

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390019

研究課題名(和文) グリコサミノグリカンシグナリングの分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of proteoglycan signalings

研究代表者

菅原 一幸 (SUGAHARA KAZUYUKI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：60154449

研究成果の概要(和文)：

ヘパラン硫酸(HS)とコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸(CS/DS)の機能分担やシグナル伝達の調節メカニズムの相違は不明である。本研究では、これまで不明であったCS/DSの構造と機能の解析に重点を置いて研究を遂行した。グリコサミノグリカン(GAG)を介した増殖因子などのタンパク質の機能発現とシグナル伝達には、単なる硫酸化二糖の配列だけではなく、コンフォメーションと静電ポテンシャルの分布も重要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：

The difference in the functions and regulatory mechanisms of heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate/dermatan sulfate (CS/DS) is still obscure. In the present study we analyzed molecular interactions between signaling molecules and the glycosaminoglycan (GAG) chains, especially CS/DS chains, to investigate the differences in the roles of HS and CS/DS in the signaling processes. Our results revealed that not only the sequences of disaccharide units but also the conformation of oligosaccharide domains and electrostatic distribution along the chains are important.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：グリコサミノグリカン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、神経突起、細胞増殖因子、計算科学、プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

GAG糖鎖の合成異常による遺伝病の存在などから、GAG糖鎖の生理的重要性が明瞭に

なっていた。GAG鎖の機能発現のメカニズムは、HS鎖に関してはかなり研究が進んでおり、いわゆるヘパリン結合性増殖因子、塩基

性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) の補助レセプターとしての機能調節作用の研究が盛んであった。

一方、我々は、多くのヘパリン結合性増殖因子が多硫酸化 CS とも高い親和性で結合することを発見し、その相互作用の生理的重要性を指摘していた。さらに、量子力学に基づく計算化学を駆使したコンピューターモデリングとシミュレーションによって、抗 CS 抗体に認識される複数の硫酸化八糖の三次元構造とその表面の静電ポテンシャルの分布を解析し、糖鎖と機能性タンパク質の相互作用を明瞭に視覚化する解析技術を開発していた。したがって本研究では、それまでに蓄積してきた糖鎖構造解析技術を用いて、従来は極めて困難であった、硫酸化 GAG の機能を担う複数の増殖因子に対する結合ドメインの精密かつシステムティックな解析を遂行することを目指していた。

2. 研究の目的

プロテオグリカンの GAG 側鎖である HS の生合成遺伝子のハエやマウスの変異株の形態形成異常の研究成果等から、HS が種々の細胞増殖因子、サイトカイン、形態形成因子のシグナル伝達に関与していることが次々に明らかにされ、細胞の増殖、分化、癌化、組織の形態形成、再生等の基本的な生命現象に不可欠の分子として、今や細胞生物学、発生生物学の舞台の中央に位置し、活発な研究対象となっている。

一方、我々は、HS 以外に、もう一群の GAG 多糖鎖である CS/DS も重要な生命情報を担うことを示してきた。興味深いことに、細胞増殖因子やサイトカインなどのシグナル分子は、HS だけでなく、CS/DS にも高い親和性で結合し、そのシグナル伝達機構の重要性を我々は証明してきた。しかし、両糖鎖の機能分担やシグナル伝達の調節メカニズムの

相違は不明である。本研究の目的は、シグナル分子と糖鎖との相互作用の解析から、シグナル伝達機構における両糖鎖の機能分担を解明することであった。具体的には、代表的な3種類の増殖因子であるプレイオトロフィン (PTN)、bFGF、肝細胞増殖因子 (HGF) をはじめとする様々なヘパリン結合性タンパク質と相互作用し、その機能を調節する糖鎖ドメインを HS と CS/DS について単離精製し、一次構造を解明するとともに、コンピューターモデリングも駆使して、三次元構造とその表面の静電ポテンシャルの分布を明らかにし、構造の異なる2種類のタイプの糖鎖が同一の機能性タンパク質に認識される分子メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

機能ドメインは多糖の一部のサブクラスに埋め込まれたオリゴ糖と予想され、その含量はわずかと予想されたので、生後6ヶ月齢のブタの小脳を用い、比較のために大脳も用いた。GAG 画分を抽出、陰イオン交換カラムで精製した。この画分を、PTN 固定化カラムを用いて、0.15M NaCl で素通りする画分と2M NaCl で溶出される結合画分に分離し、両方の画分について、CS/DS 鎖の二糖組成分析を行った。また、神経突起伸長促進活性を評価した。iB 二糖単位 [IdoA(2S)-GalNAc(4S)] 含有多糖鎖を最も選択的に結合、濃縮できる PTN アフィニティーカラムを用いて、大量に結合性糖鎖を調製した。この画分を、ヒアルロニダーゼまたはコンドロイチナーゼ AC-I による限定分解によってオリゴ糖に分解し、2-アミノベンズアミドで蛍光標識後、再び同じカラムにかけ、結合オリゴ糖を非結合性オリゴ糖から分離精製し、ゲルろ過により、最小オリゴ糖のサイズを決定した。その後、ゲルろ過で結合能をもつことが判明した最小サイズのオリゴ糖画分を別途大量に調製

し、その画分を2-アミノベンズアミドで蛍光標識後、再びアフィニティークラムで結合性オリゴ糖を非結合性オリゴ糖から分離精製し、陰イオン交換 HPLC で個々の糖鎖に分離精製した。各精製オリゴ糖をコンドロイチナーゼ AC-I、AC-II、B および ABC で分解した分解物を陰イオン交換 HPLC で分析し、標準オリゴ糖ライブラリーの溶出位置と比較して同定し、二糖の配列決定を行い、一次構造を決定した。得られた一次構造配列をもとにして、(株) STS の福島信弘博士、長屋州宣博士と共同でスーパーコンピューターを用いて、分子モデリングとシミュレーションを行い、三次元構造と静電ポテンシャルの分布を計算科学で求めた。コンドロイチン硫酸由来のオリゴ糖のモデリングは種々の二糖単位およびそれらから構築した四、六、八糖における糖残基間の二面角のデータを利用して行い、量子力学に基づく計算科学的手法で最適化して、最小エネルギー構造を求め、安定構造を決定した。

4. 研究成果

以前に我々は、ブタ胎児期の CS/DS 混成鎖が神経突起伸長促進活性を有することを見だし、さらにその活性発現のメカニズムとしては PTN や HGF を捕捉し神経細胞に提示することによると示していた。そして、PTN 結合ドメインから複数の異なる硫酸化八糖配列を単離していた。一方で、二糖組成の全く異なるサメ皮膚由来の CS/DS 混成鎖にも神経突起伸長促進活性を有することを見いだしたので、この混成鎖を酵素で断片化し、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、PTN 固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、五硫酸化六糖[Δ HexA-GalNAc(4-O-sulfate)-IdoA(2-O-sulfate)-GalNAc(4-O-sulfate)-IdoA(2-O-sulfate)-GalN

Ac(4-O-sulfate)]を単離し、その三次元構造と静電ポテンシャルの分布も決定した。また、既知のミッドカインの構造を用いて PTN の高次構造をシミュレーションで求め、糖鎖結合ドメインも決定した。これらの研究によって、GAG を介した増殖因子などのタンパク質の機能発現とシグナル伝達には、単なる硫酸化二糖の配列だけではなく、コンフォメーションと静電ポテンシャルの分布も重要であることが判明した。さらに、北海道産のエイの CS に D 二糖単位が含まれ、類似の組成をもつ既知のサメ軟骨由来 CS とは異なり、*in vitro* で HGF シグナル伝達系を介して、マウス胎児の海馬ニューロンの突起伸長を促進する活性を示すことも明らかにした。

その他にも、コンドロイチンを特異的に認識して加水分解する線虫の新規の酵素(コンドロイチン加水分解酵素の初めての報告)を同定した。また、ヒトの DS 4-O-硫酸基転移酵素の欠損症(DS が合成されず、代わりに CS が合成される初めての報告)を発見し、ヒトの GAG-コアタンパク質結合領域四糖(GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser)の合成を司るグルクロン酸転移酵素の新しい合成基質を用いたアッセイ法を作成し、その酵素の欠損症(骨、大動脈、心臓の発達異常を示し、硫酸化 GAG が心臓の発達に重要であることを示す初めての報告)も発見した。さらに、ヒドラのコンドロイチンプロテオグリカンの膜の形態形成における機能の初めての証明を行い、アフリカツメガエルの発生過程における CS と HS の構造の変化と各種増殖因子との結合能の変化を示し、発生過程におけるシグナル分子の発現に対応した糖鎖構造の変化が起きている可能性を指摘した。また、DS エピメラーゼ 2 のマウス脳における特異的発現の証明(脳の発達への DS の関与を示唆する発

見)を行うなど、大きな成果を挙げた。これらの生物学的に興味深い様々な現象の背景にある GAG のシグナリングの分子メカニズムの解明が今後の課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Yamada, S., Sugahara, K., and Özbek, S. (2011) Evolution of Glycosaminoglycans: Comparative Biochemical Study. **Commun. Integr. Biol.**, in press. (査読有)
2. Baasanjav, S., Al-Gazali, L., Hashiguchi, T., Mizumoto, S., Fischer, B., Horn, D., Seelow, D., Ali, B. R., Aziz, S. A. A., Langer, R., Saleh, A. A. H., Becker, C., Nürnberg, G., Cantagrel, V., Gleeson, J. G., Gomez, D., Michel, J.-B., Stricker, S., Lindner, T. H., Nürnberg, P., Sugahara, K., Mundlos, S., Hoffmann, K. (2011) Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects. **Am. J. Hum. Genet.**, in press. (査読有)
3. Hashiguchi, Y., Kobayashi, T., Fongmoon, D., Shetty, A. K., Mizumoto, S., Miyamoto, N., Nakamura, T., Yamada, S., and Sugahara, K. (2011) Demonstration of the Hepatocyte Growth Factor Signaling Pathway in the *in vitro* Neuritogenic Activity of Chondroitin Sulfate from Ray Fish Cartilage. **Biochim. Biophys. Acta**, 1810 (4), 406-413. (査読有)
4. Akatsu, C., Mizumoto, S., Kaneiwa, T., Maccarana, M., Malmström, A., Yamada, S., and Sugahara, K. (2011) Dermatan sulfate epimerase 2 is the predominant isozyme in the formation of the chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid structure in postnatal developing mouse brain. **Glycobiology**, 21 (5) 565-574. (査読有)
5. Hashiguchi, T., Mizumoto, S., Yamada, S., and Sugahara, K. (2010) Analysis of the

structure and neuritogenic activity of chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from porcine fetal membranes.

Glycoconjugate J., 27 (1), 49-60. (査読有)

6. *Miyake, N., *Kosho, T., *Mizumoto, S., Furuichi, T., Hatamochi, A., Nagashima, Y., Arai, E., Takahashi, K., Kawamura, R., Wakui, K., Takahashi, J., Kato, H., Yasui, H., Ishida, T., Ohashi, H., Nishimura, G., Shiina, M., Saitou, H., Tsurusaki, Y., Doi, H., Fukushima, Y., Ikegawa, S., Yamada, S., Sugahara, K., and Matsumoto, N. (2010) (*Equal contribution) Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. **Hum. Mutat.**, 31 (8), 966-974. (査読有)
7. Adamczyk, P., Zenkert, C., Balasubramanian, P. G., Yamada, S., Murakoshi, S., Sugahara, K., Hwang, J. S., Gojobori, T., Holstein, T. W., and Özbek, S. (2010) A non-sulfated chondroitin stabilizes membrane tubulation in cnidarian organelles. **J. Biol. Chem.**, 285 (33), 25613-25623. (査読有)
8. Li, F., Nandini, C. D., Hattori, T., Bao, X., Murayama, D., Nakamura, T., Fukushima, N., and Sugahara, K. (2010) Structure of pleiotrophin- and hepatocyte growth factor-binding sulfated hexasaccharide determined by biochemical and computational approaches. **J. Biol. Chem.**, 285 (36), 27673-27685. (査読有)
9. Tamura, J., Nakamura-Yamamoto, T., Nishimura, Y., Mizumoto, S., Takahashi, J., and Sugahara, K. (2010) Synthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage tetraosyl peptide moieties of betaglycan, which serve as a hexosamine acceptor for enzymatic glycosyl transfer. **Carbohydr. Res.**, 345 (15), 2115-2123. (査読有)

10. *Mizumoto, S., *Mikami, T., Yasunaga, D., Kobayashi, N., Yamauchi, H., Miyake, A., Itoh, N., Kitagawa, H., and Sugahara, K. (2009) (*Equal contribution) Chondroitin 4-*O*-sulfotransferase-1 is required for somitic muscle development and motor axon guidance in zebrafish **Biochem. J.**, 419 (2), 387-399. (査読有)
11. Yamada, S., Onishi, M., Fujinawa, R., Tadokoro, Y., Okabayashi, K., Asashima, M., and Sugahara, K. (2009) Structural and Functional Changes of Sulfated Glycosaminoglycans in *Xenopus laevis* during Embryogenesis **Glycobiology**, 19 (5), 488-498. (査読有)
12. Takahashi, I., Noguchi, N., Nata, K., Yamada, S., Kaneiwa, T., Mizumoto, S., Ikeda, T., Sugihara, K., Asano, M., Yoshikawa, T., Yamauchi, A., Shervani, N. J., Uruno, A., Kato, I., Unno, M., Sugahara, K., Takasawa, S., Okamoto, H., Sugawara, A. (2009) Important role of heparan sulfate in postnatal islet growth and insulin secretion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 383 (1), 113-118. (査読有)
13. Yamada, S., Mizumoto, S., and Sugahara, K. (2009) Chondroitin Hydrolase in *Caenorhabditis elegans*. **Trends Glycosci. Glycotechnol.**, 21 (119), 149-162. (査読有)
14. Basappa, Murugan, S., Sugahara, K. N., Lee, C. M., ten Dam, G. B., van Kuppevelt, T. H., Miyasaka, M., Yamada, S., and Sugahara, K. (2009) Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells. **Glycobiology**, 19 (7), 735-742. (査読有)
15. *Shetty, A. K., *Kobayashi, T., Mizumoto, S., Narumi, M., Kudo, Y., Yamada, S., and Sugahara, K. (2009) (*Equal contribution) Isolation and characterization of a novel chondroitin sulfate from squid liver integument rich in *N*-acetylgalactosamine(4,6-*O*-disulfate) and glucuronate(3-*O*-sulfate) residues. **Carbohydr. Res.**, 344 (12), 1526-1532. (査読有)
- [学会発表] (計 73 件)
- 9th International Symposium on Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules (2011.1.28 Trivandrum, Kerala, India) Kazuyuki Sugahara 「Chondroitin sulfate E type structure at tumor cell surface is involved in the experimental metastasis of mouse tumor cell lines」
 - Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG) (2010.10.27 Taipei) Kazuyuki Sugahara, Fuchuan Li, Sengottuvelan Murugan, Basappa, Taishi Hashiguchi, Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada, Kayoko Oguri, Minoru Okayama, Kazuki N. Sugahara, Chun Man Lee, Masayuki Miyasaka, Gerdy B. ten Dam, Toin H. van Kuppevelt 「The E-type structure of chondroitin sulfate on tumor cell surfaces is involved in lung and liver metastases.」
 - The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010) (2010.8.2 Chiba) K. Sugahara, F. Li, C. D. Nandini, T. Hattori, X. Bao, D. Murayama, T. Nakamura, N. Fukushima 「Glycobiology meets Computer Science: Structure of Pleiotrophin- and Hepatocyte Growth Factor-binding Sulfated Hexasaccharide Determined by Biochemical and Computational Approaches.」
 - 6th international Conference on Proteoglycan (2009.9.14-16 Aix-les-Bains, France) Kazuyuki Sugahara, Shuhei Yamada, Sengottuvelan Murugan, Fuchuan Li, Basappa, Taishi Hashiguchi, Shuji Mizumoto, Kayoko

Oguri, Minoru Okayama, Kazuki N. Sugahara, Chun Man Lee, Masayuki Miyasaka, Gerdy B. ten Dam, Toin H. van Kuppevelt 「Cell surface chondroitin sulfate E type structure of mouse tumor cell lines is involved in the experimental metastasis to the lung and liver.」

5. 日本薬学会北海道支部第130回例会

2008. 5. 10 札幌コンベンションセンター(札幌) 菅原 一幸 「動物界に必須の多糖鎖グリコサミノグリカン」

〔図書〕(計2件)

1. Sugahara, K., and Yamada, S. (2008) Microsequencing of functional chondroitin sulfate oligosaccharides In **Experimental Glycoscience "Glycochemistry"** (Taniguchi N., Suzuki A., Ito Y., Narimatsu H., Kawasaki T., Hase S., eds), pp. 64-69, Springer, Tokyo.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称: 硫酸化多糖または硫酸化オリゴ糖の分析方法、硫酸化多糖または硫酸化オリゴ糖を含む薬学的組成物および医薬、薬学的組成物および医薬の製造方法、疾患の治療、診断、症状の軽減および予防方法

発明者: 菅原一幸

権利者: JST

種類: 特許

番号: 特願 2010-244708

出願年月日: 2010年10月29日

国内外の別: 国内

名称: グリコサミノグリカン分解促進剤

発明者: 菅原一幸、山田修平、水本秀二、金岩知之

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-238490

出願年月日: 2009年10月15日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

名称: 硫酸化多糖または硫酸化オリゴ糖の分析方法、硫酸化多糖または硫酸化オリゴ糖を含む薬学的組成物および医薬、薬学的組成物および医薬の製造方法

発明者: 菅原一幸

権利者: JST

種類: 特許

番号: 特許第 4662385 号

取得年月日: 2011年1月14日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

1. Tomoyuki Kaneiwa, Shuji Mizumoto, Kazuyuki Sugahara, Shuhei Yamada
<http://www.ishas.org/index.php?/2010-Conference/Manuscripts-and-Posters.html> Manuscripts from the 8th International Conference on Hyaluronan "Demonstration of chondroitin sulfate-specific hydrolytic activity in human hyaluronidase-4"

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 一幸 (SUGAHARA KAZUYUKI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号: 60154449

(2) 研究分担者

山田 修平 (YAMADA SHUHEI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授

研究者番号: 70240017

(3) 連携研究者

水本 秀二 (MIZUMOTO SHUJI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・学術研究員

研究者番号: 40443973