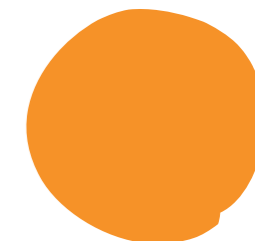


野口 研究所 時報



THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.59 2016

CONTENTS

Construction of New Research Facilities	Tsutomu INADA
Discovery of ribitol phosphate glycosylation and its defect in Fukuyama congenital muscular dystrophy	Tamao ENDO
Study on Syntheses and Electrochemical Catalytic Activity of Metal–Organic Frameworks for a Fuel Cell	Shozo KINOSHITA
Preparation of glycoengineered trastuzumab containing homogeneous core fucosylated glycan	Wataru TSUKIMURA
The study to develop glycan analysis on a glycoprotein using mass spectrometry	Junko AMANO
Synthesis of monogalactosylated complex type N-glycan heptasaccharide oxazolines	Kenji OSUMI
Glyco-antigens involved in Malignancy of Renal Cancer Cells	Akiko TSUCHIDA
Report on 2015 Annual Meeting of the Society for Glycobiology	Issaku YAMADA
23 rd International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO ²³)	Kiyoko HIRANO
23 rd International Symposium On Glycoconjugates (Glyco23)	Hiroko IDEO
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 新しい研究棟	稲田 勉
リビトールリン酸を含む糖鎖の発見と福山型先天性筋ジストロフィー	遠藤 玉夫
配位高分子による燃料電池用電極触媒材料に関する研究	木下 昌三
均一なコアフコース含有糖鎖を持つ抗体の調製	月村 亘
糖タンパク質糖鎖の再現性の高い質量分析法を目指して	天野 純子
非還元末端にガラクトース1残基を有する複合型7糖オキサゾリンの合成	大隅 賢二
腎癌の悪性化に関与する糖鎖抗原	土田 明子
2015 米国糖鎖生物学会年会参加報告	山田 一作
GLYCO ²³ 参加報告	平野 清子
23 rd International Symposium On Glycoconjugates (Glyco23) 参加報告	井手尾浩子
2015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	
2015年度誌上発表論文抄録集	

巻頭言 新しい研究棟	稲田 勉 ……	1
リビトールリン酸を含む糖鎖の発見と福山型先天性筋ジストロフィー	遠藤 玉夫 ……	3
配位高分子による燃料電池用電極触媒材料に関する研究	木下 昌三 ……	16
均一なコアフコース含有糖鎖を持つ抗体の調製	月村 亘 ……	22
糖タンパク質糖鎖の再現性の高い質量分析法を目指して	天野 純子 ……	31
非還元末端にガラクトース1残基を有する 複合型7糖オキサゾリンの合成	大隅 賢二 ……	35
腎癌の悪性化に関与する糖鎖抗原	土田 明子 ……	41
2015 米国糖鎖生物学会年会参加報告	山田 一作 ……	48
GLYCO ²³ 参加報告	平野 清子 ……	51
23rd International Symposium On Glycoconjugates (Glyco23) 参加報告	井手尾浩子 ……	53
2015年度活動概要	松田 昭生 ……	58
研究所の概要	齊藤 継男 ……	72
野口遵研究助成金／野口遵賞		…… 80
2015年度誌上発表論文抄録集		…… 87

THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.59 2016

C O N T E N T S

Construction of New Research Facilities	Tsutomu INADA ·····	1
Discovery of ribitol phosphate glycosylation and its defect in Fukuyama congenital muscular dystrophy	Tamao ENDO ·····	3
Study on Syntheses and Electrochemical Catalytic Activity of Metal–Organic Frameworks for a Fuel Cell	Shozo KINOSHITA ·····	16
Preparation of glycoengineered trastuzumab containing homogeneous core fucosylated glycan	Wataru TSUKIMURA ·····	22
The study to develop glycan analysis on a glycoprotein using mass spectrometry	Junko AMANO ·····	31
Synthesis of monogalactosylated complex type <i>N</i> -glycan heptasaccharide oxazolines	Kenji OSUMI ·····	35
Glyco-antigens involved in Malignancy of Renal Cancer Cells	Akiko TSUCHIDA ·····	41
Report on 2015 Annual Meeting of the Society for Glycobiology	Issaku YAMADA ·····	48
23 rd International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO ²³)	Kiyoko HIRANO ·····	51
23 rd International Symposium On Glycoconjugates (Glyco23)	Hiroko IDEO ·····	53
The Activities of the Institute	Akio MATSUDA ·····	58
Outline of the Institute	Tsuguo SAITO ·····	72
Noguchi Shitagau Research Grant	·····	80
Abstracts of Publications	·····	87

— 卷頭言 —

新しい研究棟

Construction of New Research Facilities

理事長 稲田 勉

President Tsutomu INADA

ふり向くな、ふり向くな、過去には夢がない / 寺山修二

野口研究所は現在、新しい研究棟を建設中です。今年8月末には完成し、9月に引っ越しをします。この時報がお手元に届く10月には新しい環境での仕事がスタートしていることでしょう。

3年前から研究施設更新の構想を練り始め、関係の皆様のご協力のもとに、何とか実現にこぎつけることができました。

創立者の野口遵（のぐちしたがう）は、昭和16年私財のほとんどをなげうって横浜山手の高台に野口研究所を立ち上げました。遵は昭和19年に亡くなり、終戦後山手は米軍に接収されます。昭和21年になり野口研究所は代替として板橋区加賀にある国有の元陸軍造兵廠火薬研究所の建物と敷地を使わせてもらうことになって転地し、現在に至っています。

石神井川のほとりの13,000㎡を超える広い土地と昭和初期建設の火薬研究所建物群をそのまま引き継ぎ、70年近く使わせていただいってきました。中心になる建物は比較的しっ

かりしていますが、一部のものはかなり老朽化し、使用に耐えないものも出てきましたし、利便性も十分とは言えないようになりました。そこで一念発起して、借地権を元手に現敷地の一部に自前の新研究棟を建設するに至った次第です。

私が新しい研究環境が必要だと考えるようになったのは4年前の着任後まもなくでした。23区内とは思えぬほど緑豊かでせいぜい2階建ての建物が点在する環境は、こう書くととても自然に恵まれた理想的な環境と思われるのですが、何分、建物にも自然にも十分手を入れきれないものですから、研究室も福利施設も前時代的な環境を我慢しながら使う状態を余儀なくされていました。しかし、所員は慣れているせいか、表立って不満が出るわけではありません。しかし、時がたつにつれ、自然環境がタイムスリップするのはいいのだけれど、研究員の気持ちまでタイムスリップしてしまうのではないかと危惧するようになりました。

知らない間に制約をかけながら研究を行うことは、将来を切り開くためにチャレンジしてゆく研究という行為にとっては望ましくなく、とくに若い人たちにそんな制約など与えたくないという思いが強くなりました。そして、一念発起して、これからの50年、100年を考えながら研究を続けられる環境を整えることにしたわけです。

野口研究所は今年で創立75周年を迎える伝統ある研究所です。しかし、伝統は過去を懐かしむためのものではなく、未来へつながる基盤となって初めて意味を持ちます。3年前の時報で「若竹屋は先祖より受け継ぎし商いにあらず、子孫より預かりしものなり」という久留米の造り酒屋の家訓を紹介しました。我が野口研も同じで、野口研究所という組織はこれから先に活躍される若い、あるいは未来の研究者から預かった組織なんだという思いが強くなります。未来の所員にお返しするときに、恥ずかしくない実績が込められていなくてはなりませんし、それにふさわしい元気の出る環境も整えてあげたい。これまで、古い環境ながら、野口研では糖鎖合成技術を中心に、現在まで受け継がれ、発展してきた技術財産があります。その技術は現在もなお糖鎖バイオロジーという形で発展し続けています。この技術発展の上昇カーブと交差するように下降してゆく施設環境を何とかフレッシュしないと20年後には朽ち果ててしまうのではないか、そして技術発展にもブレーキがかかってくることになるのではないか、という強い危惧が実行に動いた動機です。

過去を粗末にするつもりはありません。未

来につながる土台として過去は大切です。野口遵という偉大な創立者は我々の誇りですし、それに恥じない仕事をしなければならないという意味で、身を引き締めさせてくれます。新研究棟でも入り口正面には野口遵に関する記録や研究所の歩みを閲覧することのできる史料室を整備します。ただ、展示は最小限にし、史料に圧倒されるようなものではなく、バックヤードを望める明るいスペースとし、所員や来客の憩いの場となるようなものにするつもりです。未来を考えることを、そつと後押ししてくれるようなスペースにできればと思っています。

ともかく、大切なのは、いつも「これから」と向かい合うことだと思っています。

過去の出来事を反省すると言えば聞こえはいいですが、悔やむこと、取り返しのつかないことに対してくよくよと考えたり、正当化しようとして後ろに向くことはやめたい、無駄です。自分のできないことで考え悩むのではなく、自分の努力が通じる「これから」に考えを集中すること。大事なものは現実とどう向き合い、どう前に向けて未来の夢のために行動してゆくかでしょう。

「これから」を考えることを後押しするような環境を整える、これが新しい研究棟をつくる最大の狙いです。

所員には「ふり向くな、ふり向くな」と言い続けます。野口研究所のこれからの展開にご期待ください。

私はいつも これからの人生が最良のものになる と思っている／フェイ・ダナウェイ

リビトールリン酸を含む糖鎖の発見と 福山型先天性筋ジストロフィー

Discovery of ribitol phosphate glycosylation and its defect in Fukuyama congenital muscular dystrophy

東京都健康長寿医療センター研究所 遠藤 玉夫
Tamao ENDO

要約

我々は哺乳類における *O*-マンノース型糖鎖 (*O*-Man型糖鎖) を発見し、その合成に関わる糖転移酵素POMGNT1が先天性筋ジストロフィーであるmuscle-eye-brain病の原因となることを明らかにした。この研究は、生体における*O*-Man型糖鎖の重要性を示した。そして、この研究に端を発した*O*-Man型糖鎖研究は、その後糖鎖生物学の一分野を占めるまでになった。

最近我々は*O*-Man型糖鎖にはリビトール5リン酸(Rbo5P)が含まれることを発見し、その合成酵素は福山型先天性筋ジストロフィーなどの原因となることも明らかにした。これまでの一連の研究により筋ジストロフィーに関連する*O*-Man型糖鎖の全構造を提唱できる段階に至った。

はじめに

近年免疫、がん、感染、脳神経、再生医療、発生・分化など幅広いライフサイエンス分野で糖鎖研究が進み、生体における糖鎖の重要性や疾患との関わりが分かってきた。筋ジストロフィーは臨床的に筋力低下を主徴とし、病理学的には筋変性を主病変とする一群の遺伝子疾患の総称である。これらの疾患の中に、 α -ジストログリカン (α -DG) の*O*-Man型糖鎖の合成異常を原因とする疾患群がある。本

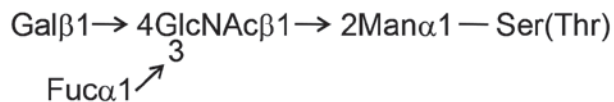
研究は生体における糖鎖機能の重要性を明確に示す代表例であり、本稿では約20年に渡る*O*-Man型糖鎖研究の歴史と最新の研究成果を紹介する。

O-Man型糖鎖

ジストログリカン(DG)は、ジストロフィン-糖タンパク質複合体の構成成分である。 α -DGは、細胞膜の外側に存在し膜貫通の β -DGと結合する一方、糖鎖を介してラミニンと結合している。一方、 β -DGは、細胞膜の内側でアクチンに繋がるジストロフィンと結合している。このようにDGは、ジストロフィン-糖タンパク質複合体において細胞外マトリックスと細胞内骨格タンパク質を繋ぐ中心的な役割を果たしている。

α -DGの主要な糖鎖は、哺乳動物には珍しいManを還元末端に持つ*O*-Man型糖鎖、Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Manである [1]。我々の報告を受け*O*-Man型糖鎖構造に関する報告が相次いだ。その結果、*O*-Man型糖鎖には多様な構造があることが分かった (図1)。シアル化糖鎖に加えて、X構造[Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] やHNK1エピトープ(HSO₃-3GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc)、さらにGlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-2)Man分岐を持つものなどである。

その後*O*-Man型糖鎖には、Manの4位に二



(Xyl/GlcA繰り返し構造)

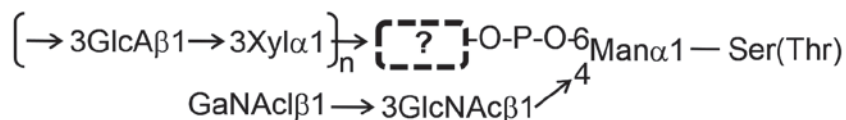


図1 哺乳類で見いだされた代表的なO-Man型糖鎖構造。タンパク質のセリン (Ser) あるいはスレオニン (Thr) にManが結合している。一番下の構造中に“?”マークで示した足場構造は不明だった。

糖構造(GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-4Man)と6位にリン酸化構造(PO₄-6Man)があるユニークな構造も報告された(図1) [2]。興味深いことに、Manの6位のリン酸基にはさらに糖鎖が伸び、その末端糖鎖はキシロース(Xyl)とグルクロン酸(GlcA)の繰り返し構造であり、この構造がラミニンとの結合を担う糖鎖であることが提唱された [3]。しかしながら、Xyl/GlcAの繰り返し構造は6位のリン酸にジエステル結合で直接結合している訳ではなく、何らかの足場構造的なものが介在することが推測された。しかしながら、その糖鎖構造については長い間不明であった。後述するように、最近我々はその糖鎖構造解明に成功した。

O-Man型糖鎖の構造多様性から、コア構造により分類することが提唱された(図2)。Manの2位のみ糖鎖がついたものをコアM1、

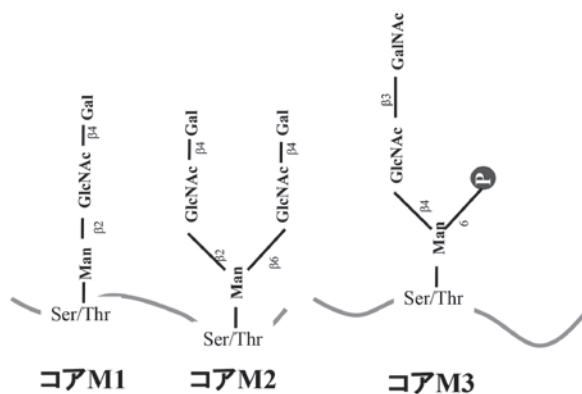


図2 O-Man型糖鎖のコア構造による分類。Manの2位のみ糖鎖がついたものをコアM1、Manの2、6位で糖鎖が分岐したものをコアM2、Manの4位に二糖構造と6位にリン酸を持つものをコアM3と分類している。

2、6位で糖鎖が分岐したものをコアM2、4位に糖鎖と6位にリン酸を持つものをコアM3と分類している。

O-Man型糖鎖の合成酵素

我々は哺乳類におけるO-Man型糖鎖の合成経路の解明を目指した。最初に明らかにできた酵素は、GlcNAc β 1-2Manを形成する糖転移酵素POMGnT(Protein O-mannose β -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase)であり、その遺伝子および酵素の性質を明らかにした [4]。引き続きタンパク質にManを転移する酵素、POMT(Protein O-mannosyltransferase)の実体解明に成功した [5]。これまで酵母のPOMTの哺乳類ホモログとしてヒトではPOMT1とPOMT2が報告されていたが、これらが酵素活性を持つかについては不明であった。POMT1とPOMT2を共発現させた細胞でPOMT活性の顕著な上昇が観察されたが、POMT1あるいはPOMT2の単独発現では活性の上昇は全く見られなかった。このことから、POMT1とPOMT2はO-Man転移酵素であり、酵素活性発現にPOMT1-POMT2複合体形成が必要であるという複雑な制御機構が明らかになった。

GlcNAc β 1-6Man形成に関わる糖転移酵素、その遺伝子GnT-IXは脳特異的に発現しており、脳ではManの6位修飾はGlcNAcとリン酸が競合する可能性がある。GnT-IXによるGlcNAcのManの6位転移にはGlcNAc β 1-2Man構造の存在が必要である。また、LARGEは、Xyl転移酵素とGlcA転移酵素であり、Xyl/GlcAの繰り返し構造[3GlcA β 1-3Xyl α 1]_nを形成することが報告された [3]。しかしながら、Manの6位のリン酸基とXyl/GlcAの繰り返し構造との間に存在する糖鎖は依然として不明であった。

O-Man型糖鎖と α -ジストログリカノパチー

筋ジストロフィーは、筋肉が徐々に弱まり失われる遺伝子疾患であり、多くの病型が知られている。 α -DGの糖鎖異常に起因する疾患群は、 α -ジストログリカノパチーと呼ばれ、筋ジストロフィー病変に加え脳奇形や眼

症状を伴う最重症タイプに分類される。

Muscle-eye-brain病(MEB)は、筋ジストロフィー、眼疾患、II型滑脳症を特徴とする常染色体劣性遺伝病である。我々は、MEB患者においてPOMGNT1遺伝子の変異を見いだした。これらPOMGNT1遺伝子の変異がO-Man型糖鎖の合成不全をもたらすか調べたところ、変異POMGnT1はすべて酵素活性を失っていた。この結果は、MEBはPOMGnT1の機能喪失によるO-Man型糖鎖不全疾患であることを示す。実際に、MEB患者骨格筋における α -DGの抗糖鎖抗体に対する反応性は消失していた。このことから、 α -DGはPOMGnT1による糖鎖修飾の標的であり、MEBはO-Man型糖鎖不全による疾患であることが明らかになった。糖鎖異常が筋ジストロフィーに係わること、それが患者で確認された初めての例となった [4]。

Walker-Warburg症候群(WWS)は、筋ジストロフィー、脳奇形、眼疾患を特徴とする常染色体劣性遺伝病である。WWS患者は出生時から重篤であり、ほとんど一年以内に死亡してしまう。WWSの原因遺伝子としてPOMT1が最初に報告された。しかしながら、我々が明らかにした様にPOMT1とPOMT2が共存することがO-Man糖転移酵素として働くために必要であることから、POMT2変異患者の存在が予想された。その後POMT2変異の患者が実際報告された。患者で見いだされたPOMT1とPOMT2の変異酵素活性を調べた結果、すべて活性を失っていた。WWSもMEBと同様O-Man型糖鎖不全疾患であることが分かったが、それぞれ異なる合成ステップであった [6]。

先天性筋ジストロフィー 1 D型(MDC1D)は、LARGE (like-acetylglucosaminyltransferase)の変異による精神遅延と脳奇形を伴う。LARGEは、前述したようにXylとGlcA転移酵素である [3]。福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD)はMEBやWWSと同様に、

先天性筋ジストロフィー、滑脳症、眼奇形を特徴とする。FCMDの原因遺伝子 (*FKTN*) はfukutinタンパク質をコードしている。先天性筋ジストロフィー 1 C型(MDC1C)は、*FKTN*のホモログ(fukutin-related protein、*FKRP*)の変異による。MDC1Cは青年期における重篤な筋衰弱と変性、心筋症を特徴とする。*FKRP*遺伝子の対立変異は、しばしば心筋症を併発し、青年期から成人期と幅広い発症時期を示す肢帯型筋ジストロフィー 2I型(LGMD2I)の原因でもある。Fukutinも*FKRP*も糖鎖修飾に関わると推測されていたが、機能は明らかになっていなかった。最近我々はこれらの機能解明に成功したが、それについては後述する。

α -ジストログリカノパチー研究から推定されるO-Man型糖鎖合成経路

これまでのコホート研究によると、 α -ジストログリカノパチーの2/3は原因遺伝子が不明であった。これは、*POMT1*、*POMT2*、*POMGNT1*、*FKTN*、*FKRP*、*LARGE* の6つ以外に原因遺伝子があることを示唆していた。最近次世代シーケンサーの開発により、 α -ジストログリカノパチーの原因遺伝子の同定が急速に進んだ(表1) [7]。

その一部を紹介すると、イソプレノイド合成酵素ホモログ(isoprenoid synthase domain containing、*ISPD*) 遺伝子がWWSの原因であることが報告された [8, 9]。 *ISPD* 遺伝子に変異を持つ患者では、O-Man転移反応が消失し*POMT*欠損によるWWSと同様の症

表1 α -ジストログリカノパチーの原因遺伝子とその機能

遺伝子	遺伝子産物の機能
<i>POMT1</i>	Protein O-mannosyltransferase 1
<i>POMT2</i>	Protein O-mannosyltransferase 2
<i>POMGNT1</i>	Protein O-mannose β 1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase
<i>FKTN</i>	Unknown*
<i>FKRP</i>	Unknown*
<i>LARGE</i>	β 1,3-GlcA and α 1,3-Xyl transferases
<i>GTDC2/POMGNT2</i>	Protein O-mannose β 1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase
<i>B3GALNT2</i>	β 1, 3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2
<i>B4GAT1</i>	β 1, 4- GlcA transferase 1
<i>SGK196/POMK</i>	Protein O-mannose kinase
<i>TMEM5</i>	Unknown*
<i>GMPPB</i>	GDP-mannose pyrophosphorylase B
<i>DPM1</i>	Dolichol-phosphate mannosyltransferase 1
<i>DPM2</i>	Dolichol-phosphate mannosyltransferase 2
<i>DPM3</i>	Dolichol-phosphate mannosyltransferase 3
<i>DOLK</i>	Dolichol kinase
<i>ISPD</i>	Unknown*
<i>DAG1</i>	Dystroglycan

*本文で記述した様にその後全て機能が明らかにされた。

状を呈するという。ISPDはイソプレノイド前駆体の合成に関与し、イソプレノイドはドリコール(Dol)の原料である。ところが、この経路は細菌や植物には存在するが、哺乳類ではISPDが関与しないメバロン酸経路によりイソプレノイドは合成される。したがって、ISPD遺伝子の変異によるO-Man型糖鎖不全がDol-P-Man前駆体であるイソプレノイドの合成不全に起因するという単純な考えはできない。ドリコールリン酸マンノース(dolicholphosphate-mannose、Dol-P-Man)を糖供与体として利用するO-Man型糖鎖合成の最初のステップにISPDが関与していることは、O-Man型糖鎖合成の制御機構に迫るうえでも興味深いことであったが、この報告を我々は追試できなかった。ISPD遺伝子に変異のある患者でも、O-Man転移反応には全く影響は見られなかった [10]。我々はISPDの機能を解明することに成功したが、それについては後述する。

Dol-P-Manは小胞体(ER)膜に存在するDol-P-Man合成酵素(GDP-Man:Dol-P mannosyltransferase、DPM)によって合成される。DPMは3つのサブユニット(DPM1、DPM2、DPM3)からなる。DPM3遺伝子の変異は、 α -ジストログリカノパチーの原因となり、臨床症状としては比較的軽度で、筋ジストロフィー症状を呈するが脳の障害はほとんど認められない [11]。ところで、Dol-P-ManはO-Man型糖鎖合成だけではなく、N-型糖鎖、C-Man型糖鎖、GPI-アンカー型糖鎖、というように他のタイプの糖鎖合成にも利用される。興味深いことにDPM3の変異患者ではO-Man型糖鎖のみが選択的に影響を受け、他の糖鎖経路は影響を受けない。一方、DPM2変異の症例も報告されたが、この場合にはO-Man型糖鎖だけでなくN-型糖鎖にも影響が及ぶ [12]。また、これまでにDPM1を原因遺伝子とする先天性グリコシル化異常症(Congenital disorders of glycosylation、CDG、糖鎖

の合成異常による先天的な疾患群。これまで30種類以上の原因が明らかになっている。)が知られていた。DPM1変異の患者では、N-型糖鎖の異常が強調されO-Man型糖鎖や筋病理については記載されていないが、O-Man型糖鎖異常も十分予想される。Dol-P-Man供給不足と共通の原因にも関わらず、各サブユニット変異の影響が異なる理由は不明である。例えば、Dol-P-Manに対する各酵素のKm値の違い、DPM3はDol-P-ManをPOMTに選択的に供与する、などが考えられる。一方、遺伝性拡張型心筋症の原因遺伝子としてDOLK(dolichol kinase)が同定された [13]。DOLKは、Dolをリン酸化し Dol-Pを合成する酵素で、Dol-Pはさらに Dol-P-Manへと代謝され糖鎖合成に利用される。この患者ではO-Man型糖鎖だけでなくN-型糖鎖にも影響がある。このようにO-Man型糖鎖はDol-P-Man代謝経路の影響を受けるなど、その制御機構は複雑である。

これまでの研究からまとめたO-Man型糖鎖合成経路を図3に示した。O-Man糖鎖はERでPOMT1/POMT2複合体により開始される。Manの供与体はDol-P-Manであり、この供給量がO-Man型糖鎖合成開始の重要な要素であり、Dol-P-Man合成経路も α -ジストログリカノパチーの原因となることは前述した。その後、Man化されたタンパク質はゴルジ体に移送され、POMGnT1の働きにより、コアM1が形成される。脳ではさらにGnT-IXの働きによりコアM2が形成される。さらに糖鎖プロセスが進み末端構造として、図1に示したX構造やHNK1エピトープ、シアル酸化糖鎖などが形成される。

一方、コアM3ではManが付いた後、GT-DC2(glycosyltransferase-like domain-containing 2)によりManの4位にGlcNAcが付く。B3GALNT2はその先のGalNAc β 1-3転移酵素であり、SGK196はManの6位をリン酸化する酵素であり、これら一連の反応によりコ

アM3がERで形成される (図3) [14]。なお、*TMEM5*や*GTDC2*、*SGK196*いずれも、 α -ジストログリカノパチーの原因である [15, 16]。そしてゴルジ体に移送された後、最終的にLARGEにより、ラミニンとの結合機能

糖鎖、Xyl/GlcAの繰り返し構造が形成される。

この結果、リン酸とその先に形成されるXyl/GlcAの繰り返し構造の間、その足場糖鎖構造とそれを作り出す酵素の同定が最後に残された。

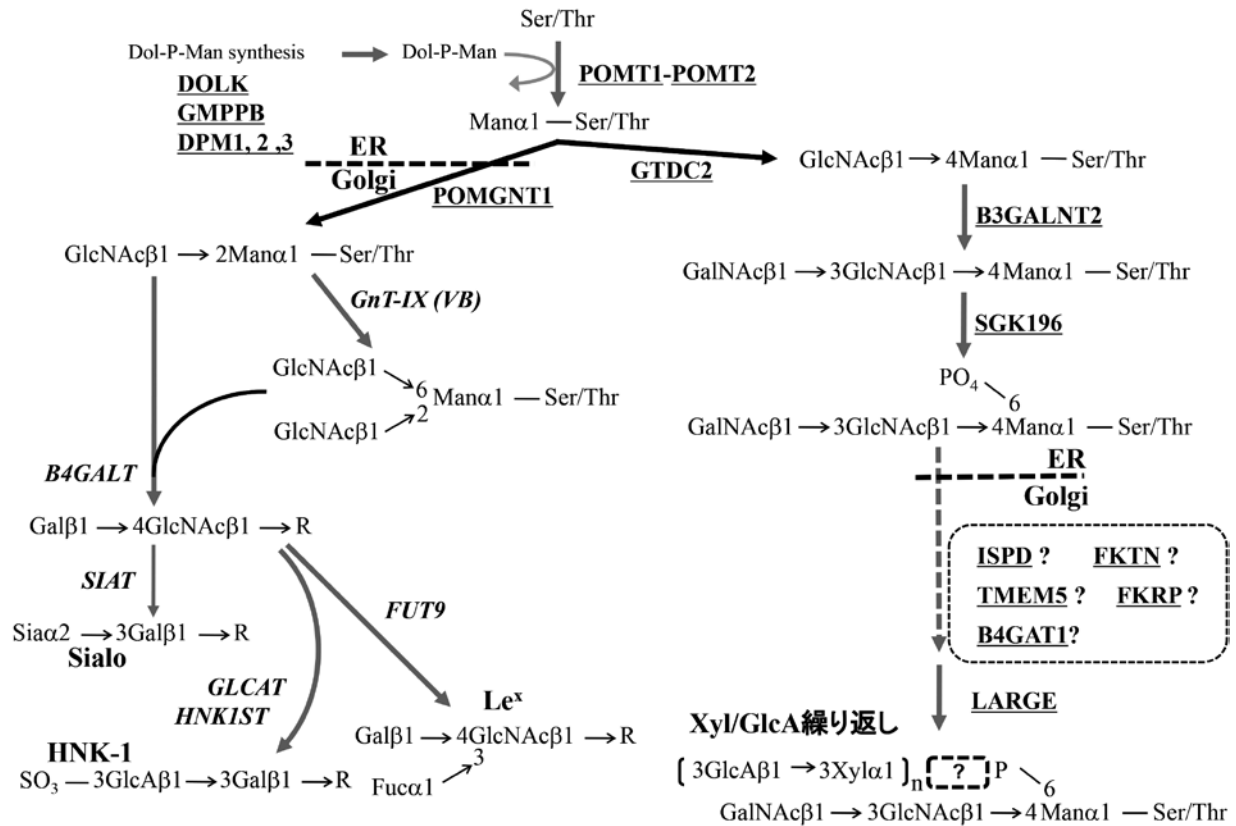


図3 O-Man型糖鎖の推定される合成経路。下線を施した酵素は、 α -ジストログリカノパチーの原因として報告されている。リン酸とその先に形成されるXyl/GlcAの繰り返し構造の間の足場糖鎖構造とそれを作り出す酵素の同定が残された課題であった。

リビトール5リン酸の発見

我々は、この足場糖鎖構造の解明に取り掛かった [17]。 α -DGの翻訳後修飾については次のことが分かっていた (図4)。 α -DGのN末端部分は糖鎖の完成 (Xyl/GlcAの繰り返し構造) に必要であること、コアM3はムチン様領域と呼ばれる317番目、319番目、379番目のスレオニンに結合している可能性が高いこと、ムチン様領域にはO-Man型糖鎖以外にO-GalNAc型糖鎖やN型糖鎖も結合していること、糖鎖完成後N末端部分はタンパク質分解酵素furinによって切断されること、

など非常に複雑である。この状況下では、足場部分の糖鎖構造情報を正確に得ることはかなり困難である。そこでコアM3の完成糖鎖を一カ所だけに持つ最少ペプチドユニットを得ることにより、分析対象をより単純化して足場糖鎖構造の解明を目指すことにした。その結果、N末端部分にムチン様領域のうち314番目から333番目までの20個のアミノ酸があれば、期待通りコアM3のXyl/GlcAの繰り返し完成糖鎖を一カ所に持つ最少ペプチドユニットが得られることが判明した。これを利用し足場構造の解明を進めた。

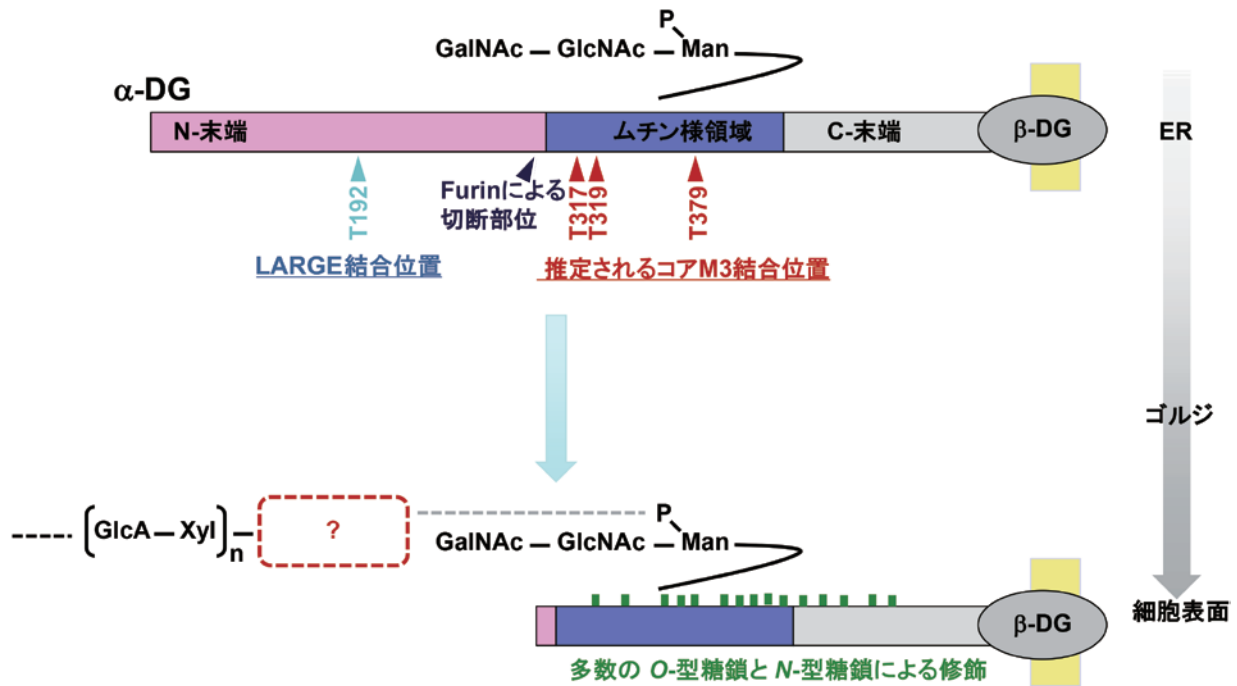


図4 α -DG翻訳後修飾とプロセシングの概略図。N末端部分は糖鎖の完成（Xyl/GlcAの繰り返し構造）には必要であること、コアM3はムチン様領域の317番目、319番目、379番目のスレオニンに結合している可能性が高いこと、ムチン様領域にはO-Man型糖鎖以外にO-GalNAc型糖鎖やN型糖鎖も結合していること、糖鎖完成後N末端部分はタンパク質分解酵素furinによって切断されること、などが報告されていた。

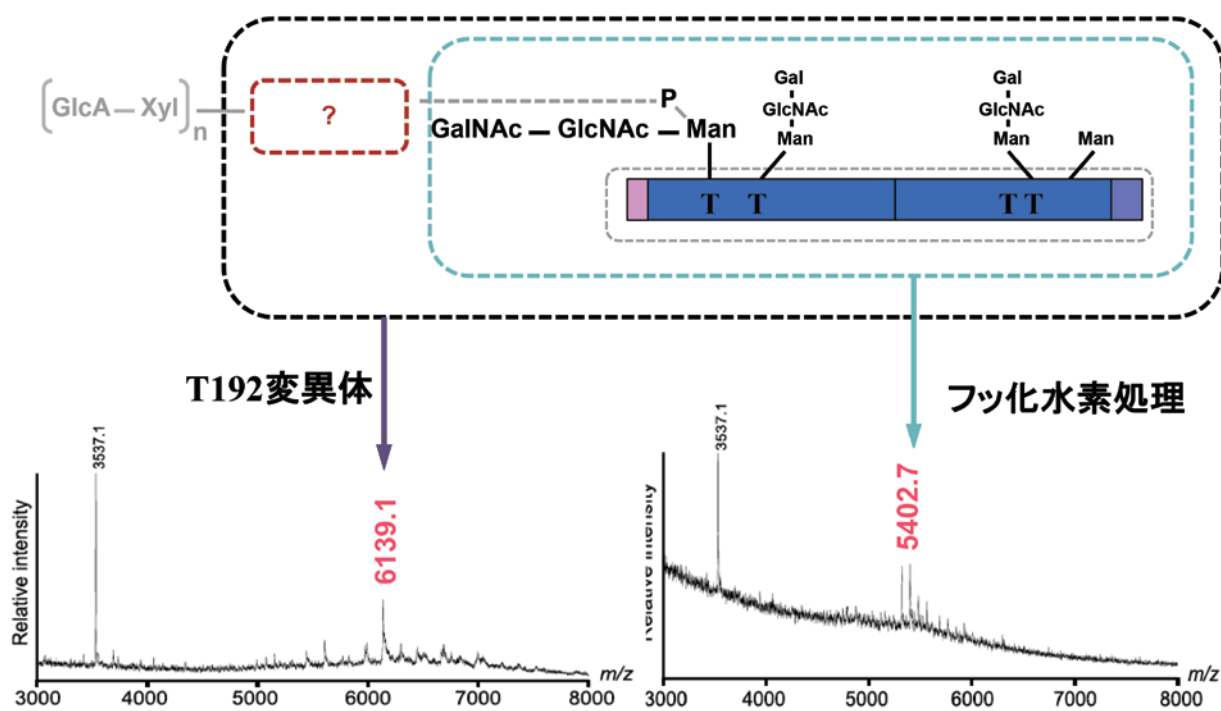
目的の足場構造を単離するためには、これまで明らかにされていた特徴を利用した。一つは、N末端部分の192番目のスレオニンに変異が起るとXyl/GlcAの繰り返し構造が形成されないことである。もう一つは、水性フッ化水素処理するとリン酸ジエステル構造が選択的に分解されることである。この二つの性質を利用し質量分析解析により、足場構造の分子量は、 $6139.1 - 5402.7 = 736.5$ と推定することができた（図5）。この736イオンを詳細に質量分析することで、足場部分の構成成分の配列が推定できた。それは末端から、GlcA、Xyl、分子量134の成分、リン酸、もう一つ分子量134の成分、リン酸であった。そしてこれまで考えられていた様にManの6位のリン酸の先ではなく、コアM3構造のGalNAcの先にこの足場構造は伸びていることが判明した。

この分子量134の成分は何であろうか。精

密質量分析の結果、5炭糖アルコール（ペンチトール）であることが分かった [17]。ペンチトールとしては、キシリトール、アラビトール、リビトールが知られている。そこで酸水解後alditol acetate誘導体としてGC/MS（ガスクロマトグラフィー／質量分析計）により分析した結果、分子量134の成分はリビトールと同定することができた。よってGlcA、Xyl、リビトール5リン酸(Rbo5P)、もう一つRbo5PでGalNAcに結合していることが明らかになった（図6）。哺乳類におけるRbo5Pを含む糖鎖の初めての発見であった。熾烈な国際競争であったことを物語る様に、ほぼ同時にRbo5Pの存在が報告されたが、結合情報まで至ったのは我々のみであった [18, 19]。

リビトール5リン酸関連酵素の解明

Rbo5Pはグラム陽性菌の細胞壁の重要な成



$$6,139.1 - 5,402.7 = \underline{736.5!}$$

図5 O-Man型糖鎖の足場部分の単離。N末端部分の192番目のスレオニンに変異が起こるとXyl/GlcAの繰り返し構造が形成されないこと、と水性フッ化水素処理するとリン酸ジエステル構造が選択的に分解されること、を利用してそれぞれの産物の質量分析解析を行った。その結果、足場構造部分の分子量は、 $6139.1 - 5402.7 = 736.5$ と推定するに至った。

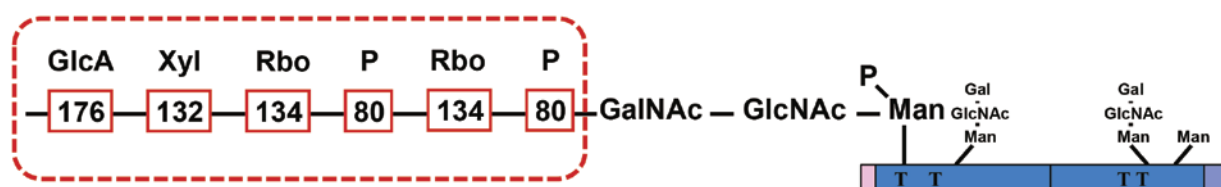


図6 質量736の構成成分の配列の決定。GlcA、Xyl、リビトール5リン酸(Rbo5P)、もう一つRbo5PでGalNAcに結合していることが明らかになった。

分であるタイコ酸の主要成分である。タイコ酸は、Rbo5Pとグルセロールリン酸、それぞれが重合したポリマーである。グラム陽性菌におけるRbo5Pポリマーの合成は、遺伝学的にも生化学的にもすでに明らかにされている。糖転移に使用される糖ヌクレオチドは、CDP-リビトール(CDP-Rbo)である。このCDP-Rboは、CTPとRbo5PからTarI(cytidyltransferase、TarはTeichoic acid ribitolの略語)の働きによって合成される。そして

枯草菌の場合はTarKによってグルセロールリン酸に一個Rbo5Pがまず転移され、さらにTarLにより次々とRbo5Pが転移されRbo5Pポリマーが形成される。一方黄色ブドウ球菌の場合は、TarLによりグルセロールリン酸に直接Rbo5Pポリマーが形成される。我々は、ISPDがTarIのホモログであることに着目した。つまり、ISPDはCTPとRbo5PからCDP-Rboを合成する酵素ではないか、という可能性について調べた。その結果、我々の予想通

り、ISPD はCTPとRbo5PからCDP-Rboを合成する酵素であった [17]。

引き続き、図6のRbo5P-Rbo5Pのタンデム構造を作り出す酵素の解明に取り掛かった。ここで着目したのが、fukutinとFKRPである。fukutinとFKRPはクローニングされた時から、糖転移酵素ではないかと予想されていた [20]。というのは、糖転移酵素に広く認められるDxDモチーフを配列上に有していた。さらに注目すべきは、phosphoryl-ligand 転移酵素にホモロジーを有していた。たとえば、酵母においてはMan-リン酸-Man構造を合成するMNN4、グラム陽性菌ではCholine-リン酸構造を作り出すLicDなどに相同性があった。そこで、fukutinあるいはFKRPがRbo5P-Rbo5Pのタンデム構造を作り出す酵素ではないかと予想した。そこでコアM3構造を有する糖ペプチドを基質とし、CDP-RboとfukutinあるいはFKRPと反応させた。その結果、fukutinの場合のみ分子量214、すなわちRbo5Pが1分子転移したものが合成された。この際どのように条件を振ってもRbo5Pが2分子以上転移した産物は検出されなかった。次にfukutinによって作られたRbo5P化コアM3構造糖ペプチドを基質として、CDP-RboとfukutinあるいはFKRPと反応させた。その結果、FKRPの場合のみ分子量214、すなわちRbo5Pが1分子転移したものが合成された。この場合も反応条件を変えてもさらに分子量の大きな産物は検出されなかった。この結果から、最初にRbo5Pを転移させるのはfukutinであり、その後で2個目の

Rbo5Pを転移させるのはFKRPであることが分かった。興味深いことに、Man6位のリン酸を欠いたコアM3構造糖ペプチドを基質にした場合、fukutinによるRbo5Pの転移はほとんど観察されなかった。これは、Manの6位をリン酸化する酵素であるSGK196が α -ジストログリカノパチーの原因であることをうまく説明する。

このRbo5Pを2分子有する産物の構造をNMRで決定した。その結果、最初のRbo5PはGalNAcの3位に結合していること、2番目のRbo5Pは最初のRbo5Pの1位に結合していることが決定できた [17]。

一方、 $[3\text{GlcA } \beta 1\text{-}3\text{Xyl } \alpha 1]_n$ を形成するLargeが働くためには、Largeによって転移されないGlcA残基とXyl残基とがそれぞれ一残基必要であることが分かった。その後、 α -ジストログリカノパチーの原因分子であるB4GAT1が、GlcA β 1-4Xyl構造を作る酵素であることが報告された [21, 22]。そして最近やはり α -ジストログリカノパチーの原因であるTMEM5(transmembrane protein 5)が、XylをCDP-Rboに転移する酵素らしいことが報告された [18]。

以上の結果、我々はコアM3のManから機能糖鎖であるXyl/GlcAの繰り返し構造までがつながった構造を推定するに至った [17]。そして興味深いことに各ステップに関わる酵素は、すべて α -ジストログリカノパチーの原因となっていることが明らかになった (図7)。

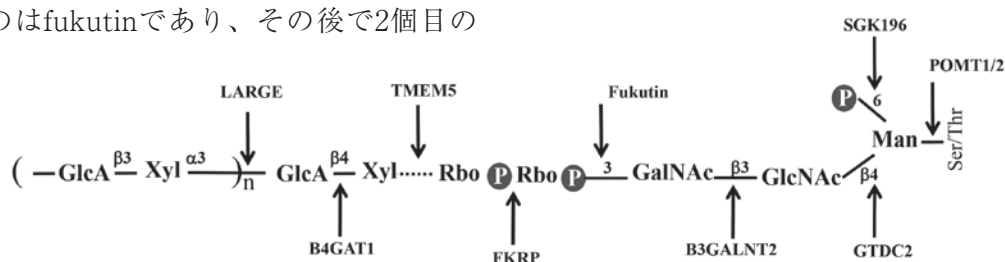


図7 コアM3のManからXyl/GlcAの繰り返しまでの推定構造。点線で示したTMEM5により形成されるXylのアノマーと結合位置情報はまだ得られていない。各ステップに関わる酵素は、すべて α -ジストログリカノパチーの原因となっている。

残されたひとつの疑問への解答

図7の糖鎖構造から一つの疑問が残った。それは本稿で私はGlcNAc β 1-2Man構造を作る酵素POMGnT1がMEBの原因であることを明らかにしたことが、この分野の隆盛をもたらしたことを述べた。しかしながら、図7の提唱構造にはGlcNAc β 1-2Manは見当たらない。つまり、異なるMan上の糖鎖がコアM3のプロセッシングを制御していることを示唆している。そのメカニズムの解明が残された。

この解明を目指して我々はPOMGnT1の構造生物学に取り組んだ。その結果、興味深い事実が明らかになった。糖転移酵素は通常一回膜貫通のタンパク質で触媒部位はゴルジ内腔を向いている。膜貫通部分と触媒部位をつないでいる部位はステム領域と呼ばれる。触媒部位は酵素反応、糖転移を司るものであるが、ステム領域の明確な機能は分かっていない。POMGnT1の構造を解いてみると、このステム領域に糖結合活性、すなわちレクチン活性が存在することが明らかになった。詳細に糖結合特異性を調べてみると、POMGnT1反応の産物であるGlcNAc β 1-2Man構造と結合することが分かった。さらにコアM3構造であるGalNAc β 1-3GlcNAc β 構造とも結合することが分かった。一方、我々はこれまでにfukutinはゴルジ体においてPOMGnT1と複合体を形成することを明らかにしていた [23]。つまり、POMGnT1とfukutinは複合体として細胞内で挙動をともにしている可能性が考えられた。したがってPOMGnT1がコアM3構造と結合することは、その場にfukutinも存在することを示唆する。

この仮説を証明するために以下の実験を行った。POMGnT1欠損細胞では、コアM3の糖鎖は成熟しないが、その細胞に野生型のPOMGnT1を発現させると当然のことながらコアM3の糖鎖はXyl/GlcAの繰り返し構造まで回復する。そして興味深いことに酵素

活性を持たないPOMGnT1(レクチン活性は持っている)を発現させると、野生型と同様コアM3の糖鎖はXyl/GlcAの繰り返し構造まで回復した。ところが糖結合活性に必須のアミノ酸を置換した変異体酵素(レクチン活性は失っている)では、コアM3の糖鎖は成熟しなかった。以上の結果は我々の仮説、POMGnT1とfukutinは複合体として挙動をともにしており、POMGnT1のレクチン領域でコアM3構造と結合することでその反応の場にfukutinを引き連れてくるのでコアM3に対してfukutinが効率良く働くことを説明する。異なるMan上の糖鎖がコアM3のプロセッシングを制御している、という巧妙なメカニズムが用意されていたのである [24]。

おわりに

哺乳類におけるO-Man型糖鎖の発見から約20年の間に、「筋ジストロフィーと糖鎖」のキーワードで研究が進み生体におけるO-Man型糖鎖の重要性が明らかになった。ところが、O-Man型糖鎖は複雑であり、その糖鎖構造や生合成経路に大きな特徴が分かった。哺乳類におけるRbo5Pを含む糖鎖の初めての発見もあった。O-Man型糖鎖は α -DGのみに特異的な修飾かという疑問については、CD24、phosphacan、neurofascin186、lecticans、cadherin、組み換え体IgG2など次々と標的タンパク質が同定されている [25]。ただし、これらはコアM1あるいはコアM2による修飾であり、コアM3構造を有するかどうかは不明である。我々はコアM3のManからXyl/GlcAの繰り返し構造までつながった構造を提唱するに至った。そして興味深いことに各合成ステップに関わる酵素はすべて α -ジストログリカノパチーの原因となっていることが判明した。Rbo5Pを含む糖鎖を持つのは α -DGだけなのであろうか、などまだ興味深い多くの疑問が残されている。

遺伝子疾患である α -ジストログリカノパ

チーの治療戦略は、第一選択として遺伝子治療が上げられる。ただし、個々の α -ジストログリカノパチーは原因が異なるので、原因遺伝子ごとに治療戦略を考えなければならない。我々の提唱したコアM3のManからXyl/GlcAの繰り返し構造までつながった糖鎖を何らかの方法で生体に補給し機能させることができれば、すべての α -ジストログリカノパチーを同じ土俵で治療できる糖鎖治療の道が拓けたことを意味する。是非この糖鎖の基礎研究が治療法の開発に繋がることを期待したい。

謝辞

本稿で記載した研究は、ほぼ20年に渡る数多くの共同研究による研究成果である。誠に申し訳ないがすべての関係者のお名前を記載できないことをお許しいただきたい。本研究のきっかけとなったのは、野口研究所の糖ペプチド合成技術に依存したことのみを記すことで謝意の一部としたい。

文献

1. A. Chiba, K. Matsumura, H. Yamada, T. Inazu, T. Shimizu, S. Kusunoki, I. Kanazawa, A. Kobata and T. Endo: *J. Biol. Chem.*, **272**, 2156 (1997).
2. T. Yoshida-Moriguchi, L. Yu, S.H. Stalnakker, S. Davis, S. Kunz, M. Madson, M.B. Oldstone, H. Schachter, L. Wells and K.P. Campbell: *Science*, **327**, 88 (2010).
3. K. Inamori, T. Yoshida-Moriguchi, Y. Hara, M.E. Anderson, L. Yu and K.P. Campbell: *Science*, **335**, 93 (2012).
4. A. Yoshida, K. Kobayashi, H. Manya, K. Taniguchi, H. Kano, M. Mizuno, T. Inazu, H. Mitsuhashi, S. Takahashi, M. Takeuchi, R. Herrmann, V. Straub, B. Talim, T. Voit, H. Topaloglu, T. Toda and T. Endo: *Dev. Cell*, **1**, 717 (2001).
5. H. Manya, A. Chiba, A. Yoshida, X. Wang, Y. Chiba, Y. Jigami, R.U. Margolis and T. Endo: *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 500 (2004).
6. K. Akasaka-Manya, H. Manya and T. Endo: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 75 (2004).
7. L.T. Jae, M. Raaben, M. Riemersma, E. van Beusekom, V.A. Blomen, A. Velds, R.M. Kerkhoven, J.E. Carette, H. Topaloglu, P. Meinecke, M.W. Wessels, D.J. Lefeber, S.P. Whelan, H. van Bokhoven and T.R. Brummelkamp: *Science*, **340**, 479 (2013).
8. T. Willer, H. Lee, M. Lommel, T. Yoshida-Moriguchi, D.B. de Bernabe, D. Venzke, S. Cirak, H. Schachter, J. Vajsar, T. Voit, F. Muntoni, A.S. Loder, W.B. Dobyns, T.L. Winder, S. Strahl, K.D. Mathews, S.F. Nelson, S.A. Moore and K.P. Campbell: *Nat. Genet.*, **44**, 575 (2012).
9. T. Roscioli, E.J. Kamsteeg, K. Buysse, I. Maystadt, J. van Reeuwijk, C. van den Elzen, E. van Beusekom, M. Riemersma, R. Pfundt, L.E. Vissers, M. Schraders, U. Altunoglu, M.F. Buckley, H.G. Brunner, B. Grisart, H. Zhou, J.A. Veltman, C. Gilissen, G.M. Mancini, P. Delree, M.A. Willemsen, D.P. Ramadza, D. Chitayat, C. Bennett, E. Sheridan, E.A. Peeters, G.M. Tan-Sindhunata, C.E. de Die-Smulders, K. Devriendt, H. Kayserili, O.A. El-Hashash, D.L. Stemple, D.J. Lefeber, Y.Y. Lin and H. van Bokhoven: *Nat. Genet.*, **44**, 581 (2012).
10. M. Riemersma, D.S. Froese, W. van Tol, U.F. Engelke, J. Kopec, M. van Scherpenzeel, A. Ashikov, T. Krojer, F.

- von Delft, M. Tessari, A. Buczkowska, E. Swiezewska, L.T. Jae, T.R. Brummelkamp, H. Manya, T. Endo, H. van Bokhoven, W.W. Yue and D.J. Lefeber: *Chem. Biol.*, **22**, 1643 (2015).
11. D.J. Lefeber, J. Schonberger, E. Morava, M. Guillard, K.M. Huyben, K. Verrijp, O. Grafakou, A. Evangelidou, F.W. Preijers, P. Manta, J. Yildiz, S. Grunewald, M. Spilioti, C. van den Elzen, D. Klein, D. Hess, H. Ashida, J. Hofsteenge, Y. Maeda, L. van den Heuvel, M. Lammens, L. Lehle and R.A. Wevers: *Am. J. Hum. Genet.*, **85**, 76 (2009).
 12. R. Barone, C. Aiello, V. Race, E. Morava, F. Foulquier, M. Riemersma, C. Passarelli, D. Concolino, M. Carella, F. Santorelli, W. Vleugels, E. Mercuri, D. Garozzo, L. Sturiale, S. Messina, J. Jaeken, A. Fiumara, R.A. Wevers, E. Bertini, G. Matthijs and D.J. Lefeber: *Ann. Neurol.*, **72**, 550 (2012).
 13. D.J. Lefeber, A.P. de Brouwer, E. Morava, M. Riemersma, J.H. Schuurs-Hoeijmakers, B. Absmanner, K. Verrijp, W.M. van den Akker, K. Huijben, G. Steenberg, J. van Reeuwijk, A. Jozwiak, N. Zucker, A. Lorber, M. Lammens, C. Knopf, H. van Bokhoven, S. Grunewald, L. Lehle, L. Kapusta, H. Mandel and R.A. Wevers: *PLoS Genet.*, **7**, e1002427 (2011).
 14. T. Yoshida-Moriguchi, T. Willer, M.E. Anderson, D. Venzke, T. Whyte, F. Muntoni, H. Lee, S.F. Nelson, L. Yu and K.P. Campbell: *Science*, **341**, 896 (2013).
 15. S. Vuillaumier-Barrot, C. Bouchet-Seraphin, M. Chelbi, L. Devisme, S. Quentin, S. Gazal, A. Laquerriere, C. Fallet-Bianco, P. Loget, S. Odent, D. Carles, A. Bazin, J. Aziza, A. Clemenson, F. Guimiot, M. Bonniere, S. Monnot, C. Bole-Feysot, J.P. Bernard, L. Loeuillet, M. Gonzales, K. Socha, B. Grandchamp, T. Attie-Bitach, F. Encha-Razavi and N. Seta: *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 1135 (2012).
 16. M.C. Manzini, D.E. Tambunan, R.S. Hill, T.W. Yu, T.M. Maynard, E.L. Heinzen, K.V. Shianna, C.R. Stevens, J.N. Partlow, B.J. Barry, J. Rodriguez, V.A. Gupta, A.K. Al-Qudah, W.M. Eyaid, J.M. Friedman, M.A. Salih, R. Clark, I. Moroni, M. Mora, A.H. Beggs, S.B. Gabriel and C.A. Walsh: *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 541 (2012).
 17. M. Kanagawa, K. Kobayashi, M. Tajiri, H. Manya, A. Kuga, Y. Yamaguchi, K. Akasaka-Manya, J. Furukawa, M. Mizuno, H. Kawakami, Y. Shinohara, Y. Wada, T. Endo and T. Toda: *Cell Rep.*, **14**, 2209 (2016).
 18. J.L. Prassman, T. Willer, M.O. Sheikh, A. Toi, D. Chitayat, Y.Y. Lin, H. Lee, S.H. Stalaker, S. Wang, P.K. Prabhakar, S.F. Nelson, D.L. Stemple, S.A. Moore, K.W. Moremen, K.P. Campbell and L. Wells: *elife*, **5**, e14473 (2016).
 19. I. Gerin, B. Ury, I. Breloy, C. Bouchet-Seraphin, J. Bolsee, M. Halbout, J. Graff, D. Vertommen, G.G. Muccioli, N. Seta, J.M. Cuisset, I. Dabaj, S. Quijano-Roy, A. Grahn, E. Van Schaftingen and G.T. Bommer: *Nat. Commun.*, **7**, 11534 (2016).
 20. L. Aravind and E.V. Koonin: *Curr. Biol.*, **9**, R836 (1999).
 21. T. Willer, K. Inamori, D. Venzke, C. Harvey, G. Morgensen, Y. Hara, D. Beltran Valero de Bernabe, L. Yu, K.M. Wright and K.P. Campbell: *elife*, **3**,

- e03941 (2014).
22. J.L. Praissman, D.H. Live, S. Wang, A. Ramiah, Z.S. Chinoy, G.J. Boons, K.W. Moremen and L. Wells: *elife*, **3**, e03943 (2014).
23. H. Xiong, K. Kobayashi, M. Tachikawa, H. Manya, S. Takeda, T. Chiyonobu, N. Fujikake, F. Wang, A. Nishimoto, G.E. Morris, Y. Nagai, M. Kanagawa, T. Endo and T. Toda: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 935 (2006).
24. N. Kuwabara, H. Manya, T. Yamada, H. Tateno, M. Kanagawa, K. Kobayashi, K. Akasaka-Manya, Y. Hirose, M. Mizuno, M. Ikeguchi, T. Toda, J. Hirabayashi, T. Senda, T. Endo, and R. Kato: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **113**, 9280 (2016).
25. M.B. Vester-Christensen, A. Halim, H.J. Joshi, C. Steentoft, E.P. Bennett, S.B. Levery, S.Y. Vakhrushev and H. Clausen: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **110**, 21018 (2013).

配位高分子による燃料電池用電極触媒材料に関する研究

Study on Syntheses and Electrochemical Catalytic Activity of Metal-Organic Frameworks for a Fuel Cell

木下 昌三

Shozo KINOSHITA

【はじめに】

メタルダイマー構造の金属サイトを有する配位高分子 (MOF: Metal-Organic Framework、または PCP: Porous Coordination Polymer) に着目して触媒への応用研究、とりわけ非白金系燃料電池用電極触媒材料への適用について研究を行ってきた。その中でプロトン伝導性や電子伝導性を有する配位高分子の一つであるルベアン酸銅誘導体が、エタノール酸化触媒活性を示すことを見出し報告した。これは、配位高分子を用いた初めての電気化学触媒活性の報告であった。

本報では、配位高分子のもつ「金属サイト」「多孔性」と、「伝導性」を結びつけることで得られた結果と、それがもたらす配位高分子による非白金系燃料電池用電極触媒材料への未来像について期待も含めて述べたい。

【配位高分子】

金属イオンと配位子 (有機物) が配位結合して出来るのが金属錯体である。金属イオンは、いくつかの (有機) 配位子と配位結合を形成して安定化される。配位子が、結合する部位を2箇所以上有するとき、金属イオンは配位子に結合し、配位子の反対側の結合部位は別の金属イオンに配位し、金属-配位子-金属-配位子・・・と無限につながった一種の高分子が得られる。金属イオンもしくは配位子の結合する箇所が3つ以上あると、これが二次元もしくは三次元の繰り返しになり、グラファイトのような層状構造になったり、ジャングルジムのような三次元構造になったりした化合物が得られる (図1)。これら無限につながった金属錯体の高分子のことを、配位高分子と呼ばれている。

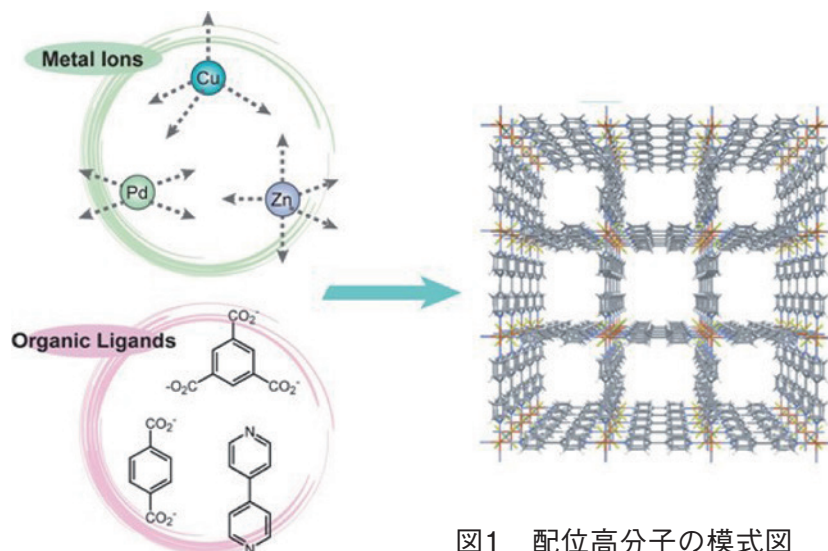


図1 配位高分子の模式図

配位高分子は1990年ごろから興味深い研究がなされているが、特に研究が活発になったのは2000年に入ってからであり、比較的新しい研究分野といえる。特に注目を集めているのは、ジャングルジム様の三次元配位高分子である。これらは内部に多数の細孔をもち、その細孔径は直径数Åからせいぜい数nm程度のものであり、その多数の細孔の比表面積(Langmuir表面積)は非常に大きく、12000m²/grに達するものまで合成されている。

配位高分子の興味深い点は、配位子の長さを適当に選べば、細孔のサイズを自在に変えることができるところにある。また、細孔はサイズだけでなく、様々な要因で特徴付けられる。たとえば炭化水素が表面に出ているものは活性炭のような疎水的な細孔になるし、配位水や酸性基があれば、親水性になる。

配位高分子はこのように「多様な配位子」と「多種の金属イオン」を用いることが出来るため、多彩な新規物質が得られる。配位高分子はここ10年で数千種類の新規化合物が報告され、ライブラリーが急速にできあがりつつある。配位高分子の場合、構造が単結晶

X線構造解析で決定できることが多く、新規化合物の同定が非常に早いことに起因していると思われる。

現在はこれらの配位高分子のライブラリーを用いて、細孔内でどのようなことが出来るか、配位高分子の応用面(実用化)に研究が移ってきている。

【配位高分子で出来ること】

配位高分子の最大の特徴は、精密に制御された分子のサイズに近い細孔径を有すること、また多孔性材料として一般的なゼオライトや活性炭をも上回る比表面積(Langmuir表面積)を有していることである。このような特徴から、ガスの分離・貯蔵に適しており、実際様々なガスの分離・吸蔵特性が調べられていて、たとえばメタンの分離や吸蔵タンクとして実用化が検討されている(図2)。

さらに配位高分子の内部にある酸点を利用した触媒活性にも興味を持たれている。酸点を利用した触媒は、ゼオライトの分野で活発に研究がなされているが、配位高分子はゼオライト以上に酸点の濃度や酸の強度を細かく制御可能であり、また細孔が狭いので、特定

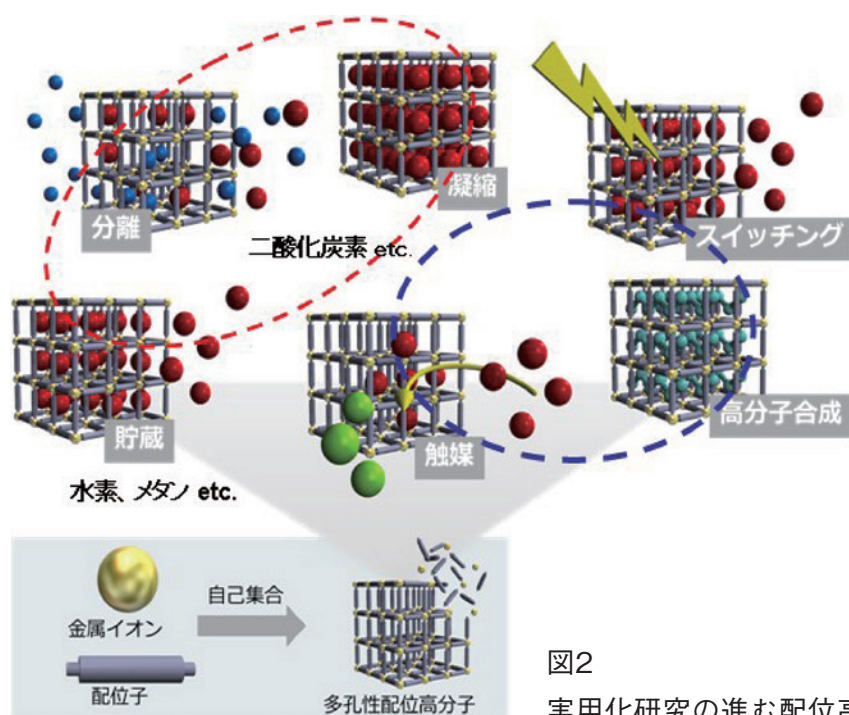


図2
実用化研究の進む配位高分子 (MOF)

の分子だけを反応させたり、分子の向きをある方向に決めて反応させたり出来ると期待され、実際にそのような報告 [6] がある。

また、酸点を利用して、配位高分子の内部の水分子を配列させ、それを使ってプロトン伝導性を発現させる報告もある。プロトン伝導性とは、物質に電場をかけたときに物質内部を水素イオンであるプロトン (H^+) が移動していく現象のことであり、センサーや燃料電池などに利用されている。配位高分子の内部に水分子をうまく並べてやり、酸点を導入することでプロトン伝導性が表れる。

特に注目されているのはルベアン酸銅という物質である。ルベアン酸は正式にはジチオオキサミド(dithiooxamide)という配位子であり、非常にシンプルな構造をもつ (図3)。これと銅からなる配位高分子、ルベア

ン酸銅誘導体は、結晶性は高くないものの細孔をもち、かつ置換基Rを変えることで多様な内空間を形成できる。Rによっては、ルベアン酸銅は高いプロトン伝導性や電子伝導性を示すことが見出されてきた[3-8]。特にR = C_2H_4OH についてはXRD及びXAFSにより構造が調べられており、図3に示すとおり、銅イオンの二量体を $(HOC_2H_4)_2dtoa^{2-}$ が架橋した二次元シートが積み重なった構造をしている。窒素吸着測定により、その細孔径は7.8 Åと見積もられる。ビス(ヒドロキシエチル)ルベアン酸銅は、ルベアン酸銅誘導体の中でも特に高いプロトン伝導性を示し、しかも強酸水溶液や熱 ($165^\circ C$) に対して安定である (1 M硫酸で $80^\circ C$ まで加熱し、一晩放置しても全く溶け出さない)。

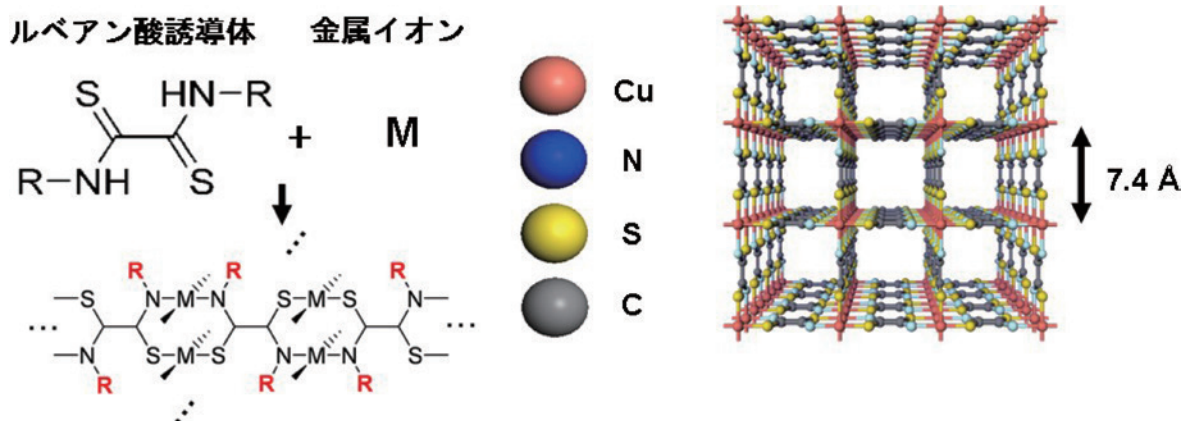


図3 ルベアン酸誘導体と、それにより得られた配位高分子の推定構造(化学計算)

【伝導性と触媒活性があると・・・】

伝導性を持つルベアン酸銅誘導体に、もし触媒活性があったとしたら、どんないいことがあるだろうか。伝導性を持つ多孔性材料と言えば活性炭である。活性炭そのものは触媒活性をほとんど示さないが、活性炭の表面に触媒活性の高い白金微粒子などを担持することで、燃料電池の電極触媒などに利用されている。燃料電池の電極においては、水素などの燃料を素早く電極に運び、燃料から電子を

取り出し、残りのプロトンなどを排出する必要がある。そのため物質などの移動のしやすい多孔性と、プロトンや電子の伝導性、そして触媒活性が重要になる。白金/活性炭触媒は電極触媒として非常に有用である。しかし、白金が希少かつ高価なため、燃料電池普及のネックになっている。

伝導性があり、銅イオンを構成要素として有するルベアン酸銅が、銅イオンの酸化還元を利用して触媒活性を示さないだろうか、そ

うしたら非白金系電極触媒として利用できるのではないかと考え、これがこの研究の出発点となった。

【ルベアン酸銅配位高分子の触媒活性評価】

まず酸化還元特性を調べてみると、ルベアン酸銅誘導体は、銅の酸化還元によると考えられる酸化還元特性を示すことがわかった。これが水素やメタノール、エタノール等の燃料を酸化してくれれば、燃料電池酸化触媒(EER)へ適用できる。さっそく研究を始めた時期に話題となっていたメタノールやエタノール燃料電池を念頭にEER触媒活性の評価を行った。

まず酸化還元抜きで、ビス(ヒドロキシエチル)ルベアン酸銅とエタノール分子との相互作用を見積もるため、エタノールの吸着特性を調べた。すると、図4に示すとおり、銅イオン二量体あたり、約0.8分子のエタノール吸着を示した。この結果はビス(ヒドロキシエチル)ルベアン酸銅の細孔表面に、エタノール分子と強く相互作用することが可能な吸着サイトが存在することを示唆している。

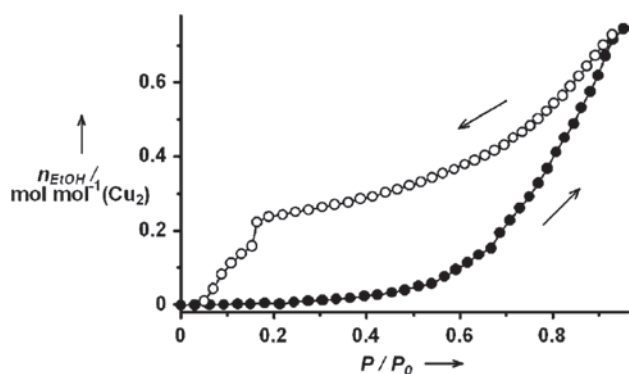


図4 25°Cにおけるビス(ヒドロキシエチル)ルベアン酸銅のエタノール吸着組成等温線

そこで配位高分子の骨格とエタノール分子との相互作用について密度汎関数法(DFT)による分子軌道計算を行った。結果は図5に示したとおりで、エタノールの酸素原子が銅イオンに配位し、水素原子はルベアン酸銅の

骨格にある窒素原子やヒドロキシエチル基の酸素原子と水素結合を形成している。それにより獲得するビス(ヒドロキシエチル)ルベアン酸銅とエタノールの相互作用エネルギーは40 kJ mol⁻¹ときわめて大きいことがわかった。この強い相互作用がエタノール分子の活性化につながっていると期待される。

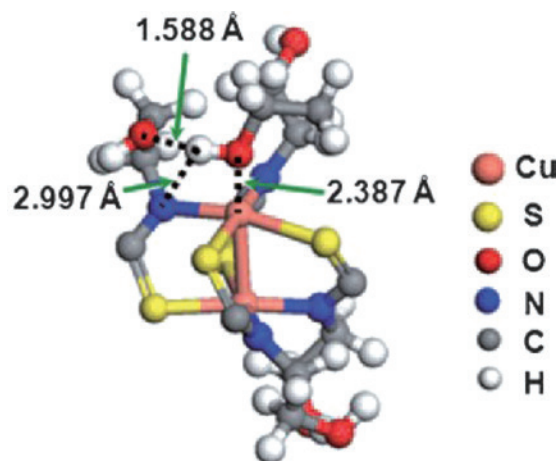


図5 分子軌道計算から求めた、ビス(ヒドロキシエチル)ルベアン酸銅の骨格とエタノールとの相互作用

さらにサイクリックボルタンメトリー法によって、ルベアン酸銅のEER触媒活性を調べた(図6)。エタノールがない状態(図の黒線)に比べ、エタノールの濃度が増加するとIおよびIIで示したピークの電流値が大幅に増加し、エタノールを酸化する反応が起きていることがわかった。特にIのピークは0.41 Vに現れたが、これは酸化反応のピークとしては十分に低い電位で、これはエタノールから電子を取り出すのにエネルギーのロスが小さいことを表している。IおよびIIでの反応後にはアセトアルデヒドが生成していることがわかり、エタノールの二電子酸化反応の触媒として、ビス(ヒドロキシエチル)ルベアン酸銅が働いていることがわかった。これらの結果から、ビス(ヒドロキシエチル)ルベアン酸銅は、エタノールから電子を取り出すEER反応の電極触媒として、直接エタノール

燃料電池などへの利用が期待される。白金やロジウムなどの高価な白金族元素を使っていないことから、元素戦略的にも有望であると考えている。

さらに興味深いことに、ルベアン酸銅誘導体を用いた場合、エタノール濃度の増大に伴いEER電流密度が増大した(図6)。白金触媒のEER活性は、一酸化炭素による被毒の影響などにより、限界があり、エタノール濃度が高い領域では、EER電流密度はエタノール濃度の増加に依存しない。しかしルベアン酸銅誘導体は白金ほど一酸化炭素との相互作用が強くないため、条件によっては高い酸化反応速度が達成できる可能性がある。白金族元素を用いないことにより、生成物との乖離反応が早くなることによるメリットもあるということが示唆された。

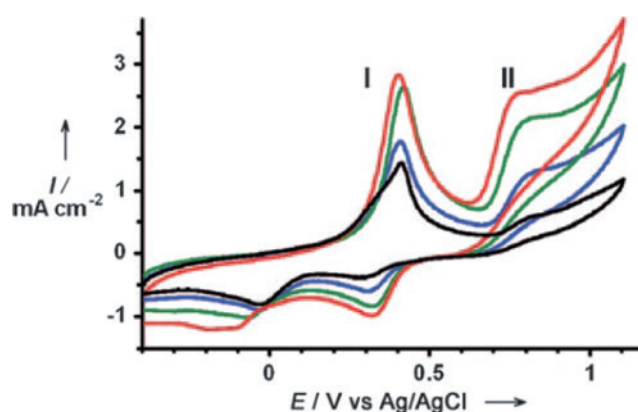


図6 ビス(ヒドロキシエチル)ルベアン酸銅塗布電極を用いたサイクリックボルタモグラムのエタノール濃度依存性(エタノール濃度:黒 0 M;青 0.5 M;緑 1.0 M;赤 2.0 M)。掃引速度:100 mVs⁻¹

【配位高分子の電極触媒としての今後の展望】

多孔性の導電体は、活性炭同様、電気化学の材料としてきわめて有望である。ルベアン酸銅誘導体は電子伝導性が十分でないが、より伝導性の高い(10¹ Scm⁻¹程度)材料であれば、それをそのまま固形化することで、電

極として利用できる。さらにプロトン・電子混合伝導性があり、多孔性配位高分子の内部ゲストの物質拡散係数が高ければ、厚い電極全体を触媒活性点として利用できるため、触媒効率が飛躍的に向上することが期待できる。プロトン伝導性、電子伝導性、物質拡散能、触媒活性のいずれにおいても改良の余地があり、今後の課題である。

一般に配位高分子は化学的に不安定であると言われてきたが、ルベアン酸銅を初めとして、配位高分子にも安定性の高いものが見出されてきている。また、プロトン・電子混合伝導性を兼ね備えた配位高分子の構造設計は可能であり、メタルサイトや配位子を選択することにより、水素酸化や酸素還元活性を有するものも確認しており、非白金系電極触媒材料として有望であると考えている。今後とも非白金系電極触媒材料の候補として提案をして行きたい。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、終始多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院理学研究科 北川宏教授、九州大学工学院応用化学部門 山田鉄兵助教に深く感謝いたします。

化学計算にとどまらず触媒化学、燃料電池および反応化学の広い領域に亘ってご指導をいただきました東北大学未来工学共同研究センター 宮本明教授、九州大学稲盛フロンティア研究センター古山道久教授に深く感謝いたします。

私が電極触媒の研究にかかわり、新しい学問と研究領域を学ぶことの必要性を説いていただきました、小松民邦博士(元旭化成株式会社)ならびに小川周一郎博士(現旭化成株式会社)に深く感謝を申し上げます。また研究の遂行に際して、惜しみないご助言や激励を賜りました、林善夫博士(元旭化成株式会社取締役)、高橋源昭博士(元旭化成株式会

社監査役) ならびに公益財団法人野口研究所の各位に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

1. S. Kitagawa, S. Noroほか、*Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 2334-2375(2004)
2. L. Yang, S.Kinoshitaほか、*Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 5348 (2010)
3. T. Yamada, S.Kinoshita, H. Kitagawa、*Chemical Today*, Vol. **478**, 50-54 (2011)
4. H. Furukawaほか、*Science*, **329**, 424 (2010)
5. H. Hitagawaほか、*Inorg. Chem. Commun.*, **6**, 346 (2003)
6. Y. Nagaoほか、*Mol.Cryst.Liq.Cryst.*, **379**, 89 (2002)
7. M. Fujishimaほか、*Synth. Met.*, **133-134**, 433 (2003)
8. Y. Nagaoほか、*Synth. Met.*, **154**, 89 (2005)

均一なコアフコース含有糖鎖を持つ抗体の調製

Preparation of glycoengineered trastuzumab containing homogeneous core fucosylated glycan

糖タンパク質工学研究室 HGPプロジェクト 月村 亘
Wataru TSUKIMURA

1. はじめに

近年、世界の医薬品売上高は抗体医薬品が従来の低分子医薬品を押し、市場規模を拡大しており、上位にはアダリムマブ（抗ヒトTNF α モノクローナル抗体）、インフリキシマブ（抗ヒトTNF α モノクローナル抗体）およびリツキシマブ（抗ヒトCD20モノクローナル抗体）等が占めている。抗体医薬品は現在日米欧で50種類以上が認可を受けており、年々増加している。

抗体は体内に侵入したウイルスや細菌等の異物中に存在する抗原と結合する性質がある。抗体医薬品は抗体のその性質に従い、抗原に対して特異的に結合するため副作用が軽減される点で注目を浴びている。

抗体医薬品は、タンパク質に糖鎖が結合した糖タンパク質である。抗体の2本の重鎖のFc領域に位置する297番目のアスパラギン（Asn297）に結合したN結合型糖鎖の構造は、産生の際に用いる宿主細胞によりその種類や割合が異なり不均一となっている。宿主細胞はヒト型の糖鎖を付加する哺乳動物細胞を用いる場合が多く、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞をはじめ、マウス骨髄腫由来のNS0細胞やSp2/0細胞等により製造されているものが存在する。CHO細胞等により産生される抗体の糖鎖は糖鎖関連酵素により生合成されるため、同じ細胞株であっても継代が異なることで糖鎖構造や糖鎖付加

の量が変わることが知られている。このように、CHO細胞等で製造された糖タンパク質は、アミノ酸配列レベルでは均一であっても、糖鎖レベルでは不均一となることが問題であった。

当研究所では抗体医薬品の糖鎖構造が不均一であることに着目し、近年糖鎖構造と機能に関する研究を実施してきた。その中で抗体医薬品の1つであるトラスツズマブ（商品名：ハーセプチン）をターゲットとして用いてきた。トラスツズマブは1998年にアメリカ食品医薬品局（FDA）で認可され、乳がんの治療薬として広く用いられている。HER2(human epidermal growth factor receptor type2)というタンパク質が過剰に発現するタイプの乳がんでは、トラスツズマブを投与しHER2と特異的に結合させ、がん細胞を攻撃する治療法がある。このメカニズムは、トラスツズマブと結合したがん細胞がナチュラルキラー（NK）細胞や単球をエフェクター細胞とした抗体依存性細胞障害（ADCC）により抗腫瘍効果を発揮するというものである。

昨年度までに当研究所では、カイコ絹糸腺により産生したトラスツズマブに対し、A2、G2、G0およびM3型の各糖鎖を均一に付加させた糖鎖改変トラスツズマブを調製し、その性質検討を実施してきた [1]。株式会社免疫生物研究所との共同研究により入手したカイコ絹糸腺産生のトラスツズマブ

は、*N*結合型糖鎖の還元末端側に存在する*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) にフコース (Fuc) が α 1-6結合した構造 (コアフコース) を有しておらず、これを基に調製した各種糖鎖改変トラスツズマブも当然のことながらコアフコースを有さない糖鎖構造として取得された。

一方、抗体医薬品として市販されているCHO細胞から産生されたトラスツズマブは、コアフコースを有する糖鎖が大部分を占めた不均一な糖鎖構造を持っている。これは、トラスツズマブのトリプシン消化後の糖ペプチドに対しMALDI-TOF MS用の糖ペプチド高感度化標識(Bz標識)を施し、MALDI-TOF MS測定によって分析したところ [2]、コアフコースを有する*N*結合型糖鎖 (約85%) とコアフコースを有さない*N*結合型糖鎖が不均一な状態でEEQYNSTYR配列のAsn297に結合していたことから確かめられた(図1)。

今回我々は新たにこのCHO細胞産生のトラスツズマブを出発材料とし、コアフコース

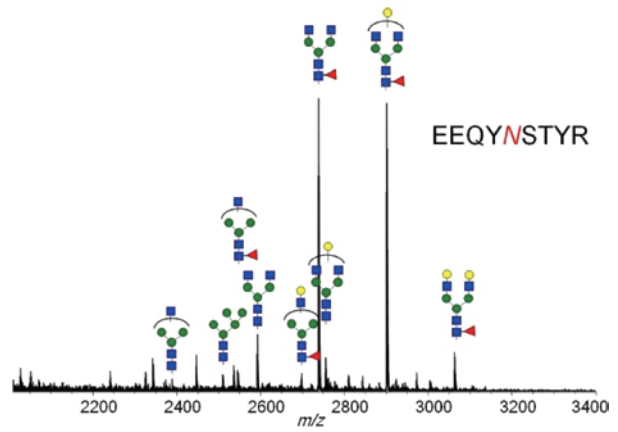


図1 CHO細胞産生トラスツズマブをトリプシン消化後Bz標識した糖ペプチドのMALDI-TOF MSスペクトル

を有する均一な糖鎖構造を持つ抗体を調製する方法を確立し、さらにその構造と機能の関係性を調べることにした。

2. 実験内容および結果

2-1 糖鎖改変トラスツズマブの調製

糖鎖改変トラスツズマブは、図2の調製フローに従って調製した。

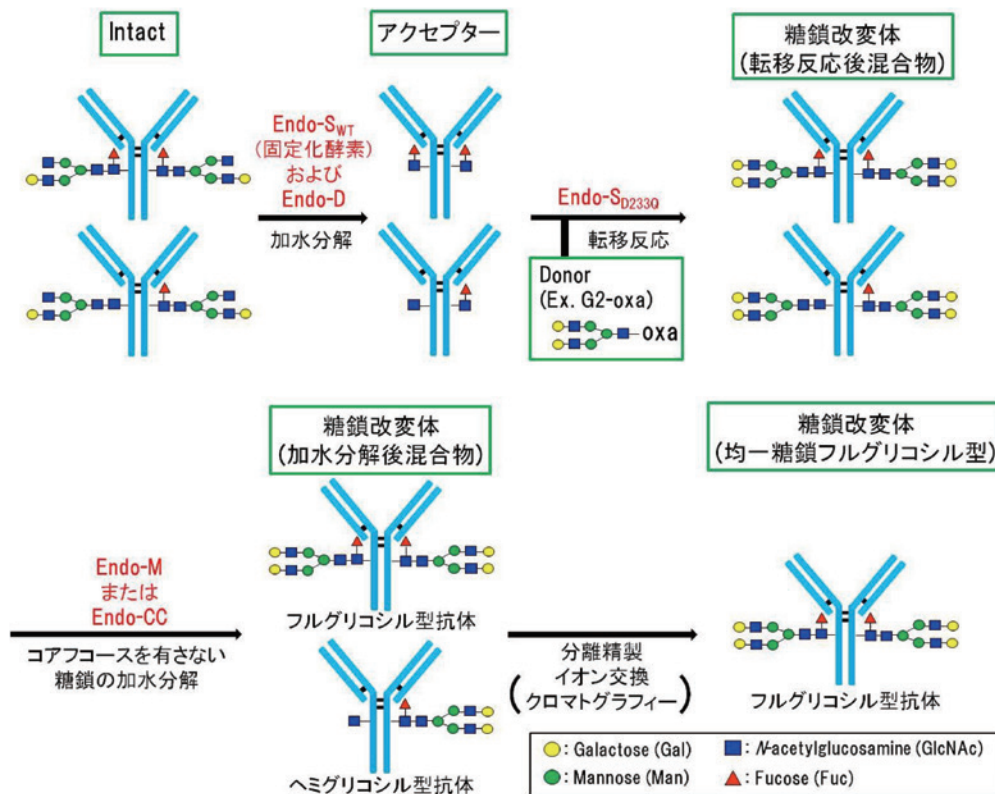


図2 G2-オキサザリンをドナーとして用いた場合を例とした、糖鎖改変トラスツズマブの調製フロー

(1) アクセプターの調製

糖鎖改変トラスツズマブ調製の最初の操作として、改変前の糖鎖構造が不均一なトラスツズマブ (トラスツズマブ-intact) に対し、エンド- β -*N*-アセチルグルコサミナーゼ (ENGase) を作用させ、既存の糖鎖を切断したトラスツズマブ-アクセプターを調製した。すなわち、*N*結合型糖鎖の還元末端側に存在するジアセチルキトビオース構造 (GlcNAc α 1-4GlcNAc) をENGaseにより加水分解し、GlcNAcもしくはGlcNAc α 1-6Fucを残したトラスツズマブに変換したことを指す。この際、ENGaseは*Streptococcus pyogenes*由来Endo-S野生型酵素 (Endo-S_{WT}) [3, 4] および*Streptococcus pneumoniae*由来Endo-D [5, 6] の両酵素を同時に使用した。実験を開始した初期の段階では、アクセプター調製時に用いたEndo-S_{WT}を以後の精製過程で完全に除去することが困難であったことが原因で、折角調製した糖鎖改変体を残存したEndo-S_{WT}が加水分解してしまうという問題が生じた。そこで、Endo-S_{WT}を残存させない手段としてEndo-S_{WT}を固定化した固定化酵素を用いて反応させ、反応終了後に固定化酵素を除去する方法を採ったところ、糖鎖改変体の分解を抑えることに成功したことから、以後アクセプター調製にはこの方法を用いている。

(2) トラスツズマブの糖鎖転移反応

糖鎖改変トラスツズマブの取得には、(1)の要領で調製したトラスツズマブ-アクセプターおよびドナーである糖鎖オキサゾリン誘導体を糖鎖合成酵素存在下で反応させた。すなわち、トラスツズマブ-アクセプターに6種類の糖鎖オキサゾリン誘導体 [A2 (α 2, 6)-oxa (シアル酸がガラクトースと α 2, 6結合した構造)、G2-oxa、G1a-oxa、G1b-oxa、G0-oxaおよびM3-oxa] をそれぞれ添加し、糖鎖合成酵素としてEndo-Sの変異型酵素Endo-

SD233Qを使用した。アクセプター調製時にも使用したEndo-Sは、活性残基近傍の233番目のアスパラギン酸をグルタミンに置換した変異型酵素とすると、野生型酵素に比べ加水分解活性が低下し糖転移活性が増す [7]。このことを利用し、6種類の糖鎖改変トラスツズマブ [トラスツズマブ-A2 (α 2, 6)、トラスツズマブ-G2、トラスツズマブ-G1a、トラスツズマブ-G1b、トラスツズマブ-G0およびトラスツズマブ-M3] を調製した (図3)。

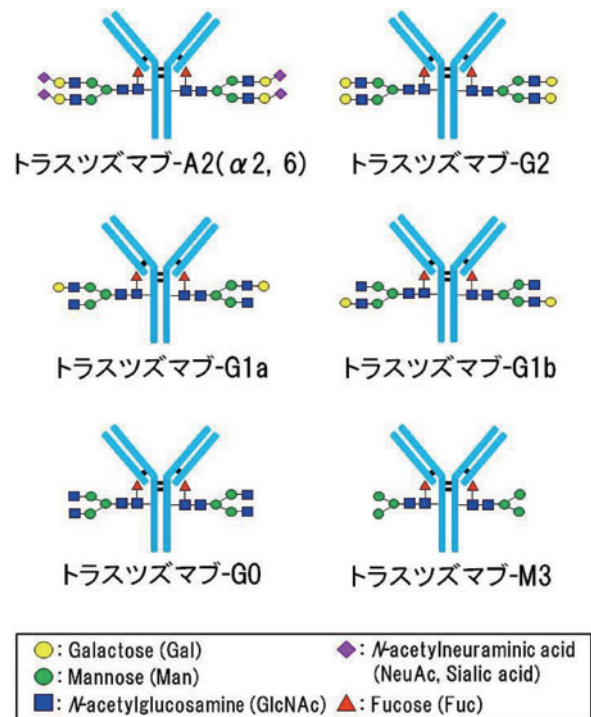


図3 調製した6種類の糖鎖改変トラスツズマブの構造模式図

(3) 糖鎖改変トラスツズマブ中のコアフコースを有さない糖鎖の選択的加水分解 (Endo-MまたはEndo-CCの利用)

CHO細胞から産生されたトラスツズマブは元々コアフコースを有さない糖鎖をおよそ15%含んでいるため、(2)の糖鎖転移反応ではコアフコースを有するアクセプターならびにコアフコースを有さないアクセプターの両方に糖鎖転移反応が進み、この段階の糖鎖改変体にはコアフコースを有する糖鎖を持つ抗体と有さない糖鎖を持つ抗体が混在してい

る。そのため、この中からコアフコースを有さない糖鎖を持つ抗体を除去する手法で、糖鎖改変体のコアフコース含有率を向上させる取り組みを実施した。

第1段階として、ENGaseを用いて糖鎖改変体のコアフコースを有さない糖鎖の還元末端側に存在するジアセチルキトビオース構造 (GlcNAc β 1-4GlcNAc) を選択的に加水分解した。ここで使用したいENGaseの特性としては、コアフコースを有さない糖鎖を加水分解し、一方で最終的に欲しいコアフコースを有する糖鎖をできるだけ加水分解しない酵素である。数多く存在するENGaseの中から選んだ酵素は、*Mucor hiemalis*由来Endo-M [8] および*Coprinopsis cinerea*由来Endo-CC [9] である。予備検討としてトラスツズマブ-intact (糖鎖未改変体) に対し両酵素をそれぞれ作用させ、反応後の糖ペプチドに対しLC-ESI MSを用いて糖鎖が結合している糖ペプチドならびに糖鎖が加水分解されたペプチド部分を解析したところ、Endo-Mは選択的に、そしてEndo-CCは優先的にコアフコースを有さない糖鎖を加水分解することが判明した。これらの結果を踏まえ、6種類の各種糖

鎖改変トラスツズマブに対しEndo-MまたはEndo-CCを作用させ、コアフコースを有さない糖鎖を選択的に加水分解した。

(4) フルグリコシル型コアフコース含有糖鎖改変トラスツズマブの分離精製

コアフコースを有さない糖鎖を持つ抗体を除去する手法の第2段階では、陽イオン交換クロマトグラフィーを利用した分離精製を実施した。(3)の反応後には糖鎖が加水分解された後にGlcNAcもしくはGlcNAc α 1-6Fucの糖鎖を残した抗体が含まれたままとまっている。ここで取得したい構造の抗体は、抗体の2つの重鎖の両方に同一糖鎖が結合したフルグリコシル型の抗体で、糖鎖にはコアフコースを有しているものである。そこで、糖鎖の付加状況に伴う電荷の違いを利用して糖鎖が加水分解された抗体を除去した [10, 11]。陽イオン交換クロマトグラフィーは、AKTA FPLCシステム (GE healthcare社製) においてMonoSカラム (GE healthcare社製) ならびに280 nmのUV検出を使用して実施した。20 mM 酢酸ナトリウム水溶液 (pH 4.3) および20 mM 酢酸ナトリウム水溶液 + 500

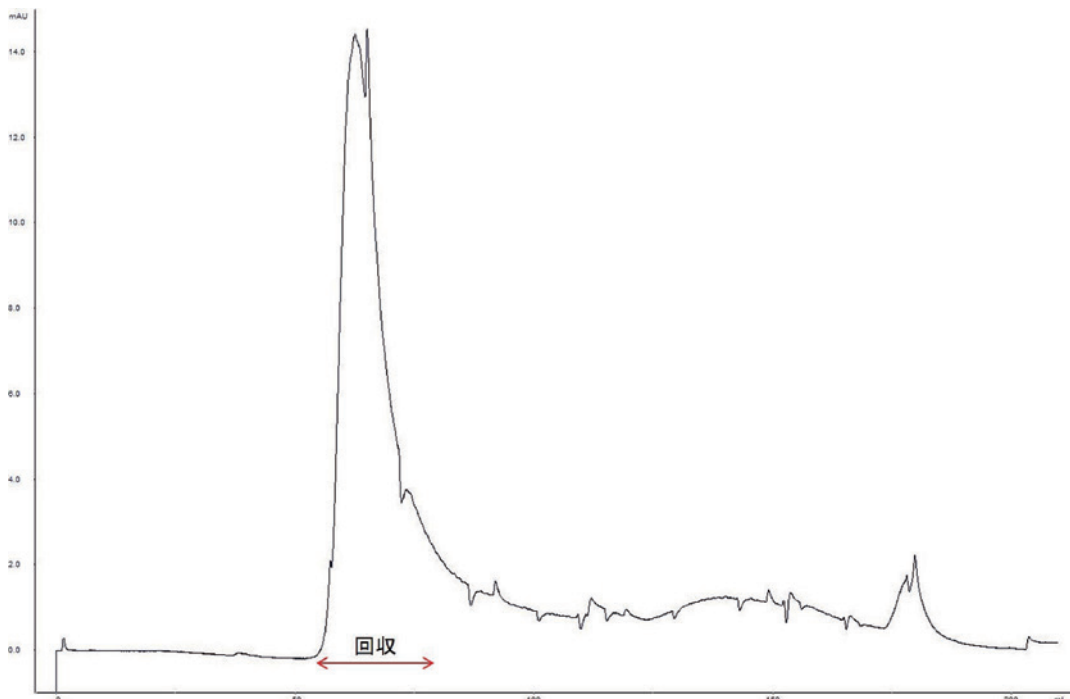


図4 糖鎖改変トラスツズマブ-G2を分離精製した際のクロマトグラム

mM 塩化ナトリウム水溶液 (pH 4.3) の2液によるグラジエント溶出により目的のフルグリコシル型抗体のみを含むフラクションを回収し分離精製した(図4)。

分離精製で得られたサンプルの確認は、HPLCシステム (島津製作所社製) においてProPac WCX-10 [4 x 250 mm] カラム (Thermo Fisher Scientific社製) ならびに280 nmのUV検出を使用し、10 mM 酢酸ナトリ

ウム水溶液 (pH 4.3) および10 mM 酢酸ナトリウム + 1 M 塩化ナトリウム水溶液の2液によるグラジエント溶出により実施した。Endo-CC加水分解後にはヘミグリコシル型抗体 (抗体の2つのN結合型糖鎖のうち、どちらか一方の糖鎖がGlcNAcもしくはGlcNAc α 1-6Fucの糖鎖構造) を示すピークがはっきりと見られるが、分離精製後にはフルグリコシル型のピークのみが見られることから、フル

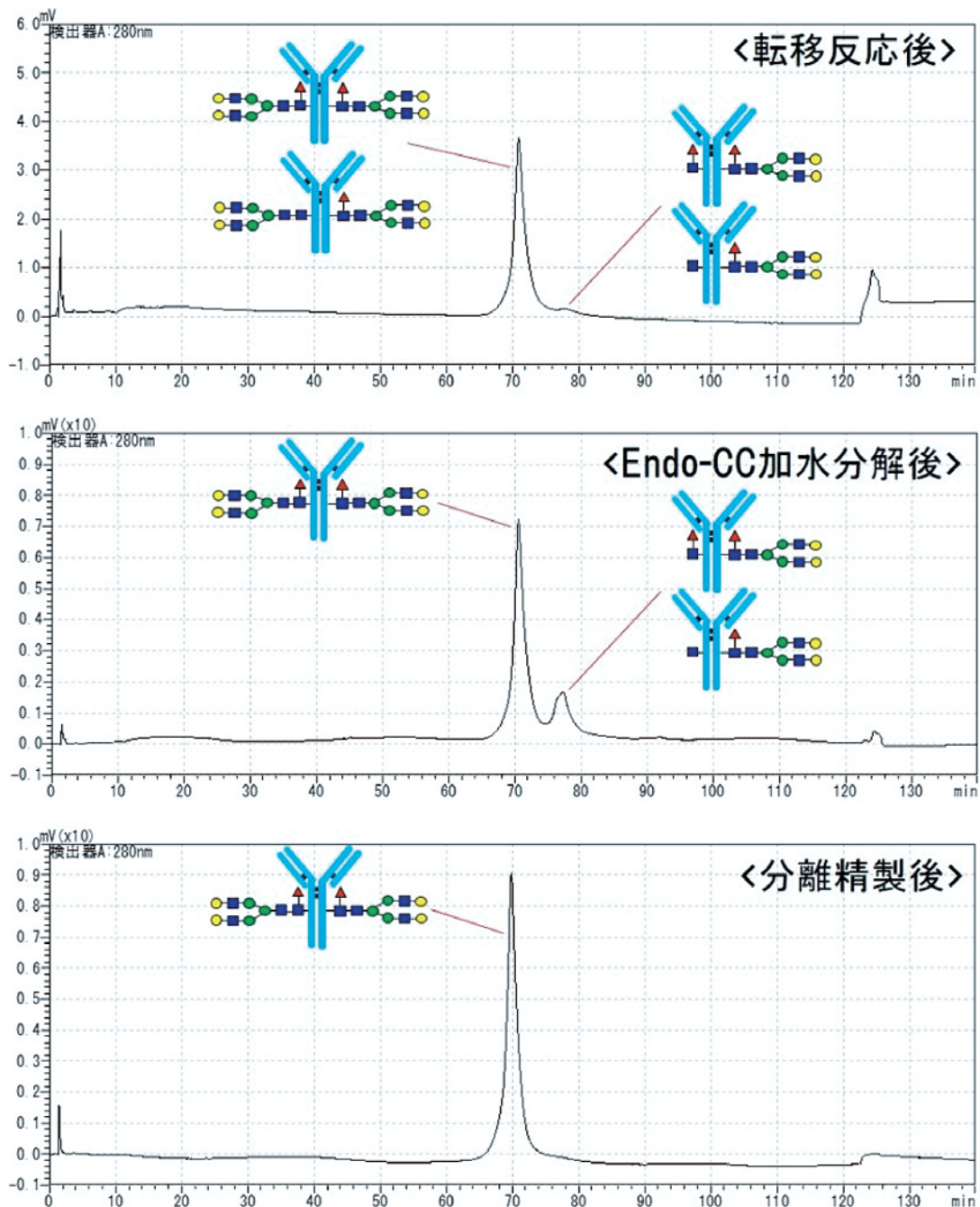


図5 糖鎖改変トラスツズマブ-G2の転移反応後、Endo-CC加水分解後および分離精製後のクロマトグラム

グリコシル型糖鎖改変トラスツズマブ-G2を分離精製できていることを確認した(図5)。

(5) 取得したフルグリコシル型糖鎖改変トラスツズマブのコアフコース含有率

分離精製により得られた糖鎖改変トラスツズマブを糖ペプチド化した後LC-ESI MSを用いて解析し、コアフコースを有する糖鎖の割合を糖鎖転移反応直後のサンプルと比較した(表1)。その結果、トラスツズマブ-G2、トラ

スツズマブ-G1a、トラスツズマブ-G1b、トラスツズマブ-G0およびトラスツズマブ-M3については、Endo-MまたはEndo-CCによる加水分解ならびに分離精製の過程を通してコアフコース含有率を99%以上まで向上させたフルグリコシル型抗体を取得できていることが確認された。また、トラスツズマブ-A2(α 2, 6)についてはEndo-MおよびEndo-CCを用い、様々な条件での検討を実施したものの、コアフコース含有率は97.6%が最大となった。

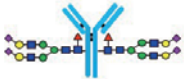
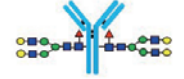
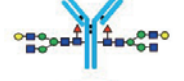


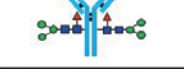
糖鎖改変トラスツズマブ	使用した ENGase	改変糖鎖のうちの コアフコースを有する糖鎖の割合 [%]	
		糖鎖転移反応後	加水分解、 分離精製後
トラスツズマブ-A2(α 2, 6) 	Endo-M	85.6	→ 97.6
トラスツズマブ-G2 	Endo-CC	95.6	→ 99
トラスツズマブ-G1a 	Endo-CC	93.0	→ 99
トラスツズマブ-G1b 	Endo-CC	94.3	→ 99
トラスツズマブ-G0 	Endo-CC	91.6	→ 99
トラスツズマブ-M3 	Endo-M	91.9	→ 99

表1 各種糖鎖改変トラスツズマブのコアフコースを有さない糖鎖を加水分解する際に用いたENGaseならびに改変糖鎖のうちのコアフコースを有する糖鎖の割合の変化

2-2 調製したコアフコース含有糖鎖改変トラスツズマブの活性

(1) 各種トラスツズマブのFc γ RIIIa-V158との相互作用解析

Fc受容体は免疫グロブリン分子のFc部位に対する受容体タンパク質であり、特にIgGに対する受容体はFc γ Rと呼ばれる。Fc γ RのうちFc γ RIIIaはNK細胞、単球およびマクロファージの細胞表面上に分布している。ターゲット細胞と結合した抗体は、これら

のエフェクター細胞上のFc γ RIIIaと結合した際にADCC活性を導き出しターゲット細胞を傷害することとなり、抗体のFc γ RIIIaとの相互作用の強さがADCC活性の強さを制御する1つの指標となる。そこで、各種トラスツズマブについて昨年当研究所に導入されたBiacore X100 (GE healthcare社製)を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によりFc γ RIIIa-V158との相互作用解析を実施した。測定に使用したトラスツズマブは、6種

類のコアフコース含有糖鎖改変トラスツズマブ [トラスツズマブ-A2(α 2, 6)-F97.6% (Fの後の数値はコアフコース含有率を表す)、トラスツズマブ-G2-F99%、トラスツズマブ-G1a-F99%、トラスツズマブ-G1b-F99%、トラスツズマブ-G0-F99%およびトラスツズマブ-M3-F99%]、糖鎖未改変のトラスツズマブ-intact (トラスツズマブ-F84.2%) ならびにカイコ絹糸腺産生トラスツズマブを2-1 (4) の操作に基づいて分離精製しフルグリコシル型として取得した糖鎖未改変トラスツズマブ (トラスツズマブ-F0%) の合計8種類である。

測定の結果を表2に示す。コアフコースを有するトラスツズマブはいずれも平衡状態での解離定数が大きく、相互作用が弱いことが確認された。一方、コアフコースを全く有さないトラスツズマブ-F0%は平衡状態での解離定数がコアフコースを有するトラスツズマブに比べ、1桁分低い数値を示し、Fc γ RIIIa-V158との相互作用が強いことがわかった。これはコアフコースを有さない糖鎖を持つ抗体がFc γ RIIIa-V158との強い相互作用があるという報告[12, 13] に沿った傾向を示したことになる。

(2) 各種トラスツズマブのADCC活性

各種トラスツズマブに対するADCC活性の

抗体	解離定数 K_D steady [M]
トラスツズマブ-F0%	$(6.98 \pm 0.40) \times 10^{-8}$
トラスツズマブ-F84.2%	$(2.90 \pm 0.49) \times 10^{-7}$
トラスツズマブ-A2(α 2, 6)-F97.6%	$(4.69 \pm 0.25) \times 10^{-7}$
トラスツズマブ-G2-F99%	$(5.36 \pm 0.29) \times 10^{-7}$
トラスツズマブ-G1a-F99%	$(6.37 \pm 0.17) \times 10^{-7}$
トラスツズマブ-G1b-F99%	$(3.69 \pm 0.18) \times 10^{-7}$
トラスツズマブ-G0-F99%	$(3.83 \pm 0.09) \times 10^{-7}$
トラスツズマブ-M3-F99%	$(7.31 \pm 1.40) \times 10^{-7}$

*サンプル名のFの後の数値はコアフコース含有率を表す。

表2 各種トラスツズマブのFc γ RIIIa-V158との平衡状態での解離定数

測定には、Promega社製のADCC reporter Bioassayキット [14] を用いた。ターゲット細胞としてHER2高発現株のヒト乳がん細胞であるSK-BR-3細胞、エフェクター細胞として遺伝子組換えJurkat細胞を用いた。Jurkat細胞は、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ものである。

今回測定に使用したトラスツズマブは、6種類のコアフコース含有糖鎖改変トラスツズマブ、糖鎖未改変のトラスツズマブ-intact (トラスツズマブ-F84.2%) ならびに2-1 (1) の操作で調製したトラスツズマブ-アクセプターの合計8種類である。各種トラスツズマブは段階希釈し、上限の抗体濃度を $0.33 \mu\text{g}/\text{mL}$ とし、以降1/3希釈を8回繰り返して計9段階の希釈液を調製した。

測定の結果を図6に示す。コアフコース含有率が99%台のトラスツズマブはいずれも低い活性を示した。一方、コアフコースの含有率がわずかに低いトラスツズマブ-A2(α 2, 6)-F97.6%は、それらよりも高い活性を示し、コアフコース含有率がさらに低い糖鎖未改変のトラスツズマブ-F84.2%はここで測定した8種類の中では最も高い活性を示した。

また、カイコ絹糸腺産生トラスツズマブを

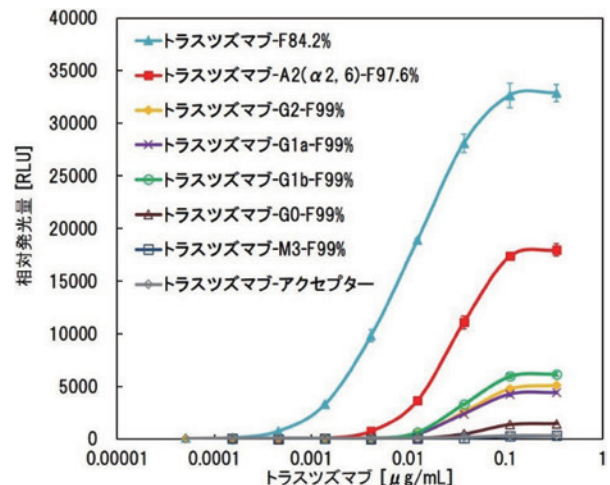


図6 各種トラスツズマブのADCC活性

出発材料とし糖鎖改変を施した、コアフコース非含有のトラスツズマブ-G2(トラスツズマブ-G2-F0%)と今回調製したトラスツズマブ-G2-F99%のADCC活性を同時に測定し、同一糖鎖間でコアフコースの有無によるADCC活性比較を実施した(図7)。その結果、コアフコースを有さないF0%ではトラスツズマブ濃度が低いところでも活性が示されたが、コアフコースを有するF99%では高濃度においても非常に低い活性しか示さなかった。したがって、同一糖鎖間でもコアフコースの有無がADCC活性に対し大きく影響を及ぼすことが確認された。コアフコースを有さない糖鎖を持つ抗体が高いADCC活性を示すという報告[15, 16]が既にあるが、今回新たに糖鎖構造の均一化ならびにコアフコース含量が限りなく100%に近いものを調製できたことにより、コアフコース含量が0%の均一糖鎖構造のものとの間でADCC活性を比較することができた。

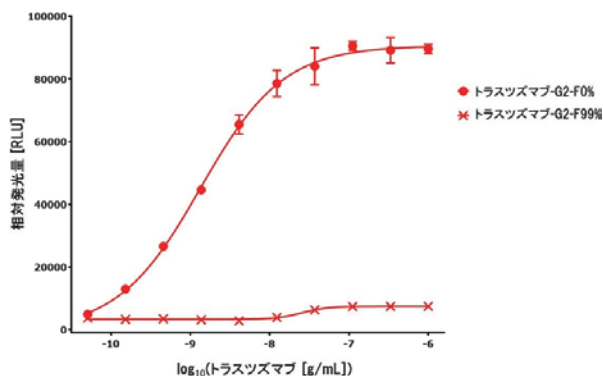


図7 トラスツズマブ-G2のF0%およびF99%のADCC活性比較

3. まとめ

CHO細胞から産生されたトラスツズマブは、コアフコースを有する糖鎖が大部分を占めた不均一な糖鎖構造を持っているが、コアフコースを有さない糖鎖構造も約15%混在していることがわかった。今回我々はこのCHO細胞産生のトラスツズマブを出発材料とし、コアフコースを有する均一な糖鎖構造

を持つ抗体を調製する方法を新たに確立した。そして、この方法に基づいて6種類のコアフコース含有糖鎖改変トラスツズマブを高純度で調製することができた。

コアフコースを有する均一な糖鎖構造を持つ抗体を調製する方法は、コアフコースを有する糖鎖を持つ抗体と有さない糖鎖を持つ抗体が混在した糖鎖改変体を調製した後、コアフコースを有さない糖鎖を持つ抗体を除去するというものである。第1段階としてENGaseを用いて糖鎖改変体のコアフコースを有さない糖鎖を加水分解した。ここで使用したENGaseがEndo-MまたはEndo-CCであり、いずれもコアフコースを有さない糖鎖を加水分解する性質を持っている。第2段階として陽イオン交換クロマトグラフィーを用い、糖鎖が加水分解された抗体と分離精製することによりフルグリコシル型コアフコース含有糖鎖改変トラスツズマブを高純度で取得するというものである。ENGaseの基質特異性を巧みに利用して糖鎖構造の均一化を図るこの技術は、1つのオリジナリティーのある技術であると考えられる。また、他の均一な糖鎖構造を有する抗体(医薬品)を製造する際の利用にも期待できる。

さらに、調製した6種類のコアフコース含有糖鎖改変トラスツズマブのFc γ RIIIa-V158との相互作用解析を実施したところ、コアフコース非含有トラスツズマブに比べ相互作用が非常に弱いことがわかった。ADCC活性についてもコアフコース含有率が99%台のトラスツズマブはいずれも低い活性を示した。

また、抗体重鎖の2箇所糖鎖構造が均一化され、なおかつコアフコース含量が0%の抗体と限りなく100%に近い抗体の間でADCC活性を比較した点は新しい成果と言える。この部分においても今回のコアフコースを有する均一な糖鎖構造を持つ抗体を調製する技術が貢献できたと考える。

謝辞

本研究の実施に携わりいただいた共同研究先である慶應義塾大学の高柳 淳先生、工藤純先生、株式会社伏見製薬所の木下崇司氏、九州大学の竹川 薫先生、株式会社免疫生物研究所の富田正浩氏、東北大学の正田晋一郎先生にこの場を借りて厚く御礼を申し上げます。また、本研究は当研究所のHGPプロジェクトに参画されている松田昭生常務理事、白井 孝顧問、天野純子室長、水野真盛室長、黒河内政樹室長、森 昌子研究員、大隅賢二研究員、菅原州一研究員、高島 晶研究員、弘瀬友理子研究員、高田美生研究員、当研究所元研究員の戸治野真美氏をはじめとした多くの方々のご指導ならびにご協力によって行われており、今回このような形で研究成果を報告させていただくことができたことに深く感謝致します。

参考文献

1. Kurogochi M, Mori M, Osumi K, Tojino M, Sugawara S, Takashima S, Hirose Y, Tsukimura W, Mizuno M, Amano J, Matsuda A, Tomita M, Takayanagi A, Shoda S, Shirai T. (2015) PLoS ONE 10: e0132848.
2. Kurogochi M, Amano J. (2014) Molecules 19: 9944-9961.
3. Collin M, Olsén A. (2001) EMBO J. 20: 3046-3055.
4. Goodfellow JJ., Baruah K, Yamamoto K, Bonomelli C, Krishna B, Harvey DJ, Crispin M, Scanlan CN, Davis BG. (2012) J. Am. Chem. Soc. 134: 8030-8033.
5. Muramatsu T. (1971) J Biol Chem, 246: 5535-5537.
6. Tai T, Yamashita K, Ogata-Arakawa M, Koide N, Muramatsu T, Iwashita S, Inoue Y, Kobata A. (1975) J Biol Chem. 250: 8569-8575.
7. Huang W, Giddens J, Fan SQ, Toonstra C, Wang LX. (2012) J Am Chem Soc. 134: 12308-12318.
8. Kadowaki S, Yamamoto K, Fujisaki M, Izumi K, Tochikura T, Yokoyama T. (1990) Agric Biol Chem. 54: 97-106.
9. Eshima Y, Higuchi Y, Kinoshita T, Nakakita S, Takegawa K. (2015) PLoS ONE 10: e0132859.
10. Wang S, Ionescu R, Peekhaus N, Leung JY, Ha S, Vlasak J. (2010) J Chromatogr A 1217: 6496-6502.
11. Ha S, Ou Y, Vlasak J, Li Y, Wang S, Vo K, Du Y, Mach A, Fang Y. (2011) Glycobiology. 21: 1087-1096.
12. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA, Presta LG. (2002) J Biol Chem. 277: 26733-26740.
13. 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) Proc Natl Acad Sci U S A. 108: 12669-12674.
14. Parekh BS, Berger E, Sibley S, Cahya S, Xiao L, LaCerte MA, Vaillancourt P, Wooden S, Gately D. (2012) MAbs. 4: 310-318.
15. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. (2003) J Biol Chem. 278: 3466-3473.
16. Niwa R, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Shinkawa T, Uchida K, Nakamura K, Matsushima K, Ueda R, Hanai N, Shitara K. (2004) Cancer Res. 64: 2127-2133.

糖タンパク質糖鎖の再現性の高い質量分析法を目指して

The study to develop glycan analysis on a glycoprotein using mass spectrometry

糖鎖生物学研究室室長 天野 純子
Junko AMANO

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) 質量分析は、生体分子をソフトにイオン化するためそれらの構造解析に重要なツールであり、汎用されている。特に、異性体の多い糖タンパク質糖鎖の解析にはMSⁿ解析することによって威力を発揮する。本研究室ではピレン誘導体化という独自の糖ペプチドの標識技術を用いてこれまで達成できなかった微量の糖ペプチド解析MALDI-MSⁿを可能にした [1]。さらに、引き続き感度の向上のみでなく再現性の向上を目指して、誰にでも糖タンパク質糖鎖の解析が容易になるような方法を開発している。本稿でその概略を述べる。

一般に糖ペプチドのMALDI-MSには固体マトリックスDHBA (2,5-dihydroxybenzoic acid)を使用する。試料とDHBAの混合溶液をプレート表面に1マイクロリットル位の液滴として載せて乾かしたものがMALDI測定試料になる (dried-droplet法)。この測定試料の結晶の全ての部分から測定分子のシグナルが同一強度で検出されるのではなく、スイートスポットといわれる、一部の部位でシグナルが特に高く発生する。実際には、試料にレーザーを細かく照射してこのスイートスポットを探しながら測定することになる。したがって、試料調製方法やスイートスポットをつかむテクニックという要因が影響し測定者によ

りスペクトルの質が変動する。そこで、より再現性の高い測定法とするために、スイートスポットがより多く形成される試料の調製方法を検討した。すでに我々はオリゴ糖をピレン標識することにより高感度になることを発表していた [2]。しかし、糖ペプチドの解析に対しては、ミクロ不均一性によりさらに微量になるので、標識の反応工程も簡便化することにより収率や再現性を向上することができると考え、試料を測定するプレート上で直接標識する方法を開発した [1]。糖ペプチドをプレートに載せ、標識試薬を滴下して加熱後、過剰の試薬を洗い流し、マトリックス溶液を載せて乾かすという行程で、わずか30分で終了する。その結果、微量試料 (1 fmol) でも十分に測定可能になった。そこで、ピレン標識がスイートスポットの形成に影響するかどうかを明らかにするため、測定試料の全域に等間隔でレーザー照射を行ってMS測定し、シグナルのマッピングを行いスイートスポットの分布を調べてみた。図1に示したように、非標識糖ペプチド試料ではイオン強度が高い点 (黄~赤) がまばらであるのに対し、オンプレートでピレン標識した糖ペプチドのMALDI試料は、結晶の起点となる円周上にスイートスポットが密集して並ぶことが判明した。スイートスポットが多数生じるとはS/Nの良いスペクトルが容易に得られることになる。

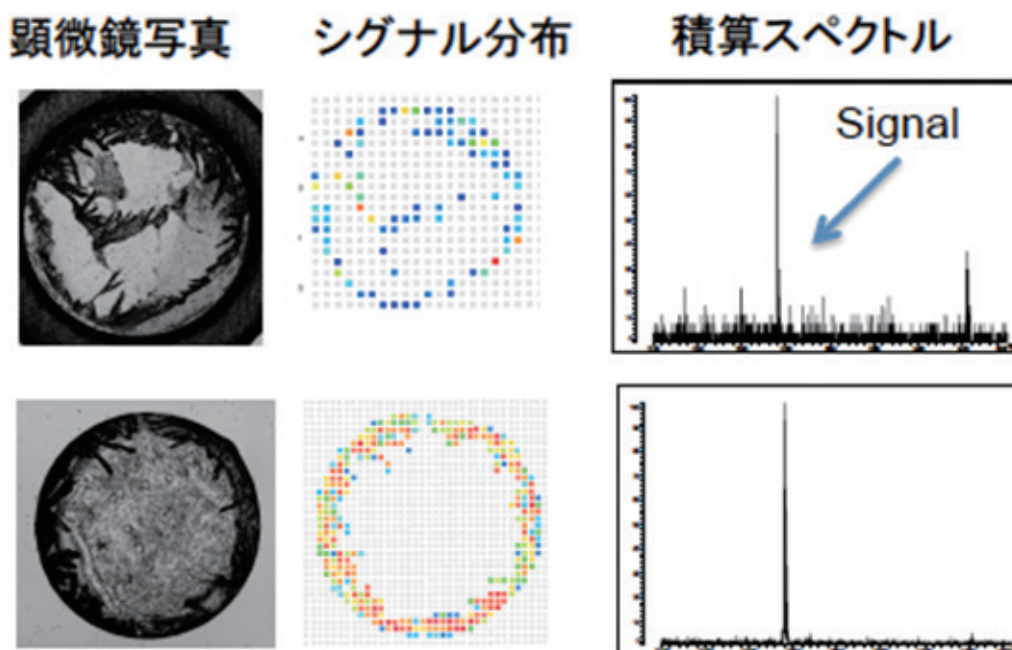


図1 非標識糖ペプチド (10fmol) (上段) およびピレン標識糖ペプチド (5fmol) (下段) のMALDI試料の比較. オンプレートピレン標識による糖ペプチドS/N向上はスイートスポットが多数生じることによる。

興味深いことに、親水性の糖ペプチド混合物をピレン標識した後にDHBA測定試料を作成してMS測定すると、いずれの糖ペプチドもスイートスポットの分布はほぼ同一で、MSスペクトルも同じプロファイルが得られた (図2)。これは、イオン化後にピレン分子が遊離するので、おそらくピレン分子が結合した糖ペプチドどうしがマトリックス溶液中で挙動を同一にして結晶化したためと思われる。2種の糖ペプチド混合物を非標識のままDHBAと共結晶を作成した測定試料は、それぞれの糖ペプチドのスイートスポットがあまり重ならずレーザー照射部位によってはスペクトルプロファイルが異なった。ピレン標識糖ペプチド試料はどのスイートスポットのスペクトルも同じプロファイルになるので、レーザーを照射する部位によらず一定のスペクトルを得ることができる。ピレン標識は感度と再現性の両面に寄与することがわかった [3]。

MALDI試料結晶中でスイートスポットと

そうでない部位で結晶構造に相違があるのかを明らかにするために、測定試料のラマンイメージを取得し、同一試料のマスイメージと比較することにした。まず、DHBA溶液のみを滴下して析出させた結晶をラマン測定するとDHBA結晶は単一ではなく、2種類の結晶多形が生じていることが判明した (図3)。さらに、測定分子との混合結晶であるMALDI試料にも同様に2種類の多形が検出されたが、スイートスポットは特定の多形上にあることを明らかにした [4]。このことから、多形結晶を生じる過程でより測定分子を取り込みやすい結晶が生じスイートスポットを形成することが推察される。さらに、MS測定前に非破壊のラマン測定を行うとスイートスポットの予測ができることを示した [5]。

以上の結果から、MALDI試料の不均一性は、不規則な針状結晶であることのみならず微視的な結晶構造の相違に依存することが判明したが、結晶化の制御は変動要因が多く困難である。ピレン標識以外にも、結晶化の温

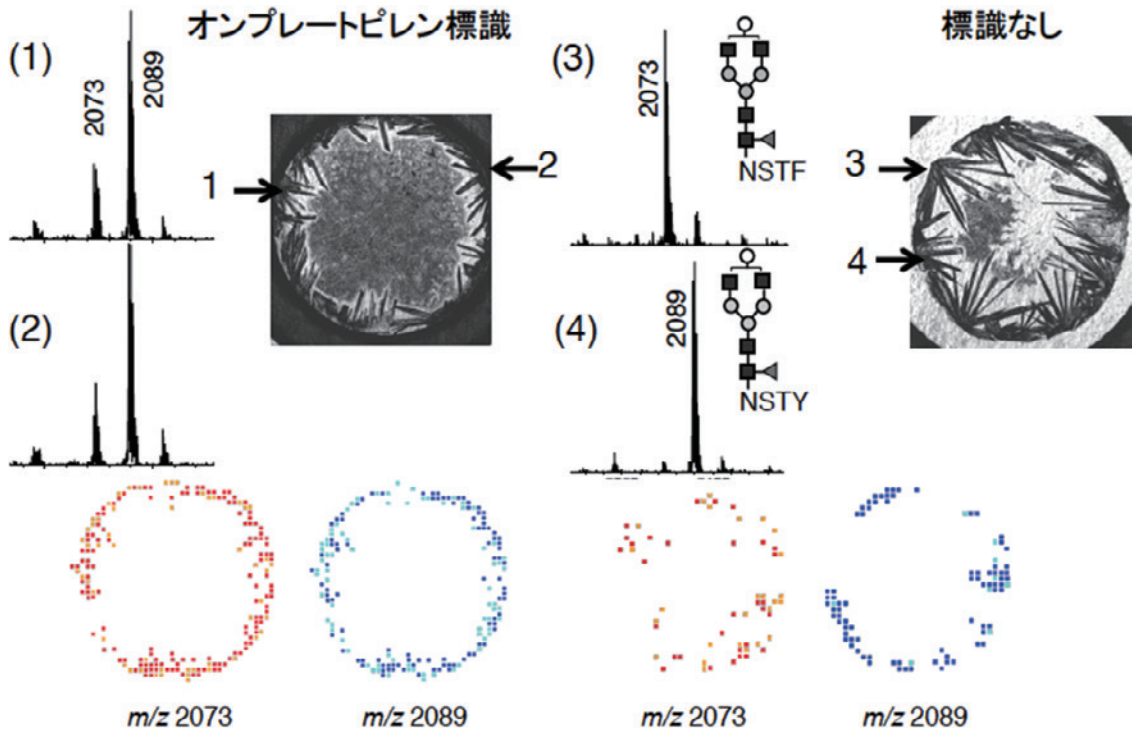


図2 2種の糖ペプチド混合物のMALDI試料の標識有無の比較. MSスペクトル(1)-(4)はMALDI試料の部位1-4を測定したもの. 下段は試料上のそれぞれの糖ペプチドのシグナル分布を示す。

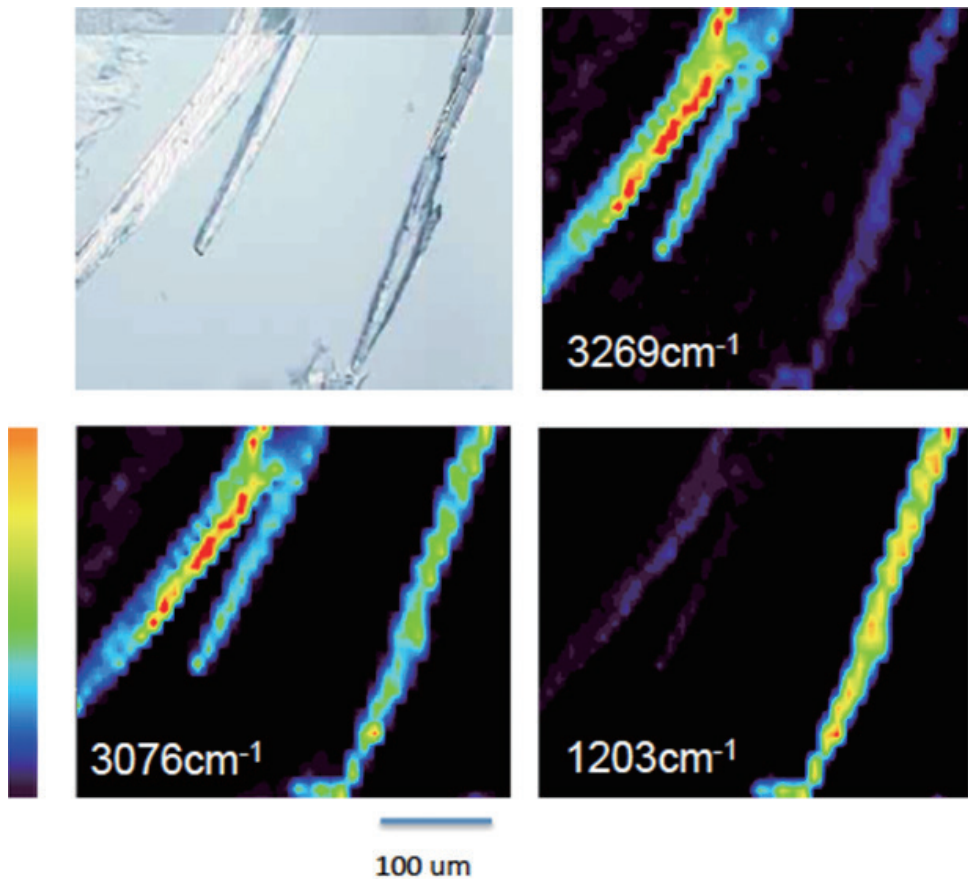


図3 DHBA結晶の顕微鏡写真及びラマンイメージ. 3076cm^{-1} は2つの多形に共通。 3269cm^{-1} および 1203cm^{-1} はそれぞれの多形に固有。

度や溶媒によって再現性が改善される条件を見出した[6]が、根本的な解決にはならない。

そこで、従来のマトリックス結晶の代わりに次世代光エネルギー変換材料を用いて、レーザー脱離イオン化を可能にする、再現性および定量性を向上させる革新的なプレートの創製に関する研究に着手した。これが実現すればいわゆるスイートスポットを探すための労力・時間をなくし、S/N比のよいスペクトルを簡便に取得できるようになる。平易に言えば、いつでもだれでも同じスペクトルが取得できるということになる。

理論的には測定分子の周囲に光エネルギーを効率よく変換・移動するシステムが構築できればよい。豊田中央研究所の稲垣らは、メソポーラス有機シリカ中に色素を担持させ、細孔壁が吸収した光エネルギーを細孔内に濃縮する光捕集アンテナ機能によって細孔中の色素を発光させている [7]。このメソポーラス有機シリカは規則的な細孔構造を有し、有機基が細孔空間表面に均一に分布・露出していると推定される。そこで、窒素レーザー337nmを吸収し、発光するメソポーラス有機シリカ薄膜を新たに作成し、その発光で励起される色素を結合した測定分子を担持させ、励起エネルギーを利用してイオン化させることを考え、豊田中央研究所と共同で開発を始めた。

有機シリカの発光スペクトルと測定分子の標識基の吸収スペクトルの重なりが大きいほど有機シリカ骨格から測定分子への光励起エネルギー移動が起こりやすいことを考慮して、モデルとなる有機シリカ薄膜および標識した測定分子を調製した。薄膜上に標識した測定分子溶液を滴下し乾燥後、レーザー照射により測定分子イオンが検出された。さらに以下のことも判明している。有機基を導入し

ていないメソポーラスシリカ薄膜や標識測定分子の吸収波長を発光しないメソポーラス有機シリカ薄膜ではシグナルがほとんど検出されなかった。また、測定分子よりも細孔が小さいと検出されなかった。以上の結果から、レーザー光によるメソポーラス有機シリカの発光に依存して脱離イオン化が起こったと推定される。また、測定分子が細孔内に入ることが重要であることも示唆された。有機基はシリカに共有結合しており、使用するレーザー強度では破壊されず、MALDI法で観察されるマトリックスクラスターイオンのような妨害イオンも観察されなかった。

まだ実用化には不十分な段階であるが、機能性有機基を自在に設計し、細孔表面に均一に配置することが可能なメソポーラス有機シリカを基盤材料とするので、いわば成り行き任せのマトリックス結晶作成に変えて、制御された局所のエネルギー変換空間を提供し、確実に測定分子を脱離イオン化させるシステムを開発したいと思っている。

文献

1. Amano J., *et. al. Anal. Chem.*, 82, 8738, 2010
2. Amano J., *et. al. Glycobiology*, 19, 592, 2009
3. Nishikaze T., *et. al. Int. J. Mass Spectrom.*, 333, 8, 2013
4. Nishikaze T., *et. al. Mass Spectrom.*, 1, A0006, 2012
5. Okumura H., *et. al. Proceedings of 59th ASMS conference*, 2011
6. Nishikaze T. and Amano J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 3787, 2009
7. Inagaki S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 4042, 2009

非還元末端にガラクトース1残基を有する 複合型7糖オキサゾリンの合成

Synthesis of monogalactosylated complex type N-glycan heptasaccharide oxazolines

糖鎖有機化学研究室 大隅 賢二
Kenji OSUMI

1. はじめに

抗体の定常領域に結合している糖鎖 (Fc結合糖鎖) の構造は、加齢や妊娠といった生理的条件の変化や、炎症の状態によって異なる。また抗体医薬品では、Fc結合糖鎖の構造が薬効や安全性に影響を及ぼすことが明らかになった[1]。ヒト正常抗体の主要なFc結合糖鎖は、コアフコースを有する二本鎖N-グリカンの非還元末端にガラクトースが2~0残基結合した糖鎖 (G2F ~ G0F) である。また抗体医薬品ではG0F糖鎖やG1F糖鎖、そして非還元末端のガラクトースとコアフコースを有していないG0糖鎖が多く含まれている [2]。このようなFc結合糖鎖と抗体機能との相関関係を明らかにする目的で、均一なG2糖鎖やG0糖鎖を有する抗体の調製が行われてきた[3]。一方G1糖鎖については、二本鎖N-グリカンのコア5糖 (Man₃GlcNAc₂) に

おいて、Man α 1,6側鎖の非還元末端にガラクトースが結合したG1糖鎖 (G1(1,6)) と、Man α 1,3側鎖の非還元末端にガラクトースが結合したG1糖鎖 (G1(1,3)) が存在し、2種類のG1糖鎖のそれぞれを有する抗体は調製されていなかった。そこで本研究では、G1糖鎖を有する抗体作成における糖鎖供給源である、非還元末端にガラクトース1残基を有する複合型7糖オキサゾリンG1(1,6)-oxa、G1(1,3)-oxaの合成について検討した。

2. モノシアリルオリゴ糖を有する糖ペプチドの単離精製

鶏卵由来のシアリルグリコペプチド (SGP) から、G1(1,6)-oxaとG1(1,3)-oxaの合成を図1に示すように計画した。すなわち、SGPの酸加水分解によってモノシアリルオリゴ糖を有する2種類の糖ペプチドA1(1,6)-P、

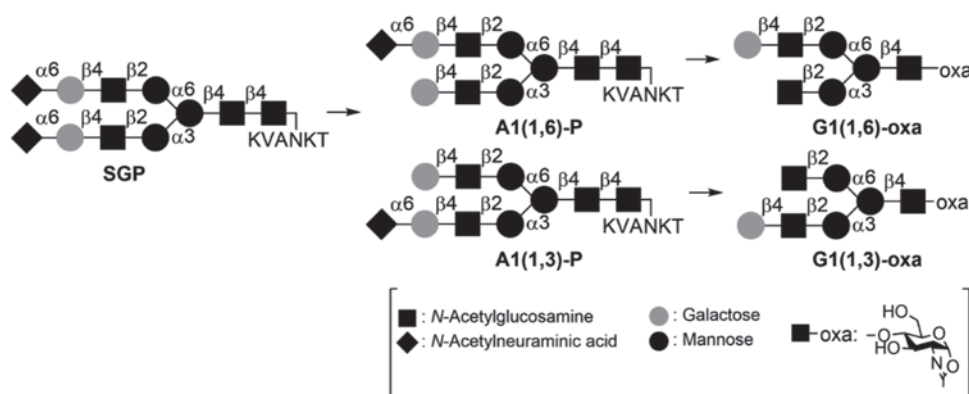


図1 G1(1,6)-oxa、G1(1,3)-oxaの合成計画

A1(1,3)-Pを調製し、そのそれぞれに対して非還元末端のガラクトースとシアル酸の加水分解、還元末端キトビオース部分の加水分解、そして遊離糖鎖のオキサゾリン化[4]を行うことでG1(1,6)-oxa、G1(1,3)-oxaを合成しようと考えた。

ところで、この合成計画において鍵となるのは、A1(1,6)-PとA1(1,3)-Pの単離精製である。すでに、SGPのペプチダーゼ処理によって調製した糖鎖アスパラギン誘導体を酸加水分解すると、モノシアルオリゴ糖を有する2種類の糖鎖アスパラギンが生成することは

知られていた [5]。またピリジルアミノ基で標識化した糖鎖において、Man α 1,6側鎖、またはMan α 1,3側鎖の非還元末端にシアル酸が結合した二本鎖N-グリカンは、カラムに水100%の移動相でも使用できるODS (オクタデシル基結合シリカゲル) を用い、移動相に酢酸緩衝液とn-ブタノールとの混合液を用いた逆相HPLCによって分離できることが報告されていた[6]。そこで、まずSGPの酸加水分解物のHPLCによる分離について検討した (図2)。

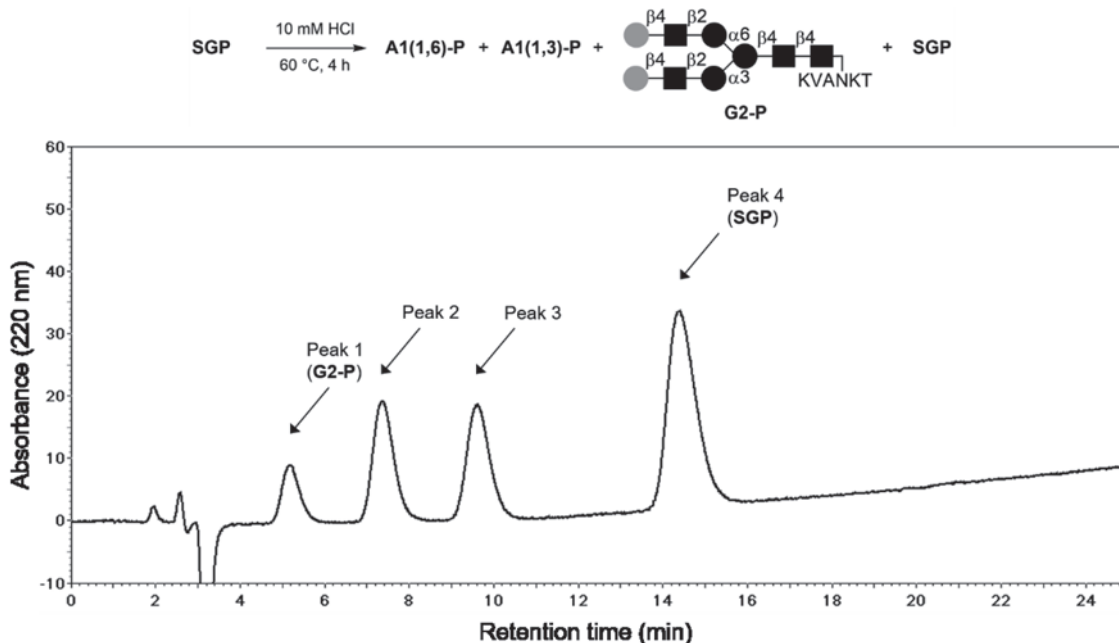


図2 SGPの酸加水分解物のHPLC

その結果、固定相に水100%の移動相でも使用可能なODSカラムを用い、移動相に酢酸-トリエチルアミン緩衝液とn-ブタノールとの混合液を用いてSGPの酸加水分解物を分離すると、SGPとアシアログリコペプチド(G2-P)の間に二本のピークPeak2、Peak3が確認された。これら二本のピークをそれぞれ分取し、NMRおよびMSにより構造解析を行ったところ、SGPよりシアル酸が一つ少ないモノシアルオリゴ糖を有する糖ペプチド由来のピークであることが判明した。しかしこの

時点において、Peak2とPeak3がA1(1,6)-PとA1(1,3)-Pのどちらに相当するかは分からなかった。

以上のように、モノシアルオリゴ糖を有する糖ペプチドのHPLCによる分離が可能になったので、これらの糖鎖が優先的に生成する反応条件について検討した。その結果、SGPを10mM 塩酸水溶液中60°Cで4時間加熱攪拌すると、HPLCの面積比から算出したPeak2とPeak3の収率が最も高くなり、それぞれ20%になることが分かった。そこでこの

反応条件下にSGP (356mg) を加水分解し、逆相HPLCを用いて各ピークの分取を行ったところ、Peak2を60mg (収率19%)、Peak3を63mg(収率20%)で単離することができた。

3. A1(1,6)-P、A1(1,3)-P から G1(1,6)-oxa、G1(1,3)-oxaへの変換

前述の糖ペプチドA1(1,6)-PとA1(1,3)-Pのそれぞれに対して、β-ガラクトシダーゼによるガラクトースの加水分解、および酸処理によるシアル酸の加水分解を行うことで、モノガラクトシルオリゴ糖を有する糖ペプチドG1(1,6)-P、G1(1,3)-Pへ変換することができた(図3)。

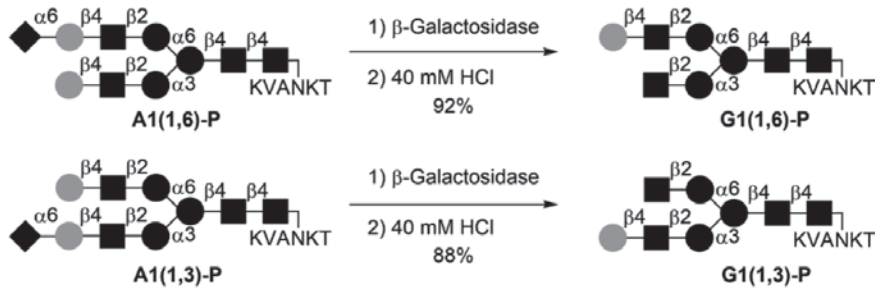


図3 G1(1,6)-P、G1(1,3)-Pの合成

このように調製したG1(1,6)-PとG1(1,3)-Pの衝突誘起解離スペクトル(MS³スペクトル)を測定し、糖鎖部分の構造を決定した。まずそれぞれの化合物の分子イオンピーク[M-H]⁻(m/z 2119)をプリカーサーイオンとしたMS²

スペクトルを測定したところ、糖内部の開裂(Cross-ring cleavage)によって生じた²⁴A₆イオン(m/z 1316)が観測された。そこで、²⁴A₆イオンをプリカーサーイオンとしてMS³スペクトルを測定した(図4)。

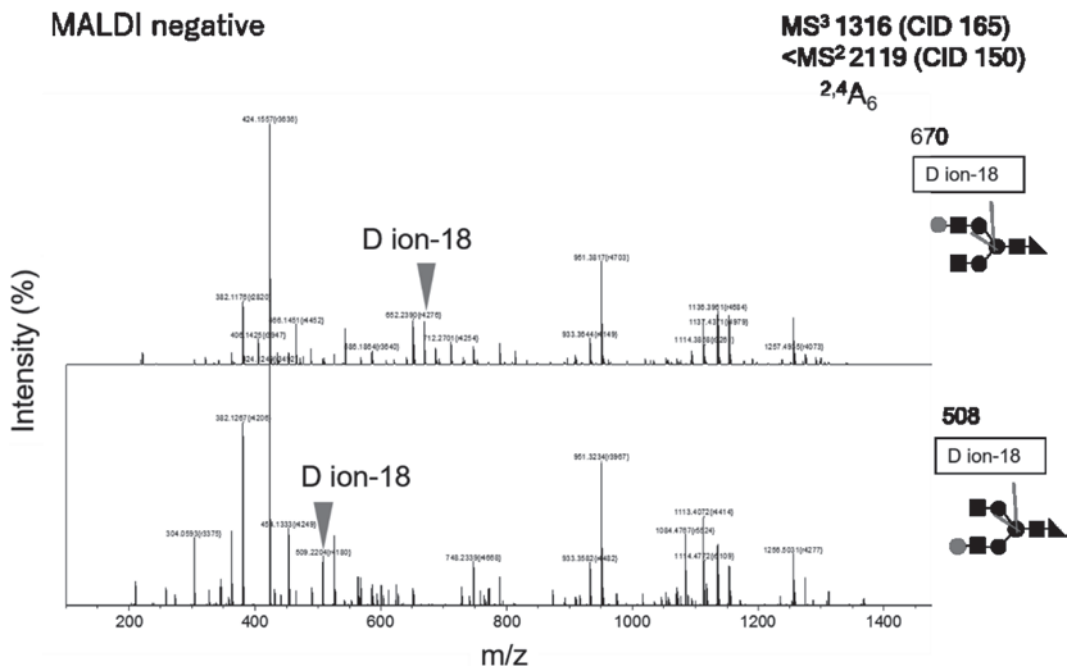


図4 G1(1,6)-P、G1(1,3)-PのMS³スペクトル

図4の上段に示したスペクトルは、図2のHPLCチャートにおけるPeak3を単離した化合物から誘導した糖ペプチドのMS³スペクトルである。このスペクトルでは、コア5糖のMan α 1,6側鎖 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man残基) の解離によって生じた、フラグメントイオンの脱水イオン[D-18 ion] に相当するシグナルm/z 670が観測された[7]。したがって、上段のスペクトルはG1(1,6)-Pのスペクトルであり、図2のHPLCチャートにおけるPeak3はA1(1,6)-Pであることが明らかとなった。また図4の下段に示したスペクトルは、図2のHPLCチャートにおけるPeak2を単離した化合物から誘導した糖ペプチドのMS³スペクトルである。このスペクトルでは、Man α 1,6側鎖 (GlcNAc β 1-2Man残基) の解離によ

て生じた、フラグメントイオンの脱水イオン [D-18 ion] に相当するシグナルm/z 508が観測された。したがって、下段のスペクトルはG1(1,3)-Pのスペクトルであり、図2のHPLCチャートにおけるPeak 2はA1(1,3)-Pであることが明らかになった。

次に、G1(1,6)-PとG1(1,3)-Pのそれぞれに対して、*Streptococcus pyogenes*由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-S) を作用させ、キトビオース部分の加水分解を行うことでG1(1,6)-OH、G1(1,3)-OHへ変換した。最後に、遊離糖鎖のオキサゾリン化[4]を行うことで、本研究の目的化合物である非還元末端にガラクトース1残基を有する複合型7糖オキサゾリンG1(1,6)-oxa、G1(1,3)-oxaを合成することができた (図5)。

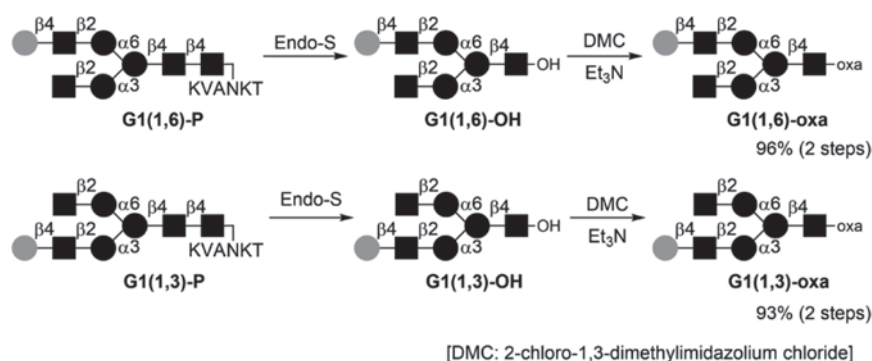


図5 G1(1,6)-oxa、G1(1,3)-oxaの合成

4. ワンポット反応によるG1(1,6)-OH、G1(1,3)-OHの合成

より効率的なG1(1,6)-OH、G1(1,3)-OHの合成を目的として、A1(1,6)-P、A1(1,3)-Pに対して行った非還元末端のガラクトースとシアル酸の加水分解、そして還元末端のキトビオース部分の加水分解を、同じ反応容器内で行うワンポット反応について検討した (図6)。

シアル酸の加水分解は、前述の酸処理から酵素反応に変えることとした。また反応溶媒については、SGPに3種類のエキソ型グリコシダーゼをワンポットで作用させ、コア5糖を有する糖ペプチドを調製した報告で使用さ

れていた、50mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いることにした[8]。ところで、この方法ではモノシリアルオリゴ糖を有する糖ペプチドA1(1,6)-P、A1(1,3)-Pに β -ガラクトシダーゼを作用させたのち、シアル酸の加水分解を伴うことなく酵素を失活させる必要がある。そこで、まず β -ガラクトシダーゼの失活条件について検討したところ、リン酸緩衝液中70°Cで1時間加熱することによって、シアル酸が脱離することなく β -ガラクトシダーゼは失活することが分かった。以上の反応条件を用いて、ワンポット反応によるG1(1,6)-OH、G1(1,3)-OHの合成を行った。すなわち、

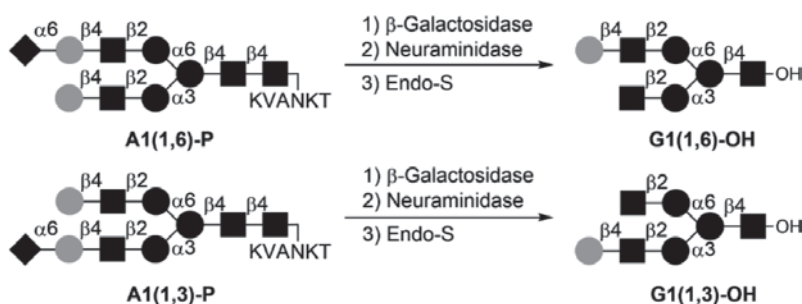


図6 One-pot反応によるG1(1,6)-OH、G1(1,3)-OHの合成

A1(1,6)-PとA1(1,3)-Pのそれぞれに対して、リン酸緩衝液中 β -ガラクトシダーゼを作用させたのち、反応液を70°C、1時間加熱することで酵素を失活させた。引き続き、シアリダーゼを加えG1(1,6)-P、G1(1,3)-Pへ変換し、最後にEndo-Sを加えキトビオース部分の加水分解を行うことで、G1(1,6)-OHをほぼ定量的に、G1(1,3)-OHを86%で合成することができた。

5. おわりに

糖鎖機能の解明を目的として様々なN-グリカンが合成されてきた。そして、その多くはコア5糖のMan α 1,3側鎖とMan α 1,6側鎖に同じ糖鎖が結合したN-グリカンであった [9]。しかし、自然界に存在する糖鎖の構造は多様性に富んでおり、Man α 1,3側鎖とMan α 1,6側鎖に異なる糖鎖が結合したN-グリカン（非対称N-グリカン）が存在している。近年、このような非対称N-グリカンの生物学的な重要性が注目され、合成法が開発され始めた[5, 10]。非対称N-グリカンであるG1糖鎖を有する抗体の調製法としては、抗体にエキソ型グリコシダーゼを作用させG0糖鎖抗体にしたのち、ガラクトシルトランスフェラーゼを作用させG1糖鎖抗体へ変換する方法が報告されている [11]。しかしこの方法では、Man α 1,3側鎖とMan α 1,6側鎖のどちらの非還元末端にガラクトースが結合したかは明らかにされていない。また本研究と同時期に、化学的に合成したG1(1,3)-oxaを用いたG1糖鎖を

有する抗体の作成が報告されたが、G1(1,6)-oxaは合成されなかった [12]。本研究ではモノシアリルオリゴ糖を有する糖ペプチドA1(1,6)-P、A1(1,3)-Pの単離が可能になったことで、二種類の糖鎖オキサゾリンG1(1,6)-oxa、G1(1,3)-oxaを初めて合成することができた。また、A1(1,6)-PやA1(1,3)-Pは、これらの糖ペプチドに対してエキソ型グリコシダーゼを用いた非還元末端糖鎖の遊離や、グリコシルトランスフェラーゼを用いた糖鎖伸長を組み合わせて行うことで、様々な構造を有する非対称N-グリカン合成の出発物質となることが考えられる。

謝辞

本研究で用いた β -ガラクトシダーゼは、森昌子研究員から提供して頂きました。また、糖ペプチドのMS解析は、黒河内政樹糖タンパク質工学研究室長に行って頂きました。ここに記して感謝いたします。

参考文献

1. Jefferis, R. (2009) *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 226-234.
2. Song, T., Ozcan, S., Becker A., and Lebrilla, C. B. (2014) *Anal. Chem.* 86, 5661-5666.
3. Huang, W., Giddens, J., Fan, S. Q., Toonstra, C., and Wang, L. X. (2012) *J. Am. Chem. Soc.* 134, 12308-12318; Kuroguchi, M., Mori, M., Osumi, K., Tojino, M.,

- Sugawara, S., Takashima, S., *et al.* (2015) *PLoS ONE*, **10**, e0132848.
4. Noguchi, M., Tanaka, T., Gyakushi, H., Kobayashi, A., and Shoda, S. I. (2009) *J. Org. Chem.* **74**, 2210-2212.
 5. Kajihara, Y., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Sasaki, K., Sakakibara, T., and Juneja, L. R. (2004) *Chem. Eur. J.* **10**, 971-986.
 6. Kondo, A., Suzuki, J., Kuraya, N., Hase, S., Kato, I., and Ikenaka, T. (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2169-2170.
 7. Harvey, D.J. (2005) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 631-646.
 8. Sun, B., Bao, W., Tian, X., Liu, H., Dong, J., and Huang, W. (2104) *Carbohydr. Res.* **396**, 62-69.
 9. Boltje, T. J., Buskas, T., and Boons, G. J. (2009) *Nat. Chem.* **1**, 611-622; Unverzagt, C., and Kajihara, Y. (2013) *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4408-4420.
 10. Wang, Z., Chinoy, Z. S., Ambre, S. G., Peng, W., McBride, R., *et al.*, (2013) *Science*, **341**, 379-383; Li, L., Liu, Y., Ma, C., Qu, J., Calderon, A. D., *et al.*, (2015) *Chem. Sci.* **6**, 5652-5661.
 11. F. HOFFMAN-LA ROCHE AG. Process for antibody G1 glycoform production. WO2013050335.
 12. Lin, C. W., Tsai, M. H., Li, S. T., Tsai, T. I., Chu, K. C., *et al.* (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10611-10616.

腎癌の悪性化に関する糖鎖抗原

Glyco-antigens involved in Malignancy of Renal Cancer Cells

糖タンパク質工学研究室 土田 明子
Akiko TSUCHIDA

1. 研究の背景

腎癌の多臓器転移症例は、5年生存率25～40%と予後不良であり、現在も免疫療法（インターフェロン、インターロイキン2療法）が行なわれているが、奏効率は、約15%と治療効果が低い。また最近では、免疫療法が効かなくなった場合には分子標的治療へ切り替えることで生存期間の延長が期待されているが、その副作用も大きな問題になっており、現在のところ手術以外に有効な治療法はなく、また早期発見や治療効果の指標となる腫瘍マーカーが未だ確立されていないのが現状である。

以前より、腎癌細胞株における糖脂質糖鎖の発現解析から、腎癌細胞株にはジシアリルガングリオシドとしてDisialyl galactosyl globoside (DSGG)抗原が発現していることが知られているが[1]、我々はこれまで、腎癌細胞株において α 2,6シアル酸転移酵素ST-6GalNAc VIの発現が抑制された結果、細胞表面のDisialyl galactosyl globoside (DSGG)抗原が消失し、前駆構造のMonosialyl galactosyl globoside(MSGG)抗原が発現するという顕著な変化を明らかにしてきた（図1-A）[2]。

一方、Lc4の末端にGalNAcが β 1-4結合した新しい糖鎖構造（図1-B）が肺への高転移株に存在するという報告[3]を受け、細胞表面糖鎖の発現解析を行った結果、多くの腎癌

細胞株にGalNAc-disialyl Lc4糖鎖抗原（以下、GalNAc-DSLc4と略す）が発現していることを確認した。

そこでGalNAc-DSLc4抗原の生合成過程に働く糖転移酵素を同定し、本抗原の発現量が少ない細胞株に関連遺伝子を導入することによりGalNAc-DSLc4の安定発現腎癌細胞株を樹立した。そこで、得られたGalNAc-DSLc4安定発現株の癌性形質につき解析を行うことにした。

本研究では、GalNAc-DSLc4抗原の肺転移への関与およびそのメカニズムについて調べ、この糖鎖抗原の腫瘍マーカーとしての可能性を探り、新規診断・治療法の開発のための基礎データの構築を目指した。

2. 実験および結果

2.1 GalNAc-DSLc4抗原安定発現株の樹立

GalNAc-DSLc4糖鎖抗原の機能を解明するため、GalNAc-DSLc4抗原安定発現株を樹立することにした。我々は、GalNAc-DSLc4の合成に関与している糖転移酵素遺伝子の同定を行い、Disialyl糖鎖部分の合成には、 α 2,6シアル酸転移酵素ST6GalNAc VI[4]が働くことを、末端GalNAc-を合成する酵素は、正常の胃や大腸において多く発現しているSda抗原を合成する β 4GalNAc-T2遺伝子[5]であることを明らかにした。そこで、糖転移酵素遺伝子 β 4GalNAc-T2をGalNAc-DSLc4

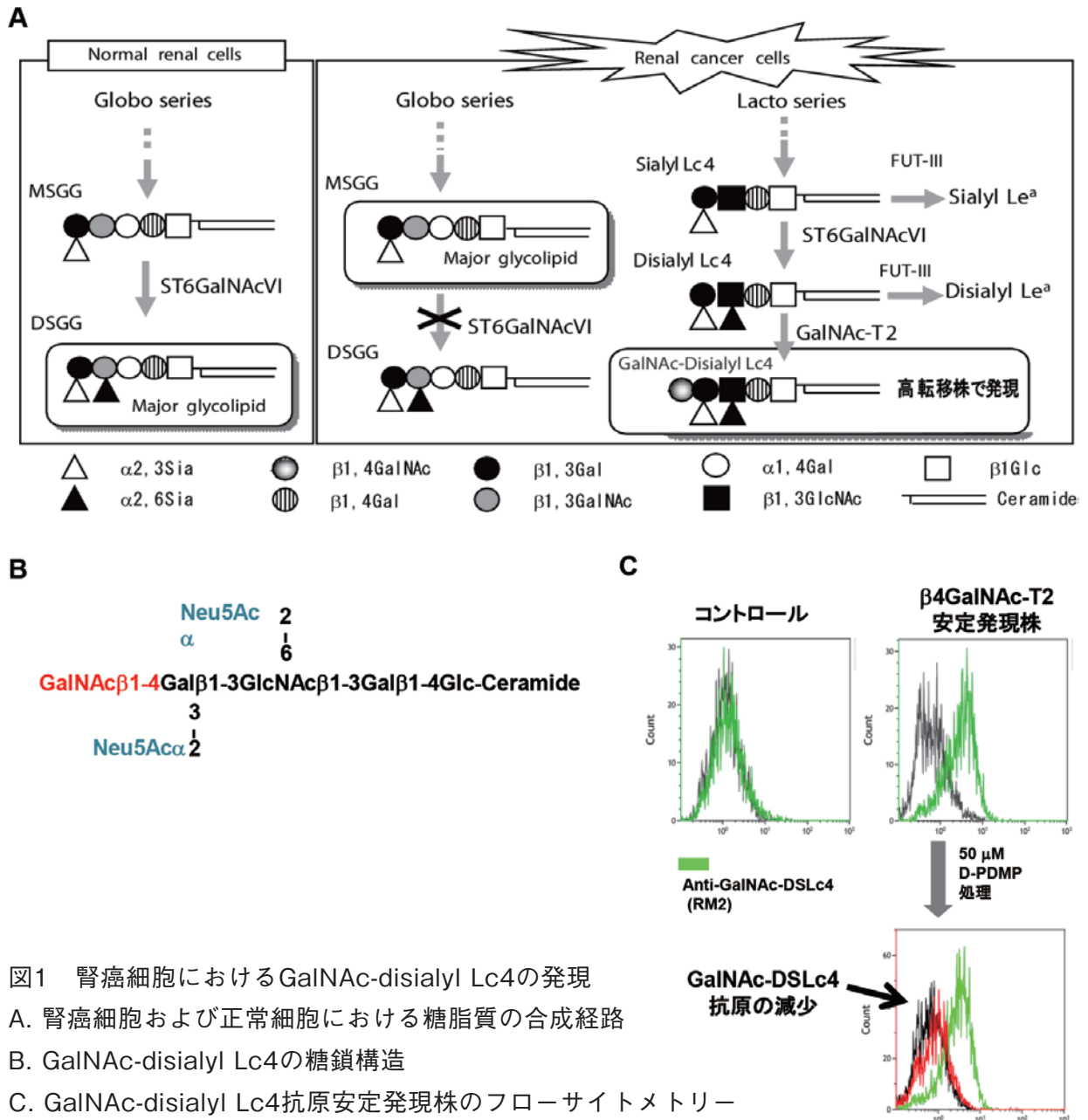


図1 腎癌細胞におけるGalNAc-disialyl Lc4の発現
 A. 腎癌細胞および正常細胞における糖脂質の合成経路
 B. GalNAc-disialyl Lc4の糖鎖構造
 C. GalNAc-disialyl Lc4抗原安定発現株のフローサイトメトリー

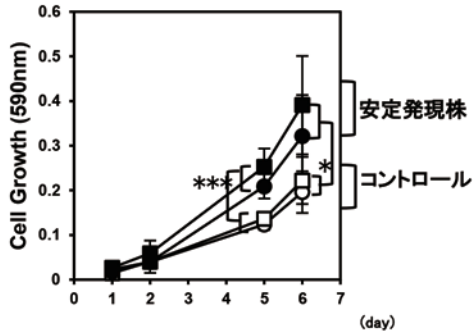
糖鎖抗原をほとんど発現していない腎癌細胞株 (VMRC-RCW細胞) に遺伝子導入し、GalNAc-DSLc4抗原安定発現株を樹立した。本抗原を特異的に認識するRM2抗体の反応性をFlow Cytometryで調べた結果、50 μM D-PDMP処理によりRM2抗体ポジティブな細胞がほぼ消失することから、本抗原エピソードは細胞表面に糖脂質として発現していることが推測された (図1-C)。よって、樹立したGalNAc-DSLc4抗原安定発現株を用いて、惹起される表現型の変異について解析を

進めた。

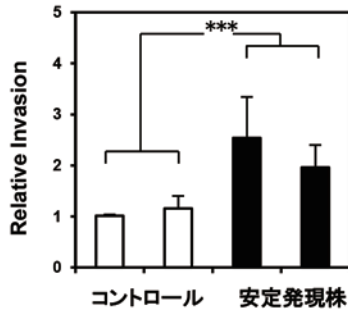
2.2 悪性形質の発現

樹立したGalNAc-DSLc4安定発現株の増殖能および浸潤能をそれぞれMTT assayおよびBoyden chamber法により調べたところ、コントロール細胞株に比べどちらも亢進していることが明らかとなった (図2-Aおよび2-B)。さらに、リアルタイム細胞形態計測システム (RT-CES™) を用い、各種細胞外マトリックス存在下での接着変化について細胞の形態を経時的にモニタリングした結果、コ

A MTT assay



B Boyden chamber migration assay



C Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES™)

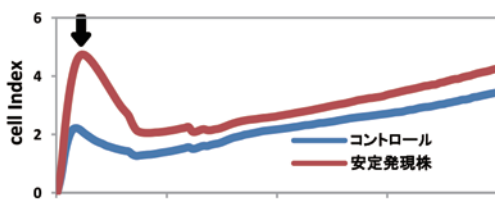


図2 GalNAc-DSLc4安定発現細胞の悪性形質増強

- A. GalNAc-DSLc4安定発現株の増殖能の亢進
 B. GalNAc-DSLc4安定発現株の浸潤能の亢進
 C. ラミニン固定化表面への細胞接着挙動

ラーゲン (I, IV)、フィブロネクチンを金電極表面に固定化した表面に対しては穏やかな接着挙動を示したが、ラミニンを金電極表面に固定化した場合においては、細胞を播種した後、早期に強い接着が観察された (図2-C)。

2.3 細胞内のシグナル変化

GalNAc-DSLc4安定発現細胞における悪形態の増強のメカニズム、特に細胞内シグナル分子の変化と悪性化に関与する分子を同定す

るため、抗リン酸化抗体を用いて細胞接着時のリン酸化レベルに変化がみられる分子を探索した。その結果、牛胎児血清 (FCS) の添加によってAktシグナル (T308およびS473) のリン酸化が亢進していた。さらに、ラミニン固定化表面への接着においても、Aktシグナル (T308およびS473) のリン酸化が亢進していることが分かった。安定発現株ではPI3K/Aktシグナル経路がコントロール細胞株よりも活性化していて、細胞の増殖能や運動能の亢進を招いている可能性が示唆

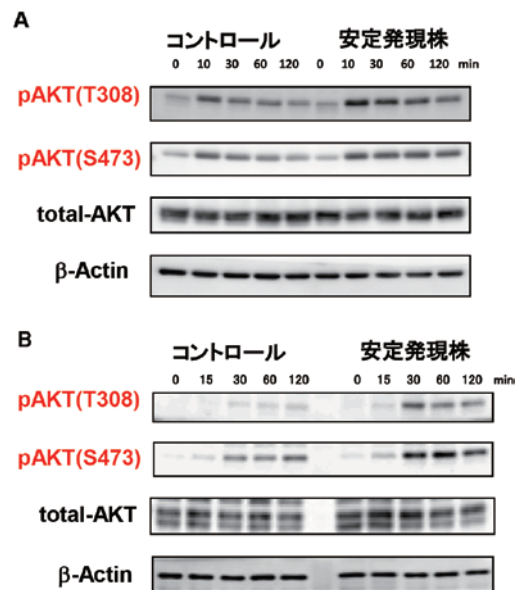


図3 細胞内のシグナル変化

- A. 牛胎児血清 (FCS) による刺激時
 B. ラミニン固定化表面への接着時

された (図3-A,B)。

2.4 インテグリン分子の局在変化

ラミニンと結合する接着分子インテグリンの発現と分布について、シヨ糖密度勾配法により細胞膜成分を分画し調べた (図4-A)。その結果、安定発現株では、ラフトドメイン (スフィンゴ糖脂質とコレステロールに富む細胞膜上のミクロドメイン) が含まれる画分にもインテグリンβ1分子が局在していることが明らかとなった。また、GalNAc-DSLc4糖鎖もラフトドメインに局在していることか

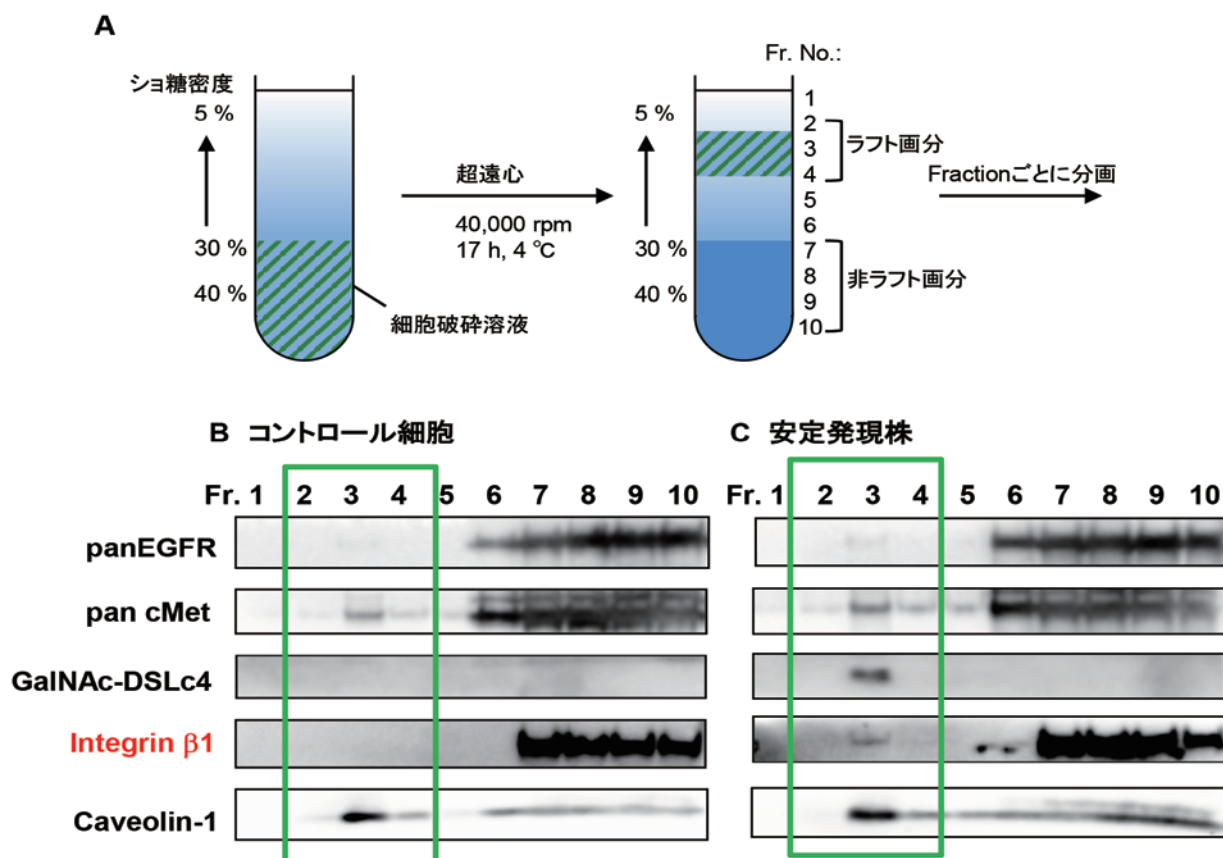


図4 チロシン受容体、接着分子(Integrin $\beta 1$)およびGalNAc-DSLc4の細胞膜表面における局在変化
 A. ショ糖密度勾配法によるラフト・非ラフト画分の調製
 B. コントロール細胞のラフト画分
 C. 安定発現株のラフト画分

ら、GalNAc-DSLc4糖鎖抗原の発現が細胞膜上でのインテグリンの局在に影響している可能性が示唆された(図4-B, 4-C)。

2.5 悪性形質に対するPI3K阻害剤(LY294002)の効果

PI3K/Aktシグナル経路の阻害剤として知られるLY294002を用いてPI3K/Aktシグナル経路を阻害し、悪性表現型がどのように変化するかを、MTT assayおよびATP assay(増殖能)、Boyden chamber法(浸潤能)、リアルタイム細胞計測システム(接着能)により調べた。その結果、安定発現株で観察された増殖能および浸潤能の亢進、ラミニン固定化表面への特異的接着が著しく抑制されることが確認された(図5-A, B, およびC)。

2.6. 悪性形質に対するRM2抗体の効果

GalNAc-DSLc4抗原に対する抗体(RM2)により、悪性表現型がどのように変化するかを調べるため、RM2抗体および抗インテグリン抗体によるブロッキング実験を行った。その結果、腎癌細胞株の特異的なラミニンへの強い接着は抗インテグリン $\alpha 3$ 抗体により顕著に抑制され、GalNAc-DSLc4の発現により増強された接着能はRM2抗体によってコントロール細胞と同レベルまで抑制されることが明らかとなった(図6-Bおよび6-D)。インテグリン分子は、 α 分子と β 分子とのヘテロな二量体で存在することが知られており、本結果から、腎癌細胞株では細胞膜上のインテグリン $\alpha 3\beta 1$ ヘテロ二量体がラミニンと

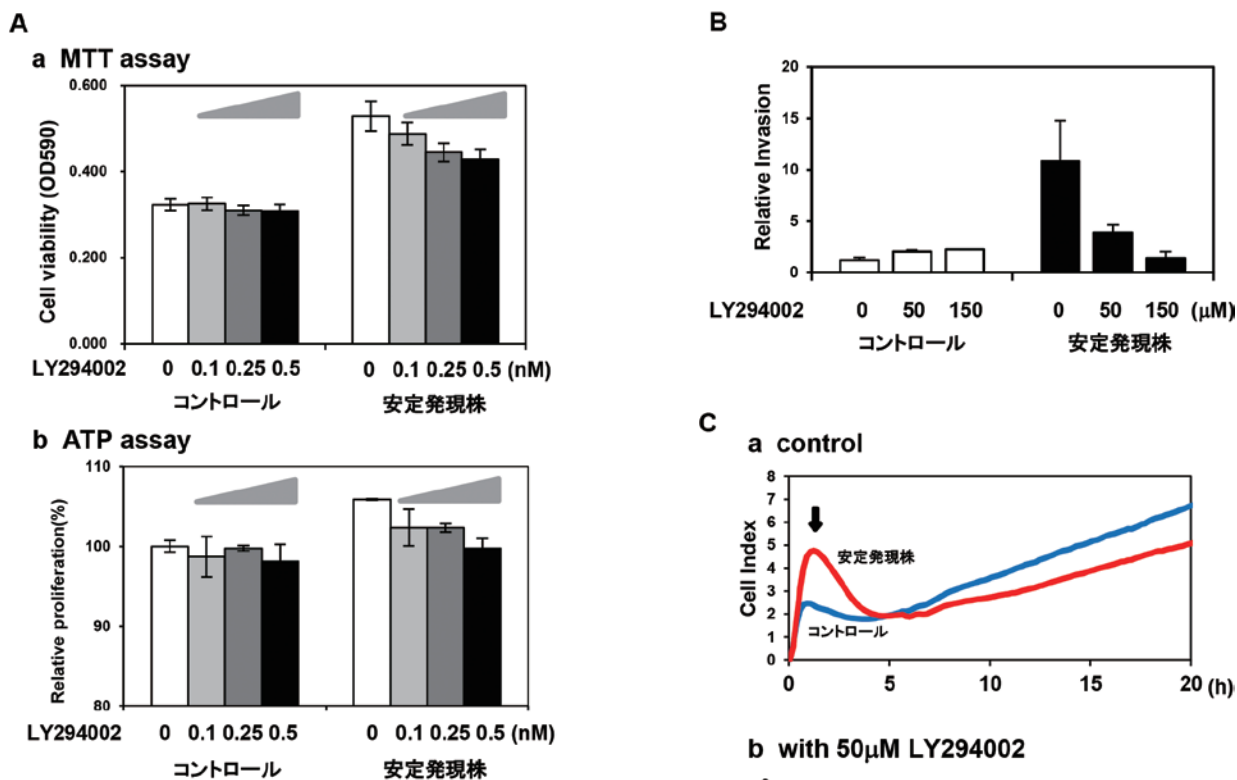


図5 PI3K阻害剤(LY294002)の悪性形質に対する効果

- A. 増殖能の抑制(a. MTT assay, b. ATP assay)
- B. 浸潤能の抑制(Boyden chamber migration assay)
- C. 接着能の抑制(RT-CES™)

の接着に強く関与していることが確認された。また、安定発現株とラミニンとの結合に GalNAc-DSLc4抗原も関与していることが推測された。

3. 考察

腎癌の糖脂質に関する初期の研究では、GM2の発現増加やGM2より大きな糖脂質の増加が報告されているが[6-8]、さらに研究が進み、腎癌患者の転移巣由来の細胞 (TOS-1) から本抗原GalNAc-DSLc4が新規糖脂質として分離された[3]。その後、村山らにより、RM2陽性の患者の予後が非常に悪いことが報告された[9]。我々もまた、Flow Cytometryによる細胞表面糖鎖の解析により、20種の腎癌細胞株のうち約70%の細胞株においてGalNAc-disialyl Lc4糖鎖抗原が発現していることを確認した。GalNAc-DSLc4

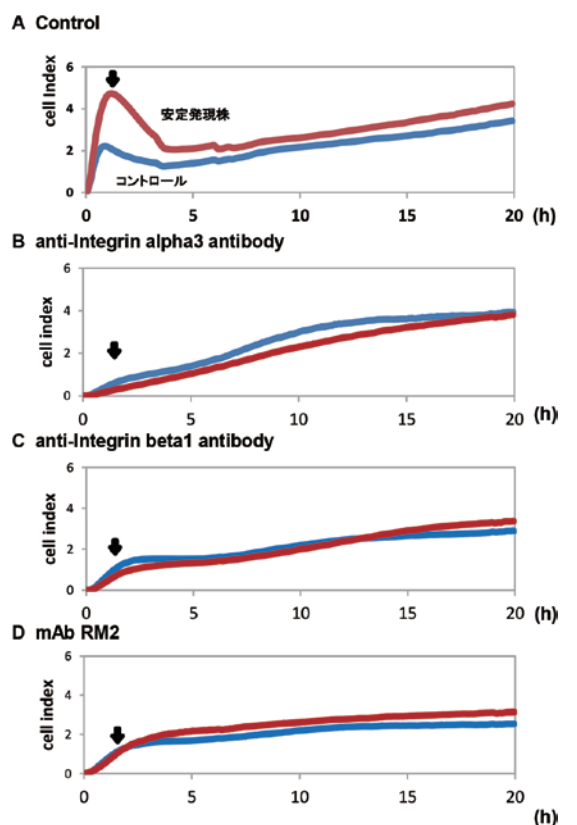


図6 各抗体が接着能に及ぼす効果

の生合成に関与する糖転移酵素を同定し、GalNAc-DSLc4抗原安定発現株を樹立して、惹起される表現型の変異について解析を進めた結果、さまざまな悪性形質の亢進が認められ、チロシン受容体分子やインテグリン分子の局在やリン酸化の状態に本抗原が深く関与していることが明らかとなった。インテグリンβ1分子が腫瘍細胞の遊走や細胞外マトリックスの認識において重要であることや、ガングリオシドがインテグリンからのシグナルを増強あるいは抑制することにより、増殖能や浸潤能に関与するという報告はこれまでもいくつかある。その一例として、メラノーマ細胞に発現しているGD3は、インテグリンの機能を増強することで増殖能や浸潤能といった悪性形質を増強することが報告されている[10-13]。GalNAc-DSLc4の安定発現株においても、インテグリンの機能が増強されており、PI3K-Aktシグナル経路の活性化を引き起こすアダプター分子が存在

することが推測され、現在検討中である。すなわち、本抗原の発現によりラフトドメインに局在するインテグリン分子が増え、ラフト内でインテグリン分子と成長因子受容体が接近することで、PI3K-Aktシグナル経路の活性化が惹起されて悪性形質が増強されると考えている(図7腎癌の悪性化メカニズム(仮説))。また、安定発現株において活性化されたPI3K-Aktシグナル経路をPI3K阻害剤(LY294002)を用いて阻害することで、悪性表現型(亢進した増殖能および浸潤能、ラミニン表面への速い接着)を抑制することが可能であった。

4. おわりに

GalNAc-DSLc4抗原は前立腺癌においても発現が上昇してくることが確認されるなど、臨床的に泌尿器系の腫瘍マーカーとしても期待される抗原である[14]。本抗原に対する良質な抗体を作成できれば、抗体治療への可能

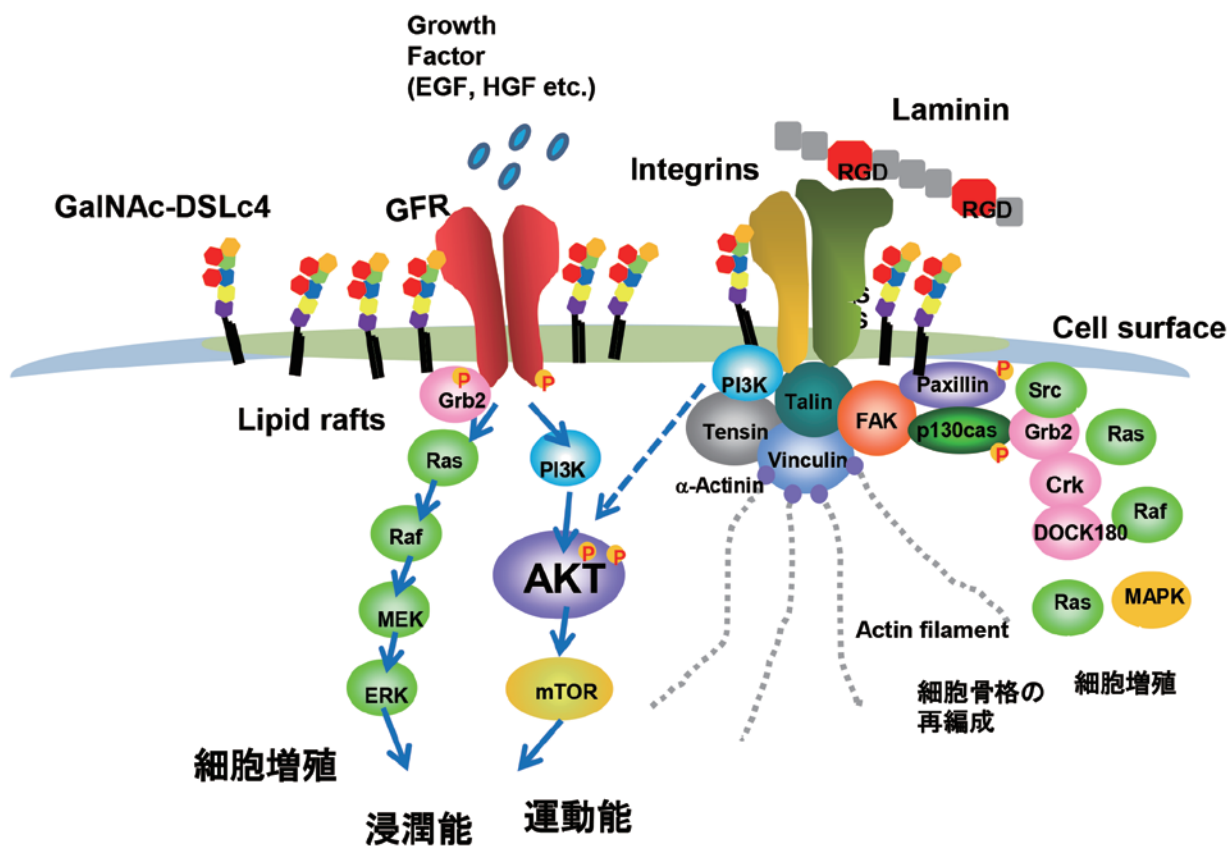


図7 腎癌悪性化メカニズムの仮説

性を見出せるかもしれないと期待している。

謝辞

本研究の成果を纏めるのに際し、長い間ご指導を頂いてきた共同研究者の中部大・古川鋼一先生、抗体を提供して頂いた東北大・伊藤明宏先生、多くのご助言を頂いた野口研・松田昭生常務理事および野口研究所の皆様にご場を借りて心より感謝申し上げます。

参考論文

1. Saito, S., Levery, S. B., Salyan, M. E. K., Goldberg, R. I., and Hakomori, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5644–5652
2. Senda, M., Ito, A., Tsuchida, A., Hagiwara, T., Kaneda, T., Nakamura, Y., Kasama, K., Kiso, M., Yoshikawa, K., Katagiri, Y., Ono, Y., Ogiso, M., Urano, T., Furukawa, K., Oshima, S., and Furukawa, K. (2007) *Biochem. J.*, **402**, 459-470
3. Ito, A., Levery, S. B., Saito, S., Satoh, M., and Hakomori, S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 16695-16703
4. Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, K., Ando, T., Ishida, H., Yoshida, A., Nakamura, Y., Kannagi, R., Kiso, M. and Furukawa, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 22787–22794
5. Montiel, M. D., Krzewinski-Recchi, M. A., Delannoy, P., and Harduin-Lepers, A., (2003) *Biochem. J.* **373**, 369–379
6. Karlson, K. A., Samuelsson, B. E., Schersten, T., Steen, G. O., and Wahlqvist, L. (1974) *Biochim. Biophys. Acta.* **337**, 349-355
7. Iguchi, T., and Hakomori, S. (1986) *Biochemistry.* **25**, 2859-2866
8. Satoh, M., Nejad, F. M., Nakano, O., Ito, A., Kawamura, S., Ohyama, C., Saito, S., and Orikasa, S. (1999) *Tohoku J. Exp. Med.* **189**, 95–105
9. Maruyama, R., Saito, S., Bilim, V., Hara, N., Itoi, T., Yamana, K., Nishiyama, T., Arai, Y., Takahashi, K., and Tomita, Y. (2007) *Anticancer Res.* **27**, 4345-4350
10. Hamamura, K., Furukawa, K., Hayashi, T., Hattori, T., Nakano, J., Nakashima, H., Okuda, T., Mizutani, H., Hattori, H., Ueda, M., Urano, T., Lloyd, K. O., and Furukawa, K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 11041–11046
11. Hamamura, K., Tsuji, M., Ohkawa, Y., Nakashima, H., Miyazaki, S., Urano, T., Yamamoto, N., Ueda, M., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 513–519
12. Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Miyata, M., Hamamura, K., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 14 –19
13. Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Hamamura, K., Kambe, M., Miyata, M., Tajima, O., Ohmi, Y., Yamauchi, Y., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 27213-27223
14. Saito, S., Murayama, Y., Oan, Y., Taima, T., Fujimura, T., Murayama, K., Sakilek, M., Egawa, S., Ueno, S., Ito, A., Ishidoya, S., Nakagawa, H., Kato, M., Satoh, M., Endoh, M., Arai, Y. (2008) *Int. J. Cancer.* **115**, 105-113

2015 米国糖鎖生物学会年会参加報告

Report on 2015 Annual Meeting of the Society for Glycobiology

糖鎖有機化学研究室 山田 一作
Issaku YAMADA

米国・カリフォルニア州・サンフランシスコのHilton San Francisco Union Squareにおいて2015年12月1日から4日に開催されたSociety for Glycobiology (SFG) Annual Meeting 2015に参加させて頂いたので報告いたします。SFG年会への参加は、昨年SFGと日本糖質学会 (JSCR) の合同会議として米国・ハワイ州・ホノルルで開催された年会に続き2回目の参加となりました。同一日程で、神戸ポートアイランドにおいて第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会が開催されたことが影響してか、日本からの参加者は非常に少ない印象でした。

University of Georgia, Complex Carbohydrate Research Center (CCRC) のWilliam York先生とRené Ranzinger先生が主催するサテライトシンポジウム (Satellite III: Transformational Informatics for Glycoscience) は、糖鎖インフォマティクスと糖鎖生物学等の研究者あわせて約20名の参加がありました。本サテライトシンポジウムでは、糖鎖インフォマティクスの最近の進捗と今後の展開について以下の発表が行われました。

- Sweet-II (糖鎖立体構造構築ツール) (Thomas Lütke先生)
- Virtual Glycome Generator (Sanjay

Agravat先生)

- Representation of Specific Oligosaccharides (Brian Haab先生)
- ISOGlyP (Thomas Gerken先生)
- GRITS (René Ranzinger先生)
- GLYCAM-WEB (Robert J. Woods先生)
- GlyTouCan (Nobuyuki P. Aoki先生)
- MIRAGE (David Smith先生)
- U01, HIVE project, DrugVar (Raja Mazumder先生)
- Glycan Name Ontology (GNOME)、GlySpace project (William York先生、Nathan J. Edwards先生)

Thomas Lütke先生は、糖鎖構造を解析するツールであるSweet-IIについて、利用者がアクセスしやすいRESTサービスの開発について発表されました。Sanjay Agravat先生は、糖鎖データベース、糖鎖アレイデータ、質量分析データなどの既知の情報を用いて、生合成の可能性があるすべての糖鎖構造をあらゆる「仮想グライコム」を発生させるVirtual Glycome Generatorについて発表されました。そして発表では独自の新しい糖鎖構造記述法を利用されていました。Brian Haab先生は、糖鎖モチーフについての可読性のシンプルな記述法について、Thomas Gerken先生はIsoform Specific O-Glycosylation Prediction (ISOGlyP) について、René

Ranzinger先生は、質量分析解析のソフトウェアであるGRITSについて、Nobuyuki P. Aoki先生は、国際糖鎖構造リポジトリ (GlyTouCan) について、David Smith先生は、MIRAGE: the minimum information required for a glycomics experimentについて発表されました。

糖鎖構造データ可視化について興味深いのは、Thomas Lütteke先生とRobert J. Woods先生がともに3次元データの可視化について発表されたことでした。PDBなどのデータを可視化する際、タンパク質は球棒、リボン、ロッドなどを利用して表現することで必要な情報がわかりやすいような工夫がされています。一方、糖鎖に関しては原子レベルで表示し、必要に応じて色を変える手法がよく見られます。しかし、この表現方法ではどんな種類の単糖が組み合わさった糖鎖であるのかを認識することは容易ではありませんでした。Thomas Lütteke先生の方法は原子毎にCFG記号のカラーコードを使い、その原子がどんな単糖の種類に含まれているのかを可視化する手法でした。Robert J. Woods先生の方法は、単糖毎に3次元のCFG記号を定義し、その記号を単糖にオーバーラップさせて表示することで、2次元のCFG記号の様に糖鎖構造を可視化する手法でした。これら二つの方法は糖鎖の3次元立体構造の理解を助ける方法として有用であり、今後の一般化、利用の浸透が期待できると考えられます。

本サテライトシンポジウムは、糖鎖構造オントロジーについてNathan J. Edwards先生と議論でき、糖鎖立体構造とそのツールについてRobert J. Woods先生とThomas Lütteke先生と情報交換ができるなど、様々な先生と交流ができた有意義な機会でした。

また、糖鎖研究におけるデータベースやツールを開発者がハンズ・オンするGlycoinformatics Hands-On Workshopでは、グライ

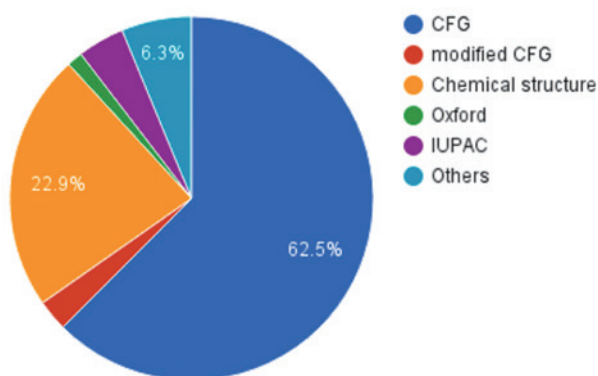
コプロテオミクスをサポートするプロテオミクスサーチエンジン: Byonic、国際糖鎖構造リポジトリ: GlyTouCan、糖タンパク質のLC-MS/MSデータから糖ペプチドの同定ツール: GPQuest、糖鎖科学の様々なデータベースやツールを提供しているGlycosciences.deからは3次元立体構造の検証やモデリングに関するツール、糖鎖MSデータを解釈するためのGRITS toolbox、糖タンパク質の糖鎖構造情報についてのキュレーションされたデータベース: UniCarbKBやLC-MS/MS実験データのデータベースであるUniCarb-DBについて開発者から説明などが行われました。私はGlyTouCanに関連したWURCSおよびGlycoNAVIを含む日本のデータベースについて説明を行いました。本ハンズ・オンに参加された研究者は、日本よりも各種情報やツールの利用に関して積極的な印象を受けました。



Hands-On Workshopの様子

糖鎖研究において学術論文や学会等において糖鎖構造に関連する発表を行う際には、どんな構造の糖鎖を利用したのかを明確にして研究内容を正確に伝える必要があります。化学の領域では元素記号と元素記号間の結合を利用した化学構造式が広く利用されています。一方、糖鎖の領域ではこのような化学構造式に加えて糖鎖に含まれる単糖の種類を明確に伝える表現方法としてIUPACやCFG、

Oxford形式が利用されていますが、これらに類似した独自の表記法を含む様々な表記法を用いた研究発表も見られます。そこで、本年会における糖鎖構造についてポスター発表で用いられている表記法を集計してみました。アメリカの学会であるためかCFG形式が広く利用されていますが、IUPACやOxford形式も見られました。興味深かったのはCFG記号とOxfordの結合形式を利用した表記を



SFG年会における糖鎖構造表記

幾つかのグループが用いていることでした。

本年会において私は、“A substructure search method for carbohydrate structures based on the WURCS notation using Semantic Web technology” について、国際糖鎖構造リポジトリであるGlyTouCanにおけるWURCSの利用を含めて発表させて頂きました。糖鎖構造の検索に加えて、糖鎖構造の関係性やRDFについて、WURCSを利用したRDF生成や関係性の構築などについても説明させて頂きました。

本年会では全開催期間にわたり、糖鎖情報学を含めたさまざまな研究者と有意義な議論を交わすことができました。そして、William York先生や Raja Mazumder先生をはじめとする多くの研究者とのWURCSに関連した糖鎖構造についての議論からは有益な知見が得られました。このような機会を頂き本年会に参加できたことに感謝いたします。

GLYCO²³ 参加報告

23rd International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO²³)

糖タンパク質工学研究室 平野 清子

Kiyoko HIRANO

昨年9月、クロアチアのスピリットにて開催された23rd International symposium on Glycoconjugates (GLYCO²³)に参加したので以下に報告する。

昨年Biochem. Biophys. Res. Commun.誌に発表した乳癌細胞におけるLacdiNAc糖鎖の役割について、下記のタイトルにてポスター発表を行った。

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

研究に関する詳細は昨年度の野口研究所時報にも書いたので割愛するが、乳癌細胞にこの糖鎖の形成を司る β 4-N-acetylgalactosaminyltransferase 4遺伝子を高発現させると、コロニー形成能や浸潤能などの癌の悪性形質が抑制されることを明らかにした。ポスターセッションの裏で別の講演があったため、かなり人がまばらだったが、岡山大及び大阪大の学生さんがそれぞれ聞きに来てくれ、乳癌の癌化メカニズムや実験の手法などを説明した。また、わたしが席を外している間にもスイスとシンガポールの学生さんが聞きに来てくれたようで、こちらは共著者である古川先生に対応して頂いた。若い人に興味を持って貰えたのは良かった。

今回の学会では癌性変化や免疫応答などによる糖鎖構造変化のGlycomicsのトピックが非常に多かった。特に質的な変化だけでなく量的な変化が重要であるということを誰もが強調していたことが印象に残った。細胞内での発現の割合が少ない糖鎖構造でも、生物学的に重要な機能を持つことが明らかになれば非常に有意義な研究になると実感した。なお今回はIgGの糖鎖構造の話題が多い印象を受けた。以下にその中でも興味深かったものについてあげる。

- High sensitivity glycomic : windows to glycan function (A. Dell, Imperial college, London)
- Nobel approaches for MS-based N-glycoproteome and N-glycome analysis (H. Lu *et. al.*, China)
- Development and application of advanced LC-MS/MS based Glycoproteomics (KH. Khoo *et. al.*, Academia Sinica, Taiwan)

また、新規前立腺癌の診断法の開発に関して、腫瘍マーカーであるprostate specific antigen (PSA)上の糖鎖を、PSAの抗体とレクチンとを用いたサンドイッチELISA法にて解析するといった講演があった。

- Lectin-based techniques for analysis of glycosylation changes using microarray

and surface plasmon resonance platform (J. Katrlik *et. al.*, Slovak Academy of Science, Slovakia)

現在、野口研究所では前立腺癌では癌化に伴いLacdiNAc糖鎖が増加するという仮説のもとに抗PSA-LacdiNAc抗体の習得を目指しており、気になるものであった。

Glycomicsなどに偏りがあったとはいえ、普段あまり聞けない研究の話を知ることが出来、非常に勉強になった。前回、オーストラリアのケアンズで開催されたGLYCO¹⁹に参加した時はstem cellのテーマがずらりと並んでいたように記憶しているが、今回はそのような発表は非常に少なく、研究も流行があるように感じる。その中で自分の研究の位置づけを見いだして、目先のことだけにとらわれない息の長い研究を行えたらと思っている。

なお、学会会場はスプリットの市街地から車で30分程離れた、ビーチリゾートのホテル

であり、わたしの滞在していたホテルから会場まで海岸を歩いて行くことができた。写真を見てお分かりのようにエメラルドグリーン
の水面、空の青さ、ビーチの砂の白さにつ
つい窓の外に目が奪われがちであったが、残
念なことに水着を忘れたのと日光アレルギー
なのでかろうじて誘惑を抑え、スクリーン上
の甘美な構造に向き合った一週間であった。

なお次回GLYCO²⁴は来年、韓国の済州島
で開催予定である。



学会会場のホテルのビーチ (古川先生撮影)

23rd International Symposium On Glycoconjugates (Glyco23) 参加報告

23rd International Symposium On Glycoconjugates (Glyco23)

糖鎖生物学研究室 井手尾 浩子
Hiroko IDEO

クロアチアのスピリットで2015年9月15日～20日に開催されたGlyco23に参加し、ポスター発表を行った。クロアチアはアドリア海をはさんでイタリアの東側に位置しており、かつてはユーゴスラビア連邦の中の一国であった。当時シリアからの難民流入問題が日本で盛んに報道されていたようだが、スピリットは問題のハンガリーとの国境のある北部ではなく、南西部の海沿いの観光地であることもあり、治安への不安は特に感じられなかった。今から約1700年前にローマ皇帝ディオクレティアヌス皇帝が建設し、その後廃墟になっていた宮殿に、残された石材などを再利用して後の人々に住み始めたのが現在のスピリットの街の起源だそうで、海に面した旧市街の狭いエリアの古代ローマ遺跡の中に中世、現代が混然一体として存在し、観光客で

とても賑わっていた。

その旧市街からバスで30分ほどの海岸沿いのリゾートホテルがGlyco23の会場となっていた。リゾートホテルだけあって、プライベートビーチにはデッキチェアが所狭しと並べられ、学会の昼休みには目の前のビーチから海やプールに入って楽しむ参加者や同伴者も少なくなかった(9月の下旬でも日差しが強く、昼間は暑い日が多かった)。海岸沿いにはヨットハーバーや別荘、ホテル等が点在し、ドイツ等北ヨーロッパの人々のリゾート地として人気があるという。学会時は通勤が無い分朝に余裕があるので、朝食前の涼しい時間帯に海岸沿いを毎朝走っていた。海も小魚の大群がホテル前のビーチから見えるほどきれいで、昼休みに講演会場で座りっぱなしの頭と体をすっきりさせるのに、ちょうど良



店が立ち並び、観光客で賑わう宮殿の外壁



会場のホテルからの海の眺め

い水温であった。

Glyco23への参加人数は400人以上、日本人の参加者も91人と参加国の中で一番多かった。講演は一番大きな会場で朝一番にプレナリー講演が2題程あった後、その会場を仕切り各シンポジウムが行われた。ポスターは細長い会場に会期の前半後半で張り替えることになっており、プログラム上は講演の合間のコーヒブレイクやランチタイムがポスターを見る時間となっているが、今までの大会と違って発表者によるプレゼンタイムが定められていない為、会場にあまり人がいないことが多かった。Glycoにはここ何回か参加しているが、Glyco23では今までに比べ、質量分析での糖鎖分析での発表がメジャーになったように感じた。特に今回は哺乳類以外の種の糖鎖を分析した話も多かった。カタツムリや牡蠣や線虫など多岐にわたり、殆どが質量分析を分析手段に用いていた。

以下、主にプレナリーレクチャーを中心に興味を引かれた講演内容を記していく。初日のIGO Awardの木下先生はGPI anchorに関する今までの研究を振り返った話に加え、GPI anchor部分の最初のマンノースにGalNAcを付加するPGAP4というトランスフェラーゼを、GalNAcをもったGPIを認識する抗体とCHO細胞を使ったforward genetic screening で同定した話をされていた。抗体を使ったFACS解析及びCHO細胞のmutant株でPGAP4の基質特異性を調べており、一般に糖鎖を認識する抗体は取得が難しいが、GPIアンカーに結合しているからか、この抗体できれいにFACS解析をしていた。アンカーされたタンパク部分はこの抗体の認識に関係しないようだ。Young scientist IGO AwardのDr. Xing Chenの“Chemical tools for probing glycosylation dynamics in vivo”の講演の中では、主に標識単糖 analog を使って、標識する方法の話をしていて、マウスを用いてこの方法で代謝標識し、心肥大

時のシアル酸付加の亢進を見出していた。また、レセプターを介したエンドサイトーシスを利用して、細胞特異的に標識する話、Targeted imaging of tumor glycanの話の中でシアル酸付加がEGFレセプターの活性化を抑制するという話、Azido-sugarを標識試薬として用いる新規合成シアル酸付加糖のシナプス局在のイメージングの話等多岐にわたる応用例が話された。FRET-based method for protein-specific-glycan imagingの話では β 2インテグリンの活性化にシアル酸付加が重要という話をしていて。

Dr. Nico Callewaert — 酵母をB-cell化する話で、ここ10年で産生系を最適化した結果、産物には酵母型の糖鎖はなく、人のIgGと同じ(かつコアフコースのない)糖鎖をもつことを質量分析で示していた。Man-6-Pを持つリソソーム酵素の産生をMNN4酵素を利用して酵母で行い、リソソーム病患者の治療に用いるという応用例の話もあった。現在治療に用いられているものは5%以下しか修飾されておらず、80%は肝臓に行き効率が非常に悪いが、酵母で作ったdrug 17は取り込み効率が良さそうだ。また293細胞でEndo T(Fungi産生)を缺として用いて糖鎖を改変して多様性のない糖を持つタンパク質の産生系を作成し、hGM-CSFの産生に応用していた。糖鎖がタンパク質のフォールディングに必要なければ大腸菌で、糖鎖がそのタンパクの生理作用に必要なければこの技術で複雑さをなくしたものを産生することを提案していた。

Dr. Wong — 糖脂質上の SSEA-3は乳癌、乳癌stem細胞で癌に重要な糖鎖エピトープであり、 β 3GalT5酵素はSSEA-3,-4, GloboHの発現に重要である。乳癌患者の70%以上にglobo Hが、98%にGb5, GloboH, SSEA-4のうちいずれか一つかそれ以上の糖鎖の発現がみられるらしい。Globo-Hをエピトープとした

ワクチンの治験は phase 3 の段階だそうだ。Dr. Prinetti—GM3合成酵素(SAT-1)が発現するとA2780細胞の運動性が減りfibronectinへの接着が強くなる。外からガングリオシドを加えても同じ効果があり、糖脂質の合成を阻害するD-PDMP処理ではその逆の効果がある。Caveolin-1と糖脂質は同じマイクロドメインに存在し、Caveolin-1のリン酸化が亢進するからだそうだ。ガングリオシド合成抑制による運動性の亢進は、それによる細胞のC-Srcの活性化に起因するという話だった。

Dr. Hanover— O-GlcNAc cyclingはNutrient-driven signalingや核ミトコンドリア相互作用に関係するという。線虫の場合にはHox遺伝子発現に関係し神経保護的に働く。マウスではインシュリン抵抗性に関与し、代謝恒常性の維持に重要な働きをする。O-GlcNAc分解酵素遺伝子のノックアウトマウスの解析からそれが神経産生に重要であることを示していた。遺伝子のプロモーター部位には多くのO-GlcNAcが存在して翻訳の開始に関係し、転写に関連するRNAポリメラーゼ IIのC末端ドメインは高度にO-GlcNAc化されており、この部位のリン酸化の調節にも関与しているという。O-GlcNAc転移酵素(OGT)はミトコンドリアの機能不全にも関係し、OGTの阻害剤の使用は雄の生殖性を阻害するので安易な使用は問題となる可能性があるらしい。

Dr. J.Marth — “分泌タンパクのターンオーバーについて” の講演であった。Asialoglycoprotein receptor(ASGR) 1の欠損でアルカリホスファターゼ(AP)の血中半減期は長くなり、AP糖鎖のシアル酸は減っていた。Aged (血中の滞在の長い) 糖タンパク質を調べると、時間依存的に糖鎖のガラクトース、N-GlcNAcの露出が増えており、血中のシアリダーゼを探したところ、Neu1,3が見

つかった。さらに調べると時間の経過とともに、分泌タンパクのN-glycanのリモデリングが亢進していた。レクチン担体により対象糖タンパク質を濃縮してからレクチンブロッティングをすることで初めて明確にシアル酸欠損糖タンパク質(ASGP)の蓄積をAMR (Ashwell-Morell receptor)欠損患者で証明できたそうだ。また、各種の癌患者で血液中のグリコシダーゼ活性が変化することや、Macrophage Mannose receptorの欠損でその認識糖タンパク質が増えること、糖タンパク質によってAgeingによる糖鎖のリモデリングは変化することなどの話があった。敗血症の肺において血小板の脱シアル酸化が亢進しており、ASGRのノックアウトでは致死率が上昇することから、敗血症への抵抗性にASGRは関与するそうだ。炎症性大腸炎において腸由来のAP活性は、そのシアル酸が減ることによりエンドサイトーシスが亢進し細胞表面への局在が減少する為変化するという話もされていた。

Dr. Taniguchi — ケラタン硫酸(KS)とその誘導体が炎症を抑えるのはLangerinというC-type lectinとの相互作用に関係するという。また、Core fucoseを作る酵素Fut-8をノックアウトすると成長が遅くなり肺気腫を起こすが、その原因としてTGF- β Receptorを介するシグナリングの抑制があるそうだ。慢性閉塞肺疾患(COPD)の病因として好中球やマクロファージの活性化がおきTNF- α , IL-6,-8,ROSの上昇、elastase, cathepsinが上昇する。FUT8(+/-)ヘテロのマウスは(喫煙にセンシティブになり) COPDのモデルマウスになりうることを利用し実験を行ったそうだ。KSの構成2糖としてのL4とそのTrimmerであるTri-L4は炎症を抑え、KSは肺のアピカル表面に発現しており、COPDモデルマウスで減少している。また、6Sが付加した2糖はLangerinがレセプターとなり、

IC50はL4は3.5 mM, Tri-L 4は2.7uMであった。L4はエラスターゼに起因する気道の空隙の増加を抑制し、ステロイドと似たような作用がある。langerinはマンノースと硫酸基に結合するが、ELISAで抑制活性を測定したところガラクトース上の硫酸基が重要であるようだ。なおLangerin陽性の樹状細胞はCOPDで増加しているようだ。

Dr. Nishimura — 主に (CA15-3, KL-6) などのMUC1抗体の話であった。糖ペプチドを合成してライブラリーを作成し解析した所、種々のMUC1抗体は広い結合特異性を持っていたが、KL-6抗体はシアル化したT抗原のみ認識していた。さらに立体構造変化を調べ、糖鎖の付加状態で構造が変化する事を見出していた。大腸がん患者血清からの自己抗体の検索や、MUC4の特異性の高い抗体の作成への応用にもライブラリーを利用していた。(上皮間葉変換) EMTが進むにつれ、コアフコシル化が進むそうだが、このフコシル化を特異的インヒビターで抑制するとEMTが抑制されるようだ。また、未分化型の癌でフコシル化が進んでいるようだ。

Dr. Sackstein—Stem cellによる治療はいかに患部に細胞を到達させるかが重要である。E-selectinは通常は骨髄や皮膚の血管内皮に発現しているが、傷ついた組織において(TNF, IL-1)などのサイトカインで誘導され、発現が増える。E-selectinはsLexを認識するが、CD44がその構造を含むリガンドを持つ。MSC(mesenchymal stem cell)は細胞移動のためのエフェクターを欠いているが、Sialyl-lactosamineに α 1-3FuTを作用させsLex糖鎖を作成することにより、MSCを膀胱にターゲティングし、糖尿病の治療に用いるようだ。

Dr. Zick. — Galectin-8は骨髄細胞の表面に

発現しており、OsteoblastにLANKL発現を誘導する。Galectin-8を加えるとOsteoclastの分化を誘導し、その際ERK signalingが重要だそうだ。Galectin-8のトランスジェニックマウスを作ったら骨が減少したそうだが、その際Osteoblastでの骨の産生自体は上昇していた。RANKLの発現は上昇していて、Osteoclast細胞が増えることによる骨の破壊吸収が骨減少の原因ということだった。

Dr. Spector — 双子のバイオリソースの分析で、遺伝的要素の強い形質とそうでないもの、環境要因に影響受ける形質の分析をした。420の大人の双子のImmunotypeを分析すると70%は遺伝によるものという話だった。また、メタボロームに関するプロジェクトで100以上の新しい因子が見つかったそうだ。10-100兆もの微生物細胞が人体にいて、ほとんどが大腸にいて病気から人間を守る。代謝物は年齢やメタボロームに影響をうけ、体内の200以上のものが微生物由来である。博士は自分の息子にジャンクフードを食べさせ続ける実験を行った結果、腸内の細菌の多様性はジャンクフード食で40%失なわれたそうだ。

Dr.Furukawa — β 1-4GalNAc-Tのノックアウトマウスは複雑な糖脂質を欠いており、生まれたときに大きな異常はないが、神経系に異常がみられ、雄の生殖性に異常がある。GD3 series KOマウスではレプチンの分泌が減っている。糖脂質ノックアウトマウスの場合には機能的補填が働く場合が多く、ダブルノックアウトマウス(GM3 only)にのみ異常が重篤であった。炎症や免疫反応にかかわる遺伝子が上昇し、年齢とともにIL-1 TNF- α などの発現が上昇し、ラフトの異常もみられた。Gb4はMD2分子に特異的に結合してLPSの働きを抑制することにより、LPSによる刺激への抵抗性をもたらすそうだ。動物実験でLPS/GalNAcによるエンドトキシンショック

を半分レスキューしたそうだ。

Dr. Fukuda — フェージライブラリーから選んだIELLQAR(I-peptide) (糖鎖模倣ペプチド)のリセプターとしてpre-mRNA splicing factors, annexin-1(fragment)を見つける。Annexin A1は内皮細胞特異的なtumor markerである。I-peptide関連ライブラリーから見つけたIFLLWQR (より癌指向性が高い、IF7と略) を蛍光ラベルして調べた結果、15分で癌部位に到達するのがわかった。IF7C(RR)-SN38(抗癌剤)を合成し、マウスのしっぽから投与した所、癌を消失させたそうだ。IF7はアネキシンに結合しトランスサイトシスされ、間質に到達するという。Blood-brain-barrierも越えるため脳腫瘍 (B16-luc tumors) も抑制されたそうだ。癌の血管内皮細胞にのみAX1が発現しているので、癌部位に特異的に到達して効果がでるそうだ。

Dr. Alter. — 感染後の血液からIgGを精製し調べた結果、抗原特異的に抗体の糖鎖が変わっていたそうだ。例えばインフルエンザHA蛋白や、HIVウイルス感染などでガラクトース等の糖鎖に変化がおきたという。抗体の糖鎖変化は抗原特異的なB-cellでの翻訳段階でおきているという。地理特異的にも抗体の糖鎖には多様性がみられるそうだ。ワクチンでも抗体の糖鎖をコントロールできる (アジュバンドで変化) そうだ。

Dr. Harrison — CD52は白血球や精子に存在するGPI結合型の糖タンパクであるが、そのリガンドや機能は不明であった。T cellは可溶性CD52と抑制性レセプター Siglec-10との相互作用による調節を受けるが、今回CD52-

Fc体を作成し実験を行った結果、CD52をsialidase, PNGase F処理するとT cell抑制がみられなかったそうだ。CD52は α 2-3-sialyl化されており脱シアル化体を再シアル化すると再び抑制効果を持つ様になる。HMGB1はCD52-Fcに高い親和性もち、CD52-FcによるT cell抑制に必要なだそうだ。CD52-Fcのsiglec-10への結合にHMGB-1は必要で、さらにSHP-1とも会合するらしい。

Dr. Rudd — 乳癌細胞の組織からの遊離の際に α 2-3シアル酸が上昇するという。組織に浸食する場合はMMP-9上のlactosamine にgalectin-3が結合するし、癌細胞上のsLex は免疫細胞を活性化するらしい。また4本鎖糖鎖の形成に寄与するGnTV酵素は 癌の血管新生に関与するそうだ。糖鎖分析の為に自動化装置とデータベースWaters UNIFI 1.7 : UPLC www.glycobase.nibr.ie/を構築したそうだ。具体的な応用例として、糖鎖の根元の α 1-6fucose が癌のPSAで減ることや、IgMのFabの糖鎖 (オリゴマンノース) の分析、4本鎖, sLex糖鎖が乳癌で上昇すること、A3F1G1型の糖鎖が進行乳癌で増えること、乳癌MCF-7細胞の培養上清でNFkBの活性化がおこりIL-1 β が上昇すること等の話があった。

Dr. Kolarich. — FFPE(パラフィン包埋) sampleからMicro laser dissection でサンプルを取得し、PGC(porous graphitized carbon)-nano LC with ESI MS & /MS/MS法で分析していた。Trypsin消化-HILIC--IM(Ion Mobility)-MS analysis を行い、糖ペプチドをfragment levelで分析しシアル酸2-3, 2-6分岐の違いもクロマトグラフィー上で区別できる系を構築したとのことだった。

— 事業概要 —

2015年度活動概要

The Activities of the Institute

常務理事 松田 昭生

Akio MATSUDA

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あるので、公的機関や企業との共同研究も積極的に進めている。

活動の中心である糖鎖研究においては、糖鎖合成、糖鎖分析、各種糖鎖修飾酵素の取得と活用など、これまで培ってきた技術の集大成として、モデル糖タンパク質の糖鎖を人為的に均一改変する技術（糖鎖リモデリング技術）の構築を進めているが、今年度初めて、まとまった成果として形にすることができ、学術誌、学会等で発表した。当面はバイオ医薬品の各種糖鎖構造と活性との関係を明らかにする道具として、医薬品開発に資することを狙う。加えて、まとまった量の均一糖鎖を有する糖たんぱく質を得ることに道筋をつけ

られたことは、それをベースとする応用展開や解析に新たな道を開くものである。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や糖構造を有する生理活性物質の探索研究にも継続して力を入れており、今年度は東京都健康長寿医療センターと神戸大学を中心とした研究グループによる画期的な成果である、筋ジストロフィーの原因解明研究においてその一翼を担うことができた。

2015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。

研究助成事業は、挑戦的な若手研究者を支援するために野口遵研究助成事業を継続している。本年度は「ライフサイエンス」と「エネルギー・資源・環境」の2課題で募集し、183名の応募の中から13名に助成金を授与した。また、本年度の野口遵賞は2011年度の助成者である関西大学の葛谷明紀氏に贈呈した。受賞講演は「DNAを用いたインテリジェント分子デバイスの開発」であった。

人材の養成については講師派遣、卒業研究生受け入れを継続して実施した。

現在の研究施設は「旧東京第二陸軍造兵廠火薬研究所」の施設の転用が主体である。老朽化が進み、利便性も劣ることから、先端研

究に打ち込む環境として適切ではない。懸案であった新研究棟の建設を平成27年8月の理事会で決議し、建設を進めている。平成28年9月には、当研究所の借地権・借家権との等価交換により、旭化成不動産レジデンス株式会社から完成した新研究棟を取得し、新しい研究棟での研究がスタートする予定である。

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、糖鎖の構造と機能の相関解明や、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実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。糖鎖に関しては混合物間での比較ではあるが、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。

そこで先ず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の抗体医薬トラスツズマブを例として確立し、これらの成果をBioTech2015,第34回日本糖質学会年会等にて発表、PLOS ONE誌に報告した。

さらに現在までに、コアフコース有する均一な糖鎖を持つ糖タンパク質の調製技術に関してもほぼ目途をつけ、コアフコース含有抗体のADCC活性は糖鎖の種類によらず痕跡程度である事等を明らかにした。

今後、外部の研究機関と連携し、リモデリングした種々の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。さらにこれらの技術を推し進める為の道具としての酵素・ドナーのラインアップを拡充するとともに他の糖タンパク質への応用展開を考えていく。

一方、鹿児島大の丸山教授らにより澱粉の酵素分解物である単糖1,5AF (1,5-Anhydro-D-fructose) がin vitroで様々な刺激による炎症惹起経路として知られるインフラマソーム活性化経路を阻害する事が示され、更には未

だ高用量ではあるが敗血症のマウスモデルで効果を示す事が見出された。

そこで我々は、本単糖の敗血症治療薬候補としてのポテンシャルを見極めるべく各種1,5AF誘導体の合成及び評価を鹿児島大と共同で数年前から実施する事とした。研究室横断的プロジェクト（APプロジェクト）を立ち上げ、評価系の整備、新規誘導体合成に取り組んできており、いくつかの高活性化化合物の取得に成功している。

今後も、評価系を整備すると共に高活性誘導体の探索研究を実施し、新薬候補としてのポテンシャルを見極めていく。

糖鎖有機化学研究室

糖・複合糖質・糖タンパク質合成に向けた、有機合成・酵素合成の要素技術研究を行っている。

(2015年度の年初計画)

- ①HGPプロジェクトにおいて糖供与体（ドナー）の合成を行う。
- ②生化学的知見に有用な糖質誘導体の合成を行う。
- ③Acid-labileな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。
- ④糖鎖技術の普及に向けて、分野の異なる研究者を含め糖質研究をサポートする「糖質科学支援システム」“グライコナビTM”の開発を行う。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)

- ①糖鎖オキサゾリンドナーの合成を行った。今期は糖鎖オキサゾリンドナー前駆体であるG2-OH、G1a-OH、G1b-OH、G0-OH、M3-OHのSGPからの効率的な合成法の開

発に成功した。また、G1a-OH、及びG1b-OHの化学合成にも成功した。

- ② α -ジストログリカン糖鎖の生合成経路において、その機能が未だ明らかにされていない2つの酵素（FKRPとFKTN）の基質と推測されるCDP-ribitolの化学合成を行った。本基質の利用により、これまで未解明であった α -ジストログリカン糖鎖の構造、及び生合成経路を明らかにすることができた。

また、APプロジェクトにおいてインフラマソームを阻害する高活性物質のとして1,5-AF、及び3-deoxy-1,5-AFの合成を行った。

- ③水酸基の保護基としてBoc基を用いることで、Fuc-GlcNAc含有糖ペプチドのBuilding BlockであるFmoc-Asn (Fuc · 1-6GlcNAc) を容易に合成できるようになった。

- ④糖鎖技術の普及に向けて糖鎖合成、糖鎖-タンパク相互作用、慣用名の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”の開発及び科研費（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。

また、糖鎖研究において遺伝子やタンパク質のようなりポジトリの構築や統合化の必要性が高まっている。そこで昨年度に引き続き、JST・ライフサイエンスデータベース統合推進事業における課題「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」を産総研、創価大、立命館大、新潟大とともに実施し、国際糖鎖構造リポジトリ (GlyTouCan) を開発・公開 (<https://glytoucan.org>) した。さらに糖鎖構造データの標準化を推進し、GlyTouCan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) および糖鎖構造検索システム

などの開発を実施した。

- ⑤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。今期は生体蓄積性の低いC4フルオロアルキル (tert-C4F9) 基を骨格とするヘビーフルオラスタグを合成し、そのフルオラス性について検討を行い、本ヘビーフルオラスタグがフルオラス糖鎖合成法に有用であることが示唆された。

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。

(2015年度の年初計画)

- ①抗LDN抗体を取得し、ELISA系を立ち上げ、LDN糖鎖含有PSAの診断マーカーとしての有用性を検証する。
- ②LDN糖鎖による乳癌進行抑制メカニズムを解析する。
- ③GalNAc-DSLc4及びその合成酵素と腎癌悪性化との関連を解明する。
- ④HGPプロジェクトにおいてHGP調製法の最適化を行う。また、取得したHGPの生物活性評価系を立ち上げ、糖鎖構造と生物機能の相関を解明する。

(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のグレーゾーンの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、新たな前立腺癌診断マーカーとしてのLDN-PSAの有用性を検証する事を目指している。先ずKLH-LDN、BSA-LDNを抗原として抗LDN抗体の取得を試みた。しかしながら、それぞれのコンジュゲートに反応する抗体は取得されるものの、当該糖鎖を特異的に認識する抗体は見いだせなかった。今後、抗原を変え新たな戦略で抗LDN抗体取得にチャレンジする事を計画している。

一方、乳癌では癌の悪性化に伴いLDN含有量の減少がみられる。そこで、LDN生合成酵素の β 4-N-acetylgalactosaminyltransferase4 (β 4GalNAcT4) 遺伝子高発現乳癌細胞株を用いた癌の悪性形質に関する各種解析を行い、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。このことから、乳癌細胞におけるLDN糖鎖のがん抑制作用が示唆された。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、プロテオミクス解析を実施し、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候補を同定した。今後、がん抑制作用との関連を解析する。また、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する事、
- 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。

また、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から、悪性形質獲得にGalNAc-DSLc4の増加は必須であることが分かった。今年度は、5種類の腎癌細胞株を用い、GalNAc-DSLc4発現腎癌細胞株ではRM2抗体の添加により増殖能が抑制される事を確認した。さらに、RM2抗体の添加により浸潤能が抑制されるかどうかの検証実験を開始した。

HGPプロジェクトにおいて、昨年度まで共同研究先 (慶応大、高柳先生) に測定依頼していたターゲット細胞にSKBR-3を利用したトラスツズマブのADCC活性測定の条件を確立した。また、エンド-N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase, EndoS) の固定化酵素を作成し使用する事によって、糖鎖改変抗体の作成時に混入してくるEndoSの余計な加水分解反応を防ぐ事に成功した。

昨年度は、カイコ絹糸腺より産生されたトラスツズマブを出発原料として糖鎖改変トラスツズマブを調製していたが、今年度はチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞から産生されたトラスツズマブを出発原料として糖鎖改変トラスツズマブの調製を行った。CHO細胞より産生されたトラスツズマブのN

結合型糖鎖は、コア構造の還元末端側に存在するN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の6位にフコースが結合した構造 (コアフコース) が大部分を占める (約85%)。当該トラスツズマブに対してENGase (固定化endoSとendoD) の加水分解活性を利用して、既存の糖鎖をGlcNAcもしくはGlcNAc α 1-6Fucに変換し、グリコシルアクセプターの調製を行った。調製したアクセプターに対してA2、G2、G1a、G1b、G0およびM3の6種類の糖鎖オキサゾリン体をENGaseの変異体 (endoS-D233Q) の糖転移活性を利用して各種糖鎖を付加させた糖鎖改変トラスツズマブを調製した。その後、コアフコースの含量を高める為に、基質特異性の高いENGaseであるendoM、endoCCを用いて、糖鎖のトリミングを行った後に陽イオン交換カラムによる精製を行い、純度の高い (約95%以上) コアフコース含有A2、G2、G1a、G1b、G0およびM3の糖鎖改変トラスツズマブを調製した。

ENGaseによるアクセプター調製前後、糖鎖転移反応後、トリミング前後、並びに精製前後の抗体をトリプシンによる断片化後に安定同位体標識を行い、2試料間のペプチドと糖ペプチドのLC-ESI-MSを用いた定量的解析を行い、抗体の糖鎖構造の純度を求める手法を開発した。

その結果、1%オーダーで抗体の糖鎖純度を求める事が出来、より純度の高い糖鎖改変抗体の調製法の開発に繋がった。また、Fc γ RIIIa-V158と抗体の相互作用を昨年度行ったEIAを用いたマイクロプレート法ではなく、BIACOREを用いた結合活性試験で測定できる方法を確立した。これにより、抗体の糖鎖のコアフコースの有無により結合活性 (特に結合速度・解離速度) に差が出る事が分かった。

APプロジェクトにおいては、これまでにヒト単球系細胞THP-1株を用いたインフラマソーム (NLRP3, AIM2系) の評価系を構築

し、1,5AF並びに1,5AF各種誘導体による当該経路の阻害活性を測定した。また、鹿児島大と共同でマウス敗血症モデル評価系の検討を実施した。

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。

(2015年度年初計画)

- ①新規材料による簡便で再現性のよいMS測定方法を開発する。
- ②LC-MS/MSによるPSA糖ペプチドの定量法の開発および前立腺がんとグリコフォームの相関を解析する。
- ③HGPプロジェクトで合成した糖タンパク質の構造を明らかにし、反応条件の検討や品質の管理へ応用する。
- ④バイオ医薬品や細胞由来糖タンパク質のグリコフォームを解析し、より高い機能を有するグリコフォームをデザイン・創製する。

(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

ン化を検討している。窒素レーザーを吸収するトリフェニルアミンを骨格に有するメソポーラス有機シリカ薄膜がメチルアクリドン標識糖鎖をイオン化する結果が得られたため、細孔径や膜厚がMSシグナルに与える影響を調べている。

今年度は、薄膜の発光スペクトルの測定が可能になったので、薄膜の評価やMSシグナル強度との相関を調べている。LC-MS/MS (MRM) 測定により、PSAグリコフォーム解析を行う条件検討を進めている。LC-MS/MS (MRM) 測定については、10種のPSA糖ペプチドの定量方法を作成した。生体試料解析では、精製過程が必要であるので、その条件検討および内部標準物質の調製を検討している。

生物学活性やバイオマーカーで重要な働きをするシアル酸結合糖鎖の結合異性体のMALDI-MS_nによる詳細な構造解析を目指して修飾方法および解析方法を開発している。2本鎖複合型糖鎖においてSiaa2-3GalおよびSiaa2-6Galをそれぞれ有する異性体の識別や構造同定を行った。より複雑な分岐構造への応用を進めている。

HGPプロジェクトにおいて、糖転移活性が高く、かつ残存水解活性が抑制されたEndoS2変異体として、D182Q変異体を見出した。本変異体とEndoS D233Q変異体を比較したところ、ドナー基質の種類によらず、EndoS2 D182Q変異体のほうが高い糖転移活性を示した（特許出願済み、学会発表）。引き続きEndoS2 D182Q以外の変異体を作成し糖転移活性を調べている。EndoS2変異体がハイマンノース型糖鎖を抗体に転移できることを確認した。また、新規ENGaseとして、担子菌Laccaria amethystinaの酵素遺伝子を人工遺伝子合成し、大腸菌で発現させ、その酵素活性を検出した。今後は本酵素の大量調製と酵素学的諸性質の検討を予定している。APプロジェクトにおいては、これまでにマ

ウスプライマリー細胞を用いたインフラマソーム (NLRP3, AIM2系) の評価系を構築し、1,5AF並びに1,5AF各種誘導体による当該経路の阻害活性を測定した。

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。

(2015年度の年初計画)

- ①合成した均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質の物性・機能を調べる。
- ②本プロジェクトから得られた知見・技術を公開し、均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質の有用性の範囲を広げる (ターゲット糖タンパク質を増やす並びに共同研究の推進)。
- ③大量調製に向けての酵素・ドナー作成と基盤技術の確立。より複雑な糖鎖改変技術の確立の為の新規酵素の探索並びに新規ドナーの作成を行う。

(今期の成果)

均一糖鎖を持つ改変トラスツズマブ12種の調製を行った。先ずSGPを原料として酸、各種酵素を組み合わせる事により効率の良いドナー調製法を確立し、本法を用いて各種ドナー糖鎖 (A2,G2,G1a,G1b,G0,M3) をそれぞれ調製した。アクセプターはカイコ中部絹糸腺から産生したトラスツズマブ (コアフコース含まず)、あるいはCHOから製造されたトラスツズマブ (コアフコース85%程度) を用いて、各種ENGaseを組み合わせで調製。このドナーとしての均一糖鎖をアクセプターに改変型ENGaseにより転移し、イオン交換による精製、あるいはENGase処理後に同クロマトを用いた精製を行い、糖鎖としての均一性は95%以上の均一糖鎖を持つ改変トラスツズマブ (A2F,A2,G2F,G2,G1aF,G1a,G1bF,

G1b,G0F,G0,M3F,M3) を調製した。Fc γ R IIIa-V158に対する結合実験、ADCC活性も測定した。

その結果、コアフコースが含まれるとFc γ R IIIa-V158に対する結合が10 μ g/mlでも見られず、ADCC活性も糖鎖を含まないトラスツズマブ程度に低下した。これらの成果をBioTech2015,第34回日本糖質学会年会、BMB2015,2016年度農芸化学会大会等にて、発表、PLOS ONEに論文が掲載された。コアフコースの有無に関わらず、種々の均一糖鎖構造を持つ抗体医薬トラスツズマブの調製に成功した。

APプロジェクト

研究室横断的に力を結集し、1,5AF並びにその各種1,5AF誘導体の敗血症治療薬候補としてのポテンシャルを見極める事を目指す。

(これまでの成果)

- 1) インフラマソーム (NLRP3) 阻害活性を評価すべくマウス骨髄由来マクロファージ、ヒト単球様細胞株THP-1を用いたin vitroの細胞アッセイ系を構築し、1,5AFの阻害活性を確認した。
- 2) 各種誘導体を合成し、上記 in vitroアッセイ系で評価したところ、1,5AFの少なくとも1000倍以上の阻害活性を示す新規化合物を見出す事に成功した。
- 3) DNAセンサーであるAIM2インフラマソーム活性化阻害をモニターする系を構築し、化合物を評価した結果、ヒト細胞系ではNLRP3の系阻害と同程度の濃度で阻害する事が確認された。一方マウスの系ではNLRP3阻害濃度との間に大きな乖離が認められた。
- 4) 各種生化学的解析の結果、1,5AF及びその誘導体は、成熟型カスパーゼの活性は阻害せず、IL-1 β の成熟化、成熟型カスパーゼ1の産生、ASCの多量体化を抑制

する事を明らかにした。

- 5) LPS投与敗血症モデルでの評価条件をほぼ確立。今後化合物評価を実施する。

1-2 触媒研究

ナノ・メソポーラス材料研究室

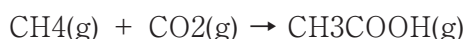
ナノポーラス・メソポーラス及びナノ薄膜・粒子を切り口とした機能性材料の技術開発を行っている。

(2015年度の年初計画)

- ①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行う。
- ②燃料電池用非白金系電極触媒材料の研究を引き続き実施する。白金系触媒と同等以上の活触媒性発現を目指して新規触媒材料の探索研究を実施する。

(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進めた。



反応平衡（酢酸の平衡収率は、 1×10^{-8} %のオーダー）を克服するために、触媒の存在下に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、及び水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、触媒の研究を進めた。

その結果、文献で酢酸の生成が報告されているCo-Pd/TiO₂触媒（酢酸収率4.4 × 10⁻⁶%）よりも高い酢酸収率が得られる新規触媒を幾つか見いだした。しかしながら、メタンに替えて窒素を反応系に供給しても酢酸が生成することが判明し、酢酸は、二酸化炭素と水素のみから生成していることが明らか

になった。

二酸化炭素を原料として化学品を製造するプロセスを開発することは、未利用安価原料である二酸化炭素の工業原料としての道を開く可能性があり、大きな意義があると考え、この反応について更に研究を進めた。その結果、ある種の触媒では、酢酸とは別の生成物が酢酸よりも多く生成することを見出した。特に金属担持触媒の金属の分散性を高めた新規触媒を用いるとこの生成物の収率が高くなった。

しかし、現状の収率としては、二酸化炭素基準で 1×10^{-3} %のオーダーであるので、今後更に触媒探索、反応条件探索などを進めて行く予定である。新規触媒材料の探索研究で、触媒活性を向上させることを目的として、MOF触媒の活性中心の検討や、新規MOF触媒の検討及び、MOFと金属ナノ粒子との複合化の検討を行った。その結果いくつかの系で触媒活性が向上することが明らかとなった。

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。

(2015年度の年初計画)

- ①酵素のフルオラス化による固定化研究は、繰り返し時の酵素活性低下を抑制しきれなかったことから中止する。
- ②燃料電池用膜原料モノマーの、新規合成プロセスの研究開発を開始する。

(今期の成果)

燃料電池用膜原料モノマーの新規合成プロセスとしてまず着手したのは、安価な炭化水素系材料で基本骨格を構築し、電解フッ素化（ECF、外部委託前提）によりモノマー前駆体を合成するというものである。新規化合物を経由し、わずか2ステップでECF原料を好

収率で合成できたが、原料の反応性、予想生成物の物性面でリスクが大きすぎる事が判明し、本ルートは断念した。

次に着手したのは、O-アルキル化によるエーテル合成で基本骨格を形成する方法である。しかしこの方法の場合、類似の反応例では目的と異なる反応が主として進行することが報告されていたことから、まずは化学計算により反応の妥当性を検証することにした。その結果、予定した合成ルートでは、副反応より目的反応が優先することが予測された。しかしながら、その活性化エネルギーは極めて高く、少なくとも何らかの触媒が必要であろうという結果であった。現在、触媒探索を前提に、モデル化合物を用いた合成に着手したところである。

1-3 その他

当研究所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。ルオラス科学は化学合成の精製工程を短縮でき、例えば糖鎖の効率的合成にも有用な化学合成手法である。当研究所は糖鎖研究を行う中でフルオラス科学の有用性に注目し当分野の研究を継続してきた。外部との連携の一環として2002年に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毎年開催してきた。

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。フルオラス科学研究会発足以来、当研究所はフルオラス科学研究会シンポジウムの開催や、フルオラス科学研究会の活性化を支援している。

2015年度は、フルオラス科学研究会第8回シンポジウムを静岡県立大学轟木堅一郎准教授にご尽力いただき、10月2日清水テルサにて開催した。(別添資料1)

1-4 大学等公的機関及び企業との共同研究 (競争的委託研究事業)

- ・科学技術振興機構 (J S T) 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
- ・株式会社免疫生物研究所
- ・大阪府立病院機構 (井上正宏部長)
- ・東北大学未来科学技術共同研究センター (宮本明教授)
- ・東北薬科大学分子生体膜研究所 (井ノ口仁一教授)
- ・東京大学大学院新領域創成科学研究科 (菅野純夫教授・植田幸嗣准教授)
- ・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
- ・創価大学工学部 (木下聖子教授)
- ・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
- ・理化学研究所 (山口芳樹チームリーダー)
- ・慶応義塾大学医学部遺伝子医学研究室 (工藤純教授)
- ・工学院大学工学部環境エネルギー化学科 (高羽洋充教授)
- ・ライフィックス社

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、ライフサイエンス及びエネルギー・資源・環境の2分野で募集し、2015年度は183件の応募の中から13件に第7回助成金を贈呈した。(詳細は80頁)

本助成金の採択者は7年間で延べ98人となった。過去の採択者のその後の調査では、職位の上がった研究者、各種の賞の受賞者も多くみられ若手研究者の研究を助成するという本助成金の趣旨にそった成果が得られつつある。

2016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。2015年度は2011年度、2012年度の採択者27名の中から関西大学の葛谷明紀氏に「第2回野口遵賞」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。2015年度は学部学生並びに大学院生をそれぞれ1名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6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 8件 (うち共同出願 4件)
- ・特許公開 2件 (うち共同出願 0件)
- ・審査請求 5件 (うち共同出願 1件)
- ・特許登録 6件 (うち共同出願 3件)
- ・PCT出願 1件 (うち共同出願 0件)
- ・外国特許出願 1件 (うち共同出願 1件)
- ・PCT公開 0件 (うち共同出願 0件)
- ・外国特許公開 1件 (うち共同出願 1件)
- ・外国特許登録 0件 (うち共同出願 0件)

(2) 学会発表 41件 (うち国際学会 12件)

(3) 誌上発表 4件

(4) 講演 5件

【別添資料1】

フルオラス科学研究会第8回シンポジウムプログラム

2015年10月2日 (金)

清水テルサ 7F 会議室 〒424-0823 静岡県静岡市清水区島崎町223

10:00-10:05 会長挨拶

10:05-10:55 特別講演 1

「フルオラス分子の疎水性制御に立脚した実用的分子合成手法の開発
～ミディアムフルオラスケミストリー～」

(名城大農) 松儀 真人

10:55-11:10 口頭発表

O-1 「Effect of chain length on cellular uptake and release of perfluorocarboxylic acids」

(東大生産研) ○粕谷マリアカルメリタ、畑中 研一

11:15-11:30 口頭発表

O-2 (静岡県大薬) ○江上 寛通、井出 貴文、川戸 勇士、濱島 義隆

- 11:30-11:45 口頭発表
O-3 「アミド脱水縮合反応に有効なフッ素含有フェニルボロン酸触媒
：新たな展開へ」
(名大院工) ○石原 一彰、魯 彦会
- 13:10-13:25 口頭発表
O-4 「FFハイブリッドプローブを用いた遺伝子発現の網羅的解析」
(静岡県大薬1、産総研バイオメディカル2)
○轟木 堅一郎1、宮内 千恵美1、富田 辰之介2、関 俊哲1、井之上 浩一1、
豊岡 利正1
- 13:25-14:15 特別講演2
「新しい有機酸触媒の開発：有機フッ素化学からのアプローチ」
(東京薬大薬) 矢内 光
- 14:20-14:35 口頭発表
O-5 「フルオラス固相抽出法を用いた代謝産物の迅速解析を指向した
フルオラス標識セラミドの合成」
(北大院生命科学)○齊藤 翔太、吉田 昌史、Mostafa A.S. Hammam、光武 進、
五十嵐 靖之、臼杵 靖剛、村井 勇太、門出 健次
- 14:35-15:25 特別講演3
「精密ラジカル重合によるフルオラス高分子：設計・合成・機能」
(京大院工) 澤本 光男
- 15:50-17:20 ポスター発表
P-01 フルオラス・タグを用いたシアリル化反応の応用研究
(広島国際大薬) ○池田 潔、松本 莉穂、谷本 崇光、年光 優、川端 亜美、
寺岡文照、大坪 忠宗
P-02 ルオラス溶媒中での初代神経細胞の培養
(東大生産研) ○宮島 浩樹、粕谷 マリアカルメリタ、池内 与志穂、
畑中 研一
P-03 新規フルオラス有機分子触媒を用いた不斉Michael付加反応
(東京薬大薬) ○成島 岳史、平島 真一、中島 康介、古石 裕治、三浦 剛
P-04 ヨードイリド型試薬を用いたトリフルオロメチルチオ化合物の合成研究
(名工大院工) ○高田 大裕、有森 貞幸、柴田 哲男
P-05 ペリフルオロエトキシフタロシアニンを用いたクロロホルムの識別
(名工大院工1、藤田保大医療2) ○徳永 恵津子1、森 悟1、小川 直也1、
秋山 秀彦2、柴田 哲男1
P-06 スチレン類の α -ケトートリフルオロメチル化反応
(岐阜薬大) 上戸 祐二、山口 英二、多田 教浩、○伊藤 彰近
P-07 パーフルオロアルキル基とアルキル基を有する低分子量キラルゲル化剤の
合成と物性評価
(お茶の水女子大院1、愛媛大院2、東邦大院3) ○近藤 瑛里1、佐藤 久子2、

- 山岸 皓彦³、佐々木 美香²¹、矢島 知子¹
- P-08 臭化ペルフルオロアルキルをラジカル前駆体とする
有機触媒的光ラジカル反応の開発
(お茶の水女子大) 矢島 知子、○重永 皇月、池上 真子、野上 栄美子
- P-09 フェイズ・バニシング法を利用したチタニウムエノラートによる
 α, β -不飽和アルデヒドの合成
(阪府大院理) ○足達裕介、松原 浩
- P-10 ガス透過性のPTFE 膜による反応性ガスのその場発生
(阪府大院理) ○隅野 修平、福山 高英、柳 日馨
- P-11 フルオラス保護基 (FBoc基) を用いたアルギニン残基のラクタム化の抑制
(東海大工) ○赤司 里奈、稲津 敏行
- P-12 フッ化水素酸溶液からのフルオラス金属抽出
(東海大工) ○中川 洸希、稲津 敏行
- P-13 新規光学分離デバイス “Dress-up キラルカラム” の開発
(静岡県大薬) ○轟木 堅一郎、石井 裕大、井出貴文、関 俊哲、井之上 浩一、
濱島 義隆、豊岡 利正
- P-14 パーフルオロアルキルイミノ二酢酸試薬によるリン酸化ペプチドの選択的
抽出とプロテインキナーゼ活性測定への応用
(福岡大薬) 長野元貴、○巴山 忠、川見祐介、糸山美紀、吉田秀幸、能田 均、
山口政俊
- P-15 ヘビーフルオラストグとF-LLE法を用いた糖質合成
(野口研1、千葉大院融合科学2) ○水野真盛¹、後藤浩太郎¹、川上宏子¹、
中野貴志¹、福田和男^{1, 2}、土肥博史²、西田芳弘²、松田昭生¹

【別添資料2】

(1) 学生の受け入れ

東海大学から卒業研究生および修士論文研究生を各1名受け入れ、下記のテーマにより研究を行った。

卒業研究

- ①短鎖パーフルオロアルキル基で構成されるヘビーフルオラストグの合成とその応用

修士論文研究

- ①脱保護が容易な水酸基保護基を用いた糖ペプチド合成

(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、黒河内政樹、大隅賢二、山田一作、菅原州一、後藤浩太郎

【別添資料3】

1. 学会発表 41件 (うち国際学会 12件)

NIF FDA Glycosciences Research Day (2015.6.28)	1件
63nd ASMS Conference on Mass Spectrometry (2015.5.31-6.4)	1件
第63回質量分析総合討論会 (2015.6.17-19)	2件
BEILSTEIN GLYCO-BIOINFORMATICS SYMPOSIUM 2015 (2015.6.22-26)	1件
第34回日本糖質学会年会 (2015.7.31-8.2)	17件
ISoFT 2015 (2015.8.23-28)	1件
第9回東北糖鎖研究会 (2015.9.4)	1件
23rd International Symposium on Glycoconjugates (2015.9.15-20)	3件
第4回日墺合同セミナー (2015.9.15)	1件
フルオラス科学研究会第8回シンポジウム (2015.10.2)	1件
トーゴーの日シンポジウム 2015 (2015.10.5-6)	4件
BMB2015 (88生化学会38分子生物学会) (2015.12.1-4)	2件
Society for Glycobiology 2015 (2015.12.1-4)	3件
The 251st ACS National Meeting (2016.3.13-17)	1件
日本農芸化学会2016年度大会 (2016.3.27-30)	2件

2. 誌上発表 4件

Expression of mucin 1 possessing a 3' -sulfated core1 in recurrent and metastatic breast cancer

Hiroko Ideo, Yuji Hinoda, Kohei Sakai, Ikue Hoshi, Shigeru Yamamoto, Masaaki Oka, Kazunari Maeda, Noriko Maeda, Shoichi Hazama, Junko Amano, Katsuko Yamashita
International Journal of Cancer 2015,137(7) 1652-1660

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

Masaki Kurogochi, Masako Mori, Kenji Osumi, Mami Tojino, Shu-ichi Sugawara, Shou Takashima, Yuriko Hirose, Wataru Tsukimura, Mamoru Mizuno, Junko Amano, Akio Matsuda, Masahiro Tomita, Atsushi Takayanagi, Shin-Ichiro Shoda, Takashi Shirai
journal.pone.0132848 DOI: 10.1371 Published: July 22, 2015

GlyTouCan 1.0 - The international glycan structure repository.

Aoki-Kinoshita K, Agravat S, Aoki NP, Arpinar S, Cummings RD, Fujita A, Fujita N, Hart GM, Haslam SM, Kawasaki T, Matsubara M, Moreman KW, Okuda S, Pierce M, Ranzinger R, Shikanai T, Shinmachi D, Solovieva E, Suzuki Y, Tsuchiya S, Yamada I, York WS, Zaia J, Narimatsu H.
Nucleic Acids Res. 2016, 44(D1) D1237-42. doi:10.1093/nar/gkv1041. Epub 2015 Oct 17.

Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy.

Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Manya H, Kuga A, Yamaguchi Y,
Akasaka-Manya K, Furukawa J, Mizuno M, Kawakami H, Shinohara Y, Wada Y,
Endo T, Toda T.

Cell Rep.2016 Mar 8;14(9):2209-23.doi:10.1016/j.celrep.2016.02.017.Epub 2016 Feb 25.

3. 講演

Biotech2015 (2015.5.13)

「均一糖鎖構造を持つ糖タンパク質合成法の開発—トラスツズマブを例として」 白井 孝

日本バイオインフォマティクス学会2015年会 (2015.10.5～6)

「糖鎖研究における質量分析」

山田 一作

「糖鎖インフォマティクスの世界へようこそ」

第152回質量分析関西談話会

「質量分析計を用いた糖ペプチドの定量的解析の利用法」

黒河内 政樹

2016年度日本農芸化学会シンポジウム (2016.3.27)

「エンドグリコシダーゼによる糖鎖改変技術開発とそのバイオ医薬品トラスツズマブへの
応用」

白井 孝

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

当研究所は、創立当初の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月にこの板橋区加賀に移転し研究活動を行っている。70年近い使用の中で建物の一部は老朽化が激しく使用に耐えず、利便性も十分と言えないため、旧敷地の一部に新しい研究環境整備のために新研究棟を建設中、今年8月末に完成し9月に引越しを行う。

新研究棟の概要

建物構造：ALC鉄骨造りの地上4階建

最高高さ：18.60m

敷地面積：2145.07㎡

建築面積：851.45㎡

延べ面積：2760.91㎡

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9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
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	
	川崎 俊之	木庭 竜一	
	木幡 陽	中尾 正文	
	畑中 研一	廣瀬 弘明	
	堀 一良	山岸 秀之	
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28年8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8月末日現在の職員の在籍者は34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98件、商標権は4件である（平成28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
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
錦戸 條 二	ルイス酸触媒	4081269	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
川上 宏 子 戸 潤 一 孔	高分子化するゲル化剤	4141772	2008.06.20
稲津 敏 行 山ノ井 孝	グリコシド誘導体の製造法	4162739	2008.08.01
川上 宏 子 戸 潤 一 孔	ビオチン脂質	4162904	2008.08.01
山ノ井 孝 喜 小田 慶	C, C-グリコピラノシル化合物とその製造法	4212087	2008.11.07
柳 日 馨 松原 浩 杉山 弘 幸	フルオラス性を利用した回収容易なアミン類	4224315	2008.11.28
小松 民 邦	排ガス浄化用ハニカム触媒	4233572	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
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 枝 米 谷 芳 枝	オリゴアルギニン脂質	4456438	2010.02.22
水 野 真 盛 後 藤 浩 太 朗	高度にフッ素化されたアルコールおよびその製造方法と中間体	4485459	2010.04.02
佐 藤 玲 子 川 上 宏 子 戸 潤 一 孔	生体適合性付与剤	4526832	2010.06.11
三 浦 剛 稲 津 敏 行 森 裕 志 横 山 慎 一 郎 梶 本 哲 也	ベロ毒素中和剤としてのスフィンゴ糖脂質類似体	4639055	2010.12.03
古 谷 方 彦 福 岡 陽 平 福 沢 章 吾	シクロオレフィンの製造方法	4641615	2010.12.10
佐 藤 玲 子 戸 潤 一 孔	硫酸糖ライブラリー	4675048	2011.02.04
小 松 民 邦 友 国 敬 三	NO _x 浄化用触媒の担体	4749093	2011.05.27
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むピロリ菌増殖抑制剤	4811953	2011.09.02

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
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
小 松 民 邦	新規排ガス浄化方法	4895858	2012.01.06
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
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
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
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
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
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
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
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
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
小松民邦	燃料電池用電極および燃料電池	5219384	2013.03.15
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
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
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
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
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
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

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
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
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
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
高木陸 戸潤一	軟骨細胞培養基材及び培養方法	5721319	2015.04.03
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	2015.04.24
小西満月男 友国敬三	ロジウム及び金を含む担持触媒	5758228	2015.06.12
菅原州一 大隅賢二	糖ペプチド誘導体及びその製造方法	5813294	2015.10.02
西風隆司 天野純子	質量分析法用測定試料及びその調製方法	5837273	2015.11.13
藤田雅也 土田明子 正田晋一郎 田中知成	N-アセチルグルコサミンが α で結合した糖誘導体の調製方法	5892750	2016.03.04
藤田雅也 土田明子 森昌子	糖質関連酵素の改良法	5917913	2016.04.15
藤田雅也 土田明子 芦田久	消化管ムチンの糖鎖に特異的に結合するポリペプチド	5951199	2016.06.17

＜以下、外国特許＞

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
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
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	質量分析法	US 7951603 (米国)	2011.05.31
天野純子 平野清子 杉本一路	前立腺癌と良性前立腺肥大症とを識別する方法	US 8030085 (米国)	2011.10.04
天野純子 平野清子 杉本一路	前立腺癌と良性前立腺肥大症とを識別する方法	EP 2161571 (英、独、仏)	2012.06.20
中山淳 山ノ井孝 藤田雅也 白井孝	α -N-アセチルグルコサミニル結合単糖誘導体を含むピロリ菌増殖抑制剤	EP 2098238 (英、独、仏)	2012.10.17
平野清子 中村紀夫 天野純子	前立腺癌の判定方法	EP 2354790 (英、独、仏)	2013.07.17
中山淳 山ノ井孝 藤田雅也 白井孝	α -N-アセチルグルコサミニル結合単糖誘導体を含むピロリ菌増殖抑制剤	US 8575117 (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
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
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)	2014.08.19
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	US 8859511 (米国)	2014.10.14

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. 2015年度実施報告

第7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) 2015年度の概要

①応募課題および応募件数

本年度は2課題で2015年9月1日から2ヶ月間募集を受け付け、総計183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	エネルギー・資源・環境の革新に寄与する新プロセスや新材料に関する研究 蓄エネルギー、創エネルギー、電子材料、バイオマス、水処理、グリーンサステイナブルケミストリー（触媒を含む）	97件	7件
合計		183件	13件

②選考委員会

2016年2月5日に当研究所において選考委員会を開催した。選考委員9名が出席し厳正な選考の結果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

2016年3月11日如水会館（千代田区一ツ橋）にて、来賓、選考委員、その他関係者各位で総勢60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
高橋 忠伸	静岡県立大学大学院 薬学研究院 生化学講座 准教授	インフルエンザウイルス酵素の蛍光イメージング剤を利用した画期的診断法の開発
武元 宏泰	東京工業大学 資源化学研究所 助教	がん細胞選択的な薬効の発現をプログラムした siRNA 型制がん剤の開発
田村 篤志	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 助教	アテローム性プラーク微小環境への能動的集積とコレステロール低下を可能とする超分子医薬の開発
相良 剛光	北海道大学 電子科学研究所 助教	微小な力を検知する水溶性メカノプローブの開発と生体材料への応用展開
関谷 毅	大阪大学 産業科学研究所 教授	装着感のないパッチ式血圧センサシートの開発
岩崎 崇	鳥取大学 農学部 生物資源環境学科 助教	ポリヒスチジンを利用した新しいリソソーム酵素補充法の開発基盤研究
杉本 宜昭	東京大学大学院 新領域創成科学研究科 准教授	原子間力顕微鏡を用いた単分子の化学反応のその場観察
邨次 智	名古屋大学大学院 理学研究科 物質理学専攻 助教	有用化学物質の効率的合成を志向した表面モレキュラーインプリンティング触媒の創製と選択的な官能基直接変換
吉田裕安材	信州大学 繊維学部 化学・材料系 助教	可逆的な溶解性と自己修復性を兼ね備えたハイドロゲルの創製
酒田 陽子	金沢大学 理工研究域 物質化学系 助教	異種成分混合系での自己組織化法を用いた新規巨大分子精密集積場の構築
内田 健一	東北大学 金属材料研究所 准教授	磁性多層膜におけるスピン流熱電変換の解明と高効率化
三友 秀之	北海道大学 電子科学研究所 助教	DNA の塩基配列選択的メッキによるプラズモニックメタマテリアルの創製
田中 一生	京都大学大学院 工学研究科 高分子化学専攻 准教授	凝集誘起型発光特性を基盤とした固体りん光発光性高分子の創出

*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・NEDO技術戦略研究センター長
	山本 憲二	石川県立大学教授・京都大学名誉教授
	小宮山 眞	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

【2013年度 (第5回) 野口遵研究助成金 研究成果報告 (要旨)】

氏名	石井 大佑	所属	名古屋工業大学 若手イノベータ養成センター	職名	助教
研究テーマ名	生物の分泌する粘性物質のもつ表面保護効果の解明と酸化防止膜への応用				
本研究では、結晶学的・熱力学的・分光学的解析を用いた内部構造の多角評価法により、Tween20プラズマ重合薄膜のもつ表面保護効果メカニズムと内部高次構造の相関を解明した。その結果、表面からの連続的に形成された重合密度の傾斜構造が、表面保護効果を生み出していた。また、表面保護効果の定量化測定を試み、水蒸気透過量測定では、プラズマ重合薄膜が有る場合は、無い場合の3/4程度に抑制できていることがわかった。					
氏名	中川 聡	所属	北海道大学大学院 水産科学研究所 海洋生物工学分野	職名	准教授
研究テーマ名	海洋性無脊椎動物の免疫因子を利用した微生物細胞分取マイクロ流体デバイスの開発				
本研究の目的は、海洋性無脊椎動物から特定の共生微生物を分取し、その性状を解明することにある。ヒトデ類の体腔液に類稀な系統の微生物群集を発見し、独自のマイクロ流体デバイスを用いて、その細胞を選択的に濃縮することに成功した。しかしながら、実施したメタゲノム解析においては、混入する宿主細胞の影響が極めて大きく、対象微生物の性状解明には至らなかった。引き続き、デバイスの選択特異性の向上等に取り組んでいる。					
氏名	合田 圭介	所属	東京大学大学院 理学系研究科 化学専攻	職名	教授
研究テーマ名	循環がん幹細胞の迅速分離を可能とする超高速イメージ・セルソーターの開発				
As a preliminary study about the isolation of circulating cancer stem cells (CSCs), we engaged in extending the capability of the high-throughput time-stretch imaging technique and developing a morphology-based detection method for cancer cell measurement. Specifically, by integrating a time-stretch microscope with a multi-color fluorescence detector, we realized optofluidic imaging cytometry with single-cell-resolution analysis, which is					

capable of providing both the morphological and chemical information of individual cell at a throughput of 10,000 particles/s and a spatial resolution of 780 nm. Meanwhile, since the morphological features of the cancer cells change after anti-cancer reagent treatment, the imaging cytometry is also applicable of detecting cancer cells in a large heterogeneous population with high throughput and high specificity.

氏名	加藤 竜司	所属	名古屋大学大学院 創薬科学研究科 基盤創薬学専攻	職名	准教授
----	-------	----	--------------------------	----	-----

研究テーマ名	再生医療における革新的細胞品質診断システムCell Catalogue ONLINEプラットフォームの開発
--------	---

本申請は、再生医療用細胞の品質を画像から自動診断するオンラインプラットフォーム技術の開発であった。成果としては、本提案システムのコアとなるアルゴリズム機能が大幅に向上し、同時に本システムの有効性について網羅的遺伝子情報により細胞形態情報が示す細胞活性や状態の変化について裏付けを得ることができた。結果、世界公開には届かなかったが、本技術は産業化支援の大型予算に評価され起業化を目指すことが可能となった。

氏名	高島 義徳	所属	大阪大学大学院 理学研究科 高分子科学専攻	職名	助教
----	-------	----	-----------------------	----	----

研究テーマ名	ホスト-ゲスト相互作用を利用した革新的超分子触媒の創製とその機能評価
--------	------------------------------------

本研究課題では、生体系の触媒反応場を参考にして、ホスト-ゲスト相互作用を利用した超分子触媒の構築を行った。ホスト分子にはシクロデキストリンを用い、環状エステルの重合やラジカル重合を行った。その結果、触媒活性中心近傍にホスト分子を配置させることで反応性が向上されることが明らかと成った。今回の研究結果で超分子触媒の設計が開環重合だけでなく、ラジカル重合においても適用できることが明らかと成った。

氏名	相川 光介	所属	東京工業大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻	職名	助教
----	-------	----	-------------------------	----	----

研究テーマ名	有機フッ素化合物の自在合成を指向した革新的不斉合成法の開発
--------	-------------------------------

有機フッ素化合物、特にフルオロアルキル基を有する化合物群は、医農薬の鍵コンポーネントとして現代の有機合成化学分野では産・学を問わず必要不可欠となっている。本研究では、高効率な新規触媒反応を駆使することで、ファインケミカルズとして付加価値の高い多種多様な光学活性および芳香族有機フッ素化合物を、簡単に、安価に、且つ安全に自在合成できる合成プロセスを開発することに成功した。

氏名	楊井 伸浩	所属	九州大学大学院 工学研究院 応用化学部門	職名	助教
----	-------	----	----------------------	----	----

研究テーマ名	新規なエネルギー移動法に基づく高効率フォトン・アップコンバージョンの実現
--------	--------------------------------------

低エネルギー光を高エネルギー光に変換する技術であるフォトン・アップコンバージョンは、太陽電池や人工光合成などの再生可能エネルギー産出を飛躍的に高効率化するとして期待されています。その実用化に不可欠な太陽光程度の弱い光での効率最大化を、金属錯体骨格中での高速エネルギー拡散により世界で初めて達成しました。また、分子集合構造の精密設計により空気に対する安定性を獲得することにも成功しました。

氏名	吉尾 正史	所属	東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻	職名	准教授
研究テーマ名	プロトン-電子混合伝導性液晶材料の創製				
<p>太陽光エネルギーを利用して水素燃料をつくる革新デバイスの開発を目指して、プロトン-電子混合伝導性液晶材料の創製に関する研究を行った。今までに報告例のないプロトン性塩を超分子組織化したプロトン伝導性液晶材料、プロトン性塩とオリゴチオフェン誘導体からなるプロトン-電子混合伝導性超分子液晶、双性イオン構造を有するイオン伝導性液晶、ジシアノイミダゾール基を有するパイ共役カラムナー液晶の開発に成功した。</p>					
氏名	桑折 道済	所属	千葉大学大学院 工学研究科 共生応用化学専攻	職名	助教
研究テーマ名	省電力型ディスプレイ開発を志向した単色構造発色性材料の創製				
<p>自然界での構造発色の源となるメラニン顆粒の模倣材料として、単分散なポリドーパミン黒色粒子を合成し、それらを用いる角度依存性のない単色構造色材料の作製を行った。構造色の彩度低下の原因となる余分な散乱光を黒色粒子により吸収することで、添加剤無しで鮮やかな単色構造色の発現に成功した。使用する黒色粒子のサイズ、粒子濃度、ならびに配列構造を制御することで構造色の色や質感の制御を達成した。</p>					
氏名	西内 智彦	所属	大阪大学大学院 理学研究科 化学専攻	職名	助教
研究テーマ名	非平面 π 共役系のひずみエネルギーを利用した反芳香環の創出とその機能開拓				
<p>本研究では、非平面π共役系骨格に内在するひずみエネルギーに着目し、通常は折れ曲がり構造を有するシクロオクタテトラエン(COT)を、そのひずみエネルギーを用いて左右から引っ張ることで平面化させ、低いHOMO-LUMOギャップを与えるというコンセプトの元、その鍵化合物となるCOT誘導体の合成検討を行った。様々な検討の結果、未だ目的化合物の合成には至っていないが達成の為の知見を多く得ており、今後はそれらを生かして合成を目指す。</p>					
氏名	坂本 良太	所属	東京大学大学院 理学系研究科 化学専攻	職名	助教
研究テーマ名	エレクトロニクスを志向した「ボトムアップ型」金属錯体ナノシートの創成				
<p>本研究課題では応用展開が可能な「ボトムアップ型」金属錯体ナノシートの開発を目指した。初の有機系二次元トポロジカル絶縁体として機能しうるジチオレン金属錯体ナノシート、光電変換材料として利用可能なジピリン金属錯体ナノシート、エレクトロクロミズムを示し電子ペーパーなどへの応用が期待されるテルピリジン金属錯体ナノシートを開発した。</p>					
氏名	岡崎 竜二	所属	名古屋大学 理学部 物理学科	職名	助教
研究テーマ名	軌道秩序絶縁体における電流による金属化メカニズムの検証				
<p>電流や電場の強さによって電気抵抗が変化する非線形伝導現象の研究では、通電下の自己発熱が実験上の最大の問題点であった。本研究では、赤外分光測定を用いて試料温度を非接触で評価する手法の開発を進め、酸化物絶縁体Ca_2RuO_4に適応したところ、反射スペクトルに含まれるフォノンピークが良い温度指標となり得ることが分かった。本手法は、赤外放射温度計に対して相補的な非接触温度計測手法となりえることが期待できる。</p>					

氏名	西野 智昭	所属	大阪府立大学 21世紀科学研究機構	職名	講師
研究テーマ名	単分子温度計測法の開発とナノスケール熱伝導への展開				
<p>分子探針を用いた単分子の電子移動計測に基づき、単分子尺度におけるセンシング法を開発した。単分子スケール、すなわちサブnmオーダーのごく微小領域の温度を計測できる手法の開発を目的として熱応答性分子探針を開発した。今後は、熱応答性分子探針の評価とともに、単分子スケールにおける温度計測を実証する。また、DNA探針を開発し、DNAの単分子検出、ミスマッチ、さらにメチル化塩基の直接検出法の開発に成功した。</p>					
氏名	姜 舜徹	所属	九州大学 先導物質化学研究所	職名	助教
研究テーマ名	新しい電子機能を併せ持つ超分子金属クラスターの創製				
<p>本研究では、機能・構造を制御することにより、サイズ・電子状態が完全に一致し、単一分子レベルで優れた特性を有する超分子金属クラスターを開発することを目的に研究を行った。その結果、スピン量子数が世界最高の$S = 90/2$を示すFe₄₂核ナノクラスターおよび、電荷移動相転移を示す一次元ナノワイヤー分子の開発に成功した。</p>					
氏名	寺尾 京平	所属	香川大学 工学部 知能機械システム工学科	職名	准教授
研究テーマ名	光駆動ナノ構造体による巨大DNA分子操作技術を用いた液中超微細配線				
<p>DNAナノデバイスとMEMS等マイクロデバイスの間を繋ぐナノ配線を実現することを目指し、ミリメートル長の巨大DNA分子を配線素材として用いてマイクロピラー電極間を配線操作する技術の開発に取り組んだ。その結果、期間中にピラー電極基板の作製、DNA操作用ナノ構造体の大量調整法の確立と、DNA分子の効率的な操作法を達成した。</p>					

野口遵賞

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。また本賞は、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) 2015年度の概要

2016年2月5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9名による選考の結果、関西大学化学生命工学部の葛谷明紀准教授を受賞者とすることを決定した。なお、本年度は2011年度、2012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葛谷明紀准教授は2011年度に「DNAのもつ様々な特色を活かした分子デバイスの開発」というテーマで野口遵研究助成に採択されています。

– Appendix –

2015年度誌上発表論文抄録集

Abstract of Publications

Expression of mucin 1 possessing a 3' -sulfated core1 in recurrent and metastatic breast cancer

Hiroko Ideo, Yuji Hinoda, Kohei Sakai, Ikue Hoshi, Shigeru Yamamoto, Masaaki Oka, Kazunari Maeda, Noriko Maeda, Shoichi Hazama, Junko Amano, Katsuko Yamashita
International Journal of Cancer 2015,137(7) 1652-1660

Breast cancer is the most frequent cancer threatening the lives of women between the ages of 30 and 64. The cancer antigen 15-3 assay (CA15-3) has been widely used for the detection of breast cancer recurrence; however, its sensitivity and specificity are inadequate. We previously found that the breast cancer cell line YMBS secretes mucin 1 possessing 3' -sulfated core1 (3Score1-MUC1) into the medium. Therefore, we here evaluated whether 3Score1-MUC1 is secreted into the blood streams of breast cancer patients, and whether it can serve as an improved breast cancer marker. We developed a lectin-sandwich immunoassay, called Gal4/MUC1, using a 3' -sulfated core1-specific galectin-4 and a MUC1 monoclonal antibody. Using the Gal4/MUC1 assay method, we found that 3Score1-MUC1 was profoundly expressed in the blood streams of patients with recurrent and/or metastatic breast cancer. The positive ratio of the Gal4/MUC1 assay was higher than that of the CA15-3 assay in both primary (n=240) and relapsed (n=43) patients, especially in the latter of which the positive ratio of Gal4/MUC1 was 86%. whereas that of CA15-3 was 47%. Furthermore, serum Gal4/MUC1 levels could more sensitively reflect the recurrence of primary breast cancer patients after surgery. Therefore, the Gal4/MUC1 assay should be an excellent alternative to the CA15-3 tumor marker for tracking the recurrence and metastasis of breast cancer.



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

Masaki Kuroguchi, Masako Mori, Kenji Osumi, Mami Tojino, Shu-ichi Sugawara, Shou Takashima, Yuriko Hirose, Wataru Tsukimura, Mamoru Mizuno, Junko Amano, Akio Matsuda, Masahiro Tomita, Atsushi Takayanagi, Shin-Ichiro Shoda, Takashi Shirai
journal.pone.0132848 DOI: 10.1371 Published: July 22, 2015

近年、抗体医薬が数多く開発され、様々な細胞系によって生産されている。抗体のFc領域に結合している糖鎖は、生産される細胞によって、そのプロファイルが異なっている。そして、その糖鎖構造がADCC活性、CDC活性、薬理効果に大きく影響を与え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不均一な糖鎖をリモデリングする為にエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ（エンド酵素）によって、糖鎖のトリミングと糖鎖の転移反応を行った。今回使用した抗体は、遺伝子組み換えカイコの絹糸腺より産生されたanti-Her2, Trastuzumab抗体であり、結合しているN結合型糖鎖の構造は、ハイマンノース型、パウチマンノース型、複合型の3つのタイプの糖鎖を含む10種類が不均一な状態で存在している。現在までに、様々な生物由来のエンド酵素が発見され、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、インタクトの抗体に対するエンド酵素(endoS, endoM, endoD, endoH, endoLL)の反応性や糖鎖に対する基質特異性を調べた。その結果、不均一な糖鎖が結合した抗体を均一な糖（N-アセチルグルコサミン）が結合した抗体に改変する為の最良のエンド酵素の組み合わせ（endoD, endoS, endoLL）が判明した。次に、付加させる均一な糖鎖（M3, G0, G2, A2）を調製し、水溶液中でオキサゾリン誘導体化を行い、糖ドナーとした。均一な糖（N-アセチルグルコサミン）が結合した抗体をアクセプターとしてendoS-D233Qの酵素を用いて反応させ、均一な糖鎖（M3, G0, G2, A2）を持つanti-Her2抗体を得た。更に、これらの糖鎖改変型anti-Her2抗体の糖鎖の機能を調べるために、ELISA法を用いたFcγRIIIa-V158との親和性測定や、Her2が高発現しているSKBR-3, BT-474の乳癌細胞をターゲットにしたADCCリポーターアッセイを行い比較した。

~~~~~

### GlyTouCan 1.0 - The international glycan structure repository.

Aoki-Kinoshita K, Agravat S, Aoki NP, Arpinar S, Cummings RD, Fujita A, Fujita N, Hart GM, Haslam SM, Kawasaki T, Matsubara M, Moreman KW, Okuda S, Pierce M, Ranzinger R, Shikanai T, Shinmachi D, Solovieva E, Suzuki Y, Tsuchiya S, Yamada I, York WS, Zaia J, Narimatsu H.

Nucleic Acids Res. 2016, 44(D1) D1237-42. doi: 10.1093/nar/gkv1041. Epub 2015 Oct 17.

糖鎖はDNAやタンパク質に次ぐ第3の生体高分子として知られています。これは他の生体分子と相互作用し多くの細胞表面を覆います。DNAおよびタンパク質の構造はアミノ酸またはヌクレオチドの線状配列であるのに対して、糖鎖の構造は分岐している点が大きく異なります。したがって、データベース内の糖鎖の情報の記録やそのキュレーションは、難しい問題で

した。そして、異なるデータベースの間の統合が試みられたとき、このような問題が多く繰り返されてきました。したがって、糖鎖構造の国際的なリポジトリ（糖鎖構造に一意的な登録番号を割り当てる）が求められるようになりました。そして、糖鎖生物学者と開発者の国際チームは、GlyTouCanと呼ぶ糖鎖構造リポジトリを開発するために協力し、ウェブサイト (<http://glytoucan.org/>) で利用可能としました。本リポジトリは、組成、トポロジーなどを含む様々な糖鎖構造を登録し登録番号（Accession Number）を得ることができます。これにより、過去にグライコムクスデータベースを統合するための負担となっていた糖鎖構造について、単にアクセス番号によって糖鎖構造が参照可能となりました。

~~~~~

Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy.

Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Many H, Kuga A, Yamaguchi Y, Akasaka-Many H, Furukawa J, Mizuno M, Kawakami H, Shinohara Y, Wada Y, Endo T, Toda T.
Cell Rep. 2016 Mar 8;14(9):2209-23. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.017. Epub 2016 Feb 25.

筋細胞や神経に存在する α ジストログリカン (α -DG) は糖タンパク質であり、その糖鎖構造の異常が筋ジストロフィーと滑脳症を引き起こす。我々は、正常な α -DG糖鎖中にはリビトール-5-リン酸 (Rbo5P) 残基が含まれていることを明らかにした。また、Rbo5Pの合成には3つの酵素が関与することも明らかにした。すなわち、ISPDはシチジン二リン酸リビトール (CDP-Rbo) 合成酵素であり、FukutinとFKRPはCDP-RboからRbo5Pを順次転移する転移酵素である。さらに、ISPD欠損細胞にCDP-Rboを投与すると α -DGの糖鎖が回復した。これらの知見は、 α -DG関連疾患の病因と治療戦略への活用が期待される。



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

野口研究所時報 第59号

2016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1-9-7
<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

新研究棟開設に伴い、2016年9月に上記の住所に移転しました。