戦略的創造研究推進事業　CREST
研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」
研究課題「感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究」

研究終了報告書

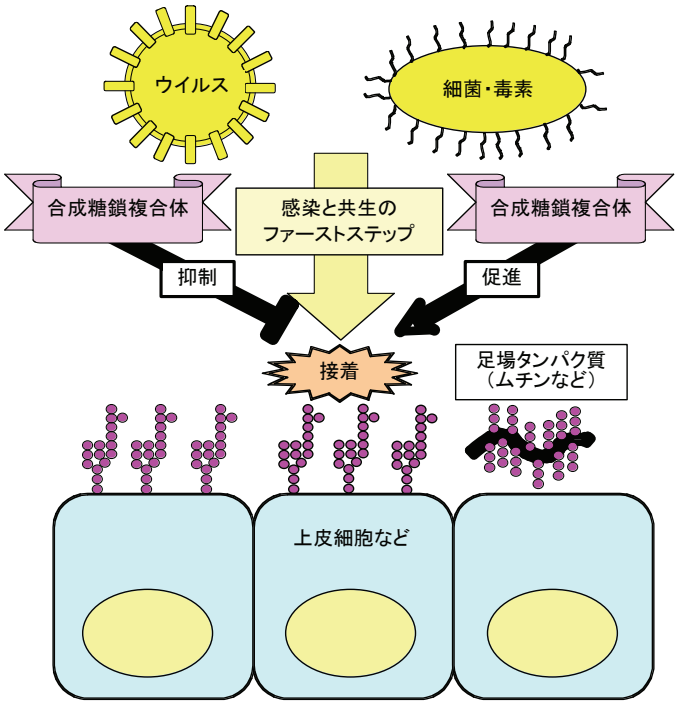
研究期間　平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：木曽　真
（岐阜大学・応用生物科学部、教授）

１　研究実施の概要

ウィルスや病原性細菌の感染及び細菌毒素の侵入は、多くの場合、宿主細胞が持つ糖鎖への付着により開始される。また有用な腸内細菌が体内に止まるための足場も糖鎖複合体である。本研究では、これら糖鎖を介した相互作用の制御を目的として、糖鎖の構造と機能情報に基づいて、化学合成法と酵素合成法を駆使することにより、天然型や非天然型の様々な糖鎖複合体の創製を行い、さらに感染症の抑制あるいは有益な共生の促進効果を持つ糖鎖医薬品の開発を目指してきた。

感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究（背景と目的）



糖鎖医薬品の開発を目指す上で、重要な課題の１つが、構造解析技術の革新である。従来よりN-結合型糖鎖の構造解析に広く用いられている、ヒドラジンによる糖鎖の切り出しとピリジルアミノ化法をO-結合型糖鎖にも適用し、シアル酸を含むムチン型糖鎖を網羅的に解析する手法の構築を目的として、糖鎖の切り出し条件の検討、蛍光標識前後における夾雑物質の効率的な除去法の検討、シアル酸の有無、及び鎖長の長短に関わらず同一条件で分離できるHPLC条件の検討、解析した構造情報の表示法に関する検討を行い、生体試料由来のムチン型糖鎖を網羅的にかつ高感度で分析する手法を確立することができた。実際、フェツイン、組織因子経路インヒビター、COS７細胞などで、*O*-結合型と*N*-結合型糖鎖の網羅的一括解析を行い、本手法の有効性を確認した。次に、本手法をさらに発展および展開させるために、標準ピリジルアミノ化糖鎖の調製とライブラリーの構築、システム生物学に向けた細胞丸ごとの糖鎖構造解析、糖鎖末端ユニットを網羅的に分析する手法の開発を行った。COS7細胞をモデルとして選択し、その*O*-結合型および*N*-結合型糖鎖の網羅的解析を、本手法を用いて行った。その結果、ハイマンノース型、パウチマンノース型、および２本鎖、３本鎖、４本鎖のコンプレックス型の*N*-結合型糖鎖と、コア１型およびコア２型のムチン型糖鎖を一括して検出し解析することができた。このように、本手法の糖鎖多様性解析への有効性を、細胞培養系において示すことができた。

糖鎖医薬品の開発を目指すには、糖鎖合成技術の革新が不可欠である。本研究課題においては、主としてムチン型糖鎖を標的として、新しい化学合成法ならびに酵素合成法の開発を

行った。糖タンパク質ムチンは、一般にガラクトサミン残基の１位とセリンあるいはスレオニンの水酸基がα結合したα-GalNAc-Ser/Thr骨格をコア構造として有している。ある種のO-結合型糖タンパク質はガン関連抗原として知られており、ガンの転移、浸潤に深く関与している。また、微生物及びその毒素はムチン型糖鎖を介して感染することが予測されている。これらの作用機序を分子レベルで解明するためには、純粋な糖鎖標品の安定した供給が必要不可欠であるが、α-GalNAc-Ser/Thr構造の化学的構築はGalNの２位に存在するアセトアミド基の影響から困難な課題であった。従来、この問題の解決法として汎用されてきた2-アジド糖の利用は、調製の煩雑さに加え、グリコシル化の収率も必ずしもよい結果を与えなかった。このような背景の下、O-結合型糖タンパク質のコア構造の効率的再構築技術として、「DTBS効果」を応用する新規なα-立体選択的ガラクトシル化／ガラクトサミニル化法の開発を行った。またα-Gal構造は糖脂質の中にも存在し、特にα-galactosyl ceramide（α-GalCer）やisoglobotriaosyl ceramide（iGb3）は、ナチュラルキラーT細胞（NKT細胞）のリガンドとして注目されている。本研究では、DTBS法の応用として上記化合物の合成に取り組み、鍵反応であるα-ガラクトシド化を高収率で達成して、目的化合物の全合成に成功にした。

有機合成は分子を自由に作り出せる特徴を有しており、天然型構造をモチーフにした種々の類縁体や誘導体を自由に設計・合成することもできる。上述した革新的α-選択的グリコシル化反応方法を応用して、山本らにより発見されたEndo-α-GalNAc-aseの高感度蛍光標識糖鎖4-methylumbelliferyl T-antigen（4-MU-T-antigen）の新規合成法の開発に成功した。さらに、当該酵素の本来の基質であるムチン型糖鎖Core-1構造（Galβ1-3GalNAc-serin/threonin）をモチーフにして、その類縁体を系統的に設計・合成することで、酵素の基質特異性の解明を目指した。具体的には、加水分解後に高感度発色団を遊離するPNP基（p-nitrophenyl基）を還元末端のガラクトースにα-グルコシドとして導入し、得られたGalα-PNPを鍵物質とする合成戦略により、天然型構造Core-1～8、非天然型として非還元側糖を変化させた類縁体５種を合成した。また小腸上皮に存在する可能性のあるムチン型糖鎖を系統的に合成することで、ボツリヌス毒素小腸リガンドの探索を行った。具体的には、Tn抗原、T抗原に加え、これらにシアル酸が結合した構造４種の合計６種類の糖鎖を設計した。得られた糖鎖のボツリヌス毒素-ムチン結合反応に対する阻害活性を測定した結果、シアリルTn抗原、シアリルT抗原糖鎖が有意な阻害効果を発現することが明らかになった。

一方、酵素法による機能性糖鎖複合体の合成及び腸内細菌と糖鎖の相互作用解析を行った。腸内細菌の中でも善玉菌と言われる“ビフィズス菌”が特異的に生産する“ムチン型糖鎖に作用するエンドグリコシダーゼEndo-α-N-acetylgalactosaminidase”を用いた機能性糖鎖複合体の合成と酵素の機能解明を試みた。先ず、酵素の遺伝子をクローニングして得られた組換え大腸菌より組換え酵素を精製単離した。この組換え酵素の糖転移活性を利用して、ムチン型糖鎖をさまざまなペプチドや化合物に転移付加し、ムチン型糖鎖を有する機能性糖鎖複合体（ムチンをミミックした化合物など）を酵素合成した。また、ビフィズス菌のヒト腸管接着における本酵素の役割や機能を解析した。次に糸状菌Mucor hiemalisが生産するエンドグリコシダーゼ Endo-β-N-acetylglucosaminidase（Endo-M）の、酵母（Candida boidini）を宿主として得られる組換え酵素の糖転移活性を用いて、シアロ糖鎖をキトサンに多価に付加した生理活性糖鎖複合体（シアロ糖鎖ポリマー：細胞膜をミミックした化合物）を酵素合成した。本複合体について、ヒトインフルエンザウィルスやトリインフルエンザウィルスの細胞への結合阻害活性を調べるとともに宿主へのウィルス感染を阻害する物質としての有効性を調べた。さらに、Endo-M の糖転移活性の上昇を企てて、活性中心部周辺のアミノ酸残基の置換を部位特異的変異によって行い、構造改変により糖転移活性が高められた変異酵素を取得した。得られた変異酵素を用いて効率的な生理活性糖鎖複合体の酵素合成に成功した。一方、ビフィズス菌のヒト腸管への接着に関わると考えられる特異的な糖分解酵素 1,2-α-L-Fucosidase の遺伝子をクローニングして、得られた組換え大腸菌より組換え酵素を精製単離し、X 線立体構造解析、さらには、腸管ムチンとビフィズス菌との接着における本酵素の役割や機能を解析した。

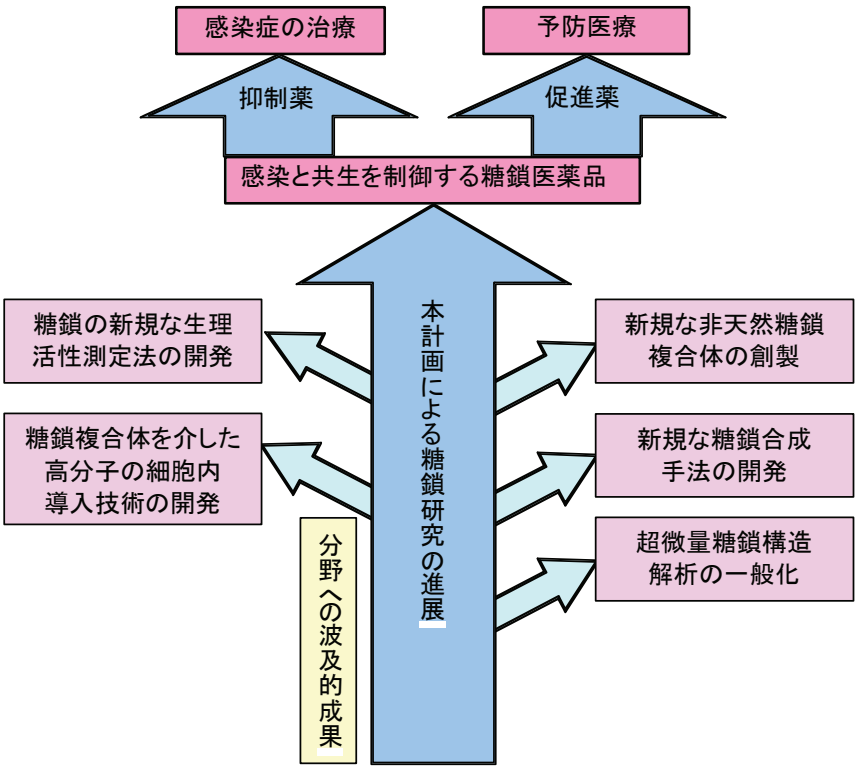
嫌気性細菌 Clostridium botulinum が産生するボツリヌス神経毒素は、その抗原性の違いから A～G 型の 7 種類に分類される。一般にボツリヌス毒素は、神経毒素の他にレクチンや機能未知のタンパク質からなる巨大な複合体構造をとっている。経口摂取された毒素複合体は小腸から吸収され、その後神経毒素は体内循環系を介して末梢の神経細胞に到達し、筋弛緩性の麻痺を起こす。この毒素がたどるルートは、研究が進んでいるコレラや赤痢の毒素が侵入した細胞内に留まることと大きく異なり、一度細胞内に侵入した毒素が別の方向から出て行くというトランスサイトーシスの機構を利用していることが考えられるが、これに関する研究報告は殆ど無いのが現状である。我々は、そのトランスサイトーシス機構の全容を解明して、深刻な問題である乳幼児ボツリヌス症における毒素吸収を阻害する毒素吸収中和化合物の調製を可能とするだけでなく、神経毒素部分を他の有用タンパク質に置き換えた物質による、有用高分子体内投与補助剤（ドラッグデリバリーシステム）の創製に応用することを目指して本研究を行った。HT-29 細胞の培地に C 型神経毒素、C12S または C16S を添加し細胞表面に結合している毒素を蛍光標識抗体で検出した。結果、HA 分子を含む C16S のみが細胞表面に強く結合することが観察された。また、培地に C16S 毒素複合体を加え、一定時間インキュベートした後に共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、時間の経過と共に毒素が細胞内に侵入していた。なお、この細胞内移行現象には、細胞表面のシアル酸が結合した O-結合型糖鎖が強く関与しており、糖脂質の顕著な関与はみられなかった。大部分の毒素複合体はクラスリン依存性のエンドサイトーシス機構で細胞内に移行しているが、一部はラフトを介するルートも利用していることが判明した。その結果、毒素複合体はエンドサイトーシスによりエンドソームに運ばれているが、神経毒素だけは更にゴルジ装置にまで到達していることが判明し、このことは、毒素複合体が細胞内に移行後神経毒素が分離され、基底膜側へ輸送されることの重要なエビデンスの一つの発見と考えられる。次に C 型毒素複合体を形成しているタンパク質群のうち、HA1 と HA3 の糖結合特異性をムチンタンパク質を用いて明らかにするとともに、HA1 と HA3 の結晶化にも成功し、X 線結晶構造解析により、それぞれの糖結合サイトを決定した。具体的には、HA１には糖結合サイトが二箇所存在し、個々の糖認識特異性に立体構造の面からも考察を加えた。HA3 はプロペラ型をした全く新規な構造であった。また HA1 の二箇所の糖結合クレフトに存在するアミノ酸に変異を加え、糖認識特異性の異なるミュータントの作製に成功した。
以上のように、ボツリヌス毒素複合体は、上皮細胞の基本的な生理作用を巧みに利用し、上皮細胞層バリヤーを通過して神経毒素を体内循環系に送り込んでおり、このトランスサイトーシス経路に毒素複合体の構成成分である HA タンパク質が重要な役割を果たしていることが我々の研究で明らかとなった。

２　研究構想及び実施体制

(1)研究構想

本研究課題は、糖鎖を介した感染と共生の構造的基盤ならびにそのメカニズムを解明し、それらを制御する医薬品の開発を目的に①糖鎖化学合成（木曽）グループ、②糖鎖酵素合成（山本）グループ、③糖鎖構造研究（長束）グループ、④細菌毒素研究（西河）グループにより組織され、それぞれ「革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製」、「酵素法による機能性糖鎖複合体の合成及び腸内細菌と糖鎖の相互作用解析」、「革新的な糖鎖構造解析手法の開発」、及び「細菌毒素と糖鎖の相互作用解析」を主要な研究テーマとして進められてきた。期待される成果として、（１）超微量糖鎖構造解析の一般化、（２）新規な糖鎖合成手法の開発、（３）新規な非天然糖鎖複合体の創製、（４）ボツリヌス毒素の感染・移行メカニズムの解明があり、他分野への波及的効果として、(5) 糖鎖複合体を介した高分子の細胞内導入技術の開発、（６）糖鎖の新規な生理活性測定法の開発等が考えられた。

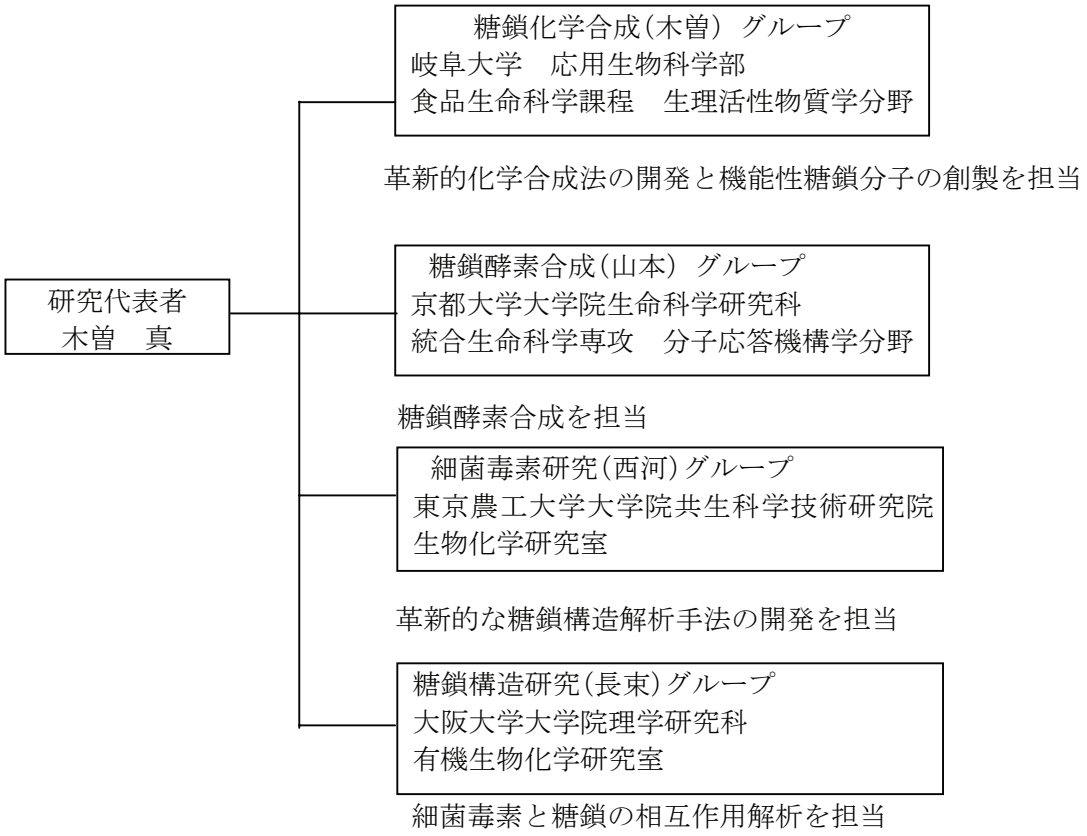
感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究（期待される成果）



本研究課題は、平成１４年１１月にスタートし、主にムチン型糖鎖に焦点を当てて、５年間のプロジェクトとして進められ、当初の計画では次の５項目について検討された。1.＜糖鎖構造解析の革新的基盤技術の開発と応用＞糖鎖創薬を目指す上で最も基盤的な技術の一つが、糖鎖の分子構造の解析法である。本研究では、特にムチン型糖鎖（O-グリコシド型糖鎖）の構造解析に焦点を当て、糖鎖の定量的切出しと蛍光標識条件の設定、HPLC による効率的分離分析法の確立に重点を置く。さらにその技術を各種ムチンタンパク質の糖鎖に対して実施し、手法の有効性を検証する。2.＜ボツリヌス毒素と小腸ムチン糖鎖の相互作用の解析＞ボツリヌス毒素は世界最強の毒素として生物兵器にも使用されている。しかしいまだに体内への侵入機構は解明されていない。本研究では、ムチン介在型エンドサイトーシス機構を想定し、毒素複合体が認識するムチン糖鎖の構造を解析する。その方法の一つは上記の革新的糖鎖構造解析法の応用であり、第二は合成シアロ糖鎖を用いた結合と阻害実験である。3.＜微生物酵素を用いた生理活性糖鎖複合体の酵素合成＞土壌より分離同定した細菌（*Bacillus* sp.）が特異的に生産する“ムチン型糖鎖に作用するエンドグリコシダーゼ”の遺伝子をクローニングして、大量に本酵素を発現した組み換え大腸菌より本酵素を精製単離する。本酵素の糖鎖転移活性を利用して、ムチン型糖鎖をさまざまなアルキル鎖に転移付加し、天然のムチン型糖鎖を有する糖鎖複合体を酵素合成する。得られた糖鎖複合体について、ボツリヌス毒素、ウィルスの吸着活性や乳酸菌の接着活性を検討する。4.＜乳酸菌の糖鎖レセプターと宿主腸管糖鎖との相互作用の解析＞糖タンパク質の糖鎖に結合する乳酸菌のレセプターを単離して、その遺伝子をクローニングし、得られたレクチン様レセプタータンパク質およびこのタンパク質を発現した組み換え大腸菌について、結合糖鎖に対する特異性を調べる。さらに、遺伝子を乳酸菌にセルフクローニングする準備を行う。さらに、有用乳酸菌であるビフィズス菌より、ビフィズス菌に特異的に存在する糖分解酵素 1,2-α-L-フコシダーゼの遺伝子をクローニングして、大量に本酵素を

発現した大腸菌より本酵素を精製単離するとともに、その糖転移活性を利用して、ビフィズス因子となり得るオリゴ糖を酵素合成する。5.＜化学合成による機能性糖鎖分子の創製＞糖鎖の化学合成は，糖鎖創薬を目指す上で最も重要な基盤技術の一つである。本年度は特にムチン型糖鎖の立体選択的構築法を新たに開発することにより、サブグループの研究で得られた情報をもとに、ウィルス、細菌及び細菌毒素、ならびに接着分子であるセレクチンやシグレックに対する新規糖鎖リガンドを化学合成し，その構造と機能について分子・官能基レベルで解析する。さらに、これらのリード化合物をミミックまたは多量体化した糖鎖複合体構築のための基盤技術を開発する。項目１では、計画通りの技術革新が進み、①本手法を用いて調製した標識糖鎖の商品化、②糖鎖分子ライブラリーの拡充と糖鎖分子リソースセンター化、③ムチン型を含む *O*-結合型糖鎖の構造グライコーム解析、④糖鎖システムの変動を分子構造のレベルで解析することによるシステム生物学への展開、⑤バイオマーカーとしての特異的糖鎖ユニットの発見、⑥糖鎖シーケンサーに向けた糖鎖構造の自動分析器開発などへの展開が期待される。項目２では、ムチン介在型エンドサイトーシス機構の解明と同時に、ボツリヌス毒素タンパク質の構造生物学的研究が急速に進展し、毒素複合体の構成成分であるHAタンパク質の役割が明らかとなったので、これを用いたドラッグデリバリーベクターの創製が期待される。項目３では、ビフィズス菌の Endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase の遺伝子クローニング、その活性中心を担う二つのアミノ酸残基の同定を行った。さらに、組換え酵素の糖転移活性を用いたムチン型糖鎖を有する生理活性糖鎖複合体の酵素合成を行った。すなわち、生理活性ペプチドにムチン型糖鎖を直接付加するとともにムチンのペプチド断片に糖鎖を直接付加して、人工ムチンのミミックを作成した。また、さまざまな糖や 1-アルカノールに糖鎖を付加した糖鎖複合体の合成に成功した。一方、本酵素の機能を明らかにするために木曽グループが合成したさまざまな基質を用いて、酵素の特異性を解析した。項目４では、その研究成果としてビフィズス菌の腸管接着に関係すると考えられる糖質分解酵素を解明したことが挙げられる。その特異性を解析することにより、ビフィズス菌とヒト腸管との接着に糖質分解酵素が関与していることが示唆された。このような結果は今後、食品や飲料に添加するプレバイオティクス（宿主腸内の有用菌のみの生育を増進し、健康に有益に働く難消化性の物質）をデザインする上で貴重な情報を与えることになり、昨今の健康志向の中、その波及効果は大きいと考えている。項目５では、今までにない全く新しいα-ガラクトース及びα-ガラクトサミン配糖体合成法を開発し、ムチン型糖ペプチドやα-GalCer、その他蛍光基質の合成へと大きく展開した。合成化学における新たな方法の開発は今まで不可能だった分子の化学的再構成を可能にし、合成化学のみならず生物学の分野に大きなブレークスルーをもたらす。本研究グループで以前開発されたα-シアロシドの合成法とその応用がその著名な例である。本研究で開発した効率的な Gal/GalNAc のα-グリコシド合成法の開発もそれに匹敵するものであり、特にムチン型糖鎖のコア構造の構築を非常に効率的にし、当該構造を含む糖鎖、複合糖質の合成を実用的なものにした。本法の有用性は大きく、既に論文の非引用回数が増加しており、また本法を基にした特許も大きな価値を有する。

(2)実施体制


研究代表者
木曽　真
糖鎖化学合成(木曽) グループ
岐阜大学　応用生物科学部
食品生命科学課程　生理活性物質学分野
革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製を担当
糖鎖酵素合成(山本) グループ
京都大学大学院生命科学研究科
統合生命科学専攻　分子応答機構学分野
糖鎖酵素合成を担当
細菌毒素研究(西河)グループ
東京農工大学大学院共生科学技術研究院
生物化学研究室
革新的な糖鎖構造解析手法の開発を担当
糖鎖構造研究(長束)グループ
大阪大学大学院理学研究科
有機生物化学研究室
細菌毒素と糖鎖の相互作用解析を担当

3. 研究実施内容及び成果

３．１　革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製（岐阜大学　木曽真グループ）

(1)研究実施内容及び成果

I.　DTBS 基を用いた新規なα-立体選択的ガラクトシル化法の開発

本研究において、*galacto* 型の糖残基に導入した DTBS(di-*tert*- butylsilylene)基が、グリコシル化反応の際に隣接基関与を発現する保護基存在下においても顕著なα選択性を与えるという興味深い知見を得た。この現象はベンジリデン基のようなアセタール系保護基の存在下では観察されず、DTBS 基特有の効果であることから、我々はこれを「DTBS 効果」と名付けた（図 1)。

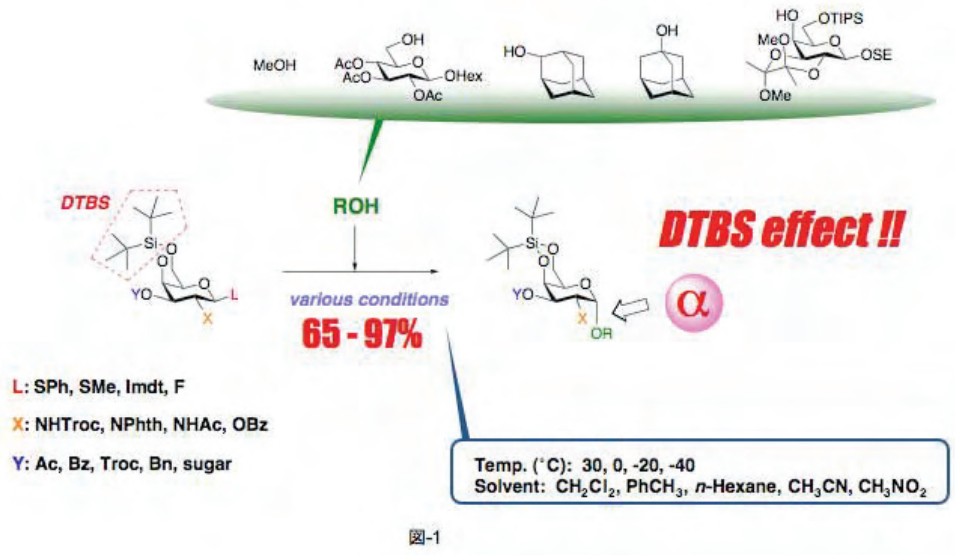


図-1

まず、以下に示すパラメーターを換えることにより汎用性の検証を行なった。すなわち(1) 2,3 位の保護基、(2) グリコシル化受容体、(3) 反応溶媒、(4) 反応温度、(5) グリコシル供与体における脱離基について検討した結果、ほとんどの場合で非常に高いα選択性が観察され、DTBS 効果の高い汎用性が確認された。

II.　DTBS 効果を応用した複合糖質の合成

α-GalNAc/Gal 構造は、*O*-結合型糖タンパク質におけるアミノ酸（セリンまたはスレオニン）の水酸基と糖残基間の結合に代表されるように、天然に広く見られる重要な構造様式である。前項で述べた DTBS 効果の応用として、糖鎖生物学的に重要な複合糖質の化学合成を行った。

II-I.　ムチン型糖鎖の合成

糖タンパク質ムチンは、一般にガラクトサミン残基の１位とセリンあるいはスレオニンの水酸基がα結合したα-GalNAc-Ser/Thr 骨格をコア構造を有している。ある種の *O*-結合型糖タンパク質はガン関連抗原として知られており、ガンの転移、浸潤に深く関与している。また、微生物及びその毒素はムチン型糖鎖を介して感染することが予測されている。これらの作用機序を分子レベルで解明するためには、純粋な糖鎖標品の安定した供給が必要不可欠であるが、α-GalNAc-Ser/Thr 構造の化学的構築は GalN の２位に存在するアセトアミド基の影響から困難な課題であった。従来、この問題の解決法として汎用されてきた 2-アジド糖の利用は、調製の煩雑さに加え、グリコシル化の収率も必ずしもよい結果を与えなかった。このような背景の下、*O*-結合型糖タンパク質のコア構造の

効率的再構築技術として、「DTBS 効果」を応用することとした。GalN 残基の 4,6 位に DTBS 基を導入した GalN、Gal β (1→3)GalN、Neu5Ac α (2→3)Gal β (1→3)GalN 誘導体をそれぞれ調製し、適切に保護したセリン誘導体と縮合反応に供した。その結果、どの場合においても高収率にて目的とする α グリコシドを得ることに成功した（図-２，表-１）。

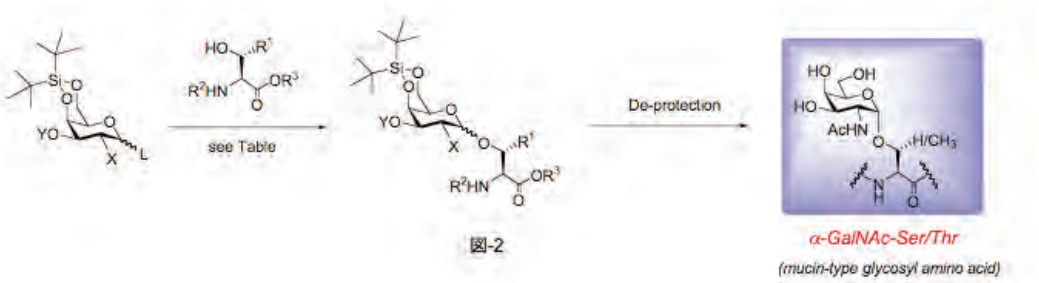


図-2

表-1

Entry	L	X	Y	R^1	R^2	R^3	Promoter	*t* (h)	% Yield (α:β)[a]
1	SPh(β)	NHTroc	Troc	H	Cbz	Bn	NIS-TfOH	0.5	**95:2**
2	SPh(β)	NHTroc	Troc	CH_3	Fmoc	Bn	NIS-TfOH	0.5	**93:0**
3	Imdt(α)	NHTroc	Troc	H	Fmoc	All	TMSOTf	0.5	**97:0**
4	SPh(β)	NHTroc	Gal[b]	H	Cbz	Pfp	NIS-TfOH	1.0	**88:0**
5	SPh(β)	NHAc	Ac	H	Cbz	Bn	NIS-TfOH	3.0	**65:0**

[a] Isolated yield. [b] 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactosyl

Cbz: benzyloxycarbonyl, Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl, Pfp: pentafluorophenyl

II-II.　ナチュラルキラーT 細胞（NKT 細胞）リガンド糖脂質の合成

α-Gal 構造は糖脂質の中にも存在し、特に α-galactosyl ceramide（α-GalCer）や isoglobotriaosyl ceramide（iGb3）は、ナチュラルキラーT 細胞（NKT 細胞）のリガンドとして注目されている。本研究では、DTBS 法の応用として上記化合物の合成に取り組み、鍵反応である α-ガラクトシド化を高収率で達成して、目的化合物の全合成に成功にした（図-３）。

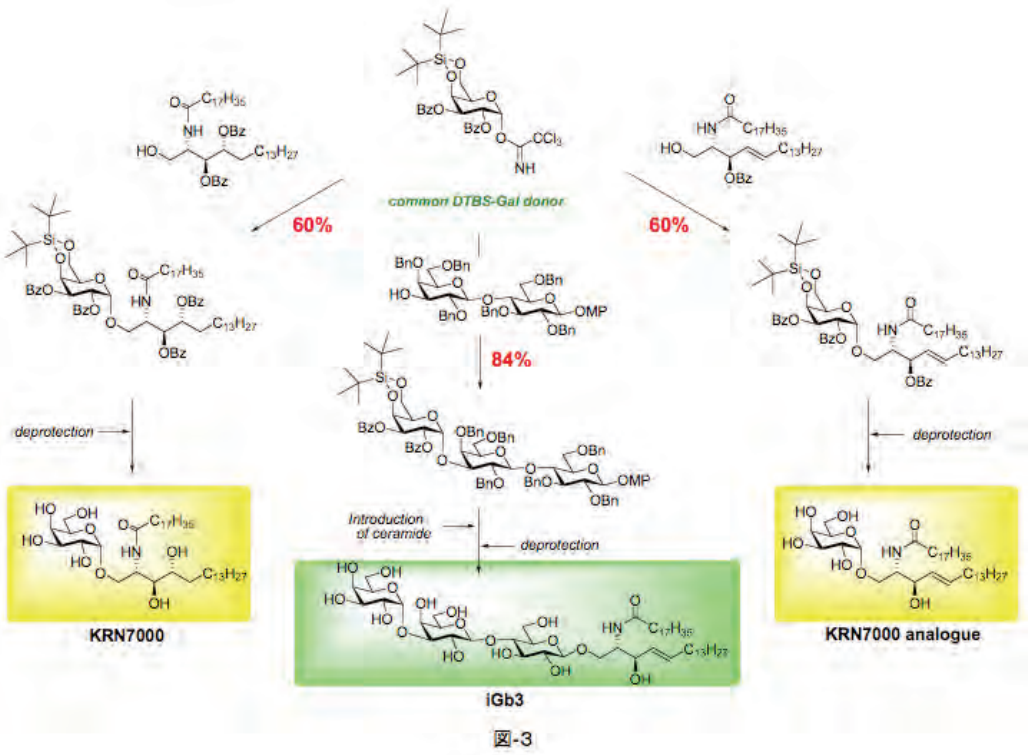


図-3

II-III.　Endo-α-N-acetylgalactosaminidase 高感度基質の設計と合成

有機合成は分子を自由に作り出せる特徴を有しており、天然型構造をモチーフにした種々の類縁体や誘導体を自由に設計・合成することができる。上述した革新的α-選択的グリコシル化反応方法を応用して、山本らにより発見された Endo-α-GalNAc-ase の高感度蛍光標識糖鎖 4-methylumbelliferyl T-antigen（4-MU-T-antigen）の新規合成法の開発に成功した。即ち、DTBS 基で保護した Galb1→3GalNHTroc を THF 中、4-methylumelliferone、トリフェニルホスフィン、DEAD と reflux 条件で反応させると、一段階 80%の高収率で対応するα-グリコシド（4-MU-T-antigen）が生成した

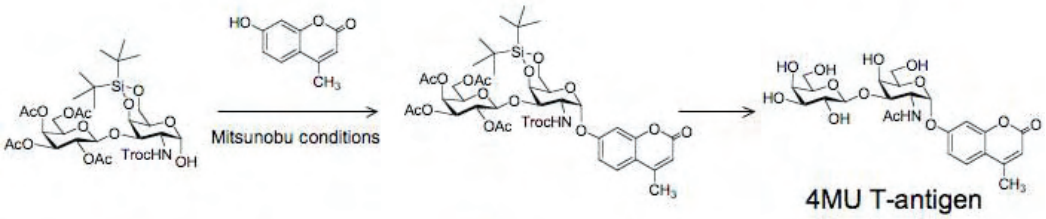


図-4

III.　分子プローブを用いた、ビフィズス菌由来エンド endo-α-N-acetylgalactosaminidase 基質特異性の解析

共同研究者の山本らは、腸内細菌の中で善玉菌と言われる“ビフィズス菌”が特異的に生産する“ムチン型糖鎖に作用するエンドグリコシダーゼ endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase”の構造と機能に関する研究を進めている。本研究では、当該酵素の本来の基質であるムチン型糖鎖 Core-1 構造（Galβ1-3GalNAc-serin/threonin）をモチーフにして、その類縁体を系統的に設計・合成することで、酵素の基質特異性の解明を目指した。具体的には、加水分解後に高感度発色団

を遊離する PNP 基（*p*-nitrophenyl 基）を還元末端のガラクトースにα-グルコシドとして導入し、得られた Galα-PNP を鍵物質とする合成戦略により、天然型構造 Core-1～8、非天然型として非還元側糖を変化させた類縁体５種を合成した（図-５）。得られた分子プローブを酵素活性試験に供した結果、非還元側糖である Gal が Glc，GalNAc で置換しうることを見出した（表２）。

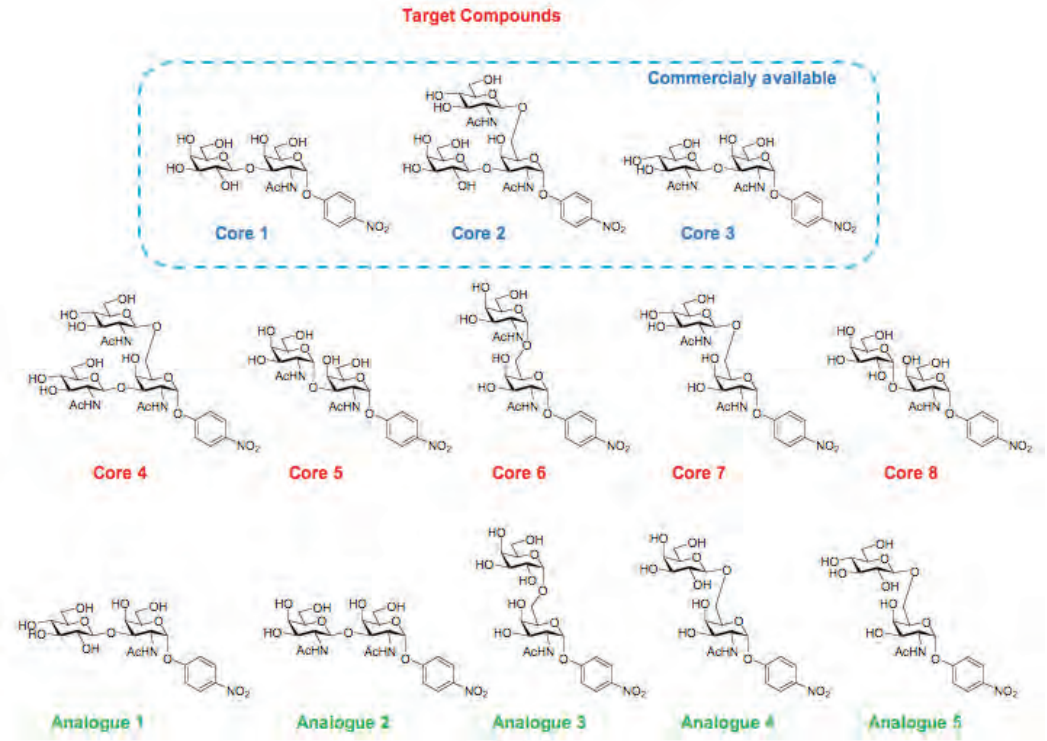


図-5

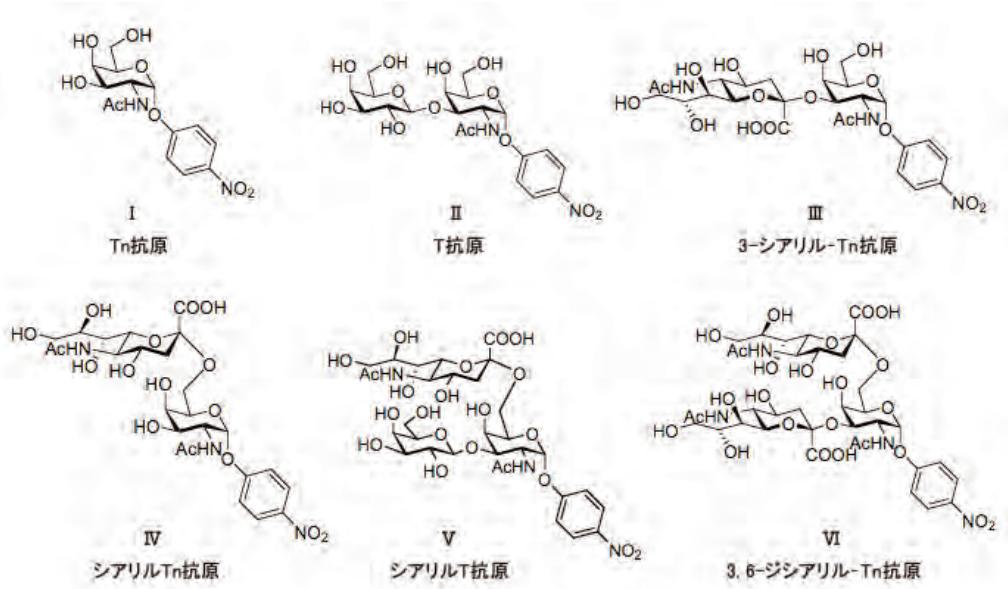
表-2. The substrate specificity of *endo*-α-GalNAcase

No.	Structure	Name	Activity
	***p*NP-substrate**		
1	GalNAcα-*p*NP	Tn antigen	—
2	Galβ(1-3)GalNAcα-*p*NP	Core 1	+
3	Galβ(1-3)[GlcNAcβ(1-6)]GalNAcα-*p*NP	Core 2	—
4	GlcNAcβ(1-3)GalNAcα-*p*NP	Core 3	±
5	GlcNAcβ(1-3)[GlcNAcβ(1-6)]GalNAcα-*p*NP	Core 4	—
6	GalNAcα(1-3)GalNAcα-*p*NP	Core 5	—
7	GlcNAcβ(1-6)GalNAcα-*p*NP	Core 6	—
8	GalNAcα(1-6)GalNAcα-*p*NP	Core 7	—
9	Galα(1-3)GalNAcα-*p*NP	Core 8	—
10	Glcβ(1-3)GalNAcα-*p*NP	Analogue 1	+
11	Galβ(1-6)GalNAcα-*p*NP	Analogue 4	—
12	GalNAcβ(1-3)GalNAcα-*p*NP	Analogue 2	+
13	Glcβ(1-6)GalNAcα-*p*NP	Analogue 5	—
14	Galα(1-6)GalNAcα-*p*NP	Analogue 3	—
15	Galβ(1-3)GlcNAcα-*p*NP		±

+: Completely Cleaved, ±: Partly Cleaved, —:Not Cleaved

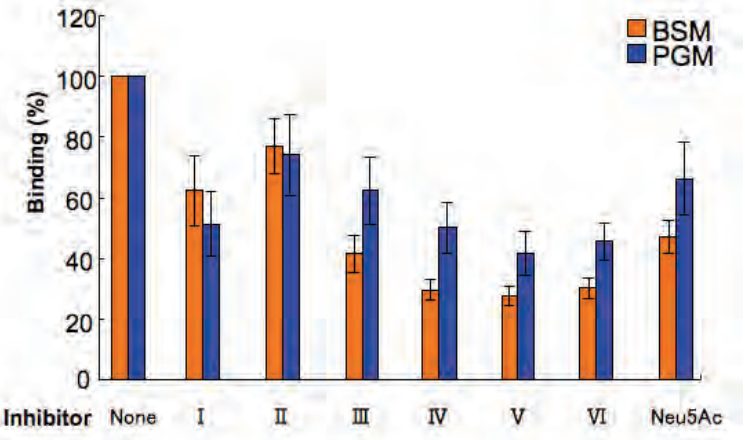
IV.　分子プローブを用いたボツリヌス毒素小腸リガンドの探索

共同研究者の西河らは、嫌気性細菌 *Clostridium botulinum* が産生するボツリヌス神経毒素に注目し、毒性発現機構の解明を進めてきた。その結果、経口摂取された毒素が小腸から吸収され、その後体内循環系を介して末梢の神経細胞に到達して毒性を発現するという、特異的な機構を介することを見出した。本研究では、小腸上皮での結合に着目し、小腸上皮に存在する可能性のあるムチン型糖鎖を系統的に合成することで、ボツリヌス毒素小腸リガンドの探索を行った。具体的には、Tn 抗原、T 抗原に加え、更にシアル酸が結合した構造４種の合計６種類の糖鎖を設計した。アグリコン部には、同様にα結合で PNP 基を導入した（図−６）。



図−6. 標的化合物

得られた糖鎖のボツリヌス毒素−ムチン結合反応に対する阻害活性を測定した結果、シアリル Tn 抗原、シアリル T 抗原糖鎖が有意な阻害効果を発現することが明らかになった（図−７）。



図−7. ムチン−C16S毒素結合におけるシアロ糖誘導体の阻害効果

合成糖鎖Ⅰ-Ⅵ及び遊離 Neu5Ac によるウシ顎下腺ムチン(BSM)、ブタ胃ムチン(PGM)の糖鎖に対する C16S 毒素複合体の結合阻害を測定した。
BSM と PGM に対する C16S 毒素の結合を 100%として、阻害糖の効果を比較している。
各糖の濃度は 2．5mM で試験はそれぞれ 3 回おこなった。
BSM は二糖程度の短い糖鎖でシアル酸を多く含む。PGM は二糖以上の比較的長い中性糖を多く含む。
本試験では各ムチンの糖鎖構成を反映した結果が得られた。

[研究成果の位置付け、類似研究との比較]
有機合成は、分子を自由に作り出せるという特徴を生かし、糖鎖生物学の発展に大きく寄与している。例えば、生体内超微量成分を純粋かつ大量に供給することができ、また天然型構造をモチーフにして種々の類縁体や誘導体を自由に設計・合成することで、医学・生物学用プローブや医薬への応用が期待される新たな生理活性物質を創出することができる。その合成化学において、新たな方法の開発は今まで不可能だった分子の化学的再構成を可能にし、合成化学のみならず、糖鎖生物学の分野に大きなブレークスルーをもたらす。本研究グループで以前開発されたα-シアロシドの合成法とその応用がその著名な例である。本研究で開発した効率的な Gal/GalNAc のα-グリコシド開発法の開発もそれに匹敵するものであり、特にムチン型糖鎖のコア構造の構築を非常に効率的にし、当該構造を含む糖鎖、複合糖質の合成を実用的なものにした。本法の有用性は大きく、既に論文の非引用回数が増加しており、また本法を基にした特許も大きな価値を有する。

(2)研究成果の今後期待される効果
本研究成果から今後期待される効果は大きく2つに分けられ、1つは化学的側面、他方は生物学的側面である。前者は、今回特に注目したムチン型糖鎖の化学的再構成のみならず、更に広範囲な複合糖質の化学的再構成への応用が可能である。本研究においても、ナチュラルキラーT 細胞(NKT 細胞)のリガンド糖脂質の化学合成に応用できることを示した。
後者としては、化学と生物の共同作用による、創薬のシーズの提供が期待される。具体的には、山本らとの共同により、善玉菌であるビフィズス菌の *endo*-α-N-acetylgalactosaminidase 基質特異性を明らかにした。更に、類似の酵素が病原菌にも存在することを発見し、それがより広い基質特異性を有することを明らかにした。この知見を活用すれば、病原菌由来酵素特異的阻害剤の開発が可能であり、当該病原菌の感染に対する治療薬のシーズとして期待される。
更に、西河らとの共同により、ボツリヌス毒素の毒性発現の主要ステップである小腸上皮への結合に必須なリガンド構造を明らかにした。この成果はボツリヌス毒素中和剤の開発に応用することができ、大腸菌ベロ毒素の例で示されたように、毒素の結合を阻害する中和剤は副作用が少なく、実用化が期待される治療剤の１つである。

3．2 酵素法による機能性糖鎖複合体の合成及び腸内細菌と糖鎖の相互作用解析(京都大学山本憲二グループ)
(1)研究実施内容及び成果
[研究実施方法]
１．腸内細菌の中でも善玉菌と言われる“ ビフィズス菌”が特異的に生産する“ ムチン型糖鎖に作用するエンドグリコシダーゼ Endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase”を用いた機能性糖鎖複合体の合成と酵素の機能解明を試みた。先ず、酵素の遺伝子をクローニングして得られた組換え大腸菌より組換え酵素を精製単離した。この組換え酵素の糖転移活性を利用して、ムチン型糖鎖をさまざまなペプチドや化合物に転移付加し、ムチン型

糖鎖を有する機能性糖鎖複合体（ムチンをミミックした化合物など）を酵素合成した。また、ビフィズス菌のヒト腸管接着における本酵素の役割や機能を解析した。
２．糸状菌 *Mucor hiemalis* が生産するエンドグリコシダーゼ Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) の、酵母（*Candida boidini*）を宿主として得られる組換え酵素の糖転移活性を用いて、シアロ糖鎖をキトサンに多価に付加した生理活性糖鎖複合体（シアロ糖鎖ポリマー：細胞膜をミミックした化合物）を酵素合成した。本複合体について、ヒトインフルエンザウィルスやトリインフルエンザウィルスの細胞への結合阻害活性を調べるとともに宿主へのウィルス感染を阻害する物質としての有効性を調べた。さらに、Endo-M の糖転移活性の上昇を企てて、活性中心部周辺のアミノ酸残基の置換を部位特異的変異によって行い、構造改変により糖転移活性が高められた変異酵素を取得した。得られた変異酵素を用いて効率的な生理活性糖鎖複合体の酵素合成を行った。
３．ビフィズス菌のヒト腸管への接着に関わると考えられる特異的な糖分解酵素 1,2-α-L-Fucosidase の遺伝子をクローニングして、得られた組換え大腸菌より組換え酵素を精製単離した。さらに、腸管ムチンとビフィズス菌との接着における本酵素の役割や機能を解析した。

［研究実施内容］
１．ビフィズス菌の Endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase の遺伝子クローニング、その活性中心を担う二つのアミノ酸残基の同定を行った。さらに、組換え酵素の糖転移活性を用いたムチン型糖鎖を有する生理活性糖鎖複合体の酵素合成を行った。すなわち、生理活性ペプチドにムチン型糖鎖を直接付加するとともにムチンのペプチド断片に糖鎖を直接付加して、人工ムチンのミミックを作成した。また、さまざまな糖や 1-アルカノールに糖鎖を付加した糖鎖複合体の合成に成功した。一方、本酵素の機能を明らかにするために木曽グループが合成したさまざまな基質を用いて、酵素の特異性を解析した。
２．Endo-M の組換え酵素の糖転移活性を利用して、ヒトＡ型インフルエンザウィルスに対して強い吸着活性を持ち、細胞への感染を阻害するシアロ糖鎖ポリマーを酵素合成するとともにその合成法を確立した。また、シアル酸転移酵素をも組み合わせた酵素合成法によってトリインフルエンザウィルスの感染阻害剤を合成した。さらに、部位特異的変異を導入することにより糖転移活性が高められた変異酵素を用いた効率的な生理活性糖鎖複合体の酵素合成法を開発した。
３．ビフィズス菌の 1,2-α-L-Fucosidase の遺伝子クローニングを行い、その触媒ドメインを組換え大腸菌で発現させ、得られた精製組換えタンパク質を結晶化して X 線立体構造解析を行った。さらに、ビフィズス菌とヒト腸管との接着における本酵素の役割を解明するために特異性を検討した。

［研究成果］
1. ビフィズス菌のEndo-α-*N*-acetylgalactosaminidaseの遺伝子クローニングと酵素機能の解明：Endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase (Endo-α-GalNAc-ase) は腸管に存在するムチンなどの糖タンパク質のセリンまたはスレオニン残基に結合する*O*-結合型糖鎖（ムチン型糖鎖）のコア 1 構造Galactosylβ 1,3-*N*-acetylgalactosamine (Galβ 1,3-GalNAc)α1-Ser/Thrから二糖を遊離するエンドグリコシダーゼである。私たちは腸内細菌の中でも善玉菌として知られるビフィズス菌が本酵素を広範に有することを見出し、*Bifidobacterium longum* JCM1217 株から本酵素遺伝子をクローニングした。先ず、全ゲノムが解読されているビフィズス菌株*Bifidobacterium longum* NCC2705 の遺伝子の情報を基にして、本酵素の遺伝子を推測した。すなわち、*Streptococcus pneumoniae*、*Alcaligenes* sp.から見出されているEndo-α-GalNAc-aseは分子量がいずれも 160kDa と大きな分子量を持つ分泌酵素である事実を基にして*B. longum* NCC2705 のゲノムを検索したところ、いくつかの本酵素遺伝子の候補を見出した。一方、Endo-α-GalNAc-aseが見

出されている*St. pneumoniae*、*Clostridium perfringens*のそれぞれのゲノムについて、上記の候補遺伝子に対するホモロジー検索を行ったところ、いずれの菌にもホモロジーが高い遺伝子を見出した。そこで、この部分を増幅させるプライマーを設計し、*B. longum* JCM1217 株のDNAを鋳型にしてPCRを行った結果、DNAの増幅が見られた。増幅したDNAから本酵素遺伝子（GenBank accession number AY836679）を含む断片をプラスミドpET-23dに組み入れ、大腸菌BL21DE3 に形質転換し、得られた組換え菌からHis-Tagが付加した組換え酵素をニッケルカラムによって精製した。本酵素のORF部分の塩基とアミノ酸の配列を決定した結果、本酵素は 1,966 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、N末端側にはシグナル配列が、C末端側には膜アンカーが存在していた（図１）。また、本酵素は既知のいずれのGlycoside Hydrolase (GH)

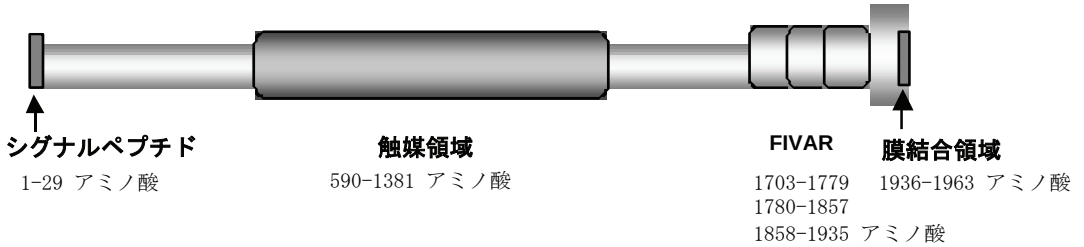


図１ *Bifidobacterium longum* JCM1217 株のエンド-α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼの構造

ファミリーに属する酵素とも有為な相同性が見られない新規なアミノ酸配列を有しており、GH ファミリー101 が新設されて CAZY に登録された。本酵素のアミノ酸配列は、*St. pneumoniae*、*Cl. perfringens*、*Streptomyces* 属などの微生物における機能未知タンパク質と高い相同性を持ち（31-53%）、これらのホモログが本酵素をコードする可能性が示唆された。次に、本酵素の活性や特異性について、木曽グループが合成した 4-Methylumbelliferyl Galβ 1,3-GalNAc や p-Nitrophenyl 二糖などを用いて調べた。その結果、本酵素は *O*-結合型糖鎖のコア１からコア８構造のうち、コア 1 構造の Galβ 1,3-GalNAcα1-にのみ特異的に作用し、コア３構造の Galβ 1,3-GalNAcα1- に若干作用する他は全く活性が見られなかった。しかし、合成された二糖である Glcβ 1,3-GalNAcα1-や GalNAcβ 1,3-GalNAcα1-に対しては、Galβ 1,3-GalNAcα1-に対する作用のそれぞれ約35%、17%の活性が見られた。

加水分解酵素は結晶構造解析などによってアスパラギン酸あるいはグルタミン酸残基の酸性アミノ酸残基が触媒に関係するアミノ酸残基と同定されている。そこで、本酵素の活性中心のアミノ酸残基を推定する目的で、ホモログ間で特によく保存されているアスパラギン酸あるいはグルタミン酸残基の全てについて部位特異的変異を導入し、アスパラギンあるいはグルタミン残基に置換した変異酵素を作成した。得られた 23 の変異酵素について加水分解活性を調べた結果、変異酵素D682NおよびE822Qについて著しい活性の低下が見られ、Asp682 およびGlu822 が本酵素の加水分解活性に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。そこで、Asp682 および Glu822 をそれぞれアラニンに置換した組換え酵素を作成し、活性を調べた結果、nativeな酵素 の K_m = 21 μM, k_{cat} = 18 /sec に対して、E822A ではそれぞれ 107 μM, 0.23 / sec となり、D682A については高い基質濃度の条件下においてもほとんど活性は見られなかった。以上の結果より、本酵素のAsp682 およびGlu822 が活性に関与する重要なアミノ酸であることを確認した。

２．<u>ビフィズス菌のEndo-α-*N*-acetylgalactosaminidaseの糖転移活性を活用した生理活性糖鎖複合体の酵素合成</u>:これまでに見出されている幾つかの Endo-α-GalNAc-ase は加水分解活性の他に糖転移活性が報告されているが、糖転移活性は基質に対してretaining型の酵素だけが有することが報告されている。そこで、本酵素について、*p*-Nitrophenyl Galβ1-3GalNAcを基質とした加水分解反応を^{1}H-NMR解析により調べたところ、遊離した二

糖の GalNAc 残基のβ-アノマーが反応時間と共に増加することが認められ、本酵素も retaining 型酵素であることが明らかになった。このような結果を踏まえて、本酵素の糖転移活性を検討した結果、本酵素が単糖に糖供与体の二糖を転移付加する糖転移活性を有することを見出した。すなわち、水酸基を持つ化合物は、本酵素の糖転移反応の受容体と成り得ると考えられ、Galβ1-3GalNAc 二糖を転移付加することが示唆された。そこで、1-アルカノールへの糖転移反応を試みた。さまざまな 1-アルカノールを受容体とし、*p*-Nitrophenyl Galβ1-3GalNAc を糖供与体として反応を行い、反応液について薄層クロマトグラフィーによって分析したところ、Galβ1-3GalNAc 二糖が各アルカノールへ転移した生成物が示された。また、本酵素はペプチド-T やブラジキニン、PUMP-12 などの生理活性ペプチドのセリンまたはスレオニン残基に二糖を付加することを確認した。さらに合成されたムチンのペプチドである MUC1a ペプチドのセリンまたはスレオニン残基へ糖鎖が転移付加されることを MALDI-TOF/MS によって確認した（ 糖転移生成物 $(M+H)^+$1476.57)。これらの結果より、本酵素の糖転移活性を用いることによってムチンのミミック化合物を合成できることが明らかになった。

３．糸状菌のEndo-β-*N*-acetylglucosaiminidaseの糖転移活性を利用したヒトインフルエンザウィルス感染阻害剤の化学-酵素合成：ヒトインフルエンザウィルスが宿主細胞の膜上にある糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の末端に存在するシアル酸を受容体として細胞に結合し感染することは良く知られている。なかでも重篤な症状をもたらすA型ウィルスはα-2,6結合したシアル酸を菌体膜上の受容体であるヘマグルチニン（赤血球凝集因子）が認識して細胞に結合する。

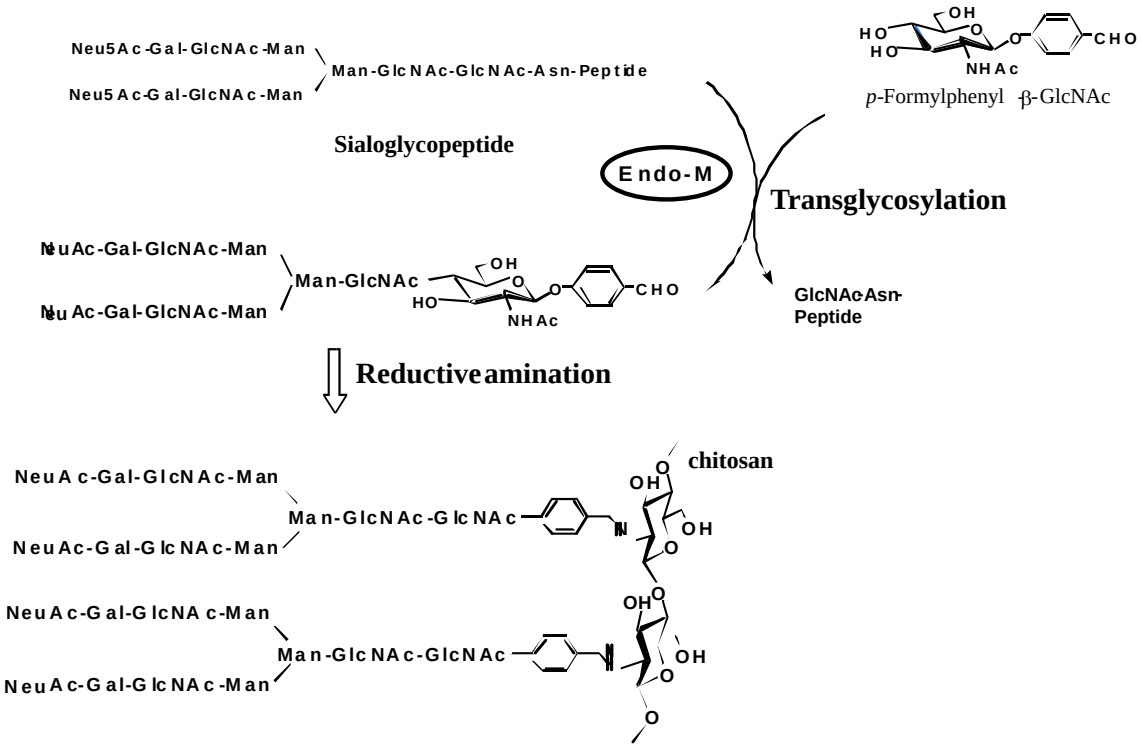


図２ ヒトインフルエンザウィルス感染阻害剤の化学-酵素合成法

私たちはニワトリ卵黄から得られる糖ペプチドの複合型糖鎖の非還元末端にα-2,6結合したシアル酸が存在することに着目し、この糖鎖にウィルスを結合させることによって、細胞への感染の制御が可能になるのではないかと考えた。さらに糖鎖はモノマーよりもポリマーの方がモル単位の効果が高められる「多価効果」があることが知られているので、シアロ糖鎖を多数持つポリマー化合物はウィルスに対する結合能が高く、従って、感染阻害剤として有効であると考えられる。そこで、シアロ糖鎖ポリマーの基材として

キトサンを用いて、細胞膜をミミックした化合物を化学-酵素合成した（図２）。先ず、合成した*p*-Formylphenyl β-GlcNAcを糖鎖受容体として、Endo-Mの糖転移活性により、ニワトリ卵黄由来の糖ペプチドのシアロ糖鎖を転移付加した。次いで、この化合物を還元アミノ化反応によってキトサンに付加して、シアロ糖鎖重合体を合成した。シアロ糖鎖重合体（CDO-Chitosan）のウィルス感染阻害能を、ペルオキシダーゼでラベルしたシアロ糖タンパク質フェツインを用いて、A型ウィルスA/New Caledonia/20/99(H1N1) および A/Panama/2007/99(H3N2) とシアロ糖鎖重合体との競合阻害活性を調べた結果、コントロールとして添加したフェツインに比べて300倍以上高い競合阻害活性が示された（図３）。また、A型ウィルスのMDCK細胞への感染をCDO-Chitosanの存在下で行い、CDO-Chitosan の残存感染力価をELISA法によって測定した結果、フェツインを添加した場合に比べて高い残存力価を示し、A/Hyogo/73/2002 (H1N1) による感染に対しては100倍以上の力価を示した。キトサンもニワトリ卵黄由来糖ペプチドもそれぞれ人体に無害な物質であり、豊富に存在することから工業生産が期待できる阻害剤である。

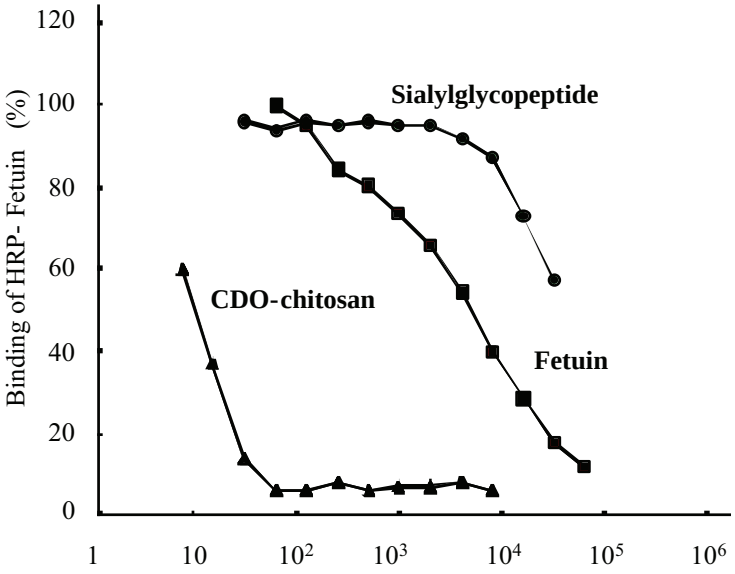


図３　シアロ糖鎖重合体によるヒトインフルエンザウイルスの結合阻害効果

４．糸状菌のEndo-β-*N*-acetylglucosaiminidaseの糖転移活性を利用したトリインフルエンザウィルス感染阻害剤の化学-酵素合成：世界中に深刻な影響を与えているトリインフルエンザウィルスは糖鎖の非還元末端にα-2,3結合したシアル酸を認識して細胞に結合し感染する。そこで、上記のようにして化学-酵素合成したヒトインフルエンザウィルス感染阻害剤の糖鎖非還元末端のα-2,6結合したシアル酸をα-2,3結合したシアル酸に転換したトリインフルエンザウィルス感染阻害剤の合成を企てた。すなわち、上記の化学-酵素合成法に従って阻害剤を作成する過程で、Endo-Mの糖転移活性によりニワトリ卵黄由来の糖ペプチド糖鎖を転移付加した後、シアリダーゼを作用して先ず脱シアル化した。このアシアロ糖鎖を含有する化合物に海洋微生物由来のα-2,3結合特異的なシアル酸転移酵素を用いてα-2,3結合シアル酸を糖鎖に導入し、得られた化合物を還元アミノ化反応によってキトサンに付加して、シアロ糖鎖重合体を合成した。本化合物についてトリインフルエンザウィルスPR（H1N1）のMDCK細胞への感染阻害活性を調べたところ、弱い阻害活性しか見られなかった。

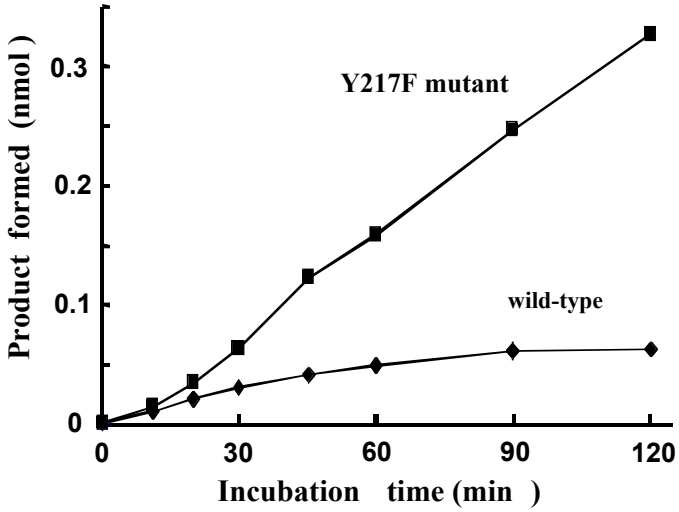


図４　Y217F 変異酵素と wild-type 酵素による糖転移反応における生成物の相違

５．糸状菌の Endo-β-*N*-acetylglucosaiminidase の変異酵素の糖転移活性解析とその応用：インフルエンザウィルスを初めとして、さまざまな生理活性糖鎖複合体を合成する際に重要なツールとなるEndo-Mの糖転移活性の上昇を図るために変異酵素の作成を行った。従来より、Endo-Mの活性中心はN-末端より177番目のグルタミン酸残基であることが示唆されている。そこで、活性中心付近のアミノ酸残基を網羅的に部位特異的変異を導入し、糖転移活性が高められた変異酵素を探索した。変異操作を容易にするために、従来、用いていた組換え酵母*Candida boidini*中の本酵素の遺伝子をPCRによって取得した後、pET23bベクターを用いて大腸菌に入れ換え、発現したHis-Tag付きの変異酵素を用いて調べた。その結果、217番目のチロシン残基をフェニールアラニンに変えた変異酵素（Y217F）はもとの酵素と比較して糖転移活性が著しく上昇し、加水分解活性が著しく抑制された変異酵素であることを見出した（図４）。
また、175番目のアスパラギン残基をアラニンに変えた変異酵素（N175A）は加水分解活性が全く失われているにもかかわらず、反応中間体と考えられるオキサゾリン型糖鎖を供与体として加えた場合には糖転移生成物を生成する特異な変異酵素であることが明らかになった。このように、Endo-Mを部位特異的変異することによって糖転移活性が高められた変異酵素を取得することができた。そこで、変異酵素を用いることによって収率良く阻害物質を合成することができた。
６．ビフィズス菌の 1,2-α-L-フコシダーゼの解析：α-1,2-L-フコシル基はヒト ABO 式血液型の抗原決定基のコア構造であり、腸管に分泌される血液型物質を含むムチンなどの糖鎖に頻繁に見出される残基である。私たちは有用な腸内細菌であるビフィズス菌について 1,2-α-L-フコシダーゼ活性を調べたところ、*Bifidobacterium bifidum* などが本酵素を分泌生産することを見出した。そこで、*B. bifidum* JCM1254 株のゲノムライブラリーを作製し、発現クローニングを行って、1,2-α-L-フコシダーゼ遺伝子を単離した。
1,2-α-L-フコシダーゼは 1,959 アミノ酸残基からなる分子量約 20 万の巨大なタンパク質であり、N 末端側にはシグナル配列が、C 末端側には膜アンカーが存在していた（図５）。そこで、deletion 解析を行い、フコシダーゼ活性を担うドメイン（catalytic

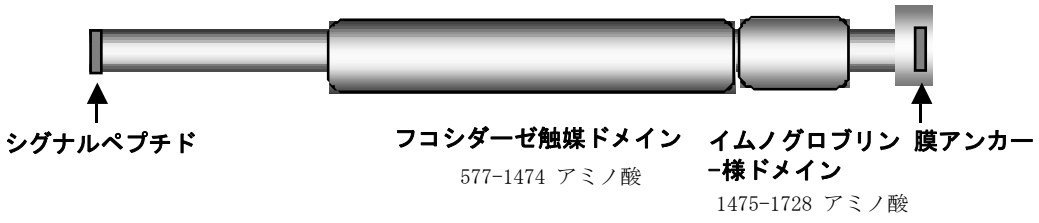


図５ *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株の 1,2-α-L-フコシダーゼの構造

domain)を単離した。精製ドメインは、α-1,2-フコシル基に対して極めて高い特異性を示し、さらにオリゴ糖だけでなくブタ胃ムチンのような糖タンパク質の糖鎖にも作用した。また、本酵素は ^{1}H-NMR 解析により、inverting 型酵素であることを明らかにした。本ドメ

インを構成するアミノ酸配列はデータベース上のいくつかの腸内細菌由来の機能未知タンパク質と高い相同性を示し、新奇なグリコシダーゼファミリー（GH family 95)を形成することが明らかとなって、CAZYに登録された。Catalytic domain　の下流には、Immunoglobulin (Ig)-likeドメインと呼ばれる保存性の高い領域が存在していた。Ig-likeドメインは、もともと病原性大腸菌が腸管に侵入する際に重要な役割を果たすタンパク質“ インチミン（Intimin)”に見出された構造であるが、糖鎖構造の認識や糖質関連酵素の構造保持などに関わることが示唆されている。1,2-α-L-フコシダーゼにおける本ドメインの機能は明らかではないが、その長さ（254 アミノ酸）から考えると、フコシダーゼドメインをビフィズス菌の細胞壁から突き出して、腸管に存在するフコシル基に作用しやすくしていることが推察される。精製したフコシダーゼドメインを用いて、L-フコシル基に対する特異性を調べた結果、糖鎖の非還元末端に存在するα-1,2-L-フコシル基に非常に高い特異性を示した。α-1,3 結合にはほとんど作用せず、α-1,4、α-1,6 結合には全く作用しなかった。*p*-Nitrophenyl α-L-フコースなどの人工基質にも全く作用しなかった。一方、α-1,2-L-フコシル基をもつミルク中のフコシルオリゴ糖やブタ胃ムチンなどの糖タンパク質糖鎖に良く作用し、本酵素が実際に腸管内においても機能していることが示唆された。また、Catalytic domainを大腸菌で大量発現させた組換えタンパク質について結晶化に成功し、その構造解析を行った結果、N-末端側からβ-サンドウィッチ領域、ヘリカルリンカー領域、α-ヘリカルバレルドメイン、C-末端のβ-シートリッチドメインの４つのドメインからなることが明らかになった。さらに、α-ヘリカルバレルドメインに活性中心と考えられる大きなポケットがあることが示された。

［研究成果の位置付け、類似研究との比較］

本研究は微生物が生産する酵素を糖鎖工学のツールとして用いることにより、有用な物質＝生理活性や機能性を持つ糖鎖複合体を合成しようとする点でユニークな研究である。すなわち、従来は糖鎖の分析など、ファインケミカルの面でしか利用が考えられていなかったエンド型のグリコシダーゼを、その特異性を生かす事によって、モノ作りの手段として利用できることを明らかにしたことは大変に意義深い。また、その成果は大量に得ることが容易な微生物の酵素を利用する点で実用化に直結し、バイオテクノロジーのレベルで糖鎖医薬品の生産が可能になった点で大きな意義がある。このような視点から、機能を持った糖鎖複合体を合成しようとする研究はこれまでに国の内外で行われていなかった。合成のターゲットは乳酸菌との腸内での共生を図る人工ムチンであり、ウィルスによる感染を阻害する物質である点で、本研究の成果は非常に有用性が高い。現在の本研究のレベルは基盤研究の域を出ていないが、今後、実現化し得る可能性は高い。そのための足固めをすることが重要である。幸いにも国の内外で私たちと類似の研究は行われていない。従って、酵素による合成条件を詳細に検討することや、技法の開発を今後も継続しなければならない。本研究はここで終了してしまう訳ではなく、今後、さらにステップアップすることが重要である。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究の課題である「酵素法による機能性糖鎖複合体の合成」については、その研究成果として、インフルエンザウィルスの感染を阻害する機能性糖鎖複合体の合成に成功し、その方法を確立して、実際に極めて効率的にモノ作りができた。この複合体の生産を実用化するためのアイデアがさまざまな企業から出されている。すなわち、マスクの製造や飲料の添加物、空気洗浄器のフィルターなどに用いると言ったアイデアが寄せられている。そこで、次に行わなければならないことは、この複合体を何らかの支持体に結合させる技術的なことがらである。これをクリアすることができれば、インフルエンザ治療薬として薬害が問題になっているタミフルなどの医薬品とは異なった感染予防医薬品として、社会へ貢献することが可能であり、その波及効果は大きいと考えている。

さらに「乳酸菌と糖鎖の相互作用の解析」に関しては、その研究成果としてビフィズス菌の腸管接着に関係すると考えられる糖質分解酵素を解明したことが挙げられる。その特異性を解析することにより、ビフィズス菌とヒト腸管との接着に糖質分解酵素が関与していることが示唆された。このような結果は今後、食品や飲料に添加するプレバイオティクス(宿主腸内の有用菌のみの生育を増進し、健康に有益に働く難消化性の物質)をデザインする上で貴重な情報を与えることになり、昨今の健康志向の中、その波及効果は大きいと考えている。

3．3　革新的な糖鎖構造解析手法の開発(大阪大学　糖鎖構造研究グループ　長束)

(1)研究実施内容及び成果

シアル酸を含むムチン型糖鎖を網羅的に解析する手法の構築を目的として、①糖鎖の切り出し条件の検討、②蛍光標識前後における夾雑物質の効率的な除去法の検討、③シアル酸の有無、及び鎖長の長短に関わらず同一条件で分離できる HPLC 条件の検討、④解析した構造情報の表示法に関する検討を行った。

①糖鎖の切り出し条件の検討

糖蛋白質からムチン型糖鎖を切り出す手法として、従来から広く用いられてきたのは、強塩基性水溶液中でのβ脱離反応である。しかし、塩基性水溶液中でムチン型糖鎖は、β脱離反応がさらに進行し、還元末端においてピーリング反応と呼ばれる分解が進んでしまう。これを避けるために、従来は、還元剤を共存させ、還元末端を糖アルコールにすることによって分解を防いでいたが、これでは蛍光標識ができず、高感度分析を行うことができなかった。これに対して、塩基性水溶液のインラインフロー方式による切り出しと直後の中和反応による手法が検討され報告されているが[Oh-eda, et al. (1996) *Anal. Biochem.*, **236**, 369-371.　Karlsson & Packer (2002) *Anal. Biochem.*, **305**, 173-185.]、反応時間を短くした場合、糖鎖構造によって収率が大幅に異なること、また反応時間を長くすると溶液が大量となり微量分析に不向きであるなどの問題点があった。また、炭酸アンモニウムを共存させることにより還元末端をブロックし、ピーリング反応を防ぐ方法が報告されているが[Huang, et al. (2001) *Anal. Chem.*, **73**, 6063-6069]、改善はされるものの十分な効果は得られなかった。これらの他にも従来から用いられてきた方法として、無水ヒドラジンによるβ脱離反応がある[Kuraya & Hase (1992) *J. Biochem.*, **112**, 122-126. Iwase et al. (1992) *Anal. Biochem.*, **206**, 202-205]。我々は、完全な無水条件で行えば、ピーリング反応を起こさずに、糖蛋白質からの切り出し反応のみを優先的に進行させることができると考え(図 3-4-1 参照)、無水ヒドラジンによる切り出し反応の至適化を行った。また、ヒドラジンは、糖の還元末端にグリコシルヒドラジンやヒドラゾンの形で付加してピーリング反応をブロックすると予想され、この点においても有利であると考えた。温度、時間、減圧度、無水ヒドラジンの品質、反応容器などの検討を行い、図 3-4-2 に示すように、非常にピーリング反応率(分解率)の低い切り出し条件を確立することができた。

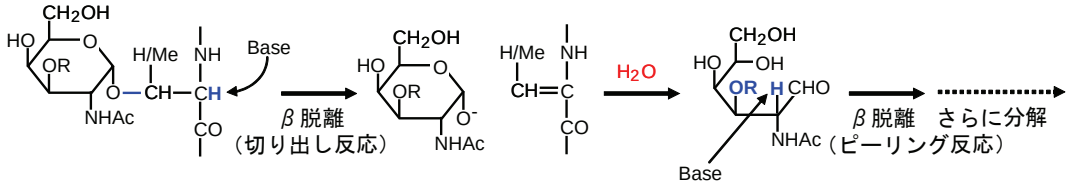


図 3-4-1. 糖蛋白質からムチン型糖鎖の塩基による切り出し反応。水が存在すると 2 段目の反応が起こり、さらなる β 脱離反応（ピーリング反応）が進行する。加水分解による糖の開環は速やかに起こるので、水溶液中では、二つの β 脱離反応を分離することは難しい。しかし、無水条件下で反応させることによって、最初の β 脱離反応（切り出し反応）のみを優先的に進行させることが可能である。

②蛍光標識前後における夾雑物質の効率的な除去法の検討

高感度な分析を可能にするためには、生体由来及び標識反応由来の様々な夾雑物質を、糖鎖を失うことなしに効率よく除去する必要がある。従来、ピリジルアミノ化標識した糖鎖の精製には、ゲル濾過が用いられてきたが[Hase (1994) *Methods Enzymol.*, **230**, 225-237]、迅速性に欠けることや、ムチン型糖鎖に多く含まれる二～三糖の小さなオリゴ糖と、夾雑物質との分離が

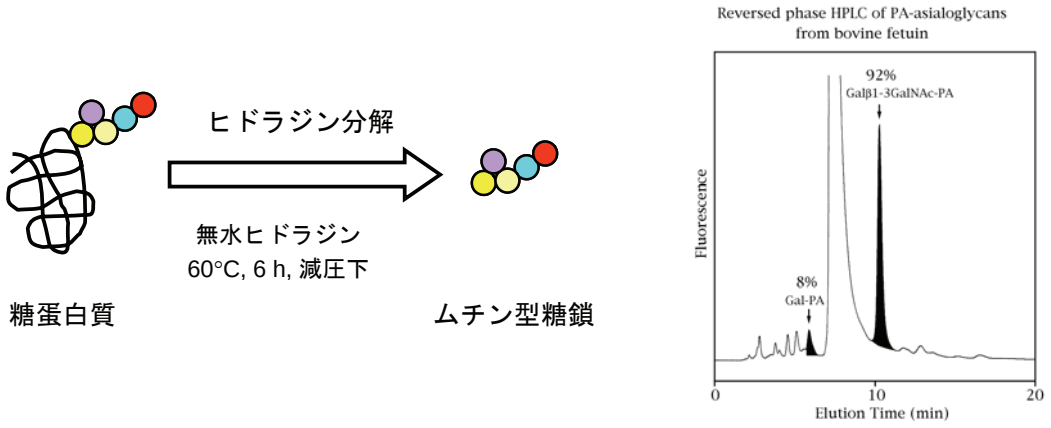


図 3-4-2. 乾燥した糖蛋白質試料を無水ヒドラジン（増田化学）に溶かして、減圧下、過熱することにより、糖鎖を切り出す。フェツインを用いてピーリング反応の割合を調べたところ、8%以下に抑えられていた。

十分でないなどの問題点があった。また、ODS 基との疎水性相互作用により、迅速にピリジルアミノ化糖鎖を精製する手法を、我々はこのプロジェクト以前に報告しているが[Natsuka et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1174-1175]、オリゴ糖の収率は高く、*N*-結合型糖鎖の精製には大変有効であるものの、単糖や二糖の回収率に問題があった。

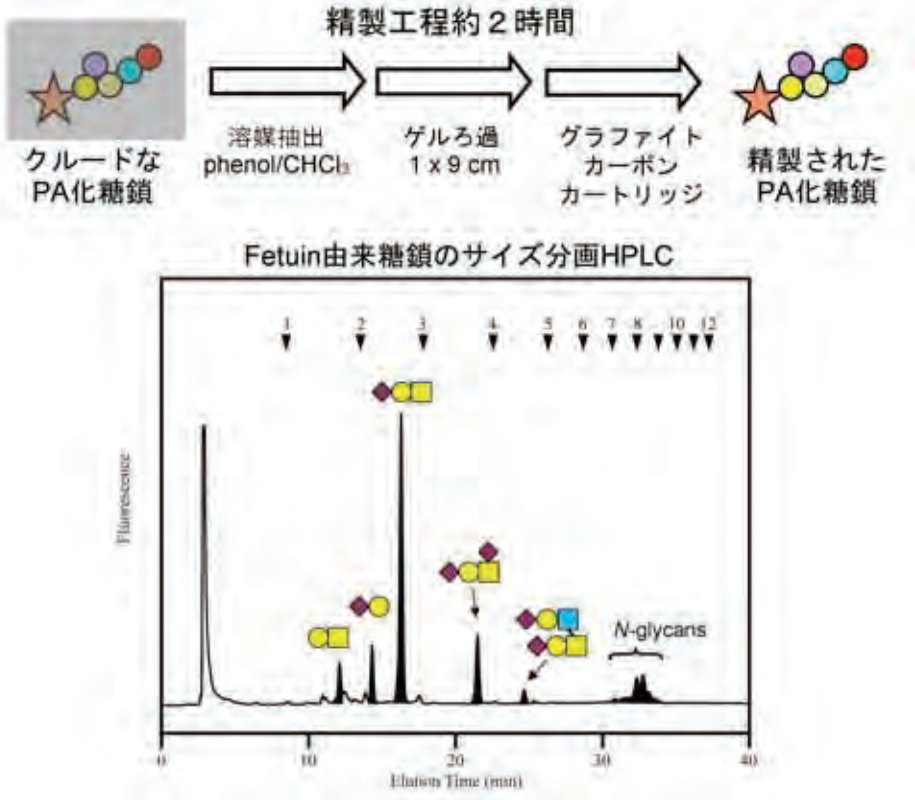


図 3-4-3. 溶媒抽出、ミニカラムによるゲル濾過、グラファイトカーボンカートリッジを組み合わせて行うことにより、短時間で効率よく、しかも糖鎖を高収率で精製することが可能になった。

さらに、セルロース樹脂やアガロース樹脂等との水素結合により糖鎖を吸着し精製する手法も、従来から使用されてきた[Shimizu et al. (2001) *Carbohydr. Res.*, **15**, 332, 381-388.　Wada et al. (2004) *Anal. Chem.*, **76**, 6560-6565]。しかしこの手法は、七糖以上の比較的長鎖のオリゴ糖の精製には極めて有効であるが、短鎖のオリゴ糖はほとんど回収できず、ムチン型糖鎖の精製には適していない。これに対して我々は、種々の溶媒抽出、ゲル濾過、種々の吸着クロマトグラフィーなどを単体または組み合わせで検討し、図 3-4-3 に示した手法を確立した。この精製手法の開発により、生体サンプル中の様々な夾雑物質の妨害を受けることなく、標識糖鎖を高感度で検出することが可能となった。また、この精製手法は、従来のゲル濾過法に比べて迅速化と小スケール化の点においても優れており、将来の自動糖鎖分析機器（糖鎖シーケンサー）の開発にも資するものである。

<u>③シアル酸の有無、及び鎖長の長短に関わらず同一条件で分離できるHPLC条件の検討</u>

標識糖鎖を分離分析する手法には、定量性、高感度検出、分取可能性、再現性、高分離能などの要件が求められる。我々は、これらのすべてを高い次元で満たす分離分析手法としてHPLC を選択し、その条件検討を行った。これに対して、キャピラリー電気泳動法では導入できる試料量や分取の制限、溶出時間の精度の問題がある。また質量分析器は構造解析法としては強力な手法の一つではあるが、生体由来の糖鎖は多種多様な混合物であり、特に分岐および結合位置によるアイソマーの定量的分別解析が不可欠であるので、未知試料を対象として複雑な混合物のままで分析することは困難である。従来から、*N*-結合型糖鎖の分離分析には2次元 HPLC マッピング法が用いられてきた[Hase et al. (1987) *Anal. Biochem.*, **167**, 321-326. Tomiya et al. (1988) *Anal. Biochem.*, **171**, 73-90]。しかし、中性糖鎖とシアル酸を含む酸性糖鎖の分析には、異なる緩衝液系が用いられており、操作とデータの解析が共に煩雑であった。これに対して我々は、Royle らが 2-アミノベンズアミド標識糖鎖の分離に使用した緩衝液系[Royle et al. (2002) *Anal. Biochem.*, **304**, 70-90]をピリジルアミノ化糖鎖にも応用し、その有効性を確か

めると共に分離条件の至適化を行った。この緩衝液系では、サイズ分画 HPLC に従来の高濃度の酢酸トリエチルアミンあるいは酢酸アンモニウムに代えてギ酸アンモニウムを、逆相 HPLC に従来の酢酸アンモニウムに代えて酢酸トリエチルアミンを使用している。これらの緩衝液系の使用により、シアル酸の

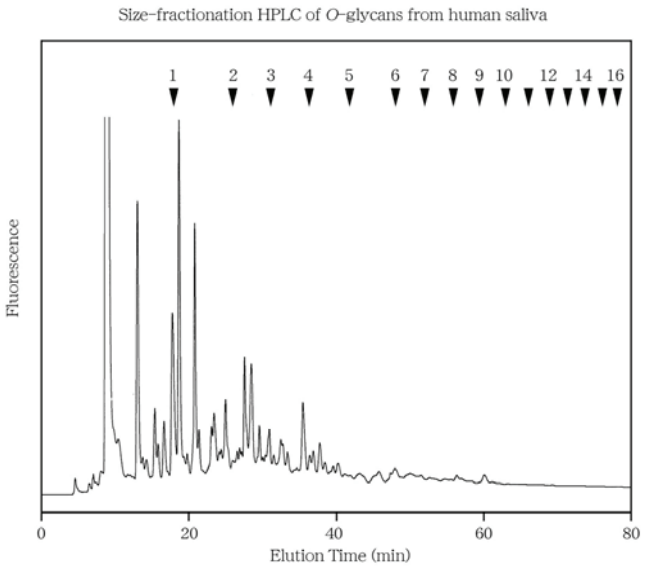


図 3-4-4. サイズ分画 HPLC によるヒト唾液由来ピリジルアミノ化糖鎖の分離パターン。多くの糖鎖がシャープなピークとして分離されている。

有無、及び鎖長の長短に関わらず同一条件でピリジルアミノ化糖鎖を分離できる HPLC 条件を確立することができた。分離分析の一例を、図 3-4-4 に示した。ヒト唾液にはシアル酸を含む多種多様なムチン型糖鎖が存在することが報告されているが[Klein et al. (1992) *Biochemistry*, **31**, 6152-6165]、本手法を用いることにより、それらの糖鎖を効果的に分離することができた。

④解析した構造情報の表示法に関する検討

HPLC により分離分析した結果を簡便に比較検討するために、図による表示法が必要である。この表示図には、糖鎖バリエーションや存在量などの情報が、視覚的に容易に認識できるような形で組み込まれている必要がある。糖鎖は構造多様性が高いので、1次元の HPLC クロマトチャートでは十分に分離できていない場合が多く、表示には不十分である。また、複数のクロマトチャートを羅列するだけでは、情報を伝えづらい。従来、*N*-結合型糖鎖の分離分析結果の表示には、HPLC マップが使用されてきた[Tomiya et al. (1988) *Anal. Biochem.*, **171**, 73-90]。我々の手法においても、この表示法を応用し、さらに糖鎖の存在比を半定量的に表示できるようにした。

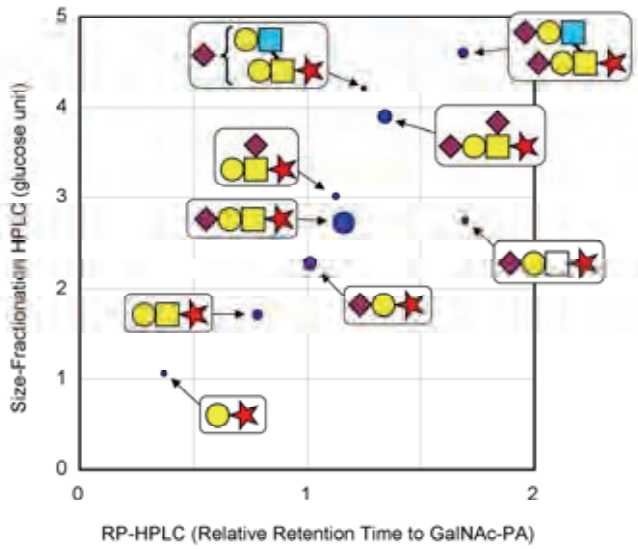


図 3-4-5. 定量値情報を付加したフェツイン由来ムチン型糖鎖の2次元 HPLC マップ。縦軸はサイズ分画 HPLC での溶出時間をイソマルトオリゴ糖の溶出時間で標準化した値、横軸は逆相 HPLC での *N*-アセチルガラクトサミン-PA に対する相対溶出時間である。糖鎖構造の記号は、Consortium for Functional Glycomics の基準に従った。白四角は *N*-アセチルガラクトサミンの C2 エピメリ化反応で生じた *N*-アセチルタロサミンを示す。この分析における当該 C2 エピメリ化率は 2.6%であった。☆印はピリジルアミノ基を示す。また、各点の直径は、各標識糖鎖の検出量の3乗根に比例している。

以上のようにして、生体試料由来のムチン型糖鎖を網羅的にかつ高感度で分析する手法を確立することができた。本手法を用いれば、本プロジェクトの当初目標であったムチン型糖鎖に限らず、①セリンまたはスレオニンに結合している他の *O*-結合型糖鎖や、②*N*-結合型糖鎖をも網羅的に解析することが可能である。また、遊離の糖鎖は、ピーリング反応以外にも、C2 エピメリ化による異性化を起こすことが知られている。本手法では、この C2 エピメリ化は3%以下に抑えられている(図 3-4-5 を参照)。この異性化率は、従来の *N*-結合型糖鎖のヒドラジン分解による切り出しの場合よりも低い値である。

①セリンまたはスレオニンに結合している他の *O*-結合型糖鎖の解析

本手法によりムチン型糖鎖を切り出し、標識し、分離する工程において、*O*-フコース型、*O*-マンノース型、*O*-GlcNAc 型などの他の *O*-結合型糖鎖も同時に解析ができる。実際、本手法を用いてマウスの脳由来の糖鎖を網羅的に分析した結果、*O*-マンノース型糖鎖を検出することができた。また、これまでに知られていない構造であっても、セリンまたはスレオニンに結合している *O*-結合型糖鎖であれば、クロマトグラフ上にピークとして検出することが可能である。このように本手法は、全く新しいカテゴリーの未知構造糖鎖を探索する研究にも有効である。

②*N*-結合型糖鎖の解析

従来から用いられている通り、ヒドラジン分解法は *N*-結合型糖鎖の切り出しにも有効である。*N*-結合型糖鎖を定量的に切り出す場合には、アミド結合を切る必要があるため、高温で比較的長い時間反応させる必要がある。またこの場合、極少量の水分が存在する方が、反応が進みやすいことが、経験的に知られている。これに対して、ムチン型糖鎖の切り出しでは、できるだけ水分のない条件下で反応させることにより、ピーリング反応を抑えている。従って、*N*-結合型糖鎖とムチン型糖鎖の両方共を高収率で切り出すことは困難である。しかし一方、本手法ではピリジルアミノ化蛍光標識を採用しているので、切り出し反応での収率が多少低くても、検出感度の高さ

により補うことが可能である。ピリジルアミノ化糖鎖は、市販の HPLC 用蛍光検出器を用いることにより、1 fmol でも検出できる。従来法による *N*-結合型糖鎖のインタクトな形での切り出し効率は30～40％であるのに対して、ムチン型糖鎖のために開発した本手法の条件下における *N*-結合型糖鎖の切り出し効率は約 10％であった。実際、フェツイン、組織因子経路インヒビター、COS 7細胞などで、*O*-結合型と *N*-結合型糖鎖の網羅的一括解析を行い、本手法の有効性を確認した。この網羅的一括解析法の概念図を下に示した(図 3-4-6)。

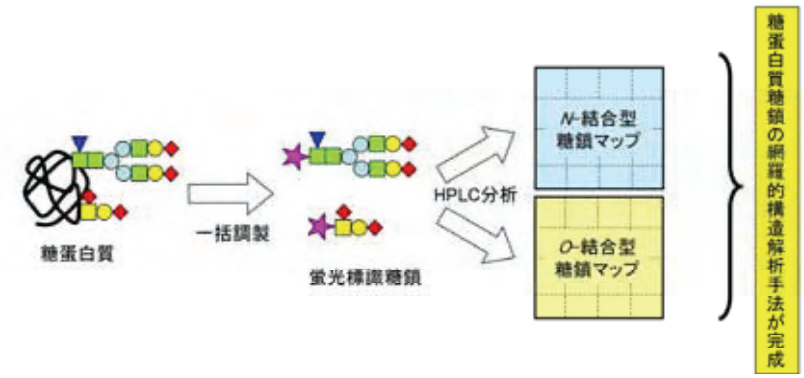


図 3-4-6. *O*-結合型および *N*-結合型糖鎖の一括解析法の確立。同一条件で糖鎖を糖蛋白質から網羅的に切り出し、蛍光標識および精製の後、それぞれの分離条件で HPLC マップを作成し解析する。

以上のようにして、糖蛋白質糖鎖の網羅的一括解析を可能にした。次に、本手法をさらに発展および展開させるために、①標準ピリジルアミノ化糖鎖の調製とライブラリーの構築、②システム生物学に向けた細胞丸ごと糖鎖構造解析、③糖鎖末端ユニットを網羅的に分析する手法の開発を行った。

①標準ピリジルアミノ化糖鎖の調製と糖鎖分子ライブラリーの構築

多種多様な標準ピリジルアミノ化糖鎖の HPLC における溶出位置情報があれば、本手法によって HPLC マップの比較を行うことにより、試料由来の糖鎖を HPLC で分離した段階で、分岐構造も含んだ構造の推定が可能となる。そこで、従来から我々が調製および収集してきた標準ピリジルアミノ化糖鎖に加えて、本プロジェクトにおいても、ムチン型糖鎖や新規構造の *N*-結合型糖鎖の調製を行い、糖鎖 HPLC マップの情報を増やした。現在までに、合わせて百数十種の標準ピリジルアミノ化糖鎖を収集あるいは調製できた。将来、千種程度の糖鎖構造が網羅できれば、他の構造解析手法を用いることなく、本手法による HPLC マッピングのみで、脊椎動物由来糖鎖の網羅的構造解析が可能になると予想される。

②システム生物学に向けた細胞丸ごと糖鎖構造解析

糖鎖は多様である。しかしその多様性の意味は未だ明らかでない。これまでに、糖鎖の生合成に関わる酵素遺伝子のノックアウト実験が多く報告されてきた[Lowe & Marth (2003) *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 643-691]。その過程で予測されたことは、糖鎖は分子システムを構成しており、そのシステムには高いロバストネスが備わっているということである。既に、糖鎖分子群をシステムとして捉え、糖鎖多様性の生物機能を明らかにしようとする記念碑的な報告がカナダのグループから出されている[Lau et al. (2007) *Cell*, **129**, 123-134]。糖鎖分野におけるこのようなアプローチは、今後急速に進展するものと予測される。しかし、糖鎖システムの解析に向けて、現段階において決定的に立ち遅れている手法がある。それは、糖鎖の多様性を分子構造のレベルで正確に分析する技術である。我々は、本手法がこの立ち遅れを解消するためのブレークスル

ーになると考え、糖鎖多様性分析のための細胞丸ごと糖鎖解析を行った。COS7 細胞をモデルとして選択し、その *O*-結合型および *N*-結合型糖鎖の網羅的解析を、本手法を用いて行った。その結果、ハイマンノース型、パウチマンノース型、および2本鎖、3本鎖、4本鎖のコンプレックス型の *N*-結合型糖鎖と、コア1型およびコア2型のムチン型糖鎖を一括して検出し解析することができた。このように、本手法の糖鎖多様性解析への有効性を、細胞培養系において示すことができた。今後は、本手法の、組織や多細胞生物個体などの複雑な系におけるシステム生物学的アプローチへの応用可能性を検証する必要がある。

③糖鎖末端ユニットを網羅的に分析する手法の開発

臨床の現場で用いられている生化学マーカーには、ABO 血液型や膵臓癌診断のための CA19-9 などの糖鎖抗原が含まれる。これらは、糖鎖の多種多様な末端構造の一部であるが、現在用いられている抗体による検出法では、単一の構造しか検出できない。これに対して我々は、糖鎖の末端ユニットを網羅的に解析できれば、多くの未知バイオマーカーを

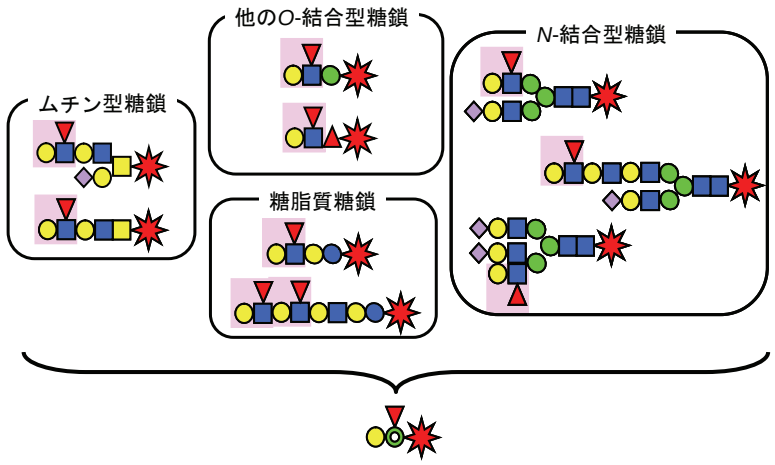


図 3-4-7. 糖鎖末端ユニットを網羅的に分析する手法の意味。例えば Lewis x 構造がどのような構造の糖鎖上に存在していても、本手法を用いれば、同じ Lewis x 構造として一括して検出することができる。化学法の網羅性と、プローブ法による機能性部分の一括検出の、両方を可能にする手法である。

発見することが可能になると考えた(図 3-4-7)。

これまでに、我々の研究も含め、国内外において多くの糖鎖構造解析研究が行われてきたが、その中で我々は、非常に多様な糖鎖構造に潜む規則性に気付いた。それは、ヒトを含む脊椎動物では、糖タンパク質糖鎖の機能構造と多様性は、主としてラクトサミンおよびその類似構造への分子修飾の多様性によって形成されていることである(図 3-4-8)。このような背景から、生体サンプルを化学的に処理してラクトサミン類似構造を持つ糖鎖末端部分だけを取り出し、蛍光標識することによって超高感度で解析すれば、機能性糖鎖ユニットを網羅的に分析できるという着想に至った。具体的には、図 3-4-9 に示したとおり、*N*-アセチルアミノ糖から

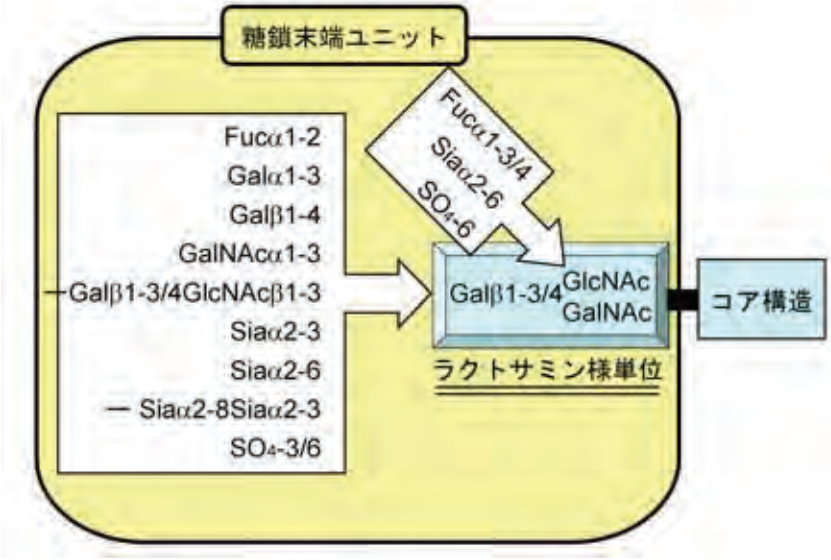


図 3-4-8. 脊椎動物の糖鎖多様性はラクトサミン様構造を含む糖鎖末端ユニットによって担われている。

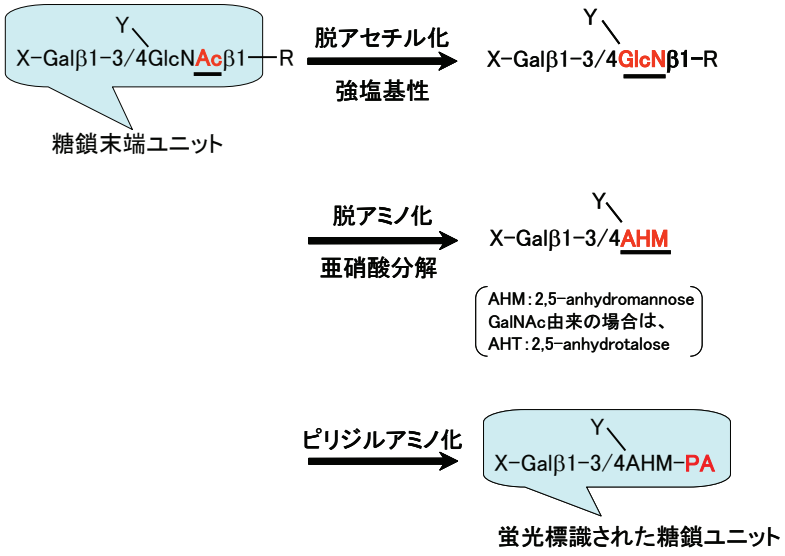


図 3-4-9. 糖鎖末端ユニットの調製スキーム。

アセチル基を強塩基によって外し、亜硝酸分解による脱アミノ化により、グリコシド結合の開裂と同時に環化し 2,5-アンヒドロ糖を生じさせる。新たに生じた還元末端のアルデヒド基に 2-アミノピリジンを結合させることにより、蛍光標識された糖鎖ユニットを調製した。各段階の反応条件の至適化と標識糖鎖の精製条件の検討を行い、蛍光標識された糖鎖末端ユニットを効率的に調製する手法を構築することができた。次に、分離分析系の検討を行い、サイズ分画と逆相の HPLC で2次元展開する系を構築した(図 3-4-10)。

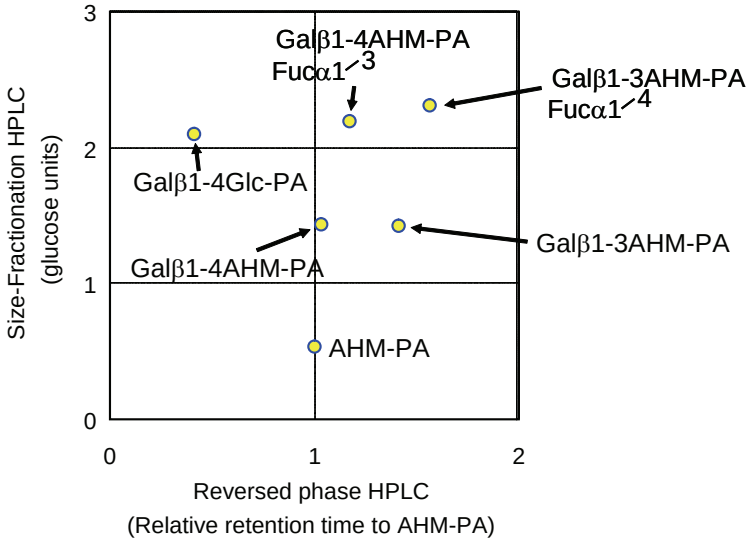


図 3-4-10. ピリジルアミノ化された糖鎖末端ユニットの2次元 HPLC マップ。アイソマーであるタイプ I コア由来糖鎖とタイプ II コア由来糖鎖、および Lewis x 由来糖鎖と Lewis a 由来糖鎖が完全に分離できている。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究により得られた成果により、今後期待できる効果として、①本手法を用いて調製した標識糖鎖の商品化、②糖鎖分子ライブラリーの拡充と糖鎖分子リソースセンター化、③ムチン型を含む *O*-結合型糖鎖の構造グライコーム解析、④糖鎖システムの変動を分子構造のレベルで解析することによるシステム生物学への展開、⑤バイオマーカーとしての特異的糖鎖ユニットの発見、⑥糖鎖シーケンサーに向けた糖鎖構造の自動分析器開発などが上げられる。

①本手法を用いて調製した標識糖鎖の商品化

現在、標識糖鎖は複数の企業から商品化されているが、ほとんどが *N*-結合型糖鎖である。研究者などからのニーズが高いにもかかわらず、ムチン型標識糖鎖はこれまで商品化されていない。これに対して、本手法を用いれば、ムチン型など幅広いタイプの多種多様な標識糖鎖を調製することが可能であり、高純度で得ることも容易であることから、商品化への障壁は低いと予測される。

②糖鎖分子ライブラリーの拡充と糖鎖分子リソースセンター化

本手法により調製できる多種多様な標準ピリジルアミノ化糖鎖を収集し、ライブラリーとする事によって、糖鎖構造解析研究の簡便化と構造研究者の増大に寄与することが期待できる。また、本手法を技術的基盤とすることにより、糖鎖分子の調製収集と分与を恒常的に行う「糖鎖分子リソースセンター」の設立が可能になる。

③ムチン型を含む *O*-結合型糖鎖の構造グライコーム解析

構造研究が進んでいる *N*-結合型糖鎖に対して、機能研究は進展しているものの構造研究は立ち遅れていたムチン型糖鎖を含む *O*-結合型糖鎖を網羅的に解析する構造グライコーム研究の実施が、本手法の確立により期待できる。

④糖鎖システムの変動を分子構造のレベルで解析することによるシステム生物学への展開

糖鎖、レクチン、糖鎖合成酵素の三者は糖鎖システムを形成していると予想される。三者の内、レクチンと糖鎖合成酵素の分析には、遺伝子工学の手法が有効であり、既に研究が進んでいる。一方、糖鎖そのものに対しては、現場に存在する糖鎖分子を直接分析する必要がある。本手法を用いて現場の糖鎖多様性を解析することにより、糖鎖研究の糖鎖システム研究への発展に寄与することが期待される。

⑤バイオマーカーとしての特異的糖鎖ユニットの発見

本研究において開発した糖鎖末端ユニットを網羅的に分析する手法を応用することにより、臨床検査などに役立つ糖鎖性のバイオマーカーを探索することが可能になった。相補性プローブの作製可能性による制限を受けないので、より多くの糖鎖構造をスクリーニングできることから、新規な糖鎖マーカーの発見が期待できる。

⑥糖鎖シーケンサーに向けた糖鎖構造の自動分析器開発

本研究において開発した糖鎖末端ユニットを網羅的に分析する手法は、末端構造だけでなく、内側の構造ユニットも検出することができる。従って、断片化の反応条件を変化させ、様々な糖鎖フラグメントを調製して一括分析することにより、糖鎖のシーケンシング法の確立が期待できる。また、その反応とHPLC 分析の操作を自動機械化し、オンラインで2次元 HPLC のデータ解析を行えるようにすれば、糖鎖シーケンサーとなる。

3．4　細菌毒素と糖鎖の相互作用解析（東京農工大学　西河グループ）

(1)研究実施内容及び成果

【目的】

嫌気性細菌 *Clostridium botulinum* が産生するボツリヌス神経毒素は、その抗原性の違いから A～G 型の 7 種類に分類される。一般にボツリヌス毒素は、神経毒素の他にレクチンや機能未知のタンパク質からなる巨大な複合体構造をとっている（図 1）。経口摂取された毒素複合体は小腸から吸収され、その後神経毒素は体内循環系を介して末梢の神経細胞に到達し、筋弛緩性の麻痺を起こす（図２参照）。この毒素がたどるルートは、研究が進んでいるコレラや赤痢の毒素が侵入した細胞内に留まることと大きく異なり、一度細胞内に侵入した毒素が別の方向から出て行くというトランスサイトーシスの機構を利用していることが考えられるが、これに関する研究報告は殆ど無いのが現状である。我々は、そのトランスサイトーシス機構の全容を解明して、深刻な問題である乳幼児ボツリヌス症における毒素吸収を阻害する毒素吸収中和化合物の調製を可能とするだけでなく、神経毒素部分を他の有用タンパク質に置き換えた物質による、有用高分子体内投与補助剤（ドラッグデリバリーシステム）の創製に応用することを目指して本研究を行った。

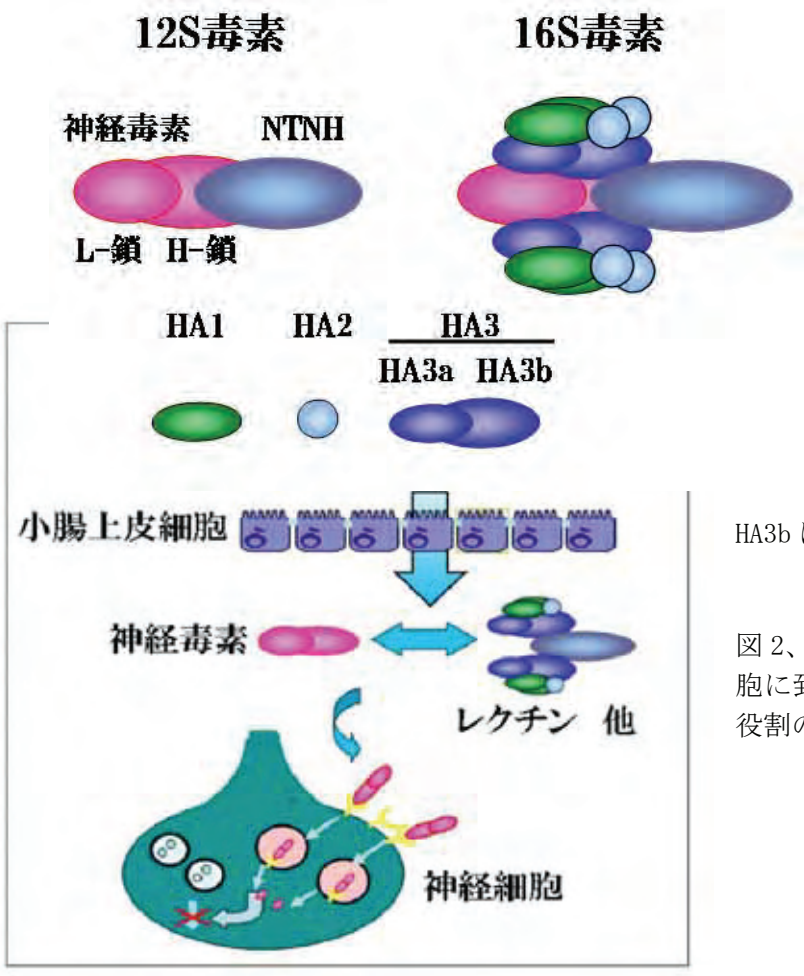


図 1、ボツリヌス毒素複合体の構造予想図。分子量約 30 万の 12S 毒素は、神経毒素と機能未知の NTNH からなり、分子量約 50 万の 16S 毒素は、12S 毒素にレクチン活性のある HA1～3 が複数結合していると考えられている。なお、C 型 16S の HA3 は菌体外でプロテアーゼの作用によりニックが入り、HA3 と HA3b に分断される。

図 2、毒素が吸収され、神経細胞に到達する経路。HA 分子の役割の一つに、神経毒素を消化

液から保護する役割があるとされている。神経毒素は、毒素複合体がリンパ管、血管内に侵入後にその他から分離されると考えられているが詳細は不明である。神経細胞に到達した毒素は、各型特有の細胞表面レセプターに結合して細胞内に侵入し、細胞質に出たプロテアーゼの作用によりアセチルコリンの放出を阻害する。

【方法と結果】

我々は、トランスサイトーシスの全容を解明するにあたって、毒素の体内への移行機構を 1，細胞内への侵入機構、２，細胞内での移動・輸送機構、３，細胞外への分泌機構の三つのステップに分けて考え、順を追って検討していくこととした（図３参照）。また、各ステップでは、毒素複合体を構成するレクチン群が生体側の糖鎖を認識して結合することが重要であるため、レクチン群の糖認識特異性を検討すると共に、各レクチンの立体構造を明らかにして糖結合サイトの部位を推定するなど構造生物学の観点からも毒素の体内移行機構に検討を加えた。

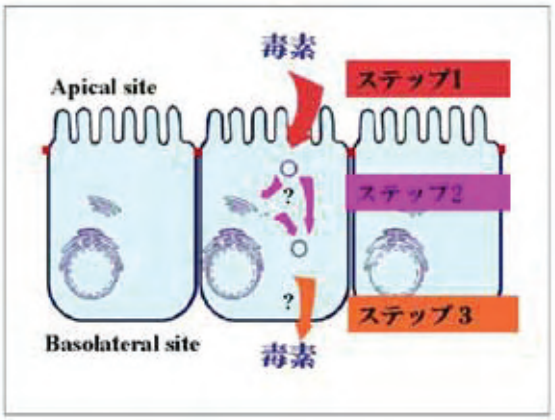
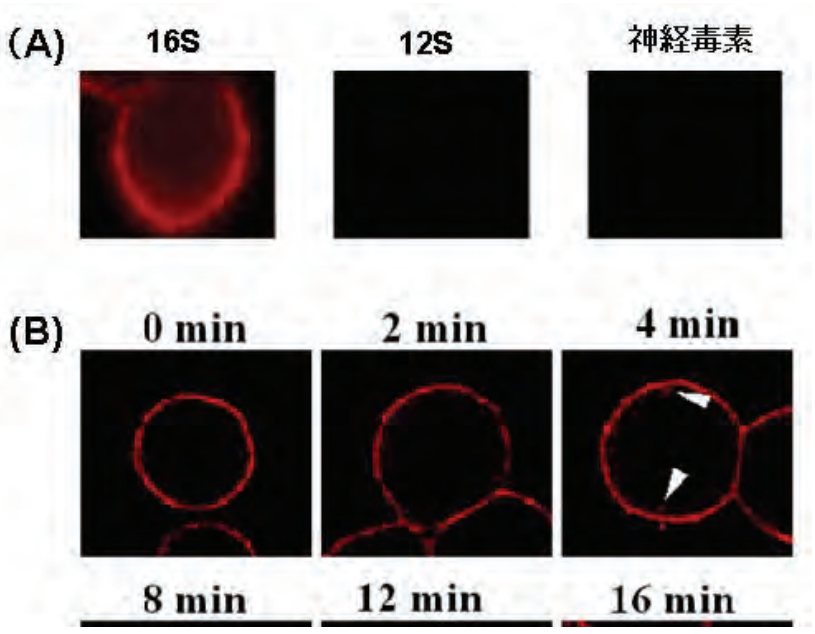


図 3、研究の段階的進め方

・細胞内への毒素侵入機構の解明（ステップ 1）

C 型ボツリヌス毒素複合体(以下 C16S)はモルモットの腸上皮粘膜に結合することが知られていた。そこで、我々はモルモットやラットの腸から毒素が結合するタンパク質を精製し、分子量測定、アミノ酸分析、糖組成分析等の結果から、結合タンパクはムチン様の糖タンパク質であることを明らかにした。そこで、各種ムチンを大量に産生するヒト結腸癌由来培養細胞 HT-29 を用いて毒素のトランスサイトーシス機構を検討することにした。

HT-29 細胞の培地に C 型神経毒素、C12S または C16S を添加し細胞表面に結合している毒素を蛍光標識抗体で検出した（図 4-A)。結果、HA 分子を含む C16S のみが細胞表面に強く結合することが観察された。また、培地に C16S 毒素複合体を加え、一定時間インキュベートした後に共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、時間の経過と共に毒素が細胞内に侵入していた（図 4-B)。



なお、この細胞内移行現象には、細胞表面のシアル酸が結合した O-

結合型糖鎖が強く関与しており、糖脂質の顕著な関与はみられなかった(Nishikawa *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004)。

図４、(A) HT-29 細胞表面に結合している毒素を蛍光顕微鏡で観察したもの。(B) 共焦点レーザー顕微鏡により時間の経過と共に細胞内へ C16S 毒素が移行していく様子。矢印は細胞内に移行した毒素。

次に、細胞表面 O-結合型糖鎖に結合した毒素複合体がいかなるルートを通って細胞内に移行されるかを検討した。具体的には、共焦点レーザー顕微鏡を用いて様々なオルガネラ特有のタンパク質（トランスフェリンレセプター、クラスリン、Lamp-1、EEA1、カベオリン、c-Src その他）と毒素との共局在を観察した。結果、大部分の毒素複合体はクラスリン依存性のエンドサイトーシス機構で細胞内に移行しているが、一部はラフトを介するルートも利用していることが判明した(Uotsu *et al. BBA-Mol. Cell Res.*, 2006)。

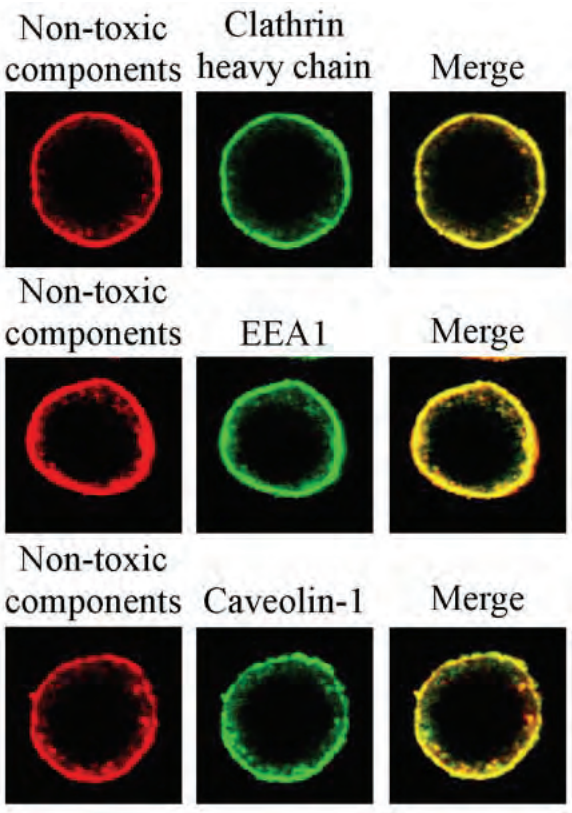


図５、毒素を赤、細胞内局在マーカー（クラスリン, EEA1, caveolin-1)を緑の蛍光で標識し、画像を重ねて共局在を観たもの。毒素複合体はクラスリンやエンドソームのマーカーである EEA1 との共局在が観察された。

・細胞内での輸送機構（ステップ 2)

上記と同様に共焦点レーザー顕微鏡で毒素と各種オルガネラ特有タンパク質との共局在を時間経過を追って調べ、毒素の細胞内での移動ルートを検討した。結果、毒素複合体はエンドサイトーシスによりエンドソームに運ばれているが、神経毒素だけは更にゴルジ装置にまで到達していることが判明した。このことは、毒素複合体が細胞内に移行後神経毒素が分離され、基底膜側へ輸送されることの重要なエビデンスの一つの発見と考えられる(Uotsu *et al. BBA-Mol. Cell Res.*, 2006)。なお、この後神経毒素がゴルジ装置からいかにして基底膜側へ移行するかについては、HT-29 や Caco2 細胞を単層培養して移行機構を観察する実験系を現在確立しており、今後の解明が待たれる。

・HA1 の糖認識特異性

C16S は、現在１分子の神経毒素に１分子の NTNX、６分子の HA1、３分子の HA2、そして３分子の HA3 から構成されると考えられており、このうち神経毒素、HA1、HA3 に糖結合活性がみられる。これまでに、A 型と C 型の HA1 の立体構造が報告されており、A 型は糖結合サイトも決定されているが、C 型は他のレクチンとのホモロジーから結合位置が推定されているに留まっていた。また、A 型はガラクトース、C 型はガラクトースの他に *N*-アセチルガラクトサミン、シアル酸も認識するため(Nakamura *et al. BBA- Gen. Subjects,* 2007)、両者の結合サイト或いはサイトの構造が異なることも考えられた。そこで、我々は大腸菌でリコンビナントの C 型 HA1 を大量に発現させ、ハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶作製を試みたところ、単斜晶系の結晶が得られ 1.6Åの解像度で X 線回折像を得ることができた。さらに、結晶を各種糖の溶液に浸してから回折像を取得するソーキング法により、ガラクトースに結合する site II（A 型の糖結合サイトに相当）の他に、ガラクトース、*N*-アセチルガラクトサミン、シアル酸に結合する新規の site Ⅰの計二箇所の糖結合サイトの存在が明らかになった（図６）。このことは、ウシ顎下腺ムチン（BSM）やブタ胃ムチン（PGM）に対する C16S 全体やリコンビナント HA1 の結合特性、さらにそれらの単糖・オリゴ糖による阻害実験のデータ（図７）とよく一致していた(Nakamura *et al. J. Mol. Biol.,* 2008)。なお、HA1 がオリゴ糖の非還元末端から何番目あたりまでの糖を認識しているかについては、木曽研究室で合成されたオリゴ糖を阻害剤としたムチン結合阻害アッセイにより非還元末端から２ないし３糖目あたりまでは認識特異性を示す可能性があるという結果が得られたため(木曽らの研究報告参照)、現在等温滴定カロリメトリーを用いてより詳細な検討を行っている。

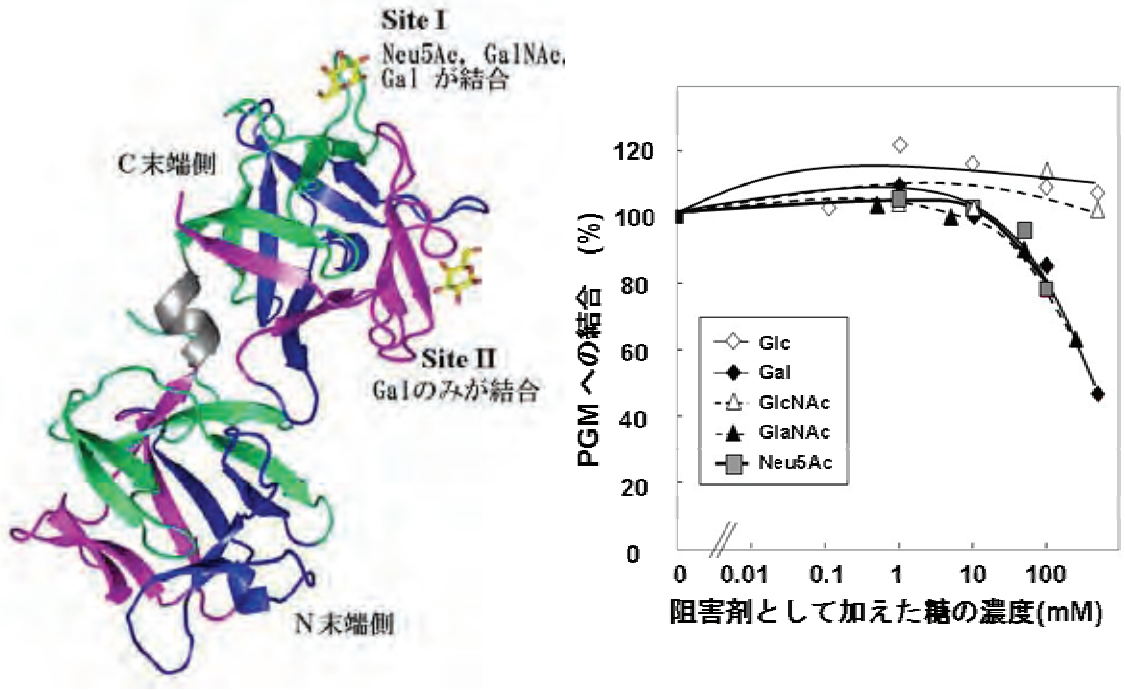


図６(左)、HA1 の立体構造。　結合サイトには得られた電子密度を元にガラクトースを描いている。レクチンによく見られるβトレホイル構造部分を緑、ピンク、青で示した。(PDB に登録済み、PDB ID：2EHI、 2EHN、2EHM)

図７（右)、HA1 の糖結合特異性。　HA1 の糖認識特異性を、ブタ胃ムチンへの結合を各種単糖で阻害する実験により検討した。Gal、GalNAc、Neu5Ac で結合が阻害された。

・HA1 の糖認識特異性の改変

HA1 の site I、site II クレフトの立体構造を詳細に解析し、糖結合に重要な幾つかのアミノ酸を見出し、それらを別のアミノ酸に置換して各サイトの結合特性の改変を試みた。

Site I では、Trp176 の側鎖と結合糖の環とが結合に重要なスタッキング構造を形成していると思われるため、それをアラニンに返還したミュータントを作製してムチンへの結合能を較べたところ、予想どおり結合能は大きく低下した（図８）。また、Phe179 をイソロイシンに置換したミュータント F179I は、還元末端にシアル酸が結合した糖鎖を多く持つ BSM に対する結合能が低下し、還元末端が中性糖である糖鎖を多く持つ PGM への結合能には変化がなかったことから、シアル酸への結合能のみが失われたと考えられる。

一方で、Site II の構造を A 型糖結合サイトと比較すると、A 型の Trp271 が C 型では Asn271 であった。そこで、C 型 site I の結合能を低下させた W176A の Asn271 をフェニルアラニンに置換したミュータントを作製してムチンへの結合性を検討したところ、中性糖鎖への結合能が極端に上昇した。これは、C 型 HA1 ではガラクトースに対して弱い結合能しかなかったが、N271F の変異により強い結合能を持つようになったことを示しており、site I でのミューテーションの結果とも合わせ、1 分子中に 2 箇所存在する糖結合サイトのマニピュレーションが可能となった。

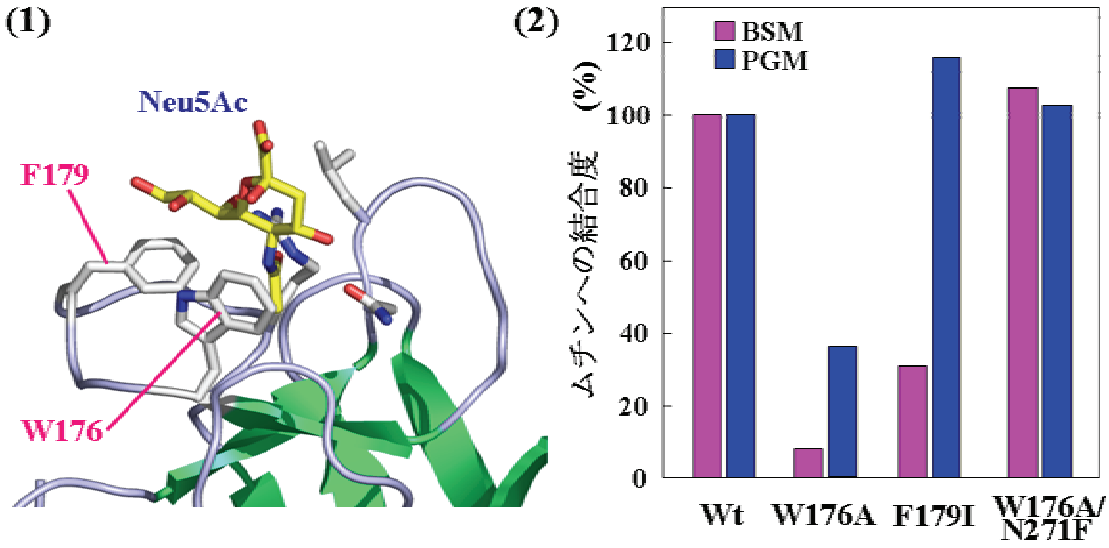


図８、Site I の構造とムチン結合性の改変。（1）、Site I に Neu5Ac が結合している様子。W176 はシアル酸の環状部分とスタックキングを形成している。（2）、W176A は、BSM に対する結合能を失い PGM に対しても弱い結合力しか示さないことから、site I は糖結合力が喪失し、残った site II で PGM に結合していると考えられる。一方、F179I は site I のシアル酸に対する結合力のみが減弱していた。このことは Neu5Ac を上記反応系に加える阻害実験からも確認されている。W176/N271F は、BSM に対する結合能も回復しているが、Neu5Ac で阻害されなかった。

・HA3 の糖認識特異性

毒素複合体を形成するもう一つのレクチン HA3 の糖認識特異性を検討した。糖結合活性は HA3b にあり、シアリダーゼ処理した BSM への結合性が極端に低下し、また Neu5Ac でのみ BSM への結合が阻害されることから、C 型 HA3 はシアル酸を特異的に認識することが判明した(投稿中)。

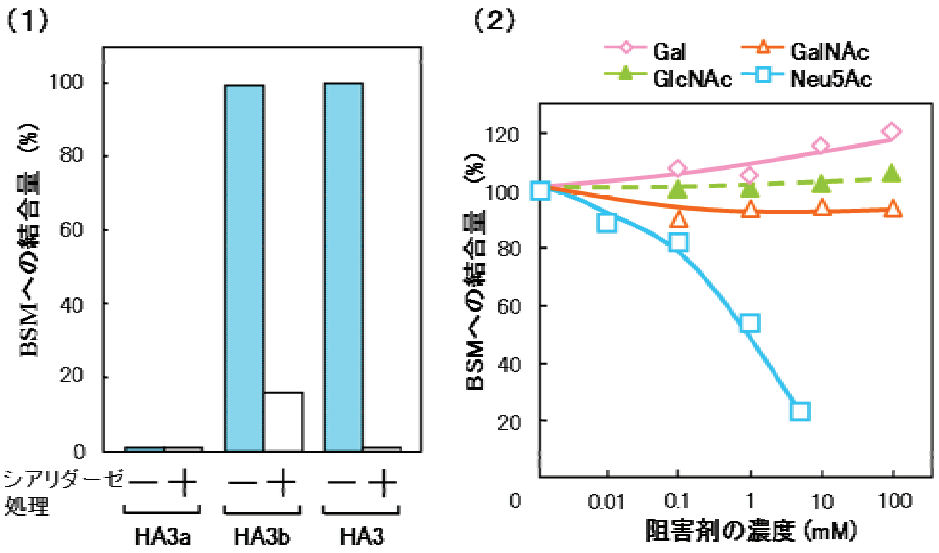


図９、HA3 の糖認識特異性。（１）、プレートに BSM をコートし、シアリダーゼ処理を行った (+) 後、HA3 を作用させ結合量を測定した。HA3b、HA3 の結合量はムチンのシアル酸除去により極端に低下した。なお、PGM についても同様の実験を行ったが、PGM にはシアル酸を持つ糖鎖が少ないため、結合量を測定できなかった。（２）、BSM-HA3 の結合を各種単糖で阻害した結果、Neu5Ac のみが結合を阻害した。

・HA3 の立体構造

分子量約 50 万もの毒素複合体の全体構造は未だに推測の域を出ないが、最近 D 型毒素複合体全体の電子顕微鏡による解析から D16S はバトミントンのシャトルの様な形が推定されており、シャトルの羽部分にあたると考えられる HA3 の立体構造の解析が待たれていた。我々は、C 型 HA3 についても結晶を作製し、X 線結晶構造解析を行った。

HA3 の結晶は六方晶系をしており (Nakamura *et al. Acta Cryst.*, 2007)、2.5Å の解像度で回折像が得られた。解析の結果（図 10）、3 分子からなる非常に特徴的な 3 回転対称のプロペラ様構造をしていることが判明した。

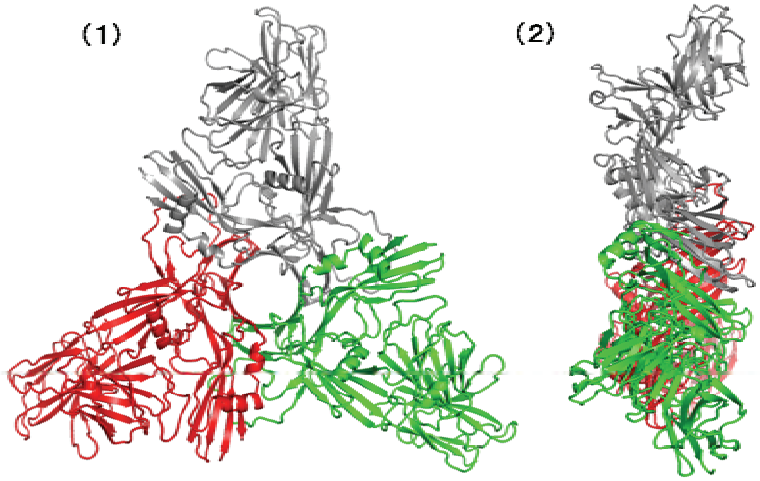
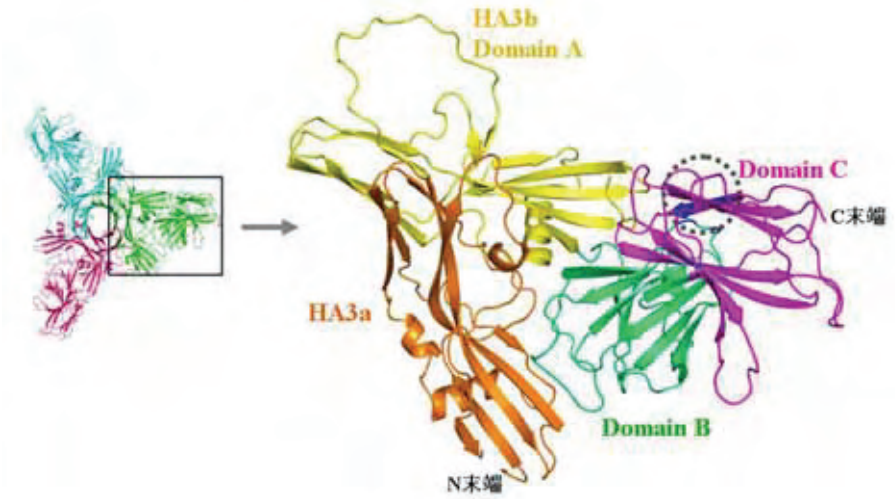


図 10、C 型 HA3 の構造。（２）は（１）を 90° 右横方向からみたもの。(PDB に登録済み、PDBID:2Z5A)
図 11、HA3 のドメイン構造と糖結合位置。３分子からなるプロペラ様構造の１分子を拡大表示した。図中、ドメインＣにある波線で囲んだあたりにシアル酸結合サイトがあると推定している。ダリサーバーで他のタンパク質との立体構造のホモロジーを検索したが、Z スコアー10 以上の類似タンパク質はなかった。

C 型ボツリヌス菌が産生する HA3 は菌体外に放出後プロテアーゼの作用によりニックが入り HA3a と HA3b に切断されている。今回結晶化に用いたものは大腸菌で発現させたリコンビナント HA3 であるが、HA3a と HA3b の分断部位近傍の 19 アミノ酸は今回の構造解析で電子密度が得られなかった。そこで、結晶を溶解し、SDS-PAGE を行ったところすべての HA3 は HA3a と HA3b に切断されていた。これは、HA3 精製中にフュージョンタンパク質の切り離しに用いた FactorXa が極微量残存していたために起こったとも考えられるが詳細は分からず、今後の検討課題の一つである。
HA3 一分子（図 11）は、HA3b がドメイン I、II、III に分けられることから HA3a と合



わせて四つのドメインらなる。ドメイン I は HA3a と大変よく似た構造をしており、三量体プロペラ構造の中心部は三組の HA3a/HA3b ドメイン I により形成されている。糖結合サイトに関しては、HA3b にシアル酸結合レクチン Siglec の糖結合サイトと類似する一次構造が存在することから、Arg604 近傍がこれまで HA3 の糖結合サイトと推定されていた。我々は、HA1 と同様にソーキングの手法を用いてシアル酸の結合部位を X 線結晶構造の面から検討したところ、Arg525 近傍にシアル酸の電子密度が観察され、その近傍を部位特異的アミノ酸置換したミュータントのムチンへの結合性の低下で確認も取れたため、HA3 の糖結合サイトは一箇所 Arg525 の近傍にあると推定している(投稿中)。

【まとめ】
これまでの本研究成果を簡単にまとめると以下のようになる。
１，ボツリヌス毒素複合体の消化管から体内循環系への移行は、毒素複合体が上皮細胞表面のムチンタンパク質の糖鎖に結合してクラスリン依存性エンドサイトーシス機構で細胞内に侵入し、神経毒素はエンドソームからゴルジ装置にまで移行することを発見した。(今後は、ゴルジ装置からいかにして基底膜側へ移行するかの検討を行い、トランスサイトーシスの全容を解明する。)
２，C 型毒素複合体を形成しているタンパク質群のうち、HA1 と HA3 の糖結合特異性をムチンタンパク質を用いて明らかにした。

３，HA1 と HA3 の結晶化に成功し、X 線結晶構造解析を行い、それぞれの糖結合サイトを決定した。具体的には、HA１には糖結合サイトが二箇所存在し、個々の糖認識特異性に立体構造の面からも考察を加えた。また、HA3 は 3 分子からなるプロペラ様の型をした特徴ある構造であった。(未だ構造の判明していない NTNH についても結晶化を試みており、解析されれば毒素複合体の全容が明らかになることが期待される。)
４，HA1 の二箇所の糖結合クレフトに存在するアミノ酸に変異を加え、糖認識特異性の異なるミュータントの作製に成功した。

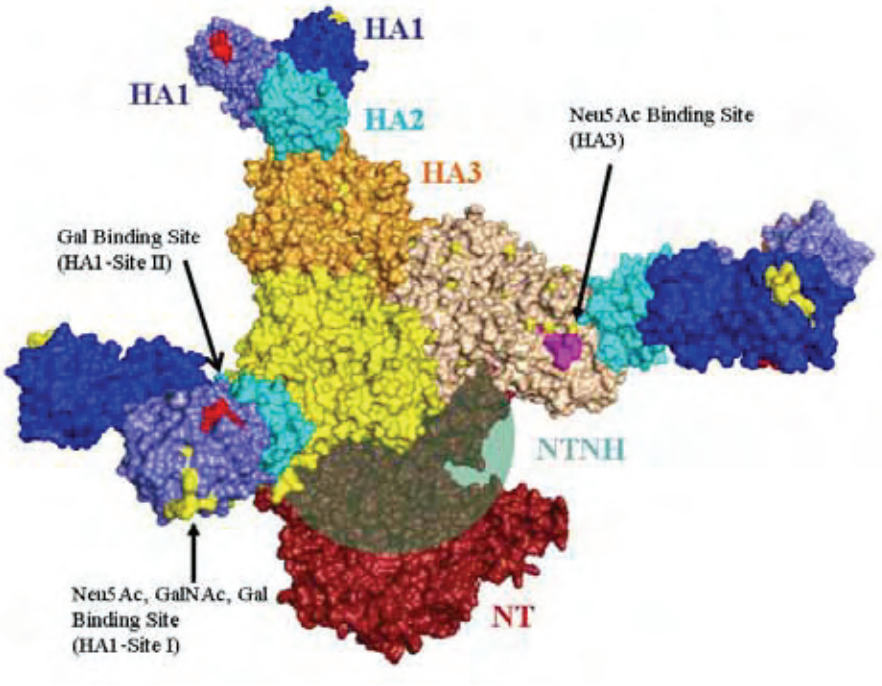


図１２、C 型ボツリヌス毒素複合体の推定構造。　大山ら(J. Biol. Chem. 282, 24777-83, 2007)が電子顕微鏡写真から提唱している D 型毒素の推定構造に我々の結晶構造データを当てはめた C 型毒素複合体の推定全体構造。多種類の糖を認識するサイトを多数持つ分子量約 60 万を超える巨大なレクチン複合体。なお、NTNH は構造未知。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究の成果は今後以下のような分野での利用、応用が考えられる。

1, ワクチンとしての利用
2, ドラッグデリバリーシステムへの利用
3, 組織、細胞表面糖鎖構造変化を捕らえたガン細胞等の鋭敏な選別、検出

本毒素複合体は、実際毒性を示す部位は神経毒素タンパク質の N 末端部位にあり、しかもその部分が神経毒素タンパク質の他の部位とジスルフィド結合のみによって結合した特徴ある構造をしている。従って、神経毒素作用のある部位を他の有用目的タンパク質に置き換えることは現在のタンパク質工学を持ってすればとても容易なことである。一方で、神経毒素以外の毒素複合体構成成分は消化酵素に強い耐性を持っており、経口摂取された神経毒素タンパク質が腸にまで届くよう保護の役目も果たしていると考えられている。ここで、恐らく微生物由来の複合体構成成分は強力な免疫原性をもつと思われるので、プロテアーゼに耐性でなおかつアジュバント活性を備えた目的タンパク質複合体の創製が可能となり、有用なワクチンとしての利用法が考えられる。なおこの背景には、毒素複合体は、モノマー化された各コンポーネントを混合すれば容易に再構成が可能であるというボツリヌス毒素複合体の持つ特性を利用できるという利点がある。

また、もし複合体構成成分の強力な免疫原性を示す部分が特定され、免疫原性を低下させるようなことが出来たなら、これは上記とは逆の考え方で有用目的タンパク質をスムーズに体内移行させることが可能と考えられ、ヒトおよび小動物へのドラッグデリバリーベクターの創製が期待される。この方法により、例えば現在静注している抗体（ガン細胞に対するものや炎症性腸疾患に対する抗 TNF 抗体など多数）を経口薬或いは座薬

に代えることができ、医療側、患者側双方共に大きな負担の軽減となる可能性がある。
最後に、上皮細胞の細胞表面糖鎖構造は、動物種、臓器、組織や部位、さらに個体によっても異なると考えられ、それぞれの上皮細胞のトランスサイトーシスを利用するためには多様な糖鎖構造に複合体のレクチン親和性を対応させなければならないが、HA１は一部のアミノ酸置換により同一分子上の糖結合サイトの数やそれぞれの部位で結合する糖の種類をマニピュレートできる特徴を持つため、種々の糖鎖に対応する複合体ベクターの創製が可能である。また、この各種細胞に対応するベクターの創製・選択過程で、ガン細胞などを対象に検討すれば、ガン細胞の特異的検出法などへの利用も容易に可能となる。ボツリヌス毒素複合体の特徴として、１分子の複合体に６分子の HA1 と３分子の HA3 を含み、さらにモノマー化した各構成成分から容易く複合体を再構成できることがあげられる。このことは、多種類の複合体ベクターを容易に作製することが可能となる大きな要因の一つで、創製ベクターに多様な性質を思いのまま付与する革新的なコンセプトを可能にするものであり今後の展開が大いに期待できる。

4 研究参加者

①糖鎖化学合成グループ（革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製）

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
木曽 真	岐阜大学 応用生物科学部	教授	糖鎖化学合成	平成14年11月～平成20年3月
石田 秀治	岐阜大学 応用生物科学部	教授	糖鎖化学合成	平成14年11月～平成20年3月
伊藤 清子	岐阜大学 応用生物科学部	研究補助員	研究事務全般	平成15年1日～平成20年3月
山口 真範	岐阜大学 大学院連合農学研究科	研究補助員 博士課程	糖鎖化学合成	平成15年4月～平成16年3月
今村 彰宏	岐阜大学 応用生物科学部	CREST 研究員	糖鎖化学合成	平成15年4月～平成20年3月
土肥 博史	岐阜大学 応用生物科学部	CREST 研究員	糖鎖化学合成	平成18年4月～平成19年3月
澤田 敏彦	岐阜大学 大学院連合農学研究科	研究補助員 博士課程	糖鎖化学合成	平成15年4月～平成19年3月
高久 博直	岐阜大学 大学院連合農学研究科	研究補助員 博士課程	糖鎖化学合成	平成17年10～平成19年3月
Magesh Sadagopan	岐阜大学 大学院連合農学研究科	博士課程 D2	糖鎖化学合成	平成18年10月～平成20年3月
Hajjaj Hassan	岐阜大学 大学院連合農学研究科	博士課程 D1	糖鎖化学合成	平成18年10月～平成20年3月

②糖鎖酵素合成グループ（酵素法による機能性糖鎖複合体の合成及び腸内細菌と糖鎖の相互作用解析の研究）

氏　名	所　属	役　職	研究項目	参加時期
山本　憲二	京都大学大学院生命科学研究科	教授	研究全般	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
芦田　久	京都大学大学院生命科学研究科	助教	糖鎖複合体の酵素合成	平成 18 年 1 月～ 平成 20 年 3 月
片山　高嶺	石川県立大学生物資源工学研究所	講師	糖鎖複合体の酵素合成	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
栗原　新	京都大学大学院生命科学研究科	CREST 研究員	糖鎖複合体の酵素合成	平成 18 年 5 月～ 平成 19 年 3 月
山口　真範	京都大学大学院生命科学研究科	CREST 研究員	糖鎖複合体の酵素合成	平成 17 年 1 月～ 平成 17 年 5 月
長嶺　賀子	京都大学大学院生命科学研究科	研究補助員	糖鎖複合体の酵素合成	平成 15 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
加藤　紀彦	京都大学大学院生命科学研究科	研究補助員	糖鎖複合体の酵素合成	平成 19 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
高瀬　珠里	京都大学大学院生命科学研究科	研究補助員	研究データの整理	平成 19 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
中村　啓亮	京都大学大学院生命科学研究科	研究補助員	研究データの整理	平成 19 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
三宅　章子	京都大学大学院生命科学研究科	研究補助員	研究データの整理	平成 19 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
矢矧　利太郎	京都大学大学院生命科学研究科	研究補助員	研究データの整理	平成 19 年 11 月～ 平成 20 年 3 月

③糖鎖構造研究グループ（革新的な糖鎖構造解析手法の開発）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
長束　俊治	大阪大学大学院理学研究科	准教授	糖鎖構造解析手法の開発	平成 14 年 11 月 ～平成 20 年 3 月
川口　将史	京都工芸繊維大学 繊維学部	M2	糖鎖構造解析手法の開発	平成 14 年 11 月 ～平成 15 年 3 月

安達 仁朗	京都工芸繊維大学 繊維学部	M2	糖鎖構造解析手法の開発	平成 14 年 11 月 ～平成 15 年 3 月
石田 美和	京都工芸繊維大学 繊維学部	M2	糖鎖構造解析手法の開発	平成 15 年 4 月 ～平成 16 年 3 月
高木 博史	京都工芸繊維大学 繊維学部	M2	糖鎖構造解析手法の開発	平成 15 年 4 月 ～平成 16 年 3 月
和田 有机子	京都工芸繊維大学 繊維学部	M1	糖鎖構造解析手法の開発	平成 15 年 4 月 ～平成 16 年 3 月
藤木 博規	大阪大学大学院理学研究科	M2	糖鎖構造解析手法の開発	平成 17 年 4 月 ～平成 19 年 3 月
廣畑 有紀子	大阪大学大学院理学研究科	M2	糖鎖構造解析手法の開発	平成 17 年 4 月 ～平成 19 年 3 月
伊藤 慎	大阪大学大学院理学研究科	M2	糖鎖構造解析手法の開発	平成 18 年 4 月 ～平成 20 年 3 月
長束 優子	大阪大学大学院理学研究科	研究補助員	糖鎖構造解析手法の開発	平成 18 年 8 月 ～平成 20 年 3 月

④細菌毒素研究グループ（細菌毒素と糖鎖の相互作用解析の研究）

氏　名	所　属	役　職	研究項目	参加時期
西河　淳	東京農工大学大学院共生科学技術研究院	教授	全般、研究統括	平成１４年１１月～ 平成１９年１０月
殿塚　隆史	東京農工大学大学院共生科学技術研究院	准教授	遺伝子導入による細胞機能改変 毒素構成蛋白の X 線結晶構造解析	平成１４年１１月～ １５年３月、 平成１７年１０月～ １９年１０月
魚津　伸夫	東京農工大学大学院連合農学研究科	博士課程学生	エンドサイトーシス機構の解析	平成１４年１１月～ １７年９月
中村　紀夫	東京農工大学大学院連合農学研究科	非常勤職員	毒素構成蛋白の X 線結晶構造解析	平成１６年４月～平成１９年３月 平成１８年７月～１９年３月 平成１９年４月～１９年１０月
小谷　真央	東京農工大学大学院農学府	修士１年	毒素構成蛋白の X 線結晶構造解析	平成１８年４月～１９年１０月
伊藤　さかえ	東京農工大学大学院農学府	修士１年	毒素構成蛋白の X 線結晶構造解析	平成１８年４月～１９年１０月

藤井　友子	東京農工大学大学院共生科学技術研究院	研究補助員	毒素構成蛋白のＸ線結晶構造解析	平成１９年４月～１０月

5 招聘した研究者等

氏　名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Mark von Itzstein(Griffith 大学・教授)	Sialoglycoscience 2006 への参加	三島	2006 年 8 月 27～31 日
Ten Feizi(インペリアルカレッジ・教授)	Sialoglycoscience 2006 への参加	三島	2006 年 8 月 27～31 日
Nicolai Bovin（シメヤキン研究所・教授)	Sialoglycoscience 2006 への参加	三島	2006 年 8 月 27～31 日

6 成果発表等

(1)原著論文発表 （国内誌　0件、国際誌　40 件）

1. Hara-Yokoyama, M., Ito, H., Ueno-Noto, K., Takano, K., Ishida, H. and Kiso, M.: Novel sulfated gangliosides, high affinity ligands for neural siglecs, inhibit NADase activity of leukocyte cell surface antigen CD38. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3441-3445, 2003.
2. Imamura, A., Ando, H., Korogi, S., Tanabe, G., Muraoka, O., Ishida, H. and Kiso, M.: Di-*tert*-butylsilylene (DTBS) group-directed α-selective galactosylation unaffected by C-2 participating functionalities. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 6725-6728, 2003.
3. Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R. and Kiso, M. Studies on the endogenous L-selectin ligands: Systematic and highly efficient total synthetic routes to lactamized-sialyl 6-*O*-sulfo Lewis x and other novel gangliosides containing lactamized neuraminic acid. *Carbohydr. Res.* **338**, 2793-2812, 2003.
4. Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R., and Kiso, M.: Synthesis and antigenic property of a novel sialyl 6-*O*-sulfo Lewis x neo-glycolipid containing lactamized neuraminic acid. *J. Carbohydr. Chem.* **23**, 201-215, 2004.
5. T.Katayama, A.Sakuma, T.Kimura, Y.Makimura, J.Hiratake, K.Sakata, T.Yamanoi, H.Kumagai and K.Yamamoto: Molecular Cloning and Characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2-α-L-Fucosidase (AfcA), a Novel Inverting Glycosidase (Glycoside Hydrolase Family 95). *J. Bacteriol.*, **186**(15), 4885-4893, 2004.
6. Y. Fujinaga, K. Inoue, S. Watarai, Y. Sakaguchi, H. Arimitsu, J-C. Lee, Y. Jin, T. Matsumura, Y. Kabumoto, T. Watanabe, T. Ohyama, A. Nishikawa and K. Oguma "Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes" *Microbiol*. 150, 1529-1538 (2004).
7. A. Nishikawa, N. Uotsu, H. Arimitsu, J.-C. Lee, Y. Miura, Y. Fujinaga, H. Nakada, T. Watanabe, T. Ohyama, Y. Sakano and K. Oguma "The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin into HT-29 cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 319, 327-333 (2004).
8. Ando, H., Koike, Y., Koizumi, S., Ishida, H., Kiso, M.: 1,5-Lactamized sialyl acceptors for various disialoside syntheses: Novel synthesis method for glycan portions of Hp-s6 and HLG-2 gangliosides. *Angewandte Chemie, International Edition in English*, 6759-6763,2005.
9. Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Di-*tert*-butylsilylene(DTBS)-directed α-selective synthesis of 4-methylumbelliferyl T-antigen. *Organic Letters*. 7(20), 4415-4418,2005.
10. Shinya, K., Hatta, M., Yamada, S., Takada, A., Watanabe, S., Halfmann, P., Horimoto, T., Neumann, G., Kim H. J., Lim, W., Guan, Y., Peris, M., Kiso, M., Suzuki, T., Suzuki, Y., Kawaoka, Y.: Characterization of a human H5N1 influenza A virus isolated in 2003. *J. Virology*,

79, 9926-9932, 2005.
11. Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R., Kiso, M.: 6-*O*-Sulfo sialylparagloboside and sialyl Lewis X neo-glycolipids containing lactamized neuraminic acid: synthesis and antigenic reactivity against G159 monoclonal antibody. *Glycoconjugate J.*, 22, 95-108, 2005.
12. Otsubo, N., Ishida, H., Kannagi, R., Kiso, M.: Design and synthesis of a novel neo-glycolipid containing sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAcβ1-6GalNAca core structure. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16(7), 1321-1327, 2005
13. Katayama, T., Fujita, K. and Yamamoto, K.: Novel bifidobacterial glycosidases acting on sugar chains of mucin glycoproteins. *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 457-465, 2005.
14. Fujita, K., Oura, F., Nagamine, N., Katayama, T., Hiratake, J., Sakata, K., Kumagai, H. and Yamamoto, K.: Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J. Biol. Chem.,* **280**, 37415-37422, 2005.
15. T. Katayama, K. Fujita, and K. Yamamoto : Novel Bifidobacterial Glycosidases Acting on Sugar Chains of Mucin Glycoproteins. *J. Biosci. Bioeng.*, **99(5)**, 457-465, 2005.
16. Magesh, S., Suzuki, T., Miyagi, T., Ishida, H., Kiso, M.: Homology modeling of human sialdase enzymes NEU1, NEU3 and NEU4 based on the crystal structure of NEU2: Hints for the design of selective NEU3 inhibitors. *J. Mol. Graphi. Modelling*, **25**, 196-207, 2006.
17. Ando, H., Shimizu, H., Katano, Y., Koike, Y., Koizumi, S., Ishida, H., Kiso, M.: Studies on the α-(1→4)- and α-(1→8)-fucosylation of sialic acid for the total assembly of the glycan portions of complex HPG-series gangliosides. *Carbohydr. Res.*, **341**, 1522-1532, 2006.
18. Fuse, T., Ando, H., Imamura, A., Sawada, N., Ishida, H., Kiso, M., Ando, T.: Synthesis and enzymatic susceptibility of a series of novel GM2 analogs. *Glycoconjugate J.*, **23**, 329-343, 2006.
19. Sawada, T., Hashimoto, T., Nakao, H., Suzuki, T., Ishida, H., Kiso, M.: Why does avian influenza A virus hemagglutinin bind to avian receptor stronger than to human receptor? Ab initio fragment molecular orbital studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 40-43, 2006.
20. Sawada, T., Hashimoto, T., Nakao, H., Shigematsu, M., Ishida, H., Kiso, M.: Conformational study of α-N-acetyl-D-neuraminic acid by density functional theory. *J. Carbohydr. Chem.,* **25(5)**, 387-405, 2006.
21. Kimura, A., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: A novel synthetic route to α-galactosyl ceramides and iGb3 using DTBS-directed α-selective galactosylation. *Synlett*, **15**, 2379-2382, 2006.
22. Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M. Q., Nidom, C. A., Sakai-Tagawa, Y., Muramoto, Y., Ito, M., Kiso, M., Horimoto, T., Sinya, K., Sawada, T., Kiso, M., Usui, T., Murata, T., Lin, Y., Hay, A., Haire, L. F., Stevens, D. J., Russell, R. J., Gamblin, S. J., Kawaoka, Y.: Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, **444**, 378-382, 2006.
23. Imamura, A., Kimura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Extended applications of Di-*tert*-butylsilylene-Directed α-Preedominant galactosylation compatible with C2-Participating groups toward the assembly of various glycosides. *Chem. Eur. J.*, **12**, 8862-8870, 2006.
24. Y. Makimura, S. Watanabe, T. Suzuki, H. Ishida, M. Kiso, T. Katayama, H. Kumagai and K. Yamamoto : Chemoenzymatic Synthesis and Application of a Sialoglycopolymer with a Chitosan Backbone as a Potent Inhibitor of Human Influenza Virus Hemagglutination. *Carbohydr. Res.*, **341**, 1803-1808, 2006.
25. N. Uotsu, A. Nishikawa*, T. Watanabe, T. Ohyama, T. Tonozuka, Y. Sakano, K. Oguma "Cell internalization and traffic pathway of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin in HT-29 cells" *BBA-Mol. Cell Res.*, 1763, 120-128 (2006).(*: corresponding author).
26. Shunji Natsuka, Miwa Ishida, Akira Ichikawa, Koji Ikura, Sumihiro Hase. Comparative biochemical study of *N*-linked glycans prepared from skin of a squid, *Todarodes pacificus. J. Biochem.*, **140 (1)** 87-93 (2006).
27. Kanta Yanagida, Shunji Natsuka, Sumihiro Hase. Structural diversity of cytosolic free oligosaccharides in the human hepatoma cell line HepG2. *Glycobiology*, **16** (4) 294-304

(2006).

28. Kazuyoshi Hirao, Yuko Natsuka, Taku Tamura, Ikuo Wada, Daisuke Morito, Shunji Natsuka, Pedro Romero, Barry Sleno, Linda O.Tremblay, Annette Herscovics, Kazuhiro Nagata, Nobuko Hosokawa. EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J. Biol. Chem.*, **281** (14) 9650-9658 (2006).
29. J. Yu, T. Sawada, T. Adachi, X. Gao, H. Takematsu, Y. Kozutsumi, H. Ishida, M. Kiso and T. Tsubata. Synthetic glycan ligand excludes CD22 from antigen receptor-containing lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. commun*. **360**, 759-764, 2007.6.
30. T. Sawada, T. Hasimoto, H. Nakano, T. Suzuki, Y. Suzuki, Y. Kawaoka, H. Ishida and M. Kiso. Influenza viral hemagglutinin complicated shape is advantageous to its binding affinity for sialosaccharide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **355**, 6-9, 2007.
31. Takaku, H., Ishida, H.-K., Fujita, M., Inazu, T., Ishida, H. and Kiso, M.: A chemical synthesis of GlcNAcβ(1-4)GlcUA-UDP to elucidate to catalytic mechanism of hyaluronic acid synthesis (HAS). *Synlett*, **5**, 818-820, 2007.
32. M. Nagae, A. Tsuchiya, T. Katayama, K. Yamamoto, S. Wakatsuki and R. Kato : Structural Basis of the Catalytic Reaction Mechanism of novel 1,2- α -L-Fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *J. Biol. Chem*., **282**, 18497-18509, 2007.
33. T. Nakamura, N. Takada, T. Tonozuka, Y. Sakano, K. Oguma, A. Nishikawa "Binding properties of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin to mucins" *BBA- Gen. Subjects*, 1770, 551-555 (2007).
34. T. Suzuki, H. Kouguchi, T. Watanabe, K. Hasegawa, T. Yoneyama, K. Niwa, A. Nishikawa, JC. Lee, K. Oguma, T. Ohyama "Effect of nicking the C-terminal region of the *Clostridium botulinum* serotype D neurotoxin heavy chain on its toxicity and molecular properties" *Protein J*., 26, 173-181 (2007).
35. J-C. Lee, T. Yokoyama, H-J. Hwang, H. Arimitsu, Y. Yamamoto, M. Kawasaki, T. Takigawa, K. Takeshi, A. Nishikawa, H. Kumon. K. Oguma, "Clinical application of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin purified by a simple procedure for patients with urinary incontinence caused by refractory destrusor overactivity" *FEMS Immunol. Med. Mic.,* 51, 201-211 (2007).
36. T. Nakamura, T. Tonozuka, M. Kotani, K. Obata, K. Oguma, A. Nishikawa, "Crystallization and preliminary X-ray analysis of HA3 component of Clostridium botulinum type C progenitor toxin" *Acta Cryst.,* F63, 1038-1040 (2007).
37. Tomonori Murakami, Shunji Natsuka, Shin-ichi Nakakita, Sumihiro Hase. Structure determination of sulfated *N*-glycans that are candidates for precursors of the selectin-ligand in bovine lung. *Glycoconj. J*., **24** (4-5) (2007).
38. N. Fujita, A. Tamura, A. Higashidani, T. Tonozuka, H. Freeze, A. Nishikawa, "The Relative Contribution of Mannose Salvage Pathways to Glycosylation in PMI-Deficient Mouse Embryonic Fibroblast Cells" *FEBS J*. 275, 788-798 (2008).
39. T. Nakamura, T. Tonozuka, A. Ide, T. Yuzawa, K. Oguma, A. Nishikawa. "Sugar-binding sites of the HA1 subcomponent of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin" *J. Mol. Biol.* 376, 854-867 (2008).
40. M. Umekawa, W. Huang, B. Li, K. Fujita, H. Ashida, L-X., Wang, K. Yamamoto :Mutants of *Mucor hiemalis* Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase Show Enhanced Transglycosylation and Glycosynthase-like Activities. *J. Biol. Chem.*, 10. 1074/jbc. M707137200, in press

⑵その他の著作物(総説、書籍など)

1. 山本憲二、片山高嶺 : 乳酸菌の腸管接着とグリコシダーゼ. *FFI JOURNAL*、**209**(9), 750-756 (2004).
2. Shin-ichi Nakakita, Shunji Natsuka, Kazuhiro Ikenaka, Sumihiro Hase. Precise recognition of "brain-type" β1-4galactosyltransferase. *Jpn. J. Electroph.*, **48**, (1) 1-4 (2004).
3. 山本憲二: 微生物の糖質分解酵素を活用した糖鎖工学技術の開発とその応用. *バイオサイエンスとインダストリー*、**63**(2), 11-16 (2005).
4. 長束俊治, 長谷純宏, *O*-結合型糖鎖の構造解析,「タンパク質修飾解析プロトコール」稲垣

昌樹　編集, 羊土社, 81-88 (2005).

5. 長束俊治, 糖タンパク質より*O*-結合型糖鎖の化学的切り出し,「未来を拓く糖鎖科学」永井克孝　監修, 金芳堂, 5 (2005).
6. 長束俊治, オリゴ糖の 2 次元 HPLC による分離,「未来を拓く糖鎖科学」永井克孝　監修, 金芳堂, 14 (2005).
7. 長束俊治, 平衡透析を用いた糖鎖ータンパク質相互作用の解析,「未来を拓く糖鎖科学」永井克孝　監修, 金芳堂, 78 (2005).
8. Shunji Natsuka, Comparative biochemical view of *N*-glycans, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **17**, 229-236 (2005).
9. 長束俊治, 糖鎖分析の統合オペレーティングシステムとしてのピリジルアミノ化法,「糖鎖科学の新展開」谷口直之, 伊藤幸成　監修, NTS, 56-62 (2005).
10. 西河　淳、魚津伸夫、小熊恵二、「ボツリヌス毒素の細胞内移行機構」　糖質科学の新展開、谷口直之、伊藤幸成　編、NTS, pp188-193、2005.
11. 西河　淳、「ボツリヌス毒素の体内移行機構」　未来を拓く糖質科学、永井克孝　監修、金芳堂、pp279-280、2005.
12. 西河　淳、小熊恵二、「ボツリヌス中毒と糖鎖」　遺伝子 MOOK　糖鎖と病気、谷口直之　編、メディカル　ドゥ、pp239-243、2005.
13. 安藤弘宗，石田秀治，木曽真，：シアル酸分子多様性を網羅する糖鎖合成法の開拓ーシアロ糖鎖多機能性の分子理解を目指してー，有機合成化学協会誌，64（5），481-491，2006.
14. M. Endo, S.Hase, K.Yamamoto and K.Takagaki (eds) : Endoglycosidases, Kodansha & Springer (2006)
15. K. Yamamoto: Application of Transglycosylation Activity of Microbial Endoglycosidases to Syntheses of Bioactive Compounds. *Trends in Glycosci. Glycotech.*, **18**(99), 49-62 (2006)
16. 山本憲二：ビフィズス菌の腸管接着にかかわるグリコシダーゼ　*科学と工業*、**80** (4), 166-171 (2006)
17. Ando, T., Imamura, A., Ishida, H. and Kiso, M.: Synthesis of glycolipids. In Comprehensive Glycoscience, J. P. Kamering (Ed.), Oxford: Elsevier Limited, vol.1, pp797-813 (2007).
18. Ando, H. and Kiso, M.: α-Selective sialylation. In Glycoscience, Fraser-Reid, K., Tatsuta, J., Theim, J. (Eds.), Berlin, Springer-Verlag, in press (2007).
19. 西河　淳、小熊恵二、「各種不随意運動の治療に用いられている最強の毒素；ボツリヌス毒素」　構造生物学、倉光成紀、杉山政則　編、共立出版、pp113-124、2007.
20. A. Nishikawa, K. Oguma, “Botulinus toxin” Comprehensive Glycoscience, N. Taniguchi et al. Ed, Elsevier, in press.

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

≪発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日等≫

①招待講演　　(国内会議 2 件、国際会議 6 件)

1. Makoto Kiso[a,b] ([a]*Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University,* [b]*CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*), Novel glycosylation methods and glycoconjugate synthesis toward glycomedicine. Joint Meeting of the Japanese and American Consortia for Glycomics. (2004, November 21, Honolulu, HI).
2. Akihiro Imamura[a,b], Hiromune Ando[a], Hideharu Ishida[a,b], Makoto Kiso[a,b] ([a]*Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University,* [b]*CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*), A synthesis of ganglioside GQ1b based on a novel synthetic strategy of B-series gangliosides. Sialobiology 2004 Fourth International Conference. (2004, July 28-30, St Andrews, UK).
3. Akihiro Imamura[a,b], Akiyoshi Kimura[a], Hiromune Ando[a], Satomi Korogi[a], Hideharu Ishida[a,b], Makoto Kiso[a,b] ([a]*Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University,* [b]*CREST,*

Japan Science and Technology Corporation (JST)), Novel α-galactosylation using di-tert-butylsilylene(DTBS) group mounted on the C-4,6 hydroxyl group. XXII International Carbohydrate Symposium. (2004, July 23-27, Glasgow, UK).

4. Yamamoto, K.: Application of Microbial Glycosidases to Glycotechnology, The 7th Northeastern Asia Symposium on Biotechnology, ２００５年１１月７日、韓国慶州
5. 山本憲二：ビフィズス菌の特異なグリコシダーゼの酵素科学、第４回畜産衛生に関する帯広ワークショップ、２００５年１２月１６日、帯広
6. 西河　淳[1]，中村紀夫[1]，渡部俊弘[2]，大山　徹[2]，小熊恵二[3]（１農工大院共生，CREST，２東農大生物生産，３岡大院医歯薬総合)、C型毒素複合体構成成分の糖結合特異性、シンポジウムタイトル：生物毒素タンパク質の新展開とその利用、日本農芸化学会２００７年度大会、東京、平成１９年３月２４～２７日
7. M. Kiso[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)),* Di-tert-butylsilylene (DTBS)-directed alpha-glycosidation of galactose/galactosamine toward the assembly of various glycosides. Gordon Research Conferences Tilton School, Tilton, NH, June 17-22, 2007.
8. Makoto Kiso[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*), Synthetic Studies on Sialoglycoconjugates and Applications in Medicinal Chemistry. (2007, December 3-7, Taiwan)

②口頭発表（国内会議 47 件、国際会議 12 件）

1. 山口真範(1,3)、石田秀治(1,3)、金森審子(2)、神奈木玲児(2,3)、木曽　真(1,3)（(1)岐阜大院連農、(2)愛知がんセンター、(3)CREST)、「L-セレクチンの内在性リガンドに関する研究：ラクタム化シアリル６スルホルイス X ガングリオシドの高効率的全合成と G159 抗体との反応性」、日本糖質学会　第 24 回年会、神奈川県、2003 年 7 月 29-31 日。
2. 牧村裕(1,2)、渡辺慎也(3)、鈴木隆(3,4)、鈴木康夫(3,4)、片山高嶺(1,4)、熊谷英彦(1)、山本憲二(1,4).（(1)京大・生命、(2)静大・農、(3)静県大・薬、(4)CREST・JST)「インフルエンザウィルス感染阻害能を持つシアロオリゴ糖鎖多価集合体の合成」2003 年度日本農芸化学会関西・中部支部合同大会、京都大学農学部　2003 年 10 月 5 日。
3. 今村彰宏(1,2)、安藤弘宗(3)、木村彰克(4)、石田秀治(2,4)、木曽 真(2,4)（(1)岐阜大院連農、(2)CREST、(3)岐阜大生命科学総合実験セ、(4)岐阜大農)、「4,6-*O*-DTBS 基を利用した高立体選択的新規αガラクトシル化」、2004 年度日本農芸化学会大会、広島、2004 年 3 月 29 日。
4. 澤田敏彦(1,4)、中野博文(2)、重松幹二(1)、橋本智裕(3)、石田秀治(1,4)、木曽 真(1,4)（(1)岐阜大農・生資科、(2)愛知教育大・理科教育、(3)岐阜大・地域、(4)CREST)、「ab initio 分子軌道法による alpha-NeuAc のコンホメーション解析」、2004 年度日本農芸化学会大会、広島、2004 年 3 月 29 日。
5. 木村隆利(1)、片山高嶺(1,2)、熊谷英彦(1)、山本憲二(1,2)（(1) 京大・生命、(2)CREST・JST)「乳酸菌を利用した異種タンパク質発現系の構築.」2004 年度日本農芸化学会大会、広島、2004 年 3 月 30 日
6. 片山高嶺(1,2)、佐久間明子(1)、木村隆利(1)、平竹潤(3)、坂田完三(3)、熊谷英彦(1)、山本憲二(1,2)（(1) 京大・生命、(2)CREST・JST、(3)京大化研)「ビフィズス菌由来 1,2-a-L-フコシダーゼの遺伝子クローニングと性状解析」2004 年度日本農芸化学会大会、広島、2004 年 3 月 30 日
7. 大浦房子(1)、藤田清貴(1)、長嶺賀子(1,2)、片山高嶺(1,2)、熊谷英彦(1)、山本憲二(1,2)（(1) 京大・生命、(2)CREST・JST)「*Bifidobacterium longum* 由来 endo-a-N-acetylgalactosamminidase 遺伝子のクローニング」2004 年度日本農芸化学会大会、広島、2004 年 3 月 30 日

8. 大浦房子(1)、藤田清貴(1)、長嶺賀子(1,2)、片山高嶺(1,2)、熊谷英彦(1)、山本憲二(1,2)（(1) 京大・生命、(2)CREST・JST）：ビフィズス菌由来 endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase の遺伝子のクローニングと機能解析、関西グライコサイエンスフォーラム、大阪、2004 年 5 月 29 日
9. 片山高嶺(1,2)、佐久間明子(1)、平竹潤(3)、坂田完三(3)、熊谷英彦(1)、山本憲二(1,2)（(1) 京大・生命、(2)CREST・JST、(3)京大化研）：ビフィズス菌由来の 1,2-α-L-fucosidase の遺伝子クローニングと機能解析、乳酸菌工学研究部会講演会、京都、2004 年 6 月 4～5 日
10. Akihiro Imamura[a,b], Hiromune Ando[a], Hideharu Ishida[a,b], Makoto Kiso[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*), A synthesis of ganglioside GQ1b based on a novel synthetic strategy of B-series gangliosides. Sialobiology 2004 Fourth International Conference. (2004, July 28-30, St Andrews, UK).
11. Akihiro Imamura[a,b], Akiyoshi Kimura[a], Hiromune Ando[a], Satomi Korogi[a], Hideharu Ishida[a,b], Makoto Kiso[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*), Novel α-galactosylation using di-tert-butylsilylene(DTBS) group mounted on the C-4,6 hydroxyl group. XXII International Carbohydrate Symposium. (2004, July 23-27, Glasgow, UK).
12. 山崎光司(1)、牧村裕(1)、片山高嶺(1,2)、熊谷英彦(1)、山本憲二(1,2)、鈴木孝(3)、伊藤正恵(4)（(1) 京大・生命、(2)CREST・JST、(3) 静県大・薬、(4)長浜バイオ大学・バイオ）：キトサンをベースとした抗インフルエンザウイルス高分子素材の開発、日本応用糖質科学会平成１６年度大会、鹿児島、2004 年 9 月 15～17 日
13. 片山高嶺(1,2)、佐久間明子(1)、木村隆利(1)、平竹潤(3)、坂田完三(3)、山ノ井孝(4)、熊谷英彦(1)、山本憲二(1,2)（(1) 京大・生命、(2)CREST・JST、(3)京大化研、(4)野口研）：*Bifidobacterium bifidum* 由来 1,2-α-L-fucosidase の遺伝子クローニングと機能解析：新規なグリコシダーゼファミリー（GH family 95）、第 77 回日本生化学会大会、横浜、2004 年 10 月 13～16 日
14. 長束俊治、長谷純宏(阪大院理)、蛍光標識法による糖鎖集団の解析と応用、2004 年高分子科学討論会シンポジウム、札幌、平成16年9月15日
15. 長束俊治、長谷純宏(阪大院理)、シアル酸を含むムチン型糖鎖の蛍光標識法による一括解析、第77回日本生化学会大会、横浜、平成16年10月14日
16. Shunji Natsuka, Sumihiro Hase (Osaka Univ.), Structural transition of *N*-glycans in phylogeny and ontogeny, 2004 年日米糖質科学合同会議サテライトシンポジウム、Hawaii、平成１６年１１月１７日
17. 長束俊治、長谷純宏（阪大院理）、多細胞動物の系統発生と個体発生における *N*-結合型糖鎖構造の変遷、2005 年日本農芸化学会大会シンポジウム、札幌、平成17年3月29日
18. 片山高嶺(1,2)、藤田清貴(3)、山本憲二(2,4)（(1)石川県大・生物資源研、(2) CREST・JST、(3)鹿児島大・農、(4) 京大・生命）：新規な GH ファミリーに属するビフィズス菌の特異なグリコシダーゼ、第 25 回日本糖質学会年会、大津、2005 年 7 月 22 日
19. 長束俊治(阪大院理)、化学的手法による糖蛋白質糖鎖の構造研究とその生合成酵素の遺伝子解析、第25回日本糖質学会年会、大津、平成17年7月20日
20. 片山高嶺(1,2)、佐久間明子(3)、土屋敦子(3)、平竹潤(4)、坂田完三(4)、山本憲二(2,3)（(1)石川県大・生物資源研、(2) CREST・JST、(3)京大・生命、(4)京大化研）：ビフィズス菌が生産する新奇な 1,2-α-L-フコシダーゼ、第 54 回日本応用糖質科学会大会、２００５年９月２８日、三重
21. 小澤隼人(1)、山口真範(2)、石田秀治(3,4)、片山高嶺(4,5)、山本憲二(1,4)、鈴木俊一(6)（(1)京大・生命、(2) 弘前大・医、(3) 岐阜大・応用生物、(4) CREST・JST、 (5)石川県大・生物資源研、 (6)味の素㈱）：ビフィズス菌由来のエンドグリコシダーゼによるペプチドへの糖鎖の付加、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会、

２００５年１０月１日、大阪

22. 山本憲二(京大・生命、CREST・JST)：エンドグリコシダーゼの糖鎖工学への応用、糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、２００５年１２月７日、東京
23. 池田翔子（1)、宮森将光（1)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ)：ウシ脳由来新規塩基性糖脂質の合成研究、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
24. 佐藤哲郎（1)、小澤恭子（1)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ)：ビフィズス菌由来酵素特異的基質の設計と合成、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
25. 藤川紘樹（1)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ)：還元末端グルコースを鍵とする効率的糖脂質合成法の開発、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
26. 吉川武（1)、加藤裕貴（1)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ):GM1epitipe糖供与体の効率的合成と応用、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
27. 小森達也（1)、藤川紘樹（1)、今村彰宏（1,2)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ)：GM2類縁体母核三糖構造の効率的合成と応用、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
28. 清水浩代（1)、小池悠介（1)、小泉幸子（1)、安藤弘宗（3)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ、3岐阜大・生命セ)：棘皮動物由来新規ガングリオシドHPG-1の合成、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
29. 加藤裕貴（1)、石原幹生（1)、三郎丸みゆき（1)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ)：ギラン・バレー症候群発症に関与するC. jejuniリポオリゴ糖の合成、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
30. 澤田敏彦（1,2)、安藤弘宗（3)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ、3岐阜大・生命セ)：インフルエンザウィルスと反応するジシアロ糖鎖リガンドの合成研究、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
31. 木村彰克（1)、今村彰宏（1,2)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ)：DTBS効果を利用したムチン型糖鎖のコアならびにα-Gal-cerの効率的合成研究、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
32. 今村彰宏（1,2)、安藤弘宗（3)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ、3岐阜大・生命セ)：DTBS効果を利用した4-methylumbelliferyl T抗原の効率的合成、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
33. 高久博直（1,2)、石田秀樹（3)、藤田雅也（4)、稲津敏行（5)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ3東京化成（株)、4野口研・糖鎖有機、5東海大・工)：ヒアルロン酸合成酵素の詳細な反応機構解明を目的とした、UDP-２糖の合成研究、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日。
34. 片野由加里（1)、安藤聖敏（1)、安藤弘宗（3)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ、3岐阜大・生命セ)：環状ペプチド架台を用いたMBP高親和性糖鎖プローブの設計と構築、日本農芸化学会2006年度大会、京都、2006年3月26～28日
35. 小澤隼人(1)、山口真範(2)、片山高嶺(3,4)、山本憲二(1,4)、鈴木俊一(5)（(1) 京大・生命、(2) 弘前大・医、(3) 石川県大・生物資源研、(4) CREST・JST、(5)味の素㈱)：ビフィズス菌のエンドグリコシダーゼを利用した機能性複合糖質の合成、日本農芸化学会 2006 年度大会、２００６年３月２７日、京都
36. 梅村舞子(1)、梅川碧里(1)、牧村裕(2)、伊藤正恵(3)、山本憲二(1,4) ((1) 京大・生命、(2) 朝日大・歯、 (3)長浜バイオ大学・バイオ、(4) CREST・JST)：インフルエンザウィルス捕捉型感染阻害剤におけるリガンド糖鎖の多価効果、日本農芸化学会

2006 年度大会、２００６年３月２７日、京都

37. Magesh, S.[a], Suzuki, T.[b], Miyagi, T.[c], Ishida, H.[a,d], Kiso, M.[a,d] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]Life Science Research Center, Gifu University, [c]Division of Biochemistry, Research Institute, Miyagi Prefectural Cancer Center, [d]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*) : Comparative Protein Modeling of Human Sialidases : Implications for the Design of Selective NEU3 Inhibitors. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.
38. Sato, T.[a], Ozawa, K.[a], Imamura, A.[a,b], Ando, H.[c], Ishida, H.[a,b], Kiso, M.[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST), [c]Life Science Research Center, Gifu University*) : Di-*tert*-butylsilylene-Directed α-Selective Synthesis of 4-Methylumblliferyl T-antigen and p-Nitrophenyl T-antigen analogs. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.
39. Takaku, H.[a,b], Sato, J.[c], Ishida, H-.K.[c], Inazu, H.[d], Ishida, H.[a,b], Kiso, M.[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST), [c]The Noguchi Institute, [d]Tokai University*) : A Chemical Synthesis of UDP-LacNAc and its Regioisomer for Finding 'Oligosaccharide transferases'. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.
40. Sawawda, T. (*Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*) : Ab Initio Molecular Orbital Study of Influenza A Virus Hemagglutinin-Sialosaccharide Interaction. Sialoglycoscience 2006, Mishima, Japan, August 27-31 2006.
41. Magesh, S.[a], Suzuki, T.[b], Miyagi, T.[c], Ishida, H.[a,d], Kiso, M.[a,d] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]Life Science Research Center, Gifu University, [c]Division of Biochemistry, Research Institute, Miyagi Prefectural Cancer Center, [d]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST),*) : Towards the Design of Human Sialidase 3 (NEU3) Selective Inhibitors: Homology Modeling and Preliminary Docking Studies. Sialoglycoscience 2006, Mishima, Japan, August 27-31 2006.
42. 高久博直（1,2)、石田秀樹（3)、藤田雅也（4)、佐藤淳平（5)、稲津敏行（5)、石田秀治（1,2)、木曽真（1,2)（1 岐阜大・応用生物、2ＣＲＥＳＴ、3 東京化成（株)、4 野口研・糖鎖有機、5 東海大・工）：糖関連酵素の機能解明を目的とした UDP-2 糖の合成研究、第 26 回日本糖質学会年会、仙台、2006 年 8 月 23～25 日。
43. 梅村舞子(1)、梅川碧里(1)、牧村裕(2)、伊藤正恵(3)、芦田久(1,4)、山本憲二(1,4)（(1) 京大・生命、(2) 朝日大・歯、 (3)長浜バイオ大学・バイオ、(4) CREST・JST）：キトサンとニワトリ卵黄糖ペプチドを素材として化学-酵素合成したインフルエンザウィルス捕捉型感染阻害剤におけるリガンド糖鎖の多価効果、平成 18 年度日本生物工学会大会、２００６年 9 月 11 日、大阪大学
44. 梅川碧里(1)、藤田清貴(2)、加藤紀彦(1)、芦田久(1,3)、山本憲二(1,3)（(1) 京大・生命、(2) 鹿児島大・農、 (3) CREST・JST）：*Mucor hiemalis* 由来エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（Endo-M）の大腸菌における発現、日本応用糖質科学会平成 18 年度大会、２００６年 9 月 27 日、大阪府立大学
45. T. Katayama(1,2), K.Fujita(3), K.Yamamoto(2,4)（(1)石川県大・生物資源研、(2) CREST・JST、(3)鹿児島大・農、(4) 京大・生命）: Novel Bifidobacteria Glycosidases Acting on Sugar Chains of Mucin Glycoproteins、The 9th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering、２００６年 11 月 1 日、Otsu.
46. T. Katayama(1,2), K.Fujita(3), A.Sakuma(4), F.Ohura(4), A.Tsuchiya(4), K.Yamamoto(2,4)（(1)石川県大・生物資源研、(2) CREST・JST、(3)鹿児島大・農、(4) 京大・生命）: Analysis of Lactic Acid Bacteria Glycosidases Acting on Sugar Chains of Glycoprotein、２００６年 11 月 9 日、Pattaya, Thailand.
47. 牧利一(1)、小澤隼人(1)、川原彰人(1)、栗原新(1,2)、藤田雅也(3)、石田秀治(2,4)、木曽真(2,4)、芦田久(1,2)、山本憲二(1,2)（(1) 京大・生命、(2) CREST・JST、(3)野口研、(4) 岐阜大・応用生物）：悪玉菌 *Clostridium perfringens* 由来の endo-α

-*N*-acetylgalactosaminidase のクローニングと諸性質の解析、日本農芸化学会 2007 年度大会、2007 年 3 月 25 日、東京

48. 小澤隼人(1)、山口真範(2)、石田秀治(3,4)、木曽真(3,4)、芦田久(1,4)、山本憲二(1,4)（(1) 京大・生命、(2)弘前大・医、(3)岐阜大・応用生物、(4) CREST・JST、）: *Bifidobacterium longum* 由来 endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase は縮合反応を触媒する、日本農芸化学会 2007 年度大会、2007 年 3 月 25 日、東京
49. 梅川碧里(1)、藤田清貴(2)、加藤紀彦(1)、芦田久(1,3)、山本憲二(1,3)（(1) 京大・生命、(2)鹿児島大・農、(3) CREST・JST、）:*Mucor hiemallis* 由来 Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) の糖転移機能の改変、日本農芸化学会 2007 年度大会、2007 年 3 月 25 日、東京
50. 長束俊治、廣畑有紀子、長島友美、長谷純宏（阪大院理）、系統発生における *N*-結合型糖鎖の構造比較、日本農芸化学会２００７年度大会、東京、平成１９年３月２５日
51. 長束俊治、廣畑有紀子、長島友美、長谷純宏（阪大院理）、プラナリア *N*-結合型糖鎖の比較グライコーム解析、第５４回日本生化学会近畿支部会例会、京都、平成１９年５月１９日
52. S. Magesh[a,d], T. Suzuki[b], T. Miyagi[c], H. Ishida[a,d], M. Kiso[a,d] *([a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, Japan, [b]Life Science Research Center, Gifu University, Japan, [c]Division of Biochemistry, Research Institute, Miyagi Prefectural Cancer Center, Natori, Miyagi 981-1293, Japan, [d]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)),* Design and library synthesis of human sialidase NEU3 selective inhibitors. B4-08, 第27回日本糖質学会年会、福岡、August 1-3, 2007.
53. 長束俊治、長谷純宏（阪大院理）、*N*-結合型糖鎖の比較構造グライコーム解析、第２７回日本糖質学会年会、福岡、平成１９年８月３日
54. 梅川碧里(1)、藤田清貴(2)、Wei Huang(3)、Lai-Xi Wang(3)、芦田　久(1,4)、山本憲二(1,4)（(1) 京大・生命、(2)鹿児島大・農、(3)メリーランド大、(4) CREST・JST）：Mucor -N-acetylglucosaminidase(Endo-M)の糖転移機能の改変とその反応解析日本応用糖質科学会　2007 年度大会、2007 年 8 月 29 日、神奈川
55. K. Fujikawa[a], H. Ishida[a,b], M. Kiso[a,b] *([a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, Japan, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)),* Efficient Synthesis of GM3 Analog by Employing Intramolecular Glycosylation. 14th European Carbohydrate Symposium, Luebeck, Germany, September 2-7, 2007.
56. 梅村舞子(1)、梅川碧里(1)、牧村裕(2)、増井彩乃(3)、又平芳春(3)、伊藤正恵(4)、芦田久(1,5)、山本憲二(1,5)（(1) 京大・生命、(2)朝日大・歯、(3)焼津水産㈱、(4)長浜バイオ大・バイオ、(5) CREST・JST）"キトサンを糖鎖支持体としたインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤におけるキトサン鎖長の最適化" 日本生物工学会 2007 年大会、2007 年 9 月 27 日、広島大学東広島キャンパス
57. 牧利一(1)、藤田雅也(2)、石田秀治(3,4)、木曽真(3,4)、芦田久(1,4)、山本憲二(1,4)（(1) 京大・生命、(2)野口研、(3)岐阜大・応用生物、(4) CREST・JST）"悪玉菌 *Clostridium perfringens* 由来の endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase のクローニングと諸性質の解析" 日本生物工学会 2007 年大会、2007 年 9 月 27 日、広島大学東広島キャンパス
58. Ishida, H.[a] and Kiso, M.[a,b,c] *([a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, Japan, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)), [c]Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University, Japan)* Development of novel methods to construct glycolipids and glycopeptides, NIPER-ACCT (I) 2007 CARBO-XXII (Punjab, India), December 13-15, 2007.
59. 長束俊治、伊藤　慎、長谷純宏（阪大院理）、非還元末端糖鎖ユニットを網羅的に解析する手法の開発、BMB2007（第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会）、横浜、平成１９年１２月１４日

③　ポスター発表（国内会議　61　件、国際会議　23　件）

1. 今村彰宏(1,2)、安藤弘宗(1,2)、石田秀治(1,2)、木曽　真(1,2)（(1)岐阜大院連農、(2)CREST)、「B 系列ガングリオシド新規合成戦略に基づいたガングリオシド GQ1b の全合成」、第２４回日本糖質学会大会　横浜　平成１５年７月２９～３１日
2. 魚津伸夫１、小熊恵二２、西河　淳１、（１；農工大・農、CREST、２；岡山大院・医歯総)、ボツリヌス毒素複合体の細胞内への移行機構、第２４回日本糖質学会大会　横浜　平成１５年７月２９～３１日
3. 長束俊治、西川賢、市川明、伊倉宏司(京都工繊大)、ムチン型糖鎖の構造多様性解析法の構築と応用、第２４回日本糖質学会年会、横浜、平成１５年７月２９日～３０日
4. 魚津伸夫、殿塚隆史、坂野好幸、小熊恵二*、西河　淳、（農工大・農、CREST、*岡山大院・医歯総)、ボツリヌス毒素複合体の細胞内への移行機構、日本農芸化学会関東支部２００３年度支部大会、府中、平成１５年１０月１１日
5. 長束俊治、西川賢、市川明、伊倉宏司(京都工繊大)、Construction of analytical method for mucin-type glycans、第７６回日本生化学会大会、横浜、平成１５年１０月１７日
6. Akihiro Imamura[a,b], Hiromune Ando[a], Hideharu Ishida[a,b], Makoto Kiso[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*), Novel α-Galactosylation Using Di-*tert*-butylsilylene(DTBS) Group Mounted on the C-4,6 Hydroxyl Group. 15th International Conference on Organic Synthesis. (2004, August 1-6, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan).
7. Akihiro Imamura[a,b], Hiromune Ando[a], Hideharu Ishida[a,b], Makoto Kiso[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*), A synthesis of ganglioside GQ1b based on a novel synthetic strategy of B-series gangliosides. Sialobiology 2004 Fourth International Conference. (2004, July 28-30, St Andrews, UK).
8. Toshihiko Sawada[a,b], Hiromune Ando[c], Hideharu Ishida[a] and Makoto Kiso[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST), [c]Life Science Research Center, Gifu University*) Preparation of sialylated galactosyl fluoride for orthogonal synthesis of ganglioside. Sialobiology 2004 Fourth International Conference. (2004, July 28-30, St Andrews, UK).
9. Toshihiko Sawada[a,b], Hirofumi Nakano[c], Mikiji Shigematsu[a], Tomohiro Hashimoto[d], Hideharu Ishida[a] and Makoto Kiso[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST), [c]Aichi University of Education, [d]Faculty of regional Science, Gifu University*), Conformational study of α-N-acetylneuraminic acid by density functional theory. XXII International Carbohydrate Symposium. (2004, July 23-27, Glasgow, UK).
10. Akihiro Imamura[a,b], Akiyoshi Kimura[a], Hiromune Ando[a], Satomi Korogi[a], Hideharu Ishida[a,b], Makoto Kiso[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*), Novel α-galactosylation using di-tert-butylsilylene(DTBS) group mounted on the C-4,6 hydroxyl group. XXII International Carbohydrate Symposium. (2004, July 23-27, Glasgow, UK).
11. 澤田敏彦[1,2]、橋本智裕[3]、中野博文[4]、重松幹二[1]、石田秀治[1]、木曽　真[1,2] (岐大院連農[1]・CREST[2]・岐大地域[3]・愛知教大自然[4])、密度汎関数理論による α-*N*-アセチルノイラミン酸のコンホメーション解析、分子構造総合討論会 2004、平成 16 年 9 月 27 日～30 日、広島。
12. Shunji Natsuka, Sumihiro Hase (Osaka Univ.), Structure Analysis of Squid *N*-Glycans from Comparative Biochemical View, 22th International Carbohydrate Symposium, Glasgow UK, 平成１６年７月２３日～２６日
13. 大浦房子(1)、長嶺賀子(1,2)、藤田清貴(2,3)、片山高嶺(2,4)、熊谷英彦(4)、山本憲二(1,2)（(1) 京大・生命、(2)CREST・JST、 (3)鹿児島大・農, (4)石川県大・生物資源研）: *Bifidobacterium longum* 由来 endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase 遺伝子のクローニングと機能解析、第 77 回日本生化学会大会、横浜、2004 年 10 月 13～16 日
14. 長束俊治、長谷純宏（阪大院理)、シアル酸を含むムチン型糖鎖の蛍光標識法による一括解析、第７６回日本生化学会大会、横浜、平成１６年１０月１４日

15. 高田紀子、坂野好幸、小熊恵二*、西河　淳（農工大・農、CREST　*岡大院・医歯総合)、ボツリヌス毒素複合体が認識する糖鎖構造の解明、第７６回日本生化学会大会、横浜、平成 16 年 10 月 15～18 日
16. F. Oura(1), N. Nagamine(1,2), K. Fujita(2,3), T. Katayama(2,4), H. Kumagai(4) and K. Yamamoto(1,2)（(1) 京大・生命、(2)CREST・JST、 (3)鹿児島大・農、 (4)石川県大・生物資源研）: Molecular Cloning and Characterization of Endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*、US/JAPAN GLYCO 2004、Hawaii, 2004 年 11 月 18～20 日
17. Shunji Natsuka, Sumihiro Hase (Osaka Univ.), Structure Analysis of Invertebrate *N*-Glycans by Comparative Biochemical View, US/JAPAN GLYCO 2004、Hawaii, 2004 年 11 月 18～20 日
18. Shunji Natsuka, Sumihiro Hase (Osaka Univ.), *N*-Glycan structures of invertebrates, Gordon Research Conferences 2005 “Glycobiology”, California, 平成17年3月9日～10日
19. 井上望(1)、石田秀治(1,2)、木曽真(1,2)(1 岐阜大・応用生物、2CREST)、「ボツリヌス毒素受容体関連ムチン型糖鎖の合成研究」、日本農芸化学会 2005 年度大会、札幌、平成 17 年 3 月 28 日
20. 加藤裕貴(1)、石田秀治(1,2)、木曽真(1,2)(1岐阜大・応用生物、2CREST)、「ガングリオシド-KLH複合体合成へ向けた新規糖鎖プローブの開発研究」、日本農芸化学会2005年度大会、札幌、2005年3月28日
21. 清水浩代(1)、小池悠介(1)、安藤弘宗(2)、石田秀治(1,3)、木曽真(1,3)(1岐阜大・応用生物、2岐阜大・生命セ、3CREST)、「棘皮動物由来新規ガングリオシドＨＰＧ－１の合成研究」、日本農芸化学会2005年度大会、札幌、2005年3月28日
22. 布施智明(1)、安藤弘宗(2)、石田秀治(1,3)、木曽真(1,3)(1岐阜大・応用生物、2岐阜大・生命セ、3CREST)、「GM2母核三糖の効率的合成とその応用」、日本農芸化学会2005年度大会、札幌、2005年3月28日
23. 木村彰克(1)、石田秀治(1,2)、木曽真(1,2)(1岐阜大・応用生物、2CREST)、「DTBS効効果を利用したムチン型糖鎖の合成」、日本農芸化学会2005年度大会、札幌、2005年3月28日
24. 片野由加里(1)、石田秀治(1,2)、木曽真(1,2)(1岐阜大・応用生物、2CREST)、「環状ペプチド基盤を用いた先天性免疫システムにおけるパターン認識の解明」、日本農芸化学会2005年度大会、札幌、2005年3月28日
25. 小泉幸子(1)、安藤弘宗(2)、石田秀治(1,3)、木曽真(1,3)(1岐阜大・応用生物、2岐阜大・生命セ、3CREST)、「シアリルα(2-8)シアル酸含有糖鎖の新規構築法の開発と応用」、日本農芸化学会2005年度大会、札幌、2005年3月28日
26. 今村彰宏(1,3)、安藤弘宗(2)、石田秀治(1,3)、木曽真(1,3)(1岐阜大・応用生物、2岐阜大・生命セ、3CREST)、「ガングリオシドGQ1bの効率的全合成研究」、日本農芸化学会2005年度大会、札幌、2005年3月28日
27. 澤田敏彦1,3)、安藤弘宗(2)、石田秀治(1,3)、木曽真(1,3)(1岐阜大・応用生物、2岐阜大・生命セ、3CREST)、「チオ糖とフッ化糖をオルソゴナルに用いたシアロオリゴ糖鎖の合成」、日本農芸化学会2005年度大会、札幌、2005年3月28日
28. 宮森将光(1)、石田秀治(1,2)、小倉暁(3)、問註所初美(3)、伊東信(3)、木曽真(1,2)(1岐阜大・応用生物、2CREST、3九大院・生資環・生物機能)、「細菌セラミダーゼ阻害剤の設計と合成　第2報」、日本農芸化学会2005年度大会、札幌、2005年3月28日。
29. 中村毅(1)、宮島亜季(1)、長岡利(1)、石田秀治(1,2)、木曽真(1,2)、金丸義敬(1)(1岐阜大・応用生物、2CREST)、「人乳タンパク質での新規二糖糖鎖抗原の生化学的解析」、日本農芸化学会2005年度大会、札幌、2005年3月28日
30. 高久博直(1)、佐藤淳平(2)、石田秀樹(2)、稲津敏行(3)、石田秀治(1,4)、木曽真(1,4)(1岐阜大院・連農、2 野口研、3 東海大工・応化、4CREST)、「UDP-オリゴ糖の合成と生理活性研究」、日本農芸化学会 2005 年度大会、札幌、2005 年 3 月 28 日
31. 山崎光司(1)、牧村裕(2)、片山高嶺(3,4)、山本憲二(1,3)、伊藤正恵(5)（(1) 京大・

生命、 (2)朝日大・歯、(3)CREST・JST、 (4)石川県大・生物資源研、(5)長浜バイオ大・バイオ)：インフルエンザウイルス感染阻害能を有する機能性高分子の化学-酵素合成、2005年度日本農芸化学会大会、2005年3月28日～30日、札幌

32. 大浦房子(1)、長嶺賀子(1,2)、藤田清貴(3)、片山高嶺(2,4)、熊谷英彦(4)、山本憲二(1,2)、鈴木俊一(5) ((1) 京大・生命、(2)CREST・JST、 (3)鹿児島大・農、 (4)石川県大・生物資源研、(5)味の素㈱)： *Bifidobacterium longum* 由来 endo-α-*N*-acetylgalactosaminidaseの組換え酵素の解析、2005年度日本農芸化学会大会、2005年3月28日～30日、札幌
33. 今村彰宏(1,3)、安藤弘宗(2)、木村彰克(1)、石田秀治(1,3)、木曽真(1,3)(1岐阜大・応用生物、2岐阜大・生命セ、3CREST)、「4,6-O-DTBS基を利用した高立体選択的αガラクトシル化」、第25回日本糖質学会年会、大津、2005年7月20日
34. 澤田敏彦(1,2)、橋本智裕(3)、中野博文(4)、重松幹二(1)、石田秀治(1,2)、木曽真(1,2)(1岐阜大院・連農、2CREST、3岐阜大・地域科学、4愛知教育大・化)、「密度汎関数理論によるα-N-アセチルノイラミン酸の構造研究」、第25回日本糖質学会年会、大津、2005年7月20日
35. 安藤弘宗(1)、小池悠介(2)、小泉幸子(2)、石田秀治(2,3)、木曽真(2,3)(1岐阜大・生命セ、2岐阜大・応用生物、3CREST)、「高反応性N-Troc-シアル酸供与体および1,5-ラクタム化シアル酸受容体の開発とジシアル酸ファミリーへの合成的対応」第25回日本糖質学会年会、大津、2005年7月20日
36. 清水浩代(1)、小池悠介(1)、小泉幸子(1)、安藤弘宗(2)、石田秀治(1,3)、木曽真(1,3)(1岐阜大・応用生物、2岐阜大・生命セ、3CREST)、「棘皮動物由来新規ガングリオシドHPG-1の合成研究」、第25回日本糖質学会年会、大津、2005年7月20日
37. 金森審子(1)、山口真範(2)、石田秀治(2,3)、木曽真(2,3)、神奈木玲児(1,3)(1愛知がんセ・分子病態、2岐阜大・応用生物、3CREST)、「シアル酸環状化をもたらすシアル酸シラクラーゼの遺伝子単離」、第25回日本糖質学会年会、大津、2005年7月20日
38. 山仲毅(1)、井上望(1)、今村彰宏(1,2)、石田秀治(1,2)、木曽真(1,2)(1岐阜大・応用生物、2CREST)、「DTBS効果を利用したムチン型糖鎖ライブラリーの合成研究」、第25回日本糖質学会年会、大津、2005年7月20日
39. 片野由加里(1)、安藤弘宗(2)、石田秀治(1,3)、木曽真(1,3)(1岐阜大・応用生物、2岐阜大・生命セ、3CREST)、「環状ペプチド架台を用いた糖鎖プローブの構築」、第25回日本糖質学会年会、大津、2005年7月20日
40. 木村彰克(1) 今村彰宏(1,2)、石田秀治(1,2)、木曽真(1,2) (1岐阜大・応用生物、2CREST)、「DTBS効果を利用したムチン型糖鎖の合成」、第25回日本糖質学会年会、大津、2005年7月20日
41. Shunji Natsuka, Tatsuya Takemoto, Moriguchi, K., Aoki, T., Nobuko Ito, Sumihiro Hase (Osaka Univ.), Lewis X-oligosaccharides appeared at segmentation period of zebrafish embryo. Glyco XVIII, Florence Italy, 平成１７年９月８日
42. 魚津伸夫 1、井出　梓 1、殿塚隆史 1、坂野好幸 1、小熊恵二 2、西河　淳 1（1 農工大連院・生物工、CREST、2 岡山大院・医歯総）、Internalization pathway of *Clostridium botulinum* progenitor toxin、第 77 回日本生化学会大会　横浜　平成 17 年 10 月 13～16 日
43. 井出　梓 1、中村紀夫 1，魚津伸夫 1、殿塚隆史 1、坂野好幸 1、小熊恵二 2、西河　淳 1（１農工大連院・生物工、CREST、2 岡山大院・医歯総）、Characterization of hemagglutinin subcomponents of Clostridium botulinum type C progeniter toxin、第 77 回日本生化学会大会　横浜　平成 17 年 10 月 13～16 日
44. 広畑有紀子、長束俊治、長谷純宏(阪大院理)、プラナリアの *N*-結合型糖鎖の構造解析、日本生化学会大会、神戸、平成17年10月21日
45. Toshio Nakamura[1], Takayuki Yuzawa[1], Azusa Ide[1], Takashi Tonozuka[1], Yoshiyuki Sakano[1], Keiji Oguma[2], and Atsushi Nishikawa[1,3] ([1]*Dept. of Appli. Biol. Sci., Tokyo Univ. of Agri. and*

Technol., [2]*Dept. of Bacteriology., Okayama Univ. Grad. Sch. of Medicine and Dentistry,* [3]*CREST*) Structural analysis and characterization of *Clostridium botulinum* type C subcomponents. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 2006. June 18-23.

46. Yukiko Hirohata, Shunji Natsuka, Sumihiro Hase (Osaka Univ.), Structural analysis of *N*-linked glycans in planarian, *Dugesia Japonica*, 20th IUBMB International Congress, Kyoto, 平成１８年６月１９日
47. Hironori Fujiki, Shunji Natsuka, Sumihiro Hase (Osaka Univ.), Structural analysis of mucin-type glycans from COS7 cells. 20th IUBMB International Congress, Kyoto, 平成１８年６月１９日
48. Imamura, A.[a,b], Kimura, A.[a], Ando, H.[c], Ishida, H.[a,b], Kiso, M.[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University,* [b]*CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST),* [c]*Life Science Research Center, Gifu University*): DTBS-directed High α-selective Galactosylation and Its Applications. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.
49. Sawada, T.[a,b], Hashimoto, T.[c], Nakano, H.[d], Ishida, H.[a,b], Kiso, M.[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University,* [b]*CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST),* [c]*Faculty of regional Science, Gifu University,* [d]*Aichi University of Education,*): Ab Initio Fragment Molecular Orbital Study of Influenza Virus Hemagglutinin-(α2-3)sialolactose Interaction. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.
50. Komori, T.[a], Fujikawa, K.[a], Imamura, A.[a,b], Ishida, H.[a,b], Kiso, M.[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University,* [b]*CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*): Synthesis of GM2 Analogues toward the Elucidation of the Functon GM2 Activator. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.
51. Ikeda, S.[a], Ishida, H.[a,b], Kiso, M.[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University,* [b]*CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*): Synthetic Study on Novel Basic Glycolipids from Bovine Brain. XXIII International Carbohydrate Symposium, Whistler, Canada, July 23-28 2006.
52. M. Umemura(1), M.Umekawa(1), K.Yamazaki(1), Y.Makimura(2), M.Itoh(3), K. Yamamoto (1, 4)((1) 京大・生命、(2)朝日大・歯、(3)長浜バイオ大・バイオ、(4)CREST・JST)：Chemo-Enzymatic Synthesis of an Inhibitor Against Influenza Virus Infection Using Endo-β-*N*-Acetylglucosaminidase from *Mucor hiemalis*、XXIIIrd International Carbohydrate Symposium、Whistler, Canada, 2006年7月24日
53. 佐藤哲郎 (1)、小澤恭子 (1)、今村彰宏 (1,2)、石田秀治 (1,2)、木曽真 (1,2) (1岐阜大・応用生物、2CREST)：ビフィズス菌由来 endo-α-N-acetylgalactosaminidase 特異的基質の設計と合成、第２６回日本糖質学会年会　仙台、平成１８年８月２３～２５日
54. 池田翔子 (1)、石田秀治 (1,2)、木曽真 (1,2) (1 岐阜大・応用生物、2CREST)：ウシ脳由来新規塩基性糖脂質の合成研究、第２６回日本糖質学会年会　仙台、平成１８年８月２３～２５日
55. 木村彰克 (1)、今村彰宏 (1,2)、安藤弘宗 (3)、石田秀治 (1,2)、木曽真 (1,2) (1岐阜大・応用生物、2CREST、3 岐阜大・生命セ)：DTBS 効果を利用したα-ガラクトシルセラミド及び iGb3 の効率的合成、第２６回日本糖質学会年会　仙台、平成１８年８月２３～２５日
56. 中村紀夫 1，湯沢孝之 1，殿塚隆史 1，坂野好幸 1，小熊惠二 2，西河淳 1，3(1 農工大・応用生物，2 岡大院・医歯総合，3CREST)、結晶構造解析手法を用いた C 型ボツリヌス毒素構成成分、HA1 の糖鎖認識に関する検討、第２６回日本糖質学会年会　仙台、平成１８年８月２３～２５日
57. Ishida, H.[a,b], Komori, T.[a], Yoshikawa, T.[a], Imamura, A.[a,b], Kiso, M.[a,b] (*[a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University,* [b]*CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)*): Synthesis of Useful Ganglioside Probes Designed for Biomedical Application. Sialoglycoscience 2006, Mishima, Japan, August 27-31 2006.

58. 中村紀夫（農工大大学院・連合農学)、C 型ボツリヌス毒素複合体構成成分 HA コンポーネントの糖特異性とその機能、第 32 回糖質科学懇話会 Applied Glycoscience Forum、長野、平成 18 年 9 月 8～9 日
59. 澤田敏彦[1,2]、橋本智裕[3]、中野博文[4]、鈴木徹[5]、石田秀治[6]、木曽真[2,6]（[1]岐阜大院・連農、[2]CREST、[3]岐阜大・地域、[4]愛知教大・化、[5]岐阜大・生命科学総合研究支援セ、[6]岐阜大・応用生物）: ab initio フラグメント分子軌道法によるインフルエンザＨＡとシアロ糖鎖の相互作用解析、2007年度大会　日本農芸化学会、東京、March 24-27、2007.
60. 今村彰宏[1]、安藤弘宗[2]、石田秀治[1,3]、木曽真[1,3]（[1]CREST、[2]岐阜大・生命科学総合研究支援セ、[3]岐阜大応生・食品生命）：ガングリオシドGQ1bの合成に向けた方法論の開発と応用、2007年度大会　日本農芸化学会、東京、March 24-27、2007.
61. 佐藤哲郎[1]、大野ひろみ[2]、今村彰宏[3]、石田秀治[2,3]、木曽真[2,3]（[1]岐阜大院農・生物資源、[2]岐阜大応生・食品生命、[3]CREST）：ビフィズス菌由来 endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase特異的基質の設計と合成、2007年度大会　日本農芸化学会、東京、March 24-27、2007.
62. 藤川紘樹[1]、石田秀治[2,3]、木曽真[2,3]（[1]岐阜大院農・生物資源、[2]岐阜大応生・食品生命、[3]CREST）：分子内グリコシル化を利用した効率的糖脂質合成法の開発、2007年度大会日本農芸化学会、東京、March 24-27、2007.
63. 高久博直[1,2]、石田秀樹[3]、藤田雅也[4]、稲津敏行[5]、石田秀治[1,2]、木曽真[1,2]（[1]岐大・応用生、[2]CREST、[3]東京化成（株）、[4]野口研、[5]東海大・工）：ヒアルロン酸合成酵素の詳細な反応機構解明を目的とした、UDP-２糖の合成、2007年度大会　日本農芸化学会、東京、March 24-27、2007.
64. S. Magesh[1]、T. Suzuki[1]、T. Miyagi[2]、H. Ishida[1,3] and M. Kiso[1,3]（[1]Dept. of appl. bioorg. chem.., [2]Miyagi pref. cancer center, [3]CREST）: Predicition of selectivity using mixed sequence and structure based computational mehotds: A step towards selective human sialidase 3 (NEU3) inhibition. 2007年度大会　日本農芸化学会、東京、March 24-27、2007.
65. A. Hajjaj Hassan Mohamed[1,3], 鍔田武志[2], 石田秀治[1,3], 木曽真[1,3]（[1]岐阜大院・連農、[2]東京医科歯科大院・疾患生命科学、[3]CREST）：CD22 特異的阻害剤としての新規シアロシドの設計と合成、日本ケミカルバイオロジー研究会 第２回年会、京都、平成１９年５月９～１０日
66. 今村彰宏[1,5]、H. Attrill[2]、P. R. Croker[3]、D. M. F. Aalten[2,3]、安藤弘宗[4]、石田秀治[1,5]、木曽真[1,5]（[1]岐阜大・応用生物、[2]Divisions of Biological Chemistry and Molecular Microbiology, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, Scotland, United Kingdom, [3]Divisions of Cell Biology and Immunology, School of Life Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, Scotland, United Kingdom, [4]岐阜大生命科学総合セ、[5]CREST）：ガングリオシドGT1b糖鎖プローブの合成とSiglec-7 との共結晶構造解析、日本ケミカルバイオロジー研究会第２回年会、京都、平成１９年５月９～１０日
67. Tomomi Nagashima, Shunji Natsuka, Shin-ichi Nakakita, Sumihiro Hase (Osaka Univ. & Kagawa Univ.), Structure analysis of *N*-glycans from invertebrates with HPLC mapping method, The 27th Sapporo Cancer Seminar International Symposium, Sapporo, 平成19年7月11～13日
68. A. Hajjaj Hassan Mohamed[a,c], T. Tsubata[b], H. Ishida[a,c] and M. Kiso[a,c] *([a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, Japan, [b]Laboratory of Immunology, School of Biomedical Science, and Department of Immuno, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, [c]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST))*: Design and synthesis of novel sialosides as potential CD22-specific inhibitors. XIX International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, Australia, 15-20 July 2007.
69. M. Ando[a], T. Komori[a], T. Yoshikawa[a], A. Imamura[a,b], H. Ishida[a,b] and M. Kiso[a,b], Y. Suda[c] *([a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, Japan, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST), [c]VBL, Kagoshima University, Japan)*: Systematic synthesis of functional oligosaccharide probes for sugar_chips. XIX International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, Australia, 15-20 July 2007.
70. T. Sato[a], A. Imamura[a,b], H. Ishida[a,b] and M. Kiso[a,b] *([a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, Japan, [b]CREST, Japan Science and Technology Corporation*

(JST)): Di-tert-butylsilylene-Directed α-Selective Synthesis of p-Nitrophenyl T-antigen analogs. XIX International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, Australia, 15-20 July 2007.

71. T. Yoshikawa[a], N. Yuki[b], T. Yabe[a], H. Ishida[a,c] and M. Kiso[a,c] *([a]Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, [b]Department of Neurology, Histology and Neurobiology, Dokkyo University School of Medicine, Japan, [c]CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST))*: A synthesis of GM1 epitope-KLH conjugate for elucidation of the pathogenic mechanism of the Guillan-Barré Syndrome. XIX International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, Australia, 15-20 July 2007.
72. 今村彰宏[1,5]、H. Attrill[2]、P. R. Croker[3]、D. M. F. Aalten[2,3]、安藤弘宗[4]、石田秀治[1,5]、木曽真[1,5]（[1]岐阜大・応用生物、[2]Divisions of Biological Chemistry and Molecular Microbiology, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, Scotland, United Kingdom, [3]Divisions of Cell Biology and Immunology, School of Life Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, Scotland, United Kingdom, [4]岐阜大生命科学総合セ、[5]CREST）：合成ガングリオシドプローブを用いたSiglec-7との共結晶構造解析、第27回日本糖質学会年会、福岡、平成１９年８月１～３日
73. 吉川武[1]、野原偏弘[1]、石田秀治[1,2]、木曽真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]CREST）：生理活性糖鎖への蛍光標識FITCの効率的導入法の開発、第 27 回日本糖質学会年会、福岡、平成１９年８月１～３日
74. 小森達也[1]、石田秀治[1,2]、木曽真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]CREST）: GM2 activatorの作用機構解明を目的とした新規GM2 類縁体の設計と合成、第 27 回日本糖質学会年会、福岡、平成１９年８月１～３日
75. 澤田敏彦[1]、橋本智裕[2]、鈴木徹[3]、中野博文[4]、石田秀治[1,5]、木曽真[1,5]、鈴木康夫[5,6]（[1]岐阜大院・連農、[2]岐阜大・地域科学、[3]岐阜大生命科学総合研究支援セ、[4]愛知教育大・化、[5]CREST、[6]中部大・生命健康): 非経験的フラグメント分子軌道法によるインフルエンザＨＡとシアロ糖鎖の相互作用解析、第 27 回日本糖質学会年会、福岡、平成１９年８月１～３日
76. 藤川紘樹[1]、石田秀治[1,2]、木曽真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]CREST）：分子内グリコシル化を利用したフィトスフィンゴシン含有GM3 の合成、第 27 回日本糖質学会年会、福岡、平成１９年８月１～３日
77. 梅村舞子(1)・梅川碧里(1)・牧村裕(2)・増井彩乃(3)・又平芳春(3)・伊藤正恵(4)・芦田久(1,5)・山本憲二(1,5)（(1) 京大・生命、(2)朝日大・歯、(3)焼津水産㈱、(4)長浜バイオ大・バイオ、(5) CREST・JST）：インフルエンザウイルスの捕捉に最適なキトサン鎖を持つシアロ糖鎖含有阻害剤の探索″ 第 27 回日本糖質学会年会、福岡、平成１９年８月３日
78. 大野ひろみ１，佐藤哲朗、中村紀夫２，西河淳２，石田秀治１，木曽真１（１岐阜大院農・生物資源、２農工大院・応用生命、CREST)、ボツリヌス毒素のリガンド探索に向けたムチン方糖鎖の合成と生物活性、第２７回日本糖質学会　福岡　平成１９年８月１～３日
79. 長島友美、長束俊治、中北愼一、長谷純宏(阪大院理、香川大)、マボヤ *N*-結合型糖鎖の構造解析、第 27 回日本糖質学会年会、福岡、平成１９年８月２～３日
80. 伊藤慎、長束俊治、長谷純宏(阪大院理)、非還元末端由来機能性糖鎖ユニットの構造解析法の開発、第27回日本糖質学会年会、福岡、平成19年8月2日～3日
81. 長束俊治、伊藤慎、長谷純宏(阪大院理)、非還元末端糖鎖ユニットを網羅的に解析する手法の開発、BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会)、横浜、平成19年12月14日
82. Mao Kotani[1], Toshio Nakamura[1,2], Takashi Tonozuka[1], Azusa Ide[1], Ryutaro Sato[1], Keiji Oguma[3] and Atsushi Nishikawa[1,2]（[1]Tokyo Univ. of Agri. and Technol., [2]CREST, [3]Okayama Univ. Grad. Sch. of Med.）、Crystal structure of *Clostridium botulinum* type C HA3 component、第８０回日本生化学会大会　横浜　平成１９年１２月１１～１５日

83. 大野ひろみ１，佐藤哲朗、中村紀夫２，西河淳２，石田秀治１，木曽真１（１岐阜大院農・生物資源、２農工大院・応用生命、CREST）ボツリヌス毒素の小腸リガンド探索に向けたムチン型糖鎖の設計及び合成とその毒素結合能（Design and synthesis of sialylatedα-GalNAc derivatives to explore a small intestine ligand of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin and determination of the biological activities)、日本農芸化学会２００８年度大会、名古屋、平成２０年３月２６日～２９日（予定）

84. 中村 紀夫、佐藤 龍太朗、殿塚 隆史、小熊 恵二*、西河 淳(農工大院、CREST、岡山大院)、C 型ボツリヌス毒素複合体を構成するレクチン成分、HA1 の糖特異性改変に関する検討、日本農芸化学会２００８年度大会、名古屋、平成２０年３月２６日～２９日（予定）

(4)特許出願

①国内出願（4件）

1. 発明者：今村彰宏、安藤弘宗、木曽　真、石田秀治
発明の名称：α-選択的グリコシル化反応方法
出願人：独立行政法人科学技術振興機構
出願日：平成１５年５月２２日
出願番号:特願２００３－１４４６２２号

２．発明者：木曽　真、石田秀治、今村彰宏
発明の名称：エンドα–ガラクトサミニダーゼ高感度基質、その製造方法及び利用方法
出願人：国立大学法人　岐阜大学
出願日：2005 年 5 月 31 日
出願番号：特願 2005-158437

3. 発明者:大浦房子、山本憲二、片山高嶺、藤田清貴、山口真範、小澤隼人、鈴木俊一、長嶺賀子、熊谷英彦
発明の名称:糖鎖転移方法および糖鎖転移酵素
出願人:味の素株式会社、東京化成工業株式会社
出願日:2005 年 9 月 20 日
出願番号:特願2005－272770

4. 発明の名称:「糖結合性ポリペプチド、複合材料、及び薬剤送達システム」
発明者:西河　淳、小熊恵二
出願人:東京農工大学、岡山大学
出願日:平成19年1月14日
出願番号:特願 2007-005265

②海外出願（2件）

1. 発明者：Ando Hiromune, Imamura Akihiro, Kiso Makoto, Ishida Hideharu
発明の名称：Method of α-selective glycosylation
出願人：Japan Science and Technology Agency
出願日：平成１５年１１月１２日
出願番号：PCT/JP2004/007155

2. 発　明　者:Kenji Yamamoto, Takane Katayama, Fusako Oura, Kiyotaka Fujita, Noriko Nagamine, Hidehiko Kumagai
発明の名称：Transglycosylation method and protein having transglycosylation activity

出 願 人:Ajinomoto Co., Tokyo Kasei Kogyo Co.
出願日:2005 年 3 月 25 日
出願番号:11／089508

(5)受賞等

①受賞

平成16年度日本糖質学会奨励賞
受賞者:長束俊治、受賞日:平成16年8月25日
題目:化学的手法による糖蛋白質糖鎖の構造研究とその生合成酵素の遺伝子解析

山本憲二:有馬啓記念バイオインダストリー協会賞　2004 年 10 月

木曽　真:第 57 回岐阜新聞大賞(学術部門)　平成 18 年 2 月

②新聞報道

山本憲二:日経産業新聞 2005 年 3 月 28 日 「インフルエンザ感染防ぐ高分子」

③その他

(6)その他特記事項

7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成16年3月22日	チーム内打ち合わせ	岐阜大学	15人	共同研究体制の強化と推進
2006 年 8 月 27～31 日	Sialoglycoscience 2006	三島	165 名（内外国人 53 名）	シアロ糖鎖科学の基礎と応用について発表討論した。
2006 年 12 月 14 日	情報交換会	岐阜大学	25人	共同研究体制の強化と推進
2007 年 10 月 5 日	情報交換会	岐阜大学	25人	共同研究体制の強化と推進

8 結び