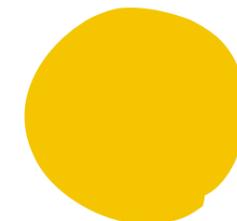


# 野口 研究所 時報



THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.63 2020

CONTENTS

An Essay ..... Hiroshi KOBAYASHI

Regulation of autophagy by liquid-liquid phase separation ..... Nobuo N. NODA

Biological and chemical overview of regulation of Notch signaling by O-linked glycosylation ..... Hideyuki TAKEUCHI

Efficient Synthesis of Glycopeptides using Acid-Labile Boc Groups for the Protection of Carbohydrate hydroxyls ..... Mamoru MIZUNO

Preparation of O-Glycopeptide Library from Commercial Bovine Whey Protein Powder ..... Masaki KUROGOCHI

Study of glycosylation of prostate-specific antigen secreted by cancer tissue-originated spheroids reveals new candidates for prostate cancer detection ..... Hiroko IDEO

LacdiNAcylation of N-glycans in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in changes in morphological appearance and adhesive properties of the cells ..... Kiyoko HIRANO

Links between deep-sea microbes and our lives ..... Satoshi NAKAGAWA

Flexible medical devices to support the post-Corona era ..... Tsuyoshi SEKITANI

The Activities of the Institute ..... Tomokazu SUGI

Outline of the Institute ..... Tatsunori IRIE

Noguchi Shitagau Research Grant

Abstracts of Publications

ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

巻頭言 所感 ..... 小林 宏史

液-液相分離によるオートファジー制御 ..... 野田 展生

O-結合型糖鎖修飾による Notch シグナル制御の生物化学論 ..... 竹内 英之

糖水酸基保護基としてBoc基を用いたN-およびO-結合型糖ペプチドの効率的な合成 ..... 水野 真盛

ホエイプロテインパウダーからO-結合型糖ペプチドライブラリーの調製 ..... 黒河内 政樹

がん組織由来スフェロイドのPSA解析から明らかになった新たながん特異的グライコフォーム ..... 井手尾 浩子

LacdiNAc糖鎖を強制発現したMDA-MB-231ヒト乳がん細胞の細胞形態及び細胞接着能の変化 ..... 平野 清子

深海微生物と我々の関わり ..... 中川 聡

コロナ後の時代を支えるフレキシブル医療機器の研究開発と展望 ..... 関谷 毅

2019年度活動概要 ..... 杉 智和

研究所の概要 ..... 入江 辰則

野口遵研究助成金／野口遵賞

2019年度誌上発表論文抄録集

---

---

巻頭言 所感	小林 宏史 ……	1
液-液相分離によるオートファジー制御	野田 展生 ……	4
O-結合型糖鎖修飾による Notch シグナル制御の生物化学論	竹内 英之 ……	10
糖水酸基保護基としてBoc基を用いたN-およびO-結合型糖ペプチドの水野 真盛 効率的な合成	……………	20
ホエイプロテインパウダーからO-結合型糖ペプチドライブラリーの 調製	黒河内 政樹 ……	27
がん組織由来スフェロイドのPSA解析から明らかになった 新たながん特異的グリコフォーム	井手尾 浩子 ……	33
LacdiNAc糖鎖を強制発現したMDA-MB-231ヒト乳がん細胞の 細胞形態及び細胞接着能の変化	平野 清子 ……	40
深海微生物と我々の関わり	中川 聡 ……	46
コロナ後の時代を支えるフレキシブル医療機器の研究開発と展望	関谷 毅 ……	53
2019年度活動概要	杉 智和 ……	63
研究所の概要	入江 辰則 ……	76
野口遵研究助成金／野口遵賞	……………	81
2019年度誌上発表論文抄録集	……………	87

THE ANNUAL REPORT OF THE NOGUCHI INSTITUTE

No.63 2020

C O N T E N T S

An Essay	Hiroshi KOBAYASHI	1
Regulation of autophagy by liquid-liquid phase separation	Nobuo N. NODA	4
Biological and chemical overview of regulation of Notch signaling by <i>O</i> -linked glycosylation	Hideyuki TAKEUCHI	10
Efficient Synthesis of Glycopeptides using Acid-Labile Boc Groups for the Protection of Carbohydrate hydroxyls	Mamoru MIZUNO	20
Preparation of <i>O</i> -Glycopeptide Library from Commercial Bovine Whey Protein Powder	Masaki KUROGOCHI	27
Study of glycosylation of prostate-specific antigen secreted by cancer tissue-originated spheroids reveals new candidates for prostate cancer detection	Hiroko IDEO	33
LacdiNAcylation of N-glycans in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in changes in morphological appearance and adhesive properties of the cells	Kiyoko HIRANO	40
Links between deep-sea microbes and our lives	Satoshi NAKAGAWA	46
Flexible medical devices to support the post-Corona era	Tsuyoshi SEKITANI	53
The Activities of the Institute	Tomokazu SUGI	63
Outline of the Institute	Tatsunori IRIE	76
Noguchi Shitagau Research Grant		81
Abstracts of Publications		87

— 卷頭言 —

## 所 感

### An Essay

理事長 小林 宏史

President Hiroshi KOBAYASHI

2020年の幕開け、多くの日本国民が東京オリンピック・パラリンピックの開幕を待ち遠しく思っていたことでしょう。正月気分が抜けきらない中、1月6日に「中国湖北省武漢で病原体が特定されていない肺炎の患者が59人確認され、うち7人が重症。厚生労働省は武漢からの帰国者でせきや熱などの症状がある場合は速やかに医療機関を受診し、渡航歴を申告するよう呼びかけた。」というニュースが流れます。当初、中国保健当局は「感染は地域で広がっておらずヒトヒト感染のリスクは比較的低い」としていました。この2週間後、武漢は1月23日から2か月半にわたって封鎖されることになるわけですが、ちょうど春節の時期、すでに多くの人々が国内外に大移動していました。この後、一気に世界中に新型コロナウイルス「COVID-19」が広まることになりました。(前年12月にはすでにイタリア北部でウイルス感染が始まっていた可能性があるとの報告もある)

現在(9月24日時点)、世界の累計感染者は3100万人超、死亡者約97万人となっていますが、まだまだ増えると予想されています。ここまで感染が広がった原因として、このウイルスが持つ致死率が比較的低く、過去にない「潜伏性の高さ」という特徴があげられています。また当初、中国当局の情報開示が不十分だったこと、緊急事態宣言などが後手に

回ったWHO(世界保健機構)の対応、各国の感染症対応能力なども要因として指摘されています。

人類の歴史は感染症との闘いの歴史でもあります。狩猟から農耕中心の社会に変化し、定住して人口が増えるとともに野生動物を家畜化することによって、“家畜に起源を持つ病原体は、増加した人口という格好の土壌を得て、ヒト社会に定着していった”(山本太郎『感染症と文明』岩波新書)といます。また交通が発達して人の往来が増えることにより感染症が世界中に拡散することになりました。ペストの起源は中国にあるそうですが、中世ヨーロッパにおける大流行ではヨーロッパの人口の実に3分の1が失われたといますし、20世紀初頭に世界的に大流行したスペイン風邪(新型インフルエンザ)では5000万人以上が亡くなりました。

20世紀半ばには医学の発達により感染症への対応が目覚ましい進歩を遂げました。ペニシリンをはじめとする抗生物質やワクチンが次々に開発され感染症の治療、予防が可能になってきたからです。1958年、天然痘根絶決議がWHO総会で決議され、関係者の大変な苦勞の末、1980年、WHOは地上から天然痘が根絶されたと宣言しました。東西冷戦下において、国籍、宗教、人種などの違いを超えて天然痘根絶に向かって一致協力してそれ

を成し遂げたことは特筆すべき成果です。しかし感染症との闘いは終わることなく今も続いています。今回の新型コロナウイルスのような新種のウイルスが出現しますし、地域に封じ込められていた感染症が開発によって広がったり、地球温暖化の影響で感染地域が拡大すること、凍土によって閉じ込められていた感染症が再び拡大することもあると言われています。迅速に情報を共有し、結束して対応に当たらなければ感染症の被害を食い止めることはできないでしょう。

ところが今回の新型コロナウイルスの場合は逆に対立、分断を加速してしまいました。米中に代表される国家間の対立、人種間の対立、富裕層と貧困層の対立等々、表面化していなかったリスクが顕在化するとともに、トレンドが一気に加速して世界中に分断が広がっています。分断をおおる一部のリーダーは自らの立場を強化するために感染症を利用しているようにも見えます。これ以上犠牲者を増やさないため、また経済活動を正常化するためにも各国がちぐはぐな対応に終始することなく、WHOを中心に結束して感染症と戦って行かなければならないと思います。

今回のコロナ禍では日本の弱点が浮き彫りになりました。特にIT化、デジタル化の遅れです。以前からこれに起因する日本の生産性の低さが指摘されてきました。今年の世界競争力ランキングでは調査対象63か国中、34位と過去最低を記録しましたが、中でもデジタル技術は62位という低さです。今回、行政の電子化の遅れは新型コロナウイルス対策の大きな障害となりました。省庁間、中央と地方自治体のシステムがバラバラで情報がつながらないのです。情報がデジタルでつながっていかなければ、その分断しているところに人が介在せざるを得ず、ITのメリットは生かされません。政府が提唱する「Society5.0」への取組は重要ですが、それ以前に情報をデジタルでつなげなければならぬと思うので

す。そのためには「標準化」が必要です。この「標準化」はそうやすやすとは進みません。様々な障害や抵抗があります。法的な制約やIT人材の不足の問題がありますし、「標準化」のためにはこれまでの仕事のやり方を変える必要があります。7月に閣議決定された骨太の方針では政府のIT・デジタル化が最優先課題として位置づけられました。今から20年近く前の2001年にはe-JAPAN戦略が発表され、“5年以内に世界最先端のIT国家を目指す”とされていたはずですが。これまでのIT化施策のどこに問題があったのかを十分検証したうえで、今度こそ本気で取り組んでほしいと思います。

日本でIT化が遅々として進まない原因の一つとして国民のITに関するスキル、いわゆるITリテラシーの不足・欠如をあげることができます。有能な技術者でもITは苦手という人が少なからずいます。学校や企業でコンピューターに触れる機会が少なく、系統だった教育を受ける機会が少なかったことがITに対する苦手意識を生んでしまったのではないかと思います。

経済協力開発機構（OECD）が進めている15歳児を対象にした学習到達度調査（PISA）2018年版によれば、日本は学校の授業におけるデジタル機器の利用時間が短く、OECD加盟国中最下位です。「利用しない」と答えた生徒の割合は約80%にも及びます。この調査結果に対して文部科学省は「学校のICT環境整備の加速化に向けた取組の推進；一人一台の学習用コンピューター、学校内全教室の通信ネットワークの整備推進」としていますが、同様の文言はすでに15年前の『IT政策パッケージ2005』にも書かれています。予算が不十分だったのか、推進体制に問題があったのか…十分に検証してほしいところです。これからの時代、日本が世界と伍してゆくために国民のITリテラシーの向上は必要不可欠です。IT教育、ITを活用した教育が継続的

に行われる仕組みを作ってほしいと思います。またコロナ禍で大学の授業はオンラインで行われていますが、積極的に活用しているとはいいがたい状況のようです。欧米ではインターネットで学べる「大規模公開オンライン講座」が普及し、学生だけではなく社会人を含め多くの受講者を集めていると言います。ITの積極活用で大学も自ら改革に取り組んでほしいと思います。

日本は教育に対する公的支出の割合が低いと言います。OECDの調査（2016年）では初等教育から高等教育の公的支出が国内総生産（GDP）に占める割合は日本が2.9%と35か国中最下位、OECD諸国平均は4.0%となっています。特に大学や専門学校などの高等教育で公的支出の割合が低い。教育支出の公私の負担割合を見ると、小学校から高校までは公的支出が92%とOECD平均（90%）を上回っていますが、高等教育では31%まで低下します。これはOECD平均（66%）を大きく下回っています。アンヘル・グリアOECD事務総長は次のように述べています。「若者が、予測不能で変化し続ける世界で生きていくために必要な知識と技能を身に付けることが、かつてないほど重要になっている。われわれは機会を拡大し、将来のスキルニーズへの橋渡しを強化して、あらゆる学生が社会で自分の場所を見つけ、その能力を最大限発揮できるようにしなければならない」。全く同感です。

野口研究所の状況について触れておきます。今回のコロナ禍をきっかけに在宅勤務のできる環境を整え、緊急事態宣言の間は所員全員を在宅勤務としました。また理事会や多人数の会議はweb会議を活用しましたし、システム上で承認・決済が可能となるようなワーク

フローもスタートしています。

研究面では「チーム研究」をスタートしました。これまでは一人一テーマとなっていました。一人ですることには限りがあります。なるべく各研究員の得意分野を生かす形で研究テーマをグルーピングし、共通の目標を設定して研究に取り組むことにしました。この結果、4つの研究テーマに絞り込むことができました。また研究員には研究成果について論文の投稿や特許出願のような「アウトプット」だけではなく、研究開発成果の本質的ないし内容的側面を表す「アウトカム」を十分考慮して研究に取り組んで行くように求めています。

一方、当研究所の収入の大半を占める資産運用については今回のコロナ禍で一時的に資産が大きく目減りする事態となりました。その後の為替水準の回復により改善しつつありますが、しばらくは厳しい運営を強いられるものと考えています。

最後になりましたが、野口遵研究助成事業は創設10周年を迎えました。昨年9月にこれを記念して10周年記念講演会（講演会副題“若き挑戦者ととともに化学の力で未来を動かそう”）を開催いたしました。基調講演を選考委員の旭化成（株）名誉フェローの吉野彰氏に、また講演を5名の採択者の方をお願いしましたが、約150名の聴衆を集め盛会のうちに実施することができました。またこの講演会直後に吉野さんがノーベル化学賞を受賞され、講演者や聴衆の方々から多くのお祝いと喜びのご連絡をいただきました。

吉野さんの今後ますますのご活躍を祈念しています。

## 液-液相分離によるオートファジー制御

### Regulation of autophagy by liquid-liquid phase separation

公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 野田 展生  
Nobuo Noda

#### 要旨

オートファジーはリソソームを用いた細胞内分解系であり、余剰あるいは有害な自己成分の分解を通して細胞の恒常性維持に働いている。一方、液-液相分離は近年生命科学分野で注目を集めている現象であり、タンパク質などの生体分子を局所的に濃縮するメカニズムとして働くことで、様々な生理現象に関与している。最近我々は、液-液相分離がオートファジーの制御に中心的な役割を担うことを見出した。本稿では我々の研究成果を中心に、液-液相分離の視点を導入することで明らかになってきたオートファジーの分子機構を概説する。

#### オートファジー概論

真核細胞には分解に特化したオルガネラであるリソソーム（酵母や植物では液胞）が存在するが、そこに自己成分を運び、分解する現象をオートファジーと呼ぶ（図1左）。リソソームへの輸送はオートファゴソームと呼ばれるオルガネラが担っているが、オートファゴソームは分解の一サイクルごとに新生、分解される、いわば使い捨てのオルガネラである。オートファジーの特徴は、オートファゴソーム内に隔離できるものは原則すべて分解できる点であり、分解対象はタンパク質や核酸、脂質、糖鎖などの生体分子、ミトコンドリアや小胞体、核などのオルガネラ、液-液相分離で形成されるメンブレンレスオルガネ

ラ、そして細胞内に侵入した細菌まで多岐にわたる [1]。オートファゴソームに隔離されたものは原則すべてリソソームへと輸送され、分解を受けることから、オートファジーはメカニズム的に非選択的な分解機構であると長い間考えられてきた。しかし最近の研究により、オートファゴソーム新生過程において隔離する基質を選別する場合があることが明らかとなり、それは選択的オートファジーと呼ばれる。オートファジーは選択性を用いて多様な高次生理機能を担っており、その破綻は神経変性疾患やがんなどの重篤な疾病を引き起こす [1]。

オートファゴソームの新生過程は約20種類のAtgタンパク質が担っていることが、出芽酵母をモデル生物とした解析により明らかとなった。栄養飢餓でオートファジーが誘導されるとこれらAtgタンパク質は一ヶ所に集合し、オートファゴソーム形成場を構築する。そして主に小胞体から供給されたリン脂質を材料として用いることで、オートファゴソーム形成場においてオートファゴソーム新生が進行すると考えられている [2,3]。また選択的オートファジーでは、選択的オートファジー受容体が重要な役割を担う。受容体は特定の基質を認識するとともに、オートファゴソーム前駆体である隔離膜に局在するタンパク質Atg8と結合することで、基質を隔離膜に繫留し、選択的な隔離を促進すると考えられている [4]。

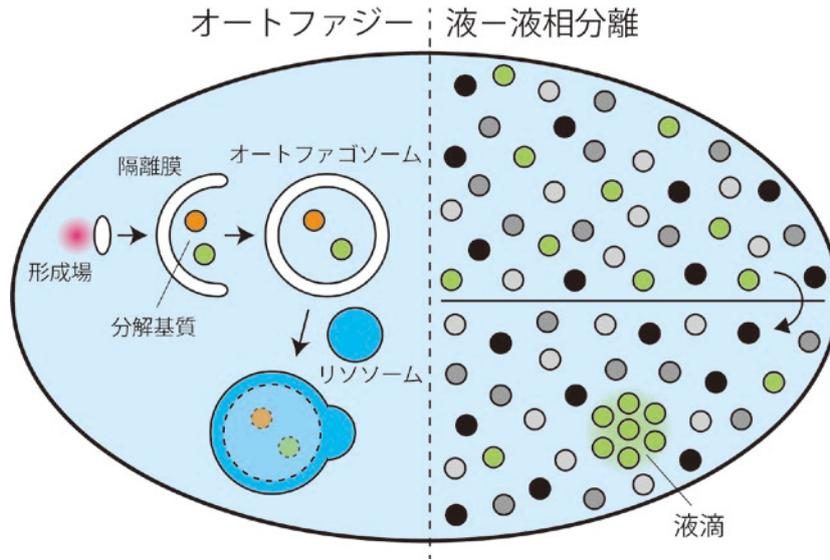


図1 オートファジーおよび細胞内相分離の模式図

左：オートファゴソーム形成場で隔離膜が作られ、隔離膜は伸展しながら分解基質を取り囲み、閉じてオートファゴソームとなる。オートファゴソームはリソソームと融合し、内容物は加水分解酵素の働きで分解される。

右：細胞質に分散していたタンパク質のうち特定のものが、液-液相分離により液滴へと濃縮される。

### 液-液相分離概論

液-液相分離とは1つの液相が2つ以上の液相へと分離する熱力学的現象であり、我々の生活でも水と油の分離現象としてしばしば観察される。2009年に細胞内における液-液相分離現象が報告されて以来、細胞内相分離は普遍的に生じる現象であり、多様な生理現象に深く関わっていることが明らかとなってきた [5,6]。細胞内相分離は、細胞質や核に均質に分散しているタンパク質や核酸が、環境の変化などに応じて新たな液相を形成する現象である (図1右)。新たに形成された液相には、特定のタンパク質や核酸が濃縮されることから、濃縮体 (condensate) と呼ばれ、液体の性質を持つことから液滴 (liquid droplet) とも呼ばれる (以降液滴と呼ぶ)。液滴は分子間の弱い多価相互作用により形成されると考えられており、特に天然変性タンパク質やRNAなどの構造のゆらぎの大きい分子がその形成に働く [7]。固体状の凝集体と異なり、液滴内ではタンパク質は運動性お

よび活性を保っており、分子の出入りも自由であることから、特定の酵素反応を促進する反応場として用いられる。また液滴は環境の変化に応じて速やかに形成と解消を繰り返すことが可能であり、ストレス応答機構としても重要な役割を担う。細胞内液滴はここ10年ほどの新しい概念であるが、200年以上前から存在が知られていた核小体が実にそれに該当するなど、古くから観察されてきた構造体である。オルガネラのような境界膜を持たないことからメンブレンレスオルガネラとも呼ばれ、様々な生理機能を担っている。そして最近になり、液-液相分離がオートファジーと密接に関係していることがわかってきた [8]。

### 液-液相分離によるオートファジー始動制御

上述のように、オートファジーが誘導されるとAtgタンパク質群が集積してオートファゴソーム形成場を構築する。しかし集積のメカニズムや、その結果形成されたオートファ

ゴソーム形成場がどのような実体であるのか、長らく不明であった。出芽酵母では、Atg1複合体がオートファゴソーム形成場の構築に働く [9]。栄養が豊富な条件下では、栄養センサーであるTORキナーゼ複合体が高活性型で存在し、天然変性タンパク質Atg13を直接リン酸化することでAtg1複合体の形成を阻害する。栄養飢餓でTORキナーゼの活性が阻害されると、複数のホスファターゼの働きでAtg13が脱リン酸化され、Atg13はAtg1およびAtg17と結合することでAtg1複合体を形成する [10]。さらにAtg13が持つAtg17分子同士を架橋する活性によって、Atg1複合体の高次会合が引き起こされる [11]。我々はこの過程でAtg1複合体が液-液相分離して液滴を形成することをin vitroの実験で見出した (図2) [12]。形成した液滴は互いに融合して球形になるなど液体の性質を示す。さらに酵母におけるオートファゴソーム形成場も液体の性質を示すこと、in vitroでAtg1複合体の相分離を阻害する変異がオートファゴソーム形成場の構築も阻害することから、オートファゴソーム形成場の実体はAtg1複合体が相分離した液滴であると考えられる。Atg1複合体液滴は下流のAtgタンパク質も濃縮する場として働き、すべての役者を揃えることでオートファゴソーム形成を促進すると

考えられる。

オートファゴソーム形成場が液滴であることの意義として、その可逆性が挙げられる。すなわち栄養の増減という環境の変化に応じて液滴は速やかに形成と解消を行うことが可能であり、オートファジーのon/offを厳密かつ迅速に制御できる。また液滴は酵素反応の場としての意義も持ち、オートファジーの進行に必須なAtg1のキナーゼ活性を自己リン酸化の亢進を通して上昇させる役割を持つ。これらに加え、オートファゴソームの形成過程において液滴でしか担えない、なにか重要な機能を持っている可能性も考えられるが、その解明は今後の課題である。

#### 液-液相分離によるオートファジー分解基質の選別

液-液相分離はオートファジーにおいても1つ重要な役割を担っている。オートファジーが特定のタンパク質を選択的に分解しようとする場合、細胞質に充填された無数のタンパク質 ( $10^8$ - $10^9$ ) の中からある特定のタンパク質だけ選び出し、オートファゴソーム内に隔離していくことは至難の業である。しかし液-液相分離によりあらかじめ特定のタンパク質を液滴内に濃縮しておけば、その選択的隔離は遥かに容易に行うこと

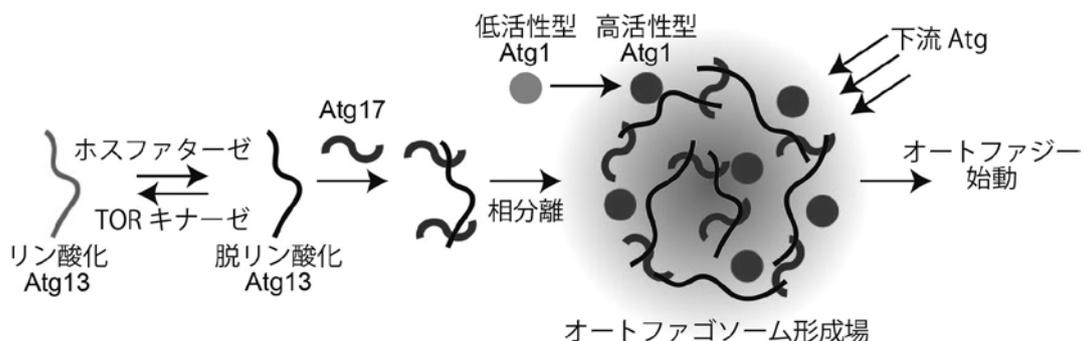


図2 相分離によるオートファゴソーム形成場の構築

脱リン酸化依存的にAtg13はAtg17を架橋するように結合し、相分離を誘導することでAtg1複合体液滴を形成する。液滴ではAtg1が活性型へと変換されるとともに、下流のAtgタンパク質が集められ、オートファジーが始動する。

が可能である。実際に、オートファジーはストレス顆粒やPGL顆粒、p62ボディなど相分離で形成された液滴を選択的に分解することが最近相次いで報告されている [8]。我々は出芽酵母において最初に発見されたタンパク質選択的オートファジーの系であるCvt経路に着目し、その解析を行った。Cvt経路では、細胞質で翻訳されたアミノペプチダーゼ I (Ape1) を選択的にオートファゴソーム内へと隔離し、液胞へと輸送する [13]。Ape1 はホモ12量体を形成して機能するペプチダーゼであるが、翻訳直後はプロペプチドが付加されており、プロペプチドの自己会合を通して12量体同士が繋がれて巨大会合体を形成する [14]。我々はApe1の会合体が実は液-液相分離で形成された液滴であることを突き止めた [15]。すなわちCvt経路は液滴選択的オートファジーの一種であることが明らかとなった。次に我々はApe1液滴をオートファゴソームがどのように選択的に隔離するのか、そのメカニズムの解析を進めた。Cvt経路にはAtg19と呼ばれる受容体タンパク質が必須であり、Atg19はApe1を特異的に認識するとともに隔離膜に局在するAtg8とも結合することで、Ape1を隔離膜に繫留する役割を果たす。Atg19によるApe1液滴の認識様式を蛍光顕微鏡で解析した結果、*in vitro*でも酵母内でもAtg19はApe1液滴の表面選択的な結合を示した。一方、Atg19のN末端領域欠損変異体の場合、Atg19はApe1液滴内部へと浸潤したことから、野生型Atg19にはApe1液滴内部に沈まない能力（浮性）が備わっていると考えられる。この浮性により、Atg19はApe1液滴と細胞質の界面に集まり、Ape1液滴表面を覆うことが明らかとなった。続いてApe1液滴の脂質膜内への隔離過程を*in vitro*で再構成した結果、Atg19とAtg8だけでApe1液滴は脂質膜内に選択的に取り込まれること、その際Atg19の浮性が重要であることが示された。すなわち液滴の選択的隔

離過程は、浮性を備えた受容体とAtg8のみで実行可能であることが明らかとなった (図3A) [15]。

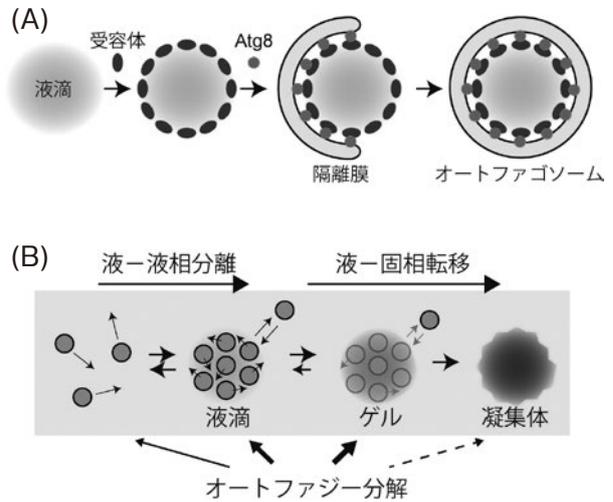


図3 液滴選択的オートファジーの分子機構

(A) 液滴選択的オートファジーの分子機構。

液滴表面を受容体が覆い、それに隔離膜上のAtg8が結合することで選択的な隔離が進行する。

(B) 液-液相分離で形成された液滴は液-固相転移によりゲルや凝集体へと変化する。

オートファジーは液滴やゲルの分解が得意であるが、凝集体の分解は不得手である。

#### 液-固相転移と疾患

液-液相分離で形成された液滴は、時間経過、翻訳後修飾、あるいは様々なストレスなどにより次第に流動性を失っていき、ゲル状態、そしてアミロイドのような不溶性の凝集体へと変化する現象（液-固相転移；老化や成熟化とも呼ばれる）が知られている (図3B) [16]。家族性の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子であるFUSやTDP43などは、神経細胞において液-液相分離し、液滴を形成することが知られている。これらのタンパク質は低複雑性領域という特徴的な配列を持っており、その領域を介して相分離するが、家族性ALSを引き起こす変異は低複

雑性領域に集中しており、液滴の流動性を失わせて凝集体へと変化させる [17]。すなわちALSの発症機構として、液滴の凝集体への変化、すなわち液-固相転移が重要な役割を担っていることが示唆された。では神経変性疾患の防御機構であるオートファジーは、変異で形成された凝集体の分解はできないのであろうか？我々はこの疑問に答えるため、Cvt経路をモデル系とした解析を行った。

Ape1のプロペプチド内のプロリン22番がロイシンに置換される変異 (P22L) は、Cvt経路を阻害することが知られていた。我々はApe1のP22L変異体が不溶性の凝集体を形成することを見出した。Atg19はこの凝集体の中では浮くことができず、Ape1と共凝集する。続いてApe1 P22L凝集体に対して *in vitro*再構成系を用いた解析を行った結果、Atg19およびAtg8が存在しても凝集体は脂質膜に隔離されなくなった。すなわちオートファゴソームにより選択的にタンパク質を隔離するためには、タンパク質は液滴である必要があり、固体化した凝集体は隔離されなくなることが明らかとなった [15]。このことは、神経細胞においても液滴の液-固相転移が進行してしまうとオートファジーによる除去が出来なくなることを示唆している。これまで神経変性疾患の治療薬としてオートファジー促進剤の可能性が議論されてきたが、単にオートファジーを促進するだけでは不十分であり、液-固相転移を抑制するような薬剤の開発も併せて行うことが重要になると考えられる。

#### おわりに

液-液相分離の視点を導入したオートファジー研究はまだ始まったばかりである。オートファゴソーム形成を液滴が担う本質的意義や、タンパク質の状態とオートファジーによる分解効率との詳細な相関関係など、興味深い課題が山積している。また液-液相分離や

液-固相転移の制御をターゲットとした創薬も世界的に始まったばかりである。神経変性疾患の多くははまだ良好な治療法が確立出来ていないが、今後これらターゲットとオートファジーを統合した創薬研究が創生、発展していくことで、全く新しい治療薬や予防薬の開発が進んでいくことを期待している。

#### 謝辞

本総説で紹介した研究内容は研究室のメンバー、そして多くの共同研究者とともに進めてきたものです。またJSPS 科学研究費補助金 (18H03989, 18H02099, 19H05707) およびJST CREST (JPMJCR13M7) の支援を受けました。この場を借りて深く感謝いたします。

#### 参考文献

1. Morishita, H., and Mizushima, N. (2019) Diverse Cellular Roles of Autophagy. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 35, 453-475
2. Noda, N. N., and Inagaki, F. (2015) Mechanisms of Autophagy. *Annu Rev Biophys* 44, 101-122
3. Osawa, T., Kotani, T., Kawaoka, T., Hirata, E., Suzuki, K., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., and Noda, N. N. (2019) Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 281-288
4. Noda, N. N., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2010) Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1379-1385
5. Brangwynne, C. P., Eckmann, C. R., Courson, D. S., Rybarska, A., Hoegge, C., Gharakhani, J., Julicher, F., and Hyman, A. A. (2009) Germline P granules are liquid droplets that localize by

- controlled dissolution/condensation. *Science* 324, 1729-1732
6. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., and Rosen, M. K. (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 285-298
  7. Han, T. W., Kato, M., Xie, S., Wu, L. C., Mirzaei, H., Pei, J., Chen, M., Xie, Y., Allen, J., Xiao, G., and McKnight, S. L. (2012) Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies. *Cell* 149, 768-779
  8. Noda, N. N., Wang, Z., and Zhang, H. (2020) Liquid-liquid phase separation in autophagy. *J. Cell Biol.* 219 e202004062
  9. Noda, N. N., and Fujioka, Y. (2015) Atg1 family kinases in autophagy initiation. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3083-3096
  10. Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y., and Noda, N. N. (2014) Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 513-521
  11. Yamamoto, H., Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Noshiro, D., Suzuki, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Ando, T., Noda, N. N., and Ohsumi, Y. (2016) The Intrinsically Disordered Protein Atg13 Mediates Supramolecular Assembly of Autophagy Initiation Complexes. *Dev. Cell* 38, 86-99
  12. Fujioka, Y., Alam, J. M., Noshiro, D., Mouri, K., Ando, T., Okada, Y., May, A. I., Knorr, R. L., Suzuki, K., Ohsumi, Y., and Noda, N. N. (2020) Phase separation organizes the site of autophagosome formation. *Nature* 578, 301-305
  13. Lynch-Day, M. A., and Klionsky, D. J. (2010) The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1359-1366
  14. Yamasaki, A., Watanabe, Y., Adachi, W., Suzuki, K., Matoba, K., Kirisako, H., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., Inagaki, F., and Noda, N. N. (2016) Structural Basis for Receptor-Mediated Selective Autophagy of Aminopeptidase I Aggregates. *Cell Rep.* 16, 19-27
  15. Yamasaki, A., Alam, J. M., Noshiro, D., Hirata, E., Fujioka, Y., Suzuki, K., Ohsumi, Y., and Noda, N. N. (2020) Liquidity Is a Critical Determinant for Selective Autophagy of Protein Condensates. *Mol. Cell* 77, 1163-1175
  16. Woodruff, J. B., Hyman, A. A., and Boke, E. (2018) Organization and Function of Non-dynamic Biomolecular Condensates. *Trends Biochem. Sci.* 43, 81-94
  17. Taylor, J. P., Brown, R. H., Jr., and Cleveland, D. W. (2016) Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 539, 197-206

# O-結合型糖鎖修飾によるNotchシグナル制御の生物化学論

Biological and chemical overview of regulation of Notch signaling

by O-linked glycosylation

名古屋大学大学院 医学系研究科 竹内 英之

Hideyuki TAKEUCHI

## 1. はじめに

Notchシグナルは、多細胞生物において細胞の運命決定を司る情報伝達経路の一つである [1-3]。発生はもとより、成体の多くの組織の幹細胞の維持に重要な機能を果たしている [4]。翻って、その異常はヒトの様々な疾患の原因となる [5,6]。

Notchシグナルは、シグナルを受容する細胞の表面に存在するI型膜タンパク質受容体Notchと、シグナルを送る細胞の表面に存在するI型膜タンパク質リガンドとの相互作用によって活性化する (図1A) [2,3,7]。他のシグナル伝達とは異なり、Notch活性化の基本的な機構は、増幅もなく、受容体は一回使い切りで、見かけ上シンプルである。しかしながら、Notchシグナルは様々なレベルで調節されており、かつ、調節因子の発現パターンは細胞や組織の種類に依存するため、Notchシグナルの制御機構は、実は非常に複雑で、完全には理解されていない。

本稿では、Notch受容体の機能調節に極めて重要な役割を果たす糖鎖修飾に関する生物化学的研究成果と、今後の課題について概説させて頂く。

## 2. 糖鎖修飾の構造的分類

Haltiwangerらは、2000年に、細胞外分泌タンパク質としてNotchシグナルを制御すると考えられていたFringeが、ゴルジ装置で、Notch細胞外ドメインに、29-36個連続して存

在する上皮増殖因子様 (EGF) リピートに付加したO-フコース単糖にN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を転移する糖転移酵素であることを Nature誌に報告した [8,9]。これが、糖鎖科学がNotchシグナルを研究対象とする端緒となった。以来、O-フコースのみならず、O-グルコース、そして細胞外O-GlcNAc糖鎖もNotchシグナルの制御に関与していることが明らかとなってきた (図1B) [10-15]。

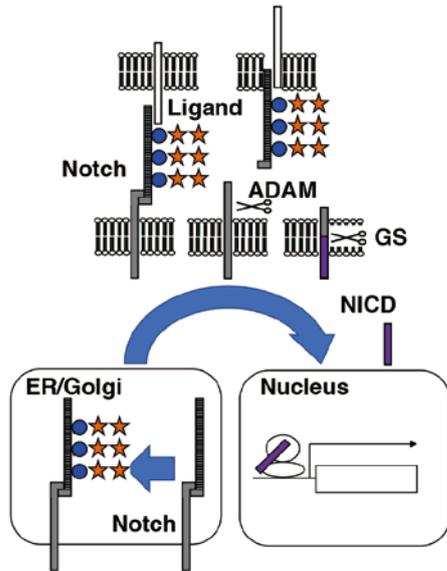
### 2-1. Notch O-結合型糖鎖修飾の異常と疾患

Notch受容体を修飾する糖転移酵素の変異は、ヒトの種々の遺伝性疾患の原因となる [14]。POFUT1やPOGLUT1の変異により、Dowling-Degos病、Lunatic FRINGEの変異により脊椎肋骨異骨症、EOGTの変異によりAdams-Oliver症候群が引き起こされる。

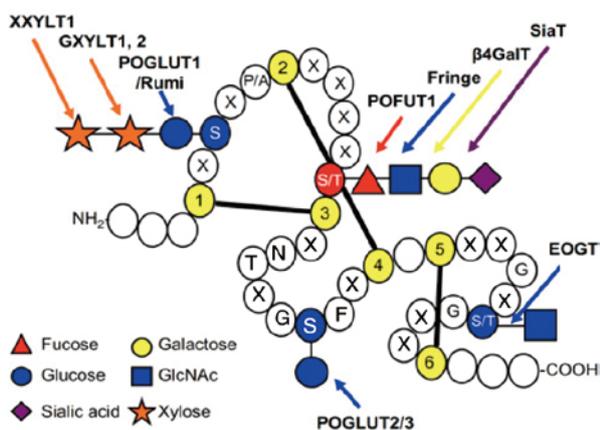
我々は最近、POGLUT1のp.D233E変異により、その酵素活性がおよそ90%低下し、新たなタイプの肢帯型筋ジストロフィーが生じることを報告した [16,17]。筋肉の恒常性の維持には、幹細胞である衛星細胞の筋線維への分化が中心的な役割を果たしている (図2A)。衛星細胞の増殖と分化は、自己の内的要因と、衛星細胞の存在している場である“Niche”由来の生物学的並びに物理的情報によって制御されている。Notchシグナルも衛星細胞の増殖と分化に重要であることが分かっているが、その詳細は明らかになっ

図1

A



B



ていない。Notch1とNotch2は衛星細胞におけるNotchシグナルを活性化するのに対し、Notch3は抑制する [18]。筋線維細胞表面のNotchリガンドDLL1は、衛星細胞上のNotchと相互作用し、Notchシグナルを活性化するが、加齢と共にDLL1の発現量は減少する (図2B) [19]。Notch1-3はいずれもO-グルコース糖鎖修飾を受けると推測される (図2C)。POGLUT1のp.D233E変異により、Notchの糖鎖修飾に質的な変化が起こり、衛星細胞のNotchシグナル情報処理能力が変化し、筋ジストロフィーの発症に至ると考えられる。

## 2-2. O-グルコース糖鎖修飾

1988年、池中らは、ウシ血液凝固因子VIIおよびIXのEGFリピートに付加されたO-グ

図1 Notch シグナルの活性化の模式図

(A) Notch受容体はシグナルを受け取る細胞に発現し、小胞体とゴルジ装置で糖鎖修飾を受ける。細胞表面に発現したNotch受容体にリガンド (Ligand) が結合すると、NotchのADAM、そして、 $\gamma$ -セクレターゼ (GS) による膜内切断が起こり、切り出されたNotchの細胞内ドメイン (NICD) が核に移行し、これが転写調節因子と複合体を作り、下流の標的遺伝子の転写を活性化する。1985年にショウジョウバエで初めてクローニングされたNotch受容体をコードする遺伝子は、ショウジョウバエでは、1種類のみ存在する。マウスやヒトなど哺乳類では4遺伝子存在する [2,42]。一方、活性化リガンドは、ショウジョウバエではDelta とSerrateの2遺伝子であるが、哺乳類では、Delta-like ligand (DLL1)、DLL4、そして、SerrateのホモログであるJAGGED1とJAGGED2が存在する。

(B) 1つの上皮増殖因子様 (EGF) リピートは、およそ40アミノ酸からなり、6個のシステイン残基 (黄色) が保存されており、それらが決まったパターンで3本のジスルフィド結合を形成する。付加する糖鎖の位置と生合成を担う酵素を示した。O-グルコース糖鎖は、EGFリピートに保存されている6個のシステイン残基のうち、1番目と2番目の間のセリン残基 (コンセンサス配列はC1-X-S-X-(P/A)-C2、ここでXは任意のアミノ酸である) に付加される。O-グルコース単糖は、POGLUT1 (ショウジョウバエではrumi) によって付加される [25,27]。O-グルコース糖鎖は、GXYLT1およびGXYLT2によりキシロースが付加され (ショウジョウバエではShams) [43,44]、XXYLT1によりさらにキシロースが付加され、キシロースを末端にもつ直鎖三糖構造となる [45,46]。文献 [47] より改変。

図2

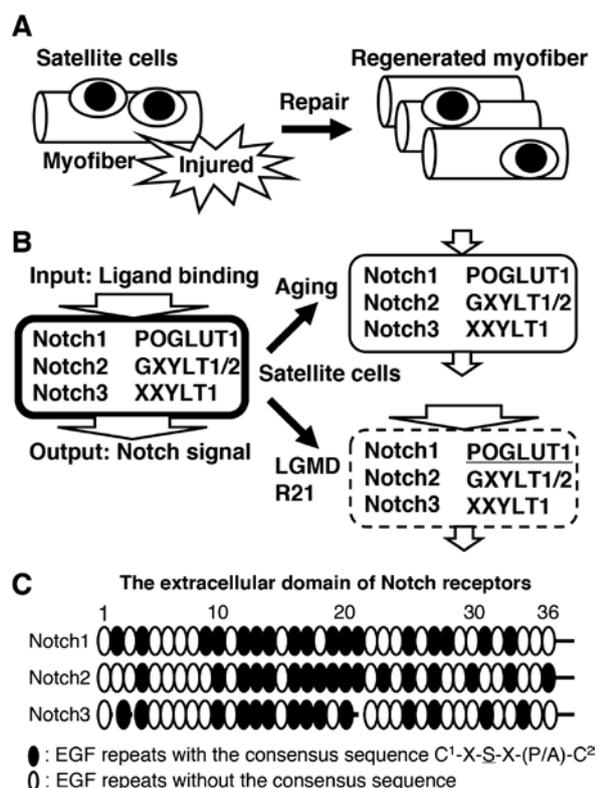


図2 筋衛星細胞とPOGLUT1 p.D233E変異による筋ジストロフィー

- (A) 筋肉の幹細胞である衛星細胞 (Satellite cells) による筋再生の模式図。
- (B) 老化と肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) R21型における衛星細胞に発現するO-グルコース糖鎖修飾関連因子。
- (C) Notch1-3 の細胞外ドメインの模式図。

ルコース糖鎖を初めて報告した [20]。2000年には、Haltiwangerらが、O-グルコース糖鎖がNotch1にも存在していることを報告した [21]。我々は、最近、HEK293T細胞に発現させたNotch1とNotch2上のO-グルコース糖鎖の付加と伸長度を質量分析技術により半定量かつ網羅的に明らかにした [22]。面白いことに、コンセンサス配列からO-グルコース糖鎖の付加が予測されたEGFリピートには、ほぼ全てO-グルコース糖鎖の三糖構造が付加している一方で、キシロースによる伸長を受けないEGFリピートが存在した。また、我々の知る限り、これまで報告のなかったへ

キシロースによる伸長構造がNotch1の10番目のEGFリピートに存在していた。

*Poglut1*ノックアウトマウスは、体節形成や血管リモデリングの異常などのNotch様の表現型を呈し、胎生致死となる [23]。これは、O-グルコース糖鎖がNotchの完全な機能発揮に必須であることを強く示唆する。O-グルコース糖鎖の生理的役割に関する情報は比較的限られているが、Jafar-Nejadらは、*Poglut1*が肝臓の胆管形成に関与していることを報告している [23,24]。

### 3. 糖鎖と生合成糖転移酵素の立体構造解析

O-グルコース糖鎖の伸長に関わる3つの哺乳類のキシロース転移酵素は、POGLUT1およびPOFUT1と同様に、受容基質中のEGFが正しく折り畳まれている場合に高い活性を示す [25]。付加される $\alpha$ -結合のキシロースは、UDP- $\alpha$ -キシロースから転移される。つまり、キシロース転移酵素は結合保持型 (retaining) 酵素である。結合保持型糖転移酵素の触媒反応機構は完全には理解されていない。我々は、O-グルコース糖鎖修飾の開始を担うPOGLUT1、そして、終結を担うXXYLT1の立体構造を、それぞれ基質との複合体という形で解き重要な知見を得た [26]。

シヨウジョウバエのPOGLUT1であるRumiと受容基質EGFとの複合体の立体構造を示した (図3A) [27]。RumiはGT-B型の構造を有し、試験管内酵素活性から示唆されていた通り [25]、受容基質の「かたち」を厳密に認識していた。O-グルコースの付加するセリン53を含むコンセンサス配列中の個々のアミノ酸が水素結合などを介して相互作用していること、そして、一次構造上離れた位置に存在するチロシン69が、EGFが正しく折りたたまれることで活性中心近傍に位置し、Rumiのフェニルアラニン122と疎水性相互作用することにより認識されていた。このことがPOGLUT1/Rumiによる基質立体認

図3

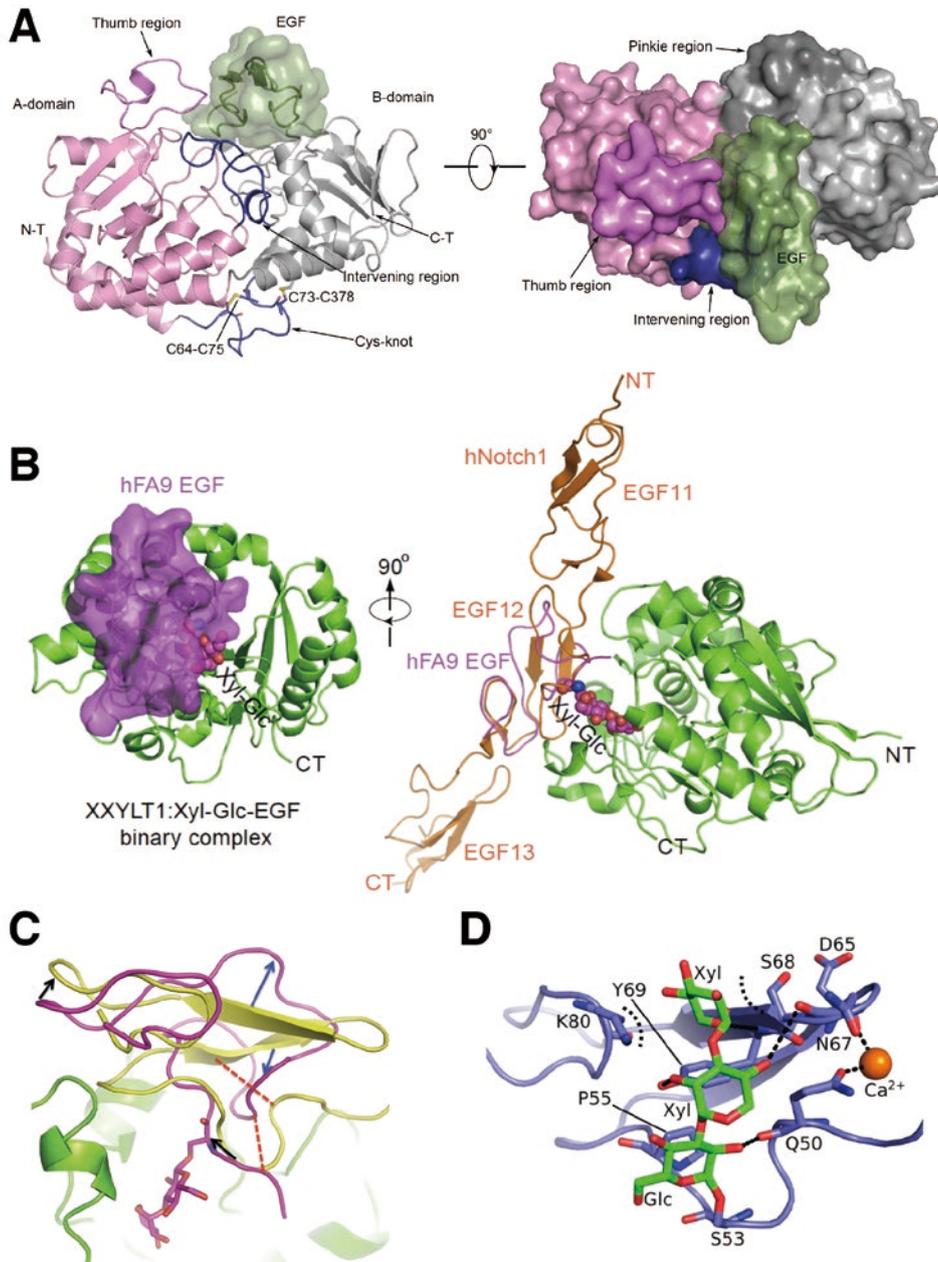


図3 O-グルコース糖鎖修飾関連分子構造ギャラリー

- (A) ショウジョウバエPOGLUT1/Rumiとヒト凝固因子IXの第一番目のEGFリピートタンパク質の複合体の構造。文献 [27] より。
- (B) マウスXXYL1とO-グルコース二糖の付加したEGFリピートタンパク質の複合体の構造。文献 [29] より。
- (C) XXYL1に結合した受容基質EGF (紫色)と通常のEGF (黄色)の構造の重ね合わせ。文献 [29] より。
- (D) Xyl-Xyl-Glc-の付加したヒト凝固因子IXのEGFリピートの結晶構造。文献 [34] より。

識の本質であると考えられた。のちに、ヒトPOGLUT1の結晶構造が解かれ、Rumiとよく似た構造を有していることが明らかとなっている [28]。

XXYL1とXyl-Glc二糖を予め付加したEGF受容基質の複合体の立体構造を図示した (図3B) [29]。XXYL1は、GT-A型の構造を有していた。非常に驚いたことに、受容

基質の糖鎖部分が酵素の活性中心に引き込まれ、アグリコン、すなわち、EGFポリペプチド部分のコンフォメーションが大きく変化していたのである (図3C)。しかし、その状態でもEGFの3本のジスルフィド結合は保たれていた。キシロース転移反応終了後にはEGFのコンフォメーションは、まるでバネのように元に戻ると考えられ、EGFリピートは構造的な可塑性を有していることが判明した。

さて、XXYLT1の触媒反応時、キシロースの $\alpha$ -結合はどのように保持されるのだろうか。当時、結合保持のメカニズムとして、酵素と基質が共有結合を介して中間体を生成する Double-displacement mechanismと S<sub>N</sub>i-like mechanismが提唱されていた。我々は、結晶中のXXYLT1が酵素活性を保持していることに気づき、供与基質UDP-キシロースを結晶に添加し、キシロース転移反応中の構造変化を視覚化することに成功した [29]。反応前のミカエリス複合体、キシロースが受容基質に転移される様子、そして、最終反応産物の構造を捉えたのである。一連の過程において、最も基質に近い所に位置するXXYLT1のグルタミン330は、基質と共有結合せず、供与基質と受容基質の両方と水素結合によって相互作用し、それらの位置関係を調節していた。以上より、Double-displacement mechanismは棄却され、S<sub>N</sub>i-like mechanismを支持する結果となった。

#### 4. Notch 糖鎖修飾の新たな分子機能

GlcNAc転移酵素Fringeによる修飾がリガンド結合を制御することはよく研究されており、Notchとリガンドとの複合体の結晶構造も解かれるなど、その詳細が明らかとなってきた [30-32]。さらに、フコースアナログによるNotchシグナル調節が可能であることも、ケミカルバイオロジー研究から実証されている [33]。

O-グルコース糖鎖がNotch受容体の活性化

を制御するメカニズムは明らかとなっていないが、その一端が見え始めてきている。O-グルコース三糖の付加したEGFリピートの結晶構造を解くと、糖鎖がEGFのチロシン69とプロリン55で形成される疎水表面と分子内相互作用し安定に存在していた (図3D) [34]。これらのアミノ酸残基がPOGLUT1による基質認識にも重要である点は、面白い事実である。また、O-グルコース糖鎖修飾を受けたEGFリピートは、糖鎖修飾のないものより、還元剤による変性を受けにくい。つまり、O-グルコース糖鎖修飾はEGFリピートの構造を安定化する [34]。

O-グルコース糖鎖修飾は小胞体で起こること、小胞体はタンパク質の品質管理を担う細胞内オルガネラであること、そして、O-グルコース糖鎖修飾が正しく折りたたまれたEGFリピートのみを選択的に起こり、Notchをフォールディングという観点から仕分け、その構造を安定化することから、O-グルコース糖鎖修飾はNotchタンパク質の品質管理を通じて細胞表面発現の調節に寄与すると考えられる。この作用はO-フコースやO-GlcNAcにも共通しているようである。実際、POGLUT1を欠損させるとNOTCH1の細胞表面発現が50%程度減少し、さらにPOFUT1を欠損させると、ほぼ消失した [34,35]。

#### 5. 今後の課題と展望

ショウジョウバエのNotch変異体は100年以上前に同定されている。最近、Notchシグナルの異常の、筋ジストロフィーや関節リウマチなど、新たな病態との関連を示す報告が相次いでいる [16,17,36]。大脳形成に関与するNOTCH2NL遺伝子がヒト特異的に存在していることは、生物進化との関連を想起させる [37,38]。さらに、分子切断を受け、シグナルを伝えるというNotchのユニークな特性は、CAR-T免疫療法への合成生物学的応

用も検討されている [39,40]。したがって、Notchシグナルの完全理解は、今なお、生命科学の中心的課題の一つとなっている。

糖鎖修飾によるNotch受容体の活性化制御は、ほぼ全てのコンテキストにおいて重要であると考えられる。その分子機構は、おそらく1種類ではない。Notchタンパク質のフォールディングや安定性など、いわゆるプロテオスタシスへの関与、また、Notchとリガンドとの相互作用への関与が証拠として提出されている [14,26,35]。さらに、糖鎖によるEGFリピートの構造安定化作用や、POGLUT1変異体が温度感受性のNotch表現型を示すことを考慮すると、最新の研究で明らかになりつつある、リガンド結合とADAMによる分子切断の間の過程におけるNotchの物理学的性質、つまりPulling force生成や細胞外ドメインの構造変化を伴うキャッチボンド機構への関与もあるかもしれない [12,31,41]。ゆえに、分野横断的な研究の推進が望まれる。最後に、技術的な課題として、現状、Notch糖鎖修飾は質量分析計を用いた解析が主流となっている。今後、質量分析技術の鋭敏化だけでなく、生体内Notchの糖鎖修飾を捉える新たな技術が開発されれば、Notch糖鎖修飾に関する研究は、より多くの研究者の参画が可能となり、飛躍的に進展していくものと思われる。

## 謝辞

貴重な寄稿の機会を下さった天野純子先生に深謝致します。本稿で紹介した研究成果の一部は科研費基盤研究 (JP19H03176) の支援によるものです。本稿の推敲に貢献してくれた浦田悠輔君、齊木颯君に感謝します。

## 参考文献

1. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776
2. Kopan, R., and Ilagan, M. X. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216-233
3. Bray, S. J. (2016) Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 722-735
4. Siebel, C., and Lendahl, U. (2017) Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev* 97, 1235-1294
5. Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J., and Aifantis, I. (2014) From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell* 25, 318-334
6. Aster, J. C., Pear, W. S., and Blacklow, S. C. (2017) The Varied Roles of Notch in Cancer. *Annu Rev Pathol* 12, 245-275
7. Fortini, M. E. (2009) Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell* 16, 633-647
8. Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S., and Vogt, T. F. (2000) Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 406, 369-375
9. Brückner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000) Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411-415
10. Haines, N., and Irvine, K. D. (2003) Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 786-797
11. Stanley, P., and Okajima, T. (2010) Roles of glycosylation in Notch signaling. *Curr Top Dev Biol* 92, 131-164
12. Takeuchi, H., and Haltiwanger, R. S. (2010) Role of glycosylation of Notch in

- development. *Semin Cell Dev Biol* 21, 638-645
13. Varshney, S., and Stanley, P. (2018) Multiple roles for O-glycans in Notch signalling. *FEBS Lett* 592, 3819-3834
  14. Urata, Y., and Takeuchi, H. (2020) Effects of Notch glycosylation on health and diseases. *Dev Growth Differ* 62, 35-48
  15. Pandey, A., Niknejad, N., and Jafar-Nejad, H. (2020) Multifaceted regulation of Notch signaling by glycosylation. *Glycobiology* doi:10.1093/glycob/cwaa049.
  16. Servián-Morilla, E., Takeuchi, H., Lee, T. V., Clarimon, J., Mavillard, F., Area-Gómez, E., Rivas, E., Nieto-González, J. L., Rivero, M. C., Cabrera-Serrano, M., Gómez-Sánchez, L., Martínez-López, J. A., Estrada, B., Márquez, C., Morgado, Y., Suárez-Calvet, X., Pita, G., Bigot, A., Gallardo, E., Fernández-Chacón, R., Hirano, M., Haltiwanger, R. S., Jafar-Nejad, H., and Paradas, C. (2016) A POGlut1 mutation causes a muscular dystrophy with reduced Notch signaling and satellite cell loss. *EMBO Mol Med* 8, 1289-1309
  17. Servián-Morilla, E., Cabrera-Serrano, M., Johnson, K., Pandey, A., Ito, A., Rivas, E., Chamova, T., Muelas, N., Mongini, T., Nafissi, S., Claeys, K. G., Grewal, R. P., Takeuchi, M., Hao, H., Bönnemann, C., Lopes Abath Neto, O., Medne, L., Brandsema, J., Töpf, A., Taneva, A., Vilchez, J. J., Tournev, I., Haltiwanger, R. S., Takeuchi, H., Jafar-Nejad, H., Straub, V., and Paradas, C. (2020) POGlut1 biallelic mutations cause myopathy with reduced satellite cells,  $\alpha$ -dystroglycan hypoglycosylation and a distinctive radiological pattern. *Acta Neuropathol* 139, 565-582
  18. Fujimaki, S., Seko, D., Kitajima, Y., Yoshioka, K., Tsuchiya, Y., Masuda, S., and Ono, Y. (2018) Notch1 and Notch2 Coordinately Regulate Stem Cell Function in the Quiescent and Activated States of Muscle Satellite Cells. *Stem Cells* 36, 278-285
  19. Conboy, I. M., Conboy, M. J., Smythe, G. M., and Rando, T. A. (2003) Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302, 1575-1577
  20. Hase, S., Kawabata, S., Nishimura, H., Takeya, H., Sueyoshi, T., Miyata, T., Iwanaga, S., Takao, T., Shimonishi, Y., and Ikenaka, T. (1988) A new trisaccharide sugar chain linked to a serine residue in bovine blood coagulation factors VII and IX. *J Biochem* 104, 867-868
  21. Moloney, D. J., Shair, L. H., Lu, F. M., Xia, J., Locke, R., Matta, K. L., and Haltiwanger, R. S. (2000) Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem* 275, 9604-9611
  22. Alam, S. M. D., Tsukamoto, Y., Ogawa, M., Senoo, Y., Ikeda, K., Tashima, Y., Takeuchi, H., and Okajima, T. (2020) -Glycans on EGF domain-specific. *J Biol Chem* 295, 8560-8574
  23. Fernandez-Valdivia, R., Takeuchi, H., Samarghandi, A., Lopez, M., Leonardi, J., Haltiwanger, R. S., and Jafar-Nejad, H. (2011) Regulation of mammalian Notch signaling and embryonic development

- by the protein O-glucosyltransferase Rumi. *Development* 138, 1925-1934
24. Thakurdas, S. M., Lopez, M. F., Kakuda, S., Fernandez-Valdivia, R., Zarrin-Khameh, N., Haltiwanger, R. S., and Jafar-Nejad, H. (2016) Jagged1 heterozygosity in mice results in a congenital cholangiopathy which is reversed by concomitant deletion of one copy of Poglut1 (Rumi). *Hepatology* 63, 550-565
25. Takeuchi, H., Kantharia, J., Sethi, M. K., Bakker, H., and Haltiwanger, R. S. (2012) Site-specific O-glucosylation of the epidermal growth factor-like (EGF) repeats of notch: efficiency of glycosylation is affected by proper folding and amino acid sequence of individual EGF repeats. *J Biol Chem* 287, 33934-33944
26. Yu, H., and Takeuchi, H. (2019) Protein O-glucosylation: another essential role of glucose in biology. *Curr Opin Struct Biol* 56, 64-71
27. Yu, H., Takeuchi, H., Takeuchi, M., Liu, Q., Kantharia, J., Haltiwanger, R. S., and Li, H. (2016) Structural analysis of Notch-regulating Rumi reveals basis for pathogenic mutations. *Nat Chem Biol* 12, 735-740
28. Li, Z., Fischer, M., Satkunarajah, M., Zhou, D., Withers, S. G., and Rini, J. M. (2017) Structural basis of Notch O-glucosylation and O-xylosylation by mammalian protein-O-glucosyltransferase 1 (POGLUT1). *Nat Commun* 8, 185
29. Yu, H., Takeuchi, M., LeBarron, J., Kantharia, J., London, E., Bakker, H., Haltiwanger, R. S., Li, H., and Takeuchi, H. (2015) Notch-modifying xylosyltransferase structures support an SNI-like retaining mechanism. *Nat Chem Biol* 11, 847-854
30. Luca, V. C., Jude, K. M., Pierce, N. W., Nachury, M. V., Fischer, S., and Garcia, K. C. (2015) Structural biology. Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4. *Science* 347, 847-853
31. Luca, V. C., Kim, B. C., Ge, C., Kakuda, S., Wu, D., Roein-Peikar, M., Haltiwanger, R. S., Zhu, C., Ha, T., and Garcia, K. C. (2017) Notch-Jagged complex structure implicates a catch bond in tuning ligand sensitivity. *Science* 355, 1320-1324
32. Kakuda, S., and Haltiwanger, R. S. (2017) Deciphering the Fringe-Mediated Notch Code: Identification of Activating and Inhibiting Sites Allowing Discrimination between Ligands. *Dev Cell* 40, 193-201
33. Schneider, M., Kumar, V., Nordstrøm, L. U., Feng, L., Takeuchi, H., Hao, H., Luca, V. C., Garcia, K. C., Stanley, P., Wu, P., and Haltiwanger, R. S. (2018) Inhibition of Delta-induced Notch signaling using fucose analogs. *Nat Chem Biol* 14, 65-71
34. Takeuchi, H., Yu, H., Hao, H., Takeuchi, M., Ito, A., Li, H., and Haltiwanger, R. S. (2017) O-Glycosylation modulates the stability of epidermal growth factor-like repeats and thereby regulates Notch trafficking. *J Biol Chem* 292, 15964-15973
35. Ogawa, M., Tashima, Y., Sakaguchi, Y., Takeuchi, H., and Okajima, T. (2020) Contribution of extracellular O-GlcNAc to the stability of folded epidermal growth factor-like domains and Notch1 trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 526, 184-190
36. Wei, K., Korsunsky, I., Marshall, J. L.,

- Gao, A., Watts, G. F. M., Major, T., Croft, A. P., Watts, J., Blazar, P. E., Lange, J. K., Thornhill, T. S., Filer, A., Raza, K., Donlin, L. T., Siebel, C. W., Buckley, C. D., Raychaudhuri, S., Brenner, M. B., and Consortium, A. M. P. R. A. S. L. E. A. R. S. (2020) Notch signalling drives synovial fibroblast identity and arthritis pathology. *Nature* 582, 259-264
37. Suzuki, I. K., Gacquer, D., Van Heurck, R., Kumar, D., Wojno, M., Bilheu, A., Herpoel, A., Lambert, N., Cheron, J., Polleux, F., Detours, V., and Vanderhaeghen, P. (2018) Human-Specific NOTCH2NL Genes Expand Cortical Neurogenesis through Delta/Notch Regulation. *Cell* 173, 1370-1384. e1316
38. Fiddes, I. T., Lodewijk, G. A., Mooring, M., Bosworth, C. M., Ewing, A. D., Mantalas, G. L., Novak, A. M., van den Bout, A., Bishara, A., Rosenkrantz, J. L., Lorig-Roach, R., Field, A. R., Haeussler, M., Russo, L., Bhaduri, A., Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Dougherty, M. L., Nuttle, X., Addor, M. C., Zwolinski, S., Katzman, S., Kriegstein, A., Eichler, E. E., Salama, S. R., Jacobs, F. M. J., and Haussler, D. (2018) Human-Specific NOTCH2NL Genes Affect Notch Signaling and Cortical Neurogenesis. *Cell* 173, 1356-1369. e1322
39. Morsut, L., Roybal, K. T., Xiong, X., Gordley, R. M., Coyle, S. M., Thomson, M., and Lim, W. A. (2016) Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell* 164, 780-791
40. Roybal, K. T., Williams, J. Z., Morsut, L., Rupp, L. J., Kolinko, I., Choe, J. H., Walker, W. J., McNally, K. A., and Lim, W. A. (2016) Engineering T Cells with Customized Therapeutic Response Programs Using Synthetic Notch Receptors. *Cell* 167, 419-432. e416
41. Gordon, W. R., Zimmerman, B., He, L., Miles, L. J., Huang, J., Tiyanont, K., McArthur, D. G., Aster, J. C., Perrimon, N., Loparo, J. J., and Blacklow, S. C. (2015) Mechanical Allosteric Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. *Dev Cell* 33, 729-736
42. Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1985) Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 567-581
43. Sethi, M. K., Buettner, F. F., Krylov, V. B., Takeuchi, H., Nifantiev, N. E., Haltiwanger, R. S., Gerardy-Schahn, R., and Bakker, H. (2010) Identification of glycosyltransferase 8 family members as xylosyltransferases acting on O-glucosylated notch epidermal growth factor repeats. *J Biol Chem* 285, 1582-1586
44. Lee, T. V., Sethi, M. K., Leonardi, J., Rana, N. A., Buettner, F. F., Haltiwanger, R. S., Bakker, H., and Jafar-Nejad, H. (2013) Negative regulation of notch signaling by xylose. *PLoS Genet* 9, e1003547
45. Sethi, M. K., Buettner, F. F., Ashikov, A., Krylov, V. B., Takeuchi, H., Nifantiev, N. E., Haltiwanger, R. S., Gerardy-Schahn, R., and Bakker, H. (2012) Molecular cloning of a xylosyltransferase

- that transfers the second xylose to O-glucosylated epidermal growth factor repeats of notch. *J Biol Chem* 287, 2739-2748
46. Pandey, A., Li-Kroeger, D., Sethi, M. K., Lee, T. V., Buettner, F. F., Bakker, H., and Jafar-Nejad, H. (2018) Sensitized genetic backgrounds reveal differential roles for EGF repeat xylosyltransferases in Drosophila Notch signaling. *Glycobiology* 28, 849-859
47. Takeuchi, H., Schneider, M., Williamson, D. B., Ito, A., Takeuchi, M., Handford, P. A., and Haltiwanger, R. S. (2018) Two novel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E8395-E8402

# 糖水酸基保護基としてBoc基を用いた N-およびO-結合型糖ペプチドの効率的な合成

## Efficient Synthesis of Glycopeptides using Acid-Labile Boc Groups for the Protection of Carbohydrate hydroxyls

糖鎖有機化学研究室 水野 真盛  
Mamoru MIZUNO

### 1. はじめに

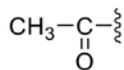
真核細胞のタンパク質の約50%が糖タンパク質であると推定されている [1]。糖タンパク質の機能と糖鎖部分の関係を解明するには、均質な糖鎖を持つ糖ペプチドや糖タンパク質の標品が不可欠である。特に、糖タンパク質の糖鎖の部位の機能や構造の解析には、その部分構造である糖ペプチドフラグメントの標品が重要となる。

糖ペプチドの合成は主に固相合成法で行われており、そのビルディングブロックとして糖アミノ酸が使用されている。固相合成に使用される糖アミノ酸の糖水酸基には合成中の副反応 (O-アシル化等) を避けるために「保護基」が使用される。糖ペプチド合成に用い

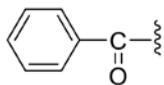
られる一般的な糖水酸基の保護基としてはアセチル (Ac) 基やベンゾイル (Bz) 基などのアシル型保護基 [2]、ベンジル (Bn) 基やメトキシベンジル (PMB) [3] およびメチルベンジル (MBn) [4] 基などのベンジル型保護基、トリエチルシリル (TES) 基 [5] および *tert*-ブチルジメチルシリル (TBDMS) 基 [6] 基などのシリル型保護基が挙げられる (図1)。

アシル型保護基の除去にはナトリウムメトキシドやヒドラジン等の塩基処理が必要となる。しかしペプチド部分の保護基 (構成する各アミノ酸の側鎖官能基の保護基) の除去、及び固相担体からの切り出しはトリフルオロ酢酸 (TFA) 等を用いる酸性条件下で行わ

#### アシル型保護基

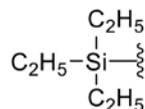


アセチル基  
(Ac)

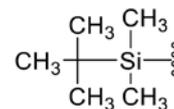


ベンゾイル基  
(Bz)

#### シリル型保護基

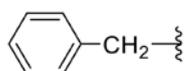


トリエチルシリル基  
(TES)

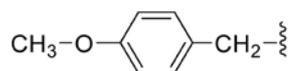


*tert*-ブチルジメチル  
シリル基 (TBDMS)

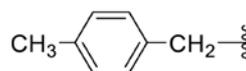
#### ベンジル型保護基



ベンジル基  
(Bn)



メトキシベンジル基  
(PMB)



メチルベンジル基  
(MBn)

図1 糖ペプチド合成に用いられる糖水酸基の保護基

れる。したがって糖水酸基保護基にアシル型保護基を用いた場合は最終的に、①酸処理によるペプチド部位の脱保護と脱樹脂、②塩基処理による糖部位の脱保護、の2種類の脱保護工程が必要となる。しかし、脱アシル化の

塩基性条件下では、図2に示すように、ペプチド部分のエピメリ化やO結合型糖ペプチドの $\beta$ 脱離など、様々な副反応を引き起こす可能性が懸念される [7]。

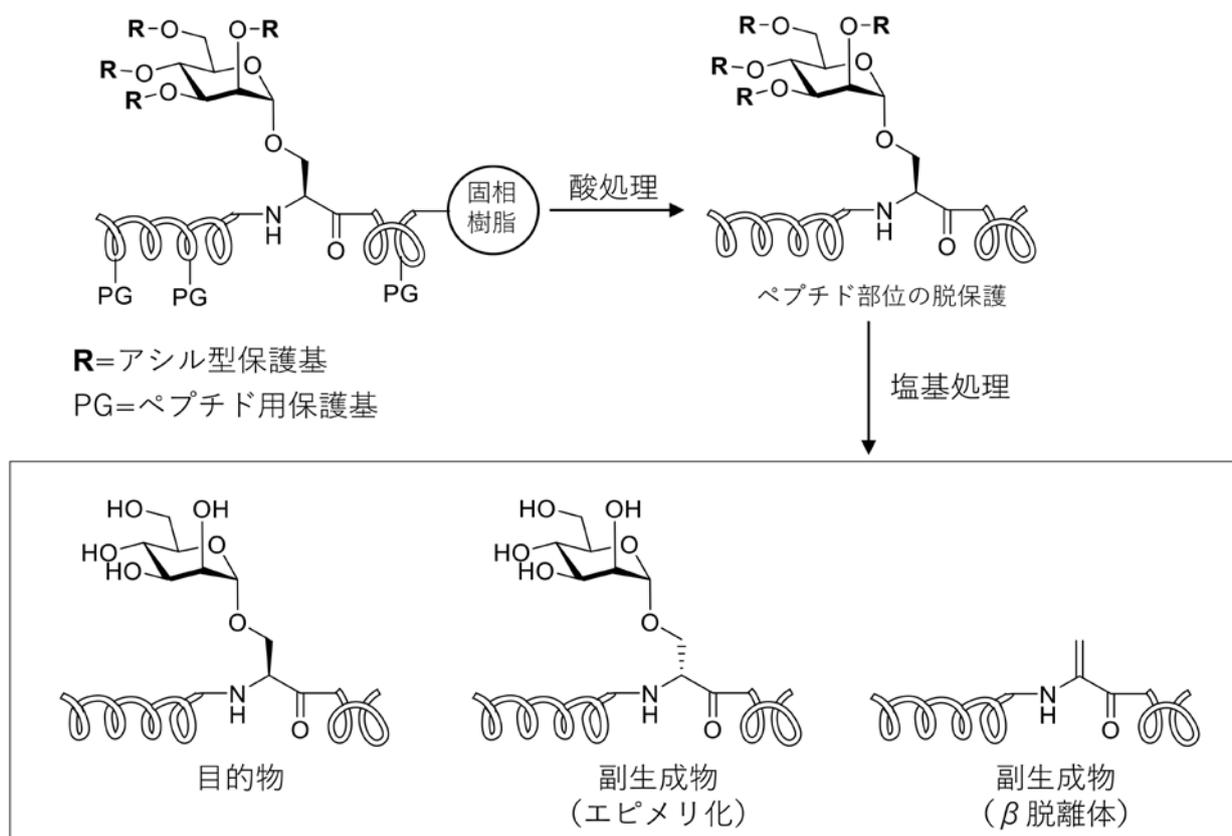


図2 従来の保護基の問題点 (アシル型保護基の場合)

酸性条件下で除去できるベンジル型やシリル型などの保護基を糖水酸基に用いれば、酸処理により糖部位の脱保護とペプチド部位の脱保護・脱樹脂が同時に行うことが可能であり、これらの保護基を用いた糖ペプチド合成が報告されている。しかし、これらベンジル型およびシリル型保護基は電子供与性の保護基であるため、フコースやシアル酸のような酸感受性グリコシド結合を有する糖 (主にデオキシ糖) に用いた場合は、脱保護時の酸性条件下でO-グリコシド結合が切断されてしまい糖部分の分解が起きてしまう (図3) [8]。そのために酸感受性糖残基を有する糖ペプチ

ド合成への使用には適していないといえる。

このような従来の糖ペプチド合成に用いられてきた保護基の問題点を解決するには、「酸処理で脱保護できる電子求引性の保護基」を用いればよいと考えた。そこで、著者らはペプチド合成の際のアミノ基の保護基として汎用されているtert-ブトキシカルボニル (Boc) 基を糖ペプチド合成の際に糖水酸基の保護基として用いることにした。Boc基はその導入試薬が安価でかつ容易に入手できることも魅力である。

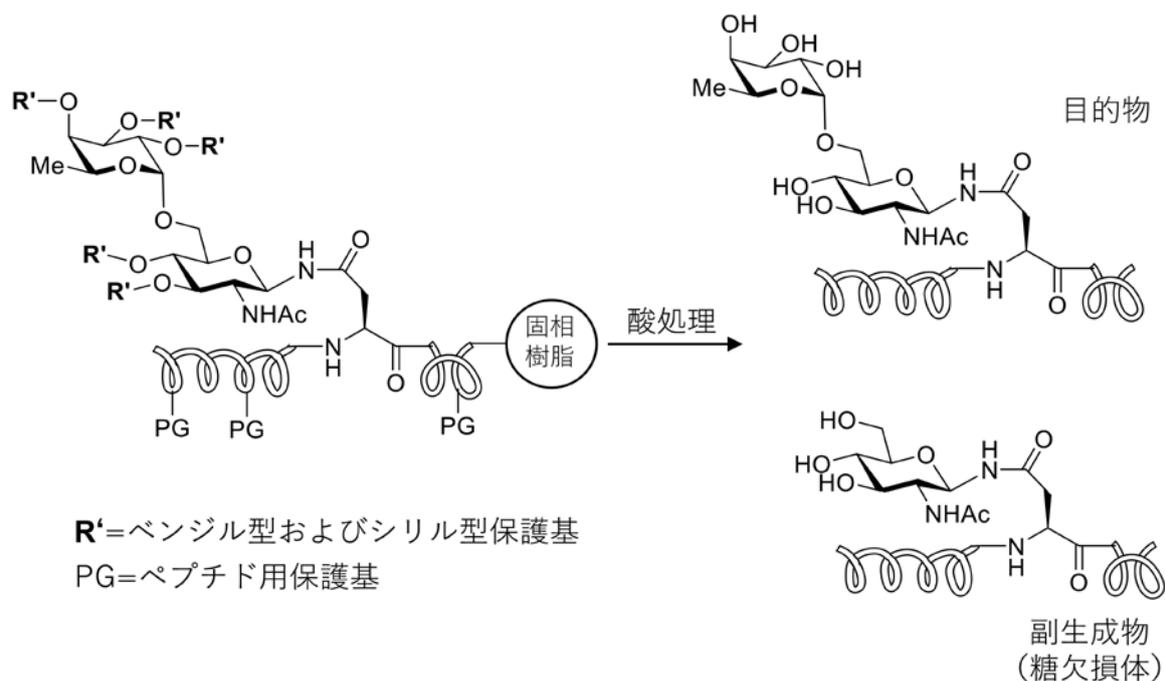


図3 従来の保護基の問題点 (ベンジル型およびシリル型保護基の場合)

## 2. N-結合型糖ペプチド合成への応用

まずは、N結合型糖ペプチドへの応用を目指し、そのビルディングブロックとなるGlcNAc-Asn誘導体の合成を試みた。GlcNAc-Asnの合成はGlcNAcアジドとアスパラギン酸とのシュタウディンガー反応で行うことから、水酸基をBoc基で保護されたGlcNAcアジドの合成を行うことにした。図4に示すように、GlcNAcアジド1にDMAP存在下でBoc<sub>2</sub>Oを反応させたところ、水酸基とアミド基にBoc基が導入された化合物2が得られた。しかし、アミド基に導入されたBoc基はその電子求引効果によりアミド結合を不安定化させ、NaOMeやヒドラジンなどの塩基性条件下でのアミド結合の開裂を誘発することが報告されている [12]。そこでFmoc固相合成法での脱Fmoc化条件である20%ピペリジン/DMF溶液中での化合物2の安定性について検討を行ったところ、2位のアセトアミド基のアミド結合が切断されて、グルコサミン誘導体3へと変換されることが明らかとなった。

そこで化合物2よりアセトアミド部位の

Boc基のみを選択的に除去する条件の検討を行った。種々条件検討を行った結果、Staffordらの報告 [9] を参考にしてアセトニトリル溶媒中で過塩素酸マグネシウムと反応させることでアセトアミドBoc基のみが選択的に除去された化合物4が得られた。念のため、化合物4を20%ピペリジン/DMFで処理したが24時間後でも全く安定であった。得られた化合物4をトリブチルホスフィンを用いてFmoc-Asp(OPfp)-OBnと縮合させた後、接触還元によりベンジルエステルを除去することで目的とするN結合型糖ペプチドのビルディングブロックとなるFmoc-Asn[β-GlcNAc(OBoc)<sub>3</sub>]-OH(5)を得ることができた (図4)。

次に、合成したビルディングブロック5を用いてN結合型糖ペプチドのモデル化合物として、ヒト免疫グロブリンGのトリプシン処理で生じる糖ペプチドフラグメント (Fc領域の293残基目グルタミン酸から301残基目アルギニンまでのアミノ酸9残基の構造) の合成を行った (図5)。アミノ酸及び糖アミノ酸の縮合はFmoc固相合成法で行った。縮

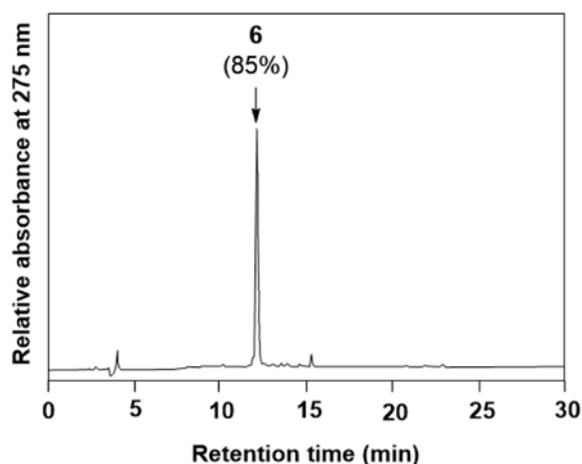
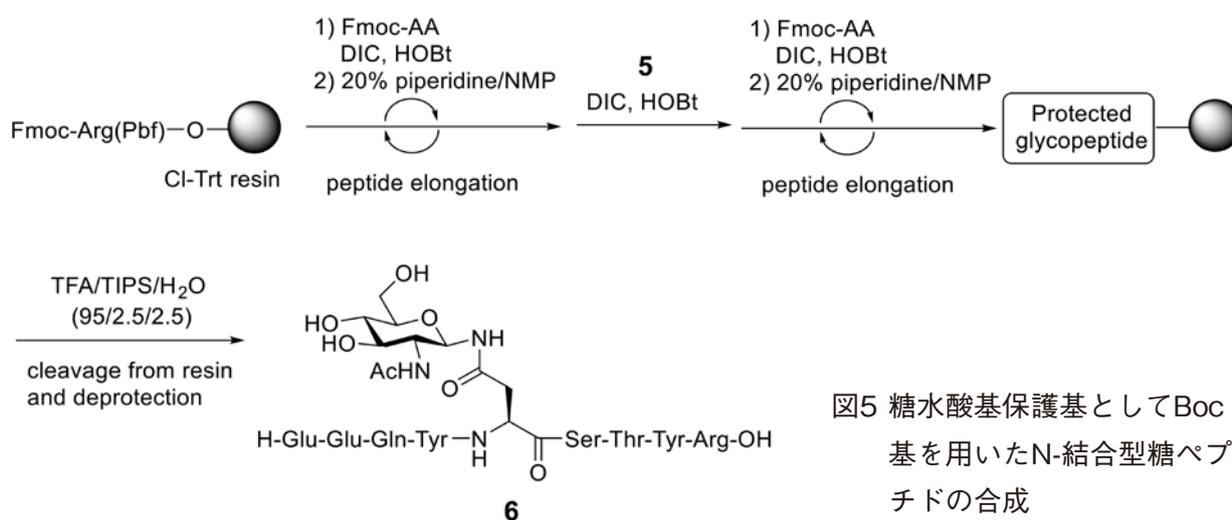
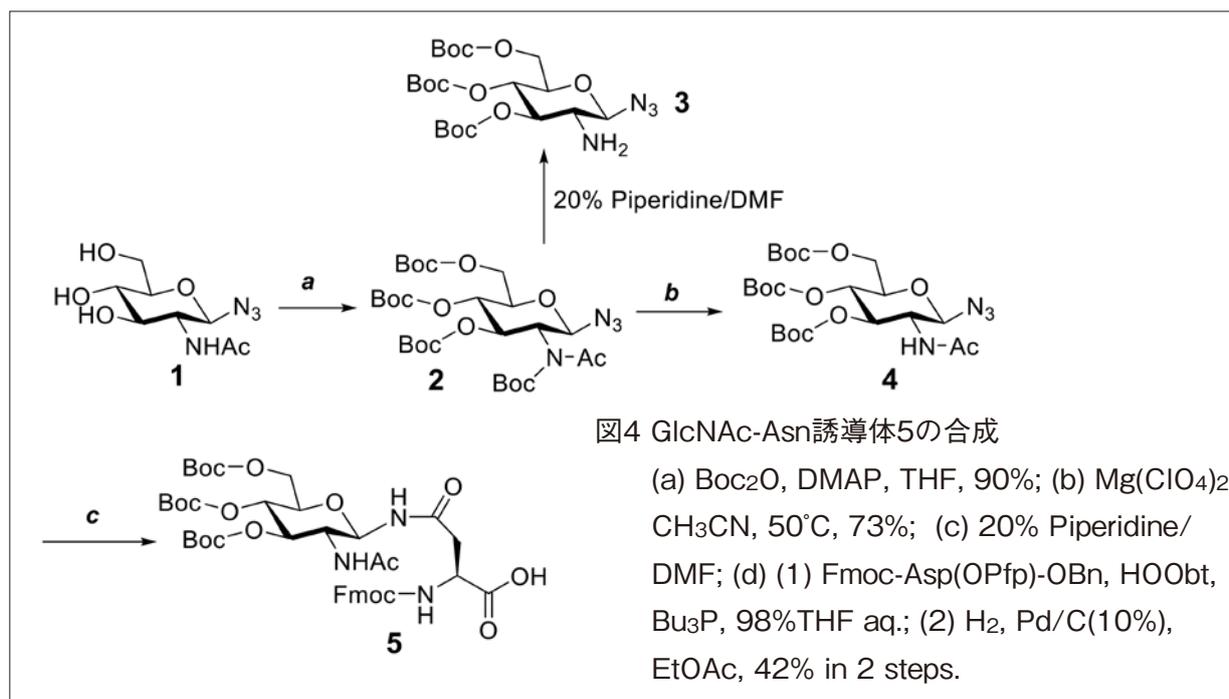


図6 N-結合型糖ペプチド6の粗生成物のHPLCチャート

合剤としてジイソプロピルカルボジイミド (DIC) および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)を、脱Fmoc化は20%ピペリジン/1-メチル-2-ピロリジニン(NMP)溶液を用いて行った。ペプチド鎖伸長後、得られた糖ペプチド樹脂を5%トリイソプロピルシラン (TIPS) と2.5%水を含むトリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液で処理し、糖部位とペプチド部位からすべての保護基の除去と固相樹脂からの切り出しを行った。得られた粗生成物のHPLC分析 (図6) を行い、メインピーク (図6中矢印) を分取し、質量分析を行った結果

も目的とする糖ペプチド**6**であることが確認された。また図6のHPLCチャートが示すように目的物が高純度かつ高収率（HPLC収率85%）で得られることも明らかとなった。

### 3. O-結合型糖ペプチドへの応用

N-結合型糖ペプチド合成の結果より、Boc基が糖ペプチド合成において糖水酸基の有用な保護であることが明らかとなった。そこでO-結合型糖ペプチド合成への展開についての検討も行った。O-結合型糖ペプチドのモデルとして筋ジストロフィーに深くかかわっている

$\alpha$ ジストログリカン ( $\alpha$ -DG) 中のマンノシルペプチドフラグメント ( $\alpha$ -DGの379残基目スレオニンから389残基目アルギニンまでのアミノ酸21残基の構造) を選択した。

まずビルディングブロックとなるMan-Thr誘導体の合成を行った (図7)。水酸基をトリメチルシリル (TMS) 基で保護したマンノース誘導体**7**をヨウ化トリメチルシリル (TMS-I) と反応させヨウ化マンノシド**8**を活性中間体として生成させた後、2,6-ジブチルピリジンとヨウ化テトラブチランモニウム (TBAI) の存在下でスレオニン

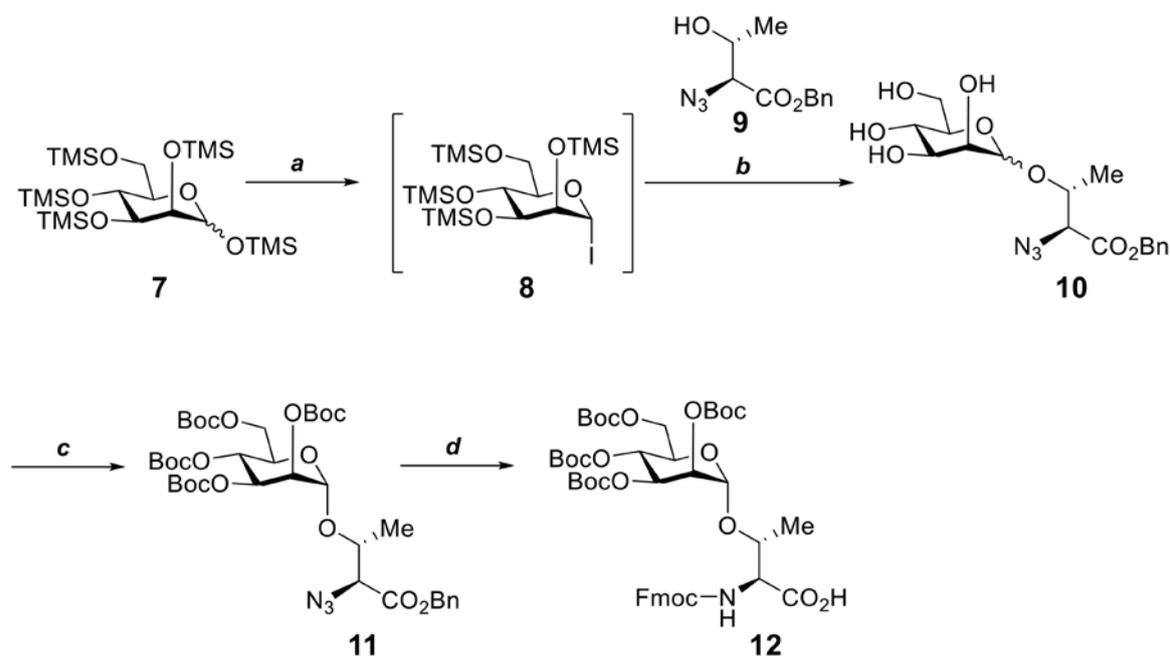


図7 Man-Thr誘導体**12**の合成

(a) TMSI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (b) **9**, TBAI, 2,6-di-tert-butyl pyridine then MeOH ( $\alpha : \beta = 20 : 1$ ); (c) Boc<sub>2</sub>O, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 62% in 3 steps (a~c); (d) (1) H<sub>2</sub>, Pd/C(en) THF; (2) Fmoc-Cl, DIEA, THF, 93% in 2 steps.

誘導体**9**と反応させマンノシル化合物**10**を得た。化合物**10**をBoc<sub>2</sub>OとDMAPで処理することによって糖水酸基にBoc基の導入を行い化合物**11**を合成した。Pd/Cエチレンアミン複合体[Pd/C(en)]を触媒に用いた接触還元により化合物**11**のアジド基の還元とベンジルエステルの除去を行った後に、Fmoc-Clを用いて

スレオニンのアミノ基をFmoc保護することで、目的とするビルディングブロックFmoc-Thr[ $\alpha$  Man(Boc)<sub>4</sub>]-OH (**12**)が得られた。

糖ペプチド合成はN結合糖ペプチド合成と同様のFmoc固相合成法で行った。ペプチド鎖伸長後の脱保護・脱樹脂は2.5%TIPSと5%の1,3-ジメトキシベンゼン(DMB) [10] を



## 6. 参考文献

1. Varki, A. *Essentials of Glycobiology* 3rd edition; Cold Spring Harbor Lab Press, Plainview, NY, **2009**.
2. (a) Broddefalk, J.; Bergquist, K.; Kihlberg, J. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 12047-12070.  
(b) Unverzagt, C.; Kunz, H. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2(11), 1189-1201.  
(c) Peters, S.; Lowary, T. L.; Hindsgaul, O.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Chem. Perkin. Trans.* **1995**, 3017-3022.  
(d) Guo, Z-W.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y.; Ogawa, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 1464-1466.  
(e) Holm, B.; Linse, S.; Kihlberg, J. *Tetrahedron* **1998**, 54, 11995-12006.  
(f) Mitchell, S. A.; Pratt, M. R.; Hruby, V. J.; Polt, R. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2327-2342.  
(g) Herzner, H.; Reipen, T.; Schultz, M.; Kunz, H. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4495-4537.
3. Asahina, Y.; Kanda, M.; Suzuki, A.; Katayama, H.; Nakahara, Y.; Hojo, H. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 7199-7207.
4. Asahina, Y.; Fujimoto, R.; Suzuki, A.; Hojo, H. *J. Carbohydr. Chem.* **2015**, 34, 12-27.
5. Manabe, S.; Sakamoto, K.; Nakahara, Y.; Sisido, M.; Hohsaka, T.; Ito, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 573-581.
6. Toonstra, C.; Amin, M. N.; Wang, L. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 6176-6185.
7. (a) Vuljanic, T.; Bergquist, K.; Clausen, H.; Roy, S.; Kihlberg, J. *Tetrahedron* **1996**, 52, 7983-8000.  
(b) Eloffsson, M.; Salvador, L. A.; Kihlberg, J. *Tetrahedron* **1997**, 53, 369-390.  
(c) Sjolín, P.; Eloffsson, M.; Kihlberg, J. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 560-565.
8. (a) Kunz, H.; Unverzagt, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 1697-1699.  
(b) Shao, N.; Xue, J.; Guo, Z. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 9003-9011
9. Stafford, J. A.; Brackeen, M. F.; Karanewsky, D. S.; Valvano, N. L. *Tetrahedron* **1993**, 34, 7873-7876
10. Stathopoulos, P.; Papas, S.; Tsikaris, V.; *J. Pept. Sci.* **2006**, 12, 227-232
11. Kuwabara, N.; Imae, R.; Manya, H.; Tanaka, T.; Mizuno, M.; Tsumoto, H.; Kanagawa, M.; Kobayashi, K.; Toda, T.; Senda, T.; Endo, T.; Kato, R. *Nat. Commun.*, **2020**, 11, Article number 303

# ホエイプロテインパウダーから O結合型糖ペプチドライブラリーの調製

## Preparation of O-Glycopeptide Library from Commercial Bovine Whey Protein Powder

糖鎖有機化学研究室 黒河内 政樹  
Masaki KUROGOCHI

### 1. 背景

生体内のタンパク質の50%以上は、糖鎖が結合している糖タンパク質である。この糖鎖は、大きくN結合型糖鎖とO結合型糖鎖に分類される。N結合型糖鎖は、アスパラギンの側鎖に、O結合型糖鎖は、セリン、スレオニンの側鎖に結合している。糖タンパク質の糖鎖は、タンパク質のフォールディング、構造安定性に関与しており、生体分子の輸送、分泌、認識、代謝、シグナル伝達に重要な役割を果たしている。近年、生体内においてO結合型糖鎖は、重要な機能を示し、疾患マーカーや医薬品のターゲットとなっているが、その研究はあまり進んでいない。[1] [2] [3] [4] 何故なら、N結合型糖鎖に比べて、O結合型糖鎖のグライコミクス・グライコプロテオミクスが、非常に困難であるのが要因である。N結合型糖鎖は、タンパク質上の結合部位にNXS/Tというコンセンサス配列を持ち、糖鎖構造も共通のコア構造を持っているが、O結合型糖鎖は、タンパク質の結合部位にコンセンサス配列はなく、糖鎖構造のコア構造は8パターンも存在する。また、糖タンパク質からN結合型糖鎖を網羅的に切断する酵素は、PNGase (ペプチドNグリコシダーゼ) として存在するが、タンパク質から網羅的にO結合型糖鎖を切断する酵素は、未だ見つからない (図1)。さらに、O結合型糖鎖は、タンパク質上のセリン、スレオニンが密集した

ムチンドメインという領域に結合している事が多く、タンパク質から解析可能な適度な長さのペプチドへの断片化が難しく、隣接したセリン、スレオニン残基のどの部分に糖鎖が結合しているかを同定するのが非常に難しい。

我々はO結合型糖鎖を1か所に持つO結合型糖ペプチドライブラリーを天然資源から調製した。原料として、サプリメント並びに家畜の飼料として利用されている安価で入手が容易なホエイプロテインパウダーを用いて、O結合型糖ペプチドライブラリーを簡単かつ大量に調製する事を念頭に実験を行った。牛乳のタンパク質組成はすでに十分研究され、ホエイプロテインパウダーには複数のO結合型糖鎖を有するκ-カゼイングリコマクロペプチド (GMP) やラクトフォリン (LP) が大量に含まれていることが知られている。ここでは、市販のホエイプロテインパウダーを原料として用いて、プロテオースペプトン抽出、酵素消化 (トリプシンまたはサーモライシンによる分解反応)、高速液体クロマトグラフィー精製を行い、ジシアリルコア1型およびコア2型の糖鎖構造を持つO結合型糖ペプチドを調製した。また、エレクトロスプレーイオン化質量分析計の衝突誘起解離法 (CID) と電子移動解離法 (ETD) を用いたMSMS分析からこれら糖ペプチドの糖鎖構造・糖鎖結合部位同定・ペプチド配列同定を行った。[5]

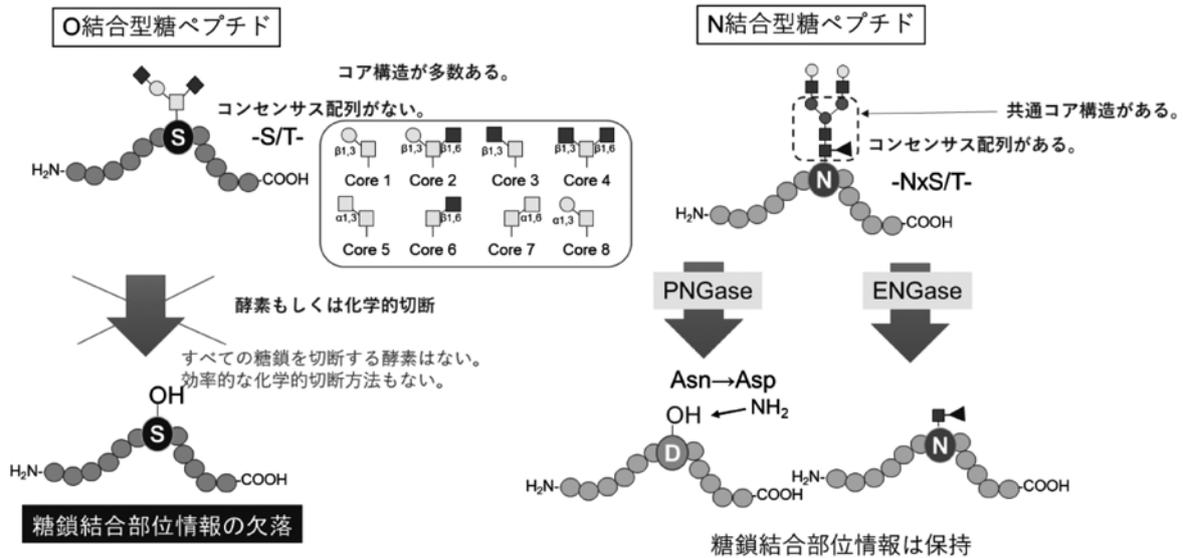


図1 O結合型糖ペプチドとN結合型糖ペプチドの解析の比較

## 2. 実験及び結果

本研究では、LPおよびGMPに由来するO結合型糖ペプチドを2種類のプロテアーゼ(トリプシンまたはサーモライシンによる)を用いて調製した(図3)。O結合型糖ペプチドは、他の化合物と識別できる分光学的性質を持っていない為、フローインジェクション分析(FIA)-ESI-MSおよびMS/MSを組み合わせたオフライン液体クロマトグラフィー-質量

分析法(LC-MS)を用いて精製した。すなわち、プロテアーゼ消化物のサンプルを逆相(RP)カラムまたは順相(NP)カラムを備えたHPLCを用いて分画し、各分画をFIA分析でモニターしながら、糖ペプチド画分を精製した。精製したO結合型糖ペプチドは、糖鎖構造・ペプチド配列・糖鎖結合部位をMS/MS分析を用いて同定した。

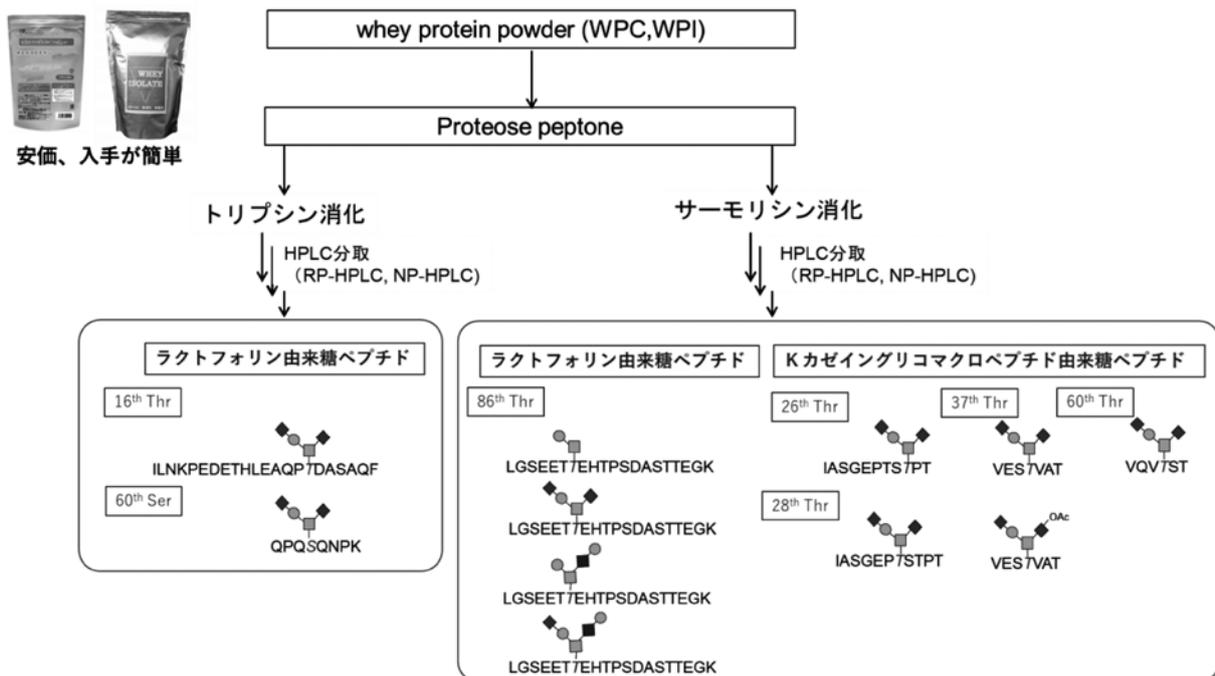


図2 ホエイプロテインからO結合型糖ペプチドの調製プロトコール

## 2-1. 逆相カラムと順相カラムによる多段階HPLCで糖ペプチドの精製

トリプシン処理を行ったプロテオースペプトンからLP由来のアミノ酸8残基の<sup>57</sup>QPQSQNP<sup>64</sup>とアミノ酸22残基の<sup>1</sup>ILNKPEDETHLEAQPTDASAQF<sup>22</sup>にO結合型糖鎖のNeuAc α 2-3Gal β 1-3 (NeuAc α 2-6)GalNAcが結合した2種類のO結合型糖ペプチドを単離する事ができた。例えば、<sup>1</sup>ILNKPEDETHLEAQP(NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc α 1-)TDASAQF<sup>22</sup>は、逆相カラムのFr21の分画した物を順相カラムで分離し、そのFr18の分画をさらに逆相カラムで分離する事によって、精製した。

結果として、ホエイプロテインのプロテオースペプトンから図2に記されているO結合型糖ペプチド11種類を調製できた。

## 2-2. ESI-MS/MS, MS3測定による糖ペプチドの同定

多段階HPLCで精製されたO結合型糖ペプチドをエレクトロスプレーイオン化ESI-Mのフローインジェクション分析(FIA)によって、糖鎖構造、糖鎖結合部位、ペプチド配列の同定を行った。

O結合型糖ペプチドの糖鎖構造は、CID-MS/MSで解析した。CID-MS/MSによるグリコシド結合間の開裂により、糖鎖を完全に喪失したペプチドのみのフラグメントイオンと糖鎖を部分的に切断された糖を含むペプチドのフラグメントイオンの検出からペプチドの大きさと糖鎖の組成や糖鎖配列・分岐構造が決定できる。例えば、アミノ酸8残基のO結合型糖ペプチドは、2価のイオンとしてm/z : 937.4(2+)で検出される。このイオンのCID-MS/MSで測定したスペクトルは、糖鎖が完全に切断されたペプチドのみのフラグメントイオン(m/z : 926.5(1+))、および糖鎖を部分的に切断された糖を含むペプチドのフラグメントイオン(m/z : 792.2(2+), 711.2(2+),

646.5(2+), 565.5(2+))が検出されるので、このO結合型糖ペプチドの糖鎖構造がジシアリルコア1型糖鎖の分岐構造(NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc)であると分かる(図3a)。特に、m/z : 711.2(2+)のフラグメントイオンは、分子量(Mw) : 925.4のペプチド鎖に2糖残基(Mw: 494.3; NeuAc α 2-6GalNAc)が結合した糖ペプチドのフラグメントイオンである事からジシアリルコア1型糖鎖の分岐構造(NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc)が分かる。この手順を用いて、他の糖ペプチドの糖鎖構造も決定した。

O結合型糖ペプチドのペプチド鎖の配列決定は、CID-MS3解析を用いて行うことができる。O結合型糖ペプチドのMS/MSスペクトルから糖鎖が完全に切断されたペプチドだけのフラグメントイオンをMS3解析する事によって、ペプチド配列の情報を得られる。ペプチドのCID法を用いたフラグメントは、ペプチドの主鎖に沿って断片化されたb-イオンおよびy-イオンのフラグメントイオンを生成する。例えば、アミノ酸8残基のO結合型糖ペプチドのMS3スペクトル(m/z : 937.4(2+) > m/z : 926.5(1+))は、<sup>57</sup>QPQSQNP<sup>64</sup>から生成される理論上のb-イオンおよびy-オンシリーズと照合することによって、ペプチドの配列が同定された。この手順に基づいて、他のO結合型糖ペプチドのペプチド鎖の配列を同定した(図3b)。

O結合型糖ペプチドの糖鎖結合部位の決定は、ETD-MS/MSを用いて行う。ETDによる糖ペプチドのフラグメントは、糖鎖結合の切断が起きずにペプチドの主鎖に沿って断片化されたc-イオンおよびz-イオンのフラグメントイオンを生成する。アミノ酸8残基のO結合型糖ペプチドのETD-MS/MSスペクトルは、四糖の糖鎖(Mw : 947.4 ; NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc)を持つ糖ペプチドのフラグメントc-イオンがm/z : 1405.8(c-4), 1533.8(c-5), 及び1648.8(c-6)で観

察された。これらのフラグメントイオンの照合によって、アミノ酸8残基のO結合型糖ペプチドの糖鎖結合部位はSer-60であることが

わかった (図3c)。この手法を用いて、他のO結合型糖ペプチドの糖鎖結合部位を同定した。

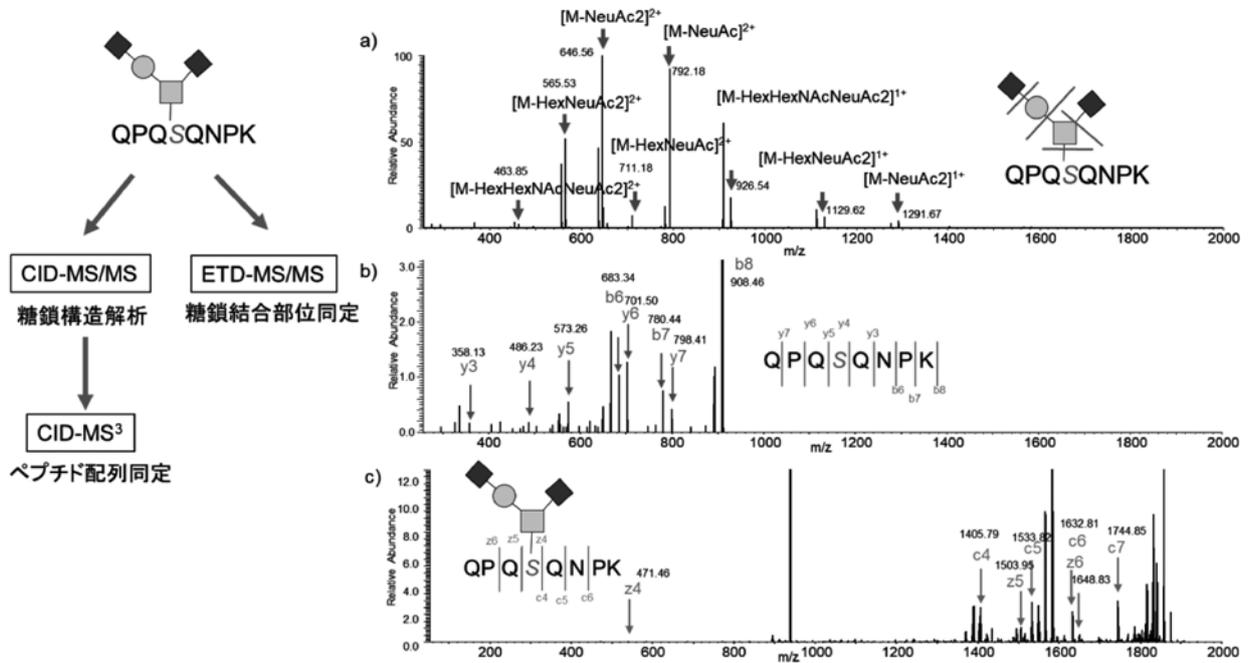


図3 O結合型糖ペプチド<sup>57</sup>QPQ(NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3 (NeuAc  $\alpha$  2-6)GalNAc  $\alpha$  1-)SQNP<sup>64</sup>KのMS/MS測定による同定 (a:CID-MS/MSスペクトル, b: CID-MS<sup>3</sup>スペクトル, c: ETD-MS/MSスペクトル)

### 3. 結論

生体試料の多くのムチン型糖タンパク質は、糖鎖構造の不均一性、糖鎖結合部位の不均一性が大きく、高密度に糖鎖が密集しているため、単一の糖鎖を有するO結合型糖ペプチドを調製することは非常に困難である。本研究では、出発原料であるホエイプロテインパウダーからLPおよびGMP由来の単一の糖鎖を有するO結合型糖ペプチドの調製を行い、Ser結合型とThr結合型のO結合型糖ペプチドを入手できた。また、異なる糖鎖を有するO結合型糖ペプチドや糖鎖結合部位の異なるO結合型糖ペプチドを得た。[5]

最近、O結合型糖鎖が結合したSer残基またはThr残基のN末端で、ペプチド鎖を切断することができるO型糖鎖認識プロテアーゼの存在が報告され [6] [7] [8]、O結合型糖

鎖をターゲットにしたグライコプロテオミクスの研究で注目されている。このプロテアーゼは、N末端側にO結合型糖鎖を持つSerまたはThr残基を有する糖ペプチドを調製するので、糖鎖結合部位の不均一性や密集した糖鎖に起因する同定の煩わしさを回避し、O結合型糖ペプチドの効率的な同定に役立つと考えられる。しかしながら、このエンドプロテアーゼの正確な基質特異性は、不明である。従って、本研究で調製された多様な糖鎖構造とペプチド配列を有するO結合型糖ペプチドライブラリーは、O型糖鎖認識プロテアーゼ、エンドグリコシダーゼ等のO結合型糖鎖関連酵素を評価する基質として使用することができ、様々なO結合型糖鎖の機能解明の研究に貢献すると期待される (図4)。

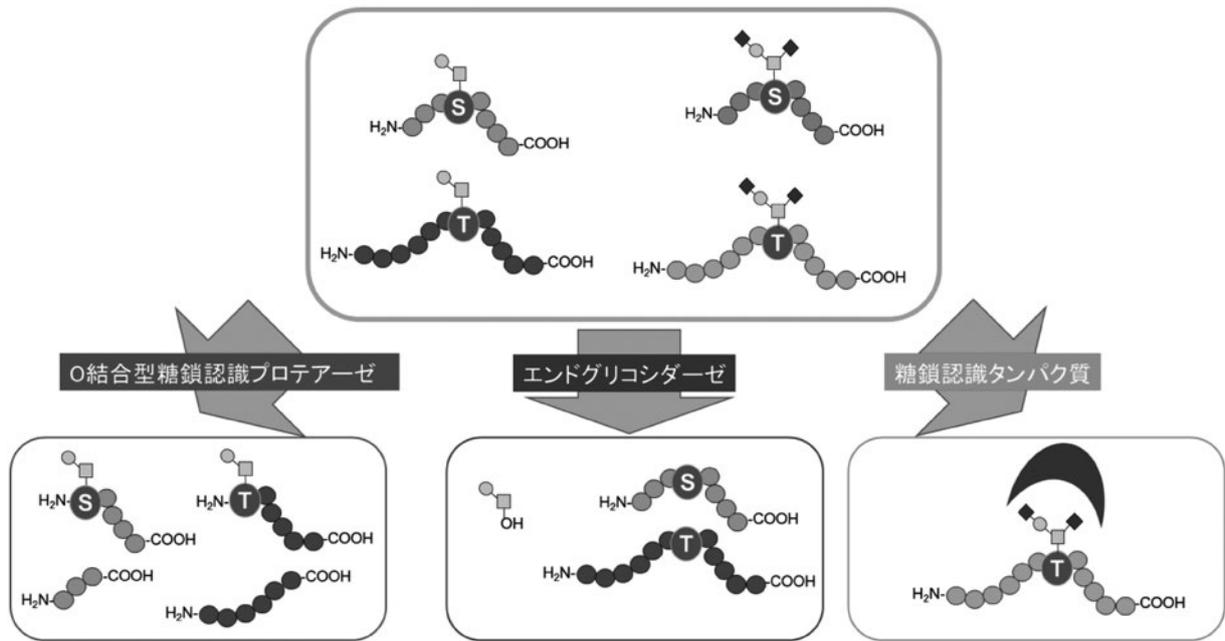


図4 O結合型糖ペプチドラブラリーを用いた研究

## 謝辞

松田昭生前常務理事、水野真盛室長をはじめとする野口研究所の皆様の厚いご支援にこの場を借りて感謝の意を表します。

## 参考文献

1. C.A. Reis, H. Osorio, L. Silva, C. Gomes, L. David, Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection, *J. Clin. Pathol.* 63 (2010) 322–329. <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.071035>.
2. R. Azevedo, A. Peixoto, C. Gaiterio, E. Fernandes, M. Neves, L. Lima, L.L. Santos, J.A. Ferreira, Over forty years of bladder cancer glycobiology: Where do glycans stand facing precision oncology?, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19433>.
3. Z. Darula, K.F. Medzihradsky, Analysis of mammalian O-glycopeptides - We have made a good start, but there is a long way to go, *Mol. Cell. Proteomics.* 17 (2018) 2–17. <https://doi.org/10.1074/mcp.MR117.000126>.
4. A. Varki, Biological roles of glycans, *Glycobiology.* 27 (2017) 3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>.
5. M. Kuroguchi, A. Matsuda, M. Mizuno, Preparation of O-Glycopeptides from commercial bovine whey proteins using offline liquid chromatography - Mass spectrometry, *Carbohydr. Res.* 491 (2020) 107981. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107981>.
6. S. Yang, P. Onigman, W.W. Wu, J. Sjogren, H. Nyhlen, R.F. Shen, J. Cipollo, Deciphering Protein O-Glycosylation: Solid-Phase Chemoenzymatic Cleavage and Enrichment, *Anal. Chem.* 90 (2018) 8261–8269. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01834>.
7. S.A. Malaker, K. Pedram, M.J. Ferracane, B.A. Bensing, V. Krishnan, C. Pett, J. Yu, E.C. Woods, J.R. Kramer, U. Westerlind, O. Dorigo, C.R. Bertozzi, The mucin-selective protease StcE enables molecular and functional analysis of human cancer-associated mucins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A.* 116 (2019) 7278–7287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813020116>.
8. I. Noach, E. Ficko-Blean, B. Pluinage, C. Stuart, M.L. Jenkins, D. Brochu, N. Buenbrazo, W. Wakarchuk, J.E. Burke, M. Gilbert, A.B. Boraston, Recognition of protein-linked glycans as a determinant of peptidase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E679–E688. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615141114>.

# がん組織由来スフェロイドのPSA解析から明らかになった 新たながん特異的グリコフォーム

Study of glycosylation of prostate-specific antigen secreted by cancer tissue-originated spheroids reveals new candidates for prostate cancer detection

糖鎖生物研究室 井手尾浩子

Hiroko IDEO

はじめに

前立腺がんのスクリーニングとして前立腺特異抗原 (PSA) の濃度を測定する方法では、前立腺炎や前立腺肥大等の良性疾患でもその量が増える為、4 ~ 10ng/mlの場合ではがんの確率が25%という問題がある。がん細胞では異常な糖鎖が発現することから [1,2]、より正確な診断を目指してPSA上のがん特異的な糖鎖構造を見出す研究が行われてきた [3]。LNCaP前立腺がん細胞株の培養上清と健常人精漿由来のPSA糖鎖を比較し、シアリル化糖鎖の欠如とFuc  $\alpha$  1-2GalやGalNAc  $\beta$  1-4GlcNAc(LacdiNAc)構造の増加が見出された [4] が、前立腺がん患者血清由来PSAにはそのような糖鎖変化はみられなかった [5,6]。細胞株の樹立時に、親腫瘍のいくつかの特徴を失い糖鎖プロファイルが変化することも知られていることから [7-9]、この場合それが起こっているのかもしれない。

また、 $\alpha$  2,3-シアリル化またはLacdiNAc構造を持つPSA量をそれぞれの糖鎖を認識するレクチンを用いて測定した結果、前立腺がん患者血清で前立腺肥大に比べ増加傾向が認められたものの、これらの糖鎖の増加が必ずしも全ての患者でみられなかった [10-13]。その原因として、これらの糖鎖は健常人由来精漿PSAにも一部存在し、血管壁の破綻部位を通じて非がん組織からもPSAが漏出する、前

立腺がんでは多くの場合前立腺肥大も伴う等の理由により、患者血液中のPSAが全てががん細胞由来ではないことも考えられる。さらに、血液中の大部分のPSAは、糖タンパク質の $\alpha$  1-アンチトリプシン (ACT) と複合体を形成している為、PSAの糖鎖の解析を困難なものにしている。

これらの課題を克服する為に、筆者らはがん組織由来のスフェロイド (CTOS) の培養上清由来のPSAの糖鎖構造を初めて分析した。CTOSはもとの腫瘍の主要な特徴を保持している為、CTOS由来PSAは患者の腫瘍の糖鎖構造を反映すると考えられる [9]。さらに、CTOS由来PSAは、すべてがん細胞からのみ分泌され、ACT複合体も形成していない。健常人精漿、CTOS、がん細胞株LNCaP (リンパ節転移) 及び22Rv1 (前立腺に局在) 由来のPSAのグリコフォームを比較して、新たながん特異的なPSAのグリコフォームを見出し発表した [14] ので本稿で紹介する。

## 1. CTOS由来PSA糖鎖構造のレクチンカラムクロマトグラフィーによる分析

CTOS培養上清中のPSAは濃度が低く (約30ng/ml) 利用可能な量は数mlと限られていた。そこでまず培養上清をレクチンカラムに添加し、非結合(-)及び結合(+)画分中のPSA量をELISA法で測定することで、CTOS

から分泌されたPSAの糖鎖構造を推定した。LNCaP細胞由来PSAに多くその構造がみられる [15,16] LacdiNAc構造に関して WFAレクチンカラムを用いて分析した (図1)。LNCaP由来及び精漿由来PSAの結果はMALDI-MSでの分析結果 [17] と一致していた。WFAカラムの結果は、CTOS由来PSA中のGalNAc含有糖鎖の割合がLNCaP由来PSAと異なり、精漿由来PSAより高くないことを示している。別の前立腺がん細胞株である22Rv1もCTOSと同様で、これらの結果はLNCaP細胞以外のCTOSや22Rv1がん細胞で、LacdiNAc構造が増加していないことを示している。

一方、CTOSでは12%、22Rv1細胞は13%、LNCaP細胞では22%のPSAがCon Aカラムに結合せず、正常由来PSAではそれは2%未満であり (図2)、がん細胞で共通してCon A非結合のPSAが分泌されていることが明らかになった。

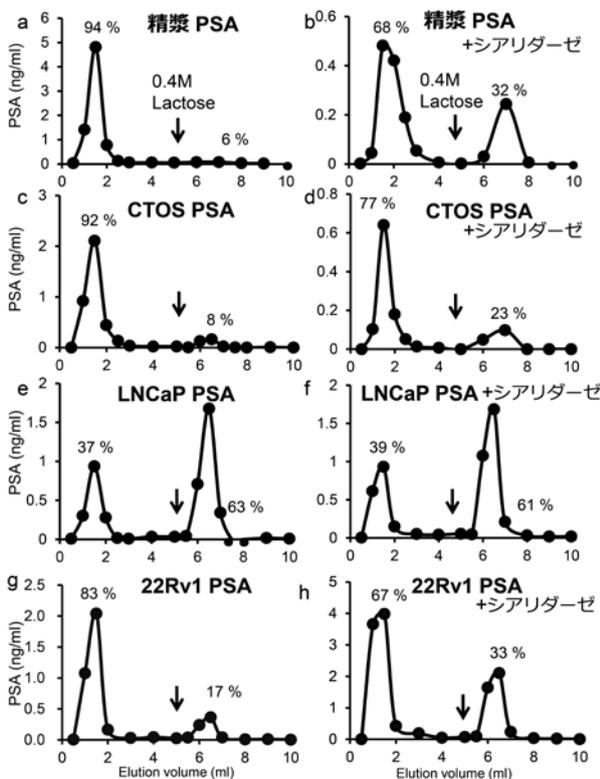


図1 PSAのWFAレクチンカラムクロマトグラフィー

## 2. がん細胞のCon A(-)画分に見出される分子量の異なるPSA

Con A(-)及び(+画分のPSA分子を電気泳動で分析した所、CTOS及びLNCaPのがん細胞のCon A(-)画分には高分子量 (32 kDa) と低分子量 (29 kDa) のものが存在し (図3)、22Rv1も同様 (図は省略) であった。また、低分子量PSAはN型糖鎖を切断するPNGF処理で分子量が変化しなかったが、高分子量PSAは低分子化した。

従って、CTOS、22Rv1及びLNCaPのがん細胞に共通して存在するCon A(-)画分に、糖鎖をもった高分子量PSAと、殆どあるいは全くN型糖鎖が付加していないと推定される低分子量PSAが存在することが明らかになった。

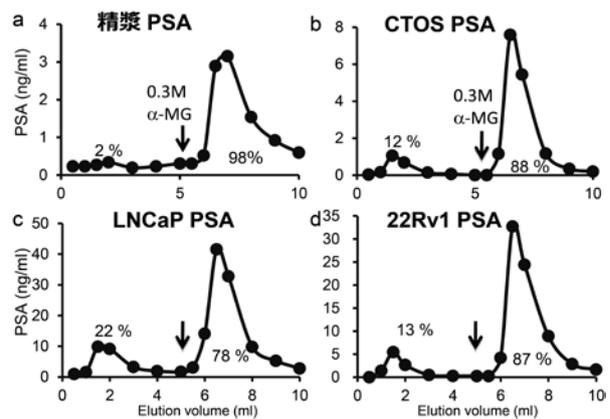


図2 PSAのCon Aレクチンカラムクロマトグラフィー

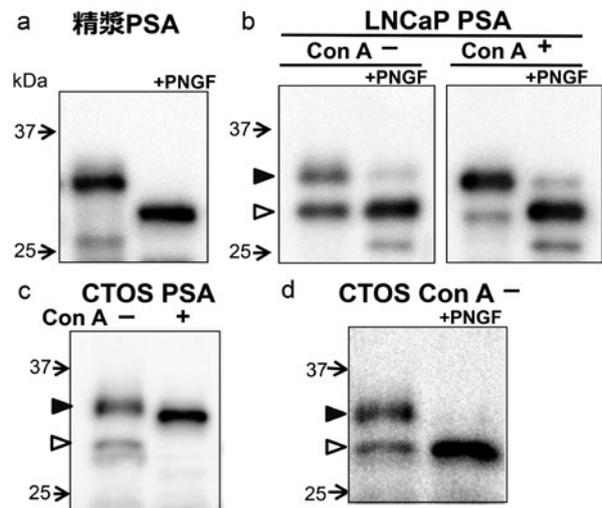


図3 PSAのウェスタンブロットティング

### 3. LNCaPがん細胞由来高分子量PSAの糖鎖構造解析

LNCaP細胞培養上清を濃縮後カラムでCon A(-)及び(+)-画分に分離し免疫沈降法でPSAを精製した。その後、サーモリシン酵素で糖ペプチド<sup>43</sup>IRNKKS<sup>47</sup>へと消化し、糖鎖構造をMALDI-MSにより解析した。Con A(+)-画分の糖ペプチドは、0～2個のLacdiNAc糖鎖及びコアフコース以外に非還元末端に0～2個のフコースを含む2本鎖糖鎖を、Con A(-)-画分の糖ペプチドは、0～3個のLacdiNAc糖鎖及びコアフコース以外に非還元末端に0～3個のフコースを含む多分岐糖鎖を含んでいた(図4a)。

さらに糖鎖の非還元末端に存在するフコースの結合位置を $\alpha$ 1,2-または $\alpha$ 1,3/4特異的フコシダーゼへの感受性をもとに解析した結果、Con A(-)(+)-両画分に $\alpha$ 1,2-、 $\alpha$ 1,3(4)-あるいは両方でフコースが結合している糖鎖が存在していることが明らかになった。

### 4. LNCaPがん細胞由来Con A(-)画分の低分子量PSAには糖鎖が結合していない

LNCaP培養上清のCon A(-)-画分から精製したPSAのサーモリシン酵素消化後のペプチドをMALDI-MSにより低分子量域に注目して解析を行った。その結果endo- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの作用によってできるGlcNAc-IRNKKS (m/z :820.4)またはFuc-GlcNAc-IRNKKS (m/z:966.5)をもった糖ペプチドは見出されなかったが、ペプチドIRNKKSと同様のm/z:617.3及び618.3の質量ピークが検出され、MS<sup>2</sup>スペクトルからもアミノ酸配列が確定された(図は省略)。しかしながら、m/z :618.3は糖鎖切断により生成するペプチドIRDKKSの質量ピークからも生じる為、このピークがIRNKKS由来なのか、IRNKKSとIRDKKSの混合物なのかは確定できない。そこで両ペプチドの溶出位置が違うことを利用し、LC-MSでの解析を試みた。

その結果、合成ペプチドIRNKKS及びIRDKKSと同じ保持時間でピーク(I)及び(II)が検出された(図5a-c)。合成ペプチドIRNKKSをサーモリシン消化しても、ピークII及びIIIと同じ位置に新たに2つのピークが生じる為(図5d)、ピークII及びIIIの多くは、IRNKKSからサーモリシン消化で生成したと考えられた。従って、<sup>45</sup>Nに糖鎖が結合していないPSAが存在することが示された。

### 5. CTOS及び22Rv1由来PSAに存在するシアリルルイスX型糖鎖構造

本稿では割愛するがCTOS及び22Rv1由来PSAのCon A(-)-画分のDSAレクチンカラムでの結果から、ルイスX型糖鎖の存在する可能性が示唆された。ガレクチン-1の親和性がガラクトースの $\alpha$ 2,6-シアリル化や隣接するGlcNAcの $\alpha$ 1,3(4)-フコシル化によって減少する[18,19]ことを利用し、ルイスX型糖鎖構造の存在の有無を調べた。

シアリダーゼ処理後にガレクチン-1に結合することから、健常人精漿PSAのガラクトースは主に $\alpha$ 2,6-シアリル化されており、 $\alpha$ 1,3(4)-フコシル化糖鎖は殆ど存在しないことが推定された(図6a,b)。LNCaP由来PSAの場合、シアリル化されていないにも関わらず50%はガレクチン-1に結合せず、非還元末端がGalNAc或いは $\alpha$ 1,3(4)-フコシル化GlcNAcを検出しているMS分析(前述)の結果と一致した(図6c)。22Rv1及びCTOSのPSAの殆どはガレクチン-1カラム(図6d,e)に結合せず、一部はシアリダーゼ処理後も結合しなかった(図6f,g)。しかし、シアリダーゼ処理後のガレクチン-1非結合画分を $\alpha$ 1,3/4-フコシダーゼ消化した場合、その一部はガレクチン-1(図6h, i)に結合したことから、 $\alpha$ 1,3(4)-フコシル化GlcNAc糖鎖の存在が示唆された。

リアルタイムPCR法により $\alpha$ 1,3-フコシル転移酵素(FT)の発現を調べた結果、CTOS及び22Rv1はLNCaP細胞のそれよりも

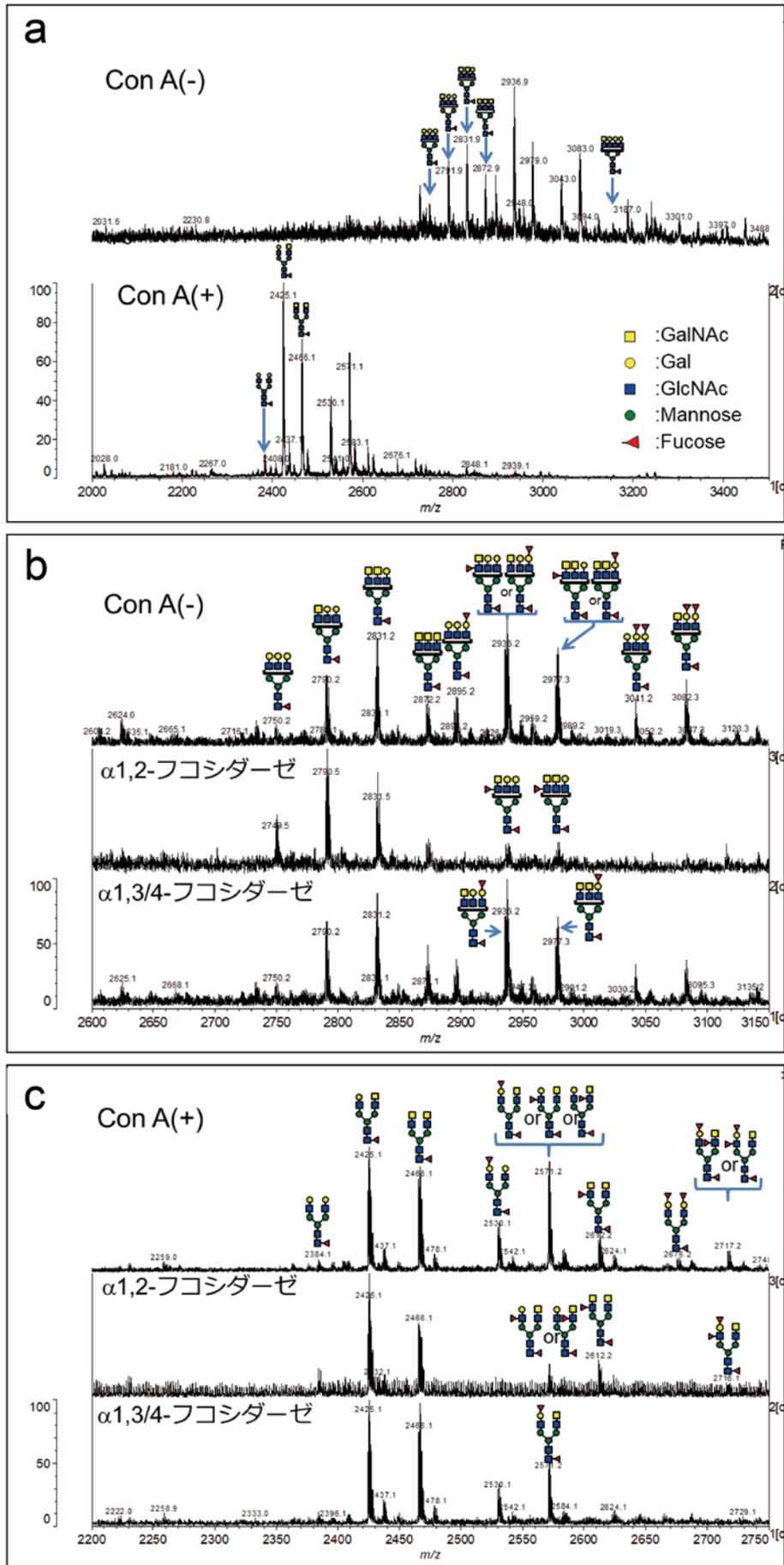


図4 MALDI-MSによるLNCaP由来PSA糖ペプチドの解析 (negative ionモードで取得)

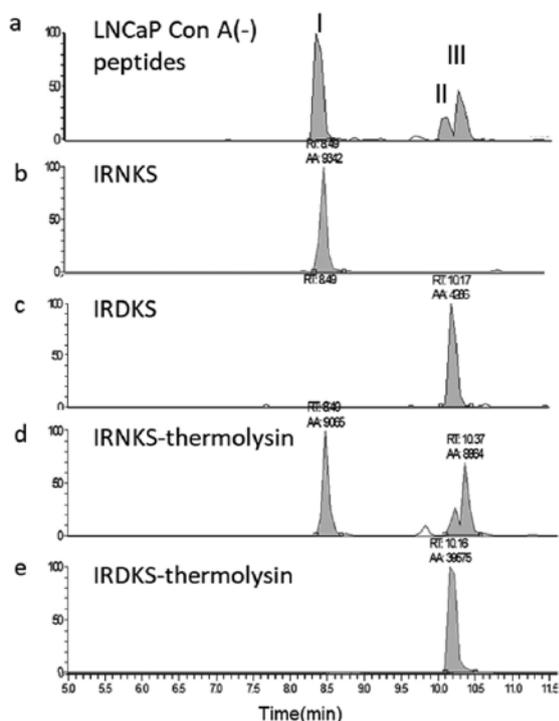


図5 PSA由来サーモリシン消化ペプチド及び合成ペプチドのLC-MSクロマトグラム

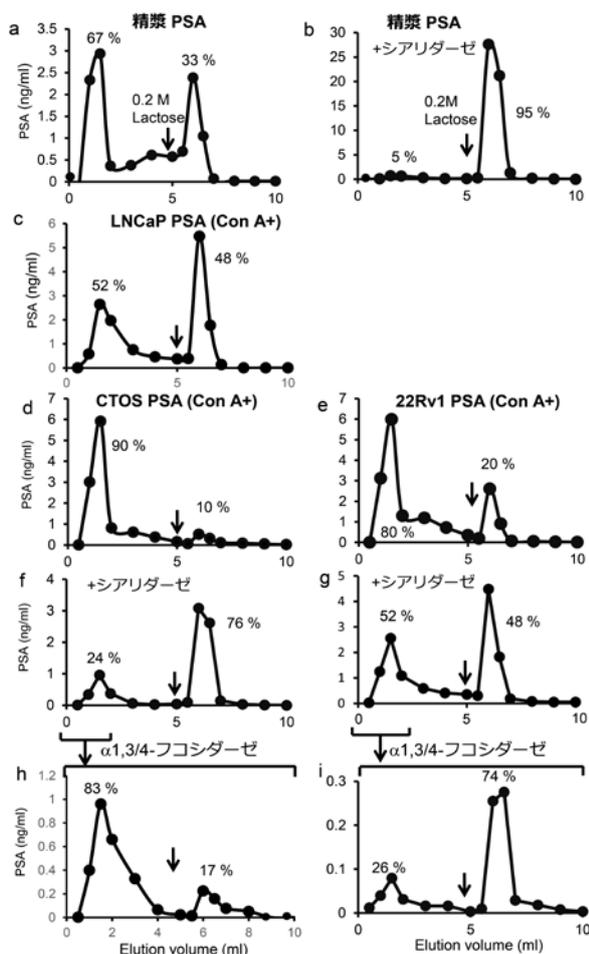


図6 PSAのガレクチン-1カラムクロマトグラフィ

多くの  $\alpha$ 1,3-FTを発現しており、CTOS及び22Rv1における  $\alpha$ 1,3(4)フコシル化糖鎖の上昇を裏付けていた (本稿では図を省略)。

## 6. まとめ

CTOS由来PSAの糖鎖構造解析より、がん特異的PSAグリコフォームの候補として高分岐化糖鎖型及び無糖鎖型を見出した。LacdiNAc構造の増加やシアリル化の変化は、すべての前立腺がん細胞由来PSA糖鎖に共通な変化ではなかったが、Con A非結合性のPSA分子はCTOSを含めて解析したがん細胞共通に見出され、健常人精漿由来PSAでは殆ど見出されなかった。

過去の研究の中に、PSA分子を2次元電気泳動とPAS染色を組み合わせる解析した研究 [20,21] や、前立腺がんとBPHの組織溶解液間 [22] あるいは血清間 [10, 23,24] の比較が行われた例があったが、糖鎖構造解析はなされていなかった。我々の研究によって、今回初めてCon A(-)画分に含まれるがん細胞由来PSAの詳細な糖鎖構造が明らかになった。

がん細胞由来PSAにはCon A(-)画分に共通して高分子量と低分子量のPSAが存在すること、MALDI-MS解析も行い、高分岐複合型糖鎖がCon A(-)画分に存在し  $\alpha$ 1,2-、 $\alpha$ 1,3(4)-フコースが存在することが見出された (図4)。培養細胞内でPNGase活性が報告されているが [25]、低分子量のPSAは糖鎖が切断されて生じるのではなく、その殆どが生合成経路における糖鎖転移の不全の結果生じたものであることが見出された。不完全なO-結合型糖鎖は多くのがんで見出されてきたが [26]、N-結合型糖鎖不全に関する研究は今まで殆ど報告がない。その理由の一つとして、一般的に無糖鎖のペプチドは質量分析前に親水性樹脂によって行われる糖ペプチドの濃縮過程で失われることで、検出されてこなかった可能性があると考えられる。N-結合型糖鎖

の転移不全に注目するというのは、がんと糖鎖という領域に新たな視点をもたらすものと考えられる。無糖鎖のペプチドを抗体等のプローブで検出できれば、より正確な診断に役立つ可能性を秘めていると考えられる。*N*-結合型糖鎖の消失はがんの悪性度に影響を及ぼすとの報告 [27,28] もあることから、特定の糖鎖構造を検出する以外に*N*-結合型糖鎖修飾の割合も決定することが重要になるかもしれない。

*N*-結合型糖鎖の高分岐化は、がん細胞産生糖タンパク質においてしばしば観察される [29]。本研究でも、CTOS及び22Rv1及びLNCaP細胞由来のPSAで高分岐糖鎖が存在していることを見出した。我々は以前、MALDI-MS法で前立腺がん血清中の3本鎖糖鎖をもつPSAを見出し [30]、芳賀らはLC-MS/MSを用いて前立腺がん患者血清中のPSAにBPH患者と比較してシアル酸をもつ高分岐糖鎖がより多く存在することを報告している [31]。本研究でこれらの糖鎖ががん細胞由来であることが明らかになった。また、がん細胞でシアリルルイス<sup>x/a</sup> (SLe<sup>x/a</sup>)の発現が上昇することが多く報告されている [32]。本研究でもPSAの非還元末端にフコースが存在すること(図4b,c, 6)や、CTOS及び22Rv1細胞での $\alpha$ 1,3FTsの顕著な発現上昇を見出している。これらの $\alpha$ 1,3FTsはPC-3前立腺がん細胞においてLe<sup>x</sup>及びSLe<sup>x</sup>の合成を調節している [33]。転移性前立腺がんにおいてSLe<sup>x</sup>の発現上昇が報告されている [34] ので、PSA上のSLe<sup>x</sup>の発現は予後マーカーの候補となり得るのではないかと考えられる。

本研究では、CTOS及び他のがん細胞からPSAの*N*-結合型糖鎖を分析することにより、PSAの新しいがん関連グライコフォームを提示できた。これらの新しいグライコフォームを認識するプローブの開発はより進化した診断への道を開く可能性を秘めている。これらのPSAグライコフォームの血中安定性は不明

である為、次の段階では、これらの形態ががん患者の血清中に実際に上昇しているかどうかを確認する必要があると考えられる。

## 7. 実験概要

CTOSは共著者である近藤助手及び井上教授(現京都大学)、野村教授(医薬基盤研究所)、野々村教授(大阪大学)らにより樹立され、野口研究所にその培養上清が供与された。免疫沈降によるPSAの精製、ELISA、レクチンカラムクロマトグラフィー、MALDI-MS、LC-MS等の詳細な実験方法は論文 [14] を参照されたい。

## 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(旧糖鎖生物学室長)に深く感謝いたします。また、野口研究所の皆様にご挨拶いたします。

## 参考文献

1. *Acta Histochem.* 113, 236-247 (2011).
2. *Nat Rev Cancer* 15, 540-55 (2015).
3. *J. Int J Mol Sci.* 20, E1389, doi: 10.3390/ijms20061389 (2019).
4. *Glycobiology* 13, 457-70 (2003).
5. *Glycobiology* 16, 132-45 (2006).
6. *Glycobiology* 18, 2-8 (2008).
7. *Semin Cancer Biol.* 15, 405-12 (2005).
8. *Cancer Cell* 9, 391-403 (2006).
9. *Sci Rep.* 6, 24823 (2016).
10. *Glycobiology* 14, 671-679 (2004).
11. *J BUON.* 10, 247-250 (2005).
12. *J Proteome Res.* 8, 613-19 (2009).
13. *Int J Mol Sci.* 18, E261, doi:10.3390/ijms18020261 (2017).
14. *Sci Rep.* 10, 2708 (2020).
15. *J Biol Chem.* 291, 24085-95 (2016).
16. *Proteomics* 15, 183-190 (2018).
17. *J. Glycom. Lipidom.* S5:001.

- doi:10.4172/2153-0637 (2012).
18. *Glycobiology* **14**, 157-67 (2004).
19. *J Biol Chem.* 283, 10109-23 (2008).
20. *Clin Chem.* 48, 2187-94 (2002).
21. *OMICS.* 14, 465-74 (2010).
22. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 727, 9-14 (1999).
23. *Clin Chem.* 37, 1133-1134 (1991).
24. *Oncology* 46, 75-7 (1989).
25. *Biochem Biophys Res Commun.* 194, 1124-30 (1993).
26. *Adv Cancer Res.* 126, 53-135 (2015).
27. *Int J Oncol.* 42, 1383-89 (2013).
28. *Cell* 143, 711-24 (2010).
29. *Biomolecules.* 6, 10.3390/biom6020025 (2016).
30. JP 5443156 B2 (2013).
31. *Anal Chem.* 91, 2247-54 (2019).
32. *Glycoconj. J.* **34**, 147-56 (2016).
33. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106, 19491-96 (2009).
34. *Cancer Res.* 55, 1817-19 (1995).

# LacdiNAc糖鎖を強制発現したMDA-MB-231ヒト乳がん細胞の 細胞形態及び細胞接着能の変化

LacdiNAcylation of N-glycans in MDA-MB-231 human breast cancer cells results  
in changes in morphological appearance and adhesive properties of the cells

糖鎖生物研究室 平野 清子  
Kiyoko HIRANO

我々はこれまでにヒト乳がん細胞MDA-MB-231において、細胞表面の糖タンパク質のN-型糖鎖にGalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc (LacdiNAc) 構造を増大させると、ヌードマウスでの造腫瘍能等の悪性形質が抑制されることを明らかにしてきた。本研究ではMDA-MB-231細胞にこの糖鎖を作る糖転移酵素 $\beta$ 4-N-acetylgalactosaminyltransferase-4 ( $\beta$ 4GalNAcT4) 遺伝子を導入・発現したclone細胞株 (clone 1及びclone 2) を樹立し、細胞表面の糖タンパク質糖鎖にLacdiNAcの発現を増大させると、細胞の形態および細胞外基質への接着性が変化することを見出した。すなわち、2種のclone細胞は敷石状の形状を示し、紡錘状で間葉系細胞様の対照株細胞と比較し明らかに細胞の形態に変化が見られた。また、2種のclone細胞は対照株細胞に較べ上皮系細胞の特徴であるE-カドヘリンの細胞表面での発現が亢進すると共に、間葉系細胞の特徴であるN-カドヘリン及び転写因子ZEB1等の発現が減少した。さらに2種のclone細胞は細胞遊走能が低下していた。以上の結果から、clone細胞では間葉-上皮移行 (mesenchymal-epithelial transition: MET) が誘導されることが強く示唆された。また、細胞外基質への接着性について無血清条件下にて解析した結果、2種のclone細胞は対照株細胞に較べ、フィブロネクチン、I型とIV型コラーゲン、及びラミニンに強い結

合が見られた [1]。

## 背景

乳がんは女性では最も罹患率が高く、患者数も世界規模で増加傾向にあるが、症状に合わせた治療法が確立され、生存率も大幅に改善されている。一方、トリプルネガティブタイプの乳がんに対する有効な治療法は未だ見つかっておらず、早急に解決すべき課題となっている。

ヒト乳がん組織においてN-型糖鎖上のLacdiNAcの発現が悪性度の増大に伴い減少・消失することから [2]、この糖鎖は乳がんの腫瘍マーカーとしての可能性が示唆されてきた。我々はトリプルネガティブタイプのMDA-MB-231細胞にこの糖鎖を作る糖転移酵素 $\beta$ 4GalNAcT4遺伝子を導入し、細胞表面の糖タンパク質のN-型糖鎖にLacdiNAcを増大させると、コロニー形成能やヌードマウスへの腫瘍形成能さらに浸潤能が抑制されることを明らかにした [3]。なお、ヒト乳がんの正常組織ではLacdiNAcが多く発現していることから [2]、この糖鎖は乳房組織細胞の恒常性を保つことに重要な役割を担っていると考えられるものの、依然としてその役割はよく分かっていない。

上皮-間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) は上皮系細胞がその上皮系様の性質を失い間葉系様の性質を獲得す

るプロセスを言い、がんの進行に深く関与することが知られている。具体的にはEMTが起こると上皮系細胞は細胞の極性や細胞同士の接着性が失われ、その一方、細胞の遊走能や浸潤能といった間葉系細胞の性質を獲得する [4, 5]。さらにEMTではアクチンフィラメントの再構築による細胞の形態変化が生じる。EMTが起きると上皮系細胞のマーカであるE-カドヘリンの細胞表面での発現が減少する一方、間葉系細胞の特徴であるN-カドヘリン、ビメンチン及び平滑筋アクチン ( $\alpha$ -smooth muscle actin:  $\alpha$ -SMA) 等の発現が増大する。なお、これらEMTのマーカ分子の発現はSnail、Twist及びZEB1等の転写因子によって調節されている [5]。EMTは可逆的なプロセスであり、逆の経路は間葉-上皮移行 (MET) と呼ばれる。これまでも乳がん細胞ではEMT及びMETが誘導されることが数多く報告されており、特にluteolin等の分子がMETを誘導し、トリプルネガティブタイプの乳がんの悪性形質を抑制することが報告されている [6]。また、MDA-MB-231細胞において $\alpha$ 2,6-sialyltransferase-Iの発現を抑制するとMETが誘導される [7]。このように特定の糖転移酵素の発現や糖化合物の投与がEMTやMETの誘導に深く関与することが明らかになっている。

## 実験および結果

MDA-MB-231細胞に $\beta$ 4GalNAcT4遺伝子を導入したclone 1及びclone 2細胞ではヌードマウスへの腫瘍形成能等の悪性形質が抑制されるが [3]、その細胞の形態に着目した時、対照株細胞は間葉系細胞様の紡錘状の形であるのに対して (図1a)、2種のclone細胞は対照株細胞と比較してサイズがやや大きく、隣接する細胞同士が密接した敷石上の形態を呈していた (図1b,c)。また、抗アクチン抗体を用いた免疫染色では、対照株細胞では間葉

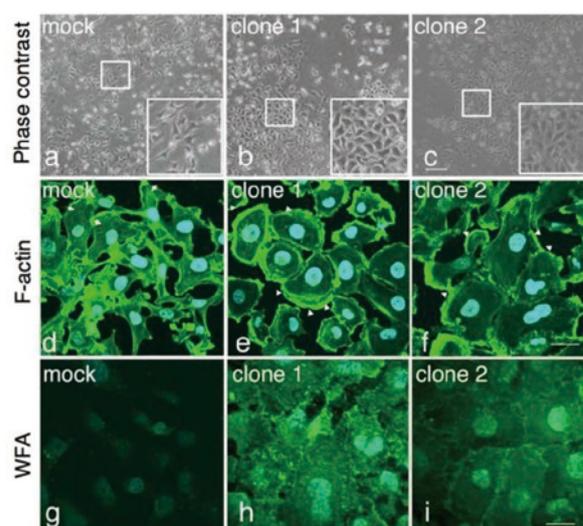


図1  $\beta$ 4GalNAcT4強制発現株の細胞の形態  
位相差顕微鏡による細胞の形態解析 (a-c)。Scale bar : 100  $\mu$ m。F-アクチン染色した細胞の共焦点顕微鏡による解析 (d-f)。WFAレクチン染色 (g-i)。Scale bar : 20  $\mu$ m。

系細胞の特徴であるストレスファイバーの形成が見られるのに対して (図1d, arrows)、2種のclone細胞では細胞の淵に沿ってcortical actinの形成が観察された (図1e,f, arrow heads)。これらの結果から、細胞表面の糖タンパク質糖鎖上にLacdiNAcの発現を増大させると、細胞の形態が間葉系から上皮系へと変化することが示唆された。

次に、EMT及びMETのマーカタンパク質の発現レベルについてウエスタンブロットにより解析・定量化した。その結果、2種のclone細胞では対照株細胞に比較して上皮系細胞のマーカのE-カドヘリンの発現が増大するのに対して、間葉系細胞のマーカであるN-カドヘリン、ビメンチン及び $\alpha$ -SMA、転写因子ZEB1発現が減少していた (図2a,b)。

E-カドヘリンは細胞表面に発現し、細胞同士の接着に重要な役割を果たすことが知られている。フローサイトメーターによる解析の結果、2種のclone細胞ではE-カドヘリンの細胞表面での発現の増大がみられた (図2c)。

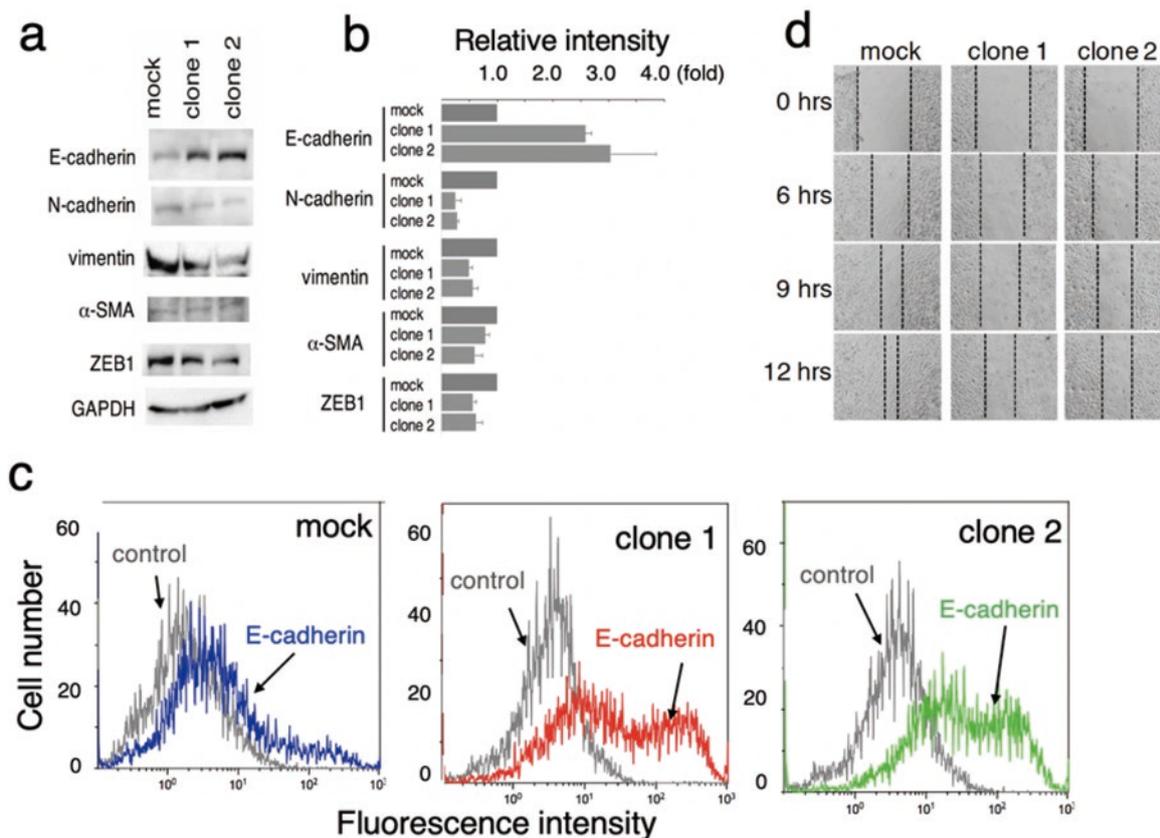


図2 β4GalNAc4強制発現株におけるMET化の誘導

ウエスタンブロットによるMETのマーカータンパク質の発現解析 (a) 及び得られたバンドの定量化 (b)。フローサイトメーターによる細胞表面のE-カドヘリンの発現解析 (c)。wound-healing assayによる細胞の遊走能の解析 (d)。

また、一般的に間葉系細胞では細胞遊走能が増大することから、遊走能についてwound-healing assayを行った結果、2種のclone細胞では対照株細胞と比較して遊走能の減少がみられた (図2d)。以上の結果から細胞表面のLacdiNAcの発現の増大はMETを誘導することが示唆された。

TGF β1はMDA-MB-231細胞を含む様々な細胞のEMTを誘導することが知られている。実際にclone細胞及び対照株細胞にTGF β1を投与したところ、未処理の状態のものと比較していずれの細胞でも増殖が著しく抑制された。この時、対照株細胞はより紡錘状の形状を呈するのに対し、2種のclone細胞の多くは敷石状の形状が保たれていたが、一部の細胞で細胞間同士の接着が失われ、紡錘状を示す

様子が観察された (図3a)。

次にEMTの誘導を引き起こす転写因子のSlug、Snail及びZEB1の発現レベルについてリアルタイムPCR法にて解析した。clone細胞では対照株細胞と比較していずれの遺伝子も発現量の減少が見られたが、TGF β1処理するとSlug及びSnail遺伝子の転写活性は全ての細胞で未処理の状態のものと比較して増大するが、ZEB1遺伝子の転写活性は変化が見られなかった (図3b)。

TGF β1によって誘導されるEMTはSmad依存シグナル経路とSmad非依存シグナル経路によって制御されることから [8]、TGF β1処理後の細胞のシグナル伝達系に関わるターゲット分子のリン酸化状態についてウエスタンブロット解析を行った。その結果、

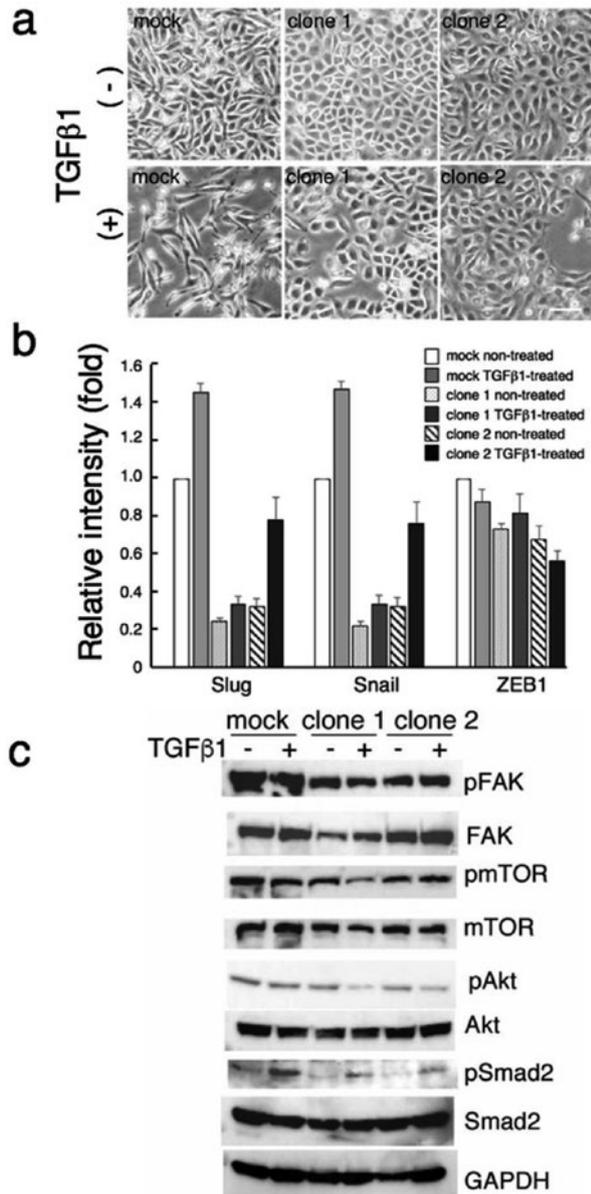


図3 TGF  $\beta$  1が  $\beta$  4GalNAcT4強制発現株に及ぼす影響

10 ng/mLのTGF  $\beta$  1を添加後3日目の細胞の形態(a)。Scale bar : 100  $\mu$ m。B. リアルタイムPCR法による転写因子遺伝子の発現レベルの解析(b)。ウエスタンブロットによるSmad2、Akt、mTOR及びFAKのリン酸化レベルの解析(c)。

全ての細胞でTGF  $\beta$  1刺激に対してSmad2のリン酸化の亢進が見られ(図3c)、Smad依存的シグナル経路の関与が示唆された。一方、Smad非依存的シグナル経路について、PI3K、P38及びERK/MAPK等の様々なシグナル経

路の関与が報告されているが[8]、TGF  $\beta$  1処理後のAkt、mTOR及びFAKのリン酸化状態はいずれの細胞でも未処理の状態と比較して顕著な差異が見られなかった(図3c)。

EMTは細胞と基底膜との相互作用に強く影響を及ぼすことが知られていることから[5]、clone細胞の細胞外基質への接着性について解析した。無血清条件下において2種のclone細胞は対照株細胞と比較してラミニンをはじめとする各種の細胞外基質に強く結合する様子が観察された(図4a,b)。この時の細胞の形状について抗アクチン抗体を用いた免疫染色にて観察した結果、ラミニンでコートしたプレート上では、clone細胞は接着・伸展するのに対し、対照株細胞では一部の細胞のみが接着し伸展は見られなかった(図4d-f)。一方、フィブロネクチンでコートしたプレートにはいずれの細胞も強く接着していた(図4g-i)。以上の結果から、2種のclone細胞は特にラミニンに対して強い接着能を獲得することが明らかになった。

#### 考察

本研究では  $\beta$  4GalNAcT4遺伝子を導入して細胞表面のLacdiNAcの発現を増大させたMDA-MB-231細胞においてMET様の形態及び生化学的变化が生じることを初めて明らかにし[1]、我々がこれまでに報告してきたLacdiNAcの発現増大に伴うこの細胞の悪性形質抑制に相関する結果が得られた[3]。

細胞表面の糖タンパク質の糖鎖構造変化はがんの悪性形質に影響を及ぼす[9]。特に細胞接着分子であるインテグリンのN-型糖鎖は細胞-細胞間、細胞-基底膜との相互作用に重要な役割を担っている[10]。インテグリンは $\alpha$ 及び $\beta$ 鎖からなるヘテロ二量体を形成する膜貫通型の受容体であり、ラミニンやフィブロネクチン等の細胞外基質と選択的に結合するが、これらヘテロ二量体の形成をはじめ、細胞の接着や遊走性に特定のN-型糖

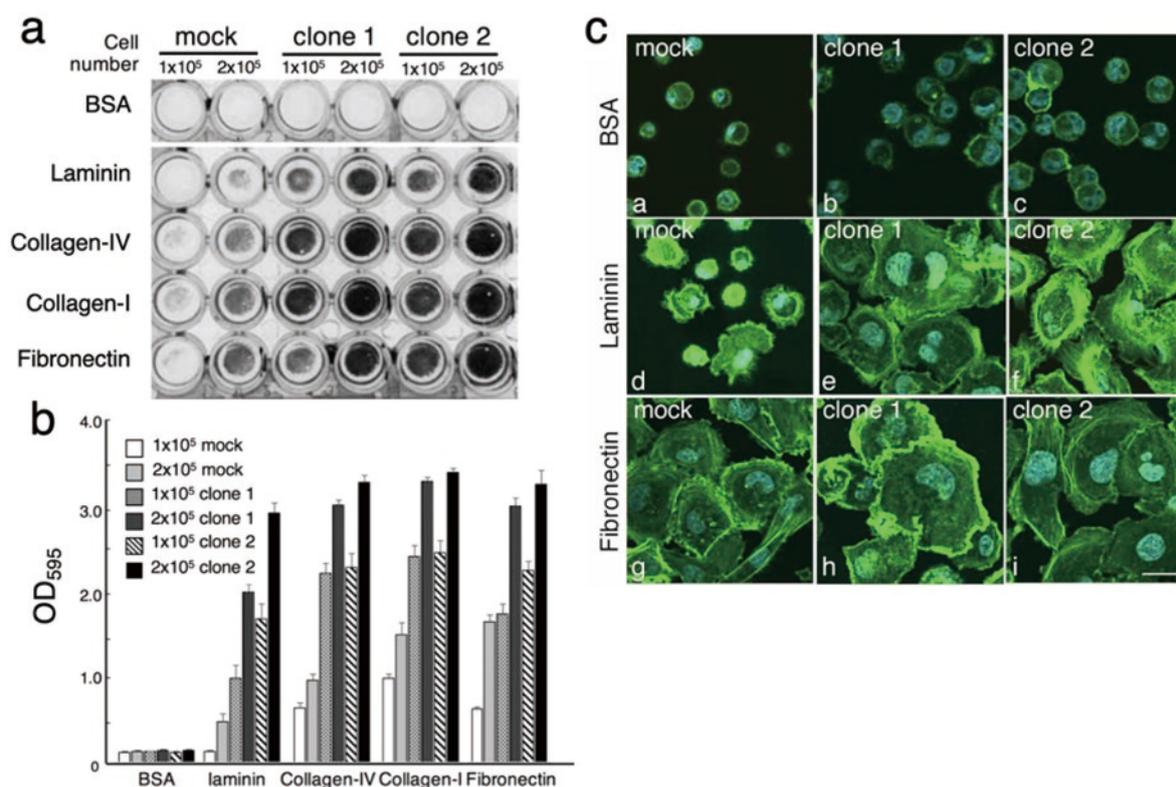


図4 細胞外基質への細胞の接着性

無血清条件下、各種の細胞外基質でコートしたプレートへ接着した細胞をクリスタルバイオレットにて染色 (a)、接着した細胞を可溶化し定量化 (b)。この時の細胞のF-アクチンを染色し、位相差顕微鏡で解析 (c)。Scale bar : 20  $\mu$ m。

鎖部位の糖鎖構造変化が関与することが報告されている [11]。今回、MDA-MB-231細胞において細胞表面の糖タンパク質糖鎖上のLacdiNAcの発現の増大がラミニンやフィブロネクチンに対する結合能を増強することを明らかにしたが、これまでの予備実験において、clone細胞では $\beta$ 1インテグリン糖鎖上でLacdiNAc化が顕著に増大することが分かってきた (未発表データ)。今後はインテグリンの $\alpha$ 鎖のN-型糖鎖の構造変化にも着目し、細胞外基質への接着性に及ぼす影響について解析を行う予定である。

各々のがん細胞でLacdiNAcの発現レベルやその修飾を受ける糖タンパク質は異なり、この糖鎖の細胞内での役割は未だ不明な点が多い [12]。例えば、 $\beta$ 4GalNAcT4同様にLacdiNAcを作る $\beta$ 4GalNAcT3遺伝子をヒト結腸がん細胞HCT116細胞に過剰発現させる

と、 $\beta$ 1インテグリンがLacdiNAc化され、この分子を介したシグナル伝達系が活性化され、細胞の接着能や遊走能そして浸潤能が増大することが報告されている [13]。一方、ヒト神経芽腫細胞SK-N-SH等に $\beta$ 4GalNAcT3遺伝子を導入し、 $\beta$ 1インテグリン糖鎖上のLacdiNAcが増大すると、逆にFAK、Akt及びERKのリン酸化が抑制され、浸潤能等の悪性形質が抑制されるなど [14]、細胞のタイプによって真逆の結果が報告されている。本研究においてもインテグリン糖鎖上のLacdiNAc化の増大に伴う、下流のシグナル伝達系分子のリン酸化状態に変化が期待されたが、FAK、Akt及びmTORのリン酸化に顕著な差異は見られなかった (図3c)。今後はインテグリンのみならず、他の受容体上糖鎖にも着目しLacdiNAcによる乳がんの悪性形質制御の分子機構の解明に取り組んでいく

予定である。

LacdiNAcは微量ながらも多くのヒトがん組織やがん細胞の糖タンパク質に存在し、組織特異的にその発現が増大・減少することから [2, 12, 13, 14]、腫瘍マーカーとして期待されている。実際にヒト前立腺がんでは前立腺特異抗原上のLacdiNAcの検出による診断法が提唱されている [15]。このようなことからLacdiNAcのがん細胞における役割の解明は非常に重要である。

### 謝辞

東北医科薬科大の伊左治知弥先生並びに顧建国先生にはモノクローナル抗 $\beta$ 1インテグリン抗体の供与、及び実験に関するアドバイスをいただきましたことに心よりお礼を申し上げます。

### 参考文献

- Hirano *et al.*, (2020) *Histochem Cell Biol* 153:17-26
- Kitamura *et al.*, (2003) *Int J Cancer* 105:533-541
- Hirano *et al.*, (2015) *Biochem Biophys Res Commun* 461:80-85
- Thiery and Sleeman (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-142
- Lamouille *et al.*, (2014) *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:178-196
- Lin *et al.*, (2017) *Oncol Rep* 37:895-902
- Lu *et al.*, (2014) *J Biol Chem* 289:34627-34641
- Colak and Dijke (2017) *Trend in Cancer* 3:56-71
- Varki (1993) *Glycobiology* 3:97-130
- Gu *et al.*, (2012) *Glycoconj J* 29:599-607.
- Isaji *et al.*, (2006) *J Biol Chem* 281:33258-33267
- Hirano *et al.*, (2014) *BioMed Res Int* Article ID 981627
- Huang *et al.*, (2007) *Mol Cancer Res* 5:543-552
- Hsu *et al.*, (2011) *Am J Path* 179:1394-1404
- Haga *et al.*, (2019) *Anal. Chem* 91:2247-2254

# 深海微生物と我々の関わり

## Links between deep-sea microbes and our lives

京都大学大学院農学研究科応用生物学専攻 中川 聡  
Satoshi NAKAGAWA

### 1. はじめに

地球表面の約7割を覆う広大な海。その水深は平均3,800mに達し、水面下には総延長70,000kmに達する大山脈（中央海嶺）や水深10,000mを超える海溝など、ダイナミックな地形が隠されている。深海の定義は複数あるが、光合成がほぼ不可能となる200m以深を深海とする場合、体積で見れば海の90%以上が深海にあたる。深海の水温は1年を通して2-4℃程度にすぎない。暗黒・高水圧・低温の深海は人類の侵入を拒む「代表的な極限環境」であると同時に、生物圏としての空間的広がりやを考慮すれば「ありふれた環境」と言うこともできる。人類が知っている海底は未だ10%に満たないと言われているものの、栄養に乏しい深海底は、基本的に生物の気配がしない砂漠のような景色が広がっている。しかし顕微鏡を覗いてみれば、水深10,000m（水圧1,000気圧）を超えるマリアナ海溝チャレンジャー海淵にも多様な微生物（細菌すなわち真正細菌とアーキア）が生息し、その密度は海底に降り積もった堆積物1mlあたり1億細胞にも達する [1]。

海洋微生物の活動は、海水の化学組成や地球の大気組成までも左右するほど重要な役割を果たし、地球史を通して生物の進化や絶滅を促してきた。目には見えないが、海洋には現在 $10^{29}$ 細胞を超える微生物が棲息していると見積もられており、全海洋微生物を一直線に並べると、その長さは天の川銀河の直径の

10倍を軽く超える。微生物からクジラまで、海に棲息する多様な生物をバイオマス（生物の炭素重量）で見た場合、魚のような代表的海洋生物のバイオマスはごくわずかであり、海洋バイオマスの4分の3以上は長さ $1\mu\text{m}$ 程度の単細胞微生物（細菌）のもの、また、その8割以上が深海に存在すると見積もられている（図1） [2]。海洋に極めて多くの微生物が棲息していることはチャールズ・ダーウィンも指摘しているが（1845年）、海洋に生息する多様な微生物のうち、人類が実験室で培養できるのは現在でも全体の1%に満たない。世界中の海洋に分布し最も数多く棲息している微生物種ですら、その存在に人類が気づいた（遺伝子断片を検出した）のは1990年であ

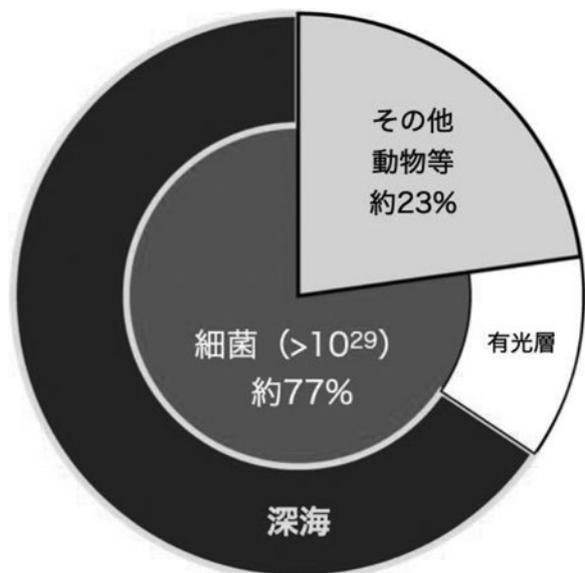


図1 海洋バイオマスの内訳と分布。[2]をもとに作成。

り、さらに、それが培養されたのは2002年のことである（その培養には現在でも極めて限られた研究者しか成功しておらず、正式な学名すら与えられていない）[3]。

このように海洋微生物は、数でもバイオマスでも「重要かつ最もありふれた生物」でありながら、そのほとんどは未だ名前すらついていない「ダークマター」のような存在である。我が国は海洋立国を掲げ、世界に誇る有人潜水艇や巨大海底掘削船のようなプラットフォームを有し、積極的に深海探査を推し進めてきた。深海への科学的アクセスは未だ容易とは言えないが、次世代シーケンサーや高分解能質量分析計といった科学技術の革新を受け、例えば真核生物の誕生過程に関する新しい学説が我が国の深海微生物学から誕生するなど[4]、我々の深海微生物への認識を変えるような新しい研究展開が見られるようになってきた。加えて、海底鉱物資源の開発が進むなか、ファッションデザイナーや公共機関等がスポンサーとなった海洋微生物探査により画期的な知見が得られるなど、従来の枠組みを打ち破る研究も誕生し[5]、海洋微生物学は身近でエキサイティングな科学的発見の舞台へと昇華しつつある。本稿では、著者らの研究グループが研究対象としてきた深海海底熱水活動域に棲息する微生物を切り口として、我々と深海微生物の関わりについて紹介したい。

## 2. 地球を食べる生物

人類を含め、身近な生物は全て光合成を起点とする食物連鎖の中にあり、直接的あるいは間接的に太陽光に依存している。一方、中央海嶺等の深海に形成される暗黒温泉のような環境、深海海底熱水活動域には太陽光に依存しない「地球を食べる」生物が棲息する。そのような生物群は1977年、東太平洋ガラパゴス島沖で行われた地質探査において偶然発見され、その後世界各地の海底に広く分布する

ことが明らかとなっている。1977年といえば既に人類は月に降り立つほどの科学技術を手にしていても関わらず、地球の深海底に独自の駆動力を有する豊かな生態系が存在することは想像もしていなかったのである。深海海底熱水活動域では、海底にしみ込んだ海水がマグマにより熱せられ、周囲の地殻物質と化学反応を起こした後に噴出している。熱水の温度は時に400℃を超えるばかりか、高濃度の有害重金属や還元的ガス成分（硫化水素・メタン・水素ガス等）を含む。「地球を食べる」生物達は、熱水を介して地球内部から供給される還元物質と、酸素や硝酸イオンといった海水中の酸化物質を反応させ、得られるエネルギーを用いて二酸化炭素を固定する「化学合成」により有機物を作り出す[6]。

これまで、口も肛門も持たない長さ2m以上にもなる巨大ミミズのような環形動物（ジャイアントチューブワーム）や、腹足部に鉄の鱗をまとった巻貝（スケーリーフット）など、世界各地の深海海底熱水活動域から500種を超える動物種が発見されており、固有種の多くは熱水噴出孔周辺の、噴出熱水と海水が混合する領域（ミキシングゾーンと呼ばれる）に高密度な群れを形成している（図2）。ミキシングゾーンの温度は5℃程度に過ぎず（瞬間的に10℃以上となることもあるが）、噴出熱水の影響は限定的である。深海海底熱水活動域に固有の動物は飼育が困難なため、その生活史や成長速度、寿命等の基礎的知見は極めて乏しいが、多くの場合ほぼ全ての栄養を細胞外あるいは細胞内に住ませた共生微生物に依存している。例えば図2に見られる白い甲殻類（ゴエモンコシオリエビと呼ばれる）は、腹部の剛毛に大量の化学合成微生物を付着させており（外部共生や付着共生と呼ばれる）、それを脚で掻き取って食べる（死んだ魚等を与えても通常見向きもしない）。またチューブワームや巻貝等においては、消化管が退化している代わりに特定の組

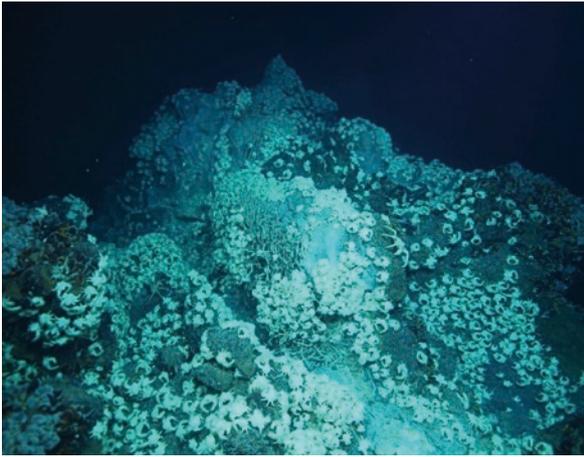


図2 中部沖縄トラフの熱水活動域（水深約1,000m）における、ミキシングゾーンの代表的光景。白く無数に見える甲殻類がゴエモンコシオリエビ。2枚貝（シシカヒバリガイ）やチューブワームも見える。©海洋研究開発機構

織が発達し、そこでは共生微生物が宿主生物の細胞内に共生している。例えば、チューブワームにはトロフォソームと呼ばれる共生微生物の専用組織が存在し、1gあたり $10^9$ - $10^{11}$ 細胞もの微生物が詰めこまれている。共生微生物がエネルギー源とする硫化水素はチューブワームにとって有毒であるが、チューブワームのヘモグロビンは酸素と結合する部位と硫化水素と結合する部位を合わせ持っており、共生微生物へ効率的に硫化水素を運ぶことができる [7]。微生物の栄養共生は陸上植物や昆虫でもよく見られるが、それらは宿主に不足する特定の栄養素（例えばビタミン）だけを共生微生物が補う場合がほとんどであり、宿主生物と共生微生物の相互依存度が極めて高い点は深海底熱水活動域の共生系の大きな特徴の1つである。

宿主と微生物の相互依存度が高いにも関わらず、深海底熱水活動域に棲息する固有の動物種のはほぼ全ては、卵の時期に共生微生物を有しておらず、幼生期等に共生微生物を環境中から選択的に獲得する [8]。例えば上記のスケリーフット（巻貝）について、1つの

群れから採取した個体群について細胞内共生微生物のバリエーションをゲノムレベルで調べたところ、個体差がほとんど検出されないことから（非同義置換すらほとんど検出されない）、個々の宿主は共生微生物を環境中から厳格に選抜していると考えられる [8]。一般に、宿主体外における共生微生物の優占度は低いにも関わらず、宿主が共生微生物を厳格に選択し、体内においてその局在性を制御できるメカニズムはほとんど知られていない。上記のゴエモンコシオリエビにおいては、体液中に特定の微生物に結合するレクチン様分子が検出されている [9]。

### 3. 共生微生物 *Epsilonproteobacteria*

地球上には様々な微生物共生系が存在するが、深海底熱水活動域にみられる共生系最大の特徴として、共生微生物として *Epsilonproteobacteria* 綱と呼ばれる系統群が優占する点が挙げられる。深海底熱水活動域以外の環境において *Epsilonproteobacteria* 綱が共生微生物として大規模に優占する例は皆無であり、むしろ本系統群は一般に *Helicobacter pylori*（胃潰瘍や胃癌の原因菌、別名ピロリ菌）や *Campylobacter jejuni*（腸炎等の原因菌）のようなヒトに蔓延する病原性微生物を多く含むことで知られている [10]。 *Epsilonproteobacteria* 綱を含む *Proteobacteria* 門は、陸上から海洋まで幅広い環境に見られる巨大系統群であり、大きく6つの綱に分類される。最もよく研究されているのは大腸菌を含む *Gamma* *proteobacteria* 綱であり、深海底熱水活動域では上記のチューブワームやスケリーフット等が *Gamma* *proteobacteria* 綱の硫黄酸化細菌を細胞内に共生させている。 *Epsilonproteobacteria* 綱の微生物は、 *Gamma* *proteobacteria* 綱の微生物とともに深海底熱水活動域における1次生産者として普遍的に優占しており、特に熱水噴出

孔近傍において上記のゴエモンコシオリエビや巻貝の仲間に細胞内～細胞外共生するとともに、単独生活型微生物としても優占する（その優占度は多くの環境で90%を超える）[11, 12]。深海底熱水活動域に棲息する*Epsilonproteobacteria*は培養が困難とされ長らく性状未知の微生物であったが、著者らは世界各地の深海底熱水活動域を調査し、現場に優占する*Epsilonproteobacteria*を数多く分離培養してきた[10]。一般に深海微生物は水圧を必要としないが、深海底熱水活動域に棲息する*Epsilonproteobacteria*の多くは大気中の酸素を嫌う嫌気性～微好気性であることから、培養に際しては培養容器内の空気を適切なガスに置換する必要がある。培養実験により本微生物群は、水素ガスや還元的硫黄化合物を電子供与体、硝酸イオンや酸素を電子受容体として利用する化学合成微生物であることが明らかとなった[13, 14]。

我々は深海底熱水活動域に優占する*Epsilonproteobacteria*の全ゲノム解析により、本微生物の多様な呼吸経路・炭素固定（還元的TCA回路）・重金属の解毒・環境応答を担う遺伝子群を網羅的に同定することに成功した[15]。深海底熱水活動域に優占する*Epsilonproteobacteria*に毒素やその分泌系をコードする遺伝子は見つかっていないが、ピロリ菌やキャンピロバクターなど近縁の病原性*Epsilonproteobacteria*と同様に、通常微生物が有するDNA修復遺伝子を多数欠損し、ゲノムが柔軟に変化することが示唆された[16]。これらの特徴は本系統群の微生物が、世界各地の深海底熱水活動域に広く分布し、物理化学的な変動が激しい本環境で生存・優占するのに貢献すると考えられる。また、*Gammaproteobacteria*の共生微生物と比較すると、炭素固定経路（*Gammaproteobacteria*ではカルビン回路）や硫黄酸化経路（*Gammaproteobacteria*ではsox非依存型、*Epsilonproteobacteria*で

はsox依存型）等に違いが見られ、これらは各微生物の生息環境の違いを反映するとともに、宿主生物側から見たときの共生微生物としての利用価値の違いにも直結すると考えられる[8]。

#### 4. 深海微生物と人類に蔓延する病原微生物のリンク

深海底熱水活動域に優占する共生*Epsilonproteobacteria*とヒトの病原性近縁種（ピロリ菌やキャンピロバクター）に見いだされた興味深い共通点として、それらが高度に保存されたN型糖鎖の合成遺伝子群を有する点が挙げられる。糖鎖は全ての生物細胞の表層にある「生物の顔」として主に真核生物において研究されてきたが、近年、原核微生物においても感染から共生にいたる幅広い異種生物間相互作用において、重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。例えば病原性*Epsilonproteobacteria*であるキャンピロバクターは、バチロサミンと呼ばれる特異な糖を還元末端に持ち、主にNアセチルガラクトサミンからなるユニークな構造のN型糖鎖（真核生物のものとは大きく異なる）により様々なタンパク質を修飾するが、本糖鎖合成能は感染を始めとする本菌の病原性において重要な役割を担っていることが示されている[17]。またピロリ菌ではN型糖鎖が報告されていないものの、別種の*Helicobacter*においてN型糖鎖関連遺伝子群のクラスタが発見され、糖鎖の合成も確認されている（関連遺伝子のレパートリーは似ているが、糖鎖の構造はキャンピロバクターのものとは大きく異なる）[18]。深海底熱水活動域に優占する共生*Epsilonproteobacteria*にも、キャンピロバクターのものと類似したN型糖鎖合成遺伝子クラスタが見いだされた。その一部については酵素学的性状も報告されたが[19]、実際に合成されるN型糖鎖の構造や修飾分子・生理機能に関する研究の進展だけ

でなく、糖鎖工学分野での応用展開も期待される [20]。

深海底熱水活動域に優占する共生 *Epsilonproteobacteria* のゲノム進化的解析等により、人類に蔓延する病原性 *Epsilonproteobacteria* (ピロリ菌やキャンピロバクター) が、深海底熱水活動域のような厳しい環境に棲息する化学合成共生微生物と共通のルーツを有することが明らかとなりつつある。しかしながら、これまでに知られている *Epsilonproteobacteria* の棲息環境は限られており、「深海底熱水活動域に優占する共生微生物」と「人の消化管に感染する病原菌」の間には、大きなミッシングリンクが存在すると言わざるをえなかった。そこで我々は様々な浅海性無脊椎動物に共生する微生物群を解析し、興味深い新規 *Epsilonproteobacteria* を発見している [21, 22]。特にヒトデの仲間において、その体腔液 (我々の血液とリンパ液を合わせたものに相当し、免疫細胞や様々な抗菌物質が含まれることから、通常は無菌的であると考えられ

てきた) に、ピロリ菌の近縁種にあたる新規 *Epsilonproteobacteria* が特異的に優占して棲息する (時に検出された微生物の95%以上を占め、かつ、それらは死菌ではない) ことを発見した [21]。ピロリ菌の近縁種はこれまで主に陸上脊椎動物の消化管だけに発見されており (海棲哺乳類からも検出例があるが)、ヒトデに発見した本 *Epsilonproteobacteria* は、ヘリコバクター関連微生物の常識を打ち破る存在といえる。本 *Epsilonproteobacteria* は今のところヒトデの体外では培養できないため、人類に対する病原性の有無やヒトデとの相互作用等については未解明であるが、安全・安心な水産資源の持続的利用にむけた研究の必要性を示唆するとともに、深海の共生微生物から人類の病原性微生物へといたる *Epsilonproteobacteria* 進化の謎を紐解く鍵を握る存在として注目される (図3)。

### 5. まとめ

人類に蔓延するピロリ菌やキャンピロバクターといった病原性 *Epsilonproteobacteria*

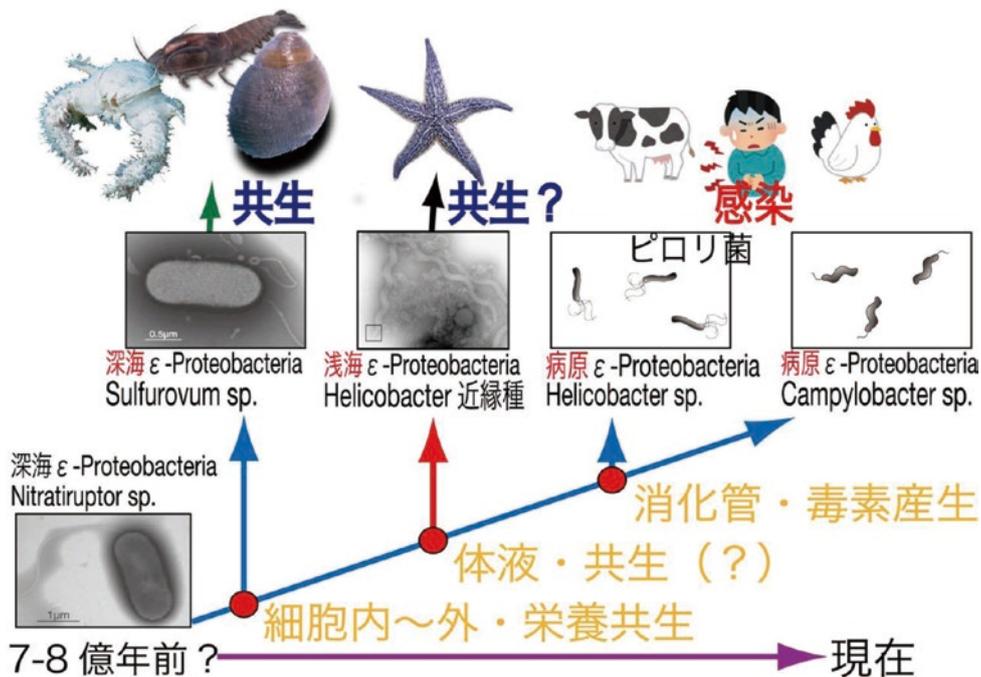


図3 深海底熱水活動域に優占する共生微生物やヒトの病原菌を多く含む系統群 *Epsilonproteobacteria* の進化のシナリオ。

については古くから膨大な研究例があるものの、それらのルーツを海洋に求め、進化の観点からその生理性状や病原性を捉えようとする研究展開は、近年の海洋科学技術の進歩や分子生物学分野の技術革新により初めて可能となったものといえる。深海底熱水活動域や浅海性無脊椎動物に共生する *Epsilonproteobacteria* の研究を足がかりとして、新たな学術的発見はもちろん、病原性 *Epsilonproteobacteria* の新しい特異的治療法の開発や、糖鎖関連遺伝子群の応用展開、さらには安全安心な水産資源の利用や海洋保全といった、我々の生活と密接に関わりのある幅広い研究展開が実現可能となり、極めてエキサイティングな時代を迎えている。

#### 謝辞

著者らの研究は、2014年度野口遵研究助成金のほか、科学研究費補助金（20687003, 23687004, 21658072, 25660146）などの援助により行われました。

#### 参考文献

1. T. Nunoura, Y. Takaki, M. Hirai, S. Shimamura, A. Makabe, O. Koide, T. Kikuchi, J. Miyazaki, K. Koba, N. Yoshida, M. Sunamura, and K. Takai: *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E1230 (2015).
2. J. Kallmeyer, R. Pockalny, R. Adhikari, D. Smith, and S. D'Hondt: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16213 (2012).
3. S. Giovannoni, and U. Stingl: *Nat Rev Microbiol* 5, 820 (2007).
4. H. Imachi et al.: *Nature* 577, 519 (2020).
5. S. Sunagawa et al.: *Nat Rev Microbiol* 18, 428 (2020).
6. S. Nakagawa, and K. Takai: *FEMS Microbiol Ecol* 65, 1 (2008).
7. C. L. Van Dover, *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. (Princeton University Press, Princeton, 2000).
8. S. Nakagawa et al.: *ISME J* 8, 40 (2014).
9. S. Fujiyoshi, H. Tateno, T. Watsuji, H. Yamaguchi, D. Fukushima, S. Mino, M. Sugimura, T. Sawabe, K. Takai, S. Sawayama, and S. Nakagawa: *Microbes Environ* 30, 228 (2015).
10. S. Nakagawa, and Y. Takaki: *Encyclopedia of Life Sciences*, a0021895 (2009).
11. H. Muto, Y. Takaki, M. Hirai, S. Mino, S. Sawayama, K. Takai, and S. Nakagawa: *Microbes Environ* 32, 330 (2017).
12. S. Nakagawa, K. Takai, F. Inagaki, H. Chiba, J. Ishibashi, S. Kataoka, H. Hirayama, T. Nunoura, K. Horikoshi, and Y. Sako: *FEMS Microbiol Ecol* 54, 141 (2005).
13. S. Nakagawa, K. Takai, F. Inagaki, H. Hirayama, T. Nunoura, K. Horikoshi, and Y. Sako: *Environ Microbiol* 7, 1619 (2005).
14. J. Miyazaki, T. Ikuta, T. O. Watsuji, M. Abe, M. Yamamoto, S. Nakagawa, Y. Takaki, K. Nakamura, and K. Takai: *ISME J* 14, 1273 (2020).
15. S. Nakagawa, Y. Takaki, S. Shimamura, A. L. Reysenbach, K. Takai, and K. Horikoshi: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12146 (2007).
16. S. Mino et al.: *ISME J* 11, 909 (2017).
17. J. Duma, H. Nothaft, D. Weaver, C. Fodor, B. Beadle, D. Linton, S. L. Benoit, N. E. Scott, R. J. Maier, and C. M. Szymanski: *Front Microbiol* 11, 1191 (2020).
18. A. J. Jervis, A. G. Wood, J. A. Cain, J. A. Butler, H. Frost, E. Lord, R. Langdon, S. J. Cordwell, B. W. Wren, and D. Linton:

- Glycobiology* 28, 233 (2018).
19. D. C. Mills, A. J. Jervis, S. Abouelhadid, L. E. Yates, J. Cuccui, D. Linton, and B. W. Wren: *Glycobiology* 26, 398 (2015).
20. A. L. Lewis, N. Desa, E. E. Hansen, Y. A. Knirel, J. I. Gordon, P. Gagneux, V. Nizet, and A. Varki: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13552 (2009).
21. S. Nakagawa, H. Saito, A. Tame, M. Hirai, H. Yamaguchi, T. Sunata, M. Aida, H. Muto, S. Sawayama, and Y. Takaki: *Sci Rep* 7, 8764 (2017).
22. M. Enomoto, S. Nakagawa, and T. Sawabe: *Microbes Environ* 27, 300 (2012).

# コロナ後の時代を支えるフレキシブル医療機器の 研究開発と展望

Flexible medical devices to support the post-Corona era

大阪大学産業科学研究所 関谷 毅  
Tsuyoshi SEKITANI

## 概要

新型コロナウイルス感染症が世界的に拡大し、パンデミックとなっている。これにより社会生活の在り方が大きく変わり、“三密の禁止”に代表される新常态(ニューノーマル)が形成されている。このような社会生活において、科学技術の社会への貢献が改めて注目を集めている。

例えば、ヒトを介することなくコミュニケーションをとることができるデジタル技術は、急速にその適用領域を広めており、まさにデジタル革新【デジタルトランスフォーメーション (DX)】を構築している。超少子高齢社会が進む我が国においては、“岩盤規制”とも称されていた医療分野におけるDXも急速に社会に浸透しており、遠隔医療へ向けた法整備も進んでいる。

このような社会背景の中、本稿では「コロナ後の時代を支えるフレキシブル医療機器の研究開発と展望」と題して、私の取り組みを紹介する機会をいただいた。装着感なく、違和感を生じさせることなくシート一枚を身体に貼り付けるだけで、脳関連疾患の早期発見や脳のヘルスケアに繋がる電子デバイス、医療機器の取り組みである。

本稿では具体的には、以下の4章により構成する。

## 1. 野口遵研究助成テーマ

「装着感のないパッチ式血圧センサシート  
の開発」

## 2. 野口遵賞テーマ

「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」

## 3. 残されている課題と今後の取り組み

## 4. 将来展望とまとめ

誰にとっても他人事ではない「医療・ヘルスケア」において、科学技術への期待は大きい。使用するヒトへ負担をかけることなく、健康状態を正確に計測することを目指し、柔軟性や伸縮性を有するエレクトロニクス(フレキシブル・ストレッチャブルエレクトロニクス)の研究開発を続けてきた。この技術が2020年夏に医療機器認可を受けるに至るまでの取り組みを紹介できれば幸いである。

## 1. 野口遵研究助成テーマ「装着感のないパッチ式血圧センサシートの開発」とその進展(目的)

2016年より2年間、野口遵研究助成金による支援を得て、無装着感により、意識することなく24時間血圧モニタリングができるシステムの基盤技術開発【研究テーマ：装着感のないパッチ式血圧センサシートの開発】に取り組んだ。

関谷らが独自に開発してきた“違和感が生

「生じることなく密着できる柔軟センサ」をシステムに搭載することで、いつでも手軽に血圧計測可能なエレクトロニクスシステムの基盤技術を構築することを目的に取り組んできた。本システムの特徴は、「柔軟センサ素子、ワイヤレス計測モジュール、信号処理用IC、電源制御回路と電池」から構成され、最大の特徴は、軽量・薄型・フレキシブルで、「装着感が生じることなく血圧の日内変動をモニタリングできる」点にある。

#### (取り組み概要)

野口遵研究助成研究開発では、二つの計測システムを開発し、その有用性、技術的優位性を検証してきた。

##### 1. 「光学的ドップラーシフト」

(⇒光源と光センサを搭載し、血液からの反射光もしくは透過光を利用して推定血圧を算出)

##### 2. 「シート型圧力センサ」

(⇒多点の圧力センサから、脈波伝搬速度を計測し、推定血圧を算出)

いずれも、生体に貼り付ける部分は柔軟性材料で構成し、積層搭載するワイヤレス通信モジュール計測回路と融合させることで常時血圧モニタリング可能な「装着感のないパッチ式血圧センサシートの開発」を進めてきた。

#### (研究開発の結果 & 現在の状況)

上記に示す二つの手法、いずれにおいてもワイヤレスシステムにより推定血圧 (\*1) の検出が可能であることを実証できた。(\*1) 従来の血圧計測では加圧することにより血圧を計測している。本研究開発では、装着感を与えないという観点から「加圧は行わない」。そのため、得られる血圧は、真の血圧ではなく、推定血圧となる。

本ハードウェアの研究開発と同時に、医療

機関と連携することで、実使用における課題抽出を行った。その結果「正確な計測と装着感の低減」は相反する性質を持ち合わせることを確認した。すなわち装着感を如何に低減しながら、計測精度を向上させるという取り組みにおいて共通点を見出した。

「光学的ドップラーシフト」型の血圧センサにおいては、光源の消費電力が大きく、必然的に大きなバッテリーを必要とする。これにより小型化、薄型化することが容易ではなく、24時間装着時に患者への負担が大きいことが、医療現場からの課題が挙げられた。

そこで、患者への負担を最小限に抑えることを目的として、小型かつ軽量の「シート型感圧(振動)センサ」に特化し、開発を進めている。脈波による振動から脈波伝搬速度を計測し、ここから血管の硬さを導くことで血圧を推定する手法である。大阪大学医学部付属病院をはじめ複数の医療機関と連携することで研究開発を進めている。

医療の現場では、簡易的に血圧や血管弾性度を知りたいというニーズが大きく、これを容易に計測できる「シート型感圧(振動)センサ」への期待が大きい。現在は、装着感を低減するための柔軟な電極材料、強誘電性材料(圧力検出材料)、デバイスの研究開発を進めている。柔軟材料の開発のみならず、ここから得られる信号の計測精度向上においてはハードウェアの側面とともに、信号処理アルゴリズムの開発において大きな最適化の余地があることを認識しており、ソフトウェアや独立成分分析を基軸とした機械学習の研究開発を進めている。

本研究助成を得て、生体適合性が極めて高い柔軟電極と、1マイクロメートル超薄膜有機薄膜の生体信号増幅回路を実現し、心電や筋電などの信号を正確に取得できる技術開発に成功した。本成果の一部は、関谷が筆頭著者として実験実施から成果取りまとめを担い、2016年4月29日出版のNature

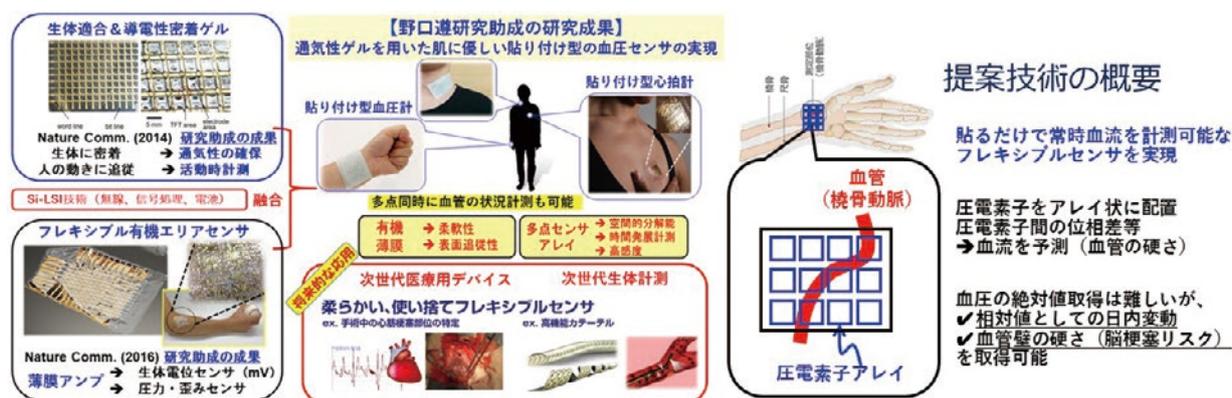


図1 野口遵研究助成テーマ「装着感のないパッチ式血圧センサシートの開発」の取り組みと成果の概要

Communications, Vol.7, 11425 (2016).) に掲載された。

生体の硬さ（ヤング率換算で100kPa程度）に近い導電性ハイドロゲルを表面積に大きなカーボンナノチューブ電極上に形成することで、低周波から高周波までの広い周波数帯域において安定的に生体活動電位が計測できる柔軟電極の開発に成功した。特に通気性や柔軟性材料とその高度なプロセス集積化技術によりこれまでにない生体適合性柔軟電極の開発に成功した。さらに、その電極の直近に薄膜の生体信号増幅機能を持たせることで、高品質な生体活動電位の計測を可能にした世界で初めての実証例である。

上記に関連する成果は、さらに6つの欧文学術論文誌に掲載されるなど、世界的にも大きな注目を集めた。（\*参考文献に記載）

#### （代表的成果に関する論文）

“Ultraflexible organic amplifier with biocompatible gel electrodes”

（生体適合性ゲル電極を搭載した優れた柔軟性を有する有機信号増幅回路、に関する論文）

Nature Communications, Vol.7, 11425 (2016).  
2016年4月29日出版

#### （本論文の要旨と成果）

本論文は、世界で初めて「生体適合性ゲル

を搭載した有機薄膜トランジスタによる生体信号増幅回路を報告した論文」である。さらに、「生体適合性電極の有用性を実証するために長期間の生体内埋め込みを実施し、3か月に及ぶ生体内計測を実現した初めての論文」である。

本研究開発では、「柔軟なゲル電極」、「生体信号を増幅する薄膜回路」、「これらの融合化プロセス」といった、材料・物性・材料科学・回路設計・システムに及ぶ広範な研究開発によって実現された。

この研究開発により、ミリボルト（mV）程度の心臓や筋電など臓器の生体活動電位を長時間位置ずれすることなく計測できる技術開発に成功した。フレキシブル薄膜センサの開発は世界で進められているが生体適合性ゲルの密着性の改善により、長時間の生体計測を可能にした前例はなく、本研究が初めてである。

その後、ヒトや動物に対する皮膚などへの長時間密着させた状態での研究開発も進め、通気性や生体適合性を向上したことから、皮膚への一切の侵襲性が認められないことを確認した。本成果は、野口遵研究助成により取り組んできた成果の一部である。

#### （本論文において残された課題）

ミリボルト程度の心電や筋電など「比較的

大きな生体活動電位」においては、上記システムにより安定的に計測できることを確認した。しかし、脳波などの計測では、マイクロボルト程度の計測精度を必要とする。申請者らはすでにシート型の脳波計測システムを実現しているが（\*注1）、介護空間などで見られる数日に及ぶ脳波計測では、計測の安定性に課題がある。特に、柔軟電極に使用している銀電極のイオンマイグレーションが大きな要因となり、マイクロボルト程度の脳波を安定的に計測できていない。

\*注1：大阪大学発ベンチャー PGV株式会社を設立し、社会展開を進めている。  
PGV（株）のWEBサイト  
<http://www.pgv.co.jp/>

野口遵研究助成テーマを経て、野口遵賞テーマ「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」へと展開した経緯

上記に示す通り、野口遵研究助成の支援を受けて「24時間連続して血圧計測可能なパッチ式血圧センサシート」の研究開発を進めてきた。ここでは、柔軟電極の開発により、その装着感を取り除くことに成功したが一方で、

残された課題が「長時間の安定的な連続計測」である。

これは、現在関谷らが開発を進めているパッチ式脳波センサシートにおいても同様の課題である。装着感、違和感の生じない生体計測技術において、高い計測精度を長期間維持することが共通した課題であり、克服すべきものであるとの想いを持った。このようにして「野口遵賞テーマ」では、柔軟電極が長時間の連続計測に耐える材料およびシステムの研究開発を提案するに至った。

（期待される社会的波及効果）

この開発により、長時間の連続血圧計測と連続脳活動計測を同時に実現できれば、「脳梗塞リスク」を特定するバイオマーカー創出することができる可能性が広がる。要介護の主原因である「脳梗塞」の予兆検出をご家庭内で手軽に行えるようにすることで、将来大きな課題となる介護分野へ大きく貢献する取り組みに結び付けることを目標に定めた。

2. 野口遵賞テーマ「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」とその進展

## シート型センサシステムによる生体ネットワークの構築

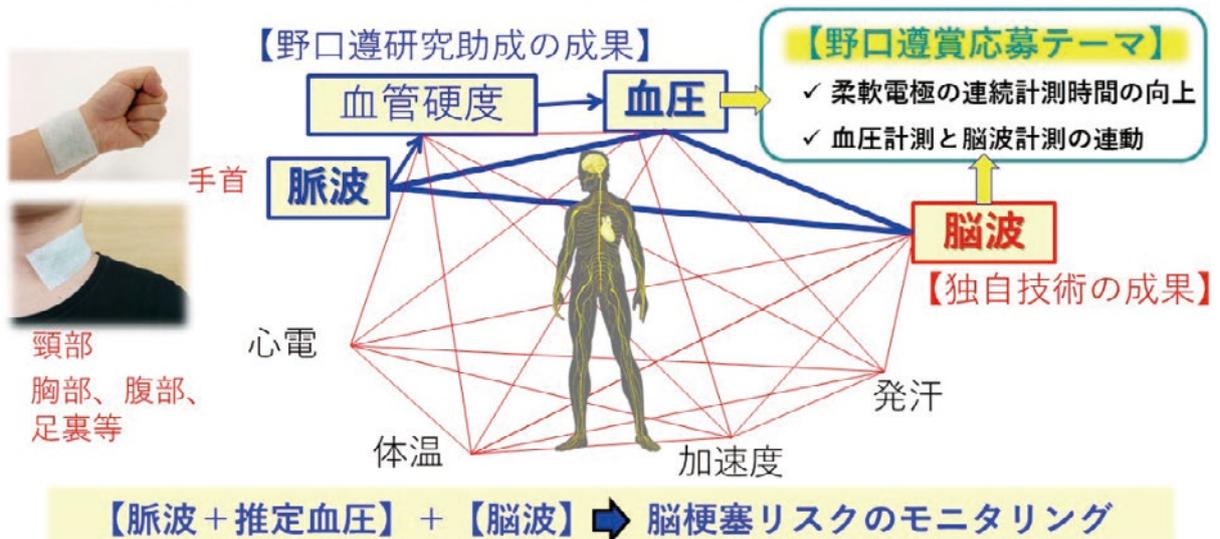


図2：装着感時の違和感がなく生体情報を計測できるようにするための生体ネットワーク構想

**(目的)**

厚生労働省の調べでは、要介護となる主原因のおよそ60%が、「脳関連疾患（認知症、脳梗塞など）」である。ところが、脳信号は、他の生体活動と比べて3～4ケタ小さく、手軽な計測は実現されていない（例えば、心電・筋電は数十ミリボルト（～mV）、脳波は数マイクロボルト（～ $\mu$ V））。その結果、「家庭内での手軽な脳のセルフケア」は実現が困難とされてきた。

関谷らは、世界に先駆けて【医療機器の精度を持つパッチ脳波センサ】を実現し、大学発ベンチャーPGV（株）を立ち上げることで、その技術を社会展開してきた（<http://www.pgv.co.jp/>）。

**(研究開発の内容)**

これまでの取り組みにおいて、生体計測技術開発で見えてきた課題は、「柔軟電極の長期間脳計測の耐久性」である。関谷らによって開発してきたフレキシブル脳波計、血压計はともに柔軟な電極を用いることにより、その装着感を抑制してきた。その一方で、柔らかさと導電性の両立は「水分子、すなわちハイドロゲルと柔軟電極材料（ここでは銀ナノワイヤを使用）」によって得られているため、乾燥によりその計測持続時間は限定的であった。近年の開発により、ハイドロゲルの乾燥速度を制御することに成功しているがより大きな課題は、導電材料において電流・電圧印加時にイオンが揺動することにより、電気伝導性を不安定化させる現象：イオンマイグレーションである。この現象は、数マイクロボルト以上の電圧揺動を生み出し、脳波計測における致命的なノイズとなる。したがって、現状におけるパッチ脳波センサ、および血压センサの計測持続時間は、イオンマイグレーションの影響が比較的小さい12時間以内にとどまる。しかし、今後、医療、ご家庭や介護空間での使用を満たすためには、数日程度の

計測安定性が求められている。

そこで野口遵賞テーマにおける研究開発では、マイクロボルト以下の脳波と血压計測を長期間（一週間）計測可能な柔軟電極を実現する取り組みに焦点を当てた。具体的には、柔軟電極を形成する銀ナノワイヤの表面を安定導電材料で被覆するナノメッキプロセス技術およびフラッシュアニールプロセス技術を開発することで、イオンマイグレーションを完全に抑え込む取り組みである。

本取り組みを成功させることで実現できる「未来の医療」は以下の二つである。

1. いつでも、だれでも、手軽な「脳活動と血压計測」の機会を手に入れることで、「ご家庭内で脳のヘルスケア」の時代を実現する。脳の健康管理を通して、要介護となる方々の人数を本質的に減らす。
2. すでに要介護となっている患者の負担のない「脳活動と血压計測」を通して、脳の健康はもとより、快不快の把握等、これまでの医療用センサでは把握が難しかったバイタル情報を取得し、QOL（Quality of Life）向上を実現する。

**野口遵賞研究テーマにおける取り組みと成果**

関谷らはこれまでの取り組みにおいて、0.1マイクロボルトまでの脳波を、ワイヤレス・シート型センサで実現しており、その有用性を社会に示している。この応用拡大には、上述の通り、12時間以上の脳波計測においても安定性を保つ必要があり、柔軟電極の耐久性デザインが不可欠である。

またさらに、マイクロボルト程度の微小な脳波計測を長時間安定して行うためには、「信号源である肌への的確な密着」と「信号を確保するための高い導電性」を兼ね備える必要がある。そこで、野口遵研究助成による研究助成で基盤技術を構築した通気性に富み高い生体適合性が認められている柔軟電極技

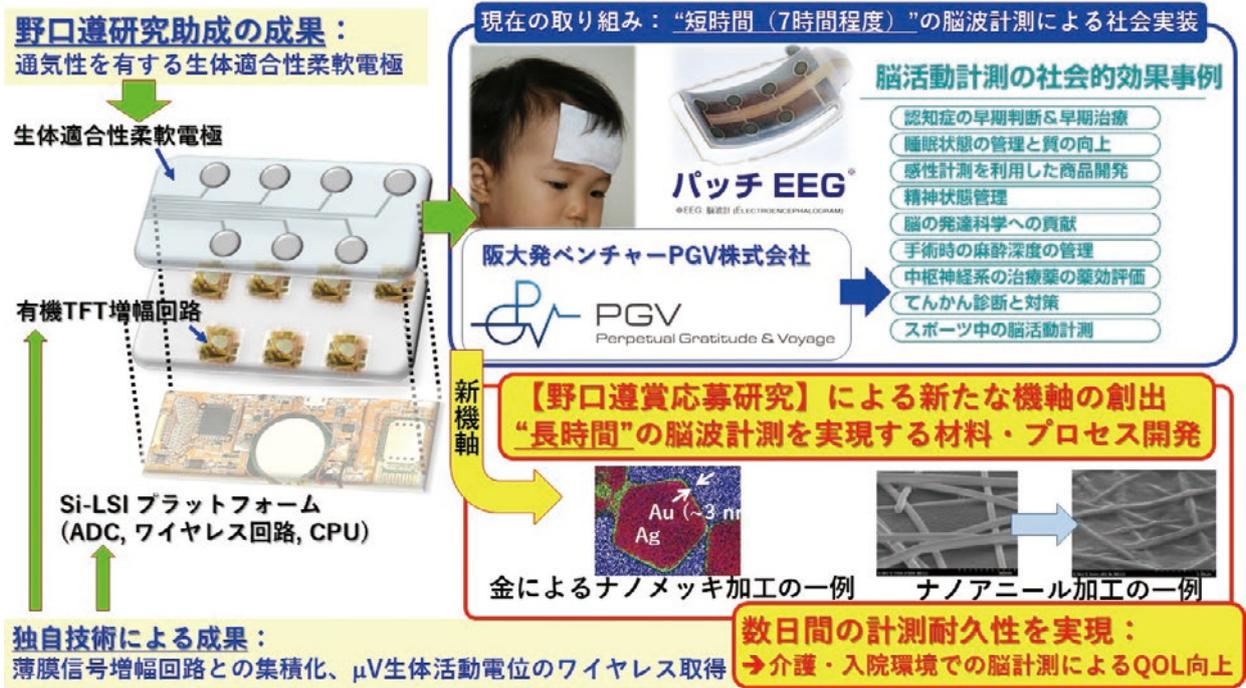


図3 野口遵賞テーマ「シート型センサシステムによる長時間脳活動・血圧計測への挑戦と介護分野への貢献」を示す。ここでは特に、銀をベースとした柔軟電極での最大の課題であるイオンマイグレーション（電圧・電流印加時に銀イオンが動き、キャリアの輸送安定性を乱し、ノイズの要因となる現象）を抑制する研究開発を実施

術および薄膜回路技術を用いてこれを実現した。さらに、野口遵賞の支援により長期的な計測精度を高度化することを目的に、柔軟性に富み、高い導電性を有する銀ナノワイヤーを導電材料とし、本目標を実現する取り組みを行った。

より具体的には、以下の二つの技術開発を主軸に研究開発を進めた。

1. 銀ナノワイヤー表面のナノメッキプロセス
2. ナノワイヤーの伝導物資としての純度を向上させるためのフラッシュアニールプロセス

本取り組みでは、3年間の計画を立て、これを進めてきた。関谷らは、すでにpA、nVレベルの電流・電圧ノイズ密度を計測可能な【独自の大型計測装置】を完成させており、これを性能指標（標準機）として用いた。

野口遵賞テーマ研究の初年度である2018年度は、野口遵研究助成の研究開発によって確立した通気性に優れた柔軟電極において、導電性を担う銀ナノワイヤーの表面に対して安定金属（金、プラチナ）によるナノメッキプロセスを行うことに成功した。このナノメッキを施した柔軟電極配線において、電流ノイズ密度の計測を行った結果、イオンマイグレーションに起因する電流量の不安定性を除去することに成功した。さらに金属の種類、メッキ厚み、熱アニール条件をパラメーターとしてノイズ密度との相関を見出し、生体計測における最適なメッキプロセスを実現した。

2年目となる2019年度には、有機薄膜生体信号増幅回路およびワイヤレス通信モジュールと集積化することにより、パッチ式脳波センサシステムを構築し、「従来の柔軟電極」と「ナノメッキプロセスを施した柔軟電極」の差異を、脳波計測を通して評価した。さらにISO10993等の規格に則り、生体適合性評

価を行い、用いている材料が高い生体適合性を有していることを確認した。この成果をもって阪大医学部産婦人科医、精神科、小児科、脳外科等すでに脳計測において連携している医師とともに、医療・ヘルスケアへ向けた取り組みを行った。

一連の成果は、エレクトロニクス分野における最高権威の欧文学術論文誌「Nature Electronics」に掲載され、その表紙を飾ることができた。

最終年度となる2020年度には、医学部との連携に特化したユーザーインターフェースの開発を行った。特に医療・ヘルスケアへ向けた取り組みから、新規開発電極を最適化し、医療用システムとしての有用性を検証し、その信頼性を向上させる取り組みを進めている。ここでは、24時間連続で血圧計測できるセンサと脳活動センサの同時計測から、生体ネットワークに関するBIG DATA取得を行い、脳血管疾患、認知症などの脳関連疾患に関する情報を集積化する取り組みを進めている。3年目以降も上記「脳活動+血圧の連続計測BIG DATAの構築」に努め、脳梗塞等の脳関連疾患に関するバイオマーカーの創出に取り組む予定である。

関連成果は、総合科学分野における最高権威の欧文学術論文誌「Science Advances」に掲載され、その表紙を飾ることができた。

### これまでの成果の総括

野口遵研究助成テーマにおいては、通気性に優れた柔軟電極の開発およびそれによる“ミリボルト (mV) 級の生体活動電位 (心電、筋電)”の計測について、そのシステム開発を進めてきた。さらに野口遵賞研究テーマでは、“マイクロボルト ( $\mu$ V) 級の生体活動電位 (脳波、胎児心電)”を対象として、かつ従来では実現できていない、12時間を超える連続計測が可能な柔軟電極を開発してきた。

これにより、長時間の脳活動計測を必要と

する介護空間において脳活動計測という新たなバイタル情報を提供することが可能になる。さらに、脳活動計測と血圧計測の長時間連続モニタリングから脳梗塞リスクとそのトリガー技術 (客観的指標に基づき患者への治療の優先順位をつける技術) を創出する大きな一歩となると確信している。

「“ご家庭で”、“手軽に”、“正確に”生体情報を測れる、可視化・日内変化を判断できるセンサ技術」は、超高齢社会を迎えた我が国を支える次世代社会基盤として欠かすことが出来ない。とりわけ医療、介護、福祉、ヘルスケアに資するウェアラブルセンサは、今後の社会的課題を克服する技術として注目されており、この真の社会実装は喫緊の課題である。

「装着感をなくし、無意識のうちに正確な生体信号計測するためにはどのような技術が必要であるか?」、現在、多くの研究者によりその取り組みが進められている。ここでは単体電子デバイスやその材料の開発だけでは不十分であり、「低消費電力の無線通信技術」、「薄膜・小型の大容量電池技術」、「膨大な情報を処理するためのサーバーや情報解析・処理・可視化技術」など、異分野連携の研究開発と融合技術が不可欠である。

近年では、モノのインターネット (Internet of Things : IoT) の重要性が認識されている。単体の電子デバイスとしての機能ではなく、互いに連携することで新たな機能を創出する試みであり、大きな波及効果が期待されている。このIoTの追い風により、無線技術、薄膜電池、情報処理技術 (人工知能 : Artificial Intelligence, AI) の開発が急速に発達している。これらの融合技術により真に社会実装可能なウェアラブルセンサの要素技術が整った。

### 3. 残されている課題と今後の取り組み

IoT社会の中で、ウェアラブルセンサにおける一般的な課題と社会的背景を上記の通り

取りまとめた。現在の最も大きな課題がある。それは、「キラーアプリケーションの創出」である。各種の優れたウェアラブルセンサはあるものの、それから得られる情報の信頼性の低さとあいまいさ、「装着するメリットを感じられない」という課題を残し、その応用範囲は現在のところ極めて限定的である。

関谷らは世界に先駆けて、このキラーアプリケーションとして「ご家庭で体温計、血圧計、体重計のように手軽に脳活動を計測できる“パッチ脳波センサ”」を提案している。おでこに貼り付けるだけで、医療機器の精度で脳活動計測できる。ヘッドギアタイプのような装着感や、髪の毛につける導電ゲルも必要としない。この手軽な脳波計の深化こそが、将来の我が国における最大の課題でもある認知症の早期発見と早期治療の社会基盤を実現する根幹と確信している。

#### 4. 将来展望とまとめ

生体を正確かつ、負担なく計測するためには、肌をとらえる材料開発が極めて重要であり、これに資する材料開発が重要であることは言うまでもない。我が国は、世界の電子情報産業の実に4割もの材料を提供する実力を持つ。この優れた電子材料技術を基軸に、次世代ナノIoT（\*注2）を実現する取り組みである。

\*注2：次世代ナノIoT（社会的な価値が高いが、従来技術では「コストと時間をかけなければ計測が困難」であった計測対象を、だれでも、手軽に、簡単に計測できるようにするIoTの取り組み）

#### 【社会的意義】

我が国では、“平均寿命”と“健康寿命（身の回りのことを自身でこなすことが出来る寿命）”の間には、男女ともおよそ10年あることがわかっている。この10年間は介護を必要

（要介護）とする。この要介護期間は、患者や家族のみならず、社会保障費においても多大な負担となっている現実がある。

厚生労働省の調べによれば、我が国の医療・社会保障費はすでに70兆円を超しており、2025年には150兆円にも到達するといわれている。大きな社会保障費負担となっている「要介護者」の総数は現時点で800万人を超し、この半数以上（約6割）は脳関連疾患（脳血管疾患（脳梗塞）と認知症）に由来する。すなわち、脳関連疾患に関連する「日々の脳ヘルスケア技術」が実現すれば、要介護者を圧倒的に減らすことが出来る。とりわけ家庭内で手軽に脳のセルフケアを行える健康機器の開発が極めて重要である。

上記を背景に、本研究提案では、手軽に、日常的、かつ必要に応じて長期的に脳活動を計測可能なシステムを開発し、脳の健康管理を手軽に実現できる基盤技術開発をこれからも行っていきたい。

関谷らが目指す「手軽な脳活動計測と、ご家庭内での脳のセルフケア実現」は、既に大きな社会的反響を得ている。例えば、大阪大学発ベンチャーとして発足したPGV株式会社は、すでにメガバンク3行のベンチャーキャピタル等から7億円近い資金調達を実施し、多くの医療機関と連携して、パッチ脳波センサを社会へ展開する取り組みを進めている。脳波など「これまで時間とコストをかけなければ計測することができなかった計測事象」を手軽に計測できる革新的技術開発は、社会的に極めて大きな期待があることを改めて感じた。

このような取り組みと社会的要請の中で、関谷の代表的な成果の一つであるパッチ脳波計が2020年夏に世界最薄・最軽量のテレメトリ式脳波計として医療機器の認可を受けるに至った。今後ますます医療機関との連携を進め、多くの医療に貢献していく。

我が国の最大の課題でもある「超少子高齢

社会における社会保障費（2025年に必要な介護職者数253万人、社会保障経費総額150兆円厚労省調べ）」の根本的な低減にこの技術を役立たせたいと強く願っている。そのためには、IoT・AI・DX技術の研究開発と利活用が不可欠である。今後もこのような研究開発を進め、真に役立つモノづくりを行うことで、コロナ後の社会において科学者としての責任を果たしていきたい。

### 謝辞

先進医療の取り組みを初期のころよりご支援くださりました野口遵研究助成および野口遵賞の研究支援に心より御礼申し上げます。この取り組みを加速さて夢を実現すべく進めてまいります。またこの研究開発の一緒に取り組んでくれた大阪大学産業科学研究所関谷研究室のメンバーに心から感謝いたします。

参考文献：助成期間中に出版された代表文献（査読付き欧文学術論文誌で、本研究開発に関連するもののみ記載）

1. M. Kondo, M. Melzer, D. Karnaushenko, T. Uemura, S. Yoshimoto, M. Akiyama, Y. Noda, T. Araki, O. G. Schmidt, and T. Sekitani “Imperceptible Magnetic Sensor Matrix System Integrated with Organic Driver and Amplifier Circuits” *Science Advances* Vol. 6, eaay6094 (2020).
2. T. Araki, T. Uemura, S. Yoshimoto, A. Takemoto, Y. Noda, S. Izumi, and T. Sekitani “Wireless Monitoring Using a Stretchable and Transparent Sensor Sheet Containing Metal Nanowires” *Advanced Materials* Vol. 32, 1902684 (2020).
3. M. Kondo, T. Uemura, F. Ishiwari, T. Kajitani, Y. Shoji, M. Morita, N. Namba, Y. Inoue, Y. Noda, T. Araki, T. Fukushima, and T. Sekitani “Ultralow-Noise Organic Transistors Based on Polymeric Gate Dielectrics with Self-Assembled Modifiers” *ACS Appl. Mater. Interfaces* Vol. 44, pp. 41561-41569 (2019).
4. M. Sugiyama, T. Uemura, M. Kondo, M. Akiyama, N. Namba, S. Yoshimoto, Y. Noda, T. Araki, and T. Sekitani “An Ultraflexible Organic Differential Amplifier for Recording Electrocardiograms” *Nature Electronics* Vol. 2, pp. 351-360 (2019).
5. A. Takemoto, T. Araki, Y. Noda, T. Uemura, S. Yoshimoto, R. Abbel, C. Rentrop, J. van den Brand, and T. Sekitani “Fine Printing Method of Silver Nanowires Electrodes with Alignment and Accumulation” *Nanotechnology* Vol. 30, 37LT03 (2019).
6. M. Kondo, T. Kajitani, T. Uemura, Y. Noda, F. Ishiwari, Y. Shoji, T. Araki, S. Yoshimoto, T. Fukushima, and T. Sekitani “Highly-Ordered Triptycene Modifer Layer Based on Blade Coating for Ultraflexible Organic Transistors” *Scientific Reports* Vol. 9, 9200 (2019).
7. T. Araki, F. Yoshida, T. Uemura, Y. Noda, S. Yoshimoto, T. Kaiju, T. Suzuki, H. Hamanaka, K. Baba, H. Hayakawa, T. Yabumoto, H. Mochizuki, S. Kobayashi, M. Tanaka, M. Hirata, and T. Sekitani “Long-Term Implantable, Flexible, and Transparent Neural Interface Based on Ag/Au Core-Shell Nanowires” *Advanced Healthcare Materials* Vol. 8, 1900130 (2019).
8. T. Yokota, T. Kajitani, R. Shidachi, T. Tokuhara, M. Kaltenbrunner, Y. Shoji,

- F. Ishiwari, T. Sekitani, T. Fukushima, and T. Someya “A Few-Layer Molecular Film on Polymer Substrates to Enhance the Performance of Organic Devices” *Nature Nanotechnology* Vol. 13, pp. 139–144 (2017).
9. S Yoshimoto, T. Araki, T. Uemura, Y. Noda, T. Sekitani “Flexible electronics for bio-signal monitoring in implantable applications” *IEICE Electronics Express*, Vol.14 No.20, 20172003 (2017).
10. M. Kondo, T. Uemura, T. Matsumoto, T. Araki, S. Yoshimoto, T. Sekitani “Ultraflexible and ultrathin polymeric gate insulator for 2 V organic transistor circuits” *Applied Physics Express*, Vol. 9, 061602 (2016).
11. T. Sekitani, T. Yokota, K. Kuribara, M. Kaltenbrunner, Takanori Fukushima, Yusuke Inoue, Masaki Sekino, Takashi Isoyama, Yusuke Abe, Hiroshi Onodera, Takao Someya “Ultraflexible organic amplifier with biocompatible gel electrodes” *Nature Communications*, Vol.7, 11425 (2016).
12. S. Lee, A. Reuveny, J. Reeder, S. Lee, H. Jin, Q. Liu, T. Yokota, T. Sekitani, T. Isoyama, Y. Abe, Z. Suo, T. Someya “A transparent bending-insensitive pressure sensor” , *Nature Nanotechnology* Vol. 11, 472 (2016).

－ 事業概要 －

## 2019年度活動概要

### The Activities of the Institute

常務理事 杉 智和  
Tomokazu SUGI

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。2019年度は当研究所の原資のおよそ90%を糖鎖研究、10%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。なお、本研究は2019年11月に終了した。

研究成果は学会報告、論文投稿を実施する

とともに、取得特許をホームページに掲載、及び野口研究所時報に掲載し配布するなどして、成果を広く使っていただく事を目指して活動している。

研究助成事業は、挑戦的な若手研究者を支援するために野口遵研究助成事業を継続している。本年度は「ライフサイエンス」、「エネルギー・資源・環境」及び「新しい電子材料・デバイス」の3課題で募集し、164名の応募の中から13名に助成金を授与した。本年度の野口遵賞は2015年度の助成者である東北大学の内田健一氏に贈呈した。受賞テーマ名は「磁性・スピントロニクス材料がもたらす革新的熱エネルギー制御原理・技術の開拓」であった。

人材の養成については大学への講師派遣、卒業研究生（2名）受け入れを継続して実施した。

#### 1. 研究事業

##### 1-1 糖鎖工学研究

##### (1) 糖鎖リモデリング法の開発と抗体上の糖鎖機能解明

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。我々はバイオ医薬品の中でも隆盛を極め分子内一か所のみ

に不均一なN結合型糖鎖を有する抗体医薬にフォーカスし、糖鎖リモデリング法により均一な糖鎖を持つ各種抗体分子を調製し、糖鎖構造と活性の相関を解析してきた。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、GlcNAc一個のみを有する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）、酵素反応を利用してこのアクセプターとドナーを人為的に連結後、目的物を分離精製する。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（抗体等）を自由自在に合成できる。これまでに高マンノース糖鎖、バイセクティング糖鎖、多分岐糖鎖等を含めた28種（25種はSGPより誘導）のドナー糖鎖を酵素・化学的手法で合成し、抗Her2抗体（ハーセプチン）or抗CD20抗体（リツキササン）由来のアクセプターと連結させ40種以上の高純度の均一糖鎖抗体を創製した。そして其々活性評価を実施し、糖鎖構造と機能に関する種々の重要な知見を得て報告してきた。（PLOS ONE誌2015、BBB誌2018、Mab誌2019<国衛研との共同>、Glycobiology誌2020）。

今年度は懸案であった一本鎖糖鎖搭載抗体の創製、評価が漸く完了し、これまでの糖異性体評価結果と併せ、抗体の機能において少なくともFcγRIIIaとの結合、ADCC活性発現に関しては複合型2本鎖のうちα1-6側糖鎖のみがあれば必要十分である事を結論づけた。（現在論文投稿準備中）

## (2) リモデリング技術を活用した抗体医薬の機能向上、改善へ向けた研究。

### ・ADCC活性の向上へ向けた探索

上記研究過程において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化糖鎖も同リモデリング法により抗体の糖付加部位に連結可能である事、PEG化

糖鎖搭載抗体もADCC活性を保持している事を見出した。今後、クリックケミストリーを活用し、アジドPEG化糖鎖搭載抗体に各種官能基を導入し、活性向上の可能性を探っていく。

### ・抗体・薬物複合体（ADC）創製スキューホールド（足場）の探索

ADCとは抗体医薬品にリンカーを介して細胞傷害性低分子医薬品等を結合させた複合体医薬品であり、両医薬の利点を併せ持つ第二世代の抗体医薬として期待されている。すでにグローバルに6品目（国内は4品目）が上市され、多くの新規品目が開発されつつある。しかし、抗体分子上に多数存在するシステイン残基、もしくはリジン残基を主な結合部位とする現行のADC創製法では、結合部位及び薬物搭載数の制御が困難であり、抗体分子の特定部位に、特定数の薬物を搭載させるADC創製技術の開発が望まれている。

そこで、我々は薬物搭載数の制御を可能とする技術として、抗体分子中1か所のみ存在する糖鎖付加部位に種々のアジド基含有糖鎖誘導体を搭載させたものをスキューホールドとし、クリックケミストリーを活用して薬物を連結する方法の検討を開始した。現在足場としては、①上述のアジド化PEG糖鎖誘導体、②G2糖鎖を酵素-化学的にアジド化した2種のADC創製技術を開発中である。

①に関してはアジド化PEG糖鎖誘導体搭載リツキササンのアジド基に蛍光物質をモデル薬剤として導入し、抗原発現細胞特異的な発光を予備的に確認した。今後は細胞障害性薬剤の導入、特異的細胞障害活性を確認した後、PEG鎖の鎖長、導入アジド基の数等を検討しスキューホールドの最適化を図っていく（一部は共同研究）。②に関してはモデル基質によるG2糖鎖の酵素-化学的手法による位置選択的修飾が確認できた。今後はアジド基含有誘導体の合成、G2糖鎖搭載抗体への付加修飾、クリックケミストリーを活用した薬剤導

入、活性評価を順次進め、スキヤットホールドとしての総合的性能を見極める。

### (3) 複数個所に糖鎖を有する糖タンパク質、糖ペプチドのリモデリング法の開発

一般に糖タンパク質は複数個所で糖鎖付加が起こっており、それぞれの糖鎖機能を解明するには特定の箇所に特定の糖鎖を付加できる技術が必要となる。上記抗体に適用したりモデリング技術では複数の付加部位を有する糖タンパク質への適用は困難と考えられる。GlcNAc-Asnもしくはその前駆体をタンパク質、ペプチドの特定部位に導入できれば上記のアクセプターとドナーの酵素連結反応により特定部位に特定糖鎖構造を有する糖タンパク質、糖ペプチドの合成が可能となる。我々は脱保護法の異なる2種の保護基を有するGlcNAc-Asnを利用して特定箇所に異なる糖鎖構造を有するモデル糖ペプチドを合成する事に成功した。また、GlcNAc-Tyrに関しては化学的にtRNAに連結させた後、in vitroの翻訳システムによりタンパク質に導入可能である事を確認した(北陸先端大との共同研究)。

今後はGlcNAc-Asnへの変換可能な前駆体の探索、直行系のアミノアシルtRNA合成酵素-tRNAの探索等を通して複数個所の糖鎖リモデリング技術の確立を目指す。

## 1-2 疾患と糖鎖の関連解析研究

### (1) 癌と糖鎖の研究

我々は糖鎖伸長に関わる特定の糖転移酵素である $\beta$ 4GalNAc-T4、 $\beta$ 4GalNAc-T2がそれぞれ乳がん細胞悪性形質の抑制、腎がん細胞の悪性化等に寄与する事を、当該遺伝子高発現細胞を用いて解明してきた。また今年度、悪性度の高い胃がん細胞の腹膜播種の過程で糖鎖結合タンパク質の一種であるガレクチン分子が重要な役割を果たしている事を、当該遺伝子を欠損させた細胞を用いた動物試験により突き止めた。有望な新規創薬標的の発掘、

新規治療法考案の糸口となる知見を得るべく、引き続き種々の切り口でこれら乳がん、腎がん、胃がん細胞に上記形質変換を引き起こすメカニズムの解析を実施する。

更に癌の診断、治療の新たな標的候補となる疾患特異的なグリコフォームを有する糖タンパク質を特定する事を目指し、グリコプロテオミクス (GP) アプローチによる探索研究を開始した。まずはエクソソームの膜糖タンパク質で、癌との関連性が種々報告されているテトラスパニンファミリーにフォーカスし、悪性形質を獲得した細胞とその親細胞それぞれが放出するエクソソーム間で当該タンパク質由来のN結合型糖ペプチドの比較解析を行う事を計画し準備を進めている。将来的にはO-結合型糖ペプチド解析法も含めた解析技術のブラッシュアップを行い、エクソソームの膜糖タンパク質全体、更には細胞膜総糖タンパクへとGP解析の幅を拡張し、新たな標的分子の発掘に挑む。抗体医薬を含めた創薬標的の枯渇が叫ばれて久しいが、GPアプローチは従来のオミックス手法では見逃されて来た標的を発掘できる可能性を秘めた手法であると期待される。

### (2) 骨格筋領域の疾患と糖鎖

加齢に伴い全身の筋量、筋力が低下するサルコペニア (近年疾患として認知) の診断、予防、治療に繋がる知見を提供すべく、糖鎖を切り口とした本病態の発症、進行進展のメカニズム探索研究を実施している。まずは本病態と糖鎖の関連を検証すべく骨格筋モデル細胞で糖鎖関連酵素の発現が異なる細胞株群を樹立した。今後これらの細胞の機能、糖鎖構造の解析等を実施し仮説を検証する。その後、重要糖タンパク質の同定作業、メカニズム解析等を実施していく。

### 糖鎖有機化学研究室

糖・複合糖質・糖タンパク質合成に向けた、

有機合成・酵素合成の要素技術研究、及び糖・糖タンパク質糖鎖の質量分析による構造解析技術研究を行っている。また、インフォマティクス技術を活用し、糖質科学支援システムであるグライコナビTMの開発も行っている。

#### (2019年度の年初計画)

- ① グライコプロテオミクス解析手法の確立を目指した技術開発を行う。
- ② 糖タンパク質、及び糖ペプチドの効率的合成法の開発を行う。
- ③ 非天然アミノ酸のタンパク質への導入技術を用いて、タンパク質を糖鎖で修飾するための要素技術研究を行なう。
- ④ ENGase 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。
- ⑤ PEG 化糖鎖を有する均一抗体の創製検討と機能評価、及びその応用。
- ⑥ JST・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」の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。
- ⑦ 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。
- ⑧ 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。
- ⑨  $\alpha$ -ジストログリカン糖鎖関連化合物等、生化学的知見に有用な糖質誘導体の合成を行う。
- ⑩ 糖質科学の研究進展に寄与する新規技術の探索研究を行う。

#### (今期の成果)

- ① グライコプロテオミクス解析手法の確立を目指した研究に関しては、<1>O-結合型糖タンパク質のグライコプロテオミクス解析手法の開発、及び<2>癌細胞由来エクソソーム上のN-結合型糖タンパク質のグライコプロテオミクスを行った。<1>に関しては、市販のホエイプロテインから得られる糖ペプチドライブラリーを用いて、エンドグリコシダーゼとO-結合型糖鎖認識プロテアーゼの活性の評価を行い、グライコプロテオミクスに有効なMS測定技術と消化酵素の開発に成功した。さらに、O-結合型糖鎖のグライコミクスで使用されているBEP ( $\beta$ -elimination pyrazolone) 法の改良を行い、ピーリング反応の少ない糖鎖切断効率の良い手法の開発にも成功した。<2>に関しては、癌細胞由来エクソソームのエクソソームマーカーである膜4回貫通型タンパク質CD9、CD63のターゲットグライコプロテオミクスを行い、それぞれのLC-MSによる解析方法を確立した。また、エクソソーム及び細胞から膜タンパク質を抽出し、CD63及びCD9を免疫沈降にてエンリッチする手法を確立した。
- ② 糖タンパク質、及び糖ペプチドの効率的合成法の開発としては、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。本年度は本手法のフコシルペプチド合成への応用を検討し、最終脱保護時における $\beta$ 脱離等の副反応をほぼ抑制できることを明らかにした。
- ③ 非天然アミノ酸のタンパク質への導入に関する研究に関しては、無細胞タンパク質合成系を用い、非天然型糖アミノ酸のタンパク質への導入に成功した。また非天然型糖アミノ酸の糖部位に対してグライコシターゼによる糖鎖転移反応が進行することが明らかとなった。

- ④⑤タンパク質の位置選択的なPEG化法、及びPEG化糖鎖を有する均一抗体の創製に関して、本年度は本手法を用いた抗体への位置選択的な薬物の導入、すなわち位置選択的に薬物が導入された抗体薬物複合体 (ADC) の合成法の開発を目的に、<1>PEG化糖オキサゾリンのPEG末端をアジド基で修飾した「アジドPEG化糖オキサゾリン」の合成、<2>抗体への位置選択的アジド基の導入及びクリックケミストリーによるアジド基への基質の導入の検討を行った。アジドPEG化糖オキサゾリンの合成に関しては、昨年度までに予試験的には成功したが、収率や精製工程に一部問題があることも明らかとなったため、本年度はグラムスケール合成に適した合成ルートの見直しと最適化の検討を行った。その結果、<1>に関しては目的とするアジドPEG化糖オキサゾリンの1工程前の化合物まで、合成工程を確立することに成功した。<2>に関しては昨年度合成したアジドPEG化糖オキサゾリンを用い、ENGaseによりリツキシマブへの導入を行い、目的とするアジドPEG化リツキシマブの合成に成功した。さらに、得られたアジドPEG化リツキシマブに対してクリックケミストリーにより蛍光基の導入にも成功した。このようにして調製された蛍光化リツキシマブはCD20抗原を有する細胞に選択的に作用することが明らかとなり、アジドPEG化リツキシマブがADCの前駆体となりうる可能性が示唆された。
- ⑥⑦JST・統合化推進プログラム「糖鎖科学ポータル構築」に関しては、WURCSを活用したツール、複合糖質表記法、糖鎖構造の可視化ツールの開発を実施した。さらに糖鎖構造リポジトリGlyTouCanおよび糖鎖科学ポータルGlyCosmosの開発を実施した。また、糖鎖科学ポータル

GlyCosmosが日本糖質学会に公認された。糖タンパク質データベースの開発に関しては、“グライコナビTM”のコンテンツとして、疾患糖鎖データベース、糖鎖立体構造データベースの開発を実施した。

- ⑧ボロン酸誘導体を用いた新規糖鎖構造解析法の開発に関しては、有機ボロン酸のジオールと結合する性質を利用し、通常の質量分析法やNMR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、昨年度選定した糖鎖と親和性の高い有機ボロン酸を用い、2糖の糖鎖ライブラリーを用いた異性体識別能や糖鎖結合能に関する評価を行い、論文化のためのデータ解析を行った。
- ⑨有用な糖質誘導体の合成に関しては、AMED「難治性疾患実用化研究事業」の一環として、 $\alpha$ -ジストログリカンの糖アミノ酸ユニットであるMan-Thrの合成を行った。
- ⑩新規技術の探索研究に関しては、複合型糖鎖の非還元末端の新規修飾法開発を行った。高い薬物抗体比を有する抗体薬物複合体の開発を目的として、抗体へアジド基を8個、または16個導入する方法の開発を行った。その結果、モデル物質として用いた糖ペプチドに対して、アジド基4個 (抗体の場合のアジド基8個に相当) を導入することに成功した。

#### 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。

#### (2019年度の年初計画)

- ①LDN糖鎖による乳癌進行抑制メカニズム

を解明する。

- ② 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、新たな癌マーカーとしての可能性を検証する。
- ③ GalNAc-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。
- ④ 特定の組織の癌で異所的に発現が亢進するガレクチン-4に着目し、ガレクチン-4の癌転移・線維化に関与するメカニズムを解明する。
- ⑤ 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行う。
- ⑥ リモデリング技術を活用した抗体医薬の機能向上、改善へ向けた探索。
- ⑦ 確立した均一糖鎖構造を持つ糖タンパク質調製法を応用し、標的糖タンパク質を拡充すると共に、機能物質を有する糖タンパク質を調製して性質検討を行なう。

#### (今期の成果)

- ① 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  $\beta$ 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解析を進め、この糖鎖の増大によって乳癌細胞の間葉-上皮移行が誘導されることを明らかにした。
- ② 癌性変化に関連するグライコフォームに関する研究では、前立腺癌患者由来CTOS (Cancer tissue-originated spheroid) および前立腺癌細胞株由来PSAに共通に存在し、健常人精漿由来PSAにはほとんど存在しないグライコフォームをCon Aレクチンカラムを利用して分離することに成功した。その後、種々のレクチンカラムでの分析や質量分析等により、高分岐糖鎖型および無糖鎖型PSAを新たな癌マーカー候補として見出した。しかし、合成抗原による家兎免疫によって無糖鎖型PSA特異抗体の取得を目指したが目的とする抗体が得られなかった為、新たな前立腺癌スクリーニング方法の開発は断念し、それまで得られた結果をまとめて論文を行った。
- ③ GalNAc-DSLc4と腎癌悪性化に関する研究は、GalNAc-DSLc4安定発現株が分泌するエクソソームに着目し、腎癌の肺転移におけるGalNAc-DSLc4糖鎖抗原の「がん微小環境」構築への関与について検討を進めてきた。今年度は、血管内皮細胞へのエクソソーム添加実験からGalNAc-DSLc4安定発現株由来エクソソームがコントロールに比べて細胞の増殖を強く阻害することを明らかとし、real-time qPCR解析結果からも細胞周期関連遺伝子の発現変化を確認することができた。また、免疫系細胞に与える影響について検討を開始し、NK92細胞と腎癌細胞株との共培養実験により悪性腎がん細胞株由来のエクソソームがNK92細胞の細胞障害活性を低下させることを明らかにした。
- ④ 癌転移・線維化とガレクチンに関する研究では、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調べている。今年度は、CRISPR-Cas9システムによって作製したガレクチン-4ノックアウト細胞に加え、遺伝子導入によりガレクチン-4を再発現させたレスキュー株の作製も行った。これらの細胞をマウスの腹腔に投与して腹膜播種試験を行うと共に、株間で発現の変化

する分子の探索や腹膜播種に關与する細胞の性質を調べることにより、ガレクチン-4の腹膜播種への關与機構を様々な側面から解析した。

⑤骨格筋の機能変化と糖鎖の役割に關する研究は、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て予防や治療に關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、糖鎖関連酵素遺伝子をノックダウンさせた筋芽細胞株を樹立することができ、現在仮説を検証するためにこれらの細胞の機能や糖鎖構造の解析等を実施している。

⑥⑦HGPプロジェクトに記載。

### HGPプロジェクト

本プロジェクトは昨年度末に終了したが、今年度は成果の論文化に向けて各種作業を実施した。

多分岐糖鎖を有する抗体の調製については、ENGase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の至適化の検討とラージスケールでの調製を行った。G3a型3本鎖糖鎖、G3b型3本鎖糖鎖およびG2B型bisecting GlcNAc含有糖鎖は、それぞれEndoS2 D182Q変異体、EndoF3 D165Q変異体およびEndoF3を用いてコアフコースを有する抗CD20抗体（リツキシマブ）アクセプターに対する糖転移反応を実施し、各反応とも8～9割の効率で当該糖鎖を転移させることができた。またG4型4本鎖糖鎖の転移はEndoF3を用い、反応系に経時的にオキサゾリン基質を追加することで効率良く抗体アクセプターに当該糖鎖を転移させ、均一糖鎖構造を有する抗体を調製することができた。

また、コアフコースを有さないG0型糖鎖含有抗HER2抗体（トラスツズマブ）に対し

て各種糖転移酵素を作用させることで多分岐糖鎖を有する抗体を調製する手法については、今年度は新たに4本鎖糖鎖を有する抗体1種に關して純度を高めたものを取得し、3本鎖糖鎖を有する抗体4種および4本鎖糖鎖を有する抗体2種の調製が完了した。これら調製した多分岐糖鎖を有する抗体の表面プラズモン共鳴（SPR）法によるFc $\gamma$ レセプターとの相互作用解析では、新たにセンサーチップ側にFc $\gamma$ レセプターを捕捉し希釈系列を作った抗体を送液する形での測定系を採用し、2本鎖糖鎖を有するトラスツズマブと解離定数を比較した。

また、糖鎖間で構造的に異性体関係にある各種均一糖鎖抗体を調製して生物活性評価を行う研究では、トラスツズマブをターゲット抗体として新たに1本鎖糖鎖を有する抗体の調製も進め、SPR法によるFc $\gamma$ レセプターとの相互作用解析を実施した。これら分岐異性体糖鎖を有するトラスツズマブは、HER2高発現乳がん細胞株であるSK-BR-3をターゲットとした抗体依存性細胞障害（ADCC）活性測定によってG2、G0またはM3糖鎖を有するトラスツズマブとの活性比較を実施した。

これまでに確立してきた均一糖鎖抗体創製技術を活用し、糖鎖有機化学研究室で開発および合成したポリエチレングリコール（PEG）化糖鎖の非還元末端側にN3基を結合させたオキサゾリン誘導体の抗体糖鎖結合部位への導入を検討した。さらにN3基を介したヒュスゲン環化付加反応により糖鎖結合部位に化合物を導入した抗体も調製し、培養細胞を用いた実験へと展開した。

また糖鎖有機化学研究室が調製したホエイ由来のO型糖鎖含有糖ペプチドなどの解析に用いる新規のムチン分解酵素3種類を大腸菌発現させ、その調製と活性の確認を行った。その結果、これらの酵素にはNeuAc  $\alpha$  2,3Gal  $\beta$  1,3GalNAc-あるいはGal  $\beta$  1,3GalNAc-といったO-型糖鎖が結合したSer/Thr近傍のペ

プチド結合を切断する活性が認められた。

### 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。2019年度は、フルオラス科学研究会第12回シンポジウムを名城大学松儀真人教授にご尽力いただき、10月18日名城大学天白キャンパス・タワー 75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)

- ・ 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)
  - ・ 東京化成工業株式会社
  - ・ 北陸先端科学技術大学院大学 (芳坂貴弘教授)
  - ・ 大阪大学大学院理学研究科 (深瀬 浩一 教授)
  - ・ 慶応義塾大学医学部百寿総合研究センター (佐々木 貴史 講師)
  - ・ 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 シニアフェロー)
  - ・ 東海大学工学部応用化学科 (稲津 敏行 教授)
  - ・ 北海道大学大学院医学研究科 (古川 潤一 特任准教授)
  - ・ 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)
  - ・ 立命館大学 (松村 浩由 教授)
- ・ 国立研究開発法人科学技術振興機構 (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: 糖鎖科学ポータル構築
  - ・ 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: 新規修飾体リピート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
  - ・ 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)  
「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」  
研究開発課題名: 革新的中分子創薬技術の開発/中分子シミュレーション技術の開発
  - ・ 科学研究費補助金 基盤研究 (B)  
研究開発課題名: 老化現象の解明に資する、オープンデータを体系的に利用した知識推論基盤の構築
  - ・ 科学研究費助成事業 (科学研究費補助金)  
研究成果公開促進費 (データベース)  
データベース名称: グライコナビ

### (共同研究)

- ・ 旭化成株式会社

## 2. 研究助成事業

### 2-1 野口遵研究助成金

2009年度より野口遵研究助成金を始めた。本助成金は国内の大学またはそれに準じる研究機関に所属する39歳以下の若手研究者を対象に、ライフサイエンス、エネルギー・資源・環境、新材料・デバイスの3分野で募集し、2019年度は164件の応募の中から13件に第11回助成金を贈呈した。

本助成金の採択者は11年間で延べ150人となった。過去の採択者のその後の調査では、職位が上がった研究者、各種の賞の受賞者も多くみられ若手研究者の研究を助成するという本助成金の趣旨にそった成果が得られつつある。本年度より、多様な雇用形態に対応し、よりフレッシュな研究者や女性研究者の応募拡大を図るため、非常勤でも応募可能とした。

その結果、女性の応募者数の大きな増加がみられた。2020年度も野口遵研究助成金を継続する。

## 2-2 野口遵賞

2014年度に「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。2019年度は2015年度、2016年度の採択者の中から東北大学の内田健一氏に「第6回野口遵賞」を贈呈した。

## 2-3 10周年記念講演会

本研究助成制度は10周年を迎えその記念事業として講演会を開催した。副題を「若き挑戦者とともに化学の力で未来を動かそう」とし、過去の採択者5名に講演を依頼し化学の未来を考える機会を提供した。基調講演は本助成金の選考委員を務める、リチウムイオン電池の発明と事業化の功績をもつ旭化成(株)名誉フェローの吉野彰氏に依頼した。この一ヶ月後ノーベル化学賞を受賞され時宜に

適った講演会となった。

## 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。2019年度は2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 3件(うち共同出願 1件)
- ・国内特許公開 0件(うち共同出願 0件)
- ・国内審査請求 4件(うち共同出願 2件)
- ・国内特許登録 3件(うち共同出願 0件)
- ・PCT出願件 1件(うち共同出願 0件)
- ・外国特許出願 0件(うち共同出願 0件)
- ・PCT公開 0件(うち共同出願 0件)
- ・外国特許公開 0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)

### (3) 学会発表 24件 (うち国際学会3件)

### (3) 誌上发表 6件

### (4) 依頼講演 4件

## 【別添資料1】

フルオラス科学研究会第12回シンポジウムプログラム

2019年10月18日 (金)

名城大学天白キャンパス タワー75 〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口一丁目501番地

フルオラス科学研究会

9:50~10:00 会長挨拶

10:00~10:15 座長: 中村 修一 (名古屋工業大)

口頭発表 O-1

キラルp-Cu(II)触媒によるエナンチオ選択的 $\alpha$ -フッ素化反応

○石原 一彰、西村 和揮、山川 勝也 (名大院工)

10:15~11:00 座長: 矢島 知子 (お茶の水女子大)

招待講演 1

ヘキサフルオロイソプロピルアルコール(HFIP)のカチオン安定化効を活用する合成反応

市川 淳士 教授 (筑波大学大学院数理物質科学研究科)

- 11:15~12:00 座長：網井 秀樹 (群馬大)  
招待講演 2  
フェイズ・バニシング法：フルオラス溶媒の疎有機性と大きな比重を活用した有機合成手法  
松原 浩 教授 (大阪府立大学大学院理学系研究科)
- 13:30~14:15 座長：伊藤 彰近 (岐阜薬科大)  
招待講演 3  
含窒素芳香環の特性を活用したアルキル化剤の開発  
国嶋 崇隆 教授 (金沢大学大学院医薬保健学総合研究科)
- 14:15~14:45 座長：折田 明浩 (岡山理科大)
- 14:15~14:30 口頭発表 O-2  
フルオラス分離技術を利用した微量生体成分の HPLC 分析法の開発研究  
轟木 堅一郎 (静岡県立大薬)
- 14:30~14:45 口頭発表 O-3  
フッ化炭素側鎖を持つ蛍光色素を含むシアリダーゼプローブの合成  
○池田 潔 1、紅林 佑希 2、南 彰 2、高橋 忠伸 2、鈴木隆 2、寺岡 文照 1、大坪 忠宗 1 (広島国際大薬 1、静岡県立大薬 2)
- 15:00~15:45 座長：三浦 剛 (東京薬科大)  
招待講演 4  
パーフルオロシクロペンテン誘導体を触媒として用いた合成反応の開発  
是永 敏伸 教授 (岩手大学理工学部化学・生命理工学科)
- 16:00~16:45 ポスターセッション (タワー75ラウンジ)
- P-1 フェイズ・バニシング (PV) 法によるボランの発生その利用  
○曾我 寧々、松原 浩 (阪府大院理)
- P-2 DITB を用いた臭素化反応へのフッ素溶媒の利用  
○太田 史弥、湯畑 康太郎、松原 浩 (阪府大院理)
- P-3 含フッ素 Deng ウイルス感染阻害剤の合成研究 (Ⅲ)  
○寺岡 文照、向原 大貴、佐藤 理貴、大坪 忠宗、池田 潔 (広国大薬)
- P-4 ホスフェート型フルオラス抽出剤によるセリウムイオンの抽出  
○横内 優、山口恭弥、広瀬貴也、稲津敏行、浅沼徳子 (東海大・工)
- P-5 固相/液相間移動型フルオラスプロリン触媒を用いる不斉アルドール反応  
○小林 佑基、大林 里帆、石原 稿太朗、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大農)
- P-6 分子内フルオロフィリック効果を活用した鉄 (III) サレン錯体の不斉空間構築と不斉エポキシ化  
○渡辺 優樹、小林 佑基、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大農)
- P-7 DPPAによるフルオラス媒体中でのBeckmann転位経由型1,5-tetrazole合成  
○石原 稿太朗、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大農)
- P-8 ホスホリルイナミンを出発原料に用いたアミノトリアゾール合成  
○折田 明浩、奥田 靖浩、今福 和篤、土田 喜之、鯖戸 泰生 (岡山理科大)

- P-9 有機分子触媒を用いた  $\alpha, \beta$ -不飽和トリフルオロメチルケトンに対する不斉Henry反応  
○河田 雅宏、小坂井 皓啓、山田 美咲、阿久津 裕士、中島 康介、平島 真一、三浦 剛 (東京薬科大)
- P-10 [2.2] パラシクロファン骨格を有する面不斉ビスチオウレア触媒によるニトロアルカンの付加反応  
○吉田 圭佑、松本 高利、本山 大夢、服部 友美、鈴木 晶絵、霜依 莉子、武田 紗和、小園 友明、野田 さやか、武永 尚子、北垣 伸治 (名城大薬)
- P-11 ビスイミダゾリン-銅 (II) トリフラート触媒によるケチミンへの不斉ビニロガス-マンニッヒ反応の開発  
○松坂 康市、中村 修一 (名工大院工)
- P-12 オキシラニルアニオンを用いた Gymnocin-B の GHIJKL フラグメント合成  
○坂井 健男、榊原 英晃、尾本 弓美、常川 真里菜、森 裕二 (名城大薬)
- P-13 酸化型ステロイドの自在合成法の開発  
渡邊 正悟, 西川 俊夫、○中崎 敦夫 (名大院生命農)
- P-14 ペリレン光触媒を用いたビニルスルホンの脱スルホニル化反応  
○渡部 光、中嶋 和輝、枝川 領太、奥田 靖浩、福山 高英、柳 日馨、折田 明浩 (岡山理科大)
- P-15 糖加水分解酵素を利用したタンパク質の位置選択的な PEG 化法の開発  
後藤 浩太郎、朝倉 大堯、高島 晶、田中 智博、黒河内 政樹、森 昌子、松田 昭生、○水野 真盛 (公益財団法人野口研究所)

## 【別添資料2】

### (1) 学生の受け入れ

東海大学から卒業研究生を2名受け入れ、下記のテーマにより研究を行った。

#### 卒業論文研究テーマ

- ・ ENGaseとクリック反応を利用したタンパク質の位置選択的修飾化法の開発
- ・ 糖水酸基保護基としてBoc基を用いたフコシルペプチドの合成

### (2) 職員の教育活動

今年度は下記の職員が大学の非常勤講師として教育活動に携わった。

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 24件 (うち国際学会 3件)  
第67回質量分析総合討論会 (2019.5.11-13) 1件  
日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会 (2019.6.10-12) 1件

第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会 (2019.6.24-26)	1件
第38回 日本糖質学会 (2019.8.19-21)	7件
American Chemical Society National Meeting 2019 San Diego (2019.8.25-29)	1件
25th International Symposium on Glycoconjugates (Glyco25) (2019.8.25-31)	1件
第68回 日本応用糖質科学会大会 (2019.9.11-13)	1件
第92回 日本生化学会大会 (2019.9.18-20)	2件
トーゴの日シンポジウム2019 (2019.10.5)	1件
フルオラス科学研究会第12回シンポジウム (2019.10.18)	1件
第56回 ペプチド討論会 (2019.10.23-25)	1件
2019 Society for Glycobiology Annual Meeting (2019.11.2-5)	1件
GlycoTOKYO2019 (2019.11.6)	1件
第10回 グライコバイオロジクス研究会 (2019.11.26)	1件
第37回 メディシナルケミストリーシンポジウム (2019.11.27-29)	1件
第42回 日本分子生物学会年会 (2019.12.3-6)	1件
日本農芸化学会2020年度大会 (2020.3.25-28)	1件

2. 誌上発表 6件

Effects of terminal galactose residues in mannose  $\alpha$  1-6 arm of Fc-glycan on the effector functions of therapeutic monoclonal antibodies  
 Michihiko Aoyama, Noritaka Hashii, Wataru Tsukimura, Kenji Osumi, Akira Harazono, Minoru Tada, Masato Kiyoshi, Akio Matsuda, and Akiko Ishii-Watabe  
 MAbs, 11, 826-836 (2019)

Efficient Synthesis of N- and O-linked Glycopeptides using Acid-Labile Boc Groups for the Protection of Carbohydrate Moieties  
 Tomohiro Tanaka, Mika Shiraishi, Akio Matsuda and Mamoru Mizuno  
 Tetrahedron Lett., 60, 151106 (2019)

Site-specific protein PEGylation catalyzed by endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase  
 Kohtaro Goto, Masaki Kuroguchi, Shou Takashima, Masako Mori, Akio Matsuda, Mamoru Mizuno  
 Tetrahedron Lett., 61, 151475 (2020)

Preparation of O-Glycopeptides from commercial bovine whey proteins using offline liquid chromatography–Mass spectrometry  
 Masaki Kuroguchi, Akio Matsuda, Mamoru Mizuno  
 Carbohydr. Res., 491, 107981 (2020)

Study of glycosylation of prostate-specific antigen secreted by cancer tissue-originated

spheroids reveals new candidates for prostate cancer detection

Hiroko Ideo, Jumpei Kondo, Taisei Nomura, Norio Nonomura, Masahiro Inoue and Junko Amano

Scientific Reports, 10, 2708 (2020)

LacdiNAcylation of N-glycans in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in changes of morphological appearances and adhesive properties of the cells

Kiyoko Hirano, Yoshio Takada, Kiyoshi Furukawa

Histochemistry and Cell Biology, 153, 17 (2020)

3. 講演 4件

創価大学糖鎖生命システム融合センターキックオフ (2019.4.12)

「糖鎖科学の情報基盤構築」 山田一作

統合データベース講習会：AJACS徳島 (2019.6.6)

「化合物データベース (PubChem Bioassay、他)」 山田一作

CBI学会 講演会 (2019.11.27)

「MALDI-MSによる糖鎖多様性の解明」 天野純子

SPARC Japan 2019 第3回セミナー (2020.2.7)

「糖鎖科学における研究データ管理」 山田一作

# 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 杉 智和\*

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

向井 克典 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2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2年7月末日現在、30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

令和2年3月末の正味財産は約119億円である。

## 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49件 (国内42件、外国7件)、商標権は2件である (2020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
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體	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	トレハロース誘導體とその製造法	4950521	2012.03.16
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	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體及びベンジル化アルドース誘導體の製造法	5155577	2012.12.14

山ノ井孝	フルクトフラノシド誘導体とその製造法	5155578	2012.12.14
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
水野真盛 戸治野真美	ペルフルオロ有機物の製造方法	5436093	2013.12.20
天野純子 中村紀夫	前立腺癌を判定する方法	5443156	2013.12.27
天野純子	分析方法	5478998	2014.02.21
菅原州一 大隅賢二	11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの製造方法	5566226	2014.06.27
菅原州一 大隅賢二	糖ペプチド誘導体及びその製造方法	5611105	2014.09.12
菅原州一 大隅賢二	糖ペプチド被覆シリカ	5614897	2014.09.19
塚本郁子 小西良士 窪田泰夫 大隅賢二 水野真盛	血管内皮細胞の管腔形成抑制剤	5649358	2014.11.21
水野真盛 川上宏子	微小流路内のフルオラス不均一多相系反応方法	5670654	2014.12.26
菅原州一 大隅賢二	11糖シアリルオリゴ糖アスパラギンの製造方法	5680576	2015.01.16
高木陸 戸潤一	軟骨細胞培養基材及び培養方法	5721319	2015.04.03
山田一作	糖鎖構造認識用解析方法、糖鎖構造認識用解析装置およびプログラム	5734586	2015.04.24
小西満月男 友国敬三	ロジウム及び金を含む担持触媒	5758228	2015.06.12
菅原州一 大隅賢二	糖ペプチド誘導体及びその製造方法	5813294	2015.10.02
西風隆司 天野純子	質量分析法用測定試料及びその調製方法	5837273	2015.11.13
藤田雅也 土田明子 正田晋一郎 田中知成	N-アセチルグルコサミンが $\alpha$ で結合した糖誘導体の調製方法	5892750	2016.03.04
藤田雅也 土田明子 森昌子	糖質関連酵素の改良法	5917913	2016.04.15

藤田雅也 土田明子 芦田久	消化管ムチンの糖鎖に特異的に結合するポリペプチド	5951199	2016.06.17
天野純子 奥村寿子	MALDI 質量分析法用測定試料調製方法	5990000	2016.08.19
水野真盛 戸治野真美 後藤浩太郎	炭素-炭素結合型ヘビーフルオラストグ	6001267	2016.09.09
後藤浩太郎 水野真盛	エーテル化合物製造法	6055293	2016.12.09
後藤浩太郎 水野真盛	アグリコン転位抑制効果を持つ無臭チオール誘導体	6066621	2017.01.06
天野純子 後藤康友 稲垣伸二	レーザー脱離イオン化質量分析法	6108805	2017.03.17
天野純子 奥村寿子	MALDI 質量分析法	6125426	2017.04.14
小西満月 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
水野真盛 大隅賢二	糖アミノ酸誘導体または糖ペプチド誘導体の製造方法	6605201	2019.10.25
大隅賢二 黒河内政樹 森昌子 白井孝	7糖オリゴ糖の製造方法	6618176	2019.11.22
井ノ口仁一 ルーカスベ イロン	疾患を検出する方法	6634379	2019.12.20
白井孝 後藤浩太郎 井手尾浩子 水野真盛 天野純子 松田昭生 丸山征郎	カスパーゼ1活性化阻害剤	6722895	2020.6.25
後藤浩太郎 水野真盛	ポリエチレングリコール鎖が導入された化合物の製造方法	6731381	2020.7.8

## &lt;以下、外国特許&gt;

中山 淳 山ノ井 孝 藤田 雅也 白井 孝	$\alpha$ -N-アセチルグルコサミニル結合単糖誘導 体を含むピロリ菌増殖抑制剤	US 8575117 (米国)	2013.11.05
菅原 州一 大隅 賢二	11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの製造方法	EP 2474560 (英、独、仏)	2014.03.19
天野 純子 田中 耕一	生体試料の解析法及び疾患マーカーの検索法	US 8772044 (米国)	2014.07.08
菅原 州一 大隅 賢二	11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの製造方法	US 8809496 (米国)	2014.08.19
中山 淳 白井 孝 山ノ井 孝 藤田 雅也 森 昌子	ピロリ菌増殖抑制剤	US 8859511 (米国)	2014.10.14
白井 孝 森 昌子 黒河内 政樹 富田 正浩	糖鎖切断抗体の製造方法及び均一糖鎖抗体	US 9550834 (米国)	2017.01.24
井ノ口 仁一 ルーカス ベイロン	疾患を検出する方法	EP 3217173 (英、独、仏、 伊)	2020.1.1

## 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オン	第9類、第42類	5156474	2008.08.01

## 野口遵研究助成金

### I. 2019年度野口遵賞実施報告

第11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。

本年度より、多様な雇用形態に対応し、よりフレッシュな研究者や女性研究者の応募拡大を図るため、非常勤でも応募可能とした。

#### 2) 2019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2019年9月1日から2ヶ月間募集を受け付け、総計164件の応募があった。

(表1参照)

【表1 課題別応募件数・採択数】

課題番号	課題名	応募件数	採択件数
課題 1	ライフサイエンスの進展に寄与する研究 a 医薬、b 診断薬、c 再生医療、d 医療機器、e 医用材料、 f その他	88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 g 蓄エネルギー、h 創エネルギー、i 省エネルギー、j 触媒 化学、k 反応開発、l 錯体化学、m バイオマス、n その他	52件	5件
課題 3	新しい電子材料やデバイスに関する研究 o 電子材料、p デバイス、q センサー、r その他	24件	2件
件数計		164件	13件

##### ②選考委員会

2020年2月13日に当研究所において選考委員会を開催した。選考委員11名が出席し厳正な選考の結果13件が採択された。(表2、表3参照)

##### ③贈呈式

2020年3月13日如水会館(千代田区一ツ橋)にて贈呈式を開催する予定であったが、新

型コロナウイルス感染拡大防止のため一年延期し来年度に2019/2020年度合同で開催する予定である。

### 3) 10周年記念講演会の開催

10周年を記念して、2019年9月12日に板橋区立文化会館小ホールにて「野口遵助成金10周年記念講演会ー若き挑戦者とともに化学の力で未来を動かそう」を開催した。

基調講演に旭化成(株)名誉フェローでノーベル化学賞受賞者の吉野 彰選考委員を迎え、活躍中の助成金受給者5名が講演を行い盛会であった。

【表2 採択者・採択テーマ一覧 (順不同)】 \*所属は応募時のもの

採択者氏名	所属*	研究テーマ名
鬼塚 和光	東北大学多元物質科学研究所	RNA標的創薬を指向したRNA結合小分子新規探索システムの構築
寺坂 尚紘	東京大学大学院理学系研究科化学専攻	標的的特異的ドラッグデリバリーを可能にするタンパク質カプセルの分子進化
水野 洋輔	東京工業大学科学技術創成研究院未来産業技術研究所	任意波形変調と動画像処理技術に基づくブリルアン光相関領域反射計の性能進化
鈴木 康介	東京大学大学院工学系研究科	金属ナノ複合材料の精密設計とその触媒機能
緒明 佑哉	慶應義塾大学理工学部	2次元ランダム共重合による共役高分子材料の創製とエネルギー分野への応用
江島 広貴	東京大学工学部	海棲生物の接着メカニズムにヒントを得た高強度水中接着剤の開発
松田 泰斗	九州大学大学院大学医学研究院	マイクログリアからニューロンへのダイレクトリプログラミングによる脊髄損傷治療法開発
塩田 拓也	宮崎大学テニユアトラック推進機構	グラム陰性菌βバレル型膜タンパク質アセンブリー阻害ペプチドの作用機構解析
高原 茉莉	北九州工業高等専門学校生産デザイン工学科	酵素反応と薬物融合ペプチドを基盤とした部位特異的な抗体-薬物複合体の開発
伊藤 英人	名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻	Hetero-APEX反応の開発と新奇ヘテロ多環芳香族化合物の迅速合成
加藤 英明	東京大学大学院総合文化研究科	自閉症治療に向けたペプチド受容体構造解析と構造情報に基づいたバイアスリガンド開発
貞清 正彰	東京理科大学理学部第一部	次世代蓄電池を指向した革新的電解質材料の開発
鈴木 健仁	東京農工大学大学院工学研究院	屈折率ゼロ材料によるTHzデバイスの創出

【表3 選考委員】 \*五十音順。所属・職名は選考委員会開催時のもの。

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	(公財)川崎市産業振興財団副理事長・ナノ医療イノベーションセンター長・東京大学名誉教授・東京大学特任教授
	川合 知二	大阪大学招聘教授・大阪大学名誉教授
	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・京都大学特任教授
	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株式会社顧問
	山本 憲二	和歌山大学客員教授・京都大学名誉教授・石川県立大学名誉教授
	吉野 彰	旭化成株式会社名誉フェロー

【2017年度 (第9回) 野口遵研究助成金 研究成果報告 (要旨)】 \*所属は応募時のもの

氏名	山田 勇摩	所属	北海道大学大学院 薬学研究院
研究テーマ名	再生医療を加速するミトコンドリアを強化した幹細胞の創生		
<p>心筋幹細胞(CPC)移植は、心筋症に対する有望な治療法として報告されている。一方で、持続的な移植効果維持が困難とされており、移植細胞のミトコンドリア(Mt)機能不全などが原因として報告されている。本研究では、Mt標的型ナノカプセルを用いてCPCのMtに機能性分子を送達し、Mtを強化した心筋幹細胞(MITO Cell)を構築した。さらに、心筋症モデルマウスを用いた検証実験より、MITO Cell移植の治療有効性(生存延長、心機能回復、など)を示すことに成功した。</p>			
氏名	増田 貴史	所属	北陸先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科
研究テーマ名	液体Alの創出		
<p>本研究の目的は、金属Alの前駆体液体となる新材料「液体Al」の創出である。我々はトリエチルアミン-アラン、4-メチルアニソール、三塩化シクロペンタジエニルチタンの混合液からなる「液体Al」を合成した。そしてスピコート法によって、比抵抗値<math>4.2\mu\Omega\text{cm}</math>の塗布型金属Al薄膜を実現した。これはバルクAlの<math>3\mu\Omega\text{cm}</math>とほぼ同水準の高品質な膜であった。</p>			
氏名	中村 貴志	所属	筑波大学 数理物質系 化学域
研究テーマ名	基質が結合する配位サイトを集積した大環状錯体の創製と特異的の多量化反応		
<p><math>\text{N}_2\text{O}_2</math>配位部位であるsalenと<math>\text{N}_2</math>配位部位であるbpyをもつ三角形大環状配位子bpytrisalenを用いて、亜鉛-銀ヘテロ6核金属錯体およびダブルデッカー型亜鉛12核金属錯体の合成に成功した。これらの錯体は、配位サイトを残した状態で複数金属が一定間隔で集積された興味深い構造を有しており、複数の基質を配位捕捉して特異的な多量化反応を実現するための有望なプラットフォームを創製することができた。</p>			

氏名	稲木 信介	所属	東京工業大学 物質理工学院 応用化学系
研究テーマ名	グリーンケミストリーを志向した革新的有機電解合成法の開発		
本研究では、バイポーラ電気化学に基づく新しい有機電解合成システムの開発と、従来の電解合成法の課題である電解質使用量の削減に挑戦した。電解セル設計と条件最適化を経て、トリフェニルメタンの電解フッ素化反応を検討したところ、電解質使用量を従来法の100分の1程度に削減しても同程度の収率で生成物を得ることに成功し、新規有機電解合成法としての可能性を見出した。			
氏名	寺島 崇矢	所属	京都大学大学院工学研究科 高分子化学専攻
研究テーマ名	セルフソーティングポリマー会合体を基盤とする高機能ハイドロゲルの創成		
本研究では、高選択的かつ動的な自己組織化(これを「セルフソーティング」という)を実現する両親媒性ランダムコポリマーを利用して、物性を自在に制御でき、自己修復性や選択的接着性を併せ持つ高機能ハイドロゲルを創出することに成功した。このハイドロゲルは、水存在下で特定の部位に選択的に接着可能という革新的な特徴を持つため、医療・生体材料などに応用可能な革新的基盤材料として、今後の展開が期待される。			
氏名	小嶋 隆幸	所属	東北大学 学際科学フロンティア研究所
研究テーマ名	新奇触媒としてのホイスラー合金の研究		
磁性材料などとして有名なホイスラー合金( $X_2YZ$ )を触媒に応用し、アルキンの選択水素化に対して、実用Pd系触媒とは異なり貴金属を用いない新規高機能触媒を発見した。また、第四元素置換により電子状態または表面構成元素を精密に制御することで触媒機能チューニングが可能なることを実証した。メタノールの水蒸気改質についての研究からは、優れた触媒開発のための前駆体としてホイスラー合金が有用な可能性が示唆された。			
氏名	UYANIK Muhammet	所属	名古屋大学大学院工学研究科 有機・高分子化学専攻
研究テーマ名	高活性次亜ハロゲン酸塩触媒を用いる酸化的アジド化反応の開発		
本研究では、高活性次亜ヨウ素酸塩・過酸化水素の酸化触媒システムの構築に成功し、カルボニル化合物の酸化的 $\alpha$ -アジド化反応を開発した。本手法は、温和な条件(常温・常圧・中性)で反応が円滑に進行するため高い官能基許容性を示し、複雑な構造を有する様々な生物活性物質にアジド基を容易に導入可能で、合成後期のアジド化反応として有用な手段であると言える。			
氏名	佐藤 和秀	所属	名古屋大学高等研究院医学系研究科 呼吸器内科学
研究テーマ名	物性化学反応と医学の融合:光反応を分析、イメージすることで明らかになる革新的光治療		
細胞表面の抗原に特異的な抗体に近赤外線に反応するprobeをつけ、近赤外線を当てる事で治療を行うNear-Infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT)は、革新的光標的癌治療として、日本を含めた国際第3相試験が進行中である。しかし、NIR-PITの詳しい細胞死の機序は不明であった。本研究では、分析化学、ナノイメージングにより、NIR-PITの細胞死機序が光感受物質が光化学反応により親水性から疎水性に変化することで抗体・抗原蛋白を変性させ細胞死を誘導することを明らかにした。			

氏名	廣戸 聡	所属	名古屋大学大学院工学研究科 有機・高分子化学専攻
研究テーマ名	窒素含有ナノチューブの精密合成と機能性の開拓		
本研究では鍵反応である鞍型ジヒドロフェナジンの平面化の条件確立のため、窒素含有多環芳香族炭化水素(N-PAH)の合成を目指した。その結果、ピレンを基質としたジヒドロフェナジンの合成および縮環反応により窒素含有二重ヘリセンの合成に成功した。また、ポルフィリンを基質として、エレクトロミズムを示すジヒドロフェナジンの合成に成功した。以上はさらに発展させることで窒素含有なチューブ合成に繋がる重要な結果である。			
氏名	新居 陽一	所属	東京大学大学院総合文化研究科
研究テーマ名	新奇フォノクスデバイス創出に向けた基礎現象の開拓		
本研究では格子振動の量子であるフォノンに着目し、マルチフェロイクスにおけるフォノン物性に着目して二つの研究を行った。一つ目は、CuB <sub>2</sub> O <sub>4</sub> を用いて表面弾性波デバイスを作成することでマグノンと結合したフォノンモードの観測に成功した(Phys. Rev. B 99, 014418(2019))。もう一つは、表面弾性波の直接可視化のための走査型プローブ顕微鏡を構築した。今後これを発展させ非相反なフォノン伝搬などの直接可視化を行う。			
氏名	南 豪	所属	東京大学 生産技術研究所
研究テーマ名	分子認識能をもつ $\pi$ 共役高分子材料の創製と電解質ゲートランジスタ型化学センサへの展開		
本研究では、有機デバイス工学と分子認識化学を融合させた学際研究として、分子認識能を組み入れた有機半導体材料を設計・合成し、当該材料を用いたOTFTセンサデバイスの開発に取り組んだ。具体的には、アニオンレセプタを側鎖に導入したランダム共重合体を合成し、そのアニオン検出能を調査した。さらに、OTFTの設計をデバイス工学的に検討し、水系媒質中に含まれる標的化学種を検知可能な超低電圧駆動OTFTの作製に成功した。			
氏名	太田 禎生	所属	東京大学大学院工学系研究科 応用化学専攻
研究テーマ名	イメージングとシークエンシングを融合する機械学習駆動型サイトメトリー技術		
本研究では、イメージング技術とシークエンシング技術を繋ぎ合わせることで、機械学習の力をフルに引き出すサイトメトリーシステムの開発に取り組んでいます。本助成金のご援助を頂き、具体的には、最終的なサイトメトリーシステムに必要となる、高速の三次元蛍光イメージング装置を開発しました。			
氏名	高橋 治子	所属	東京大学 生産技術研究所
研究テーマ名	抗がんナノメディシン評価のためのがん微小環境モデルデバイスの構築		
3次元in vitro微小血管を有するがん微小環境モデルデバイスを作製し、抗がんナノメディシンの動態と抗がん効果を検討した。微小血管近傍にがん細胞を置き、ナノ粒子を送液することで、がん細胞との相互作用を顕微鏡下で直接観察でき、粒子サイズによって血管透過性が異なることを明らかとした。本モデルは、がん微小環境における抗がん薬の効果を評価可能な第3の評価系として、創薬研究やスクリーニングなどへの応用が期待できる。			

## 2019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) 2019年度の概要

2020年2月13日に野口遵研究助成金の選考に先立って第6回野口遵賞の選考を行った。

選考の結果、東北大学金属材料研究所 内田健一教授を受賞者として決定した。

なお、本年度は2015年度、2016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内田健一教授は2015年度に「磁性多層膜におけるスピン流熱電変換の解明と高効率化」という研究テーマで野口遵研究助成に採択されている。

## 2019年度誌上発表論文抄録集

### Abstracts of Publications

#### Effects of terminal galactose residues in mannose $\alpha$ 1-6 arm of Fc-glycan on the effector functions of therapeutic monoclonal antibodies

Michihiko Aoyama, Noritaka Hashii, Wataru Tsukimura, Kenji Osumi, Akira Harazono, Minoru Tada, Masato Kiyoshi, Akio Matsuda, and Akiko Ishii-Watabe

MAbs, 11, 826 (2019)

コアフコースを有する4種類の均一な糖鎖構造 (G2F、G1aF、G1bFまたはG0F) をそれぞれ持つ抗CD20抗体を調製し、その評価を実施したところ、ガラクトースがマンノース  $\alpha$  1-6側鎖に付加する抗体は高いエフェクター活性を示したとともにCH2ドメインの一部領域で構造の揺らぎが少ないことが確認された。マンノース  $\alpha$  1-6側鎖に付加するガラクトースによる構造の安定化が抗体医薬品のエフェクター活性発揮に重要な役割を果たしていることが示唆された。

~~~~~

#### Efficient synthesis of *N*- and *O*-linked glycopeptides using acid-labile Boc groups for the protection of carbohydrate moieties

Tomohiro Tanaka, Mika Shiraishi, Akio Matsuda, Mamoru Mizuno

Tetrahedron Letters, 60, 151106 (2019)

糖ペプチド合成における糖水酸基の保護基としてAc基やBn基が用いられているが、これらの保護基の脱保護工程の際にはペプチド部位や糖鎖部位への副反応が報告されている。本論文では、糖水酸基の保護にBoc基を用いた糖ペプチドの簡潔かつ簡便な合成法について報告する。本法を用いることで、酸処理による一工程の操作で、ペプチド部位や糖鎖部位から副反応を起こすことなく保護基を除去することが可能となった。

~~~~~

## Site-specific protein PEGylation catalyzed by endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase

Kohtaro Goto, Masaki Kurogochi, Shou Takashima,  
Masako Mori, Akio Matsuda, Mamoru Mizuno  
Tetrahedron Letters, 61, 151475 (2020)

PEG化2糖オキサゾリンをドナーとし、エンドー $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(ENGase)を用いることで、GlcNAc残基を足場としたタンパク質の新規な位置選択的なPEG化手法の開発を行った。本手法によるPEG化は、*p*-ニトロフェニル*N*-アセチルグルコサミニドやRNase B誘導体などのGlcNAc化合物に対して収率良く進行した。



## LacdiNAcylation of *N*-glycans in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in changes in morphological appearance and adhesive properties of the cells

Kiyoko Hirano, Yoshio Takada, Kiyoshi Furukawa  
Histochem Cell Biol., 153, 17 (2020)

ヒト乳がん細胞MDA-MB-231に糖転移酵素 $\beta$ 4GalNAcT4遺伝子を導入し、細胞表面の糖タンパク質の*N*-型糖鎖にLacdiNAc構造を強制発現させると、ヌードマウスへの造腫瘍能等の悪性形質が抑制された。本研究ではこの糖鎖の増大が乳がん細胞の間葉-上皮移行を誘導し、その結果ラミニン等の細胞外基質への接着性が増大することを明らかにした。これらはLacdiNAcによる乳がん細胞の悪性形質抑制機序の一因であると考えられる。



## Crystal structures of fukutin-related protein (FKRP), a ribitol-phosphate transferase related to muscular dystrophy

Naoyuki Kuwabara, Rieko Imae, Hiroshi Many, Tomohiro Tanaka, Mamoru Mizuno,  
Hiroki Tsumoto, Motoi Kanagawa, Kazuhiro Kobayashi, Tatsushi Toda, Toshiya Senda,  
Tamao Endo, and Ryuichi Kato

Nature Communications, 11, Article number 303 (2020)

フクチンとFKRPは、ジストログリカノパシーの原因となる変異遺伝子である。本論文では、ドナー (CDP-Rbo) および/またはアクセプター [RboP-(phospho-)コアM3ペプチド] 基質とFKRPの構造解析について報告する。アクセプター複合体では、RboPのリン酸基は一方のサブユニットの触媒ドメインに認識され、O-マンノース上のリン酸基は他方のサブユニットのステムドメインに認識され、この二量体構造がFKRPの酵素活性に必須であることを確認した。

~~~~~

Study of glycosylation of prostate-specific antigen secreted  
by cancer tissue-originated spheroids reveals  
new candidates for prostate cancer detection

Hiroko Ideo, Jumpei Kondo, Taisei Nomura, Norio Nonomura,  
Masahiro Inoue and Junko Amano  
Scientific Reports, 10, 2708 (2020)

前立腺特異抗原 (PSA) 検査の改善の為に、親腫瘍と同様の特徴を持つがん組織由来スフェロイド (CTOS) 産生PSAの糖鎖構造を、他の前立腺がん細胞株由来PSAと共にレクチンや質量分析等を用いて解析した。LacdiNAc構造の増加やシアリル化に関しては解析したがん細胞で共通の変化はみられなかったが、健常人精漿由来PSAに殆ど存在しない癌関連グライコフォームとしてCon Aレクチン非結合画分に高分岐糖鎖型及び無糖鎖型PSAが見出された。



最寄り駅からの所要時間

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

---

---

## 野口研究所時報 第63号

2020年11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

---

---