

## 平成 1 9 年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名：(プログラム名) 健康安心プログラム  
(大項目) 糖鎖機能活用技術開発

## 2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第 1 5 条第 1 項第 2 号

## 3. 背景及び目的・目標

## (1) 背景及び目的

ヒトゲノムが解読されて以降のいわゆるポストゲノム研究の主要課題は、タンパク質や DNA、RNA をはじめとする生体分子の構造解析から機能解析へと展開を見せつつある。その代表的生体分子であるタンパク質の半数以上は糖鎖の修飾を受けており、糖鎖と一体化することによりはじめて様々な機能を発揮する一方で糖鎖の異常が様々な疾病を引き起こすことが明らかになりつつある。すなわち、糖鎖は、タンパク質等の安定性や局在性に深く関わっており、細胞表面にあっては認識分子として機能するなど、細胞の高次な生命機能の発現に重要な役割を果たしている。

従来より、こうした糖鎖機能の根本的な解明を行うことの重要性は認識されてはいたが、そのために必要な研究手段の開発が不十分であり研究のネックとなっていた。しかし、研究手段として不可欠であるヒト糖鎖合成関連遺伝子の取得数で我が国が世界のトップに立ち、さらに我が国が世界に先んじて糖鎖構造統合解析システムの開発や糖鎖合成装置の開発に成功するに至り、いよいよ糖鎖とタンパク質を一体として捉えて糖鎖構造を機能に結びつけて根本的に解明し、その知見を活用するための環境が整備されたと言える。

糖鎖研究は、平成 1 7 年 3 月に経済産業省において策定された技術戦略マップにおいて、創薬・診断分野の個別化医療の実現に向けた技術のうち、画期的な医薬品・診断技術の開発に資する重要技術であり、また、日本の強みが活かせる技術分野であって更なる強化を図るべき重要技術として位置付けられた。しかしながら、欧米も糖鎖研究の重要性を認識し研究の加速化を既に図り始めており、わが国の糖鎖研究の優位性を産業利用に役立つ形に結実させることは焦眉の課題であると言っても過言ではない。

本研究開発では、日本が優位性を有する、糖鎖合成関連遺伝子、糖鎖構造統合解析システム、糖鎖合成装置といった基盤的要素技術を活用することにより、生体サンプルから糖鎖や糖タンパク質などの極微量の目的分子を抽出する技術開発や、種々の疾患マーカーなどになり得る有用な特異的糖鎖を特定し、これらの糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術を開発し、糖鎖機能の解析を促進することを目的とする。さらに、機能が解明され重要と判断されたこれらの分子構造を選択的に認識させるための、特異的抗糖鎖プローブの開発により、糖鎖機能の活用を加速する。また、ヒト型糖鎖の大量合成法を開発し、新規な医用材料を開発することを目的とする。

これにより癌、免疫、感染症、再生医療などの分野における画期的な早期診断法の開発・実用化が期待されるとともに個別化医療に向けた最適な治療法や創薬への重要な手掛かりが得られるものと期待される。

## (2) 目標

### 1) 最終目標 (平成22年度末)

産業上有用な機能を有する糖鎖マーカ―を、臨床サンプルから高効率に分画・精製・同定する技術を確認する(未知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質50種類以上、及び既知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質20種類以上について解析を終える)。また、糖鎖マーカ―の精製や診断用糖鎖構造解析等に供される新たな装置またはデバイスを開発する。これらの糖鎖マーカ―の中から、特許出願可能で産業上有用な糖鎖機能を30種類程度見いだす。さらに、10種類以上の糖鎖マーカ―に対する糖鎖認識プローブを複数個作製し、実用化可能な糖鎖認識プローブを数個開発する。大量合成技術については、100種類以上のヒト型糖鎖を10ミリグラムのオーダーで、また20種類以上のヒト型糖鎖をグラムオーダーで安価に合成する技術を開発する。

#### 研究開発項目①「糖鎖マーカ―の高効率な分画・精製・同定技術の開発」

産業上有用な機能を有する糖鎖を生体試料から高効率かつ迅速に分画・精製・同定する技術を確認する。これらの技術を活用し、未知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質50種類以上、及び既知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質20種類以上について解析を行い、産業上有用な30種類以上の糖鎖(糖タンパク質)マーカ―を開発する。また、糖鎖マーカ―の精製や診断用糖鎖構造解析等に供される新たな装置、またはデバイスを少なくとも1種類開発する。

#### 研究開発項目②「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

特許出願可能で産業上有用な糖鎖機能を30種類程度見いだす。

糖鎖と感染症病原体の相互作用を検討し、感染症病原体の検出、診断、除去に関する画期的な技術を開発する。

#### 研究開発項目③「糖鎖認識プローブの作製技術の開発」

10種類の糖鎖マーカ―に対する糖鎖認識プローブを複数個作製して有用性を検証し、最終的に数個の実用化可能な糖鎖認識プローブを開発する。

#### 研究開発項目④「糖鎖の大量合成技術の開発」

高価な合成材料を使用せずに、100種類以上のヒト型糖鎖を10ミリグラムのオーダーで合成する技術を開発する。また、20種類以上のヒト型糖鎖についてはグラムオーダーで安価に合成する技術を開発する。これらの糖鎖を用い、2種類以上の医用材料等を開発する。

### 2) 中間目標 (平成20年度末)

既知及び未知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質20種類以上に応じた分画・精製技術の確立に目途をつけ、これらの糖タンパク質10種類以上の構造を同定する。20種類程度の糖転移酵素遺伝子改変動物、50種類程度の糖転移酵素遺伝子改変細胞株、50種類程度のヒト型糖鎖を作成し、機能解析や糖鎖認識プローブ作製に利用することにより、特許出願可能で産業上有用な糖鎖機能を10種類程度見いだす。さらに、5種類の糖鎖マーカ―に対する糖鎖認識プローブを作製し、有用性を検証する。また、ヒト型糖鎖の大量合成技術の開発に目処をたてる。

産業上有用な機能を有する糖鎖マーカ―(未知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質50種類以上、及び既知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質20種類以上)を、臨床サンプルから高効率に分画・精製・同定する技術を確認する。これらの中から、特許出願可能で産業上有用な糖鎖機能を30種類程度見いだす。さらに、10種類

以上の糖鎖マーカ―に対する糖鎖認識プローブを作製し、実用化可能な糖鎖認識プローブを数個開発する。大量合成技術については、高価な合成材料を使用せずに、100種類以上のヒト型糖鎖を10ミリグラムのオーダーで、また20種類以上のヒト型糖鎖をグラムオーダーで合成する技術を開発する。また、これらを用いた2種類以上の医用材料等を開発する。

#### 研究開発項目①「糖鎖マーカ―の高効率な分画・精製・同定技術の開発」

生体試料から、既知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質10種類以上、未知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質10種類以上に応じた分画・精製技術の確立に目途をつけ、これらの糖タンパク質10種類以上の構造を同定する。

#### 研究開発項目②「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

20種類程度の糖転移酵素遺伝子改変動物、50種類程度の糖転移酵素遺伝子改変細胞株、50種類程度のヒト型糖鎖を作成し、機能解析や糖鎖認識プローブ作製に利用する。また、特許出願可能で産業上有用な糖鎖機能を10種類程度見いだす。

#### 研究開発項目③「糖鎖認識プローブの作製技術の開発」

5種類の糖鎖マーカ―に対する糖鎖認識プローブを複数個作製し、有用性を検証するとともに、プローブ作製技術の開発に目途をつける。

#### 研究開発項目④「糖鎖の大量合成技術の開発」

ヒト型糖鎖の大量合成技術の開発に目処をたてる。また、これらの糖鎖を用い、産業上有用な糖鎖材料の開発に目処を立てる。

### 4. 実施内容及び進捗（達成）状況

研究開発項目①～③については、独立行政法人 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター センター長 成松久を、研究開発項目④については東京大学・国際・産学共同研究センター 教授 畑中研一をプロジェクトリーダーとし、医療機関との緊密な連携の下で、産・学・官の各研究開発ポテンシャルを最大限に活用して出来るだけ早くかつ効率的に糖鎖機能活用技術開発を推進するために、以下の体制で実施した。

#### (1) 研究開発項目①「糖鎖マーカ―の高効率な分画・精製・同定技術の開発」

生体試料からの質量分析と、レクチンアレイを基盤とする分析により、疾患関連糖鎖バイオマーカ―の探索のための試料濃縮と分析の全体システム設計を進め、各要素技術に要求される感度・精度・再現性に基づいた技術の絞り込みを進めた。例として市販の生体試料を用い、設計された前処理・分析を実施し、システムの有効性と問題点の洗い出しを進めた。質量分析で産総研では、特定のタンパク質を免疫沈降させて濃縮した試料から糖鎖を遊離させ、それを患者と健常者で相対定量するための方法について基礎的な研究を行なった。現在、相対定量のために内標を添加する方法と、安定同位体でディファレンシャルに比較する方法を検討中である。加える内標としてはグルコースオリゴマー混合物が、安定同位体ラベルはヒドリド還元が有力候補となっている。

首都大学では、レクチンカラムで捕集される糖タンパク質の大規模同定の際に、検出される糖ペプチドの量を患者と健常者で相対定量するための「糖タンパク質ダイナミクス分析法」の開発を目的として研究を行なった。相対定量のための安定同位体標識として、1) PNGaseF処理時の $^{18}\text{O}$ ラベル化、2) プロテアーゼ消化ペプチドのLys側鎖のO-メチルイソウレアによるグアニジノ化、3)  $^{13}\text{C}_6$ -Lysによる代謝標識法、を検討した。2) の手法については、標識前に糖ペプチドをレクチンカラムなどで濃縮する必要があるが、その際の回収率を補正するための内標としてオボムコイドを加えることを検討している。さらに、野口研では、膵臓癌の血清マーカ―探索を目的に研究を進めた。

一方レクチンマイクロアレイによる分析では、アレイを用いた糖鎖関連バイオマーカー探索のための基本戦略を確定した。先ずSGプロジェクトで開発したレクチンアレイ法の基本性能（感度、処理力、応用性）の検定を、臨床試料提携元である各パートナー（愛知がんセンター・腹腔洗浄液、筑波大医・胆のう系がん、成育医療センター・ES分化誘導細胞）との綿密なディスカッションを行い、細胞レベルの糖鎖プロファイリングがレクチンマイクロアレイにおいて有効になしえること、抗体・レクチンを用いたエンリッチメントが、非標的タンパク質の除去、ならびに標的等タンパク質の濃縮に有効であることを確認し、今後の系統的マーカー分子の同定・差分解析に有効と思われる抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイ法を確立した（一部、BBRC06 に発表）。また、病理切片数枚からがん部、非がん部を切り出し、それぞれの糖鎖プロファイリングを行うことを可能とした。さらに、従来行われてきたプロテオーム解析手法（2D-PAGE）とカップリングさせた、糖鎖マーカータンパク質解析の基本ストラテジーをほぼ構築した。本ストラテジーはMSによる糖鎖構造の最終同定→プローブ開発に着実に結びつくことが期待されるもので、レクチンマイクロアレイの機動性、感度、操作の簡便さと応用性の高さをうまく活用した、従来に無いマーカー開発の基本指針に繋がるものと位置づけられる。

IgA 腎症の分野は1) レクチンによる糖鎖構造の検出、2) MSによる糖鎖構造解析、3) 異常糖鎖不全 IgA の分離についての研究内容を含む。

1) レクチン（糖結合タンパク質）を用いて、IgA 上の 0-glycan との結合について相互比較を行っている。現在までに、レクチンをスライドガラス上にアレイ化したシステム「レクチンアレイ」（集中研）および改変処理を施した MAH レクチンライブラリを用いたシステム（入村研）、レクチン ELISA（比企）の検出システムを構築した。

2) IgA の有する糖鎖構造を解析し、患者特異的糖鎖構造を検出することを目的とする。現在までに IgA の 0-glycan を有する糖ヒンジペプチドについて分離精製・ESI/LC/MS によって解析するシステムを構築した（比企）。

また産総研集中研ではN-glycan糖鎖構造のMS<sup>n</sup>データベースを構築している。ヒト血清からIgAを精製し、切り出したN-glycanについて作製したデータベースを基に構造決定を行っている。現在までに健常者サンプルについて構造決定を行った。（集中研）

3) 血清 IgA1 のうちジャカリン高親和性画分やκカゼインカラム結合画分などの精製によって粘膜由来の IgA1 抗体、糖鎖不全 IgA1 が濃縮された。得られた結果は、以前報告された患者の血清から分離したジャカリン高親和性かつ相対的に中性の IgA1 画分がラット腎への選択的沈着にかかわるという結果を得ている。（岩瀬）

更に前述のように、エンリッチメントの面では抗体の利用と合わせて糖鎖をキャリアするタンパク質側の選択が重要となり、インフォーマティクスからのアプローチと合わせて、タンパク質からの検討も進めた。また、目標の定まっているタンパク質としては、前述のポドプラニンや IgA 糖鎖、についての解析系の開発を進めた。さらに糖鎖発現量による病態糖鎖検出に関しては、次年度の糖鎖構造推定システム構築に先立って、発現量定量の基盤を設定した。

（実施体制：産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合）

## (2) 研究開発項目②「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

### A. 「ノックアウトマウス関連研究開発」

A. ノックアウトマウス関連では1) 糖鎖遺伝子ノックアウトマウスの作製、2) ノックアウトマウスを用いた糖鎖機能の検証、3) ノックアウトマウスを用いた抗糖鎖プローブの作製の研究内容を含む。

1) GGプロジェクトで新規に得られた糖転移酵素遺伝子のノックアウトマウスを作製している。マウスの作製は、筑波大と産総研で行い、疾患に関連して遺伝子発現が変化するもの、遺伝子発現が組織特異的なもの、機能性糖鎖を合成するもの10種類の遺伝

子をターゲットにしている。18年度は、3種類の完全ノックアウトマウス、2種類のヘテロマウス、1種類のキメラマウス、4種類の遺伝子改変 ES 細胞を作製した。

2) 既に存在するノックアウトマウスを解析し、糖鎖機能の検証を目的とする。ポリラクタサミン合成酵素である b3Gn-T2 のノックアウトマウスは免疫機能に異常が生じ、016 遺伝子ノックアウトはヘテロで不妊の表現型を示している。

3) Gb3/CD77 合成酵素遺伝子のノックアウトマウスに対して、3種のヒト腎癌細胞株およびガングリオシド GM2/GD2 合成酵素遺伝子と GD3 合成酵素遺伝子のダブルノックアウトマウスの腎臓から抽出した糖脂質を用いて免疫を行った。現在、細胞融合および抗体スクリーニングを実施中である(名古屋大)。また、これまでプロジェクトで作製してきたノックアウトマウスのリストをプロジェクト内で共有し、リソースの活用を計った。

糖鎖のアレイチップに関しては、糖鎖の機能解析に役立つ新しいタイプの糖鎖アレイの開発を目的として研究を進めた。三菱化学は、独自のアレイ化技術を糖鎖のアレイ化に応用する研究、産総研はアレイ化する糖鎖(Nグリカン、Oグリカン)の調製、愛知医大はアレイ化するGAGオリゴ糖の調製という役割分担で開発を進めている。

三菱化学では、三次元的な糖鎖固定化技術としてハイドロゲルを利用しているが、今期はゲルの小スポット化を目的にゲル作成条件の検討を行なった。一方で、この方法による糖鎖アレイの性能を予備的に判断するため、数種類の糖鎖を固定化し、レクチンとの反応性をSPR検出により検討した。その結果、2次元固定化法に比べて約5倍の信号強度の増大が見られた。なお、GAGオリゴ糖の固定化については、反応条件の検討を開始したところである。また、酵素法で糖鎖ライブラリーを合成するための糖プライマーの合成も行っている。

産総研では、糖鎖アレイの性能を予備的に判断するにあたり、アレイ化する糖鎖の調製を行なった。還元末端にスパーサーを介してビオチンを結合させた6種類の糖鎖を酵素的に数10マイクログラム合成し、三菱化学に供給した。

愛知医大では、GAGオリゴ糖ライブラリーの調製を進めた。ヒアルロン酸オリゴ糖を14種、コンドロイチンオリゴ糖を16種、ヘパリン/ヘパラン硫酸(HP/HS)オリゴ糖を16種、さらにそのうちの一部を使って、ヘパラン硫酸O-硫酸基転移酵素(HA-6ST-1, HS-2ST等)の組換え酵素作用により、様々に硫酸基修飾したオリゴ糖の調製を実施した。

再生医療については、再生医療としての細胞移植が治療法として確立されるためには、治療に用いる細胞の再現性を保証するための基準となる細胞マーカーが必要である。

18年度はヒト再生医療用細胞の前段階として、マウス胎児性腫瘍細胞F9およびマウスES細胞をレクチンによる染色性で識別する技術開発を行った。レチノイン酸による分化誘導土のマウスES細胞、F9細胞などを産総研レクチン応用開発チームでレクチンアレイ解析を行った結果、分化誘導土のES細胞、F9細胞、ES細胞フィーダー用マウス胎児線維芽細胞をレクチンのクラスター解析により分別することが出来、数種類のレクチンにより各細胞集団を特異的に認識することが可能になった。

一方、生殖関連では、精巣特異的に発現する糖転移酵素様遺伝子のKOマウスを作製して受精能を解析したところ、オスはヘテロで不妊であった。雄性不妊の原因を調べた結果、精子の奇形と運動能の著しい低下が認められた。現在、この遺伝子がコードするタンパク質に対する特異抗体を作製し、野生型マウスにおいてこのタンパク質が精巣/精子における局在について解析している。

また糖鎖機能のデータベースについては、前プロジェクトにて構築したC a b o s D Bと統合して利用出来るように、まずは機器面での基盤整備を進めた。

さらに感染症については、ノロウイルスの糖鎖結合性検討で、ノロウイルスのタイプにより血液型抗原への結合力が大きく異なることがわかった。さらに、糖鎖改変ウイルスベクターの開発では産総研より8種の糖転移酵素遺伝子の供給を受けベクターの作成、細胞構築、評価系の構築を進めた。

(実施体制:産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合)  
B.「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に関しては、糖鎖を感染症の予防・診断・治療に利用することを目指し、C型・B型肝炎ウイルス(HCV・HBV)、ヒト後天性免疫不全ウイルス(HIV)および破傷風毒素・ボツリヌス毒素(クロストリジウム神経毒素)と糖鎖との相互作用の解析を行った。破傷風毒素については、嫌気培養を行なって、培養上清から得られた毒素を精製し、精製毒素と糖鎖との結合を糖鎖アレイでスクリーニングし、数種のガングリオシドとの結合を確認した。HCVについては、糖鎖との相互作用が想定される表層のエンベロープ蛋白 E1 及び E2 の発現系を構築し、精製法を確立した。HIVについては、エンベロープ蛋白 gp120 の発現系を構築し、細胞の培養上清中に分泌させることに成功した。

糖鎖利用診断システムの開発に関しては、糖鎖による病原体・毒素検出のためのセンサーデバイスやそれらを集積したアレイ型デバイスの開発を最終目標として、今年度は金基板表面に糖鎖を固定化する技術の確立に関する研究を実施し目標を達成した。

(実施体制:(財)化学技術戦略推進機構、産業技術総合研究所・北海道センター)

### (3)研究開発項目③「糖鎖認識プローブの作製技術の開発」

腫瘍マーカープローブの分野では、前述のようにバイオインフォマティクスを利用したマーカー分子の絞り込みを実施した。また、第一回目の腫瘍マーカーコアメンバー会議で臨床検体を他施設へ移動する事の難しさが確認され、統一的な対処策を作成した。このガイドラインにそって臨床検体の移動を行い実際のマーカー開発が進む事になる。さらには、臨床の現場でマーカーの利用と開発に携わってきた臨床医と病理医を中心とした意見交換を行い、研究開発の出口から、新規マーカー開発の道筋を確認致した。また、臨床側では、倫理委員会などの必要な手続きを実施し、集中研へのサンプル提供の体制整備をほぼ終了し、研究サイドへの試料供給が実施された。

抗体作製の抗原や糖鎖チップの材料としての糖鎖化合物については供給体制の整備を終わり、供給出来る糖鎖については、リソース一覧としてプロジェクト内で利用出来る体制を築いた。また、糖鎖マーカーのプローブとなる抗体については、抗体レポートリーや、発現系の改良など基盤整備を終了し、抗原の供給を受けて作成が可能な状態となった。一方、ノックアウトマウスを用いた抗体作製も実験基盤の整備を進め、順次抗体作製の試験を開始した。

個別の疾患については、スキルス性胃がん・卵巣明細胞がん抗体では候補となるいくつかの陽性クローンを得た。また、腎癌では、ノックアウトマウスを用いて腎癌プローブの作製を進めている。

(実施体制:産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合)

加えて、18年度グリコサミノグリカン糖鎖腫瘍マーカー認識プローブの研究開発については、これまでに既存の抗マウス単クローン抗体、ヒト型フェージディスプレイ抗体およびマウス Lewis 肺癌細胞、マウス骨肉腫細胞を用いて抗体評価系を作製した。その結果に基づき、E二糖単位の重要性が示唆されたので、E含量が高いCS-Hでマウスを免疫し、複数種類のハイブリドーマを作製し、その特異性と高転移性マウス肺癌細胞に対する増殖阻害活性を検討している。

(実施体制:北海道大学)

### (4)研究開発項目④「糖鎖の大量合成技術の開発」

糖鎖ライブラリーを作製するための設計図の作成を目的として糖鎖プライマー7種類と培養細胞株17種類を組み合わせて糖鎖伸長実験を行い、得られた糖鎖の構造を決定した。これまでの研究により約80種類の糖鎖を合成するための設計図を作成した(目標達成)。生産効率については、N-アセチルマンノサミンを培養液中に添加したところ、B16

細胞において GM3 型の糖鎖合成が約 50% 向上した。平成 18 年度に 3 種類の糖鎖を 10 mg 生産することに関しては、GM3 型が合成完了し、ラクトサミンとグロボ三糖が合成中で 3 月に完了予定。

複雑な構造の糖鎖を製造するための糖鎖の修飾に関しては、細胞法にて調整されるアジド基含有糖鎖を糖鎖自動合成装置(Golgi™)にて再修飾することを目的として、Golgi™ の仕様を調整し、同時に糖鎖プライマーの化学変換研究を進め、さらに適当なリンカーを設計・調製した。アジド基含有グルコサミン誘導体に対し「化学的還元反応後、ペプチドリンカーを介して水溶性高分子体に導入し、3 種の糖を順次伸長させた後、酵素反応にて切り出す」という方法でシアリルルイス X 4 糖体の mg スケールでの合成に成功した。またグルコサミン転移酵素の大量調製と固定化、フコース転移酵素の調製に成功した。

糖鎖の大量合成に適するチオグリコシドプライマーの開発については、ドデシルチオラクトシドと B16 細胞によって、シアリル化された生成物が 50% 以上の高収率で得られることを見出した。Vero 細胞においても、Gb3 型糖鎖の生産において同様に収率向上が確認された。

ハムスター法による糖鎖の大量合成法の開発に関しては、4 種類の細胞を選抜し、2 種類の糖鎖プライマーを用いて合成可能な糖鎖構造の決定を行った。また、ハムスター法で調製した細胞を用いて 10L スケールでの糖鎖伸長反応を行い約 10mg の糖鎖を得た。

中空糸膜法による糖鎖の大量合成法の開発に関しては、中空糸膜の基材による細胞の接着性・増殖性を検討し種々な知見を得、市販の中空糸膜培養器具を用いて B16 細胞の培養を行ったところ培養の進行が観察された。

糖鎖の分離精製技術の開発に関しては、合成系吸着剤を用いることにより安価かつ簡便に糖鎖を濃縮できることや、糖鎖伸長生成物を溶媒抽出法により分離精製する方法を見出した。

フルオラスプライマーの導入に関しては、4 種類のフルオラスプライマーを合成し、B16 細胞の培溶液中に添加し、フッ素含有量と、細胞内への取り込まれ性および糖鎖伸長反応性との関係を見出した。

糖鎖高分子の合成に関しては、側鎖に GM3 型糖鎖を有するポリマーを合成した。また、糖鎖と長鎖アルキル基、リン脂質をそれぞれ含むモノマー 3 種を共重合することによって得られる糖鎖ポリマーが細胞膜を通過して細胞内の特定部位に運ばれることを見出した。糖鎖デンドリマーの合成に関しては、糖鎖を担持するためのデンドリマー骨格の設計と合成を行い、カルボシランデンドリマーを調製した。

病原体・毒素除去装置の開発に関しては、フィルターペーパーに糖鎖ポリマーを共有結合で固定化したところベロ毒素を選択的に吸着した。また、中空糸にグラフト重合によりグロボ三糖を固定化したところ、ベロ毒素を特異的に捕捉していることが確認され、固定化の最適化を検討中。

(実施体制：(財)化学技術戦略推進機構、産業技術総合研究所・北海道センター)

## (5)総合調査研究

### A. 研究項目①～③

本プロジェクトを効率的に推進するため、24 の研究機関・病院との共同研究を推進、研究開発進捗状況の検討・調整を行う研究開発委員会研究推進委員会を年 3 回、分科会 2 回を開催した。さらに内外の最新技術調査、開発情報収集、外部発表等を実施した。また、糖鎖構造解析、糖鎖合成、糖鎖関連酵素、等の分野の専門家から技術指導を受けた。

(実施体制：バイオテクノロジー開発技術研究組合)

### B. 研究項目④及び②の一部

総合調査研究委員会を 3 回開催(予定を含む)し、3 回目には外部有識者委員も出

席し、大所高所からの技術指導を受ける。

(実施体制：(財) 化学技術戦略推進機構)

#### 4. 2 実績推移

	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度
実績額推移					
一般会計(百万円)	1,190				
特許出願件数(件)	8				
論文発表数(報)	22				
フォーラム等(件)	—				

#### 5. 事業内容

##### (1) 平成19年度事業内容

研究項目①～③を担当する実施先では、独立行政法人産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センター センター長・成松 久氏のプロジェクトリーダーのもと、25の共研先等と連携協力して以下の研究開発を実施する。さらに研究項目④及び②の一部を担当する実施先については、東京大学・畑中 研一教授のプロジェクトリーダーのもと、6カ所の共研先等と連携協力して以下の研究開発を実施する。

実施体制については、別紙を参照のこと。

##### 1) 研究開発項目①「糖鎖マーカーの高効率な分画・精製・同定技術の開発」

疾患の臨床診断や再生医療技術開発を実施する上で、臨床検体等生体試料中に微量に含まれる糖鎖マーカーを高効率に分画・精製し、必要に応じて同定するために、以下の技術開発を行う。

まずは、生体試料から特異的糖鎖を高効率に分画・精製する技術を開発する。すなわち、生体試料中の微量の糖鎖マーカーを糖鎖特異的手法・非特異的手法で濃縮(エンリッチメント)する方法を確立し、濃縮精製した糖鎖・糖タンパク質を(2)の糖鎖同定および③-(2)の糖鎖認識プローブ作製用抗原として用いる。また、特異的プローブを用いた、既知の糖鎖マーカーを有する糖蛋白質の精製・同定法を開発し、糖鎖マーカーをキャリアする蛋白質を同定する。さらに、疾患/細胞分化特異的な未知の糖鎖マーカーを発見するため、ディファレンシャル糖鎖・糖蛋白質プロファイリング法を開発する。また、個別のターゲットについては、特異的糖鎖同定技術の開発をおこなう。すなわち、糖鎖エンジニアリングプロジェクトで開発したレクチンアレイ、質量分析装置等を用いて有用な疾患関連糖鎖マーカーの構造解析を可能にする糖鎖マーカー探索システムを開発する。また、糖鎖関連遺伝子転写量解析による糖鎖構造予測システムを開発する。

このように、方法論の確立に向けて研究を進め、整備してきた生体試料の濃縮・分析のプロトコールに沿って、臨床現場より送られた疾患実試料の解析をすすめることにより、作製してきた濃縮解析プロトコールに対してフィードバック行う。

以下具体的に、質量分析では、バイオマーカー候補の構造同定までを目標とし、実サンプルの解析結果に基づき、新規マーカーを項目②の機能、項目③のプローブ開発グループへ候補として供給する事を旨とし、臨床でのバリデーションは抗体などの特異的プローブによる免疫学的手法を別途開発して行なう。

レクチンアレイ解析においては、H18年度に確立した上記ストラテジー(レクチン・抗体によるエンリッチ→プロテオーム解析法による候補糖タンパク質の選定→抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイによる糖鎖構造の比較プロファイリング・差分解析→マーカー糖タンパク質の決定)は臨床現場で最終的に求められる血清を対象にした解析系ではなく、これらが有効な血清マーカーになるためには、がんなどの病変部から糖タンパク質が分解などを受け血中に分泌されることが必要となる。このことを考慮し、



H19 年度には2つのアプローチから血清マーカーの開発を目指す。第1に、上記ストラテジー（細胞、組織、・腹腔洗浄液）で見つかった候補糖タンパク質が血中に分泌されているかどうかを、抗体を用いて検証する。第2に、血清中に分泌されている糖タンパク質（断片）を、一定のエンリッチ処理後にレクチンアレイを用いて比較プロファイリングする。後者については、あらたに消化器系がん（食道がん、胃がん、大腸がん）を対象に北里大学との共同研究を展開する。抗体の使用が可能なものについては、100検体を目途にレクチンアレイによる検証を目指す（本格的な検証はH20年度を想定）。臨床研究者との連携をこれまで以上に密に行うとともに、コアメンバー会議などを通しまだ接点の無いグループに呼びかけ、解析範囲を広げる。そのための産総研内における分析系グループの強化を適宜行いシステムティックな解析体制を築き上げる。

IgA腎症の分野では前年度までに検出システムを構築してきた。これら構築したシステムを用いて、多検体サンプルについて相互比較することを予定している。また、MS解析ではN-glycan糖鎖構造解析およびヒンジ部糖ペプチドについて解析してきたが、今後はO-glycan糖鎖構造についても解析を行う予定でいる。レクチン、MS解析を行うと同時に異常IgA（患者特異的）を分離し、それに対する抗体作製を行う計画をしている。

糖鎖関連遺伝子転写量解析に基づく疾患糖鎖解析については、前年度に整備した解析システムを用いて、ソフト開発を進め、その実用性を検証する。

（実施体制：産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合）

## 2) 研究開発項目②「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

### A. 「ノックアウトマウス関連研究開発」

まずは、糖鎖改変による糖鎖の生物学的機能解析を実施する。すなわち、糖鎖合成関連遺伝子を導入・削除して糖鎖を改変した動物・細胞株を多数樹立し、糖鎖改変による細胞機能・生体機能の変化を生化学的、生物学的、病理学的に解析することで糖鎖機能を解明する。また、これらの細胞機能、タンパク質や抗体機能の変化と疾患との関係を臨床サンプルを用いて検証する。さらには、ヒト型糖鎖ライブラリーを用いた機能解析を実施する。すなわち、多様な糖鎖および糖鎖複合体等を用い、糖鎖及び糖鎖複合体と病原体表面蛋白質等との相互作用認識解析技術等を開発することにより、有用な糖鎖および糖鎖機能を見出す。

以下具体的に、ノックアウトマウスの作製はコンディショナルで行っている。まず完全ノックアウトを行い、致死性を示すものは各種発現組織での特異的ノックアウトを計画している。できたマウスから糖鎖機能解析を進める予定である。ノックアウトマウスを用いた糖鎖機能解析、抗糖鎖プローブ作製は共に現方針で継続して推し進める予定である。また、ノックアウトマウス分科会は19年度からは糖鎖の機能ごとに分科会を立ち上げ、糖鎖機能分科会に移行する計画である。またマウス解析によるアウトプットについては、糖鎖マーカーの候補として、項目③の糖鎖抗原作製候補とする。さらには、これらの情報は、前年度より継続して開発するデータベースに収納する。

糖鎖アレイチップについては引き続き糖鎖アレイ化に最適なハイドロゲル作製条件の検討および検定方法の開発を進めるとともに、検討中の3次元的固定化による糖鎖アレイの性能を見極め、糖鎖機能解析に利用すべく応用のための研究計画を立てる。具体的には、アレイ化する糖鎖のライブラリデザインを行ない、その合成に着手する。GAGオリゴ糖については、ライブラリ調製を引き続き進めるとともに、マイクロアレイへの固定化について検討を進める。

再生医療については、19年度、種々のヒト臓器より国立成育医療センターで樹立した再生医療用ヒト間葉系細胞を用い、採取臓器・分化度等による細胞表面糖鎖マーカーについて18年度と同様の解析を行い、レクチンによるヒト間葉系幹細胞の分別を目指す。また、各細胞での糖転移酵素遺伝子の発現を産総研で立ち上げている網羅的糖転移酵素遺伝子real-time PCR発現解析システムで解析し、細胞ごとにどのような糖鎖が発現している可能性があるか予測する。上記レクチン解析の結果と比較照合して、ヒト間

葉系幹細胞と他の細胞を分別できる糖鎖マーカーの開発を試みる。

生殖関連では、上記糖転移酵素様遺伝子の K0 マウスにおける精巣／精子の変化についてより詳細な組織学的・生化学的解析を行い、このタンパク質の精子形成／生殖における機能について明らかにする。また、ヒト男性不妊症患者の遺伝子解析を行い、この遺伝子が男性不妊症の原因遺伝子である可能性について調べる。

(実施体制:産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合)

#### B. 「病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明」

ヒトの感染症と糖鎖との相互作用を明らかにし、糖鎖を用いる感染症病原体の新しい検出、診断、治療の技術を開発する。

病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明に関しては、ウイルス、クロストリジウム神経毒素などの精製を行ない、糖鎖との相互作用のスクリーニングを進めていく。

糖鎖利用診断システムの開発に関しては、前年度の検討で得られた固定化反応条件を用いて、局在表面プラズモン共鳴用のデバイスの試作に着手する。また、糖鎖の固定化状態とタンパク質認識における反応性との関係や金基板表面の修飾法を検討する。

(実施体制:(財)化学技術戦略推進機構、産業技術総合研究所・北海道センター)

#### 3) 研究開発項目③「糖鎖認識プローブの作製技術の開発」

ここでは、臨床検体等の生体試料中の糖鎖マーカーを特異的に高い親和性を持って認識するための糖鎖／糖蛋白質認識プローブを作製するための技術開発を行う。

まずは、プローブ作製用糖鎖・糖蛋白質の精製／合成技術の開発を行う。すなわち、バイオマーカーである糖鎖を認識するプローブの作製を可能にするため、プローブ作製の抗原あるいはスクリーニング試薬として必要になる、サブmgレベルの糖鎖・糖ペプチドを精製する、あるいは、合成する技術開発を行う。さらには、糖鎖認識プローブの作製と臨床検体を用いた検証をおこなう。すなわち、精製／合成したバイオマーカー糖鎖・糖ペプチドを用いて糖鎖／糖蛋白質認識プローブを作製する。実験動物に免疫して抗体を作製する従来法、免疫せずランダムに抗体を作製してスクリーニングする方法、*in vitro*の抗体・ランダムペプチド作製法等、必要であれば可能な限りの方法でプローブ作製を試みる。臨床検体等を用いて作製した糖鎖／糖蛋白質認識プローブを評価し、有用なプローブを選別する。

以下具体的には、臨床検体のライブラリー構築を行うなどを通じて、バイオインフォや、グライコプロテオームによるマーカー開発の支援を行う。また、バイオマーカーを必要とする疾患および病態リストアップすることで、医療において必要とされるバイオマーカー開発計画を整備する。

糖鎖・糖ペプチドの調製については、ひきつづき各種標準糖鎖／糖ペプチドを合成して糖鎖チップアレイ等に供給すると共に、前年度に得られたいくつかの糖鎖マーカー候補について、抗原を作製、プローブ候補の作製を進める。研究項目①の解析結果や、研究項目②のノックアウトマウス解析結果より挙げられた、糖鎖抗原候補よりいくつか選択して、抗原作製、プローブ候補作製を進め、性能の検証を進める。ノックアウトマウスを利用した抗体作製は、前年度に整備した基本プロトコールに従って継続して抗体の取得を進める。このようにして得られた候補プローブは、標準サンプルを用いて基本性能を評価し、良いモノについてはさらに前年度作製したプローブ評価プロトコールに従って臨床サンプルを用いて評価する。

(実施体制:産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合)

加えて、19年度グリコサミノグリカン糖鎖腫瘍マーカー認識プローブの研究開発については、マウスの癌細胞以外に各種のヒト癌細胞株を用いた抗体の評価系を作製して、上記マウス抗体の特異性と高転移性マウス肺癌細胞に対する増殖阻害活性を評価に用いる。一方、マウス肺癌細胞の合成する GAG に対する抗体の作成も試みる。

(実施体制：北海道大学)

#### 4) 研究開発項目④「糖鎖の大量合成技術の開発」

新たな動物細胞の開発や合成した糖鎖の糖鎖自動合成装置を用いる修飾を行うことにより多種のヒト型糖鎖を合成する。また、新たな糖鎖プライマーの開発、パイロットプラントや中空糸膜での培養法、分離精製技術などの開発により糖鎖の大量生産技術を開発する。

産業上有用な新規材料を開発するために、糖鎖ポリマーや糖鎖デンドリマーなど機能的糖鎖クラスターを創製するとともに、病原体・毒素の除去装置の開発を行う。

3種類の糖鎖プライマーと20種類以上の細胞を用いて、約100種類のヒト型糖鎖が合成できる設計図を作成する。また、昨年度は3種類の糖鎖を各10mg合成したが、今年度は新たな糖鎖7種類を各10mg合成する。

糖鎖自動合成装置(Golgi™)による糖鎖再修飾に関しては、効率的にGolgi™での糖鎖修飾を可能にすべく水溶性高分子体の改良、簡便なペプチドリンカー合成法の確立、フコース転移酵素の高活性化などに取り組む。

チオグリコシドプライマーに関しては、数種類を効率的で安価な合成法を開発するとともに、種々の細胞による糖鎖伸長反応を検討し、チオグリコシド型の糖鎖生産(10mg)を行う。

ハムスター法に関しては、細胞をハムスター法で調製し、パイロットプラントにて糖鎖伸長反応を行ない、スケールアップにおける糖鎖合成・精製方法の問題点などを検討する。

中空糸膜法に関しては、中空糸膜の最適化を行い、目標である10種類、10mg以上の糖鎖を生産するとともに、糖鎖生産性の向上技術を開発する。

糖鎖精製法に関しては、生産される糖鎖が多種である場合、より高度な分離技術が必要となるため、CPCシステムやHPLCによる分離方法を確立する。

フルオラスプライマーの導入による糖鎖伸長反応および分離・精製技術の開発に関しては、細胞培養液からの効率的なフルオラスカラム等を用いた分離方法を開発する。

糖鎖高分子の合成では、水溶性の糖鎖高分子の作製法やアジド基の直接利用による簡便な糖鎖高分子作成法を検討する。また、糖鎖デンドリマーの合成に関しては、ラクトース由来のアジド化長鎖アルキルグリコシドの合成条件やカルボシランデンドリマーの調製とその末端の誘導体化条件を検討する。

病原体・毒素除去装置の開発では、糖鎖を固定化した浄化用モジュールの最適化を行い、試料中のベロ毒素濃度を実用レベルまで低下させることができるモジュールの作製を行う。

(実施体制：(財)化学技術戦略推進機構、産業技術総合研究所・北海道センター)

#### 5)総合調査研究

##### (1) 研究項目①～③

本プロジェクトを効率的に推進するため、共同研究の実施及び再委託の推進、研究開発進捗状況の検討・調整を行う研究開発委員会及び分科会(エンリッチ・分析分科会、IgA腎症分科会、ノックアウトマウス組換え細胞関連分科会、再生医療・生殖分科会糖鎖チップ・アレイ・感染症分科会、腫瘍マーカー関連分科会、プローブ関連分科会)の開催、内外の最新技術調査、開発情報収集の実施、成果報告書作成、外部発表等を実施する。特に、国内の第一線の研究者と合同して該研究分野の最新の情報収集を図るとともに、糖鎖構造解析、糖鎖合成、糖鎖関連酵素、糖鎖機能等の分野の専門家から技術指導を適宜受ける。

(実施体制：バイオテクノロジー開発技術研究組合)

(2) 研究項目④及び②の一部

総合調査研究委員会を2回開催し、外部有識者委員からの大所高所からの技術指導を受ける。また、関連する外部の研究開発状況などを把握し、適切な研究推進を図る。

(実施体制：(財)化学技術戦略推進機構)

(2) 平成19年度予算規模

一般会計 1120百万円(継続)

(注) 事業規模については、多少の変動があり得る。

5. その他重要事項

(1) 運営・管理

プロジェクトリーダー、各研究開発に係わるチームリーダー、関連研究分野の有識者等を委員とした研究開発委員会を年1～2回程度開催する。

6. スケジュール

(1) 本年度スケジュール：

平成19年9月(予定)・・・研究開発委員会開催

平成20年2月(予定)・・・研究開発委員会開催

「糖鎖機能活用技術開発」実施体制図

