

研 究 報 告 書

「フォトリソグラフィーを活用した糖鎖ナノデバイスの構築」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：今場 司朗

1. 研究のねらい

第三の生命鎖として重要な機能を有する糖鎖であるが、その複雑な構造故現在においても、その機能を網羅的に解析可能となる満足いく糖鎖アレイは存在しない。そこで、申請者が独自に開発しその有効性を明らかにした「だるま落とし保護法」による糖鎖合成手法と、DNAアレイ作製技術であるフォトリソグラフィー技術を融合し、ガラス基板上での選択的糖鎖合成手法を確立する事を目指した。糖鎖は複雑に分岐した構造をとっているが、上記2つの技術の融合により、光を照射した部位にある糖鎖の、特定の水酸基を選択的に活性化させることが可能になり、基板上に、プログラムされた特定の糖鎖を、選択的にかつ高密度で構築する事により、高度に集積化された糖鎖アレイの作製が可能になる。これにより各種病気の診断、毒素の検出、生命現象の解析等、生命科学の分野で応用が期待される糖鎖ナノデバイスとしての、糖鎖アレイを作製する為の基盤技術を確立する。

2. 研究成果

1) 基板の選定

糖鎖アレイを構築する上での土台である基板をまずは選定した。基板として考えられるのはガラスかプラスチックであるが表面修飾のしやすさから、様々なガラスを検討した結果、反応追跡の必要性から loading 量の多い多孔質ガラスを選定した。ガラス表面にアミノ基を共有結合させた後、アミノ基の検知テストであるクロラニルテストを行うと、様々なガラスの中で唯一多孔質ガラスが陽性を示し、今後の使用に耐えうる十分量のアミノ基がある事がわかった。

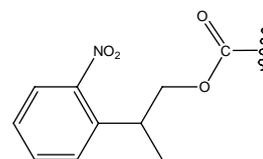


2) 反応追跡法の確立

未知の素材であるガラス上での糖鎖合成を行うに当たり、反応追跡が重要になる。クロラニルテストのような呈色試験でもある程度の予測がつかうが、表面構造をしっかりと知るためにはやはり切り出して調べるのが一番良いと考え、ガラス上の化合物を切り出す新規な手法を開発した。直接ガラスを玉尾酸化の反応条件にさらすと炭素-珪素結合が切断され、リンカーの末端が水酸基になって切り出される事を発見した。この切り出し反応はほぼ中性条件で進行するため、様々な保護基に影響を与えずにありのままの構造を切り出す事が可能であり、切り出された物のMSを測定する事により、ガラス上での有機合成反応を追跡する事が可能になった。

3) 光切断保護基の選定

水酸基の保護基として光切断保護基を用いる必要がある。そこで光を当てると選択的に脱保護可能な水酸基の保護基を種々比較検討し



NPPOC



た。その結果NPPOC基を用いると360nm の光で30分照射すると定量的に脱保護できる事を見いだした。

4) 光酸発生剤の選定

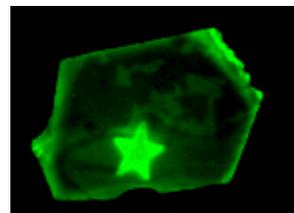
光を当てるだけで切れる光切断保護基と違い、光を当てる事により酸を発生させ、その部分にある酸で切れる保護基(Boc 基)を選択的に切断する検討を行った。10種類にも及ぶ光酸発生剤を比較検討した結果、triarylsulfonium hexafluoroantimonate を用い、312nm の光でガラスの表・裏それぞれ2時間ずつ照射するとほぼ定量的に Boc 基を脱保護可能であった。

5) 今後の多種類合成を見据えた新規合成手法の開発

当初、光切断保護基、光酸発生剤およびだるま落とし保護基を組み合わせる事で、基板上でのビルドアップ合成を達成しようと考えたが、今後、数百・数千の多種類糖鎖を合成する上でこれでは、反応段階が長すぎて非現実的であると気がついた。そこで、だるま落とし保護基を脱保護し選択的に目的の水酸基を遊離させた後に、光切断保護基を選択的に導入する。そして目的の部位に光を当て光切断保護基を脱保護する事により目的の水酸基を選択的に遊離させる。そこに次の糖またはキャッピングを行う。その後また別の所に選択的に光を当て水酸基を選択的に脱保護させる。という操作を繰り返した方が、反応段階を飛躍的に減少可能であると気がついた。この手法を用い、実際に一枚のガラス基板上で、3種類の構造の異なる2糖を合成し、基板上での糖鎖合成手法を確立した。

6) ガラス上でのレクチンアッセイの検討

糖鎖アレイは基板上の糖鎖がレクチンなどの生体物質に認識されなくてはならない。そこで、ビルドアップ的に合成した糖鎖がレクチンにより認識されるか検討を行った。基板上の水酸基に光切断保護基を導入し、目的の所に光(星形)を当て選択的に水酸基を遊離させた後、ガラクトースを導入した。このガラス基板に蛍光標識レクチンを作用させた所、星形に蛍光を観察し、ビルドアップ的に合成した糖鎖もタンパク質により認識される事を確認した。



さらに、Gal β 1-4GlcNAc、GlcNAc β 1-4GlcNAc、GlcNAc の2種類の2糖と1種類の1糖をガラス基板上で作り分ける事に成功したと共に、レクチンにより識別する事にも成功した。

3. 今後の展開

基板上での糖鎖の作り分けに成功し、各ステップの反応条件を確立した。今後はその反応条件を用いてより複雑な糖鎖構造を有する糖鎖アレイを作製する。本手法を用いて合成した糖鎖アレイ・糖鎖チップが近い将来、医療現場・研究現場で実際に使われるべく、製品化を目指した研究を今後も続けていく。

4. 自己評価

当初の目標は、「だるま落とし保護法」による糖鎖合成手法と、DNAアレイ作製技術であるフォトリソグラフィ技術を融合し、ガラス基板上での選択的糖鎖合成手法を確立する事であった。結果、見事、一枚のガラス基板上で糖鎖を作り分ける事に成功した。糖鎖の作り分けはマススペクトル

による確認と、HPLCの保持時間による確認で証明された。さらに、作り分けた糖鎖をレクチンにより選択的に認識させる事にも成功し、今後の糖鎖アレイ開発の大きな基礎を築く事ができた。

5. 研究総括の見解

ガラス基板上にフォトリソグラフィーの技術を利用して様々な糖鎖のアレイを作ることを目的とした研究である。研究者はそのために光で切断できる独自の保護基を開発し、その特徴を利用して複雑な糖鎖のアレイが基板上で作成できることを示した。これらの成果は、糖鎖合成の基盤技術として評価でき、今後の実用化を期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Komba S., Sasaki S., and Machida S. A new colorimetric test for detection of hydroxyl groups in solid-phase synthesis: <i>Tetrahedron Lett.</i> , 48 (12), 2075–2078, (2007).
2. Komba S., Terauchi T., and Machida S. Automated synthesis of a tri-branched pentasaccharide: the application of the uni-chemo hydroxyl protection method to the automated synthesis of oligosaccharide: <i>J. Appl. Glycosci.</i> , 56 (3), 193–206, (2009).
3. Komba S., and Machida S. UCHP Method for Oligosaccharide Combinatorial Library Synthesis: <i>J. Carbohydr. Chem.</i> 28 (6), 369–393, (2009).
4. Terauchi T., Machida S., Komba S. A new method for cleavage of silicon-carbon linkers on glass plate supports with applications to solid-phase syntheses on silica resins: <i>Tetrahedron Lett.</i> , 51 (12), 1497–1499, (2010).
5. Komba S., Terauchi T., Machida S. A Regio- and Stereo-selective Parallel Synthesis of Five Types of Trigalactoses on a Solid Support as a Model of a Combinatorial Oligosaccharide Library: <i>J. Appl. Glycosci.</i> Accepted.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:2件

発明者: 今場 司朗

発明の名称: 固相合成装置用反応槽モジュールおよびそれを用いた固相合成装置

出願人: 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

出願日: 2008/10/7

発明者: 今場 司朗、寺内毅、渡辺悟

発明の名称: 基板上でビルドアップ型コンビナトリアルライブラリーを合成する方法

出願人: 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

出願日: 2010/12/2

(3) 学会発表

【国際】

- 1) Komba S. “General strategy for synthesis of oligosaccharide combinatorial library to develop for oligosaccharide array“, 1st International conference on drug design & discovery, 2008 (UAE).
- 2) Komba S. “General Strategy for Both of Combinatorial Solid-Phase Oligosaccharide Library Synthesis and Automated Solid-Phase Oligosaccharide Synthesis.” ,24th International Carbohydrate Symposium A-P110, 2008 (Norway).
- 3) Komba S. “General synthesis strategy of oligosaccharide combinatorial library to develop oligosaccharide array.” Microarray world congress 14MWC, 2009 (USA).

- 4) Komba S. "Purification study of commercial ganglioside GM1." Plant polysaccharide and applied glycoscience workshop 2010 P-48, 2010(Japan).
- 5) Komba S. and Terauchi T. "A new method for cleavage of silicon-carbon linkers for clarifying the surface structure on glass plate of microarray." The 25th International Carbohydrate Symposium E-P2-010, 2010 (Japan).

【国内】

- 1) 今場司朗: 機能性糖鎖材料創製の為の網羅的糖鎖合成法. 繊維学会予稿集 2009 2F08, 2009 (東京).
- 2) 今場司朗: 網羅的糖鎖合成法. 日本応用糖質科学会平成 21 年度大会講演要旨集 Cp-12, 2009 (弘前).
- 3) 寺内毅、今場司朗. マイクロアレイ構築及び固相合成への応用を目的としたガラス基板及びシリカビーズ上リンカーの新規切断法の開発. 日本化学会第 90 春季年会 1PB-026, 2010(大阪).
- 4) 今場司朗: 糖脂質の新規精製法. 日本応用糖質科学会平成 22 年度大会 Bp2-23, 2010(静岡).