

糖鎖多様性研究

蟹江 治

背景と目指すもの

有機化学の基礎は糖化学から始まったと言っても過言でない。糖は光学活性中心を複数有し、反応性に富むアルデヒドと複数の水酸基を分子内に有する。形成される分子内アセタール構造は糖により5員環や6員環構造を形成する。19世紀中頃この糖は経済の中心にあり製品のクオリティーコントロールのために当時最先端であった旋光度計が使用された。すなわち、アセタールには水中で平衡となる光学異性体が存在することが当時発見されたのであった。エミル・フィッシャーがノーベル賞を受賞したのはこの約60年後のことである。

血液型物質がこのような単糖の結合物である糖鎖であることが明らかにされてから半世紀が経過し、糖鎖の広範な機能が明らかになってきた。我々の体を形成する全ての細胞は糖衣をまとっている。10程度の単糖が重合し形成される糖鎖は、極めて多様に富んだ分子群を与えている。この物理化学的根拠は、構成単位の単糖が上述のように光学中心を伴う反応点（水酸基）を複数有することが理由の一つである。その他、1）分岐構造を一般的にとること、2）縮合反応により立体異性体を形成することが、ポリヌクレオチドやポリペプチドとの基本構造上の



大きな相違点である。糖鎖はゴルジ体で合成され、脂質やポリペプチドの修飾を担う。このゴルジ体における合成過程も解明されておらず、糖鎖に関する研究は現在でも困難を極める。

例えば創薬に結びつく成果を得るためには、累積する多くの問題を解決する必要がある。本質的問題に取り組むことなく応用展開はない。我々は、1）糖鎖のコンビナトリアル化学合成法の確立とコンビナ

Structural glycomics research

Osamu Kanie, Ph.D.

Background and aim

The chemistry of optically active carbohydrates is the basis of organic chemistry. Carbohydrates carry several stereogenic hydroxyl groups and a carbonyl function. This class of molecules forms intramolecular acetals or ketals resulting in five- or six-membered ring structures. In the 19th century, sugar itself was an important commodity, the quality control of which was vital in that era. A polarimeter was the high technology equipment for this purpose. Mutarotation of carbohydrates was a significant scientific discovery and earned Emil Fischer a Nobel Prize 60 years later.

Evidences of involvement of glycans in many biological phenomena created further problems. Such problems

include 1) method of reconstruction of biologically important glycans, 2) investigation directed towards glycan-based pharmaceuticals, and 3) microanalytical methods for structural investigation. Problem 1 has been overcome after about 30 years of effort by researchers, however, problems 2 and 3 remained to be addressed. One of the major issues in the second problem is that 'a drug candidate' suffers from glycosidases that exist in the blood stream. Our aim is to find a seed from a combinatorial oligosaccharide library, however, we do not have any convincing evidence for this challenge did. An issue in the third problem is the lack of a known method that can be used in the systematic elucidation of structurally isomeric oligosaccharides. We are currently attempting to find answers to these problems.

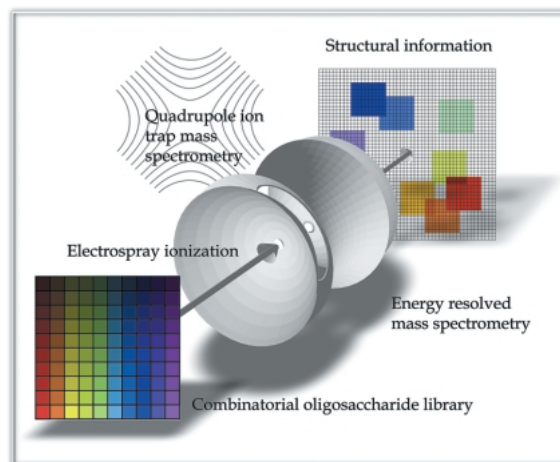
トリアルライブラリーの構築、2) コンビナトリアルライブラリーからの糖鎖の構造情報の収集、3) コンビナトリアルライブラリーからの機能性分子の発掘からなる大きな課題を主軸とし、総合的に糖鎖の合成、質量分析法による構造解析法の開発、また、マイクロチップによる糖鎖の再構築法の開発研究を通し、糖鎖研究のボトムアップを行ってきた。

アプローチ

ライブラリーには収集物の意味がある。しかし、化学において定義されたライブラリーはコンビナトリアルライブラリーであり、二つ以上の可変項からなる組み合わせ領域を形成するものである。我々は、このようなコンビナトリアルライブラリーこそ、糖鎖の研究分野において今（基礎研究における“今”は一般的な“将来”を意味する）必要とされていると考えている。構築法が存在しなかったためその価値の議論がなされることがなかったが、構築法の導入により状況が変わることを期待した。また、通常考えでは、スクリーニングにより有用化合物の探索が重大事であるが、コンビナトリアルライブラリーの構築法の開発だけでも一大事であるのに、さらにスクリーニングに必要な量を求めることは非現実的と考え、かつ、微量糖鎖の構造解析技術の開発が急務であるとの認識から、コンビナトリアルライブラリー物質から質量分析法により糖鎖の構造に関する構造特徴の抽出を行うこととした(図1)。このアプロー

【図1】 コンビケムライブラリーから構造情報を引き出す

[Fig. 1] Concept of extracting structural information from a combinatorial library.



チは糖鎖に限らずいかなる分野においても取り組まれたことがないため、期待値は無量大といえる。

質量分析法は観測対象分子を何らかの方法でイオン化し、このイオンの質量数と電荷の比 (m/z) を計測する方法である。我々は、非常に温和なエレクトロスプレーイオン化法を用い、また、質量分析法としては四重極イオントラップを用いることで多段階の衝突誘起解離による構造情報を求めることとした。さらに、通常の方法で得られる m/z のみでは糖鎖に見られる構造異性体を見極めることは困難と考え、新たな次元を解裂エネルギーに求めエネルギー分解質量分析法 (ERMS) を行うこととした。

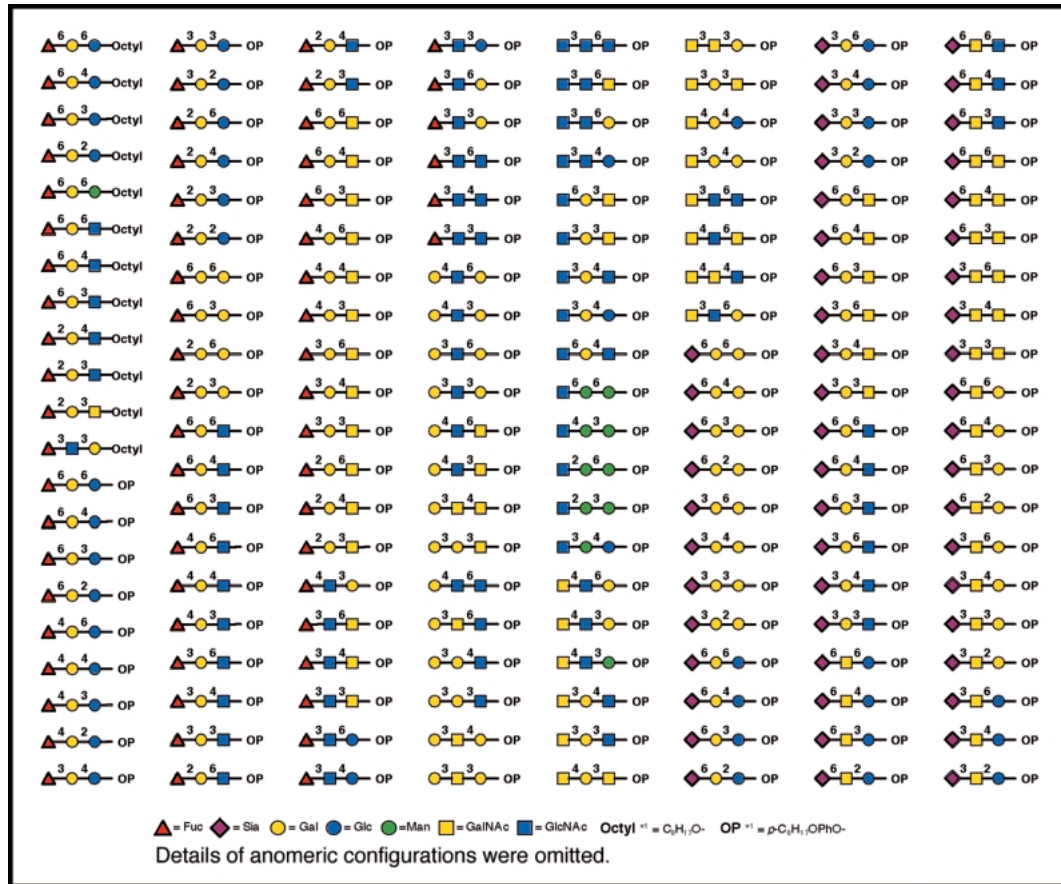
Approach

The word “library” implies a collection, but a library in chemistry is a combinatorial library that is synthesized by condensing a small number of reagents in combinations defined by a small set of reactions where more than two parameters are used by definition. We believe this concept is what we should apply to the field of carbohydrate chemistry. However, there has been a missing link between the methods available in oligosaccharide synthesis and library synthesis. We hoped that a library showing a potential would make the situation different. In an ordinary case, the combinatorial chemistry is followed by the high-throughput screening to find drug candidates, but it seemed impossible from the beginning because a synthetic method itself was not available. We considered various options and then decided to extract structural information instead of finding some functional molecules from a library. In this way, all the precious molecules become

equally important, otherwise some will be discarded. This is also convincing in the current demands in the structural elucidation of glycans. This type of investigation had never been attempted in any field of science, and was expected to hold infinite value (at least in our vision but more precisely it should be said that no one knows the value of our investigation, but at the same time no one can deny the value.). Mass spectrometry analyzes mass to charge ratio of ions generated by any method. We decided to use a combination of electrospray ionization, known as one of the most mild ionization methods, and quadrupole ion-trap (QIT) mass spectrometry (MS). The selection of QIT-MS enables multi-stage collision-induced dissociation that is advantageous in obtaining as much structural information as possible. We further envisioned utilizing energy-resolved mass spectrometry (ERMS), which provides an activation-energy related factor, in distinguishing structural isomers of oligosaccharides.

【図2】 合成した糖鎖コンビネムライブラリー (一部)

[Fig. 2] List of synthesized oligosaccharides.



成果

糖鎖コンビネムライブラリー合成に適する極めて高効率な合成法を開発した [1]。我々の手法は、無攪拌固相法と名付けた手法、オルトゴナルグリコシル化法、さらに、固相抽出法の3者を組み合わせる方法で、これまでにない高効率合成を達成するとともに、オリゴ糖鎖のコンビネムライブラリーの合成を可能とした。本法によりアノマー異性体、結合位置異性体の組み合わせからなるライブラリー

を初めて達成し（プレスリリース）、その数は1000となった（図2）。我々の方法では攪拌が必要でないため、合成装置の小型化を期待できる。

このようにして合成したコンビネムライブラリー中の糖鎖は、ERMS法により衝突誘起解離実験を行い、特にアノマー異性に関する一般的な構造情報を取得することが可能であることを初めて示すことに成功した[2,3]。このERMS法は構造異性体の判別に極めて有効であり、従来見分けることができなかった天然由来の糖鎖異性体の判別にも有効で

Achievements

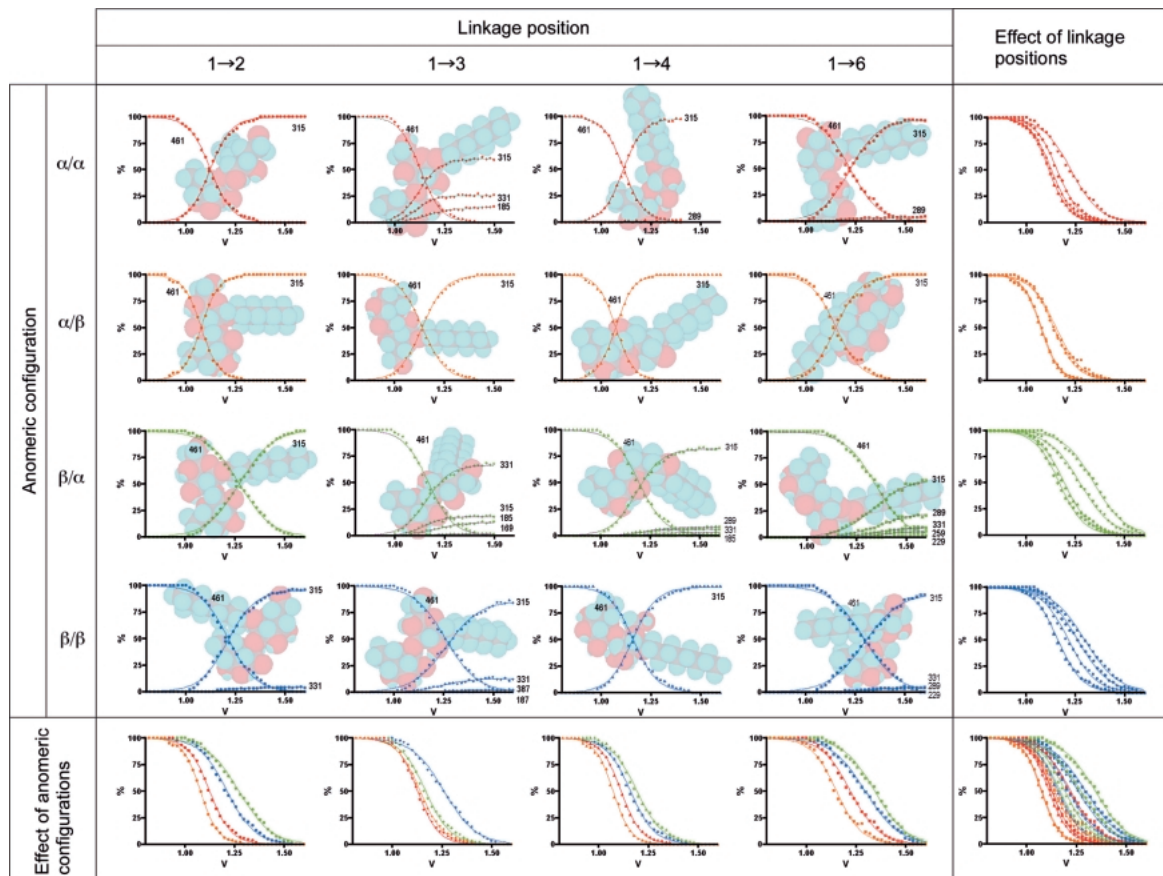
We developed an efficient method that enabled synthesis of a combinatorial oligosaccharide library. The method consists of 1) a method we named as the stationary solid-phase reaction (SSPR), 2) the orthogonal glycosylation protocol, and 3) solid-phase extraction. Using the method, we succeeded at synthesizing a combinatorial

library with 1,000 members. Because the synthetic method does not require mechanical mixing, it is expected to be used in a small synthesizer [1].

The synthesized oligosaccharides were then subjected to ERMS to extract the structural information. We found general phenomena reflecting the individual anomers of

[図3] 一連の二糖のERMS

[Fig. 3] ERMS of a series of disaccharides.



あることも実証している(図3)。さらに、糖鎖の衝突誘起解離により得られるヘミアセタール性のイオン種はこの条件下で異性化しないことを証明した。この発見は、気相ではヘミアセタールが平衡化しないことを意味し、水溶液中での挙動から150年来の発見である。この発見に基づく構造解析もすでに報告しており[4]、今後、広範な応用展開が期待できる。

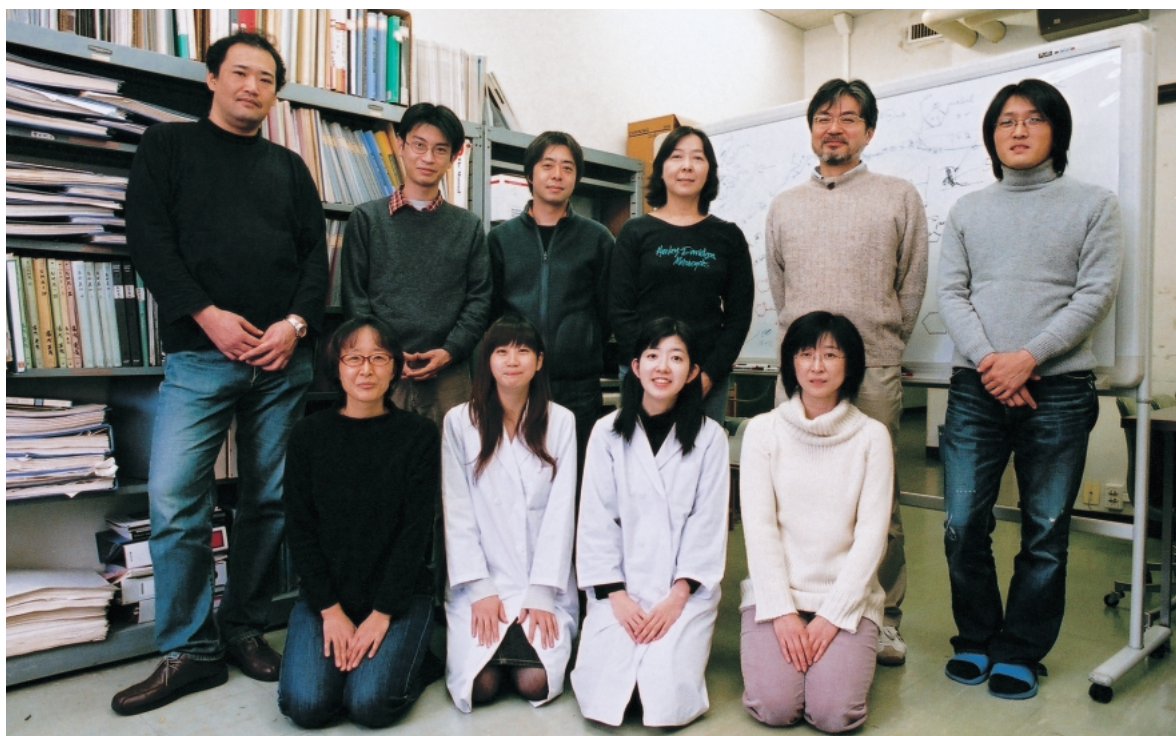
この他、分子量が16万を超える糖タンパク質のグリコフォームを含む全配列解析を可能とした。マイクロチップ上での糖鎖構築においては、異なる転移

酵素の3連続反応により四糖を合成した。目指しているのは、ゴルジシミュレータである。具体的には、マイクロチップ上の流路中に複数の酵素反応場を形成し、各々の任意温度制御下、糖転移酵素の連続反応を達成した。これは、マイクロチップによる酵素の連続反応として世界初の成果となった[5]。ゴルジ体における糖鎖合成制御メカニズム研究においては、糖転移酵素複合体の解析から2種の酵素が協調的に基質特異性を決定するメカニズムの存在を初めて示した。

monosaccharides for the first time[2,3]. We also reported that the complex and isomeric oligosaccharides can be easily distinguished by the method. Furthermore, we discovered that the hemiacetal species generated by the CID process do not anomerize in gas phase. This finding has been reported once in 150 years since the discovery of mutarotation. Our results can be applied not only in the structural investigation, but also in the investigation of the

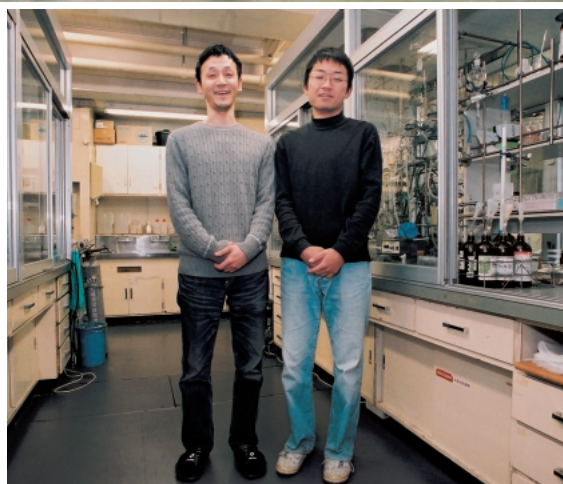
mechanism of glycosidase reactions[4].

Regarding the research on microchip-based synthesis of oligosaccharide, we succeeded in the synthesis of a tetrasaccharide corresponding to a linkage region of proteoglycan through three sequential enzymatic reactions on a microchip. This is, to the best of our knowledge, the first report of multiple enzyme reactions in a microfluidic system[5].



あとがき

5年間の研究は確実に結実したが、成果発表の途上でもあり次期プロジェクトへの助走中でもある。基礎研究の先には応用研究があり、将来事業化への可能性もあるだろう。私は、基礎研究を通し私が化学に、科学に、人類の未来に対してできることを行ってきたし今後もそうしていこう。決して偉業と呼べるようなものではないが、それでも私は満足している。社会はそうしたとるに足りないものものとするに足りない生業で成り立っている。私は、これからもそのようにして社会に貢献していこう。いつの日か経済主義社会に変わる世の中が実現する日を夢見て。5年間で得た最も重要なものは信頼できる仲間である。



- [1] Ako T, *et al.*, Chem Asian J, 1: 798, 2006.
- [2] Kurimoto A, *et al.*, Anal Chem, 78: 3461, 2006.
- [3] Daikoku S, *et al.*, J Mass Spectrom, 42: 714, 2007.
- [4] Suzuki K, *et al.*, Anal Chem, 79: 9022, 2007.
- [5] Ono Y, *et al.*, Lab on a Chip, 8: 2168, 2008.

Remarks

We believe that the concepts and program of our research have been successful after 5 years of continuous efforts. To use a military analogy, our current position is in the middle of the battlefield of science, rather than in the goal area. Science is often understood in terms of the hierarchy of basic research, application, and further R&D leading to a business opportunity. This does not necessarily mean that one has to follow this hierarchy. I have been

involved so far in the basic part of science, and I will continue as in the past. I am satisfied with what I do and the way I have contributed to society, though my achievement might not be a great feat. As a matter of speaking, the world consists of many such small individuals. Most people, including myself, will contribute to the foundation of society through one's business dreaming that one day more people-friendly principles will replace current economics. Friendship that grows during the period is the most important aspect of all.