【解説】

細胞を用いる糖鎖生産

畑中研一

本稿では「細胞」を糖鎖の生産工場に見立て、「物質」としての糖鎖を生産する方法について紹介する。細胞を用いる糖鎖生産法では、極微量に存在する糖転移酵素を精製する必要もなく、糖ヌクレオチドという高価な基質を添加する必要もない。適当なアルキルグリコシドを培地に添加するだけで、糖鎖伸長生成物が培地中に放出されるという誰にでも利用できる簡単な方法である。さらに、予め官能基を導入できることについても紹介する。

糖鎖が核酸とタンパク質に続く第3の生命分子鎖と呼ばれて久しく、様々な研究が行なわれ、数々の学術論文誌に報告されてきたが、実際の医療現場や産業用途で目にするには滅多にないのが現状である。糖の官能基（主にヒドロキシル基）が複数個あるため糖鎖が枝分れを含む複雑な分子構造をしていることが利用しにくい一つの要因と考えられるが、糖鎖の生産工程が確立していないことが実用化開発研究の障害になっていることが大きな原因であろう。

核酸やペプチド鎖を合成するには自動合成器があり、だれでも比較的簡単に目的物を得ることができる。特に核酸の場合は少量あれば増幅することが可能であり、バクテリアを用いてリコンビナントタンパク質を大

量生産することも可能である。ところが糖鎖は、構成糖と同数の酵素（糖転移酵素）が必要であり、それぞれの酵素が働く順番や酵素どうしの力関係（どちらの反応が優先的に起こるかということ）が遺伝子の支配下にならないため、リコンビナントDNAを有する大腸菌を使って自動的に糖鎖を大量合成することは不可能に近い。

たとえば血液型糖鎖の場合、AB型のヒトはA型糖鎖をつくる酵素とB型糖鎖をつくる酵素の両方を持っている（図1）。換言すれば、A型糖鎖をつくる酵素をコードする遺伝子とB型糖鎖をつくる酵素をコードする遺伝子をもっている（したがって、血液型は親から受け継いだ遺伝情報によって決まる）。A型糖鎖をつくる酵素とB型糖鎖をつくる酵素は両方とも糖転移酵素（糖を転移して糖鎖を構築する酵素）であり、それぞれN-アセチルガラクトサミン転移酵素（GalNAcT）とガラクトース転移酵素（GalT）と呼ばれるが、N-アセチルガラクトサミンやガラクトースの受け取り手（アクセプター）は両方ともH型糖鎖（フコース-ガラクトース-N-アセチルグルコサミン、血液型で言うとO型の糖鎖）である。したがって、共通のアクセプターであるH型糖鎖は2種類の酵素（GalNAcTとGalT）によって競争的に反応に用いられる。しかし、反応の結果得られるA型糖鎖とB型糖鎖の量的な関係は遺伝情報には記載されてい

Saccharide Production by Using Cells
Kenichi HATANAKA, 東京大学生産技術研究所

図1 ■ 血液型糖鎖（A型、B型、H型、いずれも type 1）の末端部分

い、少なくとも糖供与体（ドナー）である糖ヌクレオチド（UDP-GalNAc と UDP-Gal）の存在量が、合成される血液型糖鎖の量比に関連していると考えられる。

ここに示した血液型糖鎖の場合には、並列の反応であるため、酵素を別々に精製し、別々の酵素反応で合成した A 型糖鎖と B 型糖鎖を混合すれば問題は解決するが、2 種類以上の酵素が直列に（順番に）働くようなより複雑な糖鎖合成では、多段階の酵素反応が順序良く起こる必要があり、遺伝子導入によるリコンビナント糖鎖の大量合成はきわめて難しいと考えられる。

糖鎖生産

現在主に用いられている糖鎖の生産方法は 3 種類が挙げられる。天然物からの抽出、有機合成、酵素による合成である。天然物中に多量に存在する多糖類やその加水分解物（低分子量オリゴ糖）などは抽出による生産が適している。多糖類は、1 種類または 2 種類の酵素が繰り返し作用することにより糖鎖が合成される点が特徴であり、それが天然に多量に存在できる理由でもある（図 2-A）。これに対して、複合糖質糖鎖のように幾種類もの糖が各々異なる結合で繋がっているオリゴ糖鎖は、多種類の酵素が順番に働くことによってつくられる複雑な構造を有しており（図 2-B）、天然物中には少量しか存在しないため、化学合成や酵素合成によって生産するのが一般

的である。

糖鎖合成の一般的な方法の一つは化学合成法である。糖鎖は「グリコシド結合」と呼ばれるアセタール結合によって結合しており、糖鎖の化学合成ではこのグリコシド結合を化学反応によって形成することになる。ところが、グリコシド結合を形成可能なヒドロキシル基が糖分子に複数個存在することから、反応に関与しないヒドロキシル基は予め保護基を導入してブロックしておくことが必要となる。また、形成されるグリコシド結合が α 結合なのか β 結合なのかを制御することの困難さを伴う。合成するオリゴ糖が複雑であればあるほど、位置選択的な保護基の導入、立体特異的なグリコシル化反応などの操作が複雑に絡み合い、数十段階の化学反応で全体の収率が 1% 以下の合成となってしまう。このように化学合成法は「職人技の必要な糖鎖合成法」であり、糖鎖合成をしたことのない研究者にとってはハードルが高いといえる。ただし、比較的簡単な構造のオリゴ糖を大量に合成するときには、化学合成法が適している。

一方、保護基を導入する必要がなく、立体配置 (α , β) の制御も必要ないという便利な合成法が酵素合成法である。加水分解酵素の逆反応を利用する方法は、適用できる酵素の種類が限られており、現時点では、単純な構造の糖鎖を合成するときに適用可能である。また、糖転移酵素を利用する反応（生体内で行なわれているのと同じ反応）は、適用範囲が広いと考えられるが、多種類の酵

図4 ■ アルキル鎖の長さや細胞膜への作用

溶解した糖鎖プライマーを培地中に添加する)が細胞内に取り込まれる必要がある。長鎖アルキルグリコシドは細胞膜(脂質二分子膜)に突き刺さり、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後、ゴルジ体などの膜に到達する。アルキルグリコシドが細胞膜に突き刺さるためにはある程度の疎水性が必要であり、炭素鎖6以下のアルキルグリコシドでは細胞内にほとんど取り込まれない。

ゴルジ体に到達した長鎖アルキルグリコシドは、膜上に存在する糖転移酵素によって修飾(糖鎖伸長)を受ける。この際、ドナー基質である(UDP-ガラクトースやCMP-シアル酸などの)糖ヌクレオチドを外から加える必要がなく、細胞内で生成した基質を用いることができる点は便利である。

さらに、糖鎖が伸長した生成物は細胞膜表面に運ばれてくるが、そのまま細胞膜に留まるのか、培地中に放出されるのかによって生成物の回収過程に大きな差が生じる。生成物が細胞膜に留まっている場合、生成物を取り出すためには細胞を破壊する必要がある、細胞膜を形成する多量のリン脂質や細胞内成分との分離が厄介である。これに対して、生成物が培地中に放出される場合、生成物の単離は培地成分や原料(糖鎖プライマー)からの分離だけでよく、より簡素化される。細胞膜を形成する主成分であるリン脂質の脂質部分の長さは炭素原子20~24個であるので、それに近い長さの長鎖アルキル基を有するグリコシド化合物は細胞膜に留まると考えられ

る。

以上のようなことを考慮すると、*n*-ドデシル基(炭素数12個)を有するグリコシドが糖鎖生産に最も適しており、細胞内に取り込まれた後、ゴルジ体で糖鎖伸長反応を受け、細胞膜表面から再び培地中に放出される(図4)。すなわち、原料(糖鎖プライマー)と生成物(糖鎖伸長したプライマー)は培地と細胞膜の間を行ったり来たりしているが、培地中や細胞膜中に局在化することなく、存在場所が適度に分配されている(平衡が偏っていない)化合物(たとえば*n*-ドデシルグリコシド)が糖鎖生産に適しているといえよう。ただし、培地中の糖鎖プライマー濃度が臨界ミセル濃度を超えると細胞毒性が極端に強まる。これは、アルキルグリコシドのミセルが細胞膜を直接攻撃して破壊しているのではないかと考えられる。また、*n*-ドデシルグリコシドのうち単糖由来の化合物には非常に強い細胞毒性を示すものがある(たとえば*n*-ドデシルβ-D-グルコピラノシド)ため、糖鎖生産に用いることはできない⁽¹⁾。

細胞の選択による生産性の違い

n-ドデシルラクトシドを糖鎖プライマー(原料)として用いる場合、この化合物は糖脂質合成経路における「ラクトシルセラミド」に位置する。ラクトシルセラミドはそこから伸長される糖鎖の種類によって、グロボ系列、イソグロボ系列、ラクト系列、ネオラクト系列、ガ

ングリオ系列 (a 経路, b 経路, c 経路, α 経路) に成長することが可能な、「分化前の糖脂質」とでも言うべき未成熟の糖脂質である。したがって、細胞の種類や細胞の状態が異なるとドデシルラクトシドを原料として合成される糖鎖のプロフィールも大きく異なるのである。ある細胞では主に 1 種類の生成物を多量に生産し、別の細胞では多種類の生成物を少量ずつ生産するという具合である。たとえば、B16 細胞や SH-SY-5Y 細胞ではラクトースにシアル酸が結合した GM3 型糖鎖が主に生産され、それ以外の生成物はほとんど見られないのに対して、Cos-7 細胞や MDCK 細胞にドデシルラクトシドを投与すると GM3 上にさらに糖鎖が伸長した GM2, GM1, GD1a などが生産される。

ここで気をつけなければならない点は、細胞の「状態」も生成物に影響するという点である。すなわち、同じ種類の細胞を用いたからといって、得られる糖鎖（糖脂質）のプロフィールは同じではない、ということである。このことは一見、糖鎖生産における困難さを示しているようにも思えるが、細胞の状態を制御することによって生産する糖鎖の種類や量を制御することが可能であるということにもなる。

培養条件による生産性の違い

物質の生産技術を構築する際に考慮すべき指標として「生産量」と「生産効率」の 2 つが挙げられる（もちろんコストなども重要であるが、別途考えることとする）。キログラムやトンのオーダーでの物質生産では生産効率が重要であることは言うまでもないが、ミリグラム以下のスケールでの物質生産においては、生産効率とともに生産量そのものの値も重要である。すなわち、容量が 7 ml のディッシュでの培養によって生産される物質量が 1 ng である場合、1 mg の物質を得るためには 100 万倍のスケールアップが必要となり、単なるスケールアップではなく、別の技術導入が必要となってくる。7 kl の培養器（1 辺が 2 m の立方体の体積が 8 kl）を使って 1 mg の物質を生産しようというのは少々乱暴であろう。

ドデシルラクトシド（糖鎖プライマー）について考える場合、50~100 μM の濃度では、細胞毒性を示さない（臨界ミセル濃度は約 100 μM ）。プライマー濃度が 100 μM で糖鎖生産を行なうとすると、培地 7 ml 中には 0.7 μmol (357 μg) の糖鎖プライマーが存在する。仮に生産効率が 30% だとすると、1 mg 程度の生産量を得るためには 10 枚程度のディッシュ培養を行なうことになり、現実的に可能である（実際には細胞内での糖鎖付与に

よって分子量が増加するので、10 枚より少ない枚数で足りる）。逆算すると、生産効率が数% の糖鎖であればディッシュ培養で生産することが可能といえよう。

細胞数や培養時間も糖鎖生産に影響する。コンフルエントになるまでは、糖鎖の生産量は、培養細胞数にほぼ比例する。コンフルエントな状態を超えた細胞数になると、細胞の塊が盛り上がり、死細胞数も増えるが、糖鎖の生産にはそれほど影響しない。つまり、多少の細胞死が起こるような状態でも糖鎖の生産が起こることであり、細胞の生存にとって糖鎖が必須であることの証明にもなるであろう。また、培養時間も長いほど糖鎖の生産量が増加する。ただし、時間の経過とともに原料（糖鎖プライマー）や生産物の加水分解反応も進むため、培地中の糖鎖プライマーが減ってくると糖鎖の生産量も頭打ちとなる。そのため、培地中に糖鎖プライマーを新たに添加すると、糖鎖の生産量は再び増加する。

前述したように、 n -ドデシル基を有するグリコシドは細胞内に取り込まれ、ゴルジ体での糖鎖伸長後に細胞外（培地中）に放出されるが、このことは糖鎖の生産量を増やすことにもつながっていると考えられる。すなわち、合成された糖鎖伸長化合物が細胞外に放出されることによって、ゴルジ体の酵素は糖鎖伸長を盛んに行ない、糖鎖をつくり続ける。

糖鎖の精製と構造決定

物質生産において最も重要なプロセスの一つが精製である。化学合成においても副生成物の中から目的とする化合物を取り出すのは大変な作業であるが、バイオプロセスから得られる生成物中には生体由来の化合物が含まれるため、より複雑で困難になる。収率の低い化合物を単離するのはさらに難しくなる。ところが、プライマー法による糖鎖合成では、得られる物質が糖脂質類似の化合物、すなわち両親媒性の化合物であるので、比較的簡単に精製できる。たとえば、疎水性の吸着剤に吸着させて親水性の化合物を洗い流した後に、水より疎水性の強い溶媒（たとえばメタノール）と水との混合溶媒を用いて両親媒性化合物を流出させることによって、糖脂質類似体を得ることが可能である。その後、シリカゲルクロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー⁽²⁾などを用いて、個々の両親媒性化合物（糖鎖プライマー由来の生成物および細胞由来の内在性糖脂質）を分離する。

筆者らは、主に遠心液々分配クロマトグラフィー (CPC) を用いて分離精製を行なっている。CPC は分液

図5 ■ 細胞から得られた糖鎖伸長化合物 (GM3 型糖鎖) の構造決定

ロートを何段も重ねたような原理で分離を行なう、すなわち液相のみを用いるため、化合物の回収率はほぼ100%であり、精製プロセスにおける収率ロスを極力避けたい微量の化合物などを分離する場合に適した方法といえる⁽³⁾。さらに、フッ素を使うと精製はさらに容易になる。プライマー中のアグリコン部位である長鎖アルキル基に多数のフッ素原子を導入しておき、細胞による糖鎖伸長後にフッ素を含む溶媒（フルオラス溶媒）を用いて選択的に抽出する方法である^(4,5)。水も油も寄せつけないテフロン加工のフライパンを思い出せば容易に想像できる。

フルオラス溶媒による抽出はヘビーフルオラス法と呼ばれるが、ライトフルオラス法を用いるとさらに細かい分離を行なうことができる。ライトフルオラス法にはフルオロアルキル基を担持したシリカゲルを用いる方法があるが、プライマー中のフルオラス構造を変化させることによって、流出速度を調整することが可能である。

次に、単離精製物の構造決定を行なう。糖鎖プライマーであるドデシルラクトシドは前述のように多くの脂質類似体の原料となるが、実際にはガラクトシド結合（ガラクトースとグルコースの間の結合）やグルコシド結合（グルコースと長鎖アルキル基の間の結合）が切断された分解生成物も観察される。しかし、分解物にさらに糖鎖が伸長した化合物はこれまでに観察されていないため、原則としてドデシルラクトシドに糖鎖伸長が起こった化合物の構造決定を行えばよいことになる。

解析手段の主役はマスペクトル（MALDI-TOFMSやLC-MSなど）である。伸長した糖鎖が1残基や2残基の場合、プライマーと比較して増加した質量分からヘキソース、アミノ化糖、デオキシ糖、シアル酸などを当

てはめ、生合成経路を考慮して構造を推定する。その後、新たに形成されたグリコシド結合を適当な加水分解酵素を用いて切断することによって生成物の構造を確定する（図5）。伸長した糖鎖が4,5残基以上の複雑な構造をしている場合は、マスペクトルのフラグメントイオン解析と酵素による加水分解反応を組み合わせで解析していく。特にGD1aとGD1bのように分子量が同じでシアル酸の結合位置と結合様式のみが異なる場合には、分子のイオン化の様子が異なり興味深い。一般にシアル酸を含む糖鎖のマスペクトル解析では、ネガティブモードが効果的であり、中性糖の構造解析ではポジティブモードが良好な結果を与える。

官能基の導入

糖鎖プライマー法による糖鎖合成では、細胞内において不活性な官能基を予め分子内に導入することができる。たとえばアジド基は生体不活性であるが、糖鎖伸長の化合物を抽出・精製後に還元してアミノ基に変換することができるため、生成物を機能分子化することが可能となる。一方、アグリコンであるドデシル基内にアジド基が存在すると、細胞膜との親和性などが変化し、糖鎖の生産効率にも影響を及ぼす⁽⁶⁾。筆者らは、これまでにアジド置換された糖鎖プライマーとして、2-アジドドデシル、5-アジドドデシル、12-アジドドデシルラクトシドの3種を合成し、細胞に投与した。細胞の種類によっても異なるが、アジド基の位置が異なる各プライマーの細胞内への取り込みや糖鎖伸長反応は大きく異なる。これは、疎水性のドデシル基が細胞膜に突き刺さっていく際に、アジド基が障害になるかならないかが大きく関

図6 ■ 細胞による糖鎖伸長と糖脂質 (GM3) 類似化合物の合成

わっていると考えられる。いずれの化合物も、還元すること（接触水添またはトリフェニルホスフィンによる還元）によってアジド基をアミノ基に変換することができ、アミノ基を使って様々な分子や材料に結合することが可能であるため、糖鎖修飾分子や糖鎖修飾材料という分野へと発展していくことが期待される。アジド基はアミノ基に変換する以外にも三重結合と反応（クリック反応）させることが可能であり、（爆発性であることを考慮しても）きわめて有効な置換基であるといえる。

アジド基以外の官能基としては二重結合などが考えられるが、これまでの研究では細胞内への取り込みが悪く、糖鎖生産には適さないと思われる。そのような中で、ドデシル基の水素原子のいくつかをフッ素原子で置換した化合物は細胞に取り込まれて糖鎖付与が行なわれる。フッ化炭素は細胞内で不活性である上にフッ素原子の数が増えるとフルオラス性*を発揮するため、生成化合物の分離・精製が簡便化される。

*フッ化炭素どうしが集まる特性で、水とも炭化水素とも混ざらない性質（たとえばテフロン）

糖脂質類似体による生理活性分子の設計

前述のように、アジド基を有するプライマーは、細胞による糖鎖伸長後にアジド基（およびそれを還元したアミノ基）を用いて様々な機能性分子への変換が可能である。ここでは、2-アジドドデシルシアルラクトシド（リソ GM3 類似体）を用いた EGFR（上皮細胞増殖因子受容体）リン酸化阻害剤の開発について紹介する⁽⁷⁾。

2-アジドドデシルラクトシドを B16 マウスメラノーマ細胞の培地中に投与すると、約 30% の高収率でシアル酸が伸長した 2-アジドドデシルシアルラクトシドが得られる。このアジド基をアミノ基へと還元した後、長鎖脂肪酸と縮合させると、ガングリオシド GM3 に類似の化合物が得られる（図 6）。天然の GM3 やその加水分解物（アミノ基がフリーでアグリコンが一本鎖の化合物）であるリソ GM3 には EGFR のリン酸化を阻害する効果が報告されているが、筆者らの合成した GM3 類似体およびリソ GM3 類似体にも同様の阻害効果が見られる。長鎖脂肪酸の代わりにグルタミン酸ダイマーのカルボキシル基を介してリソ GM3 類似体のアミノ基と縮合した化合物は面白い活性を示す。すなわち、EGFR リン酸化の阻害効果は単量体の活性と同程度であるが、細胞毒性が非常に低い。この化合物は 2 本の長鎖アルキル基

(疎水性基)が別々の方向を向いていて、両親媒性分子としての能力(界面活性能)に影響し、細胞膜を破壊しにくくなっていると考えると理解できるのだが、詳しいことはわかっていない。この化合物のEGFRリン酸化阻害は、Aktのリン酸化を阻害して細胞増殖にブレーキをかけることによることがわかったが、MAPKの経路にはほとんど影響しないため、抗ガン剤としての可能性は他の薬剤との併用がキーとなるように思われる。

おわりに

細胞による糖鎖合成には幾つかの利点がある。

- ① 細胞培養以外に特別な技術を必要としないため、誰にでも容易に生産可能である。
- ② 原料を培地に投与して生成物を培地中から抽出するので、細胞を破壊することなく多量の有機溶媒も使わない効率的な方法といえる。
- ③ 細胞内の酵素と基質(糖ヌクレオチド)を用いることで、容易で安価な方法といえる。
- ④ 原料である糖鎖プライマーの種類を変えることにより、異なる糖鎖を生産することができる。
- ⑤ on timeでの細胞の状態を反映した糖鎖のプロフィールを得ることができる。→ 細胞の状態観察や診断に使うことができる。

- ⑥ アグリコン中に予め官能基を導入することが可能である。→ 生成物の機能分子化や固定化が容易である。

しかし、生産スケールが小さいことや細胞によっては生産性が低いことなどの欠点もあり、今後の改善が必要である。現在、この研究は、NEDOのプロジェクト「糖鎖機能活用技術開発」として進行中である。

本稿で紹介した「細胞を用いて糖鎖を合成する」というユニークな方法の創始者であり、研究のきっかけをつくっていただいた瀋陽薬科大学教授山形達也先生、ならびにこの方法で得られた糖鎖を用いたEGFRリン酸化阻害の研究で御指導いただいたワシントン大学教授箱守仙一郎先生に感謝申し上げます。

文献

- 1) M.C.Z. Kasuya, M. Ikeda, K. Hashimoto, T. Sato & K. Hatanaka : *J. Carbohydr. Chem.*, **24**, 705 (2005).
- 2) T. Kato, M.C.Z. Kasuya & K. Hatanaka : *J. Oleo Sci.*, **57**, 397 (2008).
- 3) T. Kato, A. Miyagawa, M.C.Z. Kasuya, A. Ito & K. Hatanaka : *J. Chromatogr. A*, **1178**, 154 (2008).
- 4) M.C.Z. Kasuya, R. Cusi, O. Ishihara, A. Miyagawa, K. Hashimoto, T. Sato & K. Hatanaka : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 599 (2004).
- 5) M.C.Z. Kasuya, A. Ito, R. Cusi, T. Sato & K. Hatanaka : *Chem. Lett.*, **34**, 856 (2005).
- 6) Y. Murozuka, M.C.Z. Kasuya, M. Kobayashi, Y. Watanabe, T. Sato & K. Hatanaka : *Chem. Biodivers.*, **2**, 1063 (2005).
- 7) Y. Haga, K. Hatanaka & S.-I. Hakomori : *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 393 (2008).