

「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」(長東グループ)、(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、培養細胞 COS-7 及びマウスの脳試料を対象として網羅的な糖鎖解析を行い、本手法の有効性を確認した。本手法は、様々な O-結合型糖鎖を同時に検出・分析できることがわかった。項目(2)では、毒素複合体がムチンの糖鎖を認識して結合する際、最も重要な役割を果たすと思われる複合体の構成成分 HA1 について X 線結晶構造解析を行い、HA1 の糖結合部位を決定した。項目(3)では、ビフィズス菌由来のエンド- $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ及び土壌分離菌由来エンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼについてその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、糖転移生成物の生産効率向上を図った。項目(4)では、「DTBS 効果」を利用した革新的  $\alpha$ -立体選択的ガラクトシル化法を利用して、様々な機能性糖鎖分子の開発に成功するとともに、新規ビフィズス菌由来エンド- $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの基質特異性を解明した。

## 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」

[研究目的]

前年度までに開発した技術の細胞試料や組織試料への応用をはかるために、多種多様な糖鎖を失うことなく夾雑物質を効率的に除去する手法を確立する。

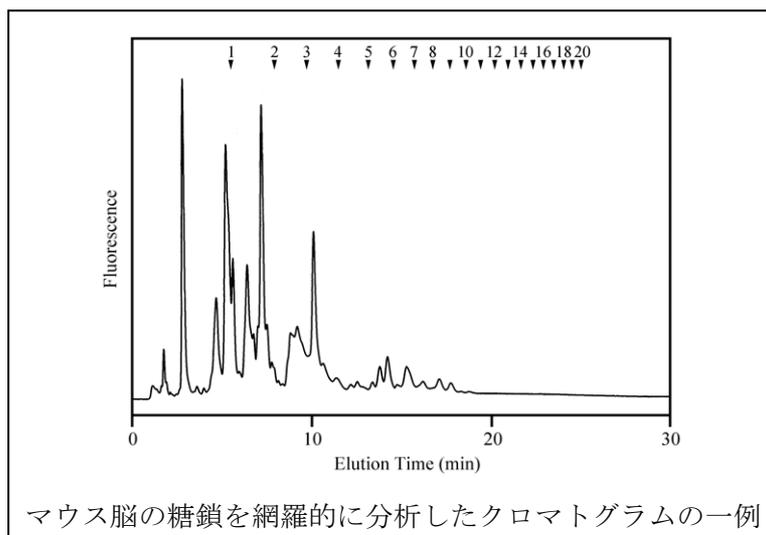
[方法]

各種溶媒抽出、イオン交換樹脂、グラファイトカーボン、疎水性樹脂、ゲルろ過などを組み合わせ

せて用いることにより、簡便かつ迅速に糖鎖画分を精製する条件を探索した。また、確立した手法の評価は、培養細胞試料およびマウス組織試料に対して実際に網羅的糖鎖解析を行うことにより行った。

#### [結論]

ピリジルアミノ化後に有機溶媒抽出、ゲルろ過ミニカラム、グラファイトカーボンカートリッジによって標識糖鎖を精製することにより、HPLC 上で標識糖鎖と共溶出する夾雑物を効率よく除く手法を確立した。培養細胞 COS-7 を対象として、N-結合型と O-結合型糖鎖の網羅的解析を行い、多種多様な夾雑物が含まれる細胞試料に対しても、本手法を用いることにより、高感度で分析ができることを確認した。また、マウスの脳試料を対象として、同様に網羅的な糖鎖解析を行い、本手法の有効性を確認することができた。これらの研究過程において、本手法を用いた解析によってムチン型糖鎖だけでなく他の O-結合型糖鎖も同時に検出・分析できることが分かった。また、既知のムチン型糖鎖コア構造とは異なるコア構造を持つ一連の未知糖鎖を検出することに成功しており、本手法が、既知構造の確認分析にとどまらず、未知構造の探索研究にも有効であることが分かった。



## (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。

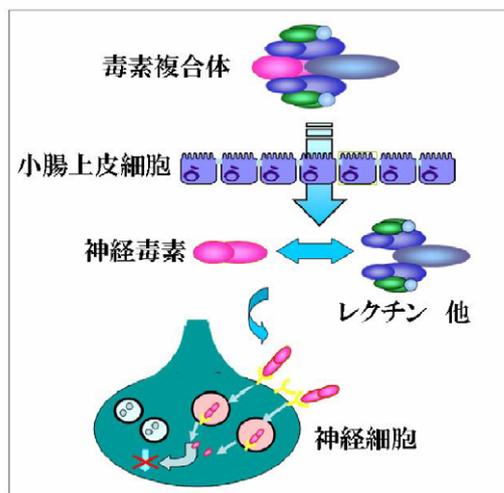


図 1、毒素が吸収され、神経細胞に到達する様子。

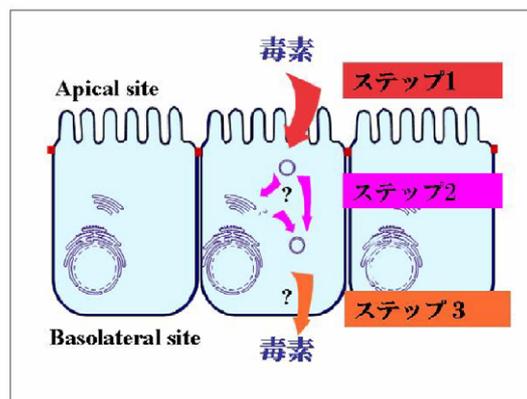


図 2、研究の段階的進め方

## 方法と結果

平成 18 年度は、毒素複合体がムチンの糖鎖を認識して結合する際、最も重要な役割を果たすと思われる複合体の構成成分 HA1 について X 線結晶構造解析を行い、HA1 の糖結合部位を決定した。

### ・結晶化

HA1 をマルトースバイディングプロテイン(MBP)との融合タンパク質として大腸菌で大量に発現させ、MBP 部分を切断して精製後、ハンギングドロップ蒸気拡散法で種々の母液で結晶化を試み、12% エタノールを含む 1.7M 塩化ナトリウム溶液から単斜晶系の結晶が得られた。

### ・糖結合部位の推定

リガンド糖を含むリザーバーに HA1 の結晶を浸す操作(ソーキング)で HA1-リガンド複合体結晶を作製し、X 線回折像を測定しリガンド特異性及び結合部位の特定を試みた。リガンド糖に Neu5Ac, Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc を用いたところ、Neu5Ac, Gal, GalNAc の 3 種類で明確な糖の電子密度が観察できた。解析の結果、Neu5Ac, Gal, GalNAc の 3 種類の糖全ての結合サイト(Site I)と Gal の結合サイト(Site II)の 2 カ所の結合部位が観察された(PDB に登録済み、PDB ID:2EHI, 2EHN, 2EHM. 図3)。

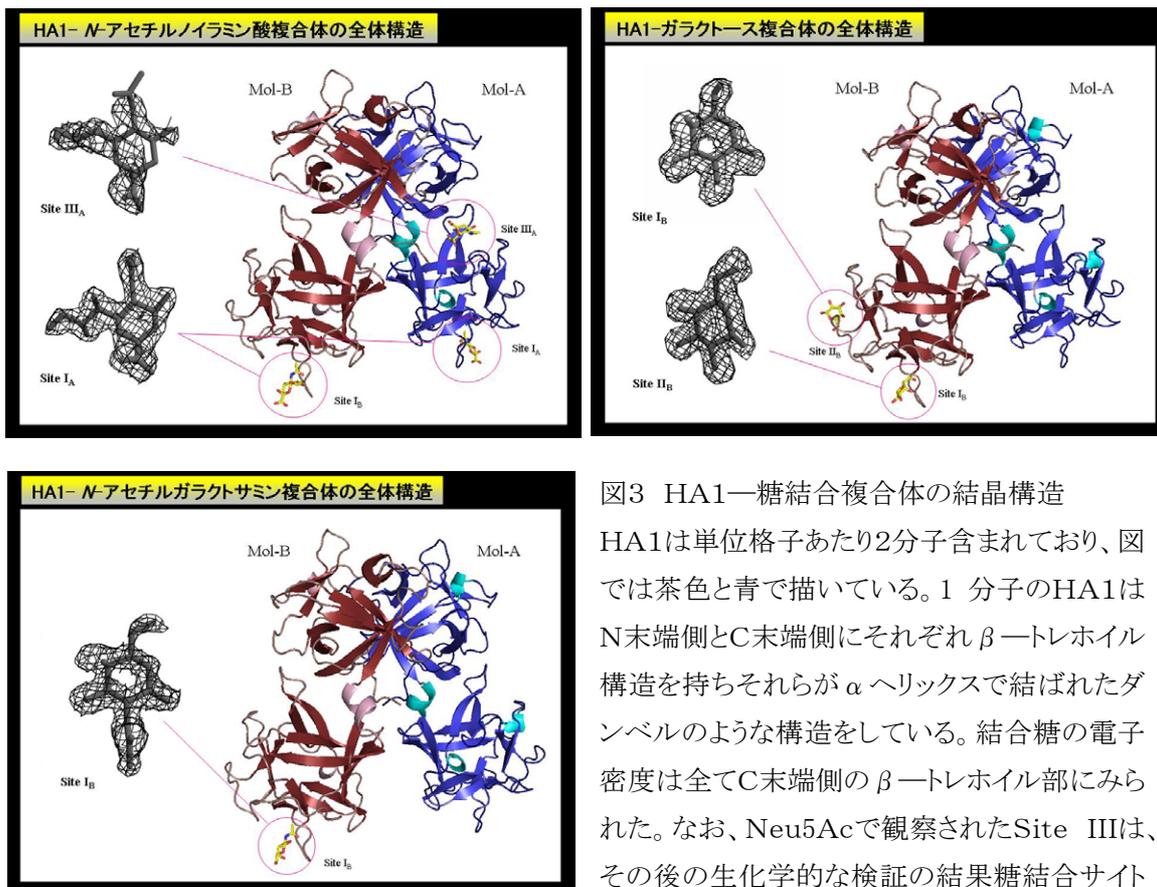


図3 HA1—糖結合複合体の結晶構造  
 HA1は単位格子あたり2分子含まれており、図  
 では茶色と青で描いている。1 分子のHA1は  
 N末端側とC末端側にそれぞれβ-トレホイル  
 構造を持ちそれらがα-ヘリクスで結ばれたダ  
 ンベルのような構造をしている。結合糖の電子  
 密度は全てC末端側のβ-トレホイル部にみら  
 れた。なお、Neu5Acで観察されたSite IIIは、  
 その後の生化学的な検証の結果糖結合サイト

ではないことが判明した。

### (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」

#### 1. Endo-Mの構造改変による糖転移生成物の生産収率の向上

従来、我々は土壌分離菌 *Mucor hiemalis* 由来の Endo-β-N-acetylglucosaminidase (Endo-M) の特異な糖転移活性を活用して、生理活性糖ペプチドやインフルエンザウイルス感染阻害剤などの機能性糖鎖複合体の化学-酵素合成を行ってきた。本研究では Endo-M の糖転移活性の上昇と糖転移生成物の収率向上を目的として本酵素の機能改変を試みた。本酵素については既にその遺伝子を挿入した組換え酵母 *Candida boidinii* が作製され、酵素生産が行われているが、本研究では遺伝子操作が容易な大腸菌での新たな生産系の確立を試みた。すなわち、*C. boidinii* より抽出したゲノムDNAを鋳型とし、プライマーを用いたPCRを行い、得られたDNA断片を大腸菌発現用ベクターに挿入して、大腸菌で発現したHis-tagの付いた酵素タンパク質を精製した。

本酵素のホモログである *Arthrobacter protophormiae* 由来の Endo-A で得られているX線結晶構造解析の結果を基にして、Endo-Mの活性中心付近のアミノ酸残基について部位特異的の変異を行い、さまざまな変異体酵素を得た。それらの糖転移活性を糖鎖供与体としてシアロ糖ペプチドを用い、4-Methylumbelliferyl-GlcNAc (4MU-GlcNAc)を糖鎖受容体として酵素反応を行い調べた。その結果、種々の変異体のうち Y217F 変異酵素が wild type の約 1.5 倍の糖転移活性を有し、

4MU-GlcNAc に対する  $K_m$  値は wild type の 10 分の 1 程度に低下することを見出した。Y217F 変異酵素は単糖や GlcNAc 残基を有するペプチドに対して糖ペプチド糖鎖を効率よく転移付加した。一方、Y217 をフェニルアラニン以外の他のアミノ酸へ置換したところ触媒活性が失われた。すなわち、チロシンをフェニルアラニンへ置換することにより水酸基が除かれたために、水に優先して糖鎖受容体としての GlcNAc がより活性中心に取り込まれやすくなり、糖転移反応が触媒されやすくなることが示唆された。

本酵素においては GlcNAc の 2-アセトアミド基が求核基となり、オキサゾリン中間体が形成されることによって触媒反応が行われると考えられている。そこで、ホモログ間で保存性が高い N175 をアラニンに置換した N175A 変異酵素を作成し、その活性を調べたところ、ほぼ完全に活性を失っていたが、オキサゾリン構造を還元末端に有する化学合成したオリゴ糖を糖鎖供与体として反応させると糖転移反応が進行することを見出した。この結果から、N175 がオキサゾリン中間体形成に寄与する残基であることが示された。また N175A 変異酵素は糖転移生成物をほとんど加水分解しないため、グリコシターゼに類似した酵素としての応用が期待される。

## 2. ビフィズス菌の組換え Endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase による機能性複合糖質の合成

既に、我々は善玉菌として知られるビフィズス菌の多くが Endo- $\alpha$ -GalNAc-ase 活性を有する事を見出し、*Bifidobacterium longum* JCM1217 株より本酵素をコードする遺伝子 *engBF* をクローニングしている。EngBF は糖や 1-アルカノールあるいはペプチドのセリン/スレオニン残基にムチン型糖鎖を転移付加する活性を有する事が確認されている。本研究では EngBF が縮合反応を触媒することを見出し、その活性を用いる事によって複合糖質の合成を試みた。すなわち、グルコースやラクトース、セリン、さらにはペプチドへ本酵素の縮合反応によってムチン型糖鎖 (Gal  $\beta$  1-3GalNAc) を付加することを見出した。

## 3. *Clostridium perfringens* の特異な Endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase の発見

*Cl.perfringens* のゲノム DNA 上にビフィズス菌の EngBF のホモログを見出した。そこで、適当なプライマーを作成して、PCR を行い、得られた DNA 断片を pMAL-c2X ベクターにライゲーションして、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大腸菌 DH5  $\alpha$  で発現させ、精製酵素を得た。本酵素の基質特異性について、木曾グループで合成されたさまざまな pNP 基質を用いて調べたところ、コア1 (Gal  $\beta$  1-3GalNAc  $\alpha$ -pNP) のみならずコア2 (Gal  $\beta$  1-3(GlcNAc  $\beta$  1-6)GalNAc  $\alpha$ -pNP) に対しても作用する特異な酵素であることを見出した。また、本酵素はコア3 (GlcNAc  $\beta$  1-3GalNAc  $\alpha$ -pNP) や Glc  $\beta$  1-3GalNAc  $\alpha$ -pNP、GalNAc  $\beta$  1-3GalNAc  $\alpha$ -pNP に対しても作用することを確認した。

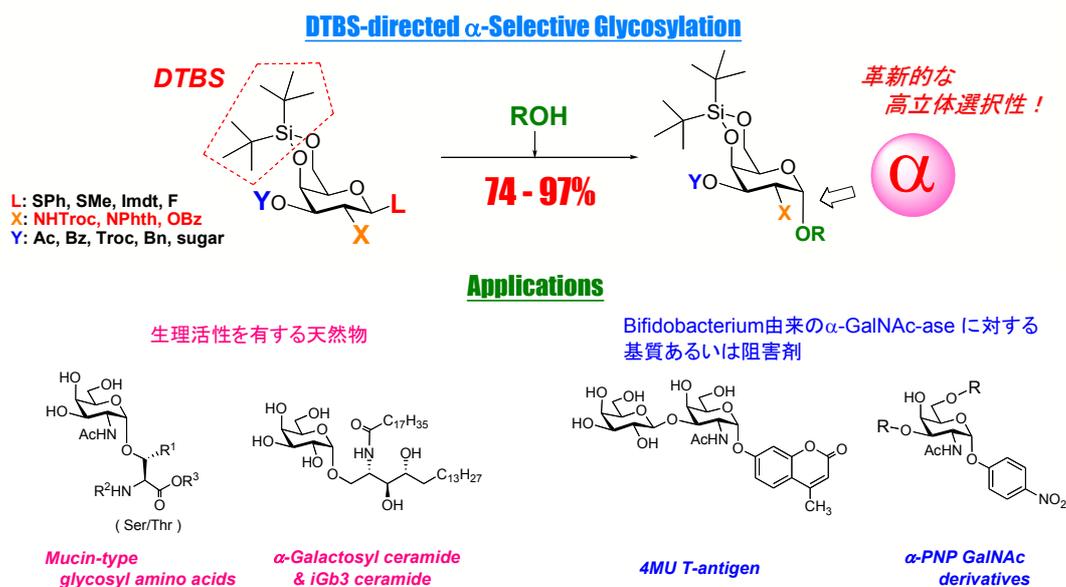
## (4)「革新的化学合成法の開発と機能性糖鎖分子の創製」

糖鎖合成化学の歴史上、 $\alpha$ -GalNAc/Gal 構造の構築、特に、GalNAc の  $\alpha$  グリコシドの構築は 2 位に存在するアセトアミド基の存在を主因として困難な課題であった。従来汎用されてきた 2 位にアジド基を導入した供与体を用いる方法は、供与体の調製法が煩雑であることに加えて、グリコシル化反応における縮合収率、立体選択性に課題の残るものであった。このような背景の下、本研

究では、従来の方法論とは一線を画す画期的且つ独創的な $\alpha$ ガラクトシル化法を開発した。以下に、その概要を述べる。

ガラクト型の糖残基(Gal/GalNAc)の4,6位水酸基に、シリルケタール系の保護基であるDTBS(di-tert-butylsilylene)基を導入した糖供与体を用いてグリコシル化反応に供することで、高収率にて $\alpha$ グリコシドが得られた。汎用性について精査した結果、現在一般的に用いられているグリコシル化法の条件下において、高いシス選択性及び縮合収率が達成されることが確認された。また、本方法を応用することで、ムチン型糖タンパク質中に存在するコア構造[ $\leftarrow$ -GalNAc-*O*-Ser/Thr]、あるいはNKT細胞に対する賦活能を有する $\alpha$ ガラクトシルセラミドのような生理活性糖鎖の効率的合成を達成した。さらに、アグリコンに蛍光基質(4MU、PNP)を $\alpha$ 結合で導入した糖加水分解酵素 $\alpha$ -GalNAc-aseに対する高感度基質の合成にも成功した。

これらの成功から、本研究において確立された新規 $\alpha$ ガラクトシル化法は、従来の方法と比較して、供与体調製の簡便性、グリコシル化反応における汎用性及び実用性において非常に優れた革新的な方法であると結論づけられる。



- 文献 1) *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 6725.    特許 1)  $\alpha$ -選択的グリコシル化反応方法； 国際公開番号WO2004/104163  
 2) *Org. Lett.* **2005**, 7, 4415.            2) エンド $\alpha$ -ガラクトサミニダーゼ高感度基質、その製造方法及び利用方法；  
 3) *Synlett* **2006**, 15, 2379.                特許公開2006-335644 号  
 4) *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 8862.

### 3. 研究実施体制

#### (1)「木曾 真」グループ(糖鎖化学合成)

##### ①研究者名

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

(2)「糖鎖酵素合成」グループ

①研究者名

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

(3)「糖鎖構造研究」グループ

①研究者名

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

(4)「細菌毒素研究」グループ

①研究者名

西河 淳(東京農工大学 助教授)

②研究項目

- ・細菌毒素と糖鎖の相互作用解析  
ボツリヌス毒素のトランスサイトosisによる体内移行機構を解明する。また、毒素複合体を構成しトランスサイトosisに重要な役割を果たすと考えられる二種類のレクチンの立体構造や糖鎖結合部位を解析し、毒素のレセプターとなる糖鎖の詳細な構造を明かにする。本研究組織の糖鎖化学合成グループによって合成された糖鎖の利用や、糖鎖構造研究グループによる糖鎖の構造解析法は、レクチン様タンパク質と糖鎖との相互作用の解析に重要で相互に密接に関わっている。この研究の成果を、細菌毒素の阻害薬開発にだけでなく、有用高分子物質の腸管からの吸収による新規投与方法への開発に応用して行く。

## 4. 研究成果の発表等

### (1)論文発表(原著論文)

- Magesh, S., Suzuki, T., Miyagi, T., Ishida, H., Kiso, M.: Homology modeling of human sialidase enzymes NEU1, NEU3 and NEU4 based on the crystal structure of NEU2: Hints for the design of selective NEU3 inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **25**, 196-207, 2006.
- Attrill, H., Takazawa, H., Witt, S., Kelm, S., Isecke, R., Brossmer, R., Ando, T., Ishida, H., Kiso, M.: The structure of Siglec-7 in complex with sialosides: leads for rational structure-based inhibitor design. *Biochemical Journal*, **397(2)**, 271-278, 2006.

- Takaku, H., Sato, J., Ishida, H-K., Inazu, T., Ishida, H., Kiso, M.: A chemical synthesis of UDP-LacNAc and its regioisomer for finding 'oligosaccharide transferases'. *Glycoconjugate Journal*, **23**, 565-573, 2006.
- Ando, H., Shimizu, H., Katano, Y., Koike, Y., Koizumi, S., Ishida, H., Kiso, M.: Studies on the  $\alpha$ -(1→4)- and  $\alpha$ -(1→8)-fucosylation of sialic acid for the total assembly of the glycan portions of complex HPG-series gangliosides. *Carbohydrate Research*, **341**, 1522-1532, 2006.
- Makimura, Y., Watanabe, S., Suzuki, T., Suzuki, Y., Ishida, H., Kiso, M., Katayama, T., Kumagai, H., Yamamoto, K.: Chemoenzymatic synthesis and application of a sialoglycopolymer with a chitosan backbone as a potent inhibitor of human influenza virus hemagglutination. *Carbohydrate Research*, **341**, 1803-1808, 2006.
- Fuse, T., Ando, H., Imamura, A., Sawada, N., Ishida, H., Kiso, M., Ando, T.: Synthesis and enzymatic susceptibility of a series of novel GM2 analogs. *Glycoconjugate Journal*, **23**, 329-343, 2006.
- Sawada, T., Hashimoto, T., Nakao, H., Suzuki, T., Ishida, H., Kiso, M.: Why does avian influenza A virus hemagglutinin bind to avian receptor stronger than to human receptor? Ab initio fragment molecular orbital studies. *Biochemical and Biophysical research communications*, **351**, 40-43, 2006.
- Sawada, T., Hashimoto, T., Nakao, H., Shigematsu, M., Ishida, H., Kiso, M.: Conformational study of  $\alpha$ -N-acetyl-D-neuraminic acid by density functional theory. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **25(5)**, 387-405, 2006.
- Kimura, A., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: A novel synthetic route to  $\alpha$ -galactosyl ceramides and iGb3 using DTBS-directed  $\alpha$ -selective galactosylation. *Synlett*, **15**, 2379-2382, 2006.
- Campanero-Rhodes, M. A., Childs, R. A., Kiso, M., Komba, S., Narvor, C. L., Warren, J., Otto, D., Crocker, P. R., Feizi, T.: Carbohydrate microarrays reveal sulphation as a modulator of siglec binding. *Biochemical and Biophysical research communications*, **344(4)**, 1141-1146, 2006.
- Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M. Q., Nidom, C. A., Sakai-Tagawa, Y., Muramoto, Y., Ito, M., Kiso, M., Horimoto, T., Sinya, K., Sawada, T., Kiso, M., Usui, T., Murata, T., Lin, Y., Hay, A., Haire, L. F., Stevens, D. J., Russell, R. J., Gamblin, S. J., Kawaoka, Y.: Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, **444**, 378-382, 2006.
- Imamura, A., Kimura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Extended applications of Di-*tere*-butylsilylene-Directed  $\alpha$ -Predominant galactosylation compatible with C2-Participating groups toward the assembly of various glycosides. *Chem. Eur. J.*, **12**, 8862-8870, 2006,

- Attrill, H., Imamura, A., Sharma, R. S., Kiso, M., Crocker, P. R., van Aalten, D. M. F.: Siglec-7 undergoes a major conformational change when complexed with the (2,8)-Disialylganglioside GT1b. *Journal of biological chemistry*, **281(43)**, 32774-32783, 2006.
- Y.Makimura, S.Watanabe, T.Suzuki, Y.Suzuki, H.Ishida, M.Kiso, T.Katayama, H.Kumagai and K.Yamamoto : Chemoenzymatic Synthesis and Application of a Sialoglycopolymer with a Chitosan Backbone as a Potent Inhibitor of Human Influenza Virus Hemagglutination. *Carbohydr. Res.*, **341**, 1803-1808 (2006).
- K.Haneda, M.Takeuchi, M.Tagashira, T.Inazu, K.Toma, Y.Isogai, M.Hori, K.Kobayashi, M.Takeuchi, K.Takegawa and K.Yamamoto : Chemo-enzymatic Synthesis of Eel Calcitonin Glycosylated at Two Sites with the Same and Different Carbohydrate Structures. *Carbohydr. Res.*, **341**, 181-190 (2006).
- K.Fujita and K.Yamamoto : A Remodeling System for the Oligosaccharide Chain on the Glycoproteins with Microbial Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidases. *Biochim. Biophys.Acta*, **1760**, 1631-1635 (2006).
- K.Yamamoto : Application of Transglycosylation Activity of Microbial Endoglycosidases to Syntheses of Bioactive Compounds. *Trends in Glycosci. Glycotech.*, **18(99)**, 49-62 (2006).
- Kazuyoshi Hirao, Yuko Natsuka, Taku Tamura, Ikuo Wada, Daisuke Morito, Shunji Natsuka, Pedro Romero, Barry Sleno, Linda O.Tremblay, Annette Herscovics, Kazuhiro Nagata, Nobuko Hosokawa. EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J. Biol. Chem.*, **281** (14) 9650-9658 (2006).
- Kanta Yanagida, Shunji Natsuka, and Sumihiro Hase. Structural diversity of cytosolic free oligosaccharides in the human hepatoma cell line HepG2. *Glycobiology*, **16** (4) 294-304 (2006).
- Shunji Natsuka, Miwa Ishida, Akira Ichikawa, Koji Ikura, and Sumihiro Hase. Comparative biochemical study of *N*-linked glycans prepared from skin of a squid, *Todarodes pacificus*. *J. Biochem.*, **140** (1) 87-93 (2006).
- T. Nakamura, N. Takada, T. Tonozuka, Y. Sakano, K. Oguma, A. Nishikawa "Binding properties of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin to mucins" *Biochim. Biophys. Acta- Gen. Subjects*, 1770, 551-555, 2007.

## (2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 1 件 (CREST 研究期間累積件数: 4 件)