

「糖鎖機能活用技術開発」
(事後評価)第1回分科会
資料6-2

公開

糖鎖機能活用技術開発プロジェクト (Medical Glycomics / MG project)

概要説明

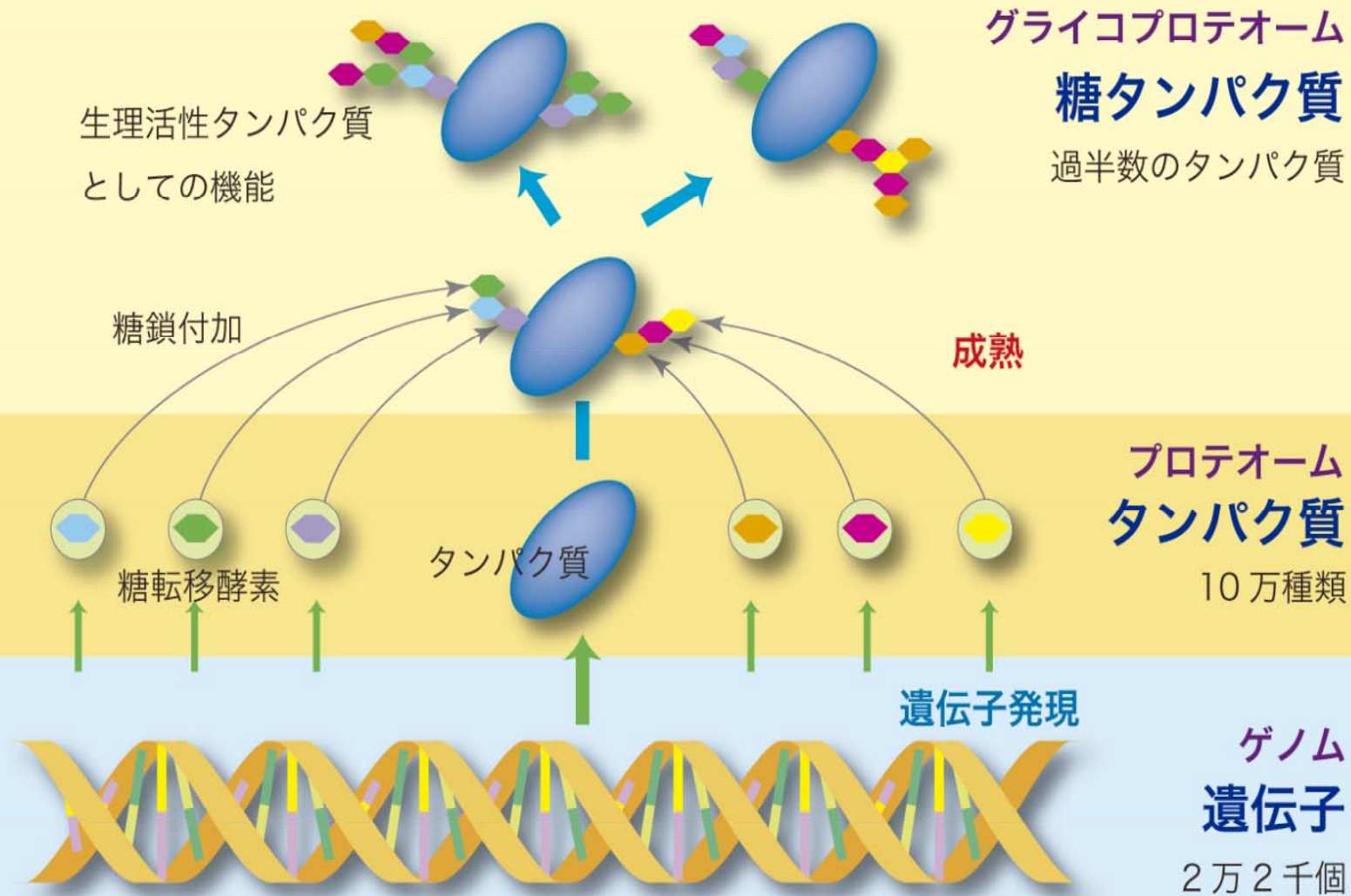
プロジェクトリーダー

(独)産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター

成松 久

公開

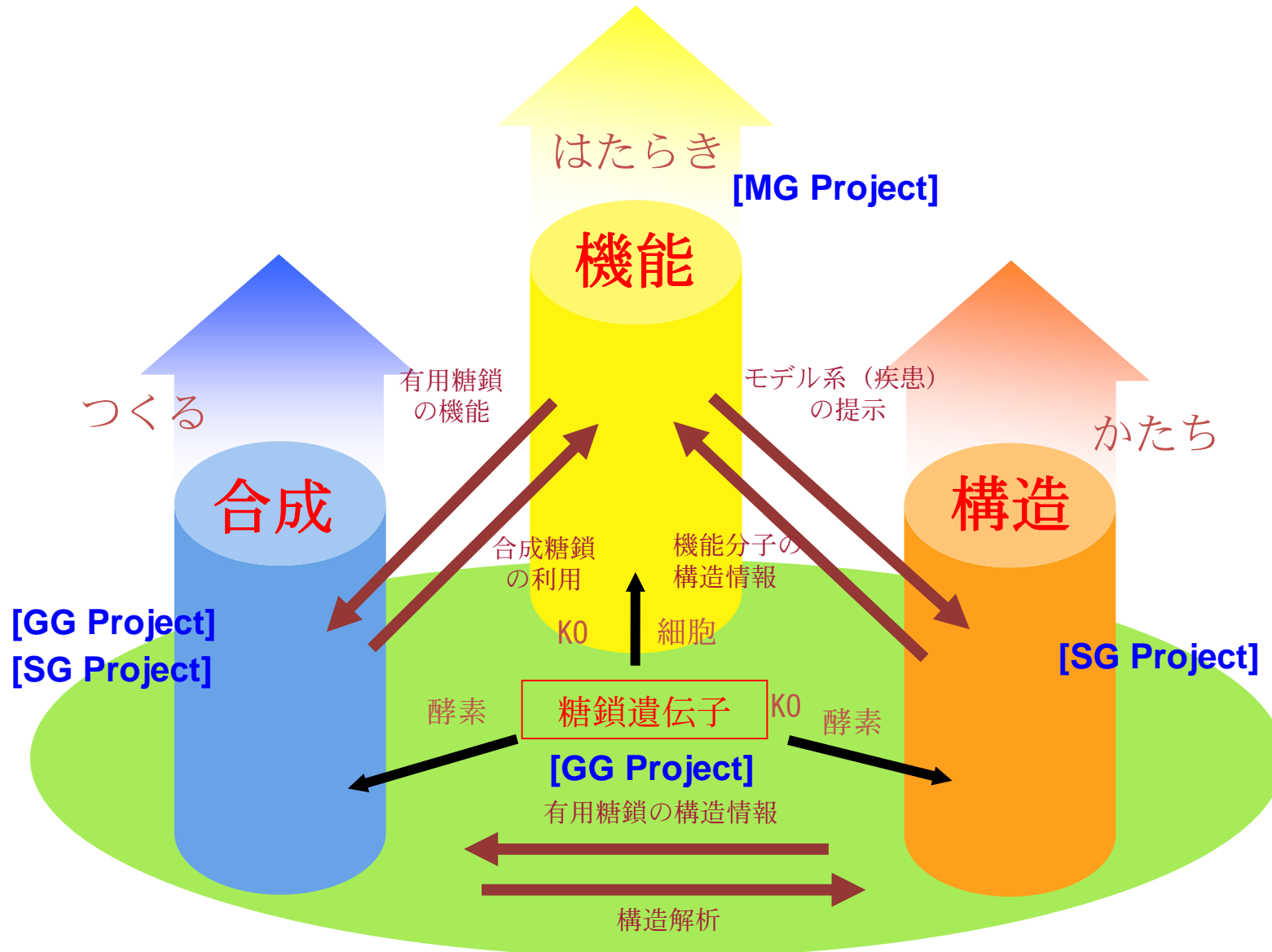
グライコプロテオミクス



公開

事業原簿 p.74

糖鎖研究の三本柱



公開

事業原簿 p.74

ヒト糖鎖合成関連遺伝子ライブラリーの構築 (Glycogene / GG project 2002-2005)

バイオインフォマティクスによるヒト糖鎖遺伝子の網羅的検索と機能解析

ホモロジー検索

- ホモロジーが全体的に高いもの。既に開発されているプログラムで十分に検索できる。

```

A YGE---SHKPLK-CTMNETLSRYKFLAFENSLHPDYITEKLRNALAANA-VVVVLPSPRSNYERFLPPDAFZHVOOF
B FQGGPGQ-PWPEIG-LLHTWARYKFLAFENSLHPDYITEKLRNALAANA-VVVVLPSPRSNYERFLPPDAFZHVOOF
C YGE---SHKPLK-CTMNETLSRYKFLAFENSLHPDYITEKLRNALAANA-VVVVLPSPRSNYERFLPPDAFZHVOOF
D YGE---SHKPLK-CTMNETLSRYKFLAFENSLHPDYITEKLRNALAANA-VVVVLPSPRSNYERFLPPDAFZHVOOF
    ..
    
```

従来の欠点 (抜粋)

- 既知のものも多くヒットする (サブファミリー、同一配列の多重登録など) ため、大量のデータを研究者が全て確認する必要があった。
- 配列のデータ自体の精度の不足。

- 全体的なホモロジーは低い、モチーフが保存されているもの。検索が困難な場合がある。

```

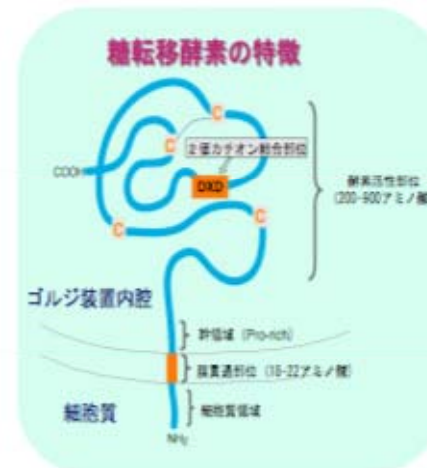
A AKQPSA-EVEYQSLQALAVDNYGR---SHKPLK-CTMNETL-S---RYKFLAFENSLHPDYITEKLRNALAANA-V
B ERQ--A-EVEYHQLSCHVTVDFQGGPGQ-PWPEIG-LLHTV-A---RYKFLAFENSLHPDYITEKLRNALAANA-V
C AKQPSA-EVEYQSLQALAVDNYGR---SHKPLK-CTMNETL-S---RYKFLAFENSLHPDYITEKLRNALAANA-V
D CQTN-SAREDFWKLQHLQDEVEYAGCPHAK---ARGSKLDTMLDTHHPDVTFFENSICDHYVTEKLRNALAANA-V
    ..
    
```

- ほとんどホモロジーなし。断片的にモチーフ的配列があるもの。このようなものを効率よく検索できるプログラムはなかった。

```

A -----CHTAD---IKVYQASIVVHH-----AGCSIDPTSE-----LPPSP-IRQC
B -FNISGCLLTD--RATYGEARVLPFRHDLV-AGPPDHPNWCIDAGITTSVQLRVLDTYEAAAACALATSSPRPFS
C -----CHTAD---SSVYQASIVVHH-----AGCSIDPTSE-----LPPSP-IRQC
D PSMLENV-----PAXKT-IR-----I-SP---VGAZ-----PFDVQIDLTSY-DEK-L---L-----LMTATVI-P-S
    ..
    
```

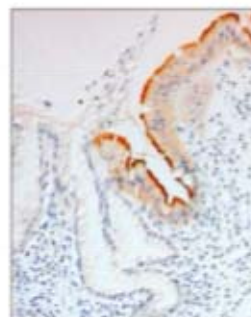
高効率検索システムの開発



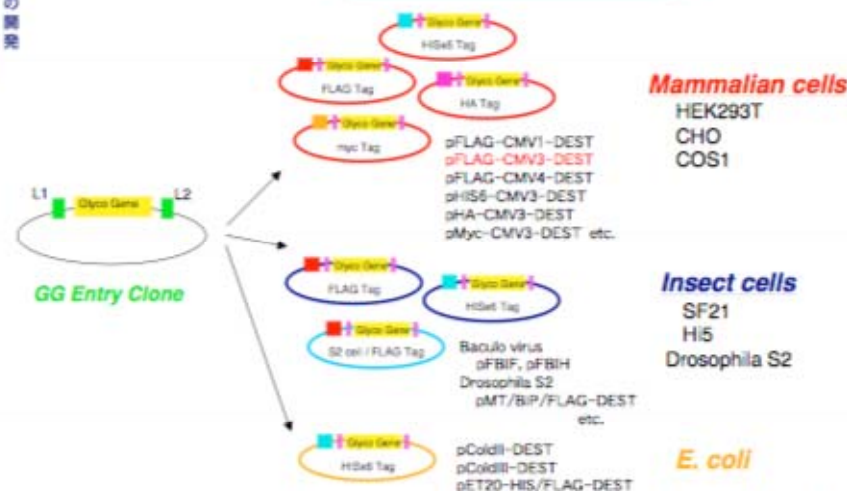
胃におけるβ4GalNAc-T3の発現



anti-β4GalNAc-T3



anti-villin



Narimatsu H. Glycoconj J. 2004;21(1-2):17-24.

簡便・高感度 糖鎖構造同定を実現

タンパク質の糖鎖構造は、他のタンパク質や生体分子との相互作用を介した生体機能に重要な役割を果たしていることが広く知られています。しかしながらその複雑な構造のため、糖鎖構造解析は熟練した専門的研究者がNMRや多次元-HPLCなどを用いてしか行えないのがこれまでの現状でした。

糖鎖微量迅速解析システムは、糖鎖を高感度で検出できるMALDI-QIT-TOFを利用し糖鎖構造同定を行います。このシステムには構造既知の糖鎖の実測MSⁿスペクトルで構成されたデータベースが収録されており、測定された未知試料のスペクトルとデータベースとをマッチングすることにより、高感度・高精度で簡便な糖鎖構造同定を可能にします。

MALDI-QIT-TOF MS

AXIMA Resonance[®] は、四重極イオントラップ(QIT)を採用した唯一のMALDI-TOF MSです。独自のイオン捕捉・加速技術を用いたQITが高感度のMSⁿ測定を、TOF MSが高い質量精度と高感度測定を可能とします。これらの独自技術によりAXIMA Resonance[®] は、糖鎖の構造解析に必要な高精度多段階MSⁿスペクトルを提供します。



AXIMA Resonance

容易な糖鎖構造同定を実現するインテリジェントな測定法

多段階MSⁿスペクトルを用い複雑な立体異性体の違いも判別

微量の糖鎖を数分で解析可能

生体試料由来の糖鎖の構造同定が可能



Open the door to Glycomics !

インターフェースソフトウェア

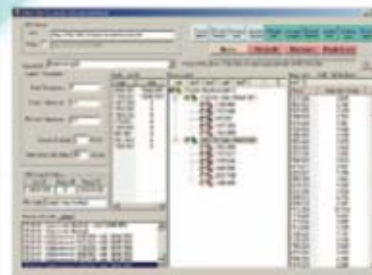
検索ソフトウェア/データベース*

検索ソフトウェアのマッチングアルゴリズムが、データベースに収録された糖鎖のMSⁿスペクトルパターンと実測スペクトルを比較し、未知糖鎖構造の高精度な同定を実現します。検索ソフトウェアは三井情報株式会社の製品です。



検索ソフトウェア/データベース

*データベースは三井情報株式会社の研究開発成果です。



クライアント

AXIMA Resonance[®] の操作ソフトウェア"LaunchPad"に組み込まれたインターフェースソフトウェア"クライアント"は、糖鎖構造同定作業を視覚的に表示し、複雑な分析・解析作業をサポートします。



Contents

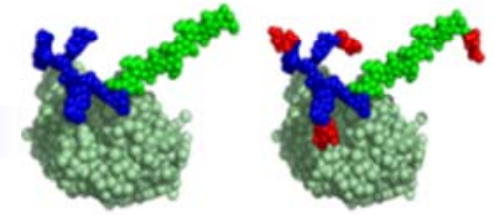
多段階タンデム質量分析計による糖鎖構造解析の流れ	p. 4
試料由来N-結合型糖鎖の構造同定	p. 5
仕様	p. 7
関連製品	p. 8

公開

糖鎖構造解析技術開発プロジェクト(2004-2007)

事業原簿 p.74

レクチンマイクロアレイ



“修飾異性体”

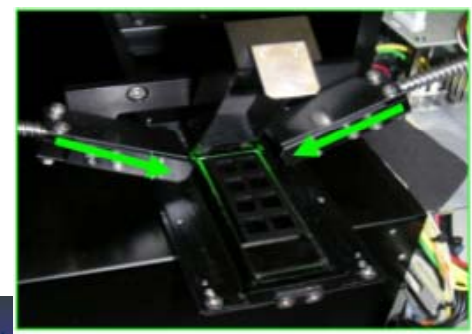
糖鎖構造プロファイリング



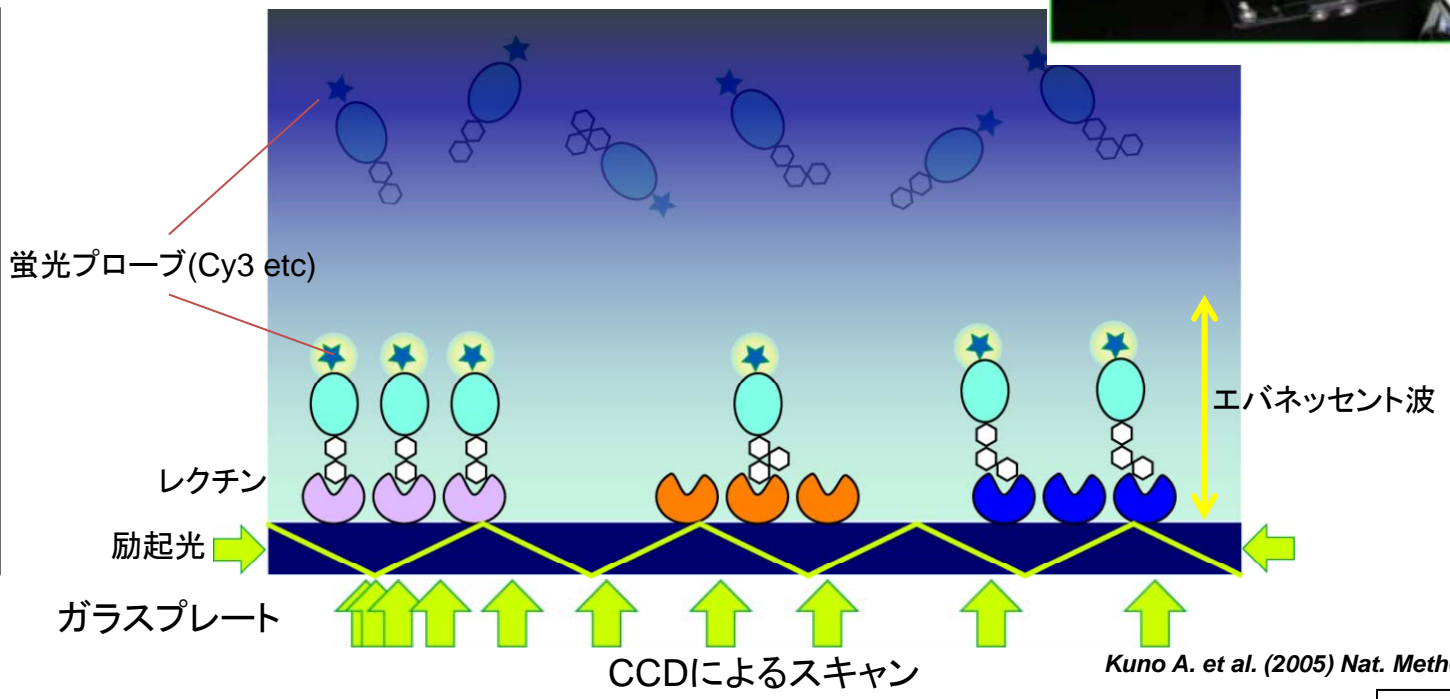
レクチンマイクロアレイ

スキャナー

スキャンイメージ



LTL	GSL-I	Jacalin
PSA	NPA	PNA
LCA	ConA	WFA
UEA-I	GNA	ACA
AOL	HHL	MPA
AAL		HPA
MAL		VVA
SNA	BPL	DBA
SSA	TJA-II	SBA
TJA-I	EEL	GSL-I
PHA(L)	ABA	PTL-I
ECA	LEL	MAH
RCA120	STL	WGA
PHA(E)	UDA	GSL-A4
DSA	PWM	GSL-IB4



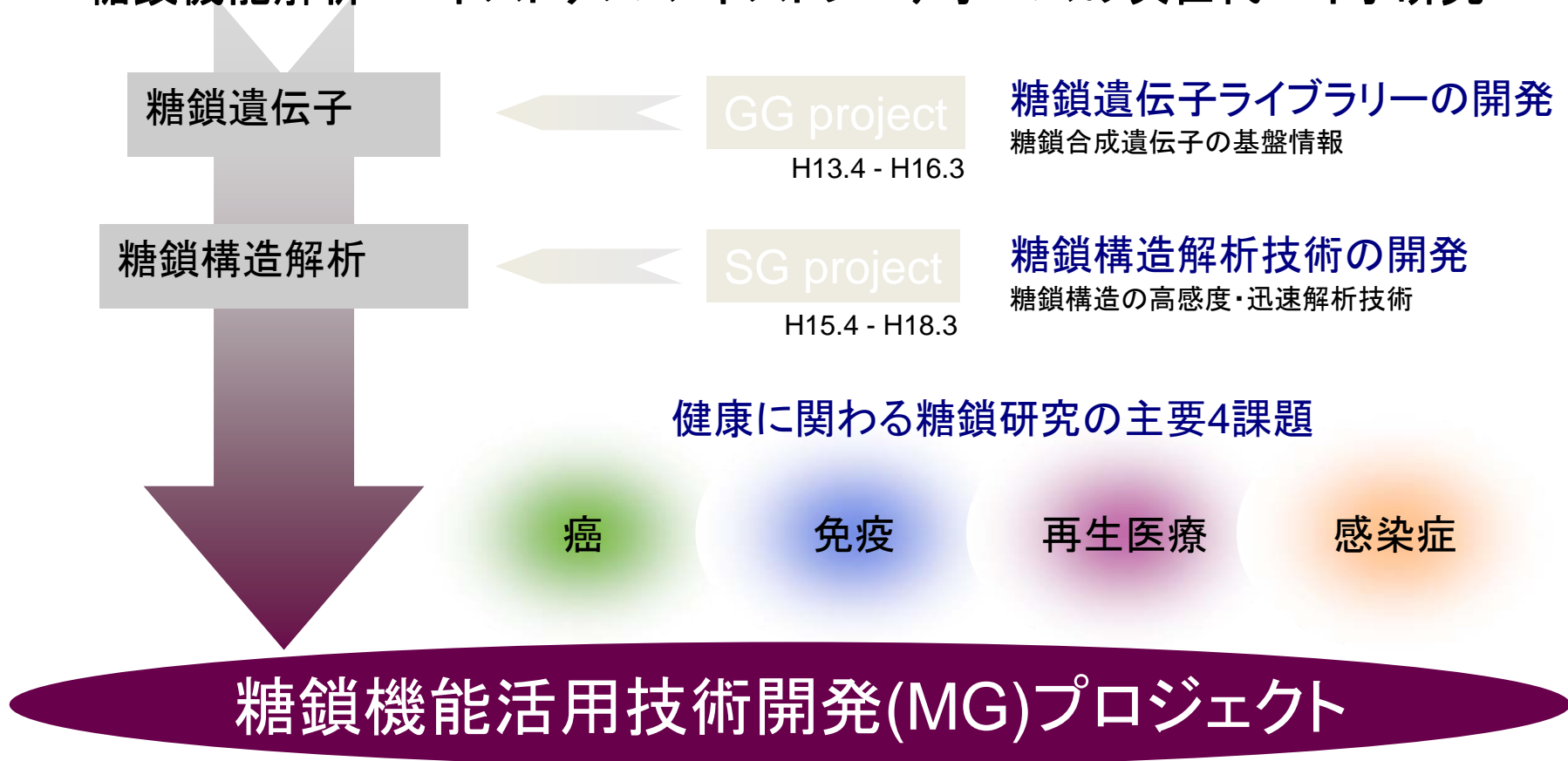
Kuno A. et al. (2005) Nat. Methods

糖鎖機能活用技術開発(MG)プロジェクト

事業原簿 p.74

公開

糖鎖機能解析 = ポストゲノム・ポストプロテオームの次世代バイオ研究



糖鎖機能を解明し、
国民の健康増進のため
医療応用を図る。

↓
診断

↓
機器

↓
創薬

公開

研究実施体制

共同研究機関

参加企業

技術開発企業

島津製作所
野口研究所
GPサイエンス
シスメックス社
免疫生物学研究所

三井情報(株)
三菱化学(株)

タカラバイオ(株)
グライコジーン(株)

マーカー・機能開発企業

検体・臨床情報系研究機関

国立がんセンター	藤田保健衛生大学
大阪医療センター	筑波大学内科
北里大学外科	筑波大学病理
愛知県がんセンター	国立成育医療センター
名古屋市立大学	福生病院

産総研
(成松久)



技術系研究機関

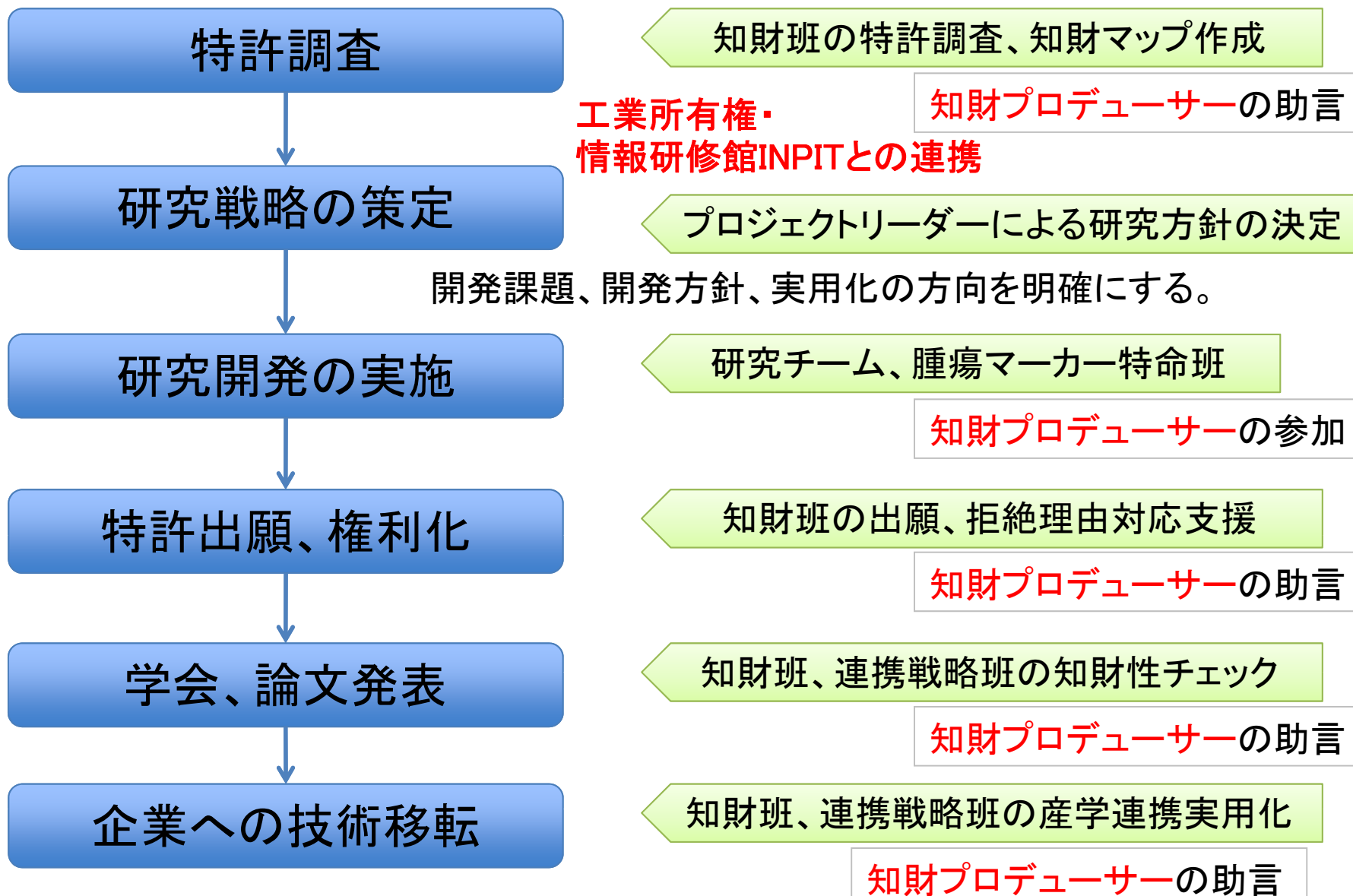
国立感染研究所	近畿大学
筑波大学動物資源センター	
首都大学東京	
慶応義塾大学	
大阪大学薬学部	
九州大学	

機能解析系研究機関

大阪大学	名古屋大学
東京大学	中部大学
京都産業大学	東大医
創価大学	理研
愛知医科大学	福島医科大学
東京工業大学	

公開

MGプロジェクトにおける知財管理



本プロジェクトにおける研究開発項目

①糖鎖の高効率な分画・精製・同定技術の開発

- (1) 生体試料から特異的糖鎖を高効率に分画・精製する技術の開発
- (2) 特異的糖鎖同定技術の開発

②糖鎖の機能解析・検証技術の開発

- (1) 糖鎖改変による糖鎖の生物学的機能解析
- (2) ヒト型糖鎖ライブラリーを用いた機能解析

③糖鎖認識プローブの作成技術の開発

- (1) プローブ作成用糖鎖・糖蛋白質の精製／合成技術の開発
- (2) 糖鎖認識プローブの作製と臨床検体を用いた検証

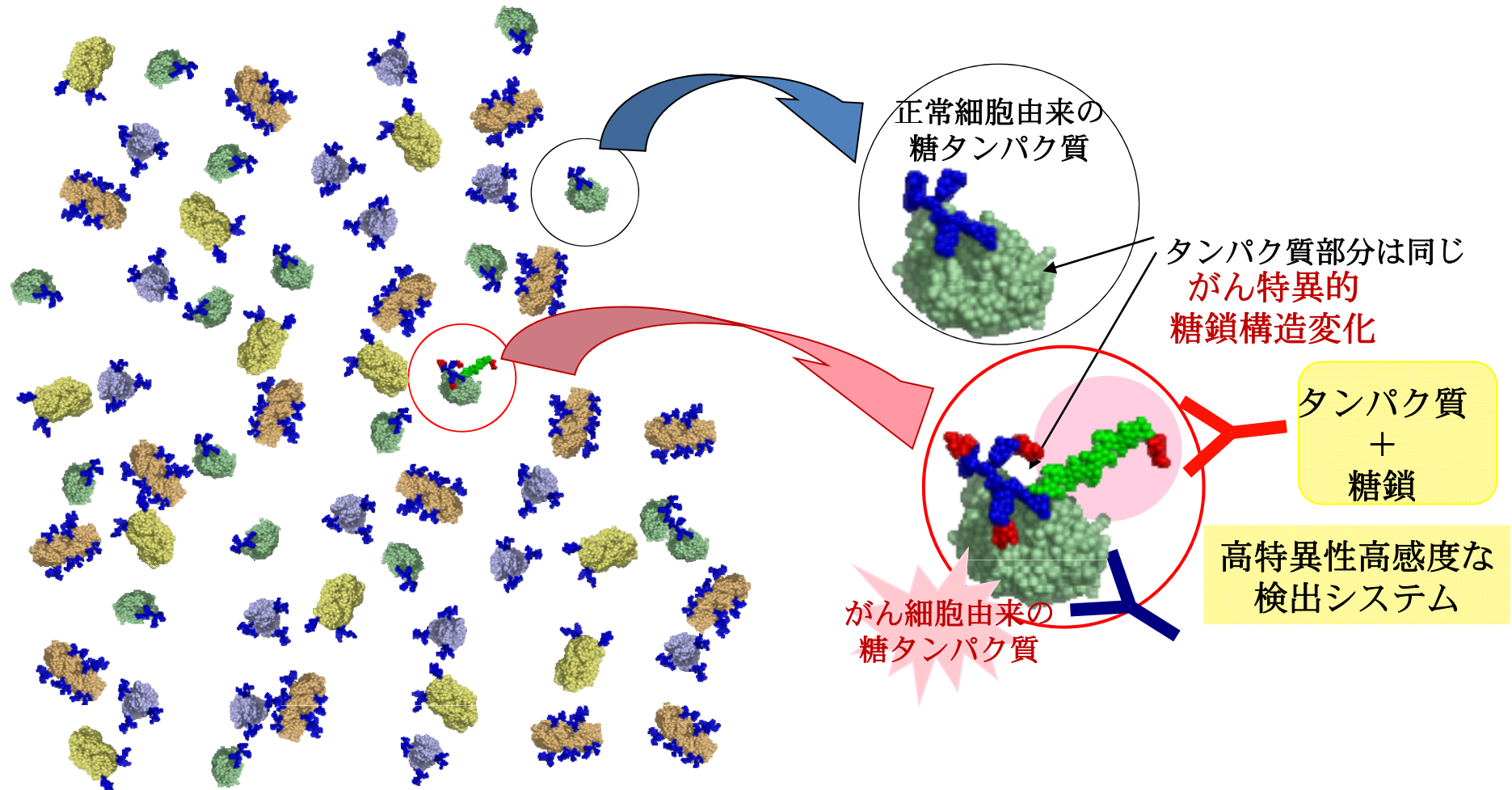
公開

糖タンパク質バイオマーカー開発の基本理念

事業原簿 p.81

“がん化により糖鎖構造は変化する”

正常細胞とがん細胞では分泌するタンパク質の種類は同じであっても糖鎖構造は異なっている



公開

がんに対する糖鎖バイオマーカーの開発方向

—現在の技術では十分に取得できなかった臨床上必要な情報を取得可能にする—

がんの発症と進展 (がんの自然史)

1次予防: がん発症の原因を除去

B型肝炎、C型肝炎、パピローマ、
ヘリコバクターピロリ、喫煙

リスクの評価、**進展の評価**)

感染の予防、抗ウイルス治療、除菌、生活習慣改善
リスクの存在
進行度 (ハイリスク群の囲いこみ: 肝臓の線維化)

2次予防: 疾患の早期発見 (対策型検診)

子宮がん検診 (頸部細胞診)
胃がん検診 (X線造影)
乳がん検診 (マンモグラフィー)

前がん病変、早期がんの検出

局所外科・内視鏡切除、放射線治療、ラジオ波凝固
確定診断へのフォロー

3次予防: 再発の予防

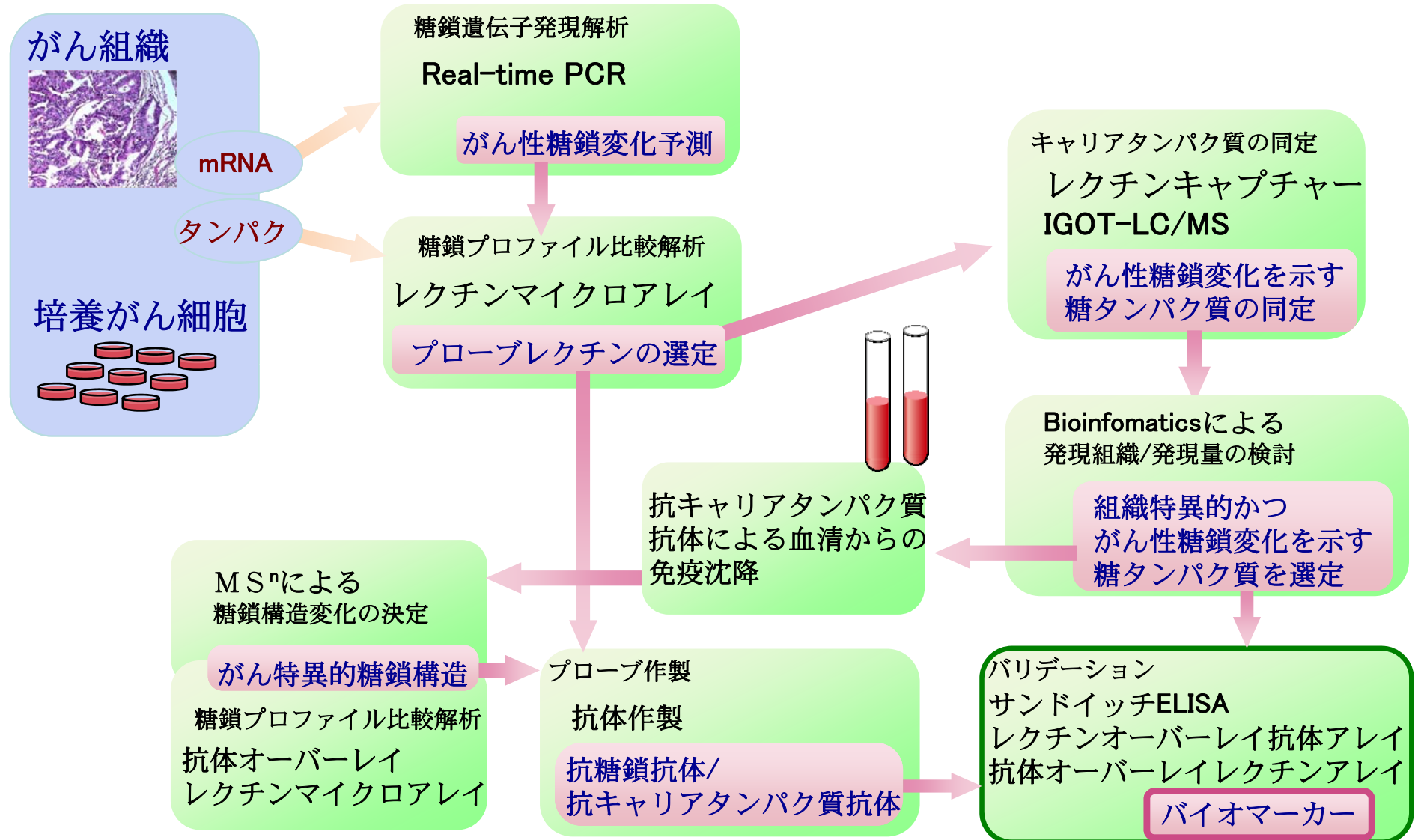
卵巣がん再発の早期発見
乳がん再発の早期発見
胃がん再発の早期発見

再発の早期発見、**再発高リスク群の予測 (前立腺がん)**

治療効果判定: 手術、放射線療法及び化学療法を効果的に組み合わせた集学的治療をサポートする。

公開

マーカー探索の戦略

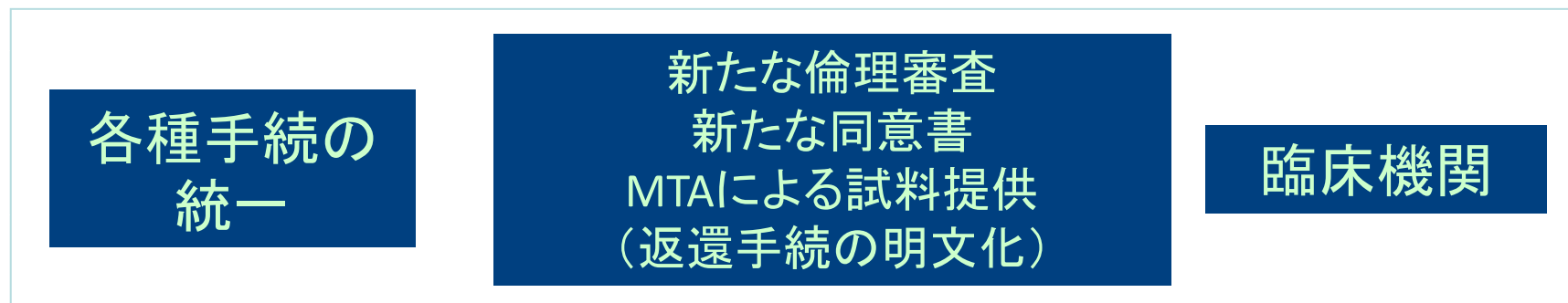
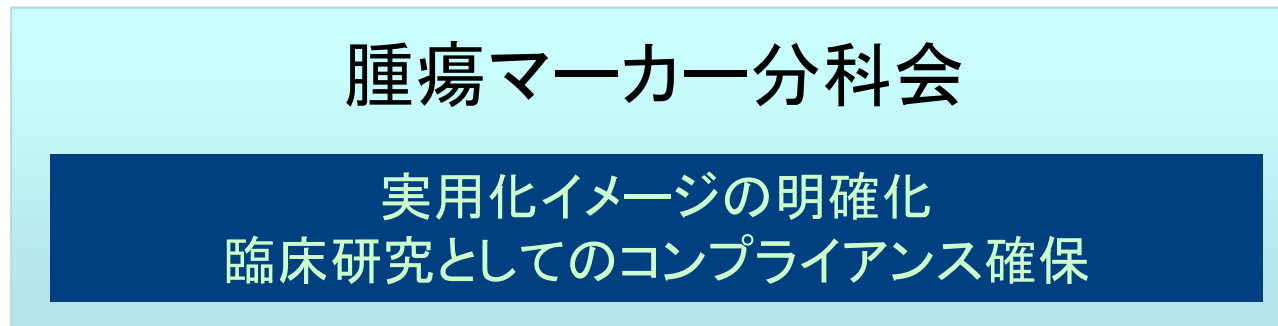


公開

研究開発に用いる臨床検体ライブラリーの構築



ヒトゲノム・遺伝子解析倫理指針(平成13年4月1日)
 発現解析は、これに準拠して審査される



公開

研究開発項目①

「糖鎖の高効率な分画・精製・同定技術の開発」

- (1) 生体試料から特異的糖鎖を高効率に分画・精製する技術の開発
- (2) 特異的糖鎖同定技術の開発

近畿大、九州大、GPバイオサイエンス、首都大東京、(財)野口研、産総研・糖鎖医セ

公開

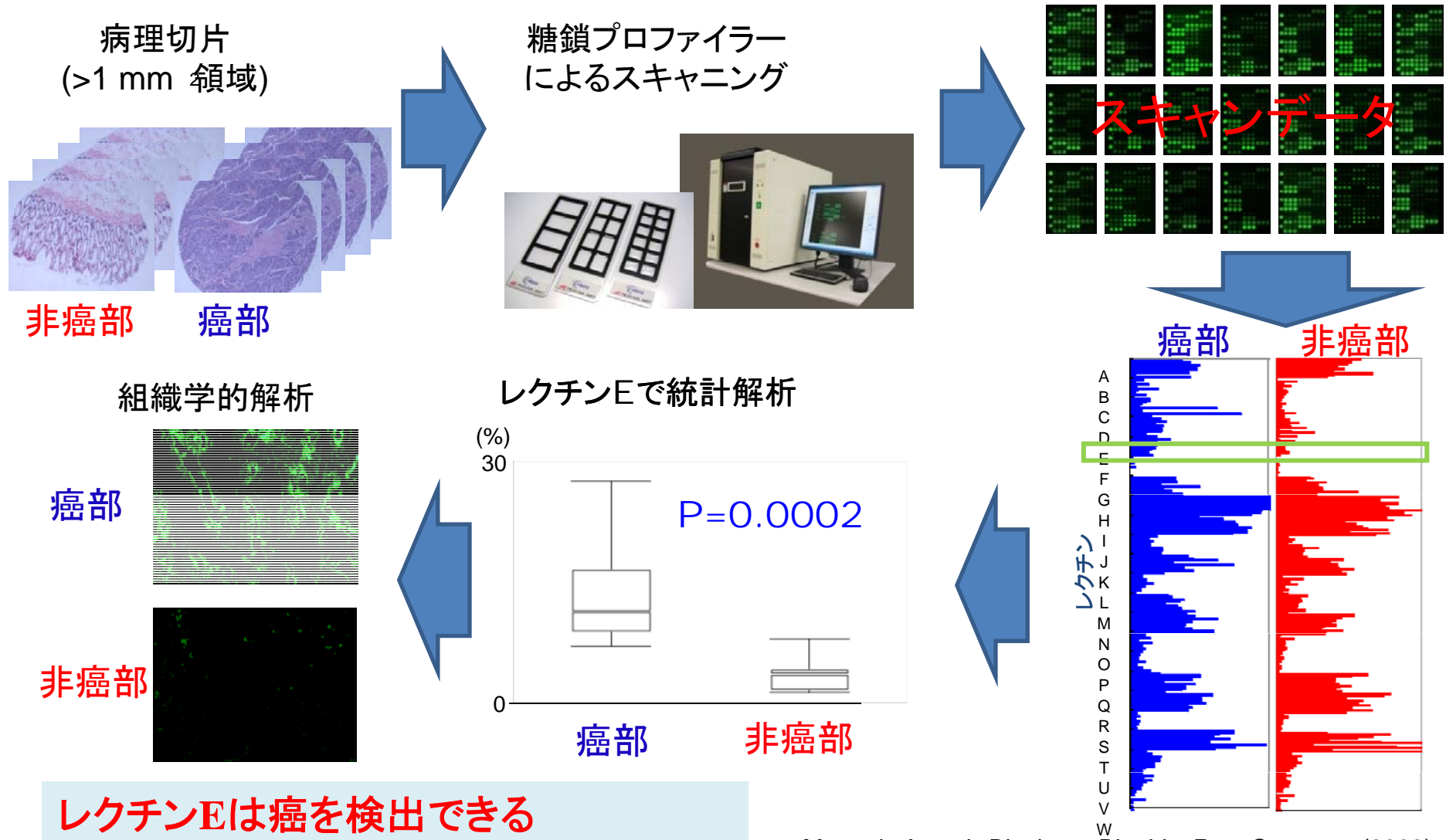
研究成果の概要 研究開発項目①

「糖鎖の高効率な分画・精製・同定技術の開発」

- 1) 生体試料の前処理濃縮装置の開発
 - ・生体試料からの特定糖鎖含有タンパク質のエンリッチ法の確立
- 2) レクチンアレイ解析
 - ・レクチンアレイによる疾患糖鎖の洗い出し
- 3) 疾患関連糖タンパク質のハイスループットな同定法の開発
 - ・IGOT法による培養細胞由来分泌糖タンパク質の大規模解析とこれを用いたマーカー候補の絞り込み
- 4) 高分子ムチンの分離解析技術の解析
 - ・SMME法の開発と応用
- 5) O-グリカン分離分析法の開発
 - ・微生物由来O-グリカナーゼの基質特異性の決定
 - ・AGC(Auto Glyco-Cutter)の生体試料への応用
- 6) 疾患関連糖鎖遺伝子の発現量を網羅的に測定する方法の開発
 - ・糖鎖遺伝子リアルタイムPCRアレイ

公開

微小組織切片中糖タンパク質の比較糖鎖解析 でエンリッチに有用なレクチンを絞り込む



レクチンEは癌を検出できる

Matsuda A et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2008)

公開

研究開発項目②

「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

- (1) 糖転移酵素ノックアウトマウスの解析
- (2) ヒト型糖鎖ライブラリーを用いた機能解析

筑波大、東大(薬)、生育医療セ、大阪大、タカラバイオ、三菱化学、国立感染症研、愛知医大、大阪赤十字、産総研・糖鎖医セ

研究成果の概要 研究開発項目②

「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

- 1) 糖鎖遺伝子ノックアウトマウスの作製と糖鎖機能解析
 - ・12種類の糖鎖遺伝子ノックアウトマウスを作製した。
 - ・ポリラクトサミンが免疫細胞の活性化に関与していることを見出した。
- 2) 間葉系幹細胞のプロファイリング
 - ・細胞移植医療に必須となる、レクチンマイクロアレイを用いた細胞表面糖鎖解析による細胞選別技術の開発を行なった。
- 3) ポドプラニンのO-グリカンの糖鎖構造解析
 - ・PLAGドメインのdi-sialyl-T構造が活性に必須であり、内在性レクチンCLEC2がこの糖鎖を認識することがわかった。
- 4) ヒト型糖鎖ライブラリーの応用
 - ・ノロウイルスが結合する糖鎖構造を決定した。

公開

糖鎖遺伝子改変マウス作製・維持および糖鎖機能検証 — 個体レベルでの糖鎖機能の検証 —

事業原簿 p.83

成果のポイント

- 12種類の糖鎖合成関連遺伝子の遺伝子改変マウスを作製、維持。
- 各遺伝子改変マウスの表現型解析により、個体レベルでの糖鎖機能の検証を可能とする。
- 糖鎖修飾異常におけるキャリアタンパク質の機能解明の為の材料提供。

共同研究状況

産総研糖鎖医工学研究センター糖鎖遺伝子機能解析チーム・分子医用技術開発チーム・東京大学・愛知医科大学・信州大学等

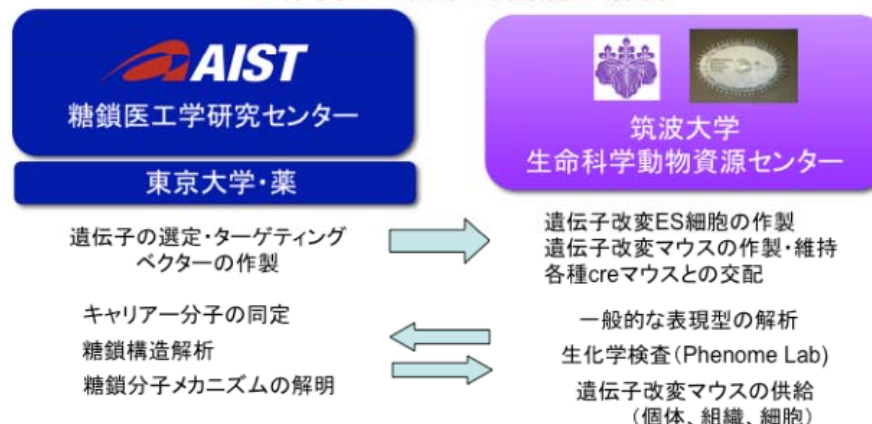
今後の展開

- 遺伝子改変マウスで見られた異常な表現型の原因について分子的異常を探索する。
- 糖鎖修飾変化に起因するヒト疾患モデル動物の開発をおこなう。

特記事項

- 日本生化学学会等、各種学会で発表。学術論文としてPNAS, JBCに掲載(AISTとの共同実験)。

糖鎖遺伝子ノックアウトマウス・トランスジェニックマウスの作製と生物学的機能の解析



糖鎖合成関連遺伝子の遺伝子改変マウスの表現型

- 1 *Fut9*(SSEA-1合成酵素)情動異常、萎縮性胃炎
- 2 *B3gnt2*(ポリラクトサミン合成酵素)免疫細胞の恒常的活性化
- 3 *B3gnt5*(ポリラクトサミン合成酵素)糖脂質ラフト形成異常
- 4 *MG1KO*: 精子運動能不全
- 5 *MG2KO*:ウレタン誘導肺発がんの亢進
- 6 *MG3KO*:胃腺窩上皮組織の恒常性維持に機能
- 7 *MG4KO*:糖タンパク質ホルモンの代謝に機能
- 8 *MG5KO*:骨形成異常による成長遅延
- 9 *MG6KO*:免疫細胞の分化不全
- 10 *MG7KO*:血小板異常 →コンディショナルKO
- 11 *MG8KO*:血小板異常 →コンディショナルKO
- 12 *MG9KO*:胎生致死 →コンディショナルKO
- 13 *MG10KO*:胎生致死 →コンディショナルKO

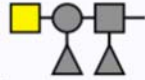
**糖鎖遺伝子
ノックアウトマウス**

公開

ノロウイルスと血液型抗原との結合の解析

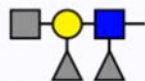
ノロウイルス(NoV)はウイルス性下痢症の主な原因ウイルスであり、糖鎖抗原の一種である血液型抗原に結合する。合成糖鎖ライブラリーを用いたELISA、Surface Plasmon Resonance (SPR)、X線結晶構造解析によって、ウイルス様中空粒子(VLP)との結合を解析した結果、NoVが糖鎖末端残基のみでなく、糖鎖の内部構造も識別していることを明らかにした。NoVが認識する糖鎖エピソードの解明は、糖鎖発現を指標とした感染標的組織・細胞の同定に繋がるばかりでなく、NoV-糖鎖相互作用を利用した診断薬、新規治療薬の開発に繋がる可能性を秘める。

A/B抗原の認識機構の解析



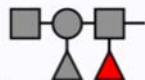
➢糖鎖ライブラリー、VLPsを用いたELISA、SPR解析

type1/2構造の認識機構の解析



➢糖鎖ライブラリー、VLPsを用いたELISA、SPR解析
➢糖鎖遺伝子改変細胞、VLPsを用いたFlow cytometry解析

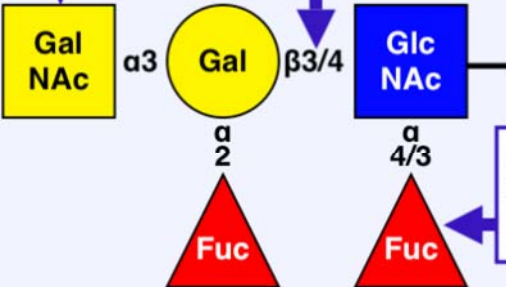
α1,4Fuc認識機構の解析



➢糖鎖ライブラリー、VLPsを用いたELISA、SPR解析
➢糖鎖ライブラリーを用いたX線結晶構造解析

NoV認識部位1:
遺伝子群Iに属する株はGalNAc (A抗原)、
遺伝子群IIに属する株はGal (B抗原) に結合しやすい

NoV認識部位2:
linkageがβ1-3の場合はNoVは血液型抗原から
解離しにくく、β1-4の場合は解離しやすい



NoV認識部位3:
α1-4Fucを認識する株は、
カプシドPドメイン上に
ループ構造をもつ

NoVは糖鎖認識においては高い特異性と保存性を有する

研究開発項目③

「糖鎖認識プローブの作製技術の開発」

- (1) プローブ作製用糖鎖・糖タンパク質の精製／合成技術の開発
- (2) 糖鎖認識プローブの作製と臨床検体を用いた検証

慶應大、大阪大(薬)、神戸学院大、名古屋大、中部大、東大、大阪大(産研)、北大、愛知県がんセ、京産大、東工大、筑波大、東京医大、名市大、国際医療セ、シスメックス、免疫生物研究所、上海交通大学、復旦大学、創価大、国立がんセ、藤田保健大、理研、福島医大、北里大、大阪医療セ、産総研・糖鎖医セ

研究成果の概要 研究開発項目③

「糖鎖認識プローブの作成技術の開発」

- 1) 酵母による糖タンパク質・糖ペプチドの大量発現
 - ・ヒト型糖鎖含有糖タンパク質・糖ペプチドの合成
- 2) 糖鎖認識プローブの作成方法の開発
 - ・ファージディスプレイ法、B1細胞、糖鎖遺伝子KOマウスの利用
- 3) 研究開発に用いる臨床検体ライブラリーの構築
 - ・各臨床機関との連携
- 4) 肝疾患マーカーの開発
 - ・肝炎ウイルス感染に伴う肝線維化マーカーの開発
- 5) 各種癌マーカーの開発
 - ・胆管がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がんなどのマーカー開発
- 6) その他の疾患マーカーの開発
 - ・正常圧水頭症マーカー

公開

肝疾患病態指標マーカー開発

糖鎖医工学研究センター

事業原簿 p.83

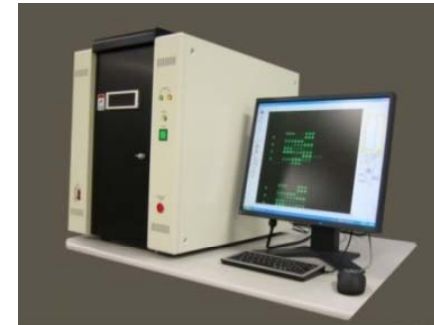
【研究成果の概要】

肝疾患の進展に特徴的な糖鎖修飾異性体を検出することで、生検等の侵襲性の高い生検検査に代替できる、**低侵襲検査マーカー分子**を開発してきた。現在のレクチンアレイを用いた検査システムは、18時間以上の測定時間を要するため、臨床で実用化するには、測定の迅速化、自動化によって多検体を処理できるシステムの確立が必要であった。

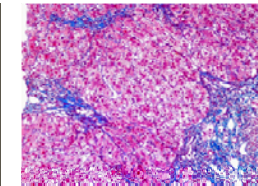
検定に必要な3項目のうち1項目の測定を17分で完了する検査システムを、シスメックス社と共同開発する事に成功した。シスメックス社の自動免疫反応測定装置HISCLで測定した場合、1時間に60症例の測定を完了できる。開発したシステムは、レクチンアレイ検査法と同等の感度・精度を達成し、緩徐に進行する線維化を検出し、**肝硬変や肝がんに向かうリスク評価を可能とする。**

【開発技術の用途】

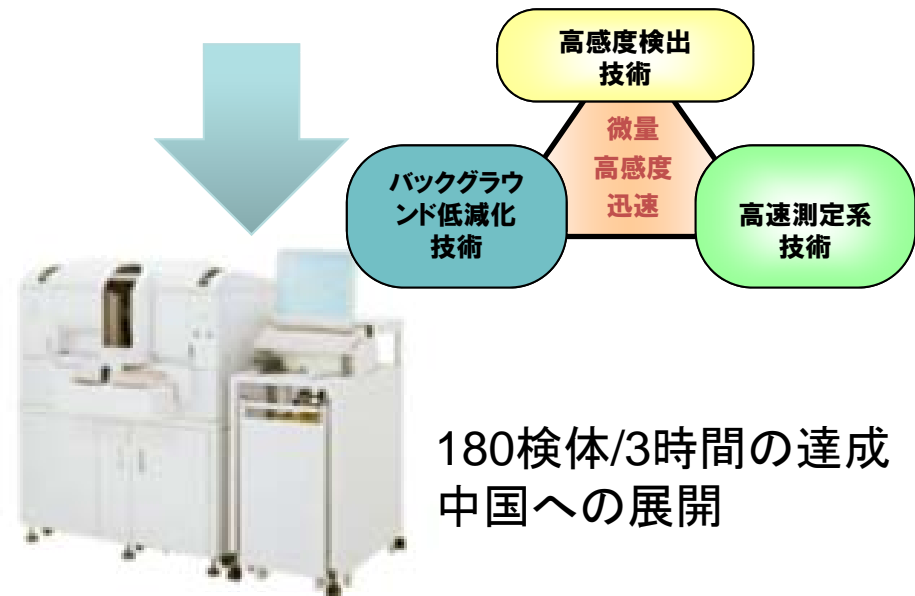
- ・ 先端糖鎖解析技術により、既存マーカーが示す量的変化だけでなく質的变化も検出することに成功した。
- ・ 特異的・高感度、しかも迅速に自動測定する事が可能となったので、外来診療前検査として普及すると思われる。



50検体/1.5-day



糖鎖バイオマーカーの迅速検出測定に適したシステム



180検体/3時間の達成
中国への展開

迅速全自動免疫測定装置
HISCL(シスメックス社)

公開

脳脊髄液中の糖鎖マーカーによる“治る”認知症の鑑別診断 事業原簿 p.83
 ー神経系に特有の鉄代謝経路の発見と疾患マーカーへの応用ー

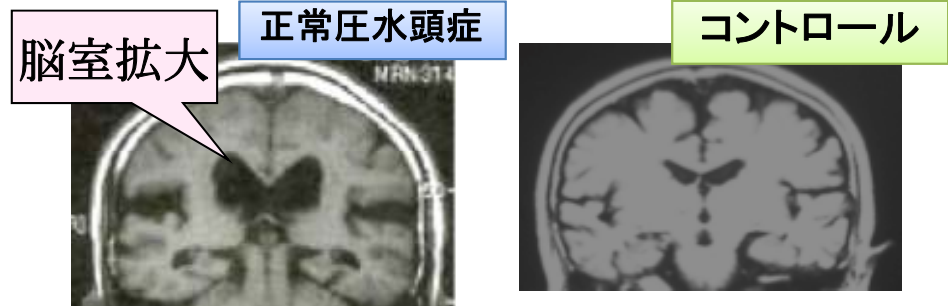
福島県立医科大学
橋本康弘

特発性正常圧水頭症はアルツハイマー病と誤って診断されている
 → 本疾患の患者数は30万人と見込まれているが、
 根治手術を受けている患者数は年間1200人に過ぎない。

成果のポイント

- ー脳脊髄液(髄液)中の鉄輸送タンパク質(トランスフェリン)は特徴的な糖鎖(髄液型糖鎖)を持つことを示した。
- ー髄液型トランスフェリンは認知症を示す髄液代謝異常症(特発性正常圧水頭症)の診断マーカーであり、**アルツハイマー病との鑑別が可能であった。**

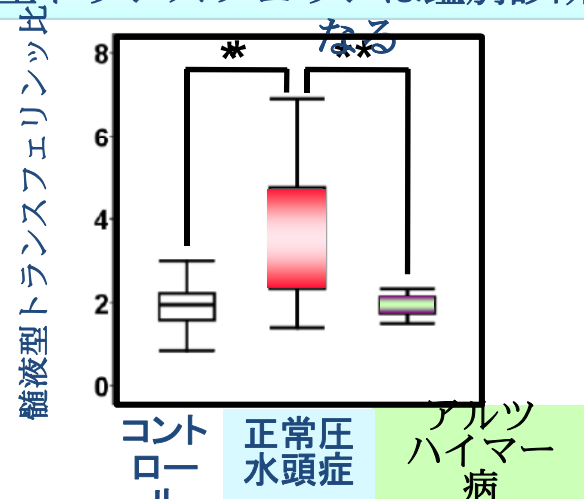
特発性正常圧水頭症とアルツハイマー病の症状は似ている。(脳室の拡大と認知症)



企業との連携状況

IBL社と髄液型トランスフェリンを検出するための抗体を作製した。診断薬製造企業とこの抗体を利用したハイスクリーンング法を開発中である。(共同研究契約に基づく)

髄液型トランスフェリンは鑑別診断マーカーとなる



今後の展開

アルツハイマー病は根治療法がないが、特発性正常圧水頭症は小手術にて“治る”認知症であることから、新たな鑑別診断法が必要である。診断薬製造企業との共同研究により、スクリーニング法の開発と臨床治験を行う。

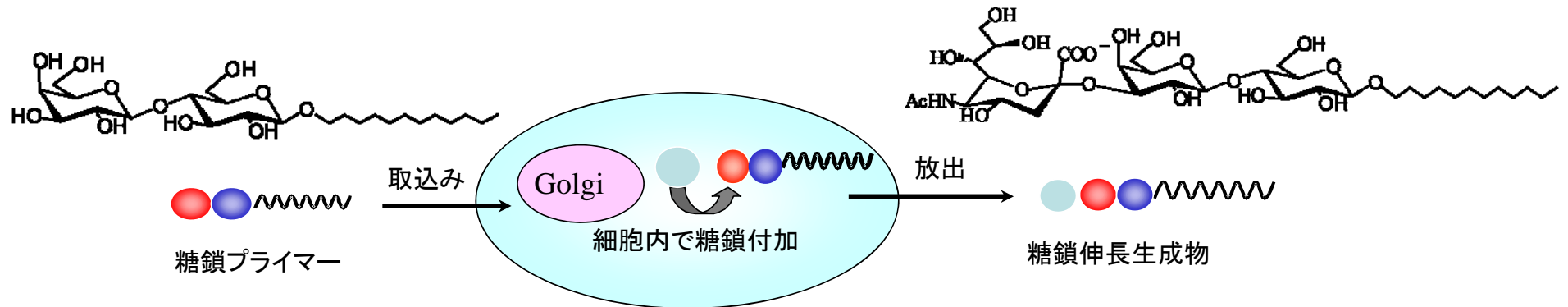
「糖鎖機能活用技術開発」(畑中G) (事後評価)分科会説明資料

研究開発成果、実用化の見通し について (公開)

「④糖鎖の大量合成技術の開発」 及び
「②糖鎖の機能解析・検証技術の開発の一部」

本研究の概要

細胞を用いて糖鎖を生産する ⇒ 糖鎖機能を活用する



本研究における技術開発

- (1) 多種のヒト型糖鎖を生産
- (2) 大量のヒト型糖鎖を生産
- (3) 糖鎖の効率的精製

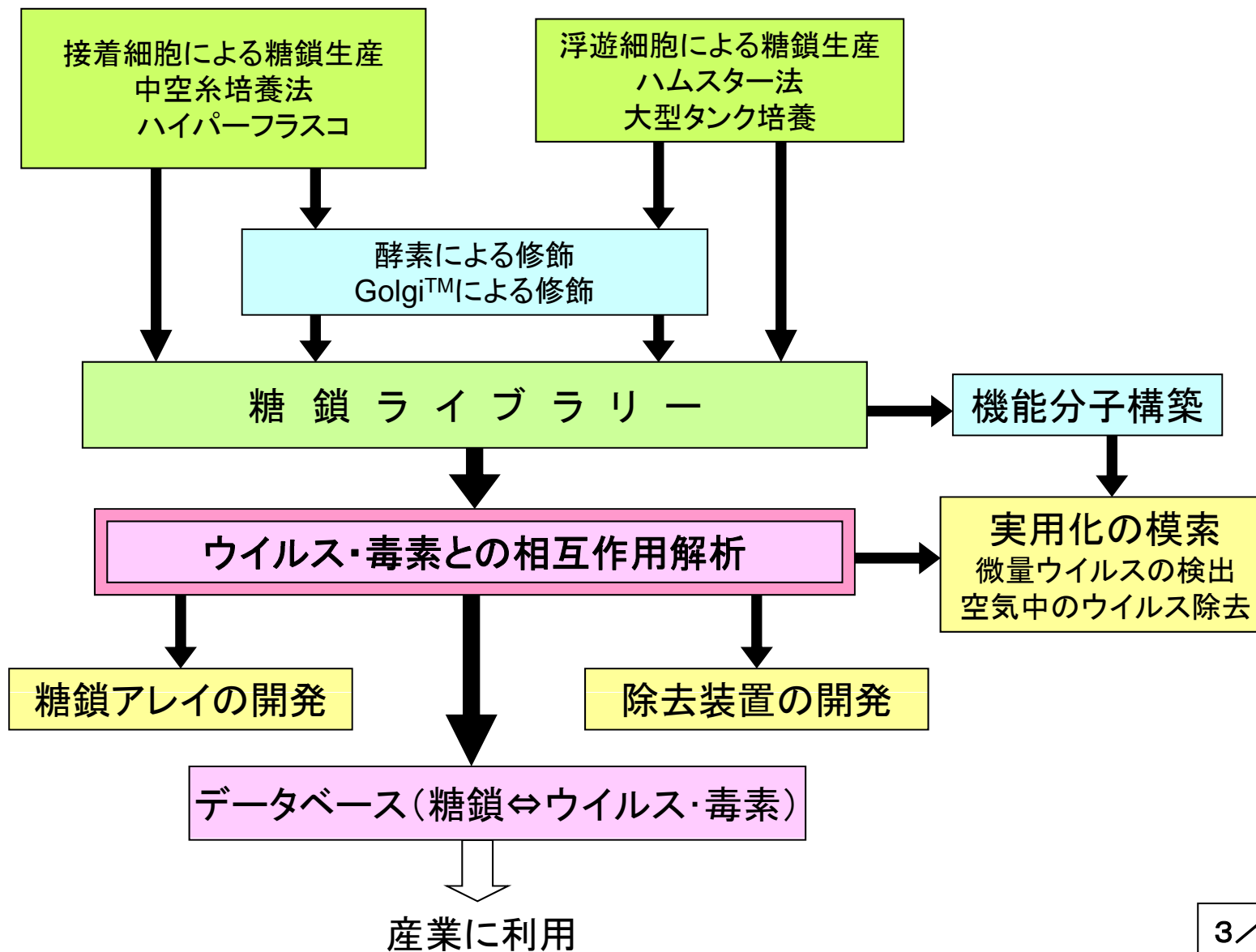
糖鎖を作る

- (4) 糖鎖への機能付加
- (5) 毒素・ウイルスとの相互作用を検討
- (6) 糖鎖の産業利用

糖鎖を使う

本研究の流れ

公開



(1)個別研究開発項目の目標と達成状況

	目標	成果	達成度	今後の課題
1) 多種類のヒト型糖鎖を生産する技術開発	10 mg100種類の合成法を確立する	128種類を合成した(20種以上は10 mgを合成)	◎	微量な糖鎖の増産技術を開発する
2) 大量のヒト型糖鎖を生産する技術開発	有用糖鎖の少なくとも1種類についてグラムオーダーの製造スキームを示す	ハムスター法、中空糸培養法により3種類の有用糖鎖について製造法を示した	◎	生産コストの低減
3) 糖鎖の効率的精製技術開発	糖鎖を効率的に精製する	PStを用いて安価に精製した	○	中性糖鎖の精製
4) 糖鎖高分子・糖鎖 dendrimer 作成技術開発	機能性分子を構築する	電子線重合、dendrimer 合成	○	糖鎖 dendrimer の固定化技術
5) 糖鎖機能分子利用病原体・毒素除去装置の開発	プロトタイプ作製と評価	ベロ毒素を除去、ポリオマウイラスの一種を除去	○~△	HIVや肝炎ウイルスの除去
6) 病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明	多数のデータベース構築	新規な相互作用の発見	○	HIVや肝炎ウイルスと糖の相互作用
7) 糖鎖利用診断システムの開発	糖鎖アレイの試作と評価	LSPR糖鎖アレイを試作し、基本性能を評価	○	糖鎖の種類を増やす

(2) 各個別テーマの成果

1) 多種類のヒト型糖鎖を生産する技術開発

100種類以上の糖鎖合成について纏めた糖鎖生産の一覧表は、これまでの研究には見られない新規なデータベースであり、今後の糖鎖研究の基盤になる。

2) 3) 大量のヒト型糖鎖を生産する技術開発、糖鎖の効率的精製技術開発

ヒト型糖鎖の多種・大量供給の道が拓け、糖鎖機能解明研究が一層進むものと考えられる。

4) 糖鎖高分子、糖鎖 dendrimer 作成技術開発

糖鎖機能を利用した病原体・毒素除去装置や診断システムの開発において、電子線グラフト重合、水溶性の高い糖脂質高分子合成やアミド結合型糖鎖 dendrimer 合成技術等が有効に利用された。

5) 糖鎖機能分子利用病原体・毒素除去装置の開発

糖鎖固定化中空糸によるベロ毒素やポリオマウイルス除去で得られた成果は、糖鎖を利用した毒素・ウイルス除去装置開発の実用化に向けた基盤技術となる。

6) 病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明

病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明研究で得られた新知見は、除去装置や診断システム開発に活かされ、大きな意義をもつ。

7) 糖鎖利用診断システムの開発

試作したLSPR糖鎖アレイセンサーは、簡便・ハイスループットにウイルス・毒素と糖鎖との相互作用を解析できることが実証され、実用化のための基盤技術を構築した。

1) 多種類のヒト型糖鎖を生産する技術開発

公開

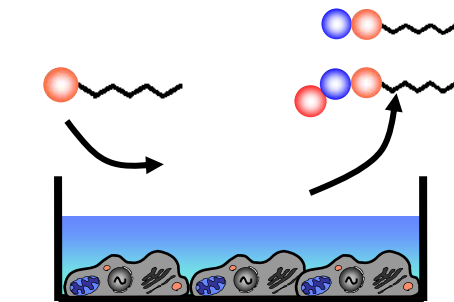
糖鎖プライマー法での糖鎖ライブラリーの作製

糖鎖プライマー

Lac-C12

GlcNAc-C12

GalNAc-Thr-C12



培養細胞(38種類)

Lac-C12

63種類

GlcNAc-C12

40種類

GalNAc-Thr-C12

13種類

合計

116種類

酵素反応による糖鎖の修飾

細胞法で合成された糖鎖

Gb3

糖転移酵素

4種類

NeuAc-Lac

2種類

NeuAc-LacNAc

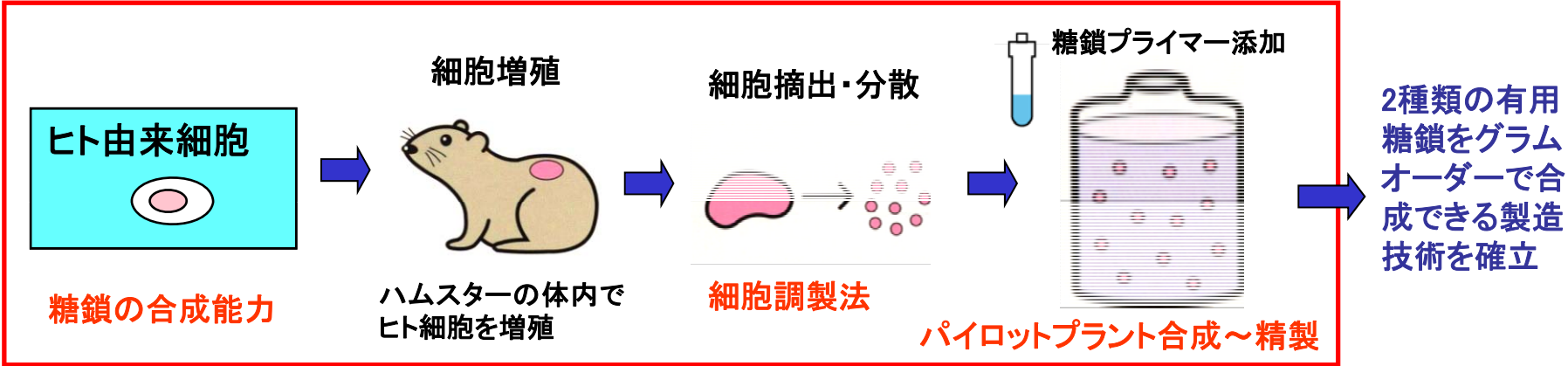
6種類

合計

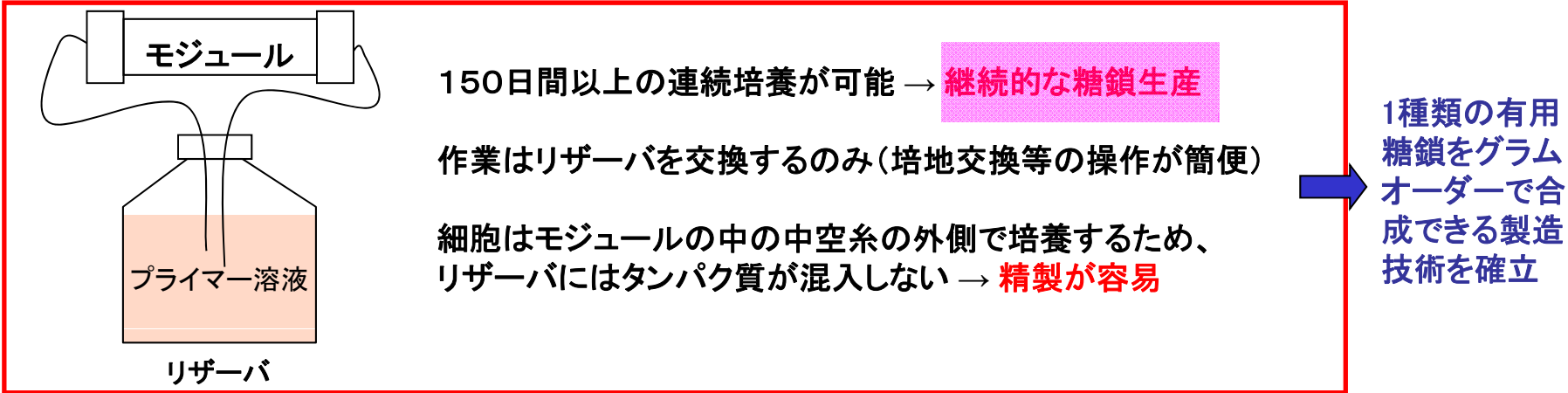
12種類

2) 大量のヒト型糖鎖を生産する技術開発

ハムスター法による大量合成技術の開発(浮遊細胞)



中空糸法による大量合成技術の開発(接着細胞)



動物細胞による糖鎖生産データベース(抜粋)

公開

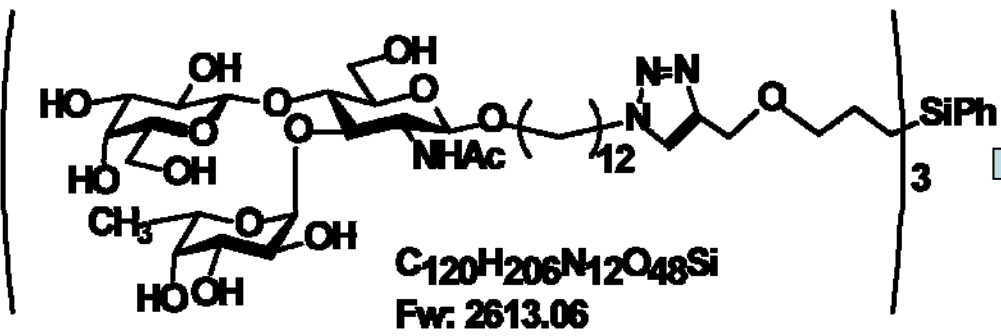
糖鎖伸長生成物の種116種類(使用した細胞種38種類)について記載

DB No.	糖鎖プライマー	動物細胞種	生成糖鎖構造式	糖鎖略号	m/Z	培養法	生産スケール	単離精製	相互作用対象
1	Lac-C12	293,B16,BMEC,COS7,HL60,etc.	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc-C12	GM3 (Ac)	800.4-800.9	中空系培養、マイクロキャリア等	41mg/B16細胞(中空系)	250mg	HIV,HBV,HCV,ポリオーマウイルス等
5	Lac-C12	COS7,HuH-7,293,RERF,etc.	Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc-C12	GM1a (Ac)	1165.3-1165.9	単層培養、ハイパーラスコ	10mg/COS7細胞	1.7mg	HBV,HCV,ポリオーマウイルス等
7	Lac-C12	HMEC,HL60,MDC K,BMEC,etc.	NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc-C12	GD3 (AcAc)	1091.5-1092.0	単層培養、ハイパーラスコ	10mg/MDCK細胞	2.0mg	ポリオーマウイルス等
9	Lac-C12	COS7,RERF,RAW 117-P,etc.	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc- β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-3Glc-C12	GD1a (AcAc)	727.8-728.9	単層培養、ハイパーラスコ、中空系培養	10mg/COS7細胞	1.1mg	ポリオーマウイルス等
102	GlcNAc-C12N ₃	ECV304,HMEC,AM O-1,B16,etc.	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-C12N ₃	sLacNAc: 3'-シアリルラクトサミン	841.5-841.9	フラスコ培養、タンク培養	314mg/パイロット	384mg	トリインフルエンザウイルス等
103	GlcNAc-C12N ₃	HL60,ECV304,BV173,NALM16,etc.	NeuAc α 2-6Gal-GlcNAc-C12N ₃	sLacNAc: 6'-シアリルラクトサミン	841.9	フラスコ培養、タンク培養	64mg/パイロット	46.9mg	ヒトインフルエンザウイルス等
104	GlcNAc-C12N ₃	ECV304,BMEC,Bx PC-3,COLO201,etc.	Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc-C12N ₃	Le ^x	732.3-734.4	フラスコ培養、タンク培養	340mg/パイロット	199mg	細胞接着因子等

4) 糖鎖高分子・糖鎖デンドリマー作成技術開発

公開

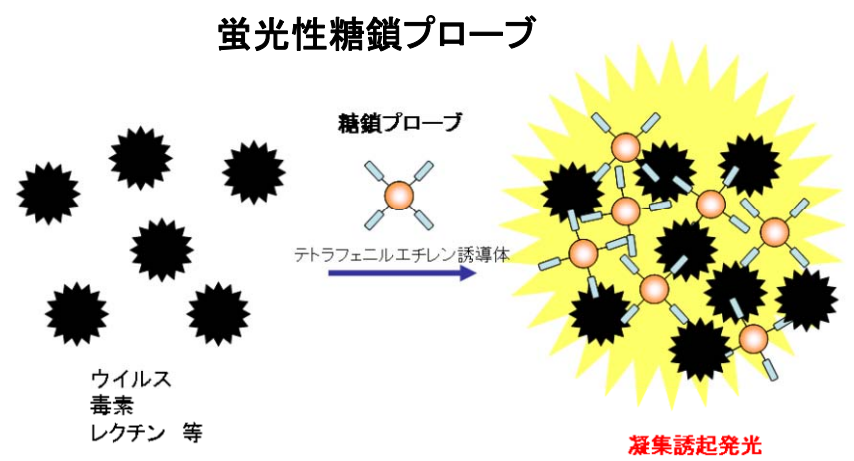
Fan型糖鎖デンドリマーの開発



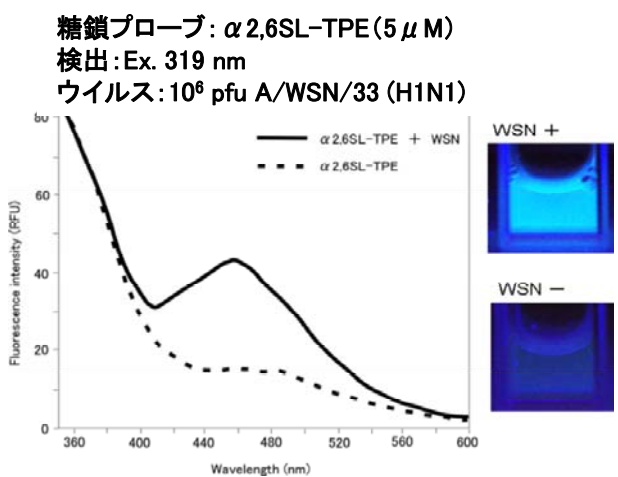
Compounds	K_a (M^{-1})	relative potency
Fucose	1.4×10^4	1.1
Le ^x -C ₅ N ₃	1.3×10^4	1
Fan(0)3-Le ^x	1.2×10^6	92
GlcNAc-pentenyl glycoside	-	-

LTAレクチンによる認識が約100倍
(クラスター効果)高まることを確認

新規多価型糖鎖プローブの開発



インフルエンザウイルスの検出と解析



5) 糖鎖機能分子利用病原体・毒素除去装置の開発

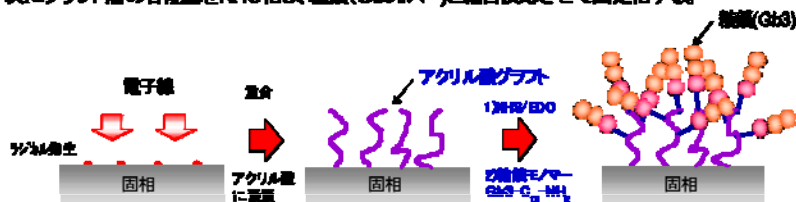
公開

糖鎖固定化中空糸による病原体・毒素除去装置の開発

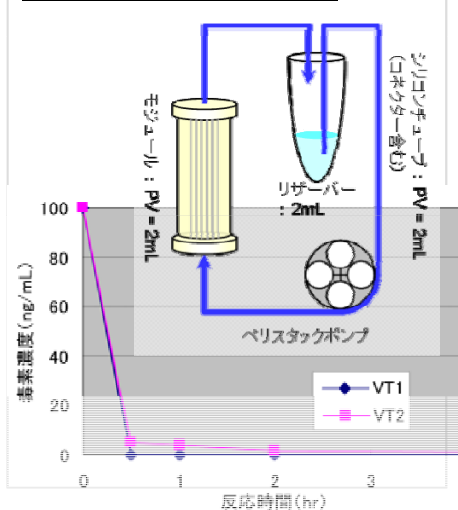
ベロ毒素を99%以上、ヒトポリオウイルスの一種を90%以上、吸着除去できることを確認した。

電子線グラフト重合法

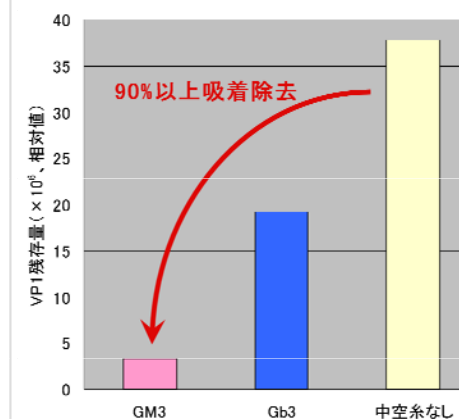
固相にラジカルを発生させ、アクリル酸などの官能基を有するモノマーをグラフト重合させる。次にグラフト層の官能基をNHS化し、糖鎖(Gb3E/A)と縮合反応させて固定化する。



ベロ毒素吸着除去(循環法)

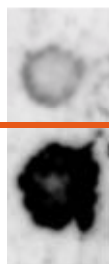


MCV様粒子の吸着除去



感染性病原体除去用糖鎖フィルターの開発

免疫染色



Lac-フルオラスプライマー

α 2-3シアルル化したLac-フルオラスプライマー

A/duck/Pennsylvania /10218/84

細胞法で合成されたシアルル化されたLacフルオラスプライマーをフルオラスフィルター上へ固定化し、インフルエンザウイルスとの相互作用について検討を行ったところ、糖鎖特異的なウイルスとの相互作用を確認することができた。

6) 病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明

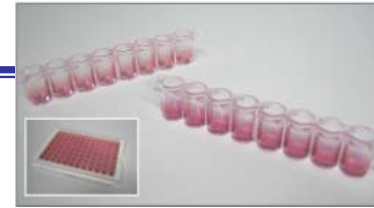
公開

病原体・毒素	主な知見	達成度
肝炎ウイルス	B型肝炎ウイルスと結合性を示す糖脂質糖鎖の構造の特徴を明らかにした。	○～△
エイズウイルス	Gb3、GM3との結合を確認した。一方、ウイルス除去装置開発には相互作用が弱いため、さらなる技術開発の必要性を示した。	△
ヒトポリオーマウイルス	関連疾患の異なるJCウイルス、BKウイルス、メルケル細胞ポリオーマウイルスの糖脂質結合の共通性、特異性を明らかにした。 糖鎖を活用したウイルス抗原診断技術開発の可能性を示した。	◎
破傷風毒素	ガングリオシド系列の新たな結合糖鎖を見出した。	○
ボツリヌス毒素	B型ボツリヌス16S毒素に関して、新たな結合糖鎖を見出した。また、ラクトースおよびGb3との結合を利用して、高効率の毒素除去装置開発の可能性を示した。	○

7) 糖鎖利用診断システムの開発

公開

LSPR糖鎖アレイチップ



検討項目	得られた知見、成果	達成度
LSPR糖鎖アレイチップ作製技術の確立	<p>96穴マイクロプレート仕様LSPRセンサーチップに、本プロジェクトで開発した固定手法で各種糖鎖を固定することで再現性安定性の高いLSPR糖鎖アレイチップ作製技術が確立できた。</p> <p>また、糖鎖使用量の低減により、材料コストの観点では実用化が図れる価格になる可能性を示した。</p>	◎
基本性能評価、実証	<p>基本性能としては、同等の目的で用いられる市販SPR装置(Biacore)と同程度の相互作用解析が可能であることを実証した。</p> <p>更に、LSPRの特徴である「洗浄操作なし」の系でも同等の相互作用解析が可能であることが示され、簡便性において実用上の優位性を示すことができた。</p>	○
実検体評価系の確立と実証	<p>実検体評価の課題であった「非特異吸着」によるノイズを低減する手法を確立することで、本試作品によりポリオーマウイルス3種の識別が可能となった他、HIV(gp120)、ベロ毒素に関してもこれまで、或いは他手法と矛盾の無い識別が可能となった。</p> <p>一方、B型ボツリヌス毒素の識別に関しては他手法と一致しない結果となった。</p>	○~△

国内外の現状と比較した際の本プロジェクトにおける顕著な成果

- (1) 116種類の糖鎖生産に関するデータベース
- (2) 中空糸培養法による糖鎖の継続的な生産
- (3) ポリスチレン系樹脂を用いた糖脂質の効率的な濃縮(大量処理)
- (4) 糖鎖固定化中空糸によるウイルス除去
- (5) ヒトポリオーマウイルスと特異的に結合する糖鎖を発見
- (6) 洗浄操作不要の糖鎖アレイチップを開発

(3) 知的財産権、成果の普及

	H18	H19	H20	H21	H22	計
特許出願(うち外国出願)	0	10	12	4	5(1)	31件
論文(査読付き)	8	18	17	9	8	60件
研究発表・講演	16	34	26	24	45	145件
新聞・雑誌等への掲載	3	4	1	1	7	16件

4. 実用化、事業化の見通しについて (2) 事業化までのシナリオ

	2006	2007	2008	2009	2010	2011 ~ 2015	2015 ~ 2018近傍
糖鎖サプライヤーとしての展開			細胞別糖鎖合成能調査▲		有用糖鎖の絞込み パイロット合成反応 題点 出▲ パイロット合成反応改良・検証 製造技術実証	事業化検討	受託製造の事業化 酵素法との融合
新規インテリジェント材料への展開				多価型化糖鎖合成技術	ウイルス検出技術▲	実用化検討	事業化検討 解析技術の事業化
病原体・毒素除去装置の開発		EB 射による糖鎖固定化技術開発		毒素除去装置開発・ジール試作	ジール安全性評価	実用化検討	事業化検討 事業化
糖鎖利用診断システムの開発		糖鎖アレイチップ作製方法の確立▲	基本性能評価▲		優位性実証▲ 実検体評価 件検討▲	実用化検討	研究用試薬/装置として展開 医療用試薬/装置として展開

▲ : 基本原理確認 : 基本技術確立