

# 酵素連続反応による糖鎖自動合成法

## 糖鎖自動合成装置 Golgi™ の開発

生体内での糖鎖合成機構をヒントにして、酵素連続反応による世界初の糖鎖自動合成装置 Golgi™ の開発に成功した。この装置には、酵素固定化用の磁性体ビーズ技術や分子量分画用ろ過膜技術などが新たに導入されており、全ての工程を 36 穴あるいは 96 穴型反応用ベッセルプレート内で完了できるように設計されている。また、ペプチド自動合成装置と併用すれば、種々の生理活性糖ペプチドの平行合成などにも応用できることが実証されている。

An automated carbohydrate-synthesizer (glycoconjugate-synthesizer) “Golgi™” was developed by mimicking biosynthetic system of the Golgi apparatus in cells. The system was improved by using tailored-magnetic beads for immobilizing glycosyltransferases and fine-filter membrane system to achieve fully-automated synthesis in 36 or 96-well reaction vessel. It was demonstrated that combined use of Golgi™ with a conventional peptide-synthesizer allows for high throughput parallel synthesis of biologically important glycopeptides.

西村 紳一郎 にしむら しんいちろう (中)  
tiger.nishimura@aist.go.jp

糖鎖工学研究センター  
糖鎖自動合成チーム チームリーダー  
(北海道大学理学研究科教授兼任)  
(北海道センター)

新しい創薬基盤技術のひとつとしての糖鎖自動合成法を産学連携による実用化研究に積極的に活用して産総研発の新技術をもさらに大きく発展させたい。

清水 弘樹 しみず ひろき (右)  
hiroki.shimizu@aist.go.jp

糖鎖工学研究センター  
糖鎖自動合成チーム 研究員  
(北海道センター)

液晶 NMR を用いた糖鎖-タンパク質間相互作用の解析、マイクロ波を用いた新規グリコシル化反応の開発など、従来の方法論では困難な生体分子間相互作用解析データの抽出法や新規な合成法を実現したい。

比能 洋 ひのう ひろし (左)  
h.hinou@aist.go.jp

糖鎖工学研究センター  
糖鎖自動合成チーム 研究員  
(北海道センター)

自動合成技術を駆使して糖鎖を中心とした生体機能探索プローブの分子設計とその効率的合成法への展開を進めたい。



### 生合成機構をヒントとした糖鎖自動合成技術の開発

核酸、ペプチドに続く第3の生体鎖として糖鎖が注目されている。われわれは、図1に示した生体内における糖タンパク質の生合成プロセスを参考に、糖鎖の自動合成法を開発した。

われわれは、①糖鎖はまずランダムコイル型のタンパク質に導入されること、②糖転移酵素は細胞内のゴルジ膜表面に高密度に分布して機能していること、に着目し、これで糖タンパク質の生合成を再現するために、(a)糖転移

酵素の大量発現と固定化技術、(b)特異的な操作が可能な多官能性リンカーや機能性高分子担体などの開発を進めてきた。その結果、糖転移反応に必要な3成分(酵素、受容体基質、供与体基質)をそれぞれ、不溶性担体支持成分、可溶性高分子成分、低分子成分に分けて取り扱うことが可能となり、分離の大幅な簡素化と受容体基質の集積効果による高い反応効率を実現した。

### プロトタイプから製品化まで

2001年7月、実用化への第一歩とし

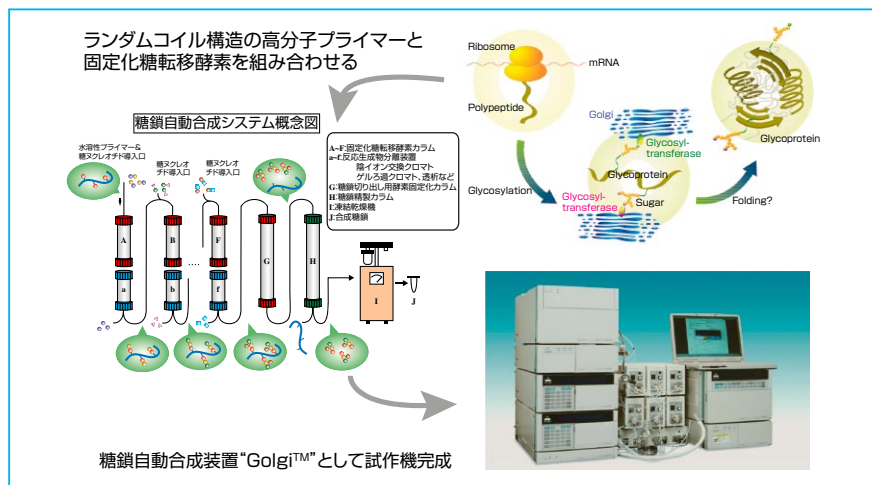


図1 生合成の仕組みを模倣した糖鎖合成法



図2 平成17年9月に完成した製品版“Golgi™”

て自動合成装置Golgi™ 1号機<sup>1)</sup> (図1右下)を試作し、実際に糖鎖合成の完全自動化が可能であることを検証した。この1号機以降、反応液の流路、目的物の分離・精製法、糖転移酵素の利用法などを改良した結果、2005年9月には、図2の“Golgi™4号機”を完成・発表<sup>2)</sup>した。この“Golgi™”では、磁性体ナノビーズに固定化された酵素と遊離型酵素の両方を必要に応じて使用することができ、汎用性に富んだシステムになっている。なお、この装置は(株)日立ハイテクノロジーズから受注生産により販売されている。

### 創薬研究には複合糖質合成が必須

この装置の特徴は、糖鎖だけでなく糖鎖以外の物質と結合した多様な“複合糖質”の合成にも対応している点である。糖鎖に関連した医薬品開発が期待されているが、それらの創薬研究を加速するためには糖脂質や糖ペプチドなどの多様なリード化合物ライブラリーを構築する必要がある。例えば、糖脂質の合成では、脂質の疎水性によるプライマーの凝集を防ぐための糖脂質合成用プライマーを開発した。このプライマーを用いて、構造の均一な天然ガングリオシドとその誘導体を得ることができた(図3)。<sup>3)</sup>一方、糖ペプチ

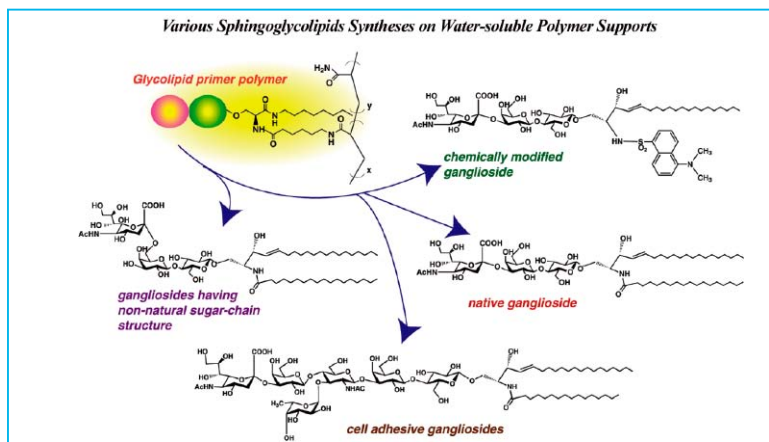


図3 糖脂質合成システム

ド合成では、小さな糖残基をもつ糖アミノ酸誘導体を用いてペプチド合成を行うことにより、ペプチド配列、糖鎖配列、糖鎖導入位置をそれぞれ独立に制御できるようにした(図4)。すでに、この糖ペプチド合成システムを利用して、短時間で300種以上のムチン型糖ペプチドライブラリーの作成<sup>4, 5)</sup>に成功している。

### 今後の展望

近年、極微量の糖鎖試料でもその

構造や機能の解析研究が可能となりつつあるが、実際には、多様な複合糖質合成を実現できる汎用性のある技術が糖鎖機能の解明とその応用において重要と考えられる。糖鎖自動合成装置“Golgi™”は、高速自動合成が可能であり、糖鎖に限らず糖脂質や糖ペプチド・糖タンパク質などの多様な複合糖質合成にも柔軟に対応できるため、今後、次世代バイオ医薬品開発や診断用バイオマーカー探索などの実用化研究の推進に結びつくことを期待している。

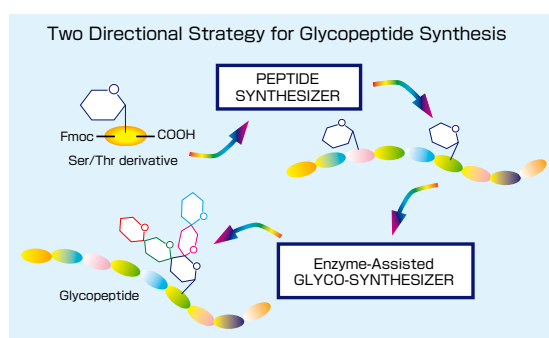


図4 糖ペプチド合成システム

### 関連情報：

- 共同研究者：清水和美、松下隆彦（糖鎖自動合成チーム）、山田久里子、麓呂高、大藪巨樹、岩田一道、太田尚志（バイオテクノロジー開発技術研究組合）
- 1) 日経バイオテック、2001年7月16日号
- 2) 毎日新聞、2005年9月27日
- 3) K. Yamada et al.: J. Am. Chem. Soc., Vol. 119, No. 43, 10555-10556 (1997)
- 4) M Fumoto et al.: Angew. Chem. Int. Ed., Vol. 44, No. 17, 2534-2537 (2005)
- 5) M Fumoto et al.: J. Am. Chem. Soc., Vol. 127, No. 33, 11804-11818 (2005)