

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成14年度採択研究代表者

木曾 真

(岐阜大学応用生物科学部 教授)

## 「感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究」

### 1. 研究実施の概要

様々な感染症や炎症性疾患、がんの転移、血液の凝固や血栓の形成、脳神経疾患などを対象に、様々な機能性糖鎖分子を設計・合成することによって、構造と機能の関係を分子レベルで明らかにし、創薬へのアプローチをします。すなわち、①多彩な人工ガングリオシドプローブを用いて「機能性（シアロ）糖鎖コード」とそのコードを認識する「受容体タンパク質」の相互作用を分子レベルで解析し、その機能を促進または阻害する薬剤の創出、②糖タンパク質ムチンを標的分子として、O-グリコシド型糖鎖の革新的構造解析技術の確立と化学・酵素法による汎用性の高い合成法の開発を目指しています。また③インフルエンザウイルス感染阻害剤ならびに④ビフィズス菌結合特異的糖鎖を標的とした合成研究を展開します。

これまでに、1) 新しい免疫制御系を構築するL-セレクトインの糖鎖リガンドの系統的合成、2) 自然免疫系を構築するシグレックとその糖鎖リガンドによる構造生物学的研究、3) ムチン型糖鎖の $\alpha$ -立体選択的グリコシル化法の開発、4) ヒトインフルエンザウイルス感染阻害能をする新しいシアロ糖鎖重合体の合成開発、5) ボツリヌス毒素の糖鎖認識特異性の解析等において大きな成果を得ました。今後、これらの研究成果をさらに発展させることにより創薬を目指します。

### 2. 研究実施内容

#### (1) ペリジルアミノ化法に基づく2次元HPLCマッピングの応用

本手法が細胞や組織サンプルに対しても適応できることを示すために、COS7細胞株とマウス臓器（脳、大腸、眼球、小腸、胃、肝臓、腎臓、肺、筋肉、脾臓）から標識糖鎖を調製し、分析を行った。それぞれ数十種類のムチン型糖鎖を分別することに成功し、現在、個々の糖鎖の構造解析を進めている。これらの実験結果から、本手法が細胞や組織サンプル中の多様なムチン型糖鎖の分別と検出に有効であることが分かったので、次の段階として、癌関連糖鎖抗原を持つムチン型糖鎖の検出と構造解析の研究に着手した。

#### (2) ヒトインフルエンザウイルス感染阻害性を有する糖鎖重合体の開発

ヒトインフルエンザウイルス感染阻害性を有する機能性糖鎖重合体を化学-酵素合成し

た。まず、*p*-Formylphenyl- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminideを合成し、これに糸状菌 *Mucor hiemalis*由来Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) の糖転移活性によって、ニワトリ卵黄から抽出して得た糖ペプチドのシアロ複合型糖鎖を転移付加した。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重合して、シアロ糖鎖重合体を合成した。このシアロ糖鎖重合体 (CD0-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である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。その結果、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。一方、ヒトインフルエンザウィルスのMDCK細胞への感染をCD0-Chitosanの存在下で行い、CD0-Chitosanの残存感染力価をELISA法によって測定した。その結果、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。

### (3) Endo- $\beta$ -*N*-acetylgalactosaminidase (Endo- $\alpha$ -GalNAc-ase) 及び1,2- $\alpha$ -L-Fucosidaseの基質特異性と糖転移反応への応用

ムチン型糖鎖をタンパク質の結合部分より切断遊離する酵素Endo- $\alpha$ -*N*-acetylgalactosaminidase (Endo- $\alpha$ -GalNAc-ase) をビフィズス菌が特異的に有することを見出し、*Bifidobacterium longum* JCM1217株より遺伝子クローニングした組換え酵素の特異的な糖鎖転移活性を用いて、ムチン型糖鎖を持つ機能性複合体を合成した。また、*Bifidobacterium bifidum* JCM1254株より、1,2- $\alpha$ -L-Fucosidaseの遺伝子をクローニングした。すなわち、大腸菌で発現したEndo- $\alpha$ -GalNAc-aseの組換え酵素について、木曾研究室で合成されたGalactosyl $\beta$ 1,3*N*-acetylgalactosamine (Gal $\beta$ 1,3GalNAc)  $\alpha$ 1-4-Methylumbelliferroneを用いてアッセイし、本酵素がGal $\beta$ 1,3GalNAc二糖を遊離する酵素であることを確認した。また、Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-*p*-nitrophenolを糖鎖供与体として糖転移反応を行うことによりGal $\beta$ 1,3GalNAcを受容体に転移付加できることを確認した。またさまざまな単糖やアルコールを受容体として、Endo- $\alpha$ -GalNAc-aseの糖転移活性により、ムチン型糖鎖を有する化合物を酵素合成した。一方1,2- $\alpha$ -L-Fucosidaseの遺伝子をクローニングして、新規なグリコシダーゼファミリー (GH family 95) に属する酵素であることを見出した。

### (4) ボツリヌス毒素複合体を構成するレクチン様タンパク質の糖鎖認識特異性の解析とその移行メカニズム

まず4種類のレクチン様タンパク質 (HA-1、HA-2、HA-3a、HA-3b) のリコンビナントをGSTフュージョンタンパク質の形で大腸菌に大量発現させ、精製し、それぞれの糖鎖結合特異性を検討した。その結果、HA-3がプロテアーゼで切られて生じたHA-3aは糖鎖結合能を持たないこと、もう片方のHA-3bは切られる前のHA-3とよく似た挙動を示すこと等が確認できた。そして、HA-2はレクチンとしての活性はないことが明らかとなった。HA-3bは、シアル酸を含むシアロ糖鎖のみを認識しているようであるが、HA-1はどちらかというシアロ糖鎖よりもシアル酸を持たないアシアロ糖鎖の方へ強く結合するという程度で、

シアル酸が結合に必須の糖残基ではないことが判明した。毒素複合体はシアロ糖鎖に非常に強く結合するので、複合体の結合にはHA-3bが大きく関与していると考えられる。しかし、複合体と各HA単独とでムチンへの結合力を比べてみたところ、HA-1、HA-3b共に複合体の数十分の一程度しかないことが判明した。このことの原因としては、1分子の毒素複合体にはHA-1、HA-3bが2-4分子ずつ含まれていて、これらが同時に近傍の糖鎖と結合する相乗効果によるものではないかと推察している。一方、既に毒素複合体が培養細胞の細胞表面ムチン様糖タンパク質に結合し細胞内に取り込まれて行く様子を共焦点顕微鏡で捉えることが出来ているが、同様の実験を各HA単独でも行ってみた。結果、毒素複合体の細胞内取り込みが観察される濃度のやはり数十倍の濃度でHA-1、HA-3b単独での細胞内移行を観察することが出来た。

現在、各HAの大量発現、大量精製を行って結晶化を試みており、一部結晶が採れ始めている。今後はHAの構造の面からも親和性糖鎖構造の検討を行っていく予定である。

(5) 革新的 $\alpha$ -選択的グリコシル化反応方法(特許出願中)を用いたムチン型糖ペプチド、及び各種標識糖鎖合成への応用展開

前年度開発に成功した標記の $\alpha$ -選択的グリコシル化法を用いて各種のムチン型糖ペプチド合成法の基盤技術を確立するとともに、山本らにより発見されたEndo- $\alpha$ -GalNAc-ase研究用試薬として各種の蛍光標識糖鎖の合成に成功した(特許出願中)。

(6) ラクタム化シアル酸を含有する有用分子プローブの合成とSiglec-7を介する免疫応答の解析

シアリル6-スルホルイスX(L-セレクチンの内在性リガンド)のラクタム化代謝物に反応するモノクローナル抗体(G159)のマッピングを行う有用分子プローブの合成に成功し、その反応特異性を明らかにした。一方、ジシアリルルイスAの完全合成に成功し、ヒト大腸癌に発現されるシアリルルイスAの増加に伴う本分子の減少とシアル酸認識レクチンSiglec-7の免疫応答について新しい知見を得た。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 糖鎖構造 研究グループ

①研究分担グループ長：長束俊治(大阪大学大学院理学研究科、助教授)

②研究項目：シアル酸含有ムチン型糖鎖の構造解析

#### (2) 細菌毒素 研究グループ

①研究分担グループ長：西河 淳(東京農工大学大学院 共生科学技術研究部、  
助教授)

②研究項目：細菌毒素と糖鎖の相互作用解析

#### (3) 糖鎖化学合成 研究グループ

①研究分担グループ長：木曾 真(岐阜大学応用生物科学部、教授)

②研究項目：革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製

(4) 糖鎖酵素合成 研究グループ

- ①研究分担グループ長：山本憲二（京都大学大学院生命科学研究科、教授）
- ②研究項目：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

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- 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.
- Miyazaki, K., Ohmori, K., Izawa, M., Koike, T., Kumamoto, K., Furukawa, K., Ando, T., Kiso, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Yoshida, A., Takeuchi, M. and Kannagi, R.: Loss of disialyl Lewis<sup>x</sup>, the ligand for lymphocyte inhibitor receptor sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-7 (siglec-7) associated with increased sialyl Lewis<sup>x</sup> expression on human colon cancers. *Cancer Res.*, **64**, 4498-4505, 2004.
- Matsuura, K., Oda, R., Kitakouji, H., Kiso, M., Kitajima, K. and Kobayashi, K.: Surface plasmon resonance study of carbohydrate-carbohydrate interaction between various gangliosides and Gg3-carrying polystyrene. *Biomacromolecules*, **5**, 937-941, 2004.
- 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- $\alpha$ -L-Fucosidase (AfcA), a Novel Inverting Glycosidase (Glycoside Hydrolase Family 95). *J. Bacteriol.*, **186**(15), 4885-4893, 2004.
- 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.
- 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.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：3件）