(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4259876号
(P4259876)
(45)発行日　平成21年4月30日(2009.4.30)　(24)登録日　平成21年2月20日(2009.2.20)

(51)Int.Cl.　　F I
C12P 19/52 (2006.01)　　C12P 19/52
C12N 15/09 (2006.01)　　C12N 15/00　A

請求項の数 6　(全 14 頁)

(21)出願番号　特願2002-580085(P2002-580085)
(86)(22)出願日　平成14年4月2日(2002.4.2)
(86)国際出願番号　PCT/JP2002/003310
(87)国際公開番号　WO2002/081723
(87)国際公開日　平成14年10月17日(2002.10.17)
審査請求日　平成17年2月22日(2005.2.22)
(31)優先権主張番号　特願2001-103737(P2001-103737)
(32)優先日　平成13年4月2日(2001.4.2)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

前置審査

(73)特許権者　504322471
株式会社グライコメディクス
東京都渋谷区渋谷三丁目１８番４号
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(72)発明者　佐藤　智典
神奈川県横浜市港北区綱島東５－４－５－４０７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】オリゴ糖鎖の生産方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒト細胞に糖鎖プライマーGal－Glc－C12を与え、高密度培養法により培養を行うことを特徴とする下記のオリゴ糖鎖：
GalNAc-Gal-Gal-Glc-C12　（Gb4　タイプ）又は
NeuNAc-NeuNAc-Gal-Glc-C12　（GD3　タイプ）
の生産方法。
【請求項２】
前記ヒト細胞がヒト組織由来正常細胞である請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ヒト組織由来正常細胞が２倍体線維芽細胞である請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記細胞が、糖鎖生合成系酵素をコードするDNAを組み込んだベクターを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
糖鎖合成酵素がヒト型である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記高密度培養法が、マイクロキャリアー法、細胞固定用ディスクを用いる培養槽、中空糸モジュールを用いた培養システム、又は浮遊細胞サスペンジョンカルチャーである請求項１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【０００１】
発明の分野
本発明は医薬・医療・糖鎖チップなどに利用されるオリゴ糖鎖の生産法に関する。
【０００２】
背景技術
生体における細胞は、受精・発生・分化・増殖・細胞死などのあらゆる過程で特異的な糖鎖を発現しており、細胞の機能と密接に関係している。また、糖鎖は多くの毒素、ウイルスおよびバクテリアなどの受容体であり癌のマーカーとしても注目されおり、最近では癌細胞の転移やアルツハイマー病の原因と考えられているアミロイド蛋白質との相互作用も報告されている。
【０００３】
動物細胞は、それぞれ異なった種類の糖鎖を発現しており、それらの機能についても近年明らかにされつつある。例えば、B16メラノーマ細胞はGM3型の糖鎖を(Komori;H. et al., FEBS Letter;374, 299-302, 1995)、PC12細胞はGb3型の糖鎖を(Shimamura, M. et al., J. Biol. Chem. 263. 24, 12124-12128, 1998)、COS-7細胞はganglioside A系列の糖鎖（安養寺久栄他、2000年度日本化学会年会予稿集）を発現している。Gb3型糖鎖はベロ毒素の受容体となり、シアリールガラクトースを有するオリゴ糖鎖及びGM1型オリゴ糖鎖はそれぞれインフルエンザウイルスおよびコレラ毒素の受容体であることが知られている。
【０００４】
また、GD1a型オリゴ糖鎖は細胞接着に関与することから、癌の転移との関連も論じられている。このように糖鎖には多くの機能があり、糖鎖の機能解析はこれからの医薬、医療や病気の診断などに欠かせないことから、多種類の糖鎖からなる糖鎖ライブラリーの構築が望まれている。現在までに糖鎖合成は合成技術が律速となって糖鎖ライブラリーを構築できる程には至っていない。
【０００５】
一方、生産性の優れた有用物質の生産宿主として酵母が活用されているが、酵母もまた、糖鎖生合成系を持ち、各種糖鎖が合成される。しかし、酵母により生産される糖蛋白質には、いわゆる高マンノース型と呼ばれる糖鎖が結合し、これが人体において抗原性があるため医薬品には不適とされている。
【０００６】
また、各種キノコを中心に植物には多糖類と呼ばれる食物繊維の一種、β-グルカンが含まれている。このβ-グルカンには免疫増強作用があることが知られている。
【０００７】
糖鎖の合成法には化学合成および酵素を用いた方法がある。化学合成では一つの天然型のオリゴ糖鎖を得るのに、多くの反応ステップと特殊な技術を必要とし、膨大な時間と人件費を必要とするが、その割には収率が低いために、合成手法により得られたオリゴ糖鎖は天然からの抽出に比べてコストが高い欠点がある。
【０００８】
また、酵素反応によるオリゴ糖鎖の作製には加水分解酵素と糖転移酵素を用いる方法があるが、いずれも使える酵素には制限があり、望みのオリゴ糖鎖を自由に作ることは現在ではほとんど不可能である。また、反応の原料に制限があったり、非常に高価であるなど、糖鎖ライブラリーを作るための実用的な段階には至っていない。
【０００９】
動物細胞を用いた糖鎖合成では、簡単な構造の糖鎖プライマーを培養細胞に投与すると糖鎖伸長が起き、作られたオリゴ糖鎖が培養液中に放出され、培養細胞の種類を変えると異なった構造のオリゴ糖鎖が合成されることが既に知られている(Nakajima, H. et al., J. Biochem. 124, 148-156(1998);)。この方法では、培養細胞に安価で大量にしかも簡単に合成できる糖鎖プライマーを投与するだけで、生体内で機能しているオリゴ糖鎖だけを作り出すことが出来るため、糖鎖ライブラリーのプールとしては非常に質の高いものを得

ることができる利点がある。しかし、現在、これらの糖鎖産生実験は培養皿を用いた平面単層培養で行われており、糖鎖ライブラリーを構築するだけの量的な供給が難しい。

【００１０】

これまで動物細胞を用いた有用生理活性物質の生産は、大量培養技術が難しく、特に接着依存細胞の大量培養化は難航してきた。最近になり、小スケールマイクロキャリアー培養法を用いてCOS-7細胞を培養し、オリゴ糖プライマーを投与してオリゴ糖鎖を産生させる試みが報告されたが、COS-7のような接着依存性の強い癌細胞以外は、細胞機能を維持した大量培養化は非常に難しく、全ての細胞に適用できる状況ではない。

【００１１】

発明の開示

本発明は医薬、医療、診断薬、糖鎖チップなどへの応用の可能性のある有用な糖鎖ライブラリーを動物細胞から効率的に生産する方法を提供する事を目的とする。

これまでの単層培養では、細胞に作られたオリゴ糖鎖の分析はできるものの、オリゴ糖鎖を素材として工業的に提供したり、さらには糖鎖ライブラリーの構築のための多種多様なオリゴ糖鎖を量的に提供するのは困難である。そのためには、簡便な高密度大量培養技術が必要である。

【００１２】

実際に工業的に応用可能な高密度大量培養法を用いて糖鎖プライマーを投与する実験系を行うことが出来れば、有用オリゴ糖鎖の大量生産が可能になり、さらに糖鎖ライブラリーの構築を行うことができる。あるいは、各種動物の癌細胞などの大量培養または高密度培養を用いることで、一度に多種類のオリゴ糖鎖を同時に作ることができるので、省エネルギーで効率の良い糖鎖生産ができる。最近、社会的に必要性の高い環境に低負荷型の物質生産という観点においても、糖鎖プライマーの合成と生成物の抽出の過程においては一部有機溶剤を用いるが、それ以外の操作の過程では有機溶剤を使用しないため、他の手法に比べて環境に優しい物質生産を可能にする。

【００１３】

動物細胞を用いた物質生産で重要な課題となっている大量培養は、特異的抗体を産生するハイブリドーマ細胞や株化された浮遊細胞などはスケールアップが可能なタンク培養である程度可能であるが、ヒト２倍体正常細胞や他の接着依存性細胞の大量培養化は装置やスケールアップのための継代技術が難しく、細胞機能を維持した接着依存性細胞の大量培養技術の確立が強く望まれている。

【００１４】

上記目的は以下の本発明により達成される。本発明は、ヒト細胞、植物細胞、酵母にオリゴ糖プライマーを与えることを特徴とするオリゴ糖鎖の生産方法、及び高密度培養法を用いて培養した細胞（COS-7を除く）にオリゴ糖プライマーを与えることを特徴とするオリゴ糖鎖の生産方法である。

【００１５】

ヒト細胞としてはヒト組織由来正常細胞、特に２倍体線維芽細胞あるいは血管内皮細胞が好ましい。

【００１６】

糖鎖生合成系酵素をコードするDNAを組み込んだベクターを含む細胞も用いることができる。糖鎖生合成酵素としてはヒト型が好ましい。

【００１７】

また、上記高密度培養法はマイクロキャリアー培養法、細胞固定用デイスクを用いた培養槽、中空糸モジュールを用いた培養システム又は浮遊細胞のサスペンジョンカルチャーであるのが好ましい。

【００１８】

発明の実施の形態

本発明におけるオリゴ糖鎖の生産に用いる細胞には、動物細胞、植物細胞、あるいは酵母があり、動物細胞としては、各種動物由来細胞、ヒト組織由来正常細胞、ヒト癌細胞な

どが挙げられる。また、糖鎖合成酵素、特にヒト型をコードするDNAを組み込んだベクターを含む各種細胞が用いられるが、これらに限定されるものではない。

【００１９】

酵母を用いた糖鎖の生産には、酵母特有の高マンノース型糖鎖合成経路を断ち切り、高マンノース型糖鎖（アスパラギン結合型糖鎖）合成系を利用するのが好ましい。

【００２０】

本発明に用いる細胞の高密度培養方法には、マイクロキャリアー培養法、細胞固定用デイスクを用いた培養槽、中空糸モジュールを用いた培養システム、浮遊細胞のサスペンジョンカルチャー、多段式培養装置やローラーボトルを用いる方法又はマイクロカプセルに細胞を固定化培養する方法などがあるが、マイクロキャリアー培養法、細胞固定用デイスクを用いた培養装置、中空糸モジュールを用いた培養システム又は浮遊細胞のサスペンジョンカルチャーを用いる方法が好ましく用いられる。

【００２１】

マイクロキャリアーとしては、マトリックス素材はコラーゲン、ゼラチン、セルロース、架橋デキストラン又はポリスチレンのような合成樹脂からなり、荷電基としてジメチルアミノプロピル、ジメチルアミノエチル、トリメチルハイドロキシアミノプロピル又は負電荷が付加されているものが好ましく用いられる。また、マトリックス素材をコラーゲンやゼラチンでコートしたものも使用される。市販品としては、架橋デキストランにジメチルアミノエチルを付加した“Cytodex-1、ファルマシア社”、”Cytodex-3、ファルマシア社”がある。中空糸としては、修飾セルロースを使用したものがある（”Vitafiber”、アミコン社）。

【００２２】

マイクロカプセルは水透過性のあるゲルを形成するコラーゲンやアルギン酸ソーダを用いて、内部に細胞を包埋して作製する方法が知られている（A. Klausner, Bio/Technol., 1, 736, 1983）。

【００２３】

マイクロキャリアーの小スケール培養は、スピナーフラスコにマイクロキャリアーを含むPBS(-)を入れ、高圧蒸気滅菌したあと、培養液に培地交換し、細胞を接種して培養を開始する。適度な間隔を置いて培地交換し、細胞がマイクロキャリアー上にコンフルエントに増殖してから糖鎖プライマー投与を行う。ヒト血管内皮細胞など増殖生存に増殖因子を必要とする細胞は、内皮細胞増殖因子（VEGF）や線維芽細胞増殖因子（FGF）などを培養液に添加するが、内皮細胞の大量培養化は難しいとされている。

【００２４】

マイクロキャリアー培養では、200mLスケールの培養瓶１本で内径100mmのシャーレの100枚分に相当する細胞数が得られ、しかも単位液量当たりの細胞数は約４倍の高密度培養であるために、オリゴ糖プライマーの投与量も少なく、またシャーレの細胞では確認出来ない新規なオリゴ糖鎖が検出できる利点がある。

【００２５】

本発明に用いるオリゴ糖プライマーは生体内で糖脂質糖鎖の合成プレカーサーになるラクトシルセラミドの構造を模倣して作られたラクトースもしくはガラクトースに疎水鎖を付けたアナログ、又はN-アセチルグルコサミンもしくはN-アセチルガラクトサミンなどを有する糖鎖プライマーが用いられるがこれらに限定されるものでない。糖鎖プライマーの調製方法については、特開2000-247992に記載されているが、これに限定されるものではない。

【００２６】

培養細胞からオリゴ糖鎖を作らせるには、コンフルエントに増殖した細胞に、無血清あるいは低血清培地を用いて10～100μMの糖鎖プライマーを投与し、37℃で1～5日間培養することにより伸長した糖鎖を含む産生原液を得ることができる。培養上清をハーベストし、濃縮、分離、構造解析を行い、多種類のオリゴ糖鎖のライブラリーを得ることが出来る。細胞の種類によって糖鎖プライマーの種類と投与量、培養液、培養日数が異なるので

、細胞毎に培養の最適条件を見出すことは、オリゴ糖鎖の効率的な生産に繋がる。

【００２７】

ハーベスト液に含まれるオリゴ糖鎖は、アフィニテイークロマトグラフ、限外濾過、あるいは硫安沈殿などを用いて濃縮分離し、高速薄層クロマトグラフィー（HPTLC）、MALDI-TOF MSで構造解析を行う。未知物質については高速薄層クロマトグラフィーにブロッティング後、酵素処理を行い、得られた物質の組成分析から構造の推定を行う。

【００２８】

実施例

実施例１．ヒト正常線維芽細胞を用いたオリゴ糖鎖の産生

平面培養による糖鎖合成実験は、ヒト正常線維芽細胞細胞を75cm^{2}の培養フラスコにウシ胎児血清10%を含むイーグルMEMを用いて増殖させ使用した。マイクロキャリアー培養は、0.3w/v%に調製したCytodex-1（ファルマシア）200mLを入れた500mL用スピナーフラスコに平面培養で増殖させた4 x 10^{7}個の細胞を接種し、回転数100-150rpmで撹拌培養した。75cm^{2}のフラスコおよびマイクロキャリアー培養でコンフルエントに増殖した時の細胞数はそれぞれ5 x 10^{6}個／フラスコおよび4 x 10^{8}個／ボトル であった。

【００２９】

培養液をフェノールレッドおよび血清不含のイーグルMEM培地に替え、50μMオリゴ糖プライマー Gal-Glc-C_{12} により細胞を処理した。さらに培養を続け4日後の培養上清をハーベストし、C18カラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で濃縮後、HPTLCとMALDI-TOF MSで糖鎖の構造を解析した。図１にHPTLCの泳動パターン（バンド）を示し、そして図２及び図３に各バンドのMALDI-TOF MSによる分析結果を示した。 マイクロキャリアー培養を用いて、ラクドシドプライマー（Gal-Glc-C_{12}）から得られたオリゴ糖鎖の構造を表１に示した。平面培養では(X1)及び(X3)のオリゴ糖鎖のみが確認された。

【００３０】

表１．ヒト線維芽細胞の産生するオリゴ糖鎖

（マイクロキャリアー培養）

(X1)	Gal-Gal-Glc-C12	(Gb3 タイプ)
(X2)	GalNAc-Gal-Gal-Glc-C12	(Gb4 タイプ)
(X3)	NeuNAc-GalNAc-Gal-Gal-Glc-C12	(NeuNAc-Gb4 タイプ)
(X4)	NeuNAc-Gal-Glc-C12	(GM3 タイプ)
(X5)	NeuNAc-NeuNAc-Gal-Glc-C12	(GD3 タイプ)

【００３１】

実施例２．ヒト血管内皮細胞を用いたオリゴ糖鎖の産生

ヒト臍帯静脈より分離した内皮細胞をコラーゲンコートフラスコ（25cm^2, 75cm^2）を用いて培養し、平面培養によるオリゴ糖鎖合成実験に使用した。培養液はM199培地にウシ胎児血清（FCS）10%及び増殖因子として塩基性線維芽細胞増殖因子（basic FGF）10ng/mLを添加して用いた。内皮細胞のマイクロキャリアー培養は、コラーゲンコートフラスコで増殖させた細胞をゼラチンコートしたマイクロキャリアー（Cytodex-3, ファルマシア）を0.6g入れて滅菌したスピナーフラスコ（200mL培養）に約1.5 x 10^5 個 /mLで接種し、平面培養と同じ培養液を用いて200rpmの撹拌速度で培養した。

【００３２】

ヒト内皮細胞のマイクロキャリアー培養における増殖曲線を図４に示した。細胞がコンフルエントに増殖後、フェノールレッド不含のM199培地（FCS1%）に変え、糖鎖プライマーGal-Glc-C_{12}を処理して48時間後に培養上清をハーベストした。培養上清をC18カラムを用いた逆相HPLCで濃縮し、HPTLCとMALDI-TOF MSを用いて構造解析を行った。その結果を表２に示した。平面培養では(1)及び(4)のオリゴ糖鎖のみが確認された。

【００３３】

表２．ヒト血管内皮細胞が産生するオリゴ糖鎖

(1)	Gal-Gal-Glc-C12	(Gb3 タイプ)
(2)	GalNAc-Gal-Gal-Glc-C12	(Gb4 タイプ)

(3) NeuNAc-GalNAc-Gal-Gal-Glc-C12 （NeuNAc-Gb4 タイプ）
(4) NeuNAc-Gal-Glc-C12 （GM3-タイプ）

【００３４】

例３（参考例）．ラットPC12を用いたオリゴ糖鎖の産生

ラットPC12細胞を75cm^{2}フラスコおよびCytodex-1，Cytodex-3を用いたマイクロキャリアー培養法で培養し、オリゴ糖プライマーGal-Glc-C_{12}を投与して糖鎖合成を行った。図５に培養液画分の高速薄層クロマトグラフィーの泳動パターンを示した。これらのバンドのMALDI-TOF MSによる構造解析の結果を図６に示した。マイクロキャリアー培養で得られた画分の分析から得られた糖鎖構造を表３に示した。

【００３５】

表３．ラットPC12細胞が産生するオリゴ糖鎖

(1) Gal-Gal-Glc-C12 （Gb3 タイプ）
(2) Gal-Gal-Gal-Glc-C12 （Gal-Gb3 タイプ）
(3) Hex-Gal-Gal-Gal-Glc-C12 （Hex-Gal-Gb3 タイプ）

平面培養とマイクロキャリアー培養で合成されたオリゴ糖鎖２種の産生量を、resorcinol/HCl染色した薄層クロマトグラフィーのデンシトメーターによる解析で定量し、結果を図７に示した。マイクロキャリアー培養では、オリゴ糖鎖の合成量が平面培養に比較して単位液量当たり2～5倍増加していることが明らかになった。

【００３６】

例４（参考例）．COS-7を用いたオリゴ糖鎖の産生

COS-7細胞を径100mmの培養シャーレ、並びにCytodex-1およびCytodex-3を用いたマイクロキャリアー法で培養し、オリゴ糖プライマーGal-Glc-C_{12}を投与して糖鎖合成を行った。細胞はダルベッコウMEMにウシ胎児血清（FCS）10%を添加した培養液を用いて培養した。マイクロキャリアー培養は、スピナー培養フラスコにCytodex-1、Cytodex-3をそれぞれ0.6 g入れて滅菌し、200 mLの培養液を入れて平面培養で増殖させた細胞を約2 x 10^5 個/mLの濃度で接種した。

【００３７】

細胞がコンフルエントに増殖後、培養液を血清およびフェノールレッド不含の培地に換え、オリゴ糖プライマー、Gal-Glc-C_{12}を50 μM投与して培養を続けた。培養上清をハーベストし、C18カラムを用いた逆相HPLCで濃縮し、HPTLCとMALDI-TOF MSで産生オリゴ糖鎖の解析を行った。 表４にCytodex-1を用いたマイクロキャリアー培養で得られたオリゴ糖鎖の分析結果を示した。図８培養液画分のHPTLCの泳動パターンを示した。また、図９にMALDI-TOF MSによる分析結果を示した。図10に合成されたオリゴ糖鎖GM3 タイプの産生量を平面培養（シャーレ）とマイクロキャリアー培養（Cytodex-1，Cytodex-3）で比較した結果を示した。

【００３８】

【表１】

表４．COS-7細胞が産生するオリゴ糖鎖

(X1) C_{12}-Glc-Gal-NeuAc (GM3 タイプ)

(X2) C_{12}-Glc-Gal-GalNAc (GM2 タイプ)
|
NeuAc

(X3) C_{12}-Glc-Gal-GalNAc-Gal (GM1 タイプ)
|
NeuAc

(X4) C_{12}-Glc-Gal-GalNAc-Gal-Hex (Hex-GM1 タイプ)
|
NeuAc

C_{12}-Glc-Gal-GalNAc-Gal-HexNAc (HexNAc-GM1タイプ)
|
NeuAc

(X5) C_{12}-Glc-Gal-GalNAc-Gal-NeuAc (GD1aタイプ)
|
NeuAc

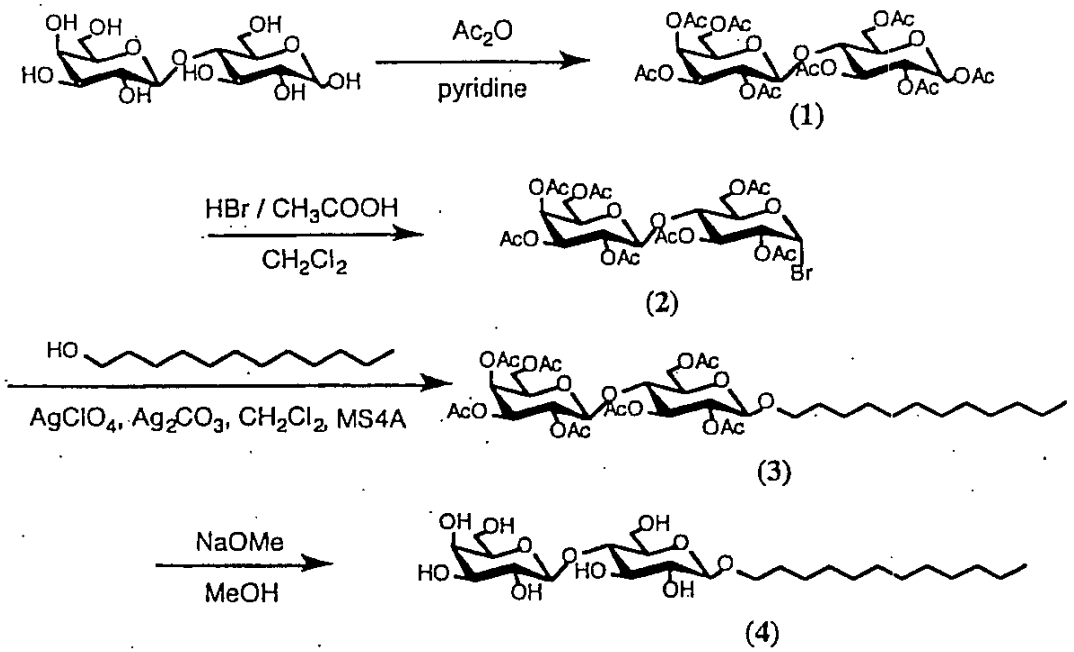
【００３９】

実施例５．ラクトシド型プライマーの調製

下記の反応スキームに沿って糖鎖プライマー1-O-dodecyl-4-O-β-D-galactopyranosyl-β-D-glucopyranosideを合成した。

【００４０】

【表２】



【００４１】

(a) Lactose octaacetate(1)の合成

ラクトース10ｇ（29mmol, Sigma)、無水酢酸160mL (1.8mol, nacalai tesque)、ピリジン160mL (nacalai tesque)を三角フラスコに入れ、室温で一晩撹拌した。TLC で反応が進行したことを確認し、氷上の蒸留水に反応液をあけ（褐色粘稠体が沈殿した）、一晩撹拌した。生じた沈殿を蒸留水で洗浄し、上清が中性になったことをpH試験紙で確認後、沈殿を真空乾燥して白色粉末を得た。

収量12.4ｇ（63%）

【００４２】

(b) 1-Bromo-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactosyl)-2,3 ,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside(2)の合成

化合物(1) 12ｇ(18mmol)と25%臭化水素／酢酸溶液20mL(Wako)、脱水ジクロロメタン(Wako)を氷冷下１時間撹拌した。TLC で反応が進行したことを確認し、クロロホルムを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。クロロホルム層を水で洗浄し芒硝乾燥後、溶液をエバポレート、真空乾燥した（フラスコの壁に白色固体が生じた）。酢酸エチルで固体を溶解し、ヘキサンを滴下することで生じた白色固体を回収し、真空乾燥して白色粉末を得た。

【００４３】

収量7.6ｇ（61%）

^{1}H-NMR($CDCl_3$, TMS) :δ2.2-2.2(m, 21H, O-Acetyl group), 3.9-4.2(m, 6H, H-4, H-5, H-6, H'-5, H'-6, H'-6'), 4.48(m, 1H, H'-6'), 4.52(d, 1H, H'-1, J12=7.8Hz, β-anomer), 4.8(dd, 1H, H-2), 5.0(dd, 1H, H'-3), 5.1(dd, 1H, H'-2), 5.4(d, 1H, H'-4), 5.6(t,1H, H-3), 6.5(d, 1H, H-1, J_{12}=3.2Hz, α-anomer)

【００４４】

(c) 1-O-n-Dodecyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside(3)の合成

活性化モレキュラーシーブ4A3.0ｇ（nacalai tesque)、化合物(2)5.0ｇ（6.8mmol)、脱水ジクロロメタン50mL(Wako)をナスフラスコに入れ、Ar雰囲気下２時間撹拌した。同時に、遮光したナスフラスコにモレキュラーシーブ4A5.0ｇ、ｎ－ドデカノール1.9ｇ（10mmol, nacalai tesque)、過塩素酸銀1.4ｇ（10.0mmol, nacalai tesque)、炭酸銀1.9ｇ（10.0mmol, Wako)、脱水ジクロロメタン50mLを入れ、Ar雰囲気下２時間撹拌した。その後、ice bath上で化合物(2)が入っているフラスコの中身を遮光しているフラスコに移し、そのままAr雰囲気下15時間撹拌した。セライト濾過でモレキュラーシーブと銀塩を除き、ろ液をエバポレートした。精製はオープンカラムクロマトグラフィー(Silica Gel 60, Merck, Φ5x20cm, eluent; n-hexane: ethyl acetate=55:45→50:50)で行った。目的物を含むフラクションを集め濃縮し、黄色粘稠体を得た。

【００４５】

収量1.8ｇ（32％）

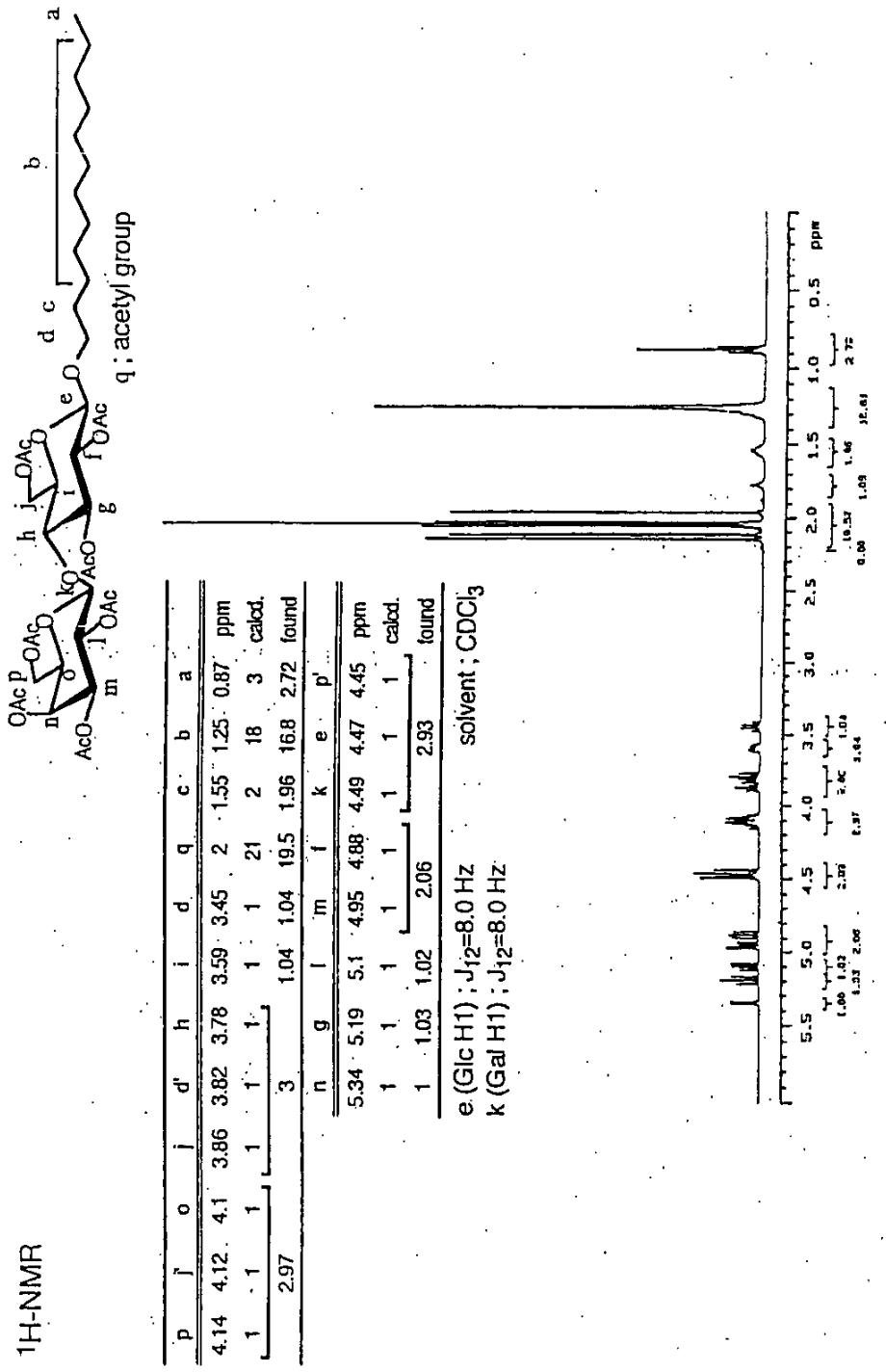
分析　MALDI-TOFMS calcd.$[M+Na]^+$=827.37

found$[M+Na]^+$=827.80

^{1}H-NMR 結果を次頁に示した。

【００４６】

【表３】



【００４７】

産業上の利用可能性

本発明により、動物細胞、植物細胞あるいは酵母にオリゴ糖プライマーを与えることによるオリゴ糖鎖の生産、あるいは高密度培養法を用いて培養した細胞（COS-7を除く）にオリゴ糖プライマーを与えることによるオリゴ糖鎖の生産が可能になった。

【００４８】

オリゴ糖鎖を細胞に作らせることにより、生体に存在するあらゆる機能性のオリゴ糖鎖を手に入れることが出来る。オリゴ糖鎖は、発生・分化・増殖・細胞死、あるいは毒素・ウイルス・バクテリアの感染、さらには癌のマーカーや転移に関係している。最近ではア

ルツハイマーの原因物質であるアミロイド蛋白質の受容体も糖鎖であると考えられている。素材として糖鎖ライブラリーを利用して、それらの阻害剤として、最も活性の高いオリゴ糖鎖を探し出すことができる。

【００４９】

あるいは糖鎖ライブラリーを構築してマイクロプレートに固定化することで糖鎖チップを作成することも可能である。このような糖鎖チップの作製は、生化学・分子生物学・細胞工学・ウイルス学の分野での受容体解析などを初めとする分子機能の解析のみならず、臨床分野では癌のマーカーや毒素の検出のための検査用の試薬として、あらゆるバイオ分野の研究・開発への応用が考えられる。

【００５０】

【図面の簡単な説明】

【図１】　図１は、実施例１において生成したオリゴ糖の高速薄層クロマトグラフィー（HPTLC）の泳動パターンを示す写真である。

【図２】　図２は、図１および表１に示すオリゴ糖X1、X2およびX4、並びに基質サッカライドプライマーのMALDI-TOF MSによる分析結果を示すチャートである。

【図３】　図３は、図1および表１に示すオリゴ糖X3およびX5、並びに基質サッカライドプライマーのMALDI-TOF MSによる分析結果を示すチャートである。

【図４】　図４は、実施例２における、基質サッカライドプライマーを添加するまでの、ヒト血管内皮細胞のマイクロキャリアー培養における培養経過を示すグラフである。

【図５】　図５は、実施例３において生成したオリゴ糖の高速薄層クロマトグラフィー（HPTLC）の泳動パターンを示す写真である。レーン１は基質サッカライドプライマーを示し、レーン２～４およびレーン５～７はそれぞれCytodex-1およびCytodex-3を用いた場合の結果を示し、これらのレーンにおいて、レーン２および５は24時間、レーン３および６は48時間、レーン４および７は72時間の培養後の結果を示す。レーン８は、48時間平面培養した場合の結果を示す。

【図６】　図６は、図５および表３に示すオリゴ糖X1、X2およびX3のMALDI-TOF MSによる構造解析の結果を示すチャートである。

【図７】　図７は、実施例３における、100㎜径培養皿における平面培養、並びにそれぞれCytodex-1およびCytodex-3を用いた培養において生成したオリゴ糖X1（Gb3-C_{12}）およびX2（Gal-Gb3-C_{12}）の相対量を示すグラフである。

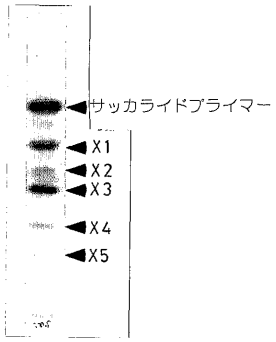
【図８】　図８は、実施例４においてCytodex-1（レーン４）またはCytodex-3（レーン５）を用いてマイクロキャリヤー培養した場合の上清、および単層平面培養した場合（レーン３）の上清、の濃縮物の高速薄層クロマトグラフィーの結果を示す写真である。レーン１はガングリオサイド標準を示し、レーン６は基質サッカライドプライマーを示す。

【図９】　図９は、実施例４において生成した、表４に示すオリゴ糖のMALDI-TOF MSによる分析結果を示すチャートである。

【図１０】　図１０は、実施例４における、100㎜径培養皿における平面培養、ならびにCytodex-1およびCytodex-3を用いた培養において生成したオリゴ糖X1（GM3タイプ）相対量を示すグラフである。

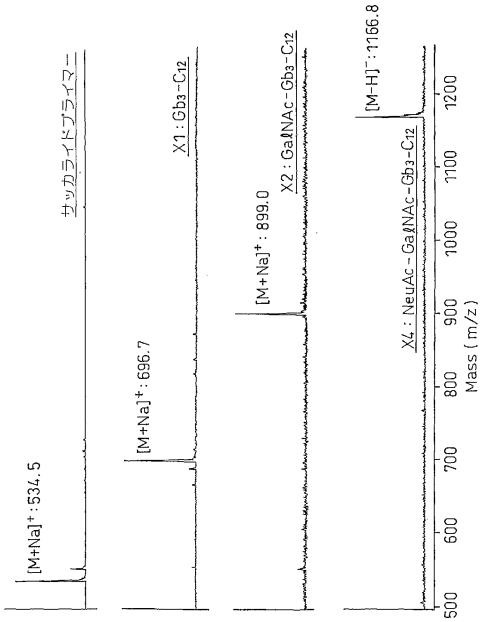
【図１】

Fig.1



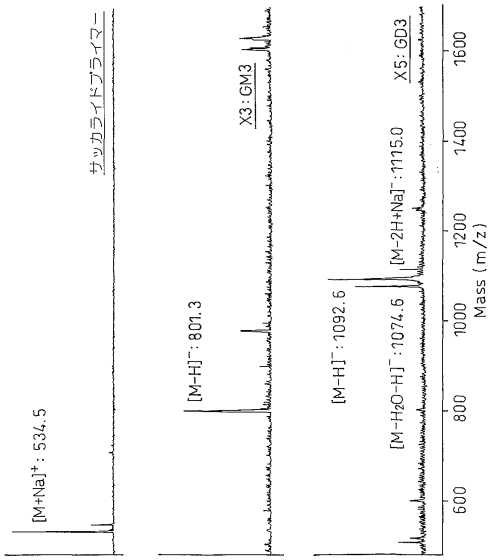
【図２】

Fig.2



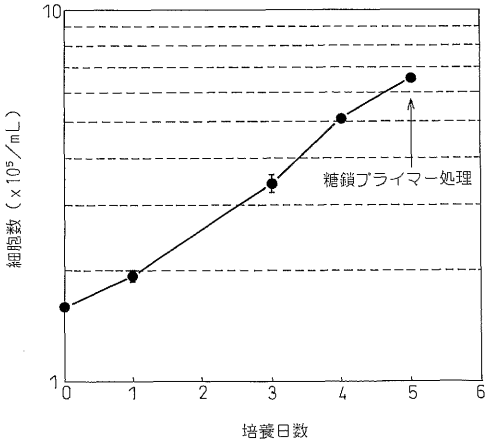
【図３】

Fig.3



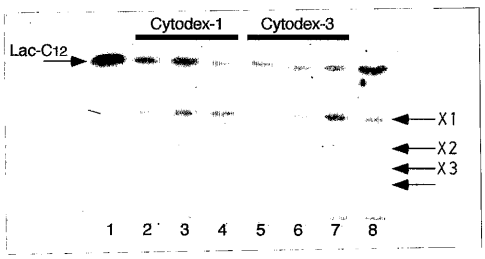
【図４】

Fig.4



【図５】

Fig.5



【図６】

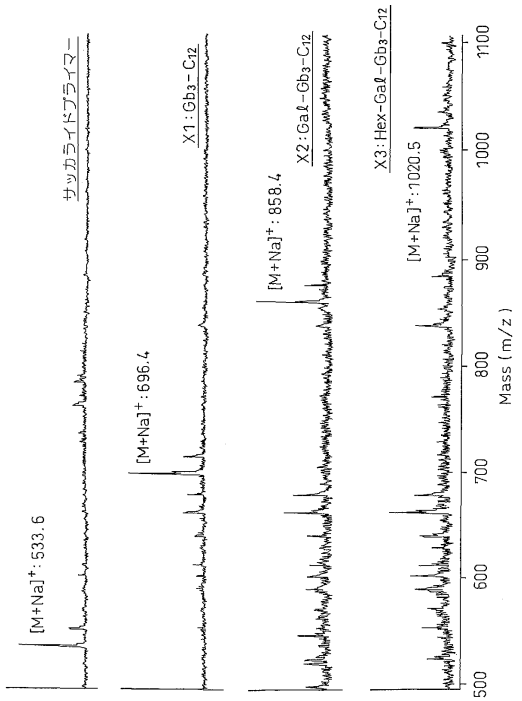
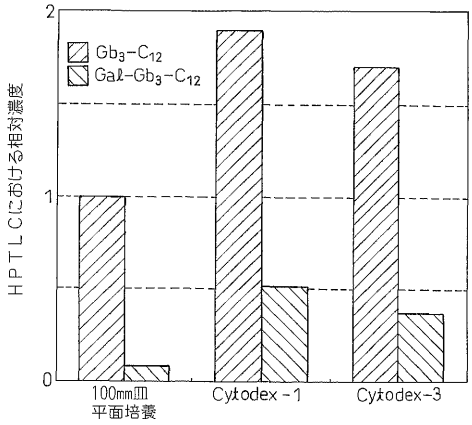


Fig.6

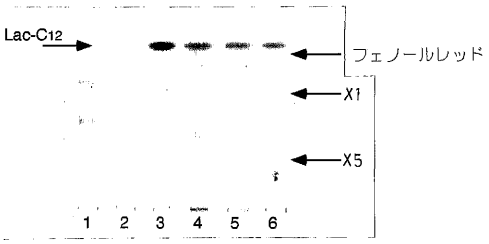
【図７】

Fig.7



【図８】

Fig.8



【図９】

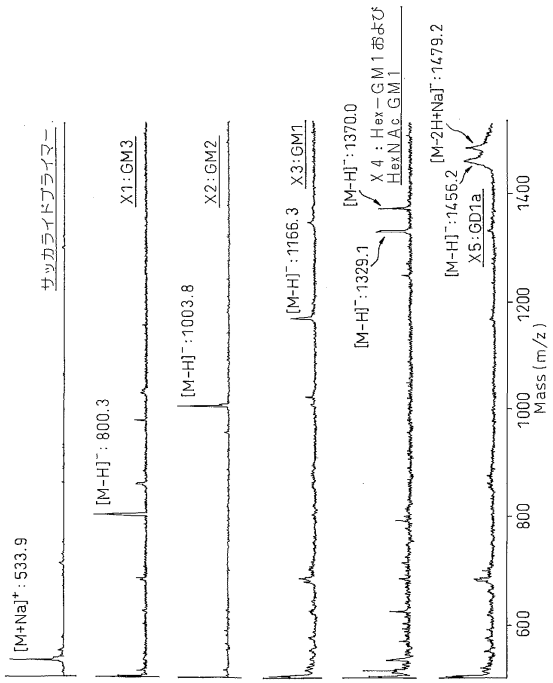
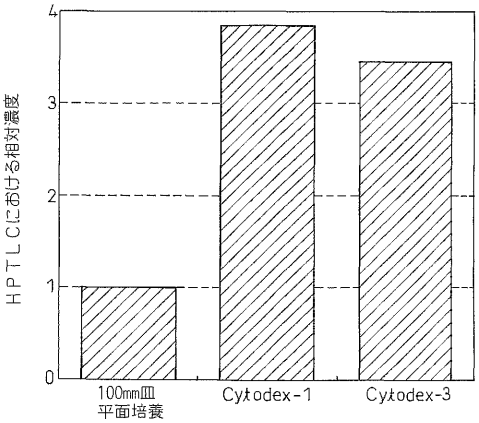


Fig.9

【図１０】

Fig.10



フロントページの続き

(72)発明者　佐野　恵海子
神奈川県横浜市旭区中希望ヶ丘２１２－２１

審査官　小金井　悟

(56)参考文献　特開２０００－２４７９９２（ＪＰ，Ａ）
特開平６－２７７０５２（ＪＰ，Ａ）
安養寺久栄ら，細胞に作らせる糖鎖ライブリー（４）ＣＯＳ－７細胞を用いた糖鎖伸長反応，日本化学会第７８春季年会，２０００年　3月１５日，Vol.78，No.2，pp.824
山崎徹ら，動物細胞の大量培養，化学工学，１９８６年　6月　5日，Vol.50，No.6，pp.388-393
Carbohydr Res.，２０００年１２月　1日，Vol.329，No.4，pp.755-763
J. Biochem.，１９９８年　7月，Vol.124，No.1，pp.148-156
Biochem. Biophys. Res. Commun.，１９９７年１２月２９日，Vol.241，No.3，p.698-703
小林雅樹ら，細胞を利用した糖鎖高分子合成　－糖鎖プライマーの設計－，高分子学会予稿集，２０００年　9月　8日，Vol.49，No.13，pp.4030-4031

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12P　19/00 -19/64
C12N　15/00 -15/90
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
CAplus(STN)
PubMed
JSTPlus(JDreamII)