

「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

感染と共生を制御する糖鎖医薬品の創製を目的として、(1)「糖鎖構造解析の革新的基盤技術の開発と応用」(長束グループ)、(2)「ボツリヌス毒素と小腸ムチン糖鎖の相互作用の解析と応用」(西河グループ)、(3)「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」(山本グループ)及び(4)「革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製」(木曾グループ)の4つの研究実施項目によりグループ研究を実施し、新しい基盤的技術の開発と応用研究を展開している。

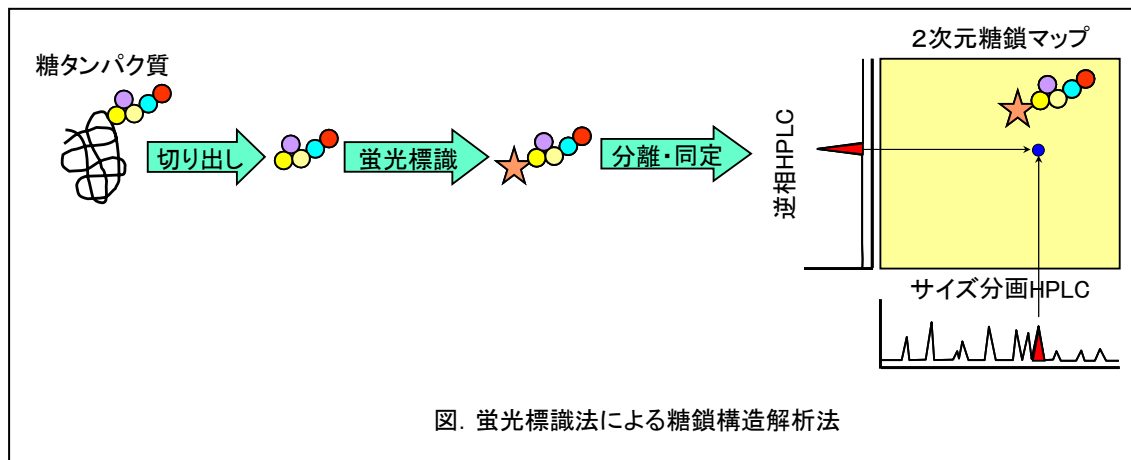
項目(1)では、N-結合型とO-結合型糖鎖の一括解析法を確立するとともに、フェツイン、リコンビナントTFPI等の糖タンパク質糖鎖の一括解析に成功し、シアル酸を含む疾患関連糖鎖解析への応用へと発展している。項目(2)では、毒素の糖鎖親和性解析法を確立するとともに、毒素複合体を構成するレクチン様タンパク質の糖鎖認識特異性と結合メカニズムを明らかにした。項目(3)では、ビフィズス菌のエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの遺伝子クローニングを完了し、活性中心構造と基質特異性の解析、糖転移活性を用いた新規糖鎖複合体合成への応用を展開している。項目(4)では、「DTBS効果」を利用した新規な α -立体選択的ガラクトシル化法を開発し、O-結合型糖鎖アミノ酸及び α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの高感度基質の効率的合成に成功した。

2. 研究実施内容

(1)「糖鎖構造解析の革新的基盤技術の開発と応用」

これまで主にN-結合型糖鎖に用いられてきた構造解析手法をO-結合型糖鎖にも適応し、ムチン型を含む複数タイプの糖鎖の一括解析法を構築することを目的としている。これにより感染や共生の際に認識される宿主の糖鎖の構造情報取得の効率化を目指す。本研究では、糖蛋白質から切り出した糖鎖を蛍光標識し、複数のHPLCによって分離同定する方法を用いている(下図参照)。ムチン型糖鎖を効率よく切り出す手法の検討、シアル酸を含む糖鎖のHPLC分離条件の確立、構造決定のための標準糖鎖の調製などによって、簡便、

迅速、精密な構造解析法を構築することができた。



(2)「ボツリヌス毒素と小腸ムチン糖鎖の相互作用の解析と応用」

・目的

ボツリヌス毒素は、嫌気性細菌 *Clostridium botulinum* が産生する猛毒で、神経毒素の他にレクチンや機能未知のタンパク質からなる巨大な複合体構造をとっている。経口摂取された毒素複合体は小腸から吸収され、その後神経毒素は体内循環系を介して末梢の神経細胞に到達し、筋弛緩性の麻痺を起こす（図1参照）。この毒素がたどるルートは、研究が進んでいるコレラや赤痢の毒素が侵入した細胞内に留まることと大きく異なり、一度細胞内に侵入した毒素が別の方向から出て行くというトランスサイトosisの機構を利用していることが考えられ、これに関する研究報告は殆ど無いのが現状である。我々は、そのトランスサイトosis機構の全容を解明して、深刻な問題である乳幼児ボツリヌス症における毒素吸収を阻害する毒素吸収中和化合物の調製を可能とするだけでなく、神経毒素部分を他の有用タンパク質に置き換えた物質による、有用高分子体内投与補助剤の創製に応用することを目指して本研究を行っている。

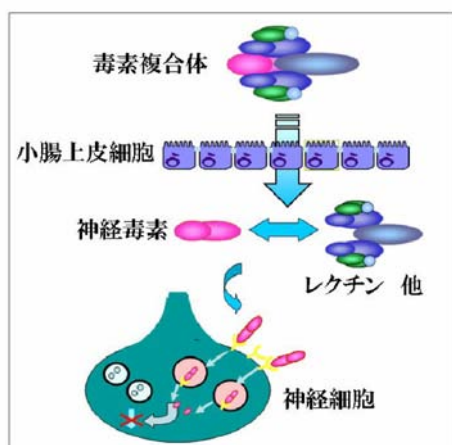


図1、毒素が吸収され、神経細胞に到達する様子。

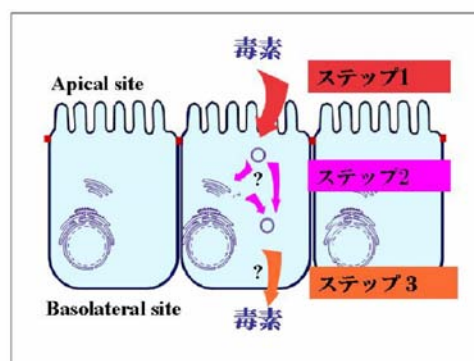


図2、研究の段階的進め方

・方法と結果

我々は、トランスサイトosisの全容を解明するにあたって、毒素の体内への移行機構を1, 細胞内への侵入機構、2, 細胞内での移動・輸送機構、3, 細胞外への分泌機構の三つのステップに分けて考え、順を追って検討していくこととした。(図2参照)

・細胞内への毒素侵入機構の解明 (ステップ1)

ボツリヌス毒素の細胞内への侵入機構については、昨年度までの本研究により毒素複合体の細胞表面のレセプターがムチンタンパクで、その糖鎖に結合して細胞内に取り込まれることを明らかにした。そこで本年度は、レセプターに結合した毒素複合体がいかなるルートを通して細胞内に移行されるかを検討した。具体的には、共焦点レーザー顕微鏡を用いて様々なオルガネラ特有のタンパク質 (トランスフェリンレセプター、クラスリン、Lamp-1、EEA1、カベオリン、c-Src その他) と毒素との存在場所を観察した。結果、大部分の毒素はクラスリン依存性のエンドサイトーシス機構で細胞内に移行しているが、一部はラフトを介するルートも利用していることが判明した。

・細胞内での輸送機構 (ステップ2)

上記と同様に共焦点レーザー顕微鏡で毒素と各種オルガネラ特有タンパク質との共存を時間経過と共に調べ、毒素の細胞内での移動ルートを検討した。結果、毒素複合体はエンドサイトーシスによりエンドソームに運ばれているが、神経毒素だけは更にゴルジ装置にまで到達していることが判明した。このことは、毒素複合体が細胞内に移行後神経毒素が分離され、基底膜側へ輸送されることの重要なエビデンスの一つの発見と考えられる。

一方で、我々は毒素複合体を構成するタンパク質の内、赤血球凝集活性があるとされている HA-1、HA-2、HA-3 を大腸菌で大量に発現させて精製し、HA-1、HA-3 については結晶化に成功した (図3, 4参照)。HA-1 に関しては既に X 線結晶構造解析の報告があるが、我々の結晶は 1.6 Å の高分解能で回折像が得られており、単糖をソーキングした解析結果よりシアル酸とガラクトースが結合する位置を確認した。

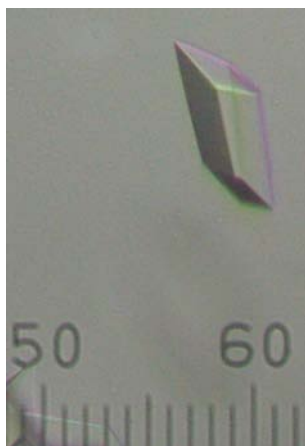


図3、HA-1の単斜晶系結晶

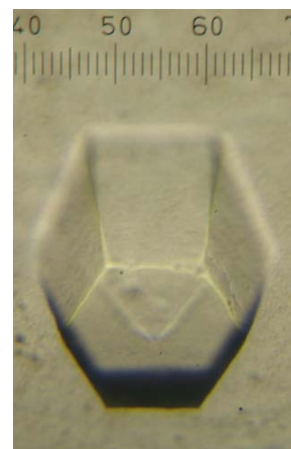


図4、HA-3の六方晶系結晶

今後は、毒素複合体を形成するすべてのタンパク質の立体構造を解析し、糖鎖結合部位の他、構成タンパク質同士の結合サイトなども検討し、毒素複合体全体の立体構造の解明と、神経毒素を有用タンパク質に置き換えた複合体形成作製の試みへの第一歩としたい。

(3) 「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」

糖タンパク質の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- α -*N*-acetylgalactosaminidase (Endo- α -GalNAc-ase) の遺伝子をビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* JCM1217 株よりクローニングし、大腸菌で発現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酵素合成した。

1. 本酵素を用いて、ムチン型糖鎖を有する生理活性糖鎖複合体の酵素合成を試みた結果、生理活性ペプチドの Peptide T、PAMP-12、Bradykinin などのセリン／スレオニン残基にムチン型糖鎖 (Gal β 1-3GalNAc) を直接付加することに成功した。また、ムチンのペプチド断片 Muc1A にムチン型糖鎖を直接付加することにも成功した。

2. 糖鎖の受容体に対する本酵素の特異性を調べる目的で Bradykinin のセリン残基をスレオニン残基に変換したペプチドを化学合成して、その転移活性を調べた結果、糖鎖の転移はペプチドのセリン残基の方がスレオニン残基よりも高い活性を示した。

3. 本曾グループで合成されたさまざまな基質 Gal β 1-3GalNAc α 1-*p*-Nitrophenol、Glc β 1-3GalNAc α 1-*p*-Nitrophenol、Gal α 1-3GalNAc α 1-*p*-Nitrophenol、Gal β 1-3GlcNAc α 1-*p*-Nitrophenol について本酵素の作用特異性を調べたところ、Gal β 1-3GalNAc α 1-*p*-Nitrophenol のみならず Glc β 1-3GalNAc α 1-*p*-Nitrophenol についても作用することを見出した。すなわち、糖鎖の非還元末端は β 結合した Glc 残基でも本酵素は作用することが明らかになった。

微生物の生産するエンドグリコシダーゼの糖鎖転移活性を活用して、ヒトインフルエンザウィルスの細胞への感染を阻害する高分子化合物を化学-酵素合成した。

1. 既に昨年度において、糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来 Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) の糖転移活性を用いて、ニワトリ卵黄から得られる糖ペプチドのシアロ複合型糖鎖を、合成した *p*-Formylphenyl β -*N*-acetylglucosaminide に転移付加し、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ヒトインフルエンザウィルス感染阻害剤として調製している。今年度は重合度が小さいキトサンオリゴマーをバックボーンとしたシアロ糖鎖重合体の合成を試みた。すなわち、重合度が2〜6糖のキトサンオリゴマーを用いて、上記のシアロ糖鎖重合体を調製した。

2. 得られたシアロ糖鎖重合体のウィルス感染阻害能を、MDCK細胞へのA型インフルエンザウィルスA/New Caledonia/20/99(H1N1)の感染に対する競合阻害活性として調べた。その結果、阻害効果はほとんど認められず、逆にキトサンオリゴマー自身がウィルスの感染を促進する効果が見られた。

3. シアロ糖鎖重合体にシアリダーゼを作用して、糖鎖の非還元末端に α -2,6-結合しているシアル酸を除去した後、 α -2,3-シアリルトランスフェラーゼを用いて、糖供与体の CMP-

シアル酸の存在下で酵素反応を行うことにより、トリインフルエンザウィルスの感染阻害剤となる可能性がある α -2,3-シアルリ糖鎖を持つキトサンポリマーを合成した。

(4)「革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製」

①研究のねらい

糖鎖の化学合成は、糖鎖創薬を目指す上で最も重要な基盤技術の一つである。特にムチン型糖鎖の立体選択的構築法を新たに開発することにより、サブグループの研究で得られた構造と機能の情報をもとに、ウィルス、細菌及び細菌毒素、ならびに接着分子であるセレクチンやシグレックに対する新規糖鎖リガンドや阻害剤を化学合成し、その構造と機能について分子・官能基レベルで解析する。さらに、これらのリード化合物をミミックまたは多量体化した糖鎖複合体構築のための基盤技術を開発する。

②研究実施方法

有機合成は、分子を自由に作り出せるという特徴を生かし、糖鎖生物学の発展に大きく寄与している。例えば、生体内超微量成分を純粋かつ大量に供給することができ、また天然型構造をモチーフにして種々の類縁体や誘導体を自由に設計・合成することで、医学・生物学用プローブや医薬への応用が期待される新たな生理活性物質を創出することができる。

1. 方法論の開発- 「DTBS 基を用いた新規な α -立体選択的ガラクトシル化法の開発」：近年、ガングリオシド合成の過程において、*galacto* 型の糖残基に導入した DTBS(di-*tert*-butylsilylene)基が、グリコシル化反応の際に隣接基関与を発現する保護基存在下においても顕著な α 選択性を与えるという興味深い知見を得た。この現象はベンジリデン基のようなアセタール系保護基の存在下では観察されず、DTBS 基特有の効果であることから、我々はこれを「DTBS 効果」と名付けた。 α -GalNAc/Gal 構造は、O-結合型糖タンパク質におけるアミノ酸（セリンまたはスレオニン）の水酸基と糖残基間の結合に代表されるように、天然に広く見られる重要な構造様式である。そこで、本研究では DTBS 効果について探求し、その汎用性、実用性を明らかにすると共に、糖鎖生物学への応用を指向した合成研究を進めることとした。

2. 有用分子プローブの設計と合成：L-セレクチンの内在性リガンドである 6-スルホ-ラクタム化シアルリルイス X ガングリオシドプローブの完全合成とそれらの特異抗体を用いた生体内シアル酸代謝研究への応用を目指すとともに、上記「DTBS 効果」を応用して、エンド α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの高感度基質を合成する。さらに、シグレック-7 を標的とした $\alpha(2\rightarrow3)/\alpha(2\rightarrow6)$ ジシアルラクトテトラオシルセラミド及びジシアルリルイス A の全合成を行うとともに、これをリガンドとしたシグレック-7 との共結晶を作成し結合様式を X 線解析する。

③研究結果

③- 1. 方法論の開発：新規ガングリオシド合成法の開発過程で、「革新的 α - 選択的グリコシル化反応方法」を発見・開発することができた。本法は、ガラクトサミン及びガラクトースの C-2 位に隣接基関与 (NHTroc, NPhth, NHBz, NHAc, OBz 等) が存在しても α -グリコシドを優先的に与える画期的グリコシル化反応方法であり、その汎用性と実用性が確認された。収率の幅は、水酸基の保護基、グリコシル受容体の種類、反応溶媒、反応温度、グリコシル供与体における脱離基の種類により変化するが、NHTroc 体で 83~97%、NPhth 体でも 90~94% で α -グリコシドを優先的に与えた。GalNHTroc 体をグリコシル供与体、Ser/Thr 誘導体をグリコシル受容体とした場合、93~97% の高収率で α -グリコシドが得られ、Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNHTroc、NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNHTroc 体でも 85~90% の高収率で反応が進行した。

③- 2. 有用分子プローブの設計と合成：上述した革新的 α - 選択的グリコシル化反応方法を応用して、山本らにより発見された Endo- α -GalNAc-ase の高感度蛍光標識糖鎖 4-methylumbelliferyl T-antigen (4-MU-T-antigen) の新規合成法の開発に成功した。即ち、DTBS 基で保護した Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNHTroc を THF 中、4-methylumbelliferone、トリフェニルホスフィン、DEAD と reflux 条件で反応させると、一段階 80% の高収率で対応する α -グリコシド (4-MU-T-antigen) が生成した。一方、一連のラクタム化シアル酸を含むシアリル 6-スルホレイス X 関連化合物の系統的合成を行い、モノクローナル抗体 (G159) による認識特異性のマッピングに成功するとともに、生体内シアル酸シクラーゼの存在が示唆された。他方、ジシアリルルイス A (DSL^e) 及びジシアリルラクテトラオシルセラミド (DSLc4) の世界初完全合成に成功するとともに、大腸癌に発現される SL^e の代謝経路及び発現パターンのメカニズムに新しい概念をもたらせた。また DSLc4 は、主に NK 細胞に発現される Siglec-7 と共結晶を生成し、X-線結晶構造解析によりその結合様式を明らかにした。

3. 研究実施体制

「糖鎖化学合成」グループ

- ①研究分担グループ長：木曾 真 (岐阜大学、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

「糖鎖酵素合成」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、教授)
- ②研究項目：機能性糖鎖複合体の酵素合成
糖鎖複合体の機能解析

「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、助教授)

②研究項目：シアル酸含有糖蛋白質糖鎖の構造解析手法の開発

「細菌毒素研究」グループ

①研究分担グループ長：西河 淳（東京農工大学共生科学技術研究部、助教授）

②研究項目：

- ・毒素複合体の細胞内移行ルートの詳細な検討
- ・毒素複合体を形成するコンポーネント（まず取組始めている具体的なものはHA-1とHA-3）のX線結晶構造解析により、認識糖鎖の結合部位やコンポーネント同士の結合位置を明らかにする。
- ・毒素トランスサイトosisを測定する系の確立

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

- Ando, H., Koike, Y., Koizumi, S., Ishida, H., Kiso, M.: 1,5-Lactamized sialyl acceptors for various disialoside syntheses: Novel synthesis method for glycan portions of Hp-s6 and HLG-2 gangliosides. *Angewandte Chemie, International Edition in English*, 6759-6763, 2005.
- Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Di-*tert*-butylsilylene(DTBS)-directed α -selective synthesis of 4-methylumbelliferyl T-antigen. *Organic Letters*. 7(20), 4415-4418, 2005.
- Shinya, K., Hatta, M., Yamada, S., Takada, A., Watanabe, S., Halfmann, P., Horimoto, T., Neumann, G., Kim H., J., Lim, W., Guan, Y., Peris, M., Kiso, M., Suzuki, T., Suzuki, Y., Kawaoka, Y.: Characterization of a human H5N1 influenza A virus isolated in 2003. *Journal of Virology*, 79, 9926-9932, 2005.
- Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R., Kiso, M.: 6-*O*-Sulfo sialylparagloboside and sialyl Lewis X neo-glycolipids containing lactamized neuraminic acid: synthesis and antigenic reactivity against G159 monoclonal antibody. *Glycoconjugate Journal*, 22, 95-108, 2005.
- Otsubo, N., Ishida, H., Kannagi, R., Kiso, M.: Design and synthesis of a novel neo-glycolipid containing sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc1-6GalNAc core structure. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16(7), 1321-1327, 2005
- Katayama, T., Fujita, K. and Yamamoto, K.: Novel bifidobacterial glycosidases acting on sugar chains of mucin glycoproteins. *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 457-465, 2005.
- Fujita, K., Oura, F., Nagamine, N., Katayama, T., Hiratake, J., Sakata, K., Kumagai, H. and Yamamoto, K.: Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium*

- longum*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 37415-37422, 2005.
- Haneda, K., Takeuchi, M., Tagashira, M., Inazu, T., Toma, K., Isogai, Y., Hori, M., Kobayashi, K., Takeuchi, M., Takegawa, K. and Yamamoto, K.: Chemo-enzymatic synthesis of eel calcitonin glycosylated at two sites with the same and different carbohydrate structures. *Carbohydr. Res.*, **341**, 181-190, 2006.
 - Shin-ichi Nakakita, Shunji Natsuka, Jun Okamoto, Kazuhiro Ikenaka, and Sumihiro Hase. Alteration of Brain Type *N*-glycans in Neurological Mutant Mouse Brain. *J. Biochem.*, **138** (3) 277-283, 2005.
 - Shunji Natsuka, Masahumi Kawaguchi, Yukiko Wada, Akira Ichikawa, Koji Ikura, and Sumihiro Hase. Characterization of wheat germ agglutinin ligand on soluble glycoproteins in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.*, **138** (2) 209-213, 2005.
 - N. Uotsu, A. Nishikawa*, T. Watanabe, T. Ohyama, T. Tonozuka, Y. Sakano, K. Oguma “Cell internalization and traffic pathway of Clostridium botulinum type C neurotoxin in HT-29 cells” *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, 1763, 120-128, 2006. (*: corresponding author)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：3 件）