

機関番号：15101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20510200
 研究課題名（和文） 蛍光共鳴エネルギー転移とヘパラーゼ基質特異性を利用するがん診断薬の開発
 研究課題名（英文） Development of diagnostic technology for cancer detection using FRET and heparanase specificity
 研究代表者
 田村 純一（TAMURA JUN-ICHI）
 鳥取大学・地域学部・教授
 研究者番号：30221401

研究成果の概要（和文）：

本研究では、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）を起こす蛍光発色基を装着したヘパラン硫酸オリゴ糖を酵素基質として化学合成することにより、迅速かつ簡便なヘパラーゼ濃度の診断を可能にし、がんの早期発見法を開発する。本研究期間中に、基質となるヘパラン硫酸四糖骨格の高収率かつ立体選択的な合成経路を確立した。現在FRETを起こす蛍光発色基の糖鎖への装着を進めている。

研究成果の概要（英文）：

We planned to synthesize heparan sulfate oligosaccharides labeled with fluorescence groups to show FRET. This would be able to diagnose the cancer in early stage conveniently. In this research period we established a stereoselective synthetic route for the heparan sulfate tetrasaccharide in high yield. We are trying to equip the fluorescence groups on the heparin sulfate tetrasaccharide as a substrate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：糖鎖工学、オリゴ糖、がん、診断薬

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は成長増殖とともに血管内に浸潤し、遠隔臓器に血行性転移する。その際、上皮細胞と結合組織の境界に位置する基底膜を破壊して、がん細胞は血管内に浸潤する。基底膜はヘパラン硫酸を構成分子としており、がん細胞自身の分泌するヘパラーゼによる

基底膜ヘパラン硫酸の分解が、血行性転移の突破口となることが知られている[Nakajima, M. et al. *J. Biol. Chem.*, **259**, 2283 (1984)]。また、がん転移の開始と血中ヘパラーゼの濃度上昇には高い相関がある。ヘパラーゼの濃度診断を迅速かつ簡便に行うことができれば、がんの早期発見が可能になる。申請者は、ヘ

パラナーゼが認識するヘパラン硫酸の微細構造が極めて特異的であること[Okada, Y. et al. *J. Biol. Chem.*, **277**, 42488 (2002)]に着目し、高感度な蛍光発色基を装着したヘパラン硫酸オリゴ糖を酵素基質として分子設計した。さらに、より簡便な検出操作を実現するため、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) をオリゴ糖基質に適用することを考案した。

FRETをヘパラン硫酸の合成オリゴ糖基質に適用することや、その原理を診断薬にまで適用することは、世界でも初めての試みである。本研究を通じて得られるオリゴ糖基質を使えば、酵素分解に伴う分光学的変化を超微量レベルで検出できるので、画期的かつ極めて有力な診断薬となり、臨床医療に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

天然由来の糖鎖を利用すると、基質構造が不正確で診断結果の振幅が大きくなることは避けられない。本研究は、がんの正確かつ早期の発見を可能にするため、FRETを利用してがん細胞の分泌するヘパラン硫酸を、高感度で検出できるヘパラン硫酸オリゴ糖基質 (診断薬) の化学合成的手法を用いる開発を目的とする。

3. 研究の方法

蛍光発色基を装着したヘパラン硫酸四糖基質 (診断薬試作品) を化学合成する合成経路として、より長い糖鎖の合成や蛍光発色基の変更にも柔軟に対応できるものを考案した。合成した四糖基質に対して酵素アッセイと臨床試験を試みることにした。

まず、ヘパラン硫酸四糖骨格形成経路の確立をめざした。今回の酵素基質となるヘパラン硫酸は、 α -GlcN (グルコサミン) と β -GlcA (グルクロン酸) からなる二糖単位が2回繰り返されている。グルコースから誘導できる GlcA-GlcN型二糖を共通ユニットとして、その量的確保を行った。非還元側GlcAには蛍光発色基Xを装着するので、選択的に除去できる保護基を導入した。また、アミンの前駆体としてアジドをC-2位に導入した。

基質骨格と蛍光発色基の導入の後、診断薬試作品の完成を目指した。診断薬の基本的な機能として、糖鎖が切断された際にFRETの変化が確認されることが必要である。まず、四糖骨格に、異なる二つの蛍光発色基XとYを導入することとした。その後、硫酸化と脱保護を経て、試作品に至る経路である。蛍光発色基として、これまでにいくつかのXとYの組み合わせが報告されている[Fairclough, R. H. and Cantor, C. R. *Methods Enzymol.*, **48**, 347 (1978) など]が、酵素反応を妨害せず、分子の極性を極端に変化させないものを選ぶ必要がある。蛍光発色基Xを還元末端に、Yを非還元側カル

ボン酸に導入できるように、合成経路を勘案した。

次いで、試作品を使って酵素反応試験を行い、その結果を受けて臨床試験 (共同研究) を開始することとした。試験項目としては、①糖鎖基質を酵素が認識すること、②蛍光発色基による酵素反応への立体的な影響 (妨害)、③糖鎖切断後にFRETの変化が確実に検出できること、が挙げられる。

4. 研究成果

本研究期間中に以下の点を明らかにした。
(1) 蛍光発色基を装着した四糖基質 (診断薬試作品) を化学合成するため、グルコースから誘導できる GlcA-GlcN 型二糖 (共通二糖ユニット) の合成経路を確立した。単糖同士の縮合は高収率かつ立体選択的に進行し、共通二糖ユニットを効率的に合成することができ、その量的確保も行った。
(2) ヘパラン硫酸四糖骨格の形成のための共通二糖ユニット間の効率的な縮合方法 (オリゴマー化) も見だし、 α -GlcN と β -GlcA からなる二糖単位が二回繰り返されているヘパラン硫酸四糖の合成にも成功した。
(3) FRET を起こす蛍光発色基のペアのうち、立体的に酵素反応を阻害しないものを選択し、糖鎖の前後への装着を試みた。しかし、意外にもダンシルやナフタレン環やインドール環で構成される蛍光発色基が温和な加水分解条件にも反応してしまうことが明らかになった。蛍光発色基が影響を受けないように合成経路を変更し、完成を目指している。完成次第、酵素反応に供する予定である。

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10件)

- ① Down-regulation of Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 by Wnt Signaling Triggers Diffusion of Wnt-3a. S. Nadanaka, H. Kinouchi, K. Taniguchi-Morita, J. Tamura, H. Kitagawa, *J. Biol. Chem.*, **286** (6), 4199-4208 (2011). 査読有
- ② Synthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage tetraosyl peptide moieties of betaglycan, which serve as a hexosamine acceptor for enzymatic glycosyl transfer. J. Tamura, T. Nakamura-Yamamoto and Y. Nishimura, S. Mizumoto, J. Takahashi, K. Sugahara, *Carbohydr. Res.*, **345**, 2115-2123 (2010). 査読有
- ③ Anti-arthritis Activity of Synthesized Chondroitin Sulfate E Hexasaccharide. T. Matsumoto, A. Takahashi, A. Higuchi, K.

- Taniguchi-Morita, M. Miyasaka, J. Tamura, *Arznei. Forsch. Drug Res.*, **60** (12), 754-759 (2010). 査読有
- ④ Biosynthesis of Heparan Sulfate in EXT1-deficient cells. M. Okada, S. Nadanaka, N. Shoji, J. Tamura, H. Kitagawa, *Biochem. J.*, **428**(3), 463-471 (2010). 査読有
- ⑤ FAM20b is a Kinase that Phosphorylates Xylose in the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region. T. Koike, T. Izumikawa, J. Tamura, H. Kitagawa, *Biochem. J.*, **421**(2), 157-162 (2009). 査読有
- ⑥ Sulfation Patterns and the Amounts of Chondroitin Sulfate in Diamond squid, *Thysanoteuthis rhombus*. J. Tamura, K. Arima, A. Imazu, N. Tsutsumishita, H. Fujita, M. Yamane, Y. Matsumi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **73** (6) 1387-1391 (2009). 査読有
- ⑦ Chondroitin Sulfate E Fragments Enhance CD44 Cleavage and CD44-Dependent Motility in Tumor Cells. K. N. Sugahara, T. Hirata, T. Tanaka, S. Ogino, M. Takeda, H. Terasawa, I. Shimada, J. Tamura, G. B. ten Dam, T. H. van Kuppevelt, and M. Miyasaka, *Cancer Res.*, **68**(17), 7191-7199 (2008). 査読有
- ⑧ 2-O-Phosphorylation of Xylose and 6-O-Sulfation of Galactose in the Protein Linkage Region of Glycosaminoglycans Influence the Glucuronyltransferase-I activity Involved in the Linkage Region's Synthesis. Y. Tone, L. C. Pedersen, T. Yamamoto, T. Izumikawa, H. Kitagawa, J. Nishihara, J. Tamura, M. Negishi, and K. Sugahara, *J. Biol. Chem.*, **283** (24) 16801-16807 (2008). 査読有
- ⑨ Identification of Chondroitin Sulfate Glucuronyltransferase as Chondroitin Synthase-3 Involved in Chondroitin Polymerization: CHONDROITIN POLYMERIZATION IS ACHIEVED BY MULTIPLE ENZYME COMPLEXES CONSISTING OF CHONDROITIN SYNTHASE FAMILY MEMBERS. T. Izumikawa, T. Koike, S. Shiozawa, K. Sugahara, J. Tamura, and H. Kitagawa, *J. Biol. Chem.*, **283** (17) 11396-11406 (2008). 査読有
- ⑩ Synthesis of Chondroitin Sulfate E Octasaccharide in a Repeating Region Involving an Acetamide Auxiliary. J. Tamura, Y. Nakada, K. Taniguchi and M. Yamane, *Carbohydr. Res.*, 343, 39-47 (2008). 査読有
- [学会発表] (計34件)
1. 松下健也、奥原隆司、林宏樹、湯村健、渡辺彩子、増田紳哉、石原幸雄、田村純一、魚介類由来グリコサミノグリカンの含有量と組成分析、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月27日、京都
2. 田村純一、川野愛美、加藤早紀、武田尚子、Herbert Geller、片桐康博、ビオチンリンカーに結合したコンドロイチン硫酸オリゴ糖の合成と細胞との相互作用、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月28日、京都
3. 橋口太志、水本秀二、西村裕子、田村純一、山田修平、菅原一幸、HNK-1硫酸基転移酵素はグリコサミノグリカン-タンパク質結合領域に硫酸基を転移する、日本薬学会第131年会、2011年3月28日、静岡
4. J. Tamura, Synthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage tetraosyl peptide moieties of betaglycan, which serve as a hexosamine acceptor for enzymatic glycosyl transfer. PepCon-2011, 23, Mar. 2011(Invited), Beijing (China)
5. 柘植亜衣子、保坂善真、田村純一、上原正人、コンドロイチン硫酸Eの脂肪細胞分化抑制作用、第150回獣医学会、2010年9月17日、帯広
6. 保坂善真、田村純一、上原正人、ナマコ由来糖鎖の脂肪細胞分化抑制活性、第150回獣医学会、2010年9月17日、帯広
7. N. Takeda, M. Otaki, R. Ikeda, M. Nanjo, J. Tamura, Synthesis of Heparan Sulfate Oligosaccharides for Heparanase Detection, *25th International Carbohydrate Symposium*, 4, Aug. 2010, Makuhari (Japan)
8. K. Matsushita, S. Funamoto, J. Tamura, Synthesis of Oligosaccharides with Protected Sulfate Groups, *25th International Carbohydrate Symposium*, 4, Aug. 2010, Makuhari (Japan)
9. J. Tamura, K. Arima, H. Fujita, M. Kitagaki, A. Nakamura, R. Hatto, Y. Hieda, S. Morimoto, S. Masuda, Y. Ishihara, S. Yoshioka, S. Yoshioka, Contents and Compositional Analyses of Glycosaminoglycans Derived from Fish, *25th International Carbohydrate Symposium*, 4, Aug. 2010, Makuhari (Japan)
10. 森本稔、林哲也、森大貴、川本仁志、伊福伸介、田村純一、南三郎、齋本博之、亜臨界水処理による硫酸化多糖の低分子化、第59高分子学会年次大会、2010年5月26日、横浜
11. 森大貴、林哲也、田村純一、殿井貴之、伊福伸介、森本稔、齋本博之、水熱処理により低分子化されたコンドロイチン硫酸の硫酸基分布、日本化学会第90春季年会、2010年3月27日、大阪
12. 鈴木大進、作野えみ、石原亨、田村純一、

- 中島廣光、植物毒-radicinin-の生合成 – 第4報–、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月29日、東京
13. 武田尚子、谷口森田佳代、大瀧未来、池田礼美奈、南條美輪、田村純一、酵素活性検出用基質糖鎖の合成、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月29日、東京
 14. 田村純一、堤下奈緒、中尾康裕、川野愛美、灘中里美、北川裕之、ビオチンリンカーに結合したコンドロイチン硫酸オリゴ糖の合成と特異タンパクとの相互作用、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月29日、東京
 15. 松下健也、船本真司、田村純一、位置特異的保護硫酸化オリゴ糖の合成、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月29日、東京
 16. 藤田裕之、北垣雅大、中村歩、八東龍也、稗田優香、森本慎、川野愛美、田中晴奈、松下健也、増田紳哉、石原幸雄、吉岡忍、吉岡俊介、高森吉守、田村純一、山陰産魚介類由来グリコサミノグリカンの含有量と組成分析、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月29日、東京
 17. N. Takeda, M. Otaki, R. Ikeda, M. Nanjo and J. Tamura, Synthesis of glycosaminoglycan oligosaccharides equipped with fluorogenic groups for FRET, *XXth International Symposium on Glycoconjugates*, 1st, Dec 2009, San Juan (Puerto Rico)
 18. J. Tamura, T. Nakamura and A. Imazu, Synthesis of Primers for Biosynthesis of Proteoglycan, *XXth International Symposium on Glycoconjugates*, 1st, Dec 2009, San Juan (Puerto Rico)
 19. 小池敏靖、泉川友美、田村純一、北川裕之、Fam20B はグリコサミノグリカンの生合成に関わるキシロースリン酸化酵素である、第29回日本糖質学会年会、2009年9月10日、高山
 20. 田村純一、大瀧未来、池田礼美奈、南條美輪、武田尚子、酵素活性検出用オリゴ糖鎖の合成、第29回日本糖質学会年会、2009年9月10日、高山
 21. 田村純一、船本真司、松下健也、保護硫酸基を利用するオリゴ糖鎖の合成、第29回日本糖質学会年会、2009年9月10日、高山
 22. 田端海、山岸大輔、清水克彦、田村純一、佐々木茂雄、鳥取大学における知的財産動向の分析を踏まえた活用評価システムの検討、産学連携学会第7回大会、2009年8月17日、福井
 23. 鈴木大進、松永祥吾、作野えみ、田村純一、中島廣光、植物毒-radicinin-の生合成– 第3報–、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月28日、福岡
 24. 田村純一、松下健也、武田尚子、船本真司、コンドロイチンオリゴ糖への硫酸基の位置選択的導入、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月、福岡
 25. 田村純一、石原幸雄、増田紳哉、中山清、川野愛美、田中晴奈、松下健也、藤田裕之、魚介類由来コンドロイチン硫酸の含有量と組成分析、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月28日、福岡
 26. 鈴木大進、松永祥吾、作野えみ、田村純一、中島廣光、植物毒-radicinin-の生合成– 第2報–、日本農芸化学会中四国支部第22回講演会、2008年9月12日、鳥取
 27. 田村純一、川野愛美、田中晴奈、藤田裕之、松下健也、今津綾夏、堤下奈緒、有馬和也、石原幸雄、中山清、魚類由来コンドロイチン硫酸の組成分析、日本農芸化学会中四国支部第22回講演会、2008年9月12日、鳥取
 28. 小池敏靖、泉川友美、塩澤章子、菅原一幸、田村純一、北川裕之、4種のコンドロイチン硫酸合成酵素ファミリーの酵素複合体によるコンドロイチン硫酸の合成機構、第28回日本糖質学会年会、つくば、2008年8月19日
 29. 田村純一、仲村友美、今津綾夏、プロテオグリカン生合成プライマーの合成、第28回日本糖質学会年会、つくば、2008年8月19日
 30. T. Izumikawa, T. Koike, S. Shiozawa, K. Sugahara, J. Tamura, H. Kitagawa, Identification of Chondroitin Sulfate Glucuronyltransferase as Chondroitin Synthase-3 Involved in Chondroitin Polymerization: CHONDROITIN POLYMERIZATION IS ACHIEVED BY MULTIPLE ENZYME COMPLEXES CONSISTING OF CHONDROITIN SYNTHASE FAMILY MEMBERS, *XIXth International Carbohydrate Symposium*, 2nd, Aug. 2008, Oslo (Norway)
 31. J. Tamura, Effective Synthesis of the Chondroitin Sulfate E Repeating Oligosaccharide via Acetamide Auxiliary and the Pharmaceutical effect for Collagen-Induced Arthritis in Mice(oral presentation), *XIXth International Carbohydrate Symposium*, 2nd, Aug. 2008, Oslo (Norway)
 32. J. Tamura, K. Nakayama, N. Takeda, Y. Nakao, H. Wang, A. Imazu, N. Tsutsumishita, K. Arima, Isolation and Characterization of Chondroitin Sulfate from Marine Sources(oral presentation), *XIXth International Carbohydrate Symposium*, 2nd, Aug. 2008, Oslo (Norway)

33. 泉川友美、小池敏靖、塩澤章子、菅原一幸、田村純一、北川裕之、コンドロイチン合成酵素複合体によるコンドロイチン鎖の合成機構、第9回 関西グライコサイエンスフォーラム、2008年5月17日、大阪
34. 田村純一、プロテオグリカンの化学合成と生物活性(招待講演)、糖鎖機能研究会、2008年5月22日、岡崎

[図書] (計3件)

- ① 田村純一他、シーエムシー出版、複合糖質の化学と最新応用技術、正田晋一郎、稲津敏行監修、第2編第5章プロテオグリカンの化学合成をめざして pp.154-160、2009
- ② 田村純一他、三恵社、地域環境学への招待、岡田昭明編、5章地域の未利用資源の活用 2 節水産系不可食部の高付加価値化、pp95-102、2009
- ③ J. Tamura et. al., Springer, Experimental Glycoscience Glycochemistry, Part 2 Chemical Synthesis of Sugar Chains, Section VI Chemical Synthesis of Sugar Chains Glycosaminoglycans, pp186-190, 2008

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 純一 (TAMURA JUN-ICHI)
鳥取大学・地域学部・教授
研究者番号：30221401

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし