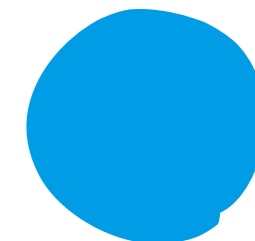


野口 研究所 時報



ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.60 2017

CONTENTS

An Essay Hiroshi KOBAYASHI

The Spirits of the Noguchi Institute Toshiyuki INAZU

Preparation of monoclonal antibodies having N-glycans with homogeneous Wataru TSUKIMURA
structures using substrate specificity of endo-β-N-acetylglucosaminidase

Analysis of EndoS2 D184M mutant for the use of glycoengineering of antibodies..... Shou TAKASHIMA

Manipulation of Bio-Molecules in Single-Molecule Manner by Utilizing DNA Akinori KUZUYA
Origami Nanostructures

Recent advances in molecular-based photon upconversion materials Nobuhiro YANAI

Beilstein Glyco-Bioinformatics Symposium 2017 Issaku YAMADA

The Activities of the Institute Akio MATSUDA

Outline of the Institute Tsuguo SAITO

Noguchi Shitagau Research Grant

Abstracts of Publications

巻頭言 所感 小林 宏史

“自由に研究して良い”—野研魂— 稲津 敏行

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの糖転移活性を利用した 後藤浩太郎
タンパク質の位置選択的ポリエチレングリコール化法の開発

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの特性を利用した 月村 亘
均一糖鎖構造を持つ抗体の調製

抗体糖鎖リモデリングに向けたEndoS2 D184M変異体の解析 高島 晶

DNAオリガミ構造体を活用した生体関連分子の単分子操作法 葛谷 明紀

分子性フォトン・アップコンバージョン材料における最近の展開 楊井 伸浩

Beilstein Glyco-Bioinformatics Symposium 2017 参加報告 山田 一作

2016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

2016年度誌上発表論文抄録集

巻頭言 所感	小林 宏史 ……	1
“自由に研究して良い” —野研魂—	稲津 敏行 ……	3
エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの糖転移活性を利用したタンパク質の位置選択的ポリエチレングリコール化法の開発	後藤浩太郎 ……	12
エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの特性を利用した均一糖鎖構造を持つ抗体の調製	月村 亘 ……	17
抗体糖鎖リモデリングに向けたEndoS2 D184M変異体の解析	高島 晶 ……	25
DNAオリガミ構造体を活用した生体関連分子の単分子操作法	葛谷 明紀 ……	34
分子性フォトン・アップコンバージョン材料における最近の展開	楊井 伸浩 ……	43
Beilstein Glyco-Bioinformatics Symposium 2017 参加報告	山田 一作 ……	49
2016年度活動概要	松田 昭生 ……	52
研究所の概要	齊藤 継男 ……	69
野口遵研究助成金／野口遵賞		…… 77
2016年度誌上発表論文抄録集		…… 84

THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.60 2017

C O N T E N T S

An Essay	Hiroshi KOBAYASHI ·····	1
The Spirits of the Noguchi Institute	Toshiyuki INAZU ·····	3
Preparation of monoclonal antibodies having N-glycans with homogeneous structures using substrate specificity of endo- β -N-acetylglucosaminidase	Wataru TSUKIMURA ·····	17
Analysis of EndoS2 D184M mutant for the use of glycoengineering of antibodies	Shou TAKASHIMA ·····	25
Manipulation of Bio-Molecules in Single-Molecule Manner by Utilizing DNA Origami Nanostructures	Akinori KUZUYA ·····	34
Recent advances in molecular-based photon upconversion materials	Nobuhiro YANAI ·····	43
Beilstein Glyco-Bioinformatics Symposium 2017	Issaku YAMADA ·····	49
The Activities of the Institute	Akio MATSUDA ·····	52
Outline of the Institute	Tsuguo SAITO ·····	69
Noguchi Shitagau Research Grant	·····	77
Abstracts of Publications	·····	84

— 卷頭言 —

所 感

An Essay

理事長 小林 宏史

President Hiroshi KOBAYASHI

今年6月に理事長に就任いたしました。

私はこれまで野口研究所とは全く接点がなかったもので、現状を理解するためには、まず当研究所の歴史や経緯を知らねばならないと思ひ、過去の時報や創立50周年記念特集号(平成3年発行)、野口研究所外史(平成13年発行)などを読み、一通り基礎知識をつけたところです。75年に及ぶ歴史の中で、何度か訪れた存亡の危機を関係者の皆様が懸命に対策を打ち、乗り切った結果、現在の姿があることを知りました。野口遵が私財をなげうって創設した研究所を後世に残さなければならないという先人の強い思いがあったからこそ今の姿があるのだと思っています。

また現在、当研究所では糖鎖研究が主要な研究テーマになっています。これは木材の化学研究からスタートし、そこで蓄積された知見をベースに糖質合成、複合糖鎖の研究へと発展させてきたものです。近年、糖鎖は多種多様な機能が解明されつつあり医療関連の研究分野として大きな注目を集めるようになりましたが、野口研究所では1970年代から糖鎖バイオロジーの発展を見越し、固有技術として成果を蓄積してきました。企業の事業ポートフォリオ転換が企業の存続にとって非常に重要であるのと同様、環境変化に合わせて研究テーマを変えてゆくことが極めて重要ですが、研究テーマをうまく転換し発展させてき

た先人の先見の明に敬服しました。

今後、こうした歴史、経緯も踏まえて運営に取り組んでまいりたいと考えています。

さて、この1年あまりの間に世界の政治・経済情勢は大きく変化しました。昨年6月には英国が国民投票でEUからの離脱を決めましたし、昨年11月の米国大統領選挙ではドナルド・トランプ氏が当選、韓国でも革新系の文在寅氏が大統領に就任しました。

国内に目を転じると東京都知事に小池百合子氏が就任し、今年7月の東京都議会選挙では小池氏率いる都民ファーストの会が圧勝しました。また盤石と思われていた安倍政権の内閣支持率が諸々の問題で急落し、政権発足後、最低になったとメディアが報じています。

こうした変化は世界的に「ポピュリズム」が台頭してきたことによるものと説明されることがあります。政治学者の水島治郎氏によれば、「現代のポピュリズムは既成政党に緊張感を与え、沈滞した既成政治に改革を促し活性化させる効果も指摘される」とのこと。政治・経済情勢の変化は研究所の運営に無縁ではないので注意深く見守る必要があると思っています。

この1年の間に野口研究所でも大きな変化がありました。昨年8月に新研究棟が完成し、9月に移転を完了しました。現在は近代化遺

産として保存される予定の建屋を除いて撤去が完了し、跡地利用のための前工事が着々と進捗しています。歴史を象徴する建屋や植栽などが無くなるのは淋しさを禁じ得ませんが、一方で研究テーマにふさわしいインフラであるべきだと思います。建屋や設備が新しくなれば良い研究ができるとは限りませんが、新研究棟は機能的で研究の効率も上がるものと期待しています。

新研究棟建設がつつがなく進められたのも、関係各位のご支援・ご協力と、稲田前理事長の強力なリーダーシップ、所員の協力があったこそと感謝しています。

さて、ここで野口研究所の今後の運営について考えを述べてみます。現状では第三者的な見方になるかもしれませんが、あくまで現時点での思いです。

野口研究所の役目、ミッションについて、これまでも歴代の理事長が述べられています。少しずつ表現が違いますが、主旨は共通しています。

- 1) 野口遵の研究所設立の精神を尊重し、引き継ぐ
- 2) 時代のニーズに応えるオリジナリティーのある研究テーマに取り組む
- 3) 社会の評価を得るような研究成果を積み上げる

私もこの通りだと思います。野口研究所設立時の趣旨は現在でも十分通用します。類まれな事業家としての積極果敢な精神を引き継いで、日本の、いや世界の平和的な、調和のとれた発展に貢献してゆかなければなりません。また企業の研究所でもなく大学の研究所でもないという自由度を生かした野口研究所ならではのユニークなテーマに取り組み、その成果を社会に還元しなければならないと

思っています。上記3点のミッションを引き継いでゆきます。

私は研究組織の運営に直接タッチするのは初めての経験です。私見ですが、研究は他の仕事とは少し異なる一面を持っていると思っています。一般論として、他の仕事は目的・目標を明確に定め資源を投入し適切に管理してゆけば、それなりの結果が残せます。しかし研究はそうはいきません。例えば立派な解析設備を入れても成果が上がるとは限りません。もちろん研究テーマの選択、インフラは重要ですが、それに加えて研究を担う人達のやる気、モチベーションが重要だと思うのです。寝食を忘れて研究に没頭する、研究が面白くて仕方ない、そうでなければ研究分野において大きな成果が上がらないのではないかと思います。また研究者が個人の殻に閉じこもっては井の中の蛙になってしまいます。研究者が外の世界にも接し常に刺激を感じられるような環境や研究者を支援する体制が重要ではないかと思っています。

研究所員が、モチベーション高く研究に取り組めるよう、そして野口研究所の確固たるポジションを将来にわたって維持できるような環境を整えてゆきたいと思います。

最後になりましたが、20年間にわたり共同研究を実施していただいている遠藤玉夫先生(東京都健康長寿医療センター研究所、副所長)が日本学士院賞を受賞されました(神戸大学、戸田達史教授と共同)。受賞理由は「福山型筋ジストロフィーを含めた糖鎖合成異常症の系統的な解明と新しい糖鎖の発見」で、不治の難病である筋ジストロフィーに対する根本的な治療法開発につながる研究として高く評価されました。大変荣誉ある日本学士院賞受賞を心よりお慶び申し上げます。

“自由に研究して良い” — 野研魂 —

The Spirits of the Noguchi Institute

東海大学工学部応用化学科教授

東海大学大学院総合理工学研究科研究科長

東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター所長

稲津 敏行

Toshiyuki INAZU

1. はじめに

野口研究所を退職し、東海大学に着任してすでに15年になろうとしている。今般、研究関連の内容で執筆依頼を頂いた。さて、何を書こうかと悩みながら、自らの研究を振り返ってみると、結局野口研究所在職時に挙げた成果やその間の経験・ネットワークに今でも依存していることを痛感する。そこで、野口研在職中に挙げた主な成果を振り返り、その概略を書くことで、自らの反省材料として、また、次世代を担う研究者のヒントになればと筆を執った。なお、この間の研究以外の側面については、「野口研究所時報46」をご参照頂ければ幸いである [1]。

野口研究所に採用されたとき、当時の刈谷亨理事長、鈴木明常務理事から、「野研では、研究は自由に何をやってもいいから。これが野研スピリッツだ。」と言われたことを昨日のように思い出す。また、中原安治研究総括は“内職実験”を推奨されていた。こうした自由に何でもやって良いという環境は、学位取り立ての身には大変ありがたかった。また、そのおかげで次々といろいろなことに挑戦させて頂けた。いつの頃からか、研究室のメインテーマを「ヘテロな有機合成」と言っただけからなくなっている。逆に「研究は何をされていますか？」という問いに窮することさえ多い。これも、野口研究所で研究者の第一歩を記させて頂いた結果と感謝に堪えない。

若手研究者の自由な発想や失敗を恐れず取り組む姿勢を容認して下さった野口研の懐の深さが、研究の運を運んでくれたように感じている。若い研究者は、是非とも上司に追従するだけではなく、自らの発想を大切にし、その具現化を図ってほしいと思う今日この頃である。それこそが、野研魂だと思う。

2. 糖ジメチルホスフィノチオエートを用いるグリコシル化反応

ペプチド合成化学の研究で学位を取得した者として、糖ペプチドの合成、糖タンパク質の合成は、大きな目標であった。しかし、門外漢であった「糖化学」について攻め口は全く見えなかった。ペプチド合成と言っても、有機リン誘導体を用いた合成法について研究してきたこともあり、ヘテロ原子を利用する何らかの合成法の開発を夢見て研究室をスタートさせていた。

まず、取り組んだテーマは「糖ジメチルホスフィノチオエートを用いるグリコシル化反応」であった。恩師植木正彬先生の下で授かったジメチルホスフィノチオイル基を用いる方法に思い至った。すなわち、糖のアノマー位に組み込んだジメチルホスフィノチオエートが銀イオンなどの親イオウ試剤の存在下、リンの化合物がP=O結合になりやすい性質と協奏的に反応し、グリコシドを与えるという仮説であった (図1)。

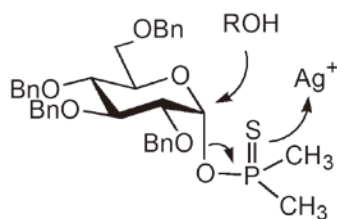


図1 ジメチルホスフィノチオエートを用いるグリコシル化反応

2,3,4,6-テトラ-*O*-ベンジル-D-グルコピラノースをTHF中-78°Cでブチルリチウムを作用させリチオ化し、次いで塩化ジメチルホスフィノチオイルを反応させると、対応するジメチルホスフィノチオエート体が収率よく得られた。さらに、種々検討した結果、過塩素酸銀存在下、アルコールと反応しグリコシドを収率よく、かつ、 α 選択的に与えることを明らかにした [2]。

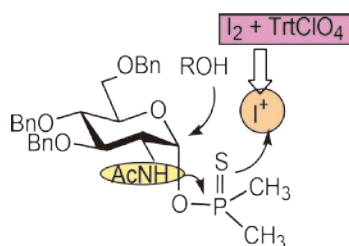


図2 アミノ糖のグリコシル化反応

次にこの反応を、2-アセトアミド-2-デオキシ糖のジメチルホスフィノチオエートへ応用したところ、意外にも過塩素酸銀ではグリコシドを与えるには至らなかった。活性化剤を種々検討した結果、ヨウ素-過塩素酸トリチルという新規な組み合わせが功を奏することがわかった (図2)。IClO₄が系内で発生しているものと理解できた [3]。この手法を展開させ、さらに、触媒量の過塩素酸トリチルを用いることで、2-デオキシ糖、ケトースなどのジメチルホスフィノチオエート体へ応用することができた [4]。また、今でも化学的に合成が困難な β -マンノシド合成にも応用した [5]。残念ながら β -選択性はさほど高いものではなかったが、当時としては画期的な

挑戦であったと思われる。

こうした一連のグリコシル化反応の研究は、山ノ井孝さん、中村和美さんが中心となって進めて下さった成果である [6]。山ノ井さんは、これらの成果で学位を取得された。また、糖化学の素人集団にとって、糖化学に厳然として残る「糖のくせ」を把握できる大変良い経験となった。

3. グリコシルアスパラギン誘導体の合成

糖ペプチドの合成を考えつつも、その突破口を何年も見いだすことはできなかった。この間、ホスフィン酸アミドのアルキル化でグリコシルアミノ酸が合成できないかなどと、成果の出ない実験を学生たちと続けた。あるとき、グリコシルアミンの不安定性に着目した。不安定なグリコシルアミンを経由することなく、グリコシルアジドから一段階でグリコシルアスパラギン誘導体が調製できればきっと良い方法になるであろうという仮説であった。そこで、Staudinger法を応用することを計画した。すなわち、グリコシルアジドとアスパラギン酸 β カルボキシル基を三級ホスフィン存在下反応させることを検討した。

ジクロルメタン中、2-アセトアミド-2-デオキシ-3,4,6-トリ-*O*-アセチルグルコピラノシルアジドと、Fmoc-Asp-OBu^tを溶解させ、トリエチルホスフィンを加えた。その結果、予期したように目的とするFmoc-Asn(GlcNAc)-OH誘導体が高収率で得られることがわかった [7]。その後、水野真盛さんが、反応機構がStaudinger 反応とは異なること、反応を低温で行えば、必ずしもトリエチルホスフィンでなくても三級ホスフィンであれば進行することなどを明らかにした [8] (図3)。

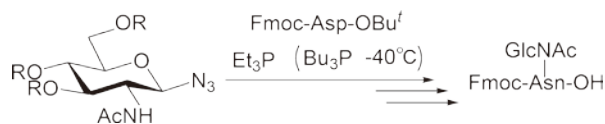


図3 グリコシルアスパラギン誘導体の合成

この低温で行う反応は、将に水野さんの内職研究(自由な研究)で見つかったものである。あるとき、ドラフトの前で「低温で行えば反応機構から言って……トリブチルホスフィンでもいいと思います……。実は……。すでにやって、うまくいきます！」と言われた。忘れられない出来事の一つである。

この反応は、グリコシルアスパラギン形成反応として総説にも取り上げられている [9]。研究グループとしては、やっと糖ペプチド合成の入り口にたどり着いた極めて重要な意味を持つ反応開発となった。

4. 糖ペプチド合成

糖アミノ酸合成の手法を手に入れた我々は、次のテーマを糖ペプチド合成に大きくシフトした。しかし、糖の化学ではアノマー化やグリコシド結合の切断が懸念されるため、酸性条件は好ましくない。一方、ペプチド合成化学は糖化学より進展し、自動合成装置も市販され、すでに完成されているとも言われていた。ただし、アミノ酸のラセミ化を防ぐために塩基性条件は避けることが大原則であった。このように、糖ペプチドという境界領域の化合物を合成しようとする、2つの領域の相容れない条件設定を容認できる手法開発が必須であることがわかる。

ところで、学生時代に発表していたアミノ酸—ジメチルチオホスフィン酸混合酸無水物 (Mpt-MA) は、無水物でありながら極めて安定で、アミノ基とはカルボニル基側でのみ反応し、水酸基とは全く反応しない特異な性質を有していた [10]。そこで、糖水酸基を遊離のまま、ペプチド結合形成反応ができるはずというアイデアが生まれた。この方法であれば、ペプチド合成終了時に、目的とする糖ペプチドがゲットできる。しかし、水酸基の保護基を導入したまま合成すれば、ペプチド合成終了後にさらに糖水酸基の保護基の脱保護を、ペプチド合成化学に容認される方法

で行う必要がある。前者は、ミニマムプロテクションの立場、後者はマキシマムプロテクションの立場と言えよう。我々は、Mpt-MAを用い、前者の立場で糖ペプチドを合成する研究を展開した。後者の方法としては、中原義昭先生、北條裕信先生らの研究を挙げることができる [11]。

我々は、Fmoc-Asn(GlcNAc)-OHの固相合成における反応性を明らかにし、種々の糖ペプチド固相合成の実績を積んでいた [12]。こうした経験を基に老人研の遠藤玉夫先生との共同研究、すなわち、GlcNAc-Man結合を形成する新規酵素の探索研究がスタートした。我々がデザイン、合成したマンノシルペプチドが良い基質となって、POMGnT1の発見となった [13]。いまだに本酵素の基質はこのマンノシルペプチドであることに、ある種の満足感を感じている。その後の筋ジストロフィー症関連研究の進展はめざましい [14]。野口研会議室で遠藤先生と水野さんと3人で基質の設計を議論したときには、まさかこのような大研究の一歩になるとは知るよしもなかった。

当初は、より大きな糖鎖をAsnなどアミノ酸に結合させ、糖鎖ペプチドの合成を行おうと計画していたが、次項で述べる糖鎖転移反応と出会い、「化学—酵素法による糖ペプチドの合成」へと大きく転換していくことになる。

いずれにしろ、糖アミノ酸誘導体の糖水酸基を無保護のまま、Mpt-MA法で固相ペプチド合成を行う方法論は、極めて有効であり、学生が初めて行う実験であってもかなりの収率で確実に目的物が得られる優れた方法である。

5. 糖鎖転移反応

GlcNAcペプチドが自由に合成できるようになった頃、老人研の木幡陽先生から「化学—酵素法」の存在をご教示頂いた。 β マンノシ

ド合成に酵素利用を考えていた矢先のことであった。その後、Endo-Mについて糖質学会で発表された山本憲二先生との共同研究という形で、羽田勝二さんが糖鎖転移反応を実用化されていった。

我々がGlcNAcペプチドを合成し、羽田グループが糖鎖を付ける、この戦略で次々と糖鎖ペプチドの合成を行った [15]。合成品故にできること、たとえばグルタミンに糖鎖を付ける誘導體合成など天然には存在しない糖鎖-アミノ酸結合を有するペプチドの合成など [16]、山本先生のご指導の下、多くの成果を挙げる事ができた [17]。

カルシトニンには、糖鎖が付いても良いアミノ酸配列があるにもかかわらず、その当時まで糖鎖カルシトニンは発見されていなかった。そこで、骨粗鬆症治療薬開発の基になった生理活性ペプチドのカルシトニンにN-グリカン結合させた糖鎖ペプチドの合成を行った。

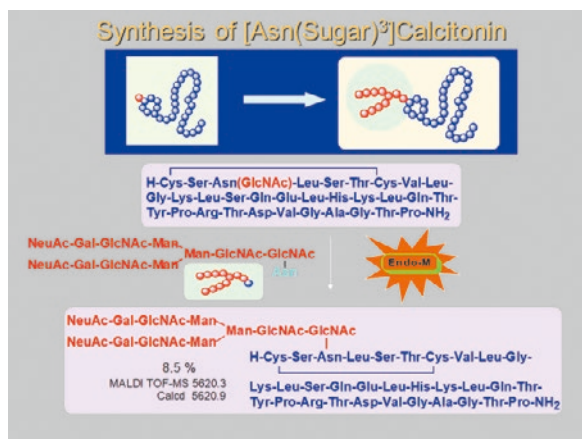


図4 糖鎖カルシトニンの合成

カルシトニンは、アミノ酸残基数32で、我々の合成経験を大きく超えていた。そのために大阪大学蛋白質研究所の相本三郎先生に、チオエステル法によるセグメント縮合法をご教示頂き、カルシトニン1-10位のGlcNAcペプチド [18] と11-32位のペプチドをセグメント縮合する方法でGlcNAcカルシトニンを合

成することができた。さらに、Endo-Mによる糖鎖転移を行い、糖鎖カルシトニン合成という目的を達することができた[19]。当時は、糖鎖転移収率は数パーセントでも意義があったが、その後の研究展開でいまや定量的に進行する優れた方法になっている (図4)。

この研究に関連して、武田順一さんのリーダーシップの下、旭化成研究グループと「シュガーミーティング」を定期的を開催したことは、その後の研究活動の幅を大きく広げた[20]。

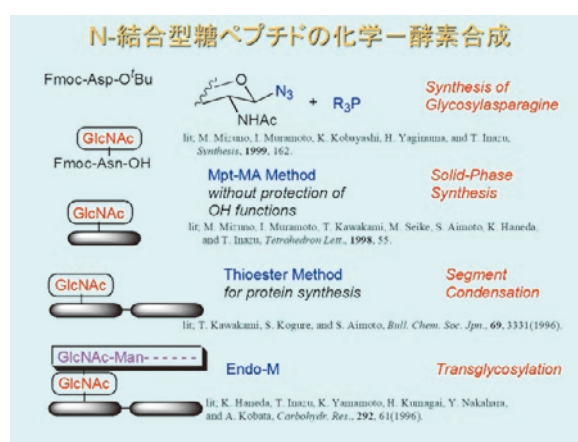


図5 N-結合型糖ペプチド合成

これらの研究から我々は、N-結合型糖ペプチドの化学-酵素法による合成戦略を確立することができた。すなわち、1) 三級ホスフィンを用いる上記3の方法によりFmoc-Asn(GlcNAc)-OHの合成を行う、2) 上記4のMpt-MA法による固相合成法に従い、ペプチドセグメント、糖ペプチドセグメントを合成する、3) セグメント同士をチオエステル法で縮合し(ライゲーション)、ペプチド鎖を伸張する、4) Endo-Mを用いる糖鎖転移反応により、ペプチド鎖中のGlcNAc残基に天然のN-グリカンを転移させ、目的とする糖鎖ペプチドを調製する、という4段階の工程から成る方法論である (図5)。一連の糖鎖ペプチド合成の成果をまとめて、水野さんが学位を取得された。

6. Fmoc-Asn(糖鎖)-OHの合成と利用

Endo-Mを用いる糖鎖転移反応は、その後東京工芸大学の服部憲次郎先生との共同研究で、シクロデキストリン (CD) 誘導体へ応用した。すなわち、モノアミノCDとFmoc-Asn(GlcNAc)-OHと縮合させ、次いでEndo-Mを用いる糖鎖転移反応を行い、糖鎖—シクロデキストリン複合体の合成に成功した [21]。この複合体は、糖鎖—タンパク質相互作用とシクロデキストリン—医薬包接作用という二重認識をすることを明らかにし、ドラッグデリバリーシステム (DDS) に利用可能であることを示すことができた [22] (図6)。

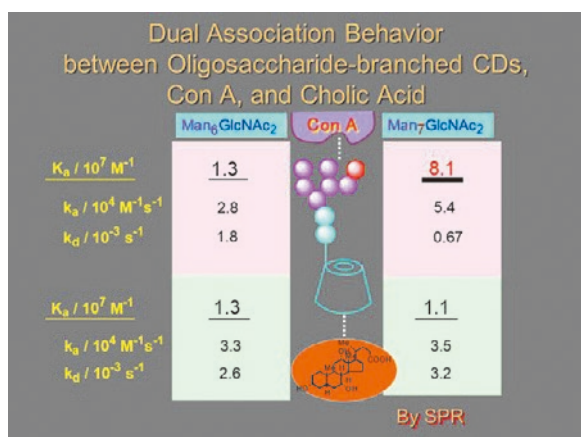


図6 糖鎖CDの二重認識

しかし、実用化を視野に入れた相互作用解析のためには大量合成が必須であった。

Endo-Mを用いる酵素反応は、酵素の入手が必ずしも容易ではなかったため、非常に少量で行われていた。直ちに糖鎖転移反応のスケールを大きくすることはかなわなかった。思案したあげく、糖タンパク質をプロテアーゼで加水分解すれば、糖鎖アミノ酸だけ単離できるのではないかという考えに至った。

オブアルブミンや糖鎖転移反応の供与体を用いていたシアログリコペプチド (SGP) を用いて実際に加水分解を行った。得られる糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入したところ、ダイアイオンHP-20のような合成吸着剤で水相より容易に単離でき、ODS逆相HPLCにより、糖鎖構造の違う誘導体をそれぞれ精製できることがわかった [23]。すなわち、Fmoc-Asn(糖鎖)-OHが容易に入手できることが明らかになった (図7)。

これを合成原料にすれば、糖鎖の付いたペプチドやタンパク質の合成は容易であることは、すぐに考えついた。しかし、我々グループとしては、ただ単に糖鎖ペプチド合成へ展開することを急がないことにし、基礎的研究を続けることにした。しかし、この方法論は、朝井洋明社長の率いる糖鎖工学研究所が糖タンパク質製剤へ実用化し、また、大阪大学の梶原康宏先生による精力的な糖タンパク質合成などに利用され、いまやFmoc-Asn(糖鎖)-OHの有用性に疑問の余地はない [24]。

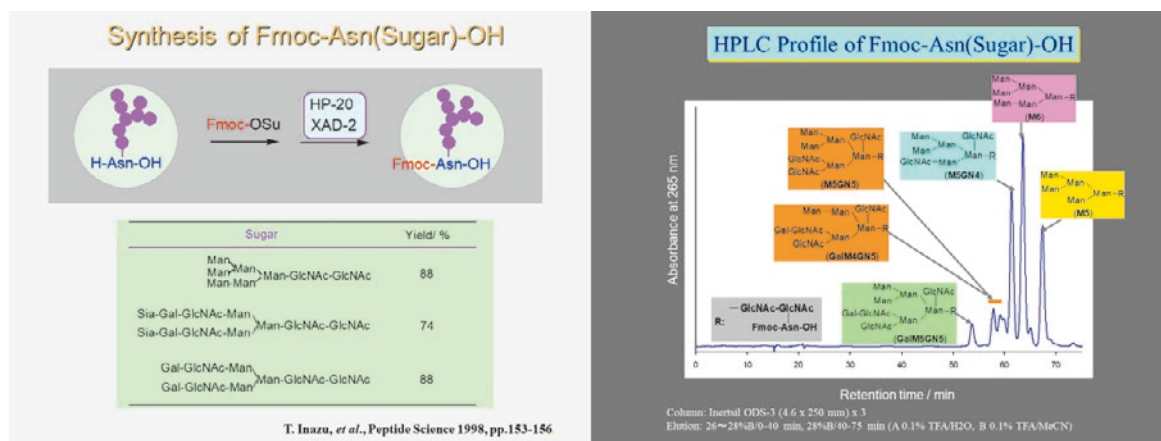


図7 Fmoc-Asn(糖鎖)-OHの調製 (左) とHPLCプロファイル (右)

我々は、この方法論により糖鎖CDの大量合成を達成するとともに、天然の糖鎖を丸ごと有する糖鎖チップの創出と蛍光性誘導体を用いるELISAや一分子蛍光法による糖鎖—タンパク質相互作用解析に応用した [25]。

Endo-Mによる糖鎖転移反応とFmoc-Asn (糖鎖)-OHという天然糖鎖を丸ごと導入できる二つの技術開発に成功したことになった。現在でも、このどちらかを使う以外、天然糖鎖誘導体を化学的に容易に調製する方法はないと言っても過言ではない。

7. フルオラス合成法

フルオラス合成が糖鎖やペプチドのような配列性の化合物の合成に有用であろうという考えに基づき、大前仁さんと、フルオラスベンゾイル基を創出する計画で研究をスタートした。しかし、失敗続きの一年間で、誘導体を作っても作っても、溶解性が悪く、使い物にならなかった。この経験を基盤に三浦剛さんとアセチル基のフルオラス化という戦略ですすめた。その結果、三浦さんが設計したBfp基が非常に使いやすく有用であることが明らかになった [26] (図8)。

たとえば、ガラビオースの合成では、Bfp基を三残基導入した糖受容体にトリクロルアセトイミデート法で反応させ、受容体合成から5工程を各工程抽出操作のみで進め、最終

段階の1回のクロマトグラフィーを行い、5工程27%の収率で目的とするガラビオース誘導体が得られた [27]。このようにしてフルオラス糖鎖合成法を提案し、確立することができた [28]。

さらに、石田秀樹さんや後藤浩太郎さんの力を結集し、固相合成の樹脂に相当するフルオラス担体を開発することができた。これを利用し、実際の糖鎖合成やペプチド合成の迅速合成へ展開できた [29]。これらの成果で後藤さんが学位を取得され、また、現在のフルオラス科学研究会の前身と言えるNoguchi Fluorous Projectがスタートした。

生まれて間もない「フルオラス化学」は、何にでも応用できる可能性を秘めており、また、誰でも取り組むことができる分野である。この分野がさらに大きくブレークスルーし、大いに発展することを期待している。筆者自身、新たな挑戦を続けるとともに、斬新なアイデアの出現を待っている。

8. おわりに

野口研究所で行った研究には、まだまだ多くのテーマがあった。

モレキュラーシーブス上で保存したメタノールを用いると、糖のアセチル基が脱保護されることに気づき、その本質が溶出した炭酸カリウムであることを突き止めたこと

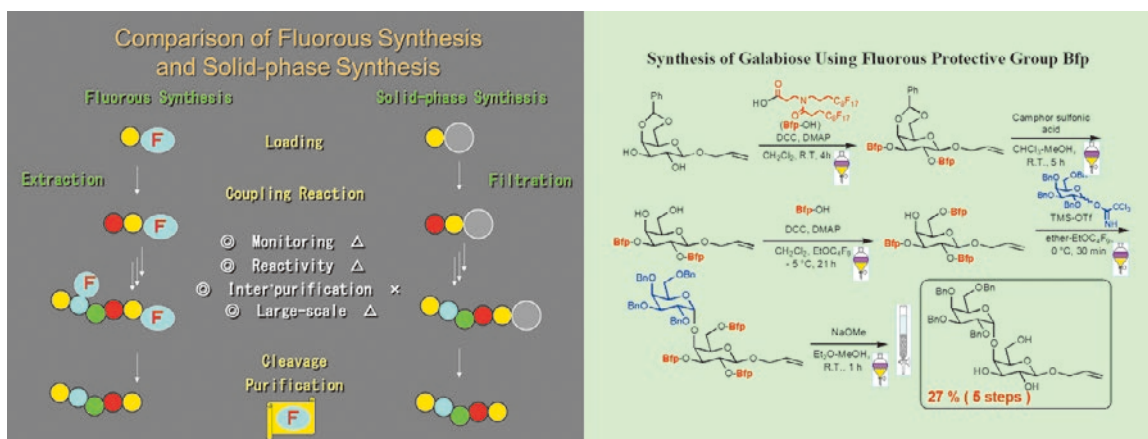


図8 糖鎖合成とフルオラス合成の比較 (左) と合成例 (右)

[30]。保護糖をジチオアセタールに誘導する方法として、三フッ化ホウ素トリメチルボレートというルイス酸の組み合わせが有効であることを見いだしたこと [31]。スフィンゴシン、セラミドの不斉合成を行ったこと [32]。ムチン型糖ペプチドの化学—酵素法を開発したこと。立体配座を反転固定して β マンノシド合成を行ったこと。考え始めると、次から次へと思ひ起こされる。

これらの中には、成果としてまとまったものもある反面、担当者の退職などにより研究が中座したままになっているものがあるなど、各テーマは様々な状態にある。立体配座を反転固定した誘導体を用いるグリコシル化は最近になって、関西学院大学の山田英俊先生が精力的に研究されている。我々が取り組み始め、そのままになっていた考えや議論が、正しかったことを証明して頂けたように思え、とても嬉しい気持ちになった。

翻って、私自身の研究できる時間には限りあることが、最近になって現実のものとなってきた。これまでに達成できていないアイデアを何とか現実のものとするのか、あきらめきれないテーマに再度挑戦するのか、・・・何を優先するべきか悩む日が続いている。

野口研究所時代の私には「あー、だめだったか」という口癖があったと、元研究室メンバーから聞かされたことがある。研究アイデアのほとんどはだめだったということであろう。若い研究者には、自由に数多くのアイデアを出し合い、それらを実際に沢山やってみる内職研究を勧めたい。アイデアとその実践の繰り返しのうちにこそ、必ず次の研究成果があるはずである。これこそが、野研魂のいう自由な研究であると確信している。顧問をされていた向山光昭先生の「へこたれずに」にも通じるであろう。野研魂をもった次世代の研究者が次々と生まれることを大いに期待している。

謝辞

以上述べてきた内容は、ともに汗をかき、アイデアを出し合い、研究を進めてくれた多くの共同研究者のおかげと、改めて感謝申し上げます。

参考文献

1. 稲津敏行, *野研時報*, **46**, 17-26(2003).
2. T. Inazu, H. Hosokawa, and Y. Satoh, *Chem. Lett.*, **1985**, 297-300.
3. T. Inazu and T. Yamanoi, *Chem. Lett.*, **1989**, 69-72.
4. T. Yamanoi and T. Inazu, *Chem. Lett.*, **1990**, 849-852.
5. T. Yamanoi, K. Nakamura, H. Takeyama, K. Yanagihara, and T. Inazu, *Chem. Lett.*, **1993**, 343-346.
6. a) T. Yamanoi, K. Nakamura, S. Sada, M. Goto, Y. Furusawa, M. Takano, A. Fujioka, K. Yanagihara, Y. Satoh, H. Hosokawa, and T. Inazu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 2617-2622(1993);
b) T. Yamanoi, K. Nakamura, H. Takeyama, K. Yanagihara, and T. Inazu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 1359-1366(1994);
c) T. Yamanoi, A. Fujioka, and T. Inazu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 1488-1491(1994).
7. T. Inazu and K. Kobayashi, *Synlett*, **1993**, 869-870.
8. M. Mizuno, I. Muramoto, K. Kobayashi, H. Yaginuma, and T. Inazu, *Synthesis*, **1999**, 162-165.
9. B. G. Davis, *Chem. Rev.*, **102**, 579-601(2002).
10. M. Ueki and T. Inazu, *Chem. Lett.*, **1982**, 45-48.
11. A. Ueki, Y. Takano, A. Kobayashi, Y. Nakahara, H. Hojo, and Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.*, **66**, 1742-1759 (2010).

12. a) T. Inazu, K. Kobayashi, and H. Yaginuma, "Peptide Chemistry 1993," Proceedings of the 31st Symposium on Peptide Chemistry" ed by K. Okada, Protein Research Foundation, Osaka (1994), pp.101-104;
 b) T. Inazu, M. Mizuno, Y. Kohda, K. Kobayashi, and H. Yaginuma, "Peptide Chemistry 1995: Proceedings of the 33rd Symposium on Peptide Chemistry" ed by N. Nishi, Protein Research Foundation, Osaka (1996), pp.61-64.
13. A. Yoshida, K. Kobayashi, H. Many, M. Mizuno, T. Inazu, H. Mitsuhashi, H. Topaloglull, M. Takeuchi, T. Toda, and T. Endo, *Dev. Cell*, **1**, 717-724(2001).
14. 遠藤玉夫, *野研時報*, **59**, 3-15 (2016).
15. a) H. Haneda, T. Inazu, K. Yamamoto, H. Kumagai, Y. Nakahara, and A. Kobata, *Carbohydr. Res.*, **292**, 61-70(1996);
 b) K. Yamamoto, K. Fujimori, K. Haneda, M. Mizuno, T. Inazu, and H. Kumagai, *Carbohydr. Res.*, **305**, 415-422(1997);
 c) I. Saskiawan, M. Mizuno, T. Inazu, K. Haneda, S. Harashima, H. Kumagai, and K. Yamamoto, *Arch. Biochem. Biophys.*, **406**, 127-134(2002).
16. K. Haneda, T. Inazu, M. Mizuno, R. Iguchi, H. Tanabe, K. Fujimori, K. Yamamoto, H. Kumagai, K. Tsumori, and E. Munekata, *Biochim. Biophys. Acta*, **1526**, 242-248(2001).
17. a) 山本憲二、藤森賢也、島田義啓、熊谷英彦、羽田勝二、稲津敏行、伊藤和央、南浦能至、*J. Appl. Glycosci.*, **48**(2), 195-203(2001);
 b) 羽田勝二、稲津敏行、山本憲二、*バイオサイエンスとインダストリー*, **60**(3), 23-26(2002);
 c) K. Haneda, T. Inazu, M. Mizuno, and K. Yamamoto, *Method Enzymol.*, **362**, 74-85(2003).
18. M. Mizuno, I. Muramoto, T. Kawakami, M. Seike, S. Aimoto, K. Haneda, and T. Inazu, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 55-58 (1998).
19. a) M. Mizuno, K. Haneda, R. Iguchi, I. Muramoto, T. Kawakami, S. Aimoto, K. Yamamoto, and T. Inazu, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 284-290(1999);
 b) K. Haneda, T. Inazu, M. Mizuno, R. Iguchi, K. Yamamoto, H. Kumagai, S. Aimoto, H. Suzuki, and T. Noda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 1303-1306(1998);
 c) 稲津敏行、水野真盛、羽田勝二、*有合化*, **56**, 210-220(1998).
20. a) K. Haneda, M. Tagashira, E. Yoshino, M. Takeuchi, T. Inazu, K. Toma, H. Iijima, Y. Isogai, M. Hori, S. Takamatsu, Y. Fujibayashi, K. Kobayashi, M. Takeuchi, and K. Yamamoto, *Glycoconj. J.*, **21**, 377-386(2004);
 b) M. Tagashira, A. Tanaka, K. Hisatani, Y. Isogai, M. Hori, S. Takamatsu, Y. Fijibayashi, K. Yamamoto, K. Haneda, T. Inazu, and K. Toma, *Glycoconj. J.*, **18**, 449-455(2001);
 c) Y. Hashimoto, K. Toma, J. Nishikido, K. Yamamoto, K. Haneda, T. Inazu, K. G. Valentine, and S. J. Opella, *Biochemistry*, **38**, 8377-8384(1999);
 d) K. Yamamoto, K. Haneda, R. Iguchi, T. Inazu, M. Mizuno, K. Takegawa, A. Kondo, and I. Kato, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 175-179(1999).
21. K. Matsuda, T. Inazu, K. Haneda, M. Mizuno, T. Yamanoi, K. Hattori, K. Yamamoto, and H. Kumagai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2353-2356(1997).

22. a) K. Hattori, H. Imata, K. Kubota, K. Matsuda, M. Aoyagi, K. Yamamoto, C. Jindoh, T. Yamanoi, and T. Inazu, *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.*, **25**, 69-72(1996);
b) 服部憲治郎, 稲津敏行, *有合化*, **59**, 742-754(2001).
23. T. Inazu, M. Mizuno, T. Yamazaki, and K. Haneda, "Peptide Science 1998: Proceedings of the 35th Symposium on Peptide Science," ed by M. Kondo, Protein Research Foundation, Osaka (1999), pp.153-156.
24. http://www.glytech.jp/jp/profile_about.html
25. M. Mizuno, M. Noguchi, M. Imai, T. Motoyoshi, and T. Inazu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**(2), 485-490 (2004).
26. T. Miura, Y. Hirose, M. Omae, and T. Inazu, *Org. Lett.*, **3**(24), 3947-3950(2001).
27. a) T. Miura and T. Inazu, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 1819-1821(2003);
b) T. Miura, S. Tsujino, A. Satoh, K. Goto, M. Mizuno, M. Noguchi, T. Kajimoto, M. Node, Y. Murakami, N. Imai, and T. Inazu, *Tetrahedron*, **61**, 6518-6526(2005).
28. a) T. Miura, K. Goto, H. Waragai, H. Matsumoto, Y. Hirose, M. Ohmae, H.-K. Ishida, A. Satoh, and T. Inazu, *J. Org. Chem.*, **69**(16), 5348-5353(2004);
b) T. Miura, A. Satoh, K. Goto, Y. Murakami, N. Imai, and T. Inazu, *Tetrahedron Assym.*, **16**(1), 3-6(2005);
c) 稲津敏行, 後藤浩太郎, "糖鎖化学の最先端技術", 小林一清, 正田晋一郎監修, シーエムシー出版, 東京(2005), pp.86-92.
29. a) M. Mizuno, T. Miura, K. Goto, D. Hosaka, and T. Inazu, *Chem. Commun.*, **2003**, 972-973;
b) T. Miura, K. Goto, D. Hosaka, and T. Inazu, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **42**, 2047-2051(2003);
c) K. Goto, T. Miura, M. Mizuno, H. Takaki, N. Imai, Y. Murakami, and T. Inazu, *Synlett*, **2004**, 2221-2223;
d) M. Mizuno, K. Goto, T. Miura, T. Matsuura, and T. Inazu, *Tetrahedron Lett.*, **45**, 3425-3428(2004);
e) K. Goto, T. Miura, D. Hosaka, H. Matsumoto, M. Mizuno, H.-K. Ishida, and T. Inazu, *Tetrahedron*, **60**, 8845-8854(2004);
f) M. Mizuno, K. Goto, T. Miura, and T. Inazu, *QSAR Comb. Sci.*, **25**(8), 742-752(2006).
30. M. Mizuno, K. Kobayashi, H. Nakajima, M. Koya, and T. Inazu, *Synth. Commun.*, **32**, 1665-1670(2002).
31. 稲津敏行, *野研時報*, **29**, 17-21(1986).
32. T. Yamanoi, T. Akiyama, E. Ishida, H. Abe, M. Amemiya, and T. Inazu, *Chem. Lett.*, **1989**, 335-336.
33. N. Asakura, A. Motoyama, T. Uchino, K. Tanigawa, and H. Yamada, *J. Org. Chem.*, **78**, 9482-9487(2013).

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの 糖転移活性を利用したタンパク質の 位置選択的ポリエチレングリコール化法の開発

糖鎖有機化学研究室 後藤 浩太郎

1. はじめに

ポリエチレングリコール (PEG) は無毒性かつ非免疫原性の水溶性高分子であり、このPEGにより修飾されたPEG化タンパク質は免疫原性の低下、各種酵素による分解からの保護、半減期の増大などにより、生体内での安定性を高める効果が得られることが知られている [1]。このためこれまでに様々なタンパク質のPEG化についての報告がある [2]。その最も代表的な手法としてはタンパク質のリジン側鎖アミノ基へアミド結合を介してPEG鎖の導入する方法が知られている [3]。またそれ以外の方法としては例えば、タンパク質のシステイン上のジスルフィド結合を温和な条件で還元後、遊離した2カ所のチオール部位に2官能性のPEG鎖含有化合物を挿入し再架橋することでジスルフィド結合選択的にPEG鎖を導入可能な方法などが報告されている [4]。さらに位置選択的なPEG鎖導入法の研究も精力的に行われている。例えばタンパク質のN末端選択的な手法として、リジン側鎖のアミノ基とのpKaの差を利用して弱酸性条件下で分子内にアルデヒド基を含むPEG化試薬との縮合を行う手法が報告されている [5]。またC末端選択的な手法としてはSortase [6] を使用した酵素的な手法が報告されている [7]。この酵素は、トランスペプチダーゼの一種であり、グリシンに由来するN末端アミノ基とタンパク質 (通常はLPXTG) 上のスレオニ

ン-グリシン結合との間のペプチド交換反応を触媒する。すなわちタンパク質のC末端にLeu-pro-X-Thr-Gly残基を付加し、これにSortaseとN末端にグリシンの結合したPEG誘導体を加えることで、タンパク質C末端のスレオニン-グリシン結合が切断されPEG誘導体のN末端グリシンとの間の交換反応が進行することでC末端選択的にPEG化が進行するというものである。これ以外にも様々な手法がこれまでに報告されているが、現在でもPEG鎖導入の簡便さから前述したリジン側鎖アミノ基へ導入する手法が多くを占めているのが現状である。しかしながらこの方法を用いた場合、PEG鎖がタンパク質上に複数箇所存在するアミノ基にランダムに導入されるため、PEG鎖の導入位置や数の異なる種々のPEG化タンパク質の混合物が生成物として得られてしまい、単一化合物としてPEG化タンパク質を得ことは困難である。この問題点を解決する方法の1つとして、糖タンパク質上の糖を足掛かりとして、糖転移酵素を用いた転移反応により位置選択的にPEG化する方法が報告されている [8]。この方法は糖の結合した部分にのみ選択的にPEG鎖を導入することができるため、従来の方法よりも高い位置選択性を有する利点を持つため非常に優れた手法であるといえる。さらにこの手法により得られたPEG化糖タンパク質は、従来の手法で得られたPEG化タンパク質

と同様に生体内での安定性が向上することが明らかとなっている。しかしその一方で糖転移酵素は高価であり、さらに糖供与体としてPEG化糖ヌクレオチドが必要となるため大量に調製することは非常に困難であると言わざるを得ない。そこで問題点を解決するために使用する糖転移酵素をより安価な加水分解酵素に置き換えることを考えた。近年では加水分解酵素の中には糖鎖転移活性を有する者も多く含まれていることが明らかとなっている。そのような加水分解酵素の中の1つであるエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) はエンド型加水分解酵素の1つであり、*N*-結合型糖鎖のジアセチルキトビオース結合を切断してGlcNAc1残基を有する糖タンパク質を生成するという機能を有している。さらにある種のENGaseは糖鎖を水酸基含有化合物へ付加するという転移活性を有している [9]。また、このENGaseを使用する糖転移反応の基質としては糖オキサゾリンが有用であることが既に明らかとなっている [10]。一般に糖オキサゾリンは対応する糖ヌクレオチドより安定であり合成も容易である。そこでENGaseを利用した位置選択的なタンパク質のPEG化法の開発を行うこととした。

まず、ENGaseを利用してタンパク質のPEG化を行うためにはPEG化されたオキサゾリンが必要となるが、現状ではENGaseがPEG化された化合物を基質として認識するかどうかは明らかとなっていない。そこで藤田ら [11] の報告を参考にしてマンノシルグルコサミン骨格を持つ二糖オキサゾリンを基本骨格とし、さらに*N*型糖鎖をモチーフに非還元末端のマンノース残基の3位と6位に2本のPEG鎖をそれぞれ導入した3,6-BisPEG化オキサゾリン (1) をPEG鎖導入試剤として合成することとした (Figure 1)。

2. 3,6-BisPEG化オキサゾリン (1) の合成

まず、1 の合成の鍵となる二糖誘導体 8 の

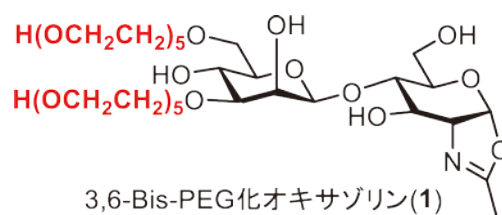
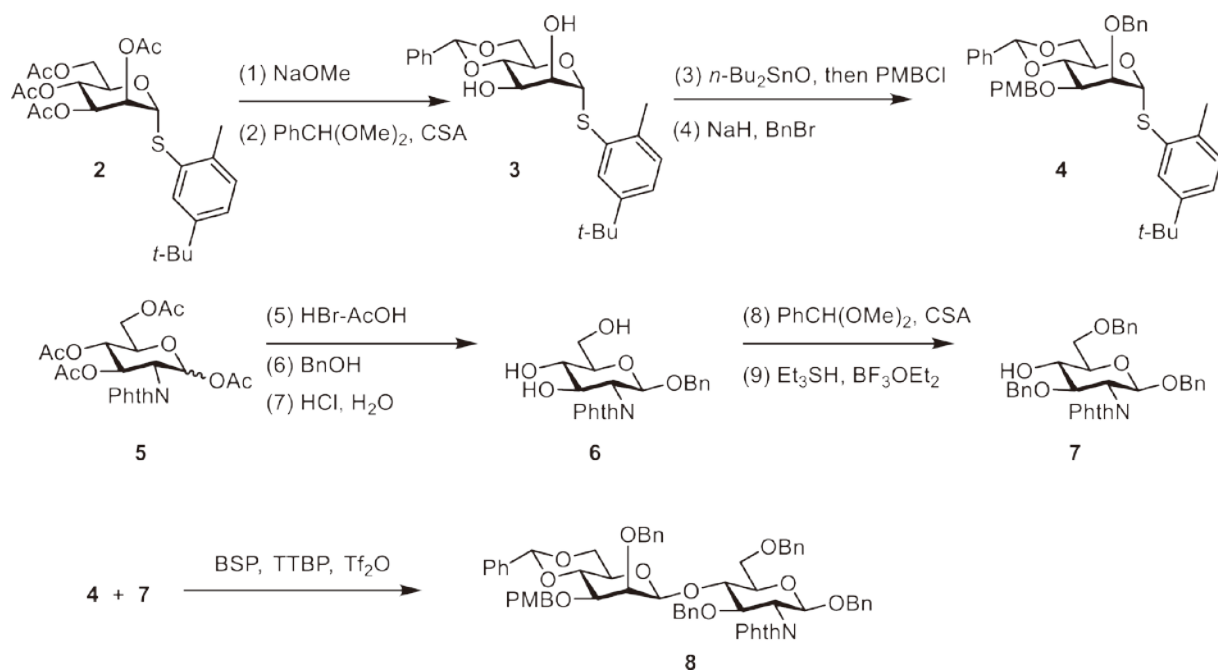


Figure 1. 3,6-Bis-PEG化オキサゾリン(1)

合成についての検討を行った (Scheme 1)。すなわち、市販のマンノースのアセチル体を常法によりチオグリコシド 2 へと変換した。次いで、脱アセチル化を行った後4,6位水酸基のベンジリデン化を経て2,3-ジオール 3 を合成した。さらに*n*-Bu₂SnOを用いて3位水酸基への位置選択的PMB化を行った。最後に2位水酸基のベンジル化を行うことで糖供与体 4 を合成した。一方の糖受容体は市販の*N*-フタロイルグルコサミン誘導体 5 を出発原料にして3工程でベンジルグリコシド 6 へと変換した。その後、常法にて4,6位水酸基のベンジリデン化を行った後、ベンジリデン基の位置選択的還元開裂を行うことで糖受容体 7 を合成した。これら合成した糖供与体 4 および糖受容体 7 のグリコシル化反応はCrichら [12] の β -マンノシル化の手法を用いて縮合することとした。その結果、収率64%で鍵中間体である β -マンノシド 8 を得た。

次にオキサゾリン体 1 の合成について検討を行った (Scheme 2)。まず、DDQによる脱PMB化を行った後、ベンジリデン基の位置選択的還元開裂を行うことで3,6-ジオール 9 を合成した。次いでエチレンジアミンを用いて*N*-フタロイル基を除去した後、アセチル化することで*N*-アセチル基へと変換した。その際に同時にアセチル化されるマンノース残基の3位と6位のアセチル基をナトリウムメトキシドにより除去することでPEG鎖導入前駆体 10 へと導いた。この前駆体 10 と別途調製したPEG化試薬(Bn(OCH₂CH₂)₅OTs)を水素化ナトリウムを用いて縮合させるこ



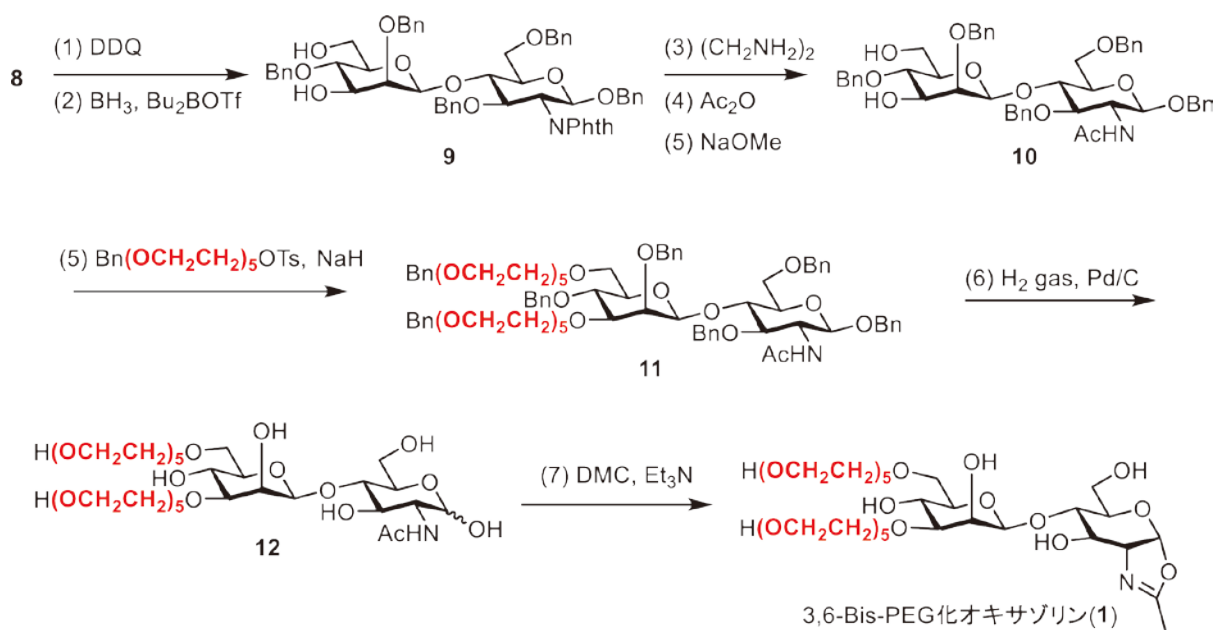
Scheme 1. 二糖8の合成

とにより、マンノース残基の3位と6位に2本のPEG鎖を導入した化合物 11 へと変換した。この 11 の全てのベンジル基をPd/Cを用いた接触水素添加にて除去してオキサゾリン化前駆体 12 を得た後、最後に正田らの手法 [10] によりDMCを用いてオキサゾリン化することで、目的のPEG鎖導入試剤である

3,6-Bis-PEG化オキサゾリン 1 を合成することに成功した。

3. 糖転移反応の検討

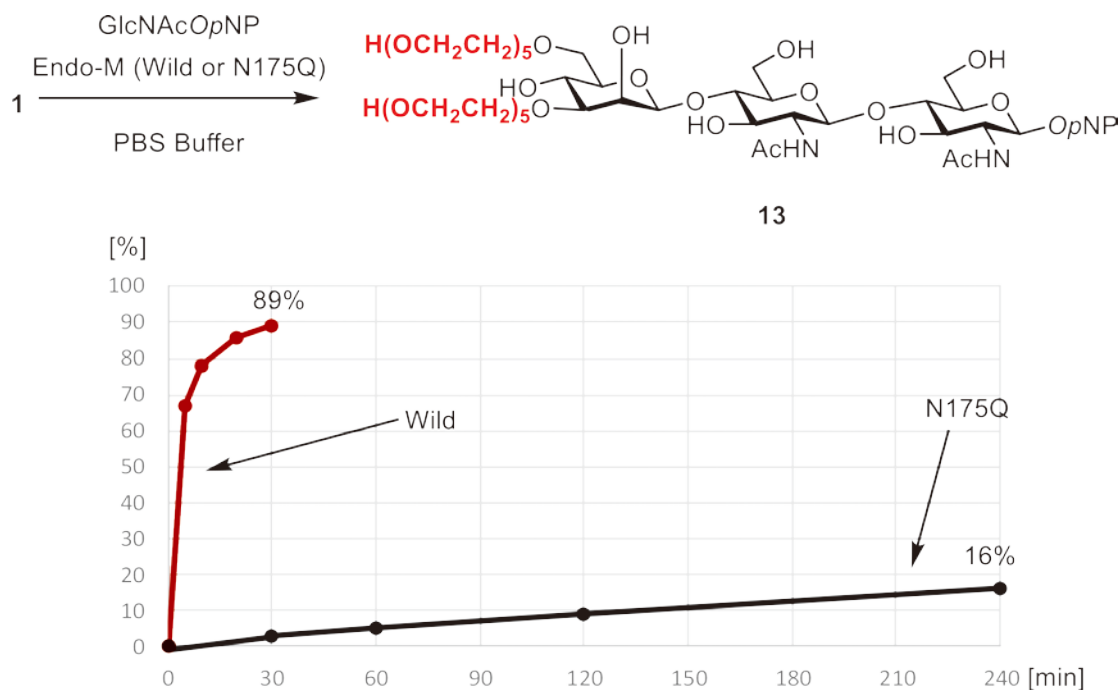
次に実際に1を糖供与体として用いた糖転移反応の検討を行った。そのモデルとして糖受容体にGlcNAcOpNPを使用することと



Scheme 2. 3,6-Bis-PEGオキサゾリン (1) の合成

した。また使用する酵素としてはEndo-Mの改変体であるN175Q [13] を用いて検討を行った。その結果HPLC収率で16%の目的化合物であるPEG鎖含有化合物 **13** の生成を確認することができた。さらに使用する酵素をEndo-M (wild)に変更したところ、反

応は速やかに進行し、89%のHPLC収率で **13** が得られることが明らかとなった。これらEndo-MのN175Qとwild を比較した結果、Endo-M (wild)の方が収率、反応時間いずれも優れていることが判明した (Scheme 3)。



Scheme 3. GlcNAcOpNPを用いたPEG化の検討

4. おわりに

今回ENGaseを用いたタンパク質の位置選択PEG化を目的としてPEG鎖導入試剤として3,6-Bis-PEG化オキサゾリン**1**を合成することに成功した、この**1**はEndo-Mの基質となり、GlcNAcOpNPに対して糖転移反応を介してPEG鎖を導入することが可能であることが明らかとなった。Endo-Mとしてはwild typeの方がN175Qより高い収率で目的のPEG鎖導入体を与えることも明らかとなった。今回得られたこれらの結果は今後のタンパク質のPEG化へ向けた布石となりうる結果だと思うので、今後より一層の研究に励みたい。

謝辞

なお本研究の一部は科研費・若手研究 (B)

(26860019) の助成を受けたものである。また本研究は水野真盛室長、森昌子研究員をはじめとする野口研究所の皆様には有益なご指導ならびにご協力によって行われました。この場を借りて心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Y. Kodera, A. Matsushima, M. Hirato, H. Nishimura, A. Ishii, T. Ueno, Y. Inada: *Prog. Polym. Sci.*, **1998**, *23*, 1233-1271.
2. (a) G. Pasut, F.M. Veronese: *J. Control. Release* **2012**, *161*, 461-472, (b) J. K. Dozier, M. D. Distefano: *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 25831-25864.

3. M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris: *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 459-476.
4. (a) S. Brocchini, A. Godwin, S. Balan, J.W. Choi, M. Zloh, S. Shaunka: *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 3-12, (b) S. Balan, J.-W. Choi, A. Godwin, I. Teo, C.M. Laborde, S. Heidelberger, M. Zloh, S. Shaunka, S. Brocchini: *Bioconjug. Chem.* **2006**, *18*, 61-76.
5. J. Hu, W. Sebal, *Int. J. Pharm.* **2011**, *413*, 140-146.
6. S. Tsukiji, T. Nagamune: *Chem. Bio. Chem.* **2009**, *10*, 787-798.
7. M.W. Popp, S.K. Dougan, T.-Y. Chuang, E. Spooner, H.L. Ploegh *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3169-3174.
8. S. DeFrees, Z.-G. Wang, R. Xing, A. E. Scott, J. Wang, D. Zopf, D. L. Gouty, E. R. Sjoberg, K. Panneerselvam, E.C.M. Brinkman-van. der Linden, R. J. Bayer, M. A. Tarp, H. Clausen: *Glycobiology* **2006**, *16*, 833-843.
9. (a) K. Yamamoto, S. Kadowaki, M. Fujisaki, H. Kumagai, T. Tochikura: *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*, 72-77, (b) Y. Tomabechi, Y. Odate, R. Izumi, K. Haneda, T. Inazu: *Carbohydr. Res.*, **2010**, *345*, 2458-2463.
10. M. Noguchi, T. Tanaka, H. Gyakushi, A. Kobayashi, S. Shoda: *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2210-2212.
11. M. Fujita, S. Shoda, K. Haneda, T. Inazu, K. Takegawa, K. Yamamoto: *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, *1528*, 9-14.
12. (a) D. Crich, M. Smith: *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9015-9020, (b) G. Zou, H. Ochiai, W. Huang, Q. Yang, C. Li, L.-X. Wang: *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18975-18991.
13. M. Umekawa, T. Higashiyama, Y. Koga, T. Tanaka, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, W. Huang, L.-X. Wang, H. Ashida: *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, *1800*, 1203.

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの特性を利用した 均一糖鎖構造を持つ抗体の調製

Preparation of monoclonal antibodies having N-glycans with homogeneous structures using substrate specificity of endo- β -N-acetylglucosaminidase

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

免疫グロブリンG (IgG) 抗体は2本の重鎖および軽鎖から構成されており、機能的には抗原と結合するFab領域ならびに抗体依存性細胞障害 (ADCC) および補体依存性細胞障害 (CDC) 等の免疫活性を媒介するFc領域に分けられる [1, 2]。またIgG抗体は、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N結合型糖鎖が結合しており、糖タンパク質に分類される [3]。抗体医薬品の製造では、ヒト型糖鎖を付加するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞等の哺乳動物細胞を宿主細胞として用いる場合が多い。しかし、産生された抗体の構造を確認するとアミノ酸配列は均一でありながら、N結合型糖鎖の構造は不均一な状態で存在している。抗体のN結合型糖鎖はナチュラルキラー細胞やマクロファージ上で発現しているFc受容体と相互作用することから、N結合型糖鎖の構造は抗体医薬品の効能に影響すると考えられる [4, 5]。

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継続してきた。その中でHER2タンパク質が過剰に発現するタイプの乳がん治療薬として用いられている、抗HER2抗体のトラスツズマブをモデル抗体として扱ってきた。これまでに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を使用した研究を進めてきた。当該トラスツズマブは、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、この抗体を出発材料として均一糖鎖を付加させたコアフコースを有さない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た [6]。

また、これまでに抗体のN結合型糖鎖のコアフコースを除去した場合、除去しない場合に比べ抗体のADCC活性が劇的に上昇することが報告されている [7, 8, 9]。しかし、コアフコースを除去しない場合において、個々の糖鎖構造を均一な状態で持つ抗体の機能に関しては明確にされていない。

今回我々は製剤として市販されているCHO細胞産生のトラスツズマブ (商品名: ハーセプチン) を出発材料とし、最初にコアフコースを有する均一糖鎖構造を高純度で持つ抗体の調製方法を確立した。調製の過程ではエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) を用いたが、個々の過程においてその特性を見極めながらENGaseを選択した。今回はその部分も交えながらご紹介する。また、調製したコアフコースを有する均一糖鎖構造を持つ抗体は、コアフコースを有さない均一糖鎖構造を持つ抗体との比較を通して、その構造と機能の関係性を調べた。

2. 実験内容および結果

2-1 CHO細胞産生トラスツズマブの糖鎖構造

最初にCHO細胞から産生された製剤としても市販されているトラスツズマブの糖鎖構造を解析した。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、糖ペプチド高感度化標識 (Bz標識) を施し、MALDI-TOF MS測定によって糖鎖構造を分析した [10]。その結果、コアフコースを有するN結合型糖鎖が全体の約86%を占めた不均一な糖鎖構造を持つことが確かめられた (図1)。また、製剤のトラスツズマブにおける糖鎖構造は、G0F、G1F、G2Fの順に多いことがわかった。

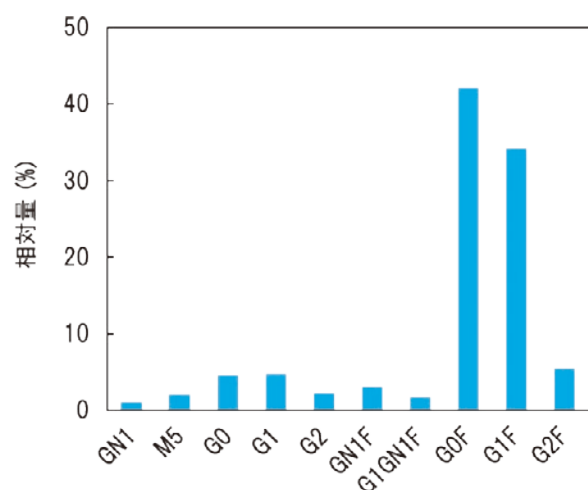


図1 CHO細胞産生トラスツズマブの糖鎖プロファイル

2-2 コアフコースを有する均一糖鎖構造を持つトラスツズマブの調製およびそれらのADCC活性 (G2F、G1aF、G1bFおよびG0F)

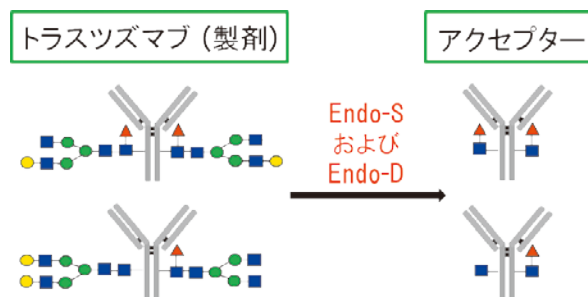


図2 アクセプター調製の模式図

2-2-1 アクセプターの調製 (Endo-SおよびEndo-Dの利用)

均一糖鎖構造を持つトラスツズマブの調製のためには、出発材料となる糖鎖構造が不均一なトラスツズマブ (製剤) に対する処理を最初に施さなければならない。トラスツズマブ (製剤) の既存の糖鎖はその構造がマンノース型および複合型等様々であり、その既存の糖鎖に対して個々の糖を1つ1つ付加または欠失させて均一化を図ることは極めて困難である。そこで、糖鎖構造の不均一な部分を切り出し、新たな糖鎖を付け替える方法が一般的に活用されている [11]。その糖鎖構造の不均一な部分を切り出す際にENGaseを活用した。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 β 1 \rightarrow 4GlcNAc) をENGaseにより加水分解し、GlcNAcもしくはFuc α 1 \rightarrow 6GlcNAcを残したトラスツズマブに変換した (図2)。本構造をアクセプターと呼ぶことにする。この反応に実際に使用したENGaseは、*Streptococcus pyogenes*由来Endo-S (GHファミリー 18) [12, 13] および*Streptococcus pneumoniae*由来Endo-D (GHファミリー 85) [14, 15] である。2種類のENGaseを同時に活用した理由であるが、Endo-Sは抗体の大部分の糖鎖を加水分解するものの、マンノースタイプの糖鎖をあまり加水分解しない基質特異性があるため、マンノースタイプの糖鎖を効率よく加水分解するEndo-Dを組み合わせることにより既存の糖鎖を切り出した。なお、Endo-Sは反応後に行なう抗体のProtein A精製において完全に除去することが困難であり、残存したEndo-Sがその後に調製する糖鎖改変抗体を加水分解してしまう現象が見られたことから、Endo-Sを残存させない手段として固定化酵素を活用した。

2-2-2 アクセプターへの糖鎖転移反応 (Endo-S変異型酵素の利用)

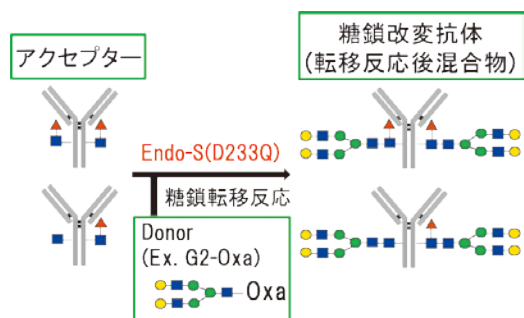


図3 G2オキサゾリン誘導体を用いた場合の糖鎖転移反応の模式図

2-1で述べた通り、製剤のトラスツズマブにおける主要な糖鎖構造は、G2F、G1FおよびG0Fであり、製剤中のこれらの糖鎖構造の生物活性への寄与を調べるためにG2F、G1aF、G1bFおよびG0F（G1F型はG1aFおよびG1bFの2種類に分けて調製）の合計4種類のコアフコースを有する均一糖鎖構造を持つトラスツズマブを調製することとした。トラスツズマブの糖鎖改変には、2-2-1で調製したアクセプターに対し、シアリルグリコペプチド（SGP）を出発原料とし当研究所糖鎖有機化学研究室で調製した上述の目的糖鎖構造を有する糖鎖オキサゾリン誘導体 [6, 16] を混合し、そこへENGaseを添加した（図3）。ここで使用したENGaseであるが、抗体への糖鎖転移活性があると報告されているEndo-Sを選択した [11]。最初にEndo-Sの野生型酵素および変異型酵素を使用し、糖鎖転移活性が高い酵素を探索した。ここで試した酵素は、野生型酵素のEndo-S(WT)ならびに変異型酵素のEndo-S(D233A)、Endo-S(D233Q)およびEndo-S(E235Q)である。それぞれの酵素の存在下で、アクセプターに対しG2オキサゾリン誘導体を糖鎖転移反応した場合の反応産物を還元状態でSDS-PAGEに供し、クマシーブリリアントブルー染色した際の電気泳動図を図4に示す。いずれの酵素を使用した場合においても、抗体の重鎖部分はアクセプターのタンパク質バンドより高分子側にシフトした糖鎖転移産物に相当するタンパク質

バンドが観察されたが、Endo-S(WT)を使用した場合にはそれがあまり得られていなかった。これは反応中にEndo-Sによる加水分解活性も同時に進行し、糖鎖転移反応で得られた糖鎖を同時に加水分解していることが考えられる。3種類の変異型酵素の中では、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Endo-S(D233Q)が最も高い糖鎖転移活性を示した。この酵素では野生型酵素に比べ加水分解活性が低下し糖鎖転移活性が増したと考えられる。この特性を利用し、4種類の糖鎖改変トラスツズマブ（トラスツズマブ-G2F、トラスツズマブ-G1aF、トラスツズマブ-G1bFおよびトラスツズマブ-G0F）を調製した（図5）。なお、G1aFはMan α 1 \rightarrow 6Man側のGlcNAcにガラクトースが1個

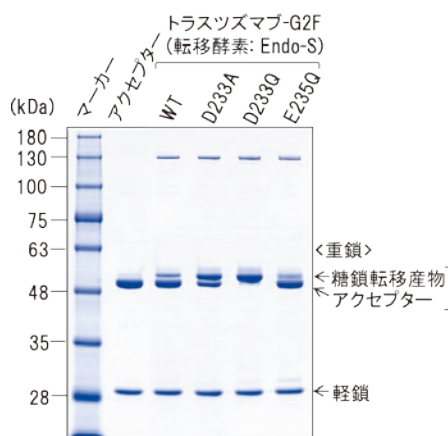


図4 各種Endo-Sを用いて反応させた際のトラスツズマブ-G2Fの電気泳動図

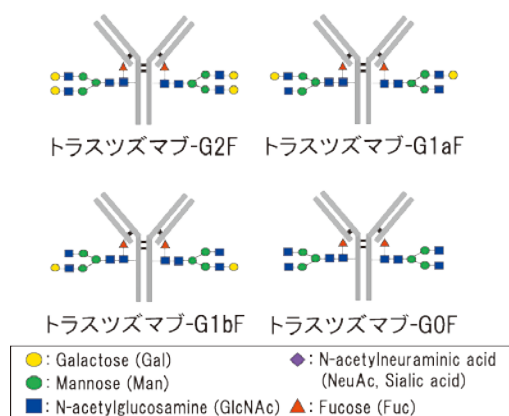


図5 調製した4種のコアフコースを有する糖鎖改変トラスツズマブの構造模式図

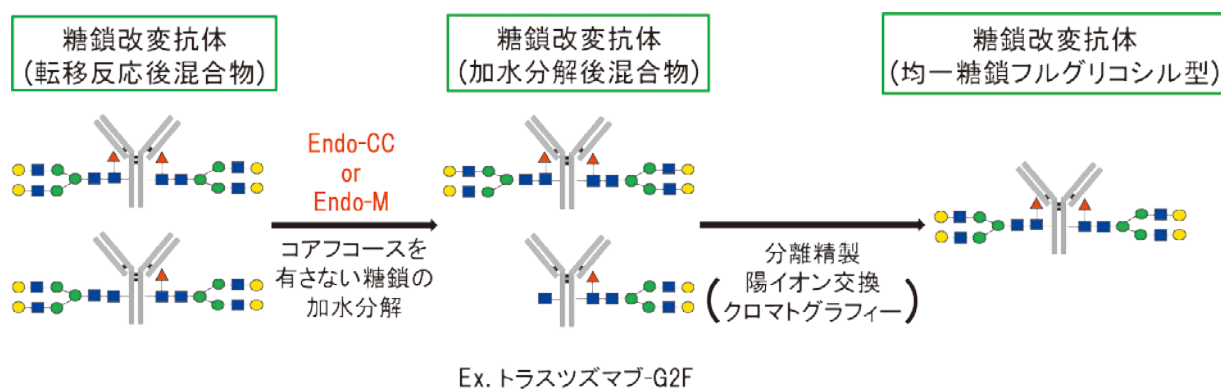


図6 トラスツズマブ-G2Fを例としたコアフコースを有さない糖鎖の選択的加水分解および陽イオン交換クロマトグラフィーによる分離精製の模式図

結合した構造、G1bFは Man α 1 \rightarrow 3Man側の GlcNAcにガラクトースが1個結合した構造を指す。

2-2-3 糖鎖改変抗体中のコアフコースを有さない糖鎖の選択的加水分解（Endo-CCまたはEndo-Mの利用）および陽イオン交換クロマトグラフィーによる分離精製を利用した均一糖鎖構造を持つ抗体の取得

2-1で示した通り、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さない糖鎖をおよそ14%含んでいる。そのため、Endo-S(D233Q)を糖鎖転移酵素として用いた2-2-2の反応では、その基質特異性からコアフコースを有するアクセプターおよび有さないアクセプターの両方に糖鎖転移反応が進み、生成した糖鎖改変抗体にはコアフコースを有する糖鎖を持つ抗体および有さない糖鎖を持つ抗体の両方が混在した状態となる。実際にこの状態の抗体の糖鎖構造をMassにより解析したところ、改変糖鎖の中にコアフコースを有さない糖鎖が4～15%含まれていた。コアフコースを有する均一糖鎖構造を持つ抗体を取得するためには、このコアフコースを有さない糖鎖構造を持つ抗体を除去し目的物の純度を向上させる必要がある。我々はその目的に対してもENGaseを活用した。

ここで要求するENGaseの特性は、糖鎖改変抗体中のコアフコースを有さない糖鎖を選択的に加水分解することである。我々は、陽イオン交換クロマトグラフィーを利用して糖鎖付加に伴う電荷の違いから2つの重鎖の両方に同一糖鎖が結合した抗体（フルグリコシル型抗体）およびGlcNAcもしくはGlcNAc α 1 \rightarrow 6Fucの糖鎖を残した抗体の混合物からフルグリコシル型抗体のみを分離精製する方法を利用してきた [6, 17]。したがって、ENGaseによってコアフコースを有さない糖鎖のみを選択的に加水分解できればクロマトグラフィーの技術を利用して目的の抗体のみを取得することができる（図6）。ここで選択したENGaseは、いずれもGHファミリー-85に属する*Mucor hiemalis*由来Endo-M [18] または*Coprinopsis cinerea*由来Endo-CC [19] である。予備検討として不均一な糖鎖構造を持つ製剤のトラスツズマブに対し両酵素をそれぞれ作用させ、反応前後の糖ペプチドをLC-ESI MSを用いて解析した。その結果、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した。これらの結果を踏まえ、4種の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。その後、前

述の陽イオン交換クロマトグラフィーによる分離精製を施し、コアフコースを有する均一糖鎖構造を持つフルグリコシル型抗体を取得した。

分離精製により得られた糖鎖改変トラスツズマブに関して、糖ペプチド化した後LC-ESI MSを用いてその糖鎖構造を解析した。いずれの糖鎖改変トラスツズマブにおいても、糖鎖転移反応で利用した糖鎖オキサゾリン誘導体由来した糖鎖のみが付加されていることを確認した。また、トラスツズマブ-G2F、トラスツズマブ-G1aF、トラスツズマブ-G1bFおよびトラスツズマブ-G0Fに関しては、Endo-CCによる加水分解および分離精製の過程を通してコアフコース含有率を99%以上にまで向上させたフルグリコシル型抗体として取得できていることが確認された。

2-2-4 各種トラスツズマブのADCC活性

調製した抗体のADCC活性を測定した。測定には、Promega社製のADCC reporter Bioassayキット [20]を用いた。抗体はターゲット細胞と結合した際に、エフェクター細胞上のFc γ 受容体タイプIIIa (Fc γ RIIIa)とも結合し、その際にADCCを導き出すことによりターゲット細胞を傷害する。本実験で

抗体	EC ₅₀ [ng/ml]
トラスツズマブ-F86% (製剤)	6.97
トラスツズマブ-G2-F0%	1.35
トラスツズマブ-G1a-F0%	1.22
トラスツズマブ-G1b-F0%	2.05
トラスツズマブ-G0-F0%	2.25
トラスツズマブ-G2-F99%	25.45
トラスツズマブ-G1a-F99%	32.78
トラスツズマブ-G1b-F99%	31.97
トラスツズマブ-G0-F99%	108.50

表1 各種トラスツズマブのADCC活性におけるEC₅₀

はターゲット細胞にHER2高発現株のヒト乳がん細胞であるSK-BR-3細胞を使用した。また、Fc γ RIIIaのV158変異体を安定に発現し、ホタルルシフェラーゼの発現を駆動するNFAT応答配列を安定に保持する遺伝子組換えJurkat細胞をエフェクター細胞として用いた。

ここでは、調製した4種のコアフコースを有する均一糖鎖構造を持つトラスツズマブ [トラスツズマブ-G2-F99% (Fの後の数値はコアフコース含有率)、トラスツズマブ-G1a-F99%、トラスツズマブ-G1b-F99%およびトラスツズマブ-G0-F99%]のADCC活性を測定した。また、糖鎖未改変のトラスツズマブ-F86% (製剤) および同一糖鎖間でのコアフコースの有無によるADCC活性比較のため、4種のコアフコースを有さない均一糖鎖構造を持つトラスツズマブも測定に用いた。4種のコアフコースを有さない均一糖鎖構造を持つトラスツズマブについては、カイコ絹糸腺産生トラスツズマブに対しG2、G1a、G1bまたはG0の均一糖鎖を付加させたトラスツズマブ (トラスツズマブ-G2-F0%、トラスツズマブ-G1a-F0%、トラスツズマブ-G1b-F0%およびトラスツズマブ-G0-F0%)であり、[6]に示した方法で調製した。各種トラスツズマブは1 μ g/mlを起点に1/3希釈を繰り返した計10段階の濃度のものを調製し測定に用いた。

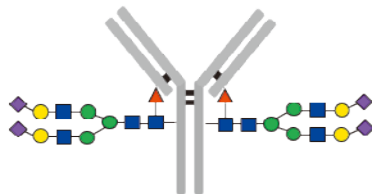
測定したADCC活性におけるトラスツズマブの半数効果濃度 (EC₅₀)を表1に示す。コアフコース含有率が99%以上のトラスツズマブ4種はいずれも高いEC₅₀を示し、ADCC活性が大きく低下した。特にトラスツズマブ-G0-F99%は、活性がほぼ消失していると言える。一方、コアフコースを有さないトラスツズマブはいずれも製剤やコアフコース含有率が99%以上のトラスツズマブと比較するとEC₅₀が低く、高いADCC活性を示した。以上により、コアフコースを有するトラスツズ

マブとコアフコースを有さないトラスツズマブではADCC活性に大きな差があり、同一糖鎖間で比較した場合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。

2-3 コアフコースを有する均一糖鎖構造を持つトラスツズマブの調製およびそれらのADCC活性 [A2(α 2,6)F]

2-3-1 コアフコースを有するトラスツズマブ-A2(α 2,6)Fの調製(Endo-F3変異型酵素の利用)

コアフコースを有するトラスツズマブ-A2(α 2,6)F (2つのシアル酸がそれぞれ末端のガラクトースと α 2,6結合した構造; 図7) に関して、最初に2-2で示した方法での調製を試みた。しかし、最終的な糖鎖改変抗体のコアフコース含有率はEndo-CCを使用した場合で95%、Endo-Mを使用した場合で97%に留まり、これらの方法ではコアフコース含有率99%以上の純度で調製することができなかった。



トラスツズマブ-A2(α 2,6)F

図7 トラスツズマブ-A2(α 2,6)Fの構造模式図

そこで、トラスツズマブ-A2(α 2,6)Fに関しては、別の方法で純度を向上させることができないものか検討した。最近、L.X. Wangらのグループから抗体への糖鎖転移反応において、*Elizabethkingia meningoseptica*由来Endo-F3 (GH family 18) の変異型酵素を糖鎖転移酵素として用いた際にアクセプターのFuc α 1 \rightarrow 6GlcNAc構造に対し特異的に糖鎖が転移することが報告された [21]。そこで、我々もEndo-F3の変異型酵素を用いた方法

によるトラスツズマブ-A2(α 2,6)Fの調製を試みた。変異型酵素としてEndo-F3(D165Q)を使用し糖鎖転移反応を行ない、糖鎖転移産物の糖鎖構造をMassにより解析したところ、この時点で改変された糖鎖構造のうちコアフコースを含むものが99%以上であることが確認され、その後陽イオン交換クロマトグラフィーにより未反応物等を除去し、コアフコース含有率99%以上のフルグリコシル型抗体としてトラスツズマブ-A2(α 2,6)Fを調製することができた。この結果から、文献での報告通りEndo-F3の変異型酵素には、Fuc α 1 \rightarrow 6GlcNAc構造に特異的に糖鎖が転移する基質特異性があることが確認され、均一糖鎖構造を持つ抗体の調製の工程としては2-2-3で実施したEndo-MまたはEndo-CCによる加水分解反応を実施せずに済むため、操作を1工程簡略化できることがわかった。

2-3-2 各種トラスツズマブのADCC活性

ここではトラスツズマブ-A2(α 2,6)Fのコアフコース含有率の異なるサンプルに関してADCC活性を測定した。すなわち、カイコ絹糸腺産生トラスツズマブに対しA2(α 2,6)の均一糖鎖を付加させたトラスツズマブ-A2(α 2,6)-F0%、途中の加水分解反応にEndo-CCを用いて調製したトラスツズマブ-A2(α 2,6)-F95%、途中の加水分解反応にEndo-Mを用いて調製したトラスツズマブ-A2(α 2,6)-F97%、および糖鎖転移反応にEndo-F3を用いて調製したトラスツズマブ-A2(α 2,6)-F99%を測定

抗体	EC ₅₀ [ng/ml]
トラスツズマブ-A2(α 2,6)-F0%	0.49
トラスツズマブ-A2(α 2,6)-F95%	9.24
トラスツズマブ-A2(α 2,6)-F97%	14.96
トラスツズマブ-A2(α 2,6)-F99%	27.86

表2 各種トラスツズマブ-A2(α 2,6)のADCC活性におけるEC₅₀

に使用し、EC₅₀を算出した (表2)。

コアフコース含有率に応じてEC₅₀が上昇し、ADCC活性が低下した。99%のサンプルは、95%および97%のサンプルに比べさらにEC₅₀が上昇しており、ADCC活性はG2F、G1aF、G1bFおよびG0Fの99%のサンプルと同様に大きく低下した。これらの結果からもトラスツズマブのADCC活性はコアフコースの存在が大きく影響することが示唆された。

3. まとめ

今回我々はCHO細胞産生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糖鎖構造を持つ抗体を高純度で調製した。その際、ENGaseの基質特異性を巧みに利用した。糖鎖構造が不均一なトラスツズマブ製剤からアクセプターを調製する部分では、Endo-Sの基質特異性の低い部分をEndo-Dで補完して調製した。Endo-Sを使用した糖鎖転移反応では糖鎖転移活性の高い変異型酵素を選択した。コアフコースを有する抗体と有さない抗体の混合物に対しては、コアフコースを有さない糖鎖を加水分解する基質特異性を持つEndo-CCまたはEndo-Mを使用し、その後の陽イオン交換クロマトグラフィーを用いた分離精製を通して、フルグリコシル型のコアフコースを有する均一糖鎖構造を持つトラスツズマブを高純度で取得する方法を確立した。しかし、A2(α 2,6)型についてはこの方法では高純度のものが調製できなかった。これはA2(α 2,6)型に対しては、Endo-CCまたはEndo-Mによる加水分解活性が他の糖鎖構造より低いことが考えられる。そこで代わりに糖鎖転移酵素として使用したEndo-F3の変異型酵素は、Fuc α 1 \rightarrow 6GlcNAcへの糖鎖転移に関する基質特異性が非常に高いことが確認された。このように、糖タンパク質の糖鎖リモデリング反応を行なう上で、ENGaseの特性を理解し選択することは非常に重要な鍵となる。しかし、現在見出されている

ENGaseを使用しても目的の反応が進行しないケースも依然として存在する。この解決には使用できるENGaseの種類をさらに拡充し、その特性に関する情報を蓄積する必要があると考える。

今回このように調製したコアフコースを有する均一糖鎖構造を持つ抗体のADCC活性測定の結果から、トラスツズマブではコアフコースを限りなく100%に近い割合で持つとADCC活性が大きく低下することが示され、コアフコースのADCC活性に与える影響が大きいことが改めて示された。この部分は今後他の抗体でも検証していきたいと思う。

しかし、製剤のトラスツズマブではコアフコースを有する糖鎖がおおよそ86%も含まれており、残りの14%のコアフコースを有さない糖鎖がトラスツズマブのADCC活性の大部分を担っていることが想定される。その意味では、抗体医薬品の製造において効率よくADCC活性等の薬効を示す製造方法を選択する必要があると考える。

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堂崎雅仁氏、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、元常務理事の白井 孝氏、天野純子室長、水野真盛室長、高田美生室長、黒河内政樹研究員、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、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なわれており、今回研究成果をご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. R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* **21** (2005) 11-16.
2. F. Nimmerjahn, J.V. Ravetch, *Nat. Rev. Immunol.* **8** (2008) 34-47.
3. R. Huber, J. Deisenhofer, P.M. Colman, M. Matsushima, W. Palm, *Nature* **264** (1976) 415-420.
4. M.R. Wormald, P.M. Rudd, D.J. Harvey, S.C. Chang, I.G. Scragg, R.A. Dwek, *Biochemistry* **36** (1997) 1370-1380.
5. S. Krapp, Y. Mimura, R. Jefferis, R. Huber, P. Sondermann, *J. Mol. Biol.* **325** (2003) 979-989.
6. M. Kurogochi, M. Mori, K. Osumi, M. Tojino, S. Sugawara, S. Takashima, Y. Hirose, W. Tsukimura, M. Mizuno, J. Amano, A. Matsuda, M. Tomita, A. Takayanagi, S. Shoda, T. Shirai, *PLoS ONE* **10** (2015) e0132848.
7. R.L. Shields, J. Lai, R. Keck, L.Y. O'Connell, K. Hong, Y.G. Meng, S.H.A. Weikert, L.G. Presta, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 26733-26740.
8. T. Shinkawa, K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, K. Uchida, H. Anazawa, M. Satoh, M. Yamasaki, N. Hanai, K. Shitara, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 3466-3473.
9. N. Yamane-Ohnuki, S. Kinoshita, M. Inoue-Urakubo, M. Kusunoki, S. Iida, R. Nakano, M. Wakitani, R. Niwa, M. Sakurada, K. Uchida, K. Shitara, M. Satoh, *Biotechnol. Bioeng.* **87** (2004) 614-622.
10. M. Kurogochi, J. Amano, *Molecules* **19** (2014) 9944-9961.
11. W. Huang, J. Giddens, S.Q. Fan, C. Toonstra, L.X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 12308-12318.
12. M. Collin, A. Olsen, *EMBO J.* **20** (2001) 3046-3055.
13. J.J. Goodfellow, K. Baruah, K. Yamamoto, C. Bonomelli, B. Krishna, D.J. Harvey, M. Crispin, C.N. Scanlan, B.G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 8030-8033.
14. T. Muramatsu, *J. Biol. Chem.* **246** (1971) 5535-5537.
15. T. Tai, K. Yamashita, M. Ogata-Arakawa, N. Koide, T. Muramatsu, S. Iwashita, Y. Inoue, A. Kobata, *J. Biol. Chem.* **250** (1975) 8569-8575.
16. M. Noguchi, T. Tanaka, H. Gyakushi, A. Kobayashi, S. Shoda, *J. Org. Chem.* **74** (2009) 2210-2212.
17. S. Wang, R. Ionescu, N. Peekhaus, J.Y. Leung, S. Ha, J. Vlasak, *J. Chromatogr. A.* **1217** (2010) 6496-6502.
18. S. Kadowaki, K. Yamamoto, M. Fujisaki, K. Izumi, T. Tochikura, T. Yokoyama, *Agric. Biol. Chem.* **54** (1990) 97-106.
19. Y. Eshima, Y. Higuchi, T. Kinoshita, S. Nakakita, K. Takegawa, *PLoS ONE* **10** (2015) e0132859.
20. B.S. Parekh, E. Berger, S. Sibley, S. Cahya, L. Xiao, M.A. LaCerte, P. Vaillancourt, S. Wooden, D. Gately, *mAbs* **4** (2012) 310-318.
21. J.P. Giddens, J.V. Lomino, M.N. Amin, L.X. Wang, *J. Biol. Chem.* **291** (2016) 9356-9370.

抗体糖鎖リモデリングに向けたEndoS2 D184M変異体の解析

Analysis of EndoS2 D184M mutant
for the use of glycoengineering of antibodies糖鎖生物学研究室 HGPプロジェクト 高島 晶
Shou TAKASHIMA

1. はじめに

現在、がん治療等で抗体医薬品が広く活用されている。抗体は分子量約5万の重鎖2本と分子量約2万5千の軽鎖2本によって構成されており、重鎖と軽鎖、および重鎖同士がジスルフィド結合を介して結合している。そして重鎖の297番目のアスパラギン残基はN-結合型糖鎖の結合部位となっている。抗体に結合している糖鎖（抗体糖鎖）の構造は、抗体依存性細胞傷害活性や抗炎症作用などの抗体機能に影響を及ぼす場合があることから [1-3]、抗体医薬品の機能向上を目指した糖鎖改変の取り組みが注目されるようになってきた [4]。ところで、糖タンパク質のある糖鎖付加部位に結合している糖鎖の構造を解析すると、構成糖や鎖長の異なる様々な構造の

糖鎖が含まれていることが多い。抗体の場合も例外ではなく、種々の構造をした糖鎖が存在していることが報告されている [5]。このことは、抗体「医薬品」と言っても、例えば、非常に高い抗体依存性細胞傷害活性を発揮できる糖鎖をもつ抗体や、逆に、薬効がない、あるいは極めて低い活性しか発揮しない糖鎖が結合した抗体が混在していることを示しており、医薬品としての品質や機能の面からすると、好ましくない状況と考えられる。近年、この解決策として、抗体に結合している不均一構造の糖鎖をまずEndo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase) で除去し、つぎに抗体上に残ったGlcNAc残基に、化学合成等によって調製した均一構造をもつ糖鎖のオキサゾリン体

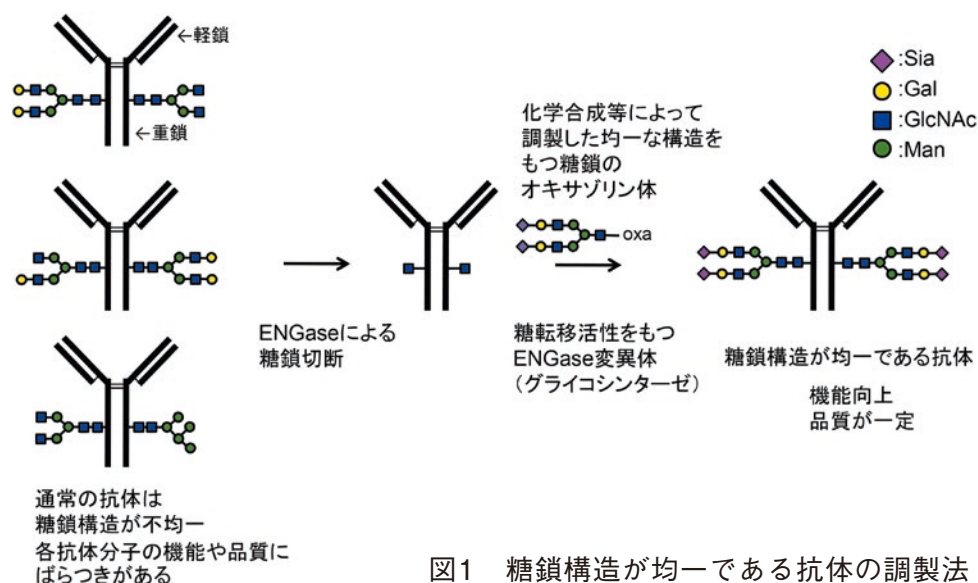


図1 糖鎖構造が均一である抗体の調製法

異体（グライコシターゼ）を用いて結合させ、抗体「医薬品」としての機能および品質を向上させようという試みがなされるようになってきた（図1）。

2. EndoSとEndoS2

この抗体糖鎖のリモデリングに用いるENGaseとして注目されるようになってきた酵素の一つに化膿レンサ球菌*Streptococcus pyogenes* Serotype M1由来のEndoSがある。本酵素は2001年にMattias Collin博士によって初めてクローニングされたもので、抗体糖鎖に対する嗜好性が非常に高いという基質特異性を有する [6]。また2013年には、*S. pyogenes* Serotype M49由来のEndoS2が、同じくMattias Collin博士らのグループによってクローニングされた [7]。EndoS2はEndoSと同様に抗体糖鎖を切断するという基質特異性を有していたが、両者の基質特異性は若干異なっていた。すなわち、EndoSはハイマンノース型およびハイブリッド型の抗体糖鎖に対する切断活性はなく、専ら2本鎖複合型の抗体糖鎖を切断するが、EndoS2にはこれらすべてのタイプの抗体糖鎖を切断する活性があるという [8]。またEndoS2は抗体糖鎖以外にも α 1-acid glycoproteinに含まれる2本鎖複合型糖鎖を切断できるが、EndoS

はその糖鎖を切断できない [7]。抗体糖鎖を特異的に切断するこのような酵素がなぜ存在するのかということに関して、*S. pyogenes*は抗体を特異的に切断するSpeB、IdeSといったプロテアーゼも生産することが報告されており [9]、これらのプロテアーゼやEndoS様酵素を利用して、感染時に宿主の抗体を機能させないようにしていると考えられる。

構造面からみると、EndoSは全長995アミノ酸、EndoS2は全長843アミノ酸からなり、それぞれアミノ酸配列レベルで37%の相同性を示す。EndoSについては立体構造解析がなされており、特徴的なドメイン構造をとっていることが報告されている [10]。なお、EndoSに対してEndoS2のアミノ酸配列が若干短い、これはEndoS2のCatalytic domainのN末端側、Leucine-rich repeatの中央部分、およびC末端のThree-helix bundle領域の大部分が欠失しているためである（図2）。

ところでENGaseは糖質関連酵素のデータベースであるCAZy(Carbohydrate-Active enZymes)の分類によると、GH(Glycoside Hydrolase)18とGH85の2つのグループに分けられる。EndoSとEndoS2はGH18グループに属する酵素である。GH18グループのENGaseとしては、ほかにEndoH、EndoF1、EndoF2、EndoF3などの酵素が知られているが、これ

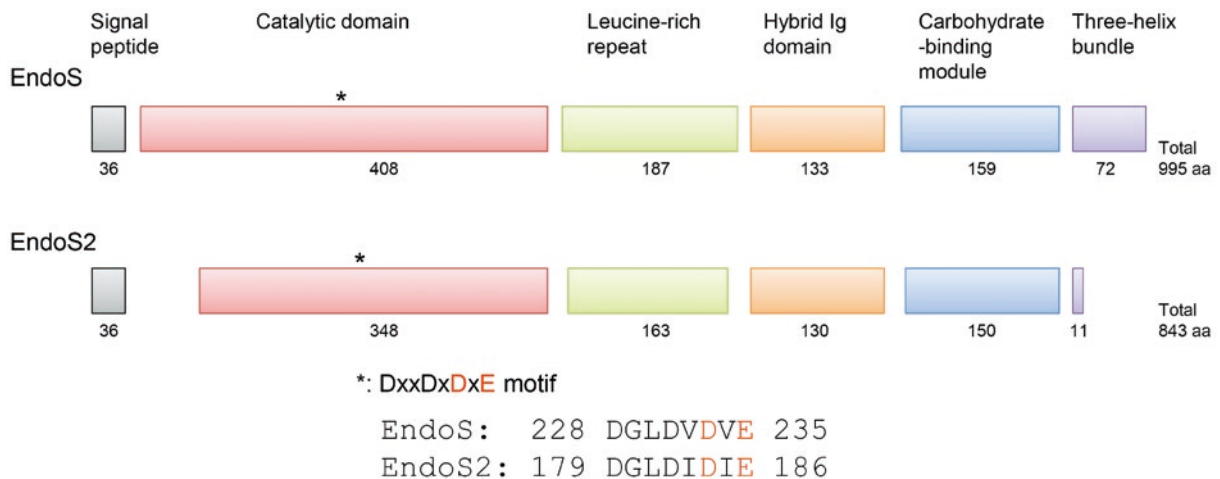


図2 EndoSおよびEndoS2のドメイン構造

らの酵素の活性部位にはDxxDxDxEというモチーフが保存されている。このうち、グルタミン酸残基はグリコシダーゼの加水分解反応におけるgeneral acid/base残基として機能しており、その2残基前のアスパラギン酸残基は、反応中間体のオキサゾリニウムイオンの形成促進に関与していると考えられている [11]。これに対し、GH85グループのENGaseとしては、Endo-M、Endo-CCといった酵素が知られており、これらの酵素の活性部位にはNx Eという配列が保存されている。ENGaseの中には、糖鎖切断活性のほかに、その逆反応の糖転移活性を発揮する酵素も存在するが、そのような酵素の活性部位に変異を導入して、糖鎖切断活性を抑制するとともに糖転移活性を強化した変異体が、糖タンパク質糖鎖のリモデリングにおけるグライコシターゼとして活用されている [12, 13]。

3. EndoS2 D184M変異体とEndoS D233Q変異体の酵素活性の比較

EndoSについては2012年にLai-Xi Wang博士らのグループによって、DxxDxDxEモチーフ内にあるアスパラギン酸残基を置換してグライコシターゼ化したD233A変異体、D233Q変異体が報告されており [11]、野口研究所のHGP (Homogeneous GlycoProtein) プロジェクトでも、このEndoS変異体 (D233Q) を利用して、抗体糖鎖のリモデリングを実施してきた [14]。また2016年に、同じくLai-Xi Wang博士らのグループによって、EndoSのD233に相当するEndoS2のD184を他のアミノ酸に置換してグライコシターゼ化した変異体が報告されている [15]。これらEndoS2 D184変異体の中では、D184M変異体が優れたグライコシターゼとして紹介されており、野口研究所のHGPプロジェクトにおいても、本変異体の諸性質を検討してみることにした。

EndoS2の遺伝子は、American Type Culture

Collection (ATCC)より*S. pyogenes* NZ131株 (Serotype M49) のgenomic DNAを入手し、それを鋳型としてPCR増幅した。これをもとに、部位特異的変異導入法を用いてEndoS2 D184M変異体をコードするDNAを調製した。このDNA断片をpGEX-6P-1発現ベクター (GEヘルスケア) に挿入し、EndoS2 D184M変異体をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として大腸菌に生産させた。このGST融合タンパク質を、グルタチオン-セファロース (GEヘルスケア) を用いてアフィニティー精製した後、EndoS2 D184M変異体のN末端側に付加されたGSTを、PreScission Protease (GEヘルスケア) を用いて除去して、EndoS2 D184M変異体を得た。また、EndoS D233Q変異体やEndoF3 D165A変異体 [12] もGST融合タンパク質として大腸菌に生産させ、同様に調製した。

なお、糖転移反応のドナー基質であるシアル酸含有2本鎖複合型糖鎖のオキサゾリン体 (A2-oxa、図3A)、およびアクセプター基質である($\pm \alpha$ 1,6-Fuc)-GlcNAc抗体の調製は既報に従った [14, 16]。

EndoS2 D184M変異体を用いた抗体アクセプターへの糖転移反応は、既報 [15] を参考にして、PBS (pH 7.4)中で、抗体アクセプター 100 μ g (69 μ M)、オキサゾリン体糖鎖基質 1.38 mM、および酵素溶液の合計10 μ Lの反応系を基本として、適宜、濃度、液量等を調整して、30°Cの条件で行った。

まず、本実験における糖転移反応に使用する酵素量について検討した。A2-oxaをドナー基質、CHO細胞にて生産された抗体医薬品のトラスツズマブに対してENGase処理を施して調製した($\pm \alpha$ 1,6-Fuc)-GlcNAc抗体をアクセプター基質とした上記10 μ Lの反応系において、EndoS2 D184M変異体の添加量を増減させて糖転移反応を実施した。この反応産物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した結果を図3Bに、ま

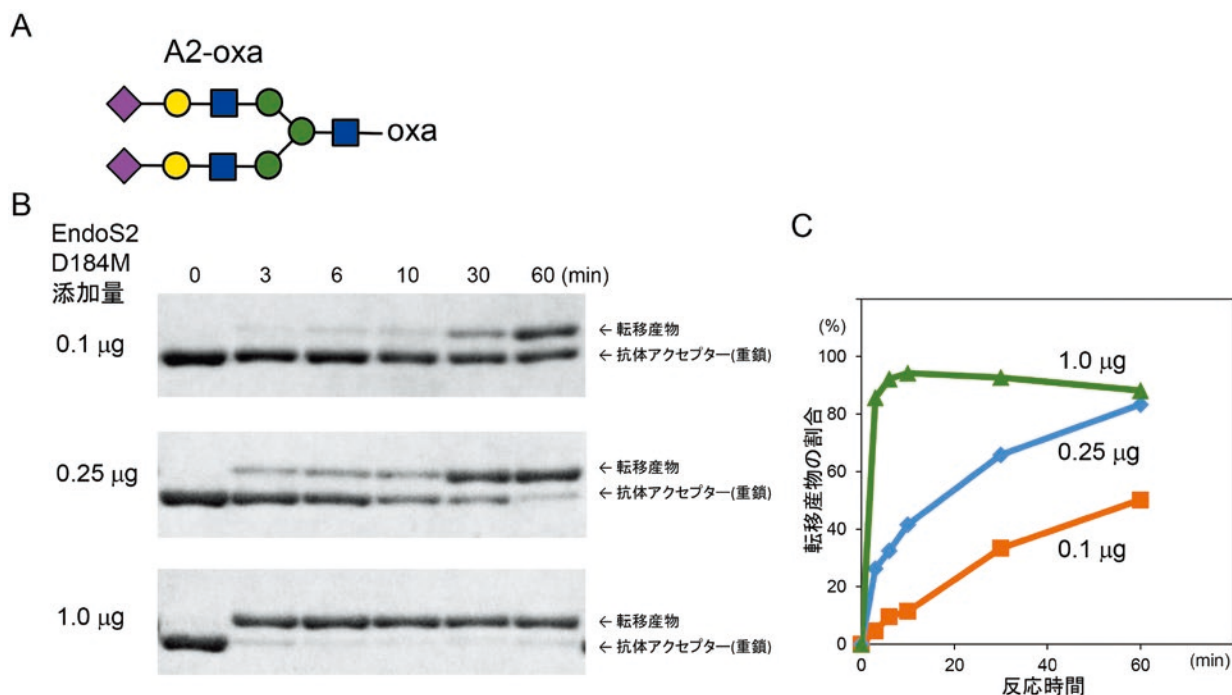


図3 EndoS2 D184M変異体による2本鎖複合型糖鎖 (A2) のトラスツズマブアクセプターへの転移反応 (酵素量の検討)

- A. シアル酸含有2本鎖複合型糖鎖のオキサゾリン体 (A2-oxa) 記号は図1と同じ
 B. 糖転移反応産物のSDS-PAGE 抗体アクセプター (重鎖) の分子量は約5万
 C. 反応時間と転移産物量の関係

たそのときの転移産物の割合を測定した結果を図3Cに示す。その結果、この反応系においては、酵素添加量が $0.1 \mu\text{g}$ のときは、反応1時間での糖転移産物の割合は50%であったが、酵素添加量を $0.25 \mu\text{g}$ にすると、転移産物の割合は80%以上になった。一方、酵素添加量が $1.0 \mu\text{g}$ の場合では、反応3分で転移産物の割合は80%以上に達したが、酵素反応の経時の変化を観察する上では、反応が速すぎると思われた。基質の組合せによって転移効率が増減することが予想されたため、以後の実験では酵素添加量を $0.25 \mu\text{g}$ にして反応させることにした。

酵素量 $0.25 \mu\text{g}$ でEndoS2 D184M変異体あるいはEndoS D233Q変異体を用い、上記と同じドナー/アクセプター基質の組合せによる糖転移反応を2時間まで実施した結果を図4に示す。この基質の組合せで、同じ量 (重

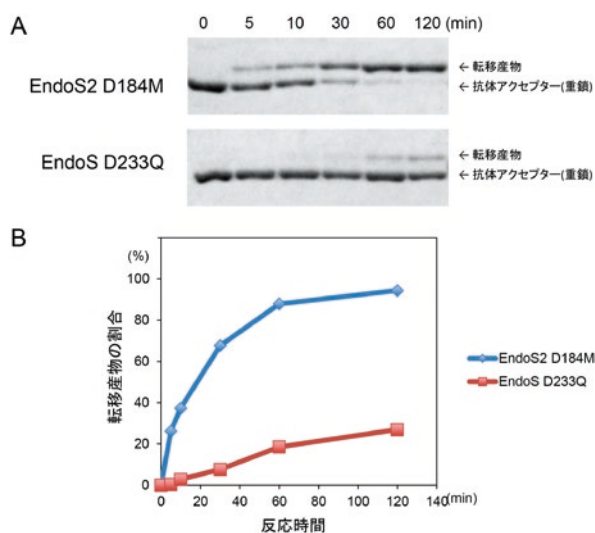


図4 EndoS2 D184M変異体とEndoS D233Q変異体による2本鎖複合型糖鎖 (A2) のトラスツズマブアクセプターへの転移反応
 A. 糖転移反応産物のSDS-PAGE
 B. 反応時間と転移産物量の関係

量)の酵素を用いた場合、反応の初期段階(5分)では、EndoS2 D184M変異体のほうが、EndoS D233Q変異体よりも約70倍、転移産物量が多かった。また、反応2時間ではEndoS2 D184M変異体による転移反応はほぼ終了しており、その転移産物量は、同反応時間におけるEndoS D233Q変異体の転移産物量の3.5倍であった。

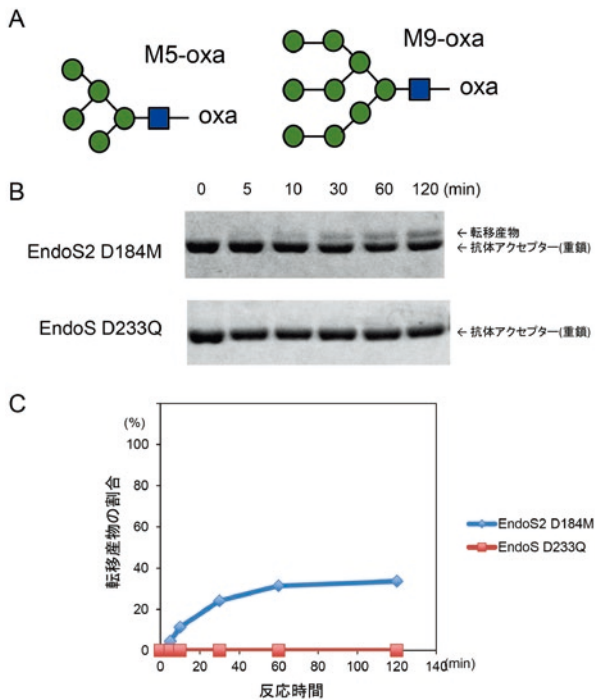


図5 EndoS2 D184M変異体とEndoS D233Q変異体によるハイマンノース型糖鎖混合物(M5～M9)のトラスツズマブアクセプターへの転移反応

- A. ハイマンノース型糖鎖のオキサゾリン体の例(M5-oxaおよびM9-oxa)
記号は図1と同じ
M5～M9混合物における各糖鎖の存在比はM5>M6>M7, M8>>M9
- B. 糖転移反応産物のSDS-PAGE
- C. 反応時間と転移産物量の関係

つぎに、ウシ臍臓由来リボヌクレアーゼBより調製したハイマンノース型糖鎖(M5～M9)の混合物をオキサゾリン体化した糖鎖

(図5Aには代表としてM5-oxaとM9-oxaを示す)をドナー基質とし、上記トラスツズマブの抗体アクセプターを用いてEndoS2 D184M変異体あるいはEndoS D233Q変異体により実施した糖転移反応の結果を図5B, Cに示す。EndoS2 D184M変異体の場合、A2-oxaをドナー基質として用いた場合にくらべると、転移効率は低いものの反応1時間で転移産物の割合は31%に達し、この時点で転移反応はほぼ終了していると考えられた。一方、EndoS D233Q変異体の場合は、抗体アクセプターに対しハイマンノース糖鎖を転移することができなかった。野生型EndoSは抗体上のハイマンノース型糖鎖やハイブリッド型糖鎖を切断できないが[8]、これらの糖鎖のオキサゾリン体を基質とした場合には、切断活性や転移活性を示すという[17]。EndoS D233Q変異体では、変異の影響で酵素活性が野生型より低下しているため、ハイマンノース型糖鎖の転移ができなくなっている可能性がある。

ところで、EndoS、EndoS2ともに抗体上の2本鎖複合型糖鎖を切断するが、この場合、糖鎖付加部位のアスパラギンに結合したGlcNAcに、 α 1,6-結合で付加したFuc(コアフコース)が存在するほうが好基質となる。一方、抗体依存性細胞傷害活性はコアフコースのない抗体のほうが高い[1, 2]。そこで、コアフコースが付加していない抗体を作り出すポテリジェント技術[4]によって作製された抗体医薬品であるモガムリズマブの抗体アクセプターを調製し、これとA2-oxaを用いてEndoS2 D184M変異体あるいはEndoS D233Q変異体による糖転移反応を実施してみた(図6A, B)。

その結果、両変異体とも、大部分の抗体糖鎖にコアフコースが付加しているトラスツズマブの場合とくらべると転移効率が低く、反応4時間での転移産物の割合は、EndoS2 D184M変異体で29%、EndoS D233Q変異体で7%であった。なお、この実験では、酵素

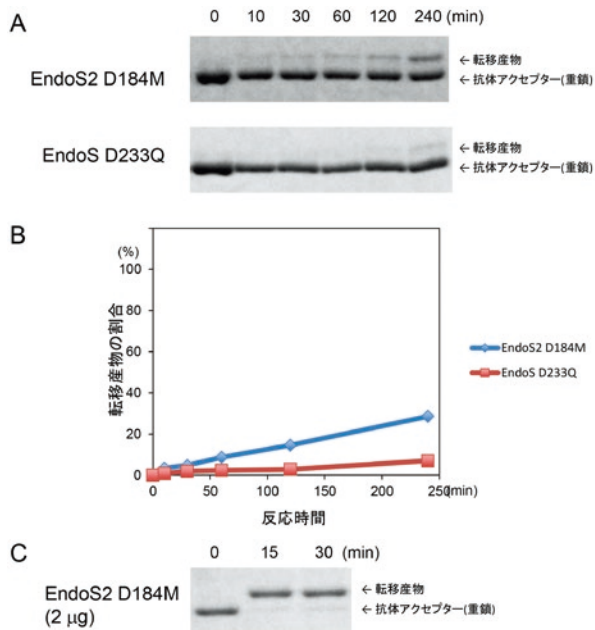


図6 EndoS2 D184M変異体とEndoS D233Q変異体による2本鎖複合型糖鎖(A2)のモガムリズマブアクセプターへの転移反応
A. 糖転移反応産物のSDS-PAGE
B. 反応時間と転移産物量の関係
C. EndoS2 D184M変異体の酵素量を2.0 μgに増やして同じ転移反応を実施した場合

の反応特性を調べるために酵素量が少ない条件 (0.25 μg) で反応を行っており、見かけ上、低い転移効率にとどまっている。しかし、両変異体とも酵素量、反応時間等の反応条件を至適化すれば、コアフコースがない抗体アクセプターに対しても効率よく転移産物を得られる場合があり (図6C)、実際の抗体糖鎖リモデリングの反応では、そのように至適化された条件で反応を行っている [14]。

ここまではEndoS2 D184M変異体、EndoS D233Q変異体の糖転移活性をみてきたが、図3Cを見直すと、EndoS2 D184M変異体を1.0 μg使用した際の糖転移反応では、反応10分以降で転移産物量が徐々に減少していることがわかる。これはEndoS2 D184M変異体の残存水解活性によるものと考えられる。そこで、

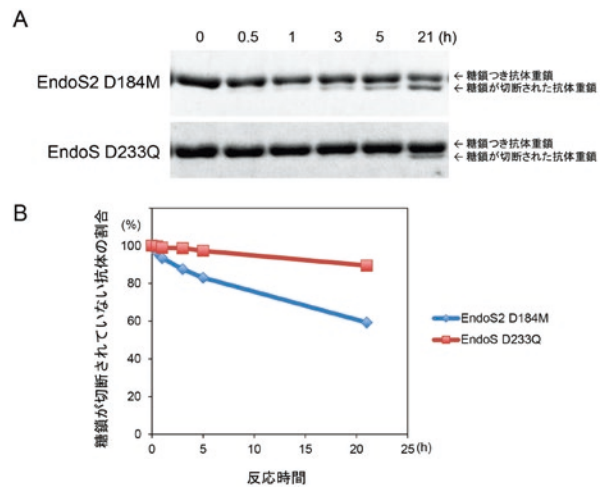


図7 EndoS2 D184M変異体とEndoS D233Q変異体の残存水解活性.

- A. EndoS2 D184M変異体とEndoS D233Q変異体によるトラスツマブ糖鎖の切断
B. 反応時間と糖鎖が切断されていない抗体の割合の関係

EndoS2 D184M変異体およびEndoS D233Q変異体にどれほどの残存水解活性があるのかを調べてみた (図7A, B)。

反応は10 μLのPBS (pH 7.4) 中で、酵素0.1 μgとトラスツマブ10 μgを混和し、30℃にて行った。その結果、EndoS2 D184M変異体のほうがEndoS D233Q変異体よりも残存水解活性が高く、反応21時間では、反応液中の40%の抗体分子の糖鎖が切断されていた。一方、EndoS D233Q変異体の場合、反応21時間では、反応液中の10%の抗体分子の糖鎖が切断されるにとどまっていた。

4. EndoS2 D184M変異体とEndoF3 D165A変異体の酵素活性の比較

EndoF3 D165A変異体についてはコアフコース付き抗体アクセプターに対し、3本鎖複合型糖鎖を転移できる活性が報告されている [12]。そこで、このような糖転移活性がEndoS2 D184M変異体にもあるのかを調べてみた。

まず、ウシのフェツインからシアル酸含

有の3本鎖および2本鎖複合型糖鎖の混合物（3本鎖：2本鎖=85:15）を調製し、これをオキサゾリン体化した。つぎに、コアフコース含量の高い抗体医薬品であるリツキシマブから抗体アクセプターを調製した。これらをそれぞれドナー/アクセプター基質として、EndoS2 D184M変異体、あるいはEndoF3 D165A変異体による糖転移反応を実施した。なお反応は文献12を参考にして、25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 5 μ L中で、抗体アクセプター 12.5 μ g (17.25 μ M)、オキサゾリン体化糖鎖基質6.24 mM、および酵素1.75 μ gを混和し、EndoS2 D184M変異体については30 $^{\circ}$ C、EndoF3 D165A変異体については37 $^{\circ}$ C

で4～6時間行った。反応産物をSDS-PAGEに供した結果（図8A）、EndoS2 D184M変異体による反応産物には、A2型糖鎖に相当する2本鎖複合型糖鎖が付加されたと考えられる抗体重鎖が検出された。一方、EndoF3 D165A変異体による反応産物には、2本鎖複合型糖鎖が付加されたと考えられる抗体重鎖に加え、それより分子量の大きい3本鎖複合型糖鎖が付加されたと考えられる抗体重鎖が主要転移産物として検出された。これら転移反応産物のMS解析を実施した結果（図8B）、EndoS2 D184M変異体による糖転移反応では2本鎖複合型糖鎖のみが転移されていたのに対し、EndoF3 D165A変異体による糖転移反

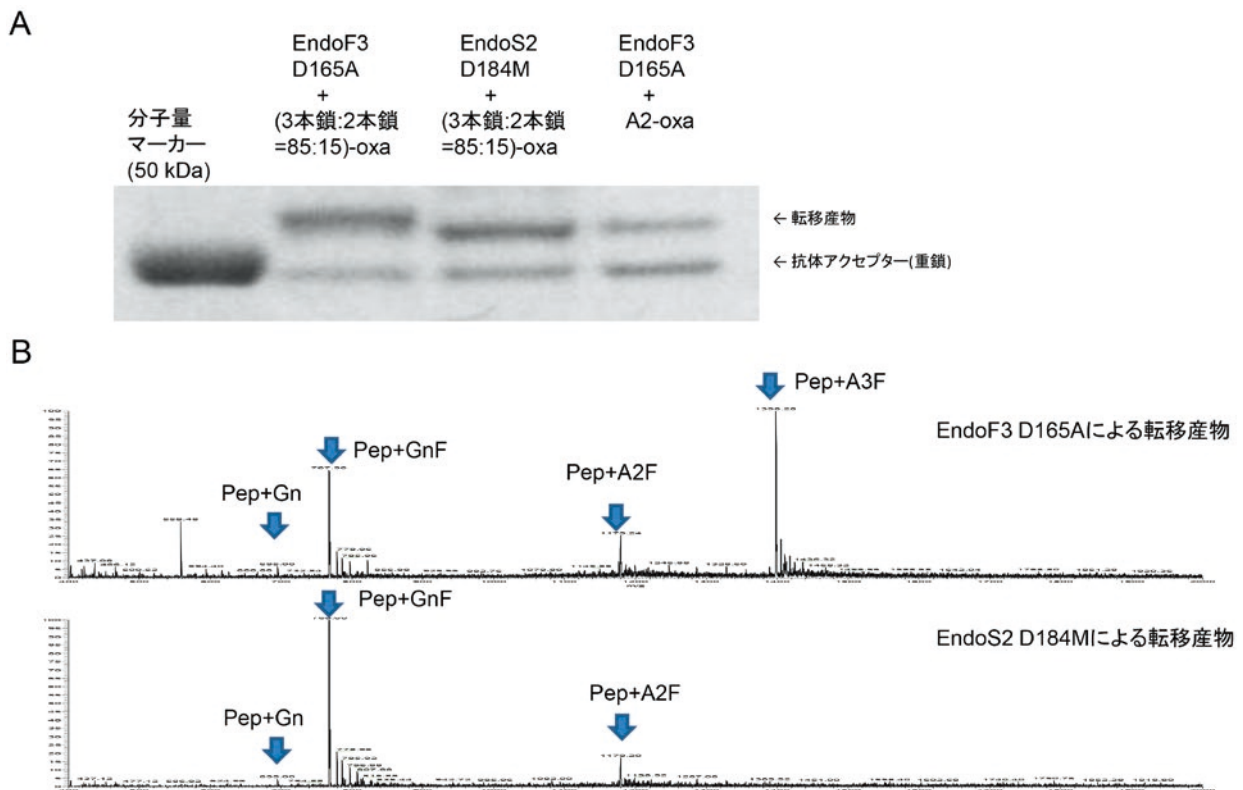


図8 EndoS2 D184M変異体とEndoF3 D165A変異体によるシアル酸含有3本鎖/2本鎖複合型糖鎖混合物のリツキシマブアクセプターへの転移反応

A. 糖転移反応産物のSDS-PAGE

B. 糖転移反応産物のMS解析

Pep+Gn, GlcNAc結合ペプチド; Pep+GnF, コアフコースつきGlcNAc結合ペプチド;

Pep+A2F, コアフコースつき2本鎖複合型糖鎖結合ペプチド; Pep+A3F, コアフコースつき3本鎖複合型糖鎖結合ペプチド

応では2本鎖複合型糖鎖と3本鎖複合型糖鎖の両方が転移されていたことが実際に確認できた。このことは、EndoS2 D184M変異体には3本鎖複合型糖鎖を抗体アクセプターに転移する活性がないことを示す。

5. まとめ

以上の結果によれば、抗体糖鎖リモデリングに使用するグライコシターゼとしては、添加酵素の残存水解活性による転移産物糖鎖の切断反応を抑制することができれば、従来使用されてきたEndoS D233Q変異体よりも、EndoS2 D184M変異体のほうが使い勝手がよいように思われる。特に、ハイマンノース型糖鎖のように、EndoS D233Q変異体では転移できない糖鎖に対しては、EndoS2 D184M変異体を使用するほうが効果的だろう。また、オキサゾリン体化糖鎖をドナー基質とした場合、反応条件によっては、非酵素的な反応により、抗体分子中のリジンやヒスチジン残基に糖鎖が付加された副生成物が生じることが報告されている [18]。このような非特異的な反応を抑制するためにも、反応速度の速いEndoS2 D184M変異体を用いて、短時間のうちに糖転移反応を終了させるのがよいかもしれない。しかしながら、EndoS2 D184M変異体がどのような糖鎖でも抗体アクセプターに転移できるというわけではなく、3本鎖複合型糖鎖の例のように、糖鎖の構造によっては、ほかのグライコシターゼを利用したほうが効率のよい場合もあるといえる。今後の課題として、抗体糖鎖のリモデリングに限らず、様々な糖タンパク質糖鎖のリモデリングを考えた場合、既存のENGaseやグライコシターゼの基質特異性では対処できない部分（多分岐複合型糖鎖の転移など）が現状ではあると思われる。このような問題の克服のためにも、広い基質特異性を有する新規ENGaseの探索や、新たなグライコシターゼの開発を行い、様々なドナー/アクセ

プター基質の組合せにおいて、効率のよい糖転移が実施できるよう、多様な関連酵素をそろえていく必要があるだろう。

謝辞

本研究を実施するにあたり、基質の供給やMS解析において、当研究所黒河内政樹研究員、大隅賢二研究員、月村 亘研究員、森昌子研究員には特段のご協力を賜りました。また松田昭生常務理事、天野純子室長をはじめとするHGPプロジェクトメンバー各位のご指導ならびにご鞭撻に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA, Presta LG. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 26733-26740.
2. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosoka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anzawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3466-3473.
3. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. (2006) *Science* **313**, 670-673.
4. 設楽研也 (2009) 薬学雑誌**129**, 3-9.
5. Gahoual R, Biacchi M, Chicher J, Kuhn L, Hammann P, Beck A, Leize-Wagner E, François YN. (2014) *MAbs* **6**, 1464-1473.
6. Collin M, Olsén A. (2001) *EMBO J.* **20**, 3046-3055.
7. Sjögren J, Struwe WB, Cosgrave EFJ, Rudd PM, Stervander M, Allhorn M, Hollands A, Nizet V, Collin M. (2013) *Biochem. J.* **455**, 107-118.
8. Sjögren J, Cosgrave EFJ, Allhorn M, Nordgren M, Björk S, Olsson F, Fredriksson S, Collin M. (2015) *Glycobiology* **25**, 1053-1063.

9. von Pawel-Rammingen U, Björck L. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 50-55.
10. Trastoy B, Lomino JV, Pierce BG, Carter LG, Günther S, Giddens JP, Snyder GA, Weiss TM, Weng Z, Wang LX, Sundberg EJ. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 6714-6719.
11. Huang W, Giddens J, Fan SQ, Toonstra C, Wang LX. (2012) *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12308-12318.
12. Giddens JP, Lomino JV, Amin MN, Wang LX. (2016) *J. Biol. Chem.* **291**, 9356-9370.
13. Umekawa M, Li C, Higashiyama T, Huang W, Ashida H, Yamamoto K, Wang LX. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 511-521.
14. 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.
15. Giddens JP, Lomino JV, Amin MN, Wang LX. (2016) *J. Biol. Chem.* **291**, 9356-9370.
16. 月村亘 (2016) 野口研究所時報 **59**, 22-30.
17. Tong X, Li T, Orwenyo J, Toonstra C, Wang LX. (2017) *Bioorg. Med. Chem.* In press.
18. Parsons TB, Struwe WB, Gault J, Yamamoto K, Taylor TA, Raj R, Wals K, Mohammed S, Robinson CV, Benesch JL, Davis BG. (2016) *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 2361-2367.

DNAオリガミ構造体を活用した生体関連分子の単分子操作法

Manipulation of Bio-Molecules in Single-Molecule Manner

by Utilizing DNA Origami Nanostructures

関西大学・化学生命工学部 葛谷 明紀

Akinori KUZUYA

1. はじめに

生命の遺伝情報の保持と継承をつかさどるDNAは、その機能に特化した構造（非常に精緻な右巻き二重らせん構造）と化学的特性（核酸塩基の相補的水素結合）により、自己組織化を利用した超分子材料の構成要素としても魅力的な特質を備えている。ニューヨーク大学のNed Seemanによって提唱された「DNAナノテクノロジー」は [1]、配列を厳密に設計した化学合成DNAを積み木のブロックのように使うことにより、DNA二重らせんがいかだやログブロックのように組み上げられた構造体を自在に操ることができる。本稿では、筆者がこの分野で取り組んできた研究、特に最近力を注いでいる、DNAオリガミ構造体を用いた単分子機能デバイス（DNAオリガミ分子機械）の構築について概説する。

2. DNAオリガミ構造体とは

近年盛んになってきたDNAナノテクノロジーにおいて、2006年の発表以来、特に注目を集めているナノ構造体の形成手法が、DNAオリガミである [2,3]。これを研究対象とする原著論文は年々数を増しており、その最初の報告として知られるカリフォルニア工科大のP.W.K. Rothemundによる単著のNature論文の引用件数は、2017年の前半で実に2,300回を超えている。「オリガミ」とい

う名称であっても、これは米国人が命名したものであり、我々日本人にとっては、その手法はむしろ「オリモノ（織物）」と呼ぶものに近い。DNAは通常、生物の体内では2本の鎖が絡まりあって、二重らせんの状態で存在しているが、一部のウイルスには、このうちの1本の鎖しか体内に所有していないものが存在する。DNAオリガミ法では、このような中途半端な状態にある非常に長い1本鎖DNA（足場鎖と呼ばれる）を織物の横糸のように使い、二重らせん形成の相手となる200本以上の多数の短いDNA（ステーブル鎖と呼ばれる）を縦糸として、横糸を橋掛けしながら織り込むように平面ナノ構造を自在に形成させる（図1）。DNAの2本鎖形成は、そ

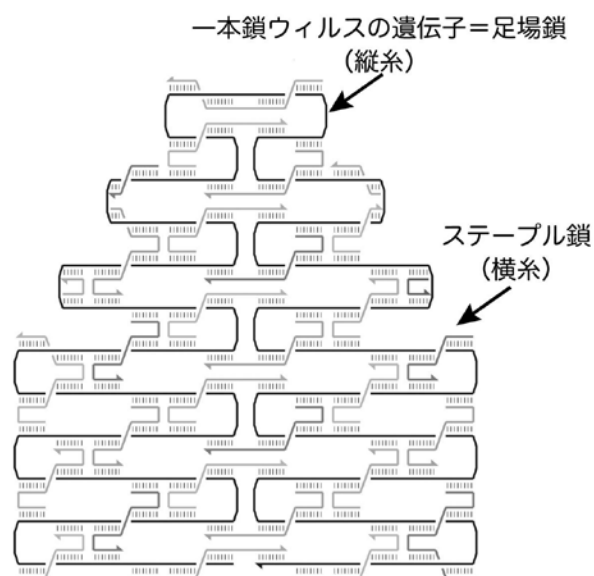


図1 DNAオリガミ法

の配列によって必ず決まった相手としか行われられないため、足場鎖が狙った形の平面構造に折り畳まれるようにステープル鎖の配列をうまく設計しておけば、これらの構成要素を混合するだけで、DNAの自己組織化を利用して、基本的にはどのような形状でも、設計通りに自在に形成させることができる。

3. タンパクの単分子足場としてのDNAオリガミ構造体

DNAオリガミ構造体に限らず、DNAでつくられるナノ構造体の利用法として最も好まれている研究トピックのひとつが、タンパクが1分子ずつ精密に並べられたタンパクナノアレイの作成である。このようなナノアレイ形成に用いる足場として、我々は以前、9本のDNAを平行に束ねてU字型のタイルをつくり、これを一次元方向に数珠つなぎに配列化してできるテープ状の構造体を開発している [4]。この構造体には、ナノメートルサイズのウェルを等間隔に組み込まれることになり、さらにこれらのウェルの両側の壁から2分子のビオチンを生やしておくことで、それぞれのウェルにちょうど1分子ずつストレプトアビジン4量体 (SA) が取り込まれ、ストレプトアビジンナノアレイを作製できることが明らかになっている。ウェルのサイズを2倍にするとしばしば2分子のストレプトアビジンがウェル内に取り込まれてくることから、ウェルへのゲストの取り込みはサイズ選択的である (図2)。

このようにナノアレイの作成に有効であることが確認された従来の系ではあるが、小さなDNAタイルを自己集積化して作る1次元のナノ構造体は、(1) 形成する構造体の長さを制御することができない、(2) それぞれのウェルを区別することが困難、などの不都合も存在した。そこでこれらの問題を解決する手段として、DNAオリガミ構造体が活躍する。我々が設計したタンパクナ

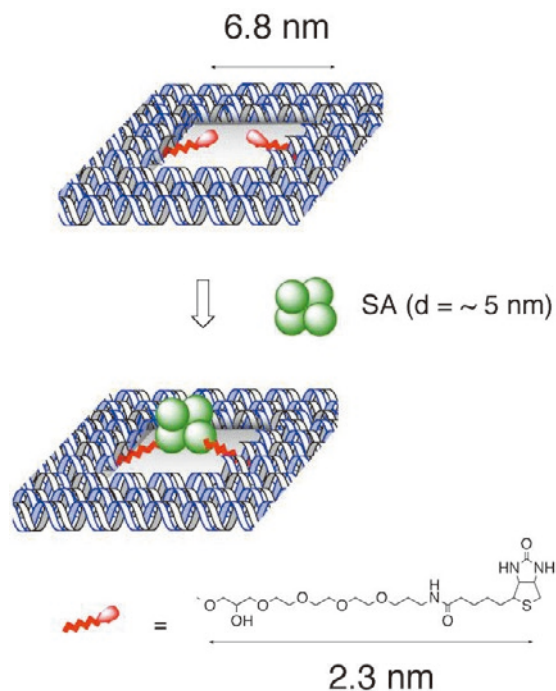


図2 DNAウェルへのストレプトアビジン (SA) の選択的取り込み

ノアレイ構築のためのDNAオリガミ構造体、DNA Nanostick (英語で試験紙に相当するdipstickになぞらえて名付けた) の構造を図3に示す [5]。足場となる環状DNAウイルスM13mp18の7249塩基の1本鎖ゲノムを、構造を固定するための267本のステープル鎖を用いて一筆書き状に折りたたみ、長さ約280nmの10本のDNA二重らせんが平行に束ねられた棒状の構造体から、らせんの幅2ピッチ分 (6.8nm) の幅を持つウェルが9つ切り抜かれた形状を作成する。実際の構造形成は1xTAE/Mg²⁺(12.5mM) 緩衝液中ですべての構成DNAを混合し、90℃から25℃まで徐冷 (-1℃ /min) することで行った。溶液のAFM測定を行うと、マイカ上に長さ約270 nm、幅約30nm、高さ約1.4nmのほぼ均一な棒状分子が多数観察される (図3右)。これらの構造体の中には、約24nmの間隔で規則的に切り抜き状の穴が9つ観察され、狙った通りのウェルが組み込まれた構造体が正しく形成されていることが確認できた。

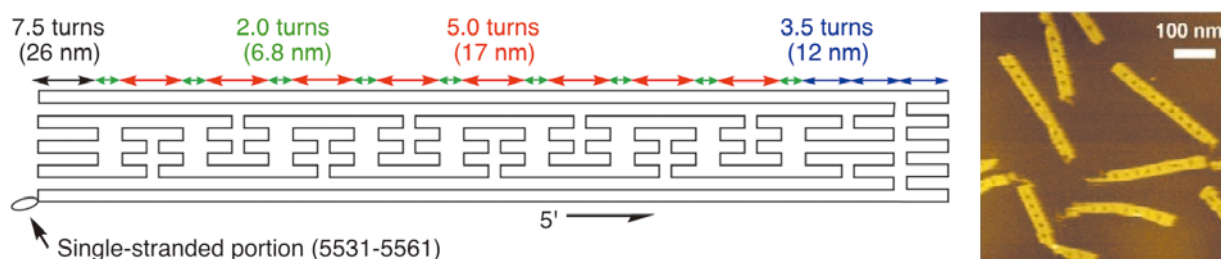


図3 DNA NanostickのDNA折りたたみパターン (左) とAFM像 (右)

4. ナノメートルサイズのウェルへの単分子取り込みを利用したタンパクナノアレイの作成

次いで、導入した各ウェルへのストレプトアビジンのサイズ選択的な取り込みについて紹介する。このためには、まず全てのウェルの左右両側の壁面からビオチンを提示させるために、該当の位置に配置される計18本のステープル鎖について、5'末端にbiotin-TEG残基を導入した修飾DNAを化学合成した。これらを用いてDNA Nanostickを形成させることにより、ウェルにビオチンが修飾されたDNA Nanostickを得ることができる。次いでウェルに対して3等量のストレプトアビジンを溶液中加入すると、ビオチン・ストレプトアビジンの強力かつ迅速な結合により、それぞれのウェルに高さ5nmのストレプトアビジンが正しく1分子ずつ内包された、DNA Nanostick・ストレプトアビジン複合体の形成をAFMで確認することができる (図4左)。ストレプトアビジン取り込みの収率はおよそ99%で、ほぼ例外なく1分子だけを内包している。

DNAオリガミ構造体を使う利点のひとつ

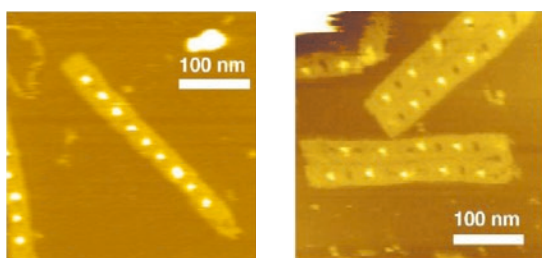


図4 DNA Nanostickで作成した1次元 (左) および2次元 (右) SAナノアレイのAFM像

は、構造体の全ての位置を区別できる、すなわちDNA Nanostick中の9つのウェルを、構成するステープル鎖によってそれぞれ区別できることである。そこで狙った一部のウェルだけにビオチン修飾を施したところ、そのウェルにのみ、選択的に1分子ずつストレプトアビジンを取り込むことに成功した。異なるパターンでビオチン修飾した2種類のDNA Nanostick分子をあらかじめ用意しておき、これらを平行につなぎ合わせることで、ジグザグに配置した2次元ナノアレイを作成することもできる (図4右)。

DNAナノテクノロジーの分野でよく知られた「DNA鎖交換反応」を利用すると、DNAオリガミ構造体を形成するステープルDNAを、選択的に好きなものだけ構造体から抜き取ることができる [6]。そこで、ストレプトアビジンの取り込みに利用したビオチン修飾DNAをこの方法で抜き取ることにより、ストレプトアビジンの取り込みを可逆的に制御することにも成功した (図5)。

ストレプトアビジンそのものには、強力なビオチン結合能以外、さしたる機能はないが、

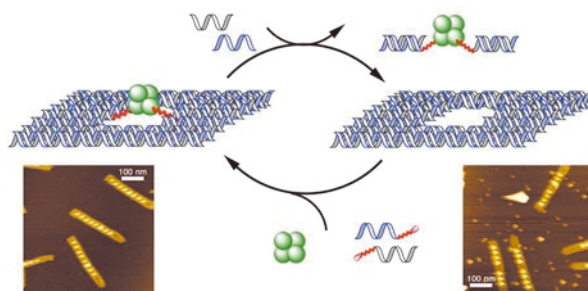


図5 DNA鎖置換反応を利用したDNA NanostickへのSAの可逆的取り込み

このタンパクは酵素免疫測定法などで多用されており、今日では様々な酵素と複合化した修飾ストレプトアビジンが市販されている。これらをゲストとすることで、酵素活性を維持していることが世界で初めて確認された、DNAオリガミ上の酵素ナノアレイの構築に成功した [7]。ここではDNA Nanostickに結合していないストレプトアビジン・酵素複合体を系中から取り除くために、人工タンパクの精製に広く用いられているヒスチジンタグと磁気ビーズを使ってDNA Nanostickを精製するという手法も使われ、4.8MDaにもおよぶ超巨大分子でも、たった12残基のヒスチジンで操作できることが明らかとなった。

5. ウェルへの単分子取り込みを利用した金ナノ粒子アレイの作成

ナノテクノロジーの分野でよく用いられる重要な材料のひとつに、金ナノ粒子が挙げられる。ナノメートルレベルで距離を制御しながら金ナノ粒子を配置することができれば、表面増強ラマン散乱など、バルクの系では評価が難しい特異な物理現象を、より詳細に解析することが可能となり、将来新たなナノデバイスの開発へと応用されることが期待できる。上述の実験でゲストとして使用してきたストレプトアビジンは、直径がおよそ5nmのタンパクであり、これは一般的に研究に用いられている最も小さい金ナノ粒子と、ほぼ同じ大きさである。そこでDNA Nanostickに

導入したウェル内に、ストレプトアビジンと同じように金ナノ粒子を取り込むことを検討した [8]。金とチオールは比較的強固な結合を作ることが知られているため、ビオチン修飾の代わりにDNA Nanostickを構成するDNAにチオール修飾を行った。これらを用いて、ストレプトアビジンを固定するのと同様に、両側から2分子のチオールが生えたウェルを有するDNA Nanostickを調製した。十分な取り込み収率を得るためには、ストレプトアビジンと異なり一晩より長い反応時間が必要ではあったが、AFM測定の結果、ターゲットが金ナノ粒子であっても、狙ったウェル内に必ず一粒子ずつが取り込まれることが明らかとなった。タンパク同様、無機ナノ粒子でもサイズ選択が機能していると推測される。

ウェルに取り込まれるゲストの種類は、ウェルに施した化学修飾の種類によって完全にコントロールされており、たとえばビオチン修飾（奇数ウェル）とチオール修飾（偶数ウェル）を交互に施してやれば、ストレプトアビジンと金ナノ粒子が交互に並んだ、有機・無機材料の交互ナノアレイを作成することも可能である（図6）。AFM像では大きさが同じストレプトアビジンと金ナノ粒子を区別することができないが、このナノアレイ上で無電解メッキを行って金の粒子サイズを成長させることで、正しく偶数番目のウェルのみに金が含まれていることも確認できた。

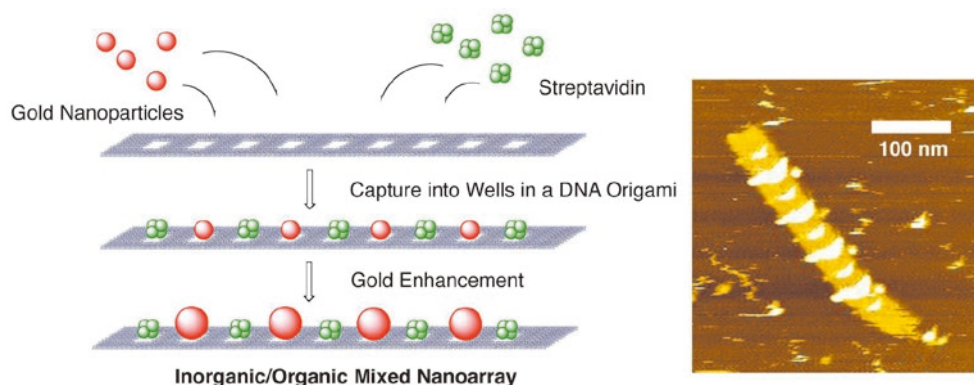


図6 DNA NanostickによるSA・金ナノ粒子交互ナノアレイの構築

この研究以前にもDNAナノ構造体を足場にした金ナノ粒子のアレイ化は数例報告されていたが、いずれの場合も、まずチオール修飾DNAを1本だけ結合した金ナノ粒子を別途調製、精製し、これをDNAナノ構造体に結合するという手順がとられている。本系はチオール修飾したDNA Nanostickの溶液に、未修飾の金ナノ粒子を加えるだけで、狙ったウェルの中に1粒子ずつが自動的に取り込まれる。金ナノアレイの非常に簡便な作成法を構築できた。

6. 同一分子上における異なるゲスト固定法の直接比較

一般的に、DNAナノ構造体上に固定化したゲストの解析を行うには、AFMによるイメージングが欠かせない。しかしながらAFMで鮮明なイメージを得るためには、AFMプローブの個体差や日々のサンプル状態などの様々な要因に応じ、測定ごとにその都度パラメーターを微調整することが必須となっている。このような理由から、異なる方法で固定されたゲストの諸性質を完全に同一の条件で比較することは、従来の系では非常に困難であった。一方DNAオリガミを用いると、1分子の構造体上で、異なる複数のゲスト固定法を同時に使用することができる。さらにこれらを厳密に区別しながら、一度のAFM測定内で両者の性質を直接比較することも可能である。例えばDNA Nanostickを使えば、ゲストタンパクを「DNAオリガミ構造体の上にのせる」DNAナノテクノロジー分野でよく使われるタンパク固定化法と、DNAウェルを使う我々の提唱する固定化法を直接比較することもできる。9つあるウェルのうち、偶数番目に位置するウェルを短いDNAで埋めてしまい、かわりにDNAオリガミ表面から突き出るでっぱり状の構造（一般に「ダンベルヘアピン構造」と呼ばれている）を形成させる。さらにこのでっぴりの両

側に、1もしくは2分子のビオチンを修飾する。どちらのダンベルにも、AFM測定ではストレプトアビジンが一分子結合している様子が観察されるが、これらのストレプトアビジンは、数回のスキャンを行っている間に全て脱落してしまう。同様に、ウェルの内部に導入するビオチンの数で、取り込まれるストレプトアビジンにどのような影響があるかも厳密に調べることができる。2分子のビオチンでウェルの中に固定したストレプトアビジンは、十数回のAFMスキャンにも耐えたのに対し、1分子のビオチンしか修飾されていないウェルに取り込まれたストレプトアビジンは、2,3回のスキャンで容易に脱落してしまった。これらの結果から、DNAで囲まれたウェル内に2本のリンカーでターゲットを固定する我々の手法が、最も効果的にタンパクを固定化できることが確認された。

以上のように、様々な利点がある「DNAオリガミ構造体の中にウェルを形成させてターゲットを埋め込む手法」は、今日では多くの研究グループによって広くゲスト分子の固定化に用いられるようになっている [9-12]。

7. 可動式DNAオリガミ分子機械による生体関連分子の単分子解析

上記で述べたタンパクの固定化法は、ナノアレイの構築にとどまらず、世界初の「構造変化して動作するDNAオリガミ分子機械」を用いたタンパクの単分子解析法の開発へとつながった [13,14]。その系の概略を図に示す (図7)。

ここで使用するのは、DNA二重らせんを6本束ねて作った、長さ約170nmの2本のレバー部から構成されるペンチ型 (DNA Pliers)、および鉗子型 (DNA Forceps) の可動式DNAオリガミ構造体である (図8)。

これら2本のレバーは、オリガミ形成の足場となる1本鎖DNAで連結されており、間に

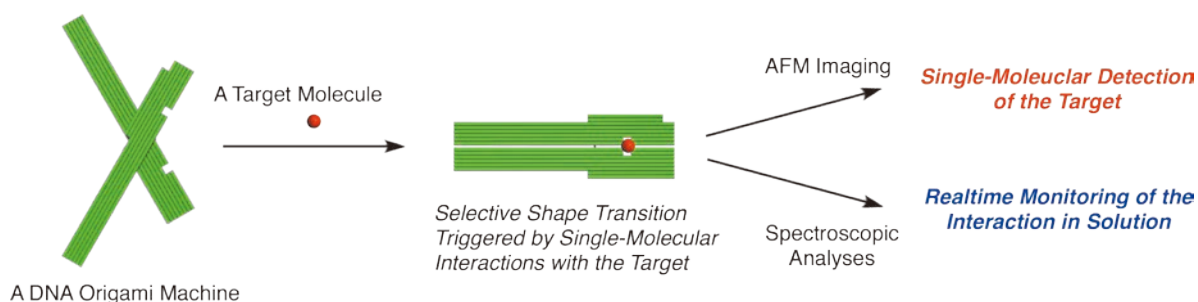


図7 DNAオリガミ分子機械を利用した生体分子の単分子検出



図8 DNA Pliers (上) とDNA Forceps (下) の設計成

はリン酸ジエステル結合だけが挟まった状態になっている。この連結部分は、DNA二重らせんが4分岐したホリデイジャンクションと呼ばれる構造に相当し、天然でも細胞分裂に際して相同組換えがおこるときなどに形成されることが知られている。過去に行われた立体構造解析等の結果から、ホリデイジャンクション構造はDNAオリガミの作成条件である Mg^{2+} 存在下では、2本のDNA二重らせんがX字型に交叉した構造を優先してとることがわかっている。実際にDNA PliersおよびDNA Forcepsを形成させた後に、これらをマイカ基板上に吸着させてAFMでイメージングしてみると、そのほとんどが、レバーがX字になった「cross体」をとっていることが確かめられた(図9左)。これらの「DNAオリガミ分子機械」を使ってタンパクを単分子解析する戦略は以下の通りある。まず、検出したいタンパクと特異的に結合するリガンドを、2本のレバーに先にそれぞれ1分子

ずつ結合しておく。ターゲットのタンパクが溶液内に共存すると、2分子のリガンドが同時に1分子のターゲットタンパクと結合することにより、ターゲットタンパクを挟むかたちで2本のレバーが平行に閉じ、通常はX字のcross体をとっているDNAオリガミ分子機械は、2本のレバーが平行になって閉じた「Parallel体」としてAFMで観察されることになる(図9右)。それぞれのレバーにタンパクがちょうど納まるサイズの切り抜きを作っておくと、Parallel体に閉じた際に上述のウェルと同様の構造が形成され、トラップされたタンパク分子を明瞭にイメージングすることができる。ターゲットタンパクとしては、現在のところ1分子のタンパクで2分子以上のリガンドを結合できることが必要となっており、これまでにストレプトアビジンやIgGの単分子検出に成功している。AFM像における外形だけからは区別できない異種のタンパクも、DNA PliersとDNA Forcepsという

異なる形状の分子機械を同時に使用することで、どちらの分子機械が閉じたかを観察することで、溶液内のタンパクを容易に区別することができる。原理的には、レクチンや一部の毒素なども検出対象とできるだろう。さらに、1本鎖抗体などの抗体フラグメントを分子機械内に組み込むことができれば、1分子のターゲットタンパクの異なるエピトープを同時に認識して構造変化する「可動式人工抗体」のようなものも、将来的には実現できるかもしれない。

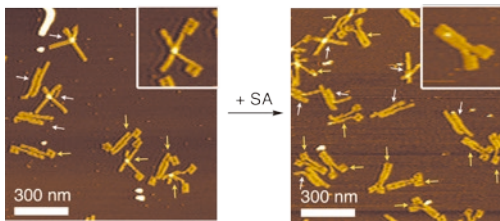


図9 抗原修飾DNA Pliersとビオチン修飾DNA Forcepsの1:1混合水溶液のAFM像

1分子のターゲットタンパクを挟んで閉じる上記の「pinching機構」以外にも、異なる検出メカニズムを利用することで、これらのDNAオリガミ分子機械は、プロトンからATP、1本鎖RNAなどの様々な生体関連分子を、単分子レベルで検出することができる。その一つの例が、「zipping機構」を用いた金属イオンの検出である。ある程度の大きさがあるDNAオリガミ分子機械の利点の一つは、複数の機能性DNAを構造体上にのせ、協調して動作させることができることにある。そこでタンパクのようにリガンドと強い相互作用を示さないターゲットに対しては、レバー部上に複数のDNA鎖をジッパーの歯のように導入し、これらを協同的に動作させるとよい。例えば、12merのヒトテロメア配列一本鎖DNAが、DNA四重鎖を形成して二量化する性質を利用すると、溶液中の Na^+ や K^+ の存在をトリガーとして、DNAオリガミ分子機械を閉じることができる。同様

に、溶液中の Hg^{2+} や Ag^+ の存在も、これらと強く相互作用することが知られているピリミジンミスマッチ配列を利用することで検出できる。さらには、弱酸性環境下のみで形成されるDNA四重鎖であるi-motifを形成させれば、溶液のpH変化を検知することも可能である [15]。

複数の相互作用を協同的に作用させてオリガミデバイスを選択的に閉じるzipping機構とは逆に、ターゲットと検出部との相互作用により、あらかじめ閉じておいたDNAオリガミ分子機械を選択的に開く「unzipping機構」も考えられる。DNA二重鎖における鎖交換反応を利用すればmicroRNAをトリガーとした構造変化を誘起できるし、DNAアダプターを使えばATPなどの小分子も検出可能である。

「zipping機構」のように代替手段に頼ることなく、結合の比較的弱いターゲットの1分子捕獲を実現するための別の方策としては、アロステリック酵素の機構を模倣した分子機械の二段階構造制御を行うことが考えられる [16]。1番目のターゲット分子（エフェクター）の結合により酵素全体の構造が変化し、2番目のターゲット、すなわち本来の基質の結合が促進される機構を（正の）アロステリック効果といい、ヘモグロビンに対する酸素の結合など、自然界では良く利用されている仕組みである。これを模倣した系として、レバーに導入したジッパー部によってあらかじめDNA Pliersをparallel型に閉じておき（すなわちこれがエフェクターの結合とそれに伴う構造変化に相当する）、捕獲したいターゲットに対する2分子のリガンドをあらかじめ極めて近接した位置に固定しておく系の構築を試みた。 Na^+ 検出に使用したヒトのテロメア配列をジッパー部に使ってあらかじめ構造体を閉じておくと、開いた形態からでは捕獲効率が非常に低かったmiRNAや、金ナノ粒子を効率良くウェルの中に取り込むこ

とができた。系からNa⁺を除いてジッパーを解除してもDNA Pliersは閉じた形状を保つことから、これらのターゲットが目的通りにレバー間を架橋していることも確かめられている。上記で提案した「可動式人工抗体」にこの機構を組み込めば、抗原と結合したときにのみシグナルを発するような「スイッチ付き二次抗体」を、将来酵素免疫測定法や顕微鏡用の免疫染色法などに提供できるかもしれない。

DNAオリガミ分子機械における構造変化は、AFMに限らず、一般的な研究室でも容易に実施できるゲル電気泳動を使っても、明瞭に判別することができる。たとえば、リン酸ジエステルではなくペプチド結合の主鎖を持った核酸アナログであるPNAによるDNAへの特異な結合形態を、DNA Pliersをゲル電気泳動することで容易に解析することがわかっている [17]。DNAオリガミ分子機械には蛍光ラベル化なども自在に行うことが可能であり [18]、全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡と蛍光修飾DNAを組み合わせた超解像蛍光観察法の一つであるDNA-PAINT法と組み合わせれば [19]、デバイス1分子の構造変化をリアルタイムに検出することも将来的には可能となるだろう。

8. おわりに

設計さえできれば望みの構造を自在に構築できるDNAオリガミを使えば、上で紹介した2種の分子デバイスにとどまらず、例えば40nm角の箱型の立方体を形成し、その中に粒径10 nmの金ナノ粒子を一粒だけ内包することなどもできる [20,21]。近年の核酸化学研究の進展によりDNAへの化学修飾の技術は飛躍的に進歩しており、今日DNAに導入することができる官能基にはほぼ制限がないところまで到達している。核移行シグナル等と組み合わせ、DNAオリガミ構造体を細胞内に送り込む研究なども盛んに行われつつ

おり、広くDNAナノ構造体の医療応用の試みが今後も広がっていくのではないかと期待している。

謝辞

これらの研究は、2011年度野口遵研究助成金の他、JSTさきがけ「分子技術と新機能創出」領域研究 (JPMJPR12K4)、科学研究費補助金基盤研究 (B) (24350088)、新学術領域研究「ソフト界面」(23106706)、「分子ロボティクス」(24104004)などの援助により行われました。また、様々なご助言をたまわりました東京大学小宮山眞名誉教授、関西大学大矢裕一教授、東京大学加藤隆史教授、さらに一緒に研究に携わってくれた多くの学生たちに感謝いたします。

文献

1. N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.*, **1982**, *99*, 237-247.
2. P. W. K. Rothmund, *Nature*, **2006**, *440*, 297-302.
3. A. Kuzuya, M. Komiyama, *Nanoscale*, **2010**, *2*, 310-322.
4. A. Kuzuya, K. Numajiri, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 3400-3402.
5. A. Kuzuya, M. Kimura, K. Numajiri, N. Koshi, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1811-1815.
6. K. Numajiri, M. Kimura, A. Kuzuya, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5127-5129.
7. K. Numajiri, T. Yamazaki, M. Kimura, A. Kuzuya, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9937-9939.

8. A. Kuzuya, N. Koshi, M. Kimura, K. Numajiri, T. Yamazaki, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama, *Small* **2010**, *6*, 2664–2667.
9. E. Nakata, F. F. Liew, C. Uwatoko, S. Kiyonaka, Y. Mori, Y. Katsuda, M. Endo, H. Sugiyama and T. Morii, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 2421–2424.
10. T. Yamazaki, J. G. Heddle, A. Kuzuya, M. Komiyama, *Nanoscale* **2014**, *6*, 9122–9126.
11. T. M. Nguyen, E. Nakata, M. Saimura, H. Dinh and T. Morii, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 8487–8496.
12. M. Zhao, X. Wang, S. Ren, Y. Xing, J. Wang, N. Teng, D. Zhao, W. Liu, D. Zhu, S. Su, J. Shi, S. Song, L. Wang, J. Chao and L. Wang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9*, 21942–21948.
13. A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, M. Komiyama, *Nature Commun.* **2011**, *2*, 449.
14. A. Kuzuya, Y. Ohya, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1742–1749.
15. A. Kuzuya, R. Watanabe, Y. Yamanaka, T. Tamaki, M. Kaino, Y. Ohya, *Sensors* **2014**, *14*, 19329–19335.
16. A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, Y. Yamanaka, Y. Ohya, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 8276–8279.
17. T. Yamazaki, Y. Aiba, K. Yasuda, Y. Sakai, Y. Yamanaka, A. Kuzuya, Y. Ohya, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11361.
18. H.-K. Walter, J. Bauer, J. Steinmeyer, A. Kuzuya, C. M. Niemeyer, H.-A. Wagenknecht, *Nano Lett.*, **2017**, *17*, 2467–2472.
19. R. Jungmann, M. S. Avendaño, J. B. Woehrstein, M. Dai, W. M. Shih, P. Yin, *Nat. Methods*, **2014**, *11*, 313–318.
20. A. Kuzuya, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2009**, 4182–4184.
21. A. Kuzuya, M. Kaino, M. Hashizume, K. Matsumoto, T. Uehara, Y. Matsuo, H. Mitomo, K. Niikura, K. Ijio, Y. Ohya, *Polym. J.*, **2015**, *47*, 177–182.

分子性光子・アップコンバージョン材料における最近の展開

Recent advances in molecular-based photon upconversion materials

九州大学大学院工学研究院 楊井 伸浩

Nobuhiro YANAI

1. 緒言

光子・アップコンバージョン (UC) とは、低エネルギー光を高エネルギー光に変換する現象であり、太陽電池・光触媒などエネルギー産出デバイスの効率を飛躍的に向上させる技術として近年大きな注目を集めている。2光子吸収や第2次高調波発生は古くから研究されているが、これらは太陽光に比べて桁違いに強い励起光を必要とする。近年バイオイメージングへの応用が検討されている希土類ナノ粒子を用いたUC系も、有意な変換効率を出すには数 W/cm²以上の強い励起光が必要である。一方、1960年代初頭に見いだされた三重項-三重項消滅 (triplet-triplet annihilation, TTA) 機構に基づくアップコンバージョン (TTA-UC) は、最近10年間に太陽光レベルの弱い励起光により効率的な波長変換を達成しうることが示され、注目されている [1-3]。

TTA-UCのメカニズムを図1に示す。まずドナーが光を吸収し、励起一重項状態 ($S_{1,D}$) からの系間交差 (ISC) により励起三重項状態

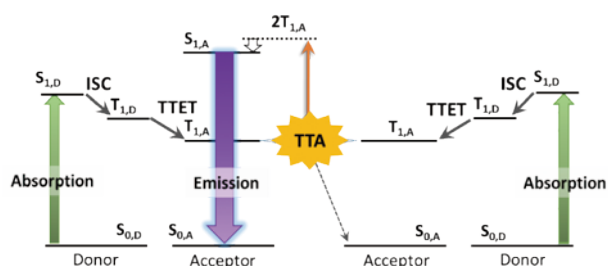


図1 一般的なTTA-UCのエネルギーダイアグラム

態 ($T_{1,D}$) を与える。その後、ドナーからアクセプターへの三重項-三重項エネルギー移動 (TTET) により、アクセプターの三重項励起状態 ($T_{1,A}$) が生成する。この三重項励起状態にある2分子のアクセプターが拡散・衝突してTTAを起こすことにより、 $S_{1,D}$ より高いエネルギーレベルの励起一重項 ($S_{1,A}$) が生成し、アップコンバージョン発光を発する。ここで三重項励起エネルギー移動の各過程 (TTET、TTA) は電子交換 (Dexter) 機構により進むため、分子は約1 nm以下の距離に接近する必要がある。

以上のメカニズムから、ドナーとアクセプターが満たすべき条件が導かれる。ドナーは励起波長において大きな吸光係数を持ち、高い系間交差効率を示す必要がある。また、効率よくアクセプターへのTTETを起こすためには、長い三重項寿命 ($>10 \mu\text{s}$) を持つことが望まれる。一方、アクセプターが効率よくTTAを起こすためには長い三重項寿命 ($>100 \mu\text{s}$) を持ち、さらに $S_{1,A}$ のエネルギーが $T_{1,A}$ エネルギーの2倍以下であること、 $S_{1,A}$ からの蛍光量子収率が高いことが必要である。ドナーとアクセプターとして良く用いられる組み合わせは、Pt, Pdなどの重金属ポルフィリン錯体 (ドナー) と多環芳香族分子 (アクセプター) である。特に白金オクタエチルポルフィリン (PtOEP) と9,10-ジフェニルアントラセン (DPA) が最も基本的な組み合わせとして広く利用され、効率よく緑色光を

青色光へと変換する。

最近では新しいドナー、アクセプターが開発されたことにより、多様な波長範囲に対応可能となってきた [4]。しかし、エネルギー分野やバイオ分野への応用に必要な近赤外光を可視光にUCすることは未だに困難である。また、光触媒などの高効率化に寄与しうる可視光から紫外光への高効率な変換も容易でない。これらの原因の一つは、ドナーがISCする過程でエネルギーを失うことにある。この問題を解決するための検討が我々を含め世界中で開始されており、新しいコンセプトに基づくドナー材料の開発によりこれまで困難であった波長域のUCが達成されつつある。

尚、TTA-UCの研究例において溶液系の分子拡散を利用したものが大半であるが、揮発性溶媒を使う必要がある、溶存酸素に消光される、固相では分子拡散が制限される、などの本質的課題を有する。これらの問題を一挙に解決するため、以前より我々は分子拡散に依存しない、分子集積系におけるエネルギーマイグレーションを利用したTTA-UCへと移行することを提案しており、詳しくは最近の総説を参考にされたい。

2. TTA-UCの性能評価

TTA-UCの性能を評価する際に重要であるのは変換波長に加え、①励起光強度と②量子収率の2点である。

通常の1光子過程である蛍光やりん光の量子収率は、励起光強度に関わらず一定である。一方、TTA-UCは励起種間の衝突・消滅を含む過程であるため、その効率は励起種の濃度、すなわち励起光強度に依存する。太陽光をアップコンバージョンするためには、数mW/cm²程度の弱い励起光強度において効率良くTTA-UCが起こるシステムが必要である。Monguzziらは、TTA-UCの速度式を解くことで、TTA-UC過程を最適化するために必要な励起光強度を見積る方法を提案した

[5]。すなわち、生成したアクセプター T₁ の50%がTTAに用いられる励起光強度が「しきい励起光強度 I_{th} 」と定義され、効率のよいTTA-UCに必要な励起光強度の指標となる。この I_{th} は以下の式で表わされる。

$$I_{th} = (\alpha(E)\Phi_{TTET}\tau_T^2\gamma_{TT})^{-1} \quad (1)$$

ここで $\alpha(E)$ は励起波長での吸光係数、 Φ_{TTET} はドナーからアクセプターへのDexterエネルギー移動の効率、 τ_T はアクセプターの励起三重項の寿命、 γ_{TT} はTTAの速度定数である。実験的にはUC発光強度を励起光強度に対して両対数プロットし、低励起光領域と高励起光領域をそれぞれ傾き2と1でフィッティングすると、それら2つの直線の交点として I_{th} が求まる。

従来、TTA-UCは分子の拡散が容易な溶液系を中心に研究されてきた。三次元拡散系の場合、しきい励起光強度 I_{th} に関わるTTAの速度定数 γ_{TT} と励起三重項の拡散速度 D_T は以下の関係にある [2]。

$$D_T = (\gamma_{TT})(8\pi a_0)^{-1} \quad (2)$$

ここで a_0 はTTAが起こる分子間距離であり、多くの場合1nm程度である。従って (1)、(2) 式より、低い I_{th} を得るには大きな吸光係数、高いTTET効率 Φ_{TTET} 、長い三重項寿命、ならびに三重項の拡散速度 D_T が大きいことが求められる。可視光領域でのUCにおいてはこれらの全ての要求を満たすことが出来、実際に数mW/cm²という低い I_{th} 値が達成された [2]。

溶液中におけるアップコンバージョン量子収率は、以下の式に基づき相対法により求められる [2,6]。

$$\Phi_{UC} = 2\Phi_{std} \left(\frac{I_{std}}{I_{UC}} \right) \left(\frac{A_{std}}{A_{UC}} \right) \left(\frac{E_{UC}}{E_{std}} \right) \left(\frac{\eta_{UC}}{\eta_{std}} \right)^2 \quad (3)$$

ここで I, A, E, η はそれぞれ励起光強度、吸光度、発光スペクトルの積分値、溶媒の屈折率であり、下付の UC と std はそれぞれUC試料と標準試料を意味する。TTA-UCは2光子を1光子に変換する過程であるため、本質的には量子収率の最大値は50%であるが、本研究分野においては慣例的に(3)式にあるように2倍することで Φ_{UC} の最大値を100%と規格化されることに注意されたい[3]。固体材料やゲルなどで光の散乱が大きい場合は、レーザーと積分球を組み合わせた絶対法により Φ_{UC} を正確に見積もることができる[7,8]。

TTA-UCの量子収率 Φ_{UC} を決める要素は以下の式により示される。

$$\Phi_{UC} = f\Phi_{ISC} \Phi_{TTET} \Phi_{TTA} \Phi_A \quad (4)$$

ここで f はアクセプターのTTAにより S_1 を生じる確率、 Φ_{ISC} はドナーの系間交差の効率、 Φ_{TTA} は生成した三重項がTTAにより消費される確率、 Φ_A はアクセプター S_1 からの蛍光量子収率である。ドナーとして重金属イオンを含むPtOEPなどを用いることで Φ_{ISC} はほぼ1となり、DPA(アクセプター)の溶液中での Φ_A は1に近い。また、ドナーとアクセプターの濃度を適切に設定すれば、例えばPtOEPが100mM、DPAが10mMという条件で、100mWcm²程度の励起光強度で Φ_{TTET} と Φ_{TTA} がほぼ1となり、結果的に Φ_{UC} が52%という高い値が得られている[2]。ここで f 値以外の全てのパラメーターは最適化されており、残る f 値は実験的に得られた値を(4)式に代入することで0.52となる。

3. 半導体ナノ粒子による三重項増感

RaoらやBaldoらは最近、有機分子の励起三重項から半導体ナノ粒子(量子ドット)へのエネルギー移動を報告した[9,10]。これらの報告を受け、三重項から量子ドットにエネルギーが移るのであれば、その逆過

程、すなわち量子ドットによって励起三重項を増感できるのではないかと着想した[11-14]。Bardeenらは溶液中においてCdSeナノ粒子とアントラセン誘導体を組み合わせて緑色光を青色光に、更にPbSeナノ粒子とルブレンを組み合わせることで近赤外光を黄色光に変換することに成功した[11]。これまで近赤外光から可視光へのTTA-UCが困難を極めていたことを考えると、大きなブレイクスルーとなった。その後Baldoらによって同様の波長変換が固体系へと展開され[13]、Castellanoらによって予想されていたエネルギー移動過程が過渡吸収分光を用いて確認された[12]。我々も同様のコア型CdSeナノ粒子を用いてTTA-UCの検討を行っていたが、表面の失活サイトが原因でUC量子収率が低下することに気づき、バンドギャップの大きなZnSで失活サイトを埋めたコア/シェル型CdSe/ZnSナノ粒子を用いた検討を行ったので、以下にその概要を紹介する[14]。

CdSe/ZnS量子ドットに、ピリジル基を有するアントラセン誘導体を配位結合により修飾し、更に溶液中にフリーのDPAを共存させた。量子ドットの発光減衰を測定することでアクセプター分子へのエネルギー移動過程を調べた。溶液中にフリーのDPAが存在するだけでは量子ドットの寿命に変化は見られなかった。一方、量子ドットの表面をアクセプターで修飾すると発光寿命は短くなり、加えてフリーのDPAが共存すると発光寿命が更に短くなった。これは量子ドットから表面のアクセプター分子へとエネルギー移動して三重項状態を増感し、更にそのエネルギーがフリーのDPAに渡るといふ、いわばエネルギーリレーが起こっていることが示唆された。

コア/シェル構造の優位性はUC量子収率の評価により確認された。量子ドット表面とフリーのアクセプターが共存する条件において、コア/シェル型CdSe/ZnS量子ドットを増感剤に用いた際のUC量子収率は1.4%で

あったのに対し、対応するコア型CdSe量子ドットを用いた場合はUC量子収率が0.026%と50倍以上も低いことが分かった。これはコア型量子ドットの表面に欠陥サイトが存在して効率よく三重項増感が出来なかったのに対し、シェル層の形成によりその欠陥サイトが埋められたためと考えられる。但し、シェル層が厚くなりすぎると今度はアクセプター分子へのエネルギー移動が阻害されると予想されるが、実際に最近のTangらのシェル層の厚みを変えた実験によりその予想は実証され

た [15]。しかし未だUC量子収率に改善の余地があり、今後は薄いシェル層で可能な限り欠陥サイト無くし、より高いUC量子収率を達成することが期待される。

4. S-T吸収分子による三重項増感

欠陥が無く構造が一義的に決まる分子性ドナーで、ISCによるエネルギーロス完全に無くすることは出来ないだろうか。このような考えのもと他分野を眺めていると、瀬川らが基底状態から励起三重項状態へのS-T吸収を

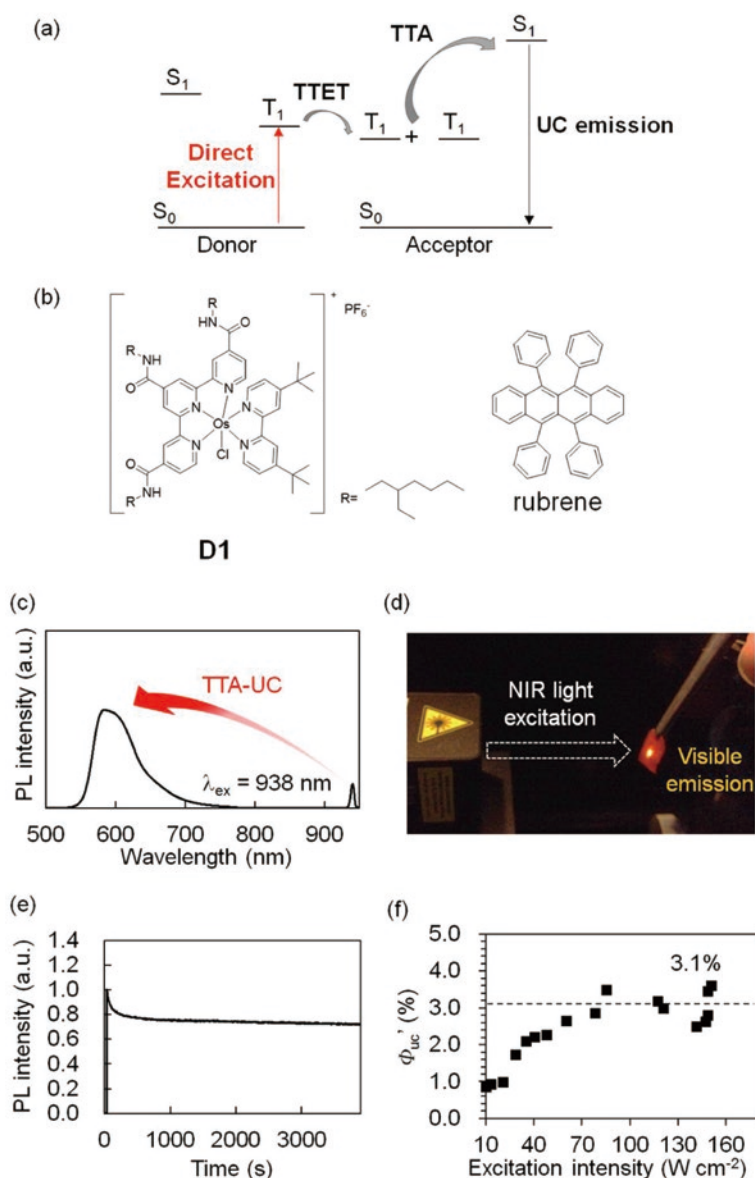


図2 (a)S-T吸収型ドナーを用いたTTA-UCのエネルギーダイヤグラム。(b)S-T吸収型ドナー (D1) とアクセプター (ルブレン) の化学構造。固体フィルム中における近赤外—可視UC発光の(c)スペクトル、(d)写真、(e)励起時間依存性、(f)量子収率。

示すOs錯体を用い、高効率な色素増感太陽電池の作製を報告していた [16,17]。S-T吸収は禁制遷移であるが、太陽電池に利用できるほどの吸光係数があれば、TTA-UCの増感剤としても利用できるのではないかという着想を得た。S-T吸収を利用すれば、ISCを経ずに直接三重項状態を形成でき、ISCによるエネルギーロスを回避できる (図2a) [18]。

溶媒やアクセプターと馴染みやすいようにOs錯体に分岐アルキル鎖を修飾したドナーD1を合成し、アクセプターとしてルブレンと組み合わせた (図2b)。脱気したジクロロメタン中にこれらのドナーとアクセプターを溶解させ、波長938nmの近赤外光を照射したところ、570nm付近にUC発光を観測できた。有機系のドナーを用いた際には近赤外可視のUCは困難を極めていたため [19]、900nmを超える近赤外光を利用できるようになったことはS-T吸収型ドナーの有用性を顕著に示している。しかし、ドナー三重項の寿命が12nsと短く、溶液中でのアクセプターへのエネルギー移動効率は非常に低いものであった。

そこで、我々が提案している分子集積系におけるエネルギーマイグレーションを利用したTTA-UC [20] を導入することにより、この問題の解決に至った。再沈殿法によりルブレンのアモルファスなナノ粒子を形成し、そのナノ粒子中にドナー分子を均一に分散させることができた。そのナノ粒子を酸素バリア能の高いポリビニルアルコール中に分散することで、得られた固体フィルムは空気中においても近赤外光を可視光へと変換でき (図2c,d)、その経時安定性も高いことが分かった (図2e)。非常に興味深いことに、この固体フィルムは3.1%という高いUC量子収率を示し、溶液系よりも遥かに優れた性能を示した (図2f)。これは固体中において隣接するドナーからアクセプターへのエネルギー移動が効率的に行われたためであり、分子集積系の利点が顕著に反映された結果である。

5. 結言

変換波長域の拡大は有機系フォトン・アップコンバージョン材料が日の目を見るためには越えなければならない壁であり、本稿ではそのためのブレイクスルーとなりうる新しいドナー材料の開発について紹介した。つい数年前までは特に近赤外光の利用は夢物語であったが、最近の顕著な研究の進展により現実のものとなってきた。従来はアップコンバージョン材料といえば無機系の材料が主流であったが、高い励起光強度が必要であることがボトルネックとなっていた。一方、有機系材料は励起光強度を格段に低くすることが原理的に可能であり、太陽光や生体内光といった弱い励起光を利用できる。今後もドナー材料の更なる設計により性能向上がなされ、そのドナー材料をアクセプターの分子集積系へと融合することで、エネルギーマイグレーションに基づく理想的なフォトン・アップコンバージョン系の実現が期待される [20]。

謝辞

本研究の一部は平成25年度野口遵研究助成金、JSTさきがけ「分子技術と新機能創出」領域研究 (JPMJPR14KE)、科学研究費補助金若手研究 (A) (JP17H04799)、新学術領域研究「柔らかな分子系」(JP16H00844) などの援助により行われました。多くのご助言を頂きました九州大学君塚信夫教授、東京大学加藤隆史教授に感謝申し上げます。また、共に日夜研究に没頭してくれたポスドク、学生諸氏に感謝いたします。

参考文献

1. S. Balushev, T. Miteva, V. Yakutkin, G. Nelles, A. Yasuda, and G. Wegner: Phys. Rev. Lett. **97**, 143903 (2006) .

2. A. Monguzzi, R. Tubino, S. Hoseinkhani, M. Campione, and F. Meinardi: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 4322-4332 (2012) .
3. T. N. Singh-Rachford, and F. N. Castellano: *Coord. Chem. Rev.* **254**, 2560-2573 (2010) .
4. J. Zhou, Q. Liu, W. Feng, Y. Sun, and F. Li: *Chem. Rev.* **115**, 395-465 (2015) .
5. A. Monguzzi, J. Mezyk, F. Scotognella, R. Tubino, and F. Meinardi: *Phys. Rev. B* **78**, 195112 (2008) .
6. V. Gray, D. Dzebo, M. Abrahamsson, B. Albinsson, and K. Moth-Poulsen: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 10345-10352 (2014) .
7. P. F. Duan, N. Yanai, H. Nagatomi, and N. Kimizuka: *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 1887-1894 (2015) .
8. S. H. C. Askes, A. Bahreman, and S. Bonnet: *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 1029-1033 (2014) .
9. N. J. Thompson, M. W. B. Wilson, D. N. Congreve, P. R. Brown, J. M. Scherer, T. S. Bischof, M. F. Wu, N. Geva, M. Welborn, T. Van Voorhis, V. Bulovic, M. G. Bawendi, and M. A. Baldo: *Nat. Mater.* **13**, 1039-1043 (2014) .
10. M. Tabachnyk, B. Ehrler, S. Gelinias, M. L. Bohm, B. J. Walker, K. P. Musselman, N. C. Greenham, R. H. Friend, and A. Rao: *Nat. Mat.* **13**, 1033-1038 (2014) .
11. Z. Y. Huang, X. Li, M. Mahboub, K. M. Hanson, V. M. Nichols, H. Le, M. L. Tang, and C. J. Bardeen: *Nano Lett* **15**, 5552-5557 (2015) .
12. C. Mongin, S. Garakyaraghi, N. Razgoniaeva, M. Zamkov, and F. N. Castellano: *Science* **351**, 369-372 (2016) .
13. M. Wu, D. N. Congreve, M. W. B. Wilson, J. Jean, N. Geva, M. Welborn, T. Van Voorhis, V. Bulović, M. G. Bawendi, and M. A. Baldo: *Nat. Photon.* **10**, 31-34 (2016) .
14. K. Okumura, K. Mase, N. Yanai, and N. Kimizuka: *Chem.-Eur. J.* **22**, 7721-7726 (2016) .
15. M. Mahboub, Z. Huang, and M. L. Tang: *Nano Lett*, DOI:10.1021/acs.nanolett.1026b03503 (2016) .
16. T. Kinoshita, J. T. Dy, S. Uchida, T. Kubo, and H. Segawa: *Nat. Photon.* **7**, 535-539 (2013) .
17. T. Kinoshita, J. Fujisawa, J. Nakazaki, S. Uchida, T. Kubo, and H. Segawa: *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 394-398 (2012) .
18. S. Amemori, Y. Sasaki, N. Yanai, and N. Kimizuka: *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 8702-8705 (2016) .
19. S. Amemori, N. Yanai, and N. Kimizuka: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 22557-22560 (2015) .
20. N. Yanai, and N. Kimizuka: *Chem. Commun.* **52**, 5354-5370 (2016) .

Beilstein Glyco-Bioinformatics Symposium 2017 参加報告

Beilstein Glyco-Bioinformatics Symposium 2017

糖鎖有機化学研究室 山田 一作
Issaku YAMADA

シンポジウム概要

Beilstein Glyco-bioinformatics SymposiumはBeilstein Instituteが主催するシンポジウムの一つであり、2009年より隔年で開催され、今回で5回目にあたるBeilstein Glyco-bioinformatics Symposium 2017はドイツ・ベルリンのHotel Akademie Berlin-Schmöckwitzにおいて行われた。本シンポジウムはSociety for Glycobiology (SFG) Annual MeetingにおけるGlycoinformatics サテライトシンポジウムとともに糖鎖情報学（グライコインフォマティクス）について焦点をあてた数少ないシンポジウムで、ヨーロッパ、アメリカ、アジア、オーストラリアをはじめ多くの地域から約60名の参加者が参集した。

本シンポジウムは口頭発表、ポスター発表、ソフトウェアデモンストレーションから構成されており、ポスター発表とソフトウェアデモンストレーションは、2分間のElevator Talk（ショートトーク）で研究のアピールを行うことができる。

Beilstein Instituteは他にもBeilstein Enzymology Symposium, Beilstein Organic Chemistry Symposium, Beilstein Nanotechnology Symposiumを開催している (<http://www.beilstein-symposia.org>)。

参加報告

2017年6月13日から15日にかけてドイツ、ベルリンにおいて開催されたBeilstein Glyco-bioinformatics Symposium 2017に参加させていただいた。



シンポジウム会場とホテル

本シンポジウムは23件の口頭発表、13件のポスター発表、9件のソフトウェアデモンストレーションがあった。



シンポジウム案内

口頭発表

口頭発表ではRené Ranzinger先生 (University of Georgia) は” GRITS Toolbox - A Platform for the Development Integrated Glycomics Data Processing and Data Analysis Tools” と題して発表された。GRITS Toolboxは主に質量分析データを解析して糖鎖構造を同定するためのソフトウェアであり、様々な機能追加が行われており、インターネット (<http://www.grits-toolbox.org>) よりダウンロードして無料で利用することができる。Ajit Varki先生 (University of California San Diego) は” SNFG: Symbol Nomenclature for Glycans” と題して発表された。SNFGは従来のOxford形式やCFG形式よりも多くの単糖に対応させ、単糖記号の色の指定も論文や発表資料に利用しやすいようにCMYKおよびRGB形式で指定できるようにしている。SNFGの単糖記号については、SNFG Discussion Groupによって議論され仕様を決定している。私も昨年のSFG Annual Meetingにおいて、Ajit Varki先生と議論させていただき、本年よりSNFG Discussion Groupのメンバーとして参加している。James C. Paulson先生 (The Scripps Research Institute) は” HIV Glycosylation” と題して発表された。糖タンパク質の各グリコシル化部位について高マンノース型、複合型、糖鎖無修飾を迅速に評価するための半定量的な部位特異的解析が可能な手法について質量分析をもとに開発された。Robert J. Woods先生 (University of Georgia) のグループは、” Gly-Spec: Glycan 3D Structure and Specificity Prediction” と題して発表された。Gly-SpecはVirtual Glycan Arrayを活用してタンパク質と糖鎖の結合を予測するツールで、Consortium for Functional Glycomics (CFG) 糖鎖マイクロアレイデータやGlycomeDBの糖鎖構造データを利用していた。Frédérique Lisacek先生

(SIB - Swiss Institute of Bioinformatics) は” Glycomics@ExPASy” と題して発表された。SIBでは様々なバイオインフォマティクスツールを開発し公開している。2016年にSIBが公開しているサイトにglycomicsを追加し順次拡充している。そして、William S. York先生 (University of Georgia) は” Requirements for a Unified Bioinformatics Infrastructure to Increase Understandability and Accessibility of Glycoanalysis” , Ten Feizi先生 (Imperial College London) は” Progress and Prospects for O-Glycome Arrays” , Matthew P. Campbell先生 (Griffith University) は” GlycoStore: A Behind the Scenes Look” と題した発表された。

ソフトウェアデモンストレーション

ソフトウェアデモンストレーションでは以下の9件が行われた。このセッションは実際にこれらのソフトウェアなどを開発している研究者に使い方や実装方法など様々なことを気軽に相談・議論できる場として有益であった。

- ◆ Semi-automated Analysis of Glycopeptide Mass Spectrometry Data with glyXtool-MS (Markus Pioch)
- ◆ GlycoNAVI: GlycoBio Database Utilizing Semantic Web Technologies (Issaku Yamada)
- ◆ GlyConnect, an Interactive Tool to Query and Navigate across Glycoproteomics Data (Julien Mariethoz, Alessandra Gastaldello)
- ◆ PepSweetener and Glynsight - Two Interactive Tools Supporting Glycoproteomics Studies (Davide Alocci)
- ◆ The International Glycan Structure Repository GlyTouCan (Kiyoko F. Aoki-Kinoshita)
- ◆ GRITS Toolbox - A Freely Available

Software System for Processing and Storing of Glycomics MS Data and Metadata (René Ranzinger)

- ◆ The New Glycan-web User Interface and Webtool Suite (Oliver C. Grant)
- ◆ Software for Management, Storage and Presentation of Glycan Array Data (Yukie Akune)
- ◆ UniCarb-DB (Miguel Rojas-Macias)

おわりに

本シンポジウムは小規模な国際会議ではあるが、その分多くの研究者と密に交流するこ

とができ、人脈の構築や情報交換などにおいて非常に有益な機会であった。

私は” GlycoNAVI: GlycoBio Database Utilizing Semantic Web Technologies” についてポスター発表とソフトウェアデモンストレーションおよびそのElevator Talkを行った。ここでも研究において様々な意見交換・議論を行うことができ貴重な経験となった。

最後に、このような非常に有意義なシンポジウムに参加させていただけたことに感謝するとともに、この経験を今後の研究に活かしていきたい。

— 事業概要 —

2016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中心に、機能性材料研究も継続している。2016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。

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）の構築を進めてきた。今年度までに、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ある程度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った。この技術が評価され、国立医薬品食品衛生研究所からの要請で共同研究も始まっている。この技術は合成、バイオ、解析のきめ細かな連携で進化する。進めば進むほど技術とノウハウが蓄積し、野口研究所の固有技術に育ってゆく可能性が高く、大切にしたい。そして、これらで培ってきた技術と経験の当然の出口として、疾患と糖鎖修飾の関わりに関する研究や糖構造を有する生理活性物質の探索研究にも継続して力を入れ、疾病克服の一翼を担うことを目指している。昨年度に引き続き、都立健康長寿医療センター研究所のパートナーとして参加した筋ジストロフィー症の原因解明研究において役割を果たすことができた。

機能性材料研究では、これまで非白金電極の開発やCO₂の有効活用など触媒技術を中心に探索研究を進めてきたが、本格展開のきっかけはつかめていない。来年度からは触媒にとらわれず、環境・エネルギー分野に資する研究を目指しテーマを開拓してゆくこととした。

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は糖鎖合成等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。

研究助成事業は、挑戦的な若手研究者を支援するために野口遵研究助成事業を継続している。本年度は「ライフサイエンス」、「エネルギー・資源・環境」及び「豊かな生活」の3課題で募集し、164名の応募の中から13名に助成金を授与した。また、本年度の野口遵賞は2012年度の助成者である名古屋大学の瀬川泰知氏に贈呈した。受賞講演は「ナノカーボンを指向した湾曲芳香族炭化水素の合成化学」であった。瀬川氏の研究は明瞭に過去の弊所助成が発展の礎となっていた。今年度で9年目を迎えたが、ようやく花が開いてきた

感がある。

人材の養成については講師派遣、卒業研究生受け入れを継続して実施した。

平成27年8月の理事会で決議し、建設を進めていた新研究棟は、予定通り平成28年8月末に完成した。9月に引っ越し、10月より新しい研究棟での研究が順調にスタートしている。

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、学問的には糖鎖の構造と機能の相関や、バイオ医薬品等の開発、改良ターゲットの明確化が期待できると考え検討している。いわゆるバイオ医薬品はCHOに代表される動物細胞を利用しタンク培養により製造されている。抗体医薬の場合、10g/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を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、トラスツズマブ製剤中の主要糖鎖に関してはコアフコースを有し、かつ均一な糖鎖構造を持つ高純度糖鎖均一抗体の調製技術も確立した。そしてコアフコースの有無以外同一の構造を有する数種の均一糖鎖抗体間での活性比較を行い、コアフコースの存在が生物活性をほぼベールレベルにまで低下させる事を明らかにした。即ち、製剤中10～15%しか含まれないコアフコース非含有トラスツズマブが活性本体である事をつきとめた。今後は他の抗体へ技術適用するとともに酵素・ドナーのラインアップ拡充検討を推し進め、バイセクティング糖鎖、多分岐糖鎖等を含めた製剤中のマイナー糖鎖構造に関してもリモデリングによる均一化を図り、構造活性相関データを網羅する。さらには他の糖タン

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いる。現在までにin vitroで1,5AFの数千倍のインフラマソーム阻害活性を示す高活性化化合物を取得してきたがin vivoでの明確な薬効確認に至っていない。引き続き、高活性誘導体の探索研究を実施するとともに、特に薬効評価モデルの検討に注力し、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。

(2016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。
- ②APプロジェクトにおいてインフラマソームを阻害する新規高活性物質の創製を行う。
- ③生化学的知見に有用な糖質誘導体の合成を行う。
- ④Acid-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。
- ⑤糖鎖技術の普及に向けて、分野の異なる研究者を含め糖質研究をサポートする「糖質科学支援システム」“グライコナビ

TM”の開発を行う。また、国際糖鎖構造リポジトリ(GlyTouCan)の開発と、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。

- ⑥糖鎖転移活性を利用した位置選択的なタンパク質のPEG化法の開発を行う。
- ⑦フルオロアルキル基含有糖鎖プローブを用いる糖鎖抗原作成を行う。

(今期の成果)

- ① 種々の糖鎖オキサゾリンドナーの合成・供給を行った。また、卵黄より得られるSialylglycopeptide(SGP)を出発原料とし、新たな糖鎖ドナーであるGN1a-oxaとGN1b-Oxaの合成の検討を行った。更に、ウシのリボヌクレアーゼBから高マンノース型糖鎖のM5-OHを調製し、M5-oxaドナーの合成も行った。
- ② インフラマソームを阻害する物質として3種類の新規化合物を合成した。
- ③ α -ジストログリカン糖鎖は、筋細胞膜構造の安定化に必須な膜たんぱく質である筋ジストログリカン上に存在している。最近、FKTNとFKRPがGlcNAc β 1-4Man型 α -ジストログリカン糖鎖の生合成経路に関与していることが報告された。そこでこれらの酵素の構造解析、及び構造解析のための基質としてCore M3糖ペプチドの化学合成を行った。
- ④ α -Fuc結合が安定な酸処理条件を見出し、Acid-labile なBoc基を糖水酸基保護基として用い、Fuc α 1-6GlcNAc残基を有する糖ペプチドの合成を行った。
- ⑤ グライコナビの拡充として新たに糖タンパク質データベースの開発に着手した。また、JST・ライフサイエンスデータベース統合推進事業「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」では、国際糖鎖構造データリポジトリシステムの開発、糖鎖構造データの標準化の基盤技術である国際糖鎖標準表記法 (WURCS: Web3.0 Unique Representation Carbohydrate Structures)の開発を行った。

- ⑥ 本研究では、PEG化糖オキサゾリンをドナーとして用い、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼによる糖鎖転移反応を利用したタンパク質の位置選択的なPEG化法の開発を行っている。昨年度はモデル実験として、単糖誘導体に対するPEG化糖オキサゾリンドナーの転移反応が進行することを確認した。本年度は転移生成物についての構造解析を行った。その結果、新たに生成したグリコシド結合が $\beta(1\rightarrow4)$ であることが明らかになった。次にタンパク質を用いた検討として、モガリズマブ (抗CCR4抗体)、及びカイコ絹糸腺産生トラスツマブ (抗HER2抗体)を用い、本PEG化法による位置選択的PEG化について検討を行った。その結果、Asn297上のN-アセチルグルコサミン部位に選択的にPEG鎖が導入されることが明らかとなった。
- ⑦ 本年度は脂質部分にアルキル/フルオロアルキルを含む種々の糖鎖誘導体を合成し、糖鎖含有リポソームの作成を試みた。

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。

(2016年度の年初計画)

- ① LDN含有PSAの診断マーカーとしての有用性を検証すべくLDN含有PSA抗体を取得し、EIA系を構築する。
- ② LDN糖鎖による乳癌進行抑制メカニズム

を解析する。

- ③ GalNAc-DSLc4およびその合成酵素と腎癌悪性化との関連を解明する。
- ④ HGPプロジェクトにおいてHGP調製を行う。また、取得したHGPの品質評価系を立ち上げ、各種糖鎖の機能を解明する。
- ⑤ APプロジェクトにおいてヒト細胞系を用いた評価系の整備と誘導体評価を行う。また鹿児島大と共同で病態モデルの整備と評価を実施する。

(今期の成果)

我々は、以前行ったPSAの糖鎖構造に関するMS解析により、ヒト前立腺癌においては前立腺肥大と比較してLacdiNAc (LDN)含有量の増加を示唆する結果を得ている。しかしながら、PSA濃度が4~10ng/mLのグレーゾーン患者由来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系を構築して、新たな診断マーカーとしてのLDN-PSAの有用性を検証すべく検討を進めている。今年度は、抗LDN抗体の作製を行うため糖鎖リモデリング法およびリポソーム法にて2種類の抗原を作製してマウスへ免疫したが、LDN糖鎖を特異的に認識する抗体の取得には至っていない。現在、抗原を変えて抗LDN抗体の取得を試みている。

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遺伝子高発現乳癌細胞株を用いた各種癌の悪性形質に関する解析により、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評価により腫瘍形成能の低下を確認し、これら結果から、乳癌細胞においてはLDN糖鎖が癌抑制作用を有することを明らかとした。現在、LDN

糖鎖による癌抑制作用の分子メカニズムを解明すべく、上記遺伝子高発現株において増加しているLDN糖鎖含有膜タンパク質を同定するとともに、LDN糖鎖の増加によって起こる影響について細胞を用いて解析を進めている。

腎癌において肺への高転移株にGalNAc α 1,4-DSLc4糖鎖構造が存在することに着目し、腎癌の悪性化や転移性へのジシアリル糖鎖の関与について検討している。これまでに、GalNAc-DSLc4糖鎖抗原の機能を解明するため、この糖鎖抗原の合成に関わる糖転移酵素遺伝子 β 4GalNAc-T2を同定し、GalNAc-DSLc4をほとんど発現していない腎癌細胞株に遺伝子導入して、糖鎖リモデリングの結果惹起される表現型の変異について解析を進めてきた。樹立した β 4GalNAc-T2安定発現株を用いた解析から、1) 細胞表面のGalNAc-DSLc4を増加させる事で癌悪性形質の特徴とされる増殖能、浸潤能、ラミニンへの接着能が亢進する事、2) その要因の1つとしてPI3K経路の活性化増強が関与する事、3) GalNAc-DSLc4は脂質ラフト中に局在し、インテグリン等膜タンパクの局在を変える事、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、GalNAc-DSLc4発現量の異なる腎癌細胞株を用い、RM2抗体の添加によりGalNAc-DSLc4発現腎癌細胞株の浸潤能が抑制される事を確認した。また、 β 4GalNAc-T2遺伝子導入によって生じる糖鎖構造の変化について把握するためにLC-MS解析を進めている。

HGPプロジェクトにおいて、カイコ絹糸腺にて産生させたトラスツズマブ (抗HER2抗体) を出発原料として、これまでに構築した糖鎖改変技術を駆使してA2(α 2, 6)、G2、

G1a、G1b、G0およびM3型の糖鎖改変トラスツズマブを揃えた。当該トラスツズマブの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) を有していない。しかし、実際の製剤としても使用されているチャイニーズハムスター卵巣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N結合型糖鎖を約85%含む。同種の均一糖鎖間でのコアフコース有無による各種比較評価を行うため、昨年度までに調製済みのコアフコース含有率を向上させた糖鎖改変トラスツズマブとともに、表面プラズモン共鳴法によるFc γ RIIIa-V158との相互作用解析およびHER2高発現株のSK-BR-3細胞をターゲット細胞とした抗体依存性細胞障害活性の測定を行った。また、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た糖鎖改変体に関してはA2(α 2, 3)型も新たに調製し、コアフコースを含まないA2(α 2, 6)型との各種比較評価を同様に実施した。また、今年度新たな糖タンパク質 (抗体) への糖鎖改変技術の拡充という点では、リツキシマブ (抗CD20抗体) の構造解析に向け、糖鎖改変体の調製方法を確立し大量調製を実施した。さらに、モガムリズマブ (抗CCR4抗体) の糖鎖改変体調製にも着手し、既存の糖鎖をGlcNAc β 1 \rightarrow Asnの構造に変換したアクセプターの調製方法を確立し、糖鎖改変体調製法の検討を行った。

APプロジェクトにおいて、in vitro系ではヒトTHP1細胞を用いた評価系を整備し、1,5-AFおよびその類縁体の添加によるインフラマソーム形成阻害効果を調べている。これまでに、各刺激によるNLRP3系、AIM2系、およびNLRC4系のインフラマソーム活性化により産生されるIL-1 β を検出するcell assay系を立ち上げて化合物の評価を行い、1,5-AFに比べ3-Deoxy体などの1,5-AF類縁体がより強くIL-1 β 産生を阻害することを明ら

かにした。本年度は、各刺激に対する化合物のIC50値を決定するとともに細胞に与える毒性についても検討し、より有効な化合物の選定を行った。またin vivo評価では、マウスLPS敗血症モデルにおいて既得データのような顕著な生存率改善は認められなかった。その原因として、本モデルではインフラマソーム活性化阻害のみで致死抑制とはならないことが考えられ、1,5-AFの再現性取得は困難と判断した。そこで、インフラマソーム活性化の明らかな in vitro/ex vivoモデルとしてマウス尿酸結晶腹膜炎モデルに着手したところ、尿酸結晶刺激により腹腔内洗浄液中で浸潤細胞の種類の変化が認められ、炎症が惹起されていることが示唆された。現在、化合物の評価を行うため、評価系確立を目的とした検討を継続している。

新規テーマとして、骨格筋における疾患の発症や進展に関わる糖鎖についての研究を開始した。

加齢により進行性かつ全身性に筋肉量および筋力が低下するサルコペニア、また寝たきりの患者が運動量低下などによって起こる廃用性筋萎縮などの骨格筋領域の疾患について、その発症や進展における糖鎖の役割を明らかとし、その予防や治療に関する情報を提供することを目的とする。今年度は、共同研究により外部研究機関で動物を用いた研究を行う環境を整備し、各種筋萎縮モデルマウス作製技術を習得して萎縮した筋肉を調製した。現在、これら筋肉を用いて糖鎖関連の解析を進めている。

糖鎖生物学研究室

糖鎖とペプチドを遊離せずアミノ酸配列情報および糖鎖付加位置情報を含む糖タンパク質のMSによる分析技術研究を推進している。これまで糖ペプチドをプレート上で直接ピレン標識し高感度MALDI-TOF-MSを本研究室で開発した。また、糖ペプチドを安定同位体

ベンゾイル基で標識し、比較定量法を開発した。より定量的にグライコフォームを解析するために、糖ペプチドのLC-MS/MS(SRM)解析法も開発している。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ライコフォーム（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。

(2016年度年初計画)

- ① 血清より調製したPSA糖ペプチドのLC-MS/MSによる定量法を開発し前立腺がん患者血清を解析する。LacdiNAc含有PSAがバイオマーカーとなるかどうかを明らかにする。
- ② 前立腺がんとPSAグライコフォームの相関を解明するため、標準品、細胞株や患者由来CTOSを比較解析する。
- ③ HGPプロジェクトの次期適用候補としてバイオ医薬品であるIL-1レセプターアンタゴニストに着目し、各種グライコフォームと血中動態の関係を解析する。
- ④ HGPプロジェクトで使用する酵素およびその変異体を調製し、酵素活性や反応条件を検討する。
- ⑤ APプロジェクトにおいてマウスBMDMを用いて化合物の評価をする。

(今期の成果)

前立腺癌のスクリーニングとして実施される、PSA濃度を測定するPSA検査は、前立腺肥大症によっても血中PSA濃度が上昇するため、特にグレーゾーン（4-10ng/ml）では鑑別が困難である。そこで癌特異的な糖鎖構造を含有するPSAが存在するのであればそのグライコフォームを検出することでスクリーニングの精度が向上する。これまでに約20例のPSA 30ng/ml以上の前立腺癌患者血清をMALDI-TOF MSによって解析し、

LacdiNAc含有G2F糖鎖を有するPSAの割合が増加する傾向があることがわかったが、検出限界によりグレーゾーンの血清を測定することはできなかった。そこで感度および定量性の向上を目指してLC-MS/MSによる解析法の開発に着手した。今年度は血清からのPSA精製、糖ペプチド調製・精製工程を見直し改良を行った結果、血清由来の夾雑ピークを軽減することができた。これにより従来法では困難であった、標準血清にPSA標品を5 ng/mL添加した試料でLacdiNAc含有糖ペプチドについて定量できることが判明した。再現性を確認後、グレーゾーン濃度の前立腺癌患者及び前立腺肥大症患者の血清のPSA糖ペプチドを解析し、LacdiNAc含有PSAがバイオマーカーとなるかどうかを検証していく。

よりプライマリーに近い前立腺癌患者由来CTOSの産生するPSAの解析を行った。予備実験として精漿（正常細胞由来）、癌細胞株由来のPSAと並べてレクチンカラムクロマトグラフィーを行ってその溶出パターンを比較した。その結果、レクチンによっては結合プロファイルが異なることが明らかになりCTOSの産生するPSAに精漿由来のものとは異なるグリコフォームが存在することが示唆されたので、さらに詳しい解析を行っている。

HGPプロジェクトにおいて、均一構造のハイマンノース糖鎖M5型糖鎖をもつ抗体を調製するための酵素を検討した。コアフコース非含有抗体のハイマンノース糖鎖へのリモデリングには、これまでに調製したEndoS D233Q、EndoS2 D184Q、EndoS2 D182Q、EndoF3 D165A/Qなどの変異体では転移活性が低く実用的でなかった。そこで、新たなグリコシターゼを作製するため、EndoH、EndoF1、EndoF2、EndoA、EndoD各酵素の変異体を作製し、その糖転移活性を調べたが、いずれの変異体にも期待される糖転移活性が検出されなかった。一方、EndoS2

のD184Mはコアフコース含有抗体アクセプターに対して、十分なハイマンノース糖鎖の転移活性があることが報告された (JBC 291, 16508-16518, 2016)。そこでEndoS2 D184Mを調製して、抗体アクセプターに対するハイマンノース糖鎖の転移反応を実施したところ、コアフコース含有抗体アクセプターに比べて約1/2の生成量ではあったが、コアフコース非含有抗体アクセプターに対して約40%の転移効率を示した。この変異体を用いて750 ugのコアフコース非含有トラスズマブアクセプターにM5型の均一構造糖鎖を転移させ、最終的に約50%の転移効率で転移産物を得た。

HGPプロジェクトでさらに多様な糖鎖について均一糖鎖をもつ糖タンパク質を作成する技術を開発するために必要な新規酵素の探索も引き続き実施している。現在、菌周病菌の酵素を大腸菌で発現させ、多分岐複合型糖鎖の切断活性があることを確認した。これら酵素のグリコシターゼ化を試みている。

APプロジェクトでは、前年度から引き続きマウスBMDMを使用した系で、インフラマソーム活性化阻害剤の評価を行った。野口研究所において新規有機合成された化合物も含め各種化合物のNLRP3インフラマソーム阻害活性のIC50値を求め、比較した。新規化合物enone体のフッ素化や、アセチル化、C3H7エステル化、C7H15エステル化によって、enone体に比べ数倍阻害活性が亢進していた。Levoglucononeもフッ素化やアセチル化により、阻害活性の亢進が見られたが、その亢進の程度はenone体の場合程顕著なものではなかった。AIM2インフラマソーム阻害活性に対するこれらの誘導体のIC50は、NLRP3を阻害するIC50の10倍以上の濃度を要した。

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。

(2016年度の年初計画)

- ① 共同研究を推進し、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 ターゲット糖タンパク質を増やし、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。
- ③ 調製に必要な新規酵素の探索、並びに新規ドナーの作成と基盤技術の確立。

(今期の成果)

製剤中の主要成分である4種 (G2,G1-a,G1-b,G0) の糖鎖に関して、高純度のコアフコース含有 (コアフコース付加率99% \lt)、非含有均一糖鎖トラスツズマブをそれぞれ調製し並べて活性評価を再実施しデータをフィックスした。

その結果、何れのコアフコース非含有体も含有体と比して2オーダー以上強いADCC活性を示す事が判明した。Fc γ RIIIaとの結合に関しても非含有体の方が1オーダー以上高い親和性を示した。

以上の結果より、トラスツズマブでは製剤中に10数%程度しか存在しないコアフコース非含有体が活性本体である事が強く示唆された。

今回新たに調製したA2 (α -2,3体)、M3を含む7種のコアフコース非含有均一糖鎖トラスツズマブ (糖鎖付加率 \gt 95%) に関してその活性評価を複数回実施し、糖鎖間の比較データをフィックスした。その結果、コアフコースの有無による違いには遠く及ばないものの異なる均一糖鎖トラスツズマブ間でFc γ RIIIa親和性並びにADCC活性に差異が観察された。同一組成の構造異性体間 (G1a/G1b,A2(2,6)/A2(2,3)) においても活性の明確な違いが検出された。Fc γ RIIIa-V158との相互作用の強さは、HerB-A2(α 2,6)

\geq HerB-G2 \geq HerB-G1a \gt HerB-G1b \doteq HerB-G0 \doteq HerB-A2(α 2,3) \gt HerB-M3 \gt HerB-intact-fullの順となった。また、Fc γ RIIIaとの親和性とADCC活性強度間に正の相関を確認できた。

今回確認された糖鎖の構造活性相関が一般化されるか否かは今後モガムリズマブを材料として検証する予定である。モガムリズマブのアクセプター調製並びに上記7種のドナーの転移はトラスツズマブと同様の方法で実施可能である事は確認済みである。更にM5,GN1a/b,G1GN1a/b,バイセクティングGlcNAc含有糖鎖、多分岐糖鎖等抗体医薬製剤中にマイナー成分として検出される糖鎖、製剤中に未同定の天然型、非天然型糖鎖等を有する均一糖鎖抗体に関しても創製フローを確立後、順次、構造活性相関を調べていく予定であるが、今年度はM5糖鎖並びに2本のPEG鎖を有する糖鎖誘導体に関してリモデリングの目途をつけた。ドナーに関してはSGPからではなく、M5は、ハイマンノースタイプ糖鎖を有する糖タンパク質であるRNaseBより2段階の酵素処理後に精製したM5-OHを、PEG化糖鎖に関しては化学合成した(PEG5) 2-Hex1-HexNAc-OHをそれぞれオキサゾリン化する事により調製した。コアフコース非含有アクセプターへの転移反応に関してはいくつかのシナーゼを検討し、M5ではEndoS2のある種の変異体が50%程度の転移効率を示す事を突き止めた。尚、これまで我々が抗体への転移に汎用して来ている酵素群を使用した場合、転移反応の進行は殆ど認められなかった。PEG化糖鎖に関してはEndoS(野生型)を使用することにより満足のいく転移が確認された。今後、スケールアップ、精製、機能解析を実施する。

一方、国立医薬品食品衛生研究所と共同で、リツキシマブを対象として各種糖鎖が抗体の構造特性、ひいては熱安定性、凝集性等に及ぼす影響を調べる研究を開始した。本評価で

はこれまでの10倍以上の量を要する為、先ずコアフコース含有均一糖鎖調製フローをコアフコース指向型加水分解酵素を使用する従来法からコアフコース指向型合成酵素を利用する方法に改変し工程数を短縮した。収率向上が認められた本法を用いて解析対象とする主要糖鎖構造4種のうち先ず2種 (G2F,G0F) のコアフコース含有均一糖鎖リツキシマブ (コアフコース付加率<99%) を各々1mgずつ調製した。現在、国立医薬品食品衛生研究所にて水素重水素交換/質量分析法による構造特性解析等が進行中である。我々はG1aF,G1bF体を順次調製する。尚、今回調製したコアフコース含有均一糖鎖リツキシマブに関して予備的にADCC活性を調べたところ予想通り何れもコアフコース非含有糖鎖を7%程度含むリツキサン製剤よりも低下し、G2Fの方がG0Fよりも強い活性を示すことが確認された。しかしながら興味有ることにトラスツブマブの場合と異なりコアフコースの存在による極端な活性低下は認められなかった。今後、リツキシマブに関してもコアフコース非含有均一糖鎖体を調製し、検証する。

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。

(2016年度の年初計画)

- ①規誘導体の合成を行う。
- ②ヒト、マウスの細胞系を用いて、上記誘導体群の活性評価を行う。また、細胞評価系の整備、拡充も平行して実施する。
- ③敗血症モデルでの化合物評価を実施する。

(今期の成果)

マウス細胞の系において3-deoxy-1,5-AFの約100倍、1,5AFの約1000倍の活性向上が認められたenone体をベースに新たに2種の化

合物を合成し、一連のenone誘導体の評価をヒト、マウス両系で複数回実施し、IC50をそれぞれ算出した。enone体の6位の水酸基をアセチル化したAc-enone体及びその3位にフッ素を導入したAc-F-enone体では、ヒトの系で約10倍、マウスNLRP3の系で数倍の活性向上が認められた。新規誘導体C3-enone体、C7-enone体に関してもそのIC50値はいずれもアセチル体とほぼ同等であった。興味深い事に、C3-enone体はヒト系においてこれまでのどの化合物よりATP量を指標とした毒性と活性との乖離が大きく、少なくとも25倍以上の乖離が認められた。

これまででマウスの細胞系で最強の阻害活性を示したLevoglucoenoneは構造既知である事から、今回本化合物にFを導入した新規化合物を合成し評価に供した。その結果、大幅な活性向上はないものLevoglucoenoneと同等以上の阻害活性をヒト、マウス両細胞系で示す事が確認された。尚、今回評価した化合物群もこれまでの物と同様にヒトの系では複数のインフラマソーム系をほぼ同等の濃度で阻害したのに対して、マウスの系ではNLRP3経路特異的な阻害剤として作用する傾向を示した。

LPS投与後の致死率改善を指標としたマウス敗血症モデルでの化合物評価系を種々検討して来たが、下記理由により本モデルの活用を断念する事とした。

- 1) 各種条件検討を実施したが、系が安定せず、1,5AFを用いた鹿大のデータが再現不能。
- 2) 最近他のvivoモデルでの効果が示されたインフラマソーム阻害剤が本モデルでは無効。

現在、インフラマソーム経路と病態の関連が確度高く証明されているマウス尿酸結晶膜膜炎モデルの確立を急いでいる。またインフラマソームの活性化をvivoで直接モニター可能とされているIDOLマウスの利用も検討中

である。

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。

(2016年度の年初計画)

二酸化炭素からの新規な化学品製造プロセスの開発を目指して、二酸化炭素と水素から高収率で化学品を製造できる触媒の探索研究を推進する。

(今期の成果)

昨年度までの研究で二酸化炭素と水素を出発原料として、Niをゼオライトに担持し、高温処理した触媒を用いることにより400℃の反応で「コハク酸」が生成することを見出したと考えていた。今年度も本研究を更に推進したが、触媒のロットによって「コハク酸」収率の再現性が得られなかった。

その原因を検討した結果、触媒調製は、Niを担持したゼオライトを高温処理した後に硝酸処理するのであるが、その処理時にテフロン攪拌子を用いて調製した触媒では「コハク酸」収率が高く、テフロン攪拌翼を用いて調製した触媒では「コハク酸」収率が低いという結果が得られ、テフロン触媒への混入が影響している可能性が示唆された。

そこで、生成物の分析に用いているイオンクロマトで試みにFイオンの保持時間を測定したところ標品のコハク酸の保持時間と完全に一致することが分かり、これまでコハク酸と考えていたピークがFイオンである可能性が高いことが判明した。

イオンクロマトの分析条件を検討し、コハク酸とFイオンが分離できる分析条件に変更し、これまで検討した触媒の代表的なものについて再反応を行ったところ、これまでコハ

ク酸であると考えていた生成物は、Fイオンであり、コハク酸は全く生成していないことが分かった。

Fイオンは、触媒に混入したテフロンが反応温度400℃でNi等の金属によって分解して生成したものと考えられる。

ただ、いくつかの触媒では、微量ではあるが酢酸が生成しており、炭素数1の二酸化炭素から炭素数2の酢酸を直接合成できる反応が存在することを確認した。

しかしこれまで検討した触媒では、酢酸の収率は極微量であり、収率を飛躍的に向上させることは、これまでの研究の延長線上では望めそうにないため本研究は今年度を持って終了することとした。

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を行っている。昨年度からは燃料電池用膜原料モノマーの、新規合成プロセスの研究を行っている。

(2016年度の年初計画)

- ①ウィリアムソン合成を用いたエーテル骨格形成によるモデルモノマー合成について検討する。特に、化学計算結果から示唆されたように、各種触媒の効果を検証する。
- ②モデルモノマーで良好な知見が得られれば、実モノマー合成を検討する。

(今期の成果)

モデルモノマー合成では触媒の探索を中心に検討したところ、クラウンエーテルやクリプタンド等の触媒や、アルキル化剤活性化の目的で用いたルイス酸触媒の使用で、極めて低収率ながら目的物が得られた。一方、高温では生成物の分解の兆候があったことから、クリプタンド触媒の系で室温・長時間の反応を行ったところ、途中まで収率が向上したものの、その後低下に転じた。

そこで目的物標品を、アルキル化剤を除いた反応条件下に曝したところ、クリプタンド触媒添加で標品の減少が認められた。すなわち、系内では活性種アニオンが目的物をも攻撃していることが確認され、本ルートは断念した。

次に上記不可逆的な副反応の懸念がない実モノマー合成について検討した。その結果、モデルモノマー合成で効果があった触媒を数種類検討したが、いずれの場合も目的物は全く得られなかった。

実モノマーの場合は可逆的な副反応の可能性があったことから、副反応の進行を前提に目的物に戻す処理を行ってみたところ、一部の反応バッチで目的物が得られた。しかしながら収率は最高5%弱に止まった。

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。フ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。2016年度は、フルオラス科学研究会第9回シンポジウムを名古屋大学石原一彰教授にご尽力いただき、10月7日名古屋大学ベンチャービジネスラボラトリーにて開催した。(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
- ・ 鹿児島大学 (丸山征郎教授)
- ・ 大阪府立病院機構 (井上正宏部長)
- ・ 東北薬科大学分子生体膜研究所 (井ノ口仁一教授)
- ・ 東海大学工学部応用化学科 (稲津敏行教授)
- ・ 東京都健康長寿医療センター研究所老化機構研究チーム (遠藤玉夫副所長)
- ・ 株式会社豊田中央研究所
- ・ 理化学研究所 (山口芳樹)
- ・ 慶応義塾大学医学部 (工藤純教授)
- ・ 群馬大学 (松尾一郎教授)
- ・ 東京理科大学薬学部 (青木伸教授)
- ・ 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 (武田伸一所長)
- ・ 国立医薬品食品衛生研究所 (橋井則貴室長)

2. 研究助成事業

2-1 野口遵研究助成金

2009年度より野口遵研究助成金を始めた。本助成金は国内の大学またはそれに準じる研究機関に所属する39歳以下の若手研究者を対象に、ライフサイエンス、エネルギー・資源・環境、新材料・デバイスの3分野で募集し、2016年度は164件の応募の中から13件に第8回助成金を贈呈した。(詳細は77頁)

本助成金の採択者は7年間で延べ111人となった。過去の採択者のその後の調査では、職位の上昇した研究者、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。

2017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。2016年度は2012年度、2013年度の採択者29名の中から名古屋大学の瀬川泰知氏に「第3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。2016年度は2名の大学院生を受け入れ卒業研

究等の指導を行った。また、非常勤講師として研究員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 5件(うち共同出願 1件)
- ・特許公開 4件(うち共同出願 2件)
- ・審査請求 3件(うち共同出願 1件)
- ・特許登録 7件(うち共同出願 1件)
- ・PCT出願 3件(うち共同出願 1件)
- ・外国特許出願 0件(うち共同出願 0件)
- ・PCT公開 3件(うち共同出願 1件)
- ・外国特許公開 0件(うち共同出願 0件)
- ・外国特許登録 1件(うち共同出願 1件)

(2) 学会発表 17件 (うち国際学会 8件)

(3) 誌上発表 4件

(4) 依頼講演 3件

【別添資料1】

フルオラス科学研究会第9回シンポジウムプログラム

2016年10月7日(金) 名古屋大学VBLホール3F 会議室 〒464-8603 名古屋市千種区不老町

9:40-9:50 会長挨拶

座長:畑中研一(東大生産研)

9:50-10:40 特別講演S-1「含フッ素有機化合物と炭化水素の常識・非常識」

(京大化研) 長谷川健

座長:折田明浩(岡山理科大工)

10:40-11:10 招待講演I-1「フルオラスキラルゲル化剤の合成と物性:ペルフルオロアルキル基による配列制御」

(お茶水女大) 矢島知子

11:10-11:25 口頭発表O-1「有機分子触媒による光酸素酸化的スチレン類のケト-トリフルオロメチル化反応の開発」

(岐薬大薬) ○山口英士、伊藤彰近

13:15-14:30 ポスターセッション

座長:轟木堅一郎(静県大薬)

14:30-15:00 招待講演I-2「球状錯体の『中』の化学:世界最小のフルオラス溶媒からの展開」

(東北大WPI-AIMR;JST ERATO) 佐藤宗太

15:00-15:30 招待講演I-3「フッ素置換疑似基質による生体触媒の反応制御」

(名大院理・JST CREST) 荘司長三

座長:波多野学 (名大院工)

- 16:00-16:30 招待講演I-4「ペルフルオロ有機物を活用する有機分子変換」
(分子研・総研大) 榎山儀恵
- 16:30-16:45 口頭発表0-2「芳香族フッ素化合物を活用するelliptoxanthone Aの合成」
(東京薬大薬) ○藤本裕貴、矢内光、松本隆司
- 16:45-17:15 招待講演I-5「芳香族ペンタフルオロスルファニル (SF5) 化合物の効果的な合成法とその応用展開について」
(宇部興産 (株) 医薬事業部) 齋藤記庸
- 17:15-17:30 研究会総会
ポスターセッション (13:15-14:30)
*学生による発表
- *P-1 「フッ化炭素系有機修飾鎖の非混和性に基づく粒径制御混合磁性ナノ粒子膜の相分離形態形成」
(¹埼玉大院理工、²埼玉大工) ○大村京平(M2)¹、柚木健²、藤森厚裕¹
- *P-2 「細胞培養を指向したフルオラス鎖を有するゲル化剤の開発」
(東大生産研) ○伊藤稜哉(M1)、粕谷マリアカルメリタ、畑中研一
- P-3 「Perfluorocarboxylic acids exhibit higher cytotoxicity and cellular uptake than the non-fluorinated carboxylic acids」
(IIS,Univ.of Tokyo) ○Maria Carmelita, Z.Kasuya,Kenichi Hatanaka
- *P-4 「フルオラス溶媒中での細胞培養とその毒性評価」
(東大生産研) ○宮島浩樹(D3)、粕谷マリアカルメリタ、池内与志穂、畑中研一
- *P-5 「新規フッ素置換疑似基質による生体触媒の誤作動誘起とガス状アルカンの水酸化」
(¹名大院理、²JST CREST、³名大物国セ) ○中村大介(M1)¹、叢志奇¹、荘司長三^{1,2}、渡辺芳人³
- *P-6 「弗素原子を有する疑似基質を用いた非天然基質酸化反応系の開発」
(¹名大院理、²JST CREST、³名大物国セ)
○スタンフィールド・ジョシュア・カイル(D1)¹、荘司長三^{1,2}、渡辺芳人³
- P-7 「Dress-upアプタマーアフィニティーカラムのための新規フルオラスタグの開発」
(静岡県大薬) ○轟木堅一郎、佐藤雄飛、工藤悠翔、福土南、水野初、関俊哲、豊岡利正
- *P-8 「フェイズ・バニシング (PV) 法における反応系の設定とその制御」
(阪府大院理) ○足達裕介(M2)、池上潤、松原浩
- P-9 「ヘビーフルオラスタグを用いた糖質合成」
(¹野口研、²東海大工) ○水野真盛¹、後藤浩太郎¹、中野貴志^{1,2}、松田昭生¹
- *P-10 「タンパク質の非特異吸着を抑制するフルオラス糖鎖プローブの開発」
(東海大工) ○高山幹生(M2)、藤田遥一、西村大祐、羽田勝二、稲津敏行
- P-11 「デングウイルス感染阻害剤の開発を目指したフルオロアルキル鎖を有する

糖類の合成研究 (I)

(広島国際大) ○寺岡文照、松本莉穂、大坪忠宗、池田潔

P-12 「酢酸ナトリウムを促進剤としたオレフィンとポリハロアルカンの原子移動ラジカル付加反応」

(岐薬大) ○澤間善成、中谷亮祐、佐治木弘尚

P-13 「光レドックス触媒によるジフルオロハロメチル化合物の不飽和炭化水素類への還元的付加反応」

(阪府大院理¹・ダイキン工業株式会社²) 隅野修平¹、宇野美沙恵¹、○福山高英¹、柳日馨¹、松浦誠²、山本明典²、岸川洋介²

*P-14 「トリフルオロエトキシ基修飾型フタロシアニン色素を用いる光フルオロアルキル化反応」

(名工大院工) ○松崎浩平(D3)、広村知也、徳永恵津子、柴田哲男

P-15 「周辺をトリフルオロエトキシ基でコーティングしたフタロシアニン二量体の合成と性質」

(名工大院工) ○徳永恵津子、辻享兵、森悟、柴田哲男

*P-16 「ベンジル位Csp³-Hトリフルオロメチル化反応」

(静岡県大薬) ○井出貴文(D2)、増田柊也、川戸勇士、江上寛通、濱島義隆

*P-17 「新規相間移動触媒を用いたオレフィン類の不斉フッ素官能基化反応の開発」

(静岡県大薬) ○丹羽智紀(M1)、浅田純司、佐藤健太郎、橋爪大輔、江上寛通、川戸勇士、濱島義隆

*P-18 「フルオラス有機分子触媒を用いたフラン誘導体の不斉アルキル化反応」

(東京薬大薬) ○阿久津裕士(D2)、中島康介、平島真一、吉田彰宏、古石裕治、三浦剛

*P-19 「含フッ素キラル超分子リン酸触媒を用いる高エナンチオ選択的カルボニル-エン環化反応」

(名大院工) ○石原英幸(M2)、波多野学、石原一彰

*P-20 「含フッ素キラル超分子Lewis酸触媒の鍵穴を用いた高次立体選択的Diels-Alder反応」

(名大院工) ○阪本竜浩(D1)、波多野学、石原一彰

*P-21 「トリス(ペンタフルオロフェニル)ボランを触媒としたアルキンの分子内ヒドロアルコキシ化/アリル化反応の開発」

(名大院創薬) ○岡本将希(M1)、藤口将史、澁谷正俊、山本芳彦

*P-22 「新規フルオラス鉄サレン錯体の合成と孤立二重結合の不斉酸化反応」

(名城大農) ○宮崎裕紀(M2)、小林佑基、宮田一誠、榊原有希、杉山祐也、塩入孝之、松儀真人

*P-23 「フッ素化されたコバルトポルフィリン錯体によるアルキンのヒドロアルコキシ化反応」

(名大院理・名大物質科学国際研) ○岩月俊樹(M2)、牛丸理一郎、西村拓歩、野依良治、中寛史

P-24 「フルオロフェニル基を有するパイ共役拡張型芳香族アミドの合成」

(岡山理大工) ○折田明浩、西邑浩司、西田孝徳

*P-25 「次亜ヨウ素酸塩触媒を用いるカルボニル化合物の酸化的 α -アジド化反応」
(名大院工) ○佐原直登(M2)、服部悠平、塚原万由子、UYANIK Muhammet、
石原一彰

*P-26 「New Boronic Acid-catalyzed Amide Condensation Reaction」
(Grad.Sch.of Eng,Nagoya Univ.) ○Ke WANG(M1)、Yanhui LU、
KazuakiISHIHARA

*P-27 「アミン触媒を用いた α -フルオロ- β -ケトカルボン酸の脱炭酸的塩素化反応」
(豊橋技科大) ○北原一利(M2)、成瀬敦司、岩佐精二、柴富一孝

P-28 「L-スレオニン由来のキラルオキサザボロリジン触媒によるトリフルオロア
セチルビフェニルおよびmeso-1,4-ジオキサン誘導体の不斉還元反応」
(三重大院工) ○溝田功、小野川善郎、進藤大明、山本健太、人谷巖、清水真

*P-29 「トリフルオロメチル置換四員環化合物の反応性」
(名大院創薬) ○黒原崇(D2)、高水陽介、澁谷正俊、山本芳彦

*P-30 「トリフルオロメチルアルキンの電子欠損性を利用した銅触媒ヒドロアリー
ル化反応」
(名大院創薬) ○大久保恵理奈(M2)、渋谷正俊、山本芳彦

*P-31 「フルオラス化学の核燃料リサイクルへの応用研究」
(東海大工・応化¹、東海大工・原子力²) ○中川洸希(M2)¹、浅沼徳子²、
稲津敏行^{1,2}

【別添資料2】

(1) 学生の受け入れ

東海大学から修士論文研究生を2名受け入れ、下記のテーマにより研究を行った。

- ①フコース含有ペプチド合成に関する研究
- ②ENGaseの糖鎖転移活性を利用した位置選択的なPEG化法に関する研究

(2) 職員の教育活動

今年度は研究員6名を各大学に派遣し、非常勤講師として教育活動に携わった。

【別添資料3】

1. 学会発表 17件 (うち国際学会 8件)

MICC-4 symposium (2016.4.11-13)	1件
第64回質量分析総合討論会 (2016.5.18-20)	1件
2016 NIH & FDA Glycoscience Research Day (2016.6.29)	2件
The 28th International Carbohydrate Symposium (2016.7.17-22)	1件
Warren Workshop 2016 (2016.8.24)	2件
第35回日本糖質学会年会 (2016.9.1-3)	6件

Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology Database Meeting (2016.10.13)	1件
2016 SFG Annual Meeting (2016.11.19)	1件
日本化学会第97春季年会 (2017.3.16-19)	1件
日本農芸化学会2017年度大会 (2017.3.17-20)	1件

2. 誌上発表 4件

Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan

Naoyuki Kuwabara, Hiroshi Manya, Takeyuki Yamada, Hiroaki Tateno, Motoi Kanagawa, Kazuhiro Kobayashi, Keiko Akasaka-Manya, Yuriko Hirose, Mamoru Mizuno, Mitsunori Ikeguchi, Tatsushi Toda, Jun Hirabayashi, Toshiya Senda, Tamao Endo, and Ryuichi Kato
Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Aug 16; 113 (33) : 9280-9285.
Published online 2016 Aug 4. doi: 10.1073/pnas.1525545113

The Muscular Dystrophy Gene TMEM5 Encodes a Ribitol β 1,4-Xylosyltransferase Required for the Functional Glycosylation of Dystroglycan.

Manya H, Yamaguchi Y, Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Akasaka-Manya K, Kawakami H, Mizuno M, Wada Y, Toda T, Endo T.
J Biol Chem. 2016 Nov 18;291 (47) :24618-24627. Epub 2016 Oct 12.

3D structural analysis of protein O-mannosyl kinase, POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy.

Nagae M, Mishra SK, Neyazaki M, Oi R, Ikeda A, Matsugaki N, Akashi S, Manya H, Mizuno M, Yagi H, Kato K, Senda T, Endo T, Nogi T, Yamaguchi Y.
Genes Cells. 2017 Mar 2. doi: 10.1111/gtc.12480. [Epub ahead of print]

WURCS 2.0 Update To Encapsulate Ambiguous Carbohydrate Structures

Masaaki Matsubara, Kiyoko F. Aoki-Kinoshita, Nobuyuki P. Aoki, Issaku Yamada, and Hisashi Narimatsu
J Chem Inf Model. 2017 Apr 24;57(4):632-637. DOI: 10.1021/acs.jcim.6b00650
Publication Date (Web) : March 6, 2017

3. 講演 3件

第35回日本糖質学会年会 ワークショップ「糖鎖インフォマティクスにおける産学連携」
(2016.9.1)

「糖鎖構造の明確化」 山田一作

Glyco-Bioinformatics satellite meeting in 2016 Society for Glycobiology Annual Meeting
(2016.11.19)

「Compound cross reference database」 山田一作

2016 SFG ANNUAL MEETING (2016.11.19)

「Development and Application for the Web3 Unique Representation of Carbohydrate
Structures (WURCS)」 松原正陽

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、我が国化学工業界のパイオニアであり、日本窒素肥料（現JNC株式会社）、旭ベンベルグ絹糸（現旭化成株式会社）、鴨緑江水電を初め20数社の社長として内外地で大電力を自給し、世界的規模で各種化学工業を振興した不世出の企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. 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日に登記し、公益財団法人に移行した。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。

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	JNC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	センコーグループホールディングス株式会社
KISCO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. 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 小林 宏史*

常務理事 松田 昭生*

理事 齊藤 継男* 木幡 陽 畑中 研一 柴田 豊 山岸 秀之 加藤仁一郎
木庭 竜一 畠山 昌和 上ノ山智史 川崎 俊之

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

監事 城戸 信介 大沼 亮一 浦 一昭

*は常勤

5. 学術顧問

当研究所の学術顧問は平成29年7月末日現在、次のとおりである。

木幡 陽 畑中 研一 古川 清 柴崎 一郎

6. 職員

職員は平成29年7月末日現在、32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。

7. 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、この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り昭和21年1月に移転し研究活動を行ってきた。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、利便性も十分とはいえないため、借地権を元手に自前の新研究棟を建設し、昨年8月末日に竣工、9月に引越し、10月から新研究棟にて研究活動を行っている。

新 研 究 棟

最高高さ：18.60m

敷地面積：2145.07㎡

建設面積：851.45㎡

延床面積：2734.39㎡

地上4階建 鉄骨ALC造

1階：機器分析、史料室、
会議室兼食堂など

2階：生化学、
遺伝子組換えなど

3階：有機合成など

4階：居室、会議室など

設計・施工：

西松建設株式会社

着工：平成27年12月1日

竣工：平成28年8月31日



8. 特許および商標

当研究所所有の特許権は102件、商標権は4件である（平成29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
稲 津 敏 行 山 ノ 井 孝	グリコシド誘導体の製造法	4162739	2008.08.01
川 上 宏 子 戸 潤 一 孔	ビオチン脂質	4162904	2008.08.01
山 ノ 井 孝 小 田 慶 喜	C, C-グリコピラノシル化合物とその製造法	4212087	2008.11.07
柳 日 馨 松 原 浩 杉 山 弘 幸	フルオラス性を利用した回収容易なアミン類	4224315	2008.11.28
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
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
後藤浩太郎 水野真盛	高度にフッ素化されたアルコール誘導体と再利用が容易な使用法	4950436	2012.03.16
山ノ井孝	トレハロース誘導体とその製造法	4950521	2012.03.16
水野真盛 後藤浩太郎	高度にフッ素化されたフェノール誘導体およびその中間体	5005212	2012.06.01
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 -グリカール誘導体の製造法	5060028	2012.08.10
山ノ井孝	グリコシド誘導体と非還元性二糖およびその製造法	5091508	2012.09.21
山ノ井孝 小田慶喜	糖分岐シクロデキストリン誘導体とその製造法	5100160	2012.10.05
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
天野純子 奥村寿子	MALDI 質量分析法用測定試料調製方法	5990000	2016.08.19
水野真盛 戸治野真美 後藤浩太郎	炭素-炭素結合型ヘビーフルオラストグ	6001267	2016.09.09
後藤浩太郎 水野真盛	エーテル化合物製造法	6055293	2016.12.09
後藤浩太郎 水野真盛	アグリコン転位抑制効果を持つ無臭チオール誘導体	6066621	2017.01.06
天野純子 後藤康友 稲垣伸二	レーザー脱離イオン化質量分析法	6108805	2017.03.17
天野純子 奥村寿子	MALDI 質量分析法	6125426	2017.04.14
＜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
白井 孝 森 昌子 黒河内 政樹 富田 正浩	糖鎖切断抗体の製造方法及び均一糖鎖抗体	US 9550834 (米国)	2017.01.24

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. 2016年度野口遵賞実施報告

第8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) 2016年度の概要

①応募課題および応募件数

本年度は3課題で2016年9月1日から2ヶ月間募集を受け付け、総計164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	70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、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）など	62件	4件
課題 3	豊かな生活に寄与する新材料やデバイスに関する研究 電子材料、デバイス、センサーなど	32件	3件
件数計		164件	13件

②選考委員会

2017年2月3日に当研究所において選考委員会を開催した。選考委員11名が出席し厳正な選考の結果13件が採択された。（表2、表3参照）

③贈呈式

2017年3月8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
谷口 敦彦	東京薬科大学 薬学部 医療衛生薬学科 講師	アミロイド選択的光酸素化を基盤としたアミロイド病治療への挑戦
西村 勇哉	神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科 特命助教	放射線増感治療を可能にするナノ粒子の生体内動態と抗腫瘍効果
大塚 洋一	大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 助教	ナノ液体の物理化学特性を生かした多次元情報イメージング法の研究
塚越かおり	東京農工大学 大学院工学研究院 生命機能科学部門 助教	アプタマーポリマーの合成に基づく高感度検出法の開発とアルツハイマー病超早期診断への応用
藤枝 俊宣	早稲田大学 高等研究所 講師	無線給電にて作動可能なインジェクタブルナノ薄膜状デバイスの開発
内藤 瑞	東京大学 大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター 臨床医工学部門 特任研究員	筋ジストロフィーの治療を目指した骨格筋への薬物送達技術の開発
小野 利和	九州大学 大学院工学研究院 応用化学部門 助教	多成分分子の自己組織化を利用した有機蓄光発光材料の創製
竹澤 悠典	東京大学 大学院理学系研究科 化学専攻 助教	DNA酵素合成を活用した金属集積人工DNAワイヤーの合成
松本 剛	中央大学 理工学部 応用化学科 助教	完全貴金属フリーな常温常圧動作型水素吸蔵材料 (非貴金属・典型元素複合型ハイドライド) による化学エネルギー変換プロセスの構築
砂田 祐輔	東京大学 生産技術研究所 物質環境系部門 准教授	高い小分子捕捉・活性化能を示す鉄触媒による窒素固定化
松原 正和	東北大学 大学院理学研究科 物理学専攻 准教授	光メタマテリアルを用いたスピン流制御技術の開発
渡邊峻一郎	東京大学 大学院新領域創成科学研究科 物質系専攻 特任准教授	単結晶有機半導体を用いた発熱しないスピンドバイスの実現
関 朋宏	北海道大学 大学院工学研究院 応用化学部門 助教	メカニカルライティング法を利用した電子材料の構築

*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	NEDO技術戦略研究センター長・大阪大学特任教授
	山本 憲二	石川県立大学教授・京都大学名誉教授
	小宮山 眞	物質・材料研究機構招聘研究員・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）顧問
	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
	増村 正志	JNC（株）非常勤顧問

*所属・職名は選考委員会開催時のもの

【2014年度（第6回）野口遵研究助成金 研究成果報告（要旨）】

氏名	東田 裕一	所属	九州大学 稲盛フロンティア研究センター	職名	教授
研究テーマ名	哺乳類初期胚細胞外分泌タンパク質を利用した生殖補助医療技術の開発				
哺乳類着床前初期胚発生における細胞外分泌タンパク質の役割は不明である。我々はトランスクリプトーム解析によりマウス着床前初期胚で発現する細胞外分泌タンパク質を同定し、機能阻害実験によりEGF、IGF-I、IGF-IIがマウス着床前初期胚発生に重要な役割を果たしている可能性を見出した。本研究成果は哺乳類初期胚発生メカニズムに新たな概念をもたらし、生殖補助医療技術の開発へと発展することが期待できる。					
氏名	栗原 顕輔	所属	岡崎統合バイオサイエンスセンター	職名	特任准教授
研究テーマ名	ドラッグデリバリーシステムを志向した自律構築型リポソームの開発				
本研究はドラッグデリバリーシステムのキャリアとして、低分子で形成される環境応答性のリポソームを応用することを目的とした。リポソーム内部で膜生産反応を加速させるための触媒を、リポソーム内部で自発的に生産させた後に、アルデヒド基を持つリポソーム膜の前駆体として添加すると、リポソームは肥大分裂を繰り返した。環境に応じてリポソームの膜組成を変えながら、繰り返し増殖するリポソームの開発に成功した。					
氏名	丸山 健太	所属	大阪大学 免疫学フロンティア研究センター	職名	特任助教
研究テーマ名	革新的骨保護ワクチンの開発				
熱変性RANKL/SOSTをアジュバント+低用量抗PD-1抗体とともに投与することで、骨保護ワクチンの開発を試みている。現時点で骨密度を上昇させることのできる骨保護ワクチンの同定には至っていないが、熱変性SOSTをアジュバント+低用量抗PD-1抗体とともに投与することで機能的SOST中和抗体の産生が生じることを示唆する知見を得ており、現在ワクチン成分の改良をすすめている。					

氏名	塚崎 智也	所属	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科	職名	准教授
研究テーマ名	蛋白質分泌マシーナリーの動的精密探査を可能とする新しい再構成系の構築				
<p>生命必須の現象であるタンパク質の分泌過程に着目した研究である。蛋白質分泌マシーナリーが大きな構造変化を伴ってタンパク質の分泌を駆動していると予測されているが、その詳細は明らかとなっていない。本研究では、タンパク質透過孔を形成するSecトランスロコン膜タンパク質複合体の高分解能解析と機能解析から、その細胞質領域の動態を明らかとした。また、Secトランスロコンの動態を直接観測すべく、高速AFMを用いた1分子解析を進めた。</p>					
氏名	久代京一郎	所属	東京大学 大学院工学系研究科	職名	助教
研究テーマ名	材料構造に基づくがん診断デバイスの開発とその機械的シグナル伝達メカニズムの解明				
<p>"転移の際に癌細胞は体内の様々なマイクロ構造中を移動するが、これら構造による影響やそのメカニズム等は解明されていない。近年、マイクロサイズのトポグラフィー（溝、隙間構造等）を用いて構造に対する細胞移動と癌の転移メカニズムを調べる研究が増えてきている。本研究ではTetra-PEGハイドロゲルでマイクロ溝構造を形成し、材料構造がどのように癌細胞の移動へ影響を与えるのかを調べた。結果、構造により細胞移動性が向上するものの、癌細胞は、アクチン骨格などを極性化できず、正常細胞ほど構造による機械的シグナルに反応せず、代わりに自由に移動でき、さらに壁などを登るなど、特異的な移動挙動を示すことが分かった。これらを理解することで、例えば癌の転移メカニズムの理解と共に、従来の分子マーカーではなく、移動挙動による癌細胞の悪性評価ができるデバイスの開発につながる。</p>					
氏名	秋山 佳丈	所属	信州大学 繊維学部	職名	准教授
研究テーマ名	ラベルフリー磁気細胞操作によるオンチップ臓器アッセイ系の構築				
<p>本研究では、磁気アルキメデス効果を用いたラベルフリー操作技術により、マイクロ流路内で細胞パターンニングと微小组織の操作を実証した。従来法では困難だった細胞シートのような生体組織上への細胞のパターンニングを実証し、さらには電磁石による可変磁場を用い、スフェロイドの操作と融合にも成功した。今後、本手法をさらに発展させることで、生体同様に複雑な3次元組織のマイクロ流体デバイス内で構築を目指したい。</p>					
氏名	前田 和彦	所属	東京工業大学 大学院理工学研究科	職名	准教授
研究テーマ名	金属錯体とナノ構造酸化物で創る水中駆動型CO ₂ 固定化光触媒				
<p>本研究では、広域可視光に応答して水中でCO₂を還元できる新たな光触媒系の開発を行った。C₃N₄、TaON、CaTaO₂N、Y₂Ta₂O₅N₂などの（酸）窒化物は、Ru(II)二核錯体を吸着担持することで、可視光照射によりCO₂を還元してギ酸を与える光触媒となることを明らかにした。また、Co(OH)₂を水の酸化触媒活性点かつ光吸収中心として用いることで、ワイドギャップの酸化物半導体を可視光応答化できることをはじめて見出した。</p>					

氏名	高橋 幸奈	所属	九州大学 大学院工学研究院	職名	助教
研究テーマ名	金ナノロッドを光捕集アンテナとした光エネルギー変換デバイスの開発				
<p>プラズモン誘起電荷分離を利用することで、高分子色素を、球状や棒状を含む金ナノ粒子の光アンテナ効果が強いナノ空間に、ナノレベルで制御して配置することに成功した。また、ボトムアップ手法により、球状金ナノ粒子や金ナノロッドの、担持密度や配向配列を制御した単層膜の作製に成功した。さらに、三角形平板状銀ナノ粒子も安定性を向上することで、高効率な光エネルギー変換デバイスに利用できる可能性を示した。</p>					
氏名	平田 修造	所属	東京工業大学 物質理工学院	職名	助教
研究テーマ名	ナノ空間場を用いた10mW/cm ² で最大効率を示すフォトンアップコンバージョン材料への挑戦				
<p>10mW/cm²の低パワー光強度下且つ大気中の環境下で効率よくフォトンアップコンバージョン特性を示す材料技術の開発を行った。新規液状化合物を媒体や添加剤として用いると、大気中でも脱酸素下と同等のフォトンアップコンバージョン特性が得られることを見出した。さらに、上記大気中で動作するメカニズムが、光照射時に材料中に存在する酸素が液状化合物との化学反応により効率よく消失することによるものであることを特定した。</p>					
氏名	所 裕子	所属	筑波大学 大学院数理物質科学研究科	職名	准教授
研究テーマ名	相転移挙動の熱力学的制御による環境調和型エネルギー材料の開発				
<p>これからの科学技術は、環境との調和も重要視し、人間社会の将来を担っているという使命感を帯びて発展していくことが大切である。この課題に対し、今までにない発想や着眼点に基づき新しい技術を世の中に提案していくことは、極めて重要である。本研究ではこのような視点から、レアメタルを使用しない埋蔵量豊富な元素からなる機能性材料の開発に取り組んだ。具体的には、物質の相転移特性を利用するという着眼点により、圧力や電流、光など多種多様な外場により熱特性や電気物性、光学物性などが変化する環境調和型外場応答機能材料の開発を行った。</p>					
氏名	島 弘幸	所属	山梨大学 大学院総合研究部	職名	准教授
研究テーマ名	螺旋型ナノ繊維の構造柔軟性を利用した革新的電磁シールド材料の創製				
<p>極微な大きさのコイル型炭素繊維 (= Carbon Micro-Coil: CMC) は、構造柔軟性と特異な電磁応答特性を兼ね備えた、魅力あるナノ材料の一つとしてよく知られている。本研究では、このナノ炭素材料を基盤素材として活用した次世代型の電磁ナノマテリアル開発を目指して、同材料の構造解析と電気伝導特性を実験・理論の両面から解析し、コイル形状と伝導特性との相関関係を定量的に明らかにした。</p>					
氏名	山田 鉄兵	所属	九州大学 大学院工学研究院	職名	准教授
研究テーマ名	インコメンシュレートに配列したイオン性ゲストの構築と物性の探索				
<p>クーロン相互作用や水素結合といった強い分子間相互作用を有するゲストを配位高分子の細孔に導入することで、ゲスト分子・イオン間の相互作用による大きな安定化エネルギーが存在する。これらを配位高分子に導入することで、配位高分子の持つ周期性とゲスト間の周期とのミスマッチを作ることで、分子間の相互作用を弱めて相転移温度を低下させ、ディスオーダーを導入することでイオンの流動性を導入することに成功した。</p>					

氏名	矢野 隆章	所属	東京工業大学 物質理工学院	職名	助教
研究テーマ名	単一分子機能制御能を具備した革新的ナノ分光計測法の開拓				
<p>本研究では、ナノスケールの空間分解能と分子機能制御能力を兼備する革新的ナノ分光計測手法を開発した。具体的には、先鋭な金属プローブ探針先端で試料分子に局所的な電氣的摂動および機械的摂動を印加することによって試料分子の機能・物性を変調し、さらにその分子のラマン散乱をその場検出することによって摂動下の分子の機能・物性変化をその場分光分析することに成功した。</p>					

2016年度野口遵賞実施報告

1) 野口遵賞の趣旨

本賞は過去の野口遵研究助成金採択者の中から毎年1名に「野口遵賞」を贈呈し、副賞として500万円を大学等の所属研究機関へ奨学寄付金として支給いたします。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) 2016年度の概要

2017年2月3日に野口遵研究助成金の選考に先立って第3回野口遵賞の選考を行った。選考委員11名による選考の結果、名古屋大学大学院理学研究科瀬川泰知特任准教授を受賞者とすることを決定した。なお、本年度は2012年度、2013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瀬川泰知特任准教授は2012年度に「分岐型カーボンナノチューブの精密合成」というテーマで野口遵研究助成に採択されています。

– Appendix –

2016年度誌上発表論文抄録集

Abstract of Publications

Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan

Naoyuki Kuwabara, Hiroshi Manya, Takeyuki Yamada, Hiroaki Tateno, Motoi Kanagawa, Kazuhiro Kobayashi, Keiko Akasaka-Manya, Yuriko Hirose, Mamoru Mizuno, Mitsunori Ikeguchi, Tatsushi Toda, Jun Hirabayashi, Toshiya Senda, Tamao Endo, and Ryuichi Kato

Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Aug 16; 113(33): 9280–9285.

Published online 2016 Aug 4. doi: 10.1073/pnas.1525545113

The dystrophin glycoprotein complex is essential for a variety of biological events, including maintenance of muscle integrity. An O-mannosyl glycan [GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-4(phosphate-6)-Man] of α -dystroglycan (α -DG). Reduced glycosylation of α -DG is linked to some types of inherited muscular dystrophy; consistent with this relationship, many disease-related mutations have been detected in genes involved in O-mannosyl glycan synthesis. Defects in POMGnT1 are causally related to muscle-eye-brain disease. Crystal structures of POMGnT1 agreed with our previous results showing that the catalytic domain recognizes substrate O-mannosyl proteins via hydrophobic interactions with little sequence specificity. Furthermore, it was found that the stem domain recognizes the β -linked GlcNAc of O-mannosyl glycan. This interaction may recruit POMGnT1 to a specific site of α -DG to promote GlcNAc β 1-2-Man clustering and also may recruit other enzymes that interact with POMGnT1, e.g., fukutin, which is required for further modification of the GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-4(phosphate-6)-Man glycan. On the basis of these findings, we propose a mechanism for the deficiency in postphosphoryl modification of the glycan observed in POMGnT1-KO mice and MEB patients.

~~~~~

#### The Muscular Dystrophy Gene TMEM5 Encodes a Ribitol $\beta$ 1,4-Xylosyltransferase Required for the Functional Glycosylation of Dystroglycan Cytotoxicity Activities

Manya H, Yamaguchi Y, Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Akasaka-Manya K,  
Kawakami H, Mizuno M, Wada Y, Toda T, Endo T.  
J Biol Chem. 2016 Nov 18;291(47):24618-24627. Epub 2016 Oct 12

O-マンノシルグリカンの欠損は、 $\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ -DG) の異常なグリコシル化によって引き起こされる先天性筋ジストロフィー群である  $\alpha$ -ジストログリカノパシーの原因である。最近、 $\alpha$ -DGと細胞外マトリックスリガンドとの結合に必要とされるO-マンノシルグリカン [3GlcA  $\beta$  1-3Xyl  $\alpha$  1] n-3GlcA  $\beta$  1-4Xyl-Rbo5P-1Rbo5P-3GalNAc  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$  1-4 (6-リン酸) Man  $\alpha$  1-の構造全体が提案されている。しかしながら、還元末端側Xyl残基のリビトール5-リン酸 (Rbo5P) への結合は明らかになっていない。TMEM5は、 $\alpha$ -ジストログリカノパシーに関与する遺伝子産物であり、この連鎖形成に関与する可能性のある酵素として報告されているが、実験的証拠は依然として不明である。本論文では、TMEM5がO-マンノシルグリカン上のXyl  $\beta$  1-4Rbo5P結合を形成するキシロシルトランスフェラーゼであることを報告する。NMR分析により、生成物のアノマー立体配置および結合位置 ( $\beta$  1,4結合) を決定した。 $\alpha$  ジストログリカノパシー患者に見られるTMEM5における2つのミスセンス突然変異の導入は、キシロシルトランスフェラーゼ活性を損なう。さらに、CRISPR/Cas9によるTMEM5遺伝子の破壊は、O-マンノシルグリカン上の (-3GlcA  $\beta$  1-3Xyl  $\alpha$  1-) ユニットの伸長を排除した。これらの結果に基づいて、我々はTMEM5 がO-マンノシルグリカンの生合成経路におけるUDP-d-キシロース：リビトール-5-リン酸  $\beta$  1,4-キシロース転移酵素として作用すると結論した。

~~~~~

3D structural analysis of protein O-mannosyl kinase, POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy

Nagae M, Mishra SK, Neyazaki M, Oi R, Ikeda A, Matsugaki N, Akashi S, Manya H,
Mizuno M, Yagi H, Kato K, Senda T, Endo T, Nogi T, Yamaguchi Y.
Genes Cells. 2017 Mar 2. doi: 10.1111/gtc.12480. [Epub ahead of print]

α -DGの異常なO-マンノシル化は、基底膜からの細胞外マトリックスタンパク質の分離による重度の先天性筋ジストロフィーにつながる。タンパク質O-マンノシルキナーゼ (POMK) によって触媒されるO-マンノースのC6-位置でのリン酸化は、O-マンノースグリカンの生合成経路における重要な段階である。POMK触媒ドメインのいくつかのミスセンス突然変異は、重度の先天性筋ジストロフィーであるWalker-Warburg症候群を引き起こすことが知られている。またPOMKは他の典型的なキナーゼとの配列類似性が低いため、この酵素の構造-活性関係は不明なままである。ATP類似体およびO-マンノシル化糖ペプチドの非存在下および存在下におけるPOMK触媒ドメインの結晶構造解析の結果、POMK触媒ドメインは、N-ローブおよびC-ローブからなる典型的なプロテインキナーゼフォールドを示す。マンノース残基は、他の単糖残基と区別して、主にC2位のヒドロキシル基を介してPOMKに結合することが明らかとなった。

WURCS 2.0 Update To Encapsulate Ambiguous Carbohydrate Structures

Masaaki Matsubara, Kiyoko F. Aoki-Kinoshita, Nobuyuki P. Aoki, Issaku Yamada, and
Hisashi Narimatsu

J Chem Inf Model. 2017 Apr 24;57(4):632-637. DOI: 10.1021/acs.jcim.6b00650

Publication Date (Web): March 6, 2017

Accurate representation of structural ambiguity is important for storing carbohydrate structures containing varying levels of ambiguity in the literature and databases. Although many representations for carbohydrates have been developed in the past, a generalized but discrete representation format did not exist. We had previously developed the Web3 Unique Representation of Carbohydrate Structures (WURCS) in an attempt to define a generalizable and unique linear representation for carbohydrate structures. However, it lacked sufficient rules to uniquely describe ambiguous structures. In this work, we updated WURCS to handle such ambiguous monosaccharide structures. In particular, to handle structural ambiguity around (potential) carbonyl groups incidental to the carbohydrate analysis, we defined a representation of backbone carbons containing atomic-level ambiguity. As a result, we show that WURCS 2.0 can represent a wider variety of carbohydrate structures containing ambiguous monosaccharides, such as those whose ring closure is undefined or whose anomeric information is only known. This new format provides a representation of carbohydrates that was not possible before, and it is currently being used by the International Glycan Structure Repository GlyTouCan.

Licensed under CC-BY © American Chemical Society



最寄り駅からの所要時間

- 都営三田線・板橋区役所前駅A1出口、新板橋駅A3出口から徒歩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60号

2017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
