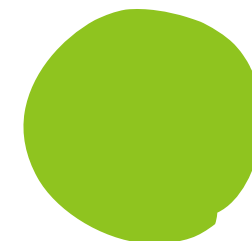


野口 研究所 時報

ISSN 0369-5131

2019



62

ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.62 2019

CONTENTS

An Essay	Hiroshi KOBAYASHI
Immunoregulation through innate immunity	Koichi FUKASE
Clinical Investigation of Glyco-Science	Eiji MIYOSHI
Regulation and physiological functions of galectin-4 in cancer disease	Hiroko IDEO
LC-MS/MS-based strategy for the analysis of glycosylation of prostate-specific antigen (PSA) at low level in human serum	Kazuko HACHISU
Development of Glycosylated Amino Acid Protected with Acid Labile Group and Its Application for Glycopeptide Synthesis	Tomohiro TANAKA
Real-time observation of membrane protein-embedded nanodiscs by high-speed atomic force microscopy.	Takamitsu HARUYAMA Tomoya TSUKAZAKI
Spin Peltier effect	Ken-ichi UCHIDA
Report on the International Meeting	Tomohiro TANAKA
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
自然免疫を介した免疫制御	深瀬 浩一
糖鎖科学の臨床応用	三善 英知
癌疾患におけるガレクチン-4の役割と制御	井手尾浩子
グレーゾーンレベル前立腺がん患者血清PSAの糖ペプチドのLC-MS/MS解析法の開発	八須 和子
酸感受性保護基を有する糖アミノ酸の開発と糖ペプチド合成への応用	田中 智博
高速原子間力顕微鏡によるナノディスクを用いた膜タンパク質のリアルタイム動態観察	春山 隆充 塚崎 智也
スピンベルチェ効果	内田 健一
ACS Fall, 2018 National Meeting & Exposition参加報告	田中 智博
2018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	
2018年度誌上発表論文抄録集	

巻頭言 所感	小林 宏史	1
自然免疫を介した免疫制御	深瀬 浩一	4
糖鎖科学の臨床応用	三善 英知	15
癌疾患におけるガレクチン-4の役割と制御	井手尾浩子	22
グレーゾーンレベル前立腺がん患者血清PSAの糖ペプチドの LC-MS/MS解析法の開発	八須 和子	30
酸感受性保護基を有する糖アミノ酸の開発と糖ペプチド合成 への応用	田中 智博	36
高速原子間力顕微鏡によるナノディスクを用いた膜タンパク質の リアルタイム動態観察	春山 隆充 塚崎 智也	42
スピンペルチェ効果	内田 健一	50
ACS Fall, 2018 National Meeting & Exposition参加報告	田中 智博	60
2018年度活動概要	松田 昭生	62
研究所の概要	入江 辰則	75
野口遵研究助成金／野口遵賞		80
2018年度誌上発表論文抄録集		86

THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.62 2019

C O N T E N T S

An Essay	Hiroshi KOBAYASHI ·····	1
Immunoregulation through innate immunity	Koichi FUKASE ·····	4
Clinical Investigation of Glyco-Science	Eiji MIYOSHI ·····	15
Regulation and physiological functions of galectin-4 in cancer disease	Hiroko IDEO ·····	22
LC-MS/MS-based strategy for the analysis of glycosylation of prostate-specific antigen (PSA) at low level in human serum	Kazuko HACHISU ·····	30
Development of Glycosylated Amino Acid Protected with Acid Labile Group and Its Application for Glycopeptide Synthesis	Tomohiro TANAKA ·····	36
Real-time observation of membrane protein-embedded nanodiscs by high-speed atomic force microscopy	Takamitsu HARUYAMA ····· Tomoya TSUKAZAKI	42
Spin Peltier effect	Ken-ichi UCHIDA ·····	50
Report on the International Meeting	Tomohiro TANAKA ·····	60
The Activities of the Institute	Akio MATSUDA ·····	62
Outline of the Institute	Tatsunori IRIE ·····	75
Noguchi Shitagau Research Grant	·····	80
Abstracts of Publications	·····	86

— 卷頭言 —

所 感

An Essay

理事長 小林 宏史

President Hiroshi KOBAYASHI

日本と韓国の関係が国交正常化以来、最悪と言われるほど悪化しています。相次ぐ問題に対して日本政府は韓国政府に対する不信感をあらわにしていますし、メディアは世論調査の結果、日韓双方で互いの国が嫌いな人が増えていると報じています。私の周囲にもいわゆる「嫌韓」の人がいますが、歴史的背景なども良く理解した上で韓国が嫌いになったという人はほとんどいません。多くはメディアの影響により「嫌韓」になったようです。ファクトフルネス（日経BP社刊）を書いたハンス・ロスリング氏はメディアの情報だけで様々な事柄を判断することの危険性を説いています。メディアが嘘を言っているとか、歪んだ世界観を意図的に植え付けようとしているということではなく、読者・視聴者の気を引く、目を引き付ける刺激的なことが記事になっているということを良く理解しておく必要があります。

植民地時代の日本の統治の是非についてはともかく、この時代には同胞としての意識を持って朝鮮半島の近代化に一所懸命取り組んだ日本人が少なからずいたはずです。野口研究所の創設者である野口遵は昭和初期に朝鮮半島で事業を展開していましたので、野口研究所にはこの時代の書籍や資料が残されていますが、その中にその一端が垣間見られる記述がありましたので、ご紹介します。これは

野口遵が設立した日本窒素肥料の社員が赴戦江水力発電所(今の北朝鮮)の建設状況を視察に行った時の様子を記したものです。（「新興の咸南」藤本梅良著、秀英舎刊、1929年）

“赴戦嶺水電工事を実施している一帯は古くより火田民（いわゆる焼き畑農業をする人々）が1万人余り住み着いている。彼らは食料とする馬鈴薯と燕麦を作るために何百年来生い茂る密林に火を放ち、辺りを見るも無残な焼け野原となっている。当社は水源確保のためにも火田民を救済し、森林の保護をしなければならない。貯水地域となる地区に暮らしていた600人余りの人たちは畑が買い上げられ、立退料の交付も受けたが、彼らは都見物に出かけて遊興し、ついには浪費してしまった。会社はこの状態を顧みて政府の了解を得て火田民救済の策を講ずることにした。ここに農林部を発足し農務、畜産、林業、開墾等に分けて申込を受理している。第1回の申し込み定員はすでに超過し3000人に及ぶが、これによって火田民も生活安定の場所が定まるわけである。社会的施設として学校、医療機関、娯楽、生産品販売所等を設け、その他は時代の要求と必要により各種施設を設けることになっている。

朝鮮山岳地帯に住む農民はほとんど赤貧洗うがごとき者ばかりであるが、これは王朝政治の罪であるとともに行政施設が皆無で交通

も不便、貯蓄心の養成がないためである。彼らを愛撫し平等の精神をもって彼らの父兄として親しみ、指導訓練して貯蓄心の涵養に努めたならば、明るい結果を得られるであろう。

“(現代語訳は筆者)

野口遵は発電所、工場群、インフラ（鉄道、港湾など）などを建設して朝鮮の近代化に貢献し、朝鮮奨学会に500万円（現在の50億円に相当）を寄付したことは知られていますが、農業の近代化にも取り組んでいたことを知る人はほとんどいないと思います。おそらく同じように様々な分野で朝鮮の近代化に取り組んだ日本人が数多くいたことでしょう。このような貢献も事実として評価されるべきではないかと思います。

さて話は変わります。野口研究所の事業の一つに研究助成事業があります。野口研究所の設立趣意書には「重要な研究に援助をなし…」とあり、過去から自らの研究周辺では研究支援を行ってきましたが、野口遵ゆかりの旭化成株式会社とJNC株式会社の援助を受けて野口遵研究助成事業を開始したのは2009年からです。昨年度に10周年を迎えることができ、この間の採択者累計は137人となりました。

助成の趣旨は「独創的でチャレンジングな若手研究者（39歳以下を対象）の独立した研究を助成します。応募課題分野で産業応用までには課題が多く短期的な産業有用性は見えにくいものであっても、ロジックがしっかりしていて、実現できた場合の学術性や発展性が強く期待されるものの孵化をお手伝いすることが狙いです」としており、応募課題は化学を根底に置いていますが、幅広い分野で構えています。

昨年、今後の運営の参考とするために採択者の方々にご協力をいただき、本制度に関するアンケートを実施しました。その結果、採択者の方から高い評価を得ていることが示されました。その理由として、特に以下の3点

が多くあげられました。

①金額が大きい

“他の助成金の多くは100万円以下、本制度の助成金額（220万円/人）であれば中型の機器購入にも充てられる。”

②使途が限定されない

“装置の故障など不測の事態に対応できた。”

“当初予定していた以外の化学薬品や計算機等の購入に充てることができた。”

③使用期限が限定されず、繰越可能である。

以下に、自由意見もいくつかご紹介します。

“まだ実績も少ない萌芽的なテーマを採択していただき、とてもありがたかった。それまでの実績・ネームバリューにとられない採択に救われました。”

“研究に対する意欲と研究予算のギャップが大きく悩んでいる地方大学の若手・中堅の研究者にもチャンスをいただけたことは非常にありがたいと心底思いました。”

“「使っても繰り越しても良い研究費」が10万円でもあれば研究者の年度末の心理的負担は想像を絶するほど軽減される。また220万円は若手にとっては高額であり、これを自ら獲得したという実績によって研究室主宰者からの精神的・経済的独立が果たせるとともに、自らのアイデアに従い研究に邁進する原動力となる。まだまだ徒弟制度的な空気の抜けない日本の若手研究者を鼓舞するものであり、素晴らしい制度である。”

私たちが考えていた以上に高く評価されているようで、大変うれしく思いました。

今年の9月には10周年を記念して記念講演会を計画しています。これを契機にさらに研究者の立場に立った研究助成を目指すとともに、微力ながら科学技術の裾野の強化に貢献してゆきたいと思っています。（昨年度の選

考データを本巻末に掲載していますので、ご参照ください。)

さて最後に野口研究所の資産運用についてふれておきます。現在の活動資金の大半は100億円余りある資産を運用することによって捻出しています。これまでは、この資産を元本が保証される債券で運用してきましたが、長引く低金利の影響で運用収入が減少し、活動資金を確保することが難しくなってきました。一定レベルの研究を将来にわたって続けてゆくためには最低でも現状レベルの運用収

入が必要ですし、また高額な解析機器の保守や買い替えのための資金も不可欠です。国内外の財団法人の資産運用状況の調査・研究を行った結果、上場投資信託(ETF)による資産運用が適当と判断し、理事会の承認を得て満期を迎える債券をETFへ切り替えてゆくことにしました。今後、専門家の助言を得ながら進めてゆきます。

しばらくは収支が厳しい状況が続くと思いますが、将来的に安定した運営ができるようなベースを築いておきたいと思っています。

自然免疫を介した免疫制御

Immunoregulation through innate immunity

大阪大学大学院理学研究科 深瀬 浩一

Koichi FUKASE

1. はじめに

全ての生物は生体防御機構を備えている。原核生物は、抗菌物質生産によって原核生物間の競合に対応し、CRISPR-Cas機構などによってファージから身を守っている。一方、真核生物の生体防御機構は免疫と呼ばれる。免疫は自然免疫と獲得免疫に大別され、脊椎動物のみがリンパ球と抗体からなる獲得免疫を有している。一方、自然免疫は真核生物に普遍的に存在しており、種々の自然免疫受容体（病原体認識受容体、パターン認識受容体）を介して、細菌、ウイルス、カビなどの病原体由来の複合糖質、グリカン鎖、リポタンパク質、DNA、RNA、鞭毛タンパク質フラジェリン、など病原体に特徴的な分子を認識して、抗菌物質、活性酸素、加水分解酵素などにより生体防御にあたる [1]。自然免疫は微生物に対する防御機構として働くだけでなく、アレルギーや自己免疫疾患、慢性炎症や癌とも深く関わっている。なおB. A. Beutler博士とJ. A. Hoffmann博士は自然免疫機構の解明で2011年のノーベル生理医学賞を受賞している。

我々は、主に細菌由来の化合物について、合成とそれらの自然免疫調節作用について研究を行ってきた。代表的なものが、グラム陰性菌の産生する複合糖質リポ多糖に関連した研究であり、活性本体であるリポD Aやリポ多糖部分構造を合成して、それらを用いて受容体TLR4/MD-2複合体との詳細な相互作用

解析と免疫応答の制御について研究を行ってきた。一方、自然免疫は、抗原-抗体反応や腫瘍免疫などの獲得免疫の活性化にも重要な働きをしていることがよく知られている。そこで、自然免疫活性化物質を基盤にしたアジュバント（ワクチンの効力を高める物質）開発が行われきた [2]。多くの場合ワクチンは健康体に接種するので、含有されるアジュバントを含めて、高い安全性が要求されており、従ってアジュバントには強い炎症を引き起こすことなく、適度に免疫を活性化する機能が求められる。ここではリポD Aのアジュバントとしての利用についても紹介する。

一方、アジュバントと抗原との複合体が自己アジュバント化ワクチン [3] として、獲得免疫を効率的に活性化することが見出され、種々の研究が行われている。本稿では、がんワクチン開発を目指した我々の研究について紹介する。

2. リポ多糖の合成と生物活性発現機構に関する研究

細菌が免疫を高めることは古くから知られており [1,4]、細菌感染による癌の治療や縮小は300年以上前から報告されていた [5]。コーリー（William Coley）は*Streptococcus pyogenes*と*Serratia marcescens*を用いた抗癌治療を1893年に実施した（世界で最初の癌の免疫療法）。1916年には*Salmonella typhimurium*死菌体に、1924年には結核菌

に免疫活性化作用が報告された。

これらの現象は自然免疫の働きによるものであるが、物質レベルでの最初の報告は、内毒素（エンドトキシン）の発見である。近代細菌学の開祖コッホ（Robert Koch）の弟子であるファイファー（Richard Friedrich Johannes Pfeiffer）は1892年にコレラ菌には外毒素（エキソトキシン）と内毒素（エンドトキシン）の二種類の毒素があることを発見した。ウエストファール（Otto Westphal）らは1945年に内毒素の本体がグラム陰性菌の外膜を構成するリポ多糖（LPS）であること、1957年にLPSの脂質であるリピドAが活性中心であることを報告した。内毒素は、強力な免疫増強作用と炎症惹起作用を有しており、発熱性、組織障害作用、致死性ショックを引き起こす。上記のコーリーらが見出した *Serratia* による免疫増強効果は内毒素の作用によるものと考えられる。大阪大学の芝哲夫、楠本正一らはウエストファール、リュエデリッツ（Otto Lüderitz）、リーチェル（Ernst Th. Rietschel）、ガラノス（Chris Galanos）らと共同研究を開始し、リピドAの正しい構造を提出し、1985年には大腸菌リピドA（1）の全合成に成功して、リピドAが内毒素の本体であることを確定させた（図1）[4]。

この領域にブレークスルーをもたらしたのが、リポ多糖に対するアンタゴニストの発見であり、生合成前駆体型リピドA（precursor

Ia, リピド IVa）（2）がマウスに対しては免疫増強作用を示すが、ヒトにおいてはアンタゴニスト作用を示すこと [6]、*Rhodobacter sphaeroides* lipid A (RSLA)（3）がヒト、マウスともにアンタゴニスト作用を示すことが明らかにされた（図1）[7]。これらの結果は、リポ多糖受容体が存在することを示すものであり、LPSの活性発現機構の解明を目指し、受容体探索を含めた多数の研究が行われた。1996年にHoffmannらは、ショウジョウバエのTollが真菌に対する生体防御機構に必須であることを発見した。翌年には哺乳類にToll様受容体（TLR）が見出され、1998年にはBeutlerらによりTLR4がLPS受容体であることが明らかにされた。その後様々なTLRならびにそのリガンドが次々に同定され、さらには細胞内シグナル伝達機構や獲得免疫との連携メカニズムが明らかにされた。なお大阪大学の審良らはノックアウトマウスを用いた解析を中心にして、多くの自然免疫機構を明らかにしており、現代免疫学の新しい潮流を作った [1]。

TLRは、膜外にロイシンリッチリピート（LRR）と呼ばれるモチーフを持ち、膜内にはインターロイキン1（IL-1）受容体細胞内ドメインと相同性の高いTIR（Toll/IL-1 receptor）ドメインをもつ。TLR4の下流では様々なアダプター分子（MyD88, TIRAP, TRAM, TRIFなど）が結合してシグナルを

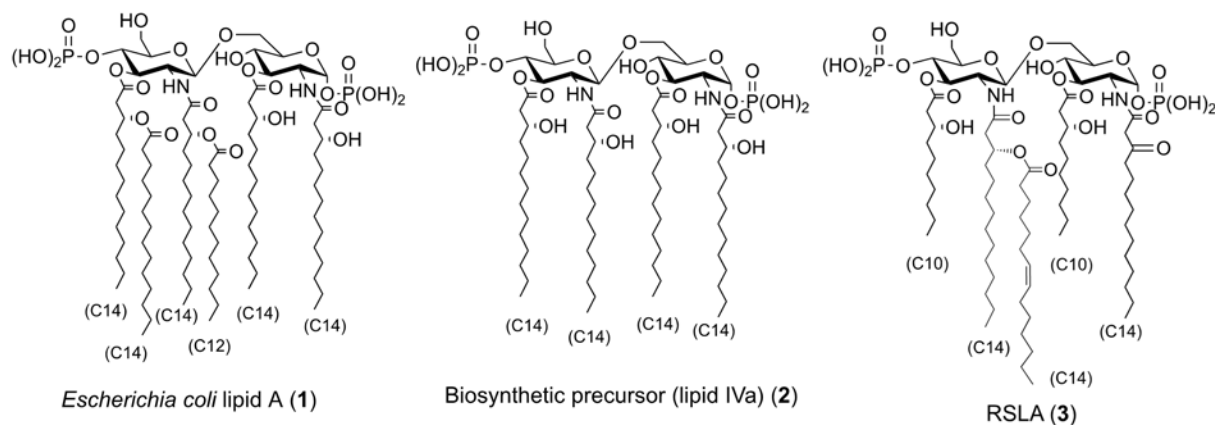


図1 リピドAの構造

伝達する (図2)。MyD88活性化は転写因子NF- κ Bの活性化とTNF α やIL-1、IL-6等の炎症性サイトカインを誘導する。TRIF化は、転写因子IRF3活性化と抗ウイルス応答を惹起するインターフェロン (IFN) を誘導する [1,5,8]。この他にも、最近カスパーゼ経路が見出され (げっ歯類: caspase-11、ヒト: caspase-4 と caspase-5) [9,10]、これらのシグナルが同時に強力に活性化されると、強い炎症が惹起され、毒性の発現につながるものと考えられる。

TLR4によるリポ多糖、リポドAの認識機構の解析も行われた。三宅らはTLR4の結合タンパク質であるMD-2がシグナルの伝達に必須であることを見出し、我々の合成したリポドA放射性標識類縁体を用いてTLR4/MD-2複合体との相互作用の解析に成功し、種特異性がMD-2とリポドAの認識の違いにより生じることを明らかにした (図3) [11]。さらに、大戸、佐藤らは、X線結晶構造解析によりリポドIVa (2) とヒトMD-2複合体の3次元構造を明らかにし [12]、KAISTのLi

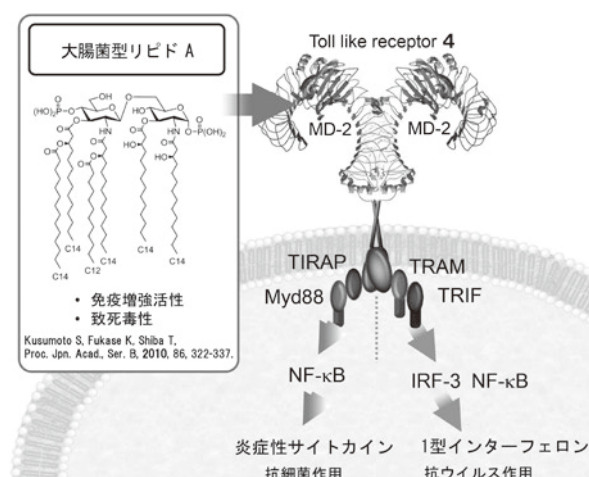


図2 TLR4を介した自然免疫活性化機構

らは、エーザイの開発したアンタゴニストであるエリトランとマウスTLR4/MD-2複合体の3次元構造を解明し [13]、アンタゴニストの結合様式が解かれた。2009年にはLiらによってリポ多糖/ヒトTLR4/MD-2のX線結晶構造解析が行われた [14]。さらに大戸らにより、リポドIVa/マウスTLR4/MD-2複合体の3次元構造が解明された [15]。大腸菌型リポドA部の5本のアシル基はMD-2の疎水

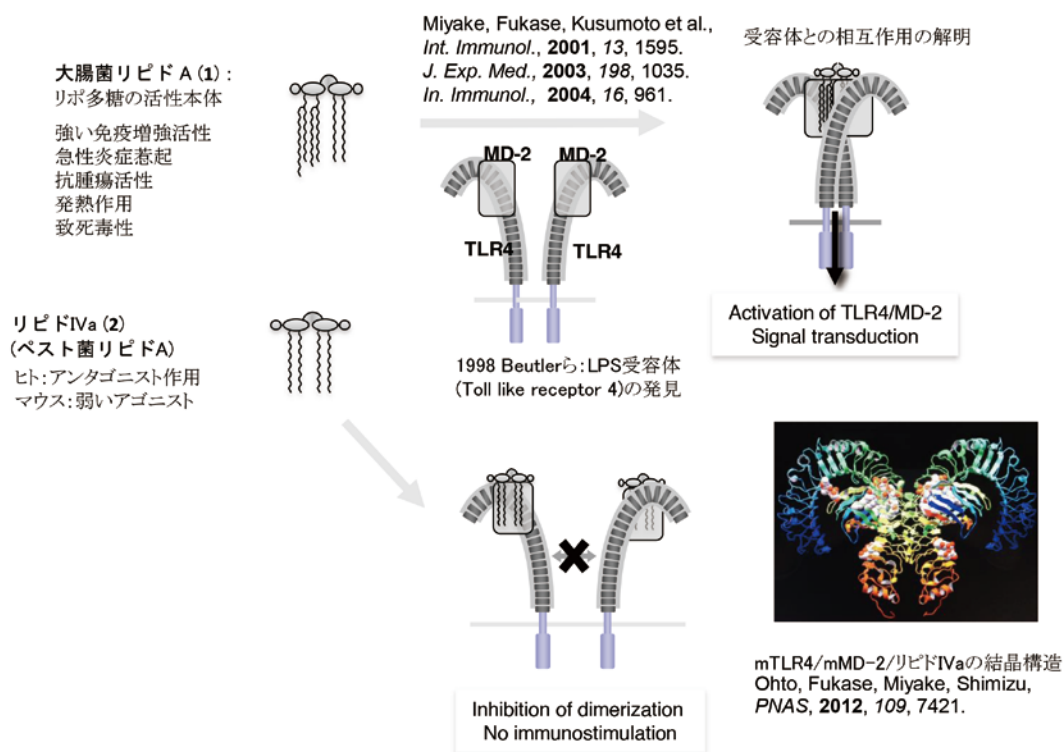


図3 TLR4/MD-2とリポドA, LPSの相互作用

性ポケットに収容され、残りの一本が隣接するTLR4の疎水性面と相互作用することが引き金になって受容体の二量体化が引き起こされる。一方、マウスの場合にはリピドAのアシル基の数が4本であっても、一つのアシル基が隣のTLR4に提示され、二量体化が起こることが明らかとなった。なおアンタゴニストの場合は、リピドA部が180°回転した形でMD-2に結合しており、二量体化は起きない。このようにリピドAのMD-2への結合様式の違いにより、受容体活性化あるいはアンタゴニスト作用が発現することが明らかとなった。

3. リピドAの構造活性相関研究とアジュバントとしての応用

上述のようにリピドAのアシル基の数や構造は、活性に大きな影響を及ぼす。またリン酸基の数も活性に大きな影響を与える。我々は様々な類縁体を合成し、免疫増強作用やアンタゴニスト作用の強度を制御できることを明らかにしてきた [16]。例えば1位リン酸を欠くモノホスホリルリピドA (MPL) (5) はリピドAに比較すると活性が大きく低下し、温和な免疫増強作用を示す [17]。MPL 4は、TLR4/MD-2の二量体化能が大腸菌LPSに比べると大きく低下するが、MyD88-依存的にTNF α を誘導し、TRIF-依存的にインターフェロンを誘導有する [18]。一方4'リン酸を欠くMPL 5は、MPL 4と同様に温和な免疫増強作用を示す。MPL 4のIL-18誘導能が大腸菌LPSよりも低下するのに対して、MPL 5のIL-18誘導能は大腸菌LPSと同様レベルに保たれており [19]、異なったアジュバント能が期待される。

一方で、近年、グラクソ・スミスクラインにより、*Salmonella Minnesota* LPSから誘導したモノリン酸構造を有する3D-MPL (6) が、炎症惹起作用を抑えつつ、抗ウイルス作用示す化合物として開発され、6とアルミニウム塩の混合剤であるAS04が、子宮頸がん

予防ワクチンであるヒトパピローマウイルス (HPV) ワクチンCervarixならびにHBV ワクチン (Fendrix) のアジュバントとして実用化されている [20]。

環境や発酵食品由来のLPSも免疫調節に関わっており、アジュバントとしての利用も期待される。*Pantoea agglomerans*は土壌および植物 (小麦、イネ、サツマイモ、リンゴやナシなど) に広く存在するグラム陰性菌で、リピドAの構造は、*E. coli* タイプ (1) と*S. minnesota*タイプ (7) の両方があり [21]、そのLPSは経口投与で免疫増強作用を示すことからサプリメントとして開発された [22]。酢酸菌は、酢酸発酵に用いられるグラム陰性菌で、リン酸基を含まない特徴的なリピドA (8) の構造が明らかにされた (図3) [23]。酢酸菌LPSは温和な免疫増強作用を有しており、新規アジュバントとして可能性がある。また黒酢中にはLPSを含む種々の免疫増強物質が含まれており、その摂取により免疫を調節しているものと思われる。

環境中の細菌への曝露が、アレルギー疾患発症のリスクを減らすという「衛生仮説」が提唱されており、疫学的な証拠が集まりつつある。*Acinetobacter lwoffii* F78は [24]、アレルギー抑制能を有する細菌を、飼料から探索する中で見出されたもので、そのLPSは、IL-12, IFN- γ などのTh1細胞由来のサイトカインを選択的に誘導し、抗アレルギー作用を誘導することが示され、*A. lwoffii* F78 LPSならびにそのリピドA (9) もアジュバント候補化合物である [25]。

寄生菌や病原菌の中には自然免疫システムをすり抜けるものがある。ペスト菌 (*Yersinia pestis*) はタンパク毒素である外毒素を産生し、この毒素が末梢血管を破壊し、浮腫や壊死を形成する。ペスト菌は、哺乳類の体温である37℃ではアンタゴニストであるリピドIVa含有LPSを発現し、初期免疫応答から逃れることにより強い病原性を発現する (図3)

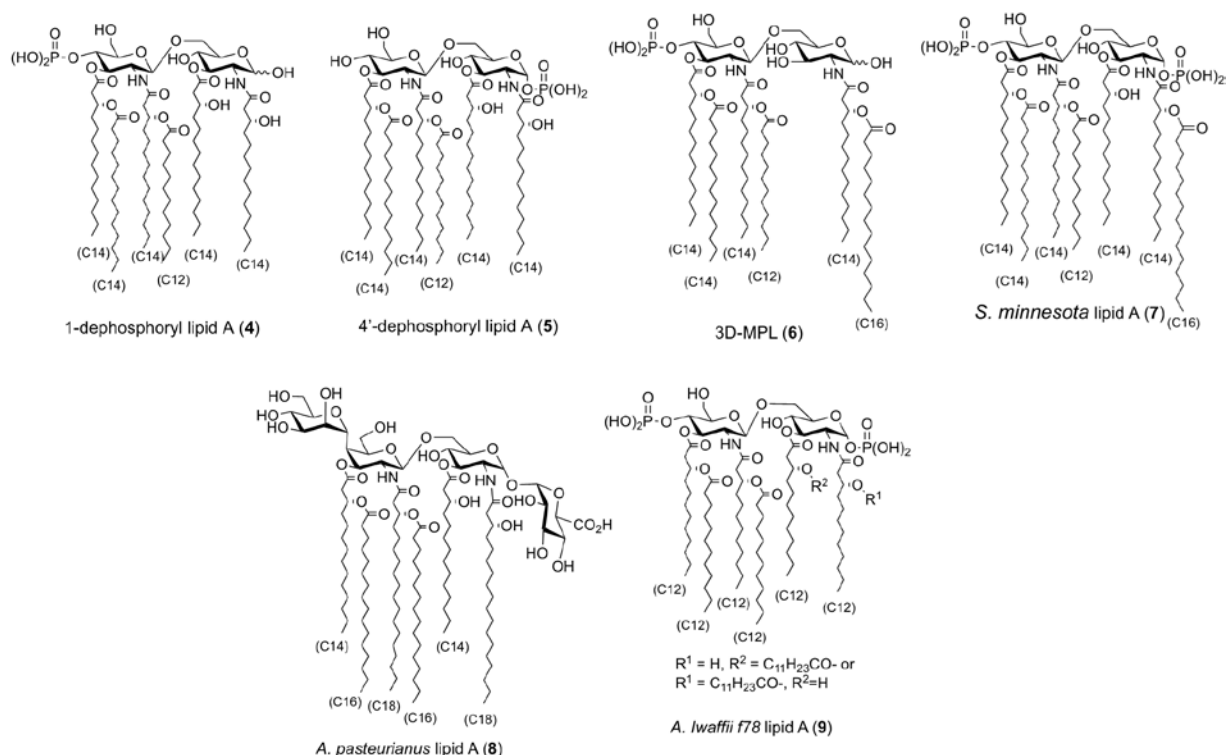


図4 アジュバントならびにアジュバント候補リピドAの構造

[26,27]。

胃に生息し胃潰瘍の起 因 菌 となる *Helicobacter pylori* や歯周病の要因の一つとして知られる *Porphyromonas gingivalis* 等の寄生性細菌のLPSは、免疫活性化作用は弱い、慢性炎症やアテローム性動脈硬化との関連が報告されている。我々は、寄生菌リピドAの機能解明を目的として、寄生菌リピドA (10-15) を合成し [19,28]、ヒト末梢全血を用いたサイトカイン誘導活性を指標に、免疫増強作用を調べた (図5)。その結果、3～4本の脂肪酸とリン酸基を有する寄生菌リピドA (10a, 11a, 12-15) は、アンタゴニスト作用を示した。一方で、エタノールアミンリン酸基を有するピロリ菌リピドA (10b, 11b)、および5本の脂肪酸を有するジンジバリス菌リピドA (15) は、大腸菌LPSに比べると大変弱いもののIL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインを誘導した。天然のピロリ菌LPSは、リピドAの6'位に酸性糖Kdoが付加された部分構造を有しているので、10a,bのKdo付加体を合成したところ、それらはアンタゴニス

ト作用を示した。これらの結果から、寄生菌は、宿主の自然免疫から逃れるように進化しており、感染に有利であるようにTLR4アンタゴニストであるLPSを産生すると考えられる。

一方で、これらの寄生菌リピドAは慢性炎症に関与するIL-12, IL-18を誘導し、TLR4のアンタゴニストであってもIL-12, IL-18を選択的に誘導することを見出した [19,28]。リポ多糖の細胞内受容体として報告されたCaspase 4 ならびにCaspase -5の選択的活性化の後、Caspase -1が活性化されIL-18が誘導されたと考えている。IL-12とIL-18のコンビネーションはIFN- γ を誘導し、抗腫瘍作用、抗アレルギー作用につながる、寄生菌リピドAは、特徴的なアジュバント候補化合物として期待される。

近年、清野、國澤らは、*Alcaligenes* 属が、腸管における免疫組織であるパイエル板の樹状細胞内に共生することを見出した [29]。*Alcaligenes* 由来のLPSは宿主に対して、粘膜面獲得免疫の代表格であるIgA産生応答を誘

導するが、ほとんど炎症を惹起しない [30]。共生菌由来の化合物は、安全性の高いアジュバントとして期待され、現在LPSの構造解析とリピドAの合成、ならびにそれらの生物機能評価を進めている。

リピドAの活性発現・制御には、親水性部と疎水性部のボリュームの微妙なバランス、疎水性部と酸性官能基の空間配置が重要で、構造修飾により受容体活性化の制御、細胞内シ

グナルの選択の制御が可能である。このことは様々なリピドA誘導体を用いることにより細胞性免疫や液性免疫あるいは粘膜免疫の応答の制御が可能であることを示している。今後、リピドAの構造活性相関研究がさらに進むことで、特に以下に述べるセルフアジュバント戦略において、リピドAは極めて有効なアジュバントとなることが期待される。

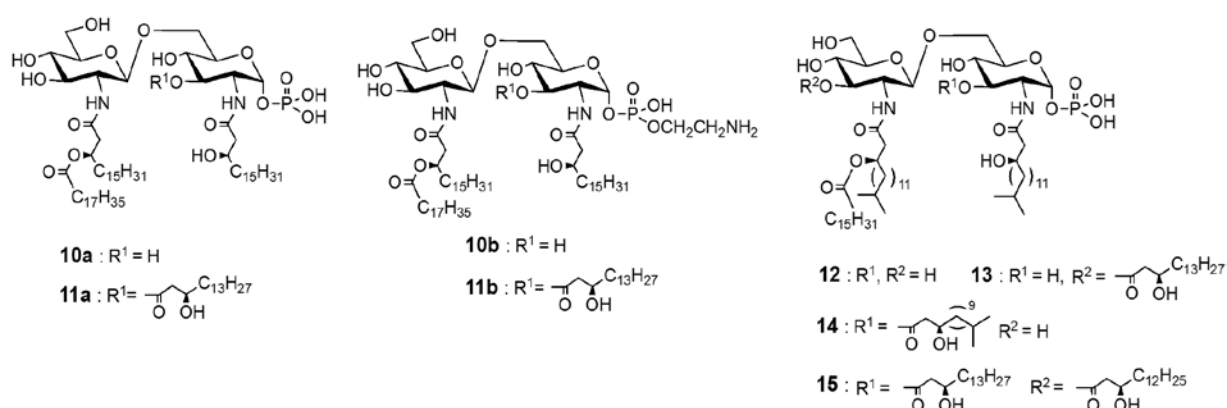


図5 寄生菌リピドAの構造

4. 自己アジュバント化（セルフアジュバント化）ワクチン

ワクチンの多くは、生ワクチン、死菌ワクチン（細菌）、不活化ワクチンなどのように病原体やその毒素を弱毒もしくは不活化した生物学的製剤であり、これらには抗原とともに抗体産生を増強させるアジュバントが含まれている。獲得免疫の活性化には自然免疫の活性化が必要とされ、抗原に自然免疫活性化リガンドを共存させ、共刺激を行うことで、抗体産生等の獲得免疫系の活性化が著しく促進される [31]。

安全性の向上ならびに品質管理の観点から、精製抗原ワクチンやコンポーネントワクチンが開発されてきており、それらの添加剤として安全なアジュバントが開発されてきた（表1） [32,33]。現在、様々な自然免疫リガンドを基にしたアジュバント開発が進められているが、自然免疫活性化剤として認可されてい

るものは、アルミニウム塩と上述の3D-MPL、QS-21、CpG1018のみである。多くの自然免疫リガンドは有用なアジュバント作用に加え強い炎症惹起作用に代表される副作用を有するものが多いため、アジュバント作用を維持しつつ副作用を抑える試みが必要となる。

一方、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 等へのワクチンのプラットフォームとして、グラム陰性菌から放出される外膜微粒子 (outer membrane vesicle, OMV) が注目をされている。Native OMVにはLPSが含まれているので、デオキシコール酸ナトリウムで抽出してLPS含量を減らす [34]、あるいは *Neisseria meningitidis* LPSのアシル基転移酵素を修飾して、リピドA上のアシル基を減らすことで低毒化したOMVが用いられる [35]。B型髄膜炎菌ワクチンであるBexseroは、タンパク質抗原とOMVを含んでおり、OMVがアジュバントとして働いている [36]。

種類	組成	適用	原理
Alum (1924)	AlPO ₄ or Al(OH) ₃	ジフテリア 破傷風 百日咳など	抗原の不溶化、自然免疫活性化 (NALP3) (ダメージ関連分子パターン)
AS04 (GSK:2005)	MPL, Al(OH) ₃	B型肝炎 子宮頸がん	自然免疫活性化 (TLR4, NALP3) (ダメージ関連分子パターン)
MF59 (Novartis:1997)	Squalene, Tween 80, Span 86 (脂質、界面活性剤)	インフルエンザ	抗原の取込み促進 (オイルエマルジョン)
AS03 (GSK:2009)	Squalene, Tween 80, α -tocopherol (脂質、界面活性剤)	インフルエンザ	抗原の取込み促進 (オイルエマルジョン)
Virosomes (Berna Biotech:2000)	Lipids hemagglutinin	インフルエンザ A型肝炎	抗原の取込み促進 (ウイルス用粒子)
AS01B (GSK:2017)	MPL, QS-21 (saponin from soap bark tree) liposomal formulation	带状疱疹	自然免疫活性化 (TLR4, NALP3)
CpG 1018 (Dynavax Technologies:2017)	CpG motif (DNA)	B型肝炎	自然免疫活性化 (TLR9)

表1 認可されているアジュバント

近年、ワクチン開発の新たな戦略としてセルフアジュバンティング（自己アジュバント化）戦略（図6）が注目されている。自己アジュバント化ワクチンは、共有結合により連結した抗原-アジュバント複合体である。自己アジュバント化ワクチンは、自然免疫リガンドを介して積極的に抗原提示細胞に取り込まれ、アジュバントが免疫系を活性化することで、効率的な抗体産生を誘導する。この方法の特徴は、共有結合により連結した抗原とアジュバントが同一の抗原提示細胞に取り込まれるため、抗原に対する免疫反応を特異的に誘起できる点である。また本手法では、化学的に均一な抗原-アジュバント複合体を供給可能であるので、高品質製品の生産を可能とし、品質管理を容易にするものであり、ワクチンの実用化における大きな長所である。

Trumenbaは*Neisseria meningitidis* sero group Bに対するリコンビナントワクチンとして実用化されており、そのN末端にトリアシル化システイン構造を持つ自己アジュバント化ワクチンである [37]。トリアシル化システイン構造を持つ細菌由来のリポタンパク質は、TLR2/TLR1を介して自然免疫を活性

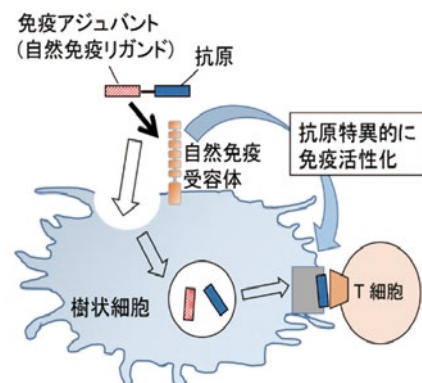


図6 セルフアジュバンティング戦略

化する。

化学合成自己アジュバント化ワクチンにおいても、合成の容易さからアジュバントとしてTLR2リガンド [38-40] が汎用されている。TLR4リガンドを用いた例として、Guoらは髄膜炎菌由来リピドAの1位リン酸基を除いたMPLと、髄膜炎菌抗原である α -2,9-オリゴシアル酸の複合体 [41]、腫瘍関連糖鎖抗原であるGM3糖鎖 [42] やSTn [43] との複合体を合成した。いずれの場合においても強力な抗体産生増強作用を確認している。その他にも、CD1dリガンド [44-46] を利用した自己アジュバント化ワクチンが開発されている。

5. STn抗原を利用した自己アジュバント化がんワクチン候補の合成

細胞表面に存在する糖鎖は、がんをはじめとする様々な疾病において、特異的なパターンを発現する。そのため、がん関連糖鎖抗原 (TACA) を中心に、糖鎖は多くの疾病、感染症のワクチン開発におけるターゲットとして注目を集めている。一方で、変質した自己であるがん抗原の低い抗原性のがんワクチン開発の問題点であった。従来は、低分子抗原に対する免疫応答を促進するためには、Keyhole limpet hemocyanin (KLH) やBovine Serum albumin (BSA) などのキャリアタンパク質に抗原を連結させる手法が汎用されてきた。この方法では、キャリアタンパク質に対する免疫応答が惹起される場合があり、その結果として抗原に対する免疫応答に影響を与えることがある。そこで近年、糖鎖ワクチンの開発において自己アジュバント化戦略が精力的に検討されている [38-46]。

Sialyl-Tn (STn) 抗原はムチンタンパク質由来のTACAであり、乳がん、肺がん、大腸がん、胃がん、卵巣がんなどに高発現しているが、正常細胞にはほとんど発現していない。そこでSTn-KLH複合体 (Theratope) が転移性乳がんのワクチンとして開発された

が、第III相臨床試験において十分な効果が認められなかった。Theratope投与患者には、STnを認識する抗体や、KLHを認識する抗体は多量に誘導されたが、ムチンを認識する抗体はわずかであった。

我々は、TLR2リガンドであるリポペプチドをアジュバントとして利用したSTnがんワクチンの開発に取り組んだ [47]。STn構造が3残基連続して配列したTriSTnは膵がんや卵巣がんを高発現しているため、TriSTnに、リポペプチドアジュバント (Pam3CSK4) とTセルエпитープ (IgGへのクラススイッチを促進) を複合化したがんワクチン候補**23**を合成した (図7)。シアル酸の5位アセチル基をプロピオニル基に変換することでSTnの抗原性が向上することが見出されていたので [48]、プロピオニル修飾体**24**も合成した。

アジドシアル酸チオグリコシド**16**と糖アミノ酸誘導体**17**のグリコシル化について、我々の開発した一塩化ヨウ素とIn(OTf)₃の組み合わせを活性化剤に用い、プロピオニトリル中-78℃で反応を行うことにより、高い選択性で目的の α シアロシド**18**を得た。これを、アジド含有TriSTn **18**, **19**に導き、これらに銅触媒存在下でのクリックケミストリーにより、アルキニル化Tセルエピトープ (**21**) をカップリングさせ、さらにチオエステル形成反応を利用したPam3CSK4 (**22**) との複合化を行って、**23**, **24**に導いた。

得られた**23**, **24**をマウスに接種したところ、天然型のTriSTnを認識するIgG抗体ならびにIgM抗体が顕著に誘導された。また誘導された抗体はSTnモノマーも認識したが、TriSTnをより強力に認識し、非天然型のN-プロピオニルTriSTnを有する**24**の免疫で得られたIgGの方がTriSTnに対する選択性が顕著に高かった。また**23**, **24**から得られたIgG抗体 (抗血清) は、STnを高発現したがん細胞を強く認識した。以上のように、triSTnワクチン**23**, **24**は、クラスター化STnを発現

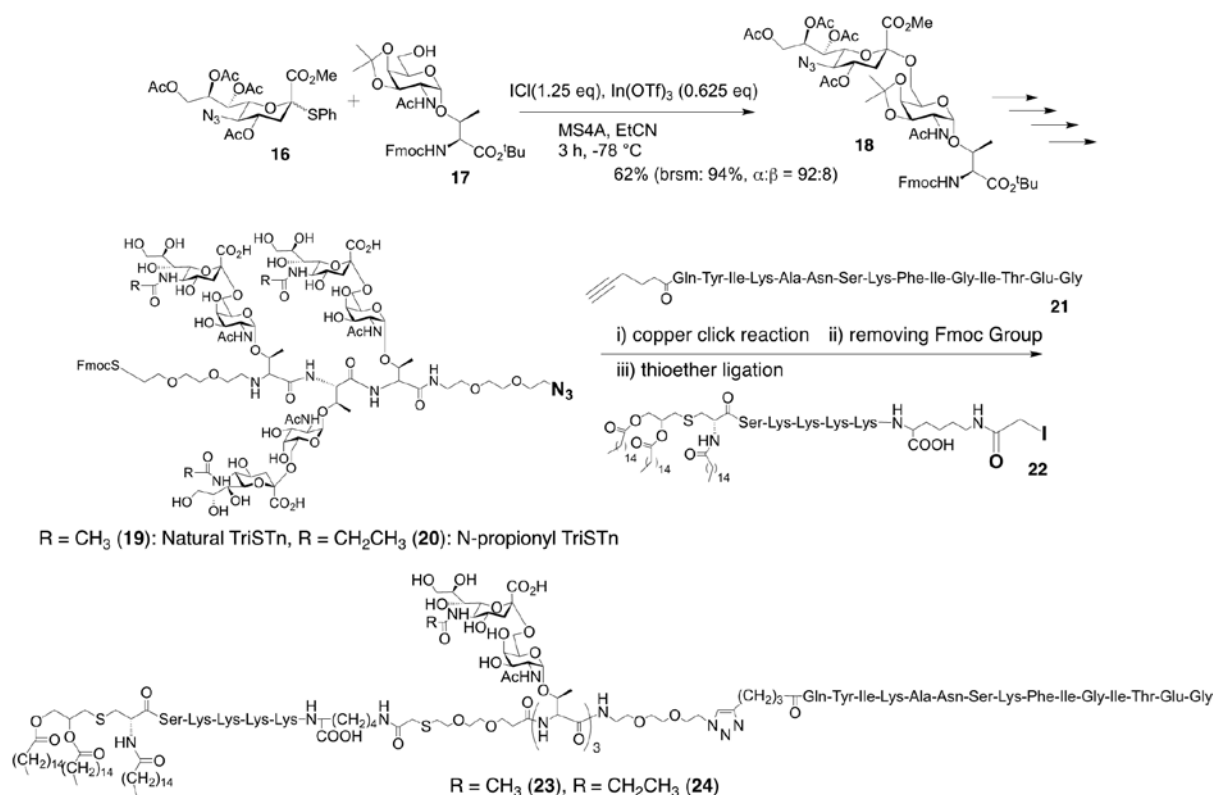


図7 抗がんワクチン候補の合成

するがん細胞を効率的に認識する抗triSTn IgG抗体を誘導し、Theratopeの弱点を回避することに成功した。

以上のように、ワクチン開発における自己アジュバント化戦略の有効性が示されつつある。実用化に向けて、有効性、安全性の確認とともに、複合化ワクチンの効率的な合成法の開発に向けた検討を行っている。

参考文献

1. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. *Cell* **2006**, 124, 783-801.
2. Coffman, R. L.; Sher, A.; Seder, R. A.; *Immunity* **2010**, 33, 492-503.
3. Jackson, D. C.; Lau, Y. F.; Le, T.; Suhrbier, A.; Deliyannis, G.; Cheers, C.; Smith, C.; Zeng, W.; Brown, L. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 15440-15445.
4. Kusumoto, S.; Fukase, K.; Shiba, T. *Proc. Japan Acad., Ser. B: Phys. Biol. Sci.* **2010**, 86, 322-337.
5. Wei, M. Q.; Mengesha, A.; Good, D.; Anné, J. *Cancer Lett.* **2008**, 259, 16.
6. Wang, M.H.; Feist, W.; Herzbeck, H.; Brade, H.; Kusumoto, S.; Rietschel, E. T.; Flad, H.D.; Ulmer, A. J. *FEMS Microbiol. Immunol.* **1990**, 2, 179-185.
7. Golenbock, D. T.; Hampton, R. Y.; Qureshi, N.; Takayama, K.; Raetz, C. R.; *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 19490-19498.
8. Takeda, K.; Akira, S. *Int. Immunol.* **2005**, 17, 1-14.
9. Hagar, J. A.; Powell, D. A.; Aachoui, Y.; Ernst, R. K.; Miao, E. A. *Science*, **2013**, 341, 1250-1253.
10. Shi, J.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Gao, W.; Ding, J.; Li, P.; Hu, L.; Shao, F. *Nature* **2014**, 514, 187-192.
11. Akashi, S.; Saitoh, S.; Wakabayashi, Y.; Kikuchi, T.; Takamura, N.; Nagai, Y.; Kusumoto, Y.; Fukase, K.; Kusumoto, S.

- S.; Adachi, Y.; Kosugi A.; Miyake, K. *J. Exp. Med.* **2003**, 198, 1035-1042.
12. Ohto, U.; Fukase, K.; Miyake, K.; Satow, Y. *Science* **2007**, 316, 1632-1634.
13. Kim, H. M.; Park, B. S.; Kim, J. I.; Kim, S. E.; Lee, J.; Oh, S. C.; Enkhbayar, P.; Matsushima, N.; Lee, H.; Yoo, O. J.; Lee, J. O.; *Cell* **2007**, 130, 906-917.
14. Park, B. S.; Song, D. H.; Kim, H. M.; Choi, B. S.; Lee, H.; Lee, J. O. *Nature* **2009**, 458, 1191-1195.
15. Ohto, U.; Fukase, K.; Miyake, K.; Shimizu, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 7421-7426.
16. Fukase, K.; Fujimoto, Y.; Shimoyama, A.; Tanaka, K.; *J. Synth. Org. Chem. JPN* **2012**, 70, 113-130.
17. Yoshizaki, H.; Fukuda, N.; Sato, K.; Oikawa, M.; Fukase, K.; Suda Y.; Kusumoto, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 1475-1480.
18. Tanimura, N.; Saitoh, S.; Ohto, U.; Akashi-Takamura, S.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.; Shimizu T.; Miyake, K. *Int. Immunol.* **2014**, 26, 307-314.
19. Fujimoto, Y.; Shimoyama, A.; Saeki, A.; Kitayama, N.; Kasamatsu, C.; Tsutsui, H.; Fukase, K. *Mol. Biosyst.* **2013**, 9, 987-996.
20. Mata-Haro, V.; Cekic, C.; Martin, M.; Chilton, P. M.; Casella, C. R.; Mitchell, T. *C. Science* **2007**, 316, 1628-1632.
21. Tsukioka, D.; Nishizawa, T.; Miyase, T.; Achiwa, K.; Suda, T.; Soma, G.; Mizuno, D. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, 149, 239-244.
22. Hebishima, T.; Matsumoto, Y.; Watanabe, G.; Soma, G.; Kohchi, C.; Taya, K.; Hayashi, Y.; Hirota, Y. *Exp. Anim.* **2011**, 60, 101-109.
23. Hashimoto, M.; Ozono, M.; Furuyashiki, M.; Baba, R.; Hashiguchi, S.; Suda, Y.; Fukase, K.; Fujimoto, Y. *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 21184-21194.
24. Debarry, J.; Hanuszkiewicz, A.; Stein, K.; Holst, O.; Heine, H. *Allergy* **2010**, 65, 690-697.
25. Hanuszkiewicz, A.; Hubner, G.; Vinogradov, E.; Lindner, B.; Brade, L.; Brade, H.; Debarry, J.; Heine, H.; Holst, O. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 10251-10258.
26. Kawahara, K.; Tsukano, H.; Watanabe, H.; Lindner, B.; Matsuura, M. *Infect. Immun.* **2002**, 70, 4092-4098.
27. Montminy, S. W.; Khan, N.; McGrath, S.; Walkowicz, M. J.; Sharp, F.; Conlon, J. E.; Fukase, K.; Kusumoto, S.; Sweet, C.; Miyake, K.; Akira, S.; Cotter, R. J.; Goguen, J. D.; Lien, E.; *Nature Immunol.* **2006**, 7, 1066-1073.
28. Shimoyama A.; Saeki A.; Tanimura N.; Tsutsui H.; Miyake K.; Suda Y.; Fujimoto Y.; Fukase K. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 14464-14474.
29. Obata, T.; Goto, Y.; Kunisawa, J.; Sato, S.; Sakamoto, M.; Setoyama, H.; Matsuki, T.; Nonaka, K.; Shibata, N.; Gohda, M.; Kagiya, Y.; Nochi, T.; Yuki, U.; Fukuyama, Y.; Mukai, A.; Shinzaki, S.; Fujihashi, K.; Sasakawa, C.; Lijima, H.; Goto, M.; Umesaki, Y.; Benno, Y.; Kiyono, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 7419-7424.
30. Shibata, N.; Kunisawa, J.; Hosomi, K.; Fujimoto, Y.; Mizote, K.; Kitayama, N.; Shimoyama, A.; Mimuro, H.; Sato, S.; Kishishita, N.; Ishii, K. J.; Fukase, K.; Kiyono, H. *Mucosal Immunol.* **2018**, 11, 693-702.
31. Leroux-Roels, G. *Vaccine*, **2010**, 28 Suppl

- 3, C25-36.
32. <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/adjuvants.html#as01>
33. <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/B/excipient-table-2.pdf>
34. van der Ley, P.; van den Dobbelsteen, G. *Hum. Vaccin.* **2011**, 7, 886-890.
35. Christodoulides, M.; Heckels, J. *Pathog. Dis.* **2017**, 75(3).
36. Watson, P.S.; Turner, D.P. *Vaccine* **2016**, 34, 875-880.
37. Azmi, F.; Ahmad Fuaad, A. A.; Skwarczynski, M.; Toth, I.; *Hum. Vaccin. Immunother.* **2014**, 10, 778-796.
38. Ingale, S.; Wolfert, M.A.; Gaekwad, J.; Buskas, T.; Boons, G. J. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 663-667.
39. Kaiser, A.; Gaidzik, N.; Becker, T.; Menge, C.; Groh, K.; Cai, H.; Li, Y.-M.; Gerlitzki, B.; Schmitt, E.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3688-3692.
40. Cai, H.; Sun, Z.Y.; Huang, Z.H.; Shi, L.; Zhao, Y.F.; Kunz, H.; Li, Y.-M. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 1962-1970.
41. Liao, G.; Zhou, Z.; Suryawanshi, S.; Mondal, M.A.; Guo, Z. *ACS Cent. Sci.* **2016**, 2, 210-218.
42. Wang, Q.; Zhou, Z.; Tang, S.; Guo, Z.; *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 235-240.
43. Zhou, Z.; Mondal, M.; Liao, G.; Guo, Z. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 3238-3245.
44. Cavallari, M.; Stallforth, P.; Kalinichenko, A.; Rathwell, D. C. K.; Gronewold, T. M. A.; Adibekian, A.; Mori, L.; Landmann, R.; Seeberger, P. H.; De Libero, G. *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, 10, 950-956.
45. Anderson, R. J.; Compton, B. J.; Tang, C.-W.; Authier-Hall, A.; Hayman, C. M.; Swinerd, G. W.; Kowalczyk, R.; Harris, P.; Brimble, M. A.; Larsen, D. S.; Gasser, O.; Weinkove, R.; Hermans, I. F.; Painter, G. F. *Chem. Sci.*, **2015**, 6, 5120-5127.
46. Yin, X.-G.; Chen, X.-Z.; Sun, W.-M.; Geng, X.-S.; Zhang, X.-K.; Wang, J.; Ji, P.-P.; Zhou, Z.-Y.; Baek, D. J.; Yang, G.-F.; Liu, Z.; Guo, J. *Org. Lett.* **2017**, 19, 456-459.
47. Chang, T.-C.; Manabe, Y.; Fujimoto, Y.; Ohshima, S.; Kametani, Y.; Kabayama, K.; Nimura, Y.; Lin, C.-C.; Fukase, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2018**, 57, 8219-8224.
48. Sahabuddin, S.; Chang, T.-C.; Lin, C.-C.; Jan, F.-D.; Hsiao, H.-Y.; Huang, K.-T.; Chen, J.-H.; Horng, J.-C.; Ho, J.-a. A.; Lin, C.-C. *Tetrahedron* **2010**, 66, 7510-7519.

糖鎖科学の臨床応用

Clinical Investigation of Glyco-Science

大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学講座 分子生化学研究室 三善 英知
Eiji MIYOSHI

はじめに

野口研究所時報をお読みの皆さま、初めまして大阪大学の三善と申します。このたび貴研究所から「最近の糖鎖と医療応用に関する総説」というご依頼があり、伝統ある本時報に研究紹介をさせていただけることを大変光栄に存じます。現在の三善研究室は教授以外に准教授1名と学生が28名在室しています。博士前期課程の学生が中心に、糖鎖解析技術を使った疾患バイオマーカーの開発とその機能解析という全体テーマで、研究を行っています。研究以外には年間150-180コマの講義/実習があり、学生教育にも非常に力を入れています。本総説の原稿締め切りと期末試験などが重なった関係で、本当は糖鎖科学の臨床応用について俯瞰的に書くつもりでしたが、最近書きました3つの和文総説をまとめる形で紹介させていただきます。ご承知のように、糖鎖解析技術の急速な進歩によって、糖鎖科学は様々な臨床医学分野との融合研究が進展しています。

1. コアフコースの多彩な生物学的機能

コアフコースとは、N型糖鎖の還元末端のGlcNAcに α 1-6結合でフコースが付いた糖鎖である。この糖鎖構造は、 α 1-6フコース転移酵素(Fut8)の作用によって生合成される(図1A)。ほとんどのIgGの糖鎖にはコアフコースが結合するが、肝臓で産生される多くの糖タンパク質にはこの糖鎖構造がない。肝

臓がんの腫瘍マーカーとして知られるAFP(α フェトプロテイン)は、肝硬変では上昇することが多い。これに対してAFPの糖鎖にコアフコースが結合したAFP-L3は極めて特異性の高い肝がんのバイオマーカーである(図1B)。なぜAFP-L3が肝がんのみで産生されるのかという臨床的な疑問に答えるため、私たちはFut8のタンパク精製と遺伝子クローニングを行った。ところが実際に肝がん組織でFut8の遺伝子発現を検討すると、肝がんよりもむしろ周囲の肝硬変組織で高発現していた。細胞株の実験でもコアフコースの量を増加させるためには、Fut8の遺伝子発現よりもそのドナー基質であるGDP-フコース量やGDP-フコーストランスポーターの発現量を増加させた方が顕著であった。これらの実験結果からは、Fut8の遺伝子クローニングまでに5年以上の歳月をかけた私たちの努力に対して、コアフコースに対するFut8の役割は大きくないのではという印象を受けた。ところが、Fut8 KOマウスの劇的な表現型は、その不安を一掃した。生後3日以内にほとんどのマウスが死亡し、生存したマウスも肺気腫様の病理組織をもつ著明な成長障害をきたした(図1C)。フコース転移酵素は9種類存在する中で、マウスの致死という表現をもったフコース転移酵素のノックアウトマウスはFut8 KOマウス以外にはいない。これに対して、フコース転移酵素の基質GDP-フコースを作るFX という酵素のノックアウト

トマウスは、糖鎖不全症によく似た表現型を示す。80%以上のFut8 KOマウスは生後すぐに死亡し、生き残ったマウスも著しい成長障害をきたした。そして病理学的な解析から肺胞の成長障害を伴う肺気腫様の病変を認めた。Fut8 KOマウスとともに、コアフコースの生物学的機能が続々と発見された。

Fut8 KOマウスに認められた肺気腫様の病変の原因は、TGF β 受容体のシグナル異常に起因する。細胞膜表面に存在する多くの膜受容体や接着分子には、コアフコースが存在する。コアフコースの欠損によって、EGF受容体やインテグリンの機能低下が認められることがわかった。コアフコースの欠損によって、リガンドとの結合が低下することが機能低下のメカニズムと考えたが、EGF受容体やインテグリンには非常に多くのN型糖鎖が結合し、どのような理由で（どこの糖鎖が重要で）リガンドとの結合が低下するのかは未解明であった。N型糖鎖の部位特異的糖鎖mutantを作成しても、単にタンパク質の立体構造やfoldingを変化されるだけで、コアフコースの本質的な生物機能の解明にはつながらない。Fut8 KOマウスの樹立とともに、私たちは一度試してみたいことがあった。CEAやCA19-9など多くのがんバイオマーカーは、本来血中に分泌されることがない物質ががん化に伴って細胞極性が失われることによって血中に放出される。正常の肝細胞では、Apicalが胆管側でBasolateralが血液側に当たる。肝臓由来の血清タンパクがほとんどフコシル化されていないにもかかわらず、ヒト胆汁中には多くのフコシル化タンパクが存在する。糖鎖研究を始めた当初から、肝細胞を含む極性の保たれた上皮細胞には糖鎖を介した選別輸送があるのではないかと考えた（図1D）。肝細胞に発現するフコース転移酵素としてはFut6とFut8が存在するが、マウスではFut6がpseudo-geneとなる。このため正常肝細胞ではFut8が主要なフコース転移

酵素となる。マウスの胆汁を調べてみると、wild-typeマウスの胆汁に存在する α 1酸性タンパクや α 1アンチトリプシンがFut8 KOマウスの胆汁では存在しない。これに対して、肝細胞で作られる糖タンパクでないアルブミンは両者のマウスに同量存在する。肝細胞の中に、フコースを認識するレクチン様のタンパクが存在し、肝細胞のフコシル化タンパクの選別輸送を制御するのではないかと考え、その探索に数年間の労力を投入したが残念ながら同定には至っていない。比較的極性が保たれた肝がん細胞HepG2と肝がんモデル動物を用いた研究から、肝臓の選別輸送にはタンパク質側にも選別輸送があること、肝細胞の極性破綻がAFP-L3の産生機序に関わることがわかった。正常の肝臓ではフコシル化関連遺伝子の発現が低く、炎症やがん化に伴いその発現が上昇する。さらにがん化に伴う細胞極性の消失により、多くのフコシル化タンパクが血中に分泌され、様々なバイオマーカーとなる。

炎症性腸疾患は、何らかの免疫学的な異常により腸に慢性炎症を繰り返す難治性疾患である。最近私たちは炎症性腸疾患患者の炎症部においてのみT細胞上のコアフコースが発現上昇していることがわかった。非炎症部のT細胞では、コアフコースの発現が低い。この現象が結果か原因なのかを検証するためにFut8ノックアウトマウスに腸炎誘導実験を行った。上述の成長障害に加えて肝切除後の肝再生も遅延するにもかかわらず、Fut8ノックアウトマウスでは腸炎発症が抑制された。詳細は原著論文をお読みいただきたいが、腸炎発症抑制のメカニズムとして、T細胞受容体のコアフコースが結合しないとラフトに移行できないことがわかった。つまりT細胞が活性化されにくいと、T細胞から炎症性サイトカインが分泌されず、腸炎が発症しにくい。糖鎖は本質的に細胞や個体の生存に重要なことが多く、ブロードな糖鎖合成阻害薬は

副作用や過剰反応のため治療薬としては、使用しにくい。ただ炎症性腸疾患の場合は、内視鏡を用いた局所療法が期待できる。コアフコースの多彩な生物機能は、どこから生まれてくるのであろうか。Fut8は糖転移酵素としては比較的発現量の多い酵素だが、肝臓で作られる糖タンパクにはほとんどコアフコースが結合せず、血中IgGの90%以上にコアフ

コースが結合する。これまでの研究から推定されることは、N型糖鎖の根元にフコースが結合することで、糖鎖のゆらぎが安定し、フコースの疎水性によって細胞膜と糖タンパク質の親和性を調節するのかもしれない。この仮説は、化学や構造学の専門家によって、正解を得られたら嬉しく思う。

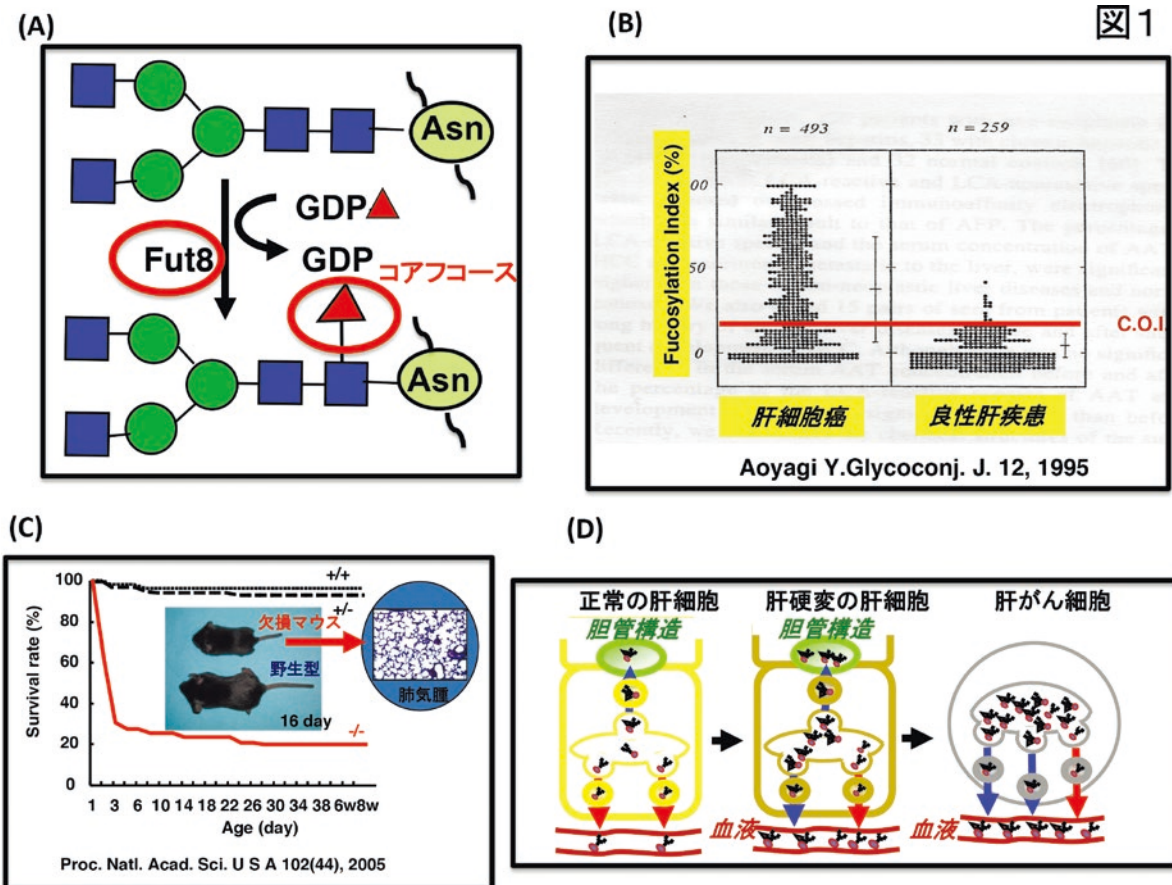


図1 コアフコースとその周辺

2. NASHの糖鎖バイオマーカー

フコシル化バイオマーカーの対象疾患として、まず患者数の多い脂肪肝を対象を定めた。肥満人口の増加に伴い、我が国を含めた世界中でも非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) 患者数は増加している。NAFLD患者は我が国で約1000-2000万人存在すると推定され、非進行性の非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver: NAFL) と進行

性の非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) に大別される (図2A)。NASHは現時点では肝生検による病理組織診断によってのみ診断可能な疾患であり、食事/運動療法による体重コントロール以外に、未だ確立された治療法がない。一般的に病理組織診断において脂肪滴を伴う肝細胞が30%以上認められる場合、画像診断でも脂肪肝が強く疑われる。脂肪滴を伴う肝細胞が5%以上認められるものを脂肪変性と定義し

ている。脂肪性肝疾患の病因は様々で、過剰飲酒、肥満、内分泌疾患、極度の低栄養、薬物などが挙げられるが、一般臨床で遭遇する主な脂肪性肝疾患はアルコール性と非アルコール性に大別される。NAFLDは肝障害を惹起する程度の飲酒歴がなく、ウイルス肝炎や自己免疫性肝炎等原因の明らかなものを除外した肝への脂肪沈着を認める疾患の総称である。NASHはNAFLDの重症型で、アルコール性肝炎に類似した炎症、風船様肝細胞腫大 (ballooning hepatocyte)、線維化を認め、肝硬変から肝細胞癌へ進展し得る。肝生検はその侵襲性以外にも様々な問題点を抱えている。そのため非侵襲的にNASHを診断する試みが血液検査データ、画像検査を用いて検討されている。NASHの病態進展には肝細胞のアポトーシスが促進的に作用しており、アポトーシスマーカーであるサイトケラチン18断片は単一マーカーとしては有用性が高く、近年最も注目されているバイオマーカーである。大規模試験でもその有用性が確認されているが、必ずしも感度/特異度は満足がいくものではない。一般的に、NAFLD/NASHは健診を契機にして肝機能異常、脂肪肝を指摘されることが多い。注意すべき点は『肝臓からの逸脱酵素である血中トランスアミナーゼ値 (AST/ALT値) はNAFLDの重症度判定に有用でない』という点である。NASH症例の中には、肝機能検査値 (AST、ALT、 γ GTP) が基準値内の症例もある。特に線維化の進展した症例では見かけ上肝機能検査値が基準値内となっている症例も多い。

NASHにおいては肝臓に風船様肝細胞 (Ballooning hepatocyte) という特徴的な肝細胞が出現する。NASHの病理診断において、風船様肝細胞の存在と線維化が重要な要素である。風船様肝細胞では細胞骨格が破壊されているため細胞極性が失われていることが古くから知られている。そこで第1項 (図1D) で説明した細胞極性とフコシル

化選別輸送の理論に従い、NASHにおいて肝臓での風船様肝細胞増加により本来胆管側へと分泌されるフコシル化タンパクが血中へと分泌され、血中フコシル化タンパクがNASHで上昇するのではないかと仮説を立てた。そしてフコシル化関連タンパクがヒトNASH血液バイオマーカーとなることを見いだした (フコシル化ハプトグロビン、Mac-2 binding protein)。フコシル化ハプトグロビン (Fuc-Hpt) は私たちの研究室が開発したレクチン抗体ELISAにより測定した。このキットはハプトグロビンに対するIgG抗体のFab部分を固相化し、フコース全般を認識するレクチンAAL (*Aleuria aurantia Lectin*) とのサンドイッチアッセイにより検出するユニークなELISAである (図2B)。我々の仮説どおりFuc-HptはNASH患者で上昇しており、なかでも肝組織の風船様肝細胞出現頻度増加に伴い有意な上昇を示し、風船様肝細胞の血液バイオマーカーとなりうることがわかった。一方、Mac-2 binding protein (Mac-2bp) はNASH患者で上昇していたが、なかでも肝線維化進展の程度との関連が強く、NASHの肝線維化マーカーとなることがわかった。この2つの糖鎖バイオマーカーはそれぞれNASHの風船様肝細胞、肝線維化というNASHの肝組織診断に重要な因子を予測可能であることから我々はこの2つの糖鎖バイオマーカーの組み合わせにより非侵襲的にNASH診断が可能となるのではないかと考えた。そこで、肝組織診断をした506名、健診受診803名のNAFLD患者の解析を行い、Fuc-HptとMac-2bpの組み合わせが極めて有用な非侵襲的NASH診断法となることを発見した。この方法は、海外で提唱されているいくつかのスコアリングシステム (FIB4 index、BARD score、NAFLD fibrosis score) よりもNASH鑑別能に優れた方法であることがわかった (図2C)。NASHを正しく評価できるバイオマーカーができれば、肝生検は不要と

なり、疾患概念そのものが変わる可能性がある。本論文の公表とともに、いくつかの製薬

会社、臨床検査関連企業から共同研究の申し込みがあった。

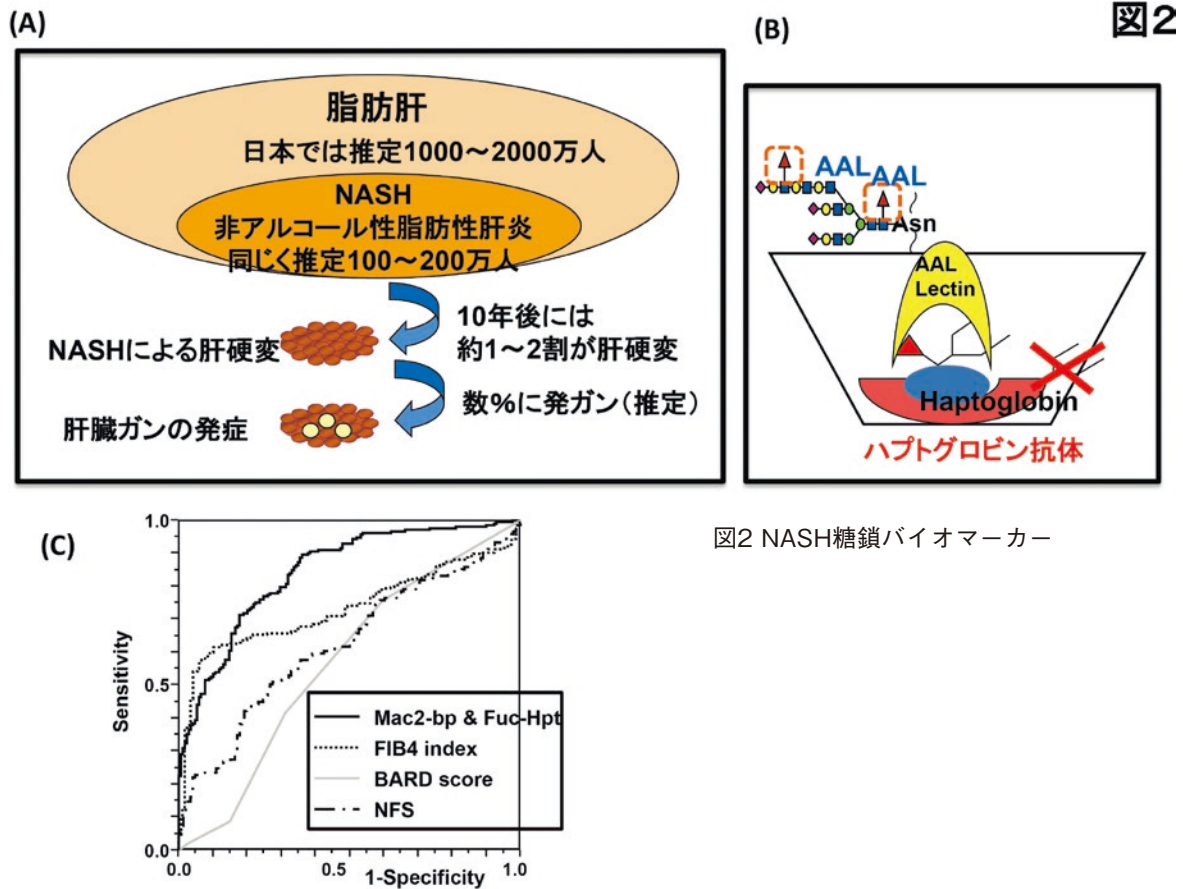


図2 NASH糖鎖バイオマーカー

3. 膵臓がん糖鎖バイオマーカーとしてのフコシル化ハプトグロビン

フコシル化は上述のように、がんや炎症と最も関係が深い糖鎖修飾の1つである。フコシル化には、 $\alpha 1-2/\alpha 1-3/\alpha 1-4/\alpha 1-6$ 結合様式が存在し、それぞれの糖鎖に生物学的機能のあることが知られている。また、フコシル化糖鎖を認識するレクチンとしてAAL (*Aleuria aurantia Lectin*)、AOL (*Aspergillus oryzae Lectin*)、LCA (*Lens culinaris Agglutinin*)、PhoSL (*Pholiota squarrosa Lectin*)、UEA1 (*Ulex europaeus Agglutinin-1*)などが知られている。紙面の都合で、それぞれのレクチンがどのようなフコシル化を認識するのかについては、成書を参考にしていただきたい。私たちの研究室では、膵臓がんの患者血清中にAALと強く結

合する分子量40Kのタンパク質を見つけ、N末端シーケンスの結果ハプトグロビンの β 鎖であることがわかった(図3A)。質量分析を使った糖鎖解析により、このフコシル化の多様性は複数の結合様式であると考えられたため、フコシル化を広く認識するAALとハプトグロビンのポリクローナル抗体を使って、血中のフコシル化ハプトグロビンを定量できる測定系を開発した(図2B)。このレクチン-抗体ELISAを使って多数の膵臓がん患者と健常者の血中フコシル化ハプトグロビンを測定したところ、膵臓がん患者で有意に上昇しROC解析の結果AUC値は0.9以上で従来の膵臓がんのマーカーとして知られるCA19-9に匹敵する腫瘍マーカーであることがわかった(図3B)。しかし、その後の検討で血中フコシル化ハプトグロビンは、大腸がん、肺がん、

肝臓がんなど多くのがん患者で上昇するだけでなく、上述のように非アルコール性脂肪肝炎のバイオマーカーとなることもわかってきた。元来ハプトグロビンは99%以上が肝臓で産生される急性期タンパクの1つである。溶血した赤血球から遊離されたヘムと結合し脾臓で処理することが主な生物学的機能であるが、正常の肝臓ではフコシル化制御因子の発現が極めて低く、血中ハプトグロビンのほとんどがフコシル化されていないことが知られている。がんに伴って増加するフコシル化ハプトグロビンがいったいどの細胞で産生されるのか、まだ解明されていない。私たちは、より膵臓がんの特異性を高いフコシル化ハプトグロビンの測定系を開発するために、様々な検討を行ってきた。

AAL、PhoSLのどちらのレクチンを使ったレクチン-抗体ELISA系でも、膵臓がんの一部の患者でフコシル化ハプトグロビン値が感度以下で測定できないことがわかっていった。ハプトグロビンには、その α 鎖の遺伝子型からHpt1-1, Hpt2-1, Hpt2-2の表現型に分類され、各タイプで臨床検査としての正常値も異なることが知られている。その理由としては、Hpt1-1, Hpt2-1, Hpt2-2の立体構造が大きく異なり、ELISAで測定した場合の抗体の反応性が異なるためと考えられる。そこでフコシル化ハプトグロビン値をハプトグロビンの表現形ごとに分けて、膵臓がん患者と健常者で比較検討した。図3Cに示すように、Hpt2-1とHpt2-2では、これまでの結果と同様に血中フコシル化ハプトグロビン値は、膵臓がん患者で有意に上昇していた。しかし、Hpt1-1においては、膵臓がん患者と健常者共に感度以下で、測定できなかった。Hpt1-1の β 鎖にフコシル化した糖鎖が実際に存在しないのか、それともHpt1-1の立体構造の問題でレクチンが結合しにくいのかは、今後の検討課題と言える。膵臓がんとしての糖鎖バイオマーカーの観点から見ると、Hpt1-1を除くこ

とによってAUC値が改善される点も興味深い。この現象は膵臓がんの腫瘍マーカーであるCA19-9が、ルイス酵素遺伝子(Fut3)欠損者で測定できない現象に似ている。レクチンは天然物由来のため、ワインのように毎年その品質を一定に保つことは困難である。また上述のように、ハプトグロビンに結合する何らかの糖タンパク質が血中に存在した場合、その糖鎖構造をレクチンが認識してしまう可能性がある。この2つの問題を解決し、より精度の高いフコシル化ハプトグロビンの測定系を確立するため、フコシル化ハプトグロビンそのものを認識する次世代型糖鎖抗体の作成を試みた。大腸がん細胞HCT116は、フコース転移酵素に必要なドナー基質GDP-フコースを合成する酵素GMDSを欠損している。従って、この細胞にハプトグロビンを過剰発現させると、非フコシル化ハプトグロビンを得ることができる。この細胞の培養上清にL-フコースを添加すると、サルベージ経路が働きフコシル化ハプトグロビンを作る。そこで、マウスをフコシル化ハプトグロビンで免疫し、フコシル化ハプトグロビンと膵臓がん患者由来のハプトグロビンに反応し、非フコシル化ハプトグロビンと健常人由来のハプトグロビンに反応しない抗体10-7G mAbの作成に成功した。10-7G mAbを使ったELISAで患者血清を測定すると、健常者、慢性膵炎患者に比較して、大腸がん、膵臓がん患者で有意に血中10-7G値は増加していた。臨床病期から見ると、大腸がんの場合Stage IIIまでは血中10-7G値は増加せず、Stage IVで増加していた。検討した症例では、特に肝転移があるものは全て高値を示した。次に10-7G mAbを用いて免疫染色を行うと、正常の肝臓では染色されないが、膵臓がんが肝臓に転移した周囲の肝臓で陽性像を示した(図3D)。従って10-7G mAbが認識するフコシル化ハプトグロビンは、肝転移の周囲肝臓組織で産生されていることが示唆された。同一のコホートを

用いてAALのレクチン-抗体ELISAで測定したフコシル化ハプトグロビンと10-7G mAb ELISAで測定したフコシル化ハプトグロビン (10-7G値) を比較すると、前者の方がややAUC値が高かった。しかし特異度では

10-7G値が上回り、バイオマーカーとしての評価はどちらが上とは言にくい。一般的に測定系の精度を上げた場合、感度が下がることは珍しくないようである。

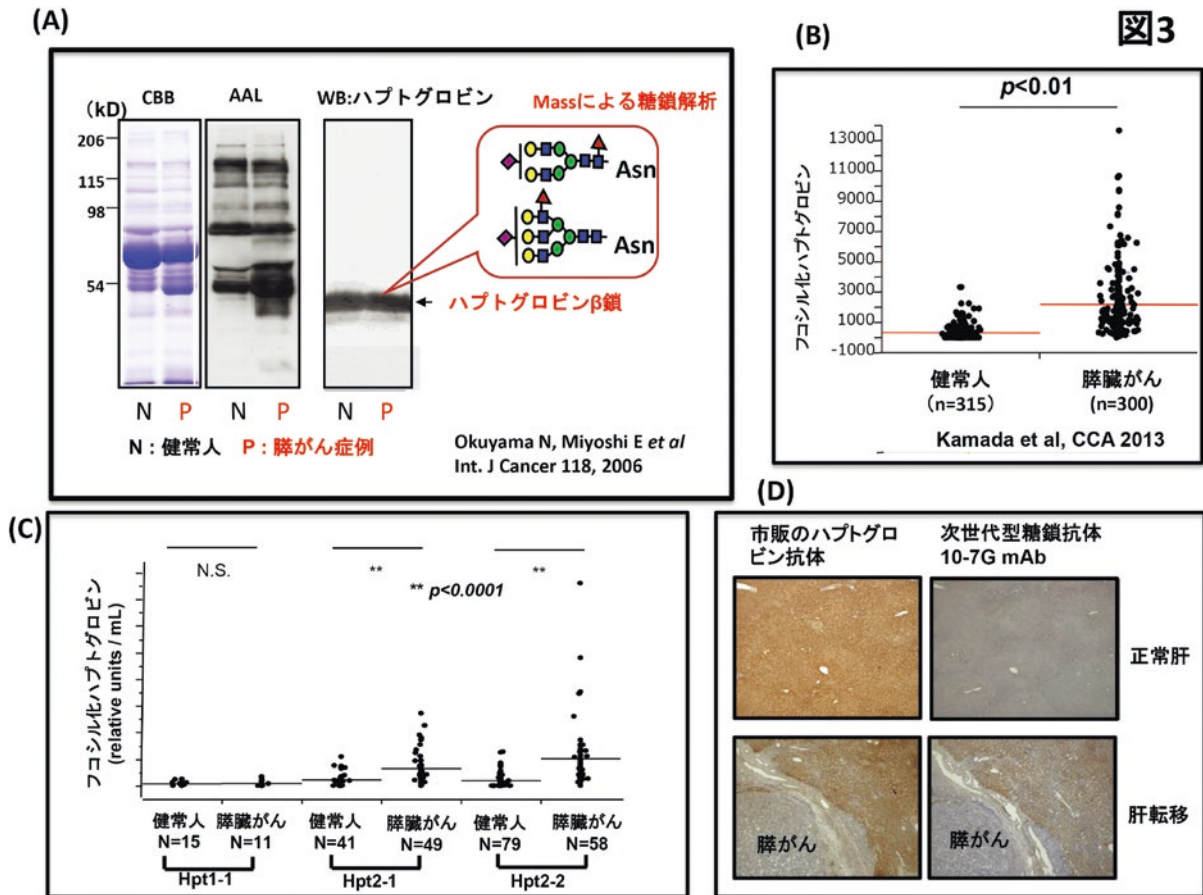


図3 肝臓がんのバイオマーカーとしてのフコシル化ハプトグロビン

おわりに

本総説は、原稿締め切りまでの時間と紙面の関係で全体を通してまとまりに欠けた感がありますが、もしご興味のある方がいらっしゃれば、原著論文もしくは参考文献をお読みください。最後に本研究内容に関して、大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻の多くの大学院生、鎌田佳宏准教授、高松真二研究員、大阪国際がんセンター研究所の谷口直之先生に深謝いたします。

参考文献

1. フコシル化タンパク質を標的にした新規が

ん診断・治療薬の開発

三善英知、高松真二、魚住尚史、鎌田佳宏
実験医学35 (9) 1447-1452, 2017

2. 内臓脂肪と異所性脂肪～非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)

鎌田佳宏 医学のあゆみ 266 (10), 763-768, 2018

3. レクチン医学最前線～肝がん糖鎖バイオマーカーとしてのフコシル化ハプトグロビンの臨床応用

三善英知 医学のあゆみ 269 (9), 651-657, 2019

癌疾患におけるガレクチン-4の役割と制御

Regulation and physiological functions of galectin-4 in cancer disease

糖鎖生物研究室 井手尾 浩子
Hiroko IDEO

はじめに

生体内で糖鎖は発生、分化、感染、免疫、細胞の接着、増殖、アポトーシス等、様々な場面で重要な役割を果たす。それゆえ、糖鎖を認識するレクチンの機能も様々な生命現象に及び、哺乳動物には多くのレクチン様蛋白質が存在する。ガレクチンファミリー蛋白質は、ガラクトースに親和性をもち、配列上保存された糖鎖結合ドメインを有し、多くの生物種に存在する。哺乳類においては現在14種類が知られ、それぞれ糖結合特異性、発現組織が異なり、多様な生物学的機能を有している。

ガレクチン-4は、消化器官に特異的に発現し2つの糖結合ドメインを有するが、その詳細な糖結合特異性は筆者らによってはじめて明らかにされた [1]。ガレクチン-1, -3等と比べてlactosamineに対する結合は弱く、Gal β 1-3GalNAcを有するO型糖鎖や糖脂質に結合が強く、特に末端に硫酸が付加すると大幅に結合力は増加する。細胞膜上のCEAや硫酸化糖脂質、コレステロール硫酸等にガレクチン-4は結合し [2, 3]、各種シグナル伝達分子群のプラットフォームであるラフト画分に存在している [4]。その他、ガレクチン-4に関する様々な機能、疾患との関わりに関して総説 [5] に詳しい。本稿では筆者らが報告したガレクチン-4の分泌機構 [6] と乳癌診断への応用 [7] を中心に、近年報告されたと癌の転移とガレクチン-4の関連について紹介する。

1. ガレクチン-4の細胞外分泌機構

ガレクチンの結合する糖鎖は細胞外に存在するのにも関わらず、ガレクチン自体は分泌蛋白質が持つようなシグナル配列をもたず、その分泌メカニズムは殆ど解明されてこなかった。ガレクチン-4が主に存在する消化管上皮細胞は、生体外からの様々な刺激や病原性細菌やウイルスなどの攻撃にさらされ、それによりシグナル伝達系が活性化されている。ガレクチン-4が細胞外に分泌される機構にシグナル伝達系の活性化が関与しているのではないかと考えた。そこでガレクチン-4の高発現細胞であるNUGC-4細胞の細胞内のチロシンリン酸化レベルをチロシンフォスファターゼ阻害剤であるPervanadate (PV) を添加することにより亢進させ、抗ガレクチン-4抗体で免疫沈降を行った。その結果、ガレクチン-4がチロシンリン酸化されること、このリン酸化がSrcキナーゼファミリー (SKF) 阻害剤によって阻害されることから、SKFがガレクチン-4のリン酸化に関わっていることが見出された (図1)。

ガレクチン-4のリン酸化におけるSKFの関与が示唆されたことから、常に活性型の状態を保つSrcキナーゼ (Act-Src) を使って細胞のチロシンリン酸化レベルの亢進を試みた。Act-Src のプラスミドの導入で、抗リン酸化Src (Y416) 抗体で検出される活性型Srcが、Act-Src導入細胞及び、PV処理NUGC4細胞の細胞画分及び、ガレクチン-4抗体免疫沈降

物に検出された (図2, [6])

ガレクチン-4C末端のYVQIを欠失した変異体の導入実験によって、ガレクチン-4C末端ペプチドYVQIがガレクチン-4のチロシンリン酸化に重要であることがわかり (図3A)、このC末端リン酸化ペプチドは、Srcキナーゼ及びSHP-2のSH2ドメインにより認識されることがわかった (図3B)。

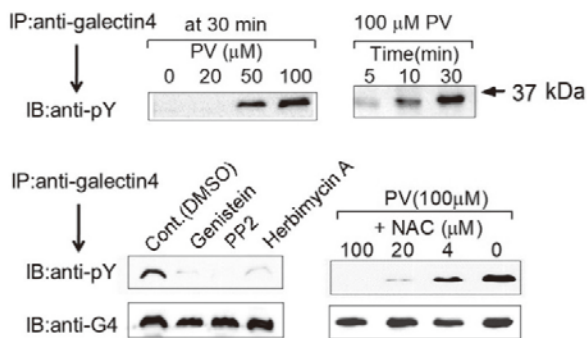


図1. NUGC4細胞におけるガレクチン-4のチロシンリン酸化。

PVの濃度及び処理時間依存的にガレクチン-4のチロシンリン酸化が亢進する。
ガレクチン-4のチロシンリン酸化はHerbimycin A (1 μM), PP2 (10 μM), genistein (50 μM) で阻害される。
チロシンリン酸化は抗pY抗体 (4G10) で染色

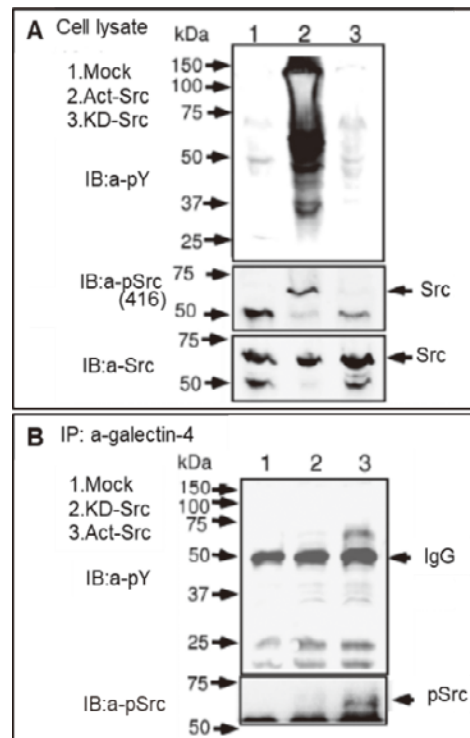


図2. ガレクチン-4はAct-Srcと相互作用している。

A. 各プラスミド (Mock:Srcを含まない, Act-Src: 常時活性型Src, KD-Src:キナーゼ部位を不活化したSrc) 導入時の細胞溶解物のチロシンリン酸化レベル (IB:pY) と活性型Src (IB:a-pSrc (416))
B. 各プラスミド導入時のガレクチン-4抗体免疫沈降物中のチロシンリン酸化物 (pY) 及び活性型Src (IB:a-pSrc (416))

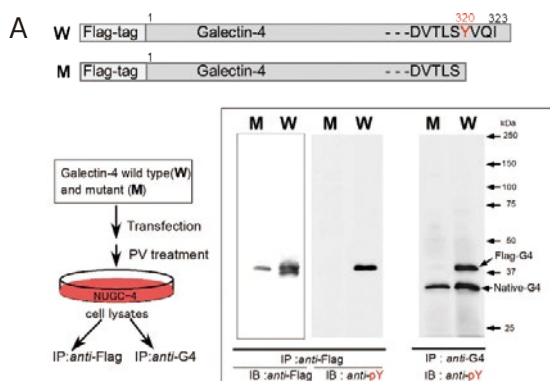
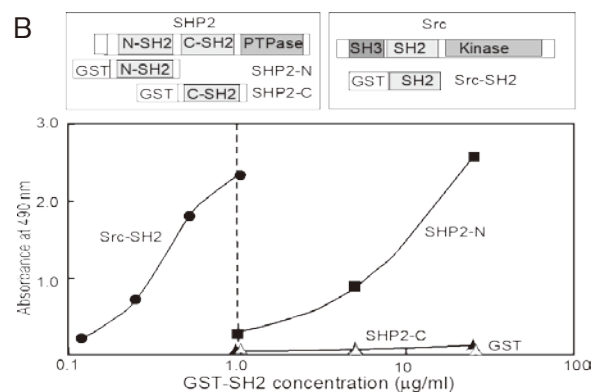


図3. ガレクチン-4C末端ペプチドYVQIがガレクチン-4のチロシンリン酸化に重要である。

A. C末端ペプチドYVQIを欠損したガレクチン-4はリン酸化されない。
B. ガレクチン-4C末端リン酸化ペプチドはSrcのSH2ドメイン、SHP-2のN側SH2ドメインに認識される。
(合成ガレクチン-4C末端リン酸化ペプチドDVTLS(P) YVQIに対する各GST-SH2ドメインの結合を、HRP標識抗GST抗体を使い検出)



また、NUGC-4細胞培養上清中にガレクチン-4は通常状態では極めてわずかし分泌されているが、添加するPVの濃度、時間依存的に分泌量が増える (図4A)。C末端ペプ

チドYVQIを欠損したガレクチン-4変異体が培養上清中に見られないこと (図4B) から、ガレクチン-4のチロシンリン酸化がその分泌に重要であることが示唆された。

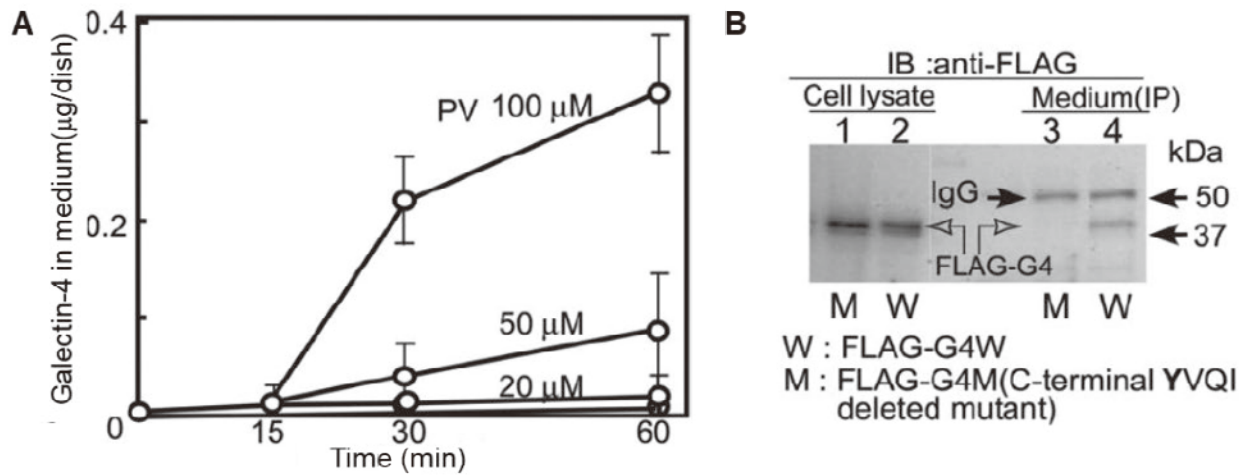


図4.チロシンリン酸化が亢進するとガレクチン-4の細胞外分泌が亢進する。

A. PV添加による細胞外ガレクチン-4濃度の変化。

B. ガレクチン-4 C末端欠失変異体はPV処理時細胞外に放出されない。(細胞溶解液及びメディウム (免疫沈降で濃縮) はFLAG抗体によって染色)

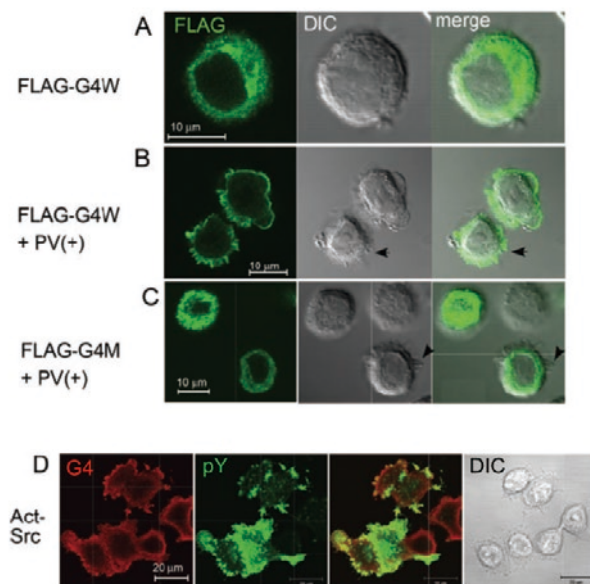


図5. ガレクチン-4のNUGC4細胞での局在

A. FLAGガレクチン-4.

B. PV処理後

C. PV処理後のFLAGガレクチン-4 (変異体)

D. Act-Srcを導入した細胞のガレクチン-4 (G4) 及びリン酸化蛋白質 (pY) の染色

内在性のガレクチン-4は細胞膜近傍に強く染色されるが、一過性に導入したFLAGガレクチン-4は細胞内に強く染まり (図5A)、PV処理により細胞膜近傍部位へと染色がシフトする (図5B)。しかしC末端欠失変異体ではそのような変化はみられない (図5C)。FLAGガレクチン-4は、PV処理或いはAct-

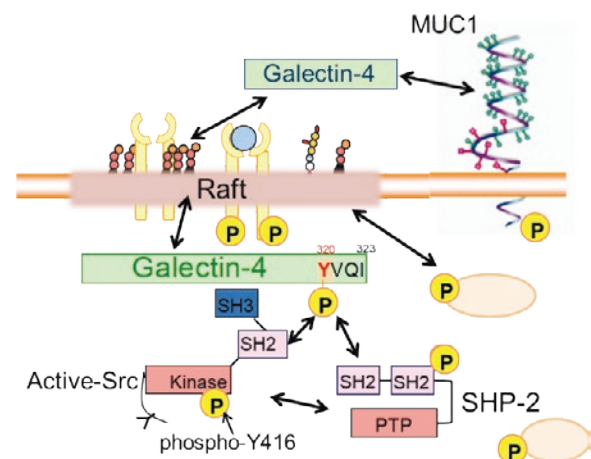


図6. ガレクチン-4と相互作用する分子群

Src導入で、チロシンリン酸化蛋白質と共に膜近傍部に局在が変化することから (図5D)、ガレクチン-4の膜への局在に、活性型Srcキナーゼ等によるガレクチン-4のリン酸化が関与することが示唆された。

Srcキナーゼはがんの進行に伴ってその量や活性が増大し、転移等がん悪性化形質の獲得に関わることから、ガレクチン-4がSrcキナーゼ等の分子と相互作用することにより、がん細胞の悪性度に関わる可能性が強い。また、本稿では詳述しないが、NUGC4細胞の分泌するMUC1にガレクチン-4は結合し、PV処理でその細胞外分泌は亢進する。過去に大腸癌細胞を使用した系でガレクチン-4が

MUC1をはじめとして各種糖蛋白質のアピカル側の輸送に関わるという報告がある [8, 9]。それゆえガレクチン-4の細胞内局在はそれらの分子の局在、分泌にも影響を与える可能性が高い。

2. 乳癌患者血清中のガレクチン-4結合性MUC1の分析

近年日本人女性の乳癌の罹患率は増えており、30～65歳の女性の癌の罹患部位において、もっとも頻度が高い。乳癌の診断マーカーとしてCA15-3が使用されているが、その陽性率は全乳癌患者中15%と低く、主に予後の追跡に使用されている。CA15-3のターゲッ

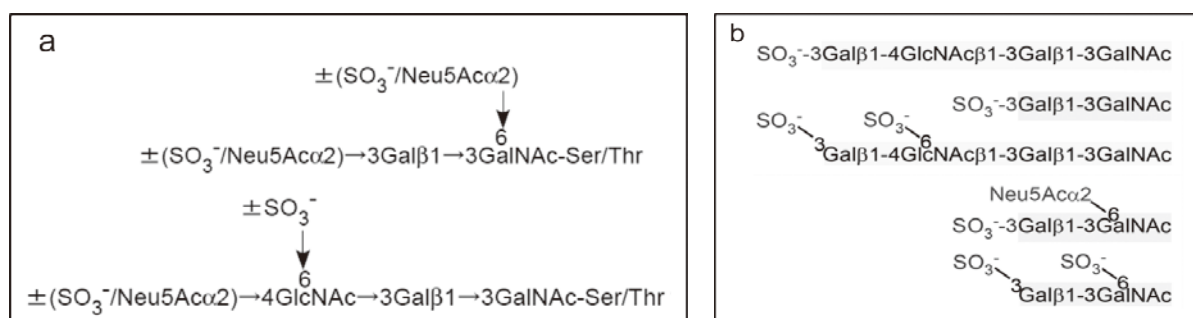


図7. YMB-S培養上清中のMUC1に含まれる糖鎖構造 [10]

a) 推定された酸性糖鎖構造 b) 3'-硫酸化ガラクトース含有糖鎖構造

糖 鎖	Kd(M) at 25°C a)	相対値 b)
$\text{SO}_3^- \text{---} 3\text{Gal}\beta 1 \text{---} 3\text{GalNAc-O-Bn}$ ($\text{SO}_3^- \text{---} 3\text{core1-O-Bn}$)	3.4×10^{-6}	100
$\text{SO}_3^- \text{---} 3\text{Gal}\beta 1 \text{---} 3(\text{GlcNAc}\beta 1 \text{---} 6)\text{GalNAc-O-Bn}$ ($\text{SO}_3^- \text{---} 3\text{core2-O-Bn}$)	1.1×10^{-4}	3.0
$\text{Gal}\beta 1 \text{---} 3\text{GalNAc}(\text{core1})$	3.4×10^{-4}	1.0
$\text{SO}_3^- \text{---} 3\text{Gal}\beta 1 \text{---} 4\text{Glc-O-PNP}(\text{SO}_3^- \text{---} 3\text{Lac-O-PNP})$	7.5×10^{-5}	4.5
$\text{NeuAc } \alpha 2 \text{---} 6\text{Gal}\beta 1 \text{---} 4\text{Glc}(\text{NeuAc } \alpha 2 \text{---} 6\text{Lac})$	$>1.0 \times 10^{-3}$	<0.3
$\text{NeuAc } \alpha 2 \text{---} 3\text{Gal}\beta 1 \text{---} 4\text{Glc}(\text{NeuAc } \alpha 2 \text{---} 3\text{Lac})$	$>1.0 \times 10^{-3}$	<0.3
$\text{SO}_3^- \text{---} 6\text{Gal}\beta 1 \text{---} 4(\text{SO}_3^- \text{---} 6)\text{GlcNAc}$	$>1.0 \times 10^{-3}$	<0.3
$\text{Gal}\beta 1 \text{---} 4\text{Glc}(\text{Lactose})$	8.7×10^{-4}	0.4

表1. ガレクチン-4の糖結合特異性

a) 数値は文献[1]の値から引用 b) 相対値は $\text{Gal}\beta 1 \text{---} 3\text{GalNAc}$ のKd値を各糖鎖のKd値で割ることにより算出。

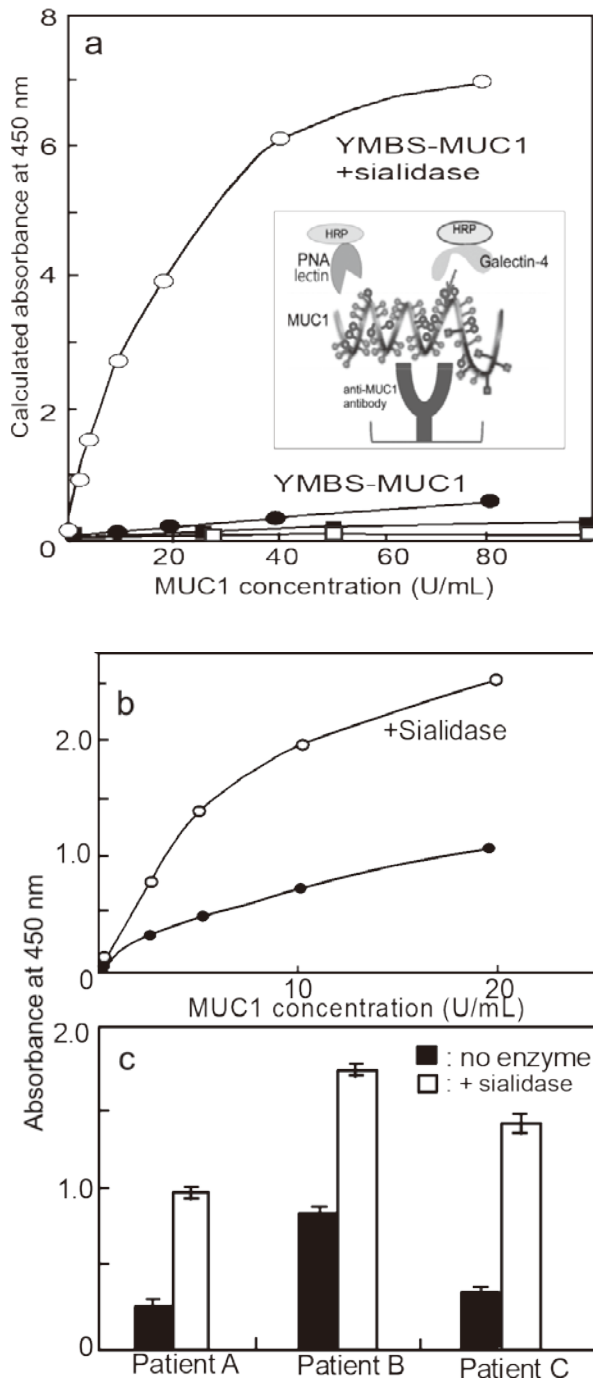


図8. レクチンELISAによる乳癌MUC1糖鎖のキャラクタリゼーション

- a) PNA/MUC1 (PNA結合性MUC1)の測定値。YMB-S細胞上清由来MUC1 (●)、シアリダーゼ処理YMB-S-MUC1 (○)、乳癌患者血清由来MUC1: 患者1 (■)、患者2 (□)。
- b) Gal4/MUC1測定値。YMB-S細胞上清由来MUC1のシアリダーゼ処理前 (●)、処理後 (○)
- c) シアリダーゼ処理前後の乳癌患者血清由来Gal4/MUC1測定値。

ト蛋白であるMUC1は呼吸器、消化器、乳腺等の組織の上皮細胞に存在し、癌疾患との関連が多く報告されている。

筆者らは乳癌細胞 (YMB-S) 培養上清のMUC1を精製し分析した結果、図7aに示す様な糖鎖構造を持つことを明らかにしてきた [10]。中でも3'-硫酸化ガラクトース含有糖鎖 (図7b) が全酸性糖鎖の約36%存在する。また、Gal β 1-3GalNAc(core1)-認識レクチンPNAが、乳癌細胞YMB-S培養上清や乳癌患者由来のMUC1には殆ど結合せず、シアリダーゼ消化後に初めて結合したことから、これらのMUC1は大部分がシアル酸あるいは硫酸で修飾されていると考えられた (図8a)。

表1に示すように、ガレクチン-4は3-O-硫酸化core1に対して結合は強いが、還元末端core1の置換、C-6部位へのシアル酸、硫酸付加、また、LacやLacNAcのGalのC-6位がシアル酸、硫酸付加された糖鎖に対しては著しく結合が減弱する。前述の様に乳癌細胞由来MUC1中に多くの硫酸化糖鎖が存在することから、硫酸化糖鎖を認識するガレクチン-4をプローブとして、乳癌患者血清中のガレクチン-4結合性MUC1(Gal4/MUC1)の測定を考え、免疫アッセイ系を構築した。YMB-S細胞培養上清及び乳癌患者血清由来のMUC1へガレクチン-4は結合し、シアリダーゼ処理で増加したことから、乳癌由来MUC1はシアル酸及び硫酸で修飾されていることが示唆された (図8b, c)。

280例の原発乳癌及び43例の再発乳癌患者血清中のガレクチン-4結合性MUC1(Gal4/MUC1)を測定した結果、その陽性率はCA15-3に比べて高く、特に再発転移患者の平均は 839 ± 618 U/mL で350 U/mL をcutoff値とした陽性率は86%と、47%のCA15-3に比べて有意に高かった (図9A)。同一検体群のGal4/MUC1及びCA15-3測定値をもとに、ROCカーブを作成し比較した結果、Gal4/MUC1アッセイはCA15-3アッセイ

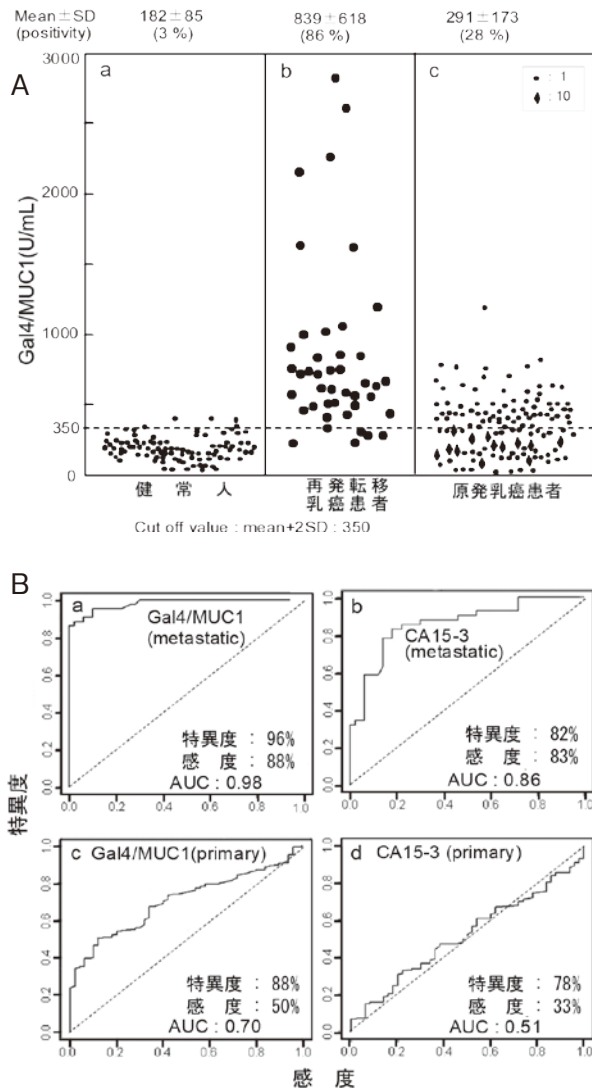


図9

- A. 健康人(a)、再発/転移乳癌患者(b)、原発乳癌患者(c)血清のGal4/MUC1測定値
- B. Gal4/MUC1アッセイのROCカーブ。再発/転移乳癌患者血清(a)、原発乳癌患者血清(c) CA15-3アッセイのROCカーブ。再発/転移乳癌患者血清(b)、原発乳癌患者血清(d)

に比べ、感度、特異度ともに勝っていた (図9B)。原発乳癌患者での陽性率は再発転移患者に比べ低かったが、ステージ毎の陽性率は stages I, II, III, and IVではそれぞれ21.2%, 27.9%, 37.9%, 60.0%であり、CA15-3の陽性率より高値であった。

乳癌の中で最も一般的な組織型である浸潤性乳管癌は、乳頭腺管癌、充実腺管癌、硬癌(スキルス)の3つのサブタイプに分類され、

これらサブタイプと予後には密接な関係がある。硬癌はリンパ節転移の割合が高く、乳癌患者の50%の割合を占め、予後は一般的に悪い。Gal4/MUC1の陽性率はCA15-3に比べ乳癌の全ての組織型で高かったが、硬癌とその他のタイプの複合例でその差が一番顕著であった。乳癌の悪性度及びサブタイプにガレクチン-4が具体的にどう関与しているか興味深いところである。予備的な実験で乳癌以外の各種癌患者血清を測定した所、Gal4/MUC1値は、肝癌、胃癌、前立腺癌以外はあまり高くないことから、臓器特異性はあるようだ。NUGC-4細胞を用いた実験でチロシンリン酸化の亢進でメディウム中のMUC1が増えることを明らかにしたが [6]、多くの乳癌細胞においてチロシンキナーゼの活性化が報告されていることから、乳癌細胞においてもGal4/MUC1の細胞外放出にシグナル分子が関与しているか興味深い。

3. ガレクチン-4と癌の転移

細胞間コミュニケーションの異常により細胞は癌化して異常増殖能や転移性を獲得するが、この時糖タンパク質や細胞表面糖鎖の変化がしばしば観察される [11]。糖鎖を認識するガレクチンも様々な組織の癌での発現の変化が報告されているが、ガレクチンの種類や発現組織により癌の進展に促進的にあるいは抑制的働くかが異なっている [12]。癌の中でも悪性度の高い癌は転移性が高く、しばしば線維化をとまなうスキルスタイプを示すが、細胞の最外表面に存在する糖鎖が、どのように線維化、転移メカニズムに関与しているのかよくわかっていない。近年、人の前立腺癌細胞をマウスに移植し、その転移巣を繰り返し移植することにより高転移性細胞株が樹立され、樹立された高転移細胞で特異的に発現が上昇する遺伝子の一つとしてガレクチン-4が見出された [13]。続報でC1GALT1 (O型糖鎖の合成酵素) 及びST3GAL1の発現上

昇により増加するNeuAc α 2-3Core1へのガレクチン-4の結合が前立腺癌の悪性化に寄与する [14] と報告されたが、Core1糖鎖のシアリル化はガレクチン-4への結合を抑制するという筆者らの結果と矛盾する点もあり、糖鎖生物学の側面からのさらなる解明が必要と思われる。また、過去に胃癌細胞で腹膜転移をおこす細胞に共通して発現の上昇する遺伝子の一つとして、ガレクチン-4が同定されたが [15]、認識分子の同定やメカニズムの解明等、その後詳しい研究はなされていない。ガレクチン-4の場合もその発現によって悪性度が亢進する組織 [16, 17] と低下する組織 [18, 19] とがあって一様ではなく、ガレクチン-4を取り巻く微小環境、認識リガンド、糖鎖、相互作用する分子等を総合的に解析しないと癌の転移や悪性化に関わるメカニズムの解明につながらないと考えられる。現在、癌の転移に関わる糖鎖変化と、それを認識するガレクチンの関与という側面から再びガレクチン-4に焦点をあてて研究を進めている所である。

謝辞

本稿で紹介した研究の大部分は前所属先(佐々木研究所)の山下克子先生のもとで行われたものであり、この場を借りて深く感謝申し上げます。また、本稿執筆の機会を与えていただき、再びガレクチン-4の研究を行うにあたり多くの助言を賜っております松田常務理事、天野純子旧室長、高田美生室長をはじめとする野口研究所の皆様に感謝いたします。

参考文献

1. Ideo H, Seko A, Ohkura T, Matta KL, Yamashita K. High Affinity Binding of Recombinant Human Galectin-4 to SO₃-→3Gal β 1→3GalNAc pyranoside. *Glycobiology* 12, 199-208, **2002**.
2. Ideo H, Seko A, Yamashita K. Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and
- CEA in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 280, 4730-4737, **2005**.
3. Ideo H, Seko A, Yamashita K, Recognition mechanism of galectin-4 for sulfated compounds, *J. Biol. Chem.*, 282, 21081-9, **2007**.
4. Braccia, A, Villani, M, Immerdal L, Niels-Christiansen, LL, Nystrom BT, Hansen, GH, Danielsen, EM. Microvillar membrane microdomains exist at physiological temperature. Role of galectin-4 as lipid raft stabilizer revealed by "superrafts". *J Biol Chem.* 278, 15679-84, **2003**.
5. Cao ZQ, Guo X. The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein Cell* 7, 314-24, **2016**.
6. Ideo H, Hoshi I, Yamashita K, Sakamoto M. Phosphorylation and externalization of galectin-4 is controlled by Src family kinases. *Glycobiology* 23, 1452-62, **2013**.
7. Ideo H., Hinoda Y, Sakai K, Hoshi I, Yamamoto S, Oka M, Maeda K, Maeda N, Hazama S, Amano J, Yamashita K. Expression of mucin 1 possessing a 3'-sulfated core1 in recurrent and metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 137, 1652-60, **2015**.
8. Delacour D., Delacour DV, Gouyer JP, Zanetta H. Drobecq E, Leteurtre G, Grard O, Moreau-Hannedouche E, Maes A, Pons S, Andre Le Bivic A, Gabius HJ, Manninen A, Simons K, Huet G. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol.* 169, 491-501, **2005**.
9. Morelle W, Stechly L, André S, Van Seuningen I, Porchet N, Gabius HJ, Michalski JC, Huet G. Glycosylation pattern of brush border-associated

- glycoproteins in enterocyte-like cells: involvement of complex-type N-glycans in apical trafficking. *Biol Chem.* 390, 529-44, **2009**.
10. Seko A, Ohkura T, Ideo H, Yamashita K. Novel O-linked glycans containing 6'sulfo-Gal/GalNAc of MUC1 secreted from human breast cancer YMBS cells: possible carbohydrate epitopes of KL-6(MUC1) monoclonal antibody. *Glycobiology* 22, 181-95, **2012**.
 11. Pinho, SS. Reis, CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 15, 540-55, **2015**.
 12. Dings RPM, Miller MC, Griffin RJ, Mayo KH. Galectins as molecular targets for therapeutic intervention. *Int J Mol Sci.* 19, pii: E905. **2018**.
 13. Tsai CH, Tzeng SF, Chao TK, Tsai CY, Yang YC, Lee MT, Hwang JJ, Chou YC, Tsai MH, Cha TL, Hsiao PW. Metastatic Progression of Prostate Cancer Is Mediated by Autonomous binding of galectin-4-O-glycan to cancer cells. *Cancer Res.* 76, 5756-67, **2016**.
 14. Tzeng SF, Tsai CH, Chao TK, Chou YC, Yang YC, Tsai MH, Cha TL, Hsiao PW. O-Glycosylation-mediated signaling circuit drives metastatic castration-resistant prostate cancer. *FASEB J.* fj201800687, **2018**.
 15. Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, Kodama T, Aburatani H. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res.* 61, 889-95, **2001**.
 16. Cai Z, Zeng Y, Xu B, Gao Y, Wang S, Zeng J, Chen L, Huang A, Liu X, Liu J. Galectin-4 serves as a prognostic biomarker for the early recurrence / metastasis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 105, 1510-7, **2014**.
 17. Hayashi T, Saito T, Fujimura T, Hara K, Takamochi K, Mitani K, Mineki R, Kazuno S, Oh S, Ueno T, Suzuki K, Yao T. Galectin-4, a novel predictor for lymph node metastasis in lung adenocarcinoma. *PLoS One* 8, e81883, **2013**.
 18. Maftouh M, Belo AI, Avan A, Funel N, Peters GJ, Giovannetti E, Van Die I. Galectin-4 expression is associated with reduced lymph node metastasis and modulation of Wnt/ β -catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget* 5, 5335-49, **2014**.
 19. Wu MM, Li CF, Lin LF, Wang AS, Pu YS, Wang HH, Mar AC, Chen CJ, Lee TC. Promoter hypermethylation of LGALS4 correlates with poor prognosis in patients with urothelial carcinoma. *Oncotarget.* 8, 23787-802, **2017**.

グレーゾーンレベル前立腺がん患者血清PSAの糖ペプチドの LC-MS/MS解析法の開発

LC-MS/MS-based strategy for the analysis of glycosylation of prostate-specific antigen (PSA) at low level in human serum

糖鎖有機化学研究室 八須 和子
Kazuko HACHISU

1. はじめに

前立腺がんは欧米では男性が罹患するがんの1位になっており、日本においても2014年の統計で胃がん、肺がん、大腸がんに次いで4位であり、今後さらに罹患率が上がることが予測されている [1,2]。

前立腺がんのスクリーニングには血中の前立腺特異抗原 (Prostate Specific Antigen, PSA) 量の測定すなわちPSA検査が有効であり、1991年にCatalonaらにより有用性が報告されて以来現在に至るまで行われている [3,4]。しかし、近年PSA検査における擬陽性の多さや過剰診断及び治療が問題になっている [4,5]。

PSAはセリンプロテアーゼに分類されるタンパク質分解酵素であり、健常人の前立腺においても分泌される糖タンパク質である。前立腺がん患者で血中のPSA値が上昇する傾向にあることが知られるが、前立腺炎および良性前立腺肥大症の患者でも血中PSA値が上昇する傾向にある。よってPSA検査は前立腺がんスクリーニング検査としてその感度および特異度は不十分であることが言える。実際、血中PSA値が10 ng/mL以上では、前立腺がんである可能性が高く (>50%)、4 ng/mL以下ではその可能性は低い (<15%)。それらの中間である4-10 ng/mLは”グレーゾーン”と呼ばれ、うち20-30%程度で前立腺がんが見つかる。グレーゾーンの診断では針を穿刺

する侵襲的検査 (前立腺生検) が必要となるが、上述の通り、70-80%は結果的に不要な検査となる。入院や麻酔を伴う不必要な生検を避けるため、特にグレーゾーンにおけるより精度の高い前立腺がんのスクリーニングが求められる。そこで、本研究所ではPSAの量だけでなくその質、すなわちPSAの糖鎖変化に着目した解析を行うことを考えた。

近年、がん化に伴うタンパク質や脂質の糖鎖構造変化が報告されており、糖鎖はがんを特定するマーカーとして期待されている。既に臨床検査において用いられている糖鎖関連マーカーとしては、CA19-9、SLX、CA125、AFP-L3などが知られる [6]。

前立腺がんにおけるPSAの糖鎖変化についても本研究所や他の研究機関において解析が行われており、*N*-結合型糖鎖のLacdiNAc構造の増加や α 2,3シアリル化の増加、コアフコシル化の減少、 α 1,2フコシル化の増加、高分岐化などの報告がある [7-17]。前立腺がん特異的なPSA糖鎖マーカーを発見できれば、より精度の高いスクリーニング法の開発につながる。

現在までに本研究所で、MALDI-TOFMS解析によりLacdiNAc含有糖ペプチドが前立腺がん患者血清 (>PSA 30 ng/mL) で増加傾向にあるという結果が出ており、LacdiNAc含有糖鎖増減の解析が新規な前立腺がんスクリーニング法となり得ることが期待されるが、

MALDI-MSを用いた手法では、グレーゾーンの微量なPSAを解析するのは困難であった。またMS解析では、高精度のスクリーニングが求められるPSAグレーゾーンレベルでの解析例がほとんどなかったことから、本研究では、微量で高感度に測定可能なLC-MS/MS (Selected Reaction Monitoring, SRM) 法を用いて、特にグレーゾーンレベルのPSAのLacdiNAc含有糖鎖に着目しそのグライコフォームを解析することを目指した。

2. 実験概要

本研究ではヒト血清中のグレーゾーン濃度PSAの糖ペプチドを定量解析するためのLC-MS/MSを用いた方法を開発した。実験概要を図1に示す。

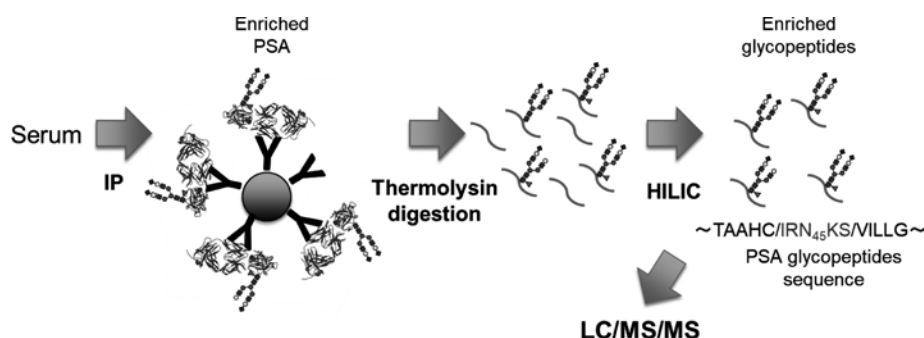


図1 血清PSA糖ペプチドLC-MS/MS解析概要

3. 合成PSA糖ペプチド $[^{13}\text{C}]$ A2-IRNKSを用いたLC-MS/MS解析検量線の作成

2で開発した方法を用いたPSA糖ペプチドのLC-MS/MSの解析可能範囲を確認するために、合成PSA糖ペプチド $[^{13}\text{C}]$ A2-IRNKS (0, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 fmol, 各n=3) を用いてLC-MS/MS解析 (negative mode) を行い、そのクロマトグラムエリア数値の検量線を作成したところ、7.8125-1000 fmol (0.23–30 ng PSA換算) の範囲で直線性を持った検量線を作成することができた (図2)。それらの変動係数 (CV) は3-12.7% (7.8125 fmolはCV 7.8%, 15.625

本方法は免疫沈降 (IP)、サーモリシン消化、HILIC精製およびLC-MS/MS解析からなる。先ず血清中のtotal PSA (PSA-ACT & free PSA) をanti-PSA抗体マグネティックセファロースビーズを用いたIPにより捕捉した後、サーモリシン消化により $^{43}\text{IRNKS}^{47}$ 糖ペプチド断片に切断し、HILIC (sepharose4B) により糖ペプチドを精製し、negative modeにてLC-MS/MS SRM解析を行った。また、LC-MS/MS解析の際に内部標準として、安定同位体標識PSA糖ペプチド $[^{13}\text{C}]$ A2-IRNKS (非還元末端のGalactoseを安定同位体標識した $[^{13}\text{C}]$ NA2-IRNKSにシアル酸を結合させた合成糖ペプチド) を用いることでMS/MSクロマトグラムエリア数値の補正を行った。

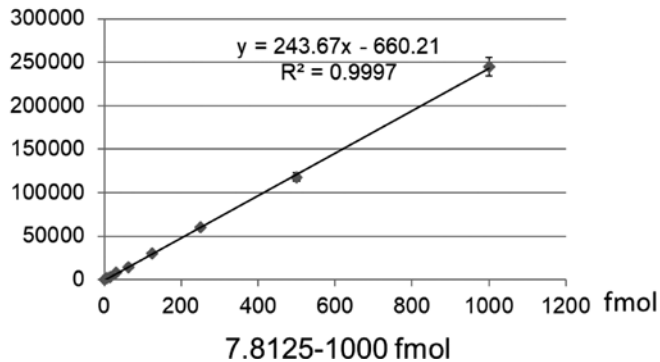
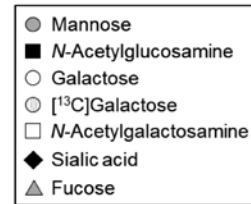
fmolはCV 12.7%, 31.25 fmolはCV 6.4%, 62.5 fmolはCV 4.1%, 125 fmolはCV 4.5%, 250 fmolはCV 3.0%, 500 fmolはCV 4.3%, 1000 fmolはCV 4.2%) であった。検出限界に近づくともCVが高くなり、MS/MSクロマトグラムエリア数値のばらつきが大きくなる。

4. 前立腺がん患者PSA濃度グレーゾーンモデル血清を用いた糖ペプチドLC-MS/MS解析

前立腺がん患者血清のモデルとして、PSAを含まない標準血清1 mL中にグレーゾーン濃度でPSA標準品 (PSA-ACT STD) を添加した。このモデル血清を用いてPSA糖ペプチ

MS² 1415.5(2-)>1270(2-)

fmol	n=1	n=2	n=3	Average	SD	CV
1000	232696	257966	243327	244663	10359.6	4.2%
500	115747	124922	113134	117934.3	5054.9	4.3%
250	61701	60815	57511	60009	1803.0	3.0%
125	28297	31630	30082	30003	1361.8	4.5%
62.5	14199	13151	14490	13946.7	575.0	4.1%
31.25	8598	7954	7348	7966.7	510.4	6.4%
15.625	2905	2985	3810	3233.3	409.1	12.7%
7.8125	1541	1809	1840	1730	134.2	7.8%

図2 LC-MS/MSを用いた合成PSA糖ペプチド[¹³C]A2-IRNKSの検量線

ドのLC-MS/MS解析 (negative mode) を行なった。

初めに、解析の再現性を確認するために、PSA標準品5 ng/mL血清のPSA糖ペプチドのLC-MS/MS解析を行い、CVを算出した (n=4)。解析時には内部標準 (IS) として [¹³C]A2-IRNKSを1解析あたり50 fmol添加し、MS/MSクロマトグラムエリア数値の補正に用いた。

その結果、検出上位6糖ペプチドA2F, A2FLacdiNAc(LDN), A2, A2LDN, A1FSLDN, A1F (ペプチド:IRNKSの表記は省略) はA2F

(54.6 ± 10.4 fmol) でCV 19.0%、A2FLDN (14.9 ± 2.5 fmol) でCV16.5%、A2 (9.3 ± 2.0 fmol) でCV 21.5%、A2LDN (4.2 ± 1.4 fmol) でCV 33.3%、A1FSLDN (1.2 ± 0.3 fmol) でCV 25.2%、A1F (0.7 ± 0.6 fmol) でCV 86.8%であった。PSA糖ペプチドが10 fmol以上であればCVは約20%であり、5 fmol程度ではCVは約30%であった。1 fmol以下ではCVは80%を超え、定量は難しい。検出限界に近づくほどCVが高くなった (図3)。

次に、解析の定量性を確認するために、PSA標準品0, 2.5, 5, 10, 20 ng/mL血清の

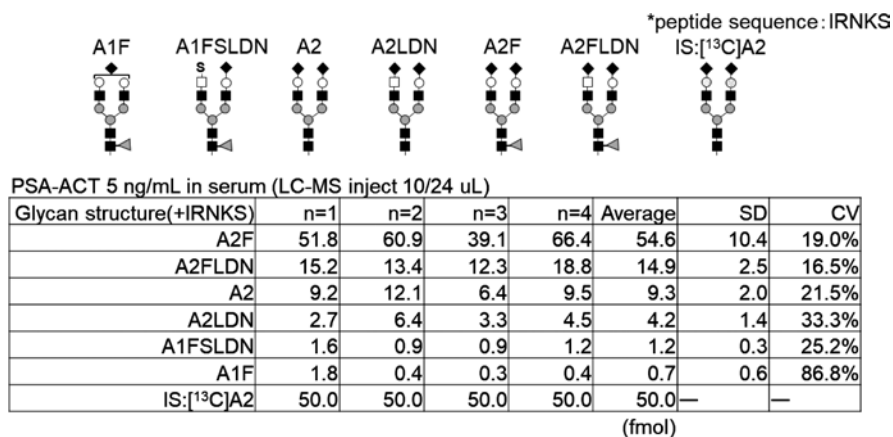


図3 PSA標準品5 ng/mL血清の糖ペプチドLC-MS/MS解析

Glycan structure (+peptide:IRNKS)	0 ng (0 fmol)	2.5 ng (83.3 fmol)	5 ng (166.7 fmol)	10 ng (333.3 fmol)	20 ng (666.7 fmol)	Amounts of IP PSA Amounts of LC/MS inject PSA (IP PSA*10/24uL)
	0 ng (0 fmol)	1.04 ng (34.7 fmol)	2.08 ng (69.4 fmol)	4.17 ng (138.9 fmol)	8.33 ng (277.8 fmol)	
A2F	0.0	16.0	51.8	121.7	231.2 (fmol)	
A2	0.0	4.3	9.2	25.2	54.1	
A2FLDN	0.0	3.1	15.2	36.9	52.4	
A2LDN	0.0	1.5	2.7	10.0	20.8	
A1FSLDN	0.0	1.1	1.6	4.0	10.2	
A1F	0.0	0.0	1.8	0.9	6.8	
IS:[¹³ C]A2	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	

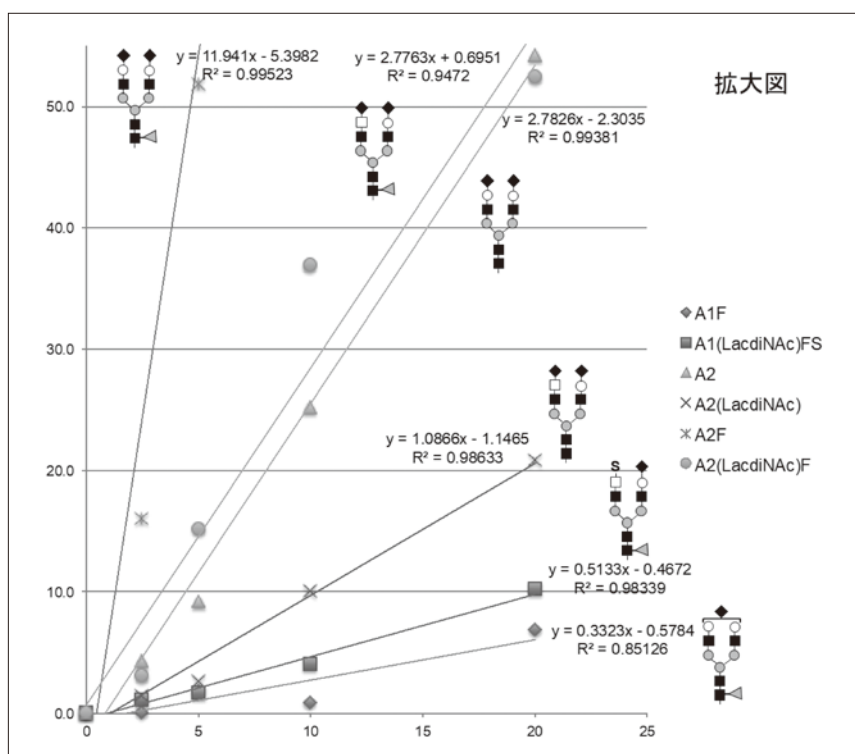
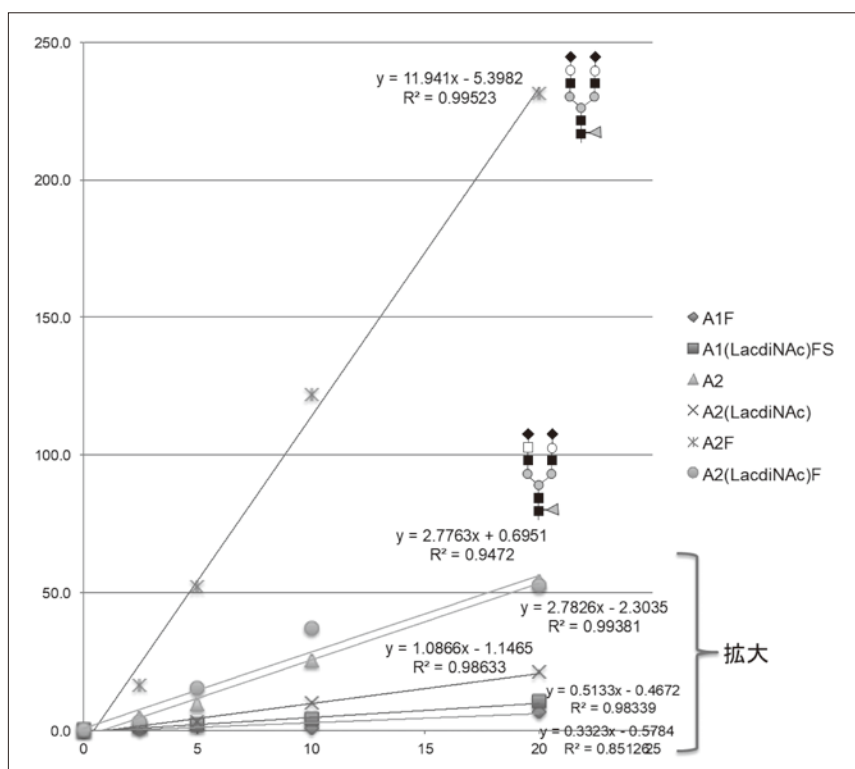


図4 PSA標準品0, 2.5, 5, 10, 20 ng/mL血清の糖ペプチドLC-MS/MS解析

PSA糖ペプチドのLC-MS/MS解析を行った。解析時にはISとして ^{13}C A2-IRNKSを1解析あたり50 fmol添加し、MS/MSクロマトグラムエリア数値の補正に用いた。検出上位6糖鎖A1F, A1FSLDN, A2, A2LDN, A2F, A2FLDNの定量性を確認したところ、A2F ($y = 11.941x - 5.3982$)で $R^2 = 0.99523$, A2FLDN ($y = 2.7763x + 0.6951$)で $R^2 = 0.9472$, A2 ($y = 2.7826x - 2.3035$)で $R^2 = 0.99381$, A2LDN ($y = 1.0866x - 1.1465$)で $R^2 = 0.98633$, A1FSLDN ($y = 0.5133x - 0.4672$)で $R^2 = 0.98339$, A1F ($y = 0.3323x - 0.5784$)で $R^2 = 0.85126$ と上位5糖鎖に関してはPSA 0-20 ng/mLの範囲で相関係数 R^2 が0.94以上であり、直線性のある定量が可能であった。6糖鎖中最小量 (PSA20 ng時に6.8 fmol) であるA1Fに関しては2.5 ngにおいては不検出であり、5, 10 ngでも検出量が低くばらつきが見られた(図4)。

これらの結果から、本方法でのPSAの定量の限界は数fmol (0.1 ng程度) であり、例えば、PSA濃度がグレーゾーンの血清 (4-10 ng/mL) を解析する場合、全PSA中に数%存在する糖鎖構造であれば定量解析が可能であると言える。

5. おわりに

本研究で開発した方法を用いて、PSA濃度がグレーゾーンの血清 (4-10 ng/mL) 中に数%存在するPSA糖鎖構造の解析が可能になった。そこでテストスタディとして本方法を用いて、前立腺がん患者及び前立腺肥大症患者のPSA濃度グレーゾーン血清数検体を解析した。PSA糖鎖構造ではシアリル化2本鎖*N*-結合型糖鎖がメジャーであり、LacdiNAc含有糖鎖に関しても同様であるため [7-17]、特にA2F及びLacdiNAc含有糖鎖A2FLacdiNAc付加ペプチドの比を算出したが、LacdiNAc含有糖鎖が前立腺がん特異的に増加するという傾向は認められなかった。以前、本研究において前立腺がんではPSAの*N*-結合型糖

鎖の分岐が増え、LacdiNAc含有3本鎖*N*-結合型糖鎖が特異的に検出されると報告したが [9]、その量は検体中全PSA糖鎖の数%以下であるため、本方法ではPSA濃度グレーゾーンレベルの検体でLacdiNAc含有3本鎖*N*-結合型糖鎖を検出するのは難しいと考えられる。

本研究をまとめていた際に、芳賀らにより「Identification of Multisialylated LacdiNAc Structures as Highly Prostate Cancer Specific Glycan Signatures on PSA」というタイトルの論文が公開された [18]。この論文では最新のLC-MS機器 (LCMS-8060超高速トリプル四重極型LC/MS/MSシステム, 島津製作所) とEreximという糖鎖構造解析手法を用いて、PSA中に0.03%存在する糖鎖構造の解析が可能とのことであった。芳賀らの方法は、本方法の約100倍の感度での解析が可能ということであり、本方法では見えてこない数%以下の糖鎖構造も確認されていた。芳賀らの方法においても前立腺がん患者及び前立腺肥大症患者の血清PSAの全LacdiNAc含有糖鎖量を比較した場合、前立腺がんでは特異的に増加しているという傾向は認められていなかった。これは本研究でのテストスタディ結果と一致していた。しかし、芳賀らの方法では、ごく微量しか存在しないLacdiNAc含有3本鎖糖鎖及び4本鎖糖鎖が検出できており、この糖鎖構造を用いて前立腺がんと前立腺肥大症を見分けることが可能であると報告している。

本方法ではグレーゾーンレベルでのLacdiNAc含有3,4本鎖糖鎖を検出する感度を実現できなかったが、PSAの糖鎖構造について多くの知見を得ることができた。前立腺がんにおけるPSAのLacdiNAc糖鎖のマーカーとしての可能性及び臨床検査への展開は、今後の高性能分析装置の低価格化、サンプル処理の簡便化等によって実現されるものと期待したい。

謝辞

本研究を実施するにあたり、終始ご指導いただいた野口研究所 天野純子上席研究員に深く感謝いたします。また、有益なご助言をいただいた松田昭生常務理事、水野真盛糖鎖有機化学研究室長ならびに野口研究所の皆様がこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Siegel, R. L.; Miller, K.D.; Jemal, A. *CA Cancer J Clin.* **2019**, 69, 7-34.
2. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」最新がん統計
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html (2019年7月 閲覧)
3. Catalona, W. J.; Smith, D. S.; Ratliff, T. L.; Dodds, K. M.; Coplen, D. E.; Yuan, J. J.; Petros, J. A.; Andriole, G. L. *N. Engl. J. Med.* **1991**, 324, 1156–1161.
4. Kim, H. K.; Andriole, G. L. *BMC Med.* **2015**, 13, No.61
5. Klotz, L. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2013**, 20, 204-209.
6. 大川 二郎. 日本臨床検査医学会編 臨床検査のガイドライン2005/2006, **2005**, 3, 298-306.
7. 天野 純子、平野 清子、杉本 一路. 前立腺がんと良性前立腺肥大症とを識別する方法. 特許第5284958号, 2013.
8. 平野 清子、中村 紀夫、天野 純子. 前立腺がんを判定する方法. 特許第5431360号, 2013.
9. 天野 純子、中村 紀夫. 前立腺がんを判定する方法. 特許第5443156号, 2013.
10. Peracaula, R.; Tabares, G.; Royle, L.; Harvey, D. J.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M.; de Llorens, R. *Glycobiology* **2003**, 13, 457–470.
11. Ohyama, C.; Hosono, M.; Nitta, K.; Oheda, M.; Yoshikawa, K.; Habuchi, T.; Arai, Y.; Fukuda, M. *Glycobiology* **2004**, 14, 671-679.
12. Tajiri, M.; Ohyama, C.; Wada, Y. *Glycobiology* **2008**, 18, 2–8.
13. Fukushima, K.; Satoh, T.; Baba, S.; Yamashita, K. *Glycobiology* **2010**, 20, 452–460.
14. Kaya, T.; Kaneko, T.; Kojima, S.; Nakamura, Y.; Ide, Y.; Ishida, K.; Suda, Y.; Yamashita, K. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 1797–1803.
15. Llop, E.; Ferrer-Batalle, M.; Barrabes, S.; Guerrero, P. E.; Ramirez, M.; Saldova, R.; Rudd, P. M.; Aleixandre, R. N.; Comet, J.; de Llorens, R.; Peracaula, R. *Theranostics* **2016**, 6, 1190–1204.
16. Hagiwara, K.; Tobisawa, Y.; Kaya, T.; Kaneko, T.; Hatakeyama, S.; Mori, K.; Hashimoto, Y.; Koie, T.; Suda, Y.; Ohyama, C.; Yoneyama, T. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, No.261.
17. Ishikawa, T.; Yoneyama, T.; Tobisawa, Y.; Hatakeyama, S.; Kurosawa, T.; Nakamura, K.; Narita, S.; Mitsuzuka, K.; Duivenvoorden, W.; Pinthus, J. H.; Hashimoto, Y.; Koie, T.; Habuchi, T.; Arai, Y.; Ohyama, C. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, No.470.
18. Haga, Y.; Uemura, M.; Baba, S.; Inamura, K.; Takeuchi, K.; Nonomura, N.; Ueda, K. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 2247-2254.

酸感受性保護基を有する糖アミノ酸の開発と 糖ペプチド合成への応用

Development of Glycosylated Amino Acid Protected with Acid Labile Group and Its Application for Glycopeptide Synthesis

糖鎖有機化学研究室 田中 智博*
Tomohiro TANAKA

1. はじめに

たんぱく質のグリコシル化は主要な翻訳後修飾の一つであり、生体が発現する多くのたんぱく質は糖たんぱく質として存在することが明らかになっている。それらの糖たんぱく質における糖鎖の機能を明らかにするためのツールとして、その部分構造である糖ペプチドが用いられている。糖ペプチドは化学分野においては、糖タンパク質の化学合成のビルディングブロックとして用いられており、生物分野では特定の構造を有する糖鎖に特異的な酵素、レクチンや抗体を探索するための基質として用いられている [1]。

現在、糖ペプチドの調製は生体試料からの単離または化学合成によって行われている。生体中の様々な酵素によって糖鎖構造が編集されているため、均一な糖鎖構造を有する糖ペプチドの生体試料からの取得は困難である。

更に、生体試料の調製においては収量が低い、より多くの試料を必要とする構造解析などに用いるための十分な量の確保ができないという問題が生じる。そのため、均一な糖鎖を有する糖ペプチドを大量に調製する手法としてその化学合成法が重要となる。

2. 糖ペプチドの化学的調製法

糖ペプチドの化学合成には固相担体を用いた固相合成法が用いられる。ペプチド固相合成と同じく、アミノ酸のアミノ基の保護基によって、Boc法およびFmoc法の二種類の合成法が知られている。中でも、フッ化水素 (HF) のような腐食性の高い酸を用いないことから、Fmoc法を採用した糖ペプチド合成が主流となっている。糖ペプチド合成のためのビルディングブロックとして、糖水酸基が保護された糖アミノ酸が汎用されてい

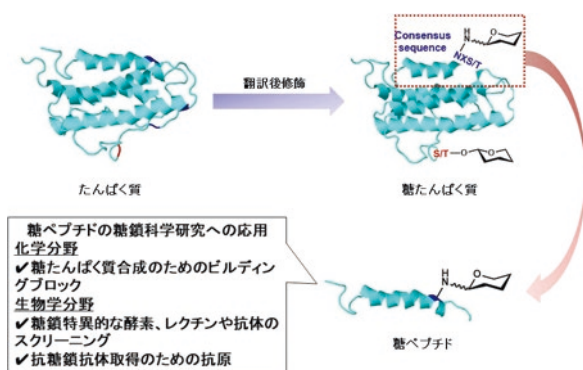


図1 糖鎖科学研究における糖ペプチドの役割

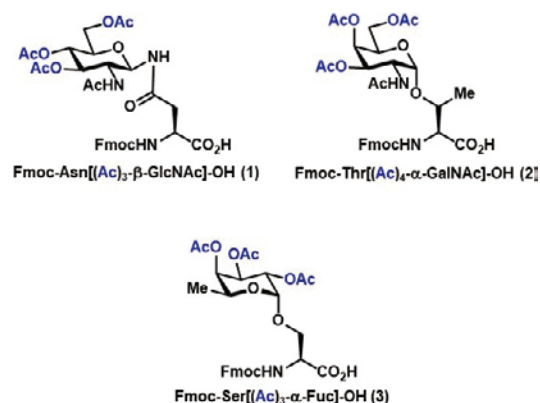


図2 市販の糖アミノ酸の構造

* 現職：東京理科大学 薬学部 助教

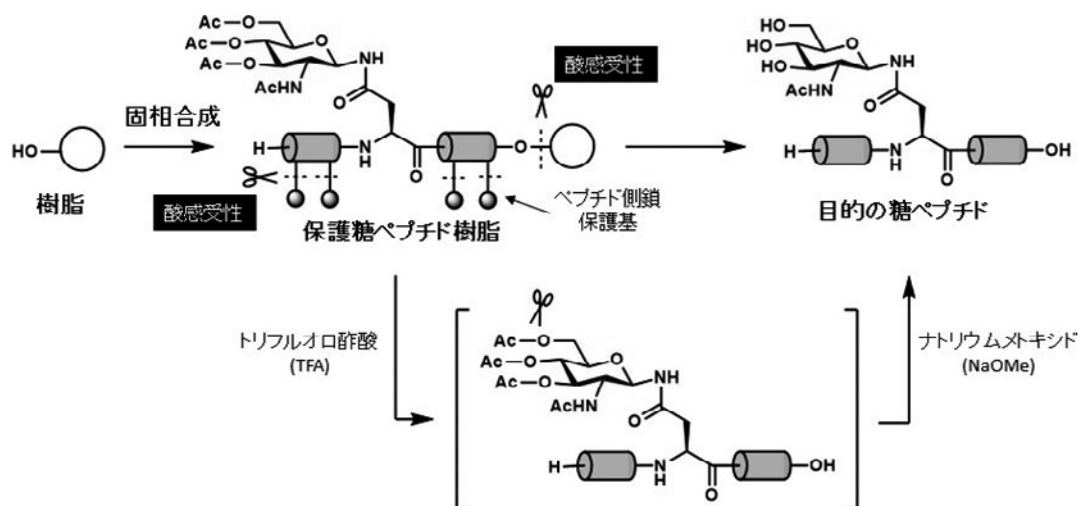


図3 糖水酸基をAc基で保護した糖アミノ酸を用いた糖ペプチド合成

る。市販の糖アミノ酸の多くは糖水酸基がアセチル (Ac) 基で保護された糖アミノ酸 (図2)である。これらの糖アミノ酸を用いた場合、下記のような工程を経る (図3)。

縮合剤を用いて固相担体に逐次的にアミノ酸または糖アミノ酸を導入し、ペプチド鎖を伸長する。目的の配列まで保護された糖ペプチドを伸長した後に、脱樹脂およびペプチド側鎖の脱保護を行うため、強酸 (TFA) を用いた反応を行う。この時、糖水酸基の保護基であるアセチル基はTFA耐性であるため、脱保護は進行しない。そのため、目的の糖ペプチドを得るためには別途糖水酸基を脱保護しなくてはならない。アセチル基の脱保護には通常ナトリウムメトキシドやヒドラジンなどの求核性の高い塩基を用いる。このように多段階の脱保護過程を経て、ようやく目的の糖ペプチドが得られる。

しかしながら、この脱保護過程において、糖ペプチド合成のジレンマともいえる問題が生じる。糖鎖合成において、フコースやシアル酸残基を有する糖鎖は酸感受性が高く、強酸によってグリコシル結合の開裂などの副反応を起こすことが知られている。一方で、ペプチド合成においては塩基によるエピメリ化などの副反応がしばしば問題になる。そのため、両者の性質を有する糖ペプチドの効率的

な合成法を考えた場合、上記の副反応の全てに留意しなくてはならない。更に、一部のO結合型糖ペプチドの合成では上記の副反応に加えNaOMe存在下に β 脱離を介した糖分子の脱離が報告されている。これらの点から、汎用されているO-アセチル保護糖アミノ酸をビルディングブロックとした糖ペプチド合成にはいまだ改善の余地があると考えられる。

3. 酸感受性保護基を有する新規ビルディングブロックの開発

上記の問題を解決するためのアプローチの一つとして、糖水酸基を酸感受性の高い官能基で保護したビルディングブロックを使用する手法が報告されている。本手法では図4のように、固相合成後に酸による単工程の脱保護を行うだけで目的とする糖ペプチドが得られることから、作業の煩雑さや副反応による収率の低下を回避できると期待される。そこで、これまでに合成されたビルディングブロックについて紹介する。

朝比奈、北条らはベンジル系保護基で糖水酸基を保護した糖アミノ酸4を報告している (図5、上部左)。^[2]これまで、ベンジル (Bn) 基は高い堅牢性とペプチドやチオエステルに損傷を与えることなく除去できる保護基として糖アミノ酸の糖水酸基保護基として用い

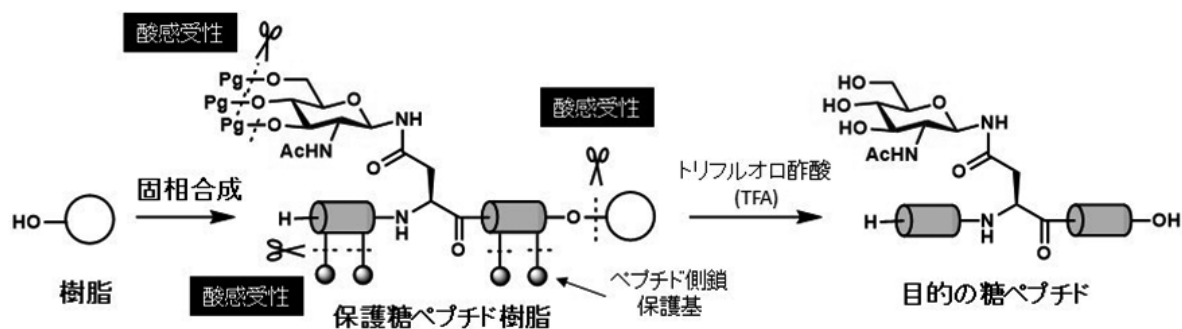


図4 糖水酸基を酸感受性保護基で保護した糖アミノ酸を用いた糖ペプチド合成

られていた。しかしながら、Bn基は堅牢であるがゆえに通常のTFAによる脱保護では除去できず、Low-TfOH試薬による多段階の脱保護を必要とし、操作が煩雑になるという問題点があった。そこで、北条らはより効率的に糖ペプチドセグメントを供給するためにBn基よりも酸感受性の高いベンジル系保護基であるメトキシベンジル (MPM) 基やベンジリデンアセタールに注目し、糖水酸基をそれらの保護基で保護したN-グリコシル化アスパラギン誘導体を合成した。また、合成した糖アミノ酸を実際に用いて、N結合型糖たんぱく質であるemmprin 1st Igドメイン (22-104) の合成を行っている。同様に、北条らはO結合型糖ペプチドの合成のためのO-グリコシル化スレオニン誘導体 **5** についても報告している。(図5、上部右) [3] O-グリコシル化スレオニンの合成に際し、O-グリコシル化はN-グリコシル化とは異なり、比較的強い酸性条件を要することから、酸感受性の高いMPM基の使用は困難である。そのため、彼らはMPM基よりも酸に安定かつBn基よりも酸感受性の高いメチルベンジル (MBn) 基を糖水酸基の保護基として選択している。実際に、彼らの合成したMBn保護Core-1糖鎖を有する糖アミノ酸誘導体 (**5**) はグリコシル化を含む各工程で収率60%以上と比較的高い収率で得られている。合成した糖アミノ酸を用いて、インターロイキン-2 (IL-2) 由来のペプチドチオエステルの効率的合成に成功

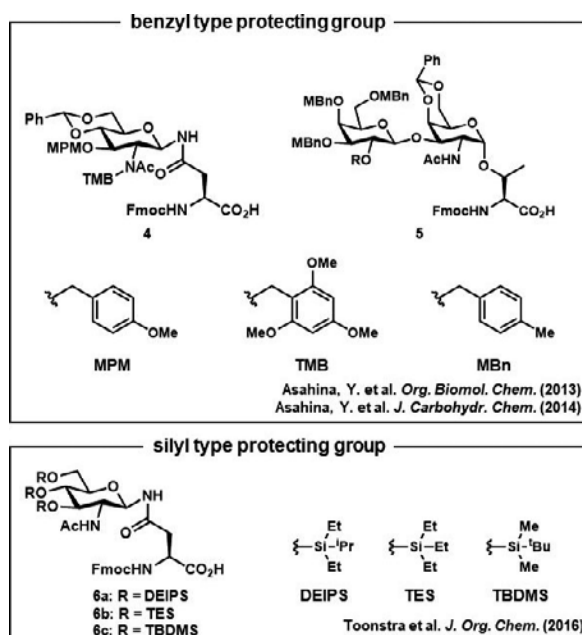


図5 糖水酸基を酸感受性保護基で保護した糖アミノ酸の構造

している。

また、後述のように酸感受性保護基としてシリル系保護基を用いた糖アミノ酸も開発されている。(図5)

4. 酸感受性保護基を有する糖アミノ酸を利用した糖ペプチドの化学酵素合成法の開発

Wangらのグループはヒト免疫不全ウイルス (HIV) の外被タンパク質gp120 (ZM109 strain) の可変領域であるV1V2ループに由来する糖ペプチドを標的とした化学酵素的合成を報告している。[4] この糖ペプチドはHIVの広域中和抗体として知られる2G12の

エピトープとして知られており、新たな広域中和抗体を得るための抗原として有用である。また、標的とする糖ペプチドはその配列中に高マンノース型糖鎖およびA2糖鎖の2種類の異なる糖鎖を保有していることが知られている。そこで、Wangらはまず2か所にGlcNAc残基を有する糖ペプチドを合成し、その後に2段階のENGase (N-アセチルグルコサミニダーゼ) による糖転移反応を行うことで上記の糖ペプチドの化学酵素合成を達成している。しかしながら、この手法では

複数あるGlcNAc残基のどこに転移が起こるかを制御できず、生成物の生成や同定が困難であるという問題があった。そこで、Wangらは酵素による糖転移反応が起こる二ヶ所のGlcNAc残基のうち、片方だけに糖水酸基保護基を残すことで糖転移する箇所を制御する手法を開発している。[5] 具体的には、糖水酸基が酸感受性保護基で保護された糖アミノ酸と塩基感受性保護基で保護された糖アミノ酸を使い分けることで、酸による脱保護後に一方のGlcNAc残基だけが保護された糖ペ

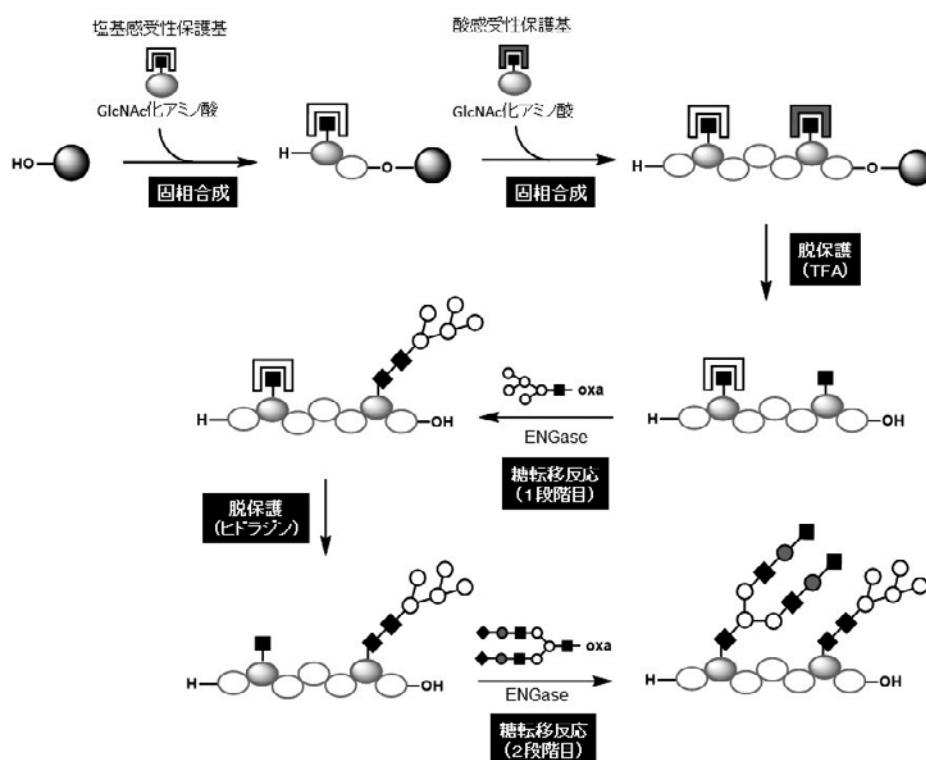


図6 直交性保護基を用いた複数糖鎖を有する糖ペプチドの化学酵素合成

チドを合成する事ができるため、これに段階的な糖転移反応を行うことで目的のグリコフォームを有する糖ペプチドを合成する事ができる。(図6)

Wangらは塩基感受性保護基であるアセチル基と直交する保護基としてシリル系保護基 (DEIPS, TES, TBDMS) に着目し、3種類のシリル系保護基で糖水酸基を保護した糖アミノ酸6a-cを合成した。(図5、下部) Wangらはこれらの糖アミノ酸を用いて、合

成標的となる24残基の糖ペプチドを合成した。Fmoc固相合成法に従い合成した保護糖ペプチド樹脂7の脱樹脂脱保護を行ったところ、糖水酸基がTBDMS基で保護されている場合には糖水酸基に保護基が残った8が生成した。TEIPSおよびTES基で保護されている場合には酸による脱樹脂脱保護により目的の糖ペプチド9を与えた。一方で、(図7) このようにして合成した糖ペプチドをアクセプターにして、糖オキサゾリンをドナーとした

ENGaseによる糖転移反応を連続的に行うことでWangらは目的のグライコフォームの糖ペプチドを合成することに成功している。

5. 既存の酸感受性保護基の問題点

上記のように、ベンジル系およびシリル系保護基のような酸感受性保護基を有する糖アミノ酸は糖ペプチド合成の効率化や新たな合成手法の開発に貢献している。しかしながら、

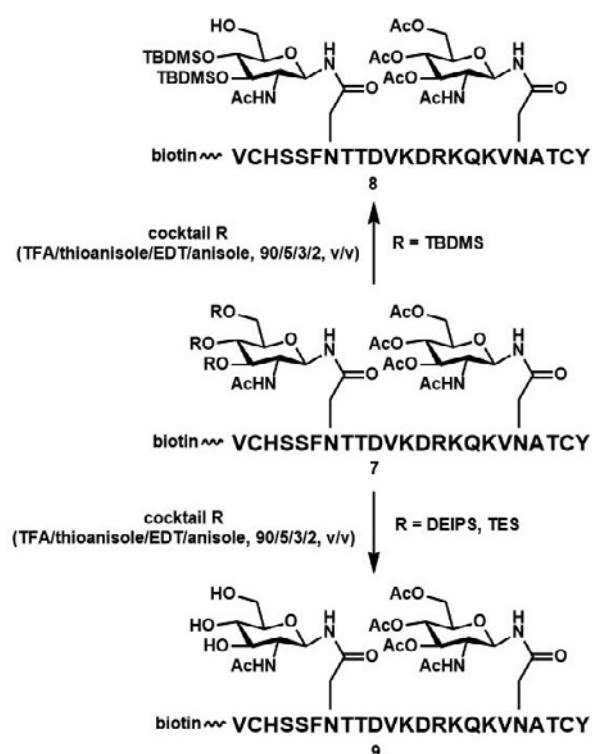


図7 TFAによるフコシル結合の切断と糖水酸基保護基の影響

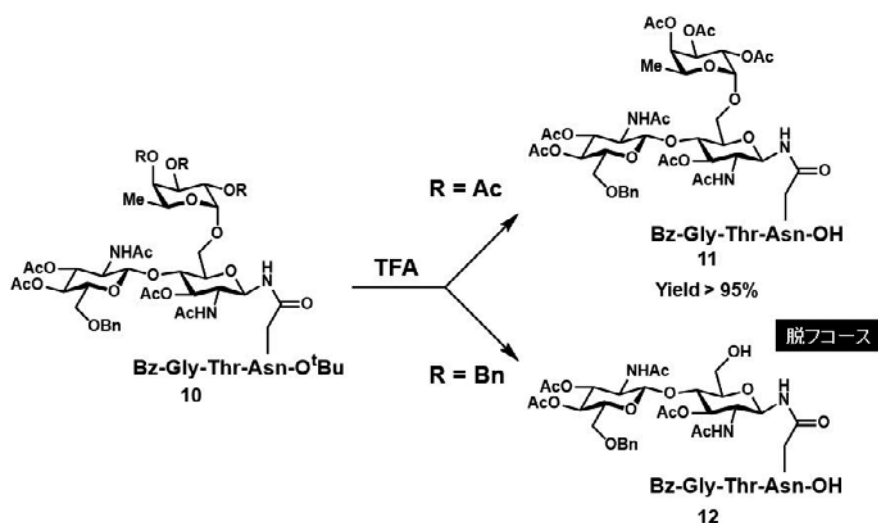


図8 酸によるフコシル結合開裂の糖水酸基保護基依存性

これらの誘導体にも欠点は存在する。

フコース残基は免疫グロブリンGのADCC（抗体依存性細胞障害活性）やNotchシグナル伝達系といった様々な生理現象にも関与していることから生物学的に非常に重要な標的である。一方で、その化学的性質は他の単糖とは異なり、酸に対するグリコシル結合の安定性が低いという特徴を有している。糖ペプチド合成の観点からみれば、脱保護に用いる酸によるフコース残基の遊離が懸念されるため、フコシル化ペプチドの合成は困難であると考えられる。Kunzらはフコース残基を有する糖ペプチドの合成を報告しているが、糖水酸基をベンジル基で保護したフコース残基を有する保護ペプチドを脱保護する際にフコシル結合の開裂を観測している。[6] 更に、Kunzらはこのフコシル結合の開裂は糖水酸基を電子吸引性のアセチル基で保護した場合に進行しないことを明らかにしている。(図8) これらの結果は、フコシル結合の安定性は保護基によって大きく左右されることを示唆している。この結果から、フコース残基を有する糖ペプチドを合成するための糖水酸基保護基の条件として、酸感受性が高く、電子吸引性であることが重要であることが示唆される。上記で紹介したベンジル系およびシリル系保護基は電子供与基であるため、フコシ

ル化ペプチドの合成への適用は困難である可能性が考えられる。したがって、今後はフコース残基にも適用可能なジェネラルな酸感受性保護基を有する糖アミノ酸の開発が期待される。

6. 最後に

近年の糖鎖科学において、糖鎖機能の解明のためのツールの一つである糖ペプチドの需要は確実に高まっている。このような背景の基で、これまで以上に効率的な糖ペプチド合成技術が求められている。本稿で紹介した酸感受性保護基で糖水酸基を保護したビルディングブロックの創製とそれを利用した糖ペプチド合成法の開発はそのような需要に答える技術の一つであると著者は考えている。糖鎖もペプチド鎖も非常に高い多様性を有する生体高分子である。そのため、一つのビルディングブロックからそれらの多様性に対応可能な合成法の開発がますます重要になってくるのではないかと期待している。

本稿では詳細は延べないが、著者らも現在多様な糖ペプチドの合成に適用可能な酸感受性保護基を有するビルディングブロックの開

発研究を行っている。糖水酸基の保護基を用いた新たな糖アミノ酸を合成し、*N*-および*O*-結合型の糖ペプチドや合成困難とされるフコシル化糖ペプチドの合成へと応用している。今後、これらの技術を多様な構造の糖ペプチドに対しても適用していきたいと考えている。

【参考論文】

1. Varki, A. Essentials of Glycobiology 3rd edition; Cold Spring Harbor Lab Press, Plainview, NY, **2009**.
2. Asahina Y. Kanda M. Suzuki A. Katayama H. Nakahara Y. Hojo H. *Org Biomol Chem.* **2013**;11:7199-7207.
3. Asahina Y. Fujimoto R. Suzuki A. Hojo H. *J Carbohydr Chem.* **2015**;34:12-27.
4. Amin, M. N. McLellan J. S. Huang, W. Orwenyo, J. Burton, D. R. Koff, C. W. Kwong P. D. Wang, L-X. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, 12, 1566-1575
5. Toonstra, C. Amin, M. N. Wang, L-X. J. *Org. Chem.* **2016**, 81, 6176-6185
6. Kunz, H. Unverzagt, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 12, 1697-1699

高速原子間力顕微鏡によるナノディスクを用いた膜タンパク質のリアルタイム動態観察

Real-time observation of membrane protein-embedded nanodiscs
by high-speed atomic force microscopy.

奈良先端科学技術大学院大学 春山 隆充

Takamitsu HARUYAMA

塚崎 智也

Tomoya TSUKAZAKI

1. はじめに

生命活動においてタンパク質はさまざまな役割を果たす。タンパク質は大きく分けて可溶性タンパク質と膜タンパク質がある。可溶性タンパク質は細胞質など溶液中に存在しており、膜タンパク質は脂質二重膜に埋め込まれている。膜タンパク質は、膜を超えた物質輸送・シグナル伝達・エネルギー変換など細胞内で重要な働きを担っている。多くの場合、膜タンパク質は膜に埋め込まれたままで構造変化を伴いながら機能する。そのため、膜タンパク質の分子メカニズムを理解するには、膜に埋め込まれた状態で1分子観察する必要がある。タンパク質の1分子観察には蛍光分子を用いた手法や光ピンセットを用いた手法などがある。本研究では、1分子動態観察の手法として高速原子間力顕微鏡（高速AFM^{*1}）を用いて、制御された2つの方向から膜タンパク質の分子動態をリアルタイムで直接観測することに成功した [1]。本稿では、その詳細を紹介する。

2. ナノディスクの利用

これまでの高速AFMによる解析にて、膜タンパク質の動態観察には生体から抽出した膜や、膜タンパク質を再構成したリポソームが用いられてきた。しかしながら、これらは膜の流動性が詳細な解析の妨げになったり、

膜の片側からしか測定できなかつたりするなど問題点があった。そこで本研究では、ナノディスクと呼ばれる粒子に注目した。ナノディスクは脂質と膜骨格タンパク質（MSP: membrane scaffold protein）から構成されるナノ粒子である。ナノディスク構成時に膜タンパク質が存在している場合に、膜タンパク質がナノディスク内に取り込まれ、膜タンパク質含有ナノディスクが構築される（図1）。これを用いることで膜の流動性を最小

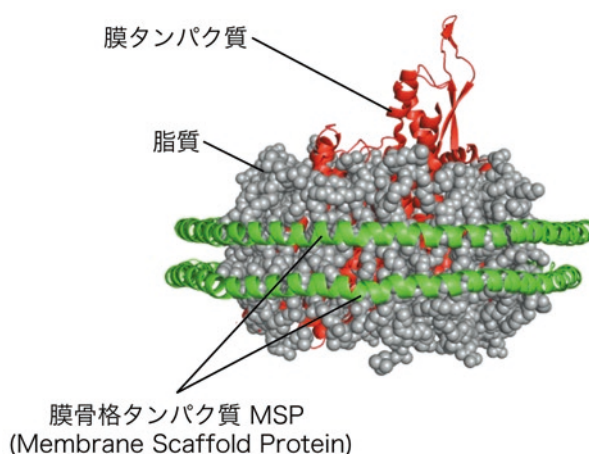


図1 膜タンパク質含有ナノディスクの模式図。膜タンパク質、膜骨格タンパク質（MSP）、脂質（灰色）から構成されるナノ粒子である。この形で、膜タンパク質は水溶液中で安定に存在することが可能である。

限に膜の両側を一度に観察することができる考えた。MSPのサイズを変更することで、ナノディスクのサイズは直径約70 Åから500 Åまで変化し、さまざまな大きさの膜タンパク質の測定に利用できる [2,3]。

本研究では次のようにして膜タンパク質含有ナノディスクを準備した。界面活性剤で抽出し精製した膜タンパク質溶液、脂質およびMSP (MSP1D1) を特定の比率で混ぜ合わせ、SM2バイオビーズ (Bio-Rad) を用いて界面活性剤を除去する。続いて、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって分離する。界面活性剤を除去するときに、多くのアグリーゲーションが生じるため、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分離は均一なナノディスクを得るためには欠かせない。本研究では膜タンパク質として、タンパク質膜透過チャネルとなるSecYEG複合体 [4] とマグネシウムイオントランスポーター MgtE [5] を用いた。それらを再構成させた時の条件は、SecYEGのときが、10 mg/mL SecYEG複合体、8 mg/mL MSP、8 mg/mL 大腸菌リン脂質であり、MgtEのときが、6 mg/mL MgtE、8 mg/mL MSP、8 mg/mL 大腸菌リン脂質であった。この手法により純度の高い膜タンパク質含有ナノディスクの調製が可能であり、本研究を遂行することができた。しかしながら、タンパク質溶液の濃度がmg/mLオーダー必要であることはこの手法の欠点である。今後は、より効率のよいナノディスク再構成法の確立が望まれる。

3. タンパク質膜透過チャネルSecYEGの観察

バクテリアのSecYEG複合体は、SecY、SecE、SecGからなる複合体で細胞質膜に存在し、新規に合成されたタンパク質が膜を越えるためのチャネルを形成する必須の因子である。真核細胞では、SecYEGはSec61複合体として保存されている [6,7]。SecYEGチャネルは、それ自身単独で働くことができない。

い。生体内でタンパク質膜透過に関わる時には、タンパク質膜透過駆動モータータンパク質SecA ATPaseと相互作用して機能する (図2A)。生体内ではこの反応を膜タンパク質SecDFが促進する [8]。タンパク質の膜透過反応では、基質タンパク質という比較的大きな物体が膜の片側から反対側へと輸送される。そのため、in vitroでタンパク質膜透過反応を起こすためには、膜の両側に十分な空間を確保することが必要である。タンパク質の膜透過反応の解析に、膜の両側に空間を保持できるナノディスクを用いることは、将来的に有用であると考えた。よって、本研究ではモデル膜タンパク質としてSecYEGを系の構築に利用した。

高速AFM観察において、測定基板上のそれぞれの粒子の向きを揃えることは観察を容易にする。そのため、SecYEGのペリプラズム側の2箇所にシステイン残基を導入し、そこをビオチンマレイミド修飾後ナノディスクに再構成させ、ストレプトアビジン2次元結晶基板^{*2}に特異的に結合させた。高速AFM観察により、高さ約7.7 nmの球状の粒子が確認された (図2B)。次に、SecAのN末端とSecYのC末端を融合させて作成したSecYAEG複合体を用いた。この融合タンパク質がタンパク質膜透過活性を持つことは確かめている [9]。高速AFMによる観察の結果、高さ約10.9 nmの粒子を観察することができ (図2C)、SecAの増加分だけ高さも高くなったと考えられる。また、そのAFM画像はSecAのX線結晶構造解析から予測される形と一致していた。これらの結果から、SecYEGを含むナノディスクはナノディスクの膜表面が測定基板に対して水平な「上向き」に固定されていることが示された。

次に、基板をマイカ (雲母^{*2}) に変更し測定を行なった (図2D)。雲母基板上への吸着は非特異的に起こるため、ランダムな配向になる可能性もあったが、バッファーの条件を

検討した結果、均一な雪だるま状の粒子が確認できた。この粒子はナノディスクの膜表面が基板に対して垂直となりSecYEGが「横向き」であると考えられた。さらに、ストレプトアビジン溶液を添加して調製したナノディスクを同様に観察したところ、雪だるま状の粒子に2つのタンパク質が結合していることが認識できた。ストレプトアビジンが結合している領域がペリプラズム側に相当するので、間違いなくナノディスクを「横向き」に

固定できたと考えられる。これらの実験により、膜タンパク質含有ナノディスクを「上向き」と「横向き」に固定できる系を確立した。

Secタンパク質の解析においては次の段階として、タンパク質膜透過をリアルタイムで観察する必要がある。現在、シグナル結合が切断される前の基質タンパク質を尿素でアンフォールドさせたものを加えてタンパク質の膜透過反応を測定しており、タンパク質の膜透過中間体のような構造が見られている。し

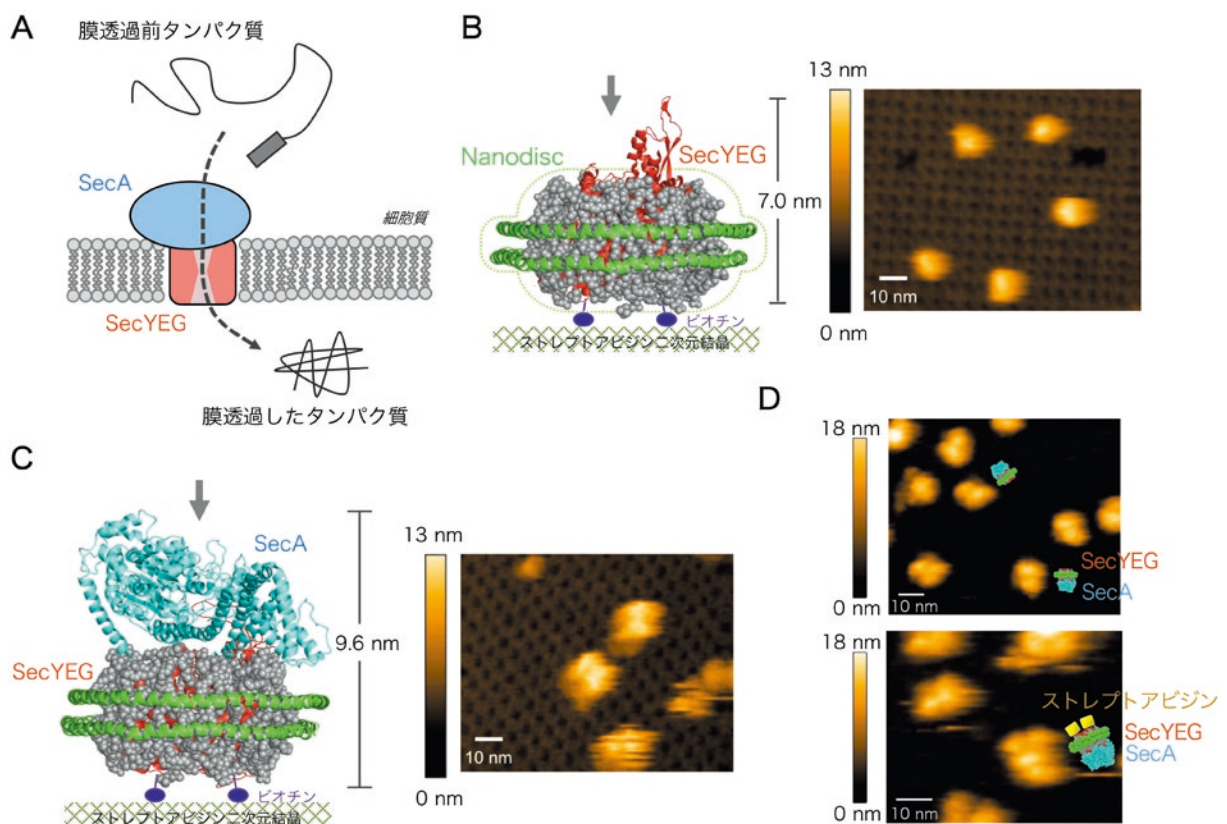


図2 高速AFMによるSecYEG含有ナノディスクの解析。

- タンパク質の膜透過。タンパク質膜透過チャネルSecYEGを経由するタンパク質の膜透過はモータータンパク質SecA ATPaseによって駆動される。
- SecYEG含有ナノディスクの観察。SecYEG含有ナノディスクをストレプトアビジン二次元結晶基板上に「上向き」に固定し（左）、高速AFMで観察した（右）。
- ストレプトアビジン二次元結晶基板上でのSecYEG含有ナノディスクの観察。SecYEG含有ナノディスクを「上向き」に固定し（左）、高速AFMで観察した（右）。
- 雲母基板上でのSecYEG含有ナノディスクの観察。SecYEG含有ナノディスクを「横向き」に固定し高速AFMで観察した（上）。ストレプトアビジンをSecYに結合させることで、ナノディスクが「横向き」に結合していることを確かめた（下）。

かし、基質領域のAFM画像が不鮮明であり、さらなる測定条件や基質の最適化を進めている。アイデアの一つとしては、基質のC末端側に大きなドメインを付加して基質を見やすくさせることである。また、基質の変異体を用いることで、基板へ基質をやや強く相互作用させることで基質の動きを制限し、より見やすくする方法も模索している。タンパク質膜透過反応のリアルタイム観察への準備はほぼ整ってきた。引き続き、研究を進めていきたい。

4. 膜タンパク質含有ナノディスク観察系の応用

3.で述べたように、Secタンパク質を用いて高速AFMによるナノディスク解析系を組むことができた。次にこの系の有用性を確かめるべく、別の膜タンパク質マグネシウムイオントランスポーター MgtEの解析を行った。MgtEは5回の膜貫通領域を持ち2量体で働く膜タンパク質であり、マグネシウムイオン濃度によって構造変化を起こす [5]。MgtEには膜貫通領域だけでなく、NドメインとCBSドメインと呼ばれる細胞質領域がある。マグネシウムイオン濃度が高いときにはこれらのドメインが強固な構造体を取り、マグネシウムイオン濃度が低いときにはこれらの領域が乖離してMgtEの膜貫通領域にマグネシウムイオンを透過させるチャネルが開き、マグネシウムイオンを輸送させることが示唆されている。しかしながら、リアルタイムでNドメインとCBSドメインの動きを追跡した例はなかった。

そこで、MgtEのペリプラズム領域にシステイン残基を導入し、ビオチンマレイミドで修飾した。SecYEGのときと同様にナノディスクに再構成し、ストレプトアビジン2次元結晶基板にMgtE含有ナノディスクを結合させ、高速AFMによりリアルタイム観察を行った (図3A)。その結果、高さ約9.6 nm程度の

丸い形状をした粒子が観察された。これらは、MgtEを細胞質側から観察していることとなる。マグネシウムイオン存在下では安定な粒子として存在し、測定時間内において高さはほぼ一定値を示した。一方で、マグネシウムイオン非存在下においては、粒子の高さが大きく揺らいでいることが確認された。このことはNドメインとCBSドメインが安定な構造体をとらず、揺らいでいることを意味する。次に、MgtE含有ナノディスクを雲母基板の表面に直接非特異的に結合させて観察を行った。測定バッファの条件を調節することで、SecYEGの場合と同様にナノディスクを横向きに配置することに成功した (図3B)。マグネシウムイオン存在下では、細胞質領域に相当する部分は安定な構造をとっていた。また、マグネシウムイオン非存在下では、この領域がふらついており、NドメインとCBSドメインの揺らぎを明確に可視化することに成功した。本研究によって初めて、リアルタイムでナノディスクに埋め込まれた膜タンパク質のドメインの動態を詳細に捉えることができた。

5. 今後の展開について

近年、タンパク質が生きて働く姿を解析するためには、平均像や平均シグナルに基づく測定方法では不十分であり、機能しているタンパク質を1つ1つ測定する1分子解析が必要な段階になっている。本研究では、高速AFMを用いて、膜タンパク質含有ナノディスクを2方向からリアルタイム動態観察することに成功した [1]。今回紹介した2つの膜タンパク質の測定の成功例から、本手法はさまざまな膜タンパク質に適応可能な手法であると考えている。たとえば、次のような膜タンパク質の動態観察に有用であると考えられる。膜を隔ててシグナルを伝達する膜タンパク質では、本手法を用いることで膜の両側の構造変化を一度に確認することができ、リアルタイムでシグナル伝達の詳細を構造生物学

的に理解できる。また、大きな構造変化を伴って物質を輸送するABCトランスポーターの脂質中での動態解析に適切な手法であると考えられる。

私たちは、3.の項目で紹介したようにSecタンパク質によるタンパク質の膜透過をリアルタイムで解析することをひとつの目標としている。Secタンパク質の膜透過について

は、X線結晶構造解析によってタンパク質の膜透過中間状態のSecYEG-SecAの構造が3.5 Å分解能で報告され [10]、クライオ電子顕微鏡観察においても同様の報告がなされた [11]。しかし、この構造は静止状態であるため具体的な作動メカニズムは解明されておらず、作用機構に関してパワーストロークモデル [12] やブラウニアンラチェットモデル

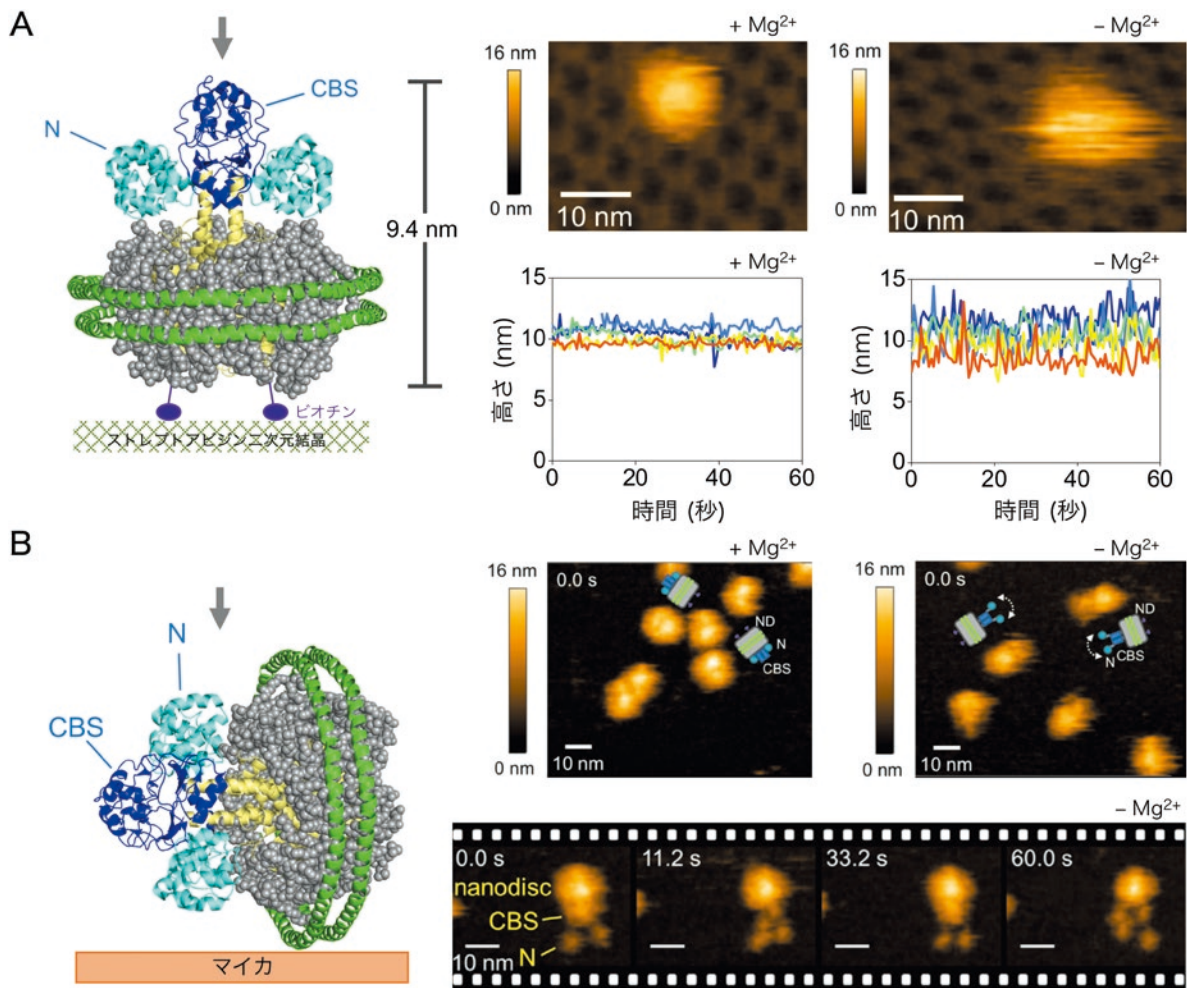


図3 高速AFMによるMgtE含有ナノディスクの解析。

- A. 「上向き」に固定したMgtE含有ナノディスクの解析。MgtEの可溶性領域はNドメインとCBSドメインから構成される。MgtE含有ナノディスクをストレプトアビジン二次元結晶基板上に固定し（左）、高速AFMによってマグネシウムイオン存在下（中）と非存在下（右）の条件で観察した。高さの変化はMgtEの可溶性領域の揺らぎの大きさを示す。
- B. 「横向き」に固定したMgtE含有ナノディスクの解析。MgtE含有ナノディスクを雲母基板上に固定し（左）、高速AFMによってマグネシウムイオン存在下（中上）と非存在下（右上）の条件で観察した。マグネシウムイオン非存在下での観察ではリアルタイムでNドメインとCBSドメインの揺らぎが観測できた（右下）。

[13] が提唱されているものの、議論の余地がある。これらを明らかとすべく蛍光1分子観察や高速でない通常のAFMを用いた解析の報告もされているが、断片的なデータではタンパク質膜透過を完全に理解できていない [14]。詳細な理解のためには高分解能リアルタイム観察が欠かせない。SecYEGは膜タンパク質SecDF [15] やYidC [16] とともに複合体を形成し機能していると考えられており [17]、これらを同時にナノディスクに再構成することで、これらのタンパク質がどのように協力してタンパク質の輸送を行っているのか情報を得られるであろう。今回紹介した膜タンパク質の動態観察は、さまざまな膜タンパク質の機能解明に非常に有用であると期待されるため、今後は本技術を他の膜タンパク質の解析に次々と応用させたい。

*1補足 高速AFM

原子間力顕微鏡 (AFM) は、カンチレバーの先端に付加した探針で測定基板上の試料表面を走査する走査型プローブ顕微鏡の一種である。探針と試料間に働く原子間力を検出することで試料表面の凹凸を計測し、試料表面の3次元画像をナノメータースケールで得ることができる。AFMは水溶液中で試料を直接観察することを可能にし、タンパク質や核酸といった生体分子の測定に幅広く用いられている。しかしながら、従来のAFMは一枚の画像を取得するのに数分を要するため、生体分子の分子動態を可視化することが困難であった。そこで、金沢大学 安藤敏夫 特任教授らのグループは、低侵襲性を維持した状態でのAFMの走査速度の劇的な向上に努め、高い時間分解能 (30 ms程度) と空間分解能 (XY方向で1-2 nm, Z方向で0.1 nm) を持つ高速AFMを開発した [18-20]。高速AFMは、ミオシンVの歩行運動 [21]、セララーゼによる結晶性セルロースの分解 [22]、CRISPR-Cas9がDNAを切断する瞬間 [23]

などのリアルタイム1分子イメージングを次々と可能にし、生体分子の分子動態の解明の強力なツールとなっている。また、高速AFMは可溶性タンパク質ばかりでなくイオンチャネルといった膜タンパク質の分子動態の可視化にも用いられている [24,25]。本稿で述べたナノディスク技術と高速AFM法を組み合わせた手法は、膜タンパク質の高速AFMによるリアルタイム1分子イメージングの裾野を広げると期待される。

*2補足 雲母基板とストレプトアビジン2次元結晶基板

高速AFMの観察において最も利用されるのが雲母基板である。雲母のへき開によって不純物が吸着しておらず原子レベルで平らな表面が露出する。この表面をサンプルの測定基板としている。雲母表面は負電荷を帯びているため、正電荷を持ったタンパク質表面が吸着しやすい。負電荷を持つタンパク質を吸着させるために、雲母表面を二価金属イオンで処理をして、基板表面の電荷を調節することがある。本研究でリアルタイムでの動態観察に成功したMgtEの細胞質ドメインは負電荷を帯びているため、雲母表面との反発があった。そこで、雲母表面を二価金属イオンで処理することにより、細胞質ドメインを雲母基板上で追跡するのに適切な電荷状態にすることができた。また、本研究ではストレプトアビジン2次元結晶も基板として用いている [26]。ストレプトアビジン2次元結晶の調製には、ビオチンが親水性の頭部に付加したリン脂質を用いる。このリン脂質を含む平面脂質二重膜を雲母基板上に形成させ、ストレプトアビジン溶液とインキュベートすることで2次元結晶を作成した。ストレプトアビジンが雲母基板上で格子状に結晶化することにより、タンパク質レベルで均一な面が構成される。ストレプトアビジン2次元結晶基板を用いる利点としては、タンパク質の非特異

的な吸着を防ぎ、ビオチンラベルタンパク質を選択的に吸着させることができることである。本研究で進めたナノディスクの「上向き」解析では、非特異的な不純物の結合を排除できたため、目的粒子のみを測定できた。また、ビオチンラベルタンパク質を用いての測定基板への結合は、ストレプトアビジンとナノディスクの膜表面の間に隙間が生じる。このことは膜タンパク質が関わる反応で、ある程度空間が必要な場合において有効に働くと期待される。

参考文献

1. Haruyama, T. *et al.* Single-Unit Imaging of Membrane Protein-Embedded Nanodiscs from Two Oriented Sides by High-Speed Atomic Force Microscopy. *Structure* 27, 1221-1230 (2019). doi:10.1016/j.str.2018.09.005
2. Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 481-486 (2016). doi:10.1038/nsmb.3195
3. Yokogawa, M., Fukuda, M. & Osawa, M. Nanodiscs for Structural Biology in a Membranous Environment. *Chem. Pharm. Bull.* 67, 321-326 (2019). doi:10.1248/cpb.c18-00941
4. Tanaka, Y. *et al.* Crystal Structures of SecYEG in Lipidic Cubic Phase Elucidate a Precise Resting and a Peptide-Bound State. *Cell. Rep.* 13, 1561-1568. (2015). doi:10.1016/j.celrep.2015.10.025
5. Hattori, M., Tanaka, Y., Fukai, S., Ishitani, R. & Nureki, O. Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter. *Nature* 448, 1072-1075 (2007). doi:10.1038/nature06093
6. Rapoport, T. A., Li, L. & Park, E. Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33, 369-390. (2017). doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060439.
7. Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Sostaric, N., Economou, A. & Karamanou, S. Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat Rev. Microbiol.* 15, 21-36 (2017). doi:10.1038/nrmicro.2016.161
8. Tsukazaki, T. Structure-based working model of SecDF, a proton-driven bacterial protein translocation factor. *FEMS Microbiol Lett* 365, fny112 (2018). doi:10.1093/femsle/fny112
9. Sugano, Y., Furukawa, A., Nureki, O., Tanaka, Y. & Tsukazaki, T. SecY-SecA fusion protein retains the ability to mediate protein transport. *PLoS One* 12, e0183434 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0183434
10. Li, L. *et al.* Crystal structure of a substrate-engaged SecY protein-translocation channel. *Nature* 531, 395-399 (2016). doi:10.1038/nature17163
11. Ma, C. *et al.* Structure of the substrate-engaged SecA-SecY protein translocation machine. *Nat. Commun.* 10, 2872 (2019). doi:10.1038/s41467-019-10918-2
12. Catipovic, M. A., Bauer, B. W., Loparo, J. J. & Rapoport, T. A. Protein translocation by the SecA ATPase occurs by a power-stroke mechanism. *EMBO J* 38, e101140 (2019). doi:10.15252/embj.2018101140
13. Allen, W. J. *et al.* Two-way

- communication between SecY and SecA suggests a Brownian ratchet mechanism for protein translocation. *Elife* 5, e15598 (2016).
doi:10.7554/eLife.15598
14. Kedrov, A., Kusters, I. & Driessen, A. J. Single-molecule studies of bacterial protein translocation. *Biochemistry* 52, 6740-6754 (2013).
doi:10.1021/bi400913x
 15. Tsukazaki, T. *et al.* Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* 474, 235-238 (2011).
doi:10.1038/nature09980
 16. Kumazaki, K. *et al.* Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* 509, 516-520 (2014).
doi:10.1038/nature13167
 17. Schulze, R. J. *et al.* Membrane protein insertion and proton-motive-force-dependent secretion through the bacterial holo-translocon SecYEG-SecDF-YajC-YidC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 4844-4849 (2014).
doi:10.1073/pnas.1315901111
 18. Ando, T. *et al.* A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 12468-12472 (2001).
doi:10.1073/pnas.211400898
 19. Uchihashi, T., Kodera, N. & Ando, T. Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy. *Nat. Protoc.* 7, 1193-1206 (2012).
doi:10.1038/nprot.2012.047
 20. Ando, T., Uchihashi, T. & T., F. High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes. *Prog. Surf. Sci.* 83, 337-437 (2008).
doi:10.1016/j.progsurf.2008.09.001
 21. Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R. & Ando, T. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* 468, 72-76 (2010).
doi:10.1038/nature09450
 22. Igarashi, K. *et al.* Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. *Science* 333, 1279-1282 (2011).
doi:10.1126/science.1208386
 23. Shibata, M. *et al.* Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy. *Nat. Commun.* 8, 1430 (2017).
doi:10.1038/s41467-017-01466-8
 24. Shibata, M., Yamashita, H., Uchihashi, T., Kandori, H. & Ando, T. High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin. *Nat. Nanotechnol.* 5, 208-212 (2010).
doi:10.1038/nnano.2010.7
 25. Marchesi, A. *et al.* An iris diaphragm mechanism to gate a cyclic nucleotide-gated ion channel. *Nat Commun* 9, 3978 (2018).
doi:10.1038/s41467-018-06414-8
 26. Yamamoto, D., Nagura, N., Omote, S., Taniguchi, M. & Ando, T. Streptavidin 2D crystal substrates for visualizing biomolecular processes by atomic force microscopy. *Biophys J* 97, 2358-2367 (2009).
doi:10.1016/j.bpj.2009.07.046

スピネルペルチェ効果

Spin Peltier effect

物質・材料研究機構／東北大学金属材料研究所

内田 健一

Ken-ichi UCHIDA

1. まえがき

スピンと熱の相互作用により、磁性体において様々な物理現象や新機能が発現する。特に、磁性体に温度勾配を与えることによりスピン流（スピン角運動量の流れ）[1,2] が生成されるスピントロニクス効果 [3-6] の発見以来、「スピントロニクス」[7,8] と呼ばれるスピントロニクスと熱エネルギー工学の融合研究が急速な進展を見せている。

これまでのスピントロニクス研究は、熱電発電技術への将来展開を念頭に置いて、スピントロニクス効果を中心とした熱流からスピン流・電流を生成する現象に焦点が当てられてきた [9-11]。一方で、スピン流やスピン偏極電流を入力とした熱応答現象も多く存在する。例えば、スピン流による熱流生成

現象であるスピネルペルチェ効果（スピントロニクス効果の相反現象；図1）[12-19]、磁性体において電流と磁化の両方に直交した方向に熱流が発生する異常エッチングスハウゼン効果 [20-22]、磁化と電流の相対角に依存してペルチェ係数が変化する異方性磁気ペルチェ効果 [23-25] などが挙げられる。著者らは近年、ロックインサーモグラフィ（Lock-In Thermography : LIT）法 [26-28] と呼ばれる動的赤外線解析技術を用いて、これらの現象による熱応答をイメージング計測することに成功した。その結果、スピン流には空間的に局在した特異な温度変化が伴うことなど、「磁性材料やスピントロニクスを使わなければ実現できない熱制御機能」が見出されてきた。本稿ではスピネルペルチェ効果に焦点を絞り、LIT法により明らかになったスピン流-熱流変換特性と最新の実験結果について概説する。

2. ロックインサーモグラフィ法

LIT法は、半導体産業における集積回路の動作・欠陥解析を主用途として近年導入が進んでいる。通常のサーモグラフィ法とは異なり、LIT法では測定対象への熱的励起を周期的に行いながら赤外線カメラにより熱画像を測定し、励起に追従する温度変化成分のみをリアルタイムにフーリエ解析することにより取り出す。通常のサーモグラフィ計測で現実

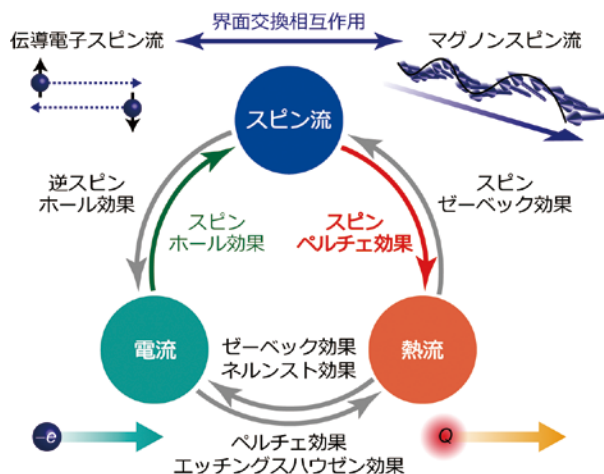


図1 スピン流-熱流-電流変換現象 [19]

的に達成できる温度分解能は20-30 mK程度であるが、LIT法を用いればサブmKオーダーの高感度温度分布計測を比較的容易に実現できる。著者らは、電流やスピン流を入力として熱流や温度変化を発生させる熱電・熱スピン変換現象にLIT法を適用し、その高い温度分解能・空間情報・制御性を駆使することで、これまで知られてこなかった特性や機能を明らかにしてきた。

例として、熱電・熱スピン効果のLIT計測を図2に模式的に示した。多くの場合、スピン流はスピン軌道相互作用（スピンホール効果 [29-31]）を介して電流から生成されるため（図1）、いずれの場合も入力電流は電流、出力は熱流（に伴う温度変化）となる。入力として、オフセットゼロ・周波数 f の矩形波電流を与えた場合を考える。熱電・熱スピン効果は入力電流に対して線形応答するため、撮影した熱画像をフーリエ解析して電流と同周波数で変動する温度変化のみを抽出することで、熱電・熱スピン効果に由来する信号のみを観測することができる。フーリエ解析の結果、熱

画像は温度変化の基本振動成分の強度分布を表す振幅像、入力信号に対する温度変化の位相遅延分布を表す位相像の2つに分割される（図2）。位相像は、温度変化の符号情報と、熱拡散に伴う時間遅れ情報を含む。熱拡散の影響が無視できる場合、入力電流と出力温度変化が同位相（位相 $=0^\circ$ ）であれば電流が正の時に発熱、逆位相（位相 $=180^\circ$ ）であれば吸熱となる。ここで重要なことは、オフセットゼロの矩形波電流に伴うジュール熱は時間的に一定であるため、フーリエ解析で基本振動成分のみを抽出することによって除去される点である。よって、熱電・熱スピン効果の信号が小さく、通常のサーモグラフィ測定ではバックグラウンド信号に埋もれてしまうような場合であっても、LIT法を用いれば高感度かつ純粋に線形応答成分のみを検出することができる。なお、入力電流にオフセットを与えれば、ジュール熱による発熱分布を測定することができる。

重複する点もあるが、LIT法のメリットを以下にまとめた。

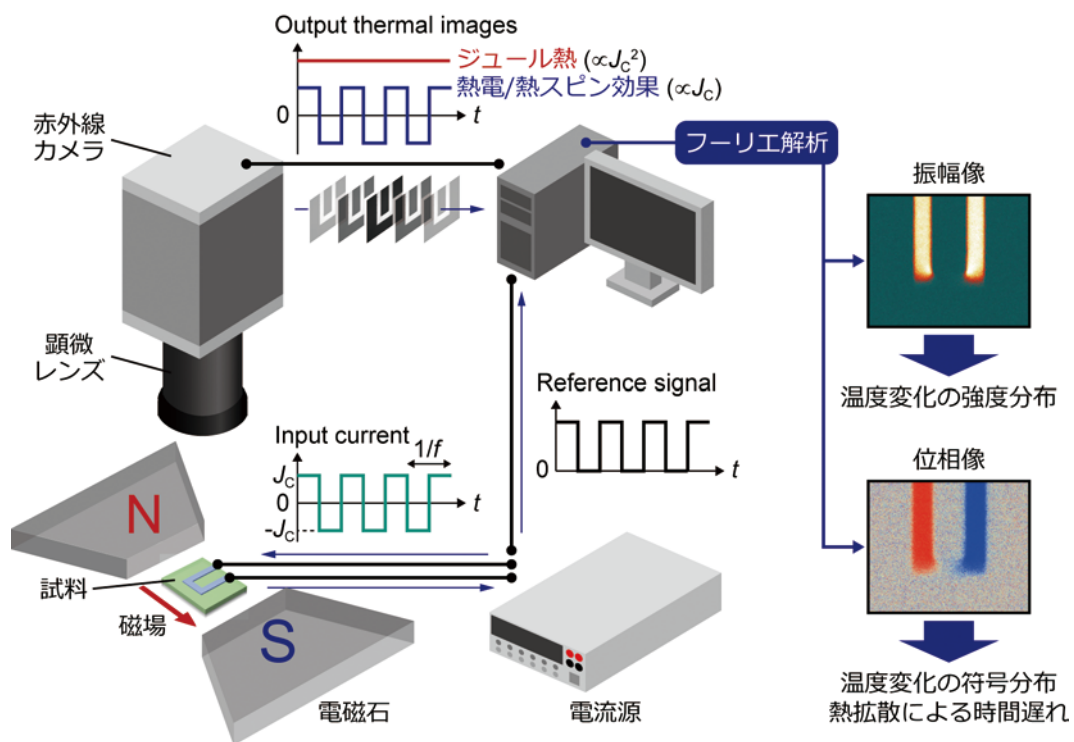


図2 LIT法による熱電・熱スピン効果計測の概念図

- A) 環境温度の変動など、入力信号の周波数に同期しないバックグラウンドを除去可能
- B) 入力信号の種類や印加条件を適切に選択することで、様々な熱応答現象を純粹に測定・評価可能
- C) 位相遅延から時間情報（熱拡散情報）を取得可能
- D) ロックイン周波数を上げることで熱源の位置を特定可能

一般的にLIT熱画像は低ロックイン周波数にするほど定常状態における温度分布に近くなり、高ロックイン周波数にするほど熱拡散による影響が抑制された過渡状態における温度分布となるため、上記D)のメリットが得られる。集積回路の欠陥解析においては、電流印加に伴うジュール熱を高ロックイン周波数下で測定することによって、異常発熱箇所の特定制を行っている。熱拡散による位相遅延から（熱拡散率が既知であれば）深さ情報も取得可能であることから、電極面を露出させることなく、積層デバイスなどの非破壊解析を実現できる。逆に、熱拡散率・熱伝導率の測定に用いられるケースもある [32,33]。

著者らのグループに設置されているLIT装置は、通常の構成である赤外線カメラ、ロックイン入力源（電流源）、解析部（PC）に加えて、熱画像の磁場依存性を測定するための電磁石を備えている。以下に示すスピネル効果のイメージング計測実験は、すべて室温・大気圧下で行った。

3. スピネル効果のイメージング計測

3-1. スピネル効果

スピネル効果はスピンゼーベック効果の相反現象であり、磁性体/伝導体界面にスピネル流が流れた際に熱流が生成される現象である。スピネル効果の実験的観測は、2014年にオランダのFlipseらによって初めて報告された [12]。彼らは、フェリ磁

性絶縁体であるイットリウム鉄ガーネット（Yttrium Iron Garnet : YIG）とPt薄膜の接合構造において生じたスピネル注入に伴う温度変化を、微細加工で作製した薄膜サーモパイル型熱電対を用いて電氣的に検出した。スピネル効果が発現する典型的な試料構造は、磁性絶縁体上にスピネル軌道相互作用の大きな常磁性金属薄膜が成膜されたものである。金属薄膜に電流 J_C を印加するとスピネルホール効果によって膜厚方向に伝導電子スピネル流 J_S が生成され、接合界面近傍に以下の関係を満たす方向に偏極したスピネル蓄積が生成される [29-31]：

$$\mathbf{J}_S = -\frac{\hbar}{2e} \theta_{SH} \boldsymbol{\sigma} \times \mathbf{J}_C \quad (1)$$

ここで、 e (>0)、 θ_{SH} 、 $\boldsymbol{\sigma}$ はそれぞれ素電荷、スピネルホール角、スピネル偏極ベクトルを表す。生成されたスピネル蓄積は、界面交換相互作用を介して磁性絶縁体中の磁化ダイナミクス（マグノン）が運ぶスピネル流に変換される（図1）。このスピネル輸送・変換の結果、図3に模式的に示すように、スピネル移行トルク [34] によって磁性絶縁体中の磁気モーメントの歳差運動振幅の抑制（マグノン数の減少）または増強（マグノン数の増加）が生じる。前者はマグノン系が低温になった状態、後者はマグノン系が高温になった状態であり、マグノン系と格子系は相互作用しているため、磁性絶縁体/金属界面近傍の温度がスピネル流の強度・方向に依存して変化するのである。スピネル移行トルクの性質により、注入されるスピネル流の偏極方向 $\boldsymbol{\sigma}$ が磁性絶縁体の磁化 $\mathbf{M}$ と平行か反平行かによって誘起される熱流方向が変化し、 $\boldsymbol{\sigma}$ と $\mathbf{M}$ が直交している場合には熱流は生じない。以上より、スピネル効果によって生成された熱流 J_Q が満たす対称性は

$$J_Q \propto (\boldsymbol{\sigma} \cdot \mathbf{M}) \mathbf{n} \propto \mathbf{J}_C \times \mathbf{M} \quad (2)$$

と表される (n : 磁性絶縁体/金属界面の法線ベクトル) [13]。

スピネルルチェ効果による温度変化は、スピネルホール効果を介することで電流に応答して生じるため、原理的には従来のペルチェ効果と同様に電子冷却として機能する。この現象が従来の熱電効果と決定的に異なるのは、スピネルゼバック効果と同様に磁性絶縁体においても発現する点である。

3-2. スピン流に伴う温度変化の検出

著者らはLIT法を用いてスピン偏極に依存した温度変化成分のみを抽出し、その電流(スピン流)・磁化方向依存性を調べることで、スピネルルチェ効果の高感度なイメージング計測を実現した [13-15,17-19]。図3中央に本研究で用いた試料構造の模式図を示した。単結晶YIG基板の表面に“コ”の字形状にパターニングされたPt薄膜が成膜されている。

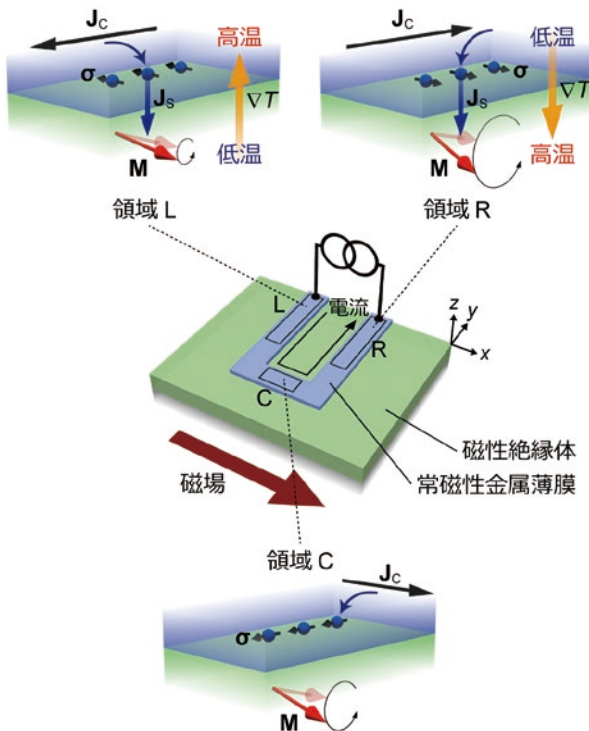


図3 スピネルホール効果によって誘起されたスピネルルチェ効果の概念図とLIT計測に用いた試料の模式 (図15)。 ∇T はスピネルルチェ効果によって生成された温度勾配を表す。

このような構造とイメージング計測がもたらす空間情報を組み合わせることで、スピネルルチェ効果が示す対称性 ((2) 式) を一度に検証することができる。YIG層が x 方向に磁化している場合、スピネルホール効果によって生成されたスピン偏極方向は領域L、Rでは磁化と平行または反平行になるためスピネルルチェ効果による温度変化が生じるが、領域Cでは両者が直交するため温度変化は生じない (図3)。重要な点は、領域LとRでは電流およびスピン偏極が逆向きであるため、熱流方向が反転することである。

LIT法を用いてPt/YIG接合の表面温度分布を測定した結果を図4に示した。図4(a)は振幅像であり、電流と磁場が直交している領域L、Rにおいて明瞭な温度変化が生じていることがわかる。磁場と電流が平行になる領域Cには温度変化は生じておらず、(2) 式と整合する結果が得られている。領域L、Rの温度変化信号は位相が 180° 異なることから、温度変化の符号が電流印加方向に依存して反転していることがわかる (図4(b))。さらに、温度変化の符号は磁場反転によっても反転することが確かめられた (図4(b))。熱画像の磁場依存性は、外部磁場強度ではなくYIG層の磁化過程と対応している [13]。これらの振る舞いは、電流や磁場の向きによらず一定の発熱信号を示すジュール熱とは明らかに異なる。

観測された信号がスピネルルチェ効果に由来していることを裏付けるために、温度変化の電流依存性を測定した。図4(c), (d) はそれぞれPt/YIG界面上の振幅・位相値を電流強度に対してプロットした結果であり、領域L、R間の位相差が 180° のまま温度変化の大きさが電流に比例して増大していることがわかる。この結果は、YIG層に注入されたスピン流強度に対する線形応答現象であるスピネルルチェ効果が示す振る舞いと整合する。さらに、Ptと逆符号の θ_{SH} を有するW薄膜を

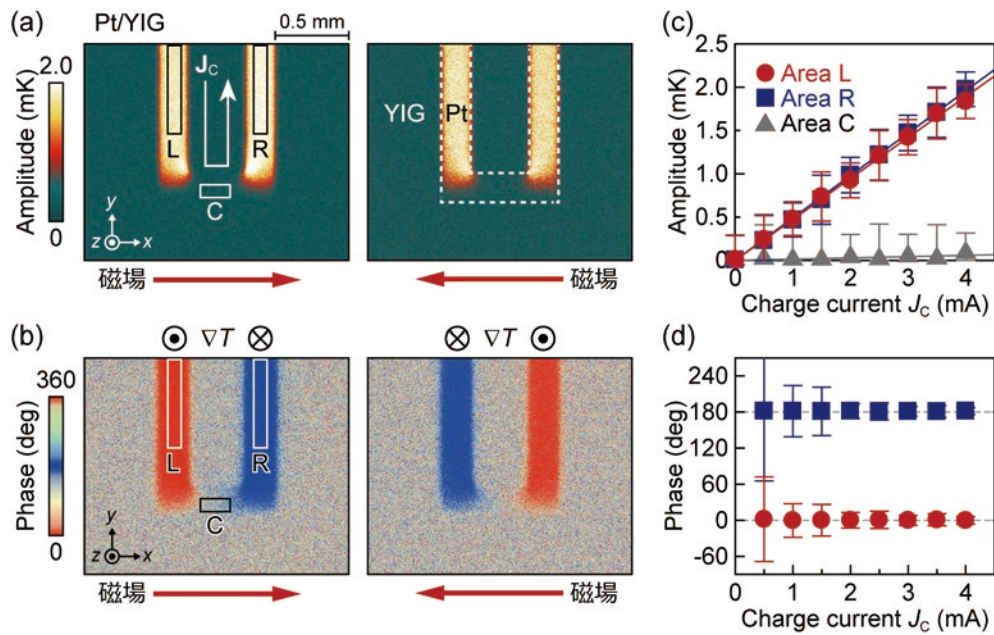


図4 Pt/YIG接合におけるスピネルチェ効果の熱イメージング [13]。(a),(b) 電流振幅 $J_c = 4.0$ mA, 磁場強度 $H = \pm 16$ kA/mにおける温度変化の振幅像および位相像。(c),(d) 振幅および位相の J_c 依存性。ロックイン周波数は $f = 5.0$ Hzに固定した。

YIG上に成膜した試料においては逆符号の温度変化が生じること、PtとYIGの間にスピン蓄積－マグノン間相互作用を妨げる Al_2O_3 絶縁膜を厚さ僅か1 nm挿入しただけで温度変化信号が消失することも確認されている [13]。以上の結果は、いずれも(1)、(2)式と整合するものであり、観測された温度変化信号がスピネルチェ効果に由来することを示している。このように、LIT法を用いると、微細加工を用いることなくスピン流による温度変調を非接触かつ高感度に可視化することができるのである。

3-3. 温度変化の空間分布と双極子型熱源

スピネルチェ効果によって生成された温度変化の空間分布を検証した結果を図5(a), (b)に示した。驚くべきことに、スピネルチェ効果によって生じた温度変化は、スピン流が注入されるPt薄膜とYIG基板の接合部に局在していることが明らかになった。この結果は、ジュール熱など通常の熱源による温度変化が、熱拡散によって熱源位置から周囲

に拡がっていくのとは対照的である(図5(c), (d))。ジュール熱による温度変化の空間分布は強いロックイン周波数依存性を有し、2節で述べた直感的な振る舞いに従い、低ロックイン周波数では熱拡散により定常状態に近い温度分布を示す一方、高ロックイン周波数では熱源位置付近にのみ温度変化が生じる(図5(d))。しかし、スピネルチェ効果に伴う温度変化は全く異なる振る舞いを示し、高周波数領域までロックイン周波数に依存しないことが確認されている [17]。この実験結果は、スピネルチェ効果に伴う温度変化は定常状態においても熱源位置に局在していること、および非常に短い時間スケールで定常状態に達することの2点を示している。これらの振る舞いはジュール熱のような熱生成現象では説明できず、スピン流によって生成される熱源は通常の熱源とは質的に異なることが明らかになった。

本研究では、スピネルチェ効果に伴う独特な温度分布が、スピン流によって磁性体/伝導体界面近傍に生成される「双極子型熱

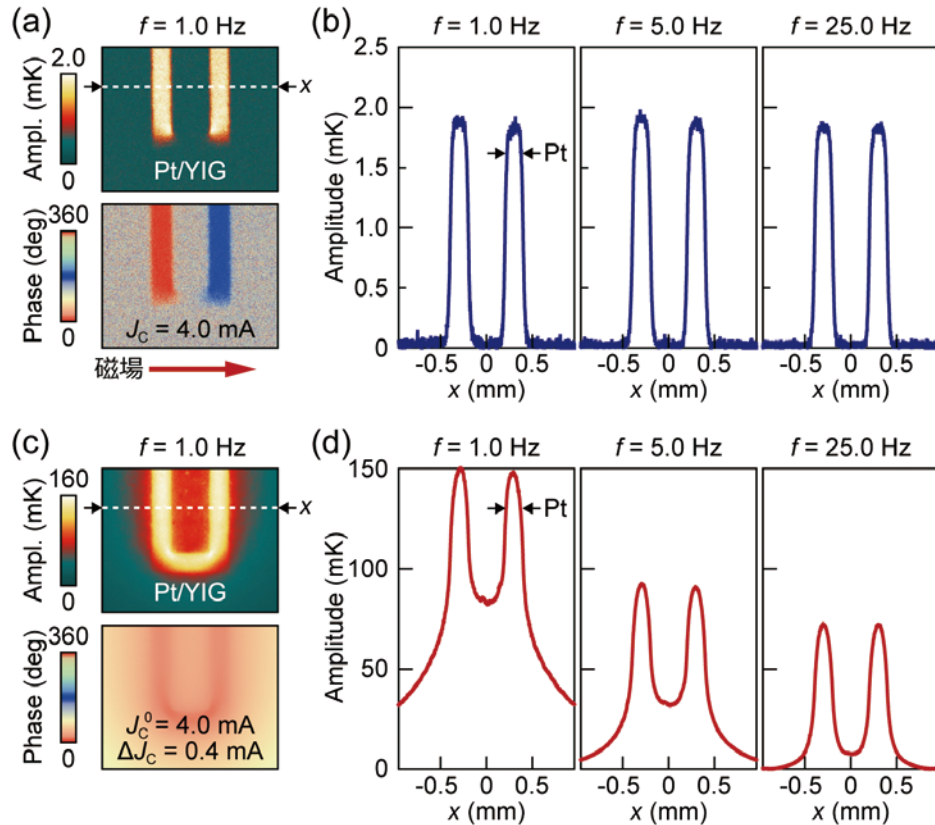


図5 スピンペルチェ効果とジュール熱に伴う温度変化の空間分布 [13]。(a),(b) スピンペルチェ効果によって生成された温度変化の振幅像・位相像および表面プロファイルの f 依存性。(c),(d) ジュール熱によって生成された振幅像・位相像および表面温度プロファイルの f 依存性。

源」に由来することを示した [13]。双極子型熱源は、等量の発熱源・吸熱源のペアで構成され、通常の単一熱源とは異なり、異方的な温度変化を示す (図6 (a), (b))。著者らは、実験に用いた試料を模した磁性体/伝導体複合構造に双極子型熱源を設置した系において熱伝導シミュレーションを行い、スピン流に伴う局所的な温度変化が良く再現されることを確認した (図6 (c), (d))。局所的な温度変化が生じるためには、発熱源と吸熱源が厳密に等量である必要があり、この場合には巨視的にみると正味の熱量がゼロになるため、熱源から離れた位置には温度変化が生じないのである。スピン流による双極子型熱源生成は、磁性体/伝導体界面におけるスピン蓄積→マグノン変換がエネルギー保存しているということの帰結であると定性的に解釈されている [35]。

スピンペルチェ効果に伴う局所加熱・冷却効果はLIT法に基づくイメージング計測によって初めて見出されたものである。空間分布情報を得ることができない従来研究では、この特異な温度分布は解析においても考慮されておらず、温度変化の大きさが一桁以上も過小評価されていたことが明らかになった [12,13]。これまでスピンペルチェ効果はその測定手法すら十分に確立されていなかったが、局所的な温度分布を考慮して実験を再設計することにより、現在では市販の熱電対ワイヤーでもスピン流によって誘起された温度変化を観測可能になっている [16]。スピンペルチェ効果の系統的な測定や原理解明は今まさに急速に進展しているところであり、最近では現象論 [36,37] のみならず微視的な理論 [38] も構築されている。

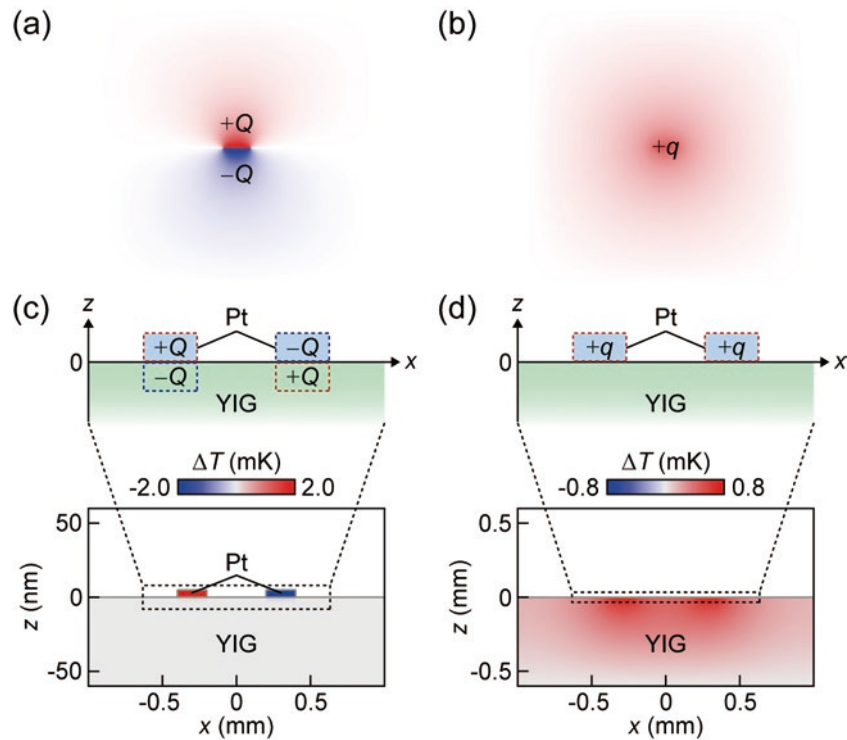


図6 有限要素法により熱拡散方程式を数値計算することによって求めた温度分布 [13]。(a),(b) 双極子型熱源（発熱源 $+Q$ と吸熱源 $-Q$ のペア）および単一熱源 $+q$ の概念図。(c),(d) Pt/YIG接合界面に設置した双極子型熱源および単一熱源に伴う温度変化 ΔT の断面分布。

4. 熱スピン変換の高出力化に向けて

4-1. 多層膜におけるスピネルチェ効果の増大

以上の研究によりスピン流がもたらす熱制御特性が明らかになった。しかし、スピネルチェ素子の熱電変換能は従来素子よりも劣っているのが現状であり、スピン流が有するポテンシャルを最大限に発揮させるための物理原理・材料・素子構造が希求されている。このような状況の中、2015年に著者らは、強磁性体と常磁性体により構成される交互積層多層膜において、スピンゼーバック効果が飛躍的に増大する現象を見出した。ゆえに、スピンゼーバック効果の相反現象であるスピネルチェ効果も多層化によって増大することが期待される。

そこで本研究では、すでにスピンゼーバック効果の増大が確認されている $[\text{Pt}/\text{Fe}_3\text{O}_4] \times n$ 多層膜を用いて、スピネルチェ効果の積層数 n 依存性を調べた。電流密度当たりの

温度変化は $n=12$ の積層によって40倍以上増大しており（図7）、多層化はスピン流による熱制御性能を向上させるための有効な手法であることが確認された。

4-2. LIT法を用いた熱スピン効果の材料探索 単層当たりの熱スピン変換能が高い材料の探

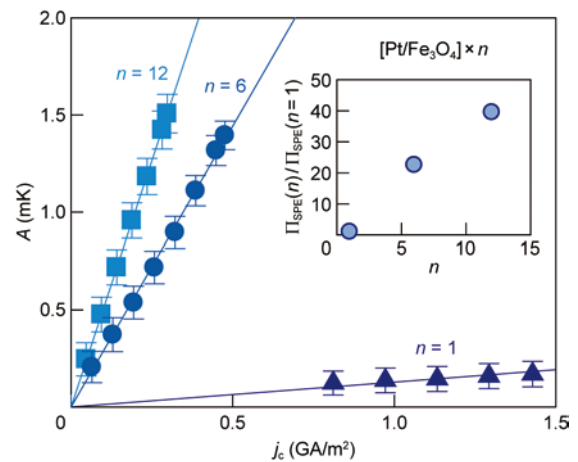


図7 $[\text{Pt}/\text{Fe}_3\text{O}_4] \times n$ 多層膜におけるスピネルチェ効果の積層数 n 依存性 [14]。

索・開発も重要な課題である。著者らは、材料探索のスループットを向上させるために、LIT法に基づくイメージング計測とコンビナトリアル材料技術を組み合わせた手法の導入も進めている [18]。LIT法を用いると熱画像の撮影範囲内の熱電・熱スピン変換特性の空間分布を取得できるため、コンビナトリアル薄膜作製技術により組成傾斜した試料を作製して計測すると、スピントロニクス効果ないしはスピネル効果の物質依存性を1つの試料から、計測にかかる時間的なコストを増やすことなく一挙に得ることができるのである。文献 [18] では、YIG上にPtとWの組成傾斜膜を作製して用いてスピネル効果を実証した (図8)。このように、LIT法は高性能な熱電・熱スピン変換材料の探索・開発にも貢献することが期待される。

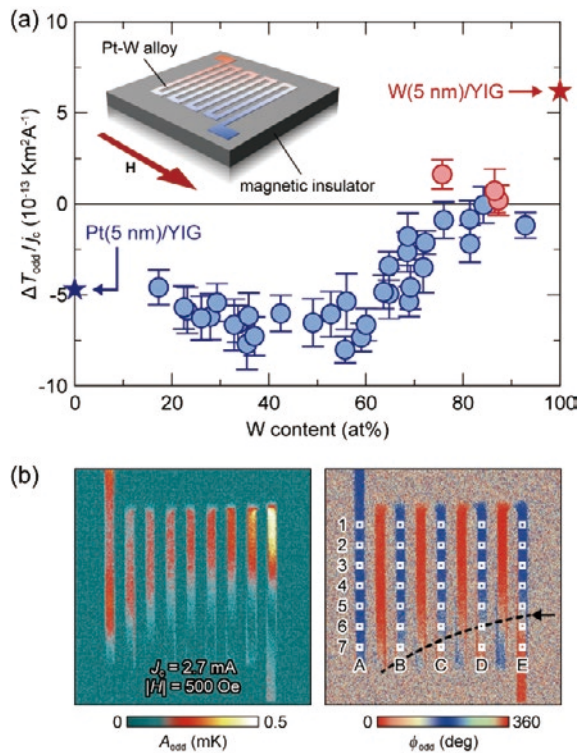


図8 コンビナトリアルスパッタリング法によりYIG上に作製したPt-W組成傾斜膜におけるスピネル効果 [18]。(a) 温度変化のW含有量依存性。(b) LIT法により観測された熱画像の例。

5. おわりに

本稿では、スピネル効果を中心に、近年著者らが進めてきたLIT法を用いたスピントロニクス研究について紹介した。本手法は非接触でありながら、温度分布をサブmKオーダーの温度分解能、 μm スケールの空間分解能で測定できる上、外部入力に対するスピントロニクス現象の応答を従来手法よりも効率的・系統的・定量的に評価することができる。

スピネル効果のイメージング計測によって明らかになった応用面における重要な点は、スピネルによってスピントロニクスデバイスの局所温度変調を実現できる可能性を示したことにある。双極子型熱源を用いれば対象の温度のみを (周りの温度に影響を与えずに) 変調することが可能になるため、新しい熱制御技術に繋がる可能性がある。今後、本稿で紹介した手法が、スピントロニクス現象の更なる原理解明・材料探索や新たな応用技術の創出に繋がることを期待したい。

参考文献

1. 齊藤英治, 村上修一: スピネルとトポロジカル絶縁体 —量子物性とスピントロニクスの発展— (共立出版, **2014**) .
2. S. Maekawa, E. Saitoh, S. O. Valenzuela, and T. Kimura (eds.): *Spin Current (2nd edition)* (Oxford University Press, **2017**).
3. K. Uchida, S. Takahashi, K. Harii, J. Ieda, W. Koshibae, K. Ando, S. Maekawa, and E. Saitoh: *Nature* **455**, 778 (**2008**).
4. K. Uchida, J. Xiao, H. Adachi, J. Ohe, S. Takahashi, J. Ieda, T. Ota, Y. Kajiwara, H. Umezawa, H. Kawai, G. E. W. Bauer, S. Maekawa, and E. Saitoh: *Nat. Mater.* **9**, 894 (**2010**).
5. C. M. Jaworski, J. Yang, S. Mack, D. D. Awschalom, J. P. Heremans, and R. C.

- Myers: *Nat. Mater.* 9, 898 (2010).
6. K. Uchida, H. Adachi, T. Ota, H. Nakayama, S. Maekawa, and E. Saitoh: *Appl. Phys. Lett.* 97, 172505 (2010).
 7. G. E. W. Bauer, E. Saitoh, and B. J. van Wees: *Nat. Mater.* 11, 391 (2012).
 8. S. R. Boona, R. C. Myers, and J. P. Heremans: *Energy Environ. Sci.* 7, 885 (2014).
 9. A. Kiriwara, K. Uchida, Y. Kajiwara, M. Ishida, Y. Nakamura, T. Manako, E. Saitoh, and S. Yorozu: *Nat. Mater.* 11, 686 (2012).
 10. K. Uchida, H. Adachi, T. Kikkawa, A. Kiriwara, M. Ishida, S. Yorozu, S. Maekawa, and E. Saitoh: *Proc. IEEE* 104, 1946 (2016).
 11. 石田真彦：応用物理 87, 11 (2018).
 12. J. Flipse, F. K. Dejene, D. Wagenaar, G. E. W. Bauer, J. B. Youssef, and B. J. van Wees: *Phys. Rev. Lett.* 113, 027601 (2014).
 13. S. Daimon, R. Iguchi, T. Hioki, E. Saitoh, and K. Uchida: *Nat. Commun.* 7, 13754 (2016).
 14. K. Uchida, R. Iguchi, S. Daimon, R. Ramos, A. Anadón, I. Lucas, P. A. Algarabel, L. Morellón, M. H. Aguirre, M. R. Ibarra, and E. Saitoh: *Phys. Rev. B* 95, 184437 (2017).
 15. S. Daimon, K. Uchida, R. Iguchi, T. Hioki, and E. Saitoh: *Phys. Rev. B* 96, 024424 (2017).
 16. R. Itoh, R. Iguchi, S. Daimon, K. Oyanagi, K. Uchida, and E. Saitoh: *Phys. Rev. B* 96, 184422 (2017).
 17. R. Iguchi and K. Uchida: *Jpn. J. Appl. Phys.* 57, 0902B6 (2018).
 18. K. Uchida, M. Sasaki, Y. Sakuraba, R. Iguchi, S. Daimon, E. Saitoh, and M. Goto: *Sci. Rep.* 8, 16067 (2018).
 19. 内田健一: 応用物理 87, 506-510 (2018).
 20. P. W. Bridgman: *Phys. Rev.* 24, 644 (1924).
 21. E. H. Hall: *Phys. Rev.* 26, 820 (1925).
 22. T. Seki, R. Iguchi, K. Takanashi, and K. Uchida: *Appl. Phys. Lett.* 112, 152403 (2018).
 23. K. Uchida, S. Daimon, R. Iguchi, and E. Saitoh: *Nature* 558, 95-99 (2018).
 24. R. Das and K. Uchida: *Appl. Phys. Lett.* 114, 082401 (2019).
 25. K. Masuda, K. Uchida, R. Iguchi, and Y. Miura: *Phys. Rev. B* 99, 104406 (2019).
 26. H. Straube, J.-M. Wagner, and O. Breitenstein: *Appl. Phys. Lett.* 95, 052107 (2009).
 27. O. Breitenstein, W. Warta, and M. Langenkamp: *Lock-in Thermography Basics and Use for Evaluating Electronic Devices and Materials* (Springer Science & Business Media, 2010).
 28. O. Wid, J. Bauer, A. Müller, O. Breitenstein, S. S. P. Parkin, and G. Schmidt: *Sci. Rep.* 6, 28233 (2016).
 29. Y. K. Kato, R. C. Myers, A. C. Gossard, and D. D. Awschalom: *Science* 306, 1910 (2004).
 30. J. Wunderlich, B. Kaestner, J. Sinova, and T. Jungwirth: *Phys. Rev. Lett.* 94, 047204 (2005).
 31. J. Sinova, S. O. Valenzuela, J. Wunderlich, C. H. Back, and T. Jungwirth: *Rev. Mod. Phys.* 87, 1213 (2015).
 32. T. Ishizaki and H. Nagano: *Int. J. Thermophys.* 36, 2577 (2015).
 33. 辻輝, 長野方星：日本機械学会論文集 83, 16-00296 (2017).

- 34. Y. Tserkovnyak, A. Brataas, G. E. W. Bauer, and B. I. Halperin: *Rev. Mod. Phys.* 77, 1375 **(2005)**.
- 35. 大門俊介：博士論文 動的サーモグラフィ法を用いた熱流・スピン流・電流変換現象の研究（東北大学, **2017**年度）.
- 36. V. Basso, E. Ferraro, A. Magni, A. Sola, M. Kuepferling, and M. Pasquale: *Phys. Rev. B* 93, 184421 **(2016)**.
- 37. L. J. Cornelissen, K. J. H. Peters, G. E. W. Bauer, R. A. Duine, and B. J. van Wees: *Phys. Rev. B* 94, 014412 **(2016)**.
- 38. Y. Ohnuma, M. Matsuo, and S. Maekawa: *Phys. Rev. B* 96, 134412 **(2017)**.

ACS Fall, 2018 National Meeting & Exposition参加報告

Report on the International Meeting

糖鎖有機化学研究室 田中 智博*
Tomohiro TANAKA

1. シンポジウム概要

ACS National Meeting & Expositionはアメリカ化学会が主催するシンポジウムのひとつであり、年間に2回（springとfall）開催される。今回、著者は2018年8月19~23日に米国のボストンで開催されたACS Fall 2018 National Meeting & Expositionに参加した。（図1）



図1 シンポジウム会場

本会には毎回テーマがあり、今回は“Nanoscience, Nanotechnology & Beyond”というテーマでの開催となった。シンポジウムは第一会場であるBoston Convention & Exhibition Centerを中心に4ヶ所の会場（Sheraton Boston Hotel, Westin Boston Waterfront, Aloft, Boston Seaport）で行われた。

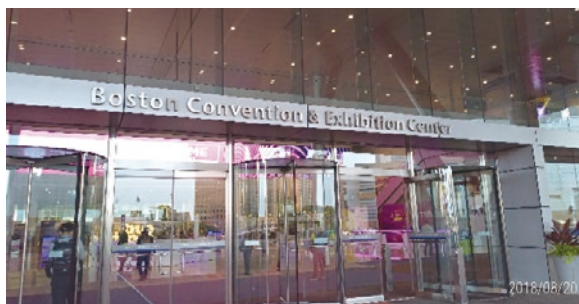
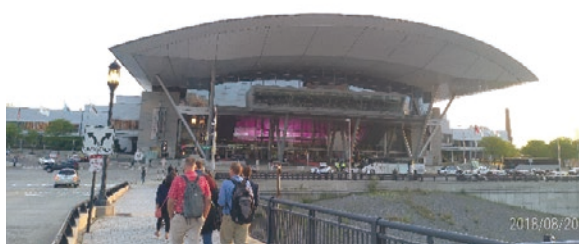


図2 Boston Convention & Exhibition Centerの外観とエントランス

2. 興味を持った演題について

本シンポジウムでは合成化学に限らず、非常に広い分野の演題が集まっている。そのなかで、著者が特に印象に残った演題を下記に挙げる。

演題1) A. Schepartz, Imaging organelle Interactions at Super-resolution for Almost Forever and in Multiple Colors.

演題2) L.L. Kiessling, Carbohydrates as Microbial IDs.

演題3) L. Wang, Chemoenzymatic Synthesis of Homogenous Glycoproteins.

* 現職：東京理科大学 薬学部 助教

1つ目の演題はこれまでに様々な蛍光プローブを開発し、ケミカルバイオロジー研究を牽引してきたSchepartz教授らの報告である。Schepartzらは様々なオルガネラ（細胞膜、ミトコンドリア、小胞体）の脂質膜に特異的に局在する蛍光プローブを種々開発し、それらを用いて長時間のマルチカラーイメージングに成功した。講演の中で、単位面積当たり（1 nm四方）の分子数で考えれば、たんぱく質（2～3分子程度）を標識するよりも脂質（100分子以上）を標識の方が感度および蛍光寿命の点で優れているとの話があった。当たり前の話ではあるが、著者はこれまでそのような観点で考えたことがなかったので非常に印象に残る講演となった。

2つ目の演題はKiessling教授のマイクロバリオームに関わる研究である。近年、マイクロバリオームは人の健康に大きく関わっていることが示唆されているが、それを構成する菌種の検出法としてKiesslingらは菌の表面の糖鎖構造に注目した。特定の菌種に存在する糖鎖パターンを認識するレクチンを開発することでマイクロバリオーム研究のためのツールにする試みについて報告していた。

3つ目の演題はWang教授らによる変異型ENGase（エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ）による糖転移反応を利用した均一糖鎖を有する糖たんぱく質の化学—酵素合成の報告である。今回は、エリスロポエチン(EPO)を合成標的とした研究を主に報告していた。

3. 著者の発表について

今回、著者は“Facile Glycopeptide Synthesis Using Glycoamino acid with O-Boc Protection.”という演題で開催4日目の朝のセッションにて口頭発表させて頂いた。その日は朝からひどい雨が降っており、会場にもあまり人が来ていなかった。英語で30分の口頭発表だったので、著者も会場に入るまでは非常に緊張していたが、こちらの会場も他の会場と同様に数えるほどしか人がいなかったので、リラックスして発表する事ができた。今回の発表では糖ペプチド合成の化学を中心に発表したが、座長のReinhold教授をはじめとしてグライコバイオロジーの方が多かったので、あまりケミストリーの部分には触れられなかった。しかし、「この手法で合成した糖ペプチドを用いて、具体的にどのような糖タンパク質を標的として機能解析を進めるのか？」などバイオロジーならではの質問を頂いた。その点については、著者も今後研究を進めていくにあたり留意しなくてはならないと考えていたところだったので非常に参考になった。

4. 最後に

今回のACS Fall, 2018 National Meeting & Expositionに参加したことで、様々な分野の研究における世界の動向を知ることができ、自分の研究テーマの課題も見出すことができた。この経験を基に今後の研究を進めていきたいと考えている。

－ 事業概要 －

2018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。2018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。これまで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てきたが、当初の目的を達成できたので成果を論文化して研究に一区切りをつけることとした。今後、本研究で蓄積した技術の応用展開を図ってゆく。また本技術に着目した国立医薬品食品衛生研究所と共同研究を実施した。

上記の合成系の研究のほか、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。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、企業との共同研究により、環境・エネルギーに資する研究を行った。

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、146名の応募の中から13名に助成金を授与した。本年度の野口遵賞は2015年度の助成者である大阪大学の関谷毅氏に贈呈した。受賞テーマ名は「シート型センサシステムによる長時間脳活動・血圧計測への挑戦と介護分野への貢献」であった。

また過去の助成金採択者に対してアンケートを実施した。90名から回答があり、研究費が不足しがちな萌芽期の研究や実績の少ない若手研究者を支援するユニークな助成制度として大変高い評価を得ていることを改めて確認した。

人材の養成については大学への講師派遣、卒業研究生（1名）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、10g/Lの高い最終生産物濃度に達し、精製も容易になってきており、動物細胞を用いたバイオ医薬品の製造プロセスはほぼ完成されている。しかし、生きた細胞を用いる為、生物反応特有の不確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ベ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）。同技術を他の抗体医薬であるリツキサンにも適用して各種均一糖鎖搭載抗体を作成後、国立医薬品衛生研究所と共同でADCC、CDC活性、物性等、種々の相関データを取得し、興味ある知見を得た（mABsに投稿、受理）。更に、酵素・ドナーのラインアップ拡充検討を推し進め、高マンノース糖鎖、バイセクティング糖鎖、多分岐糖鎖等を含めた製剤中のマイナー糖鎖構造に関してもリモデリングによる均一化に目途を付けた。そして活性比較により、高マンノース糖鎖搭載抗体は複合型糖鎖搭載抗体に比して著しく活性が低い事、少なくともFc γ RIIIaとの結合、ADCC活性発現に関しては複合型2本鎖のうち α 1-6側糖鎖のみがあれば十分である事等の重要な知見を取得した。尚、3本鎖、4本鎖等多分岐糖鎖搭載抗体作成に関しては現存酵素を用いるドナー、アクセプターの連結が困難を極めた為、別ルートとして2本鎖搭載HGP抗体を出発材料として試験管内で糖転移させる方法を検討採用して目的物を取得した。当初計画してい

た代表的なドナー糖鎖群による抗体タンパク質のリモデリングがほぼ達成できたので、論文を残しプロジェクトとしての研究は終了とする。

尚、本プロジェクト遂行過程で我々は天然型糖鎖のみならず非天然型糖鎖であるPEG化糖鎖、アジドPEG化糖鎖も同様のアプローチにより抗体の糖付加部位に連結可能である事を見出しており、今後アジドPEG化糖鎖搭載抗体とクリックケミストリーを活用し、ADCC活性向上、抗体のADC化等有用抗体創製の可能性を探索する。また上記方法では困難である複数個所のリモデリング、更にはO型糖鎖のリモデリングを可能とする事が期待される非天然糖アミノ酸の蛋白質への導入検討に関しても、共同研究にて着手する。

糖鎖有機化学研究室

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

(2018年度の年初計画)

- ①各種糖鎖オキサゾリン（ドナー）の合成、及び糖タンパク質の構造解析を行う。
(HGP project)
- ② α -ジストログリカン糖鎖関連化合物の合成を行う。
- ③生化学的知見に有用な糖質誘導体の合成を行う。
- ④Acid-labileな糖水酸基保護基を用いた糖ペプチド合成法の開発を行う。
- ⑤JST・統合化推進プログラムとして実施している「糖鎖科学ポータル構築」において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「Web3.0 Unique Representation of Carbohydrate Structure (WURCS)」の開発および複合糖質構造の整理・データベース化を行う。
- ⑥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」のコンテンツを拡充するため、糖タンパク質データベースの開発を行う。

- ⑦ENGase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。
- ⑧糖鎖抗体作成用新規糖鎖プローブの開発を行う。
- ⑨ボロン酸誘導体を用いた質量分析法による新規糖鎖構造解析法の開発を行う。
- ⑩LC-SRM (MS/MS) による定量法を用いてグライコフォームの解析を行う。

(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、本年度は卵黄より得られるSialylglycopeptide (SGP) を出発原料とし、多分岐糖鎖ドナーの合成を行った。

α -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 α -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 α -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 α -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 α -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、 α -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。またAMED「難治性疾患実用化研究事業」の一環としてcoreM3-ペプチドの合成も行った。

牛乳からチーズを製造する際の生じる乳清

は有効な価値のある資源ではないために主に廃棄処分されているが、O-結合型糖タンパク質が含まれていることが知られている。本研究では乳清中に含まれるプロテオースペプトンから、構造明確なO-結合型糖ペプチドの量的調製法の開発に成功した。

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、従来法では合成が困難であった1分子内に2種類の異なる構造のFuc含有糖鎖を有する糖ペプチドを本手法を用いることで効率的に合成できることを明らかにした。

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から抽出し整理し、可視化ツールの開発を行った。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- β -N-アセチルグルコサミニダーゼによる糖鎖転移反応を利用したタンパク質の位置選択的なPEG化法の開発を行っている。本年度は、転移反応におけるPEG鎖と糖との間の結合様式の影響について検討した。これまでは低分子量PEG(分子量300～600程度)

をエーテル結合により糖へ導入してきたが、分子量1万以上の高分子PEGをエーテル結合で糖へ導入することは非常に困難であることが予想される。一般的分子量1万以上の高分子PEGはスクシンイミド体で市販されており、タンパク質のアミノ基と反応してアミド結合を介してPEG鎖が導入されている。そこで本研究でも高分子PEG導入には市販のスクシンイミドを用いることを想定し、その際に生じるPEG鎖と糖との間のアミド結合が転移反応において及ぼす影響について検討した。その結果従来のエーテル結合の場合とほぼ同様の転移効率を示し、PEGドナーとして機能することが明らかとなった。

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。本年度は有機ボロン酸を用いた植物由来配糖体の糖鎖構造の解析を行った。その結果、分子量は同じであるが糖水酸基のエピマーであるグルコースとガラクトースを末端に有する糖鎖構造も識別できることが明らかとなった。

グレーゾーン (4-10ng/ml) 前立腺がん患者血清中のPSAグライ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による解析法の開発を行っている。今年度グレーゾーンレベル血清中のPSAの数%のグライコフォーム (糖鎖構造) まで解析可能な手法を確立し、患者血清解析に着手した。

糖鎖生物研究室

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。

(2018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抗体を取得し、EIA系を構築する。
- ③患者癌細胞CTOS由来、癌細胞株由来および精漿由来PSAのグライコフォームの比較解析により見出されたし、癌性変化に関連する可能性のあるグライコフォームに関し、構造解析を行うとともに新たな癌マーカーの可能性を検証する。
- ④GalNAc-DSLc4及びその合成酵素と腎癌悪性化との関連を解明するため、エクソソームの役割に着目しその関与を調べる。
- ⑤組織の癌転移・線維化にガレクチンが関与するかどうかの予備検討を行う。
- ⑥HGP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、均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質の調製を行う。また、取得した糖鎖改変体に関して生物活性測定を実施し、各種糖鎖間での比較を通してその機能を解明する。
- ⑦骨格筋の機能変化における糖鎖の役割に関する仮説を証明するために、細胞ならびに動物を用いた解析を進める。

(今期の成果)

LDN (LacdiNAc) 糖鎖による乳癌進行抑制メカニズムに関する研究は、LDN生合成酵素の β 4-N-acetylgalactosaminyltransferase4遺伝子強制発現乳癌細胞株を用いることで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てきた。今年度は、上記細胞における形態変化に着目し、LDN糖鎖の発現増大が細胞に及ぼす影響について細胞の遊走能や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た。

LDN抗体を取得してEIA系を構築する研究

は、ファージディスプレイなどの技術を利用して抗体の取得を目指したが目的の抗体を得ることが出来なかったため、本研究は今年度で終了することとした。

癌性変化に関連するグライコフォームに関する研究は、前立腺癌患者由来CTOS(Cancer tissue-originated spheroid) および前立腺癌細胞株LNCaP由来PSAに共通に見出されたグライコフォームに関し、レクチンカラムでの分離、免疫沈降による精製、サーモリシン消化、MALDI/MS解析を行い、MS/MSにより糖鎖構造を確定した。今年度は、原発性癌由来細胞株22Rv1由来PSAについて解析し、同様のグライコフォームが存在することを明らかにした。また、見出されたグライコフォームの一つに対する特異的な抗体の取得を目指して合成した抗原によるウサギへの免疫を行ったが、目的とする抗体は得られなかった。

GalNAc-DSLc4と腎癌悪性化に関する研究は、樹立したGalANc-DSLc4安定発現株を用いて癌悪性化や転移性へのGalNAc-DSLc4糖鎖抗原の関与について検討を進めてきた。今年度は、癌細胞が分泌するエクソソームに着目して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」構築について検討を行った。腎癌細胞株由来エクソソームの調製方法を確立して最適化を行った後、GalNAc-DSLc4発現株由来エクソソームが血管内皮細胞および肺線維芽細胞に与える影響について調べた結果、エクソソームの添加により一部の関連遺伝子が増加することが明らかとなったが、GalANc-DSLc4発現株由来エクソソームとコントロール株由来エクソソーム間に顕著な差は認められなかった。その一方で、受容細胞による蛍光標識エクソソームの取り込みについて調べ、コントロールに比べてGalNAc-DSLc4発現株由来エクソソームの方が取り込まれやすい傾向が認められた。

癌転移・線維化とガレクチンに関する研究は、腹膜播種能を有し悪性度の高い胃癌細胞

に高発現するガレクチン-4の悪性形質への関与を検討している。今年度は、CRISPR-Cas9システムによってガレクチン-4ノックアウト(KO)細胞の作製およびクローニングを行い、ターゲット部位の異なる2種類のcrRNAから作製した細胞株をそれぞれ3クローンずつ取得した。取得したガレクチン-4KO細胞について配列解析により遺伝子の欠失や変異を確認し、ガレクチン-4が悪性形質にどう関与するかを様々な側面から解析を進めている。

HGPプロジェクトでは均一糖鎖抗体の創製と生物活性評価を行ってきたが、今年度は新たに多分岐糖鎖を有する均一糖鎖抗体の調製と評価を進めた。コアフコースを有さないG0型糖鎖をもつ抗HER2抗体(トラスツズマブ)に対して各種の糖転移酵素を作用させ、3~5本鎖糖鎖を有する抗体を調製できることを確認し、このうち3本鎖糖鎖を搭載する抗体4種ならびに4本鎖糖鎖を搭載する抗体1種について高純度での大量調製を行った。また、ENGase(EndoS2、EndoF3)およびその変異体と多分岐糖鎖オキサゾリンを用いた糖転移反応により、コアフコースを有する抗CD20抗体(リツキシマブ)アクセプターに対して多分岐糖鎖を転移させることにも成功した。新たに調製した多分岐糖鎖を有するトラスツズマブは、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Fcγレセプターとの相互作用解析により2本鎖糖鎖を有するトラスツズマブとの活性比較を実施した。また、新たに調製した糖鎖改変リツキシマブは、CD20発現株のRaji細胞あるいはWIL2-S細胞をターゲットとしたADCC活性と補体依存性細胞障害(CDC)活性の評価を、表面プラズモン共鳴法と共に行った。一方、多分岐糖鎖の切断活性を有する新規ENGaseとして、Bacteroides属細菌由来のEndo-Bno1263(複合型糖鎖切断酵素)と、Tannerella属細菌由来のEndo-

Tsp1603(ハイマンノース型糖鎖切断酵素)の解析を行った。また糖ペプチド基質を用いた解析により、Tannerella属細菌由来のEndo-Tsp1006は複合型糖鎖のうち糖鎖末端がガラクトースか α 2,6シアル酸である糖鎖を好んで切断する酵素、Endo-Tsp1263は複合型糖鎖のうち糖鎖末端がN-アセチルグルコサミンである糖鎖を好んで切断する酵素であることを明らかにした。

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。今年度は、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取得した疾患特異的な糖鎖構造の変化を裏付けるための検討を行ったが、確定することはできなかった。また、新たな視点からのアプローチとして培養細胞を用いて筋管へ分化する系を構築し、糖鎖の関与についての解析を開始した。

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

(2018年度年初計画)

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。今年度は

- ①3本鎖、4本鎖の均一糖鎖抗体の創製技術を確立し、調製抗体の特性を評価する。
- ②バイセクティングGlcNAc含有糖鎖を含めた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一連の均一糖鎖抗体を作成し、構造、活性相関を調べる。特に

複合型2本鎖に関しては一連の分岐異性体を創製し、活性比較を行う事によりマンノース α 1-6、 α 1-3側鎖の役割解明を目指す。

- ③一連のPEG化糖鎖を有する均一抗体の創製検討と機能評価。

(今期の成果)

3本鎖、4本鎖の均一糖鎖抗体の創製に関してはオキサゾリン化ドナー糖鎖を抗体アクセプターに連結する従来法では現状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(G0-HGP)を出発原料として3、4本鎖に伸長させる方法を小スケールで検討し、先年度までに目的とする産物の生成を確認した。今年度はスケールアップして反応を行い、純化を試みた。3本鎖a体の創製フローはG0-HGPとUDP-GlcNAcをGnT5orGnT4で反応させ、GN3a or GN3bを生成させた後、endoS処理を行い、未反応G0糖鎖を切断後に陽イオンクロマトにて両3本鎖フル体を精製した。収率は低い(～15%)が、a体、b体ともにGN3型糖鎖付加率98%の高純度標品を取得できた。ついで両標品それぞれにUDP-Gal存在下で β 4GalTを作用させた後、プロテインAによる精製を経て、G3GN3a、G3GN3bを取得した。MS解析の結果、G3GN3型糖鎖付加率はそれぞれ97、98%以上と算出され良好であった。これらの高純度3本鎖均一糖鎖抗体群並びに対照としてG0、G2抗体を用いて活性評価を実施し、以下の知見を得た。

- ・3本鎖GN3シリーズにおいては、GN3b(1,3鎖側GlcNAcが β 1-4結合した分岐構造を有する)が分岐のないG0より高いADCC活性を示し、その強度は末端にGalを持つG2と同等であった。一方、活性変動が予想されたGN3a(1,6鎖側マンノースにGlcNAcが β 1-6結合した分岐構造を有する)はG0とほぼ同等の活性を示した。SPRによるFc γ RIIIaとの結合親和性評価

も同様の結果となり相関性が確認された。

- ・3本鎖G3GN3シリーズに関しては両分岐タイプ(G3GN3a/b)ともに分岐なしのG2より高いFc γ RIIIaとの結合親和性を示した。しかしながらADCC活性評価ではいずれもG2と同等以下の活性しか示さず、相関が取れていない、今後再試験を行いデータフィックス並び考察を行う。

一方、4本鎖搭載抗体は、G0-HGPとUDP-GlcNAcを用いて先ずGnT5でGN3aの生成、endoSによる未反応G0の切断、ついでGnT4による4本鎖GN4の生成、endoS2による未反応GN3aの消化というプロセスを経て陽イオンクロマトで分離精製を実施した。その結果、GN4型糖鎖付加率～98%の4本鎖均一糖鎖抗体を取得できた。

先年度までに調製した分岐異性体ペアG1GN1a/b、の活性評価を実施した。G1GN1a/bペアに関しては予想通り、 α 1-3鎖側が還元末端より2残基欠失したG1GN1aは非欠失型であるG2とほぼ同等のFc γ RIIIa親和性を示し、 α 1-6側の2残基欠失体であるG1GN1bは親和性の低下が確認された。尚、本結果はADCC活性とも良く相関した。これまでのG1a/b、GN1a/bの結果と合わせ、 α 1-6側鎖の重要性を支持するとともに、少なくともFc γ RIIIaとの結合、ADCC活性発現に関しては複合型2本鎖のうち α 1-6側糖鎖のみで十分である事を強く示唆する。現在調製検討中であるコアM3の3位側のマンノースまで欠失させた1本鎖搭載抗体(HGP-G1GN1M1a)の評価結果が出次第、論文化する予定である。尚、1本鎖搭載抗体創製に関しては、先ずG1GN1M1aオキサゾリン体を合成し、手持ちのENGasesによるアクセプターへの転移を試みたが、全く転移産物の生成が確認されなかったため、HGP-G1GN1aからマンノシダーゼによるトリミング法を検討中である。

一方、国立食品衛生研究所との共同研究(リ

ツキサン糖鎖構造と物性及び生物活性の関連解析) に関しては以下の知見を得、共著論文として投稿中である。

これまで糖鎖末端のGalの量がリツキサンのCDC活性と関連する事が報告されていたが、均一糖鎖抗体を用いた今回の解析により末端Galのうち α 1-6Man側鎖に付加するGalがCDC活性、C1qの結合に重要である事が始めて明らかとなった。また上記ハーセプチンの場合と同様、ADCC活性、Fc γ IIIaとの結合にも α 1-6側の同Galが重要との結果を得た。

HDX解析により本GalによるCH2ドメインの構造安定性の変化が両活性に影響を及ぼす事を示唆するデータを得た。

PEG化糖鎖に関してはハーセプチンアクセプター (HerB,Fuc-) へのendoS (WT) によるPEG5糖鎖オキサゾリンの転移が不調であったため (原因不明) しばらく棚上げにしていたが、今回材料を一新し、ハーセプチンアクセプター (HerC,Fuc-)、リツキサンアクセプター (Fuc-) への同オキサゾリンのendoS (WT) ,endo-S2 (WT) による転移を試みた。その結果、効率良く転移する事が確認された。また新たに合成したPEG10糖鎖オキサゾリンに関してもリツキサンアクセプター (Fuc-) へendo-S2 (WT) による転移が確認された。更に、今後、クリックケミストリーをADCC活性の向上、ADC創製への適用するための当面の足場として設計合成したアジド化PEG5糖鎖オキサゾリンもリツキサンアクセプター (Fuc-) にendoS2 (WT) で、(Fuc+) にendoS2 (WT) 及びendoF3 (WT) でそれぞれ転移可能である事が確認された。

1-2 機能性材料研究 (2018年度年初計画)

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引き続き推進する。

その後、研究テーマ見直しを行い、光触媒金属酸化物、ガス分離膜用高分子などの合成技術の探索研究を推進することに変更した。

(今期の成果)

種々の合成法を駆使することにより多岐にわたる複合酸化物を合成し、有機物分解活性が高い光触媒金属酸化物のスクリーニングを実施した。これにより数種類の高性能な複合酸化物を見出すことができた。有望なガス分離素材として選定されたポリマーについて、再現性のある合成条件確立に向けた検討を行った。その過程で副反応の存在を見出し、それを回避・コントロールすることで安定な合成条件を確立した。

1-3 その他

当研究所はフルオラス科学の研究振興を継続して支援している。2018年度は、フルオラス科学研究会第11回シンポジウムを広島国際大学池田潔教授にご尽力いただき、9月21日広島市立大学サテライトキャンパスにて開催した。(別添資料1)

1-4 大学等公的機関及び企業との共同研究 (競争的委託研究事業)

- ・ 科学技術振興機構 (JST) ライフサイエンスデータベース統合推進事業「統合化推進プログラム」
研究開発課題名：糖鎖統合データベースおよび国際糖鎖構造リポジトリの開発
- ・ 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 「難治性疾患実用化研究事業」
研究開発課題名：新規修飾体リビトールリン酸の病態生理機能に着目した福山型筋ジストロフィーの発症機序の解明と治療法の開発

(共同研究)

- ・ 旭化成株式会社

- ・旭化成ファーマ株式会社
- ・大阪府立病院機構 (井上正宏部長)
- ・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)
- ・慶応義塾大学医学部 (工藤純教授)
- ・国立精神・神経医療研究センター (武田伸一理事)
- ・国立医薬品食品衛生研究所 (橋井則貴室長)
- ・東京大学医科学研究所 (山梨裕司教授)
- ・北陸先端科学技術大学院大学 (芳坂貴弘教授)
- ・高エネルギー加速器研究機構 (加藤龍一准教授)

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、2018年度は146件の応募の中から13件に第10回助成金を贈呈した。

本助成金の採択者は10年間で延べ137人となった。過去の採択者のその後の調査では、職位の上がった研究者、各種の賞の受賞者も多くみられ若手研究者の研究を助成するという本助成金の趣旨にそった成果が得られつつある。

【別添資料1】

フルオラス科学研究会第11回シンポジウムプログラム

2018年9月21日 (金) 広島市立大学サテライトキャンパス 〒730-0051 広島市中央区大手町

9:30 ~ 9:40 会長挨拶

9:40 ~ 9:55 座長: 池田潔 (広国大薬)

口頭発表O-1「B (C₆F₅)₃ を触媒に用いる立体選択的 Diels-Alder 反応」

2-2 野口遵賞

2014年度に「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。

2018年度は、2014年度及び2015年度採択者の中の12名の応募者から、大阪大学の関谷毅氏に第5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。2018年度は1名の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2)

4. 研究の成果 (別添資料3)

(1) 特許出願関係

- ・国内特許出願 8件 (うち共同出願 5件)
- ・国内特許公開 3件 (うち共同出願 2件)
- ・国内審査請求 5件 (うち共同出願 2件)
- ・国内特許登録 2件 (うち共同出願 1件)
- ・PCT出願 0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 0件 (うち共同出願 0件)
- ・外国特許公開 2件 (うち共同出願 0件)
- ・外国特許登録 1件 (うち共同出願 0件)

(2) 学会発表 31件 (うち国際学会 8件)

(3) 誌上発表 6件

(4) 依頼講演 3件

- (名古屋大学大学院工学研究科有機・高分子化学専攻) (石原一彰)
- 9:55 ~ 10:45 座長: 松儀真人 (名城大農)
招待講演1「フルオラス溶媒を用いたメタン・メタノール変換反応」
(1阪大高等共創研、2阪大先導的学際研) (大久保敬1,2)
- 11:00 ~ 11:50 座長: 轟木堅一郎 (静岡県大薬)
招待講演2「可逆的相互作用を利用した生体関連物質のフルオラス溶媒抽出」
(福岡大学薬学部) (巴山忠)
- 13:15 ~ 14:05 座長: 矢島知子 (お茶の水女子大)
招待講演3「脱フッ素ホウ素化反応によるフルオロアルケン合成法の開発」
(理化学研究所 生命機能科学研究センター (BDR)) (丹羽節)
- 14:05 ~ 14:20 座長: 畑中研一 (東大生産研)
口頭発表O-2「フェニル基を有するジアミノシクロヘキサン骨格含フッ素低分子ゲル剤の合成と物性評価」
(お茶の水女子大院) (叶野花菜子)
- 14:20 ~ 14:33 座長: 畑中研一 (東大生産研)
口頭発表O-3「フルオラスプロリン触媒を用いた高立体選択的不斉アルドール反応」
(名城大農) (小林佑基)
- 14:50 ~ 15:40 座長: 伊藤彰近 (岐阜薬大)
招待講演4「ペルフルオロアルキル基を含む縮合多環芳香族化合物の合成とその物性」
(東京農工大学 大学院工学研究院応用化学部門) (山崎孝)
- 15:50 ~ 16:50 ポスターセッション
- P-1 直鎖ジアミノアルキル骨格を有する含フッ素低分子ゲル化の合成と物性評価
(1 お茶大院、2 楠本化) ○叶野花菜子、佐藤栄一 2、矢島知子 1
- P-2 フルオラス有機分子触媒を用いた不斉 direct vinylogous aldol 反応」
(東京薬大薬) ○松島恭征、坂井崇亮、平島真一、山下祥史、中野樹、中島康介、古石裕治、三浦剛
- P-3 計算化学による含フッ素医薬品の設計
(広島市立大学大学院情報科学研究科) ○齋藤徹、鷹野優
- P-4 ベンゾイミダゾール scaffold を有する farnesoid X receptor (FXR) アンタゴニストの構造活性相関
(1 広島国際大学 薬学研究科、2 同大薬学部、3 大阪薬科大学、4 関西分子設計研究会) ○増田有沙 1、山下ユキコ 2、井口裕介 2、藤森功 3、合田圭吾 4、手納直規 1
- P-5 Diphenyl Phosphorazidate を用いたテトラゾールの効率的合成: フルオラス溶媒の検討
(1 名城大農、2 東北大多元研) ○石原稿太郎 1、川島麻友美 1、松本高利 2、塩入孝之 1、松儀真人 1

- P-6 含フッ素デングウイルス感染阻害剤の合成研究 (Ⅱ)
(広島国際大学) ○寺岡文照、向原大貴、佐藤理貴、大坪忠宗、池田潔
- P-7 フルオラス・タグを組み込んだ 2-(benzo[d]thiazol-2-yl)phenol 型固体発光性色素の合成と応用に関する研究
(広島国際大学) ○大坪忠宗、寺岡文照、池田潔
- P-8 フルオラス誘導体化を用いたシアン化物分析法の開発
(福岡大薬) ○富田陵子、巴山忠、藤岡稔大
- P-9 ペルフルオロヘテロ環を用いた蛍光色素の新規合成とその優れた特性
(1 岐阜大院自然科技、2 岐阜大工) ○齋藤優生 1、窪田裕大 2、船曳一正 2
- P-10 パーフルオロアルキルタグ化による 5-アミノレブリン酸及び ALAS 活性の簡便、高感度、高精度な誘導体化 LC-MS/MS 分析法の開発
(1 静岡県立大学薬学部、2 SBIファーマ株式会社) 工藤悠翔 1、福土南 1、水野初 1、多田大 2、太田麗 2、石塚昌宏 2、豊岡利正 1、○轟木堅一郎 1
- P-11 フルオラス分子クラウディング反応の試み
(東海大・工・応化) ○廣瀬貴也、稲津敏行
- P-12 フルオラス誘導体化 LC-MS 法による二枚貝中のオカダ酸分析
(福岡大薬) 赤穂健太、○坂口洋平、河村梨那、吉田秀幸、古賀鈴依子、能田均
- P-13 フェイズ・バニシング (PV) 法によるアルケンのヒドロホウ素化
(阪府大院理) ○曾我寧々、吉木朋、松原浩
- P-14 トリフルオロメチル基を有するオキシインドール類の簡便合成
(1 岐阜大院自然科技、2 岐阜大生命科学総合研究支援センター、3 岐阜大工) ○中島昂哉 1、犬塚俊康 2、船曳一正 3
- P-15 不安定化学種の銅 (111) 面上でのワンショットオリゴマー化反応:9,10-ビス (トリメチルシリルエチニル) アントラセンの脱シリル化とホモカップリング
(1 岡山理大工、2 NIMS、3 Aalto Uni. Sch. Sci.、4 WPI-NanoLSI, Kanazawa Univ.、5 Grad. Sch. Mater. Sci. Mainz、6 Univ. Basel) ○折田明浩 1、川井茂樹 2、Adam S. Foster 3,4,5、奥田 靖浩 1、Ernst Meyer 6

【別添資料2】

(1) 学生の受け入れ

北里大学から卒業研究生を1名受け入れ、下記のテーマにより研究を行った。

卒業論文研究テーマ

ENGase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

(2) 職員の教育活動

今年度は下記の職員が大学の非常勤講師として教育活動に携わった。

黒河内政樹、大隅賢二、山田一作、後藤浩太郎

【別添資料3】

1. 学会発表 31件 (うち国際学会 8件)

質量分析インフォマティクス研究会 2018年ワークショップ (2018.4.23)	1件
第66回質量分析総合討論会 (2018.5.15-18)	2件
GlycoT 2018 (2018.6.19-23)	1件
2018 NIH & FDA Glycoscience Research Day (2018.7.13)	1件
International Symposium on Zeolites and Microporous Crystals 2018 (2018.8.5-9)	1件
7th Charles Warren Workshop (2018.8.15-20)	1件
256th ACS National Meeting (2018.8.19-23)	1件
第37回日本糖質学会年会 (2018.8.28-30)	8件
第91回日本生化学会大会 (2018.9.24-26)	4件
Annual Meeting of Society for Glycobiology 2018, Glyco-Bioinformatics satellite meeting (2018.11.5)	1件
Annual Meeting of Society for Glycobiology 2018 (2018.11.5-8)	1件
第41回日本分子生物学会年会 (2018.11.28-30)	3件
第10回国際ペプチドシンポジウム／第55回ペプチド討論会 (2018.12.3-7)	2件
Antibody Engineering & Therapeutics ASIA (2019.2.26-28)	1件
日本薬学会第139年会 (2019.3.20-23)	2件
日本農芸化学会2019年度大会 (2019.3.24-27)	1件

2. 誌上発表 6件

Roles of GalNAc-disialyl Lactotetraosyl Antigens in Renal Cancer Cells
Akiko Tsuchida, Motohiro Senda, Akihiro Ito, Seiichi Saito, Makoto Kiso, Takayuki Ando, Anne Harduin-Lepers, Akio Matsuda, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa
Scientific Reports, 8, 7017 (2018)

CDP-glycerol inhibits the synthesis of the functional O-mannosyl glycan of α -dystroglycan

Rieko Imae, Hiroshi Manya*, Hiroki Tsumoto, Kenji Osumi, Tomohiro Tanaka, Mamoru Mizuno, Motoi Kanagawa, Kazuhiro Kobayashi, Tatsushi Toda, Tamao Endo
J. Boil. Chem., 293, 12186 (2018)

Meeting Report of the International Life Science Integration Workshop 2018
Glycobiology, 28, 552 (2018)

Issaku Yamada、他33名

Binding Assessment of Monosaccharide–Boronic Acid Complexes via Tandem Mass Spectrometry

Masaki Kuroguchi,* Mamoru Mizuno, and Akio Matsuda
ChemistrySelect, 3, 8193-8198 (2018)

Glycan Remodeling of Glycoproteins Using ENGases

Masaki Kuroguchi
Trends in Glycoscience and Glycotechnology
30, E209 (2018)

GlycanFormatConverter: a conversion tool for translating the complexities of glycans
Shinichiro Tsuchiya, Issaku Yamada and Kiyoko F. Aoki-Kinoshita
Bioinformatics, 2018, 1-7 (2018)

3. 講演 3件

静岡大学グリーン科学研究所グリーン研セミナー (2018.5.15)

“Detection of Copper (II) ion by o-Carborane Based Chemical Probe for ¹¹B NMR/MRI”
田中智博

日本原子力研究開発機構 講演会 (2019.2.21)

「糖鎖科学の発展により広がる世界」天野純子

阪大蛋白研セミナー～タンパク質化学合成が切り拓く新潮流～ (2019.2.28)

「糖水酸基に酸感受性保護基を用いた糖ペプチド合成およびその応用」田中智博

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等の公益目的事業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11名、評議員6名、監事3名で、次のとおりである。（＊は常勤）

理事長 小林 宏史*

常務理事 松田 昭生*

理事 入江 辰則* 白井 博史 野崎 貴司 松崎 修 大塚 信之 内野 正純
小笠 眞男 川崎 俊之 小宮山 眞

評議員 岩澤 康裕 澤本 光男 小堀 秀毅 柴田 豊 山田 敬三 高下 貞二

監事 中尾 正文 大沼 亮一 山本 宏

5. 学術顧問

当研究所の学術顧問は令和元年7月末日現在、次のとおりである。

木幡 陽（名誉顧問） 遠藤 玉夫 古川 清 深瀬 浩一 柴崎 一郎

6. 職員

職員は令和元年7月末日現在、32名である。このほかに技術アドバイザー 2名が勤務している。

7. 財産

平成31年3月末の正味財産は約134億円である。

8. 土地・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、老朽化が激しく平成28年9月末に建替え、新研究所にて研究事業に取り組んでいる。新研究棟は敷地面積2,734.1㎡、延床面積2734.4㎡の地上4階建である。

9. 特許および商標

当研究所所有の特許権は56件（国内48件、外国8件）、商標権は2件である（2019年7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
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
三 浦 剛 稲 津 敏 行 森 裕 志 横 山 慎 一 郎 梶 本 哲 也	ペロ毒素中和剤としてのスフィンゴ糖脂質類似体	4639055	2010.12.03
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
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
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
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
山 ノ 井 孝	トレハロース誘導体とその製造法	4950521	2012.03.16
山 ノ 井 孝	e x o -グリカル誘導体の製造法	5060028	2012.08.10

山ノ井孝喜 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
山ノ井孝喜	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
山ノ井孝喜	フルクトフラノシド誘導体とその製造法	5155578	2012.12.14
山ノ井孝喜 小田慶喜	トリクロロエチルオキシカルボニル化 α -ガラクトサミニド誘導体	5252841	2013.04.26
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
山ノ井孝喜 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
山ノ井孝喜 小田慶喜	糖結合型スピロクラウンエーテル誘導体	5394645	2013.10.25
土田明子 藤田雅也	α -N-アセチルグルコサミニル結合を加水分解する新規な糖質加水分解酵素	5425481	2013.12.06
平野清子 中村紀夫 天野純子	前立腺癌の判定方法	5431360	2013.12.13
水野真盛 戸治野真美	ペルフルオロ有機物の製造方法	5436093	2013.12.20
佐藤智典 水野真盛	新規糖鎖プライマーとその利用	5438998	2013.12.20
天野純子 中村紀夫	前立腺癌を判定する方法	5443156	2013.12.27
天野純子	分析方法	5478998	2014.02.21
天野純子 西風隆司 奥村寿子	MALDI質量分析法	5504282	2014.03.20
菅原州一 大隅賢二	11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの製造方法	5566226	2014.06.27
菅原州一 大隅賢二	糖ペプチド誘導体及びその製造方法	5611105	2014.09.12
菅原州一 大隅賢二	糖ペプチド被覆シリカ	5614897	2014.09.19

塚本郁子 小西良士 窪田泰夫 大隅賢二 水野真盛	血管内皮細胞の管腔形成抑制剤	5649358	2014.11.21
水野真盛 川上宏子	微小流路内のフルオラス不均一多相系反応方法	5670654	2014.12.26
菅原州一 大隅賢二	11糖シアリルオリゴ糖アスパラギンの製造方法	5680576	2015.01.16
高木睦 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	糖ペプチド誘導体及びその製造方法	5813294	2015.10.02
西風隆司 天野純子	質量分析法用測定試料及びその調製方法	5837273	2015.11.13
藤田雅也 土田明子 正田晋一郎 田中知成	N-アセチルグルコサミンが α で結合した糖誘導体の調製方法	5892750	2016.03.04
藤田雅也 土田明子 森昌子	糖質関連酵素の改良法	5917913	2016.04.15
藤田雅也 土田明子 芦田久	消化管ムチンの糖鎖に特異的に結合するポリペプチド	5951199	2016.06.17
天野純子 奥村寿子	MALDI質量分析法用測定試料調製方法	5990000	2016.08.19
水野真盛 戸治野真美 後藤浩太朗	炭素-炭素結合型ヘビーフルオラストグ	6001267	2016.09.09
後藤浩太朗 水野真盛	エーテル化合物製造法	6055293	2016.12.09
後藤浩太朗 水野真盛	アグリコン転位抑制効果を持つ無臭チオール誘導体	6066621	2017.01.06
天野純子 後藤康友 稲垣伸二	レーザー脱離イオン化質量分析法	6108805	2017.03.17
天野純子 奥村寿子	MALDI質量分析法	6125426	2017.04.14

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
黒河内政樹 天野純子	糖ペプチドの質量分析法	6368502	2018.07.13

<以下、外国特許>

平野清子 中村紀夫 天野純子	前立腺癌の判定方法	EP 2354790 (英、独、仏)	2013.07.17
中山淳 山ノ井孝 藤田雅也 白井孝	α -N-アセチルグルコサミニル結合単糖誘導体を含むピロリ菌増殖抑制剤	US 8575117 (米国)	2013.11.05
菅原州一 大隅賢二	11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの製造方法	EP 2474560 (英、独、仏)	2014.03.19
天野純子 天田中耕一	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

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

野口遵研究助成金

I. 2018年度野口遵賞実施報告

第10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) 2018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2018年9月1日から2ヶ月間募集を受け付け、総計146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	73件	6件
課題 2	エネルギー・資源・環境の革新に寄与する新プロセスや新材料に関する研究 蓄エネルギー、創エネルギー、バイオマス、水処理、グリーンサステイナブルケミストリー（触媒を含む）など	47件	4件
課題 3	豊かな生活に寄与する新材料やデバイスに関する研究 電子材料、デバイス、センサーなど	26件	3件
件数計		146件	13件

②選考委員会

2019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10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

2019年3月13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	研究テーマ名
上田(石原) 奈津実	名古屋大学大学院理学研究科 生命理学専攻	新規認知症治療薬開発を目指した空間弁別機能亢進を促す物質の探索
弓場 英司	大阪府立大学大学院工学研究科 応用化学分野	アジュバント機能を有するポリカルボン酸誘導体の合成と免疫誘導システムへの展開
生長幸之助	東京大学大学院薬学系研究科 有機合成化学教室	位置選択的なタンパク質化学修飾法の開発と応用
武田 行正	京都府立医科大学大学院 医学研究科	インスリン産生細胞の非遺伝子導入型直接誘導法の開発
植木 亮介	東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻	ミメティクス核酸技術で実現する増殖因子フリーの幹細胞培養
松尾 和哉	北海道大学 電子科学研究所	オプトケミカルサージェリー技術の確立
堀内新之介	長崎大学大学院工学研究科 物質科学部門	オンデマンドな発光特性を有する錯体内包型超分子の開発
村上 慧	名古屋大学 トランスフォーマティブ 生命分子研究所	新構造複合カーボン分子の自在合成を可能とする触媒反応デザイン
正井 宏	東京大学大学院 総合文化研究科	光機能性相反材料の創成
竹澤 浩気	東京大学大学院工学系研究科 応用化学専攻	基質の配座固定能をもつ可視光応答性中空錯体の構築と高歪み化合物の空孔内可視光合成
須田 理行	自然科学研究機構 分子科学研究所	キラル分子の利用による"磁性体と磁場を必要としない"新奇スピントロニクス素子の開発
山田 道夫	東京学芸大学教育学部	鉄原子内包フラレン合成への挑戦
相川 洋平	沖縄工業高等専門学校 情報通信システム工学科	光信号処理に基づく全光スイッチ技術の開拓

*所属は応募時のもの

【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	五十嵐泰夫	中国西南大学教授・東京大学名誉教授
	片岡 一則	東京大学特任教授・(公財)川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンター長
	川合 知二	NEDO技術戦略研究センター長・大阪大学特任教授
	小宮山 眞	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
	柴崎 一郎	野口研究所顧問
	福岡 伸典	野口研究所技術アドバイザー
	増村 正志	JNC(株)顧問
	山本 憲二	石川県立大学教授・京都大学名誉教授
	吉野 彰	旭化成(株)名誉フェロー

* 五十音順。所属・職名は選考委員会開催時のもの。

【2016年度（第8回）野口遵研究助成金 研究成果報告（要旨）】

氏名	谷口 敦彦	所属	東京薬科大学 薬学部
研究テーマ名	アミロイド選択的光酸素化を基盤としたアミロイド病治療への挑戦		
アルツハイマー病関連アミロイド β (A β) を始めとするアミロイドタンパク質は、凝集体が毒性を示し、アミロイド病を起こす。本研究では、人工分子を用いた光酸素化によってA β の凝集性・毒性を抑制した。本分子は、アミロイド高次構造に結合した時にのみ光酸素化活性を発現するスイッチ機能を有するため、A β 選択的酸素化を実現した。また、組織透過性が高く、障害性が低い近赤外光で励起可能であり、マウス脳内におけるA β の酸素化に成功した。			

氏名	西村 勇哉	所属	神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科
研究テーマ名	放射線増感治療を可能にするナノ粒子の生体内動態と抗腫瘍効果		
放射線増感効果を示すポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子(PAATiOx)の粒径・表面修飾・細胞種・経時の違いによる体内分布や抗腫瘍効果を評価した。粒径や表面修飾によって肝臓へのトラップを減らし、腫瘍への集積率が向上する条件が示唆された。また、X線併用治療において、X線照射のみと比較して優位な腫瘍体積の減少が確認された。これらの検討から得られた粒子と治療条件を総合し、既存の治療法よりも効果的な併用治療法を確立していく。			

氏名	大塚 洋一	所属	大阪大学大学院 理学研究科化学専攻
研究テーマ名	ナノ液体の物理化学特性を生かした多次元情報イメージング法の研究		
申請書が発案した抽出イオン化法である、走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法に、プローブの振動情報の概念を導入する「物理・化学・形状情報の同時計測技術」を開発し、①化学成分と形状情報の同時イメージングと、②抽出イオン化過程におけるナノ体積液体の物理情報と生成イオンの化学情報の同時計測に成功した。また、異種多次元データの特徴量抽出に必要な解析プログラムも開発した。以上の研究項目の検討の結果、イメージング質量分析法の限界打破の源流となる成果が得られた。			

氏名	塚越かおり	所属	東京農工大学大学院 工学研究院 生命機能科学部門
研究テーマ名	アプタマーポリマーの合成に基づく高感度検出法の開発とアルツハイマー病超早期診断への応用		
アルツハイマー病の診断・治療法開発においてAβオリゴマー(AβO)の分析が重要視されている。そこで本研究ではAβO結合アプタマーと酵素結合アプタマーを組み合わせた高感度AβO検出法の開発を実施し、以下の2つの成果を得た。(1) AβO結合アプタマーの結合に基づき、AβO上に高密度に核酸を修飾することに成功した。また、この核酸を測ることで高感度なAβO検出に成功した。(2) 酵素結合アプタマーポリマーの合成・評価系を確立した。			

氏名	藤枝 俊宣	所属	東京工業大学生命理工学院
研究テーマ名	無線給電にて作動可能なインジェクタブルナノ薄膜状デバイスの開発		
本研究では、硬いエレクトロニクスと柔らかい生体を繋ぐためのインターフェースとして、高分子ナノ薄膜に着目した。ナノ薄膜とプリントエレクトロニクスを組み合わせることで、生体に搭載可能なデバイス「プリントナノ薄膜」を創製し、無線給電技術や神経工学による生体機能の計測・制御手法を構築した。本研究成果は生体と人工物の融合に向けた基盤技術として、生体融合型デバイスの革新的な設計指針になると期待される。			

氏名	内藤 瑞	所属	東京大学大学院 医学系研究科 疾患生命工学センター 臨床医工学部門
研究テーマ名	筋ジストロフィーの治療を目指した骨格筋への薬物送達技術の開発		
本課題研究では、筋ジストロフィー治療を目指した全身投与による骨格筋へのアンチセンス核酸送達を目指した送達手法の開発を行った。アンチセンス核酸内包ポリイオンコンプレックスミセルを含むアンチセンス核酸送達システムに対してグルコーストランスポーターを標的とするグルコース改変リガンドを導入することで骨格筋への送達効率の向上を試みた。			

氏名	小野 利和	所属	九州大学大学院工学研究院 応用化学部門
研究テーマ名	多成分分子の自己組織化を利用した有機蓄光発光材料の創製		
『多孔性有機結晶が形成するナノ空間に分子を閉じ込める技術』を利用した有機燐光発光材料の創製を目的とし、超分子ホスト分子(EBPDI-TPFB複合体)に芳香族ゲスト分子を包接した固体発光材料の創製を検討した。結果として、ヨードベンゼン等の重原子を包接した3成分結晶の創製により、室温大気下でマイクロ秒オーダーの燐光発光材料の創製を達成した。本手法の利用による革新的な光学材料が次々と生み出されることが期待できる。			

氏名	竹澤 悠典	所属	東京大学大学院 理学系研究科化学専攻
研究テーマ名	DNA酵素合成を活用した金属集積人工DNAワイヤーの合成		
DNA鎖を鋳型とした金属集積ワイヤーの構築を目的とし、DNA合成酵素を活用した金属配位子型ヌクレオチドオリゴマーの合成と金属錯体形成を検討した。5-ヒドロキシウラシルおよび5-カルボキシウラシルを配位子型核酸塩基として設計し、5-20塩基長のオリゴマーの酵素合成が可能であること、およびオリゴマーとの錯体形成によりGd(III)イオンやCu(II)イオンの集積が可能であることを見出した。			

氏名	松本 剛	所属	中央大学
研究テーマ名	完全貴金属フリーな常温常圧動作型水素吸蔵材料		
本研究では、光エネルギーを駆動力とし、常温常圧で動作する新しい水素吸蔵材料の創出を目的に、酸化還元活性な有機骨格である芳香族ジアミン類の光反応による化学エネルギー変換反応に関して検討を行なった。検討を行なった結果、二酸化炭素(CO ₂)雰囲気下での芳香族ジアミン類の光反応により、ベンゼン環C－HのCO ₂ を原料とする直接的カルボキシル化反応が常温常圧下で進行することを初めて見出した。			

氏名	砂田 祐輔	所属	東京大学 生産技術研究所
研究テーマ名	高い小分子捕捉・活性化能を示す鉄触媒による窒素固定化		
窒素分子変換は、現代科学において極めて重要な反応である。本反応は、工業的にはHaber-Bosch法により高温・高圧下で達成されている。本研究では、高反応性鉄錯体の構築に基づく、温和な条件下での窒素固定化法の開発を目的とした研究を行った。その結果、高度に配位不飽和で高い反応性を示す鉄ケイ素錯体の一段階での簡便な合成法を開発し、この錯体が温和な条件下での窒素分子の触媒的変換に活性を示すことを見出した。			

氏名	松原 正和	所属	東北大学大学院 理学研究科
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クメタマテリアルの創製		
本研究では、対称性を制御した光メタマテリアルを用い、スピン流の生成・制御を可能とする新原理の検証を行った。その結果、光の波長よりも小さな3回回転対称構造を持つ光メタマテリアルにおいて、外場を印加することなく光照射のみにより電流を生成し、その流れる方向を光メタマテリアルの2次元面内で360°自在に制御することに成功した。これを発展させることで、光によるスピン流制御の新しい原理の開拓が期待される。			

氏名	渡邊峻一郎	所属	東京大学大学院 新領域創成科学研究科
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		
本研究では、有機半導体を用いたスピン機能性を開拓し、既存のエレクトロニクスでは実現できない革新的なスピントロニクスデバイスの創成を目指して、材料探索・物性理解・デバイス製造を行なった。分光計測から有機半導体におけるスピン緩和機構を解明することに成功し、スピンの長寿命化に必要な材料合成指針を確立できた。また、大面積の有機単結晶薄膜の成膜にも成功し、発熱しないスピndeデバイス製造への基盤技術を確立できた。			

氏名	関 朋宏	所属	北海道大学大学院 工学研究院
研究テーマ名	メカニカルライティング法を利用した電子材料の構築		
発光性メカノクロミズムと単結晶間相転移を示す金錯体群について、電気伝導性のスイッチング挙動を調査した。メカノクロミズムに起因する相転移がきっかけとなり、電気伝導特性が同時に切り替わることを、電子顕微鏡、時間分解マイクロ波測定によって明らかにした。その他にも、disappearing polymorph現象を発見し、この材料についても電気伝導特性の評価に成功した。			

2018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する。

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す。

2) 2018年度の概要

2019年2月6日に野口遵研究助成金の選考に先立って第5回野口遵賞の選考を行った。

選考の結果、大阪大学産業科学研究所 関谷毅教授を受賞者として決定した。

なお、本年度は2014年度、2015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関谷毅教授は2015年度に「装着感のないパッチ式血圧センサシートの開発」というテーマで野口遵研究助成に採択されている。

2018年度誌上発表論文抄録集

Abstracts of Publications

Roles of GalNAc-disialyl Lactotetraosyl Antigens in Renal Cancer Cells

Akiko Tsuchida, Motohiro Senda, Akihiro Ito, Seiichi Saito, Makoto Kiso, Takayuki Ando,
Anne Harduin-Lepers, Akio Matsuda, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa
Scientific Reports, 8, 7017 (2018)

糖転移酵素遺伝子 β 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安定発現株ではコントロール株に比べて増殖能、浸潤能、接着能の亢進が認められ、細胞内シグナルについて比較検討した結果、安定発現株のAkt分子のリン酸化が亢進しており、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。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。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 β 1分子が共局在していることを見出した。これらの結果から、GalNAc-DSLc4抗原という糖脂質の発現増加に伴いラフト様ドメインに局在するインテグリン分子が増え、ラフト様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た。さらに、本論文では細胞膜表面の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についても示した。

~~~~~

#### CDP-glycerol inhibits the synthesis of the functional O-mannosyl glycan of $\alpha$ -dystroglycan

Rieko Imae, Hiroshi Manya\*, Hiroki Tsumoto, Kenji Osumi, Tomohiro Tanaka, Mamoru Mizuno, Motoi Kanagawa, Kazuhiro Kobayashi, Tatsushi Toda, Tamao Endo  
J. Boil. Chem., 293, 12186 (2018)

$\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ -DG) のO-マンノシルグリカン上のラミニン結合エピトープの合成にはリン酸リビトール (RboP) が必要である。RboPおよびグリセロールホスフェート (GroP) - 置換グリコフォームの両方が最近組換え  $\alpha$ -DGにおいて検出された。しかし、GroPがどのようにO-マンノシルグリカンに変換されるのか、またはGroP置換がO-マンノシルグリカンの合成に影響するのかどうかは不明である。本論文では、RboP転写活性を有することに加えて、FKTNおよびFKRPがドナー基質としてCDP-グリセロール (CDP-Gro) を用いることによってGroPをO-マンノシルグリカンに転写することができることを報告する。動的实验は、CDP-GroがCDP-RboよりもFKTNに対する効率の低いドナー基質であることを示した。また、FKTNによって合成されたGroP置換グリコフォームがFKRPのアクセプター基質として機能しないこと、そしてそれ故にこのグライコフォームでは外側グリカン鎖のさらなる伸長が起こり得ないことを明らかにした。また、CDP-GroはFKTNとFKRPの両方のRboP伝達活性を阻害した。これらの結果は、CDP-Groが、グリカン鎖のさらなる伸長を妨げることによって、 $\alpha$ -DGのO-マンノシルグリカンの合成を阻害することを示唆している。

~~~~~

Meeting Report of the International Life Science Integration Workshop 2018

Issaku Yamada、他33名
Glycobiology, 28, 552 (2018)

第1回国際ライフサイエンス統合ワークショップが、2018年3月5日から9日まで、Glycoinformatics Consortium (GLIC)、科学技術振興機構 (JST)・バイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) の後援により東京で開催された。このワークショップでは、ライフサイエンスの実験家やバイオインフォマティクスの専門家からの招待講演によるシンポジウムや、さまざまなソフトウェアプロジェクト間のコミュニケーションをさらに発展させ、さまざまなライフサイエンス分野の統合をサポートするためにハッカソンが行われた。

~~~~~

## Binding Assessment of Monosaccharide-Boronic Acid Complexes via Tandem Mass Spectrometry

Masaki Kuroguchi, Mamoru Mizuno, Akio Matsuda  
Chemistry Select, 3, 8193 (2018)

ベンゾオキサボロールおよびアリールボロン酸は、水中で単糖に結合して、複数のヒドロキシル基を有する可逆的ボロン酸エステルを形成する。ベンゾオキサボロールがジオールと結合、またはアリールボロン酸が単糖上のトリオールと結合する際に、四面体ホウ素アニオンが

ホウ素原子で形成される。これらのホウ素アニオンは、質量分析およびタンデム質量分析において陰イオンとして検出することができ、そしてそれらのフラグメントアニオンをプロファイリングすることで、単糖上のヒドロキシル基の立体配置および位置化学配置に関する情報が得られる。ベンゾオキサボロール酸とアリールボロン酸の両方から誘導されるホウ酸フラグメントアニオンは、ヒドロキシル基との異なる結合を示し、これは単糖の立体構造を反映する。その結果、単糖 - ボロン酸錯体の結合能の違いを用いて、質量分析により単糖を識別することができた。

~~~~~

Glycan Remodeling of Glycoproteins Using ENGases

Masaki Kurogochi

Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 30, E209 (2018)

近年、酵素化学法を用いた均一糖鎖構造を有する糖タンパク質の調製、及び機能解明に関する研究が盛んになっている。一般的に、培養細胞によって生産された糖タンパク質は、不均一な糖鎖構造を持つ為、どの糖鎖構造が糖タンパク質の機能に作用しているかが不明瞭である。この問題点を解決する方法として、様々な糖鎖の付け替えを可能とするエンドグリコシダーゼを用いる酵素化学的手法が開発された。糖タンパク質上の糖鎖構造が機能に関与している例として、抗体の細胞障害活性があり、抗体の糖鎖改変が数多く行われている。本論文では、これらの研究や技術を紹介する。

~~~~~

## GlycanFormatConverter: a conversion tool for translating the complexities of glycans

Shinichiro Tsuchiya, Issaku Yamada, Kiyoko F. Aoki-Kinoshita

Bioinformatics, 2018, 1 (2018)

本研究では、GlycanFormatConverterを開発し、WURCSを3種類のIUPACフォーマット (IUPAC-Extended、IUPAC-Condensed、およびIUPAC-Short) に変換することに成功した。さらに、IUPAC-Extended、KEGG Chemical Function (KCF)、およびLinearCodeフォーマットをインポートし、WURCSをエクスポートする機能を実装した。この変換ツールのソースコードはオープンソースツールとして公開している。



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・下板橋駅から徒歩15分

---

---

## 野口研究所時報 第62号

2019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  
〒173-0003 東京都板橋区加賀1-9-7  
<https://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

---

---