

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510297

研究課題名(和文) 医療応用を目指した糖鎖プローブの次世代型合成法の開発

研究課題名(英文) Development of novel synthetic method of carbohydrate probes toward medicinal applications

研究代表者

山口 真範 (Yamaguchi, Masanori)

和歌山大学・教育学部・准教授

研究者番号：20400129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖は細胞間の認識、情報伝達、形態形成、ガン細胞転移など我々が生命を維持していく上で必須の生命現象や、好ましくない現象を司っている。その中で、糖鎖の末端にシアル酸という糖が付加されたものをシアロ糖鎖といい、ガン関連糖鎖抗原として知られている。本研究では、これらの糖鎖と糖鎖プローブを糖質加水分解酵素の逆反応を利用した種々合成システムを構築することに成功した。そして現時点では限定はされるものの、糖鎖をペプチド合成のように自動的に合成することが可能なシステムを世界に先駆けて創出した。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrates play important roles in numerous physiological processes. For example, cell migration, recognition, morphogenesis, cancer cell metastasis and so on. Sialo-sugar chain is a generic term for sugar chains having a sialic acid at the non-reducing end. It has been elucidated that many sialo-sugar chains are present in cancer related carbohydrate antigens. In the present study, we succeeded the synthetic methodology of sialo-sugar chains and its probes utilizing trans glycosylation activity of neuraminidase. The system that is able to synthesize the sialo-sugar chains automatically like the peptide synthesis, though it is limited in present stage.

研究分野：糖鎖生命科学

キーワード：シアロ糖鎖 糖鎖プローブ 免疫 自動合成 酵素合成

## 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

### (1) シアロ糖鎖の次世代型合成法の開発

糖鎖の合成は、高度な技術、マンパワーや実験設備を必要とし、反応点の多さ、立体制御の困難さからペプチドや核酸の合成のように完全な自動化は達成されていない。シアロ糖鎖合成可能な次世代型合成方法を新たに開発し、その合成過程の自動化を可能とする。

### (2) ガン関連糖鎖抗原の自動合成の達成

ガンの糖鎖抗原である糖鎖( $T_N$ 抗原, T抗原, 2, 6-シアリル T 抗原, 2, 3-シアリル T 抗原, sialyl  $T_N$  抗原)とそれらのアナログ体の合成を達成する。

### (3) 構造中に硫酸基を有するシアロ糖鎖の合成

部位特異的にその水酸基が硫酸化された糖鎖は多く存在している。硫酸加水分解酵素の逆反応を利用し、1段階で部位特異的硫酸化が可能な反応法を新たに開発する。

### (4) 合成糖鎖の医療応用

合成を達成したシアロ糖鎖のプローブ化を行う。これらのプローブは分子イメージング

に応用するとガン病変組織を発見することができ、効率的な治療手段となり得る。

## 3. 研究の方法

加水分解酵素の逆反応を用いて受容体糖に糖や硫酸基を転移させ目的糖鎖を合成する手法を用いる。逆反応を用いた合成であるため、基質特異性にとらわれず自在な構造の糖鎖を創出できる。その合成の自動化においては、酵素固定化カラムを作成し、基質となる糖鎖を通じ、カラム内での糖転移反応、硫酸基導入反応を実施する。更に反応終了時、酵素固定化カラムから溶出される目的糖鎖を含む溶液を直接連結された適切なカラムへ通じ、反応から精製までの過程を連続作業にて糖を精製できるシステムを構築する。すなわち合成者(作業員)はカラム内への糖鎖を通じ、所定の時間に所定の溶液をシステムに通じるのみで目的糖鎖を手にすることが出来るようにする。本システムを用いて、各種ガン関連糖鎖抗原と構造中に硫酸基を有するシアロ糖鎖の自動合成を世界に先駆けて達成する。つぎにこれらの糖鎖をプローブ化し、生命機能の解明、糖鎖型ガンワクチンの創出、新たな病原ウイルスの感染防御薬への開発へ導き医療応用を目指す。

## 4. 研究成果

### (1) シアロ糖鎖の次世代型合成法の開発

本研究の大きな柱であるシアロ糖鎖の次世代型合成法の開発は成功した。従来法の合成における煩雑な操作を一切除き、合成者は作成した反応装置に基質となる糖類を導入するのみでシアロ糖鎖を得ることが出来るようになった。また開発に成功したこの革新的合成システムは米国及び欧州特許をそれぞれ取得し、日本においても出願は完了している。

### (2) ガン関連糖鎖抗原の自動合成の達成

T 抗原においては位置選択的ガラクトシル化反応「Gal (1-3)結合形成」を開発することに成功し合成を達成した。2-3 及びシアリル T<sub>N</sub> 抗原においては、位置選択的および高収率でのシアリル化反応の開発に成功し合成を達成することが出来た。2,6-シアリル T 抗原の合成においては還元末端側と非還元末端側の糖の区別をしたシアリル化反応が芳しくなく、課題を残す結果となった。

#### (3) 構造中に硫酸基を有するシアロ糖鎖の合成

加水分解酵素の逆反応を用いた硫酸化反応は鋭意検討を行ったが、有意に目的物を得ることが出来なかった。よって申請書に代替法として挙げた有機化学的手法により硫酸化を達成するに至った。続くガラクトシル化、シアリル化に関しては(1)で開発した合成システムを適用することにより、想定どおり進めることが出来た。

#### (4) 合成糖鎖の医療応用

本研究課題で合成した糖鎖のうちプローブ化を行うものは還元末端側にアルキニル基を導入してある。別途合成したアジド基を有する脂質と双極子付加反応を用いることにより糖鎖プローブへと導くことに成功した。ガン免疫療法へ有用性のある糖鎖プローブの合成を達成した。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

(1) 山口真範, CARBOHYDRATES: 多糖の役割, 和歌山大学学芸学会, 2016, 62, 83-85. 査読なし

(2) Kawamuro, Y., Yamaguchi, M. Synthesis of a-galactosyl ceramide analog toward medical treatment applications *Bull, fac, edu, wakayama university natural science*, 2015, 65, 29-32. 査読有

(3) Sakurama, H., Kiyohara, M., Wada, J., Honda, Y., Yamaguchi, M., Fukiya, S., Yokota, A., Ashida, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K. Lacto-N-biosidase Encoded by a Novel Gene of *Bifidobacterium longum* Subspecies *longum* Shows Unique Substrate Specificity and Requires a Designated Chaperone for Its Active Expression. *J. Boil.Chem.*, 2013, **288**, 25194-25206. 査読有

(4) Yabushita, U., Yamaguchi, M. Exploring sialidases from marine organisms toward the development of glycoengineering. *Bull, fac, edu, wakayama university natural science*, 2013, 63, 29-32. 査読有

(5) Yamaguchi, M. "The Meaning of Glycan Synthesis" *J. Glycomics Lipidomics*, 2012, 2, 3, 1000e111. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

(1) 山口真範, 山口実沙子「グリコシダーゼの逆反応を用いた生理活性オリゴ糖の効率的合成」第88回日本生化学会大会(2015,12,2 兵庫県)

(2) 川室裕太郎, 山口真範「脂質修飾酵素を用いたガラクトシルセラミド類縁体の効率的合成法の開発」第88回日本生化学会大会(2015,12,2 兵庫県)

(3) 井川真宏, 伊豫昌己, 山口真範「酵素反応を用いた Sia (2-6) Lac の効率的合成」第87回日本生化学会大会(2014, 10, 15 京都府)

(4) 川室裕太郎, 山口真範「ガラクトシルセラミド類縁体の合成」第87回日本生化学会大会(2014, 10, 15 京都府)

(5) 薮下侑平, 山口真範「医療応用を目指したシアロ糖鎖類縁体の効率的合成研究」第87回日本生化学会大会(2014, 10, 15 京都府)

(6) Masahiro Ikawa, Masanori Yamaguchi「Efficient synthesis of sailosaccharide utilizing enzymatic reaction」Active Enzyme Molecule (2014, 12, 17 Toyama)

(7) Yuhei Yabushita, Masanori Yamaguchi  
「Chemoenzymatic synthesis of sialo-glycoconjugate derivatives utilizing transglycosylation activities of sialidase」Active Enzyme Molecule (2014, 12, 17 Toyama)

(8) 藪下侑平、佐瀬典子、澁谷真由美、吉松志鶴麻、山口真範「生理活性糖鎖の効率的ハイブリッド型合成法の開発研究Ⅰ」第86回日本生化学会大会(2013, 9, 13 横浜)

(9) 藪下侑平、山口真範「生理活性を有するシアロ糖鎖の効率的かつ簡便な合成システムの開発」第85回日本生化学会大会(2012, 12, 16 福岡市)

〔図書〕(計1件)

Masanori Yamaguchi., Masahiko Endo.  
“Novel glycosaminoglycan glycotchnology: Efficient synthesis and elongation procedure of chondroitin sulfate oligosaccharides”, *Chondroitin Sulfate: Structure, Uses and Health Implications*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2013, pp 29-40.

〔産業財産権〕  
出願状況(計4件)

(1)名称: 抗ウイルス用繊維又は繊維製品  
発明者: 山口真範  
権利者: 国立大学法人和歌山大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-050963  
出願年月日: 2016, 3, 5  
国内外の別: 国内

(2)名称: 免疫グロブリンA分泌促進剤  
発明者: 山口真範  
権利者: 国立大学法人和歌山大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-184634  
出願年月日: 2015, 9, 18  
国内外の別: 国内

(3)名称: 反応性基導入 ガラクトースの製造方法  
発明者: 山口真範  
権利者: 国立大学法人和歌山大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-260418  
出願年月日: 2014, 12, 24  
国内外の別: 国内

(4)名称: 新規(2 3)結合型シアロ糖鎖の

製造方法  
発明者: 山口真範  
権利者: 国立大学法人和歌山大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-056256  
出願年月日: 2013, 3, 19  
国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: PROCESS FOR PRODUCING NOVEL SIALO-SUGAR CHAIN  
発明者: Masanori Yamaguchi  
権利者: Wakayama University  
種類: United States Patent  
番号: US 9,290,532 B2  
取得年月日: 2016, 3, 22  
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1)研究代表者  
山口真範 (YAMAGUCHI MASANORI)  
和歌山大学・教育学部・准教授  
研究者番号: 20400129