2006.06.02
三浦 剛 稲津 敏行	高度にフッ素化されたカルボン酸誘導体およびその製造方法と中間体	3888914	2006.12.08
川上 宏子 戸 潤一 孔	ジアミド型ゲル化剤	3947483	2007.04.20
三浦 剛 稲津 敏行	高度にフッ素化されたカルボン酸およびその製造方法と中間体	4019125	2007.10.05
川上 宏子 戸 潤一 孔	高分子化するゲル化剤	4141772	2008.06.20
稲津 敏行 山ノ井 孝	グリコシド誘導体の製造法	4162739	2008.08.01
川上 宏子 戸 潤一 孔	ビオチン脂質	4162904	2008.08.01
山ノ井 孝喜 小田 慶	C,C-グリコピラノシル化合物とその製造法	4212087	2008.11.07
柳 日馨 松原 浩 杉山 弘幸	フルオラス性を利用した回収容易なアミン類	4224315	2008.11.28
天野 純子	質量分析法	4295338	2009.04.17

高木 睦 吉田 敏臣 久保 一介 戸 潤 一 孔	動物細胞培養素材	4381000	2009.10.02
佐藤 玲子 戸 潤 一 孔	ガラクトース二硫酸誘導体	4381002	2009.10.02
水野 真盛 後藤 浩太朗	高度にフッ素化されたカルボン酸誘導体およびその製造方法	4440167	2010.01.15
川上 宏子 戸 潤 一 孔 古幡 昌彦 服部 喜之 米谷 芳枝	オリゴアルギニン脂質	4456438	2010.02.22
水野 真盛 後藤 浩太朗	高度にフッ素化されたアルコールおよびその製造方法と中間体	4485459	2010.04.02
佐藤 玲子 川上 宏子 戸 潤 一 孔	生体適合性付与剤	4526832	2010.06.11
三浦 剛 稲津 敏行 森 裕志 横山 慎一郎 梶本 哲也	ベロ毒素中和剤としてのスフィンゴ糖脂質類似体	4639055	2010.12.03
佐藤 玲子 戸 潤 一 孔	硫酸糖ライブラリー	4675048	2011.02.04
水野 真盛 稲津 敏行 山ノ井 孝	N-アセチルグルコサミニルチロシン誘導体	4781597	2011.07.15
山ノ井 孝 藤田 雅也	α -N-アセチルグルコサミニル結合を加水分解する新規な糖質加水分解酵素	4781851	2011.07.15
天野 純子	糖鎖異性体を分離同定する質量分析法	4808542	2011.08.26
中山 淳 山ノ井 孝 藤田 雅也 白井 孝	α -N-アセチルグルコサミニル結合単糖誘導体を含有するピロリ菌増殖抑制剤	4811953	2011.09.02
山ノ井 孝	二本鎖糖分岐シクロデキストリン誘導体	4870400	2011.11.25
大寺 純蔵 折田 明浩	ルイス酸性フルオラススタノキサン触媒	4902840	2012.01.13
天野 純子	微量質量分析法	4907334	2012.01.20
川上 宏子 戸 潤 一 孔	生体適合性ヒドロゲル	4947512	2012.03.16
後藤 浩太朗 水野 真盛	高度にフッ素化されたアルコール誘導体と再利用が容易な使用法	4950436	2012.03.16

山ノ井孝	トレハロース誘導体とその製造法	4950521	2012.03.16
水野真盛 後藤浩太郎	高度にフッ素化されたフェノール誘導体およびその中間体	5005212	2012.06.01
渡邊正人 米谷芳枝 戸潤一孔	水溶性カンプトテシン製剤	5021899	2012.06.22
山ノ井孝	exo-グリカール誘導体の製造法	5060028	2012.08.10
山ノ井孝	グリコシド誘導体と非還元性二糖およびその製造法	5091508	2012.09.21
山ノ井孝 小田慶喜	糖分岐シクロデキストリン誘導体とその製造法	5100160	2012.10.05
中山淳 山ノ井孝 藤田雅也 千室智之	N-アセチルグルコサミンの誘導体を含有するピロリ菌増殖抑制剤	5140246	2012.11.22
山ノ井孝	パーベンジル化スクロースオリゴ糖の酸加水分解によるベンジル化フルクトフラノース誘導体及びベンジル化アルドース誘導体の製造法	5155577	2012.12.14
山ノ井孝	フルクトフラノシド誘導体とその製造法	5155578	2012.12.14
天野純子	質量分析法	5170566	2013.01.11
山ノ井孝 小田慶喜	トリクロロエチルオキシカルボニル化 α -ガラクトサミニド誘導体	5252841	2013.04.26
山ノ井孝	糖二分岐シクロデキストリン誘導体	5284566	2013.06.07
天野純子 平野清子 杉本一路	前立腺癌と良性前立腺肥大症とを識別する方法	5284958	2013.06.07
天野純子 菅原大介	多様性を表現するオリゴ糖又はその誘導体	5331293	2013.08.02
山ノ井孝 小田慶喜	多価の糖分岐シクロデキストリン誘導体とその製造法	5383257	2013.10.11
中山淳 白井孝 山ノ井孝 藤田雅也 森昌子	ピロリ菌増殖抑制剤	5383692	2013.10.11
山ノ井孝 小田慶喜	糖結合型スピロクラウンエーテル誘導体	5394645	2013.10.25
土田明子 藤田雅也	α -N-アセチルグルコサミニル結合を加水分解する新規な糖質加水分解酵素	5425481	2013.12.06

平野清子 中村紀夫 天野純子	前立腺癌の判定方法	5431360	2013.12.13
水野真盛 戸治野真美	ペルフルオロ有機物の製造方法	5436093	2013.12.20
天野純子 中村紀夫	前立腺癌を判定する方法	5443156	2013.12.27
天野純子	分析方法	5478998	2014.02.21
天野純子 西風隆司 奥村寿子	MALDI質量分析法	5504282	2014.03.20
天野純子 田中耕一	生体試料の解析法及び疾患マーカーの検索法	EP 1876441 (英、独、仏)	2010.10.06
天野純子	質量分析法	US 7951603 (米国)	2011.05.31
天野純子 平野清子 杉本一路	前立腺癌と良性前立腺肥大症とを識別する方法	US 8030085 (米国)	2011.10.04
天野純子 平野清子 杉本一路	前立腺癌と良性前立腺肥大症とを識別する方法	EP 2161571 (英、独、仏)	2012.06.20
中山淳 山ノ井孝 藤田雅也 白井孝	α -N-アセチルグルコサミニル結合単糖誘導体を含むピロリ菌増殖抑制剤	EP 2098238 (英、独、仏)	2012.10.17
平野清子 中村紀夫 天野純子	前立腺癌の判定方法	EP 2354790 (英、独、仏)	2013.07.17
中山淳 山ノ井孝 藤田雅也 白井孝	α -N-アセチルグルコサミニル結合単糖誘導体を含むピロリ菌増殖抑制剤	US 8575117	2013.11.05
菅原州一 大隅賢二	11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの製造方法	EP 2474560 (英、独、仏)	2014.03.19
＜以下は共有特許＞			
古谷方彦 中嶋齊	有機化合物の転化触媒	3780581	2006.03.17
福岡陽平 友国敬三 中嶋齊	燃料電池用水素の精製法	3986586	2007.07.20

福岡陽平 友国敬三 中嶋齊	燃料電池用水素の精製方法	4014243	2007.09.21
古谷方彦 中嶋齊 相島逸穂	メソポア分子ふるい、およびその製造方法	4026884	2007.10.19
錦戸條二 中嶋齊	シクロデキストリン含有物	4047976	2007.11.30
小松民邦 友国敬三	排ガス浄化用触媒	4063807	2008.01.11
錦戸條二	ルイス酸触媒	4081269	2008.02.15
錦戸條二	ケトン化合物の酸化触媒	4081270	2008.02.15
錦戸條二 吉田彰宏 池田正紀	ルイス酸触媒含有組成物	4119371	2008.05.02
錦戸條二 山元文彦 中嶋齊	トリス（パーフルオロアルキルスルホニル）メチドの金属塩	4127917	2008.05.23
小松民邦	排ガス浄化用ハニカム触媒	4233572	2008.12.19
錦戸條二 中嶋齊	ルイス酸触媒	4234262	2008.12.19
錦戸條二	酸触媒組成物	4234307	2008.12.19
錦戸條二 山崎長武 カク秀花	固定化ルイス酸触媒	4234461	2008.12.19
天野純子 田中耕一	生体試料の解析法及び疾患マーカーの検索法	4262289	2009.02.20
錦戸條二 中嶋齊	シクロデキストリン含有物質	4321687	2009.06.12
小松民邦 友国敬三	多孔質結晶性ジルコニア材料、及びその製造方法	4562360	2010.08.06
亀山昭彦 菊池紀弘 中家修一 石田秀樹 成松久	糖鎖構造を予測する方法	4599602	2010.10.08
古谷方彦 福岡陽平 福沢章喜	シクロオレフィンの製造方法	4641615	2010.12.10
小松民邦 友国敬三	排NO _x 浄化用触媒	4712406	2011.04.01

小松民邦 友国敬三	NO _x 浄化用触媒の担体	4749093	2011.05.27
小松民邦	排NO _x 浄化用触媒	4753613	2011.06.03
天野純子	プレート上での測定対象分子の局在化方法、およびこれを用いた質量分析法	4820444	2011.09.09
小松民邦	新規排ガス浄化用触媒	4823100	2011.09.16
佐藤玲子 戸潤一孔	低非特異相互作用糖鎖プローブ	4878777	2011.12.09
小松民邦	新規排ガス浄化方法	4895858	2012.01.06
天野純子	質量分析法	4913656	2012.01.27
福澤章吾 小松民邦 古谷方彦 友国敬三	シクロオレフィン製造用触媒及び、シクロオレフィンの製造方法	4931099	2012.02.24
小松民邦	燃料電池用電極及び該電極を用いた燃料電池	5019905	2012.06.22
小松民邦 友国敬三	排ガス浄化用触媒	5025148	2012.06.29
小松民邦	非白金系燃料電池用電極及び該電極を用いた燃料電池	5025283	2012.06.29
菅原州一	ポリエーテルの製造方法	5105166	2012.10.12
菅原州一 大隅賢二	糖ペプチド結合ポリマー	5106497	2012.10.12
小松民邦 友国敬三	リーンバーン排ガス浄化用触媒	5112966	2012.10.19
小松民邦 友国敬三	排NO _x 浄化方法	5116377	2012.10.26
佐藤玲子 戸潤一孔	糖鎖結合物質の精製法	5129936	2012.11.09
小松民邦	燃料電池用電極および燃料電池	5219384	2013.03.15
小松民邦 友国敬三	リーンバーン自動車排ガス浄化用触媒	5264316	2013.05.10
菅原州一 大隅賢二	糖ペプチド誘導体及びその製造方法	5285022	2013.06.07
佐藤智典 水野真盛	新規糖鎖プライマーとその利用	5438998	2013.12.20
菅原州一 大隅賢二	11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの製造方法	5566226	2014.06.27

福岡陽平 友国敬三 中嶋齊	燃料電池用水素含有ガスの製造方法	US 6190430 (米国)	2001.02.20
小松民邦 友国敬三	排ガス浄化用触媒	US 7838461 (米国)	2010.11.23

8-2 商標権

登録商標 (標準文字)	商品、役務の区分	登録番号	登録日
グライコナビ	第9類、第42類	5156473	2008.08.01
グライコナビゲーション	第9類、第42類	5156474	2008.08.01
糖鎖ナビ	第9類、第42類	5223454	2009.04.17
糖鎖ナビゲーション	第9類、第42類	5223455	2009.04.17

野口遵研究助成金

I. 2013年度実施報告

第5回目の野口遵研究助成金の贈呈を2013年度に実施したので、以下に簡単に報告する。

1) 助成の趣旨

本助成金は独創的かつチャレンジングな内容でイノベーションや産業振興を期待させる研究を行っている若手研究者に助成を行っている。

2) 2013年度の概要

①応募課題および応募件数

本年度は4課題で9月1日から2ヶ月間募集を受け付け、総計207件の応募があった。(表1参照)

【表1 課題別応募件数・採択数】

課題番号：課題名		応募件数	採択件数
課題 1	ライフサイエンスの進展に資する物質やデバイスに関する研究 <健康、医療（医薬を含む）など>	84件	4件
課題 2	地球資源並びに環境の保全に寄与するプロセスや新材料に関する研究 <グリーンサステナブルケミストリー（触媒を含む）、バイオマス、水処理など>	54件	2件
課題 3	蓄エネルギー、創エネルギー、省エネルギーに寄与する新材料やデバイスに関する研究	38件	4件
課題 4	新しい電子材料やそれを活用した新たなプロセスやデバイスに関する研究	31件	5件
件数 計		207件	15件

②選考委員会

2014年2月3日に当研究所において選考委員会を開催した。選考委員9名が出席し厳正な選考の結果15件が採択された。なお、欠席された選考委員からもご意見を書面で提出して頂いた。(表2、表3参照)

③贈呈式

2014年3月11日如水会館（千代田区一ツ橋）にて、来賓、選考委員、その他関係者、関係者各位で総勢70名ほどの出席を得て贈呈式を開催した。

【表2 採択者・採択テーマ一覧 (順不同)】

採択者氏名	所属・職名	研究テーマ名
石井大佑	名古屋工業大学若手研究イノベータ 養成センター テニユアトラック助教	生物の分泌する粘性物質のもつ表面保護効果の解明と酸化防止膜への応用
中川 聡	北海道大学大学院 水産科学研究院 海洋生物工学分野 准教授	海洋性無脊椎動物の免疫因子を利用した微生物細胞分取マイクロ流体デバイスの開発
合田圭介	東京大学大学院 理学系研究科 化学専攻 教授	循環がん幹細胞の迅速分離を可能とする超高速イメージ・セルソーターの開発
加藤竜司	名古屋大学大学院 創薬科学研究科 基盤創薬学専攻 准教授	再生医療における革新的細胞品質診断システム Cell Catalogue ONLINEプラットフォームの開発
高島義徳	大阪大学大学院 理学研究科 高分子科学専攻 助教	ホスト-ゲスト相互作用を利用した革新的超分子触媒の創製とその機能評価
相川光介	東京工業大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻 助教	有機フッ素化合物の自在合成を指向した革新的不斉合成法の開発
楊井伸浩	九州大学大学院 工学研究院 応用化学部門 助教	新規なエネルギー移動法に基づく高効率 フォトン・アップコンバージョンの実現
吉尾正史	東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻 准教授	プロトン-電子混合伝導性液晶材料の創製
桑折道濟	千葉大学大学院 工学研究科 共生応用化学専攻 助教	省電力型ディスプレイ開発を志向した単色 構造発色性材料の創製
西内智彦	大阪大学大学院 理学研究科 化学専攻 助教	非平面 π 共役系のひずみエネルギーを利用した反芳香環の創出とその機能開拓
坂本良太	東京大学大学院 理学系研究科 化学専攻 助教	エレクトロニクスを志向した「ボトムアップ型」金属錯体ナノシートの創成
岡崎竜二	名古屋大学理学部 物理学科 助教	軌道秩序絶縁体における電流による金属化メカニズムの検証
西野智昭	大阪府立大学21世紀科学研究機構 特別講師 (テニユア・トラック講師)	単分子温度計測法の開発とナノスケール熱伝導への展開
姜 舜徹	九州大学先導物質化学研究所 特任助教	新しい電子機能を併せ持つ超分子金属クラスターの創製
寺尾京平	香川大学工学部 知能機械システム 工学科 准教授	光駆動ナノ構造体による巨大DNA分子操作技術を用いた液中超微細配線

*所属・職名は応募時のもの

【表3 選考委員】

選考委員長	岩澤 康裕	電気通信大学特任教授・東京大学名誉教授
選考委員	川合 知二	大阪大学特任教授・大阪大学名誉教授
	山本 憲二	石川県立大学教授・京都大学名誉教授
	小宮山 真	筑波大学教授・東京大学名誉教授
	澤本 光男	京都大学教授
	五十嵐泰夫	中国西南大学教授・東京大学名誉教授
	畑中 研一	東京大学教授・野口研究所学術顧問
	吉野 彰	LIBTEC理事長・旭化成 (株)吉野研究室
	柴崎 一郎	豊橋科学技術大学特命教授・野口研究所学術顧問
	福岡 伸典	元旭化成アドバイザー
	多羅尾良吉	特定非営利法人 ヴイエムシ監事

*所属・職名は選考委員会開催時のもの

II. 2011年度研究成果報告

助成金採択者は、助成期間終了年の12月31日までに研究成果を報告する。2011年度（第3回）採択者〔助成期間：2012年4月1日～2013年3月31日〕の研究成果（要旨）を以下に記す。

【2011年度（第3回）野口遵研究助成金 研究成果報告（要旨）】

氏名	森 浩亮	所属	大阪大学大学院工学研究科	職名	准教授
研究テーマ名	水からの光触媒的水素製造を可能とする有機-無機複合材料の新規創製				
可視光（太陽光）を利用した水からの水素生成反応において、真に実用的な光触媒の開発を目指し、太陽エネルギーを有効利用するための可視光応答性、高い触媒効率を兼ね備えた有機-無機ハイブリッド型光触媒を設計開発を行った。具体的には、機械的強度、耐久性に優れ、かつ精密制御可能なマイクロ分子反応場を提供する層状化合物や多孔質シリカへの光応答性金属錯体の固定化を検討した。					
氏名	鷹巢 守	所属	大阪大学大学院工学研究科	職名	准教授
研究テーマ名	脂肪族化合物の炭素-水素結合の直截変換触媒の開発電解質への展開				
有用な官能基であるアルキニル基を、ベンゼン系の炭素-水素結合へ直接導入するための触媒系を開発した。アミド型配向基を持つ場合はパラジウム触媒が、ピリジンなどのN-複素環配向基を持つ場合はルテニウム触媒が、よい触媒となることがわかった。本手法では、エステル基やブロモ基なども損なわれず、高い官能基許容性を示し、複雑な芳香族アルキンの簡便な合成法として利用できる。					
氏名	竹井 敏	所属	富山県立大学 工学部機械システム工学科	職名	准教授
研究テーマ名	糖鎖化合物を主成分とするEUVリソグラフィ用環境配慮型最先端レジスト材料の開発				
糖鎖化合物を用いた水現像可能なEUVリソグラフィ用環境配慮型レジスト材料の研究を行った。糖鎖化合物を用いた水現像可能なEUVリソグラフィ用環境配慮型レジスト材料による最先端リソグラフィプロセスのエコグリーン化を推進するため、電子線照射による高感度化、並びに膜収縮性を改善できる糖鎖化合物を用いて合成した。75 keVの電子線描画装置を用いて、植物性原料から合成されたEUVリソグラフィ用環境配慮型レジスト材料により100-200 nmのラインパターンの電子線加工に7.0 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ の照射量で成功した。糖鎖化合物から合成された水現像可能なEUVリソグラフィ用環境配慮型レジスト材料は、従来のアクリル系レジスト材料に比べ低い膜収縮性を有した。得られたレジスト材料と好適な条件を用いる技術は、EUVグリーンリソグラフィとして、環境配慮型マイクロナノデバイス製造に期待できる。					
氏名	柳田 剛	所属	大阪大学 産業科学研究所	職名	准教授
研究テーマ名	単結晶ナノワイヤを用いた超低消費電力メモリスタ素子				
金属酸化物を用いたメモリスタはレジスタ、キャパシタ、インダクタに次ぐ第四の回路素子として注目されているが、既存の素子構造では本質的に避けることが出来ない高い消費電力（mW）と統計的な分散が存在することが応用展開するうえで最も大きな障壁となっている。本研究では、単結晶極微1次元ナノ構造体を活用した新しいメモリスタ素子構造を導入することにより、メモリスタにおけるこれらの本質的・原理的な問題を解決した。					

氏名	横井 俊之	所属	東京工業大学 資源化学研究所	職名	助教
研究テーマ名	AI置換サイトの自在制御によるプロピレン製造用ゼオライト触媒の高性能化				
<p>プロピレン製造用ゼオライト触媒として有望なZSM-5 (MFI型) を合成する際に用いる有機構造規定剤 (OSDA) を調整することにより骨格内Alの分布、すなわち、酸点位置分布の制御が可能であることを見出した。また、同じ構造、酸量を有するゼオライトであっても酸点分布を制御することで触媒性能が大きく変化することを見出した。</p>					
氏名	伊藤 建	所属	東海大学 理学部化学科	職名	講師
研究テーマ名	イオン液体を用いたリチウムイオン含有型ハイブリッド層状結晶の創製と固体電解質への展開				
<p>オクタモリブデン酸とイオン液体系界面活性剤をハイブリッド化した層状結晶を合成し、その結晶構造を明らかにした。いずれもオクタモリブデン酸の無機層とアルキルイミダゾリウムの有機層が交互に積層した層状構造であったが、再結晶条件により組成やオクタモリブデン酸の分子構造、アルキル鎖のパッキングが異なった。ナトリウムイオンを取り込んだハイブリッド層状結晶も合成でき、ナトリウムイオン伝導体として期待できる。</p>					
氏名	小山 大介	所属	同志社大学理工学部電気工学科	職名	准教授
研究テーマ名	水晶体を模擬した超音波式可変焦点光学レンズ				
<p>本研究では、超音波駆動により焦点距離を変化可能な光学レンズを開発した。レンズはレンズ材料である透明シリコーンゲル、超音波振動子、PETフィルムで構成される。人間の眼の様に音響放射力によりレンズ形状が変形し、電圧振幅値によって焦点距離を制御することが可能である。機械的可動部を持たない簡素な構造であるため、小型化が容易である。将来的にはMEMS技術を利用した血管内内視鏡などへの応用が期待される。</p>					
氏名	葛谷 明紀	所属	関西大学化学生命工学部化学・物質工学科	職名	准教授
研究テーマ名	DNAナノデバイスを利用した超高感度単分子検出法の開発				
<p>望みのターゲット分子との相互作用により形態変化するナノメカニカルDNAオリガミデバイスを設計・作成した。長さ170 nmのレバー部二本が支点上で結合されたペンチ型のDNAオリガミデバイスを、質量数1のプロトンから分子量数万のタンパク質までの様々なターゲット分子・イオンとの相互作用をトリガーに形態変化させることに成功した。これを原子間力顕微鏡で観察することにより、ターゲットの存在を検知する超高感度単分子検出法を開発した。</p>					
氏名	丸山 達生	所属	神戸大学大学院工学研究科	職名	准教授
研究テーマ名	精密な分子認識素子を利用したDNA/RNAの塩基配列選択的液液抽出技術の開発				
<p>本研究では、DNA界面活性剤という分子認識素子を開発し、これを逆ミセルに組み込むことで一本鎖DNAやRNAの溶媒抽出を検討した。その結果、水溶液から有機溶媒中に一本鎖DNAやRNAを抽出することに成功し、この抽出がDNA界面活性剤によるものであることを実証した。また複数種のDNA鎖が混在する中から目的のDNA鎖だけを選択的に抽出可能であることも判明した。さらに、DNA表面機能化ナノ粒子も同様の方法で逆ミセル抽出することに成功した。</p>					

氏名	辻村 清也	所属	筑波大学 数理工質系 物質工学域	職名	准教授
研究テーマ名	マルチスケール多孔体炭素を用いたバイオ燃料電池の高出力化				
<p>酵素を電極触媒として用いる燃料電池であるバイオ燃料電池の出力の向上を目指した“マルチスケール”での階層構造が制御された多孔質炭素を開発した。レドックスハイドロゲル超薄膜を用いたナノスケールでの速やかな酵素-電極間界面電子移動速度の向上, メソスケール細孔での酵素の安定した固定化, マクロスケール細孔によりスムーズな物質・イオン輸送を同時達成する酵素正・負極を作成することができた。</p>					
氏名	篁 耕司	所属	旭川工業高等専門学校 電気情報工学科	職名	准教授
研究テーマ名	チタン系酸化物を用いたハイブリッド型太陽電池・熱電変換素子の基礎研究				
<p>チタン系酸化物を用い、ハイブリッド型太陽電池・熱電変換素子の作製および物性評価を行った。熱電素子の基本材料SrTiO_3についてRF スパッタリング法を用いた低コスト作製法を提案した。また、色素増感太陽電池の原理を用いて、多孔質TiO_2電極の透明導電膜の代わりに熱電材料SrTiO_3Nb 単結晶を使用し、ハイブリッド素子を作製した。試料は太陽電池としての発電とともに、熱電素子としても機能していることを確認した。</p>					
氏名	阿野 嘉孝	所属	愛媛大学農学部生物資源学科	職名	准教授
研究テーマ名	微生物物質生産の飛躍的向上を目指した電気化学的バイオリクターの開発				
<p>石油枯渇時代の到来に向け、微生物による物質生産は従来以上に「省エネ」かつ「高効率」なプロセスが求められている。それらを同時に解決できる「電気化学的バイオリクター」を提案し、その科学基盤を構築することを目指している。本研究課題では酢酸菌の5-ケトグルコン酸発酵をモデルとし発酵過程の呼吸鎖電子伝達系の挙動の変化を明らかにした。さらに酢酸菌生細胞による呼吸鎖電子伝達系の生物電気化学的制御を試みた。</p>					
氏名	津田 哲哉	所属	大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻	職名	助教
研究テーマ名	低電圧駆動アクチュエータへの応用を志向した次世代ソフトマテリアルの創製				
<p>室温イオン液体由来アイオノマー電解質薄膜や電気二重層容量の向上が期待できるグラフェン-室温イオン液体ゲルコンポジット薄膜電極を作製し、それらを用いることで、電気化学アクチュエータ用の不揮発性ソフトマテリアルを合成することに成功した。また、本研究で作製したソフトマテリアルは± 2.0 Vの低印加電圧条件において、従来の不揮発性電気化学アクチュエータを上回る良好な変位挙動を示すことが分かった。</p>					
氏名	仁宮 一章	所属	金沢大学 環日本海域環境研究センター	職名	助教
研究テーマ名	腫瘍に集積する超音波応答性ナノ粒子の創製とその非侵襲的がん治療への利用				
<p>これまで、我々は、二酸化チタン/超音波触媒法 (TiO₂/U.S.法) によるがん細胞殺傷を実証してきた。これは、TiO₂ナノ粒子存在下で超音波を照射すると、強い酸化力をもつOHラジカルの発生が促進することを利用した方法である。しかし、OHラジカルには腫瘍部位選択性がないため、投与したTiO₂ナノ粒子を腫瘍部位に集積させる必要がある。本研究ではがん細胞に特異的に結合するリガンドとしてアビジンに着目し、アビジン修飾TiO₂ナノ粒子の作製と、それを用いたTiO₂/U.S.法によるがん細胞殺傷を行った。</p>					

– Appendix –

2013年度誌上発表論文抄録集

Abstract of Publications

Convenient synthesis of glycosyl bromide from 1-O-acetyl sugars by photo-irradiative phase-vanishing reaction of molecular bromine

Mami Tojino, Yuriko Hirose, Mamoru Mizuno

Tetrahedron Letters, 54(52) ,7124-7126, 2013

We were developed the synthesis of glycosyl bromides from 1-O-acetyl sugars using a photo-irradiative phase-vanishing method involving molecular bromine. A bottom phase of molecular bromine was overlaid first with perfluorohexanes (FC-72), followed by overlaying with ethyl acetate containing a 1-O-acetyl sugar. Upon irradiation, the bromine layer gradually disappeared, leaving two phases. We obtained glycosyl bromide in good yield from the ethyl acetate phase.

~~~~~

#### Phosphorylation and externalization of galectin-4 is controlled by Src family kinases.

Ideo H, Hoshi I, Yamashita K, Sakamoto M.

Glycobiology ,23(12) ,1452-62 ,2013

Galectin-4 is a cytosolic protein that lacks a signal sequence but is externalized and recognizes 3-O-sulfated glycoconjugates extracellularly. However, the mechanism of subcellular localization and externalization of galectin-4 has not been determined yet. Tyrosine-phosphorylation of galectin-4 in cells were observed and involvement of Src kinases are suggested in a preliminary experiment. It was found that galectin-4 can be tyrosine phosphorylated by members of the Src kinase family by transfection of cells with galectin-4 and active Src plasmids. The C-terminal peptide YVQI of galectin-4 plays an important role in its tyrosine phosphorylation, and the SH2 domains of Src and SHP2 bound to this peptide. Galectin-4 and phosphorylated proteins were intensely stained in the area of membrane protrusions of PV-treated or Src-activated cells by Immunofluorescence analysis. Furthermore, the binding of MUC1 to galectin-4 was observed, and externalization of the bound molecules from the NUGC-4 cells to the medium increased in the hyperphosphorylated condition. Study of the transfection of the mutant galectin-4 which lacks the C-terminal

peptide showed that the phosphorylation status is important for externalization of galectin-4. These results suggest that externalization of galectin-4 can be regulated by signaling molecules and that it may function intracellularly as an adaptor protein serving to modulate the trafficking of glycoproteins.



## The Fifth ACGG-DB Meeting Report: Towards an International Glycan Structure Repository

Kiyoko F Aoki-Kinoshita, Hiromichi Sawaki, Hyun Joo An, Matthew Campbell, Qichen Cao, Richard Cummings, Daniel K Hsu, Masaki Kato, Toshisuke Kawasaki, Kay-Hooi Khoo, Jaehan Kim, Daniel Kolarich, Xianyu Li, Mingqi Liu, Masaaki Matsubara, Shujiro Okuda, Nicole H Packer, René Ranzinger, Huali Shen, Toshihide Shikanai, Daisuke Shinmachi, Philip Toukach, Issaku Yamada, Yoshiki Yamaguchi, Pengyuan Yang, Wantao Ying, Jong Shin Yoo, Yan Zhang, Yang Zhang and Hisashi Narimatsu  
*Glycobiology* , 23, 1422-1424, (2013)

大連（中国）で開催された第5回ACGG-DB (Asian consortium for glycobiology and glyco-technology—database) 会議において、国際糖鎖構造リポジトリに関する合意が得られた。このリポジトリは、曖昧、単糖組成などを含むすべての糖鎖構造に対して一意の識別子を提供し、任意のリソースから糖鎖構造を識別することを容易とする。



## Introducing glycomics data into the Semantic Web

Kiyoko F Aoki-Kinoshita, Jerven Bolleman, Matthew P Campbell, Shin Kawano, Jin-Dong Kim, Thomas Lütteke, Masaaki Matsubara, Shujiro Okuda, Rene Ranzinger, Hiromichi Sawaki, Toshihide Shikanai, Daisuke Shinmachi, Yoshinori Suzuki, Philip Toukach, Issaku Yamada, Nicole H Packer and Hisashi Narimatsu\*  
*Journal of Biomedical Semantics* , 4:39, 2013

セマンティックウェブを活用して効率的な糖鎖研究を行うため、糖鎖構造やアノテーション情報などを含む糖鎖データベースのResource Description Framework (RDF) 版を開発した。そのデータをトリプルストアに登録し、単一のSPARQLクエリでUniCarbKB、GlycomeDB、JCGGDBを利用しターゲット情報を取得することができた。また、PDB、LfDB、GlycomeDBを利用し、レクチンデータから糖鎖構造データを取得することができた。このように、セマンティックウェブ技術の実装によりグライコミクスデータとプロテオミクスデータをリンクすることができた。



## Application of fluorous chemistry for Oligosaccharide synthesis

Kohtaro Goto ,Mamoru Mizuno

TIGG 25(146) ,1-11 ,2013

Oligosaccharide synthesis requires many steps and a large amount of work after each synthetic reaction. The fluorous tag method is an efficient synthetic methodology that does not resort silica-gel column chromatography. Here, synthesis of oligosaccharide with the fluorous tag method is described. In addition, we describe how the efficiency of oligosaccharide synthesis can be increased by using a combination of the fluorous tag method and other synthetic methodologies.

~~~~~



最寄り駅からの所要時間

- 都営三田線・板橋区役所前駅A1出口、新板橋駅A3出口から10分
- J R 埼京線・板橋駅西口から15分（タクシーで5分）
- 東武東上線・下板橋駅A1から15分

野口研究所時報 第57号

2014年9月30日 発行

禁無断転載 非売品

編集兼発行人 齊藤 継男

発行所 公益財団法人 野口研究所
〒170-0003 東京都板橋区加賀1-8-1
<http://www.noguchi.or.jp/>
TEL 03(3961)3255 (代表)
FAX 03(3964)4071

印刷所 恒信印刷株式会社
