

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24350052

研究課題名(和文)有機反応と酵素反応のワンポット化による高分子グライコマテリアルの最短合成

研究課題名(英文)The shortest synthetic route of polymeric glycomaterials through a one-pot reaction system based on organic reaction and enzymatic reaction

研究代表者

正田 晋一郎(Shoda, Shin-ichiro)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10143364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：有機反応と酵素反応のワンポット化を指向した糖オキサゾリン中間体を基盤とする基礎研究を行った。市販のSGオリゴ糖に各種糖加水分解酵素を順次作用させることにより、還元末端にN-アセチルグルコサミンをもつ各種オリゴ糖の調製を行った。得られた2-アセタミド-2-デオキシ糖に水溶性2-クロロイミダゾリニウム塩を作用させると、対応する糖オキサゾリンが95%以上の高収率で生成することを見出した。また、酵素活性の制御のためのモデル物質として、キトオリゴ糖含有熱応答性高分子を合成した。これらの結果を踏まえて、均一な糖鎖を有する糖タンパク質やヒトミルクオリゴ糖をワンポットで高収率で化学酵素合成することに成功した。

研究成果の概要(英文)：A basic research on the development of one-pot glycosylation based on chemical reaction and enzymatic reaction has been carried out. An oligosaccharide having an N-acetylglucosamine moiety at the reducing end was converted to the corresponding sugar oxazoline derivative in more than 95% yields by using 2-chloroimidazolium salt or 2-chlorobenzimidazolium salt as dehydrating agents. As a model compound for controlling enzyme activities, several thermosensitive glycopolymers based on poly(N-isopropylacrylamide) having a chitoooligosaccharide was prepared. Based on these results, glycoproteins having a definite oligosaccharide as well as human milk oligosaccharides have successfully been prepared in good yields.

研究分野：糖鎖工学 高分子合成

キーワード：化学酵素合成 糖タンパク質 糖転移反応 糖加水分解酵素 ヒトミルクオリゴ糖 糖オキサゾリン 脱水縮合剤 熱応答性高分子

1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質は、タンパク質のアスパラギンやグルタミン部位にオリゴ糖鎖が結合した高分子化合物であり、生体内において重要な働きを担っているだけでなく、バイオ医薬品としても大きな注目を集めている。中でも最も注目されるものの一つに抗体医薬がある。抗体医薬は、腫瘍細胞を直接あるいは間接的に死滅させることができる(図1)。

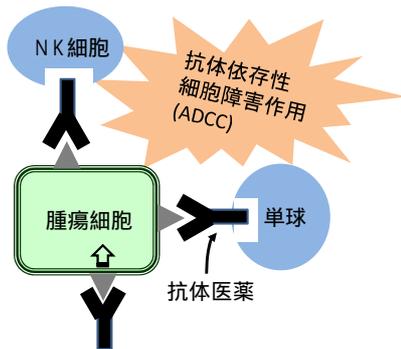


図1 糖タンパク質である抗体医薬が腫瘍細胞を死滅させるメカニズム:単球やNK細胞を介した抗体依存性腫瘍細胞障害作用(ADCC)および直接的腫瘍細胞増殖抑制作用

抗体医薬は非常に高価であり、場合によっては300万円を超えと言われる。コスト削減のため、大腸菌、ニワトリなどを使った生産法が検討されている。しかし、生産された抗体タンパク質は、糖鎖を欠いていたり、糖鎖構造が不均一なため、安定で長期持続する薬効が期待できない。糖鎖構造が不均一だと、医薬品の国際標準にも成りえない。そこで、均一な糖鎖をもつ糖タンパク質の合成法の開発が強く求められていた。

このような糖鎖をもつタンパク質は、自然界からは極微量しか得られないことから、基礎科学のみならず産業界において、その有効利用が大きく妨げられている。糖タンパク質を大量に合成することのできる一般的手段をもつことができれば、工業化はもとより基礎学問としての発展の大きな原動力となる。

しかし、工学とりわけ高分子合成の観点から見て、均一なオリゴ糖鎖をもつタンパク質をきれいに生産する技術は未だ確立されておらず、高収率、高選択的、低環境負荷、かつ、実用化可能な真に力量ある一般的合成手法が求められていた。

自然界で、タンパク質に糖鎖が付加する過程は、複雑な多段階反応であるため、ヒト以外の生物を使って糖タンパク質を再構築するのは容易ではない。化学者がフラスコ中で人工的に大量合成する意義はそこにある。抗体医薬品に代表される糖タンパク質を合成する現場で求められていることは、合成プロセスの短縮である。既往の方法はヒドロキシ基の保護、活性化、配糖化、脱保護からなる多段階の煩雑なプロセスであった。本研究の目的を達成するためには、無保護の糖を、できるだけ短工程で配糖体へと変換する技術が是非必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖タンパク質を、**保護基を用いることなく、水中において、有機反応と酵素反応をワンポット化して合成する画期的な方法論**を提供することである。具体的には、有機反応と酵素反応のワンポット化を指向した三つの基礎研究ならびに生成糖タンパク質の評価を含め、抗体医薬の高効率な生産プロセスを、4年間で開発する。すなわち、1)鶏卵由来の希少オリゴ糖を原料とする活性化糖オキサゾリンの調製、2)ワンポット条件に適応した酵素触媒の調製、3)酵素触媒高分子反応によるタンパク質の配糖化、である。それらの結果を踏まえ、有機溶媒や試薬を大幅に削減することができ、低環境負荷型の糖タンパク質大量合成プロセスを初めて実現する。

3. 研究の方法

平成24年度

2-アセタミド-2-デオキシ糖を還元末端に有する細胞表面SGオリゴ糖原料の調製

SGオリゴ糖は、シアル酸を含むオリゴ糖であり、その重合度ならびに構造は大変多様かつ複雑である。糖タンパク質のSGオリゴ糖鎖が生体の分化、増殖、受精、免疫や細胞、ウイルス、細菌等との相互作用に関与することが明らかになってきており、この糖鎖を医薬品として利用しようという研究が活発化している。細胞表面オリゴ糖などに広く分布しており、それらを限定的に分解したオリゴ糖は、さまざまな機能性高分子グライコマテリアルの重要な原料である。初年度においてはこれらオリゴ糖を、対応する鶏卵由来のSGオリゴ糖から調製する。

無保護糖の直接活性化反応の開発

考えられる水溶性脱水縮合剤を徹底的にスクリーニングすることにより、オリゴ糖を直接活性化糖モノマーへ変換する反応の開発を行う。すでに、2-アセタミド-2-デオキシ糖に水溶性カルボジイミドあるいはトリアジン誘導体を作用させると、対応する糖オキサゾリンが中程度の収率で生成することを予備実験的に認めている。本研究では、さらに詳細に条件を検討することにより、**収率95%以上という具体的な目標値**を掲げ、従来方法では合成困難なN結合型オリゴ糖オキサゾリンへの変換を試みる。

平成25年度

酵素触媒の改良

糖オキサゾリンのような人工的な物質を酵素基質として用いる場合、触媒酵素の活性、安定性、基質特異性、有機化合物に対する耐性等を自由自在にコントロールすることが必要である。申請者はすでに、反応水溶液をアルカリ性にして酵素を低活性状態とすることで、効率の良い配糖化が進行することを明らかにしてきた。ここでは、本研究で触媒として使用するN-アセチルグルコサミン

ダーゼを、より中性条件下で使用可能な触媒へと改良する。最近山本らは、当該酵素に関し、基質オリゴ糖と活性中心近傍アミノ酸との相互作用を基に、糖転移に適した変異型酵素の開発に成功している（例えば *J. Biol. Chem.* 283, 4469 (2008)）。本研究では、山本らのグループと密接な連携をとり、活性中心近傍のアミノ酸を他のアミノ酸へ変換することにより、触媒酵素のスコープを拡張する。

熱応答性高分子による酵素反応の制御

本研究で初めて明らかにするワンポット化学-酵素合成プロセスを、さらに展開させ、繰り返し行えるようにするには、触媒酵素活性を必要に応じて、活性化状態から失活状態へと、逆に、失活状態から活性化状態へと、可逆的にコントロールすることが求められる。酵素活性をオンオフするための手段として、熱応答性高分子による酵素触媒反応の制御を試みる。

平成26年度

ワンポット化学-酵素法を用いる糖タンパク質の合成

配糖化反応は、本研究の根幹をなす部分であり、特に綿密な実験計画が必要であるので、以下の3つの観点から周到な準備を行う。すなわち、初年度で得られた糖オキサゾリン誘導体と前年度で得られた変異型酵素の最もよい組み合わせの探索、反応系内に混在すると予想されるさまざまな化学種に対する触媒酵素の安定性に関する基礎的知見の集積、配糖体収率向上のために必要な諸条件（温度、濃度、pH等）の最適化、について詳細に検討する。

すでに申請者らは、ホルムアミジン系脱水縮合剤の副産物である、環状ウレア化合物がエンド型酵素触媒の活性に与える影響を予備実験的に調査した結果、若干の酵素活性の低下は見られるものの、かなりの糖転移活性を保持しており、糖タンパク質の合成に使えることを確認した。したがって、本研究でより適切な反応条件を設定することができれば、糖タンパク質を高収率で合成できる可能性は極めて高い。N-結合型オリゴ糖オキサゾリンの一段階合成、変異型エンド酵素の調製、そしてワンポット反応に適した反応条件の設定、という3つの柱を基礎として、目的とする糖タンパク質を**ミリグラムスケールで合成**し、糖鎖工学における一般的方法論として確立する。

平成27年度

前年度までの継続研究を行う。また、モデル糖受容体としてIgG抗体を用い、均一なN-結合型オリゴ糖鎖を有する抗体を合成する。国内外の研究所との連携により、抗ガン作用を有する抗体が入手できた場合は、同様にN-結合型オリゴ糖鎖を付加する。また、生成糖タンパク質の抗体依存性細胞障害（ADCC）活性の評価を、学内あるいは学外の専門家チームと連携しながら進めていく。均一の糖鎖を

有する抗体を大量に調製する技術はこれまで皆無であり、本研究によって、はじめて糖鎖構造が明確な抗体の大量合成が可能になる。初年度および25年度で得られた、異なる重合度のオリゴ糖オキサゾリンを原料とする糖タンパク質をライブラリー化を行う。その結果として、最も治療効果の大きな糖タンパク質がスクリーニングされ、抗体医薬品の開発へと結びつける。

4. 研究成果

平成24年度

平成24年度においては、市販のSGオリゴ糖を原料とし、各種糖加水分解酵素を順次作用させた。これにより、還元末端にN-アセチルグルコサミンをもつ各種オリゴ糖の調製を行った。上記混合物を、液体クロマトグラフィーで精製した。また、それぞれの段階でオリゴ糖の分離を適切なカラムを用いて行い、市販されていないオリゴ糖原料をグラムスケールで調製した。

各種水溶性脱水縮合剤をスクリーニングすることにより、オリゴ糖を直接活性化糖モノマーへ変換する反応の開発を行った。すなわち、2-アセタミド-2-デオキシ糖に水溶性2-クロロイミダゾリニウム塩を作用させると、対応する糖オキサゾリンが95%以上の高収率で生成することを見出した。

ワンポット化を指向した糖オキサゾリンの簡易合成を試みた。すなわち、酵素反応に悪影響を与えると予想されるオキサゾリン化副生物の除去を目的として、水に難溶性のウレア型副生物を設計した。すなわち、これまで用いてきた、脱水縮合剤DMCの構造を、ワンポット合成に適した構造に変換した。具体的には、ベンゾイミダゾリニウム塩型の縮合剤(CDMBI)を開発した(図2)。これにより、本研究課題の中核である有機反応と酵素反応のワンポット化にとって、より適した新規脱水縮合剤を開発することができ、従来方法では合成困難なN結合型オリゴ糖オキサゾリンへの変換が可能となった。

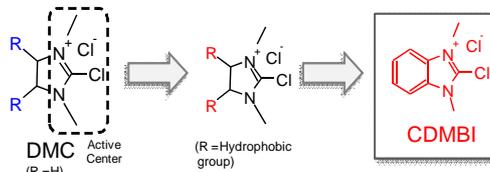


図2 ワンポット配糖化に適した脱水縮合剤の分子設計

平成25年度

部位特異的な変異導入により、触媒残基と考えられているGlu-177の2残基N-末端側に保存されているアスパラギンを他のアミノ酸へ変換した触媒を調製した。すなわち、京都大学と共同して、エンドM酵素の糖オキサゾリンに対する転移活性を格段に向上させた変異型酵素を開発した。

N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)は、35 付近で相変化を起こし、水分子の脱

水和を伴う凝集を可逆的に示すことが知られている。そこで弱い酵素阻害剤を NIPAM に結合し、温度制御により、酵素が交互に働く反応系の構築を目指し、*N*-アセチルグルコサミニダーゼの弱い阻害剤と、NIPAM のグラフト化合物を調製した。これにより、30 °C では阻害剤の効果により酵素反応が起きず、40 °C では NIPAM の凝集とともに阻害剤効果が薄れ、酵素反応が起こる系を実現するための足場を構築した。

具体的には、キチナーゼ酵素触媒による *N*-アセチルグルコサミン伸長反応により、重合度が制御されたキトオリゴ糖マクロモノマーを調製した。引き続き、これをイソプロピルアクリルアミドと共重合させることで新規熱応答性グライコマテリアルを合成した。酵素活性をオンオフするための手段として、その熱応答性を評価した結果、糖鎖高分子としては最も高い相転移温度をもつグライコポリマーであることを明らかにした。

平成26年度

有機反応と酵素反応のワンポット化反応のモデルとして、ラクト *N*-ピオースのオキサゾリン体を用いるラクト *N*-テトラオースのワンポット合成を試みた。その結果、ラクト *N*-ピオースを対応するオキサゾリン誘導体へ段階で変換した後、それを単離精製することなく、オキサゾリン誘導体を糖供与体、ラクトースを糖受容体として用いる酵素的糖転移反応を開発した。生成物はヒトミルクオリゴ糖として近年多くの科学者の注目を集めているラクト *N*-テトラオースであり、この成果により、これまでのように出発原料の保護、脱保護、ならびに有機溶媒を使用することなく、効率的に目的とするオリゴ糖をワンポットで合成するプロセスの開発に成功した。

平成27年度

抗体医薬に代表される糖タンパク質は、21世紀のライフサイエンスの中核の一つとなる重要な高分子グライコマテリアルである。これまで、均一な糖鎖を有する糖タンパク質を合成する一般的な手法が存在しないために、糖タンパク質を基盤とする医薬品開発の大きな障害となっていた。

最終年度において、(公財)野口研究所、株式会社免疫生物研究所と共同して、糖鎖リモデリング法により、糖鎖を均一化した抗HER2ヒト化モノクローナル抗体(トラスツズマブ)を創製することに世界で初めて成功した。本研究で開発した水溶液中、無保護糖から1段階でオキサゾリン体を合成する手法を用いて、まず数種類の均一糖鎖オキサゾリン体を調製し、次いでカイコから調製したトラスツズマブから均一なアクセプターを作製し、そしてこの両者に変異型エンド型酵素を反応させることにより、糖鎖均一化トラスツズマブを合成した。本合成法を用いることにより、トラスツズマブ以外の抗体医薬品の糖鎖均一化への応用も期待できる。

さらに、抗体のFc領域に結合している糖鎖にコアフコースが欠落しているとADC活性が高まる事実を踏まえ、6種のコアフコースのない糖鎖均一化トラスツズマブを作製し、ADC活性を測定したところ、糖鎖により、それぞれ活性に差があることが判明した。今後更に糖鎖分解酵素のライブラリーを充実させ、種々の糖タンパク質で同様の糖鎖リモデリング研究を積み重ねることにより任意の均一な評価用糖タンパク質を合成する有用な手段となることで、糖タンパク質における糖鎖の役割を明確にする研究の進展に大きく資するものと期待される。

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16件)

Shin-ichiro Shoda, Hiroshi Uyama, Jun-ichi Kadokawa, Shunsaku Kimura, Shiro Kobayashi

Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis

Chemical Reviews

査読有, 116巻, 2307-2413, 2016年

DOI:10.1021/acs.chemrev.Sb00472

Tomonari Tanaka, Naoya Kikuta, Yoshiharu Kimura, Shin-ichiro Shoda

Metal-catalyzed Stereoselective and Protecting-group-free Synthesis of 1,2-cis-Glycosides

Using 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl

Glycosides as Glytcosyl Donors

Chemistry Letters

査読有, 44巻, 846-848, 2015年

DOI:10.1246/cl.150201

Masaki Kuroguchi, Masako Mori, Kenji Osumi, Mami Tojino, Shuichi Sugawara, Shou Takashima, Yuriko Hirose, Wataru Tsukimura, Mamoru Mizuno, Junko Amano, Akio Matsuda, Masahiro Tomita, Atsushi Takayanagi, Shin-ichiro Shoda, Takashi Shirai

Glycoengineered Monoclonal Antibodies with Homogeneous Glycan (M3, G0, G2, and A2) Using a Chemoenzymatic Approach Have Different Affinities for FcγRIIIa and Variable Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activities

PLOS ONE

査読有, July 22, 1/24-24/24, 2015年

DOI: 10.1371/journal.pone.0132848

Masato Noguchi, Atsushi Kobayashi, Shin-ichiro Shoda

The One-step Preparation of Sugar Oxazoline Enables the Synthesis of Glycoprotein Having a Definite Structure

Trends in Glycoscience and Glycotechnology

査読有, 27 巻, E35-E42, 2015 年
doi:10.4052/tigg.1505.2E
Tomonari Tanaka, Hideki Ishitani, Yoshiko
Miura, Kenta Oishi, Tadanobu Takahashi,
Takashi Suzuki, Shin-ichiro Shoda,
Yoshiharu Kimura
Protecting-Group-Free Synthesis of
Glycopolymers Bearing
Sialyloligosaccharide and Their High
Binding with the Influenza Virus
ACS MacroLetters
査読有, 3 巻, 1074-1078, 2014 年
dx.doi.org/10.1021/mz500555x
Tomonari Tanaka, Genri Inoue, Shin-ichiro
Shoda, Yoshiharu Kimura
Protecting-Group Free Synthesis of
Glycopolymers Bearing Thioglycosides Via
One-Pot Monomer Synthesis from Free
Saccharides
Journal of Polymer Science, Part A:
Polymer Chemistry
査読有, 52 巻, 3513-3520, 2014 年
DOI: 10.1002/pola.27417
Masaki Ishihara, Yuka Takagi, Gefei Li,
Masato Noguchi, Shin-ichiro Shoda
Protection-free Synthesis of Alkyl
Glycosides under Hydrogenolytic
Conditions
Chemistry Letters
査読有, 42 巻, 1235-1237, 2013 年
DOI:10.1246/cl.130646
Naoki Yoshida, Tsukasa Fujieda, Atsushi
Kobayashi, Masaki Ishihara, Masato
Noguchi, Shin-ichiro Shoda
Direct Introduction of Detachable
Fluorescent Tag into Oligosaccharides
Chemistry Letters
査読有, 42 巻, 1038-1039, 2013 年
DOI:10.1246/cl.130379
正田晋一郎, 小林厚志, 野口真人
分子量のそろった糖タンパク質をつく
る
有機合成化学協会誌
査読無, 71 巻, 1252-1258, 2013 年
正田晋一郎
完全グリコシル化への果てしなき道
化学と工業
査読無, 66 巻, 997-999, 2013 年
正田晋一郎, 野口真人
糖オキサゾリン基質の簡易合成
野口研究所時報
査読無, 56 巻, 15-22, 2013 年
Tomonari Tanaka, Hiroyuki Fukuhara,
Shin-ichiro Shoda, Yoshiharu Kimura
Facile Synthesis of
Oligosaccharide-Poly(L-lactide)
Conjugates Forming Nanoparticles with
Saccharide Core and Shell
Chemistry Letters
査読有, 42 巻, 197-199, 2013 年

DOI:10.1246/cl.2013.197
吉田尚生, 正田晋一郎
オリゴ糖還元末端の蛍光ラベル化
Cellulose Communications
査読無, 56 巻, 15-22, 2013 年
Masato Noguchi, Tsukasa Fujieda, Wei
Chun Huang, Masaki Ishihara, Atsushi
Kobayashi, Shin-ichiro Shoda
A Practical One-Step Synthesis of
1,2-Oxazoline Derivatives from
Unprotected Sugars and Its Application to
Chemoenzymatic
 β -N-Acetylglucosaminidation of
Disialo-oligosaccharide
Helvetica Chimica Acta
査読有, 95 巻, 1928-1936, 2012 年
Masato Noguchi, Miwa Nakamura, Ayaka
Ohno, Tomonari Tanaka, Atsushi
Kobayashi, Masaki Ishihara, Masaya Fujita,
Akiko Tsuchida, Mamoru Mizuno,
Shin-ichiro Shoda
A dimethoxytriazine type glycosyl donor
enables facile chemo-enzymatic route
toward α -linked N-acetylglucosaminyl
galactose disaccharide unit from gastric
mucin
Chemical Communications
査読有, 48 巻, 5560-5562, 2012 年
DOI:10.39/c2cc.30946g
Naoki Yoshida, Tomonari Tanaka, Masato
Noguchi, Atsushi Kobayashi, Kumiko
Ishikura, Tatsuya Ikenuma, Hiromu Seno,
Takeshi Watanabe, Michinari Kohri,
Shin-ichiro Shoda
One-Pot Chemo-Enzymatic Route to
Chitoheptaose via Specific
Transglycosylation of Chitopentaose
Oxazoline on Chitinase-Template
Chemistry Letters
査読有, 41 巻, 689-690, 2012 年
DOI:10.1246/cl.2012.689

[学会発表](計10件)

Shin-ichiro Shoda, Specifically
Hemiacetal-Oriented Direct Activation
in Water, 7th Asian Community of
Glycoscience and Glycotechnology
Conference, 2015 年 11 月 14 日, ホテル
大観荘(松島)
正田晋一郎, グライコプロセスケミスト
リー 多糖バイオマス資源の有効利用
に向けて, 第64回高分子討論会, 2015
年 9 月 15 日, 東北大学川内キャンパス(仙
台)
正田晋一郎, 多糖バイオマスからグリコ
シル化合物の高効率合成, 日本化学会第
95 春季年会, 2015 年 3 月 28 日, 日本

大学理工学部（船橋）

Shin-ichiro Shoda, Specific Anomeric Activation in Water, 2014 Japanese-European Cellulose Workshop, 2014年10月13日 Fraunhofer Institute (ベルリン, ドイツ)

正田晋一郎, オリゴ糖合成における基質と酵素のデザイン, 日本応用糖質科学会平成26年度大会, 2014年9月25日, 朱鷺メッセ(新潟)

正田晋一郎, 分子量のそろった糖タンパク質をつくる -水中におけるオリゴ糖の直接活性化技術-, 化学系学協会東北大会, 2014年9月21日, 山形大学工学(米沢)

正田晋一郎, 水中における最短グリコシル化プロセスを目指して, 第2回福島大学共生システム理工学類日韓親善学術講演会, 2013年11月27日, 福島大学M1教室(福島)

正田晋一郎, 現場で役立つグリコシル化の基本, 有機合成化学講習会, 2013年11月20日, 日本薬学会会長井記念ホール(東京)

正田晋一郎, オリゴ糖脂質を合成する新手法の開発, 第11回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 2013年10月26日, 東北薬科大学70周年記念講堂(仙台)

Shin-ichiro Shoda, Protection-free glycosylation of oligosaccharides, European-Japanese Workshop on Cellulose and Functional Polysaccharides 2012, 2012年10月3日, 東京大学農学部(東京)

〔図書〕(計 4件)

S. Shoda, A. Kobayashi, S. Kobayashi, Royal Society of Chemistry, www.rsc.org, White Biotechnology for Sustainable Chemistry, 2016年, 274-309

正田晋一郎, 小林厚志, 野口真人, エヌ・ティー・エス, 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック, 2015年, 390-393

S. Shoda, A. Kobayashi, M. Noguchi, Springer Reference, Glycoscience :Biology and Medicine, 2015年, 401-407

正田晋一郎, 小林厚志, 野口真人, シーエムシー出版, クリックケミストリー 基礎から実用まで, 2014年, 61-70

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~poly/>

<http://www.eng.tohoku.ac.jp/news/news1/detail-,-id,545.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

正田 晋一郎 (SHODA SHIN-ICHIRO)

東北大学・大学院工学研究科・教授