

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19570119

研究課題名（和文） マラリアの母子感染阻止を目指した糖鎖工学的アプローチ

研究課題名（英文） Glycotechnological approaches for prevention of mother-to-child malarial transmission

研究代表者

柿崎 育子 (Kakizaki Ikuko)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80302024

研究成果の概要(和文):本研究では、糖鎖加水分解酵素を用いる糖鎖工学的技術により調製した構造が確定されたコンドロイチン硫酸オリゴ糖を用いる実験により、マラリアの母子感染に重要な糖鎖構造に関する情報を得た。コンドロイチン硫酸オリゴ糖の調製には、樹脂に固定化したヒアルロニダーゼの酵素反応を利用した。各種オリゴ糖の活性に関する評価は、マラリアに感染した赤血球の胎盤由来のプロテオグリカンへの接着阻害実験によった。その過程で、コンドロイチン硫酸オリゴ糖の高収率、高純度調製技術を開発した。

研究成果の概要(英文): We developed a new technology to custom synthesize chondroitin sulfate oligosaccharides using re-usable immobilized glycosidase with high purity and high yield reaction products. The synthetic oligosaccharides with defined structures were then used in experiments, gaining structural information that may be useful in the prevention of mother-to-child malarial transmission.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野:糖鎖工学

科研費の分科・細目:機能生物化学

キーワード:プロテオグリカン, グリコサミノグリカン, コンドロイチン硫酸, 糖鎖加水分解酵素, ヒアルロニダーゼ, 糖転移反応, オリゴ糖

## 1. 研究開始当初の背景

(1)地球の温暖化や海外渡航の頻繁化により、マラリアは我が国においても将来無視できる問題ではない。マラリアの母子感染において、胎盤上の受容体であるプロテオグリカンの糖鎖(グリコサミノグリカン)が寄与していることが明らかに

なってきた。この糖鎖構造の詳細を明らかにし、将来、糖鎖に基づく感染防御法が開発されることが期待される。

(2)プロテオグリカンはコアとなるタンパク質とグリコサミノグリカン糖鎖から成る複合糖質である。

グリコサミノグリカン糖鎖は、ウロン酸とヘキソサミンから成る基本の二糖単位が繰り返した単純な構造であるが、天然のグリコサミノグリカンの微細構造は、硫酸化やエピメリ化などの修飾により同一糖鎖上でも多様性を持つ。その不均一性の一方で、グリコサミノグリカン糖鎖は特定の生理活性を示すドメイン構造(10糖前後のオリゴ糖構造)を持つことが明らかになりつつある。しかし、構造と機能の相関が明らかにされたドメイン構造はごく少数である。

(3) 当研究グループでは、グリコサミノグリカン糖鎖上の生理活性ドメイン探索研究への応用を目指し、グリコサミノグリカンオリゴ糖の酵素的組み合わせ法を開発した。酵素的組み合わせには、糖鎖内部のグリコシド結合を加水分解するウシ精巢性ヒアルロニダーゼの糖転移活性を利用している。糖転移反応は糖鎖加水分解酵素本来の加水分解反応の見かけ上の逆反応である。ウシ精巢性ヒアルロニダーゼは基質特異性が広く、ヒアルロン酸の他、コンドロイチン硫酸にも作用する。我々は、硫酸基の位置の異なるコンドロイチン硫酸をドナーおよびアクセプターとしてそれらの系統的な組み合わせにより、新規ハイブリッド型グリコサミノグリカンカスタム合成することに成功している。

(4) 硫酸基の位置と数とが決定された上記の合成オリゴ糖は、グリコサミノグリカンの構造と機能に関する研究のモデルとして有用と考えられる。実際に、当研究グループでは、ドメイン構造の探索やグリコサミノグリカン糖鎖を基質とする酵素の作用部位の決定に関する研究にこの糖鎖工学的組み合わせオリゴ糖を利用するアプローチで成功している。

## 2. 研究の目的

本研究では、当研究グループで開発された糖鎖加水分解酵素を用いる糖鎖工学技術により、母子感染に重要なグリコサミノグリカンオリゴ糖構造に関する詳細な情報を得ることを目的とする。

また、上記目的を達成するために、ヒアルロニダーゼを用いた糖鎖組み合わせ技術の問題点の解決を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 糖鎖加水分解酵素としてヒアルロニダーゼを固定化したカラムを用いたグリコサミノグリカンオリゴ糖の高純度で高収率の系を開発した。

(2) ヒアルロニダーゼの反応を利用して、硫酸基の数や位置など、構造の知られたグリコサミノグリカンオリゴ糖のシリーズを調製した。反応前後のオリゴ糖の構造は、各種酵素反応を組み合わせた HPLC 分析および質量分析によって検定した。

(3) 調製したオリゴ糖シリーズを用いて、マラリア病原虫に感染した赤血球の胎盤プロテオグリカンへの接着阻害実験 (*in vitro*) を行った。

## 4. 研究成果

(1) 樹脂に固定化したヒアルロニダーゼを用いたオリゴ糖調製のための反応条件は、加水分解、糖転移の両反応ともに、固定化しない酵素と同様の条件であることが明らかとなった。また、糖転移反応の場合、ドナーとアクセプターの組み合わせによる至適条件の違いを決定した。固定化カラムを使用することにより、酵素が安定化され、繰り返し使用可能となった。この方法で得られる生成物には酵素の混入が無いことから、生理機能に関する分析に適したオリゴ糖をこれまでよりも大量に提供できるようになった。

(2) ヒアルロニダーゼの反応を利用して、各種グリコサミノグリカンオリゴ糖を調製し、それらの構造を確認した。調製したオリゴ糖の例を表1に示す。

表1 接着阻害実験に供したオリゴ糖

番号	PA 化コンドロイチン硫酸 12 糖
1	0-0-0-0-0-0-PA
2	4-0-0-0-0-0-PA
3	4-4-0-0-0-0-PA
4	4-4-4-0-0-0-PA
5	4-4-4-4-0-0-PA
6	4-4-4-4-4-0-PA
7	4-4-4-4-4-4-PA

0, GlcUA-GalNAc; 4, GlcUA-GalNAc4S; PA, 2-ピリジルアミン。

(3) まず、グリコサミノグリカンの種類や糖鎖長、硫酸化度に関する *in vitro* の接着阻害実験により、接着に必要なオリゴ糖の構造に関するおおよその情報が得られた。次に、(2) で調製し、構造が確定したオリゴ糖シリーズ(表1)を用いた接着阻害実験により、表の3番-5番のオリゴ糖により高い阻害効果が観察された。従って、マラリア病原虫に感染した赤血球の胎盤プロテオグリカンへの接着には、糖鎖長として12糖、非還元末端に2~4個の GlcUA-GalNAc4S 単位が重要である可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)②以外全て査読有

- ① Kakizaki, I., Ibori, N., Kojima, K., Yamaguchi, M., and Endo M.: Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase. *FEBS J.* **277 (7)**, 1776-1786 (2010)
- ② 柿崎育子: 医学応用を目指したプロテオグリカンの糖鎖工学. 月刊「化学工業」特集/糖質科学の機能探求 Vol. 61, No. 3 (2010), 216-220
- ③ Chen, F., Kakizaki, I., Yamaguchi, M., Kojima, K., Takagaki, K., and Endo, M.: Novel products in hyaluronan digested by bovine testicular hyaluronidase. *Glycoconj. J.*, **26(5)**, 559-566 (2009)
- ④ Achur, R. N., Kakizaki, I., Goel, S., Kojima, K., Madhunapantula, S. V., Ohta, M., Kumar, S., Takagaki, K., and Gowda, D. C.: Structural Interactions in Chondroitin 4-Sulfate-mediated Adherence of *Plasmodium falciparum*-infected Erythrocytes in Human Placenta During Pregnancy-Associated Malaria. *Biochemistry*, **47(47)**, 12635-12643 (2008)
- ⑤ Kakizaki, I., Itano, N., Kimata, K., Hanada, K., Kon, A., Yamaguchi, M., Takahashi, T., and Takagaki, K.: Up-regulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *Arch. Biochem. Biophys.* **471(1)**, 85-93 (2008)
- ⑥ Kakizaki, I., Takahashi, R., Ibori, N., Kojima, K., Takahashi, T., Yamaguchi, M., Kon, A., and Takagaki, K.: Diversity in the degree of sulfation and chain length of the glycosaminoglycan moiety of urinary trypsin inhibitor isomers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1770 (2)**, 171-177 (2007)

[学会発表] (計10件)

- ① 柿崎育子, 日本応用糖質科学会平成 21 年度大会 (第 58 回), 大会特別シンポジウム【東北から発信する糖質関連新技術】、「医学応用を目指したプロテオグリカンの糖鎖工学」, (2009 年 (平成 21 年) 9 月 17 日, 弘前市)
- ② 柿崎育子, 須藤晋一郎, 今淳, 山口真範, 遠藤正彦, 「ヒアルロニダーゼ固定化カラムを用いた糖転移反応の再検討」, 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同年会, (2007 年 12 月 14 日, 横浜)

学会大会 合同年会, (2007 年 12 月 14 日, 横浜)

[図書] (計2件)

- ① Kakizaki, I., and Takagaki, K.: Endoglycosidases (Glycosaminoglycans) in *Experimental Glycoscience - Glycochemistry* edited by Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H., Kawasaki, T., and Hase, S., Springer, Berlin, Germany, 173-176 (2008)
- ② Takagaki, K., and Kakizaki, I.: Degradation of glycosaminoglycans, in *Comprehensive Glycoscience - from Chemistry to Systems Biology* edited by J. P. Kamerling., G. J. Boons., Y. C. Lee., A. Suzuki., N. Taniguchi., A. G. J. Voragen., Elsevier Science B. V., Amsterdam, the Netherlands, 171-192 (2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: ヒアルロニダーゼ阻害剤  
 発明者: 遠藤正彦, 柿崎育子, 小泉英誉  
 権利者: 弘前大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2009-221568  
 出願年月日: 2009 年 9 月 25 日  
 国内外の別: 国内

名称: 糖鎖改変方法  
 発明者: 柿崎育子, 遠藤正彦  
 権利者: 弘前大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2008-133815 (特開 2009-278907)  
 出願年月日: 2008 年 5 月 22 日  
 国内外の別: 国内

名称: 糖鎖改変ウリナスタチンの製造方法  
 発明者: 柿崎育子, 高垣啓一, 高橋良樹  
 権利者: 弘前大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2007-90839 (特開 2008-247802)  
 出願年月日: 2007 年 3 月 30 日  
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~bioche1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柿崎 育子(KAKIZAKI IKUKO)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号:80302024

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: