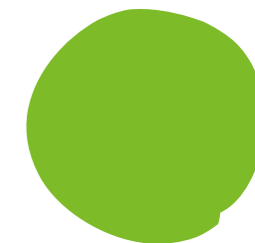


野口研究所時報



THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.58 2015

CONTENTS

“Wings for Junior Scientists” Tsutomu INADA
 Physiological significance of distinct expressionspecies Jin-ichi INOKUCHI
 of ganglioside moleculer
 Standing at the second stage of glycobiology: Kiyoshi FURUKAWA
 Elucidation of biological functions
 of β 4-galactosyltransferase 5-mediated products
 Carbohydrate synthesis using a heavy fluorous tag Mamoru MIZUNO
 Glycoengineered Monoclonal Antibodies Masaki KUROGOCHI
 with Homogeneous Glycan using a Chemoenzymatic Approach
 and their Affinities for Fc γ RIIIa
 and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
 Enhanced expression of the β 4-N-acetyl- Kiyoko HIRANO
 galactosaminyltransferase 4 gene impairs tumor growth Akio MATSUDA
 of human breast cancer cells Ryo KUJI
 Shiro NAKANDAKARI
 Takashi SHIRAI
 Kiyoshi FURUKAWA
 Semantic Web and Glycoinformatics Issaku YAMADA
 62nd American Society for Mass Spectrometry Junko AMANO
 Report on Joint Meeting of the SFG and the JSCR Issaku YAMADA
 The Activities of the Institute Akio MATSUDA
 Outline of the Institute Tsuguo SAITO
 Noguchi Shitagau Research Grant
 Abstracts of Publications

ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

巻頭言 「ジュニア科学者の翼」 稲田 勉
 ガングリオシドファミリーの分子種選択的発現の意義 井ノ口仁一
 糖鎖生物学の第二幕の幕開け: 古川 清
 β 4-ガラクトース転移酵素5を介した糖脂質の機能探索
 ヘビーフルオラス法による糖質合成 水野 真盛
 酵素化学的手法を用いた均一な糖鎖を持つ 黒河内政樹
 糖鎖改変モノクローナル抗体の作製並びにそのFc γ RIIIaに対する
 親和性とADCC活性
 β 4-N-アセチルガラクトサミン転移酵素4遺伝子の発現を 平野 清子
 増大させるとヒト乳癌細胞の腫瘍形成は抑制される 松田 昭生
 久慈 諒
 仲村渠史郎
 白井 孝
 古川 清
 セマンティック・ウェブと糖鎖インフォマティクス 山田 一作
 62st American Society for Mass Spectrometry Conference (ASMS)報告 天野 純子
 SFG-JSCR合同会議参加報告 山田 一作
 2014年度活動概要 松田 昭生
 研究所の概要 齊藤 継男
 野口遵研究助成金／野口遵賞
 2014年度誌上発表論文抄録集

巻頭言 「ジュニア科学者の翼」	稲田 勉 ……	1
ガングリオシドファミリーの分子種選択的発現の意義	井ノ口仁一 ……	3
糖鎖生物学の第二幕の幕開け： β4-ガラクトース転移酵素5を介した糖脂質の機能探索	古川 清 ……	25
ヘビーフルオラス法による糖質合成	水野 真盛 ……	34
酵素化学的手法を用いた均一な糖鎖を持つ 糖鎖改変モノクローナル抗体の作製並びにそのFcγRIIIaに対する 親和性とADCC活性	黒河内政樹 ……	48
β4-N-アセチルガラクトサミン転移酵素4遺伝子の発現を 増大させるとヒト乳癌細胞の腫瘍形成は抑制される	平野 清子 …… 松田 昭生 久慈 諒 仲村渠史郎 白井 孝 古川 清	65
セマンティック・ウェブと糖鎖インフォマティクス	山田 一作 ……	73
62st American Society for Mass Spectrometry Conference (ASMS)報告	天野 純子 ……	80
SFG-JSCR合同会議参加報告	山田 一作 ……	82
2014年度活動概要	松田 昭生 ……	84
研究所の概要	齊藤 継男 ……	98
野口遵研究助成金／野口遵賞		…… 106
2014年度誌上発表論文抄録集		…… 113

C O N T E N T S

“Wings for Junior Scientists”	Tsutomu INADA	1
Physiological significance of distinct expression of ganglioside molecular species	Jin-ichi INOKUCHI	3
Standing at the Second Stage of Glycobiology: Elucidation of Biological Functions of β 4-Galactosyltransferase 5-Mediated Products	Kiyoshi FURUKAWA	25
Carbohydrate synthesis using a heavy fluorous tag	Mamoru MIZUNO	34
Glycoengineered Monoclonal Antibodies with Homogeneous Glycan using a Chemoenzymatic Approach and their Affinities for Fc γ RIIIa and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	Masaki KUROGOCHI	48
Enhanced expression of the β 4-N-acetyl- galactosaminyltransferase 4 gene impairs tumor growth of human breast cancer cells	Kiyoko HIRANO Akio MATSUDA Ryo KUJI Shiro NAKANDAKARI Takashi SHIRAI Kiyoshi FURUKAWA	65
Semantic Web and Glycoinformatics	Issaku YAMADA	73
62nd American Society for Mass Spectrometry	Junko AMANO	80
Report on Joint Meeting of the SFG and the JSCR	Issaku YAMADA	82
The Activities of the Institute	Akio MATSUDA	84
Outline of the Institute	Tsuguo SAITO	98
Noguchi Shitagau Research Grant		106
Abstracts of Publications		113

— 卷頭言 —

「ジュニア科学者の翼」
“Wings for Junior Scientists”

理事長 稲田 勉
President Tsutomu INADA

自分を買いかぶらない人は、本人が信じているより、はるかに優れている。

ゲーテ

野口研究所の創立者である野口遵（のぐちしたがう）にゆかりの深い宮崎県延岡市に野口遵顕彰会という組織があり商工会議所内に事務局が置かれています。野口遵つながりで野口研究所も賛助会員にさせていただいているのですが、その顕彰会の事業の一つとして標題の「ジュニア科学者の翼」という企画があります。「21世紀の新しい産業社会の担い手になる少年少女たちが科学技術への関心を高め、科学技術への無限の可能性に夢と希望を抱く一助にすべく・・・」と趣旨が謳われています。

延岡市を中心とした宮崎県北部の中学校26校の2年生を対象に、「のべおか新興の母 野口遵」という冊子を副読本として配布し、その感想文をもとに各学校長が推薦する候補者の中から最終的に12名を選抜し、夏休みに3泊4日の日程で東京の科学関連施設を訪ねまわるといふものです。今年で15回目を迎え、発足時から顕彰会と延岡市教育委員会が全面的にタッグを組んで進められています。

教育委員会の若手の先生の引率のもと、初めて顔を合わせた男子8名、女子4名の計12名（今年の場合）が寝食を共にしつつ、東芝未来科学館、科学技術館、日本科学未来館といった施設や東京大学のキャンパスなどを見学してゆくのですが、野口研究所も半日生徒たちと付き合います。生徒たちに実験室に入ってもらい、各室長から説明を受け、実験器具を触ったりしたあと一緒に弁当を食べます。目がキラキラした、シャイで素直で、かと思うと大胆な生徒たちの意表を突く質問を楽しみます。

どうもこの子たちは、毎年そうですが、かわる人たちを親切な気持ちにさせるようで、弊所の場合も普段はうるさい室長や研究員達が結構楽しみにしていて、この日のためにパワーポイントを用意し、時間をオーバーしながら熱心に糖鎖のことなどを説明しています。ツアーコンダクターももともと海外が専門のベテランの方なのですが、この仕事を毎年楽しみにされ引き受けてくださるときいています。引率の先生も暑い中大変なことですが、

生徒たちの元気をもらって自分も成長したような気がするとおっしゃいます。誰もがいい仕事をしているという実感を味わうことができる企画になっています。

旅行から帰ったらまた集合して、報告書を作りはじめます。一週間ほど後にその成果を関係者や父母の前でひとりひとりが発表します。地元の新聞社も取材に来ています。私も毎年その報告会に出席させていただいていますが、ほんの10日前とは違う顔の生徒たちに会うことになって驚きます。12人の中から1-2名を選び、弊所から高校進学時の奨学金授与を約束して終わります。

これが本当の教育なのかと思います。知識や学び方を教えることで武器を与えつつ、一方で世の中を知るきっかけを与える。あとは本人の内なる世界と化学反応を起こし、多様な発展がはじまる。

「翼」を与えられた生徒たちは、帰ってきて必ず「世界が広がった」と言います。世の中を知ること、世の中が何を求めているかを考えられるようすることで今後の使命感を育むことこそ教育の最終目的ではないかと思っています。一握りの生徒だけではありますが、これからの難しい時代を支えてゆくことになる人たちであり、感受性の高いこの年代に

きっかけを与えることの効果は計り知れないと考えます。

顕彰会ではこの企画が発足して15年目を迎えた今年、これまでの参加研修生全員(173名)に案内して研修生OB会を開くそうです。最年長は28歳になる計算です。どういう形で成長しているのかとても楽しみなことでしょう。

この「ジュニア科学者の翼」の今年のツアー予算は160万円と聞きました(顕彰会にとっては大きな事業です)。もちろん、関係の方々の手弁当に近い協力があつての話なのですが、これくらいの予算でできることなのです。この企画の話を知ると、ほかの自治体などが必ずうらやむといえます。もっともっと広がってもいいと思うのですが、うらやましいで終わってしまうようです。シニアにも翼が必要なかもしれません。

最後に、ある生徒の今回のツアー感想文より、「・・・そして、野口研究所は未来を指し示すようなところだと思いました。自分もそんなところで働いてみたいです。」

一文字も変えていません。これに応えられる研究所にしてゆくことが我々の使命だと思っています。

野口遵顕彰会のホームページは、
<http://www.wainet.ne.jp/~noguti-k/>

ガングリオシドファミリーの分子種選択的発現の意義

Physiological significance of distinct expression of ganglioside molecular species

井ノ口 仁一*
Jin-ichi INOKUCHI

スフィンゴ糖脂質は、セラミドにグルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸などの糖が酵素により段階的に付加したもので、とくにシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質をガングリオシドと呼ぶ。糖鎖構造による約60種、セラミド構造による約40種の構造多様性により、理論的には2400種という膨大な数の分子が存在しうる。我々はこのように多様なガングリオシド分子種をなぜ必要とし、個々の細胞や組織・器官に選択的かつ特異的な発現機構をどのように獲得したのか、その生物学的意義は何か。進化の過程で獲得されたスフィンゴ糖脂質の分子種多様性は、生体恒常性の維持に必須であることは疑う余地はない。本稿では、スフィンゴ糖脂質生合成阻害剤の開発を契機として始まった筆者のライフワークであるスフィンゴ糖脂質研究の軌跡の中から、インスリン抵抗性発症におけるガングリオシドの関与とマイクロドメイン病の提唱、T細胞レパトア選択におけるガングリオシドの選択的発現と分子種特異的機能、GM3合成酵素欠損と聴覚機能障害について述べ、残されたスフィンクスの謎解きへの道標を探してみたい。

キーワード

スフィンゴ糖脂質、ガングリオシド GM3、細胞膜マイクロドメイン

はじめに

ドイツ生まれの神経化学者であるJ.L.W Thudichum (1829 ~ 1901) は、ヒトの脳の両親媒性の不思議な脳物質に対して、ギリシャ神話のスフィンクスにちなんで謎の脂質、すなわち、「スフィンゴシン」と名づけた [1]。長鎖アミノアルコールであるスフィンゴシン (スフィンゴイド塩基) に脂肪酸が結合し、セラミドにリン酸基を有するものをスフィンゴリン脂質と呼び、スフィンゴミエリンは動物細胞膜のスフィンゴ脂質の主要成分である。一方、糖が結合したものをスフィンゴ糖脂質と呼ぶ。スフィンゴ糖脂質は細胞膜脂質二重層の外側に発現し、セラミドにグルコース、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、シアル酸などの糖や硫酸が段階的に酵素付加することによって、実に多様な分子が生合成される (図1)。スフィンゴ糖脂質の構造多様性は、ラクトシルセラミド (LacCer) に作用する六つの酵素の発現が律速段階である (図1A)。本小論の中心であるガングリオシドは

* 東北薬科大学 分子生体膜研究所 機能病態分子学 教授

図1 スフィンゴ糖脂質の生合成と代謝

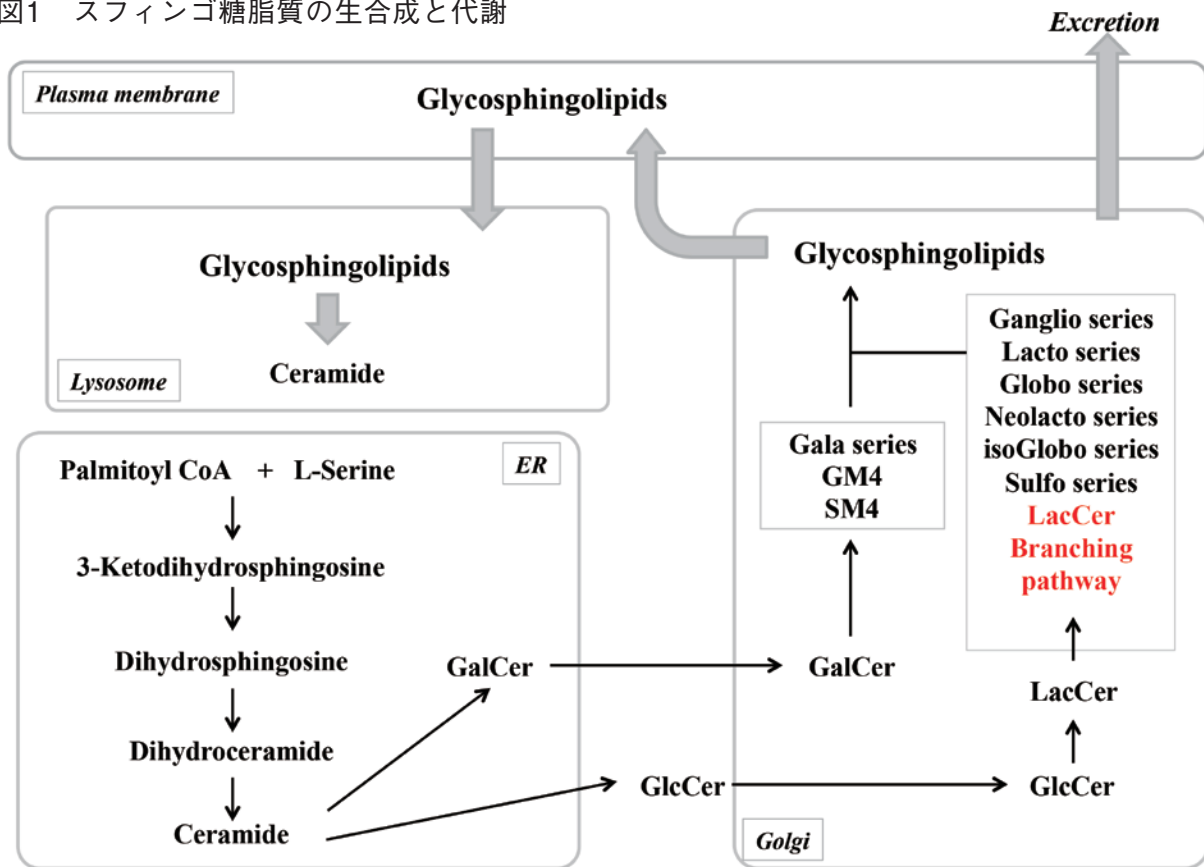


図1A 細胞小器官におけるスフィンゴ糖脂質の生合成と代謝

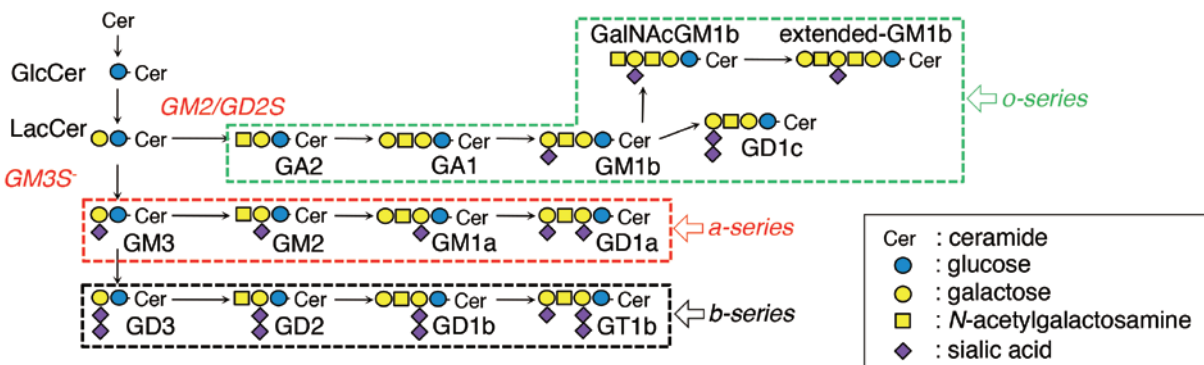


図1B ガングリオシドファミリーの生合成経路

シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質である。ガングリオシドファミリー生合成の最初の分子は、ラクトシルセラミドにシアル酸が転移して生成するGM3である。そもそもGM3は、糖脂質研究の草分けである山川民夫博士がウマ赤血球からヘマトシドとして同定されたものである [1]。私にガングリオシド研究のきっかけを与えてくれたのは、グルコシルセラミド合成酵素の阻害剤 (D-PDMP) を開

発したこと [2]、そしてこのGM3合成酵素 (GM3S、ST3GAL5) の遺伝子クローニングに参画したことである [3]。図1Bに示すように、GM3からは多様なガングリオシドが生合成されるが、これらは、細胞や組織において特徴的な発現特異性を示す。現在までに、GM3Sをはじめとして、種々の合成酵素のノックアウトマウス (KOマウス) の解析や、ガングリオシド合成酵素および分解酵素欠損

症の研究から、細胞種特異的に発現するガングリオシド分子種の機能が見いだされつつある [4, 5]。筆者は、このように多様な構造のガングリオシドを細胞特異的に発現する生命システムを必然的に獲得したのかという問いに対する答えを求め続けている [5]。本稿では、筆者の30年にわたる研究の軌跡を顧みて、ガングリオシドの今後を探ってみたい。

1. グルコシルセラミド合成酵素阻害剤 D-threo-PDMP (D-PDMP) の開発

筆者のスフィンゴ糖脂質の研究は、1985年、ジョンズ・ホプキンス大学の岸本安夫教授の紹介で、ミシガン大学のノーマン・レーディン教授の研究室 (Neuroscience laboratory building, Mental Health Research Institute) への留学に始まる。与えられたテーマは、グルコシルセラミド合成酵素の阻害物質の合成である。レーディン教授は、「セラミドの類似体である1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) という化合物はグルコシルセラミド合成酵素を阻害する可能性があるが、PDMPの四つの光学異性体のどれに阻害活性があるか確かめてくれ」と光学分割の参考書を渡された。当時は光学分割用担体の開発が始まったばかりで、現在のように光学分割カラムで分取できるわけではない。まず、PDMPを数回のバッチで約30グラム合成し、クロロホルム/エーテルで再結晶したところ、比較的簡単にジアステレオマー (DL-erythroとDL-threo体) が分離できた。両者のグルコシルセラミド合成酵素阻害活性を調べたところ、DL-threo体だけに活性があった。天然型セラミドはD-erythro (2S,3R) であることから、この結果は、私もレーディン教授も予想外であり、信州大医学部の武富教授の研究室から私の来る数年前にレーディン研に留学されていた原先生にNMRでの確認をお願いし、ようやくその立体構造を確信することができ

た。次は、いよいよさまざまなカウンターアシッドを用いてのエナンチオマーの分離である。くる日も来る日も得られた結晶を(1R)-(-)-カンファン酸クロリドで誘導化し、薄層クロマトグラフィーで光学異性体の分離を確認すること約半年が過ぎようとしていた。ミシガンの厳しい冬の土曜日の朝、DL-threo体と当モルのジベンゾイル-D-酒石酸をアセトン溶媒中、スターラーでゆっくり攪拌していたところ、フラスコの中でキラキラと冬の日光を反射している結晶を見たときのことは今でもはっきり覚えている。グルコシルセラミド合成酵素阻害物質D-threo-PDMPの誕生の瞬間である [2]。ミシガン大学から帰国した私はその後、生化学工業の山本龍人氏と水谷當稱社長にお会いしたことがきっかけで、東京研究所探索研究部門において、スフィンゴ糖脂質合成制御物質についての研究を展開した。D-threo-PDMPは広く糖脂質研究者の実験に用いられ [6-9]、現在米国では、D-threo-PDMPの経口投与可能な類縁体をゴーシェ病の治療薬として用いた臨床治験が進んでいる [10, 11]。さらに、糖尿病 [12]、多発性嚢胞腎 (PKD) [13]、脂肪肝 [14] などのモデル動物で有効性が見いだされている。表1にグルコシルセラミド合成酵素阻害剤としてD-threo-PDMPおよびPDMP類縁体およびデオキシノジリマイシン誘導体の構造についてまとめた。詳細については総説を参照されたい [15]。

一方、D-threo-PDMPのエナンチオマーであるL-threo-PDMPには、ガングリオシド生合成促進効果が認められ [16, 17]、神経突起進展活性 [18]、シナプス機能および長期増強促進作用 [19]、脳虚血モデルラットにおける再灌流障害抑制作用 [20] など、神経機能賦活効果を見いだした [21]。L-threo-PDMPのガングリオシド生合成促進効果は、酵素源として細胞破碎液を使用した場合には認められず、細胞レベルでのみ活性を示す。そ

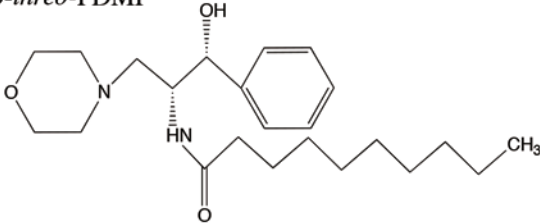
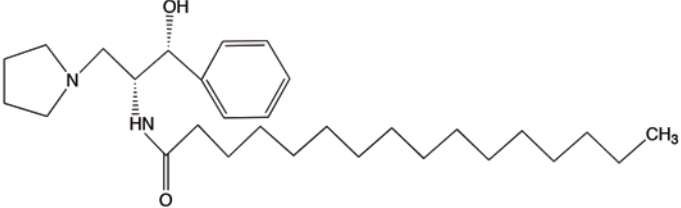
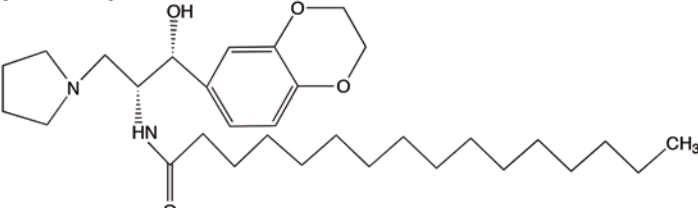
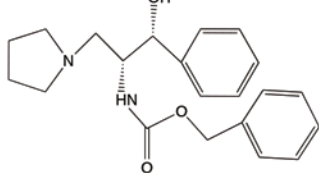
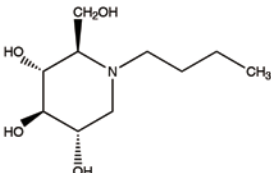
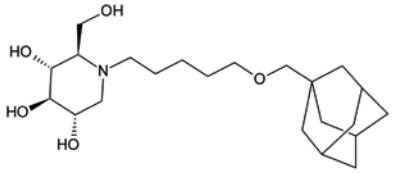
Structure	IC ₅₀ [μM]	Conc. to be used in cell culture [μM]
PDMP analogs D-threo-PDMP ²⁾ 	5	5~20
D-threo-PPPP(P4) ⁶³⁾ 	0.5	5~20
Ethylenedioxy-P4 ⁶⁴⁾ 	0.1	0.01~0.1
D-threo-PBPP ⁶⁵⁾ 	0.3	5~160
N-alkylimino sugars N-butyl-dNM (Migulstat) ¹⁵⁾ 	20	5~500
Adamantan-pentyl-dNM ¹⁵⁾ 	0.025	0.01~0.1

表1 グルコシルセラミド合成酵素阻害剤

ここで、L-threo-PDMPの結合タンパク質を探索したが、ガングリオシド生合成促進効果のメカニズムは不明のままである。

生化学工業東京研究所時代（1991～1998年）には、永井克孝先生がグループディレクターとして理化学研究所国際フロンティア研

究システム糖鎖機能研究を展開されていた。永井先生や東京都臨床医学総合研究所の鈴木明身先生には、示唆に富むさまざまなアドバイスを頂戴し、日本の糖脂質研究の伝統をご教示いただいた。永井先生は昨年ご逝去されたが、先生の哲学とお言葉を昨日のこのように思い出している。また、シアトルのワシントン大学の箱守仙一郎先生や五十嵐靖之先生（現北海道大学）との共同研究を始めさせていただいたのもこの時期である。箱守先生には、本学分子生体膜研究所顧問としてご指導いただいている。

2. スフィンゴ糖脂質生合成制御機構

1998年、箱守仙一郎教授の研究室から北海道大学薬学部へ赴任された五十嵐靖之教授の研究室の助教授となった私は、五十嵐研究室の立ち上げとともに、ここまでの研究から生命科学者としてのオリジナリティーを築く自負をこめて未来への可能性を模索していた。当時、ヒト全ゲノム解読がなされ、スフィンゴ糖脂質の生合成酵素群の遺伝子クローニング競争の真っただ中であった。そのようなときに、当時自治医科大学におられた斎藤雅樹教授が行っていた数百種類の多様なスフィンゴ糖脂質の中のシアル酸を含むガングリオ系ガングリオシドファミリー生合成の律速酵素であるGM3合成酵素（GM3S）の遺伝子クローニングプロジェクトに参加することができ、幸運にも世界の先陣を切ることができた。このプロジェクトに参加できたのは、福岡大学薬学部助手時代（永松淳雄教授）に私が3LLルイス肺がん由来細胞株より、GM3を発現していないクローンであるJ5株についての研究をしていたことからである [22]。このGM3欠損J5株にヒト脳cDNAライブラリーを導入し、世界初のGM3S発現クローニングに成功した [3]。

この仕事がきっかけで、GM3Sの分子生物学を開始することになった。細胞内にお

けるスフィンゴ脂質の生合成制御機構について、現時点での作業仮説も含めて図2に示した。国立感染症研究所の花田賢太郎博士は、ceramide traffickingにちなんでCERTと呼ばれる小胞体からゴルジ体へ特異的にセ

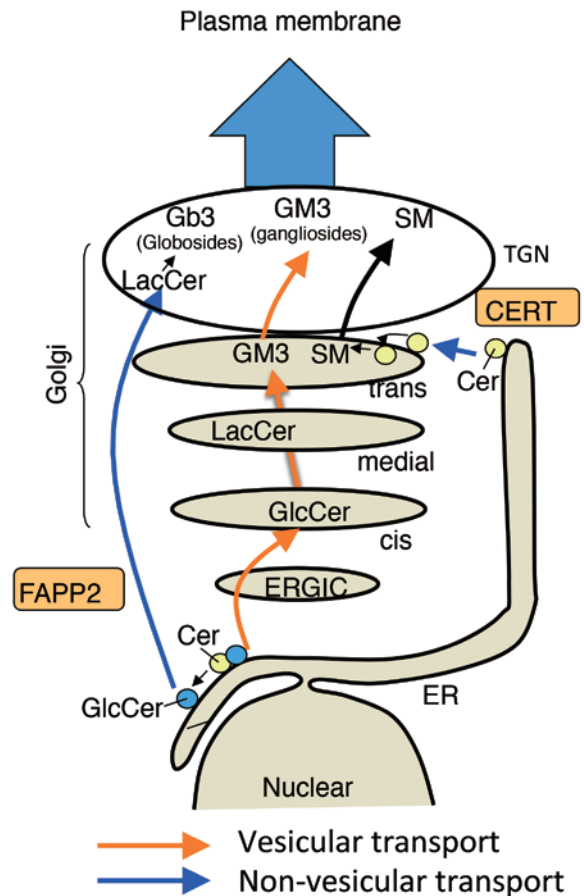


図2 スフィンゴ糖脂質生合成制御機構

スフィンゴミエリン、グロボシド、ガングリオシドの糖脂質生合成の最近の局面（作業仮説を含む）。

ラミドを運ぶ分子を発見した [23]。CERTに結合したセラミドは、CERTのPHドメインとゴルジ膜局所に濃縮されたホスファチジルイノシトールと小胞体・ゴルジ体オルガネラ部位を形成し、主としてスフィンゴミエリン（SM）の生合成に利用される。また、小胞体内腔で合成されたセラミドの一部は、小胞体膜およびシスゴルジ膜の細胞質側グルコシルセラミド（GlcCer）になる。GlcCerは、

Golgi-associated four-phosphate adaptor proteinのFAPP2と結合し、トランスゴルジに輸送され、ゴルジ体膜の内側にフリップした後、ラクトシルセラミド (LacCer) に生合成されることが示された [24, 25]。おそらく、LacCer合成酵素はゴルジ体で局在が異なる2種類が存在し、FAPP2と結合したGlcCerはLacCerのグロボ系などの中性糖脂質 (Gb3など) の生合成に利用されるのであろう。一方、LacCer合成酵素はGM3合成酵素 (GM3S) と複合体を形成してガングリオシドファミリーの合成を制御している可能性が報告されている [26]。したがって、細胞特異的なスフィンゴ糖脂質分子種の発現機構の包括的な理解には種々の生合成酵素の細胞内局在および動態を徹底的に解明していくことが不可欠である。

それでは、GM3以降の複合ガングリオシドの生合成はどのように制御されているのであろうか？当研究室の博士研究員であった上村聡志君は、いくつかのガングリオシド生合成酵素で細胞質領域のN末端の長さが異なるアイソフォームを見だし、その意義について検討していた。彼は、GM3SにはN末端側の細胞質領域の長さが異なる3種類のアイソフォーム (M1-, M2-, M3-GM3S) が存在し、それぞれの細胞内動態が大きく異なることを明らかにした [27]。注目されるのは、M1-GM3Sは細胞外領域が6-8アミノ酸あり、シアル酸転移酵素ファミリーの中でも最も長いことである (図3A)。GM3Sの三つのアイソフォームは、二つのmRNAバリエーション (mSAT-IaとmSAT-Ib) からleaky scanningにより産生される [27]。leaky scanningとは、最初のメチオニン (AUG) が開始コドンとしてリボソームに認識されず、さらに下流のメチオニンが開始コドンとして認識されて、翻訳が開始することである。開始コドンの認識には、アデニンから3塩基上流の塩基がアデニン、もしくはグアニ

ンから4塩基下流の塩基がグアニンであることが重要であると考えられている。そのため、leaky scanningはこの開始コドン認識配列が十分でないときに起こり、GM3Sの場合も開始コドンの前をリボソームによる認識に最適だとされるGCCACC (コザック配列) にした場合、このleaky scanningが大幅に抑制される。これらアイソフォーム間の性質の違いで、最も興味深いことは、細胞質領域の最も長いM1-GM3SのみがN末端側に逆行輸送シグナルR-basedモチーフを持ち、小胞体に局在することである (図3B)。M1-GM3Sの逆行輸送は不完全であり、一部のM1-GM3Sは逆行輸送を逃れ、ゴルジ体まで運ばれた後、GM3を合成する。つまり、M1-GM3Sは安定して小胞体に局在しながら、ゆっくりとゴルジ体へGM3Sを供給していることが示唆される。また、M2-GM3SとM3-GM3Sはどちらもゴルジ体に局在しているが、M2-GM3Sは速やかにリソソームへ運ばれて分解されるのに対し、M3-GM3Sは安定してゴルジ体に繫留する。3種類のアイソフォームの量的バランスと局在のバランスがGM3合成の制御に重要であると推測している (図3C) [28]。GM3SはII型の膜タンパク質であり複数のアスパラギン結合型糖鎖が付加される。我々は、これらの糖鎖が酵素活性に必須であり、立体構造の一部分を担っていることを示唆した [29]。さらに、M2-GM3SやM3-GM3Sには、現段階では、明確なシグナル配列が見つかっていないことから、未知のメカニズムでゴルジ体に繫留、もしくはリソソームへの輸送が行われていると考えられる。このように、3種類のアイソフォームが存在する生理的意義について、不明な点は残されているが、少なくとも3種類のアイソフォームが異なるメカニズムでゴルジ体に輸送・繫留していることは明らかである [27, 28]。今後、ラクトシルセラミドに作用する6種の酵素 (図1A) の細胞内動態が解明され、スフィンゴ糖脂質生

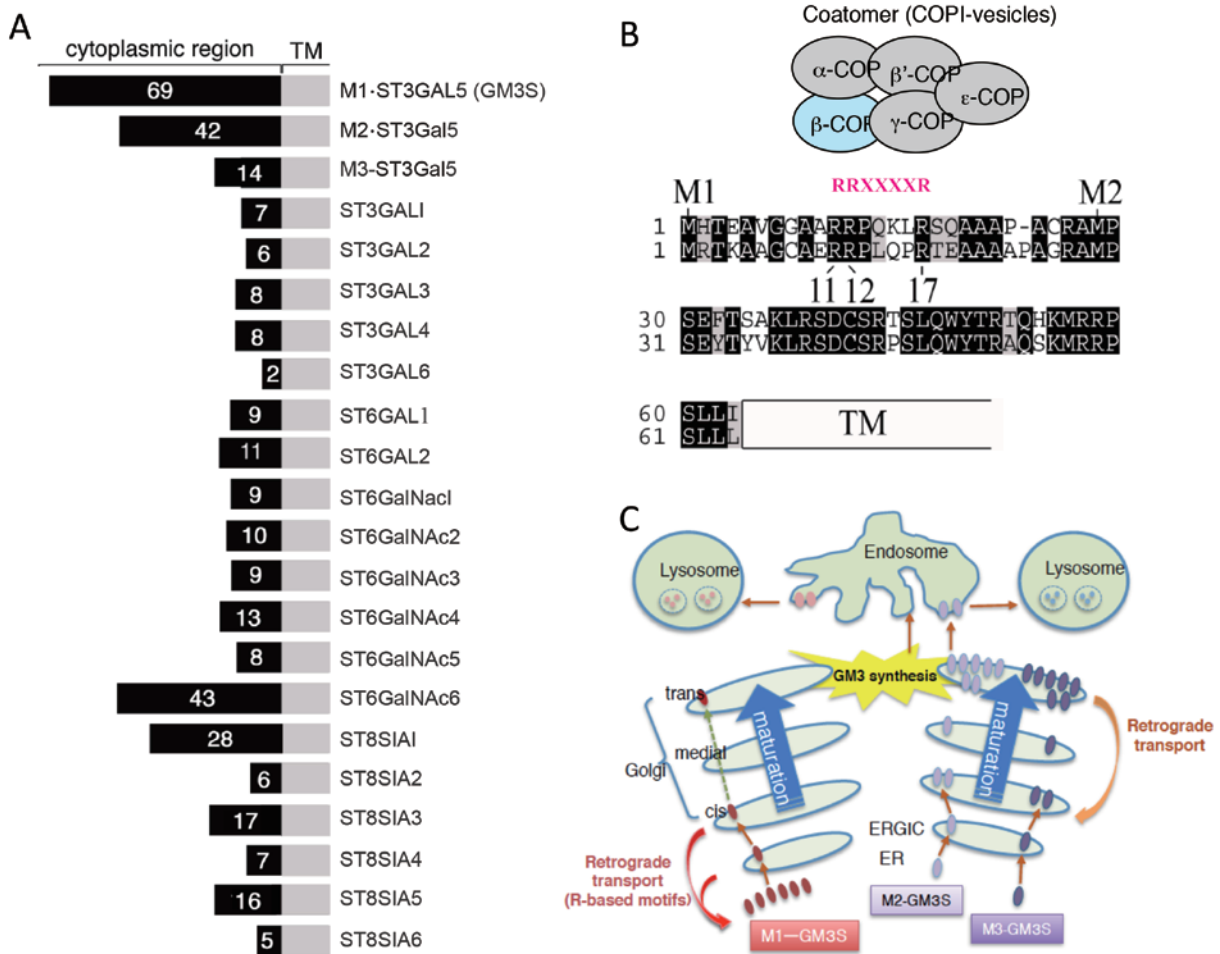


図3 GM3合成酵素アイソフォームの細胞内ダイナミクス [27, 28]

- (A) シアル酸転移酵素の細胞質領域の長さの比較。
- (B) 細胞質領域が最も長いM1- GM3S (ST3GAL5)はR-based motif (RRXXXXR)を持ち、COP-1複合体と結合して逆光輸送されて、小胞体に存在している。
- (C) GM 3 合成酵素アイソフォームの細胞内動態。

合成制御機構の全貌が解明されることを期待している。

3. マイクロドメイン病としてのインスリン抵抗性の提唱

肥満糖尿病モデルである*db/db*、*ob/ob*マウスやZucker *fa/fa*ラットなどの肥満モデル動物の脂肪組織では、それらのコントロール動物 (lean) と比較すると腫瘍壊死因子 α (TNF α) の著しい産生上昇が認められる [30]。これらの副睾丸脂肪組織のGM3合成酵素遺伝子発現を解析したところ、GM3S mRNAおよびGM3レベルの顕著な上昇が認

められ、脂肪細胞のインスリン抵抗性にGM3の発現上昇が関与している可能性が示された (図4A) [31]。GM3の増加は、高脂肪食を負荷し高血糖を誘導したC57BL6マウスの内臓脂肪組織においても確認された [32]。脂肪細胞では、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴミエリン、コレステロールなどのラフト脂質が集積して形成される細胞膜カベオラマイクロドメインにインスリン受容体 (IR) が存在していることから、細胞膜におけるインスリンシグナル伝達においてもこれらの脂質環境が影響を与えている可能性がある。TNF α 刺激によりインスリン抵抗性を獲得した

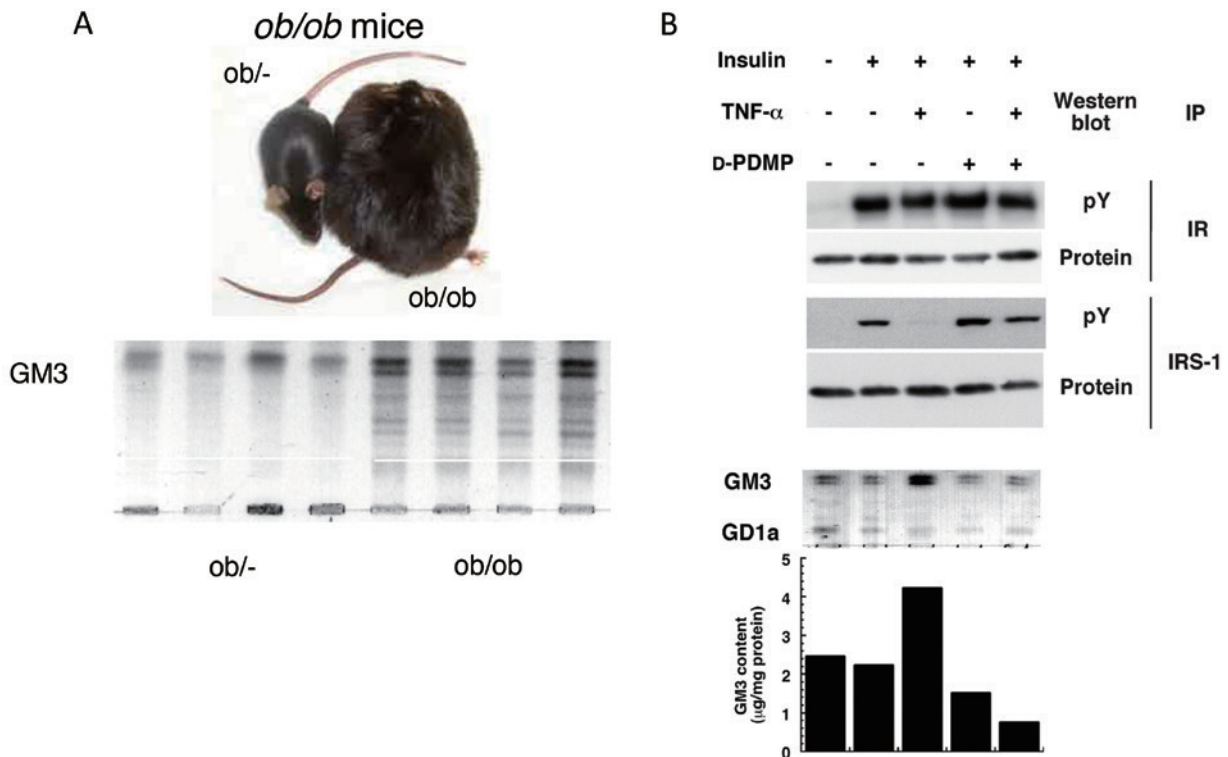


図4 グルコシルセラミド合成酵素阻害剤が脂肪細胞のインスリン抵抗性を解除する [31, 32]

(A) レプチン欠損肥満モデルである*ob/ob*マウスの副睾丸脂肪組織におけるGM3の発現上昇。
 (B) 炎症性サイトカインTNF α によりインスリン抵抗性状態を獲得した3T3-L1脂肪細胞では、ガングリオシドGM3の増加した。GM3の増加をD-PDMPで抑制するとインスリン抵抗性が解除された。

3T3-L1脂肪細胞のラフト脂質組成を調べると、GM3が特異的に2~3倍増加していた(図4B) [31]。そこで、グルコシルセラミド合成酵素の特異的阻害剤D-PDMP2)を用いて、TNF α 刺激で増加したGM3の発現を抑制すると、IRS-1 (insulin receptor substrate-1) のチロシンリン酸化の抑制がほぼ解除されたことから、GM3の異常な発現上昇がインスリン抵抗性を惹起していることが強く示唆された(図4B) [31]。さらに、樺山一哉博士(現大阪大学准教授)は蛍光標識IRおよびカベオリン-1の生細胞イメージング(FRAP法)、免疫沈降法、およびミラノ大学Sandro Sonnino教授が派遣してくれたNicoletta Loberto博士と行った光感受性GM3を用いた架橋実験などにより、GM3の発現

上昇によってIR β サブユニットの細胞膜直上のリシン残基とGM3のシアル酸残基の静電的相互作用が増大した結果、IR/カベオリン-1複合体が解離する分子機構を証明した(図5) [33]。これらの研究から「2型糖尿病などの生活習慣病は、スフィンゴ糖脂質の発現異常によってマイクロドメインの構成・構造および機能が変化し、シグナル伝達が異常になったマイクロドメイン病である」という病態概念を提唱している [5, 34-37]。生活習慣病研究分野でのスフィンゴ脂質/糖脂質研究は急速に進みつつあり、創薬や新たな診断法の開発において今後大きく発展することが期待される。図6に我々が提唱する新たなインスリン抵抗性発症機序を示す。

腸間膜脂肪組織より得られたstromal vas-

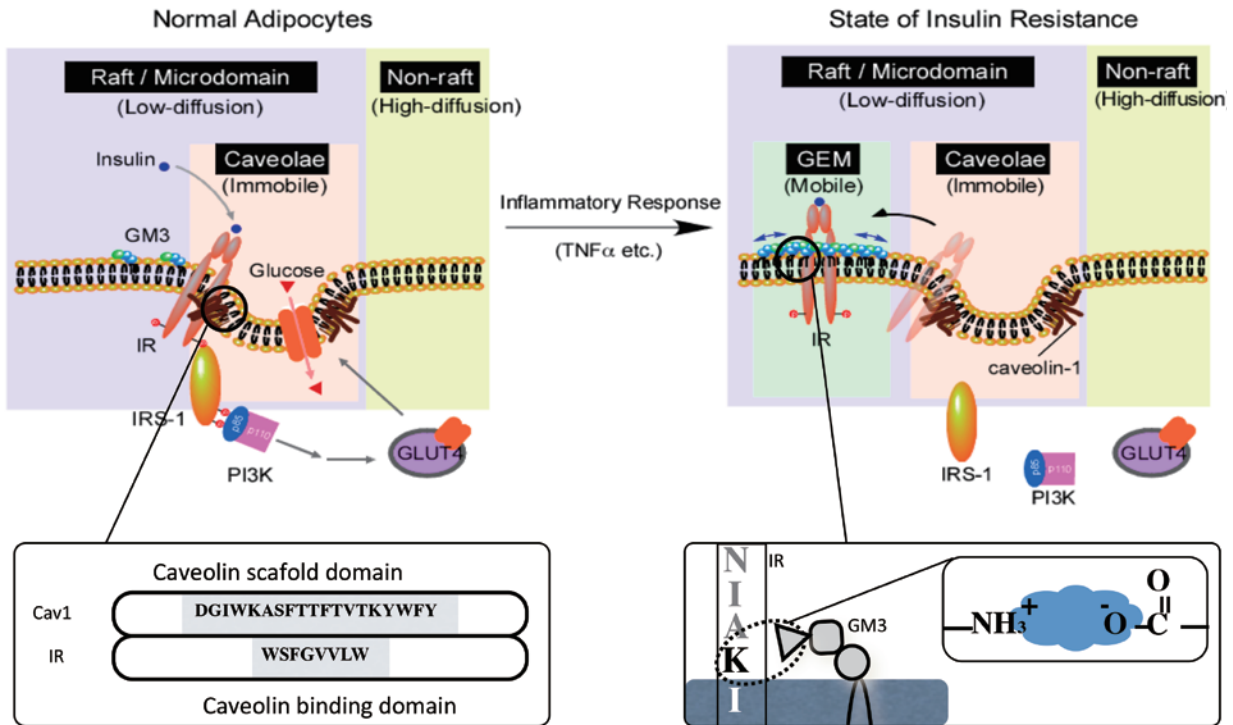


図5 脂肪細胞におけるインスリン抵抗性発症におけるマイクロドメイン病の提唱 [33]

肥満糖尿病モデル動物の内臓脂肪組織や炎症性サイトカイン $TNF\alpha$ によりインスリン抵抗性状態を獲得した脂肪細胞では、ガングリオシドGM3が増加し、増加したGM3は、細胞膜カベオラマイクロドメインからインスリン受容体(IR)を乖離し、インスリンシグナル伝達を阻害する。

cular (間質血管細胞群) 画分に存在する前駆脂肪細胞の成熟脂肪細胞への分化は、常在性マクロファージによって制御されていることが知られている [38]。常在性マクロファージを除去すると前駆脂肪細胞の分化速度が促進されるとともに、インスリンシグナルも亢進していた [32]。驚くべきことに、この常在性マクロファージを除去した前駆脂肪細胞および分化誘導した脂肪細胞ではGM3を含むスフィンゴ糖脂質の発現が遺伝子レベルから抑制されており、定常状態においても脂肪細胞のスフィンゴ糖脂質の発現は、常在性マクロファージから分泌されている液性因子により制御されていることを明らかにした [32]。さらに、GM3S KOマウス胎仔から得られた線維芽細胞 (MEF) は脂肪細胞への分化速度が対照のMEFに比較して速く、インスリンシグナルも亢進していた [32]。こ

れらの結果より、GM3およびGM3から生合成されるガングリオシド分子種は、生体の恒常性維持およびメタボリックシンドロームにおける慢性炎症状態において、インスリンシグナルを制御する生理活性脂質としての働きが示された (図7) [39]。

メタボリックシンドローム (内臓脂肪症候群) は内臓脂肪の蓄積を基盤として、ひとりに複数の危険因子が集中し、動脈硬化性疾患 (心筋梗塞や脳梗塞など) の危険性を高める複合型リスク症候群状態である [40]。現在のところ、メタボリックシンドロームの主要な危険因子であるインスリン抵抗性を簡便に診断する指標がない。血液中の血球成分を除いた血漿または血清中には、GM3を主成分として、GD3、GD1a、GM2およびGT1bなどが存在していることが知られている [41]。また、血漿または血清中のガングリオシド量

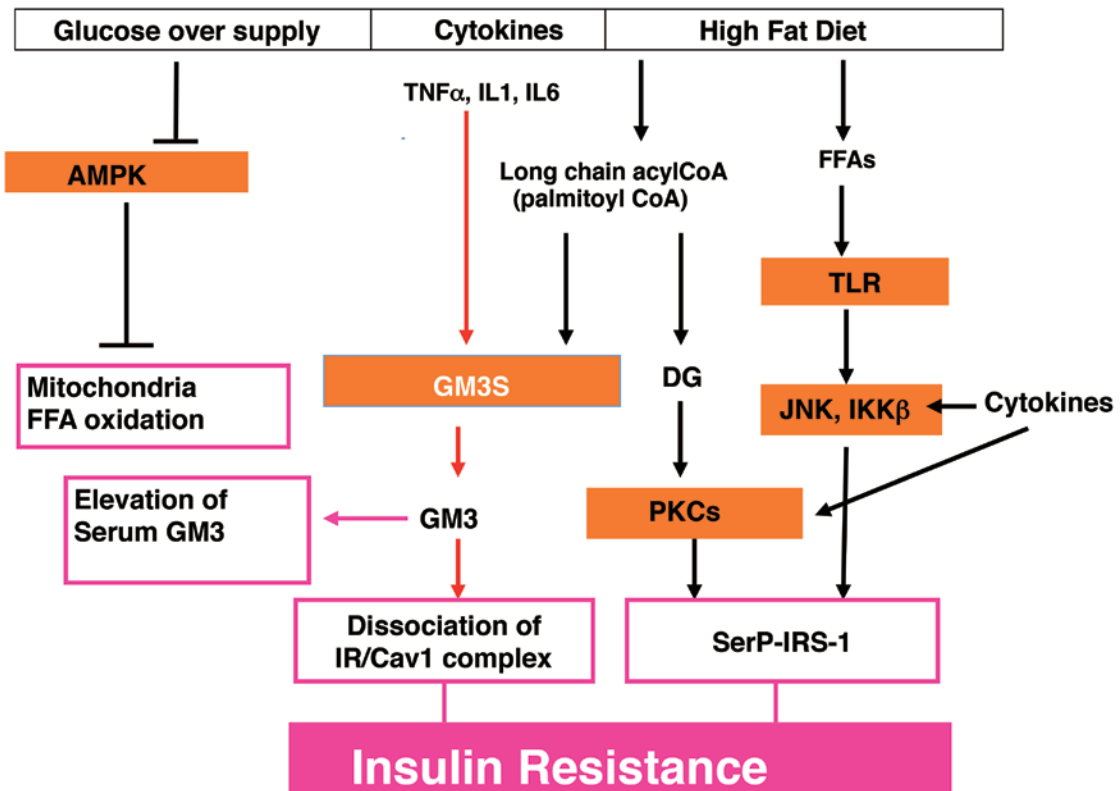


図6 マイクロドメイン病としてのインスリン抵抗性 [35-37]
 赤矢印は我々が提唱している経路。黒矢印は従来から知られているインスリン抵抗性発症機序。

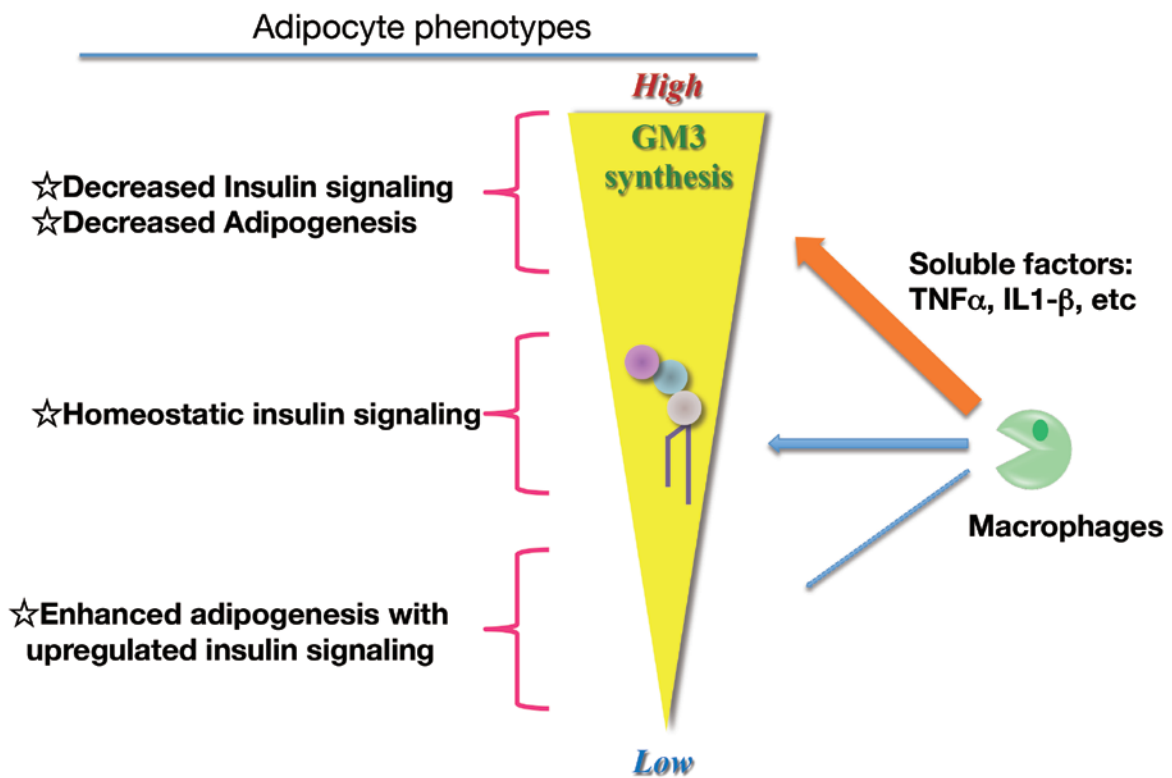


図7 多変量解析によるGM3分子種と生活習慣病発症危険因子との関連 [43]
 GM3分子種の下付きの数字は有意に関連した危険因子の数を示す。

は、自己免疫疾患や胃がんで増加傾向が認められることが報告されているが、肥満およびインスリン抵抗性状態における脂肪細胞または脂肪組織のGM3発現の増加が血液試料において検知しうるか否かはまったく不明であった。ヒト血清中の主要なガングリオシドもGM3であり、健常人では約5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で存在している [41]。我々は糖尿病などのメタボリックシンドローム患者血清のGM3値が上昇すること [42]、さらに、GM3の分子種を東海大学糖鎖科学研究所の鈴木明身教授の協力を得てLC-MS/MSで調べたところ、GM3のセラミド部分のアシル鎖2位の

水酸基付加体 (d18:1,OH24:0やd18:1,OH24:1など) が特異的に増加していることを見いだした (図8) [43]。この水酸化されたGM3分子種は2型糖尿病をはじめとする複雑なメタボリックシンドロームの慢性低炎症病態を新たな角度から検出することができる新規な病態マーカーである可能性があり、病態との詳細な相関関係を現在検証中である。

4. ガングリオシド分子種選択的なT細胞サブセットの機能制御

T細胞の抗原認識機構およびT細胞受容体 (TCR) シグナル伝達機構は非常によく研

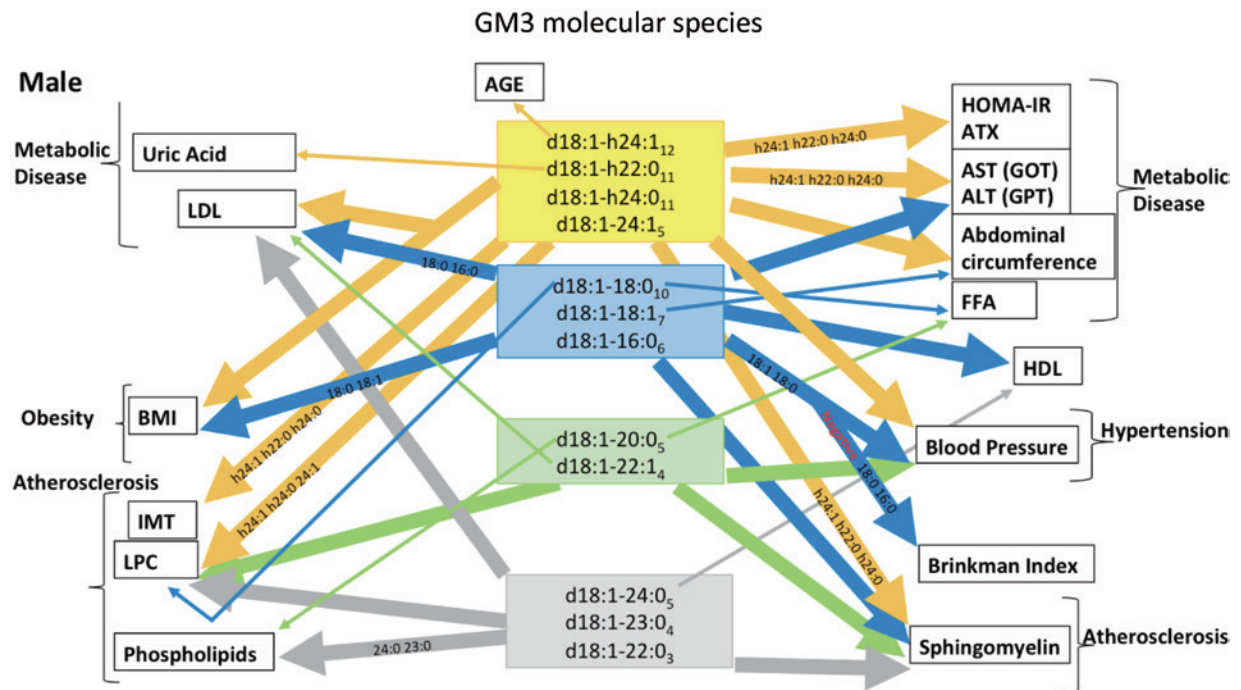


図8 ガングリオシドGM3によるインスリンシグナル制御と脂肪組織の恒常性維持機構

究されてきた分野である。近年、顕微鏡による生細胞の可視化技術の向上もあって、T細胞と抗原提示細胞APCがその接触部分に形成する“免疫シナプス”の動的変化も明らかにされてきた [44]。これまでにT細胞活性化におけるガングリオシド (シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質) の役割はいくつも報告されている。たとえば、抗CD3⁺抗CD28抗体に

よるTCR刺激に伴って惹起されるガングリオシドGM1の極性化はCD4⁺T細胞では起こるが、CD8⁺T細胞では起こらない [45]。さらに、遊走するヒト活性化T細胞では先端部とその対極側とでそれぞれGM1とGM3に富んだ異なるラフトが形成される [46]。しかし、コレラ毒素Bサブユニット (CTx-B) はラフトの可視化や機能解析に長らく汎用され

ているが、これで識別されるラフトはその一部であり（後述）、構成脂質分子の違いに基づく多様なラフトの存在が考えられる。加えて、細胞の種類やその分化に依存してGM1発現量そのものに大きな違いがあることや、細胞に発現するガングリオシド分子種としてGM1はマイナー成分であるケースも多く知られている。

CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞にどのようなガングリオシドが発現しているのかをLC-MS/MSで解析したところ、T細胞に発現するガングリオシドはT細胞サブセットごとに特徴的であり、CD4⁺ T細胞はGM1などのa-系列（図1B参照）の発現が維持されているが、CD8⁺ T細胞はGD1alphaやGalGalNAc-GM1b（extended GM1b）などのo-系列（図1B参照）優位に変化していた（図9A）[47, 48]。さらに、このガングリオシド発現パターンの相違と一致して、GM3Sの遺伝子発現はCD4⁺ T細胞の方がCD8⁺ T細胞より約3倍高く、反

対にGM2/GD2Sの発現はCD8⁺ T細胞の方が高い傾向を示した（図9B）[47]。すなわち、ガングリオシド合成経路のLacCer分岐において、CD4⁺ T細胞ではGM3Sの活性によってa-系列に合成が進みやすく、CD8⁺ T細胞ではCD4⁺ T細胞と比してo-系列に合成が進みやすいことが考えられる。T細胞サブセットにおけるガングリオシド発現パターンの相違が免疫機能に影響するか否かを解析するために、ガングリオシド合成に関与する二つの鍵酵素であるGM3SおよびGM2/GD2Sの各遺伝子改変マウス（KO）を用いた。GM3S KOはすべてのaおよびb-系列のガングリオシドが欠損してo-系列のみ発現しており、GM2/GD2S KOはGM3とGD3を除くすべてのガングリオシドが欠損している（図1B参照）。まず、各KOマウスにおけるT細胞の分化および成熟を検討したところ、胸腺、脾臓、リンパ節におけるリンパ球数は野生型マウスと同程度であった。また、胸腺におけるCD4⁺ /

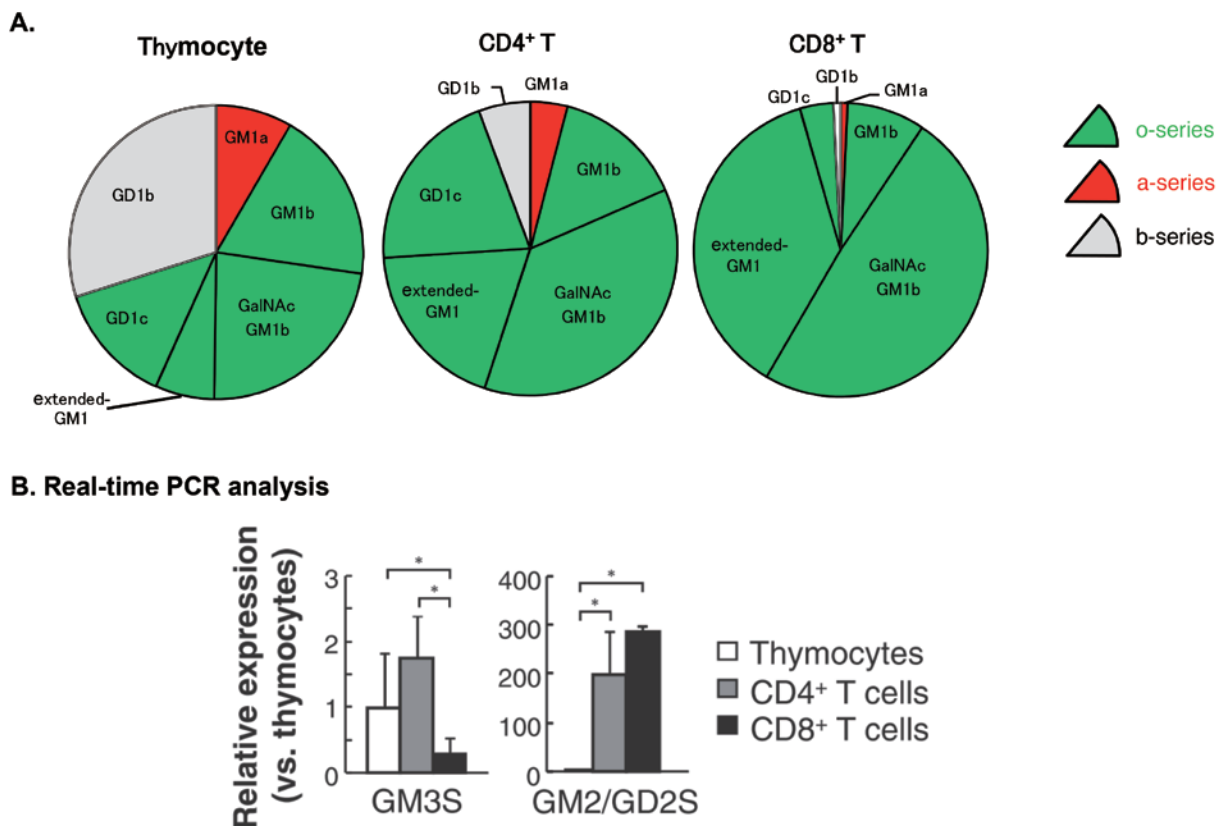


図9 T細胞サブセット分化過程におけるガングリオシド分子種の選択的発現 [47, 52]

CD8⁺ T細胞の割合にも変化はなく、リンパ節および脾臓におけるT細胞/B細胞比およびCD4⁺ T細胞/CD8⁺ T細胞比も野生型マウスと同様の分布を示した。次に、野生型および各KOマウスより単離したCD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞を、抗CD3抗体および抗CD28抗体にて刺激しTCR依存性の反応を検討したところ、GM3S KOではCD4⁺ T細胞の増殖応答およびサイトカイン産生が重度に低下していたがCD8⁺ T細胞ではまったく正常であった。対照的に、GM2/GD2S KOでは、CD4⁺ T細胞の増殖応答およびサイトカイン産生はまったく正常であったがCD8⁺ T細胞では重度に低下していた [47]。GM3S KOのCD4⁺ T細胞およびGM2/GD2S KOのCD8⁺ T細胞に対してアデノウイルスを介してそれぞれGM3SおよびGM2/GD2Sを遺伝子導入したと

ころ、両者ともに活性化は正常レベルに回復した。さらに、各種ガングリオシド (o-系列のGA2、GA1、GM1b、GD1alpha、a-系列のGM3、GM1、GD1a、b-系列のGD3、GD1b、GT1bおよびLacCer) を外来性に補充しながら、KOマウスT細胞のTCR依存性反応を検討したところ、GM3S KOのCD4⁺ T細胞ではGM3、GM1あるいはGD1a (すなわちa-系列) を添加したときのみ活性化が正常に回復し、GM2/GD2S KOのCD8⁺ T細胞では、GA2、GA1、GM1bあるいはGD1alpha (すなわちo-系列) を添加したときのみ活性化が正常に回復した (表2) [47]。以上のように、CD4⁺ T細胞はGM3Sによって合成されたa-系列が、CD8⁺ T細胞ではGM2/GD2Sにより合成されたo-系列がTCR媒介性の活性化に重要であることが判明した。

		CD4 ⁺ T cell activation		CD8 ⁺ T cell activation	
		GM3S null	GM2/GD2S null	GM3S null	GM2/GD2S null
	None	↓↓↓	Nomal	Nomal	↓↓↓
a-Series	GM3	Restored	Nomal	Nomal	↓↓↓
	GM1a	Restored	Nomal	Nomal	↓↓↓
	GD1a	Restored	Nomal	Nomal	↓↓↓
b-Series	GD3	↓↓↓	Nomal	Nomal	↓↓↓
	GD1b	↓↓↓	Nomal	Nomal	↓↓↓
	GT1b	↓↓↓	Nomal	Nomal	↓↓↓
c-Series	GA2	↓↓↓	Nomal	Nomal	Restored
	GA1	↓↓↓	Nomal	Nomal	Restored
	GM1b	↓↓↓	Nomal	Nomal	Restored
	LacCer	↓↓↓	Nomal	Nomal	↓↓↓

表2 CD4T細胞とCD8T細胞の活性化には、それぞれ特定のガングリオシド分子種を必要とする [47, 53]

CD4⁺ T細胞はGM3Sによって合成されたa-系列が、CD8⁺ T細胞ではGM2/GD2Sにより合成されたo-系列がTCR媒介性の活性化に重要である。

近年、Th1とTh2に加えて、Th17および制御性T細胞 (Treg) が新たなCD4⁺ T細胞サブセットとして認知されてきた。アレルギー性気道炎症では、Th2 (促進的) とTreg (抑制的) のバランスがTh2側にシフトしている [48]。Th17はまだ未解明な部分も多いが、

刺激に伴い炎症性サイトカインであるIL-17を強く産生する細胞であり、好中球性ステロイド抵抗性の重度の喘息に関与し、Th2媒介性の気道炎症も増強するといわれている [49]。GM3S欠損マウスではTh17への*in vitro*の分化誘導が抑制されているという報

告がされた [50]。対照的に、GM3欠損マウスではコラーゲン誘導性関節炎（関節リウマチのマウスモデル）の進行が促進しており、免疫後の局所リンパ節におけるIL-17産生細胞の誘導が亢進するという報告もある [51]。CD4⁺ T細胞はGD1c陽性IL-2産生Th1様細胞とGD1c陰性IL-4産生Th2様細胞とに分けることができる [11]。以上より、CD4⁺ T細胞サブセットごとに発現するガングリオシド分子種が違い、それに基づく多様なラフトが存在し、アレルギー疾患や自己免疫疾患に影響を与えていることが強く示唆される。今後の研究が期待される。

これらの知見から我々は、胸腺におけるT細胞分化過程（レパトア選択）は、T細胞サブセットごとの糖脂質発現の選択でもあり、この糖脂質選択は機能的T細胞への成熟に不可欠な現象であること、すなわち、“Glycolipid selection is indispensable for functional repertoire selection” という作業仮説を提唱している（図10） [47, 52-54]。

GM3S依存性のガングリオシド分子種a-系列特異的なCD4T細胞の機能発現が示されたことから、CD4T細胞免疫応答を基本病態とする気管支喘息におけるガングリオシドの役割を喘息モデルマウスにて本学病態生理学研究室の大野勲教授と検討した。卵白アルブミン（OVA）にて感作後、OVA吸入により、肺洗浄液中のTh2サイトカインと好酸球、リンパ球の増加、すなわちアレルギー性気道炎症が惹起される。野生型マウスと比較してGM3S KOでは、組織学的にも気道分泌の抑制が確認され（図11A）、好酸球、リンパ球（図11B）、血清中抗原特異的IgEの出現抑制（図11C）およびTh2サイトカインの著しい減少（図11D）が認められた [47]。さらに、OVA感作したGM3S欠損マウスのCD4⁺ T細胞を野生型マウスに移植した実験では炎症細胞の浸潤などが抑制されることから、GM3S欠損マウスにおける気道炎症の抑

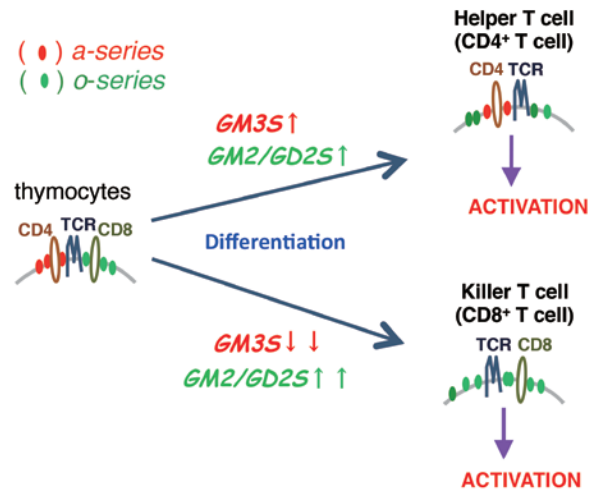


図10 胸腺におけるT細胞分化過程（レパトア選択）は、T細胞サブセットごとの糖脂質発現の選択過程でもあり、この糖脂質選択は、機能的T細胞への成熟に不可欠な現象である。 [47, 53]

制はCD4⁺ T細胞が原因であると実証された（図11E）。一方、同様の実験をGM2/GD2S欠損マウスにて行った結果では、WTと有意な違いは認められないことから、*in vivo*におけるCD4⁺ T細胞の免疫機能はGM3S欠損マウスで特異的に抑制される。以上より、少なくともGM3S依存性のガングリオシド分子種はアレルギー性気道炎症の成立に重要な役割を担っていることが判明した。GM3Sおよびその上流にあるグルコシルセラミド合成酵素やラクトシルセラミド合成酵素の阻害がIgE受容体刺激による肥満細胞の活性化経路や脱顆粒を抑制することにより、アレルギー性気道反応を低下させることも報告されている [55]。現在、さまざまな免疫抑制剤が使用されているが、問題点として非特異的な免疫抑制に基づく重篤な副作用がある。また、T細胞を標的とした免疫抑制剤も試されているが、あらゆるT細胞免疫を抑制することは生体にとって不利益も非常に多く、十分な成果をあげているものはいまだ存在しない。したがって、我々の目指す“ガングリオシド発現制御によるT細胞サブセットの選択的制御”

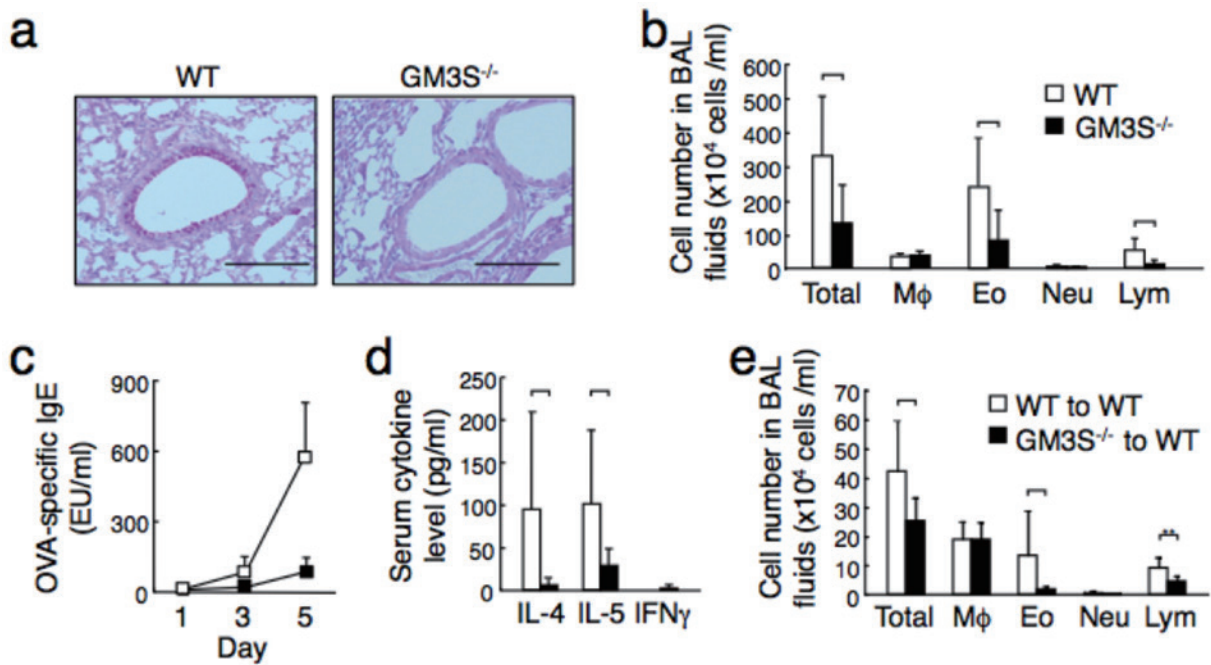


図11 GM3合成酵素KOマウスはOVA誘発気道過敏症が軽減している [47]

卵白アルブミン (OVA) にて感作後、OVA吸入により、アレルギー性気道炎症が惹起させた。野生型マウスと比較してGM3S KOでは、組織学的にも気道分泌の抑制が確認され (A)、好酸球、リンパ球 (B)、血清中抗原特異的IgEの出現抑制 (C)およびTh2サイトカインの著しい減少 (D)が認められた。さらに、OVA感作したGM3S欠損マウスのCD4⁺ T細胞を野生型マウスに移植した実験では炎症細胞の浸潤などが抑制されることから、GM3S欠損マウスにおける気道炎症の抑制はCD4⁺ T細胞が原因であると実証された (E)。

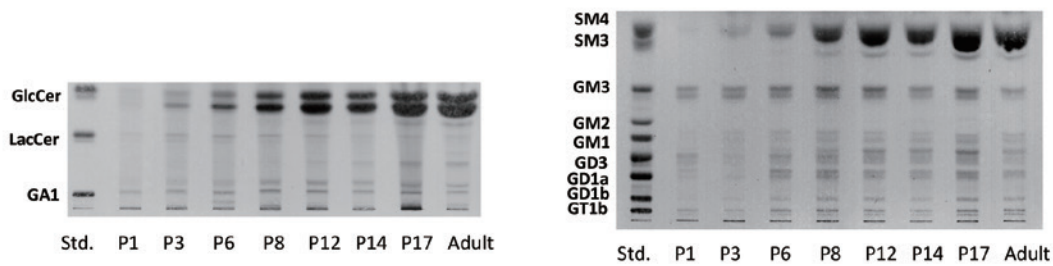
は、T細胞が重要な役割を果たすアレルギー疾患、感染症、自己免疫疾患、腫瘍や移植拒絶反応などに対し、より効果的・安全な治療法を提供することが期待される。

6. GM3合成酵素欠損症と聴覚障害

マウスの神経系の酸性糖脂質はヒトを含む他の多くの哺乳類とよく類似しており、硫酸化糖脂質サルファチド [SM4(SO₃-GalCer)]、ガングリオシドGM1、GD1a、GD1b、GT1b、GQ1などを発現している。脳の形成・発達過程において、酸性糖脂質の発現分子種・発現量は劇的に変化し、生後0日 (PO) までにガングリオシドの発現は成熟した脳とほぼ同じ分子種が発現する [56]。一方、内耳では生後の聴覚機能の成熟期間に対応して、その発現量が劇的に増加し、マウスの脳と内耳には

独立したガングリオシド発現制御機構が存在することが判明した (図12) [57]。ガングリオシドを完全に欠損したマウスであるGM3SとGM2合成酵素 (GM2S) の二重欠損 (GM2S/GM3S DKO) マウスは、生後すぐに重篤な中枢神経障害を示し、大多数が早期に死亡する [58]。一方、GM3S KOマウスはメンデルの法則に従う比率で生まれ、ほぼ正常に成長し、寿命も野生型と比較して大きな差はみられない。GM3S KOマウスのほぼすべての臓器では、a-、b-系列のガングリオシドが消失し、通常ほとんど発現がみられないo-系列のガングリオシドが発現する (図1B)。前述のようにGM2S/GM3S DKOマウスは生後数か月以内に大半が死亡することから、GM3S KOマウスでは「o-系列」ガングリオシドが生命維持に重要な「a-、b-系列」ガングリオ

A



B

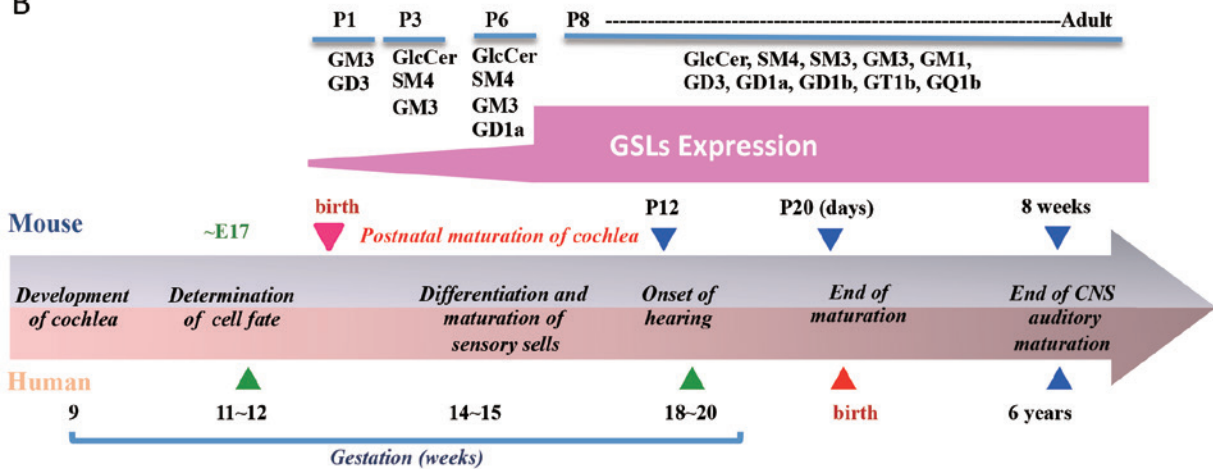


図12 マウス蝸牛のスフィンゴ糖脂質の発現は、生後2週間の聴覚機能成熟期に激増する [57]

シドの機能を代償していると考えられる。

当時大学院生であった吉川弥里さんは、GM3S KOマウスの行動薬理的検討の目的で、オスとメスのGM3Sヘテロ欠損マウスから生まれる同腹子の遺伝子型判定を行っていた。彼女が「私を振り向いてくれないのがホモ個体です」と言うので、空気圧と音に対する驚愕反応を行ったところ、音に対する反応だけがまったく認められないことが判明し、電気生理学的な聴覚試験（聴性脳幹反応：ABR）においても完全に聴覚機能が障害されていることが確認された [59]。GM3 KOマウスの聴覚障害の時期は他の難聴モデルマウスと比較しても非常に早く、マウスの聴覚発生時期である生後約14日目ですでに聴力が低下しており、その後数日で完全に消失した。形態学的には、GM3S KOマウスはコルチ器の有毛細胞の選択的な変性・脱落が起こり、遺伝性加齢性難聴モデルや薬剤性難聴と類似

した病理所見を示した [59] (図13)。内耳前庭にも有毛細胞が存在するが、GM3S KOマウスの前庭は組織学および平衡感覚にも異常は認められなかった。GM3のみを発現するB4galnt1 (GM2/GD2S) とSt8sial (GD3S) の二重欠損マウスでは、このような聴覚の消失は認められていないことから60)、GM3はコルチ器の形態・機能維持において重要な役割を有することが考えられた。GM3S KOマウスの結果を合わせて考えると、聴覚機能の維持には、特に“GM3”が重要であると考えられる。この作業仮説を支持する事実として、1) 野生型マウスの外有毛細胞の聴毛にはGM3が特異的に発現し、下流のGM1ガングリオシドなどは認められないこと、2) GM3S KOマウスで最初に認められる異常は外有毛細胞の聴毛の変性・脱落であることを見いだしている [57]。

2009年に我々が発表したGM3S KOマウス

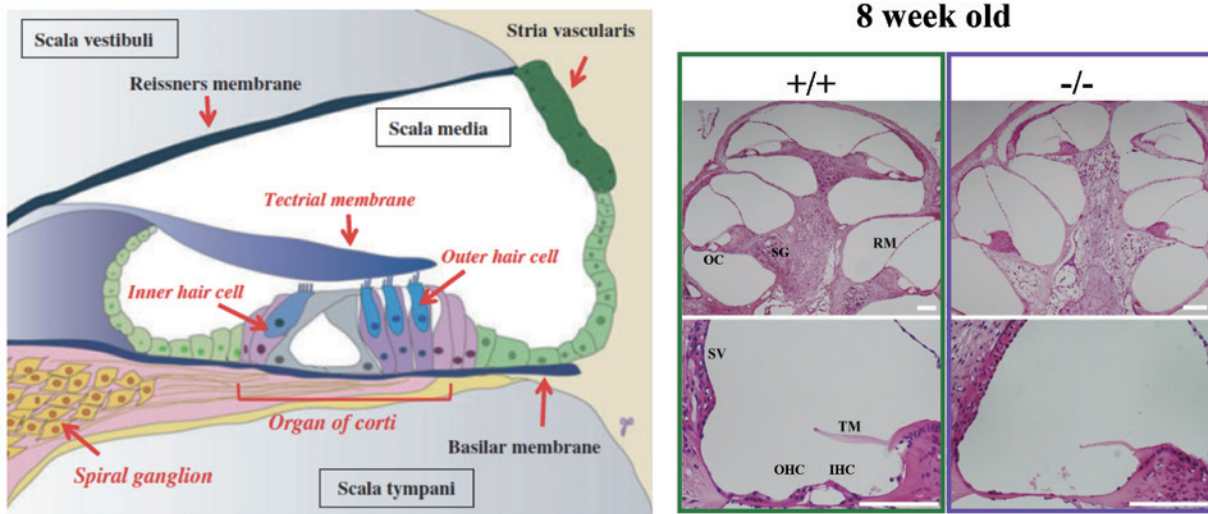


図13 GM3合成酵素KOマウスは内耳コルチ器の選択的変性が認められる [59]

の論文には解決しなければならない大きな問題があった [59]。それはヒトのGM3S欠損症との関連である。2004年、アーミッシュの家系にGM3S欠損の症例が見いだされた [61]。これはヒトにおけるスフィンゴ糖脂質合成系酵素の欠損の存在を示した最初の報告である。患者は幼児期に発症する重篤なてんかん症状と視覚異常を示し、20歳前後で死亡する。視覚の異常に関しては網膜の機能異常ではなく、視神経-中枢神経の機能異常によるものと考えられている [62]。現在のところ、我々が作製したGM3S KOマウスにおいて、顕著な視覚異常、通常飼育下における重篤なてんかん症状などはみられていない。このヒトとマウスの表現型の違いを解明するには、今後、ガングリオシド組成、遺伝子発現等を多角的に比較検討していく必要がある。このNature Geneticsに掲載された論文には、聴覚機能についての記載はなかった [61]。しかし、2012年には、フランスで見いだされたGM3S欠損患者で難聴が報告されたことから、GM3S欠損による難聴がヒトでも判明した [62]。その後、筆者はペンシルバニア州ランカスターのアーミッシュの人々で運営される病院であるClinic for Special Children (CSC) を訪れ、GM3S欠損患者と直に会って、ガングリオシド補給

などの治療の可能性を探っている [57]。

内毛細胞および外毛細胞の細胞膜上およびその細胞質内では、各難聴関連タンパク質がそれぞれ特徴的な局在を示し聴毛（不動毛：stereocilia）の形態・機能を維持している（図14A）。この聴毛の機能的・形態的維持には同一有毛細胞の聴毛間での分子連結が必須である。GM3S KOマウスでは、生後まもなく内毛細胞および外毛細胞の聴毛の変性が確認された。特に、内毛細胞では聴毛間の融合、聴毛内の分子の「局在の変化」がGM3S KOマウスの聴覚消失時期に一致して認められた（図14B）。この聴毛間の分子連結の崩壊に基づく聴毛の融合がGM3S KOマウスの聴覚機能消失の原因であると考えられる。GM3S KOマウスでは、この連結を担う分子（Shaft connector）の一つPIP2（phosphatidylinositol bisphosphate）の分解をつかさどるPTPRQ（protein tyrosin phosphatase receptor Q）の局在変化を確認している（図15）。この他にも、厳密な局在を示すmyosin VI、myosin VIIa、radixinなどの局在が異常を示したことから、細胞膜構成成分ガングリオシドは、有毛細胞の機能性膜領域の形成・維持には必須の成分であることが強く示唆される [57]。

ガングリオシドは細胞膜上で特定の分子群

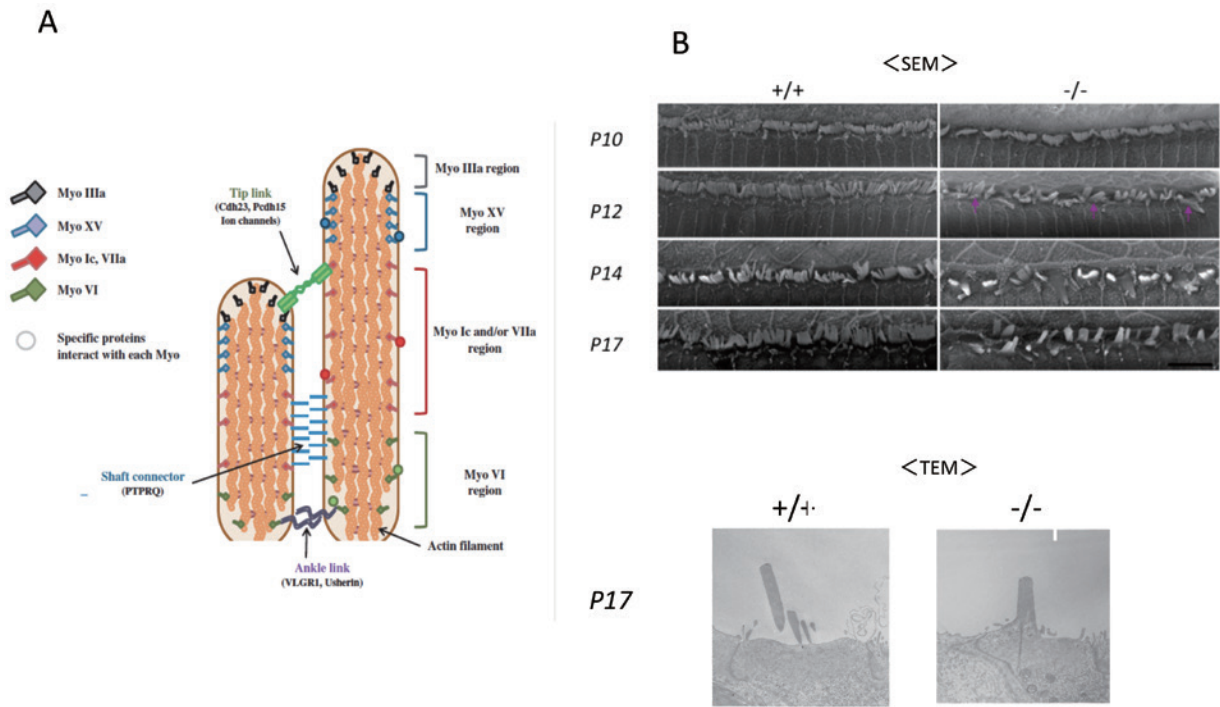


図14 GM3合成酵素KOマウスのコルチ器の内有毛細胞の融合 [57]

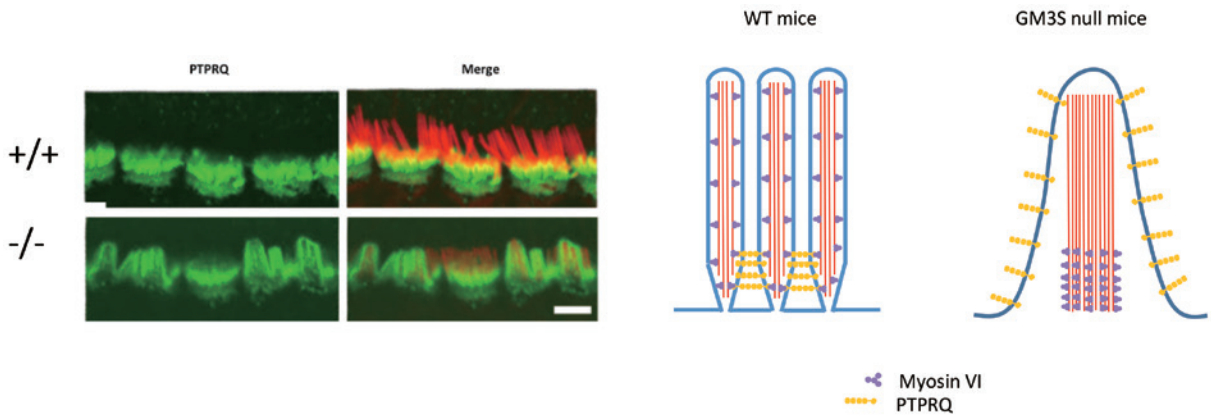


図15 GM3合成酵素KOマウスの有毛細胞の聴毛根元部分へのPTPRQ分子の局在が消失している [57]

と相互作用し、「マイクロドメイン (機能性微小膜領域)」を形成し、さまざまな生体機能を制御していると考えられている。GM3S KOマウスで変性が顕著にみられた聴毛には、多数の難聴原因遺伝子産物が固有のパターンで発現しており、機能的に異なる複数の機能性領域が存在していることが示唆されている (図14A)。したがって、聴毛に特異的に発現する分子の発現、局在、機能をGM3が制御していると考えられる。この有毛細胞にお

ける各難聴原因遺伝子産物の選択的輸送システム・局在の分子機構はほとんど解明されていない。ガングリオシドに注目したマイクロドメイン研究の対象としてきわめて興味深い。感音性難聴は難聴原因遺伝子の変異、加齢や薬物、ストレス、騒音などさまざまな要因によって引き起こされる。先天性の難聴は出生1000人あたりに1人の割合であり、最も頻度が高い先天性疾患の一つである。また、加齢性難聴は65歳以上の40%以上に生じるとき

れている。さらに、現代社会特有のストレスによる難聴や、携帯音楽プレイヤー等の普及に伴う騒音性の難聴も増加してきている。しかしながら、いったん障害を受け変性した蝸牛内の細胞は再生不可能であることから、現医療においては根本的な感音性難聴の治療はないといってよい。各難聴関連遺伝子の機能はそれぞれ解明されつつある。これら難聴原因遺伝子が中心となって形成される聴覚の機能分子複合体（マイクロドメイン）における糖脂質の役割を解明することから、新たな聴覚機能制御の概念が生まれ、新たな難聴の治療法につながっていくものと期待される。

おわりに

ガングリオシドを含むスフィンゴ糖脂質分子群の細胞特異的・選択的発現の違いが、インスリンシグナルの恒常性維持、T細胞サブセットの分化・成熟、そして聴覚機能の獲得・維持に必須な生命現象であることが理解されたと思う。今後、自然免疫と獲得免疫による生体恒常性維持機構におけるガングリオシドファミリーの分子種特異的な作動原理を解明し、生理活性脂質としての位置づけを明確にすることが、使命であると考えている。

謝辞

ミシガン大での博士研究員（フルブライト研究員）時代から始まったガングリオシド研究を今日まで発展できたことは、本文にお名前を述べさせていただいた多くの諸先輩のおかげであり、私の研究人生のさまざまな局面においての出会いに感謝の意を表します。また、最近10年間研究成果の多くは、研究代表者として行ったCREST研究領域：糖鎖の病態機能の解明と利用技術「2型糖尿病の新規な診断・治療技術の開発」（研究統括：谷口直之先生）の期間（2006年から2011年）に見いだされ、現在に至るまで進展させてきたものである。ここに、北海道大学時代そして現

在の職場での多くの共同研究者に深謝いたします。

引用文献

1. 山川民夫 (1981) 糖脂質物語 (講談社学術文庫)、講談社。
2. Inokuchi, J. & Radin, N.S. (1987) *J. Lipid Res.*, **28**, 565-571.
3. Ishii, A., Ohta, M., Watanabe, Y., Matsuda, K., Ishiyama, K., Sakoe, K., Nakamura, M., Inokuchi, J., Sanai, Y., & Saito, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 31652-31655.
4. Jennermann, R. & Gröne, H-J. (2013) *Prog. Lipid Res.*, **52**, 231-248.
5. Inokuchi, J. (2011) *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.*, **87**, 179-198.
6. Radin, N.S. & Inokuchi, J. (1988) *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2879-2886.
7. Radin, N.S. & Inokuchi, J. (1991) *Trends Glycosci. Glycotech.*, **3**, 200-213.
8. Radin, N. S., Shayman, J. A., & Inokuchi, J. (1993) *Adv. Lipid Res.*, **26**, 183-213.
9. 井ノ口仁一 (1998) 蛋白質 核酸 酵素, **43**, 2495-2502.
10. Lukina, E., Watman, N., Arreguin, E.A., Dragosky, M., Iastrebner, M., Rosenbaum, H., Phillips, M., Pastores, G.M., Kamath, R.S., Rosenthal, D.I., Kaper, M., Singh, T., Puga, A.C., & Peterschmitt, M.J. (2010) *Blood*, **116**, 893-899.
11. Poole, R.M. (2014) *Drugs*, **74**, 1829-1836.
12. Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I-H., Zhang, J., Siegel, C., Komarnitsky, S., Yew, N.S., & Chen, S.H. (2007) *Diabetes*, **56**, 1210-1218.
13. Natoli, T.A., Smith, L.A., Rogers, K.A., Wang, B., Komarnitsky, S., Budman, Y., Belenky, A., Bukanov, N.O., Dackowski, W.R., Husson, H., Russo, R.J., Shayman, J.A., Ledbetter, S.R., Leonard, J.P., &

- Ibraghimov-Beskrovnaya, O. (2010) *Nat. Med.*, **16**, 788-792.
14. Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I.H., Zhang, J., Maniatis, P., Pacheco, J., Piepenhagen, P., Copeland, D., Arbeeny, C., Shayman, J.A., Aerts, J.M., Jiang, C., Cheng, S.H., & Yew, N.S. (2009) *Hepatology*, **50**, 85-93.
15. Wennekes, T., van den Berg, R.J.B.H.N., Boot, R.G., van der Marel, G.A., Overkleeft, H.S., & Aerts J.M.F.G. (2009) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 8848-8869.
16. Inokuchi, J., Momosaki, K., Shimeno, H., Nagamatsu, A., & Radin N. S. (1989) *J. Cell. Physiol.*, **141**, 573-583.
17. Inokuchi, J., Usuki S., & Jimbo, M. (1995) *J. Biochem.*, **117**, 766-773.
18. Usuki, S., Hamanoue, M., Kosaka, S., & Inokuchi, J. (1996) *J. Neurochem.*, **67**, 1821-1830.
19. Igarashi, K., Furuse, H., Fujii, S., Ito, K., Kaneko, K., Kato, H., Waki, H., Ando, S., & Inokuchi, J. (2002) *Glycobiology*, **12**, 339-344.
20. Yamagishi, K., Ohgami, Y., Iwasaki, K., Jimbo, M., Masuda, H., Fujiwara, M., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2003) *Eur. J. Pharmacol.*, **462**, 53-60.
21. Inokuchi, J. (2009) *Int. Rev. Neurobiol.*, **85**, 319-336.
22. Inokuchi, J., Jimbo, M., Kumamoto, Y., Momosaki, K., Shimeno, H., & Nagamatsu A. (1993) *Clin. Exp. Metastasis*, **11**, 27-36.
23. Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., Nishijima, M. (2003) *Nature*, **426**, 803-809.
24. D' Angelo, G., Polishchuk, E., Di Tullio, G., Santoro, M., Di Campli, A., Godi, A., West, G., Bielawski, J., Chuang, C.C., van der Spoel, A.C., Platt, F.M., Hannun, Y.A., Polishchuk, R., Mattjus, P., & De Matteis, M.A. (2007) *Nature*, **449**, 62-67.
25. D' Angelo, G., Uemura, T., Chuang, C.C., Polishchuk, E., Santoro, M., Ohvo-Rekilä, H., Sato, T., Di Tullio, G., Varriale, A., D' Auria, S., Daniele, T., Capuani, F., Johannes, L., Mattjus, P., Monti, M., Pucci, P., Williams, R.L., Burke, J.E., Platt, F.M., Harada, A., & De Matteis, M.A. (2013) *Nature*, **501**, 116-120.
26. Giraud, C.G. & Maccioni, H.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 40262-40271.
27. Uemura, S., Yoshida, S., Shishido, F., & Inokuchi J. (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**, 3088-3100.
28. Uemura, S., Shisido, F., Kashimura, M., & Inokuchi, J.(2015) *Glycobiology* in press.
29. Uemura, S., Kurose, T., Suzuki, T., Yoshida, S., Ito, M., Saito, M., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2006) *Glycobiology*, **16**, 258-270.
30. Hotamisligil, G.S. , Schargill, N.S., & Spiegelman, B.M. (1993) *Science*, **259**, 87-91.
31. Tagami, S., Inokuchi, J., Kabayama, S., Yoshimura, H., Kitamura, F., Uemura, S., Ogawa, C., Ishii, A., Saito, M., Ohtsuka, Y., Sakaue, S., & Igarashi Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 3085-3092.
32. Nagafuku, M., Sato, T., Sato, S., Shimizu, K., Taira T., & Inokuchi, J. (2015) *Glycobiology*, **25**, 303-318.
33. Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Lobero, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13678-13683.

34. Inokuchi, J. (2007) YAKUGAKU ZASSHI, 127, 579-586.
35. Inokuchi, J. (2010) FEBS Lett., 584, 1864-1871.
36. Inokuchi, J. (2014) Glycoconj. J., 31, 193-197.
37. 井ノ口仁一 (2013) 実験医学、31, 1566-1573.
38. Feve, B. (2005) Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 19, 483-499.
39. Inokuchi, J. (2015) Sugar Chains (Suzuki, T., et al., eds) , pp.219-234, Springer.
40. Grundy, S.M. (2006) Nat. Rev. Drug. Discov., 5, 295-309.
41. Senn, H.J., Orth, M., Fitzke, E., Wieland, H., & Gerok, W. (1989) Eur. J Biochem., 181, 657-662.
42. Sato, T., Nihei, Y., Nagafuku, M., Tagami, S., Chin, R., Kawamura, M., Miyazaki, S., Suzuki, M., Sugawara, S., Takahashi, Y., Saito, A., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2008) *Obes. Res. Clin. Prac.*, 2, 231-238.
43. Veillon, L., Go, S., Matsuyama, W., Suzuki A., Nagasaki, M., Yatomi, Y., & Inokuchi, J. (2015) *PLoS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.0129645
44. Fooksman, D. R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D. A., Waite, J., Sacristán, C., Victora, G. D., Zanin-Zhorov, A., & Dustin, M. L. (2010) *Annu. Rev. Immunol.*, 28, 79-105.
45. Kovacs, B., Maus, M. V., Riley, J. L., Derimanov, G. S., Koretzky, G. A., June, C. H., & Finkel, T. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15006-15011.
46. Gómez-Mouton, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., Gallardo, E., Jiménez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Mañes, S., & Martínez-A, C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9642-9647.
47. Nagafuku, M., Okuyama, K., Onimaru, Y., Suzuki, A., Odagiri, Y., Yamashita, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Takayanagi, M., Ohno, I., & Inokuchi, J. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, E336-E342.
48. Shalaby, K. H. & Martin, J. G. (2010) *Curr. Opin. Pharmacol.*, 10, 218-225.
49. Lloyd, C. M. & Hessel, E. M. (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10, 838-848.
50. Zhu, Y., Gumlaw, N., Karman, J., Zhao, H., Zhang, J., Jiang, J. L., Maniatis, P., Edling, A., Chuang, W. L., Siegel, C., Shayman, J. A., Kaplan, J., Jiang, C., & Cheng, S. H. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 14787-14794.
51. Tsukuda, Y., Iwasaki, N., Seito, N., Kanayama, M., Fujitani, N., Shinohara, Y., Kasahara, Y., Onodera, T., Suzuki, K., Asano, T., Minami, A., & Yamashita, T. (2012) *PLoS ONE*, 7, e40136.
52. Inokuchi J, Nagafuku M, Ohno I., & Suzuki A. (2013) *Cell. Mol. Life Sci.*, 70, 3067-3075.
53. Nagafuku, M. & Inokuchi, J. (2013) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 25, 159-169.
54. Inokuchi, J., Nagafuku, M., Ohno, I., & Suzuki, A. (2015) *Biochim. Biophys. Acta*, 1851, 98-106.
55. Karman, J., Tedstone, J.L., Nathan K. Gumlaw, N.K., Zhu, Y., Nelson Yew, N., Craig Siegel, C., Shuling Guo, S., Siwkowski, A., Ruzek, M., Jiang, C., & Cheng, S.H. (2010) *Int. Immunol.* 22, 593-603.
56. Xu, Y-H., Barnes, S., Ying Sun, Y., & Grabowski, G.A. (2010) *J. Lipid Res.*, 51, 1643-1675 .
57. Yoshikawa, M., Go, S., Suzuki, S., Suzu-

- ki, A., Morlet, T., Strauss, K., Fujiwara, M., Iwasaki, K., & Inokuchi, J. (2015) *Hum. Mol. Genet.*, **24**: 2796-2807.
58. Yamashita, T., Wu, Y.P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J.M., Dupree, J.L., Geyer, R., Sandhoff, K., & Proia, R.L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2725-2730.
59. Yoshikawa, M., Go, S., Takasaki, K., Kakazu, Y., Ohashi, M., Nagafuku, M., Kabayama, K., Sekimoto, J., Suzuki, S., Takaiwa, K., Kimitsuki, T., Matsumoto, N., Komune, S., Kamei, D., Saito, M., Fujiwara, M., Iwasaki, K., & Inokuchi, J. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9483-9488.
60. Kawai, H., Allende, M.L., Wada, R., Kono, M., Sango, K., Deng, C., Miyakawa, T., Crawley, J.N., Werth, N., Bierfreund, U., Sandhoff, K., & Proia, R.L. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 6885-6888.
61. Simpson, M.A., Cross, H., Proukakis, C., Priestman, D.A., Neville, D.C., Reinke-meier, G., Wang, H., Wiznitzer, M., Gurtz, K., Verganelaki, A., Pryde, A., Patton, M.A., Dwek, R.A., Butters, T.D., Platt, F.M., & Crosby, A.H. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 1225-1229.
62. Farukhi, F., Dakkouri, C., Wang, H., Wiznitzer, M., & Traboulsi, E.I. (2006) *Ophthalmic Genet.*, **27**, 89-91.
63. Abe, A., Radin, N.S., Shayman, J.A., Wotring, L.L., Zipkin, R.E., Sivakumar, R., Ruggieri, J.M., Carson, K.G., & Ganem, B. (1995) *J. Lipid Res.*, **36**, 611-621.
64. Abe, A., Gregory, S., Lee, L., Killen, P.D., Brady, R.O., Kulkarni, A., & Shayman, J.A. (2000) *J. Clin. Invest.*, **105**, 1563-1571.
65. Jimbo, M., Yamagishi, K., Yamaki, T., Nunomura, K., Kabayama, K., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2000) *J. Biochem.*, **127**, 485-491.

糖鎖生物学の第二幕の幕開け：

β 4-ガラクトース転移酵素5を介した糖脂質の機能探索

Standing at the Second Stage of Glycobiology: Elucidation of Biological Functions of β 4-Galactosyltransferase 5-Mediated Products

古川 清*

Kiyoshi FURUKAWA

1. はじめに

糖鎖の生合成に関して "one enzyme-one glycosidic linkage" 説が唱えられてきたが、糖鎖遺伝子（糖鎖の生合成に関与する酵素をコード）がクローニングされ、その基質特異性が明らかになるにつれ、複数の酵素が一つのグリコシド結合の形成に関与しているケースが見出されてきた。私達は β 4-ガラクトース転移酵素（ β 4GalT）の精製を通して、この酵素には複数のタンパク質が存在する可能性を見出した [1]。しかしながら膜タンパク質の精製という手法で複数の酵素の存在を証明することは難しく、すでに遺伝子が単離されていた β 4GalTに関して東大医科研の岩倉洋一郎先生のグループが作製した β 4GalTノックアウトマウスの臓器や血清からの糖タンパク質を解析し、N-型糖鎖に肺炎双球菌の β 4-ガラクトシダーゼで分解される構造が残存することを見出した [2]。同時に、アムステルダム自由大学医学部のvan den Eijnden先生と共同研究を行い、 β 4GalTと糖受容体を競合する β 4-N-アセチルグルコサン転移酵素の両遺伝子間で保存されている配列をプライマーとして用い、ヒト乳癌細胞株（MRK-nu-1細胞）のcDNAライブラリーを作製して

3'-RACE/5'-RACEを行い、大元の β 4GalTとアミノ酸レベルで37%の相同性をもつ遺伝子を単離し、 β 4GalT2と命名した [3]。In vitroで酵素を発現させ、分岐側鎖をもつオリゴ糖を基質として酵素活性を測定すると、GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 2)Manへのガラクトース転移活性が見られ、 β 4GalT2は高分岐糖鎖のガラクトシル化を行う酵素と考えた [3]。しかしながら、in vitroでは β 4GalT2はO-型糖鎖のガラクトシル化も行い、またグルコシルセラミド（Glc-Cer）へガラクトースを転移シラクトシルセラミド（Lac-Cer）を合成できることも見出した [4, 5]。私達はこれをin vitroにおけるartifactと考え、 β 4GalT2がin vivoで何をしているかを明らかにしない限り、この酵素の生理的な機能を解明できないと判断した。さらに時を同じくして、 β 4GalTには相同性を有する複数の酵素の遺伝子がいわゆるホモロジークローニング（コンピュータクローニング）で単離され、2000年の段階で7つの酵素が存在することが明らかになり、大元の酵素から相同性が高い順に番号をつけ、その結果私達の酵素は5番となり、 β 4GalT2から β 4GalT5へ名称を変更した（図1）[総説6参照]。

* 長岡技術科学大学 名誉教授/野口研究所 学術顧問

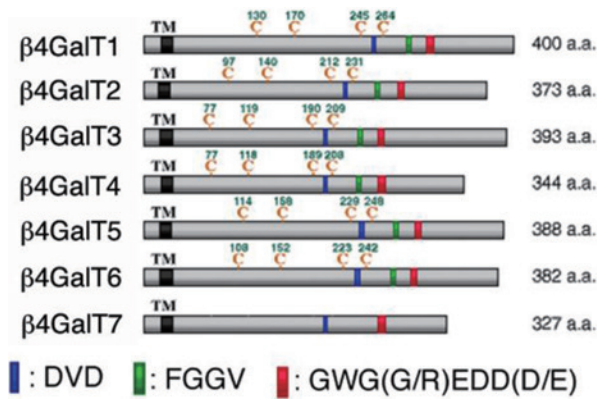


図1 ヒト $\beta 4\text{GalT}$ ファミリーのタンパク質の模式図。個々の酵素において■は膜貫通領域(TM)、青・緑・赤色の領域はファミリーで保存されている領域を示す。文献6より改変して掲載。

2. $\beta 4\text{GalT5}$ の真の基質を求めて

1) $\beta 4\text{GalT5}$ ノックアウトマウスの表現型の解析

N-型糖鎖、O-型糖鎖、糖脂質へガラクトースを転移する $\beta 4\text{GalT5}$ の真の基質を解明するため、私達は $\beta 4\text{GalT5}$ のノックアウトマウスを作製し、その臓器における複合糖質の解析を行うことで解決しようと試みた。共同研究でこのKOマウスの作製に取り組み進行している中で、NIHのプロジェクトですでに $\beta 4\text{GalT5}$ のKOマウスが作製され市販されていることを知った。私達がKOマウスを作製する迄にはさらに少なくとも半年から1年を要すると思われたので、NIHからこのマウスを購入し解析した。 $\beta 4\text{GalT5}^{+/-}$ のオスとメスを交配すると、 $\beta 4\text{GalT5}$ のホモ個体は生まれてこないことから、 $\beta 4\text{GalT}^{-/-}$ のマウスは胎生致死と判断した。そこで体外受精を行い、*in vitro*で胚の発生を解析すると、胚盤胞はメンデルの法則に従いほぼ $+/+ : +/- : -/- = 1 : 2 : 1$ の割合で存在した。即ち、ホモ個体も胚盤胞期まで発生できることが判明した。そこで着床する段階でホモ胚の有無を解析すると、胎生10.5日では胚を検出できるが胎生11.5日では出来ないことから(表1)、

$\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ マウスは胎生中期で致死となることが判明した[7]。この胎児を解析すると、正常胚から2日ほど発生が遅延していること、細胞同士や細胞のマトリクスへの接着能が著しく低下していることから、細胞間接着の異常による器官形成不全が胎生致死の一因であると考えられる(図2)(論文投稿準備中)。

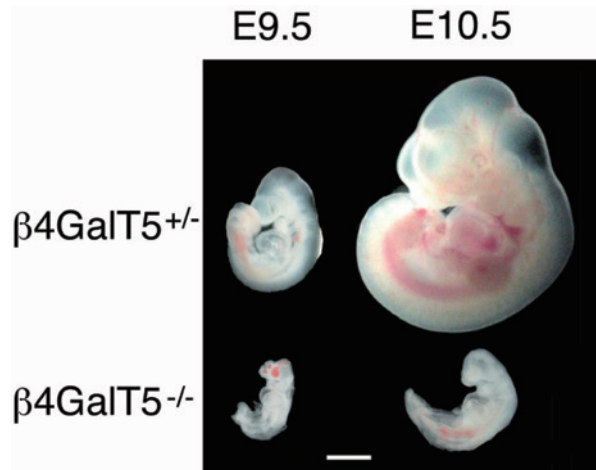


図2 $\beta 4\text{GalT5}^{+/-}$ マウス胚と $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ マウス胚の胎生中期における形態。下線の目盛りは1mm長を示す。文献7より改変して掲載。

発生段階	$\beta 4\text{GalT5}$ 遺伝子型		
	+/+	+/-	-/-
E8.5	2	9	3
E9.5	2	13	6
E10.5	3	9	2
E11.5	3	10	0

表1 発生段階の異なるマウス着床胚の $\beta 4\text{GalT5}$ 遺伝子型の解析。数値は各発生段階の妊娠マウス2匹の胎児の数を示す。文献7より改変して掲載。

2) MEF細胞を用いた複合糖質の解析

$\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ マウスは胎生致死であること、この胎児は著しい成長遅延を起こしていることから、胎児を直接生化学的に解析する

ことは困難であった。そこでマウス胎児から繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast: MEF) を調製し、細胞における糖タンパク質や糖脂質を解析することにした。その結果、 $\beta 4\text{GalT5}^{+/+}$ 、 $\beta 4\text{GalT5}^{+/-}$ 、 $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ -マウス由来のMEF細胞ではN-型糖鎖やO-型糖鎖の発現パターンに変化はみられなかったが、糖脂質のLac-Cerやそれから派生するGM3の発現量が $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ -マウス由来のMEF細胞で著しく低下、消失していることが判明した (図3)。さらにこのMEF細胞を酵素源とすると、Glc-Cerへのガラクトースの転移酵素活性は対照の正常MEF細胞の1/10以下であった。以上の結果から、 $\beta 4\text{GalT5}$ はLac-Cer合成酵素であると結論づけられた [8]。

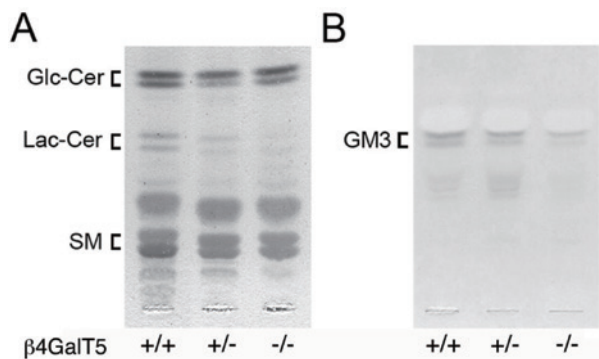


図3 MEF細胞の糖脂質の発現パターン。脂質画分を $\beta 4\text{GalT5}^{+/+}$ 、 $\beta 4\text{GalT5}^{+/-}$ 、 $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ -MEF細胞から調製し、その成分を薄層クロマトグラフィーにより分離し、発色剤により検出 (A: 中性脂質、B: 酸性脂質)。文献8より改変して掲載。

ヒト $\beta 4\text{GalT5}$ の遺伝子をクローニングし、その基質特異性を解明するまでに、実に10年余りの歳月がかかってしまった。本遺伝子をクローニングした翌年には細胞が癌化すると $\beta 4\text{GalT5}$ の遺伝子発現が増大することを見出しており [9, 10]、この変化が糖タンパク質糖鎖のガラクトシル化の変化を産み出す原動力であるのかどうか、あるいはガングリオシド

系列の糖脂質の発現に関与するのかどうか、極めてやきもちする日々を過ごさざるを得なかった。この間、 $\beta 4\text{GalT5}$ の基質特異性の確立を待たずに見切り発車で研究をしていたグループから、本酵素の機能に関して誤った結論とそれを報告する多数の論文がでてしまったことはとても残念である。酵素を扱う時には、必ず酵素が関与する最終産物である糖鎖の構造変化や発現の変化を明確に示すことが必須であることを復唱したい。

3. 細胞の癌化と $\beta 4\text{GalT5}$ の遺伝子発現の変化

細胞が癌化するとタンパク質や脂質に結合した糖鎖の構造が変化することは、1960-70年代における研究で正常細胞と癌細胞におけるレクチンの反応性の変化や [11, 12]、放射性同位元素で代謝標識した糖ペプチド (細胞膜タンパク質をプロナーゼ処理して得られた消化物) のゲル濾過カラムクロマトグラフィーでの溶出パターンの変化として捉えられていた [13, 14]。この変化の実体を白日の下に曝したのは、N-型糖鎖の構造解析法を確立した木幡陽先生 (現、野口研究所) のグループであり、また糖鎖の完全メチル化分析法を確立した箱守仙一郎先生 (米国ワシントン大学) のグループであった。糖鎖の構造が解析されて初めて細胞の癌化の実体が明らかとなり、N-型糖鎖やO-型糖鎖は分岐が促進され (糖鎖の高分岐化) [15-17]、かつ糖脂質糖鎖は短くなり (糖鎖不全)、より単純なガングリオシド系列の糖鎖をもつ脂質が増えることが明らかとなった [18]。ところで糖鎖を構成する個々の糖のなかでガラクトース (Gal) はガレクチン等と結合することで細胞の増殖や分化の制御に関与し [19]、また細胞接着に関与する糖鎖抗原が発現する土台となり (図4) [総説6参照]、極めて重要な役割を果たしている。従ってER-Golgi内でガラクトースを転移する酵素の発現は細胞の機能にとり重要であり、私達はNIH3T3細胞とそ

れをポリオーマウイルスのミドルT抗原遺伝子で癌化させたMTAg細胞 [20] で $\beta 4\text{GalT}1$ から $\beta 4\text{GalT}6$ の遺伝子発現を解析し、 $\beta 4\text{GalT}5$ 遺伝子の発現が有意に増大すること

を見出した。しかしながら、後述するもう一つのLac-Cer合成酵素である $\beta 4\text{GalT}6$ 遺伝子の発現には変化は見られなかった(図5) [9]。

4. $\beta 4\text{GalT}5$ と $\beta 4\text{GalT}6$ の機能の違いは？

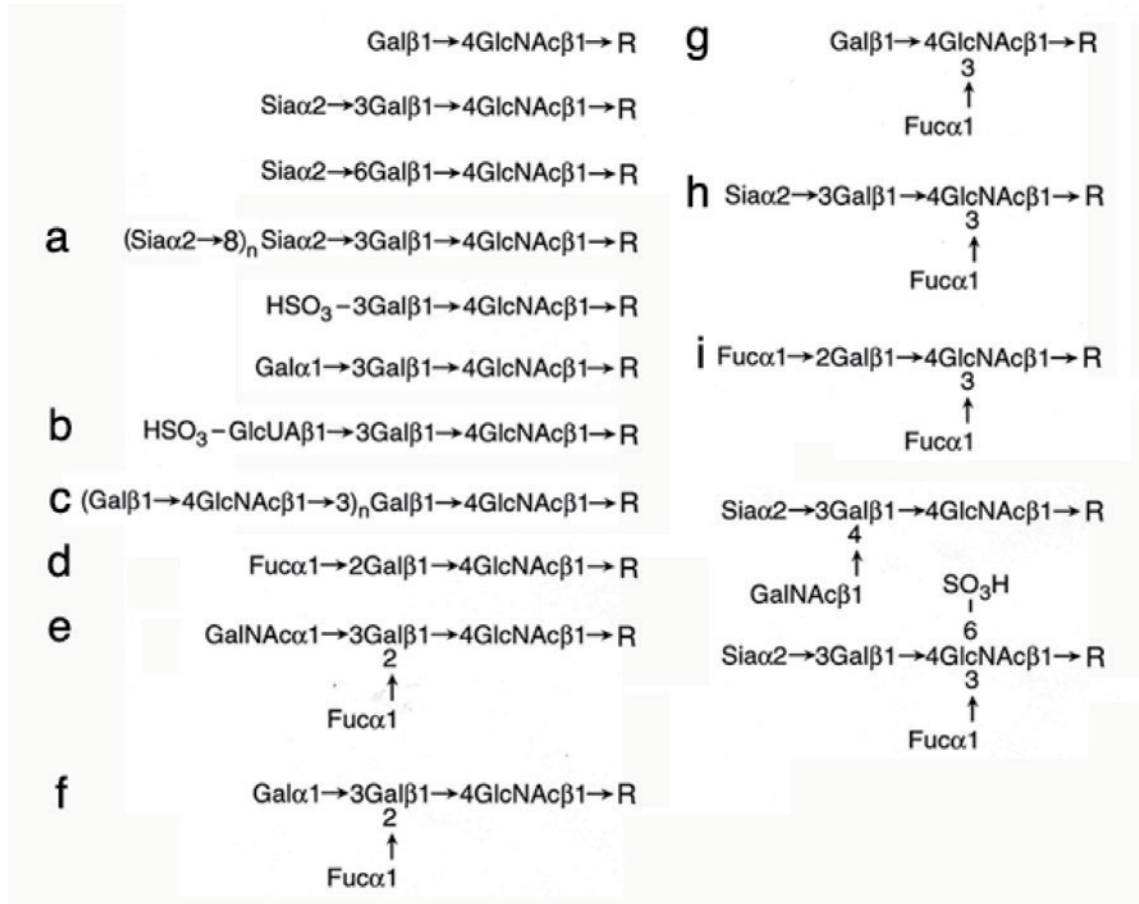
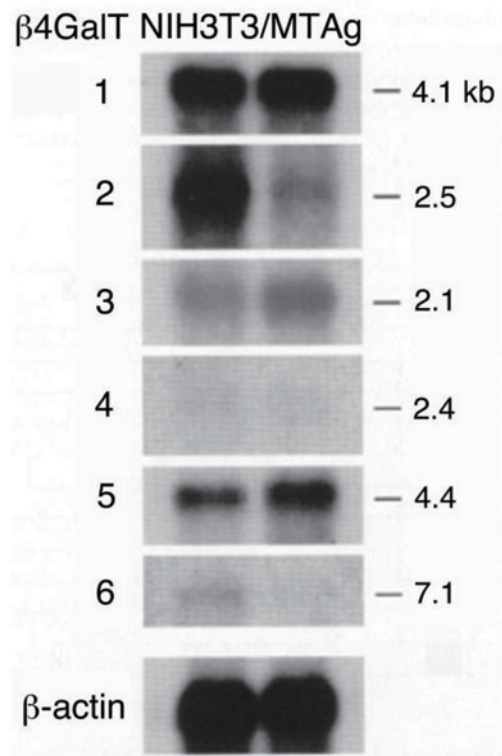


図4 糖タンパク質や糖脂質に発現する多様な糖鎖抗原。多様な糖鎖抗原がN-型糖鎖、O-型糖鎖、ネオラクト系列の糖脂質に発現する。a: ポリシアル酸、b: HNK抗原、c: ポリ-N-アセチルラクトサミン、d: O型抗原、e: A型抗原、f: B型抗原、g: Le^x 抗原、h: シアリル Le^x 抗原、i: Le^y 抗原、j: Lac-Cer、k: ペプチド-グリコサミノグリカン架橋領域 ($\beta 4\text{GalT}7 = \text{GalTI}$ が関与)。文献6より改変して掲載。

図5 NIH3T3細胞とMTAg細胞における $\beta 4\text{GalT}1$ -6の遺伝子の発現レベル。Poly (A)⁺ RNAを含むブロットを [32p] で標識したマウス $\beta 4\text{GalT}1$ -6 cDNA断片あるいは β -actin cDNA断片を用いて解析。転写産物のサイズはMTAg細胞の右列に表記。文献9より改変して掲載。



β 4GalTは複数のドメインを有するファミリーから構成され、大元の酵素をベースとして、相同性が高い順番に番号を賦与してある [6]。これらの酵素の基質特異性や癌細胞での挙動に関しては、私達の総説を参照にして欲しい [21, 22]。ここで特筆すべき点は、 β 4GalT6はもともとLac-Cer合成酵素としてラット脳から精製され、その遺伝子が単離されてきた酵素であるということである [23]。興味深いことに、*in vitro*でLac-Cerを合成する比活性を比較すると、 β 4GalT5のほうが β 4GalT6よりも高い [5]。また β 4GalT6ノックアウトマウスは見かけ上正常であり [24]、 β 4GalT6と β 4GalT5で合成されるLac-Cerに一体どのような機能の違いがあるのか（あるいは全くないのか）に、大いに興味をもっている。実は糖脂質の脂質部分に関しても鎖長や飽和・不飽和を含めた構造多様性が存在しており、これらの酵素はそうした構造の違いを基質として識別しているのかもしれない。しかし β 4GalT5や β 4GalT6がER/Golgiでガラクトースを付加するとき、糖受容体であるGlc-CerのCer部分の大半は膜内に埋もれており、果たして酵素がCer部分の構造多様性を認識できるかどうかは疑問である。疑問ではあるが、常識を打ち破り新たな考えを得るためには上記の疑問に対する答え（実験結果を得ること）は必要である。またマウスとラットの幾つかの臓器で β 4GalT5と β 4GalT6の遺伝子発現をみると、マウスの臓器では β 4GalT5遺伝子の発現は普遍的に見られるが β 4GalT6遺伝子の発現は限られた臓器でしか見られず [3, 25]、一方ラットでは β 4GalT6遺伝子の発現が β 4GalT5遺伝子より高く、Lac-Cerの合成に β 4GalT6が主として関与している可能性が考えられる（未発表データ）。ひょっとすると β 4GalT5と β 4GalT6は、単に種により使い分けられているだけかもしれない。しかし、この問題をもう少し面白くしている現象があり、それ

は多発性硬化症（中枢性脱髄性疾患）のモデルマウスの炎症部位では β 4GalT6によるLac-Cerの合成が亢進し、これが炎症を促進するという報告である [26]。マウスの脳では β 4GalT5も発現しており、かつマウスでは β 4GalT5が β 4GalT6より機能しているにも係らず（ β 4GalT5ノックアウトマウスは胎生致死であるのに対して β 4GalT6ノックアウトマウスは見かけ上は正常）、なぜ脱髄性炎症部位で β 4GalT6によるLac-Cerの合成が亢進するのか、極めて興味深い。まずこのLac-Cerは β 4GalT5が合成するものと質的に異なるのか、あるいは単に炎症部位における β 4GalT5と β 4GalT6の遺伝子発現制御が異なるためであるのか、この現象は2つの酵素の機能の相違を見極める材料を提供するとともに、糖鎖の複雑な発現制御と階層性をもった糖鎖機能が存在することを示しており、私達はすでに『糖鎖生物学の第二幕に立っている』と感じざるを得ない。

5. β 4GalT5遺伝子の発現レベルと腫瘍形成能の相関

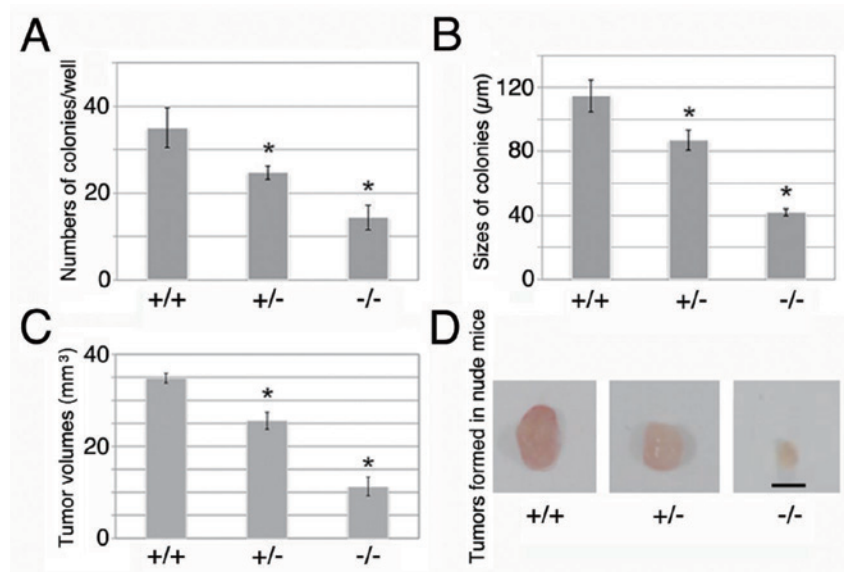
さて細胞が癌化するとLac-Cer合成酵素のうち、 β 4GalT5の遺伝子発現が増大する [9]。ヒトの種々の癌細胞でも β 4GalT5の遺伝子発現はN-型糖鎖に高分岐化を誘導し悪性度のマーカーとなっているN-アセチルグルコサミン転移酵素Vの遺伝子発現レベルと正の相関を示し、幾つかの癌細胞で共通にみられる [10]。さらにヒト大腸癌の癌部と非癌部を比較しても、癌部で β 4GalT5遺伝子の発現が数倍高いことが報告されている [27]。細胞の癌化に伴い β 4GalT5遺伝子の発現が増大する生物学的な意味を解明するため、培養細胞の中で悪性度が高いB16-F10マウスメラノーマ細胞へアンチセンスcDNAを導入し（siRNAではうまく抑制できなかった）、 β 4GalT5遺伝子の発現を抑制した細胞株を複数樹立した。これらの細胞をC57BL/6マウ

スの皮下へ移植し腫瘍形成能を解析すると、 $\beta 4\text{GalT5}$ 遺伝子の発現抑制レベルと腫瘍形成能の抑制レベルに正の相関が見られた。またマウス尾静脈へ癌細胞を注入し肺への結節の形成（転移能）を解析すると、同様に $\beta 4\text{GalT5}$ の遺伝子発現が低ければ低いほど、肺での結節の数とその大きさが抑制されることが判明した [28]。この現象をより明確に示すため、 $\beta 4\text{GalT5}^{+/+}$ 、 $\beta 4\text{GalT5}^{+/-}$ 、 $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ -MEF細胞へポリオーマウイルスのミドルT抗原遺伝子（癌遺伝子）を導入しこれらの細胞を形質転換させ、形質転換の有無とその悪性度を足場非依存的な増殖を測定するソフトアガーでのコロニー形成能と出来たコロニーの数と大きさ、さらにヌードマウス皮下での腫瘍形成能を解析した。その結果、いずれのMEF細胞もコロニーを形成することができたが、コロニーの数と大きさと腫瘍形成能は $\beta 4\text{GalT5}$ 遺伝子のコピー数0, 1, 2個に比例することが判明した(図6)。即ち、癌細胞の造腫瘍能や転移能は $\beta 4\text{GalT5}$ の遺伝子発現のレベルと相関することが明確に示された [28]。この現象を飛躍して考え、正常細胞で $\beta 4\text{GalT5}$ 遺伝子の発現レベルを増大させたら増殖異常を起こすのではないかという妄想に襲われ、現在その解析を進めている。

ところで $\beta 4\text{GalT5}$ はLac-Cer合成酵素であ

り、Lac-Cerを出発物質としてラクト系列、ネオラクト系列、グロボ系列、イソグロボ系列、ガングリオ系列の多様な糖脂質が合成される [29]。そこで問題になるのが $\beta 4\text{GalT5}$ から合成されるLac-Cerが重要な働きをしているのか、あるいはそれから派生する様々な糖脂質が生物活性を有しているのかということである。これは極めて難しい課題であるが、糖脂質合成においてLac-Cerは中間体でありながら、全て他の糖脂質へ変換されることはなく、糖脂質の主要な組成の一つとして発現している。Lac-Cerは細胞質や細胞膜に存在しており、特に細胞膜では脂質ラフト（ミクロドメイン）に存在し細胞機能分子の働きを調節し、あるいは細胞膜の性質（膜の流動性など）を制御し、細胞内への情報伝達を制御していると考えられる。私達はこれを証明する一環として、 $\beta 4\text{GalT5}^{+/+}$ 、 $\beta 4\text{GalT5}^{+/-}$ 、 $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ -マウス由来のMEF細胞のフィブロネクチン（FN）への接着に注目した。前述したように $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ -マウス胚の組織化学的解析から、この胎児を構成する細胞では細胞間の接着異常が起きている可能性を見出している [30]。そこで前述のMEF細胞を用い、これらの細胞のFNへの接着能を解析すると、対照の $\beta 4\text{GalT5}^{+/+}$ -MEF細胞に対して $\beta 4\text{GalT5}^{+/-}$ -MEF細胞では多少

図6 癌遺伝子を導入したMEF細胞の造腫瘍能。
 $\beta 4\text{GalT5}^{+/+}$ 、 $\beta 4\text{GalT5}^{+/-}$ 、 $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ -MEF細胞へ癌遺伝子を導入し、ソフトアガロスゲル内で形成するコロニーの数 (A)、その大きさ (B)、ヌードマウス皮下に移植してできる腫瘍塊の大きさ (C)、切除した腫瘍の代表的な写真 (D)。下線の目盛りは5 mm長を示す。文献28より改変して掲載。



減少し、 $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ -MEF細胞で著しく低下していた。そこで $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ -MEF細胞をLac-Cerを含む培地で30分保温しLac-Cerを細胞に取り込ませた後にFNへの接着能を解析すると、その接着は有意に回復した。しかし、この実験にガングリオシドを加えて同様な実験を行っても、細胞のFNへの接着能に回復は見られなかった。細胞の外から加えた糖脂質は細胞膜に取り込まれ、やがてはエンドソームを介して細胞内へ取り込まれると考えられるが、上記の解析はLac-Cerを細胞に加えてから接着アッセイまで60分で完了させている。楽観的な解釈をすれば、加えたLac-Cerが細胞膜に取り込まれ脂質ラフトに集積し、そこで $\alpha 5\beta 1$ -インテグリンの機能を修飾してFNとの接着能を回復させ、同時に接着斑キナーゼを活性化した結果と考えられた。実際 $\beta 4\text{GalT5}^{-/-}$ -MEF細胞へLac-Cerを添加すると、FAKのリン酸化の亢進と細胞の伸展の増大が見られている(論文投稿準備中)。これらの予備的な結果を考え合わせると、 $\beta 4\text{GalT5}$ 遺伝子の発現増大は全体の糖脂質の組成を変えると同時に、細胞膜におけるLac-Cerの発現量を増大させ、そこでも機能している可能性が高い。従って、今後の大きな課題は細胞膜でLac-Cerはどんな働きしているのかを解明することである。興味深いことに、東北薬科大学の宮城妙子先生のグループは悪性度の高い癌細胞では中性シアリダーゼ(NEU3)の活性が高いことを報告している[31, 32]。このシアリダーゼは細胞表面のガングリオシドGM3を分解してLac-Cerを生じさせる。これらの癌細胞ではGM3が消失することで悪性度が高くなるのか、あるいは細胞膜に新たに生じた(増えた)Lac-Cerが悪性度を誘導するのかが焦点となる。

一方、細胞質に存在するLac-Cerに関しては、MAPK回路を活性化し、細胞の増殖を刺激することが知られている[33]。B16-F10細胞で $\beta 4\text{GalT5}$ 遺伝子の発現を抑制すると

MAPK回路を構成する情報分子の活性化レベルが一様に低下することから、癌細胞で増大したLac-Cerの一部はMAPK回路の活性化に関与していることが考えられる[28]。これまでの結果から、Lac-Cerの合成阻害剤が有効な抗癌剤となることは容易に想像されることと思う。このレビューではLac-Cerをマクロで扱ってきたが、脂質の構造には糖鎖と同様にミクロ不均一性があり、こうしたミクロな部分での細胞分化や癌性変化に特異性があるかもしれない。今後の分析が重要であることは言うまでもない。

6. 終わりに

哺乳動物細胞にはLac-Cerを合成する酵素 $\beta 4\text{GalT5}$ と $\beta 4\text{GalT6}$ の2つが存在する。 $\beta 4\text{GalT5}$ ノックアウトマウスは胎生致死となるが、 $\beta 4\text{GalT6}$ ノックアウトマウスは見かけ上正常で生まれてくる。また細胞が癌化すると $\beta 4\text{GalT5}$ 遺伝子の発現は増大するが、 $\beta 4\text{GalT6}$ 遺伝子の発現は変化しない。このように $\beta 4\text{GalT5}$ と $\beta 4\text{GalT6}$ はLac-Cerを合成するにもかかわらず、胚の形態形成や細胞の分化癌化への関与の仕方が著しく異なる。一方、脱髄性疾患では $\beta 4\text{GalT6}$ 遺伝子の発現が増大し、 $\beta 4\text{GalT6}$ で合成されるLac-Cerが炎症を促進することから、明らかに $\beta 4\text{GalT5}$ と $\beta 4\text{GalT6}$ の生命現象への係り方が異なる。ここに新たな糖鎖の機能(厳密に制御された機能の仕分け)が潜んでいると考えられ、糖鎖生物学の第二幕が開かれたと思う。1991年に恩師木幡陽先生が「糖鎖生物学時代の幕あけ」を宣言され[34]、それから四半世紀、分析技術の飛躍的な発展により複合糖質糖鎖の構造が容易に解析できるようになったこと、糖鎖遺伝子のクローニングと遺伝子ノックアウトマウスの表現型の解析から糖鎖機能の概要が判明したことを糖鎖生物学の第一幕として捉えてみたい。しかしながら、生体で作られる多くのタンパク質に糖鎖が結合し、

糖鎖の機能を一様に論ずることはできない。これまで通り地道に個々のケースで糖鎖の機能をさらに解明することと、それが細胞、組織、器官ひいては個体にとりどのような意味をもつのかを俯瞰的に捉えながら、そこに時間軸や空間軸を挿入して糖鎖機能を評価していくことが肝要であろう。そうした中で本論で述べた β 4GalT5と β 4GalT6で合成されるLac-Cerの機能の相違などを読み取れば、糖鎖機能の本質に辿りつけるのではないかと思われる。

7. 謝辞

これまでご指導をいただいていた寺山宏先生（東大院理）、Veer P. Bhavanandan先生（Pennsylvania State University）、Steve Roth先生（University of Pennsylvania）、木幡陽先生（東大医科研）、永井克孝先生（東大医）、山川民夫先生（都臨床研）に感謝を申し上げます。またこれまで研究の苦楽を共にしてきた学生諸君並びに共同研究者の皆様にも厚くお礼を申し上げます。

文献

1. Furukawa, K., and Roth, S. (1985) *Biochem. J.* **227**, 573-582.
2. Asano, M., Furukawa, K., Kido, M., Matsumoto, S., Umesaki, Y., Kochibe, N., and Iwakura, Y. (1997) *EMBO J.* **16**, 1850-1857.
3. Sato, T., Furukawa, K., Bakker, H., van den Eijnden, D. H., and Van Die, I. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 472-477.
4. van Die, I., van Tetering, A., Schiphorst, W., Sato, T., Furukawa, K., and van den Eijnden, D. H. (1999) *FEBS Lett.* **450**, 52-56.
5. Sato, T., Guo, S., and Furukawa, K. (2000) *Res. Commun. Biochem. Cell & Molec. Biol.* **4**, 3-10.
6. Furukawa, K., and Sato, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 54-66.
7. Kumagai, T., Tanaka, M., Yokoyama, M., Sato, T., Shinkai, T., and Furukawa, K. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 456-459.
8. Kumagai, T., Sato, T., Natsuka, S., Kobayashi, Y., Zhou, D., Shinkai, T., Hayakawa, S., and Furukawa, K. (2010) *Glycoconj. J.* **27**, 685-695.
9. Shirane, K., Sato, T., Segawa, K., and Furukawa, K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 434-438.
10. Sato, T., Shirane, K., Kido, M., and Furukawa, K. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 1019-1023.
11. Aub, J. C., Tieslau, C., and Lankester, A. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **50**, 613-619.
12. Inber, M., and Sachs, L. (1969) *Nature* **223**, 710-712.
13. Meezan, E., Wu, H. C., Black, P. H., and Robbins, P. H. (1969) *Biochemistry* **8**, 2518-2524.
14. Buck, C. A., Glick, M. C., and Warren, L. (1971) *Science* **172**, 169-171.
15. Yamashita, K., Ohkura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S. and Kobata, A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10834-10840.
16. Pierce, M. and Arango, J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 10772-10777.
17. Furukawa, K., Minor, J. E., Hargaty, J., and Bhavanandan, V. P. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 7755-7761.
18. Hakomori, S., and Murakami, W. T. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **59**, 254-261.
19. Tadokoro, T., Ikekita, M., Toda, T., Ito, H., Sato, T., Nakatani, R., Hamaguchi, Y., and Furukawa, K. (2009) *J. Biol. Chem.*

- 284, 35556-35563.
20. Asada, M., Furukawa, K., Segawa, K., Endo, T., and Kobata, A. (1997) *Cancer Res.* **57**, 1073-1080.
21. Furukawa, K. (2015) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **91**, 1-16.
22. Sato, T. and Furukawa, K. (2015) *In Glycoscience: Biology and Medicine* (Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G., Seeberger, P., and Wong, C-H., eds) , Springer-Verlag, Tokyo, pp. 1135-1139.
23. Nomura, T., Takizawa, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Wakisaka, E., Yoshizuka, N., Imokawa, G., Dohmae, N., Takio, K., Hattori, M., & Matsuo, N. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 13570-13577.
24. Tokuda, N., Numata, S., Li, X., Nomura, T., Takizawa, M., Kondo, Y., Yamashita, Y., Hashimoto, N., Kiyono, T., Urano, T., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2013) *Glycobiology* **23**, 1175-1183.
25. Lo, N.-W., and Shaper, J. H., Pevsner, J., and Shaper, N. L. (1998) *Glycobiology* **8**, 517-526.
26. Mayo, L., Trauger, S. A., Blain, M., Nadeau, M., Patel, B., Alvarez, J. I., Mascanfroni, I.D., Yeste, A., Kivisakk, P., Kallas, K., Ellezam, B., Bakshi, R., Prat, A., Antel, J. P., Weiner, H. L., and Quintana, F. J. (2014) *Nature Med.* **20**, 1147-1156.
27. Kolmakova, A., Rajesh, M., Zang, D., Pili, R., and Chatterjee, S. (2009) *Glycoconj. J.* **26**, 547-558.
28. Shirane, K., Kuji, R., Tareyanagi, C., Sato, T., Kobayashi, Y., Furukawa, S., Murata, T., Kubota, S., Ishikawa, Y., Segawa, K., and Furukawa, K. (2014) *Glycobiology* **24**, 532-541.
29. Nagai, Y. and Iwamori M. (1995) *In Biology of the Sialic Acids* (Rosenberg, A., ed.) , Plenum Press, New York, pp. 197-241.
30. Furukawa, K., Kumagai, T., Sato, T., and Kanno, R. (2011) *Glycoconj. J.* **28**, 207-208.
31. Miyagi, T., and Yamaguchi, K. (2012) *Glycobiology* **22**, 880-896.
32. Takahashi, K., Hosono, M., Sato, I., Hata, K., Wada, T., Yamaguchi, K., Nitta, K., Shima, H., and Miyagi, T. (2015) *Int. J. Cancer*, in press.
33. Bhunia, A. K., Han, H., Snowden, A. and Chatterjee, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10660-10666.
34. 木幡陽 (1991) 蛋白質核酸酵素 **36**, 775-788.

ヘビーフルオラス法による糖質合成

Carbohydrate synthesis using a heavy fluororous tag

糖鎖有機化学研究室 室長 水野真盛

Mamoru MIZUNO

1. はじめに

フルオラス (fluorous) とは「フッ素 (fluorine)」と「親～性=～ous」を基に創られた、「親フルオロカーボン性」のという意味の用語である。フッ素含量の高いフルオラス化合物はペルフルオロヘキサン等のフルオラス溶媒やフルオラスシリカゲルなどのフルオラスメディアに選択的に抽出され、通常の有機化合物はフルオラス環境中から排除される。1994年にHorváthらがこの性質を利用したFluorous Biphasic System (FBS) を提

唱し [1]、さらに1997年にCurranらによってフルオラス合成法 (フルオラストグ法) が固相合成法に匹敵する簡便な液相合成法として提唱された [2]。

フルオラス合成法は、反応後の精製方法の違いによりフルオラス固相抽出 (F-SPE) 法と、フルオラス液-液抽出 (F-LLE) 法の2種類に分類される (図1)。

F-SPE法とは、比較的小さなフルオラストグ (ライトフルオラストグ) を用いて、フルオラスシリカゲルによる固-液抽出により精

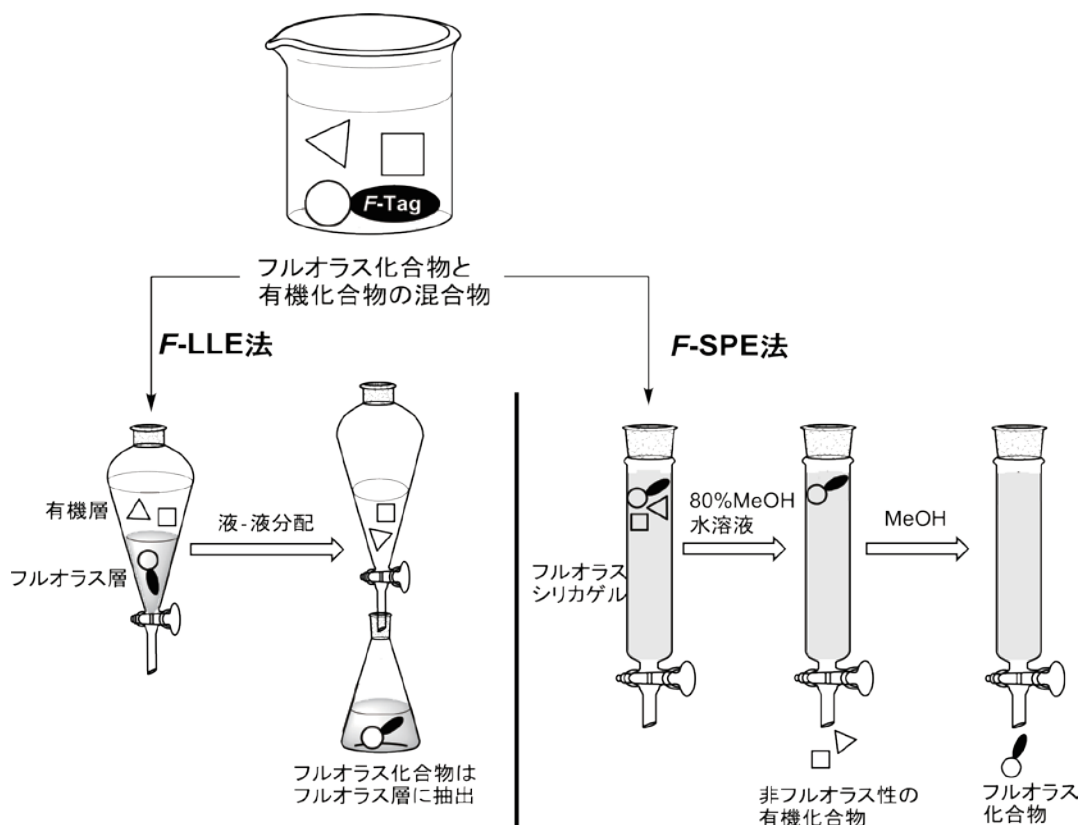


図1. フルオラス合成法 (F-LLE 法とF-SPE 法)

製を行う手法である [3]。一方F-LLE法とは重量比で40%以上のフッ素含量を有する分子サイズの大きなフルオラストグ (ヘビーフルオラストグ) を基質に導入し、反応後フルオラス溶媒と有機溶媒とを用いた液-液分配を行う。すると有機相には非フルオラス性の有機化合物が抽出され、フルオラス相にはフルオラス化合物のみが選択的に抽出される。合成後、フルオラストグを切り離し、目的化合物がえられる [2]。無論ライトフルオラストグをF-LLE法に、ヘビーフルオラストグをF-SPE法に用いることも可能である。このようにフルオラス法は液相法でありながら固相法に匹敵する効率的な合成手法として注目されている。フルオラス法は有機合成以外にも、触媒や生化学の分野等にも幅広く展開されており、成書 [4]、あるいは総説 [5] としてまとめられているので興味のある方は是非参考にしてほしい。

我々は「シリカゲルカラムクロマトグラフィー」による精製工程を極力省略することを目的とし、ヘビーフルオラストグを用いたF-LLE法による糖鎖合成手法の開発を行ってきた。本稿ではこれまでに野口研究所で行ってきたF-LLE法による糖質合成について述べる。

2. アシル型フルオラス保護基Bfp基による糖鎖合成

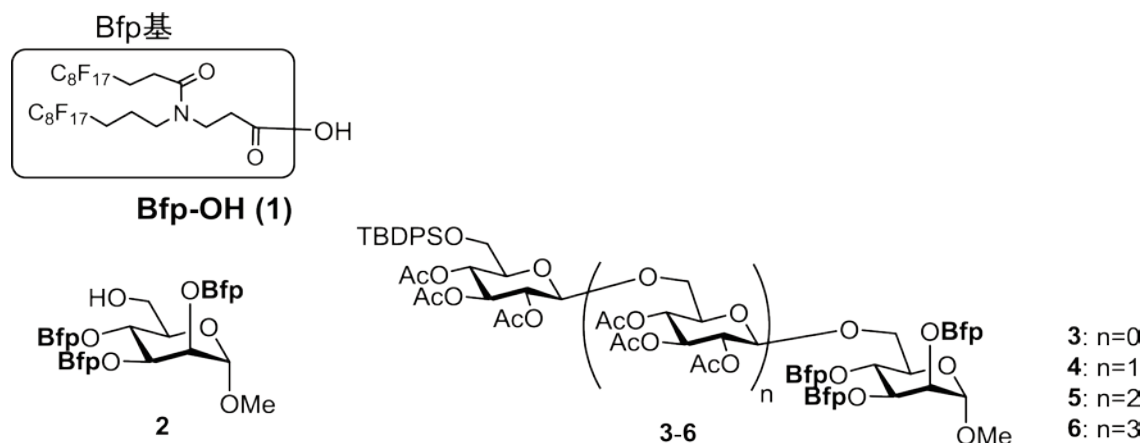
フルオラス合成法で重要になるのが合成の際に用いるフルオラストグである。野口研究所でフルオラス合成に着手した1999年当時、ベンジル型やシリル型のヘビーフルオラストグによるフルオラス合成が報告されていた [6-9]。野口研究所では糖鎖合成へのフルオラス法の展開を目指していたので、合成が容易かつ、高収率で糖水酸基への導入が可能な構造のヘビーフルオラストグの開発を行った。種々の構造を試行錯誤の結果、2本のperfluorooctyl鎖を有するアシル型フルオ

ラス保護基であるBfp基の開発に成功した。Bfp基の導入試薬であるBfp-OH (1) は合成が容易であり、さらに一般的なアシル型保護基と同様、高収率で糖水酸基に導入と除去が可能である [10]。

ところで、F-LLE法では合成する糖鎖が大きくなるとフルオラス相に分配されずに有機相へ分配されてしまうことが懸念される。そこで糖鎖の長さや分配効率の変化の関係を明らかにするため、以下の検討を行った。すなわち、Bfp基を3箇所を導入した単糖から五糖までの化合物2~6を合成し、それぞれの化合物についての分配効率をそれぞれ測定した。分配操作に用いた溶媒の組み合わせはフルオラス溶媒としてはFC-72を、有機溶媒としてはメタノールおよびトルエンを用いて検討を行った (図2)。

この結果より、フルオラス相への抽出限界は用いる有機溶媒によって大きく異なるが、溶媒の種類によってはフッ素含量が40%程度でも十分にフルオラス相へ分配されることが明らかになった。

次に、植物の分化・成長因子を考えられるアラビノガラクトタンパク質 (AGP) の構成成分である β -(1 \rightarrow 6)-ガラクトペンタオースの合成を行った (図3)。まず、ガラクトース誘導体6の2, 3, 4位の水酸基にBfp-OHをDCC-DMAP法により導入した。反応終了後、FC-72とトルエンの分配抽出によりFC-72相にBfp導入体を抽出した。以降の保護基の導入、除去、及びグリコシル化反応の精製は全てF-LLE法により行い、Bfp基の結合した β -(1 \rightarrow 6)-ガラクトペンタオース誘導体10の粗生成物を合成した。この段階で副生成物の蓄積が見られたためシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、化合物6から9工程、収率29% (1段階平均87%) で化合物10を得た。なお、9工程に要した時間は6日で、従来法 (12~14日) より大幅に短縮できた。更に脱保護操作を行い目的物であ



化合物	分配効率 (FC-72 / MeOH)	分配効率 ([FC-72 / PhMe)
2	>99 : 1	>99 : 1
3	99 : 1	90 : 10
4	98 : 2	79 : 21
5	95 : 5	69 : 31
6	94 : 6	3 : 97

図2. Bfp基保護フルオラス糖鎖のフルオラス相/有機相間の分配効率

る β - (1 \rightarrow 6) -ガラクトペンタオース11を合成することに成功した11)。なお、Bfp基はメチルエステル体 (Bfp-OMe) としてFC-72相から回収 (93%) された。

このように、ヘビーフルオラストグを用いたF-LLE法での合成は、反応工程は従来の液相法と同じなので反応時間に差はないが、精製工程において中間体の精製にカラムクロマトグラフィー精製を行わないので、従来の液相合成に比べ1/2 ~ 1/3の時間で済むことから、合成時間の短縮が可能である。

3. エーテル結合型ヘビーフルオラストグによる単糖ユニット、及び糖鎖合成

ペプチド合成は、原料となるアミノ酸誘導体が市販されているが、糖鎖合成の原料となる単糖ユニットは、近年少しずつではあるが市販される種類も増えてはきたが、それでも

依然用時調製が必要である。また糖のOH基は1級水酸基とヘミアセタール以外の2級水酸基は反応性にほとんど差がないことから位置選択的に保護基の着脱を行うには多段階、かつ多種類の反応が必要となる。従って糖鎖合成全体で見ると、脱保護・縮合の繰り返し反応である「グリコシル化反応」よりも、単糖ユニット合成のほうが時間と労力を要する律速工程になっている。そこで、糖鎖合成を効率的に行うには、糖と糖を結合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である。ここではF-LLE法による効率的な単糖ユニット合成について述べる。

まず、単糖ユニット合成は多種多様な反応条件 (酸性、塩基性、酸化、還元等) 下で行われるためタグの構造はこれらの条件下で安定である必要がある。さらに目的化合物をフル

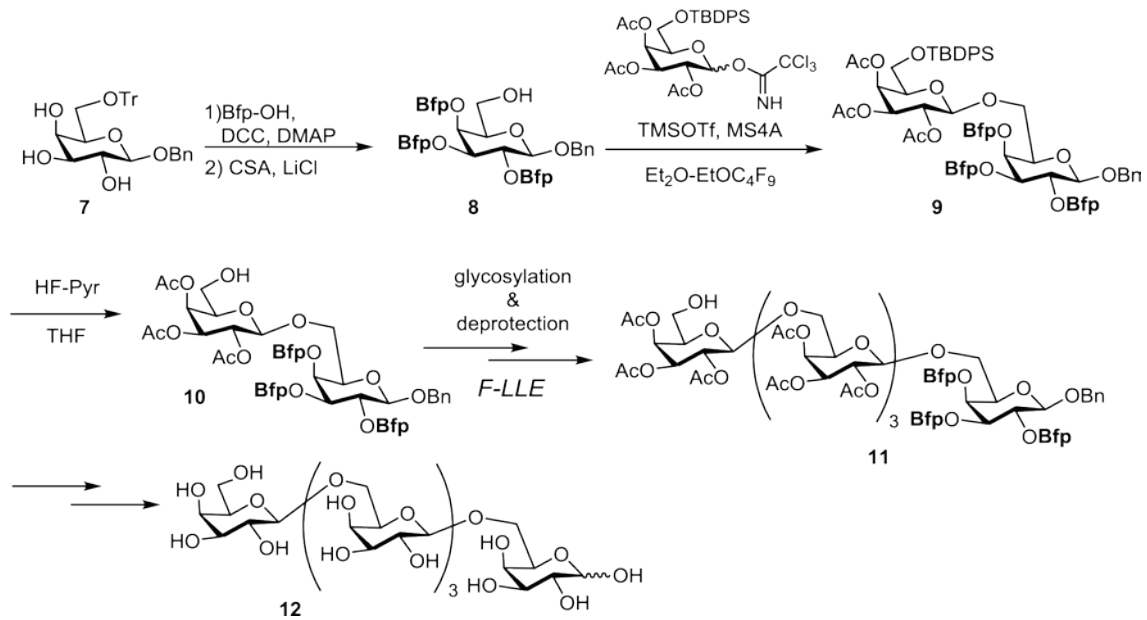


図3. Bfp基を用いたガラトペンタオースのフルオラス合成

オラス相へ十分分配できるフッ素含量とタグの合成の容易さも求められる。前述のBfpタグは、合成は容易だがタグ骨格中にアミド結合が複数存在するため、塩基性条件下や、水素化アルミニウムリチウムのような還元剤存在下ではアミド結合が反応してしまい、フルオラスタグの分解が懸念された。またアミド結合由来の配座異性体が存在するため、 $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルが複雑化してしまい、構造確認が容易でないことも問題であっ

た。そこで、化学的安定性（糖質合成に使用する反応条件下での）、合成の容易さ、十分なフッ素含量、 $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルの単純化を満たすフルオラスタグ構造について検討をした結果、エリスリトールを骨格とした「エーテル結合型フルオラスタグ」を合成した（図4）[12, 13]。本フルオラスタグの1級水酸基には種々のリンカーを導入でき、さらに合成後はリンカーを除去することでタグの再生・再利用が可能である。

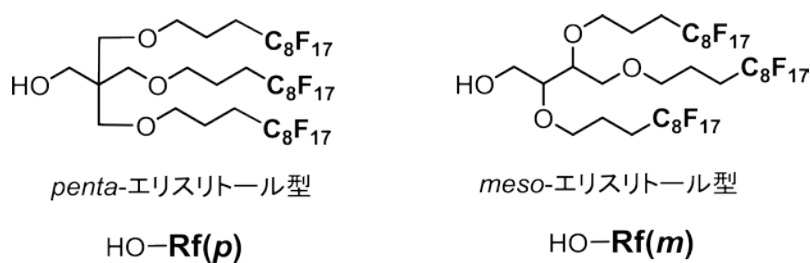
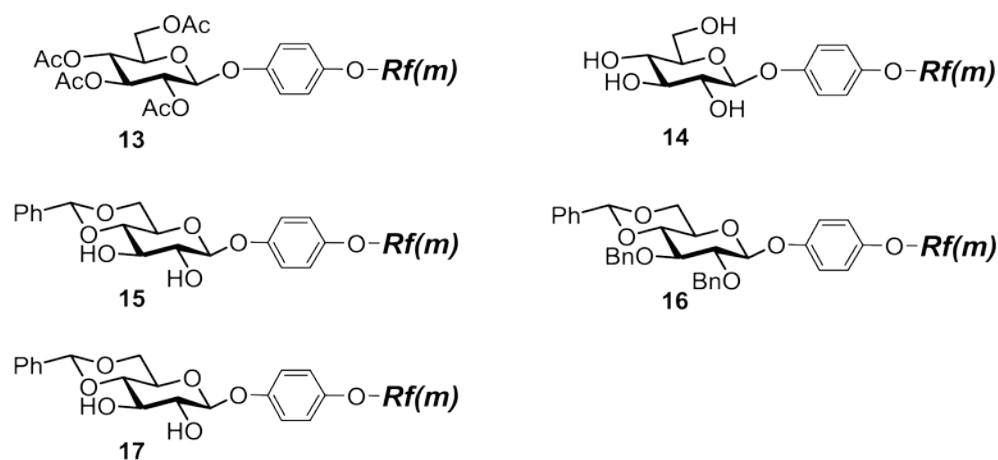


図4. エーテル結合型フルオラスタグ

得られたタグを用い、次に種々の単糖化合物のフルオラス相への分配効率について検討を行った。まずFC-72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、大部分の場合において

実用的ではない結果が得られた。これは各種単糖誘導体のFC-72への溶解性が低いことが影響を与えていると考えられた。そこで solvent turning¹⁴⁾の概念を応用し、FC-72に両親媒性フルオラス溶媒であるHFE-7100



entry	分配溶媒	13	14	15	16	17
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 / EtOH (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. 3本鎖フルオラスタグ含有単糖誘導体のフルオラス相/有機相間の分配効率

を添加した混合溶媒 (FC-72:HFE-7100=4:1) 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結果、アセトニトリルを有機溶媒とした場合、用いた全ての糖誘導体において実用的な分配効率が得られた (表1) [15]。

次に、パラ-アルコキシフェニル型、及ベンジル型リンカーを用いて単糖ユニット合成を行った。中間体は全て *F*-LLE でフルオラス相に分離され、最終工程後にシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製を行った。パラ-

アルコキシフェニル型フルオラスタグは糖の1位に容易に導入でき、さらに硝酸セリウム (IV) アンモニウム (CAN) 処理で選択的に除去され、1位遊離の単糖ユニットが得られる。また臭化亜鉛・臭化アセチル処理によりグリコシルブロミドにも容易に変換できる [12, 15] (図5)。

ベンジル型フルオラスタグは通常のベンジル基と同様に任意の水酸基へ導入でき、接触還元等で除去できる。例えば、dibutyltin Oxideを用いてガラクトースの3位水酸基に

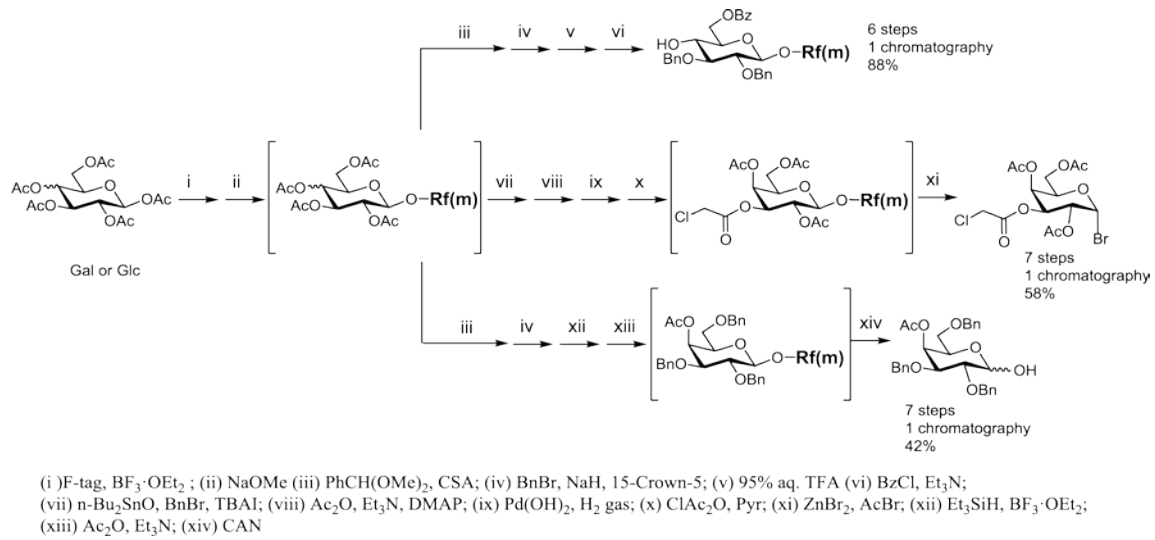


図5. パラ-アルコキシフェニル型リンカーを用いた単糖ユニット合成

導入した後、ユニット合成、グリコシル化を行い、最後に接触還元によりフルオラスタグの除去を行い、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、2糖誘導体を収率55% (8工程) で得た。またベンジル型フルオラスタグは末端官能基を様々な官能基へ変換できる。例えばブロミド体はチオ尿素処

理により容易にチオールへと変換できる。このフルオラスチオールは糖還元末端に容易に導入でき、フルオラスチオグリコシドへ誘導される。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 [13, 16] (図6)。

なお、本エーテル結合型ヘビーフルオラス

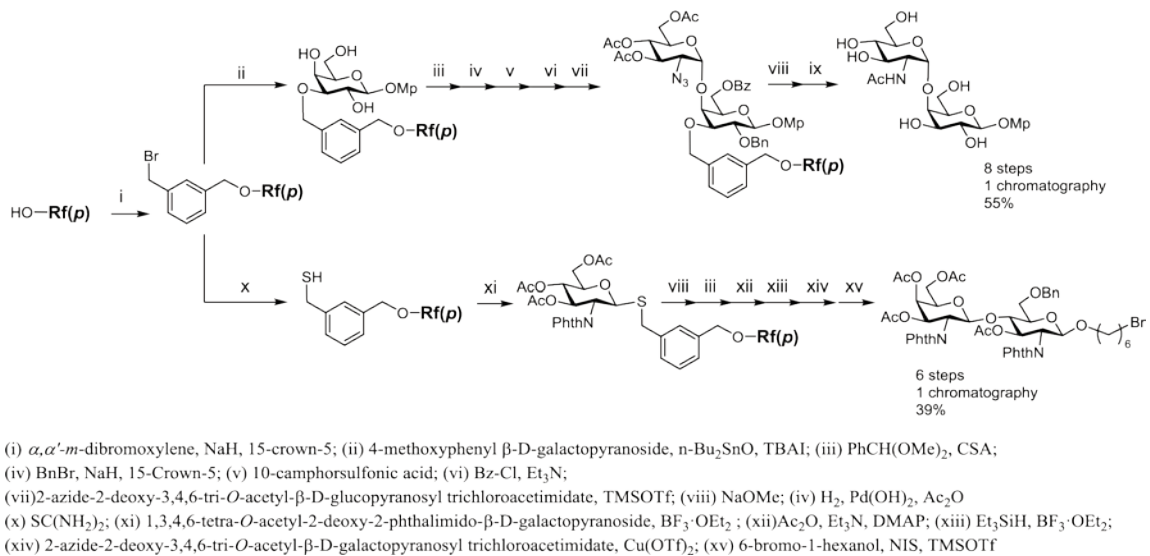


図6. ベンジル型リンカーを用いた単糖ユニット、及び糖鎖合成

タグは、目的物質合成後に除去され、F-LLEによりフルオラス相へ抽出され、容易に初期構造へと変換できる再利用可能なヘビーフル

オラスタグである。ヘビーフルオラスタグは市販されておらず、その合成には多段階反応が必要なため、合成のたびに廃棄することは

経済的に、また環境面においても効率的ではない。そのためヘビーフルオラストグのリサイクルは必須であるともいえる。

4. 耐酸性ヘビーフルオラストグによる糖鎖合成

前述のエーテル結合型フルオラストグは合成が容易で、かつ糖鎖合成に用いられているほぼ大部分の化学反応に対して安定であり、反応後の再利用も可能である。ところで、合成に用いる各種リンカーはエーテル結合によるフルオラストグへの導入が望ましい。なぜなら、エーテル結合は糖鎖合成に用いられている化学反応に対して安定だからである。前述のエーテル結合型フルオラストグへ導入した*p*-alkoxyphenyl型、及ベンジル型リンカーもエーテル結合で導入する。なお、これら2種類のリンカーとフルオラストグ間のエーテル結合は、硝酸セリウム(IV)アンモニウムや接触還元のような、「一般的なエーテ

ル結合」が安定な条件下で切断が可能である「特殊なエーテル結合」である(図5、図6参照)。しかし、糖鎖合成に汎用されている化学選択的に除去できる種々の保護基構造(例: アリル基、*p*-メトキシベンジル基、シリルエーテル、レプリノイル基)を有するリンカーを用いる場合は、リンカーとフルオラストグ間のエーテル結合は「一般的なエーテル結合」となる。従ってリンカーを除去する条件下でエーテル結合型フルオラストグの骨格自身が切断されてしまい、フルオラストグが分解してしまう可能性が考えられる。実際にエーテル結合切断試薬である三臭化ホウ素とエーテル結合型ヘビーフルオラストグを反応させたところ、予想通りフルオラストグの分解が確認された。従って既存のエーテル結合型ヘビーフルオラストグでは、リサイクルの点を考慮すると使用できるリンカー構造としては*p*-alkoxyphenyl型、及ベンジル型リンカーに限定されてしまう。

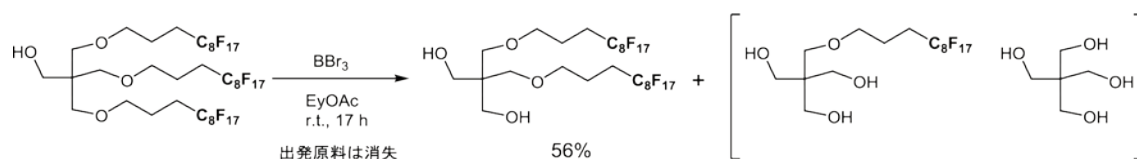


図7. 三臭化ホウ素処理によるエーテル型フルオラストグの分解

そこで、使用するリンカー構造に制限を受けず、かつリサイクルが容易なヘビーフルオラストグとして図8に示す新規ヘビーフルオラストグ22の合成を行った[17, 18]。得られた新規ヘビーフルオラストグに対して三臭化ホウ素処理を行ったところ、安定であることが明らかとなった。また、本フルオラストグの特徴として、タグ構造水酸基由来のエーテル結合は一般的なエーテル結合切断条件である「有機溶媒中での三臭化ホウ素処理」に対しては安定であり、「フルオラス溶媒(FC72)と*n*-ヘキサン中での三臭化ホウ素処理」により切断され、再生できることも明らかとなっ

た(図9)[18, 20]。

次に、アリル型リンカーを用い、*Mycoplasma pneumoniae*の細胞膜由来の糖脂質抗原(GGL)の糖鎖部位であるGlcβ1→6Galの合成を行った(図10)。まず、本耐酸性ヘビーフルオラストグに対して、臭化アリルによるアリル基の導入の後、オレフィンメタセシスと脱アセチル化により、アリルアルコールリンカーを有するヘビーフルオラス23を合成した。これにガラクトースを導入した後、保護基の変換によるアクセプター調製とグリコシル化を行いフルオラス性2糖誘導体24を合成した。なお、各反応後の精製

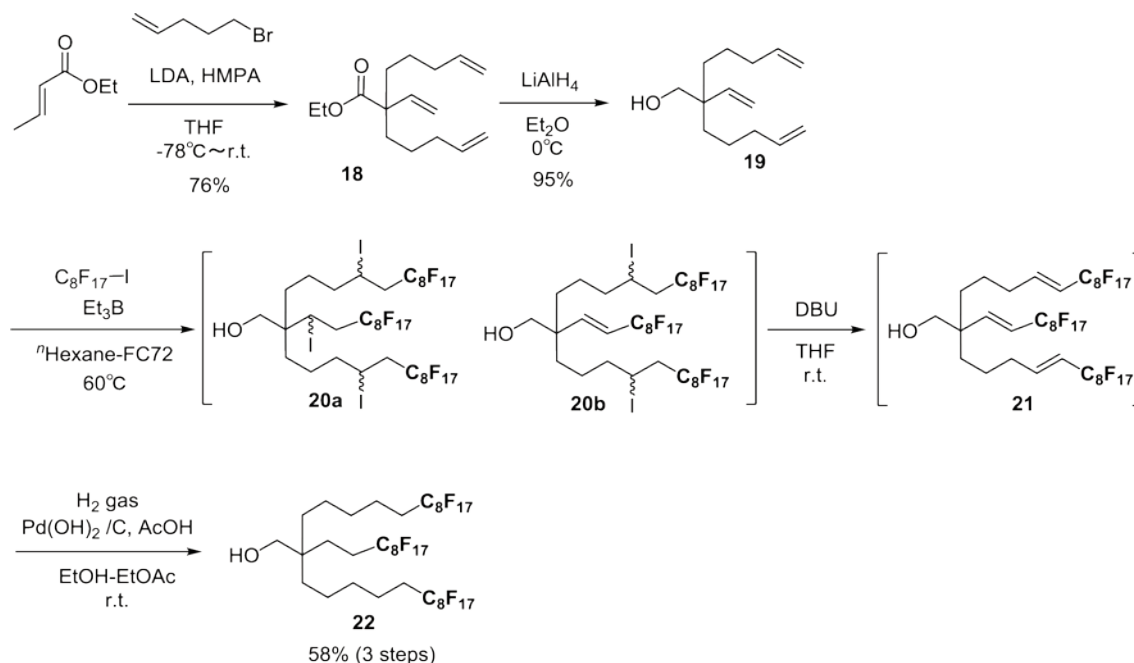


図8. 耐酸性ヘビーフルオラストグの合成

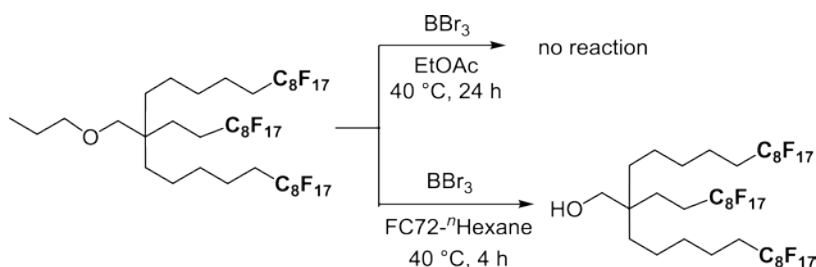


図9. 耐酸性ヘビーフルオラストグの三臭化ホウ素処理

はF-LLE法で行った。最後に2糖誘導体のフルオラストグからの切り出しを酢酸中、Pd(PPh₃)₄処理を行い、F-LLEで分配し、有機層より得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、目的の2糖誘導体25を収率58%（6工程）で得た。またF-LLEのフルオラス層よりヘビーフルオラストグ?（70%）とそのアセチル体（13%）が回収された [19]。

5. フルオラスマイクロフロー法による糖誘導体合成

近年糖質合成の分野においてもマイクロリアクターの高速混合や精密な温度制御を利用した反応効率や立体選択性の向上等、優れた

成果が報告されている [21-23]。また、マイクロ流路内での優れた抽出分離能はフルオラス溶媒を用いた液-液抽出法においても有用であることも報告されている [24]。そこで我々はF-LLE法をマイクロフロー系に組み込んだ、フルオラスマイクロフロー法により反応工程と分離工程の両方の効率化を目指すことにした。

5.1 均一溶媒系でのフルオラスマイクロフロー法

フルオラスマイクロフロー法の概念図を図11に示す。すなわち、マイクロ流路中で反応を行った後、分配用マイクロミキサーに反応溶液と分配用の有機溶媒とフルオラス溶媒を

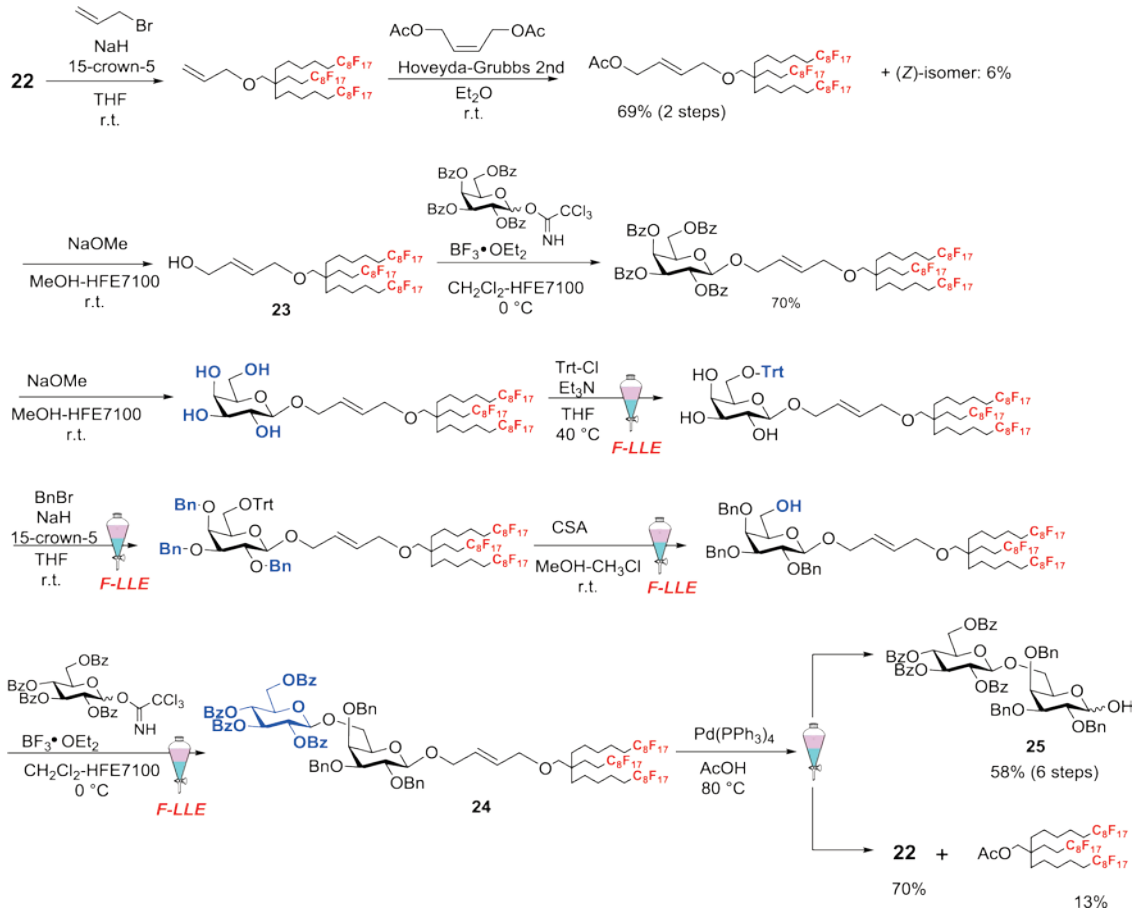


図10. 耐酸性ヘビーフルオラストグを用いた糖鎖合成

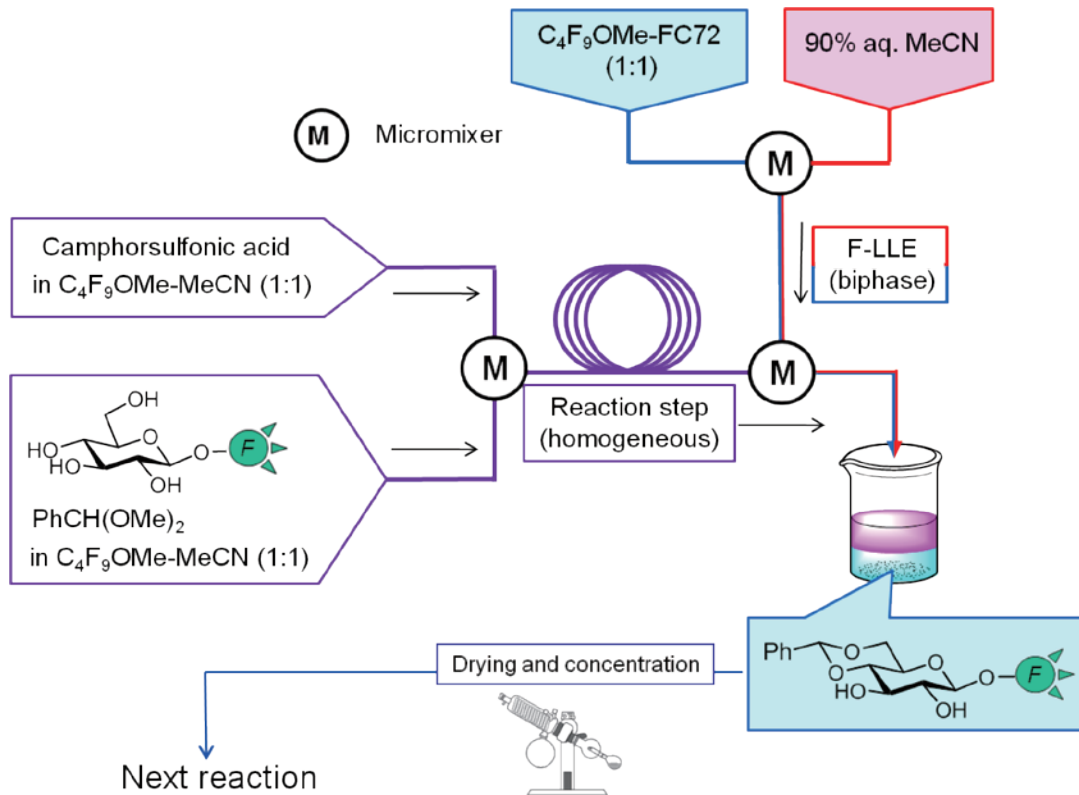


図11. フルオラスマイクロフロー法概念図

導入してマイクロ流路中で分配操作を行う。マイクロ流路からの溶出液からフルオラス相を分離し、乾燥・濃縮することで目的とするフルオラス化合物を得ることができる。

このフルオラスマイクロフロー法を用い、グルコースのペンタアセチル体を出発原料としてグルコース誘導体の合成を行った(図12)。その結果、全収率55%(6工程)で目的とするグルコース誘導体を得ることができた[25]。なお、各合成工程(各段階途中の濃縮工程も含め)と最終反応後に行ったシリカ

ゲルカラムクログラフィーによる精製1回を含め、合成に要する時間は最短で9時間であった。本フルオラスマイクロフロー法での結果を、バッチ系でのフルオラス合成法で行った同じ反応と比較すると、6工程に要する反応時間を約1/6に短縮できることも明らかとなった。以上の結果から、マイクロフロー系はフルオラスマイクロフロー法においても反応工程の効率化に有用である可能性が示唆された。

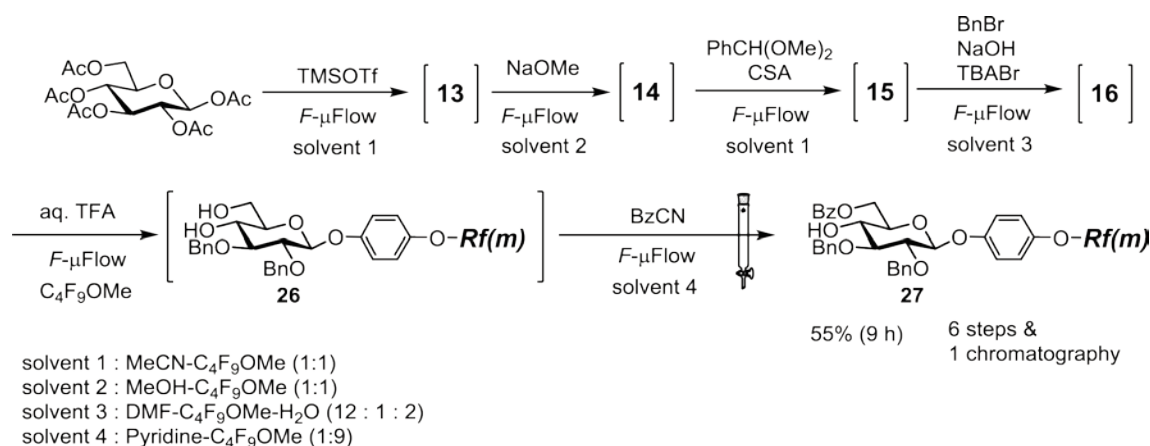


図12. フルオラスマイクロフロー法による単糖ユニット合成

5.2 不均一2相系でのフルオラスマイクロフロー法

5.1で述べた均一溶媒系でのフルオラスマイクロフロー法では、分離されたフルオラス相を次の反応工程に使用するには、基質濃度の調節と両親媒性フルオラス溶媒を除去するた、さらに分配に使用した有機相が含水有機溶媒のため、乾燥・濃縮操作が必要となる。これらの操作は効率的な多段階連続合成のボトルネックとなる。そこで、乾燥・濃縮操作を行わず分離したフルオラス相をそのまま次反応に使用できるフルオラス/有機不均一2相系反応での多段階反応についての検討を行った(図13)。

モデル反応としてグルコースのベンジリデン化とアセチル化を行った。不均一2相系でのフルオラスマイクロフロー法で使用するフ

ルオラスタグとしてはフルオラス相に基質を十分量分配できるように、高フッ素含量のKrytox™ 157-FSLを原料としてKrytox型フルオラスタグ28を合成し、グルコースを導入し化合物29を得た。(図14)。

次に、化合物29のアセチル基を除去したグルコース誘導体30のHFE7100-FC72 (1:1)溶液とベンズアルデヒドジメチルアセタールのアセトニトリル溶液をT字コネクタ (T1)に注入した。更に、カンファースルホン酸のアセトニトリル溶液を、T1から出てくるフルオラス/有機不均一2相系と一緒にマイクロミキサー (M1)へと連続的に供給した。ベンジリデン化(第1反応)はM1に接続されたマイクロチューブ内で滞留時間6秒で進行した。マイクロチューブから出てきた反応溶液から中間体31を含むフルオラス相を分離

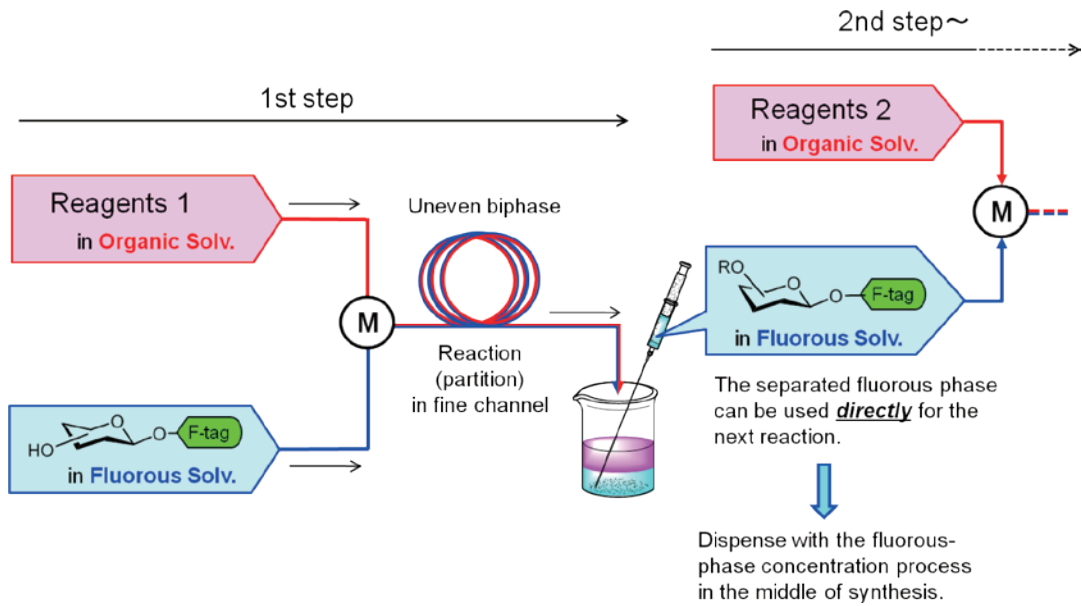


図13. 不均一2相系でのフルオラスマイクロフロー法概念図

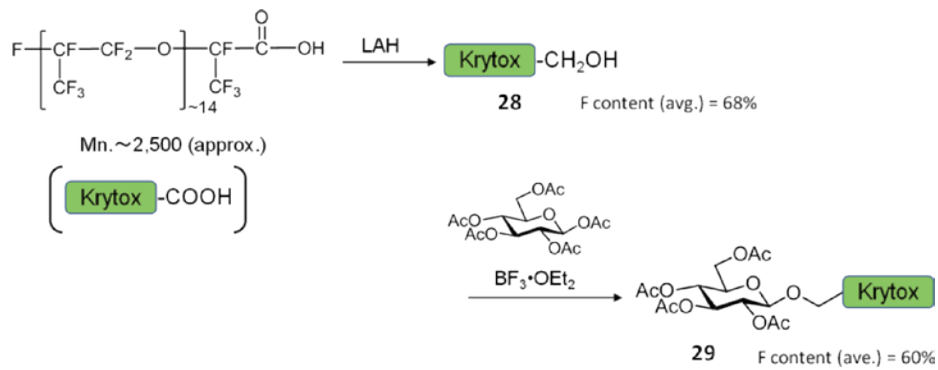


図14. Krytox型フルオラスタグ28の合成

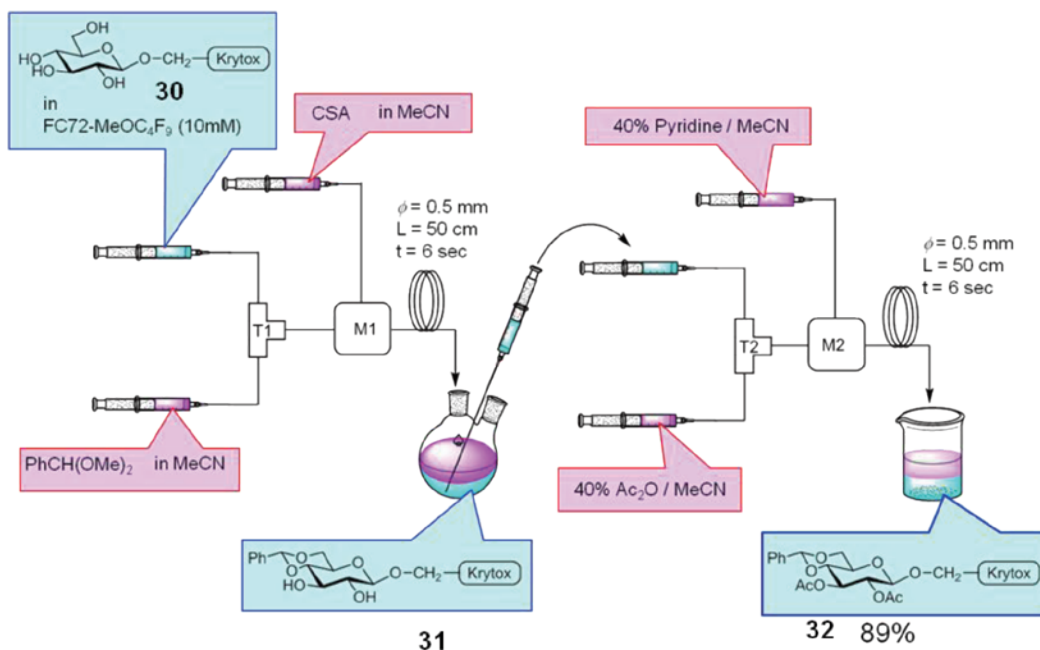


図15. 不均一2相系フルオラスマイクロフロー法による単糖ユニット合成

し、得られたフルオラス溶液を、40%無水酢酸/アセトニトリル溶液と共にT字コネクタ (T2) へと連続的に供給した。そして、40%ピリジン/アセトニトリル溶液を、T2から出てくるフルオラス—有機溶媒不均一溶液系と一緒にマイクロミキサー (M2) へと連続的に供給した。水酸基のアセチル化 (第2反応) はM2に接続されたマイクロチューブ内で滞留時間6秒で進行させた。マイクロチューブから出てきた反応溶液からフルオラス相を分離し、得られたフルオラス溶液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、目的物質である化合物32が収率89% (2工程) で得られた [26] (図15)

6. おわりに

以上述べてきたようにF-LLE法は反応中間体をフルオラス溶媒と有機溶媒を用いる分配操作により容易に精製できるため、従来の有機合成において時間と労力を要するシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどの精製工程を大幅に省略できる効率的な手法である。さらに、反応自体は通常の液相反応であることから、TLCやNMR、質量分析などの分析手法で反応の追跡や反応中間体の同定を行うことができる。このようにF-LLE法は液相法でありながら、固相法に匹敵する簡便な精製工程を併せ持つ優れた手法である。また、フルオラスタグやフルオラス溶媒は容易に回収・再利用が可能であることから、サステイナブルケミストリー的な手法ともいっても過言ではない。F-LLE法は糖鎖合成以外にもペプチドや糖ペプチド、核酸の合成にも有用な手法であるが [4, 27-29]、その他の種々の有機化合物の合成にも有用であると考えられ、今後さまざまな分野への応用が期待される。

本稿で紹介した野口研究所におけるヘビーフルオラス法糖鎖合成の歴史は、稲津敏行博士 (現：東海大学教授) と大前仁博士 (現：

京都大学) による糖鎖合成用ヘビーフルオラスタグの設計・合成の試行錯誤から始まり、三浦剛博士 (現：東京薬科大学教授) によるBfpタグの合成とそれを用いたフルオラス糖鎖合成法開発の成功により大いに前進することとなった。その後、後藤浩太郎博士によるエーテル結合型タグの開発とそれを用いた単糖ユニット合成の成功、川上宏子博士によるフルオラスマイクロフロー法の開発、そして戸治野真美博士 (現：セイコーエプソン株式会社) と当時博士課程の学生であった福田和男博士 (現：千葉大学) による耐酸性ヘビーフルオラスタグの合成とそれを用いた糖鎖合成へと発展していった。本総説で述べた研究は、これら多くの研究者諸氏の尽力によってなされた成果であることをここに記す。また御助言・御指導を賜りましたフルオラス科学研究会 (大寺純蔵・元会長、柳日馨・前会長、畑中研一会長) に深く感謝いたします。

参考文献

1. I. T. Horváth, *et al.*, “Facile Catalyst Separation Without Water: Fluorous Biphasic Hydroformylation of Olefins”, *Science*, vol. 266, 1994, pp72-75.
2. A. Studer, *et al.*, “Fluorous Synthesis: A Fluorous-Phase Strategy for Improving Separation Efficiency in Organic Synthesis”, *Science*, vol.275, 1997, pp823-826.
3. W. Zhang, *et al.*, “Solution-Phase Preparation of a 560-Compound Library of Individual Pure Mappicine Analogues by Fluorous Mixture Synthesis”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol.124, 2002, pp10443-10450.
4. J. Gladysz, *et al.* “Eds., *Handbook of Fluorous Chemistry*”, Wiley / VCH, Weinheim, 2004
5. (a) D. P. Curran, “Strategy-Level

- Separations in Organic Synthesis: From Planning to Practice” , *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol.37, 1998, pp1174-1196.;
- (b) W. Zhang, “Fluorous Synthesis of Heterocyclic Systems” , *Chem. Rev.* vol.104, 2004, pp2531-2556.;
- (c) W. Zhang, “Fluorous Linker-Facilitated Chemical Synthesis” , *Chem. Rev.*, vol.109, 2009, pp749-795.
6. D. P. Curran, *et al.*, “Preparation of a Fluorous Benzyl Protecting Group and Its Use in a Fluorous Synthesis Approach to a Disaccharide” , *Tetrahedron Lett.*, vol.39, 1998, pp4937-4940.
 7. L. Manzoni, “Rapid synthesis of oligosaccharides using an anomeric fluorosilyl protecting group” *Chem. Commun.*, 2003, pp2930-2931.
 8. P. Wipf, *et al.*, “Synthesis and Biological Evaluation of a Focused Mixture Library of Analogues of the Antimitotic Marine Natural Product Curacin A” , *J. Am. Chem. Soc.*, vol.122, 2000, 9391-9395.
 9. A. Studer, *et al.*, “A strategic alternative to solid phase synthesis: Preparation of a small isoxazoline library by “fluorous synthesis” , *Tetrahedron*, vol.53, 1997, pp6681-6696.
 10. T. Miura, *et al.*, “Fluorous Oligosaccharide Synthesis Using a Novel Fluorous Protective Group” , *Org. Lett.*, vol.3, 2001, 3947-3950.
 11. T. Miura, *et al.*, “Rapid Oligosaccharide Synthesis Using a Fluorous Protective Group” , *J. Org. Chem.*, vol.69, 2004, 5348-5353.
 12. K. Goto, *et al.*, “Synthesis of monosaccharide units using fluoros method” , *Tetrahedron Lett.*, vol.48, 2007, pp5605-5608.
 13. K. Goto, *et al.*, “Practical heavy fluoros tag for carbohydrate synthesis with minimal chromatographic purification” , *Tetrahedron Lett.*, vol.51, 2010, pp6539-6541.
 14. M. S. Yu, *et al.*, “Increasing Fluorous Partition Coefficients by Solvent Tuning” , *Org. Lett.*, vol.7, 2005, pp3677-3680.
 15. M. Mizuno, *et al.*, “p-Alkoxyphenyl-type heavy fluoros tag for the preparation of carbohydrate units” , *J. Fluorine Chem.*, vol.129, 2008, pp955-960.
 16. K. Goto, *et al.*, “Effective Application of Heavy Fluorous Thioglycoside for Oligosaccharide Synthesis” , *Chem. Lett.*, vol.40, 2011, pp756-757.
 17. 水野、後藤、戸治野、「炭素-炭素結合型ヘビーフルオラスタグ」特開2013-139420
 18. K. Fukuda, *et al.*, “Preparation of acid-resistant heavy fluoros tags for recycling in synthetic systems” , *J. Fluorine Chem.* vol. 166, 2014, pp52-59
 19. K. Fukuda, *et al.*, “A recyclable heavy fluoros tag carrying an allyl alcohol pendant group: design and evaluation toward applications in synthetic carbohydrate chemistry” , *Carbohydr. Res.*, vol. 407, 2015, pp122-130.
 20. 福田和男 (2015) 「マイコプラズマ糖脂質抗原の効率的合成手法の開発」千葉大学大学院融合科学研究科博士論文
 21. K. Taknaka, *et al.*, “Efficient Procedure for Reductive Opening of Sugar 4,6-O-Benzylidene Acetals in a Microfluidic System” , *Synlett*, 2007, pp164-166.
 22. S. Tanaka, *et al.*, “Highly Efficient

- Sialylation by Virtue of Fixed Dipole Effects of N-Phthalyl Group: Application to Continuous Flow Synthesis of a(2-3)-and a (2-6) -Neu5Ac-Gal Motifs by Microreactor” , *J. Carbohydr. Chem.*, vol.26, 2007, pp369-394.
23. F. R. Carrel, *et al.*, “Oligosaccharide Synthesis in Microreactors” , *Org. Lett.*, vol.9, 2007, pp2285-2288.
24. K. Mikami, *et al.*, “ ‘Fluorous nanoflow’ system for the Mukaiyama aldol reaction catalyzed by the lowest concentration of the lanthanide complex with bis (perfluorooctanesulfonyl) amide ponytail” , *Tetrahedron*, vol.59, 2003, pp10593-10597.
25. H. Kawakami, *et al.*, “Multi-step Synthesis of a Protected Monosaccharide Unit by Iterative Reactions in Microreactors and Fluorous Liquid-phase Extractions” , *Chem. Lett.*, vol.38, 2009, pp906-907.
26. 水野、川上「微小流路内のフルオラス不均一多相系反応方法」特許第5670654号
27. M. Mizuno, *et al.*, “A novel peptide synthesis using fluorous chemistry” , *Chem. Commun.*, 2003, pp972-973.
28. M. Mizuno, *et al.*, “Peptide synthesis on fluorous support” , *Tetrahedron. Lett.*, vol.43, 2004, pp3425-3428.
29. M. Mizuno, *et al.*, “Fluorous Glycopeptide Synthesis without Protection of Sugar Hydroxy Groups” , *Chem. Lett.*, vol.34, 2005, pp426-427.

酵素化学的手法を用いた均一な糖鎖を持つ 糖鎖改変モノクローナル抗体の作製並びに そのFc γ RIIIaに対する親和性とADCC活性

Glycoengineered Monoclonal Antibodies with Homogeneous Glycan using a Chemoenzymatic Approach and their Affinities for Fc γ RIIIa and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

糖タンパク質工学研究室 室長 黒河内 政樹
Masaki KUROGOCHI

1. 本研究の背景

近年、抗体医薬が数多く販売され、世界の医薬売上で上位を占めている。(2014年の医薬品トップ10のうち抗体医薬が5つ入っている。)そして、抗体のFc領域に結合している糖鎖がADCC活性、CDC活性、薬理効果を制御している事が分かり、抗体の糖鎖機能が非常に注目を浴びている。その為、多くの研究者らが様々なアプローチから抗体の糖鎖構造の制御を行い、その機能を調査している。抗体医薬は基本的にモノクローナル抗体であり、分子クラスはIgG抗体である。IgG抗体は、2つの重鎖と2つの軽鎖から構築され、抗原と結合するFab領域と白血球やマクロファージ等の細胞と結合するFc領域を持っている。重鎖のFc領域の297番目のアスパラギンの側鎖にはN結合型糖鎖が結合しており、この糖鎖は、抗体の免疫複合体によるエフェクター機能の活性化や動態、安全性等に寄与することか報告されている。例えば、N結合型糖鎖の還元末端側のN-アセチルグルコサミンに結合しているフコース(コアフコース)が欠落している抗体は、Fc γ RIIIaを介する抗体依存性細胞障害(ADCC活性)

が高まる事が知られている。その為、この効果を狙った糖鎖改変型抗体の開発が盛んに行われており、コアフコースを持たない抗体医薬が開発されている。現在、糖鎖改変型の抗体医薬品として2012年に日本で認可されたmogamulizumab (anti-CCR4 monoclonal antibody (mAb), 協和発酵キリン)と2013年にFDAで認可されたobinituzumab (anti-CD20 mAb, Roche/Genentech)が販売されている。一般的に、動物及び植物細胞で産生される糖タンパク質は、細胞内の複数の糖鎖転移酵素・糖加水分解酵素の働きと制御によって、また、糖ヌクレオチドの発現、代謝、分布状態、並びに翻訳後修飾の過程における糖タンパク質の輸送速度等の複数の要因によって、タンパク質の部位特異的な糖鎖構造の付加並びに不均一な糖鎖分布を持つ形で生産される。その為、現在販売されている抗体はすべて不均一な糖鎖分布を有している。

本研究では、遺伝子組み換えカイコの絹糸腺から産生された抗体を出発物質として抗体に結合している不均一なN結合型糖鎖をエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(エンド酵素)によって、一旦N-アセチルグル

コサミン1個に収束させた後に、そのN-アセチルグルコサミンに合成した任意のN結合型糖鎖モチーフを持つオキサゾリン誘導体を糖

合成酵素による転移反応で縮合を行い、任意の均一なN結合型糖鎖を持つ抗体を作製した(図1)。

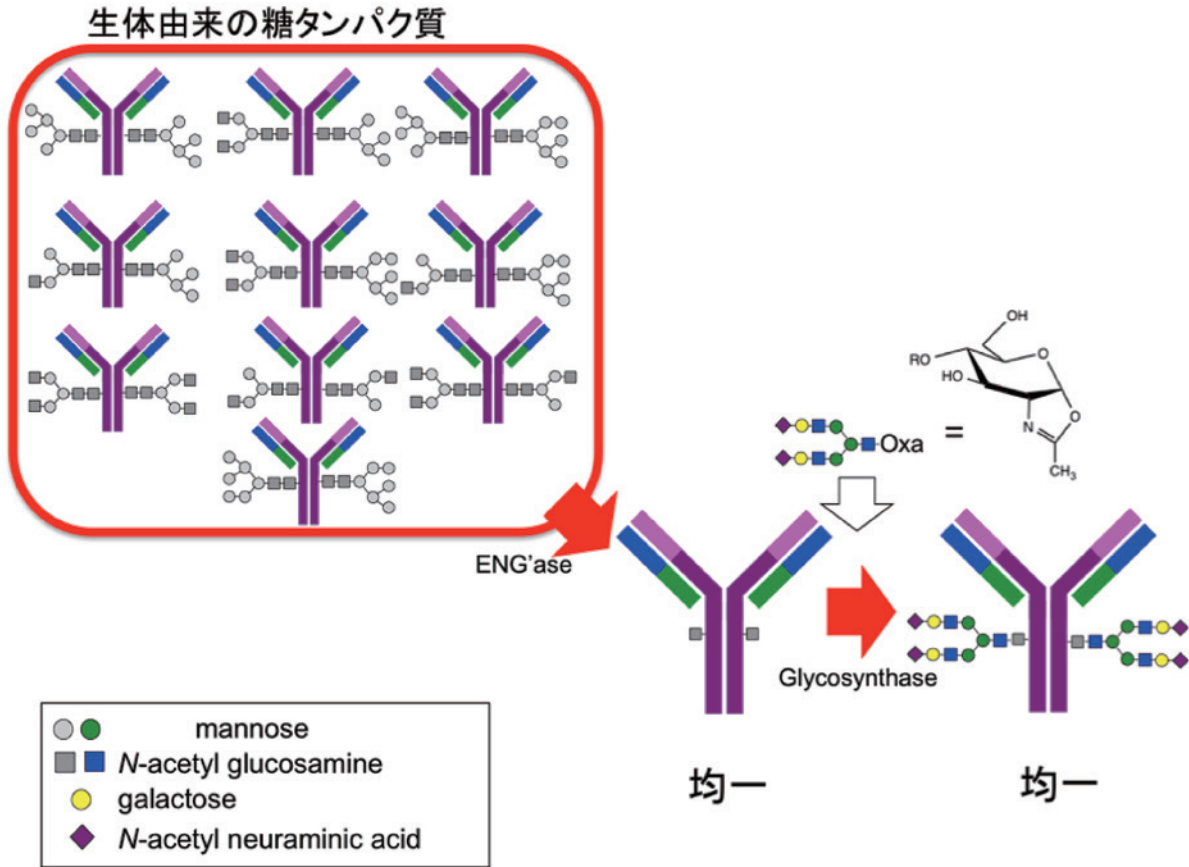


図1. 均一な糖鎖を持つ糖鎖改変型抗体の合成スキーム

2. 実験及び結果

2-1. 遺伝子組み換えカイコの絹糸腺から産生された抗体の分析

本研究で用いた遺伝子組み換えカイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体(Trastuzumab)は、共同研究先である株式会社免疫生物研究所の富田氏より提供された。このanti-Her2抗体(Trastuzumab)のN結合型糖鎖は、抗体のトリプシン消化後の糖ペプチドを以前に我々が開発したMALDI-TOF MS用の糖ペプチドの高感度化標識(Bz標識)を行った後にHILIC(親水性相互作用クロマト)による糖ペプチド抽出を行い、MALDI-TOF MS測定によって、糖ペプチド

の形で分析した[1]。これにより、コアフコースを持たないマンノース型(M9-M2)、複合型(GN1, GN2)のN結合型糖鎖が不均一な分布でEEQYNSTYR配列のアスパラギンに結合している事が分かった(図2a)。一方、市販薬のCHO細胞で生産されたanti-Her2抗体(Trastuzumab)は、コアフコースを持つ複合型のN結合型糖鎖(約85%)とコアフコースを持たない複合型とマンノース型のN結合型糖鎖が不均一な分布でEEQYNSTYR配列のアスパラギンに結合している(図2b)。また、カイコの絹糸腺から産生されたマウスIgG1モノクローナル抗体の解析ではコアフコースを持たないマンノース型(M9-

M2)、複合型 (GN1, GN2) のN結合型糖鎖が不均一な分布でEEQFNSTFR配列のアスパラギンに結合している事が分かった (図2c)。カイコの絹糸腺から産生された糖タンパク質 (抗体) は、通常の昆虫細胞 (脂肪細胞等) で生産された糖タンパク質とは違い、ほとんどのN結合型糖鎖にコアフコース (α 1,3-Fuc, α 1,6-Fuc) が付加していない [2]。同じカイコ絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) とマウスIgG1モノクローナル抗体の糖鎖構造を比較すると糖鎖プロファイルは若干違うものの糖鎖構造の種類は同じである。カイコ絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) とCHO細胞で産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) を比較すると、糖鎖プロファイルは大きく異なっている。これは、細胞内の複数の糖鎖転移酵素・糖加水分解酵素の発現の違いを反映していると考えられる。また、市販薬であるCHO細胞で産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) のN結合型糖鎖は不均一であり、コアフコースの有り無しのN結合型糖鎖が混在している事も分かった。つまり、現在の抗体医薬品はこのような様々な糖鎖が付加した不均一な混合物と考えられる。そして、糖鎖関連因子を制御していない場合では、培地成分やクローン株の種類によって、その糖鎖プロファイルが若干異なってくるので、抗体医薬を含む糖タンパク質のバイオ製剤の品質管理は非常に難しい。カイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) は、SDS-PAGE分析で糖鎖付加している重鎖のバンドが分かれており、かつMS分析の際に他の抗体と比べて糖ペプチドの回収量が悪い事から糖鎖が結合していない部分が存在するのではないかと考えた。特殊アミノ酸組成分析からタンパク質中のGlcNAc存在量の定量を行い、anti-Her2抗体 (Trastuzumab) に糖鎖が結合していない割合が約11.5%である事が分かった。IgG

抗体は2本の重鎖の297番目のアスパラギンが糖鎖結合部位として存在しているので、カイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) はN結合型糖鎖が2本の重鎖に結合していないアグリコン型、2本の重鎖の中で1本にだけ糖鎖が結合しているヘミグリコシル型、2本の重鎖に共に糖鎖が結合しているフルグリコシル型があると考えられる。最近、陽イオン交換クロマトグラフィー分析によって、アグリコン型、ヘミグリコシル型、フルグリコシル型を分離する事が出来る手法が報告され [3, 4]、カイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) を分析した所、それぞれが3.8%, 23.4%, 72.7%の存在比である事を確認できた (図3a)。このように糖タンパク質の糖鎖結合部位にN結合型糖鎖が付加しない現象は、細胞の糖タンパク質の発現系ではよく見られる現象である。同じ発現系のカイコの絹糸腺から産生されたマウスIgG1モノクローナル抗体の糖鎖付加割合を比べて見るとマウスIgG1モノクローナル抗体の方は非常に糖鎖付加割合が高かった (図3c)。同じ細胞発現系でも糖タンパク質の種類によって糖鎖付加割合が異なるのは、非常に興味深く、おそらくこれは前述した翻訳後修飾の過程における糖タンパク質の輸送速度 (発現速度) の違いが反映していると考えられる。また、抗体の生産過程でのタンパク質凝集体が問題になっている為、サイズ排除クロマトグラフィーを用いたタンパク質凝集分析を行った。この分析から、このanti-Her2抗体 (Trastuzumab) の凝集割合は、約14%であり (図4a)、比較として分析したCHO細胞で産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) は、凝集割合が1%であった (図4b)。

以上の事から、このカイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) を出発原料として均一な糖鎖抗体を作成する為には、糖鎖付加が不完全なアグリコン型抗体

とヘミグリコシル型抗体の除去並びに抗体の凝集体を除去が不可欠である事が分かった。今回、使用している市販薬のCHO細胞で生

産されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) は、共同研究先である慶応大学の高柳先生より提供を受けた。

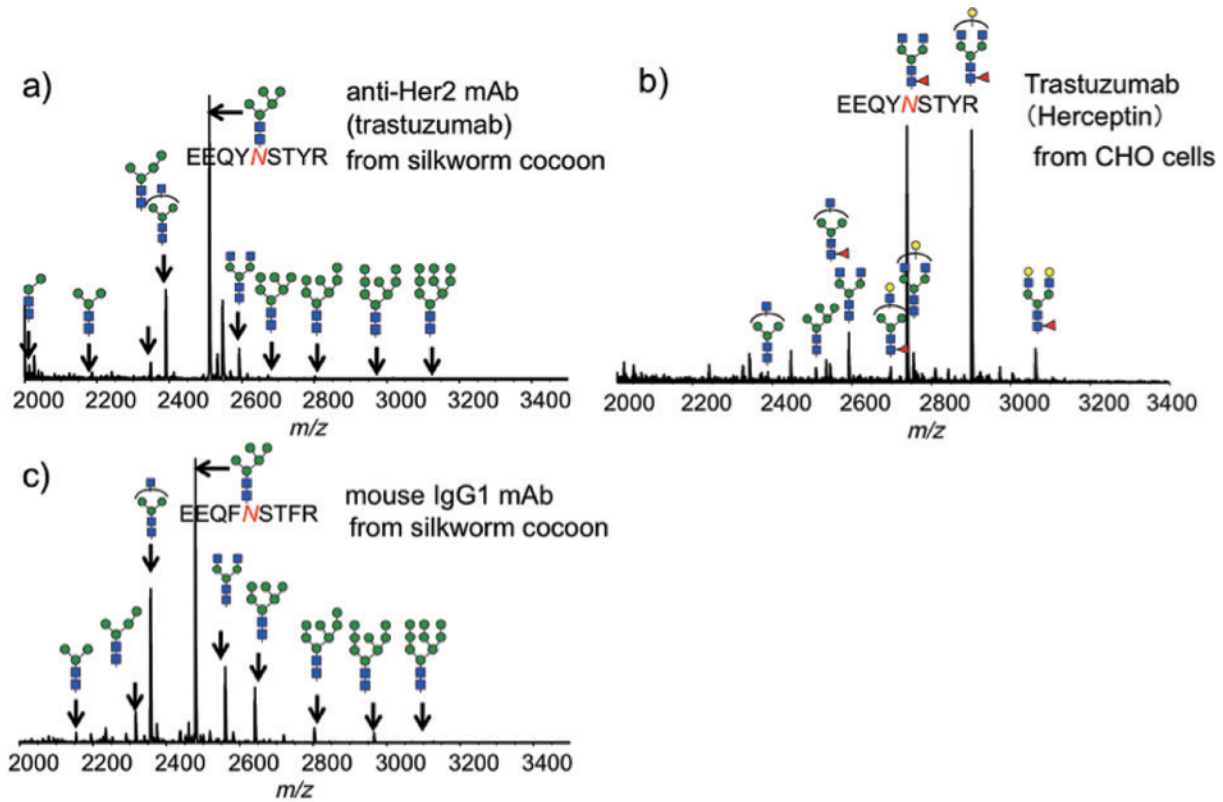


図2. Bz標識した糖ペプチドのMALDI-TOF MSスペクトル

- a) カイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab)
- b) CHO細胞で生産されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab)
- c) カイコの絹糸腺から産生されたマウスIgG1モノクローナル抗体

2-2. 遺伝子組み換えカイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) のエンド- β -*N*-アセチルグルコサミナーゼ処理による糖鎖加水分解反応の解析

カイコ絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) は、ハイマンノース型、パウチマンノース型、複合型の3つのタイプのN結合型糖鎖が10種類、不均一な分布で結合しており、2本の重鎖両方に糖鎖が結合しているフルグリコシル型のインタクトの抗体のESI-MS解析の質量分析から、2本の重鎖と2本の軽鎖からなるタンパク質の2カ所に糖鎖がランダムに結合した組み合わせで出来ている事が分かった (図5)。この抗体を均一化す

る為には、エンド- β -*N*-アセチルグルコサミナーゼ (エンド酵素) によって、2カ所に結合した不均一な分布を持つN結合型糖鎖をすべてN-アセチルグルコサミン1個に収束する必要がある。始めに、抗体に対する様々なエンド酵素の反応を行い、エンド酵素の選択の検討を行った。現在、エンド酵素は、様々な生物由来の物が発見され、それぞれ異なる活性 (基質特異性、至適pH等) を有している事が知られている。本研究では、抗体に結合しているN結合型糖鎖を温和な条件下のエンド酵素処理で糖鎖を加水分解した後に、抗体をトリプシン消化で断片化し、糖ペプチドの高感度標識法とHILICによる糖ペプチド抽

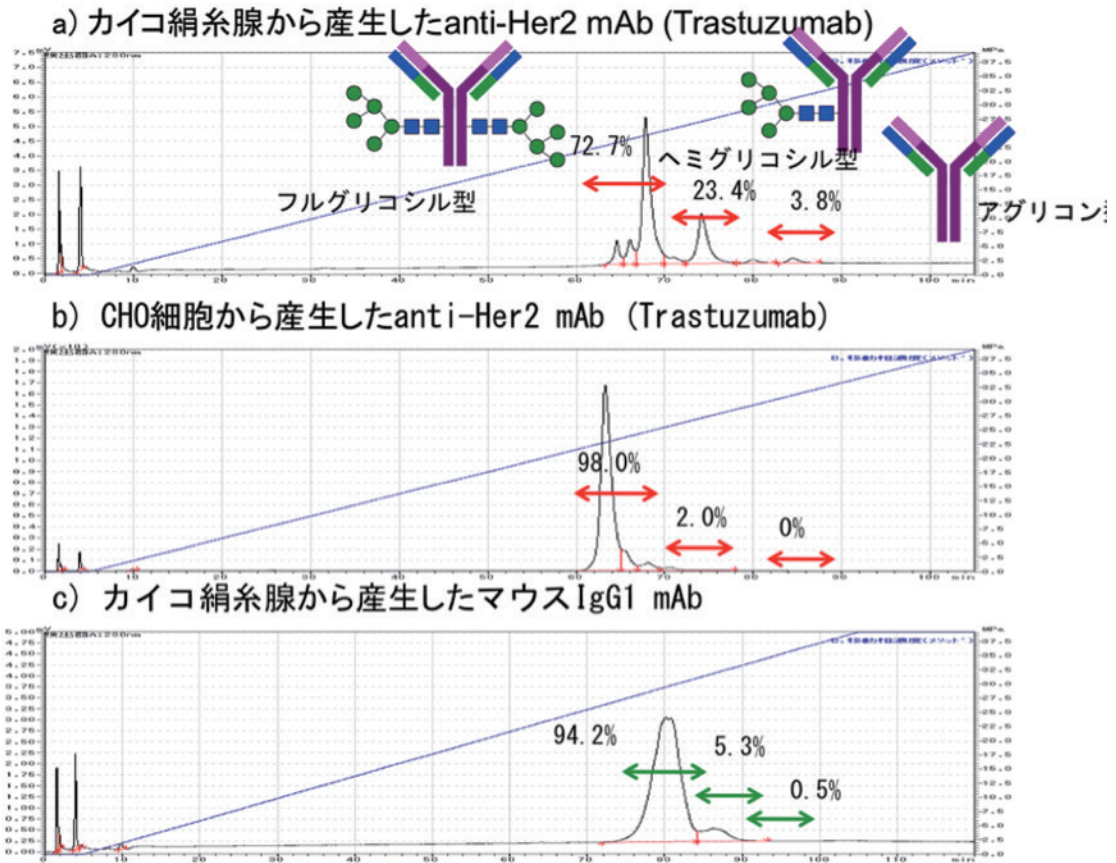


図3. 陽イオン交換クロマトグラフィー分析

- a) カイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab)
- b) CHO細胞で生産されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab)
- c) カイコの絹糸腺から産生されたマウスIgG1モノクローナル抗体

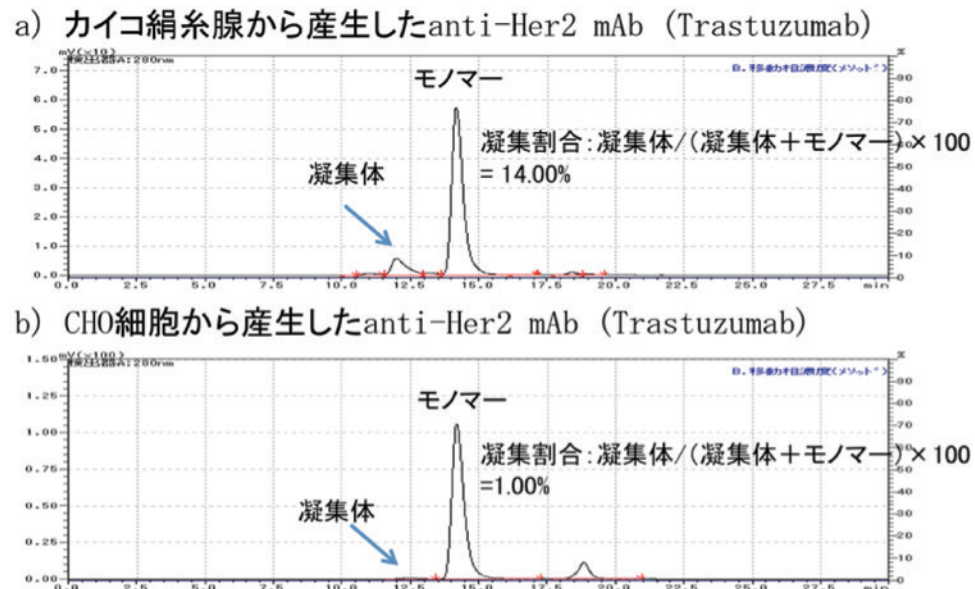


図4. サイズ排除クロマトグラフィー分析

- a) カイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab)
- b) CHO細胞で生産されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab)

出法、MALDI-TOFMS分析を用いて、エンド酵素処理後の糖鎖が加水分解されなかった抗体に結合したN結合型糖鎖を糖ペプチドの形で解析した [1]。エンド酵素処理していない糖ペプチドとエンド酵素処理後の糖ペプチドを定量的に比較する事によって (図6)、エンド酵素で加水分解された糖鎖の種類と反応効率を調べ、エンド酵素の抗体に対する反応性や糖鎖に対する基質特異性を調べた (図7)。通常、エンド酵素の基質特異性は低分子基質 (糖鎖、糖アミノ酸、糖ペプチド) を用いて調べられている為、タンパク質 (抗体) のような高分子基質ではエンド酵素の基質特異性並びに活性 (反応速度等) は、低分子基質の場合と異なってくる。使用する抗体に対するエンド酵素の反応性を調べるのは、酵素化学的合成法を用いた糖鎖改変抗体の作製には非常に重要である。今回、カイコから産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) に使用したエンド酵素は、endoS [5], endoM [6], endoD [7], endoH [8], endoLL [9] である。エンド酵素処理後の糖ペプチドの解析結果 (図7) から、endoS は抗体の複合型糖鎖 (GN1, GN2) を選択的に加水分解しており、ハイマンノース型糖鎖 (M9~M3) は加水分解しなかった。endoMは弱酸性条件 (pH 6.0) 下で抗体のハイマンノース型糖鎖 (M9~M3) と複合型糖鎖 (GN1) を加水分解するが、複合型糖鎖 (GN2) は加水分解されにくい。そして、endoD は抗体のマンノース型糖鎖 (M6~M3) と複合型糖鎖 (GN1) の一部が加水分解されており、endoDの基質特異性として知られているN結合型糖鎖の5糖のコア構造部分である非還元末端側の α 1,3-Man構造の非修飾を正しく認識してN結合型糖鎖を加水分解している事が分かった [7]。endoHは、弱酸性条件 (pH 5.5) 下でハイマンノース型糖鎖 (M9~M4) を加水分解する事が分かった。endoLLは、野口研究所で開発した*Lactococcus lactis*由来の新規

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼであり、中性条件 (pH 7.5) 下で抗体のマンノース型糖鎖 (M9~M4) を加水分解する性質がある事が分かった。この事から今回使用したエンド酵素は、単独ではカイコから産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) のN結合型糖鎖を完全に加水分解できない事が分かり、同じ温和な条件下 (pH 7.5) でN結合型糖鎖を加水分解するendoS、endoD、endoLLを組み合わせて使用する事により、カイコから産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) に結合しているすべてのN結合型糖鎖の種類を加水分解できると考えた。次に、それぞれ単独のエンド酵素で処理した抗体とエンド酵素を組み合わせて処理した抗体をSDS-PAGEで解析し、糖鎖付加している重鎖の挙動を観測した (図8)。この結果、カイコから産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) のN結合型糖鎖は単独のエンド酵素では、結合しているN結合型糖鎖を完全に加水分解する事はできないが、エンド酵素の組み合わせを用いる事によって、ほとんどすべてのN結合型糖鎖 (99%以上) を加水分解できる事を確認した。これから、糖鎖合成酵素のアクセプターとなるN-アセチルグルコサミンが結合したanti-Her2抗体 (Trastuzumab) を作製する事が出来た。

2-3. anti-Her2抗体 (Trastuzumab) に均一な糖鎖 (A2,G2,G0,M3) を転移させた糖鎖改変抗体の作製

卵黄から抽出されるシアリル糖ペプチド (SGP) を出発物質として酸加水分解による脱シアリル化、ガラクトシダーゼ消化による脱ガラクトシル化、エンドグリコシダーゼ消化による糖鎖加水分解を組み合わせ、A2-OH, G2-OH, G0-OHを調製し、M3-OHはWang LX らの報告 [10] を参考に単糖の誘導体から18ステップの化学反応の工程を経て糖鎖の全合成を行い、調製した (図9)。これ

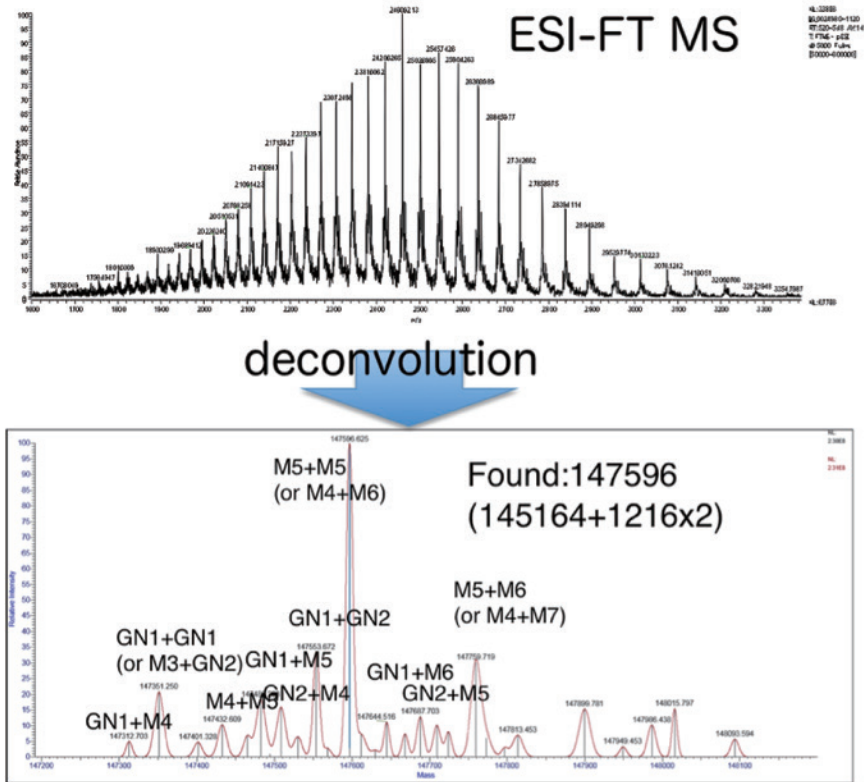


図5. カイコの絹糸腺から産生されたフルグリコシル型anti-Her2抗体 (Trastuzumab)のESI-FT MSによる質量分析

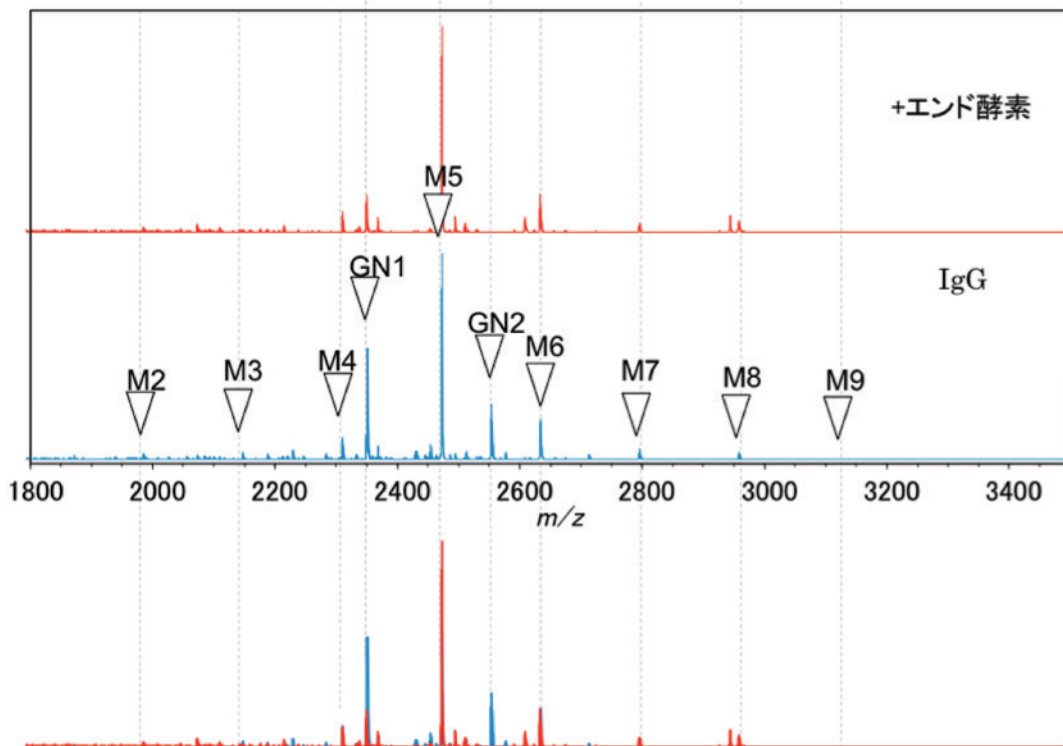


図6. エンド酵素処理していない抗体の糖ペプチドのMSスペクトルとエンド酵素処理後の抗体の糖ペプチドのMSスペクトルの比較分析

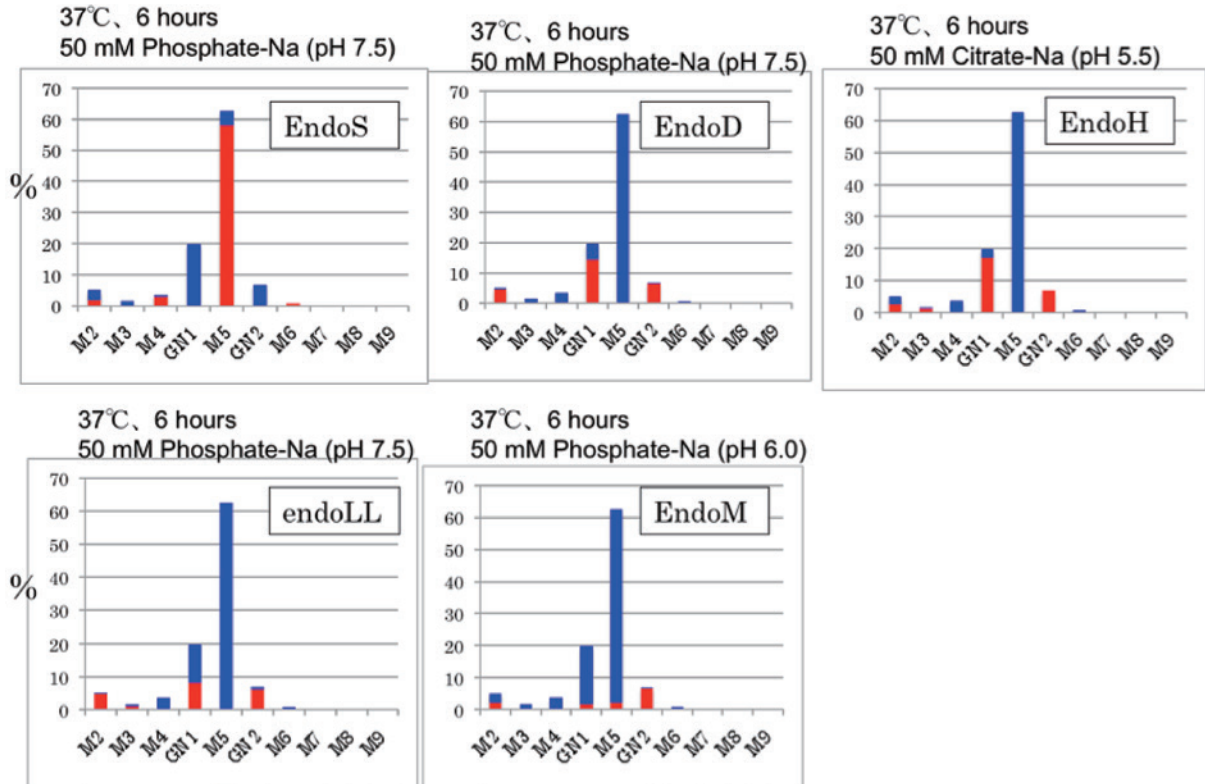


図7. エンド酵素の反応条件とエンド酵素処理後のカイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab)の糖ペプチド解析による各種エンド酵素の基質特異性の解析

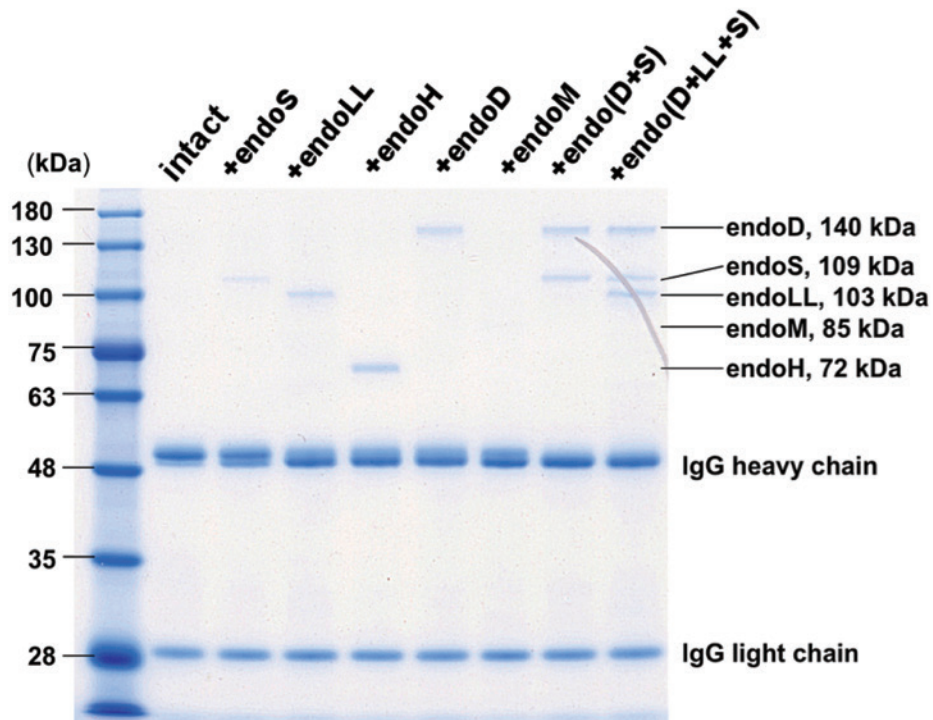


図8. カイコの絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab)の各種エンド酵素の加水分解反応後のSDS-PAGE

らの糖鎖 (M3-OH, G0-OH, G2-OH, A2-OH) はShoda Sらの報告 [11] による2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride (DMC) を用いた水溶液中でのオキサゾリン誘導体化法によって、還元末端側のN-アセチルグルコサミンをオキサゾリン体に変換して糖転移反応の為にグリコシルドナーを調製した (図9)。次に、Wang LX らが報告 [12] したendoS-D233Q変異体を用いてグリコシルアクセプターであるN-アセチルグルコサミンが結合した抗体にグリコシルドナーとなる糖鎖のオキサゾリン誘導体を反応させて、任意の均一な糖鎖をFc領域の297番目のアスパラギンに付加しているN-アセチルグルコサミンを足場に転移させた (図1)。糖転移反応後の抗体のSDS-PAGEから糖鎖が付加していない重鎖がある事が分かる (図10左) ので、2本の重鎖に糖鎖が付加していないアグリコン型、2本の重鎖の中で1つにだけ糖鎖が転移しているヘミグリコシル型の抗体を除く為に陽イオン交換カラム (MonoSカラム) を用いて、2本の重鎖に糖鎖が転移して

いるフルグリコシル型抗体の分離を行った (図11)。それぞれ糖鎖改変したフルグリコシル型抗体の分離の確認は、陽イオン交換クロマトグラフィー分析とSDS-PAGEによって、陽イオン交換クロマトグラフィーのアグリコン型、ヘミグリコシル型抗体のピークの消失とSDS-PAGEの糖鎖が付加していない重鎖の消失から確認した (図10右、図11)。その後、糖鎖改変抗体の糖ペプチド解析を行う事によって、Fc領域の297番目のアスパラギンに任意の均一な糖鎖が付加している事を確認した (図12)。また、分離精製後の糖鎖改変抗体をサイズ排除クロマトグラフィーによるタンパク質凝集体の分析を行い、mAb-A2, mAb-G2, mAb-G0, mAb-M3の凝集割合がそれぞれ0.1%, 0.5%, 0.0%, 0.0%と非常に少ない事から凝集体の除去も確認した。よって、均一な糖鎖を持つ糖鎖改変anti-Her2抗体 (Trastuzumab) をモノマーかつ2本の重鎖に糖鎖が付加しているフルグリコシル型であるmAb-A2, mAb-G2, mAb-G0, mAb-M3の4種類として作製できた。

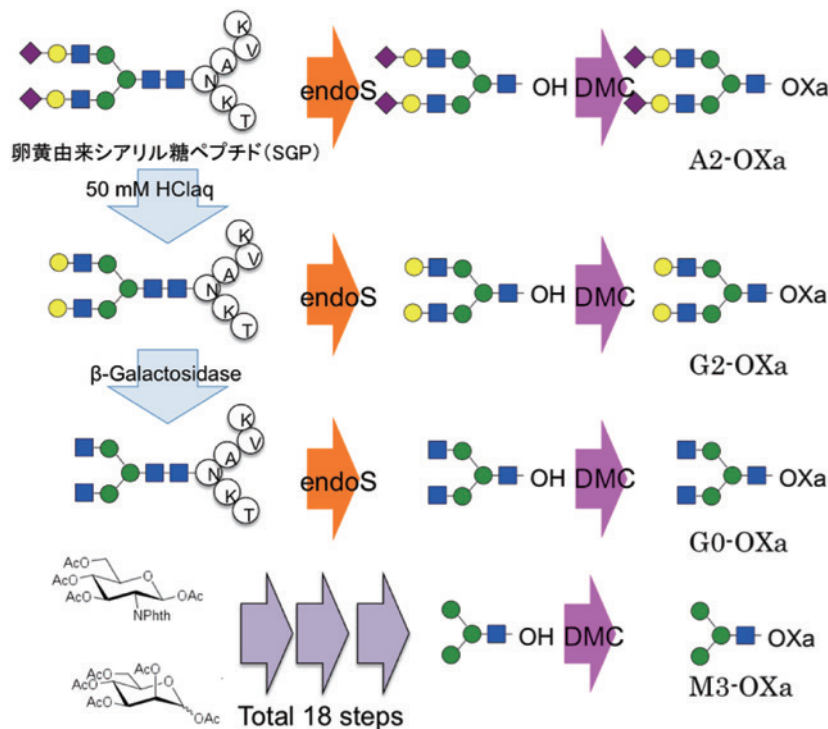


図9. グリコシルドナーの調製方法

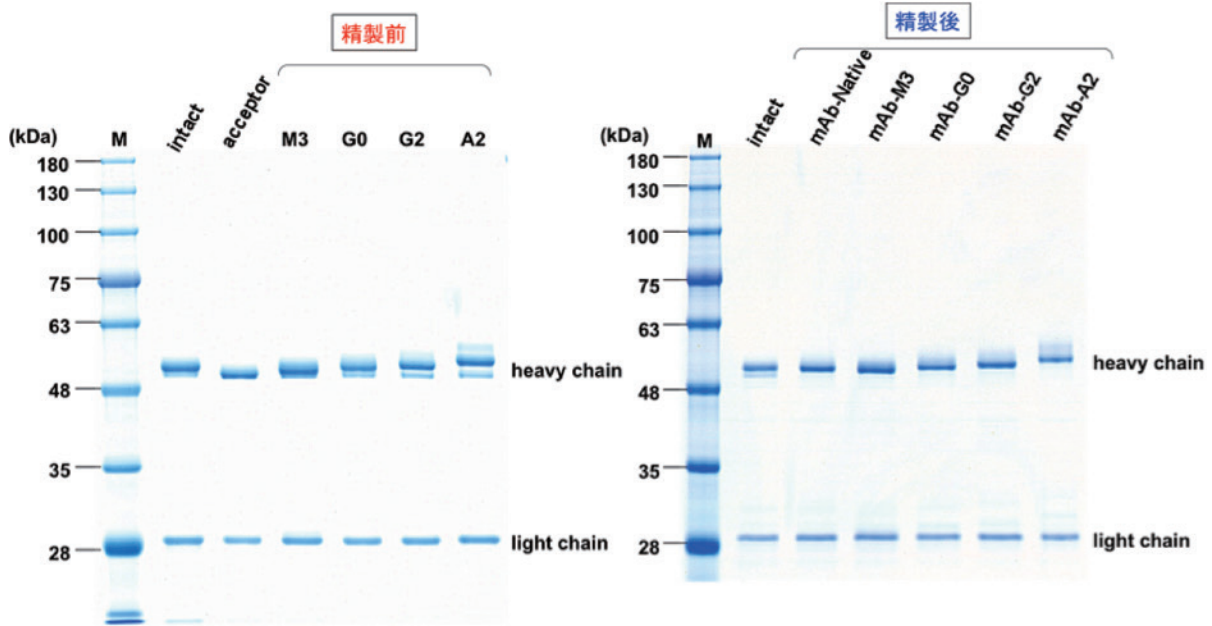


図10. 糖転移反応後の抗体のSDS-PAGE (左) と精製後の糖鎖改変抗体のSDS-PAGE (右)

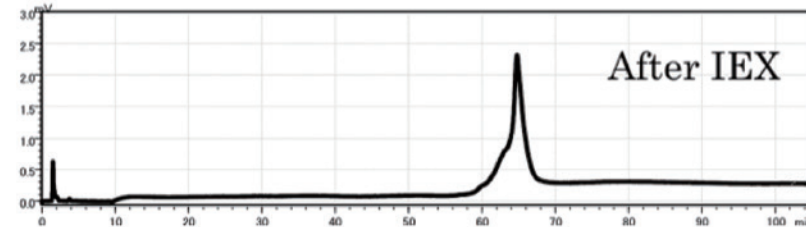
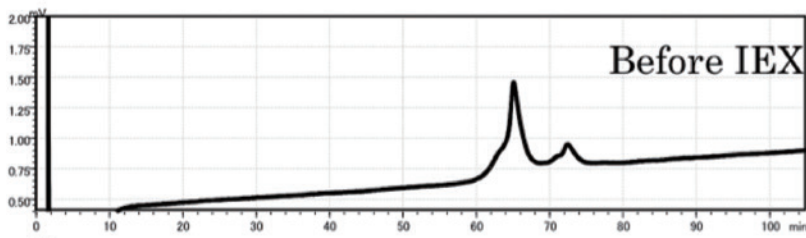
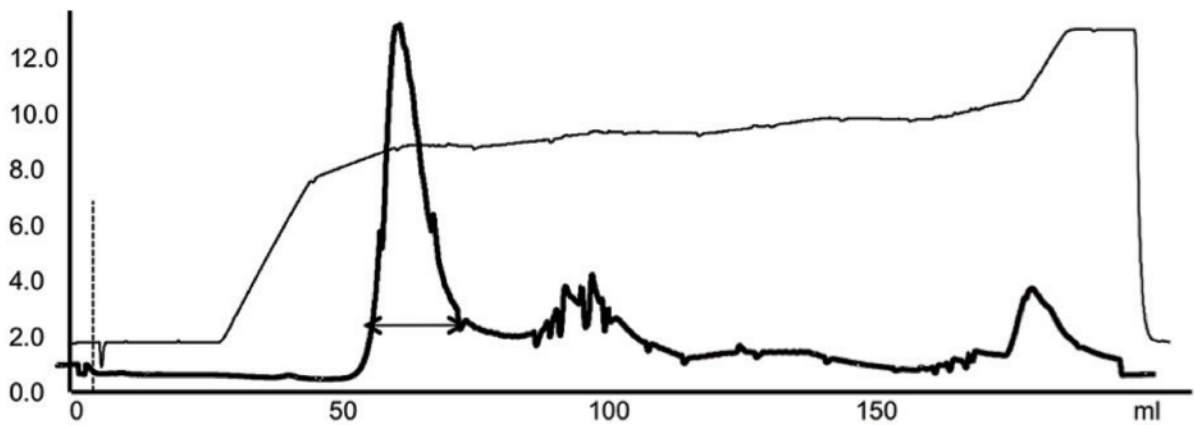


図11. 陽イオン交換カラムによる糖鎖転移反応後の糖鎖改変抗体 (mAb-G2)の分離クロマトと陽イオン交換カラムによる分離前後の糖鎖改変抗体の陽イオン交換クロマトグラフィー分析

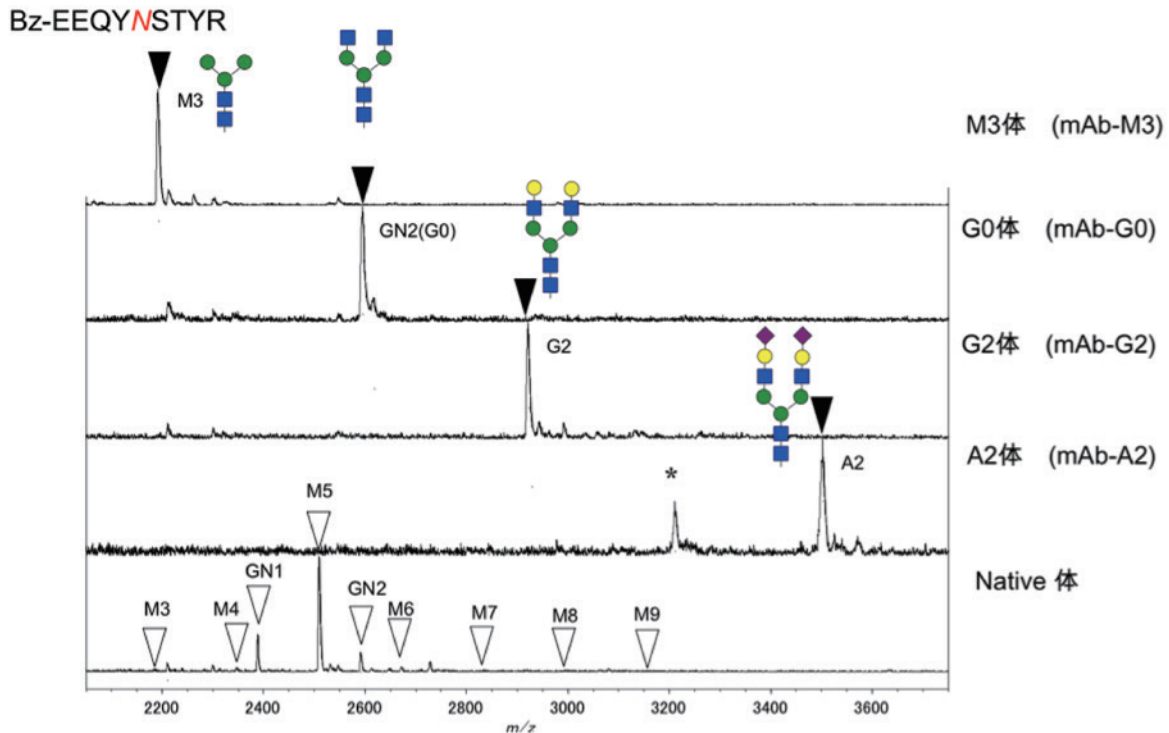


図12. 糖鎖改変抗体の糖ペプチドのMALDI-TOF MSスペクトル

2-4. 均一な糖鎖 (A2,G2,G0,M3) を持つ糖鎖改変anti-Her2抗体 (Trastuzumab) のFc γ RIIIa-V158に対する親和性並びにSKBR-3,BT-474をターゲット細胞とした時のADCC活性

Fc γ RIIIaは、抗体のFc領域受容体の一種であり、ナチュラルキラー細胞並びにマクロファージ等の細胞表面上に分布している。抗体医薬のADCC活性は、抗原を有する標的細胞に結合した抗体が免疫細胞上のFc γ RIIIaと結合することで、抗体依存的に誘導される標的細胞傷害活性である。Fc γ RIIIaと抗体のFc領域の結合は、抗体のFc領域のN結合型糖鎖の構造が深く関与しており、Dwek RA.らのグループ [13]、Sondermann P.らのグループ [14, 15]、Kato K.らのグループ [16, 17] がそれぞれコアフコースの無い抗体がFc γ RIIIaとの親和性を向上させると報告している。Fc γ RIIIaは、N結合型糖鎖の結合部位が5カ所 (N-38, 45, 74, 162, and 169) あり、その内のN162に結合しているN結合型糖鎖と抗体のFc領域のN結合型糖鎖

が糖鎖-糖鎖相互作用をしてFc γ RIIIaと抗体の親和性を構築している [13-17]。Fc γ RIIIaには、遺伝子多型が存在し、V158型とF158型が存在するが、Fc γ RIIIa-V158の方がFc γ RIIIa-F158よりもヒトのIgG1のFc領域と強く結合する事が知られている [18]。この為、Presta LGらの手法 [19] を参考にHEK293由来のヒト型Fc γ RIIIa-V158をマイクロプレートに固定化して、糖鎖改変したanti-Her2抗体 (Trastuzumab) (A2体、G2体、G0体、M3体) 並びに糖鎖改変していないanti-Her2抗体 (Trastuzumab) (Native体)、PNGaseFを用いて糖鎖切断した抗体 (aglycon体)、CHO細胞で生産されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) (CHO体) のFc γ RIIIa-V158に対する結合活性を調べた。その結果、anti-Her2抗体とFc γ RIIIa-V158の親和性の強弱はG2体>A2体>>G0体、Native体>M3体、CHO体>>aglycon体であり、糖鎖の結合の有無、糖鎖の構造によって大きく親和性が異なる事が分かった (図13)。この事から、シアリル化による親和性の低下 (G2

体>A2体)、糖鎖伸長による親和性の上昇(G2体>>>G0体, Native体(約63%がM5体)>M3体)、コアフコースを持つN型糖鎖による親和性の低下(G2体>>>G0体>CHO体(約85%がコアフコースを有する糖鎖))が判明した。

次に、Promega社製のADCCリポーターアッセイ [20, 21] を用いて糖鎖改変したanti-Her2抗体(Trastuzumab)(A2体、G2体、G0体、M3体)並びに糖鎖改変していないanti-Her2抗体(Trastuzumab)(Native体)、PNGaseFを用いて糖鎖切断した抗体(aglycon体)、CHO細胞で生産されたanti-Her2抗体(Trastuzumab)(CHO体)の抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を測定した。ターゲット細胞には、Her2レセプターが高発現しているヒト乳癌細胞(SKBR-3)とヌードマウス可移植性ヒト乳癌細胞(BT-474)をエフェクター細胞としてFc γ RIIIaのV158変異体を安定に発現し、ホタルルシフェラーゼの発現を駆動するNFAT応答配列を安定に保持する遺伝子組換えJurkat細胞を用いて行った。このADCCリポーターアッセイは、共同研究先の高柳先生によって行って

頂いた。その結果、anti-Her2抗体のSKBR-3上でのADCC活性の強さはA2体,G2体,G0体>Native体,M3体>CHO体>> aglycon体の順であり、BT-474上でのADCC活性の強さはA2体,G2体>G0体>Native体,M3体>CHO体>>aglycon体の順であった(図14)。このターゲット細胞によって微妙に違いが出ているADCC活性は、Her2レセプター以外のヒト乳癌細胞(SKBR-3)とヌードマウス可移植性ヒト乳癌細胞(BT-474)の細胞の構成成分の違いが影響している為だと考えられる[22]。また、Fc γ RIIIa-V158への親和性がほぼ同じであったM3体とCHO体が、ADCC活性では、両方のターゲット細胞でM3体の方がCHO体より非常に強い事からコアフコースの存在がFc γ RIIIa-V158への親和性よりもADCC活性に強く作用する事が分かった。さらに、Fc γ RIIIa-V158への親和性を向上に影響を与えていた糖鎖伸長がADCC活性ではほぼ影響がなくなっている。これらの事から、ADCC活性にはFc γ RIIIa-V158への親和性以外の因子が関与していると考えられる。

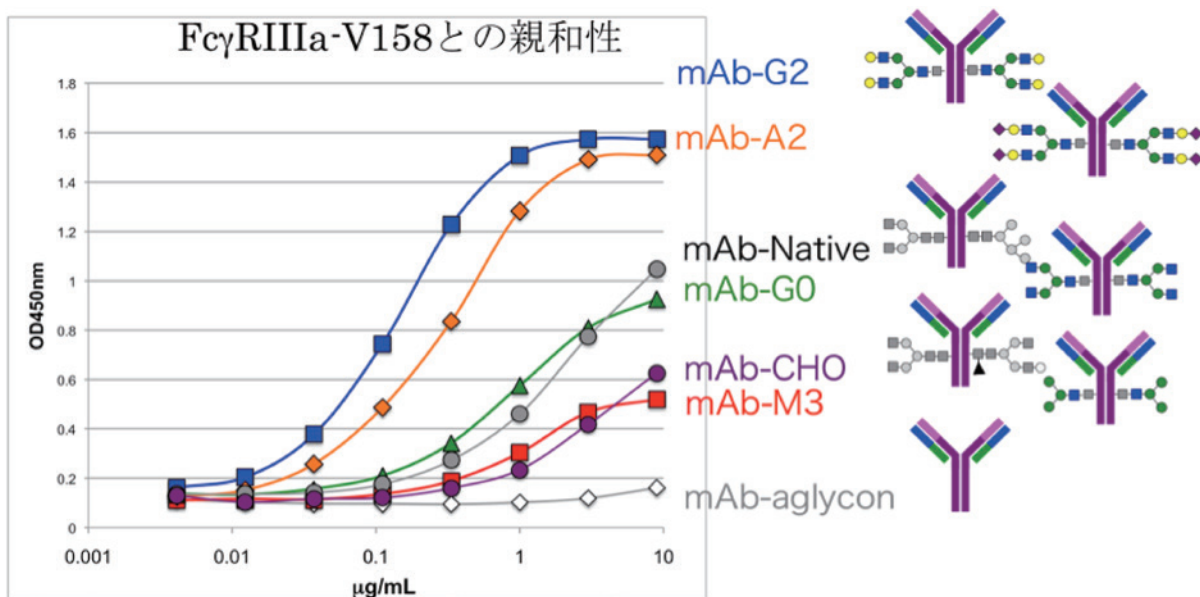


図13. Fc γ RIIIa-V158とモノクローナル抗体の相互作用

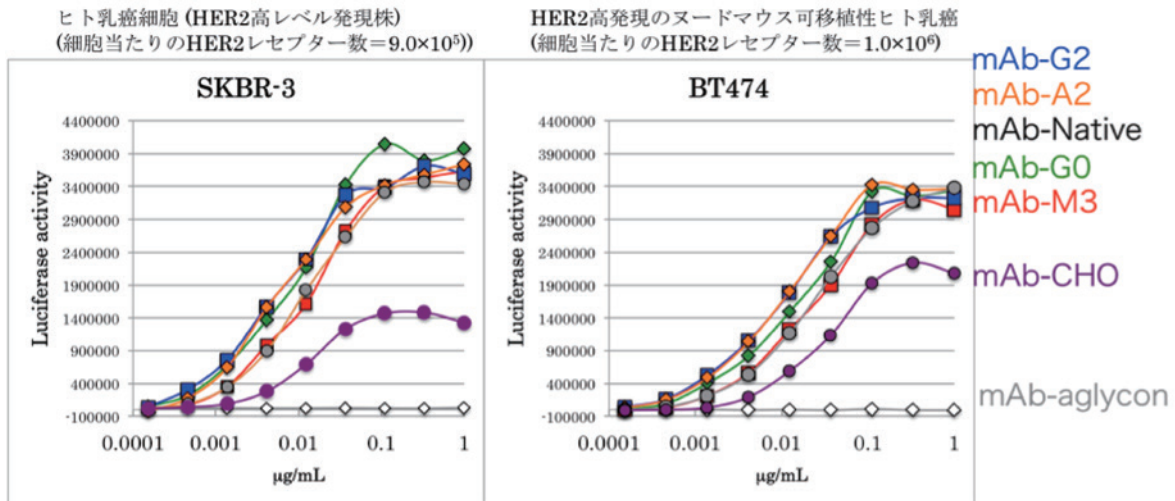


図14. モノクローナル抗体のADCCリポーターアッセイ

3. まとめ

我々は、カイコ絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) を出発原料に均一なN結合型糖鎖を持つ糖鎖改変抗体の作製を行った [9]。その際に、出発原料であるカイコ絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) の分析を糖鎖付加割合、凝集割合、糖ペプチドの質量分析による糖鎖の結合部位並びに糖鎖プロファイルの解析という点で行った。また、カイコ絹糸腺から産生されたanti-Her2抗体 (Trastuzumab) に対する各種エンド酵素の反応性を調べ、抗体に付加している不均一なN結合型糖鎖をN-アセチルグルコサミン1個に収束させる条件(エンド酵素の組み合わせ)を発見した。さらに、グリコシルドナーとなる糖鎖のオキサゾリン誘導體 (M3-OXa, G0-OXa, G2-OXa, A2-OXa) を天然物 (卵黄) 由来のSGPから調製する酵素化学的合成法と単糖の誘導體からスタートする有機化学的全合成から調製した。次に、これらの糖鎖のオキサゾリン誘導體をグリコシルドナーとして、N-アセチルグルコサミン1個が重鎖に付加しているanti-Her2抗体 (Trastuzumab) をグリコシルアクセプターとして、endoS-D233Qを用いた糖転移反応を行い、anti-Her2抗体 (Trastuzumab) の2本の重鎖に均一な糖鎖が転移しているフ

ルグリコシル型抗体の分離精製を行った。このendoS-D233Qを用いたインタクト抗体の糖転移反応は、Wang LXらによってすでに報告されている [12]。彼らはCHO細胞から生産されたrituximab (anti-CD20 mAb) を原料として使用しており、コアフコースの無い糖鎖は α -fucosidaseによる20日間の脱フコシル化反応を行い、グリコシルアクセプターとなるN-アセチルグルコサミン1個が重鎖に付加している抗体を調製した。その後、糖転移反応を行い、コアフコースの無い糖鎖を持つ抗体を作成していた。しかしながら、糖転移反応後の抗体のイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行っておらず、均一な糖鎖を持つフルグリコシル型抗体という観点では我々の手法がより精製度が高いと言える。また、我々は糖ペプチドの質量分析によって抗体の297番目のアスパラギンに結合している糖鎖が改変された事を確認している。最後に、糖転移反応後のフルグリコシル型抗体の分離精製と数種類の糖鎖改変抗体の作製のお蔭で均一な糖鎖を持つanti-Her2抗体 (Trastuzumab) のFc γ RIIIa-V158への親和性並びにADCC活性に現れる微妙な差を観測する事が出来た。これによって、抗体の糖鎖機能が部分的 (糖鎖の割合の大小等) ではなく、単一成分として導く事が出来、抗体

に結合している糖鎖構造による機能の違いを確認する事ができた。さらに、ADCC活性試験を2種類のターゲット細胞で行った事により、ターゲット細胞上での糖鎖機能の差を観測する事が出来た。

今回の糖鎖改変技術はanti-Her2抗体 (Trastuzumab) 以外の抗体に使用する事は勿論の事、抗体以外の糖タンパク質の改変技術にも大きな知見を与えられると考えている。

今までに市販されている多くの抗体医薬品、バイオ医薬品の糖タンパク質は糖鎖関連因子を制御していない動物細胞から生産されている為、付加している糖鎖構造も不均一であり、かつ非ヒト型糖鎖エピトープ (Gal α 1-3Gal, NeuGc, etc) が極少量 (1%未満) 混ざっている場合がある。この非ヒト型糖鎖エピトープはアナフィラキシー発症を引き起こす事 [23] がある為、現在、抗体医薬品並びに他のバイオ医薬品では非ヒト型糖鎖エピトープの含量を出す事が求められている。今

回の我々の糖タンパク質の酵素化学的合成法であれば、糖鎖部分は化学的に合成・調製するので上記のような極少量の非ヒト型糖鎖エピトープを完全に除去した状態にする事も逆に大量に作製する事も可能である。よって、本研究のアプローチが今まで困難だった極少量成分の糖タンパク質の詳細な糖鎖機能解析に応用できると考えられる。

近年、関節リウマチの治療として使用されているTNF抑制剤である抗体医薬品 (インフリキシマブ、アダリムマブ) とは異なる有効性を示すエタネルセプトというバイオ医薬品がある。このエタネルセプトは、可溶性TNF受容体とIgG抗体のFc領域を持つ遺伝子組替えによる融合タンパク質であり、TNF受容体部分に2カ所、Fc領域に1カ所のN結合型糖鎖があり、連結部分のヒンジ領域にO結合型糖鎖が多数付加している75kDaからなるポリペプチド鎖のホモダイマー構造を形成している (図15) [24, 25]。CHO細胞で生産されているエタネルセプトは、TNF受容体部

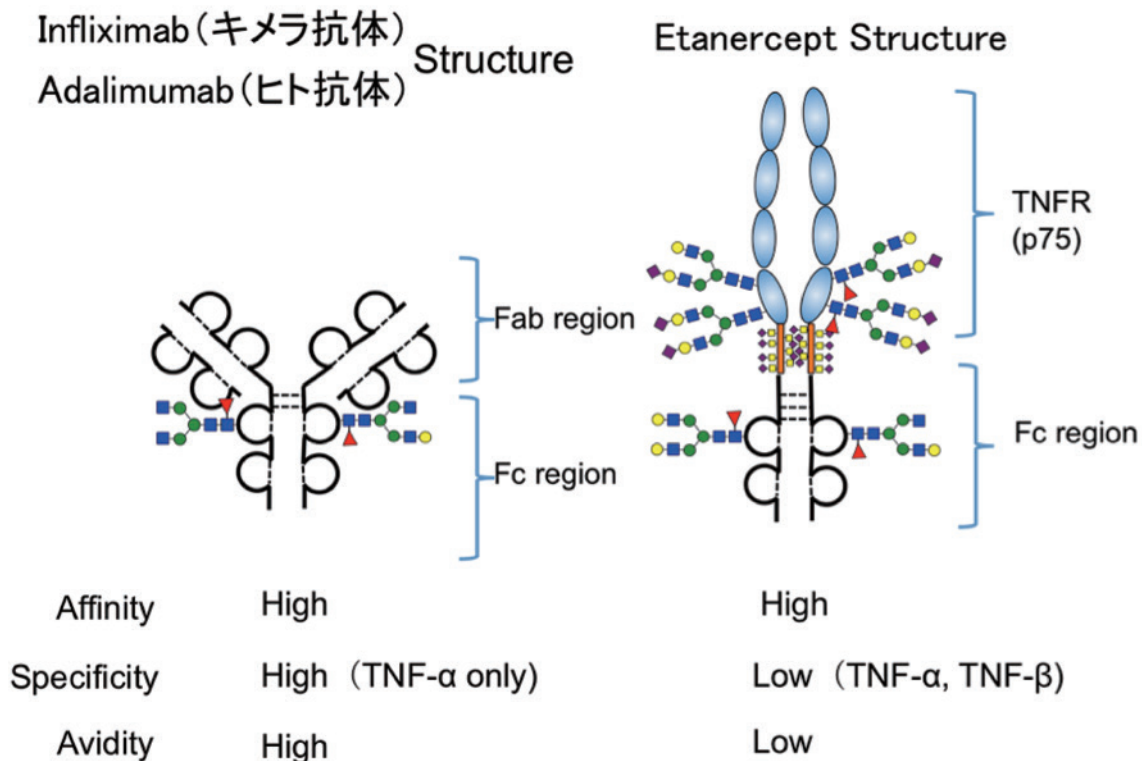


図15. 関節リウマチ治療薬のInfliximab,Adalimumabの構造とEtanerceptの構造比較

位に結合しているN結合型糖鎖にはシアル酸が付加しているが、Fc領域に付加しているN結合型糖鎖はシアル酸が付加していない。つまり、タンパク質の部位の違いによって、結合している糖鎖構造が異なっている。今回の我々の酵素化学的合成アプローチは、このような複数結合した糖鎖の部位特異的な糖鎖構造の制御への応用も可能になると期待される。

今後、この糖鎖改変技術を応用して様々な抗体の糖鎖改変体並びに糖タンパク質の調製並びにその物性評価へと仕事を発展させ、より詳細な糖鎖機能の解明に繋げていく予定である。

謝辞

抗体の特殊アミノ酸組成分析を行って頂いた北海道大学の機器分析センターの武田さん、並びに抗体のESI-FT MS分析を行って頂いた肥後さんにこの場を借りて感謝申し上げます。

また、この研究成果は、共同研究先である免疫生物研究所の富田正浩氏、慶応大学の高柳淳先生、東北大学の正田晋一郎先生、野口研究所のHGPプロジェクトに参加して頂いた多くの人達によって行われており、今回の研究成果をまとめて発表できる事を関係者皆様に感謝いたします。

References

1. Kurogochi M, Amano J. (2014) Relative Quantitation of Glycopeptides based on Stable Isotope Labeling using MALDI-TOF MS. *Molecules* 19: 9944-9961.
2. Iizuka M, Ogawa S, Takeuchi A, Nakakita S, Kubo Y, Miyawaki Y, Hirabayashi J, Tomita M. (2009) Production of a recombinant mouse monoclonal antibody in transgenic silkworm cocoons. *FEBS J.* 276: 5806-5820.
3. Wang S, Ionescu R, Peekhaus N, Leung JY, Ha S, Vlasak J. (2010) Separation of post-translational modifications in monoclonal antibodies by exploiting subtle conformational changes under mildly acidic conditions. *J Chromatogr A.* 1217: 6496-6502.
4. Ha S, Ou Y, Vlasak J, Li Y, Wang S, Vo K, Du Y, Mach A, Fang Y, Zhang N. (2011) Isolation and characterization of IgG1 with asymmetrical Fc glycosylation. *Glycobiology.* 21: 1087-1096.
5. Collin M, Olsén A. (2001) EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *EMBO J.* 20: 3046-3055.
6. Kadowaki S, Yamamoto K, Fujisaki M, Izumi K, Tochikura T, Yokoyama T. (1990) Purification and characterization of a novel fungal endo- β -N-acetylglucosaminidase acting on complex oligosaccharides of glycoproteins. *Agric Biol Chem.* 54: 97-106.
7. Tai T, Yamashita K, Ogata-Arakawa M, Koide N, Muramatsu T, Iwashita S, Inoue Y, Kobata A. (1975) Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation to the endo- β -N-acetylglucosaminidase specificity. *J Biol Chem.* 250: 8569-8575.
8. Tarentino AL, Plummer TH Jr, Maley F. (1974) The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo- β -N-acetylglucosaminidase H. *J Biol*

- Chem. 249: 818-824.
9. Kuroguchi M, Mori M, Osumi K, Tojino M, Sugawara S-i, Takashima S, Hirose Y, Tsukimura W, Mizuno M, Amano J, Matsuda A, Tomita M, Takayanagi A, Shoda S-I, Shirai T. (2015) Glycoengineered Monoclonal Antibodies with Homogeneous Glycan (M3, G0, G2, and A2) using a chemoenzymatic approach have different affinities for Fc γ RIIIa and variable antibody-dependent cellular cytotoxicity activities. PLoSOne 10: e0132848
 10. Zou G, Ochiai H, Huang W, Yang Q, Li C, Wang LX. (2011) Chemoenzymatic synthesis and Fc γ receptor binding of homogeneous glycoforms of antibody Fc domain. Presence of a bisecting sugar moiety enhances the affinity of Fc to Fc γ IIIa receptor. J Am Chem Soc. 133: 18975-18991.
 11. Noguchi M, Tanaka T, Gyakushi H, Kobayashi A, Shoda S. (2009) Efficient synthesis of sugar oxazolines from unprotected N-acetyl-2-amino sugars by using chloroformamidinium reagent in water. J Org Chem. 74: 2210-2212.
 12. Huang W, Giddens J, Fan SQ, Toonstra C, Wang LX. (2012) Chemoenzymatic glycoengineering of intact IgG antibodies for gain of functions. J Am Chem Soc. 134: 12308-12318.
 13. Wormald MR, Rudd PM, Harvey DJ, Chang SC, Scragg IG, Dwek RA. (1997) Variations in oligosaccharide-protein interactions in immunoglobulin G determine the site-specific glycosylation profiles and modulate the dynamic motion of the Fc oligosaccharides. Biochemistry. 36: 1370-1380.
 14. Krapp S, Mimura Y, Jefferis R, Huber R, Sondermann P. (2003) Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. J Mol Biol. 325: 979-989.
 15. Ferrara C, Grau S, Jäger C, Sondermann P, Brünker P, Waldhauer I, Hennig M, Ruf A, Rufer AC, Stihle M, Umaña P, Benz J. (2011) Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fc γ RIII and antibodies lacking core fucose. Proc Natl Acad Sci U S A. 108: 12669-12674.
 16. Yamaguchi Y, Nishimura M, Nagano M, Yagi H, Sasakawa H, Uchida K, Shitara K, Kato K. (2006) Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region of human immunoglobulin G1 as revealed by NMR spectroscopy. Biochim Biophys Acta. 1760: 693-700.
 17. Mizushima T, Yagi H, Takemoto E, Shibata-Koyama M, Isoda Y, Iida S, Masuda K, Satoh M, Kato K. (2011) Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. Genes Cells. 16:1071-1080.
 18. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. (1997) Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. Blood. 90:1109-1114.
 19. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG.

- (2001) High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 276: 6591-6560
20. Parekh BS, Berger E, Sibley S, Cahya S, Xiao L, LaCerte MA, Vaillancourt P, Wooden S, Gately D. (2012) Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-reporter gene assay. *MAbs.* 4: 310-318.
21. Tada M, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Kawasaki N. (2014) Development of a cell-based assay measuring the activation of Fc γ RIIa for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *PLoS One.* 9: e95787.
22. Prang N, Preithner S, Brischwein K, Göster P, Wöppel A, Müller J, Steiger C, Peters M, Baeuerle PA, da Silva AJ. (2005) Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 92: 342-349.
23. Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le QT, Berlin J, Morse M, Murphy BA, Satinover SM, Hosen J, Mauro D, Slebos RJ, Zhou Q, Gold D, Hatley T, Hicklin DJ, Platts-Mills TA. (2008) Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- α -1,3-galactose. *N Engl J Med.* 358: 1109-1117.
24. DiPaola M, Li J, Stephens E (2013) Development of Biosimilars: Analysis of Etanercept Glycosylation as a Case Study. *J Bioanal Biomed* 5: 180-186.
25. Houel S, Hilliard M, Yu YQ, McLoughlin N, Martin SM, Rudd PM, Williams JP, Chen W. (2014) N- and O-glycosylation analysis of etanercept using liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry equipped with electron-transfer dissociation functionality. *Anal Chem.* 86: 576-84.

β 4-N-アセチルガラクトサミン転移酵素4遺伝子の 発現を増大させるとヒト乳癌細胞の腫瘍形成は抑制される

Enhanced expression of the β 4-N-acetylgalactosaminyltransferase
4 gene impairs tumor growth of human breast cancer cells

平野清子*¹、松田昭生*²、久慈諒*³、仲村渠史郎*³、白井孝*⁴、古川清*³
Kiyoko HIRANO*¹, Akio MATSUDA*², Ryo KUJI*³, Shiro NAKANDAKARI*³,
Takashi SHIRAI*⁴, Kiyoshi FURUKAWA*³

要旨

N-型及びO-型糖鎖のGalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc (LacdiNAc) 構造の形成には、2種の β 4-N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (β 4GalNAcTs)、すなわち β 4GalNAcT3及び β 4GalNAcT4が関与している。特にヒトの乳腺においては、 β 4GalNAcT4遺伝子のみ発現していると報告されている。我々は以前、乳癌の進行に伴い、細胞表面の糖鎖上のLacdiNAc構造の発現量が減少することを見いだした。そこで乳癌におけるLacdiNAc構造の生物学的機能を解明すべく、ヒト乳癌由来細胞MDA-MB-231に、N-末にFLAG-tagを付加した β 4GalNAcT4をコードするcDNAを導入し、この遺伝子の高発現株を樹立した。クローン1及びクローン2細胞は対照細胞と比較して、 β 4GalNAcT4の遺伝子発現量がそれぞれ15及び9倍高く、ウエスタンブロットによる解析で酵素タンパク質の発現量が有意に増大していた。またフローサイトメーターによる解析から、酵素の反応生成物であるLacdiNAc構造も細胞表面で増大していた。クローン1及びクローン2細胞は対照細胞と比較して、増殖能に関して有意な相違は

見いだされなかったが、コロニー形成能や浸潤能は著しく抑制された。対照細胞をヌードマウスの皮下に移植すると腫瘍が形成されたが、クローン1細胞を移植しても腫瘍の形成は見られなかった。以上の結果より、MDA-MB-231細胞において細胞表面のN-型糖鎖上のLacdiNAc構造の発現量を増大させると、造腫瘍能や浸潤能が抑制されることが明らかとなった。

1. 序論

タンパク質や脂質に結合した糖鎖は発生や各種疾患など、様々な生体内の機能に重要な役割を担っている [1]。N-型及びO-型糖鎖の非還元末端のGalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc (LacdiNAc) 構造は無脊椎動物及び脊椎動物に共通してみられる構造であるが、哺乳動物では比較的珍しい [2, 3]。しかしながら、近年の糖鎖分析技術の進展に伴い、LacdiNAc構造をもつ糖鎖は極微量ながらも様々な動物組織や細胞に存在することが報告されてきた。LacdiNAc構造の生合成に関しては、2種の β 4-N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (β 4GalNAcTs)、すなわち β 4GalNAcT3 (Gen-

*1 糖タンパク質工学研究室 *2 研究部長 兼 糖タンパク質工学研究室 室長 *3 長岡技術科学大学 *4 常務理事

eBank™ accession number AB089940) 及び β 4GalNAcT4 (Gene-Bank™ accession number AB089939) が関与している [4, 5]。これらの糖転移酵素はUDP-GalNAcのGalNAcをN-型及びO-型糖鎖の非還元末端のGlcNAc残基に β -1,4-結合で転移させる [6, 7]。これら2つの β 4GalNAcTはアミノ酸配列に関して高い相同性を示し、また*in vitro*における基質特異性も類似しているが、その発現組織が異なることが知られ、 β 4GalNAcT3は胃、結腸及び精巣に、 β 4GalNAcT4は脳や卵巣に多く発現している [5]。LacdiNAc構造は硫酸化 [8]、シアリル化 [9] 及びフコシル化等の各種の修飾を受け、これらの修飾されたLacdiNAc構造は生体内で特定の機能を持つことが知られている。例えば黄体化ホルモンであるルトロピンに結合した糖鎖上の硫酸化されたLacdiNAc構造は、肝細胞上のマンノース/4位硫酸化ガラクトサミン受容体によって認識され、このホルモンの血中動態に重要な役割を担っている [11]。

これまでにLacdiNAc構造及び β 4GalNAcTの発現量の増加が前立腺癌、子宮癌、肝癌及び結腸癌の進行に相関していることが報告されている [12-16]。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、寒天培地上でのコロニー形成能や浸潤能などの各種悪性形質が著しく増加する [16]。その一方、ヒト神経芽細胞腫においては、 β 4GalNAcT3遺伝子の発現増大は予後の良好性と相関している [17]。ヒト神経芽細胞腫細胞SK-N-SH及びSK-SY5Yに β 4GalNAcT3遺伝子を過剰発現させた時、細胞遊走能、増殖能、コロニー形成能及び浸潤能が抑制される。このようにLacdiNAc構造の発現による悪性形質の制御は組織特異的であると考えられる。

我々は以前、ヒト乳癌において癌の進行に伴いN-型糖鎖上のLacdiNAc構造の発現量が減少することを見いだした [18]。この結果

から、N-型糖鎖上のLacdiNAc構造の発現は乳癌の細胞を正常に保つ上で重要な役割を担うと考えられた。しかしながら、乳癌におけるLacdiNAc構造の減少/消失の生物学的意義について、詳細は未だ不明である。そこで、本研究では乳癌由来細胞MDA-MB-231に β 4GalNAcT4遺伝子を過剰発現させ、LacdiNAc構造を強制発現した細胞株を樹立し、細胞増殖能、コロニー形成能、腫瘍形成能及び浸潤能に与える影響について解析を行った。

2. 結果

2.1. ヒト乳癌由来細胞MDA-MB-231を用いた β 4GalNAcT4遺伝子高発現株の単離

我々は以前、ヒト乳癌組織においてN-型糖鎖上にLacdiNAc構造が発現しており、癌化に伴いこの糖鎖の発現量が減少すること明らかにしてきた [18]。またヒト乳癌組織では β 4GalNAcT3ではなく、 β 4GalNAcT4遺伝子が発現していることが先行研究により明らかにされている [5]。 β 4GalNAcT活性を増大させる為、ヒト β 4GalNAcT4をコードするcDNAを発現ベクター 3xFLAG-CMV-10にサブクローニングし、これを乳癌由来細胞MDA-MB-231に導入した。G418を用いた選択により、クローン化された β 4GalNAcT4遺伝子高発現株を複数得、それぞれの β 4GalNAcT4 mRNAの発現についてリアルタイムPCR法にて解析を行った。その結果、クローン1及びクローン2細胞では対照細胞と比較して、 β 4GalNAcT4 mRNAレベルがそれぞれ15倍及び9倍に増加していた (図1A)。

FLAG- β 4GalNAcT4タンパク質の発現量について、抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロットにて解析を行った。クローン1及びクローン2細胞において全長cDNAに対応する分子量150Kのバンドが検出された (図1B)。なお、クローン1細胞はクローン2細胞と比較して150Kのタンパク質の発現量が多く、これは図1A で示したmRNAの発現レベ

ルと対応している。免疫染色にてFLAG- β 4GalNAcT4の細胞内局在を解析した結果、トランスゴルジネットワーク (TGN) のマー

カーであるTGN38と共在しており、他の多くの糖転移酵素同様にTGNに局在していることが判明した (図1C)。

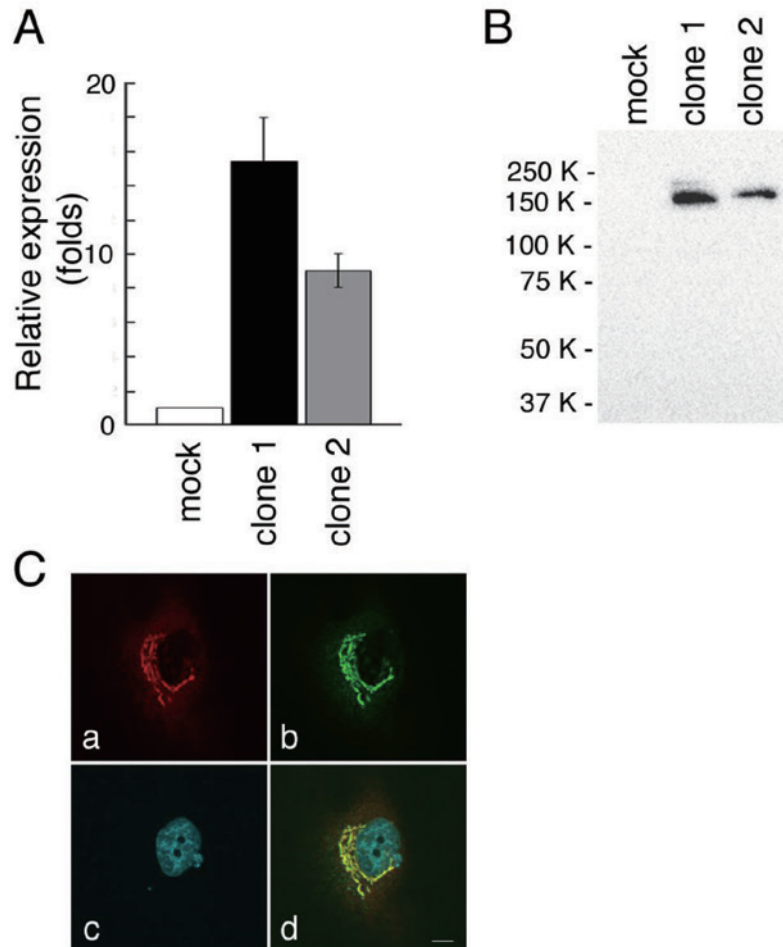


図1. 遺伝子導入細胞における β 4GalNAcT4の遺伝子とタンパク質の発現、およびタンパク質の細胞内局在。(A) リアルタイムPCR法による β 4GalNAcT4 mRNAレベルの解析 (B) 抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロット法によるFLAG- β 4GalNAcT4の検出 (C) 免疫染色法によるFLAG- β 4GalNAcT4の細胞内局在の解析; (a) 抗FLAG抗体による染色, (b) 抗TGN38抗体による染色, (c) DAPI染色, (d) a, b, cを重ねた染色。図中のスケールバーは10 μ mを示す。

FITC標識したレクチン *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) を用いてフローサイトメトリーにより、クローン1及びクローン2細胞の細胞表面に発現するLacdiNAc構造の解析を行った。その結果、対照細胞に比べてクローン1及びクローン2細胞の細胞表面

上のLacdiNAc構造の発現量が増大していた (図2A-a)。なおクローン1細胞ではクローン2細胞と比較して β 4GalNAcT4 mRNAの発現レベル及びタンパク質の発現量が高かったが、これら2つの細胞間において細胞表面のLacdiNAc構造の発現量に相違は見られな

かった (図2A-a)。一方、非還元末端のGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc/Glcを認識するレクチン*Ricinus communis* agglutinin 120 (RCA-120)

(Alexa 488で標識) を用いて解析した結果、対照細胞及び2つのクローン細胞で相違は見られなかった (図2A-b)。

膜画分中に含まれるLacdiNAc構造を持つ糖タンパク質を検出するため、WFAを用いたレクチンブロットを行った。その結果、クローン1細胞においてWFAと強く反応する分子量150 K及び200 Kのタンパク質バンドが検出された (図2B-d)。これらのバンドは100 mM GalNAcの存在下でWFAと反応させるとレクチンとの結合が阻害されることから、非還元末端のGalNAcが特異的に認識されており、LacdiNAc構造が存在することが示唆

された。また、ペプチドN-グリコシダーゼF処理を行うことによってこれらのバンドが消失することから、LacdiNAc構造はクローン細胞中の糖タンパク質のN-型糖鎖上に発現していると考えられた。さらに*A. ureafaciens*由来のシアリダーゼで消化を行うとWFAと反応する分子量150 K及び200 Kのタンパク質バンドがさらに強く検出された (図2B-e)。このことから、MDA-MB-231細胞中では一部のLacdiNAc構造はシアリル化を受けていることが明らかとなった。

3.2. β 4GalNAcT4遺伝子高発現株における細胞増殖能及びコロニー形成能の解析

対照細胞及びクローン1及びクローン2細胞の細胞増殖能に関して、MTTアッセイによ

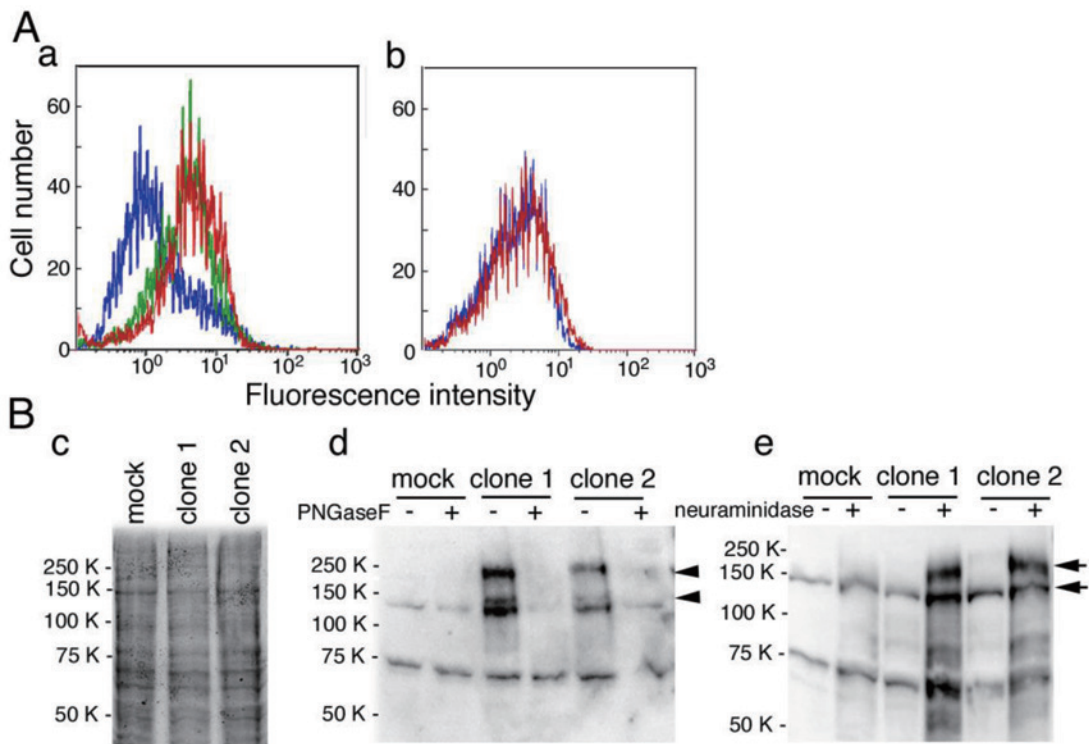


図2. 細胞表面に発現しているLacdiNAc構造をもつ糖鎖の検出。(A) フローサイトメーターによる細胞表面に発現しているLacdiNAc構造をもつ糖鎖の検出；(a) FITC標識WFAを用いた染色、(b) Alexa488標識RCA 120を用いた染色。青色は対照細胞、赤色はクローン1細胞、緑色はクローン2細胞を示す。(B) 細胞の膜画分の糖タンパク質を用いたWFAレクチンブロット。(c) CBB染色、(d) ペプチドN-グリコシダーゼ処理後のレクチン染色、(e) シアリダーゼ処理のレクチン染色。

り解析した。その結果、これらの細胞間における増殖には有意な相違は見られなかった (図3A)。次にこれら細胞を用いて寒天培地上のコロニー形成能について解析を行った。対照細胞では比較的大きなコロニーの形成が数多く見られ、直径200 μm 以上のコロニーが $13.5 \pm 2.0/\text{well}$ 観察され、この他にも小さなコロニーも多く見られた (図3B及び3C)。

一方、クローン1及びクローン2細胞では直径200 μm 以上のコロニーの形成はほとんど見られず、同時にこれよりも小さなコロニーの数も対照細胞に比べ極端に少ないことが判明した。以上の結果から細胞表面のLacdiNAc構造の発現量が増大することにより、乳癌細胞のコロニー形成能が抑制されることが明らかとなった。

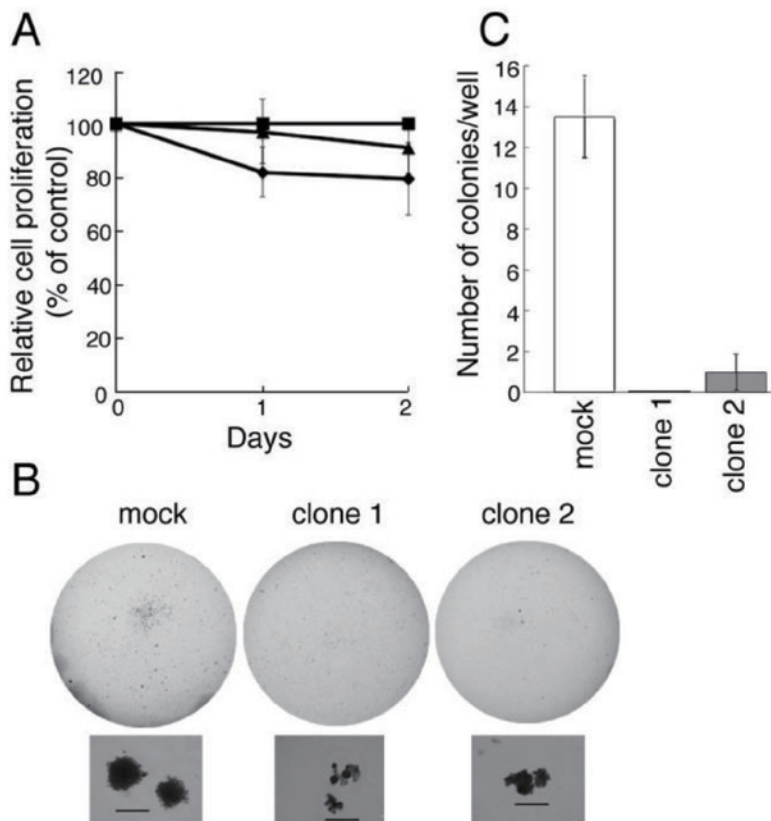


図3. LacdiNAc構造の発現量の増大による乳癌細胞の悪性形質の変化。(A) MTTアッセイによる細胞の増殖能；(■)，対照細胞、(◆)，クローン1細胞、(▲)，クローン2細胞。(B) 寒天培地上でのコロニー形成能。スケールバーは200 μm を示す。(C) 直径200 μm 以上のコロニー数。

3.3. β 4GalNAcT4遺伝子高発現株における腫瘍形成能の解析

対照細胞及び β 4GalNAcT4遺伝子高発現株クローン1細胞をそれぞれヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成能について解析を行った。移植から2週間経過した時点で対照細胞を移植したマウスのみで腫瘍の形成が確

認された。45日経過した時点でも腫瘍形成は対照細胞を移植したマウスのみでみられ、摘出した腫瘍の大きさを測定したところ平均値は $107.1 \pm 20.7\text{mm}^3$ であった (図4A)。クローン1細胞と同様にクローン2細胞をヌードマウスに移植した場合も、腫瘍形成は見られなかった。

MDA-MB-231細胞は高い浸潤能を示すことが報告されていることから [19]、細胞表面のLacdiNAc構造の発現量を増大させた時に浸潤能に与える影響についてマトリゲル浸

潤アッセイにより解析を行った。その結果、クローン1及びクローン2細胞では対照細胞に比べて60%ほど浸潤能が低下していることが判明した (図4B)。

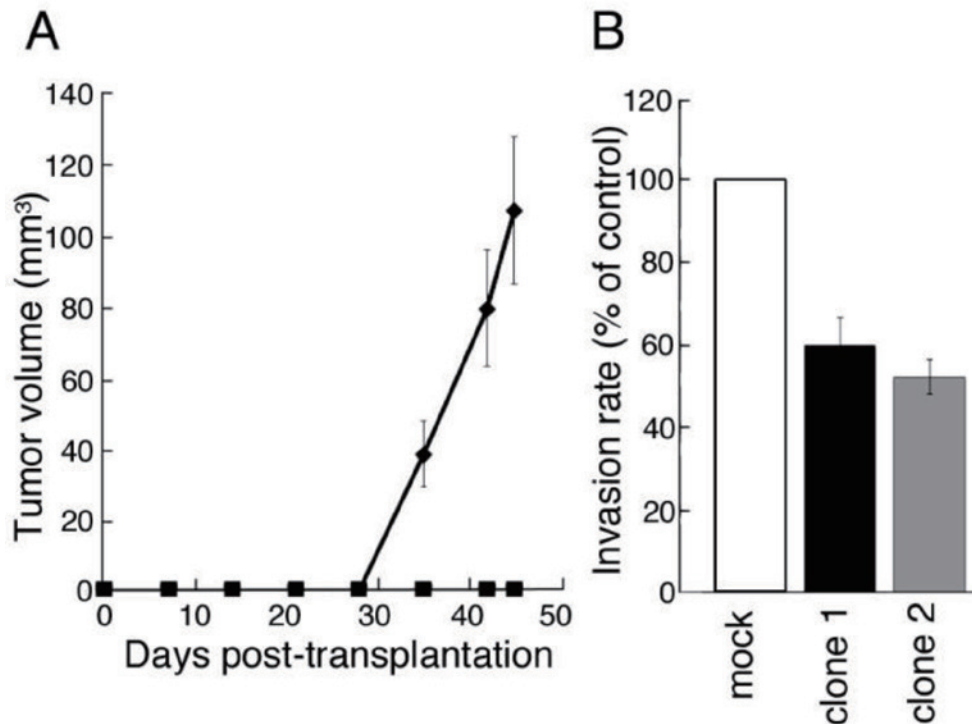


図4. LacdiNAc構造の発現量の増大による乳癌細胞の腫瘍形成能と浸潤能の変化。(A) ノードマウスの皮下に移植した対照細胞 (◆) 及びクローン1細胞 (■) が造る腫瘍の大きさ。(B) マトリゲル浸潤アッセイによる対照細胞およびクローン1及びクローン2細胞の浸潤能。

4. 考察

これまでに哺乳動物細胞の糖タンパク質にも微量ながらLacdiNAc構造が存在することが報告され、特定の癌において癌の進行にこの糖鎖が関与している可能性が示唆されている [12-18]。興味深いことにLacdiNAc構造の癌の悪性形質への関与は組織特異的であると考えられている [20]。我々は以前、ヒト乳癌において癌の進行に伴い、N-型糖鎖上にLacdiNAc構造の発現量が減少することを報告した [18]。しかしながら、乳癌におけるLacdiNAc構造の生体内での機能の詳細は未だ不明である。今回、本研究においてヒト乳癌由来細胞MDA-MB-231にLacdiNAc構造を

過剰発現させた場合、コロニー形成能、浸潤能及び腫瘍形成能などの各種悪性形質が抑制されることが明らかとなった。

これまでに β 1-インテグリンなどの細胞表面の受容体タンパク質の糖鎖構造が癌化に伴い変化し、細胞間相互作用、細胞遊走能及び浸潤能などが制御を受けることが広く知られている。例えばヒト繊維肉腫細胞中にN-アセチルグルコサミン転移酵素 VをコードするcDNAを導入して、 $\alpha 5 \beta 1$ -インテグリン上に β 1,6の分岐構造を持ったN-型糖鎖の発現を増大させると細胞遊走能及び浸潤能が促進され、E-カドヘリンを介した細胞間接着能が減じる [21]。さらに上皮成長因子受

容体 (EGFR) 上のN-型糖鎖がシアリル化及びフコシル化を受けることによって、これらの二量体化とリン酸化が阻害され、ヒトの胃がんにおいて浸潤能が抑制されることが報告されている [22]。なお、我々は本研究でMDA-MB-231細胞に β 4GalNAcT4遺伝子を導入すると、分子量150 K及び200 Kの2つの膜タンパク質のN-型糖鎖上にLacdiNAc構造の発現が増大することを明らかにした。これら糖タンパク質の同定には至っていないが、細胞表面の受容体タンパク質であり、この細胞の悪性形質を制御する情報伝達経路に深く関与している可能性が多いと考えられる。これまでに β 4GalNAcTの高発現系では β 1-インテグリン [17]、EGFR [23]、白血病抑制因子受容体 (LIFR) 及びgp130 [24] といった各種の受容体タンパク質のN-型糖鎖上にLacdiNAc構造の発現量が増大し、その結果細胞内情報伝達経路に大きな影響を与えることが報告されている。例えば神経芽細胞種細胞SK-N-SH及びSK-SY5Yにおいて、 β 4GalNAcT3遺伝子の発現量の増大は β 1-インテグリンのN-型糖鎖上のLacdiNAc構造の発現を促進し、その結果、FAK, Akt及びERKのリン酸化の減少が引き起こされる。そして最終的にこれら細胞の細胞遊走能、増殖能、コロニー形成能及び浸潤能が抑制される [17]。本研究においても同様に β 4GalNAcT4遺伝子をMDA-MB-231細胞に導入したところ、この細胞のコロニー形成能及び浸潤能が著しく抑制されており、神経芽細胞種細胞と同様の制御機構により各種の悪性形質が抑制されることが示唆される。詳細な分子制御機構の解明については今後の課題である。

今回我々はMDA-MB-231細胞中に存在するLacdiNAc構造が一部シアル酸付加されていることを明らかにした (図2)。最近MCF-7及びMDA157といったヒト乳癌由来細胞中にシアリル化やフコシル化を受けた

LacdiNAc構造が存在することが報告されている [25]。LacdiNAc構造の修飾に関しては以前からよく知られており [8-10]、これらの修飾は細胞表面の特定の受容体タンパク質による認識に重要であると考えられている。例えば硫酸化及びシアリル化されたLacdiNAc構造は、マンノース/4位硫酸化ガラクトサミン受容体 [11] やアシアロ糖タンパク質受容体 [26] に認識されることが報告されている。一方、修飾を受けていないLacdiNAc構造は β ガラクトシド結合を認識するレクチンであるガレクチン3と特異的に結合し、マクロファージを介した免疫反応に重要な役割を担うことが明らかにされている [27]。乳癌細胞においてLacdiNAc構造の修飾は、癌化にどのような影響を与えるのか詳細は不明であり、その生物学的意義を解明することは極めて重要であると考えられる。

ヒト乳癌組織では β 4GalNAcT3ではなく β 4GalNAcT4の遺伝子発現がみられ、LacdiNAc構造の生合成に関与していると考えられる [5]。しかしながら乳癌の進行に伴いこれらの β 4GalNAcT遺伝子の発現レベルが変化するか否か不明である。以前、我々は組織学的解析から、乳癌の進行に伴い細胞表面のLacdiNAc構造の発現量が減少することを報告した [18]。このことから乳癌の進行に伴い、 β 4GalNAcT遺伝子の発現レベルも減少すると推測される。実際にヒト神経芽細胞種において β 4GalNAcT3の発現レベルは、この癌の患者さんの予後の良好性によく相関していることが報告されている [17]。乳癌においてもこれらを明らかにする為、この癌の患者さんの組織を用いたDNAマイクロレイによる解析の結果が待たれる。

乳癌は女性の罹患する癌としては最も多く、世界規模でその患者数は増加している。乳癌においては癌化の分子機構が比較的よく解明されており、それぞれの患者さんに適した治療が施されている。しかしながら、ホ

ルモン受容体及び上皮成長因子受容体2が欠損している、所謂トリプルネガティブタイプの患者さんに対する適切な治療法がないのが現状である [28]。本研究で用いたMDA-MB-231細胞はトリプルネガティブタイプの細胞であり、 β 4GalNAcT4遺伝子の発現の増大によって各種の悪性形質の抑制がみられることから、将来的には β 4GalNAcT4遺伝子を用いた乳癌の遺伝子治療法の開発が期待される。

引用文献

1. A. Varki, *Glycobiology* 3 (1993) 97-130.
2. S.M. Manzella, L.V. Hooper, J.U. Baenziger, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12117-12120.
3. K. Furukawa, N. Kitamura, T. Sato, *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.* 491 (2001) 313-323.
4. T. Sato, M. Gotoh, K. Kiyohara, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 47534-47544.
5. M. Gotoh, T. Sato, K. Kiyohara, *et al.*, *FEBS Lett.* 562 (2004) 134-140.
6. D. Fiete, M. Beranek, J.U. Baenziger, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 29204-29212.
7. D. Fiete, M. Beranek, J.U. Baenziger, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 29194-29203.
8. E.D. Green, H. van Halbeek, I. Boime, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 15623-15630.
9. N. Nakata, K. Furukawa, D.E. Greenwalt, *et al.*, *Biochemistry* 32 (1993) 4369-4383.
10. S.B. Yan, Y.B. Chao, H. van Halbeek, *Glycobiology* 3 (1993) 597-608.
11. D. Fiete, V. Srivastava, O. Hindsgual, *et al.*, *Cell* 67 (1991) 1103-1110.
12. K. Fukushima, T. Satoh, S. Baba, *et al.*, *Glycobiology* 20 (2010) 452-460.
13. E. Machado, S. Kandzia, R. Carilho, *et al.*, *Glycobiology* 21 (2011) 376-386.
14. S. Yu, L. Chang, C. Cheng, *et al.*, *Glycoconj. J.* 30 (2013) 183-194.
15. H. Ito, A. Kuno, H. Sawaki, *et al.*, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 1358-1367.
16. J. Huang, J.T. Liang, H.C. Huang, *et al.*, *Mol. Cancer Res.* 5 (2007) 543-552.
17. W.M. Hsu, M.I. Che, Y. F. Liao, *et al.*, *Am. J. Path.* 179 (2011) 1394-1404.
18. N. Kitamura, S. Guo, T. Sato, *et al.*, *Int. J. Cancer* 105 (2003) 533-541.
19. D.P. Rose, J.M. Connolly, X.H. Liu, *Cancer Res.* 54 (1994) 6557-6562.
20. K. Hirano, A. Matsuda, T. Shirai, *et al.*, *BioMed Res. Int.* 2014, Article ID 981627 (2014) .
21. H.B. Guo, I. Lee, M. Kamar, *et al.*, *Cancer Res.* 62 (2002) 6837-6845.
22. Y.C. Liu, H.Y. Yen, C.Y. Chen, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011) 11332-11337.
23. M.I. Che, J. Huang, J.S. Hung, *et al.*, *Oncotarget* 15 (2014) 3673-3684.
24. N. Sasaki, M. Shinomi, K. Hirano *et al.*, *Stem Cell* 29 (2011) 641-650.
25. L.Y. Lee, M. Thaysen-Andersen, M.S. Baker, *et al.*, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 4783-4795.
26. E.I. Park, S.M. Manzella, J.U. Baenziger, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4597-4602.
27. T.K. van den Berg, H. Honing, N. Franke, *et al.*, *J Immunol.* 173 (2004) 1902-1907.
28. M.J. Higgins, J. Baselga, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 3797-3803.

セマンティック・ウェブと糖鎖インフォマティクス

Semantic Web and Glycoinformatics

糖鎖有機化学研究室 山田 一作

Issaku YAMADA

緒言

コンピュータやインターネットがない時代は、必要な情報を調査する際、雑誌や本を購入し目次や索引などから目的の情報に関連するデータを調べ、さらに引用文献等を調査するという大変労力のいる作業を行っていた。私も学生の頃、図書館で分厚い何冊もあるChemical Abstractから必要な研究情報を調べたことがあったが、同様のことを現在行うのは非常に簡単な作業になっている。これはパソコンやインターネットの出現のみで実現されたのではなく、様々な研究情報をデータベース化する研究や、データ検索アルゴリズム開発など様々な情報科学的な研究開発が行われてきたことによって初めて実現された結果である。

現在の科学研究においては、化学（特に有機化学）ではChemical Abstract Serviceを始めとする各種データベースと、これらから必要な化学構造に関する情報にアクセスするための化学構造描画と化学構造による各種の検索などは必要不可欠となっている。また、生化学・分子生物学では、国際塩基配列データベース (INSD) [1], wwPDB [2] などのリポジトリへの登録や、アミノ酸や核酸配列の相同性検索や、各種クラスタリングなどが日常的に利用されている。さらに、次世代シーケンサー (NGS) の時代に入り、バイ

オインフォマティクスを利用しなくては研究情報を処理できない状況となっている。このように、情報科学は、現在およびこれからの研究開発に必要不可欠であり、様々な分野において学際研究も盛んに実施され、今後益々重要性が増していくものと考えられる。

パソコンやインターネットが当たり前利用できる現在、これからの研究開発における情報検索は、単にデータベースを作成・検索する時代ではない。積極的に新しいインターネット技術などを活用することは、これまでにない推論検索などの情報検索が実現できる可能性を秘めており、糖鎖インフォマティクス研究においても、次世代を志向した研究開発が積極的に実施されている。

現在のウェブの問題点と新しいウェブの世界

現在のインターネットでよく用いられているHTML [3] では、文書の構造や単語を記述することは可能であるが、個々のデータの意味や詳細な意味をコンピュータに正確に理解させることはできない問題点を抱えている。ウェブ上のすべてのデータを世界中のコンピュータが認識して共有することで、ウェブ全体が単なるデータの集合から、巨大なデータベースへと進化するセマンティック・ウェブ構想がある。既に、セマンティック・ウェブ実現に向けて、標準化作業が進

められ、Resource Description Framework (RDF) [4] やWeb Ontology Language (OWL) [5] などの標準仕様がW3Cによって策定されている。セマンティック・ウェブでは、RDFやOWLを用いてデータを記述することで、コンピュータによる自動的な情報の収集や分析へのアプローチが可能となると期待されている。

RDFのデータモデルでは、トリプル (triple) と呼ぶ、主語 (subject) 述語 (predicate) 目的語 (object) の3つの要素でリソースに関する関係情報を表現する。そして、新しくデータを追加する際は、このようなトリプルを追加するのみで容易にデータを追加できる利点も持っている。

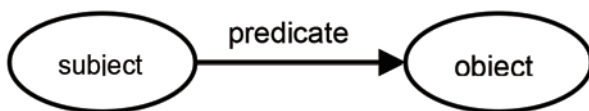


図1 トリプルのRDFグラフ表現

現在のウェブ検索

現在のウェブ検索では、セマンティック・ウェブが実現されていないHTMLをベースとした情報から、様々なアルゴリズムを利用することにより、必要とする情報へたどり着くことが可能となってきた。しかし、各情報に正確なメタデータが付加されていないことによる不要データの混在などがあり、得られた情報の確認の検証作業が負担となっている。例えば、“ β -D-glucopyranose”を検索文字列として、関連する画像検索を行った場合、 β -D-glucopyranoseを含む画像に加えて関連性がよくわからない画像も検索結果に表示される (実際にインターネットによる画像検索で試してみてください)。この検索結果から必要な情報のみに絞り込むのは困難な場合が多く、可能としてもかなりの労力を必要とする作業となる。

セマンティック・ウェブの世界

情報がRDFで記述されたセマンティック・ウェブの実現された世界では、各データに適切なメタデータが付加されていることにより、コンピュータが正しく情報を認識して処理を行うことが可能となる。例えば先ほどの、“ β -D-glucopyranose”を検索文字列として、関連する画像検索を行う場合、 β -D-glucopyranoseを含む画像のみが検索結果として得ることが容易に可能となる。さらに、的確に関連情報へ提示することも容易に実現できる。研究においてこのような正確性やデータの入手の容易さは重要であり、ライフサイエンス分野においても積極的にセマンティック・ウェブへの対応が進められている。

糖質研究における状況

日本では文部科学省の統合データベースプロジェクトの補完課題としてはじまった日本糖鎖科学コンソーシアムデータベース (JCGGDB) [6] の構築が起点となり、様々なデータベースの統合化が実現されてきた。さらに海外の糖鎖関連データベースとの連携も実現してきた。そして科学技術振興機構 (JST)・バイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) による統合化推進プログラムにおいて、ライフサイエンス分野のデータベースのセマンティック・ウェブへの対応が加速され、ゲノム、プロテオーム、メタボロームなど様々な分野において研究開発が行われている。本稿では、糖質関連におけるセマンティック・ウェブへ対応させるための取り組み [7] について紹介する。

糖質研究のセマンティック・ウェブ化

近年、様々な糖鎖関連のデータベース [8] が作成され、ウェブ上で公開されてきた。例えば、German Cancer Research Centerでは、炭水化物の三次元コンホメーションに焦点を当て、GLYCOSCIENCES.deデータベー

ス [9] を開発した。KEGG GLYCANは、ゲノムおよびパスウェイ情報 [10] にリンクされている糖鎖構造のデータベースとしてKEGGのリソースに追加された。 Consortium for Functional Glycomics (CFG) は、質量分析、糖鎖遺伝子ノックアウトマウスと糖鎖遺伝子マイクロアレイからの糖鎖配列、糖鎖プロファイリングからの実験データ等を格納するデータベースを開発した [11]。ロシアでは、文献から収集したバクテリアの糖質構造が含まれる、Bacterial Carbohydrate Structure Database (BCSDB) が開発された [12]。さらに、単糖の情報を整理するためのMonosaccharideDB [13] や、HPLCに焦点を当てたGlycoBase [14] も開発された。また、GlycomeDBは、糖鎖構造により様々なデータベースを統合したデータベースとして開発された [15]。日本では、日本糖鎖科学統合データベース (JCGGDB) が、国内の糖鎖関連のリソースを統合するために開発さ

れている。

しかし、データベースに格納された情報についての一般的な機械可読情報などに共通の標準仕様が存在しなかった。従って、研究者がデータベースに関係する情報を辿るためには、データベースにある他のデータベースへのリンク情報が頼りであり、多くの関連したデータ一覧を取得することなどは容易ではなかった。そして、幾つかのデータベースにおいて、データ標準化、交換するための試みが行われたが [16, 17]、ほとんどのグライコミクスデータベースは依然として統合化されていない [18]。このように、これらのグライコミクスデータベースが開発されてきたにもかかわらず、相互運用性の欠如が糖鎖関連データ間やプロテオミクスなどのデータとの統合を妨げていた。

そこで、RDFを使用して糖鎖データを統合するための議論がBioHackathonを中心に

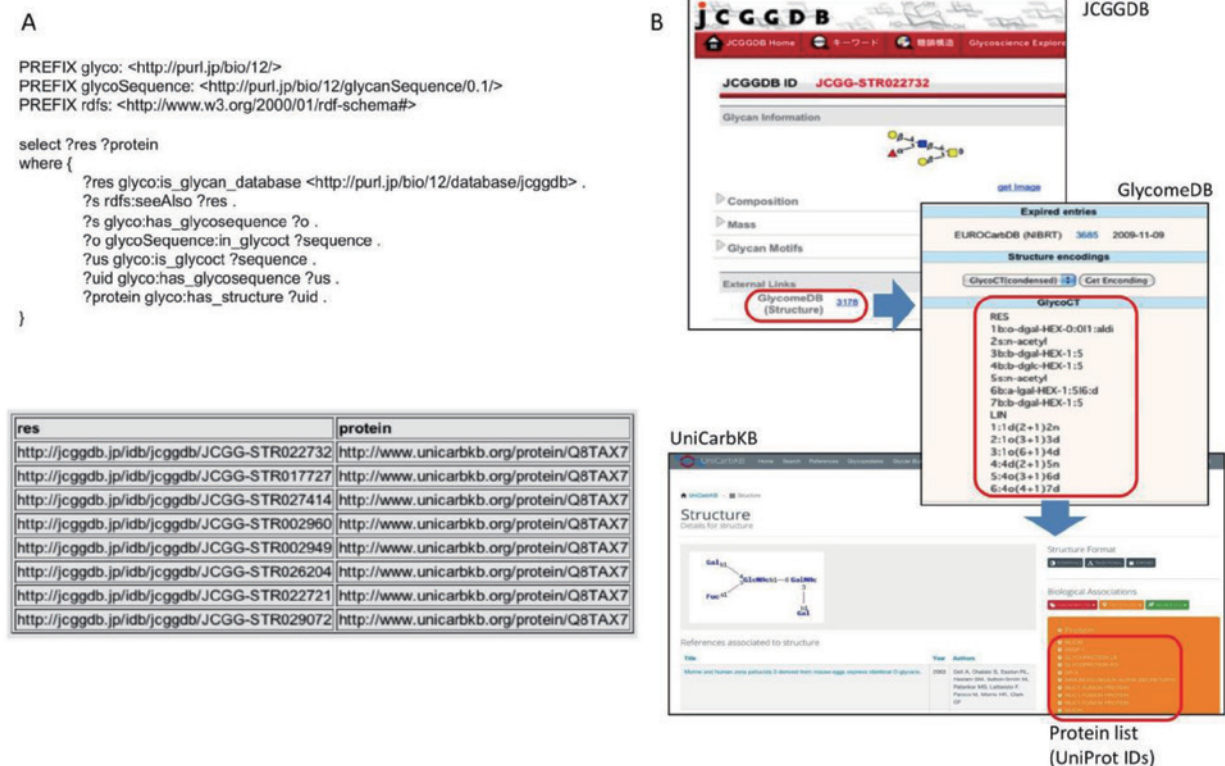


図2 単一のSPARQLクエリによるJCGGDB IDとUniProtのIDのリスト取得

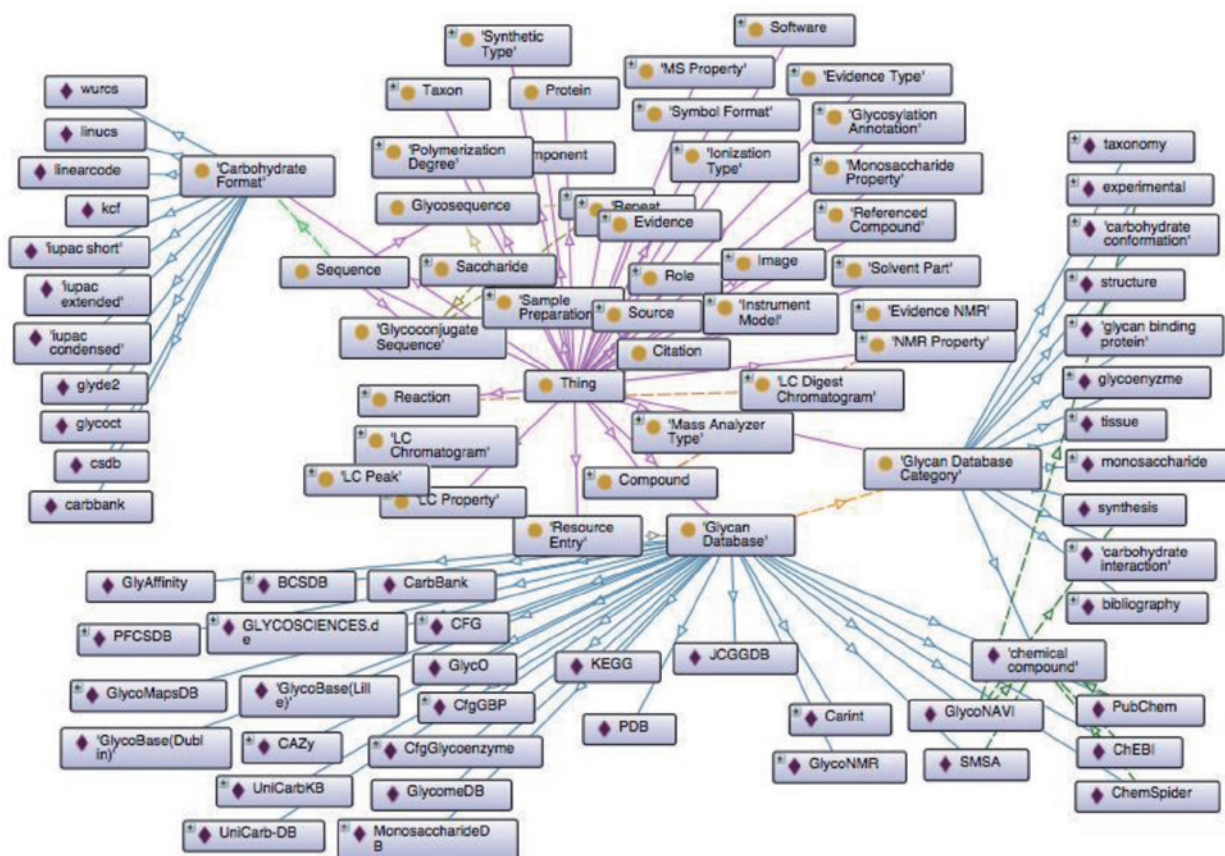


図3 GlycoRDFオントロジー図 (一部分)

行われた [19]。BioHackathonにおいて、グライコミクスにおけるセマンティック・ウェブを実現するために、グライコミクスデータベースのデータを、RDFを使用して情報を表現するための最小限の標準仕様を決定し、この規格のプロトタイプを実装し、糖鎖関連データの予備的なRDFバージョンを生成した。このRDFデータの有用性をテストするために、RDFデータセットのすべてをVirtuosoトリプルストア [20] にロードし、いくつかのSPARQL [21] クエリを用いてデータベースを検索することで、セマンティック・ウェブの有用性を検証した。具体的には、JCGGDBがUniProt [22] のへのリンクを持っていないため、JCGGDBとUniProtを繋ぐことを検討した。JCGGDBエントリはGlycoCT形式 [23] で糖鎖構造を含むGlycomeDBエントリへのリンクがある。UniCarbKB [24] エントリは、その関連UniProtのエ

ントリへのリンクを持っており、またGlycoCT形式の糖鎖構造を含んでいる。そこで、単一のSPARQLクエリでGlycomeDB、UniCarbKB、JCGGDBの各データを検索したところ、JCGGDB IDとUniProtのIDのリストを取得することができた。このように、UniCarbKB、GlycomeDBとJCGGDBをリンクして情報を取得するための概念実証ができた。図2は、使用したSPARQLクエリと、JCGGDB IDに関連するUniProtのIDを取得できた例である。

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、糖鎖関連データにおけるセマンティック・ウェブの有用性が確認できたので、さらに糖鎖関連データベースデータのRDF化に必要な概念や関係性を示すための統一仕様とし

て、GlycoRDF [25] というオントロジーについての開発も行った。これらの糖鎖関連データのセマンティック・ウェブへの対応は、日本およびアメリカ、ドイツ、オーストラリア、ロシア、スイス等の研究者が協力して実現することが出来た。

結語

現在、世界の様々なグループにおいてライフサイエンス関連データのRDF化が行われている。糖鎖データのRDF化によって、他のオミクスデータとのリンクの作成が可能となり、糖関連のデータベースだけでなく、メタボロミクスやプロテオミクスデータさらには医療データなどが利用可能になることが期待される。

謝辞

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST)・バイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) により実施されているライフサイエンスデータベース統合推進事業における「統合化推進プログラム」の助成により実施した。

References:

1. **International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC)** <http://www.insdc.org/> website (accessed August 19, 2015) .
2. **Worldwide PDB (wwPDB)** <http://www.wwpdb.org/> website (accessed August 19, 2015) .
3. **Hypertext Markup Language (HTML)** <http://www.w3.org/TR/html/> website (accessed August 18, 2015) .
4. **Resource Description Framework (RDF)** <http://www.w3.org/RDF/> website (accessed August 19, 2015) .
5. **Web Ontology Language (OWL)** <http://www.w3.org/OWL/> website (accessed August 19, 2015) .
6. **Japan Consortium for Glycobiology and Glycotechnology database (JCG-GDB)** <http://jcgddb.jp/> website (accessed August 19, 2015) .
7. Aoki-Kinoshita KF, Bolleman J, Campbell MP, Kawano S, Kim J-D, Lütteke T, Matsubara M, Okuda S, Ranzinger R, Sawaki H, Shikanai T, Shinmachi D, Suzuki Y, Toukach PV, Yamada I, Packer NH and Narimatsu H: **Introducing glycomics data into the Semantic Web.** *Journal of Biomedical Semantics* 2013, 4:39. doi:10.1186/2041-1480-4-39. PMID: 24280648.
8. Aoki-Kinoshita KF: **Using databases and web resources for glycomics research.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2013, 12 (4) :1036-1045. doi:10.1074/mcp.R112.026252. PMID: 23325765.
9. Lütteke T, Bohne-Lang A, Loss A, Goetz T, Frank M, von der Lieth CW: **GLYCOSCIENCES: de: an Internet portal to support glycomics and glycobiology research.** *Glycobiology* 2006, 16:71R-81R. doi: 10.1093/glycob/cwj049. PMID: 16239495.
10. Hashimoto K, Goto S, Kawano S, Aoki-Kinoshita KF, Ueda N, Hamajima M, Kawasaki T, Kanehisa M: **KEGG as a glycome informatics resource.** *Glycobiology* 2006, 16:63R-70R. doi: 10.1093/glycob/cwj010. PMID: 16014746.
11. Raman R, Venkataraman M, Ramakrishnan S, Lang W, Raguram S, Sasisekharan R: **Advancing glycomics: implementation strategies at the consortium for functional glycomics.** *Gly-*

- cobiology* 2006, **16**:82R-90R. doi: 10.1093/glycob/cwj080. PMID: 16478800.
12. Toukach PV: **Bacterial carbohydrate structure database 3: principles and realization.** *Journal of Chemical Information and Modeling* 2011, **51**:159-170. doi: 10.1021/ci100150d. PMID: 21155523.
 13. Lütteke T, **Monosaccharide DB** <http://www.monosaccharidedb.org/> website (accessed August 19, 2015) .
 14. Campbell MP, Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM: **GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis.** *Bioinformatics* 2008, **24**:1214-1216. doi: 10.1093/bioinformatics/btn090. PMID: 18344517.
 15. Ranzinger R, Herget S, von der Lieth CW, Frank M: **GlycomeDB-a unified database for carbohydrate structures.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:D373-D376. doi:10.1093/nar/gkq1014. PMID: 21045056.
 16. Packer NH, von der Lieth CW, Aoki-Kinoshita KF, Lebrilla CB, Paulson JC, Raman R, Rudd P, Sasisekharan R, Taniguchi N, York WS: **Frontiers in glycomics: bioinformatics and biomarkers in disease: an NIH white paper prepared from discussions by the focus groups at a workshop on the NIH campus, Bethesda MD (September 11-13, 2006)** . *Proteomics* 2008, **8**:8-20. doi: 10.1002/pmic.200700917. PMID: 18095367.
 17. Toukach PV, Joshi H, Ranzinger R, Knirel Y, von der Lieth CW: **Sharing of worldwide distributed carbohydrate-related digital resources: online connection of the bacterial carbohydrate structure data base and GLYCO-**
SCIENCES.de. *Nucleic Acids Research* 2007, **35**:D280-D286. doi: 10.1093/nar/gkl883. PMID: 17202164.
 18. Committee on Assessing the Importance and Impact of Glycomics and Glycosciences, Board on Chemical Sciences and Technology, Board on Life Sciences, Division on Earth and Life Studies, National Research Council: **Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future.** Washington, D.C., USA: The National Academic Press; 2012. OpenURL ISBN-13: 978-0-309-26083-1. ISBN-10: 0-309-26083-3.
 19. Katayama T, Wilkinson MD, Aoki-Kinoshita KF, Kawashima S, Yamamoto Y, Yamaguchi A, Okamoto S, Kawano S, Kim J-D, Wang Y, Wu H, Kano Y, Ono H, Bono H, Kocbek S, Aerts J, Akune Y, Antezana E, Arakawa K, Aranda B, Baran J, Bolleman J, Bonnal RJP, Buttigieg PL, Campbell MP, Chen Y-a, Chiba H, Cock PJA, Cohen KB, Constantin A, Duck G, Dumontier M, Fujisawa T, Fujiwara T, Goto N, Hoehndorf R, Igarashi Y, Itaya H, Ito M, Iwasaki W, Kalas M, Katoda T, Kim T, Kokubu A, Komiyama Y, Kotera M, Laibe C, Lapp H, Lütteke T, Marshall MS, Mori T, Mori H, Morita M, Murakami K, Nakao M, Narimatsu H, Nishide H, Nishimura Y, Nystrom-Persson J, Ogishima S, Okamura Y, Okuda S, Oshita K, Packer NH, Prins P, Ranzinger R, Rocca-Serra P, Sansone S, Sawaki H, Shin S-H, Splendiani A, Strozzi F, Tadaka S, Toukach PV, Uchiyama I, Umezaki M, Vos R, Whetzell PL, Yamada I, Yamasaki C, Yamashita R, York WS, Zmasek CM, Kawamoto S and

- Takagi T: **BioHackathon series in 2011 and 2012: penetration of ontology and linked data in life science domains.** *Journal of Biomedical Semantics*, 2014, **5**:5. doi:10.1186/2041-1480-5-5. PMID: 24495517.
20. **Virtuoso** https://www.w3.org/2001/sw/wiki/OpenLink_Virtuoso website (accessed August 19, 2015) .
21. **SPARQL Protocol and RDF Query Language (SPARQL)** <http://www.w3.org/TR/rdf-sparql-query/> website (accessed August 19, 2015) .
22. Consortium UP: **Update on activities at the universal protein resource (UniProt) in 2013.** *Nucleic Acids Research* 2013, **41**:D43-D47. doi: 10.1093/nar/gks1068. PMID: 23161681.
23. Herget S, Ranzinger R, Maass K, von der Lieth CW: **GlycoCT-a unifying sequence format for carbohydrates.** *Carbohydrate Research* 2008, **343**:2162-2171. doi:10.1016/j.carres.2008.03.011. PMID: 18436199.
24. Campbell MP, Hayes CA, Struwe WB, Wilkins MR, Aoki-Kinoshita KF, Harvey DJ, Rudd PM, Kolarich D, Lisacek F, Karlsson NG, Packer NH: **Uni-CarbKB: putting the pieces together for glycomics research.** *Proteomics* 2011, **11**:4117-4121. doi: 10.1002/pmic.201100302. PMID: 21898825.
25. Ranzinger R, Aoki-Kinoshita KF, Campbell MP, Kawano S, Lütteke T, Okuda S, Shinmachi D, Shikanai T, Sawaki H, Toukach PV, Matsubara M, Yamada I, Narimatsu H: **GlycoRDF: an ontology to standardize glycomics data in RDF.** *Bioinformatics* 2015, **31** (6) :919-25. doi: 10.1093/bioinformatics/btu732. PMID: 25388145.

62nd American Society for Mass Spectrometry Conference (ASMS) 参加報告

62nd American Society for Mass Spectrometry Conference (ASMS)

糖鎖生物学研究室 室長 天野 純子
Junko AMANO

第62回ASMS (2014年6月15日～19日、メリーランド州ボルチモア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ポスターを発表した。

Quantitative glycoform analysis of human IgG using a novel stable isotope-labeling and MALDI-TOF mass spectrometry
Masaki Kuroguchi, Junko Amano

糖ペプチドのN末を安息香酸スクシンイミド活性化エステルで標識することにより、MALDI-MSイオン化効率を向上させた。さらに、重水素化安息香酸スクシンイミド活性化エステルを調製し、水素体標識試料と比較することで、相対的定量解析を可能にした。この方法で血清IgGサブクラスのグリコフォームの違いを明らかにし発表した。なお、この結果はその後Molecules, 19, 9944-9961 (2014)において誌上発表している。

学会の概要は、例年と同様、コンベンションセンターを目一杯使用するほど大規模で、一日のポスター発表数が約800で日替わり4日間、口頭発表は午前、午後8つずつのセッション、それ以外にワークショップ、モーニングレクチャーがあった。企業のブースも200社

近くあった。

糖鎖構造解析に関しては、遊離糖鎖をpro-cainamideやanthranilic acidなどで還元末端を標識し、親水性親和力を利用したLCで分離する方法が相変わらず多かったが、相対比較や定量性を重視する傾向が見られた。すなわち、我々も行っているように、安定同位体置換した標識試薬を用いて、標準品を標識して、あるいは、比較対照を標識して混合し測定する実験が多くなった。シアル酸結合糖鎖の定量に、p-toluidineまたは、p-toluidine-d9でシアル酸COOH基を標識した後にPNGaseF消化で糖鎖を遊離して比較解析している発表もあった。しかし、後述のように、糖鎖を遊離せず、糖ペプチドとして測定する発表も年々増加している。

糖タンパク質の試料として、血漿のエクソソーム画分や病理切片も見られたが、疾患と直接繋がる成果はまだなかった。しかし、これまでイオン化しやすいので容易に検出できる脂質の検出が主であったイメージングMSにも糖鎖の発表が増加しており、技術の進歩を感じた。

その他糖タンパク質の解析に関して、抗体医薬品をはじめとするバイオロジクスの解析を見据えた手法として、水素重水素交換質量分析 (HDX-MS)、LC-MS/MS(MRM)、キャピラリー電気泳動(CE)-MSなどの導入が多く

見られた。

HDX-MS は、溶液中の重水素がタンパク質のアミド水素と置換した結果を質量分析装置で計測する。この重水素化した分子のマッピングを作成することにより、タンパク質のコンフォメーション変化を追跡することができる。分子間相互作用、凝集、安定性に関する推定ができるので、バイオリジクス医薬品の解析に利用されつつある。

LC-MS/MSは糖ペプチドの定量にも使われるようになってきた。一方で、ELISAに代わる、バイオリジクス製剤の定量として、ペプチドのLC-MS/MS法が増えてきたようである。

CE-MSは、異性体の分離に威力があるが、再現性やMSとの接続に問題がありこれまでは汎用されていなかったが、それらの課題が解決されつつあるのだろう。

衝突誘起解離 (CID) では不安定な修飾ペプチドの電子移動解離 (ETD) によるフラグメント解析例も増加し、糖鎖修飾をはじめとした翻訳後修飾の同定が可能になりつつある。

これらの技術は以前からあったが、それほど積極的に応用されていなかった。昨今の機器の向上とソフトウェアの改良によるところが大きい。また、FDAがバイオリジクスの解析にMSを積極的に導入しようとする動き

も影響が大きいであろう。

FDAの公式見解ではないとしながらも、Gaucher病治療薬に用いられるリソソーム酵素の1種であるglucocerebrosidaseについて、生産細胞が異なる (CHO細胞とヒト繊維芽細胞) 2種のリコンビナント酵素の糖ペプチド解析をFDAの研究者が発表していた。従来は、酵素消化による遊離糖鎖とペプチド解析を別々に行っていたが、糖ペプチドをLTQ Orbitrap XL ETDで解析することにより、1度の解析で簡単に比較解析できると発表していた。3種の異なるフラグメント化CID, ETD, HCD (高エネルギー衝突解離) によるMS²、MS³解析と安定同位体標識を組み合わせた成果である。彼らが使用しているのは、野口研究所に昨年度導入された装置の上位機種であるが、保有機種でも3種の異なるフラグメント化は可能であるので糖ペプチド解析に有用であると思われる。

さて、今回はやはり1細胞解析が盛況であった。まだ低分子のみの検出ではあるが、細胞をすりつぶした平均値でない、リアルタイムの代謝過程を追跡できるのは魅力的である。

ボルチモアは北米一危険な街と脅かされていたが (そのせいか日本人の参加者数は激減していたが)、何とか無事に戻ってきた。今回はセントルイスで開催される。また大いなる刺激を受けられると期待している。

SFG-JSCR合同会議参加報告

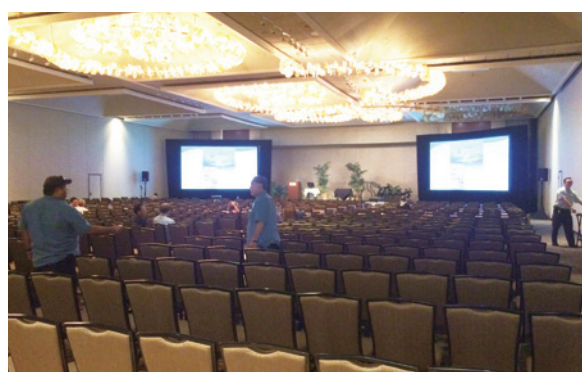
Report on Joint Meeting of the SFG and the JSCR

糖鎖有機化学研究室 山田 一作
Issaku YAMADA

米国・ハワイ州・ホノルルの“Hilton Hawaiian Village Waikiki Beach Resort”で2014年11月16日～19日に開催されたJoint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR)に参加させていただいたので、報告いたします。本会議は、SFGとJSCRによる合同会議であり、今回は10年ぶり2回目の開催でした。合同会議会場は、ビーチに近いリゾートホテル”Hilton Hawaiian Village”内でしたが、空港から乗ったバスを降りても会場案内などを見つけることができず、ホテルの案内係に会議名を説明して場所を教えて頂いて、無事会場へ到着することができました。



合同会議会場付近



講演会場



ポスター展示会場

本合同会議では、研究者における研究発表に加えて、ハンズオン・セミナーが開催されることが予稿集やポスター会場の掲示などでアナウンスされていました。ハンズオン・セミナーの内容は、GlyTouCan: an international glycan structure repository [<http://glytoucan.org>], UniCarbKB: building a glycoproteomics platform, Unicarb-DB: an experimental LC-MS/MS database,

GlycoDigest: a tool for exoglycosidase digestions, GlycoProtDB: the experimentally-proven data of glycosylation sites for glycoproteins in mice, human and *C. elegans* [<http://jcggdb.jp/rcmg/gpdb/>], GRITS Toolbox: a freely available software suite for the annotation and interpretation of free glycan MS data [<http://www.grits-toolbox.org>], Tools for Glycobiology, GlycoPAT: analysis of high-throughput LC-MSn glycoproteomics data, GNAT: construction & simulation of glycosylation reaction networks [<http://sourceforge.net/projects/gnatmatlab/>], GLYCAM-Web: quickly and easily generate 3D structures of systems containing glycans [<http://glycam.org>], RINGS: a freely-available web resource providing numerous tools and utilities to aid glycomics analyses [<http://www.rings.t.soka.ac.jp>]の各データベースやツールについての説明などでした。このハンズオン・セミナーにおいて、私はJST・NBDC統合化推進プログラムにおいて開発している糖鎖構造リポジトリ「GlyTouCan」や、IGOT法によるタンパクの糖鎖修飾位置情報を収録したGlycoProtDBなどについて説明を行いました。日本国内における同様のハンズオン・セミナーや展示会ブースなどに比べ、多くの研究者が各種ツールやデータベースについて積極的に利用法や各種質問をされていたのが印象的でした。

また、“糖鎖国際標準記法：WURCS”の発表では、WURCSの利用方法やGlyTouCanシステムへのWURCS活用などについて説明しました。そして、様々な分子において糖質部分構造と非糖質部分構造 (Aglycon) について、“What is a monosaccharide?” という、簡単なアンケートを実施しました。本アンケートと“単糖とは”についての研究者との議論の結果、研究者によってどのような構



ポスター & アンケートの様子

造を糖として認識しているかに違いがありました。今後WURCSを開発していくための有益な結果を得ることが出来ました。

講演では、オーストラリア・Macquarie UniversityのNicolle Packer先生の“From glycostructure to glycoknowledge”が印象的でした。糖の知識ベースとしてのUniCarbKBデータベースや糖転移酵素データ等を利用した糖鎖構造データ生成など公開が待ち望まれる研究成果について講演されていました。また、創価大の木下聖子先生の“Development of an International Glycan Structure Repository”の講演は、糖鎖構造リポジトリ”GlyTouCan”について説明され、糖鎖構造データを利用する際における糖鎖構造同一性の問題解決に繋がる事が期待できる内容でした。

今回の合同会議は、様々な研究者と交流することができ、非常に有意義な時を過ごすことが出来ました。今後も、国内外の糖鎖インフォマティクスの研究者と協力・協調して糖鎖科学の発展のために努めていきたいと改めて考えさせていただく良い機会になりました。

— 事業概要 —

2014年度活動概要

The Activities of the Institute

常務理事 松田 昭生

Akio MATSUDA

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。

研究開発事業では、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2009年度から実施している。2014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212件の応募の中から13件を選考した。制度創設以来はじめて女性2名が選考された。また今年度より野口遵賞を創設、過去の助成者の中から特に優れた実績を上げている研究者を対象とするもので、大阪大学の松崎典弥氏に贈呈した。応募のインセンティブをより高め、助成対象者の質の向上に資するものと信じている。

人材の養成については講師派遣、卒業研究生受け入れを継続して実施した。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、2010年度より実際の研究活動に反映させてきた。

そして今年度になり、糖鎖合成技術をベースとし、我々が独自に見出したものを含む各種糖鎖修飾酵素をラインナップすることでモデル糖タンパク質の糖鎖を人為的に均一改変する技術に見通しを得るに至った。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ことが手の届くところまで来たといえる。そして、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も継続して進めている。

2014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。

財政面について、当研究所の運営費は資金運用益を柱に寄付金、公的機関からの競争的研究助成金等で賄っている。今期の経常収益は、資金運用の為替リンク債が予想外の円安効果により対予算60.7百万円の増益となった。一方経常費用は、研究用資産の購入計画もあったため、前年度に引き続き研究の選択と集中による経費の削減に努めた結果対予算29.7百万円減少した。

正味財産増減額は、投資有価証券の評価益等を1,097.8百万円計上することができ、予算の△32.3百万円に対し、1,157.6百万円と大幅な改善となった。

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、動物細胞を用いたバイオ医薬品の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。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、2012年2月のFDAのガイドライン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。これを踏まえ、バイオ医薬品標準品の供給、糖鎖構造と生理活性の機能解明の為、2011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酵素反応を利用して、糖タンパク質の糖鎖を切除し、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し、コアフコースのないアクセプター調

製後、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を抗体医薬トラスツズマブを例として確立した。今後、こうして合成した均一な糖鎖を持つ糖タンパク質の物性・機能を調べていく事とこれらの技術を推し進める為の道具としての酵素・ドナーを各種揃える事、及び他の糖タンパク質への展開を考えていく。又、まだ技術開発が残されているコアフコース有のアクセプター調製も技術確立し、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る。

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。2014年度の年初計画は

- ①HGPプロジェクトにおいて糖鎖ドナーの合成を行う。
- 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生化学的知見に有用な糖質誘導体の合成を行う。
- ④脱保護が容易な (Acid-labile) 糖水酸基保護基を用いた糖ペプチド合成法の開発を行う。
- ⑤糖鎖技術の普及に向けて、分野の異なる研究者を含め糖質研究をサポートする「糖質科学支援システム」“グライコナビ™”の開発を行う。また、糖鎖構造リポジトリの基盤となる、糖質構造の文字列表記を次世代Webに対応させた「Web3.0 Unique Representation of Carbohydrate Structure: WURCS」の開発を行う。

今期の成果

糖鎖ドナー合成を行った。卵黄より得られるSGPを原料として糖鎖ドナーであるA2-oxa、G2-oxa、G0-oxaの3種類を調製した。ま

た、SGPからの調製が困難であるM3-oxaは化学合成により調製した。得られた糖鎖ドナーを糖鎖転移用基質として提供した。更に本年度は新たな糖鎖ドナーであるG1a-oxa、及びG1b-oxaの合成に成功した。

フルオラス法は有機溶媒とフルオラス溶媒による分液操作で簡便に精製を行えるため、従来のクロマトグラフィーによる精製と比べて使用する有機溶媒やシリカゲルの使用量を減らすことができ、産業廃棄物の削減に貢献できる。さらに、フルオラス溶媒やフルオラス試薬は回収・再利用が容易である。このようにフルオラス化学は循環型社会に適した低環境負荷な化学技術である。一昨年度から化学的に安定耐酸性ヘビーフルオラスタグ（特開2013-139420）の糖鎖合成への応用について研究を行っている。本年度はアリル型ヘビーフルオラスタグによるユニット合成とグリコシル化に成功し、本手法が糖鎖合成に有用であることが明らかとなった。

糖鎖技術の普及に向けて、糖鎖合成 (Syns)、糖鎖-タンパク相互作用 (Carint)、生薬 (CrudeDrug) などのデータベースを中心とした糖鎖研究サポートツールである“グライコナビ”の開発を行った。また、科研費 (公開促進費) による各種データベースのデータ入力・検証を実施した。

糖鎖については、世界共通データベースは未整備であった。本年度、JST・ライフサイエンスデータベース統合推進事業として「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」に産総研、創価大、立命館大、新潟大とともに採択され、国際糖鎖構造データリポジトリシステムの開発、糖鎖構造データの標準化を推進した。野口研ではデータベースシステム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) の開発を行っている。

糖タンパク質工学研究室：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。2014年度の年初計画は

- ①LDN含有PSAの診断マーカーとしての有用性を検証すべくLDN抗体取得し、EIA系を構築する。
- 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。
- ④HGPプロジェクトにおいてアクセプターの調製法及び糖転移反応条件を確立する。

今期の成果

我々は以前ヒト前立腺癌においてPSA糖鎖のMS解析を行った所、癌ではBPH（前立腺肥大）由来のものと比較して、LDN（lacdiNAc）含有量の増加を示唆する結果を得た。しかしながら、PSA濃度が4～10 ng/mLのグレーゾーン患者さんの血清サンプルでは前処理や検出感度の問題からMSでの解析が難しいのが実情である。そこで、より簡便かつ高感度のLDN-PSA検出系としてサンドウィッチELISA系を構築し、新たなPSA診断マーカーとしてLDN-PSAの有用性を検証すべく検討を開始した。現在KLH-LDN、BSA-LDNで感作したマウスより困難とされる抗LDN抗体取得を試みている。

一方、乳癌では前立腺癌とは逆の相関関係を示す。即ちLDN含有量の減少が癌の悪性化とリンクする。今年度は引き続きLDN生合成酵素の一種 β 4-N-acetylgalactosaminyl transferase4（ β 4GalNAcT4）遺伝子高発現乳癌細胞株即ち、細胞表面におけるLDN糖鎖含有タンパク質を強制的に増加させた細胞株を用いて各種解析を行い、本細胞株では対照株に比して軟寒天培地中でのコロニー形

成能、細胞浸潤能が共に低下する事を見出した。更に、xenograft modelを用いたin vivo評価を実施し、腫瘍形成能の低下を確認した。さらに新たに選定した β 4GalNAcT4遺伝子高発現株を加えて再試験を実施し、同様の結果を得た。即ち、乳癌細胞におけるLDN糖鎖のがん抑制作用が確認された。更に、LDN糖鎖によるがん抑制作用の分子メカニズムを解明すべく、上記遺伝子高発現株において増加しているLDN糖鎖含有膜タンパク質の同定作業を開始した。

我々はある種の腎癌細胞にGalNAc-Disialyl Lc4（GalNAc-DSLc4）合成に係る酵素 β 4-N-acetylgalactosaminyltransferase2（ β 4GalNAcT2）の発現コンストラクトを導入して樹立した細胞株を用いた解析から、1) 細胞表面のGalNAc-DSLc4を増加させる事で癌悪性形質の特徴とされる増殖能、浸潤能、ラミニンへの接着能が亢進する事、2) その要因の1つとしてPI3K経路の活性化増強が関与する事、3) GalNAc-DSLc4は脂質ラフト中に局在し、インテグリン等膜タンパクの局在を変える事、4) β 4GalNAcT2遺伝子導入株ではDSLc4のみならずインテグリンを含むタンパク質上の糖鎖にも変化が生じる事等を見出し報告してきた。

今年度は安定発現株が獲得した3つの悪性形質、増殖能、接着能、浸潤能亢進すべてがGalNAc-DSLc4に対する抗体（RM2）添加によりキャンセルされる事が判明した。これにより、悪性形質獲得にGalNAc-DSLc4の増加は必須であると言える。さらにsiRNAを用いたILKのKd試験を実施した結果、FCS刺激等により増強されるAKTのリン酸化が当該キナーゼを減少させる事により抑制された。この結果はクロストーク仮説を支持する。

糖鎖生物学研究室：糖鎖とペプチドを遊離せずアミノ酸配列情報および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

究を推進している。これまで糖ペプチドをプレート上で直接ピレン標識し高感度MALDI-TOF-MSを本研究室で開発した。また、糖ペプチドを安定同位体ベンゾイル基で標識し、比較定量法を開発した。これらの技術をさらに向上させていくと同時に、様々な糖タンパク質のグリコフォーム（アミノ酸配列は同一で異なる糖鎖を有する）を明らかにし、明確な構造に立脚した糖タンパク質の機能を解明する。2014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バイオ医薬品やHGPプロジェクトで合成した糖タンパク質の品質管理・規格化への展開
- ③その他の翻訳後修飾解析にも応用して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およびESI-MSデータでの検討

今期の成果

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、マトリックスを使用しないLDI-MSを開発すべく、レーザーを吸収する官能基を骨格に有するメソポーラス有機シリカ薄膜を用いてイオン化を検討した。今年度は、窒素レーザーを比較的良好に吸収する官能基を有する薄膜が得られ、残存する界面活性剤などの除去効率などにもよるが1pmolの検出も可能になった。

HGPプロジェクトにおいて、安定同位体糖ペプチド標識方法を用いてIgGグリコフォーム解析を行い、酵素反応の評価や精製後の確認に応用した。さらに、今年度導入したLC-ESI-MS装置により、IgG分子を酵素消化せずそのまま測定することが可能になり、2量体中の糖鎖分布パターンを明らかにした。

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（特許4262289、特許4295338、特許4907334、特許5170566 ; *Glycobiology*, 2009）をベースとして、実際の生体試料に応用するためのJST先端計測分析技術・機器開発事業（要素技術プログラム）での開発課題「ピレン誘導体化による超微量糖ペプチドMALDI-MSⁿ」（2007年度～2009年度）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 (*Anal. Chem.*, 2010)。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、同事業・ソフトウェア開発プログラム「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」（2010年度～2012年度）により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、2013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。製品化としてのソフトウェアの統合にはまだ時間を要するが、成果の一部である糖鎖構造エディターをフリーで近々公開する予定である。

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。2014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、糖鎖が結合しているホモ体画分（72.7%）のみを単離する手法を確立する。
- ②各種Endo酵素を用いGlcNAc糖鎖のみが付加したアクセプター糖タンパク質を大量に調製する。
- ③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。

- ④3本鎖、4本鎖糖鎖ドナーの合成を開始する。

今期の成果

カイコ中部絹糸腺から産生したハーセプチン(カイコ)は、2つのH鎖に糖鎖が結合しているfully glycosylated体(72.7%)、1つのH鎖にしか糖鎖が結合していないhemi glycosylated体(23.4%)、2つのH鎖に糖鎖が結合していないaglycosylated体(3.8%)の3つの形がある。タンパク質精製分取専用のACTA FPLC (GEヘルスケア社)を用い、強陽イオン交換カラムMono Sカラムを用いてfully glycosylated体のみを単離した。こうして得られたfully glycosylatedハーセプチン(カイコ)の純度をThermoScientific社 Exactive plus EMRを用いて確認した。

カイコ中部絹糸腺から産生したハーセプチン(カイコ)に、Endo-S,Endo-D,Endo-LLの3種のEndo酵素(Endo-N-glycanase)を反応させる事により、100mg程度のGlcNAc糖鎖のみが付加したアクセプター糖タンパク質(GlcNAc-ハーセプチン(カイコ))を調製した。ドナーとしてA2、G2、G0、M3をそれぞれオキサゾリン体とし、調製したアクセプターに合成酵素としてEndo-S (D233Q)を用いて均一な糖鎖構造を持つハーセプチンを合成した。これらの反応物中にはアクセプター調製に用いたハーセプチン(カイコ)に元々含まれているaglycosylated体、hemi glycosylated体、また合成反応が不十分な結果産生されるhemi glycosylated体、反応が進行しなかったアクセプターが含まれている為、上記と同様の方法でfully glycosylated体のみを単離した。以上の結果得られたA2-ハーセプチン、G2-ハーセプチン、G0-ハーセプチン、M3-ハーセプチンの糖鎖構造はMALDI-TOF-MSで確認した。さらにFcγR IIIa-V158に対する結合実験、ADCC活性も測

定した。ドナー合成に関してはG1a, G1bを合成した。

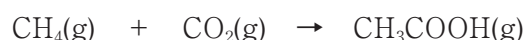
1-2 触媒研究

ナノ・メソポーラス材料研究室：ナノポーラス・メソポーラス及びナノ薄膜・粒子を切り口とした機能性材料の技術開発を行っている。2014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開発は期待していた性能に届かず中止する。
- ②メタンからの新規な化学品製造プロセスの開発を目指して、メタンを高収率で活性化できる触媒の探索研究を開始する。
- ③燃料電池用非白金系電極材の研究開発では、ダイマー構造を有する多孔性配位高分子触媒の更なる活性化向上のための研究開発を行う。

今期の成果

メタンと二酸化炭素を原料とする革新的反応を開発することを目指して、メタンと二酸化炭素から、炭化水素のC-H結合への二酸化炭素の挿入反応により、直接、酢酸を合成する反応の探索研究を行っている。



また、この反応が開発できれば、メタン以外の炭化水素に展開できる可能性も出てくる。しかし、その ΔG (200℃)から予測されるメタンと二酸化炭素の反応による酢酸の平衡収率は、 $1 \times 10^{-8}\%$ のオーダーであり、通常の反応方法では、実用的な収率は期待できない。平衡反応を克服するために、触媒を用いてメタンの活性化と二酸化炭素の挿入反応をステップワイズに行わせることにより反応を進行させることができるのではないかと考え、触媒上へのメタンの供給と二酸化炭素の供給を時間的に分離して反応を行う反応装置を設置し、触媒の探索研究を進めている。

触媒として最初に文献で酢酸の生成が報告

されているCo-Pd/TiO₂触媒を用いて反応を行ったところ微量ではあるが、平衡収率よりも高い収率 ($4.4 \times 10^6\%$) で酢酸の生成を確認できた。これによりステップワイズ反応により平衡反応を克服できる可能性が確認できた。

触媒探索としては、本反応で従来全く検討されていない触媒を研究することが肝要と考え、幾つかの新規な触媒で探索実験を行ったところ、Co-Pd/TiO₂触媒よりも多くの酢酸が生成する触媒を見出すことができた。しかし、まだまだ収率は低いので、今後更に触媒探索、改良を進めて行く予定である。

燃料電池用非白金系電極材の研究開発では、ルベアン酸配位高分子の活性中心の検討で、Cuイオンと他の遷移金属イオンからなるルベアン酸配位高分子を合成し構造解析、電極触媒活性等を測定した。その結果、電子伝導性や電子伝導性の向上及び、触媒活性向上がいくつかの混合系で見られた。

また、新規MOF触媒の構造設計を行い、合成して電極触媒としての活性評価を行い、電極触媒活性を示すものを見出した。しかし現状では、その電極触媒活性はまだ、高いものではない。

今後の検討として、さらに合成・評価を進めるとともに、化学計算による触媒活性の見積結果より、混合金属系及原子価混合系他、触媒としての構造の最適化を行う。

機能性材料研究室：フルオラス等のフッ素化学技術を武器とする合成研究。

2014年度の年初計画は

- ①酵素のフルオラス化条件改良により、繰り返し時の酵素活性低下を抑制する。
- ②フルオラスメソポーラスシリカへの酵素固定により、酵素の活性保持（安定化）を図る。
- ③①または②の効果が確認できたら、他の酵素（実用酵素）への展開を図る。

今期の成果

フルオラスの技術として、フルオラス化した触媒を、フルオラス-フルオラス相互作用を利用してフルオラス基材に固定化させる方法が知られていたが、酵素の工業的利用を目指し、これを酵素に応用する方法について検討してきた。しかし、繰り返し使用における活性低下の原因が、固定化の問題というよりは、酵素活性そのものの低下によることを示唆するデータが得られ、また改善する見通しも得られなかったことから、本テーマは今年度で中止することにした。

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、2002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、2008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。研究会では体制を一新し、新会長のもと、ホームページにフルオラストピックスの掲載を開始した。フルオラス科学研究会第7回シンポジウムを北海道大学大学院先端生命科学研究院門出健次教授にご尽力いただき、9月9日北海道大学百年記念会館にて開催した。（別添資料1）

1-4 大学等公的機関及び企業との共同研究

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26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)

研究開発課題：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

- ・ 科学技術振興機構 (JST) ライフサイエンスデータベース統合推進事業、「統合化推進プログラム」

研究開発課題名：糖鎖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

(共同研究)

- ・ 旭化成株式会社
- ・ 旭化成ファーマ株式会社
- ・ 株式会社伏見製薬所
- ・ 株式会社高分子加工研究所
- ・ 株式会社高分子加工研究所/JNC株式会社
- ・ 株式会社免疫生物研究所
- ・ 鹿児島大学システム血拴制御学 (丸山征郎特任教授) /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)
- ・ 長岡技術科学大学 (古川清教授)
- ・ 大阪府立病院機構 (井上正宏部長)
- ・ 創価大学工学部 (木下聖子教授)
- ・ 慶応義塾大学先端研GSPセンター (高柳淳講師)
- ・ ライフィクス株式会社
- ・ 東京大学大学院新領域創成科学研究科 (植田幸嗣特任准教授)
- ・ 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研究所老化機構研究チーム (遠藤玉夫副所長)
- ・ 株式会社豊田中央研究所

2. 研究助成事業

2-1 野口遵研究助成金

2009年度より野口遵研究助成金を始めた。本助成金は、国内の大学またはそれに準じる研究機関に所属する39歳以下の若手研究者を対象に、ライフサイエンス、環境資源、エネルギー、電子材料の各分野で募集し、2014年度は212件の応募の中から13件に助成金を贈呈した。(詳細は107頁)

本助成金の採択者は6年間で延べ84人となった。過去の採択者のその後の調査では、職位が上がった研究者、各種の賞の受賞者も多くみられ若手研究者の研究を助成するという本助成金の趣旨にそった成果が得られつつある。

2015年度も野口遵研究助成金を継続する。

2-2 野口遵賞

2014年度「野口遵賞」を新設した。「野口遵賞」の設置目的は、過去の助成者の中から、特に優れた実績をあげている研究者に贈呈し、更なる研究の発展を支援することである。2009年度、2010年度、2011年度の採択者43名から大阪大学の松崎典弥氏に「野口遵賞」を贈呈した。

3. 人材育成事業

化学者の育成は当研究所の設立趣意書にも記載されている重要な使命の一つである。

2014年度は3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6件 (うち共同出願3件)
- ・特許公開5件 (うち共同出願3件)
- ・審査請求6件 (うち共同出願1件)

- ・特許登録6件 (うち共同出願5件)
- ・PCT出願0件 (うち共同出願0件)
- ・外国特許出願0件 (うち共同出願0件)
- ・PCT公開0件 (うち共同出願0件)
- ・外国特許公開2件 (うち共同出願0件)
- ・外国特許登録3件 (うち共同出願1件)

(2) 学会発表22件 (うち国際学会2件)

(3) 誌上发表10件

(4) 依頼講演1件

【別添資料1】

フルオラス科学研究会第7回シンポジウムプログラム

2014年9月9日 (火) 北海道大学 百年記念会館

9:30 ~ 9:35 会長挨拶

9:35 ~ 10:25 特別講演1

「フルオラス化合物と光反応」

(岐阜薬科大学) 伊藤 彰近

10:25 ~ 10:40 口頭発表

O-1 「固相-液相間移動型ミディアムフルオラスメタセシス触媒の開発」

(名城大・農) ○小林 佑基、秦 翔吾、犬飼 紗絵、濱本 博三、塩入 孝之、松儀 真人

10:55 ~ 11:10 口頭発表

O-2 「炭素-炭素結合型ヘビーフルオラストグを用いた糖鎖合成」

(野口研・糖鎖有機1、千葉大院・融合科学2) ○福田和男1,2、戸治野真美1、後藤浩太郎1、土肥博史2、西田芳弘2、水野真盛1

11:10 ~ 12:00 特別講演2

「gem-ジフルオロシクロプロパン誘導体の合成ならびにジフルオロメチレン合成ブロックへの展開」

(鳥取大学) 伊藤 敏幸

13:30 ~ 14:20 特別講演3

「親フッ素-親油-親水バランス評価法の開発と適用」

(旭硝子) 中島 陽司

14:20 ~ 14:35 口頭発表

O-3 「フルオラス分離技術を基盤とする新規分離デバイスDress-upキラルカラムの開発とカルボン酸分離への応用」

(静岡県立大学 薬学部) ○石井裕大、轟木堅一郎、井出貴文、関俊哲、井之上浩一、濱島義隆、豊岡利正

14:50 ~ 15:05 口頭発表

- O-4 「フッ素化オリゴエチレングリコールの表面修飾が誘起するナノ粒子のカプセル状自己集合」
(北大電子研1・北大総化院2) ○新倉謙一¹・魏 金建²・三友 秀之¹・居城 邦治¹

15:05 ~ 15:55 特別講演4

- 「イオン液体中での有機電解合成—フッ素化合物を中心として」
(東京工業大学) 淵上 壽雄

16:30 ~ 17:30 ポスター発表

- P-01 フルオラス dendrimer の合成と水溶化検討
(東大生研) ○畔柳歩大、粕谷マリアカルメリタ、畑中研一
- P-02 細胞培養を目指した両親媒性フルオラスゲル化剤の開発
(東大生研) ○豊村誠、粕谷マリアカルメリタ、畑中研一
- P-03 二層系培養におけるフッ素溶媒の効果
(東大生研) ○粕谷マリアカルメリタ、畑中研一
- P-04 細胞培養における酸素供給を指向したフルオラスゲル
(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
- P-05 ライトフルオラスサレンマンガン錯体を用いる芳香族オレフィンの不斉エポキシ化反応：ベンゾトリフルオリドの共溶媒効果によるエナンチオ面選択性の向上
(名城大・農) ○秦 翔吾、小林 佑基、犬飼 紗絵、濱本 博三、塩入 孝之、松儀 真人
- P-06 フルオラスコーティングしたPDMSグラフトポリイミド膜の分離特性
(1東海大院工、2東海大工、3東海大創造科学技研) ○小田龍馬¹、高田 恭輔²、岡村陽介³、稲津敏行^{1,2}、長瀬裕^{1,2}
- P-07 ベルフルオロアルキル鎖を利用するキラルヨウ化第四級アンモニウム触媒の設計：エナンチオ選択的脱水素カップリング反応の開発
(名古屋大学大学院 工学研究科) ○石原一彰、UYANIK Muhammet、鈴木大介、林裕樹
- P-08 新規フルオラス有機分子触媒を用いた立体的炭素-炭素結合形成反応の開発
(東京薬科大学 薬学部) ○平島真一、坂井崇亮、新井亮雅、中島康介、古石裕治、三浦剛
- P-09 パーフルオロアルキル基を有するキラルゲル化剤による含フッ素溶媒のゲル化
(お茶女大院1、愛媛大院理工2、東邦大理3) ○田淵恵里香¹、矢島知子¹、佐藤久子²、山岸皓彦³
- P-10 Fabrication of Multilayered Gold Nanoparticle Vesicles Using Sugar Terminated Fluorinated Surface Ligand

(aGraduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University;bResearch Institute for Electronic Science(RIES), Hokkaido University) ○Jinjian Wei,a Kenichi Niikura,b Naotoshi Sugimura,a Hideyuki Mitomo,b Kuniharu Ijirob*

- P-11 選択的な捕集と検出を可能とするフルオラスプロテオミクス解析試薬の開発
(静岡県立大学 薬学部) 石井裕大、○轟木堅一郎、関俊哲、井之上浩一、豊岡利正
- P-12 フルオラスポリマーの合成とぬれ性の測定
(1 東京大学 生産技術研究所、2 埼玉大学大学院 理工学研究科)
○木村珠美1,2、粕谷マリアカルメリタ1、畑中研一1、松岡浩司2
- P-13 フェイズ・バニシング法による気体の発生と有機合成への利用
(阪府大院理) ○眞武亮介、丹羽勇樹、松原浩
- P-14 フルオラス保護基を用いるアルギニン残基の副反応の抑制
(東海大・工・応化) ○赤司 里奈、稲津 敏行
- P-15 スルフィド型フルオラス抽出剤の合成
(東海大・工・応化) ○中川洸希、留奥友基、稲津敏行
- P-16 フッ素系樹脂をガス透過膜としたフロー型ex-situ カルボニル化法
(大阪府立大学大学院 理学系研究科) 福山高英、Celia Brancour、向井悠、Troels Sklydstrup、○柳 日馨
- P-17 ペンタフルオロスルファニル基を持つフタロシアニンの合成研究
(名古屋工業大学大学院 工学研究科) ○飯田紀士、徳永恵津子、柴田哲男
- P-18 効率的なフルオラス固相抽出を指向したフルオラススフィンゴ脂質誘導体の合成及びその有用性評価
(北大院生命科学1、北大院先端生命2) ○齊藤 翔太1、吉田 昌史1、Mostafa A.S.Hammam2、光武 進2、五十嵐 靖之2、村井 勇太2、門出 健次2

【別添資料2】

(1) 学生の受け入れ

埼玉工業大学、東海大学から各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フェイズ・バニシング法による1段階ブロモ酸合成の解析
- ②分子内アシル転位反応を抑制可能なWilliamsonエーテル合成法の開発

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 22件 (うち国際学会 2件)

第62回質量分析総合討論会 (2014.5.14-16)	1件
62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry (2014.6.14-19)	1件
日本プロテオーム学会2014年会 (2014.7.17-18)	1件
第33回日本糖質学会年会 (2014.8.10-12)	4件
FCAAグライコサイエンス若手フォーラム2014 (2014.8.13)	1件
フルオラス科学研究会第7回シンポジウム (2014.9.9)	1件
第3回生命医薬情報学連合大会 (2014.10.2-4)	2件
トーゴの日シンポジウム 2014 (2014.10.5)	2件
CACフォーラム1泊研究会 (2014.10.6-7)	1件
第8回東北糖鎖研究会 (2014.10.10-11)	1件
第87回日本生化学会大会 (2014.10.15-18)	2件
GlycoTokyo2014 (2014.11.8)	1件
SFG & JSCR Joint Annual Meeting (2014.11.16-19)	1件
第37回情報化学討論会2014豊橋 (2014.11.27)	2件
日本化学会第95春季年会 (2015.3.26-29)	1件

2. 誌上発表 10件

Expression of LacdiNAc Groups on N-Glycans among Human Tumors Is Complex

Kiyoko Hirano, Akio Matsuda, Takashi Shirai, and Kiyoshi Furukawa
BioMed Research International ,2014, Article ID 981627, 7 pages

Relative Quantitation of Glycopeptides Based on Stable Isotope Labeling Using MALDI-TOF MS

Masaki Kurogochi and Junko Amano
Molecules , 2014, 19(7), 9944-9961; doi:10.3390/molecules19079944

The Effect of Glycosylation on the Antibody Recognition of a MUC2 Mucin Epitope

Katalin Uray, Mamoru Mizuno, Toshiyuki Inazu, Kohtaro Goto, Ferenc Hudecz
Biopolymers(peptide science) ,2014 ,102(5) 390-395 doi 10.1002/bip.22526

BioHackathon series in 2011 and 2012: penetration of ontology and linked data in life science domains

Toshiaki Katayama, Mark D Wilkinson, Kiyoko F Aoki-Kinoshita, Shuichi Kawashima, Yasunori Yamamoto, Atsuko Yamaguchi, Shinobu Okamoto, Shin Kawano, Jin-Dong Kim, Yue Wang, Hongyan Wu, Yoshinobu Kano, Hiromasa Ono, Hidemasa Bono, Simon Kocbek, Jan Aerts, Yukie Akune, Erick Antezana, Kazuharu Arakawa, Bruno Aranda, Joachim Baran, Jerven Bolleman, Raoul JP Bonnal, Pier Luigi Buttigieg, Matthew P Campbell, Yi-an Chen, Hirokazu Chiba, Peter JA Cock, K Bretonnel Cohen, Alexandru Constantin, Geraint Duck, Michel Dumontier, Takatomo Fujisawa, Toyofumi Fujiwara, Naohisa Goto, Robert Hoehndorf, Yoshinobu Igarashi, Hidetoshi Itaya, Maori Ito, Wataru Iwasaki, Matus Kalas, Takeo Katoda, Taehong Kim, Anna Kokubu, Yusuke Komiyama, Masaaki Kotera, Camille Laibe, Hilmar Lapp, Thomas Lutteke, M Scott Marshall, Takaaki Mori, Hiroshi Mori, Mizuki Morita, Katsuhiko Murakami, Mitsuteru Nakao, Hisashi Narimatsu, Hiroyo Nishide, Yosuke Nishimura, Johan Nystrom-Persson, Soichi Ogishima, Yasunobu Okamura, Shujiro Okuda, Kazuki Oshita, Nicki H Packer, Pjotr Prins, Rene Ranzinger, Philippe Rocca-Serra, Susanna Sansone, Hiromichi Sawaki, Sung-Ho Shin, Andrea Splendiani, Francesco Strozzi, Shu Tadaka, Philip Toukach, Ikuo Uchiyama, Masahito Umezaki, Rutger Vos, Patricia L Whetzel, Issaku Yamada, Chisato Yamasaki, Riu Yamashita, William S York, Christian M Zmasek, Shoko Kawamoto and Toshihisa Takagi
Journal of Biomedical Semantics ,2014, 5:5 doi:10.1186/2041-1480-5-5

WURCS: the Web3 unique representation of carbohydrate structures.

Tanaka K, Aoki-Kinoshita KF, Kotera M, Sawaki H, Tsuchiya S, Fujita N, Shikanai T, Kato M, Kawano S, Yamada I, Narimatsu H.
Journal of Chem. Inf. Model. , 2014 ,54(6):1558-66. doi: 10.1021/ci400571e

Preparation of acid-resistant heavy fluorine tags for recycling in synthetic systems

Kazuo Fukuda, Mami Tojino, Kohtarō Goto, Hirofumi Dohi, Yoshihiro Nishida, Mamoru Mizuno
Journal of Fluorine Chemistry, 2014, 166 ,52-59

Carbohydrate : Lectin Interaction Assay by Fluorescence Correlation Spectroscopy
Using Fluorescence-Labeled Glycosylasparagines

Mamoru Mizuno
Lectins Methods in Molecular Biology ,2014 ,Volume 1200, 215-221

Formation of 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosidic Linkages via Glycosidation
Using a Combination of Two Lewis Acids

Oda Yoshiki, Midorikawa Masanobu, Yamanoi Takashi
Heterocycles , 2015 ,90(1) 198-215 DOI: 10.3987/COM-14-S(K)4

GlycoRDF: an ontology to standardize glycomics data in RDF.

Ranzinger R, Aoki-Kinoshita KF, Campbell MP, Kawano S, Lutteke T, Okuda S, Shinmachi D, Shikanai T, Sawaki H, Toukach P, Matsubara M, Yamada I, Narimatsu H. *Bioinformatics* , 2015 ,31(6):919-25. doi: 10.1093/bioinformatics/btu732.

A recyclable heavy fluorous tag carrying an allyl alcohol pendant group: design and evaluation toward applications in synthetic carbohydrate chemistry

Kazuo Fukuda, Mami Tojino, Kohtaro Goto, Hirofumi Dohi, Yoshihiro Nishida, Mamoru Mizuno
Carbohydrate Research 2015 ,407 ,122-130

3. 講演

古川鋼一教授退官記念シンポジウム (2015.1.9)

「腎癌細胞におけるGalNAc-Disialyl Lc4糖鎖抗原の役割」 土田明子

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 J N C 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、創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収されたため、昭和21年1月この地に移転し、敷地は約13,700㎡、建物は約4,300㎡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	松田 昭生*		
理事	齊藤 継男*	上ノ山智史	
	木庭 竜一	木幡 陽	
	中尾 正文	野崎 貴司	
	畑中 研一	廣瀬 弘明	
	堀 一良	松本 誠	

評議員 浅野 敏雄 岩澤 康裕
 後藤 泰行 小堀 秀毅
 澤本 光男 根岸 修史
 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27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 古川 清

7. 職員

平成27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2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104件、商標権は4件である（平成27年6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
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 小田 慶喜	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	ペ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 後藤浩太朗	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	e x o - グリカル誘導体の製造法	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
水野真盛 川上宏子	微小流路内のフルオラス不均一多相系反応方法	5670654	2014.12.26
山田一作	糖鎖構造認識用解析方法、糖鎖構造認識用解析装置およびプログラム	5734586	2015.4.24
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 山ノ井孝也 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 山ノ井孝也 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 (米国)	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
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	US 8809496 (米国)	2014.8.19
中山淳 白井孝也 山ノ井孝也 藤田雅也 森昌子	ピロリ菌増殖抑制剤	US 8859511 (米国)	2014.10.14
＜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
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
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
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	NO _x 浄化用触媒の担体	4749093	2011.05.27
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
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
菅原州一 大隅賢二	糖ペプチド誘導体及びその製造方法	5611105	2014.09.12
菅原州一 大隅賢二	糖ペプチド被覆シリカ	5614897	2014.09.19
塚本郁子 小西良士 窪田泰夫 大隅賢二 水野真盛	血管内皮細胞の管腔形成抑制剤	5649358	2014.11.21
菅原州一 大隅賢二	11糖シアリルオリゴ糖アスパラギンの製造方法	5680576	2015.01.16
高木睦 戸潤一孔	軟骨細胞培養基材及び培養方法	5721319	2015.04.03
小西満月 友国敬三	ロジウム及び金を含む担持触媒	5758228	2015.06.12
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
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	US 8772044 (米国)	2014.07.08

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. 2014年度実施報告

第6回目の野口遵研究助成金の贈呈を実施したので、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、産業応用までには課題も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研究を行っている若手研究者に助成を行っている。

2) 2014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2014年9月1日から2ヶ月間募集を受け付け、総計212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>	86件	6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 <グリーンサステイナブルケミストリー(触媒を含む)、バイオマス、水処理など>	61件	1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	35件	3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	30件	3件
合計		212件	13件

②選考委員会

2015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10名が出席し厳正な選考の結果13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

2015年3月10日如水会館(千代田区一ツ橋)にて、来賓、選考委員、その他関係者各位で総勢65名ほどの出席を得て贈呈式を開催した。なお、後述の野口遵賞の贈呈式も同時に行った。

【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
東田 裕一	九州大学 稲盛フロンティア研究センター 教授	哺乳類初期胚細胞外分泌タンパク質を利用した生殖補助医療技術の開発
栗原 顕輔	自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 特任准教授	ドラッグデリバリーシステムを志向した自律構築型リボソームの開発
丸山 健太	大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任助教	革新的骨保護ワクチンの開発
塚崎 智也	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 准教授	蛋白質分泌マシーナリーの動的精密探査を可能とする新しい再構成系の構築
久代 京一郎	東京大学 大学院工学系研究科 助教	材料構造に基づくガン診断デバイスの開発とその機械的シグナル伝達メカニズムの解明
秋山 佳丈	信州大学 繊維学部 准教授	ラベルフリー磁気細胞操作によるオンチップ臓器アッセイ系の構築
前田 和彦	東京工業大学 理学部 准教授	金属錯体とナノ構造酸化物で創る水中駆動型CO ₂ 固定化光触媒
高橋 幸奈	九州大学 大学院工学研究院 助教	金ナノロッドを光捕集アンテナとした光エネルギー変換デバイスの開発
平田 修造	東京工業大学 大学院理工学研究科 助教	ナノ空間場を用いた10mW/cm ² で最大効率を示すフォトンアップコンバージョン材料への挑戦
所 裕子	筑波大学 数理物質系 准教授	相転移挙動の熱力学的制御による環境調和型エネルギー材料の開発
島 弘幸	山梨大学 大学院総合研究部 准教授	螺旋型ナノ繊維の構造柔軟性を利用した革新的電磁シールド材料の創製
山田 鉄兵	九州大学 大学院工学研究院 准教授	インコメンシュレートに配列したイオン性ゲストの構築と物性の探索
矢野 隆章	東京工業大学 大学院総合理工学研究科 助教	単一分子機能制御能を具備した革新的ナノ分光計測法の開拓

*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. 2012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。2012年度（第4回）採択者〔助成期間：2013年4月1日～2014年3月31日〕の研究成果（要旨）を以下に記す。

【2012年度（第4回）野口遵研究助成金 研究成果報告（要旨）】

氏名	岡村 陽介	所属	東海大学 創造科学技術研究機構	職名	講師
研究テーマ名	裁断化超薄膜のナノパッチワークコーティング特性を利用した新規医用材料の開発				
ナノ厚特有の高接着性が発現する高分子超薄膜(膜厚：100nm以下)に注目し、その裁断化体(裁断化超薄膜, サブミリメートルサイズ)を開発した。裁断化超薄膜分散液を滴下するだけで、平滑面のみならず複雑な形状をもつ界面にもナノ厚且つパッチワーク様にコーティング(ナノパッチワークコーティング)できることを実証した。さらに、裁断化超薄膜の粉末を用いたスプレーコーティング手法も確立し、短時間に大面積の界面をコーティング可能となった。					
氏名	大窪 章寛	所属	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 分子生命科学専攻	職名	助教
研究テーマ名	人工UsnRNAを利用した新規スプライシングテクノロジーの開発				
本研究課題では、U1 snRNAの高効率な化学合成法の検討をおこなった。その結果、「ホスホロアミダイト化合物を利用した高効率ポリリン酸化反応」を用いてm3Gキャップ構造を有するU1 snRNAの5'側の短いRNA分子（10塩基）を化学合成し、別途合成した3'側の長いRNA分子（154塩基）をT4DNALigaseを用いて連結することで、U1 snRNAを高効率に合成することに成功した。					

氏名	東 大志	所属	熊本大学 大学院生命科学研究部 製剤設計学分野	職名	助教
研究テーマ名	強力かつ腫瘍選択的な超分子ナノ抗癌剤：葉酸修飾メチル化シクロデキストリン分子ネックレスの構築				
最近我々は、腫瘍選択的抗がん剤として、葉酸修飾メチルβ-シクロデキストリン (FA-M-β-CyD) を開発した。しかし、FA-M-β-CyD の腫瘍選択性や血中滞留性は十分ではない。そこで本研究では、強力かつ腫瘍選択的な超分子ナノ抗癌剤を開発することを目的として、2,6-ジ-O-メチルβ-CyD (DM-β-CyD) ならびに DM-β-CyD から成る分子ネックレスの調製を行った。					
氏名	高妻 篤史	所属	東京薬科大学 生命科学部 環境ゲノム学科	職名	助教
研究テーマ名	電気化学的に駆動する微生物エネルギー代謝系を利用した高収率物質変換法の開発				
微生物のエネルギー代謝系を電気化学的に駆動し、細胞内の物質変換に必要な還元力を供給することによって有用物質生産を促進するシステムの構築を行った。 <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1株に遺伝子改変（糖代謝能の付与および副生成物合成系の破壊）を加え、電極から電子を供給しながら培養を行った結果、還元物質としてD-乳酸を生産させることに成功した。					
氏名	野口 真人	所属	東北大学 大学院工学研究科 バイオ工学専攻	職名	助教
研究テーマ名	無保護糖からのワンポット/フロースルー配糖体合成法の開発				
無保護のN-アセチルグルコサミンから活性化剤を用いて活性化糖誘導体を合成し、引き続き糖加水分解酵素触媒配糖化反応をワンポットで行い、 <i>Helicobacter pylori</i> の増殖抑制活性を有するα-N-アセチルグルコサミニド含有オリゴ糖の合成に成功した。また、糖タンパク質合成などに用いられている糖供与体である糖オキサゾリン誘導体をフローで合成するための新規脱水縮合剤、CDMBI-OMeの合成と評価を行った。その結果、従来用いられているCDMBIよりも効率的にオキサゾリン誘導体へと変換可能であることが分かった。					
氏名	大内 誠	所属	京都大学 大学院工学研究科 高分子化学専攻	職名	准教授
研究テーマ名	持続可能な精密ラジカル重合：真に使える鉄触媒の開発				
鉄は安全である上に地球に豊富に存在する金属であるために、持続性のあるリビングラジカル重合触媒として期待されている。しかし、これまでの鉄触媒はモノマー汎用性に乏しく、特に高極性モノマーに対する耐性が低かった。本研究では、フェロセン協奏助触媒の発展、中心鉄を守る配位子や配位力の強さが異なる複数の配位点を有する配位子の開発を通じて、真に使える鉄触媒リビングラジカル重合系を開発した。					
氏名	北野 政明	所属	東京工業大学 応用セラミックス研究所	職名	特任助教
研究テーマ名	ナノチューブ構造を有するチタン系酸化物から成る新規固体酸触媒の開発				
チタン酸ナノチューブの合成条件を制御することで、シート、チューブ、ロッド状の形態に変化させることが可能であり、表面に露出する酸量が大きく変化することがわかった。内径が約5nmのナノチューブ構造を有した場合に表面酸点の数が最大となり、最も高い酸触媒性能が発現することを見いだした。また、骨格にNbやTaをドーピングするとブレンステッド酸としての活性が最大で約10倍向上することが明らかとなった。					

氏名	大橋 理人	所属	大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻	職名	講師
研究テーマ名	フルオラス化合物の自在合成を指向した炭素-フッ素結合活性化触媒の開発				
機能性材料として多様な用途展開が期待されるフルオラス化合物の自在合成法の確立を目指し、パーフルオロアルケンの炭素-フッ素結合を位置選択的に切断する遷移金属活性種を創出した。さらに、パーフルオロ化合物を出発原料とするパーフルオロ亜鉛種の与える革新的合成法を開発した。					
氏名	井改 知幸	所属	金沢大学 理工研究域 物質化学系	職名	助教
研究テーマ名	らせん構造制御を新基軸とする両極性有機半導体の開発と有機薄膜太陽電池の高耐久化				
“高耐久な有機薄膜太陽電池の開発”を目指して、らせん構造形成に基づき両極性半導体特性を発現する新規高分子材料の開発を行った。本研究により、「電子ドナーと電子アクセプターを連結したユニット」がらせん状に規則配列したポリペプチドの開発に世界で初めて成功した。次ステージの課題は、本材料の電気化学的特性について明らかにすることであり、太陽電池素子への実装を目指し、高性能半導体材料の開発を推進していく。					
氏名	林 克郎	所属	東京工業大学 応用セラミックス研究所	職名	准教授
研究テーマ名	耐火酸化物を用いたナトリウム-空気電池の創製				
飛躍的に高いエネルギー密度を有する革新電池の候補として、非水-水溶液混合系(略して水溶液系)ナトリウム-空気電池の原理実証と、その性能向上およびナトリウム系の電池技術に寄与するための高速ナトリウムイオン伝導体の性能向上に関する検討を行った。ナシコンをセラミックス・セパレーターとして用いた水溶液系ナトリウム空気電池の実証セルを構築し、20~30mA/cm ² の最大出力を得て、アルカリ金属空気電池の中でも、現状で良好といえる面積出力を実証した。本電池の空気極にナノポーラス金(NPG)電極を適用して、本系へのNPG電極の合理性を示し、またセラミックス・セパレータ保護水溶液系電池のロバスト性を示した。また高速ナトリウムイオン伝導体のβアルミナについても、放電プラズマ焼結法を初めて適用することで、結晶配向と緻密化により、非常に優れた電導度を得る事ができた。					
氏名	獨古 薫	所属	横浜国立大学 大学院工学研究院 機能の創生部門	職名	准教授
研究テーマ名	グライム-ナトリウム塩錯体の構造とナトリウム系二次電池への展開				
本研究では、グライム-ナトリウム塩錯体の物理化学特性を詳細に検討し、ナトリウム系二次電池の電解質として応用を試みた。グライムとNa塩をモル比1:1で混合して得られる電解液中では、グライム分子がNa ⁺ イオンに配位し錯体を形成する。この錯体は、室温で液体状態であり、熱安定性に優れることが分かった。このグライム-ナトリウム塩等モル錯体をナトリウム系二次電池の電解質として適用したところ、電池の安定した作動が可能であった。					

氏名	阪口 壽一	所属	福井大学 大学院工学研究科 材料開発工学部門	職名	准教授
研究テーマ名	二酸化炭素分離を目的としたナノ空間保持ポリマー膜材料の開発				
<p>二酸化炭素の高透過性・分離能を達成する膜の開発を目指し、極性基を有する新規ポリマーとして、メチロール基を有するポリ(ジフェニルアセチレン)、イミダゾリウム塩を有するポリ(ジフェニルアセチレン)、メトキシ基を有するポリ(ジフェニルアセチレン)、オキシエチレン基を含むポリビニルエーテル膜を合成した。気体透過性を測定したところ、高い二酸化炭素選択性を示す膜が得られた。</p>					
氏名	安藤 和也	所属	東北大学 金属材料研究所 量子表面界面科学研究部門	職名	助教
研究テーマ名	スピン-軌道散乱を用いた省エネルギー電子技術の創出				
<p>本研究は、スピン流伝導及びスピン流-電流変換の新しい物理を開拓するものである。本研究により、非常に長いスピン緩和時間を示す有機材料において、スピン歳差運動による交流スピン流の整流効果が顕在化することを明らかにした。また、動的スピン流生成を用いることで導電性高分子中スピン流-電流変換が低温になるに従って減少するという結果を得た。本結果はスピン流変換の理解に重要な指針を与えることが期待される。</p>					
氏名	瀬川 泰知	所属	名古屋大学 物質科学国際研究センター	職名	助教
研究テーマ名	分岐型カーボンナノチューブの精密合成				
<p>今回我々は、分岐型CNTの接合ユニットであるベンゼン環17個、14個のカーボンナノケージの合成に成功した。さらに、初めてのカーボンナノケージのX線結晶構造解析による詳細な構造解明、光物性のサイズ依存性の実証を行なった。カーボンナノケージの合成は長期間かつ高い技術を要するため、新たに合成した2種のカーボンナノケージについては、CVD法によるCNT伸長に必要な量の確保には至っておらず、現在大量合成を進めている。今後は分岐型CNTの精密合成、および金属型と半導体型の接合部位をもつCNTの合成へと展開し、高機能な材料の創出を目指していきたい。</p>					

野口遵賞

I. 2014年度実施報告

1) 野口遵賞の趣旨

本賞は過去の野口遵研究助成金採択者の中から毎年1名に「野口遵賞」を贈呈し、副賞として500万円を大学等の所属研究機関へ奨学寄付金として支給いたします。本賞は、当財団の助成金を受けた後、研究を発展させ活躍されている研究者のさらなる飛躍を後押しすることを目指しています。

2) 2014年度の概要

2015年2月3日に野口遵研究助成金の選考に先立って野口遵賞の選考を行った。選考委員10名による選考の結果、大坂大学大学院工学研究科の松崎典弥助教を受賞者とすることを決定した。なお、本年度は2009年度、2010年度、2011年度の野口遵研究助成金贈呈者を対象として選考した。野口遵賞を受賞した松崎典弥助教は2009年度に「細胞とタンパク質の三次元統合制御に基づく革新的ハイブリッド組織の創製と医薬品評価への応用」というテーマで野口遵研究助成に採択されています。

- Appendix -

2014年度誌上発表論文抄録集

Abstract of Publications

腫瘍形成におけるN-型糖鎖上のLacdiNAc構造の生物学的意義

平野 清子、松田 昭生、白井 孝、古川 清

BioMed Research International ,2014, Article ID 981627, 7 pages

癌化に伴い細胞表面の糖タンパク質や糖脂質上の糖鎖構造が変化することは広く知られている。N-型及びO-型糖鎖の非還元末端のGalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc (LacdiNAc、LDN) 構造は、哺乳動物においては比較的珍しい構造である。我々は以前ヒト乳癌においてN-型糖鎖上のLacdiNAc構造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構造の発現量が増加することが報告されている。このことからこの糖鎖の発現量の増減は組織依存的であると考えられる。LacdiNAc構造の生合成には2種類の β 4-N-アセチルガラクトサミン転移酵素(β 4GalNAcTs)、すなわち β 4GalNAcT3 及び β 4GalNAcT4が関与しており、これらは組織特異的に発現し、この糖鎖の発現量を制御している。

~~~~~

### Relative Quantitation of Glycopeptides

#### Based on Stable Isotope Labeling Using MALDI-TOF MS

Masaki Kuroguchi and Junko Amano

Molecules , 2014, 19(7), 9944-9961; doi:10.3390/molecules19079944

私達は、安定同位体標識を用いた糖ペプチドの効果的かつ高感度のMALDI-TOF MSを用いた相対定量法を開発した。この研究では、軽水素標識された安息香酸スクシンイミド活性化エステルと重水素標識された安息香酸スクシンイミド活性化エステルをそれぞれ糖ペプチドの安定同位体標識試薬として合成した。ペプチド鎖のN端をベンゾイルで標識された糖ペプチドは、ポジティブモード、ネガティブモード共にイオン化効率が向上した。この標識試薬の反応効率は非常に良く、血清ヒトIgG由来の様々な糖ペプチドに対して幅広い濃度領域において定量的に反応した。また再現性も非常に高く、良い検量線が得られた。この標識法を利用して、血清ヒトIgGを使ってミエローマプラズマ由来のヒトIgG1糖ペプチドの同定並びに相対的定量解析を行った。また、血清ヒトIgGに含まれるIgG1とIgG2の糖鎖異性体をStreptococcus pyogenes由来のエンドグリコシダーゼ (endoS) とStreptococcus pneumoniae由来のエンドグリコシダーゼ (endoD) の基質特異性を利用して、安定同位体標識を用いた質量分析で同定した。

~~~~~

The Effect of Glycosylation on the Antibody Recognition of a MUC2 Mucin Epitope

Katalin Uray, Mamoru Mizuno, Toshiyuki Inazu, Kohtaro Goto, Ferenc Hudecz
Biopolymers(peptide science) ,2014 ,102(5) 390-395 doi 10.1002/bip.22526

MUC2 glycoprotein, built up mainly of repeat units of $^1\text{PTTTPITTTTTVTPTPTPT-GTQT}^{23}$, can be overexpressed or underglycosylated in gastrointestinal diseases. The epitope structure of the MUC2 by focusing on the repeat unit with the mucin peptide specific MAb 996 monoclonal antibody has been studied. This antibody recognizes the $^{18}\text{PTGTQ}^{22}$ sequence as minimal, and $^{16}\text{PTPTGTQ}^{22}$ as optimal epitope within the underglycosylated glycoprotein. Herein, we aim to clarify the effect of glycosylation of the epitope on MAb 996 antibody binding including its correlation with the secondary structure of the modified peptides: glycosylation in the epitope core and in the flank. For this we have synthesized the $^{16}\text{PTPTGTQ}^{22}$ peptide glycosylated with GalNAc (Tn antigen) in position 17, 19, 21, or on all three Thr residues. The MAb 996 antibody binding properties of the peptides were characterized in competitive ELISA experiments, and their solution secondary structure was studied by circular dichroism spectroscopy in water and in the ordered structure promoting trifluoroethanol. Our results show that glycosylation in position 19 (peptide $^{16}\text{PTPT}(\text{GalNAc})\text{GTQ}^{22}$) resulted in enhanced antibody recognition and significantly altered secondary structure, while glycosylation in position 21 completely demolished the binding. These results could be useful in determining the nature of antigen-antibody interaction, and perhaps designing synthetic peptide vaccines for tumor therapy.

~~~~~

### BioHackathon series in 2011 and 2012:

#### penetration of ontology and linked data in life science domains

Toshiaki Katayama, Mark D Wilkinson, Kiyoko F Aoki-Kinoshita, Shuichi Kawashima, Yasunori Yamamoto, Atsuko Yamaguchi, Shinobu Okamoto, Shin Kawano, Jin-Dong Kim, Yue Wang, Hongyan Wu, Yoshinobu Kano, Hiromasa Ono, Hidemasa Bono, Simon Kocbek, Jan Aerts, Yukie Akune, Erick Antezana, Kazuharu Arakawa, Bruno Aranda, Joachim Baran, Jerven Bolleman, Raoul JP Bonnal, Pier Luigi Buttigieg, Matthew P Campbell, Yi-an Chen, Hirokazu Chiba, Peter JA Cock, K Bretonnel Cohen, Alexandru Constantin, Geraint Duck, Michel Dumontier, Takatomo Fujisawa, Toyofumi Fujiwara, Naohisa Goto, Robert Hoehndorf, Yoshinobu Igarashi, Hidetoshi Itaya, Maori Ito, Wataru Iwasaki, Matus Kalas, Takeo Katoda, Taehong Kim, Anna Kokubu, Yusuke Komiyama, Masaaki Kotera, Camille Laibe, Hilmar Lapp, Thomas Lutteke, M Scott Marshall, Takaaki Mori, Hiroshi Mori, Mizuki Morita, Katsuhiko Murakami, Mitsuteru Nakao, Hisashi Narimatsu, Hiroyo Nishide, Yosuke Nishimura, Johan Nystrom-Persson, Soichi Ogishima, Yasunobu Okamura, Shujiro Okuda,

Kazuki Oshita, Nicki H Packer, Pjotr Prins, Rene Ranzinger, Philippe Rocca-Serra,  
Susanna Sansone, Hiromichi Sawaki, Sung-Ho Shin, Andrea Splendiani, Francesco Strozzi,  
Shu Tadaka, Philip Toukach, Ikuo Uchiyama, Masahito Umezaki, Rutger Vos,  
Patricia L Whetzel, Issaku Yamada, Chisato Yamasaki, Riu Yamashita, William S York,  
Christian M Zmasek, Shoko Kawamoto and Toshihisa Takagi  
Journal of Biomedical Semantics, 2014, 5:5 doi:10.1186/2041-1480-5-5

生物学的データの統合、バイオインフォマティクス解析、可視化ツールなどへのセマンティック技術の活用は、過去5年間に日本で開催されたBioHackathonの共通のテーマでした。本論文は、京都（2011年）富山（2012年）において開催されたBioHackathonにおける活動や成果のレビューです。効率的に生命科学のセマンティック技術を実現するために、参加者は様々なサブグループを形成して、以下のトピックに取り組みました：特定のドメインのためのRDF（Resource Description Framework）モデル、テキストマイニング、オントロジー開発、生物学的データベースに必須のメタデータ効率的なセマンティックWeb技術の開発と相互運用性、およびセマンティックWebのデータ用のアプリケーションの開発。このレビューでは、これらのサブグループによって実施されたテーマを紹介します。



### WURCS: the Web3 unique representation of carbohydrate structures.

Tanaka K, Aoki-Kinoshita KF, Kotera M, Sawaki H, Tsuchiya S, Fujita N, Shikanai T,  
Kato M, Kawano S, Yamada I, Narimatsu H.  
Journal of Chem. Inf. Model., 2014, 54(6):1558-66. doi: 10.1021/ci400571e

In recent years, the Semantic Web has become the focus of life science database development as a means to link life science data in an effective and efficient manner. In order for carbohydrate data to be applied to this new technology, there are two requirements for carbohydrate data representations: (1) a linear notation which can be used as a URI (Uniform Resource Identifier) if needed and (2) a unique notation such that any published glycan structure can be represented distinctively. This latter requirement includes the possible representation of nonstandard monosaccharide units as a part of the glycan structure, as well as compositions, repeating units, and ambiguous structures where linkages/linkage positions are unidentified. Therefore, we have developed the Web3 Unique Representation of Carbohydrate Structures (WURCS) as a new linear notation for representing carbohydrates for the Semantic Web.



American Chemical Society



## Preparation of acid-resistant heavy fluorous tags for recycling in synthetic systems

Kazuo Fukuda, Mami Tojino, Kohtaro Goto, Hirofumi Dohi, Yoshihiro Nishida, Mamoru Mizuno  
Journal of Fluorine Chemistry, 2014, 166 ,52-59

Acid-resistant heavy fluorous tags, in which all three fluorous chains are linked by carbon-carbon linkage, were designed and synthesized. The tag with an alkyl spacer equipped the primary OH group showed the greatest reactivity in conjugation reactions with target compounds and could be recovered in good yields, implying its potential for use in recycling applications.

~~~~~

Carbohydrate ; Lectin Interaction Assay by Fluorescence Correlation Spectroscopy Using Fluorescence-Labeled Glycosylasparagines

Mamoru Mizuno

Lectins Methods in Molecular Biology ,2014 ,Volume 1200, 215-221

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a high-throughput system for the assay of interactions in solution and can measure the numbers of molecules and molecular size in micro-regions. It is a useful technique for measuring bioactive substances, screening inhibitors, and detecting the binding of materials, as well as for determining K_d and IC_{50} values. Glycosyl amino acids having oligosaccharides are useful for the interaction assay of oligosaccharides. Fluorescence probes can be introduced into the glycosyl amino acid while the whole structure of the oligosaccharide is maintained. Carbohydrate-lectin interaction in a solution assay system was analyzed easily by FCS using fluorescence-labeled glycosylasparagine.

~~~~~

## Formation of 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosidic Linkages via Glycosidation Using a Combination of Two Lewis Acids

Oda Yoshiki, Midorikawa Masanobu, Yamanoi Takashi

Heterocycles , 2015 ,90(1) 198-215 DOI: 10.3987/COM-14-S(K)4

A mixed activation system composed of ytterbium(III) triflate and a catalytic boron trifluoride diethyl etherate complex efficiently promotes the glycosylation of various alcohol acceptors using 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl acetate in dichloromethane at room temperature to afford 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosides in good yields with significant formation of the  $\alpha$ -isomers. Notably, stereoselective glycosylations of phenol derivatives as the acceptors afforded aryl 1,2-*cis*- $\alpha$ -glycosides

without the formation of any  $\beta$ -isomers. This highly stereocontrolled 1,2-*cis*- $\alpha$ -glycosidation was applied to the synthesis of a novel hydroquinone  $\alpha$ -glycoside.

~~~~~

GlycoRDF: an ontology to standardize glycomics data in RDF.

Ranzinger R, Aoki-Kinoshita KF, Campbell MP, Kawano S, Lutteke T, Okuda S, Shinmachi D, Shikanai T, Sawaki H, Toukach P, Matsubara M, Yamada I, Narimatsu H. *Bioinformatics*, 2015, 31(6), 919-25. doi: 10.1093/bioinformatics/btu732.

過去数十年にわたり、グライコミクスにおいてバイオインフォマティクスリソースとして、データベースが作成され、一般に公開されてきました。しかし、データベースに格納された情報についての一般的な機械可読情報などに共通の標準仕様がありませんでした。グライコミクスの分野におけるバイオインフォマティクスの専門家の国際的なグループは、糖鎖構造および関連する生物学的供給源、出版物や実験データに焦点を当てたグライコミクスデータの標準のRDF (Resource Description Framework) 表現を作成しました。このRDF標準はGlycoRDFオントロジーとして定義され、データベースに格納されたデータを一般的な機械可読な形式とするために使用することができます。

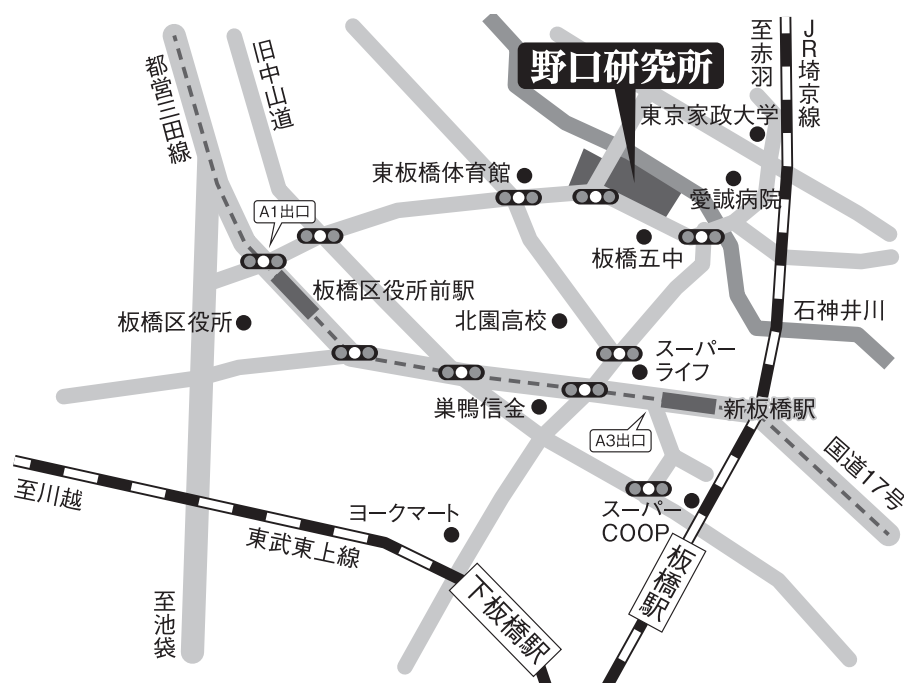
~~~~~

### **A recyclable heavy fluoros tag carrying an allyl alcohol pendant group: design and evaluation toward applications in synthetic carbohydrate chemistry**

Kazuo Fukuda, Mami Tojino, Kohtaro Goto, Hirofumi Dohi, Yoshihiro Nishida, Mamoru Mizuno *Carbohydrate Research* 2015, 407, 122-130

We converted our previous acid-resistant heavy fluoros tag [(Rf)<sub>3</sub>C-CH<sub>2</sub>-OH, **1**] to allyl alcohol derivatives [(Rf)<sub>3</sub>C-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-OH, **3** (n=1) or **4** (n=3)] using olefin metathesis. The terminal OH group in **3** and **4** was found to be glycosylated in moderate yield when 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-D-galactosyl trichloroacetimidate was used as the glycosyl donor. Upon a detachment reaction using Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, the initial fluoros tag **1** was recovered in good yield (>90%) together with 1-OH sugar. Potential utility was demonstrated by using the galactosylated derivative of **3** in a series of deprotection, protection and glycosylation reactions, which were conductible in high yields without using chromatographic purification process. These findings prompt us to propose a general scheme in which the acid-resistant heavy fluoros compound **1** is applied as a recyclable tag in synthetic carbohydrate chemistry.

~~~~~

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58号

2015年10月1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
