

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 20日現在

機関番号：72690

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590033

研究課題名（和文） シアル酸含有オリゴ糖ペプチドの機能活用

研究課題名（英文） Studies on the function utilization of sialic acid-containing Oligosaccharides peptide

研究代表者

菅原 州一 (SUGAWARA SHUICHI)

公益財団法人 野口研究所・研究部・研究員

研究者番号：70462265

研究成果の概要（和文）：

本研究はSGPの新規製造方法の確立とSGPを用いたヒトインフルエンザウイルス感染阻害に関する。SGPの製造は、脱脂卵黄を調製後、水抽出、エタノール沈殿により塩を含むSGPを得、次にODS樹脂にSGPを吸着させ水洗浄により脱塩し、有機溶媒で溶出後、そのまま凍結乾燥工程に進み最終生成物を得るといった簡便な操作により実施される。工業的に製造することを前提として製造条件を検討しカラム操作をできるだけ省いた。従来技術ではいずれも最終工程に脱塩操作が入ることになるが、本法ではODS樹脂に吸着させて洗浄しその後溶出することで脱塩工程を省くと同時に純度向上も達成することを特徴とする。本製造方法は中性条件で行うが、SGPと同時にNeuAc-Galの2糖が無い9糖からなる糖鎖ペプチドも検出された。本製造方法においては9糖を分離することが出来た。本技術は2011年1月に（株）伏見製薬所に特許導出され、その後SGPの工業的製造が開始され既に2011年3月より市販されている。SGPおよびその誘導体等の関連化合物供給体制は整いつつある状況にある。

SGPはヒトインフルエンザウイルス受容体と同一の糖鎖構造を有することから、本研究は研究材料の大量供給を可能にした。大量供給が可能となったSGPを使い種々のSGP誘導体およびその製造方法にかんする研究を実施し特許出願した。この点において、本研究はウイルス感染阻害に関する知見を得るための生化学的展開に貢献した。本研究はインフルエンザウイルス感染阻害に対する新たな知見を得ると期待された。ヒト型シアル酸含有糖鎖とウイルスヘマグルチニンHAとの相互作用研究のためのツールを十分に確保するという課題に対しても解決策を与えることができた。更に研究ツールの提供により関連研究の加速化が予想され、糖鎖-ウイルス相互作用研究という「学術面」で意義があるだけでなくインフルエンザウイルス感染阻害に関する研究加速という「実践面」にも大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：

This study relates to a human influenza virus infection inhibition using the SGP and the establishment of new production method of SGP. This report provide mainly an effective, efficient and time-saving strategy for the large-scale production of a sialylglycopeptide (SGP) and , which is a naturally abundant N-glycan isolated from hen's egg yolk. Another method for SGP production has been reported by Seko and colleague. In their method SGP was isolated from egg yolks by treatment with phenol, gel filtration, and successive rounds of chromatography on anion- and cation-exchange columns. On the other hand, in our method, from egg Yolks or de-lipidated egg Yolk, it is carried out by a simple operation and desalted by washing with water is absorbed to the SGP on the ODS resin after elution with an organic solvent, and obtain a final product proceeds to freeze-drying step as it is. In our work is carried out under neutral conditions, 9-sugar SGP which have one NeuAc-Gal also was detected. It was possible to separate 9-sugar SGP in our present method. This technology and our patents were licenced to pharmaceutical company (Fushimi Pharamceutical Co., Ltd.) in January 2011, and SGP was commercially available from March 2011 already industrial production of SGP was started then. The SGP and related compounds supply system is now being put into place.

Since it has a sugar chain structure identical to the human influenza virus receptor, the results of this study has allowed large supply of research materials. And we filed a patent application to conduct

research and a method for manufacturing the SGP various derivatives. In this regard, the present study was to contribute to biochemical deployment for obtaining knowledge about viral infection, and it is expected to gain new knowledge against influenza virus infection prevented. It was able to give a solution also to the challenge of ensuring sufficient tools for interaction studies with virus hemagglutinin (HA) and human sialic acid-containing oligosaccharides. Acceleration of related research is expected by providing research tools. This study, in the “academic” and “practical terms” that you are expected, shows larger contribution of research on influenza virus infection and the significance of virus interaction study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：生薬・天然物化学

1. 研究開始当初の背景

既存の研究について、SGP の抽出精製方法については、鶏卵卵黄をフェノール処理により脱脂卵黄を得、その後数種類のゲルろ過を含む5種類のクロマト精製により SGP を得ている(瀬古等 1997)。この様に複数のクロマト精製を経るために大量処理ができないのが難点であり、誘導體化などの研究は十分になされているとは言えない。また卵黄からの供給例としては精製途中の SGP をタンパク質分解酵素により処理しその後クロマト精製することで SGP のペプチドからアスパラギンだけを残した糖鎖アスパラギンを得る手法が報告されている(特開平6-245784)。しかし、酵素処理を始めとする複数のクロマト精製を経ることが供給上の難点である。一方、ウイルス HA (ヘマグルチニン)との結合に関連した研究ではこれまで NeuAc  $\alpha$  2-6Gal  $\beta$  1-4GlcNAc の糖配列が注目されており、この糖鎖は酵素による糖鎖転移反応を利用してリンカーと結合された例が報告されている(梅村等 2008)、この場合においても供給に難がある。

以上、ウイルス HA との相互作用研究のためのツールとして、SGP 関連化合物の供給は十分とは言えない。本研究の成果により、研究用 SGP が提供されることが相互作用研究加速に繋がるものと考えている。

2. 研究の目的

本研究は鶏卵卵黄中に含まれるシアル酸含有ヒト型 11 糖鎖ペプチド(SGP)の新規製造方法の確立と SGP の機能を活用することにある。インフルエンザウイルス感染は、ウイルス表面のヘマグルチニン(HA)が喉や肺表面にある受容体に結合することで開始される。そこで、インフルエンザウイルス感染を阻止するためには、HA と受容体との結合を阻害することが解決策となりうる。鶏卵卵黄中には、HAと結合するヒト型受容体と同一のシアル酸含有糖鎖を含む SGP が含まれる。そこで(1) 新規手法により SGP を大量に抽出精製し、その製造手法を確立する。(2) 得られた SGP を標識化あるいは固定化するこ

とでHAと受容体との相互作用に関する知見を得る。さらに(3) 結合阻害に基づく感染阻害剤の開発のための知見を得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

具体的には、以下の問題群に対する回答を求めていきたい。

(1) SGPの新規抽出精製方法は工業的な大量処理を可能にするか。従来のゲルろ過カラム精製を含む6回のクロマト精製を回避してエタノール沈殿とODS樹脂吸着による脱塩操作での大量製造を試みる。

(2) SGPのペプチドをそのまま生かした誘導體開発を実施する。すなわちペプチド部分をリンカーとして捉え、存在する3ヶ所のアミノ基に対する蛍光標識化を行うことで感度が向上するか、例えばシアル酸認識レクチンとの相互作用について感度は向上するか。これはアミノ基が1ヶ所存在するSGNを対照として用いSGNに対する蛍光標識体を比較する。

①SGPに対する最適蛍光標識方法について検討する。標識反応終了後の精製工程も含めて最適な製造法を見いだす。

②大量迅速な誘導體製造方法の検討、SGPを抽出精製後、そのまま単離することなく蛍光標識することが可能かを検討する。

(3)SGPの基材に対する固定化方法について検討する。更に固定化したSGPに対するレクチンやウイルスの結合能は変化するか、例えばシアル酸認識レクチンとの相互作用は変化するかについて検討する。

①SGP固定化の基材としてビーズ、ナノゴールド、ポリマーあるいは不織布について検討する。

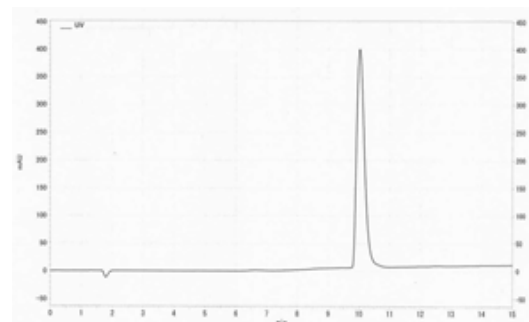
②SGPを固定化するための官能基導入について検討する。

### 4. 研究成果

(1)平成 22 年度

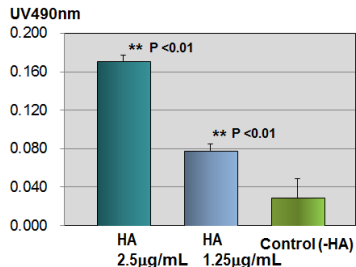
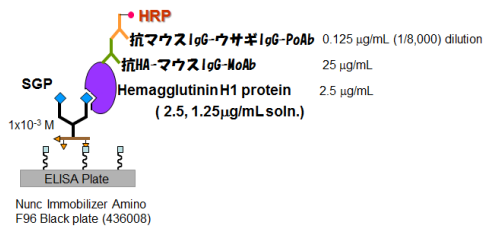
これまで鶏卵卵黄中からのシアル酸含有ヒト型 11 糖鎖ペプチド(SGP)の新規抽出および精製法

を明らかにしてきた(特願 2009-203340)。本手法に関する大量処理の妥当性検証を実施した。すなわち、実験室レベルで鶏卵卵黄を一度に500個処理することを複数回試みた。いずれの場合もエタノール沈殿と脱塩操作により、これまで通り HPLC 純度95%以上で SGP が得られ、大量処理が可能であることの確証を得た。更に、脱塩操作工程において ODS 樹脂を用いたクロマト操作を2度行うことで従来報告されていない高純度 SGP を得ることに成功し外国出願を含めた特許出願を行った(特願 2010-198213, 外国出願 PCT/JP2010/065165)。(次図)SGPの逆相HPLCによる分析例(純度>95%)



次に原料供給源の拡大を目指して、鶏卵卵黄ではなく脱脂卵黄粉末を原料として本手法を適用した。キューピー(株)より飼料用脱脂卵黄粉末を入手し SGP 製造用原料として用い、本手法の適用を試みた。その結果、鶏卵卵黄で開発された本手法は脱脂卵黄粉末においても、簡便に適用することが可能であった。更にHPLC純度95%以上でSGPを得ることができた。精製SGPを用いて蛍光標識SGPの製造検討を開始した(特願 2010-105504)。製薬企業である(株)伏見製薬所とSGP大量製造に関する共同研究を開始した。

(次図)固定化SGPは遺伝子組換えヒトインフルエンザウイルスヘマグルチニンと結合しその発色は比較対照群と比し有意に高かった。

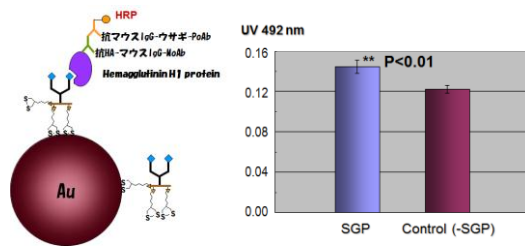


## (2)平成 23 年度

野口研製造方法に関して、鶏卵卵黄および脱脂卵黄を用いた大量処理の妥当性検証を行い製薬企業（伏見製薬所）に対して特許を導出した。企業は本件特許を実施し、SGP を試験研究用試薬として 2011.4 より提供を開始した。現在 SGP は広く国内外の研究者や企業に供給される体制が整った。

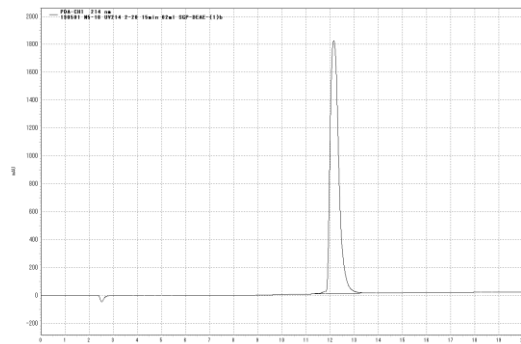
シアリルオリゴ糖ペプチド機能活用としてヒト型インフルエンザ感染診断を目的として、ナノゴールドに SGP を固定化するための検討を行った。SGP はヒト型インフルエンザ感染受容体と同一の糖鎖構造を有する。SGP をナノゴールドに固定化すれば、診断時にウイルスと SGP が結合することでナノゴールドが赤色凝集し、目視により感染を診断できるものと考えた。SGP に対し、ジスルフィド結合を有する  $\alpha$ -リポ酸を導入することでナノゴールドと結合させることに成功した（特願 2011-093308）。更に SGP をビーズに固定化することでタンパク中のヒト糖鎖結合分子の研究ツールの開発を試みた（特願 2011-179649）。

（次図）ナノゴールドに固定化した SGP は遺伝子組換えヒトインフルエンザウイルスヘマグルチニンと結合しその発色は比較対照群と比し有意に高かった。



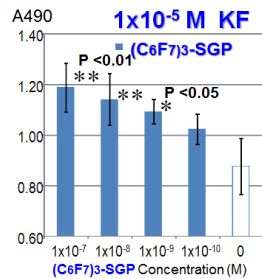
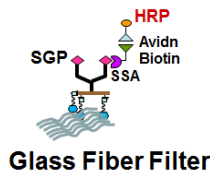
## (3)平成 24 年度

SGP の更なる純度向上を検討し高純度 SGP (HPLC, 99%以上) 製造に成功した。



シアリルオリゴ糖ペプチド機能活用として簡便なヒト型インフルエンザ感染診断キットの作成を目的として、SGP をシリカ不織布に固定化するための検討を行った。不織布は検体の固定化や洗浄が容易であるため医療関係者からの要望が強い。そこで、SGP をシリカ不織布に固定することを前提に、SGP に対しシリカ親和性を有するフッ素原子含有官能基を導入した。一方、SGP はヒト型インフルエンザ感染受容体と同一の糖鎖構造を有することから、SGP を不織布に固定化することでウイルス感染を診断できるものと考えた。SGP に対し、フッ素原子含有官能基を導入し、新規なフッ素官能基が導入された SGP の製造に成功した（特願 2012-104708）。更にフッ素化 SGP のシリカ不織布への固定化にも成功したことから、感染患者に対する診断ツールを試みた（特願 2012-104722）。

（次図）ガラスフィルターに固定化した SGP はシアル酸  $\alpha$  2-6 結合を認識するレクチン (SSA) と結合しその発色は比較対照群と比し有意に高かった。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

①

菅原州一、大隅賢二、シアリルオリゴ糖ペプチド(SGP)の研究開発、野口研究所時報, **54**, 44-48 (2011), 査読無

②

Shu-ichi Sugahara, Takashi Shirai, Mamoru Mizuno, Kenji Osumi, Sialylglycopeptide-conjugated beads bind recombinant human influenza A virus hemagglutinin protein: Glycoconjugate Journal, **28**, 347-348 (2011). 査読無

〔学会発表〕(計4件)

①

水野真盛、大隅賢二、近藤純平、藤田雅也、菅原州一、鶏卵由来シアリルオリゴ糖ペプチドの糖鎖-タンパク質間相互作用解析への利用、第31回日本糖質学会年会 2012.9/19, 鹿児島

②

Shu-ichi Sugahara, Takashi Shirai, Masa hiro Kajiki, Atsushi Tanaka, Mamoru Mizuno, Kenji Osumi, Use of sialylglycopeptide from hen's egg yolk as a tool for biochemical studies, 26th International Carbohydrate Symposium, 2012. 7/24, Madrid, Spain

③

Kenji Osumi, Takashi Shirai, Mamoru Mizuno, Shu-ichi Sugahara, Use of Sialylglycopeptide from Hen's Egg Yolk as a Tool for Biochemical Studies, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011. 12/1, Tokyo, Japan

④

Kenji Osumi, Takashi Shirai, Mamoru Mizuno, Shu-ichi Sugahara, The Use of Sialylglycopeptide from Hen's Egg Yolk in a Lectin-binding Assay, 16th European Carbohydrate Symposium, 2011.7/5, Naples, Italy

〔図書〕(計1件)

白井孝、菅原州一、シーエムシー出版、バイオ医薬品開発における糖鎖技術 第14章 シアリルオリゴ糖ペプチドの工業的製法、2011, pp151-158

〔産業財産権〕

○出願状況(計9件)

①

名称: 糖鎖被覆シリカ繊維  
発明者: 菅原州一、大隅賢二  
権利者: 野口研究所、旭化成(株)  
種類: 特許

番号: 特願 2012-104722

出願年月日: 2012. 5. 1

国内外の別: 国内

②

名称: シリカ親和性糖ペプチド誘導体

発明者: 菅原州一、大隅賢二

権利者: 野口研究所、旭化成(株)

種類: 特許

番号: 特願 2012-104708

出願年月日: 2012. 5. 1

国内外の別: 国内

③

名称: 11糖シアリルオリゴ糖アスパラギンの製造方法

発明者: 菅原州一、大隅賢二

権利者: 野口研究所、旭化成(株)

種類: 特許

番号: 特願 2012-045417

出願年月日: 2012. 3. 1

国内外の別: 国内

④

名称: シアリルオリゴ糖固定化ビーズ

発明者: 菅原州一、大隅賢二

権利者: 野口研究所、旭化成(株)

種類: 特許

番号: 特願 2011-179649

出願年月日: 2011. 8. 19

国内外の別: 国内

⑤

名称: 糖ペプチド誘導体およびその製造方法

発明者: 菅原州一、大隅賢二

権利者: 野口研究所、旭化成(株)

種類: 特許

番号: 特願 2011-093308

出願年月日: 2011. 4. 13

国内外の別: 国内

⑥

名称: 11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの製造方法

発明者: 菅原州一、大隅賢二

権利者: 野口研究所、旭化成(株)

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/65165

出願年月日: 2010. 9. 3

国内外の別：外国

⑦

名称：11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの製造方法

発明者：菅原州一、大隅賢二

権利者：野口研究所、旭化成（株）

種類：特許

番号：特願 2010-198213

出願年月日：2010. 9. 3

国内外の別：国内

⑧

名称：糖ペプチド誘導体およびその製造方法（脂溶性保護SGP）

発明者：菅原州一、大隅賢二

権利者：野口研究所、旭化成（株）

種類：特許

番号：特願 2010-105507

出願年月日：2010. 4. 30

国内外の別：国内

⑨

名称：糖ペプチド誘導体およびその製造方法（蛍光標識SGP）

発明者：菅原州一、大隅賢二

権利者：野口研究所、旭化成（株）

種類：特許

番号：特願 2010-105504

出願年月日：2010. 4. 30

国内外の別：国内

○取得状況（計2件）

①

名称：糖ペプチド誘導体及びその製造方法

発明者：菅原州一、大隅賢二

権利者：野口研究所、旭化成（株）

種類：特許

番号：特許 号

取得年月日：H25. 5. 24

国内外の別：国内

②

名称：糖ペプチド結合ポリマー

発明者：菅原州一、大隅賢二

権利者：野口研究所、旭化成（株）

種類：特許

番号：特許第5106497号

取得年月日：H24. 10. 12

国内外の別：国内

〔その他〕

新聞発表等

野口研究所から伏見製薬所への特許ライセンスとSGP関連の新聞記事

① 化学工業日報 2011. 2/9（水）  
シアリル糖ペプチド 伏見製薬所が量産体制確立

安価供給可能に 医療・医薬用途に弾み

② 四国新聞 2011. 2/9  
糖タンパク質の生産参入／伏見製薬所

（丸亀市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 州一 (SUGAWARA SHUICHI)

公益財団法人野口研究所・研究部・研究員

研究者番号：70462265

(2) 研究分担者

大隅 賢二 (OSUMI KENJI)

公益財団法人野口研究所・研究部・研究員

研究者番号：90203778

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：