

# 野口 研究所 時報

ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

巻頭言 所感 .....	小林 宏史
MALDI-MSを用いた糖鎖修飾の高感度・詳細構造解析に向けて .....	西風 隆司
最近明らかになった癌関連糖鎖抗原の重要機能 .....	古川 鋼一
1,5-アンヒドロ-D-フルクトース誘導体の合成とインフラマソーム阻害剤としての評価 .....	後藤浩太郎 井手尾浩子
ボロン酸-糖複合体を利用した質量分析による単糖異性体分析 .....	黒河内政樹
糖鎖抗原が関与する腎癌の悪性化メカニズム .....	土田 明子
<i>Tannerella</i> 属細菌由来新規 endo- $\beta$ - <i>N</i> -acetylglucosaminidase, Endo-Tsp1006の解析 .....	高島 晶
カーボンナノチューブ構造の精密有機合成 .....	瀬川 泰知
半導体、無機ナノ粒子、金属錯体を活用した水中駆動型CO <sub>2</sub> 固定化光触媒システム .....	前田 和彦
国際会議報告 .....	山田 一作
2017年度活動概要 .....	松田 昭生
研究所の概要 .....	入江 辰則
野口遵研究助成金／野口遵賞	
2017年度誌上発表論文抄録集	

---

THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.61 2018

CONTENTS

An Essay .....	Hiroshi KOBAYASHI
Towards a sensitive structural analysis of protein glycosylation by MALDI-MS .....	Takashi NISHIKAZE
Recently elucidated important function of cancer-associated glycolipid antigens .....	Koichi FURUKAWA
Preparation of 1,5-Anhydro-D-fructose derivatives and evaluation .....	Kohtaro GOTO
of their functions as inflammasome inhibitors	Hiroko IDEO
Development of Monosaccharide Isomeric Analysis using Borate Complexes .....	Masaki KUROGOCHI
and Tandem Mass Spectrometry	
Malignant Mechanism of Renal Cancer Cells evoked by Glyco-antigens .....	Akiko TSUCHIDA
Analysis of the novel endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, .....	Shou TAKASHIMA
Endo-Tsp1006, from <i>Tannerella</i> sp.	
Precise synthesis of carbon nanotube structures .....	Yasutomo SEGAWA
Photocatalytic CO <sub>2</sub> fixation systems workable in water .....	Kazuhiko MAEDA
using semiconductors, nanoparticles and metal complexes.	
Report on the International Meeting .....	Issaku YAMADA
The Activities of the Institute .....	Akio MATSUDA
Outline of the Institute .....	Tatsunori IRIE
Noguchi Shitagau Research Grant	
Abstracts of Publications	

---

---

巻頭言 所感	小林 宏史 ……	1
MALDI-MSを用いた糖鎖修飾の高感度・詳細構造解析に向けて	西風 隆司 ……	4
最近明らかになった癌関連糖鎖抗原の重要機能	古川 鋼一 ……	17
1,5-アンヒドロ-D-フルクトース誘導体の合成と インフラマソーム阻害剤としての評価	後藤浩太郎 …… 井手尾浩子	26
ボロン酸-糖複合体を利用した質量分析による単糖異性体分析	黒河内政樹 ……	33
糖鎖抗原が関与する腎癌の悪性化メカニズム	土田 明子 ……	44
<i>Tannerella</i> 属細菌由来新規 endo- $\beta$ - <i>N</i> -acetylglucosaminidase、 Endo-Tsp1006の解析	高島 晶 ……	51
カーボンナノチューブ構造の精密有機合成	瀬川 泰知 ……	60
半導体、無機ナノ粒子、金属錯体を活用した 水中駆動型CO <sub>2</sub> 固定化光触媒システム	前田 和彦 ……	67
国際会議報告	山田 一作 ……	74
2017年度活動概要	松田 昭生 ……	77
研究所の概要	入江 辰則 ……	91
野口遵研究助成金／野口遵賞		99
2017年度誌上発表論文抄録集		105

THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.61 2018

C O N T E N T S

An Essay	Hiroshi KOBAYASHI ·····	1
Towards a sensitive structural analysis of protein glycosylation by MALDI-MS	Takashi NISHIKAZE ·····	4
Recently elucidated important function of cancer-associated glycolipid antigens	Koichi FURUKAWA ·····	17
Preparation of 1,5-Anhydro-D-fructose derivatives and evaluation of their functions as inflammasome inhibitors	Kohtaro GOTO ····· Hiroko IDEO	26
Development of Monosaccharide Isomeric Analysis using Borate Complexes and Tandem Mass Spectrometry	Masaki KUROGOCHI ·····	33
Malignant Mechanism of Renal Cancer Cells evoked by Glyco-antigens	Akiko TSUCHIDA ·····	44
Analysis of the novel endo- $\beta$ - <i>N</i> -acetylglucosaminidase, Endo-Tsp1006, from <i>Tannerella</i> sp.	Shou TAKASHIMA ·····	51
Precise synthesis of carbon nanotube structures	Yasutomo SEGAWA ·····	60
Photocatalytic CO <sub>2</sub> fixation systems workable in water using semiconductors, nanoparticles and metal complexes.	Kazuhiko MAEDA ·····	67
Report on the International Meeting	Issaku YAMADA ·····	74
The Activities of the Institute	Akio MATSUDA ·····	77
Outline of the Institute	Tatsunori IRIE ·····	91
Noguchi Shitagau Research Grant		·····104
Abstracts of Publications		·····105

— 卷頭言 —

## 所 感

### An Essay

理事長 小林 宏史

President Hiroshi KOBAYASHI

この1年間は蓄積していた課題が様々な方面で一挙に表面化した年だったように感じます。地球温暖化が原因と見られる世界的な異常気象、政・官の不祥事、スポーツ界でのパワハラ問題、そして今アメリカのドナルド・トランプ大統領が次々に繰り出す発言や行動で、世界の政治・経済情勢は動揺しています。トランプ大統領は先進7カ国首脳会議（G7）や北大西洋条約機構（NATO）首脳会議などの場で西側同盟国の指導者を厳しく非難したかと思えば、北朝鮮の金正恩委員長やロシアのプーチン大統領のような独裁的指導者には親密さを演出するという、まるで敵味方の区別がなくなったかのような振る舞いで世界を混乱に陥れています。

また経済の面では「貿易戦争」とまで表現される貿易摩擦が大きな問題になっています。その矛先はアメリカの最大の貿易赤字国である中国のみならず、欧州連合（EU）や日本にも向けられています。「アメリカ1国主義」は今後どのような影響を及ぼすのか、緊迫の度を高めています。

こうした動きは一見、トランプ大統領の個人的な嗜好や世界観・価値観によるもののように見えますが、実はそれだけではなく、ポピュリズムの世界的な台頭がその原因の一つであると言われています。7月24日付の日本経済新聞は、「マネーは大企業や富裕層に集

中し、住宅や教育に投資したい中間層には行き渡らない。グローバル化の恩恵が行き届かない階層の不満が、保護主義を前面に掲げるトランプ氏を大統領にまで押し上げた」と分析しています。近年のグローバル化によるひずみが新しい秩序を要求しているのかもしれない。

こうした世界の動きの中で中国は着実に体制固めをしているように見えます。中国は2010年に日本を抜いて国内総生産（GDP）世界第2位になりました。2020年代末にはアメリカのGDPを追い越す予想もあるようです。かつて「世界の工場」と言われていた中国ですが、今では「世界の消費者」と言われるようになりました。さらに2015年には産業高度化戦略である「中国製造2025」政策を発表し、「製造強国」を目指しています。トランプ大統領が中国との「貿易戦争」で中国に対し容赦のない姿勢を見せているのは、ハイテク分野での覇権争いが根本にあるとみられています。中国では今年3月の全国人民代表大会で国家主席の任期を「2期10年」までとする規制を撤廃する憲法改正案が採択されました。習近平国家主席は2期目が終わる2023年以降も続投できるようになります。中国は「習氏1強体制」のもとで、共産党1党独裁体制のはらむ様々な矛盾を抱えながらも民主主義の持つ手続きの煩雑さを尻目に着々と地位

を築き上げてゆきそうな気配を感じます。

中国の一带一路構想や領土をめぐる強気な振る舞いを見聞きするにつけ、大方の日本人は少なからず脅威を感じているのではないのでしょうか。現行の国際秩序や規則に挑戦しているようにも見えます。近くて遠い国のように思える大国とどのように接してゆけば良いのでしょうか。歴史学者の川島真氏は中国と日本のこれからの関係について、以下のように述べています。“いかなるアジアを創るのかという点で、中国自身は試行錯誤の時期、いわば模索の時代にある。19世紀半ば以降、列強に侵略されてきた記憶を持つ中国では、抵抗の論理や防御の手法を身に纏ってはいても、「強者」としてふるまう経験に、少なくとも近代以降は乏しい。中国をただ批判し、敵対するのではなく、むしろコミットメントを強めて中国が平和的で、安定的な存在になるよう促すことが求められる。(途中略) 日本側も安保や領土では妥協せずに、かつ問題の拡大を防ぐ努力、可能な範囲での対話とルール作りをしながら、他方で経済や非伝統的安全保障の領域では戦略的観点に基づく協力を惜しまない、という方向で行くべきであろう”(21世紀の「中華」；中央公論新社刊)

さて次に話題を変えて、平成30年版の科学技術白書から科学技術の現状と課題をピックアップしてみます。

- 論文数は減少傾向にあるとともに、被引用数Top10%補正論文数ランキングについては大きく低下
- 若手研究者数の伸び悩み、国際流動性の低さ、女性研究者や外国人を含めた人材の多様性の低さ、産官学のセクター間の流動性の低さなどの面で課題あり
- 次代を担う研究者の確保、若手研究者のキャリアパス形成、経済的負担に対する不安の解消などが必要
- 国際的に注目度の高い研究領域が増えてきているが、我が国はそれらの研究領域への

挑戦的参画が不足

- 諸外国に比べると未だ不十分であるが、大学等と企業の本格的な産学連携は着実に進みつつある

2017年3月のNature誌において科学論文の国際シェアの低下など、日本の科学技術が近年失速しているとの報告があり波紋を呼びました。今年の特稿の報告でもこの傾向に歯止めがかかっていないとしています。残念ながら科学技術白書の現状分析も科学技術力の低下を裏付けているようです。またアカデミアの方々からは、研究資金獲得のためには短期的成果につながる研究テーマにシフトせざるを得ない、基礎研究の裾野が傷んでいて研究の厚み、多様性が無くなってきている、などのお話も聞きます。

日本の財政状況を考えると容易ではないと思うものの、研究者の安定した雇用と収入の見通し、競争的研究資金の獲得しづらい基礎研究の支援体制など、研究に安心して専念できる環境を整備してゆかないと日本の科学技術力の低下に歯止めがかからないのではないかという気がしてなりません。企業の研究開発でも、トップが中止を決めた研究テーマをアングラで辛抱強く継続した結果、大きな成果をもたらしたという事例は多々あります。トップダウン、政治主導のようなやり方だけではうまくゆかないのが、科学技術の世界ではないかと思うのです。私たちは民間の研究所ですが、大学や公的研究機関とは共同研究や日常的な交流を通して密接な関係を持っており、日本の科学技術の現状や将来に大きな危惧を抱いています。私たちの特徴である、アカデミアと企業との中間的な立ち位置を生かし、科学技術の発展に貢献してゆきたいと考えています。

最後に野口研究所の現況についてお話しします。

今年、野口研究所は創立77周年を迎えましたが、これまでの間、順風満帆に歩んできた

わけではありません。むしろ苦難の歴史であったといった方が良いかもしれません。資金難の時代、これまで手掛けていた研究をすべてストップして研究テーマを再構築した時代など、創立者を同じくする企業の支援を受けながら、先人たちがこうした厳しい時期を乗り越えた結果、現在の野口研究所があります。

この先、野口研究所は今のまま、いわば馬なりに進んで行って、継続的な成果を上げてゆけるのだろうかと考えてみると、必ずしも安泰ではない、私たちを取り巻く環境変化を考えると、むしろこれからいろいろな問題、課題が顕在化してくるのではないかと思っています。もう一度原点に立ち返って野口研究所の使命や研究の方向性などを見つめ直し、現時点で可能な範囲で将来を見通して、できることは今のうちから対策を立案・実施する必要があると考え、昨年から「10年後をにら

んだ5年間の中期計画」の策定を始めました。

私たちの研究所は研究者が20数名という小規模な所帯です。広範な研究領域を手掛けることはできませんので、自前の研究は1980年代から「糖質科学」の領域に集中し、合成、構造解析、機能解析という基礎的研究に必要な機能をそろえてきました。この3つの機能をあわせ持つ研究機関はあまりないと聞きます。この総合力を生かすこと、さらにそれぞれの機能に磨きをかけて野口研究所ならではの特徴的な技術を育てること、これが中期計画の主要な課題になります。

科学の原点である知的好奇心を大事にし、創設者である稀代の起業家野口遵の“化学の力で世の中を良くしてゆく”という精神を尊重して、野口研究所ならではのユニークな研究に取り組んでゆきたいと考えています。

# MALDI-MSを用いた糖鎖修飾の高感度・詳細構造解析に向けて

Towards a sensitive structural analysis of protein glycosylation by MALDI-MS

株式会社島津製作所 田中耕一記念質量分析研究所 西風 隆司  
Takashi NISHIKAZE

## 1. はじめに

著者が野口研究所で研究に勤んでいたのは2008～2011年の三年間で、当時博士号取りたての駆け出し研究者だった著者に糖鎖生物学研究室の天野先生がお声掛けくださったのがきっかけである。このときはじめて糖鎖の質量分析 (mass spectrometry; MS) を行うことになり、幸いにも現在に至るまでMSを用いた糖鎖研究を続けることができています。

思い出せば糖鎖研究を始めた当時、すでにシアル酸付きの酸性糖鎖のMSが難しいと認識していたが、紆余曲折あり10年ほど経った現在、結合様式特異的シアル酸修飾というひとつの解決策を開発できたことには個人的に一種の喜びを感じている。ここまでに至る糖鎖研究の一連の流れが評価されたのか、2017年には日本質量分析学会より奨励賞を頂くことができた。受賞の対象となった論文は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) における糖ペプチドやペプチドのsweet spotの局在とマトリックス結晶形との相関を述べたものであり、野口研究所時代の研究成果である。

本稿では、著者のこれまでの研究の総括として質量分析技術の開発と応用について述べたい。特にMSの視点から見た糖鎖解析という内容で、読者の皆様にとって有益と感じてもらえるような情報を少しでも提供できれば幸いである。

## 2. 糖鎖修飾解析とMALDI-MS

タンパク質に対する糖鎖修飾は最もユビキタスな翻訳後修飾のひとつであり、ポストプロテオミクス時代を担う研究対象として重要視されている。

基本的に直鎖であるペプチド・タンパク質と比べ、糖鎖は分岐構造を持つなど構造に多様性が高い。以前は質量分析計の性能やイオン化法に制約が多かったためか、糖鎖解析は還元末端の蛍光ラベルを行った後にHPLCで分析するのが一般的であった。しかし、巨大な生体高分子を壊すことなくイオン化できるソフトイオン化法の実用化や質量分析計そのものの性能向上、様々なイオン開裂技術の開発に伴い、糖鎖修飾の解析でもMSが多用されるようになった。現在では、MSは糖鎖分析にはなくてはならない存在と言っても差し支えない。

ペプチドやタンパク質と同様に、糖鎖のイオン化に用いられるイオン化法は大きく分けて二種類ある。エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization; ESI [1]) とMALDI [2, 3] である。プロテオミクス研究分野ではESIが用いられるケースが多いが、これはイオン化効率がペプチドごとに大きく異なるためイオンサプレッションが起りやすく、それを回避するために高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography; HPLC) などを用いてカラム分離しながら分析する必要があるためであ

る。MALDIはHPLCとの接続性がESIと比べて劣るため、プロテオミクス分野では影が薄いと言わざるを得ない。

一方で、糖鎖分析分野ではMALDIも有用である。糖鎖は物理化学的な性質のふれ幅が小さく、イオン化効率も個々の糖鎖で大きく変わることはない。つまり、イオンサプレッションが起こりにくいため、HPLCを介さず混合物のまま測定しても良好な結果が得られる。また、MALDIは一価のイオンのみが生成するためスペクトルの解釈が容易である。他にも、測定自体の高速性を生かしたハイスループットな分析に適する、破壊分析ではあるが繰り返し分析が可能である等、ESIにはない利点を有する。

しかしながら、糖鎖のMSにはいくつか技術的に克服すべき課題がある。まず、糖鎖のような親水性の高い化合物は溶媒和を受けやすくMSにおける感度が低下しやすい。これはMSが「気相イオン」の質量を測定する技術であることに起因する。基本的に溶媒和を受けやすい試料は一個の分子になるための脱溶媒効率が悪い。また、糖鎖はペプチドなど他の生体高分子と比べて不安定であり、グリコシル結合部分での加水分解やMS分析途中での分解が起こりやすい。そもそも糖鎖は分岐構造を有するため構造解析が困難であり、さらには各種異性体の存在が構造解析の難易度を大きく上げている。

以下では、これらの課題を解決するための糖鎖や糖ペプチドのMALDI-MSを用いた解析の高感度化と構造解析の高精度化に関して、著者の最近の成果を中心に、糖鎖・糖ペプチド・シアリル糖鎖分析の順に紹介する。

### 3. 糖鎖のMALDI-MS

#### 3-1. ラベル化

MALDI-MSにおいて最も簡単に糖鎖の感度を向上させる方法は、適切なマトリックスを選択して用いることである。一般的に

は、ペプチドに対して頻用される  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) よりも 2,5-di-hydroxybenzoic acid (DHB) マトリックスの方が糖鎖のイオン化には適する。他にも、様々な固体・液体マトリックスが糖鎖の感度を向上させるのに効果的であると報告されてきた。

もうひとつのアプローチとして、試料そのものの物理化学的性質を変えること、すなわちラベル化法などの誘導体化が挙げられる。本来、糖鎖の還元末端に対するラベル化はHPLCにおける紫外/蛍光検出を可能にするための処理であったが、基本的にこのようなラベル化によりMSにおける糖鎖の感度も向上する [4]。これは、①疎水性に傾ける誘導体化を行うことで一個の分子として気化しやすくなるため、及び②チャージを獲得しやすくなるという狭義のイオン化効率改善、の二つの効果と理解できる。MSにおけるイオン化現象は気化効率とチャージ獲得効率の二つの要因が複雑に絡み合った協奏現象とみなせるからである [5,6]。

最も一般的なラベル化法といえば還元アミノ化であるが、このラベル化法は必ずしもMALDI-MSの高感度検出に適するわけではない。図1に示すように、還元末端はまずラベル化試薬であるアミンと反応し、シッフ塩基を生じる。シッフ塩基の生成は平衡反応である為、シッフ塩基に対して還元剤を作用させることで安定な構造に変化させる。このラベル化反応は高温で長時間反応させるなどの条件が必要であり、さらには大過剰の試薬を用いなければならない。したがって、MALDI-MSの前にはこの大過剰試薬を除く精製が必須となる。この精製工程はサンプルを失う危険性を持つ他、完全な試薬除去は不可能である為、残留試薬がMALDI-MSのイオン化に影響する。特に、還元剤の水素化ホウ素ナトリウム等に含まれるホウ素は厄介で、MALDI-MSにおいて糖鎖に対して非特異的なホウ素結合体を生じうる [7]。場合によっ

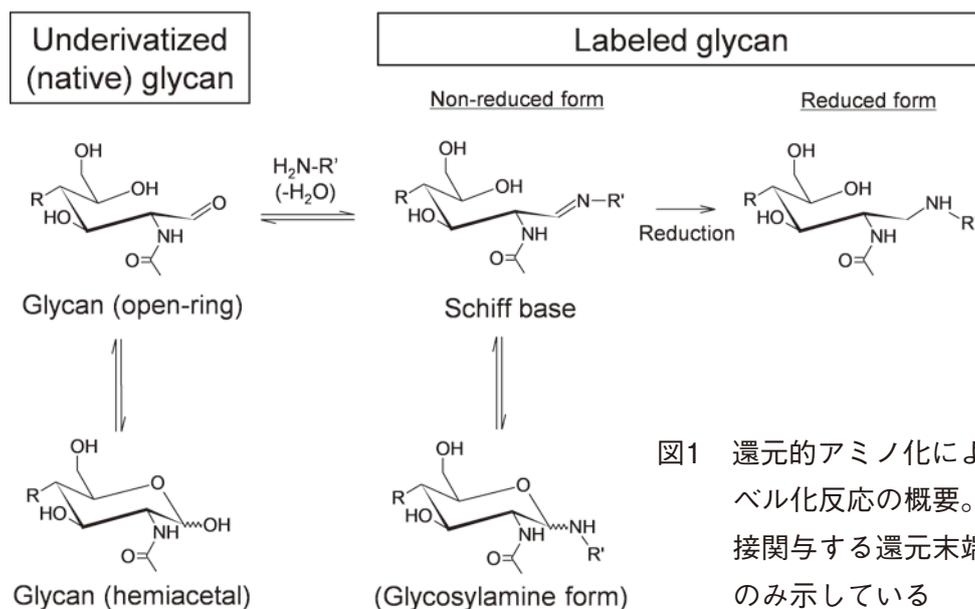


図1 還元的アミノ化による糖鎖ラベル化反応の概要。反応に直接関与する還元末端GlcNAcのみ示している

ては一分子に対して複数のホウ素が結合してスペクトルを複雑にする。そのため、特に還元剤の除去には細心の注意が払われるべきである。

MALDI-MSベースのラベル化法として、RohmerらはMALDIのマトリックスである3-aminoquinoline (3AQ)で糖鎖をラベル化する手法を提案した [8]。この反応はMALDIプレート上で行え、過剰に使用する3AQはそのままMALDIのマトリックスとして機能する。つまり、アミンの除去は必要ない。また、還元剤は用いないのでホウ素の混入も心配する必要がない。鳥津製作所のグループでも、液体マトリックス3AQ/CHCAを用いたオンターゲット3AQ化法を別途開発した [9,10]。Rohmerらの手法との違いは液体マトリックスを用いることで、これにより簡便に再現性良いラベル化を行うことが可能となっている。のちほど開発されたCHCAの代わりにp-coumaric acid (CA) を用いた3AQ/CAはイオン化時の分解が少ない“cold”なマトリックスであり、比較的不安定な糖鎖の分析にはさらに適する [11]。

このオンターゲット3AQ化のユニークな点は、中性糖鎖であっても負イオンの効率的な生成が可能なことにある。後述する

が、中性糖鎖の負イオンはタンデム質量分析 (tandem mass spectrometry; MS/MS) においてきわめて特異的なプロダクトイオンを生じるので、構造解析に有用である。一般的に、中性糖鎖は安定な負イオンを生じないため、負イオンを生じさせるにはアニオンを付加させて検出するが、MALDIではマトリックスの存在がネックとなり、中性糖鎖の負イオン検出は難しかった経緯がある。

MALDIにおけるイオン化は、レーザー照射後にマトリックスが急速に熔融蒸発して生じる濃密なプラズマ“プルーム”内での衝突によって生じると考えられているが、そのプルーム内でアニオンが中性化するようでは試料に対する効率的な付加は望めない。したがって、アニオンよりも気相塩基性度の高いマトリックス (*i.e.* アニオンとプロトンの取り合いになったときに勝てるマトリックス) を使う必要がある。この観点から、適するマトリックスは大きく制限され、固体マトリックスの $\beta$ カルボリン類 [12] や 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (THAP) [13]、液体マトリックスのG<sub>3</sub>CA (1,1,3,3-tetramethylguanidineとCAの常温融解塩) [14] などが適すると示されるまで、中性糖鎖の負イオン解析は困難であった。

3AQ [8] や3AQ/CHCA [9], 3AQ/CA [11] などもアニオンを中性化しにくいマトリックスとして有用である。

### 3-2. 負イオンフラグメンテーション

MSにおける糖鎖測定は主にプロトンやナトリウム付加体を検出する正イオンモードで行われる。したがって、MS/MSによる構造解析も正イオンモードで行われることが多い。正イオンの場合はナトリウムイオンやプロトンなどの正電荷が乗りやすい部分のイオンがプロダクトイオンとして観測される傾向にあり、逐次開裂も起こりやすい [15]。一見フラグメントイオンが豊富に見えるが、分岐構造を有する糖鎖の構造解析には必ずしも適さない [16]。さらに、イオン開裂中に単糖が転移することも知られており、スペクトル解析がよりあいまいになる [17,18]。

一方で、以下に論じる負イオンモードの場合は、MS/MSでの一般的なイオン開裂法・衝突誘起解離 (collision-induced dissociation; CID) 条件下で特異的な電子移動によって糖鎖の還元末端側がニュートラルロスしやすく、非還元末端側のプロダクトイオンを生じる。また、環開裂により生じる、結合位置解析に有用なプロダクトイオンが多いのも特徴である。さらに、単純な一次開裂で生じるプロダクトイオンが主となるため、元の構造をダイレクトに反映することから“診断的”な構造解析が可能であると表現される [19]。

ここからはN結合型糖鎖の負イオンフラグメンテーションに焦点を当てる。図2に典型的なN結合型糖鎖の負イオンCIDスペクトルとその解釈を示した。

糖鎖の負イオンCIDでは非還元末端側のイオンが主に生じる。特に環開裂に由来するAイオンやグリコシル結合開裂に由来するCイオンが生成しやすいが、最も特徴的なのはN結合型糖鎖を構成する二つのアンテナ構

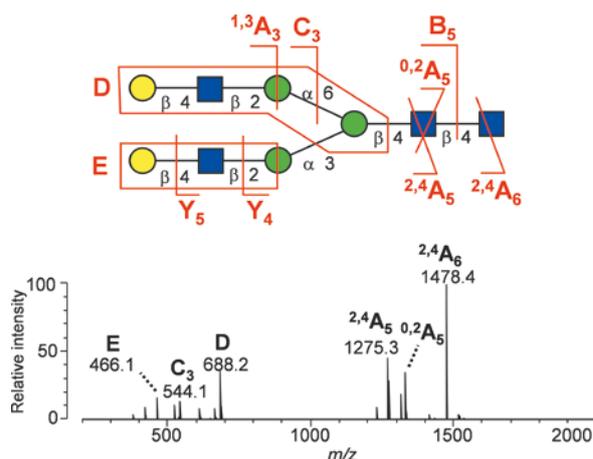


図2 典型的なN型糖鎖の負イオンCIDスペクトルとその解釈

造を反映するDイオンやEイオンの生成である。Dイオンはトリマンノシル構造の中央のマンノースから6-アンテナ側残基を全て含むイオン、Eイオンは3-アンテナ側のマンノースの一部から非還元末端までを含むイオンである。これらは分岐構造を明確に反映するため、分岐構造解析には最適である。このほか、bisecting GlcNAcの有無の判断、フコース位置の特定などにも負イオンCIDは有用である。最近、著者は日本質量分析学会誌に糖鎖の負イオン構造解析に関する総論を寄稿しているので、詳しい構造解析法はそちらを参照されたい [20]。

これらの負イオンフラグメンテーション則の構築はHarveyらによって精力的に進められてきたが [19,21-26]、ラベル化糖鎖の負イオンフラグメンテーションは議論されていなかった。著者は、ラベル化糖鎖の負イオンCIDの特徴を明らかにしたと共に、診断的な解析に足る質の高い負イオンCIDスペクトルを得るためには、還元してはならないことを見出した。還元すると、還元末端が開いた状態で安定となるため、特異的な電子移動が上手く起こらず、 $2,4A_R$ といった環開裂イオンが生じ難くなる。また、負イオンが安定になるため、CIDで開裂を起こすにはより大きなエネルギーが必要となり、結果として二次開裂

三次開裂を伴う開裂様式となり負イオンCIDの特徴である診断的なイオン生成が損なわれる。言い換えると、還元をしないラベル化法であればよいので、前述のオンターゲット3AQ化などは負イオンCID解析に適する [27]。

#### 4. 糖ペプチドのMALDI-MS

##### 4-1. ラベル化

糖鎖が付加していない通常のペプチドに比べて、糖ペプチドはイオン化効率が悪い…というのはやや強引な表現であるが、多くの場合糖ペプチドのシグナルは低くなる傾向にある。その理由は①親水性が高く気化しにくい、②多くのglycoformが存在することで1ピークあたりのモル数が低い (*i.e.* stoichiometryが低い)、などが挙げられる。したがって、多くの場合MS分析前にペプチドと分離するためのレクチン [28] や親水性相互作用 [29-32] を利用した濃縮が行われる。ボロン酸を用いた濃縮も提案されており [33]、近年もボロン酸をベースとする新たな濃縮マテリアルが開発され注目を集めた [34]。

糖ペプチドのシグナルを向上させるため、野口研究所・糖鎖生物学研究室ではピレンを用いたオンターゲットラベル化法を開発した。ピレンを用いたラベル化は天野先生が開発されてきた技術で、糖鎖に対するラベル法と糖ペプチドに対するラベル化法の二種がある。著者は糖ペプチドに対するラベル化法であるオンターゲット1-pyrenyldiazomethane (PDAM)ラベル化法の感度向上メカニズムの解明や応用に携わった [35]。

PDAMはカルボキシル基に対して速やかに反応してエステル結合を生じるが、興味深いことにMSで観測される $m/z$ はラベル化前と同一である。にもかかわらず、糖ペプチドの感度は大幅に向上する。単にラベル化試薬PDAMがMALDIマトリックスと混合されるco-matrix効果によってイオン化が増強されている可能性も考えたがそのような効果は

なく、PDAMはコバレントに糖ペプチドに対して結合しているが、イオン化時にはほぼ100%ピレンが脱離しているという結論に達した。従って、シグナルの増強効果はイオン化時にレーザーのエネルギーを糖ペプチドに付加しているピレンが吸収し気化効率が向上することに加えて、ピレンが結合して疎水性になることでマトリックスとの混合がよくなるためと考察している。

実際に、通常の糖ペプチドとPDAMラベルした糖ペプチドを混合し、乾固したマトリックス結晶のMSイメージングを取得してみると、イメージング像は全く異なる。図3で用いている試料はprostate-specific antigen (PSA) をサーモリシン消化した際に生じる糖ペプチド (二本鎖糖鎖にアミノ酸配列IRNKSのペプチドが結合したもの) を合成したもので、片方は糖鎖部分に $^{13}\text{C}$ を導入している。化学的性質は同じであるので、双方は同じMSイメージング像になるはずだが、PDAMラベル化した方は明らかに分布が異なり、良好なシグナルが検出されるsweet spotが多く生じていることが分かる。Sweet spotが多く生じることは、より再現性の高いデータが得られることを意味しており、PDAMラベルは単に感度を上げるだけでなく、再現性の向上にも寄与する技術と言える [36]。

さらに、sweet spotの位置とDHBの結晶多形が関係していることも見出した [37]。図3c は当該DHBマトリックス結晶のMSイメージング測定前に取得したラマンスペクトル (図3a) の差異を元に、結晶多形ごとに色分けしたラマンイメージング像である。ラベル化なしの糖ペプチドは主にこの赤の領域から検出されるが、ラベル化した糖ペプチドは赤緑関係なく満遍なく検出される (図3d-f)。これは試料の親水/疎水性と関係しており、糖ペプチドのような親水性の試料は緑の“ordered”結晶よりも赤の“disordered”結晶に取り込まれやすいためと考えられる。実

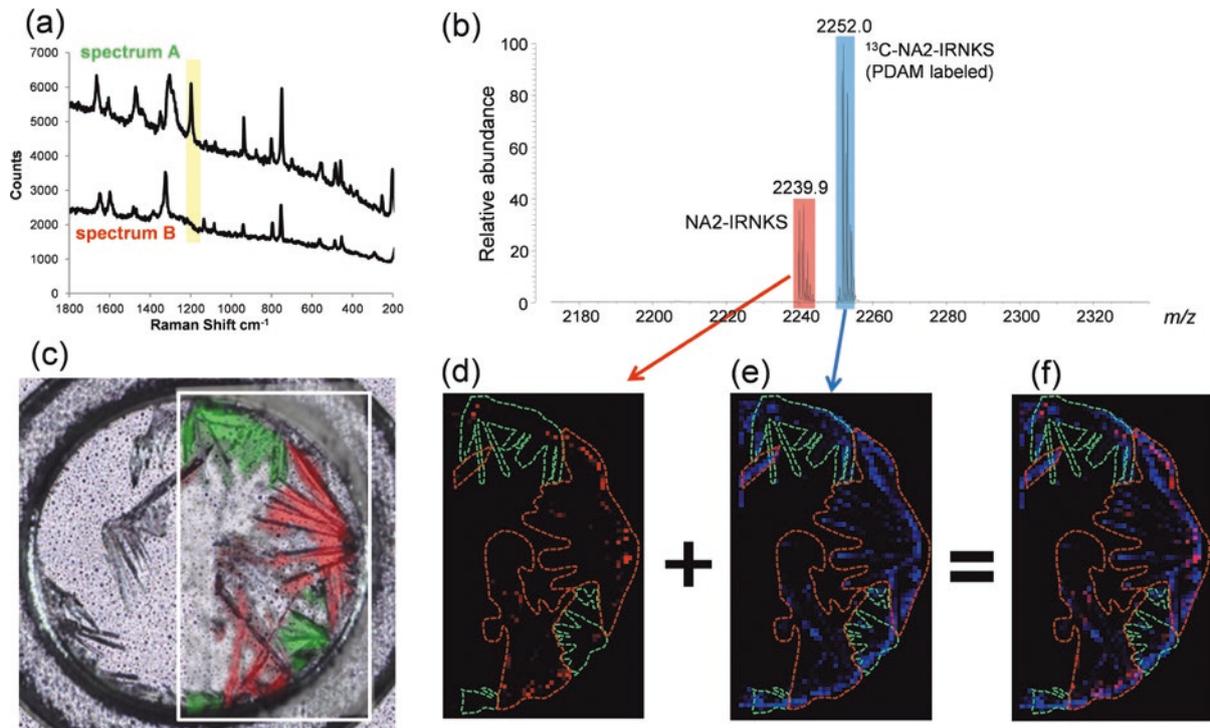


図3 NA2-IRNKS糖ペプチドを用いてマトリックス結晶多型とMSイメージングの相関を示したものの。(a) MALDIプレート上のDHB結晶のラマンスペクトルで、 $1200\text{cm}^{-1}$ のピークの有無を基準に二つの領域に分けたラマンイメージング像を描き、MALDI結晶写真に重ねたものが(c)である。(b)はこのDHB結晶から得たマスマスペクトルで、通常のNA2-IRNKSに対して $^{13}\text{C}$ を12個導入した $^{13}\text{C}$ -NA2-IRNKSが12Da差で観測されていることが分かる。 $^{13}\text{C}$ 体はPDAMでピレンラベルされているが、ラベル化部分がインソース分解で効率的に脱離するので、マスマスペクトル上の差は12Daのみである。(d)はNA2-IRNKS, (e)はPDAM-labeled  $^{13}\text{C}$ -NA2-IRNKSのMSイメージング、(f)はそれらを重ね合わせて表示したものである。緑破線で囲った領域が $1200\text{cm}^{-1}$ 付近のピークがある“ordered”結晶、赤の破線で囲った領域が $1200\text{cm}^{-1}$ 付近のピークがない“disordered”結晶を意味する。文献37より改変。

際に、糖鎖を持たない他のペプチドのMSイメージングでも試料の親水/疎水性と結晶多形の関係性は確認されている [37]。

著者の知る限り、このDHBマトリックスの結晶形とsweet spotの相関を示した例は過去になく、『マトリックスにincorporationされることは試料のイオン化に必須ではない』とした近年のMALDI現象への理解に一石を投じる形になったと考えている。

#### 4-2. 負イオンフラグメンテーション

糖ペプチドはその名の通り糖鎖とペプチドから構成されるので、MS/MSによる構造解

析は必須と言ってよい。近年は糖ペプチドイオン開裂に電子捕獲解離や電子移動解離などのラジカルを経由する開裂法も用いられるようになってきたが、汎用されるのはガスとの衝突を用いるCIDである。

糖ペプチドのCID時の開裂パターンは古くから研究されてきたが [38-40]、プロトン化分子のCIDでは主にグリコシル結合の開裂が優先されるので、得られる情報としては糖鎖の組成とその大まかな並び方であり、分岐情報などの詳細な構造情報を得るのは難しい。

一方で、糖ペプチドの負イオン解析の場合はどうだろうか？そもそも、トリプシンや

Lys-Cなどの酵素以外で切断するとペプチド部分にArgやLys等の塩基性残基が含まれるとは限らないので、正イオンモードでイオン化するとは限らない。この場合、相補的に負イオンモードが使われることもある。特異性の低い酵素で消化した糖タンパク質の解析には負イオンモードの方が適するとした報告もある [41]。

負イオンで検出できた糖ペプチドは負イオンモードでMS/MSを行う必要がある。しかし、糖ペプチドの負イオン(脱プロトン化体)から得られるプロダクトイオンがプロトン化体から得られるイオンと異なることは知られていたが、体系的な研究はなされていなかった。そこで、著者は様々な糖ペプチドの負イオンCIDスペクトルを解析し、そのフラグメンテーションのルールを明確化した [42]。図4にその概要を示す。糖ペプチドの負イオンCIDで生じるプロダクトイオンは、主に次の三つのタイプに分類できる。

- (i) 糖鎖部分のみを含むイオン (赤)
- (ii) 糖鎖部分をロスしたイオン (緑)
- (iii) 糖鎖部分を有したままペプチド部分が開裂したイオン (青)

タイプ (ii) のイオンは糖鎖に対してペプチド部分が比較的長い糖ペプチドから優位に生じる。このタイプのイオンは正イオンからも同様に生じうるが、正イオンの場合はグリコシル結合で切断されたペプチド+GlcNAcやペプチドそのもののフラグメントイオンが生じやすいが、負イオンの場合はペプチド+ $^{0,2}X_0$ やペプチド-NH<sub>3</sub>が生じやすいという違いがある。

タイプ (iii) のイオン生成はペプチドの配列に強く依存し、AspやGlu、Asnの近傍で切断を受けやすい。これは糖ペプチドだからという理由ではなく、糖鎖を持たないペプチドの負イオンCIDでも起こる。糖鎖

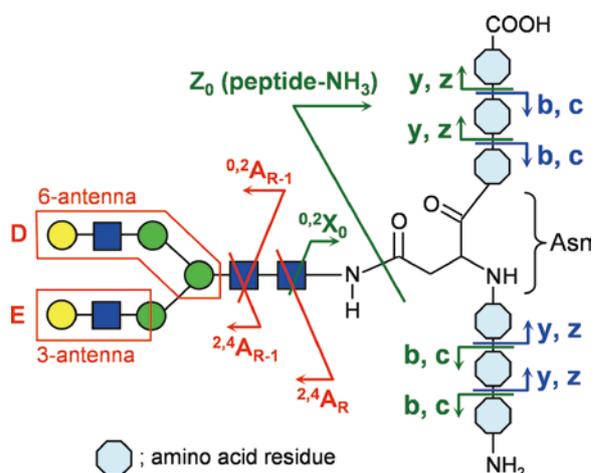


図4 N型糖ペプチドの負イオンフラグメンテーションの概要。

赤がタイプ (i) , 緑がタイプ (ii) , 青がタイプ (iii) に対応している。文献42より許可を得て使用。Copyright (2014) American Society for Mass Spectrometry.

付加したAsnがC末端近傍に位置するときは、[glycan+Asn-36]<sup>-</sup> が極めて明確に生じる。

糖ペプチドの負イオンCIDで最も特徴的なイオンはタイプ (i) のイオンであり、これは(ペプチドの付加していない)糖鎖の負イオンCIDで生じるイオンとほぼ同一である。特に $^{2,4}A_R$ イオンは糖鎖部分のみをほぼインタクトに含むイオンなので、このイオンのMS<sup>3</sup>は糖鎖構造を明確に示すfingerprintとして活用できる。また、DイオンやEイオンなど分岐構造を示すイオンも生じるため、糖ペプチドのCIDから糖鎖の詳細構造情報がダイレクトに得られる。

しかし、タイプ (i) のプロダクトイオン生成効率はペプチド部分の長さに強く影響を受け、数アミノ酸残基からなる糖ペプチドの場合はこのタイプ (i) のイオンが支配的になるが、アミノ酸残基が増えるとほとんど生じない。これはペプチド部分に負電荷が局在するようになるためと考えられる。

ペプチド部分への負電荷の局在を抑制する

ことで、このタイプ (i) のプロダクトイオン生成を増大させることが出来る。著者らは糖ペプチド部分のカルボキシル基を中性化することで、比較的長いアミノ酸配列を有する糖ペプチドからもタイプ (i) のプロダクトイオンが明確に得られることを見出した [43]。カルボキシル基の中性化には後述するシアル酸脱離を防ぐ効果もあり、正イオンモードでは糖鎖の組成情報、負イオンモードでは糖鎖の分岐情報と使い分けて詳細に解析することも出来る (図5)。

## 5. シアル酸問題について

シアル酸は主に糖鎖の非還元末端に存在する酸性残基で、ウイルス感染やがんの発症など様々な生物学的過程に参与する重要な単糖である。

しかし、シアル酸残基を有する酸性糖鎖はMS分析技術上の様々な問題を有する。その名の通りカルボキシル基を有する酸性残基なので、一般的にMSでの感度を低下させ、定量にバイアスを生じさせる。また、カルボキシル基に存在する不安定なプロトンがグリコシル結合を開裂させやすく、MSではシアル酸の脱離が起こりやすい。特に、ソフトイオン化とはいえイオン化時にESIと比べて多くの内部エネルギーを与えてしまうMALDIでは、シアル酸の脱離は深刻な問題である。MALDIではマトリックスによって試料に与えられる内部エネルギーが大きく異なるため、酸性糖鎖に適する“cold”なマトリックスがいくつか報告されているが、根本的な解決には至らない。また、カルボキシル基のような酸性官能基には塩の付加が起こりやすく、ピークが分散しやすい。

### 5-1. シアル酸の保護

これらのシアル酸問題に対して、最も根本的な解決となるのがシアル酸の誘導体化による中性化である。中性化することにより、シ

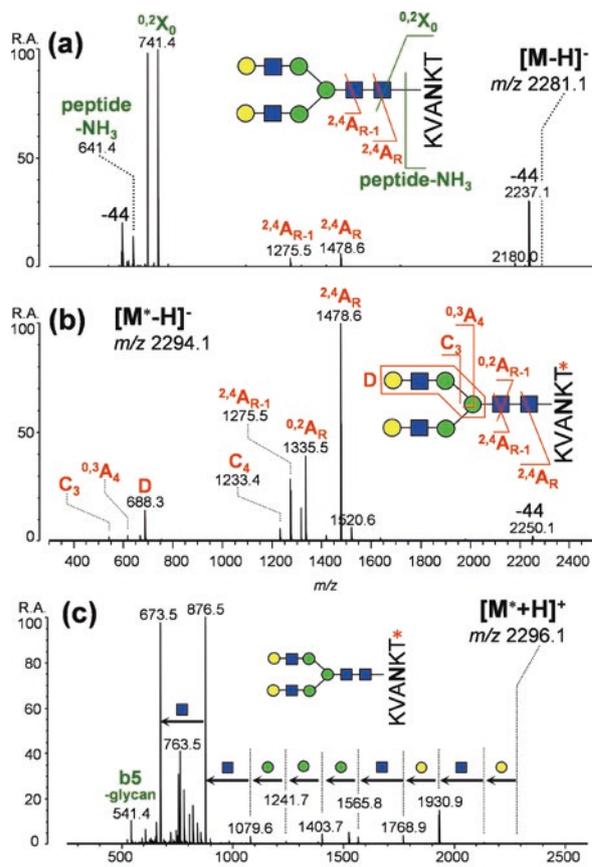


図5 カルボキシル基へのメチルアミド化が糖ペプチドCIDスペクトルに与える影響。(a) シアル酸を外したシアリルグリコペプチド (SGP) の負イオンCIDスペクトル、(b) シアル酸を外しさらにメチルアミド化したSGPの負イオンCIDスペクトル、(c) シアル酸を外しさらにメチルアミド化したSGPの正イオンCIDスペクトル。メチルアミド化を行うことで糖ペプチドの負イオンCIDスペクトルにおける糖鎖フラグメントの生成を促進できていることが分かる。文献43より許可を得て改変。Copyright (2014) American Chemical Society.

アル酸の脱離を抑制でき、塩の過剰付加も防げ、イオン化効率を中性糖鎖とそろえることが出来るので相対的な定量も可能になる。

これまでに様々なシアル酸誘導体化法が報告されている。最も単純な誘導体化はエステル化であり、Powellらによって1996年

に報告された [44]。三浦らは1-methyl-3-*p*-tolyltriazene (MTT) 試薬を用いたユニークな固相エステル化法を報告しており [45]、現在は住友ベークライト社から発売されるヒドラジドビーズを用いた糖鎖精製ラベル化キットの標準プロトコルに採用されている。異なるタイプの誘導体化として、関谷らはアミド化を導入した [46]。メチルアミド化 [47] やアセトヒドラジドによるアミド化 [48] も次いで報告されている。

著者は、前述したオンターゲット3AQラベル化に適するシアル酸誘導体化を検討したところ、メチルアミド化が最も信頼できる結果が得られることを見出した。メチルエステル化も検討したが、負イオンCIDによる構造解析の際にメタノールの脱離が顕著に起こるため適さなかった。メチルアミド化とオンターゲット3AQ化の組み合わせはMS及び負イオンCIDによる構造解析の観点から最適であり、乳がん患者の血清IgGの糖鎖解析などに応用した [49]。

この脱水縮合剤PyAOPを用いたメチルアミド化は効率的かつカルボキシル基特異的に起きるため、糖鎖だけでなく糖ペプチドにも応用できる。糖ペプチドの場合はペプチド部分の副反応が問題となるが、このメチルアミド化は脱水などの副反応がほとんど起こらない。糖ペプチドの場合も同様に、シアル酸のメチルアミド化によってシアル酸の優先的な脱離を抑制することが可能である。

## 5-2. 結合様式特異的修飾

シアル酸には主に  $\alpha$  2,3-と  $\alpha$  2,6-の二種類の結合様式が存在するが、これらは結合異性体と呼ばれ質量が等しくどんなに高分解能な質量分析計を用いても区別することは出来ない。これまでは、シアル酸の結合様式が規定された標品を用意し、それとHPLCでの保持時間を一致させることで判別したり、レクチンを用いた判別、シアリダーゼを併用した判別な

どが試みられてきた。しかしながら、より簡便に、標品が用意できなくてもシアル酸の結合様式が識別可能な技術が望まれていた。

2009年にWheelerらによって結合様式特異的メチルエステル化が報告された [50]。シアル酸結合様式の違いに由来するカルボキシル基の立体的な環境の違い、すなわち近くに他の単糖のヒドロキシル基が存在するか否かに着目し、 $\alpha$  2,6-結合シアル酸は外から加えた求核剤 (メタノール) と反応させ、 $\alpha$  2,3-結合シアル酸は分子内脱水縮合によりラク톤を組ませることで質量に違いを生じさせ、MSでシアル酸の結合様式を識別する技術である。この技術はアミド化にも応用され、結合様式特異的なアミド化法と完全メチル化を組み合わせた手法として報告された [51]。

近年、Reidingらによって、より簡便で再現性に優れる結合様式特異的エチルエステル化が報告された [52]。前記した結合様式特異的メチルエステル化とは異なる脱水縮合剤を用い、メタノールではなくエタノールを用いることで再現性や特異性を向上させたものである。

これらの結合様式特異的修飾法は  $\alpha$  2,3-結合と  $\alpha$  2,6-結合を識別出来るが、 $\alpha$  2,3-結合シアル酸から生じるラクトン構造はまだ不安定であり、容易に加水分解し本来のカルボン酸構造に戻る。実際に、このラクトン構造は水に再溶解するだけで加水分解が進行し、50時間後にはほぼ完全に元のシアル酸に戻ると報告されている [50]。このような不安定官能基を有していると定量性に難が出るばかりか、ラベル化などの前処理との組み合わせや測定法に制限が生じる。

そこで、このラクトン構造をさらに安定化するような二段階誘導体化法が提案された。Liらは、Reidingらの報告した結合様式特異的エチルエステル化の後段に脱水縮合剤PyAOPを用いるメチルアミド化を組み合わせたsolid-phase two step derivatization

(STSD) 法を提案した [53]。また、後段にp-トルイジンによるアミド化を行った手法も報告されている [54]。これらの手法は  $\alpha$  2,3-と  $\alpha$  2,6-の双方を安定化できるが、処理の煩雑さから固相担体に固定化した糖タンパク質試料に対してのみ適用が可能であり、糖鎖は固相担体から直接PNGaseFで遊離させて測定する。また、 $\alpha$  2,3-と  $\alpha$  2,6-に対して異なるタイプの修飾が入るため、イオン化効率の観点からも定量性には議論が必要であった。Holstらは結合様式特異的ジメチルアミド化とそれに続くアンモニアによるラクトンの安定化を採用するtwo-step amidationを開発し、FFPE組織のN型糖鎖MSイメージングに応用した [55]。こちらは操作としてはシンプルだが、60°Cまで加温した状態で三時間反応させる必要があった。

著者らも独自に二段階反応を採用するアミド化ベースのシアル酸結合様式特異的修飾法を開発した。異なる長さのアルキル基を有するアミンで誘導体化するこの技術を sialic acid linkage-specific alkylamidation、SALSA™ (以下、「™」を略す。) と名づけた [56]。

SALSAでは、イソプロピルアミンを用い

た結合様式特異的アミド化を行い、 $\alpha$  2,6-をイソプロピルアミド化、 $\alpha$  2,3-をラクトン化する。次いで、このラクトン構造を特異的にメチルアミド化することで、 $\alpha$  2,3-と  $\alpha$  2,6-のシアル酸を28Da差で識別することが可能となる (図6)。SALSAは他の類似手法と比べて  $\alpha$  2,3-/  $\alpha$  2,6-の識別特異性に優れ、さらに独自の反応系を採用することで、二段階反応でありながら常温・一時間で完了する迅速性に優れた手法である [57]。また、不安定官能基であるラクトンが残らないので、SALSAの後に糖鎖のラベル化や酵素処理を行うことが出来る汎用性も有する。

図7に四種のPA化糖異性体に対するSALSA適用結果を示した。シアル酸の結合様式のみ異なるこの四種の異性体は、SALSAを行わないと同一の  $m/z$  に観測されるため識別は不可能だが、SALSAを行うことでシアル酸の結合様式とその数に応じた質量変化がおき、識別が可能となる。

SALSAは通常の液相反応のほか、固相反応でもほとんど反応効率が低下することなく行うことが出来る。ヒドラジドビーズに可逆的に結合させた糖鎖に対しても、ビーズから糖鎖を遊離させることなくSALSA反応を行

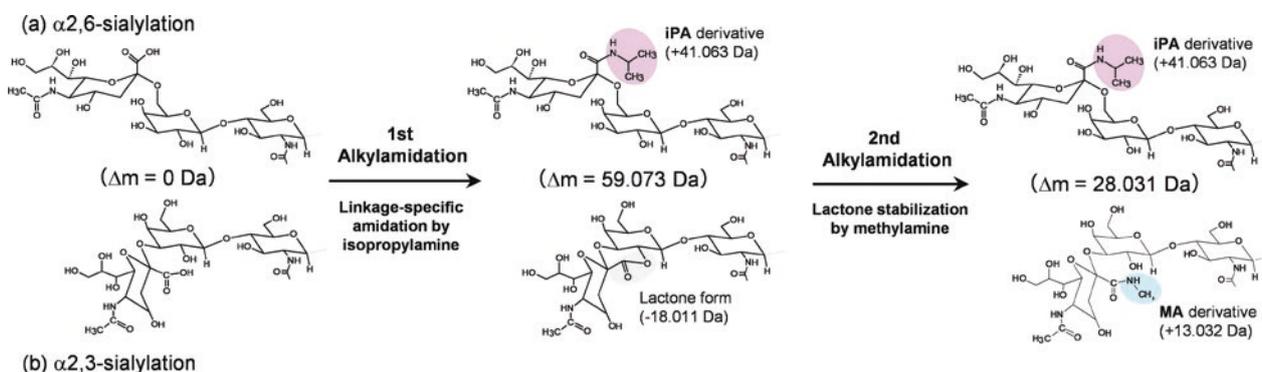


図6 SALSAの反応概要。第一段階目の反応で、(a)の $\alpha$  2,6-結合シアル酸はイソプロピルアミド化し、(b)の $\alpha$  2,3-結合シアル酸はラクトン化する。次いで、第二反応においてラクトンを特異的にメチルアミド化することで安定化する。このとき反応しているイソプロピルアミド化体は変化しないので、最終的な $\alpha$  2,3-/  $\alpha$  2,6-の質量差は28Daになる。この第二反応は極めて迅速に起こすことが可能である [57]。

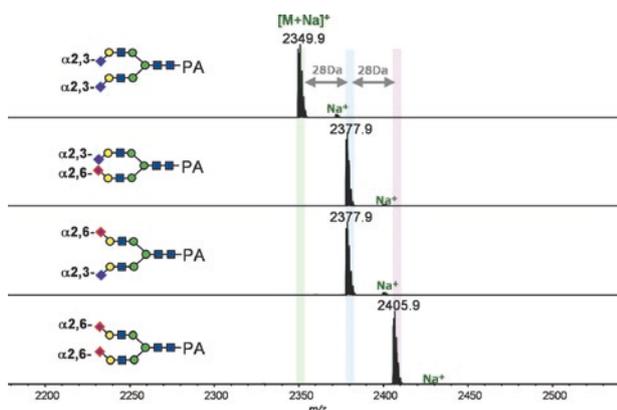


図7 四種のPA化糖鎖異性体に対してSALSAを行った後の正イオンMALDIマススペクトル。 $\alpha$ 2,3-結合シアル酸はメチルアミド化（青枠）、 $\alpha$ 2,6-結合シアル酸はイソプロピルアミド化（赤枠）されている。

うことが出来るので、クルードな糖鎖含有サンプルから糖鎖のみを化学特異的に精製しつつシアル酸の結合様式特異的修飾を行える。この固相SALSA法は合理的かつ簡便な手法として生体サンプルへの応用を進めている。

## 6. おわりに

著者の携わった糖鎖のMALDI-MS分析のための技術開発を中心に紹介した。糖鎖は異性体が多く、かつ親水性であるため、MSとの相性は良いとは言えない。しかし、質量が異なってさえいれば区別できるMSは、上手く使うことでユニークかつ詳細な構造情報を引き出すことが可能であり、前処理と組み合わせることで得られる情報を増大させることも可能である。

野口研究所時代を思い出して印象に残っているのは「実用化されない論文はただの紙である」という理事の言葉である。当時は実感としてあまり無かったが、民間企業に入った今となってはこの言葉の重みが日に日にのしかかってくるようにも感じると同時に、身の引き締まる思いでもある。MSによる糖鎖分析はまだまだ技術的に発展の余地がある分野

であり、これからもユーザーの皆様が求める技術開発を続け、糖鎖研究の進展に少しでも貢献できればと思う。

## 謝辞

著者を糖鎖研究の道に導いてくださった公益財団法人・野口研究所の天野純子先生に感謝申し上げます。また、野口研究所で共に研究させて頂いた皆様方には大変お世話になりました。この場を借りて御礼申し上げます。

SALSAの開発や応用でお世話になっております東京都健康長寿医療センター研究所の三浦ゆり先生・津元裕樹先生、北海道大学大学院医学研究院の古川潤一先生・花松久寿先生に感謝申し上げます。

本研究の一部は、JST 先端計測分析技術・機器開発プログラム (SENTAN)、及び、最先端研究開発支援プログラム (FIRST) により助成されたものです。

※SALSAは株式会社島津製作所の商標です。  
 ※本原稿は日本質量分析学会2017年奨励賞受賞記念論文として投稿したMass Spectrom. (Tokyo) 2017; 6(1): A0060を基に最新の知見などを加えて再構成したものです。

## 文献

1. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C.; Wong, S.; Whitehouse, C. M. *Science*. **1989**, 246 (4926), 64-71.
2. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2 (8), 151-153.
3. Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, 60 (20), 2299-2301.
4. Harvey, D. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, 11 (10), 900-915.
5. Nishikaze, T.; Takayama, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20 (3), 376-382.

6. Nishikaze, T.; Takayama, M. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, 268 (1), 47–59.
7. Nishikaze, T.; Kawabata, S.; Tanaka, K. *J. Mass Spectrom.* **2013**, 48 (9), 1005–1009.
8. Rohmer, M.; Meyer, B.; Mank, M.; Stahl, B.; Bahr, U.; Karas, M. *Anal. Chem.* **2010**, 82 (9), 3719–3726.
9. Kaneshiro, K.; Fukuyama, Y.; Iwamoto, S.; Sekiya, S.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2011**, 83 (10), 3663–3667.
10. Kaneshiro, K.; Watanabe, M.; Terasawa, K.; Uchimura, H.; Fukuyama, Y.; Iwamoto, S.; Sato, T.-A.; Shimizu, K.; Tsujimoto, G.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (16), 7146–7151.
11. Fukuyama, Y.; Funakoshi, N.; Takeyama, K.; Hioki, Y.; Nishikaze, T.; Kaneshiro, K.; Kawabata, S.; Iwamoto, S.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 1937–1942.
12. Yamagaki, T.; Suzuki, H.; Tachibana, K. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (6), 1701–1707.
13. Domann, P.; Spencer, D. I. R.; Harvey, D. *J. Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 26 (4), 469–479.
14. Nishikaze, T.; Fukuyama, Y.; Kawabata, S.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (14), 6097–6103.
15. Harvey, D. J.; Martin, R. L.; Jackson, K. A.; Sutton, C. W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18 (24), 2997–3007.
16. Harvey, D. J. *Mass Spectrom. Rev.* **1999**, 18 (6), 349–450.
17. Wührer, M.; Koeleman, C. A. M.; Deelder, A. M. *Anal. Chem.* **2009**, 81 (11), 4422–4432.
18. Wührer, M.; Deelder, A. M.; van der Burgt, Y. E. M. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, 30 (4), 664–680.
19. Harvey, D. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, 16 (5), 647–659.
20. Nishikaze, T. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **2017**, 65 (6), 239–244.
21. Harvey, D. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, 16 (5), 622–630.
22. Harvey, D. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, 16 (5), 631–646.
23. Harvey, D. J.; Jaeken, J.; Butler, M.; Armitage, A. J.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A. *J. Mass Spectrom.* **2010**, 45 (5), 528–535.
24. Harvey, D. J.; Rudd, P. M. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, 305 (2-3), 120–130.
25. Harvey, D. J.; Edgeworth, M.; Krishna, B. a.; Bonomelli, C.; Allman, S. a.; Crispin, M.; Scrivens, J. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, 28 (18), 2008–2018.
26. Harvey, D. J.; Abrahams, J. L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2016**, 30 (5), 627–634.
27. Nishikaze, T.; Kaneshiro, K.; Kawabata, S.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (21), 9453–9461.
28. Kubota, K.; Sato, Y.; Suzuki, Y.; Goto-Inoue, N.; Suzuki, M.; Hisanaga, S.; Suzuki, A.; Endo, T. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (10), 3693–3698.
29. Wada, Y.; Tajiri, M.; Yoshida, S. *Anal. Chem.* **2004**, 76 (22), 6560–6565.
30. Yu, L.; Li, X.; Guo, Z.; Zhang, X.; Liang, X. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 12618–12626.
31. Mysling, S.; Palmisano, G.; Højrup, P.; Thaysen-Andersen, M. *Anal. Chem.* **2010**, 82 (13), 5598–5609.
32. Selman, M. H. J.; Hemayatkar, M.; Deelder, A. M.; Wührer, M. *Anal. Chem.* **2011**, 83 (7), 2492–2499.
33. Xu, Y.; Wu, Z.; Zhang, L.; Lu, H.; Yang, P.; Webley, P. a; Zhao, D. *Anal. Chem.* **2009**, 81 (1), 503–508.
34. Xiao, H.; Chen, W.; Smeekens, J. M.; Wu,

- R. *Nat. Commun.* **2018**, 9, 1692.
35. Amano, J.; Nishikaze, T.; Tougasaki, F.; Jinmei, H.; Sugimoto, I.; Sugawara, S.; Fujita, M.; Osumi, K.; Mizuno, M. *Anal. Chem.* **2010**, 82 (20), 8738–8743.
36. Nishikaze, T.; Okumura, H.; Jinmei, H.; Amano, J. *Int. J. Mass Spectrom.* **2013**, 333, 8–14.
37. Nishikaze, T.; Okumura, H.; Jinmei, H.; Amano, J. *Mass Spectrom.* (Tokyo, Japan) **2012**, 1 (1), A0006.
38. Dodds, E. D. *Mass Spectrom. Rev.* **2012**, 31, 666–682.
39. Seipert, R. R.; Dodds, E. D.; Clowers, B. H.; Beecroft, S. M.; German, J. B.; Lebrilla, C. B. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (10), 3684–3692.
40. Wührer, M.; Catalina, M. I.; Deelder, A. M.; Hokke, C. H. *J. Chromatogr. B* **2007**, 849 (1-2), 115–128.
41. Nwosu, C. C.; Strum, J. S.; An, H. J.; Lebrilla, C. B. *Anal. Chem.* **2010**, 82 (23), 9654–9662.
42. Nishikaze, T.; Kawabata, S.; Tanaka, K. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, 25, 988–998.
43. Nishikaze, T.; Kawabata, S.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (11), 5360–5369.
44. Powell, A. K.; Harvey, D. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, 10 (9), 1027–1032.
45. Miura, Y.; Shinohara, Y.; Furukawa, J.; Nagahori, N.; Nishimura, S.-I. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4797–4804.
46. Sekiya, S.; Wada, Y.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (15), 4962–4968.
47. Liu, X.; Qiu, H.; Lee, R. K.; Chen, W.; Li, J. *Anal. Chem.* **2010**, 82 (19), 8300–8306.
48. Toyoda, M.; Ito, H.; Matsuno, Y.; Narimatsu, H.; Kameyama, A. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (13), 5211–5218.
49. Kawaguchi-Sakita, N.; Kaneshiro-Nakagawa, K.; Kawashima, M.; Sugimoto, M.; Tokiwa, M.; Suzuki, E.; Kajihara, S.; Fujita, Y.; Iwamoto, S.; Tanaka, K.; Toi, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, 469 (4), 1140–1145.
50. Wheeler, S. F.; Domann, P.; Harvey, D. *J. Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, 23, 303–312.
51. Alley, W. R.; Novotny, M. V. *J. Proteome Res.* **2010**, 9, 3062–3072.
52. Reiding, K. R.; Blank, D.; Kuijper, D. M.; Deelder, A. M.; Wührer, M. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (12), 5784–5793.
53. Li, H.; Gao, W.; Feng, X.; Liu, B.-F.; Liu, X. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 924, 77–85.
54. Yang, S.; Jankowska, E.; Kosikova, M.; Xie, H.; Cipollo, J. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 9508–9517.
55. Holst, S.; Heijs, B.; de Haan, N.; van Zeijl, R. J. M.; Briaire-de Bruijn, I. H.; van Pelt, G. W.; Mehta, A. S.; Angel, P. M.; Mesker, W. E.; Tollenaar, R. a.; Drake, R. R.; Bovée, J. V. M. G.; McDonnell, L. a.; Wührer, M. *Anal. Chem.* **2016**, 88 (11), 5904–5913.
56. Nishikaze, T.; Tsumoto, H.; Sekiya, S.; Iwamoto, S.; Miura, Y.; Tanaka, K. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 2353–2360.
57. Submitted for Analytical Chemistry.

## 最近明らかになった癌関連糖鎖抗原の重要機能

Recently elucidated important function of cancer-associated glycolipid antigens

中部大学生命健康科学部生命医科学科 古川 鋼一

Koichi FURUKAWA

以前から、正常細胞や正常組織にはほとんど発現せず、癌細胞に限局して発現する糖鎖構造が存在するとの報告がなされ、癌特異的糖鎖あるいは癌関連糖鎖として注目されてきた [1]。とくに、いくつかの癌関連糖脂質抗原は、癌マーカーとして癌の診断や抗体治療などの治療標的として利用されてきた [2]。これらの癌関連糖脂質として代表的なものに、悪性黒色腫（メラノーマ）におけるガングリオシドGD3 [3]、神経芽細胞腫におけるGD2 [4]、骨肉腫におけるGD2 [5,6]、小細胞肺癌におけるGD2 [7,8]、そしてT細胞急性リンパ芽球性白血病のGD3発現 [9,10] などがある。さらに近年、乳癌においてもGD2の発現が報告されている [11]。これらは、ほと

んどシアル酸を含む酸性糖脂質（ガングリオシド）に含まれる構造であるが、一方で、グロボトリアオシルセラミド（globotriaosyl ceramide, Gb3）という中性糖脂質もバーキットリンパ腫（Burkitt's リンパ腫）に特徴的に見出された [12]。また、セレクチンのリガンドとして有名なシアリルLewis a などの糖鎖は膀胱癌や胃癌等の上皮系癌細胞のマーカーとして臨床応用されているが [13]、これらはO型グリカンであるムチンに結合すると同時に、糖脂質の糖鎖部位にも同様のエピトープとして発現されている。

これらの癌関連糖鎖の構造を、糖鎖合成に働く糖転移酵素遺伝子（cDNA）（Fig.1）の人為的操作によって、様々に改変すること [糖

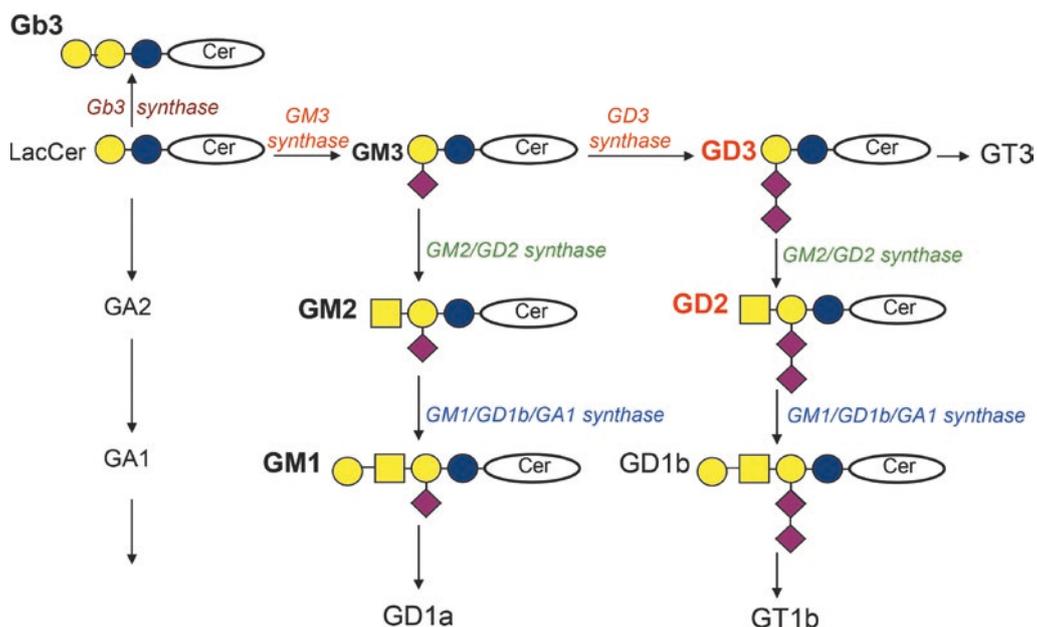


Fig.1 主なガングリオシドの合成経路と関連糖転移酵素

鎖りモデリング) が可能になり、単なる癌細胞マーカーとしてのみならず、その役割の理解が大きく進展してきた [14]。これらの研究で明らかにされてきた癌関連糖脂質抗原の機能をおおまかに大別すると、シアル酸を2個有するジシアルルガングリオシド、とくにシアル酸2個がタンデムに結合した構造を有するガングリオシドは、癌細胞の悪性形質の増強に作用することが、いくつかの系で示されている。その代表例として、前述したGD3、GD2があげられる [7,15,16]。癌細胞に特有の高い増殖性と浸潤性あるいは運動性そして転移能の獲得など、癌の本質に関わる重要な性質に癌関連糖脂質が関わっていることが示されている。これに対して、シアル酸を一個しか持たないGM3、GM1、GM2などのモノシアルルガングリオシドは癌細胞の悪性形質をむしろ抑制することが多いことが報告されている [17,18,19] (Fig.2)。

これらのジシアルルガングリオシド、モノシアルルガングリオシドがいかにして細胞形質をコントロールしうるのか、というメカニズムに関しても多くの研究がなされている。

糖鎖エピトープが機能する際には、その微細な構造を識別して結合し相互作用する「糖鎖認識分子」の存在が必須と思われる。実際、

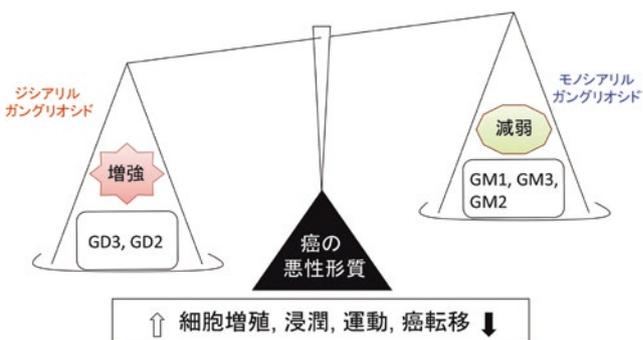


Fig.2 ジシアルルガングリオシドとモノシアルルガングリオシドは、癌の悪性形質に対して対照的な作用を示す。

細胞膜表面に発現する糖脂質がいかに近傍分子との相互作用によって細胞へ導入されるシグナルを制御するのかが分かってきた。糖脂質と同じ細胞膜上に発現して横並びに糖脂質と相互作用する「cis-結合」分子、および他の細胞膜表面上や細胞外に可溶性分子として存在して糖鎖を認識・結合する「trans-結合」分子のいくつかが同定され、その作用機構が示されてきた [20]。とくにcis-反応分子に関しては、細胞増殖因子受容体や細胞接着受容体などが膜上の糖脂質糖鎖との相互作用分子として同定されて、これらの受容体が増殖因子や細胞外基質からの刺激を受容して伝達するシグナルが様々な形で修飾されることが明らかになった [15,16] (Fig.3)。

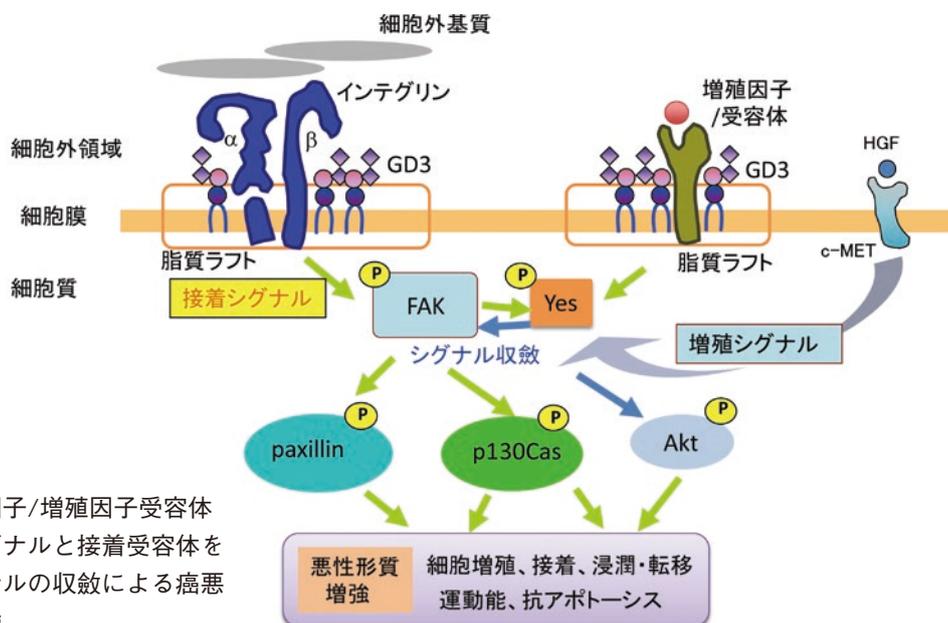


Fig.3 増殖因子/増殖因子受容体を介するシグナルと接着受容体を介するシグナルの収斂による癌悪性形質の増強

癌関連糖脂質に限らず、細胞に発現する糖脂質の作用機構の解明にとって重要な技術がおおきく進歩してきた。前述したように、糖脂質はその分子内に親水性の糖鎖構造に加えて、疎水性の脂質セラミド部位が結合する両親媒性のユニークな分子群である。細胞膜表面に存在する場合に、その分子性状を反映した独自の分子集合状態を取ることが知られ、そのことが糖鎖認識分子との相互作用によって多大な影響を及ぼすことは、容易に想

像できる。糖脂質の細胞膜上での存在形態の理解にとって重要な技術基盤となってきたのは、i. 細胞膜上でcis-反応する膜分子の同定法の開発、ii. 細胞膜上で分子クラスターの形成動態を可視化する技術の開発、である。HonkeとKotaniにより開発されたEnzyme-mediated activation of radical sources/mass spectrometry (EMARS/MS) 解析法により (Fig.4)、生細胞の膜表面上で標的糖脂質の300nm以内に存在する膜分子を同定す

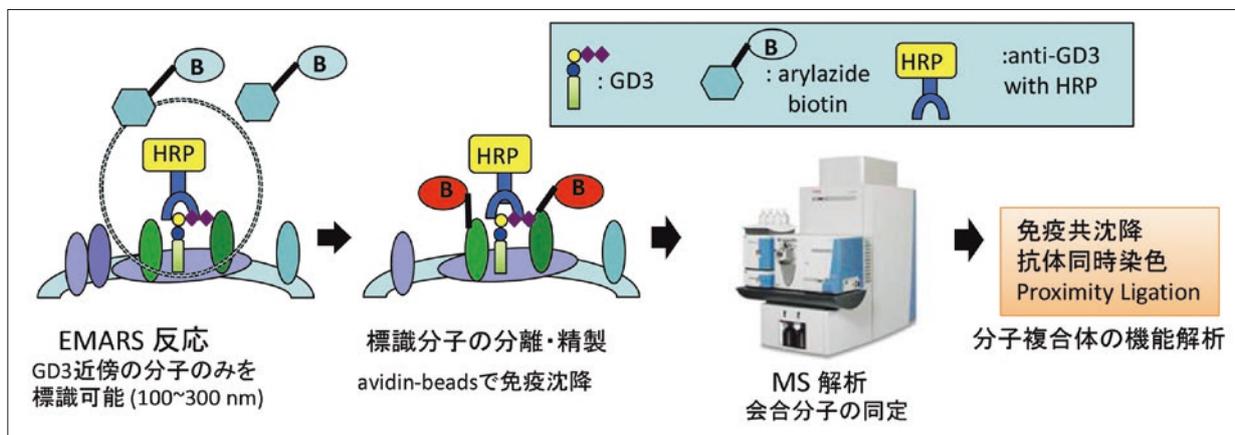


Fig.4 Enzyme-mediated activation of radical sources/mass spectrometry (EMARS/ MS) 解析によるスフィンゴ糖脂質会合分子の同定

ることが可能になった [21]。癌関連糖脂質に対する抗体を用いれば、癌関連糖鎖と会合して癌細胞の悪性形質を制御している膜分子を同定することが可能であり、癌関連糖脂質の機能解明に新しい進展をもたらしつつある [22]。もう一つの重要な技術は、Suzukiらにより開発された膜上分子の一分子動態観察技術である [23]。そのためには、Andoらの、糖脂質の高質な蛍光標識技術が必須である [24]。この技術によって、細胞膜の表面で、糖脂質が同一分子間も含めてどのような分子との相互作用を営むのかを、ミリ秒レベルで観察することが可能となり、いわゆる脂質ラフトの主成分たるGPI-アンカータンパク質と糖脂質の会合動態や、糖脂質分子間の二量体形成の実体が直接的に観察できるようになった [24]。

前述したように、ガングリオシドGD3は以前からメラノーマ特異的抗原と考えられ [25]、抗体治療や免疫治療のターゲットとされてきた [26,27]。メラノーマ細胞におけるGD3の役割に関しては、培養細胞におけるGD3合成酵素cDNA導入細胞の樹立などによって詳細に解析されてきた。その中で、GD3発現がアダプター分子であるp130Casやpaxillin、あるいはFAK (focal adhesion kinase) などの活性化を誘導して、増殖刺激からのシグナル増強 [28] や接着刺激に対するインテグリンを介したシグナルの増強に働く [16] ことを報告してきた。そこで、EMARS/MSを用いて、GD3との会合分子を同定した [29]。いくつかの候補分子の中で、Neogenin-1がGD3陽性細胞において脂質ラフトに局在する唯一のGD3近傍分子として同定

された [30]。Neogenin-1は、メラノーマ細胞に特徴的な増殖能、浸潤性の亢進、運動性の上昇を招く機能があることがわかり、メラノーマ特異抗原としてのGD3が役割を果たす際の有力な実行分子の一つと考えられた。さらに興味ふかいことに、GD3発現細胞において、Neogenin-1のみならず $\gamma$ -セクレターゼも脂質ラフトに移行することが示されるとともに、結果として $\gamma$ -セクレターゼによ

るNeogenin-1の細胞質部分が切断されてできたintracytoplasmic domain of Neogenin-1 (Ne-ICD) が核に移行して転写因子として機能することが分かった。このNe-ICDの標的遺伝子として様々な機能分子が同定され、実際にNe-ICDにより発現が上昇することが示されたことで、これらの諸分子がメラノーマの悪性形質の発現に関わるものが強く示唆された [30] (Fig.5)。

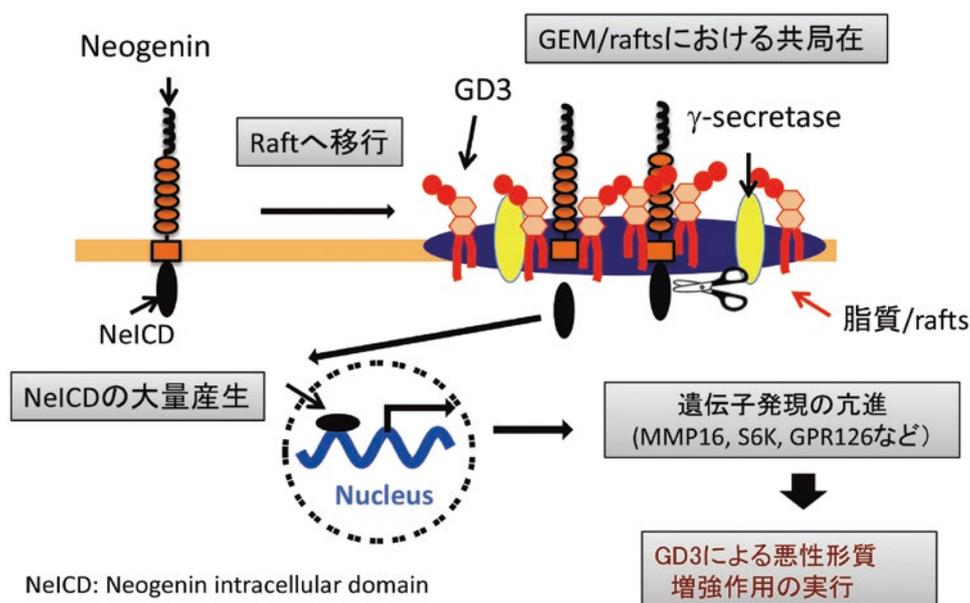


Fig.5 Neogenin-1はメラノーマ関連ガングリオシドGD3の実行分子である。

脳腫瘍、中でもグリオーマは浸潤性が強く外科的治療が根本治療となりにくい難治疾患の一つである。私たちのグループでは、ニワトリのレトロウイルスベクターを用いたRCAS system [31]により、マウスにグリオーマを誘発して、そのガングリオシド発現と役割の解析を行ってきた。PDGFbを導入したマウスのアストロサイトの一部でGD3が発現したため、GD3陽性およびGD3陰性のアストロサイトに分離して比較した結果、GD3およびGD2の発現が細胞増殖、浸潤、運動能を上昇させることが示された。そこで、その作用機構の解明のためにGD3をターゲットにしたEMARS解析を行った結果、PDGF受容体 $\alpha$ がGD3会合分子として同定されるに至った

[32]。さらにGD3がPDGFR $\alpha$ およびSrcキナーゼファミリー Yesと膜近傍で複合体を形成して働くことで、paxillinを活性化し、最終的にグリオーマの特徴である浸潤性の亢進を招くことが示唆された [33] (Fig.6)。現在、マウス体内で生成したグリオーマにおいて同様にこれらの分子複合体が作用しているか否かを解析中である。

ヒトの肺癌は癌患者の死亡原因の一位を占めているが、中でも小細胞肺癌 (SCLC) は転移や再発が頻繁におこる難治腫瘍である。以前より、SCLCにおいてガングリオシドGD2が特徴的に発現し、抗GD2抗体がその増殖抑制とアポトーシス誘導に働くことから、治療応用の可能性が示されてきた [34]。

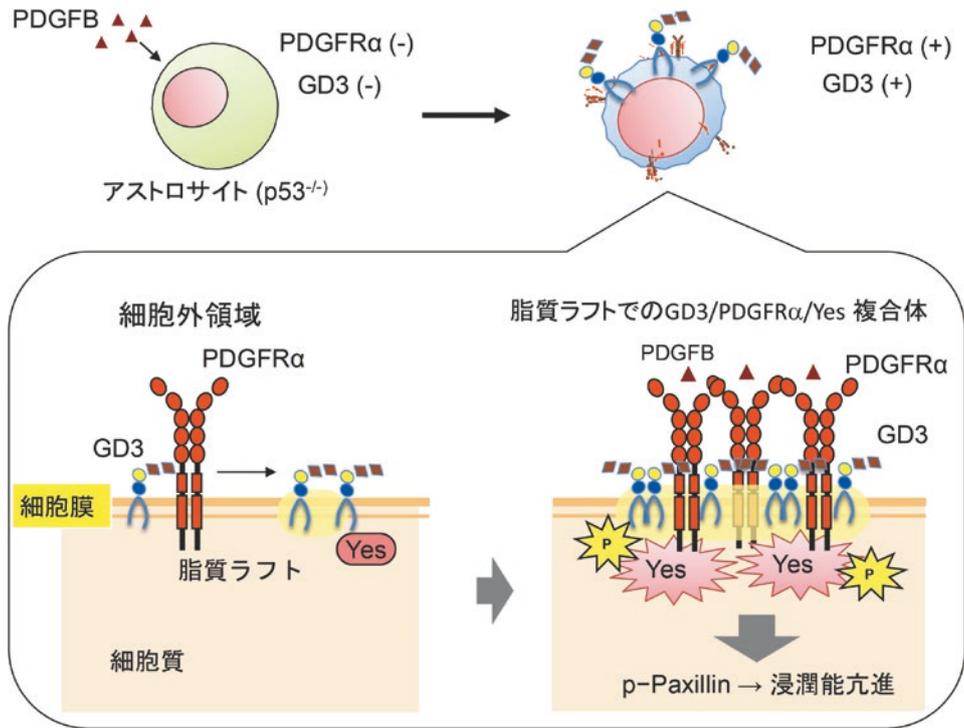


Fig.6 GD3とPDGFR $\alpha$ を含む細胞膜分子複合体がグリオーマの浸潤性を誘導する。

GD2を標的にしたEMARS/MS解析により、GD2会合分子として多くの分子が同定された [35] が、その中で最も興味ふかいものとしてASCT2が同定された。ASCT2はグルタミン輸送分子であり、GD2陽性細胞の脂質ラフトに局限して存在し、細胞増殖や浸潤性の増強に働くことが明らかになった。ASCT2がGD2と協働してグルタミンの取込みに働く (Fig.7) とともに、mTOR1の下流分子の活性化に作用することが示され、SCLCにおけるGD2発現の実行分子の一つであることが明らかになった。

以上のように、EMARS/MSは癌関連糖鎖の作用機構解明の上で極めて有効なアプローチであり、糖脂質を含む分子複合体の組成やそのシグナル制御機能の詳細を明らかにする上でこれまでになかった知見を提供しうる。よって、癌関連糖鎖抗原の具体的な作用分子の実体が明らかにされる可能性が大きい。癌関連糖脂質の大部分は脂質ラフトに局在することが多くの報告から想定される [30,36]。脂質ラフトの常在分子であるコレステロー

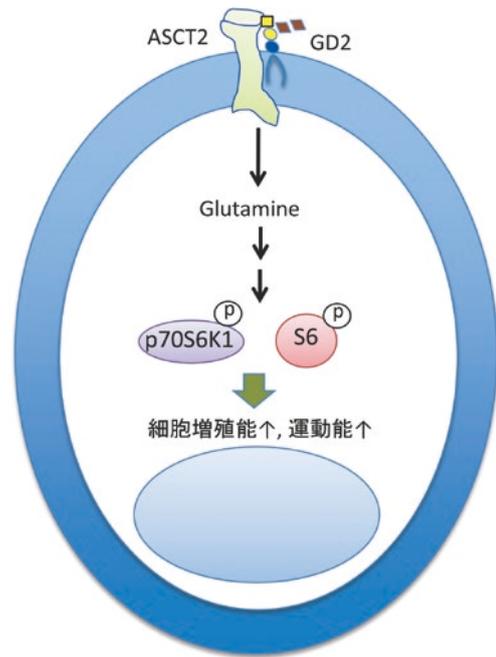


Fig.7 グルタミン輸送タンパク質、ASCT2は、GD2と協働してmTOR1の下流分子の活性レベルを増強する。

ルやスフィンゴミエリン、あるいはGPI-アンカータンパク質、スフィンゴ糖脂質の中で、後の二者は概ね共通の脂質部位に多様性に富む親水性部分が結合している点が共通している [24]。この多様性に富んだ親水性部分で

外方からの様々な認識分子と反応して細胞シグナルの調節に働くが、とくに糖脂質の場合には糖鎖が脂質ラフトの性状と機能のあり方を決めているといっても過言ではない。

脂質ラフトの性状と機能解明において重要な知見をもたらしつつあるのが、前述した一分子イメージングである。ここでは、細胞膜上での分子複合体の形成動態がreal timeで観察でき、いわゆる分子間相互作用の時空間的なりアリティを直に認識することができる [23]。脂質ラフト形成の最小単位の一つは、スフィンゴ糖脂質の二量体 (dimer) 形成と思われる [24] が、同じ糖鎖構造を有する糖脂質間の"homodimer"の形成が、糖鎖の異なる糖脂質間の"heterodimer"形成よりも明らかに持続時間が長く安定に見える点、その機構の解明が待たれる。また、癌関連糖脂質と会合分子間の相互作用のreal timeでの観察が、癌関連糖鎖シグナルの生成機構の解明に大きな"insight"をもたらすことが期待される [37]。

スフィンゴ糖脂質は、その発見以来、長らく神経系の調節因子として働くこと、とくにガングリオシドが神経系組織において例外的に高レベルで発現することから、脳神経系の発達・分化に必須の分子群と考えられてきた [38]。しかしながら、私たちの作成した糖鎖欠損マウスの表現型の異常解析の結果から、少なくとも3糖異常の糖鎖が結合する糖脂質があれば、微細な糖鎖構造の存在が生体の形成や生存には必須でないことが示された。一方で、様々な細胞や組織の機能調節において、微細な糖鎖の構造変化がその恒常性の維持に必須であることも分かってきた [39]。前述したように、スフィンゴ糖脂質の分子機能を考える時に、その両親媒性に基づく独自の細胞膜存在様式が、機能の遂行、とりわけ糖鎖認識リガンドとの相互作用に重大な影響をおよぼすことを考慮する必要がある。さらに、細胞膜を貫通して縦方向に形成される分子複

合体が細胞シグナルの制御と細胞運命の決定に重要な役割を果たすことが分かってきた [32]。今後、細胞の分化マーカーあるいは悪性転化のマーカーにとどまらず、糖脂質の膜環境や癌の微小環境の制御因子としての意義の解明が進展することが望まれる。

## 謝辞

EMARS/MS解析において多大なご援助をいただいた高知大学本家孝一教授、埼玉大学小谷典弘准教授に感謝いたします。また、共同研究者の金子慶、江崎寛季さんに感謝いたします。さらに、水野岳子さん、中安由美子さんの熱いご協力に対して感謝いたします。

## 参考文献

1. Hakomori S.: Tumor-associated glycolipid antigens, their metabolism and organization. *Chem Phys Lipids*. 1986; 42:209-33.
2. Lloyd KO.: Humoral immune responses to tumor-associated carbohydrate antigens. *Semin Cancer Biol* 1991; 2: 421-431.
3. Dippold WG, Lloyd KO, Li LT, Ikeda H, Oettgen HF, Old LJ.: Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77:6114-8.
4. Saito M, Yu RK, Cheung NK.: Ganglioside GD2 specificity of monoclonal antibodies to human neuroblastoma cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985; 127: 1-7.
5. Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y, Sakai R: Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene*. 2005; 24:4754-

- 64.
6. Shibuya H, Hamamura K, Hotta H, Matsumoto Y, Nishida Y, Hattori H, Furukawa K, Ueda M, Furukawa K.: Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Science*. **2012**; 103:1656-64.
  7. Yoshida S, Fukumoto S, Kawaguchi H, Sato S, Ueda D, Furukawa K.: Ganglioside GD2 in small cell lung cancer cell lines: Enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res*. **2001**; 61, 4244-52.
  8. Cheresch DA, Rosenberg J, Mujoo K, Hirschowitz L, Reisfeld RA.: Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD2, a relevant target antigen on small cell lung carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity. *Cancer Res*. **1986**; 46: 5112-8.
  9. Merritt WD, Casper JT, Lauer SJ, Reaman GH.: Expression of GD3 ganglioside in childhood T-cell lymphoblastic malignancies. *Cancer Res*. **1987**; 47:1724-30.
  10. Okada M, Furukawa K, Yamashiro S, Yamada Y, Haraguchi M, Horibe K, Kato K, Tsuji Y, Shiku H, Furukawa K.: High expression of ganglioside GD3 synthase gene in adult T cell leukemia cells unrelated to the gene expression of human T lymphotropic virus type I. *Cancer Res*. **1996**; 56:2844-8.
  11. Cazet A, Bobowski M, Rombouts Y, Lefebvre J, Steenackers A, Popa I, Guérardel Y, Le Bourhis X, Tulasne D, Delannoy P.: The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. *Glycobiology* **2012**; 22:806-16.
  12. Wiels J, Fellous M, Tursz T.: Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1981**; 78:6485-8.
  13. Jalanko H, Kuusela P, Roberts P, Sipponen P, Haglund CA, Mäkelä O.: Comparison of a new tumour marker, CA 19-9, with alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in patients with upper gastrointestinal diseases. *J Clin Pathol*. **1984**; 37:218-22.
  14. Furukawa K, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Hamamura K, Ohmi Y.: Fine tuning of cell signals by glycosylation. *J Biochem*. **2012**; 151:573-8.
  15. Hamamura K, Furukawa K, Hayashi T, Hattori T, Nakano J, Nakashima H, Okuda T, Mizutani H, Hattori H, Ueda M, Urano T, Lloyd KO, Furukawa K.: Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**; 102:11041-6.
  16. Ohkawa Y, Miyazaki S, Hamamura K, Kambe M, Miyata M, Tajima O, Ohmi Y, Yamauchi Y, Furukawa K, Furukawa K.: Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glycolipid-enriched microdomains. *J Biol Chem*. **2010**; 285:27213-23.
  17. Tsurifune T, Ito T, Li X-J, Yamashiro S, Okada M, Kanematsu T, Shiku H, Furukawa K.: Alteration of tumor phenotypes of B16 melanoma after

- genetic remodeling of the ganglioside profile. *Int J Oncol* **2000**; 17:159-65.
18. Yoon SJ, Nakayama K, Hikita T, Handa K, Hakomori SI. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2006**; 103:18987-91.
  19. Dong Y, Ikeda K, Hamamura K, Zhang Q, Kondo Y, Matsumoto Y, Ohmi Y, Furukawa K, Taguchi R, Furukawa K.: GM1/GD1b/GA1 synthase expression results in the reduced cancer phenotypes with modulation of composition and raft-localization of gangliosides in a melanoma cell line. *Cancer Sci* **2010**; 101:2039-47.
  20. Schnaar RL. Gangliosides of the vertebrate nervous system. *J Mol Biol*. **2016**; 428: 3325-36.
  21. Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, Honke K. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2008**; 105:7405-9.
  22. Honke K, Kotani N.: The enzyme-mediated activation of radical source reaction: a new approach to identify partners of a given molecule in membrane microdomains. *J Neurochem*. **2011**; 116:690-5.
  23. Suzuki KG, Kasai RS, Hirosawa KM, Nemoto YL, Ishibashi M, Miwa Y, Fujiwara TK, Kusumi A.: Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. *Nat Chem Biol*. **2012**; 8:774-83.
  24. Komura N, Suzuki KGN, Ando H, Konishi M, Koikeda M, Imamura A, Chadda R, Fujiwara TK, Tsuboi H, Sheng R, Cho W, Furukawa K, Furukawa K, Yamauchi Y, Ishida H, Kusumi A, Kiso M.: New fluorescent ganglioside analogues reveal raft-based ganglioside interactions with a GPI-anchored receptor. *Nat Chem Biol*. **2016**; 12:402-10. doi: 10.1038/nchembio.2059.
  25. Pukel CS, Lloyd KO, Travassos LR, Dippold WG, Oettgen HF, Old LJ.: GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. *J Exp Med*. **1982**; 155:1133-47.
  26. Houghton AN, Mintzer D, Cordon-Cardo C, Welt S, Fliegel B, Vadhan S, Carswell E, Melamed MR, Oettgen HF, Old LJ.: Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1985**; 82:1242-6.
  27. Scott AM, Lee FT, Hopkins W, Cebon JS, Wheatley JM, Liu Z, Smyth FE, Murone C, Sturrock S, MacGregor D, Hanai N, Inoue K, Yamasaki M, Brechbiel MW, Davis ID, Murphy R, Hannah A, Lim-Joon M, Chan T, Chong G, Ritter G, Hoffman EW, Burgess AW, Old LJ.: Specific targeting, biodistribution, and lack of immunogenicity of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma: results of a phase I trial. *J Clin Oncol*. **2001**; 19:3976-87.
  28. Furukawa K, Kambe M, Miyata M, Ohkawa Y, Tajima O, Furukawa K.: Ganglioside GD3 induces convergence and synergism of adhesion- and

- hepatocyte growth factor/Met-signals in melanomas. *Cancer Science*. **2014**; 105: 52-63.
29. Kaneko K, Ohkawa Y, Hashimoto N, Ohmi Y, Kotani N, Honke K, Ogawa M, Okajima T, Furukawa K, Furukawa K.: Neogenin defined as a GD3-associated molecule by enzyme-mediated activation of radical sources confers malignant properties via intra-cytoplasmic domain in melanoma cells. *J Biol Chem*. **2016**; 291: 16630-43.
30. Hashimoto N, Hamamura K, Kotani N, Furukawa K, Kaneko K, Honke K, Furukawa K.: Proteomic analysis of ganglioside-associated membrane molecules: Substantial basis for molecular clustering. *Proteomics* **2012**; 12:3154-63.
31. Huse JT, Holland EC.: Genetically engineered mouse models of brain cancer and the promise of preclinical testing. *Brain Pathol Zurich Switz*. **2009**; 19:132-43.
32. Ohkawa Y, Momota H, Kato A, Hashimoto N, Tsuda Y, Kotani N, Honke K, Suzumura A, Furukawa K, Ohmi Y, Natsume A, Wakabayashi T, Furukawa K.: Ganglioside GD3 enhances invasiveness via Yes activation by forming a complex of GD3/PDGFR  $\alpha$  /Yes in gliomas. *J Biol Chem* **2015**; 290:16043-58.
33. Chen B, Xia L, Xu CS, Xiao F, Wang YF.: Paxillin functions as an oncogene in human gliomas by promoting cell migration and invasion. *Onco Targets Ther*. **2016**; 9:6935-43.
34. Hamilton G, Rath B.: Mesenchymal-epithelial transition and circulating tumor Cells in small cell lung cancer. *Adv Exp Med Biol*. **2017**; 994:229-45.
35. Esaki N, Ohkawa Y, Hashimoto N, Tsuda Y, Ohmi Y, Bhuiyan RH, Kotani N, Honke K, Enomoto A, Takahashi M, Furukawa K, Furukawa K.: ASCT2 defined by enzyme-mediated activation of radical sources enhances malignancy of GD2-plus small cell lung cancer. *Cancer Science*. **2018** in press
36. Furukawa K, Ohmi Y, Kondo Y, Ohkawa Y, Hashimoto N, Tajima O, Furukawa K.: The role of glycosphingolipids in lipid rafts: lessons from knockout mice. In *Lipid Rafts: Properties, controversies and roles in signal transduction*. Ed. by Dan Sillence, pp1-20, Nova Science Publishers, London, **2014**
37. Furukawa K, Ohkawa Y, Matsumoto Y, Ohmi Y, Hashimoto N, Furukawa K.: Regulatory Mechanisms for Malignant Properties of Cancer Cells with Disialyl and Monosialyl Gangliosides. In *Glyco-signals in Cancer*, Eds by K. Furukawa, and M. Fukuda, pp57-76, Springer, **2016**
38. Wiegandt H.: Gangliosides. In: *Glycolipids*. Wiegandt H (ed). Vol 10. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp199-260, **1985**.
39. Furukawa K, Ohmi Y, Ohkawa Y, Tajima O, Furukawa K.: Glycosphingolipids in the regulation of the nervous system. *Adv Neurobiol*. **2014**; 9:307-20.

# 1,5-アンヒドロ-D-フルクトース誘導体の合成と インフラマソーム阻害剤としての評価

Preparation of 1,5-Anhydro-D-fructose derivatives  
and evaluation of their functions as inflammasome inhibitors

糖鎖有機化学研究室 後藤 浩太郎

Kohtaro GOTO

糖鎖生物学研究室 井手尾 浩子

Hiroko IDEO

## 1. はじめに

インフラマソームは細胞質に存在するタンパク質の複合体であり、様々な刺激因子（病原性成分、内因性因子、外因性因子など）に応答して細胞内で形成される特定のパターン認識受容体（PRR）、カスパーゼ-1、およびアダプタータンパク質であるASCなどから形成される [1,2]。その形成機構としてはまずNLRP3、AIM2、またはNLRC4などのPRRが特定の刺激因子を認識する。この認識は、PRRの構造変化を誘発し、ASCおよびカスパーゼ-1などのタンパク質との複合体の集合を促進させ、最終的にインフラマソームと呼ばれる巨大なタンパク質オリゴマーを形成するに至る。インフラマソームではまずカスパーゼ-1が活性化され、次にこの活性カスパーゼ-1がIL-1 $\beta$ およびIL-18などの炎症性サイトカインの成熟および分泌を促進することによって炎症を誘導する。これらインフラマソーム形成からの一連の炎症反応の多くは感染防御のためにしばしば有効である。

しかしながら、インフラマソーム形成に関する負の側面も知られている。すなわち特定の種類の刺激剤によって誘発される過度のインフラマソーム形成は、不適切な炎症を持続させる可能性がある。このメカニズムは、感染症、真性糖尿病、動脈硬化症、および自己免疫疾患に見られるような様々な炎症反応の

発症に関与している。したがって、インフラマソーム形成の機序が徐々に明らかにされるにつれて、診断薬および治療薬の開発を目指して、インフラマソーム阻害剤に関する多くの研究が行われているのが現状である [7]。

ところで1,5-アンヒドロ-D-フルクトース (1,5-AF) は、 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼによって *in vivo* でデンプンおよびグリコーゲンから直接形成され得る機能性単糖である [8]。この1,5-AFは海藻オゴノリ、哺乳類の肝臓やキノコ類などに含まれていることが報告されており、さらに強力な抗酸化活性と抗菌活性を示すことも明らかになっている [9]。このような理由から1,5-AFは健康食品や医薬品などの様々な分野での利用が期待されている化合物である (図1)。

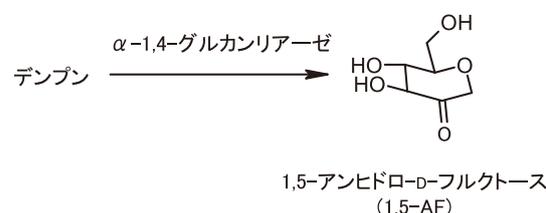


図1 1,5-アンヒドロ-D-フルクトース

また、最近この1,5-AFが前述したインフラマソームを抑制する機能をわずかながらではあるが有することが報告された [10]。そこで我々は1,5-AFをリード化合物とした様々な誘導体を合成し、それら誘導体のインフラマ

ソーム阻害剤としての評価を行うこととした。

まず、我々は1,5-AFの2-ケト構造に注目した。一般に 1,5-AFは水中で単量体としてのみ存在するわけではなく、単量体、単量体 (2-ケト) の水和物、二量体の混合物として存在している (図2)。結果として、1,5-AFの2-ケト体の存在比は水中ではわずか数パーセントに過ぎない。我々はこれが、1,5-AFがインフラマソームに関して低い阻害活性を有する理由の1つであると推測した。そこで二量体コンフォメーションを形成することが困難であると予想される様々な1,5-AF誘導体の合成し、それらの誘導体のインフラマソームに対する阻害活性を評価した。

### 2-1. 3-デオキシ1,5-AF (6) およびエノン (7) の合成

二量体の形成を抑制し、ケト型の存在比を増加させることができる可能性のある1,5-AF誘導体として、まず3-デオキシ-1,5-AF誘導体 (6) を合成することとした (図3)。すなわち、フラノース型の立体構造を持つ化合物1 [11] を出発原料として0.1 Mの硫酸中で処理した後、水酸基をアセチル化することでピラノース型の立体構造を持つ化合物2へと変換した。次いで常法に従ってアノマー位をブロモ化した後、(TMS)<sub>3</sub>SiHとEt<sub>3</sub>Bを用いた還元条件下でブロモ基を除去することで化合物3を

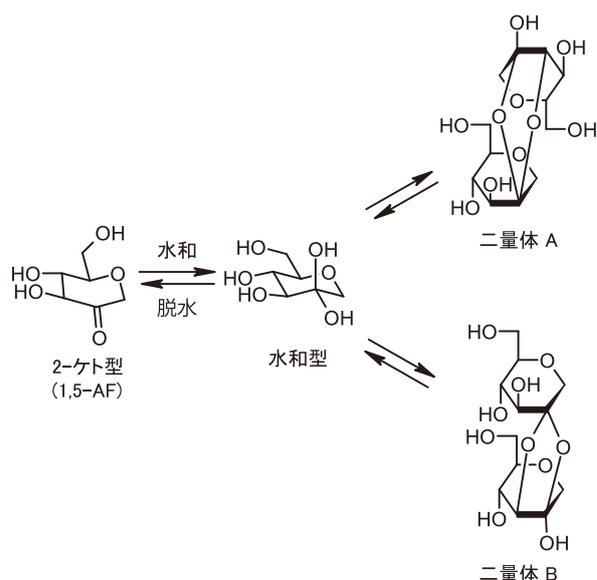


図2 1,5-AFの水中での挙動

得た。さらにアセチル基を除去した後、ベンジリデン化を行うことで化合物4へと導いた。得られた化合物4の水酸基はDess-Martin酸化 [12] により酸化してケトン5を合成した。最後にベンジリデン基を除去することで目的の3-デオキシ-1,5-AF (6) を合成することに成功した。期待したように、この3-デオキシ-1,5-AF (6) は水中で二量体を形成せず、水中でのケト型の割合が20%程度まで向上していることが明らかとなった。また、最終工程でベンジリデン基を除去した際にエノン7が副生成物として得られた。そこで目的物6と合わせてこのエノン7も以下のインフラマソームの阻害活性の評価に用いることにした。

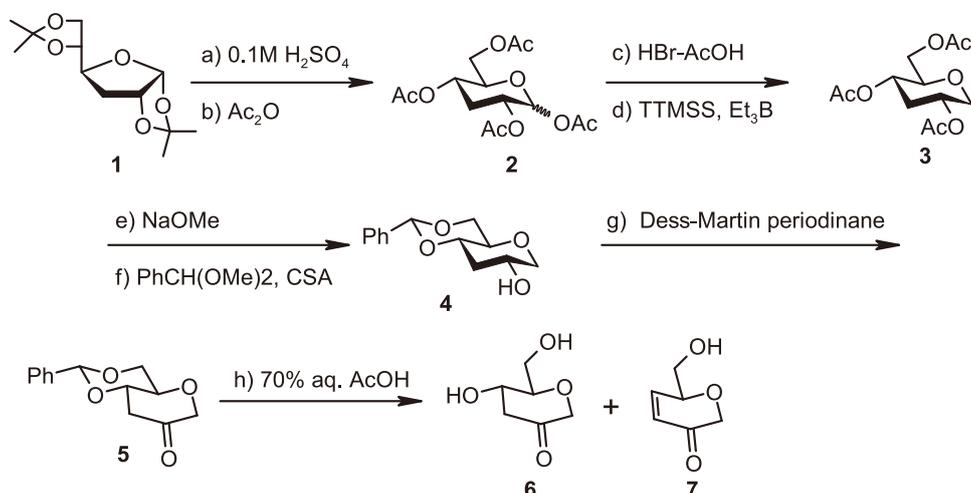


図3 3-デオキシ-1,5-AF誘導体 (6) の合成

## 2-2. 3-デオキシ-1,5-AF(6) 及びエノン(7)のインフラマソーム阻害作用

図4に示すようにマウス骨髄由来マクロファージ (BMDM) 細胞に、第1段階としてリポポリサッカライド (LPS) を添加すると、NF- $\kappa$ B経路が活性化し細胞内の前駆体IL-1 $\beta$ 量が上昇する (①)。次に第2段階としてニゲリシンを添加するとNLRP3インフラマソームが形成され (②)、カスパーゼ1が活

性化されることにより前駆体IL-1 $\beta$ から成熟IL-1 $\beta$ へと活性化し (③)、細胞の培養上清中にIL-1 $\beta$ が放出される (④)。ニゲリシン添加前に1,5AF誘導体をBMDM細胞に添加することにより、インフラマソームの活性化が阻害され、培養上清中のIL-1 $\beta$ が減少する。この培養上清中のIL-1 $\beta$ をELISA法により測定することにより、合成化合物のインフラマソーム阻害能を評価した。

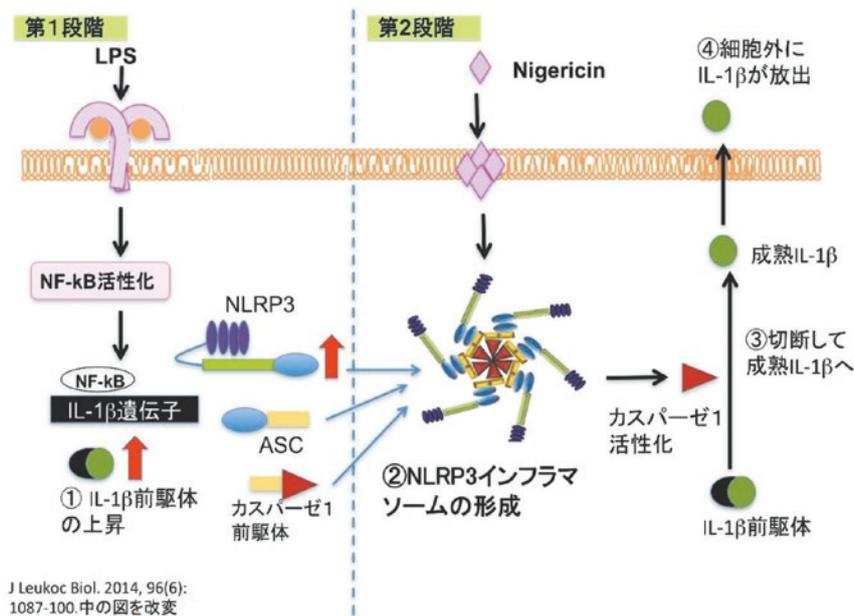


図4 NLRP3インフラマソーム活性化機構

3-デオキシ-1,5-AF (6) は濃度依存的にBMDM細胞培養上清中へのIL-1 $\beta$ の放出を阻害し (図5a)、その50%阻害濃度は1,5-AFよりも低濃度の約2 mMであった (表1)。

NLRP3インフラマソームが活性化されると、ピロトーシス (カスパーゼ1依存性細胞死) がBMDM細胞に引き起こされる。3-デオキシ-1,5-AF(6)の抗ピロトーシス活性を、細胞死を免れた細胞の細胞内ATP量を測定することによって測定した (図5b)。3-デオキシ-1,5-AF (6) がない場合は、ニゲリシン添加で引き起こされるピロトーシスによって、生細胞量の指標となる細胞内ATP量は大きく減少する。NLRP3インフラマソームの活性化による細胞死が3-デオキシ-1,5-AF (6)

の添加により阻害される為、ATP量も3-デオキシ-1,5-AF (6) の濃度依存的に回復した。エノン (7) も3-デオキシ-1,5-AF (6) と同様にNLRP3インフラマソームが活性化によるIL-1 $\beta$ の放出や細胞死を阻害し、その50%阻害の濃度は3-デオキシ-1,5-AF (6) よりもさらに低濃度の15  $\mu$ Mであった (表1)。

IL-1 $\beta$ の放出阻害はウェスタンブロッティングでも確かめられた。LPS添加により細胞内に産生される前駆体IL-1 $\beta$  (37kDa) の量はどれも同じだが、3-デオキシ-1,5-AF (6) 及びエノン (7) はニゲリシン添加で引き起こされるインフラマソームの活性化による成熟IL-1 $\beta$  (17kDa)の生成、細胞外への放出を阻害した (図6a)。

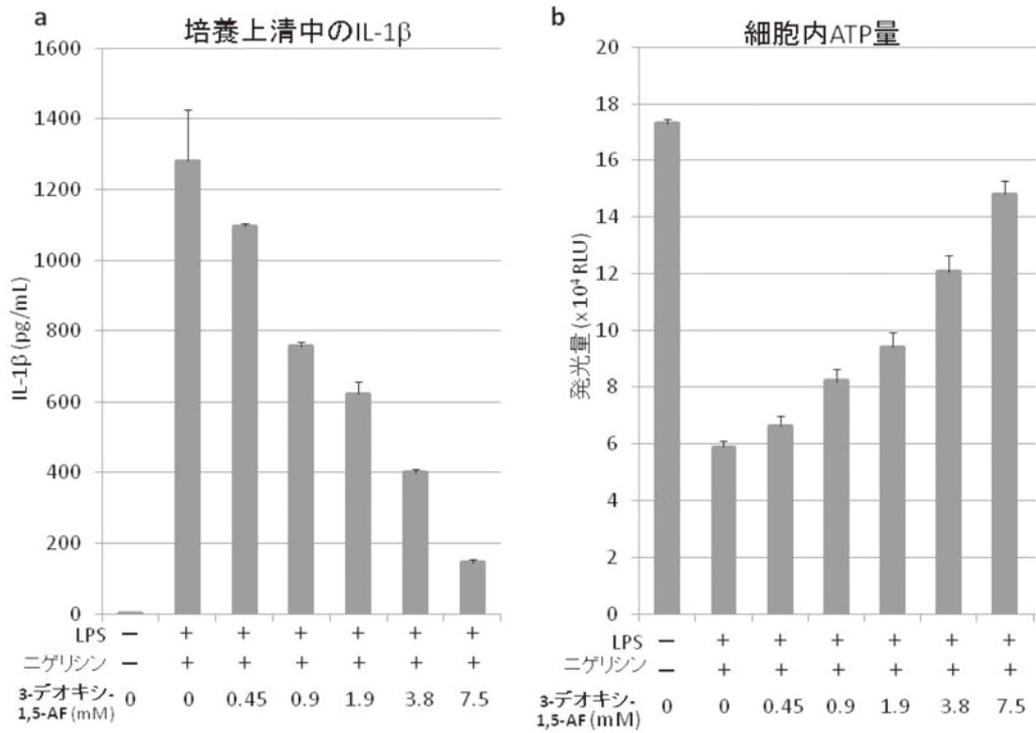


図5 3-デオキシ-1,5-AF(6)はNLRP3インフラマソームの活性化によるIL-1βの放出や細胞死を濃度依存的に阻害する

a) BMDM細胞培養上清中のIL-1βの濃度

b) BMDM細胞の細胞内ATP量

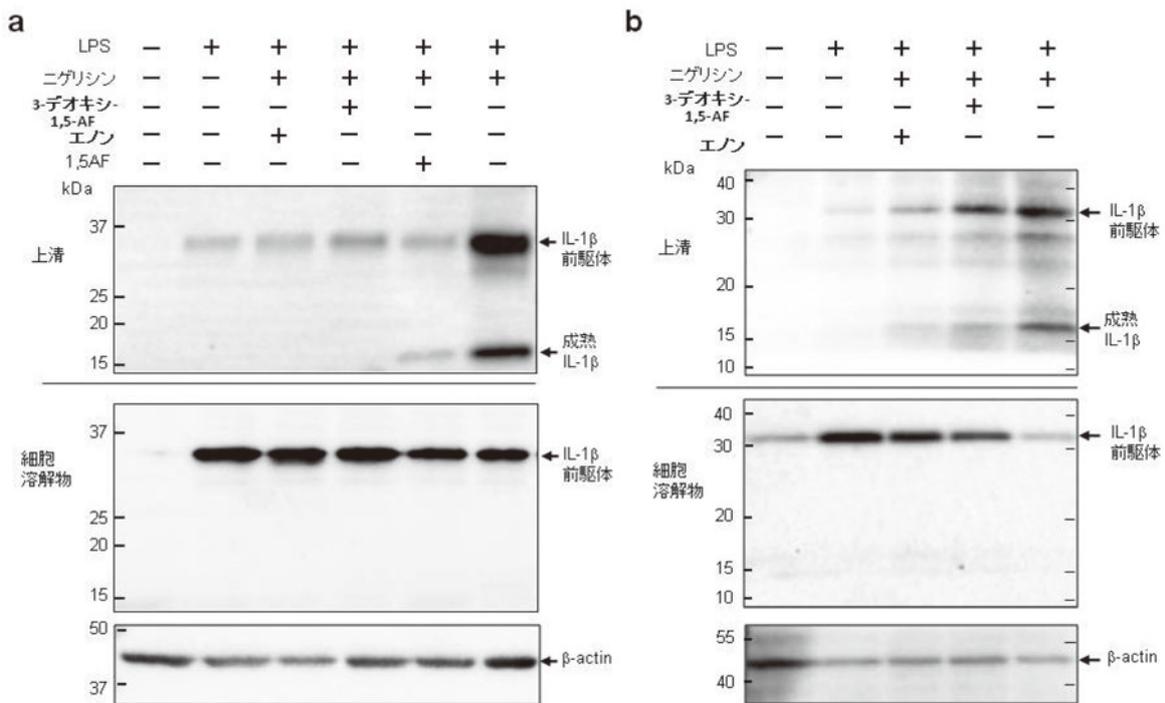


図6 1,5-AF誘導体はNLRP3インフラマソームの活性化を阻害する

a) BMDM細胞の細胞内及び細胞上清中のIL-1β前駆体及び成熟IL-1β

b) THP-1細胞の細胞内及び細胞上清中のIL-1β前駆体及び成熟IL-1β

## 2-3. エノン誘導体の合成

これらの結果から我々はインフラマソームの阻害にはエノン構造が重要であると考え、エノン誘導体8-10およびフッ化エノン誘導体17、23を設計し合成した。まずエノン誘導体8-10の合成を行った。図7に示したようにこれらのエノン誘導体は3-デオキシ体(6)と対応する酸無水物と反応させることでそれぞれ良好な収率で得ることができた。

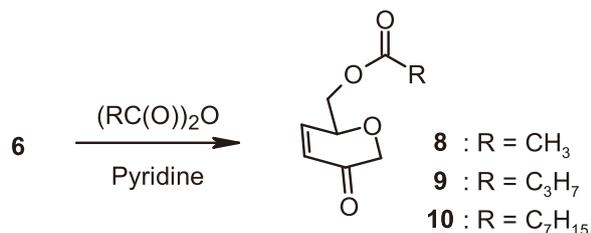


図7 エノン誘導体8, 9, 10の合成

次にフッ化エノン17の合成を行った。まず、市販の化合物11の3位水酸基をDASTによりフッ素化し化合物12を合成した。次いで0.1 M硫酸を用いてフラノース環のピラノース環への巻き直しを行った後水酸基をアセチル化し化合物13へと変換した。得られた化合物13はアノマー位をブロモ化した後、ブロモ基除去することで化合物14へと導いた。さらにすべてのアセチル基を除去した後、4,6位水酸基をベンジリデン化することで化合物15を合成した。次いで、化合物15の水酸基を1-Me-AZADO [13,14] で2位の水酸基を酸化しケトン16へと導いた。最後にベンジリデン基を除去した後、アセチル化することで目的のフッ化エノン17を得ることに成功した(図8)。

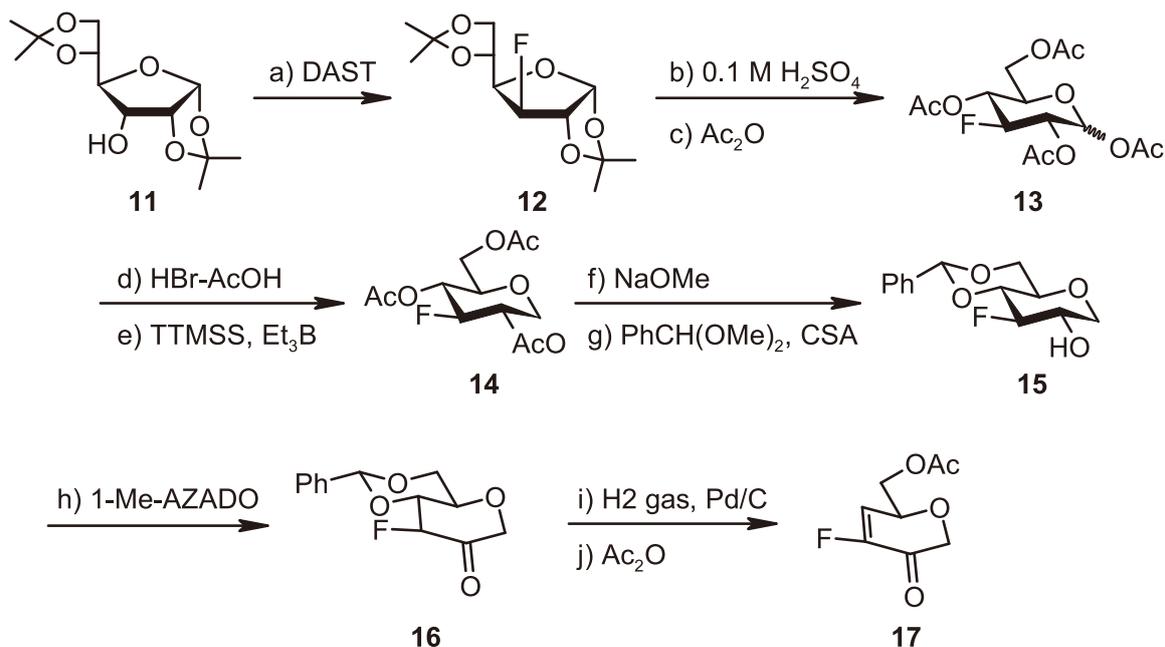


図8 フッ化エノン17の合成

最後にフッ化レボグルコセノン23の合成についても検討した(図9)。すなわち、化合物13のアセチル基を除去した後、ベンジリデン化を行うことで化合物18へと変換した。次いで1,2位の水酸基をアセチル化した後、ベンジリデン基の位置選択的還元開裂を行うことで化合物20へと導いた。さらに遊離となった6位水酸基をトシル化した後、塩基性条件下

で環化させることで二環性の化合物22を合成した。最後に1-Me-AZADOを用いた酸化、Pd/Cを用いた接触水素添加、アセチル化を経て目的のフッ化レボグルコセノン23を合成することに成功した。またその際に副生成物をしてエノールアセテート24が得られたので、この24も合わせてインフラマソームの阻害活性評価に使用することとした。

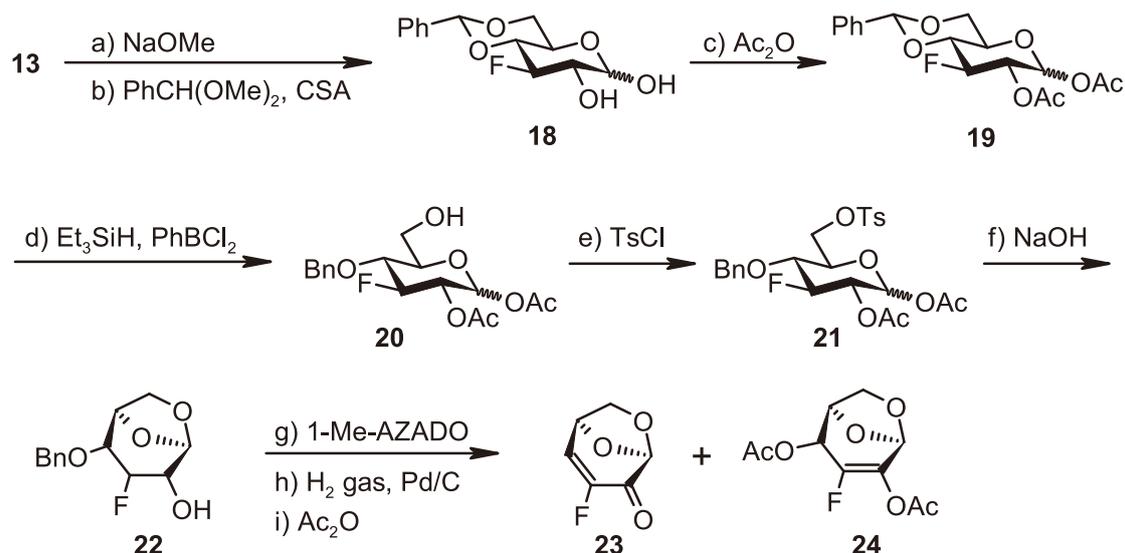


図9 フッ化レボグルコセノン23の合成

#### 2-4. エノン誘導体、レボグルコセノン誘導体のインフラマソーム阻害作用

次に合成したエノン誘導体（化合物8-10, 17）及びレボグルコセノン誘導体（化合物23, 24）のNLRP3インフラマソーム阻害活性を3-デオキシ-1,5-AF（6）と同様の方法で測定した。これらの化合物は3-デオキシ-1,5-AF（6）と同様に、濃度依存的に培養上清中へのIL-1 $\beta$ の放出を阻害し、細胞死を抑制した。エノン誘導体、レボグルコセノン誘導体のNLRP3インフラマソーム阻害活性を表1にまとめた。エノンやレボグルコセノン及びそれらの誘導体の50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>）は1,5-AFや3-デオキシ-1,5-AF（6）に比べ遥かに低濃度であった。

また、エノンのフッ素化や、アシル化によりエノンより数倍阻害活性が亢進した。マクロファージにおいて1,5-AFやその誘導体を細胞内に輸送する特別な機構があるかどうかはまだわかっていない。しかしながら、一般的に疎水性が増加すると細胞への取り込みが促進されるということが知られているので、フッ素化や、アシル化によりエノンの疎水性が増すことで、それらがより細胞内に取り込まれ、阻害活性の増加に寄与したことが考えられる。

1,5-AFやその誘導体の阻害作用は人マクロファージ細胞であるTHP-1細胞でも測定

した。ニゲリシンによるNLRP3インフラマソーム活性化が起こる前に化合物と細胞をインキュベートし、活性化の結果産生放出される成熟IL-1 $\beta$ 量をバイオアッセイで測定した。THP-1細胞の場合もBMDMの場合と同様に1,5-AFを除いてすべての化合物は、NLRP3インフラマソーム活性化を阻害することにより、濃度依存的にIL-1 $\beta$ の細胞外放出を阻害し、細胞死を抑制した。THP-1細胞を用いた場合のNLRP3インフラマソームの50%阻害濃度も同様に表1にまとめた。1,5-AFはTHP-1細胞の場合60 mMでも阻害しないが、3-デオキシ-1,5-AF（6）では2.3 mMの濃度で50%阻害し、エノン、エノン誘導体、レボグルコセノン誘導体の50%阻害濃度はBMDM同様、非常に低濃度であった。さらにTHP-1細胞においての化合物によるIL-1 $\beta$ の放出阻害は、ウェスタンブロットティング法でも確かめられた（図6b）。

#### 3. おわりに

今回我々は様々な1,5-AF誘導体を設計および合成し、NLRP3インフラマソームに対するそれらの阻害活性を、マウスBMDMおよびヒトTHP-1細胞を用いて*in vitro*で評価した。その結果、合成した各種誘導体（6～10、17、23、24）およびレボグルコセノン

化合物	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
	BMDM	THP-1
1,5-AF	29000 $\pm$ 4000	— [a]
3-デオキシ-1,5AF (6)	1600 $\pm$ 150	2300 $\pm$ 30
エノン (7)	16 $\pm$ 3.5	42 $\pm$ 9.1
アセチルエノン (8)	5.7 $\pm$ 0.6	4.3 $\pm$ 0.7
ブタノイルエノン (9)	3.2 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.7
オクタノイルエノン (10)	3.6 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.4
フッ素化エノン (17)	8.4 $\pm$ 2.0	5.1 $\pm$ 1.3
レボグルコセノン	1.2 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 2.8
フッ化レボグルコセノン(23)	0.8 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 0.2
フッ化エノールアセテート(24)	1.0 $\pm$ 0.5	3.7 $\pm$ 1.4

[a] 60 mMの1,5-AFでは阻害活性なし

表1 ニゲリシン刺激によるNLRP3インフラマソーム活性化を阻害する化合物の50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>)

は、1,5-AFよりもNLRP3インフラマソームに対してはるかに高い阻害活性を有することが明らかとなった。これらの結果から、1,5-AF誘導体のエノン構造は、NLRP3インフラマソームに対する阻害活性において重要な因子である可能性が示唆された。

#### 参考文献

- Martinon, F.; Mayor, A.; Tschopp, Y. *Annu. Rev. Immunol.*, **2009**, *27*, 229-265.
- Hara, H.; Tsuchiya, K.; Kawamura, I.; Fang, R.; Hernandez-Cuellar, E.; Shen, Y.; Mizuguchi, J.; Schweighoffer, E.; Tybulewicz, V.; Mitsuyama, M. *Nature immunology*, **2013**, *14*(12), 1247-1255.
- Dinarello, C. A. *Annu. Rev. Immunol.*, **2009**, *27*, 519-550.
- Fang, R.; Tsuchiya, K.; Kawamura, I.; Shen, Y.; Hara, H.; Sakai, S.; Yamamoto, T.; Fernandes-Alnemri, T.; Yang, R.; Hernandez-Cuellar, E.; Dewamitta, E. R.; Xu, Y.; Qu, H.; Alnemri, E. S.; Mitsuyama, M. *J. Immunol.*, **2011**, *187*, 4890-4899.
- Koizumi, Y.; Toma, C.; Higa, N.; Nohara, T.; Nakasone, N.; Suzuki, T. *Cellular Microbiology*, **2012**, *14*, 149-154.
- Dinarello, C. A.; Simon, A.; van der Meer, J. W. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2012**, *11*, 633-652.
- Baldwin, A. G.; Brough, D.; Sally Freeman, S. *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 1691-1710.
- Yu, S.; Kenne, L.; Pedersen, M. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1993**, *1156*(3), 313-320.
- Meng, X.; Kawahara, K.; Matsushita, K.; Nawa, Y.; Shrestha, B.; Kikuchi, K.; Sameshima, H.; Hashiguchi, T.; Maruyama, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2009**, *387*(1), 42-46.
- Maruyama, I.; Noma, S. WO 2015016178 A1
- Copeland, C.; Stick, R. V. *Aust. J. Chem.*, **1977**, *30*, 1269-1273.
- Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*(22), 4155-4156.
- Shibuya, M.; Tomizawa, M.; Suzuki, I.; Iwabuchi, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 8412-8413.
- Iwabuchi, Y. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, **2008**, *66*, 1076-1084.

# ボロン酸-糖複合体を利用した質量分析による単糖異性体分析

## Development of Monosaccharide Isomeric Analysis using Borate Complexes and Tandem Mass Spectrometry

糖鎖有機化学研究室 黒河内 政樹

Masaki KUROGOCHI

### 1. 背景

生体内の糖鎖の働きは生体の骨格・組織形成（キチン、セルロース、グリコゲン、デンプン等）、生命現象のエネルギー源、又は情報伝達等において機能しており、これらの糖鎖機能を解明する上で、単糖を含む複合糖質の分析技術が求められ、現在までに、数多くの糖鎖分析技術が開発されている。中でも、急速に技術が進歩している質量分析計は、分子量の決定、ペプチド配列の同定、混合物からの化合物の定性的、定量的解析の分野において感度面、精度面、分解能面において非常に優れており、多くの研究分野で使用されているが、立体異性体の識別は、装置の性質上、難しい。単糖は、糖質の最小単位であり、化学的にはカルボニル基の型と炭素数で分類され、ポリヒドロキシアルデヒドであるアルドース (aldose) とポリヒドロキシケトンであるケトース (ketose) がある。単糖は、複数の不斉炭素原子を持つキラル化合物である為、光学活性の偏光面の回転が異なるD体とL体で区分される鏡像異性体 (enantiomer)、複数の水酸基の立体配置の異なるジアステレオマー (diastereomer)、1つの水酸基が異なるエピマー (epimer) を含む立体異性体が存在する。従って、同じ分子量で同じ官能基で構成される単糖の異性体は質量情報だけしか得る事が出来ない通常の質量分析計では異性体の識別が難しい。その為、糖異性体の

同定にはNMR測定やX線結晶構造解析が用いられるが、多段階の試料測定や単離した試料が質量分析計に比べると大量（数百 $\mu\text{g}$ スケール）に必要となり、解析にも多くの時間が費やされる。よって、近年、質量分析計による異性体の化合物の解析技術の開発が盛んになっており、金属イオンやリガンド分子を付加させたイオンのMS/MS解析等によって、異性体の識別が試されている（1～7）。

我々は、糖鎖・糖タンパク質の抽出や糖認識センサー、ターゲット分子の細胞内輸送等の研究に利用されているボロン酸の性質に着目した。有機ボロン酸は温和な条件下で、水溶液中の糖の多価の水酸基（特に、1,2-ジオールと1,3-ジオール）と可逆的に結合してボロン酸エステルを形成する（図1）。そのボロン酸エステルは、 $sp^2$ 混成軌道を持つ中性型の分子と $sp^3$ 混成軌道を持つアニオン型（負電荷）の分子が存在する。本研究では、この負電荷を示す糖-ボロン酸会合体のイオンを質量分析計で測定し、そのイオンの $MS^n$ 測定によって生じるフラグメントイオンから水酸基の立体配置情報を抜き出す事によって、糖異性体を識別する事を目的とした。

1960年代の単糖類分析において、ホウ酸緩衝液を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーが開発されていたが、これは糖とホウ酸が結合した会合体が陰イオン（アニオン）を示す事を原理として、単糖類を陰イオン

交換クロマトグラフィー上で分離している (8,9)。つまり、同じ数の水酸基を持つ糖の異性体でもホウ酸に対する結合能 (結合部位、結合力) が異なるという性質によって、陰イオン交換カラムに対する吸着能の差が生じている。よって、糖異性体間のホウ酸に対する結合能の違いがこの研究から示され、この性質は質量分析計においても利用が出来ると考えた。

また、近年の開発されている異性体分子を識別する質量分析法と本手法の違いは、1) 本来は電荷を帯びていないホウ素原子 (中性を示す平面三角形構造である  $sp^2$  混成軌道) が糖と会合する事によって、ボランアニオン (-1価の電荷を示す四面体構造である  $sp^3$  混成軌道) に性質が変わる事 (原子の物性変化)

に着目している点と 2) 有機ボロン酸の化合物を変える事で、水酸基とホウ素の結合点を2つ、3つにした会合体イオンが形成できる点、また、3) 糖と有機ボロン酸の結合能の違いによって、それぞれのMS/MSフラグメントのプロファイルが異なる事を利用して、本来、イオンの質量情報だけを与える質量分析計に対して、結合力の違いを反映したMS/MSプロファイルを示す点、さらにまた 4) 負電荷によるフラグメンテーションは、糖骨格の環内で切断されるC-C結合の切断が観測される為、正電荷によるフラグメンテーションより水酸基の情報を得る事が出来る点である (図2)。これらの事を考慮してボロン酸会合体を利用した糖鎖異性体の質量分析法の開発を行っている。

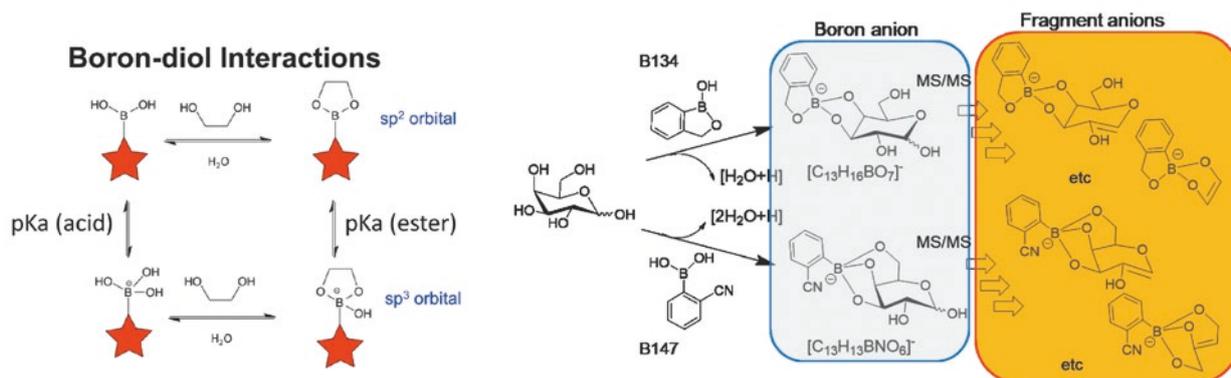


図1 有機ボロン酸とジオールの反応 図2 有機ボロン酸-糖会合体の質量分析計を用いた解析の概略図

## 2. 実験及び結果

### 2-1. 糖の水酸基とホウ素原子の結合点の確認と結合能の高い有機ボロン酸の発見

同じ化学組成式で表される6炭糖であるD-グルコース (D-Glc)、L-Glc、D-ガラクトース (D-Gal)、L-Gal、D-マンノース (D-Man)、L-Man、D-アロース (D-All)、D-フルクトース (D-Fruc)、L-Fruc、D-プシコース (D-Psi)、L-Psi、*myo*-イノシトール (*myo*-Inos)、そしてデオキシヘキソースのL-フコース (L-Fuc)、D-Fuc、また5炭糖であるD-キシロース (D-Xyl)、L-Xyl、D-アラビノース (D-Ara)、L-Ara、D-リボース (D-Rib)、L-Ribの20種類の単糖とベン

ズオキサボロール (B134)、フェニルボロン酸 (B122)、2-シアノフェニルボロン酸 (B147)、1-ナフチルボロン酸 (B172) の4種類のボロン酸を本実験で使用した。最終濃度2mM糖水溶液 + 16.7mM有機ボロン酸を50%メタノールの50 mM炭酸アンモニウム水溶液で調製し、その溶液をフローインジェクション法でESI-MS装置 (LTQ-Velos Pro, Thermo Fisher Scientific製) に導入し、ネガティブモードでMS測定とMS/MS測定を行った。それぞれ測定は複数回行い、スペクトルのデータをExcel上で処理をしている。

糖と有機ボロン酸の混合物のMSスペク

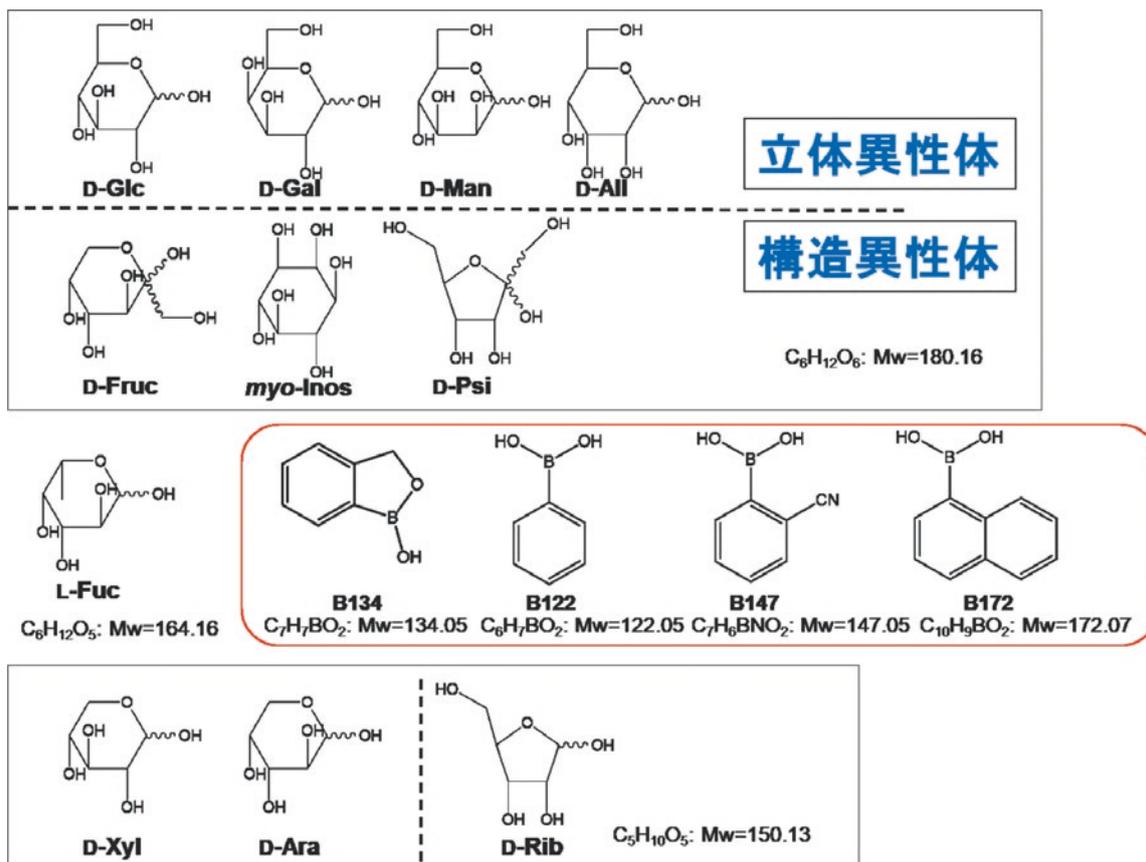


図3 今回、研究に使用した単糖類の化合物と有機ボロン酸

トル (図4) から、B134の場合、ベンゾオキサボロール ( $C_7H_7BO_2$ , Mw=133.94) の1分子と単糖 ( $C_6H_{12}O_6$ , Mw=180.16) の1分子が1対1で結合し、 $[H_2O+H]$ を損失した形で形成する会合体 (図2) のアニオンピーク ( $C_{13}H_{16}BO_7$ ,  $m/z$ : 295.11) が検出された。一方、アリールボロン酸 (B122, B147, B172) の場合では、アリールボロン酸 (Mw=121.93 ( $C_6H_7BO_2$ ), 146.94 ( $C_7H_6BNO_2$ ), 171.99 ( $C_{10}H_9BO_2$ )) の1分子と単糖の1分子が1対1で結合し、 $[2H_2O+H]$ を損失した形で形成する会合体のアニオンピーク ( $m/z$ : 265.09 ( $C_{12}H_{14}BO_6$ ), 290.11 ( $C_{13}H_{13}BNO_6$ ), 315.13 ( $C_{16}H_{16}BO_6$ )) が検出された (図2、図4)。四面体構造の $sp^3$ 混成軌道を持つボランアニオンは、ベンゾオキサボロールとアリールボロン酸の両方で形成されるが、ベンゾオキサボロールは糖の2つの水酸基と結合しており、アリールボロン酸

は糖の3つの水酸基と結合している。そして、それぞれの会合体は、脱プロトン化によって、負電荷を持つ有機ボロン酸試薬のイオンや糖のイオンと違って、そのままの形で負電荷イオンとして検出されている。

次に、糖と有機ボロン酸の混合物のMSスペクトルから、有機ボロン酸試薬のイオン ( $[M-H]^-$ : 133.2 for B134, 121.2 for B122, 146.2 for B147, 171.2 for B172) と糖のイオン ( $[M-H]^-$ : 179.1)、そして会合体のイオン ( $[M]^-$ : 295.11 for B134, 265.09 for B122, 290.11 for B147, 315.13 for B172) を抜き出し、それぞれのイオン量を測定し、濃度に変換し、以下の結合定数の式にあてはめる事によって、見かけの結合定数を算出した。この手法によって、様々な糖の結合能の比較並びに様々な有機ボロン酸の結合能の違いを簡便に観察する事が出来た (図5)。

図5より、各種糖は、有機ボロン酸に対し

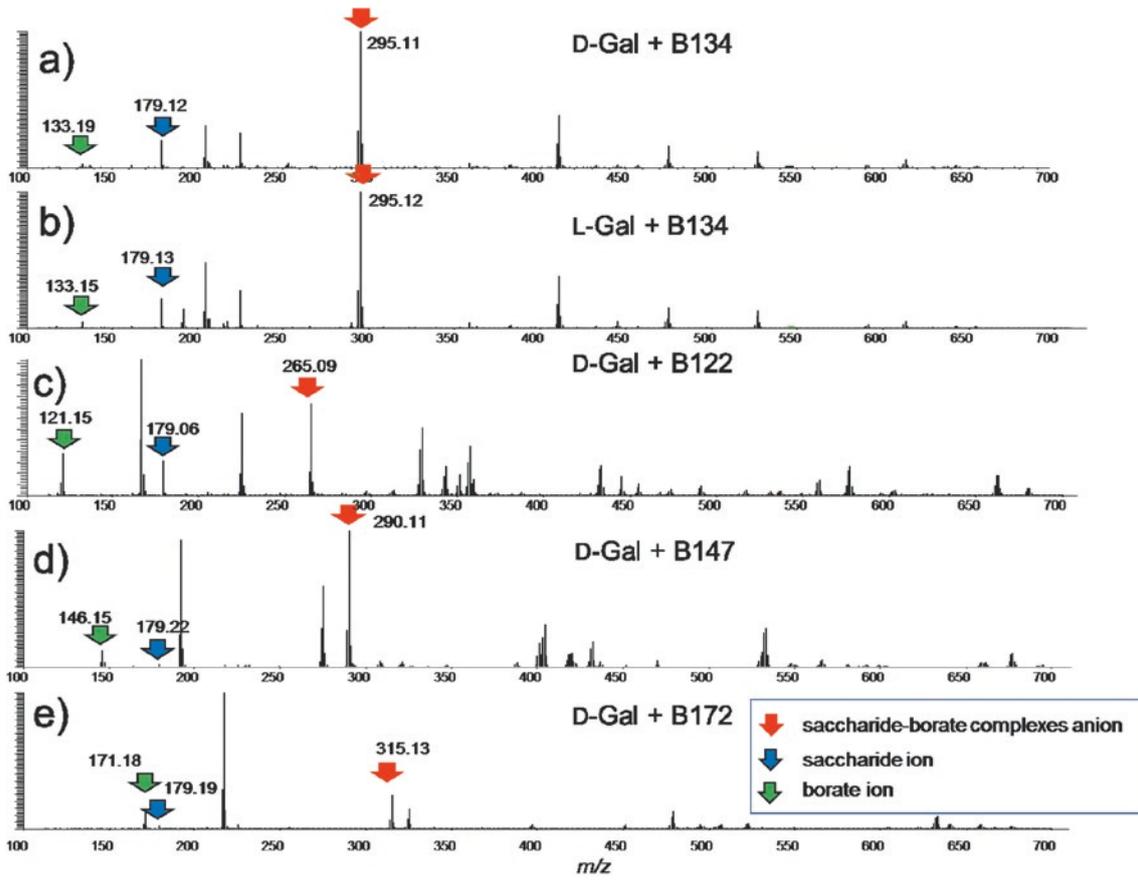


図4 a) D-GalとB134、b) L-GalとB134、c) D-GalとB122、d) D-GalとB147、e) D-GalとB172の混合物のネガティブモードのESI-MSスペクトル



$$K_{app}(\text{糖-ボロン酸の会合体}) = \frac{[BS]}{[B][S]} = \frac{[BS]}{([16.7 \text{ mM 有機ボロン酸溶液}] - [BS]) ([2 \text{ mM 糖溶液}] - [BS])}$$

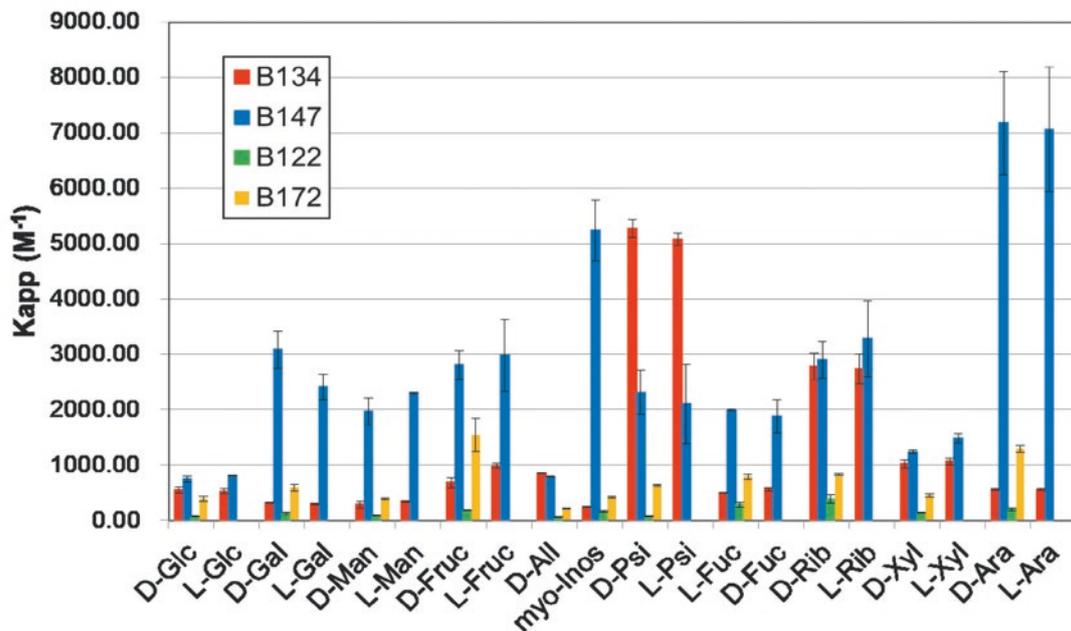


図5 ESI-MS測定から算出した各種糖と有機ボロン酸の見かけの結合定数

てそれぞれの異なる結合能を持っている事が分かる。また、すべての糖の結合定数は、鏡像異性体同士で同じ値を示している事が分かった。これは、D体、L体の糖の水酸基は絶対的な立体配置は異なっているが、水酸基間の立体配置情報は同じであることを示している。次に、同じ糖に対するアリアルボロン酸の結合定数の比較から、電子求引基の効果が結合定数の強弱に影響している事を見つけた。例えば、D-Glcの見かけの結合定数 ( $K_{app}$ ) は、B122の場合は、73.1 ( $M^{-1}$ ) であり、B147の場合は、745.4 ( $M^{-1}$ ) であり、B172の場合は、392.0 ( $M^{-1}$ ) である。また、B134に対するD-Glcの結合定数は、548.8 ( $M^{-1}$ ) である。フェニルボロン酸 (B122) < 1-ナフチルボロン酸 (B172) < 2-シアノフェニルボロン酸 (B147) の順番で結合能が上がっている事は、芳香族の置換基による電子求引性の強さと相関している。

<sup>1</sup>H-NMRによる滴定試験やARS (Alizarin Red S) に対する競合試験の報告 (10) より、D-GlcとD-Frucの見かけの結合定数が算出されているが、反応条件の有機溶媒割合やpHの違いから一定の数値を示していない (文献値の結合定数 ( $M^{-1}$ ): 4 ~ 31 for B134-D-Glc complex, 50 ~ 664 for B134-D-Fruc complex, 0 ~ 6 for B122-D-Glc complex, 79 ~ 160 for B122-D-Fruc complex)。今回の実験データと比較すると、結合定数の数値は異なっているが、B134に対するD-Frucの結合能が、D-Glcの結合能より強い事は一致している (今回の実験によるB134に対するD-Frucの結合定数: 684.5 ( $M^{-1}$ ))。また、D-GlcとD-Frucに対するB134の結合能がB122の結合能より強い事も、以前の報告と一致している (今回の実験によるB122に対するD-Frucの結合定数: 191.5 ( $M^{-1}$ ))。今回の質量分析計によって算出した見かけの結合定数は、D-Frucについては以前の報告と大体の数値は一致しているが、D-Glcに関しては以

前の報告と数値が10倍以上違っている。これは、先に述べた反応条件の違いだけでなく、以前の報告による見かけの結合定数を算出する滴定試験は図1の上段に示される中性型の平面三角形構造のボロンエステル形成を計測するメカニズムであるのに対して、今回の質量分析計の測定では、図1の下段に示されるアニオン型の四面体構造を示すボロンエステルを形成するメカニズムを計測しているという違いがある。よって、以前の報告の数値自体は、結合能の強弱の目安にはなるが、数値自体は今回の実験値と別の物であると考えている。

B134は、カテコール (1,2-ベンゼンジオール) の同一平面状に位置している1,2-ジオールと強く結合するが、フラノース環のsyn2,3-ジオールとも強く結合する事が知られている。これは、ジオールの距離と角度がB134のホウ素原子に対して最適な位置である為に、強く結合すると考えられる。この性質からB134がアデノシンモノリン酸 (AMP) のリボースのsyn2,3-ジオール部位と強く結合し、その会合体 (B134-AMP complex) がアミノアシルtRNA合成酵素の活性部位に強く結合する事によって、酵素機能を阻害する事が知られている (11, 12)。この現象を利用したTavaborole (5-fluoro-1-hydroxy-3H-2,1-benzoxaborole) が薬剤として開発され、2014年にFDAに認可を受けて爪および爪床の真菌感染症の局所抗真菌薬として販売されている。従って、フラノース環のsyn2,3-ジオールを有するPsiとRibが他の糖に比べてB134に対する結合能が高い事はこの性質を証明する物である。(  $K_{app} = 5177.5$  ( $M^{-1}$ ) for D/L-Psi, 2759.2 ( $M^{-1}$ ) for D/L-Rib)

溶液中の遊離の単糖は、ピラノース環 (6員環) もしくはフラノース環 (5員環) を形成し、アノマー効果によって、1位の水酸基の $\alpha$ 体、 $\beta$ 体が存在する。これらのピラノース環、フラノース環、 $\alpha$ 体、 $\beta$ 体は水溶液中

では容易に移り変わるが(互変異性)、糖の構造情報や環境(溶媒効果、温度、イオン等)によって、平衡状態が保たれ、ピラノース環、フラノース環並びに $\alpha$ 体、 $\beta$ 体の割合が決定している。通常、アルドヘキソースは、ピラノース環が主な形状であり、2位の水酸基の立体配置がaxialで上向きかequatorialで下向きかで1位の水酸基に対して隣接基関与が働き、水溶液中のアノマーの水酸基の向きを決定している。Glc、Gal、All、Xylは2位の水酸基がequatorialである為、熱力学的に安定な $\beta$ 体が多く存在し、水溶液中の存在比は $\alpha : \beta = 36 : 64$ を示す。一方、Man、Araは2位の水酸基がaxialである為、熱力学的に安定な $\alpha$ 体が多く、 $\alpha : \beta = 69 : 31$ の存在比を示す。従って、図5のXylとAraの部分を比較すると、B134に結合する時に推定されるアノマーの存在比( $\alpha$  1,2-complex of Xylに必要な $\alpha$ 体(36%) vs  $\beta$  1, 2-complex of Araに必要な $\beta$ 体(31%))に依存している為、B134に対する結合能は、Xylの方がAraよりも強い。(Kapp = 1041.6 ( $M^{-1}$ ) for D/L-Xyl, 560.4 ( $M^{-1}$ ) for D/L-Ara)

また、B147の場合も、B147に結合する時に推定されるアノマーの存在比( $\alpha$  1,3,4-complex of Araに必要な $\alpha$ 体(69%) vs  $\alpha$  1,2,4-complex of Xylに必要な $\alpha$ 体(36%))に依存している為、B147に対する結合能は、Araの方がXylよりも強かった(Kapp = 1362.8 ( $M^{-1}$ ) for D/L-Xyl, 7123.8 ( $M^{-1}$ ) for D/L-Ara)。

NMR解析から、Ribは水溶液中で $\beta$ -ピラノースが59.9%、 $\alpha$ -ピラノースが20%、 $\beta$ -フラノースが13%、 $\alpha$ -フラノースが7%、直鎖構造が0.1%で存在する事が示されている。また、同様にPsiは $\beta$ -ピラノースが24%、 $\alpha$ -ピラノースが22%、 $\beta$ -フラノースが15%、 $\alpha$ -フラノースが39%で存在している。B134に対して強い結合能を示すフラノース環のsyn2,3-ジオールはPsiとRibの両方に存在しているが、Psiのフラノース構造の存在比(54%)がRib

のフラノース構造の存在比(20%)よりも多い為に、PsiのB134に対する結合能がRibの物よりも強くなっていると考えられる。

よって、有機ボロン酸と糖の結合能の強さは、糖の水酸基の構造情報を反映していると言える。

## 2-2. 糖 - 有機ボロン酸会合体のMS/MS分析による糖異性体の識別

糖-有機ボロン酸会合体の負電荷イオンに対してCID (collision induced dissociation) によるMS/MS分析を行い、そのスペクトルを取得した(図6)。結合能と同様に、D体、L体の鏡像異性体間では、水酸基間の立体配置情報が同じである為に、糖-有機ボロン酸会合体のMS/MSプロファイルは、全く同じである(図7のD-GalとL-GalのプロファイルがB134とB147の両方で重なっている)。しかしながら、糖異性体間のMS/MSスペクトルは同じ官能基で構成される為にフラグメントピークの分子量情報( $m/z$ )は同じであるが、その強度において差が出る。例えば、B134の会合体の場合、図6aと6dに示しているD-GalとD-AllのMS/MSスペクトルを比較すると、 $m/z$ : 205のピークの強度が大きく異なっている。また、B147の会合体の場合、図6eと6fに示しているD-GalとD-GlcのMS/MSスペクトルを比較すると、 $m/z$ : 254のピークの強度が大きく異なっている。従って、ピークの強度差を利用して簡単に糖異性体をMS/MSスペクトルから識別する事が出来る。

しかしながら、他の糖異性体間のMS/MSスペクトルを観測すると(図6a, 6b, 6cもしくは、6e, 6g, 6h)、同じ分子量のフラグメントがほぼ同じピーク強度を示している為に、生のスペクトルを観測するだけでは糖異性体間のMS/MSスペクトルを識別する事は難しい。よって、測定間の誤差の修正並びに糖鎖間の細かな差を観測する為に、MS/MSスペクトルから有機ボロン酸を持つフラグメント

を抽出して、その相対強度を算出して散布図を作成するデータ処理を行っている (図7)。このデータ処理によって、簡便に糖異性体を識別できるようになる。

図7のMS/MSプロファイルから、立体異性体と構造異性体間の違いが大きくプロファイルに反映されている事が分かる。アルドヘキソースのジアステレオマーであるD-Gal、D-Glc、D-Man、D-AllとケトヘキソースのジアステレオマーであるD-Fruc、D-Psi、環状のポリヒドロキシル化合物であるイノシトールのプロファイルを観測すると、立体異性体同士 (ジアステレオマー間) でパターンが似ており、構造異性体間 (アルドヘキソースvsケトヘキソースvsイノシトール) で大きく異なっている。よって、今回の測定した化合物がMS/MSプロファイルによって、3つのパターンに分類されている事が分かる。

B134の会合体のMS/MSプロファイル (図7左上) から、D-GalとD-GlcとD-Manの比較をすると、 $m/z$ : 205, 235, 247のフラグメントピークの強度が微妙に異なっている事が分かる。また、図7左下に得られたフラグメントピークの分子量から推定フラグメントの構造を記述しているが、糖の2つの水酸基を結合したボランアニオンである事が分かる。Hallらは、NMR解析からB134-D-Gal会合体に対して、4,6-ジオールへの結合よりも3,4-ジオールへの結合している会合体が多く、また、B134-D-Glc会合体に対しては、3,4-ジオールへの結合よりも4,6-ジオールへの結合している会合体が多いと報告している (13)。つまり、図2に3,4-ジオールへ結合しているB134-D-Gal会合体の推定構造を示しているが、会合体は、1つの構造ではなく、複数の様々な結合様式を持つコンフォメーションの集合体であると考えられる。よって、D-GalとD-GlcとD-ManのMS/MSプロファイルの差は、2つの水酸基の結合情報の差を示していると言える。

次に、B147の会合体のMS/MSプロファイ

ル (図7右上) から、D-GalとD-ManとD-Allの比較をすると、 $m/z$ : 254のフラグメントピークはほぼ同じであるが、 $m/z$ : 230のフラグメントピークの強度が異なっている事が分かる。また、図7右下に得られたフラグメントピークの分子量から推定フラグメントの構造を記述しているが、3つの水酸基を結合したボランアニオンが形成されている事が分かる。つまり、D-GalとD-ManとD-AllのMS/MSプロファイルの差は、3つの水酸基の結合情報の差を示していると考えられる。B134と同様に、図2に3,4,6-トリオールへ結合しているB147-D-Gal会合体の推定構造を示しているが、B147の会合体も、1つの構造ではなく、複数の様々な結合様式を持っているコンフォメーションの集合体と考えられる。この知見は、 $m/z$ : 200に表される  $[C_{10}H_7BNO_3]^-$  のフラグメントが、図2に示されている3,4,6-トリオールに結合した推定会合体からでは産出されない事からも支持される。

2つの水酸基と結合する有機ボロン酸 (B134) と3つの水酸基と結合する有機ボロン酸 (B147) を用いて糖異性体を分析する利点は、1種類の有機ボロン酸のMS/MSプロファイルでは識別ができない場合、もう一方の有機ボロン酸のMS/MSプロファイルで識別が可能になる場合がある点である。例えば、D-GalとD-Glcを識別する場合は、B134よりB147の方が適しているし、D-GalとD-Manを識別したい場合は、B147よりB134の方が適している。

図7では、推定フラグメントの構造を示して、MS/MSスペクトルのピークを同定しているが、分子量の異なるアリアルボロン酸の会合体のMS/MSスペクトルを比較する事 (図8) によって、質量差を示す有機ボロン酸のフラグメントイオンを抽出し、同定する事が出来る。この手法によって、ボランアニオン以外の様々なピークが観測されている中で、簡便に有機ボロン酸に由来するフラグメント

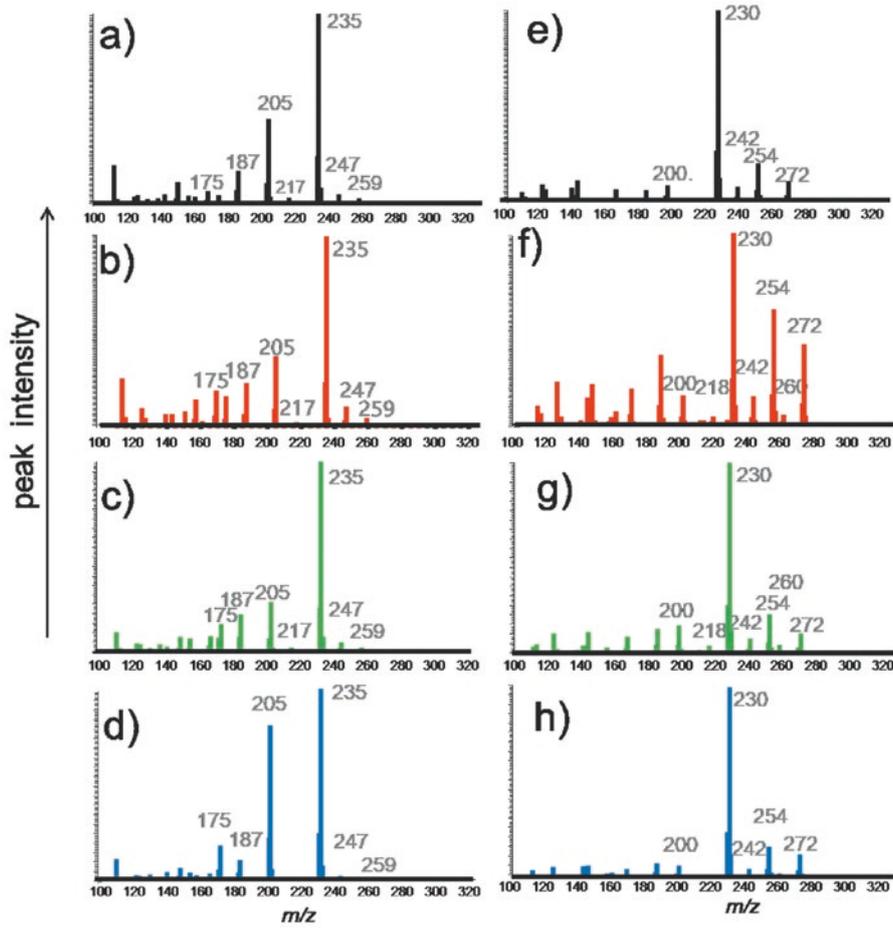


図6 有機ボロン酸-糖の会合体の負電荷のMS/MSスペクトル；B134 and (a) D-Gal, (b) D-Glc, (c) D-Man, and (d) D-All; B147 and (e) D-Gal, (f) L-Gal, (g) D-Glc, (h) D-Man, and (i) D-All.

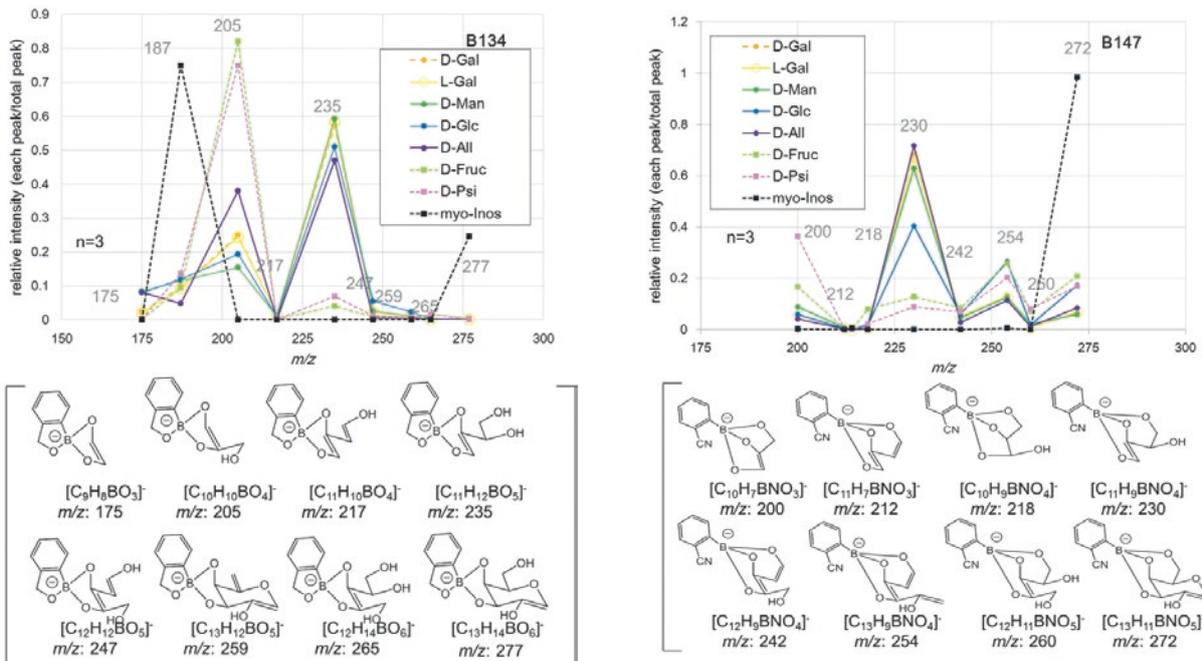


図7 MS/MS分析による有機ボロン酸-糖会合体のフラグメントプロファイルと 推定フラグメントの分子量と構造 (B134;左側、B147;右側)

イオンを抽出する事が出来る。

また、図8はD-Galと結合能の違うアリールボロン酸のMS/MSスペクトルを示しているが、結合能が高くなるにつれて ( $K_{app} = 128.3 \text{ (M}^{-1})$  for B122 <  $596.8 \text{ (M}^{-1})$  for B172 <  $3081.7 \text{ (M}^{-1})$  for B147)、糖骨格の同じ部位で切断されたフラグメントピーク [ $m/z: 205$  for B122] < [ $m/z: 255$  for B172] < [ $m/z: 230$  for B147] が分かる。有機ボロン酸と糖の会合体は、様々な結合様式を持つコンフォメーションの集合体だと考えられているので、結合能の高い有機ボロン酸の会合体は、より安定なコンフォメーションへの収束に繋がり、そのMS/MSプロファイルもその状態を反映していると考えられる。従って、有機ボロン酸の結合能はそのMS/

MSプロファイルに影響を与えていると考えられる。

つまり、図5で示した糖異性体間の結合能の違いは、MS/MSプロファイルの違いを推測する際にも利用できる。これは、D-GlcとD-Galに関して、B147に対する結合能の違い ( $K_{app} = 777.7 \text{ (M}^{-1})$  for D-Glc,  $2746.8 \text{ (M}^{-1})$  for D-Gal) の方が B134に対する結合能の違い ( $K_{app} = 573.1 \text{ (M}^{-1})$  for D-Glc,  $313.1 \text{ (M}^{-1})$  for D-Gal) よりも大きい為、MS/MSプロファイルによる識別もB134よりB147の方が適している事からも証明される。

### 3. 結論

我々は、質量分析計を利用して、糖 - 有機ボロン酸会合体の結合能の測定、並びにそのMS/MSプロファイルによる糖異性体の

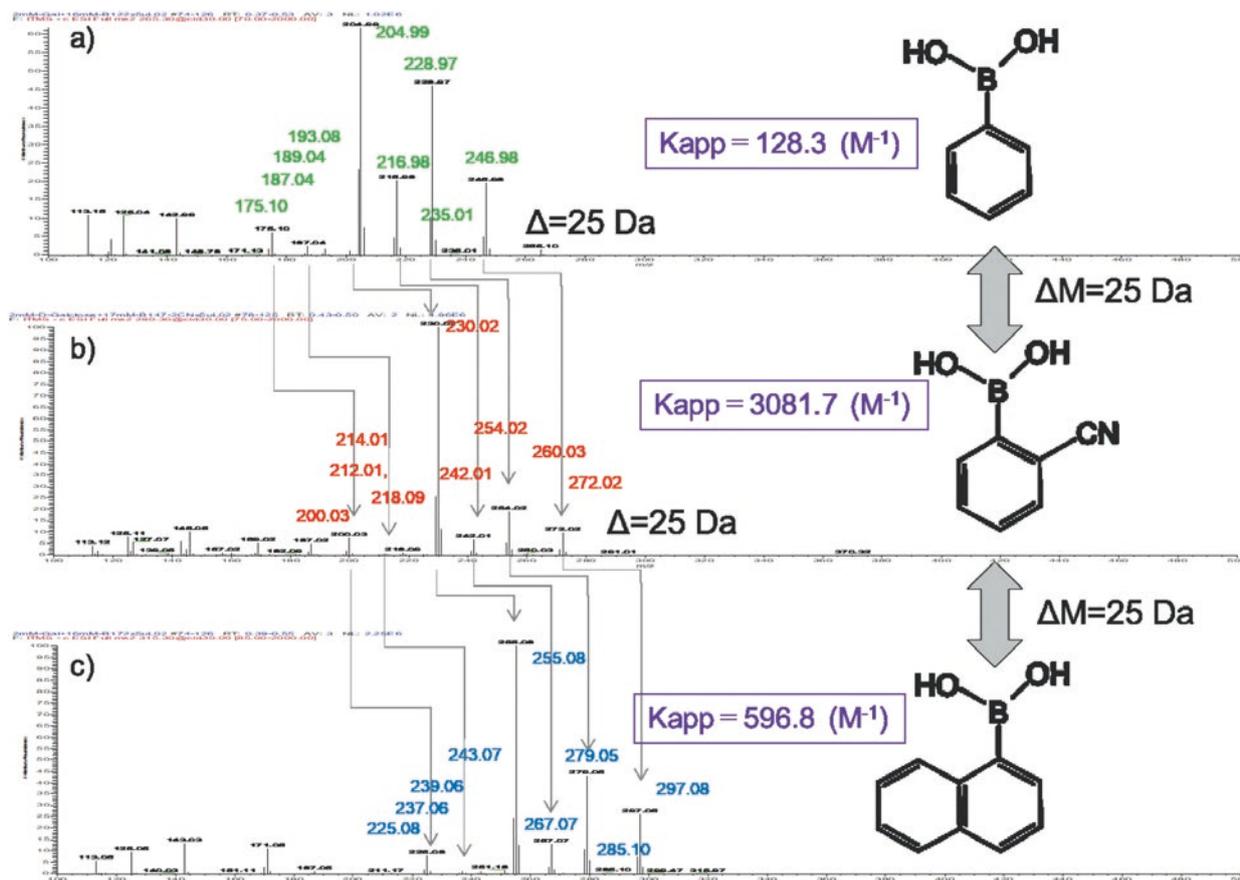


図8 有機ボロン酸-D-Galの会合体の負電荷のMS/MSスペクトル；D-Gal and (a) B122, (b) B147, (c) B172

識別する手法の開発を行った (14)。これは、簡便かつ迅速な糖異性体間のコンフォメーション解析であり、特殊な誘導体化の手順を踏む事なく、ただ有機ボロン酸を混合するだけで行える点でも優れていると言える。また、この会合体は、pH変化やシリカカラムを通す事によって、簡単に有機ボロン酸と分離する事ができるので、分析後に調製した溶液から糖を回収する事も可能である。この手法の利点は、水酸基を複数持つ化合物に応用が可能である事である。つまり、単糖以外の複合糖質である糖鎖や糖ペプチド、糖脂質等にこの手法が使用できる点である。今後は、より多くの複合糖質の解析を行い、データの取得を目指していく予定である。

また、従来の研究に使用されている有機ボロン酸 (B122) よりも強い結合能を持つ化合物 (B147) を発見したが、今後はより結合能の高い有機ボロン酸の創製を行う事によって、この知見を複合糖質のアフィニティー精製、糖認識センサー、生体分子の輸送、立体制御可能な触媒開発等の従来の有機ボロン酸の研究の発展にフィードバックできると期待される。

## 謝辞

この研究を始めるに当たり、有機化学の基礎的な知見として埼玉大学の松岡浩司教授、松下隆彦助教に有益な助言と提案をして頂きました。また、松田昭生常務理事、水野真盛室長をはじめとする野口研究所の皆様のご厚いご支援にこの場を借りて感謝の意を表します。

## References

1. R. E. March, C. J. Stadey, "A tandem mass spectrometric study of saccharides at high mass resolution." *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 805-812.
2. E. S. Berman, K. S. Kulp, M. G. Knize, L. Wu, E. J. Nelson, D. O. Nelson, K. J. Wu, "Distinguishing monosaccharide stereo- and structural isomers with TOF-SIMS and multivariate statistical analysis." *Anal Chem.* **2006**, *78*, 6497-6503.
3. M. T. Campbell, D. Chen, N. J. Wallbillich, G. L. Glish, "Distinguishing Biologically Relevant Hexoses by Water Adduction to the Lithium-Cationized Molecule." *Anal Chem.* **2017**, *89*, 10504-10510.
4. S. P. Gaucher, J. A. Leary, "Stereochemical differentiation of mannose, glucose, galactose, and talose using zinc (II) diethylenetriamine and ESI-ion trap mass spectrometry." *Anal Chem.* **1998**, *70*, 3009-3014.
5. G. Grigorean, J. Ramirez, S. H. Ahn, C. B. Lebrilla, "A Mass Spectrometry Method for the Determination of Enantiomeric Excess in Mixtures of D,L-Amino Acids" *Anal Chem.* **2000**, *72*, 4275-4281.
6. D. Williams, T. D. Lee, N. Dinh, M. K. Young, "Oligosaccharide profiling: the facile detection of mono-, di- and oligosaccharides by electrospray orthogonal time-of-flight mass spectrometry using 3-aminophenylboronic acid derivatization" *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 1530-1537.
7. Y. Yu, K. S. Ko, C. J. Zea, N. L. Pohl, "Discovery of the Chemical Function of Glycosidases: Design, Synthesis, and Evaluation of Mass-Differentiated Carbohydrate Libraries" *Org Lett.* **2004**, *6*, 2031-2033.
8. B. K. Richard, "Rapid quantitative anion-exchange chromatography of

- carbohydrates” *Anal. Chem.* **1967**, 39, 1416-1422
9. K. Mopper, “Improved chromatographic separations on anion-exchange resins. I. Partition chromatography of sugars in ethanol.” *Anal Biochem.* **1978**, 85, 528-532.
10. A. Adamczyk-Woźniak, K. M. Borys, A. Sporzyński, “Recent Developments in the Chemistry and Biological Applications of Benzoxaboroles” *Chem Rev.* **2015**, 115, 5224-5247.
11. F. L. Rock, W. Mao, A. Yaremchuk, M. Tukalo, T. Crépin, H. Zhou, Y. K. Zhang, V. Hernandez, T. Akama, S. J. Baker, J. J. Plattner, L. Shapiro, S. A. Martinis, S. J. Benkovic, S. Cusack, M. R. Alley, “An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site.” *Science.* **2007**, 316, 1759-1761.
12. A. Palencia, X. Li, W. Bu, W. Choi, C. Z. Ding, E. E. Easom, L. Feng, V. Hernandez, P. Houston, L. Liu, M. Meewan, M. Mohan, F. L. Rock, H. Sexton, S. Zhang, Y. Zhou, B. Wan, Y. Wang, S. G. Franzblau, L. Woolhiser, V. Gruppo, A. J. Lenaerts, T. O'Malley, T. Parish, C. B. Cooper, M. G. Waters, Z. Ma, T. R. Ioerger, J. C. Sacchettini, J. Rullas, I. Angulo-Barturen, E. Pérez-Herrán, A. Mendoza, D. Barros, S. Cusack, J. J. Plattner, M. R. Alley, “Discovery of Novel Oral Protein Synthesis Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis That Target Leucyl-tRNA Synthetase” *Antimicrob Agents Chemother.* **2016**, 60, 6271-6280.
13. M. Bérubé, M. Dowlut, D. G. Hall, “Benzoboroxoles as efficient glycopyranoside-binding agents in physiological conditions: structure and selectivity of complex formation.” *J Org Chem.* **2008**, 73, 6471-6479.
14. M. Kurogochi, M. Mizuno, A. Matsuda. “Binding Assessment of Monosaccharide-Boronic Acid Complexes via Tandem Mass Spectrometry.” *ChemistrySelect* **2018**, 3, 8193-8198.

## 糖鎖抗原が関与する腎癌の悪性化メカニズム

### Malignant Mechanism of Renal Cancer Cells evoked by Glyco-antigens

糖鎖生物研究室 土田 明子  
Akiko TSUCHIDA

【はじめに】

腎癌は多臓器に血行性転移をきたしやすく、初診時にすでに転移を認める症例が25～30%あるとの報告があり、初診時に転移がなくても経過中に転移をきたす症例もある。また、腎癌全体では最終的に50～60%の症例で遠隔転移がみられ、転移部位としては肺が最も頻度が高く多発性であることが多い。現在のところ手術が最も有効な治療法であるが、早期発見や治療効果の指標となる腫瘍マーカーが未だ確立されていないのが現状である。

我々はこれまでに腎癌細胞株における糖脂質糖鎖の発現解析から、腎癌細胞株において $\alpha$ 2,6シアル酸転移酵素ST6GalNAc VIの発現が抑制された結果、細胞表面のDisialyl galactosyl globoside (DSGG) 抗原が消失し、前駆構造のMonosialyl galactosyl globoside

(MSGG) 抗原が発現するという顕著な変化を明らかにしてきた(図1) [1]。

さらに、Lc4の末端にGalNAcが $\beta$ 1-4結合した糖鎖構造が肺への高転移株に存在するという報告 [2] を受け、我々がフローサイトメトリーによる細胞表面糖鎖の発現解析を行った結果、多くの腎癌細胞株の細胞表面にGalNAc-disialyl Lc4糖鎖抗原(以下、GalNAc-DSLc4と略す)が発現していることを確認した。そこで、GalNAc-DSLc4抗原の生合成過程に働く糖転移酵素を同定し、腎癌細胞表面の糖鎖をリモデリングしてGalNAc-DSLc4の安定発現腎癌細胞株を樹立した後、得られたGalNAc-DSLc4安定発現株の癌性形質につき解析を行ってきた。これまでに、GalNAc-DSLc4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

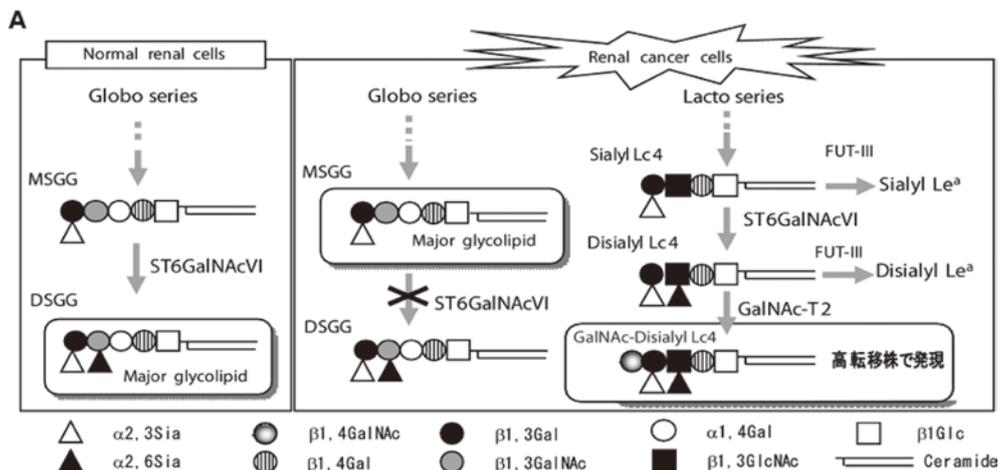


図1 腎癌細胞及び正常細胞における糖脂質の合成経路

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、などを報告してきた [3]。

本稿では、GalNAc-DSLc4抗原の発現による癌悪性化メカニズムに関して、先の報告以降に得られた知見、そして今後の展望について述べる。

### 【実験内容および結果】

#### 1. 安定発現株におけるインテグリン-ILK-Aktシグナルの増強

糖転移酵素遺伝子  $\beta$ 4GalNAc-T2をGalNAc-DSLc4糖鎖抗原をほとんど発現していない腎癌細胞株 (VMRC-RCW細胞) に遺伝子導入し、GalNAc-DSLc4抗原安定発現株を樹立した。得られたGalNAc-DSLc4安定発現株とコントロール株の細胞内シグナルについて比較検討した結果、牛血清による刺激やラミニン表面への接着刺激により安定発現株の

Akt分子のリン酸化が亢進し、さらにPI3K阻害剤 (LY294002) によりAktリン酸化の亢進が阻害された。この結果から、安定発現株における増殖能・浸潤能亢進にはPI3K-Aktシグナル経路の増強が関与する事が明らかになった [3]。また、ショ糖密度勾配法による分画実験によりインテグリン分子の一部がラフト画分 (スフィンゴ糖脂質とコレステロールに富む細胞膜上のミクロドメイン) に局在していることも見出している [3]。これらの結果から、Akt-PI3Kシグナル経路の活性化亢進の要因としてインテグリン分子からの活性化シグナルのクロストークが考えられた。クロストークを引き起こすアダプター分子の存在を明らかにするため、siRNAによるILK分子のノックダウン試験を実施した結果、牛血清などの刺激によって増強されるAktのThr308のリン酸化が強く抑制された。すなわち、インテグリンからアダプター分子であるILKを介したクロストークによりAktシグナルが増強される可能性が示唆された (図2)。

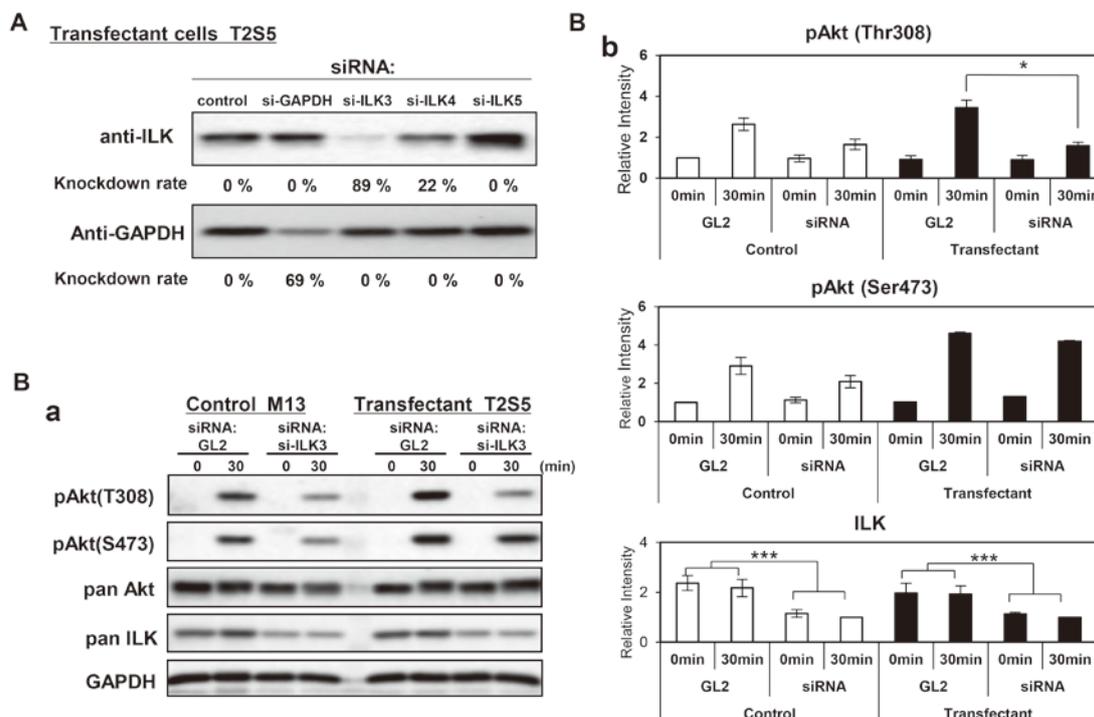


図2A siRNAを用いたILK分子ノックダウン効率のWestern blottingによる確認

図2B siRNAを用いたILK分子ノックダウンによるAktシグナルの変化(a)および定量化(b)

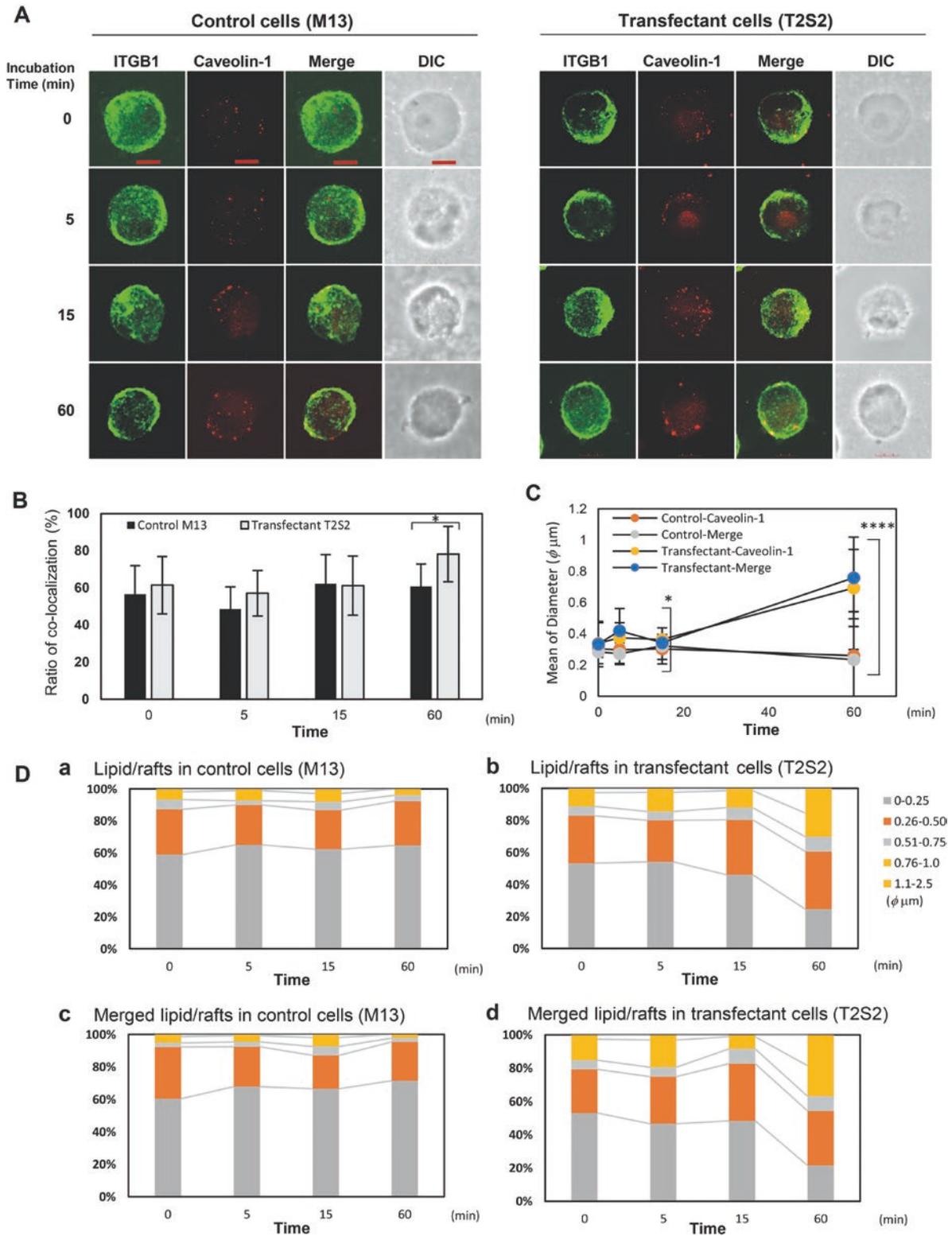


図3 牛血清刺激におけるインテグリン $\beta$ 1およびCaveolin-1の細胞内局在の経時的観察  
 A 共焦点レーザー顕微鏡による経時的観察 (インテグリン $\beta$ 1(ITGB1, green), Caveolin-1(red))  
 B 共局在の割合比率 (共局在由来dot(yellow)/Caveolin-1由来dot(red), n=10, \* ; p<0.01)  
 C ラフト様ドメインの平均直径 (Caveolin-1由来dot(red)の直径を計測, n=10, \* ; p<0.05, \*\*\*\* ; p<0.0005)  
 D ラフト様ドメインの組成比率 (コントロール細胞(a, c), 安定発現株(b, d), 各細胞の250以上のdot profileを測定)

## 2. インテグリン分子の局在変化

安定発現株ではGalNAc-DSLc4糖鎖抗原および一部のインテグリン $\beta$ 1分子がラフト画分に局在していることがこれまでに明らかになっており、GalNAc-DSLc4糖鎖抗原の発現が細胞膜上でのインテグリンの局在を制御している可能性が示唆された。そこで、GalNAc-DSLc4糖鎖抗原がラフトドメインに及ぼす影響について調べるため、牛血清刺激によるインテグリン $\beta$ 1およびCaveolin-1（ラフトマーカー）の共局在変化を共焦点レーザー顕微鏡により経時的に解析した（図3A）。血清による刺激60分後には、GalNAc-DSLc4安定発現株においてインテグリン $\beta$ 1とCaveolin-1の共局在している割合が増え（図3B）、コントロール細胞株より大きな集合体が形成された（図3C, 3D）。さらに、ラミニン表面に対する細胞接着時のGalNAc-DSLc4糖鎖抗原およびインテグリン $\beta$ 1の局在の動態について解析した（図4）。接着開始から60分後の接着形態を比較すると、未処理表面よりもラミニン表面に対するGalNAc-DSLc4発現細胞の接着面積はかなり大きく、細胞側面や接着面の先端部分にインテグリン $\beta$ 1とGalNAc-DSLc4が共局在することでラミニンと相互作用している様子が明らかになった（図4B）。これらの結果から、ラフト様ドメインの肥大化が、刺激に対する細胞内シグナルの増強に寄与していると考えられた。

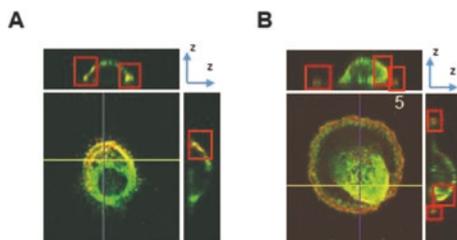


図4 未処理表面(A) およびラミニン表面(B) 接着時(60分後)におけるインテグリン $\beta$ 1およびGalNAc-DSLc4抗原の細胞内局在の様子(インテグリン $\beta$ 1(ITGB1, green), GalNAc-DSLc4(red))

## 3. 悪性形質に対するRM2抗体の効果

GalNAc-DSLc4抗原に対する特徴抗体として知られるRM2抗体の添加により、この抗原の発現量が異なる腎癌細胞株の悪性表現型がどのように変化するかを、MTT assayおよびBoyden chamber法（浸潤能）により調べた（図5）。GalNAc-DSLc4を発現している腎癌細胞株（OS-RC-2細胞、RCC10RGB細胞、VMRC-RCW細胞）において増殖能が抑制された（図5A）。また、OS-RC-2細胞に関しては、浸潤能の抑制も確認された（図5B）。

これに対し、GalNAc-DSLc4を発現していないSK-RC-29細胞では増殖能・浸潤能のどちらも抑制されなかった。安定発現株を用いた実験においてもRM2抗体による抑制効果が既に確認されている [3]。これらの結果から、細胞膜表面のGalNAc-DSLc4抗原をRM2抗体によってマスクすることで悪性形質をコントロールできる可能性が示された。

### 【考察】

これまでに、樹立したGalNAc-DSLc4安定発現株において、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要因としてPI3K経路の活性化増強が関与する事やGalNAc-DSLc4が脂質ラフト中に局在し、インテグリン等の膜タンパクの局在が変わる事を明らかにしてきた。しかしながら、インテグリンの機能が増強されることや、PI3K-Aktシグナル経路が活性化されるメカニズムについては、アダプター分子の存在が推察されていたものの解明できていなかった。ガングリオシドがインテグリンからのシグナルを増強あるいは抑制することにより、増殖能や浸潤能に関与するという報告はこれまでもいくつかあり、その一例としては、メラノーマ細胞に発現しているGD3がインテグリンの機能を増強することで増殖能や浸潤能といった悪性形質を増強する事が報告されている [4-7]。その報告においても、インテグリン

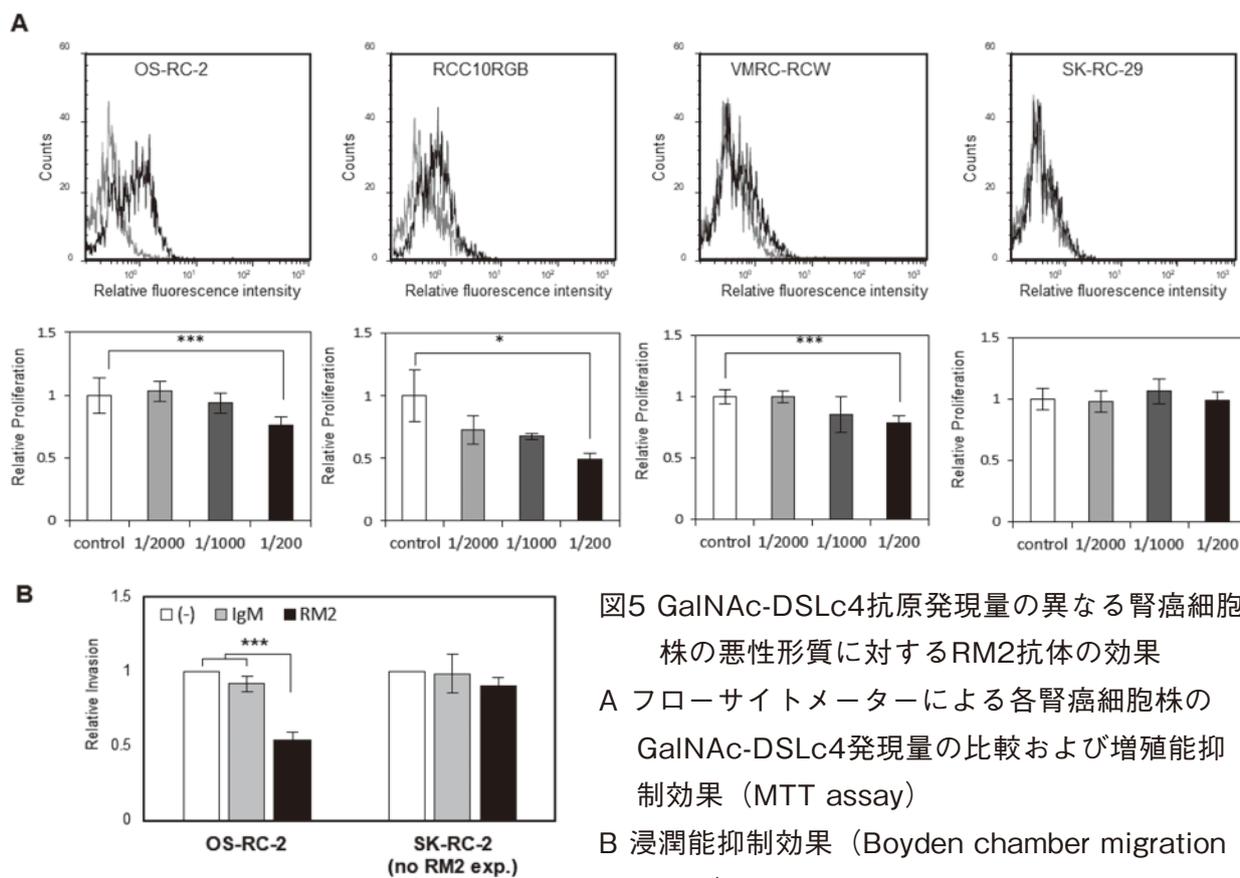


図5 GalNAc-DSLc4抗原発現量の異なる腎癌細胞株の悪性形質に対するRM2抗体の効果

A フローサイトメーターによる各腎癌細胞株のGalNAc-DSLc4発現量の比較および増殖能抑制効果 (MTT assay)

B 浸潤能抑制効果 (Boyden chamber migration assay)

ン分子と成長因子受容体の接近によるシグナルのクロストークが観察されており、そのアダプター分子としてILK分子の介在が確認されている [7]。本研究においても、ILK分子のノックダウン実験の結果からILK分子の関与が認められ、インテグリンと成長因子受容体のラフトドメインへの局在充進による近接効果によりシグナルのクロストークが増強することが明らかとなった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析からは、牛血清刺激によって安定発現株の細胞膜表面に集積するラフト様ドメインの肥大化が起こることや、ラフト様ドメインにcaveolin-1分子とインテグリン $\beta$ 1分子が共局在していることを見出した。また、ラミニン表面と強く接触している細胞膜の端部分では、インテグリン分子だけでなくGalNAc-DSLc4が共局在する様子が確認された。これまでに生細胞上のラフト様ドメインに関しては、K. Simonsらが「小

さなラフトはタンパク質—タンパク質間またはタンパク質—脂質間の相互作用によって安定化し、大きなプラットフォームを形成する。」と、提唱している [8, 9]。本研究で得られた結果からも、GalNAc-DSLc4抗原という糖脂質の発現増加によりラフト様ドメインに局在するインテグリン分子が増え、ドメイン内でインテグリン分子と成長因子受容体が接近することでタンパク—脂質間の相互作用が各刺激時に安定化し、ダイナミックなドメイン構造を形成して、より機能的なプラットフォームとして働くことで悪性を誘導する細胞内シグナルが増強すると考えられる (図6)。また、GalNAc-DSLc4を発現している腎癌細胞株やGalNAc-DSLc4安定発現株の悪性形質が、RM2抗体の添加により抑制されることから、本抗原に対する良質な抗体を作成できれば、抗体治療への可能性を見出せるかもしれないと期待している。

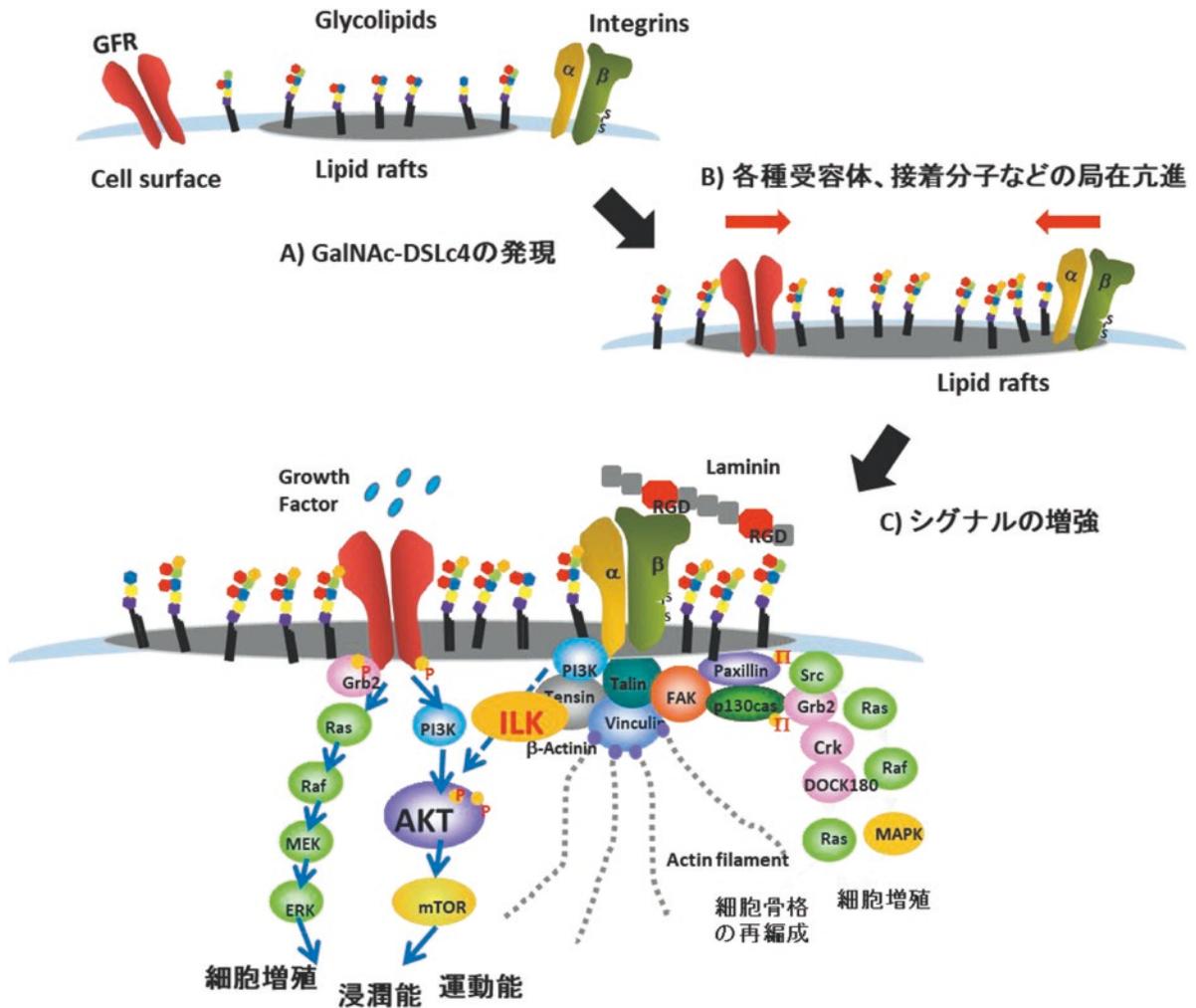


図6 腎癌悪性化のメカニズム：GalNAc-DSLc4の発現（A）により、成長因子受容体およびインテグリン分子等のLipid raftへの局在が亢進（B）し、Lipid raft様集合体が肥大化することによりシグナルが増強される（C）。

【おわりに】

本研究のなかでGalNAc-DSLc4糖鎖抗原が腎癌細胞の悪性化に大きく関与していることを明らかにすることができた。しかしながら、高転移性の細胞株から発見されたGalNAc-DSLc4抗原の発現が、腎癌の肺への転移に関与しているかについては、まだ解明できていないのが現状である。癌の遠隔転移は多段階で起こることから、悪性度が高まった癌細胞であっても遠隔転移は容易ではないと推測される。腎癌細胞の肺転移については、腎癌細胞の悪性化だけでなく、転移を促進する他の要因の存在も考えられる。近年、癌細胞が分泌するエクソソーム（exosome）と呼

ばれる顆粒が癌の転移において重要な役割を果たしていることが明らかになり注目を集めている。癌細胞が分泌するエクソソームは、癌が生存しやすいように有利に働き、細胞外の環境整備、免疫細胞の抑制、周辺の正常細胞（間質細胞、血管内皮細胞）との相互作用、新生血管の誘導など、細胞の形質を変化させることで「がん微小環境」を構築することが知られる。今後は、GalNAc-DSLc4発現株から分泌されるエクソソームの「がん微小環境」構築への関与の有無を検討し、転移メカニズムの解明および治療応用に向けて尽力していきたい。

## 【謝辞】

本研究の成果は、Scientific Reports誌へ掲載されました [10]。論文を纏めるにあたり、長い間ご指導を頂いた共同研究者の中部大・古川鋼一先生、抗体を提供して頂いた東北大・伊藤明宏先生、多くのご助言を頂いた野口研・松田昭生常務理事および野口研究所の皆様がこの場を借りて深く感謝いたします。

## 【参考論文】

1. Senda, M., Ito, A., Tsuchida, A., Hagiwara, T., Kaneda, T., Nakamura, Y., Kasama, K., Kiso, M., Yoshikawa, K., Katagiri, Y., Ono, Y., Ogiso, M., Urano, T., Furukawa, K., Oshima, S., and Furukawa, K. (2007) *Biochem. J.*, **402**, 459-470
2. Ito, A., Levery, S. B., Saito, S., Satoh, M., and Hakomori, S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 16695-16703
3. 土田明子 (2016) 野研時報第59号41-47
4. Hamamura, K., Furukawa, K., Hayashi, T., Hattori, T., Nakano, J., Nakashima, H., Okuda, T., Mizutani, H., Hattori, H., Ueda, M., Urano, T., Lloyd, K. O., and Furukawa, K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 11041-11046
5. Hamamura, K., Tsuji, M., Ohkawa, Y., Nakashima, H., Miyazaki, S., Urano, T., Yamamoto, N., Ueda, M., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 513-519
6. Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Miyata, M., Hamamura, K., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 14-19
7. Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Hamamura, K., Kambe, M., Miyata, M., Tajima, O., Ohmi, Y., Yamauchi, Y., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 27213-27223
8. Lingwood, D. and Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. (2010) *Science* **327**, 46-50
9. Simons, K. and Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. (2010) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 688-699
10. Tsuchida, A., Senda, M., Ito, A., Saito, S., Kiso, M., Ando, T., Harduin-Lepers, A., Matsuda, A., Furukawa, K., and Furukawa, K. Roles of GalNAc-disialyl Lactotetraosyl Antigens in Renal Cancer Cells. (2018) *Sci. Rep.* **8**, 7017

# *Tannerella* 属細菌由来新規 endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase、 Endo-Tsp1006の解析

Analysis of the novel endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase,  
Endo-Tsp1006, from *Tannerella* sp.

糖鎖生物研究室 HGPプロジェクト 高島 晶  
Shou TAKASHIMA

## 1. はじめに

糖タンパク質の糖鎖には、タンパク質中のSerあるいはThr残基の側鎖の水酸基を介して糖鎖が結合したO-結合型糖鎖と、タンパク質中のNxS/T (xはPro以外の任意のアミノ酸) 配列にあるAsn(N)の側鎖のアミド基を介して結合したN-結合型糖鎖がある。このうち、N-結合型糖鎖には、構成糖や糖鎖構造の違いから、おもにマンノース (Man) で構成されるハイマンノース型糖鎖、シアル酸 (Sia)、ガラクトース (Gal)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、フコース (Fuc) などを含み、複雑な分岐構造をとることもある複合型糖鎖、およびハイマンノース型糖鎖と複合型糖鎖の特徴をあわせもつハイブリッド型糖鎖が存在する (図1)。

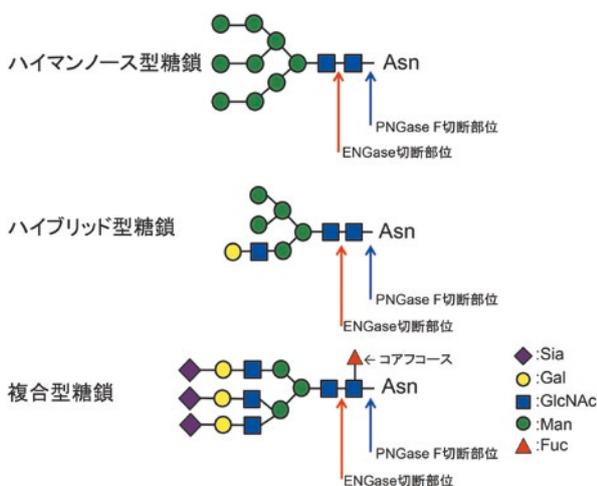


図1 N-結合型糖鎖の種類とPNGase FおよびENGaseによる切断部位

糖タンパク質にどのような糖鎖が結合しているのかを解析する手段として、以前から酵素を利用する方法が用いられてきている。Peptide:N-Glycosidase F(PNGase F)は、N-結合型糖鎖の最も還元末端側に存在するN-アセチルグルコサミンとAsn残基間の結合を切断する酵素で (図1)、N-結合型糖鎖の有無の確認や糖鎖試料の切り出し調製の際によく利用される酵素である。一般に、PNGase Fによる糖鎖切断反応は、N-結合型糖鎖の構造の影響を受けず、ハイマンノース型糖鎖、ハイブリッド型糖鎖、複合型糖鎖のいずれも切断することができる (ただし、Asnに結合したGlcNAcに $\alpha$ 1,3結合をしたFucがついている糖鎖は切断できない)。また、PNGase Fによる糖鎖切断反応の特徴として、糖鎖が結合しているAsn残基が、糖鎖切断後にはAspに変換されることが知られている。

N-結合型糖鎖を切断する酵素としてもう一つ活用されている酵素に、Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase(ENGase)がある。この酵素はN-結合型糖鎖の還元末端側に存在するN, N'-ジアセチルキトビオースユニット間を切断する酵素である (図1)。従って、切断反応後には糖鎖が結合していたAsn残基上に1分子のGlcNAcが残留するが、PNGase Fの場合と異なり、AsnがAspに変換されることはない。ENGaseが切断できる糖鎖は各酵素の基質特異性に依存する。例えば、糖鎖生

物学分野でよく利用されているENGaseとして、Endo Hが知られているが [1]、この酵素はハイマンノース型糖鎖や一部のハイブリッド型糖鎖は切断できるが、複合型糖鎖を切断することはできない。

N-結合型糖鎖については、このように糖鎖をまるごと、あるいは糖鎖の大部分を切り出すエンドグリコシダーゼが知られているが、O-結合型糖鎖を切断する酵素には、そのような活性を有する酵素が見出されていない。そのため、O-結合型糖鎖の切断には、糖鎖の非還元末端から作用するシアリダーゼ、ガラクトシダーゼ、ヘキソサミニダーゼといったエキソグリコシダーゼや、Ser/Thrに結合している2糖を切断するO-glycanaseなどが用いられている。

糖タンパク質糖鎖を切断する酵素としては上述したような酵素が存在するが、近年、ENGaseおよびその変異体を利用した糖鎖リモデリング法が開発されたことにより、本酵素に対する関心が高まってきている。一般に、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は一様ではなく、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。すなわち、ある糖タンパク質の集団は、タンパク質（アミノ酸配列）的には

同一集団であっても、糖鎖構造的には不均一な集団であるといえる。糖鎖の構造がタンパク質の機能や活性に影響を与える場合、このような不均一な糖鎖が結合した糖タンパク質よりも、均一な機能性糖鎖のみが結合した糖タンパク質のほうが機能や活性が増強されると考えられる。こうした均一構造の糖鎖のみが結合した糖タンパク質を創製するには、まず糖タンパク質に結合している様々な構造の糖鎖をENGaseで除去し、糖タンパク質上にGlcNAc（あるいは $\alpha$ 1,6結合をしたFuc [コアフコース] のついたGlcNAc）が残留した糖タンパク質を調製する。ここでは、これをアクセプター基質とよぶ。つぎにこのGlcNAc残基に、化学合成等によって調製した均一構造の機能性糖鎖を、糖転移活性を有するENGaseの変異体＝グライコシダーゼを用いて結合させればよい（図2）。現在、この糖鎖リモデリング法を用いて、各種糖タンパク質糖鎖の改変や糖鎖構造との活性相関といった機能解析が行われるようになってきており、野口研究所のHGP (Homogenous GlycoProtein)プロジェクトでも、糖鎖改変抗体の作製とその機能解析を行ってきている [2, 3]。

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

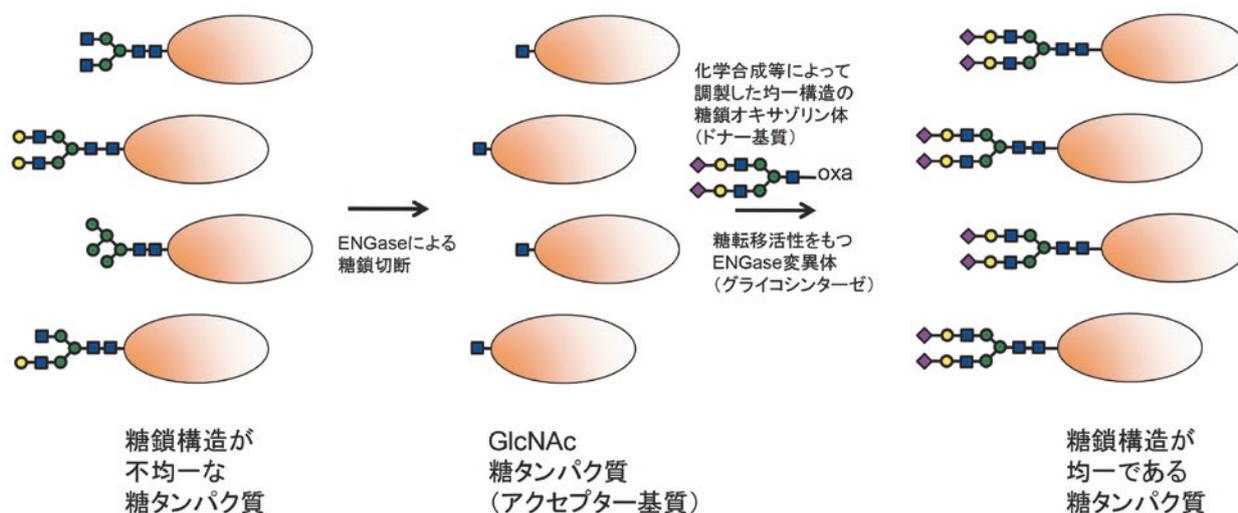


図2 ENGaseおよびその変異体を活用した糖鎖リモデリング法

enZYmes)の分類によると、GH(Glycoside Hydrolase)18とGH85の2つのファミリーに分けられる。GH18ファミリーに属するENGaseの活性部位にはDxxDxDxE (xは任意のアミノ酸) というモチーフが保存されている。このうち、Glu(E)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Asp(D)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 [4]。これに対し、GH85ファミリーに属するENGaseの活性部位にはNx E (xは任意のアミノ酸) という配列が保存されている。こうした活性部位のアミノ酸残基などに変異を導入して、糖鎖切断活性を抑制するとともに糖転移活性を発揮させたENGase変異体が、上述した糖鎖リモデリング法におけるグライコシンターゼとして活用されている [5, 6]。

今後、ENGaseを用いた糖鎖リモデリング法が様々な糖タンパク質に適用される可能性が考えられるが、その際、アクセプター基質となるGlcNAc糖タンパク質の調製やドナー基質の原料取得などに、各種ENGaseが活用されることになるだろう。このうち、いわゆるヒト型糖鎖とよばれているシアル酸含有複合型糖鎖や、複雑な構造をした多分岐複合型糖鎖などを切断できるENGaseは、特にその需要が高いと考えられる。本稿では、多分岐構造を含む複合型糖鎖に対する切断活性をもつ新規ENGaseについて紹介するとともに、本酵素と既存のENGaseを対象として、各種糖タンパク質基質に対する糖鎖切断活性を比較検討した結果について論じたい。

## 2. *Tannerella*属細菌由来新規ENGase

これまで、糖タンパク質上にある3本鎖以上の多分岐複合型糖鎖を効率よく切断する活性をもつENGaseはあまり報告されていなかった。野口研究所のHGPプロジェクトでは、そのような活性をもち、かつ組換え酵

素の大量調製が容易にできる酵素の取得を目指して、データベースサーチを中心とした新規ENGaseの探索を行ってきた。その結果、複数の新規ENGase候補の中から、今回紹介する*Tannerella*属細菌由来新規ENGaseのEndo-Tsp1006を見出した。*Tannerella*属細菌はヒトの口腔や腸などに生息しており、口腔に生息するものには歯周病の原因菌として知られているものがある。本酵素の遺伝子情報 (GenBank: CAYC010000092.1) は、ヒトの腸メタゲノム解析から得られたもので、データベースには機能未知タンパク質 (GenBank: CCY37287.1) として登録されていたが、解析の結果、*Tannerella* species由来の全長アミノ酸が1006残基のENGaseであることが判明したことから、Endo-Tsp1006と命名した。本酵素はGH85ファミリー酵素間で保存されているNx Eモチーフを有していたことから、GH85ファミリーに属するENGaseであると考えられた。GH85ファミリーに属する既知ENGaseとの全長アミノ酸配列比較を行ったところ、*Prevotella*属細菌由来の全長1009アミノ酸残基のENGase (EndoPM a [7] またはPme\_A7285 [8]) と52.2%の相同性を示した。一方、Endo-M [9] やEndo-CC1 [10] との相同性は低く、これらの酵素とは分子進化の観点からすると別起源であることが示唆された。

## 3. Endo-Tsp1006の大腸菌での発現

Endo-Tsp1006の組換え酵素を取得するため、本遺伝子の大腸菌での発現系を構築することにした。まず、Endo-Tsp1006のアミノ酸配列をもとに、大腸菌の使用コドンに最適化した本遺伝子の人工遺伝子を合成し、これをpGEX-6P-1ベクター (GEヘルスケア) に挿入した。この発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌の培養液に、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加して、Endo-Tsp1006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誘導生産させた。つぎに、遠心分離によって大腸菌を集菌し、菌体を超音波処理にて破碎して、可溶性のGST融合タンパク質を抽出した。これをグルタチオン-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、Endo-Tsp1006

のN末端側に付加されていたGSTタグを、PreScission Protease (GEヘルスケア) を用いて除去して、精製標品のEndo-Tsp1006を得た (図3)。この発現系では、100mLの培養あたり、約0.5mgの可溶性組換えEndo-Tsp1006が得られた。

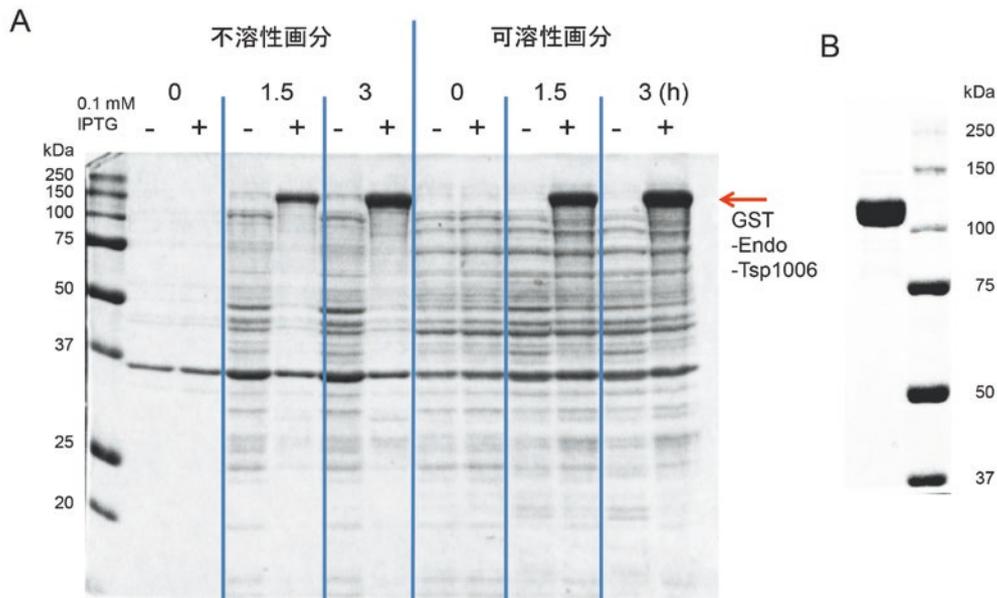


図3 大腸菌におけるEndo-Tsp1006の発現

A. 大腸菌におけるGST-Endo-Tsp1006の誘導生産

B. アフィニティー精製したEndo-Tsp1006 (GSTタグは切除済み)

#### 4. 各種ENGaseによる糖タンパク質糖鎖の切断

Endo-Tsp1006の酵素学的諸性質の詳細については他所に譲るが、ここでは本酵素と既存のENGaseについて、各種糖タンパク質糖鎖の切断パターンを比較検討した結果について紹介する。本研究では、Endo-Tsp1006以外の酵素については、複合型糖鎖の切断活性を有するENGaseを中心に、市販品が入手可能な酵素を選択して用いた (表1)。ただし本研究では、Endo-M (東京化成)、Endo H (NEW ENGLAND BioLabs)、PNGase F (Glycopeptidase F; タカラバイオ) は市販品を利用したが、他の酵素は大腸菌に生産させた組換え酵素を自家調製したものをを用いた。

表1 糖鎖切断実験に用いたENGaseと反応条件

酵素	GH family	反応温度(°C)	使用緩衝液
Endo H	18	37	50 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)
Endo-M	85	37	50 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)
Endo-CC1	85	37	50 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)
Endo F2	18	37	50 mM クエン酸緩衝液(pH 4.5)
Endo F3	18	37	50 mM クエン酸緩衝液(pH 4.5)
Endo S	18	37	50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)
Endo S2	18	37	50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)
Endo-Tsp1006	85	45	50 mMクエン酸緩衝液(pH 5.0)

PNGase Fはタカラバイオ添付説明書の変性条件反応プロトコールに従って用いた。

本実験で使用したENGaseの基質特異性であるが、Endo Hは上述したようにハイマンノース型糖鎖や一部のハイブリッド型糖鎖を切断する酵素である [1]。Endo-M、Endo-

CC1は、ともにハイマンノース型糖鎖、ハイブリッド型糖鎖、複合型糖鎖の切断活性を有するが [1]、ハイマンノース型糖鎖と複合型糖鎖に対する活性を比べると、両酵素ともハイマンノース型糖鎖に対する活性のほうが高い [9, 10]。また、Endo F2は2本鎖複合型糖鎖に対する嗜好性が高い酵素であり、Endo F3はコアフコースつきの2本鎖および3本鎖複合型糖鎖に対する嗜好性が高い酵素である [1]。Endo SはIgG抗体重鎖のFc領域に結合している複合型糖鎖を特異的に切断する酵素であるが、Endo S2はIgG抗体重鎖のFc領域に結合している複合型糖鎖に加え、ハイマ

ンノース型糖鎖やハイブリッド型糖鎖も切断できる酵素であり、抗体以外にも  $\alpha$ 1-acid glycoprotein ( $\alpha$ 1-AGP)の2本鎖複合型糖鎖も切断できることが報告されている [1, 11, 12]。

糖タンパク質糖鎖の切断反応は、各酵素 (0.25 ~ 0.5  $\mu$ g) と各種糖タンパク質 (1.0 ~ 2.0  $\mu$ g) を表1に示した緩衝液中で混和し (反応液量10  $\mu$ L)、各酵素に適した反応温度で18時間行った。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) にて泳動し、糖タンパク質糖鎖の切断状況を解析した結果を図4にまとめた。

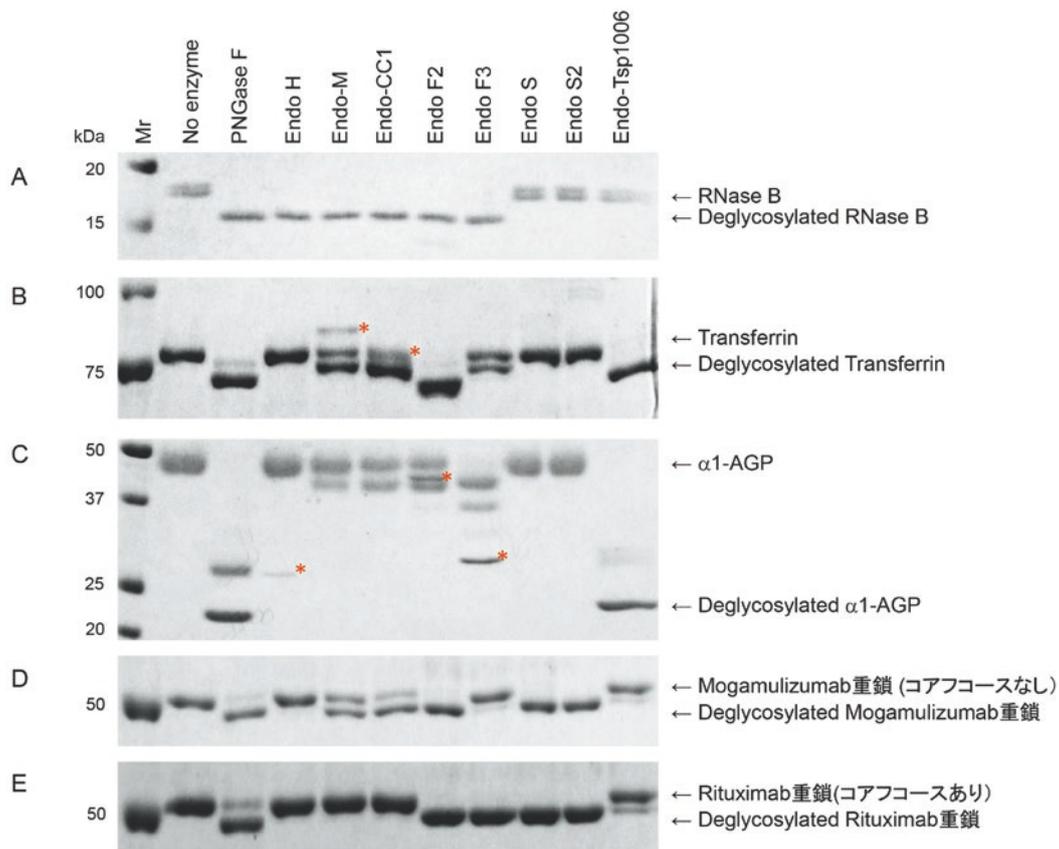


図4 各種ENGaseによる糖タンパク質糖鎖の切断

A. RNase Bを基質とした酵素反応産物の泳動結果

B. Transferrinを基質とした酵素反応産物の泳動結果

C.  $\alpha$ 1-AGPを基質とした酵素反応産物の泳動結果

D. 抗体医薬品Mogamulizumabを基質とした酵素反応産物の泳動結果

E. 抗体医薬品Rituximabを基質とした酵素反応産物の泳動結果

酵素溶液由来のバンドには赤色のアスタリスクを付した。Mr, 分子量マーカー。

まずAのカラムでは、糖タンパク質基質として牛臍臓由来のRibonuclease B(RNase B)を用いた酵素反応の結果を示している。RNase BにはN-結合型糖鎖の付加部位が1カ所あり、そこにはハイマンノース型糖鎖が結合している。その内訳は、マンノースが5残基からなるM5型糖鎖からマンノースが9残基からなるM9型糖鎖まで、それぞれM5:M6:M7:M8:M9 = 57:31:4:7:1であるとの報告がある [13]。酵素処理を施していない糖鎖が結合した状態のRNase Bは約17kDaの位置にバンドが観察されるが、PNGase F処理ですべての糖鎖を除去すると、約15kDaの位置にバンドがシフトした。また、ハイマンノース型糖鎖の切断活性がある Endo Hや、もともと複合型糖鎖よりもハイマンノース型糖鎖を好基質とする Endo-M、Endo-CC1といった酵素の処理でも同様のバンドのシフトが観察された。さらに、複合型糖鎖に対する切断活性が強調されている Endo F2やEndo F3の場合でも、反応系に加えている酵素量が過剰であり、かつ長時間反応のため、弱いながらもともと備わっているハイマンノース型糖鎖に対する切断活性が発揮されて [14]、同様のバンドシフトが観察されたと考えられる。一方、IgG抗体重鎖のFc領域に結合している複合型糖鎖を切断する Endo Sや、同じく抗体上の各種N-結合型糖鎖に対する切断活性を有する Endo S2の処理では、RNase Bのハイマンノース型糖鎖は切断されなかった。また、Endo-Tsp1006についても、今回の反応条件ではRNase Bのハイマンノース型糖鎖はほとんど切断されなかった。

つぎにBのカラムであるが、ここでは糖タンパク質基質としてヒト由来のTransferrinを用いた酵素反応の結果を示している。TransferrinにはN-結合型糖鎖の付加部位が2カ所あり、そこには、シアル酸含有の2本鎖複合型糖鎖が主要構成成分として結合してい

ると考えられるが [15]、それ以外にも健常時から病態時において様々な構造バリエーションの糖鎖が結合していることが報告されている [16-18]。酵素処理を施していない糖鎖が結合した状態のTransferrinは約76kDaの位置にバンドが観察されるが、PNGase Fで糖鎖を切断すると、約71kDaの位置にメインバンドがシフトした。Transferrinの糖鎖は、Endo F2とEndo-Tsp1006の処理では、2カ所ある糖鎖付加部位に結合している糖鎖の大部分が切断された。すなわちEndo-Tsp1006は、N-結合型糖鎖のうち、複合型糖鎖を好基質としている酵素であると考えられた。Endo-MやEndo-CC1の処理では、Transferrinにある2カ所の糖鎖付加部位のうち、いずれか1カ所の糖鎖付加部位に結合している糖鎖のみが切断されたと考えられる。またEndo F3処理でも一部の糖鎖の切断が確認された。通常、Transferrinの糖鎖はコアフコースをほとんど含まないため、Endo F3の好基質ではない。しかし、反応系に加えている酵素量が過剰であり、かつ長時間反応のため、Endo F3が有するコアフコースなしの複合型糖鎖に対する微弱な活性 [19] が発揮されたと考えられる。一方、Endo Hは複合型糖鎖に対する切断活性がなく、またEndo SやEndo S2はIgG抗体重鎖のFc領域に結合している糖鎖を好基質としているため、これらの酵素処理ではTransferrinの糖鎖切断は認められなかった。

Cのカラムは、糖タンパク質基質としてヒト由来の $\alpha$ 1-AGPを用いた酵素反応の結果を示している。 $\alpha$ 1-AGPにはN-結合型糖鎖の付加部位が5カ所あり、それらには、4本鎖:3本鎖:2本鎖= 47.7:37.9:14.4の割合で複合型糖鎖が結合しているとの報告がある [20]。また、これらの糖鎖には $\alpha$ 2,3-および $\alpha$ 2,6-結合したシアル酸や、 $\alpha$ 1,3-,  $\alpha$ 1,6-および $\alpha$ 1,2-結合したフコースが存在し得るとされている [21, 22]。酵素処理を施していない糖鎖が結合した状態の $\alpha$ 1-AGPは約43kDaの位

置にバンドが観察されるが、PNGase Fで糖鎖を切断すると、約22kDaの位置にメインバンドがシフトした。また約27kDaのバンドからは、PNGase Fでは切断できない/されにくい糖鎖の存在が示唆される。 $\alpha$ 1-AGPの糖鎖は、Endo-Tsp1006の処理では他のENGaseの場合と異なり、ほとんどの糖鎖が切断された。すなわち本酵素は、3～4本鎖糖鎖といった分岐構造を含む複合型糖鎖の切断活性を有していることが判明した。Endo-M、Endo-CC1、Endo F2の処理では、おそらく $\alpha$ 1-AGPの2本鎖複合型糖鎖のみが切断されたと考えられる。Endo F3の処理では、それに加えて一部の3本鎖複合型糖鎖も切断されたと思われる。一方、Endo H、Endo SおよびEndo S2の処理では、Transferrinの場合と同様に $\alpha$ 1-AGPの糖鎖は切断されなかった。なお、Endo S2については、 $\alpha$ 1-AGPの2本鎖複合型糖鎖の切断活性が報告されているが [11]、これは論文に記載がないので詳細は不明であるが、おそらくウシ由来の $\alpha$ 1-AGPと考えられる。データは省略するが、ウシ由来の $\alpha$ 1-AGPについては、我々も一部の糖鎖がEndo S2によって切断されることを確認している。

DとEのカラムは、糖タンパク質基質としてそれぞれ抗体医薬品のMogamulizumabとRituximabを用いた酵素反応の結果を示している。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Fc領域にあるAsn297残基はN-結合型糖鎖の結合部位となっている。抗体は標的抗原に高い親和性と特異性をもって結合することが特徴であるが、その際に抗体依存性細胞傷害活性や補体依存性細胞傷害活性といったエフェクター機能が発揮されることも医薬品としては重要である。このうち、コアフコースのない糖鎖が結合したIgG

抗体は、コアフコースがついた糖鎖が結合したIgG抗体より、はるかに高い抗体依存性細胞傷害活性を発揮することが報告されている [23, 24]。Mogamulizumabは、コアフコースのない糖鎖が結合した抗体を作り出すポテリジェント技術 [25] によって作製された抗体医薬品である。IgG抗体重鎖のFc領域に存在している糖鎖付加部位には、おもに2本鎖複合型糖鎖が結合している [26]。酵素処理を施していない糖鎖が結合した状態のMogamulizumab重鎖は約51kDaの位置にバンドが観察されるが、PNGase Fで糖鎖を切断すると、約49kDaの位置にメインバンドがシフトした。Mogamulizumab重鎖の糖鎖は、Endo F2、Endo S、Endo S2の処理では大部分が切断されたが、Endo-MやEndo-CC1の処理では、一部の糖鎖は切断されずに残存していた。また、Mogamulizumab重鎖の糖鎖はコアフコースが結合していないため、Endo F3処理ではほとんど切断されなかった。一方、Rituximab重鎖の糖鎖の大部分にはコアフコースが結合しているため、Endo F3処理では、Endo F2、Endo S、Endo S2処理のときと同様にほとんどの糖鎖が切断された。対照的に、Rituximab重鎖の糖鎖はEndo-MやEndo-CC1の処理ではほとんど切断されず、コアフコースの存在がこれらの酵素による糖鎖切断を阻害したと考えられる。また、本実験に用いた抗体にはおもに複合型糖鎖が結合しているとはいえ、Endo-Tsp1006は抗体糖鎖に対する切断活性が低く、コアフコースの有無にかかわらず一部の糖鎖しか切断できなかった。抗体糖鎖は抗体分子の内側に結合しているため、おそらく本酵素は抗体糖鎖にアクセスしにくいのではないかと思われる。なおEndo Hは、今回用いた複合型糖鎖の結合した抗体の糖鎖は切断できなかったが、ハイマンノース型糖鎖が結合した抗体の糖鎖であれば切断できることを確認している。

ところで上記実験では、長時間反応で

行った結果を示したが、Endo-Tsp1006の $\alpha$ 1-AGP糖鎖の切断については、より短い時間で糖鎖切断反応を追跡した結果を紹介したい。Endo-Tsp1006 (2  $\mu$ g) と $\alpha$ 1-AGP (100  $\mu$ g) を50 mMクエン酸緩衝液 (pH 5.0) 中で混和し (反応液量50  $\mu$ L)、経時的にサンプリングしつつ、45°Cで120分まで反応させた。この反応産物をSDS-PAGEにて泳動し、 $\alpha$ 1-AGPの糖鎖切断状況を解析した結果を図5に示す。この反応条件では、Endo-Tsp1006によって $\alpha$ 1-AGPの糖鎖が経時的に切断されていき、反応開始から120分までには大部分の糖鎖が切断されたことがわかる。基質の種類や量にもよるが、反応条件を至適化すれば、Endo-Tsp1006による糖鎖切断反応は、市販されている他のENGaseと同様に実施できると考えられる。

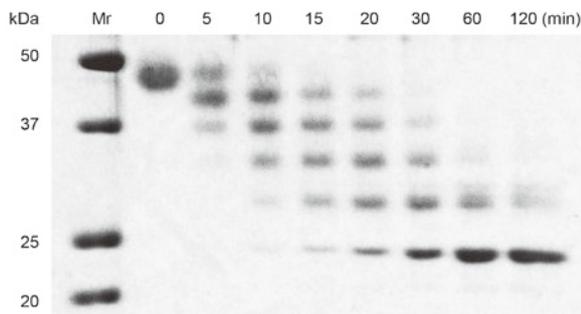


図5 Endo-Tsp1006による $\alpha$ 1-AGP糖鎖の切断反応。Mr, 分子量マーカー。

## 5. まとめ

本研究では、*Tannerella*属細菌由来新規ENGaseのEndo-Tsp1006と、基質特異性の異なる既存の各種ENGaseの糖タンパク質糖鎖切断活性の比較検討を行った。その結果、Endo-Tsp1006は、本実験で用いた既存のENGaseと異なり、多分岐複合型糖鎖に対する切断活性が高いことが判明した。従って本酵素は、既存のENGaseでは取扱いにくかった多分岐複合型糖鎖含有糖タンパク質を対象として、多分岐複合型糖鎖試料の調製や糖鎖リモデリングに用いるアクセプター基質の調

製に利用できると考えられる。一方、ハイマンノース型糖鎖や抗体糖鎖に対する本酵素の切断活性は低かったため、こういった糖鎖の切断に関しては、既存のENGaseを利用したほうがよいだろう。基質特異性の異なる様々なENGaseをそろえ、それらを適材適所で有効活用できるようになれば、ENGaseを利用した糖鎖リモデリング法の適用範囲も広がっていくと考えられる。その結果として、新たな糖タンパク質製剤や糖鎖関連製品の開発、実用化に結びつくことを期待したい。

## 謝辞

本研究を実施するにあたり、野口研究所松田昭生常務理事、天野純子研究調査担当、高田美生糖鎖生物研究室長ならびにHGPプロジェクトメンバー各位のご指導とご鞭撻に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Fairbanks AJ. (2017) *Chem. Soc. Rev.* **46**, 5128-5146.
2. 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.
3. Tsukimura W, Kurogochi M, Mori M, Osumi K, Matsuda A, Takegawa K, Furukawa K, Shirai T. (2017) *Biosci. Biotech. Biochem.* **81**, 2353-2359.
4. Huang W, Giddens J, Fan SQ, Toonstra C, Wang LX. (2012) *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12308-12318.
5. Giddens JP, Lomino JV, Amin MN, Wang LX. (2016) *J. Biol. Chem.* **291**, 9356-9370.
6. Umekawa M, Li C, Higashiyama T, Huang W, Ashida H, Yamamoto K,

- Wang LX. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 511-521.
7. 伊藤和央 (2014) 国際特許公開番号 WO2014/080991.
8. Liu CP, Tsai TI, Cheng T, Shivatare VS, Wu CY, Wu CY, Wong CH. (2018) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 720-725.
9. Fujita K, Kobayashi K, Iwamatsu A, Takeuchi M, Kumagai H, Yamamoto K. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.* **432**, 41-49.
10. Eshima Y, Higuchi Y, Kinoshita T, Nakakita S, Takegawa K. (2015) *PLoS ONE* **10**, e0132859.
11. Sjögren J, Struwe WB, Cosgrave EFJ, Rudd PM, Stervander M, Allhorn M, Hollands A, Nizet V, Collin M. (2013) *Biochem. J.* **455**, 107-118.
12. Sjögren J, Cosgrave EFJ, Allhorn M, Nordgren M, Björk S, Olsson F, Fredriksson S, Collin M. (2015) *Glycobiology* **25**, 1053-1063.
13. Fu D, Chen L, Roger AO. (1994) *Carbohydrate Res.* **261**, 173-186.
14. Trimble RB, Tarentino AL. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1646-1651.
15. Charlwood J, Birrell H, Tolson D, Camilleri P. (1998) *Anal. Chem.* **70**, 2530-2535.
16. Fu D, van Halbeek H. (1992) *Anal. Biochem.* **206**, 53-63.
17. Flahaut C, Michalski JC, Danel T, Humbert MH, Klein A. (2003) *Glycobiology* **13**, 191-198.
18. Yamashita K, Koide N, Endo T, Iwaki Y, Kobata A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 2415-2423.
19. Tarentino AL, Quinones G, Plummer TH Jr. (1995) *Glycobiology* **5**, 599-601.
20. Treuheit MJ, Costello CE, Halsall HB. (1992) *Biochem. J.* **283**, 105-112.
21. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. (2000) *Biochim. Biophys. Acta.* **1482**, 157-171.
22. Mancera-Arteu M, Giménez E, Barbosa J, Paracaula R, Sanz-Nebot V. (2017) *Analytica Chimica Acta* **991**, 76-88.
23. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA, Presta LG. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 26733-26740.
24. 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.
25. 設楽研也 (2009) 薬学雑誌 **129**, 3-9.
26. Mizuochi T, Taniguchi T, Shimizu A, Kobata A. (1982) *J. Immunol.* **129**, 2016-2020.

# カーボンナノチューブ構造の精密有機合成

## Precise synthesis of carbon nanotube structures

名古屋大学大学院理学研究科 特任准教授

JST ERATO 伊丹分子ナノカーボンプロジェクト グループリーダー

瀬川 泰知

Yasutomo SEGAWA

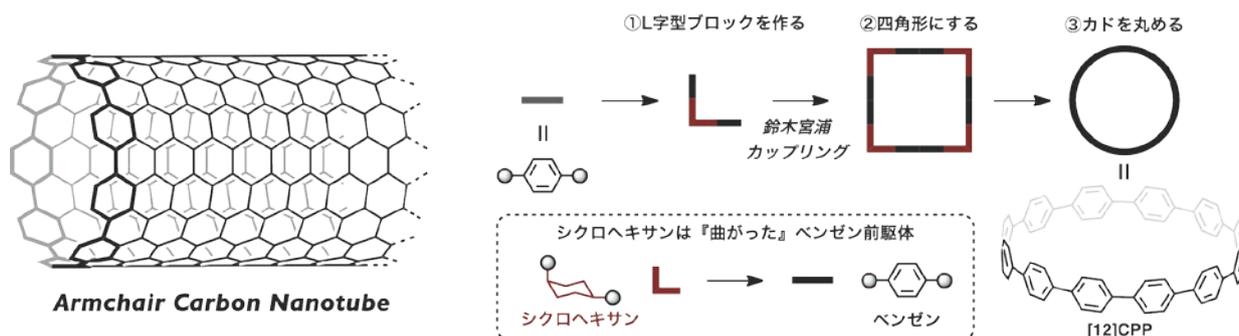
### 背景

カーボンナノチューブ (CNT) は、太さ数ナノ～数十ナノメートル、長さ数マイクロ～数ミリメートルの筒状構造をもち炭素のみからなる物質である。優れた強度と弾性力という機械的特性、熱伝導性や電気的特性、さらには非常に軽いという性質から、CNTは次世代材料として現在最も期待されている物質のひとつである。現在の製法では様々な直径・構造・長さの混合物としてしか得ることができず、またこれらの完全な分離は未だ不可能である。我々が知りうるCNTの性質は全てそれらの平均としての性質を評価しているにすぎないため、CNTが本来有する潜在的価値は計り知れない。

我々は、有機合成化学の手法を用いることで、まずCNTの部分構造であるカーボンナノリングを合成し、さらにこれを伸張させることで純正CNTが得られると考えた。アー

ムチェア型・キラル型・ジグザグ型に対応するカーボンナノリングをそれぞれ、シクロパラフェニレン (CPP)、キラルナノリング、シクラセンと呼ぶ。これらカーボンナノリングにはCNTの直径と側面構造に対応する情報がすでに完璧にインプットされているため、理想的な鋳型であると考えられる。

カーボンナノリングは、先に述べたCNT部分構造としてのみならず、一様に彎曲した終端のない $\pi$ 共役平面という特異な構造をもつことから、1世紀以上に渡って有機化学者の興味の対象であった。しかし、ナノリングを構成するベンゼン環は本来平面であるため、ナノリングには大きなひずみがかかっている。我々は、シクロヘキサンユニットを「曲がったベンゼン前駆体」として用いる手法を用いることで、ベンゼン環7個から16個までの様々なサイズのシクロパラフェニレン (CPP) の選択的合成に成功している。



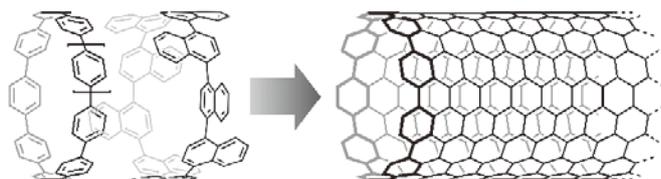
## 研究成果

## 1. 分岐型CNTを指向したカーボンナノケージの自在合成

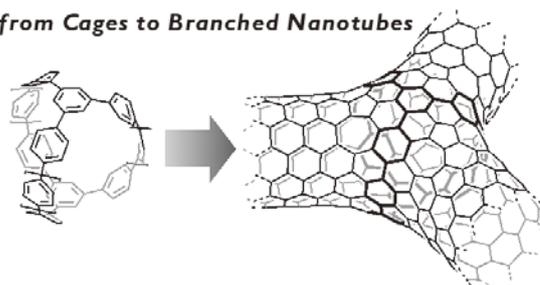
我々の究極の目標はCNTの完全化学合成である。CPPは直線型CNTの最小単位である。カーボンナノケージは分岐型CNTの接合ユニットであり、分岐型CNTは極小のトランジスタや論理ゲートとしての応用が期待

される素材であるため選択的合成がもたらす波及効果は非常に大きい。すでに [9] および [12] CPPを塗布した基盤に高温でアルコール蒸気を加える（化学気相成長法への応用）ことでCNTが生成することを見出しており、CNTの完全化学合成への道はついに拓かれたといえる。

from Rings to Straight Nanotubes



from Cages to Branched Nanotubes

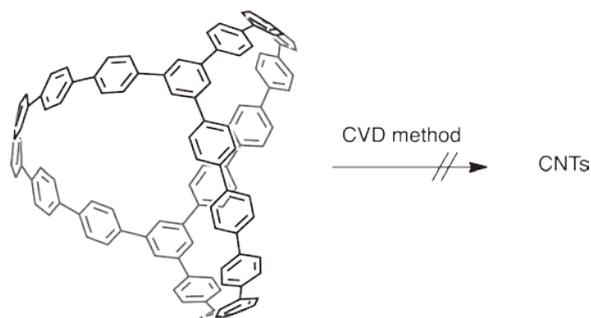


CNTは構造に応じて導電性もしくは半導体性を示すことがすでに知られている。CNTを自在に分岐・連結することができればトランジスタを含む集積回路のナノスケールでの構築が可能になることから、エレクトロニクス分野において非常に期待される技術である。

すでに我々は、分岐型CNTの接合部位に相当する構造であるカーボンナノケージの有機合成に成功した。これは世界初のカーボンナノケージ合成であり、さらに我々は「リング状化合物からナノチューブを生成する技術」をもつ。これを併せ用いることで、我々にしか達成できない『分岐型CNTの精密有機合成』が実現できると考えた。

まず、すでに合成に成功していたカーボンナノケージを用いてCNT伸長反応を行なった。すでにCPPにおいて成功している条件である、サファイアC面、溶液のスピンコートによるカーボンナノケージの塗布、500℃、15分という条件の他に、様々な条件検討を行なったが、顕著なCNTの生成は見られなかった。一般に、ある程度細いCNTの方が伸長反応が進行しやすい性質をもつことが明らか

になっている。生成するCNTの性質評価や応用の面を考慮しても、細いCNTの方が有利である。

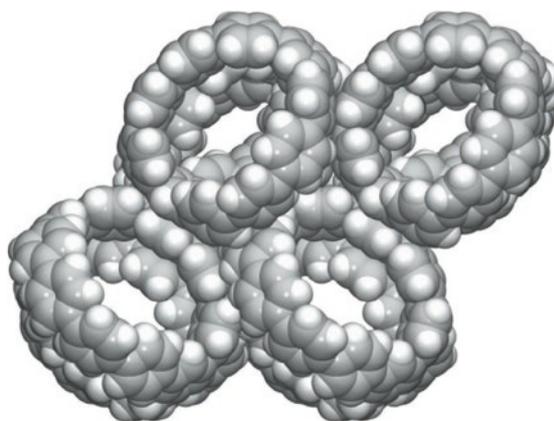
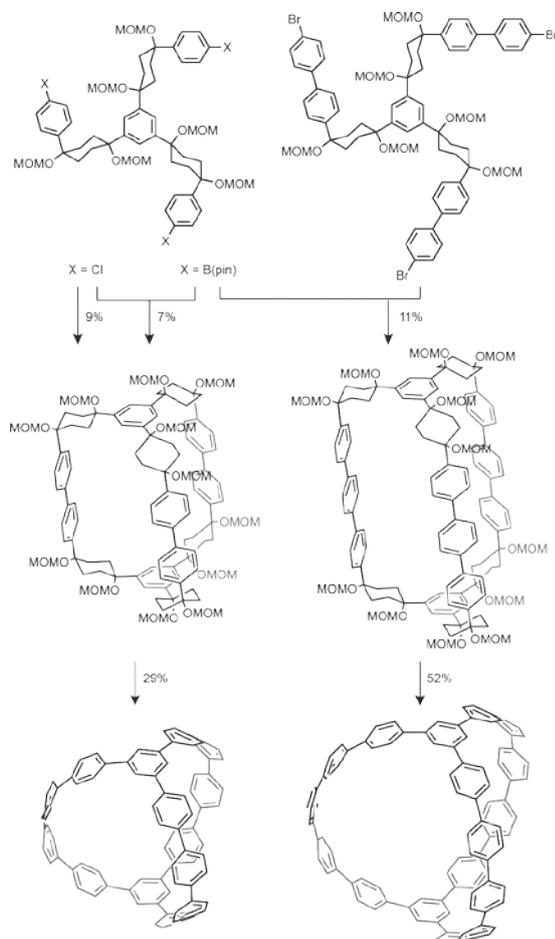


以上のような理由から、より小さなカーボンナノケージの合成に挑戦した。分子が小さい方がよりひずんでいるので、合成は比較的困難である。図に示すように、三叉ユニットを新たに二種類用意することで、従来のベンゼン環20個からなるカーボンナノケージに加えてベンゼン環17個、14個のカーボンナノケージの合成に成功した。さらに、初めてのカーボンナノケージのX線結晶構造解析による詳細な構造解明、光物性のサイズ依存性の実証を行なった。

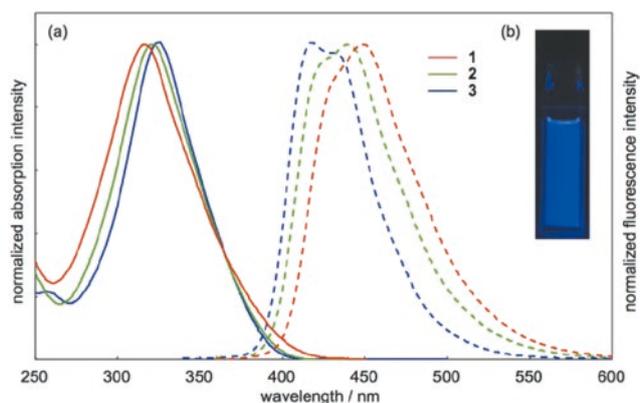
カーボンナノケージの合成は長期間かつ高い技術を要するため、新たに合成した2種の

カーボンナノケージについては、CVD法によるCNT伸長に必要な量の確保には至っておらず、現在大量合成を進めている。今後は分岐

型CNTの精密合成、および金属型と半導体型の接合部位をもつCNTの合成へと展開し、高機能な材料の創出を目指していきたい。



X-ray analysis



Photophysical properties

## 2. カーボンナノベルトのひずみエネルギー算出法の確立

カーボンナノベルトは1950年代より構造が提唱され、以降60年以上にわたり合成が挑戦され続けた分子である。しかし、カーボンナノベルトがもつ大きなひずみのために合成に成功した例はなかった。我々はカーボンナノベルトの合成を目指す道りとして、まずカーボンナノベルトのひずみエネルギーを理論化学的に定量し、それをもとに有効な合成法を策定しようと考えた。

はじめにカーボンナノベルトの定義を行なった。CNTをある幅でスライスし水素で終端すると、リング状およびベルト状の様々な分子が描ける。このうち、あるひとつの

C-C結合を切断するとCNT由来の大環状構造が解消し平面に切り開かれる分子をカーボンナノリング、2つもしくはそれ以上のC-C結合切断によって初めて上記の平面化が起きるものをカーボンナノリングとした。これまでに合成されているCPPなどは全てカーボンナノリングである。一方で、シクラセン、シクロフェナセン、Vögtle beltといった化合物はカーボンナノベルトに分類され、これらは古くから構造が提唱されており今なお合成が試みられている。

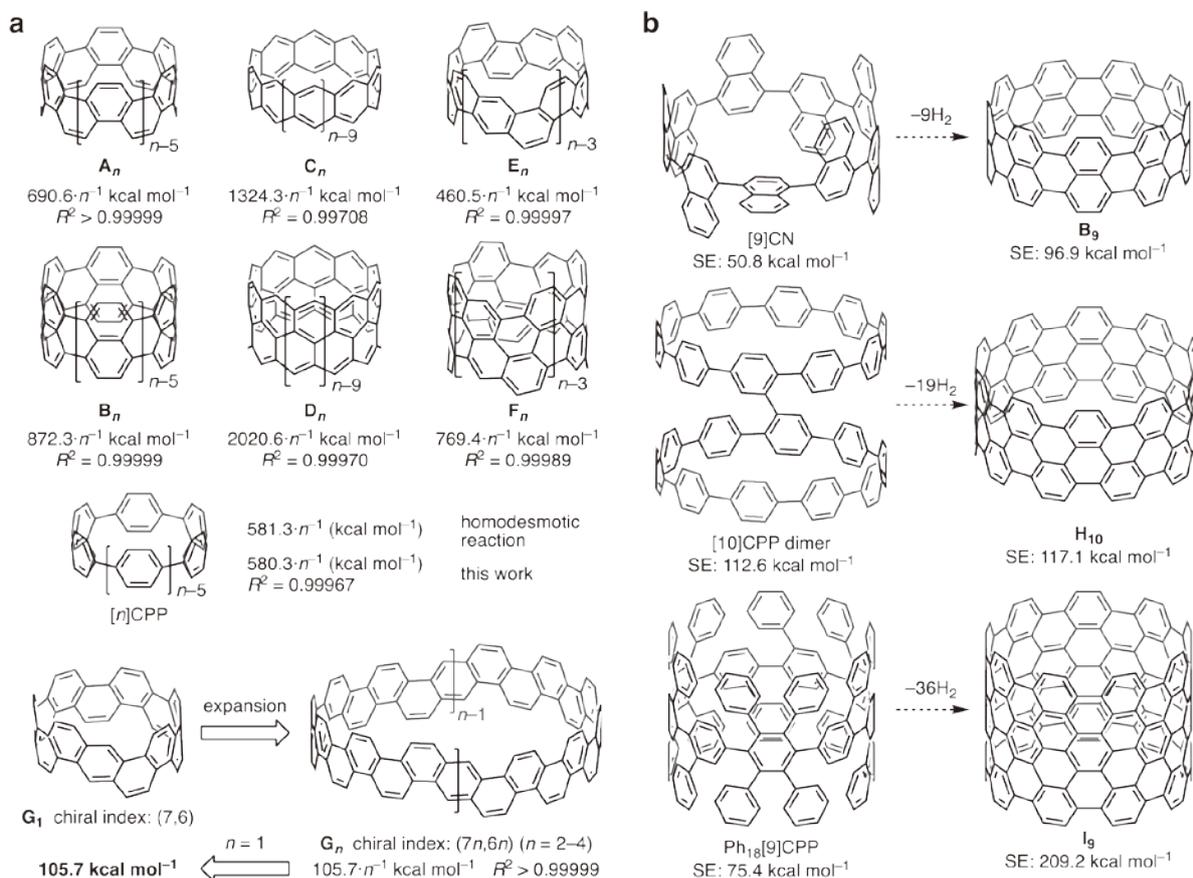
次に、既知の方法に基づきカーボンナノベルトのひずみエネルギー算出を試みた。ひずみエネルギーを算出する最も一般的な方法は、ホモデスモチック反応を用いる方法である。

しかしこの方法では、ある大きさ以上のカーボンナノベルトが負のひずみエネルギーをもつような結果になってしまった。これらのことから、カーボンナノベルトにおいて適切なホモデスモチック反応を探すのは困難であると判断した。想定した反応がホモデスモチック反応ではない理由として、組み替えた結合の結合次数が反応前後で異なっているからではないかと現在のところ考えている。

そこで、新たなひずみエネルギー算出法を考案した。その際に、サーキュレンのひずみエネルギーの算出方法を参考にした。それぞれのサイズのシクロフェナセンの全エネルギーを、繰り返し単位の個数 $n$ で割った値をプロットした。横軸は $n$ および $n$ のマイナス2乗を用いている。これらの値は $n^{-2}$ に一次の関数として非常に精度よく近似でき、 $y$ 切片の値が、 $n^{-2}$ がゼロ、つまり $n$ が無限大のときの繰り返し単位あたりの全エネルギーの極限值を表している。それぞれのサイズのシク

ロフェナセンのひずみエネルギーは、この差に $n$ をかけた値であり、また一般式として $690.6 \cdot n^{-1}$ と求めることができる。この方法は、他のアームチェア型、キラル型、ジグザグ型カーボンナノベルトにも適用でき、非常に精度よく一般式を導くことができた。

最後に、既報の前駆体候補分子とのひずみの差を計算した。[9] シクロ1,4ナフチレン、[10] CPPダイマー、ポリフェニル [9] CPPは、カーボンナノベルトとして必要な炭素原子を有しており、脱水素環化反応が理想的に進行すればカーボンナノベルトに変換できる。これらのひずみエネルギーを、対応するカーボンナノベルトと比較したところ、ポリフェニルCPPとシクロナフチレンはひずみが新たに加わるのに対し、CPPダイマーからベルトへは新たなひずみ加わらないことが分かった。これより、ひずみエネルギーの観点からは、CPPをビルディングブロックとした合成経路が最も効果的であると予想される。



(a) 算出したカーボンナノベルトのひずみエネルギー。(b) 3種の前駆体候補分子からCNBへの変換に伴うひずみ解析。

以上、DFT計算によってカーボンナノベルトのひずみエネルギーを見積もる新たな方法を考案した。この方法を用いて様々なカーボンナノベルトのひずみエネルギーを計算し、さらに前駆体候補分子と比較することで合成難易度を見積もった。本法は対称性をもつ分子に対して高い汎用性をもつため、カーボンナノベルト以外の分子への適用も期待できる。

### 3. リング状前駆体を用いたカーボンナノベルトの合成検討

前項に記した通り、ひずみエネルギーの観点からは、CPPを構成単位とする合成法がもっとも有効であることが示唆された。そこで、2つのCPPが単結合で結合したCPP二量体を設計・合成し、これをもとにカーボンナノベルトへと変換する戦略に基づいて合成を行なった。

合成は、クロロベンゼンジボロン酸エステルとL字型ユニットとを逐次的に組み合わせる手法を用い、まずクロロが1つ置換したCl [10] CPPを合成した。これをニッケルを用いたホモカップリング反応で結合させることで、2つの [10] CPPが直接結合した [10] CPPダイマーの合成に成功した。DFT計算およびNMR測定によって、2つの [10] CPPユニットは溶液中室温で自由にフリップする性質をもつことを明らかにした。この構造的性質のため、カーボンナノベルトへの変換は可能であると予想した。

得られた [10] CPPダイマーを用いて、カーボンナノベルトへの変換反応を行なった。しかし、様々な酸化的縮環反応の条件を試しても、期待したカーボンナノベルトは得られなかった。光照射下の環化反応を行なったところ、1ヶ所の炭素炭素結合生成反応と1,2-転位反応が起きた生成物が高収率で得られた。このように、CPPはひずみのある化合物であり、酸化的な反応条件では容易に1,2-転位反応が起きることが明らかになった。1-2項で

述べたシクロナフチレンもカーボンナノベルトへの変換反応を種々検討したが、望みの化合物は得られなかった。

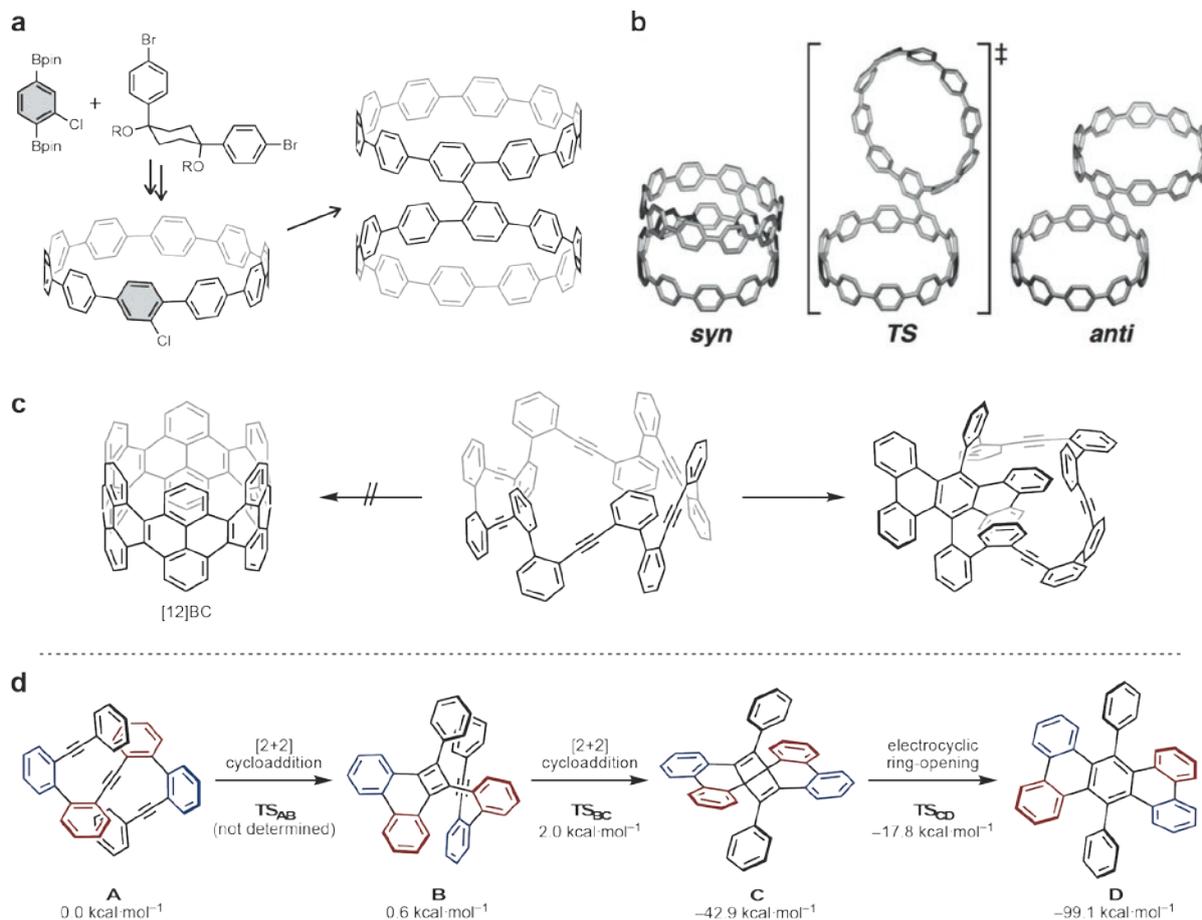
次に、これまでと異なるジグザグ型カーボンナノベルトの合成を試みた。1954年に初めて構造が提唱された「シクラセン」はカーボンナノベルトのひとつであり古くから合成が挑戦されているが、未だ達成されていない。我々はまず、シクラセンと同様にCNTの部分構造をもち、かつシクラセンと比べて非常に安定と考えられる化合物「ベンゾシクラセン」の構造を提唱し、DFT計算によって性質の予測を行った。

シクラセンは閉殻構造において $6\pi$ 系を描くことができないが、[n] BCではn個の $6\pi$ 系を有し、高い安定性をもつと期待できる。実際にDFT計算を行ったところ、閉殻構造が基底状態であり、またHOMO-LUMOギャップが [n] シクラセンと比較して大きくなっている。次に我々は、実際に前駆体候補分子を合成し、各種変換反応を試みた。しかし目的とする [12] BCは得られず、予期しない副生成物が9%の収率で得られた。DFT計算を用いて反応経路解析を行い、シクロブタジエン、デュワーベンゼン構造を経た形式的 [2+1+2+1] 付加環化反応が妥当であると結論づけた。

### 4. 世界初のカーボンナノベルトの合成

ベンゼン環が全て縮環したベルト状 $\pi$ 共役炭化水素「カーボンナノベルト」の合成は、有機合成化学における60年来の夢であった。今回我々は初めてカーボンナノベルトの合成に成功し、X線結晶構造解析によって構造を確認した。

前項にあるように、酸化条件はひずみのある化合物に対して転位反応を引き起こすことが分かった。そこで、CPP類縁体を原料に用いた合成という枠にとらわれず、さらに様々な可能性を模索した。今回行なったカーボン



(a) [10]CPPダイマーの合成。(b) 溶液中での[10]CPPダイマーのフリッピング挙動。(c) ベンゾシクラセンの構造および合成検討。(d) [2+1+2+1]付加環化反応の反応機構解析。

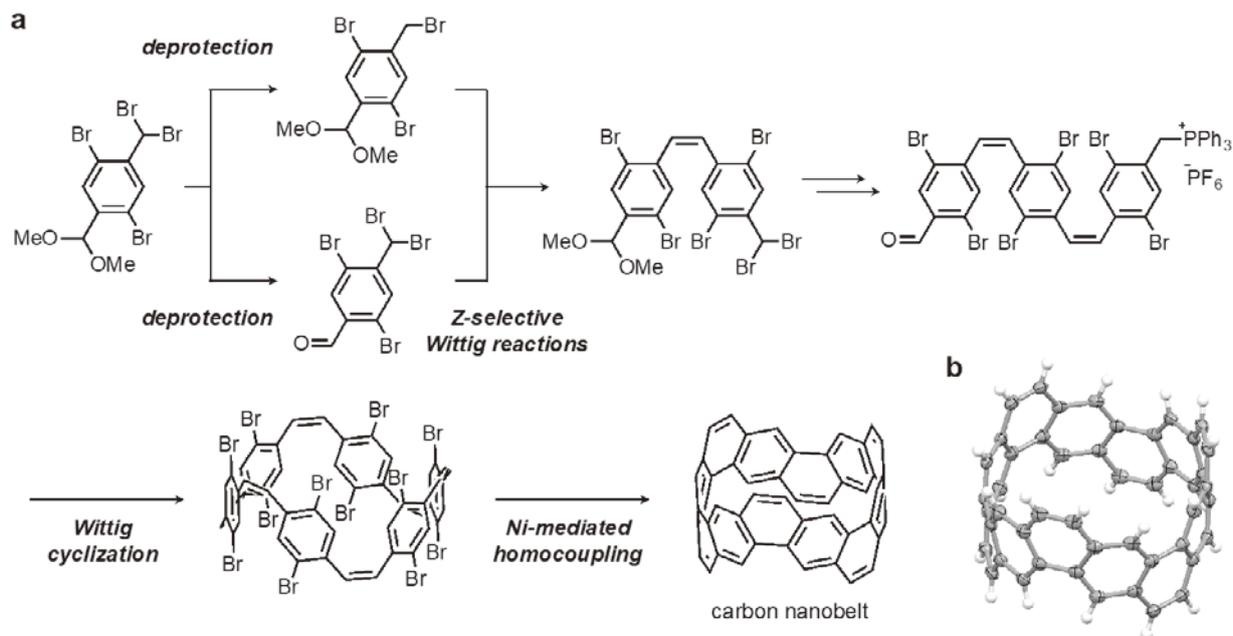
ナノベルト合成スキームを下図に示す。伊與田らが2004年に報告したall-Z環状オルトフェニレンビニレンを参考に、最終段階の反応点となる位置に臭素原子を導入し、また環状体のひずみをなくす等の合成上の理由でオルトフェニレンをパラフェニレンへと変更した環状体をカーボンナノベルト前駆体として設計した。まずパラキシレンを原料として、3段階でモノマーユニットを合成した。モノマーユニットのジメトキシメチル基は酸によってホルミル基に、ジプロモメチル基は還元反応によってブロモメチル基に変換できる。つまり、モノマーユニットを1単位とし、適宜脱保護したものを組み合わせていくことによって、逐次的にWittig反応を行うことができる。さらに、オルト位にブロモ基をもつ基質同士のWittig反応はZ選択性が非常に高いことが知られているため、鍵中間体である

all-Z環状パラフェニレンビニレンの合成を効率よく行えると考えた。Wittig反応によって2量体、3量体と伸ばしていき、さらに同様の条件で環化反応を行い環状6量体を得た。これに対して種々のホモカップリング反応を検討した。一挙に6ヶ所の炭素炭素結合を形成する段階であり、また結合形成に伴って大きなひずみがかかることから非常に困難な反応であった。様々な反応条件を試行したところ、ニッケル錯体を作用させることでわずか1%ながらカーボンナノベルトと思われる固体の単離に成功し、<sup>1</sup>H NMRや質量分析から目的の化合物であることが強く示唆された。ここからさらに1ヶ月かけてこの固体の再結晶を試み、クロロホルム溶液から再結晶することによって単結晶を得た。X線結晶構造解析によって、カーボンナノベルトが美しいベルト状であり、まさにCNTを輪切りにした

構造の分子であることを明らかにした。カーボンナノベルトは固体状態および希釈溶液状態において赤い蛍光発光を示すことから、発光材料や半導体材料としても応用可能であると期待される。

その後の研究により、合成効率は5倍以上

に向上し、現在東京化成工業（株）が大量合成を行なっている。2018年3月に市販化されたことで、これを機に世界中の研究者が物性測定や応用研究を開始し、予想を超える新たな物性が見出されることを期待している。



## 発表論文

1. Synthesis of a Carbon Nanobelt  
Guillaume Povie, Yasutomo Segawa,\* Taishi Nishihara, Yuhei Miyauchi, and Kenichiro Itami\* *Science* **2017**, 356, 172–175.
2. A Theoretical Study on the Strain Energy of Carbon Nanobelts  
Yasutomo Segawa,\* Akiko Yagi, Hideto Ito, and Kenichiro Itami\* *Org. Lett.* **2016**, 18, 1430–1433.
3. Synthesis, Structure, and Reactivity of a Cylinder-shaped Cyclo[12]orthophenylene[6]ethynylene: Toward the Synthesis of Zigzag Carbon Nanobelts  
Katsuma Matsui, Masako Fushimi, Yasutomo Segawa,\* and Kenichiro Itami\* *Org. Lett.* **2016**, 18, 5352–5355.
4. All-benzene Carbon Nanocages: Size-selective Synthesis, Photophysical Properties, and Crystal Structure  
Katsuma Matsui, Yasutomo Segawa,\* and Kenichiro Itami\* *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 16452–16458.

# 半導体、無機ナノ粒子、金属錯体を活用した 水中駆動型CO<sub>2</sub>固定化光触媒システム

Photocatalytic CO<sub>2</sub> fixation systems workable in water using semiconductors,  
nanoparticles and metal complexes.

東京工業大学理学院 前田 和彦  
Kazuhiko MAEDA

## 1. 緒言

産業活動によって排出されるCO<sub>2</sub>を還元し、有用な燃料物質へと変換することは、循環型社会実現の観点から重要な課題である。CO<sub>2</sub>固定化技術としてこれまで触媒法などが検討されてきたが、安定なCO<sub>2</sub>分子を化学変換するには高温高压が必要となる。一方、金属錯体や半導体の光触媒作用を利用した常温常圧でのCO<sub>2</sub>固定化も盛んに研究されている [1]。これらの光触媒法では、太陽光に豊富に含まれる可視光を有効利用すること、そして水中で駆動することが求められる。最近では可視光照射下で駆動する系も報告されているが、ほとんどは有機溶媒中で検討されており、環境負荷の小さい水中での検討例はほとんどない。

光触媒反応は酸化・還元反応からなり、水中でのCO<sub>2</sub>固定化実現のためには、水の酸化とCO<sub>2</sub>の還元を同時に達成することが必要である。この反応の $\Delta G^\circ$ は正であり、さらには水中でより進行しやすいプロトン還元（水素生成）を防がねばならないため、数ある光触媒反応において最高難度の反応として認識されている。また、太陽光エネルギー変換を指向した場合には、400nm以上の可視光の利用が必要不可欠である。このようなことから、本反応を再現性よく進行できる光触媒系はこれまでのところ報告されていない。

我々は、金属錯体の優れたCO<sub>2</sub>還元触媒機能と半導体の強い光酸化力に着想を得て、金

属錯体/半導体融合光触媒系の開発に取り組んできている。例えば、Ru錯体触媒を担持した有機半導体C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>は可視光照射下、有機溶媒中でCO<sub>2</sub>を還元し、80%程度の選択率でギ酸（HCOOH）を与える [2,3]。しかし、このような錯体/半導体融合光触媒系に組み込める半導体はほとんどなく、また半導体が吸収できる波長も500nm程度に限定されていた。さらには、光触媒活性向上のための指針も確立されていなかった。

本研究では、このような状況を打破すべく、(1) 錯体/半導体融合光触媒によるCO<sub>2</sub>還元反応の活性向上指針および反応選択率制御法の確立、(2) 活性な新規半導体材料の探索を行うことで、広域可視光を有効に利用できる水中駆動型CO<sub>2</sub>還元光触媒系の構築を目指した。錯体/半導体融合光触媒系としては、Figure 1に示す2つの異なる系を検討した。これらは、金属錯体が担う機能により分類できる。すなわち、錯体が光吸収過程に直接関与せずに触媒としてのみ振る舞い、半導体のみの光励起を用いる場合 (Figure 1A) と、錯体が光吸収にも関与した二光子過程で進行する場合 (Figure 1B) である。本研究の実施により得られた主な成果を以下に示す。尚、全ての系において<sup>13</sup>Cで標識された<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>を用いて光触媒反応を行い、還元生成物が系中のCO<sub>2</sub>由来であることを確認している。本稿では、これまでに得られた代表的な成果を紹介する。

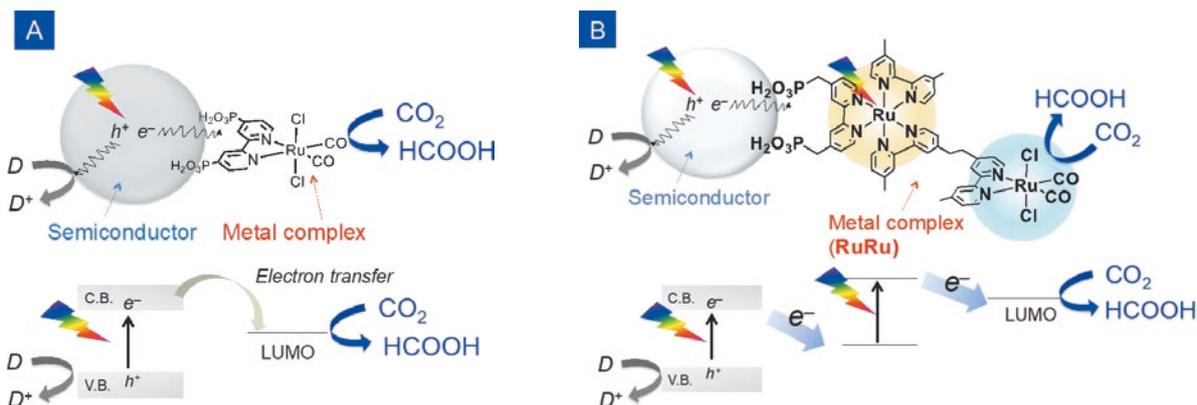


Figure 1. Metal-complex/semiconductor hybrid photocatalysts for CO<sub>2</sub> reduction. (A) One-photon, and (B) two-photon systems.

## 2. HCOOH/CO生成選択率の制御と光エネルギー変換型反応の実現

CO<sub>2</sub>還元反応は、多彩な生成物を与える反応であり、その選択率の制御は基礎科学の観点からも興味をもたれる。そこで、先行研究として実施していたRu単核錯体/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>融合系を用いて、Ru錯体の還元電位、および反応場となる溶媒環境が光触媒性能に与える影響を精査した [4,5]。Figure 2に示すRu単核錯体を吸着させたC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>を種々の溶媒条件でCO<sub>2</sub>還元反応に適用した。その結果、C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>との吸着が可能でかつより正側に還元電位 (LUMO) をもつRu単核錯体 (ここではRuCP) とドナー数の大きい (つまりLewis塩基性の強い) 溶媒を用いると、CO選択率と反応速度が相対的に高くなることを見出した (Figure 3)。

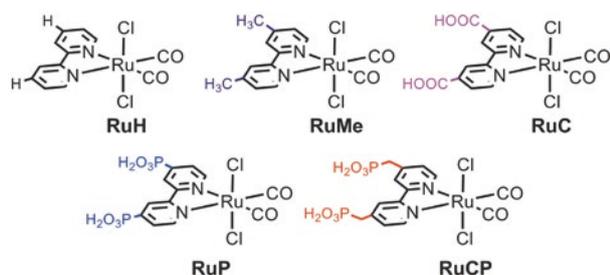
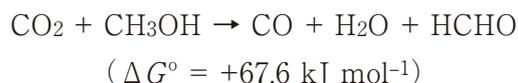


Figure 2. Mononuclear Ru(II) complexes employed.

さらには、ドナー数の大きい溶媒がCO<sub>2</sub>還

元反応を効率的に促進するという知見を生かし、DMA (N,N-dimethylacetamide) とメタノールを混合溶媒とした系で、CO<sub>2</sub>を還元してCOを得ることに成功した。この反応は、以下に示すGibbsエネルギー変化が正となる、エネルギー変換型反応である。



これは、C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>を光触媒として用いたCO<sub>2</sub>還元により光エネルギー変換を達成した最初の例である。

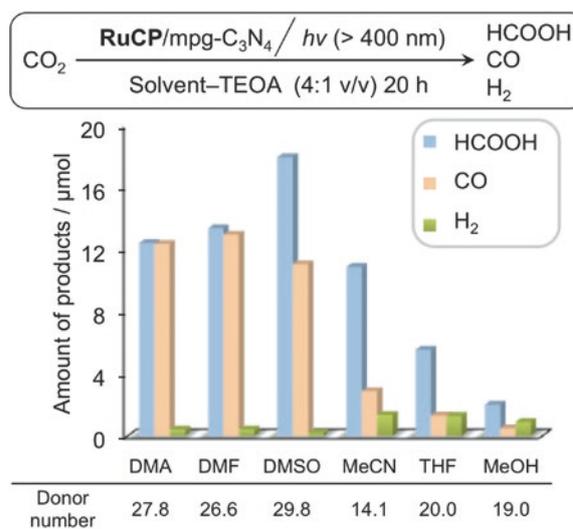


Figure 3. Product distributions for CO<sub>2</sub> reduction under visible light using RuCP/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> and various solvents under a CO<sub>2</sub> atmosphere. TEOA = Triethanolamine (that works as an electron donor).

### 3. 新規半導体材料の探索研究と電子移動機構解明

金属酸化物の多くは水中で安定に水を酸化できる光触媒として知られるが、バンドギャップが大きいと可視光照射下では駆動しない。これは、酸化物の価電子帯を形成する酸素2p軌道が3V (vs. NHE at pH 0) とかなり深い位置にあるためである [6]。そこで、酸化物の酸素の一部を窒素で置換することでバンドギャップを縮小し、可視光応答型CO<sub>2</sub>還元への適用を試みた。伝導帯電子の反応性を高く保つという狙いから、一般に高い位置に伝導帯を形成することが知られているTa系の酸窒化物に着目した。

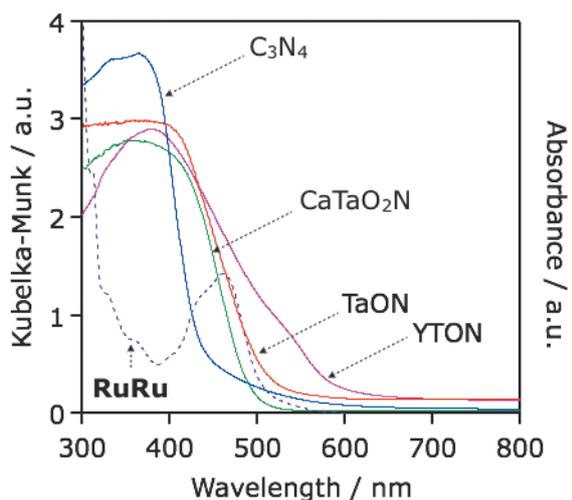


Figure 4. UV-visible diffuse reflectance spectra of some semiconductors, along with an absorption spectrum of a binuclear Ru(II) complex (RuRu).

Figure 1Bに示すRu(II)二核錯体/半導体融合光触媒系に有効な酸窒化物系半導体材料を探索した結果、CaTaO<sub>2</sub>N、Y-Ta複合酸窒化物 (YTONと略す) を新たに見出した [7,8]。特筆すべきは、これらの半導体を用いた場合は99%以上の高選択率でCO<sub>2</sub>をHCOOHへと変換できたことで、従来知られていた半導体TaONの系 [9] と比べて、CO<sub>2</sub>還元選択率を大幅に改善することに成功した。またYTONの系では、それまでの有効限界波長 (500nm) を580nmへ引き延ばすことにも成功した (Figure 4)。

RuRu/YTONの系を詳細に検討した結果、YTONにAgナノ粒子を担持することによって、HCOOH生成速度が最大で4~5倍向上することを明らかとした。Agの反応促進効果は、RuRuのモデル光増感錯体であるRu(PS)を用いた発光測定の結果からも支持された。すなわち、Agの担持量を0から1.5 wt%へと増加させるに従って、Ru(PS)からの発光減衰が加速される様子が観測された (Figure 5)。光電気化学測定から明らかにしたエネルギーダイアグラムによれば、励起状態のRu(PS)からYTONの伝導帯への酸化的電子移動は熱力学的に不利な過程である。加えて、励起状態のRu(PS)からAgへの逆電子移動 (あるいはエネルギー移動) はほとんど起こらないことも確認している。したがって、発光減衰の加速は励起状態のRu(PS)の還元的消光を意味し、この還元的消光過程によ

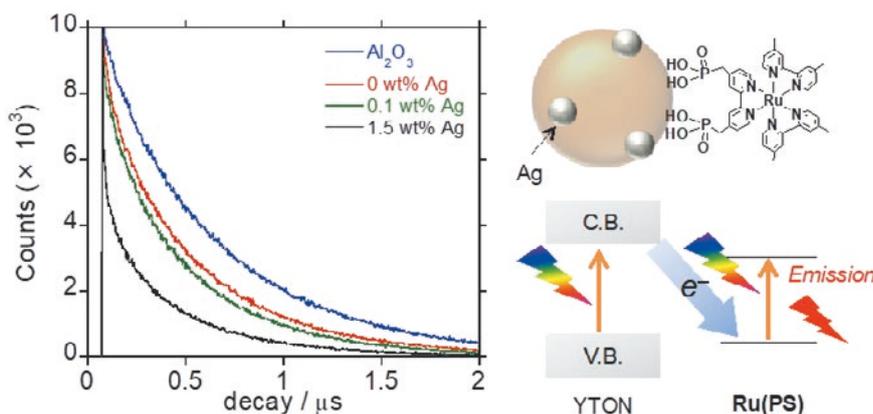


Figure 5. Emission decay profiles of Ru(PS)/Ag/YTON with various Ag loading in MeCN. Excited at 444 nm and measured at room temperature under Ar atmosphere.

る電子移動が、CO<sub>2</sub>還元反応促進の鍵であると結論した。

#### 4. C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>を光触媒としたCO<sub>2</sub>還元: Ru二核錯体の適用による高性能化

先行して開発を進めていたRu単核錯体/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>融合系 (Figure 1A) は、触媒回転数 (TON)、生成物選択率の観点から十分な性能を持たず、また水中ではほとんど駆動しないという問題も抱えていた。そこで、C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>を中核とする二光子過程の系 (Figure 1B) を構築し、詳細な検討を試みた。種々の検討の結果、Agナノ粒子をC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>に担持すると、有機溶媒中では従来系と比べてHCOOH生成のTONが約30倍向上し、錯体/半導体複合型光触媒系における最高値 (33,000) を記録した [10]。

さらに本系は、種々の還元剤 (電子源) を含む水中でもCO<sub>2</sub>還元活性を示した。Table 1に、光触媒としてRu錯体/Ag/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>を用い、EDTA・2Naを電子源とした水中でのCO<sub>2</sub>還元反応の結果を示す。RuRu/Ag/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>を用いた場合のHCOOH生成量は、触媒部のモデル単核錯体を吸着させたRuP/Ag/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>を用いた場合と比べて10倍以上高く、また選択率も24%から75%へと大きく改善した。しかしながら、水中でのギ酸生成選択率は75%程度であり十分な値ではない。そこで、更に

Table 1. Results of photocatalytic CO<sub>2</sub> reduction using RuRu/Ag/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> in aqueous solution under visible light (>400nm)<sup>a</sup>

Entry	Photocatalyst	HCOOH / $\mu\text{mol}$	HCOOH selectivity / %
1	<b>RuRu</b> /Ag/C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	2.7	75
2	<b>RuP</b> /Ag/C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	0.2	24
3 <sup>b</sup>	<b>RuRu</b> /Ag/C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	4.9	97

<sup>a</sup> Reaction conditions: photocatalyst, 4.0 mg (Ru complex, 3.4  $\mu\text{mol g}^{-1}$ , Ag, 1.5 wt %); reactant solution, aqueous EDTA・2Na solution (10 mM) 4.0 mL; irradiation time, 15 h, > 400 nm; <sup>b</sup> **RuRu**, 2.3  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ; in the presence of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 M).

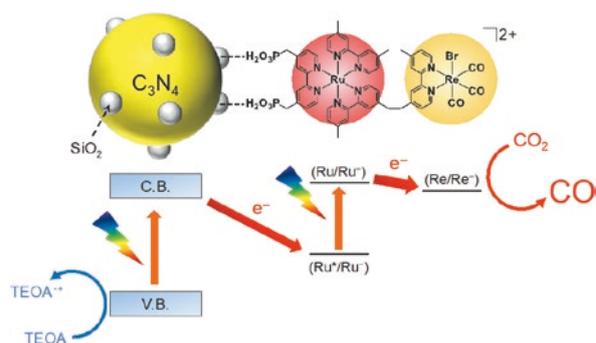


Figure 6. Z-scheme CO<sub>2</sub> reduction under visible light using a hybrid consisting of SiO<sub>2</sub>-modified C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> and a binuclear Ru(II)-Re(I) complex.

反応条件 (反応溶液への塩の添加効果等) を詳細に検討した結果、95%以上の高い選択率を維持したまま、水中でCO<sub>2</sub>をHCOOHへと還元することに成功した。同様に、RuRu/Ag/TaONの系でも、水中でのCO<sub>2</sub>還元を達成できた [11]。

#### 5. 選択的CO生成を可能とする融合光触媒

CO<sub>2</sub>の二電子還元生成物としてはCOも知られており、COはエネルギー源への変換が容易という利点を持つが、COを生成する錯体/半導体融合光触媒の例はほぼ皆無だった。我々はRuRuの触媒部位をRe(I)錯体へと変更することで、CO<sub>2</sub>のCOへの選択還元が可能となることを明らかとした (Figure 6) [12]。RuRe/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>によるCO生成速度はRuReの吸着量の増加に伴って向上し、TON<sub>CO</sub>も同時に増加した。吸着量増加にはC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>表面をSiO<sub>2</sub>で修飾することが有効で、これによりCO生成速度は2.5倍向上した。このときのCO選択率は、SiO<sub>2</sub>修飾の有無によらず90%を超える高いものとなった。しかしSiO<sub>2</sub>は絶縁性であるため、本系のような電子移動が関与する複合材料への適用へは必ずしも好ましくない。そこで、n型半導体であるルチル型TiO<sub>2</sub>をナノ粒子としてC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>に導入したところ、RuReの吸着量向上だけでなくC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>の電荷分離促進

効果が得られ、結果として光触媒活性をさらに向上できることを見出した [13]。このように、ギ酸生成のみならず、COの選択生成をも可能とする新規光触媒の開発にも成功した。

## 6. 新規な光励起機構で駆動する広域可視光応答型水の酸化光触媒

本研究では、新規な光励起機構で駆動する水の酸化光触媒の創出にも取り組んだ。先に述べたように、金属酸化物は一般にバンドギャップが大きく、可視光照射下では駆動しない。我々は、水の酸化に優れた触媒機能を示す $\text{Co}(\text{OH})_2$ とルチル型 $\text{TiO}_2$ を融合すると、850nmまでの広域可視光を利用して水を酸化する光触媒となることを明らかとした [14]。

Figure 7に、 $\text{Co}(\text{OH})_2$ の担持量を変えて調製した $\text{Co}(\text{OH})_2/\text{TiO}_2$ の拡散反射スペクトルを示す。ルチル型 $\text{TiO}_2$ の吸収端は410nmにあり、可視光をほとんど吸収できない。しかし、 $\text{Co}(\text{OH})_2$ を $\text{TiO}_2$ に担持することで可視光領域に新たな吸収帯が現れ、この可視光吸収は $\text{Co}(\text{OH})_2$ の担持量の増加に対応して大きくなった。バルク型の $\beta\text{-Co}(\text{OH})_2$ には530nm付近にd-d遷移に帰属される明瞭なピークが観測されたが、 $\text{Co}(\text{OH})_2/\text{TiO}_2$ は高

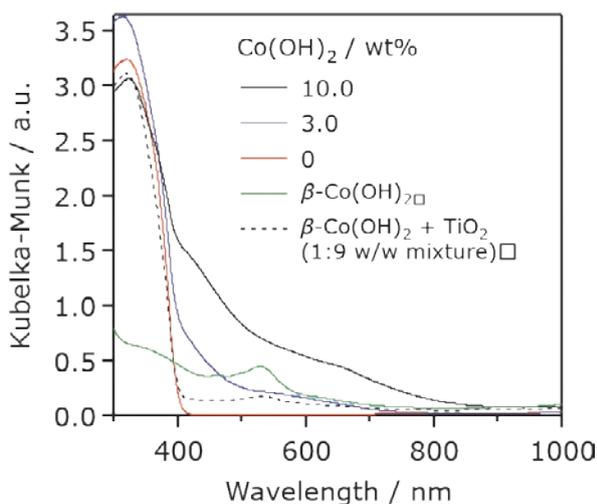


Figure 7. Diffuse reflectance spectra of  $\text{Co}(\text{OH})_2/\text{TiO}_2$  with different  $\text{Co}(\text{OH})_2$  amounts.

担持量であってもこのようなd-d遷移由来の吸収を示さなかった。 $\text{Co}(\text{OH})_2/\text{TiO}_2$ に見られた可視光吸収の起源は現時点で明らかでないが、バルク型 $\beta\text{-Co}(\text{OH})_2$ と $\text{TiO}_2$ の物理混合ではこのような光吸収は生じないことから、 $\text{Co}(\text{OH})_2\text{-TiO}_2$ 間の密なコンタクトに基づく電荷移動吸収に由来すると我々は考えている。3.0 wt%  $\text{Co}(\text{OH})_2/\text{TiO}_2$ を用いて酸素生成反応の照射波長応答性を調べた結果、遮断する波長が長波長になるにつれて酸素生成速度は低下し、850nm未満の波長域をカットすると、ほぼ酸素の生成が見られなくなった。この酸素生成の低下は、Figure 6に示した $\text{Co}(\text{OH})_2/\text{TiO}_2$ の光吸収の減少と対応しており、観測された酸素生成が $\text{Co}(\text{OH})_2/\text{TiO}_2$ の光吸収に起因することを明確に示している。

$\text{Co}(\text{OH})_2$ を光吸収中心および酸素生成活性点として用いる本手法は、 $\text{TiO}_2$ 以外のワイドギャップ酸化物半導体にも有効であることが確かめられた。また、 $\text{WO}_3$ のような代表的な可視光応答型光触媒に対しても、 $\text{Co}(\text{OH})_2$ を担持することでより長波長可視光の利用が可能となった。本系ではまた、担体となる酸化物半導体と担持コバルト種の相互作用が重要な活性発現因子になると考えられ、担持コバルト種の組成や構造に大きく依存すると予想される。実際に硝酸銀水溶液からの含浸法により酸化コバルト ( $\text{CoO}_x$ ) 種を $\text{TiO}_2$ 表面に導入し、その際の加熱処理温度を変化させることで生じる光触媒活性の変化を調べたところ、担持コバルト種が $\text{Co}_3\text{O}_4$ のナノ粒子として $\text{TiO}_2$ 表面に高分散かつ高密度に存在すると、高い光触媒活性が得られることがわかった [15]。同様の傾向は、 $\text{SrTiO}_3$ あるいはアナターズ型 $\text{TiO}_2$ を担体とした場合にも見られた [16,17]。担体の種類によらず同様な傾向が見られる理由は、 $\text{Co}_3\text{O}_4$ の密度増加に伴う可視光吸収の増大と触媒活性点密度の低下がそれぞれ活性の向上、低下に寄与していることを強く示唆する。

## 7. まとめと今後の展望

本研究では水中で駆動するCO<sub>2</sub>還元光触媒の創出を目指し、広く半導体材料を検討した。その結果、C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>とRu(II)二核錯体を用いた系では、これまでにない高選択的、高耐久CO<sub>2</sub>光還元が実現され、水中での反応駆動にも成功した。さらには、酸化物を基礎としたバンドエンジニアリングにより可視光に応答する酸窒化物を錯体/半導体融合光触媒系へと適用した結果、99%以上の高いギ酸生成選択率を達成し、また有効波長をそれまでの500nmから580nmへと拡張することにも成功した。広域可視光応答型の水の光酸化系の構築という点では、担持Co種からTiO<sub>2</sub>への電子励起とCo種がもつ酸素生成触媒能を組み合わせ、これまでにない新たな光触媒系を創出した。

今後はこれらの知見を集約し発展させることで、水中で水を酸化して酸素を生成し、同時にCO<sub>2</sub>を還元できる光触媒系の構築が期待される。

## 謝辞

本研究は、野口遵研究助成金、科研費JP16H06130「若手研究A」およびJP16H06441「新学術領域研究：複合アニオン」の助成を受けて行われた。本稿で紹介した内容は、石谷治教授（東京工業大学）、山方啓准教授（豊田工業大学）との共同研究の成果である。この場をお借りして御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Y. Yamazaki, H. Takeda, O. Ishitani, Photocatalytic Reduction of CO<sub>2</sub> Using Metal Complexes. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2015**, *25*, 106-137.
2. K. Maeda, K. Sekizawa, O. Ishitani, A Polymeric-Semiconductor-Metal-Complex Hybrid Photocatalyst for Visible-Light CO<sub>2</sub> Reduction *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10127-10129.
3. R. Kuriki, K. Sekizawa, O. Ishitani, K. Maeda, Visible-Light-Driven CO<sub>2</sub> Reduction with Carbon Nitride: Enhancing the Activity of Ruthenium Catalysts. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 2406-2409.
4. R. Kuriki, O. Ishitani, K. Maeda, Unique Solvent Effects on Visible-Light CO<sub>2</sub> Reduction over Ruthenium(II)-Complex/Carbon Nitride Hybrid Photocatalysts. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 6011-6018.
5. K. Maeda, R. Kuriki, O. Ishitani, Photocatalytic Activity of Carbon Nitride Modified with a Ruthenium(II) Complex Having Carboxylic- or Phosphonic-Acid Anchoring Groups for Visible-Light CO<sub>2</sub> Reduction. *Chem. Lett.* **2016**, *18*, 182-184.
6. D. E. Scaife, Oxide Semiconductors in Photoelectrochemical Conversion of Solar Energy. *Sol. Energy* **1980**, *25*, 41-54.
7. F. Yoshitomi, K. Sekizawa, K. Maeda, O. Ishitani, Selective Formic Acid Production via CO<sub>2</sub> Reduction with Visible Light Using a Hybrid of a Perovskite Tantalum Oxynitride and a Binuclear Ruthenium(II) Complex. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 13092-13097.
8. K. Muraoka, H. Kumagai, M. Eguchi, O. Ishitani, K. Maeda, A Z-scheme Photocatalyst Constructed with an Yttrium-Tantalum Oxynitride and a Binuclear Ru(II) Complex for Visible-Light CO<sub>2</sub> Reduction. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 7886-7889.

9. K. Sekizawa, K. Maeda, K. Domen, K. Koike, O. Ishitani, Artificial Z-scheme Constructed with a Supramolecular Metal Complex and Semiconductor for the Photocatalytic Reduction of CO<sub>2</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 4596–4599.
10. R. Kuriki, H. Matsunaga, T. Nakashima, K. Wada, A. Yamakata, O. Ishitani, K. Maeda, Nature-Inspired, Highly Durable CO<sub>2</sub> Reduction System Consisting of a Binuclear Ruthenium(II) Complex and an Organic Semiconductor Using Visible Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 5159–5170.
11. R. Kuriki, M. Yamamoto, K. Higuchi, Y. Yamamoto, M. Akatsuka, D. Lu, S. Yagi, T. Yoshida, O. Ishitani, K. Maeda, Robust Binding between Carbon Nitride Nanosheets and a Binuclear Ruthenium(II) Complex Enabling Durable, Selective CO<sub>2</sub> Reduction under Visible Light in Aqueous Solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 4867–4871.
12. K. Wada, M. Eguchi, O. Ishitani, K. Maeda, Activation of the Carbon Nitride Surface by Silica in a CO Evolving Hybrid Photocatalyst. *ChemSusChem* **2016**, 10, 287–295.
13. K. Wada, C. S. K. Ranasinghe, R. Kuriki, A. Yamakata, O. Ishitani, K. Maeda, Interfacial Manipulation by Rutile TiO<sub>2</sub> Nanoparticles to Boost CO<sub>2</sub> Reduction into CO on a Metal-Complex/Semiconductor Hybrid Photocatalyst. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9, 23869–23877.
14. K. Maeda, K. Ishimaki, Y. Tokunaga, D. Lu, M. Eguchi, Modification of Wide-Band-Gap Oxide Semiconductors with Cobalt Hydroxide Nanoclusters for Visible-Light Water Oxidation. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55, 8309–8313.
15. K. Maeda, K. Ishimaki, M. Okazaki, T. Kanazawa, D. Lu, S. Nozawa, H. Kato, M. Kakihana, Cobalt Oxide Nanoclusters on Rutile Titania as Bifunctional Units for Water Oxidation Catalysis and Visible-Light-Absorption: Understanding the Structure–Activity Relationship. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9, 6114–6122.
16. M. Okazaki, M. Eguchi, T. Uchiyama, D. Lu, H. Kato, Y. Uchimoto, M. Kakihana, K. Maeda, Effects of SrTiO<sub>3</sub> Support on Visible-Light Water Oxidation with Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Dalton Trans.* **2017**, 46, 16959–16966.
17. K. Ishimaki, T. Uchiyama, M. Okazaki, D. Lu, Y. Uchimoto, K. Maeda, Influence of TiO<sub>2</sub> Support on Activity of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> Photocatalysts for Visible-Light Water Oxidation. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2018**, 91, 486–491.

## 国際会議報告

### Report on the International Meeting

糖鎖有機化学研究室 山田 一作  
Issaku YAMADA

2017年7月2日から6日の日程でスペイン・バルセロナ・CCIB (Centre de Convencions Internacional de Barcelona) で開催された19th European Carbohydrate Symposium (EUROCARB 2017) および2017年11月5日から8日の日程で米国・オレゴン州・ポートランド・ヒルトンポートランドホテルで開催されたAnnual Meeting of the Society for Glycobiology 2017 (SFG2017) に参加させていただきました。

EUROCARB 2017には主にヨーロッパの糖鎖科学研究者が参加していますが、一部アメリカのSFG2017に参加している研究者も参加されていました。本シンポジウムでは「Carbohydrate Structure Notation Directed Towards Interdisciplinary Cooperation」と題してポスター発表を行いました。また、IUPAC糖鎖命名法会議に関連して数年間にわたりオンラインで様々な議論を行ってきたMartin Frank先生と直接議論を交わすことができ非常に良い機会でした。オフラインで直接議論することの必要性・重要性を改めて認識させていただきました。

シンポジウムは、4つの会場に別れて開催されていました。主なセッションを以下に示します。

- ◆ Glycan structure (MS methodology)
- ◆ Glycolipid and carbohydrates
- ◆ Glycan structure (modelling, NMR)
- ◆ Glycan structure (MS, NMR, XR)
- ◆ Structure and recognition (XR, NMR, modelling)
- ◆ Lectin proteins
- ◆ Glycosylation and cancer
- ◆ Ligands for protein-carbohydrate interactions
- ◆ Simulation in molecular recognition

糖鎖構造表記における単糖記号については、SFG2017よりもCFG (Consortium for Functional Glycomics) 形式またはSNFG (Symbol Nomenclature for Glycans) 形式 [1] で表記している研究者が多く、ヨーロッパでは多く使われていると聞いていたOxford形式を用いている研究者は非常に少なかったのが印象的でした。インフォマティクス関連の研究では、Robert Woods先生がMD計算結果のデータベース化とインターフェイスの改良を行っており、ユーザビリティの向上が見られました。また、Jesus Jimenez-Barbero先生は、NMRを用いた糖鎖認識の研究において STD-NMRに加えて、STD-TOCSY NMRを活用されていました。糖鎖認識部位についてNMRを用いた研究の発展が期待できると感じられました。



図1 EUROCARBの会場案内

SFG2017は、米国の糖鎖生物学会による会議であり、米国以外からもアジア、ヨーロッパ、豪州などから研究者が参集しました。しかし、今回の年会は日本からの参加者が少ないこと、全体の参加者も少ない印象を受けました。

本年会には3つのサテライトシンポジウムおよび以下に示すセッションが行われました。

- ◆ Satellite I: Glyco-BioInformatics
- ◆ Satellite II: Glycoprotein Technologies
- ◆ Satellite III: Trainee Mentoring Program
- ◆ Glycans in metabolic regulation and development
- ◆ Glycan biosynthesis and function
- ◆ Glycan related diseases and disorders I
- ◆ Glycolipids in health and disease
- ◆ Glycans in pathogenesis and infection
- ◆ Expect the unexpected from microbes
- ◆ Glycoengineering and glycan related therapeutics

## ◆ Glycan related diseases and disorders II

ジョージア大学CCRCのRanzinger先生が主催したGlycoBioinformatics Satelliteにおいて、「Development of WURCS Related Tools」と題した口頭発表を行いました。本サテライトシンポジウムでは、GlyTouCan, GlycoStore、VirtualGlycome.org、Computational Glycoscience Portal、GlyGen、MIRAGE、GPQuest、SimGlycan、GRITS-Toolbox、DANGOなどのデータベースやツールなどの発表がありました。また2017年からNIHの支援を受けてスタートしたGlyGenプロジェクトと、我々がJST・NBDCライフサイエンスデータベース統合推進事業「統合化推進プログラム」の支援を受けて開発しているGlyCosmosは連携について議論しました。さらに参加者からGlycoinformatics Consortium (GLIC) の活用についての提案があり、糖鎖科学への貢献のために実施できることについて議論することになりました。また、本会議では「Integration of glycoscience data in GlyCosmos using Semantic Web technologies」と題したポスター発表を行いました。



図2 サテライト会議の様子

本会議期間でRobert Woods先生、René Ranzinger先生、Matthew Campbell先生をはじめ様々な研究者と交流し、協力・連携について議論しました。しかし、学会期間中の

みでは時間が足りないため、今後オンライン会議なども積極的に活用し協調していくこととなりました。

日本の学会の多くは日本語による発表であり、また地理的關係から海外の研究者は日本の学会に参加することはまれです。糖鎖インフォマティクスは、研究者が少なく、世界の研究者が集結するEUROCARBやSFGは直接

議論できる非常に有益な機会でした。このような非常に有意義な会議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いかしていきたいと考えています。

#### 参考文献

1. Symbol Nomenclature for Graphical Representation of Glycans, *Glycobiology* 25: 1323-1324, 2015. (PMID 26543186).

－ 事業概要 －

## 2017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の研究および機能性材料の研究に取り組んだ。2017年度は当研究所の原資のおよそ85%を糖鎖研究、15%を機能性材料研究にあてた。

活動の中心である糖鎖研究においては、重点テーマとしてモデル糖タンパク質の糖鎖を人為的に均一改変する技術（糖鎖リモデリング技術）の構築を進めてきた。今年度は主要糖鎖に加えてバイセクティング糖鎖や多分岐糖鎖等を含むマイナー糖鎖についてもリモデリングによる均一化と構造活性の評価を実施した。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た。また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、東京都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。また、糖鎖研究を支援するため、競争的資金を活用したデータベース開発プロジェクトに参画し、糖タンパク質データベースの構築にも注力している。

機能性材料研究では、今年度より企業との共同研究により、環境・エネルギー分野に資する研究を目指し、電池関係の研究テーマに取り組んだ。

また、当研究所で長年取り組んできた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。今年度はフルオラス科学研究会第10回シンポジウムを約50名の参加を得て当研究所にて開催した。

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、178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2014年度の助成者である筑波大学の所裕子氏に贈呈した。受賞講演は「相転移を利用した新機能性材料の開発」であった。

人材の養成については講師派遣、卒業研究生受け入れを継続して実施した。

#### 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来た。いわゆるバイオ医薬品はCHOに代表される動物細胞を利用しタンク培養により製造されている。抗体医薬の場合、10 g/Lの高い最終生産物濃度に達し、精製も容易になってきており、動物細胞を用いたバイオ医薬品の製造プロセスはほぼ完成されている。しかし、生きた細胞を用いる為、生物反応特有の不確定性や不均一性は避けられない。動物細胞で製造されたバイオ医薬品（糖タンパク質）ではタンパク質部分は同じだが付加される様々な糖鎖構造の違いが薬効や安全性に大きく影響する事が明らかとなり、2012年2月のFDAのガイドラインでも多様性のある糖鎖構造を定量的に分析し、どの糖鎖構造がどの割合で含まれるのかを明らかにするよう求められてきている。これを踏まえ、バイオ医薬品標準品の供給、糖鎖構造と生理活性の機能解明の為、2011年度HGP（Homogeneous GlycoProtein）プロジェクトを立ち上げ、糖鎖リモデリングによる均一な糖鎖を持つ糖タンパク質合成技術の確立を目指してきた。糖鎖リモデリング法とはまず酵素反応を利用して、糖タンパク質の糖鎖を切除し、均一なタンパク質部分を調製する（これをアクセプターと呼ぶ）。一方、別途人為的に調製した任意の糖鎖を用意し（これをドナーと呼ぶ）、このアクセプターとドナーを、酵素を用いて人為的に連結する。これにより、任意の糖鎖構造を持った均一な糖タンパク質を自由自在に合成できる。又、一般的にCHO細胞から製造された糖タンパク質を用いてアクセプターを調製すると、根元にフコースを持つ（コアフコースと呼ぶ）アクセプターがメインとなる。コアフコースの有無により、制癌活性が100倍異なるとの報告もあるのでコアフコースの有無も構造活性相関の重要な要因になる事がわかってきている。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バーサ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。（本結果はBiosci Biotech Biochem誌に報告）現在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、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進めている。今後、これらの均一糖鎖抗体の構造活性相関データを網羅し、ADC化も視野に入れた有用抗体デザインの可能性を探る。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1,5-AF(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1,5-AF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た。その結果、現在までに*in vitro*で1,5-AFの一万倍以上のインフラマソーム阻害活性を示す高活性化化合物群を創製する事に成功した。そこで、*in vivo*での効果を確認すべくマウス敗血症モデル、更にはインフラマソームの活性化と病態との関連がより強いと考えられる尿酸結晶マウス腹膜炎モデルを用いて有望化合物数種を試験した。しかしながらいずれのモデルでも明確な病態抑制効果を確認するには至らなかった。以上の結果から本テーマはペンディングする事とした。尚、インフラマソーム阻害活性の向上を目指した化合物最適化研究成果に関してはBMC誌に報告した。

### 糖鎖有機化学研究室

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

#### (2017年度の年初計画)

- ①各種糖鎖オキサゾリン（ドナー）の合成を行う。(HGP project)
- ②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。(AP project)
- 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。(卒研生テーマ)
- 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。
- ⑥ENGaseの糖鎖転移活性を利用した位置選

択的なタンパク質のPEG化法の開発を行う。

- ⑦糖鎖抗体作成用新規糖鎖プローブの開発を行う。
- ⑧質量分析法を用いた新規糖鎖構造解析法の開発を行う

#### (今期の成果)

HGPプロジェクトで抗体の糖鎖リモデリングのための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A1G1a/bGN2-oxaとG1a/bGN2-oxa、およびGN1a/b-oxaの合成を行った。

APプロジェクトでは、*in vivo*活性評価用に2種類のenone誘導体の再合成をおこなった。また化合物合成と活性評価の結果をまとめて論文化した。

$\alpha$ -ジストログリカンは筋細胞表面に存在する糖タンパク質で、基底膜と筋細胞を結合させ筋細胞構造の安定化に寄与している。この $\alpha$ -ジストログリカン上の糖鎖構造が不完全だと筋組織の維持が困難になり福山型先天性筋ジストロフィーの原因になることが明らかになっている。このような $\alpha$ -ジストログリカン関連疾患の研究や治療法の開発として $\alpha$ -ジストログリカン糖鎖が注目されている。本研究では、立体構造に基づいた $\alpha$ -ジストログリカン糖鎖合成酵素の分子機構の解明を目的とし、 $\alpha$ -ジストログリカン糖鎖合成酵素のX線構造解析を高エネルギー加速器研究機構、及び東京都健康長寿医療センター研究所との共同研究として行った。当研究室ではX線構造解析のための共結晶用基質となるマンノシルペプチドの化学合成を行った。

糖タンパク質の機能や構造の解析には、その部分構造である糖ペプチド標品が必要である。糖ペプチドの一般的な合成法として、糖水酸基保護基にはアセチル (Ac) 基やベン

ジル (Bn) 基が用いられる。しかし、糖水酸基をAc基で保護した場合、脱保護が二段階反応になる上、塩基処理によるペプチドのラセミ化が懸念される。また、糖水酸基をBn基で保護した場合、最終脱保護の酸処理において酸に感受性の高いフコシル結合が開裂してしまうことが報告されている。そこで、本研究では糖水酸基をtert-ブトキシカルボニル (Boc) 基で保護した、簡便かつ高収率な糖ペプチド合成法の開発を行っている。本年度はFuc-GlcNAc-peptideの合成検討を行い、フコシル結合の開裂をほぼ抑制でき、効率的にN-結合型糖ペプチドを合成できることを明らかにした。また糖水酸基をBoc基で保護する本手法を前述のマンノシルペプチドの合成にも展開し、効率的かつ高純度で合成でき、O-結合型糖ペプチドに対しても本手法が有用であることが明らかとなった。

グライコナビの拡充として糖タンパク質データベースの開発を行っている。本年度は糖タンパク質糖鎖のデータを論文より抽出し整理するため、データの格納形式、データ取得方法、可視化方法の検討を行った。また、糖タンパク質データを解析するツール、国際糖鎖標準表記法 (WURCS:: Web3.0 Unique Representation Carbohydrate Structures) や複合糖質表記法の開発も実施した。

タンパク質の位置選択的なPEG化法として、PEG化糖オキサゾリンをドナーとして用い、エンド- $\beta$ -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。本年度は、転移反応におけるPEG鎖の影響について検討した。すなわち、PEG鎖の導入位置や長さの異なるPEG化糖オキサゾリン体を合成し、それらをPEGドナーとした転移反応におけるPEG鎖の影響について検討を行った。その結果、分子内に導入するPEG鎖の本数が少ないほど転移収率が向上することが明らかとなった。一方でPEG鎖の導入位置や長さの

影響はあまり大きくないことが明らかとなった。さらに本年度はPEG化生成物の加水分解酵素に対する安定性の確認を行った。その結果、PEG化生成物はENGaseに対する高い加水分解耐性を示した。一方でPNGaseに対しては速やかに加水分解されることが明らかとなった。

糖鎖抗体の取得を目的として、本年度は*in vitro*選択法に適用可能な多価型糖鎖抗原テンプレートの合成を行い、AdLiB法及びファージディスプレイ法の2種の*in vitro*選択法による抗体の作製を試みた。その結果、いずれの方法においても目的とする糖鎖抗体を得ることはできなかった。

有機ボロン酸のジオールと結合する性質を利用した、通常の質量分析法によるでは識別が困難な糖異性体を識別できる、高感度かつ特異性の高い質量分析法の開発を行っている。本年度は糖と強く結合する有機ボロン酸の選定を行った。さらに、糖-有機ボロン酸会合体をMS/MS分析する事によって、分子中の水酸基情報を持ったフラグメントを得て、その情報より糖異性体を識別できることが明らかになった。

### 糖タンパク質工学研究室

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

#### (2017年度の年初計画)

- ①LDN糖鎖による乳癌進行抑制メカニズムを解析する。
- ②LDN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。
- ③GalNAc-DSLc4及びその合成酵素と腎癌悪性化との関連を解明する。

- ④HGPプロジェクトにおいて、ターゲットとする糖タンパク質や付加させる糖鎖の種類を拡充し、糖鎖改変体の調製を行う。また、取得した糖鎖改変体の品質評価系を確立し、各種糖鎖の機能を解明する。
- ⑤AP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。
- ⑥骨格筋の機能変化と糖鎖の役割を標的とした研究テーマを軌道に乗せる。外部研究者との共同研究を進展させ、技術習得・導入と共に網羅的な探索研究からの方向性を見極める。

#### (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4～10 ng/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、合成したLDN糖鎖をスクリーニングに用いたファージディスプレイなどによりこの糖鎖を認識する抗体の取得を目指したが、特異的な抗体は得られていない。

一方、乳癌では癌の悪性化に伴いLDN含有量の減少・消失がみられる。また、LDN生合成酵素の $\beta$ 4-N-acetylgalactosaminyltransferase4遺伝子強制発現乳癌細胞株では、対照株に比して悪性形質が抑制されることを明らかにした。現在、LDN糖鎖による悪性形質抑制の作用機序について、上記遺伝子高発現株を用いて、この糖鎖の発現増大が見ら

れる細胞表面の受容体を介したシグナル伝達経路に関する解析などを進めている。

腎癌において肺への高転移株にGalNAc $\beta$ 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きた。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 $\beta$ 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、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 $\beta$ 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をすでに報告している。今年度は、GalNAc-DSLc4安定発現株に血清刺激を加えた場合、あるいはGalNAc-DSLc4安定発現株がラミニン表面へ接着する場合において、4)インテグリン $\beta$ 1分子がラフトへの集積することやLipid raft様集合体が増大する事、5)GalNAc-DSLc4とインテグリン $\beta$ 1分子が共局在することを共焦点レーザー顕微鏡による観察結果から明らかにした。これらの結果は、成長因子およびインテグリン分子のラフトへの局在増加を裏付ける結果であり、安定発現株が獲得した悪性形質(増殖能、接着能、浸潤能亢進)が抗GalNAc-DSLc4抗体(RM2)添加によりキャンセルされる事と併せて考えると、悪性形質獲得にGalNAc-DSLc4の増加は必須であり、GalNAc-DSLc4糖鎖抗原が癌の悪性化および肺への高転移に大きく関与していることが推測された。

HGPプロジェクトにおいて、新たにGN1a、GN1b、G1GN1a、G1GN1b、M5型等の糖鎖ライブラリーを拡充し、カイコ絹糸腺にて

産生させた抗HER2抗体（トラスツズマブ）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ながら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を調製した。新たに調製した糖鎖改変トラスツズマブは、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（ADCC）活性測定および表面プラズモン共鳴法によるFc $\gamma$ レセプターとの相互作用解析を通して、これまでに調製済みの糖鎖改変トラスツズマブとの比較を実施した。また、抗CD20抗体（リツキシマブ）については、コアフコースを有する均一糖鎖構造を持つリツキシマブを4種調製し、共同研究において局所構造解析を実施した。さらにコアフコースを有さないリツキシマブも調製し、CD20高発現株のRaji細胞をターゲット細胞としたADCC活性を測定し、コアフコースを有する糖鎖改変リツキシマブとも比較した。今年度は新たに補体依存性細胞障害（CDC）活性の測定系も確立し、各種リツキシマブを用いて測定した。

APプロジェクトにおいて、*in vitro*系としてヒトTHP1細胞を用いた評価系を整備し、1,5-AFおよびその誘導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きた。これまでの検討で、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 $\beta$ を検出するcell assay系を立ち上げて化合物の評価を行い、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ため、インフラマソーム活性化の明らかな*in vivo* /*ex vivo* モデルとしてマウス尿酸結晶腹膜炎モデルを構築して評価することにした。尿酸結晶投与によりマウス腹腔内洗浄液中で好中球の割合が増加・

マクロファージの割合が減少して炎症が惹起されることを確認し、その後投与方法や腹腔洗浄の方法などを改良してモデルを確立した。既存のインフラマソーム阻害化合物のモデルでの効果を確認すると共に、1,5-AFおよびその誘導体の活性評価を実施した。既存インフラマソーム阻害化合物の作用との比較から、*in vivo*での明らかなインフラマソーム活性化阻害作用を確認することはできなかった。*In vivo*での効果を求めるためには、さらなる*in vitro*での活性向上、また化合物の安全性や物性等の確認が必要と思われる。この結果を受けて、インフラマソーム阻害1,5-AF誘導体の開発は中断することとした。

骨格筋の機能変化と糖鎖の役割に関する研究は、加齢により進行性かつ全身性に筋肉量および筋力が低下するサルコペニアなどの骨格筋領域の疾患について、その発症や進展における糖鎖の役割を明らかとし、その予防や治療に関する情報を提供することを目的として進めている。共同研究先の動物飼育施設で作製した各種疾患モデルマウスより抽出した筋肉組織を用いて網羅的な解析を行い、疾患に特異的な糖鎖構造変化を検出することができた。現在、その結果を裏付けるための検討を行っている。また、新たな視点からのアプローチをスタートする目的での共同研究を開始した。

### 糖鎖生物学研究室

糖鎖とペプチドを遊離せずアミノ酸配列情報および糖鎖付加位置情報を含む糖タンパク質のMSによる分析技術研究を推進している。これまで糖ペプチドをプレート上で直接ピレン標識し高感度MALDI-TOF-MSを本研究室で開発した。また、糖ペプチドを安定同位体ベンゾイル基で標識し、比較定量法を開発した。より定量的にグライコフォームを解析するために、LC-MS/MSも導入した。これらの技術をさらに向上させていくと同時に、

様々な糖タンパク質のグリコフォーム（アミノ酸配列は同一で異なる糖鎖を有する）を明らかにし、明確な構造に立脚した糖タンパク質の機能を解明する。

#### (2017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。昨年度に確立したLC-MS/MS手法を用いて癌患者血清PSAのグリコフォームを解析し、以前から提唱しているLDNグリコフォームの癌化に伴う増加を確認、検証する。
- ②LacdiNAc以外のグリコフォームの癌性変化を明らかにすることによって新たな前立腺がんマーカーを探索するため、患者がん細胞由来CTOSのPSAグリコフォームを解析する。今年度はPSA糖ペプチドのMS解析を行い、昨年度に行ったレクチンカラムクロマトグラフィー解析結果と合わせてグリコフォームを明らかにする。
- ③メソポーラス有機シリカによるレーザー脱離イオン化：マトリックス結晶を用いずにより簡便で再現性の高いMS解析を目指したLDI-MSのための支持体を開発している。昨年度サブピコモルの検出が可能になったが、今年度はさらなる高感度化を目指す。
- ④HGP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。
- ⑤APプロジェクトにおいてマウスプライマリーの系での新規化合物の活性評価実施。

#### (今期の成果)

グレーゾーン(4-10ng/ml)前立腺がん患者血清中のPSAグリコフォーム解析を目指して、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た。今年度は定量性・再現性を重視するため2種の内部標準を作成し、患者血清の解析に着手した。

また前立腺がんと関連する新規PSAグリコフォームを解明するため、精漿（正常細胞由来）、癌細胞株、患者CTOS由来PSAのグリコフォームの比較解析を行った。レクチンカラムクロマトグラフィーにより分画したところ、精漿由来PSAにはなく、前立腺がん細胞株およびCTOS由来PSAに存在する分子種を見出した。そこで、まず前立腺がん細胞株の培養上清を大量に調製しがん細胞特異的なレクチン画分のPSA糖ペプチドのMALD-MS構造解析を行い、精漿由来PSAに見られない構造を確認した。

メソポーラス有機シリカ薄膜によるLDI-MS法は、細孔処理を確実にすることによって1 pmol以下でも安定シグナルを検出できるようになった。

HGPプロジェクトで抗体の糖鎖リモデリングのためのエンド型糖加水分解酵素を探索する中で新規酵素を調製しその諸性質を調べた。

APプロジェクトでは、尿酸結晶(MSU)投与マウスを用いて合成新規化合物のNLRP3インフラマソーム

阻害効果を検証することになったので、*in vitro*マウスプライマリー細胞系で実験に使用するMSUのNLRP3インフラマソーム活性化能の測定を行い、各種化合物のIC50を測定した。

#### HGPプロジェクト

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

#### (2017年度の年初計画)

- ①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を有する均一糖鎖抗体を作成し、構造、活性相関を調べる。
- ②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。

- ③①の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)

抗体医薬製剤中の主要成分糖鎖に関して、高純度のコアフコース含有（コアフコース付加率99%）並びに非含有均一糖鎖搭載抗体を創製する技術（糖鎖リモデリング技術）を乳癌治療薬であるハーゼプチンをモデルとして確立してきた。そして得られた均一糖鎖抗体間での生物活性を評価し、コアフコース非含有体は含有体と比して2オーダー以上強いADCC活性、1オーダー以上高い親和性を示す事、コアフコース非含有糖鎖間、更には構造異性体糖鎖間でも活性に差が有る事等を明らかにし、報告してきた。現在、代表的N結合型糖鎖を網羅し、抗体機能における糖鎖機能をより詳細に解明すべく以下の糖鎖群のリモデリングを検討している。1) 製剤中にマイナー成分として検出されるコアフコース非含有型糖鎖（ハイマンノース型M5、構造異性体ペアであるGN1a/b、G1GN1a/b、A1G1a/BN2等）2) 多分岐型糖鎖（3本鎖、4本鎖）3) バイセクティング型糖鎖 4) 非天然型PEG化糖鎖。今年度 1) に関してはそれぞれリモデリングが完了し、一部活性評価が終了した。その結果、興味深い事にM5はコア5糖のみのM3より低活性を示し、G2等に比してFc受容体との親和性が1オーダー程低い事が判明した。M5は多種の抗体医薬製剤に検出されている事から本結果はQCにとって重要な知見と考えられる。また、GN1a/b、G1GN1a/b等構造異性体ペアの解析からは $\alpha$ 1-6側鎖が抗体の機能発現に極めて重要な役割を担っている事を示唆するデータを得た。今後、異なる構造異性体ペア、並びにリツキサンの糖鎖構造異性体の解析を通して仮説検証を行うとともに、機能発現に必要な糖

鎖の最小単位の同定を試みる。2) に関しては3、4本鎖のオキサゾリン化ドナー糖鎖を調製した後、抗体アクセプターに連結するというこれまでの方法では現状リモデリング困難と判断されたので、生合成酵素であるGnT IV, GnT Vを活用し、2本鎖均一抗体を出発原料として抗体上で3、4本鎖に伸長させる戦術を検討した。その結果、3本鎖a/b体、4本鎖の生成が確認された。今後スケールアップして純品を取得し評価する予定である。一方、国立食品衛生研究所との共同研究に関しては、当研究所で調製した（今年度G1aF, G1bF体を各々1mg取得し供与）4種の均一糖鎖抗体リツキサンG2F, G0F, G1aF, G1aF体（コアフコース付加率<99%）を用いてHDX解析等、構造特性解析が先方で進行中である。当研究所では相当する4種のコアフコース非含有HGPを新たに調製し、上記4種と並べてADCC活性を評価した。その結果、ハーゼプチンのケースと同様にコアフコースの存在が1/100程度活性を低下させる事が確認された。また糖鎖の種類による活性変動もハーゼプチンの場合とほぼ同様である事が確認された。また今回CDC活性測定系を新たに立ち上げ評価した結果、糖鎖の種類による活性順はADCC活性と同様の傾向である事、コアフコースの有無は活性に殆ど影響を及ぼさない事等が判明した。

#### APプロジェクト

研究室横断的に力を結集し、1,5-AF誘導体の自己炎症性疾患治療薬としてのポテンシャルを見極め新薬リード化合物の創製を目指すプロジェクト。

#### (2017年度の年初計画)

- ①新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自己炎症性疾患モデルでの化合物評価を実施する。

#### (今期の成果)

インフラマソーム阻害活性及び細胞毒性評価結果より選択した最有望化合物2種C3-enone体、C7-enone体を再合成し、*in vivo*評価に供した。

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腹膜炎モデルの検討を種々行い、尿酸結晶の腹腔内投与による好中球の特異的浸潤、更には入手可能な最強のインフラマソーム阻害剤であるMCC化合物の投与による当該細胞の浸潤抑制が検出可能となる条件を設定した。本条件にて、上記2化合物と市販のLevoglucononeを評価した。MCC化合物による好中球浸潤抑制効果は再現良く認められたが、調べた3化合物の何れにも同条件下で浸潤抑制効果は認められなかった。

#### 1-2 機能性材料研究

##### (2017年度の年初計画)

従来培ってきたナノ・メソポーラス材料技術および機能性材料技術の切り口から、次世代電池材料の創出を目指して、電極技術、電解液技術の探索研究を推進する。

#### (今期の成果)

新規電解液の性能向上のための添加剤について基礎実験によるスクリーニングを行い、既存添加剤よりも高性能な添加剤候補化合物を見出すことができた。また、NMR解析により、電解液の分解挙動を解明し、添加剤の物性と性能との相関を明らかにした。

#### 1-3 その他

2008年に発足したフルオラス科学研究会に対し、当研究所はフルオラス科学研究会シンポジウムの開催などの活動を支援している。

2017年度は、フルオラス科学研究会第10回シンポジウムを当研究所の水野真盛糖鎖有機化学研究室長をオルガナイザーとして、10月13日に東京都板橋区で開催した。(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 (JST) ライフサイエンスデータベース統合推進事業〔統合化推進プログラム〕 (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 (山口芳樹氏)
- ・ 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、2017年度は178件の応募の中から13件に第9回助成金を贈呈した。(別添資料2)

本助成金の採択者は9年間で延べ124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。

2018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。2017年度は2013年度、2014年度の採択者28名の中から筑波大学の所裕子氏に「第4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。2017年度は大学院生1名、卒研生2名を受け入

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4名を各大学に派遣し、化学系技術者の教育・育成活動に努めた。(別添資料3)

## 4. 研究の成果 (別添資料4)

### (1) 特許出願関係

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

### (2) 学会発表 26件 (うち国際学会 5件)

### (3) 誌上発表 5件

### (4) 依頼講演 2件

## 【別添資料1】

フルオラス科学研究会第10回シンポジウムプログラム

2017年10月13日 (金) 公益財団法人野口研究所会議室 〒173-0003 東京都板橋区加賀1-9-7

9:30 ~ 9:40 会長挨拶: 畑中研一 (東大生産研)

9:40 ~ 10:20 座長: 国嶋崇隆 (金沢大院医薬保)

招待講演1 「パーフルオロアルキル基を疎水鎖末端に導入した部分フッ素化リン脂質ライブラリーの開発とin vitro 膜タンパク質研究への展開」  
(群馬大院理工) 園山正史

10:20 ~ 10:35 依頼講演 「Cell culture and glycolipid production at the interface of aqueous/fluorous culture system」  
(東大生産研) 粕谷マリアカルメリタ

10:50 ~ 11:30 座長: 矢島知子 (お茶の水女子大)

招待講演2 「マイクロ相分離を利用した子集合体の機能開発」  
(弘前大学院理工) 鷺坂将伸

11:30 ~ 13:00 評議委員会

13:00 ~ 13:30 総会

13:15 ~ 13:55 座長: 松儀真人 (名城大学農)

招待講演3「実験化学と理論計算化学が拓くヘテロ原子導入反応」

(東京大学院薬) 平野圭一

13:55 ~ 14:10 口頭発表1「含フッ素ボロン酸触媒を用いる脱水縮合反応によるジペプチド合成」

(名古屋大院工) 石原一彰

14:10 ~ 14:25 座長: 伊藤彰近 (岐阜薬科大学)

口頭発表2「ペルフルオロアルキルスルホニル基で置換されたpush-pullエチレンの合成とその動的立体構造」

(東京薬大薬) 矢内光

14:45 ~ 15:25 招待講演4「結晶性フッ素ポリマー/フッ素化ホスホン酸修飾"透明"ナノハイリッドの創出」

(埼玉大学院理工) 藤森厚裕

15:25 ~ 15:55 ポスター発表用ショートプレゼンテーション

16:05 ~ 17:10 ポスターセッション

17:30 ~ 19:30 情報交換会

ポスターセッション

P-1 フルオラス有機分子触媒を用いた不斉ヒドロホスフィニル化反応

(東京薬科大薬) ○藤野佑樹、平島真一、成島岳史、中島康介、古石裕治、三浦剛

P-2 含フッ素低分子ゲル化剤によるフルオラス溶媒のゲル化

(お茶の水女子大院) ○叶野花菜子、佐藤久子、山岸皓彦、矢島知子

P-3 酸触媒ジアシルトリアジンジオン型フルオラスベンジル化剤の開発

(金沢大院医薬保) ○山田耕平、藤井崇徳、山下莉奈、国嶋崇隆

P-4 含フッ素 Deng ウイルス感染阻害剤の合成研究

(広島国際大学薬) ○寺岡文照、三栞ゆか、大坪忠宗、池田潔

P-5 ミディアムフルオラスストラテジーに依拠した固相-液相間移動型プロリン触媒の合成

(名城大農) ○後藤万智子、杉山祐也、枝川静華、塩入孝之、松儀真人

P-6 電子供与性不斉リガンドを有するフルオラス鉄サレン錯体の合成

(名城大農) ○宮田一誠、小林佑基、松浦乃里香、塩入孝之、松儀真人

P-7 フルオラス化学を利用した核燃料リサイクル

(1東海大工・応化、2東海大工・原子力) ○廣瀬貴也1、中川洸希1、浅沼徳子2、稲津敏行1

P-8 Chronology of uptake and toxicity of perfluorodecanoic acid in mouse melanoma B16 cells

(東大生研) ○Maria Carmelita Z. Kasuya and Kenichi Hatanaka

P-9 フェイズ・バニシング (PV) 法によるCOガスの発生とその利用

(阪府大院理) ○足達裕介、松原浩

P-10 細胞培養への応用を目指したフルオラス溶媒ゲルの開発

(1東大生産研、2東大院工) ○宮島浩樹1,2、粕谷マリアカルメリタ1、畑中研一1

P-11 フルオラスポリマーからなる超薄膜の創製と生体組織用高解像度イメージングツールへの応用

(1東海大工、2東海大院工、3東海大マイクロ・ナノ研、4北大電子研) ○岡村陽介1-3、張宏3、

増田愛美<sup>1</sup>、鎗野目健二<sup>2</sup>、長瀬裕<sup>1,2</sup>、川上良介<sup>4</sup>、根本知己<sup>4</sup>

P-12 One-Potフルオラス合成法の開発

(野口研・糖鎖有機) ○後藤浩太郎、男谷義雄、水野真盛

P-13 ヨウ化水素簡便発生法を利用したペントレン合成

(岡山理大工) ○折田明浩、奥田靖浩、西田孝徳、山下博文、萩原貴史

**【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1名と卒研生1名を受け入れた。北里大学から卒研生1名を受け入れた。下記のテーマにより研究を行った。

**卒業論文研究テーマ**

- ①Boc基を糖水酸基保護基として用いる糖ペプチドの効率的合成法の開発
- ②ENGaseの糖鎖転移活性を利用したタンパク質の位置選択的なPEG化法の開発  
～転移生成物の加水分解酵素に対する安定性の検討～

**修士論文研究テーマ**

- ①ENGaseの糖鎖転移活性を利用したタンパク質の位置選択的なPEG化法の開発  
～糖転移反応におけるPEG鎖の影響～

(2) 職員の教育活動

今年度は研究員4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 26件 (うち国際学会 5件)

ケモインフォマティクス若手の会 (2017.5.16)	1件
第65回質量分析討論会 (2017.5.17-19)	1件
Beilstein Glyco-Bioinformatics Symposium 2017 (2017.6.13-15)	1件
19th European Carbohydrate Symposium (2017.7.2-7.6)	1件
第3回ENGase研究会 (2017.7.18)	1件
第36回日本糖質学会年会 (2017.7.19-21)	5件
第36回日本筋学会学術集会 (2017.8.4-8.5)	1件
State and Future of the IUPAC InChI meeting (2017.8.16-18)	1件
トーゴーの日シンポジウム2017 (2017.10.4-5)	1件
フルオラス科学研究会第10回シンポジウム (2017.10.13)	1件
第40回ケモインフォマティクス討論会 (2017.10.26-27)	1件
Annual Meeting of the Society for Glycobiology 2017 GlycoBioInformatics satellite meeting (2017.11.4)	1件

Annual Meeting of the Society for Glycobiology 2017 (2017.11.5-8)	1 件
生物有機化学フォーラム2017 (2017.11.11)	1 件
第8回グライコバイオロジクス研究会 (2017.11.17)	1 件
第54回ペプチド討論会 (2017.11.20-22)	1 件
第33回ゼオライト研究発表会 (2017.11.30-12.1)	1 件
ConBio2017 (2017.12.6-9)	1 件
第40回日本分子生物学会年会 (2017.12.6-9)	2 件
日本化学会第98春季年会 (2018.3.20-23)	1 件
日本薬学会第138年会 (2018.3.20-24)	1 件

## 2. 誌上発表 5件

フルオラス合成法の糖質合成への展開

水野真盛

有機合成化学協会誌 2017,75(6) 622 – 631

Implementation of GlycanBuilder to draw a wide variety of ambiguous glycans

Shinichiro Tsuchiya, Nobuyuki P. Aoki, Daisuke Shinmachi, Masaaki Matsubara, Issaku Yamada, Kiyoko F. Aoki-Kinoshita, Hisashi Narimatsu

Carbohydrate Research 2017, 445 104-116

MALDI – 多段階質量分析を用いた糖鎖異性体の構造解析

天野純子

分析 2017年10月号 489-492

GlyTouCan: an accessible glycan structure repository

Michael Tiemeyer, Kazuhiro Aoki, James Paulson, Richard D Cummings, William S York,

Niclas G Karlsson, Frederique Lisacek, Nicolle H Packer, Matthew P Campbell, Nobuyuki P Aoki, Akihiro Fujita, Masaaki Matsubara, Daisuke Shinmachi, Shinichiro Tsuchiya, Issaku Yamada, Michael Pierce, René Ranzinger, Hisashi Narimatsu, and Kiyoko F Aoki-Kinoshita

Glycobiology, 2017, 27(10) 915–919 doi: 10.1093/glycob/cwx066

Preparation and biological activities of anti-HER2 monoclonal antibodies with fully core-fucosylated homogeneous bi-antennary complex-type glycans

Wataru Tsukimura, Masaki Kurogochi, Masako Mori, Kenji Osumi, Akio Matsuda, Kaoru Takegawa, Kiyoshi Furukawa and Takashi Shirai

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2017, 81(12) 2353–2359

3. 講演 2件

World Chemistry Conference and Exhibition (Rome) (2017.9.4)

「WURCS :The Web3 Unique Representation of Carbohydrate Structure」 山田一作

日本技術士会化学部会講演会 (2017.11.16)

「飾り物でない糖鎖の実力 - 血液型から抗体医薬まで-」 天野純子

# 研究所の概要

## Outline of the Institute

理事 入江 辰則  
Tatsunori IRIE

### 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10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 入江 辰則\* 山岸 秀之 加藤仁一郎 松崎 修 松下 哲也 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 柴田 豊 後藤 泰行 高下 貞二

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30年7月末日現在、次のとおりである。

遠藤 玉夫 古川 清 深瀬 浩一 柴崎 一郎

## 6. 職員

職員は平成30年7月末日現在、34名である。このほかに技術アドバイザー 2名が勤務している。

## 7. 財産

平成30年3月末の正味財産は約136億円である。

## 8. 建物

当研究所は昭和21年1月、横浜より板橋区加賀に移転し研究活動を行ってきた。しかしながら、約70年に及ぶ使用の中で老朽化が激しく、利便性も十分ではなかったために建替え、平成28年9月末から新研究所にて研究事業に取り組んでいる。

### 研究所全景

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



## 9. 特許および商標

当研究所所有の特許権は87件（国内76件、外国11件）、商標権は4件である（平成30年6月末日現在）。

### 9-1 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
小松 民邦	排ガス浄化用ハニカム触媒	4233572	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
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
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	NOx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	$\alpha$ -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	$\alpha$ -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
小松民邦	燃料電池用電極及び該電極を用いた燃料電池	5019905	2012.06.22
小松民邦 友国敬三	排ガス浄化用触媒	5025148	2012.06.29
小松民邦	非白金系燃料電池用電極及び該電極を用いた燃料電池	5025283	2012.06.29
山ノ井孝	exo-グリカール誘導体の製造法	5060028	2012.08.10
山ノ井孝	グリコシド誘導体と非還元性二糖およびその製造法	5091508	2012.09.21
山ノ井孝 小田慶喜	糖分岐シクロデキストリン誘導体とその製造法	5100160	2012.10.05
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 <sub>x</sub> 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 $\alpha$ -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
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	$\alpha$ -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 孔	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	糖ペプチド誘導體及びその製造方法	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 $\alpha$ で結合した糖誘導體の調製方法	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體	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

小西満月男 友国敬三	一級アルコールからカルボキシル基を二つ以上持つ化合物を製造する方法、およびそれに用いる触媒	6290756	2018.02.16
高羽洋充 天野純子	スペクトル予測方法、スペクトル予測装置、およびプログラム	6319716	2018.04.13
＜以下、外国特許＞			
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
中山淳 山ノ井孝 藤田雅也 白井孝	$\alpha$ -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	$\alpha$ -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
天野純子 奥村寿子	MALDI質量分析法	EP 2752659 (英、独、仏)	2017.10.18
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	EP 2345656 (英、独、仏)	2018.05.02

## 9-2 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. 2017年度野口遵賞実施報告

第9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) 2017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2017年9月1日から2ヶ月間募集を受け付け、総計178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	82件	5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	66件	5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	30件	3件
件数計		178件	13件

##### ②選考委員会

2018年2月6日に当研究所において選考委員会を開催した。選考委員9名が出席し厳正な選考の結果13件が採択された。（表2、表3参照）

##### ③贈呈式

2018年3月14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
山田 勇磨	北海道大学大学院 薬学研究院 准教授	再生医療を加速するミトコンドリアを強化した幹細胞の創生
寺島 崇矢	京都大学大学院 工学研究科 高分子化学専攻 助教	セルフソーティングポリマー会合体を基盤とする高機能ハイドロゲルの創成
佐藤 和秀	名古屋大学高等研究院 医学系 研究科 呼吸器内科学 特任助教	物性化学反応と医学の融合：光反応を分析、イメージすることで明らかになる革新的光治療
太田 禎生	東京大学大学院 工学系研究科 応用化学専攻 さきがけ研究員	イメージングとシーケンシングを融合する機械学習駆動型サイトメトリー技術
高橋 治子	東京大学 生産技術研究所 特任助教	抗がんナノメディシン評価のためのがん微小環境モデルデバイスの構築
増田 貴史	北陸先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 助教	液体 A 1 の創出
中村 貴志	筑波大学 数理物質系 化学域 助教	基質が結合する配位サイトを集積した大環状錯体の創製と特異的多量化反応
稲木 信介	東京工業大学 物質理工学院 応用化学系 准教授	グリーンケミストリーを志向した革新的有機電解合成法の開発
小嶋 隆幸	東北大学 学際科学フロンティア 研究所 助教	新奇触媒としてのホイスラー合金の研究
ウヤヌクムハメット	名古屋大学大学院 工学研究科 有機・高分子化学専攻 助教	高活性次亜ハロゲン酸塩触媒を用いる酸化的アジド化反応の開発
廣戸 聡	名古屋大学大学院 工学研究科 有機・高分子化学専攻 助教	窒素含有ナノチューブの精密合成と機能性の開拓
新居 陽一	東京大学大学院 総合文化研究科 助教	新奇フォノンクスデバイス創出に向けた基礎現象の開拓
南 豪	東京大学 生産技術研究所 講師	分子認識能をもつ $\pi$ 共役高分子材料の創製と電解質ゲートランジスタ型化学センサへの展開

\*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	中部大学教授・京都大学名誉教授
	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	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

【2015年度 (第7回) 野口遵研究助成金 研究成果報告 (要旨)】

氏名	高橋 忠伸	所属	静岡県立大学大学院 薬学研究院	職名	准教授
研究テーマ名	インフルエンザウイルス酵素の蛍光イメージング剤を利用した画期的診断法の開発				
ウイルス酵素「シアリダーゼ」の蛍光化プローブを利用して、薬剤耐性インフルエンザウイルス及びその感染細胞のみを選択的に蛍光イメージングし、薬剤耐性株を蛍光化細胞から高確率に分離する手法を確立した。市販の診断薬以上の検出感度で、抗インフルエンザ薬に対する薬剤耐性化も検出でき、迅速 (16分) で簡易なインフルエンザ検出法を開発した。蛍光強度や蛍光化の鮮明度を向上させる、プローブの構造改良基盤を確立した。					
氏名	武元 宏泰	所属	東京工業大学 科学技術創成研究院	職名	助教
研究テーマ名	がん細胞選択的な薬効の発現をプログラムしたsiRNA型制がん剤の開発				
本研究では、ステルス性高分子の結合によりsiRNAの薬理機構を制御し、がん細胞選択的な薬理活性を発現する新規siRNA誘導体の創製である。研究期間を通じ、目的とするsiRNA誘導体の開発に成功し、そのがん細胞内での薬効発現を確認した。特筆すべきは、開発された化学構造には優れた細胞外安定性および光安定性が見出され、成果は特許出願および国際的学術誌への掲載 (表紙に採用) 等として結実している。					
氏名	田村 篤志	所属	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所	職名	准教授
研究テーマ名	アテローム性プラーク微小環境への能動的集積とコレステロール低下を可能とする超分子医薬の開発				
本研究ではポリロタキサン (PRX) による動脈硬化症治療を目的とした検討を行った。本研究の過程で、想定外のPRXによる炎症刺激抑制作用を見出したことにより、当初の研究計画とは異なる研究になったが、その効果は投与の予想よりも有望であり、動脈硬化症だけではなくアレルギー性疾患や自己免疫疾患への応用も期待される。今後さらに研究を継続し、PRXによる疾患治療の可能性を明らかにしたいと考えている。					

氏名	相良 剛光	所属	北海道大学 電子科学研究所	職名	助教
研究テーマ名	微小な力を検知する水溶性メカノプローブの開発と生体材料への応用展開				
<p>両親媒性分子で構成される機械的刺激応答性発光材料の機能拡張に取り組んだ。今回新しく開発した両親媒性分子は緑色の発光色を示す超分子ファイバーを形成し、機械的刺激が印加されるとファイバーが切断され、切断面で繭状の分子集合構造を形成することがわかった。この繭状の分子集合構造内で発光部位がエキシマーを形成し、発光色が橙色に変化することがわかった。</p>					
氏名	関谷 毅	所属	大阪大学 産業科学研究所	職名	教授
研究テーマ名	装着感のないパッチ式血圧センサシートの開発				
<p>本研究では、装着感のない「パッチ式血圧計」を実現し、無意識のうちに24時間血圧モニタリングができるシステムの基盤技術開発に取り組んだ。特に違和感なく密着できる柔軟センサを搭載しながらも、血圧計測可能なシステムの基盤技術（柔軟センサ素子、ワイヤレス計測モジュール、信号処理用ICとその集積化技術）を構築することを目的に取り組んだ。</p>					
氏名	岩崎 崇	所属	鳥取大学 農学部	職名	准教授
研究テーマ名	ポリヒスチジンを利用した新しいリソソーム酵素補充法の開発基盤研究				
<p>リソソームは細胞内の老廃物分解を担うオルガネラであるが、リソソーム中の酵素が欠失すると、代謝異常が発生する。このようなリソソーム酵素欠失細胞に対して、我々は独自の細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジン（H16）を利用して、細胞外からリソソーム酵素を補充する手法を開発した。リソソーム酵素を内包したポリヒスチジン（H16）修飾リポソームは、細胞内リソソームへ送達され、代謝異常に起因する細胞増殖低下を緩和することが確認された。</p>					
氏名	杉本 宜昭	所属	東京大学大学院 新領域創成科学研究科	職名	准教授
研究テーマ名	原子間力顕微鏡を用いた単分子の化学反応のその場観察				
<p>探針にかかる微弱な力を測定する原子間力顕微鏡（AFM）を用いれば、単一有機分子の内部構造（分子骨格）を直接観察できる。この技術を用いて、有機分子の表面化学反応を可視化することに成功した。この化学反応は基板との力に誘起される特異な反応であることが判明した。また、表面に吸着した水分子のネットワーク構造を観察することにも成功した。これによって、表面の濡れなどを微視的に調べることができる。</p>					
氏名	邨次 智	所属	名古屋大学大学院 理学研究科	職名	助教
研究テーマ名	有用化学物質の効率的合成を志向した表面モレキュラーインプリンティング触媒の創製と選択的な官能基直接変換				
<p>シリカ固定化Ruポルフィリン錯体を用い、Ru中心に鑄型分子を配位させ、その周囲にシリカマトリックスを積層させることにより、ステロイド類の5, 6位二重結合のエポキシ化に選択的な表面モレキュラーインプリンティング触媒を調製した。FT-IR、固体NMR、UV/vis、Ru K端EXAFSによりその構造を解析した。シリカマトリックス積層条件等を最適化することで、ステロイド類の5, 6位二重結合エポキシ化に対する高い選択性を実現した。</p>					

氏名	酒田 陽子	所属	金沢大学 理工研究域物質 化学系	職名	助教
研究テーマ名	異種成分混合系での自己組織化法を用いた新規巨大分子精密集積場の構築				
<p>本研究では、クラウンエーテルと同等なサイズの空孔を持つ金属錯体型人工環状ホスト分子にキャップを取り付け、ゲストの出入りの速さを制御できる手法を開発した。さらに、キャップを取り替えるだけで、望みのタイミングでゲストの出し入れをスタートさせることに成功した。すなわち、ホスト・ゲスト化学の「時間スケール」の自在な制御を通じて「時間」と「機能」をリンクさせる新概念を創出した。</p>					
氏名	内田 健一	所属	物質・材料研究機構 磁性・スピントロニクス材料研究拠点	職名	グループリーダー
研究テーマ名	磁性多層膜におけるスピン流熱電変換の解明と高効率化				
<p>本研究の目的は、磁性多層膜におけるスピン流熱電変換の増大原理を解明し、熱電変換効率向上に向けた指針・基盤技術を構築することである。熱流によるスピン流生成現象であるスピントロニクス効果、及びその逆効果であるスピネルチェ効果に関する系統的な実験研究を行い、その熱電特性や温度依存性の定量評価を実現すると共に、磁性多層膜におけるスピネルチェ効果の増大現象を見出した。</p>					
氏名	三友 秀之	所属	北海道大学 電子科学研究所	職名	准教授
研究テーマ名	DNAの塩基配列選択的メッキによるプラズモニックメタマテリアルの創製				
<p>本研究では、DNAを片末端で基板上に固定化したDNAブラシを鋳型に用いて、動的に構造の制御が可能な三次元金属ナノ構造体を創製する手法の開発に取り組んだ。独自開発したブロックコポリマーDNA作製技術を応用し、塩基配列選択的な金属化が可能な配列を有するブロックコポリマー型DNAブラシの作製に成功した。</p> <p>また、DNAブラシの2次元パターン化にも成功した。塩基配列選択的な金属化による3次元金属パターンの創製については現在確認中である。また、DNAブラシを足場としてロッド状金ナノ粒子を静電的に固定化する手法により、粒子を配向固定化することに成功した。配向固定化された金ナノ粒子は、電場によりその配向が可逆的に制御可能であることが確認でき、動的に制御可能な光ナノ材料への応用へと研究が発展している。</p>					
氏名	田中 一生	所属	京都大学大学院 工学研究科	職名	准教授
研究テーマ名	凝集誘起型発光特性を基盤とした 固体りん光発性高分子の創出				
<p>本研究では、有機ガリウム錯体による高輝度固体発光性材料の開発を目標とした。新奇錯体とそれらを含む高分子を合成し、従来のホウ素錯体のものと発光特性を比較した。その結果、ガリウム錯体より固体状態でより高い発光量子収率が得られたことと、りん光発光も得られた。また、残光のクロミズムなど新奇の光学現象を観測することができた。</p>					

## 2017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) 2017年度の概要

2018年2月6日に野口遵研究助成金の選考に先立って第4回野口遵賞の選考を行った。選考委員9名による選考の結果、筑波大学大学院数理物質科学研究科所裕子准教授を受賞者とすることを決定した。なお、本年度は2013年度、2014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所裕子准教授は2014年度に「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」というテーマで野口遵研究助成に採択されています。

– Appendix –

## 2017年度誌上発表論文抄録集

### Abstract of Publications

#### フルオラス合成法の糖質合成への展開

水野真盛

有機合成化学協会誌 2017,75(6) 622–631

fluorous chemistry is suitable as a strategic alternative to solid-phase synthesis, because it does not resort to chromatography due to its immiscibility with common organic solvents. Herein, the efficient synthesis of monosaccharide units and oligosaccharide using fluorous methods is described. Further, the synthesis of a monosaccharide unit using the combination of fluorous chemistry and a microreactor as a single system is reported.

~~~~~

#### Implementation of GlycanBuilder to draw a wide variety of ambiguous glycans

Shinichiro Tsuchiya, Nobuyuki P. Aoki, Daisuke Shinmachi, Masaaki Matsubara,

Issaku Yamada, Kiyoko F. Aoki-Kinoshita, Hisashi Narimatsu

Carbohydrate Research 2017, 445 104-116

GlyTouCanは2015年に国際糖鎖構造リポジトリとして公開された。GlyTouCanでは、従来のフォーマットでは、すべての糖鎖構造を汎用的に表現する柔軟性が不十分であったため、糖鎖構造の表記基盤としてWURCSを使用している。したがって、既存または新規糖鎖構造のWURCS文字列を得るために、WURCSを出力することができる変換ツール、糖鎖構造エディタが必要となった。ベースとなる糖鎖構造エディタは、コミュニティで幅広く用いられているGlycanBuilderを選択した。しかし、GlycanBuilderは、もともと哺乳動物糖鎖のために開発されたため、機能が限られていた。そして、新たに提案された単糖シンボルである「Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG)」が利用できなかった。したがって、本論文では、GlycanBuilderに新しい機能を実装して、使いやすさを大幅に向上させた。グリカンレンダリングシステムをリファクタリングして、環状糖鎖、入れ子状反復単位、単糖組成物および架橋糖鎖構造を表すことができるようにした。WURCS用の出力ユーティリティを導入し、SNFGシンボルを使用して糖鎖構造をグラフィックスとしてエクスポートできるようにした。

「GlycanBuilder2」と呼ばれるこの新しいバージョンのGlycanBuilderは、バクテリアや植物由来の単糖類を含む多種多様な糖鎖構造をサポートすることができる。これらの糖鎖構造は、新しいSNFGシンボルを使用して表示することもできる。このツールは、研究者が糖鎖の複雑で多様で曖昧な構造についてサポートすることができる。さらに、新しいGlycanBuilderは、キャンバスに描かれた糖鎖構造からWURCS文字列を簡単に出力できるようになった。最も重要なのは、GlyTouCanは糖鎖構造情報の登録と検索のための基盤フォーマットとしてWURCSを採用しているため、GlyTouCanでより多様な糖鎖構造を簡単に登録して照会できるようになった。

~~~~~

## MALDI-多段階質量分析を用いた糖鎖異性体の構造解析

天野純子

分析 2017年10月号 489-492

細胞表面は複合糖質で覆われ、細胞が合成するタンパク質の多くには糖鎖が結合している。これらの機能解明には複合糖質の構造およびそれぞれのグリコフォームとの因果関係を明らかにすることが重要である。しかし、糖鎖構造解析は糖鎖構造が複雑で多様性を有するため、核酸やタンパク質の解析に比べて困難であり分析技術開発が必要である。近年のMS解析技術の発展により、微量で糖鎖構造解析が可能になってきた。本稿では特に糖鎖異性体を多段階MSで同定する手法について紹介する。特集「社会生活に密接に関わる生体高分子・機能性高分子と分析化学」の中の1稿である。

~~~~~

## GlyTouCan: an accessible glycan structure repository

Michael Tiemeyer, Kazuhiro Aoki, James Paulson, Richard D Cummings, William S York,  
Niclas G Karlsson, Frederique Lisacek, Nicolle H Packer, Matthew P Campbell,  
Nobuyuki P Aoki, Akihiro Fujita, Masaaki Matsubara, Daisuke Shinmachi,  
Shinichiro Tsuchiya, Issaku Yamada, Michael Pierce, René Ranzinger,  
Hisashi Narimatsu, and Kiyoko F Aoki-Kinoshita  
Glycobiology, 2017, 27(10) 915-919 doi: 10.1093/glycob/cwx066

糖鎖データの迅速かつ継続的な成長により、これらのデータセットをより幅広い生物医学研究コミュニティに提示するための基本インフラストラクチャの開発が強化される必要があることが明らかになった。成長の早い段階で、ゲノムおよびプロテオーム分野は、データ提示の組織化および知識抽出のためのバイオインフォマティクスアプローチの強化に不可欠な固有の遺伝子およびタンパク質識別子を割り当てるためのメカニズムを実施した。同様の一意の識別子

は現在糖鎖データには存在しない。糖鎖データの継続的な成長とアクセシビリティを促進するために、著者は糖鎖コミュニティの糖鎖構造のGlyTouCanリポジトリへの提出を調整し、出版物にGlyTouCan識別子を使用することを強く推奨する。著者らはまた、雑誌に提出された糖鎖構造を明示的に記述するための標準的な参考資料として、提出された出版物がGlyTouCan識別子を利用する提出ワークフローをジャーナルに推奨することを深く奨励する。



## Preparation and biological activities of anti-HER2 monoclonal antibodies with fully core-fucosylated homogeneous bi-antennary complex-type glycans

Wataru Tsukimura, Masaki Kurogochi, Masako Mori, Kenji Osumi, Akio Matsuda,  
Kaoru Takegawa, Kiyoshi Furukawa and Takashi Shirai  
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2017, 81(12) 2353-2359

近年、IgGモノクローナル抗体に結合したN型糖鎖からコアフコースを欠損させると、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性が増大することが報告されている。我々は最初にコアフコースを有する4種類の複合型糖鎖 (G2F、G1aF、G1bFまたはG0F) がそれぞれ結合した均一な構造を持つ抗HER2抗体の調製方法を確立した。さらに、それらに対応するコアフコースを有さない複合型糖鎖 (G2、G1a、G1bまたはG0) がそれぞれ結合した抗体を含めた均一糖鎖構造を持つ抗体間での生物活性比較を通して糖鎖構造とコアフコースの役割を調べた。その結果、いずれの複合型糖鎖構造においてもコアフコースを有する抗体はFcγ受容体に対する解離定数がコアフコースを有さない抗体よりも10倍高い値を示した。また、コアフコースを有する抗体のADCC活性はコアフコースを有さない抗体に比べて大きく減少・消失した。したがって、抗HER2抗体に結合した複合型糖鎖にコアフコースが存在すると抗体の生物活性が著しく低下することが示された。



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61号

2018年10月1日 発行

禁無断転載 非売品

編集兼発行人 入江 辰則

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

---

---