

糖鎖研究のための基盤ツール開発 およびその応用と実用化

— 過去10年間の産総研糖鎖医工学研究センターの研究戦略 —

成松 久

糖鎖研究という新しい科学技術領域を開拓するにあたり、10年間の長期戦略を最初に考案した。多くの研究者・技術者がこの領域に参入できるよう基盤ツールの開発を行った。まずは、糖鎖遺伝子の網羅的発見と機能解析を遂行した。この成果は、糖鎖合成技術、糖鎖構造解析技術、糖鎖の生物機能解析へつながる布石となった。開発された基盤技術ツールを応用して、癌診断等に有用な糖鎖バイオマーカー開発を実施した。肝線維化マーカー、胆管癌マーカー等の実用化に成功した。その他の種類の癌マーカーの開発も進行している。10年の長きにわたる研究成果はアジア諸国をはじめ世界へ輸出され、国内および諸外国との共同研究へと発展している。

キーワード: 糖鎖、*N*-グリカン、*O*-グリカン、糖転移酵素、糖鎖遺伝子、レクチン、レクチンアレイ、質量分析、IGOT、バイオマーカー、肝線維化、肝臓、胆管癌

Development of basic tools for glycoscience and their application to cancer diagnosis

– A 10-year strategy of the Research Center for Medical Glycoscience of AIST –

Hisashi NARIMATSU

We proposed a 10-year strategy for the development of a new scientific field, glycoscience. Initially, we developed basic technological tools to help scientists and engineers enter this field. As the first project, we exhaustively discovered glycogenes and carried out their functional analyses. The fruits of this work led to several follow-on projects: 1) technology for enzyme synthesis of glycans, 2) technology for structural analysis of glycans, and 3) analysis of biological functions of glycans. The basic tools, developed in the first 5 years of our 10-year strategy, were applied to the development of more useful products, e.g., development of disease biomarkers, particularly for cancer diagnosis. We are also close to achieving the practical use of a liver fibrosis marker and a cholangiocarcinoma marker for diagnosis. Moreover, we are pursuing development of biomarkers for diagnosis of other cancers. The successful research results for these 10 years have now been transferred to the world, in particular, Asian countries, and have resulted in collaborative research contracts with domestic and overseas research groups.

Keywords: Glycan, *N*-glycan, *O*-glycan, glycosyltransferase, glycogene, lectin, lectin array, mass-spectrometry, IGOT, biomarker, liver fibrosis, liver cancer, cholangiocarcinoma

1 はじめに

生体高分子のうち、核酸（第一の鎖）、タンパク質（第二の鎖）に次ぎ、糖鎖は第三の鎖とよばれる。タンパク質は遺伝子（核酸）の直接的な産物であるから理解しやすい。また遺伝子からタンパク質への合成機構は種を超えて類似しているから、下等生物の原理原則を解明すれば人間にも適用できる。糖鎖は180種類以上にもおよぶ糖転移酵素とよばれる一群の酵素により逐次的に合成される。

糖転移酵素の基質特異性は、種の進化にしたがって劇的に変化しているので、下等生物と人間とでは糖鎖を構成する単糖の種類も違し、配列構造も大きく異なる。これは核酸やタンパク質を構成するヌクレオチド、アミノ酸が

ほとんど進化していないのと比べると不思議である。糖鎖の進化が生物の進化を反映していると言っても過言ではない。細菌とヒトの間では共有する単糖もあるがそうでないものの方が多い。動物と植物ではかなりの単糖が種類を異にする。ヒトを含む類人猿以上の動物と、ブタ、ウシ以下の哺乳動物にも差がある。

糖鎖はタンパク質や脂質に結合して存在し、それぞれ糖タンパク質、糖脂質と呼ばれる。膜タンパク質や血清タンパク質のほとんどが糖タンパク質であり、糖鎖が結合して初めて機能分子として完成する。1種類の糖タンパク質を取り出してみるとタンパク質部分は均一でも糖鎖部分は極めて不均一である。例えば、免疫グロブリンG (IgG) は2本

産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター 〒305-8568 つくば市梅園 1-1-1 中央第2
Research Center for Medical Glycoscience, AIST Tsukuba Central 2, 1-1-1 Umezono, Tsukuba 305-8568, Japan E-mail: h.narimatsu@aist.go.jp

Original manuscript received March 5, 2012, Revisions received April 13, 2012, Accepted April 25, 2012

鎖の簡単な構造の *N* 型糖鎖 (*N*-グリカン) をもつが、その構造のバリエーションは 36 種類にもなる。しかし糖鎖構造が均一な糖タンパク質を精製するのは極めて困難であり、かつ糖鎖構造の均一な糖タンパク質を合成することも不可能に近い。したがって現時点では、糖鎖構造の微細な違いによる機能の違いは、ほとんど解析されていない。

糖タンパク質に結合している糖鎖には、大別して、*N*-グリカンと *O* 型糖鎖 (*O*-グリカン) がある。*N*-グリカンのタンパク質への結合位置は、アスパラギン-X-スレオニン/セリン (Asn-X-Thr/Ser) であり、種を通して比較的保存されている。一方、*O*-グリカンはスレオニン (Thr) もしくはセリン (Ser) なら、どこにでも結合する可能性がある。*O*-グリカンの合成を開始する ppGalNac-T と命名された糖転移酵素は、ヒトでは約 20 種類が存在する。細胞の分化や癌化に伴って、20 種類の各酵素の発現パターンが大きく変化する。このことはとりもなおさず、*O*-グリカンの結合位置は、細胞の分化、癌化により異なっていることを意味する。残念ながら、現時点では *O*-グリカンの結合位置を正確に同定する技術はまだ開発されていない。

糖鎖分子として存在する限り、必ず何らかの重要な機能があるはずと考えるのは科学者として当然の発想であろう。しかし糖鎖が関与したタンパク質の機能解析となると、糖鎖機能解析のための基盤技術が存在しないため、ほとんどの研究者が避けて通る。

11 年前にヒト全ゲノム配列の解読が終了し、それを鋳型としてプロテオーム研究 (タンパク質の網羅的解析) が隆盛を極めつつあった。ゲノムからプロテオームという流れの後にくるのは、糖タンパク質 (糖鎖の結合した最終的な機能分子) の網羅的機能解析 (グライコプロテオーム) であ

ることを確信していた。そのためにはまず糖鎖研究に必要な基盤技術ツールを開発しなければならない。その後、グライコプロテオームの概念をもとに、糖鎖機能解析が可能となる。その結果が、バイオ医療分野すなわち診断や治療への応用とつながっていくと考えた。

2 糖鎖とは何か

「糖鎖とは、細胞あるいはタンパク質が羽織る衣服のようなものである。」と例えることができる (図 1)。糖鎖には次のような特徴があり、応用が期待できる。

①糖鎖は、細胞の分化・成熟・活性化とともに配列構造が大きく変化していく。正常細胞から癌細胞になれば、脱分化方向に細胞が進むので、糖鎖構造が大きく変化する。癌マーカーとして最適と予想される。また再生医療にも応用できるであろう。細胞が分化する方向にしたがって糖鎖構造が規則正しく変化する。細胞の分化系列を判定するのに有用であろう。生体内で最も早く成熟・分化するのは生殖細胞である。精子や卵子の糖鎖構造は時々刻々劇的に変化する。成熟にとって糖鎖が重要な機能を担っているに違いない。

また、細胞の活性化や休止化に伴って糖鎖構造はすばやく変化する。免疫系の細胞では、活性化、休止化を繰り返す度に糖鎖構造が変化している。

②産生する組織により糖鎖構造が異なる。一例として、肝細胞も脳の脈絡膜もトランスフェリンというタンパク質を産生する。タンパク質部分は全く同じであるが、糖鎖構造は大きく異なる。糖鎖構造を検出すれば、どの組織細胞由来かが分かるのである。また、癌細胞では、ある種のシアル酸転移酵素や硫酸転移酵素の発現が劇的に上昇

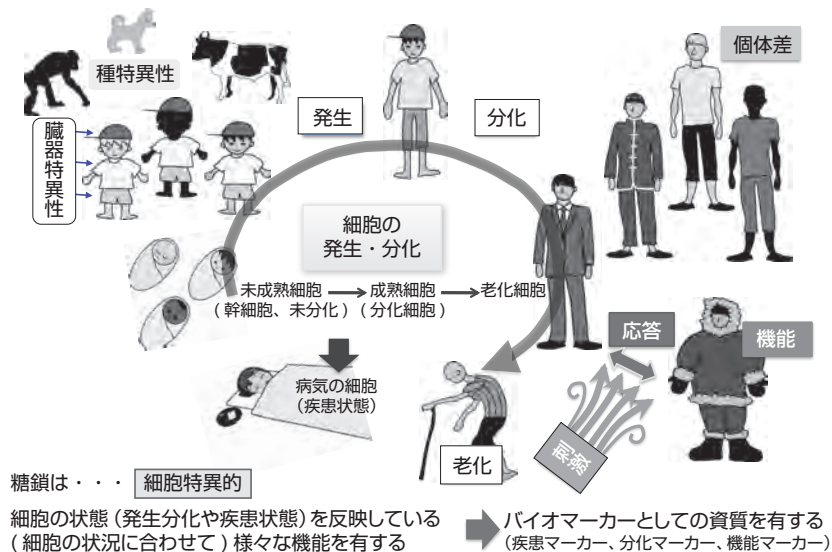


図1 糖鎖は細胞 (タンパク質) の洋服のようなもの

することがよくある。その結果、かなり多くの糖タンパク質にシアル酸や硫酸基が付加される。癌細胞表面にシアル酸や硫酸基が増加することにより、細胞表面には負電荷が上昇する。つまりほんの一握りの糖転移酵素の制御により多くの糖タンパク質の機能を制御しているらしい。その結果、細胞の性質を大きく変化させている。

- ③さらに、一個の細胞が産生する多種類の糖タンパク質の糖鎖構造は糖タンパク質の種類により異なる。一つの細胞が産生するのであるから、細胞内に発現している糖転移酵素の発現パターンは同じである。にもかかわらず、糖タンパク質の種類が異なれば、その糖鎖構造は異なる。これを決定するメカニズムは全く解明されていない。
- ④糖鎖には個体特異性がある。代表的なのは血液型である。ABO式血液型に限らず、ルイス式、P式、Ii式といった血液型は、糖鎖構造の個体間の違いである。それらを合成する糖転移酵素遺伝子に変異が起こり、酵素活性が失活したり基質特異性が変化したりすることにより、合成する糖鎖構造が異なっている。この変異遺伝子が親から子へ遺伝されている。ヒト間の臓器移植の最も大きな障壁は、ABO式血液型の糖鎖構造の違いである。
- ⑤糖鎖には種特異性がある。すべての遺伝子進化の中で、糖転移酵素遺伝子の進化は最も早い。これは外界環境の変化に直接に触れるのは、細胞表面上の糖鎖であり、環境変化に対応して糖鎖構造が選択されてきていることが想像できる。医薬品としての抗体や造血剤としてのエリスロポエチンは、現在、ハムスター細胞で産生している。糖鎖部分はヒト型とは異なり、ハムスター型の糖鎖構造となる。エリスロポエチンは運動選手がドーピングに使うことがある。ハムスター型の糖鎖を検出すればドーピング検査ができる。ブタの臓器を移植に使うという試みがある（異種移植）。この際も、ヒトにはない糖鎖構造をブタがもっているために、糖鎖構造の違いが急性拒絶反応を引き起こす。
- ⑥病原微生物は宿主細胞の特定の糖鎖構造に結合して感染を開始する。インフルエンザをはじめとする多くのウイルスが糖鎖に結合する。この逆の関係もある。病原微生物の糖鎖構造を、宿主側の細胞表面にあるレクチンが認識して結合し、細胞内に感染する。外界の環境と最も接触するのは糖鎖の末端である。多くの病原体は糖鎖に結合して感染を開始する（あるいはその逆）。外界の病原体から逃れるための個体選択が、糖鎖構造の進化速度が速い原因と考えられる。病原体から逃れるためには、糖鎖構造を変化させて遺伝的に種を保存する必要があるのだろう。インフルエンザウイルスは、末端の α 2,6シアル酸、ピロリ菌はルイス式血液型糖鎖、ノロウイルスはABO

式およびルイス式血液型糖鎖に結合して感染する。糖鎖を合成する糖転移酵素遺伝子に変異が起こり、病原体が感染しにくくなった個体が子孫を繁栄させる。この個体選択は数万年単位くらいで続いている。ABO式血液型は類人猿以上にあるが、ルイス式血液型はヒトにしかない。ルイス式血液型を決定する糖転移酵素遺伝子の変異は、2-3万年前に生じている。

3 糖鎖研究のシナリオと戦略

これまで述べたように、糖鎖構造は細胞の分化・脱分化（癌化）状態をよく反映する。また組織特異性をよく反映する。このことが、糖鎖バイオマーカー開発の基盤となっている。糖鎖構造を決定するのは、主に糖転移酵素の発現パターンであるから、糖転移酵素の転写制御機構、またはエピジェネティックな制御（遺伝子配列からは読みとれない遺伝子修飾によるその発現制御）が糖鎖構造を決定しているのであろう。しかし10年前には、この基礎的な研究はまだほとんどなされていなかった。

そのため、まずは糖鎖研究に必要とされる基盤技術を開発しなければならなかった。自ら基盤技術をまず開発することが、その研究分野の飛躍的な発展に貢献できる。このことは新規な研究分野の開拓者として最もやりたいことであり、またやらねばならないことであった。どの分野でもそうであるが、外国で開発された技術を使って研究を始めたのでは、どうしても外国の研究に遅れをとることは否めない。

遺伝子研究、タンパク質研究の分野と同様に、糖鎖研究分野でも基盤技術として要求されるのは、まずは合成技術、構造（配列）解析技術である。それらの技術は、「誰でも簡単に使える技術」でなければならない。10年前には合成・構造解析ともにまだまだ稚拙な技術しかなかった。また専門家でないと思えない技術ばかりであった。

そこで、図2にあるような10年がかりの長期展望をたてて、順序立てた一連の研究を推進することを計画した。最初の5年間は基盤技術開発に精力を注ぎ、残りの5年はその技術の応用編であった。一連の研究を次の順番で行った。1) ヒト由来の糖鎖遺伝子を網羅的に探索し解析する。→2) 網羅的に取得した糖鎖遺伝子からリコンビナント（遺伝子組み換え）の糖転移酵素を発現し、それを組み合わせて種々の構造の糖鎖を合成し糖鎖ライブラリーを作成する。→3) これら構造の判明した糖鎖を標準物質として、糖鎖構造解析技術の開発に供する。→4) 生体内における糖鎖機能を解析する。糖鎖構造の変化により糖タンパク質の機能および細胞の表現型がどのように変化するか、その解析には、以下の1)、2)、3)の基盤ツールが必須となる。

1) 糖鎖遺伝子:

糖鎖遺伝子ライブラリー構築プロジェクト (Glycogene Project: GG project) により、ヒト由来糖鎖遺伝子の網羅的探索と解析を行った。糖タンパク質の完成には、タンパク質部分は1種類の遺伝子発現で済むが、糖鎖部分は数十種類におよぶ糖鎖遺伝子発現の共同作業で合成される。とすると糖鎖遺伝子群がすべて解明されて生体内での糖タンパク質、糖脂質の生合成機構が明らかになるはずである。最終目的である糖鎖機能の解明に向けて、まずは糖鎖遺伝子の全容を解明する必要があった。

2) 合成:

網羅的に取得した糖鎖遺伝子からリコンビナント酵素として糖転移酵素を発見し、それを組み合わせて種々の構造の糖鎖を合成し糖鎖ライブラリーを作成した。有機化学合成法により糖鎖を合成するのはとても労力と時間がかかる。また画期的な有機化学合成法は考案されていない。有機溶媒を用いるので環境に負担がかかる。さまざまな構造の糖鎖を自由自在に合成するのは不可能であり、1種類の構造を合成するのに長い時間を要する。唯一の長所は、いったん合成法が確立できれば工業レベルの大量合成が可能なことである。

一方、酵素学的合成のために、網羅的に取得した糖鎖遺伝子をリコンビナント酵素として発現させた。種々の酵素の組み合わせにより、短時間にかなり自由自在に種々の構造の糖鎖を合成できるようになった。糖転移酵素は極めて基質特異性が高いので、1種類の酵素は1種類の構造しか合成しない。したがって基質特異性の判明した酵素を用い

れば、目的の構造の糖鎖を短時間で容易に合成できる。水系の反応なので環境にやさしい。短所は、ヒト由来の酵素なので極めて不安定であり、かつ酵素の生産にはコストがかかる。ヒトの糖鎖構造を合成するために下等生物の糖転移酵素で代替はできない。したがって大量合成はできないが、少量で多種類の糖鎖合成には酵素法が適している。

3) 構造:

糖鎖エンジニアリングプロジェクト (Structural Glycomics Project: SG project) において、構造の判明した糖鎖を標準物質として、糖鎖構造解析技術の開発に供した。数 mg の量ならば酵素法で多種類の構造を合成できる。

標準糖鎖(および糖ペプチド)を利用して二つの構造解析法を考案した。タンデム質量分析法(以下、MSⁿ法)とレクチンアレイ法である。それぞれに長所・短所があり使用用途が異なる。MSⁿ法の長所は、①誰でも簡単に解析ができる。②糖鎖構造を決定できる。短所は、①解析に比較的多量の糖鎖を必要とする(数μg程度)。②解析すべき糖鎖は精製物でなければならない。一方、レクチンアレイ法による構造解析技術の長所は、①感度がとても高い。②抗体オーバーレイ法を用いることにより、目的の糖タンパク質を完全精製する必要はない。③複数のサンプル間の糖鎖プロファイリング比較を簡便に行える。短所は、①糖鎖構造の完全決定はできない。②レクチンの供給体制がまだ完備されていない。

4) 機能・バイオマーカー:

糖鎖機能活用技術開発プロジェクト (Medical Glycomics Project: MG project) において、生体内で糖鎖構造の変化

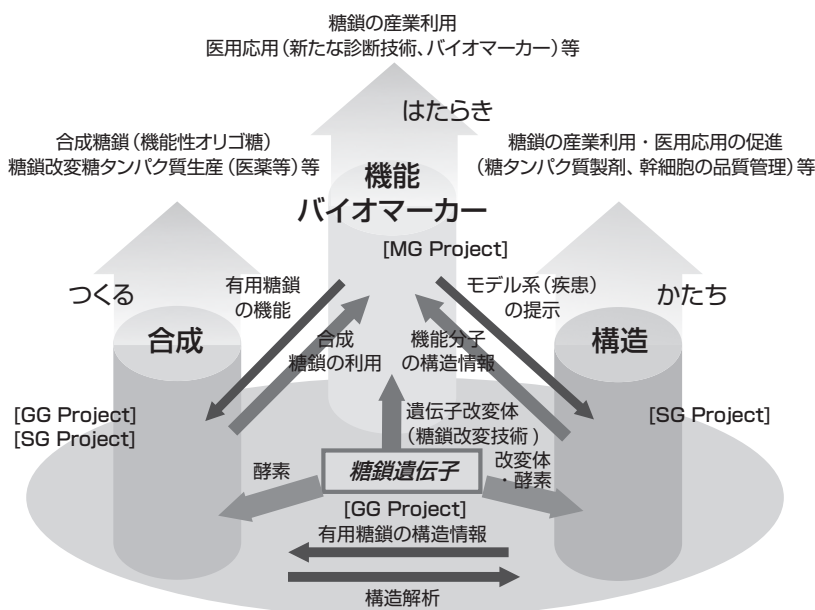


図2 糖鎖研究の三本柱
 糖鎖遺伝子ライブラリー構築プロジェクト: GG project、糖鎖エンジニアリングプロジェクト(構造解析技術): SG project
 糖鎖機能活用技術開発プロジェクト(糖鎖機能解析、糖鎖バイオマーカー開発): MG project

により糖タンパク質の機能および細胞の表現型がどのように変化するかを1)、2)、3)の基盤技術を用いて解析した。

「合成」、「構造」、「機能・バイオマーカー」の3本柱は相互に連携しながら発展し、「合成」では機能性オリゴ糖の合成や糖鎖改変タンパク質生産等、「構造」では糖タンパク質製剤、幹細胞の品質管理等、「機能・バイオマーカー」では新たな診断技術等の産業応用、医用応用に展開している。

4 基盤ツール開発のための各要素技術開発

図3に、今まで開発してきた糖鎖研究のための要素技術をリストにした。以下に各要素技術について概説する。

要素技術1. バイオインフォマティクス技術によるヒトゲノムデータベース等からの糖転移酵素遺伝子の探索

最初にとりかかったのはバイオインフォマティクス技術を駆使して、糖鎖遺伝子の候補遺伝子を網羅的に探索することであった。(株)三井情報から出向していた菊池が、ゲノムデータベース等から、新規の糖鎖遺伝子候補を探しだすソフトウェアを開発した。このソフトウェアは、単にアミノ酸ホモロジーの探索にとどまらず、次のような特徴をもった糖鎖遺伝子を探しだした。①N-末端の近くに疎水性アミノ酸の膜結合部位をもつもの。その長さは、18～22アミノ酸残基くらいであり、細胞膜結合タンパク質より少し短い。②続いて幹部位が存在するもの。幹部位はプロリンに富みセリン・スレオニンの数も多い。③酵素活性ドメ

インに続くもの。300～400アミノ酸くらいの活性ドメインであり、システインが数個存在することが多い。2価カチオンの結合部位であるDXDの3アミノ酸モチーフがある。このような特徴をもつ新規の候補遺伝子を約100種類探しだし、主にヒト培養細胞のRNAからcDNAを作製し、PCR法により酵素の全長をコードする候補遺伝子をすべてクローニングした。

要素技術2. 糖転移酵素遺伝子の各種発現ベクターへの組み替えとリコンビナント酵素の基質特異性解析

この要素技術開発には旧・糖鎖工学研究センター発足時の多くのメンバー(榎谷内、佐藤、後藤、工藤、立花、張、久保田、澤木等)が携わった。糖転移酵素はゴルジ膜や粗面小胞体(endoplasmic reticulum)膜に結合した膜タンパク質である。リコンビナント酵素として糖鎖の*in vitro*合成に使用するためには、可溶性の酵素にする必要がある。そこで候補遺伝子の膜結合部位を欠如させ、酵素活性ドメインと思われる部分をFLAGタグ付きのゲートウェイベクターにつなぎ替え、ヒト胎児由来腎臓芽細胞(HEK293T細胞)に導入し、リコンビナントタンパクとして上清中に分泌させ、抗FLAG抗体で粗精製した。多くの数の候補遺伝子由来のリコンビナント酵素の活性をいかにして網羅的に簡便にすばやく検出するか、にアイデアを絞った。ラジオアイソトープ(RI)でラベルされた9種類のヒトのドナー基質を購入して、それを混ぜ合わせた。アクセプター基質として、単糖、オリゴ糖を準備した。また培養細胞から糖脂質



図3 産総研・糖鎖医工学研究センターが開発・保有する糖鎖解析のための基盤技術(抜粋)

の混合物、糖タンパク質の混合物を準備してそれらもアクセプター基質とした。糖転移酵素のリコンビナントとしての発現には、ヒト胎児由来腎臓芽細胞 (HEK293T 細胞) を採用した。ヒト由来の糖転移酵素は極めて不安定でデリケートなタンパク質であり、活性をもたせたまま大腸菌や酵母で発現することは極めて困難であることは分かっていた。HEK293T 細胞はヒト由来であり、その糖タンパク質は高度に糖鎖修飾されていることから、もともと多くの糖転移酵素を内在的に発現しているらしい。ということは外部から導入されたヒト糖転移酵素を活性をもたせたまま発現するためのマシナリーがそろっていることを意味する。やはり現時点でも、ヒト由来リコンビナント糖転移酵素の発現には、ヒト由来の HEK293T 細胞が最適であるとの結論である。このプロジェクトで開発した新規糖転移酵素遺伝子は、物質特許申請の後、ほとんどすべて論文として発表した^{[1]-[29]}。しかし将来的には、糖鎖の大量合成が求められる時期がくるはずである。そのためにはヒト由来糖転移酵素の安価な大量発現が必要とされる。動物由来の培養細胞ではコストがかかるし大量発現系は望めない。当センターの千葉らがヒト由来糖転移酵素の酵母での大量発現系の構築を試みている^[30]。

これらは糖鎖遺伝子データベース (DB) として一般に公開している。日本糖鎖科学統合データベース (<http://jcgdb.jp/>) を参照されたい。この DB は、糖鎖遺伝子だけではなく、当センターの鹿内らが中心となりさらに多くの内容を含む発展型の DB を構築している。

要素技術3. 186種類の糖鎖遺伝子発現の定量測定法の開発

N-グリカンの根幹部を合成する糖転移酵素は、全細胞で発現しており、発現量も多く、細胞の状態によって変動することもない。その他の、特に糖鎖末端部を合成する糖鎖遺伝子の細胞での発現量は、他遺伝子と比べると極めて低い。通常の DNA チップでは検出できないし、検出できたとしてもその変動を正確に測定できない。186 種類におよぶ全糖鎖遺伝子の発現量を、網羅的、ハイスループットに正確に測定する技術を開発した。Quantitative real-time PCR 法 (qPCR 法) による糖鎖遺伝子の網羅的遺伝子発現解析の手法は実験技術的に成熟していて、検出感度や測定精度において最も信頼性の高い生物学的解析手法といえる。糖鎖遺伝子は経験的に発現レベルの低いものが多いことが分かっていたので、qPCR 法による発現解析系を開発した^[31]。具体的には、当センターの澤木が中心になり、糖転移酵素や修飾酵素をコードする 186 糖鎖遺伝子について、カスタム qPCR アレイを構築した。キャリアレーターとして糖鎖遺伝子クローンライブラリーのプラスミ

ド DNA プールを用いることで、1 回の測定で全 186 糖鎖遺伝子の転写産物量をコピー数で知ることができる。糖鎖遺伝子の発現プロファイルに基づく細胞の分類は細胞の分化や癌化によく対応しており、糖鎖遺伝子の発現は、糖鎖の発現とも相関することがこれまでに分かっている。

要素技術4. リコンビナント糖転移酵素による糖鎖および糖ペプチドの *in vitro* 合成法の確立

ヒト由来の酵素であるので、ヒト由来 HEK293T 細胞でリコンビナント酵素を発現させると、ほとんどの酵素が活性をもったまま可溶性のリコンビナント酵素として精製できる。これを利用して、糖鎖および糖ペプチドの *in vitro* 合成を行った。ただし、細胞内の粗面小胞体 (ER) で合成される *N*-グリカンの根本構造に関与する糖転移酵素は、ほとんどが脂質膜を複数回貫通する酵素であるので、リコンビナント化は不可能である。*N*-グリカンの基本構造は天然からの抽出物が市販されているので、それを出発物質として利用した。*O*-グリカンに関しては、*O*-グリカンをもつムチン等の代表的なペプチドを準備して、これに順次、糖転移酵素を加えて糖鎖を伸長させた^{[30][32][33]}。

二つの異なる目的に応じて合成した。当センターの伊藤が中心になり合成法を確立した。第 1 は、1 種類の糖鎖を可能な限り大量に合成する方法である。酵素反応の条件は一定に設定する。できるだけ多くの量の酵素を加えて、可能な限り長時間反応させた。目的物は最終的に液体クロマトグラフィーにて分離精製した。第 2 は、一つのチューブ内で、多種類の構造を同時に少量ずつ合成する方法である。各酵素の反応を、生成物が 50 % になった時点で、加熱により反応を止める。これに次の酵素を加えて同じく途中で反応を止める。これにより理論的には 2ⁿ 種類の糖鎖を 1 本のチューブ内で合成できる。前もって生成される各種の糖鎖の分子量は分かっているので、1 滴を取り出し質量分析装置で測定すると、目的の数だけの質量が検出される。この方法を、質量タグ付きの合成法と命名した^{[34][35]}。

要素技術5. 液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を基礎とした糖タンパク質大規模同定技術の開発

ペプチド混合物を試料として 1,000 種類を超すタンパク質を一斉同定する LC/MS 分析法が開発されたので、タンパク質消化物から糖ペプチドのみをレクチン親和性クロマトグラフィーで捕集後、同様に分析して糖タンパク質と糖鎖結合部位を大規模に同定する方法の開発に取りかかった。糖ペプチドは衝突解離法で MS/MS 分析しても、かさ高い糖鎖の存在によりペプチド部分が断片化されず同定に至らなかったため、グリコペプチダーゼで糖鎖を切除し、脱糖鎖ペプチドとして多数同定できるようにした。この反応で糖鎖結合 Asn は Asp に変換され、質量が 1 増えるので

糖鎖結合部位の特定も可能となった。このとき Asn 脱アミド化した非糖ペプチドが混在して、脱糖鎖ペプチドと区別できなかったため、酵素反応を安定同位体酸素-18 標識水 ($H_2^{18}O$) の中で行い、溶媒の酸素-18 をペプチドに取り込ませることによって糖鎖付加部位を標識し、高精度な糖タンパク質同定を可能とした (IGOT 法)。LC/MS 法と IGOT 法を組み合わせる方法により、当センターの梶らはきわめてハイスループットに大量の糖タンパク質同定を現在も精力的に推し進めている。現在の高速質量分析システムを用いると 1 mg の組織抽出タンパク質から 500-1,000 種の糖タンパク質が全工程 10 日ほどで同定できる^{[36][37]}。

要素技術6. MSⁿ法による糖鎖構造同定法の開発

タンデム MSⁿ 法の原理は、測定したい糖鎖の質量を測定する (MS¹ の質量)。それにアルゴン、ヘリウム等の希ガスを弱いエネルギーで衝突させ糖鎖を壊し (Collision Induced Dissociation: CID)、生じた各フラグメントの質量を測定する (MS²)。さらに MS² で壊れた各フラグメントを別々に取り出し、それにもう一度、CID を行って MS³ の質量を測定する。原理的には、サンプルの量さえ十分にあれば、MSⁿ までの測定が可能である。実際には、どんな微細な糖鎖構造の違いも、MS⁴ まで行えば CID による崩壊パターンの違いによって区別が可能である (図 4)。

できる限り多くの標準糖鎖に関して、MS⁴ までのデータを蓄積しデータベース (以下、DB) に格納した。未知の構

造を同定しようとする測定者が、まずその糖鎖の MS² のデータを取り、それを DB に送る。MS² のデータプロファイルから次にどのフラグメントを MS³ 測定すべきか、DB は格納されているデータから即座に判断して測定者に指示をする。指示にしたがって MS³ のデータを取り、再度 DB に送る。この時点で、答えが出る場合が多いが、さらに MS⁴ のデータどりが必要な場合もある。

この MSⁿ 法による糖鎖構造同定システムは、産総研の亀山、成松を中心に、(株) 島津製作所、(株) 三井情報の 3 者により共同開発され、(株) 島津製作所から市販されている。

要素技術7. 抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイの開発

生体サンプルを用いて、糖タンパク質上の病気の進展にともなう糖鎖変化を検証するためには、「高スループット、高感度、高再現性、迅速性」に優れた比較糖鎖解析技術が必須である。このニーズに最も合致する技術は、当センターの久野、平林らが開発した抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイである^[38]。レクチンマイクロアレイとは 43 種の特異性の異なるレクチンを同一基板上に固相化したものであり、通常ガラス 1 枚あたり複数のサンプルを同時に分析できる形態をとる。抗体オーバーレイ検出法は、分析対象である糖タンパク質は蛍光標識等の処理をせずそのままレクチンマイクロアレイに添加し反応させ、基板上のレ

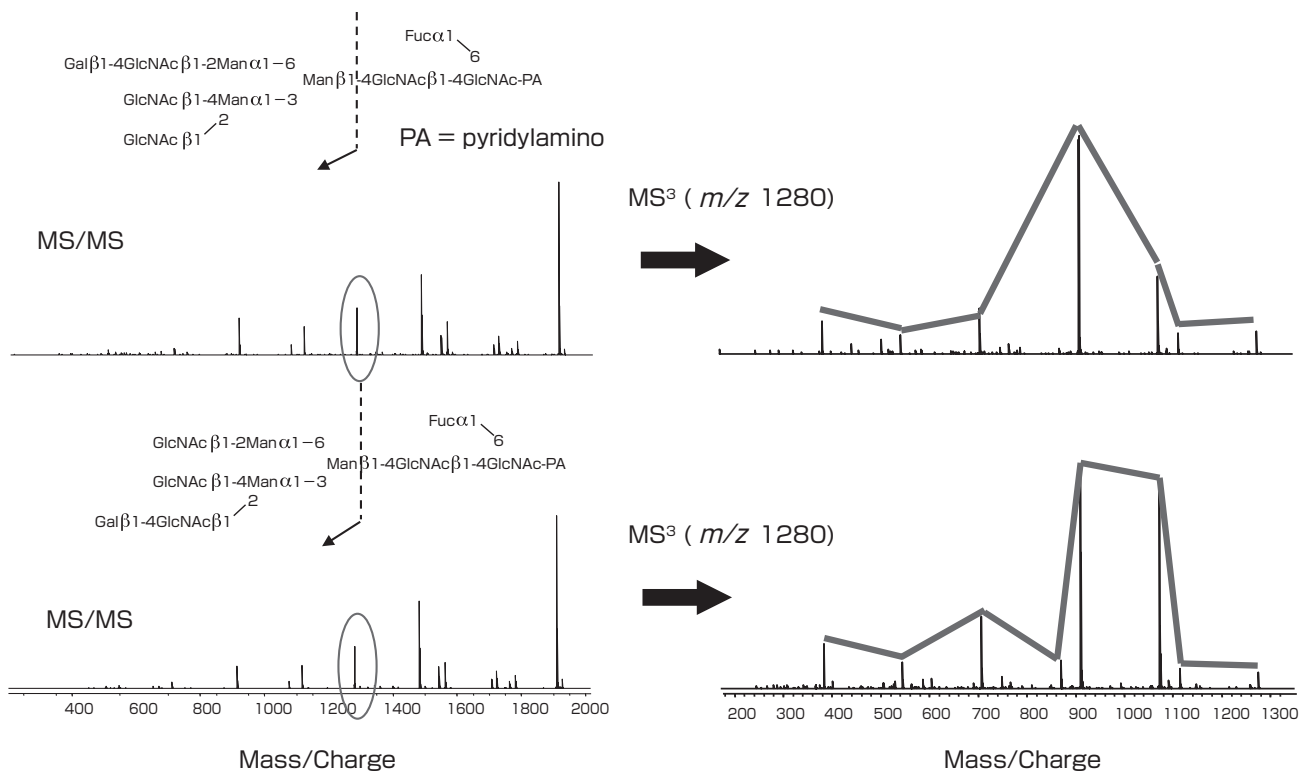


図 4 多段階タンデム質量分析による異性体の判別

クチンへ結合した糖タンパク質をコアタンパク質認識蛍光標識抗体で検出する。ガラス面断片から励起光を入射し全反射させることにより、ガラス面の周囲 200 μm くらいの厚みでエバネッセント波を発生させる。この厚みの中に入った蛍光物質だけがシグナルを出すように設計している。このアレイは極めて感度が高く微量の糖鎖でも検出できる（図5）。これまでの液体クロマトグラフィーや質量分析器を用いた糖鎖解析では、糖鎖をタンパク質から切り離して蛍光標識しなければならず、多くの工程数と時間を要していたため、それと比較すると圧倒的に簡便な手法である。感度は抗体の質に依存するが、おおむねウェスタンブロットで検出可能な量（ng 程度）の標的糖タンパク質があれば分析できる。また抗体により標的糖タンパク質の結合シグナルのみが特異的に検出されるため、サンプル調製は免疫沈降等の簡易精製程度で問題なく分析が可能である。事実、我々はこれまでに 50 種を優に超える糖タンパク質を、血清や細胞培養上清や組織切片中から数 10 ng 程度を効率よくエンリッチし、抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイで比較糖鎖解析することに成功している。この技術の候補分子検証試験への活用により、実効性の高い糖鎖バイオマーカー開発パイプラインが確立された^{[31][33][38][39]}。この研究戦略については詳解したものがあるのでそちらを参照されたい^[40]。

このレクチンアレイ糖鎖プロファイリングシステムは、産総研の久野、平林を中心に（株）GPバイオサイエンスとの共同で開発され、同社より市販されている。

5 開発した糖鎖研究基盤技術を駆使しての疾患バイオマーカーの探索と実用化

5.1 疾患糖鎖バイオマーカー探索の戦略

プロテオミクス技術により疾患バイオマーカー探索が盛んに行われている。プロテオミクスでは、タンパク質の定量的な差を見だしてバイオマーカーとしている。しかし我々の基本的概念はそれとは根本的に異なる。我々のグリコプロテオミクスによるバイオマーカー探索では、疾患になるとタンパク質部分は同じでも糖鎖部分の構造が変化することを指標にして、質的に変化した糖タンパク質を見いだすことに主眼を置く。疾患により糖鎖構造の変化した糖タンパク質は、いわば翻訳後修飾異性体とも呼べるだろう。

生体内の糖鎖バイオマーカー（翻訳後修飾異性体）は極めて微量なはずである。特に、癌の早期診断マーカーは、早期であればあるほどその量は極めて微量であり、いきなり血清から探索しても発見には至らない。そこで、これまで開発した技術を駆使して、図6にあるように癌マーカー開発戦略を提案した。

- ①まず癌組織、非癌組織からRNAを抽出しReal-time PCR法により網羅的に糖鎖遺伝子の発現量を調べる。結果、癌において変化している糖鎖構造が推定できる。
- ②癌組織から抽出された総糖タンパク質、培養癌細胞が分泌する総糖タンパク質の糖鎖をレクチンマイクロアレイにより糖鎖プロファイル比較解析を行う。特徴的なレクチンをプローブとして選び出す。

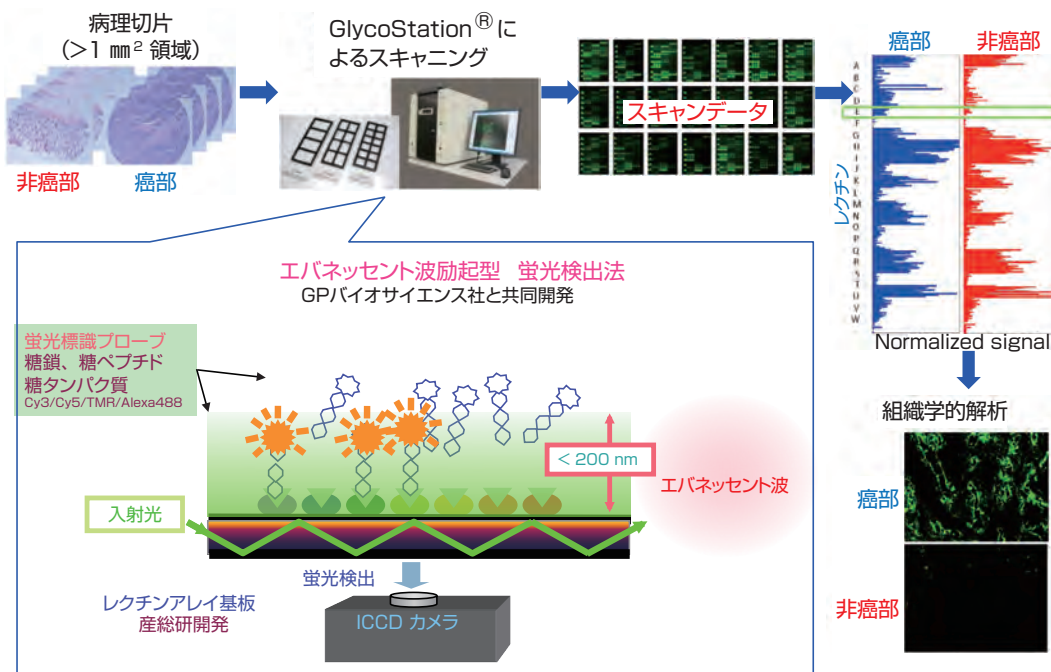


図5 レクチンマイクロアレイ
使用例：微小組織切片中糖タンパク質の比較糖鎖解析でエンリッチに有用なレクチンを絞り込む。

- ③その選択されたレクチンを用いて、LC/MS/IGOT法により網羅的に癌マーカー候補の糖タンパク質を同定する。この時点で数百以上におよぶ候補分子が同定される。
- ④血清中のマーカーを検出するには、もともと血清中に分泌量の多い糖タンパク質が有利である。バイオインフォーマティクスを用いて、(i) 各種の候補糖タンパク質の血清量を推定し、量の多いものを選ぶ。(ii) 目的の組織から分泌されているかどうか。目的の組織以外からも多量に分泌されている場合は、血清中で薄まってしまうので避ける。(iii) *N*-グリカン、*O*-グリカンの結合サイトが多いかどうか、多いものほどプローブとの結合力が高まるから、多いものから選ぶ。これらのパラメーターから候補分子に優先順位を付ける。
- ⑤優先順位にしたがって市販の抗体を購入し、候補分子である糖タンパク質のウエスタン解析を行い、血清中の量を推測する。
- ⑥この時点で有力な候補を選び出し、免疫沈降により粗精製する。粗精製した分子をもう一度、レクチンマイクロアレイにより解析し、癌患者と対象者との間でレクチンプロファイルの最も異なるレクチンAを選び出す。
- ⑦市販の抗体は結合力が弱いものが多いので、その場合は、目的の糖タンパク質のタンパク部分に対して、自ら抗体を作製し直す。
- ⑧強い結合力と特異性をもつ抗体の作製の後、抗体と糖鎖に対するプローブ（例えばレクチンA）のサンドイッチ・キットを開発し、100以上のサンプルで検証をする。
- ⑨統計解析により、既存のマーカーよりも良い成績が得られたなら、1,000以上の多数検体での評価を行う。
- ⑩さらにMSⁿにより糖鎖構造の変化を検出する。患者サンプルは微量しか手に入らないことが多いので、MSⁿにより患者サンプルの糖鎖構造を同定することが難しい。その

場合は、培養癌細胞が同じレクチン反応性を示すことを確認した後、培養細胞上清から目的の糖タンパク質を多量に生成した後、MSⁿにより糖鎖構造を決定する。

- ⑪この段階で、全国の臨床医に協力を求める。多数の臨床医に測定してもらい、極めて客観的にデータを作製し、既存のバイオマーカーとの比較の後、連携先の企業が製造承認申請から健康保険承認へと進むことにより、最終的な実用化を目指す。

これまでさまざまな疾患を対象としたが、ここでは成功例として肝線維化マーカー、胆管癌マーカーの開発について次に述べる。

5.2 肝線維化マーカーの開発

肝臓線維化マーカーに関して、現在、連携先企業から製造承認申請の直前まできている。

B型肝炎ウイルス (HBV) とC型肝炎ウイルス (HCV) は共に、感染の後 20 ~ 30 年間に、急性炎症→慢性炎症→肝硬変→肝臓癌の発症の経過をたどる。世界中で数億人にのぼる感染者がいる。日本人口の7%(約8百万人)、中国人口の10%(1億5千万人)が感染者である。感染後炎症により肝実質細胞が壊れ、フィブリン等の線維分子と置き換わることにより、肝臓が硬化していくことを肝線維化とよぶ。線維化の診断は針バイオプシー（生検法）により確定診断されるが、これは患者にとり大きな負担であり、2、3日の入院を余儀なくされる。肝線維化（肝硬化度）の程度により、針バイオプシーによる病理診断の結果、F0（fibrosis 0）、F1、F2、F3、F4の5段階に診断される。線維化が進行するにしたがって、肝臓の発症率は高まっていく。F3は慢性炎症の結果、線維化がかなり進んでいる状態であり、F4はさらに肝硬変にまで至っている状態である。F3までの線維化にはインターフェロンやリバビリン等の薬効が期待できるが、F4に至るとあまり効果が期待で

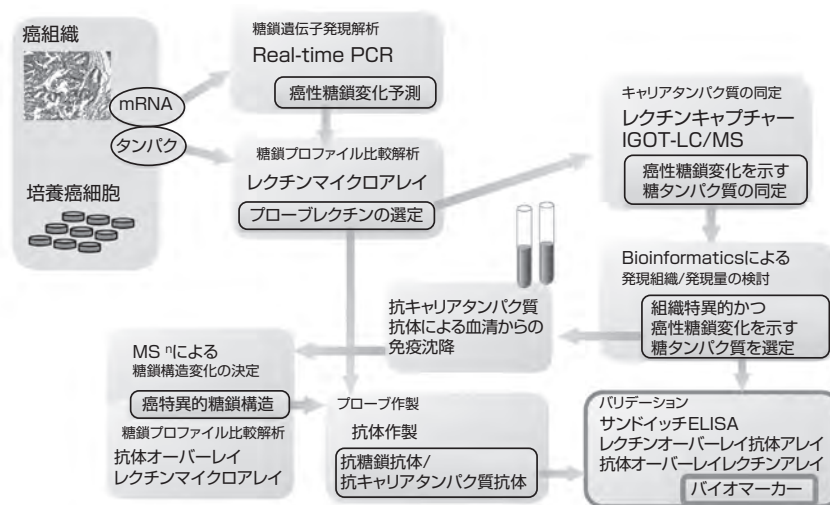


図6 疾患糖鎖バイオマーカー探索の戦略

きない。治療効果の判定のためにも、また肝臓癌の発症を予測するためにも、血液診断により簡便に肝線維化の程度を判断できるバイオマーカーが開発されなければならない。

前述した我々の開発戦略にのっとり、alpha-1 acid glycoprotein (AGP) が線維化マーカーの筆頭にあげられた。AGPは血液中に豊富な糖タンパク質であり、主に肝臓から血中に分泌されるので、肝臓の線維化状態をよく反映するに違いない。5本のN-グリカンをもつのでレクチンとの結合力も強いはずである。線維化に伴ってAGPの糖鎖構造が変化することが古くから知られていた。バイオプシーにより線維化レベルが診断されている患者血清が臨床医から提供された。AGPを免疫沈降し、レクチンアレイで解析することにより、F3とF4を鑑別するのに最適なレクチンが選出された。AOL、MAL、DSAの3種のレクチンにより、極めて高い精度で線維化レベルを判断できることが分かった^{[41][42]}。(株)シスメックス社との共同研究により、抗AGP抗体とそれぞれ3種のレクチンとのサンドイッチ系を組み上げ、HISCL((株)シスメックス社が生産している血清生化学検査の自動分析装置)機器に適應させた。これによりわずか17分で1サンプルを測定できる。しかしAGPも臨床診断にするには最適ではなかった。血清からAGPを免疫沈降する必要があり、この前処理に2時間を要する。前処理を要せず、血清を直接にHISCLで測定できる糖タンパク質分子をさらに探索したところ、X(未発表なので分子名は出せない)という分子を発見した。X分子上の糖鎖をYという特別なレクチンで検出すると、見事に肝線維化度を反映した。Xに対するモノクローナル抗体を作成し、抗X抗体-レクチンYのサンドイッチアッセイ系を組み上げ、前処理なしに血清を直接にHISCLにより17分間で測定できる。これが実用化されれば、患者さんが外来を訪れ、まず採血をして線維化を測定する。医師の診察を受ける時には、すでに当日の線維化レベルの値が医師の手元にある。

5.3 胆管癌マーカーの開発

画像診断により肝臓内に腫瘍が認められた場合、肝内の胆管上皮より発症する肝内胆管癌は、肝細胞由来の肝細胞癌と鑑別されなければならない。管内胆管癌は予後が悪く、治療指針も肝細胞癌とは全く異なる。

前述した癌マーカー探索の開発戦略にのっとり、まず胆管癌組織をマイクロダイセクションにて癌部、非癌部より直径1mmの小さな組織片をかきとった。糖タンパク質抽出液を蛍光ラベルしてレクチンアレイにより解析した結果、WFAレクチンのシグナルの差が癌部、非癌部の間で顕著であった。IGOT法により、WFAに結合する胆管癌マーカー

の候補分子を多数(230種類の糖タンパク質)同定した。これらの分子を、バイオインフォーマティクス手法により、血中量が多いと思われる順番に優先順位を付けた。上位10位までの糖タンパク質に対する抗体を購入して、胆管癌患者の胆汁中および血清中の量をウエスタン解析および免疫沈降により推測した。患者の癌組織を免疫染色することにより、標的分子が確かに癌細胞により産生されていることを確認した。現在、抗MUC1抗体&WFA、抗protein Y&WFAの二通りのアッセイ系を確立し、胆管癌患者の胆汁中のマーカー量を測定した。現在、最も用いられている胆汁中の癌細胞検出率は、わずか20-30%の低い診断率であるが、我々の診断法は、85-90%にもおよぶ高い正診率を示した^[43]。この方法論は、胆汁のみでなく患者血清を用いても有効であることが判明しつつある。

6 おわりに

全く同様の方法論を用いて、他種の癌に対しても癌マーカーの開発を進めている。肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌等の癌マーカー開発に向け、臨床診断に真に役立つマーカー開発の成功を収めたい。

疾患バイオマーカー開発に最も重要な点は、信頼のおける臨床医との綿密な共同研究体制である。次の点を熟慮しながら研究を進める必要がある。①臨床サイドで真に必要なとされるマーカーはどのようなものか、②そのためには、何と何を比較対象にすべきか。それ用のサンプルセットを臨床医が準備できるかどうか。③病歴のはっきりとした患者のサンプルを臨床医が保存しているかどうか。④可能ならば同一患者の長期間に渡る経時的サンプルがあれば極めて有効である。⑤同一患者の治療前、治療後のサンプルも極めて有効である。

癌バイオマーカー探索の悪例を一つ掲げる。末期癌患者の血清中には、癌由来の分子以外に、末期であるが故の悪液質に基づく異常分子が山ほど存在する。末期癌患者と正常人の血清を比較すれば、すぐに数百種類以上にもおよぶ異常分子を発見することができる。しかしそのどれも臨床的に何の役にも立たない。疾患の進展のマーカーとなる「真に役立つバイオマーカー」は、末期癌患者と正常人の比較では見つけることができない。

10年以上にもおよぶ産総研での糖鎖研究は、一生のうちで最も充実した研究人生であった。その要因は、①NEDOを通して潤沢な研究資金を獲得できたこと。②外部からの人材をけっこう自由自在に獲得できたこと。③医学、農学、理学、工学とあらゆる異なる分野の研究者を集めることができたこと。④最初は、30人規模で始めた糖鎖研究が次第に発展し、最後は100人の世帯になり、

目標に向かって一丸となって糖鎖研究に邁進できたこと。

また、糖鎖研究領域のアジア地域での連携も進展させていきたい。11年前に糖鎖遺伝子プロジェクトを開始した時に、10年後の中国における科学の大発展を予想した。10人ほどの中国人のポストドクを雇用し、彼らに一から糖鎖科学を教育した。彼らは、2-3年間で十分な研究成果をあげ、帰国後、中国内の教授職に就き、中国での糖鎖科学発展の中心人物として活躍している。昨年、上海交通大学に産総研糖鎖医工学研究センターの分室を設立し、より一層の共同研究を深めている。頻繁な人的交流を促し、共同研究テーマを推進している。また、産総研への国内、海外からの大学院生、ポストドクの受け入れと教育を通じて、さらに連携を深めていきたい。21世紀はアジアの時代となることは間違いない。糖鎖科学分野でもアジア連携を深めるために、3年前にアジア糖鎖科学コンソーシアム(ACGG)を創設し、つくばで第1回ACGGシンポジウムを開催した。その後、第2回は台北、第3回は上海で開催され、ACGGへの参加者数は急増している。

参考文献

- [1] L. Cheng, K. Tachibana, H. Iwasaki, A. Kameyama, Y. Zhang, T. Kubota, T. Hiruma, K. Tachibana, T. Kudo, J.M. Guo and H. Narimatsu: Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T15, *FEBS Lett.*, 566(1), 17-24 (2004).
- [2] L. Cheng, K. Tachibana, Y. Zhang, J.M. Guo, K. Tachibana, A. Kameyama, H. Wang, T. Hiruma, H. Iwasaki, A. Togayachi, T. Kudo and H. Narimatsu: Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T10, *FEBS Lett.*, 531(2), 115-121 (2002).
- [3] K. Fujimura, H. Sawaki, T. Sakai, T. Hiruma, N. Nakanishi, T. Sato, T. Ohkura and H. Narimatsu: LARGE2 facilitates the maturation of α -dystroglycan more effectively than LARGE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329(3), 1162-1171 (2005).
- [4] M. Gotoh, T. Sato, T. Akashima, H. Iwasaki, A. Kameyama, H. Mochizuki, T. Yada, N. Inaba, Y. Zhang, N. Kikuchi, Y.D. Kwon, A. Togayachi, T. Kudo, S. Nishihara, H. Watanabe, K. Kimata and H. Narimatsu: Enzymatic synthesis of chondroitin with a novel chondroitin sulfate *N*-acetylgalactosaminyltransferase that transfers *N*-acetylgalactosamine to glucuronic acid in initiation and elongation of chondroitin sulfate synthesis, *J. Biol. Chem.*, 277(41), 38189-38196 (2002).
- [5] M. Gotoh, T. Sato, K. Kiyohara, A. Kameyama, N. Kikuchi, Y.D. Kwon, Y. Ishizuka, T. Iwai, H. Nakanishi and H. Narimatsu: Molecular cloning and characterization of β 1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferases IV synthesizing *N,N'*-diacetylglucosamine, *FEBS Lett.*, 562(1-3), 134-140 (2004).
- [6] M. Gotoh, T. Yada, T. Sato, T. Akashima, H. Iwasaki, H. Mochizuki, N. Inaba, A. Togayachi, T. Kudo, H. Watanabe, K. Kimata and H. Narimatsu: Molecular cloning and characterization of a novel chondroitin sulfate glucuronyltransferase that transfers glucuronic acid to *N*-acetylgalactosamine, *J. Biol. Chem.*, 277(41), 38179-38188 (2002).
- [7] J.M. Guo, Y. Zhang, L. Cheng, H. Iwasaki, H. Wang, T. Kubota, K. Tachibana and H. Narimatsu: Molecular cloning and characterization of a novel member of the UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase family, pp-GalNAc-T12, *FEBS Lett.*, 524(1), 211-218 (2002).
- [8] T. Hiruma, A. Togayachi, K. Okamura, T. Sato, N. Kikuchi, Y.D. Kwon, A. Nakamura, K. Fujimura, M. Gotoh, K. Tachibana, Y. Ishizuka, T. Noce, H. Nakanishi and H. Narimatsu: A novel human β 1,3-*N*-acetylgalactosaminyltransferase that synthesizes a unique carbohydrate structure, GalNAc β 1-3GlcNAc, *J. Biol. Chem.*, 279(14), 14087-14095 (2004).
- [9] N. Inaba, T. Hiruma, A. Togayachi, H. Iwasaki, X.H. Wang, Y. Furukawa, R. Sumi, T. Kudo, K. Fujimura, T. Iwai, M. Gotoh, M. Nakamura and H. Narimatsu: A novel I-branching β -1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase involved in human blood group I antigen expression, *Blood*, 101(7), 2870-2876 (2003).
- [10] H. Ishida, A. Togayachi, T. Sakai, T. Iwai, T. Hiruma, T. Sato, R. Okubo, N. Inaba, T. Kudo, M. Gotoh, J. Shoda, N. Tanaka and H. Narimatsu: A novel β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (β 3Gn-T8), which synthesizes poly-*N*-acetylglucosamine, is dramatically upregulated in colon cancer, *FEBS Lett.*, 579(1), 71-78 (2005).
- [11] T. Iwai, N. Inaba, A. Naundorf, Y. Zhang, M. Gotoh, H. Iwasaki, T. Kudo, A. Togayachi, Y. Ishizuka, H. Nakanishi and H. Narimatsu: Molecular cloning and characterization of a novel UDP-GlcNAc:GalNAc-peptide β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (β 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of *O*-glycans, *J. Biol. Chem.*, 277(15), 12802-12809 (2002).
- [12] T. Iwai, T. Kudo, R. Kawamoto, T. Kubota, A. Togayachi, T. Hiruma, T. Okada, T. Kawamoto, K. Morozumi and H. Narimatsu: Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(12), 4572-4577 (2005).
- [13] N. Kikuchi, A. Kameyama, S. Nakaya, H. Ito, T. Sato, T. Shikanai, Y. Takahashi and H. Narimatsu: The carbohydrate sequence markup language (CabosML): an XML description of carbohydrate structures, *Bioinformatics*, 21(8), 1717-1718 (2005).
- [14] N. Kikuchi, Y.D. Kwon, M. Gotoh and H. Narimatsu: Comparison of glycosyltransferase families using the profile hidden Markov model, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310(2), 574-579 (2003).
- [15] T. Kudo, T. Iwai, T. Kubota, H. Iwasaki, Y. Takayama, T. Hiruma, N. Inaba, Y. Zhang, M. Gotoh, A. Togayachi and H. Narimatsu: Molecular cloning and characterization of a novel UDP-Gal:GalNAc(α) peptide β 1,3-galactosyltransferase (C1Gal-T2), an enzyme synthesizing a core 1 structure of *O*-glycan, *J. Biol. Chem.*, 277(49), 47724-47731 (2002).
- [16] H. Mochizuki, K. Yoshida, M. Gotoh, S. Sugioka, N. Kikuchi, Y.D. Kwon, A. Tawada, K. Maeyama, N. Inaba, T. Hiruma, K. Kimata and H. Narimatsu: Characterization of a heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase-5, an enzyme synthesizing a tetrasulfated disaccharide, *J. Biol. Chem.*, 278(29), 26780-26787 (2003).
- [17] H. Narimatsu: Construction of a human glycogene library and comprehensive functional analysis, *Glycoconj. J.*, 21(1-2), 17-24 (2004).
- [18] H. Narimatsu: Human glycogene cloning: focus on β 3-glycosyltransferase and β 4-glycosyltransferase families, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 16(5), 567-575 (2006).
- [19] C. Peng, A. Togayachi, Y.D. Kwon, C. Xie, G. Wu, X. Zou, T.

- Sato, H. Ito, K. Tachibana, T. Kubota, T. Noce, H. Narimatsu and Y. Zhang: Identification of a novel human UDP-GalNAc transferase with unique catalytic activity and expression profile, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402(4), 680-686 (2010).
- [20] T. Sato, M. Gotoh, K. Kiyohara, T. Akashima, H. Iwasaki, A. Kameyama, H. Mochizuki, T. Yada, N. Inaba, A. Togayachi, T. Kudo, M. Asada, H. Watanabe, T. Imamura, K. Kimata and H. Narimatsu: Differential roles of two *N*-acetylgalactosaminyltransferases, CSGalNAcT-1, and a novel enzyme, CSGalNAcT-2. Initiation and elongation in synthesis of chondroitin sulfate, *J. Biol. Chem.*, 278(5), 3063-3071 (2003).
- [21] T. Sato, M. Gotoh, K. Kiyohara, A. Kameyama, T. Kubota, N. Kikuchi, Y. Ishizuka, H. Iwasaki, A. Togayachi, T. Kudo, T. Ohkura, H. Nakanishi and H. Narimatsu: Molecular cloning and characterization of a novel human β 1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase, β 4GalNAc-T3, responsible for the synthesis of *N,N'*-diacetyllactosylamine, galNAc β 1-4GlcNAc, *J. Biol. Chem.*, 278(48), 47534-47544 (2003).
- [22] T. Sato, M. Sato, K. Kiyohara, M. Sogabe, T. Shikanai, N. Kikuchi, A. Togayachi, H. Ishida, H. Ito, A. Kameyama, M. Gotoh and H. Narimatsu: Molecular cloning and characterization of a novel human β 1,3-glucosyltransferase, which is localized at the endoplasmic reticulum and glucosylates *O*-linked fucosylglycan on thrombospondin type 1 repeat domain, *Glycobiology*, 16(12), 1194-1206 (2006).
- [23] A. Togayachi, T. Akashima, R. Ookubo, T. Kudo, S. Nishihara, H. Iwasaki, A. Natsume, H. Mio, J. Inokuchi, T. Irimura, K. Sasaki and H. Narimatsu: Molecular cloning and characterization of UDP-GlcNAc:lactosylceramide β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (β 3Gn-T5), an essential enzyme for the expression of HNK-1 and Lewis X epitopes on glycolipids, *J. Biol. Chem.*, 276(25), 22032-22040 (2001).
- [24] A. Togayachi, N. Kikuchi, T. Kudo and H. Narimatsu: Comprehensive study on glycosyltransferases which determine glycosylation, *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 48(11 Suppl), 1542-1549 (2003).
- [25] A. Togayachi, T. Sato and H. Narimatsu: Comprehensive enzymatic characterization of glycosyltransferases with a β 3GT or β 4GT motif, *Methods Enzymol.*, 416, 91-102 (2006).
- [26] H. Wang, K. Tachibana, Y. Zhang, H. Iwasaki, A. Kameyama, L. Cheng, JM. Guo, T. Hiruma, A. Togayachi, T. Kudo, N. Kikuchi and H. Narimatsu: Cloning and characterization of a novel UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase, pp-GalNAc-T14, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300(3), 738-744 (2003).
- [27] T. Yada, M. Gotoh, T. Sato, M. Shionyu, M. Go, H. Kaseyama, H. Iwasaki, N. Kikuchi, YD. Kwon, A. Togayachi, T. Kudo, H. Watanabe, H. Narimatsu and K. Kimata: Chondroitin sulfate synthase-2: molecular cloning and characterization of a novel human glycosyltransferase homologous to chondroitin sulfate glucuronyltransferase, which has dual enzymatic activities, *J. Biol. Chem.*, 278(32), 30235-30247 (2003).
- [28] T. Yada, T. Sato, H. Kaseyama, M. Gotoh, H. Iwasaki, N. Kikuchi, YD. Kwon, A. Togayachi, T. Kudo, H. Watanabe, H. Narimatsu and K. Kimata: Chondroitin sulfate synthase-3: molecular cloning and characterization, *J. Biol. Chem.*, 278(41), 39711-39725 (2003).
- [29] Y. Zhang, H. Iwasaki, H. Wang, T. Kudo, T.B. Kalka, T. Hennet, T. Kubota, L. Cheng, N. Inaba, M. Gotoh, A. Togayachi, J. Guo, H. Hisatomi, K. Nakajima, S. Nishihara, M. Nakamura, J.D. Marth and H. Narimatsu: Cloning and characterization of a new human UDP-*N*-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc α -serine/threonine antigen, *J. Biol. Chem.*, 278(1), 573-584 (2003).
- [30] K. Amano, Y. Chiba, Y. Kasahara, Y. Kato, M.K. Kaneko, A. Kuno, H. Ito, K. Kobayashi, J. Hirabayashi, Y. Jigami and H. Narimatsu: Engineering of mucin-type human glycoproteins in yeast cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(9), 3232-3237 (2008).
- [31] H. Ito, A. Kuno, H. Sawaki, M. Sogabe, H. Ozaki, Y. Tanaka, M. Mizokami, J. Shoda, T. Angata, T. Sato, J. Hirabayashi, Y. Ikehara and H. Narimatsu: Strategy for glycoproteomics: identification of glyco-alteration using multiple glycan profiling tools, *J. Proteome Res.*, 8(3), 1358-1367 (2009).
- [32] M.K. Kaneko, Y. Kato, A. Kameyama, H. Ito, A. Kuno, J. Hirabayashi, T. Kubota, K. Amano, Y. Chiba, Y. Hasegawa, I. Sasagawa, K. Mishima and H. Narimatsu: Functional glycosylation of human podoplanin: glycan structure of platelet aggregation-inducing factor, *FEBS Lett.*, 581(2), 331-336 (2007).
- [33] Y. Kato, M.K. Kaneko, A. Kuno, N. Uchiyama, K. Amano, Y. Chiba, Y. Hasegawa, J. Hirabayashi, H. Narimatsu, K. Mishima and M. Osawa: Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349(4), 1301-1307 (2006).
- [34] H. Ito, A. Kameyama, T. Sato, K. Kiyohara, Y. Nakahara and H. Narimatsu: Molecular-weight-tagged glycopeptide library: efficient construction and applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44(29), 4547-4549 (2005).
- [35] H. Ito, A. Kameyama, T. Sato, M. Sukegawa, H.K. Ishida and H. Narimatsu: Strategy for the fine characterization of glycosyltransferase specificity using isotopomer assembly, *Nat. Methods*, 4(7), 577-582 (2007).
- [36] H. Kaji, H. Saito, Y. Yamauchi, T. Shinkawa, M. Taoka, J. Hirabayashi, K. Kasai, N. Takahashi and T. Isobe: Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify *N*-linked glycoproteins, *Nat. Biotechnol.*, 21(6), 667-672 (2003).
- [37] H. Kaji, Y. Yamauchi, N. Takahashi and T. Isobe: Mass spectrometric identification of *N*-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging, *Nat. Protoc.*, 1(6), 3019-3027 (2006).
- [38] A. Kuno, Y. Kato, A. Matsuda, M.K. Kaneko, H. Ito, K. Amano, Y. Chiba, H. Narimatsu and J. Hirabayashi: Focused differential glycan analysis with the platform antibody-assisted lectin profiling for glycan-related biomarker verification, *Mol. Cell Proteomics*, 8(1), 99-108 (2009).
- [39] A. Kuno, A. Matsuda, Y. Ikehara, H. Narimatsu and J. Hirabayashi: Differential glycan profiling by lectin microarray targeting tissue specimens, *Methods Enzymol.*, 478, 165-179 (2010).
- [40] H. Narimatsu, H. Sawaki, A. Kuno, H. Kaji, H. Ito and Y. Ikehara: A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics, *FEBS J.*, 277(1), 95-105 (2010).
- [41] A. Kuno, Y. Ikehara, Y. Tanaka, T. Angata, S. Unno, M. Sogabe, H. Ozaki, K. Ito, J. Hirabayashi, M. Mizokami and H. Narimatsu: Multilectin assay for detecting fibrosis-specific glyco-alteration by means of lectin microarray, *Clin. Chem.*, 57(1), 48-56 (2011).
- [42] A. Kuno, Y. Ikehara, Y. Tanaka, K. Saito, K. Ito, C. Tsuruno,

S. Nagai, Y. Takahama, M. Mizokami, J. Hirabayashi and H. Narimatsu: LecT-Hepa: a triplex lectin-antibody sandwich immunoassay for estimating the progression dynamics of liver fibrosis assisted by a bedside clinical chemistry analyzer and an automated pretreatment machine, *Clin. Chim. Acta*, 412(19-20), 1767-1772 (2011).

- [43] A. Matsuda, A. Kuno, T. Kawamoto, H. Matsuzaki, T. Irimura, Y. Ikehara, Y. Zen, Y. Nakanuma, M. Yamamoto, N. Ohkohchi, J. Shoda, J. Hirabayashi and H. Narimatsu: Wisteria floribunda agglutinin-positive mucin 1 is a sensitive biliary marker for human cholangiocarcinoma, *Hepatology*, 52(1), 174-182 (2010).

執筆者略歴

成松 久(なりまつ ひさし)

1974年慶應義塾大学医学部卒業、同年医師免許取得。1979年慶應義塾大学医学研究科大学院・微生物学専攻・修了(医学博士)。1991年慶應義塾大学医学部助教授、同年4月創価大学・生命科学研究所・教授、2001年産業技術総合研究所分子細胞工学研究部門総括研究員を経て2006年産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センター研究センター長、現在に至る。筑波大学・医学医療系・連携大学院教授、慶應義塾大学・医学部・客員教授、中国・上海交通大学・顧問教授を兼務。専門分野は、糖鎖生物学、生化学、免疫学、微生物学、腫瘍生物学。2007年に日経BP技術賞、2010年に化学バイオつくば賞、2011年につくば賞を受賞。日本糖質学会評議員、日本糖鎖科学コンソーシアム常任理事、国際プロテオーム学会(HUPO)理事、日本プロテオーム学会(JHUPO)理事、日本生化学会評議員、日本分子腫瘍マーカー研究会評議員、日本学術会議連携会員、日本癌学会所属。



査読者との議論

議論1 全般

コメント(小野 晃:産業技術総合研究所)

糖鎖という新しい領域を先駆的に開拓してきた研究に関して、その全体戦略(シナリオ)が明確に記述されています。また必要な要素技術を適切に選択し、それぞれの開発についても大きな成果をあげています。さらに要素技術を統合し、癌診断技術を構成していったプロセスも優れたものです。

糖鎖という新しい領域を今後開拓するために、多くの研究者・技術者が容易に使えるような基盤ツールの開発を第1の研究目標に掲げたことは素晴らしいことと思います。とかく実がなっている木の下は足の踏み場もないくらいに混み合い、流行りの領域で研究のエンドユーザーにはなりたがるのに、種をまいたり、苗木を育てたりする基盤的な研究にはあまり興味を示さない研究者が多い中で、この研究は先駆的な研究のあるべき姿を示したものと称賛されます。

また図2にあるような機能、合成、構造からなる3本柱のシナリオを最初にしっかりとたてたことが、その後の研究の着実な進展を支えたように思います。明確なシナリオに基づく大規模なプロジェクトを遂行するためには、6章「おわりに」で著者が述べているように、産総研の研究センターのように大規模な研究組織が一丸となって10年という長期間取り組むことが必要だったと思います。

コメント(湯元 昇:産業技術総合研究所)

分野融合的に糖鎖構造解析のための要素技術を開発し、疾患バイオマーカーの実用化に向けてシナリオをもって要素技術を統合したことは優れた第2種基礎研究の事例となっていると思います。

議論2 基盤ツールの国内外での活用事例

質問(小野 晃)

この研究で開発された基盤ツールが国内外で広く利用されることで、糖鎖研究がさらに加速されることを期待します。現状国内外の他の研究機関や企業でこの研究の成果がどのように活用されているか、著者が知る限りで結構ですので、事例を紹介していただけないでしょうか。また国内外の他機関との共同研究のような形をとっているのでしょうか。差し支えない範囲でお教え願います。

回答(成松 久)

産総研で開発した基盤ツールの外部への波及に関して、筆者の知る範囲で一部を以下のようにリストとしてまとめました。

糖鎖遺伝子

- ・約30遺伝子の特許出願を行い、そのうち13遺伝子についてはグライコジーン社に実施許諾しました。
- ・特許に関連しない糖鎖遺伝子を国内外20研究機関に配布するとともに、より広範囲な研究機関に配布するため(独)製品評価技術基盤機構(NITE)に寄託しています。
- ・我々が開発した糖鎖遺伝子のデータベースであるGGDBへの年間アクセス数は172,570件(平成23年度)あります。
- ・糖鎖遺伝子のノックアウトマウス13種を作製し、疾患モデルマウスとしての応用を目指し国内5機関、海外3機関との共同研究を実施しています。
- ・糖転移酵素を活用した糖鎖合成を行い、糖鎖アレイ等への応用を目指した共同研究を国内外の研究機関と実施しています。
- ・酵母で発現した安価な糖転移酵素を用いて、某企業と糖タンパク質合成の共同研究を行っています。
- ・上記の共同研究の成果として多数の論文発表を行っています。

レクチンマイクロアレイ

- ・GPバイオサイエンス社が実用化しました。
- ・すでに数十件の関連論文が外部機関から出されていますが、下記に極めてインパクトのある3件を記載しました。例えば、京都大学山中伸弥教授がiPS細胞の評価に使っている例としてYC. Wang *et al.*: Specific lectin biomarkers for isolation of human pluripotent stem cells identified through array-based glycomic analysis, *Cell Res.*, 21(11), 155-1563 (2011).
- それ以外には、EL. Bird-Lieberman *et al.*: Molecular imaging using fluorescent lectins permits rapid endoscopic identification of dysplasia in Berrett's esophagus, *Nature Medicine*, 18(2), 315-321 (2012).
- SA. Fry *et al.*: Lectin microarray profiling of metastatic breast cancers, *Glycobiology*, 21(8), 1060-1070 (2011).
- ・レクチンに関するデータベースであるLfDBへの年間アクセス数は23,605件(平成23年度)ありました。
- ・産総研から、レクチンアレイを用いた糖鎖バイオマーカーに関する特許を7件出願済みです。

質量分析による糖鎖構造解析

- ・すでに島津製作所/三井情報から解析システムを販売しています。カタル、北京、上海、アメリカに各1台、国内で3台(国立がんセンター、岐阜大学、JADAに各1台)販売実績があります。
- ・糖鎖構造解析に関連する二つのDBの年間アクセス数は、GMDBが18,256件、GPDBが36,729件(平成23年度)ありました。
- ・糖鎖構造解析の共同研究の成果は多数ありますが、下記に主な発表論文を記します。T. Fukuda *et al.*: α 1,6-fucosyltransferase-deficient mice exhibit multiple behavioral abnormalities associated with a schizophrenia-like phenotype: importance of the balance between the dopamine and serotonin systems, *J. Biol. Chem.*, 286(21), 18434-18443 (2011).

N. Watanabe *et al.*: Clinicopathological features of 171 cases of primary thyroid lymphoma: a long-term study involving 24 553 patients with Hashimoto's disease, *Br. J. Haematol.*, 153(2), 236-243 (2011).

T. Nakagawa *et al.*: Glycomic analyses of glycoproteins in bile and serum during rat hepatocarcinogenesis, *J. Proteome Res.*, 9(10), 4888-4896 (2010).

N. Sasaki *et al.*: High levels of E4-PHA-reactive oligosaccharides: potential as marker for cells with characteristics of hepatic progenitor cells, *Glycoconj. J.*, 26(9), 1213-1223 (2009).

H. Suzuki *et al.*: Computationally and experimentally derived general rules for fragmentation of various glycosyl bonds in sodium adduct oligosaccharides, *Anal. Chem.*, 81(3), 1108-1120 (2009).

H. Shirato *et al.*: Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding, *J. Virol.*, 82(21), 10756-10767 (2008).

YY. Fan *et al.*: Identification of further elongation and branching of dimeric type 1 chain on lactosylceramides from colonic adenocarcinoma by tandem mass spectrometry sequencing analyses, *J. Biol. Chem.*, 283(24), 16455-16468 (2008).

T. Nishie *et al.*: Development of IgA nephropathy-like disease with high serum IgA levels and increased proportion of polymeric IgA in β -1,4-galactosyltransferase-deficient mice, *Contrib. Nephrol.*, 157, 125-128 (2007).

T. Nishie *et al.*: Development of immunoglobulin A nephropathy-like disease in β -1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice, *Am. J. Pathol.*, 170(2), 447-456 (2007).

J. Iijima *et al.*: Cell-cell interaction-dependent regulation of *N*-acetylglucosaminyltransferase III and the bisected *N*-glycans in GE11 epithelial cells. Involvement of E-cadherin-mediated cell adhesion, *J. Biol. Chem.*, 281(19), 13038-13046 (2006).

定量PCR

・共同研究で2件の論文発表があります。

K. Moriwaki *et al.*: Combination use of anti-CD133 antibody and SSA lectin can effectively enrich cells with high tumorigenicity, *Cancer Sci.*, 102(6), 1164-1170 (2011).

M. Miyata *et al.*: Membrane sialidase NEU3 is highly expressed in human melanoma cells promoting cell growth with minimal changes in the composition of gangliosides, *Cancer Sci.*, 102(12), 2139-2149 (2011).

・共同研究で特許1件を出願済みです（阪大、名大、GPバイオサイエンスと共願）。