

# ヒトミルクオリゴ糖の生産のための 基盤研究

JST新技術説明会

2025年10月7日

岐阜大学 糖鎖生命コア研究所

藤田盛久

## 【発明1】

発明の名称：ヒトミルクオリゴ糖DSLNTの製造に有用なタンパク質

発明者：藤田 盛久

出願人：国立大学法人東海国立大学機構[100%]

出願番号：PCT/JP2025/ 11559 (2025-03-24 出願/優先日2024-3-28)

新規性喪失の例外規定の適用：無し

## 【発明2】

発明の名称：ヒトミルクオリゴ糖の製造方法

発明者：藤田 盛久

出願人：国立大学法人東海国立大学機構[100%]

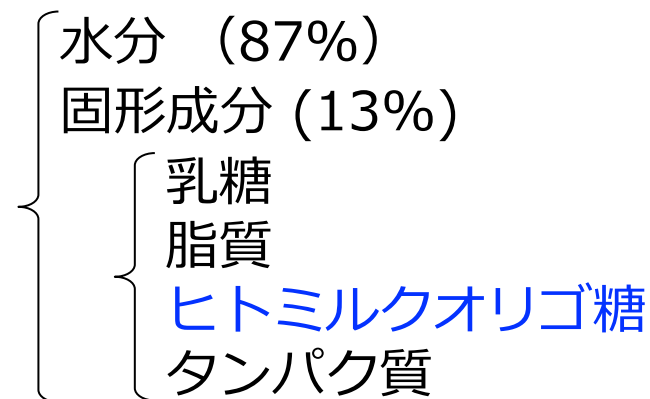
出願番号：特願2025-053908 (2025-03-27 出願)

新規性喪失の例外規定の適用：無し

## ヒトミルクオリゴ糖 (HMO)

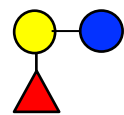
母乳特有の栄養成分（180種以上ある）

母乳

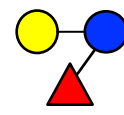


腸内フローラ維持  
抗感染、抗炎症  
脳機能発達・維持

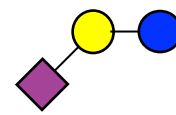
現在製品化されているHMO（5種）



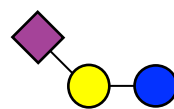
2'-FL



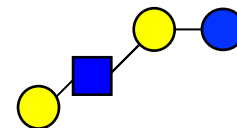
2-FL



3'-SL



6'-SL



LNT

微生物発酵により製造

## 壊死性腸炎（NEC）とヒトミルクオリゴ糖（HMO）

### Necrotizing enterocolitis (NEC: 壊死性腸炎)

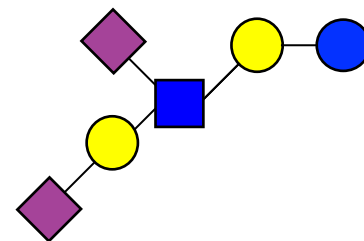
早産児における致死的な腸疾患

低体重児の 5 ～ 10% が NEC を発症

腸の炎症は細菌の侵入を引き起こし、結腸や腸の細胞損傷や壊死を引き起こす

母乳中のミルクオリゴ糖は乳児を壊死性腸炎から守ることが知られている

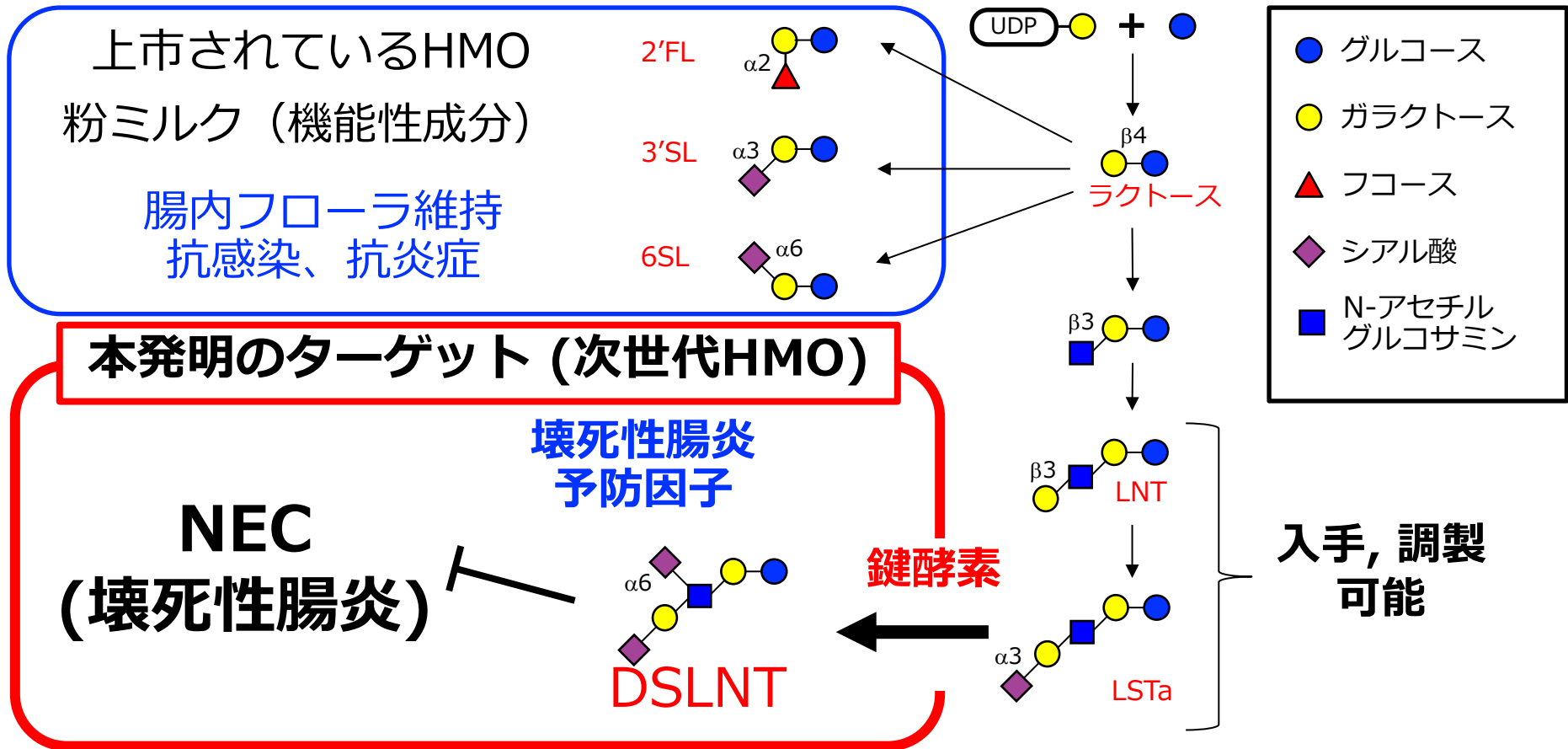
DSLNTが壊死性腸炎の予防因子として機能する



Disialyl-lacto-N-tetraose (DSLNT)

# 発明の背景③

## ヒトミルクオリゴ糖 (HMO) の合成と機能



現状： DSLNTや次世代HMOの活用が望まれているが、  
粉ミルクの機能性成分として使用されているHMOは5種のみである。

問題点： DSLNTの合成方法が確立していない、  
高分子量のHMOを人工的に生成するのは非常に難しい。

# 発明の背景と概要

ヒトミルクオリゴ糖（HMO）は母乳中に180種類以上確認されており、母乳栄養児の腸内フローラの形成・維持や抗感染、抗炎症、脳機能活性化、栄養改善効果などを付与することが知られている。HMOの中でも、ジシアリルラクト-N-テトラオース（DSLNT）と呼ばれる構造は早産児や低体重児に発症する致死性の腸炎である壊死性腸炎の予防因子として同定されている。

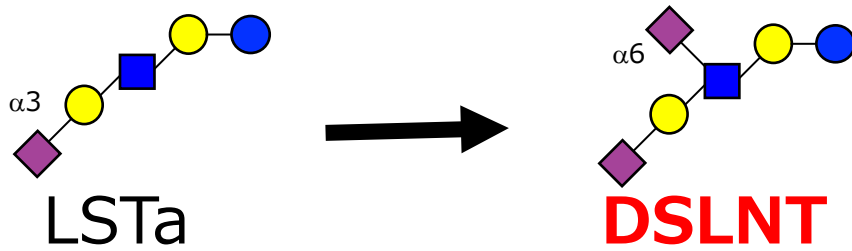
DSLNTのような複雑な構造を有する次世代HMOは、その重要性にもかかわらず、生合成経路が不明確であり、微生物発酵による合成も困難であった。

**【発明 1】**では、DSLNTを合成するために必須の酵素である、フリーのオリゴ糖におけるN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）の6位にalpha2,6結合でシアル酸を転移する反応を触媒する酵素を同定、最適化し、DSLNTなどの Neu5Aca2-6GlcNAc構造を含むオリゴ糖の製造技術を提供する。

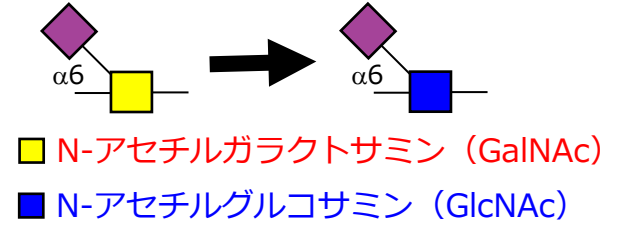
**【発明 2】**では、微生物では困難な高分子・複雑なHMO構造の生産を行うため、哺乳動物培養細胞株内でのHMO合成を可能とする技術の提供を主な目的とした。遺伝子改変を用いた哺乳動物培養細胞を用いたHMOの製造・改良方法を提供する。

# 【発明 1】 発明の概要①

ST6GALNACファミリータンパク質はGalNAcにalpha2,6結合でシアル酸を付加することが知られているため、HMOsのGlcNAcにもalpha2,6結合でシアル酸を付加できるのではないかと考え、注目した。



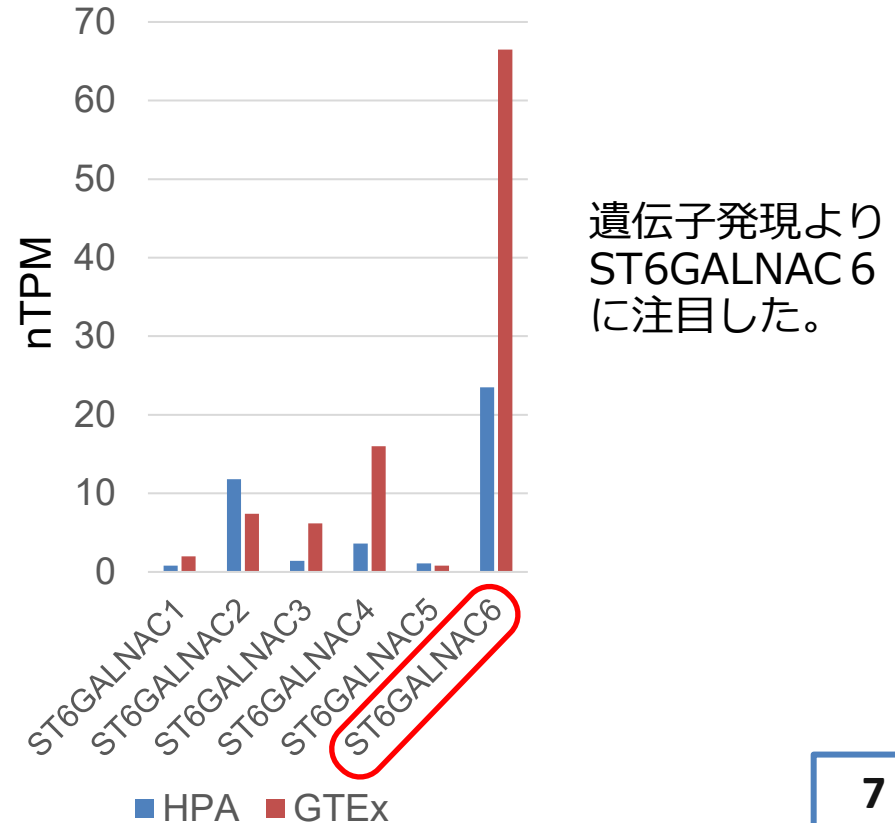
● ガラクトース  
● グルコース  
◆ シアル酸



## ST6GALNAC1 ~ 6

ST6GalNAc I	1	MGFLIRRLPKDSRIFRWLLILTVESFIITFSFSAIFGHEKSIIFROLKIYQSIHHLLQVDTQDQGSNYSANGRISKYGLER
ST6GalNAc II	1	-----
ST6GalNAc III	1	-----
ST6GalNAc IV	1	-----
ST6GalNAc V	1	-----
ST6GalNAc VI	1	-----
ST6GalNAc I	81	DIWVLELMTAVSTPSPGEGKEQKTKVPEVAIVEEAAKEKVTYKPFVPEVHGINTTTASTASVVERTEKKTARRVPGVGEAD
ST6GalNAc II	1	-----
ST6GalNAc III	1	-----
ST6GalNAc IV	1	-----
ST6GalNAc V	1	-----
ST6GalNAc VI	1	-----
ST6GalNAc I	161	GKRTTIAHPSHEDKEKATVKPSFGHEKVAHANSTSKDEPKAEKPPAVYKAIKPVTOAATVTEKKILKARDFKHEHPOVDFD
ST6GalNAc II	1	-----
ST6GalNAc III	1	-----
ST6GalNAc IV	1	-----
ST6GalNAc V	1	-----
ST6GalNAc VI	1	-----
ST6GalNAc I	241	DEYILDSSSPVSTCSSESVRAKAAKSDVLRDMLPNIHTEFIDEKSTMYSEVDRELEHFAPIYGFHELMYSLWEKYSRLPPN
ST6GalNAc II	60	RKSLR-----CQHSLSLAIDRRFRSMDLSTPLVVEGLTQEDVNMNLSQHEVYGVGOGLSHEVASTHLLKSP
ST6GalNAc III	36	-----CQHSLSLAIDRRFRSMDLSTPLVVEGLTQEDVNMNLSQHEVYGVGOGLSHEVASTHLLKSP
ST6GalNAc IV	29	-----CLPLCLATCFDHEHAKAPDSTHGGKDNFS
ST6GalNAc V	38	-----QO-----QOQOQOQOQAATATGSTOLVSSDOPEDTAPAGPROLE
ST6GalNAc VI	41	-----QMSAVFVIITALITITITSSNSANEV-----FNYGSLRGS-----TRFDVNMKEKWSFS
ST6GalNAc I	321	PHQQLLANSSSSNWTGISCAYVGGGTHNNSCHGQZIDSHBTYFVSGAVIGYKXDVGTTSFTGFTATSYSSSDONL
ST6GalNAc II	132	ESGELTGPWREKREKAVVCGGTHNNSCHGQZIDSHBTYFVSGAVIGYKXDVGTTSFTGFTATSYSSSDONL
ST6GalNAc III	63	-----CNCALVYSSSGHLLSGGQGHIDHASCHEHMAAPSTGSPLELPPN
ST6GalNAc IV	58	-----CYSSVPDGPFLIRELCHSCALVYSSSGHLLSGGQGHIDHASCHEHMAAPSTGSPLELPPN
ST6GalNAc V	78	-----CYLGVADHKLKHHCKDCALVYSSSGHLLSGGQGHIDHASCHEHMAAPSTGSPLELPPN
ST6GalNAc VI	90	SATFPFLGHTFPRSGQGVATSSSSRLGCTGLGPEHFRAGCTIRHNDAPSSGSDYGLTFRFYVASSVFRNLRFP
L-sialylmotif		
ST6GalNAc I	401	GHEKGIKTIQGGKHRTYHFLFAVRDYEVLALLDLDDIKXGFNTYGRPRERFDEDETHNMYLVAPDPLRYLKNRYLK
ST6GalNAc II	211	AKLGTSTVGGGRLRYTHLPSIRDVLNLLSALLGVPVPE-----GPDKGRPHYTFGGFSASEFLLHDFISYLTKECLE
ST6GalNAc III	141	DTYELKASRDELYVVGQ-----ENHNRKGGCGVYHNM-----AVDQAQIYTFYHNRKGGCGVYHNM-----AVDQAQIYTFYHNRKGGCGVYHNM
ST6GalNAc IV	137	SHYDQARDDLYVVGQ-----GRHNRVGGGRTYETLQLTRNYPGQVTFYHNRKGGCGVYHNM-----AVDQAQIYTFYHNRKGGCGVYHNM
ST6GalNAc V	156	RDL-LNYSOGLVYFVGQ-----SSYHNRKGGCGVYHNM-----AVDQAQIYTFYHNRKGGCGVYHNM-----AVDQAQIYTFYHNRKGGCGVYHNM
ST6GalNAc VI	169	QKE-YHNTDGLVYFVGQ-----PHEKGRQGLLYV-----QRAQLVHNRKGGCGVYHNM-----AVDQAQIYTFYHNRKGGCGVYHNM
ST6GalNAc I	481	SENLOKPYVRLTPYTGALLLITAHLLCDVSAUGYITEGHOY-----SDHYVDELNRYLVYFVHNRKGGCGVYHNM-----AVDQAQIYTFYHNRKGGCGVYHNM
ST6GalNAc II	289	SELINTYFGDNYHPSFGALLLITAHLLCDVSAUGYITEGHOY-----SDHYVDELNRYLVYFVHNRKGGCGVYHNM-----AVDQAQIYTFYHNRKGGCGVYHNM
ST6GalNAc III	202	DETGKDRVGGSLSTGVETHLAHDACTSYHNYGHINETTCETEGYKRVPHYTYEAGKDEGNEVLEHMAPTG-GRH
ST6GalNAc IV	198	DETGKDRVGGSLSTGVETHLALELCEIVYGHVSDSCSEKSPRSVPYHYHTEGRIDGCONVRLHMAPTG-GRH
ST6GalNAc V	217	DETGKDRVGGSLSTGVETHLALELCEIVYGHVSDSCSEKSPRSVPYHYHTEGRIDGCONVRLHMAPTG-GRH
ST6GalNAc VI	229	DETGKDRVGGSLSTGVETHLALELCEIVYGHVSDSCSEKSPRSVPYHYHTEGRIDGCONVRLHMAPTG-GRH
S-sialylmotif		
ST6GalNAc I	553	REHDEHMK-----LYOHS-----
ST6GalNAc II	361	DEHAGL-----LYOHS-----
ST6GalNAc III	279	FITEKVFYAKKKEHIVTHPMVTL-----
ST6GalNAc IV	276	FITEKVFYAKKKEHIVTHPMVTL-----
ST6GalNAc V	296	FITEKVFYAKKKEHIVTHPMVTL-----
ST6GalNAc VI	309	FITEKVFYAKKKEHIVTHPMVTL-----

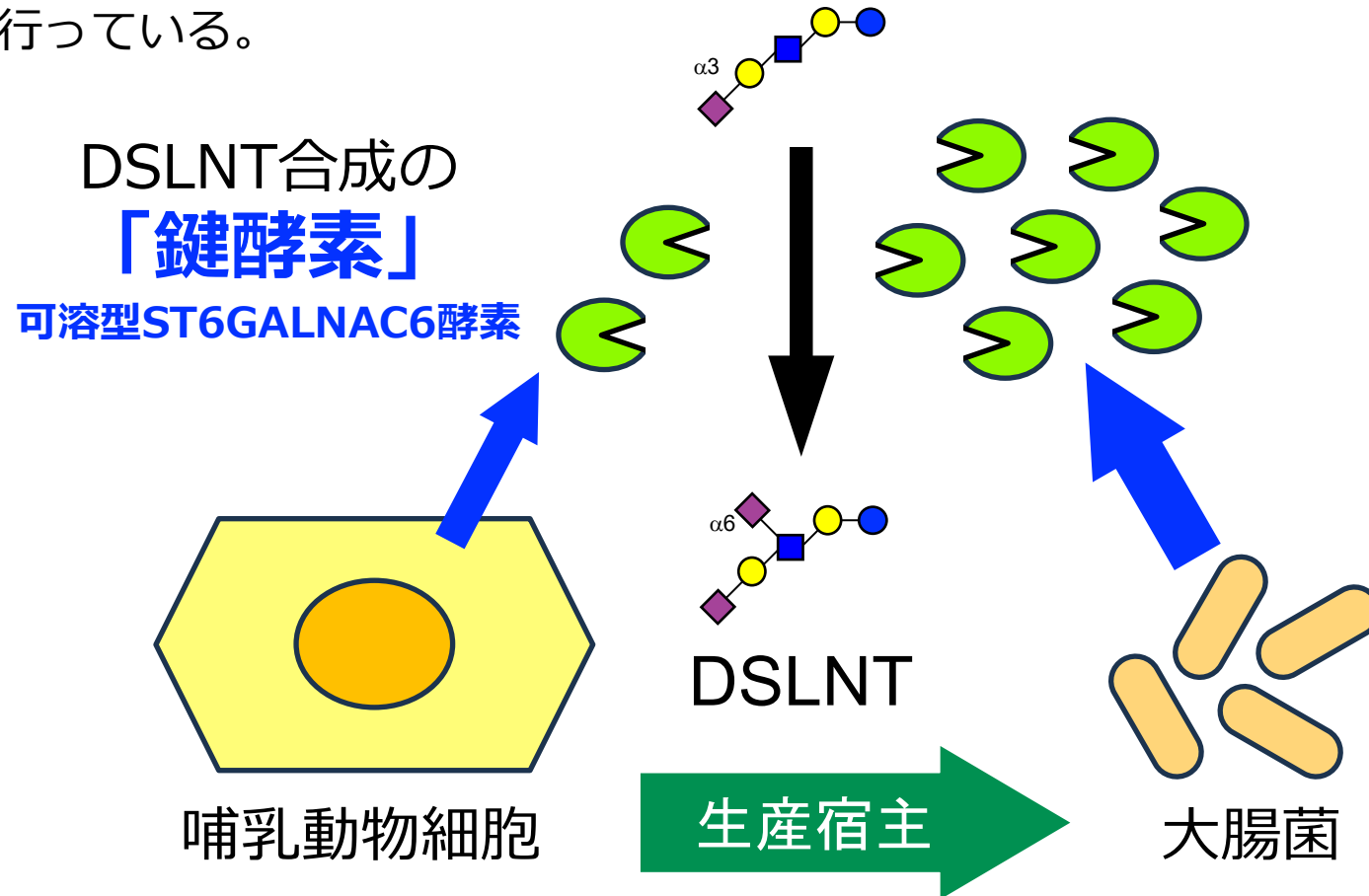
## 乳房における遺伝子発現



# 【発明 1】 発明の概要②

本発明はHMOのうち、DSLNTのようなNアセチルグルコサミンにalpha2,6結合でシアル酸を付加された構造を有するHMOsを合成することを可能としたものである。

酵素反応を担う可溶型ST6GALNAC6酵素および酵素発現細胞について、権利請求を行っている。

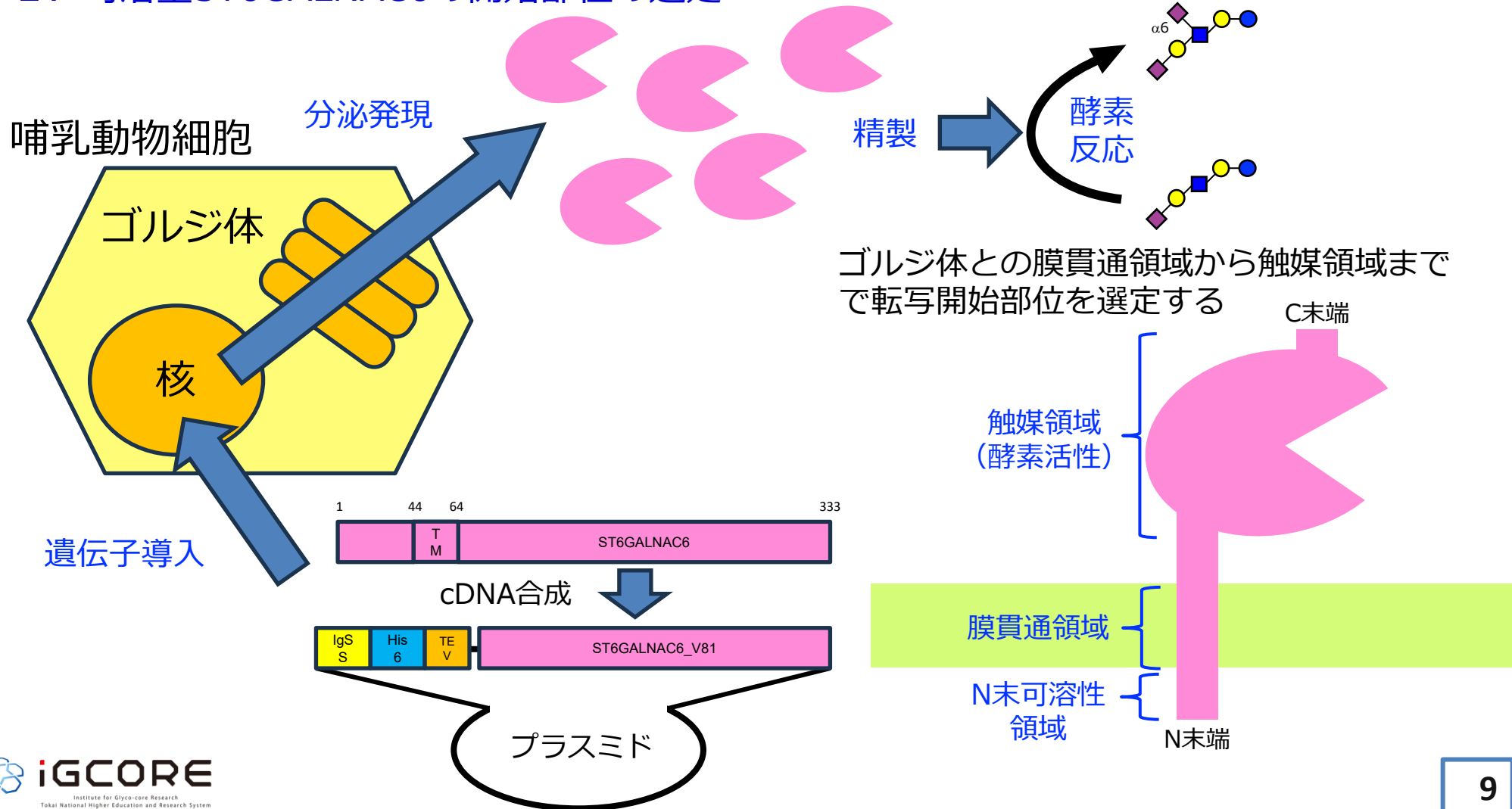


# 【発明 1】 発明の技術内容①

## 可溶型ST6GALNAC6の発現

試験例 1

1. 全長ヒト野生型ST6GALNAC6のクローニング
2. 可溶型ST6GALNAC6の開始部位の選定



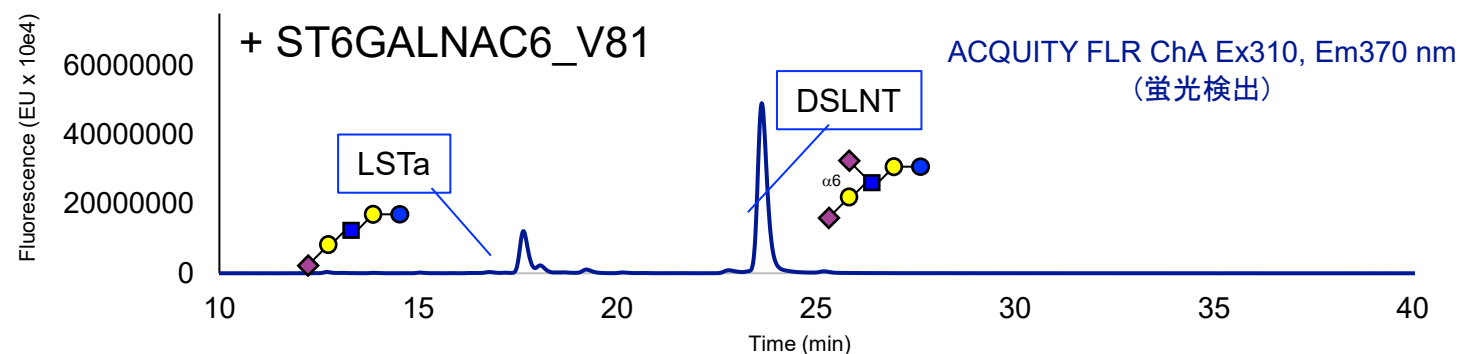
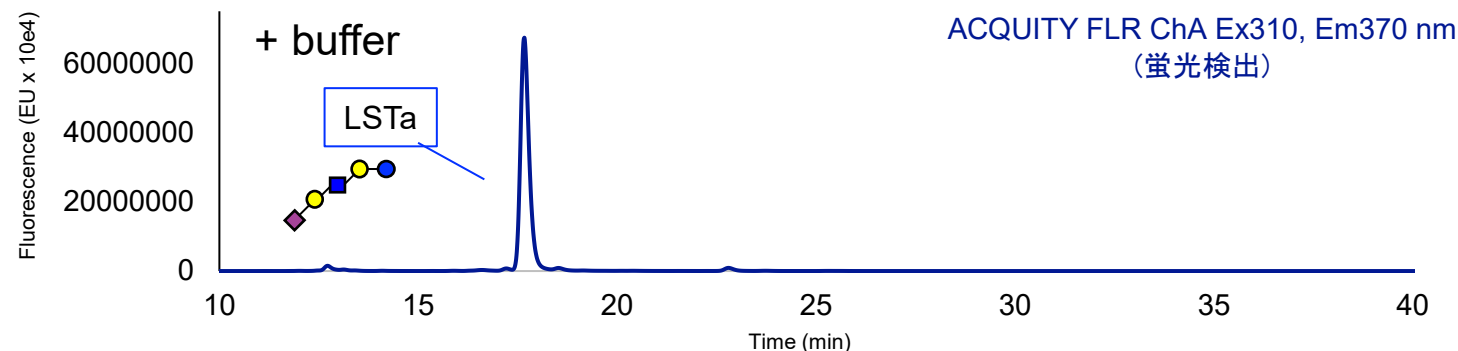
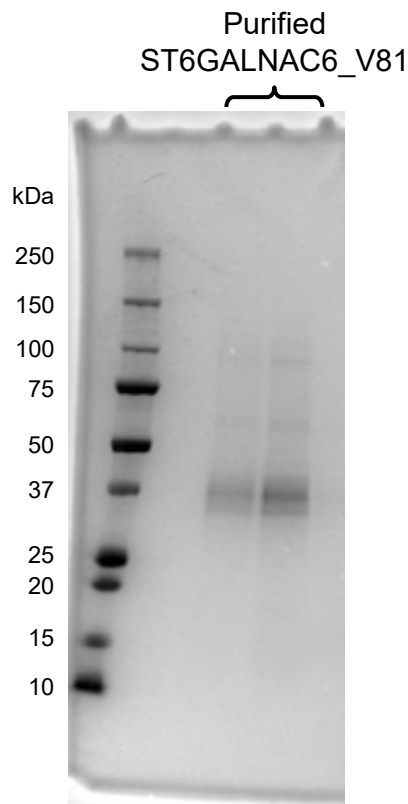
# 【発明 1】 発明の技術内容②

## 可溶型 ST6GALNAC6 の精製

## 可溶型ST6GALNAC6のDSLNT合成活性

LC-ESI-MS/MSによる検出 (蛍光検出)

LSTa, 20 h

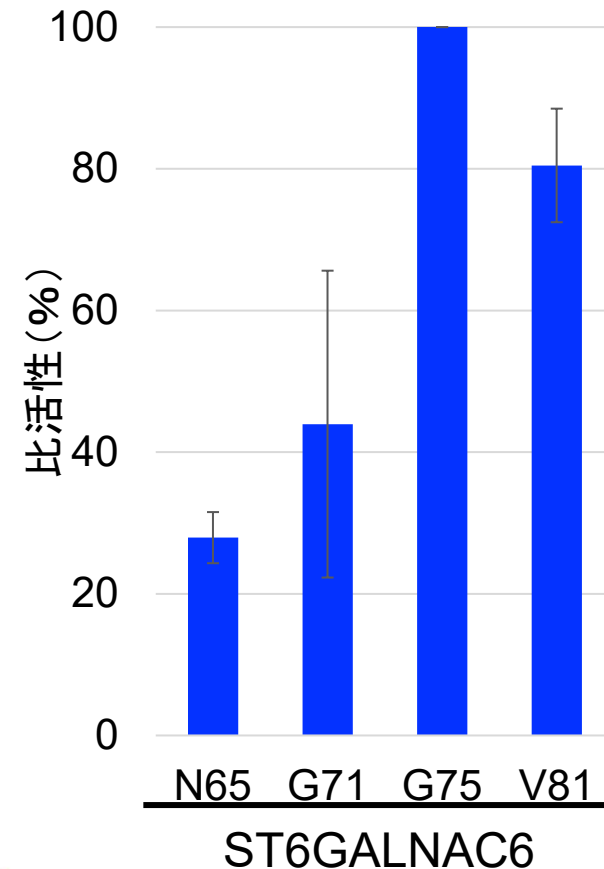
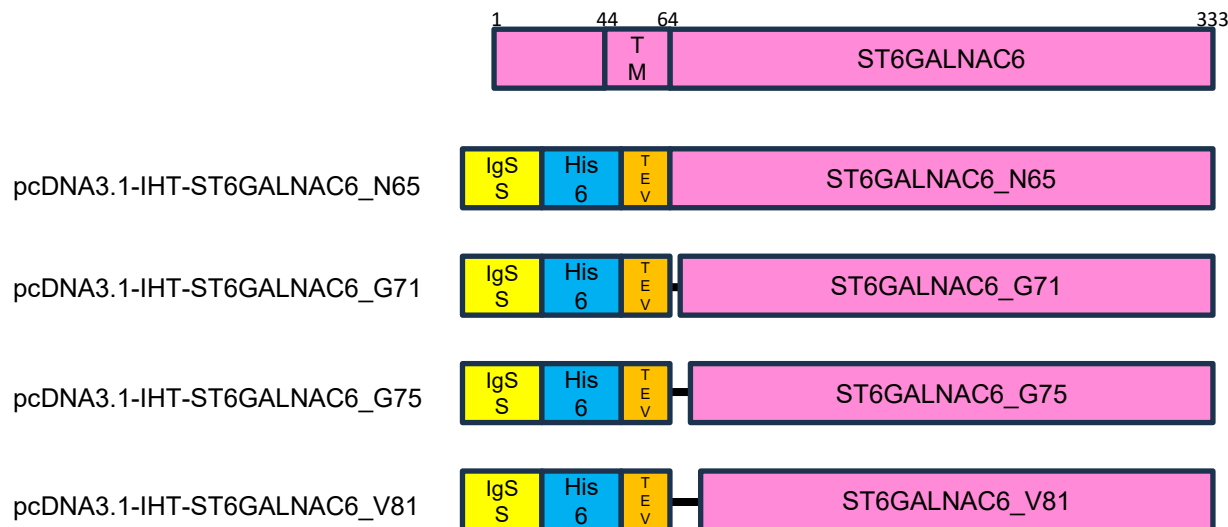


LSTa : DSLNT = 17.3 : 82.7

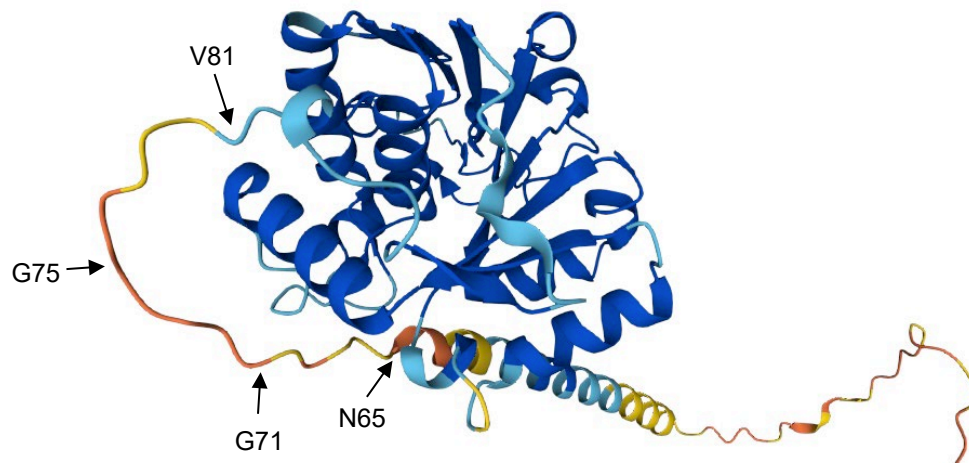
可溶型ST6GALNAC6はDSLNT合成活性を有する

# 【発明 1】 発明の技術内容③

## 可溶型開始部位の違いによる活性の最適化



ST6GALNAC6  
のモデル  
(AlphaFold)

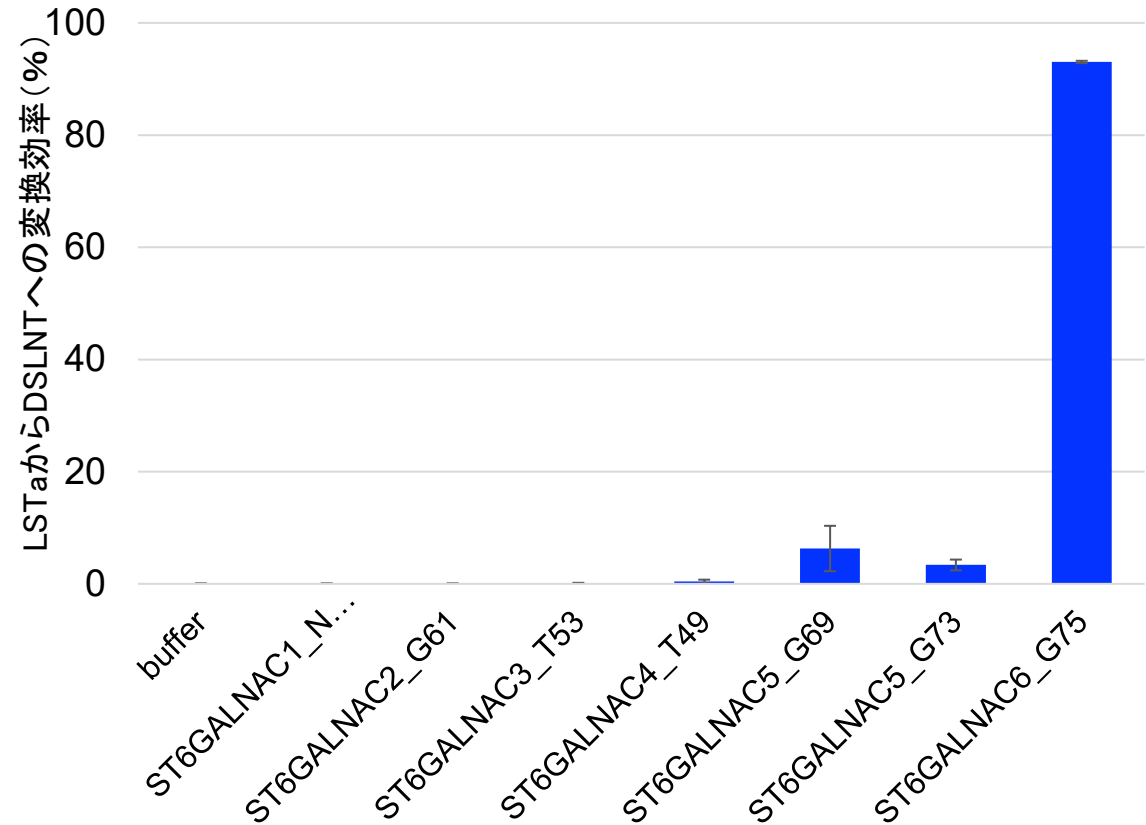
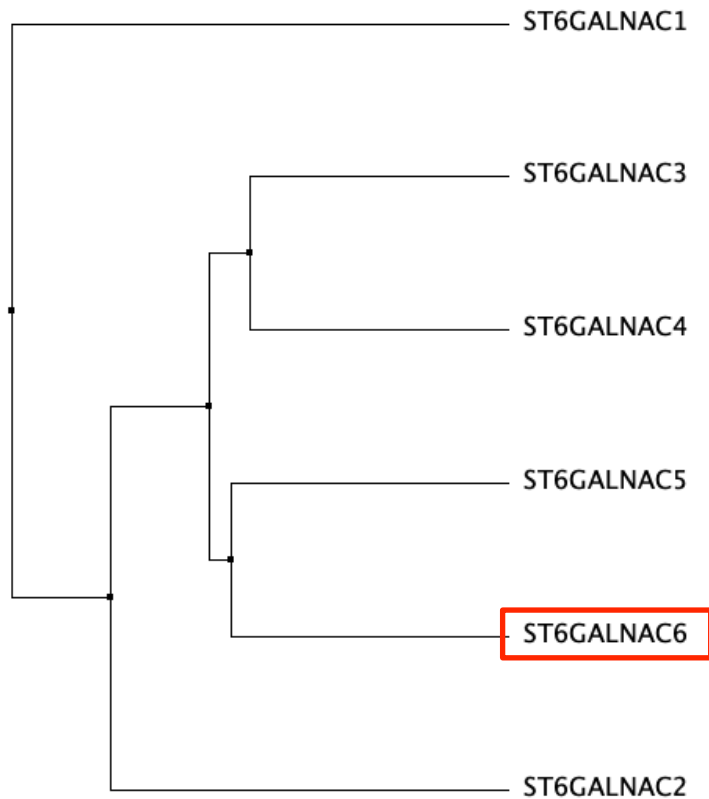
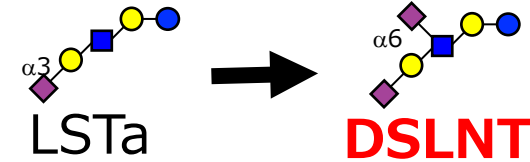


G75, V81を開始とする可溶型ST6GALNAC6が活性に最適である

n = 3

# 【発明 1】 発明の技術内容④

## LSTaに対するST6GALNAC1~6の活性



n = 3

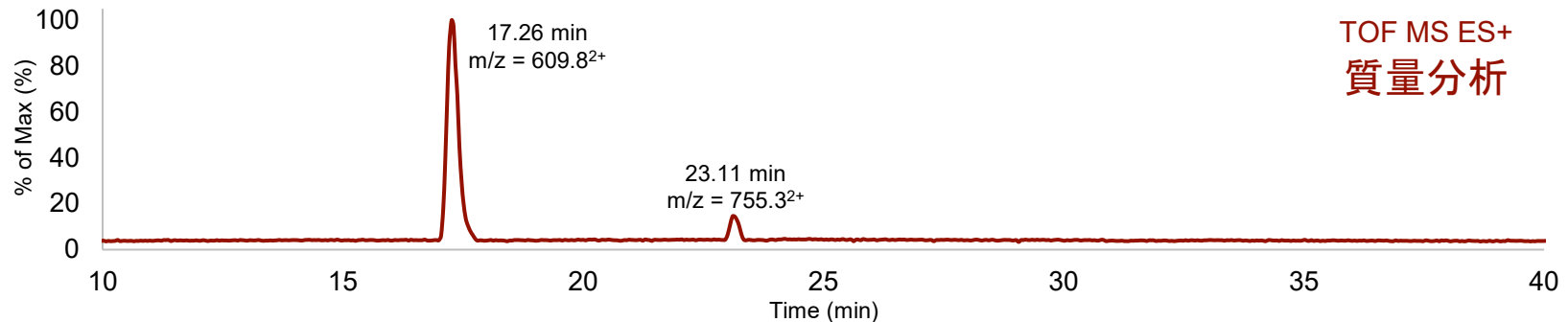
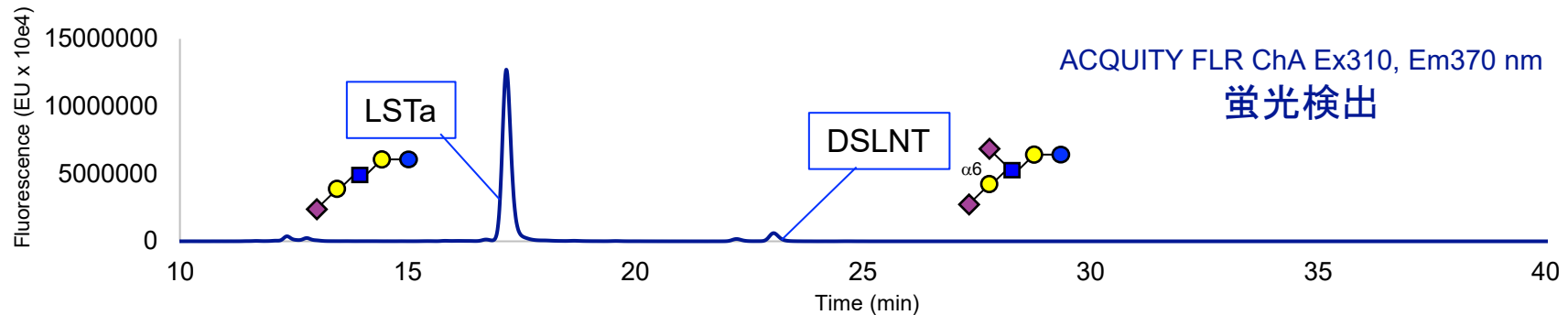
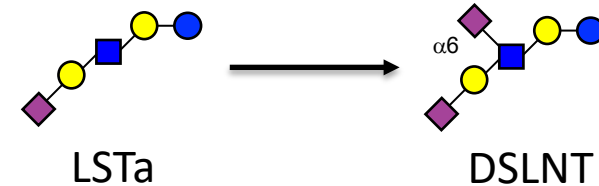
ST6GALNACファミリーのうち、ST6GALNAC6が最も高い活性を示す

# 【発明 1】 発明の技術内容⑥



大腸菌

## 大腸菌で発現したST6GALNAC6の活性



大腸菌で発現させた可溶型ST6GALNAC6は弱い活性を有する



現在、大腸菌で高活性を示す改変型組換えST6GALNAC6を取得した

# 【発明 1】本発明の優位性 比較表

	本発明	本発明の応用	競合技術1	競合技術2
DSLNTの合成	酵素合成	微生物発酵	化学合成	天然(母乳)からの抽出
利点	高い特異性、 高い反応性	大量生産、 コスト	生物を不使用、 純度	安全性
弱点	スケールアップ難、 精製、 コスト	組換え生物、 副産物、精製、 エンドトキシン	多段階、 スケールアップ難、 コスト	材料調達難、 スケールアップ難、 純度、コスト

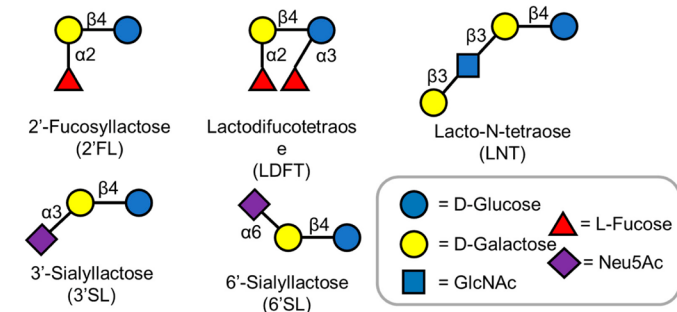
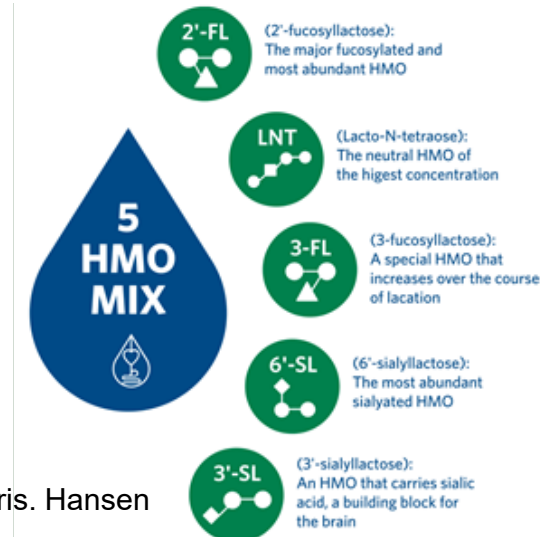
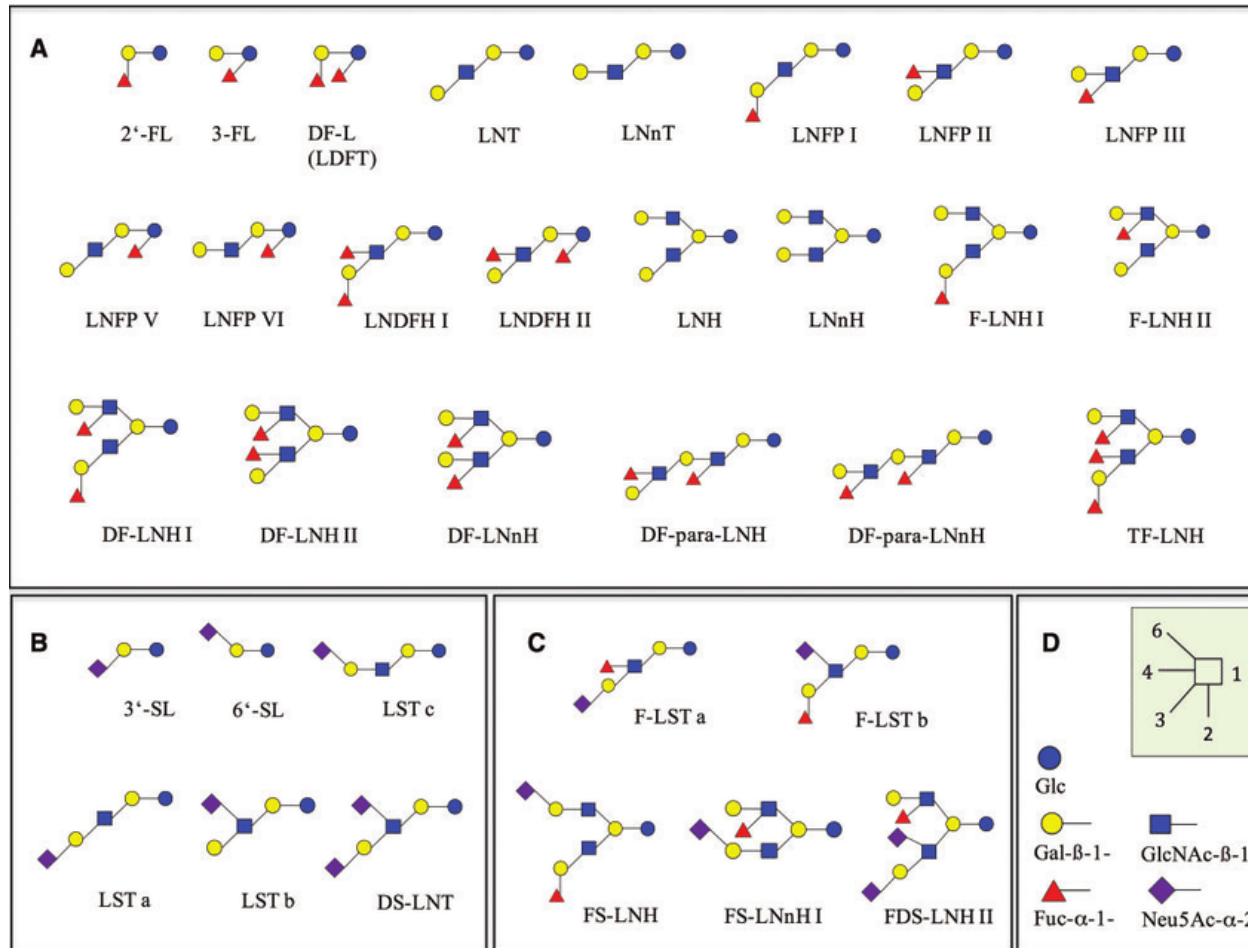
酵素合成から微生物発酵への応用展開を視野に入れる

# 【発明2】発明の概要①

## ヒトミルクオリゴ糖 (HMOs)

母乳特有の栄養成分 (180種以上ある)

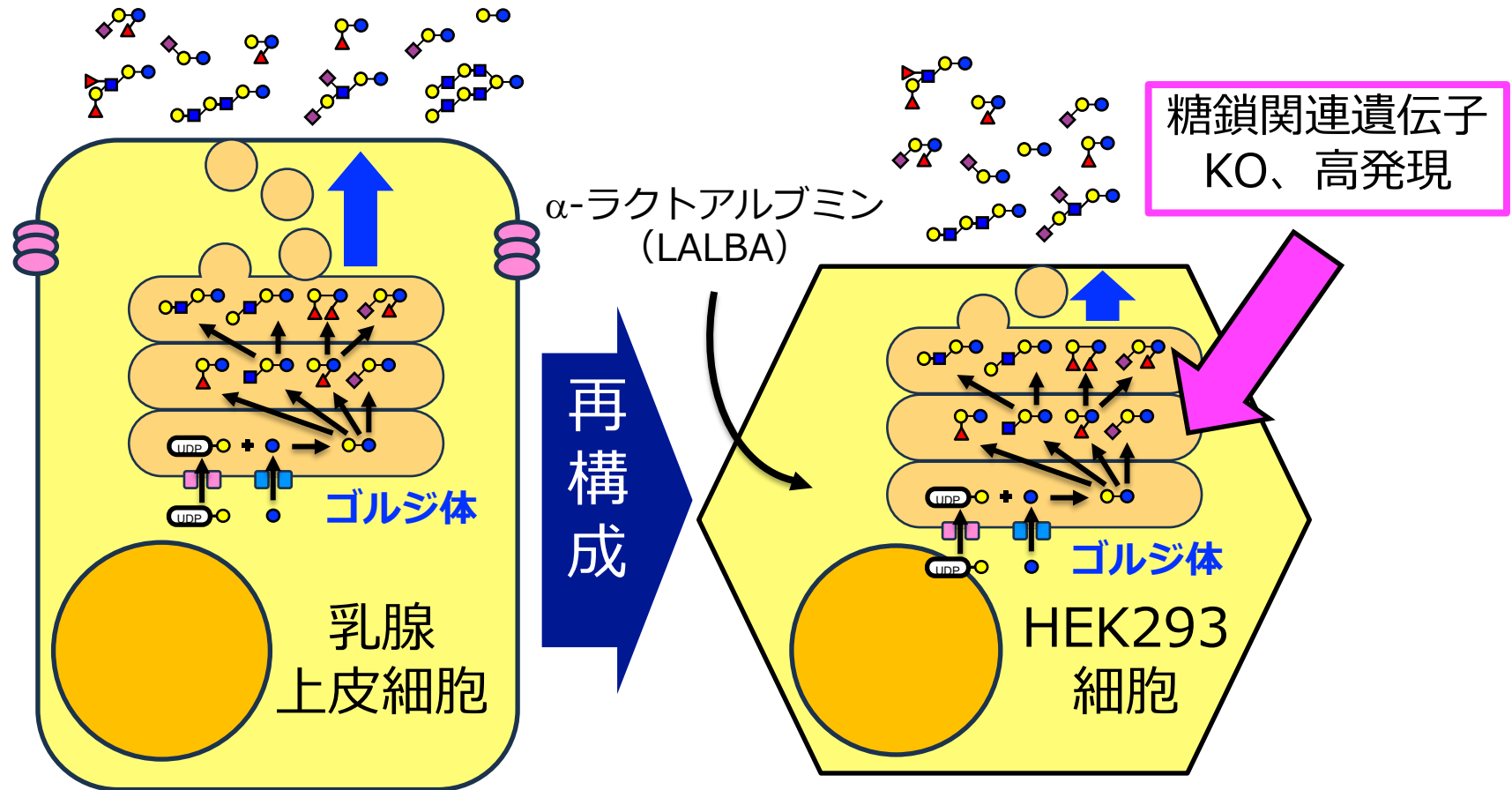
現在製品化されているHMO (5種)



高分子量で複雑構造の次世代HMOs  
微生物発酵による製造は難しい

微生物発酵により製造

# 【発明2】発明の概要②



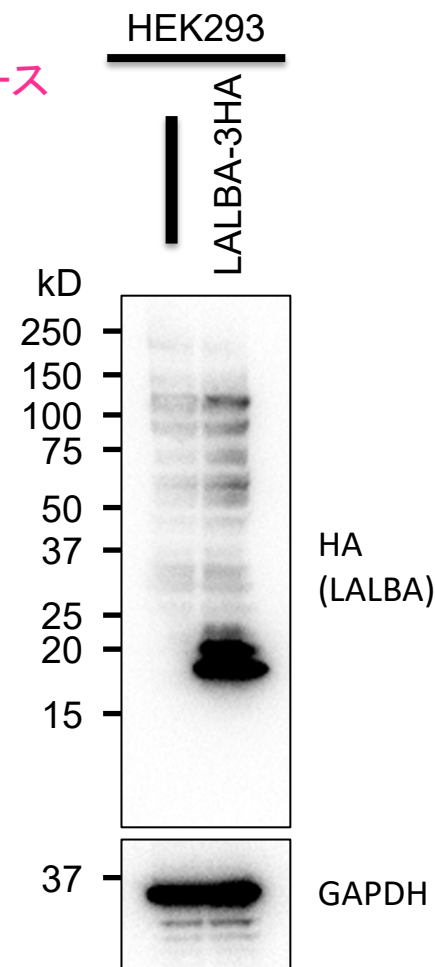
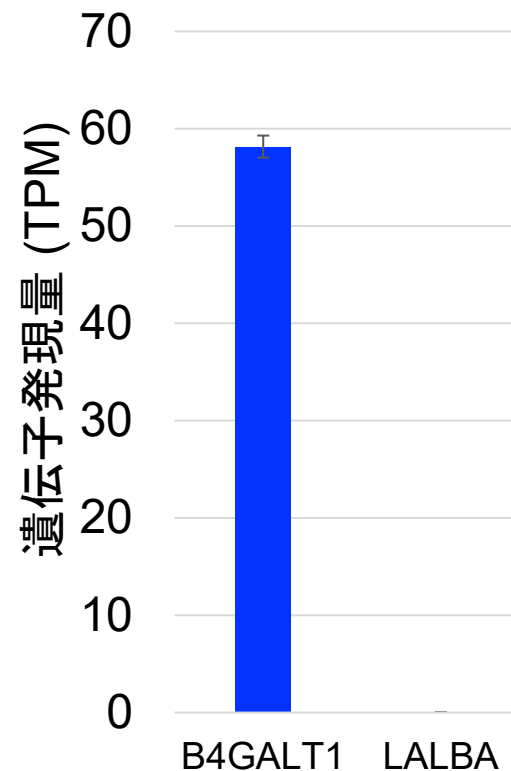
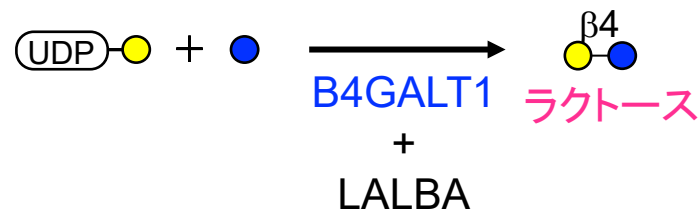
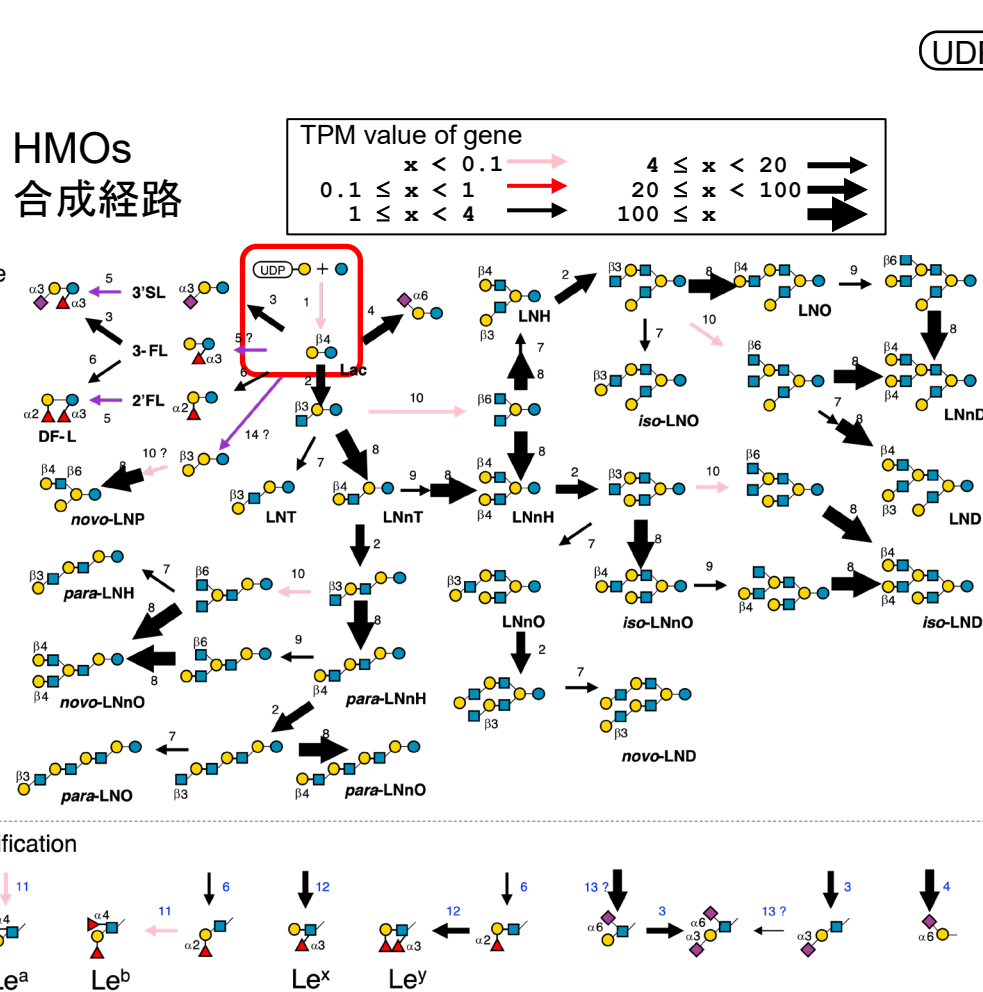
一次乳腺上皮細胞の培養は難しい  
不死化した乳腺上皮（がん）細胞では、HMOを合成できない

**哺乳動物細胞株において、HMO合成を再構成する**

## 【発明 2】 発明の技術内容①

# HEK293細胞におけるHMOs合成遺伝子の発現

## LALBAの発現を検出

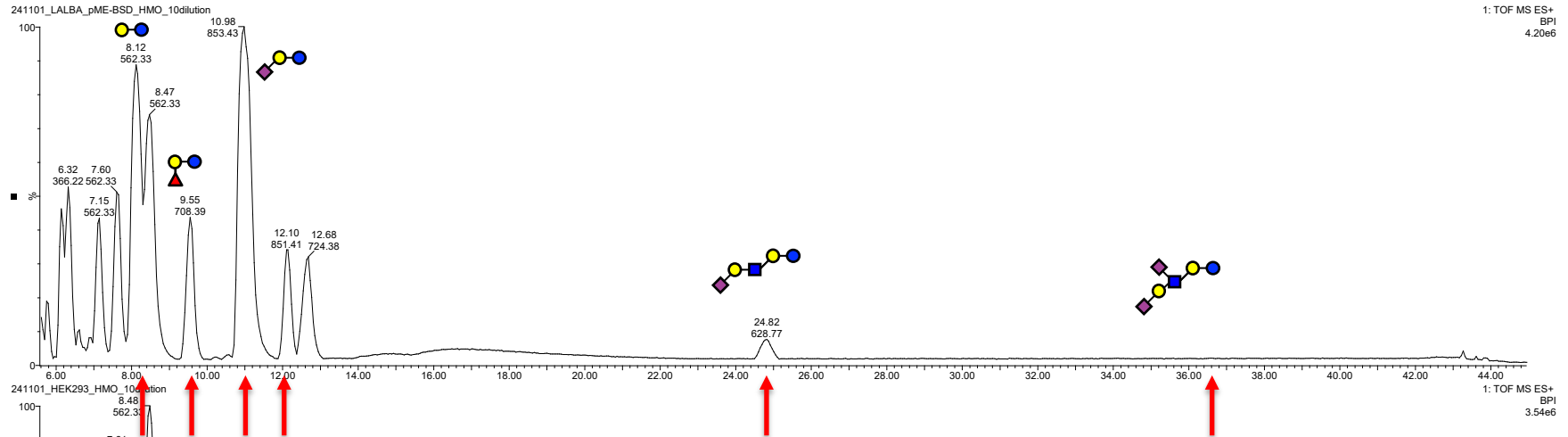


ラクトース合成を行う因子LALBAが発現していない

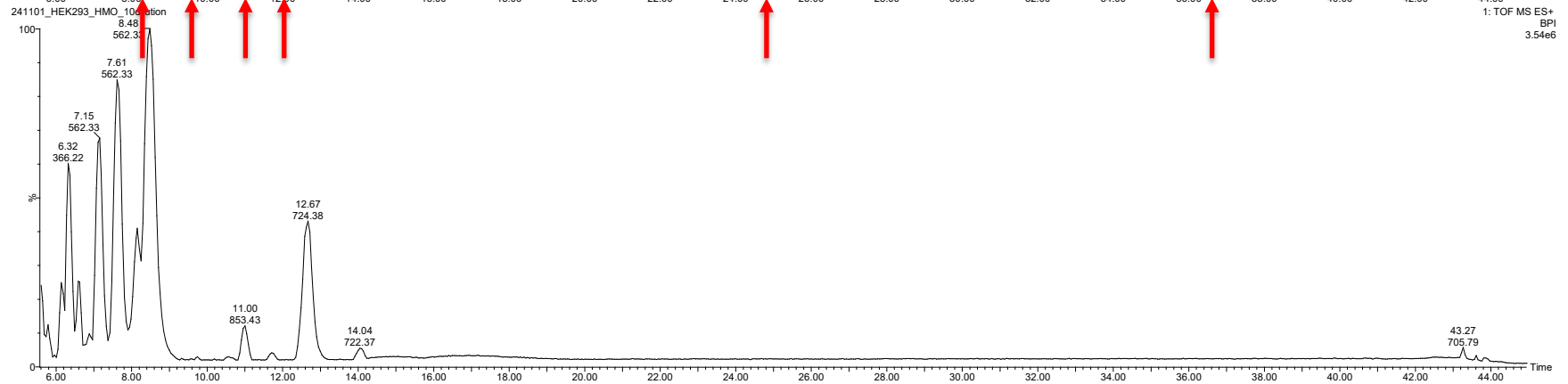
# 【発明 2】 発明の技術内容②

## HMOの合成を検出

HEK293  
+ LALBA



HEK293



●● : Lactose

●● : 2'FL

◆● : 3'SL

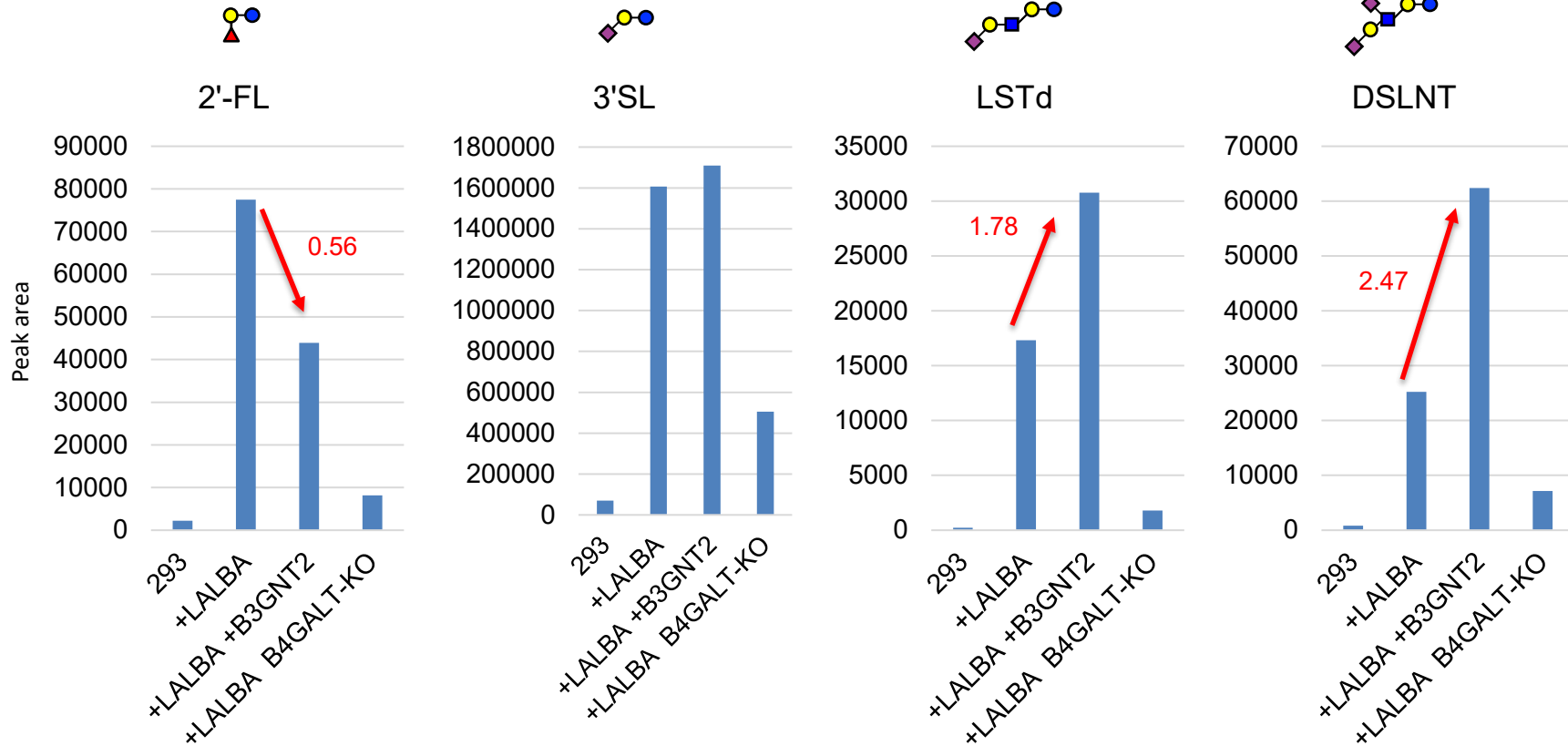
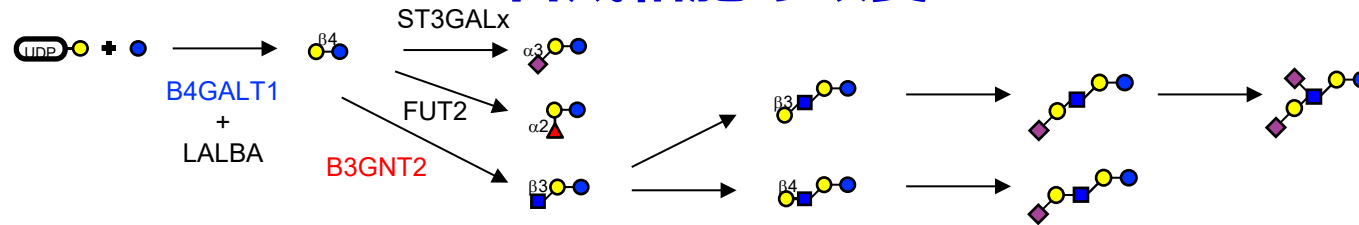
◆●● : LSTd

◆●●● : DSLNT

HEK293細胞にLALBAを発現させることでHMOが合成される

# 【発明2】発明の技術内容③

## HMO合成細胞の改変



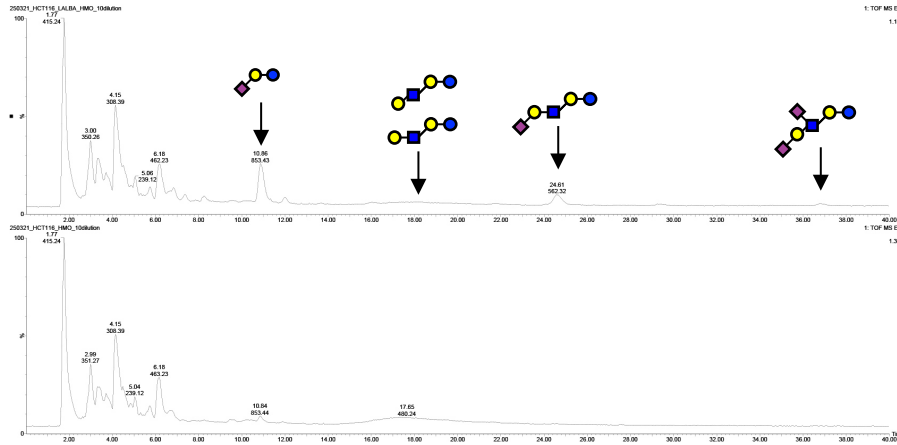
遺伝子改変を行うことでHMOの組成を変化させることができる

# 【発明2】発明の技術内容④

## HCT116、CHO-K1細胞でのHMOsの合成

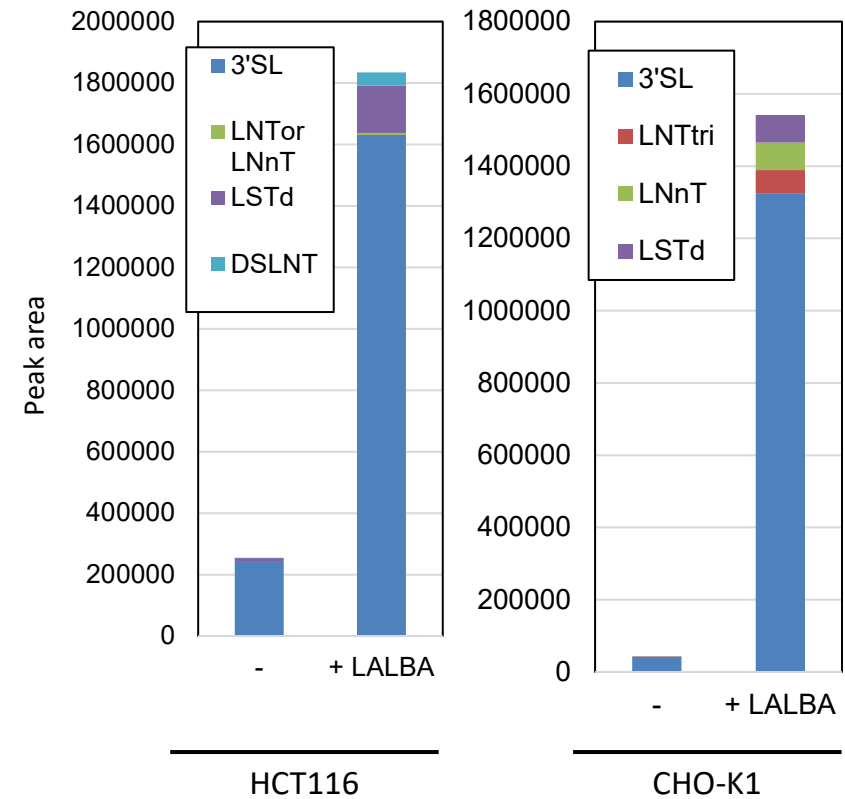
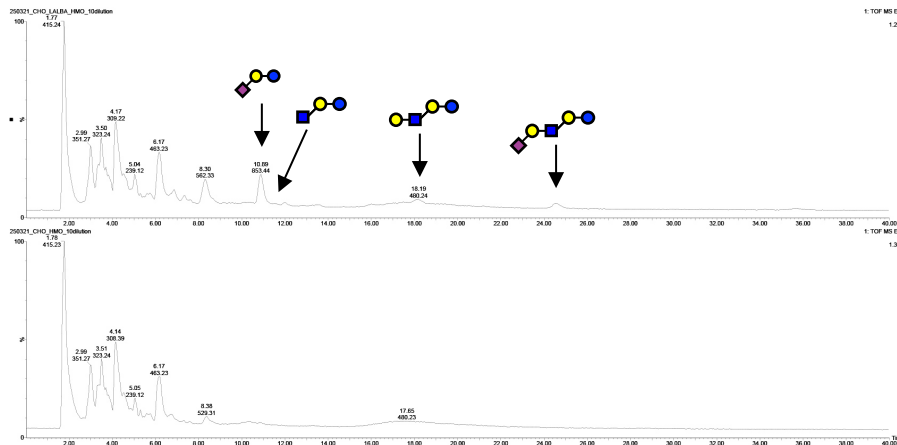
HCT116

+ LALBA



CHO-K1

+ LALBA

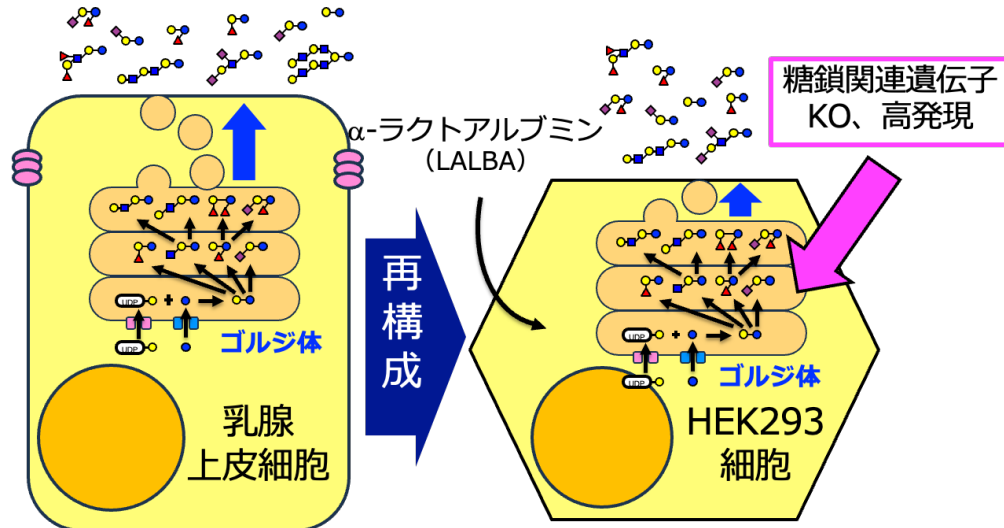
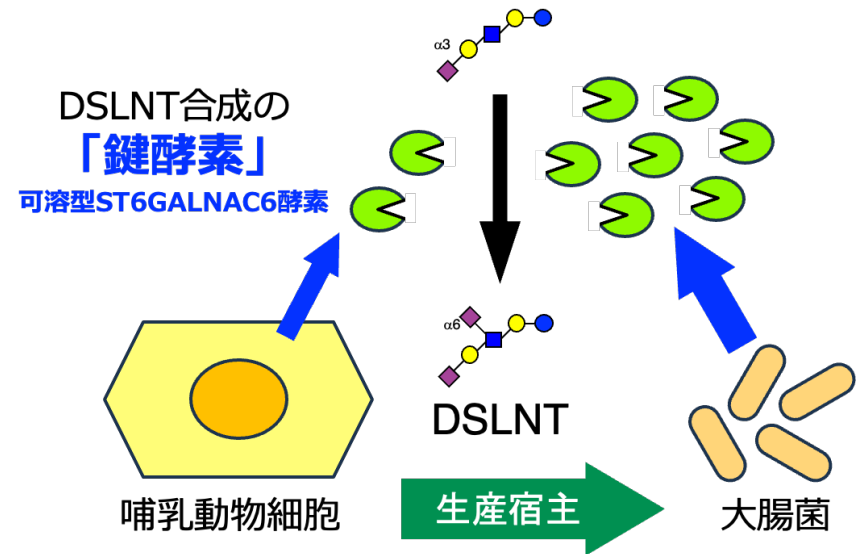


HEK293以外の細胞株でもHMOを合成できる

# 発明のまとめ

## 【発明 1】 PCT//JP2025/ 11559

- ・ 可溶型ST6GALNAC6の発現
- ・ ST6GALNAC6にDSLNTを合成する活性がある
- ・ 開始点を最適化したST6GALNAC6
- ・ DSLNTを製造する方法
- ・ 哺乳動物細胞での酵素生産
- ・ 微生物での酵素発現



## 【発明 2】 特願2025-053908

- ・ LALBAを発現させた哺乳動物細胞
- ・ HMOを合成できる哺乳動物細胞
- ・ 遺伝子改変・タンパク質導入したHMO合成哺乳動物細胞
- ・ 合成されたHMOを含む組成物

# 市場規模、海外動向

- ・乳児用調整乳の2023年の世界の総市場規模は約730億米ドルであり、2032年までに約1700億米ドルに達する予想である。その中で、**HMOの市場規模は2022年で1.9億米ドル**であり、2030年までに**約8.5億米ドル**に達すると予想されている。
- ・HMO生産の主要プレーヤーはNovonesis(旧Chr.Hansen:デンマーク)、DSM(オランダ)、Meihua(協和発酵キリンが事業譲渡:中国)などである。

国・地域	動 向
米国	・HMOsの市場規模は、2023年で約6000万米ドルと推定されており、すでに一部のHMOsの人工調整乳への添加が承認されており、さらなる拡大が予想される。
中国	・中国の乳児用調製乳の市場規模は、HMOsの市場規模は現在、約300億米ドルであり、世界の約半分を占める。2023年10月に調整乳へのHMOs成分を使用する承認がなされ、今後の拡大が予想される。
EU	・乳児用調製乳の市場規模は、2023年で約100億米ドルと推定されている。一部のHMOsは新規食品として承認されており、人工調整乳への添加が行われている。

調製乳は東南アジアなど人口増加が見込まれる国を中心に、市場拡大が予想される。

## 【発明 1】

- ・ 組換えST6GALNAC6高活性体の生産、実用化
- ・ 微生物発酵系の開発、DSLNTの生産

## 【発明 2】

- ・ HMO合成哺乳動物細胞株の改変開発
- ・ 次世代HMO合成系の開発

# お問い合わせ先

東海国立大学機構 岐阜大学  
学術研究・産学官連携推進本部  
産学官連携推進部門

T E L 058-293-2025

F A X 058-293-2032

e-mail [sangaku@t.gifu-u.ac.jp](mailto:sangaku@t.gifu-u.ac.jp)