

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570157

研究課題名(和文)多機能性プロテオグリカン分子創出のための糖鎖工学基盤技術の開発

研究課題名(英文)Development of basic glycotecnology for construction of multifunctional proteoglycan molecules.

研究代表者

柿崎 育子(Ikuko, Kakizaki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80302024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：プロテオグリカンの糖鎖組み換え技術への応用を目指し、ヒアルロニダーゼ(ウシ精巢由来)とセルラーゼ(A. nigar由来)の加水分解反応と糖転移反応について検討した。プロテオグリカンの他、プロテオグリカンの糖鎖とコアペプチドとの橋渡し構造をもつオリゴ糖や脱硫酸化糖鎖を調製し、市販の糖鎖とともに反応基質として用いた。ヒアルロニダーゼで低分子化されるが、糖転移反応のドナー基質としては働かない可能性のある糖鎖構造が新たに示唆された。プロテオグリカンの糖鎖に対するセルラーゼの加水分解反応の至適条件を明らかにしたが、糖転移反応を検出することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Hydrolysis and transglycosylation reactions of hyaluronidase (from bovine testes) and cellulase (from A. nigar) were investigated with the aim of applying them in glycotecnology for proteoglycans. As reaction substrates, commercially available sugar chains in addition to proteoglycans, as well as oligosaccharides having linkage structures between a core peptide and a sugar chain of proteoglycan, and de-sulfated sugar chains that we prepared, were used. We found a sugar chain structure that was degraded by hyaluronidase but possibly did not act as a donor substrate for the transglycosylation reaction. The optimal condition for proteoglycan hydrolysis by cellulase was determined, however, transglycosylation reaction could not be detected.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 機能生物化学

キーワード：糖鎖 糖鎖工学

1. 研究開始当初の背景

(1)プロテオグリカンは、コアとなるタンパク質にグリコサミノグリカンと呼ばれる糖鎖が結合した動物の複合糖質の総称であり、細胞の形態形成のみならず、様々な細胞機能に参与している。結合するグリコサミノグリカンは、プロテオグリカンの種類によって構造が異なり、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸などがある。ヒアルロン酸はコアタンパク質に結合していないが、グリコサミノグリカンの一種である。グリコサミノグリカンの構造に基づくプロテオグリカンの機能に関する研究は発展途上である。

(2)申請者らのグループが開発したグリコシダーゼを用いる糖鎖工学技術によって、コンドロイチン硫酸系プロテオグリカンの糖鎖組み換えは、オリゴ糖レベルでも、コアタンパク質はそのままの状態でのプロテオグリカンレベルでも実施可能となった。しかし、ヘパラン硫酸系プロテオグリカンの糖鎖組み換えにはまだ成功していない。

(3)グリコシダーゼが、本来は作用しないと考えられてきた糖鎖構造に作用することが見出された例がある。この中で、本来は、セルロースを分解するセルラーゼ (*A. niger*) が、本来の基質とは全く構造が異なるプロテオグリカンの糖鎖結合部位に作用し、無傷のグリコサミノグリカンを結合部位の根元から遊離することを申請者らのグループで見出している。このことは、プロテオグリカンの構造に対してこれまでに試されていなかったグリコシダーゼが、プロテオグリカンの糖鎖に作用し、糖鎖工学に利用できる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

上記背景のもと、プロテオグリカンのコアタンパク質はそのままに糖鎖を自由自在に組み換えることができれば、プロテオグリカンの糖鎖構造に基づく生体内での機能を見出すための研究に応用できることが期待される。また、糖鎖を改変した天然には存在しないプロテオグリカンを作り、その薬理作用を調べるといった利用法も期待される。そのための糖鎖工学技術に関する基礎的な研究が必要である。つまり、グリコシダーゼの基質特異性を改めて検討する必要があると考える。

本研究では、多機能性プロテオグリカン分子の創出を目指し、グリコシダーゼを用いた糖鎖組み換えの基盤技術を開発することを目標とした。具体的には、(1)プロテオグリカンの糖鎖に作用するグリコシダーゼの基質特異性の解析、(2)目的の糖鎖構造構築のために適切なグリコシダーゼを組み合わせる反応の設計、(3)糖鎖組み換えプロテオグリカンの調製と機能解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)主な反応基質の調製

プロテオグリカンの糖鎖とコアペプチドとの橋渡し構造をもつオリゴ糖：培養細胞に蛍光標識糖鎖プライマーを添加して培養し、橋渡し構造をもつ蛍光グリコサミノグリカンオリゴ糖を作らせた。これをイオン交換カラムクロマトグラフィーにて精製した。一部については、ヒアルロニダーゼ(ウシ精巢由来)で糖鎖部分を徹底消化し、橋渡し六糖構造のみを残した蛍光オリゴ糖を調製した。

脱硫酸化糖鎖：コンドロイチン硫酸またはヘパリンの脱硫酸化物は、既報の化学処理により調製し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにて精製した。

アグリカンはサケ鼻軟骨より既報の方法により精製した。ペプチドグリカンは、アグリカンをプロテアーゼで消化した後、イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製して得た。その他の基質としての各種グリコサミノグリカンやペプチドは購入したものをを用いた。

ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸のオリゴ糖はヒアルロニダーゼ(ウシ精巢由来)による消化の後、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにて精製した。用途に応じて蛍光標識した。

糖鎖組み換えプロテオグリカンおよび糖鎖組み換えオリゴ糖は、ヒアルロニダーゼ(ウシ精巢由来)を固定化した樹脂を用いて、加水分解反応に続く糖転移反応により調製した。

(2) 酵素反応(グリコシダーゼの反応)

ヒアルロニダーゼ(ウシ精巢由来)の加水分解反応：天然のグリコサミノグリカン、化学的脱硫酸化したグリコサミノグリカン、またはプロテオグリカンを基質とし、150 mM NaCl 存在下、37 °C、pH 4.0 で行った。ヒアルロニダーゼの反応は、液中または酵素を固定化した樹脂を用いた反応系で行った。

ヒアルロニダーゼ(ウシ精巢由来)の糖転移反応：アクセプター基質(蛍光オリゴ糖や糖鎖欠損プロテオグリカン)とドナー基質(長鎖のグリコサミノグリカン)の存在下、基質の量比と酵素量、温度、pH、反応時間、などの条件を様々に変化させて反応を行った。

セルラーゼ(*A. niger* 由来)のエンド- α -キシロシダーゼ活性(加水分解反応)：プロテオグリカンの糖鎖とコアペプチドとの橋渡し構造をもつ蛍光標識コンドロイチン硫酸を基質として、基質量と酵素量、温度、pH、反応時間、などの条件を変化させて反応を行った。

セルラーゼ(*A. niger* 由来)のエンド- α -キシロシダーゼ活性の逆反応(糖転移反応)の評価：蛍光標識ペプチドまたは蛍光標識橋渡し六糖をアクセプター基質とし、ペプチドグリカンをドナー基質として用い、基質量と

酵素量、温度、pH、反応時間、などの条件を系統的に様々に変化させて反応を行った。

(3) 反応生成物の分析

グリコシダーゼ反応の生成物は、各種のカラム（順相、逆相、イオン交換、ゲルろ過、ハイブリッドタイプ等）を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析した。HPLCで分取したピークに含まれる生成物の構造は、糖鎖構造に特異的な酵素消化を組み合わせた HPLC 分析、LC/MS 分析により総合的に判断した。

4. 研究成果

(1) プロテオグリカンの糖鎖に作用するグリコシダーゼの基質特異性の解析

予定していたグリコシダーゼが入手できなくなったため、ヒアルロニダーゼ（ウシ精巣由来）とセルラーゼ（*A. niger* 由来）に絞って検討した。

ヒアルロニダーゼ（ウシ精巣由来）の加水分解反応：結合様式上、これまでこの酵素が作用しないと報告されていた糖鎖を基質とした場合にも基質の低分子化が HPLC 分析により観察された。研究用試薬として購入した基質糖鎖中の不純物としての別の糖鎖が分解されるのではと疑い、基質の組成分析を行ったが、別の糖鎖のコンタミネーションは検出されなかった。従って、この構造の糖鎖がヒアルロニダーゼの糖転移反応のドナー基質となる可能性が示唆された。

ヒアルロニダーゼ（ウシ精巣由来）の糖転移反応：ヒアルロニダーゼに感受性であると示された構造の糖鎖をドナー基質として、アクセプター基質として用いた蛍光標識オリゴ糖への糖転移を調べた。その結果、反応液の HPLC 分析において、反応後に新たなピークが出現し、時間の経過とともにそのピーク面積が増大した。このピークを集めて、そのままあるいは、予想される構造に特異的な酵素による消化の前後の HPLC 分析や質量分析により構造分析を行ったが、期待した生成物であると同定することはできなかった。従って、ヒアルロニダーゼによる組み換え可能な糖鎖構造の範囲を広げることができなかった。

セルラーゼ（*A. niger*）のエンド- α -キシロシダーゼ活性（加水分解反応）：この酵素は、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸のいずれの糖鎖をもつコアペプチドに対しても糖鎖結合部位に作用して、エンド- α -キシロシダーゼ活性により、長い糖鎖をコアペプチドから無傷で切り出す。この反応の至適条件をはじめて明らかにした。従って、コアペプチドからの糖鎖の切り出しをこれまでよりも効率良く行うことができるようになった。

セルラーゼ（*A. niger*）のエンド- α -キシ

ロシダーゼ活性の逆反応（糖転移反応）の評価：の加水分解反応の逆反応である糖転移反応の活性をこの酵素に検出できれば、ドナー基質であるペプチドグリカン由来の長い糖鎖を一気にコアペプチドに導入できる可能性がある。しかも、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸の別を問わずに導入できることが期待される。そこで、糖転移活性を調べた。アクセプター基質として、構造の異なる蛍光ペプチド2種と蛍光橋渡し六糖構造の計3種を用い、各基質に対し、1000条件に近い条件をふって系統的に反応を行い、各種原理のカラムを用いて、HPLCの様々な分離条件で糖転移反応生成物を見つけようとしたが、検出することはできなかった。

(2) 目的の糖鎖構造構築のために適切なグリコシダーゼを組み合わせる反応の設計

今回、糖鎖関連試薬メーカーの試薬部門の終了に伴い、計画していたグリコシダーゼの入手ができなくなったため、複数のグリコシダーゼを組み合わせる反応の設計を目指した実験は行わなかった。しかし、最近少しづつではあるが、別のメーカーでグリコシダーゼを取り扱い始めているので、研究期間終了後も、実験材料がそろったときには、グリコシダーゼの基質特異性は、検討すべき課題と考える。本研究で調製した各種の糖鎖構造の基質が使用できる。

(3) 糖鎖組み換えプロテオグリカンの調製と機能解析

糖鎖組み換えプロテオグリカンとして、アグリカン、ウリナスタチンを対象とし、もともとコアペプチドに結合しているコンドロイチン硫酸鎖をヒアルロン酸鎖に組み換えたプロテオグリカンを作製した。これらは天然には存在しない。これらのプロテオグリカンについて、天然型、糖鎖欠損型、ヒアルロン酸ハイブリッド型のそれぞれを分離するクロマトグラフィーの条件を決定した。糖鎖組み換えプロテオグリカンの機能解析は進行中であり、今後の課題である。

(4) その他

本研究課題の主とした目的とは離れるが、培養細胞で作らせたプロテオグリカンの糖鎖とコアペプチドとの橋渡し糖鎖構造をもつオリゴ糖の中に、これまでに報告のない構造が含まれることが示唆された。このオリゴ糖を大量に精製し、詳細な構造を調べることにより、組み換えの検討範囲が広がる糖鎖工学の素材となる可能性がある。

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11件)

- (1) Suto, S., Kakizaki, I., Nakamura, T., and Endo, M.: One set system for the synthesis and purification of glycosaminoglycan oligosaccharides reconstructed using a hyaluronidase-immobilized column. *Biopolymers*. **101(3)**, 189-96 (2014). doi: 10.1002/bip.22300. 査読有
- (2) Kakizaki, I., Suto, S., Tatara, Y., and Endo, M.: Custom synthesis of hyaluronan/chondroitin sulfate hybrid oligosaccharides: for future medical applications, in *The 13th Meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science "Innovation in Transplant and Regenerative Medicine"*, edited by Oyama, C., *et al. Hirosaki Med. J.*, **64 (Suppl.)**, pp. S53-S57 (2013). URL: <http://repository.ul.hirosaki-u.ac.jp/dspace/handle/10129/4866>
または URL:
http://repository.ul.hirosaki-u.ac.jp/dspace/bitstream/10129/4866/1/HirosakiMedJ_64_S53.pdf. 査読無
- (3) Kakizaki, I., Suto, S., Tatara, Y., Nakamura, T., and Endo, M.: Hyaluronan-chondroitin hybrid oligosaccharides as new life science research tools. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423 (2)**, 344-349 (2012). doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.127. 査読有
- (4) Asano, K., Kakizaki, I., and Nakane, A.: Interaction of *Listeria monocytogenes* autolysin amidase with glycosaminoglycans promotes listerial adhesion to mouse hepatocytes. *Biochimie*, **94 (6)**, 1291-1299 (2012). doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.026. 査読有
- (5) Fukuyama, A., Tanaka, K., Kakizaki, I., Kasai, K., Chiba, M., Nakamura, T., and Mizunuma, H.: Anti-inflammatory effect of proteoglycan and progesterone on human uterine cervical fibroblasts., *Life Sci.* **90(13-14)**, 484-488 (2012). doi: 10.1016/j.lfs.2011.12.024. 査読有
- (6) Endo, M., and Kakizaki, I.: Synthesis of neoproteoglycans using the transglycosylation reaction as a reverse reaction of endo-glycosidases. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **88(7)** 327-344 (2012). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3422686/>. Review, 査読有
- [学会発表](計12件)
- (1) 石岡陽菜, 柿崎育子, 多田羅洋太, 須藤晋一郎, 遠藤正彦, 第86回日本生化学会大会「酵素を用いたグリコサミノグリカン糖鎖の構造解析」(2013年9月11日, 横浜市)
- (2) Kakizaki, I., Takahashi, R., Yanagisawa, M., Yoshida, T., and Takagaki, K.: Enzymatic synthesis of urinary trypsin inhibitor having an O-linked hyaluronan chain, 9th International Conference on Hyaluronan (Hyaluronan 2013) (June 2-7, 2013, Oklahoma city, OK, USA)
- (3) 須藤晋一郎, 柿崎育子, 多田羅洋太, 中村敏也, 遠藤正彦, 第85回日本生化学会大会, ヒアルロニダーゼ固定化酵素を利用した人工オリゴ糖の合成と精製システム, (2012年12月15日, 福岡市)
- (4) 柿崎育子 日本応用糖質科学会平成23年度大会(第60回)大会特別シンポジウム【応用糖質科学研究の新時代を拓く】「機能解析モデルとしての糖鎖改変プロテオグリカン」(2011年9月29日, 札幌市)
- (5) 柿崎育子, 峯田貴, 佐々木愛, 多田羅洋太, 牧野英司, 遠藤正彦, 第84回日本生化学会大会, サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの糖鎖分析(2011年9月23日, 京都市)
- (6) 須藤晋一郎, 柿崎育子, 多田羅洋太, 中村敏也, 遠藤正彦第84回日本生化学会大会人工ハイブリッドヒアルロナンとヒアルロナン結合タンパク質の結合(2011年9月23日, 京都市)
- [図書](計1件)
- (1) 加藤陽治, 柿崎育子: サケ鼻軟骨由来のプロテオグリカン『マリンバイオテクノロジーの新潮流』シーエムシー出版刊, pp. 129-140 (2011)
ISBN: 978-4-7813-0453-3
- [産業財産権]
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~bioche>
1/

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

なし

(3)連携研究者

なし