

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01963

研究課題名(和文)次世代型合成法を用いた生理活性糖鎖の合成とその医学的利用技術の創出

研究課題名(英文) Synthesis of bioactive sugar chains using next-generation synthetic method and creation of medical application technology

研究代表者

山口 真範 (Yamaguchi, Masanori)

和歌山大学・教育学部・教授

研究者番号：20400129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖は細胞間の認識、情報伝達、分化、増殖、免疫応答など我々が生命を維持していく上で必須の生命現象を司っている。その利用法は多岐にわたり医薬品、食品、化粧品などに応用されている。糖鎖の機能解明には多様な糖鎖が一定以上必要となるがその合成は難度が高く、現状では十分な供給が困難となっている。本研究は、開発してきた「次世代型合成法」を更に発展させることにより課題を解決し、糖鎖の関わる生命現象を解明するための要となる糖鎖分子プローブおよびオリゴ糖鎖を網羅的に合成した(糖鎖ライブラリーの構築)。これらの糖鎖を用いて、糖鎖型医薬品、医療応用技術、機能性食品の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現時点ではその効果が立証されているにも関わらず、その限定された供給源や生産量、さらに価格面から限られた領域でしか使用されていない糖鎖類が非常に多く存在する。本研究では、これらの糖鎖を恒常的、簡便、大量、かつ安価に供給できる合成手法の開発に着手し、多くの生理活性糖鎖の合成と供給方法の開発に成功した。このことは、糖鎖と病気の関連性を解明でき、糖鎖を用いた新しい治療薬や治療法の開発が可能となり、社会への還元に向けた役割を大きく担える。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrate chains control vital life phenomena such as cell-cell recognition, information transmission, differentiation, proliferation, and immune response, which are essential for sustaining life. Carbohydrate chains are wide-ranging and are applied to medicines, foods, cosmetics and the like. A variety of carbohydrate chains are required in order to elucidate their functions, but their synthesis is difficult, and it is currently difficult to supply them sufficiently. In the present study, solves the problem by further developing the "next generation synthesis method" that has been developed. We have comprehensively synthesized oligosaccharide chains and their probes that are essential for elucidating the biological phenomena related to oligosaccharides. Using these carbohydrate chains, drugs, medical application technology, and functional foods were developed.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：糖鎖 オリゴ糖 医療応用 機能性食品

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸、タンパク質に続く第三の生命鎖として認識され、その多くの生理作用に大きな注目が集まっている。細胞間の認識、情報伝達、分化、増殖、免疫応答など生命を維持していく上で必須の生命現象を糖鎖が司っていることが明らかにされてきた。すなわち、糖鎖が担う役割や経時的な発現を追跡することは、未知の生命現象を明らかにすることができ、炎症や病気の発症メカニズムを解明できる。このような背景のもと糖鎖関連研究は、国内外において非常に重要な研究内容として位置づけられている。

2. 研究の目的

糖鎖は細胞間の認識、情報伝達、分化、増殖、免疫応答など我々が生命を維持していく上で必須の生命現象を司っている。その利用法は多岐にわたり医薬品、食品、化粧品などに応用されている。糖鎖の機能解明には多様な糖鎖が一定以上必要となるがその合成は難度が高く、現状では十分な供給が困難となっている。本研究は、これまでに受けた若手研究B及び基盤研究Cにおいて開発してきた「次世代型合成法」を更に発展させることにより前述の課題を解決し、糖鎖の関わる生命現象を解明するための要となる糖鎖分子プローブおよびオリゴ糖鎖を網羅的に創出する。具体的には、糖鎖型医薬品の開発、ガン関連糖鎖抗原の簡便合成法の開発およびその合成、糖鎖を用いた機能性商品の開発をおこない、生化学・薬学・医学研究の進展に大きく貢献することを目標とする(図1)。

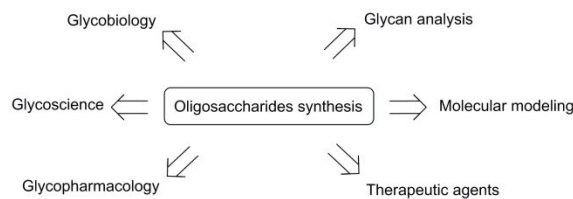


図1 オリゴ糖鎖合成の意義

3. 研究の方法

糖転移反応に用いる各種グリコシダーゼを申請者が開発した担体に固定化させ、その担体をカラム管へ詰め「酵素固定化カラム; グルコースを導入するためのグルコシル化用、ガラクトースを導入するためのガラクトシル化用など」を作成する。酵素固定化カラムを用いた糖転移反応は、反応終了時にそのカラムへ適当な緩衝液を注入することにより、目的糖鎖を酵素から簡便に分離でき、従来法では一回の反応で廃棄していた貴重な酵素を再利用できるメリットがある(図2)。

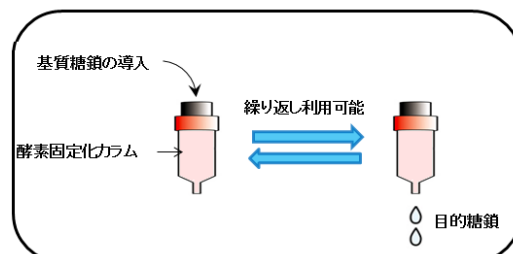


図2 酵素固定化グリコシル化反応

次に、作成したそれぞれのカラムにおける糖転移条件を（温度、pH、反応時間、カラム内へ導入する糖鎖の濃度）の「4つのファクター」をふり合わせて最適条件を見出す。この時、最大の転移収率が得られる条件を最適条件とし、その収率は反応液を HPLC 分析して緻密に算出する。使用するグリコシダーゼは研究室保有の土壌微生物（すべて安全性確認済み）より精製した酵素をはじめ市販の酵素を検討対象とする。それら酵素のグリコシル化反応の特徴を明らかにし、得られたデータ（グリコシル化反応の特徴および前述の4つのファクター）を基に、オールマイティーなグリコシル化反応を確立する。その確立した合成法を用いて糖鎖ライブラリーを創出する。

創出した糖鎖ライブラリーを用いて、ウイルスと相関のある糖鎖を選別する。その結果を受け、糖鎖を構造主体としたウイルス不活化剤などの感染防御システムを構築する。

またガンなどの病変組織の発見が出来る分子イメージング技術、糖鎖ワクチンおよび抗体薬の創出に応用するため、糖鎖ライブラリー中のガン関連糖鎖抗原においては、プローブ化を行う。

更に、創出糖鎖を実験動物などに投与し、腸内細菌叢の変化を調べることにより、腸内フローラ改善作用を有する糖鎖を見出し、食品応用技術の創出を行う。

4. 研究成果

（1）オールマイティーなグリコシル化反応の開発

糖鎖は単に繋がっていれば良いというのではなく、グリコシド結合の立体配座および結合位置が機能性の発現にとって非常に重要である。従来のグリコシダーゼの逆反応を用いた糖転移反応は位置選択的グリコシル化が困難である課題を抱えていた。原因としては、糖受容体のヒドロキシ基のうち最も反応性が高い一級ヒドロキシ基が優先的に反応し、目的としたグリコシド結合を形成できないもしくは得られたとしても低収率であった。我々は一級ヒドロキシ基を酵素を用いて保護し、他のヒドロキシ基の反応性を相対的に上げることによりその問題を克服した。このことにより、グリコシダーゼの逆反応を用いたグリコシル化反応の位置選択性を大幅に改良することに成功した。

また、我々はグリコシダーゼを固定化することにより酵素のリサイクルを可能にした合成法の開発を行ってきた。膨大な種類の酵素を利用して開発を進めていくなかで固定化により活性を失う酵素が出てきた。それらの酵素をリサイクル使用するため、新たなリサイクル方法の開発に着手し、酵素を固定化せずにリサイクルする方法を確立することが出来た（特願2020-016007）。その結果、我々が開発してきた「次世代型合成法」は更に多くの糖鎖を創出することが可能となり、当初の目的を達成するに至った。

（2）生理活性糖鎖ライブラリー合成

糖鎖の関わる生命現象を解明するための複雑な構造を有する糖鎖の網羅的合成に取り組んだ。ガン関連糖鎖抗原、免疫機構を調節する糖鎖、ウイルスのレセプターとなる糖鎖の合成にそれぞれ成功した。それらの糖鎖のうちワクチンや分子イメージングに応用する糖鎖は脂質、蛍光物質を還元末端に導入しプローブ体へ導いた。合成した糖鎖ライブラリーの中には、硫酸化糖鎖も含まれており、従来多段階合成でしか成し得なかった糖鎖類においても簡便合成に成功した。

（3）糖鎖の医療応用技術の創出

糖鎖を用いたウイルス不活化剤の開発を行った。糖鎖は人体にとって毒性を示さないため、

既存の消毒薬とは異なり“糖鎖型 ウイルス不活化剤”はヒトにとって極めて安全なウイルス防疫手段となり得る。我々はインフルエンザウイルス、ヘルペスウイルスを不活化のターゲットとして用い、それぞれ強い不活化作用を有する糖鎖の開発に成功した（図3；特願2017-139145）。これらの糖鎖はエンベロープウイルスに対して不活化作用を有すると考えられている。

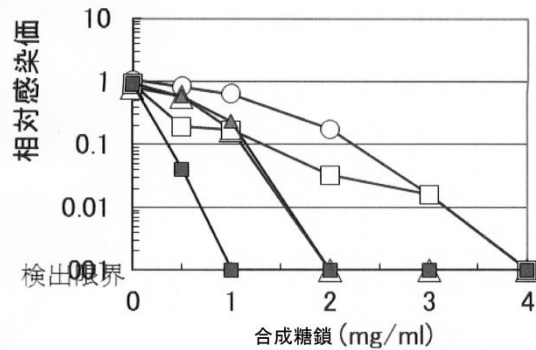


図3 インフルエンザウイルス不活化効果

(4) 糖鎖の食品応用技術の創出

腸内フローラにおいてクロストリジウムクラスターが増加すると、その中には一次胆汁酸を毒性の高い二次胆汁酸に変換するもの、腐敗臭を生成するもの、炎症を惹起するものが多く含まれ、肝炎、肝臓ガンなどの発症に関与する可能性が知られている。我々はこのクロストリジウムクラスターを抑制できる、すなわち腸内フローラの改善作用を有する新たな糖鎖の創成に成功した（特願2019-149688）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi M	4. 巻 70
2. 論文標題 Efficient synthesis of bioactive oligosaccharides toward medical treatment applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bull, fac, edu, wakayama univ, natural science	6. 最初と最後の頁 37-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi M	4. 巻 70
2. 論文標題 Development of educational material utilizing widely used organic compound (carbohydrate)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bull, fac, edu, wakayama univ, natural science	6. 最初と最後の頁 29-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi M	4. 巻 67
2. 論文標題 Cultivation of licorice and analysis of glycyrrhizic acid (Part II)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bull, fac, edu, wakayama univ, natural science	6. 最初と最後の頁 27-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato T, Maeshibu T, Kikkawa K, Gotoh A, Tomabechi Y, Nakamura M, Liao WH, Yamaguchi M, Ashida H, Yamamoto K, and Katayama T	4. 巻 81(10)
2. 論文標題 Identification and characterization of a sulfoglycosidase from Bifidobacterium bifidum implicated in mucin glycan utilization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience Biotechnology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2018 - 2027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 山口真範、山口実沙子
2. 発表標題 生理活性糖鎖の効率的合成方法の開発
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井嶋博、山口真範、山野彰夫、中筋隼都
2. 発表標題 スキャニング画像の色濃度モデルに基づいた薄層クロマトグラフィーによる糖分析の高精度化
3. 学会等名 第62回自動制御連合講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaguchi M, Ijima H
2. 発表標題 Quantification of carbohydrate based on scan image analysis for TLC technique compensating lack of spot over laps: some new results
3. 学会等名 9th International Congress on Industrial and Applied Mathematics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ijima H, Yamaguchi M
2. 発表標題 Modeling and simulation studies on development of TLC for verifying the evolution of components based on the scanned image analysis
3. 学会等名 9th International Congress on Industrial and Applied Mathematics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 I j i m a H, Y a m a g u c h i M, N a k a s u j i H, Y a m a n o A
2. 発表標題 Motion Modeling of Solutions on the TLC Plate for Analyzing Carbohydrates by Using Image Capturing and Analysis
3. 学会等名 応用数理学会（米国）主催画像科学学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口 真範、山口実沙子、和田潤
2. 発表標題 新規ガラクトシダーゼの発掘とその応用
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中筋 隼都、山野 彰夫、井嶋 博、山口 真範
2. 発表標題 糖溶液の展開モデルに基づいた薄層クロマトグラフィーにおける色濃度分布の二次元ガウスモデルの妥当性の検証
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦田久、伊藤あずさ、大東夏海、吉原侑希、米野雅大、山口実沙子、山口真範
2. 発表標題 梅干し廃液を用いて抽出した魚軟骨プロテオグリカンの腸内細菌フローラ改効果
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成30年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikeda, K., Yamaguchi, M., Nagao, T., Nishide, M., Yamaguchi, Masanori, Kuwahara, T., Koyama, A. H
2. 発表標題 Virucidal Activities of Proteoglycans Prepared with Umezu, a Salt-Extract of Japanese Apricot
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies(IUMS)2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 I j i m a , H . , Y a m a g u c h i , M . , N a k a s u j i , H . , Y a m a n o , A
2. 発表標題 Verification of 2D Gaussian Model of Concentration on TLC Plate for Image-Based Quantification of Carbohydrates
3. 学会等名 2nd International Conference on Applied Physics, System Science and Computers (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口真範、山口実沙子、嵐莉加、池田敬子、小山一
2. 発表標題 プロテオグリカンの新規簡易抽出法の開発とその医療応用
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口実沙子、山口真範
2. 発表標題 プロテオグリカン簡易抽出法の最適化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (C o n B i o 2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 櫻井翔、藪下侑平、山口真範
2. 発表標題 糖鎖型抗体によるガン治療を目指したガン関連糖鎖抗原の有機化学合成
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口真範
2. 発表標題 世界初を目指した糖質研究: 糖鎖合成とその幅広い利用について
3. 学会等名 第43回和歌山バイオサイエンスフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kojima K, Yamaguchi M	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Nova Science Publishers, Inc.	5. 総ページ数 245
3. 書名 Advances in Chemistry Research	

〔出願〕 計5件

産業財産権の名称 限外る過デバイスを用いた糖鎖合成	発明者 山口真範	権利者 和歌山大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-016007	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 腸内細菌フローラにおけるクロストリジウムクラスター抑制用組成物	発明者 山口真範、芦田久	権利者 和歌山大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-149688	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 プロテオグリカン及び/又はグリコサミノグリカンの製造方法	発明者 山口真範	権利者 和歌山大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-196397	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 反応性基含有コンドロイチン硫酸誘導体	発明者 山口真範	権利者 和歌山大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-183343	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗ウイルス剤	発明者 山口真範、小山一、 池田敬子	権利者 和歌山大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-139145	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

イノベーションジャパン2017および2018への出展を果たし、世界への研究成果の発信を果たした。出展時にコンタクトがあった民間企業と共同研究費納入を伴う共同研究を実施し(3件)研究成果の社会実装を行った。また和歌山県に、世界に通ずる研究教育拠点を構築するため、自らが会長となり、「糖質応用研究コンソーシアム」を2018年に設立した。会員は全国の公的機関研究者および企業研究者から成る。糖質研究会議を4回主催し研究成果の社会還元を行った。

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----